

Wnt5a 信号通路调控 NRTI 引起的小脑神经炎症的研究

耿明星,吴 婷,张 娟,杨 意,刘小康,舒建洪

(浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

摘 要: 分别用 NRTI 类药物 AZT(100 mg/kg)和 3TC(50 mg/kg)对 C57BL/6 小鼠进行 2、5、14 d 的处理,并于药物处理结束时采集小鼠小脑。通过 Western blotting 检测两种药物处理不同时间后小脑中炎症因子 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的表达水平,观察到炎症因子在小脑中显著性增加。然后通过 HE 染色研究 NRTI 作用 5 d 对小脑病变的影响,组织形态学分析表明, NRTI 药物作用 5 d 未引起小脑发生显著病变。通过 Western blotting 检测到小脑中 NRTI 可明显上调 Wnt5a,提示 NRTI 可能激活 Wnt5a,再利用 Wnt5a 的特异性拮抗剂 BOX5 来抑制 Wnt5a, BOX5 可以显著性降低 NRTI 诱导的炎症因子上调。因此, Wnt5a 信号通路参与调控 NRTI 引起的小脑神经炎症。

关键词: NRTI;小脑;神经炎症; Wnt5a 信号通路;BOX5

中图分类号: R741.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851(2016)06-0922-06 **引用页码:** 110705

0 引 言

人类感染人类免疫缺陷病毒(HIV-1)会导致获得性免疫缺乏综合征^[1]。截至 2016 年 2 月,全国报告现存活艾滋病病毒(HIV)感染者/AIDS 病人 581632 例,报告死亡 185959 例^[2]。HIV-1 流行疾病可以说是人类历史上的一大瘟疫,同时也是对药物、公众健康和医学研究的一项大挑战。在 1996 年,高效抗逆转录病毒治疗(HAART)的引入在全球范围内极大地延长了患者的寿命,稳定了 AIDS 流行病。这个疗法可以将血浆中的病毒水平降到可检测水平以下(<20 个复制数目/mL)^[3]。核苷类逆转录酶抑制剂(nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI)作为 HAART 的一个核心组成部分,被广泛用于抑制 HIV 的复制和增殖。然而,长期服用 NRTI 类药物可引发神经毒性^[4-5],主要表现为神经炎症和多种神经认知障碍,如阿耳茨海默氏病、帕金森氏病和慢性疼痛等^[6-7]。尽管 NRTI 用于治疗艾滋病已有数十年,但目前对于 NRTI 引发神经炎症的具体机制还是不甚明了。

Wnt5a 是非典型 Wnt 信号的主要配体之一,在器官的发展和产后细胞功能的恢复中起重要作用。Wnt5a 可以结合多种受体,比如 Fzd2、Fzd4、Fzd5 和 Ror2。Wnt5a/Ror2 信号可以阻断典型的 Wnt- β -catenin 信号通路^[8],并且在 Wnt5a 敲除小鼠中典型的 Wnt- β -catenin 信号通路后会增强^[9]。最近有报道表明 Wnt5a 介导多种炎症反应应答。但是 Wnt5a 介导炎症的报道仅仅局限于外周组织,未见 Wnt5a 参与中枢神经炎症的报道。

本实验研究了 Wnt5a 信号通路对 NRTI 引起的小脑神经炎症的调控作用。不仅有助于理解 NRTI 在小脑中对神经炎症发生的影响,而且将为治疗 HIV-1 相关的神经炎症提供潜在的药物靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C67BL/6 小鼠,雄性,8 周龄。所有动物实验均得到杭州师范大学实验动物伦理委员会授权同意,动物合格证号为:2015-106。并饲养于该校实验动物中心。NRTI 药物:齐多夫定(AZT),拉米

收稿日期:2016-04-19

基金项目:国家科技重大新药创制项目(2012ZX09102301);浙江省自然科学基金项目(LY13H090015)

作者简介:耿明星(1990-),女,山东滕州人,硕士研究生,主要从事神经药理学方面的研究。

通信作者:舒建洪, E-mail: shujianhong@zstu.edu.cn

夫定(3TC)。AZT 和 3TC 的粉末溶解在 PBS 中并贮存于 -20°C 。抗体:Goat Anti-Mouse IgG H&L-
HRP(Catalog, # GS1002); GAPDH (SANTA, sc-
25778); Anti-TNF α 抗体 (abcam, ab1793);
Purified Rat Anti-Mouse IL6(BD, 5554400); Mouse
IL-1 β 抗体 (R&D, AF-401-NA); Goat Anti-Rabbit
IgG H&L-HRP (abcam, ab97051); Anti-Wnt5a 抗
体 (abcam, ab72583)。

