基础医学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000975

炎症因子 IL-4 可能通过自噬导致正常鼠认知功能下降

辜 敏[1],吕 洋[1],赵 楠[2],田 琦[1],张 漫[1],杨文秀[2],肖 倩[1],余维华[2]
(1. 重庆医科大学附属第一医院老年病科神经与心理疾病组,重庆 400016;2. 重庆医科大学神经科学中心,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:研究腹腔注射白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)对 C57BL/6 小鼠学习记忆能力的影响。**方法**:将 10 只 C57BL/6 小鼠随机分成 2 组:IL-4 干预组和对照组。在注射 IL-4 1 d 后进行水迷宫实验,包括 5 天定位航行和 1 天空间探索实验。采用 Western blot 和 RT-PCR 对自噬标记物微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3,MAP1LC3,LC3)进行检测。**结果**:IL-4 注射组小鼠学习记忆能力较对照组明显下降(穿越平台次数:4.750 ± 0.500 vs. 6.500 ± 0.577;t=4.583,P=0.004)。免疫印迹显示,IL-4 干预组小鼠脑组织中 LC3 较对照组明显增多(皮质:0.760 ± 0.091 vs. 0.482 ± 0.085;t=-6.702,P=0.000;海马:0.772 ± 0.068 vs. 0.486 ± 0.047;t=-10.267,P=0.000)。RT-PCR 同样验证了这个趋势(皮质:1.422 ± 0.002 vs. 1.000 ± 0.000;t=-311.903,P=0.000;海马:1.434 ± 0.005 vs. 1.000 ± 0.000;t=-162.197,P=0.000)。**结论**:IL-4 可能通过大量增加小鼠自噬作用,降低小鼠的学习记忆能力。

【关键词】白细胞介素-4;自噬;认知功能;C57BL/6 小鼠
【中图分类号】R749.16 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-02-28

Inflammatory cytokine interleukin-4 may induce cognitive function impairment via autophagy in normal mice

Gu Min[1], Lü Yang[1], Zhao Nan[2], Tian Qi[1], Zhang Man[1], Yang Wenxiu[2], Xiao Qian[1], Yu Weihua[2]
(1. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: to explore the effect of interleukin-4(IL-4) on the cognitive function in C57BL/6 mice. ***Methods***: Ten C57BL/6 mice were randomly divided into two groups: IL-4 intervention group(the mice intraperitoneally injected with IL-4 at the concentration of 100 ng/kg) and the control group. Morris water maze including five days of place navigation and one day of spatial probe was performed on the next day after intraperitoneal injection of IL-4. Microtubule associated protein 1 light chain 3(MAP1LC3,LC3) was detected by Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). ***Results***: Compared with those of control group, the level of learning and memory of the mice in IL-4 intervention group was significantly decreased(times of crossing platform: 4.750 ± 0.500 vs. 6.500 ± 0.577; t=4.583, P=0.004). Western blot showed that the expression of LC3 was increased in the mice in IL-4 intervention group than in control group(cortex: 0.760 ± 0.091 vs. 0.482 ± 0.085; t=-6.702, P=0.000; hippocampus: 0.772 ± 0.068 vs. 0.486 ± 0.047; t=-10.267, P=0.000). RT-PCR also verified this trend(cortex: 1.422 ± 0.002 vs. 1.000 ± 0.000; t=-311.903, P=0.000; hippocampus: 1.434 ± 0.005 vs. 1.000 ± 0.000; t=-162.197, P=0.000). ***Conclusion***: IL-4 affects the function of autophagy, and the excessive autophagy may cause the damage to cognitive function in the mice.

