

# 阿尔茨海默病炎症的潜在治疗靶点

赵东岳\* 林丹枫

(福建师范大学生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350108)

**摘要** 炎症小体的激活与淀粉样蛋白的发生和炎性介质有关, 因此通过对抗炎症小体来抵抗炎症可延缓阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发展, 是一种很有前途的AD治疗策略。利用半定量的RT-PCR以及Western blot的方法对 $A\beta_{1-42}$ 刺激诱导的原代小胶质细胞和骨髓源巨噬细胞的炎症相关基因的转录表达情况包括免疫炎症通路的调节变化、炎症小体密切相关的细胞外受体以及核酸识别调控通路的变化在内进行初步筛选。这些炎症相关的数据为靶向炎症小体的治疗, 延缓AD的发病病程, 提供重要的线索。

**关键词** 阿尔茨海默病; 炎症小体; 免疫炎症; 受体; 核酸识别

## Potential Therapeutic Targets of Inflammation of Alzheimer's Disease

ZHAO Dongyue\*, LIN Danfeng

(Fujian Key Laboratory of Developmental and Neuro Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract** The activation of inflammasome is related to the occurrence of amyloid and inflammatory mediators. Therefore, the resistance to inflammation by anti-inflammasome can delay the development of AD (Alzheimer's disease) and is a promising treatment strategy for AD. Semi-quantitative RT-PCR and Western blot were preliminarily used to screen the inflammation-related genes in primary microglia and macrophage stimulated and induced by  $A\beta_{1-42}$ , including regulatory changes in immune inflammatory pathways, extracellular receptors closely related to inflammasome and nucleic acid recognition regulatory pathways. These inflammation-related data provide important basis for targeted therapy of inflammasome and delay the onset and progression of AD.

**Keywords** Alzheimer's disease; inflammasome; immune inflammatory; receptors; nucleic acid recognition

炎症小体是一种蛋白复合体<sup>[1]</sup>, 其活化后可导致小胶质细胞/巨噬细胞产生高促炎细胞因子, 如IL-1 $\beta$ 和IL-18<sup>[2]</sup>。值得注意的是, 衰老和衰老相关的大脑神经系统疾病中炎症小体的激活可加速衰老和大脑神经系统的紊乱<sup>[3]</sup>。神经退行性疾病中, 老年大脑神经系统中持续的炎症状态可导致衰老的小胶

质细胞和巨噬细胞中炎症小体的激活<sup>[4]</sup>, 促进炎症进一步放大, 最终可导致慢性损伤和随后的功能衰退<sup>[5]</sup>。神经退行性疾病中的特定成分, 如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)中的淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )和帕金森病(Parkinson's disease, PD)中的 $\alpha$ -突触核蛋白促进小胶质细胞/巨噬细胞炎症小体

收稿日期: 2021-01-04 接受日期: 2021-02-20

福建省自然科学基金(批准号: 2020J01174)、福建省教育厅(A类)项目(批准号: JT180080、JAT170137)、福建省科技厅引导性项目(批准号: 2016Y0027)和福建师范大学生命科学学院“溪源江学者”科研创新项目资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-22868214, E-mail: mountain@fjnu.edu.cn

Received: January 4, 2021 Accepted: February 20, 2021

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2020J01174), the Educational Department Project (Category A) of Fujian Province (Grant No.JT180080, JAT170137), the Guiding Project of Science and Technology Department of Fujian Province (Grant No.2016Y0027) and the Scientific Research Innovation Program "Xiyuanjiang River Scholarship" of College of Life Sciences of Fujian Normal University

\*Corresponding author. Tel: +86-591-22868214, E-mail: mountain@fjnu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5507>

的激活<sup>[6]</sup>。AD的主要特征是A $\beta$ 在细胞外沉积形成斑块,在斑块清除的过程中可导致溶酶体的损伤、小胶质细胞ROS的产生以及炎症小体的激活<sup>[7]</sup>。此外,低聚体的A $\beta$ 可直接与浸润的巨噬细胞中的NLRP3和ASC相互作用,激活炎症小体从而加速AD的病程<sup>[8]</sup>。同时,IL-1 $\beta$ 可促进神经元产生淀粉样前体蛋白( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP)和A $\beta$ ,诱导Tau蛋白磷酸化并介导神经纤维缠结的形成<sup>[9]</sup>。在新的AD治疗临床试验连续失败后,重新寻找有效的药物势在必行。既然炎症小体的激活与淀粉样蛋白的发生和定量炎性介质有关,因此靶向炎症小体的治疗方法可延缓AD的发展。炎症小体抑制治疗的治疗效果表明<sup>[10-11]</sup>,通过对抗炎症小体来抵抗炎症是一种很有前途的AD治疗策略。本文所选的候选因子的标准是根据NCBI上所提供的与炎症小体主要原件基因(*NLRP3*、*PYCARD*、*Caspase1*、*IL-18*以及*IL-1 $\beta$* )相关联的基因。我们首先用半定量的RT-PCR以及Western blot的方法对A $\beta_{1-42}$ 刺激诱导的炎症相关基因的转录表达情况进行初步筛选,其目的是理清以下几个问题:(1)包括炎症小体在内的免疫炎症通路调节基因的变化情况;(2)筛查与炎症小体密切相关的细胞外受体;(3)筛查与炎症小体密切相关的核酸识别调控通路的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

反转录试剂盒PrimerScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit With gDNA Eraser、PCR试剂ExTaq酶、10 $\times$  ExTaq buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)、DNTP mix等均购自宝生物工程(大连)有限公司(大连TaKaRa公司)。细胞培养相关试剂如FBS(10099-141)、DMEM以及DMEM/F12(11320-082)均购自Thermo Fisher Scientific公司。多聚赖氨酸PDL(P0296 -50mg)和GM-CSF均购自美国Sigma试剂公司。FITC-F4/80、FITC-Iba1以及anti-NLRP3/Pycard/Casp1/IL-1 $\beta$ /Nod1/Ripk2/Tirap/Ikkkb/Nedd4/Bcl2l/Nfe2l2/Pla2g4a/Pen2/Sugt1/CD63/Marco/TLR4 /TLR8/TLR2/TLR3/Scarb1/RigI/MAVS/IRF3/IRF7/Trex1/IFIT2抗体均购自Abcam公司。

### 1.2 引物

根据GenBank所登录的小鼠的基因序列,用Primer 5.0设计扩增DNA片段的上下游引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成引物序列。与

