

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.09.032

◆校庆约稿◆



杨颖

## 专家简介

杨颖(1977-),女,博士,教授,川北医学院附属医院心内科副主任。第十二批四川省卫生计生委学术技术带头人后备人选,四川省医学会心血管病专业委员会委员。主要从事心血管疾病的临床诊治及起搏、电生理介入工作,研究领域为动脉粥样硬化的流行病学及发病机制。近年来,主持国家自然科学基金项目及其他省厅级科研项目多项,公开发表多篇学术论文,获四川省医学会科学进步奖一项。

# GABA 抑制腹主动脉瘤小鼠未成熟树突状细胞的迁移机制

杨颖<sup>1</sup>,罗晖<sup>2</sup>,冯杰<sup>1</sup>,曾韡<sup>1</sup>

(1. 川北医学院附属医院心内科·川北医学院附属医院心血管病研究室;2. 南充市中心医院心胸外科,四川 南充 637000)

**【摘要】目的:**探讨  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)抑制腹主动脉瘤小鼠未成熟树突状细胞(iDCs)的迁移机制。**方法:**在腹主动脉瘤小鼠 iDCs 中转染 GABA-A 受体  $\alpha 5$  亚基 SiRNA 48 h 后,Western blot 检测 GABA-A 受体  $\alpha 5$  亚基表达水平的变化。然后 Transwell 迁移实验检测 GABA/GABA-A 受体  $\alpha 5$  亚基对 iDCs 迁移能力的调控。激光共聚焦显微镜观察 GABA/GABA-A 受体  $\alpha 5$  亚基对 iDCs 伪足生成的影响。**结果:**在 iDCs 中转染 GABA-A 受体  $\alpha 5$  亚基 SiRNA 48 h 后, $\alpha 5$  亚基的表达水平下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。GABA 抑制 iDCs 的迁移,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。GABA 抑制了 iDCs 伪足的形成。**结论:**GABA 可能作用于 GABA-A 受体  $\alpha 5$  亚基抑制腹主动脉瘤小鼠 iDCs 的迁移和 iDCs 伪足的形成。

**【关键词】**腹主动脉瘤;GABA;细胞迁移;未成熟树突状细胞;GABA 受体

**【中图分类号】** R392.11 **【文献标志码】** A

## GABA inhibit the migration function of immature dendritic cells in abdominal aortic aneurysm mice

YANG Ying<sup>1</sup>, LUO Hui<sup>2</sup>, FENG Jie<sup>1</sup>, ZENG Wei<sup>1</sup>

(1. Cardiovascular Disease Laboratory, Department of Cardiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China)

**【Abstract】 Objective:** To investigate the mechanism of GABA inhibiting migration function of immature dendritic cell (iDCs) in abdominal aortic aneurysm mice. **Methods:** 48 hours after transfection of GABA-A receptor  $\alpha 5$  subunit SiRNA in iDCs, the expression of GABA-A receptor  $\alpha 5$  subunit was detected by Western blot. Then, the transwell migration experiment was performed to assess the regulation of iDCs migration ability by GABA/GABA-A receptor pathway. The regulatory effects of GABA/GABA-A receptor pathway on iDCs pseudopodia production was further analyzed by laser confocal microscopy. **Results:** 48 hours after the transfection of GABA-A receptor  $\alpha 5$  subunit SiRNA in iDCs, the expression of  $\alpha 5$  subunit significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The migration of iDCs was significantly inhibited by GABA ( $P < 0.05$ ). GABA inhibited the formation of iDCs pseudopodia. **Conclusion:** GABA/GABA-A receptor  $\alpha 5$  subunit inhibits the migration ability of iDCs and the formation of iDCs pseudopodia.

