

INF- γ 在可溶性 β -淀粉样蛋白(fA β)介导的小胶质细胞神经毒性中的增敏作用

李艳花¹ 张海飞¹ 张鑫辰¹ 张辉¹ 尉杰忠¹ 丰玲¹ 霍明章¹ 肖保国² 马存根^{1,3 Δ}

(¹山西大同大学脑科学研究所 大同 037009; ²复旦大学附属华山医院神经病学研究所 上海 200040;

³山西中医学院第三中医院脑病科 太原 030024)

【摘要】 目的 通过体外实验的方法研究炎性环境促进异常聚集的可溶性 β -淀粉样蛋白(fibrillar β -amyloid, fA β)1-42 引发神经毒性的分子机制。方法 使用 INF- γ (100 U/mL) 或/和 fA β 1-42 (50 μ g/mL) 刺激 BV2 小胶质细胞系,检测其膜式受体表达和炎性分子释放;并通过小胶质细胞和 PC12 神经元共培养体系,检测 PC12 细胞死亡和线粒体膜电位变化。结果 INF- γ 诱导 BV2 细胞表面 A β 受体 FPR2、RAGE 和 CD36 表达明显增加。在 INF- γ 刺激下,fA β 1-42 诱导小胶质细胞释放更多的炎性因子。在 BV2 和 PC12 共培养体系中,INF- γ 和 fA β 1-42 的协同作用促使更多的 PC12 细胞走向死亡,使 PC12 细胞线粒体膜电位发生更强变化。结论 INF- γ 诱导的 A β 结合受体表达量上调,可能参与 A β 激活小胶质细胞的炎性反应和随后的神经毒性,可能成为今后阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)患者治疗的靶点。

【关键词】 阿尔茨海默病(AD); 小胶质细胞; 神经元; beta-amyloid; INF- γ

【中图分类号】 R 749.1⁺6 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2013.03.002

The enhanced effect of INF- γ on neuronal injury of microglia induced with fA β

LI Yan-Hua¹, ZHANG Hai-fei¹, ZHANG Xin-chen¹, ZHANG Hui¹, YU Jie-zhong¹,
FENG Ling¹, HUO Ming-zhang¹, XIAO Bao-guo², MA Cun-gen^{1,3 Δ}

(¹Institute of Brain Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi Province, China; ²Institute of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; ³Department of Encephalopathy, Third Hospital, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of INF- γ stimulation on fibrillar β -amyloid 1-42 (fA β 1-42) triggered neuronal injury *in vitro*. **Methods** Microglia cell line BV2 was exposed to fibrillar soluble A β 1-42 (50 μ g/mL) alone and in combination with cytokines INF- γ (100 U/mL). The expression of A β membrane receptors mRNA and the release of inflammatory cytokines were detected. Mitochondrial membrane potential cell death was analyzed by flow cytometry under BV2 and PC12 co-culture system. **Results** INF- γ treatment significantly enhanced the mRNA level of CD36, FPR2 and RAGE in BV2 cells. INF- γ and fA β 1-42 synergistically increased the production of proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and NO. Under the co-culture system of BV2 and PC12, INF- α and fA β 1-42 synergistically increased more cell death and decreased mitochondrial membrane potential in PC12 cells. **Conclusions** Our findings indicate that INF- γ profoundly increases microglial inflammatory responses to A β peptide and neurotoxic effects possible through inducing membrane receptors that can bind A β peptide and may be an approach for treating AD in humans.

国家自然科学基金项目(81070957); 山西省青年自然科学基金项目(2012021034-2); 山西大同大学博士科研启动经费项目(2011-B-11); 大同大学研究所科研项目

Δ Corresponding author E-mail: macungen2001@yahoo.com.cn

【Key words】 Alzheimer's disease(AD); microglia; neuron; beta-amyloid; INF- γ

* This work was supported by the National Natural Science Foundation (81070957), Natural Science Foundation of Shanxi (2012021034-2), Shanxi Datong University Doctoral Research Start-up Funds (2011-B-11) and Institute Research Start-up Funds.

