·论著·

α7n 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 α7 n 型乙酰胆碱能受体的抗炎作用及机制。**方法**　应用 PNU282987 激动 α7 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-1β、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-1β、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 α7 n 型乙酰胆碱能受体极大地降低了促炎因子 IL-1β、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 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。

［关键词］ α7 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 α7 nicotinic acetylcholine receptor in microglial cells and its mechanisms

SHEN Yue[1a], ZHANG Jingjing[1b], DU Jing[2], 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 α7 nicotinic acetylcholine receptor (α7nAChR) under inflammatory stress and its mechanisms. **Methods**　PNU282987 was used for the activation of α7nAChR and LPS was administrated as inflammatory stressor. Realtime PCR was used for the detection of IL-1β, 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-1β, 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-1β, 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 α7nAChR 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**］ α7 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。

α7 n 型乙酰胆碱能受体(α7 nicotinic acetylcholine receptor, α7nAChR)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, α7 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 α7 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，α7 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-1β、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，α7 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×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°C、5% CO_2 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-1β（上游）	5′-CTCGTGCTGTCGGACCCCAT-3′
IL-1β（下游）	5′- AGTGTTCGTCTCGTGTTCGGAC-3′
IL-6（上游）	5′-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3′
IL-6（下游）	5′-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3′
TNF-α（上游）	5′-AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA-3′
TNF-α（下游）	5′-GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTTG-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 ℃ 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×3 次，后用 0.1% Triton X-100 室温孵育 5 min，用 PBS 洗涤 5 min×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 ℃，30 min，避光），加入 DAPI 染核 3 min，后用 PBS 洗涤 5 min×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 α7 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，α7 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 μmol/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-1β、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-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 水平显著增加，而应用 PNU282987 激动 α7nAChR 极大地降低了促炎因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 水平。由此可以看出，炎症环境中激动 α7nAChR 在小胶质细胞中的抗炎作用。

2.2　炎症环境中激动 α7 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 α7 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 μmol/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 α7 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。

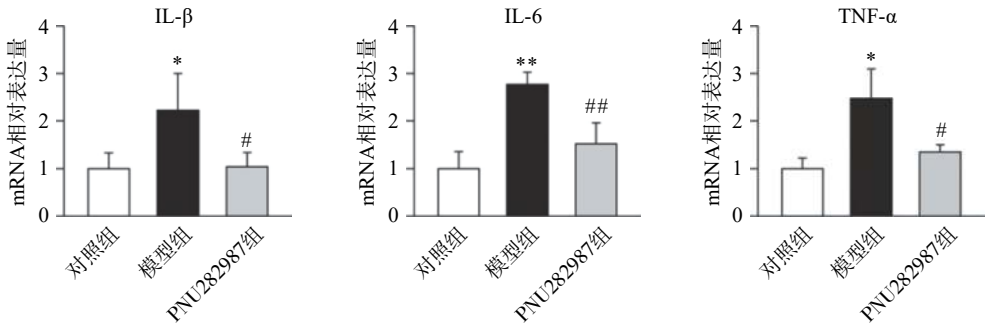


图 1　激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体抑制 BV2 细胞的促炎因子表达 (*n*=3 ~ 5)

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

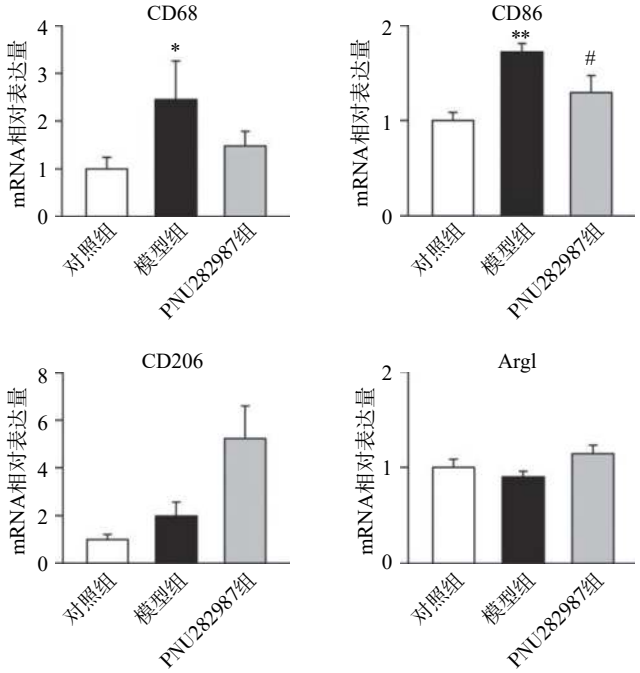


图 2　激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体对 BV2 细胞 M1 型与 M2 型巨噬细胞标记物的 mRNA 水平影响 (*n*=3 ~ 5)

