

CX3CL1 在含突变 P301L 转基因小鼠脑组织中的表达及意义

徐亚丽¹, 孙彬录², 姚莉³, 何小蓉⁴, 曾桂花², 邓霞¹, 江漫春¹, 甘丹¹, 张兴平¹

(1. 重庆市人民医院老年病科, 重庆 400014; 2. 陆军军医大学大坪医院神经内科, 重庆 400042;

3. 重庆市人民医院健康管理中心, 重庆 400014; 4. 重庆市人民医院科教处, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨炎症趋化因子 CX3CL1(fractalkine)在含突变 p301L 转基因小鼠脑组织中的表达及作用。**方法:**分别取 9 月龄含突变 p301L 转基因小鼠和 9 月龄野生型小鼠各 10 只。使用 Western blot 检测小鼠脑组织中 CX3CL1 蛋白的表达。取脑组织制作冰冻切片, 使用抗 p-tau、CX3CL1 抗体行免疫荧光检测。**结果:**与 9 月龄野生型小鼠相比, 9 月龄转基因小鼠的脑内 CX3CL1 明显上调。免疫荧光共表达结果显示 CX3CL1 与 p-tau 共表达。**结论:**CX3CL1 在含突变 p301L 转基因小鼠脑组织中表达上调, 可能与 tau 导致的神经损伤的炎症机制有关。

【关键词】额颞叶退行性变; tau 蛋白磷酸化; CX3CL1**【中图分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-09-16Expression and significance of CX3CL1 in brain tissue
in mutant P301L transgenic miceXu Yali¹, Sun Binlu², Yao Li³, He Xiaorong⁴, Zeng Guihua², Deng Xia¹,Jiang Manchun¹, Gan Dan¹, Zhang Xingping¹

(1. Department of Geriatrics, Chongqing General Hospital; 2. Department of Neurology, Daping Hospital,

Army Medical University; 3. Health Checkup Center, Chongqing General Hospital;

4. Department of Scientific Research Management, Chongqing General Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and function of CX3CL1, an inflammatory chemokine, in the brain tissue of mutant P301L transgenic mice. **Methods:** A total of 10 mutant P301L transgenic mice aged 9 months and 10 wild-type mice aged 9 months were selected. Western blot was used to measure the expression of CX3CL1 in brain tissue. Brain tissue samples were collected to prepare frozen sections, and immunofluorescence assay was performed with anti-p-tau and anti-CX3CL1 antibodies. **Results:** Compared with the wild-type mice, the transgenic mice had a significant increase in the expression of CX3CL1 in brain tissue. The immunofluorescence assay showed the co-expression of CX3CL1 and p-tau. **Conclusion:** CX3CL1 is significantly up-regulated in the brain tissue of mutant P301L transgenic mice and may play a role in the inflammatory mechanism of nerve injury induced by tau.

【Key words】frontotemporal lobar degeneration; tau protein phosphorylation; CX3CL1

额颞叶退行性变(frontotemporal lobar degeneration, FTLN)是以脑内额颞叶变性萎缩为主要病理改变的神经变性疾病。FTLD 是几种神经退行性疾病的总称, 包括皮克病(Pick's disease, PiD)、皮质基底节变性(corticobasal degeneration, CBD)、进行性

核上性麻痹(progressive supranuclear palsy, PSP)等。FTLD 所致的额颞叶痴呆是 65 岁以下痴呆患者主要的原因之一^[1]。FTLD 的具体病理机制尚不明确, 微管相关蛋白 tau 异常与 FTLN 病理机制相关。

越来越多的研究表明, 炎症免疫机制是神经退行性疾病的重要病理机制^[2-3]。炎症趋化因子 CX3CL1 (chemokine C-X3-C motif ligand)/fractalkine (FKN) 在中枢神经系统表达, 参与许多脑部疾病的炎症反应过程^[4-5]。CX3CL1 主要在 FTLN 的病理改变区域如额叶颞叶区大量表达。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 中, CX3CL1 与 Aβ 清除和磷酸化 tau 蛋

