论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411248

自噬在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中的抗炎作用

许梦雪,秦新月,冯金洲,燕伟平,张融融 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室)

[摘要] **目的** 探索自噬(autophagy)在小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)病程中的时序变化,并初步探讨其在EAE中的抗炎作用及可能机制。**方法** 20只C57BL/6雌性小鼠建模后分别于3、7、16、30 d用Western blot检测中枢神经系统中LC3B的变化。另将60只小鼠分为正常对照组、EAE模型组、EAE+3甲基腺嘌呤(3-Methyladenine,3-MA)组。神经功能评分观察各组小鼠神经功能变化。免疫组化检测各组小鼠免疫后7 d小胶质细胞激活情况,Western blot检测免疫后16、30 d白介素-1β(IL-1β)的表达,HE染色观察中枢神经系统炎性细胞浸润情况。**结果** ①EAE+3-MA组小鼠神经功能缺损症状较其他组严重($P<0.05$)。②EAE小鼠LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ自免疫后7 d开始降低($P<0.05$),此后一直呈低表达水平($P<0.05$)。③EAE免疫后7 d即有小胶质细胞激活,EAE+3-MA组EAE小鼠小胶质细胞激活程度较EAE模型组严重($P<0.05$)。④HE染色结果显示,EAE+3-MA组炎细胞浸润比同时间点EAE模型组加重($P<0.05$)。⑤免疫后16、30 d,EAE模型组高表达IL-1β,EAE+3-MA组小鼠IL-1β表达水平较同时间点EAE模型组高($P<0.05$)。**结论** EAE中存在着自噬水平降低,可能是导致疾病炎症反应发生的重要原因。

[关键词] 实验性自身免疫性脑脊髓炎;自噬;小胶质细胞;IL-1β
[中图法分类号] R-332;R392.3;R744.3 [文献标志码] A

Anti-inflammatory effect of autophagy in experimental autoimmune encephalomyelitis mice

Xu Mengxue, Qin Xinyue, Feng Jinzhou, Yan Weiping, Zhang Rongrong (Department of Neurology, Chongqing Key Laboratory of Neuropathy, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the temporal variation of autophagy in C57BL/6 mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) after immunization, and demonstrate its anti-inflammatory effect in EAE mice. **Methods** EAE models were established in 20 female C57BL/6 mice, and then the mice were killed in 3, 7, 16 and 30 d later for the expression of LC3B in the central nervous system (CNS) by Western blotting. Another 60 female C57BL/6 mice were randomly divided into the normal control group, EAE group and EAE + 3-methyladenine (3-MA) group. Neurological function scores were performed to evaluate the neurological function. Immunohistochemical assay was performed to test the activation of microglia on the 7th day post immunization. Western blotting was employed to detect the expression of IL-1β in each group in 16 and 30 d after immunization. HE staining was used to observe the infiltration of inflammatory cells in the brain. **Results** ① The neural function was more seriously damaged in the EAE + 3-MA group than the EAE group ($P<0.05$). ② Western blot results showed the expression of LC3-II/LC-3I was decreased since 7 d post immunization ($P<0.05$), and then kept in a lower level compared to the normal group ($P<0.05$).

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目(2012)
[通信作者] 秦新月,E-mail:qinxinyue@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150319.0952.012.html(2015-03-19)

③ There were activated microglia in 7 d post immunization ($P<0.05$), with more strongly activated cells in EAE+3-MA group ($P<0.05$). ④ There were more infiltrated inflammatory cells in the EAE+3-MA group than the EAE group at the same time point ($P<0.05$). ⑤ The expression of IL-1β was elevated in 16 and 30 d in the EAE group, which were more significantly in the EAE+3-MA group ($P<0.05$). **Conclusion** Autophagy is decreased in the EAE mice, which may be the main cause for the pathogenesis of inflammation.

