

[文章编号] 1671-587X(2024)01-0033-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240105

## APOE多态性在炎症因子诱导的神经毒性反应性星形胶质细胞中的差异作用

王岩, 李晓慧, 李瑶, 崔理立, 蔡玉洁

(广东医科大学附属医院 广东省衰老相关心脑血管疾病重点实验室, 广东 湛江 524001)

**[摘要]** **目的:** 探讨载脂蛋白E (APOE) 基因多态性在神经毒性反应性星形胶质细胞中的差异作用, 为阿尔茨海默病 (AD) 发病机制的研究提供理论依据。**方法:** 体外分离培养APOE基因敲除小鼠 (APOE<sup>-/-</sup>) 原代皮层星形胶质细胞, 免疫荧光染色法鉴定细胞纯度。构建人APOE3和APOE4重组过表达质粒, 分别转染至原代APOE<sup>-/-</sup>星形胶质细胞中, 以APOE<sup>-/-</sup>原代细胞为对照, 采用Western blotting法检测细胞中APOE和神经胶质酸性蛋白 (GFAP) 蛋白表达水平, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测细胞培养上清中APOE水平。采用白细胞介素1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )、肿瘤坏死因子 (TNF) 和补体C1q联合刺激转染APOE3和转染APOE4的原代星形胶质细胞制备炎症模型, 分为APOE3+PBS组、APOE4+PBS组、APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+CC1q组和APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组, 采用细胞免疫荧光染色法观察各组细胞形态表现, 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞中磷脂酰肌醇蛋白聚糖4 (Gpc4)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖6 (Gpc6)、血小板反应蛋白1 (Thbs1)、血小板反应蛋白2 (Thbs2)、酸性分泌蛋白类似蛋白1 (Sparcl1)、胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF)、C3和S100钙结合蛋白B (S100B) mRNA表达水平, 微球吞噬实验检测各组细胞吞噬能力, Western blotting法检测各组细胞中B细胞淋巴瘤2 (Bcl-2) 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3 (Caspase-3) 蛋白表达水平。**结果:** 与APOE<sup>-/-</sup>组比较, 转染APOE3和APOE4组细胞中APOE和GFAP蛋白表达水平及细胞培养上清中APOE水平明显升高 ( $P<0.01$ )。荧光显微镜下观察, 分别与APOE3+PBS组和APOE4+PBS组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组和APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组星形胶质细胞突起变短, 胞体变大; 与APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组星形胶质细胞突起更短。分别与APOE3+PBS组和APOE4+PBS组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组和APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组细胞中Gpc4、Gpc6、Thbs1、Thbs2和Sparcl1 mRNA表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ); 与APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组细胞中Gpc4、Gpc6、Thbs1、Thbs2和Sparcl1 mRNA表达水平明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。分别与APOE3+PBS组和APOE4+PBS组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组和APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组细胞中GDNF mRNA表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), C3和S100B mRNA表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组细胞中GDNF mRNA表达水平明显降低 ( $P<0.05$ ), C3和S100B mRNA表达水平明显升高 ( $P<0.05$ )。分别与APOE3+PBS组和APOE4+PBS组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组和APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组细胞吞噬微珠数量明显减少; 与APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组细胞吞噬微珠数量明显减少。分别与APOE3+PBS组和APOE4+PBS组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组和APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1组细胞中Bcl-2蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), Caspase-3蛋白表达水平明

[收稿日期] 2023-03-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81671181); 广东省科技厅自然科学基金项目 (2022A1515010593); 广东医学院科研基金项目 (GDMUM2020011)

[作者简介] 王岩 (1984-), 女, 甘肃省兰州市人, 助理研究员, 理学博士, 主要从事阿尔茨海默病发病机制方面的研究。

[通信作者] 蔡玉洁, 助理研究员, 硕士研究生导师 (E-mail: caiyujie@gdmu.edu.cn)

显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论: APOE4 基因型比 APOE3 诱导炎症因子能力更强, 可诱导神经毒性反应性星形胶质细胞表型, 增加神经毒性, 影响星形胶质细胞凋亡, 从而加剧神经元损伤。

