

拉喹莫德改善神经炎症中突触可塑性的作用研究

郭鑫 汪盛 周德喜 栾家杰

【摘要】 目的 使用脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导建立神经炎症模型研究拉喹莫德(Laquini-mod, LAQ)对突触结构可塑性的改善作用。**方法** 培养原代海马神经元、小胶质细胞株 BV-2 细胞,且分为对照[磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS)]组(常规培养)、LPS 组(低糖 + 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激 4 h、复糖 2 h)、LAQ 组(预给药 100 nM/mL LAQ 2 h、低糖 + 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激 4 h、复糖 + 100 nM/mL LAQ 2 h);免疫荧光检测神经生长相关蛋白-43(Growth-associated protein, GAP-43)、微管相关蛋白-2(Microtubule associated protein 2, MAP-2)、突触素(Synaptophysin, SYN)、突触后密度蛋白-95(Postsynaptic density protein 95, PSD-95)、白细胞介素 10(Interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)蛋白分布;Western blot 检测蛋白激酶(Protein kinase B, Akt)、磷酸化蛋白激酶(Phosphorylated protein kinase B, p-Akt)、核因子 κB (Nuclear factor kappa-B, NF- κB)、磷酸化核因子 κB (Phosphorylated nuclear factor kappa-B, p-NF- κB)、核因子 KB 抑制因子 A(Recombinant nuclear factor kb inhibitor A, I $\kappa\text{B}\alpha$)、磷酸化核因子 KB 抑制因子 A(Phosphorylated recombinant nuclear factor KB inhibitor A, p-I $\kappa\text{B}\alpha$)、 β -肌动蛋白(Actin beta, β -actin)蛋白表达水平。**结果** 与 PBS 组比较, LPS 组 BV-2 细胞 TNF- α 表达水平增高、IL-10 表达水平降低,细胞胞体增大,轴突缩回;Akt, NF- κB , I $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白磷酸化水平升高;SYN 与 PSD-95 蛋白表达减少、分布不连贯,树突棘数量减少,神经元间连接减少;LAQ 组 BV-2 细胞 TNF- α 表达水平降低、IL-10 表达水平增高,轴突延伸,胞体体积变回正常,且降低了 Akt, NF- κB , I $\kappa\text{B}\alpha$ 的磷酸化水平;神经元 SYN, PSD-95 蛋白表达水平增高且分布于各神经元突触连接处,树突棘数量增多,神经元间连接增多。**结论** LAQ 潜在机制是通过抑制 Akt-NF- κB 通路来减轻神经炎症、抑制突触蛋白的丢失,保护了树突棘使得突触连接增多,对突触结构可塑性起到积极作用。

【关键词】 拉喹莫德 神经炎症 神经元 突触结构可塑性

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)01-0036-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.01.007

Effect of Laquinimod on Synaptic plasticity in Neuroinflammation Guo Xin, Wang Sheng, Zhou Dexi, et al. Clinical Pharmacy Department, the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241001

【Abstract】 Objective The neuroinflammation induced by Lipopolysaccharide (LPS) was used to investigate the role of laquinimod (LAQ) on the plasticity of synaptic structure. **Methods** The primary hippocampal neurons and Microglia cell line (BV-2 cells) were cultured, Divided into control (PBS) group (conventional culture), LPS group (low sugar + 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS stimulation for 4 hours, normal sugar for 2 hours), LAQ group (pre-administration 100 nM/mL LAQ for 2 hours, normal sugar + 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS stimulation for 4 hours, normal sugar + 100 nM/mL LAQ for 2 hours). Immunofluorescence detection of GAP-43, MAP-2, Synaptophysin (SYN), PSD-95, IL-10, TNF- α protein distribution. Western blot detection of Akt, p-Akt, NF- κB , p-NF- κB , I $\kappa\text{B}\alpha$, p-I $\kappa\text{B}\alpha$, β -actin protein expression. **Results** Compared with the PBS group, the LPS group showed an increase of TNF- α and decrease of IL-10 in the BV-2 cell, cell body enlargement and axonal retraction; The level of p-Akt, p-NF- κB , p-I $\kappa\text{B}\alpha$ protein increased; Synaptophysin (SYN) and PSD-95 protein expression reduced and inconsistent distribution, neuron number of dendritic spines reduced, resulting in reduced intercellular connections. LAQ group showed decrease d TNF- α and increased IL-10 in the BV-2 cell, axon ex-

