

阻断 α_{1A} 肾上腺素受体抑制 AD 小鼠的中枢炎症

王睿竹 吴轶凡 刘璇 金静雯 韩松 尹君*

武汉大学泰康医学院(基础医学院), 中国·湖北 武汉 430071

摘要:目的: 探讨 α_{1A} 肾上腺素受体在阿尔茨海默病(AD)中枢神经炎症中的作用。方法: 通过生物信息学分析 α_{1A} 肾上腺素受体在野生型(WT)小鼠和 3xTg-AD 小鼠模型中的表达及作用; 通过 RT-qPCR、Western blot 和免疫荧光检测小鼠脑中 α_{1A} 肾上腺素受体的表达和定位; 给予小鼠 α_{1A} 肾上腺素受体阻断剂哌唑嗪(Prazosin)处理, Western blot、免疫荧光染色检测小鼠脑部 iNOS 和 CD68 的表达; RT-qPCR 和 ELISA 分析炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平。结果: α_{1A} 受体在 3xTg-AD 小鼠的小胶质细胞上调; 阻断 α_{1A} 受体能减少小胶质细胞的活化以及炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放。结论: α_{1A} 肾上腺素受体在 AD 脑部上调, 并引起中枢炎症。
关键词: 阿尔茨海默病; 小胶质细胞; 神经炎症; α_{1A} 肾上腺素受体

Blocking the Inhibitory Effect of α_{1A} Adrenergic Receptors on Microglial Inflammation in AD Mice

Ruizhu Wang Yifan Wu Xuan Liu Jingwen Jin Song Han Jun Yin*

Wuhan University Taikang Medical School (School of Basic Medical Sciences), Wuhan, Hubei, 430071, China

Abstract: Objective: To investigate the role of α_{1A} adrenergic receptors in Alzheimer's disease (AD) neuroinflammation. **Methods:** Bioinformatics analysis of the expression and effect of α_{1A} adrenergic receptor in WT mice and 3xTg-AD mice. The expression and localization of α_{1A} adrenergic receptor in the brains of WT mice and 3xTg-AD mice were detected by RT-qPCR, Western blot and immunofluorescence. Mice were treated with α_{1A} adrenergic receptor blocker prazosin. Western blot and immunofluorescence staining were used to detect the expression of iNOS and CD68 in mouse brain. RT-qPCR and ELISA were used to analyze the expression levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . **Result:** α_{1A} adrenergic receptors was up-regulated in microglia of 3xTg-AD mice. Blockade of α_{1A} adrenergic receptors inhibits microglia activation and the release of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . **Conclusion:** α_{1A} adrenergic receptors are up-regulated in the brain of AD mice, and can cause inflammation in central nervous system.

Keywords: Alzheimer's disease; microglia; neuroinflammation; α_{1A} adrenergic receptors

0 前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种慢性神经退行性疾病,神经炎症是AD发病的关键机制。其中,小胶质细胞是神经炎症过程的主要效应细胞。本研究的主要目的是通过对3xTg-AD阿尔茨海默病小鼠的研究,了解AD小胶质细胞中 α_{1A} 肾上腺素受体的表达情况,以及阻断 α_{1A} 受体是否能够改善AD的神经炎症状态。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源

实验所用的C57BL/6小鼠,3月龄,雌雄各半,20 \pm 2g,购买于武汉鼠贝利生物科技有限公司。阿尔茨海默病模型3xTg-AD小鼠购买于常州卡文斯实验动物有限公司。实验小鼠饲养于武汉大学动物实验中心/ABSL-III实验室。武汉大学实验动物伦理委员会对本研究中的动物实验进行了伦理审查并予以批准,批准号为WQ0210062。

1.2 主要试剂及来源

DAPI(美国Gibco)、Trizol(上海国药集团)、异丙醇(上

海国药集团)、甲醇(上海国药集团)、氯仿(上海国药集团)、无水乙醇(上海碧云天生物)、RT-qPCR引物(武汉擎科生物)、4%多聚甲醛固定液(上海国药集团)、二甲苯(上海国药集团)、RIPA裂解液(强)(上海碧云天生物)、哌唑嗪(Prazosin)(美国MCE)、Nissl染色液/甲苯胺蓝(中国Boster Biotech)、Anti-Iba1 antibody(英国Abcam)、Anti-Adra1a antibody(武汉Proteintech)、Anti-CD68 antibody(武汉Proteintech)、小鼠IL-6 ELISA Kit(北京四正柏)、小鼠TNF- α ELISA Kit(北京四正柏)、小鼠IL-1 β ELISA Kit(北京四正柏)