[关键词] 阿尔茨海默病; 星形胶质细胞; 载脂蛋白 E; 基因多态性; 细胞凋亡; 神经毒性

[中图分类号] R742 [文献标志码] A

## Differential effects of APOE polymorphism in neurotoxicity-responsive astrocytes induced by inflammatory factor

WANG Yan, LI Xiaohui, JI Yao, CUI Lili, CAI Yujie

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Age-Related Cardiac and Cerebral Diseases, Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the differential effects of apolipoprotein E (APOE) gene polymorphism in the neurotoxicity-reactive astrocytes, and to provide the theoretical basis for the study of the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). **Methods:** The primary cortical astrocytes from the APOE-knockout mice (APOE<sup>-/-</sup>) were isolated and cultured *in vitro*, and the purity of the cells was identified by immunofluorescence staining. The human APOE3 and APOE4 recombinant over-expression plasmids were constructed and separately transfected into the primary APOE<sup>-/-</sup> astrocytes, and the APOE<sup>-/-</sup> primary cells were regarded as control. Western blotting method was used to detect the expression levels of APOE and glial fibrillary acidic protein (GFAP) proteins in the cells; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the APOE level in the cellular culture supernatant. The inflammatory models were prepared with the primary astrocytes transfected with APOE3 and APOE4 and co-stimulated with interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), tumor necrosis factor (TNF), and complement C1q. The cells were divided into APOE3+PBS group, APOE4+PBS group, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group, and APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group. Cell immunofluorescence staining method was used to observe the morphology of the cells in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of glypican 4 (Gpc4), glypican 6 (Gpc6), thrombospondin 1 (Thbs1), thrombospondin 2 (Thbs2), SPARC-like protein 1 (Sparc1) and glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF), C3, and S100 calcium binding protein B (S100B) mRNA in the cells in various groups; microsphere phagocytosis assay was used to detect the phagocytic capacities of the cells in various groups; Western blotting was used to detect the protein expression levels of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and cysteinyl aspartate specific protease-3 (Caspase-3) proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with APOE<sup>-/-</sup> group, the expression levels of APOE and GFAP proteins in the cells and the APOE level in the cellular culture supernatant in transfected APOE3 and transfected APOE4 groups were increased ( $P < 0.01$ ). The fluorescence microscope observation results showed that compared with APOE3+PBS and APOE4+PBS groups, the astrocytic processes in APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group and APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group became shorter and the cell bodies became larger; compared with APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group, the astrocytic processes in APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group were even shorter. Compared with APOE3+PBS and APOE4+PBS groups, the expression levels of Gpc4, Gpc6, Thbs1, Thbs2, and Sparc1 mRNA in the cells in APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group and APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); compared with APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group, the expression levels of Gpc4, Gpc6, Thbs1,

Thbs2, and Sparcl1 mRNA in the cells in APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group were significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with APOE3+PBS and APOE4+PBS groups, the expression levels of GDNF mRNA in the cells in APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group and APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group were decreased ( $P<0.01$ ), and the expression levels of C3 and S100B mRNA were increased ( $P<0.01$ ); compared with APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group, the expression level of GDNF mRNA in the cells in APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group was decreased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of C3 and S100B mRNA were increased ( $P<0.05$ ). Compared with APOE3+PBS group and APOE4+PBS group, the numbers of phagocytosis of microspheres in the cells in APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group and APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group were significantly decreased; compared with APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group, the number of phagocytosis of microspheres in the cells in APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group was significantly decreased. Compared with APOE3+PBS group and APOE4+PBS group, the expression levels of Bcl-2 protein in the cells in APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group and APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group were decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ) and the expression levels of Caspase-3 protein were significantly increased ( $P<0.01$ ); compared with APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group, the expression level of Bcl-2 protein in the cells in APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+Cq1 group was decreased ( $P<0.01$ ), and the expression level of Caspase-3 protein was increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The APOE4 genotype has a stronger ability to induce the inflammatory factors compared with APOE3; it can lead to a neurotoxicity-reactive astrocyte phenotype, increase the neurotoxicity, affect the astrocyte apoptosis, and aggravate the neuron damage.

**KEYWORDS** Alzheimer's disease; Astrocyte; Apolipoprotein E; Gene polymorphism; Apoptosis; Neurotoxicity

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 作为多发于老年人的以痴呆为主要症状的神经退行性疾病, 是一种主要由遗传和环境等因素共同引起的复杂疾病, 其主要临床特征是渐进性记忆功能减退和认知能力下降, 是危害我国老年人群健康的重大疾病<sup>[1-2]</sup>。在发病机制上, AD是由于神经元外毒性淀粉样蛋白寡聚体和蛋白质及过度磷酸化 Tau 蛋白导致神经元内神经原纤维缠结、神经炎症、突触功能障碍和神经元丢失, 最终导致认知功能下降<sup>[3-5]</sup>。目前已确定 AD 的致病风险基因有多种<sup>[6]</sup>, 其中载脂蛋白 E4 (apolipoprotein E4, APOE4) 是目前已知的最高危致病基因。APOE4 基因存在于约 15% 的人群中, 增加了 AD 的发病风险, 降低了 AD 患者的发病年龄<sup>[7]</sup>。中枢神经系统中载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 主要由星形胶质细胞分泌, 并通过受体介导的内吞作用将含有 APOE 的脂蛋白颗粒递送至神经元, 以支持膜稳态、突触完整性和损伤修复等<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9-10]</sup>显示: 神经慢性炎症对 AD 发病具有重要的推动作用, 活化的星形胶质细胞可分泌多种炎症因子影响 AD 的病理进程。因此, 研究 APOE 多态性在神经毒性反应性星形胶质细胞中的差异作用对探讨 AD 发病机

