

· 生理学专题 ·

经鼻给脂多糖对小鼠嗅觉和嗅球及内侧前额叶皮质
轻链铁蛋白表达的影响

袁玉, 马希珍, 宋宁, 谢俊霞

(青岛大学脑科学与疾病研究院, 山东 青岛 266071)

[摘要] 目的 探讨鼻内滴注脂多糖(LPS)对小鼠嗅觉和嗅球及内侧前额叶皮质中轻链铁蛋白表达的影响。
方法 8周龄雄性 C57BL/6 小鼠 16 只, 随机分为对照组和 LPS 组, 每组 8 只。LPS 组双侧鼻孔交替滴注 1 g/L 的 LPS(每只 10 μ L), 对照组给予等体积的生理盐水, 隔天 1 次, 给药时长为 3 周。3 周后测试两组小鼠的嗅觉功能, 采用免疫印迹法检测嗅球中酪氨酸羟化酶(TH)的表达, 并检测嗅球及内侧前额叶皮质中轻链铁蛋白的表达。
结果 与对照组相比, LPS 组小鼠没有明显的嗅觉障碍; 嗅球中 TH 表达无明显变化; 嗅球中轻链铁蛋白表达升高 87%, 差异有统计学意义($t=4.486, P<0.05$); 内侧前额叶皮质中轻链铁蛋白水平升高 84%, 差异有统计学意义($t=2.391, P<0.05$)。
结论 经鼻给 LPS 能够引起嗅球及内侧前额叶皮质中铁含量上升, 但没有造成明显的嗅觉障碍及嗅球内多巴胺能神经元损伤。

[关键词] 脱辅铁蛋白质类; 脂多糖类; 多巴胺能神经元; 嗅球; 额叶前皮质; 小鼠

[中图分类号] R338.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2022)03-0317-04

doi: 10.11712/jms.2096-5532.2022.58.091

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20220617.1646.013.html>; 2022-06-20 15:20:36

EFFECT OF INTRANASAL ADMINISTRATION OF LIPOPOLYSACCHARIDE ON THE OLFACTORY SENSATION AND THE EXPRESSION OF L-FERRITIN IN THE OLFACTORY BULB AND MEDIAL PREFRONTAL CORTEX OF MICE YUAN Yu, MA Xizhen, SONG Ning, XIE Junxia (Institute of Brain Science and Diseases, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of intranasal instillation of lipopolysaccharide (LPS) on the olfactory sensation and the expression of L-ferritin in the olfactory bulb (OB) and medial prefrontal cortex (mPFC) of mice. **Methods** Sixteen male C57BL/6 mice aged 8 weeks were randomly divided into control group and LPS group, with 8 mice in each group. The LPS group was instilled with 1 g/L LPS alternately to bilateral nostrils at 10 μ L/animal, once every other day for 3 weeks, and the control group was instilled with the same volume of normal saline. Three weeks later, the olfactory function of mice in the two groups was tested, and the expression level of tyrosine hydroxylase (TH) in the OB and the expression level of L-ferritin in the OB and mPFC were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the LPS group had no obvious olfactory disorder, no significant change in the expression level of TH in the OB, an increase of 87% in the expression level of L-ferritin in the OB ($t=4.486, P<0.05$), and an increase of 84% in the expression level of L-ferritin in the mPFC ($t=2.391, P<0.05$). **Conclusion** Intranasal administration of LPS can increase the iron content in the OB and mPFC, but does not cause obvious olfactory disorder and dopaminergic neuron damage in the OB.

[KEY WORDS] apoferritins; lipopolysaccharides; dopaminergic neurons; olfactory bulb; prefrontal cortex; mice

帕金森病(PD)是第二大常见的神经退行性疾病,据统计,2016 年我国 60 岁以上人群中 PD 患病率为 1.37%^[1]。PD 的临床表现除肌僵直、运动迟缓、静止性震颤等运动症状外,还伴随有嗅觉障碍、快速眼动睡眠障碍、便秘、抑郁等非运动症状。其主要病理特征为黑质致密部多巴胺能神经元的退行性病变及黑质脑区存在特异性的异常铁沉积^[2-6]。研

