

APPSWE Tg2576 小鼠脑屏障结构

崔占军¹ 刘芳² 赵凯冰³ 李冰梅⁴ 刘中华^{1*}

(1. 河南大学基础医学院纳米药物研究所; 2. 河南大学第一附属医院病理科; 3. 开封大学医学部解剖学教研室;
4. 河南大学淮河医院教学办公室, 河南 开封 475001)

[摘要] 目的 探讨小鼠的血脑屏障(BBB)及血脑脊液屏障(BCSFB)的基本结构及其在阿尔茨海默病(AD)发生、发展过程中结构、功能及其超微结构的改变。方法 实验用动物采用 APPSWE Tg2576 鼠,分为 APPSWE 转基因阳性鼠(模型组)和同窝野生型小鼠(对照组)每组各20只。饲养16个月后进行全身灌注固定,开颅切取侧脑室室壁及其脉络丛组织。采用免疫荧光及透射电子显微镜技术观察 BBB 及 BCSFB 的超微结构,从而观察 AD 模型脑屏障的改变。结果 AD 模型组与对照组相比较,血管密度明显降低;AD 小鼠脑屏障正常结构受到损害,主要是脑血管内皮细胞(或脉络丛内皮细胞)之间的连接及其细胞器受损,脉络丛超微结构也出现明显变化,主要表现为细胞间隙增宽,细胞之间的黏附连接等连接结构也有部分破坏,胞质内出现较多的囊泡状结构等。结论 和正常鼠相比,AD 鼠脑屏障受到一定的损害,可能致使脑屏障的转运机制出现相应的改变并影响脑内 β -淀粉样蛋白($A\beta$)的清除,脑屏障中存在的稳态机制,如其分泌物和受体介导的信号传导也可能出现改变,这些因素可能共同参与了 AD 的形成和进展。

[关键词] 阿尔茨海默病;血脑屏障;血脑脊液屏障;脉络丛;增殖;血管神经单元;免疫荧光;小鼠
[中图分类号] R749.6 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-4356.2018.05.002

Brain barrier structure of APPSWE Tg2576 mice

CUI Zhan-jun¹, LIU Fang², ZHAO Kai-bing³, LI Bing-mei⁴, LIU Zhong-hua^{1*}

(1. Institute of Nano Medicine; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of He'nan University; 3. Department of Anatomy, Medical College of Kaifeng University; 4. Teaching Office He'nan University Huaihe Hospital, He'nan Kaifeng 475001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the basic structure of the blood brain barrier (BBB) and blood cerebrospinal fluid barrier (BCSFB) in mice and their changes in structure, function, and ultrastructure during the development and progression of AD. **Methods** The APPSWE Tg2576 mice were used and divided into APPSWE transgenic positive mice (model group) and littermates wild type mice (control group), twenty mice in each group. After 16 months of feeding, whole body perfusion was performed and the craniotomy was performed to obtain the lateral ventricle wall and its choroid plexus. Immunofluorescence and transmission electron microscopy were used to observe the ultrastructure of BBB and BCSFB, so as to observe the changes of brain barrier of AD model. **Results** The vascular density was significantly lower in the AD model group than in the control group; the normal structure of the brain barrier in AD mice was impaired, mainly due to the connection between the brain vascular endothelial cells (or choroid plexus endothelial cells) and their organelles being damaged. The ultrastructure of the choroid plexus also showed significant changes. The main manifestations were the widening of the intercellular space, and some of the connecting structures between the cells, such as adhesion and connection, and some vesicle-like structures in the cytoplasm. **Conclusion** Compared with normal mice, the brain barrier of AD rats is damaged, which may lead to corresponding changes in the brain barrier transport mechanism and affect the clearance of $A\beta$ in the brain, and the steady-state mechanisms existing in the brain barrier, such as secretions and receptors thereof. Mediated signaling may also change, and these factors may be involved in the formation and progression of AD.

[Key words] Alzheimer's disease; Blood brain barrier; Blood cerebrospinal fluid barrier; Choroid plexus; Proliferation; Vascular nerve unit; Immunofluorescence; Mouse

[收稿日期] 2017-11-09 **[修回日期]** 2018-05-31

[基金项目] 国家自然科学基金(21572045);河南省科技发展计划(162102310074);河南大学科研基金(xxjc20140019)

[作者简介] 崔占军(1968—),男(汉族),黑龙江省依安县人,硕士研究生,副教授。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: lzh2001hawk@163.com Tel: (0371) 23793368

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的痴呆症类型,患者在生命晚期(≥ 65 岁)常出现记忆丧失和认知功能障碍等症状^[1]。目前尚无彻底治愈的方法,致使患者的家庭和社会都要承担巨大的人力和经济负担。AD的发生可能与淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)、淀粉样前体蛋白 β -裂解酶1(beta-amyloid cleaving enzyme 1, BACE1)等基因的多位点变异、突触或线粒体功能衰竭、氧化应激、炎症等有关^[2-5]。其病理学特征主要是脑内 β -淀粉样蛋白(amyloid β -peptides, A β)沉积形成老年斑和神经纤维缠结^[6]。这些结构的改变可能会在一定程度上影响中枢神经系统(central nervous system, CNS)内环境的稳态。CNS内环境的稳态对于脑细胞的正常功能至关重要。脑屏障主要包括血-脑屏障(blood brain barrier, BBB)和血-脑脊液屏障(blood cerebrospinal fluid barrier, BCSFB)^[7]。BBB的作用长期以来一直得到研究人员的关注,而BCSFB的功能研究相对较少,与BBB相比,BCSFB也具有极其重要的功能。在CNS的多种疾病,如多发性硬化和AD发生发展过程中,BBB和BCSFB发生的变化可能会导致神经元损伤和认知功能障碍^[8-9]。