1.2 方 法

1.2.1 实验分组

将 C57BL/6 小鼠分为 AZT、3TC 和空白对照 3 大组。每大组分为 2、5、14d 3 个小组, 每组 5 只小鼠。AZT 组每天每只小鼠皮下注射 0.26 mL 浓度 1 mg/mL 的 AZT; 3TC 组每天每只小鼠皮下注射 0.26 mL 浓度为 0.5 mg/mL 的 3TC; 空白对照组每天每只小鼠皮下注射 0.26 mL PBS。小鼠 5 只/笼, 添加适量垫料, 给予充足的食物和水, 饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗循环, $(21\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 的环境中。

1.2.2 小鼠小脑组织的分离

用预冷的 PBS 对麻醉后的小鼠进行心脏灌注, 然后再冰台上迅速取出脑组织, 分离出小脑, 用于 Western blotting 及石蜡切片的制备。

1.2.3 Western blotting 检测炎症因子及 Wnt5a 的表达

1 mg 的小脑加 200 μL 的 RIPA 裂解液机械匀浆, 然后冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用 BCA 蛋白质定量试剂盒 (biomiga) 测定其蛋白质含量。取 50 μg 蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳, 然后进行蛋白质转移, 接着进行免疫反应, 所用一抗为: anti-Wnt5a (1: 1000); GAPDH (SANTA, sc-25778); Anti-TNF α (1: 1000); Purified Rat Anti-Mouse IL6 (1: 10000); Mouse IL-1 β (1: 2000), 所对应的二抗分别为 Goat Anti-Rabbit IgG H&L-HRP (1: 2000), Goat Anti-Mouse IgG H&L-HRP (1: 25000); 最后用 ECL 发光试剂盒进行显色, 拍照保存。

1.2.4 HE 染色检测小脑形态结构变化

5 μm 厚的石蜡切片, 执行常规的 HE 染色^[10], 观察小脑整个形态结构和神经元胞体形态。

1.2.5 统计分析

所有的实验数据均表示为 means \pm SEM。用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析。设 $P < 0.05$ 具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示存在极显著差异。

2 结果与分析

2.1 NRTI 对小脑的炎症因子表达影响

Western blotting 分析了 NRTI 处理 2d 后小脑炎症因子的表达水平, 结果(图 1)显示与空白对照组相比 AZT 组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达分别增加了 1.26、1.36、1.59; 3TC 组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达分别增加了 1.16、1.15、1.14。以上实验结果初步表明 NRTI 药物 AZT 和 3TC 给药 2d 能够上调小脑炎症因子表达。

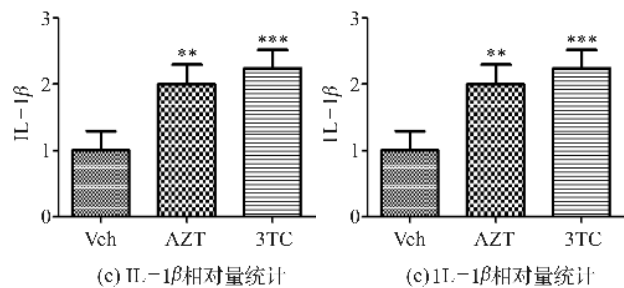
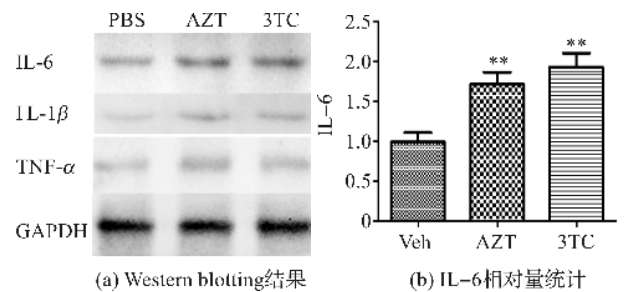


