

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.04.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 04-0001-05

基础研究 · 论著

TAK-242 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导大鼠海马神经元损伤的作用及其机制研究

葛宇松, 马成永, 徐晏雯, 林永忠

(大连医科大学附属第二医院 神经内科, 辽宁 大连 116023)

摘要: 目的 探讨 TAK-242 对 β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅ ($A\beta_{25-35}$) 诱导的大鼠海马神经元损伤的作用及其相关机制。**方法** 用 $A\beta_{25-35}$ 注射大鼠双侧海马复制阿尔兹海默病的动物模型, TAK-242 腹腔注射进行治疗, Nissl 染色观察大鼠海马 CA3 区神经元的形态和数量, Western blot 检测大鼠海马 Toll 样受体 4 (TLR4) 和髓样分化因子 88 (MyD88) 蛋白的表达, 酶联免疫吸附法检测大鼠海马白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达水平。**结果** 大鼠海马注射 $A\beta_{25-35}$ 后引起大鼠海马 CA3 区神经元破坏和数量减少, 而 TAK-242 可以抵抗 $A\beta_{25-35}$ 所造成的神经毒性并保护海马神经元, 同时 TAK-242 可降低 $A\beta_{25-35}$ 所引起的海马组织内 TLR4、MyD88、IL-1 β 和 TNF- α 表达升高。**结论** TAK-242 可以通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路, 降低炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平, 从而保护大鼠海马神经元抵抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经毒性。

关键词: 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白; TAK-242; Toll 样受体 4; 髓样分化因子 88

中图分类号: R749.16

文献标识码: A

Effect of TAK-242 on β -amyloid peptide-induced neurotoxicity in hippocampi of rats and its mechanism

Yu-song Ge, Cheng-yong Ma, Yan-wen Xu, Yong-zhong Lin

(Department of Neurology, the Second Hospital of Dalian Medical University,
Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: Objective To explore the effect of TAK-242 on β -amyloid peptide₂₅₋₃₅ ($A\beta_{25-35}$)-induced neural injury in rat hippocampi and the potential mechanism. **Methods** $A\beta_{25-35}$ was injected into bilateral hippocampi of rats to build up Alzheimer's disease (AD) mode, then TAK-242 was injected to rat intraperitoneally. The morphological features and the amount of neurons in the CA3 area of hippocampi were observed after Nissl staining. The expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 88 (MyD88) proteins were detected by Western blot. The levels of IL-1 β and TNF- α were tested by ELISA. **Results** Injection of $A\beta_{25-35}$ into hippocampi caused neuronal damage and loss in the CA3 area, however, TAK-242 could protect neurons in hippocampi against $A\beta_{25-35}$ -induced injury. Meanwhile, TAK-242 could reduce $A\beta_{25-35}$ -induced increase of TLR4, MyD88, IL-1 β and TNF- α proteins. **Conclusions** TAK-242 could inhibit $A\beta_{25-35}$ -induced toxic role on neurons in the CA3 area of hippocampi through down-regulation of the TLR4/MyD88 signaling pathway and reduction of inflammatory factors IL-1 β and TNF- α .

Keywords: Alzheimer's disease; amyloid beta-protein; TAK-242; Toll-like receptor 4; myeloid differentiation factor 88

社会老龄化日益严重,老年期痴呆的患者逐渐增多,其中阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的痴呆类型。流行病学调查结果显示,我国年龄 ≥ 65 岁老年人中 AD 的患病率为 3%~8%,并且随着年龄的增长,患病率将逐渐上升^[1]。AD 主要表现为隐匿起病,不可逆进行性加重的认知功能损伤包括记忆、视空间能力、语言表达能力等领域障碍,以及常伴随的非认知性神经精神症状,其特征性病理学改变是神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)、大量老年斑(senile plaque, SP)形成及神经元缺失^[2-3],其中 SP 核心及主要成分为 β -淀粉样蛋白(β -amyloid peptide, A β)。

近几年中枢神经系统的炎症反应与 AD 发病机制的紧密联系及相互作用日益受到关注。研究显示,在 AD 的炎症反应过程中,A β 可诱导神经细胞表达和释放多种与炎症相关的活性物质,包括白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)等,加剧神经细胞的退行性变,而抑制炎症反应可以有效缓解 A β 诱导的神经损伤^[2,4-5]。Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)信号通路是目前已知的重要的炎性通路之一,近来研究也证实 TLRs 信号通路参与 AD 的演变过程,且 TLR4 在 A β 介导的神经毒性作用中具有重要作用^[6-7],而抑制 TLR4 信号通路可以缓解 A β 介导的炎症反应^[8-9]。TAK-242 是 TLR4 的特异性抑制剂,在脑缺血、脑出血及创伤性脑损伤中都起到神经保护作用^[10-12],然而其是否可以抵抗 A β 诱导的神经细胞损伤仍然未知。