BBB主要由存在于对脑实质供血的毛细血管内皮细胞之间的紧密连接部位。研究发现,AD患者存在BBB的内皮渗透性增加和过量的A β 通过BBB的潜在清除缺陷^[10]。BCSFB的主要结构是脉络丛(choroid plexus, CP),由脉络丛上皮细胞(choroid plexus epithelial cell, CPE)折叠组成,包裹血管状基质^[11]。CPE的主要功能是产生脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF),或运输一些生物分子,并作为许多CSF废物的暂时储存地。Chalbot等^[12]指出,CPE进行性萎缩并积累许多脂褐素空泡等损伤,可能是AD部分患者发生的第1个迹象^[13]。在AD早期,CPE产生或运输离子、维生素、生长因子、激素等可能会受到影响。体外和体内AD模型研究表明,CP从CSF中摄取(过量)A β ,并通过低密度脂蛋白受体相关蛋白1(low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1)和其他转运蛋白将其从CNS中清除^[14, 15]。我们对AD模型鼠的BBB和BCSFB的大体及超微结构进行了详细的观察,试图从AD发生过程中脑屏障的结构改变,尤其是超微结构的改变探讨脑屏障与AD发生之间的关系。

材料和方法

1. 实验动物

实验采用 APPSWE Tg2576 鼠,9~12个月,体重25~30 g,购自郑州大学实验动物中心,合格证

号:SYXK(豫)2005-0016。将其分为 APPSWE 转基因阳性鼠(模型组)和同窝野生型小鼠(对照组)。每组各20只小鼠,相同条件下进行饲养,普通饲料喂养,保证充足水源,定期消毒。

2. 实验材料及试剂

本实验所用一抗主要为兔抗胶原蛋白IV(collagen IV)多克隆抗体(1:600, Abcam公司, ab6586)及兔抗GFAP单克隆抗体(1:600, Abcam公司, ab64613)。实验中所用的二抗分别为Alexa488驴抗兔IgG(1:300, Invitrogen公司, A21206);Alexa568驴抗兔IgG(1:600, Invitrogen公司, A11057)。实验中所用的胎牛血清(FBS)、一抗稀释液、二抗稀释液以及多聚赖氨酸等均从福州迈新生物技术有限公司购置;磷酸二氢钠、异戊巴比妥钠、多聚甲醛、叠氮化钠、硼砂、氢氧化钠(NaOH)、硼酸、磷酸氢二钠均购自开封开化集团有限公司。

3. 切片的制作

1%异戊巴比妥钠(300mg/kg)对小鼠进行腹腔注射麻醉,利用4%多聚甲醛与戊二醛混合液经心灌流固定,取脑,再经4%戊二醛后固定24 h,利用0.1 mol/L PB液换洗3次,每次约10 min,琼脂糖包埋,利用振荡切片机进行冠状切片,厚50~80 μ m。剥离切片周围的琼脂糖,放入0.1 mol/L PB中储存备用,尽量在3d内将切片用完。

4. 免疫荧光染色

分别应用巢蛋白(Nestin, 干细胞标记物)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-deoxyuridine, BrdU, 标记增殖的细胞)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI, 标记细胞核)、GFAP以及collagen IV(标记血管基底膜)和墨汁灌注的方法显示小鼠血脑屏障的组成。脑片经0.1 mol/L PB漂洗后,室温下复温30 min,加一抗置4℃冰箱过夜(12 h以上)。弃掉一抗,0.1 mol/L PB漂洗3次,每次约5 min,加入相应的荧光二抗,避光置于摇床上孵育3 h,弃二抗, PB漂洗3次,每次约5 min。65%甘油封片。在异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)和罗丹明激发光下观察,摄片。最后用DAPI甘油(DAPI与65%甘油比例为1:8000, Roche公司, 10236276)封片。荧光显微镜下观察,摄片。同时选择结构典型染色较好的切片在激光扫描共焦显微镜(Olympus公司, FV10, Japan)下观察并摄片。

5. 电子显微镜标本制作和观察

按选取AD组和对照组小鼠,4%多聚甲醛和戊二醛混合液固定、取脑。选取脑室部位,浸泡于4%戊二醛中固定2~4 h。0.1 mol/L PB漂洗3次,1%锇酸后固定40~60 min。漂洗后,再经系列丙酮梯度脱水(50%、70%、80%、90%、95%、100%、

100%) 各 5 min, Epon812 浸脂约 3 h, 树脂包埋, 制成电子显微镜标本树脂块。切片, 在透射电子显微镜(日立 H-7500 型) 下进行观察并摄片。

