

· 基础医学 ·

## TLR/NF- $\kappa$ B 信号通路在甲基苯丙胺诱导的原代小胶质细胞炎症反应中的作用

肖逸<sup>1,2</sup>, 王胜婵<sup>3</sup>, 王易欣<sup>4</sup>, 臧松松<sup>4</sup>, 张炜<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学附属逸夫医院泌尿外科, 江苏 南京 211100; <sup>3</sup>南京医科大学附属老年医院泌尿外科, 江苏 南京 210024; <sup>4</sup>南京医科大学公共卫生学院卫生毒理系, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的:探讨 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)/核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ B 信号通路在甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)引起原代小胶质细胞激活及炎症因子释放的作用。方法:分离培养原代小胶质细胞,免疫荧光法鉴定原代小胶质细胞纯度。细胞予 METH(300  $\mu$ mol/L)染毒 0 min、15 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h,蛋白免疫印迹检测原代小胶质细胞的激活情况及其 NF- $\kappa$ B 通路激活情况,real-time PCR 检测炎症因子[肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6)]和 TLR1~9、11 mRNA 的表达。结果:分离出的原代小胶质细胞纯度达到 95%以上。METH 暴露后原代小胶质细胞激活,其激活标志物 IBA-1 水平增高,NF- $\kappa$ B 通路被激活,炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)和 TLR2、4~5、7~9、11 的 mRNA 水平明显升高,TLR1 的 mRNA 水平明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:METH 可通过调节 TLR/NF- $\kappa$ B 信号通路激活原代小胶质细胞并促进其释放炎症因子,因而 TLR 可作为 METH 神经炎性反应干预的潜在靶点,具有一定的治疗意义。

**[关键词]** 甲基苯丙胺;原代小胶质细胞;TLR/NF- $\kappa$ B 信号通路

**[中图分类号]** R114

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2021)07-970-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20210706

## Role of TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway in methamphetamine-induced primary microglial inflammation

XIAO Yi<sup>1,2</sup>, WANG Shengchan<sup>3</sup>, WANG Yixin<sup>4</sup>, ZANG Songsong<sup>4</sup>, ZHANG Wei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Urology, Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211100; <sup>3</sup>Department of Urology, Geriatric Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210024; <sup>4</sup>Department of Toxicology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of Toll-like receptor (TLR)/NF- $\kappa$ B signaling pathway in methamphetamine (METH)-induced primary microglial activation and inflammatory reaction. **Methods:** Primary microglial cells were isolated and cultured, then the purity of primary microglia was detected by immunofluorescence. Cells were treated with METH (300  $\mu$ mol/L) for 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h, and the activations of primary microglia and NF- $\kappa$ B pathway were detected by Western blot. The inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6) and TLR1-9, 11 mRNA levels were detected by real-time PCR. **Results:** The purity of primary microglial cells was above 95%. After exposure to METH, the primary microglia activation marker IBA-1 was increased and the NF- $\kappa$ B pathway was activated. In addition, the mRNA levels of inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) and TLR2, 4-5, 7-9, 11 were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the level of TLR1 mRNA was significantly reduced. **Conclusion:** METH can activate primary microglial cells and promote the release of inflammatory factors by regulating the TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway. Therefore, TLR can be potential targets for METH neuritis response intervention with certain therapeutic significance.

**[Key words]** methamphetamine; primary microglia; TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81673213)

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(07):970-975]

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: jsphzhangwei@163.com

甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)是一种具有强烈神经毒性的苯丙胺类兴奋剂<sup>[1]</sup>。研究表明, METH的神经毒性与小胶质细胞的激活有关<sup>[2]</sup>。小胶质细胞是中枢神经系统(central nervous system, CNS)中最重要的免疫细胞, 正常情况下, 小胶质细胞处于静息状态, 而受到有害刺激后, 小胶质细胞被激活, 释放出肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎症因子<sup>[3]</sup>。小胶质细胞发生持续的激活, 可导致其周边神经组织的炎症损伤。Toll样受体(Toll like receptor, TLR)在小胶质细胞中广泛表达, 该受体家族激活后作用于下游炎症信号分子, 促使编码炎症的相关分子及细胞因子的基因转录<sup>[4-5]</sup>。然而, TLR是否参与METH引起的神经炎症反应尚不清楚。

本研究通过建立原代小胶质细胞METH染毒模型, 旨在探讨TLR及其下游炎症信号及因子介导的炎症反应, 从而为METH的干预提供潜在靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

