

丁登峰,高翔,张旭,等.瘦素受体敲除引起大鼠脑组织小胶质细胞活化[J].中国比较医学杂志,2021,31(5):7-14.
Ding DF, Gao X, Zhang X, et al. Leptin receptor knockout induced microglial cell activation in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 7-14.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.05.002

瘦素受体敲除引起大鼠脑组织小胶质细胞活化

丁登峰¹,高翔²,张旭¹,刘旭¹,孙彩显²,张丽²,张连峰^{1,2*}

(1.北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021. 2.北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021)

【摘要】 目的 本文利用瘦素受体(LEPR)敲除大鼠,分析瘦素受体基因敲除后大鼠脑中小胶质细胞形态与功能的改变,探究瘦素受体在小胶质细胞中的功能作用。方法 采用 RT-PCR,蛋白印迹法,免疫组化法和免疫荧光法,观察大鼠瘦素受体敲除后体内小胶质细胞活化状态。结果 瘦素受体在小胶质细胞表达,基因敲除可以完全剔除小胶质细胞中 LEPR 蛋白;LEPR 敲除增强大鼠 LPS 对刺激的炎症反应,存活率降低了 75%;LEPR 敲除大鼠脑中的活化的小胶质细胞比例明显增加;LEPR 敲除的原代小胶质细胞不仅分泌更多炎症因子也增强了吞噬能力;Western blot 发现 PI3K/AKT 在瘦素受体敲除大鼠脑组织蛋白中磷酸化明显增强。结论 瘦素受体敲除后,大鼠小胶质细胞向促炎促吞噬的方向发展,揭示了 LEPR/Leptin 可能通过小胶质细胞调节神经炎症。

【关键词】 瘦素受体;小胶质细胞;炎症因子;吞噬;神经炎症;基因敲除;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)05-0007-08

Leptin receptor knockout induced microglial cell activation in rats

DING Dengfeng¹, GAO Xiang², ZHANG Xu¹, LIU Xu¹, SUN Caixian², ZHANG Li², ZHANG Lianfeng^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC)&Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021, China. 2. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC)&Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021)

【Abstract】 Objective Neuroinflammation is a phenotype of leptin receptor (LEPR) mutated mice (db/db) and raises the question of whether LEPR is involved in microglial activation. To examine the function of LEPR on microglia cells, microglial activation was comparatively analyzed in LEPR^{+/+} and LEPR^{-/-} rats. **Methods** RT-PCR, Western blot, immunohistochemistry, and immunofluorescence were used to examine microglia morphology, inflammatory factor secretion, and sensitivity to lipopolysaccharide (LPS) treatment *in vitro* and *in vivo*. **Results** First, LEPR was expressed in microglia from LEPR^{+/+} rats, while LEPR protein was completely deleted in microglia from LEPR^{-/-} rats. LEPR deletion enhanced sensitivity to LPS treatment and reduced survival rate of LEPR^{-/-} rats by 75%. Activated microglia were significantly increased in brain tissue of LEPR^{-/-} rats compared with LEPR^{+/+} rats. LEPR deletion also increased the expression of inflammatory cytokines including interleukin (IL)-6, inducible nitric oxide synthase, and Interleukin-1β

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(31970508,31900380)。

【作者简介】丁登峰(1995—),男,硕士研究生,研究方向:比较医学。E-mail: dengfengding@163.com

【通信作者】张连峰(1963—),男,博士,研究员,研究方向:比较医学。E-mail: zhanglf@cnilas.org

(IL-1 β), and enhanced phagocytotic ability. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT phosphorylation was significantly increased in microglia from LEPR^{-/-} rats compared with LEPR^{+/+} rats, suggesting that activation of the PI3K/AKT signal pathway could partly be the mechanism of microglia activation. **Conclusions** Deletion of LEPR in microglia induced its activation and suggests the involvement of neuroinflammation in rats. Our result also suggest that the LEPR/leptin axis plays important roles in neuroinflammation through microglia.

【Keywords】 leptin receptor; microglia; inflammatory factors; neuroinflammation; knockout; phagocytose; rat

瘦素受体 (leptin receptor, LEPR) 是瘦素 (leptin) 的功能性受体, Leptin/LEPR 轴能激活 JAK2-STAT3、PI3K 和 AMPK 等信号转导通路, 从而发挥抑制食欲、促进能量消耗, 减少脂肪含量调节体重的功能^[1-3]。LEPR 的突变是啮齿类动物和人类肥胖/糖尿病突变的基础^[4]。LEPR 缺失的 db/db 小鼠 (diabetes mouse), 是典型的 2 型糖尿病模型, 能够反映肥胖、糖耐量进行性恶化、高血压和高脂血症等人类疾病的表型^[5-6]。LEPR 的突变的大鼠 (zucker diabetic fatty rats, ZDF) 也表现高胰岛素血症、高脂血症和高血压, 并表现出糖耐量减低的 2 型糖尿病症状^[7-8]。瘦素受体敲除大鼠表现为过度肥胖、多饮、多食、血糖高、对葡萄糖不耐受、高胰岛素血症和血脂异常^[9-10]。

