

大鼠海马内注射 β 淀粉样蛋白诱导外周血 T 细胞 MIP-1 α 过表达及其穿过血脑屏障*

郭大文 马怡然 方文刚 陈誉华**

(中国医科大学基础医学院发育生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 为观察脑内 β 淀粉样蛋白 (amyloid beta, A β) 沉积对外周血 T 细胞穿过血脑屏障的影响, 通过立体定位仪将 A β_{1-42} 肽注射到大鼠双侧海马 (以 A β_{42-1} 反序列肽为对照), 实时定量 PCR (RT-qPCR) 检测发现, A β_{1-42} 上调了外周血 T 细胞中巨嗜细胞炎症蛋白 (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α) 的表达, 同时免疫荧光分析显示, 脑内的 A β_{1-42} 也引起了脑微血管内皮上 MIP-1 α 受体 (CCR5) 的表达增加, 以及伴随的脑实质内 T 细胞数量的增加. 然而, 大鼠腹腔内注射抗 MIP-1 α 中和抗体则阻断了 A β_{1-42} 所致的脑内 T 细胞数量的增加. 提示脑内 A β 沉积能诱导外周血 T 细胞 MIP-1 α 依赖性迁移入脑.

关键词 阿尔茨海默病, β 淀粉样蛋白, MIP-1 α , T 细胞, 血脑屏障

学科分类号 R741

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一个与年龄相关的神经系统退行性疾病. 尽管其发病机制至今尚不清楚, 但遗传学和生物化学研究结果表明, β 淀粉样蛋白 (amyloid beta, A β) 的过度生成和清除障碍在 AD 发病过程中起中心作用^[1]. 脑内高度聚集状态的 A β 沉积将活化小胶质细胞 (microglia) 引起先天性免疫应答^[2]. 这种由小胶质细胞介导的免疫性炎症反应是否需要外周血 T 细胞参与, 一直是研究者关注的问题. 尸检发现, AD 患者脑实质内 T 细胞数量显著高于同龄对照人群和其他类型的痴呆患者^[3], 但外周血 T 细胞穿过血脑屏障进入脑内的机制尚不清楚. 我们前期工作发现, AD 患者外周血 T 细胞过表达巨嗜细胞炎症蛋白 (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α), 体外研究证实, MIP-1 α 与 T 细胞穿过血脑屏障模型——人脑微血管内皮细胞 (human brain microvascular endothelial cell, HBMEC) 有关. 本文将 A β_{1-42} 立体定位注射至大鼠海马, 建立 A β 在脑内沉积的动物模型, 旨在进一步研究 MIP-1 α 与外周血 T 细胞穿过血脑屏障的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物和细胞. 成年雄性 Wistar 大鼠, 体重

250 ~ 270 g, 由中国医科大学实验动物部提供. HBMEC 由美国 Johns Hopkins 大学医学院 Kim 教授惠赠.

1.1.2 主要试剂及仪器. A β_{1-42} 、A β_{42-1} 、兔抗 A β_{1-42} 抗体 (Anaspec 公司), 兔抗 MIP-1 α 抗体 (PeproTech 公司), 磁分选器和分离大鼠 T 细胞的免疫磁珠及抗体 (R&D 公司), 小鼠抗 CD3 单克隆抗体 (BD 公司), 羊抗 CCR5 多克隆抗体、牛抗兔 IgG-TRITC (Santa Cruz 公司), 兔抗 VWF 多克隆抗体 (Abcam 公司), 羊抗小鼠 IgG-TRITC 和兔抗羊 IgG-FITC (中杉金桥公司), Trizol (Gibco 公司), 反转录酶 AMV (Promega 公司), T4 DNA 连接酶、ExTaq RT-PCR 试剂 (TaKaRa 公司), pUCmT 载体 (上海生工生物技术公司), MIP-1 α 、GAPDH 的引物及 Taqman 探针由上海生工生物技术公司合成. ABI Prism7000 (Applied Biosystem 公司).

