



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 _____

U D C _____

密 级 _____

博士学位论文

**NLRP3 炎症体介导的小胶质细胞炎症反应在
锰神经毒性中的作用**

王迪雅

培 养 类 别 _____ 全日制

学 位 类 型 _____ 学术学位

一级学科(专业类) _____ 公共卫生与预防医学

二级学科(专业) _____ 劳动卫生与环境卫生学

研 究 方 向 _____ 环境神经毒理

指 导 教 师 _____ 骆文静 教授

培 养 单 位 _____ 军事预防医学院

二〇一六年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
英文摘要	8
前 言	14
文献回顾	17
一、锰污染及其危害	17
二、小胶质细胞活化与神经元的相互关系	23
三、小胶质细胞活化释放炎性因子的分子机制	25
四、炎症体在小胶质细胞释放炎性因子中的关键作用及其调控的分子信号通路	31
五、自噬生理作用及调控机制	38
六、锰暴露促进小胶质细胞活化的可能机制及其生物学作用	48
正 文	51
实验一 锰暴露对小胶质细胞炎性因子释放及小鼠学习记忆的影响	51
1 材料	52
2 方法	56
3 结果	71
3.1 锰暴露动物模型的建立及其对小鼠学习记忆能力的影响	71
3.2 锰暴露对小胶质细胞活化以及炎性因子释放的影响	75
4 讨论	83
实验二 炎症体 NLRP3 的增多在锰诱导炎性因子释放中的作用	86
1 材料	87
2 方法	90
3. 结果	95
3.1 锰暴露对 NLRP3 炎症体及相关分子表达的影响	95

3.2 干涉 NLRP3 表达对锰诱导的炎性因子释放的改变	99
3.3 运用 qRT-PCR 方法检测干涉 NLRP3 后炎性因子在 mRNA 水平的变化 ..	103
4 讨论	103
实验三 锰诱导的自噬溶酶体功能紊乱对 NLRP3 炎症体的影响	106
1 材料	106
2 方法	108
3 结果	109
3.1 锰作用后自噬溶酶体功能发生紊乱	109
3.2 干涉自噬反应对 NLRP3 表达的抑制作用	112
4 讨论	121
小 结	125
参考文献	126
个人简历和研究成果	137
致 谢	139

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
AD	Alzheimer's disease	阿尔兹海默症
AMPK	AMP-activated protein kinase	腺苷酸活化蛋白激酶
APP	Amyloid peptides's Precursor Protein	淀粉样肽前体蛋白
ATG	Autophagy-related	自噬相关蛋白
ATP	Adenosine Triphosphate	三磷酸腺苷
A β	β -amyloid peptides	β -淀粉样蛋白
BBB	Blood-Brain Barrier	血脑屏障
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	神经营养因子
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	细胞外环腺苷酸
Caspase-1	SysteinyI aspartate-specific protease	半胱氨酸蛋白酶
CNS	Central Nervous System	中枢神经系统
CTLs	C-Type Lectins	C型外源性凝集素
DA	Dopamine	多巴胺
DAMPs	Danger Associated Molecular Patterns	危险相关分子模式
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
GABA	γ -aminobutyric acid	γ -氨基酸
GABARAP	γ -aminobutyric-acid-type-A receptor-associated protein	γ -氨基丁酸 A 型受体相关蛋白
GWAS	Genomewide association study	全基因组关联研究
HD	Huntington's disease	亨廷顿氏综合症
HO-1	Heme-Oxygenase-1	血红素加氧酶
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1	胰岛素生长因子
IL-1RA	IL-1 receptor antagonist	IL-1 受体拮抗剂
IL-1 β	Interleukin-1 beta	白介素-1 β

缩略词	英文全称	中文全称
LC3B	Light Chain 3 Beta	微管相关蛋白 1 轻链 3 β
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	细胞分裂素活化蛋白激酶
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor	巨噬细胞集落刺激因子
Mn	Manganese	锰
MSU	Monosodium urate	尿酸单钠
mTORC1	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1	雷帕霉素复合体 1
NLRP3	NLRs,Pyrin domain containing 3	NLRP3 炎症体
NLRs	NOD-Like Receptors	NOD 样受体
NOS2	Nitric Oxide Synthase	一氧化氮合酶
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns	病原相关分子模式
PD	Parkinson's Disease	帕金森病
PGE2	Prostaglandin E ₂	前列腺素 E ₂
PI3P	Phosphatidylinositol 3-Phosphate	磷脂酰肌醇 3-磷酸盐
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	过氧化物酶体增生物活化受体
PrP	Prion Protein	朊病毒蛋白
PRRs	Pattern-Recognition Receptors	模式识别受体
RAGE	Receptors Advanced Glycation End products	补体受体晚期糖化终产物
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧族
TGF β	Transforming Growth Factor	转化生长因子 β
TLRs	Toll-like receptors	Toll 样受体
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha	肿瘤坏死因子- α
WD	Wilson's disease	威尔氏综合症
α -syn	α -synuclein	α 共核蛋白

NLRP3 炎症体介导的小胶质细胞炎症反应在 锰神经毒性中的作用

博士研究生：王迪雅

导 师：骆文静 教 授

辅 导 教 师：张 建 彬 博 士

第四军医大学军事预防医学院 劳动与环境卫生学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金重点项目（81230063）

中文摘要

背景

锰在自然界中广泛分布，是人体所必须的微量元素。在人体的一些生理反应中均需要锰的参与，包括：免疫反应，ATP 的生成，骨骼的生长，消化等。此外，锰还可以作为机体许多酶的辅助因子，以保障其发挥正常的生理作用。然而，当机体摄入过多的锰则会引起锰中毒的发生，其临床表现主要为类似帕金森氏病病症。研究表明，中枢神经系统是锰作用人体的主要靶器官，黑质纹状体通路更是锰损伤神经系统的关键核团。也正因为如此，国内外广大的学者们也都聚焦于此，总结证实了一系列关于锰能够引起黑质纹状体内多巴胺能神经元功能减弱的经典理论。我们教研室也长期一直致力于研究锰对运动行为能力的影响及其具体机制。然而，随着人们对锰神经毒性的进一步关注，锰对海马脑区调控的空间记忆能力损伤也渐渐被人们所证实。大量的研究结果证实锰在大脑中的蓄积所造成的神经毒性作用与阿尔兹海默症（Alzheimer's disease, AD）、帕金森症（Parkinson's disease, PD）、威尔森氏症（Wilson's disease, WD）等多种神经退行性疾病都有着密切的关系。

在中枢神经系统中，小胶质细胞是免疫反应的关键细胞，主要来源于脑膜，脉络丛以及血管周围。其与巨噬细胞的功能相似，能通过一系列的模式识别受体（Pattern-Recognition Receptors, PRR）实时监测中枢神经系统的内环境。当组织受损

或有害物质入侵的情况下，小胶质细胞发生活化反应，一方面其发挥吞噬作用，清除有害物质；另一方面其能释放大量促炎症因子，诱导外周固有免疫细胞（例如，巨噬细胞、中性粒细胞）以及适应性免疫细胞（例如，T 细胞和 B 细胞）迁移至受损或入侵部位，发挥免疫防御的作用。因此，小胶质细胞的活化以及炎症因子的释放在中枢神经系统的免疫应答防御反应中发挥了至关重要的作用。小胶质细胞的活化后能够快速诱导出多种促炎性细胞因子，其中包括白介素-1 β （Interleukin-1 beta，IL-1 β ）、肿瘤坏死因子- α （Tumor Necrosis Factor-alpha，TNF- α ）和 IL-18 等。本课题组在以往对锰诱导黑质致密部多巴胺能神经元毒性损伤的研究中发现，锰暴露能够诱导中枢神经系统中的小胶质细胞发生活化，其活化后释放的炎症因子可能是锰暴露导致神经元损伤的关键因素。为锰的神经毒性机制的阐明以及锰中毒的防护提供了重要的线索。

小胶质细胞活化后所释放炎症因子的成熟及释放是近年来研究的热点问题之一。在正常的生理状态下，促炎症因子一般处于静息状态。以促炎症因子 IL-1 β 为例，它常以非活性状态存在【36KDa，又称为 IL-1 β 前体（pro-IL-1 β ）】与细胞质中，而在受到刺激的情况下，IL-1 β 发生活化，裂解为活性形式（17KDa，又称为成熟的 IL-1 β ）。炎症体是近年来炎症性疾病研究领域关注的重点，在炎症因子的成熟、释放过程中发挥着重要作用。研究表明，处于静息状态的 pro-IL-1 β 通过加工、裂解最终变成成熟的 IL-1 β 需要一系列相关分子的介导和调控。NLRP3/caspase-1 炎症体目前被认为是调控 IL-1 β 、IL-18 等炎症因子成熟释放的重要分子平台。NLRP3 炎症复合体隶属于 NLRs 家族，由 NLRP3 支架，ASC（PYCARD）接头蛋白以及活化剪切的 caspase-1 三部分组成。NLRP3 受体具有广泛的识别性，参与并介导了多种疾病引起的固有免疫反应，与多种神经性疾病（包括感染，急性无菌性的脑损伤，慢性神经退行性疾病）的病理发生关系密切。在急性感染引起的神经性疾病中，多种 PAMPs（包括病毒：日本脑炎病毒、西尼罗河病毒等，细菌：肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌等）能激活中枢神经系统中小胶质细胞的 NLRP3 炎症复合体。而在慢性非感染性引起的神经炎症中，小胶质细胞和巨噬细胞内的 NLRP3 炎症复合体能被多种病理性的蛋白质【包括 β 淀粉样蛋白（Amyloid-beta, A β ）， α -共核蛋白（ α -synuclein, α -syn）朊病毒蛋白】所激活。活化的 NLRP3 首先发生寡聚化，然后募集接头蛋白 ASC，通过 CARD 结构域与 PYD 结构域相互作用，进一步激活 caspase-1。caspase-1 在静息

状态下为前体 caspase-1 (45KDa, 又称为 pro-caspase-1), 发生活性反应后即裂解为两种具有酶活性的四聚体复合物, caspase-1 p10 和 caspase-1 p20 (分别为 20KDa 和 10KDa 又称为 casp-1 p20 和 casp-1 p10), 具有功能的 caspase-1 进一步加工 pro-IL-1 β 为成熟的 IL-1 β , 并释放于细胞外发挥作用。

调控 NLRP3/caspase-1 炎症体活化成熟的因素很多, 细胞内 ROS 的增多、K⁺浓度改变、细胞内 ATP 水平降低以及自噬的抑制等均能够影响 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化。其中自噬与炎症体之间的关系被人们广泛关注和研究。自噬是细胞维持内环境稳定重要的生理过程。自噬的发生对细胞的存活发挥着至关重要的作用。当细胞内营养匮乏时就会诱导细胞自噬的发生, 除此之外其它原因, 包括变性或聚积的蛋白、细胞器的损伤、ROS、缺氧以及应激等亦能够引起自噬发生的增高。自噬的形成过程包括自噬的启动、延伸、与溶酶体的融合和降解几个重要阶段。自噬的相关基因参与和调控着自噬各个阶段的形成过程。当自噬形成的某一过程受到抑制时则会导致自噬功能处于紊乱状态。研究表明, 许多神经系统疾病的发生都与自噬功能的异常相关, PD、AD、HD 等均发现体内自噬降解过程异常。自噬与 NLRP3/caspase-1 炎症体之间的关系较为复杂, 一方面当 NLRP3/caspase-1 炎症体处于激活状态时, 则会促进自噬的发生; 另一方面, 自噬的过度活化则能够抑制 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化。许多研究表明, 自噬的抑制能够活化 NLRP3/caspase-1 炎症体, 促进 pro-IL-1 β (36kDa) 向成熟 IL-1 β 的转变。虽然自噬能够调控 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化, 但其具体机制至今尚未阐明, 这也成为当今该领域研究的热点和难点。

目的

研究锰暴露所诱导的小胶质细胞活化及其释放的炎性因子在锰介导的学习记忆损伤中的重要作用; 揭示 NLRP3/caspase-1 炎症体活化是锰作用小胶质细胞活化后释放炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 的关键环节; 阐明锰暴露导致的自噬溶酶体功能紊乱与 NLRP3/caspase-1 炎症体活化之间的紧密关系; 并进一步研究锰暴露所诱导的自噬功能紊乱调控 NLRP3/caspase-1 炎症体活化的具体分子机制, 最终为锰的神经毒性的防护和治疗提供关键靶点和理论依据。

方法

1. 通过皮下注射氯化锰的方法，构建亚急性锰暴露的小鼠体内模型，采用原子荧光光谱法检测小鼠血锰和脑锰的浓度，运用恐惧条件箱以及电生理实验评估小鼠锰暴露后学习和记忆能力的改变；

2. 通过免疫荧光化学法检测锰暴露后 NLRP3 炎症体在小鼠海马区以及 BV2 小胶质细胞（之后简称为 BV2）中的表达改变。Western blot 检测 NLRP3/caspase-1 炎症体相关蛋白 NLRP3、cleaved caspase-1，炎性因子 IL-1 β 的表达改变；

3. 通过 ELISA 检测锰暴露后炎性因子 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 的改变，以及 RT-PCR 检测 NLRP3 和炎性因子 IL-1 β 、IL-18mRNA 水平的改变。

4. 通过免疫荧光化学法检测自噬相关蛋白 LC3 的表达影响，Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin 1、Atg5、LC3、p62、组织蛋白酶 B（cathepsin B）蛋白的变化。透射电镜观察 BV2 自噬亚细胞结构的改变；

5. 分别运用 Atg5 siRNA、Baf A1 以及 NH₄Cl 处理 BV2，Western blot 检测锰暴露后 NLRP3 炎症体相关蛋白 NLRP3、cleaved caspase-1，炎性因子 IL-1 β 的表达改变，ELISA 检测锰暴露后炎性因子 IL-1 β 、IL-18 的改变。

结果

1. 皮下注射氯化锰 7 天后，小鼠的血锰和脑锰与对照组（注射氯化钠组）相比明显升高，恐惧条件箱检测以及 LTP 实验发现锰暴露后能够引起小鼠学习记忆能力下降；

2. 海马脑片以及 BV2 免疫荧光化学染色表明，锰暴露能够引起 NLRP3 炎症体的表达增多。Western blot 实验也证实，无论是体内实验或是体外实验锰暴露均能够引起 NLRP3 炎症体相关蛋白 NLRP3、cleaved caspase-1 的增加；

3. ELISA 实验检测发现锰暴露能够诱导炎性因子 IL-1 β 、IL-18 表达增加，并且在 mRNA 水平检测上也得以证实；

4. 免疫细胞化学荧光染色结果提示，锰暴露可导致 BV2 内 LC3 标记的自噬体大量聚集。Western blot 检测结果也证明锰暴露组与对照组相比，自噬体相关蛋白 Beclin 1、Atg5、LC3II 显著增加。在此基础上，p62 蛋白表达升高提示锰暴露能够引起自噬溶酶体降解功能出现障碍。组织蛋白酶 B 的表达增加以及电镜检测所发现的

溶酶体形态异常提示锰暴露能够引起 BV2 溶酶体功能异常。

5. Atg5 siRNA 和 Baf A1 分别抑制自噬体的启动、延伸和与溶酶体的融合后,并不能抑制锰暴露所诱导的 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化以及炎性因子 IL-1 β 、IL-18 的释放。NH₄Cl 作用 BV2 后, Western blot 检测发现其能够降低组织蛋白酶 B 的表达,抑制锰暴露所诱导的 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化以及炎性因子 IL-1 β 、IL-18 的释放。

结论

锰作为一种神经毒性较强的金属,在神经系统内若大量的蓄积,不但能够影响黑质纹状体通路调节的运动行为能力,而且还能够影响海马脑区所调控的学习和记忆能力。锰暴露对学习记忆能力的影响可能与其所诱导的小胶质细胞活化后释放的促炎性因子(IL-1 β 和 IL-18 等)有关。并且锰暴露激活的 NLRP3/caspase-1 炎症体通路是其介导促炎性因子释放的关键因素。自噬溶酶体功能紊乱参与了锰暴露诱导的 NLRP3/caspase-1 炎症体活化,其中自噬体的启动、延伸以及与溶酶体的融合几个阶段的异常并不是自噬溶酶体功能紊乱调控 NLRP3/caspase-1 炎症体活化的重要环节,锰暴露后所导致的溶酶体功能异常以及 cathepsin B 的大量释放是引起 NLRP3/caspase-1 炎症体活化的关键因素。

关键词: 锰; 神经毒性; 小胶质细胞; 炎性因子; NLRP3 炎症体; 自噬

The role of NLRP3 inflammasome mediated microglia inflammation in Manganese-induced neurotoxicity

Candidate for Ph.D: Wang Diya

Supervisor: Luo Wenjing

Tutor: Zhang Jianbin

Department of Occupational and Environmental Health and the Ministry of Education Key
Lab of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment,
School of Public Health, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Sponsored Programs: Natural Science Foundation of China (81230063)

Abstract

Background

Manganese(Mn) is an essential trace element that is distributed in the earth crust. It not only plays a key role in numerous biochemical reactions, including immune response, ATP generation, bone growth, digestion and reproduction, but also serves as a cofactor for various enzymes. In the past two decade, there has been a growing interest in understanding the neurotoxic effect of Mn and their influence on various neurodegenerative diseases, including manganism, Wilson's disease (WD), Parkinson's disease (PD), and Alzheimer's disease (AD). Due to the susceptibility of the brain (especially for the striatum and substantia nigra) to an excess Mn, accumulation of this from either environment or occupational sources leads to a neuron-degenerative disorder referred to as manganism. Patients with manganism present with cognitive and motor dysfunction, which are similar to PD. Additionally, Mn overload in brain may be involved in the etiology of AD, since patients with elevated Mn levels exhibit dementia and typical

pathological signs of AD characterized by neuritic plaques and neurofibrillary tangles.

In the central nerve system (CNS), microglia are the chief innate immune cells which are mainly located in the meninges, choroid plexus and perivascular space. These cells constantly survey the proximal environment through the pattern-recognition receptors (PRRs) that they express (for example, Toll-like receptors and NOD-like receptors (NLRs)). When these cells sense tissue injury or a foreign (infectious) agent, a network of activation pathways is induced in microglia, resulting in an altered microglial morphology, intense respiratory metabolism and the expression and release of immune molecules. This response promotes the recruitment of peripheral innate immune cells (macrophages and neutrophils) and adaptive immune cells (T cells and B cells) to the site of CNS injury as well as further activation of nearby glial cells. However, overactivated microglia can induce significant and highly detrimental neurotoxic effects by the excess production of a large number of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-18 and TNF- α .

Mn has been shown to induce microglial activation, releasing pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β . However, the mechanism of Mn-induced microglial activation involved in the innate immune response remains unclear. IL-1 β is synthesized as an inactive cytoplasmic precursor (36KDa, called pro-IL-1 β), which is cleaved into the biological active form (17KDa, called mature IL-1 β) in response to pro-inflammatory stimuli. The maturation and release of IL-1 β requires cysteine proteases. The inflammasome of NLRP3/caspase-1 platform represents a primary pathway, which can regulate the maturation of IL-1 β . Belonging to the NLRs family, NLRP3 has emerged as the most versatile innate immune receptor because of its broad specificity. The NLRP3 inflammasome, which is comprised by the NLRP3 scaffold, the ASC (PYCARD) adaptor and caspase-1, has been demonstrated to involve in a range of neurological diseases including infection, acute sterile brain and chronic neurodegenerative disease. In acute infections, most of PAMPs like virus (such as Japanese encephalitis virus and West Nile virus) and bacteria (such as *S.pneumoniae* and *S.aureus*) can activate the NLRP3 inflammasome in microglia and macrophages within CNS. While in the case of chronic

sterile inflammation, the NLRP3 inflammasome activation in microglia and macrophages within CNS can be induced by misfolded protein, such as A β , α -synuclein and prion protein (PrP). The active NLRP3 can oligomerize and recruit the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain [CARD]) by using pyrin-domain interaction. Subsequently, caspase-1, which is synthesized as a 45kDa pro-caspase-1(P45), is recruited by ASC through CARD-CARD interactions. Upon cleavage pro-caspase-1 generates two proteins of 10 and 20 kDa (p10 and p20) that form a heterotetrameric complex with enzymatic activity, thus processing and releasing pro-inflammatory cytokines IL-1 β .

It has been reported that multiple factors can lead to NLRP3/caspase-1 inflammasome activation, mainly including extracellular ATP, reactive oxygen species (ROS), as well as the release of cathepsin B from lysosomal damage. Autophagy is a highly conserved homeostatic process by which cytoplasmic macromolecules, excess or damaged organelles, and some pathogens are delivered to lysosomes for degradation. Autophagy is identified as a pro-survival pathway. Activation of autophagy can occur in the event of stress due to starvation, depletion of growth factors, endoplasmic reticulum stress, oxidative stress and infection. The autophagy related genes regulate autophagy pathway. For example, the autophagy adapter protein p62 binds to ubiquitinated protein aggregates and the autophagosome marker protein LC3, targeting these protein aggregates for degradation in the autolysosome. It has been reported that autophagy dysfunction plays a vital role in a range of neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD) and Alzheimer's disease (AD). Recent reports reveal a complex interplay between NLRP3/caspase-1 inflammasome and autophagic pathways. Activation of NLRP3/caspase-1 inflammasome promotes the autophagy pathway. However, over-reaction of autophagy pathway prohibits the NLRP3/caspase-1 inflammasome activation. Further research is required to clarify the complex reciprocal regulation of inflammasome and autophagic pathway in neurodegenerative diseases.

Aims

1. Investigation on the role of Mn-induced microglial activation, thus releasing pro-inflammatory cytokines in the Mn mediated hippocampal-dependent impairment of learning and memory.
2. Investigation on the mechanism of Mn-induced microglial activation involved in neuroinflammation via NLRP3/caspase-1 inflammasome.
3. Investigation on the relationship between autophagy and NLRP3/caspase-1 inflammasome activation in Mn-induced neurodegenerative diseases .
4. Investigation on the molecular mechanism of autophagy dysfunction in regulating the activation of NLRP3/caspase-1 inflammasome.

Methods

1. A sub-acute Mn exposure in murine model was established by subcutaneously injected with manganese (II) chloride tetrahydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) based on a published protocol. Mn levels in blood and brain tissue in various groups of mice were tested by atomic fluorescence spectrophotometer. Contextual fear conditioning and patch clamp were used to evaluate the learning and memory ability of mice.
2. Immunofluorescence staining was carried out to investigate whether Mn induced the activation of NLRP3/caspase-1 inflammasome in hippocampal microglia. The protein expression of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β was analysed in response to Mn, LPS and NaCl by western blotting.
3. The protein expression of IL-1 β , IL-18 and TNF- α was analysed by ELISA. The gene expression of NLRP3, IL-1 β and IL-18 was analysed by qPCR.
4. Immunofluorescence staining was carried out to evaluate the protein expression of LC3. The protein expression of Beclin, Atg5, LC3, p62 and cathepsin B was analysed by western blotting. Morphological change of BV2 associated with autophagy were analyzed by Transmission electron microscopy (TEM).
5. NLRP3 and Atg5 in BV2 were knocked-down by siRNA and two types of pharmacological inhibitors (including NH_4Cl and Baf A1) were used, to evaluated the

protein expressions of NLRP3/caspase-1 inflammasome as well as the pro-inflammatory cytokine (including IL-1 β and IL-18) in response to Mn by western blot and ELISA, respectively.

Results

1. Compared with NaCl-injected group, the concentration of Mn in blood and brain tissue was significantly increased after 7 days of Mn injection. The accumulation of Mn in the hippocampal region significantly reduced contextual fear conditioning, indicating that Mn selectively influences the learning and memory ability of mice.

2. After 7 days of Mn-injection, the hippocampal region displayed strong and extensive staining for NLRP3 compared with the NaCl group *in vivo study*. After 6h Mn treatment, BV2 were positively stained for NLRP3 in the cytoplasm compared with the untreated cells *in vitro study*. Then further protein analysis by western blot demonstrated that the microglia can be activated by Mn both *in vivo* and *in vitro*, thus leading to the up-regulation of NLRP3/caspase-1 inflammasome.

3. The release of pro-inflammatory cytokine (including IL-1 β and IL-18) was increased both in gene and protein level in response to Mn demonstrated by qPCR and ELISA, respectively.

4. After 6h Mn treatment, BV2 were positively stained for LC3 in the cytoplasm compared with the untreated cells *in vitro study*. And the protein expression of autophagy related genes (including Beclin 1, Atg5 and LC3II) was significantly increased. Additionally, the up-regulation of p62 and cathepsin B, as well as the increased number of dysfunctional swollen lysosomes containing high dense particulate materials and mitochondrial vacuolus as evident by TEM, indicated that Mn could induce lysosomal dysfunction in BV2.

5. Blocking autophagy pathway by Atg5 siRNA and Baf A1 could not prohibit the activation of NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway in BV2 in response to Mn induction. However, the release of cathepsin B could be down-regulated by NH₄Cl in BV2, thus further prohibiting the activation of NLRP3/caspase-1 inflammasome, as well as the release of pro-inflammatory cytokine, including IL-1 β and IL-18.

Conclusion

Mn an essential, yet potentially neurotoxic metal can cross the blood-brain barrier (BBB) and blood-cerebrospinal fluid barrier (BCB) in a sub-acute Mn exposure of murine model. Excessive accumulation of Mn in the brain region of mice(especially in the striatum and substantia nigra) can lead to the cognitive and motor dysfunction. The microglia can be activated by Mn both *in vivo* and *in vitro*, thus leading to the activation of NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway, releasing of IL-1 β , involved in the innate immune response. Excessive accumulation of IL-1 β in the hippocampus may cause neuron and oligodendrocyte dysfunction or death thus contributing to the impairment of learning and memory. Additionally, excessive Mn induction causes autolysosomes dysfunction in the microglia. The release of protease cathepsin B caused by lysosomal damage or leakage is recognized by the immune system, resulting in the activation of the NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway. Taken together, the data in this study about the neurotoxic effect of Mn in the brain region (especially in the striatum and substantia nigra), as well as the molecular mechanism of Mn-induced neuroinflammation via NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway and Mn-induced autolysosomes dysfunction represent a step forward in providing a better understanding for further research in the role of Mn in the etiology of neurodegenerative disease.

Key words: Manganese; Neurotoxicity; Microglia; Inflammatory factor;
NLRP3 inflammasome; Autophagy

前 言

锰在自然界中广泛分布，是人体所必须的微量元素。然而，当机体摄入过多的锰则会引起锰中毒的发生，其临床表现主要为类似帕金森氏综合症症状。研究表明，中枢神经系统是锰作用人体的主要靶器官，黑质纹状体通路更是锰损伤神经系统的关键核团。但近几年锰暴露对学习记忆能力影响的屡见报道，学习记忆能力损伤作为锰作用神经系统的新靶点及其具体分子机制急需我们解决。

小胶质细胞是中枢神经系统内关键的免疫细胞，其主要来源于脑膜，脉络丛以及血管周围。与巨噬细胞的功能相似，小胶质细胞能通过一系列的模式识别受体实时监测中枢神经系统的内环境。当组织受损或有害物质入侵的情况下，小胶质细胞发生活化反应，一方面其发挥吞噬作用，清除有害物质；另一方面其能释放大量促炎症因子，诱导外周固有免疫细胞以及适应性免疫细胞迁移至受损或入侵部位，发挥免疫防御作用。因此，小胶质细胞活化在中枢神经系统的免疫应答防御反应中发挥了至关重要的作用。小胶质细胞活化后能快速诱导出多种促炎性细胞因子，包括 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-18 等。炎症因子释放被认为是损伤神经元的重要因素。本课题组在以往对锰诱导黑质致密部多巴胺能神经元毒性损伤的研究中发现，锰暴露能够诱导中枢神经系统中的小胶质细胞发生活化，其活化后释放的炎症因子可能是锰暴露导致神经元损伤的关键分子。为锰神经毒性机制的阐明以及锰中毒的防护提供了重要的线索。

小胶质细胞活化后所释放炎症因子的成熟及释放是近年来研究的热点问题之一。在正常的生理状态下，促炎症因子一般处于静息状态。而在受到刺激的情况下，IL-1 β 发生活化。炎症体是近年来炎症性疾病研究领域关注的重点之一，在炎症因子的成熟、释放过程中发挥着重要作用。研究表明，处于静息状态的 pro-IL-1 β 通过加工、裂解最终变为成熟的 IL-1 β 需要一系列相关分子的介导和调控。NLRP3/caspase-1 炎症体目前被认为是调控 IL-1 β 、IL-18 等炎症因子成熟释放的重要分子平台。NLRP3 炎症复合体隶属于 NLRs 家族，由 NLRP3 支架，ASC (PYCARD) 接头蛋白以及活

化剪切的 caspase-1 三部分组成。NLRP3 受体具有广泛识别性,参与并介导了多种疾病引起的固有免疫反应,与多种神经性疾病的发病机制关系密切。NLRP3 活化首先发生寡聚化,然后募集接头蛋白 ASC,通多 CARD 结构域与 PYD 结构域相互作用,进一步激活 caspase-1。Caspase-1 在静息状态下为前体 caspase-1 (45KDa, 又称为 pro-caspase-1),发生活性反应后即裂解为两种具有酶活性的四聚体复合物, caspase-1 p10 和 caspase-1 p20 (分别为 20KDa 和 10K Da 又称为 casp-1 p20 和 casp-1 p10),具有功能的 caspase-1 进一步加工 pro-IL-1 β 为成熟的 IL-1 β ,并释放于细胞外发挥作用。在锰暴露过程中小胶质活化及其释放的炎性因子参与了锰诱导的神经元损伤,可以说小胶质细胞炎性因子的释放是锰损伤神经元最为重要的原因之一。因此,探讨锰暴露如何诱导小胶质细胞活化以及炎性因子释放的分子机制将会为锰神经毒性的防治提供重要的线索。

调控 NLRP3/caspase-1 炎症体活化成熟的因素很多,细胞内 ROS 的增多、K⁺浓度改变、外源性 ATP 的刺激以及自噬的抑制等均能影响 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化。其中,自噬与炎症体之间的关系被人们广泛关注和研究。自噬是细胞维持内环境稳定的重要生理过程。自噬的发生对细胞的存活发挥着至关重要作用。当细胞内营养匮乏时会诱导细胞自噬的发生,除此之外其它原因,包括变性或聚积的蛋白、细胞器的损伤、ROS、缺氧以及应激等亦能引起自噬反应的升高。自噬的形成过程包括自噬的启动、延伸、与溶酶体的融合和降解四个重要阶段。自噬的相关基因参与并调控着自噬各个阶段的形成过程。当自噬形成的某一过程受到抑制时会导致自噬功能处于紊乱状态。研究表明,许多神经系统疾病的发生都与自噬功能的异常相关,PD、AD、WD 等均发现体内自噬降解过程异常。

自噬与 NLRP3/caspase-1 炎症体之间的关系较为复杂,一方面当 NLRP3/caspase-1 炎症体处于激活状态时,则会促进自噬的发生;另一方面,自噬的过度活化则能抑制 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化。许多研究表明,自噬的抑制能够活化 NLRP3/caspase-1 炎症体,促进 pro-IL-1 β 向成熟的 IL-1 β 转变。虽然自噬能调控 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化,但其具体机制至今尚未阐明,这也成为当今该领域研究的热点和难点。我们团队在前期研究中发现,锰暴露能显著抑制黑质致密部多巴胺能神经元内自噬水平。提示锰暴露与自噬关系紧密,因此本研究进一步探索锰

暴露所介导的 NLRP3/caspase-1 炎症体活化与自噬过程之间的相互作用关系。

综合以上的阐述，我们不禁会产生这样的疑问，是否锰暴露所诱导的小胶质细胞活化以及炎性因子的释放是依赖于 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化；是否在锰暴露能够影响海马脑区小胶质细胞自噬的水平；是否锰诱导自噬功能的紊乱是介导 NLRP3 炎症体的活化的关键因素？如果自噬功能异常是调控 NLRP3/caspase-1 炎症体活化的，那么其具体的分子机制是什么？以上种种的问题正是我们本课题研究的主要思路，也是我们亟待解决的关键科学问题。以上的问题如果能够解决将对锰神经毒性的研究拓宽思路，为锰神经毒性的防治提供重要的理论依据。

文献回顾

一、锰污染及其危害

1. 锰污染的流行病学特征

1.1 锰的存在形式以及对机体生理活动的重要作用

锰是一种非常重要的金属离子，也是一种无处不在的微量元素，是机体正常生长发育，以及维持细胞内稳态过程中是必需的[1]。锰有多种化学形式的存在，其中包括氧化态、盐以及螯合物等主要形式。氧化态包括 Mn^{2+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{4+} 、 Mn^{6+} 、 Mn^{7+} 等离子的存在形式，盐包括硫酸、葡萄糖酸等，螯合物则包括天冬氨酸、盐湖所酸酯、琥珀酸等。在环境中锰多以无机化合物的形式存在。无机锰用于钢铁的生产、干电池组的制造，也用于生产高锰酸钾、制造玻璃、纺织品漂白以及火柴和烟花的制造，锰的氧化剂则作为在焊接过程中焊条涂料。锰的有机化合物则作为燃油添加剂甲基环戊二烯羰基锰（MMT），杀真菌剂（例如农药代森锰、代森锰锌），同时有机锰也用作磁共振成像过程中的造影剂[2]。