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一个以老年斑、神经原纤维缠结、神经元缺失和进行性痴呆为特征的神经系统疾病,已成为危害老年人群健康和生命的重要疾病,AD发病机制的研究成为当前神经科学和神经病学研究领域的热点问题。 β -淀粉样蛋白(β amyloid, A β)是AD的主要病理特征之一,也是老年斑的核心成分,是造成AD的重要诱因^[1]。然而,目前对于A β 如何启动AD病理机制,进而造成神经退化仍未完全阐明。已有大量的实验证据表明脑内炎症微环境和A β 沉积是AD病理过程中的重要事件,A β 本身可能并无神经毒性,也不会引发明显的神经症状,只有炎症因子和A β 协同作用于小胶质细胞才会诱发A β 对神经元明显的毒性作用^[2]。因此A β 神经毒性及其诱发的中枢神经系统(central nervous system, CNS)免疫炎症级联反应被认为是AD的主要发病机制之一^[3],且多种抗炎类药物可以减轻A β 神经毒性,抑制炎症反应,保护神经细胞,对控制AD的疾病进展具有积极的意义。然而,由于许多潜在药物 semagacestat (美国 Eli Lilly 公司)、bapineuzumab (美国 JNJ&Pfizer 公司)和 solanezumab (美国 Eli Lilly 公司)陆续宣告三期临床试验失败,作为主流致病假说之一的A β 假说受到越来越多的挑战。神经免疫炎症已成为研究发病机制和干预治疗的另一突破口,日益受到人们的关注,有望成为另一个新的研究热点。美国研究人员进行的一项长期跟踪调查发现,血液有炎症迹象的人,晚年患AD的危险性将大大增加^[4]。

以往的研究显示小胶质细胞表面表达许多识别受体,被认为能与外来和自身异构的A β 蛋白发生相互作用^[5]。这些受体主要包括CD36、A类清道夫受体(SR-A)、B类清道夫受体(SR-B)和晚期糖化终末产物受体(receptor for advanced glycation endproducts, RAGE)等。A β 与受体结合后能启动第二信使激活NF- κ B途径进而释放炎症分子。CD36在纤维状 β -淀粉样蛋白(fibrillar β -amyloid, fA β)诱发小胶质细胞释放炎症介质过程中发挥至关重要的作用^[6],小胶质细胞通过integrin β 1完成对fA β 的胞吞作用^[7]。RAGE依赖的信号途径参与神经炎症反应和A β 的聚集,在AD疾病的学习、

记忆损伤中起作用^[8]。由此可见,小胶质细胞表面存在多种参与fA β 结合和反应的受体,对小胶质细胞应答fA β 起到互补作用。

炎性激活的小胶质细胞对A β 有何反应?炎性微环境在A β 诱发神经毒性作用过程中扮演怎样的角色?本研究探讨了炎性刺激条件下小胶质细胞对A β 的反应性以及引起这种反应的分子基础。

材料和方法

药品与仪器 INF- γ (纯度>98%)(Peprotech),用pH8.0的10 mmol/L的磷酸钠缓冲液配制成 5×10^5 IU/mL;A β 1-42由生工生物合成,纯度为>95%,多肽序列为:DAEFGHDSGFVVRHQKLVFFAEDVGSNK-GAIIGLMVGGVIVIA,用少许DMSO溶解后,加入无菌三蒸水稀释至5 mg/mL,37℃培养箱中温育3天进行老化。DMEM培养液,胎牛血清均购自美国Gibco/Invitrogen公司。PI购自美国Sigma公司。TNF- α 和IL-1 β ELISA试剂盒(美国Peprotech公司),All-in-one™ qPCR Mix(美国GeneCopoeia公司),酶标仪(美国Thermo公司),流式细胞仪(美国BD FACS Calibur公司),CO₂培养箱(美国Thermo公司)。

细胞培养与药物处理 小胶质细胞BV2以 1×10^5 /mL种植于6孔板内,每孔1.5 mL,5%胎牛血清,置于37℃、5%CO₂培养箱内培养12 h,使其贴壁。用INF- γ (终浓度为100 U/mL)和fA β 1-42(终浓度50 μ g/mL)处理24 h,然后利用Transwell小室建立BV2和PC12细胞共培养体系、RNA提取或取上清液进行细胞因子检测。实验组分为4组:PBS对照处理组、INF- γ 处理组、fA β 1-42处理组、INF- γ /fA β 1-42处理组。每个组设置3次重复实验。

