



$\alpha 7$ 型乙酰胆碱能受体在小胶质细胞中下调炎症水平的作用及其机制研究

沈越, 张静静, 杜晶, 曹奇, 刘冲, 钱皎

The anti-inflammatory role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in microglial cells and its mechanisms

SHEN Yue, ZHANG Jingjing, DU Jing, CAO Qi, LIU Chong, QIAN Jiao

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202103028>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

巨噬源性泡沫细胞中p62蛋白上调作用和机制的研究

A study on the role and mechanism of upregulated p62 protein in macrophage-derived foam cells

药学实践杂志. 2019, 37(5): 400-405,426 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.004

改善糖尿病内皮祖细胞功能的研究进展

Research on the improving function of endothelial progenitor cells in diabetes

药学实践杂志. 2020, 38(1): 18-21 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201906065

海绵来源的smenospongine诱导乳腺癌MCF7细胞凋亡机制研究

Effect of marine sponge-derived smenospongine on apoptosis in breast cancer MCF7 cells

药学实践杂志. 2018, 36(5): 399-402,421 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.004

白三烯受体拮抗剂改善哮喘患者炎症及免疫功能的效果分析

Effect of leukotriene receptor antagonist on anti-inflammation and immune function in asthmatic patients

药学实践杂志. 2017, 35(6): 562-564,568 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.020

胰腺癌细胞中TRPV1受体参与EGFR介导的细胞功能研究

Transient receptor potential type vanilloid 1 regulates EGFR related functions in pancreatic cancer cells

药学实践杂志. 2018, 36(2): 126-130 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.007

阿司匹林联合阿托伐他汀协同抑制非小细胞肺癌细胞增殖及其机制研究

Study on the synergistic effects of aspirin and atorvastatin on cell proliferation of non-small cell lung cancer cells

药学实践杂志. 2021, 39(1): 38-43 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003191



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

$\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体在小胶质细胞中下调炎症水平的作用及其机制研究

沈越^{1a}, 张静静^{1b}, 杜晶², 曹奇^{1b}, 刘冲^{1b}, 钱皎^{1a} (1. 海军军医大学: a. 长海医院药学部, b. 药学院, 上海, 200433; 2. 济宁医学院药学院, 山东 济宁, 276826)

[摘要] 目的 小胶质细胞在中枢神经系统的炎症相关疾病中发挥重要作用,旨在研究在炎症环境中 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体的抗炎作用及机制。方法 应用 PNU282987 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体,应用脂多糖(LPS)造成细胞的炎症模型,通过实时定量 PCR 技术检测 BV2 细胞的炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 M1 型巨噬细胞标记物 CD68、CD86 与 M2 型巨噬细胞标记物 CD206、Arg1 的 mRNA 水平,通过细胞免疫荧光检测 M1 型及 M2 型巨噬细胞的比例,通过 Western blot 技术检测自噬相关蛋白的表达。结果 在 LPS 的刺激下,小胶质细胞中促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平显著增加、M1 型巨噬细胞比例显著增加、自噬水平显著上调,而应用 PNU282987 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体极大地降低了促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平、增加 M2 型巨噬细胞比例、降低 M1 型巨噬细胞比例,并进一步上调小胶质细胞的自噬水平。结论 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体可以发挥抑制小胶质细胞炎症反应的作用,其作用的实现依赖于调节小胶质细胞 M1 型和 M2 型巨噬细胞比例和上调自噬水平。

[关键词] $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体;小胶质细胞;炎症;自噬

[中图分类号] R743.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)04-0340-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202103028

The anti-inflammatory role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in microglial cells and its mechanisms

