DOI:10.16016/j.2097-0927.202403052

靶向敲低腺苷转运体1通过降低炎症反应对阿尔茨海默病的保护作用研究

张效源[1],马子腾[1],贾云芳[1,2],贺桂琼[1,3] 400016 重庆,重庆医科大学:神经科学研究中心[1],基础医学院生理教研室[2],基础医学院解剖教研室[3]

[摘要] **目的** 通过构建腺苷转运体1(equilibrative nucleotide transporter 1,ENT1)过表达和敲低质粒,观察ENT1对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)的影响及可能的机制。**方法** 利用分子克隆的方式构建ENT1过表达质粒pAAV-ENT1-mCherry和敲低质粒pAAV-ENT1shRNA-ZsGreen。将过表达质粒转染入小鼠神经元N2A细胞,将敲低质粒转染入含瑞士家族人APP695的N2A细胞(N2A-APP)。结合real-time qPCR和Western blot分别检测ENT1 mRNA和蛋白表达及炎症因子的变化,通过CCK-8试剂盒检测对细胞活性的影响。**结果** 测序和real-time qPCR验证结果显示小鼠ENT1过表达和敲低质粒已成功构建。CCK-8检测结果显示,过表达ENT1水平24 h内细胞存活率显著下调($P<0.05$),而当敲低ENT1时细胞存活率显著上调($P<0.01$)。Real-time qPCR检测进一步发现,ENT1过表达可引起细胞内炎症因子IL-1β、TNF-α、C1q-a和C1q-b水平的显著上调($P<0.05$),而敲低ENT1时可逆转N2A-APP细胞内炎症因子水平的上调($P<0.05$)。**结论** 靶向敲低ENT1的蛋白水平可通过降低炎症反应从而减轻AD的病理改变,ENT1可能是AD病理机制的一个潜在靶点。

[关键词] 腺苷转运体1;阿尔茨海默病;炎症因子;细胞活力
[中图法分类号] R394-33;R394.3;R745.7 [文献标志码] A

Knockdown of equilibrative nucleotide transporter 1 protects against Alzheimer's disease by reducing inflammatory response

ZHANG Xiaoyuan[1], MA Ziteng[1], JIA Yunfang[1,2], HE Guiqiong[1,3] [1]Neuroscience Center; Department of Physiology[2], [3]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To study the role and mechanisms of equilibrative nucleotide transporter 1 (ENT1) on Alzheimer's disease (AD) by constructing ENT1 overexpression and knockdown plasmids. **Methods** Molecular cloning was used to construct the ENT1 overexpression (pAAV-ENT1-mCherry) and knockdown (pAAV-ENT1shRNA-ZsGreen) plasmids. The overexpression plasmids and the knockdown plasmids were transfected into N2A cells (mouse Neuro A2 cells) and N2A-APP cells (N2A cells stably expressing human APP695). The expression of ENT1 and inflammatory factors at mRNA and protein levels were detected by real-time qPCR and Western blotting, respectively, and the change in cell viability were measured with CCK-8 assay. **Results** Sequencing and real-time qPCR indicated that ENT1 overexpression and knockdown plasmids were successfully constructed. CCK-8 assay showed that ENT1 overexpression significantly reduced the cell survival rate within 24 h ($P<0.05$), while its knockdown increased the cell survival rate ($P<0.01$). Real-time qPCR displayed that overexpression of ENT1 enhanced the expression levels of inflammatory factors, such as IL-1β, TNF-α, C1q-a and C1q-b in N2A cells ($P<0.05$), while ENT1 knockdown reversed the above changes in inflammatory factors in N2A-APP cells ($P<0.05$). **Conclusion** Knockdown of ENT1 attenuates pathological changes in AD by reducing the inflammatory

[基金项目] 重庆市教育委员会科学技术研究青年项目(KJQN202200454)
[通信作者] 贺桂琼,E-mail:guiqionghe@cqmu.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/)

response. ENT1 may be a potential target in the pathological mechanism of AD.

[**Key words**] equilibrative nucleotide transporter 1; Alzheimer's disease; inflammatory factor; cell viability

Supported by the Scientific and Technological Research Project for Young Scholars of Chongqing Education Commission (KJQN202200454). Corresponding author: HE Guiqiong, E-mail: guiqionghe@cqmu.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年痴呆,是一种以进行性认知功能障碍和记忆损害为特征的慢性神经系统退行性疾病[1]。其起病隐匿,病程长,致残致死率高,是全球面临的重大公共卫生健康问题之一。AD的典型病理特征包括由β样淀粉蛋白(amyloid β peptide, Aβ)聚集导致的胞外老年斑、由tau蛋白过度磷酸化导致的胞内神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)以及神经元的丢失和胶质细胞的活化[2-3]等,其中,Aβ来源于淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经β-分泌酶和γ-分泌酶协同切割产生,被认为在AD发病中起核心作用。然而AD的发病机制还未完全弄清楚,尚缺乏有效防治AD的措施。因此,从新的角度探寻AD发病机制以及筛选AD治疗新靶点迫在眉睫。

腺苷又称腺嘌呤核苷,是能量产生和代谢的重要组成部分,腺苷也是一种神经调节剂[4],调控多种生理功能,包括神经免疫反应[5]、突触传递以及神经元兴奋性[6]、表观遗传学介导的基因调控[7]等等。因此,脑内腺苷水平的改变可能影响多种病理生理功能,包括睡眠和觉醒、认知功能、神经元损伤和神经变性[8-9]等。脑内细胞外腺苷主要由平衡型核苷转运蛋白(equilibrative nucleoside transporters, ENTs)回收并清除[10],ENTs在所有组织中广泛表达,促进腺苷沿着浓度梯度跨膜双向运输。近期有文献报道通过分析ENT1敲除小鼠的蛋白质组学发现,ENT1与神经系统疾病密切相关[11]。但ENT1是否与AD相关以及如何影响AD发生尚不清楚。

因此,本研究拟在构建ENT1过表达和敲低质粒的基础上,以小鼠神经元N2A以及N2A-APP细胞为研究对象,探讨过表达或敲低ENT1对AD的影响及可能机制。本研究将为揭示AD发病的新机制提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 过表达质粒的构建

1.1.1 RNA提取及逆转录cDNA 总RNA从小鼠N2A细胞系提取,每30~50 mg细胞匀浆中加入1 mL TRNzol(天根生化科技公司,DP424),冰浴5 min;每1 mL TRNzol加入200 μL三氯甲烷(川东化工公司,1888),立即剧烈振荡至溶液变成粉色不透明后冰浴3 min,12 000 r/min离心15 min;小心取上清水相,加入等体积的异丙醇(川东化工公司,1219),混匀后冰浴10 min,12 000 r/min离心10 min;弃去上清液,此时底部应有白色沉淀,加入1 mL 75%酒精清洗沉淀,10 000 r/min离心5 min;弃上清液后将沉淀晾干,加入20 μL DEPC水(碧云天公司,R0022),振荡混匀所得即为RNA。根据ABclonal逆转录试剂盒(RK20433)方法进行逆转录得到cDNA。反转录的流程是在50 ℃ 30 min,在95 ℃下15 min。

1.1.2 PCR扩增基因片段 ENT1基因片段扩增引物(ENT1-F,ENT1-R),与ENT1作为融合基因连接的mCherry基因片段扩增引物(mCherry-F,mCherry-R)以及作为对照的mCherry基因片段扩增引物(mCherry-con-F)见表1,Reverse引物与mCherry组相同。

反应体系:5×PS buffer(TaKaRa公司,AL91346A)10 μL,2.5 mmol/L dNTP mix(TaKaRa公司,AL21859A)4 μL,Forward引物2.5 μL,Reverse引物2.5 μL,模板cDNA 500 ng,Prime STAR(TaKaRa公司,R010A)0.5 μL,DEPC水补足至50 μL,达到总体积50 μL。反应条件:94 ℃ 30 s,98 ℃ 10 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 2 min,30个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃保存。用0.6%琼脂糖凝胶电泳鉴定,恒压130 V跑胶30 min,进行紫外显影鉴定。胶回收纯化试剂盒(Sangon biotech公司,B110092-0050)纯化基因片段。