$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 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 α7 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 α7 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 α7 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 α7 n 型乙酰

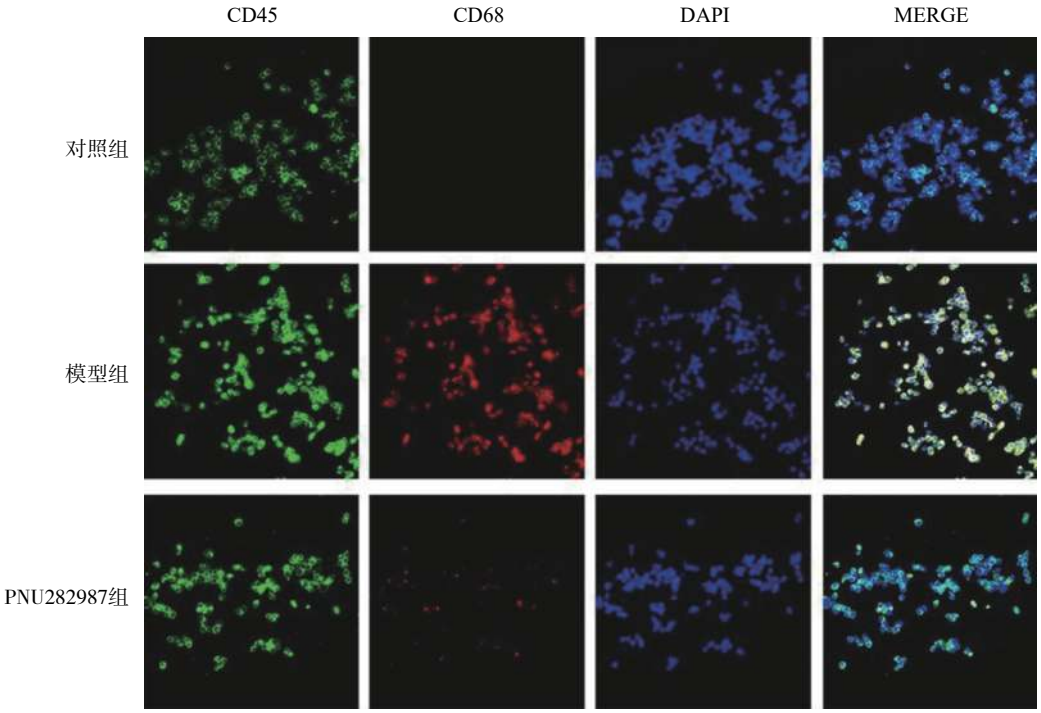