锰是机体内所必须的元素之一，参与着机体多项生命活动，回顾文献我们不难发现，锰的主要功能包括：1 锰参与了骨骼形成的过程中，并且在脂肪以及碳水化合物的代谢过程中，在血糖的调节以及钙吸收等正常生理活动过程中都具有十分重要的作用；2 在人类以及动物体内，锰可以作为多种神经元以及胶质细胞完成正常活动所需的酶的辅助因子，这些酶参与了神经递质传递以及新陈代谢过程[3]；3 不仅如此，大量的体外实验证明锰参与了星形胶质细胞的形成过程[4]，这也充分体现了锰的重要性和必要性。锰的缺乏虽然不常见，但缺锰可以导致先天缺陷、生育功能障碍、骨骼畸形、虚弱无力、对癫痫等神经系统疾病的易感性等多种生理功能障碍[5, 6]。

1.2 锰中毒的发生

大量研究表明，尽管锰在机体多种代谢过程中发挥重要作用，但过量锰暴露会引起精神状态和认知反应异常，并导致运动能力失常，而这些都被认为是锰中毒症状[7]。

慢性吸入含有高锰浓度 ($>5\text{mg}/\text{m}^3$) 的空气、饮用含有高浓度锰的水、肠外营养、慢性肝坏死都会引起锰的神经毒性[8, 9]。过量锰暴露会使锰蓄积在大脑, 引发基底神经节系统功能障碍, 出现厌食、冷漠、肌肉和关节疼痛等类似帕金森综合症 (Parkinson's Disease, PD) 症状, 造成神经功能紊乱[10, 11]。

James Couper 在 1837 年最早对这一现象进行了描述: 他发现五个在锰矿石粉碎机上工作的工人出现了肌肉无力、姿势弯曲、低声细语、肢体震颤、以及流涎等症状。此后在 1941 年出现了第一例水中锰污染的环境案例。随后, 陆续在矿工、冶炼厂、焊工和干电池工人中出现了多例有关锰中毒病例的报道。锰中毒的神经毒性症状具有迟发性, 一般在锰暴露 1-2 年后才出现, 且进展缓慢。锰中毒早期, 病人会出现情绪化、狂躁、强迫或暴力行为、出现幻觉、睡眠和饮食障碍以及性功能障碍等精神症状, 只有少数病人会出现行为运动方面异常。之后病人会出现运动功能障碍, 如运动迟缓僵化、静止性震颤、姿势失稳、面具脸以及语言障碍[12]。随后, 病人会陆续出现语音障碍及书写障碍, 同时也会出现肢体的肌张力障碍, 部分患者会出现趾尖支撑身体、肘部弯曲、脊柱直立的步伐状态, 被称作“公鸡步伐”。停止锰暴露后, 锰中毒病人的神经功能障碍会持续发展, 且具有不可逆转性[13, 14]。但是, 如果在锰中毒早期阶段对病人及时诊断并使用一些螯合药物进行治疗, 它所造成的症状是可以逆转的。此外, 有研究认为锰可能作为一种潜在的神经毒素参与了肝性脑病的发病机制, 因为在患有慢性肝病病人的血液和脑中都有锰蓄积, 病人也同时出现了锥体外系症状; 这些病人进行肝脏移植后, 上述症状消失[15]。

锰中毒主要发生于职业环境中的高浓度锰暴露。但新近研究表明, 低剂量的职业暴露, 如通过空气吸入等于或低于职业暴露标准浓度的锰, 同样对机体具有毒性作用。在锰中毒引起机体结构性损伤之前, 还可能出现神经行为及神经内分泌的变化, 这些变化可能与致病因素有一定关联。此外, 除了锰的暴露水平和持续时间外, 年龄、性别、种族、遗传、位置及现有的医疗条件都可能与锰毒性有关[16]。

2 锰的毒性作用

2.1 锰的吸收途径

胃肠道是锰的主要吸收途径。机体也可以通过呼吸道吸入空气中的锰。非法静脉注射含锰的毒品被认为是锰的第三种暴露途径[17]。

饮水饮食是锰最主要的摄入途径。日常饮食摄入少量锰是机体所必需的，但如果饮用或食用了高锰浓度的水或食物则会产生毒性作用。孟加拉国的饮用水存在锰污染 ($>2.0\text{mg/L}$) [18]，高于 WHO 所制定的饮用水锰含量标准 ($400\ \mu\text{g/L}$) 4 倍[19]，研究发现孟加拉国学生数学运算成绩偏低。加拿大高锰含量的饮用水可导致学龄儿童头发锰含量显著升高[20]；头发锰含量增高被认为可引起过度活跃的行为增加、认知发育受损及智力低下[21]。意大利铁合金工厂附近的土壤中富含锰，工厂周围居住的学龄儿童被发现存在运动协调及气味识别障碍[22]。对美国 2167 口井进行检测后发现，约有 5.2% 的被调查井水中锰含量超标。因此，饮用水中锰污染不仅是发展中国家的公共卫生问题，这一问题在发达国家同样值得关注。

经空气吸入造成的锰暴露主要存在于电焊厂和冶炼厂。吸入的锰可绕开肝脏进入血流，并通过嗅神经束绕过血脑屏障直接进入大脑。大鼠模型锰暴露后 8-48h，锰可快速通过嗅神经束进入大脑，提示三叉神经在锰经鼻腔入脑的运送中具有重要作用。

机体内的锰主要蓄积于骨、肝、肾、胰腺、肾上腺和脑垂体腺。不同组织中的锰阈值不同，骨是 1mg/kg ，胰腺是 1.04mg/kg ，肾皮质是 0.98mg/kg [23, 24]。人体正常血锰浓度为 $4\text{-}15\ \mu\text{g/L}$ 。最近一次中国人口调查表明，与男性相比，女性血锰水平较高[25, 26]。

2.2 锰的转运途径

人体内的锰主要以 Mn^{2+} 和 Mn^{3+} 两种氧化形式存在[3, 27]。 Mn^{2+} 在血液中主要与白蛋白和 β -球蛋白等高分子片段结合，形成水合离子；也可与碳酸氢盐复合物、柠檬酸和其它低分子结合。大多数 Mn^{3+} 都会与铁转运蛋白 (Tf) 结合，形成更为稳定的复合物。存在于肝、肾、胰腺、骨及脑中的锰主要以 Mn^{2+} 形式存在[28]。

脑脊液中的 Mn^{2+} 可与锰柠檬酸盐等低分子化合物结合，由柠檬酸盐形式进行转运。尽管 ZIP8 等转运蛋白被认为参与了锰在大脑中的运输，但大量研究发现 Mn^{2+} 主要通过二价金属转运蛋白 (DMT1) 进入大脑。 Mn^{2+} 还可通过钙离子通道进入大脑，但转运效率显著低于转运体介导的传输[29, 30]。 Mn^{3+} 也可通过与转铁蛋白的结合进入大脑[31]。

职业暴露是锰中毒的主要来源，多通过呼吸经肺摄入。吸入的锰可以离子形式

被吸收, 并通过血流被运送到各个组织中[32]。Mn²⁺是最容易被吸收的氧化态, 被吸入的锰中 60-70%都会通过黏膜纤毛运动被肺排出[6]。

锰可通过三种途径进入大脑: 通过血脑屏障(Blood-Brain Barrier, BBB)中的大脑毛细血管内皮细胞; 通过脉络丛进入脑脊液, 之后进入大脑; 从鼻腔的嗅神经直接进入大脑。锰在脑组织中的正常生理水平范围是 2-8 μ M[33, 34]。脑脊液是锰的主要运输途径[35, 36]。

2.3 锰在体内的分布

进入机体的锰主要蓄积于肝脏 (1.2-1.3mg/kg)、脑 (0.15-0.46mg/kg) 和骨 (1mg/kg)。骨骼中蓄积的锰占全身锰量的 40%[23-26, 37]。研究发现, 亚慢性锰暴露后, 锰主要蓄积于大鼠的股骨、胫骨、肱骨和顶骨, 蓄积浓度在 6 周后达到稳定状态[38]。

锰在血红细胞内的分布主要由于转铁蛋白受体和 DMT1 的存在[39, 40]。细胞内的锰可作用于线粒体并引起能量代谢紊乱, 但线粒体并不是胞内锰主要蓄积的细胞器。电子能谱成像技术检测后发现, 锰主要蓄积于异染色质和细胞核中, 细胞质中蓄积较少, 线粒体中的蓄积量最低。但在慢性锰暴露后, 线粒体中的锰蓄积量最高。过度或长期接触锰会导致富含多巴胺的基底神经节锰的高度蓄积, 光谱学检测发现基底神经节中的锰主要存在于线粒体, 造成神经退行性疾病的发生[41]。

3 锰具有神经毒性

3.1 锰的神经毒性症状

锰暴露后在神经系统中有大量的蓄积, 机体发生锰中毒反应, 这就造成了一系列与帕金森病相类似的临床症状, 例如厌食、情绪冷淡、肌肉和关节的疼痛等等。在这些症状后不久, 患者还会出现记忆丧失、强迫行为、视觉障碍、幻觉和妄想以及定向障碍, 这些在临床上都是锰中毒的具体症状[42]。锰的过量摄入主要会影响两个重要的器官, 那就是大脑和肺。锰进入大脑和肺的具体过程在之前有所介绍。大脑中锰水平的升高会影响铁在体内的平衡状态, 不仅如此, 锰在大脑中的蓄积还会使得身体发生兴奋性中毒反应, 线粒体功能障碍, 氧化应激, 并诱导蛋白质的聚合, 从而改变与锰共享相同转运系统的其它二价金属离子的体内平衡状态[43]。尽管体内锰水平的增加对神经化学以及神经传导物质的破坏性影响还未被完全揭示, 但

是高浓度锰可以改变 γ -氨基酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、多巴胺以及谷氨酸等神经递质在大脑中的含量[44, 45]。

3.2 锰的毒性靶器官

大脑是锰毒性的主要靶器官。正常情况下脑组织中锰的平均干重为 1-2 $\mu\text{g/g}$ [46]。通过对在工作场所受到锰暴露的受试工人进行磁共振成像 (MRI), 发现较其他脑部位, 锰主要蓄积在受试对象大脑的苍白球。使用 X 射线荧光 (XRF) 成像技术, 可以说明锰在大脑中的分布情况。在大鼠大脑中, 锰在苍白球部位存在最高浓度的蓄积, 其次是黑质致密部、丘脑、尾状核、轴突束, 和皮层。然而染锰大鼠的海马较对照组大鼠没有比它们蓄积更多的锰, 但实际锰暴露可以增加海马中的锰使其达到和黑质致密部以及丘脑相同的程度[2, 47]。所以说明, 海马对锰毒性的敏感程度与其他脑部位相同[48]。此外, XRF 的数据还显示锰蓄积所在的大脑部位同时也存在高浓度铁 (Fe) 的蓄积[2]。

将脉络丛上皮细胞系 Z310、大鼠脑内皮细胞系 RBE4、多巴胺能的 N27 和 PC12 细胞系进行体外实验后发现, 与 Z310 和 RBE4 细胞相比, PC12 和 N27 细胞中锰蓄积水平最高。四种细胞中锰多聚集于细胞核内, 线粒体和微粒体中锰含量较少; 但慢性锰暴露后线粒体中锰蓄积量最多, 提示线粒体在锰神经毒性中的作用不可忽视[49]。

4 锰损伤学习记忆能力的新依据

4.1 在生物样品中检测锰存在

在过去的二十年里,几个检测的分析方法已经开发出来锰水平和监测 Mn 在生物样品内稳态[50]。大多数方法需要消化的有机矩阵分析之前,最近开发的方法成功地测量微量元素浓度没有样品消化。在过去的检测方法中,生物样品的类型决定了消化使用的方法。以血液、唾液的样本或者组织样本为例,在消化时样本中的离子交换需要酸(硝酸或硫酸)来进行消化[51]。外源性的锰可以污染生物样本和影响测量的准确性。目前用于测定生物标本中锰水平的方法包括原子吸收光谱法(AAS)、原子发射光谱法(AES)、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)、质谱法(ICP)、中子活化分析法、X射线荧光分析法、分光光度法以及放射性跟踪化验法[47]。

4.2 锰在神经退行性病变中的作用

职业或自然环境锰暴露与多种神经退行性疾病的发生发展关系密切，如威尔森氏综合症（Wilson's disease, WD）、帕金森氏综合症（Parkinson's Disease, PD）、阿尔兹海默氏综合症（Alzheimer's disease, AD）和亨廷顿氏综合症（Huntington's disease, HD）等。正常情况下，锰在脑内的含量受到严格调控，但过量的锰进入机体则会造成锰在脑中的大量蓄积。蓄积于脑内的锰分布并不一致，且锰在不同脑区的蓄积具有不同的神经毒性作用。大脑黑质致密部的锰蓄积会引发机体的行为运动功能障碍，而锰在海马部位的蓄积可造成学习记忆能力的缺失。此外，过量锰蓄积与蛋白异常折叠或沉积与神经退行性疾病的发生和发展有着密切的关系。锰还可通过损伤破坏线粒体功能，过量消耗 ATP 和诱导活性氧产生，来导致细胞死亡或坏死[52]。

有研究表明，给线虫的 PD 模型进行急性锰暴露，可以引起多巴胺能神经元的退化[53]。通过对 PD 患者大脑的解剖研究，人们发现了氧化应激反应与 PD 之间的紧密关联。具体来说，急性锰暴露后发现体内 Fe 含量的增加，并且在黑质中存在明显的氧化应激反应与脂质过氧化反应[54]。

锰可引起淀粉样原纤维的形成和朊病毒蛋白（Prion Protein, PrP）、 α 共核蛋白（ α -synuclein, α -syn）等蛋白的异常蓄积并造成细胞最终的死亡。这些蛋白与金属结合后可改变其构象状态、溶解度及聚合情况。在对 AD 的研究中，锰可以与 β 淀粉样蛋白（Amyloid beta protein, A β ）结合并促使其在大脑中沉积形成老年斑，最终对学习记忆等高级脑功能产生影响[55, 56]。

总结上述报道，研究人员认为锰与 PrP、 α -synuclein、以及 A β 等蛋白的相互作用，可以通过引起蛋白的异常蓄积造成细胞最终的死亡[57, 58]。通过芬顿和哈伯-韦斯反应来激活氧化还原反应循环，可以耗尽细胞内产生的抗氧化剂，从而增加活性氧族（HO, O $_2^-$, 或者 H $_2$ O $_2$ ）的水平。这些高活性反应组分可以引起氧化应激反应从而对脂类、蛋白质以及 DNA 造成损伤，并且进一步消耗 ATP 最终造成细胞死亡[59]。这些病理生理机制，包括兴奋性中毒、氧化应激反应、蛋白质聚合、线粒体功能障碍以及改变金属体内平衡状态。而这些机制与已知的神经退行性疾病包括 PD、AD 以及 HD 等的生理病理机制相同[60]。

二、小胶质细胞活化与神经元的相互关系

1 小胶质细胞的正常生理功能

1.1 小胶质细胞的起源

巨噬细胞几乎存在于机体所有器官之中。Pio del Rio-Hortega 首次以“神经胶质细胞”的概念描述了存在于中枢神经系统内的巨噬细胞。他发现了一种存在于神经外胚层的小细胞，认为它来源于中胚层且与体内其它巨噬细胞有一定关联[61]。这种存在于中枢神经系统内特殊的巨噬细胞就是小胶质细胞。研究发现小胶质细胞的祖细胞可能来源于卵黄囊[62]。

1.2 小胶质细胞在中枢神经系统中维持内稳态

一旦脑实质发生感染或受到外界刺激，小胶质细胞就会迅速发生活化，吞噬病原体、细胞碎片以及死细胞[63, 64]。小胶质细胞可作为被吞噬物质的抗原提呈细胞，还可通过释放效应分子并从血中募集其它免疫细胞，限制中枢神经系统感染的发生。此外，小胶质细胞释放的生长因子及抗炎因子可帮助受损组织再生。因此，小胶质细胞不仅是中枢神经系统中重要的免疫反应细胞，也是生理条件下组织内稳态的稳定剂和调节器[65]。

小胶质细胞在不同脑区的分布密度有所不同，胼胝体中约为 5%，黑质中约为 12%[66]。静息状态下小胶质细胞具有胞体较小，突起细长等特有的形态特征。正常情况下，小胶质细胞与周围细胞的位置不会重叠，且胞体的位置也相对稳定。体内成像技术发现，小胶质细胞在脑组织中呈现高度的动态过程，它会连续不断地延伸或回缩突起[67]。当识别到病原体或其它炎性刺激物后，小胶质细胞就会迅速收回突起，发挥着重要的免疫监控功能。小胶质细胞可被 Toll 样受体（Toll-like receptors, TLRs）的子集、清道夫受体及细胞因子和趋化因子受体激活。新近研究还发现自噬可能会影响炎症的发生发展过程，并且对小胶质细胞产生激活作用[68]。尽管自噬和巨噬细胞之间的相互作用已有所报道，但小胶质细胞与自噬是否存在关联及其可能分子机制还未被阐明，亟待进一步的研究。

2 小胶质细胞活化在神经元损伤中的作用

2.1 正常情况下小胶质细胞与神经元的相互关系

作为中枢神经系统中的免疫细胞，小胶质细胞在神经元损伤及 AD、PD 等神经退行性疾病的发生发展中发挥重要作用。小胶质细胞对分子及免疫系统具有遗传影响，而全基因组关联研究（Genomewide association study, GWAS）也确定了多种免疫基因的突变体是迟发性 AD 发病的可能危险因素，因此小胶质细胞可能在其中显现着前所未有的重要性[69, 70]。正常生理条件下，小胶质细胞积极参与体内平衡的调控，并通过释放神经营养因子（Brain-derived neurotrophic factor, BDNF）及转化生长因子 β （Transforming growth factor, TGF β ）对受损的神经元进行修复，发挥神经保护作用；而在病理条件下，小胶质细胞会处于过度活化增殖状态，不仅会影响神经元的功能，还能改变其在感染、损伤、缺血以及炎症过程中的免疫功能。

2.2 病理情况下小胶质细胞与神经元的相互关系

小胶质细胞的不同活化状态可产生神经毒性或神经保护两种不同的效应。脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）激活的小胶质细胞可释放 IFN- γ 或 TNF- α 等炎症因子，被称为经典的活化反应，这类小胶质细胞也被称为是“M1”型小胶质细胞[71]。M1 型小胶质细胞可通过释放 IL-1 β 、TNF- α 、STAT3、IL-6、IL-12、IL-23 等促炎因子及活性氧族（Reactive Oxygen Species, ROS）等自由基，在病原体防御及神经元缺失中发挥重要作用[72]。另一种小胶质细胞的激活方式为“M2”型，它们具有抗炎表型，可通过大量释放 IL-10、IL-4、IL-13 及 TGF- β 等抗炎因子和少量促炎性因子来促进血管生成和组织的重塑及修复。

通过对小鼠 AD 模型的研究发现，与对照组相比，AD 模型小鼠中 M1 型（IL-1 β 、TNF- α 、iNOS、IL-6）和 M2 型（YM1、Arg-1、Mrc、IL-10）小胶质细胞释放因子水平均有所增加。在疾病发展过程中，小胶质细胞活化会经历从神经保护型即 M2 型向更为经典的活化类型转变；AD 模型中的小胶质细胞在后期也会经历从 M2 型向 M1 型的转变。这些研究结果被认为是小胶质细胞为适应不同环境刺激并通过一系列的机体反应而发生活化的证据[73]。由于小胶质细胞在促炎性的神经毒性作用和抗炎性的神经保护作用中都能够保持微妙的平衡，因此认为它在疾病的发生发展过程中具有非常重要的作用[74]。

2.3 小胶质细胞活化在 AD 中的作用

在神经退行性疾病 AD 的发生发展过程中，小胶质细胞能有效作用于淀粉样肽前体蛋白（Amyloid peptides, their precursor protein, APP）和神经纤维缠结。AD 发生早期，小胶质细胞可通过其表面的清道夫受体（Scavenger Receptors, SRs）促进 A β 的清除，延缓 AD 的发病进程。A β 可间接诱导炎症系统的活化反应，导致 AD 的发生和发展。具体来说，A β 可通过 CD36 受体、Fc 受体、toll 样受体和补体受体晚期糖化终产物（complement receptors advanced glycation end products, RAGE）刺激小胶质细胞使其处于持续活化的状态。这些受体会通过增加 A β 的产生和阻碍 A β 的清除，最终导致神经元损伤。因此，抑制由 A β 诱导的小胶质细胞活化可减轻炎症因子的释放和 A β 的蓄积，并可改善行为能力方面的功能障碍。 β 分泌酶（ β -secretase，BACE1）是 A β 蓄积的关键酶[75]。Sastre 等发现炎症反应可通过 BACE1 增加 A β 的蓄积，同时 BACE1 介导的神经炎症与 Tau 诱导的神经退行性病变也关系密切。新近研究发现小胶质细胞还可通过学习记忆相关的 BDNF 信号通路促进 CX₃CR1^{CreER} 小鼠模型的学习相关突触的形成[76]。

综上所述，我们发现各种外界环境刺激、不同信号的特异性及细胞间的相互作用都可影响小胶质细胞的活化类型，决定其最终发挥神经保护或神经损伤作用，在今后的研究中我们应当更为严谨的看待这一问题[73]。

三、小胶质细胞活化释放炎症因子的分子机制

如图 1 所示，正常情况下，小胶质细胞的表型受到严格调控，其活化信号的传导对神经退行性病变及神经炎症的发生具有重要作用。在形态学上，小胶质细胞呈现出一种动态且活跃的表型，它可通过自身持续的回缩和延伸进入脑实质。脑微环境中的小胶质细胞可迅速对体内环境的变化做出反应，因此在各种病理性事件的早期都会发现有小胶质细胞的活化，小胶质细胞的活化与神经炎症相关的病毒或细菌感染、多发性硬化等自身免疫性疾病、头部外伤、血管系统损伤、神经精神疾病以及神经退行性疾病等都有着密切的关联[62]。活化的小胶质细胞最初的存在意义是其可作为一个敏感的组织损伤的标志物。因此，小胶质细胞活化和神经炎症的发生可能都是环境因素暴露后神经毒性作用下的一致作用[64]。

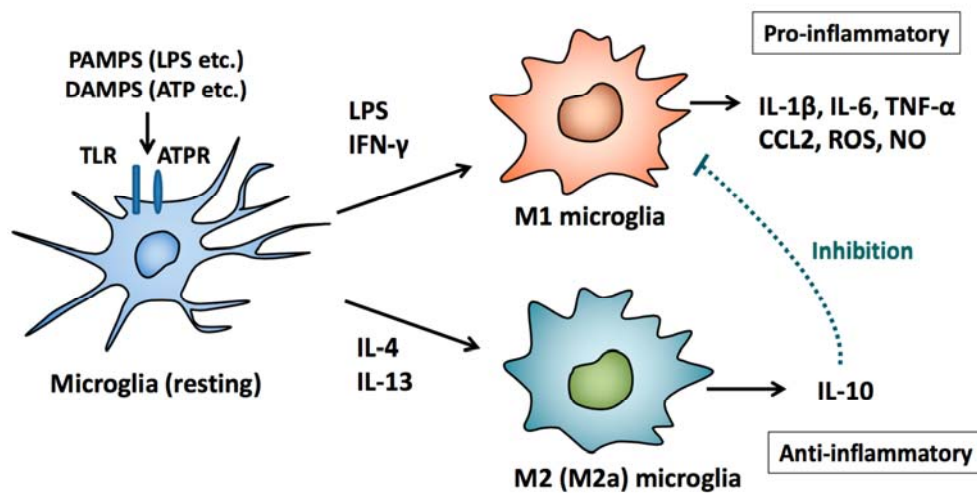


图 1. 小胶质细胞活化机制图[77]

1 影响小胶质细胞活化的可能因素

1.1 促进小胶质细胞活化的因素

1.1.1 可溶性因子

组织间质液是人们首先认为可能影响小胶质细胞表型的因素，这一点与巨噬细胞有所不同。通常情况下，巨噬细胞被血清蛋白隔离并因此发生活化，这也是血清成分可选择性激活巨噬细胞的证据[78]。此外，在中枢神经系统中，转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 和前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 等细胞因子易被检测出，而细胞因子的中介物对这些因子的释放始终处于一种下调的状态。处于可溶或受约束的状态细胞因子在巨噬细胞生存、增殖以及分化的过程中都具有非常重要的作用。

1.1.2 细胞间的相互作用

小胶质细胞与其周围环境中的细胞存在紧密联系，并呈现受体-配体的配对现象，这对它们的表型具有重要的影响。根据受体的免疫受体酪氨酸活化基序 (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs, ITAMs) 以及免疫受体酪氨酸抑制基序 (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs, ITIMs) 的表达水平，可以对骨髓细胞进行分类[79]。对受体进行阻断后，受体会承载胞内 ITIM 的共有序列，即磷酸化 Src 家族蛋白激酶，而这一过程将会阻断 Syk 蛋白激酶中的 SH2 结构域与细胞内活化的关联。与之相反，ITIM 承载受体会通过 Src 对 SHP-1 和 SHP-2 磷酸酶

的募集而发生磷酸化，最终造成细胞内活性的降低。其中，CD200R 受体由小胶质细胞表达，且具有 ITIM 基序。在 CD200 缺失的小鼠体内，这一受体通常由神经元表达，而小胶质细胞会呈现形态变化及 MHC-II 类分子表达上调，这些改变与多种神经炎症性疾病的发生关系密切。受体-配体的配对在这里也发挥着类似的作用。其中，巨噬细胞表达的 CD172a/SIRPa 与 CD47 配体结合后，可通过 ITIM 基序抑制细胞吞噬作用。Neumann 等也发现小胶质细胞所表达的 TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2) 以及其受体会参与细胞吞噬作用，并对促炎性因子的释放产生抑制作用。这种受体的损失和消融使得其针对凋亡细胞碎片的清除功能降低和炎症介质释放增加，这对炎症的进一步发生发展都起到了推动作用。通过配体 DAP12 传导的 TREM2 受体信号可能与细胞活性有关，但其如何导致巨噬细胞失活尚不清楚。研究发现，缺失 TREM2 或 DAP12 的巨噬细胞会使得炎性因子的释放增多，所以被认为与 TLR 激动剂具有相同的表型。TREM2 或 DAP12 缺失的病人还会出现成年痴呆性脑白质病变，而这些受体的表达可能与小胶质细胞维持静息状态有关，其受到干扰或缺失都可能使小胶质细胞发生活化，进一步证明了小胶质细胞在中枢神经系统自稳态调控中发挥重要作用[80]。

1.1.3 典型的小胶质细胞活化状态

受到外界刺激而活化的小胶质细胞会从静息状态向活化状态转变，并具有细胞突起增多等特殊形态。此外，活化的小胶质细胞还可能出现胞体的昆虫样变、突起增粗及吞噬作用增强等状态。由于越来越多的炎症性疾病被认为与小胶质细胞的活化密切相关，因此进一步认识小胶质细胞活化及其具体机制显得尤为重要[81]。

1.1.4 影响小胶质细胞活化表型的因素

小胶质细胞的活化是一个重要阶段，中枢神经系统中各种轻微刺激（神经电位的传输、细胞外电解质组分、胞内可溶性因子的改变等）都可被它感应到。小胶质细胞从静息状态向活化状态的转变具有独有特征，其数量会迅速增多，且位置会向病灶区域移动。小胶质细胞对外界刺激做出的应急响应可使它在第一时间进入防御功能或转换至组织修复功能。活化的小胶质细胞可作为抗原递呈细胞或巨噬细胞抵挡外界刺激的入侵[82]。

小胶质细胞的活化通常受到胶质细胞间的接触、CD200R-CD200 通路的神经电

位活动和/或一些可溶性神经递质的调控，但小胶质细胞对各种外界刺激产生不同应答方式的具体机制仍不清楚。因此，小胶质细胞过度活化的过程受到广泛关注，包括对无害刺激的错误应答、不同 PRRs 诱导出的毒性效应及促炎反应，如 Toll 样家族、复合物、MAC1 等[83]。

活化状态下的小胶质细胞具有可塑性，不仅其数量增多，胞体也相应增大，且可发生增殖及迁移。研究发现，巨噬细胞集落刺激因子（Macrophage-colony Stimulating Factor, M-CSF）、嘌呤受体 P2X₇、GM-CSF、BDNF、神经营养蛋白 3 (NT3) 或 IL-1、IL-5 等可能都参与小胶质细胞的活化与增生过程[84]。

小胶质细胞出现胞体肥大、细胞因子合成增多、CD11b 上调等表型反应后，细胞会发生膨胀反应，4-7 天后会达到最大状态。研究发现，在停止刺激一个月内，小胶质细胞的数量与刺激前相比仍有增多。小胶质细胞的迁移和增殖可能与 β 受体亚基的 IL-3 及趋化因子受体 5 有关，小胶质细胞的迁移还和它与周围细胞及 ECM 的相互作用有关。研究发现，小胶质细胞表面整联蛋白的表达与活化与 ECM 组分和细胞因子的变化有关。小胶质细胞通过可控制它的伪足，使其发生退化并且与 ECM 分离，而这也是小胶质细胞转化为迁移表型过程中出现的特点[85]。此外，大量的化学诱导剂被认为可以影响小胶质细胞的状态，并控制小胶质细胞的功能。其中，最为重要的就是三磷酸腺苷（Adenosine Triphosphate, ATP）[86]。ATP 释放的具体机理不清楚，但认为可能与细胞分裂素活化蛋白激酶（Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK）或细胞外信号调节激酶（Extracellular signal-Regulated Kinase, ERK）通过小胶质细胞 P2Y₁₂ 受体以及钾离子外排等机制有关。一些神经肽也具有调控小胶质细胞状态及功能的作用，如血管紧张肽 II、血管舒缓激肽、内皮素、甘丙肽以及神经降压肽等；此外，具有胞内信号传导功能的一氧化氮（Nitric Oxide, NO）也被认为具有类似作用[87]。

还有一些因素可使小胶质细胞迅速发生形态学改变，如细胞突起的增粗、细胞回缩及迁移能力的丧失。为了维持小胶质细胞的活化，调控小胶质细胞运动功能的嘌呤受体 P2Y₁₂ 会有所下调，而引发吞噬作用的 P2Y₆ 受体会有所下调[88]。小胶质细胞不同的活化状态与不同形式的外界刺激和损伤都有着密切的关系。运用放射自显影技术对一侧大脑半球损伤后增殖的小胶质细胞进行观察，发现主要包括以下几种阳性细胞：具有多个伪足突起的细胞；过度肥大的细胞；增殖后紧密聚集的细胞

(APCs) 以及圆形细胞 (巨噬细胞) [89]。小胶质细胞的增生一般多出现多个伪足突起的细胞形式, 且发生于损伤后 12 小时内; 损伤发生 24 小时后, 该类型小胶质细胞占有所有细胞的 50%, 并且位置远离损伤部位; 损伤后两天、四天及八天后, 分枝状的小胶质细胞数量和所占区域都有所减少, 而 APCs 状细胞及巨噬细胞状细胞都有所增加[90]。

小胶质细胞表型的变化可使其向损伤区域移动, 并增加细胞的吞噬作用。在体外研究中, 一旦正常环境发生改变, 小胶质细胞就会自发释放细胞因子, 并改变自身的形态。运用电子显微镜技术观察小胶质细胞的吞噬作用后发现, 活化的小胶质细胞胞质内存在髓鞘碎片, 这可能是由于星形胶质细胞分泌的黏附分子激活髓鞘吞噬作用, 引起吞噬作用的增强。Smith 和 Hoerner 还发现小胶质细胞和星形胶质细胞都具有减弱髓鞘吞噬作用的能力, 检测胆固醇酯的形成发现其吞噬作用增加了四倍。小胶质细胞中退化的髓鞘具有的吞噬作用是由 MAC1、SRA1/2 【Steroid Receptor ribonucleic acid (RNA) Activator 1/2】及 Fc γ 受体 (IgG 的 Fc 受体) 所介导的[91]。