METH(中国食品药品检定研究院, 纯度: 99.9%), PrimeScript™ RT Reagent Kit反转录试剂盒(TaKaRa公司, 日本), 小鼠IBA-1单克隆抗体(Proteintech公司, 美国), 小鼠Phospho-NF- $\kappa$ B p65(Ser536)单克隆抗体、兔NF- $\kappa$ B p65(D14E12)单克隆抗体(Cell Signaling Technology公司, 美国), HRP标记的羊抗兔IgG(H+L)及HRP标记的羊抗小鼠IgG(H+L)(Jackson Immuno公司, 美国), 磷酸酶抑制剂(Roche公司, 瑞士), 细胞裂解液、蛋白酶抑制剂、小鼠 $\beta$ -actin单克隆抗体(Sigma公司, 美国), PVDF膜、ECL发光液(Millipore公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 原代小胶质细胞培养

孕18 d SD大鼠(购买于南京医科大学实验动物中心), 麻醉后断头, 无菌条件下取出腹中胎鼠, 分离出两侧的大脑半球皮质, 去除脑膜后置于HBSS液, 胰酶消化后依次经100  $\mu$ m和40  $\mu$ m网筛过滤, 将 $3 \times 10^7$ 个细胞接种于含18 mL DMEM培养液(内含10%胎牛血清、1%双抗、0.04 mg/mL巨噬细胞集落刺激因子)的75 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 接种4 d后半量更换培养液, 以后每隔3 d换1次培养液。本研究南京医科大学实验动物福利伦理审查委员会批准(批准号: IACUC-1801008)。

#### 1.2.2 免疫荧光染色

4%多聚甲醛固定原代小胶质细胞30 min, 1%的Triton X-100冰上透化5 min, 10%山羊血清37  $^{\circ}$ C封闭30 min, 一抗4  $^{\circ}$ C孵育过夜, 二抗37  $^{\circ}$ C避光孵育2 h, 加入含防荧光淬灭液的DAPI复染, 激光共聚焦显微镜下扫描。所有结果至少重复3次。

#### 1.2.3 蛋白免疫印迹实验

用蛋白裂解液(内含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂)裂解原代小胶质细胞, 提取总蛋白, 采用BCA法测定蛋白质浓度。电泳(浓缩胶电泳40 V, 分离胶电泳90 V), 转膜(200 V, 1 h), 封闭(5%脱脂奶粉溶液, 2 h), 一抗4  $^{\circ}$ C孵育过夜, 二抗室温孵育2 h, 将PVDF膜与ECL发光液A液和B液(1:1)混合, 置于化学发光成像系统进行曝光。所有结果至少重复3次。

#### 1.2.4 Real-time PCR

提取原代小胶质细胞的mRNA后, 按照Prime-Script™ RT Reagent Kit反转录试剂盒说明书, 将mRNA逆转录成cDNA, 设计引物(引物序列见表1), 冰上配制反应体系, 设置ABI7300荧光定量PCR仪反应程序(两步法): 96  $^{\circ}$ C 30 s预变性, 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 34 s, 40次循环。每个样品4个复孔, 利用熔解曲线确定PCR产物是否单一, 根据标准曲线得出扩增效率。以 $\beta$ -actin作内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法对结果进行计算和分析。 $\Delta\Delta C_T = (C_{T1} - C_{T2}) - (C_{T3} - C_{T4})$ ,  $C_{T1}$ : 处理样品待测基因的临界循环数,  $C_{T2}$ : 处理样品管家基因的临界循环数,  $C_{T3}$ : 对照样品待测基因的临界循环数,  $C_{T4}$ : 对照样品管家基因的临界循环数, 所有结果至少重复3次。

### 1.3 统计学方法

利用SPSS20.0软件对实验结果进行统计学分析, 各组数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组定量资料比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验, 多组间数据两两比较用Dunnett  $t$ 检验, 两组定量数据比较用Student's  $t$ 检验, 用Graphpad Prism5软件进行作图。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小胶质细胞的鉴定与纯度分析

小胶质细胞培养至第10~14天, 在恒温水平摇床上37  $^{\circ}$ C, 260 r/min摇晃2 h, 收集悬浮细胞, 放入CO<sub>2</sub>恒温培养箱培养2~3 d后, 利用免疫荧光方法对原代培养细胞进行鉴定与纯度分析。如图1所示, 红色荧光显示的是IBA-1阳性细胞, IBA-1是小胶质细胞的特异性激活标志蛋白, 主要分布于细胞体。