实时荧光定量PCR

引物设计 所有小鼠小胶质细胞表面A β 结合受体的引物序列均参照文献^[9]中设计,GAPDH为内参(表1)。

BV2细胞总RNA的提取与cDNA获得 INF- γ 和PBS处理的BV2细胞,12 000 \times g离心5 min获取细胞沉淀,用1 mL Trizol(美国Invitrogen公司)提取RNA,具体步骤参见说明书。用20 μ L DEPC水溶解

RNA 沉淀,电泳检测 RNA 完整性,Biowave DNA(英国 Biochrome 公司)检测 RNA 的纯度与浓度。5 μ g

RNA,用反转录酶 M-MLV (promega)反转录获得 cDNA。

表 1 所有引物的序列

Tab 1 Sequences of qRT-PCR primers

Murine gene	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')	Accession
GAPDH	CAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTG	CTCGCTCCTGGAAGATGGTGAT	NM_008084.2
CD36	GAACCACTGCTTTCAAAAAGTGG	TGCTGTTCTTTGCCACGTCA	NM_007643.4
CD47	TTGCGAAGTGACAGAGTTATCC	ACCTCCTTCTCCTCCTCGTAA	NM_010581.3
Integrin β 1	CTGATTGGCTGGAGGAATGTA	TGTCCATCATTGGGTAAAACAA	NM_010578.1
SRA	ACATCACCAACGACCTCAGACT	AGTTTGTCCAGTAAGCCCTCTG	NM_031195.2
SRB	TTTGGAGTGGTAGTAAAAAGGGC	TGACATCAGGGACTCAGAGTAG	NM_016741.2
RAGE	GTGCTGGTCTTGCTCTATGG	TTCCTGTGTTTCAGTTTCCATTC	NM_007425.2
FPR2	ATTGTTGCTGTTTGTCTATGGAC	CTGCTGTAAGGACTCGTAAAGG	NM_008039.2
FC γ R I	CGGATGGAAGAATAAACTGGTG	GGTAGATGCCGCTGTGACTC	NM_010186.5
FC γ R III	TTCTCTATCCAAAAGCCAACC	GAGGATGTAGTTGCTGGGTCTT	NM_010188.5

实时定量 PCR 反应体系为 15 μ L,每个样本做 3 个复孔,实验重复 3 次,经过优化,反应条件如下:37 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 40 个循环,循环结束运行熔解曲线。

细胞因子和 NO 测定 用 ELISA 试剂盒检测各实验组 BV2 细胞培养液中 IL-1 β 和 TNF- α 水平,具体方法参见说明书,用 Griess 法检测培养液中 NO 释放水平。

流式细胞术分析 PC12 细胞线粒体膜电位 利用 Transwell (5 μ m)小室建立共培养体系,具体如下:在 24 孔板内种植 PC12 细胞(1×10^5 /mL,每孔加 500 μ L),贴壁后,取 200 μ L 不同实验组的 BV2 细胞及其培养液加入到 Transwell 上室。共培养 36 h 后,进行线粒体膜电位标记,步骤如下:胰酶消化,1 000 \times g 离心 2 min,收取 PC12 细胞沉淀,10 mL PBS 洗涤 2 次,重悬于 5 mL 的 1 \times HBSS 缓冲液中。加入 TMRM(终浓度为 50 nmol/L),37 $^{\circ}$ C,避光,摇床(150 r/min)温育 15 min,阳性对照中加入去极化剂 FCCP(终浓度 20 μ mol/L)。1 000 \times g 离心 5 min 去除上清,并用 4 mL PBS 洗 2 次,细胞沉淀重悬于 500 μ L PBS 中,流式细胞仪检测线粒体膜电位并分析。

流式细胞术分析 PC12 细胞死亡 上述细胞共培养 48 h 之后,离心收集 PC12 细胞,直接用细胞核染料 PI 进行核标记,流式细胞仪分析并统计细胞死亡情况。

