

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.17.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 17-0026-05

α -突触核蛋白对小鼠星形胶质细胞的激活作用*

王进堂¹, Jeremy Walston², Peisong Gao³, 高茂龙¹, Sean X Leng², 陈峥¹

(1. 北京老年医院 老年病临床与康复研究所, 北京 100095; 2. Division of Geriatric Medicine and Gerontology, Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore 21224, USA; 3. Johns Hopkins Asthma and Allergy Center, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore 21224, USA)

摘要: **目的** 研究外源性 α -突触核蛋白 (α -syn) 及其 A53T 突变型对星形胶质细胞的激活作用。**方法** 分离培养小鼠原代星形胶质细胞, 经 α -syn 和 A53T 刺激后, 用实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 检测 Toll 样受体 (TLRs) 和核转录因子- κ B (NF- κ B) 的表达变化。**结果** 与对照组比较, 2 种 α -syn 提高 TLRs1 ~ 4 和 NF- κ B 的表达水平 ($P < 0.05$), 其中 A53T 作用更强; Western blot 检测结果表明, A53T 提高 TLR2 和 NF- κ B 的蛋白水平。**结论** α -syn 激活星形胶质细胞介导的固有免疫反应, 为神经退行性疾病机制提供免疫学证据。

关键词: α -突触核蛋白; 星形胶质细胞; Toll 样受体; 神经退行性疾病

中图分类号: R742

文献标识码: A

Alpha synuclein activates astrocytes in mice*

Jin-tang Wang¹, Jeremy Walston², Peisong Gao³, Mao-long Gao¹, Sean X Leng², Zheng Chen¹

(1. Institute for Geriatrics and Rehabilitation, Beijing Geriatric Hospital, Beijing 100095, China; 2. Division of Geriatric Medicine and Gerontology, Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21224, USA; 3. Johns Hopkins Asthma and Allergy Center, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21224, USA)

Abstract: Objective To investigate the activation effect of α -synuclein (α -syn) on astrocytes and innate immunity. **Methods** Primary astrocytes of mice were isolated and treated with α -syn (wild type, Wt) and its A53T mutant. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot analysis were used to examine altered expressions of toll-like receptors (TLRs) 1-4 and NF- κ B. **Results** In comparison with the control groups, Wt α -syn and its A53T mutant increased mRNA expressions of TLRs 1-4 and NF- κ B, displaying a statistical significance ($P < 0.05$), with the A53T mutant having more potent immune induction effect than Wt α -syn. Western blot analysis showed the A53T mutant upregulated protein expressions of TLR2 and NF- κ B. **Conclusions** Alpha synuclein is a powerful immunogenic substance to activate the astrocyte-mediated innate immune response, which provides a strong immunological evidence for the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

Keywords: α -synuclein; astrocyte; toll-like receptors; neurodegenerative diseases

α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 正常存在于突触前神经终端, 产生生理功能^[1]。其异常代谢

或产物被释放到细胞外基质, 激活胶质细胞和固有免疫反应, 引起神经元损伤^[2-4], 成为某些神经退行

收稿日期: 2016-12-08

* 基金项目: 美国米尔斯坦亚美医学基金会奖学金项目

[通信作者] 陈峥, E-mail: paul_c99@sina.com; Tel: 010-83183977

性疾病的发病机制之一^[5-6]。有证据表明, α -syn 突变和聚合可以激活小胶质细胞产生炎症反应^[4, 7], 但其对星形胶质细胞的激活作用, 目前仍有争议。本研究利用 α -syn 及其 A53T 突变型检测 α -syn 对 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 1 ~ 4 和核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 表达的影响, 以证实其是否参与星形胶质细胞介导的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 细胞培养剂和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 野生型和 A53T α -syn 购自美国 rPeptide 公司, β -Actin 初级抗体、Alexa Fluor®514 羊抗兔二级抗体、实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒、DAPI 核染色剂购自美国 Thermo Fisher 公司, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记二级抗体 (美国 Cell Signaling 公司), TLR-2、胶质纤维原酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、NF- κ B 初级抗体购自美国 Abcam 公司。