表1 大鼠源引物序列

Table 1 Sequence of rat derived primers

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
TLR1	CAGTTTCTGGGATTGAGCGGTT	TAATGTGCTGAAGACACTTGGGATC
TLR2	GGAGGTCTCCAGGTCAAATCT	ATTCCGCTGGACTCCAATGT
TLR3	ATFGGCAAGTTATTGCTCCTCCTC	AGAGATTCTGGATGCTTGTGTTTGA
TLR4	CTGGTGGCTGTGGAGACAAA	AAGGCTTGGGCTTGAATGGA
TLR5	GCTCCGTGCCTTGGACATAAC	TAGCAGTGAATTGGGGTACATGC
TLR6	CAACCTTATTGAATCTGACCCTCC	CCCTGCTTATGCTCTCAGTTATCG
TLR7	TCCTTGGGTTTCGATGGTATCCT	AGAGATGCTTGGTATGTGGTTGATG
TLR8	GAGACTCTGACACGCTTGGACTTAT	AGCACATGAAGGTGAGGAAAATACT
TLR9	CTGGTGCTGAAGGACAGTTCTCTC	GCTGGTTTTTGTGATGCTCTCGTA
TLR11	CTGGAGTCTTGGGCTACACG	TTATCAGCAGAAGCAGCAGGGAG
IL-6	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	GTGCATCATCGCTGTTTCATACAATC
TNF-α	CCAGACCCTCACACTCAGATCA	GGAGGCTGACTTTCTCCTGGTA
IL-1β	AGCTTCAGGAAGGCAGTGTCT	TCAGACAGCAGCAGGGCATT
β-actin	CACCCGCGAGTACAACCTTC	GGTGTGATGCTGGGTATGGG

DAPI 染核,显示蓝色荧光。Merge 为两者的合并图。小胶质细胞的纯度=IBA-1 阳性细胞/DAPI 核染细胞×100%。随机计数 10 个视野下的 IBA-1 标记小胶质细胞数与 DAPI 标记总细胞数,结果显示,按照本实验室分离培养小胶质细胞的方法,小胶质细胞纯度达到 95% 以上,符合后续实验要求。

2.2 METH 对小胶质细胞的激活作用

为探究 METH 对小胶质细胞的激活作用,用 300 μmol/L 的 METH 处理原代小胶质细胞 15 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h,观察原代小胶质特异性激活标志蛋白 IBA-1 的表达情况。如图 2 所示,IBA-1 表达在 METH 处理 30 min 后开始上升,并在 1 h

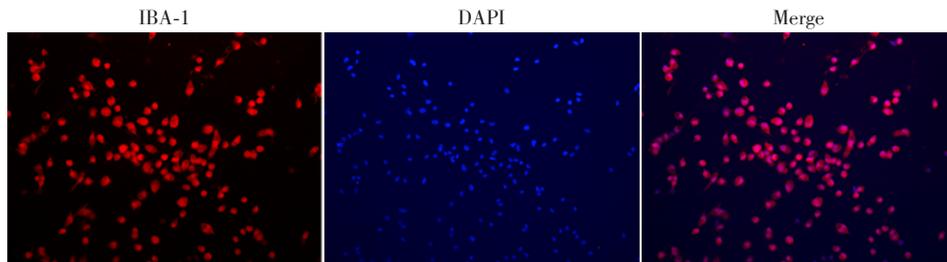
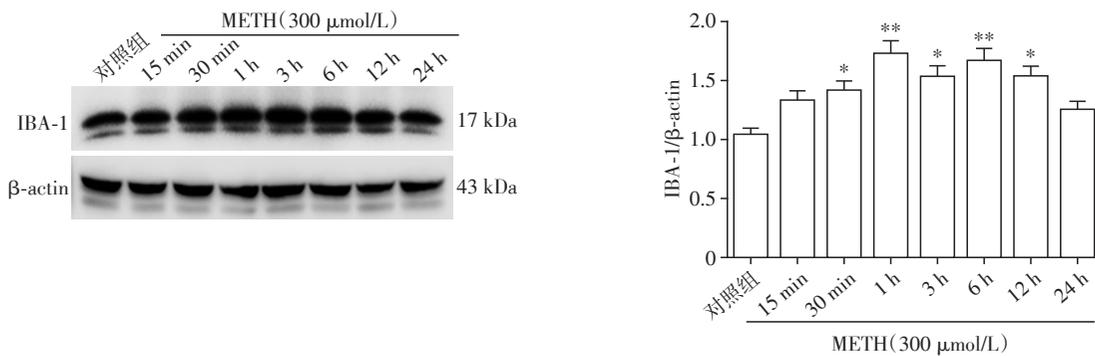