【Key words】interleukin-4; autophagy; cognitive function; C57BL/6 mice

炎症是机体对外来伤害的一种自身防御机制,适度的炎症对机体起保护作用,但炎症一旦失控则又可成为机体组织损伤的重要原因[1]。近年来,炎症反应在神经系统变性疾病中的作用越来越被大家所关注。阿尔茨海默病作为老年人最为常见的神经变性疾病,炎症机制在其发病中起到了重要作用。细胞因子是在感染、创伤等刺激作用下产生的与自身免疫反应有关的具有多功能生物学效应的小分子蛋白物质[2]。白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)是由活化 T 细胞产生的一种具有多种生物效应的细胞因子,其由 802 氨基酸残基组成,分子量为 140 kD,

作者介绍:辜 敏,Email:gumin618cq@163.com,研究方向:老年医学,神经科学。
通信作者:吕 洋,Email:lyu_yang@126.com。
基金项目:重庆市应用开发一般资助项目(编号:cstc2014yykfA110002);国家临床重点专科经费建设资助项目(编号:国卫办医函〔2013〕544 号)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1641.096.html (2016-03-25)

能促进急性炎症过程[3]。本研究通过对 C57BL/6 小鼠腹腔注射 IL-4 诱导炎症反应，观察小鼠学习记忆功能改变，以探讨炎症对正常小鼠认知功能的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

重组小鼠 IL-4 购自美国 PeproTech 公司，小鼠兔抗多克隆自噬标记物微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule associated protein 1 light chain 3，MAP1LC3，LC3）抗体购自英国 Abcam 公司，小鼠单抗 β-actin 购自江苏碧云天生物技术研究所。

1.2 实验动物及分组

C57BL/6 野生型小鼠 10 只，雄性，6 月龄。小鼠饲养于明暗周期 12 h（8:00~20:00）、室温恒定（22 ℃~24 ℃）、可自由摄取水分、食物的环境中。随机将小鼠分为 IL-4 干预组和对照组，每组各 5 只[4]。采用腹腔注射 IL-4（100 ng/kg）干预小鼠。腹腔注射第 2 天行 Morris 水迷宫实验后处死小鼠，获取脑组织，置-80 ℃保存。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所指定的伦理学标准。

1.3 Morris 水迷宫实验

实验时平台随机至于第 2 象限，并固定于水下 1.0~1.5 cm，水温保持在 20 ℃~24 ℃。实验分为定位航行实验和空间探索实验两部分。（1）定位航行实验：实验历时 5 d，分别从 4 个象限任选一入水点将小鼠面向池壁放入水中，记录小鼠从入水到找到平台所需时间（逃避潜伏期，escape latency）。如果 60 s 内小鼠未找到平台，则引导其至平台并停留 10 s。（2）空间探索实验：撤离平台，将小鼠轻柔放入水池中，记录小鼠穿过原平台所在位置的次数。

1.4 Western blot 法检测 LC3 蛋白的表达

采用 RIPA 裂解液提取脑组织总蛋白，使用 BCA 法对蛋白质进行浓度测定及定量，以 β-actin 水平作为等量蛋白质上样对照，行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白。转膜后根据 MARKER 所示位置剪裁条带，使用一抗封闭液封闭 1 h。封闭完成后用含 0.01% Tween20 的 TBS 缓冲液（TBST）漂洗 3 次，加入相应 LC3 抗体（1:2 000），4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后进行二抗（1:5 000）孵育约 1 h。再使用 TBST 洗膜 3 次后显影（ECL PLUS 购自美国 GE 公司）。Western blot 实验重复 3 次。

1.5 RT-PCR 法检测 LC3 mRNA 的表达

取出脑组织，按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA，经反转录、PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳得到 RT-PCR 结果。LC3 上游引物：5'-ATTTCAGTCCCCAGTGGATTAG-3'，下游引物：5'-AGCACCCAAAAGAGCAACC-3'。β-actin 上游引物：5'-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3'，下游引物：5' -ATGCCACAGGATTCCATACC-3'。反应条件为：95 ℃预变性 2 min，95 ℃ 10 s，60 ℃ 40 s 共 40 个循环。