统计分析 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 5 软件、*t* 检验、单尾、置信空间

95%对实验数据进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

目的基因 PCR 扩增曲线 已有研究表明小胶质细胞表面存在大量的 A β 结合受体,A β 通过这些受体与小胶质细胞结合,并引起不同的生理病理反应。本文用 100 U/mL 的 INF- γ 处理小鼠胶质瘤细胞系 BV2 24 h,PBS 处理组为对照,提取小胶质细胞的 RNA,进行反转录,RT-PCR 法在 mRNA 水平上检测小胶质细胞表面的 A β 受体表达。结果荧光定量的扩增动力学曲线符合标准的“S”形荧光增长曲线,曲线拐点清楚,基线平而无明显上扬趋势,可以反应样本中目的基因的 mRNA 水平(图 1)。

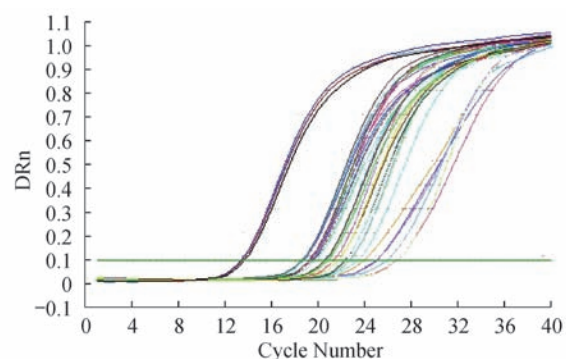


图 1 BV2 细胞 A β 结合受体的 mRNA 的扩增曲线
Fig 1 Amplification curves of A β -binding receptors mRNAs in BV2 cell line

INF- γ 诱导小胶质细胞 A β 受体 FPR2、RAGE

和 CD36 mRNA 表达明显增加 对上述 3 次独立的实验数据进行统计学分析,可以看出,经 INF- γ 刺激后,小胶质细胞 CD36、FPR2 和 RAGE 的表达量

均明显增加,超过对照 PBS 两倍以上($P < 0.01$)。而 SRA、SRB、CD47、FC γ R I、FC γ R III 和 Integrin β 1 的表达量则无明显变化(图 2)。

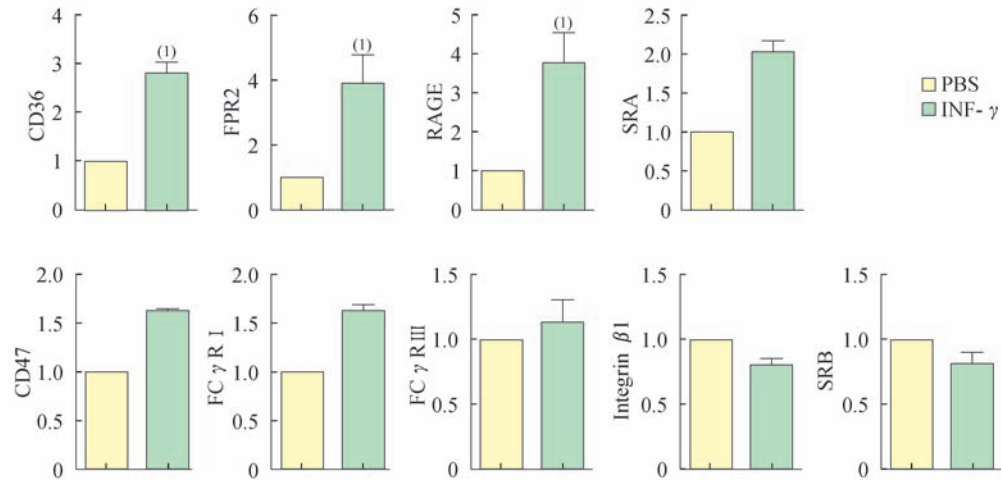


图 2 BV2 细胞 A β 结合受体的表达

Fig 2 Expression of A β -binding receptors in BV2 cell line

vs. the PBS group, ⁽¹⁾ $P < 0.001$. The treatment of INF- γ have a twofold to sixfold increase in expression of the A β -binding CD36, FPR2 and RAGE.