制具有重要意义。本研究通过细胞实验分析 APOE 基因多态性对神经毒性反应性星形胶质细胞中产生的突触生长因子、神经损伤因子、神经营养因子和细胞凋亡的影响, 为 AD 提供新的治疗途径。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** APOE 敲除 (APOE<sup>-/-</sup>) 小鼠购自苏州赛业生物科技有限公司, 生产许可证号: SCXK (苏) 2020-0006, 饲养于 SPF 级动物房。本研究经广东医科大学实验动物中心动物伦理委员会批准, 用于繁殖乳鼠。DMEM 高糖培养基、双抗、胰酶和胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 转染试剂 Liposuction LTX 和白细胞介素 1 $\alpha$  (interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ) 购自美国 Thermo 公司, 补体 C1q、一抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和 APOE 购自美国 Abcam 公司, TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒和 SYBR Green PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 载脂蛋白 E3 (apolipoprotein E3, APOE3) 和 APOE4 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自美国 RB 公司, 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、一抗 B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell

lymphoma-2, Bcl-2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3 (cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 和内参  $\beta$ -actin 购自美国 CST 公司, HRP 标记的二抗购自美国 Jackson 公司, 荧光微珠购自美国 Sigma 公司, 蛋白裂解液购自上海碧云天生物科技有限公司, ECL 试剂盒购自美国密理博公司。C600 多功能荧光分子成像系统购自美国 Azure Biosystems 公司, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪购自瑞士 Roche 公司。

**1.2 APOE<sup>-/-</sup>原代星形胶质细胞的提取、分离、培养和鉴定** 按照参考文献 [11] 中的方法, 从出生 1~3 d APOE<sup>-/-</sup>小鼠大脑中分离出原代皮层星形胶质细胞。将分离出的 APOE<sup>-/-</sup>星形胶质细胞在含有 10% 灭活胎牛血清和 1% 双抗的新鲜 DMEM 高糖培养基中培养 7~8 d, 每 3 d 换液 1 次。待细胞长满培养瓶, 180 r·min<sup>-1</sup> 摇动 30 min, 240 r·min<sup>-1</sup> 摇动 6 h 除去小胶质细胞和少突胶质细胞。更换新鲜培养液培养, 胰酶消化传代。星形胶质细胞的纯度通过细胞免疫荧光染色对细胞标记物 GFAP 表达进行表征, 显微镜下观察细胞形态表现。

**1.3 质粒的构建、转染和转染效率** 根据 APOE 蛋白 112 位氨基酸的差异构建 APOE3 (Cys112, Arg158) 和 APOE4 (Arg112, Arg158) 过表达质粒。分别将空载质粒、APOE3 和 APOE4 质粒转染至原代 APOE<sup>-/-</sup>星形胶质细胞, 分别为 APOE<sup>-/-</sup>组、转染 APOE3 组和转染 APOE4 组, 转染后 48 h 在荧光倒置显微镜下观察活细胞中增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 表达情况。收集细胞采用 Western blotting 法检测转染效率。收集细胞上清, 采用 ELISA 法检测各组细胞分泌至细胞外的 APOE 水平。

**1.4 神经毒性 A1 型星形胶质细胞模型建立** 采用 IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 联合刺激星形胶质细胞建立神经毒性 A1 型星形胶质细胞模型: 分别转染 APOE3 和 APOE4 过表达质粒的原代 APOE<sup>-/-</sup>星形胶质细胞培养至实验需要时间, 更换为含终浓度 3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  IL-1 $\alpha$ +30  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF+400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  C1q 的新鲜 DMEM 高糖完全培养基, 加入等量 PBS 缓冲液作为对照组, 培养 24 h 后荧光显微镜下观察各组 (APOE3+PBS 组、APOE4+PBS 组、APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组和 APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组) 细胞形态表现, 收集各组星形胶质细胞用

于后续实验。

**1.5 RT-qPCR 法检测各组细胞中突触生长因子、胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)、C3 和 S100 钙结合蛋白 B (S100 calcium binding protein B, S100B) mRNA 表达水平** 细胞分组见 “1.4”。采用 TRIzol 提取细胞总 RNA, 使用反转录试剂盒反转录合成 cDNA。采用 RT-qPCR 法, 通过 Roche 96 荧光定量 PCR 仪和 SYBR Green PCR 试剂盒检测各组星形胶质细胞中磷脂酰肌醇蛋白聚糖 4 (glypican 4, Gpc4)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 6 (glypican 6, Gpc6)、SPARC 样蛋白 1 (SPARC like protein 1, Sparcl1)、血小板反应蛋白 1 (thrombospondin 1, Thbs1)、血小板反应蛋白 2 (thrombospondin 2, Thbs2)、GDNF、C3 和 S100B mRNA 表达水平。引物由上海生工生物工程有限公司合成, 以 GAPDH 作为内参, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法计算目的基因 mRNA 表达水平, 实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列  
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequence(5'-3')
Gpc4	F:CTCAAGTCGAAAAGTTGCTCGG R:TGGTCACCGTTGATCTCATAGA
Gpc6	F:TCCGGGCTGTGATTCTTCTCT R:CCTTGGCACCCTAAGCCTG
Sparcl1	F:GGCAATCCCACAAAGTACAAG R:TGTAGCGTCTTCCGGTGTC
Thbs1	F:CCTGCCAGGGAAGCAACAA R:ACAGTCTATGTAGAGTTGAGCCC
Thbs2	F:CTGGGCATAGGGCCAAGAG R:GTCTTCCGGTTAATGTTGCTGAT
GDNF	F:TTCTGGCTGTTACGTTAAGC R:GCCATTTGCATCAATCAAGCA
C3	F:GCAGAGACCCTACGGGTGA R:GGTGGCATCTTCGGTCTGTG
S100B	F:TGGTTGCCCTCATTGATGTCT R:CCCATCCCCATCTTCGTCC
GAPDH	F:AAGAGGGATGCTGCCCTTAC R:TACGGCCAAATCCGTTTACA

