DOI:10.16016/j.2097-0927.202312110

Siglec-E 影响小白菊内酯靶向 MAPK/NF-κB 通路抑制小胶质细胞 M1 极化

付文莹[1],王鹏博[2],唐翔宇[1],冯力元[1],黄钰婷[1],李 鹏[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系:生药学与中药学教研室[1],药剂学教研室[2]

[**摘要**] **目的** 探讨唾液酸结合样凝集素 E(sialic acid binding lectin E,Siglec-E)对小白菊内酯(parthenolide,PTL)抑制脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的小鼠小胶质细胞(BV2)M1 极化作用的影响。**方法** ①从基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus,GEO)获取 *Siglece* 相关小鼠脑组织单细胞测序数据,分为野生型组(*WT*,$n=3$)和敲除型组(*Siglece*$^{-/-}$,$n=4$)。从中筛选出小胶质细胞并分析相关差异基因及通路富集。通过 shRNA 干扰技术构建 BV2 细胞株模型,得到 *NC*-shRNA BV2 和 *Siglece*-shRNA BV2 细胞并检测 Siglec-E(*Siglece*)表达水平。②将 *NC*-shRNA 和 *Siglece*-shRNA 细胞分别分为 Control 组、LPS 组、PTL 组和 PTL+LPS 组($n=3$),采用 RT-qPCR 检测小胶质细胞 M1 极化标志物 *iNOS*、*IL*-1β 和 *IL*-6 的 mRNA 水平。将 *Siglece*$^{fl/fl}$ 和 *Cx3cr1*^{cre} 小鼠交配,获得小胶质细胞特异性 Siglec-E 缺失(*Siglece*$^{fl/fl}$×*Cx3cr1*^{cre})小鼠,并建立 LPS 诱导的神经炎症模型。③将出生 4 d 的各 9 只 *WT* 和 *Siglece*$^{fl/fl}$×*Cx3cr1*^{cre} 雄鼠分成 Control 组、LPS 组和 PTL+LPS 组($n=3$)。采用 RT-qPCR、免疫荧光技术和 Western blot 验证敲除效果以及极化相关通路,研究 Siglec-E 影响 PTL 抑制小胶质细胞 M1 极化的机制。**结果** 与 *NC*-shRNA 组比较,*Siglece*-shRNA 组中 Siglec-E 表达显著降低($P<0.01$),说明 SiglecE 敲除细胞模型建立成功。在 LPS 刺激的条件下,与 Control 组比较,*NC*-shRNA 细胞和 *Siglece*-shRNA 细胞的 *iNOS*、*IL*-1β 和 *IL*-6 的 mRNA 水平均显著上调($P<0.01$)。PTL 与 LPS 共同作用下,*NC*-shRNA 细胞中上述 M1 极化的标志物均明显下降($P<0.05$)。而对于 *Siglece*-shRNA 细胞,上述 M1 极化的标志物无显著下调。PTL 对 BV2 细胞 JNK、IκB 蛋白的磷酸化具有抑制作用($P<0.01$),也可抑制 NF-κB 核转位,而下调 Siglec-E 则会减弱该作用。与 *WT* 组小鼠比较,*Siglece*$^{fl/fl}$×*Cx3cr1*^{cre} 小鼠小胶质细胞 Siglec-E 表达显著降低($P<0.01$),PTL 对 *Siglece*$^{fl/fl}$×*Cx3cr1*^{cre} 小鼠小胶质细胞 NF-κB 磷酸化水平的抑制作用也降低。**结论** 小胶质细胞 Siglec-E 缺失会减弱 PTL 靶向 MAPK/NF-κB 通路对其 M1 极化的抑制作用。

[**关键词**] 唾液酸结合样凝集素 E;小胶质细胞;小白菊内酯;M1 极化

[**中图法分类号**] R285.5;R322.8;R394.3 [**文献标志码**] A

Effects of Siglec-E on parthenolide inhibiting microglia M1 polarization and targeting MAPK/NF-κB pathway

FU Wenying[1], WANG Pengbo[2], TANG Xiangyu[1], FENG Liyuan[1], HUANG Yuting[1], LI Peng[1] [1]Department of Pharmacognosy and Chinese Pharmacy, [2]Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University(Third Military Medical University), Chongqing,400038,China

[**Abstract**] **Objective** To explore the impact of the sialic acid binding lectin-E (Siglec-E) on the inhibitory properties of parthenolide (PTL) against lipopolysaccharide (LPS)-induced M1 polarization of microglia(BV2). **Methods** ① Single cell sequencing data of *Siglece* related mouse brain tissue was obtained from Gene Expression Omnibus (GEO) database and divided into the *WT* group ($n=3$) and the *Siglece*$^{-/-}$ group ($n=4$). The microglia cells were screened, and the enrichment analysis was performed to analyze related differential genes and pathways. BV2 cells were constructed by the shRNA interference technique and

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81673098)

[**通信作者**] 李 鹏,E-mail:pengli@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

were divided into *NC*-shRNA and *Siglece*-shRNA to detect the expression level of Siglec-E (*Siglece*). ② *NC*-shRNA and *Siglece*-shRNA cells were respectively divided into the Control group, LPS group, PTL group and PTL+LPS group ($n=3$). The mRNA levels of markers of M1 polarization in microglia, *iNOS*, *IL*-1β and *IL*-6, were detected by RT-qPCR. $Siglece^{fl/fl}$ and $Cx3cr1^{cre}$ mice were mated to obtain microglia-specific *Siglece* deletion ($Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$) mice, and LPS-induced neuroinflammation model was established. ③ Nine *WT* and $Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$ male mice were assigned to the Control group, LPS group and PTL+LPS group ($n=3$). RT-qPCR, immunofluorescence assay and Western blotting were used to verify the knock-out effect and polarization-related pathways, and to investigate the mechanism of Siglec-E affecting PTL inhibition of M1 polarization of microglia. **Results** Compared with the *NC*-shRNA group, the expression of Siglec-E in the *Siglece*-shRNA group was significantly decreased ($P<0.01$), indicating that the Siglec-E knock-down cell model was successfully established. With the stimulation of LPS, mRNA levels of *iNOS*, *IL*-1β and *IL*-6 were significantly up-regulated compared with the Control group both in shRNA cells and *Siglece* -shRNA cells ($P<0.01$). With the influence of PTL and LPS, the markers of M1 polarization in *NC*-shRNA cells mentioned before were significantly decreased ($P<0.05$), while for *Siglice*-shRNA cells, there were no significant changes in the markers of M1 polarization. PTL inhibited the phosphorylation of JNK and IκB protein ($P<0.01$) and the nuclear translocation of NF-κB in BV2 cells, down-regulated Siglec-E, and weakened the inhibitory effect. Compared with mice in the *WT* group, the expression of Siglec-E in microglia of $Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$ mice was decreased significantly ($P<0.01$), and the inhibitory effect of PTL on the phosphorylation of NF-κB in microglia of $Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$ mice was also decreased. **Conclusion** The absence of Siglec-E in microglia attenuates the inhibition of M1 polarization by the MAPK/NF-κB pathway targeted by PTL.