炎症小体相关基因的引物信息见表1;与炎症小体相关的受体基因的引物信息见表2;与核酸识别通路相关基因的引物信息见表3。

### 1.3 骨髓源巨噬细胞的培养及A $\beta_{1-42}$ 的刺激

小鼠饲养在福建师范大学实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(闽)2015-0004;动物实验方案经过福建师范大学实验动物伦理委员会的审查符合动物福利和伦理的原则(批准号:IA-CUC-20190033)。骨髓来源的巨噬细胞的体外诱导培养方法,将骨髓来源单个核细胞悬液在体外用培养基培养,具体包括以下步骤。(1)小鼠股骨的提取:将6~8周龄小鼠脱颈处死,浸入75%的酒精。用镊子夹起腹部上皮,用剪刀在小鼠腹部下方横着剪开一个小口,分别夹着开口两端向不同的方向拉开,曝露出小鼠的大腿部,使小鼠股骨与小鼠身体及胫骨从关节处分离。保持股骨两段完整性,采用酒精浸润的纱布去除股骨两端关节连接处残留组织及软骨。放置于75%酒精中漂洗2~3次后,用无菌PBS缓冲液漂洗,最后放置于盛有无菌PBS的细胞培养皿中。(2)骨髓来源的细胞混合液的制备:用1 mL注射器吸取含有质量分数为0.05%的吐温-20的pH7.4的PBS缓冲液插入离体动物股骨两端的软骨处冲出股骨内的骨髓,收集骨髓来源的细胞混合液,重复2~3次直到股骨变白。(3)单个核细胞悬液的制备:将上述步骤所收集的骨髓来源细胞混合液混悬,用滤孔40  $\mu$ m的过滤器过滤,将过滤液在1 000 r/min条件下离心5~10 min,弃上清液,用含巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF的PRMI 1640完全培养基(10% FBS+PRMI 1640+双抗+2 g/L NaHCO<sub>3</sub>+20 ng/mL GM-CSF)重悬细胞。(4)将步骤3所得细胞重悬液调节成浓度为10<sup>6</sup>个/mL,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24~30 h后,吸弃上清,另加入含20 ng/mL巨噬细胞集落刺激因子的PRMI 1640完全培养基,再培养48 h。(5)第二阶段培养,在第一阶段细胞培养完成后,不超过24 h培养的细胞进行换液,另培养3~6天,其间每2天换液(含巨噬细胞集落刺激因子的PRMI 1640完全培养基)1次,第9天得到分化成熟的巨噬细胞。(6)第9天分化成熟的骨髓源巨噬细胞用浓度为10  $\mu$ mol/L的A $\beta_{1-42}$ 刺激,8 h后观察其细胞形态。

### 1.4 原代小胶质细胞的取材、分离、纯化及A $\beta_{1-42}$ 的刺激

(1)将出生24 h之内小鼠置于冰上低温麻醉5 min,酒精中各消毒5 min;用眼科剪在乳鼠颅部正中作T

表1 炎症小体通路相关的基因

Table 1 Inflammation pathway-related genes

基因 Gene	基因登录号 Gene ID	引物 Primer	溶解温度/°C T <sub>m</sub> /°C	扩增长度/bp Length /bp
<i>NALP3</i>	NM_145827.3	F: GTT GTC AGG ATC TCG CAT TG R: GGC TGT GGT TGT GGG TCA	57	384
<i>Pycard</i>	NM_023258.4	F: AGC CAG AAC AGG ACA CTT TG R: CCA GGT CCA TCA CCA AGT AG	57	254
<i>Sugt1</i>	NM_026474.5	F: GGC TGC TCC ACC CTA TAA TA R: CAT CGG AAC CGT CTG AGT AG	57	300
<i>Casp1</i>	NM_009807.2	F: CCT GGT CTT GTG ACT TGG AG R: GCT TCT TAT TGG CAC GAT TC	57	191
<i>Ikkbb</i>	NM_001159774.1	F: CAG AAT CAT CCA TCG AGA CC R: ATG TCC ACT TCG CTC TTC TG	57	312
<i>Bcl2l1</i>	NM_001289716.1	F: AGG TAT TGG TGA GTC GGA TTG R: AGT GGA CGG TCA GTG TCT GG	57	244
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	NM_008361.3	F: GGG CCT CAA AGG AAA GAA T R: AAG GCA TTA GAA ACA GTC CAG	57	309
<i>Nedd4</i>	NM_010890.3	F: CAG CGA CAC CGC ATT CTT TT R: GTG GCA GCA TCT GGT TGG TC	57	296
<i>Nfe2l2</i>	NM_010902.3	F: AAG ATG CCT TGT ACT TTG AA R: GGA ACA GCG GTA GTA TCA GC	57	286
<i>Nod1</i>	NM_001171007.1	F: TCA AGC ACC TTA AAC TAG GGA A R: GCA TCT CAG CGA AGC ACT CT	57	318
<i>Pla2g4a</i>	NM_008869.3	F: GAA GTC GGA ACT GTG AAG GG R: TAC TTT GGT GGC ACG TAG AA	57	238
<i>Psen2</i>	NM_001128605.1	F: CAG CAG GCT TAC CTT ATT GTG R: GCC AGC GTA GTG TTC CAG TC	57	488
<i>Ripk2</i>	NM_138952.3	F: GCC ACC TGA GAA CTA TGA GC R: CAG CCT CAA GGA AAG TTA TGT C	57	338
<i>Tirap</i>	NM_001177845.1	F: CTC CAC TCC GTC CAA GAA GC R: TGG CGA GGT AGG TGA CAT TC	57	235

表2 与炎症小体相关的受体基因

Table 2 Inflammation-related receptor genes

基因 Gene	基因登录号 Gene ID	引物 Primer	熔解温度/°C T <sub>m</sub> /°C	扩增长度/bp Length /bp
<i>MARCO</i>	NM_010766	F: CCA GTG CCC AAG AAG AGA AAT R: GAG GTT GTT GAA CTG CTG ACG	57	306
<i>SCARB1</i>	NM_001205082.1	F: CGT CCC TTT CTA CTT GTC TGT R: GGA CCA AGA TGT TAG GCA GTA	57	245
<i>TLR4</i>	NM_021297.2	F: TGG ATC AGA AAC TCA GCA AAG R: CTG GGG AAA AAC TCT GGA TAG	57	237
<i>TLR2</i>	NM_011905.3	F: CCC TTC CCT CAC TTC CAG R: AAA CAG TCC GCA CCT CCT	57	215
<i>TLR3</i>	NM_126166.4	F: GCA AAG AAG ATA AAG CGA GTT R: ATT CAG GCA GTT TAA CTT CCC	57	176
<i>TLR8</i>	NM_133212.2	F: CGT TTT ACC TTC CTT TGT CTA R: TCG ATT TTA GTG AGG TTT TGC	57	305
<i>CD63</i>	NM_001042580.1	F: ATT ACA TTT GCC ATC TTC CTG R: CAG CCC ACA GTT ATG TTG ATG	57	281