6. 统计学处理

利用 Imag J 1.48u 图像处理软件, 分别选取模型组和对照组小鼠各 5 只, 选取大脑皮质部位测量脑血管的密度, 每只测量 5 张典型的脑片。测量的所有数据均采用 SPSS 13.0 统计学软件处理, 均值比较采用独立样本 t 检验。结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. BBB 的结构

BBB 主要由存在于脑实质内的毛细血管内皮细胞之间的紧密连接形成, 其次还包括围绕毛细血管内皮细胞的基底层、星形胶质细胞末梢和周细胞。图 1A、1B 利用墨汁灌注来显示脑血管。Nestin 标记的神经胶质细胞的足板紧贴在血管壁的外面, 构成了 BBB 的一部分; 图 1C、1D 为脑血管的超微结构, 图中显示血管内皮细胞的细胞核结构完整, 胞质内可见数量较多的线粒体等细胞器, 血管基底膜清晰完整。

2. BCSFB 的结构

CP 由 CPE 通过紧密连接构成 BCSFB 的主要部分。图 2A、2B 为胚龄 (embryonic day, E) 14 d (E14) 图 2C~2E 为 E18 CP 的基本形态结构, 该结构中毛细血管位于 CP 单链状结构的中部, 其外层为单层柱状 CP 上皮细胞, 两者之间有少量的结缔组织。出生后随日龄的增长 CP 逐渐形成由单链状结构盘曲缠绕而成的复链状结构。图 2F~2H 为出生后 (postnatal day, P) 7 d (P7) 图 2I~2K 为 P14 和 P30 CP 的基本形态结构, 图中清晰的显示此时期 CP 由单链状结构盘曲缠绕而成复链状结构, 该结构中毛细血管位于 CP 单链状结构的中部, 其外层为单层立方 CP 上皮细胞, 两者之间有少量的结缔组织。

3. AD 小鼠脑血管密度的改变

实验中我们首先采取墨汁灌注的方法观察大脑皮质部位 AD 模型组和对照组脑血管密度的差别。两组图片中可看到, 墨汁灌注标记的皮质区血管主干较粗直, 多数与大脑皮质表面垂直且相互平行排列, 其分支互相交织形成血管网(图 3)。通过统计数据我们可以看到, AD 模型组与对照组相比较, 血管密度明显降低 ($n = 25$ $t = 13.31$ $P < 0.01$)。

4. AD 小鼠 BBB 超微结构的改变

BBB 主要由存在于脑实质内的毛细血管内皮细胞之间的紧密连接形成, 其次还包括围绕毛细血

管内皮细胞的基底层、星形胶质细胞末梢和周细胞。我们观察到, 野生小鼠 BBB 的基底膜完整, 周细胞所包绕的血管内皮细胞只见到均匀的胞质, 未见细胞核(图 4A、4B); AD 小鼠 BBB 血管内皮细胞及其之间的紧密连接尚完整, 部分线粒体嵴消失, 甚至出现线粒体空泡化, 血管内皮细胞肿胀, 向管腔内突出, 血管管腔狭窄, 血管基底膜不清晰(图 4C~4F)。

5. 小鼠 BCSFB 的超微结构及其在 AD 中的改变

BCSFB 的结构为图 5A、5B、5G 所示, 即两侧由单层立方脉络丛上皮细胞构成, 两层脉络丛上皮细胞之间为以毛细血管为中心的脉络丛中央部, 这样的“三明治”样的脉络丛相互缠绕, 形成脉络丛结构。图 5G~5I 为 AD 小鼠脉络丛的基本结构。除了对照组所示的基本结构外, 图中出现了一些其他的结构, 主要有包括扩张的细胞间隙, 次级溶酶体, 异质材料的囊泡, 和透明材料的小囊泡等结构。与对照组相比, AD 小鼠脉络丛超微结构最明显的变化是细胞间隙明显增宽, 细胞之间的黏附连接等连接结构也有部分碰坏, 胞质内出现较多的囊泡状结构等。

讨 论

BBB 和 BCSFB 是血液和脑细胞外液之间最大的两个屏障, 它们通过复杂的形态学结构, 包括内皮细胞连接和上皮细胞的紧密连接, 分别阻止极性分子的自由扩散。CNS 的正常功能取决于必需分子的不断供应, 如血液中的葡萄糖和氨基酸, 脑细胞外液和血液之间的电解质交换, 以及有效去除脑 CSF 的代谢废物和过量的神经递质。因此, BBB 和 BCSFB 这两个屏障的结构完整对于维持其正常生理功能至关重要。

BBB 除保护大脑免受各种血浆溶质和可能干扰神经传递的血源物质的影响外, 还可调控血液和 ISF 之间的营养物质、代谢废物、信号分子和离子的交换。BBB 的核心结构是脑实质的毛细血管内皮细胞之间形成的紧密连接以及围绕其周围由周细胞形成的基底膜和星形胶质细胞末梢。人脑中毛细血管的总长度约为 600 km, 毛细血管表面积约为 20 m^2 ^[16]。事实上, 几乎每一个神经元都有自己的毛细血管灌注, 除了小的亲脂性分子如 O_2 和 CO_2 等可沿着浓度梯度自由扩散通过内皮细胞, 其他血液分子通过 BBB 进入细胞外液需要特定的转运蛋白或受体系统的存在。例如, 葡萄糖和氨基酸通过特定的转运蛋白进入大脑细胞外液, 而一些分子如胰岛素、瘦素和转铁蛋白通过受体介导的胞吞作用转运^[17, 18]。类似的机制也适用于脑细胞代谢产物的