1.3 实验方法

1.3.1 转录组测序和生物信息学分析

将3只野生型C57BL/6小鼠(WT)和3只3xTg-AD小鼠的大脑进行转录组测序。按照P<0.05且Fold change>1.5的筛选标准,获取AD相关差异表达基因,形成可视化类聚热图。对差异表达基因进行KEGG富集分析。使用“微生物信”在线分析平台对相关生物信息学数据进行可视化处理。

1.3.2 各组小鼠的处理

取 3 月龄小鼠随机分为四组，分别是正常对照组 (WT 组)、正常 Prazosin 处理组 (WT+PRA)、AD 组 (3xTg-AD 组)、Prazosin 治疗 AD 组 (3xTg-AD+PRA)。按照 1mg/kg 的剂量，将 Prazosin 工作液或对照溶剂以腹腔注射的方式给予 WT 小鼠或 3xTg-AD 小鼠，隔天注射，连续注射一个月。

1.3.3 实时荧光定量 PCR

①全过程使用无酶的枪头和试管，根据实验设计，选择 96 孔板或者 384 孔板，每个样品测的每个基因设置三个副孔。②合成小鼠 Adra1a、Adra1b、Adra1d、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS、GAPDH mRNA 的引物，浓度为 10mM。③先加入合成的上、下游引物各 0.2 μ L，再加入 3.6 μ L DEPC 水，再加入 1 μ L 逆转录得到的 cDNA；最后加入 5 μ L 商品化的 2 \times SYBR qPCR Mix。④把体系加入孔板后，使用 PCR 板离心机以 1000rpm 离心混匀 5min。⑤离心后将孔板放入实时荧光定量 PCR 仪，选择反应程序，采用三步法：95 $^{\circ}$ C 5min、95 $^{\circ}$ C 10s、58 $^{\circ}$ C 15s、72 $^{\circ}$ C 15s (40 个循环)、72 $^{\circ}$ C 5s。

1.3.4 酶联免疫吸附试验

① ELISA 试剂盒和样品室温复温 30min，将样品使用 4 $^{\circ}$ C 低温离心机 12000rpm 离心 5min。②配制稀释液：将 ELISA 试剂盒中的冻干标准品取出，使用 1mL 标准品稀释液进行溶解，随后静置 15min，标准品的终浓度为 500pg/mL，将其分装并保存于 -20 $^{\circ}$ C。取其中一管进行等比稀释，对于样品的稀释，根据经验进行 5~10 倍的稀释，以保证不超过标准品浓度。③向每个孔中加入 100 μ L 的稀释的标准品或样品，对孔板进行封存后放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 90min。④配制洗液，用超纯水将 40 \times 洗液稀释为 1 \times 洗液，甩去孔内液体，每孔加入 300 μ L 洗涤液，静置 30s 后甩干，并且重复此过程四次。⑤继续向每孔加入 100 μ L 的生物素化抗体工作液，封存后放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 60min。⑥继续

洗板 4 次，甩干洗液后，向每孔中加入 100 μ L 的酶结合物工作液，封存后放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 30min。⑦继续洗板 4 次，继续加入 100 μ L 显色剂，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10~20min。⑧向孔板中继续加入 100 μ L 终止液，并立刻使用酶标仪测量 OD450 值。