**1.6 ELISA 法检测各组细胞培养上清中 APOE 水平** 收集各组细胞的培养上清, 采用 APOE ELISA 检测试剂盒, 按照试剂盒说明书中的方法

检测星形胶质细胞分泌的 APOE 水平, 实验重复 3 次。

**1.7 Western blotting 法检测各组细胞中 APOE、GFAP、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达水平** 各组细胞处理后加入蛋白裂解液裂解离心收集总蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5% 牛奶封闭后加入 APOE、GFAP、Bcl-2、Caspase-3 和  $\beta$ -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜, 分别加入 HRP 标记的二抗稀释液室温孵育 1 h; 采用 ECL 化学发光显色试剂盒进行检测, 使用 C600 多功能荧光分子成像系统曝光并拍照。采用 Quantity One 软件分析各蛋白条带灰度值, 以  $\beta$ -actin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 /  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值, 实验重复 3 次。

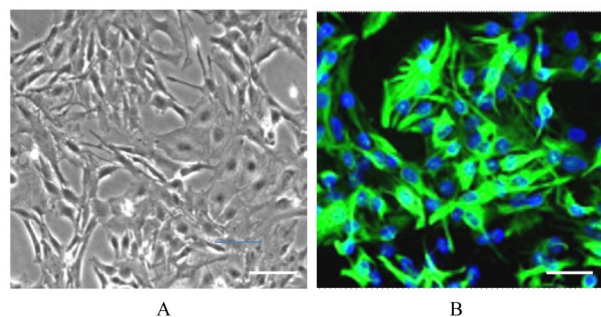
**1.8 荧光微珠吞噬实验检测各组细胞吞噬能力** 将荧光微珠以终浓度 0.01% (V/V) 添加至新鲜的 DMEM 完全培养基中, 充分混匀, 置于 37 °C 细胞培养箱孵育 1 h, 随后加入各组处理的星形胶质细胞中, 置于 37 °C 细胞培养箱孵育 3 h。用 PBS 缓冲液洗涤 3 次洗去多余的荧光微珠, 4% 多聚甲醛固定, 倒置荧光显微镜下观察, 计数细胞吞噬微珠数量, 代表星形胶质细胞的吞噬能力。

**1.9 统计学分析** 采用 GraphPad Prism 5.0 和 Quantity One 统计软件进行统计学分析。各组细胞培养上清中 APOE 水平, 各组细胞中 Gpc4、Gpc6、Thbs1、Thbs2、Sparcl1、GDNF、C3 和 S100B mRNA 表达水平, 各组细胞中 APOE、GFAP、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达水平, 均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 星形胶质细胞的纯化和鉴定** 对 APOE<sup>-/-</sup> 小鼠的星形胶质细胞进行提取纯化。培养 21 d 后, 荧光显微镜下观察: 星形胶质细胞表现出明显的形态特征, 形状不规则, 边界清晰, 细胞体形态丰满扁平, 细胞相互连接。免疫荧光染色法检测细胞中 GFAP 蛋白呈阳性表达。见图 1。

**2.2 转染 APOE3 和 APOE4 过表达质粒后各组细胞中 APOE 和 GFAP 蛋白表达水平及细胞培养上清中 APOE 水平** EGFP-N1-APOE3 和 EGFP-N1-APOE4 质粒转染至 APOE<sup>-/-</sup> 星形胶质细胞中, 结果显示: 与 APOE<sup>-/-</sup> 组比较, 转染 APOE3 组和转



A: Morphology of APOE<sup>-/-</sup> astrocytes under fluorescence microscope after purification; B: Positive expression of GFAP protein in cells (immunofluorescence staining).

图 1 星形胶质细胞的纯化和鉴定 (Bar = 50  $\mu$ m)

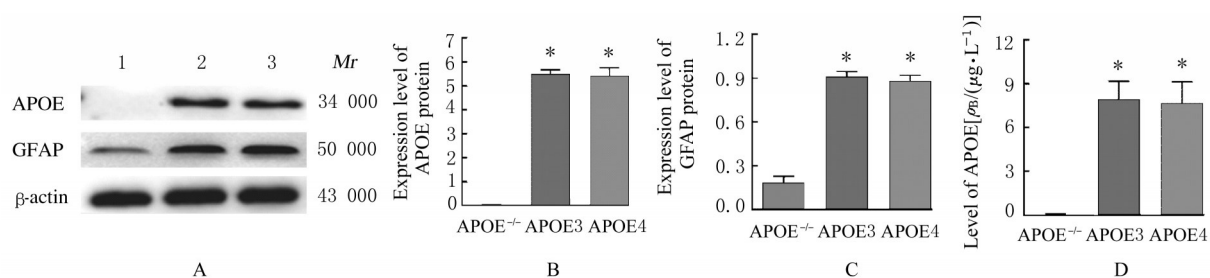
Fig. 1 Purification and identification of astrocytes (Bar = 50  $\mu$ m)

