

学校编码: 10384

分类号____密级____

学 号: 24520120153970

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

LRP1 在小胶质细胞以及神经炎症中的功能
研究

The role of LRP1 in microglia and neuroinflammation

杨龙雨

指导教师姓名: 卜国军 教授

陈小芬 副教授

专 业 名 称: 生理学

论文提交日期: 2016 年 11 月

论文答辩时间: 2016 年 11 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: 张杰

评 阅 人: _____

2016 年 11 月

IRP1 在小胶质细胞以及神经炎症中的功能研究

指导教师

卜国军

陈小芬

教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学卜国军教授和陈小芬副教授)课题(组)的研究成果,获得(厦门大学卜国军教授和陈小芬副教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学卜国军教授和陈小芬副教授)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

神经炎症以中枢神经系统中小胶质细胞的激活、炎症因子以及趋化因子的大量表达为特征。小胶质细胞作为脑内最主要的免疫和吞噬细胞，在神经损伤以及包括阿尔兹海默症（Alzheimer's disease, AD）在内的神经退行性疾病中过度激活，同时起到神经保护或者毒性损伤功能。作为载脂蛋白 E（apolipoprotein E, apoE）和 β 淀粉样蛋白（amyloid- β , A β ）最主要的受体，低密度脂蛋白受体相关蛋白 1（low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1）大量表达在脑内介导 A β 的清除，在 AD 的病理进程中发挥着重要作用。此外，LRP1 可以调节外周免疫细胞的炎性因子释放和吞噬能力。然而目前关于 LRP1 是否在大脑中参与调控小胶质细胞的功能以及小胶质细胞介导的神经炎症还不清楚。在本研究中，我们证实了 LRP1 大量表达在小胶质细胞中，并且通过在原代小胶质细胞中敲低 *Lrp1* 的方法研究了其参与调控 AD 发病的机制。

我们首先发现 LRP1 可以调控原代小胶质细胞的增殖，迁移，吞噬和 A β 内吞功能。其次在鼠原代小胶质细胞中敲低 *Lrp1* 会同时导致 JNK 和 NF κ B 信号通路的激活，显著增加 LPS 诱导的促炎基因的产生。LRP1 拮抗剂受体相关蛋白（receptor-associated protein, RAP）同样也可以诱导这两条信号通路的激活。我们进一步实验发现 LRP1 可以特异性抑制 JNK 和 NF κ B 信号通路来调节小胶质细胞的激活。此外，我们发现炎性刺激可以在体内外显著抑制 LRP1 的表达。有意思的是，我们发现 NF κ B 抑制剂不仅可以在小胶质细胞上抑制 LRP1 调控的炎性因子的产生，还可以逆转由 LPS 诱导的 *Lrp1* 表达水平的下降。

综上，我们的研究表明了 LRP1 对于小胶质细胞的功能发挥具有重要作用。LRP1 可以通过调节 JNK 和 NF κ B 通路来抑制小胶质细胞的激活。鉴于小胶质细胞功能紊乱与 AD 发病机理密切相关，我们的工作进一步提示了 LRP1 可能通过影响小胶质细胞的功能而参与调控 AD 的发病机制，进一步提出在 AD 治疗中 LRP1 可以作为一个潜在的靶点。

关键词：LRP1 小胶质细胞 JNK NF κ B 神经炎症 阿尔茨海默病

Abstract

Neuroinflammation is characterized by microglial activation and the increased levels of cytokines and chemokines in the central nervous system (CNS). Microglia, the resident immune and phagocytic cells of the brain, plays both beneficial and toxic roles when over-activated upon nerve injury or in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), a major apolipoprotein E (apoE) and amyloid- β ($A\beta$) receptor, is highly expressed in the brain to mediate $A\beta$ clearance, which play critical roles in AD pathogenesis. LRP1 regulates inflammatory responses in peripheral immune cell by modulating the release of inflammatory cytokines and phagocytosis. However, whether LRP1 regulates the function of microglia and microglia-mediated neuroinflammation in the brain remains unclear. Here, we showed that LRP1 is highly expressed in primary microglia and determined the mechanism of microglial LRP1 modulates AD pathogenesis by knocking down *Lrp1* in mouse primary microglia.