作者介绍: 徐亚丽, Email: xuyalib@126.com,

研究方向: 老年神经退行性疾病。

通信作者: 张兴平, Email: xzp24680@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (编号: 81301111);

重庆市卫计委面上资助项目 (编号: 2016MSXM066)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.0905.014.html>

(2018-11-06)

白(p-tau)沉积相关,CX3CL1 在 AD 的病理中起着重要作用^[6]。然而,关于 CX3CL1 在 FLTD 中的研究很少。Tau 病理变化是 FTLTD 的主要病理表现之一,含突变 P301L 转基因的小鼠模型是 tau 蛋白磷酸化致 FLTD 的主要动物模型之一,是进行研究 FLTD 中 p-tau 机制的动物模型。为进一步明确 CX3CL1 在 FLTD 中 p-tau 的病理损伤机制可能的作用,本研究采用 Western blot 和免疫荧光双标法检测含突变 P301L 转基因小鼠脑组织中的表达情况,探讨趋化因子 CX3CL1 在 p-tau 病理改变中的表达及其可能机制,为进一步认识额颞叶退行性变病理机制提供依据。

1 资料及方法

1.1 动物模型和取材

野生型(wild type, WT)小鼠由陆军军医大学大坪医院实验动物中心提供。含 P301L 突变的转基因小鼠(pR5 小鼠)由澳大利亚昆士兰大学脑研究所提供。在陆军军医大学大坪医院实验动物中心繁殖和饲养。本研究符合陆军军医大学大坪医院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

分别取 9 月龄野生型小鼠和 9 月龄含 P301L 突变的转基因小鼠(pR5 小鼠)各 10 只用于研究。小鼠用水合氯醛麻醉,每只小鼠开胸暴露心脏后用灌注针经左心室快速注入生理盐水 150 mL,立即断头取脑,一半脑组织放入 4%多聚甲醛和 0.1 mmol/L PBS 后固定 6~8 h,用 0.1 mmol/L PBS 充分冲洗后,放入冰冻切片机内进行冠状位连续切片,切片厚度为 30 μ m,放入-4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,为免疫荧光实验备用;另一半脑组织冰上小心快速分离出大脑(含皮质及海马)组织后,迅速放入-80 $^{\circ}$ C 中保存,为免疫印迹实验备用。

1.2 主要试剂

蛋白定量试剂盒购自 Thermo Scientific 公司。兔抗 CX3CL1 抗体为 Abcam 产品,小鼠抗内参 β -actin 抗体购自 Sigma 公司,抗磷酸化 tau 蛋白抗体为 Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Monoclonal Antibody, 购自 Thermo Scientific 公司,二抗为 IRDye-800CW 山羊抗兔、IRDye-800CW 山羊抗小鼠,购自 Li-cor 公司。

1.3 检测方法

1.3.1 Western blot 检测 将取材的小鼠脑组织放入研钵中,加入液氮后于冰上研磨,待成浆液状后加入总蛋白提取液(碧云天公司),按操作说明进行。提取物经低温高速离心后,提取上清,保存于-80 $^{\circ}$ C 低温冰箱中备用。行 Western blot 检测时,将总蛋白样品经 BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo Scientific 公司)定量,取 30 μ g 加入 5 $\times$ Loading Buffer(碧云天公司)后进行电泳、转膜。然后分别加入兔抗 CX3CL1 一抗(1:500, Abcam 公司)和小鼠抗 β -actin(1:3 000)一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,分别加入二抗(山羊抗兔、

山羊抗小鼠),室温 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,在 ODSEY 仪器扫膜。分别得出 CX3CL1 与 β -actin 条带荧光强度的比值用于统计分析。

1.3.2 免疫荧光 从冰箱中取出,用 PBS 冲洗 3 遍,加 0.4% 的 Triton X-100,室温 15 min; PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次,滴加封闭血清封闭,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育箱孵育 30 min; 甩去多余封闭血清,滴加一抗(兔抗 CX3CL1 和小鼠抗磷酸化 tau 蛋白 [Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Monoclonal Antibody]), 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜, PBS 洗 5 min $\times$ 3 次; 避光加入二抗, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育箱避光孵育 60 min; 二抗为 Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG 和 Alexa Fluor 594 标记驴抗小鼠, PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,甘油-PBS(1:1)封片后荧光显微镜观察荧光双标表达并采集图片。