1.2 细胞分离和培养

混合胶质细胞分离于新生 (3 ~ 4 d) C57BL/6 小鼠的大脑皮层, 根据细胞黏附程度, 将星形胶质细胞与其他细胞, 如小胶质和少突胶质细胞分离^[8]。取出大脑皮层, 经胰蛋白酶消化制成细胞悬浮液, 在聚赖氨酸包被的培养瓶及 37℃、5% 二氧化碳 CO₂、95% 湿度培养箱中用 DMEM/F12 (含 10% FBS、100u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素) 培育 16 h, 通过剧烈摇动和清洗, 继续培养 3 ~ 5 d, 然后根据需要分离于多个培养瓶, 培养至 90% 覆盖时即可使用。

1.3 荧光显微镜观察

在盖玻片上培养星形胶质细胞, 用冰冷的甲醇和丙酮 (1 : 1) 溶液固定 5 min, 予以生理盐水 PBS (pH 7.4) 冲洗 10 ~ 15 min, 2.25% 甘氨酸室温下作用 20 min, PBS 反复冲洗后包被缓冲液 (1% 牛血清白蛋白、0.3% Triton X-100、10% 山羊血清) 室温下作用 1 h, PBS 反复冲洗后用 GFAP 初级抗体 (兔抗鼠 1 : 1 000) 4℃过夜, PBS 反复冲洗后用 Alexa Fluor®514 二级抗体 (羊抗兔, 1 : 1 000) 室温下作用 1 h, PBS 反复冲洗后用 1 μ g/ml DAPI

进行细胞核荧光染色 10min。封片后在荧光显微镜 (日本尼康公司, 型号 ECLIPSE Ni-U) 下检查。

1.4 细胞药物处理

将传代的星形胶质细胞在 6 孔板上分成多个处理组, 替换新鲜培养液, 分别加入适当浓度的药物^[7]: 2 和 20 μ g/ml 野生型 α -syn、A53T 突变型, 留取 0% 药物作为对照, 继续常规培养 24 h。然后按分组进行细胞裂解液 (0.5 ml/孔 Trizol 液) 的 RNA 提取和蛋白裂解液 (0.2 ml/孔) 的蛋白质提取, 分别用于 qRT-PCR 和 Western blot 检测。

1.5 qRT-PCR

qRT-PCR 测定 TLRs 1 ~ 4 和 NF- κ B mRNA 的表达水平, 并以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的表达作为内部参照。在分光光度计 (型号 NanoDrop™ 2000) 上严格按照美国 Applied Biosystems 公司提供的 TaqMan 基因表达分析程序进行测定。目标转录物用美国 TaqMan 公司探针测定: TLR1 (Mm01208874_m1), TLR2 (Mm00442346_m1), TLR3 (Mm00628112_m1), TLR4 (Mm00445273_m1), NF- κ B (Mm00476361_m1), 其相对丰度用 GAPDH (Mm03302249_g1) 进行标准化处理。基因表达改变 = Δ Ct 值 - GAPDH 参照值, 然后计算 Δ Δ Ct 和倍数差异数, 用于统计学处理。

1.6 Western blot 检测

用 Western blot 检测 TLR2 和 NF- κ B 蛋白的表达, 以 β -actin 作为内部对照。用 Bradford 试剂 (美国 Bio-Rad 公司) 测定蛋白浓度, 取 30 μ g 蛋白质加热至 95℃变性, 经 Bio-Rad 电泳仪电泳和聚偏二氟乙烯膜半干转移仪转膜, 进行初级抗体 (4℃过夜) 和 HRP 结合二级抗体 (室温 1 h) 孵育。然后分别用增强化学荧光试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司) 在暗室显影。

1.7 统计学方法

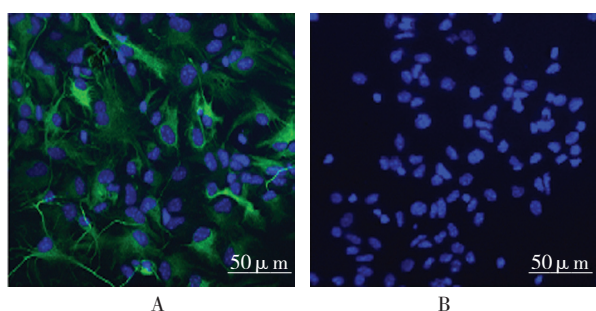
数据分析采用 SAS 9.1.3 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 星形胶质细胞荧光显微镜观察