究表明,75%~90%的 PD 病人早期嗅觉功能减退,因此嗅觉障碍被认为是 PD 发病早期的一个重要标志^[7-10]。鼻腔上皮的嗅觉感知神经元能够检测环境中的气味信息,并通过嗅神经传递到嗅觉相关的大脑皮质,最终形成嗅觉^[11]。嗅觉感知神经元容易受到环境毒素如细菌、病毒、灰尘、花粉等的影响,继而引发神经炎症,导致嗅觉系统出现损伤^[12]。有研究显示,C57BL/6 小鼠鼻内滴注脂多糖(LPS)6 周后出现明显的嗅觉障碍及 PD 样行为学变化;经鼻给予 α -突触核蛋白的预制纤维,猕猴黑质和苍白球脑区内出现明显铁沉积^[13-14]。但在发生上述病变之前

[收稿日期] 2021-11-04; **[修订日期]** 2022-03-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(32170984)

[第一作者] 袁玉(1995-),女,硕士研究生。

[通信作者] 谢俊霞(1956-),女,博士,教授,博士生导师。E-mail:jxiaxie@public.qd.sd.cn。

其他脑区是否存在铁沉积尚不清楚。有研究结果证实,黑质到嗅球和内侧前额叶皮质存在直接的神经投射通路^[15-16]。本研究旨在探讨经鼻给 LPS 对小鼠嗅觉和嗅球及内侧前额叶皮质中轻链铁蛋白表达的影响。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,7 周龄,体质量为 (19±1) g,购自北京维通利华公司,饲养在可自由饮水摄食、室温 25℃、湿度(50±5)%、12 h 昼夜循环光照的 SPF 级清洁环境中,适应环境 1 周后开始实验。LPS 购于美国 Sigma 公司;酪氨酸羟化酶 (TH)抗体购于美国 Millipore 公司,轻链铁蛋白抗体购于美国 abcam 公司,Rabbit Anti-GAPDH 和 HRP-IgG 标记的二抗购于中国爱必信公司;PVDF 膜、ECL 发光液购于美国 Millipore 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物分组与处理

将 16 只小鼠随机分为对照组和 LPS 组,每组 8 只。LPS 组双侧鼻孔交替给药(LPS 用生理盐水配制的工作浓度为 1 g/L),每只 10 μL;对照组给予等体积的生理盐水。小鼠异戊烷麻醉后,采用文献报道的方法进行鼻内滴注,隔天 1 次^[17]。给药时间为 3 周,3 周后立即进行嗅觉检测。

1.3 嗅觉功能检测

检测采用透明的亚克力盒(30 cm×20 cm×20 cm),盒子中间有可拆卸的透明隔板,隔板底部中间有可供小鼠自由穿梭的拱形通道。将小鼠置于盒子底部通道处,盒子一侧铺放适量新垫料,另一侧铺放等量的小鼠笼内的旧垫料(笼内已生活过 3~5 d)。小鼠适应 1 min 后,应用 Ethvision XT7 系统分别采集两组小鼠自由活动 5 min 内在新垫料中的总逗留时长,若时长存在统计学差异则反映 LPS 组有嗅觉障碍;反之,则不存在嗅觉障碍。

1.4 免疫印迹法检测 TH 和轻链铁蛋白表达

嗅觉功能检测结束后,处死小鼠,取新鲜的嗅球及内侧前额叶皮质组织并称质量。按每毫克 25 μL 的比例向组织样本中加入 RIPA 蛋白裂解液,用机器充分研磨后,于冰上静置 30 min 充分裂解,以 12 000 r/min 离心 25 min,取上清,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,加入 1/4 体积的 Loading Buffer 后 95℃金属浴 5 min。行十二烷基硫酸钠-

聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳(80 V、40 min,120 V、90 min),然后应用湿转法转至 0.45 μm 的 PVDF 膜上(300 mA、90 min)。用 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入 TH(1:3 000)、轻链铁蛋白(1:1 000)、GAPDH(1:20 000)一抗于 4℃摇床孵育过夜;以 TBST 溶液洗 3 次,每次 10 min;加入山羊抗兔的 HRP-IgG 二抗(1:10 000)室温孵育 1 h;以 TBST 溶液洗 3 次,每次 10 min;使用 ECL 发光液显影。应用 Image J 软件进行分析,TH 和轻链铁蛋白表达水平以目的蛋白和内参照蛋白(GAPDH)的比值表示。