Leptin/LEPR 轴不仅与能量代谢有关, Leptin 和 LEPR 在被发现脑中具有表达^[11]。那么, Leptin/LEPR 是否参与脑中免疫调节的问题, 目前研究很少。已知无论是在 leptin 突变的 ob/ob 和 LEPR 突变的 db/db 小鼠, 都有明显的脑损伤和神经炎症^[12-13]。小胶质细胞 (microglia) 是中枢神经系统的主要免疫细胞, 与脑损伤与神经炎症有关^[14-15], 但目前瘦素受体与小胶质细胞、神经炎症的研究报道的很少, 这将是本文的切入点, 利用瘦素受体敲除大鼠阐述 LEPR 与小胶质细胞之间的联系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

LEPR 全身敲除大鼠 (LEPR^{-/-}) 由中国医学科学院医学实验动物研究所遗传疾病模型工程平台培育, LEPR^{-/-} 繁育过程中所需的 8 周龄 SPF 级 SD 大鼠由中国医学科学院医学实验动物研究所提供 [SCXK(京)2019-0011]。雌雄各 10 只, 体重在 200~400 g 之间, 按照雌雄比例 1:1 进行合笼繁育。实验所需大鼠均饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房 [SYXK(京)2019-0014], 饲养间温度 (23±2) °C, 12/12 h 明暗交替照明, 动物自由饮水及采食。本实验涉及到的所有实验动物

程序均通过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会 (IACUC ZLF18003) 的批准, 实验过程中遵循了 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基、Neurobasal Media 神经元培养基、DPBS 缓冲液和 Fetal Bovine Serum 胎牛血清购自于美国 Gibco 公司; FITC-Dextran 购自美国 Sigma 公司; A β (1-40) 购自于美国 AnaSpec 公司; TRIzol 购自于美国赛默飞公司; 一抗 leptin receptor、PI3K 和 AKT 购自于英国 Abcam 公司; RT-PCR 试剂盒购自于日本 TaKaRa 公司; 无水乙醇和异丙醇购自于北京化工厂有限责任公司; DNA 提取试剂盒和质粒小提试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 兔二步免疫组化试剂盒和 DAB 染色液购自于北京中杉金桥生物技术有限公司; 细胞培养板和细胞培养瓶购自于美国康宁公司; 实时荧光定量 PCR 仪购自美国伯乐公司; 激光共聚焦显微镜和双光子显微镜购自于德国莱卡公司; 离心机和移液器购自于德国艾本德公司; 6 孔板、24 孔板细胞爬片和 10% 福尔马林固定液购自于北京索莱宝科技有限公司; qPCR 引物购自于北京天一辉远生物科技有限公司; 生物安全工作台购自于苏州设备净化设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠原代神经元细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞培养

LEPR^{+/+} 交配, 选取同窝阴性对照 (LEPR^{+/+}) 和敲除纯和子 (LEPR^{-/-}) 1 周龄新生 SD 幼鼠各 20 只, 低温麻醉处死, 用高压过的手术器械取出大鼠置于含 DPBS (Gibco) 的圆皿中清洗, 去除脑组织上面的脑膜和血块, 然后在 1 mL 胰酶中剪碎, 再加入 2 mL 胰酶转移到 15 mL 离心管置于温箱中消化 8 min, 加 10 mL 培养基混匀中和胰酶消化, 将上清过滤到新的 15 mL 离心管中, 1500 r/min, 离心 5 min, 倒掉上清, 保留管底沉淀, 用 1 mL 培养基吹打混匀后转移至 75 cm² 培养瓶中^[16]。将获得的细胞放在在含 5% CO₂, 37°C 的细胞培养箱里常规培

养 7~14 d 左右。上述是三种细胞的共同培养步骤,但是培养基和分离方式不同,其中原代星形胶质细胞和小胶质细胞的培养基是含 10% 胎牛血清,1% 非必需氨基酸,1% 青霉素/链霉素和 1% 的谷氨酰胺的 DMEM-F12 培养基 (Gibco), 上层细胞是小胶质细胞,37℃ 摇床,200 r/min 振荡分离 2 h 即可获得,下层贴壁细胞是星形胶质细胞,用胰酶消化即可获得;原代神经元细胞的培养基是含有 10% B27,1% 非必需氨基酸,0.5% 青霉素/链霉素和 1% 的谷氨酰胺的 Neurobasal Media 无血清培养基 (Gibco), 其他细胞在此环境中无法存活,获得的细胞即为神经元细胞。

1.3.2 小胶质细胞吞噬的免疫荧光观察

在 24 孔板中放置多聚赖氨酸包被过的爬片 (Acme), 接种原代小胶质细胞, 接种密度一般为 60%~70%, 完全培养基培养 24 h, 随后换无血清培养液饥饿培养 12 h, 随后分别给予吞噬示踪剂 FITC-Dextran (Sigma) 和 β (1-40) (AnaSpec), 分别继续孵育 2 h 和 3 h, 暗光处 PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 4% 多聚甲醛 (碧云天) 固定 20 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min, DAPI (中杉金桥) 封片, 双光子显微镜 (Leica) 观察小胶质细胞吞噬。每组 30 个视野, 根据小胶质细胞吞噬的荧光强度用 Image J 软件计算每个小胶质细胞吞噬能力。