[**Key words**] experimental autoimmune encephalomyelitis; autophagy; microglia; IL-1β

Supported by the Project of National Clinical Key-discipline Construction Program (2012). Corresponding author: Qin Xinyue, E-mail: qinxinyue@yahoo.com

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)自身免疫性疾病,减轻炎症反应对控制疾病发生发展具有重要临床意义[1]。目前有研究表明,MS及实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)在脱髓鞘、炎细胞浸润等典型病理改变发生前,首先存在着少突胶质细胞凋亡,凋亡的少突胶质细胞直接激活小胶质细胞,此病理改变称"激活前损伤区"[2]。持续激活的小胶质细胞通过分泌一系列细胞因子成为后续的T、B淋巴细胞浸润的扳机点,可能是炎症反应发生的使动因素[3]。本课题组早期研究发现,增加EAE中的自噬水平,可通过清除受损线粒体抑制疾病早期的少突胶质细胞凋亡。研究证实自噬对T细胞具有前存活和前死亡的双重作用,是自身免疫及炎症反应的重要介导者[4]。还有研究发现在离体培养的单核细胞中,抑制自噬会导致炎症细胞因子IL-1β的分泌增加,从而促使T、B淋巴细胞的激活[5-6]。由此推测自噬对EAE中炎症反应的发生、发展都可能存在着一定的调节作用。本实验初步探讨自噬与EAE炎症反应的可能联系,旨在为多发性硬化的治疗寻求新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

自噬抑制剂3甲基腺嘌呤(3-Methyladenine,3-MA)、完全弗氏佐剂、兔抗小鼠多克隆微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)抗体(Sigma公司),兔抗小鼠Iba-1多克隆抗体、兔抗小鼠IL-1β多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),山羊抗兔IgG-HRP(Santa Cruz公司),髓鞘少突胶质细胞糖蛋白MOG_{35-55}(西安联美生物科技有限公司),卡介苗购自中国生物制品研究所,百日咳菌液由中国药品生物制品检定所赠送。

1.2 实验动物

80只雌性C57BL/6小鼠(8~10周龄),购自重庆医科大学动物实验中心。所有小鼠在相同环境下喂养,饲养及实验过程符合《实验室动物饲养和使用条例》。

1.3 实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立

MOG_{35-55}多肽2.0 mg/L溶于PBS(0.01 mmol/L, pH 7.2)中,与完全弗氏佐剂CFA(含卡介苗10 g/L)等体积混合成乳浊液,于小鼠四肢皮下注射(0.2 mL/只),并于免疫后0 h和48 h腹腔注射百日咳菌稀释液(15 μL/kg)。

1.4 动物处理及标本采集

实验组动物分为正常对照组、EAE模型组和EAE+3-MA组。正常对照组、EAE模型组和EAE+3-MA组自免疫后0 d开始腹腔注射3-MA(100 nmol/μL, 2 μL/d)。分别于3、7、16、30 d麻醉处死,取脑白质、脊髓腰膨大和颈膨大段组织。

1.5 神经功能评分

观察正常对照组、EAE模型组和EAE+3-MA组动物每日体质量变化及活动情况,参照五分评分法[7]对各组小鼠进行神经功能评分。0分:正常,无发病;1分:动物尾部无力;2分:双后肢无力;3分:双后肢麻痹;4分:双后肢加前肢瘫痪;5分:濒死或死亡。症状介于两者之间取均值,达到或超过1级为临床发病。

1.6 Western blot检测LC3B、IL-1β表达

新鲜脑脊髓组织经RIPA裂解液裂解提取全蛋白,BCA法测定蛋白浓度,经电泳、转膜、封闭后加入LC3B、IL-1β和β-actin一抗(1∶1 000),4 ℃孵育过夜;加入二抗(山羊抗兔)37 ℃孵育2 h,加入ECL显影液,凝胶成像仪成像,Quantity One软件分析蛋白表达水平。

1.7 免疫组化检测小胶质细胞激活情况

石蜡切片常规脱蜡、脱水、修复,山羊血清封闭,加入IBA1多抗(1∶100)4 ℃孵育过夜;滴加兔SABC试剂盒检测试剂,DAB显色,苏木精复染,盐酸酒精分化,碳酸锂返蓝,于光镜下观察。