表3 RigI-MAVS通路相关的基因  
Table 3 RigI-MAVS pathway-related genes

基因 Gene	基因登录号 Gen ID	引物 Primer	熔解温度/°C Tm /°C	扩增长度/bp Length /bp
<i>RigI</i>	NM_172689.3	F: GCT ACC TCG GTC GCT GAT R: AAG GAC AGT GTA GTG GGA CG	57	416
<i>MAVS</i>	NM_001206382.1	F: TCC ACT GCT GCG ATG ACG R: AGG GCT AAT GGC AAG GTC	57	315
<i>IRF3</i>	NM_001206382.1	F: GGG ATT TCT TGA CTT TAT TTC G R: TAG GCA CCA CTG GCT TCT	57	381
<i>IRF7</i>	NM_001252600.1	F: TTT GGA GAC TGG CTA TTG GG R: GCA TCA CTA GAA AGC AGA GGG	57	497
<i>TREX1</i>	NM_001012236.1	F: CAC ATG CTG CCA CAG CTA CT R: GCC AGG AAG AGT CCA TAC A	57	193
<i>IFIT2</i>	NM_001355262.1	F: AGG ACC CGA AGA ACC CAG AAT TCA C R: GCC GGG TAC CAC ATC ACT AGT ATT CAG	57	930

形切口, 眼科镊剥离颅骨, 取全脑, 置于盛有预冷的解剖液(1× DPBS、0.1% glucose、10 μmol/L Hepes、1× sodium pyruvate)的小培养皿中。(2) 用显微镊子在解剖显微镜下仔细剥离脑膜和血管, 保留全脑(小脑比皮层的小胶质细胞要多), 用尖镊夹碎组织。整个过程中必须保持组织湿润, 尽量缩短取材时间。(3) 用5 mL枪头吸取DMEM/F12完全培养基(10% FBS+DMEM/F12+双抗)进行吹打, 直到组织吹散为止, 70 μm细胞筛过滤, 800 r/min离心5 min, 弃上清。(4) DMEM/F12完全培养基重悬沉淀物, 按照2~3个脑的重悬量接种到预先涂布PDL(10 μg/mL)的细胞培养瓶(T75), 放于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养; 第2天用含有GM-CSF(20 ng/mL)的DMEM/F12完全培养基换液, 直到观察到多量漂浮的小胶质细胞后开始进行纯化。其间更换1次含有GM-CSF的完全培养液。(5) 摇床纯化前进行半量换液, 用摇床以450 r/min的速度振荡摇晃40 min; 转移至镜下观察, 收集培养皿中的细胞液, 以800 r/min速度离心5 min, 收集上清液, 用新鲜的培养液重悬细胞后, 接种于预先涂布PDL(10 μg/mL)的培养皿, 其中培养液包含一半新鲜培养液一半回收的培养液; 培养24 h后进行实验。(6) 用浓度为10 μmol/L的Aβ<sub>1-42</sub>刺激原代小胶质细胞, 8 h后观察其细胞形态。

### 1.5 骨髓源巨噬细胞以及原代小胶质细胞的鉴定

采用FITC标记的anti-F4/80抗体鉴定骨髓源巨噬细胞以及FITC标记的anti-Iba1抗体鉴定小胶质细胞。免疫荧光染色具体步骤如下。(1) 原代细胞在PDL(10 μg/mL)包被的共聚焦小皿中培养过夜, 待贴

壁后开始进行细胞免疫荧光实验; (2) PBS漂洗3次, 每次5 min; (3) 固定: 4 °C下用多聚甲醛固定30 min; (4) PBS漂洗3次, 每次5min; (5) 渗透: 加入渗透液(0.1% Triton X-100/PBS)室温静置、透化20 min; (6) PBS漂洗3次, 每次5 min; (7) 封闭: 加入封闭液(3% BSA/PBS)室温静置30 min; (8) 抗体孵育: 加入用封闭液稀释的FITC-CD11b抗体(1:50)和FITC-Iba1抗体(1:50), 室温避光条件孵育1 h; (9) 避光条件下, PBS漂洗3次, 每次5 min; (10) 核染色: 加入DAPI(1 μg/mL)室温避光静置2 min; (11) PBS漂洗3次, 每次5 min; (12) 封片: 用荧光淬灭剂进行封片后避光保存; (13) 共聚焦显微镜下观察并采集图像。

### 1.6 RT-PCR

根据反转录试剂盒(PrimerScript™ RT reagent Kit With gDNA Eraser, TaKaRa DRR047A)的操作说明对提取小鼠原代小胶质细胞的总RNA进行反转录成cDNA。根据TaKaRa ExTaq推荐的PCR扩增体系(50 μL): 原代小胶质细胞的cDNA 1 μL(200 ng DNA)、TaKaRa ExTaq(5 U/μL) 1 μL、10× ExTaq buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 5 μL、DNTP (2.5 mmol/L) 4 μL、上下游引物(10 μmol/L)各1 μL, 灭菌的蒸馏水加至50 μL。PCR扩增参数为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 4 min, 4 °C运行保存。PCR扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.7 Western blot分析

将细胞裂解液用10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜; 室温下封闭液(5%脱脂奶粉、0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)封闭30 min; 用

PBST在摇床上漂洗PVDF膜3次, 每次10 min; 小鼠单克隆抗体用封闭液按照1:2 000的比例稀释, 在4 °C下孵育过夜; 用PBST在摇床上漂洗PVDF膜3次; 滴加封闭液稀释的山羊抗鼠的Alexa Fluor-800荧光二抗(1:10 000稀释), 室温孵育2 h; 用PBST在摇床上漂洗PVDF膜3次。用红、绿双色荧光成像系统检测。Western blot的生物学重复3次, 技术重复3次。

## 1.8 数据统计与分析

应用GraphPad Prism(version 5.0; GraphPad, San Diego, CA, USA)软件对实验数据进行方差分析和卡方检验, \* $P < 0.05$ 为差异显著, \*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 为差异极显著。用ImageJ软件定量分析Western blot图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 骨髓源巨噬细胞与原代小胶质细胞的培养、纯化与鉴定

