

# Tau 蛋白聚集体促进小胶质细胞活化的机制研究

郭笑迪 张国新 彭琴玉 张振涛

**【摘要】 目的** 探讨 Tau 蛋白聚集体对小胶质细胞活化的影响及机制。**方法** 纯化重组的 Tau 蛋白并制备 Tau 聚集体,处理小鼠小胶质细胞(BV2 microglia of mice,BV2),Western blot 检测半乳糖凝集素(Galectin,Gal)-9 的表达水平,酶联免疫吸附测定(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法检测细胞培养基中 Gal-9 蛋白的水平;体外表达纯化 Gal-9 蛋白,处理 BV2,Western blot 检测细胞中白细胞分化抗原 68(Cluster of differentiation 68,CD68)和电离钙结合适配器分子 1(Ionized calcium-binding adapter molecule 1,IBA1)蛋白的表达水平;免疫荧光检测 CD68 的表达水平;ELISA 检测细胞培养基中炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )的水平,逆转录-聚合酶链反应(Reverse transcription-Polymerase chain reaction,RT-PCR)检测细胞中 TNF- $\alpha$  的转录水平;Tau 蛋白聚集体与短发夹 RNA(Short hairpin RNA,ShRNA)-Gal-9 同时处理 BV2,观察阻断 Gal-9 的作用对小胶质细胞活化的影响。**结果** 与对照组比较,Tau 蛋白聚集体处理 BV2 引起 Gal-9 蛋白表达增加,并释放到细胞外;Gal-9 蛋白处理 BV2 导致其活化,CD68 和 IBA1 表达增加;促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  表达增加;阻断 Gal-9 的作用可减轻 Tau 聚集体诱导的小胶质细胞活化。**结论** Tau 聚集体促进 BV2 表达 Gal-9 蛋白,后者诱导小胶质细胞激活和促炎性细胞因子释放。

**【关键词】** 半乳糖凝集素-9 Tau 蛋白 小胶质细胞 炎症因子

**【中图分类号】** R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2023)05-0429-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2023.05.001

**Tau aggregates promote microglia activation** Guo Xiaodi, Zhang Guoxin, Peng Qinyu, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of tau aggregates on microglial activation. **Methods** BV2 cells were exposed to recombinant tau aggregates. The levels of galectin-9 (Gal-9) were detected using Western blot analysis. The levels of Gal-9 in the culture medium were detected by ELISA. Purified Gal-9 was used to treat BV2 cells. The levels of CD68 and IBA1 were analyzed by Western blots. Immunofluorescence was used to detect the expression of CD68. The level of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was determined by ELISA. Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to assess the mRNA levels of TNF- $\alpha$ . The role of Gal-9 in the activation of microglia was observed by treating BV2 cells with Tau aggregates and ShRNA-Gal-9. **Results** Compared with the PBS control, Tau PFFs elevated Gal-9 levels in BV2 cells. The levels of Gal-9 in the medium were also increased after treatment with Tau PFFs. Compared with control BV2 cells, the levels of CD68 and IBA1 in BV2 cells were increased in cells exposed to Gal-9, indicating that Gal-9 induces microglial activation. The protein and mRNA levels of the pro-inflammatory factor TNF- $\alpha$  were increased after Gal-9 treatment. Blocking the expression of Gal-9 attenuated the activation of microglia induced by Tau aggregates. **Conclusion** Tau aggregates promote Gal-9 expression in BV2 cells, which in turn induces microglial activation.