本研究提取的星形胶质细胞清除了绝大多数其他细胞类型。免疫荧光分析显示, 不同形态的 GFAP 阳性细胞代表星形胶质细胞数, DAPI 阳性细胞代表

细胞总数。在镜下随机选取 5 个视野进行细胞计数, GFAP 阳性细胞占 $(93.96 \pm 4.03)\%$ 。见图 1。

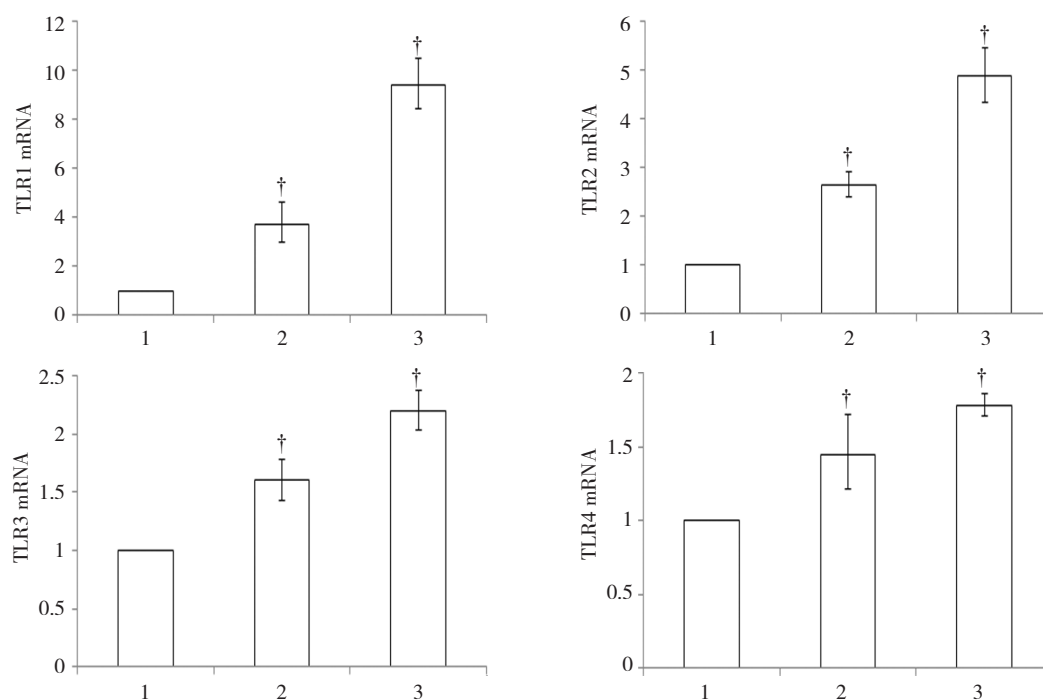


A: GFAP 阳性细胞 (绿色胞浆染色), DAPI 阳性细胞 (蓝色细胞核染色); B: GFAP 阴性细胞, DAPI 阳性细胞

图 1 星形胶质细胞免疫荧光分析

2.2 α -Syn 诱导 TLRs 的表达

TLRs 是固有免疫反应中用于识别各种内源性或外源性抗原的一组受体。经 A53T 突变型刺激 24 h 后, 2 和 20 μ g/ml A53T 突变型组与对照组的 TLRs 1 ~ 4 mRNA 表达水平比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=4.490$ 、 7.617 、 7.328 和 4.031 , $P=0.027$ 、 0.005 、 0.009 和 0.048)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 2 和 20 μ g/ml A53T 突变型组 TLRs 1 ~ 4 mRNA 表达水平高于对照组, 其中以 TLR1 mRNA 和 TLR2 mRNA 增长幅度较大 (见图 2)。



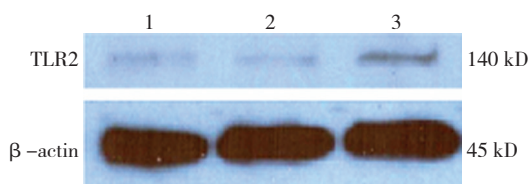
1: 对照组; 2: 2 μ g/ml A53T 突变型组; 3: 20 μ g/ml A53T 突变型组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 A53T 突变型对 TLRs 1 ~ 4 表达的激活作用 ($\bar{x} \pm s$)

Western blot 检测结果显示, 当 A53T 突变型浓度增加到 20 μ g/ml, TLR2 蛋白的表达水平升高 (见图 3)。结果提示, α -syn 诱导和激活星形胶质细胞介导的固有免疫反应。另外, 野生型 α -syn 对 TLRs 也产生较弱的免疫诱导效应。