We first found that LRP1 can regulate the function of proliferation, migration, phagocytosis and $A\beta$ internalization in microglia. Knocking down of *Lrp1* in mouse primary microglia led to the activation of both JNK and NF κ B pathways with corresponding enhanced sensitivity to lipopolysaccharide (LPS) in the production of pro-inflammatory cytokines. Similar effects were observed when microglia were treated with LRP1 antagonist RAP. We further found LRP1 suppresses microglial activation by modulating JNK and NF κ B signaling pathways. In addition, treatment with pro-inflammatory stimuli suppressed LRP1 expression both *in vitro* and *in vivo*. More interesting, we found that NF κ B inhibitor not only suppressed LRP1-regulated cytokine production but also restored LPS-induced *Lrp1* down-regulation in primary microglia.

In summary, our study uncovers that LRP1 plays important roles on microglia function. It can suppress microglial activation by modulating JNK and NF κ B

signaling pathways. Given that dysregulation of microglia has been associated with AD pathogenesis, our work further reveals that LRP1 can regulate microglial function that related to AD pathogenesis thus further nominating LRP1 as a potential target for the treatment of AD.

Key words: LRP1; microglia; JNK; NF κ B; Neuroinflammation; AD;

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

第一章 前言	1
1.1 阿尔兹海默症	1
1.1.1 阿尔兹海默症概述.....	1
1.1.2 阿尔兹海默症的病理特征和发病机制.....	1
1.2 小胶质细胞在 AD 中的病因学作用	5
1.3 LRP1 与 AD	8
1.3.1 低密度脂蛋白受体家族.....	8
1.3.2 LRP1 的结构与表达.....	9
1.3.3 LRP1 与 AD 的发病机制.....	15
1.4 本论文的研究内容与研究意义	19
第二章 实验材料与amp;方法	20
2.1 实验材料	20
2.1.1 细胞及动物.....	20
2.1.2 培养基、抗体、试剂及耗材.....	20
2.2 溶液配制	21
2.2.1 A β 42 贮液制备.....	21
2.2.2 A β 42 寡聚体 (Oligomeric A β 42) 制备.....	22
2.2.3 蛋白样品制备溶液及配制.....	22
2.2.4 蛋白免疫印迹 (Western blot) 溶液及配制.....	23
2.2.5 免疫荧光所需溶液及配制.....	25
2.3 主要仪器设备	25
2.4 实验方法	27
2.4.1 原代神经细胞分离及培养.....	27
2.4.2 原代小胶质细胞 siRNA 干扰.....	28
2.4.3 原代小胶质细胞活性检测 (CCK-8 检测法).....	29
2.4.4 原代小胶质细胞增殖能力检测 (BrdU ELISA 检测法).....	29

2.4.5 原代小胶质细胞 Transwell 小室迁移实验.....	30
2.4.6 原代小胶质细胞吞噬能力检测.....	31
2.4.7 原代小胶质细胞 A β 42 内吞检测	32
2.4.8 蛋白印迹 (Western blot)	33
2.4.9 实时定量 PCR (Quantitative real-time PCR).....	34
2.4.10 ELISA 检测小胶质细胞炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α	36
2.4.11 小鼠 LPS 腹腔注射及脑组织样品收集	36
2.4.12 数据统计.....	38
第三章 实验结果与分析.....	39
3.1 LRP1 在小胶质细胞上的表达和功能.....	39
3.1.1 LRP1 在原代小胶质细胞中具有较高的糖基化水平	39
3.1.2 LRP1 可以促进小胶质细胞的活力与增殖	41
3.1.3 LRP1 可以促进小胶质细胞的迁移能力	43
3.1.4 LRP1 可以促进小胶质细胞的吞噬能力	44
3.1.5 LRP1 可以促进小胶质细胞的对 A β 42 的内吞	46
3.1.6 LRP1 能够抑制 LPS 诱导的炎症反应	49
3.2 LRP1 抑制小胶质细胞炎症反应的机制研究.....	51
3.2.1 LRP1 抑制小胶质细胞中的 JNK 和 NF κ B 通路.....	51
3.2.2 RAP 激活 JNK 和 NF κ B 通路促进小胶质细胞的炎症反应.....	51
3.2.3 LRP1 通过 JNK 和 NF κ B 通路调控小胶质细胞的炎症反应.....	55
3.3 LRP1 在体内外的表达调控.....	57
3.3.1 炎症介质抑制 LRP1 在原代小胶质细胞上的表达.....	57
3.3.2 LPS 刺激显著抑制了 LRP1 在脑中的表达.....	59
3.3.3 NF κ B 信号通路在炎性条件下调控 LRP1 表达	61
第四章 总结与讨论.....	64
参考文献.....	69
致谢.....	101
攻读学位期间发表的学术成果.....	103