**【Key words】** Galectin-9 Tau Microglia Inflammatory factors

小胶质细胞是存在于中枢神经系统的髓系先天免疫细胞,在发育性突触修剪、神经元凋亡、突触可塑性维持和免疫监视等方面发挥重要作用<sup>[1]</sup>。半乳糖凝集素-9(Galectin-9, Gal-9)属于内源性  $\beta$ -半乳

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82271447)  
作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[郭笑迪 张国新 彭琴玉 张振涛(通信作者)]

糖苷结合蛋白家族的成员,可通过非经典途径分泌到细胞外,参与细胞迁移、细胞凋亡、免疫应答和炎症信号传导等生理过程。在中枢神经系统 Gal-9 主要在小胶质细胞表达。转录组分析发现, Gal-9 在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 转基因小鼠 [人淀粉样蛋白前体蛋白 (Mo/HuAPP695swe, APP)]/[突变的人早老蛋白 1 (PS1-DE9, PS1)] 和 AD 患者脑内广泛存在<sup>[2]</sup>。近期文献报道 AD 患者外周血中 Gal-9 水平升高, 且与认知功能损害相关, 而且 Gal-9 的表达水平与 AD 症状明显相关<sup>[3]</sup>。Tau 蛋白聚集形成的神经纤维缠结 (Neurofibrillary tangles, NFTs) 和小胶质细胞介导的神经炎症是 AD 重要的病理变化, 但 Gal-9 与 Tau 病变和神经炎症的关系尚不明确。本研究通过体外培养 BV2, 并探索 Tau 蛋白聚集体促进小胶质细胞活化的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

BV2 培养于 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 培养基, 添加 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 次日以 1:3 比例传代培养。

### 1.2 主要试剂与仪器

硫磺素 T (Sigma; 596200) 购自 BioFRox 公司 (EZ3412B205); Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; ELISA 试剂盒购自 ABclonal 公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自 BioFRox 公司 (EZ3412B205); Gal-9 抗体购自 Abcam 公司; CD68 抗体购自 Proteintech 公司; IBA1 抗体购自 Servicebio 公司。

### 1.3 Tau 蛋白的纯化和聚集

构建携带多组氨酸标签 (His-tag, His) 标签, 含有人全长 Tau 蛋白基因的表达式质粒; 将质粒转化入 BL21 大肠杆菌, 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导表达 6 h, 通过亲和层析镍柱纯化蛋白, 10 mmol/L 咪唑缓冲液洗去杂蛋白及 125 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱 Tau 蛋白, BCA (Bicinchoninic acid protein assay) 法测定 Tau 蛋白水平, 冻干机冻干并冻存于 -80 °C; 用无菌磷酸缓冲液 (Phosphate buffer saline, PBS) 溶解 Tau 蛋白干粉制备 Tau 预制原纤维 (Pre-formed fibrils, PFF), 加入肝素和 5mM 二硫苏糖醇 (DL-dithiothrei-

tol, DTT), 37 °C 恒温混匀仪震荡 2 d, 硫磺素 T 检测 Tau 蛋白聚集情况, 分装储存于 -80 °C。

### 1.4 免疫荧光染色

挑取细胞爬片, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 用新鲜配置的 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 0.2% 4-(1, 1, 3, 3-四甲基丁基) 苯基-聚乙二醇 [4-(1, 1, 3, 3-Tetramethylbutyl) Phenyl-polyethylene glycol, Triton X-100] 室温透化 5 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 3% 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 30 min, 一抗 4 °C 孵育过夜; 次日 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 在黑暗潮湿的环境中加入荧光二抗, 室温孵育 2 h; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; DAPI 避光染色 5 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 用抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜下观察。

### 1.5 统计学处理

使用 Prism Graphpad 8.0 软件, 2 组计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 *t* 检验, 多组比较采用 One-way ANOVA 和 LSD 法检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Tau 聚集体处理 BV2 导致 Gal-9 蛋白表达增加

Tau 聚集体处理 BV2, 收集细胞行 Western blot 检测, 收集细胞上清液行 ELISA 检测; 与对照组 (PBS 组) 比较, Western blot 显示 Tau PFF 组 Gal-9 蛋白表达增加; ELISA 发现 Tau PFF 组细胞上清液中 Gal-9 蛋白水平显著增高 (图 1)。即 Tau 聚集体处理 BV2 后 Gal-9 蛋白表达增加。