1.4 统计学处理

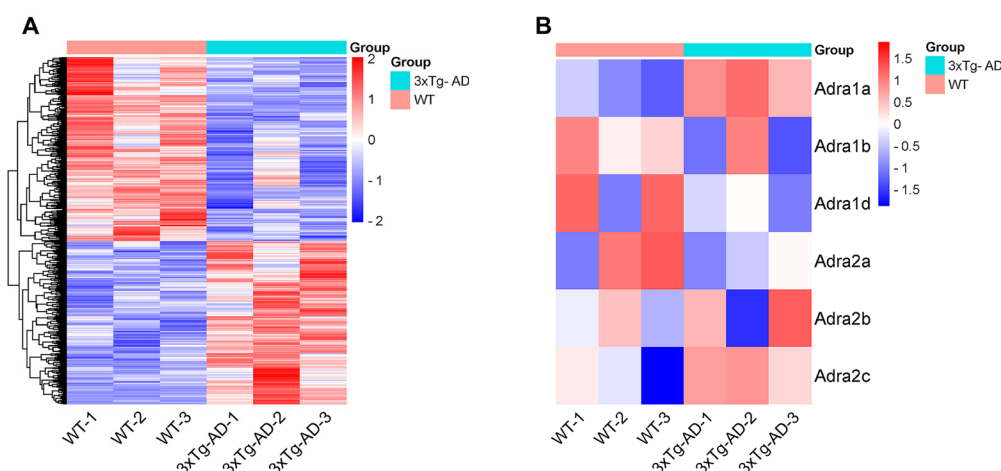
①采用 ImageJ 软件计算免疫荧光强度值。②采用 Image-Pro Plus6.0 进行荧光图像共定位分析。③ GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析，并且做成图片，所有数据以 mean \pm SEM 表示。两组之间的比较数据，使用 Student's t-test 进行分析，两组以上的比较数据，使用 one-way ANOVA 进行分析。其中，P < 0.05 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 α_{1A} 受体在 AD 小鼠的小胶质细胞中表达上调

对野生型 WT 小鼠和 3xTg-AD 小鼠大脑进行转录组测序。根据 P < 0.05 和 Fold change > 1.5 的差异基因筛选标准，获得了大量与 AD 相关的差异基因，形成了类聚热图 (见图 1A)。其中，肾上腺素受体家族变化显著，我们分析了肾上腺素受体相关基因的表达水平。结果发现，Adra1a 的变化最为显著，它编码 α_{1A} 肾上腺素受体 (见图 1B)。

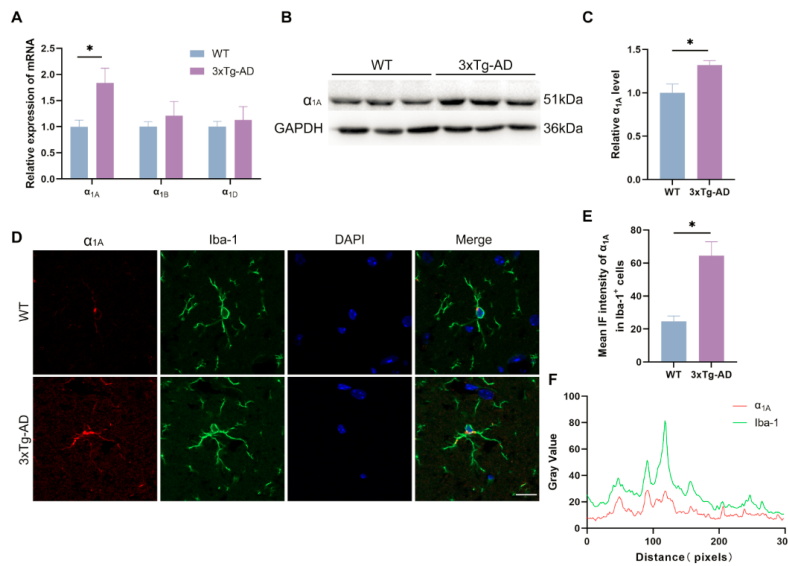
接下来我们验证了 WT 小鼠和 3xTg-AD 小鼠脑中 α_{1A} 受体的表达情况。结果显示，3xTg-AD 小鼠脑中 α_{1A} 受体在转录水平显著升高，而编码同家族的 α_{1B} 受体和 α_{1D} 受体的 mRNA 水平无显著性差异 (见图 2A)。在蛋白水平上，相对于 WT 小鼠，3xTg-AD 小鼠脑中 α_{1A} 受体的蛋白含量显著升高 (见图 2B、图 2C)。免疫组织荧光实验结果显示，在 3xTg-AD 小鼠脑中， α_{1A} 受体呈现显著上调 (见图 2D、图 2E)，并且主要定位于 Iba-1 阳性的小胶质细胞 (见图 2D，图 2F)。