表1 ENT1及mCherry基因扩增引物

名称	序列
ENT1	正义:5′-TGGGATTCGAACATCGATTGATGACAACCAGTCACCAGCCTC-3′
	反义:5′-ACCATAGAGCCTCCACCCCCCACAAGTGCCCTTAACAAG-3′
mCherry	正义:5′-GGGGGTGGAGGCTCTATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3′
	反义:5′-GGATGCCACCCGTAGATCTCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3′
mCherry-con	正义:5′-TGGGATTCGAACATCGATTGATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3′

表 2 Control 与 ENT1-KD oligo 序列

名称	序列
ENT1 oligo	正义:5′-GATCCGGAGACCAAGTTGGATCTCATACTCGAGTATGAGATCCAACTTGGTCTCTTTTTA-3′ 反义:5′- AGCTTAAAAAGAGACCAAGTTGGATCTCATACTCGAGTATGAGATCCAACTTGGTCTCCG-3′
Scramble oligo	正义:5′- GATCCGGTCTGTCTTGTTCGTTATTCGCTCGAGCGAATAACGAACAAGACAGACTTTTTTA-3′ 反义:5′- AGCTTAAAAAAGTCTGTCTTGTTCGTTATTCGCTCGAGCGAATAACGAACAAGACAGACCG-3′

1.1.3 过表达载体酶切 过表达腺相关病毒质粒载体 pAAV vector 进行酶切,酶切体系:pAAV vector 3 μg,EcoR Ⅰ(TaKaRa 公司,1040A) 0.5 μL,XhoⅠ(TaKaRa 公司, 1094A) 0.5 μL, 10×H buffer(TaKaRa 公司,1040A) 4 μL,DEPC 水补足至 40 μL,达到总体积 40 μL。在 37 ℃孵育 3 h 后,用 0.6%琼脂糖凝胶电泳鉴定,恒压 130 V 跑胶 30 min,进行紫外显影鉴定。胶回收纯化试剂盒纯化。

1.1.4 基因片段与载体连接 用无缝克隆试剂盒(碧云天公司,D7010S) 进行 ENT1 片段、mCherry 片段及 pAAV vector 的连接,连接体系:ENT1 基因片段 1 μL,mCherry 基因片段 1 μL,pAAV vector 8 μL,2× mix 10 μL,总体积 20 μL。体系混合均匀后,进行细菌转化:将 2 μL 连接产物加入 50 μL 感受态细菌 stabl3(擎科生物公司,TSC-C06) 中,冰上放置 30 min,42 ℃热激 60 s,立即置于冰上 2 min,加入 300~400 μL LB 液体培养基,37 ℃培养 1 h,离心后的细菌涂于氨苄 LB 固体培养基上,37 ℃ 孵育 14 h,挑取单克隆菌落接种于 15 mL 氨苄 LB 液体培养基中,37 ℃培养 12~14 h。采用质粒提取试剂盒(康为世纪公司,CW2105S) 提取质粒,将阳性克隆测序比对分析。

1.2 敲低质粒的构建

1.2.1 ENT1 敲低(shRNA)以及对照(Scramble) oligo 变性 ENT1 oligo 与 Scramble oligo 见表 2。变性体系:Forward 引物 5 μL, Reverse 引物 5 μL, 补水至 50 μL。变性程序为:95 ℃ 4 min,70 ℃ 10 min,随后慢降至室温备用。

1.2.2 shRNA 载体酶切 酶切体系:pAAV-shRNA-zsGreen 6 μg, *Bam*H Ⅰ (TaKaRa, 1010A) 0.5 μL, Hind Ⅲ (TaKaRa, 1060A) 0.5 μL, 10×K buffer (TaKaRa, 1010A) 5 μL, DEPC 水补足至 50 μL。37 ℃孵育 3 h。0.6%琼脂糖凝胶电泳鉴定,130 V 30 min,进行紫外显影鉴定。胶回收纯化试剂盒纯化。

1.2.3 质粒载体和 shRNA/Scramble 的连接 同样用无缝克隆试剂盒进行 ENT1 shRNA oligo 或 Scramble oligo 与载体 pAAV-shRNA-zsGreen 的连接,连接体系:ENT1 oligo 1 μL,pAAV-U6-zsGreen 8 μL,2×mix 10 μL。总体积 20 μL。50 ℃孵育 15 min。之后进行细菌转化并挑克隆,扩大菌群培养后提取质粒(方法同 1.1.4),将阳性克隆测序比对分析。

1.3 细胞培养

细胞培养依照本实验室方法[12]进行,N2A 细胞系及 N2A-APP 均来自本实验室的细胞库。N2A 细胞系用含有 47% opti-MEM 培养基(源培生物公司,L530KJ)、47%DMEM 培养基、5%胎牛血清以及 1%青霉素/链霉素的混合完全培养基中培养,在含有 5% CO_2 以及 37 ℃恒温培养箱孵育培养;N2A-APP 细胞系用含有 47%opti-MEM 培养基,47%DMEM 培养基,5%胎牛血清,1%青霉素/链霉素以及 0.1%遗传霉素 G418(碧云天公司,ST081)的完全培养基中培养,在含有 5%CO_2 以及 37 ℃恒温培养箱孵育培养。

1.4 质粒转染

待细胞铺满 50%~60%时按照 lipo3000 试剂盒(赛默飞公司,L3000-015) 方法对 HEK293 以及 N2A 细胞进行转染 pAAV-mCherry (Control)、pAAV-ENT1-mCherry 质粒 (ENT1 OE) 以及对 N2A-APP 细胞进行转染 pAAV-Scramble-zsGreen (Scramble)、pAAV- ENT1 shRNA-zsGreen (ENT1 KD)。

1.5 Real-time qPCR 检测

细胞转染 48 h 后,用胰酶(赛默飞公司,12604021) 吹打下来后加入 1×PBS 重悬细胞沉淀,RNA 提取与逆转录方法同上 1.1.1,按照 Abclonal qPCR 试剂盒(RK21203) 的方法,取 2 μL cDNA 进行 qPCR。qPCR 引物见表 3。qPCR 程序为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s→58 ℃ 30 s 40 循环,65~95 ℃ 熔解曲线。通过比较循环阈值并以 GAPDH 作为内参、将对照组归一化计算从而检测各组中以下基因的 mRNA 的相对表达水平。

表 3 Real-time qPCR 引物序列

名称	序列	扩增产物大小/bp
m-ENT1	正义:5′-AGAGTATCTGTGTCCCGGCT-3′ 反义:5′-AAGAAACAGGCCACGGGAAT-3′	145
hm-GAPDH	正义:5′-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3′ 反义:5′-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3′	87
m-TNF-α	正义:5′-TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC-3′ 反义:5′-GAGGCCATTTGGGAACTTCT-3′	117
m-IL-1β	正义:5′-TGTAATGAAAGACGGCACACC-3′ 反义:5′-TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG-3′	68
m-C1q-a	正义:5′-GAGCACCCAACGGGAAGGAT-3′ 反义:5′-GGATACCAGTCCGGATGCCA-3′	111
m-C1q-b	正义:5′-CACAGAACACCAGGATTCCATAC-3′ 反义:5′-GGAGAAAACCTAGAAGCAGCAGT-3′	109
m-C1q-c	正义:5′-GCGATGAGGTGTGGCTATCA-3′ 反义:5′-GGAAGAGGTCTGAGTGAGGATG-3′	174

1.6 Western blot 检测

细胞转染 48 h 后,用胰酶(赛默飞,12604021)吹打下来后加入 1×PBS 重悬细胞沉淀,在细胞沉淀中加入 RIPA 裂解液[碧云天,P0013B,含 1%蛋白酶抑制剂 PMSF(Biosharp,BM507A-1)及 1%磷酸酶抑制剂(碧云天,P1045-2)]裂解,提取总蛋白,取 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,半干转法转至 NC 膜,分别加入兔抗 ENT1(Affinity,DF8542;1∶1 000)、兔抗 APP(Abcam,ab32136;1∶5 000),小鼠抗 GAPDH(Proteintech,60004-1-Ig,1∶5 000),4℃过夜,1×TBST 漂洗后加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(Proteintech,SA00001-2;1∶5 000)、山羊抗小鼠 IgG 二抗(Proteintech,SA00001-1;1∶5 000)室温 1 h,ECL 试剂盒(四正柏生物,4AW011-500)显色。将条带的灰度值与 GAPDH 的灰度值相比且将对照组归一化计算从而表征各蛋白的相对表达水平。