基金项目:国家自然科学基金(批号为 822200662)

作者单位:241001 安徽省芜湖市皖南医学院第一附属医院(弋矶山医院)临床药学科[郭鑫 汪盛 周德喜 栾家杰(通信作者)]

tension, cell volume returned to normal, the level of p-Akt, p-NF- κ B, p-I κ B α protein decreased; Synaptophysin (SYN) and PSD-95 protein increased and distributed at synaptic connections of various neurons, the number of dendritic spines also increased. **Conclusion** LAQ plays a positive role in synaptic structural plasticity by inhibiting the Akt-NF- κ B pathway, which reduces neuroinflammation, inhibits the loss of synaptic proteins and protects synaptic connections.

【Key words】 Laquinimod Neuroinflammation Neurons Synaptic structural plasticity

神经系统退行性疾病仍然是医学最棘手的问题之一,神经元丢失与突触损伤是其主要病理特征^[1]。小胶质细胞作为中枢神经系统唯一的免疫细胞,大脑发育过程中日常参与突触的生长与其结构的调节^[2-3],当微环境发生改变,小胶质细胞被激活而引起自身形态学改变,胞体膨胀而短圆,轴突缩回并释放炎症因子(如 IL-6, TNF- α)^[4],称之为促炎型(M1 type microglia, M1),引起神经炎症^[5],使突触功能障碍,使得小胶质细胞介导的突触丢失成为神经系统退行性疾病的主要原因之一^[6-7];在某些助力下促炎型可向抑炎型(M2 type microglia, M2)转变,轴突延伸细胞呈纵向分支状,释放抗炎因子(如 IL-10, IL-13)下调炎症细胞,以使促炎细胞表型失活并重新建立体内平衡。

突触结构的完整性是突触传递效率的基础,结构可塑性不仅与突触在形态、数量、轴突-树突连接功能方面有关^[8-9],还与树突棘数量与突触蛋白的分布有关^[10]。树突棘是兴奋性突触传递的主要位点,在数量和形状上经历动态变化^[11],当树突萎缩、棘突减少,突触结构所需物理基础消失,突触功能随之丧失,神经元离开电信号与化学信号的传导,很快调亡。

树突相关蛋白 MAP-2 与神经生长蛋白 GAP-43 一方面可以标记神经元、标记树突;另一方面作为神经可塑性的首选探针,参与神经元与突触结构发育^[12]。神经传递依赖于突触蛋白紧密传递与活动调节,所以不仅需要突触蛋白有足够的表达水平,也需要分布紧密、连续。SYN 和 PSD-95 是决定突触可塑性的 2 个重要调节因子和指标^[13-14]。SYN 作为突触前终末的特异性标记物,用来检测突触的密度和分布,也可检测突触的重建^[15];PSD-95 是谷氨酸能突触信号传导的中心,定位和表达在神经元中受到高度调节,与神经发育障碍中的突触功能障碍有关,是突触强度的有效调节因子^[16]。

大量研究表明脂多糖(LPS)是神经炎症的有效激活剂,脂多糖 LPS 已被证明可诱导神经炎症和认知功能障碍^[17-19]。本研究一种新型免疫调节化合

物-拉喹莫德(Laquinimod, LAQ),曾在Ⅲ期临床试验中用于治疗多发性硬化症^[20],在自身免疫性脑脊髓炎和亨廷顿病的临床试验中也表现出神经保护作用,动物实验中表现出抗炎与抗凋亡作用^[21],但对于突触可塑性的作用还有待探寻。本研究的目的是通过研究 LAQ 对炎症因子的影响及潜在机制,可视化对树突数量、形态及突触蛋白的表达与分布,从而探寻 LAQ 在突触结构可塑性中是否具有保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