图 1 NRTI 处理 2d 后小脑炎症因子的表达

注: Means \pm SEM 来自 5 只小鼠, * 为 $P < 0.05$; ** 为 $P < 0.01$; *** 为 $P < 0.001$ 。

接下来分析了 NRTI 处理 5d 后小脑炎症因子的表达。Western blotting 结果(图 2)显示与空白对照组相比 AZT 组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达分别增加了 1.71、1.99、1.53; 3TC 组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达分别增加了 1.93、2.23、1.18。AZT 和 3TC 引起小脑中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 三种炎症因子显著增加。表明上述两种 NRTI 药物处理 5d 能够引起小脑发生神经炎症。

进一步分析了 NRTI 处理 14d 后大脑皮层炎症因子的表达。Western blotting 结果(图 3)显示与空白对照组相比 AZT 组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达分别增加了 1.79、1.96、1.86; 3TC 组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达分别增加了 1.81、1.48、1.54; AZT 和 3TC 炎症因子显著增加, 进一步证实了上述两种 NRTI 药物能够引起小脑的神经炎症。

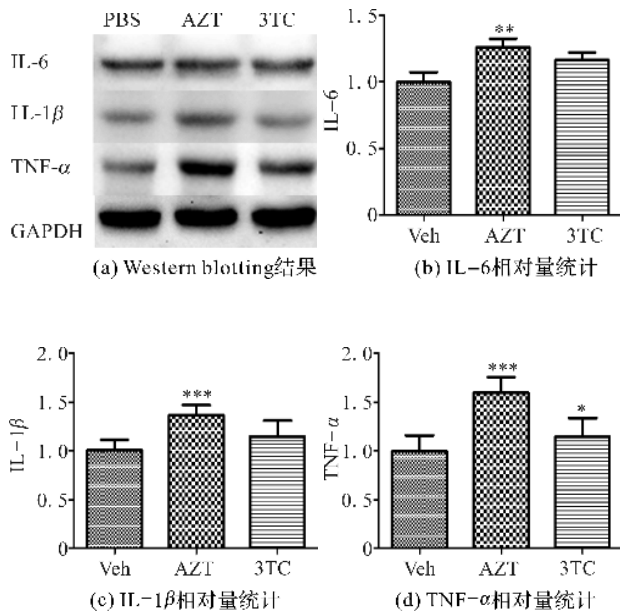


图2 NRTI处理5 d后小脑炎症因子的表达

注: Means \pm SEM 来自 5 只小鼠, * 为 $P < 0.05$; ** 为 $P < 0.01$; *** 为 $P < 0.001$ 。

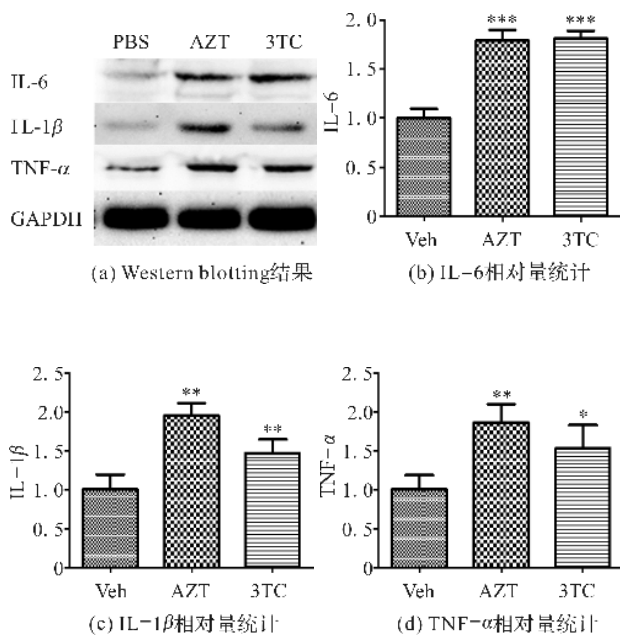


图3 NRTI处理14 d后小脑炎症因子的表达

注: Means \pm SEM 来自 5 只小鼠, * 为 $P < 0.05$; ** 为 $P < 0.01$; *** 为 $P < 0.001$ 。

2.2 NRTI对小脑的形态结构变化的影响

小脑 HE 染色结果(图 4)显示,空白对照组小脑结构完整,细胞核呈蓝紫色(图中深灰色部分),细胞质呈粉红色(浅灰色的部分),并且核质对比明显,AZT 和 3TC 处理 14d 后与空白对照组相比没有明