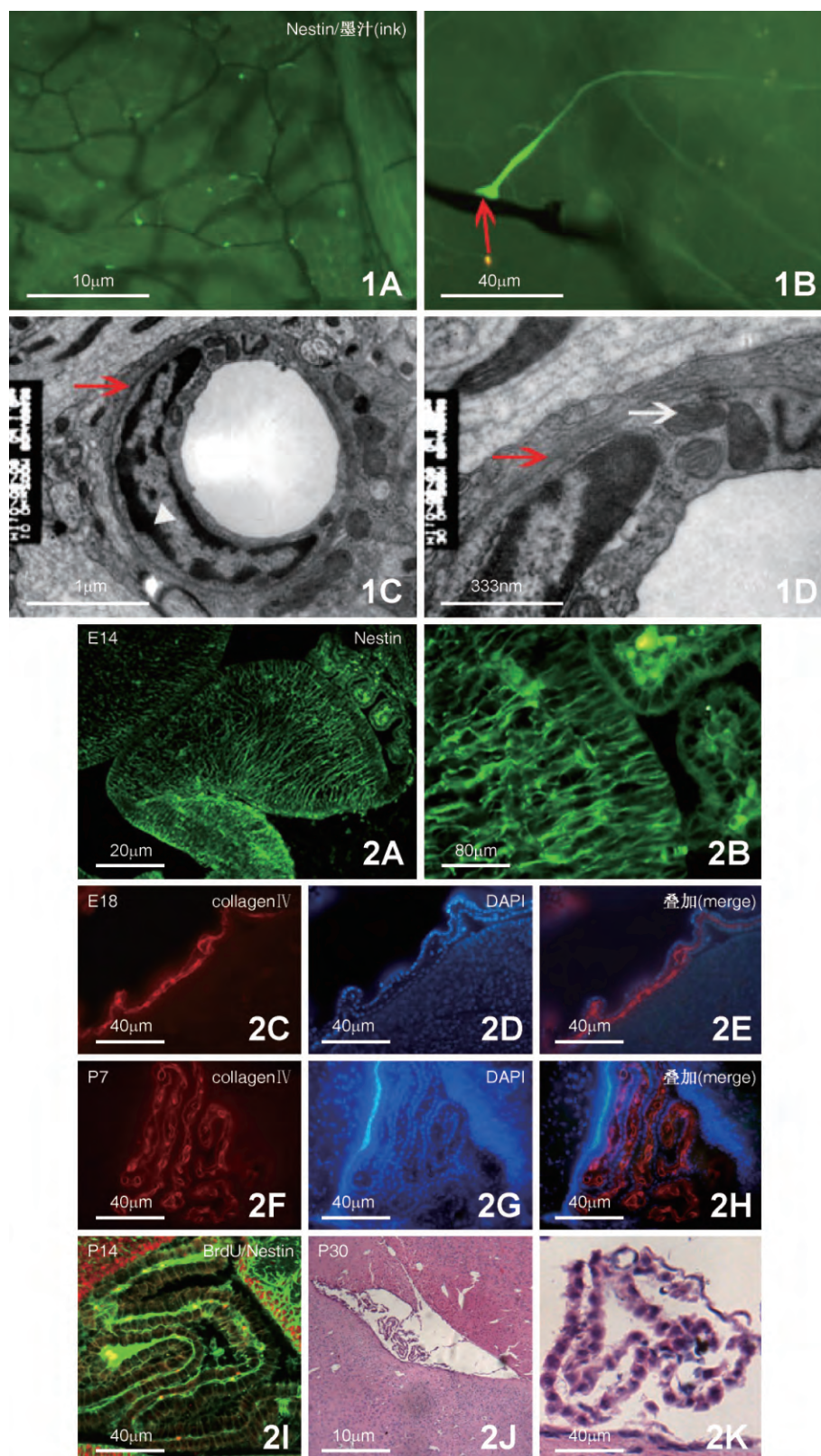


图1 BBB 的结构

A、B. 免疫荧光染色及墨汁灌注, Nestin 标记的神经胶质细胞的足板紧贴在血管壁的外面(红色↑); C、D. 透射电子显微镜下显示结构完整的血管内皮细胞的细胞核(△) 胞质内的线粒体(白色↑) 血管基底膜(红色↑); A. 标尺示 10 μm; B. 标尺示 40 μm; C. 标尺示 1 μm; D. 标尺示 333 nm

图2 BCSFB 的结构

A、B. 为 E14 Nestin 标记的脉络丛的基本形态结构, B 为 A 局部放大; C ~ E. 为 E18 collagen IV 和 DAPI 标记的脉络丛的基本形态结构, collagen IV 标记毛细血管(红色), DAPI 标记单层柱状脉络丛上皮细胞(蓝色); F ~ H. 为 P7 collagen IV 和 DAPI 标记的脉络丛的基本形态结构; I ~ K. 为 P14 和 P30 BrdU、Nestin 标记的和 HE 染色的脉络丛的基本形态结构; A ~ I. 免疫荧光染色; J、K. HE 染色; A. 标尺示 20 μm; B. 标尺示 80 μm; C ~ I、K. 标尺示 40 μm; J. 标尺示 10 μm