本实验通过双侧海马注射聚集态的 A β_{25-35} 复制 AD 模型,腹腔注射 TAK-242 进行干预,观察 TAK-242 的治疗是否可以促进海马神经细胞的存活,以及对大鼠海马组织中 TLR4 信号通路蛋白及炎症因子表达的影响,从而了解 TAK-242 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 Wister 大鼠共 30 只,雌雄不限,体重 200~250 g,由中国医科大学动物部提供。所有动物按照自然昼夜,自由进食进水,20~25℃、标准大鼠饲料常规饲养。A β_{25-35} (用无菌生理盐水将 A β_{25-35} 稀释成 5 μ g/ μ l,37℃下孵育 2 d,使其变为聚

集态的 A β_{25-35})、二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)购自美国 Sigma 公司, TAK-242(TAK-242 溶于 1% DMSO 生理盐水溶液,终浓度为 0.4 mg/ml)购自美国 MCE 公司, TLR4 多克隆抗体购自武汉三鹰公司,髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)多克隆抗体购自武汉博士德公司, β -肌动蛋白和辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, IL-1 β 和 TNF- α 酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型的复制 Wister 大鼠随机分为对照组(双侧海马分别注入生理盐水+腹腔注射 1% DMSO 生理盐水)、模型组(双侧海马分别注入 A β +腹腔注射 1% DMSO 生理盐水)和药物组(双侧海马分别注入 A β +腹腔注射 TAK-242/1% DMSO 生理盐水),每组 10 只。将 Wister 大鼠用 10% 水合氯醛(300 mg/kg)腹腔麻醉后,颅顶正中切开皮肤,暴露头骨,俯卧位固定于脑立体定向仪上,双侧颅骨分别钻孔,深达硬脑膜。定位:前囟后 3.5 mm,中缝左右 2.0 mm,颅骨平面向下 2.7 mm,即为海马注射点。模型组和药物组每侧海马注射 2 μ l(10 μ g) A β_{25-35} ,并留针 5 min,对照组注射相应剂量生理盐水。TAK-242 按 5 mg/(kg·d)一次性给予大鼠腹腔注射,从海马注射前 1 天开始至海马注射后 7 d 结束,对照组和模型组按同样时间注射相应剂量的 1% DMSO 生理盐水。各组大鼠均于海马注射后 7 d 处死。

1.2.2 标本采集 ①各组 5 只大鼠麻醉后迅速开胸,生理盐水灌注心脏后以 4% 多聚甲醛液灌注至动物四肢变硬,断头取脑,样本置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,以注射针道为中心做冠状切脑,酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋。连续冠状切片,片厚 6 μ m。相邻切片分别作 Nissl 染色。②各组 5 只大鼠麻醉后,断头取脑,冰上分离双侧海马组织,-70℃冰箱保存。左侧进行 Western blot 检测;右侧进行 ELISA 检测。

1.2.3 NISSL 染色 取各组大鼠切面相同的切片,石蜡切片常规脱蜡至水,染色于硫堇-石碳酸 30 min,37℃温箱加热。梯度酒精粉色脱水后,二甲苯透明,中性树胶封片。对 Nissl 染色的结果进行海马锥体神经元计数,即在低倍镜下($\times 40$)确定海马 CA3 区位置,然后在高倍镜下($\times 400$)连续数 2 个视野的海

马锥体神经元数目,取其均值,每只动物数3张切片,取其均值,为该只大鼠海马CA3区锥体神经元数。

1.2.4 Western blot 检测 取保存的冷冻组织,低温提取蛋白,Lowry法测定蛋白浓度。取50 μ g蛋白上样到10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,电泳(120V,1.5h)。待溴酚蓝进入凝胶底部后,把蛋白质再印迹到硝酸纤维素膜上,封闭,将膜与溶于封闭液中一抗(兔抗TLR4抗体1:500、兔抗MyD88抗体1:300和小鼠抗 β -actin抗体1:300)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗涤,最后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10000)室温孵育1h,洗涤后用ECL发光液曝光显影,将蛋白印迹显影图扫描,利用图像分析软件Scion Image对蛋白带进行光密度分析。以 β -actin作为内对照,以对照组目的条带与 β -actin灰度值比值为1,计算各组目的蛋白相对表达量。作为TLR4和MyD88蛋白的半定量指标。