1.3.3 LPS 诱导致死性和脑组织小胶质细胞形态分析

选取 8 周龄 LEPR^{+/+} 和 LEPR^{-/-} 大鼠, 分为 4 组, 每组 12 只大鼠, 雌雄各 6 只, 雄性大鼠体重在 200~450 g 之间, 雌性大鼠体重在 200~350 g 之间, 各个组分别为 LEPR^{+/+} 组, LEPR^{-/-} 组, LEPR^{+/+}+LPS 组, LEPR^{-/-}+LPS 组。LEPR^{+/+} 组和 LEPR^{-/-} 组腹腔注射 0.2 mL PBS; LEPR^{+/+}+LPS 组和 LEPR^{-/-}+LPS 组, 根据体重分别腹腔注射 LPS (Sigma), 注射剂量为 0.5 mg/100 g。随后每 1 h 观察大鼠情况, LPS 处理的大鼠濒临死亡时麻醉取材, PBS 组大鼠同时点取材。48 h 未死大鼠安乐死取材。统计 LPS 诱导致死的数量, 并作生存曲线。大脑组织福尔摩林固定, 按一般病理程序石蜡包埋, 制备 5 μ m 切片^[17], 用 1:100 稀释的抗 IBA-1 单克隆抗体 (Abcam) 标记脑组织的小胶质细胞, 用兔二步法免疫组化试剂盒标记二抗, DAB 显色 (中杉金桥), Panoramic 扫描仪扫描 (3DHISTECH), 观察并统计小胶质细胞的不同活化形态。

1.3.4 蛋白提取与蛋白免疫印迹

收集 LEPR^{+/+} 和 LEPR^{-/-} 大鼠原代小胶质细胞, 在细胞蛋白裂解液 Pierce TM RIPA Buffer 中, 加入 1% PMSF, 1% 磷酸酶抑制剂和 1% 蛋白酶抑制剂 (Thermo), 冰上裂解 20 min。4℃, 10000 r/min 离心 10 min。用 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白样品按照等质量上样于 10% 的 SDS-PAGE 电泳, 冰水混合物中恒流湿转, 5% 封闭液 (脱脂奶粉配置) 室温封闭 1~2 h。一抗 leptin receptor (5% BSA, 1:1000, Abcam)、PI3K (1:1000, CST)、p-PI3K (1:1000, CST)、AKT (1:1000, CST)、p-AKT (1:1000, CST)。4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。兔抗山羊 IgG 二抗 (1:10000, CST) 摇床低速振荡, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 化学发光试剂盒进行曝光显影。

1.3.5 细胞 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

收集 LEPR^{+/+} 和 LEPR^{-/-} 大鼠原代小胶质细胞, TRIzol 法 (Thermo) 提取 RNA, 取 1 μ g RNA 按照试剂盒方法 (Takara) 进行逆转录反应获取 cDNA, RT-PCR 检测 leptin receptor 以及 IL-6, i-NOS, IL-1 β 等的表达。以 GAPDH 基因作为内参, 定量分析。引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

所有独立实验重复 3 次, 用 Image J 软件计算蛋白免疫印迹条带灰度值和免疫荧光荧光值, 采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行柱形图绘制和统计学分析, 数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 多组数据采用方差分析 *F* 检验, 并得到 *F* 值。

2 结果

2.1 LEPR 的表达、敲除效率及 LEPR^{-/-} 大鼠对 LPS 刺激不耐受

为了确定 LEPR 在脑中表达的细胞类型, 分离

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence
GAPDH	F: 5'-CTCATGACCACAGTCCATGC-3'
	R: 5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'
IL-6	F: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3'
	R: 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTTC-3'
i-NOS	F: 5'-AGGGAGTGTGTTCCAGGTG-3'
	R: 5'-TCCTCAACCTGCTCCTCACT-3'
IL-1 β	F: 5'-CTGTGACTCGTGGGATGATG-3'
	R: 5'-GGGATTTGTCGTTGCTTGT-3'

并培养大鼠原代小胶质细胞、星形胶质细胞和神经元,用 RT-PCR 分析 LEPR 的表达,结果表明,LEPR 在小胶质细胞、星形胶质细胞和神经元中均有表达(图 1A)。分离 LEPR 基因敲除大鼠 LEPR^{-/-}的原代小胶质细胞,Western blot 分析证实,LEPR 蛋白表达被完全剔除(图 1B)。对比分析 LEPR^{+/+}和 LEPR^{-/-}大鼠对 LPS 刺激的反应性,表明 LEPR 敲除增加了大鼠 LPS 刺激的敏感性,LEPR^{-/-}大鼠在 LPS 刺激下 48 h 内生存率降低了 75%。(图 1C、1D)