1.2 抑制小胶质细胞活化的因素

抑制小胶质细胞活化是一个复杂的过程, 需要中枢神经系统内的微环境具有较好的抑制作用, 同时也需要神经元和其它细胞的参与其中, 共同维护大脑内环境的稳定状态。通过抑制小胶质细胞的活化, 可使其避免发生过度活化的情况。参与抑制小胶质细胞活化的调节信号除了可由神经元进行传导, 还可通过趋化因子及 CX₃CR1 进行, 而这些传导功能可能是通过糖蛋白 OX-2 进行的。此外, TGF- β 家族也发挥着重要作用。细胞因子主要由活化的星形胶质细胞产生, 且这些细胞因子具有很强的免疫抑制及神经营养作用, 体外研究发现 I、II、III 三种亚型均可抑制分枝状小胶质细胞的增殖[76]。内皮细胞释放的内皮素 2 可减轻由 IFN- γ 激活小胶质细胞后所产生的免疫反应。与之相反, 血管收缩剂内皮素 1 和内皮素 3 具有免疫增强效应。由于小胶质细胞可发生增殖, 具有转化成巨噬细胞、生成自由基和释放 TNF- α 等细胞因子的能力, 因此其具有潜在的神经毒性作用[92]。这些作用可以一直腺苷受体激动剂: 腺苷酸 2A 受体可以调节多种急性神经性损伤动物模型中的脑损伤, 包括脑局部缺血、脑外伤及出血性休克等。小胶质细胞的增殖还可受 β 肾上腺素激动剂 (肾上腺素、异丙肾上腺素以及毛喉素等) 的调节, 它可作用于 β_2 肾上腺素受体来

增加细胞外环腺苷酸 (cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP)水平[93]。此外, 增强胞内 cAMP 水平被认为可抑制小胶质细胞的神经毒性和诱导细胞凋亡[94]。因此, 有研究认为对 CD29 和 CD54 等小胶质细胞表面抗原表达的调控可能依赖于 cAMP 通路。多种物质都可增强胞外 cAMP 的表达水平, 如西布朗腺苷单磷酸、异丁基甲基黄嘌呤等, 它们可以通过抑制以剂量依赖方式表达的 β -1 整联蛋白 CD29 和细胞外黏附分子 CD54 来增强 cAMP 的表达[95]。

近年来, 越来越多的具有大脑保护作用的内源性信号调节物质被确定, 包括神经肽、大麻素类、激素类 (雌激素、糖皮质激素) 和小胶质细胞凋亡本身, 这些因素在抑制小胶质细胞过度活化中具有重要作用。然而, 一旦这些防御机制受到影响, 或由于过度的炎症反应使其功能受到抑制, 小胶质细胞就会失去自身的防御功能, 发生过度反应, 最终导致神经元死亡及神经退行性病变的发生[96]。

2. 小胶质细胞释放的炎性因子种类

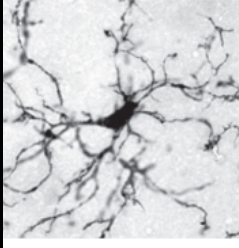
2.1 M1 型小胶质细胞释放的致炎因子

如图 2 所示在经典的小胶质细胞活化状态中, 小胶质细胞可感应到 LPS 及促炎因子 IFN- γ , 固有免疫系统中将出现 T-辅助细胞(T helper cells, Th)1 型。在 Th1 反应过程中, 活化的小胶质细胞会表达 CD68 和 CD16/32, 并产生大量的氧化代谢产物(NO 和 O₂•⁻)、蛋白酶类及促炎症介质 (TNF, IL-1 and -2) [71]。这些物质的释放的在宿主抵御病原体和肿瘤细胞的过程中具有重要的作用, 但其自身也可对正常细胞产生损伤[97]。

2.2 M2 型小胶质细胞释放的抗炎因子

由 IL-4 和 IL-13 诱导小胶质细胞产生的活化形式中, 免疫系统中出现 Th2。在 Th2 应答过程中, 活化的小胶质细胞会表达 CD206 以及精氨酸酶 1, 还会分泌 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等抗炎因子及转化生长因子 β (Transforming Growth Factor β , TGF- β) [98]。此外, 还发现 Th1-促炎性因子和一氧化氮合酶 (Nitric Oxide Synthase, NOS2) 的生成降低, 氮氧化物 NOX2 (包括噬菌细胞 NADPH 氧化酶) 发生活化。小胶质细胞活化状态的改变受两种不同的过氧化物酶体增生物活化受体 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, PPAR) 家族成员调控, 分别是 PPAR- γ 和 PPAR- β / δ , 它们在组织中广泛分布, 且具有配体特异性, 可对小胶质细胞特征性表型中基因的

表达产生调控作用[99]。PPAR- β/δ 在成人中枢神经系统普遍存在，但 PPAR- γ 却在小胶质细胞中占主导地位。新近研究发现 PPAR- γ 是调节炎症的主要靶点，可通过抑制促炎基因的表达形成由 PPAR- γ 介导的反抑制转录过程，并进一步通过抑制炎症促进组织修复和血管生成[99]。

Microglia	Stimulus	Receptor	Signaling	Activation pattern	Output
	Serum proteins such as fibrinogen	CD11b/CD18 (Mac-1)	Rho-family GTPases	Danger	Cytoskeletal rearrangement, enhanced phagocytosis
	Glutamate	mGluR2	GPCR/NF- κ B	Neurotoxic	TNF- α
	ATP, ADP (brief exposure)	P2Y12	GPCR	Danger	Process extension
	UDP (prolonged exposure)	P2Y6	GPCR	Danger	Phagocytosis
	Peripheral nerve injury	Unknown	Src-family kinases	Axotomy and loss of input	Via P2X4, mediate neuropathic pain
	CX3CL1	CX3CR1	GPCR	Inhibition	Reduced IL-1, ROS, iNOS/RNS
	CD200	CD200L	ITIM	Contact-dependent inhibition	Reduced inflammatory cytokines, less MHC class II

* Abbreviations: GPCR, G protein-coupled receptors; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IRF, interferon regulatory factor; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; LPS, lipopolysaccharide; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; TLR, Toll-like receptor.

图 2. 小胶质细胞释放炎症因子的种类[64]

四、炎症体在小胶质细胞释放炎症因子中的关键作用及其调控的分子信号通路

炎症体是由细胞内感染或者应激等刺激情况所触发激活的一种分子平台，它是多种促炎因子如白介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素 18 (Interleukin-18, IL-18) 等成熟的场所，在体内固有免疫防御系统中具有重要的作用。然而异常的炎症体活化状态，与人类遗传类炎症疾病或者后天的炎症类疾病都有着密切的联系[83]。因此这也就突出表现出了炎症体及其相关通路在免疫应答中的重要性。

1 炎症体的分类和功能

Tschopp 和他的团队在 2000 年首次提出了炎症复合体这个概念[100]。他们发现组织损伤，固有免疫反应，以及 caspase-1 所介导的炎症反应存在潜在的相关性。而在胞浆中存在一种复合蛋白分子平台，其能有效的激活 caspase-1 所介导的固有免疫反应，这个多蛋白复合体，称为炎症体。随着对炎症体研究的深入，越来越多的文献报道由炎症体所介导的固有免疫反应与一系列中枢神经系统疾病密切相关[101]。在中枢神经系统中，主要存在 3 种免疫细胞，包括小胶质细胞、巨噬细胞、星形细胞。它们能通过分子相关模式识别受体 (PRRs) 识别来自外界的病源相关分子模式 (PAMP) 以及来自于

宿主自身的危险相关分子模式 (DAMP), 从而激活免疫反应。这些 PRRs 主要包括存在于细胞膜表面的 Toll 样受体, 以及存在于细胞胞浆中的 Nod 样受体[102]。

1.1 炎症体的分类与结构

炎症复合体 (主要由 NLRs 家族组成) 是固有免疫系统中加工和处理炎症反应信号的主要分子平台, 它主要包括 3 个组成成分: 胞浆中的 PRRs, caspase-1, 以及连接二者相互作用的接头蛋白。NLRs 主要由 22 个人类基因所编码, 其一般由 NACHT 结构域, LRRs 结构域以及不同的氨基末端结构域组成。NACHT 结构域主要负责结合核苷酸和蛋白质寡聚化, 而不同的氨基末端结构域用以区分不同类型的 NLRs 家族成员[103]。NLRP 亚家族属于 NLRs 家族的主要成员之一, 其主要特点是存在一个 PYD 结构域。而 NLRP3 炎症体是 NLRP 亚家族中目前研究最为广泛的炎症体之一, 它主要是由 NLRP3 框架蛋白, ASC (PYCARD) 接头蛋白以及 caspase-1 蛋白组成。之前研究报道多种不同的病原体能激活 NLRP3 炎症复合体, 其中部分细菌 (例如白色念珠菌、酵母菌等) 通过 Syk 激活炎症体, 此外, 有些细菌 (例如李斯特菌和金黄色葡萄球菌等) 通过释放成孔毒素激活炎症体; 有些病毒 (例如仙台病毒、腺病毒、流感病毒等) 也能激活炎症体[104]。

前期的研究认为, 炎症体的特征性运作多关注髓系细胞, 例如巨噬细胞、树突状细胞, 然而, 额外的细胞也可以激活炎症体。例如, 在皮肤刺激或者紫外照射的刺激下的角质细胞会激活 NLRP3 炎症体。炎症体是由自身寡聚化支架型蛋白所组成的, 在体外研究中一些 NLR 家族的成员已经展现出了它们的炎症体活性, 但在体内观察中, 只有少部分 NLR 家族成员明显展现出了炎症体的生理功能[105]。其中 NLRP1, NLRP3 以及 IPAF 作为危险信号的哨兵, 时刻监测着自身寡聚体。它们可以通过同型的 NACHT 结构域的相互作用, 来形成高分子量的复合物 (可能是六聚体或者七聚体), 以此来激发 Caspase-1 的自身活性。还有 HIN-200 家族成员中的 AIM2, 它可以介导炎症体的组合。炎症体的合成以及活化的具体机制都依赖于天然存在的单个蛋白框架。在 NLRPs 家族中各个结构域之间的相互保护也说明了非特征性的家族成员也可以接到或者调节炎症体的活化[106]。

炎症体在炎症反应中的作用受到大家广泛的关注, 但炎症因子以炎症体为平台从成熟到释放的过程以及其中的具体机制还并未被解决, 炎症体的激活过程以及活

化状态下的炎症体在机体受到损伤、感染等外部刺激时的聚体作用，也是研究人员进一步探讨的方向。

1.2 NLRP3 炎症体的结构特点

NLRP3 炎症体包括作为支架的 NLRP3 蛋白，以及具有 PYD、CARD 结构的连接蛋白 ASC 和 caspase-1（图 3）。在受到刺激的情况下，NLRP3 的 LRR 功能区被认为能够调节自动抑制反应。在 NLRP3 的活性反应过程中，NLRP3 的寡聚化能够诱导 PYD 功能区的聚合，同源的 PYD 功能区与 ASC（凋亡相关样点状蛋白，炎症体的主体接头蛋白）蛋白之间相互作用。这里提到的 ASC 是与凋亡相关样点状蛋白[107]。ASC 编码 22-KDA 蛋白，包含有：amino (N)-terminal pyrin domain 氨基末端 (PYD) 和 a car-boxy (C)-terminal 羧基末端 CARD 功能区，作为募集其他包含有 PYD-和 CARD-功能区蛋白的接头蛋白，ASC 可以通过自身的同型蛋白 CARD 和 PYD 功能之间的相互作用从而在炎症体的活性反应中发挥重要的作用[108]。研究人员认为 ASC 是 NLRP3 支架蛋白与 pro-caspase-1 之间的连接器。ASC 所包含的 PYD 和 CARD 结构域可以募集下游 pro-caspase-1 的 CARD 结构域，并且通过它们之间的作用促使 pro-caspase-1 变成具有活性的 caspase-1 以加工 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18，使得这些促炎性因子从不具活性的前体蛋白成熟为具有活性的促炎性因子 IL-1 β 、IL-18 并以这种成熟的形式释放到细胞外[109, 110]。

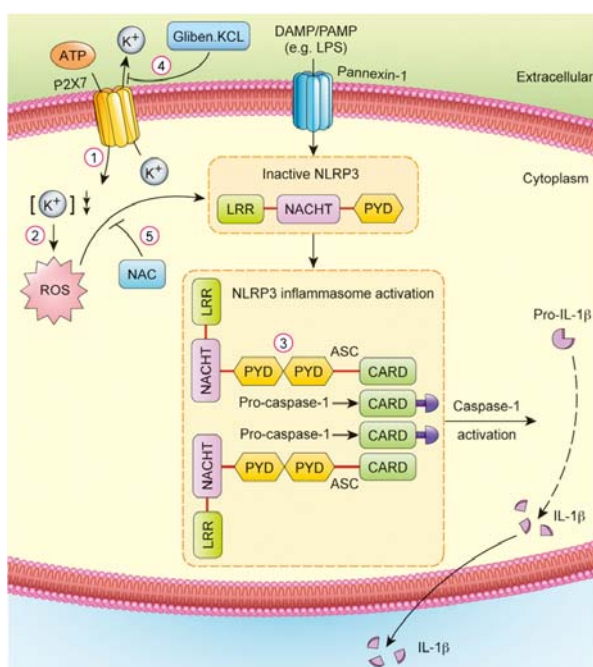


图 3. NLRP3 炎症体结构在激活后的变化[108]

2 NLRP3 炎症体的激活与抑制

2.1 NLRP3 炎症体的活化条件

NLRP3 炎症体的活性在促炎性因子的成熟以及释放过程中具有重要的作用，那么 NLRP3 炎症体是如何从非活化状态转变为活化状态的呢？激活它的途径又有哪些？这些内容将在这一部分进行介绍。

在以往的研究中发现，诱导 NLRP3 炎症体激活主要通过 3 中途径（图 4），第一种途径：细胞外的 ATP 刺激 P2X7 受体，而它作为 ATP 的门控离子通道，受到外界刺激后可以激活钾离子的外排，从而促使 Pannexin-1 膜孔的形成[111, 112]。膜孔形成后外界的李LRP3 炎症体激活剂就可以通过膜孔穿过细胞膜直接进入细胞质中激活 NLRP3 炎症体。第二种途径：一些结晶或者颗粒的形成（例如： β 淀粉样蛋白、白矾、二氧化硅等）可以作为 NLRP3 炎症体的激动剂[113, 114]。这些激动剂被吞噬细胞吞噬后可以导致溶酶体损伤，从而促使细胞释放溶酶体组分物质，以此来激活 NLRP3 炎症体，其中一种溶酶体蛋白酶-组织蛋白酶 B 因为具有 NLRP3 炎症体的作用而受到研究人员的广泛关注[115, 116]。第三种途径：所有 NLRP3 炎症体的激动剂都可以触发 ROS 的产生，而这一共同的通路可以促使 NLRP3 炎症体的激活[117]。

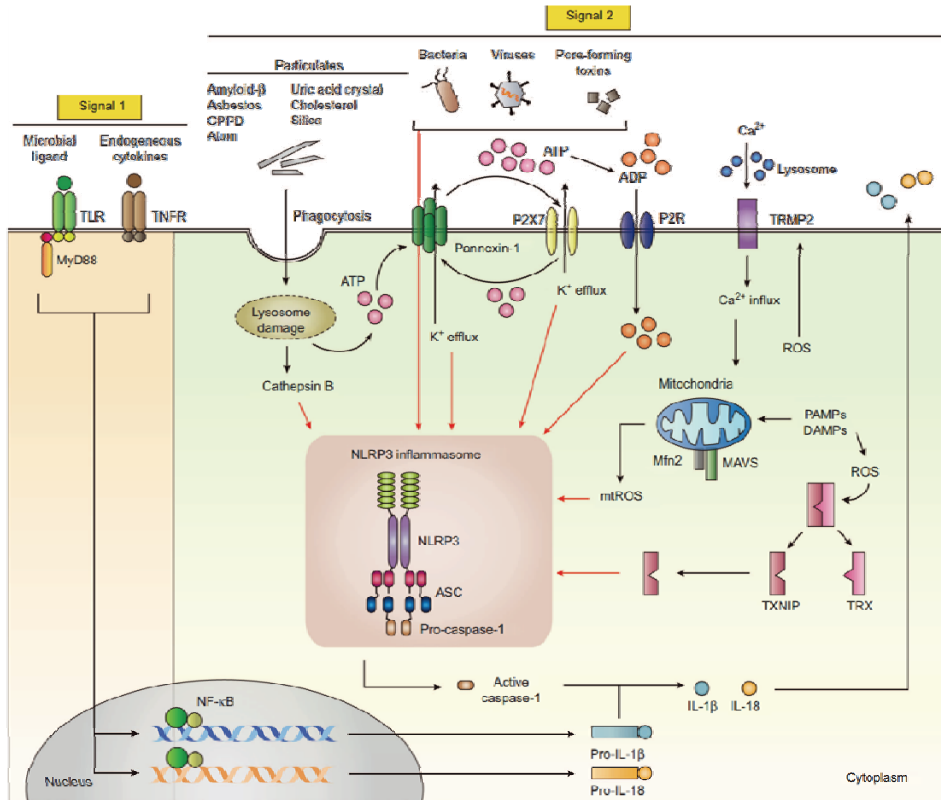


图 4. NLRP3 炎症体激活途径示意图[118]

2.2 抑制 NLRP3 炎症体活化的因素及其机制

炎症体在控制感染等炎症反应的过程中主要是通过炎症体抑制剂中的微生物演化。这些抑制剂包括病毒性的 PYD 蛋白以及各种细菌的毒力因子，它们可以抑制 Caspase-1 的活性。一些主要的机制也可以抑制炎症体的活化，同时抑制免疫活性中可能的危险因素。近日有研究结果显示，小鼠的 CD4⁺效应器及 T 细胞都可以表现出对 NLRP3 的抑制，从而抑制 NLRP3 介导的 Caspase-1 的活性以及 IL-1 β 的释放。它们之间的抑制作用主要依赖于细胞与细胞之间的接触，并且由 TNF 家族配体的信号所介导。这样一种抑制性通路可能会帮助“断开”适应先天免疫反应的免疫系统[119]。许多包含 CARD-和 PYD-结构域的蛋白也可以抑制 NLRP3 等炎症体的活化。它们的抑制途径是通过阻断炎症体组件的补充。这其中 PYD-包含蛋白包括热蛋白 (pyrin)、POP1 (PYDC1) 以及 POP2 (PYDC2) [120]。因为这些基因多存在于灵长类动物，所以依赖 POP1 和 POP2 所进行的炎症体活化抑制作用的生物相关性是很难被评估的。但是对于 pyrin 在调节炎症体活化过程中的生理意义却已有较为明确的认识，因为 pyrin 的突变在人类家族性地中海热疾病中已有证实，但是此蛋白在疾病中的潜在驱动机制还有待澄清。Pyrin 可能是通过隔离连接蛋白 ASC 来抑制 NLRP3 炎症体的，也有研究人员认为 pyrin 自身就可以构成炎症体。对于 pyrin 具有重要调节功能的证据来自于一个 pyrin 相互作用蛋白—PSTPIP1，许多自身炎症疾病如化脓性关节炎、坏疽性脓皮症以及痤疮中 PSTPIP1 的突变与 IL-1 β 表达升高有关[121]。CARD-包含蛋白则包括人体内的 COP、INCA 以及 Caspase-12，这些蛋白通过抑制 Caspase-1 来抑制 NLRP3 等炎症体的激活。其中 Caspase-12 被认为是 Caspase-1 抑制剂的假作用物，但是 Caspase-12 在大多数人群中是不具有功能的[122]。

对于 NLRP3 炎症体活化的影响因素，使之发生活化的参与因素 Caspase-1 的重要性是毋庸置疑的，它的功能改变也必然是影响 NLRP3 炎症体活化功能的重要节点。在 NLRP3 炎症体活化后，被激活的 Caspase-1 参与释放成熟的 IL-1 β ，这些都属于 Caspase-1 在细胞外的功能[123]。然而 Caspase-1 虽然具有强大的细胞内功能，却在许多实验设定当中的被刺激细胞内无法被检测出来，这些研究结果提示 Caspase-1 的释放是一个快速的激活反应，因此如何对这一过程进行监管并探索其中的作用机制对于控制 Caspase-1 的活性具有重要的作用。由此也可以更好的控制 NLRP3 炎症体活化的进程[124]。

随着生物进程的发展，大量潜在的炎症体抑制剂不断进化，人体在这其中选择可以控制炎症体活化的物质。在激活 NLRP3 炎症体的不同途径中，会有不同的影响因素参与其中，所以在对 NLRP3 炎症体活化产生的下游效应我们需要反观上游因素，以此来确定 NLRP3 炎症体所介导的机体或细胞变化。

3. 炎症体与神经性疾病的关系

近期的研究发现炎症体同样在神经相关性疾病中发挥了重要作用，下面主要对神经相关性疾病与炎症体的关系展开论述。

3.1 急性脑组织感染，炎症体活性反应的作用

在中枢神经系统中，急性感染可以诱发脑炎或脑膜炎，其中炎症体的活化，所介导的固有免疫反应发挥了重要的作用。研究发现，同一种细菌引起的感染，在中枢神经系统和其他系统诱导的免疫反应，其效果截然不同。同为肺炎链球菌引起的感染，在小鼠肺炎的动物模型中，NLRP3 炎症体的活化能有效的抑制该细菌引起的感染，起到保护的作用。NLRP3 基因缺失的小鼠表现出更为严重的肺部感染症状。相反，肺炎链球菌引起的脑膜炎感染，NLRP3 炎症体介导免疫反应，释放促炎症因子反而会加重大脑病理性的改变[125]。在大脑中，促炎症因子 IL-1 β 或 IL-18 不仅不能有效的抑制细菌的感染，反而会加速大脑中的病理性炎症反应[126]。此外，其他细菌（例如金黄色葡萄球菌、结合分支杆菌、嗜肺军团菌）能激活小胶质细胞内的 NLRP3 或 NLRC4 炎症体，引起神经炎症反应[127]。

在中枢神经系统中，病毒引起的感染与细菌引起的感染效果不同。由西尼罗病毒，流感病毒 A 和单纯疱疹病毒感染的小鼠动物模型中，炎症体介导的免疫反应，释放促炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 具有神经保护的功能。在这些疾病中，炎性因子的释放能有效控制病毒血症，从而提高神经元的存活率。此外，由虫媒病毒、日本脑炎病毒、西尼罗病毒引起的感染，可导致病毒性脑膜炎。日本脑炎病毒能激活小胶质细胞中的 NLRP3 炎症体，诱导 IL-1 β 和 IL-18 的释放[128]。而西尼罗病毒的感染能有效的增加血浆中 IL-1 β 的含量，并且在小鼠 NLRP3 或 ASC 基因缺失的西尼罗病毒感染动物模型中，与对照组相比，基因缺失的实验组小鼠死亡率大大增加。这些结果表明炎症体活性反应在西尼罗病毒感染中起到了有效的保护作用。ASC 基因缺失在中枢神经系统和其他系统所达到的效果各不相同[129]。在西尼罗病毒感染的小鼠模型中，ASC 基因的缺失抑制了外周固有免疫反应，增加了西尼罗病毒的复制，而

在中枢神经系统中，ASC 基因的缺失反而促进了免疫反应。西尼罗病毒感染同时还能诱导神经元释放 IL-1 β ，从而抑制了病毒的复制，保护了神经元[130]。

3.2 急性无菌性脑损伤

由中风等原因引起的急性脑损伤将引起局部的固有免疫反应，导致神经组织的损伤。缺血性脑中风的动物模型，caspase-1 基因的缺失将保护神经元免受损伤，表明炎症体的活性反应在脑中风的过程中起到了致病性的作用[131]。IL-18 基因敲除的小鼠并不能保护中枢神经系统免受缺血引起的损伤，而 IL-1R 的拮抗剂能有效保护大鼠的脑组织免受由于缺血引起的损伤，表明促炎症因子的神经毒性作用同时依赖于 IL-1 β 和 IL-1 α ，如果小鼠同时缺失了这两种基因，能有效的抑制缺血引起的病理性反应。虽然 IL-1 α 并不是受 caspase-1 直接调控，但是 caspase-1 能通过降解蓄积的抑制细胞溶质的 IL-1R2，从而间接调控 IL-1 α 的释放[125]。

急性无菌性脑损伤，炎症体的活性反应可能是由细胞膜表面的 pannexin-1 膜孔所调控。研究报道，皮质扩散抑郁症引起的相关性头痛和大肠炎相关肠道神经元的死亡都与 pannexin-1 介导的炎症体活性反应相关联[112]。然而，小鼠中风的动物模型中，pannexin-1 基因的敲除抑制了疾病的发展，尤其是减少了梗死的范围，但是基因敲出并不会影响 IL-1 β 的释放，表明在中风的模型中，炎症体的活性反应并不受 pannexin-1 基因所调控[132]。

3.3 慢性无菌性中枢神经系统炎症

在中枢神经系统中，慢性炎症反应会加剧大脑组织的损伤，导致其功能丧失。长期的中枢神经系统慢性炎症反应能引起多种硬化症，其与炎症体的活性反应，T 细胞的活化，巨噬细胞的迁移等方面相关。在实验性自身免疫引起的脑炎的小鼠动物模型中，NLRP3 和 ASC 基因敲除的小鼠抑制了免疫反应，表明自身免疫引起的脑炎受到 NLRP3 炎症体的调控[133]。NLRP3 基因缺失后，IL-1 β 和 IL-18 释放减少，有效的减少了 T 细胞的活化和迁移，从而抑制脑炎的发展。

在体内铜宗诱导的固有免疫反应，引起神经的脱髓鞘，IL-1 β 和 IL-18 发挥了不同的作用。IL-1 β 基因敲除的小鼠，与对照组相比，髓鞘再生延迟，表明 IL-1 β 可能促进髓鞘再生的过程。相比较，IL-18 基因敲除反而能促进髓鞘的再生[134]。NLRP3 基因敲除的小鼠，与野生组相比较，铜宗所诱导的病理学改变延缓，表明在这个疾病模型中，炎症体的活性反应能促进疾病的发展，而 IL-1 β 和 IL-18 起到了截然不同

的作用[135]。

在神经退行性疾病（例如 AD、PD、HD 等）中，炎症体所介导的固有免疫反应促进了它们的发展。在中枢神经系统中，免疫细胞的炎症体（尤其是 NLRP3 炎症复合体）对于异常蛋白质蓄积的敏感性，促进了疾病的发展。淀粉样蛋白- β ($A\beta$) 是 AD 中老年斑的主要组成成分，也是其重要致病因素[136]。研究发现， $A\beta$ 能有效的激活巨噬细胞内的 NLRP3/caspase-1 炎症复合体，释放 IL-1 β 。激活的机制主要与溶酶体的损伤以及组织蛋白酶 B 的释放有关。同样，作为 PD 的主要致病因素 α -synuclein 蛋白的错误折叠，同样能激活 NLRP3 炎症复合体[82]。

目前，由 $A\beta$ 或 α -synuclein 等异常蛋白质蓄积所诱导的神经炎症反应，其起到了致病性的作用还是修复性作用，还存在着争议。例如，在 AD 中，IL-1 β 的作用存在着截然不同的观点[137]。基因敲除 IL-1RA 的小鼠，在脑室内的 $A\beta$ 的刺激下，活化的小胶质细胞增加，神经元存活率下降。而在 AD 的小鼠模型中，过表达 IL-1 β 能有效减少斑块的大小[138]。因此，在神经退行性变的发展过程中，由免疫细胞所介导的固有免疫反应既有保护作用，又存在病理性作用。

锰作为一种机体所必须的微量元素同时也存在着神经毒性作用。研究证明，长期慢性的锰中毒能引起一系列的神经退行性疾病，包括锰中毒、PD、AD、HD 等。长期的锰暴露，过量摄入体内的锰能有效的通过血脑屏障进入大脑中枢神经系统，引起神经炎症反应。研究报道过量的锰进入大脑组织后能有效的活化小胶质细胞等中枢神经系统免疫细胞，释放大量的促炎症因子，包括 IL-1 β 、TNF- α 等[139]。然而，锰是如何激活小胶质细胞释放促炎因子，引起神经炎症反应的分子调控机制目前尚不清楚。锰是否能通过激活小胶质细胞内的炎症复合体，以及释放的促炎症因子对于神经退行性疾病的影响，本课题将就此进行初步的研究和探索。

五、自噬生理作用及调控机制

1 自噬系统的简介及功能

1.1 自噬的概念及分类

自噬是一个分解代谢的过程，在这一过程中，可以通过把细胞内组分如蛋白质和细胞器等运输到溶酶体，以此来降低它们在细胞内的存在。自噬反应受到自噬相关基因 (Autophagy-related gene, ATG) 表达的调节。研究证明饥饿可激活自噬反应，

包括氨基酸或者葡萄糖的缺乏。自噬具有清除缺陷或聚集的蛋白，以及受损细胞器等功能[140]。以往研究已经证明有三种不同类型的自噬存在，包括大自噬、小自噬以及分子伴侣介导的自噬。

大自噬（之后简称为自噬），通过形成一种可以孤立蛋白和细胞器的双膜囊泡结构-自噬体，来促使蛋白和细胞器的发生退化。这一过程可以降解细胞质组分，同时自噬体可以融合于溶酶体，从而形成自噬性溶酶体[141]。由于神经元中变性或聚积的蛋白以及功能障碍的细胞器不能被细胞本身清除，因此自噬反应在保护健康神经元细胞的过程中具有重要的作用。一旦自噬反应受到抑制或损伤，造成自噬功能障碍，则会导致神经退行性病变的发生[142]。

1.2 自噬的作用机理

自噬反应通过溶酶体降解细胞内各组分这一过程与机体的许多疾病关系密切，这些疾病包括神经退行性病变、病毒或细菌引起的感染、心脏病以及肿瘤。多种应激刺激状态下的信号通路都可以正向或者负向的调控自噬的活化[143]。这些复合物通过 AMP 活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase, AMPK）以及雷帕霉素的哺乳动物靶向蛋白（mTOR）等通路来激活自噬。正是因为自噬是细胞信号传导的重要途径，所以其作用重要靶点被认为可以运用药物或者其它途径来进行调控[144]。

然而自噬是一个动态的过程主要可以分为三个独立的阶段：（1）由自噬体进行细胞中组分的吸收（2）自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体（3）自噬体自身通过溶酶体中的蛋白酶进行降解。在此过程中，细胞内的通路自噬体和溶酶体通路紧密相连，经过了溶酶体和自噬体的融合以及细胞内复合体的排列从而介导自噬溶酶体的形成[145]。

自噬泡的双膜结构主要起源于多种细胞器这些膜结构包括：ER（包括内质网出口，以及 ER-线粒体相关的联系区域），以及 ER-高尔基体中间区域，再循环内体，细胞质膜、高尔基复合体以及可能存在的脂肪滴[146]。这些膜结构通过重新排列来自噬小体进行调节作用，可以促使自噬体的形成，随后将其输送到溶酶体中，在这个过程中，受到多种自噬相关（Autophagy-related, ATG）蛋白（Autophagy-related, ATG）的调节。这些蛋白质中的一部分会参见两种泛素样偶联反应。其中第一种反应中包括 ATG12 接合 ATG5，这种 ATG12-ATG5 的结合非共价于 ATG16L1，是吞噬

泡形成的一个复杂的必要条件[147]。这些复合体被定位在吞噬泡和自噬体形成后的分离体中。自噬体的形成是由 ATG8/LC3 中的第二偶联反应辅助进行。第一个通过 ATG4 剪切的 LC3 可以形成细胞质的 LC3-I,它可以在自噬体上与磷脂酰乙醇胺的前体结合并结合细胞膜相关的 LC3-II[148]。

1.3 调控自噬形成的信号转到通路其分子机理

mTORC1 被认为是控制自噬过程启动阶段的关键调控因素。而 mTORC1 的激活是通过在溶酶体膜上, GTP (Guanosine-5' -Triphosphate) 加载的 Rheb (Ras homolog enriched in brain) -GTP-loaded Rheb。Rheb 是一种小的 GTP 酶, GTP-loaded Rheb 使它的一种活化形式。由 TSC1 和 TSC2 组成的 TSC-TBC 复合体和 Tre2-Bub2-Cdc16 1 结构域家族成员 7 (Tre2-Bub2-Cdc16 1 domain family member 7, TBC1D7), 可以负向调控 Rheb[149]。其中, TSC-TBC 复合体中的 TSC2 具有对 Rheb 的 GAP 活性作用, 并且可以通过改变 GTP 和 GDP 来抑制 Rheb 的活性。磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) v-akt 小鼠胸腺瘤病毒致癌基因相同物 1 (Akt) 通路, 通过介导生长因子, 如: 胰岛素生长因子 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1)、表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF), 可以使 TSC-TBC 复合体发生磷酸化, 并且抑制 TSC-TBC 复合体的表达, 之后 GTP-loaded Rheb 形成最终造成 mTORC1 被激活。活化了的 mTORC1 通过阻断 Unc-51 样激酶 (ULK) 1/2 复合体 (Unc-51-like kinase (ULK) 1/2 complex) 对自噬进行负向调控[150]。其中 Unc-51-like kinase (ULK) 1/2 复合体作为自噬的初始诱导物包括 ULK1/2、ATG13 以及具有 200kD 的粘着斑激酶家族相互作用的蛋白质 (FIP200)。因此, 抑制 mTORC1 对 ULK1/2 复合体的激活作用, 可以诱导自噬过程[151]。但是另一方面, 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 抑制 mTORC1 却能激活 ULK1/2 复合体。活化的 ULK1/2 复合体的自磷酸化以及在 ULK1/2 复合体中磷酸化的 ATG13 和 FIP200。ULK1/2 复合体通过磷酸化的 Beclin1 可以激活 Beclin1 液泡蛋白质分选 34 (Vacuolar protein sorting 34, VPS34) 复合体, 该复合体包括 Beclin1, VPS34 以及 ATG14L。活化的 Beclin1-VPS34 复合体的功能可以作为 III 类 PI3K 去产生磷脂酰肌醇 3-磷酸盐 (Phosphatidylinositol 3-Phosphate, PI3P), 并且 PI3P 会募集 WD-重复蛋白与磷酸肌醇蛋白相互作用 (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides, WIPI proteins) 以及双重 Fab1、YGL023、Vps27 以及 EEA1 (FYVE) 结构域-包含蛋白 1 (DFCP1)。WIPI