1.2.5 ELISA 取保存的冷冻组织,用0.01mmol/L PBS(pH=7.2~7.4),匀浆后4 $^{\circ}$ C离心,取上清,用ELISA检测IL-1 β 和TNF- α 水平,操作按试剂盒说明进行。所有实验均重复3次,取平均值进行比较。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 20.0统计软件,计量资料以

均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,两两比较用Tukey's检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TAK-242对A β_{25-35} 诱导大鼠海马CA3区神经元损伤的影响

3组大鼠海马CA3区神经元比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=21.618$, $P=0.000$)。对照组大鼠海马CA3区细胞带无明显受损,神经细胞密集,排列完整。模型组大鼠海马CA3区较对照组神经细胞排列紊乱,细胞带结构丧失,细胞减少明显,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);药物组大鼠较模型组上述表现明显改善,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1、2。

2.2 TAK-242对A β_{25-35} 诱导大鼠海马TLR4和MyD88表达的影响

3组大鼠TLR4和MyD88蛋白表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=53.006$ 和 26.129 ,均 $P=0.000$)。对照组TLR4和MyD88蛋白表达量较低。与对照组相比,模型组TLR4和MyD88蛋白表达升高($P<0.05$),药物组上述指标表达亦高于对照组

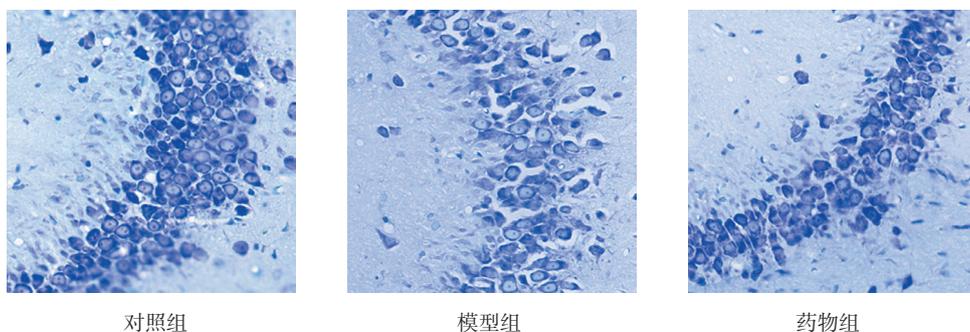
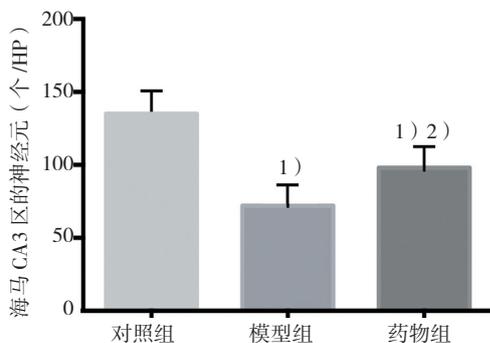


图1 各组大鼠海马CA3区的神经元 (Nissl染色 $\times 400$)



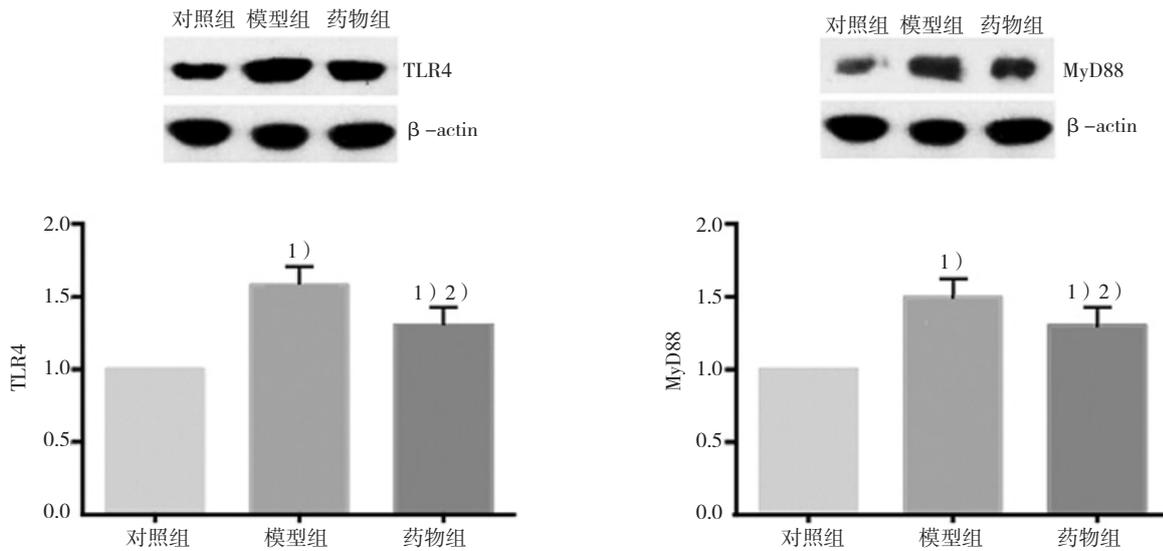
1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$