A1 PLUS 激光共聚焦显微镜购于 Nikon 公司;Bio-Rad 酶标仪、ChemiDoc TMXRS + 凝胶成像仪器购于 Bio-Rad 公司;细胞培养箱、冰箱(-80℃)购于 ThermoFisher Scientific 公司。

拉喹莫德(CAS 号为 248281-84-7,纯度>98%)购于阿拉丁试剂公司;LPS(CAS 号为 L8880 纯度 \geq 98%)购于索莱宝试剂公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)染液、抗荧光淬灭封片剂购于上海翊圣生物科技有限公司;GAP-43(ab134019), MAP-2(ab302487), Synaptophysin (SYN)(ab196166), PSD-95(ab18258), IL-10(ab133575), TNF- α (ab215188), Akt(ab8805), p-Akt(ab38449), NF- κ B(ab32536), p-NF- κ B(ab86299), I κ B α (ab32518), p-I κ B α (ab133462), β -actin(ab8226)一抗购于英国 Abcam 公司。Sprague-Dawley 大鼠(200~220 g, $n=10$)取自中国科学院(上海)动物中心;光照和黑暗各 12 h 循环并控制 25℃室温与 40%的湿度环境;经过弋矶山医院动物实验中心动物伦理委员会同意(批准号为 LLSC-2022-090)。

1.2 方法

1.2.1 原代神经元提取与培养

取 0 天新生鼠 10 只,取出脑部用 Hank's 缓冲液冲洗残留血液与组织液,用光学解剖显微镜分离海马,随后剪碎消化过滤,将细胞重悬于 F12 培养

基(Ham's F 12 nutrient medium)完全培养基中,所有6孔板中均放置灭菌后多聚赖氨酸包被的盖玻片,以每毫升含500,000个细胞的密度接种于6孔板中,培养基换成含2% B-27无血清添加剂(B-27 supplement, serum free, B27)和0.5 mM L-谷氨酰胺的Neurobasal培养基。

1.2.2 BV-2细胞株购买与培养

BV-2细胞株购买于宁波明舟生物科技有限公司,培养于含5%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)高糖培养基中,铺板时所有6孔板中均放置灭菌后的盖玻片。

1.2.3 脂多糖模拟炎症环境与给药模型的建立

LPS组:将LPS粉末溶于PBS配置成5 μ g/mL的溶液。BV-2细胞组:将生长至55%~60%的细胞用PBS清洗后加入Opti-DMEM培养基,加入10 μ L LPS溶液继续培养4 h,4 h后换回原培养基培养2 h;神经元组:细胞PBS清洗后加入BV-2细胞组(已用LPS刺激)上清液培养12 h后换回Neurobasal培养基继续培养2 h。

LAQ组:将LAQ粉末溶于PBS配置成100 nM/mL的溶液。BV-2细胞组:将10 μ L LAQ溶液加入6孔板预给药2 h后重复LPS组操作给予LPS刺激,换回培养基后也重新加入LAQ溶液,整个过程中LAQ一直作用于细胞;神经元组:同样10 μ L LAQ溶液预给药2 h,重复LPS组步骤最后换回Neurobasal培养基后再次加入10 μ L LAQ溶液。

1.2.4 细胞荧光染色检测

细胞用4%多聚甲醛固定后PBS清洗,将盖玻片转移至载玻片滴加一抗,湿盒中4 $^{\circ}$ C孵育过夜;避光PBS清洗,滴加相对应的二抗,避光37 $^{\circ}$ C孵育1 h后避光清洗滴加DAPI染液,室温孵育后再次清洗用抗荧光淬灭剂封片;所有图像都是用共聚焦荧光显微镜(日本尼康)拍摄;设置波长为488 nm和647 nm的激光器激发绿色和红色荧光,选用63 \times 物镜;为避免相近波长之间相互干扰,采用序列扫描模式采集图像。

1.2.5 细胞蛋白水平检测

加入细胞裂解液冰上静置用刮刀提取蛋白,用二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白水平后提取总蛋白,进行凝胶电泳、转膜等Western blot步骤后进行蛋白水平的检测,采用ImageJ软件

分析灰度值。

1.2.6 统计学处理

采用Graphpad Prism软件统计。所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAQ对小胶质细胞炎症的影响