Fig. 1 The structure of BBB

A, B, Immunofluorescent staining and instillation of ink, Nestin-marked glial cells have footplates that cling to the outside of the blood vessel wall (red ↑); C, D, Structured intact vascular endothelial cell nucleus (△), cytoplasmic mitochondria (white ↑), vascular basement membrane (Red ↑) by transmission electron microscope technology; A, Bar = 10 μm; B, Bar = 40 μm; C, Bar = 1 μm; D, Bar = 333 nm

Fig. 2 The structure of BCSFB

A and B show the basic morphological structure of the choroid plexus of the embryonic day 14 (E14) labeled by the Nestin, and Fig. B shows the partial magnified view of Fig. A; C-E show the basic morphological structure of the choroid plexus of the embryonic day 18 (E18) marked by the collagen IV and DAPI, and the collagen IV is the marker of capillary (red), DAPI is the marker of the monolayer columnar choroid plexus epithelium (blue); F-H are the basic morphological structure of choroid plexus labeled by collagen IV and DAPI at 7 days after birth (P7); I-K are 14 days after birth (P14) and the basic morphological structure of BrdU, Nestin-tagged, and HE-stained choroid plexus 30 days after birth (P30); A-I, Immunofluorescent staining; J, K, HE staining; A, Bar = 20 μm; B, Bar = 80 μm; C-I, K, Bar = 40 μm; J, Bar = 10 μm

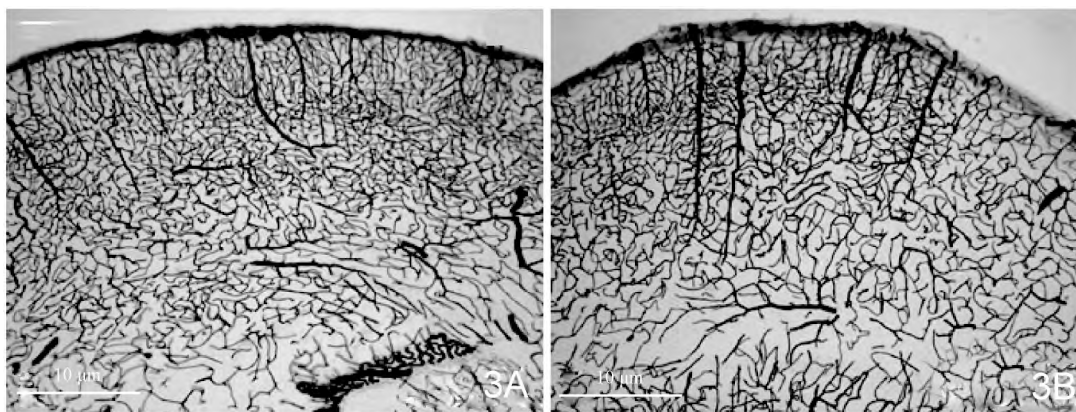


图3 AD小鼠脑血管密度的变化 墨汁灌注 标尺示 10 μm

A. 对照组; B. AD模型组, 大脑皮质血管分布与对照组比较, 血管密度明显降低($P < 0.05$)

Fig. 3 Changes of cerebral vascular density in AD mice Instillation of ink Bar = 10 μm

A, Control group; B, AD model group, AD model group shows the distribution of blood vessels in cerebral cortex of AD model rats; Compared with the wild type mice, the vascular density is significantly reduced($P < 0.05$)

转运,例如谷氨酰胺和 $A\beta$ 等的排出^[19]。所有这些屏障结构都含有各种肽酶和胆碱酯酶等。因此,任何生物分子,包括主动转运的 $A\beta$,必须克服若干物理和酶屏障,以便从血液到脑实质穿过 BBB,反之亦然^[20]。AD 患者或者小鼠其 BBB 结构可能已经发生了病理性改变。我们实验结果可见,AD 小鼠血管周细胞和内皮细胞及其之间的紧密连接尚完整,部分线粒体嵴消失,甚至出现线粒体空泡化,血管内皮细胞肿胀,向管腔内突出,血管管腔狭窄,血管基底膜模糊不清。AD 小鼠部分 BBB 的血管基底膜模糊不清,屏障作用减弱,而这些结构的改变可部分解释 AD 患者 BBB 通透性改变,从而使脑细胞微环境发生改变,进而出现相应的临床表现^[21-22]。另外,内皮细胞、周细胞相互作用对于形成和维持 BBB 至关重要^[23-24]。AD 的发生与线粒体功能障碍有关,而本实验室的 AD 小鼠血管周细胞和内皮细胞胞质中的部分线粒体嵴消失,甚至出现线粒体空泡化,这些线粒体的改变会严重影响其功能。线粒体主要功能是提供细胞代谢及物质转运所需的能量,线粒体功能的改变同样会严重影响血液和 ISF 之间的营养物质、代谢废物、信号分子和离子的交换。进一步,会影响神经细胞的功能,可能与 AD 的