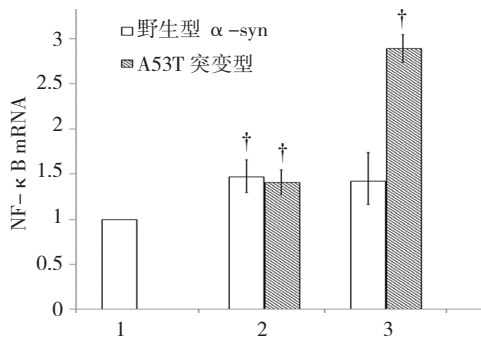
2.3 α -Syn 诱导 NF- κ B 的表达

NF- κ B 作为非常重要的转录因子, 是多种炎症因子基因表达的上游调节分子, 在固有免疫炎症通路中发挥中枢和核心的调控作用。分别经野生型 α -syn、A53T 突变型处理后, 2 和 20 μ g/ml A53T 突变型组与对照组的 NF- κ B mRNA 表达水平比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=4.640$ 和 9.810 , $P=0.047$ 和 0.008)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 2 和 20 μ g/ml A53T 突变型组 NF- κ B mRNA 表达水平高于对照组。其中, 经野生型 α -syn 处理后, 20 μ g/ml A53T 突变型组较 2 μ g/ml A53T 突变型组 NF- κ B mRNA 表达水平升高幅度较大 ($P < 0.05$) (见图 4)。Western blot 检测结果显示, 当 A53T 突变型浓度增加到 20 μ g/ml, NF- κ B 蛋白的表达水平升高 (见图 5)。结果提示 α -syn 能提高 NF- κ B 表达的水平, 增加固有免疫反应程度, 并且 A53T 突变型具有较强的刺激活性。



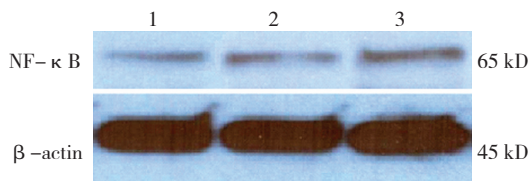
1: 对照组; 2: 2 μ g/ml A53T 突变型组; 3: 20 μ g/ml A53T 突变型组

图 3 TLR2 蛋白的表达



1: 对照组; 2: 2 μ g/ml; 3: 20 μ g/ml; †: 与对照组比较, $P < 0.05$

图 4 野生型 α -syn 及 A53T 突变型对 NF- κ B 表达的激活作用 ($\bar{x} \pm s$)



1: 对照组; 2: 2 μ g/ml A53T 突变型组; 3: 20 μ g/ml A53T 突变型组

图 5 NF- κ B 蛋白的表达

3 讨论

大量研究证明, 在神经退行性疾病的发病机制中, 星形胶质细胞扮演重要角色, 其激活固有免疫和炎症反应, 促进神经元毒性微环境的形成^[2-3, 5]。近年来, 在 α -syn 介导的神经元变性的炎症病理中, 研究的重点都放在 α -syn 对小胶质细胞的致炎效应上^[7, 9], 包括 TLRs 表达和促炎症细胞因子分泌等, 然而其对星形胶质细胞的免疫诱导作用却很少得到关注。本实验证实, α -syn 及其 A53T 突变型上调 TLRs 1 ~ 4 和 NF- κ B 的表达水平, 且 A53T 突变型具有较强的诱导效应, 揭示 α -syn 能刺激星形胶质细胞, 激活脑的固有免疫反应。

关于 α -syn 对星形胶质细胞的激活效应, 仅有几篇文献报道, 例如将神经元分泌的 α -syn 直接作用

于星形胶质细胞, 诱导炎症反应, 刺激 IL-6、IL-1 β 、ICAM-1 的释放和 CXCL10 的表达^[8, 10-11]。TLRs 作为免疫原识别受体也参与神经变性的炎症病理变化, 并且与 α -syn 诱导的免疫反应密切相关, 例如在小胶质细胞, α -syn 上调 TLR2、TLR3 和 TLR7 的表达, 并且激活炎症反应^[7, 12], 而对 NF- κ B 和 TNF- α 没有作用^[12]。然而在星形胶质细胞中, α -syn 诱导的 TLRs 激活罕有报道, 目前仍不清楚。本研究结果弥补这一事实, 证实 TLRs 1 ~ 4 都得到激活。NF- κ B 作为神经炎症通路的关键转录因子, 直接参与神经炎症和神经变性病理变化, 这已在小胶质细胞得到证实^[13], 同时 α -syn 也上调小胶质细胞 NF- κ B 的表达^[14]。本研究证实, α -syn 提高星形胶质细胞 NF- κ B 表达, 与其对 TLRs 的诱导效应是一致的, 进一步提示 α -syn 通过刺激星形胶质细胞, 激活脑的固有免疫反应, 为神经退行性疾病的致病机制的研究提供了有力的免疫学证据。

