

大鼠慢性乙醇损伤神经元模型的建立

熊叶 黄蜚洋 方千发 李涵 唐枫怡 陈琳*

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

摘要: 目的: 探讨大鼠慢性乙醇损伤神经元模型, 建立合适的动物模型。方法: 采用健康成年 Wistar 大鼠 32 只, 按照体重随机分为空白组和乙醇组, 每组 16 只。乙醇灌胃组给予 600mL/L 乙醇, 按 5mL/kg 灌胃, 1 次/d; 连续 16 周。空白给予等体积的蒸馏水。乙醇组末次给乙醇后戒断第 1 天、第 7 天和第 16 天取脑进行染色实验, 观察大鼠一般情况, 及检测大鼠神经元和突触超微结构的变化。结果: 连续 16 周后, 大鼠存活 28 只 (对照组 15 只, 乙醇灌胃组 13 只)。乙醇灌胃组大鼠 4 周后少食少动、反应淡漠、毛发无光泽、营养不良。对照组动物无明显异常。乙醇灌胃组大鼠的体质量重增加较对照组慢。第 4、8 周乙醇组大鼠体质量低于对照组 ($P < 0.05$), 灌胃第 16 周大鼠体质量差异最明显 ($P < 0.01$); 在乙醇戒断后第 1 天和第 7 天, 与空白组相比, 大鼠脑内 DG 区 Fluoro-Jade B (FJB) 标记的死亡神经元数目显著增加; 到戒断后 16 天, DG 区不能检测到 FJB 阳性细胞。说明慢性乙醇损伤神经元建模较为理想; 电镜观察大鼠 DG 区发现, 与空白对照组相比, 乙醇组第 7 天和第 16 天突触间隙变窄、变模糊, 突触后致密区增厚, 部分或完全遮盖了突触间隙。说明乙醇可至突触超微结构的退变。结论: 实验建立的模型可较理想地复制慢性乙醇损伤神经元的过程, 且研究表明乙醇具有显著神经毒性作用。

关键词: 大鼠; 乙醇; 神经元; 模型

乙醇是一种低分子量并且可以在水和脂质中溶解。由于乙醇具有脂溶性, 早期假设认为乙醇通过影响细胞膜作用于细胞蛋白质 [1]。因此“膜流动性假说”开始包括乙醇与其他中枢神经系统抑制剂包括全身麻醉药。随着人们掌握了乙醇对蛋白质直接的影响以及蛋白质分子结构的更多信息, 研究重点转移到描述特定的信号系统活动。现在清楚的是, 乙醇直接改变了许多离子通道, 受体和酶活性, 这些作用影响了突触的功能和可塑性变化 [2]。近年随着乙醇性脑损伤发病率的增加, 世界各国相继对慢性乙醇中毒导致的脑损伤机理开展了广泛研究 [3-4]。因此, 本课题对给予乙醇的大鼠神经元和突触超微结构的变化进行了初步的探讨, 为开发预防和治疗乙醇损伤神经元性疾病的药物提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验于 2023 年 4 月-2023 年 12 月在长沙医学院实验室完成。选用健康成年 Wistar 大鼠 32 只, 体质量 240-260g, 鼠龄 8-10 周, 由长沙医学院实验动物中心提供。所有大鼠分笼饲养, 每笼 8 只, 在自然光线, 室温及湿度条件稳定的情况下, 用标准啮齿类动物饲料喂养。动物实验箱, H-7500 电镜, 60 度二锅头。

1.2 方法

1.2.1 大鼠给予乙醇模型

健康成年 Wistar 大鼠 32 只, 按照体重随机分为空白组和乙醇组, 每组 16 只。乙醇灌胃组给予 600mL/L 乙醇, 按 5mL/kg 灌胃, 1 次/d; 连续 16 周。空白给予等体积的蒸馏水。乙醇组末次给乙醇后 (16 周后) 戒断第 1 天、第 7 天和第 16 天取脑进行染色实验。