图1 小胶质细胞的鉴定与纯度分析(×200)

Figure 1 Microglial identification and purity analysis(×200)



与对照组相比,\*P < 0.05,\*\*P < 0.01,n=3。

图2 METH 对原代小胶质细胞的激活情况

Figure 2 Activation of primary microglia induced by METH

达到高峰, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示 METH 明显激活原代小胶质细胞。

### 2.3 METH 对小胶质细胞炎症因子表达的影响

在 300  $\mu\text{mol/L}$  的 METH 分别处理原代小胶质细胞 12 h、24 h 后, 使用 real-time PCR 检测炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 表达。如图 3 所示, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 在 METH 孵育 24 h 后表达均显著上升, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.4 METH 对小胶质细胞 TLR 家族 mRNA 水平的影响

文献报道, TLR 家族参与小胶质细胞的炎症反应作用。用 300  $\mu\text{mol/L}$  的 METH 与原代小胶质细胞孵育 24 h, 检测 TLR 1~9、11 的 mRNA 表达情况。结果显示, 与对照组相比, METH 处理后 TLR1 的 mRNA 在原代小胶质细胞表达下降, TLR2、4~5、7~9

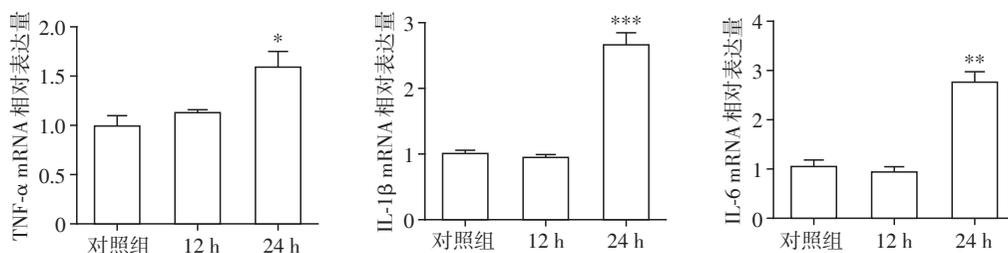
和 11 的 mRNA 表达均显著上升, 差异具有统计学意义(图 4), 而 TLR3 和 TLR6 的 mRNA 水平无明显变化。

### 2.5 METH 对 NF- $\kappa$ B 通路激活的影响

转录因子 NF- $\kappa$ B 是 TLR 信号的下游, 参与调节炎症因子转录和表达<sup>[6]</sup>。300  $\mu\text{mol/L}$  的 METH 处理原代小胶质细胞 15 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 后, 在 15 min 时 NF- $\kappa$ B 的磷酸化水平开始升高, 在 30 min 时达到高峰, 与对照组比较, 差异具有统计学意义, 随后下降, 但仍高于对照组(图 5)。