1.2 方法

1.2.1 聚集态 A β_{1-42} 的制备. 参照 Jantarantotai 等^[4]

*教育部跨世纪人才基金 (2002 教技函 48 号), 教育部博士点基金 (20040159002) 和辽宁省科技厅资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 024-23260246, 024-23256666-5019

E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

收稿日期: 2006-03-17, 接受日期: 2006-08-29

的方法: Aβ_{1~42} 全长肽和 Aβ_{42~1} 反序列全长肽溶于灭菌 0.1 mol/L PBS (pH 7.4), 终浓度为 500 μmol/L. 37℃ 保温 24 h, 转变为聚集态 Aβ_{1~42} 和 Aβ_{42~1}, 分装, 冻存于 -20℃.

1.2.2 海马定位注射. 实验大鼠随机分为 Aβ_{1~42} 组 ($n = 12$)、Aβ_{42~1} 组 ($n = 6$) 和 PBS 组 ($n = 6$). 以 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 用脑立体定位仪取平颅头位固定大鼠, 参照 Paxinos 和 Watson 的《大鼠脑立体定位图谱》, 定位前囟后 4.0 mm, 中线旁 3.0 mm, 颅骨表面下 3.1 mm 为双侧海马背侧注射点, 用 10 μl 微量注射器 5 min 内缓慢注入 Aβ_{1~42}、Aβ_{42~1} 或 PBS, 每侧 2.5 μl, 予以留针 10 min. Aβ_{1~42} 组又随机分为 3 组: Aβ_{1~42} 组 ($n = 6$), 仅注射 Aβ_{1~42}; Aβ_{1~42} + 中和抗体组 ($n = 3$), 分别于 Aβ_{1~42} 注射后第 1、4 天腹腔注射 1 ml 兔抗 MIP-1α 抗体 (150 mg/L); Aβ_{1~42} + 同型 IgG 组 ($n = 3$), 分别于 Aβ_{1~42} 注射后第 1、4 天腹腔注射 1 ml 兔 IgG (150 mg/L).

1.2.3 取材. 海马注射后第 7 天, 大鼠腹腔麻醉, 心脏采血 5 ml, 肝素抗凝. 用肝素化生理盐水及预冷 4% 多聚甲醛经左心室 - 升主动脉灌注固定. 立即取脑, 置 4% 多聚甲醛中, 固定 2~4 h, 置于 30% 蔗糖溶液, 待沉底后冰冻切片机切片. 从双侧海马注射针孔两侧行连续冠状切片, 片厚 10 μm, 隔 6 取 1, 连续取 10 张. 晾干后 -70℃ 保存.

1.2.4 免疫荧光. 切片经 0.4% Triton X-100 透化、10% BSA-PBS 封闭, 分别与 1% BSA-PBS 稀释的如下一抗 4℃ 孵育过夜: 兔抗 Aβ_{1~42} 抗体 (1 : 100), 小鼠抗 CD3 抗体 (1 : 100), 羊抗 CCR5 (1 : 100)/兔抗 VWF (1 : 5 000) 混合抗体, 再分别与如下荧光标记二抗室温孵育 1 h: 牛抗兔 IgG-TRITC (1 : 100), 羊抗小鼠 IgG-TRITC (1 : 100), 兔抗羊

IgG-FITC (1 : 100)/牛抗兔 IgG-TRITC (1 : 100) 混合抗体, 最后用 DAPI (1 : 1 000, 甲醇稀释) 复染细胞核. 甘油封片, 荧光显微镜观察. 两人双盲法计数 CD3 阳性细胞数, 每只鼠数 10 张切片, 均值代表每只鼠的 T 细胞数.