1.5 统计学处理

应用 Prism 6 软件进行统计学处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料结果,两组间均数的比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 经鼻给 LPS 对嗅觉功能的影响

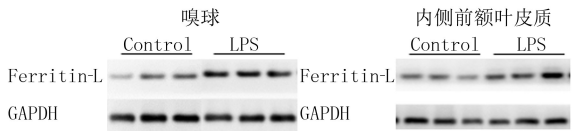
两组小鼠在新垫料中的总逗留时长的差值为 (9.95±15.38)s,差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.2 经鼻给 LPS 对嗅球 TH 和轻链铁蛋白表达的影响

与对照组相比较,LPS 组小鼠嗅球内 TH 蛋白表达无明显变化(*P*>0.05);轻链铁蛋白表达明显上升,差异具有统计学意义(*t*=4.486,*P*<0.05)。见图 1 和表 1。

2.3 经鼻给 LPS 对内侧前额叶皮质中轻链铁蛋白表达的影响

与对照组相比,LPS 组轻链铁蛋白表达明显上调,差异有统计学意义(*t*=2.391,*P*<0.05)。见图 1 和表 1。



注:Ferritin-L 为轻链铁蛋白。

图 1 LPS 对嗅球和内侧前额叶皮质内轻链铁蛋白表达的影响

表 1 两组小鼠嗅球和内侧前额叶皮质中各蛋白表达水平比较(*n*=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	嗅球 TH	嗅球轻链铁蛋白	内侧前额叶皮质轻链铁蛋白
对照组	1.212±0.066	0.435±0.053	0.481±0.052
LPS 组	1.232±0.113	0.815±0.066 *	0.888±0.145 *

与对照组比较,**t*=4.486、2.391,*P*<0.05。

3 讨 论

Braak 分级学说认为,PD 病理过程始于嗅球并逐渐累及延髓等低位脑干,进而中脑黑质等脑区发生损伤,出现运动症状^[18-20]。有研究表明,经鼻给予 LPS 6 周,嗅球中小胶质细胞激活,导致黑质区多巴胺能神经元损伤,纹状体内多巴胺减少,这一过程与炎症因子受体介导有关^[13]。本研究探讨经鼻给予 LPS 3 周能否引发嗅觉损伤,结果显示,LPS 处理后小鼠没有明显的嗅觉障碍。这可能是由于 LPS 介导的炎症反应在 3 周时不足以引起嗅觉系统损伤。普遍认为嗅觉障碍可能与嗅球内多巴胺能神经元有关^[17]。PD 病人尸检研究显示,嗅球内 TH 阳性神经元数目增多;另有临床研究显示,PD 病人给予多巴胺制剂,不能改善其嗅觉障碍^[7,21]。这两项研究表明嗅球中的多巴胺能神经元似乎与嗅觉障碍并无直接关系。本研究亦未观察到嗅球内多巴胺能神经元出现明显损伤。

在脑内神经元生长代谢过程中,金属元素铁发挥着重要的生理作用,如参与线粒体中能量产生、合成血红蛋白参与氧转运、髓鞘形成、神经递质的合成与代谢等。然而,脑内过多的铁能通过 Fenton 反应产生羟自由基等活性氧,造成氧化应激;过多的铁也可能通过铁死亡方式诱导脂质过氧化物积累,造成细胞死亡^[6,22-24]。研究表明,PD 病人脑铁代谢存在异常^[25-26]。本文研究结果显示,鼻内滴注 LPS 3 周能够引起嗅球和内侧前额叶皮质内轻链铁蛋白表达上调,提示嗅球和内侧前额叶皮质内可能存在铁沉积。有文献报道,经鼻给 LPS 通过白细胞介素 1 β 及其受体途径介导嗅球小胶质细胞激活和 α -突触核蛋白聚集^[13]。嗅觉系统具有极其复杂的神经网络,在脑内与多个脑区存在直接或间接的联系^[27]。聚集形式的 α -突触核蛋白可经相互联系的神经通路从嗅球传播至黑质和纹状体并造成多巴胺能神经元损伤^[13]。因此我们推测,LPS 诱导的嗅球 α -突触核蛋白聚集体也可能传播至内侧前额叶皮质或其他脑区,并进一步诱导这些脑区小胶质细胞激活。本实验室的研究结果和有关文献报道结果均表明,小胶质细胞介导的神经炎症可以促进脑区铁沉积的发生^[14,28-34],但铁沉积是否能够引发神经炎症尚无定论^[35]。因此,LPS 能够引起内侧前额叶皮质等不同脑区的铁含量增加,且可能与 LPS 导致的 α -突触核蛋白聚集体的传播和神经炎症有关。鉴于黑质与嗅