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	1
1.1 Alzheimer’s disease(AD)	1
1.1.1 Introduction of AD.....	1
1.1.2 Pathogenesis of AD.....	1
1.2 Role of microglia in AD pathogenesis	5
1.3 LRP1 与 AD.....	8
1.3.1 LDLR family.....	8
1.3.2 The structure and expression of LRP1	9
1.3.3 LRP1 and AD pathogenesis	15
1.4 Purposes and contents of this thesis	19
Chapter 2 Materials and Methods.....	20
2.1 Materials	20
2.1.1 Cell and animals.....	20
2.1.2 Antibodies and reagents	20
2.2 Solutions preparation	21
2.2.1 A β 42 stock preparation.....	21
2.2.2 Oligomeric A β 42 preparation	22
2.2.3 The solutions of protein samples	22
2.2.4 The solutions of Western blot	23
2.2.5 The solutions of IF	25
2.3 Equipments	25
2.4 Methods.....	27
2.4.1 Primary microglia isolation and culture.....	27
2.4.2 LRP1 knockdown by siRNA	28
2.4.3 CCK-8 assay	29
2.4.4 BrdU ELISA	29
2.4.5 Transwell assay	30
2.4.6 Phagocytosis assay.....	31

2.4.7 A β 42 internalization assay	32
2.4.8 Western blot	33
2.4.9 Quantitative real-time PCR	34
2.4.10 Mouse IL-1 β and TNF- α ELISA	36
2.4.11 LPS administration and tissue processing	36
2.4.12 Data analysis	38
Chapter 3 Results and Analysis	39
3.1 Expression and function of LRP1 in primary microglia	39
3.1.1 Abundant expression of LRP1 and differential glycosylation pattern in primary microglia	39
3.1.2 LRP1 promotes cell viability and proliferation ability of primary microglia	41
3.1.3 LRP1 promotes cell migration of primary microglia	43
3.1.4 LRP1 promotes phagocytosis ability of primary microglia	44
3.1.5 LRP1 promotes A β internalization in primary microglia	46
3.1.6 LRP1 suppresses LPS-stimulated pro-inflammatory responses	49
3.2 Mechanism of LRP1 suppresses microglial activation	51
3.2.1 LRP1 suppresses JNK and NF κ B pathways in primary microglia ...	51
3.2.2 JNK and NF κ B signaling function in the pathway by which RAP promotes pro-inflammatory responses in primary microglia	51
3.2.3 LRP1 suppresses microglia activation by modulating JNK and NF κ B pathways	55
3.3 Expression and regulation of LRP1 in vitro and in vivo	57
3.3.1 Inflammatory mediators suppresses LRP1 expression in primary microglia	57
3.3.2 LPS significantly decreases LRP1 expression in the brain	59
3.3.3 NF κ B pathway regulates LRP1 expression upon LPS	61
Chapter 4 Conclusion and Discussion	64
References	69
Acknowledgment	101