1.2.2 大鼠脑组织的前处理

大鼠腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉后开胸, 经左心室插管, 剪开右心耳, 先以

100 ml 生理盐水经左心室灌注, 再用 4℃ 含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 先快后慢灌注, 固定 2h, 然后断头取脑置于 20% 蔗糖中过夜,

直至脑组织沉底, 再置于 30% 蔗糖中至沉底。取脑组织恒冷切片机连续冠状切片,

片厚 30μm。

1.2.3 染色步骤

①载玻片浸入含有 1% NaOH 的 80% 乙醇溶液 (即 5% NaOH 20 ml + 无水乙醇 80 ml), 5 min; ②70% 乙醇浸泡 2 min; ③ddH₂O 漂洗, 2 min; ④切片转入 0.06% 高锰酸钾溶液中, 并摇床振荡 10 min, 以确保切片之间背景抑制一致; ⑤ddH₂O 漂洗 2 min; ⑥载玻片置于 FJB 染色液中避光染色 20 min, 摇床振荡; ⑦ddH₂O 漂洗 2 min; ⑧玻片垂直放置在滤纸上 15 s, 滤纸吸水; ⑨50℃, 烘干 5-10 min; ⑩

二甲苯透明至少 1 min; 最后 DPX 封片 (非水溶性无荧光的封片介质)。

1.2.4 电镜

两组动物水合氯醛麻醉后, 经生理盐水、0.25% 戊二醛-4% 多聚甲醛全身灌

流后, 低温快速切取海马组织约 1-3mm³, 用 2.5% 戊二醛磷酸盐缓冲液 4℃ 固定 PBS 漂洗 3 次, 10 min 可次, 1% 锇酸固定 2h, PBS 漂洗 3 次, 10 min/次, 梯度乙醇脱水, Epon 环氧树脂浸透包埋、聚合、修块, 超薄切片机切片, 片厚 50μm, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, 采用透射电子显微镜进行海马齿状回 (dentate gyrus, DG) 组织神经元和神经突触的超微结构观察。

1.3 统计分析

采用 SPSS23.0 统计学软件处理数据, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异比较采用 wilcoxon 符号秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠体质量实验前后变化情况

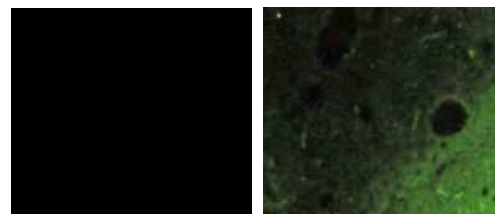
连续 16 周后, 大鼠存活 28 只 (对照组 15 只, 乙醇灌胃组 13 只)。乙醇灌胃组大鼠 4 周后少食少动、反应淡漠、毛发无光泽、营养不良。对照组动物无明显异常。乙醇灌胃组大鼠的体质量重增加较对照组慢。第 4、8 周乙醇组大鼠体质量低于对照组 ($P < 0.05$), 灌胃第 16 周大鼠体质量差异最明显 ($P < 0.01$)。具体见表 1。

表 1 两组大鼠体质量实验前后比较 (kg)

组别	例数	第 4 周	第 8 周	第 16 周
对照组	15	342.42 ± 31.45	386.15 ± 33.87	425.19 ± 40.38
乙醇组	13	312.55 ± 23.54	339.24 ± 30.62	304.11 ± 24.41

2.1 大鼠给予乙醇后神经元的影响

在乙醇戒断后第 1 天和第 7 天, 与空白组相比, 大鼠脑内 DG 区 Fluoro-Jade B (FJB) 标记的死亡神经元数目显著增加; 到戒断后 16 天, DG 区不能检测到 FJB 阳性细胞。说明慢性乙醇损伤神经元建模较为理想。具体见图 1。