(A) 在 WT 和 3xTg-AD 小鼠脑中，差异表达基因转录水平的层次聚类 and 表达热图

(B) 肾上腺素受体相关基因表达热图

图 1 生物信息学分析小鼠脑内肾上腺素受体表达情况



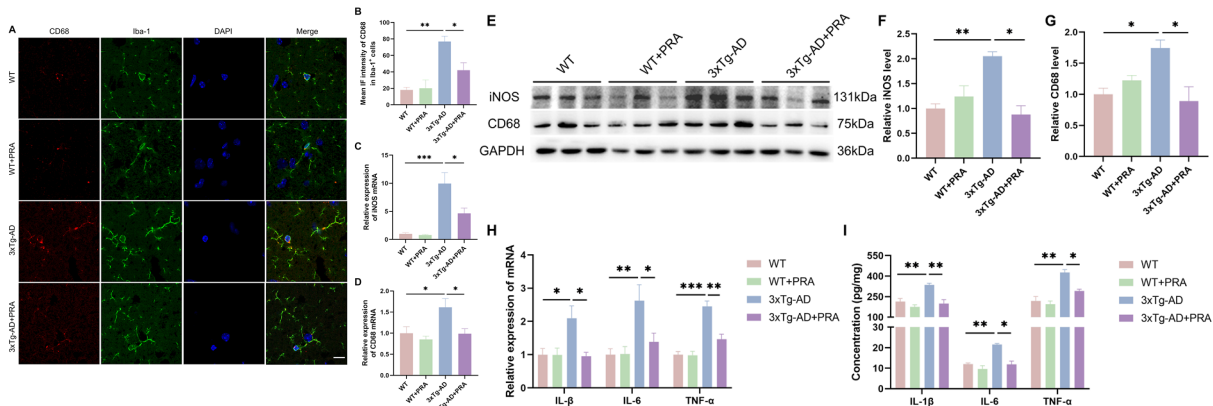
(A) 采用 RT-qPCR 检测 α_1 受体家族的 mRNA 水平。(B, C) Western blot 检测小鼠脑中 α_{1A} 受体蛋白水平, 并进行相应统计。 $n=3$, $*P < 0.05$ 。(D, E) 采用免疫组织荧光染色检测小鼠海马小胶质细胞中 α_{1A} 受体的表达, 并分析其荧光强度。 $n=3$, 比例尺为 $25\mu m$ 。(F) 分析 3xTg-AD 小鼠海马 Iba-1 和 α_{1A} 的共定位情况。

图 2 AD 小鼠的脑中的 α_{1A} 受体表达上调

2.2 阻断 α_{1A} 受体抑制了小胶质细胞的激活及炎症细胞因子的释放

小胶质细胞参与了中枢神经系统炎症的产生, 且我们发现 AD 脑部小胶质细胞的 α_{1A} 受体明显上调, 因此我们推测阻断 α_{1A} 受体可能通过抑制小胶质细胞的激活及减少炎症

因子的释放来缓解 AD。为了验证这一假设, 我们对 3xTg-AD 小鼠给予 Prazosin 给药处理, 观察其小胶质细胞激活情况。组织免疫荧光分析显示, 3xTg-AD 小鼠的小胶质细胞激活标志物 CD68 表达显著升高, 而 Prazosin 的处理有效抑制了这种升高 (见图 3A、图 3B)。



(A, B) 免疫荧光染色检测小鼠海马区小胶质细胞的激活情况, 并统计分析 CD68 在小胶质细胞上表达强度的百分比。比例尺为 $25\mu m$ 。(C, D) 使用 RT-qPCR 检测小胶质细胞激活相关基因 iNOS 和 CD68 的水平。(E-G) 使用 Western blot 检测四组样本 iNOS 和 CD68 的蛋白表达水平。(H) RT-qPCR 检测炎症细胞因子 (IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α) 的 mRNA 水平。(I) ELISA 检测小鼠脑组织中炎症细胞因子 (IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α) 的表达水平。 $n=3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

图 3 阻断 α_{1A} 受体可抑制 AD 小鼠小胶质细胞的激活及炎症细胞因子的释放

同时, 我们检测了小胶质细胞激活的标志物 iNOS 和 CD68 在转录水平和蛋白水平的变化。结果显示, iNOS 和 CD68 的 mRNA 水平在 3xTg-AD 小鼠脑中显著升高, Prazosin 处理可以显著降低 iNOS 和 CD68 的 mRNA 水平 (见图 3C、图 3D)。对蛋白水平的检测也发现, 3xTg-AD 小鼠脑中的 iNOS 和 CD68 蛋白水平较高, 而 Prazosin 可以降