Publications.....103

厦门大学博硕士学位论文摘要库

英文缩略词中英对照表

英文缩写	英文全名	中文名称
AD	Alzheimer's Disease	阿尔茨海默症
LOAD	Late-onset AD	晚发型阿尔茨海默症
EOAD	Early-onset AD	晚发型阿尔茨海默症
A β	β -Amyloid	β -淀粉样蛋白
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	有丝分裂原激酶
APOE	Apolipoprotein E	载脂蛋白 E
APP	β -Amyloid Precursor Protein	β -淀粉样前体蛋白
BACE	β -Site APP cleaving enzyme	β -位 APP 切割酶
NF κ B	Nuclear factor kappa beta	核因子 kappa beta
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
CDK5	Cyclin dependent kinase 5	细胞周期依赖性蛋白激酶 5
RAP	Receptor-associated protein	受体相关蛋白
CTF	C-terminal fragment	C 端肽段
LRP1	LDLR-related protein 1	低密度脂蛋白受体相关蛋白 1
LDLR	low-density lipoprotein receptor	低密度脂蛋白受体
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	Ethylenediamine tetracetic acid	乙二胺四乙酸
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	荧光激活细胞分选
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β	糖原合成激酶 3 β
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
GWAS	Genome-wide association study	全基因组关联分析
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
ICD	Intracellular domain	胞内片段
IL-10	Interleukin-10	白介素 10
IL-1 β	Interleukin-1 β	白介素 1 β
HSPG	heparan sulfate proteoglycan	硫酸肝素蛋白聚糖
LOAD	Late-onset AD	晚发型阿尔茨海默症
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
LTP	Long-term potentiation	长时程增强
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs	非甾族抗炎药物
NTF	Neurofibrillar tangles	神经纤维缠结
PD	Parkinson's disease	帕金森病
PKA	Protein kinase A	cAMP 依赖性蛋白激酶
PKC	Protein kinase C	蛋白激酶 C
PS1	Presenilin 1	早老素 1
PS2	Presenilin 2	早老素 2
PP2A	Protein phosphatase 2A	磷酸酶 2A

英文缩略词

siRNA	Small interference RNA	小分子干扰 RNA
SNPs	Single nucleotide polymorphisms	单核苷酸多态性
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	2 型髓系细胞触发受体
PNS	Peripheral nervous system	外周神经系统
CNS	Central nervous systems	中枢神经系统
OPCs	Oligodendrocyte progenitor cells	少突胶质前体细胞
tPA	Tissue-type plasminogen activator	组织纤溶酶原激活物
SRE-1	Sterol regulatory element 1,	胆固醇调节元件 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1.1 阿尔兹海默症

1.1.1 阿尔兹海默症概述

阿尔兹海默症（Alzheimer's Disease, AD）是一种与认知能力退化有关的渐进性神经退行性疾病。阿尔兹海默症发病隐秘，病程长，临床上其病程最长可达二十年。在这段时间里，AD 给病人本身及其家属甚至社会都会带来巨大的负担和痛苦^[1,2]。在老龄化日益严重的趋势下，AD 已经逐渐成为影响老年人生活质量的常见病和多发病。据统计，发达国家 60 岁以上人群中，约有 5-8% 的人患有痴呆症，其中 AD 约占 50-60%。而在 65 岁以上的人群中，年龄每增加 5 岁，AD 的发病率就会增加一倍；85 岁以上的人群里，则有半数的人患有某种程度的痴呆，其中多为 AD。目前全世界有超过 4600 万的 AD 患者，据预测，到 2050 年，这一数字将增加三倍^[3]。美国政府在 AD 方面的投入已经 2000 年的 620 亿美元增加到 2015 年的 1890 亿美元。当下的中国已经步入老年化社会，60 岁以上人口数超过总人口的 10% 以上。在中国，目前数据显示，阿尔兹海默症患者人数已居世界第一，数量约为 1000 万人左右，并且每年以约 30 万的新发病例在递增。随着生活水平的提高、医疗条件的改善，人们的寿命大幅延长，AD 的发病率将会呈直线上升趋势^[4]。因此，AD 研究的重要性和迫切性已经越来越明显。每年的 9 月 21 日被定为世界老年痴呆日，体现了人们对 AD 疾病的认识 and 关注程度，今年的主题是“关注记忆、关爱老人”。尽管在上世纪之初德国精神病学家 Alois Alzheimer 就首次报道描述了阿尔茨海默症的存在，但是由于 AD 病因不明，发病机理之复杂，所以该病研究进展缓慢，直到现在其确切的发病机制也未知。