发生相关。

BCSFB 主要由 CP 上皮细胞形成。CP 是 1 个高度血管化的结构,悬挂在脑室内,并含有单层的 CPE。这些 CPE 构成 BCSFB 的主要部分。CP 在胚胎发生早期就开始发育,并在妊娠的第 1 周内已经构成功能屏障^[25-26]。在这种屏障形成之前,衬在脑室壁上的神经内膜细胞通过带状结合连接,阻止大分子进入脑实质。构成 BCSFB 的 CPE 通过紧密连接彼此结合,位于脉络丛的表面,可阻止生物大分子和细胞直接进入 CSF 中。CP 超微结构显示,上皮细胞含有许多线粒体,高尔基体,平滑的内质网和溶酶体样囊泡,表明它是一个具有很强合成能力的结构。CP 的主要功能是产生 CSF^[27]。CSF 是一种透明的、稍黏稠的液体,细胞少,蛋白质浓度比血液低约 10 倍。成年人脑室内含有大约 150 ml CSF,并且每天更新 3~4 次,证明 CP 上皮具有较强的分泌能力。CSF 有几个既定功能:保护大脑免受机械损伤和血压变化的影响,运输各种分子进出整个 CNS,促进毒素和废物的清除^[28]。解剖学、生理学、生物化学和免疫学研究显示,CP 参与 AD 的发病或进展^[29]。在 AD 中 CP 上皮萎缩显著,与同龄的对照相比,细胞高度降低了 22%,与新生儿相比降低了