图2 各组大鼠海马CA3区的神经元比较

($P<0.05$)。与模型组相比,药物组TLR4和MyD88表达降低($P<0.05$)。见图3。

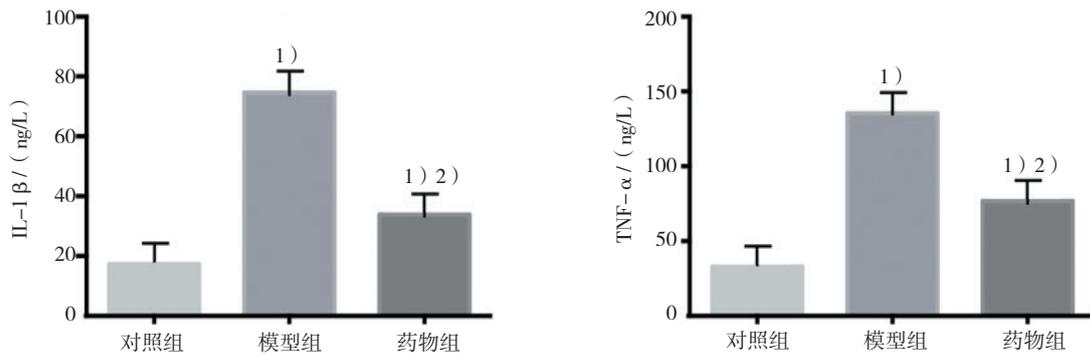
2.3 TAK-242对A β_{25-35} 诱导大鼠海马IL-1 β 和TNF- α 表达的影响

3组大鼠IL-1 β 和TNF- α 的表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=51.539$ 和 69.299 ,均 $P=0.000$)。对照组IL-1 β 和TNF- α 的含量较低,与对照组相比,模型组IL-1 β 和TNF- α 表达量升高($P<0.05$);与模型组相比,药物组IL-1 β 和TNF- α 表达量降低($P<0.05$)。见图4。



1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

图 3 各组海马 TLR4 和 MyD88 蛋白的表达



1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

图 4 各组海马 IL-1 β 和 TNF- α 的表达

3 讨论

AD 是中枢神经系统原发性退行性疾病, 其主要病理特征之一是在大脑皮层和海马出现大量的老年斑, 其主要成分是 A β 。在体和离体实验均发现 A β 可以诱导神经元凋亡, 氧化应激以及炎症反应等, 而炎症反应越来越受到关注。在 AD 脑内, A β ₁₋₄₀/A β ₁₋₄₂ 形成了 β 折叠的核心片段, 发挥毒性作用。而研究证实, A β ₂₅₋₃₅ 可以产生同样的毒性作用^[13], 因此可以应用 A β ₂₅₋₃₅ 作为 AD 的研究工具。

本实验采用双侧海马注射聚集态的 A β ₂₅₋₃₅ 复制 AD 模型, 采用 Nissl 染色可见模型组海马 CA1 区神经细胞带受损, 细胞排列紊乱, 细胞数减少, 由此可见模拟 AD 脑内 A β 对神经细胞的损伤成功, 与既往研究一致^[14]。而应用 TAK-242 治疗的药物组明显改善海马神经细胞的损伤, 保护海马神经元抵抗 A β ₂₅₋₃₅ 诱

导的神经毒性。

TLR4 是膜蛋白家族一员, 是非特异性免疫反应中一类重要的模式识别受体, 能过激活下游多种信号分子的表达, 促进致炎因子如 IL-1、TNF- α 的释放, 其在神经系统炎症反应中具有重要作用。在体及离体实验研究均显示 TLR4 参与 AD 的炎症反应, 在其发病机制和病理生理过程中发挥重要作用^[4], 且抑制 A β 诱导的炎症反应可以起到神经保护作用^[5]。

TLR4 信号传导通路包括 MyD88 依赖途径和非 MyD88 依赖途径, 其中 MyD88 依赖性途径主要介导促炎细胞因子的表达, 在传递上游信息和疾病发生发展中具有重要作用^[15]。TLR4 活化后与 MyD88 结合, 依次激活下游信号分子 IL-1 受体相关激酶、肿瘤坏死因子受体相关因子 6, 最终激活 NF- κ B 信号传导途径, 启动细胞因子 (如 IL-1、TNF- α 等) 的转录、