染 APOE4 组细胞中 APOE 和 GFAP 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), 细胞培养上清中 APOE 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 转染 APOE3 组和转染 APOE4 组组间上述各指标比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

**2.3 炎症因子刺激后各组星形胶质细胞形态表现** 荧光显微镜观察显示: 分别与 APOE3+PBS 组和 APOE4+PBS 组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组和 APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组星形胶质细胞突起变短, 胞体变大; 与 APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组星形胶质细胞突起更短。见图 3。

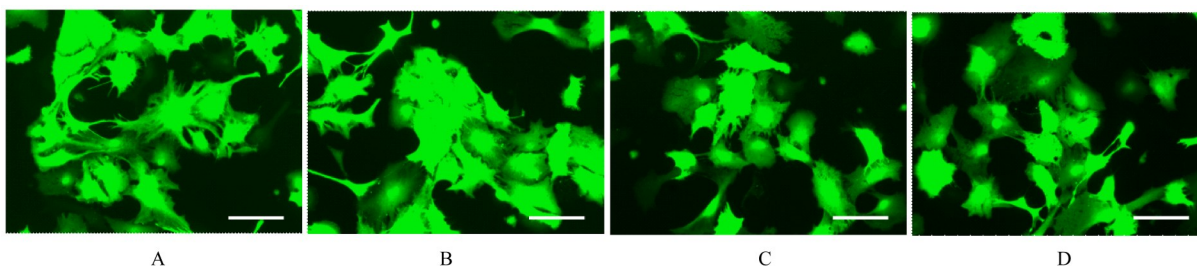
**2.4 各组星形胶质细胞中突触生长因子 mRNA 表达水平** 分别与 APOE3+PBS 组和 APOE4+PBS 组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组和 APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组星形胶质细胞中 Gpc4、Gpc6、Thbs1、Thbs2 和 Sparcl1 mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组星形胶质细胞中 Gpc4、Gpc6、Thbs1、Thbs2 和 Sparcl1 mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 4。

**2.5 各组星形胶质细胞中 GDNF、C3 和 S100B mRNA 表达水平** 分别与 APOE3+PBS 组和 APOE4+PBS 组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组和 APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组星形胶质细胞中 GDNF mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), C3 和 S100B mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q 组比较,



A: Electrophoregram of expression of APOE and GFAP proteins; B, C: Histograms of expression of APOE and GFAP proteins; D: Level of APOE in cell culture supernatant. Lane 1: APOE<sup>-/-</sup> group; Lane 2: Transfected APOE3 group; Lane 3: Transfected APOE4 group. \* $P < 0.01$  compared with APOE<sup>-/-</sup> group.

图2 Western blotting法和ELISA法检测各组细胞中APOE和GFAP蛋白表达水平及细胞培养上清中APOE水平  
Fig. 2 Expression levels of APOE and GFAP proteins and level of APOE in cell culture supernatant detected by Western blotting and ELISA methods



A: APOE3+PBS group; B: APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group; C: APOE4+PBS group; D: APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group.

图3 荧光显微镜观察炎症因子刺激后各组星形胶质细胞形态表现(Bar=100  $\mu$ m)

Fig. 3 Morphology of astrocytes in various groups after stimulated with inflammatory factors observed by fluorescence microscope(Bar=100  $\mu$ m)

APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组星形胶质细胞中GDNF mRNA表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), C3和S100B mRNA表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。见图5。

**2.6 各组星形胶质细胞吞噬微珠数量** 荧光微珠吞噬实验结果显示:分别与APOE3+PBS组和APOE4+PBS组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组和APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组星形胶质细胞吞噬微珠数量明显减少;与APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组星形胶质细胞吞噬微珠数量明显减少。见图6。