低其蛋白水平 (见图 3E-G)。这些结果表明, 阻断 α_{1A} 受体能够有效抑制 3xTg-AD 小鼠的小胶质细胞激活。小胶质细胞激活能分泌炎症细胞因子, 通过 RT-qPCR 和 ELISA 的检测发现, 相较于 WT 小鼠, 3xTg-AD 小鼠脑中的炎症细胞因子 (IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α) 水平显著上升, 而 Prazosin 处理能显著降低小鼠脑中炎症细胞因子的表达 (见图 3H, 图 3I)。

3 讨论

α_{1A} 受体在 AD 患者和 AD 小鼠的海马和皮层中高表达, 且 α_{1A} 受体密度相对于对照组均有所增加^[1-3], 这意味着 α_{1A} 受体在 AD 的发病过程中可能发挥着重要作用。我们通过 WT 小鼠和 AD 小鼠的转录组数据分析, 同样发现 α_{1A} 受体的表达水平有显著变化, 并且通过 RT-qPCR、Western blot 和免疫荧光实验验证了 α_{1A} 受体在 AD 小鼠小胶质细胞中表达增加。之前的研究是在 17 月龄的 Tg2576 小鼠上发现 α_{1A} 受体表达上升, 这些鼠已经有明显的老年斑的形成^[4]; 而我们的实验小鼠取材时是 4 月龄, 此时老年斑尚未形成, 属于 AD 的早期, 因此我们的实验结果对 AD 疾病早期的机制研究和早期预防具有一定意义。

据报道, α_{1A} 受体通路的激活与炎症的产生密切相关。在外周, 激活 α_{1A} 受体可以通过激活体内 NLRP3 炎性小体引起心脏炎症和功能障碍^[5]。而 α_{1A} 受体拮抗剂可以通过抑制外周炎症, 减轻大鼠的膀胱炎^[6], 抑制肝纤维化中的炎症^[7], 保护大鼠肝脏免受缺血一再灌注损伤^[8]。在 AD 中也存在慢性、持续性神经炎症, 导致神经元的持续损伤, 减少突触数目, 并促进疾病的发展^[9]。我们的结果显示, α_{1A} 受体激活时, 小胶质细胞激活并且炎性细胞因子释放增加。在经过一个月的 Prazosin 处理后, 显著减轻了小鼠脑中小胶质细胞的激活并减轻了神经炎症。

在本项研究中, 我们证明了 AD 条件下 α_{1A} 受体在小胶质细胞中的表达上调, 以及对神经炎症的产生具有的重要意义。值得注意的是, 抑制 α_{1A} 受体可以抑制小胶质细胞的激活并降低促炎细胞因子 (如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α) 的分泌。我们的发现为 AD 的防治提供了一定的理论基础。

参考文献:

[1] Sharp S I, Ballard C G, Chen C P, et al. Aggressive behavior and neuroleptic medication are associated with increased number of alpha1-adrenoceptors in patients with Alzheimer disease[J]. *Am J Geriatr Psychiatry*,2007,15(5):435-437.

[2] Sztot P, White S S, Greenup J L, et al. Changes in adrenoreceptors

in the prefrontal cortex of subjects with dementia: evidence of compensatory changes[J]. *Neuroscience*,2007,146(1):471-480.

[3] Klingner M, Apelt J, Kumar A, et al. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with β -amyloid plaque pathology[J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*,2003, 21(7):357-369.

[4] Klingner M, Apelt J, Kumar A, et al. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology[J]. *Int J Dev Neurosci*,2003,21(7):357-369.

[5] Xin J Z, Wu J M, Hu G M, et al. α (1)-AR overactivation induces cardiac inflammation through NLRP3 inflammasome activation[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2020,41(3):311-318.

[6] Liu N, Shimizu S, Shimizu T, et al. Protective effects of the selective alpha1A-adrenoceptor antagonist silodosin against cyclophosphamide-induced cystitis in rats[J]. *J Pharmacol Sci*, 2016,132(1):71-77.

[7] Sancho-Bru P, Bataller R, Colmenero J, et al. Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006,291(5):877-884.

[8] Khajepour F, Mahmoodpoor F, Jafari E, et al. Prazosin Protects the Liver Against Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats[J]. *Drug Res (Stuttg)*,2023,73(5):289-295.

[9] Hong S, Beja-Glasser V F, Nfonoyim B M, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models[J]. *Science*,2016,352(6286):712-716.

作者简介: 王睿竹(2001-), 女, 中国湖北汉川人, 硕士, 从事阿尔茨海默病研究。

通讯作者: 尹君(1980-), 女, 中国湖北武汉人, 博士, 副教授, 从事阿尔茨海默病研究。