小鼠骨髓单核细胞在GM-CSF的诱导下, 当培养第9天时可以看到95%以上的细胞具有F4/80阳性特征, 并且出现静息状态时巨噬细胞的典型形态(图1A)。采用摇床法<sup>[1]</sup>纯化的原代小胶质细胞用小胶质细胞特异性抗体Iba1染色, 大部分细胞处于静息状态, 形态表现为梭形、阿米巴样等不规则形态并且纯化后的小胶质细胞阳性率 $> 99%$ (图1B)。老化的 $A\beta_{1-42}$ 刺激后细胞状态变化明显, 骨髓源巨噬细胞由静息状态下的椭圆形或者圆形(图2A)胞伸出大量的伪足(图2B); 老化的 $A\beta_{1-42}$ 刺激后原代小胶质细胞由静息状态下的梭形、阿米巴样(图2C)变为胞体有数个长或短

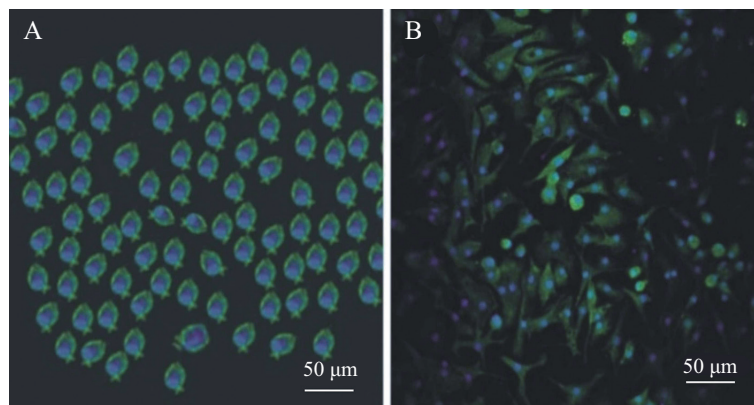
的突起的长杆状细胞(图2D)。

### 2.2 炎症相关基因及其蛋白的表达

为了探讨中枢神经系统和外周循环系统的免疫细胞受到 $A\beta_{1-42}$ 刺激后, 其炎症通路是否具有类似的分子调控机制, 我们从53对炎症相关基因中利用RT-PCR进行初步筛选。从RT-PCR数据分析看(图3), 在 $A\beta_{1-42}$ 的刺激下, 炎症小体通路的主要元件及其调节基因包括NLRP3、Pycard、Caspase-1、Nod1、IL-1 $\beta$ 、Ripk2、Tirap、Ikkkb等在骨髓源巨噬细胞和原代小胶质细胞中有强烈的上调变化, 其他被影响的基因还包括Sugt1、Bcl2l1、Nedd4、Nfe2l2、Pla2g4a、Psen2。Western blot的数据与RT-PCR的结果基本保持一致, 炎症小体通路的主要元件蛋白NLRP3、Pycard、Caspase-1、Nod1、IL-1 $\beta$ 、Ikkkb、Ripk2、Tirap在骨髓源巨噬细胞和原代小胶质细胞中表达显著上调; 还有些参与细胞命运调控的Sugt1、Bcl2l1, 参与蛋白降解的Nedd4, 参与蛋白修饰及蛋白转运的Psen2, 参与氧化应激反应的Nfe2l2, 还有些参与脂质代谢的Pla2g4a在骨髓源巨噬细胞和原代小胶质细胞中同样也表达显著上调(图4)。

### 2.3 炎症相关受体基因及其蛋白的表达

$A\beta$ 在骨髓源巨噬细胞和原代小胶质细胞的内吞途径有多种包括Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)或者清道夫受体(scavenger receptor, SR)介导的内吞、胞饮作用以及吞噬作用。而NLRP3炎症小体需要TLR或者SR作为第一信号, 以及作为配体的第二信号(胞内特异性的激动剂)与胞内感受器结

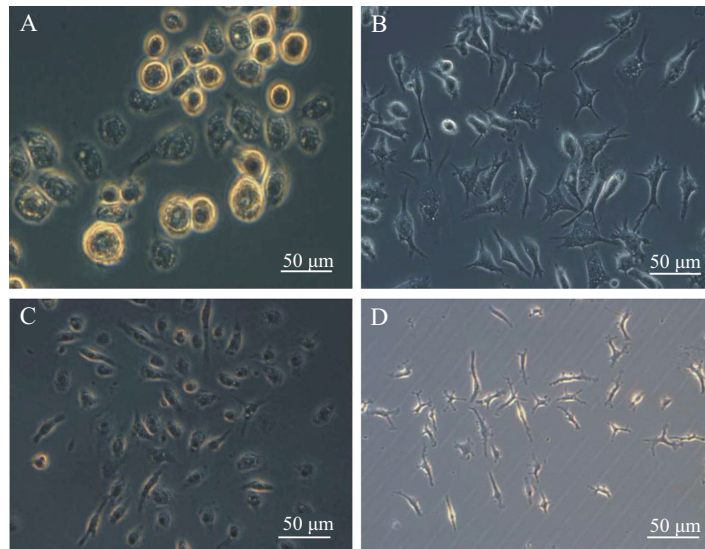


A: 用FITC标记的anti-F4/80抗体来鉴定骨髓来源的巨噬细胞; B: 用FITC标记的anti-Iba1抗体来鉴定从胎鼠中提取纯化的小胶质细胞。

A: anti-F4/80 antibody labeled by FITC was used to identify macrophages derived from bone marrow; B: anti-Iba1 antibody labeled by FITC was used to identify microglia extracted and purified from fetal mice.