### 2.2 Gal-9 激活 BV2

Gal-9 处理 BV2, 收集细胞行 Western blot 检测; 与对照组比较, Western blot 发现 Gal-9 组 CD68 和 IBA1 蛋白表达增加; 细胞免疫荧光发现 Gal-9 处理后 BV2 CD68 染色显著 (图 2)。

### 2.3 Gal-9 诱导 BV2 释放促炎细胞因子

Gal-9 处理 BV2, 与对照组比较, ELISA 发现 Gal-9 组细胞培养基上清促炎细胞因子 TNF-α 表达增加; RT-PCR 显示 Gal-9 组促炎细胞因子 TNF-α 的 mRNA 表达增加 (图 3)。

### 2.4 阻断 Gal-9 可减轻 Tau 聚集体诱导的小胶质细胞活化

Tau 聚集体单独处理 BV2, 收集细胞行 West-

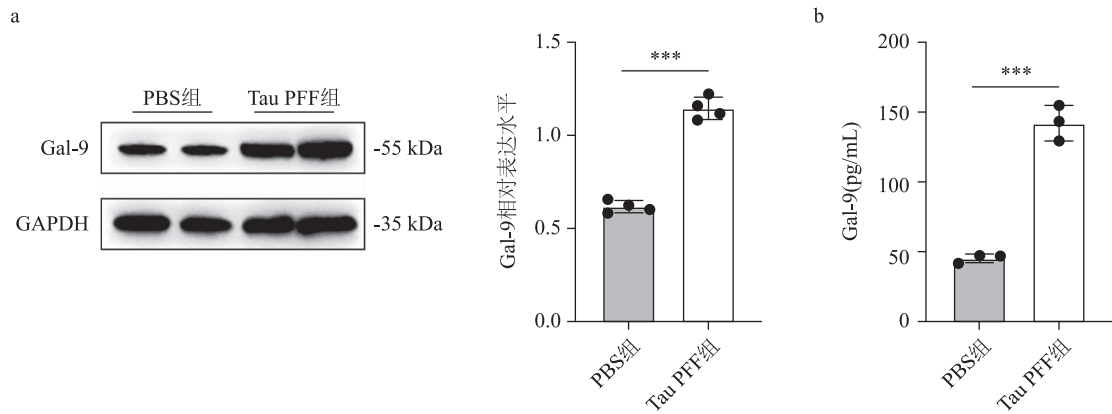


图 1 Tau PFF 处理 BV2 后 Gal-9 表达水平变化 a 为 Western blot 检测 Gal-9 蛋白表达水平变化;b 为 ELISA 法检测细胞培养液上清中 Gal-9 的水平;两两比较,\*\*\*  $P<0.001$