[**Key words**] sialic acid binding lectin E; microglia; parthenolide; M1 polarization

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81673098). Corresponding author: LI Peng, E-mail: pengli@tmmu.edu.cn

小胶质细胞是中枢神经系统的先天免疫细胞,对神经发育和功能起着关键作用,与突触可塑性、神经支持、化学趋化、神经发生与炎症调节等密切相关[1-2]。在健康状态下,小胶质细胞以静息态存在,其主要功能是维持神经组织的稳定和清除代谢产物。然而,在神经炎症过程中,小胶质细胞可发生极化而分为两个亚型:M1 型和 M2 型[3]。M1 型小胶质细胞释放促炎因子,如 TNF-α 和 IL-1β,加剧炎症反应;而 M2 型小胶质细胞释放抗炎因子,如 IL-10 和 IL-4,具有神经保护作用[4-5]。这 2 种亚型小胶质细胞之间的平衡调控着神经炎症的进程。近年来,研究者们致力于探讨小胶质细胞极化的分子机制,以期为神经炎症的治疗提供新靶点。有研究报道,某些药物和生物分子可以通过调控小胶质细胞的极化,减轻神经炎症反应[6-8],如中医药中的某些具有抗炎和神经保护作用的成分,可能通过调节小胶质细胞的极化发挥作用。

小白菊内酯(parthenolide, PTL)是草本类植物艾菊中提取分离的一种倍半萜内酯,具有多种药理作用,包括抗炎、抗氧化、抗肿瘤、促进坐骨神经的再生等[9]。PTL 能显著降低 M1 型小胶质细胞的活化和促炎因子的释放,从而减轻神经炎症和神经元损伤,并能部分逆转 LPS 诱导所致的 M2 表型标志物表达的下降,增强其抗炎和神经营养作用,保护神经[10]。尽管有研究提示,其可能的机制与 PTL 可以调节小胶质细胞的 JNK、NF-κB 等信号通路有关[9,11],但 PTL 对小胶质细胞作用的研究仍不够充分,需要进一步探讨其作用机制和临床应用价值。

Siglec-E 是一种唾液酸结合型免疫球蛋白样凝集素,主要在免疫细胞表达,通过结合以唾液酸为末端的特异性聚糖结构,调节免疫细胞的活化和功能,降低炎症反应[12-13]。有研究报道:炎症及损伤可以诱导小胶质细胞高表达 Siglec-E,抑制小胶质细胞的吞噬作用的同时,发挥重要的抗炎和神经保护作用[14]。作为具有抗炎作用的外源性药物 PTL 与内源性分子 Sigelec-E 是否共享相同的抗炎信号传导通路,PTL 是否经 Siglec-E 发挥抗炎作用尚不清楚。本研究拟通过体内外实验明确 PTL 抗炎作用的发挥与 Siglec-E 表达之间的关系,为进一步开发基于 PTL 及 Siglec-E 的抗神经炎症药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

从基因表达综合(gene expression omnibus, GEO)

数据库下载注册号为 GSE212616 的小鼠小胶质细胞 scRNA-seq 数据,使用 R 4.1.3 版本软件的 edgeR 包对数据进行标准化处理,并且进行差异分析,按照 $P<0.05$ 且 $|LogFC|>0.1$ 对差异基因进行筛选。使用 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/)对差异基因进行富集分析,按照 FDR 值<0.05 且 count 值>2 筛选显著性富集结果。基因本体论(Gene Ontology,GO)注释相关条目使用 ggplot2 可视化为柱状图,展示前 10 个显著性相关条目。京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路使用 ggplot2 可视化为气泡图。

1.2 细胞培养及药物处理

小鼠小胶质细胞系 BV2(中国莱博斯生物公司)常规培养于含 10%胎牛血清(美国 Hyclone 公司)和 1%青-链霉素的 DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司)中,培养至对数生长期后,置换为含 1%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基处理 12 h 后,给予 1 μmol/L PTL(美国 MCE 公司)处理 2 h,而后给予 1 μg/mL LPS 刺激。

1.3 BV2 细胞 Siglec-E 敲低模型构建

shRNA 克隆载体编号:plvx-shRNA2-Zsgreen-T2A-puro,元件顺序:U6-MCS-Zsgreeen-T2A-puro。NC-shRNA 插入序列:TTCTCCGAACGTGTCACGT,Siglec-shRNA 插入序列:ACGGAGTACTCAGAGATAAAG。以 2.5×10^5/孔接种 BV2 细胞于 24 孔板中过夜培养,每孔培养总体积 1 mL。按照 Lipofectamine™ 3000(美国 Invitrogen 公司)说明书进行转染,48 h 后通过观察荧光判断转染效率并加入 2 mg/mL 嘌呤霉素筛选培养基,每天更换新鲜的筛选培养基直至所有细胞都带绿色荧光信号,换为常规完全培养基后扩增细胞用于实验。将得到的 NC-shRNA 和 Siglec-shRNA 细胞分为 Control 组、LPS 组、PTL 组和 PTL+LPS 组。

1.4 动物模型建立与干预

C57 *WT* 小鼠(购自陆军军医大学动物实验中心)和 $Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$ 小鼠(购自美国赛业生物公司的 $Siglece^{fl/fl}$ 和 $Cx3cr1^{cre}$ 小鼠交配繁殖获得)均在无病原体的条件下饲养,温度保持在 22~25 ℃,12 h/12 h 的光/暗周期,可自由获取水和食物。所有动物实验按照机构指南进行,并已获得陆军军医大学实验动物伦理委员会批准(AMUWEC20211295)。出生 4 d 的雄性 *WT* 和 $Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$ 小鼠各 9 只,体质量约为 2 g,设置 Control 组、LPS 组和 PTL+LPS 组,每组 3 只。从出生后第 4 天,每天给幼鼠腹腔注射 20 mg/kg PTL(Control 组和 LPS 组注射等体积玉米油),2 h 后腹腔注射 250 μg/kg LPS(Control 组注射等体积生理盐水),第 8 天注射完后 6 h 收取脑组织样本固定于 4%多聚甲醛中,依次用 15%、30%蔗糖梯度脱水后包埋制备冰冻切片。