图1 原代细胞的免疫荧光鉴定

Fig.1 Identification of primary cells by immunofluorescence

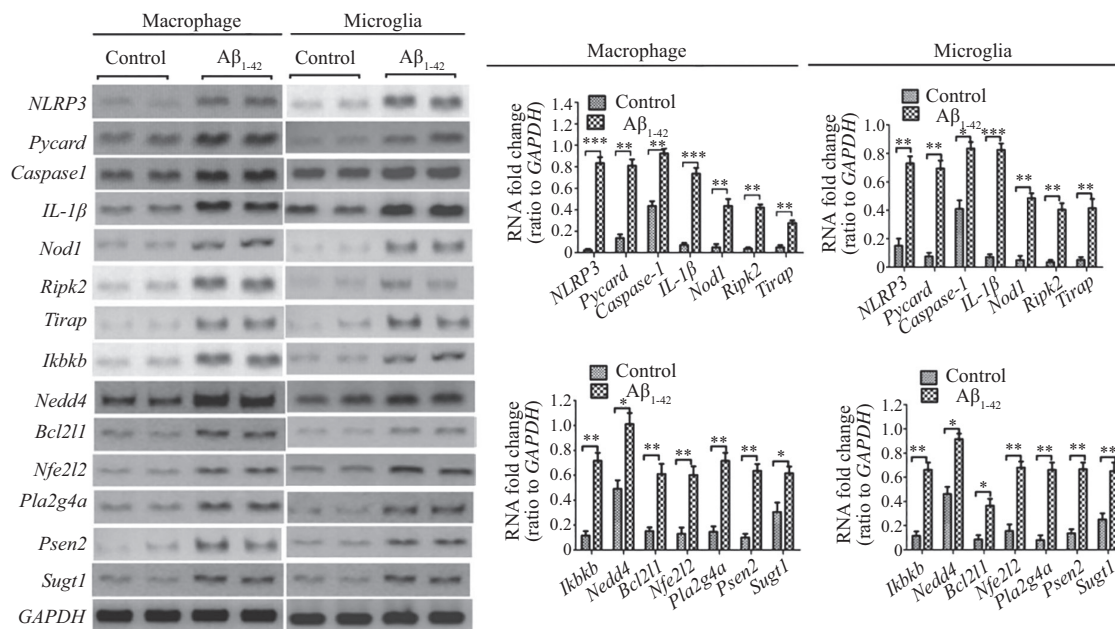


A: 骨髓来源的巨噬细胞; B: 用Aβ<sub>1-42</sub>处理的骨髓源巨噬细胞; C: 从胎鼠中提取纯化的小胶质细胞 D: 用Aβ<sub>1-42</sub>处理的从胎鼠中提取纯化的小胶质细胞。

A: macrophage derived from bone marrow; B bone marrow derived macrophage treated with Aβ<sub>1-42</sub>; C: microglia extracted and purified from fetal mice; D: microglia extracted and purified from fetal mice treated with Aβ<sub>1-42</sub>.

图2 Aβ<sub>1-42</sub>刺激前后原代细胞的形态

Fig.2 The morphology of primary cell before and after stimulated by Aβ<sub>1-42</sub>



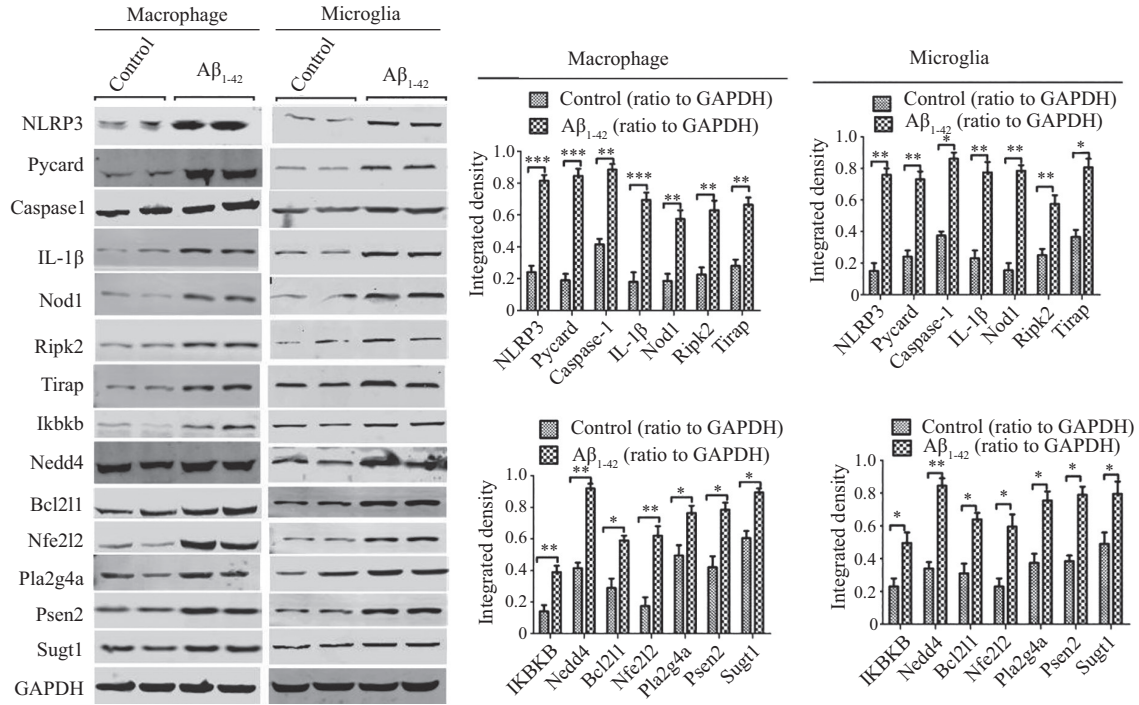
\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

图3 Aβ<sub>1-42</sub>刺激原代细胞前后炎症小体相关基因的表达

Fig.3 Expression of the genes relevant to inflammasome of primary cells before and after stimulated by Aβ<sub>1-42</sub>

合, 才能够激活炎症信号通路。因此, 炎症小体的调控可以通过寻找上游可能激活炎症小体的受体来实现。我们估计了可能参与Aβ<sub>1-42</sub>诱导激活炎症小体通路的38个细胞表面识别受体。通过半定量RT-PCR, 在38个受体中初步筛选出在骨髓源巨噬细胞上调的受体基因: CD63、Marco、TLR4、TLR8; 原代小胶