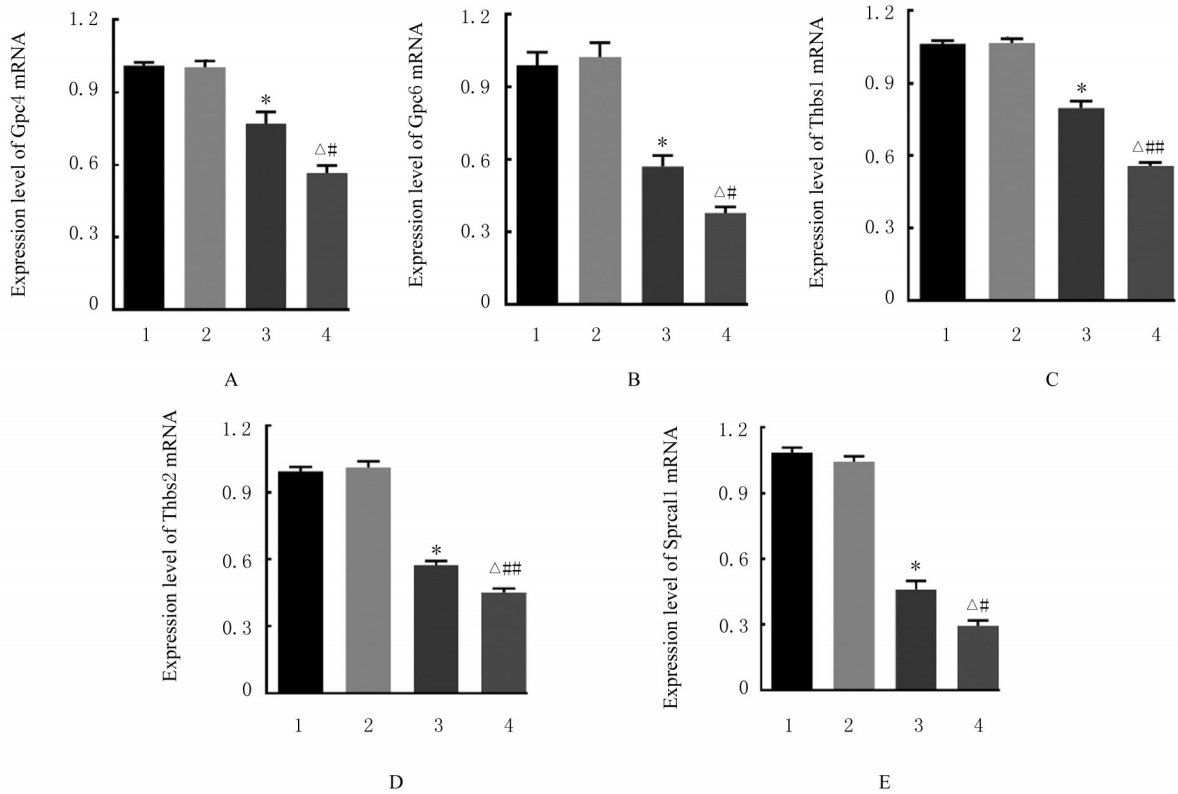
**2.7 各组星形胶质细胞中Bcl-2和Caspase-3蛋白表达水平** 分别与APOE3+PBS组和APOE4+PBS组比较, APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组和APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组星形胶质细胞中Bcl-2蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), Caspase-3蛋白表达水平明显升高( $P < 0.01$ );与APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组比较, APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q组星形胶质细胞中

Bcl-2蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ ), Caspase-3蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。见图7。

### 3 讨论

世界卫生组织(World Health Organization, WHO)数据<sup>[12]</sup>显示:2019年AD患者人数为5500万,预计至2050年将增至1.39亿。AD患者的临床特征主要包括认知衰退、运动障碍和生活自理能力严重下降,给家庭和整个社会造成沉重的负担。因此,AD的致病机制和药物研发一直是研究热点。

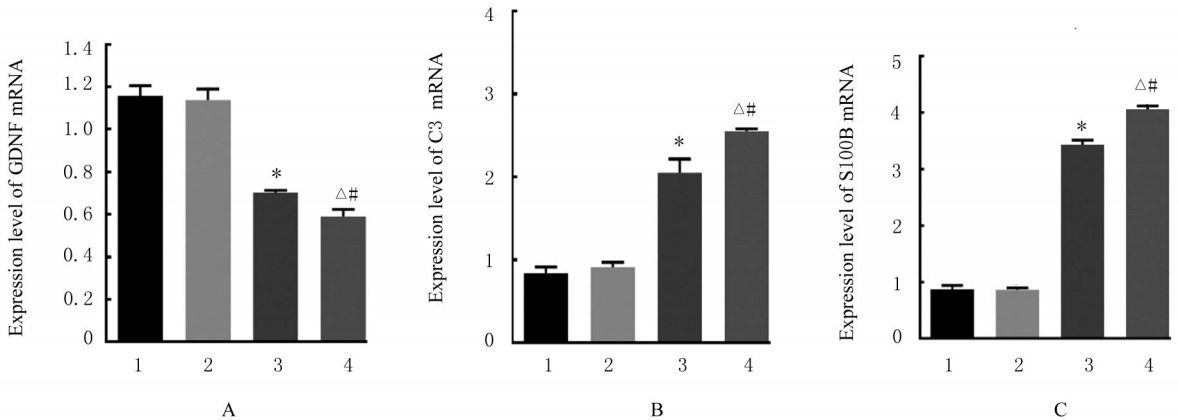
研究<sup>[13]</sup>显示:神经胶质细胞(小胶质细胞和星形胶质细胞)产生神经炎症并随着AD的退行性进展而加重。神经毒性反应性星形胶质细胞(A1型)获得毒性功能,同时丧失神经营养功能。星形胶质细胞功能障碍导致细胞因子和炎症介质释放增加、神经变性、谷氨酸摄取减少和神经元突触丧失,并最终导致AD认知缺陷<sup>[14]</sup>。神经毒性反应性星形胶质细胞是反应性星形胶质细胞的一个亚



A: Expression level of Gpc4 mRNA; B: Expression level of Gpc6 mRNA; C: Expression level of Thbs1 mRNA; D: Expression level of Thbs2 mRNA; E: Expression level of Sparcl1 mRNA. 1: APOE3+PBS group; 2: APOE4+PBS group; 3: APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group; 4: APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group. \* $P$ <0.01 vs APOE3+PBS group;  $\Delta$  $P$ <0.01 vs APOE4+PBS group; # $P$ <0.05, ## $P$ <0.01 vs APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group.