蛋白和 DFCP1 是 PI3P 的黏附蛋白。募集 WIPI 蛋白和 DFCP1 在产生吞噬泡(单膜),它是一种具有不成熟膜结构的自噬体的过程中具有重要作用。WIPI2 是 WIPI 蛋白中的一员,可以募集 ATG16L 到吞噬泡。不仅如此,ULK1/2 复合体中的 FIP200 也与 ATG16L 具有相互作用。ATG16L 黏附 ATG5 和 ATG12 以形成 ATG12-ATG5-ATG16L 复合体,所形成的复合体可以与磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)结合成为微管相关蛋白 1 轻链 3 β (Light Chain 3 beta, LC3B) [152]。PE 结合的 LC3B 对自噬体的延长和形成具有自身的功能。不仅如此,LC3B 可以运载变性和聚集的蛋白以及损伤的细胞器进入自噬体。LC3B 是 ATG8 的哺乳类直系同源,除了 LC3B,ATG8 的哺乳类直系同源还包括六种蛋白,这六种蛋白是由 LC3 的亚族以及 γ -氨基丁酸 A 型受体相关蛋白 (γ -aminobutyric-acid-type-A receptor-associated protein, GABARAP) 的亚族分出的。其中 LC3 亚族包括 LC3 alpha (LC3A)、LC3B 和 LC3C [153]。而 GABARAP 亚族包括 GABARAP、GABARAP-样 1 (GABARAP-like 1, GABARAPL1), 以及 GABARAP-样 2 (GABARAP-like, GABARAPL2)。LC3 的亚族成员以及 GABARAP 亚族成员具有自噬体形成的功能 [154]。自噬体膜派生于多种来源,包括内质网 (Endoplasmic Reticulum, ER)、线粒体膜 (Mitochondrial Membrane)、细胞质膜 (Plasma Membrane)、高尔基体 (Golgi) 以及再循环内体 (Recycling endosomes)。其中 ER 是自噬体膜最主要的来源,与隔离单膜具有物理连接。 Ω 样形状的隔离单膜包含 PI3P 和 DFCP1,称为欧米茄体 (Omegasome),来源于 ER,发展为自噬体,在两片 ER 的膜之间衔接。这些结果表明,这层隔离单膜由 ER 产生,并由 ER 引导出隔离单膜的延长。ULK1, 在自噬的启动阶段发挥作用,它可以被募集到 ER 膜上以促进隔离单膜的形成。因此,ER 的结构和功能在自噬的早期阶段发挥着重要的作用。当自噬体的形成完成时,自噬体会和溶酶体融合成为自噬溶酶体 [155]。溶酶体中的酶会降解由自噬体带来的底物,而自噬体和溶酶体的融合通过可溶性的 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, SNAREs)、Rab7、介导紫外线辐射抗性相关基因的蛋白质 (UV radiation resistance-associated gene protein, UVRAG)、在同型融合蛋白分拣 (Homotypic fusion and Protein Sorting HOPS) 复合物、LC3 以及 GABARAPs 等因素。尽管 mTORC1 可以通过阻断 ULK1/2 复合物来抑制自噬体的启动阶段, mTORC1 还可以通过磷酸化的 UVRAG 来抑制自噬体和溶酶体的融合 [156]。这些机制表明 mTORC1 对于自噬的启动阶段和成熟阶段具有负向调控。

如图5所示自噬的原理是:通过各种应激信号激活 AMP 通路或者抑制 mTORC1, 都可以诱导 ATG1-ULK1 复合体的活化, 它可以通过磷酸化作用的依赖机制来正向调控 VPS34 复合体的活化。三级 PI3K VPS34 可以向吞噬泡提供 PI3P, 而这一过程可以通过辅助 ATG12-ATG5-ATG16L1 复合体向膜上的募集作用来限制 LC3 脂化位点[147]。在 ATG12-ATG5-ATG16L1 复合体结合到吞噬泡、LC3 结合到 PE (LC3-II) 后, 膜会发生延长并且吞噬细胞质内的组分, 最终导致完整的自噬体的形成。还有一些蛋白, 如 p62、NDP52 以及 NBR1 等, 它们会分别通过它们的 LIR 和 UBA 结构域来确立 LC3-II 以及特定的泛素化物质(如: 聚合物、细菌、线粒体以及过氧化物酶体)之间的联系来进行通路中的底物选择。在这一过程的最后一步, 自噬体会融合于溶酶体, 使得囊泡的内容物发生退化[148]。总之, AMPK、AMP 活化蛋白激酶、mTORC1、复杂机械的雷帕霉素的目标 1、ULK、Unc-51-样激酶、VPS34、磷脂酰肌醇 3-激酶 VPS34、PI3P、磷脂酰肌醇、PE、磷脂酰乙醇胺、LIR、LC3 相互作用区域、UBA、泛素相关区域这些都与自噬的过程有着密切的关系[157]。

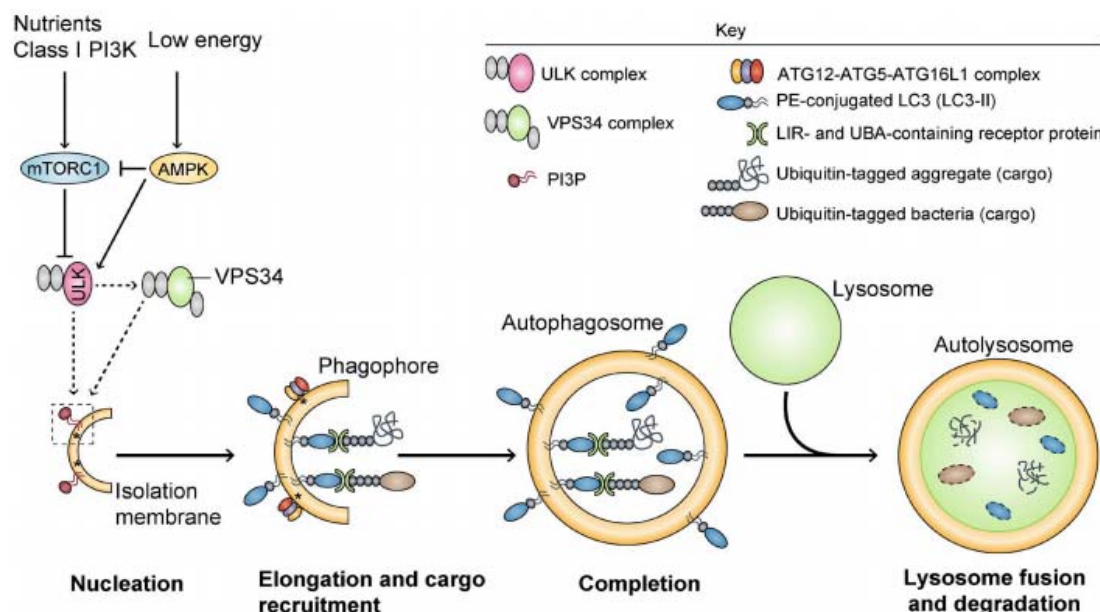


图 5. 溶酶体功能障碍的可能机制[158]

1.4 自噬的功能生物学意义

细胞内蛋白的异常折叠及聚集是许多迟发型神经退行性疾病的共同特点, 这种蛋白的异常表达被称为病理性蛋白。而由病理性蛋白引起的迟发型神经退行性疾病包括阿尔兹海默症、帕金森氏病、Tau 病变以及多聚谷氨酰胺扩张型病变(包括 HD 和

多种脊髓小脑的共济失调类疾病) [159]。目前, 还没有什么有效的治疗手段去减缓或者预防这类神经退行性疾病的发生。而引起 HD 的突变以及其它蛋白病理(例如: 多聚谷氨酰胺疾病以及 Tau 蛋白疾病等) 会给这些特定的蛋白带来异常的毒性功能, 然而这类疾病的严重程度常与相关蛋白的表达有着密切的关系[160]。因此对调控这些蛋白的表达水平以及聚集情况的因素的了解就显得非常的重要。当这些蛋白出现在细胞质中, 它们可以通过反溶蛋白酶系统或者通过自噬进行清除。前一种途径的清除速度可能更快, 它被限制成可以进入蛋白酶体的种类, 以此来排除寡聚体以及更高形式的结构。这些形式的种类可以被自噬清除。与上述的认为的一致, 可以通过异常聚集形成聚集体的蛋白包括: Tau 蛋白(Tau)、 α -共核蛋白(α -synuclein, α -syn)、突变的亨廷顿蛋白(Huntingtin) 以及突变的脊髓小脑性共济失调蛋白 3 (Ataxin 3)。这些蛋白在野生状态下都表现除了对自噬的高度依赖性[161]。

在许多神经退行性疾病如亨廷顿氏病(Huntington's disease, HD)、阿尔兹海默综合症(Alzheimer's disease, AD), 这些疾病中都表现出在神经元里 mTORC1 活性的降低, 以及大量的聚集。然而自噬的最终结果可能不是一种直接反应, 而是一种随着钙水平增加而造成的兴奋性毒性, 而这种状态反过来又会抑制自噬体的生物合成[162]。而在神经退行性疾病中突变的蛋白往往就会起到重要的作用, 以亨廷顿氏病为例, 突变的亨廷顿蛋白可以与自噬诱导物 Rhes 结合从而降低自噬。因此特异突变或者疾病情况的最终结果常常是不可预测的, 多种活化以及抑制的通路都是可以对疾病造成影响[163]。此外非细胞自主性的影响也可以对疾病造成影响, 例如在 AD 疾病中, 自噬体生物功能的损伤会导致胶质细胞 NO 释放的增加。

1.5 溶酶体的概念及在自噬降解过程中功能

溶酶体是细胞降解的中心, 也是可以分解蛋白质、多糖以及分别可以进入他们的分子结构单元包括: 氨基酸、单糖以及游离脂肪酸的主要结构。溶酶体中充满多于 60 种的不同类型的水解酶包括: 脂肪酶、蛋白酶以及分解代谢降解糖苷酶等。降解后的产物, 作为溶酶体的代谢物通过特定的出口如局限的膜或者囊泡膜。通过溶酶体的作用, 可以维持能量稳态或者是促使生物合成过程中的重复利用[164]。

1.6 自噬溶酶体功能紊乱的主要表现

溶酶体是内吞作用通路中的末端的细胞器, 它可以消化大分子以及获得细胞组

分，以此来是细胞获得营养。在溶酶体当中一种特定存在的酶即水解酶，它大范围的存在于溶酶体中，且在细胞器的内部由高酸性的 pH (pH 值在 4.5-5.0) 所激活。溶酶体的生成以及维持其自身 pH 值的稳定是通过运用一种质子泵 V 型 ATP 酶 (proton-pumping V-type ATPase) 的活性，这种质子泵 V 型 ATP 酶可以运用能量代谢的形式将 ATP 质子泵带入溶酶体中[165]。由于这种活性作用，可以分离电荷并且生成横跨膜电位。另一种离子必须移动到电压的位置，从而出现这种泵的作用。参与这一过程的离子被称为反离子，且通常情况下可能是作为阳离子移动出溶酶体，又或者是一种阴离子移动进入溶酶体。最近有数据显示在这个过程还存在 ClC-7, a Cl⁻/H⁺ 逆向转运，而对这一种参与其中的转运者还有许多问题。虽然它们的功能结果显示这个过程中存在一个阳离子转运体，但是对于它的分子组成还不清楚。然而，V-ATPase 和反离子转运体对于维持溶酶体内环境当中 pH 的稳定都是非常重要的。而溶酶体的 pH 在一些细胞类型中可能会被动态的进行调控[166]。

溶酶体酸化：哺乳动物的细胞中，在许多生理功能中都会运用到 H⁺，所以，对于质子（或水合氢离子）它们的无处不在以及时刻具有反应性的特性人们也就能够理解了。质子处于生物能学的中心位置，它作为一种在氧化磷酸化中重要的媒介可以让线粒体使用这些离子的核苷酸成分来跨越它们的内膜[167]。而这一过程中有许多细胞内的细胞器都可以与膜结合，这其中包括：高尔基体、分泌囊泡、细胞核内体以及溶酶体，它们也可以产生跨膜质子梯度。然而细胞内的这一过程取决于这些细胞器内腔当中的 pH 值，这些与细胞器内腔中 pH 值相关的过程包括对分泌途径的翻译后修饰，细胞内途径中的配体定位过程以及在溶酶体中大分子的降解过程。每一个细胞器都维持着其内环境的 pH 稳定，这也是促进起爆器功能的必不可少的因素之一。事实上，许多功能障碍都可以引起细胞器酸化，而细胞器酸化又与一些疾病的发生有关，且其中的部分疾病都非常严重甚至危及生命。或许在哺乳动物细胞中，溶酶体是细胞器酸化的最极端的例子。因为溶酶体的存在本身就是为了消化异常的细胞器及过分沉积的蛋白，所以它始终维持高度酸性的 pH (pH<5.0)，这样就可以使其内腔可以成功的执行它的消化功能，并且推动消化后的产物向外代谢[168]。

前期有研究表明酸性的溶酶体内腔最初来源于多种方式的融合，事实上，细胞内的酸化最早就是发现于溶酶体的。1893 年，Metchnikoff 发现草履虫可以从 pH 敏感的石蕊试纸中摄取颗粒，且试纸内部的颜色发生了改变，也提示发生了酸性反应。

而在现代,对于酸性溶酶体的标志是来源于 Coffey 和 De Duve 的发现,他们发现溶酶体中存在的水解酶与溶酶体都处于酸性状态。通过使用弱碱来对单独的溶酶体进行标注,在使用放射性或者荧光分布技术进行观察,结果发现这些细胞器可以保持一种高度的细胞内 pH 的酸性状态,且较培养基来说,细胞器中 pH 值更偏酸性[168]。现在公认的是, pH 值得这种梯度存在是由 V 型 ATP 酶的作用产生的,它以 ATP 水解能力进行驱使,以质子泵膜蛋白的形式来驱动质子反作用于溶酶体内腔中的电化学梯度质子。然而,与每一个质子泵 ATP 酶反应后也可以生成一种可以跨越溶酶体膜的电压差,这种电压差可以一直更进一步的抽吸作用。因此,对于 ATP 酶能够有效的促使溶酶体内部酸化,质子的迁移运动一定会伴随发生,而这种质子的这种运动必须通过 ATP 酶运用反离子来消除跨膜电压的作用来产生。在理论上,这种抗衡离子的运动,可以由进入溶酶体内部的细胞质阴离子来产生,或者是由通过溶酶体内腔而进入细胞质中的阳离子来产生,又或者同时由两者共同产生。然而,对于这种抗衡离子构成的确定仍然存在争议,但是这种抗衡离子的运动过程已经被认为是酸化过程的重要因素之一。虽然许多细胞器在其内部都运用相同的 V 型 ATP 酶进行酸化,每一种方式都可以维持内部 pH 的稳定状态,而对于不同的抗衡离子作用机制的解释都是不同的[169]。人们对于 pH 调节的具体机制还不清楚,尤其是对于定量水平的机制还毫无头绪。可是,由于抗衡离子的运动是酸化过程必不可少的,因此对于参与细胞器 pH 值调节的分子的作用机制就得到了大家的关注。溶酶体作为一种不仅可以生存于细胞中,也可以被分离出单独生存的细胞器是一种为人类探寻细胞内部活动以及外部刺激对细胞的影响的状态及具体作用机制的好的研究对象。溶酶体 pH 值的稳定对细胞内环境及外部作用的感应都具有非常重要的作用[170]。

1.7 影响自噬溶酶体功能紊乱的主要因素和分子机制

由于自噬发挥着重要的生理作用,自噬功能障碍与许多类型的病理联系在一起,因此,自噬过程的程度必须严格监管,以确保适当的水平。通过溶酶体降解的自噬途径是细胞生存和死亡必不可少的的途径,对维持细胞内稳态具有重要作用(图 6)。

1) 哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白酶,负调节自噬和凋亡,主要包括:mTOR/raptor,构成 mTOR 复合物 1(mTORC1); mTOR/riCTOR,构成 mTOR 复合物 2(mTORC2)。mTOR 反应轴的主要组件均为自噬抑制剂,在培养

环境营养富裕的条件下主要功能自噬抑制剂，它通过调节 Akt 的下游和上游分子，对细胞增殖调节和生存调节起着至关重要的作用。抑制 mTOR 分子通路（例如用雷帕霉素）将诱导自噬发生。2) 酵母自噬相关蛋白 1 (Autophagy-related protein 1, Atg1) 与哺乳动物 Unc-51-类似物激酶 1 (ULK1) 和 ULK2 同源，可以与其他 Atg 成员（例如 Atg13）形成复合物，然后参与自噬溶酶体早期的形成[171]。mTOR 在培养环境营养富裕的条件下处于活化态，可以磷酸化 ULK1 和 mAtg13 进而抑制 ULK1 激酶活性。ULK1 活性抑制将直接导致前自噬溶酶体结构形成失败，并因此导致自噬过程受抑并促进 LC3-II 的形成。3) LC3-II 形成对于自噬溶酶体形成至关重要的，因此 LC3-II 水平已被广泛用于评价自噬溶酶体富集程度。自噬溶酶体双层膜结构形成后，Atg4 会通过去共轭方式从外层自噬溶酶体膜上去除 LC3-II，但由于 LC3-II 仍然与内层膜相连导致溶酶体融合后仅部分降解。Bafilomycin A1 阻断 LC3-II 的降解，进而维持 LC3-II 水平[164]。4) 异常蛋白积累,PD 是经典的因异常 α -syn 积累导致溶酶体功能障碍性的神经退行性疾病。有研究表明，在 α -syn 突变的细胞中 CMA 通路被阻断，但对阻断以及其效应的溶酶体改变与 CMA 通路阻断的关系还不明确。在人 SH-SY5Y 神经细胞过表达 A53T α -syn 突变后可以导致总溶酶体降解蛋白的减少[172]。同样在大鼠原代培养的神经元中过表达 A53T α -syn 将导致 CMA 活性的显著降低，并伴随补偿性的巨型自噬的显著增高。过表达野生型或突变型 α -syn 作为一种诱发因素激活两种自噬通路的功能，但这种异常蛋白最终将影响正常自噬溶酶体通路过程。溶酶体功能障碍会进一步导致异常的 α -syn 总量增加并释放到细胞中，免疫荧光染色表姐过表达野生型 α -syn 的 SH-SY5Y 细胞中的 α -syn 可发现 α -syn 在近核结构的积累，进而导致神经病理性改变和神经细胞的死亡[173]。

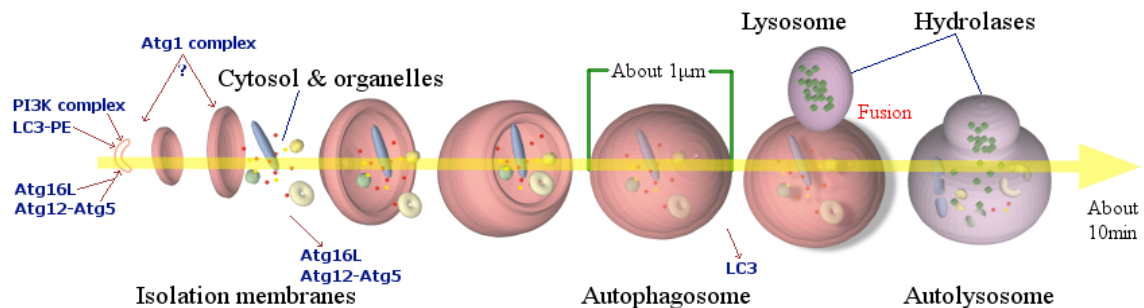


图 6. 自噬体溶酶体结合为自噬溶酶体的过程

1.8 自噬溶酶体与 NLRP3 介导的神经炎症之间的关系

IL-1 β 是重要的促炎性细胞因子，在许多类型的感染或者损伤中都会出现 IL-1 β 的释放，而它的释放，可以调节各种生理反应，包括细胞的募集、食欲、睡眠以及提问。然而，IL-1 β 最初是以前体的形式出现并参与对炎症刺激的应答，就像 TLR 的配体。这种非活化前体状态可以在炎症体活化后被 caspase-1 的分子剪切成为具有生物活性的状态。炎症体作为一种分子支架，可以触发激活 caspase-1 之后促使 IL-1 β 和 IL-18 的成熟。通常情况下，炎症体至少会从细胞质的固有免疫传感器家族中的一个家庭成员来形成[174]。NOD 样受体 (NLRs)，包括 NLRP1、NLRP3 以及 NLRC4，它们与包含有 caspase 募集结构域 (ASC 以及 PYCARD) 的凋亡相关斑点样蛋白相结合。在这些炎症体中，NLRP3 炎症体是其中激活内源性和外源性信号最具有特点的炎症体[175]。

大量针对 TLR 配体所进行的体外研究，尤其是 LPS 等刺激物诱导 pro-IL-1 β 的形成。但是在大部分情况下，这不足以刺激炎症体使其发生活化并且释放成熟的细胞因子。与之相反的是，多种内源性和外源性的信号传导却是激活炎症体的重要需求，这些信号包括：ATP 和微粒（其中包括：尿酸结晶、淀粉、二氧化硅、失眠、合成微粒以及明矾等）。细胞外 ATP 可以触发 ATP-门离子通道，导致 K⁺ 的外排，并且诱导 pannexin-1 膜孔的形成[127]。这将使得细胞外 NLRP3 受体激动剂可以通过 pannexin-1 膜孔进入细胞，从而激活炎症体。对于微粒来说，它主要通过以下机制进行活动。通过吞噬细胞来摄取微粒可能会引起溶酶体损伤以及溶酶体的产物释放进入细胞质中，从而激活 NLRP3 炎症体。具体来说，溶酶体蛋白酶组织-cathepsin-B 参与其中，cathepsin-B 的抑制剂 CA-074 甲酯可以抑制 IL-1 β 的释放。另外还有研究者认为 NLRP3 受体激动剂可以通过外界刺激所产生的 ROS 来激活炎症体[176]。

在炎症体被激活的过程中，自噬发挥着重要的作用。自噬作为一种高度保持自我平衡状态的过程，可以隔离以及降解细胞质大分子也可以吞噬过量的或者受损的细胞器和病原体以此来维持细胞内稳态。而自噬的作用受到自噬相关基因 (Atg) 的调控。在正常的生理条件下，自噬会为了维持内稳态而发生，但是也可以被许多不同的因素上调，这些引物包括营养剥夺以及使用 mTOR 的药物抑制剂等。此外，自噬可以受到细胞因子的调控，例如它可以受到 IFN- γ 以及 TNF- α 的上调，同时也会受到 IL-4 和 IL-13 的抑制。之前有报道指出，在巨噬细胞中可以通过敲除 Atg7 或者

Atg16L1 来抑制自噬反应从而促进 LPS 刺激下的 IL-1 β 的释放[177]。这一过程背后的机制以及炎症体的在这一过程中发挥的作用还没有完全确定，但是通过研究发现这一过程与通过（TIRToII/IL-1 受体）结构域诱导产生的 IFN- β （TRIF）以及 ROS 之间的信号有关[178]。

如图 7 所示，自噬过程在神经退行性疾病以及损伤、感染的病理过程中都具有重要的作用，自噬溶酶体功能障碍与多种蛋白的异常表达以及所表现出的病理反应都息息相关，因此对于自噬溶酶体功能障碍所导致的下游反应的探索就显得尤为重要。

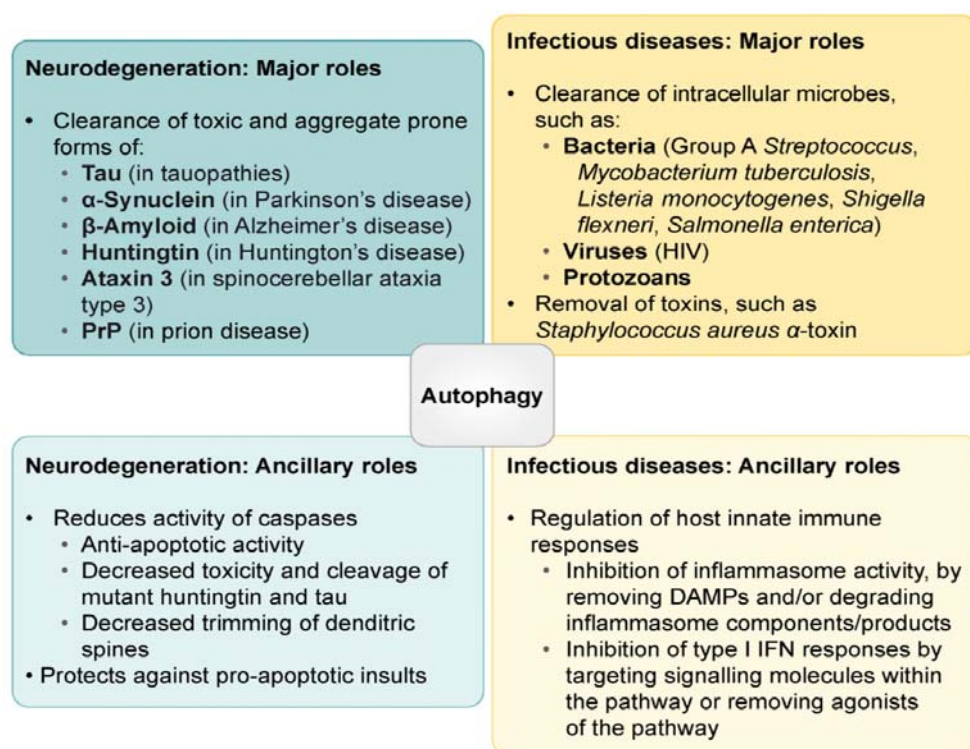


图 7. 自噬过程在各类疾病中具有重要作用[158]

六、锰暴露促进小胶质细胞活化的可能机制及其生物学作用

1 锰暴露对小胶质细胞释放炎性因子的影响

在锰中毒模型中，长期过量的锰暴露和小胶质细胞的活化有着密切关系。经过慢性过量的锰暴露后，小胶质细胞活化主要表现为细胞增殖。以往的研究结果表明，暴露于锰环境的人大脑中会出现胶质细胞增殖的情况，不仅如此，在非人灵长类动物以及啮齿类动物的锰中毒模型中都会出现胶质细胞增殖的现象[66]。对于重金属锰本身，如果长时间接触锰或是接触高浓度的锰，都可激活小胶质细胞。这一点充分

证明了小胶质细胞作为中枢神经系统中的主体免疫细胞，在介导神经炎症反应中发挥的作用，其中尤为重要是从活化的小胶质细胞中释放出的促炎症因子，这些促炎症因子在整个炎症反应过程中都具有非常重要的作用。[179]。

1.1 锰暴露对小胶质细胞的影响

小胶质细胞是中枢神经系统的主体免疫细胞，占整个大脑组织的 12%，且在脑组织中也具有相当重要的作用[180]。小胶质细胞在不同脑区的分布数量是各不相同的，它主要分布在大脑的灰质区域，包括海马区以及基底神经节。在病原体的刺激下，小胶质细胞发生活化，处于活化状态的小胶质细胞与星形胶质细胞一起参与免疫反应，释放大量炎性因子（包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 以及 IL-6 等），以及 ROS、NO 以及 PGE2。在 1999 年 Chang 和 Liu 首次报道了锰对活化小胶质细胞（此部分实验均运用 N9 小胶质细胞系）的影响[181]。他们使用脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）刺激小胶质细胞，使其表达 iNOS 并且释放 NO，之后对这些细胞进行一定剂量和时间的锰暴露，结果发现 iNOS 的表达以及 NO 的释放量都有所增加，而单独的锰刺激对 iNOS 以及 NO 的表达则影响较小。同时研究还发现，锰对小胶质细胞释放 iNOS 以及 NO 具有增强的作用，但这一点必须建立在 LPS 作用使得小胶质细胞活化后。在与 LPS 共同作用下，锰对小胶质细胞的影响具有时间、剂量依赖效应。研究还发现，锰不仅可以增加 LPS 诱导的小胶质细胞 iNOS 和 NO 的释放量，对于其它的细胞因子锰也具有相同的作用，这些细胞因子包括 TNF- α 、IL-6 以及 IL-1 β 。而单独使用锰（500mM）刺激小胶质细胞所释放的细胞因子却非常少[182]。为了确定锰对小胶质细胞炎性因子释放的影响，研究人员又对炎性因子的 mRNA 水平进行了检测，结果发现锰对小胶质细胞炎性因子释放的影响存在延时效应，一般情况下会在锰暴露后 4h 出现，而这种效应能持续 24h。这也充分证明了锰对小胶质细胞炎性因子释放的影响。虽然前期研究中有数据显示单独锰作用对小胶质细胞释放 NO、PGE2 以及炎性因子的影响并不大，但是后续的研究却显示高剂量的锰（300mM）可以激活原代培养的小胶质细胞使其释放 NO、TNF- α 以及 IL-1 β 等炎性因子[183]。也有研究结果显示，高剂量锰单独作用 BV2 小胶质细胞系，可以诱导产生 iNOS。如果在锰和 LPS 共同作用中增加锰浓度，则在锰参与的小胶质细胞炎性因子释放过程中 LPS 的作用就越小[184]。

锰除了可以诱导小胶质细胞释放炎症因子，同时也可以诱导小胶质细胞释放 ROS。ROS 能有效促使在小胶质细胞-神经元环境中发生神经毒性作用从而影响多巴胺 (Dopamine, DA) [185]。事实上，锰诱导的损伤可以增加神经系统中小胶质细胞的数量，从而造成多巴胺能神经元的损伤。但也有研究显示，不同剂量的锰 (10-300mM) 可以造成 H₂O₂ 产生时间剂量效应的释放，但是在这个过程中锰却不能使小胶质细胞释放 TNF- α 以及 IL-1 β 。虽然如此，，锰却可以增加 LPS 诱导的抗氧化酶以及血红素加氧酶 (Heme-Oxygenase-1, HO-1) 的释放，而这些酶都参与了小胶质细胞中炎症因子以及 H₂O₂ 的释放[186]。

1.2 锰中毒与小胶质细胞活化之间的关系

以往的研究表明，在体外进行的锰暴露实验中，锰可以诱导小胶质细胞活化，使其释放炎症因子、NO、以及 COX-2/PGE2 等。在锰的作用下，小胶质细胞释放通过转录因子 (例如 NF κ B、MAPK p38 等) 的介导释放炎症因子 (例如: TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、IL-6) [187]。在 NF κ B 或者 p38 的抑制剂的作用下，小胶质细胞炎症因子释放下降。在混合的胶质细胞中，锰含量的增加所引起的炎症介质的输出也伴随着 MAPK 的活化以及 NF κ B 的活性作用。NF κ B 活性的增加与星形胶质细胞释放更多的 NO 也有一定的关系[188]。

鉴于上述文献回顾的内容，我们发现，以往报道虽证实了锰暴露可以诱导小胶质细胞活化并释放炎症因子，但锰诱导小胶质细胞活化并释放炎症因子的分子调控机制，目前尚不清楚。而锰诱导小胶质细胞炎症因子的释放是否依赖于 NLRP3/caspase-1 炎症体这一炎症因子孵育平台？NLRP3/caspase-1 炎症体的活化又是否与锰暴露致使海马脑区小胶质细胞的自噬过程有关？锰暴露造成的自噬溶酶体功能障碍与 NLRP3/caspase-1 炎症体的活化以及小胶质细胞炎症因子释放之间存在怎样的联系？因此，本研究拟利用亚急性锰中毒小鼠模型以及锰暴露 BV2 小胶质细胞模型，分别从体内和体外实验揭示锰诱导小胶质细胞活化并释放炎症因子的分子调控机制，并进一步利用分子生物学技术及细胞生物学技术对 NLRP3 炎症体在锰诱导小胶质细胞炎症因子释放过程中的作用进行剖析，同时揭示锰中毒致自噬溶酶体功能障碍与 NLRP3 炎症体活化之间的关系，从而为初步揭示锰的神经毒性作用，尤其是针对锰诱导小胶质细胞炎症因子释放在神经退行性病变病理学发展过程中的作用提供实验依据。