BV-2是常用小胶质细胞株。与PBS组比较,LPS组细胞毒性因子TNF- α 表达增多,抑炎因子IL-10表达减少;胞体体积增大,趋于短圆,轴突缩回,细胞形态趋向于促炎型;LAQ组降低了TNF- α 的表达,增加了抑炎因子IL-10的表达并且细胞形态趋向于抑炎型细胞形态,轴突细长、向两端延伸,胞体也恢复正常大小。即LAQ可以抑制LPS刺激后小胶质细胞炎症因子的表达,促进抑炎因子的表达,使得小胶质细胞由促炎转为抑炎形态(图1)。

2.2 LAQ对小胶质细胞中AKT-NF- κ B通路的影响

NF- κ B是在神经炎症中发挥关键作用的转录因子,细胞蛋白水平上LPS组诱导NF- κ B, I κ B α , AKT磷酸化水平上升,而LAQ组降低了LPS诱导后的NF- κ B, I κ B α , AKT蛋白磷酸化水平,即LAQ潜在机制部分是通过抑制AKT-NF- κ B通路来抑制神经炎症(图2)。

2.3 LAQ对突触数目及突触素表达水平的影响

神经元培养7 d用MAP-2标记神经元骨架。PBS组可见细胞间正常建立突触连接,SYN在细胞间传递、分布在各个神经元之间;LPS组可见神经元间突触连接减少,突触素的表达水平降低,并且在树突上呈现不连续表达;降低SYN水平会抑制海马神经元树突和突触形态发育^[22];LAQ组SYN表达水平恢复,且连续表达在神经元之间,可见与其他神经元建立信息传递。即LAQ可增加突触素蛋白的表达并促进神经元间突触素传递(图3)。

2.4 LAQ对突触后蛋白PSD-95表达水平的影响

神经元培养7 d用GAP-43标记神经元。PBS组神经元树突棘呈多支状,PSD-95连续表达于树突棘上,可见神经元间建立良好突触连接(如箭头所示);LPS组不仅树突棘数量明显减少,PSD-95蛋白表达水平也显著降低,在树突棘上呈现间断表达;LAQ组使神经元在LPS的刺激下依旧保持数量众多的树突棘,神经元间连接树突数目增多,并在树突