**基金项目:** 四川省科技计划项目(2016JY0172);四川省卫生健康委科研课题(201716PJ121);国家自然科学基金青年基金项目(201881700417)

**作者简介:** 杨颖。E-mail: yang\_ying3000@sina.com

**通讯作者:** 曾韡。E-mail: 182415202@qq.com

**[Key words]** Abdominal aortic aneurysm; GABA; Cell migration; Immature dendritic cell; GABA-A receptor

腹主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) 及其并发的动脉破裂是一类致命的血管性疾病, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是其常见的病因<sup>[1]</sup>。AAA 的主要病理改变为炎症细胞浸润, 血管平滑肌细胞凋亡, 弹力纤维和胶原纤维断裂, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 降解, 从而导致动脉管腔扩张或膨出甚至发生破裂, 造成严重出血, 危及生命<sup>[2]</sup>。因此, 如何抑制炎症细胞的活化, 阻止 ECM 降解是预防 AAA 的主要措施, 也是目前尚未解决的临床难题。γ-氨基丁酸 (γ-aminobutyric acid, GABA) A 型受体是配体门控氯离子通道超家族的成员, 通常是由 α, β, γ, δ, ε, π, θ, ρ 8 类亚基组成的异源五聚体。这些亚基又组成众多功能结构特异的 GABA-A 受体。GABA 激动 GABA-A 受体后对脑内抑制性神经传递进行调控<sup>[3]</sup>。近年来, 研究<sup>[4]</sup>发现, GABA-A 受体同样表达于外周树突状细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞等细胞膜上, 抑制炎症免疫细胞的活性, 延缓某些自身免疫性疾病的进展。本小组既往研究<sup>[5]</sup>发现, 在 AS 模型中, 激活外周血单核-巨噬细胞膜表面的 GABA-A 受体可改善巨噬细胞内失衡的胆固醇转运, 抑制巨噬细胞分泌 TNF-α, 上调调节性 T 淋巴细胞的比例, 减轻载脂蛋白 E 缺乏 (apoE<sup>-/-</sup>) 小鼠主动脉粥样硬化斑块的形成。该结果提示, AS 与 AAA 同为血管炎症性疾病, 发病机制类似, 炎症免疫反应贯穿始终<sup>[6]</sup>。本研究旨在探讨 GABA 是否能够通过其受体抑制腹主动脉瘤小鼠未成熟树突状细胞 (immature dendritic cells iDCs) 的迁移机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

C57BL/6J 雄性小鼠 (购于川北医学院实验动物中心), 鼠龄 6 周, 体重 18 ~ 20 g。日夜节律变化条件为 12 h 光照和 12 h 黑暗, 食物和饮水按需供给。实验动物的使用都严格按照川北医学院实验动物中心的动物伦理学条例执行。GABA 购于美国 Sigma 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 动物处理 弹性蛋白酶 (PPE) 构建小鼠腹主动脉瘤动脉模型<sup>[7-8]</sup>: 将小鼠麻醉后, 打开腹腔游离出肾动脉以下髂动脉分叉以上腹主动脉段, 依次结扎腹主动脉分支, 先行阻断腹主动脉近端, 记录阻断时间, 接着阻断腹主动脉远端, 在灌注段腹主动脉穿孔, 接入 PPE 管, 结扎固定, 检验灌注段腹主动脉密闭性, PPE 灌注浓度采用 4.5 U/mL, 维持灌注压

100 mmHg, 灌注时间为 5 min, 灌注完毕后拔出 PPE 管, 修复穿刺口, 检查若无出血, 逐层关腹。手术时间 40 ~ 60 min, 建模周期 14 d。腹主动脉扩张率 (%) = (术后 4 周腹主动脉直径 - 灌注前腹主动脉直径) / 灌注前腹主动脉直径 × 100%, 以术后 14 d 腹主动脉扩张率 50% 以上作为诊断腹主动脉瘤的标准。病理组织学检测提示, 细胞外基质降解, 平滑肌细胞减少或消失, 炎症细胞浸润<sup>[9]</sup>。

1.2.2 细胞培养 获取 C57BL/6J 腹主动脉瘤小鼠骨髓来源的未成熟树突状细胞。将小鼠脱颈处死, 在无菌条件下分离小鼠股骨。用 PBS 将股骨中骨髓细胞冲洗出来直至股骨泛白。收集冲洗液使用细胞筛过滤。将过滤后的冲洗液移入 15 mL 离心管中, 1 000 rpm 离心 5 min。倒去上清液, 加入适量的红细胞裂解液轻轻吹打混匀, 4℃ 裂解 1 ~ 2 min。加入 10 ~ 20 mL PBS 混匀, 离心弃上清。将沉淀加入无血清培养基 6 mL 吹打混匀后移至 6 孔板中, 每孔 1 mL, 放入 37℃ 培养箱孵育 3 h 后小心倒掉上清液, 每孔分别加入 2 mL 完全培养基及 CSF 和 IL-4 各 10 μL, 放入 37℃ 培养箱中继续培养。隔天换液并加入新的 CSF 和 IL-4, 第 6 天收集细胞液。从而获得未成熟 DCs 细胞<sup>[10]</sup>。