正文

实验一 锰暴露对小胶质细胞炎性因子释放及小鼠学习记忆的影响

锰在自然界中广泛分布，是人体所必须的微量元素。然而，当机体摄入过多的锰则会引起锰中毒的发生，其临床表现主要为类似帕金森氏病病症[30]。研究表明，中枢神经系统是锰作用人体的主要靶器官，黑质纹状体通路更是锰损伤神经系统的关键核团[50]。也正因为如此，国内外广大的学者们也都聚焦于此，总结证实了一系列关于锰能够引起黑质纹状体内多巴胺能神经元功能减弱的经典理论。我们教研室也长期一直致力于研究锰对运动行为能力的影响及其具体机制。然而，随着人们对锰神经毒性的进一步关注，锰对海马空间记忆能力的损伤也渐渐被人们所证实[189]。

在本部分实验过程中，我们通过皮下注射的方式进行亚急性锰暴露，通过小鼠血锰和脑锰的检测，证实锰暴露动物模型的成功。又通过小鼠的行为学检测分别对小鼠锰暴露后运动以及学习记忆能力进行了评估，发现锰暴露不但能够引起运动系统的损伤，同时对控制学习记忆能力的海马神经元也有一定的损害效应。小胶质细胞是中枢神经系统内的一种免疫细胞，它的活化以及炎性因子释放对于中枢神经系统而言具有十分重要的调节作用[61]。之前的研究发现，在黑质纹状体通路，锰暴露所诱导的多巴胺能神经元损伤与其介导的小胶质细胞活化以及炎性因子的释放关系密切。那么在锰暴露所导致的海马神经元损伤中，小胶质细胞是否也参与了其中，在这部分实验中我们将进行深入的研究。

1 材料

1.1 主要仪器

行为学录像机 (WV-CP500D)	Panasonic 公司 (日本)
小鼠恐惧条件箱 (NIR-022MD)	Med associates 公司 (美国)
小鼠恐惧条件系统 (SG-6080D)	Med associates 公司 (美国)
超低温冰箱 (MDF-U73V)	SANYO 公司 (日本)
冰柜 (BC/BD-2720S)	Haier 公司 (中国)
低温高速离心机 (5804R)	Eppendorf (美国)
小型低温告诉离心机 (5424R)	Eppendorf (美国)
超纯水机 (Milli-Q)	MILLIPORE (美国)
原子吸收分光光度计	热电 (美国)
小鼠运动杆	Med associates 公司 (美国)
超声破碎仪 (VCX105)	SONICS&MATERIALS 公司 (美国)
抽吸泵 (WP6122050)	MILLIPORE 公司 (美国)
DNA/RNA 定量仪 (NANODROP 2000C)	Thermo scientific 公司 (美国)
96 孔板离心机 (LMC-3000)	Grant-bio 公司 (美国)
低温离心机 (5804R)	Eppendorf 公司 (美国)
紫外分光光度计 (UV-2550)	SHIMADZU (日本)
全能型凝胶成像系统 (Universal HoodIII)	BIO-RAD (美国)
酶标仪 (Infinite F200)	TECAN (美国)
制冰机 (SIM-F140)	SANYO (日本)
摇床 (ZD-9550)	Kylin-Bell Lab instruments (中国)
基因扩增仪 (7500 Fast Real-Time PCR system)	Applied Biosystems (美国)
蛋白垂直蛋白电泳系统 (Universal/300)	BIO-RAD (美国)
梯度 PCR 仪	Biometra TGRADIENT (美国)
超纯水机 (Milli-Q)	MILLIPORE (美国)
液氮生物容器 (YDS-100B-125)	成都金凤 (中国)
高压灭菌器 (MLS-3750)	SANYO (日本)
电热恒温水浴锅 (HH-2)	科伟 (中国)
室温离心机 (5430)	Eppendorf 公司 (美国)
超净工作台 (SW-CJ-1F)	苏州净化 (中国)
二氧化碳培养箱 (3423)	Thermo scientific (美国)
生物显微镜 (IX71)	OLYMPUS (日本)
激光共聚焦显微镜	Nikon (日本)

1.2 主要试剂和抗体

锰 (13446-34-9)	ACROS ORGANICS (美国)
LPS (L3880-500MG)	Sigma (美国)
戊巴比妥钠	Sigma (美国)
EDTA 抗凝管	IMPROVACUTER (中国)
95%酒精	康制工贸 (中国)
Tris	Sigma (美国)
Anti-IL-1beta (ab9722)	Abcam (美国)
Anti-IL-18(ab71495)	Abcam (美国)
Anti-TNF-alpha (ab6671)	Abcam (美国)
OX-42 (MOUSE ANTI RAT CD11b)	AbD Serotec (美国)
Mouse IL-1beta ELISA Ready-SET-Go! ® (88-7013)	eBioscience (美国)
Mouse IL-18 ELISA BMS618/2TEN	eBioscience (美国)
Mouse TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go! ® (88-7324)	eBioscience (美国)
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	晶彩 (中国)
蛋白印迹膜再生液 (Stripping Buffer for Western Blot CW0056)	康为世纪 (中国)
显色液	七海 (中国)
乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)	国产分析纯
Bovine Albumin Standard	MP Chromato Pur™ (美国)
DMSO (D4540-1L)	Sigma (美国)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (12800-017)	Gibco (美国)
FBS	Gibco (美国)
蛋白酶抑制剂	Roche (美国)
PMSF	碧云天 (中国)
Tween-20	Sigma (美国)
DEPC 水	Sigma (美国)
DTT	碧云天 (中国)
甲叉双丙烯酰胺	Sigma (美国)
Triton-X-100	科昊生物 (中国)
蛋白印迹膜再生液	康为世纪 (中国)
β-actin	Cell Signaling Technology (美国)
Goat Anti-Rabbit IgG, HRP Conjugated (CW0103)	康为世纪 (中国)
Goat Anti-Mouse IgG, HRP Conjugated(CW0102)	康为世纪 (中国)
BCA 蛋白定量试剂盒	Thermo (美国)
Tyrosine Hydroxylase Antibody	Cell Signaling Technology (美国)
三氯甲烷	国产分析纯
异丙醇	国产分析纯
无水乙醇	国产分析纯
mRNA 反转录试剂盒	TAKARA (日本)
qRT-PCR 反应试剂盒	TAKARA (日本)
Trizol RNA 提取液	Invitrogen (美国)

1.3 动物

健康的成年 C57BL/6 小鼠（之后简称为 C57 小鼠/小鼠），体重 15-30g，所有动物实验所涉及的动物处理是严格按照国际标准的动物护理指南执行，由第四军医大学动物中心批准并予以提供（许可证号：SCXK-2012-0007），从学校动物中心取回后置于科室动物房中，保持饲养环境的干净、安静以及室温状态（ $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ），使小鼠适应饲养环境 7 天，之后进行相关实验。

1.4 细胞系

采用 BV2 小胶质细胞系，它是由 Blasi 等研究人员在 1990 年运用携带癌基因 v-raf/ v-myc 的反转录病毒 J2 感染原代培养的小鼠小胶质细胞而获得的永生细胞系，该细胞系不仅高度纯化，而且基本具备了原代培养的小胶质细胞的形态学、表型以及各项功能特点，也被许多学者及科研工作者所接受。

1.5 实验用试剂配置

LPS

LPS	20mg
-----	------

溶于 20ml 高压去离子水中，混匀，分装于 500 μl EP 管中， -20°C 保存

1%戊巴比妥钠

戊巴比妥钠	1g
-------	----

溶于 100ml 之前已配好的 0.9%NaCl 中，混匀， 4°C 保存

75%酒精

95%酒精
溶于 ml 去离子水中，混匀，室温保存

0.5MTris-HCl (pH7.6)

Tris	60.57g
1N HCL	420ml

双蒸水加至 1L

0.2M PB

KH ₂ PO ₄	27.2g
NaOH	6.4g

加去离子水至 1L，调整 pH 值至 7.4

MTT

MTT	250mg
-----	-------

溶于 50mlPBS 中，避光搅拌混匀，之后使用 0.22 μm 小滤器过滤，将过滤好的溶液分装于避光 EP 管中

100mM MnCl₂·4H₂O

MnCl₂·4H₂O (MW:197.91) 0.39582g

溶于 20ml 的高压去离子水中, 使用 0.22μm 孔径的小滤器过滤, 装于 50ml 无菌大 EP 管中, 混匀, 4℃ 保存。(用于细胞实验)

100mg/kg 组用 Mn 刺激液

为使锰注射液的配制浓度与体积方便给药, 故进行以下计算: 目标注射浓度为 100mg/kg, 以小鼠平均体重 20g 进行计算即 2mg/20g, 为保证每只小鼠接受皮下注射药物体积为 200μl 即 2mg/200μl, 故称取 0.2gMn 溶于 20ml 之前配好的生理盐水中, 混匀, 4℃ 保存。(用于动物实验)

DMEM 高糖培养基

使用 DMEM 粉末一袋 (g), 称取 HEPES3.3g, 以及青霉素、链霉素各 60mg, 称取 NaHCO₃3.7g, 使用去离子水定容至 1L, 之后使用滤器垫 0.45μm、0.22μm 两层滤膜进行过滤, 滤出液体直接滴入 200ml-250ml 培养基盛放玻璃瓶, 封口膜包好, 做好当天标记, 放入 4℃ 保存, 待用。(每个玻璃瓶中盛放 180-200ml 混匀过滤的 DMEM 培养基, 方便之后直接给瓶子里加入 10%的胎牛血清)

含 10%胎牛血清 (FBS) 培养液

使用 10ml 注射器吸取 FBS 并通过 0.22μm 孔径的小滤器进行过滤, 最终达到血清所加体积占整瓶培养基的 10%, 加好后, 进行混匀。4℃ 保存。

4%多聚甲醛

称取 10.68gNaOH 溶于 600-800ml 双蒸水中, 彻底溶解后给溶液中加入 120g 多聚甲醛, 溶解后加入 40g 磷酸二氢钾, 以上全部溶解后进行过滤, 过滤出的液体定容至 3000ml。

30%AB

丙烯酰胺 29g

甲叉双丙烯酰胺 1g

溶于去离子水, 定溶于 100ml, 之后过滤, 4℃ 避光保存。

10%AP(过硫酸铵)

AP 0.5g

溶于 5ml 去离子水中, 混匀后分装在 1.5mlEP 管中, 每个 EP 管中分装 1ml, -20℃ 保存。

1.5M Tris-HCL (pH=8.8)

Tris-base 9.0855g

溶解于 20ml 去离子水中, 调整 pH 值达到 8.8, 定容至 50ml, 室温保存。

10%SDS(十二烷基硫酸钠)

SDS 5g

溶解于 20ml 去离子水之后加去离子水定容至 50ml

1.0M Tris-HCl (pH=7.54)

Tris-base 24.228g

溶解于 50ml 去离子水中, 调整 pH 值达到 7.54 之后使用去离子水定容至 200ml, 室温保存。

10×TBS

1.0M Tris-HCL	200ml
NaCl	80g
使用去离子水定容至 1L	

DEPC 水

0.9% NaCl (生理盐水)	1L
DEPC 母液(成品购于晶彩)	1ml
搅拌过夜，之后放入高压灭菌器中高压后使用	

2 方法

2.1 建立亚急性锰中毒小鼠模型

2.1.1 动物的分组与饲养

从第四军医大学实验动物中心领回 6 周龄 C57 小鼠，体重在 15g-30g 之间，将动物随机分为 3 组（每组 n=20）：对照组（0.9%NaCl）、锰组（100mg/kg）、LPS（10 μ g）阳性对照组。分组后对动物进行适应性饲养 7 天，之后进入实验阶段。且适应性饲养与实验阶段动物均处于自由进食自由饮水状态，所食饲料购买于本校实验动物中心，饮用水为去离子水，所用饲养垫料也购于本校实验动物中心，且需勤换，以保持动物生活环境处于干净的状态。

2.1.2 亚急性锰中毒小鼠模型的建立

经过 7 天适应环境的饲养过程，开始建立亚急性锰中毒小鼠模型。以一周为染锰时间点，分别在第 1、4、7 天对锰处理组按照 100mg/kg 的标准给予相应体积的 MnCl₂，染锰的方法为皮下注射。对照组给予相同体积的 NaCl，采用相同的给药方式即皮下注射。LPS 组在第七天实施 LPS 注射，给药方法为皮下注射。

2.2 行为学方法检测亚急性锰中毒小鼠的行为学改变（这里进行行为学检测的顺序是由刺激较弱的行为学检测方法到刺激较强的行为学检测方法的顺序进行的）

2.2.1 旷场实验（Open Field Test）

通过旷场实验可以检测染锰后小鼠探索能力及运动运动能力的变化。将实验用小鼠提前一天放入行为学检测室进行适应。适应过程中仍旧处于自由饮食饮水状态，且保持环境干净、安静、温度为室温状态（23 \pm 5 $^{\circ}$ C），第二天进行旷场实验，采用购买于美国 Med associates 公司的旷场系统。将实验所用旷场通过配套软件进行区域

划分，具体划分如下：

之后将各组小鼠一次一只依次放入旷场中运用软件计时 6min 并通过软件进行录像。注意每次每只老鼠实验进行结束后，将其留于旷场中的粪便捡起并计数，之后使用 75%酒精擦拭旷场内部场地及边框周围，以防止实验动物留下气味或粪便以影响之后进行实验的动物。

2.2.2 爬杆实验 (Pole Test)

通过爬杆实验可以检测染锰后小鼠行为运动能力的变化，准备一小鼠爬杆，标准为：杆长为 60cm，直径约为 1cm，杆顶端设置一个圆球，直径约为 3cm，杆底设一平台，并在圆球外部、杆外部以及平台上包裹纱布以此防止小鼠运动阶段打滑掉落。实验总共需要记录两个时间：①小鼠站上圆球（即出发点）后到头彻底向下准备进入爬杆阶段的时间（From top to head down）；②小鼠从在圆球上头彻底向下并开始向下爬杆至杆底平台的时间（From head down to bottom）。并将测得的时间进行比较。以此来确定亚急性锰中毒小鼠行为运动能力的改变。提前一天先进行训练，让每只被测小鼠均进行训练，熟悉爬杆过程，不计时间。第二天同一时间段进行检测，并进行计时。最终得到上述两个时间及小鼠整体运动时间，并予以分析。

2.2.3 恐惧条件箱 (Cue and Contextual Fear Conditioning)

通过恐惧条件箱可以检测染锰后小鼠空间学习和恐惧记忆能力的变化。针对恐惧条件箱的记忆主要在于联想记忆，主要使用提示作为后续恐惧刺激条件性测试。在下图 1-4-C 中对此次恐惧条件箱实验的各个阶段设置进行了梳理。简单来说，分为三个阶段：

a. 先对各组待测小鼠进行恐惧条件训练，在配套软件中进行设置，设置整个训练时长为 6min，前 120s 为小鼠自由运动适应环境时间，之后给予 30s 的 90 分贝的噪声刺激，在声音刺激到最后给予强度为 0.75mA 的电击刺激，之后 60s 为小鼠正常活动且无刺激时间，紧接着 30s 给予之前相同的条件刺激（即 30s 噪声刺激到最后给予电击刺激），再重复一遍 60s 的活动及 30s 的噪声和电刺激，最后 30s 为小鼠自由活动时间。以上为训练阶段；

b. 24h 后对训练小鼠进行空间环境记忆的检测（即 Contextual test），将昨天进行过训练的各组小鼠继续依次放入恐惧条件箱中，计时 300s 不给予任何刺激，观察小

鼠的状态，小鼠处于恐惧状态会出现一种 Freezing 的静止状态，这种静止状态维持时间越长，越能说明小鼠对恐惧条件箱的内部空间记忆力越强；

c. 在 300s 空间环境记忆检测结束后 1h，再次对同批小鼠进行恐惧条件记忆的检测（即 Cued test），对之前的空间进行调整，在电极条上铺上隔板，并且在恐惧条件箱中小鼠运动空间内加挡板以改变之前小鼠的运动空间，将整个检测时长设置为 6min，前 3min 不给予任何刺激，后 3min 持续给予 90 分贝噪声刺激，观察小鼠状态。运用软件对小鼠在恐惧条件箱中的静止行为进行记录与分析。针对不同的检测阶段将每个检测阶段的总时程以 10s 为标尺划分为一个 bout，最终计算在 10s 中静止的次数与整个划分为 bouts 的时间段相比，最终得到整个时间段与静止次数的百分比，以方便比较各个阶段中小鼠的静止状态，以此揭示染锰后小鼠对于空间及刺激源的记忆能力。

$$\text{Context} = (\text{the number of bouts of freezing in the context}/30 \text{ bouts}) \times 100\%$$

$$\text{Pre-cued test} = (\text{the number of bouts of freezing in the altered context}/18) \times 100\%$$

$$\text{Auditory cue test} = (\text{the number of bouts of freezing to the auditory CS}/18) \times 100\%$$

2.3 血锰脑锰浓度检测

在染毒结束后，各组除一部分小鼠进行行为学检测，剩下的小鼠则进行血锰、脑锰的检测。

- 1) 通过腹腔注射 1%戊巴比妥钠将小鼠麻醉（按照 60mg/kg 体重剂量进行）；
- 2) 依次暴露腹腔、胸腔，进行心脏取血，所取血液存放于 EDTA 抗凝管中，混匀，暂放 4℃冰箱中保存；
- 3) 断头取脑组织，将脑组织存放于 5mlEP 管中，暂放于-80℃冰箱中保存，待各组样品收集结束，统一运用原子吸收分光光度计检测各组小鼠血液及脑组织中的锰含量。
- 4) 血锰的检测，通过将之前收集的各组小鼠血样进行稀释，之后直接运用原子吸收分光光度计对稀释后的血样进行检测；
- 5) 仔细分离脑部海马组织，放入 EP 管中，贮存至-20℃冰箱中，以备检测；
- 6) 脑锰的检测，分别称取每只小鼠的海马/脑组织 20mg，加入 3ml 的硝酸，运用微波消解仪进行消解 30min（此过程中各组各小鼠脑组织需在各自的消解管中进行消解，所以提前做好适量的消解管，并经过清洗、泡酸、冲洗、烘干等步骤

使其不会残留上次样品或其它杂质，便于此次试验)；

7) 待充分消解完毕后运用纯水进行稀释，通过原子吸收分光光度计分别检测。

2.4 染锰小鼠脑组织蛋白的收集

- 1) 亚急性锰中毒小鼠模型建立完成后，运用腹腔注射 1%戊巴比妥钠将小鼠麻醉(按照 60mg/kg 体重剂量进行)；
- 2) 依次暴露腹腔、胸腔，使用 10ml 注射器吸取 10ml 之前配好的生理盐水 (0.9%NaCl) 注射器针头换为一次性使用的静脉输液针，排出管内空气，将生理盐水通过暴露出的小鼠心脏左心室，剪开心耳，进行快速灌注；
- 3) 灌注结束后，断头，快速取出完整脑组织，并进行海马、黑质、纹状体等组织的分离，整个操作在冰上进行，所取出的脑组织放入以做好标记的 1.5mlEP 管中，及时放入超低温-80°C 冰箱保存样品。

2.5 脑组织样品蛋白的提取

- 1) 分别取出海马、黑质、纹状体等各个核团的样品，由于小鼠脑组织体积很小，故将针对各个小鼠所收集的各个核团样品全部使用，以保证蛋白浓度，且将所有样品放入冰盆，并且保证之后提取蛋白的过程也都在冰上进行，保持低温防止蛋白降解；
- 2) 按照 1mlRIPA 裂解液+40 μ l 蛋白酶抑制剂+10 μ lPMSF 的体积进行裂解液的配制 (即 100:4:1) 并将配制好的裂解液进行预冷；
- 3) 按照称取的脑组织重量给放入各脑组织的 1.5mlEP 管中加入相应体积的裂解液，且按照 1mg 脑组织样品加 10 μ l 裂解液的比例进行裂解液的添加；
- 4) 使用电动匀浆器进行蛋白匀浆，整个过程在冰上操作，且每个样品之间清洗电动匀浆头，直到将各组样品匀浆成为无组织块的均值蛋白液体；
- 5) 电动匀浆结束后，将样品静置于冰上裂解 30min，之后将具有蛋白液的各个 1.5mlEP 管按组别按标号分别离心管底部放入冰水混合物中，使用超生裂解仪进行进一步裂解，在超生裂解仪上进行设置，每个样品超生裂解 30s，且超生振幅为 25%，每超生裂解 3s，停止 3s，直至整体超生裂解时间结束；
- 6) 超生裂解结束后，放入 4°C 低温离心机中离心，12500rpm，15min，离心结束后，收集每个样品中的蛋白上清并记录体积；

- 7) 按照需定量的蛋白样品个数，使用 BCA 蛋白定量试剂盒，配制定量溶液，即 A 液和 B 液按照 50:1 的比例进行配制，每个样品使用 200 μ l 配好的 AB 显色液，另外需要 200 μ l AB 液在蛋白定量前对分光光度计的测定值调零，在 96 孔板中一个样品为一孔分别加入 200 μ l AB 液以及 2 μ l 的蛋白上清，再多加一个孔的 AB 液为之后调零做准备，放入 37 $^{\circ}$ C 恒温孵箱，孵育 30min；
- 8) 孵育结束后，使用之前已连接好的分光光度计进行蛋白浓度的测定，具体按照定量软件的提示进行即可，蛋白标准曲线已提前做好，调零后直接依次读取蛋白浓度即可；
- 9) 进行蛋白样品配平，【分光光度计测出蛋白浓度/2 \times 各自样品的体积（第 6 步所记录的）】/最低蛋白浓度=各组蛋白需达到的体积，此体积减去之前第 6 步所记录的体积就等于各组蛋白上清需加入的稀释裂解液的体积；
- 10) 配平结束后，按照最终体积加入等体积的 2 \times 上样缓冲液，加入后混匀，放入水浴锅煮沸 8min，煮沸结束后离心，带样品温度下降后放入 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.6 电生理方法检测染锰小鼠海马神经元 LTP

2.6.1 脑切片

- 1) 通过腹腔注射 1%戊巴比妥钠将小鼠麻醉（按照 60mg/kg 体重剂量进行）；
- 2) 断头处死迅速将小鼠大脑取出并放置在预冷处理过的含氧 ACSF（Artificial Cerebrospinal Fluid，饱和人工脑脊液）中，ACSF 中的主要成分包括：NaCl: 125mM，碳酸氢钠: 25mM，氯化钾: 2.5mM，磷酸二氢钠 1.25mM，氯化钙 2mM，氯化镁 1.5mM，葡萄糖 25mM，且持续通 95%O₂+5%CO₂ 混合气体；
- 3) 使用振荡切片机切冠状脑片，厚度为 300 μ m，之后放入 32 $^{\circ}$ C 含氧 ACSF 中孵育 1h；
- 4) 将切好的脑片移至红外相差倒置显微镜 Olympus BX51 下进行观察，持续通 ACSF（2-3 ml/min）并对过程进行记录。

2.6.2 电生理记录

- 1) 在红外可视情况下进行细胞场点位进行记录；
- 2) 采用膜片钳记录放大器（Axon 700B），在海马脑切片中，记录经 schaffer 侧支刺激诱导 CA1 区椎体神经元产生的厂甸尾 EPSPs（fEPSPs），fEPSPs 在 0.02Hz 电流重复刺激时产生，获得稳定的 fEPSPs，时间 \geq 10min；

- 3) LTP 诱导方法为强直刺激，其方法为 100Hz 电脉冲持续 1s，脉冲训练 4 次，两次脉冲之间间隔 20s，记录电极内冲入的 ACSF，在持续灌流液内加入 100mM 印防己毒素 (Picrotoxin) 拮抗 GABA 受体介导的抑制性突触电流；
- 4) 持续监测记录电极的介入阻抗 (Access resistance) 15-30mV，接入阻抗后改变超过 15% 的数据不可用，另外，通过 1400A 数模转换器 (Axon Instruments) 滤波频率为 1kHz 记录突触反应。

2.7 运用免疫组织化学染色观察染锰后小鼠体内小胶质细胞的变化

2.7.1 冰冻脑片的制备

- 1) 通过腹腔注射 1% 戊巴比妥钠将小鼠麻醉 (按照 60mg/kg 体重剂量进行)；
- 2) 依次暴露腹腔、胸腔，使用 10ml 注射器吸取 10ml 之前配好的生理盐水 (0.9%NaCl) 注射器针头换为一次性使用的静脉输液针，排出管内空气，将生理盐水通过暴露出的小鼠心脏左心室，剪开心耳，进行快速灌注；
- 3) 待小鼠四肢无血色，利用灌注器材将新鲜配制的低温 4% 多聚甲醛进行慢速灌注，以固定组织；
- 4) 待小鼠四肢及尾巴等全部僵硬，再使用 10ml 低温 4% 多聚甲醛进行慢速灌注，灌注结束后断头迅速取完整脑组织，分组放入已标记好的装有低温 4% 多聚甲醛的 50ml EP 管中进行后固定，后固定时间 > 12h；
- 5) 后固定结束后使用 10%、20%、30% 的蔗糖溶液，依此浓度顺序进行梯度脱水，不同小鼠组别分别准备各批梯度浓度蔗糖溶液，每次放入管中待组织由漂浮在蔗糖溶液表面变为沉入溶液底部再予以取出放入下一个浓度的蔗糖溶液中，以完成脱水步骤；
- 6) 脱水结束后，从蔗糖溶液中取出，在滤纸上吸走多余的蔗糖溶液，同时准备好已挂好胶的成品载玻片，并在载玻片的一边做好标记，之后运用冰冻切片机进行冠状切片，切片厚度为 17 μ m，每切好一张利用手的温度将脑片吸附到载玻片上，切片完成后，将所有片子放入片盒避免刮蹭，放入 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.7.2 免疫组织化学染色

- 1) 将 -20 $^{\circ}$ C 保存的片子拿到室温，复温，风干 2h；
- 2) 使用画圈笔画圈，将组织切片圈在圈中；

- 3) 使用 0.01MPBS 将待染片子洗 3 遍，每次 5min，每次弃当时洗片子的 PBS，更换新鲜 PBS，弃最后一遍的 PBS，使用 0.3%的 Triton-X100 进行透化，在冰上进行 15min；
- 4) 透化结束，继续使用 0.01MPBS 将片子洗 3 遍，每次 6min，弃最后一遍的 PBS，使用 3%BSA 进行封闭，室温进行 1h；
- 5) 弃封闭液，将片子放入湿盒中，使用同样的 3%BSA 稀释一抗 NLRP3 (1:100)、OX42 (1:400)，滴加至片子表面（注意不要滴加到画圈笔所画圈外），在 4℃ 环境中孵育过夜，且保持湿度；
- 6) 将片子从 4℃ 环境中取出，弃表面留下的一抗，使用 0.01MPBS 对片子进行清洗，洗 3 次每次 6min，之后弃最后一次洗片的 PBS，将片子放入湿盒，使用 3%BSA 稀释荧光二抗，鼠红 (1:400)、兔绿 (1:400)，之后将稀释好的抗体滴加到片子上，在避光的环境中室温孵育 2h，且保持湿度；
- 7) 室温孵育结束后，使用 0.01MPBS 进行洗片，共洗 3 次，每次 2min，结束后，将提前化冻的 Hoechst 滴加至片子上对细胞核进行衬染，继续在避光的环境中室温孵育 30min，且保持湿度；
- 8) 取出片子，在避光条件下运用 0.01MPBS 清洗片子，洗 3 次，每次 10min，之后使用甘油封片，并运用荧光显微镜进行观察，拍片。

2.8 运用免疫细胞化学染色观察染锰 BV2 小胶质细胞活化及炎症因子释放

2.8.1 细胞的培养与传代

使用含有 10%胎牛血清及 100U/ml 的青霉素、100 μ g/ml 的链霉素的 DMEM 高糖培养基来培养 BV2 小胶质细胞，细胞均放于购自 Thermo scientific 公司的二氧化碳培养箱中，以温度 37℃、CO₂ 浓度为 5%、且具有相对饱和湿度的环境进行细胞培养。每天观察细胞状态，1 天换一次培养基以保证其生长环境中的营养，待细胞密度达到 70%左右时，进行细胞传代。

2.8.2 运用 MTT 法检测染锰 BV2 小胶质细胞时间剂量

- 1) 常规消化细胞，重悬后进行细胞计数，按照 5000 个细胞/孔的浓度种于 96 孔板各孔中，96 孔板每孔可承载 200 μ l 的细胞悬液，即计数后将细胞悬液稀释至 2.5 \times 10⁴ 个/ml，以保证得到 5000 个细胞/200 μ l 的细胞密度，并单设一组对照孔，

其中不接种细胞仅加入培养基，接种结束后进行常规培养；

- 2) 培养细胞 24h 后加刺激，将之前的培养基换成含有梯度锰浓度的培养基,浓度依次为：0、12.5、25、50、100、200、400（单位： μM ），每组刺激设置 6 个复孔，且每个 96 孔板都以相同的方法加入一整组锰刺激，加完刺激后分别继续培养 3h、6h、12h、24h；
- 3) 刺激时间点到后，在每个 96 孔板各自的固定刺激结束时间将 96 孔板取出，每孔加入 5mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl ，并且继续放回培养箱常规培养 4h；
- 4) 孵育结束后，使用 1ml 注射器，小心延孔壁吸走上清，再给每孔加 150 μl DMSO，放入培养箱使其反应 15min，之后取出放入酶标仪中，震荡 480s，之后以 490nm 的波长测定各孔的吸光度值；
- 5) 计算结果。

2.8.3 运用免疫细胞化学染色观察染锰小胶质细胞活化状态

- 1) 首先将细胞爬片所用的玻片准备好，选用大号圆形盖玻片（12 孔板每孔可放一个，6 孔板每孔可放 2 个），将此盖玻片泡酸过夜，之后使用蒸馏水冲洗干净，再浸泡于 75%酒精中备用；
- 2) 将准备好的盖玻片从 75%酒精中取出，在酒精灯上烤干，之后放入 6 孔板中，每孔放 2 个，由于 BV2 细胞胞体较圆，属于半贴壁细胞，因此使用多聚赖氨酸溶液进行包被（此处多聚赖氨酸使用高压去离子水以 1:10 的比例进行配制），将配置好的多聚赖氨酸溶液每孔加入 1.5ml，以使得将盖玻片完全覆盖，之后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜；
- 3) 将包被好的板子取出，弃多聚赖氨酸，加入 PBS 多次冲洗，直至无多聚赖氨酸残留，之后同时开启紫外照射以及风淋，照射及吹干 20min；
- 4) 按正常培养方法将 BV2 小胶质细胞处理为细胞悬液，进行细胞计数，以 1.5×10^5 个/ml 的细胞密度进行接种，在以加入盖玻片并包被好的 6 孔板中每孔加入 2ml 细胞悬液，之后进行常规培养；
- 5) 培养细胞 24h 后加刺激，将之前的培养基换成含有梯度锰浓度的培养基,根据前期 MTT 的结果对锰浓度进行选择，最终选择锰浓度为：0、100（单位： μM ）及 LPS：10 μg ，刺激时间点仍为 3、6、12、24（单位：h）；

- 6) 在达到刺激时间后, 依次取出达到刺激时间点的板子, 进行免疫细胞化学染色;
- 7) 使用 10ml 注射器轻柔吸走板子中原来的培养液, 轻柔加入 PBS 进行清洗, 轻柔进行, 洗 3 次, 每次 5min;
- 8) 清洗结束后, 进行固定, 使用 4%多聚甲醛加入 6 孔板, 每孔加入 1ml 以保证完全覆盖盖玻片, 室温固定 25min;
- 9) 固定结束后, 使用 PBS 进行清洗, 动作轻柔, 清洗 3 次, 每次 5min, 之后进行透化, 在冰上运用 1%TritonX-100 进行透化, 透化进行 10min;
- 10) 透化结束后, 继续使用 PBS 清洗, 洗 3 次, 每次 5min (每次清洗注意动作轻柔, 弃洗液时使用 10ml 注射器, 不要使用泵和直接倾倒, 以防细胞掉落);
- 11) 运用 3%BSA 进行封闭, 封闭样品 1h, 在室温环境进行;
- 12) 在封闭过程中准备一抗, NLRP3 抗体使用 3%BSA 以 1:100 的比例进行稀释, 待封闭结束后, 在盖玻片上加一抗, 放入湿盒, 4°C 过夜;
- 13) 拿出敷好一抗的片子, 使用 PBS 清洗, 洗 3 次, 每次 6min;
- 14) 清洗结束后, 加荧光二抗, 使用兔绿荧光二抗, 避光、室温孵育 2h, 并且保持一定的湿度, 之后使用 PBS 清洗 3 次, 每次 3min, 清洗过后使用 Hoechst 染核, 室温进行 30min, 之后运用 PBS 清洗 3 次, 每次 8min;
- 15) 清洗结束后, 使用滤纸吸干盖玻片周围多余的液体, 准备好感觉的载玻片, 并在载玻片上滴加封片剂, 将盖玻片倒扣在载玻片上即可直接在荧光显微镜下观察 (注意以上步骤均需避光)。