间连续表达 PSD-95(如箭头所示)。即 LAQ 可保护树突棘,使得树突丢失减少,也保护了 PSD-95 蛋

白的丢失,使 PSD-95 连续表达构成良好的神经元间通讯(图 4)。

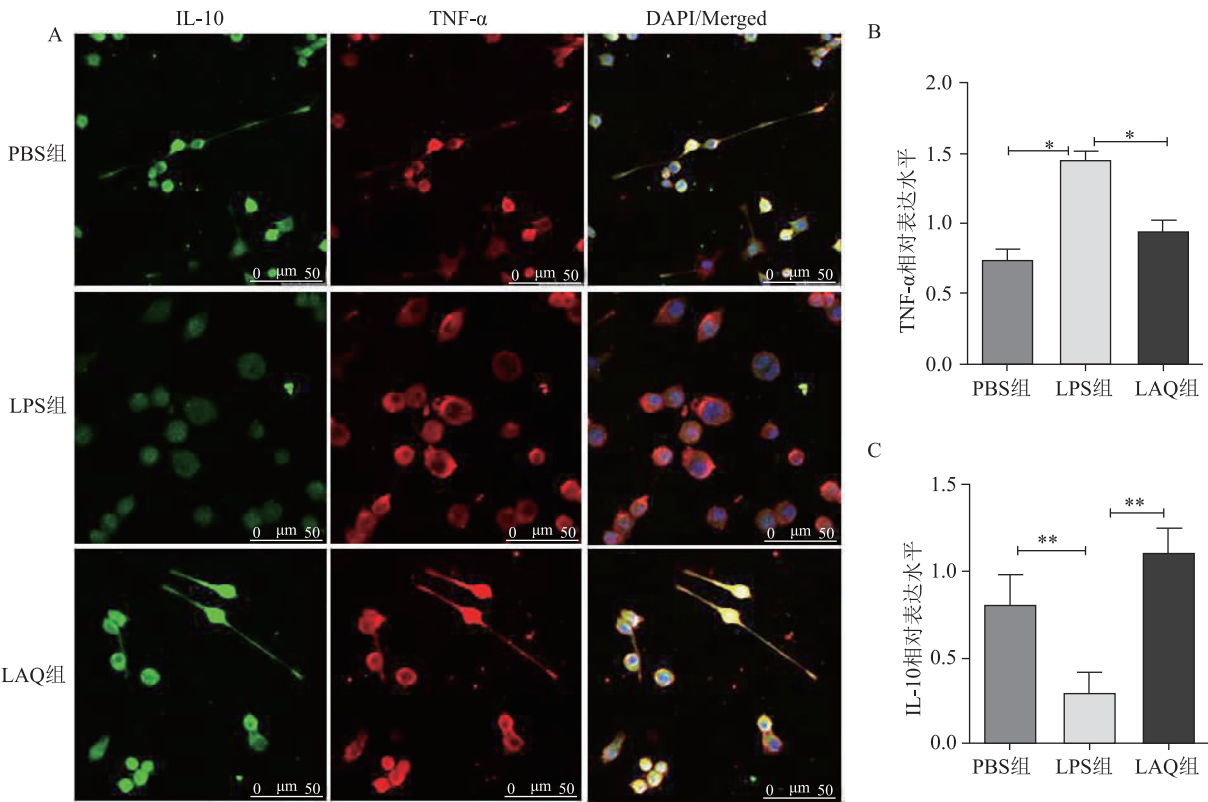


图 1 LAQ 对小胶质细胞炎症因子 TNF- α 和抑炎因子 IL-10 的表达水平以及小胶质细胞形态的影响($n = 3$) 两两比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

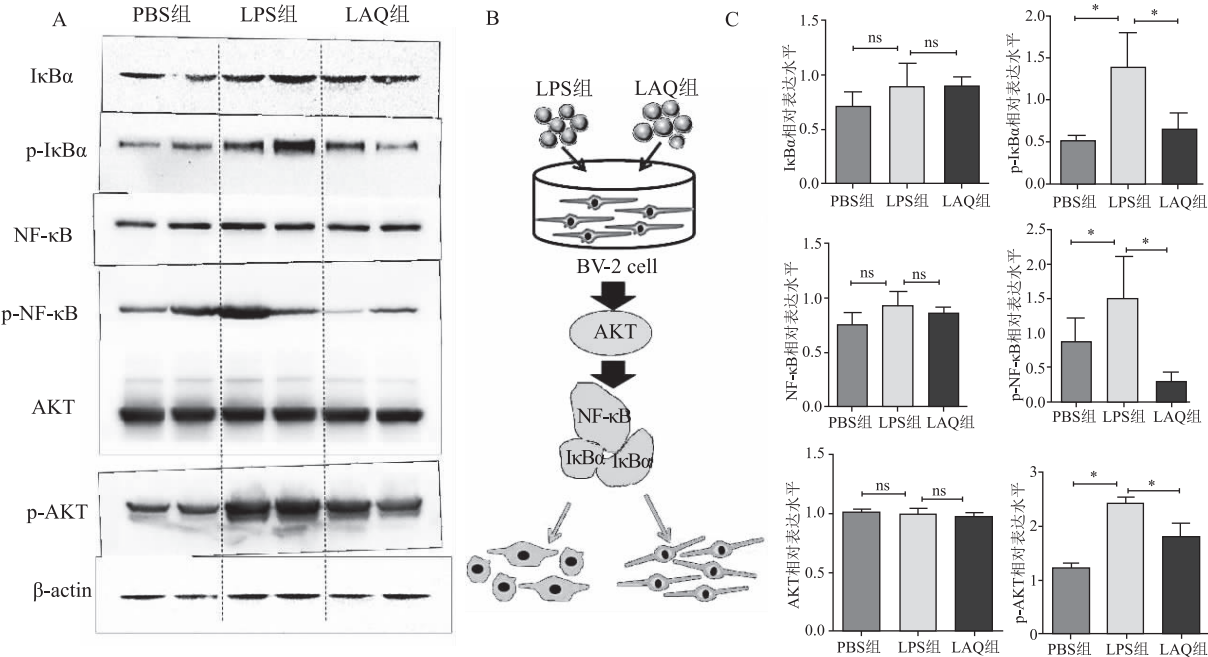


图 2 LAQ 对小胶质细胞 AKT-NF- κ B 通路中的 Akt, p-Akt, NF- κ B, p-NF- κ B, I κ B α , p-I κ B α 蛋白水平的影响($n = 3$) 两两比较, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$