1.5 RT-qPCR 检测

细胞/组织用 TRIzol 试剂(中国天根公司)提取总 RNA。依照 HiScript Ⅲ RT SuperMix for qPCR 试剂(中国诺唯赞公司)说明书去除基因组 DNA,然后反转录制备 cDNA。根据 *Taq* Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(中国诺唯赞公司)说明书进行定量 PCR。本研究使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达变化。用 GAPDH 基因对结果进行归一化处理。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	产物长度/bp
GAPDH	上游:TGGATTTGGACGCATTGGTC	20
	下游:TTTGCACTGGTACGTGTTGAT	21
iNOS	上游:CAGGGAGAACAGTACATGAACAC	23
	下游:TTGGATACACTGCTACAGGGA	21
IL-1β	上游:TGAAAACACAGAAGTAACGTCCG	23
	下游:CCCAGGAGGAAATTGTAATGGGA	23
IL-6	上游:GGCGGATCGGATGTTGTGAT	20
	下游:GGACCCCAGACAATCGGTTG	20
Siglece	上游:GGAGGGTCAGAACCCCCAA	19
	下游:TGAGATAGGAGAAGTTACAGGGC	23

1.6 Western blot 分析

细胞/组织中加入细胞裂解缓冲液(中国碧云天公司)后在冰上裂解,蛋白质变性后用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(德国 Millipore 公司)上,用 5%脱脂牛奶密封 1 h。与一抗在 4 ℃的低速摇床孵育过夜,用 TBST 洗涤 3 次,10 min /次。与二抗在室温下孵育 2 h,用 TBST 洗 3 次,然后与发光液混合显色。抗体信息见表 2。

表 2 Western blot 抗体信息

抗体名称	品牌	使用浓度
JNK	Zen Bio(中国)	1∶2 000
p-JNK	Zen Bio(中国)	1∶2 000
ERK	Zen Bio(中国)	1∶2 000
p-ERK	Zen Bio(中国)	1∶2 000
P38	Zen Bio(中国)	1∶2 000
p-P38	Zen Bio(中国)	1∶2 000
IκB	Zen Bio(中国)	1∶2 000
p-IκB	Zen Bio(中国)	1∶2 000
GAPDH	Proteintech(中国)	1∶5 000

1.7 免疫荧光

细胞爬片/脑组织切片在含有0.05% TritonX-100和10%山羊血清(中国碧云天公司)的PBS中浸泡封闭1 h后孵育一抗。将一抗兔抗IBA1(1∶100,中国艾方生物公司)、鸡抗GFP(1∶500,英国abcom公司)、山羊抗Siglec-E(1∶200,美国R&D公司)、兔抗p-NF-κB(1∶300,美国CST公司)4 ℃孵育过夜,用DPBS洗涤3次,然后于室温避光孵育二抗2 h,用DAPI(1∶100,中国Solarbio公司)进行核染色。图像采集选择蔡司荧光显微镜。

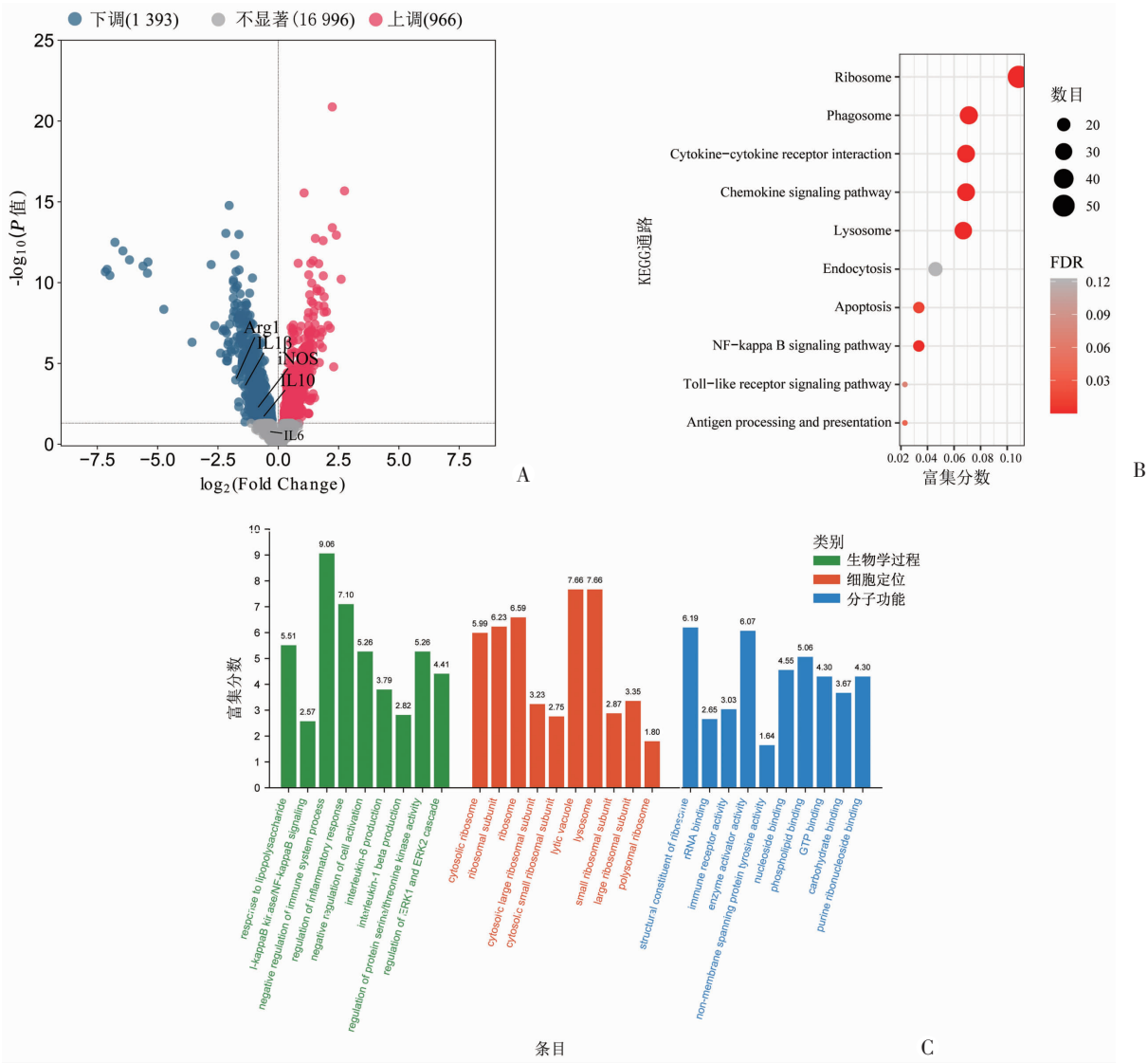
1.8 统计学分析

本研究中生物信息学分析及图像绘制使用R软件(4.1.3版本)。用Image J软件测定并记录Western blot条带灰度值。采用Graghpad Prism 9.0软件进行数据分析及柱状图绘制,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,t 检验用于2组之间的数据分析,单因素方差分析用于比较多组数据间差异。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 下调Siglec-E可能影响小胶质细胞极化