SHEN Yue^{1a}, ZHANG Jingjing^{1b}, DU Jing², CAO Qi^{1b}, LIU Chong^{1b}, QIAN Jiao^{1a} (1a. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, 1b. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Jining Medical University, Jining 276826, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-inflammatory role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) under inflammatory stress and its mechanisms. **Methods** PNU282987 was used for the activation of $\alpha 7$ nAChR and LPS was administrated as inflammatory stressor. Realtime PCR was used for the detection of IL-1 β , IL-6, TNF- α , M1 macrophage marker CD68, CD86 and M2 macrophage marker CD206, Arg1. Cell immunofluorescence was used for the detection of M1/M2 ratio and Western blot was applied for the detection of autophagy-related proteins. **Results** Under the stimulation of LPS, the mRNA levels of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , the proportion of M1 macrophage and autophagy process were increased in BV2 microglial cells. However, the administration of PNU282987 significantly decreased the mRNA levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α and the proportion of M1 macrophage while increased the proportion of M2 macrophage and the level of autophagy process. **Conclusion** Activating $\alpha 7$ nAChR plays an anti-inflammatory role in microglial cells under inflammatory stress due to the regulation of M1/M2 macrophage ratio and increase of autophagy level.

[Key words] $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor; microglial cells; inflammation; autophagy

小胶质细胞是一种神经胶质细胞,是存在于中枢神经系统中的炎症免疫相关细胞,相当于中枢神经器官(脑和脊髓)中的巨噬细胞^[1]。小胶质细胞的生理作用是清除中枢神经系统中受损的神经组织、通过血脑屏障入侵中枢的感染源及异物等。在病

理状态下,已有多项研究表明,小胶质细胞在多种中枢神经系统疾病的发生发展中发挥重要的作用,包括缺血性脑梗、多发性硬化、神经退行性疾病等^[2-3]。因此,抑制小胶质细胞的促炎反应对多种疾病的治疗具有重要意义。

$\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体 ($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR) 是一种 n 型乙酰胆碱能受体亚型,从属于配体门控的离子通道受体家族^[4]。从传统意义上来说, $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体位于神

[作者简介] 沈越, 硕士研究生, Email: flyingsy@smmu.edu.cn

[通信作者] 刘冲, 副教授, 研究方向: 心脑血管药理, Email: wanlc2004@aliyun.com; 钱皎, 副主任药师, 研究方向: 临床药学, Email: qianjiaosmmu@163.com

经肌肉接头后膜,接受传出神经末梢突触释放的化学递质(Ach)的作用,使得电信号继续传播。然而,近年来越来越多的研究表明,激动 $\alpha 7$ n型乙酰胆碱能受体可以参与胆碱能抗炎通路的激活,进而在多种病理状态下发挥抗炎作用^[5]。目前研究已表明, $\alpha 7$ n型乙酰胆碱能受体介导的胆碱能抗炎通路在多种疾病的发生发展中发挥抑制作用^[6]。

与其他巨噬细胞一样,小胶质细胞也分为经典活化的M1型巨噬细胞和选择性活化的M2型巨噬细胞^[7]。一般来讲,M1型巨噬细胞主要分泌促炎因子,如IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-12、IL-18等;而M2型巨噬细胞主要分泌抗炎因子,如IL-4、IL-10、IL-13等^[8]。因此,在炎症免疫相关疾病中,降低M1/M2细胞的比例成为重要的治疗手段。

自噬是生物体的一种重要的代谢机制,利用溶酶体降解自身受损细胞器和大分子物质的进化上高度保守的过程^[9]。自噬通常分为大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬,由于大自噬的研究相对较多,在疾病中的作用也较为突出,因此,本研究主要讨论大自噬的作用(后续将描述为“自噬”)。在自噬过程中,自噬小体形成,包裹细胞组分或入侵的病原体,与溶酶体融合形成自噬溶酶体,最后自噬溶酶体将包裹的底物降解并释放入胞浆供细胞重新利用^[10]。已有报道,自噬具有抗炎的作用^[11]。

由此,本课题组探究在小胶质细胞中, $\alpha 7$ n型乙酰胆碱能受体是否具有抗炎的作用,并且探究这一过程是否有调节M1型与M2型巨噬细胞的比例与诱导自噬过程的参与。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂与仪器