## 3 讨论

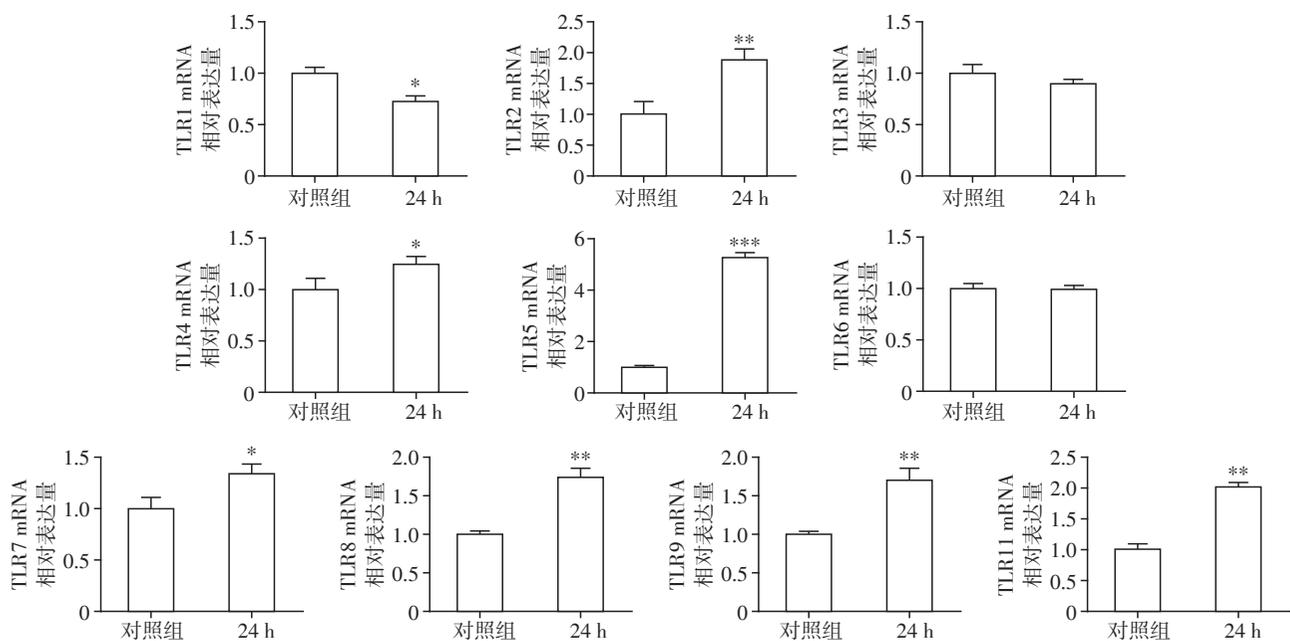
METH 属于苯丙胺类物质, 是一种新型毒品。因为制造工艺简单, 价格低廉, METH 的滥用日益严重, 给全世界带来严重的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。动物和人群实验都显示, METH 滥用可导致严重的神经系



与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图3 METH 对小胶质细胞炎症因子表达的改变

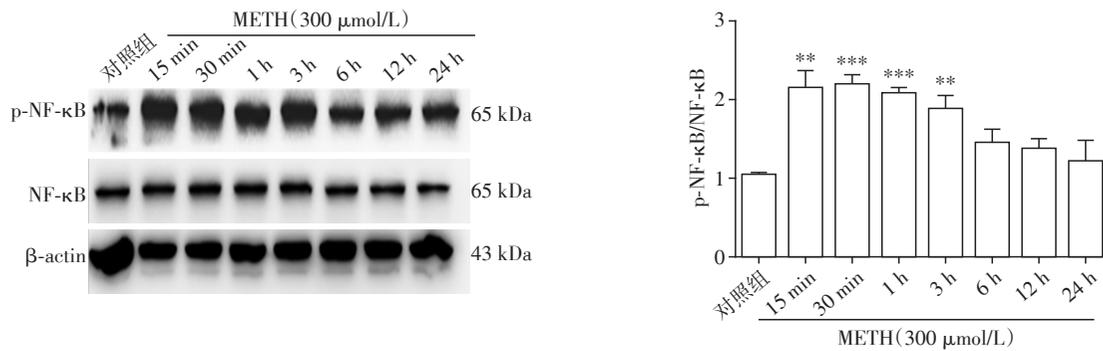
Figure 3 Effects of METH on the expression of inflammatory factors in microglia



与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图4 METH 对原代小胶质细胞 TLR1~9、11 的 mRNA 水平的影响

Figure 4 Effects of METH on mRNA expression of TLR 1-9 and TLR11



与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图5 METH对NF-κB通路激活的影响

Figure 5 Effects of METH on NF-κB activation

统毒性<sup>[7-8]</sup>。METH的神经毒性作用机制十分复杂,主要包括兴奋性毒性、线粒体损伤、氧化应激、小胶质细胞炎症反应等<sup>[9]</sup>。目前,METH诱导的小胶质细胞炎症反应是METH神经毒性的研究热点。小胶质细胞是中枢神经系统的主要炎性细胞,在保护大脑的完整性和维持大脑平衡中发挥重要作用。正常情况下,小胶质细胞处于静止状态,但当受到损伤或感染时,小胶质细胞被激活。持续激活的小胶质细胞会释放各种促炎细胞因子,如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6,导致神经元细胞死亡<sup>[10]</sup>。本实验结果显示,原代小胶质细胞暴露在METH 30 min后,IBA-1蛋白的表达明显升高;处理24 h后,炎性因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6的mRNA水平明显升高,上述结果提示,METH暴露明显激活小胶质细胞,且促进小胶质细胞中炎性因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA的高表达。然而,目前METH诱导小胶质细胞炎症反应的机制并不完全明了。因而,本研究探讨METH激活小胶质细胞可能的上游信号通路。