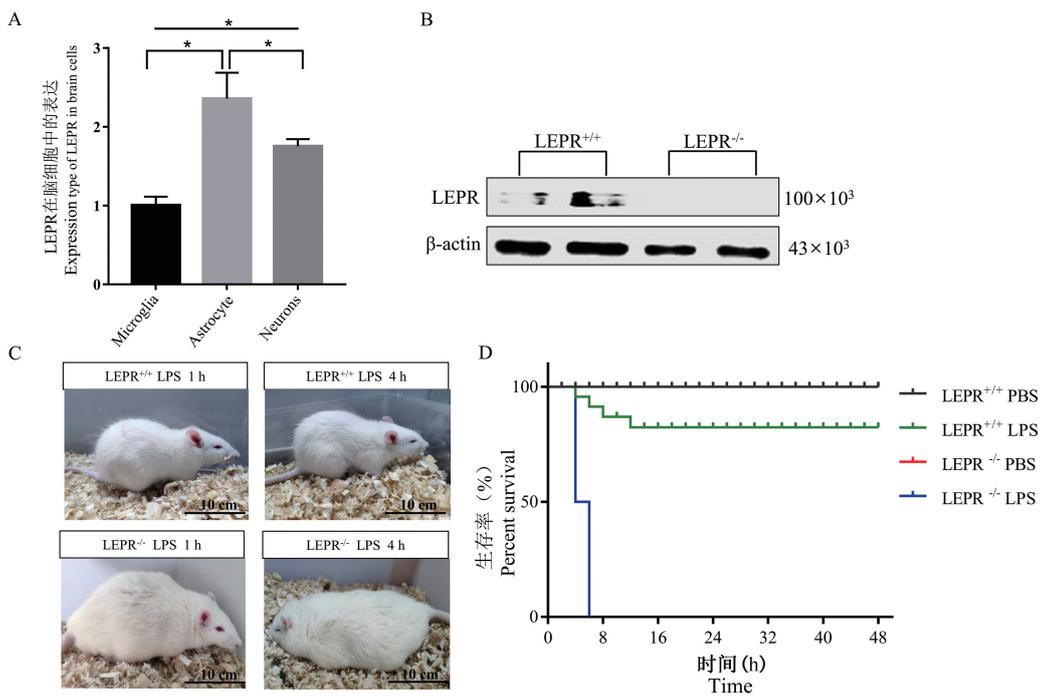
2.2 小胶质细胞形态结构的变化情况

用小胶质细胞的标志分子 Iba1 的抗体,比较分析 LEPR^{+/+}和 LEPR^{-/-}大鼠大脑组化中小胶质细胞的形态(图 2A、2C),相比于 LEPR^{+/+},LEPR^{-/-}脑组织中处于静息态(Resting)的小胶质细胞减少了 55.2%($n=6, P<0.001$),而趋于活化的肥大态(Hypertrophic)和阿米巴样态(Amoeboid)的小胶质细胞分别增加了 34.7%和 14.1%($n=6, P<0.01$)。LEPR^{-/-}大鼠对 LPS 刺激反应更强烈,相对于

LEPR^{+/+}(LPS), LEPR^{-/-}(LPS)大鼠脑组织中处于静息态的小胶质细胞减少了 16.1%($n=6, P<0.01$),而趋于活化的肥大态和阿米巴样态的小胶质细胞分别增加了 16.6%和 25.1%($n=6, P<0.01$)。(图 2B、2D)统计各种小胶质细胞形态的数目作图(图 2E)。

2.3 LEPR 敲除大鼠小胶质细胞炎症因子分泌增加

为了进一步明确 LEPR^{-/-}对小胶质细胞的活化作用,分别分离了来源于 LEPR^{+/+}和 LEPR^{-/-}大鼠的原代小胶质细胞,用 RT-PCR 对比分析了 3 种炎症因子的 mRNA 表达水平(图 3A~3C)。不存在刺激因素的情况下,与 LEPR^{+/+}相比 LEPR 敲除导致 IL-6, i-NOS, IL-1 β 表达分别增多了 61.4 倍, 53.7 倍和 2.7 倍。在 LPS 刺激的情况下,LEPR 敲除导致 IL-6, i-NOS, IL-1 β 表达分别增多了 3.3 倍, 1.8 倍和 1.9 倍,同时在 A-C 三个多组数据中得到的 F 值分别是 94.47, 86.95 和 33.64。见图 3D、3F,我们进一

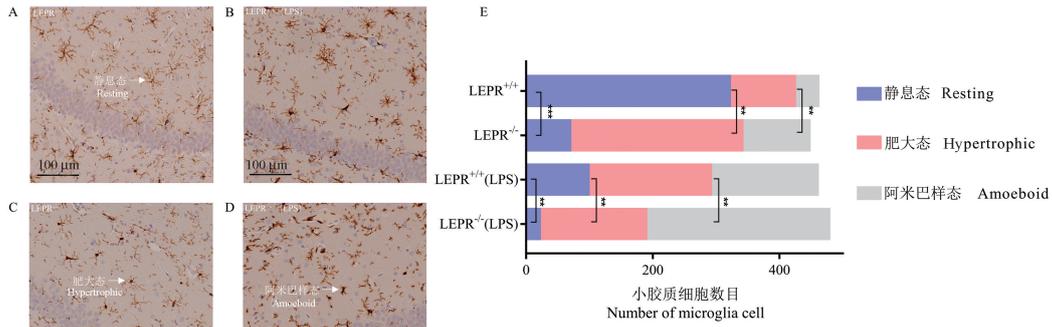


注:A:LEPR 在小胶质细胞、星形胶质细胞和神经元中的表达情况;B:LEPR 基因在 LEPR^{-/-} 的小胶质细胞的表达被完全沉默;C、D:LEPR^{+/+} 和 LEPR^{-/-} 大鼠对 LPS 刺激的反应性及对应的生存曲线。三组细胞之间两两比较, * $P<0.05$ 。

图 1 LEPR 的表达、敲除效率及 LEPR^{-/-} 大鼠对 LPS 刺激不耐受

Note. A, LEPR expression in microglia, astrocytes and neurons. B, The expression of LEPR gene in microglia of LEPR^{-/-} was completely silenced. C/D, LEPR^{+/+} and LEPR^{-/-} rat responses to LPS treatment and corresponding survival curves. Pairwise comparisons of the three groups of cells, * $P<0.05$.