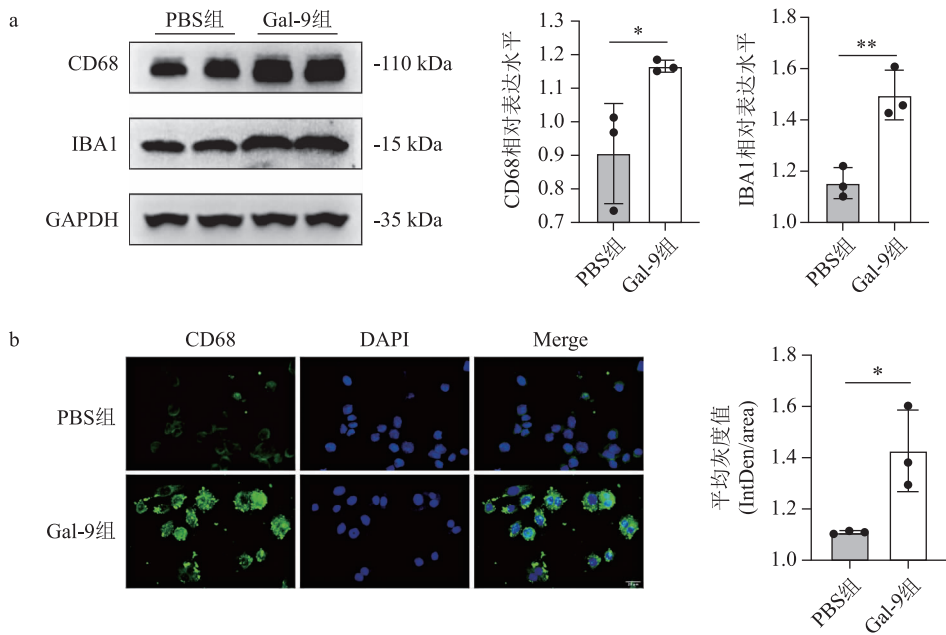


图 2 Gal-9 促进 BV2 活化 a 为 Western blot 检测 CD68 和 IBA1 表达水平;b 为细胞免疫荧光染色检测 BV2 细胞 CD68 染色情况;两两比较,\*  $P<0.05$ ,\*\*  $P<0.01$

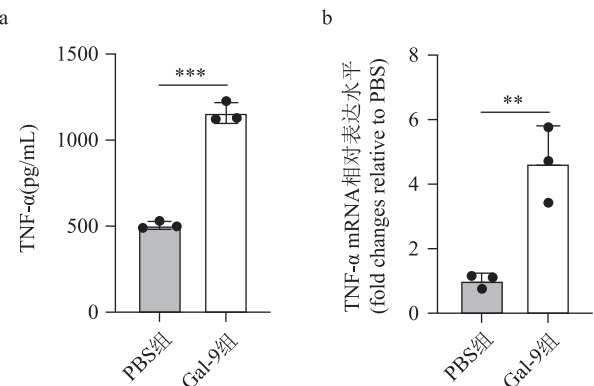


图 3 Gal-9 诱导 BV2 细胞中促炎细胞因子 TNF-α 表达 a 为 ELISA 法检测促炎细胞因子 TNF-α 表达水平;b 为 RT-PCR 法检测促炎细胞因子 TNF-α 的 mRNA 转录水平;两两比较,\*\*  $P<0.01$ ,\*\*\*  $P<0.001$

ern blot 检测;与对照组比较,Western blot 发现 Tau PFF 组 CD68 和 IBA1 蛋白表达增加;ELISA 发现 Tau PFF 组细胞培养基上清液中促炎细胞因子 TNF-α 表达增加;RT-PCR 显示 Tau PFF 组促炎细胞因子 TNF-α 的 mRNA 转录增加;ShRNA-Gal-9 单独处理 BV2,与对照组比较,ShRNA-Gal-9 组 CD68 和 IBA1 蛋白表达减少,TNF-α 分泌减少;预先使用 ShRNA-Gal-9 抑制 BV2 中 Gal-9 基因转录,后使用 Tau 蛋白聚集体处理 BV2,与 Tau PFF 组比较,ShRNA-Gal-9 + Tau PFF 组 CD68 和 IBA1 蛋白表达水平显著下降,TNF-α 水平显著降低(图 4)。即阻断 Gal-9 基因转录可抑制 Tau 聚集体诱导的小胶质细胞活化和促炎细胞因子 TNF-α 表达。