75%乙醇、异丙醇、甲醇、吐温-80、20 \times PBS、BSA、Tris碱、多聚甲醛、引物、LPS、DMEM高糖培养基、抗LC3抗体、抗Beclin-1抗体、抗p62/SQSTM1抗体、荧光二抗、DAPI染料、氯仿、细胞/组织蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂(三联装)、甘氨酸、30%聚丙烯酰胺溶液、过硫酸铵、TEMED、1.5 mol/L Tris(pH 8.8)、1.5 mol/L Tris(pH 6.8)。JA2003电子天平(上海天平仪器厂);电热恒温水浴槽DK-8D(上海一恒科学仪器有限公司);STS-8A转移脱色摇床(上海琪特分析仪器有限公司);离心管(Corning公司);移液枪(Eppendorf公司);7500RT-PCR仪器(Applied Biosystems公司);超纯水仪(Millipore公司);荧光显微镜IX71(日本Olympus公司);锥形瓶;激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司);酶标仪(瑞士Tacan公

司);细胞操作超净台(苏州净化设备有限公司);Odyssey扫膜仪(LI-COR公司)。

1.2 主要方法

1.2.1 BV2细胞的培养与处理

BV2小胶质细胞系(美国ATCC细胞库)。细胞常规培养加入10% FBS的DMEM高糖培养基中,培养在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中。在实验中,我们提前10 min加入PNU282987孵育,后加入LPS(1 000 ng/ml)刺激BV2细胞12 h。

1.2.2 实时定量PCR

提取细胞总RNA,逆转录成cDNA,使用cDNA进行实时定量PCR检测,引物由上海生工生物合成,序列见表1。

表1 实时定量PCR引物序列

引物名称	引物序列
IL-1 β (上游)	5'-CTCGTGCTGTCGACCCCAT-3'
IL-1 β (下游)	5'-AGTGTCGTCTCGTGTTCGGAC-3'
IL-6(上游)	5'-TAGTCCTTCTACCCCAATTTC-3'
IL-6(下游)	5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
TNF- α (上游)	5'-AAGCCTGTAGCCACGTCGTA-3'
TNF- α (下游)	5'-GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG-3'
GAPDH(上游)	5'-GTATGACTCCACTCACGGCAAA-3'
GAPDH(下游)	5'-GGTCTCGCTCCTGGAAGATG-3'

按规范程序设置PCR仪,所得CT值按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算。

1.2.3 Western blot

提取细胞/组织蛋白,BCA法测定蛋白浓度,经加样、跑胶、转膜等步骤后,PVDF膜孵育牛奶封闭3 h,后分别孵育一抗(4 $^{\circ}$ C过夜)、二抗(35 min,避光),用PBST液进行漂洗后,置于Odyssey扫膜仪中获取Western blot图像。

1.2.4 细胞免疫荧光

取出经过处理后的BV2细胞,弃掉培养基,加入PBS液润洗,用4%多聚甲醛室温孵育固定10 min,用PBS液洗涤5 min \times 3次,后用0.1% Triton X-100室温孵育5 min,用PBS洗涤5 min \times 3次;用山羊血清封闭室温10 min,后孵育一抗(室温1 h)、二抗(37 $^{\circ}$ C,30 min,避光),加入DAPI染核3 min,后用PBS洗涤5 min \times 3次,加入抗荧光淬灭剂后于激光共聚焦显微镜拍照。

1.2.5 统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理过程中,多组间比较用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)并Bonferroni检验, $P < 0.05$ 时认为差异具

有统计学意义。

2 结果

2.1 炎症环境中激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体具有抗炎作用

首先,我们探究在小胶质细胞中, $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体对炎症反应水平的影响。提前 10 min 加入 PNU282987(10 μ mol/L)孵育,后加入 LPS(1 000 ng/ml)刺激 BV2 细胞,刺激 12 h 后,通过实时定量 PCR 技术检测 BV2 细胞的促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平(图 1)。