球和内侧前额叶皮质存在直接的神经投射通路,这两个脑区的铁沉积也可能通过跨脑区铁转运导致黑质等 PD 相关脑区铁沉积,但这还需要进一步的实验研究证实。

综上所述,经鼻给 LPS 3 周后,小鼠嗅觉功能没有发生显著变化,而且嗅球内多巴胺能神经元没有明显损伤,嗅球和内侧前额叶皮质内的铁含量显著上升。在本研究基础上,我们将继续探讨铁与炎症是否具有协同作用,以及经鼻给 LPS 能否引起黑质等 PD 相关脑区的铁含量上升。本文结果为研究经鼻给药对脑内铁代谢的影响提供了新的实验依据及理论基础。

〔参考文献〕

- [1] QI S G, YIN P, WANG L H, et al. Prevalence of Parkinson's disease: a community-based study in China[J]. *Movement Disorders*, 2021,36(12):2940-2944.
- [2] LEAK R K. Conditioning against the pathology of Parkinson's disease[J]. *Conditioning Medicine*, 2018,1(3):143-162.
- [3] SUN J Y, LAI Z Y, MA J H, et al. Quantitative evaluation of iron content in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder[J]. *Movement Disorders*, 2020,35(3):478-485.
- [4] JIANG H, WANG J, ROGERS J, et al. Brain iron metabolism dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017,54(4):3078-3101.
- [5] BARBOSA J H, SANTOS A C, TUMAS V, et al. Quantifying brain iron deposition in patients with Parkinson's disease using quantitative susceptibility mapping, R2 and R2*[J]. *Magnetic Resonance Imaging*, 2015,33(5):559-565.
- [6] ZUCCA F A, SEGURA-AGUILAR J, FERRARI E, et al. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease[J]. *Progress in Neurobiology*, 2017,155:96-119.
- [7] DOTY R L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders[J]. *Neurobiology of Disease*, 2012,46(3):527-552.
- [8] DOTY R L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2012,8(6):329-339.
- [9] BOESVELDT S, VERBAAN D, KNOL D L, et al. A comparative study of odor identification and odor discrimination deficits in Parkinson's disease[J]. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 2008,23(14):1984-1990.
- [10] FULLARD M E, MORLEY J F, DUDA J E. Olfactory dysfunction as an early biomarker in Parkinson's disease[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2017,33(5):515-525.
- [11] WILSON D A, KADOHISA M, FLETCHER M L. Cortical contributions to olfaction: Plasticity and perception[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2006,17(4):462-470.
- [12] CONNOR E E, ZHOU Y, LIU G E. The essence of appetite:

does olfactory receptor variation play a role[J]? Journal of Animal Science, 2018,96(4):1551-1558.

[13] NIU H C, WANG Q, ZHAO W G, et al. IL-1 β /IL-1R1 signaling induced by intranasal lipopolysaccharide infusion regulates alpha-Synuclein pathology in the olfactory bulb, substantia nigra and striatum[J]. Brain Pathology (Zurich, Switzerland), 2020,30(6):1102-1118.

[14] GUO J J, YUE F, SONG D Y, et al. Intranasal administration of α -synuclein preformed fibrils triggers microglial iron deposition in the substantia nigra of Macaca fascicularis[J]. Cell Death & Disease, 2021,12(1):81.

[15] HÖGLINGER G U, ALVAREZ-FISCHER D, ARIAS-CARRIÓN O, et al. A new dopaminergic nigro-olfactory projection[J]. Acta Neuropathologica, 2015,130(3):333-348.