从GEO数据库下载的单细胞测序数据野生型组($n=3$)和敲除组($n=4$)获取小胶质细胞的差异表达基因。火山图展示差异情况,得到上调基因966个,下调基因1 393个,其中包含了*iNOS*、*IL-1β*等与小胶质细胞极化相关的标志基因(图1A)。KEGG通路富集分析提示Siglec-E与NF-κB信号通路、TLR信号通路等相关(图1B)。GO相关注释提示,Siglec-E与IκB/NF-κB通路、IL-1β/IL-6的表达、ERK1/2级联反应等相关,且与核糖体功能关系密切(图1C)。



A:差异基因火山图;B:KEGG通路富集气泡图;C:GO注释图

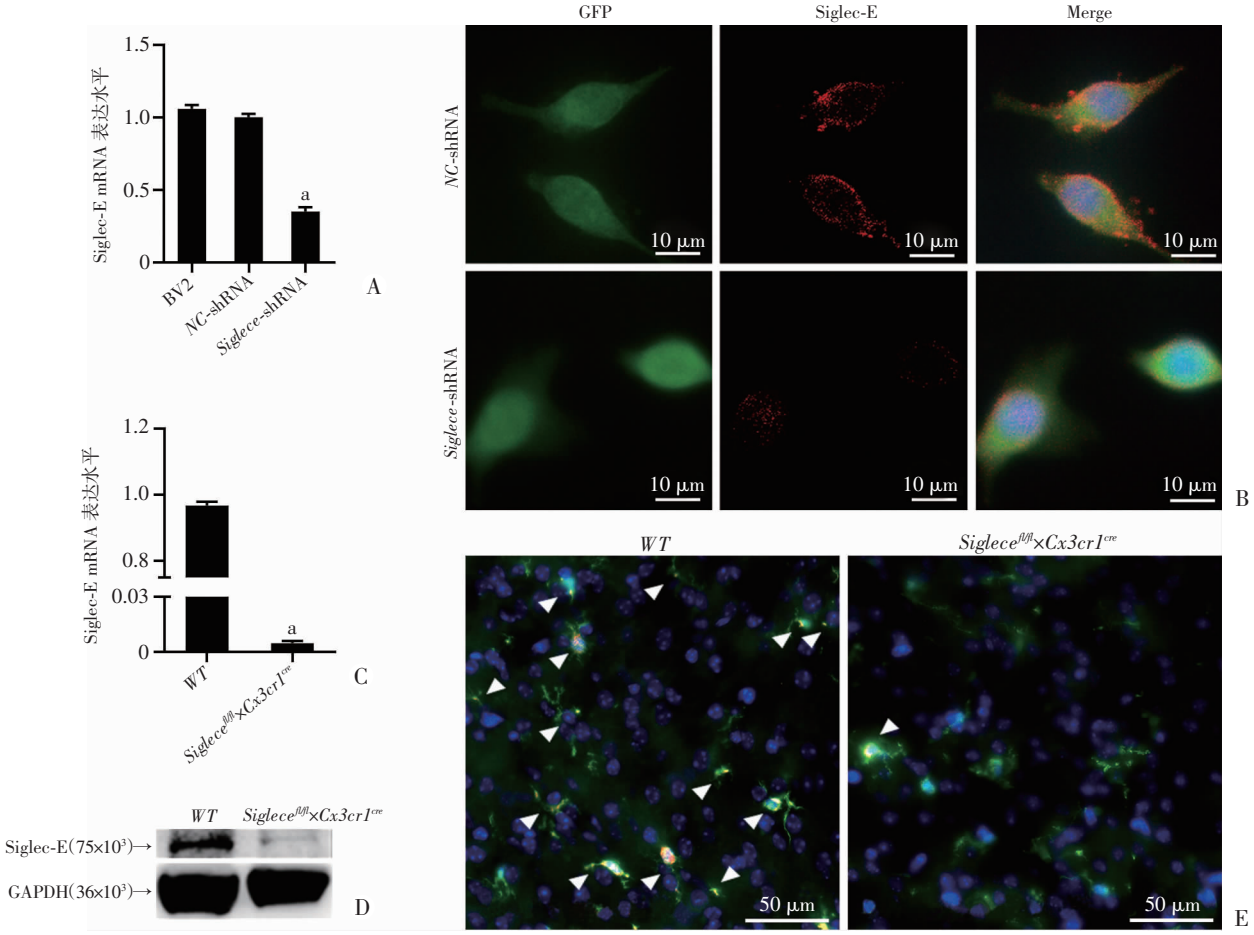
图1 差异表达基因的筛选及富集分析

2.2　敲低/敲除模型中 Siglec-E 表达显著减少

利用 shRNA 技术敲低 BV2 细胞中 Siglec-E 的表达从而构建 Siglec-E 低表达小胶质细胞模型,通过 RT-qPCR 技术检测其 mRNA 表达水平。*NC*-shRNA 组细胞与野生型 BV2 细胞的 Siglec-E 表达无明显差异。与 *NC*-shRNA 组比较,*Siglece*-shRNA 组下降约 70%($P<0.01$,图 2A),免疫荧光结果同样证实 Siglec-E 的表达显著降低(图 2B)。相较于 *WT* 小鼠,$Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$ 小鼠小胶质细胞中 Siglec-E 的 mRNA 表达处于极低水平($P<0.01$,图 2C),且脑组织蛋白中 Siglec-E 表达也明显降低(图 2D),但小鼠整体生长发育无明显异常。冰冻切片免疫荧光显示,$Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$ 小鼠小胶质细胞几乎不表达 Siglec-E(图 2E)。

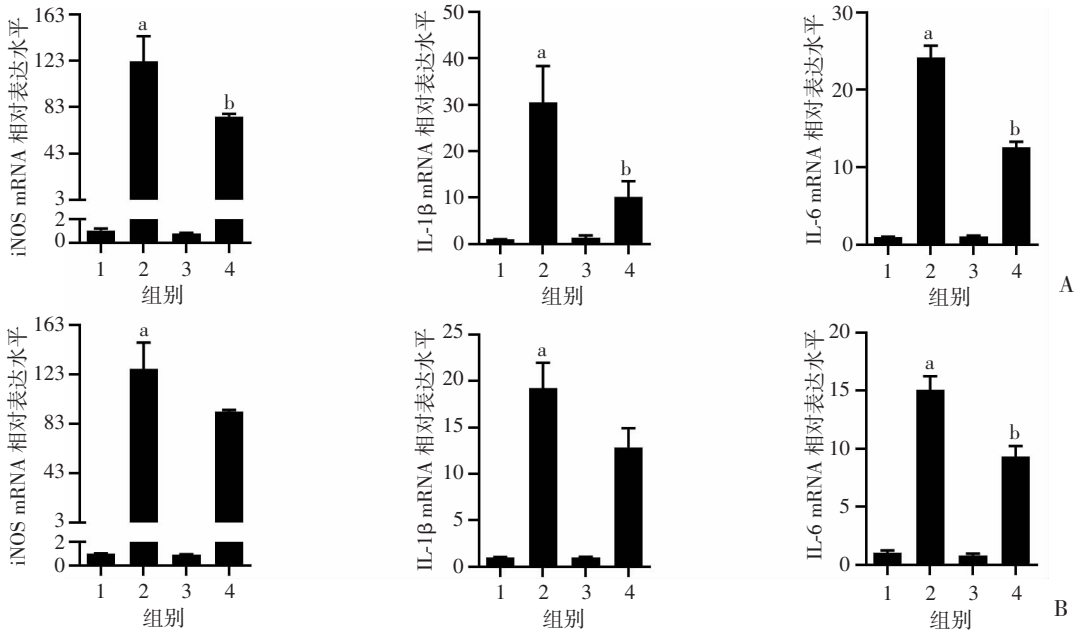
2.3　下调小胶质细胞 Siglec-E 的表达减弱 PTL 对其 M1 型极化的抑制作用