1.7 CCK-8 检测

传代细胞进行铺板,按照 96 孔板需要 1×10^4 个细胞进行铺板。待细胞铺满近 50%开始转染,转染方法同 1.4。分别取转染后 0、24、48、72、96 h 的细胞加入 CCK-8 液体(Biosharp,BS350B)混匀,继续孵育 30 min 后测定其 *OD*(460)值。细胞活力=[*OD*(转染)−*OD*(空白)]/[*OD*(Naïve)−*OD*(空白)],其中空白组为只含有培养基和 CCK-8 溶液不含有细胞的组,Naïve 为含有细胞、培养基和 CCK8 溶液,没有进行转染处理的组。

1.8 统计学分析

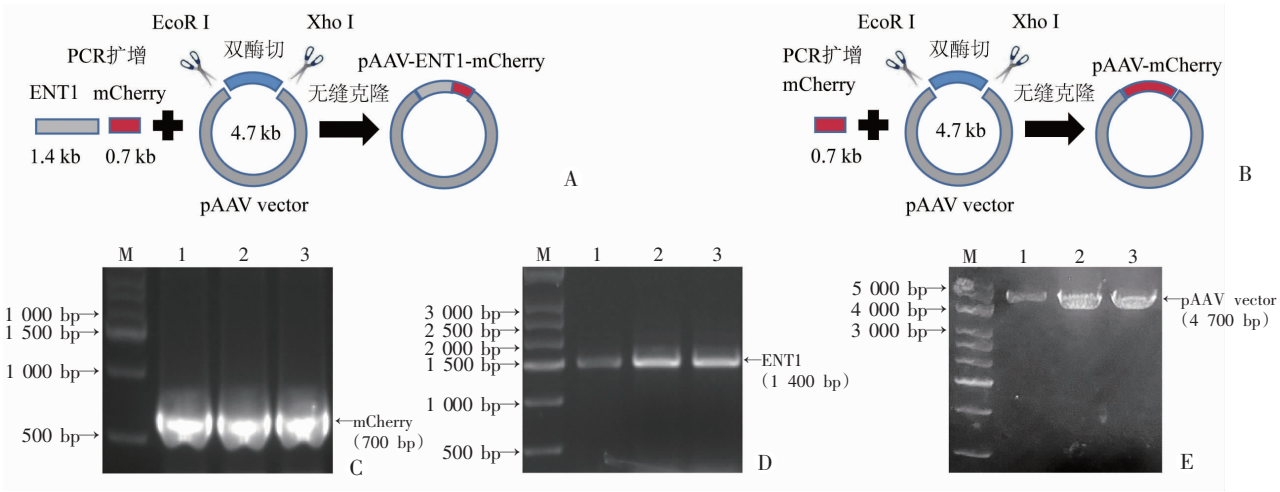
应用 GraphPad Prism 10 统计软件进行分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 ENT1 过表达质粒

构建模式图见图 1A、B。为了验证是否构建成功,应用 PCR 成功扩增出 ENT1 基因片段,进行了 PCR 产物电泳鉴定,结果显示,基因片段条带单一明亮,大小约为 1 500 bp,与 ENT1 基因大小一致(图 1)。使用 PCR 扩增 mCherry 基因片段,PCR 产物电泳鉴定结果显示,基因片段条带单一明亮,大小约为 700 bp,与 mCherry 基因大小一致(图 1)。通过电泳鉴定 pAAV vector 酶切后的产物,结果显示在 4 700 bp 位置有单一明亮的条带,符合载体大小,即为所需要的载体(图 1),将此条带进行回收纯化使用。将纯化好的基因片段 ENT1 和 mCherry 用无缝克隆的方式连接入切开的载体 pAAV vector,测序结果显示与 NCBI 数据库 ENT1 基因序列完全相同(图 1),将所得质粒命名为 pAAV-ENT1-mCherry 即为 ENT1 过表达质粒。

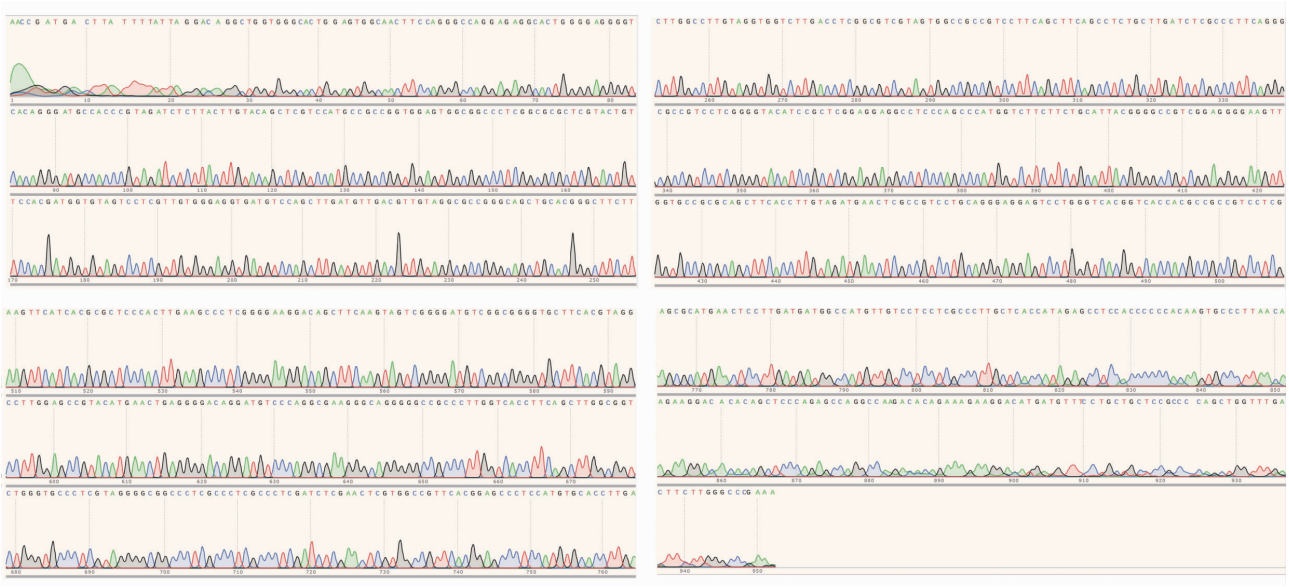
在小鼠 N2A 中验证所构建的过表达质粒是否上调 ENT1 的水平。将 ENT1 过表达质粒和对照质粒转染入 N2A 细胞系中 48 h 后,观察到两组均表达红色荧光(图 2A)。通过 real-time qPCR 检测 ENT1 的 mRNA 水平(图 2B),结果显示,过表达组 ENT1 的 mRNA 水平显著高于对照组($P<0.000\ 1$)。使用 Western blot 方法检测蛋白水平(图 2C、D),结果显示,过表达组 ENT1 的蛋白表达水平也显著高于对照组($P<0.01$)。



A:过表达质粒构建模式;B:过表达对照质粒构建模式;C:琼脂糖凝胶检测 mCherry 扩增条带,大小约 700 bp;D:琼脂糖凝胶检测 ENT1 扩增条带,大小约 1.4 kb;E:琼脂糖凝胶检测 pAAV vector 载体酶切条带,大小约 4.7 kb,M:标准;1~3:基因片段