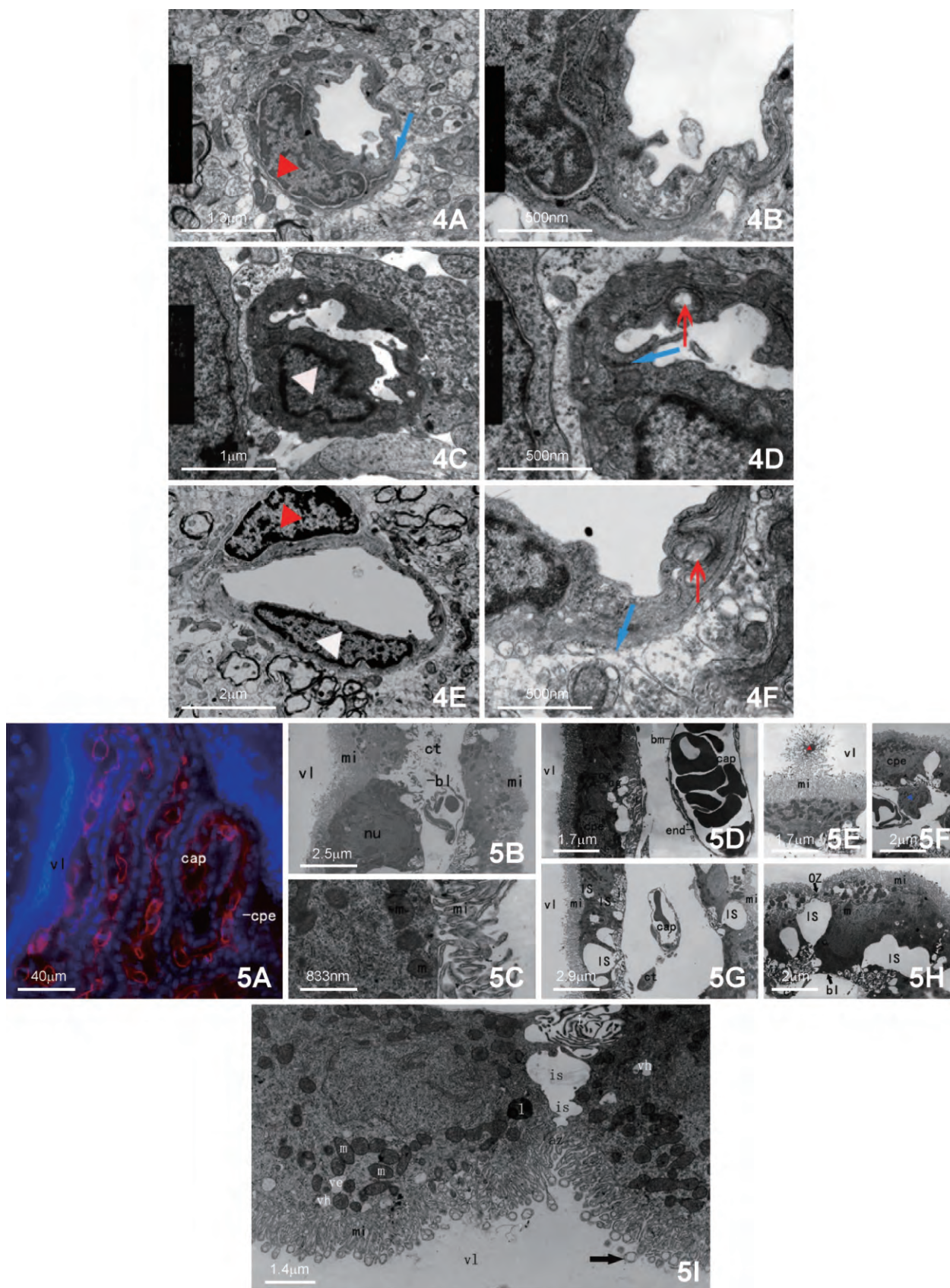


图4 AD小鼠BBB超微结构的改变 透射电子显微镜

A、B为野生小鼠血脑屏障的基本结构,图B为图A局部放大,图中清晰的显示血管周细胞(红色△)及其形成的血管基底膜(蓝色↑);C~F为AD小鼠血脑屏障的基本结构,图D为图C的局部放大,图F为图E的局部放大,图中显示血管周细胞(红色△)和内皮细胞(白色△)及其之间的紧密连接(蓝色↑);A.标尺示1.3 μm;C.标尺示1.0 μm;E.标尺示2 μm;B、D、F.标尺示500 nm

图5 小鼠BCSFB的超微结构及其在AD小鼠中的改变

A~F.野生小鼠;G~I. AD小鼠;A.免疫荧光染色;B~I.透射电子显微镜;cpe.脉络丛内皮细胞;cap.毛细血管;vl.脑室腔;end.血管内皮;bm.毛细血管基底膜;mi.微绒毛;nu.细胞核;m.线粒体;i.基底部纤维交叉;bl.基底层;ct.结缔组织;oz.脉络膜细胞的顶端部分阻塞区;图E、F

中(红色和蓝色△)所示的分别为脉络丛从外和从内的巨噬细胞;is.扩张的细胞间隙;1.次级溶酶体;vh.异质材料的囊泡;ve.透明材料的小囊泡;↑.微绒毛表面出现大量的分泌泡;A.标尺示40 μm;B.标尺示2.5 μm;C.标尺示833 nm;D、E.标尺示1.7 μm;F.标尺示2 μm;G.标尺示2.9 μm;H.标尺示2 μm;I.标尺示1.4 μm

Fig.4 Changes in the ultrastructure of BBB in AD mice Transmission electron microscope

A、B, The basic structure of the blood-brain barrier in wild mice, B shows a partial enlargement of figure A; It clearly shows perivascular cells (red △) and the vascular basement membrane they form (blue ↑); C-F, The basic structure of the blood-brain barrier in AD mice; D, Partial enlargement of figure C; F, Partial enlargement of figure E, showing perivascular cells (red △) and endothelial cells (white △) and their closeness connection (blue ↑); A, Bar = 1.3 μm; C, Bar = 1.0 μm; E, Bar = 2 μm; B, D, F, Bar = 500 nm

Fig.5 Ultrastructure of mouse BCSFB and its changes in AD mice

A-F, Wild type mice; G-I, AD mice; A, Immunofluorescent staining; B-I, Transmission electron microscope; cpe, Choroid plexus endothelial cells; V1, Capillaries, ventricular cavity; end, Endothelium; bm, Capillary basement membrane; mi, Microvilli; nu, Nuclei; m, Mitochondria; i, Basal fiber crossover; bl, Basal lamina; ct, Connective tissue; oz, Choriogon cell apical obstruction zone; The macrophages from the outer and inner parts of the choroid plexus are shown in Figures E and F (red and blue △), respectively; is, Structures such as expanded intercellular spaces; 1, Secondary lysosomes; vh, Vesicles of heterogeneous materials; ve, Small vesicles of transparent materials; A large number of secretory vacuoles appear on the microvilli surface (↑); A, Bar = 40 μm; B, Bar = 2.5 μm; C, Bar = 833 nm; D, E, Bar = 1.7 μm; F, Bar = 2 μm; G, Bar = 2.9 μm; H, Bar = 2 μm; I, Bar = 1.4 μm

30%^[30];上皮细胞含有许多空泡和包含体。我们观察到BCSFB病理性结构的改变,例如细胞间隙明显增宽,细胞之间的黏附连接等连接结构也有部分破坏,胞质内出现较多的囊泡状结构等。BCSFB的这些结构的改变,会使脑脊液的成分发生相应的变化,从而使得脑细胞的微环境改变,进而出现相应的临床表现。

总之, BBB和BCSFB在脑内微环境的稳态中起着关键的作用,它们的结构完整性对CNS的生理和病理功能有重要影响。与正常小鼠相比较,AD小鼠BBB和BCSFB的超微结构发生了某些变化(部分线粒体嵴消失,甚至出现线粒体空泡化,血管基底膜不清晰以及脉络丛上皮细胞间隙明显增宽,细胞之间的黏附连接等结构部分破坏等)。通过观察超微结构的变化,可能会有利于AD的早期诊断;在诊断明确后,可及早进行干预,着眼于恢复BBB和BCSFB的功能,有助于AD的治疗。