2.9 运用 ELISA 方法检测 Mn 作用 BV2 小胶质细胞炎性因子的释放

根据所购买的 eBioscience ELISA 试剂盒说明书进行操作

- 1) 提前一天包被板子 (试剂盒所带 96 孔板) 计算好样品数量, 按照标准品+样品数量以及所带复孔进行包被, 将 capture antibody 稀释于 coating buffer 中 (稀释比例为 1:25), 稀释好后, 每孔包被 100 μ l, 4°C 过夜;
- 2) 第二天, 吸走液体, 使用 wash buffer 洗板 3 次, 每次 5min, 且每孔加入 wash buffer 体积为 >250 μ l, 每次清洗需使用干净吸水的布或滤纸将板子拍干;
- 3) 稀释 Assay Diluent (5 \times), 以 1:4 的比例稀释至高压去离子水中, 稀释好后 (即稀释为 1 \times Assay Diluent), 每孔加入 200 μ l 封闭, 室温进行 1h;

- 4) 使用 wash buffer 清洗板子，具体方法同前；
- 5) 使用之前配好的 1×Assay Diluent 倍比稀释标准品 (standard)，第 1 孔为 10μl 标准品+990μl 1×Assay Diluent 配好后的 10μl+190μl 1×Assay Diluent，此 200μl 为第 1 孔，之后从第 1 孔中取 100μl 到第 2 孔，混匀后再从第 2 孔吸 100μl 至第 3 孔，由此类推，倍比稀释，形成梯度标准品，之后样品区域每孔加入 100μl 样品（此处为锰刺激 BV2 小胶质细胞后所得蛋白或细胞培养液，加好后，用试剂盒所带贴膜将板子密封，4°C 过夜；
- 6) 取出板子，清洗 5 次，每次 5min，且孔中 wash buffer 体积需>250μl，清洗后需完全拍干；
- 7) 配制继续使用 1×Assay Diluent 稀释 detection antibody (250:1)，稀释好后，每孔 100μl 加入板子，室温孵育 1h；
- 8) 孵育结束，清洗板子，具体方法同前；
- 9) 继续使用 1×Assay Diluent 稀释 HRP (250:1)，稀释好后每孔 100μl 加入板子，室温孵育 30min；
- 10) 洗板子，方法同前，之后每孔加入 100μl substrate solution，室温孵育 15min；
- 11) 以 1:8 的比例混合浓硫酸和高压去离子水，配制为 stop solution，之后给每孔加入 50μl；
- 12) 最后，运用酶标仪以 450nm 吸光度值进行读取，得到 OD 值，使用 ELISA Calc 软件对结果进行分析，最终得到目的蛋白浓度。

2.10 运用 Western blot 方法检测 Mn 作用下 BV2 小胶质细胞相关炎症因子蛋白表达的变化

2.10.1 细胞的培养与传代

具体方法同前。

2.10.2 细胞样品蛋白的收集

- 1) 运用与之前相同的方法对细胞进行计数，计数结束后，用同样方法将细胞悬液稀释至 3×10^5 个细胞/ml，将细胞接种在 10cm 皿中，将之前细胞浓度的悬液加在 10cm 皿中，每个皿加入 10ml 的细胞悬液，之后进行正常细胞培养；

- 2) 细胞培养 24h 后, 按照之前方法配制锰刺激液, 刺激浓度分别是 0、25、50、100 (单位: μM) 以及 LPS: $1\mu\text{g/ml}$ 即 10ml 刺激液中含有 $10\mu\text{g}$ LPS 刺激液, 加入刺激液后继续培养 3、6、12、24 (单位: h), 按照各自的时间剂量点收集样品, 此处配制锰刺激也得具体体积如下:

不同浓度含锰培养液的配制

终浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900
原液 (ml)	0	0.005	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
DMEM (ml)	1	0.995	0.99	0.98	0.97	0.96	0.95	0.94	0.93	0.92	0.91
原液 (ml)	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18
DMEM (ml)	2	1.99	1.98	1.96	1.94	1.92	1.90	1.88	1.86	1.84	1.82
原液 (ml)	0	0.015	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15	0.18	0.21	0.24	0.27
DMEM (ml)	3	2.985	2.97	2.94	2.91	2.88	2.85	2.82	2.79	2.76	2.73
原液 (ml)	0	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.20	0.24	0.28	0.32	0.36
DMEM (ml)	4	3.98	3.96	3.92	3.88	3.84	3.80	3.76	3.72	3.68	3.64
原液 (ml)	0	0.025	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45
DMEM (ml)	5	4.975	4.95	4.90	4.85	4.80	4.75	4.70	4.65	4.60	4.55
原液 (ml)	0	0.03	0.06	0.12	0.18	0.24	0.30	0.36	0.42	0.48	0.54
DMEM (ml)	6	5.97	5.94	5.88	5.82	5.76	5.70	5.64	5.58	5.52	5.46
原液 (ml)	0	0.035	0.07	0.14	0.21	0.28	0.35	0.42	0.49	0.56	0.63
DMEM (ml)	7	6.965	6.93	6.86	6.79	6.72	6.65	6.58	6.51	6.44	6.37
原液 (ml)	0	0.04	0.08	0.16	0.24	0.32	0.40	0.48	0.56	0.64	0.72
DMEM (ml)	8	7.96	7.92	7.84	7.76	7.68	7.60	7.52	7.44	7.36	7.28
原液 (ml)	0	0.045	0.09	0.18	0.27	0.36	0.45	0.54	0.63	0.72	0.81
DMEM (ml)	9	8.955	8.91	8.82	8.73	8.64	8.55	8.46	8.37	8.28	8.19
原液 (ml)	0	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
DMEM (ml)	10	9.95	9.90	9.80	9.70	9.60	9.50	9.40	9.30	9.20	9.10
原液 (ml)	0	0.06	0.12	0.24	0.36	0.48	0.60	0.72	0.84	0.96	1.08
DMEM (ml)	12	11.94	11.88	11.76	11.64	11.52	11.40	11.28	11.16	11.04	10.92
原液 (ml)	0	0.08	0.16	0.32	0.48	0.64	0.80	0.96	1.12	1.28	1.44
DMEM (ml)	16	15.92	15.84	15.68	15.52	15.36	15.20	15.04	14.88	14.72	14.56
原液 (ml)	0	0.10	0.2	0.4	0.60	0.80	1.0	1.20	1.40	1.60	1.80
DMEM (ml)	20	19.90	19.80	19.60	19.40	19.20	19.0	18.80	18.60	18.40	18.20

注: 原液为 100mM 母液稀释 10 倍, 浓度为 10mM。根据需要的刺激液体积, 按照上表进行配置;

- 3) 提前准备好 15mlEP 管, 将每个样品的上清进行收集, 给各个样品的 EP 管做好标记, 之后滴加 2ml0.02%EDTA 对细胞进行消化, 3min 后对消化好的细胞进行吹打收集, 各个组的样品都收集到一个 15mlEP 管中, 室温离心 300rcf, 8min, 离心完成后, 弃上清, 得到 BV2 小胶质细胞各组的蛋白团块, 使用 PBS 将细胞团块进行清洗, 轻柔吹打, 之后 1250rpm 离心 5min, 之后给每个样品中加入 $200\mu\text{l}$

裂解液（已按照 100:4:1 的比例分别加好 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、PMSF），混匀，冰上静置裂解 30min，之后将 15mlEP 管中的蛋白液移至 1.5mlEP 管中，放入-80°C 保存。

2.10.3 细胞样品蛋白的提取

- 1) 将之前收集的蛋白样品从-80°C 冰箱拿出，化冻，之后使用超生破碎仪对样品进行超生破碎，超生破碎仪的设置同前，且仍将 EP 管放入冰水混合物中；
- 2) 超生结束后放入提前降温的 4°C 离心机中离心，12500rpm，15min，离心结束后收集蛋白上清并记录上清体积；
- 3) 仍使用 BCA 蛋白检测试剂盒，仍以 50:1 的比例配 AB 液，和之前收集组织样品蛋白的方法一样，以 200 μ lAB 混合液加 2 μ l 离心后的蛋白上清液，加入 96 孔板中，放入 37°C 恒温箱中孵育 30min，之后进行蛋白定量，定量方法同前；
- 4) 定量结束按照与组织蛋白配平方法相同的步骤进行蛋白浓度配平，之后加入 6 \times 上样 buffer(使用前以 1ml 上样 buffer+0.613mlDTT 的比例进行混合)加入体积为蛋白样品体积的 1/5，加入后混匀，之后煮沸 8min，待煮沸后，放入离心机离心至管壁上的样品均至管底，之后放入-20°C 保存。

2.10.4 SDS-PAGE 凝胶的制备

清洗 Bio-Rad 公司配套提供的玻璃板、上样梳子、胶架等，放入烤箱烘干，在平整的桌面上将玻璃板装入玻璃板夹，并组装到配胶架上，参考《分子克隆实验指南》，根据目的蛋白质的分子量，配制合适的分离胶浓度，具体如下表：

分离胶的有效分离范围	
分离胶浓度 (%)	线性分离范围 (kDa)
15	10-43
12	12-60
10	20-80
7.5	36-94
5.0	57-212

使用晶彩公司的 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒中说明书的要求配置所需浓度的凝胶，具体加入各配胶试剂体积如下：

成分	配制不同体积和浓度凝胶所需各成分的体积/ml								成分	配制不同体积和浓度凝胶所需各成分的体积/ml							
	5	10	15	20	25	30	40	50		5	10	15	20	25	30	40	50
6%浓度的胶									12%浓度的胶								
双蒸水	2.6	5.5	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5	双蒸水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30%丙烯酰胺混合液	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0	30%丙烯酰胺混合液	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
pH8.8 1.5M Tris	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5	pH8.8 1.5M Tris	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
8%浓度的胶									15%浓度的胶								
双蒸水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2	双蒸水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30%丙烯酰胺混合液	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3	30%丙烯酰胺混合液	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
pH8.8 1.5M Tris	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5	pH8.8 1.5M Tris	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
10%浓度的胶																	
双蒸水	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8									
30%丙烯酰胺混合液	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7									
pH8.8 1.5M Tris	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5									
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5									
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5									
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02									

按照以上体积进行配胶，将溶液加入玻璃板至顶端 1.5cm 的位置，加入双蒸水压胶，使胶面平整，室温放置月 30min，待分离胶凝固后配积层胶，将之前压胶的双蒸水倒掉，并用滤纸吸干，之后倒入配好的积层胶，缓慢插入 10 齿泳道梳子，室温放置约 30min，待积层胶凝固后，即可拔掉梳子准备上样。

2.10.5 Western blotting

- 1) 准备好电泳槽，夹好之前配好的凝胶，并在电泳槽中倒入电泳液；
- 2) 使用微量上样器上样，每个泳道保证 90 μ g 的总蛋白，上样结束后，固定好电极，设置为恒压状态，以 80V 的电压电泳约 30min，直至样品泳至分离胶界面，仍以恒压状态以 120V 电压继续电泳，直至溴酚蓝全部泳出；
- 3) 准备电转，每块胶需要根据大小准备好滤纸 6 层，PVDF 膜 (5cm \times 8cm)，以及两块海绵，将准备好的 PVDF 膜放入甲醇浸泡 1min，其余用品放入电转液中待用；
- 4) 电泳完毕取出胶板并用塑料板撬开上层玻璃、划去积层胶，在装满电泳液的盘子中黑色向下放好电转夹，按照海绵-3 层滤纸-胶-浸泡过甲醇的 PVDF 膜-3 层滤纸-海绵的顺序依次小心放入，排出气泡，最后夹紧电转夹，并放入已倒满电转液的电转盒中，注意电极的方向，固定好后设置为恒流状态以 250mA 的电流进行电转，NLRP3 电转 96min，Caspase-1 电转 36min；

- 5) 电转结束后, TBST 洗膜 3min, 之后放入 5%BSA 中封闭, 室温进行 2h;
- 6) 封闭期间, 准备一抗, NLRP3 及 Caspase-1 以 1:100 的比例稀释在 TBS 中, 放入 4°C 待用, 待封闭结束, 将封闭好的膜按照之前跑的蛋白内容及不同的胶的浓度和电转时间分别加入不同的一抗, 4°C 孵育过夜;
- 7) 一抗孵育结束后, 取出 PVDF 膜, 使用 TBST 洗膜 3 次, 每次 8min, 同时以 1:1000 的比例稀释羊抗兔二抗, 洗膜结束后孵育二抗, 室温进行 2h;
- 8) 二抗孵育结束, 取出 PVDF 膜, 使用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 同时打开发光仪降温;
- 9) 洗膜结束后, 将膜放入发光仪中, 按照 1:1 的比例配制发光液, 并且均匀的滴加在 PVDF 膜上, 进行曝光;
- 10) 发光结束后, 使用 TBST 洗膜 3min, 在使用 Strip buffer 清洗 20min, 将孵育在 PVDF 膜上的抗体洗掉, 之后 TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 洗膜结束后, 继续使用 5%BSA 进行封闭, 室温封闭 1h 后, 使用 TBS 以 1:1000 的比例稀释 Actin 一抗, 之后对膜进行 4°C 孵育过夜, 之后以相同的步骤使用 TBS 以 1:1000 的比例稀释羊抗鼠二抗, 将一抗孵育过 Actin 的膜以相同步骤放入鼠二抗, 之后进行曝光, 得到内参。

2.11 运用 qRT-PCR 方法检测 Mn 作用下 BV2 小胶质细胞炎性因子在 mRNA 的变化

2.11.1 细胞的培养与传代

具体方法同前。

2.11.2 细胞样品 RNA 的收集

- 1) 运用与之前相同的方法对细胞进行计数, 计数结束后, 用同样方法将细胞悬液稀释至 2×10^5 个细胞/ml, 将细胞接种在 6 孔板中, 每个孔加 2ml 的细胞悬液, 之后进行正常细胞培养;
- 2) 细胞培养 24h 后, 按照之前方法配制锰刺激液, 刺激浓度分别是 0、25、50、100 (单位: μM) 以及 LPS: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 10ml 刺激液中含有 10 μg LPS 刺激液, 加入刺激液后继续培养 3、6、12、24 (单位: h), 按照各自的时间剂量点收集样品;
- 3) 提前准备好 1.5ml 无 RNA 酶的 EP 管, 按照各个时间剂量点收集样品, 使用 2ml 注射器轻柔吸去上清, 并使用 PBS 轻柔清洗 2 次, 每次 1min;

- 4) 每孔加入 500 μ l Trizol, 吹打, 直至溶液均匀, 之后将样品移至 1.5ml 无 RNA 酶 EP 管中, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存样品。

2.11.3 细胞 RNA 样品的提取

- 1) 将之前收集好的样品从-80 $^{\circ}$ C 冰箱取出, 待充分融化, 加入 Trizol 1/5 体积的三氯甲烷, 剧烈摇晃 15s, 室温放置 5min;
- 2) 之后进行 4 $^{\circ}$ C 离心, 12000rcf 离心 15min, 离心结束后, 将通过离心得到的无色上清液移至新的 1.5ml 无 RNA 酶 EP 管中, 给其中加入等体积的异丙醇, 上下轻柔颠倒离心管使其充分混匀, 之后室温静置 10min;
- 3) 静置结束后进行 4 $^{\circ}$ C 离心, 12000rcf 离心 10min, 离心结束后, 管底会出现白色羽毛样沉淀, 小心弃掉上清, 加入 75%无水乙醇, 轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁, 再进行 4 $^{\circ}$ C 离心, 12000rcf 离心 5min, 之后小心弃掉乙醇;
- 4) 室温干燥 8min, 加入 RNase-free 水溶解沉淀, 20 μ l/管, 用移液枪轻轻吹打沉淀, 使其充分溶解, 之后进行运用 Thermo 公司的 NANODROP2000c 进行 RNA 定量 (OD260/OD280 的比值均在 1.8-2.0 之间);
- 5) 反转录合成 cDNA, 具体体系及反应条件如下:

反应试剂	反应体系
5 \times Prime Script RT Master Mix	2 μ l
Total RNA	500ng
RNase-free H ₂ O	10 μ l 减去上述体积

反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15min; 85 $^{\circ}$ C 5s; 4 $^{\circ}$ C 保存

2.11.4 扩增

- 1) 引物序列:

名称	序列 (5'-3')
IL-1 β	Forward: GCCATCCTCTGTGACTCAT
	Reverse: AGGCCACAGGTATTTGTGC
IL-18	Forward: FACCAAGTTCTTTCGTTGAC
	Reverse: RCTTCACAGAGAGGGTCACAG
TNF- α	Forward: CGTCAGCCGATTTGCTATCT
	Reverse: CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
Actin	Forward: AGCCATGTACGTAGCCATCC
	Reverse: GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA

2) 具体反应体系及反应条件:

反应试剂	反应体系
SYBR Buffer	15 μ l
Forward primer (10 μ M)	1.2 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1.2 μ l
ROX Dye II	1.2 μ l
cDNA模板	3 μ l
RNase-free H ₂ O	10 μ l

反应条件: 反应体系约为30 μ l, 重复三个孔, 每孔10 μ l。反应分三步:
 第一步, 95 $^{\circ}$ C 30s; 第二步, 95 $^{\circ}$ C 3s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 40个循环; 第三步, 72 $^{\circ}$ C, 10min

2.12 统计学分析

使用 $\bar{x} \pm s$ 表示实验结果, 使用统计学程序软件 SPSS 22.0 对结果进行分析, 运用 T 检验等方法对数据进行方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 锰暴露动物模型的建立及其对小鼠学习记忆能力的影响

3.1.1 亚急性锰暴露后小鼠血锰和脑锰的变化

对收集的各组小鼠的血液及脑组织进行消化、稀释等处理后使用原子吸收分光光度计进行检测, 结果发现与对照组相比染锰后小鼠的血锰和脑锰含量均有所升高(图 1-1)。

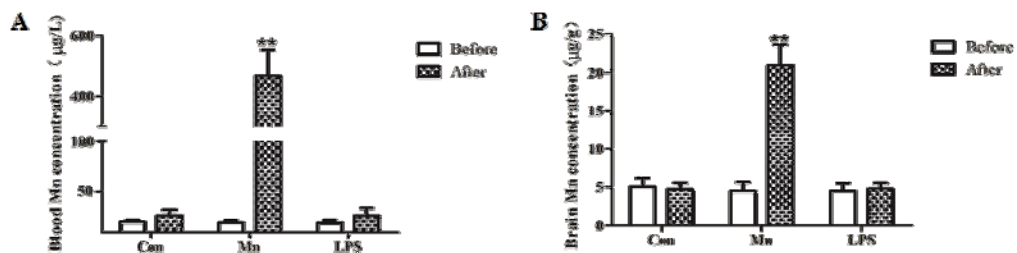


图 1-1 原子吸收分光光度法检测染锰小鼠的血锰、脑锰含量

A: 血锰值在染锰前后对比结果; B: 脑锰值在染锰前后对比结果。 (** $P < 0.01$ vs. Con)

3.1.2 运用旷场实验对染锰小鼠的探索及行为运动能力进行检测

运用旷场实验对小鼠探索及行为运动能力进行检测, 结果显示与对照组相比染锰后小鼠的探索及行为运动能力均有所下降(图 1-2)。

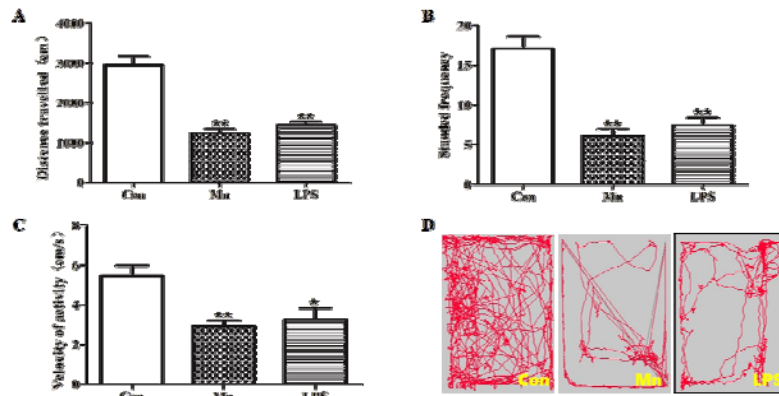


图 1-2 旷场实验检测小鼠的探索及行为运动能力

A: 旷场实验中各组小鼠的运动距离; B: 旷场实验中各组小鼠的站立次数;
C: 旷场实验中各组小鼠的运动速度; D: 对照组和高剂量锰组的小鼠运动轨迹图。

(* $P < 0.05$ vs. Con ; ** $P < 0.01$ vs. Con)

3.1.3 运用爬杆实验对染锰小鼠的行为运动能力进行检测

爬杆实验结果显示, 100mg/kg 浓度锰处理组(之后简称为 Mn 组)中小鼠与对照组相比从顶端到头向下的时间以及从头向下到爬至杆底部平台的时间明显较长(图 1-3A、B、C)且具有统计学意义($P < 0.05$)。结果提示, 与对照组相比, 锰暴露促使小鼠行为运动能力明显下降, 并且在小鼠向下爬杆的过程中, Mn 组小鼠动作明显不协调, 爬动速度慢, 由此可以说明在亚急性锰中毒模型中, 锰可以诱导小鼠行为运动能力的下降(图 1-3)。

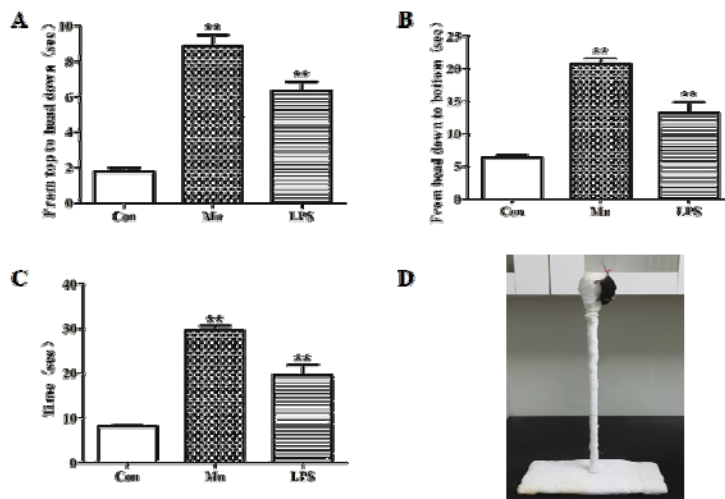


图 1-3 爬杆实验中小鼠的各阶段运动时间

A: 小鼠从出发点顶端到头完全向下的时间; B: 小鼠从头完全向下到爬杆至平台的时间
C: 小鼠爬杆过程总时间; D: 小鼠爬杆状态。(** $P < 0.01$ vs. Con)

3.1.4 锰暴露对小鼠黑质脑区多巴胺水平的影响

运用 ELISA 方法检测小鼠黑质脑区多巴胺的含量，结果发现，与对照组相比，锰组及 LPS 组多巴胺水平明显降低（图 1-4），并具有统计学意义（ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ）。结果提示，锰暴露促使小鼠黑质多巴胺神经递质释放水平降低。

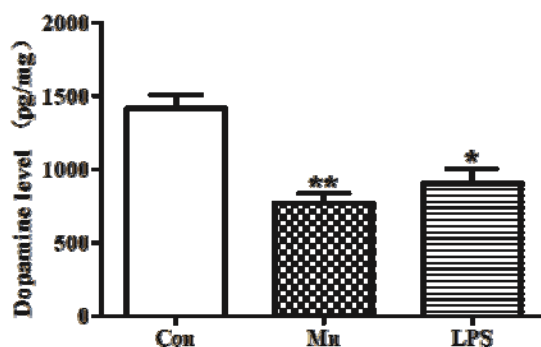


图 1-4 染锰后黑质脑区多巴胺水平明显降低
(* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con)

3.1.5 锰可以诱导多巴胺能神经元发生损伤

运用 Western blot 方法检测锰暴露后小鼠黑质 TH 蛋白表达水平，结果显示，锰暴露后小鼠黑质 TH 蛋白表达水平与对照组相比明显减少（图 1-5），且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。结果提示，锰可以诱导多巴胺能神经元发生损伤。

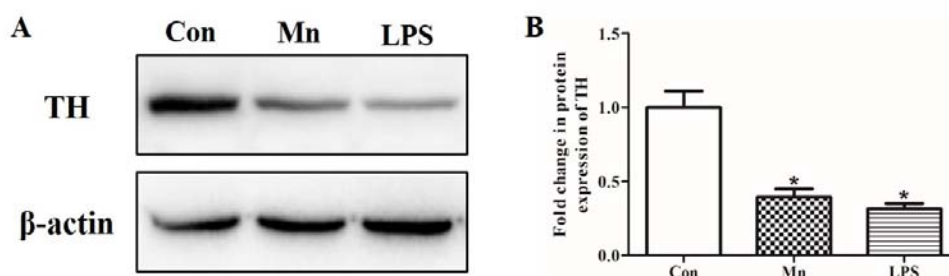


图 1-5 Western blot 方法检测锰暴露对小鼠黑质多巴胺能神经元的影响

A: 染锰黑质脑区 TH 表达下降; B: 灰度分析结果。(* $P < 0.05$ vs. Con)

3.1.6 锰暴露对小鼠学习记忆能力进行检测

运用恐惧条件箱检测锰暴露对小鼠学习记忆能力的影响，结果发现，染锰后小鼠对刺激条件记忆及空间记忆都有明显的降低（图 1-6）。

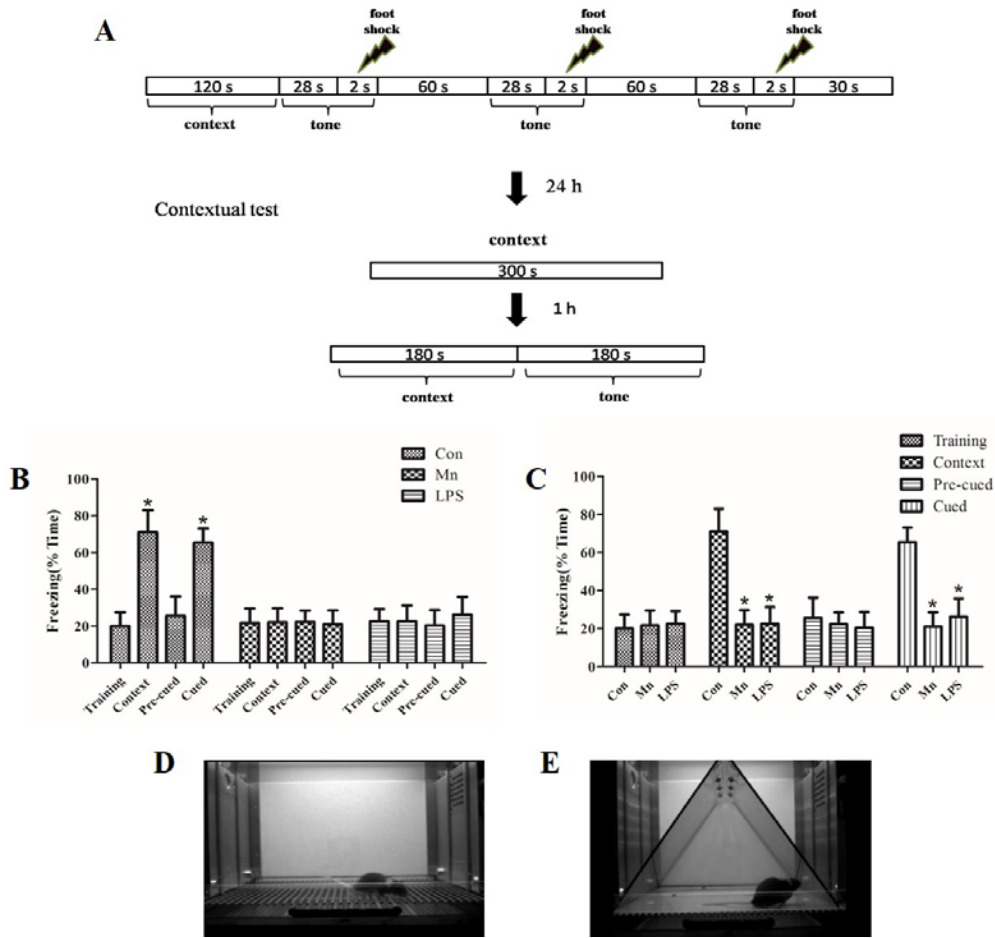


图 1-6 恐惧条件箱检测染锰小鼠学习记忆能力的变化

A: 根据恐惧条件箱实验方法及需使用软件记录的时间或刺激因素，制成的恐惧条件箱刺激及空间调整汇总图; B-C: 是小鼠在训练和检测过程中受到刺激后以静止不动的时间和整体时间的百分比(* $P < 0.05$ vs. Con); D: 检测小鼠针对刺激条件的记忆的环境; E: 调整空间，检测小鼠对空间的记忆。

3.1.7 锰暴露对小鼠海马神经元 LTP 的影响

运用膜片钳技术检测锰暴露对小鼠海马神经元场兴奋性突触后电位 (图 1-7)，结果发现，锰暴露对小鼠海马神经元 LTP 可产生显著的抑制作用 ($P < 0.01$)。

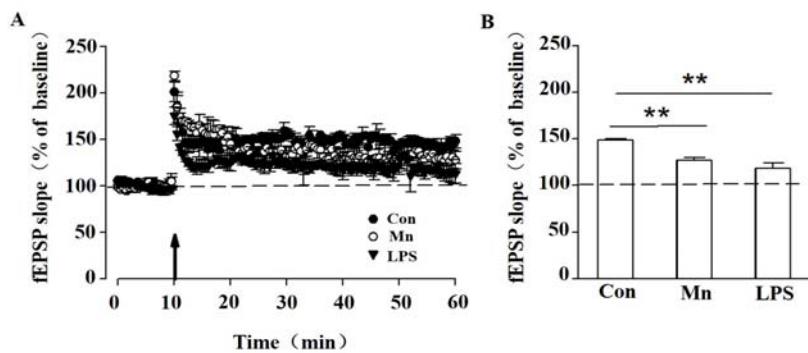


图 1-7 膜片钳检测锰暴露对小鼠 LTP 诱导水平的影响

A: Con、Mn、LPS 3 组场兴奋性突触后电位; B: 统计图 (** $P < 0.01$ vs. Con)

3.2 锰暴露对小胶质细胞活化以及炎性因子释放的影响

3.2.1 锰可以诱导小鼠体内小胶质细胞发生活化

通过免疫组织化学染色的方法观察染锰小鼠海马脑区，使用 OX42 标记小胶质细胞，通过荧光显微镜观察小胶质细胞的形态变化以及荧光强度（图 1-8）。结果发现，与对照组相比，染锰后，小鼠海马脑区小胶质细胞胞体变大，突起增粗，荧光强度较强，提示锰可以诱导小胶质细胞发生活化。

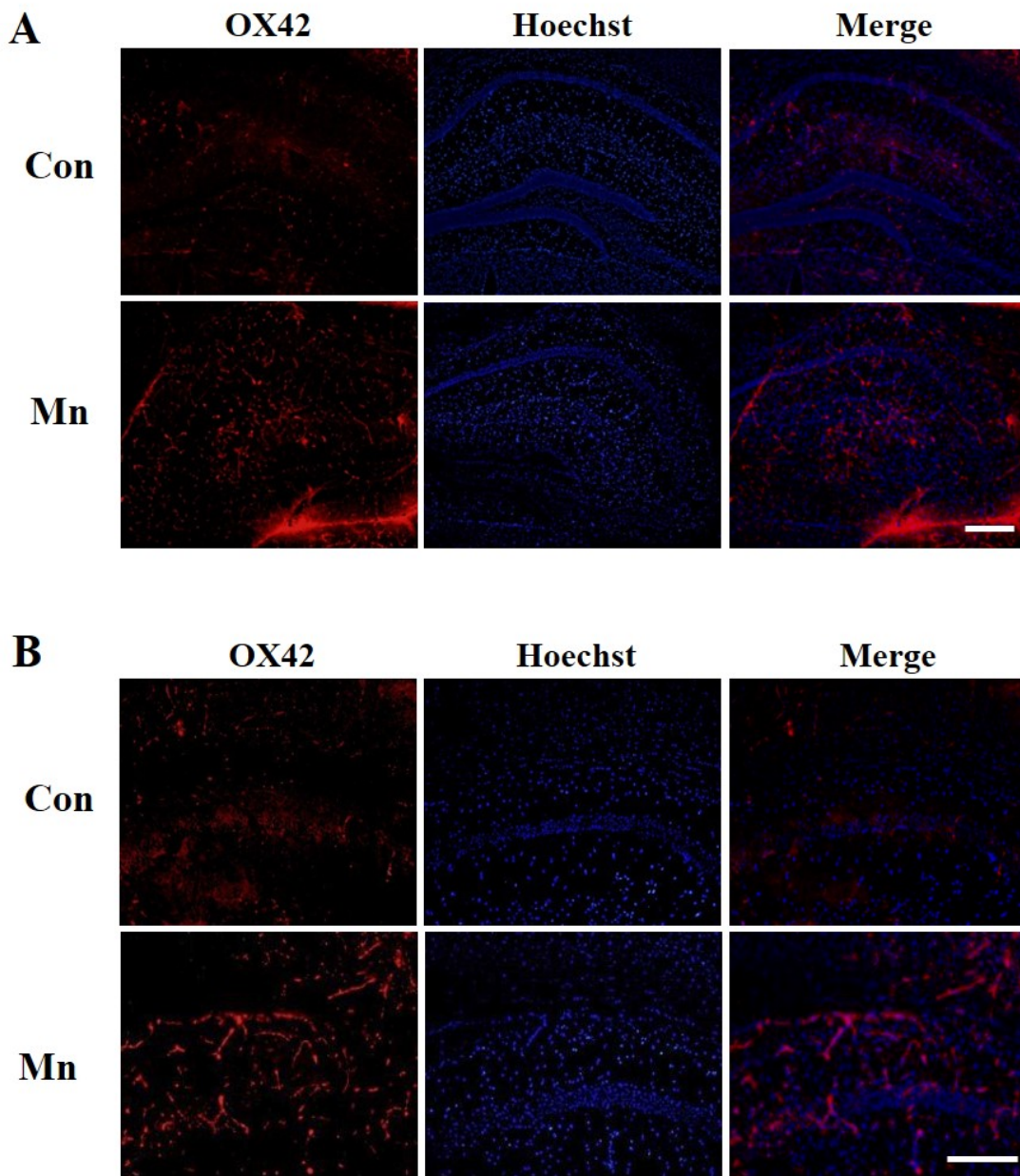


图 1-8 免疫组织化学检测海马脑区 OX42 表达

(A: Bar 200X; B: Bar 400X)