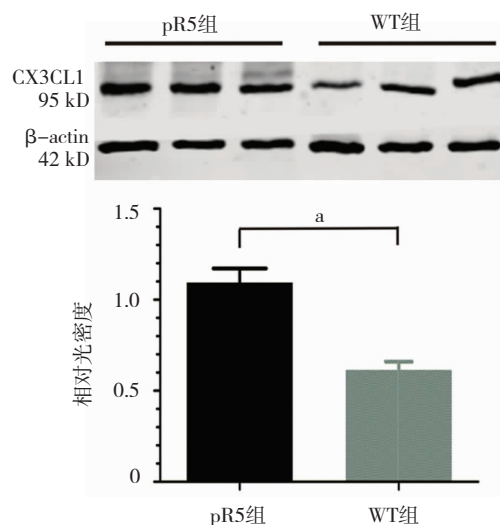
1.4 统计学处理

统计分析采用 GraphPad Prism 5.0 软件,数据均采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验方法检验 2 组小鼠脑组织中 CX3CL1 的表达水平,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

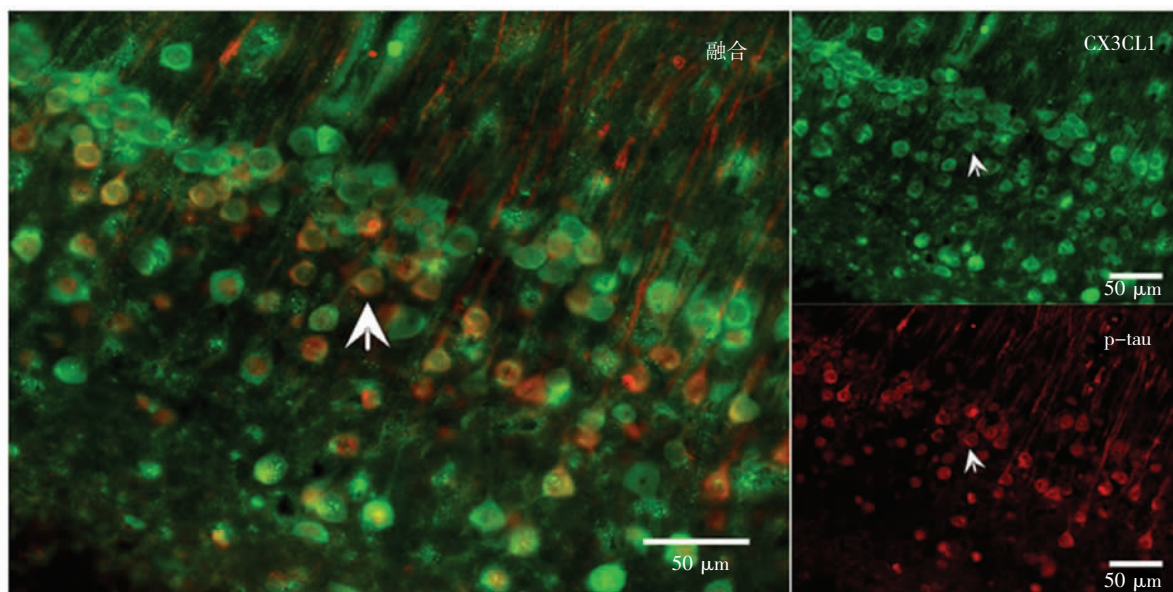
2.1 CX3CL1 在 pR5 小鼠脑组织中表达升高

运用 Western blot 测定 CX3CL1 条带为 95 kD,内参 β -actin 条带为 42 kD(图 1),测定 CX3CL1 在 WT 小鼠脑组织中和 pR5 小鼠脑组织中的表达, CX3CL1 在 WT 小鼠脑组织中表达低,而在 pR5 小鼠脑组织表达升高。2 组之间的平均光密度值有统计学差异(1.09 ± 0.23 vs. 0.61 ± 0.14 , $t=5.340$, $P=0.000$),如图 1 所示。