TLR是模式识别受体,在生物体中广泛存在。哺乳动物中至少存在13个TLR基因,TLR1~9在小鼠和人类中均表达,而TLR10~13仅在小鼠中表达<sup>[11]</sup>。研究表明,TLR在神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经干细胞中都有表达<sup>[12]</sup>。小胶质细胞表达多种TLR,该家族受体在小胶质细胞的免疫反应中发挥重要作用,是识别细菌或病毒感染的第一道防线,并促进各种炎症介质的产生。在静止的小胶质细胞中几乎无法检测到TLR的表达,但一旦小胶质细胞被激活,就会迅速表达多种TLR<sup>[11]</sup>。本实验中,通过real-time PCR检测METH激活的小胶质细胞内TLR家族成员mRNA的水平变化,我们发现TLR2~5、7~9、11的mRNA表达显著增加。提示小胶质细胞可能通过上调多种TLR来响应METH的

刺激,TLR表达的增加随后通过信号转导来上调炎性因子mRNA的表达。NF-κB作为炎症反应中的关键转录因子,在小胶质细胞激活导致的神经炎性的发生过程中发挥重要作用。因而,本研究探讨了参与TLR诱导炎性因子表达的下游信号通路NF-κB的激活情况。在中枢神经系统中,NF-κB信号通路可参与多种神经退行性疾病进程。一些研究表明,NF-κB的激活是促炎性细胞因子表达调控的关键步骤,活化后的NF-κB转移到核内与其相关DNA基序结合以诱导炎性因子基因的转录<sup>[13-14]</sup>。这些结果支持了本研究中METH暴露激活原代小胶质细胞内NF-κB的结果,提示NF-κB参与了TLR诱导炎性因子的表达。

本研究揭示了TLR/NF-κB信号通路参与METH诱导的原代小胶质细胞的激活及其炎性因子表达的过程,后续将进一步对TLR/NF-κB信号通路之间的信号传递蛋白进行深入研究,以期对METH神经毒性的干预提供潜在靶点。

#### [参考文献]

- [1] KRASNOVA I N, CADET J L. Methamphetamine toxicity and messengers of death [J]. Brain Res Rev, 2009, 60 (2): 379-407
- [2] 程洁, 蒋雷, 环飞, 等. 甲基苯丙胺对大鼠小胶质细胞的损伤及炎性相关基因表达的影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(9): 1131-1135, 1181
- [3] XU E, LIU J, LIU H, et al. Inflammasome activation by methamphetamine potentiates lipopolysaccharide stimulation of IL-1 $\beta$  production in microglia [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2018, 13(2): 237-253
- [4] EMSLEY H C, APPLETON R E, WHITMORE C L, et al. Variations in inflammation-related genes may be associated with childhood febrile seizure susceptibility [J]. Seizure, 2014, 23(6): 457-461

- [5] CHOY M, DUBÉ C M, EHRENGRUBER M, et al. Inflammatory processes, febrile seizures, and subsequent epileptogenesis[J]. *Epilepsy Curr*, 2014, 14(1 Suppl):15-22
- [6] 谢蓓蓓, 苏厚恒. MSU 晶体介导的痛风性关节炎的炎症机制[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(16):102-104
- [7] HALPIN L E, COLLINS S A, YAMAMOTO B K. Neurotoxicity of methamphetamine and 3, 4 - methylenedioxy-methamphetamine[J]. *Life Sci*, 2014, 97(1):37-44
- [8] LOFTIS J M, JANOWSKY A. Neuroimmune basis of methamphetamine toxicity[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2014, 118:165-197
- [9] DARKE S, KAYE S, MCKETIN R, et al. Major physical and psychological harms of methamphetamine use [J]. *Drug Alcohol Rev*, 2008, 27(3):253-262
- [10] ROTHHAMMER V, QUINTANA F J. Role of astrocytes and microglia in central nervous system inflammation. *Introduction* [J]. *Semin Immunopathol*, 2015, 37(6):575-576
- [11] TRUDLER D, FARFARA D, FRENKEL D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application[J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010:497987
- [12] FIEBICH B L, BATISTA C, SALIBA S W, et al. Role of microglia TLRs in neurodegeneration[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12:329
- [13] KOPITAR-JERALA N. Innate immune response in brain, NF-kappa B signaling and cystatins[J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8:73
- [14] GHOSH S, DASS J. Study of pathway cross-talk interactions with NF- $\kappa$ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: a brief review [J]. *Gene*, 2016, 584(1):97-109

[收稿日期] 2020-11-05



欢迎关注本刊微博、微信公众号!