RT-qPCR 结果显示:Control 组中检测到较少的促炎因子 iNOS、IL-1β 和 IL-6。在 LPS 刺激下 M1 型小胶质细胞分泌的 iNOS、IL-1β 和 IL-6 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。单纯加入 PTL 对以上促炎因子的表达无明显影响,而在 PTL 合并 LPS 的条件下,PTL 能显著抑制 LPS 所致小胶质细胞 M1 型极化作用($P<0.05$,图 3A),但对于 Siglec-E 敲低的 BV2 细胞(*Siglece*-shRNA BV2 细胞),尽管 PTL 也能诱导 IL-6 的表达水平显著降低,但是降低程度低于 *NC*-shRNA BV2 细胞。同时,iNOS 和 IL-1β 的表达水平并未显著减少(图 3B)。



A:RT-qPCR 检测 Siglec-E 在细胞株中 mRNA 表达水平　　a:$P<0.01$,与 *NC*-shRNA 组比较;B:免疫荧光检测 Siglec-E 在 *NC*-shRNA 和 *Siglece*-shRNA 细胞中表达情况;C:原代小胶质细胞 Siglec-E 的 mRNA 表达水平 a:$P<0.01$,与 *WT* 组比较;D:小鼠脑组织蛋白 Siglec-E 表达情况;E:小鼠脑组织下丘皮层处小胶质细胞和 Siglec-E 共定位免疫荧光图像　△:示 IBA1 和 Siglec-E 双阳性;红色:Siglec-E;绿色:IBA1;蓝色:DAPI

图 2　shRNA 干扰细胞株/*Siglece* 敲除动物中 Siglec-E 的表达情况($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



1:Control 组;2:LPS 组;3:PTL 组;4:PTL+LPS 组;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 3 各组 *NC*-shRNA 细胞(A)和 *Siglece*-shRNA BV2 细胞(B)的 iNOS、IL-1β 和 IL-6 mRNA 表达水平($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.4 下调 Siglec-E 会减弱 PTL 经 MAPK/NF-κB 通路对 M1 极化抑制作用

LPS 刺激 4 h 后,*NC*-shRNA 和 *Siglece*-shRNA BV2 细胞中 JNK 和 IκB 蛋白的磷酸化水平都明显升高($P<0.01$),但 ERK 和 P38 蛋白磷酸化水平未受到明显影响。给予 PTL 预处理的 *NC*-shRNA 细胞中,经 LPS 诱导的 p-JNK 和 p-IκB 的水平显著降低($P<0.01$);而在 *Siglece*-shRNA BV2 细胞中没有显著差异(图 4A~C)。根据 p-NF-κB 免疫荧光结果,LPS 刺激 1 h 后磷酸化的 NF-κB 聚集于小胶质细胞核内,而在刺激前给予 PTL 的 *NC*-shRNA BV2 细胞中磷酸化 NF-κB 主要存在于细胞质。与之相反,刺激前给予 PTL 处理的 *Siglece*-shRNA BV2 细胞中磷酸化的 NF-κB 仍大量聚集于细胞核内(图 4D)。研究结果表明:PTL 可以通过抑制 MAPK 信号通路中的 JNK 蛋白以及 NF-κB 信号通路中的 IκB 蛋白磷酸化,抑制 NF-κB 核转位,从而减轻 LPS 诱导的小胶质细胞炎性反应,但 Siglec-E 的表达降低会减弱这一作用。

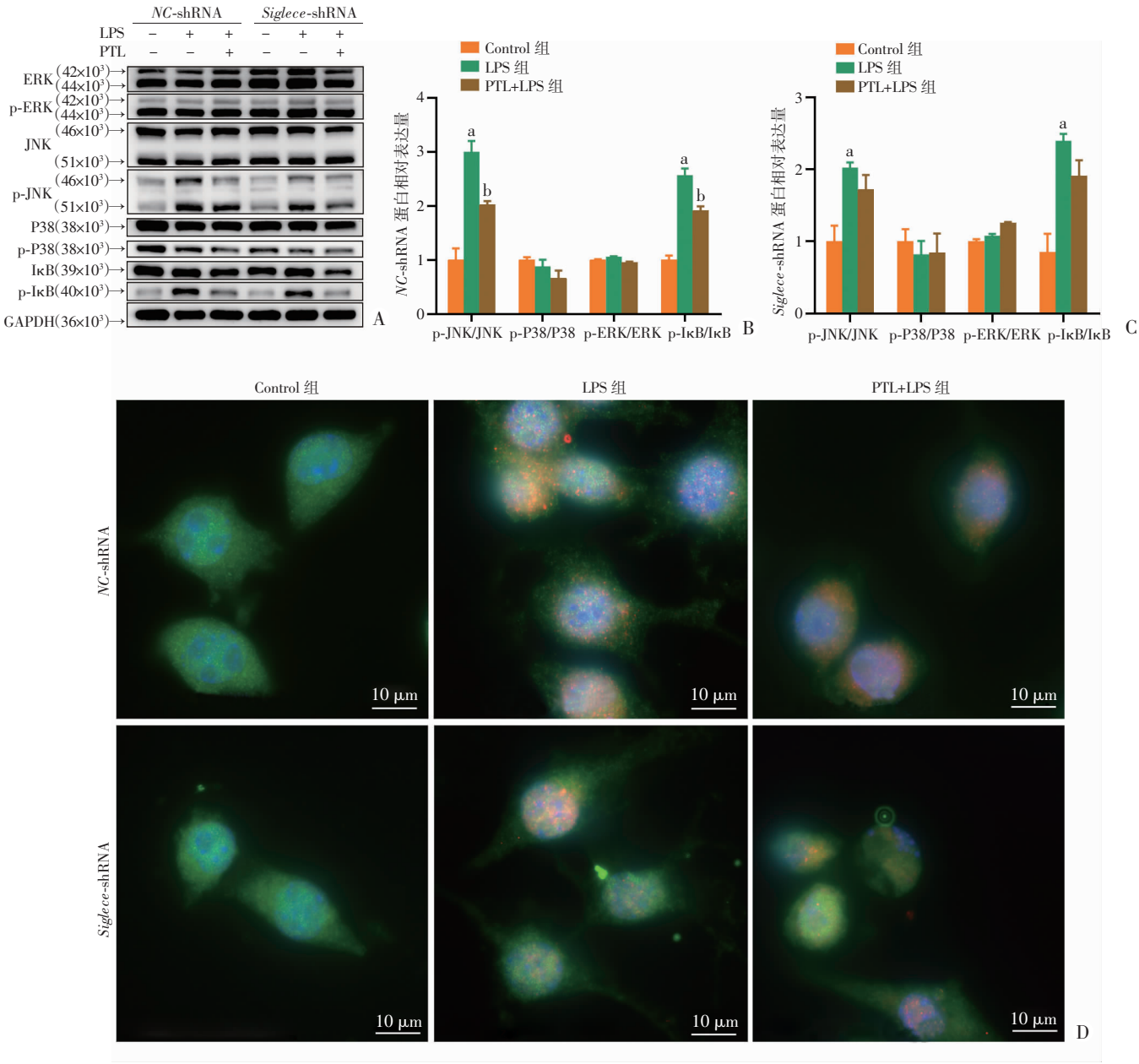
2.5 Siglec-E 缺失导致 PTL 对小胶质细胞 NF-κB 磷酸化抑制作用减弱