Figure 1 Expression and knockout efficiency of LEPR and LEPR^{-/-} rat tolerance to LPS treatment

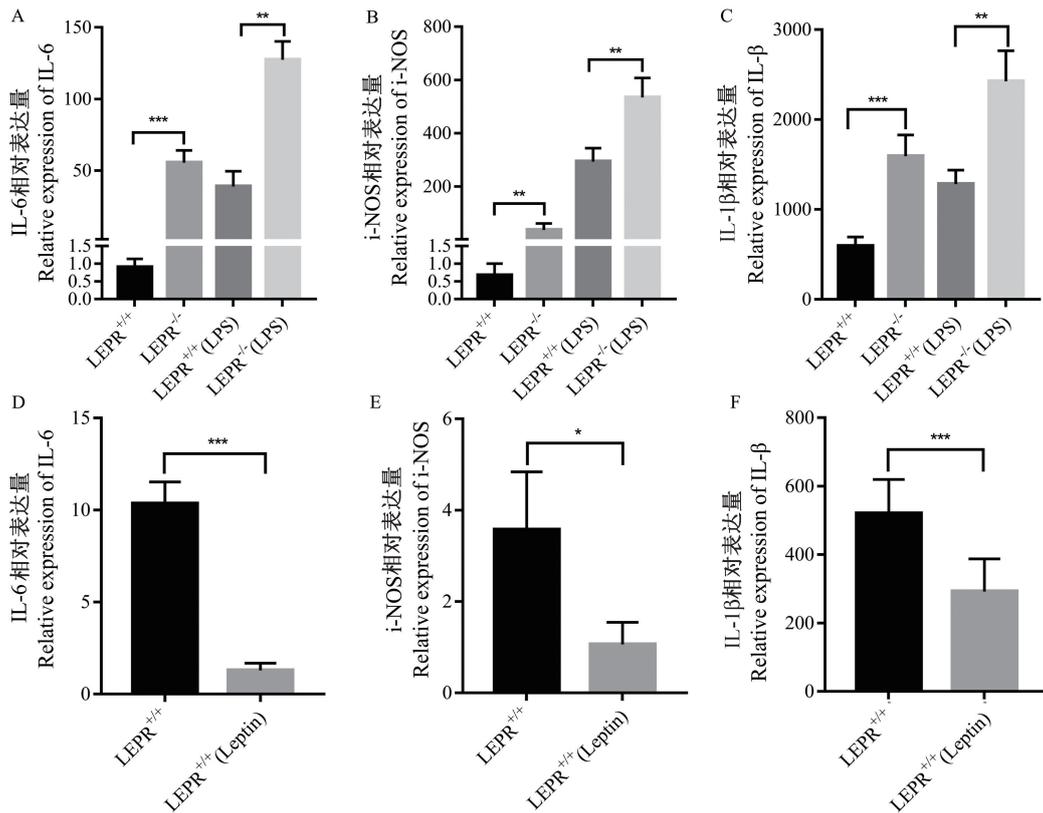


注:A,C:LEPR^{+/+}和LEPR^{-/-}大鼠脑切片小胶质细胞形态;B,D:LEPR^{+/+}(LPS)和LEPR^{-/-}(LPS)大鼠脑切片小胶质细胞形态;E:小胶质细胞数目统计。与LEPR^{+/+}和LEPR^{+/+}(LPS)大鼠相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图2 小胶质细胞形态结构的变化情况

Note. A/C, LEPR^{+/+} and LEPR^{-/-} microglia morphology in rat brain slices. B/D, Morphology of microglia in brain slices, LEPR^{+/+}(LPS) and LEPR^{-/-}(LPS) rats. E, Microglia count. Compared with LEPR^{+/+} rats and LEPR^{+/+}(LPS) rats, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Changes of microglia cell morphology and structure



注:A~C:IL-6,i-NOS,IL-1β在LPS刺激存在或不存在时的表达;D~F:IL-6,i-NOS,IL-1β在leptin刺激下的表达。与LEPR^{+/+}和LEPR^{+/+}(LPS)大鼠相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图3 LEPR 敲除大鼠小胶质细胞炎症因子分泌增加

Note. A~C, Expression of IL-6, i-NOS, IL-1β in the presence or absence of LPS stimulation. D-F, IL-6, i-NOS, IL-1β expression of in response to leptin. Compared with LEPR^{+/+} rats and LEPR^{+/+}(LPS) rats, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Increased secretion of inflammatory factors in microglia cells of LEPR knockout rats