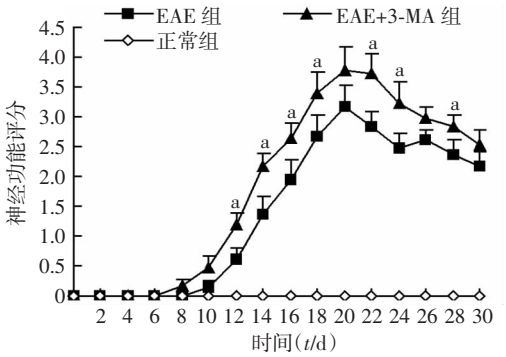
1.8 统计学分析

采用SSPS 17.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较行单因素方差分析,方差齐时两两比较行LSD检验,方差不齐时行Tamhane检验。

2 结果

2.1 神经功能评分

正常小鼠无发病。EAE小鼠最早于免疫后9 d开始发病,大多数集中在12~16 d发病,并于16~20 d达到疾病高峰。与EAE模型组相比,EAE+3-MA组小鼠发病时间提前,神经功能评分增高,疾病严重程度加重($P<0.05$,图1)。



a: $P<0.05$,与同时间点EAE组比较

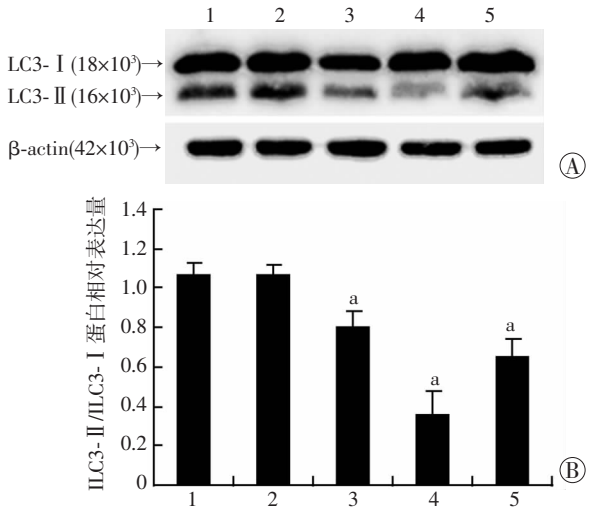
图1 免疫后不同时间各组小鼠神经功能评分

2.2 EAE疾病不同阶段脑白质中LC3B表达

Western blot检测结果显示,与正常对照组相比,EAE小鼠脑白质LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平在免疫后3 d无明显差异($P>0.05$),免疫后7 d显著降低,16 d达最低,30 d时有所升高,但仍低于正常水平($P<0.05$,图2)。

2.3 EAE免疫后早期小胶质细胞激活情况

免疫组织化学法标记小胶质细胞标记物Iba-1示小胶质细胞激活情况。结果显示,EAE免疫后7 d即有小胶质细胞激活,形态上表现为胞体变大,呈高度分枝状,细胞计数示与正常对照组[(1.6±0.5)个/HP]相比,EAE模型组激活的小胶质细胞个数明显增加[(20.2±2.8)个/HP,$P<0.01$],而同时间点EAE+3-MA组脑白质小胶质细胞激活数[(27.6±3.5)个/HP]高于EAE组($P<0.05$,图3)。

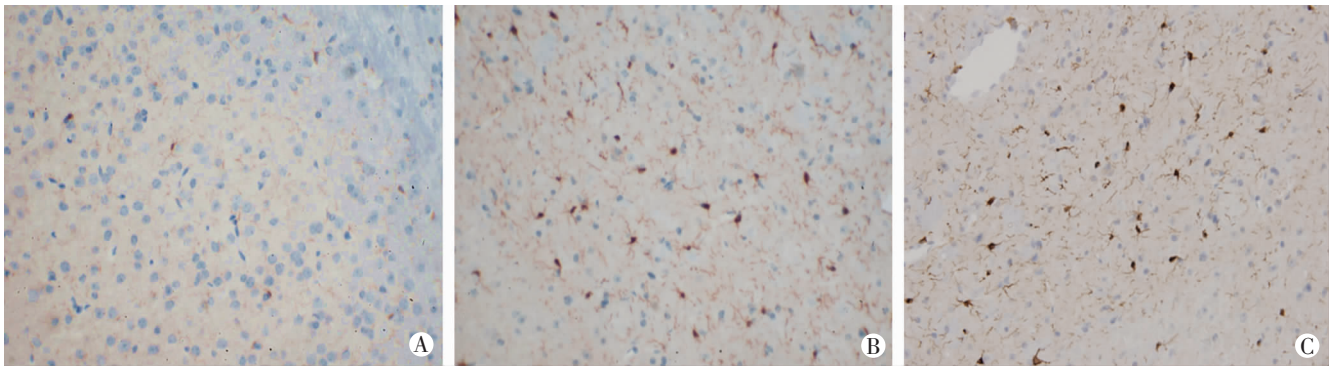


1: 正常对照组; 2: EAE免疫后3 d组; 3: EAE免疫后7 d组; 4: EAE免疫后16 d组; 5: EAE免疫后30 d组
A:Western blot检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与正常对照组比较