图4 各组星形胶质细胞中突触生长因子 mRNA 表达水平

Fig. 4 Expression levels of synaptic growth factor mRNA in astrocytes in various groups



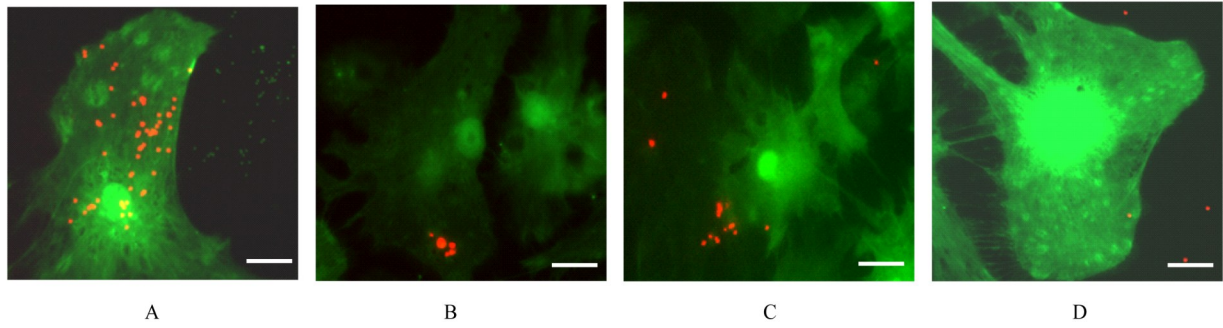
A: Expression level of GDNF mRNA; B: Expression level of C3 mRNA; C: Expression level of S100B mRNA. 1: APOE3+PBS group; 2: APOE4+PBS group; 3: APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group; 4: APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group. \* $P$ <0.01 vs APOE3+PBS group;  $\Delta$  $P$ <0.01 vs APOE4+PBS group; # $P$ <0.05 vs APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group.

图5 各组星形胶质细胞中 GDNF、C3 和 S100B mRNA 表达水平

Fig. 5 Expression levels of GDNF, C3, and S100B mRNA in astrocytes in various groups

型, 由脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激而活化的小胶质细胞诱导。活化的小胶质细胞通过分

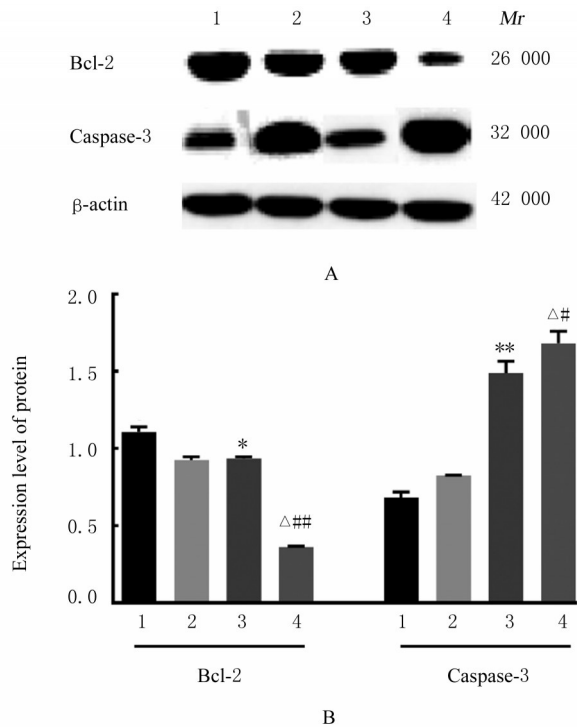
泌 IL-1 $\alpha$ 、TNF 和 C1q 诱导 A1 型星形胶质细胞表型<sup>[15]</sup>。上述 3 种细胞因子共同刺激可诱导 A1 型星



A: APOE3+PBS group; B: APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group; C: APOE4+PBS group; D: APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group. Red represented fluorescence microsphere.

图6 荧光微珠吞噬实验检测各组星形胶质细胞吞噬能力(Bar=20  $\mu$ m)

Fig. 6 Phagocytic abilities of astrocytes in various groups detected by fluorescence microsphere phagocytosis test (Bar=20  $\mu$ m)



Lane 1: APOE3+PBS group; Lane 2: APOE4+PBS group; Lane 3: APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group; Lane 4: APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group; 1: APOE3+PBS group; 2: APOE4+PBS group; 3: APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group; 4: APOE4+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs APOE3+PBS group;  $\Delta$  $P$ <0.01 vs APOE4+PBS group; # $P$ <0.05, ## $P$ <0.01 vs APOE3+IL-1 $\alpha$ +TNF+C1q group.