1.2.5 实时定量 PCR (RT-qPCR) 检测 MIP-1α 和 CCR5. 用免疫磁珠分选大鼠外周血 T 淋巴细胞, 操作按说明进行. 按 Trizol 试剂说明提取 T 细胞总 RNA, 测定并计算总 RNA 浓度. 反转录体系总体积 20 μl, 含 4 μl 5 × AMV 缓冲液, 3 μl 总 RNA (约 1.8~3.5 μg), 1 μl AMV (20 U/μl), 0.8 μl RNasin (50 U/μl), 1 μl 随机引物 (200 μmol/L), 6 μl dNTPs (各 2.5 mmol/L), 以去离子水补足体积. 反应条件为 42℃ 45 min, 95℃ 5 min. cDNA 于 -20℃ 冻存. RT-qPCR 采用相对定量的 Taqman 探针法, 以 GAPDH 作为归一化 MIP-1α 和 CCR5 的持家基因. 分别用 pUCmT 载体构建含 GAPDH、MIP-1α 和 CCR5 cDNA 的重组质粒. 引物及 Taqman 探针按 Beacon Designer 3.0 软件设计, 序列见表 1. RT-qPCR 在 ABI 7000 上进行, 反应总体积为 25 μl, 含 5 μl 5 × 实时定量缓冲液, cDNA/质粒 1 μl, 上、下游引物各 0.5 μl (10 μmol/L), ExTaq 酶 0.25 μl (5 U/μl), dNTPs 0.75 μl (各 10 mmol/L), Mg²⁺ 0.5 μl (250 mmol/L), Taqman 探针 0.5 μl (10 μmol/L). PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 15 s, 64℃ 40 s, 40 次循环. 以系列稀释的重组质粒为模板标准品绘制标准曲线, 根据 C_t (threshold cycle) 值求得每个标本的初始模板数. 以 “目的基因初始模板数 / GAPDH 初始模板数” 比值代表每个标本目的基因的 mRNA 表达水平的相对量.

Table 1 Primers and probes for MIP-1α and CCR5 detection by RT-qPCR

Target	Amplicon length/bp	Oligonucleotide sequence, 5'~3', forward, probe, reverse	Nucleotide position	GenBank Accession No.
Rat MIP-1α	123	GCTCTGGAACGAAGTCTTCTC	117~137	NM_013025
		CCCGACTGCCTGCTGCTCTCC	159~180	
		CAAAGCTGCTGGTCTCAAA	220~239	
Rat CCR5	152	GGACTGAATAATTGCAGTAGTTC	872~894	NM_053960
		CGGAACCTTCTCCCCAACAAAGGCA	970~993	
		TGTTTTCGGAAGAACACAGAG	1003~1023	
Rat GAPDH	195	CCCTTCATTGACCTCAACTACA	949~970	NM_017008
		ACCCACGGCAAGTTCAACGGC	997~1017	
		GCCAGTAGACTCCACGACATA	1123~1143	

1.2.6 蛋白质印迹 (Western blot) 检测 CCR5 表达. HBMEC 培养于 Nu-1640 培养液(RPMI1640 +10% FBS + 10% Nu- 血清 + 非必需氨基酸 + MEM 维生素), 待细胞形成单层后, 分别加入 $A\beta_{1\sim42}$ 和 $A\beta_{42\sim1}$ (125 nmol/L), 继续培养 2 h, 收获细胞. 用冰冷 PBS 洗细胞, 裂解, 上样于 10% SDS-PAGE, 转印于 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭, 与兔抗 CCR5 抗体 4℃孵育过夜,再与 HRP 标记的羊抗兔抗体室温孵育 1 h, 最后进行 ECL 显色. 以 GAPDH 作为内对照.

1.2.7 统计学分析. 实验结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 利用 SPSS 11.0 对组间比较进行 t 检验.

2 结 果

2.1 大鼠海马内注射 $A\beta_{1\sim42}$ 上调了外周血 T 细胞中 MIP-1 α 的表达

我们前期研究发现, AD 病人外周血 T 细胞中 MIP-1 α 的表达量显著高于同龄对照人群. 由于病人脑内 $A\beta$ 的沉积被视为 AD 发病的中心环节, 因此我们探讨外周血 T 细胞中 MIP-1 α 的表达是否与 $A\beta$ 有关. 结果显示, 当 $A\beta_{1\sim42}$ 注射到大鼠的海马后, 沉积在海马区(图 1a), 在注射后的第 7 天显著诱导了外周血 T 细胞表达 MIP-1 α , 为 $A\beta_{42\sim1}$ 组的 3.5 倍 ($P < 0.01$, 图 1b). 相反, 存在于大鼠脑内的