1.6 透射电镜

获取经 2.5%戊二醛灌注后的小鼠脑组织，取出海马部位 CA1 区，用刀片将组织切成 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小组织放入标记好的固定液中。后用 PBS 缓冲液（pH 7.4）清洗 3 次，每次 15 min，再经 1%四氧化锇固定 2 h，PBS 充分清洗。将脑组织依次置于 4 ℃ 50%酒精、70%酒精、90%酒精、90%酒精-丙酮、90%丙酮及室温 100%丙酮各 20 min 脱水及浸透，再用环氧树脂 618 树脂将脑组织包埋过夜。后用显微超薄切片机（Leica，德国）将脑组织切成 50~60 nm 厚的脑片。铜网捞片后用醋酸双氧铀染色和枸橼酸铅染色脑片。于投射电镜（Olympus，日本）下观察细胞形态、细胞器和细胞核形态，照相记录实验结果。

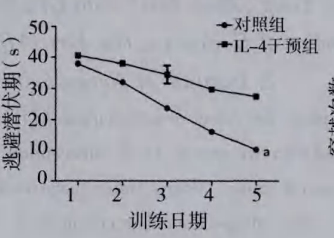
1.7 统计学分析

使用 SPSS 20.0 统计分析软件进行处理，所得数据的结果都以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，经过正态分布检验后，用两独立样本 t 检验比较对照组和 IL-4 干预组各项指标。检验水准 α=0.05。

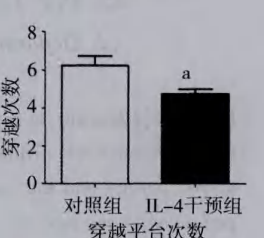
2 结 果

2.1 小鼠学习记忆能力

Morris 水迷宫结果显示，在定位航行实验中，连续 5 d 的检测结果分析 IL-4 干预组小鼠的逃避潜伏期明显长于对照组小鼠（图 1A、表 1）。在空间探索实验中（撤去平台），IL-4 干预组小鼠穿越平台次数明显少于对照组（4.750 ± 0.500 vs. 6.500 ± 0.577；t=4.583，P=0.004）（图 1B）。此结果说明腹腔注射 IL-4 后，C57BL/6 小鼠学习记忆能力明显下降。

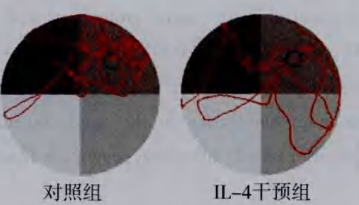


A. IL-4 干预组和对照组小鼠分别在第 1、2、3、4、5 天定位航行试验中的逃避潜伏期间



a：与正常对照组相比较有统计学意义（P<0.05）

B. 直方图数值表示 $\bar{x} \pm s$



C. 第 5 天各组小鼠的轨迹图

图 1 腹腔注射 IL-4 影响 C57BL/6 小鼠学习记忆能力

Fig.1 Decrease in learning and memory ability of the mice after intraperitoneal injection of IL-4

2.2 小鼠脑组织中 LC3 Ⅱ/Ⅰ表达的情况

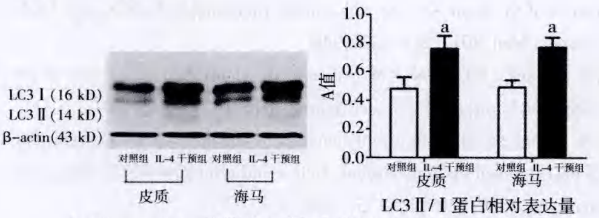
Western blot 结果显示，IL-4 干预组小鼠皮质中 LC3 Ⅱ/Ⅰ蛋白的表达量较对照组小鼠明显升高（0.760 ± 0.091 vs. 0.482 ± 0.085；t=-6.702，P=0.000）；并且在海马中也有相同的趋势（0.772 ± 0.068 vs. 0.486 ± 0.047；t=-10.267，P=0.000）（图 2A，表 2）。此外，RT-PCR 结果显示，IL-4 干预组小鼠皮质中