图7 Western blotting法检测各组星形胶质细胞中Bcl-2和Caspase-3蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 7 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of Bcl-2 and Caspase-3 proteins in astrocytes in various groups detected by Western blotting method

形胶质细胞形成。星形胶质细胞可控制突触的形成、功能和消除。A1型星形胶质细胞失去了促进突触生成和神经元存活的能力，并诱导神经元和少突胶质细胞死亡<sup>[16]</sup>。大脑中的APOE蛋白主要由星形胶质细胞分泌<sup>[17]</sup>，而A1型星形胶质细胞随着APOE4水平升高而增加<sup>[18]</sup>。

人APOE的合成由3个等位基因( $\epsilon$ 2、 $\epsilon$ 3和 $\epsilon$ 4)控制，产生6种基因表型( $\epsilon$ 2/2、 $\epsilon$ 2/3、 $\epsilon$ 2/4、 $\epsilon$ 3/3、 $\epsilon$ 3/4和 $\epsilon$ 4/4)。APOE基因的112位和158位氨基酸的置换可产生3种不同的蛋白APOE2、APOE3和APOE4，APOE2的112位氨基酸是半胱氨酸(cysteine, Cys)，158位氨基酸是精氨酸(arginine, Arg)，APOE3的112位和158位氨基酸均为Cys，APOE4则均为Arg。结构上的区别导致了APOE2、APOE3和APOE4功能的不同。

本研究结果显示：由IL-1 $\alpha$ 、TNF和C1q诱导的A1型星形胶质细胞中的突触生长因子Gpc4、Gpc6、Sparcl1、Thbs1、Thbs2和GDNF mRNA表达水平明显降低，而神经损伤标志物C3和S100B mRNA表达水平明显升高；与APOE3亚型比较，APOE4亚型变异体加重了A1型星形胶质细胞的毒性，下调突触生长因子mRNA表达水平，上调神经损伤标志物如C3和S100B mRNA表达水平。

本研究结果表明：APOE4基因型比APOE3更容易诱导炎症因子导致的神经毒性反应性星形胶质细胞表型，增加神经毒性，影响星形胶质细胞的凋亡，而加剧神经元损伤。

**利益冲突声明:**

所有作者声明不存在利益冲突。

**作者贡献声明:**

王岩参与实验设计和论文撰写,李晓慧参与实验研究和数据采集,季瑶参与实验操作,崔理立参与实验操作和材料整理,蔡玉洁参与数据分析、文章审阅和统计学分析。

**[参考文献]**

- [1] JIA L F, DU Y F, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study [J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5(12): e661-e671
- [2] KHAN S, BARVE K H, KUMAR M S. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020, 18(11):1106-1125.
- [3] SELKOE D J, HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(6):595-608.
- [4] BAKOTA L, BRANDT R. Tau biology and tau-directed therapies for Alzheimer's disease [J]. *Drugs*, 2016, 76(3):301-313.
- [5] GUO T T, ZHANG D H, ZENG Y Z, et al. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2020, 15(1):40.
- [6] RICHARD A A. Risk factors for Alzheimer's disease [J]. *Folia Neuropathol*, 2019, 57(2):87-105.
- [7] HERSI M, IRVINE B, GUPTA P, et al. Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer's disease: A systematic review of the evidence [J]. *Neurotoxicology*, 2017, 61:143-187.
- [8] JEONG W, LEE H, CHO S, et al. ApoE4-induced cholesterol dysregulation and its brain cell type-specific implications in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Mol Cells*, 2019, 42(11):739-746.
- [9] CALSOLARO V, EDISON P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(6):719-732.
- [10] AMAIA M A, BART D S. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(4):406-414.
- [11] SCHILDGE S, BOHRER C, BECK K, et al. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes [J]. *J Vis Exp*, 2013, 71:50079.
- [12] WHO. World failing to address dementia challenge, News release [R/OL]. (2021-09-02) [2021-09-02]. <https://www.who.int/news/item/02-09-2021-world-failing-to-address-dementia-challenge>.
- [13] CHUN H, IM H, KANG Y J, et al. Severe reactive astrocytes precipitate pathological hallmarks of Alzheimer's disease via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-production [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(12):1555-1566.
- [14] KAUR D, SHARMA V, DESHMUKH R. Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease [J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(4):663-677.
- [15] SHANE A L, KEVIN A G, LAURA E C, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. *Nature*, 2017, 541(7638):481-487.
- [16] CLARKE L E, LIDDELOW S A, CHANDRANI C, et al. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(8): E1896-E1905.
- [17] ROOA A R, MONTOLIU-GAYA L, VILLEGAS S. The role of apolipoprotein E isoforms in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 68(2):459-471.
- [18] LIN Y T, SEO J, GAO F, et al. APOE4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with Alzheimer's disease Phenotypes in human iPSC-derived brain cell types [J]. *Neuron*, 2018, 98(6):1294.