图 1 ENT1 过表达质粒的构建

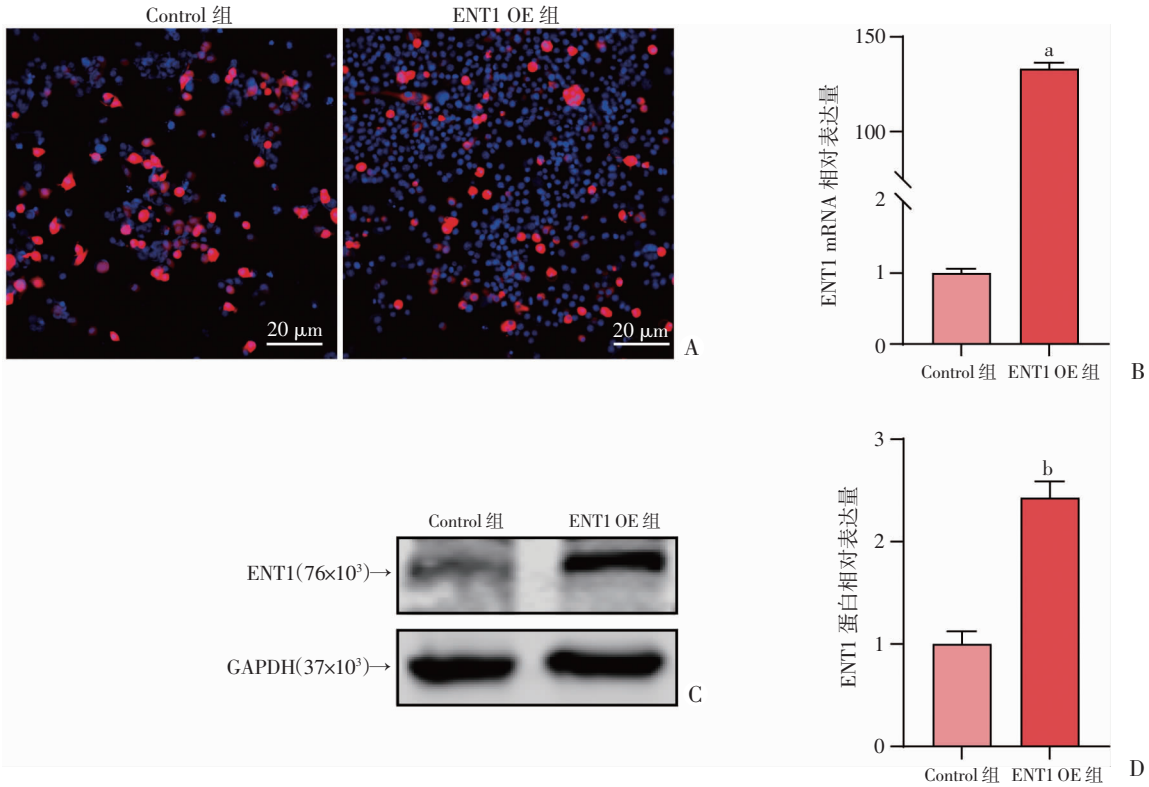
(图 1F 续下页)



F

F:过表达质粒测序结果,4 幅图为测序 1~1 000 bp 的峰值图

续图 1 ENT1 过表达质粒的构建



A:在荧光显微镜下观察两组细胞红色荧光蛋白表达情况;B:qPCR 检测两组 ENT1 mRNA 水平,$n=3$,a:$P<0.000\ 1$,与 Control 组比较;C、D:Western blot 检测 ENT1 蛋白水平,$n=3$,b:$P<0.01$,与 Control 组比较

图 2 ENT1 过表达质粒的验证

2.2 成功构建 ENT1 敲低质粒

构建模式图见图 3A、B。为了验证 ENT1 敲低质粒是否下调 ENT1 的水平,将 ENT1 敲低质粒(ENT1 KD)和对照质粒(Scramble)转染入 N2A-APP 细胞系中。结果显示,在转染 48 h 后,对照和过表达组均表达绿色荧光(图 3C),说明构建的敲低和对照质粒均成

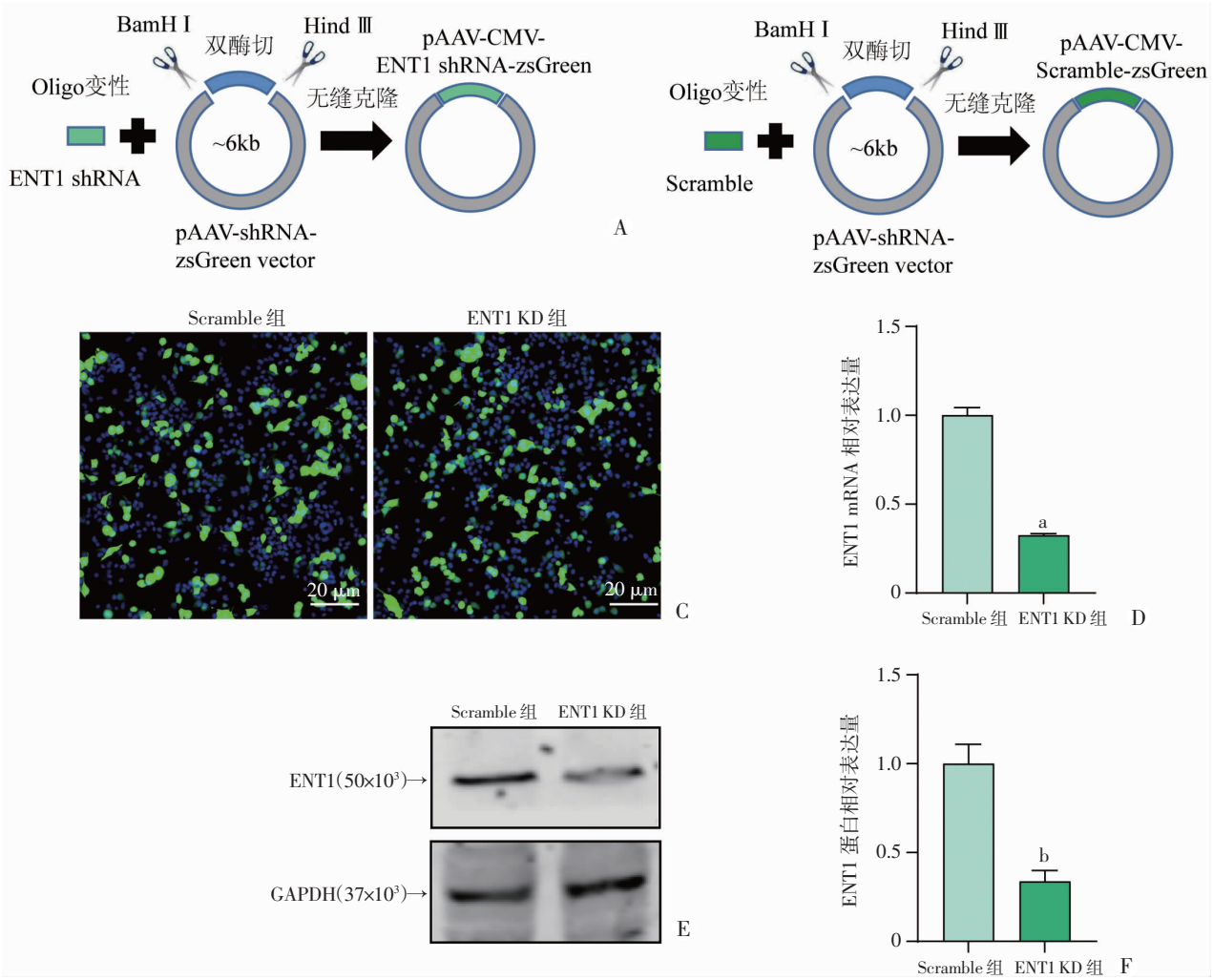
功转染入细胞系中。通过 Real-time qPCR 检测 ENT1 的 mRNA 水平(图 3D),结果显示,敲低组 ENT1 的 mRNA 水平显著低于对照组($P<0.000\ 1$);Western blot 检测 ENT1 的蛋白水平,结果显示敲低组 ENT1 的蛋白水平显著低于对照组($P<0.01$,图 3E、F)。

2.3 AD 模型细胞中 ENT1 表达上升

为了检测 ENT1 在 AD 状态下的表达变化,利用 Real-time qPCR 以及 Western blot 检测 N2A 以及 N2A-APP 细胞系中 APP 的表达(图 4A~C),结果显示,N2A-APP 组中 APP 的 RNA 及蛋白水平均显著高于 N2A 组($P<0.000\ 1$),提示该细胞系可用来模拟 AD 细胞。其次,利用 Real-time qPCR 以及 Western blot 检测 ENT1 的表达(图 4D~F),结果显示,N2A-APP 组中 ENT1 的 RNA 及蛋白水平均显著高于 N2A 组($P<0.01$)。