1.2.3 细胞转染 将收集的未成熟 DCs 细胞接种至 6 孔板中, 每孔加入细胞液 1 mL; 用移液枪吸取 0.35 μL siRNA 加入 200 μL 1640 培养基; 加入 15 μL 转染试剂, 震荡混匀后室温下静置 15 min; 混合液加入细胞液中后放入 37℃ 培养箱孵育 6 h, 每孔加入新鲜完全培养基 2 mL。Gaba5 SiRNA GGUGCGAA-CAGACAUCUAUTT; AUAGAUGUCUGUUCGCACCTT (购于上海生工)。

1.2.4 Transwell 迁移实验观察细胞迁移能力 转染 48 h 后收集细胞离心, 将细胞分为对照组 (生理盐水组)、GABA (200 nmol/L) 组、Gaba5 siRNA + GABA (200 nmol/L) 组; 上室中各加入细胞悬液 100 μL, 下室中加入 500 μL 完全培养基, 放入 37℃ 培养箱孵育 2 h; PBS 淋洗, 4% 多聚甲醛固定 15 min, DAPI 染色 10 min, PBS 洗涤 3 次; 待干燥后荧光显微镜下观察拍照, 采用 Image J 软件分析, 计算细胞数。

1.2.5 荧光技术观察细胞骨架 收集未成熟的 DCs 细胞, 调整细胞浓度为 10<sup>6</sup>/mL, 用移液枪抽吸细胞液 1 mL 接种于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 放入 37℃ 培养箱孵育 48 h; 经 PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定, 0.25% Tritonx-100 破膜, 滴加稀释好的鬼笔环肽至载玻片上, 室温避光孵育, PBS 洗涤, 待晾干后滴加抗荧光淬灭封片剂, 荧光显微镜下观察拍照

显示 F-肌动蛋白染色(F-actin)。

### 1.2.6 蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测

GABAA受体 $\alpha 5$ 亚基的表达 收集细胞转染后 iDCs,提取细胞蛋白,免疫组化 BCA 法测蛋白浓度,依次通过制胶、电泳、转膜、染色、封闭、抗体孵育,最后化学发光、成像、分析。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 one-way ANOVA 分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 未成熟树突状细胞(iDCs)的培养及纯度

培养的第 0 天光学显微镜观察显示培养液中充满大量圆形单核细胞;第 2 天观察发现细胞贴壁生长且有集落生成,部分细胞开始伸出突起;第 4 天观察发现集落数量增加,伸出突起的细胞数量增多;第 6 天观察发现有大量细胞悬浮在培养液中,细胞周围有长短不一的突起。因单核细胞来源的 iDC 表达 CD11c,CD11c-FITC 抗体检测 iDC 纯度。在第 6 天收集细胞液后加入 CD11c-FITC 抗体标记,利用流式细胞仪检测细胞纯度在 80% 左右。见图 1。