图2 各组小鼠脑白质LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ的表达变化

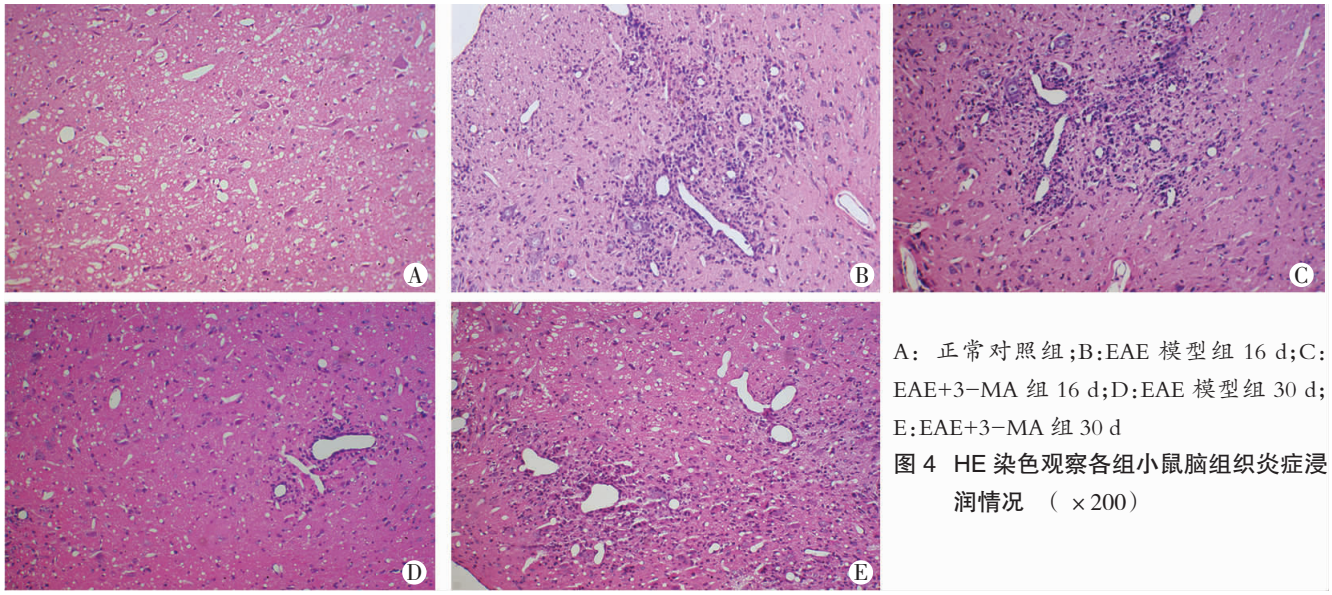
2.4 EAE小鼠炎细胞浸润情况

HE染色观察免疫后16 d疾病高峰期及30 d慢性期EAE小鼠脑白质炎细胞浸润情况。正常小鼠无明显炎细胞浸润,EAE小鼠免疫16 d可见大量炎细胞浸润在血管周围,呈典型"血管袖套样改变",30 d时血管周围及脑实质仍有炎细胞浸润,但程度较急性期明显减轻。EAE+3-MA组炎细胞浸润程度均较同时间点EAE模型组加重。炎性浸润评分示与正常对照组(0.20±0.45)相比,EAE模型组16 d(2.80±0.84)、EAE+3-MA组16 d(3.30±0.45)、EAE模型组30 d(1.40±0.55)均明显升高($P<0.01$);与EAE模型组30 d组相比,EAE+3-MA组30 d(2.60±0.55)评分增高($P<0.05$,图4)。