参 考 文 献

- [1] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329-344.
- [2] Alonso Vilatela ME, López-López M, Yescas-Gómez P. Genetics of Alzheimer's disease [J]. *Arch Med Res*, 2012, 43(8): 622-631.
- [3] Kim DH, Yeo SH, Park JM, et al. Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Gene*, 2014, 545(2): 185-193.
- [4] Steinberg S, Stefansson H, Jonsson T, et al. Loss-of-function variants in ABCA7 confer risk of Alzheimer's disease [J]. *Nat Genet*, 2015, 47(5): 445-447.
- [5] Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, et al. Meta-analysis of 74046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1452-1458.
- [6] Zuroff L, Daley D, Black KL, et al. Clearance of cerebral Aβ in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(12): 2167-2201.
- [7] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(1): 13-25.
- [8] Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function [J]. *Nature*, 2011, 477(7362): 90-94.
- [9] Liu YJ, Guo DW, Tian L, et al. Peripheral T cells derived from Alzheimer's disease patients overexpress CXCR2 contributing to its transendothelial migration, which is microglial NF-α-dependent [J]. *Neurobiol Aging*, 2010, 31(2): 175-188.
- [10] Gosselet F, Saint-Pol J, Candela P, et al. Amyloid-beta peptides, Alzheimer's disease and the blood-brain barrier [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2013, 10(10): 1015-1033.
- [11] Spector R, Keep RF, Robert SS, et al. A balanced view of choroid plexus structure and function: focus on adult humans [J]. *Exp Neurol*, 2015, 267: 78-86.
- [12] Chabot S, Zetterberg H, Blennow K, et al. Blood-cerebrospinal fluid barrier permeability in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 25(3): 505-515.
- [13] Krzyzanowska A, Carro E. Pathological alteration in the choroid plexus of Alzheimer's disease: implication for new therapy approaches [J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 75.
- [14] Silverberg GD, Mayo M, Saul T, et al. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis [J]. *Lancet Neurol*, 2003, 2(8): 506-511.
- [15] Gonzalez-Marrero I, Gimenez-Llort L, Johanson CE, et al. Choroid plexus dysfunction impairs beta-amyloid clearance in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 17.
- [16] Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier [J]. *Prog Drug Res*, 2003, 61: 39-78.
- [17] Pardridge WM, Eisenberg J, Yang J. Human blood-brain barrier insulin receptor [J]. *J Neurochem*, 1985, 44(6): 1771-1778.
- [18] Zhang Y, Pardridge WM. Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier [J]. *J Neurochem*, 2001, 76(5): 1597-1600.
- [19] Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders [J]. *Neuron*, 2008, 57(2): 178-201.

- [20] Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease [J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(5): 648-672.
- [21] Zhong Z, Deane R, Ali Z, et al. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration [J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11(4): 420-422.
- [22] Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging [J]. *Neuron*, 2010, 68(3): 409-427.
- [23] Daneman R, Zhou L, Kebede AA, et al. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis [J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 562-566.
- [24] Li F, Lan Y, Wang Y, et al. Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with Notch [J]. *Dev Cell*, 2011, 20(3): 291-302.
- [25] Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, et al. Development of the choroid plexus [J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(1): 5-20.
- [26] Saunders NR, Daneman R, Dziegielewska KM, et al. Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 742-752.
- [27] Speake T, Whitwell C, Kajita H, et al. Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus [J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(1): 49-59.
- [28] de Lange EC. Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 56(12): 1793-1809.
- [29] Bergen AA, Kaing S, ten Brink JB, et al. Gene expression and functional annotation of human choroid plexus epithelium failure in Alzheimer's disease [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 956.
- [30] Serot JM, Béné MC, Foliguet B, et al. Morphological alterations of the choroid plexus in late-onset Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2000, 99(2): 105-108.

(编辑 张立克)

《解剖学报》可以直接使用的英文缩略词

一、以下词汇在文中首次出现时可直接用英文缩略词

CT(计算机 X 线断层摄影术)	MRI(磁共振成像)
DAB(二氨基联苯胺)	MTT(四甲基偶氮唑盐)
DMEM(缓冲液培养基)	OCT(包埋剂)
DMSO(二甲基亚砷)	PB(磷酸缓冲液)
DNase(脱氧核糖核酸酶)	PBS(磷酸盐缓冲液)
ECL(增强型化学发光法)	PBST(磷酸盐吐温缓冲液)
EDTA(乙二胺四乙酸)	PVDF (聚偏二氟乙烯)
ELISA(酶联免疫吸附测定)	RT-PCR(反转录-聚合酶链反应)
FITC(异硫氰酸荧光素)	SDS-PAGE (SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)
GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶)	TBST(三乙醇胺缓冲盐水)
GFAP(胶质纤维酸性蛋白)	TRITC(四甲基异硫氰酸罗丹明)
HRP(辣根过氧化物酶)	TUNEL(原位缺口末端标记)

二、以下词汇在论文中首次出现时应注明中文全称 括号内直接写英文缩略词

白细胞介素(IL)	扫描电子显微镜 (SEM)
β 样淀粉蛋白 (A β)	神经生长因子(NGF)
表皮生长因子(EGF)	46-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)
成纤维细胞生长因子(FGF)	胎牛血清(FBS)
多巴胺 (DA)	透射电电子显微镜 (TEM)
N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)	5-羟色胺 (5-HT)
干扰素- γ (IFN- γ)	5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)
链霉菌素-过氧化物酶法 (SP)	血管内皮生长因子(VEGF)
牛血清蛋白(BSA)	一氧化氮合酶(NOS)
亲和素-生物素过氧化物酶体系 (ABC)	转化生长因子- β (TGF- β)

三、其他在论文中首次出现的专业词汇应执行稿约规定 即中文全称(英文全称 缩略词)