表 1 2 组小鼠前 5 d 的平均逃避潜伏期

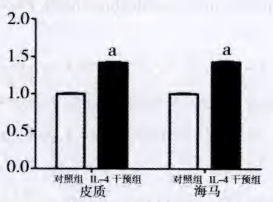
Tab.1 Average escape latency of five days in each group

组别	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5
对照组	37.943 ± 1.139	31.986 ± 0.658	23.621 ± 0.602	16.083 ± 1.370	10.256 ± 0.437
IL-4干预组	40.503 ± 0.725	38.000 ± 1.129	32.285 ± 1.702	29.685 ± 0.670	27.400 ± 1.187
t 值	-3.792	-9.199	-9.601	-17.837	-27.108
P 值	0.012	0.000	0.000	0.000	0.001

LC3 Ⅱ/Ⅰ mRNA 水平较对照组小鼠明显升高(1.422 ± 0.002 vs. 1.000 ± 0.000;t=-311.903,P=0.000);海马也存在相同的趋势(1.434 ± 0.005 vs. 1.000 ± 0.000;t=-162.197,P=0.000)(图 2B,表 3)。说明,腹腔注射 IL-4 后,C57BL/6 小鼠脑中自噬作用明显增加。



A. Western blot 检测 LC3 Ⅱ/Ⅰ 在 IL-4 干预组和对照组小鼠皮质,海马中的表达,β-actin 作为内参,$\bar{x} \pm s$,n=5



a:与正常对照组相比较有统计学意义(P < 0.05)

B. RT-PCR 检测 LC3 Ⅱ/Ⅰ 在 IL-4 干预组和对照组小鼠皮质,海马中的表达(n=5)

图 2 腹腔注射 IL-4 后,C57BL/6 小鼠脑中自噬标记物明显增加

Fig.2 Increase in lysosome expression in the mice after intraperitoneal injection of IL-4

表 2 Western blot 法检测 LC3 Ⅱ/Ⅰ 蛋白表达

Tab.2 Expression of LC3 Ⅱ/Ⅰ detected by Western blot

组别	皮质	海马
对照组	0.482 ± 0.085	0.486 ± 0.047
IL-4干预组	0.760 ± 0.091	0.772 ± 0.068
t 值	-6.702	-10.267
P 值	0.000	0.000

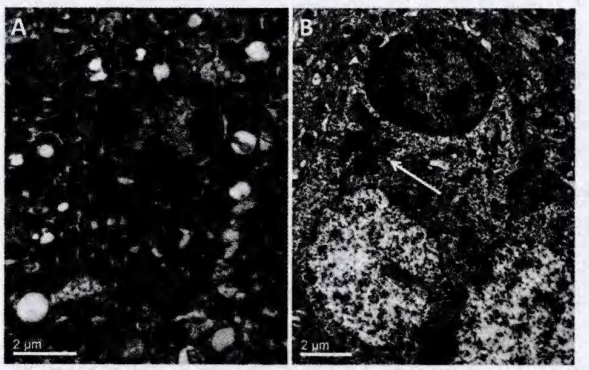
表 3 RT-PCR 法检测 LC3 Ⅱ/Ⅰ mRNA 表达

Tab.3 mRNA expression of LC3 Ⅱ/Ⅰ detected by RT-PCR

组别	皮质	海马
对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
IL-4干预组	1.422 ± 0.002	1.434 ± 0.005
t 值	-311.903	-162.197
P 值	0.000	0.000

2.3 小鼠脑组织中溶酶体的表达情况

采用透射电镜检测小鼠海马 CA1 区中小胶质细胞的形态。在对照组小鼠中,细胞质内的细胞器正常,核间隙正常,未见溶酶体(图 3A)。在 IL-4 干预组小鼠海马 CA1 区的小胶质细胞中,细胞核周围出现了大量溶酶体(图 3B)。