INF- γ 协同 fA β 1-42 诱导小胶质细胞炎症因子释放 鉴于上述研究结果,INF- γ 诱导小胶质细胞表达能与 A β 结合的受体,推测可能增强小胶质细胞对 fA β 1-42 反应的敏感性,故我们采用 ELISA 和 Griess 方法检测小胶质细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 NO 等炎症物质的释放水平。发现单独 INF- γ 可显著

增加 TNF- α 、IL-1 β 和 NO 的释放(P 均 < 0.001),而单独 fA β 也可诱导分泌 TNF- α 和 NO 的产生(P 值分别为 < 0.001 、 < 0.01 和 < 0.05)。相比之下,INF- γ 和 fA β 1-42 联合使用则可以明显增加小胶质细胞释放更多的炎症和氧化物质(图 3)。

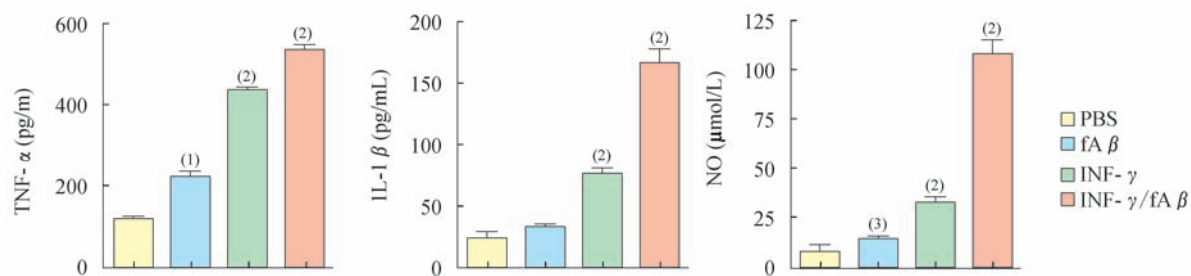


图 3 fA β 1-42 /INF- γ 联合增强小胶质细胞炎症因子的释放

Fig 3 Effect of fA β 1-42 /INF- γ on the production of TNF- α , IL-1 β and NO

vs. PBS group, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$, ⁽³⁾ $P < 0.05$.

INF- γ 刺激有助 fA β 激活的小胶质细胞介导的神经毒性 线粒体跨膜电位 DYmt 的下降,被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,它发生在细胞核凋亡特征(染色质浓缩、DNA 断裂)出现之前,一旦线粒体 DYmt 崩溃,则细胞凋亡不可逆转。本实

验采用线粒体膜电位测定,了解 fA β 1-42 和 INF- γ 单独或联合对神经元毒性的影响。结果显示: FCCP 是一种线粒体膜电位的去极化剂,可以有效降低线粒体膜电位,在本实验中作为阳性对照(图 4)。通过与 PBS、INF- γ 、fA β 1-42 处理组比较,可以看出 INF- γ 和

fA β 同时处理更加明显地降低 PC12 细胞线粒体膜电位。另外,共培养 48 h 之后,用 PI 标记 PC12 细胞,流式细胞仪检测发现:与其他实验组比较,INF- γ 协同 fA β 诱导更多的细胞凋亡(图 5)。