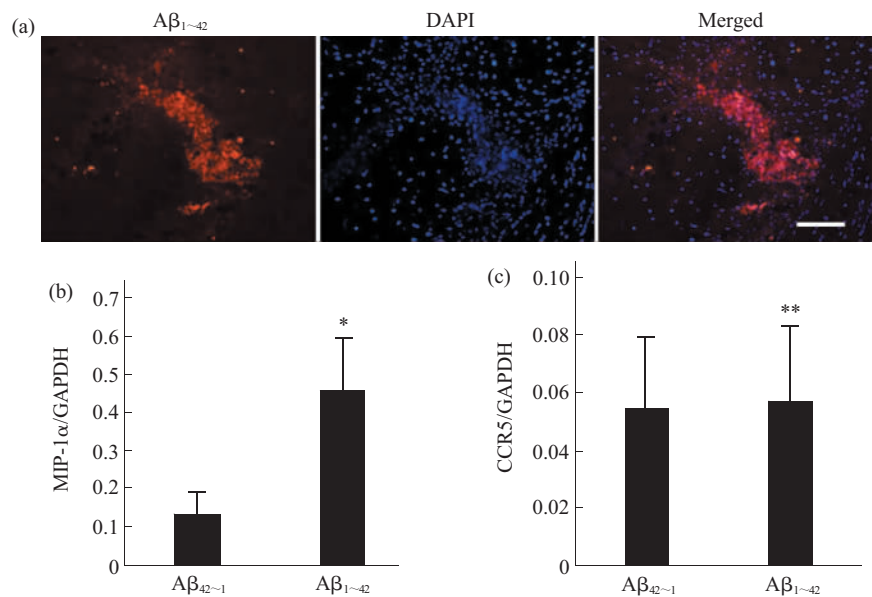


Fig. 1 $A\beta_{1\sim42}$ deposits in hippocampus and expression of MIP-1 α and CCR5 in rats' peripheral blood T cells

(a) $A\beta$ immunofluorescence (red) in hippocampus at 7 days following injection of $A\beta_{1\sim42}$. Bar: 100 μ m. (b), (c) Real-time-qPCR analysis for MIP-1 α (b) and CCR5 (c) expression in rats' peripheral T cells using GAPDH for normalization. * $P < 0.01$ vs $A\beta_{42\sim1}$, ** $P > 0.05$ vs $A\beta_{42\sim1}$.

$A\beta_{1\sim42}$ 并没有上调外周血 T 细胞膜上 CCR5 受体的表达(图 1c, $P > 0.05$). 这提示脑内 $A\beta$ 的沉积可特异性地上调外周血 T 细胞表达 MIP-1 α .

2.2 $A\beta_{1\sim42}$ 上调了脑微血管内皮细胞中 CCR5 的表达

CCR5 是趋化因子 MIP-1 α 的受体, 它主要表达于不同亚群的白细胞. 我们在体外试验中用 $A\beta_{1\sim42}$ 刺 HBMEC, 发现 $A\beta_{1\sim42}$ 可以诱导人脑微血管内皮细胞表达 CCR5 (图 2a). 为研究脑内 $A\beta$ 的沉积与脑内皮细胞 CCR5 表达的关系, 我们将

$A\beta_{1\sim42}$ 注射到大鼠的海马, 结果显示, 大鼠脑内有大量的脑微血管内皮细胞表达 CCR5, 而注射 $A\beta_{42\sim1}$ 的对照组很少发现有脑微血管内皮细胞表达 CCR5(图 2b).

2.3 大鼠海马内注射 $A\beta_{1\sim42}$ 诱导了 MIP-1 α 依赖性的 T 细胞迁移入脑

为研究 $A\beta_{1\sim42}$ 注射到大鼠海马后所引起的外周血 T 细胞中 MIP-1 α 的表达上调是否与 T 细胞迁移入脑有关, 我们试图去鉴定脑实质中的 CD3⁺ T 细胞. 如图 3 所示, 注射 $A\beta_{1\sim42}$ 的大鼠脑内可观察

到一定数量的 T 细胞, 显著高于 $A\beta_{42-1}$ 对照组 ($P < 0.01$), 这些 T 细胞主要分布在大脑皮质深部和海马区. 腹腔内注射 MIP-1 α 的中和抗体后, 脑

内 T 细胞数量减少, 而注射同型 IgG 则对 $A\beta_{1-42}$ 引起的 T 细胞增多无影响 (图 3).