图 3　激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体对 M1 型小胶质细胞比例的影响

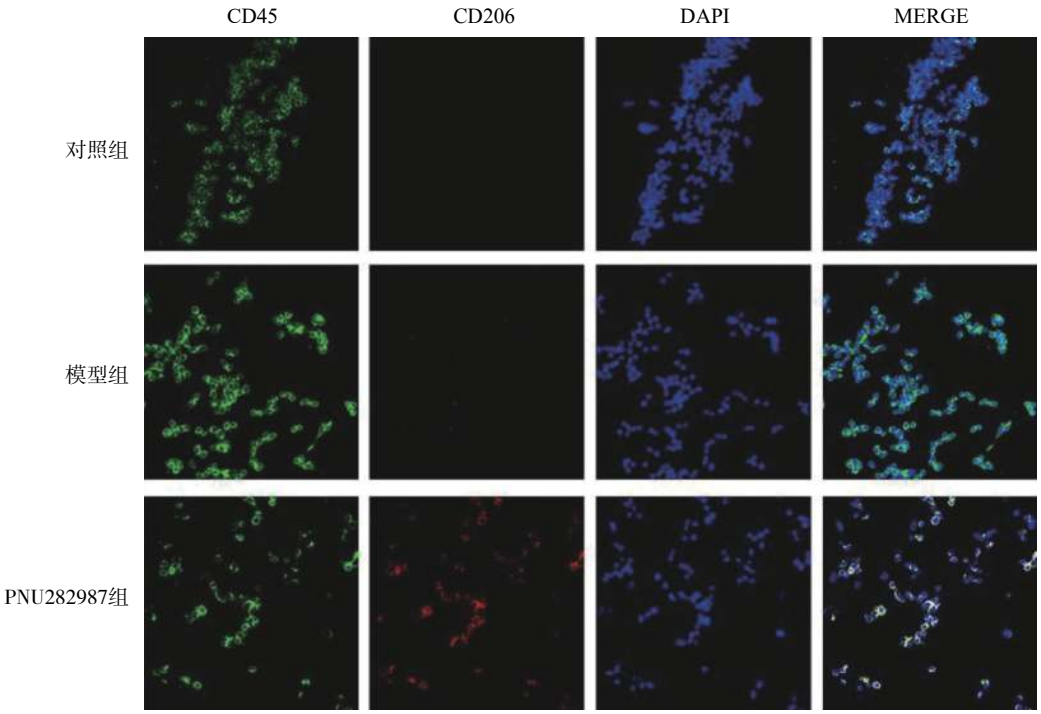


图 4　激动 α7 n 型乙酰胆碱能受体对 M2 型小胶质细胞比例的影响

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)。

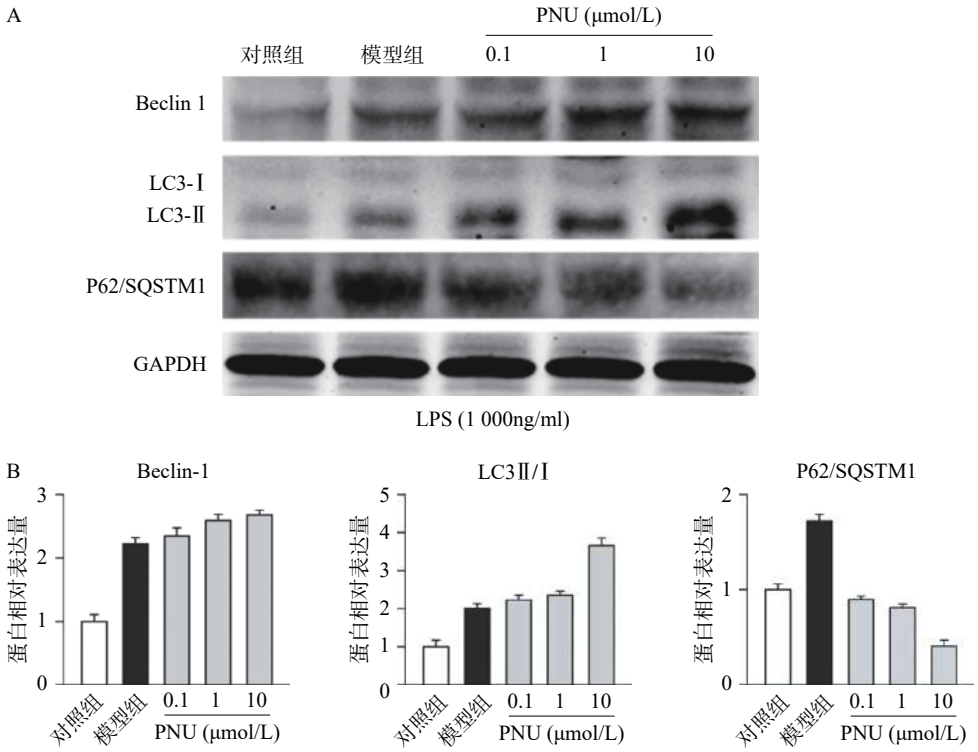


图 5　激动 α7nAChR 上调 BV2 细胞自噬水平 (*n*=3)

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.