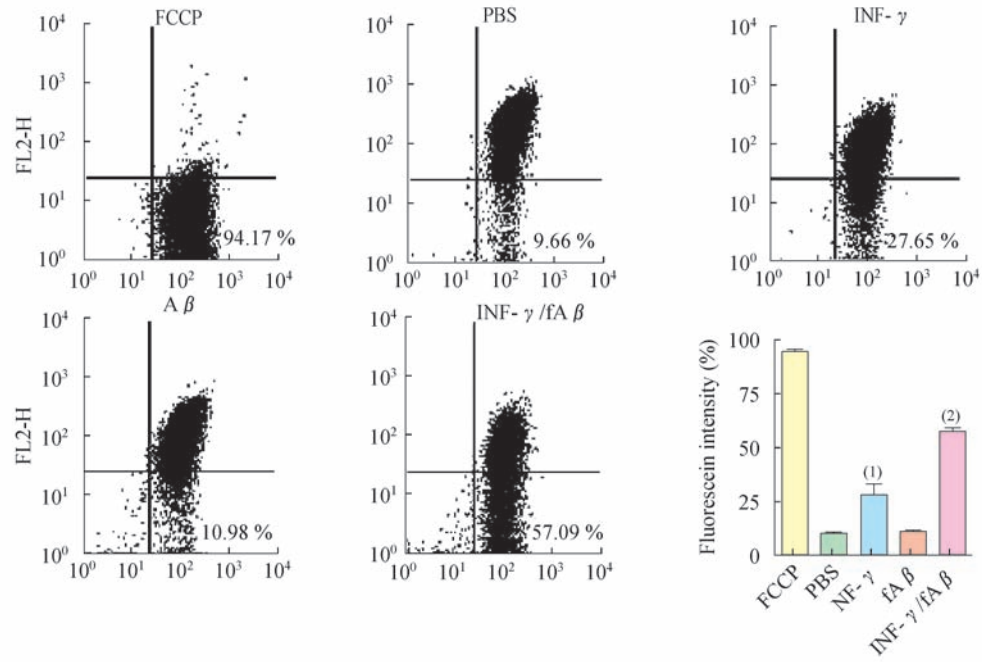


图 4 fA β 1-42 / INF- γ 诱导神经元线粒体膜电位下降

Fig 4 Mitochondrial membrane potential was significantly reduced with the treatment of fA β 1-42/INF- γ vs. PBS group, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.001$.

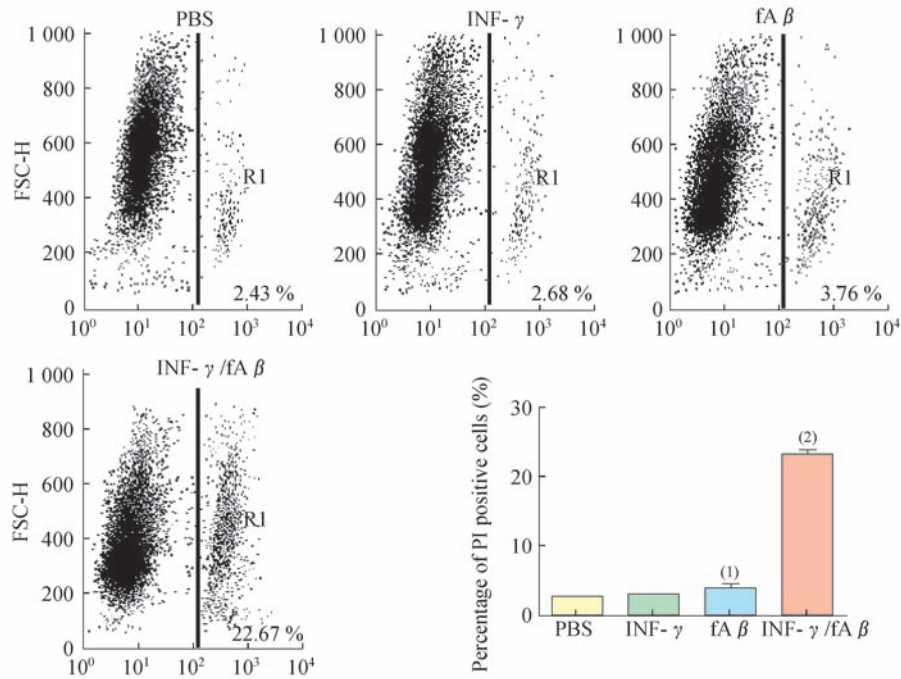


图 5 fA β 1-42 / INF- γ 诱导神经元细胞死亡

Fig 5 fA β 1-42 / INF- γ induced neuron cell death

vs. PBS group, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.001$.