步对 LEPR^{+/+}小胶质细胞进行瘦素蛋白处理,反向验证了 LEPR 的激活可以抑制炎症因子表达,证明敲除 LEPR 会增强炎症因子表达。

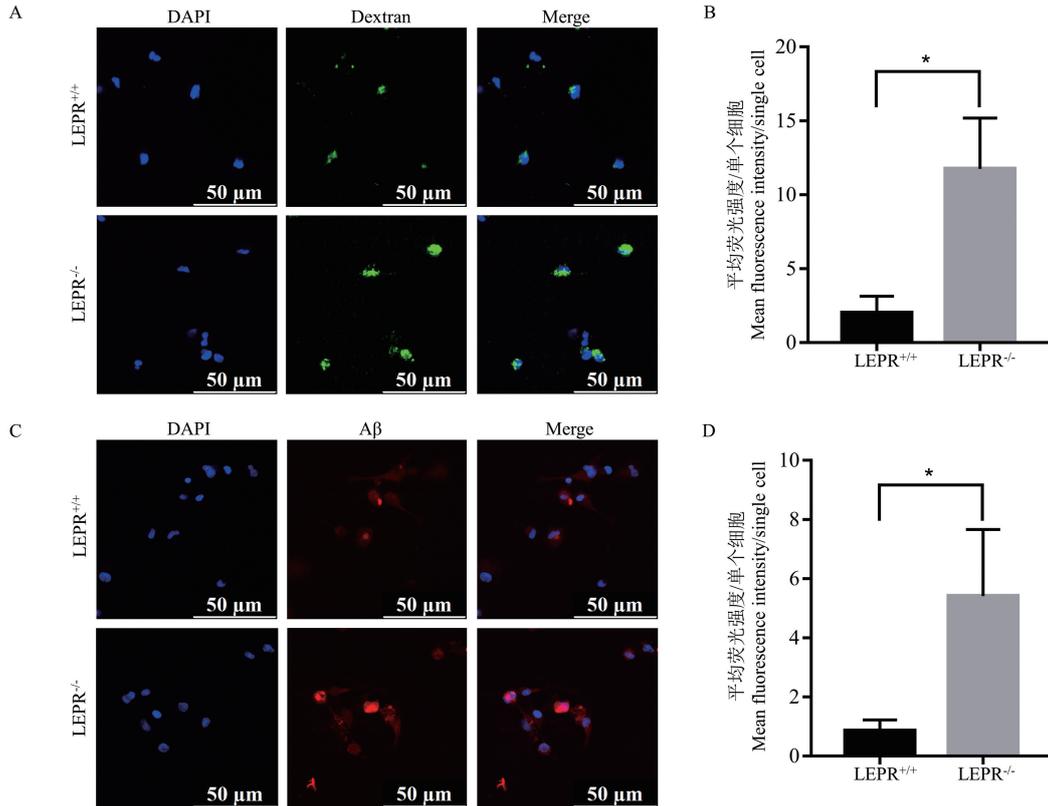
2.4 LEPR 敲除大鼠小胶质细胞吞噬能力增强

小胶质细胞的活化一般会伴随着吞噬能力的增强,分离 LEPR^{+/+}和 LEPR^{-/-}原代小胶质细胞,对比分析其对 Dextran 的吞噬(图 4A、4B)和 A β 的吞噬(图 4C、4D),结果表明,相比于 LEPR^{+/+}小胶质细

胞,LEPR^{-/-}小胶质细胞 Dextran 和 A β 的吞噬分别增加了 10.3 倍和 6.5 倍($P < 0.05$)。

2.5 PI3K/AKT 信号通路可能参与小胶质细胞促炎促吞噬过程

分离 LEPR^{+/+}和 LEPR^{-/-}大鼠的脑组织,用 Western blot 分析 JAK2、STAT3、PI3K、AKT、ERK1/2 等信号分子的磷酸化(图 5A~C)。LEPR 敲除没有明显改变 JAK2、STAT3 和 ERK1/2 的磷酸化水平

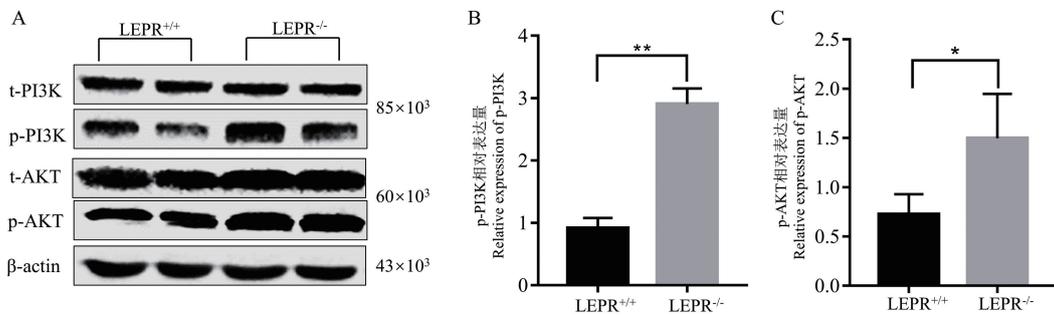


注:A、B:Dextran 的吞噬;C、D:A β 的吞噬。与 LEPR^{+/+}组大鼠相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 LEPR 敲除大鼠小胶质细胞吞噬能力增强

Note. A/B, Dextran phagocytosis. C/D, A β phagocytosis. Compared with LEPR^{+/+} rats, * $P < 0.05$.