显差别,表明该阶段上述两种 NRTI 药物未引起小脑显著神经病变。

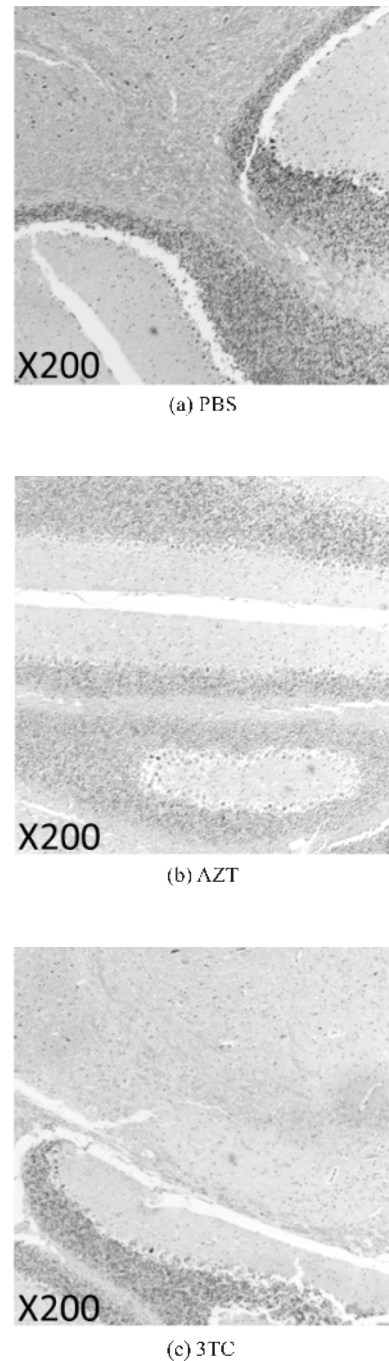


图4 NRTI处理14 d后小脑 HE 染色结果

2.3 NRTI对小脑 Wnt5a 表达的影响

Western blotting 检测 NRTI 对小脑 Wnt5a 表达的影响。NRTI 处理 2d 如图 5(a),AZT 显著上调小脑中 Wnt5a 表达,3TC 对小脑 Wnt5a 表达没有显著上调,但是呈现出上升趋势。NRTI 处理 5d

如图 5(b),小脑中 Wnt5a 表达均开始显著增加。NRTI 处理 14d 如图 5(c),小脑中 Wnt5a 表达显著增加,其中 AZT 处理后 Wnt5a 表达增加 2 倍以上。结果表明上述两种 NRTI 药物显著上调小脑 Wnt5a 表达。