WT 和 $Siglece^{fl/fl}\times Cx3cr1^{cre}$ 小鼠从出生第 4~8 天,每天给予 LPS 刺激 2 h 前腹腔注射 PTL 予以保护,第 8 天灌注取脑组织样本制备冰冻切片。脑冰冻切片下丘皮层处 IBA1 和 p-NF-κB 免疫荧光共染结果显示,与 Control 组比较,LPS 组小胶质细胞 p-NF-κB 表达水平显著增加,且主要在细胞核内。而在 PTL+LPS 组中,尽管 p-NF-κB 表达都有所减少,但 *WT* 小鼠明显表达更低,结果提示 Siglec-E 缺失导致 PTL 对小胶质细胞 NF-κB 抑制作用减弱(图 5)。

3 讨论

3.1 Siglec-E 缺失导致 PTL 对小胶质细胞 M1 极化抑制作用减弱

神经炎症逐渐成为众多神经系统疾病发病机制中的关键因素。其显著特点之一是胶质细胞激活,尤其是小胶质细胞激活[14]。激活的小胶质细胞会释放各种破坏性促炎因子,累积之后会导致周围神经元损伤,而神经元的持续损伤及死亡又会进一步激活小胶质细胞,形成恶性循环,导致长期的神经炎症和神经元的进行性丢失[15],从而引发各种神经系统疾病。因此,抑制小胶质细胞激活,或者说抑制其 M1 极化,进而减轻神经炎症,可能成为一种有前景的神经保护的治疗策略。本研究探讨了 Siglec-E 在小胶质细胞极化中的作用及其对 PTL 抗炎效应的影响。通过生物信息学分析发现,Siglec-E 与小胶质细胞极化相关,而后利用 shRNA 干扰技术构建了 Siglec-E 敲低的 BV2 细胞株模型,并通过转基因小鼠交配获得了小胶质细胞特异性 Siglec-E 缺失的动物模型。通过 RT-qPCR 及免疫荧光技术验证了敲除效果,并通过 Western blot 方法研究了 Siglec-E 如何影响 PTL 抑制小胶质细胞 M1 极化



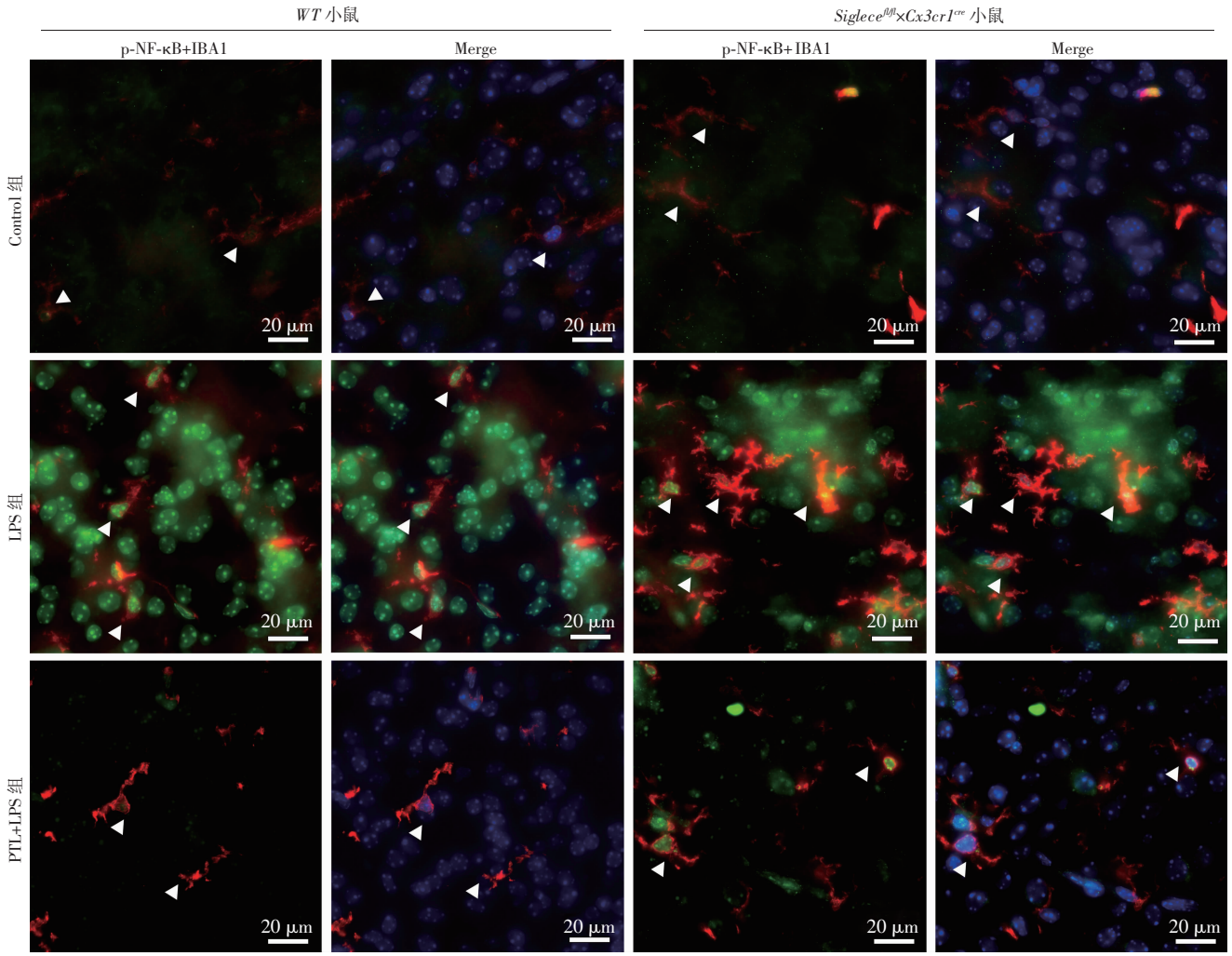
A：Western blot 检测；B～C：半定量分析（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）　a：$P<0.01$，与 Control 组比较；b：$P<0.05$，与 LPS 组比较；D：p-NF-κB 的核转位情况　绿色：GFP；红色：Siglec-E；蓝色：DAPI