1.1.2 阿尔兹海默症的病理特征和发病机制

阿尔茨海默症按照发病年龄的不同可以分为早发型 AD (Early-onset Alzheimer's disease, EOAD) 和晚发型 AD (Late-onset Alzheimer's disease, LOAD)。其中

早发型 AD 仅仅约占疾病人数的 5% 左右,其发病年龄一般在 65 岁之前、甚至更早,其所占比例不到所有患者的 5%^[5],主要由淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)、早老素蛋白 1(Presenilin1, PSEN1)和早老素蛋白 2 (Presenilin2, PSEN2) 基因突变所致,具有家族遗传性的特点;后者占 AD 患者的绝大多数,一般在 65 岁之后发病,且多为散发性,病因复杂,载脂蛋白 E (Apolipoprotein E, apoE) 基因的 $\epsilon 4$ 亚型是目前已被普遍证实的晚发型 AD 最强的风险因子。另外,2 型髓系细胞触发受体 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2) 基因突变也与晚发型 AD 极为相关,其中 R47H 的突变增加 3-4 倍的风险,其优势比例(Odds ratio, OR)与 APOE $\epsilon 4$ 相当^[6,7],但是由于 TREM2 基因突变非常罕见(在一般人群中出现频率约为 0.5%),与 APOE $\epsilon 4$ 相比只有小部分人会受此基因突变的影响。

1.1.2.1 阿尔茨海默症的病理特征

对病人尸检发现,早发型和晚发型 AD 的病理特征基本一致,都是:(1)在病人海马区和皮质区的神经细胞外出现淀粉样(Amyloid plaques)沉积(图 1-1-a);(2)在神经元内出现神经纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFTs)(图 1-1-b)^[8]。其它的病理特征还包括特定脑区的神经细胞丢失而出现脑萎缩、神经胶质细胞过度活化、脑血管淀粉样物质沉积等^[9]。

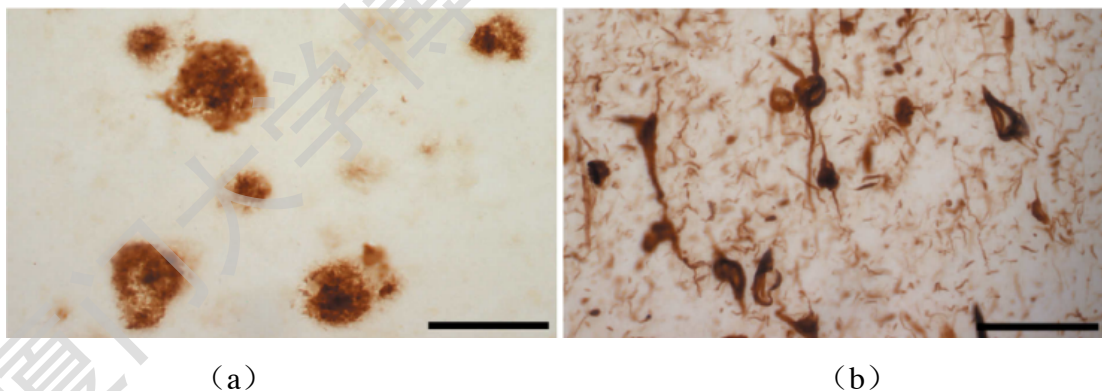


图 1-1: 阿尔茨海默症的病理学特征^[10]

Figure 1-1: Neuropathological hallmarks of AD

(a)AD 病人脑中的淀粉样斑,使用抗 A β 42 抗体免疫染色,图中标尺为 125 μ m; (b) AD 脑中的神经纤维缠结,使用抗 Tau 蛋白 PHF 抗体免疫染色,标尺为 62.5 μ m。
注:引自 LaFerla & Oddo (2005) Trends Mol Med.

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.