从图 1 中可以看出,在 LPS 的刺激下,小胶质细胞中促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平显著增加,而应用 PNU282987 激动 $\alpha 7$ nAChR 极大地降低了促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平。由此可以看出,炎症环境中激动 $\alpha 7$ nAChR

在小胶质细胞中的抗炎作用。

2.2 炎症环境中激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体调节小胶质细胞 M1 型与 M2 型比例

炎症环境中激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体在小胶质细胞中的抗炎机制。提前 10 min 加入 PNU282987(10 μ mol/L)孵育,后加入 LPS(1 000 ng/ml)刺激 BV2 细胞,刺激 12 h 后,通过实时定量 PCR 技术检测 BV2 细胞的 M1 型巨噬细胞标记物 CD68、CD86 与 M2 型巨噬细胞标记物 CD206、Arg1 的 mRNA 水平(图 2)。

从图 2 可以看出,在 LPS 的刺激下,小胶质细胞中 M1 型巨噬细胞标记物 CD68、CD86 的 mRNA 水平显著增加,而应用 PNU282987 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体极大地降低了巨噬细胞标记物 CD68、CD86 的 mRNA 水平并增加了 M2 型巨噬细胞标记物 CD206、Arg1 的 mRNA 水平。

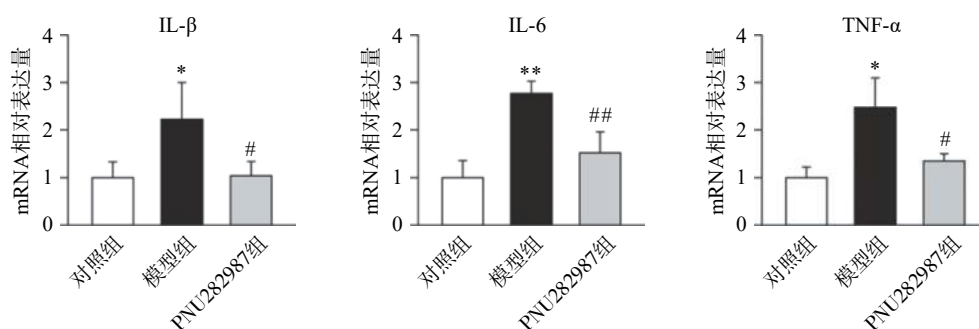


图 1 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体抑制 BV2 细胞的促炎因子表达 ($n=3 \sim 5$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与模型组比较。

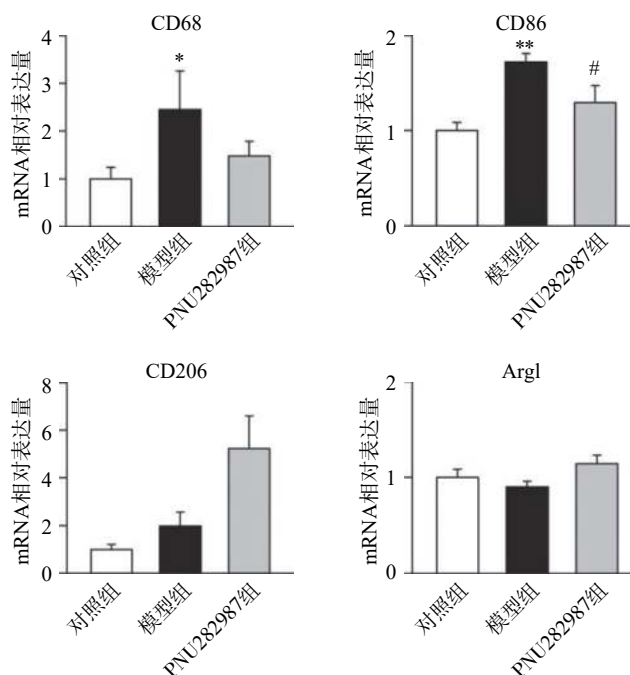


图 2 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体对 BV2 细胞 M1 型与 M2 型巨噬细胞标记物的 mRNA 水平影响 ($n=3 \sim 5$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与模型组比较。