A. 在对照组中,细胞质内细胞器正常,核间隙正常,未见溶酶体

B. 在 IL-4 干预组中,细胞核周围出现了大量溶酶体。箭头指示的是典型的溶酶体

图 3 腹腔注射 IL-4 后,C57BL/6 小鼠脑中溶酶体增加(7 000×)

Fig.3 Increase in lysosome expression in the mice after intraperitoneal injection of IL-4(7 000×)

3 讨 论

炎症等应激条件可以引起促炎细胞因子大量表达,其能通过影响中枢神经系统炎症、神经元的退变和丢失以及免疫等方面,导致认知功能的下降[5]。最近很多研究证实以记忆和认知功能进行性减退为特征的阿尔茨海默病的发生发展与神经系统炎症密切相关[6-7]。炎症导致中枢神经病理的级联反应,从而促进 β 淀粉样蛋白异常沉积,最终导致阿尔兹海默病患者认知功能下降[8]。又有研究发现老年人认知损害与系统炎症密切相关,经抗炎治疗后,老年认知功能有一定改善[9]。这都提示炎症与认知功能存在密切关系。

IL-4 是由活化 T 细胞产生,通过激活嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞等促进炎症。在 T 细胞表面,通过 IL-4 受体 α 链(IL-4Rα)和共同 g 链之一组成的异质二聚体促进 IL-4 的结合[10]。细胞内信号通过酪氨酸激酶介导的信号传导器和转录激

活子(signal transducer and activator of transcription-6,STAT6)的磷酸化所启动,一旦磷酸化,STAT6 分子形成二聚体,进入细胞核,激活靶基因转录,诱导产生 IgE,完成炎症信号的传递,促进机体炎症反应[11]。

自噬是细胞利用溶酶体对自身受损的细胞器和大分子物质进行降解的过程[12],细胞受到刺激后吞噬物最终在溶媒体内降解[13]。正常情况下,自噬作为细胞生存的一种机制在清除损伤和衰老细胞器等生理过程中发挥重要作用。但是,自噬一旦被过分激活便会导致细胞程序性死亡[14]。自噬调控机制的失调与多种疾病的发生发展有关。值得注意的是,细胞自噬与炎症反应之间存在密切联系[15]。在关于克罗恩病的研究中发现,小肠上皮出现炎症过程中,炎症因子影响了细胞自噬功能[16]。LC3 是自噬泡主要的组成蛋白,参与自噬体的形成,现已作为自噬体的特异性标记蛋白[17]。自噬形成时,胞浆型的 LC3(即 LC3 Ⅰ)会酶切掉一小段多肽,转变为模型 LC3(即 LC3 Ⅱ),因此 LC3 Ⅱ/Ⅰ比值的大小可估计自噬水平的高低[18-19]。因此,本实验通过检测小鼠脑中 LC3 Ⅱ/Ⅰ表达量反映小鼠脑中自噬情况。

本实验主要研究在 IL-4 干预后的 C57BL/6 小鼠大脑中自噬以及小鼠学习记忆能力的情况。本研究发现腹腔注射 IL-4 后,小鼠的学习记忆能力较对照组下降,小鼠脑组织中自噬标记物增多。由此我们推测,腹腔注射 IL-4 后,IL-4 通过 IL-4Rα 将信号传递至细胞内,通过酪氨酸激酶介导的信号传导器和 STAT6 的磷酸化完成炎症信号的传递,进而引发机体的炎症反应[20]。在本研究中发现,经 IL-4 干预后,LC3 Ⅱ/Ⅰ的表达量有所增多,且电镜显示小鼠脑组织中出现溶酶体。这提示 IL-4 激活体内炎症反应这一过程使小胶质细胞的自噬作用增强。一方面小胶质细胞的自噬有效清除了在炎症过程中损坏的细胞器和坏死的细胞。另一方面,随着自噬作用的过分激活,部分正常细胞器也被清除,部分细胞出现程序性死亡。正常细胞数量减少,大脑基本结构和功能遭到破坏,因此导致小鼠认知功能下降[21]。

综上所述,通过本研究说明,腹腔注射 IL-4后,小鼠学习记忆能力会明显下降,这可能与小鼠脑组织中过度的自噬有关。

参 考 文 献

[1] Meraz-Ríos MA,Toral-Rios D,Franco-Bocanegra D,et al. Inflammatory process in Alzheimer's Disease[J]. Front Integr Neurosci,2013,7(7):59.