图 4　下调 Siglec-E 后相关蛋白表达水平及 NF-κB 的核转位情况

的机制。有研究发现，PTL 显著抑制小胶质细胞促炎细胞因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的释放，并增加 IL-10 水平[14]。本研究也发现，PTL 降低了 BV2 细胞促炎细胞因子 *iNOS*、*IL*-6、*IL*-1*β* 的 mRNA 水平，证实 PTL 具有抑制小胶质细胞经 LPS 激活向 M1 极化的作用，而 siglec E 的缺失在一定程度上减弱了 PTL 的抗炎效应。

3.2　Siglec-E 经 NF-κB 通路影响 PTL 的抗炎作用

本研究发现，尽管敲低细胞株/敲除动物模型的 Siglec-E 表达显著减少，但在正常情况下对细胞和小鼠的生长并无明显影响。其原因其在于 Siglec-E 的作用可能主要是针对小胶质细胞所处微环境的变化而发生。有研究已经证实在没有外界刺激的情况下大脑中的 Siglec-E 呈低表达状态，但在炎症或损伤刺激下，其表达会迅速而强烈地被诱导提高[15]。提示 Siglec-E 的表达与小胶质细胞炎症反应相关。通过分析 GEO 数据库中野生型和敲除型小鼠脑组织单细胞测序数据揭示了 Siglec-E 在小胶质细胞中的潜在作用。GO 分析中，生物学过程（biological process，BP）分析提示，Siglec-E 影响 LPS 的反应、调节炎症反应、IL-1β/IL-6



△:示细胞结构较完整的小胶质细胞;绿色:p-NF-κB;红色:IBA1;蓝色:DAPI

图 5 小鼠下丘皮层处 IBA1 和 p-NF-κB 免疫荧光共染图像

的表达等。KEGG 富集分析表明 Siglec-E 参与 NF-κB 和 Toll 样受体通路等相关信号通路。NF-κB 信号传导通路与小胶质细胞极化之间存在密切关系。正常情况下,NF-κB 以与 IκB 蛋白结合的二聚体形式存在于细胞质中,处于静息状态。当小胶质细胞受到炎症刺激时,IκB 激酶复合物被激活,进而磷酸化 IκB 蛋白,导致 IκB 蛋白被泛素化并降解,从而释放出 NF-κB,使其转位入核,并能够结合到特定的 DNA 序列上,启动相关基因的转录,进而调控炎症因子的产生[16]。激活的 NF-κB 可以诱导 M1 型小胶质细胞释放促炎细胞因子(如 IL-1β、TNF-α 等)、趋化因子、氧自由基和一氧化氮等神经毒性物质,从而加重炎症反应和神经元损伤[17]。PTL 能够抑制 IκB 激酶的活性,从而阻止 IκB 的磷酸化及之后的泛素化降解过程,导致 NF-κB 无法被释放并进入细胞核,进而降低了炎症基因的表达。除此之外,PTL 还能抑制组蛋白去乙酰化酶 1 的活性[18],而这一酶的抑制有助于维持 IκB 蛋白的稳定性,进一步抑制 NF-κB 的活化。另一方面,抑制 NF-κB 信号通路可以促使小胶质细胞从 M1 促炎表型向 M2 抗炎表型极化。M2 型小胶质细胞释放抗炎性细胞因子、神经营养因子,具有抗炎和促进组织修复重塑的作用,有助于清除细胞碎片、保护神经元和促进神经再生[19]。本研究结果显示,下调 Siglec-E 的表达后,PTL 对 NF-κB 通路的抑制作用减弱,证实 Siglec-E 通过 NF-κB 通路影响 PTL 的抗炎作用。

3.3 Siglec-E 经 MAPK 通路影响 PTL 的抗炎作用

MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)信号传导通路在小胶质细胞极化过程中也起着重要作用。在小胶质细胞中,MAPK 信号通路主要涉及 ERK(细胞外信号调节激酶)、JNK(c-Jun 氨基末端激酶)和 p38 MAPK 三个

亚家族,激活的 ERK 信号通路可以促进小胶质细胞的增殖和活化,从而促使小胶质细胞向 M1 促炎表型极化。而 JNK 和 p38 MAPK 信号通路的激活则主要参与小胶质细胞的炎症反应和细胞应激过程[4]。有研究报道 PTL 可以通过 AKT/MAPK/NF-κB 信号通路减少活性氧的产生[15]。研究证实 PTL 可以通过抑制 MEK(MAPK 激酶)的活性阻断 ERK(细胞外信号调节激酶)的激活。ERK 信号通路在小胶质细胞的增殖、迁移等过程中发挥重要作用。JNK 信号通路在小胶质细胞的应激、炎症反应和凋亡等过程中起重要作用,PTL 也可以阻断 JNK 信号通路的激活[20]。本研究的结果也证实 PTL 可以降低 LPS 刺激诱导的磷酸化 JNK 蛋白表达水平,这与报道的内容一致。这些研究为 Siglec-E 经 MAPK 通路影响 PTL 的抗炎作用提供依据。另一方面,Siglec E 作为一种模式识别受体,能够识别并结合特定的聚糖配体,进而调控小胶质细胞活化、增殖、极化和迁移等各种生物学功能[13,21]。既往报道 M1 表型巨噬细胞具有捕获、吞噬功能[22]。有研究显示,Siglec-E 能抑制小胶质细胞对神经元碎片的吞噬,阻止小胶质细胞分泌促炎细胞因子和产生超氧阴离子,而 Siglec-E 基因的敲除则增加了神经碎片的吞噬[12],考虑到 JNK 通路的激活与小胶质细胞的吞噬作用密切相关[23],PTL 可能在一定程度上通过 Siglec-E 影响 JNK 通路抑制小胶质细胞的吞噬功能发挥抗炎作用。

此外,作为聚唾液酸的受体,当小胶质细胞受到 LPS 刺激后,它会通过细胞膜内吞,向高尔基体方向移动与聚唾液酸结合,从而负向调节小胶质细胞的激活[24]。PTL 与 Siglec-E 的分子对接得分为-6.4,实际的结合能力需要验证。本研究的生物信息学分析结果中细胞内组分和分子功能分析均提示 siglec E 和核糖体关系密切。也有研究提示 LPS 促进 Siglec-E 内吞向高尔基体移动[12],核糖体作为承担翻译功能的细胞器,高尔基体作为翻译后蛋白修饰的重要场所,Siglec-E 参与炎症相关蛋白分子的正常翻译与修饰的作用也值得研究。因此,Siglec-E 的表达影响 PTL 抗炎作用的具体机制还需要更深入的研究来揭示。综上所述,本研究证实了 Siglec-E 对炎症反应的重要作用,完善了 PTL 发挥抗炎作用的可能机制,为进一步开发基于 PTL 及 Siglec-E 的抗神经炎症药物提供了实验依据。

参考文献:

[1] STOESSEL M B,MAJEWSKA A K. Little cells of the little brain: microglia in cerebellar development and function[J]. Trends Neurosci,2021,44(7): 564-578. DOI: 10.1016/j.tins.2021.04.001.