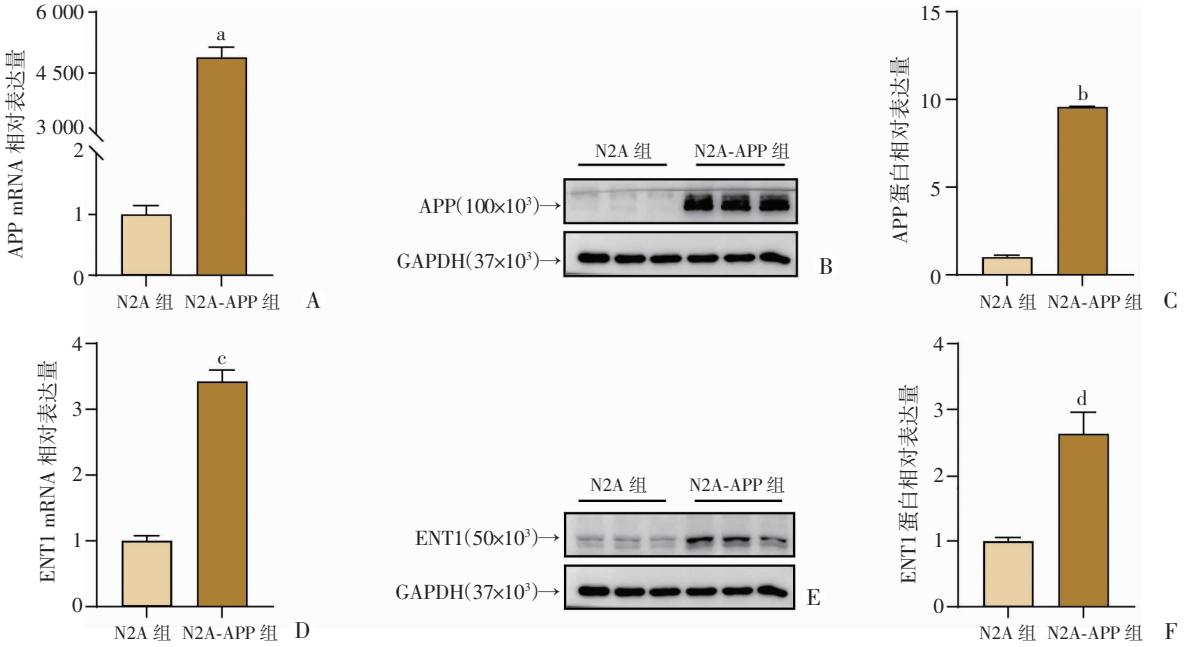
2.4 ENT1 过表达显著降低细胞活力,增加 Aβ 的表达并加重炎症反应

上述实验发现 ENT1 在 AD 细胞中表达升高,本实验通过在 N2A 细胞中过表达 ENT1 以观察 ENT1 对正常细胞的影响。在质粒转染后的 0、24、48、72、96 h 进行 CCK-8 细胞活力测定。结果显示,与对照组相比,过表达 ENT1 在 24 h 显著降低细胞活力(图 5A,$P<0.05$)。且 Western blot 检测结果发现,过表达 ENT1 后显著增加细胞内 Aβ 蛋白水平(图 5B、C,$P<0.000\ 1$)。为了进一步探究过表达 ENT1 对细胞损伤的原因,使用 Real-Time qPCR 检测了一系列炎症因子包括 TNF-α、IL-1β、C1q-a、C1q-b、C1q-c mRNA 水平。结果显示,与对照组相比,过表达组的炎症因子 TNF-α($P<0.05$)、IL-1β($P<0.05$)、C1q-a($P<0.05$)、C1q-b($P<0.05$)、C1q-c($P<0.01$)均显著上升(图 5D~H)。



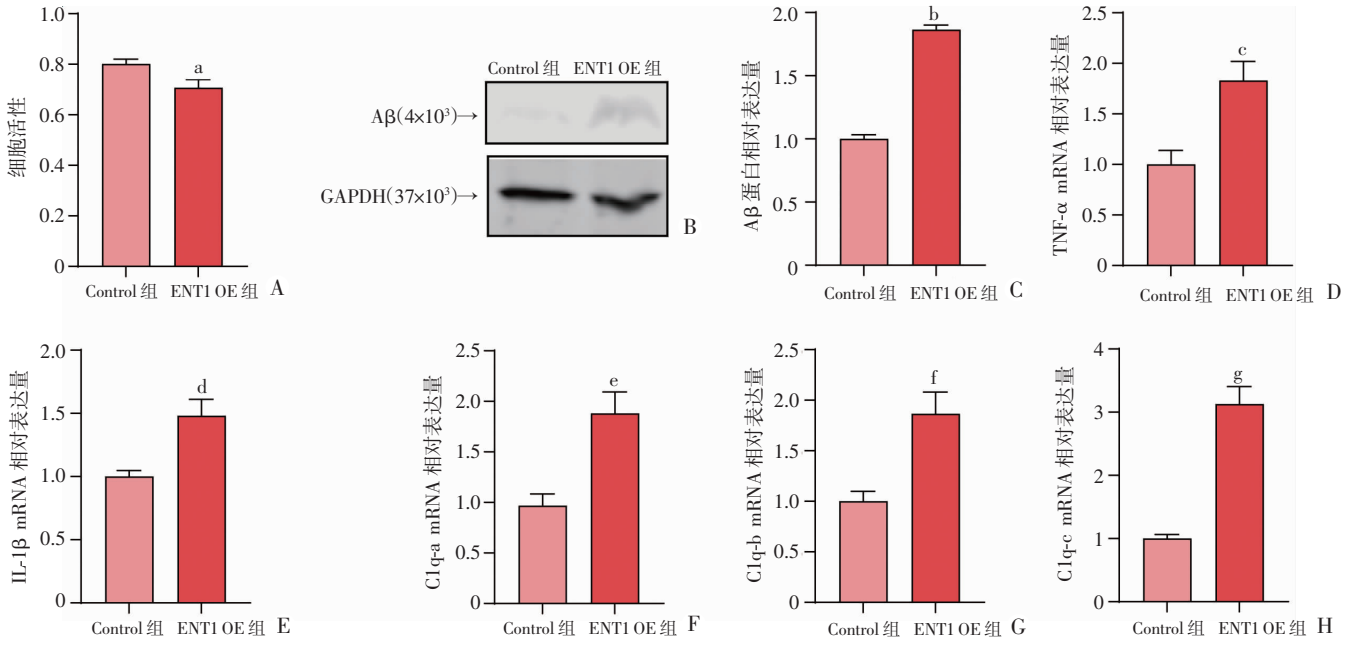
A:ENT1 shRNA 质粒构建模式;B:对照 shRNA 质粒构建模式;C:在荧光显微镜下观察两组细胞红色荧光蛋白表达情况;D:qPCR 检测 ENT1 的 mRNA 水平,$n=3$,a:$P<0.000\ 1$,与 Scramble 组比较;E、F:Western blot 检测 ENT1 蛋白水平,$n=3$,b:$P<0.01$,与 Scramble 组比较

图 3 ENT1 敲低质粒的构建与验证



A:qPCR 检测 APP 的 mRNA 水平,$n=3$,a:$P<0.000\ 1$,与 N2A 组比较;B、C:Western blot 检测 APP 蛋白水平,$n=3$,b:$P<0.000\ 1$,与 N2A 组比较;D:qPCR 检测 ENT1 的 mRNA 水平,$n=3$,c:$P<0.001$,与 N2A 组比较;E、F:Western blot 检测 ENT1 蛋白水平,$n=3$,d:$P<0.01$,与 N2A 组比较