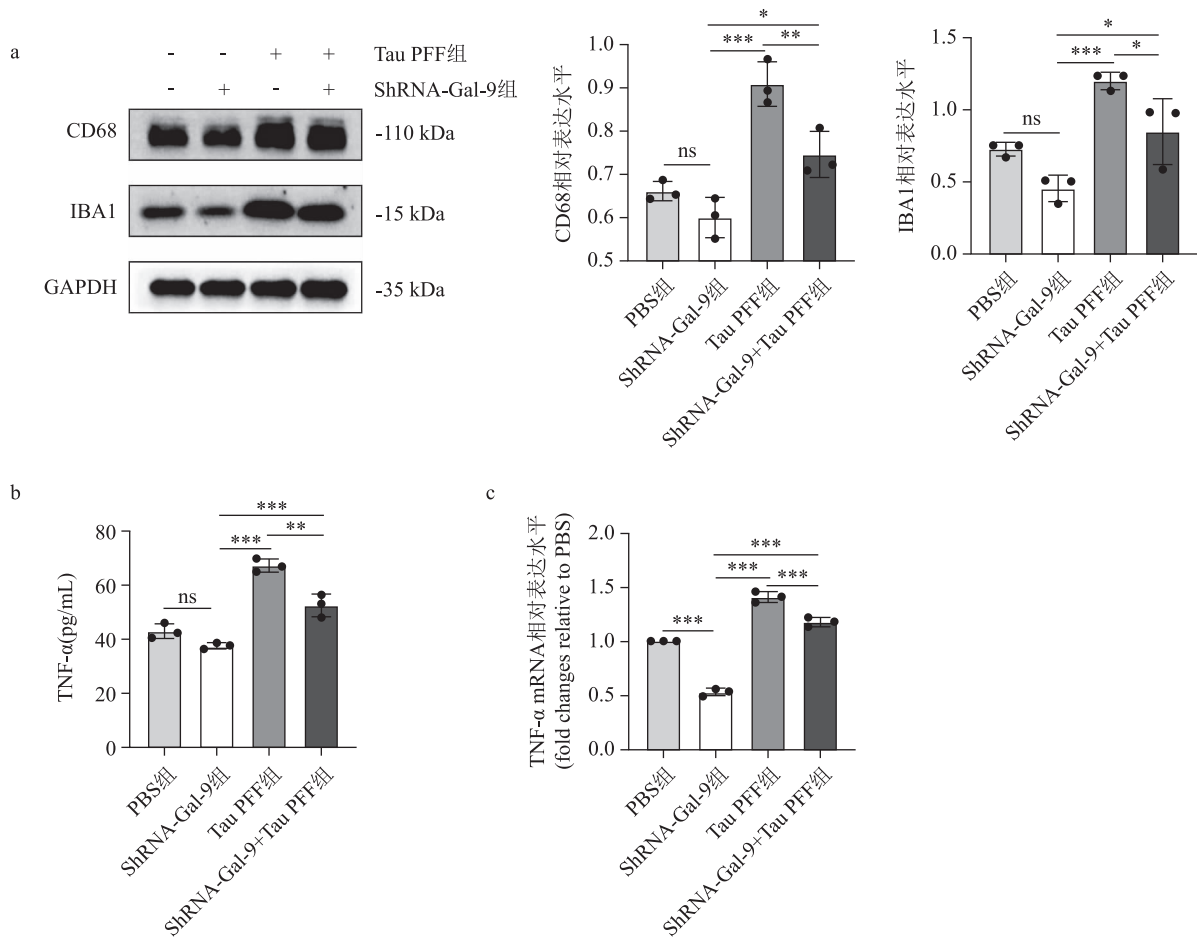


图4 阻断 Gal-9 基因转录可抑制 Tau 聚集体诱导的小胶质细胞活化 a 为 Western blot 检测 CD68 和 IBA1 表达水平变化;b 为 ELISA 法检测细胞培养液上清中 TNF-α 水平;c 为 RT-PCR 法检测促炎细胞因子 TNF-α 的 mRNA 转录水平;两两比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$