对 BV2 细胞进行同样的处理,而后通过细胞免疫荧光技术检测 M1 型巨噬细胞比例($CD45^+$ 、 $CD68^+$ 细胞,图 3)与 M2 型巨噬细胞比例($CD45^+$ 、 $CD206^+$ 细胞,图 4)。

从图 3 和图 4 可以看出,在 LPS 的刺激下,小胶质细胞中 M1 型巨噬细胞比例显著增加,而应用 PNU282987 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体极大地降低了 M1 型巨噬细胞的比例并增加了 M2 型巨噬

细胞的比例。

综合图 2~4 的结果可以发现,炎症环境中激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体可以调节小胶质细胞 M1 型与 M2 型比例,增加 M2 型巨噬细胞的比例并降低 M1 型巨噬细胞的比例。

2.3 炎症环境中激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体上调小胶质细胞自噬水平

最后,我们探究炎症环境中激动 $\alpha 7$ n 型乙酰

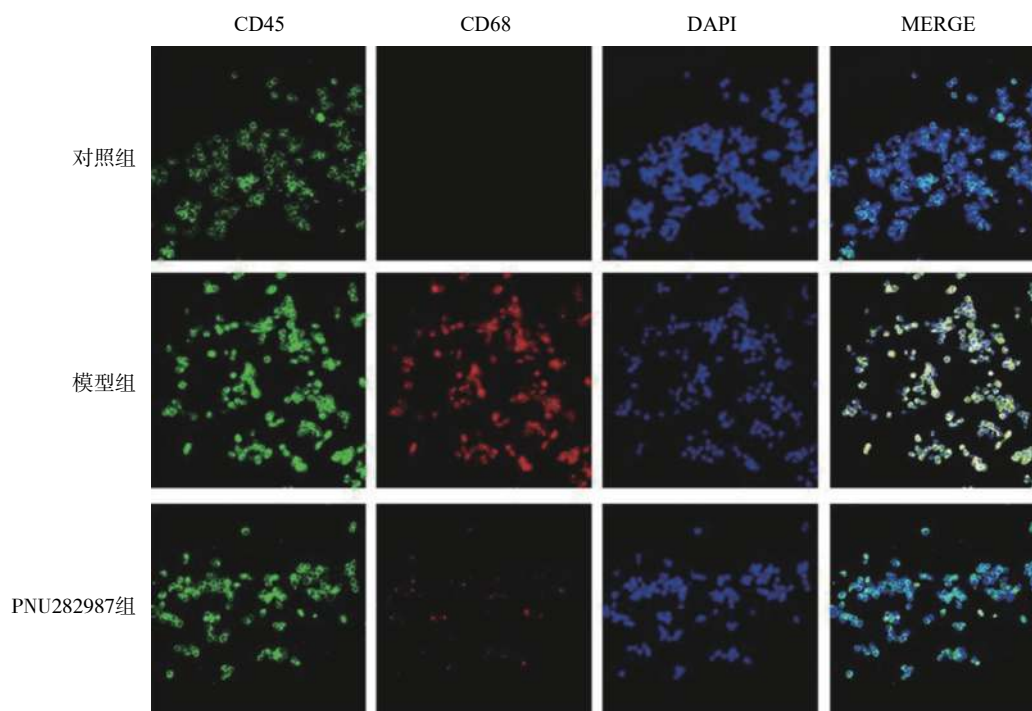


图 3 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体对 M1 型小胶质细胞比例的影响

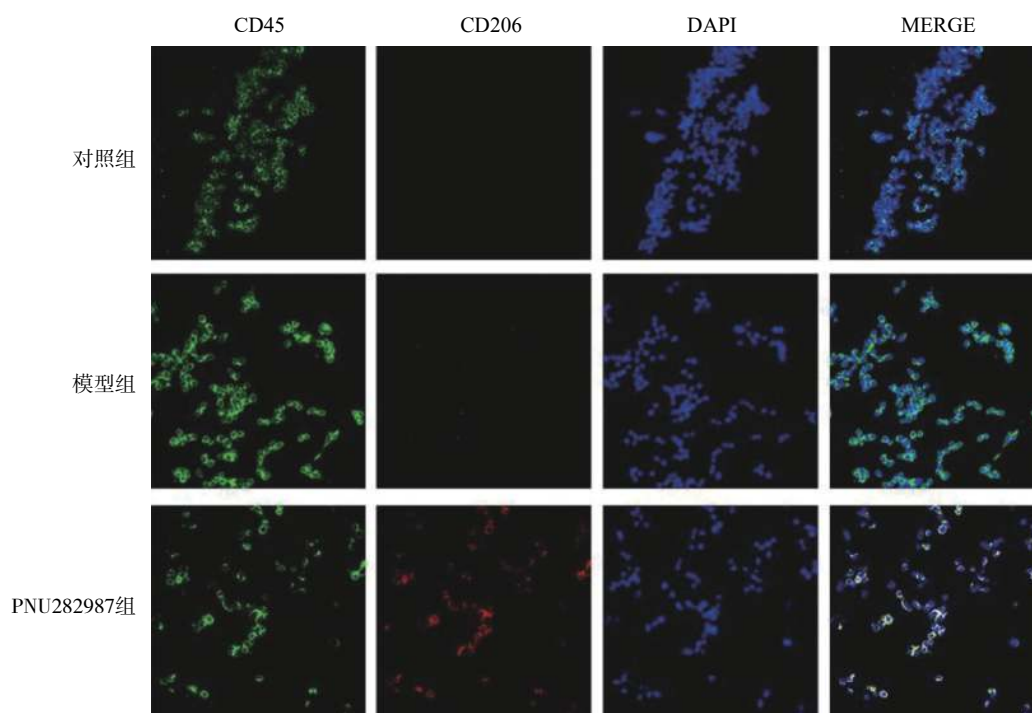


图 4 激动 $\alpha 7$ n 型乙酰胆碱能受体对 M2 型小胶质细胞比例的影响

胆碱能受体的抗炎作用是否有自噬过程的参与。选用不同剂量的 PNU282987, 提前 10 min 加入 PNU282987(0.1、1、10 μmol/L) 孵育, 后加入 LPS

(1 000 ng/ml) 刺激 BV2 细胞, 刺激 12 h 后, 通过 Western blot 技术检测 BV2 细胞中的自噬相关蛋白 Beclin 1、LC3-II/I 比例、p62/SQSTM1 表达水平(图 5)。