3.2.2 锰可以诱导小鼠海马核团中炎症因子表达升高

1) 锰可以诱导小鼠海马组织中成熟的 IL-1 β 蛋白水平升高

运用 Western blot 方法检测锰暴露小鼠海马组织炎症因子在蛋白水平的改变(图 1-9)。结果显示, 锰暴露能够增加小鼠海马组织中成熟的 IL-1 β 在蛋白水平有所增加。将结果进行灰度分析, 结果发现锰暴露组及 LPS 组所释放的成熟 IL-1 β 在蛋白水平明显增加与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

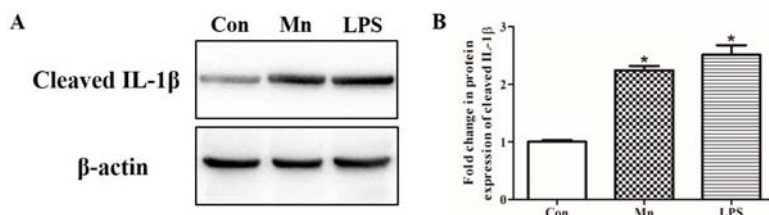


图 1-9 Western blot 检测锰暴露后小鼠海马组织中成熟 IL-1 β 蛋白水平的表达

A: 锰暴露小鼠海马组织 IL-1 β 的表达; B: 灰度分析结果。(* $P < 0.05$ vs. Con)

2) 锰可以诱导小鼠海马组织中成熟的 IL-18 蛋白水平升高

运用 Western blot 方法检测锰暴露小鼠海马组织所释放的成熟 IL-18 在蛋白水平的改变(图 1-10), 灰度分析结果发现锰暴露组与 LPS 组所释放的成熟 IL-18 在蛋白水平明显增加与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

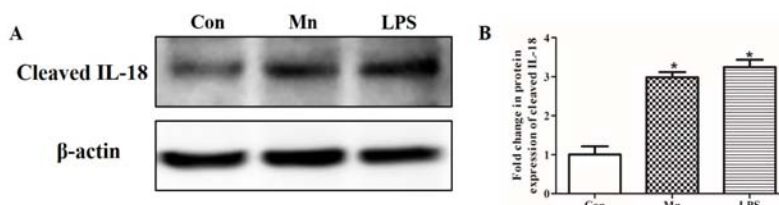


图 1-10 Western blot 检测锰暴露后小鼠海马组织中成熟 IL-18 蛋白水平的表达

A: 锰暴露小鼠海马组织 IL-18 的表达; B: 灰度分析结果。(* $P < 0.05$ vs. Con)

3) 锰可以诱导小鼠海马组织中 TNF- α 蛋白水平升高

同样运用 Western blot 方法检测锰暴露小鼠海马组织所释放的 TNF- α 在蛋白水平的改变(图 1-11), 灰度分析结果发现锰暴露组与 LPS 组所释放的 TNF- α 在蛋白水平明显增加与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

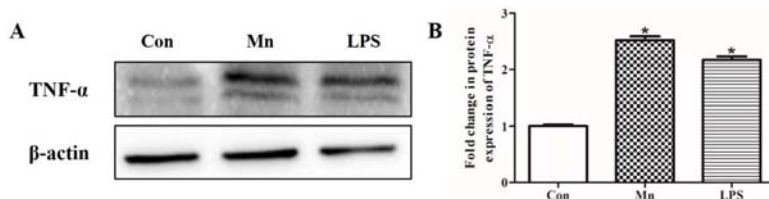


图 1-11 Western blot 检测锰暴露后小鼠海马组织 TNF- α 蛋白水平的表达

A: 锰暴露小鼠海马组织 TNF- α 的表达; B: 灰度分析结果。(* $P < 0.05$ vs. Con)

3.2.5 锰对 BV2 小胶质细胞增殖活力的影响

运用 MTT 方法来检测不同时间剂量点对 BV2 小胶质细胞活性的影响(图 1-12)。将细胞暴露于不同浓度的锰 (0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μM), 分别在 3h, 6h, 12h, 24h, 48h 后进行检测, 结果发现与对照组相比在 200 μM 浓度锰暴露刺激下细胞活力有明显下降 (图 B), 在之后的时间剂量点中, 细胞活力呈时间剂量依赖性降低 (图 C、D、E)。

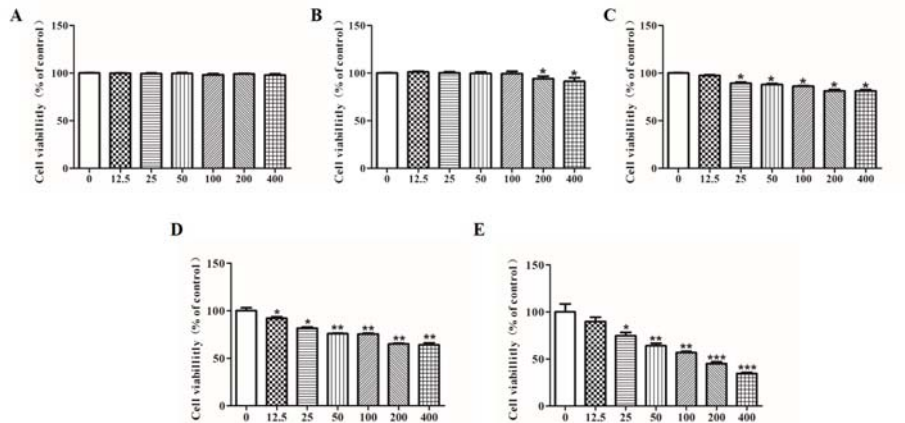


图 1-12 MTT 检测锰暴露对 BV2 小胶质细胞活性的影响

A、B、C、D、E 分别为 3、6、12、24、48h 时间点不同剂量锰对 BV2 小胶质细胞活性的影响
 (* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con; *** $P < 0.001$ vs. Con)

3.2.6 锰可以诱导 BV2 小胶质细胞发生活化

根据 MTT 的结果, 我们进一步运用免疫细胞化学染色方法观察 BV2 小胶质细胞形态及 OX42 表达的变化 (图 1-13)。结果发现, 与对照组相比 100 μM 锰作用细胞 6h 可以诱导其胞体变圆, 突起增粗增长, 且 OX42 荧光强度增强, 提示在这一时间剂量点细胞发生活化。

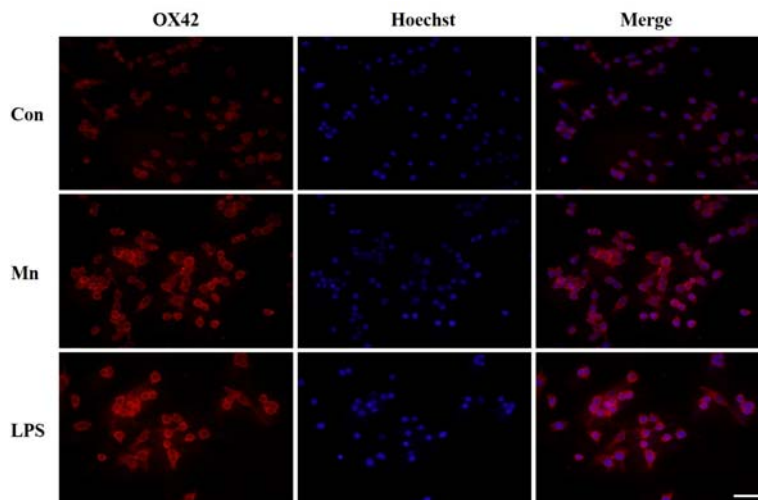


图 1-13 免疫细胞化学染色检测锰暴露对 BV2 小胶质细胞活化的影响 (Bar: 400X)

3.2.7 锰可以诱导 BV2 小胶质细胞炎性因子的释放

1) 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放 IL-1 β 的影响

小胶质细胞作为中枢神经系统的免疫反应细胞，在外界刺激或者内源性病理作用下会发生活化反应，而它所释放的炎性因子增多就是其活化的主要表现之一（图 1-14）。我们运用 ELISA 方法检测 BV2 小胶质细胞在锰作用 3、6、12、24h 中炎性因子的释放情况，结果显示，在作用 6h 后，与对照组相比，锰组与 LPS 组中 BV2 小胶质细胞所释放的 IL-1 β 水平明显增加，且具有统计学意义 ($P < 0.01$)，在作用 12、24h 小时后锰组与 LPS 组中细胞释放的 IL-1 β 水平持续增加，与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

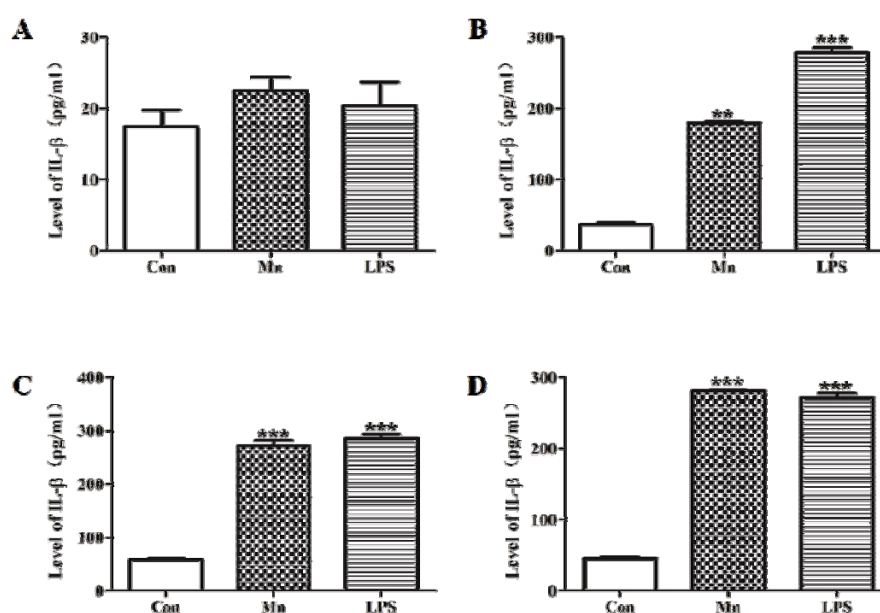


图 1-14 ELISA 方法检测锰暴露对 BV2 细胞释放 IL-1 β 的影响

A、B、C、D 分别为 3、6、12、24h 时间点，Mn 组剂量为 100 μ M，LPS 组剂量为 10 μ g

(** $P < 0.01$ vs. Con; *** $P < 0.001$ vs. Con)

运用 qRT-PCR 方法检测 BV2 小胶质细胞在锰作用 3、6、12、24h 后释放的 IL-1 β 在 mRNA 水平的变化（图 1-15）。结果发现，锰作用 6h 后 BV2 小胶质细胞所释放的 IL-1 β 在 mRNA 水平有显著增加，与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.05$)，在锰、LPS 作用 12、24h 后 IL-1 β 在 mRNA 水平会持续增加，且与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.01$)。

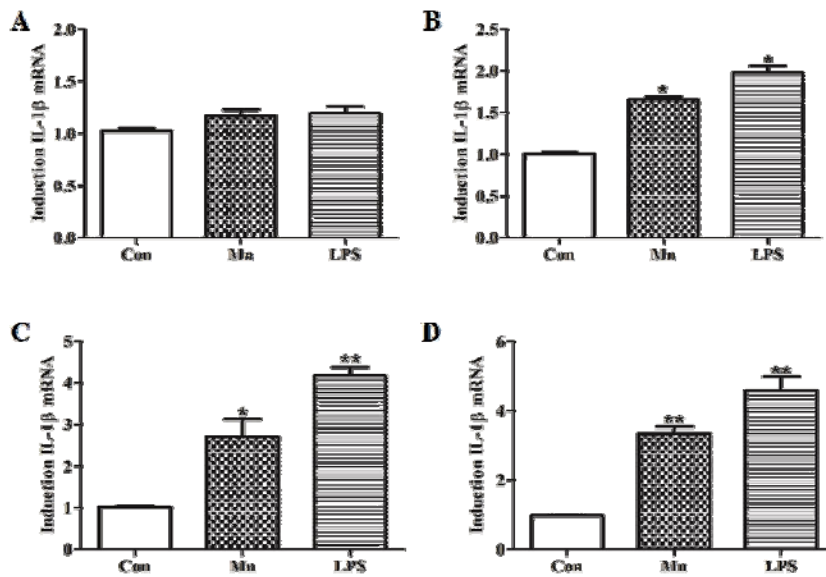


图 1-15 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放的 IL-1 β 在 mRNA 水平的的影响

A、B、C、D 分别为 3、6、12、24h

(* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con)

运用 Western blot 方法检测锰作用 6h 后 BV2 小胶质细胞释放成熟的 IL-1 β 在蛋白水平的改变(图 1-16)。结果显示,与对照组相比,锰组 BV2 小胶质细胞中成熟的 IL-1 β 在蛋白水平的表达明显增加,且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

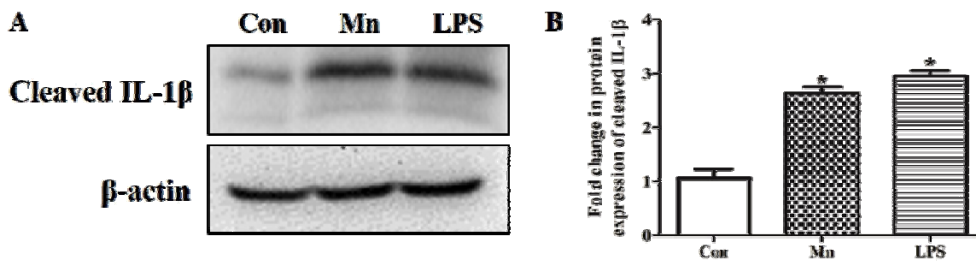


图 1-16 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放的 IL-1 β 在蛋白水平的影响

A: 锰暴露 6h 后 BV2 小胶质细胞释放的 IL-1 β 在蛋白水平的表达; B: 灰度分析结果。

(* $P < 0.05$ vs. Con)

2) 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放 IL-18 的影响

运用 ELISA 方法检测在锰作用 BV2 小胶质细胞 3、6、12、24h 后释放 IL-18 的情况(图 1-17)。结果显示,在锰作用 3h 后 BV2 小胶质细胞所释放的 IL-18 有一定的增加,在锰作用 BV2 小胶质细胞 6h 后 IL-18 有明显增加,且与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.01$),并随着刺激时间加长 IL-18 释放量持续增加,且与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

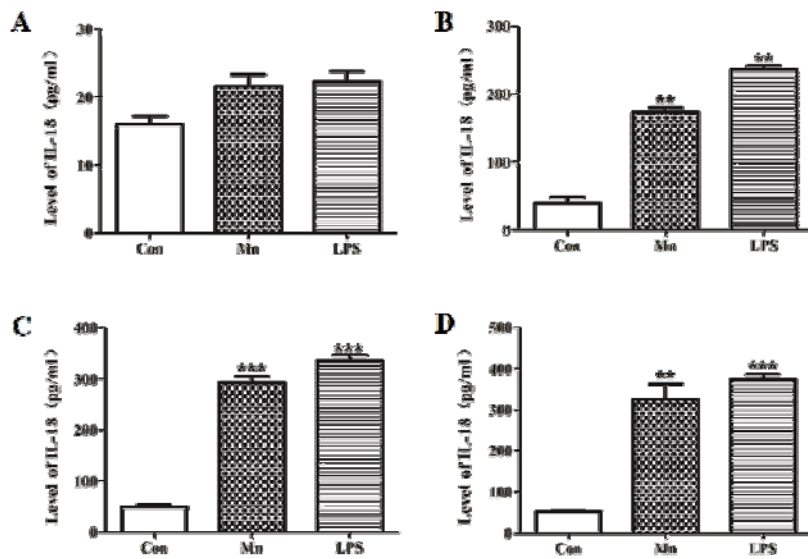


图 1-17 ELISA 方法检测锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放 IL-18 的影响

A、B、C、D 分别为 3、6、12、24h 时间点，Mn 组剂量为 100 μ M，LPS 组剂量为 10 μ g
 (** $P < 0.01$ vs. Con; *** $P < 0.001$ vs. Con)

运用 qRT-PCR 方法检测 BV2 小胶质细胞在锰作用 3、6、12、24h 后释放的 IL-18 在 mRNA 水平的变化 (图 1-18)。结果发现，在锰作用 6h 后 BV2 小胶质细胞所释放的 IL-18 在 mRNA 水平有显著增加，与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.05$)，在锰、LPS 作用 12、24h 后 IL-18 在 mRNA 水平会持续增加，且与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.05$)。

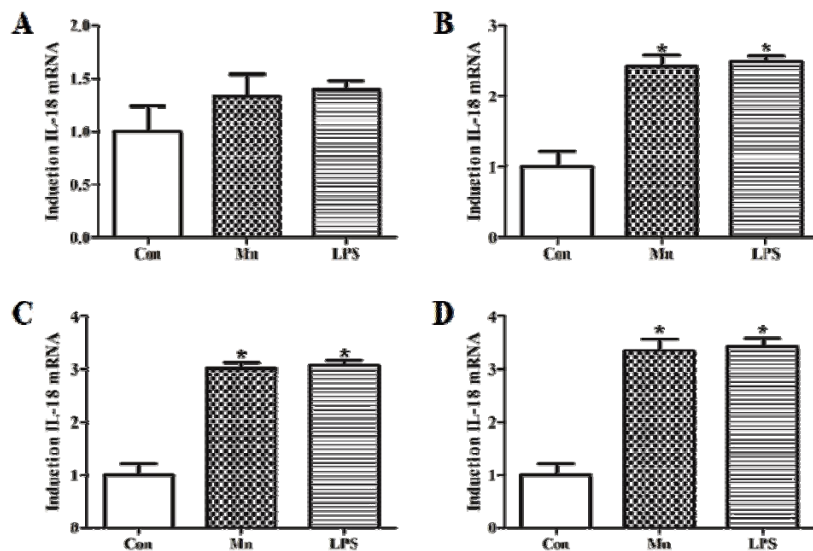


图 1-18 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放的 IL-18 在 mRNA 水平的影响

A、B、C、D 分别为 3、6、12、24h 时间点，Mn 组剂量为 100 μ M，LPS 组剂量为 10 μ g
 (* $P < 0.05$ vs. Con)

Western blot 方法检测锰作用 6h 后 BV2 小胶质细胞释放成熟的 IL-18 在蛋白水平的表达 (图 1-19)。结果显示, 与对照组相比, 锰组 BV2 小胶质细胞所释放成熟的 IL-18 在蛋白水平有明显增加, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

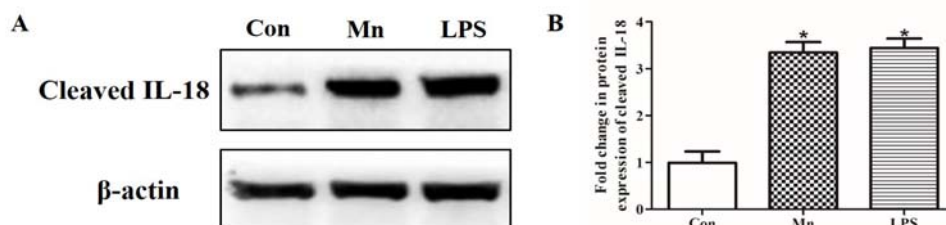


图 1-19 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放成熟的 IL-18 在蛋白水平的影响

A: 锰暴露 6h 后 BV2 小胶质细胞释放的 IL-18 在蛋白水平的表达; B: 灰度分析结果。

(* $P < 0.05$ vs. Con)

3) 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放 TNF- α 的影响

同样运用 ELISA 方法检测在锰作用 BV2 小胶质细胞 3、6、12、24h 后释放 TNF- α 的情况 (图 1-20)。结果显示, 在作用 3h 后, 与对照组相比, 阳性对照组 LPS 组中 BV2 小胶质细胞所释放的 TNF- α 水平明显增加, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$), 在作用 6h 后锰组细胞释放的 TNF- α 水平明显增加, 与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.01$), 12、24h 小时后, 锰组与 LPS 组中细胞释放的 TNF- α 水平持续增加, 与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

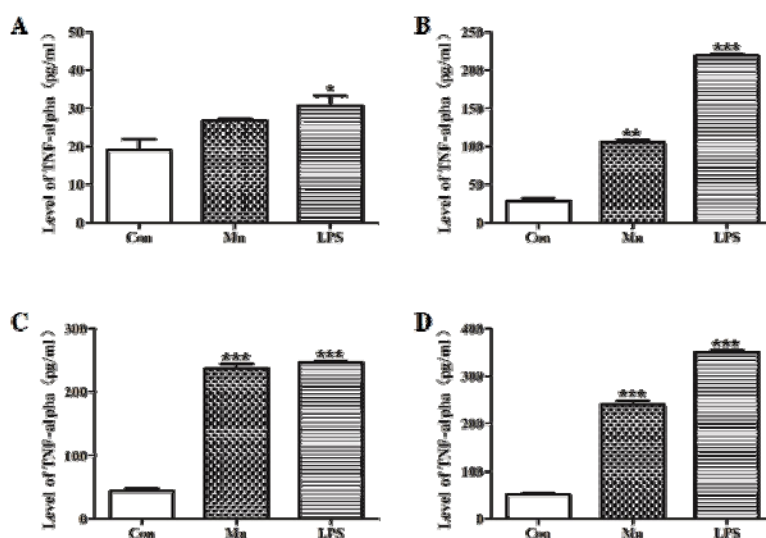


图 1-20 ELISA 方法检测锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放 TNF- α 的影响

A、B、C、D 分别为 3、6、12、24h 时间点

(* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con; *** $P < 0.001$ vs. Con)

运用 qRT-PCR 方法检测 BV2 小胶质细胞在锰作用 3、6、12、24h 后释放的 TNF- α 在 mRNA 水平的变化 (图 1-21)。结果发现, 同样在锰作用 6h 后 BV2 小胶质细胞所释放的 TNF- α 在 mRNA 水平有显著增加, 与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.05$), 在锰、LPS 作用 12、24h 后 TNF- α 在 mRNA 水平会持续增加, 且与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.01$)。

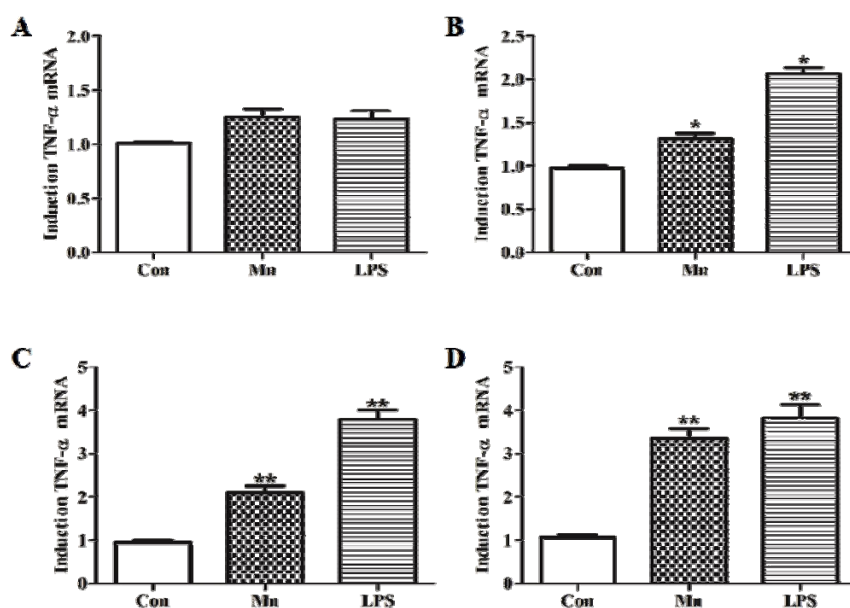


图 1-21 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放的 TNF- α 在 mRNA 水平的影响

A、B、C、D 分别为 3、6、12、24h (* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con)

Western blot 方法检测锰作用 6h 后 BV2 小胶质细胞释放的 TNF- α 在蛋白水平的改变 (图 1-22)。结果显示, 与对照组相比, 锰组 BV2 小胶质细胞所释放的 TNF- α 在蛋白水平的表达明显增加, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

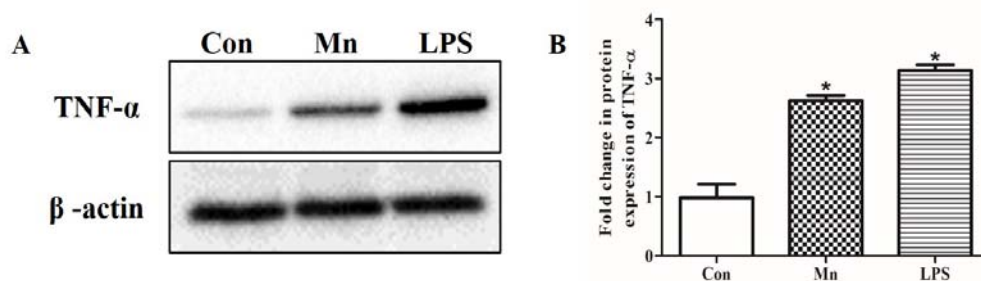


图 1-22 锰暴露对 BV2 小胶质细胞释放的 TNF- α 在蛋白水平的影响

A: 锰暴露 6h 后 BV2 小胶质细胞释放的 TNF- α 在蛋白水平的表达; B: 灰度分析结果。

(* $P < 0.05$ vs. Con)

4 讨论

锰在自然界中广泛分布，是人体所必须的微量元素。在人体的一些生理反应中均需要锰的参与，包括：免疫反应，ATP 的生成，骨骼的生长，消化等[29]。此外，锰还可以作为机体许多酶的辅助因子，以保障其发挥正常的生理作用[30]。然而，当机体摄入过多的锰则会引起锰中毒的发生，其临床表现主要为类似帕金森氏病病症。研究表明，中枢神经系统是锰作用人体的主要靶器官，黑质纹状体通路更是锰损伤神经系统的关键核团[189]。也正因为如此，国内外广大的学者们也都聚焦于此，总结证实了一系列关于锰能够引起黑质纹状体内多巴胺能神经元功能减弱的经典理论。我们教研室也长期一直致力于研究锰对运动行为能力的影响及其具体机制。然而，随着人们对锰神经毒性的进一步关注，锰对海马空间记忆能力的损伤也渐渐被人们所证实。

在本研究的过程中，我们通过皮下注射的方式进行亚急性锰的暴露，通过小鼠血锰和脑锰的检测，发现染锰组小鼠与对照组以及 LPS 注射组相比，血锰和脑锰水平均显著增高，提示了锰暴露的动物模型的成功。我们有运用经典的运动行为检测实验，对小鼠的运动能力进行了测试，发现染锰组以及 LPS 组小鼠的运动行为能力受到显著抑制，无论在旷场实验亦或是在爬杆实验中均得以证实。锰对小鼠运动行为的损伤进一步证实了我们建立的亚急性锰暴露模型的成功。在此基础上，我们观察了小鼠的空间学习记忆能力是否发生了改变，我们运用恐惧条件箱进行了测试。在训练期间，锰暴露小鼠与对照组相比并无差异，然而在测试以及改变场景后发现，染锰组小鼠的环境记忆能力显著降低，提示锰暴露可能对小鼠的海马脑区产生了损伤作用。在这里，也许有人会有这样的疑问，检测学习记忆能力的经典行为学测试时 Morris 水迷宫，可这里为什么选择恐惧条件箱进行测试？是的，Moriss 水迷宫被广泛的认为能够检测学习记忆能力，然而，在本研究中，锰暴露能够引起小鼠运动功能共济失调，因此运用依赖小鼠运动寻找平台的 Morris 水迷宫很难检测出空间学习记忆的改变。我们在一系列研究学习记忆能力的行为测试中选定对运动能力依赖较小的恐惧条件箱进行了测试。

为了进一步证实锰暴露能够损伤小鼠海马脑区神经元的功能，我们又进行了电生理测试，观察了染锰组、LPS 以及 NaCl 三组小鼠 LTP 的改变，结果发现，锰暴露

组的 LTP 与对照组相比显著降低，提示锰对海马神经元产生了一定的损伤作用。我们以上的结果证实了锰暴露不仅能够影响调控运动行为的黑质纹状体脑区，同样对调控学习记忆能力的海马脑区也产生了损伤效应。回顾文献，我们发现，已有的学者研究也证实了长期大量的锰在大脑中蓄积还将进一步引起类似于阿兹海默综合症（AD）的临床症状：在猕猴的慢性锰中毒动物模型中，慢性的锰刺激将引起大脑额叶皮质淀粉样蛋白增加以及 A β 斑块的蓄积。

在中枢神经系统中，小胶质细胞是免疫反应的关键细胞，主要来源于脑膜，脉络丛以及血管周围。其与巨噬细胞的功能相似，能通过一系列的模式识别受体（PRRs）实时监测中枢神经系统的内环境[181]。当组织受损或有害物质入侵的情况下，小胶质细胞发生活化反应，一方面其发挥吞噬作用，清除有害物质；另一方面其能释放大量促炎症因子，诱导外周固有免疫细胞（例如，巨噬细胞、中性粒细胞）以及适应性免疫细胞（例如，T 细胞和 B 细胞）迁移至受损或入侵部位，发挥免疫防御的作用[88]。因此，小胶质细胞的活化在中枢神经系统的免疫应答防御反应中发挥了至关重要的作用。本科研团队在以往对锰诱导黑质致密部多巴胺能神经元毒性损伤的研究中发现，锰暴露能够诱导中枢神经系统中的小胶质细胞发生活化，其活化后释放的炎症因子可能是锰暴露导致神经元损伤的关键分子[81]。得与以往的研究基础，我们在研究锰暴露损伤学习记忆能力的过程中，同样把关注点落在了小胶质细胞上，观察锰暴露诱导的海马神经元损伤是否同锰暴露诱导的多巴胺能损伤类似均是通过小胶质细胞的过度活化而实现的。我们运用免疫组织化学染色检测了锰暴露后小鼠海马脑区小胶质细胞的形态学改变，发现锰暴露组与对照组相比的海马 DG 区小胶质细胞形态上表现为胞体变大，突触变短，形成类似于“变形虫样”的巨噬细胞样活化状态。这初步证实了锰暴露后诱导了海马脑区小胶质细胞的活化。为了进一步证实锰暴露诱导了小胶质细胞的活化，我们对海马脑区又进行了炎症因子的检测，运用 Western blot 检测了 IL-1 β 的蛋白改变，ELISA 检测了 IL-1 β 、IL-18 的改变，发现锰暴露组与阳性对照组（LPS 处理组）均能够引起炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的增加，证实了锰暴露能够诱导小胶质细胞活化。

我们在体外选择 BV2 小胶质细胞作为研究对象，BV2 小胶质细胞为小鼠小胶质细胞广泛的应用于体外研究小胶质细胞的实验中。我们首先通过锰暴露时间以及暴露剂量的各时间点以及梯度浓度，筛选出能够使得 BV2 小胶质细胞活化又不导致其

死亡的锰暴露浓度和对应时间。MTT 增殖活力实验以及免疫细胞化学染色实验发现 100 μ M 锰暴露 6h 即能够引起 BV2 的活化而对其不产生损伤效应。我们在之后的实验过程中，为了简化操作过程，我们选择 100 μ M 锰暴露 6h 作为研究对象。我们对锰暴露 BV2 小胶质细胞后个时间点的炎性因子进行了检测，同样运用 Western blot 和 ELISA 两种检测手段，发现锰暴露组与对照组相比，炎性因子 IL-1 β 、IL-18 在锰暴露 6h 发生显著增高。