注:上图为 WT 小鼠及 pR5 小鼠脑组织中 CX3CL1 和内参 β -actin 的免疫印迹条带,条带显示 CX3CL1 在 pR5 小鼠脑组织中的免疫反应性明显强于 WT 对照组;下图为比较 2 组之间的平均 OD 值, CX3CL1 在 pR5 组的表达明显高于 WT 对照组; a: $P < 0.01$

图 1 免疫印迹分析 CX3CL1 在 WT 小鼠及 pR5 小鼠脑组织中的表达



注: CX3CL1 (绿色) 和磷酸化 tau 蛋白 p-tau (红色) 在 pR5 小鼠脑组织中共表达, 图中箭头所示为 CX3CL1 和 p-tau 免疫荧光阳性细胞

图2 免疫荧光双标在 pR5 小鼠脑组织中 CX3CL1 的表达

2.2 CX3CL1 和磷酸化 tau 蛋白在 pR5 小鼠脑组织中共表达

运用免疫荧光双标方法, 发现 CX3CL1 与磷酸化 tau 蛋白在转基因小鼠脑组织中同一部位表达 (图 2)。因此, CX3CL1 在含 P301L 转基因小鼠脑组织中, 与磷酸化 tau 共表达。

3 讨论

本研究结果表明 CX3CL1 与 p-tau 在含突变 P301L 转基因小鼠脑组织中共表达, CX3CL1 在 pR5 小鼠脑组织中表达上调。该结果支持中枢神经炎症机制在 p-tau 病理中起重要作用^[7-8], CX3CL1 在调控 tau 磷酸化中发挥重要作用^[9]。

炎症趋化因子 CX3CL1 是第 4 代趋化因子, 是 CX3C 类趋化因子家族唯一的成员, 命名为 CX3CL1^[10], 其受体为 CX3CR1。CX3CL1 有膜结合型和分泌型 2 种形式^[10]。在中枢神经系统, CX3CL1 主要表达于神经元, 其唯一的受体 CX3CR1 位于小胶质细胞。CX3CL1 具有独特的结构、多种性质和细胞表达模式, CX3CL1 参与神经元、神经元和小胶质细胞间的细胞间通讯^[11]。CX3CL1 作为神经调节蛋白, 参与神经退行性疾病等中枢神经系统疾病^[12-13], 在小胶质细胞活化、tau 病理中发挥重要作用^[13-14]。CX3CL1/CX3CR1 信号轴在小胶质细胞吞噬 tau 机制中起重要作用^[9, 15], CX3CL1/CX3CR1 信号缺失导致小胶质细胞对 tau 的吞噬反应改变, 体内外实验发现敲除

CX3CR1 导致小胶质细胞对 tau 的摄取和降解功能受损^[9], tau 和 CX3CL1 竞争性地与 CX3CR1 结合, tau 与 CX3CR1 结合引起小胶质细胞对 tau 的内吞, 但 p-tau 可以降低与 CX3CR1 的亲和力。

在小鼠模型中, 炎症趋化因子 CX3CL1 可以减轻小胶质细胞活性, CX3CR1 缺失的小鼠实验显示 CX3CL1 信号可以减少 tau 病理。过表达可溶性 CX3CL1 可以明显减少 rTg4510 小鼠模型中的 tau 病理沉积, 减少小胶质细胞活化, 阻止神经退行性改变^[15]。含人 tau-P301L 突变的海马 HT22 细胞中有 CX3CL1 表达, CX3CL1 信号可以激活转录因子 NRF2-ARE 并减轻 tau-P301L 导致的微神经胶质瘤^[16]。细胞培养模型显示促炎症因子可以引发磷酸化 tau, 通过调节小胶质细胞和神经元的相互作用从而影响小胶质细胞活化, 小胶质细胞活化可以加速恶化磷酸化 tau^[17]。CX3CL1 还可以通过抑制炎症因子如肿瘤坏死因子- α , 促炎症因子白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6 炎症因子的产生^[18], 通过减少炎症反应从而限制微神经胶质增生^[16]。有报道小胶质细胞活化可能通过 CX3CL1 信号促进磷酸化 tau 水平, CX3CL1 信号依赖与炎症因子的相互作用, 主要是炎症因子 IL-6^[19]。