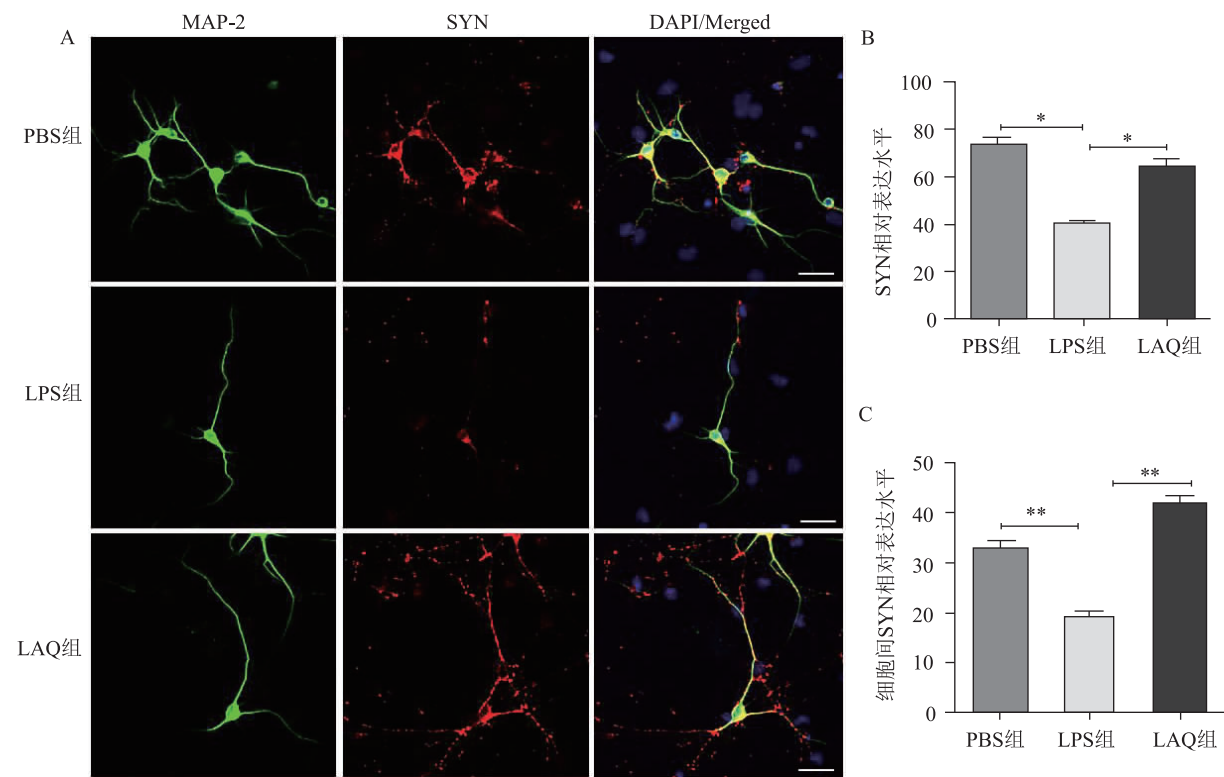


图3 LAQ对突触数目、突触形态(A)、细胞总体突触素(B)与突触部位突触素(C)的影响($n=3$) 两两比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