[2] Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour:a neuroimmune response to activation of innate immunity[J]. Eur J Pharmacol,2004,500(1-3):399-411.

[3] Ottenhoff THM,Ellner JJ,Kaufmann SHE. Ten challenges for TB biomarkers[J]. Tuberculosis,2012,92(s1):17-20.

[4] 孙玉霞,包海军,刘伟丽,等. 小鼠脑出血后自噬相关蛋白表达及 NF-kB 信号通路对其调节作用的研究[J]. 苏州大学学报:医学版,2011,31(1):30-34.

[5] Lucas SM,Rothwell NJ,Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease[J]. Br J Pharmacol,2006,147(s1):232-240.

[6] Wirths O,Breyhan H,Marcello A,et al. Inflammatory changes are tightly associated with neurodegeneration in the brain and spinal cord of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging,2010,31(5):747-757.

[7] Wyss-Coray T,Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature[J]. Cold Spring Harb Perspect Med,2012,2(1):a006346.

[8] Heneka MT,Carson MJ,Khoury JE,et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. Lancet Neurol,2015,14(4):388-405.

[9] Gorelick PB. Role of inflammation in cognitive impairment:results of observational epidemiological studies and clinical trials[J]. Ann N Y Acad Sci,2010,1207(1):155 - 162.

[10] Rosarosa JM,Graciaaznárez FJ,Hodges E,et al. Deep sequencing of target linkage assay-identified regions in familial breast cancer:methods,analysis pipeline and troubleshooting[J]. PLoS One,2010,5(4):9976.

[11] Chou LS,Liu CSJ,Boese B,et al. DNA sequence capture and enrichment by microarray followed by next-generation sequencing for targeted resequencing:neurofibromatosis type 1 gene as a model[J]. Clin Chem,2010,56(1):62-72.

[12] Nixon RA,Yang DS. Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect[J]. Neurobiol Dis,2011,43(1):38-45.

[13] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy[J]. Int J Biochem Cell Biol,2004,36(12):2491-2502.

[14] Edinger AL,Thompson CB. Death by design:apoptosis,necrosis and autophagy[J]. Curr Opin Cell Biol,2004,16(6):663-669.

[15] Jones SA,Mills KHG,Harris J. Autophagy and inflammatory diseases[J]. Immunol Cell Biol,2013,91(3):250-258.

[16] Scharl M,Rogler G. Inflammatory bowel disease:dysfunction of autophagy?[J]. Dig Dis,2012,30(s3):12-19.

[17] Reggiori F,Klionsky DJ. Autophagosomes:biogenesis from scratch?[J]. Curr Opin Cell Biol,2005,17(4):415-422.

[18] Tanida I,Ueno T,Kominami E. LC3 and Autophagy[J]. Methods Mol Biol,2008(445):77-88.

[19] Stipanuk MH. Macroautophagy and its role in nutrient homeostasis.[J]. Nutr Rev,2009,67(12):677-689.

[20] Li Y,Li L,Sun Y,et al. High-resolution deep sequencing reveals biodiversity,population structure,and persistence of HIV-1 quasispecies within host ecosystems[J]. Retrovirology,2012,9(1):1-9.

[21] Fardell JE,Zhang J,Souza RD,et al. The impact of sustained and intermittent docetaxel chemotherapy regimens on cognition and neural morphology in healthy mice[J]. Psychopharmacology,2014,231(5):841-52.

（责任编辑:冉明会）