### 3 讨论

本研究发现 Tau 蛋白聚集体可以促进 BV2 表达并释放 Gal-9 蛋白,后者可进一步促进 BV2 细胞活化和促炎细胞因子 TNF-α 的表达而加重神经炎症反应。现有的证据支持神经小胶质细胞所介导的慢性炎症在神经退行性病变发病中的重要作用。小胶质细胞是大脑内促炎分子的主要来源,有研究发现 Tau 聚集体激活小胶质细胞可加速其向 M1 促炎表型转化,释放大量促炎分子(如细胞因子、趋化因子),加重神经元功能障碍和死亡<sup>[4]</sup>。此外,活化的小胶质细胞可以损伤突触,导致突触丢失和长时程增强效应减弱<sup>[5]</sup>。在中枢神经系统半乳糖凝集素作为促炎或抗炎因子,参与神经调节、神经炎症在内的各种生理病理过程。本研究发现 Gal-9 具有促炎作用。

近期研究发现,半乳糖凝集素在多种神经退行性疾病患者脑内表达水平增高,并与脑内小胶质细胞活

化、自噬及神经炎症密切相关<sup>[6]</sup>。在中枢神经系统 Gal-9 在小胶质细胞和星形胶质细胞中表达,并在小胶质细胞和星形胶质细胞信号传导中发挥一定作用<sup>[7]</sup>。Gal-9 是重要的促炎性介质和凋亡调节因子<sup>[8-11]</sup>。有研究报道,与 BALB/c 小鼠比较,C57BL/6 小鼠易感染弓形虫脑炎,Gal-9 和炎症标记物表达水平显著上调,脑内小胶质细胞活化更加明显,持续时间更长<sup>[12]</sup>。在脑出血小鼠模型中 Gal-9 表达增加,下游通路激活,促炎性因子释放增加,提示 Gal-9 在脑出血诱导的二次脑损伤中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。

磷酸化 Tau 蛋白可以激活小胶质细胞<sup>[14]</sup>。本研究发现 Tau 蛋白聚集体可以促进 BV2 中 Gal-9 蛋白表达,细胞上清中 Gal-9 水平显著增高。重要的是,Gal-9 可以激活小胶质细胞,增加促炎细胞因子 TNF-α 表达;阻断 Gal-9 基因转录可抑制 Tau 聚集体所诱导的小胶质细胞活化。本研究结果表明

(下转第 439 页)

- ease; causes and treatment[J]. *Molecules*, 2020, 25(24):5789.
- [6] Justice NJ. The relationship between stress and Alzheimer's disease[J]. *Neurobiology of Stress*, 2018, 8:127-133.
- [7] Wang ZH, Xia Y, Liu P, et al. ApoE4 activates C/EBP $\beta$ / $\delta$ -secretase with 27-hydroxycholesterol, driving the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Prog Neurobiol*, 2021(427/441):102032.
- [8] Liao JM, Chen GQ, Liu X, et al. C/EBP $\beta$ /AEP signaling couples atherosclerosis to the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(7):3034-3046.
- [9] Xiong J, Zhang Z, Ye K. C/EBP $\beta$ /AEP signaling drives Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *Neurosci Bull*, 2023:1-13.
- [10] Liu J, Guo M, Zhang D, et al. Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(30):12248-12253.
- [11] Wang X, Liu Q, Li XG, et al. T217-Phosphorylation exacerbates Tau pathologies and Tau-Induced cognitive impairment[J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 81(4):1403-1418.
- [12] Tyng CM, Amin HU, Saad MNM, et al. The influences of emotion on learning and memory[J]. *Frontiers in Psychology*, 2017, 8:1454.
- [13] Pfau ML, Russo SJ. Neuroinflammation regulates cognitive impairment in socially defeated mice[J]. *Trends Neurosci*, 2016, 39(6):353-355.
- [14] Mckim DB, Niraula A, Tarr AJ, et al. Neuroinflammatory dynamics underlie memory impairments after repeated social defeat[J]. *Journal of Neuroscience*, 2016, 36(9):2590-2604.
- [15] Qiong W, Feng S, Weiwen W. Region-dependent alterations in cognitive function and ERK1/2 signaling in the PFC in rats after social defeat stress[J]. *Neural Plast*, 2018;1-11.
- [16] Canchi SRA, Swinton MK, Rissman RA, et al. Transcriptomic analysis of brain tissues identifies a role for CCAAT enhancer binding protein  $\beta$  in HIV-associated neurocognitive disorder[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):112.
- [17] Morales-Garcia JA, Gine E, Hernandez-Encinas E, et al. CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  silencing mitigates glial activation and neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):13526.
- [18] Chen C, Ahn EH, Kang SS, et al. Gut dysbiosis contributes to amyloid pathology, associated with C/EBP $\beta$ /AEP signaling activation in Alzheimer's disease mouse model[J]. *Science Advances*, 2020, 6(31): eaba0466.
- [19] Wang HL, Liu X, Chen SD, et al. Spatiotemporal activation of the C/EBP $\beta$ / $\delta$ -secretase axis regulates the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(52):E12427-E12434.