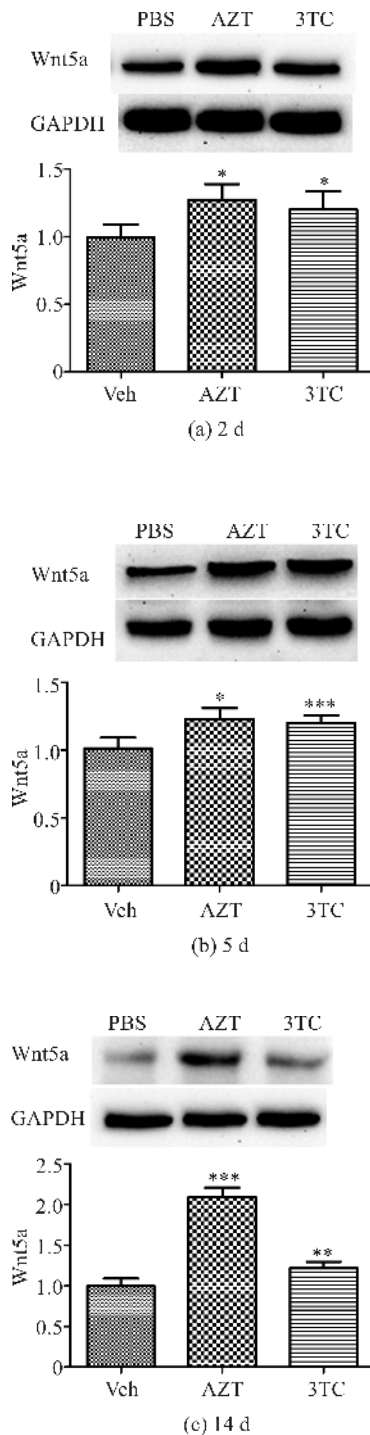


图 5 NRTI 处理不同时间后小脑 Wnt5a 的表达

注: Means \pm SEM 来自 5 只小鼠*为 $P<0.05$; **为 $P<0.01$; ***为 $P<0.001$ 。

2.4 BOX5 对小脑 NRTI 引起神经炎症的影响

为了进一步研究 Wnt5a 对 NRTI 诱导的神经炎症的作用,本文利用 Wnt5a 的特异性拮抗剂 BOX5 来抑制 Wnt5a。观察 BOX5 和 NRTI 同时作用 14d 后对小脑炎症因子 TNF- α 和 IL-6 表达的影响。Western blotting 结果显示 BOX5 可以显著性降低 AZT 和 3TC(图 6)诱导的炎症因子上调,与空白对照组相比 BOX5 本身并不影响这些炎症因子的表达。说明小脑中 NRTI 诱导的 Wnt5a 上调至少部分介导了 NRTI 导致的神经炎症。

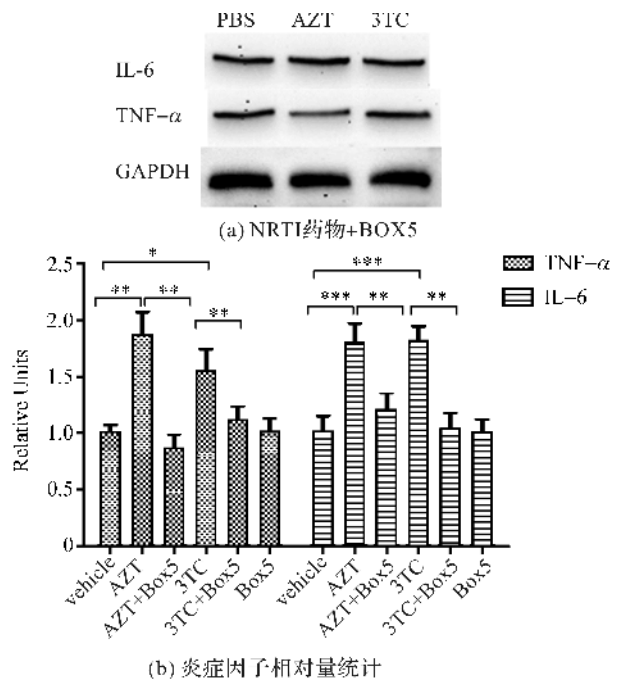


图 6 BOX5 对小脑炎症因子表达的影响

注: Means \pm SEM 来自 5 只小鼠,*为 $P<0.05$; **为 $P<0.01$; ***为 $P<0.001$ 。

3 讨论

目前,HAART 在治疗 AIDS 疾病中广泛应用,极大程度降低了机会性感染的发生几率^[11]。然而,长期服用 NRTI 类药物会引发一系列神经毒性,例如乳酸性酸中毒、线粒体毒性、周围神经病变等。神经炎症则被普遍认为是神经疾病如 AIDS 并发的痴

呆和疼痛、中风及帕金森等的关键致病因素^[12],但是NRTI类药物引发的神经毒性和神经炎症是否相关联还不清楚。炎症因子如IL-1 β 、IL-6和TNF- α 是各种中枢神经系统疾病的关键的炎症调节介质,也在中枢神经系统损伤引起的炎症应答反应中发挥重要作用。本研究发现注射NRTI药物后小鼠小脑中炎症因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 表达量显著增加,说明NRTI能够诱导小脑中神经炎症的发生。

Wnt5a是非经典Wnt信号的主要配体之一,在组织发育和信号转导过程中发挥重要功能。近年来,越来越多的研究表明Wnt5a具有启动和调节外周炎症应答的功能^[13]。本研究中观察到注射NRTI药物后小鼠小脑中Wnt5a表达量显著增加,所以推测NRTI引起的神经炎症和Wnt5a相关联。利用Wnt5a的特异性拮抗剂BOX5来抑制Wnt5a进一步验证两者之间的关系。Western Blotting结果表明,BOX5可以显著性降低NRTI诱导的小脑炎症因子上调。因此,以上结果表明Wnt5a信号通路调节NRTI引起的小脑神经炎症。