图 4 ENT1 在正常组以及 AD 模型细胞组的表达



A:CCK-8 试剂盒检测细胞活力 $n=5$,a:$P<0.05$,与 Control 组比较;B、C:Western blot 检测 Aβ 表达变化 $n=3$,b:$P<0.000\ 1$,与 Control 组比较;D~H: qPCR 检测 TNF-α($n=3$,c:$P<0.05$,与 Control 组比较)、IL-1β($n=4$,d:$P<0.05$,与 Control 组比较)、C1q-a($n=3$,e:$P<0.05$,与 Control 组比较)、C1q-b($n=3$,f:$P<0.05$,与 Control 组比较)、C1q-c($n=3$,g:$P<0.01$,与 Control 组比较)的 mRNA 水平

图 5 过表达 ENT1 对细胞活力以及炎症反应的影响

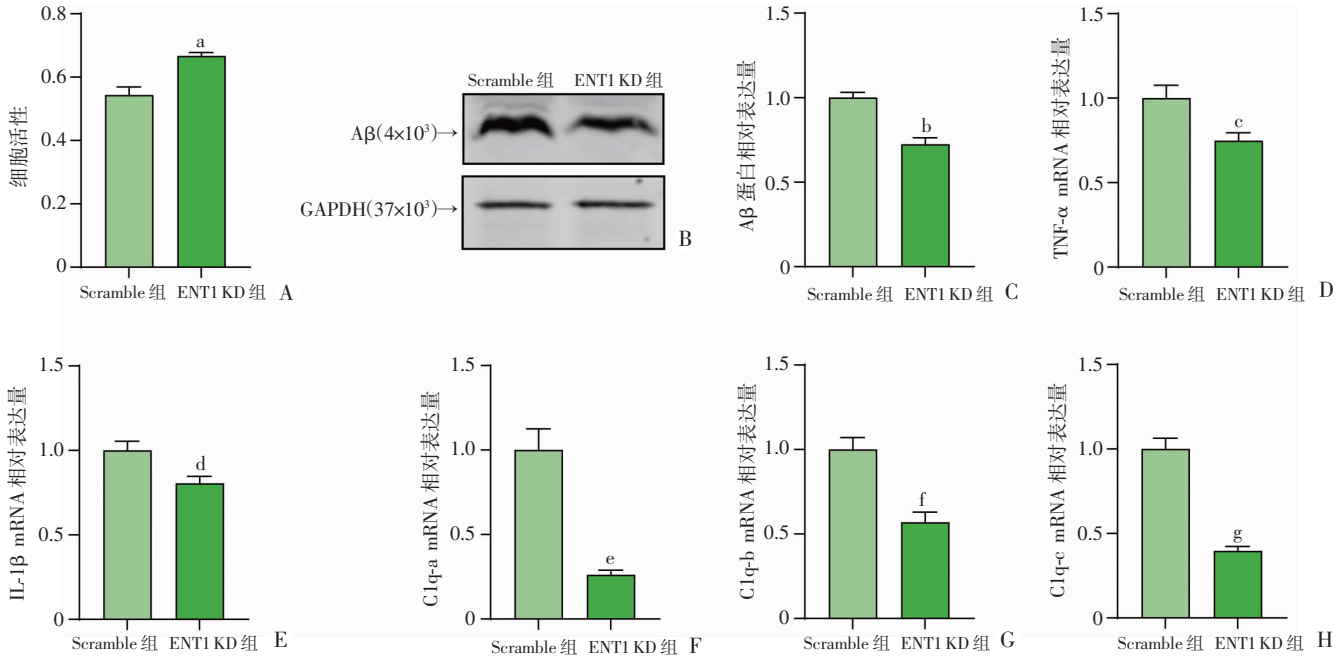
2.5　下调 ENT1 显著增加 AD 模型细胞的细胞活力,并减轻炎症反应

以上实验结果提示 AD 细胞中 ENT1 的表达增加可能对细胞有害,本实验通过敲低 AD 模型细胞 N2A-APP 中的 ENT1 水平,观察是否对 AD 发挥保护作用。在敲低质粒转染后的 0、24、48、72 和 96 h 进行 CCK-8 细胞活力测定,结果显示,与对照组相比,下调 ENT1 在 72 h 显著增加细胞活力(图 6A, $P<0.01$)。同样,Western blot 结果显示,敲低 ENT1 后大大减少细胞内 Aβ 水平(图 6B、C, $P<0.01$)。进一步使用 real-time qPCR 检测炎症因子包括 TNF-α、IL-1β、C1q-a、C1q-b 和 C1q-c 的 mRNA 水平。结果显示,与对照组相比,ENT1 敲低组的炎症因子 TNF-α ($P<0.05$)、IL-1β ($P<0.05$)、C1q-a ($P<0.01$)、C1q-b ($P<0.001$) 和 C1q-c ($P<0.001$) mRNA 均显著降低(图 6D~H)。

3　讨论

随着世界人口老龄化的加剧,AD 发病率逐年上升。流行病学调查显示[13-14],全球 AD 患者人数已高达 6 千万,预计到 2050 年将增加至 1.3 亿,并且 AD 已上升为全球第 5 大死因。由于确切的发病机制目前尚不十分清楚,影响因素众多,截至目前都未找到有效的防治措施。因此,寻找其新的作用靶点迫在眉睫。

已有研究表明,脑内腺苷水平失衡与 AD 的病理发生密切相关[15],腺苷作为人体内的核苷,在很多生理功能中发挥着很大的作用。但由于其属于亲水性大分子,不能简单地透过生物膜,所以其跨膜运输需要依赖特殊的转运蛋白[16],即为腺苷转运蛋白。该类蛋白广泛存在于生物体中,通过跨膜转运腺苷从而参与调节一系列重要生理功能。腺苷转运体主要分为两个家族:ENTs 以及浓度型核苷转运体(concentrative nucleoside transporters, CNTs)。其中 ENTs 存在于大多数真核生物细胞中[17],作为腺苷转运蛋白的一个重要的分支扮演着很重要的角色。根据转运方式的不同,ENTs 被划分为 4 类成员[18]:ENT1-4。其中 ENT1 和 ENT2 是最有特征的腺苷转运蛋白,主要在神经系统表达,位于细胞膜上。ENT3 和 ENT4 都是 pH 敏感的腺苷转运蛋白,在酸性环境中发挥作用,在酸中毒条件下调节腺苷跨膜运输,主要在肿瘤领域研究比较全面[19]。其中 ENT1 是与腺苷的亲和力最强的亚型,也是在大脑中表达最广泛的亚型,ENT1 在神经系统中主要表达于神经元,胶质细胞中也有少量表达[20]。研究指出,ENT1 在脑内表达增多会过多地将腺苷转运到胞内从而破坏细胞的腺苷稳态,随后增加细胞 AMP 的水平,改变 AMP/ATP 的比率,最终激活海马神经元中的AMPK[21]。目前关于ENT1的研究主要集中于抗病



A:CCK-8 试剂盒检测细胞活力,$n=5$,a:$P<0.01$,与 Scramble 组比较;B、C:Western blot 检测 Aβ 表达变化,$n=3$,b:$P<0.01$,与 Scramble 组比较;D~H:qPCR 检测 TNF-α ($n=4$,c:$P<0.05$,与 Scramble 组比较)、IL-1β ($n=4$,d:$P<0.05$,与 Scramble 组比较)、C1q-a ($n=3$,e:$P<0.01$,与 Scramble 组比较)、C1q-b ($n=6$,f:$P<0.001$,与 Scramble 组比较)、C1q-c ($n=3$,g:$P<0.001$,与 Scramble 组比较) 的 mRNA 水平

图 6　敲低 ENT1 对细胞存活率以及炎症反应的影响

毒以及抗肿瘤药物领域,在神经科学领域的研究主要集中于神经精神类疾病,比如睡眠障碍、焦虑以及酒精成瘾[22]等等。本研究主要探讨 ENT1 表达变化与 AD 是否相关。