翻译,致使炎症因子大量释放^[16]。IL-1 β 具有多种细胞活性,如细胞增殖,分化和凋亡,并且在脑内高表达。其可以引起APP表达增多,加重A β 的沉积和Tau磷酸化水平^[17]。TNF- α 是诱导炎症反应和诱导免疫调节过程中的一个重要因子,通过调节细胞因子的级联反应,导致神经元死亡并促进淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)和A β 的产生^[5]。此外,炎症因子可通过上调APP蛋白水解酶 β -分泌酶和 γ -分泌酶的表达活性来增加脑内A β 产生和沉积^[18]。由此推断,A β 和炎症因子间形成一个恶性循环,加重AD脑内的病理变化。

本实验结果显示,A β 可以引起大鼠海马组织TLR4、MyD88蛋白,以及IL-1 β 和TNF- α 表达增高,而TAK-242降低A β 诱导的上述蛋白表达变化。结合Nissl染色结果可以得出,TAK-242作为TLR4特异性抑制剂可以通过下调TLR4/MyD88信号通路,减少IL-1 β 和TNF- α 炎症因子的释放,从而起到神经保护作用。此外,TAK-242目前已经应用于脓毒症临床2期实验研究中,在人体中具有良好的安全性^[19],这为AD的治疗提供新的思路,并可能带来治疗方法的新进展。

参 考 文 献:

- [1] PRINCE M, BRYCE R, ALBANESE E, et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis[J]. *Alzheimers Dement*, 2013, 9(1): 63-75.
- [2] KUMAR A, SINGH A, EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(2): 195-203.
- [3] de PAULA V J, RADANOVIC M, DINIZ B S, et al. Alzheimer's disease[J]. *Subcell Biochem*, 2012, 65: 329-352.
- [4] ZHANG F, JIANG L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 11: 243-256.
- [5] RUBIO-PEREZ J M, MORILLAS-RUIZ J M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines[J]. *Scientific World Journal*, 2012, DOI: org/10.1100/2012/756357.
- [6] LAROCHELLE A, BELLAVANCE M A, RIVEST S. Role of adaptor protein MyD88 in TLR-mediated preconditioning and neuroprotection after acute excitotoxicity[J]. *Brain Behavior & Immunity*, 2015, 46: 221-231.
- [7] MIN S, JIN J J, LIM J E, et al. TLR4 mutation reduces microglial activation, increases A β deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(1): 92.
- [8] CHEN L, BAI Y, ZHAO M, et al. TLR4 inhibitor attenuates amyloid- β -induced angiogenic and inflammatory factors in ARPE-19 cells: Implications for age-related macular degeneration[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3249-3256.
- [9] TANG S C, LATHIA J D, SELVARAJ P K, et al. Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal[J]. *Exp Neurol*, 2008, 213(1): 114-121.
- [10] HUA F, TANG H, WANG J, et al. TAK-242, an antagonist for toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(4): 536-542.
- [11] WANG Y C, WANG P F, FANG H, et al. Toll-like receptor 4 antagonist attenuates intracerebral hemorrhage-induced brain injury[J]. *Stroke*, 2013, 44(9): 2545-2552.
- [12] FENG Y, GAO J L, CUI Y, et al. Neuroprotective effects of resatorvid against traumatic brain injury in rat: involvement of neuronal autophagy and TLR4 signaling pathway[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(1): 155-168.
- [13] FROZZA R L, HORN A P, HOPPE J B, et al. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(2): 295-303.
- [14] 曹梦园,赵月鸣,张晶,等. 人参皂苷Rb1对A β_{25-35} 诱导痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(35): 33-36.
- [15] PERI F, PIAZZA M. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists[J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(1): 251-260.
- [16] HE X B, JING Z Z, CHENG G F. MicroRNAs: new regulators of toll-like receptor signalling pathways[J]. *Biomed Res Int*, 2014, DOI: org/10.1155/2014/945169.
- [17] LIU L, CHAN C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 15: 6-15.
- [18] GONG C Y, ZHOU A L, MAO J H, et al. The role of Toll-like receptor 4 on inflammation and A β formation in cortex astrocytes[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2014, 66(6): 631-638.
- [19] RICE T W, WHEELER A P, BERNARD G R, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis[J]. *Crit Care Med*, 2010, 38(8): 1685-1694.

(张西倩 编辑)