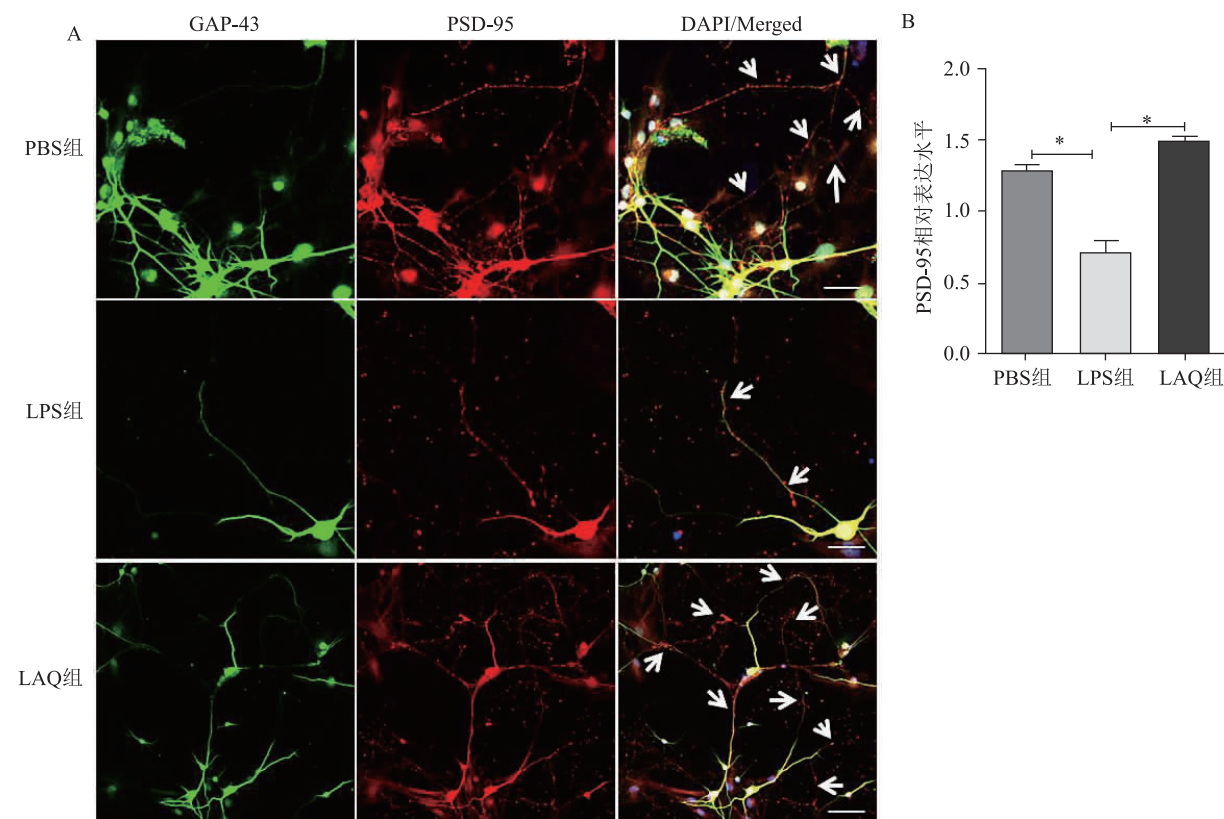


图4 LAQ对于树突棘数量及PSD-95蛋白连续表达水平的影响(A)、树突上PSD-95表达水平(B)的影响($n=3$) 两两比较,* $P<0.05$

3 讨论

突触障碍是加重神经系统疾病进展的原因之一,目前临床有效治疗策略有限。拉喹莫德(LAQ)作为 1 个小分子亲脂性喹啉类化合物,最新研究中具有抑制小胶质细胞活化、星形胶质细胞增生、血脑屏障损伤的作用而改善神经损伤,抑制轴突损伤与神经炎症^[23]。本研究首次探索神经炎症中 LAQ 对突触结构可塑性是否有改善作用。

在小胶质细胞实验中 LAQ 抑制细胞毒因子 TNF- α 的表达,促进抑炎因子 IL-10 的表达,并促使细胞形态从胞体短圆、轴突缩回转变为正常胞体、轴突延伸,由此猜测 LAQ 可以使小胶质细胞由促炎型转为抑炎型,且 LAQ 降低了 NF- κ B, I κ B α , AKT 蛋白的磷酸化水平,初步推测 LAQ 减轻神经炎症的潜在机制是部分通过抑制 AKT- NF- κ B 通路,确切的机制有待进一步发掘与验证。