本研究使用的细胞为 N2A 细胞系以及转染入瑞士家族人 APP695 的 N2A-APP 细胞。N2A 细胞为贴壁细胞,形态呈圆梭形;而 N2A-APP 细胞形态则较 N2A 更圆,贴壁水平下降。通过核酸和蛋白水平检测发现,AD 模型细胞中 ENT1 的基因和蛋白水平均显著上升,高于正常细胞的 2~3 倍,且与 APP 表达呈显著正相关。那么,AD 细胞中上调的 ENT1 究竟发挥有利还是有害作用呢? 调控 ENT1 表达水平是否可影响 AD 的病理改变? 为回答该问题,本课题采用无缝克隆的方法构建了带荧光的 ENT1 过表达和敲低质粒:将腺相关病毒质粒载体 pAAV vector 与扩增好的 ENT1 片段与 mCherry 片段进行连接构建 ENT1 过表达质粒;将带绿色荧光蛋白(zsGreen)的腺相关病毒的 shRNA 质粒载体 pAAV-shRNA-zsGreen 与针对小鼠 ENT1 基因的特定 shRNA oligo 或乱序排列设计的 Scramble oligo 进行连接构建 ENT1 敲低质粒。无缝克隆的方式连接成功率高,不易连接出错,且 AAV 载体构建的质粒经过包装成病毒后注射小鼠体内的效果更好,因此本课题选用无缝克隆的方式构建腺相关病毒载体的 2 种质粒,为接下来更深入的研究奠定了工具上的基础。研究结果显示,4 组细胞均有荧光蛋白表达,且荧光强度无明显差别;过表达质粒在 RNA 水平升高 100 倍,蛋白水平增高 2 倍;敲低质粒在 RNA 水平降低了 70%,蛋白水平降低 50%左右,提示本实验的 2 组质粒构建成功且能稳定改变 ENT1 的表达水平。

本实验采用 CCK-8 检测 ENT1 表达变化对神经细胞的影响。CCK-8 实验的原理在于其可被活细胞产生的脱氢酶还原生成黄色的甲臜,而生成的甲臜数量与活细胞的数量成正比,因此,利用分光光度计测量反应后的吸光度就可以反映出活细胞数量,进而表征待测细胞的活力[23]。研究发现,当正常细胞过表达 ENT1 后的 24 h 神经细胞活力下降出现具有统计学意义的改变,细胞内出现了炎症因子的增加。结合 AD 中 ENT1 显著上调的实验结果,继而发现过表达 ENT1 后 AD 的相关病理指标之一的 Aβ 的表达显著增加,提示 ENT1 的异常增加可能促进 AD 的病理改变。那么,通过敲低 AD 细胞的 ENT1 是否发挥保护作用? 本实验将成功构建的病毒装载 ENT1 敲低质粒转染入 AD 模型 N2A-APP 细胞,实验发现在 N2A-APP 细胞敲低 ENT1 后 72 h 神经细胞活力上升并具有统计学意义,相应地,AD 细胞的炎性改变被显著抑制。同时,Aβ 的表达也有所降低。以上研究结果提示,ENT1 极可能是 AD 病理机制的重要调控因子,靶向敲低 ENT1 的表达有望对 AD 发挥保护作用。本结果与近期 CHANG 等[21]的实验发现一致,该研究构建了 Tau 突变小鼠,应用 ENT1 抑制剂 J4 处理小鼠后,观察到 J4 可以显著改善 Tau 突变诱导的小鼠认知障碍及脑损害。

近年来,大量研究都已证实,神经炎症也是 AD 病程发展中最常见的机制之一[24]。大脑中的细胞(包括神经元以及胶质细胞)和一些蛋白质(包括细胞因子以及趋化因子)都会引起神经炎症,破坏神经元周围的环境,导致神经元损伤,最终使神经元凋亡,导致 AD 的发生[25]。对大脑和整个生物体产生促炎作用最重要的物质包括:细胞因子(TNF-α、IL-1β 等),趋化因子,补体成分(C1q 等),转录因子等[26-27]。有研究指出[28-29],不仅只有中枢神经系统中的胶质细胞会产生炎症因子,神经元受到刺激时同样也会与胶质细胞一样产生上述炎症因子,进而产生神经炎症反应,最终导致神经元受损,细胞活性发生改变等。例如,有研究报道[30],小鼠神经元受到缺氧缺血刺激后导致 CCAAT/增强子结合蛋白 β(C/EBPβ)表达升高随即诱导其基因靶点 TNF-α、IL-1β 等的表达释放从而进行一系列下游炎症反应。因此当中枢神经系统受到刺激时(例如缺氧缺血、Aβ 的聚集等),TNF-α、IL-1β 以及 ROS 等细胞因子或促炎介质被释放,通过一系列反应使神经元受损,进一步使小胶质细胞激活引发神经炎症的恶性循环[31-32],并且 TNF-α 以及 IL-1β 还会影响血脑屏障通透性,并导致次级反应的激活[33]。人类补体系统是先天和获得性体液免疫的效应器,补体被激活所产生的蛋白分解片段可被白细胞和内皮细胞靶向,导致炎症部位的免疫细胞外渗和迁移[34]。在功能上,补体系统可以分为 2 个主要部分:酶的级联途径和裂解途径;酶的级联途径中最典型的方式为经典途径:始于 C1 复合体的激活,C1 是由传感分子 C1q 以及由酶原 C1r、C1s 形成的异二聚体所组成的[35],C1q 的主要靶点是一类可以和 IgG1、IgG2、IgG3 以及 IgM 结合的抗原[36],即使在没有病原体特异性抗体的情况下,C1q 也可以通过直接与病原体表面结合来启动一线防御。同时 C1q 也在中枢神经系统中局部产生,并可在调节小胶质细胞和突触形成中发挥作用。综上所述,脑内神经元受到刺激后产生的炎性因子可以进一步使神经元受到损伤,并结合上述 N2A 细胞中 CCK-8 的结果,本研究进而检测了 TNF-α、IL-1β 以及补体 C1q 的 3 个亚基 a、b、c 作为细胞炎性改变的指标。研究发现,在正常细胞中过表达 ENT1 后以上炎症因子均显著增高,说明 ENT1 表达上调会产生炎症反应,这可能与

ENT1 增多导致细胞内外腺苷转运失衡所导致的一系列下游不利后果有关[37-38];而在 AD 模型细胞敲低 ENT1 后发现以上炎症因子均显著下降,说明敲低 ENT1 后挽救了 AD 细胞中的炎症反应。并且本研究发现过表达 ENT1 还使细胞中 Aβ 水平升高,因此本实验发现的过表达 ENT1 产生炎症反应这一现象很有可能与 Aβ 增多有关,如前所述细胞中 Aβ 增多可以使神经元分泌炎症因子从而进一步损伤神经元本身[30-40]。而敲低 ENT1 后细胞内 Aβ 水平明显降低,因此炎症反应随之降低,细胞活性不会受到影响。但本研究仅仅对炎症因子的 mRNA 水平做了检测,并未对其蛋白水平如何变化做出检测,因此也是本课题的不足之处,后续的研究中会对其蛋白水平进行探究。此外,本文揭示出 ENT1 会对 AD 病理进程产生影响这一现象,但具体确切机制尚未十分清楚,因此本课题接下来还需要探究导致这一过程的确切机制以及其他潜在机制。

综上所述,本课题一系列结果提示,靶向敲低 ENT1 的表达对 AD 发挥保护作用的机制,很可能与 ENT1 介导 Aβ 的变化从而降低炎症反应有关,本研究结果可为 AD 的防治提供新的思路。

参考文献:

[1] LANE C A, HARDY J, SCHOTT J M. Alzheimer's disease [J]. Eur J Neurol, 2018, 25(1): 59-70. DOI: 10.1111/ene.13439.

[2] CASTELLANI R J, ROLSTON R K, SMITH M A. Alzheimer disease[J]. Dis Mon, 2010, 56(9): 484-546. DOI: 10.1016/j.disamonth.2010.06.001.

[3] PROVIAS J, JEYNES B. The role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of senile plaques in Alzheimer's disease [J]. Int J Alzheimers Dis, 2014, 2014: 191863. DOI: 10.1155/2014/191863.

[4] CHANG C P, WU K C, LIN C Y, *et al*. Emerging roles of dysregulated adenosine homeostasis in brain disorders with a specific focus on neurodegenerative diseases[J]. J Biomed Sci, 2021, 28(1): 70. DOI: 10.1186/s12929-021-00766-y.

[5] ANTONIOLI L, CSÓKA B, FORNAI M, *et al*. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? [J]. Drug Discov Today, 2014, 19(8): 1051-1068. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.02.010.