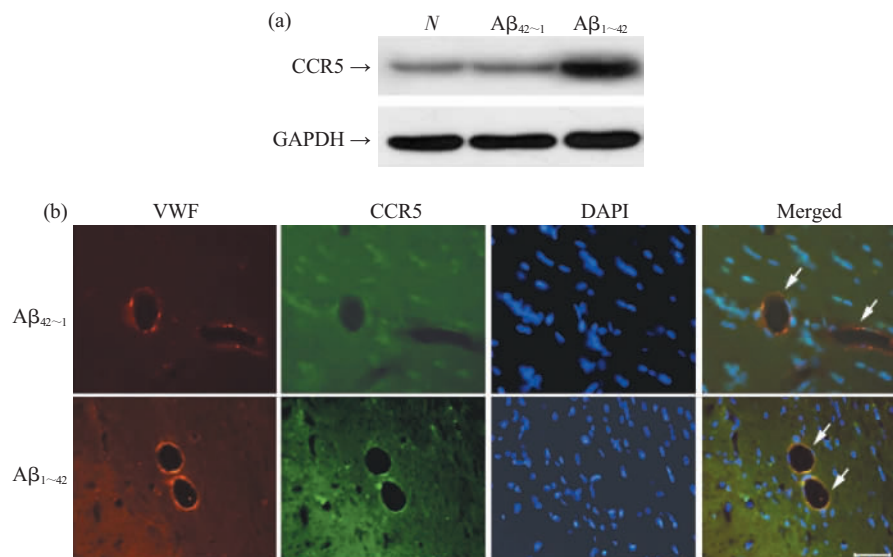


Fig. 2 Up-regulated CCR5 expression on microvascular endothelia cells induced by $A\beta_{1-42}$

(a) The expression levels of CCR5 in HBMECs exposed to $A\beta_{1-42}$ or $A\beta_{42-1}$ were measured by Western blot. N: untreated HBMECs. (b) Double immunolabeling for VWF (red) and CCR5 (green) was performed on the brain cryosections from $A\beta_{1-42}$ or $A\beta_{42-1}$ injected rats 7 days post-injection. Merged images show lower expression of CCR5 on microvascular endothelia cells in $A\beta_{42-1}$ -injected brains and higher expression in $A\beta_{1-42}$ -injected brains (white arrow). Bar: 80 μ m.

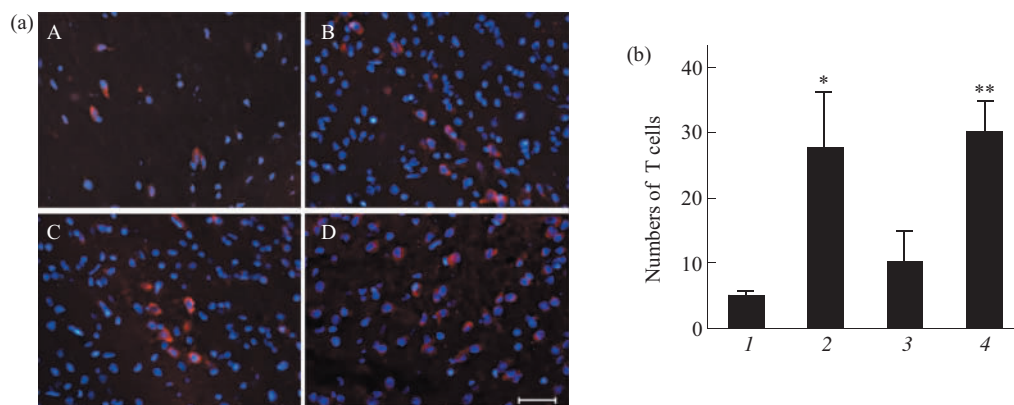


Fig. 3 T cells migration across blood brain barrier of $A\beta_{1-42}$ -injected rats was blocked by neutralizing antibody specific for MIP-1 α

(a) Immunostaining for CD3 (red) was performed on the brain cryosections from (A) $A\beta_{42-1}$, (B) $A\beta_{1-42}$, (C) $A\beta_{1-42}$ + anti-MIP-1 α - and (D) $A\beta_{1-42}$ + isotypic IgG-injected rats 7 days post-injection. Bar: 40 μ m. (b): Quantitative analysis of CD3⁺ cells in rat brain. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ ($A\beta_{1-42}$ vs $A\beta_{42-1}$), ** $P < 0.01$ ($A\beta_{1-42}$ + anti-MIP-1 α vs $A\beta_{1-42}$ + isotypic IgG). 1: $A\beta_{42-1}$; 2: $A\beta_{1-42}$; 3: $A\beta_{1-42}$ + anti-MIP-1 α ; 4: $A\beta_{1-42}$ + isotypic IgG.