[16] WANG Z, ZENG Y N, YANG P, et al. Axonal iron transport in the brain modulates anxiety-related behaviors[J]. Nature Chemical Biology, 2019,15(12):1214-1222.

[17] 王冬霞,谢俊霞,宋宁. 经鼻给枸橼酸铁铵对小鼠嗅觉、嗅球铁含量及 TH 蛋白表达影响[J]. 青岛大学学报(医学版), 2019, 55(1):13-16.

[18] BRAAK H, DEL TREDICI K, RÜB U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson’s disease[J]. Neurobiology of Aging, 2003,24(2):197-211.

[19] KALIA L V, LANG A E. Parkinson’s disease[J]. Lancet (London, England), 2015,386(9996):896-912.

[20] BRAAK H, RÜB U, DEL TREDICI K. Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson’s disease[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2006,248(1/2):255-258.

[21] SCHAPIRA A H V, CHAUDHURI K R, JENNER P. Non-motor features of Parkinson disease[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2017,18(8):435-450.

[22] ZECCA L, YODIM M B H, RIEDERER P, et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2004,5(11):863-873.

[23] WARD R J, ZUCCA F A, DUYN J H, et al. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders[J]. The Lancet Neurology, 2014,13(10):1045-1060.

[24] SNYDER A M, CONNOR J R. Iron, the substantia nigra and related neurological disorders [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009,1790(7):606-614.

[25] DEXTER D T, WELLS F R, AGID F, et al. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain [J]. Lancet (London, England), 1987,2(8569):1219-1220.

[26] AYTON S, LEI P, HARE D J, et al. Parkinson’s disease iron deposition caused by nitric oxide-induced loss of β -amyloid precursor protein[J]. The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience, 2015,35(8):3591-3597.

[27] WILSON R S, SCHNEIDER J A, ARNOLD S E, et al. Olfactory identification and incidence of mild cognitive impairment in older age[J]. Archives of General Psychiatry, 2007,64(7):802-808.

[28] URRUTIA P J, MENA N P, NÚÑEZ M T. The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders[J]. Frontiers in Pharmacology, 2014,5:38.

[29] ANDERSEN H H, JOHNSEN K B, MOOS T. Iron deposits in the chronically inflamed central nervous system and contributes to neurodegeneration [J]. Cellular and Molecular Life Sciences; CMLS, 2014,71(9):1607-1622.

[30] CHEN L L, HUANG Y, YU X, et al. Corynoxine protects dopaminergic neurons through inducing autophagy and diminishing neuroinflammation in rotenone-induced animal models of Parkinson’s disease[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12:642900.

[31] BADANJAK K, FIXEMER S, SMAJIĆ S, et al. The contribution of microglia to neuroinflammation in Parkinson’s disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9):4676.

[32] PAJARES M, I ROJO A, MANDA G, et al. Inflammation in Parkinson’s disease: mechanisms and therapeutic implications [J]. Cells, 2020,9(7):E1687.

[33] VAN VLIET E A, NDODE-EKANE X E, LEHTO L J, et al. Long-lasting blood-brain barrier dysfunction and neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. Neurobiology of Disease, 2020,145:105080.

[34] FERNÁNDEZ-MENDÍVIL C, LUENGO E, TRIGO-ALONSO P, et al. Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: implication of iron metabolism [J]. Redox Biology, 2021,38:101789.

[35] LIU Z, SHEN H C, LIAN T H, et al. Iron deposition in substantia nigra: abnormal iron metabolism, neuroinflammatory mechanism and clinical relevance[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):14973.

(本文编辑 马伟平)

作者书写统计学名词及符号须知

根据国家标准 GB3358—82《统计学名词及符号》的规定,样本的算术平均数用英文小写斜体 \bar{x} ;标准差用英文小写斜体 s ;标准误用英文小写斜体 s_x ,下角 \bar{x} ,即 $s_{\bar{x}}$; t 检验用英文小写斜体 t ; F 检验用英文大写斜体 F ;卡方检验用希腊文小写斜体 χ^2 ;相关系数用英文小写斜体 r ;自由度用希腊文小写斜体 ν (钮);概率用英文大写斜体 P ;样本数用英文小写斜体 n 。请作者来稿时遵照执行。