(2023-04-19 收稿)

(上接第 432 页)

Tau 聚集体促进 BV2 细胞表达 Gal-9 蛋白,后者进一步诱导小胶质细胞激活和促炎因子释放,二者形成正反馈而加重神经损伤。这为 Tau 蛋白介导神经炎症研究提供了 1 个潜在的新靶点。Gal-9 通过何种通路激活小胶质细胞以及其在 Tau 蛋白介导的神经炎症中发挥何种作用将是下一步的研究内容。监测 AD 患者外周血和脑脊液中 Gal-9 水平变化,探讨其与 Tau 蛋白病理的关系,并探寻其作为认知功能障碍严重程度标志物的可能性,将为监测 AD 进展和促进个体化治疗提供新的指标。

### 参 考 文 献

- [1] Frost JL, Schafer DP. Microglia; architects of the developing nervous system[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(8):587-597.
- [2] John S, Mishra R. mRNA transcriptomics of galectins unveils heterogeneous organization in mouse and human brain[J]. *Front Mol Neurosci*, 2016;139.
- [3] Wang X, Niu Y, Yue CX, et al. Increased ileal bile acid binding protein and galectin-9 are associated with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. *J Psychiatr Res*, 2019, 119:102-106.
- [4] Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease[J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(2):459-472.
- [5] Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models[J]. *Science*, 2016, 352(6286):712-716.
- [6] Rmm DA, Afm DE, Olca DE, et al. Alzheimer's disease; is there a role for galectins? [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021:174437.
- [7] Steelman AJ, Li J. Astrocyte galectin-9 potentiates microglial TNF secretion[J]. *J Neuroinflammation*, 2014;144.
- [8] Bellac CL, Coimbra RS, Simon F, et al. Gene and protein expression of galectin-3 and galectin-9 in experimental pneumococcal meningitis[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 28(2):175-183.
- [9] Steelman AJ, Smith R, Welsh CJ, et al. Galectin-9 protein is up-regulated in astrocytes by tumor necrosis factor and promotes encephalitogenic t-cell apoptosis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(33):23776-23787.
- [10] Burman J, Svenningsson A. Cerebrospinal fluid concentration of Galectin-9 is increased in secondary progressive multiple sclerosis[J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 292:40-44.
- [11] Stancic M, van Horssen J, Thijssen VL, et al. Increased expression of distinct galectins in multiple sclerosis lesions[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011, 37(6):654-671.
- [12] Liu J, Huang S, Lu F. Galectin-3 and galectin-9 May differentially regulate the expressions of microglial M1/M2 markers and T helper 1/Th2 cytokines in the brains of genetically susceptible C57BL/6 and resistant BALB/c mice following peroral infection with toxoplasma gondii[J]. *Front Immunol*, 2018;1648.
- [13] Chen ZQ, Yu H, Li HY, et al. Negative regulation of glial Tim-3 inhibits the secretion of inflammatory factors and modulates microglia to antiinflammatory phenotype after experimental intracerebral hemorrhage in rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(6):674-684.
- [14] Merighi S, Nigro M, Travagli A, et al. Microglia and Alzheimer's Disease [J]. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(21).

(2023-04-07 收稿)