本研究发现 WT 小鼠脑组织中有一定的 CX3CL1 表达, 而 pR5 小鼠脑组织中 CX3CL1 表达上调。有

报道 CX3CL1 及其受体在 5XFAD 模型小鼠视网膜中表达上调^[20]。另有研究表明 CX3CL1 蛋白水平在 AD 患者海马中表达上调,且与 tau 病理改变相关^[9,16]。

本实验结果显示,9 月龄野生型小鼠脑组织中有 CX3CL1 的表达,而 9 月龄 pR5 小鼠脑组织中有大量 CX3CL1 表达,同时 CX3CL1 与 p-tau 蛋白通过免疫荧光共表达。本研究结果显示,含突变 P301L 转基因小鼠脑组织中 CX3CL1 的表达上调,可能与磷酸化 tau 有关,但 CX3CL1 与磷酸化 tau 的关系及机制仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Brettschneider J, Del Tredici K, Irwin DJ, et al. Sequential distribution of pTDP-43 pathology in behavioral variant frontotemporal dementia(bvFTD)[J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 127(3):423-439.
- [2] Harold D, Abraham R, Hollingworth P, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(10):1088-1093.
- [3] Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(2):107-116.
- [4] Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, et al. CSF and serum levels of soluble fractalkine(CX3CL1) in inflammatory diseases of the nervous system[J]. *J Neuroimmunol*, 2003, 137(1-2):210-217.
- [5] Xu Y, Zeng K, Han Y, et al. Altered expression of CX3CL1 in patients with epilepsy and in a rat model[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(5):1950-1962.
- [6] Chen P, Zhao W, Guo Y, et al. CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's disease: a target for neuroprotection[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016:8090918.
- [7] Azizi G, Khannazer N, Mirshafiey A. The potential role of chemokines in Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*, 2014, 29(5):415-425.
- [8] Laurent C, Dorothée G, Hunot S, et al. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy[J]. *Brain*, 2017, 140(1):184-200.
- [9] Bolós M, Llorens-Martín M, Perea JR, et al. Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia[J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1):59.
- [10] Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. *Nature*, 1997, 385(6617):640-644.
- [11] Meucci O, Fatatis A, Simen AA, et al. Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14):8075-8080.
- [12] Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(7):917-924.
- [13] Cipriani R, Villa P, Chece G, et al. CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(45):16327-16335.
- [14] Morganti JM, Nash KR, Grimmig BA, et al. The soluble isoform of CX3CL1 is necessary for neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(42):14592-14601.
- [15] Nash KR, Lee DC, Hunt JB Jr, et al. Fractalkine overexpression suppresses tau pathology in a mouse model of tauopathy[J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(6):1540-1548.
- [16] Lastres-Becker I, Innamorato NG, Jaworski T, et al. Fractalkine activates NRF2/NFE2L2 and heme oxygenase 1 to restrain tauopathy-induced microgliosis[J]. *Brain*, 2014, 137(Pt 1):78-91.
- [17] Desforges NM, Hebron ML, Algarzae NK, et al. Fractalkine mediates communication between pathogenic proteins and microglia: implications of anti-inflammatory treatments in different stages of neurodegenerative diseases[J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 2012:345472.
- [18] Mattison HA, Nie H, Gao H, et al. Suppressed pro-inflammatory response of microglia in CX3CR1 knockout mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 257(1-2):110-115.
- [19] Hebron ML, Algarzae NK, Lonskaya I, et al. Fractalkine signaling and Tau hyper-phosphorylation are associated with autophagic alterations in lentiviral Tau and Aβ1-42 gene transfer models[J]. *Exp Neurol*, 2014, 251:127-138.
- [20] Chu LQ, Lu Y, Karen B, et al. Expression and function of Fractalkine and its receptor in 5XFAD mouse[J]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2016, 45(11):786-790.

(责任编辑:冉明会)