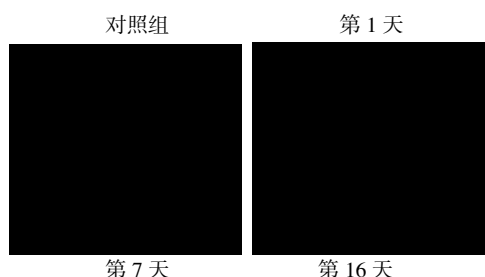


图1 大鼠给予乙醇后神经元的变化

2.2 大鼠给予乙醇后突触超微结构的影响

电镜观察大鼠 DG 区发现,与空白对照组相比,乙醇戒断后第 7 天和第 16 天突触间隙变窄、变模糊,突触后致密区增厚,部分或完全遮盖了突触间隙。说明乙醇可至突触超微结构的退变。具体见图 2。

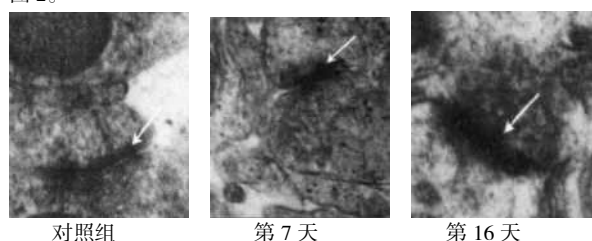


图2 大鼠给予乙醇后突触超微结构的变化

3 讨论

乙醇是亲神经性毒物,具有脂溶性和水溶性,容易透过生物膜和血脑屏障,进入体内的乙醇 10 min 后即进入大脑,大脑和血液的乙醇浓度之比为 1:1.18,乙醇容易与卵磷脂结合,而神经组织卵磷脂极为丰富,故对乙醇的损害敏感。当乙醇进入神经细胞膜的类脂层时,使神经细胞活动受到抑制,神经元萎缩死亡和缺失[5]。乙醇的代谢产物乙醛能与各种蛋白质结合,形成的乙醛-蛋白质毒物蓄积量与慢性乙醇中毒者的饮酒量成正比,此毒物可以抑制蛋白质合成,干扰细胞膜中类脂和蛋白结构,改变神经细胞膜的流动性,阻碍钙的运输,引起神经细胞功能障碍[6]。

海马是学习与记忆的解剖基础,是神经中枢记忆回路的重要结构,直接参与

信息的储存和回忆,在辨别空间信息、新异刺激抑制性调节和短时记忆向长时记

忆的过度中起重要作用,是认知功能障碍研究领域涉及最多的脑区之一[7]。内嗅皮层属于边缘系统一部分,内嗅皮层作为大脑重要的记忆脑区,与海马结构有大量的纤维联系,并且在海马传入和传出信息的处理过程中起重要作用,被认为是海马输入与输出的重要中继站[8]。一方面内嗅皮层接受新皮层的输入并投射至海马,另一方面将海马的输出信息传至大脑皮层。从功能上来说嗅皮层对认知的影响主要涉及目标识别记忆和空间记忆[9]。有临床研究显示,海马、内嗅皮层体积与临床记忆量表总分呈正相关,即海马及内嗅皮层体积越小,则记忆功能越差。

乙醇作为一种致畸剂,可诱导中枢神经系统神经元在不同发育阶段广泛凋亡。乙醇调控神经发育的一种机制即诱导细胞凋亡。凋亡是哺乳动物正常发育过程中的一个关键过程,具有区域特异性,在数量和潜伏期上均存在差异,早期发育过程中产生的细胞中有多达一半细胞发生凋亡,这对成功建立突触连接极为重要[10]。乙醇诱导凋亡的机制包括通过抑制 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor,NMDAR)和增强 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid,GABA)能受体,导致发育中大脑神经活性下降,抑制突触活性,诱导神经元凋亡[11]。因为突触活性对神经细胞在妊娠期和产后早期的存活至关重要,突触活性降低可能导致活