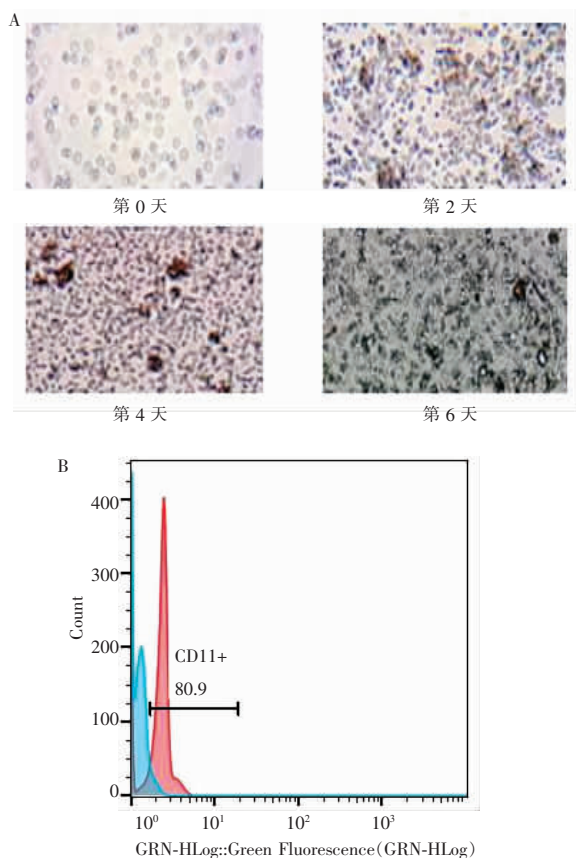


图 1 未成熟树突状细胞的培养及纯度

A. 第 0、2、4、6 天光学显微镜下观察到的 iDC 形态的变化(4 $\times$ 10);B. 利用 CD11c-FITC 检测的 iDC 的纯度。

### 2.2 GABAA受体 $\alpha 5$ 亚基 SiRNA 转染情况

GABAA受体 $\alpha 5$ 亚基 SiRNA 转染率 > 90%。将 iDCs 分为空白组(生理盐水组)、GABA 组、转染试剂组、NC-FAM 组(NC 组)、Gabara5siRNA 组(SiRNA 组),转染 48 h 后收集细胞利用 Western blot 检测 GABA-A 受体 $\alpha 5$ 亚基的表达发现,GABA 可以促进 GABA-A 受体 $\alpha 5$ 亚基表达,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而 SiRNA 干扰了 GABAA 受体 $\alpha 5$ 亚基的表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。

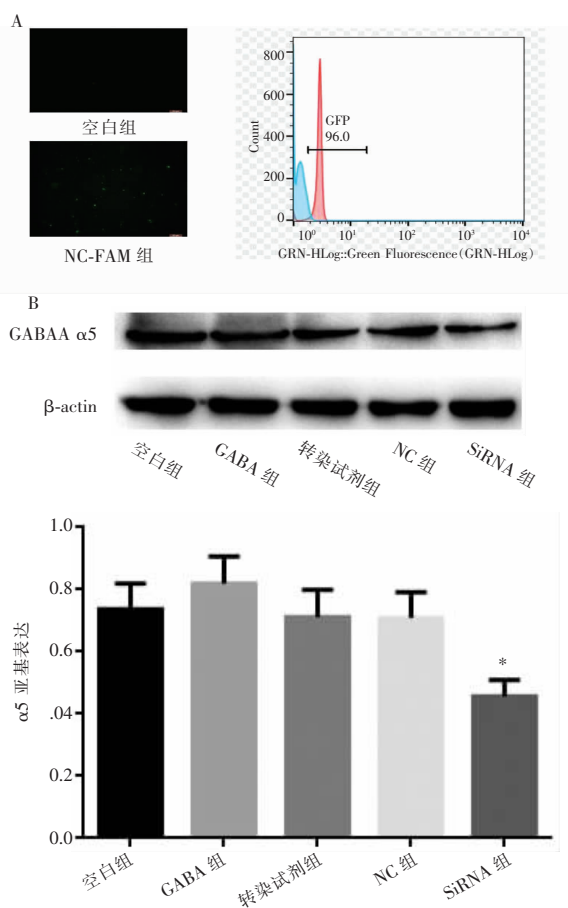


图 2 GABA-A 受体 $\alpha 5$ 亚基 SiRNA 转染情况

A. 荧光显微镜镜下 iDC 的转染情况(4 $\times$ 10),流式细胞技术检测的 iDCs 转染率;B. West blot 验证;iDCs 转染效果。\* $P < 0.05$ ,与 GABA 组比较。

### 2.3 GABA 通过 GABA-A 受体抑制 iDCs 的迁移

将 iDCs 分为空白组(生理盐水组)、GABA 组、Gabara5siRNA 组(SiRNA 组),其中 GABA 组和 SiRNA 组分别加入 200 nmol/L 的 GABA 共孵育,利用 transwell 小室检测细胞迁移能力,结果显示,与对照组比较,GABA 组 iDCs 的个数明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。SiRNA 组 iDCs 的个数较对照组无明显变化,这些结果表明 GABA 对 iDCs 的迁移能力起负调节作用,并且可能是通过 GABA-A 受体 $\alpha 5$ 亚基进行的。见图 3。