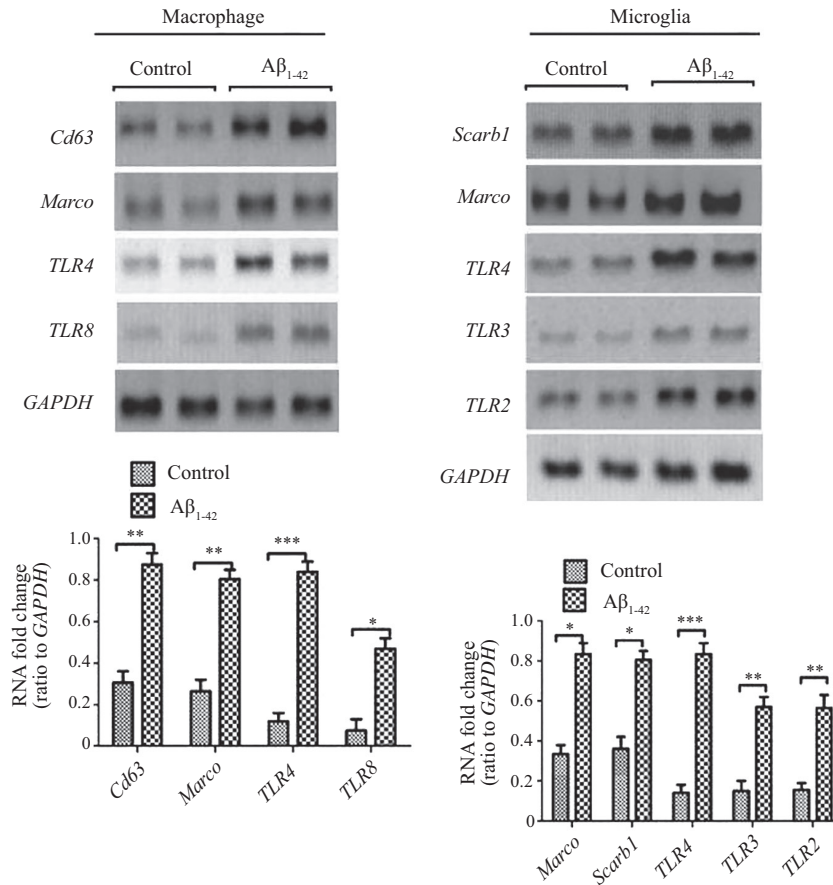
质细胞中上调的受体基因有: Marco、TLR2、TLR3、TLR4、Scarb1(图5)。Western blot的数据与RT-PCR的结果基本保持一致, 在Aβ<sub>1-42</sub>的刺激下骨髓源巨噬细胞表面受体蛋白CD63、Marco、TLR4、TLR8表达显著上调; 原代小胶质细胞表面受体蛋白Marco、TLR2、TLR3、TLR4、Scarb1表达显著上调(图6)。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图4  $A\beta_{1-42}$ 刺激原代细胞前后炎症小体相关蛋白的表达

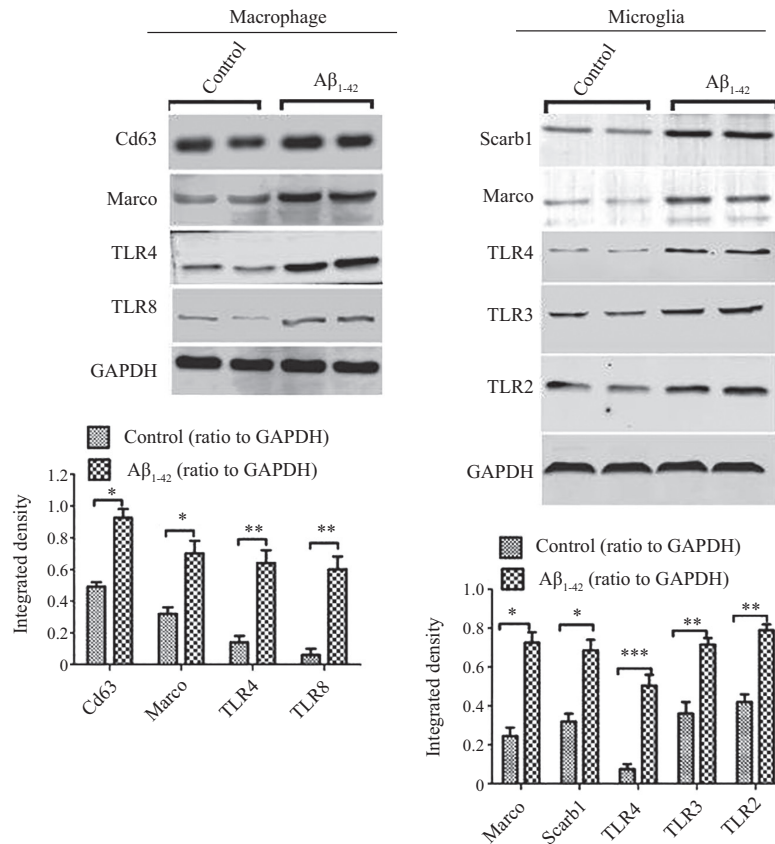
Fig.4 Expression of the proteins relevant to inflammasome of primary cells before and after stimulated by  $A\beta_{1-42}$



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图5  $A\beta_{1-42}$ 刺激原代细胞前后炎症受体相关基因的表达

Fig.5 Expression of the receptor genes relevant to inflammasome of primary cells before and after stimulated by  $A\beta_{1-42}$



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图6 Aβ<sub>1-42</sub>刺激原代细胞前后炎症受体相关蛋白的表达

Fig.6 Expression of the receptor proteins relevant to inflammasome of primary cells before and after stimulated by Aβ<sub>1-42</sub>