[2] WANG L T,LIU Q,ZHANG Y L,*et al*. Establishment of BV2 microglia polarization model and its effect on Toxoplasma gondii proliferation[J]. Res Vet Sci,2019,125: 382-389. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.08.002.

[3] RANSOHOFF R M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? [J]. Nat Neurosci,2016,19: 987-991. DOI: 10.1038/nn.4338.

[4] ZHANG B,WEI Y Z,WANG G Q,*et al*. Targeting MAPK pathways by naringenin modulates microglia M1/M2 polarization in lipopolysaccharide-stimulated cultures[J]. Front Cell Neurosci,2019,12: 531. DOI: 10.3389/fncel.2018.00531.

[5] GUO S R,WANG H,YIN Y F. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases[J]. Front Aging Neurosci,2022,14: 815347. DOI: 10.3389/fnagi.2022.815347.

[6] ZHOU X Q,ZHAO S Y,LIU T T,*et al*. Schisandrol A protects AGEs-induced neuronal cells death by allosterically targeting ATP6V0d1 subunit of V-ATPase[J]. Acta Pharm Sin B,2022,12(10): 3843-3860. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.06.013.

[7] WANG Q Q,HAN B,MAN X,*et al*. Chuanzhitongluo regulates microglia polarization and inflammatory response in acute ischemic stroke[J]. Brain Res Bull,2022,190: 97-104. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2022.09.015.

[8] GUO Y T,DAI W B,ZHENG Y,*et al*. Mechanism and regulation of microglia polarization in intracerebral hemorrhage[J]. Molecules,2022,27(20): 7080. DOI: 10.3390/molecules27207080.

[9] TAO G J,QIAN D F,LI L W,*et al*. Parthenolide promotes the repair of spinal cord injury by modulating M1/M2 polarization *via* the NF-κB and STAT 1/3 signaling pathway[J]. Cell Death Discov,2020,6(1): 97. DOI: 10.1038/s41420-020-00333-8.

[10] MAGNI P,RUSCICA M,DOZIO E,*et al*. Parthenolide inhibits the LPS-induced secretion of IL-6 and TNF-α and NF-κB nuclear translocation in BV-2 microglia[J]. Phytother Res,2012,26(9): 1405-1409. DOI: 10.1002/ptr.3732.

[11] ZHAO Z J,XIANG J Y,LIU L,*et al*. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-κB pathway, ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. Int Immunopharmacol,2012,12(1): 169-174. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.11.007.

[12] CLAUDE J,LINNARTZ-GERLACH B,KUDIN A P,*et al*. Microglial CD33-related Siglec-E inhibits neurotoxicity by

preventing the phagocytosis-associated oxidative burst[J]. J Neurosci,2013,33(46): 18270-18276. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2211-13.2013.

[13] SIDDIQUI S S,MATAR R,MERHEB M,*et al*. Siglecs in brain function and neurological disorders[J]. Cells,2019,8(10): 1125. DOI: 10.3390/cells8101125.

[14] BLOCK M L,ZECCA L,HONG J S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms[J]. Nat Rev Neurosci,2007,8(1): 57-69. DOI: 10.1038/nrn2038.

[15] LI L X,CHEN Y,SLUTER M N,*et al*. Ablation of Siglec-E augments brain inflammation and ischemic injury[J]. J Neuroinflammation,2022,19(1): 191. DOI: 10.1186/s12974-022-02556-1.

[16] TANG J R,MICHAELIS K A,NOZIK-GRAYCK E,*et al*. The NF-κB inhibitory proteins IκBα and IκBβ mediate disparate responses to inflammation in fetal pulmonary endothelial cells[J]. J Immunol,2013,190(6): 2913-2923. DOI: 10.4049/jimmunol.1202670.

[17] TENTILLIER N,ETZERODT A,OLESEN M N,*et al*. Anti-inflammatory modulation of microglia *via* CD163-targeted glucocorticoids protects dopaminergic neurons in the 6-OHDA Parkinson's disease model[J]. J Neurosci,2016,36(36): 9375-9390. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1636-16.2016.

[18] DAI Y J,WEI T F,SHEN Z X,*et al*. Classical HDACs in the regulation of neuroinflammation[J]. Neurochem Int,2021,150: 105182. DOI: 10.1016/j.neuint.2021.105182.

[19] XIE J H,TUO P,ZHANG W,*et al*. Inhibition of the TLR4/NF-κB pathway promotes the polarization of LPS-induced BV2 microglia toward the M2 phenotype[J]. Neuroreport,2023,34(17): 834-844. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001961.

[20] FAN M D,WANG C,ZHAO X Y,*et al*. Parthenolide alleviates microglia-mediated neuroinflammation *via* MAPK/TRIM31/NLRP3 signaling to ameliorate cognitive disorder[J]. Int Immunopharmacol,2023,120: 110287. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110287.

[21] LINNARTZ-GERLACH B,KOPATZ J,NEUMANN H. Siglec functions of microglia[J]. Glycobiology,2014,24(9): 794-799. DOI: 10.1093/glycob/cwu044.

[22] LIU J Y,GENG X F,HOU J X,*et al*. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression[J]. Cancer Cell Int,2021,21(1): 389. DOI: 10.1186/s12935-021-02089-2.

[23] MA X R,LIU H F,ZHU J,*et al*. MiR-185-5p regulates inflammation and phagocytosis through CDC42/JNK pathway in macrophages[J]. Genes,2022,13(3): 468. DOI: 10.3390/genes13030468.

[24] THIESLER H,BEIMDIEK J,HILDEBRANDT H. Polysialic acid and Siglec-E orchestrate negative feedback regulation of microglia activation[J]. Cell Mol Life Sci,2021,78(4): 1637-1653. DOI: 10.1007/s00018-020-03601-z.

(**收稿**:2023-12-21;**修回**:2024-01-05)

(编辑 栗 嘉)