Figure 4 Enhanced phagocytosis of microglia cells in rats with LEPR knockout



注:A;PI3K/AKT 通路;B;p- PI3K 灰度值;C;p- AKT 灰度值。与 LEPR^{+/+}组大鼠相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 PI3K/AKT 信号通路可能参与小胶质细胞促炎促吞噬过程

Note. A, PI3K/AKT pathway. B, p-PI3K gray value. C, p-AKT gray value. Compared with LEPR^{+/+} rats, * $P < 0.05$.

Figure 5 PI3K/AKT signaling pathway may be involved in the proinflammatory and phagocytic process of microglia cells

(结果未见)。LEPR 敲除反而激活了 PI3K/AKT 通路 LEPR^{-/-}脑组织蛋白中 PI3K 和 AKT 的磷酸化分别增加了 2.9 倍和 1.6 倍($P < 0.05$)。

3 讨论

瘦素主要由脂肪组织分泌,与瘦素受体结合,除了调节能量代谢,还能作为炎性因子激活巨噬细胞,参与外周神经性疼痛^[18-20]。表达在巨噬细胞中的瘦素受体维持着其吞噬,清除的能力,影响炎性因子的分泌,并被证实瘦素受体可单独影响巨噬细胞不受其他因素干扰^[21-22]。小胶质细胞认为是脑组织中特化的巨噬细胞^[14],但关于瘦素受体与小胶质细胞的报道却很少。小胶质细胞不管是本身的生物学特性,还是微环境与巨噬细胞有一定的差别,对巨噬细胞的研究结论不能简单的推理至小胶质细胞。本研究通过 LEPR 敲除大鼠明确了在 LEPR 缺失的情况下,小胶质细胞会由静息状态转化为肥大形态和阿米巴样形态,并表现出促炎和促吞噬的表型。推测 Leptin/LEPR 在小胶质细胞中,应该是抗炎的,而不是巨噬细胞中的促炎作用。

LEPR 基因敲除导致小胶质细胞活化主要表现在三个方面:第一、LEPR^{-/-}大鼠的脑组织中小胶质细胞由静息形态向肥大形态和阿米巴样形态转换,表现为胞体变大(图 2)。小胶质细胞的增生与肥大被认为是 M1 型的极化,通常与炎症有关^[23-25],阿米巴样形态的小胶质细胞更倾向于吞噬^[26-28]。第二、LEPR^{-/-}小胶质细胞比 LEPR^{+/+}小胶质细胞表达更多的 IL-6, i-NOS 和 IL-1 β 等炎性因子(图 3)。小胶质细胞分泌 IL-6 增多,通常认为与脑损伤,自闭症和多动症有关^[29-30]; IL-1 β 和 i-NOS 升高与神经炎症有关^[31-32],在给予 LPS 刺激后,LEPR^{+/+}组和 LEPR^{-/-}组的 IL-6, i-NOS 和 IL-1 β 表达均升高,并且 LEPR^{-/-}组炎性因子升高更为明显,我们发现 LEPR 敲除后发生的内质网应激参与了炎症^[10],提示内质网应激可能在 LEPR^{-/-}组在 LPS 刺激后炎性因子明显升高中发挥作用;此外我们也做了肿瘤坏死因子 TNF- α 的表达,发现 LEPR^{-/-}组 TNF- α 的表达存在争议,这与我们预期不符(结果未显示),猜测 LEPR 的敲除会降低磷酸酶 D1 的表达从而抑制了 TNF- α 的表达;第三、LEPR^{-/-}小胶质细胞比 LEPR^{+/+}小胶质细胞表现出更强的吞噬 A β 和 Dextran 的能力(图 4),这与小胶质细胞由静息形态向阿米巴样形态转变结果相符合。无论是在 leptin 突变的 ob/ob 和

LEPR 突变的 db/db 小鼠,都有明显的脑损伤和神经炎症^[12-13],结合我们的研究结果,ob/ob 和 db/db 小鼠的神经炎症不仅仅是肥胖和 2 型糖尿病引起的,一部分原因应该是 leptin 和 LEPR 的功能缺失引起的小胶质细胞活化。我们对比分析了几种可能参与小胶质细胞活化的信号通路,发现 LEPR 敲除没有明显改变 JAK2、STAT3 和 ERK1/2 的磷酸化水平,反而是激活了 PI3K/AKT 通路(图 5),有报道认为,PI3K/AKT 激活,能调节 IL-6, i-NOS, IL-1 β , TNF- α 等炎性因子的表达^[33-34],我们的结果未能解释 LEPR 敲除如何激活了 PI3K/AKT 通路,但是该通路的激活可能是小胶质细胞活化的信号通路之一。

综上所述,本研究在瘦素受体敲除的大鼠模型中发现小胶质细胞向着促炎促吞噬的表型转变,首次将瘦素受体与小胶质细胞和神经炎症联系起来,并揭示了 LEPR/Leptin 可能通过小胶质细胞调节神经炎症,并可能在中枢神经系统里面发挥着某种保护性作用。

参考文献:

- [1] Gale SM, Castracane VD, Mantzoros CS. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: Recent advances in endocrinology [J]. J Nutr, 2004, 134(2): 295-298.
- [2] Wauman J, Tavernier J. Leptin receptor signaling: Pathways to leptin resistance [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2011, 16: 2771-2793.
- [3] 蒋丹丹,曹兰凤,许朝霞,等.瘦素受体基因敲除 SD 大鼠的表型及病理观察 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(3): 331-338.
- [4] Israel D, Chua S Jr. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility [J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21(1): 10-16.
- [5] Sullivan MA, Harcourt BE, Xu P, et al. Impairment of liver glycogen storage in the db/db animal model of type 2 diabetes: A potential target for future therapeutics? [J]. Current Drug Targets, 2015, 16(10): 1088-1093.
- [6] 吴静,王华旻,李晶,等. db/db 小鼠的实验室应用 [J]. 生理科学进展, 2013, 44(1): 12-18.
- [7] Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models [J]. J Diabetes Res, 2016, (2016): 9051426.
- [8] Sultan A, Singh J, Howarth FC. Mechanisms underlying electro-mechanical dysfunction in the Zucker diabetic fatty rat heart: a model of obesity and type 2 diabetes [J]. Heart Fail Rev, 2019, 25(5): 873-886.
- [9] Bao D, Ma Y, Zhang X, et al. Preliminary characterization of a leptin receptor knockout rat created by CRISPR/Cas9 system [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15942.

- [10] Yao F, Jiang DD, Guo WH, et al. FABP4 inhibitor attenuates inflammation and endoplasmic reticulum stress of islet in leptin receptor knockout rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(24): 12808-12820.
- [11] Di Spiezio A, Sandin ES, Dore R, et al. The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward [J]. *Mol Metab*, 2018, 8: 13-22.
- [12] Dey A, Hao S, Erion JR, et al. Glucocorticoid sensitization of microglia in a genetic mouse model of obesity and diabetes [J]. *J Neuroimmunol*, 2014, 269(1-2): 20-27.
- [13] Jin Z, Kim KE, Shin HJ, et al. Hippocampal lipocalin 2 is associated with neuroinflammation and iron-related oxidative stress in ob/ob mice [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2020, 79(5): 530-541.
- [14] 李晶文, 张丽, 张连峰. 小胶质细胞在神经发育和神经退行性疾病中的吞噬作用与调节机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(4): 120-126, 102.
- [15] Bilimoria PM, Stevens B. Microglia function during brain development: New insights from animal models [J]. *Brain Res*, 2015, 1617: 7-17.
- [16] Houalla T, Levine RL. The isolation and culture of microglia-like cells from the goldfish brain [J]. *Neurosci Methods*, 2003, 131(1-2): 121-131.
- [17] 秦川, 朱华, 张兵林, 等. 阿尔茨海默症转基因动物模型脑组织病理学及免疫组化研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2000, 8(4): 213-217.
- [18] 裴娜娜, 吴丽红, 高永新, 等. 大鼠瘦素基因重组腺相关病毒的构建及在原代神经元细胞中的过表达 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(5): 42-47, 105.
- [19] Chang KT, Lin YL, Lin CT, et al. Leptin is essential for spinal microglial activation and neuropathic pain after preganglionic cervical root avulsion [J]. *Life Sciences*, 2017, 187: 31-41.
- [20] Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, et al. Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(31): 13076-13081.
- [21] Dib LH, Ortega MT, Melgarejo T, et al. Establishment and characterization of DB-1; a leptin receptor-deficient murine macrophage cell line [J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(4): 921-933.
- [22] Voloshyna I, Mounessa J, Carsons S, et al. Effect of inhibition of interleukin-12/23 by ustekinumab on the expression of leptin and leptin receptor in human THP-1 macrophages [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2016, 41(3): 308-311.
- [23] Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(8): 987-991.
- [24] Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 1181-1194.
- [25] 张凯华, 王飞, 胡慧敏, 等. 骨髓间充质干细胞抑制小胶质细胞介导的炎症反应 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(2): 1-5.
- [26] Levtova N, Healy LM, Gonczi CMC, et al. Comparative morphology and phagocytic capacity of primary human adult microglia with time-lapse imaging [J]. *J Neuroimmunol*, 2017, 310: 143-149.
- [27] Tao X, Li N, Liu F, et al. *In vitro* examination of microglia-neuron crosstalk with BV2 cells, and primary cultures of glia and hypothalamic neurons [J]. *Heliyon*, 2018, 4(8): e00730.
- [28] Tsukahara T, Haniu H, Uemura T, et al. Therapeutic potential of porcine liver decomposition product: new insights and perspectives for microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(11): 446.
- [29] Gumusoglu SB, Fine RS, Murray SJ, et al. The role of IL-6 in neurodevelopment after prenatal stress [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 65: 274-283.
- [30] Willis EF, Macdonald KPA, Nguyen QH, et al. Repopulating Microglia Promote Brain Repair in an IL-6-Dependent Manner [J]. *Cell*, 2020, 180(5): 833-846.
- [31] He MC, Shi Z, Sha NN, et al. Paricalcitol alleviates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by suppressing hypothalamic microglia activation and neuroinflammation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 163: 1-8.
- [32] Roqué PJ, Dao K, Costa LG. Microglia mediate diesel exhaust particle-induced cerebellar neuronal toxicity through neuroinflammatory mechanisms [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 56: 204-214.
- [33] Chen H, Zhou L, Wu X, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2016, 21: 1084-1091.
- [34] 饶志粒, 曹海娟, 石博宇, 等. 荆防药对正丁醇提取部位分离物 A 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(5): 1026-1033.

[收稿日期]2021-01-04