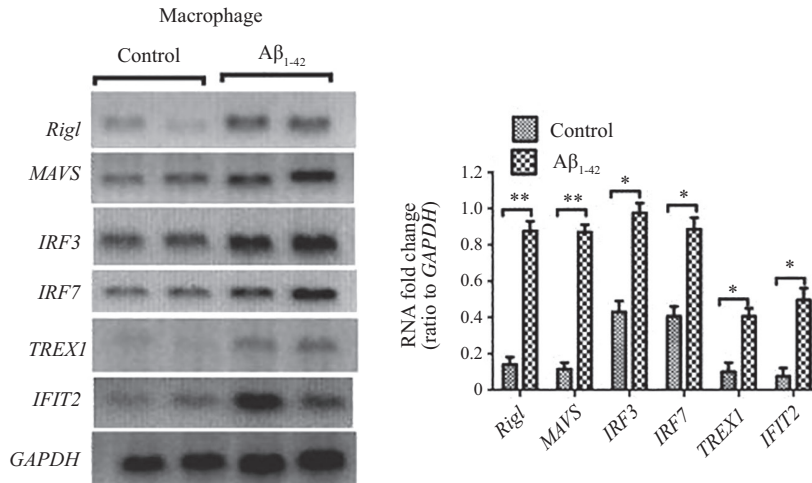
## 2.4 Aβ与MAVS通路的关系

在受体筛选的结果中发现, Aβ<sub>1-42</sub>能够激活胞外的模式识别受体SR和TLR及其胞内感受器NLRP3, 使其自身寡聚化后招募PYCARD, 使caspase-1成熟后引起细胞因子和炎性介质的高表达。Aβ<sub>1-42</sub>通过进入胞质后是否造成细胞器的损伤例如线粒体、内质网等从而激活DNA或者RNA诱导的免疫通路未见相关报道。DNA或者RNA诱导的免疫通路分别受CGAS-CGAMP-STING及RigI-MAVS通路调节, 因此设计了其相关的引物, 对这两个通路的相关基因用半定量RT-PCR初步筛选。RT-PCR的结果显示, 骨髓源巨噬细胞中RNA介导的RigI-MAVS先天免疫通路基因*RigI*、*MAVS*、*IRF3*、*IRF7*、*TREX1*、*IFIT2*明显发生上调, 而DNA介导的CGAS-CGAMP-STING通路不受影响(图7)。Western blot的数据与RT-PCR的结果基本保持一致, Aβ<sub>1-42</sub>的刺激下骨髓源巨噬细胞的RigI-MAVS先天免疫通路被活化, 其RigI、MAVS、IRF3、IRF7、TREX1、IFIT2蛋白表达显著上调(图8)。

## 3 讨论

老年神经退行性疾病患者如AD、PD以及老年术后认知障碍(post operative cognitive dysfunction, POCD)的中枢性炎症在疾病的发生发展过程中起到至关重要的作用<sup>[12]</sup>, 因此寻找抑制衰老大脑小胶质细胞免疫通路异常活化的靶点是研发治疗药物的重要策略。小胶质细胞作为中枢神经系统和免疫系统的枢纽, 在AD相关的动物模型中处于“预激状态”或者是“激活状态”, 使衰老大脑中产生剧烈的炎症反应<sup>[13]</sup>。随着年龄的增长, 小胶质细胞的数量在脑中并不会增加并且骨髓中转化而来的小胶质细胞的数量也是有限的<sup>[14]</sup>, 因此衰老大脑中的炎症与小胶质细胞的活化程度密切相关。AD的动物模型显示, 老年大脑内小胶质细胞对β-淀粉样蛋白的清除能力减弱以及炎症细胞因子持续上调<sup>[15]</sup>, 这可能与抑制小胶质细胞激活的能力受损有关。为了研究AD大脑中小胶质细胞激活的免疫通路, 我们也试图用6月龄和8月龄的APP/PS1双转小鼠大脑中的小胶质细胞作为研究材料来研究小胶质细胞激活的免疫通

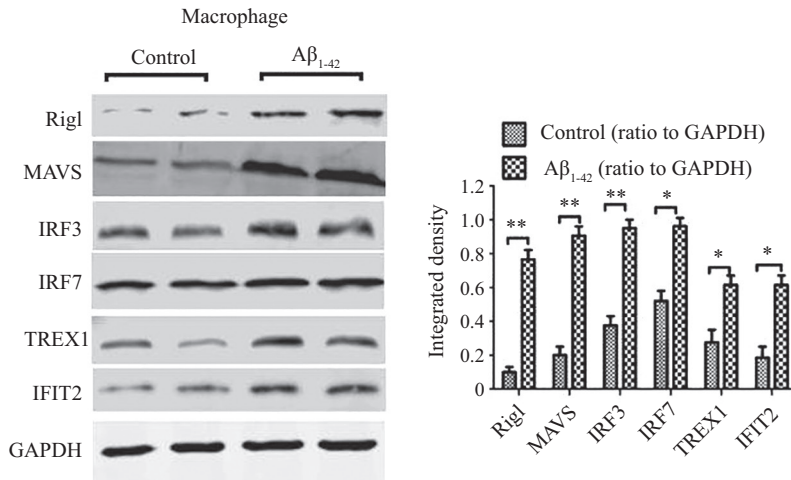




\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图7 Aβ<sub>1-42</sub>刺激原代细胞前后RigI-MAVS通路相关基因的表达

Fig.7 Expression of the genes relevant to RigI-MAVS pathway of primary cells before and after stimulated by Aβ<sub>1-42</sub>



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图8 Aβ<sub>1-42</sub>刺激原代细胞前后RigI-MAVS通路相关蛋白的表达

Fig.8 Expression of the proteins relevant to RigI-MAVS pathway of primary cells before and after stimulated by Aβ<sub>1-42</sub>

路,但是始终无法从老年大脑中纯化到小胶质细胞来开展相关的实验。我们也只能从胎鼠的大脑中提取纯化小胶质细胞进行体外培养并用老化的Aβ<sub>1-42</sub>进行刺激,在体外细胞水平模拟AD的病理状态,帮助我们更好地了解AD大脑中小胶质细胞免疫通路的激活,让我们更好地了解神经炎症反应,指导临床治疗,改善患者预后。在Aβ<sub>1-42</sub>的刺激下,骨髓源巨噬细胞和原代小胶质细胞可以被Aβ<sub>1-42</sub>活化,炎症小体通路的主要元件及其调节蛋白包括NLRP3、Py-card、Caspase-1、Nod1、IL-1β、Ripk2、Tirap、Ikkkb等在巨噬细胞和原代小胶质细胞中有强烈的上调,其他被影响的蛋白还包括Sugt1、Bcl2l1、Nedd4、Nfe2l2、Pla2g4a、Psen2。其中,有些参与细胞命运

的调控如Sugt1、Bcl2l1;有些参与了蛋白的降解如Nedd4;部分参与了蛋白修饰及蛋白转运如Psen2;有些参与了氧化应激反应如Nfe2l2;有些参与了脂质的代谢如Pla2g4a。这些与炎症免疫相关基因变化趋势在骨髓源巨噬细胞和原代小胶质细胞中表现基本一致,说明两者的功能相似。原代小胶质细胞和骨髓源巨噬细胞活化NLRP3炎症小体可能存在以下几种可能。(1)细胞通过胞吞或者吞噬,使Aβ<sub>1-42</sub>进入胞内后引起线粒体损伤产生游离的寡核苷酸作为配体激活NLRP3<sup>[15]</sup>或者破坏线粒体呼吸链的电子传递,产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)通过ROS依赖的途径诱导NLRP3炎症小体的组装活化<sup>[16]</sup>,但是尚未明确是否作为直接配体激活