神经元实验发现在小胶质细胞产生的炎症因子影响下 LAQ 减少了树突棘的丢失并显著增加了突触蛋白的表达,使 PSD95, SYN 蛋白在树突间贯续表达,使得神经元间连接与信号传导增多,对于突触结构的可塑性有很大帮助。

接下来的研究会进行体内验证包括药物灌胃后观察 LAQ 能否进入血脑屏障、在海马产生神经保护作用以及动物行为学测试等;进行体外实验加入 LAQ 对神经元采用 Sholl 分析量化树突分支数、树突长度、树突棘密度及 LAQ 作用靶点机制进一步研究,可能对受突触可塑性影响的相关疾病有积极的临床价值。

参 考 文 献

- [1] Brewer JG. Neuronal plasticity and stressor toxicity during aging[J]. *Exp Gerontol*, 2000, 35(9/10): 1165-1183.
- [2] Andoh M, Koyama R. Microglia regulate synaptic development and plasticity[J]. *Dev Neurobiol*, 2021, 81(5): 568-590.
- [3] Paolicelli CR. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development[J]. *Science*, 2011, 333(6048): 1456-1458.
- [4] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 649-665.
- [5] Woodburn SC, Bollinger JL, Wohleb ES. The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 258.
- [6] Taheri F. The role of efferocytosis in neuro-degenerative diseases[J]. *Neurol Sci*, 2022, 43(3): 1593-1603.
- [7] Rajendran L, Paolicelli RC. Microglia-mediated synapse loss in Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(12): 2911-2919.
- [8] Ramiro-Cortés Y, Hobbiss AF, Israely I. Synaptic competition in structural plasticity and cognitive function[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369(1633): 20130157.
- [9] Wang Y. Structural and functional synaptic plasticity induced by convergent synapse loss in the drosophila neuromuscular circuit[J]. *J Neurosci*, 2021, 41(7): 1401-1417.
- [10] Batool S. Synapse formation: from cellular and molecular mechanisms to neurodevelopmental and neurodegenerative disorders[J]. *J Neurophysiol*, 2019, 121(4): 1381-1397.
- [11] Skaper DS. Synaptic plasticity, dementia and Alzheimer disease[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16(3): 220-233.
- [12] Chakravarthy B. Association of Gap-43 (neuromodulin) with microtubule-associated protein MAP-2 in neuronal cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(4): 679-683.
- [13] Liu Y. Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 112.
- [14] Greengard P. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function[J]. *Science*, 1993, 259(5096): 780-785.
- [15] Cousin MA. Synaptophysin-dependent synaptobrevin-2 trafficking at the presynapse-mechanism and function[J]. *J Neurochem*, 2021, 159(1): 78-89.
- [16] Ugalde-Triviño L, Diaz-Guerra M. PSD-95: an effective target for stroke therapy using neuroprotective peptides[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12585.
- [17] Qin L. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration[J]. *Glia*, 2007, 55(5): 453-462.
- [18] Vasconcelos RA. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment [Z], 2014: 85.
- [19] Huffman JW. Modulation of neuroinflammation and memory dysfunction using percutaneous vagus nerve stimulation in mice [J]. *Brain Stimul*, 2019, 12(1): 19-29.
- [20] Varrin-Doyer MSZ, Schulze-Topphoff U. Laquinimod, an up-and-coming immunomodulatory agent for treatment of multiple sclerosis[Z], 2014: 66-71.
- [21] Jiang N. Laquinimod exerts anti-inflammatory and antiapoptotic effects in retinal ischemia/reperfusion injury [Z], 2020: 106989.
- [22] Elibol-Can B, Kilic E, Yuruker S, et al. Investigation into the effects of prenatal alcohol exposure on postnatal spine development and expression of synaptophysin and PSD95 in rat hippocampus[J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2014, 33(1): 106-114.
- [23] Xiong Y. Laquinimod inhibits microglial activation, astrogliosis, BBB damage, and infarction and improves neurological damage after ischemic stroke[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(11): 1992-2007.

(2023-07-28 收稿)