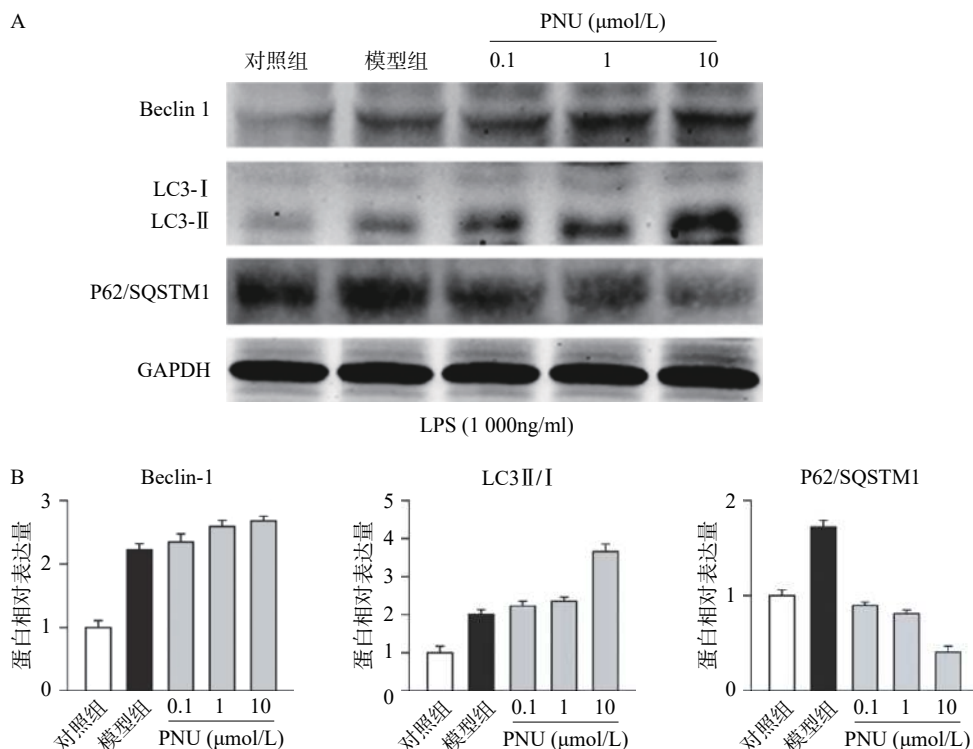


图 5 激动 α7nAChR 上调 BV2 细胞自噬水平 (n=3)

A. 蛋白图; B. 蛋白定量统计图

**P<0.01, 与对照组比较; #P<0.05, ##P<0.01, 与模型组比较。

从图 5 中可以看出, 在 LPS 的刺激下, 小胶质细胞中自噬水平显著增加, 而应用 PNU282987 激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体进一步增加了自噬水平。由此可以看出, 炎症环境中激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体可以上调 BV2 细胞的自噬水平。

3 讨论

α7 n 型乙酰胆碱能受体介导的胆碱能抗炎通路在多种炎症免疫相关疾病中发挥重要的调节作用。课题组的前期研究发现, 在小鼠多发性硬化模型中, 激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体可以发挥重要的抑制小胶质细胞炎症的作用^[12]。本研究在细胞水平应用小胶质细胞系 BV2 细胞, 再次证明了 α7 n 型乙酰胆碱能受体的抗小胶质细胞炎症的作用。

对于在小胶质细胞中 α7 n 型乙酰胆碱能受体抗炎作用的机制, 本研究首次表明, 其抗炎作用的实现有调节小胶质细胞 M1 型和 M2 型巨噬细胞比例的参与, 即激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体可以上调具有抗炎作用的 M2 型巨噬细胞并且下调 M1 型巨噬细胞的比例。这一结论为利用 α7 n 型乙酰

胆碱能受体激动剂作用治疗相关疾病的药物提供了重要的理论依据。此外, 我们也探讨了自噬这一重要的抗炎机制是否参与了这一过程。通过细胞实验得到了肯定的答案, 与以往研究相一致, 我们证明了上调小胶质细胞的自噬水平发挥抗炎作用。

由此我们得出, 激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体可以发挥抑制小胶质细胞炎症反应的作用, 其作用的实现依赖于调节小胶质细胞 M1 型和 M2 型巨噬细胞比例和上调自噬水平。下一步, 我们将通过单核巨噬细胞特异性敲除 α7 n 型乙酰胆碱能受体的小鼠进行研究, 进一步验证激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体是否可以通过调节巨噬细胞比例和自噬水平, 进而抑制小胶质细胞炎症发挥作用, 使实验结果更具说服力。我们相信, 这一研究将为开发利用新的胆碱能抗炎药物提供新的思路。

【参考文献】

[1] SHE H, HE Y, ZHAO Y, et al. Autophagy in inflammation: the p38α MAPK-ULK1 axis[J]. Macrophage, 2018, 4: 1629.