## 2.4 GABA/GABA-A 受体通路抑制 iDCs 伪足的形成

将 GABA 加入 iDCs 中共孵育 1 h, 激光共聚焦显微镜发现, 加入 GABA 后 iDCs 的伪足生成明显减少。然后利用 SiRNA 敲低 iDCs 表面的 GABA-A 受体  $\alpha 5$  亚基后与 GABA 共孵育 1 h, F-actin 荧光染色结果显示 iDCs 周围有较多的伪足形成, 并不受 GABA 的影响。综合实验结果, 说明 GABA/GABA-A 受体通路通过抑制 iDCs 伪足的形成来抑制细胞的迁移能力。见图 4。

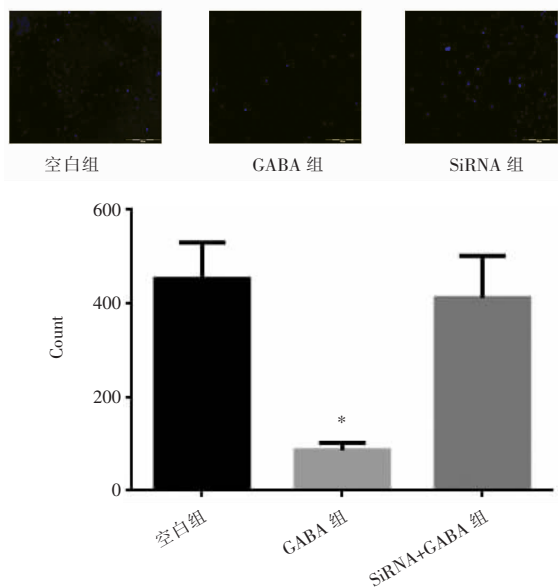


图 3 GABA 对 iDCs 迁移的影响( $\times 10$ )  
\* $P < 0.05$ , 与空白组相比。

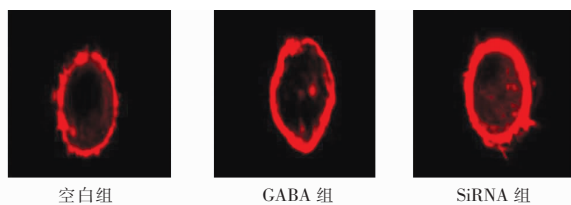


图 4 GABA 抑制 iDC 伪足形成( $\times 60$ )

## 3 讨论

本研究发现, GABA/GABA-A 受体通路可以抑制未成熟树突状细胞的迁移能力, 当利用 SiRNA 敲低 GABA-A 受体  $\alpha 5$  亚基表达后, GABA/GABA-A 受体通路则不再抑制未成熟树突状细胞的迁移。进一步研究发现, 在 GABA 作用下, 未成熟树突状细胞伪足生成明显减少, 提示了 GABA/GABA-A 受体通路可能通过抑制未成熟树突状细胞伪足的生成来影响细胞的迁移。

研究<sup>[11]</sup>证实, 敲除浆细胞样 DCs 基因的 AAA 模型小鼠, 动脉瘤的形成明显减轻。在正常主动脉, 少量 DCs 存在于内膜下并与平滑肌细胞和内皮细

胞直接接触; 但在承受血流涡流压力较大的部位, 如动脉扩张处, 大量成熟 DCs 呈簇状聚集与 T 淋巴细胞接触, 进行抗原呈递, 激活 T 淋巴细胞的致炎活性<sup>[12]</sup>。同时, 富集于病变血管处的未成熟 DCs 开始向血管外膜迁移, DCs 胞内的运动装置骨架蛋白发生构象改变, p38MAPK 信号通路被激活, 细胞骨架相关蛋白丝切蛋白去磷酸化, 肌动蛋白单体在肌丝末端的解聚速度增加, DCs 伪足伸出, 迁移开始<sup>[13-14]</sup>。随着 DCs 到达 ECM, 除借助伪足穿行外, 尚需分泌相关蛋白酶降解 ECM。未成熟 DCs 主要分泌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-1、MMP-2、MMP-9 和基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-1 等, 分泌过程与 MAPK 信号途径中 p38/ERK1/2 的磷酸化状态有关<sup>[15]</sup>。因此, 抑制成熟 DCs 的抗原呈递功能, 削弱未成熟 DCs 的迁移及分泌 MMPs 的能力可有效阻止动脉瘤破裂。哺乳动物骨髓来源的 DCs 胞内含有 GABA 合成酶、GABA 转运蛋白和 GABA-A 受体亚基 ( $\alpha 3, \alpha 5, \beta 1, \beta 3, \rho 1$ )<sup>[4]</sup>。当弓形虫感染 DCs 后, DCs 内合成的 GABA 通过自体分泌的方式作用于 GABA-A 受体, 调控 DCs 的运动; 此过程中, 细胞表面 GABA-A 受体的亚基表达也发生变化,  $\alpha 3, \beta 3$  和  $\rho 1$  亚基的转录明显增加<sup>[16]</sup>。另有研究<sup>[17]</sup>发现, 神经元突触表面的 GABA-A 受体通过胞吞和受体再循环, 能够在细胞膜和细胞质之间发生迁移, 如亚基  $\alpha 5$  发生膜受体内化后在埃兹蛋白-根蛋白-膜突蛋白 (ezrin-radixin-moesin, ERM) 家族中根蛋白的帮助下锚定肌动蛋白, 从而引发抑制性突触可塑性的改变。