性依赖性细胞凋亡,乙醇可以诱导新生儿期海马神经元细胞发生神经变性。

成年海马神经发生分为五个阶段[12]:增殖、分化、迁移、成熟和长期存活各阶段依赖于突触可塑性整合形成。从细胞产生到完全整合过程需要 3 个月时间。细胞增殖、存活、分化和成熟是正常神经元形成的关键阶段,而这些阶段都可能受到乙醇的影响。研究发现[13],慢性乙醇暴露能够通过降低 NPC 的增殖、抑制细胞存活和改变新生神经元细胞形态,阻碍神经发生,而且会影响新生神经元细胞表型。长期接触乙醇会导致海马齿状回 NPC 增殖和神经发生出现可逆性抑制,这可能会增强行为应激反应。反应性神经发生是一种补偿的神经发生丧失的尝试,可能是神经再生期间组织结构损伤修复和认知功能改善的关键内在机制。测试海马功能的时间主要集中在乙醇暴露后数天至 3 周内,在出生 6 周后细胞观察不到反应性神经发生的功能效应。

综上所述,本文从电生理学检查证实慢性乙醇损伤神经元模型成功建立。为研究慢性乙醇损伤神经元的发病机制,及其临床治疗和早期诊断提供了简单可行的动物模型。

参考文献:

- [1]孙婧,李玉明.乙醇对心肌细胞电生理特性的影响[J].武警医学院学报,2004(04):326-328.
- [2]王昌亮.慢性乙醇暴露经钠钙交换体诱导神经细胞凋亡的机制研究[D].中国医科大学,2019.
- [3]康传依,胡建.慢性酒精中毒脑损伤的研究进展[J].医学综述,2017,23(24):4895-4899+4904.
- [4]徐永立,赵小华,郝金华,等.慢性酒精中毒性脑病患者脑白质损伤的 MRI 特点[J].中国中西医结合影像学杂志,2019,17(04):345-347+350.
- [5]洪远玲.慢性酒精中毒患者的脑电图改变分析[J].中外医疗,2018,37(33):193-194+198.
- [6]王文.慢性应激对酒精中枢作用的双向调控效应及其机制[D].华中科技大学,2017.
- [7]董华平,钟志凤,李鹏,等.模拟高原低压低氧暴露小鼠记忆损伤与脑海马体磷酸化蛋白质组学分析[J].陆军军医大学学报,2022,44(04):291-301.
- [8]石叶军,陆钦池,宫新伟,等.小鼠海马脑片和海马-内嗅皮层联合脑片癫痫样放电特性的比较研究[J].中华临床医师杂志(电子版),2013,7(12):5397-5400.
- [9]葛曼玲,郭俊丹,陈盛华,等.颞叶癫痫患者海马 CA3 和内嗅皮层网络的癫痫尖波对 theta 节律抑制作用的量化评估[J].生理学报,2017,69(01):77-88.
- [10]蒲小平,李燕云.肉苁蓉苯乙醇苷抗中脑神经元凋亡机制的研究[C]//中国药理学会.中国药理学会第八次全国代表大会论文摘要集(第一部分).中国药理学会,2002:56-57.
- [11]姚国恩,王景周,陈曼娥.血管性痴呆大鼠认知障碍的 N-甲基 D-天冬氨酸受体机制(英文)[J].中国临床康复,2003(10):1496-1498.
- [12]鄂晓,张英鸽.成年海马中神经发生及影响因素[J].生物技术通讯,2010,21(03):443-448.
- [13]李凡,张中乐,马书玲,等.慢性乙醇中毒大鼠神经细胞凋亡和学习记忆能力下降的关系[J].中国病理生理杂志,2008(07):1441-1444.

基金项目:湖南省大学生创新创业训练计划项目:湘教通[2022]174号-4588。

第一作者:熊叶,2000.03,女,汉,湖南永州,本科在读,临床专业;

*通讯作者:陈琳,1982.10,女,汉,湖南益阳,硕士,副教授,研究方向为精神医学、儿童青少年心理卫生保健。