[6] DIAS R B, ROMBO D M, RIBEIRO J A, *et al*. Adenosine: setting the stage for plasticity[J]. Trends Neurosci, 2013, 36(4): 248-257. DOI: 10.1016/j.tins.2012.12.003.

[7] WILLIAMS-KARNESKY R L, SANDAU U S, LUSARDI T A, *et al*. Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(8): 3552-3563. DOI: 10.1172/JCI65636.

[8] CUNHA R A. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? [J]. J Neurochem, 2016, 139(6): 1019-1055. DOI: 10.1111/jnc.13724.

[9] PORKKA-HEISKANEN T, KALINCHUK A V. Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis[J]. Sleep Med Rev, 2011, 15(2): 123-135. DOI: 10.1016/j.smrv.2010.06.005.

[10] LI B, GU L, HERTZ L, *et al*. Expression of nucleoside transporter in freshly isolated neurons and astrocytes from mouse brain[J]. Neurochem Res, 2013, 38(11): 2351-2358. DOI: 10.1007/s11064-013-1146-5.

[11] OLIVEROS A, STARSKI P, LINDBERG D, *et al*. Label-free neuroproteomics of the hippocampal-accumbal circuit reveals deficits in neurotransmitter and neuropeptide signaling in mice lacking ethanol-sensitive adenosine transporter[J]. J Proteome Res, 2017, 16(4): 1445-1459. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00830.

[12] 杜烨湘, 罗敏, 冯敏, 等. 甘草素通过抗炎发挥对阿尔茨海默病的保护作用[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(4): 327-333. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20190051.
DU Y X, LUO M, FENG M, *et al*. The protective effect of liquiritigenin on Alzheimer's disease by inhibiting inflammation response[J]. Immunol J, 2019, 35(4): 327-333. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20190051.

[13] JIA L F, QUAN M N, FU Y, *et al*. Dementia in China: epidemiology, clinical management, and research advances [J]. Lancet Neurol, 2020, 19(1): 81-92. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30290-X.

[14] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, *et al*. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics[J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 5541-5554. DOI: 10.2147/IJN.S200490.

[15] ALONSO-ANDRÉS P, ALBASANZ J L, FERRER I, *et al*. Purine-related metabolites and their converting enzymes are altered in frontal, parietal and temporal cortex at early stages of Alzheimer's disease pathology[J]. Brain Pathol, 2018, 28(6): 933-946. DOI: 10.1111/bpa.12592.

[16] CHOI J S, BERDIS A J. Nucleoside transporters: biological insights and therapeutic applications [J]. Future Med Chem, 2012, 4(11): 1461-1478. DOI: 10.4155/fmc.12.79.

[17] YOUNG J D, YAO S Y, BALDWIN J M, *et al*. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2/3): 529-547. DOI: 10.1016/j.mam.2012.05.007.

[18] BOSWELL-CASTEEL R C, HAYS F A. Equilibrative nucleoside transporters-a review [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2017, 36(1): 7-30. DOI: 10.1080/15257770.2016.1210805.

[19] HSU C L, LIN W Y, SESHASAYEE D, *et al*. Equilibrative nucleoside transporter 3 deficiency perturbs lysosome

function and macrophage homeostasis[J]. Science, 2012, 335(6064): 89-92. DOI: 10.1126/science.1213682.

[20] DARMANIS S, SLOAN S A, ZHANG Y, *et al*. A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(23): 7285-7290. DOI: 10.1073/pnas.1507125112.

[21] CHANG C P, CHANG Y G, CHUANG P Y, *et al*. Equilibrative nucleoside transporter 1 inhibition rescues energy dysfunction and pathology in a model of tauopathy [J]. Acta Neuropathol Commun, 2021, 9(1): 112. DOI: 10.1186/s40478-021-01213-7.

[22] KIM T, RAMESH V, DWORAK M, *et al*. Disrupted sleep-wake regulation in type 1 equilibrative nucleoside transporter knockout mice[J]. Neuroscience, 2015, 303: 211-219. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.037.

[23] BAO K T, LI Y Y, WEI J L, *et al*. Fangchinoline suppresses conjunctival melanoma by directly binding FUBP2 and inhibiting the homologous recombination pathway [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4): 380. DOI: 10.1038/s41419-021-03653-4.

[24] JAGUST W. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2018, 19(11): 687-700. DOI: 10.1038/s41583-018-0067-3.

[25] FAKHOURY M. Inflammation in Alzheimer's disease[J]. Curr Alzheimer Res, 2020, 17(11): 959-961. DOI: 10.2174/1567205017112101011105 13.

[26] LIAO H F, YE J, GAO L L, *et al*. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: a comprehensive review [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110917. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110917.

[27] NEWCOMBE E A, CAMATS-PERNA J, SILVA M L, *et al*. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 276. DOI: 10.1186/s12974-018-1313-3.

[28] BREDER C D, TSUJIMOTO M, TERANO Y, *et al*. Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system[J]. J Comp Neurol, 1993, 337(4): 543-567. DOI: 10.1002/cne.903370403.

[29] DAVIS S, LAROCHE S. What can rodent models tell us about cognitive decline in Alzheimer's disease? [J]. Mol Neurobiol, 2003, 27(3): 249-276. DOI: 10.1385/MN:27:3:249.

[30] WU D M, LIU J P, LIU J, *el al*. Immune pathway activation in neurons triggers neural damage after stroke[J]. Cell Report, 2023, 42(11): 113368. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113368.

[31] LULL M E, BLOCK M L. Microglial activation and chronic neurodegeneration[J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(4): 354-365. DOI: 10.1016/j.nurt.2010.05.014.

[32] NOVOA C, SALAZAR P, CISTERNAS P, *et al*. Inflammation context in Alzheimer's disease, a relationship intricate to define[J]. Biol Res, 2022, 55(1): 39. DOI: 10.1186/s40659-022-00404-3.

[33] THAKUR S, DHAPOLA R, SARMA P, *et al*. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics[J]. Inflammation, 2023, 46(1): 1-17. DOI: 10.1007/s10753-022-01721-1.

[34] RICKLIN D, HAJISHENGALLIS G, YANG K, *et al*. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis[J]. Nat Immunol, 2010, 11(9): 785-797. DOI: 10.1038/ni.1923.

[35] TENNER A J, STEVENS B, WOODRUFF T M. New tricks for an ancient system: physiological and pathological roles of complement in the CNS[J]. Mol Immunol, 2018, 102: 3-13. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.06.264.

[36] SHARP T H, BOYLE A L, DIEBOLDER C A, *et al*. Insights into IgM-mediated complement activation based on *in situ* structures of IgM-C1-C4b[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(24): 11900-11905. DOI: 10.1073/pnas.1901841116.

[37] GUITART X, BONAVENTURA J, REA W, *et al*. Equilibrative nucleoside transporter ENT1 as a biomarker of Huntington disease[J]. Neurobiol Dis, 2016, 96: 47-53. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.08.013.

[38] PASQUINI S, CONTRI C, BOREA P A, *et al*. Adenosine and inflammation: here, there and everywhere[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14): 7685. DOI: 10.3390/ijms22147685.

[39] 侯明亮, 马琳秋, 李金平, 等. 胰淀素对阿尔茨海默病小鼠脑组织中 circRNA 和 mRNA 表达谱的影响[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(19): 2018-2028. DOI:10.16016/j.2097-0927.202304089.

HOU M L, MA L Q, LI J P, *et al*. Effect of amylin on expression profiles of circRNAs and mRNAs in brain tissue of Alzheimer's disease mice[J]. J Amry Med Univ, 2023, 45(19): 2018-2028.

[40] 廖旗荣,杨红岩,卢静,等. 胰淀素对阿尔茨海默病小鼠学习和记忆能力以及 Akt 信号通路的影响[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(21): 2467-2474. DOI:10.16016/j.2097-0927.202404087.

LIAO Q R, YANG H Y, LU J, *et al*. Effect of amylin on learning and memory abilities and Akt signaling pathway in mice with Alzheimer's disease[J]. J Amry Med Univ, 2024, 46(21): 2467-2474. DOI:10.16016/j.2097-0927.202404087.

(**收稿**:2024-03-12;**修回**:2024-04-19)

(编辑 吴培红)