A:正常对照组;B:EAE模型组;C:EAE+3-MA组

图3 免疫组化观察各组小鼠小胶质细胞激活情况 (IHC ×400)

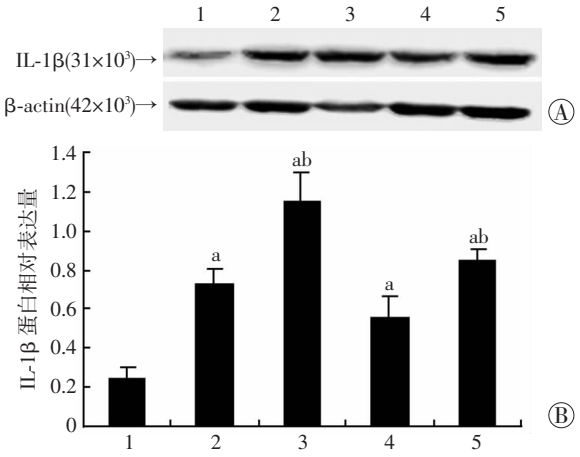


A：正常对照组；B：EAE 模型组 16 d；C：EAE+3-MA 组 16 d；D：EAE 模型组 30 d；E：EAE+3-MA 组 30 d

图 4 HE 染色观察各组小鼠脑组织炎症浸润情况（×200）

2.5 Western blot 检测 IL-1β 蛋白的表达

免疫后 16、30 d，与正常对照组相比，EAE 模型组 IL-1β 表达增高（$P<0.05$），而 EAE＋3-MA 组小鼠的 IL-1β 表达水平均较同时间点 EAE 模型组高（$P<0.05$，图 5）。



1：正常对照组；2：EAE 模型组 16 d；3：EAE＋3-MA 组 16 d；4：EAE 模型组 30 d；5：EAE＋3-MA 组 30 d

A：Western blot 检测；B：半定量分析　a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与同时间点 EAE 组比较

图 5 Western blot 检测各组小鼠脑白质 IL-1β 的表达变化

3 讨论

多发性硬化一般认为是由 T 细胞介导的免疫反应而导致的脱髓鞘事件。新近研究发现，在 MS 患者复发前，最早出现的病理改变为少突胶质细胞凋亡，凋亡的少突胶质细胞通过表达 αB-Crystallin 可直接激活、聚集小胶质细胞，而此时并没有炎细胞浸润、白质脱髓鞘、轴突损伤等典型病理改变，称“激活前损伤区”[8]。当小胶质细胞持续激活时，可通过释放 TNF-α、IL-1 等多种细胞因子和趋化因子、蛋白分解酶、ROS、NOS 等参与 MS 损伤形成过程，成为后续 T、B 淋巴浸润的使动因素[9-10]。EAE 是研究 MS 的经典模型。本课题组早期研究发现，在 EAE 免疫后 3 d，即存在着线粒体损伤[11]，损伤的线粒体通过释放 ROS、cyt-c 导致少突胶质细胞发生凋亡，从而激活小胶质细胞。线粒体自噬是细胞清除体内损伤线粒体以及维持自身稳态的一种重要调节机制。在本课题组早期研究中，增加 EAE 中的自噬水平，可以有效阻止线粒体凋亡的发生。这可能会抑制疾病早期小胶质细胞的激活。此外，一系列研究证实，自噬也是免疫和炎症的重要介导者，它对 T 细胞有着前存活和前死亡的双重作用，自噬相关基因 5（autophagy associated gene，Atg5）缺陷的 T 细胞受刺激后不能进行有效地增殖[12-13]。同时，在 MS 患者及 EAE 小鼠的 T 细胞中，都发现存在着 Atg5 的升高[14]，提示自噬与 MS/EAE 的 T 细胞免疫存在着一定相关性。而自噬与自身免疫的另一重要联系为自噬能调节细胞因子的分泌。研究证实，在 LPS 刺激下的离体培养的单核细胞中，抑制自噬会导致细胞的内源性促炎因子 ROS、线粒体 DNA 无法清除，从而使 IL-1β 分泌的增加[5-6]。IL-1β 可促使 ICAM-1 的增加，导致炎细胞浸润；同时会使 Th17 细胞因子 IL-17、IL-23 的分泌增加，导致 T 淋巴细胞的激活。这给我们自噬参与 MS/EAE 炎症调节的另一提示。