3 讨 论

T淋巴细胞迁移到血管外的局部组织是常见的病理生理现象. 但在中枢神经系统, 由于血脑屏障

的存在, 脑组织曾被认为是脱离了 T 细胞监视的免疫豁免区. 现已明确, T 细胞能够穿过血脑屏障进入中枢神经系统^[5], 参与脑内的病理生理过程^[6]. 早期研究发现, 在阿尔茨海默病患者的脑实质内存

在一定数量的 T 淋巴细胞^[7], 最近 Togo 等^[3]发现 AD 患者脑实质内 T 细胞数量比其他痴呆患者和同龄对照者多, 但促使 AD 患者外周血中的 T 细胞穿过血脑屏障的机制并不清楚. 本研究结果提示, 脑内 A β 的沉积是外周血 T 细胞迁移入脑的始动因素, T 细胞表达的 MIP-1 α 与脑血管内皮细胞表达的 CCR5 的相互作用可能与 T 细胞迁移入脑有关.

MIP-1 α 是趋化因子 C-C 家族成员, 主要由单核细胞、中性粒细胞、巨嗜细胞产生, 局部组织中产生的 MIP-1 α 能特异性趋化淋巴细胞、单核细胞向炎症部位迁移^[8]. 有报道成人白血病 T 细胞也能分泌 MIP-1^[9]. 我们前期研究发现, AD 患者外周血 T 细胞中 MIP- α 的表达水平显著高于同年龄对照人群, 又鉴于脑内注射 A β 的大鼠已被广泛用于 AD 型痴呆的动物模型^[10,11], 为探讨外周血 T 细胞中 MIP-1 α 的表达是否与脑内 A β 的沉积有关, 我们设计了本实验. 我们发现, A β_{1-42} 大鼠注射组的外周血 T 细胞中趋化因子 MIP-1 α 的表达水平明显增高, 大脑皮质和海马区 T 细胞数量明显增多. 为进一步阐明 MIP-1 α 在 T 细胞穿越血脑屏障过程中的作用, 我们分别于注射 A β_{1-42} 后的第 1、4 天给大鼠注射 MIP-1 α 的特异性中和抗体, 结果显示, MIP-1 α 的特异性中和抗体有效地阻断了 A β_{1-42} 所致脑内 T 细胞数量的增加. 外周血 T 细胞中 MIP-1 α 受体 (CCR5) 的表达量并未因 A β_{1-42} 的脑内注射有所改变, 进一步提示 T 细胞表达的 MIP-1 α 参与其穿过血脑屏障的过程.

有关 MIP-1 α 如何启动 T 细胞穿过血脑屏障, 以及组成血脑屏障的脑微血管内皮细胞上是否有 MIP-1 α 受体 (CCR5) 的表达等问题, 有研究显示, 在成鼠脑内, CCR5 在血管内皮细胞有低水平表达^[12], 脑血管内皮上有 MIP-1 α 的结合位点^[13]. 我们的体外研究结果证实, A β_{1-42} 能够上调人脑微血管内皮细胞中 CCR5 的表达, 体内实验进一步证明, 大鼠海马内注射的 A β_{1-42} 也能上调脑微血管内皮细胞表达 CCR5. 这提示血液循环中高表达 MIP-1 α 的 T 细胞可能通过 CCR5 与脑微血管内皮细胞结合而驻留, 进而通过紧密连接的开放进入中枢神经系统. 脑内沉积的 A β 如何诱导脑微血管内皮细胞 CCR5 的表达、及上调外周血 T 细胞中的 MIP-1 α , 有待进一步研究.

我们首次证实, 大鼠脑内 A β 沉积能特异性地诱导外周血 T 细胞高表达 MIP-1 α , 并上调脑血管内皮细胞上 CCR5 的表达, 提示 T 细胞表达的 MIP-1 α 与脑微血管内皮细胞上 CCR5 的相互作用可能参与到 T 细胞穿过血脑屏障迁移入脑的过程. 这为进一步研究 T 细胞免疫在阿尔茨海默病病变中的作用积累了新资料.