讨 论

本研究选择了一组可能与炎症反应和 A β 作用相关的分子,如 FPR2、RAGE 和 CD36, SRA、SRB、CD47、FC γ R I、FC γ R III 和 Integrin β 1, 期望了解 INF- γ 刺激小胶质细胞对这些分子的影响以及与 A β 作用的相关性。结果显示 INF- γ 诱导小胶质细胞 FPR2、RAGE 和 CD36 表达明显增加,而 SRA、SRB、CD47、FC γ R I、FC γ R III 和 Integrin β 1 的表达无明显变化。以往研究大部分聚焦于炎症因子与 A β 相互作用所导致的炎症因子释放和神经毒性作用方面,而对于炎症过程中 A β 受体变化的研究相对较少,只有 Chen 等^[10] 发现 INF- γ 通过浓度依赖性地上调 mFPR2 的表达,增强了小胶质细胞通过 mFPR2 途径的 A β 吞噬能力和 TNF- α 的释放。Mou 等^[11] 提出 LPS 和 IL-1 β 上调血管内皮细胞的 mFPR2 的表达。Józefowski 等^[12] 报告了 LPS 诱导 TNF- α 的产生与 CD36 分子相关。本文利用 RT-PCR 的方法对大多数 A β 结合受体的表达量进行检测发现:INF- γ 不仅可以诱导 FPR2 的表达,还可以增加 CD36 和 RAGE 的表达,为今后研究 A β 作用于小胶质细胞提供了新的信息。

由于小胶质细胞表面这些受体可以与 A β 结合传导信号,因此有理由相信 INF- γ 激活后的小胶质细胞可加重对 A β 的反应性。我们的结果显示:与 INF- γ 或 fA β 处理相比较,两者联合使用刺激小胶质细胞产生更多炎症细胞因子、引起神经元更强线粒体膜电位的改变和更多的细胞凋亡,与以往研究相一致。LPS 促进 fA β 诱导的单核细胞 IL-1 β 的释放,充分提示小胶质细胞炎症反应在 A β 作用时的重要性。

综上所述,INF- γ 诱导的 A β 结合受体表达量上调,可能参与 A β 激活小胶质细胞的炎症反应和随后的神经元毒性,可能成为今后 AD 患者治疗的靶点。

参 考 文 献

[1] 肖增平,吉爱国.老年痴呆的发病机制及治疗的研究进展

[J]. 中国老年学杂志,2008,28(1):95-97.

- [2] Li M, Pisalyaput K, Galvan M, et al. Macrophage colony stimulatory factor and interferon-gamma trigger distinct mechanisms for augmentation of beta-amyloid-induced microglia-mediated neurotoxicity[J]. *J Neurochem*, 2004, 91(3):623-633.
- [3] Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, et al. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2012,9:151.
- [4] Tan ZS, Seshadri S. Inflammation in the Alzheimer's disease cascade: culprit or innocent bystander? [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2010,2(2):6.
- [5] Antic A, Dzenko KA, Pachter JS. Engagement of the scavenger receptor is not responsible for beta-amyloid stimulation of monocytes to a neurocytopathic state[J]. *Exp Neurol*, 2000, 161(1):96-101.
- [6] Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, et al. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(7):2665-2674.
- [7] Koenigsnecht J, Landreth G. Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism[J]. *J Neurosci*, 2004,24(44):9838-9846.
- [8] Fang F, Lue LF, Yan S, et al. RAGE - dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *FASEB J*, 2010, 24(4):1043-1055.
- [9] Pan XD, Zhu YG, Lin N, et al. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2011,6:45.
- [10] Chen K, Iribarren P, Huang J, et al. Induction of the formyl peptide receptor 2 in microglia by IFN-gamma and synergy with CD40 ligand[J]. *J Immunol*, 2007, 178(3): 1759-1766.
- [11] Mou H, Li Z, Kong Y, et al. Proinflammatory stimulants promote the expression of a promiscuous G protein-coupled receptor, mFPR2, in microvascular endothelial cells[J]. *Inflammation*, 2012,35(2):656-664.
- [12] Józefowski S, Sobota A, Pawlowski A, et al. Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan enhances LPS-induced TNF- α production and inhibits NO secretion by engaging scavenger receptors [J]. *Microb Pathog*, 2011,50(6):350-359.

(收稿日期:2012-10-27;编辑:王蔚)