NLRP3。(2) 纤维化的 $A\beta_{1-42}$ 进入细胞后被溶酶体吞噬后可导致溶酶体损伤或破裂, 使其中的一些蛋白酶被释放到细胞质进而激活NLRP3<sup>[6]</sup>, 但是溶酶体破裂后组织蛋白酶B是否诱导激活NLRP3炎症小体, 还是单纯溶酶体破裂即可引起NLRP3炎症小体活化, 尚未清楚。小胶质细胞是中枢神经系统的巨噬细胞和主要的免疫应答细胞, 对大脑中 $A\beta$ 的清除有重要作用, 其清除方式主要通过TLR或者SR介导的内吞、胞饮作用以及吞噬作用<sup>[7]</sup>。小胶质细胞表面有相应的受体与不可溶的纤维状 $A\beta$ 结合, 从而激活小胶质细胞的内吞。小胶质细胞的SR是最早报道的与之相关的受体, 这一受体家族包括SR-A、SR-B(SCRAB1, SCRAB2)、CD63、 $\alpha 6\beta 1$ 整合素、CD36、CD47、CD14、CD47、CD68等<sup>[18]</sup>。此外, 与天然免疫相关的受体TLR包括TLR2、TLR3、TLR4等也在 $A\beta$ 内吞的过程中有重要作用<sup>[19]</sup>。从RT-PCR和Western blot筛选的细胞表面模式受体的结果来看, 在骨髓源巨噬细胞中上调的受体蛋白主要有Marco、CD63、TLR8、TLR4; 原代小胶质细胞中上调的蛋白主要有Marco、TLR2、TLR3、TLR4、Scarb1, 其中TLR2、TLR3、TLR4已经报道是参与炎症小体活化的细胞外受体<sup>[9]</sup>。通过筛选出的受体结果发现, 两者转运 $A\beta$ 的方式可能不同。小胶质细胞既有受体介导的胞吞作用, 也通过大胞饮作用以及吞噬作用介导 $A\beta$ 进入细胞。骨髓源巨噬细胞介导 $A\beta$ 进入细胞的方式还不明确, 我们可以通过吞噬作用抑制剂细胞松弛素D(cytochalasin D)、清道夫家族受体的广泛性抑制剂岩藻多糖(fucoidin)、胞饮抑制剂诺考达唑(nocodazole)确定介导 $A\beta$ 入胞的具体方式, 同时骨髓源巨噬细胞表面受体的表达是介导 $A\beta$ 内吞进入细胞, 还是为了增强细胞的自噬作用清除 $A\beta$ , 也有待进一步研究。从细胞膜受体和CGAS、RigI通路相关基因的筛选结果来看, 骨髓源巨噬细胞中RNA介导的RigI-MAVS先天免疫通路基因明显发生上调, 而DNA介导的CGAS-CGAMP-STING通路不受影响; 而神经系统的小胶质细胞则不受影响, 这说明骨髓源巨噬细胞与原代小胶质细胞代谢 $A\beta$ 的方式并不完全相同。从结果来看, 推测骨髓源巨噬细胞介导 $A\beta$ 入胞的方式较小胶质细胞单一, 同时骨髓源巨噬细胞降解 $A\beta$ 的方式可能较小胶质细胞要剧烈, 而导致内质网受到损伤, 使细胞质出现游离的RNA, 进而激活RigI-MAVS信

号通路或者通过与TLR8受体结合激活炎症小体。因此, 阐明骨髓源巨噬细胞和小胶质细胞炎症免疫调控机制, 对神经炎症引起的神经退行性疾病分子靶点的发现具有重要意义。

## 参考文献 (References)

- [1] SOCHOCKA M, DINIZ B S, LESZEK J. Inflammatory response in the CNS: friend or foe [J]? *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 8071-89.
- [2] GUO H, CALLAWAY J B, TING J P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 677-87.
- [3] KNEZEVIC D, VERHOEFF N P L, HAFIZI S, et al. Imaging microglial activation and amyloid burden in amnesic mild cognitive impairment [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(11): 1885-95.
- [4] FOWLER J H, MCQUEEN J, HOLLAND P R, et al. Dimethyl fumarate improves white matter function following severe hypoperfusion: involvement of microglia/macrophages and inflammatory mediators [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(8):1354-70.
- [5] TAKIZAWA T, QIN T, MORAIS A L D, et al. Non-invasively triggered spreading depolarizations induce a rapid proinflammatory response in cerebral cortex [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 40 (5): 1117-31.
- [6] JABIR N R, KHAN F R, TABREZ S. Cholinesterase targeting by polyphenols: a therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(9): 753-62.
- [7] SARKAR S, MALOVIC E, HARISHCHANDRA D S, et al. Mitochondrial impairment in microglia amplifies NLRP3 inflammasome proinflammatory signaling in cell culture and animal models of Parkinson's disease [J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2017, 3: 30.
- [8] FURMAN D, CHANG J, LARTIGUE L, et al. Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states [J]. *Nat Med*, 2017, 23(2):174-84.
- [9] LABZIN L I, HENEKA M T, LATZ E. Innate immunity and neurodegeneration [J]. *Annu Rev Med*, 2018, 69: 437-49
- [10] HUANG Y, HUANG X, ZHANG L, et al. Magnesium boosts the memory restorative effect of environmental enrichment in Alzheimer's disease mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(1):70-9
- [11] XU J, LU L, LI L. NEK7: a novel promising therapy target for NLRP3 related inflammatory diseases [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(10): 966-8.
- [12] LUCIN K M, O'BRIEN C E, BIERI G, et al. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 2013, 79(5): 873-86.
- [13] DAMANI M R, ZHAO L, FONTAINHAS A M, et al. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia [J]. *Aging Cell*, 2011, 10(2): 263-76.
- [14] BHASKAR K, KONERTH M, KOHIKO-COEHRAN O N, et al. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor [J]. *Neuron*, 2010, 68(1):19-31.

- [15] NISHANTH RP, JYOTSNA R G, SCHLAGER J J, et al. Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: role of ROS-NF $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Nanotoxicology*, 2011, 5(4): 502-16.
- [16] LI W W, NIE Y, YANG Y, et al. Ubiquitination of TLR3 by TRIM3 signals its ESCRT-mediated trafficking to the endolysosomes for innate antiviral response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(38): 23707-16.
- [17] BOEHMER E D, MEEHAN M J, CUTRO B T, et al. Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126 (12): 1305-13.
- [18] WEI Y, CHEN J, HU Y, et al. Rosmarinic acid mitigates lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory responses through the inhibition of TLR4 and CD14 expression and NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Inflammation*, 2018, 41(2): 732-40.
- [19] BORYSIEWICZ E, FIL D, KONAT G W. Rho proteins are negative regulators of TLR2, TLR3, and TLR4 signaling in astrocytes [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(7):1565-72.