参 考 文 献

- Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, **297** (5580): 353~356
- Monsonogo A, Weiner H L. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science*, 2003, **302** (5646): 834~838
- Togo T, Akiyama H, Iseki E, *et al.* Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol*, 2002, **124** (1~2): 83~92
- Jantarotnotai N, Ryu J K, Kim S U, *et al.* A myloid beta peptide-induced corpus callosum damage and glial activation *in vivo*. *Neuroreport*, 2003, **14** (11): 1429~1433
- Ransohoff R M, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev*, 2003, **3** (7): 569~581
- Town T, Tan J, Flavell R A, *et al.* T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 2005, **7** (3): 255~264
- Eikelenboom P, Rozemuller J M, Kraal G, *et al.* Cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease but not in scrapie-affected mice are closely associated with a local inflammatory process. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1991, **60** (5): 329~336
- Smits H A, Rijmsmus A, van Loon J H, *et al.* Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. *J Neuroimmunol*, 2002, **127** (1~2): 160~168
- Hara T, Wakatsuki S, Ozaki S, *et al.* Primary adult T-cell leukemia/lymphoma of bone. *Int J Hematol*, 2004, **79** (2): 157~160
- Jhoo J H, Kim H C, Nabeshima T, *et al.* Beta-amyloid (1~42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav Brain Res*, 2004, **155** (2): 185~196
- O'Hare E, Weldon D T, Mantyh P W, *et al.* Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta (1~42). *Brain Res*, 1999, **815** (1): 1~10
- Cowell R M, Xu H, Galasso J M, *et al.* Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1 α expression in immature rat brain. *Stroke*, 2002, **33** (3): 795~801
- Andjelkovic A V, Pachter J S. Characterization of binding sites for chemokines MCP-1 and MIP-1 α on human brain microvessels. *J Neurochem*, 2000, **75** (5): 1898~1906

High Expression of MIP-1 α in Peripheral Blood T Cells by Hippocampus Injection of β -Amyloid Peptide (1~42) Triggers T Cells Entry Into Rat Brain*

GUO Da-Wen, MA Yi-Ran, FANG Wen-Gang, CHEN Yu-Hua**

(Department of Developmental Biology, China Medical University, Key Laboratory of Cell Biology,

Ministry of Public Health, Shenyang 110001, China)

Abstract In order to investigate the effects of β -amyloid ($A\beta$) deposits on migration of peripheral blood T cells across blood-brain barrier, $A\beta_{1\sim 42}$ was stereotactically injected into rat hippocampus with reverse peptide $A\beta_{42\sim 1}$ as control. After 7 days post-injection, the expression of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and its receptor (CCR5) in peripheral blood T cells was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Brain sections were analyzed with immunofluorescence of CD3, VWF and CCR5. The results showed that $A\beta_{1\sim 42}$ deposits in rat brains led to significantly higher expression of MIP-1 α in circulating T cells than $A\beta_{42\sim 1}$ did, while no increase of CCR5 expression was observed in circulating T cells of $A\beta_{1\sim 42}$ -injected rats compared to $A\beta_{42\sim 1}$ -injected rats. Furthermore, the expression of CCR5 was up-regulated by $A\beta_{1\sim 42}$ on rat brain microvascular endothelial cells (RBMEC). In addition, T cells were increased in abundance in $A\beta_{1\sim 42}$ -injected brains compared with $A\beta_{42\sim 1}$ -injected brains, scattered mainly in cortex and hippocampus. Treatment of $A\beta_{1\sim 42}$ -injected rats with neutralizing antibody specific for MIP-1 α dramatically blocked the enhanced T cells entry into rat brain. The results implied that the interaction between MIP-1 α over-expressed in T cells and CCR5 on RBMECs may contribute to the $A\beta_{1\sim 42}$ -induced circulating T cells migrating across blood-brain barrier.

Key words Alzheimer's disease, β -amyloid peptide, macrophage inflammatory protein-1 α , T cells, blood-brain barrier

*This work was supported by grants from The China State Education Ministry, The Trans-Century Training Program Foundation for Talents (JJH2002-48), The National Research Foundation for The Doctoral Program of Higher Education of China (20040159002) and The Foundation of Department of Science and Technology, Liaoning Province.

**Corresponding author. Tel: 86-24-23260246, 86-24-23256666-5019, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

Received: March 17, 2006 Accepted: August 29, 2006