本研究表明，自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ的表

达在免疫后7 d即有降低,并在疾病高峰期(16 d)降至最低,30 d时仍处于较低水平。Dasgupta等[15]也证实在EAE慢性期LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ表达降低。3-MA是自噬抑制剂。对正常对照组、EAE模型组、EAE+3-MA组、EAE+PBS组进行检测,免疫组化染色结果显示EAE免疫后7 d(疾病早期)即有小胶质细胞的激活,EAE+3-MA组EAE小鼠小胶质细胞激活数量高于EAE模型组($P<0.05$)。Western blot检测结果显示,与正常对照组比较,免疫后16 d(急性期)及30 d(缓解期)EAE模型组高表达IL-1β($P<0.05$),而EAE+3-MA组IL-1β表达水平均高于同时间点EAE模型组($P<0.05$)。HE染色结果显示免疫后16 d及30 d EAE+3-MA组小鼠炎细胞浸润情况较同时间点EAE模型组加重($P<0.05$)。

自噬在EAE中的研究鲜有报道,本实验提出在EAE早期,即存在着自噬水平的降低,并贯穿疾病全程。进一步抑制自噬水平,可以促使疾病早期小胶质细胞激活,增高病程中IL-1β的表达水平及炎细胞浸润情况,加重神经功能缺损,所以EAE自噬水平的降低是导致疾病炎症反应发生发展的可能原因。这为治疗MS提供了新的临床思路和治疗策略。但本实验尚不能明确自噬降低的原因,有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Proudfoot A E, de-Souza A L, Muzio V. The use of chemokine antagonists in EAE models[J]. J Neuroimmunol, 2008, 198(1/2): 27-30.

[2] van-der-Valk P, Amor S. Preactive lesions in multiple sclerosis[J]. Curr Opin Neurol, 2009, 22(3): 207-213.

[3] Bsibsi M, Holtman I R, Gerritsen W H, *et al*. Alpha-B-crystallin induces an immune-regulatory and antiviral microglial response in preactive multiple sclerosis lesions[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2013, 72(10): 970-979.

[4] Bhattacharya A, Eissa N T. Autophagy and autoimmune crosstalks[J]. Front Immunol, 2013, 4: 88.

[5] Nakahira K, Haspel J A, Rathinam V A, *et al*. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasomes[J]. Nat Immunol, 2011, 12(3): 222-230.

[6] Peral-de-Castro C, Jones S A, Ni-Cheallaigh C, *et al*. Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on IL-1 secretion[J]. J Immunol, 2012, 189(8): 4144-4153.

[7] Chong W P, Horai R, Mattapallil M J, *et al*. IL-27p28 inhibits central nervous system autoimmunity by concurrently antagonizing Th1 and Th17 responses[J]. J Autoimmun, 2014, 50: 12-22.

[8] van-Noort J M, van-den-Elsen P J, van-Horssen J, *et al*. Preactive multiple sclerosis lesions offer novel clues for neuroprotective therapeutic strategies[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011, 10(1): 68-81.

[9] van-Horssen J, Singh S, van-der-Pol S, *et al*. Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 156.

[10] van-Noort J M, Bsibsi M, Gerritsen W H, *et al*. Alphab-crystallin is a target for adaptive immune responses and a trigger of innate responses in preactive multiple sclerosis lesions[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2010, 69(7): 694-703.

[11] Feng J, Tao T, Yan W, *et al*. Curcumin inhibits mitochondrial injury and apoptosis from the early stage in EAE mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014: 728751.

[12] Bell B D, Leverrier S, Weist B M, *et al*. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(43): 16677-166782.

[13] Pua H H, Dzhagalov I, Chuck M, *et al*. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation[J]. J Exp Med, 2007, 204(1): 25-31.

[14] Ben-Sasson S Z, Hu-Li J, Quiel J, *et al*. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(17): 7119-7124.

[15] Dasgupta A, Zheng J, Perrone-Bizzozero N I, *et al*. Increased carbonylation, protein aggregation and apoptosis in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. ASN Neuro, 2013, 5(1): e00111.

(收稿:2014-11-27;修回:2014-12-24)

(编辑 王小寒)