综上, GABA/GABA-A 受体通路可以抑制未成熟树突状细胞的迁移能力。后续本研究小组将在体外实验中继续研究 GABA/GABA-A 受体通路对腹主动脉瘤小鼠树突状细胞抗原提呈功能的影响, 从而为腹主动脉瘤的临床治疗寻找新的靶点。

## 参考文献

- [1] LeFevre, Michael L. Screening for abdominal aortic aneurysm: U. S. Preventive Services Task Force recommendation statement [J]. *Annals of internal medicine*, 2014, 161(4): 281 - 290.
- [2] Hendel A, Ang LS, Granville DJ. Inflammaging and proteases in abdominal aortic aneurysm [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2015, 13(1): 95 - 110.
- [3] Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL. Mechanisms and functions of GABA co-release [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(3): 139 - 145.
- [4] Barragan A, Weidner JM, Jin Z, et al. GABAergic signalling in the immune system [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015, 213(4): 819 - 827.
- [5] Yang Y, Lian YT, Huang SY, et al. GABA and topiramate inhibit the formation of human macrophage-derived foam cells by modula-

- ting cholesterol-metabolism-associated molecules [J]. *Cell Physiol Biochem*,2014,33(4):1117-1129.
- [6] Ladich E, Yahagi K, Romero ME, *et al.* Vascular diseases; aortitis, aortic aneurysms, and vascular calcification [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2016, 25(5):432-441.
- [7] Bartoli MA, Kober F, Cozzone P, *et al.* In Vivo Assessment of Murine Elastase-induced Abdominal Aortic Aneurysm with High Resolution Magnetic Resonance Imaging [J]. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*,2012,44(5):475-481.
- [8] Azuma J, Maegdefessel L, Kitagawa T, *et al.* Assessment of Elastase-Induced Murine Abdominal Aortic Aneurysms: Comparison of Ultrasound Imaging with In Situ Video Microscopy [J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*,2011,2011(5):1-10.
- [9] Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments [J]. *Nature reviews, Cardiology*, 2019, 16(4):225-242.
- [10] Yan H, Zhou HF, Akk A, *et al.* Neutrophil Proteases Promote Experimental Abdominal Aortic Aneurysm via Extracellular Trap Release and Plasmacytoid Dendritic Cell Activation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2016,36(8):1660-1669.
- [11] Peshkova IO, Schaefer G, Koltsova EK. Atherosclerosis and aortic aneurysm-is inflammation a common denominator? [J]. *FEBS J*, 2016, 283(9):1636-1652.
- [12] Chang TW, Gracon AS, Murphy MP, *et al.* Exploring autoimmunity in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2015,309(5):719-727.
- [13] Kobayashi M, Nishita M, Mishima T, *et al.* MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration [J]. *EMBO J*,2006,25(4):713-726.
- [14] Gawden-Bone C, Zhou Z, King E, *et al.* Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14 [J]. *J Cell Sci*,2010,123(9):1427-1437.
- [15] Kouwenhoven M, Ozenci V, Tjernlund A, *et al.* Monocyte-derived dendritic cells express and secrete matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitors and are imbalanced in multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmunol*,2002,126(1):161-171.
- [16] Fuks JM, Arrighi RB, Weidner JM, *et al.* GABAergic signaling is linked to a hypermigratory phenotype in dendritic cells infected by *Toxoplasma gondii* [J]. *PLoS Pathog*,2012,8(12):e1003051.
- [17] Loebrich S, Bähring R, Katsuno T, *et al.* Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton [J]. *EMBO J*,2006,25(5):987-999.