总的说来,本研究揭示Wnt5a信号通路调节NRTI引起的小脑神经炎症,为NRTI刺激神经炎症提供了病因机制,提示Wnt5a信号通路是HIV相关中枢炎症和神经性疾病的一个很有潜力的防治靶点。

参考文献:

- [1] BARRE SINOUSSE F, CHERMANN J C, REY F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) [J]. *Science*, 1983, 220(4599): 868-71.
- [2] 中国疾病预防控制中心, 性病艾滋病预防控制中心, 性病控制中心. 2016年2月全国艾滋病性病疫情及主要防治工作进展[J]. *中国艾滋病性病*, 2016, 22(4): 223.
- [3] GEERAERT L, KRAUS G, POMERANTZ R J. Hide-and-seek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection [J]. *Annual Review of Medicine*, 2008, 59: 487-501.
- [4] ZHANG Y, SONG F, GAO Z, et al. Long-term exposure of mice to nucleoside analogues disrupts mitochondrial DNA maintenance in cortical neurons[J]. *PloS One*, 2014, 9(1): e85637.
- [5] LEWIS W. Mitochondrial dysfunction and nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy: experimental clarifications and persistent clinical questions [J]. *Antiviral Research*, 2003, 58(3): 189-97.
- [6] ABBAS W HERBEIN G. Molecular understanding of HIV-1 Latency[J]. *Advances In Virology*, 2012, 2012(74): 525-531.
- [7] HAO. The molecular and pharmacological mechanisms of HIV-related neuropathic pain [J]. *Current Neuropharmacology*, 2013, 11, 499-512.
- [8] WAN X Z, LI B, LI Y C, et al. Activation of NMDA receptors upregulates a disintegrin and metalloproteinase 10 via a Wnt/MAPK signaling pathway[J]. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 2012, 32(11): 3910-3916.
- [9] EVERS S, WIBBEKE B, REICHEL D, et al. The impact of HIV infection on primary headache. Unexpected findings from retrospective, cross-sectional, and prospective analyses[J]. *Pain*, 2000, 85(1/2): 191-200.
- [10] HE X. ZHANG Z, ZHANG H, et al. Neurotoxicological evaluation of long-term lanthanum chloride exposure in rats[J]. *Toxicol Sci*. 2008, 103(2): 354-361.
- [11] 陈永宏. HAART治疗对AIDS机会性感染的影响研究[J]. *河北医药*, 2016, 38(2): 218-220.
- [12] 邱奥望, 刘展, 郭军, 等. 神经炎症与神经退行性疾病的关系[J]. *生理科学展*, 2011, 42(5): 353-357.
- [13] 谢妮, 何成松. Wnt信号通路与类风湿关节炎的关系[J]. *医学综述*, 2015, 21(1): 27-30.

Study on Cerebellum Neuroinflammation Induced by NRTI Regulation with Wnt5a Signal Channel

GENG Mingxing, WU Ting, ZHANG Juan, YANG Yi, LIU Xiaokang, SHU Jianhong

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In this study, mice (C57Bl/6) were treated with NRTI drugs AZT (100 mg/kg, sc./days) and 3TC (50 mg/kg) for 2, 5, or 14 days and cerebellum of mice was collected at the end of drug treatment. The expression level of inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α and IL-6) in cerebellum was detected with Western blotting under different treatment time of two drugs. The results show that IL-1 β , TNF- α and IL-6 significantly increase in the cerebellum of NRTI-treated mice. Then, the effect of NRTI treatment for 5d on cerebellum lesion was investigated through HE dyeing. Histomorphology analysis shows that NRTI treatment for 5d does not induce significant cerebellum lesion. Western blotting detection indicates that NRTI in cerebellum can significantly up-regulate Wnt5a, which prompts that NRTI may activate Wnt5a. Then, BOX5- a specific Wnt5a antagonist was applied to restrain Wnt5a. Western blotting result indicates that BOX5 can significantly reduce NRTI-induced inflammatory factor up-regulation. Thus, Wnt5a signal channel participates in regulating cerebellum neuroinflammation induced by NRTI.

Key words: NRTI; cerebellum; neuroinflammation; Wnt5a signal channel; BOX5

(责任编辑: 许惠儿)