综上所述, α -syn 作为神经细胞的异常代谢产物, 是一种较强的免疫原物质, 增加星形胶质细胞的 TLRs 活性, 提高 NF- κ B 的表达, 直接参与对脑固有免疫的激活, 并且 A53T 突变型具有较强的免疫诱导效应, 为 α -syn 参与星形胶质细胞介导的神经退行性疾病的病理机制研究提供了有力的免疫学证据。

致谢 感谢美国约翰霍普金斯大学医学院 Sean Leng 教授实验室提供实验条件。

参 考 文 献:

- [1] NORRIS E H, GIBSON B I, LEE V M. Alpha-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2004, 60: 17-54.
- [2] MA D, JIN S, LI E, et al. The neurotoxic effect of astrocytes activated with toll-like receptor ligands[J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 254(1/2): 10-18.
- [3] LEE H J, SUK J E, PATRICK C, et al. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 9262-9272.
- [4] MORI F, TANJI K, YOSHIMOTO M, et al. Demonstration of alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment[J]. *Exp Neurol*, 2002, 176: 98-104.
- [5] GOEDERT M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2: 492-501.
- [6] LAWAND N B, SAADÉ N E, EL-AGNAF O M, et al. Targeting α -synuclein as a therapeutic strategy for Parkinson's disease[J].

- Expert Opin Ther Targets, 2015, 19: 1351-1360.
- [7] ROODVELDT C, LABRADOR-GARRIDO A, GONZALEZ-REY E, et al. Preconditioning of microglia by α -synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (TLR) stimulation[J]. PLoS One, 2013, 8: e79160.
- [8] GORINA R, FONT-NIEVES M, MÁRQUEZ-KISINOU SKY L, et al. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NF- κ B signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways[J]. Glia, 2011, 59: 242-255.
- [9] KIM C, HO D H, SUK J E, et al. Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia[J]. Nat Commun, 2013, 4: 1562.
- [10] KLEGERIS A, GIASSON B I, ZHANG H, et al. Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells[J]. FASEB J, 2006, 20: 2000-2008.
- [11] LEE H J, KIM C, LEE S J. Alpha-synuclein stimulation of astrocytes: potential role for neuroinflammation and neuroprotection[J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3: 283-287.
- [12] BÉRAUD D, TWOMEY M, BLOOM B, et al. α -Synuclein alters toll-like receptor expression[J]. Front Neurosci, 2011, 5: 80.
- [13] LANZILLOTTA A, PORRINI V, BELLUCCI A, et al. NF- κ B in innate neuroprotection and age-related neurodegenerative diseases[J]. Front Neurol, 2015, 6: 98.
- [14] REYNOLDS A D, GLANZER J G, KADIU I, et al. Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease[J]. J Neurochem, 2008, 104: 1504-1525.

(童颖丹 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年，系中国科技论文统计源期刊、北大中文核心期刊、中国核心学术期刊（RCCSE）（A-）及湖南省十佳期刊，被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》（CA）、俄罗斯《文摘杂志》（AJ）等国内外多个检索系统收录。本刊是中华人民共和国教育部主管的综合性医学学术期刊，以服务于广大医药卫生科技人员，促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学湘雅医院主办，湖南省湘雅医学期刊社有限公司出版。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果，以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。读者为广大医药卫生工作者。

《中国现代医学杂志》为旬刊，国际标准开本（A4），全刊为彩色印刷，无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸（880×1 230 mm），封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸（635×965 mm）印刷，每个月 10、20、30 日出版。定价 25 元/册，全年 900 元。公开发行，国内统一刊号：CN 43-1225/R；国际标准刊号：ISSN 1005-8982；国内邮发代号：42-143。欢迎新老用户向当地邮局（所）订阅，漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址：湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部，邮编：410008

电话：0731-84327938；传真：0731-89753837；E-mail：journal@zgxddy.com

唯一官网网址：www.zgxddy.com