(下转第 358 页)

物中药物含量在 4 ~ 12 h 时间段内持续较高水平，有利于药物在作用位点及时释放以提高疗效。

【参考文献】

[1] 马士杰, 罗小玲, 谢睿, 等. 美沙拉嗪缓释颗粒剂不同用药方式在轻-中度溃疡性结肠炎中的临床疗效[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2016, 25(11): 1305-1306.
[2] 林德鑫. 美沙拉嗪肠溶片治疗激素抵抗型重症溃疡性结肠炎的临床疗效评价[J]. 医学理论与实践, 2019, 32(7): 1001-1002.
[3] 解占峰. 美沙拉嗪缓释颗粒治疗溃疡性结肠炎30例疗效观察[J]. 中国肛肠病杂志, 2018, 38(7): 54-55.
[4] 苏诗娜, 谢清春, 梁超峰, 等. 美沙拉嗪缓释胶囊含量测定方法的研究[J]. 今日药学, 2018, 28(4): 233-237.
[5] 苏诗娜, 吕竹芬, 梁超峰, 等. 美沙拉嗪肠溶缓释微丸的制备及体外释放度考察[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(2): 127-136.
[6] 许勇, 王闰. LC-MS/MS法测定吡非尼酮在大鼠体内的药动学参数[J]. 中南药学, 2015, 13(9): 919-922.
[7] 吴畅烜, 缪明星, 王毅兵, 等. LC-MS法研究熊胆粉提取物中熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸在大鼠体内药物代谢动力学[J]. 中南药学, 2016, 14(7): 716-720.
[8] 饶志, 秦红岩, 邵云云, 等. 液相色谱-质谱联用方法测定大鼠血浆、尿液及结肠组织中美沙拉嗪及其代谢产物N-乙酰-5-ASA的浓度[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(14): 1252-1257.
[9] 陈云. 美沙拉嗪对结肠炎大鼠肠黏膜完整性的影响[J]. 现代诊断与治疗, 2014, 25(17): 3881-3882.
[10] 王星星, 贺沁, 赵婕, 等. 美沙拉嗪联合酪酸梭菌对溃疡性结肠炎大鼠治疗作用及机制研究[J]. 延安大学学报, 2019, 17(1): 5-8.
[11] 黄林雄, 战丹, 韦文俊, 等. 糖苷PAL在大鼠胃肠道吸收动力学研究[J]. 中南药学, 2009, 7(5): 335-337.
[12] 李楠, 冯玲玲, 蒋学华, 等. 黄芩苷磷脂复合物大鼠在体胃肠道吸收研究[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(12): 994-998.

［收稿日期］ 2020-07-30　［修回日期］ 2021-05-16
［本文编辑］ 陈盛新

(上接第 344 页)

[2] LI Q S, CHEN L, LIU X W, et al. Pterostilbene inhibits amyloid-β-induced neuroinflammation in a microglia cell line by inactivating the NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(8): 7053-7062.
[3] GARRISON A M, PARROTT J M, TUÑON A, et al. Kynurenine pathway metabolic balance influences microglia activity: Targeting kynurenine monooxygenase to dampen neuroinflammation[J]. Psychoneuroendocrinology, 2018, 94: 1-10.
[4] KABBANI N, NICHOLS R A. Beyond the channel: metabotropic signaling by nicotinic receptors[J]. Trends Pharmacol Sci, 2018, 39(4): 354-366.
[5] HONE A J, MCINTOSH J M. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain[J]. FEBS Lett, 2018, 592(7): 1045-1062.
[6] HOOVER D B. Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation[J]. Pharmacol Ther, 2017, 179: 1-16.
[7] CHU F, SHI M, ZHENG C, et al. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neuroimmunol, 2018, 318: 1-7.
[8] L'EPISCOPO F, TIROLO C, SERAPIDE M F, et al. Microglia polarization, gene-environment interactions and wnt/β-catenin signaling: emerging roles of *Glia*-neuron and *Glia*-stem/neuroprogenitor crosstalk for dopaminergic neurorestoration in aged parkinsonian brain[J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10: 12.
[9] TAKEMURA G, KANAMORI H, OKADA H, et al. Anti-apoptosis in nonmyocytes and pro-autophagy in cardiomyocytes: two strategies against postinfarction heart failure through regulation of cell death/degeneration[J]. Heart Fail Rev, 2018, 23(5): 759-772.
[10] SHAO B Z, HAN B Z, ZENG Y X, et al. The roles of macrophage autophagy in atherosclerosis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(2): 150-156.
[11] KE P, SHAO B Z, XU Z Q, et al. Intestinal autophagy and its pharmacological control in inflammatory bowel disease[J]. Front Immunol, 2016, 7: 695.
[12] KE P, SHAO B Z, XU Z Q, et al. Activating α7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits NLRP3 inflammasome through regulation of β-arrestin-1[J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(11): 875-884.

［收稿日期］ 2021-03-18　［修回日期］ 2021-05-13
［本文编辑］ 李睿旻