在体内和体外两部分实验中，我们均证实锰暴露能够诱导小胶质细胞的活化并释放炎性因子 IL-1 β 和 IL-18。炎性因子作为小胶质细胞应激活化后所释放的分子，能够对外源性的物质产生杀伤作用。然而，炎性因子同样也会对中枢神经系统内的神经元也产生同样的损伤效应。研究报道，在 PD 病人的大脑黑质和纹状体组织中可检测到高表达的促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β ，这些炎性因子与神经元的凋亡以及神经损伤相关。在 AD 的小鼠动物模型以及 AD 患者的海马组织中也发现 IL-1 β 表达升高，表明 IL-1 β 与 AD 的发病机制存在相关性。在我们以往的研究中发现抑制小胶质细胞活化、阻止其炎性因子的大量释放能够对锰暴露所致的神经毒性产生保护作用。可见，锰暴露诱导的小胶质细胞活化以及炎性因子的释放是引起神经系统紊乱的关键因素。然而，之前的研究只是将炎性因子的释放在锰诱导多巴胺能神经元损伤中的关键作用进行了论述，对其如何引起小胶质细胞活化释放炎性因子的分子机制并没有阐明。可见，进一步深入的研究锰如何诱导炎性因子释放的具体机制将会弥补以往研究锰神经毒性的空白。因此，在下一部分实验中，我们将针对此问题进行进一步研究讨论。

实验二 炎症体 NLRP3 的增多在锰诱导炎性因子释放中的作用

在前一部分实验中，我们通过皮下注射 MnCl_2 的方式建立了亚急性锰暴露的小鼠模型，运用 AAS 对小鼠的血锰、脑锰进行了检测，并评价了小鼠行为能力的改变，验证了锰中毒模型的建立成功。与以往报道不同的是，锰在损伤调控运动行为能力的黑质纹状体通路的同时，也对控制学习记忆能力的海马脑区产生了损害效应[190]。通过对小鼠锰暴露后 LTP 检测发现，锰暴露能够抑制海马脑区神经元的突触可塑性，提示锰暴露对海马脑区有一定的损伤效应。因此，我们以锰暴露损伤学习记忆能力的现象为基础，对锰影响小鼠学习记忆功能进行了深入的研究，观察了在中枢神经系统内具有免疫作用的小胶质细胞的改变。在体内体外的模型中我们分别证实了锰暴露能够诱导海马脑区和 BV2 小胶质细胞的活化以及炎性因子的释放，提示锰暴露诱导海马神经元损伤可能是通过介导小胶质细胞的活化以及炎性因子的释放发挥作用的。在以往研究锰暴露诱导黑质纹状体核团多巴胺能神经元损伤的效应机制探讨中证实了小胶质细胞活化的重要作用[184]。然而对于锰中毒过程中小胶质细胞是怎样过度释放炎性因子的，这些炎性因子从成熟到释放的具体的作用机制却没有过多的探讨。因此本研究对胶质细胞活化在锰影响学习记忆能力方面的影响并没有深入的验证，而是把关注点放在锰诱导小胶质细胞活化的具体机制上进行更加深层次的研究。

回顾文献我们发现，NLRP3 炎症体是炎性因子孵育成熟的重要平台，在小胶质细胞活化以及炎性因子释放过程中发挥着重要作用[174]。那么，在本课题研究中，锰诱导的小胶质细胞炎性因子的释放是否依赖于 NLRP3 炎症体的途径呢？本部分实验将对此展开详细的论证。

1 材料

1.1 主要仪器设备

冷冻切片机 (CM1900)	LEICA (日本)
隔水式电热恒温培养箱 (PYX-DHS-50X65)	上海跃进 (中国)
超低温-80°C 冰箱 (MDF-U73V)	SANYO (日本)
冰柜 (BC/BD-2720S)	Haier (中国)
超生破碎仪 (VCX105)	MILLIPORE (美国)
DNA/RNA 定量仪 (NANODROP 2000c)	Thermo Scientific (美国)
96 孔板离心机 (LMC-3000)	Grant-bio 公司 (美国)
低温离心机 (5804R)	Eppendorf 公司 (美国)
紫外分光光度计 (UV-2550)	SHIMADZU (日本)
全能型凝胶成像系统 (Universal HoodIII)	BIO-RAD (美国)
酶标仪 (Infinite F200)	TECAN (美国)
制冰机 (SIM-F140)	SANYO (日本)
摇床 (ZD-9550)	Kylin-Bell Lab instruments (中国)
基因扩增仪 (7500 Fast Real-Time PCR system)	Applied Biosystems (美国)
蛋白垂直蛋白电泳系统 (Universal/300)	BIO-RAD (美国)
梯度 PCR 仪	Biometra TGRADIENT (美国)
超纯水机 (Milli-Q)	MILLIPORE (美国)
液氮生物容器 (YDS-100B-125)	成都金凤 (中国)
高压灭菌器 (MLS-3750)	SANYO (日本)
电热恒温水浴锅 (HH-2)	科伟 (中国)
室温离心机 (5430)	Eppendorf 公司 (美国)
超净工作台 (SW-CJ-1F)	苏州净化 (中国)
二氧化碳培养箱 (3423)	Thermo scientific (美国)
生物显微镜 (IX71)	OLYMPUS (日本)

1.2 主要试剂（盒）抗体

锰（13446-34-9）	ACROS ORGANICS（美国）
LPS（L3880-500MG）	Sigma（美国）
氯化钠（NaCl）	国产分析纯
戊巴比妥钠	Sigma（美国）
Dulbecco's Modified Eagle Medium（12800-017）	Gibco（美国）
三氯甲烷	国产分析纯
异丙醇	国产分析纯
无水乙醇	国产分析纯
mRNA 反转录试剂盒	TAKARA（日本）
qRT-PCR 反应试剂盒	TAKARA（日本）
Trizol RNA 提取液	Invitrogen（美国）
胎牛血清	Gibco（美国）
EDTA	国产分析纯
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（PE001）	晶彩（中国）
Anti-TNF alpha 抗体（ab6671）	Abcam（美国）
Anti-IL1 beta 抗体（ab9722）	Abcam（美国）
Anti-IL-18(ab71495)	Abcam（美国）
Anti-CIAS1 / NALP3 抗体（ab4207）	Abcam（美国）
Anti-caspase-1 抗体（ab108362）	Abcam（美国）
Negative control（RNA oligo）	GenePharma（中国）
Nlrp3-Mus-727（siRNA oligo）	GenePharma（中国）
Nlrp3-Mus-1755（siRNA oligo）	GenePharma（中国）
Nlrp3-Mus-2052（siRNA oligo）	GenePharma（中国）
Mouse IL-1beta ELISA Ready-SET-Go!®（88-7013）	eBioscience（美国）
Mouse TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go!®（88-7324）	eBioscience（美国）
Mouse IL-18 ELISA BMS618/2TEN	eBioscience（美国）

1.3 模型建立的动物及细胞需求

具体方法同实验一

1.4 实验用试剂配制

LPS

LPS 20mg
溶于 20ml 高压去离子水中，混匀，分装于 500 μ lEP 管中，-20 $^{\circ}$ C 保存

1%戊巴比妥钠

戊巴比妥钠 1g
溶于 100ml 之前已配好的 0.9%NaCl 中，混匀，4 $^{\circ}$ C 保存

75%酒精

95%酒精
溶于 ml 去离子水中，混匀，室温保存

0.5MTris-HCl (pH7.6)

Tris 60.57g
1N HCL 420ml
双蒸水加至 1L

0.2M PB

KH₂PO₄ 27.2g
NaOH 6.4g
加去离子水至 1L，调整 pH 值至 7.4

MTT

MTT 250mg
溶于 50mlPBS 中，避光搅拌混匀，之后使用 0.22 μ m 小滤器过滤，将过滤好的溶液分装于避光 EP 管中

100mM MnCl₂·4H₂O

MnCl₂·4H₂O (MW:197.91) 0.39582g
溶于 20ml 的高压去离子水中，使用 0.22 μ m 孔径的小滤器过滤，装于 50ml 无菌大 EP 管中，混匀，4 $^{\circ}$ C 保存。（用于细胞实验）

100mg/kg 组用 Mn 刺激液

为使锰注射液的配制浓度与体积方便给药，故进行以下计算：目标注射浓度为 100mg/kg，以小鼠平均体重 20g 进行计算即 2mg/20g，为保证每只小鼠接受皮下注射药物体积为 200 μ l 即 2mg/200 μ l，故称取 0.2gMn 溶于 20ml 之前配好的生理盐水中，混匀，4 $^{\circ}$ C 保存。（用于动物实验）

DMEM 高糖培养基

使用 DMEM 粉末一袋(g),称取 HEPES3.3g,以及青霉素、链霉素各 60mg,称取 NaHCO₃3.7g,使用去离子水定容至 1L,之后使用滤器垫 0.45 μ m、0.22 μ m 两层滤膜进行过滤,滤出液体直接滴入 200ml-250ml 培养基盛放玻璃瓶,封口膜包好,做好当天标记,放入 4 $^{\circ}$ C 保存,待用。（每个玻璃瓶中盛放 180-200ml 混匀过滤的 DMEM 培养基,方便之后直接给瓶子里加入 10%的胎牛血清）

2 方法

2.1 建立亚急性锰中毒小鼠模型

2.1.1 动物的分组与饲养

具体方法同实验一。

2.1.2 亚急性锰中毒小鼠模型的建立

具体方法同实验一。

2.2 运用免疫组织化学染色法检测锰暴露对小鼠大脑 NLRP3 及其相关分子表达的影响

2.2.1 冰冻脑片的制备

具体方法同实验一。

2.2.2 免疫组织化学染色

具体方法同实验一。

2.3 运用 Western blot 方法检测锰暴露对小鼠不同脑区 NLRP3 及其相关分子表达的影响

2.3.1 脑组织蛋白样品的收集

具体方法同实验一。

2.3.2 脑组织蛋白的提取

具体方法同实验一。

2.3.3 SDS-PAGE 凝胶的制备

具体方法同实验一。

2.3.4 Western blotting

具体方法同实验一。

2.4 运用 qRT-PCR 方法检测染锰小鼠不同脑部核团中 NLRP3 及其相关分子 mRNA 表达变化

2.4.1 脑组织 RNA 样品的收集

- 1) 亚急性锰中毒小鼠模型建立完成后,运用腹腔注射 1%戊巴比妥钠将小鼠麻醉(按照 60mg/kg 体重剂量进行);
- 2) 依次暴露腹腔、胸腔,使用 10ml 注射器吸取 10ml 之前配好的 DEPC 水,注射器针头换为一次性使用的静脉输液针,排出管内空气,将生理盐水通过暴露出的小

鼠心脏左心室，剪开心耳，进行快速灌注；

- 3) 灌注结束后，断头，快速取出完整脑组织，并进行海马、黑质、纹状体等组织的分离，整个操作在冰上进行，所取出的脑组织放入以做好标记的 1.5ml 无 RNA 酶 EP 管中，及时放入超低温-80℃ 冰箱保存样品；

2.4.2 脑组织样品 RNA 的提取

- 1) 拿出-80℃ 冰箱中的样品化冻，室温静置 5min，按 1mg 组织体积加 10 μ l Trizol 的比例，称量好各组各个核团的重量，加入相应体积的 Trizol，使用手握式电动匀浆器匀浆，直至 EP 管中无组织块切形成均质的溶液（每匀好一个样品就换一个电动匀浆器头，且这些电动匀浆器头需提前清洗并使用 DEPC 水浸泡，以确保其无 RNA 酶污染）；
- 2) 使用 Trizol 消化完成之后，加入 Trizol 1/5 体积的三氯甲烷，剧烈摇晃 15s，室温放置 5min；
- 3) 之后进行 4℃ 离心，12000rcf 离心 15min，离心结束后，将通过离心得到的无色上清液移至新的 1.5ml 无 RNA 酶 EP 管中，给其中加入等体积的异丙醇，上下轻柔颠倒离心管使其充分混匀，之后室温静置 10min；
- 4) 静置结束后进行 4℃ 离心，12000rcf 离心 10min，离心结束后，管底会出现白色羽毛样沉淀，小心弃掉上清，加入 75% 无水乙醇，轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁，再进行 4℃ 离心，12000rcf 离心 5min，之后小心弃掉乙醇；
- 5) 室温干燥 8min，加入 RNase-free 水溶解沉淀，20 μ l/管，用移液枪轻轻吹打沉淀，使其充分溶解，之后进行运用 Thermo 公司的 NANODROP2000c 进行 RNA 定量（OD260/OD280 的比值均在 1.8-2.0 之间）；
- 6) 反转录合成 cDNA，具体体系及反应条件同实验一；
- 7) 运用 7500 Fast 反应仪器进行扩增，具体使用引物购于奥科鼎盛公司，具体序列如下：

名称	序列 (5'-3')
NLRP3	Forward: FCCAGGTTTCAGTGTGTTTTCC
	Reverse: RCGGTTGGTGCTTAGACTTGA
Actin	Forward: AGCCATGTACGTAGCCATCC
	Reverse: GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA

具体反应体系及反应条件同实验一。

2.5 运用免疫细胞化学染色法检测染锰 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 及其相关分子表达的变化

2.5.1 细胞的培养及传代

具体方法同实验一。

2.5.2 运用免疫细胞化学染色方法检测染锰 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 的表达

- 1) 首先将细胞爬片所用的玻片准备好, 选用大号圆形盖玻片 (12 孔板每孔可放一个, 6 孔板每孔可放 2 个), 将此盖玻片泡酸过夜, 之后使用蒸馏水冲洗干净, 再浸泡于 75%酒精中备用;
- 2) 将准备好的盖玻片从 75%酒精中取出, 在酒精灯上烤干, 之后放入 6 孔板中, 每孔放 2 个, 由于 BV2 细胞胞体较圆, 属于半贴壁细胞, 因此使用多聚赖氨酸溶液进行包被 (此处多聚赖氨酸使用高压去离子水以 1:10 的比例进行配制), 将配置好的多聚赖氨酸溶液每孔加入 1.5ml, 以使得将盖玻片完全覆盖, 之后放入 37°C 培养箱过夜;
- 3) 将包被好的板子取出, 弃多聚赖氨酸, 加入 PBS 多次冲洗, 直至无多聚赖氨酸残留, 之后同时开启紫外照射以及风淋, 照射及吹干 20min;
- 4) 按正常培养方法将 BV2 小胶质细胞处理为细胞悬液, 进行细胞计数, 以 1.5×10^5 个/ml 的细胞密度进行接种, 在以加入盖玻片并包被好的 6 孔板中每孔加入 2ml 细胞悬液, 之后进行常规培养;
- 5) 培养细胞 24h 后加刺激, 将之前的培养基换成含有梯度锰浓度的培养基, 根据前期 MTT 的结果对锰浓度进行选择, 最终选择锰浓度为: 0、100 (单位: μM) 及 LPS: 10 μg , 刺激时间点仍为 3、6、12、24 (单位: h);
- 6) 在达到刺激时间后, 依次取出达到刺激时间点的板子, 进行免疫细胞化学染色;
- 7) 使用 10ml 注射器轻柔吸走板子中原来的培养液, 轻柔加入 PBS 进行清洗, 轻柔进行, 洗 3 次, 每次 5min;
- 8) 清洗结束后, 进行固定, 使用 4%多聚甲醛加入 6 孔板, 每孔加入 1ml 以保证完全覆盖盖玻片, 室温固定 25min;
- 9) 固定结束后, 使用 PBS 进行清洗, 动作轻柔, 清洗 3 次, 每次 5min, 之后进行透化, 在冰上运用 1%TritonX-100 进行透化, 透化进行 10min;
- 10) 透化结束后, 继续使用 PBS 清洗, 洗 3 次, 每次 5min (每次清洗注意动作轻柔,

弃洗液时使用 10ml 注射器，不要使用泵和直接倾倒，以防细胞掉落)；

- 11) 运用 3%BSA 进行封闭，封闭样品 1h，在室温环境进行；
- 12) 在封闭过程中准备一抗，NLRP3 抗体使用 3%BSA 以 1:100 的比例进行稀释，待封闭结束后，在盖玻片上加一抗，放入湿盒，4℃ 过夜；
- 13) 拿出敷好一抗的片子，使用 PBS 清洗，洗 3 次，每次 6min；
- 14) 清洗结束后，加荧光二抗，使用兔绿荧光二抗，避光、室温孵育 2h，并且保持一定的湿度，之后使用 PBS 清洗 3 次，每次 3min，清洗过后使用 Hoechst 染核，室温进行 30min，之后运用 PBS 清洗 3 次，每次 8min；
- 15) 清洗结束后，使用滤纸吸干盖玻片周围多余的液体，准备好感觉的载玻片，并在载玻片上滴加封片剂，将盖玻片倒扣在载玻片上即可直接在荧光显微镜下观察（注意以上步骤均需避光）。

2.6 运用 Western blot 方法检测染锰 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 及其相关分子在蛋白水平的变化

2.6.1 细胞的培养及传代

具体方法同实验一。

2.6.2 细胞样品蛋白的收集

具体方法同实验一。

2.6.3 细胞样品蛋白的提取

具体方法同实验一。

2.6.4 SDS 凝胶制备与 Western blotting

具体方法同实验一。

2.7 运用 qRT-PCR 方法检测染锰 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 及其相关分子在 mRNA 水平的变化

2.7.1 细胞的培养及传代

具体方法同实验一。

2.7.2 细胞样品 RNA 的收集

具体方法同实验一。

2.7.3 细胞 RNA 样品的提取

具体方法同实验一。

2.8 建立染锰 BV2 细胞的 siRNA-NLRP3 模型

2.8.1 细胞的培养与传代

具体培养方法同前，进行细胞计数后，将 BV2 小胶质细胞以 2×10^5 个/ml 的密度种于 6 孔板中，每孔 2ml 细胞悬液。

2.8.2 建立染锰 BV2 细胞的 NLRP3siRNA 模型（转染实验）

1) 从吉玛所订购的 siRNA oligo 及 Negative control(之后简称为 NC), 具体序列如下:

名称	序列 (5'-3')
NLRP3-Mus-727	sense: CCAACUGGUCAAGGAGCAU antisense: AUGCUCCUUGACCAGUUGGT
NLRP3-Mus-1755	sense : GCGAGAGAUUCUACAGCUUTT antisense : AAGCUGUAGAAUCUCUCGCTT
NLRP3-Mus-2052	sense : GGAUUGAAGUGAAAGCCAATT antisense : UUGGCUUUCACUUCAAUCCTT
Negative control	sense : UUCUCCGAACGUGUCACGUTT antisense : ACGUGACACGUUCGGAGAATT

- 2) 弃之前的培养液，将 BV2 小胶质细胞的培养液更换为无血清无双抗培养液 (Opti-MEM)，每孔加入 1ml Opti-MEM;
- 3) 更换为无血清无双抗培养液继续培养 4h，观察细胞，并准备加入 siRNA，按照 RNA oligo 合成报告单上的说明，离心 siRNA 干燥品，使其处于管底，之后 siRNA 加入 125 μ l 进行稀释，NC 加入 62.5 μ l 进行稀释，轻柔混匀，待用;
- 4) 首先配制 lipofectamine2000 酶 100 μ l Opti-MEM 中加入 2 μ l lipofectamine2000 以此体积配出所需体积的 lipofectamine2000，配好后静置 5min;
- 5) 在 lipofectamine2000 静置的同时配制 NC、siRNA，以 100 μ l Opti-MEM 中加入 4 μ l 已稀释好的 oligo 的比例按照所需体积进行配置，轻柔混匀后静置 5min;
- 6) 混合配制好的 lipofectamine2000 与 NC 及 siRNA (保证其中 lipofectamine2000 为 100 μ l Opti-MEM +2 μ l lipofectamine2000，NC、siRNA 分别为 100 μ l Opti-MEM +4 μ l oligo/NC) 轻柔混匀后室温静置 20min;
- 7) 给需要加入 siRNA 及 NC 的孔加入 500 μ l Opti-MEM，再给每孔加入 200 μ l 混合好的 siRNA/NC，之后轻柔晃动板子将板子放回细胞培养箱继续进行培养。

2.9 ELISA 方法检测干涉 NLRP3 表达后炎症因子的释放

具体方法同实验一。

2.10 统计学分析

具体方法同实验一。

3. 结果

3.1 锰暴露对 NLRP3 炎症体及相关分子表达的影响

3.1.1 锰诱导小鼠海马组织中 NLRP3 表达的变化

免疫组织化学染色检测染锰小鼠的海马脑区，使用 OX42 标记小胶质细胞，同时标记 NLRP3（图 2-1）。结果发现，与对照组相比，染锰后的小胶质细胞形态会发生一定的变化，胞体变大，突起变粗变长，且 OX42 荧光强度增加；同时发现，染锰组小鼠海马脑区的 NLRP3 表达与对照组相比荧光强度明显有所增加，且与 OX42 标记的小胶质细胞存在共定位现象，结果提示，染锰后小胶质细胞中 NLRP3 的表达会有所升高，即 NLRP3 炎症体被激活。

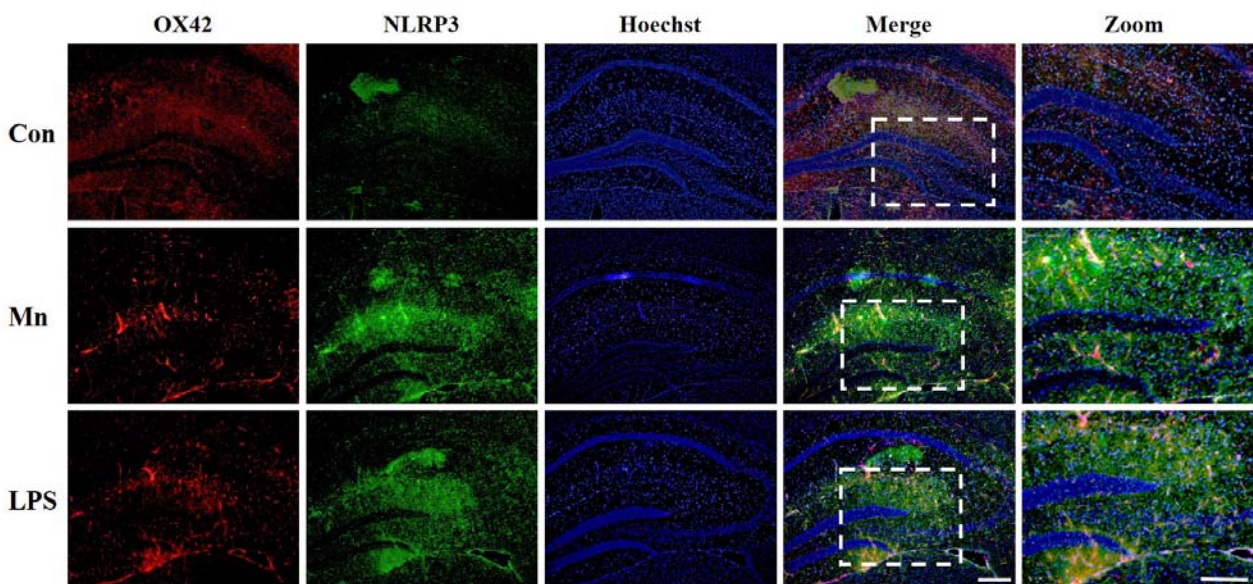


图 2-1 免疫组织化学检测染锰小鼠海马脑区小胶质细胞中 NLRP3 表达的变化

(Bar: 200X; Zoom: 400X)

3.1.2 锰诱导小鼠海马组织中 NLRP3 及其相关分子在蛋白水平的变化

运用 Western blot 方法检测的染锰小鼠海马组织中 NLRP3 及其相关分子在蛋白水平的表达(图 2-2)，结果发现与对照组相比染锰后小鼠海马组织中 NLRP3、cleaved

caspace-1 表达均由所增加且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

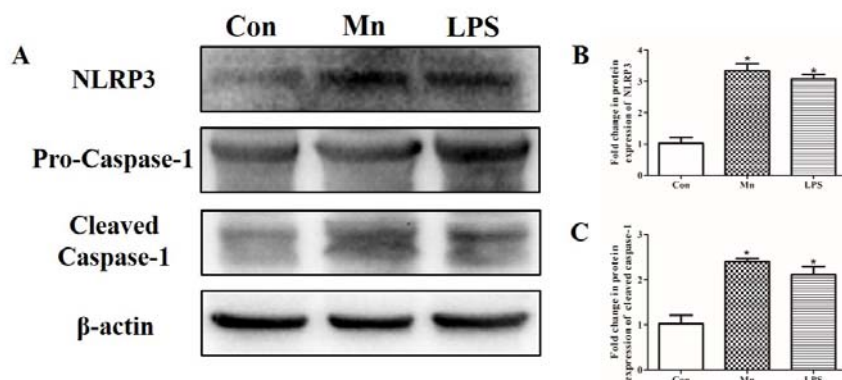


图 2-2 Western blot 方法检测染锰小鼠海马组织 NLRP3 相关分子在蛋白水平的变化

A: 染锰小鼠海马组织中 NLRP3 炎症体及相关分子在蛋白水平的表达; B-C: 灰度值分析结果。

(* $P < 0.05$ vs. Con)

3.1.3 锰诱导小鼠海马组织中 NLRP3 在 mRNA 水平的变化

运用 qRT-PCR 方法检测染锰小鼠海马组织中 NLRP3 在 mRNA 水平的变化 (图 2-3), 结果发现锰处理组与对照组相比 NLRP3 在 mRNA 水平有所增加, 且具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果提示, 在鼠体内环境中, 锰可以诱导小鼠海马脑区的 NLRP3 炎症体发生活化。

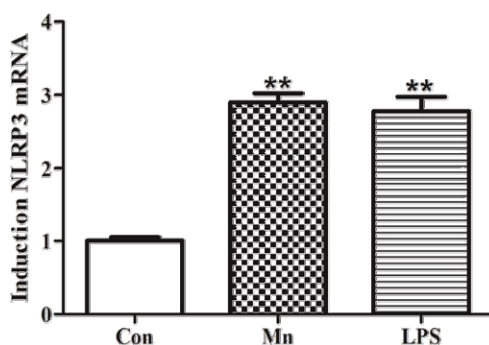


图 2-3 qRT-PCR 方法检测染锰小鼠海马核团中 NLRP3 在 mRNA 水平的变化

染锰小鼠海马脑区 NLRP3 在 mRNA 水平的变化 (** $P < 0.01$ vs. Con)

3.1.4 免疫细胞化学染色检测染锰 BV2 细胞不同时间点 NLRP3 的表达

1) 运用免疫细胞化学染色方法检测后我们发现, 与对照组相比, 染锰 3h 后 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 的表达有所增加, 说明 NLRP3 可以在染锰后短时间内被激活 (图 2-4);

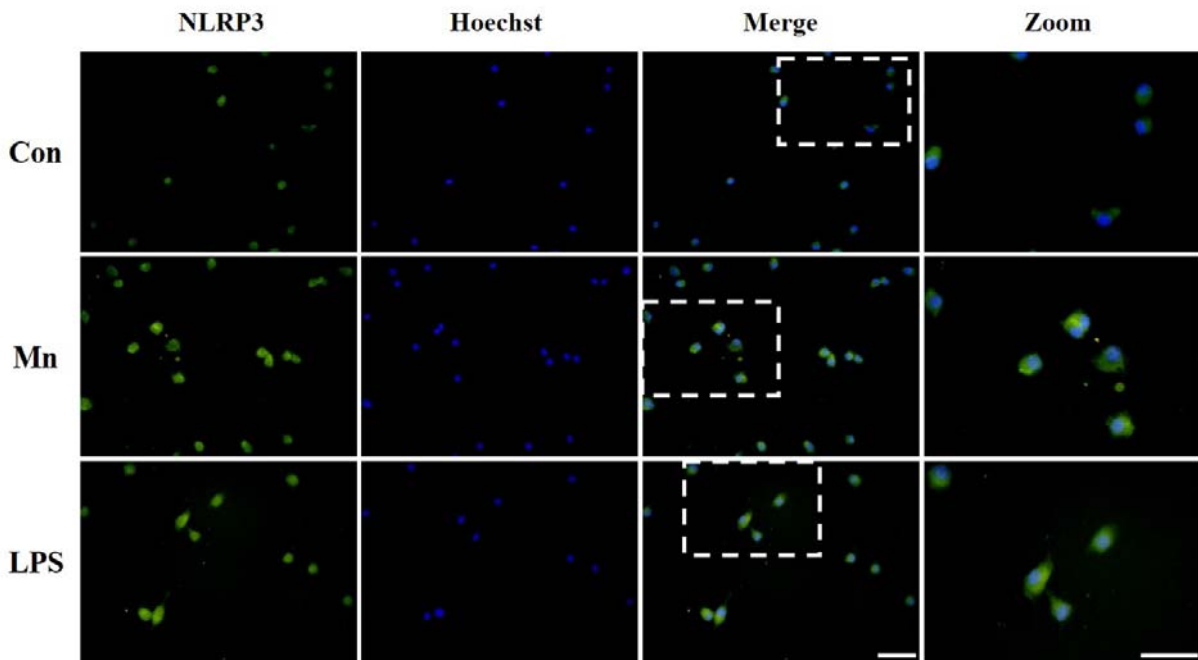


图 2-4 免疫细胞化学染色检测锰暴露 BV2 小胶质细胞 3h 后 NLRP3 表达的变化

(Bar: 200X; Zoom: 400X)

- 2) 之后运用同样的方法检测发现与对照组相比, 染锰 6h 后 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 表达有所升高且较 3h 表达更高, 说明 NLRP3 可以在染锰后 6h 继续处于活化状态持续表达 NLRP3 (图 2-5);

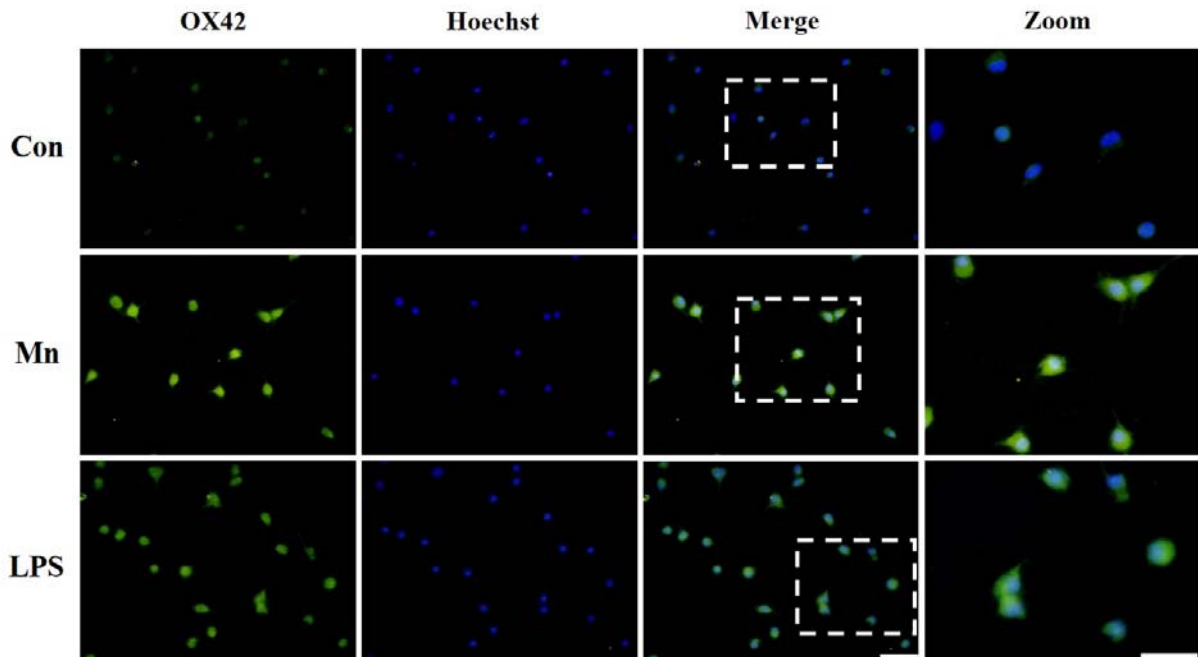


图 2-5 免疫细胞化学染色检测锰暴露 BV2 小胶质细胞 6h 后 NLRP3 表达的变化

(Bar: 200X; Zoom: 400X)

3.1.5 锰诱导 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 及其相关分子在蛋白水平的变化

Western blot 方法检测锰暴露 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 在蛋白水平的变化，结果显示，锰暴露 3h 后 NLRP3 的蛋白水平只有在 100 μ M 浓度的锰刺激下会有所升高，cleaved caspase-1 也没有明显变化（图 2-6A）；锰暴露 6h 后 NLRP3 在蛋白水平有明显升高，cleaved caspase-1 的表达也有明显升高（图 2-6D），且与对照组相比具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

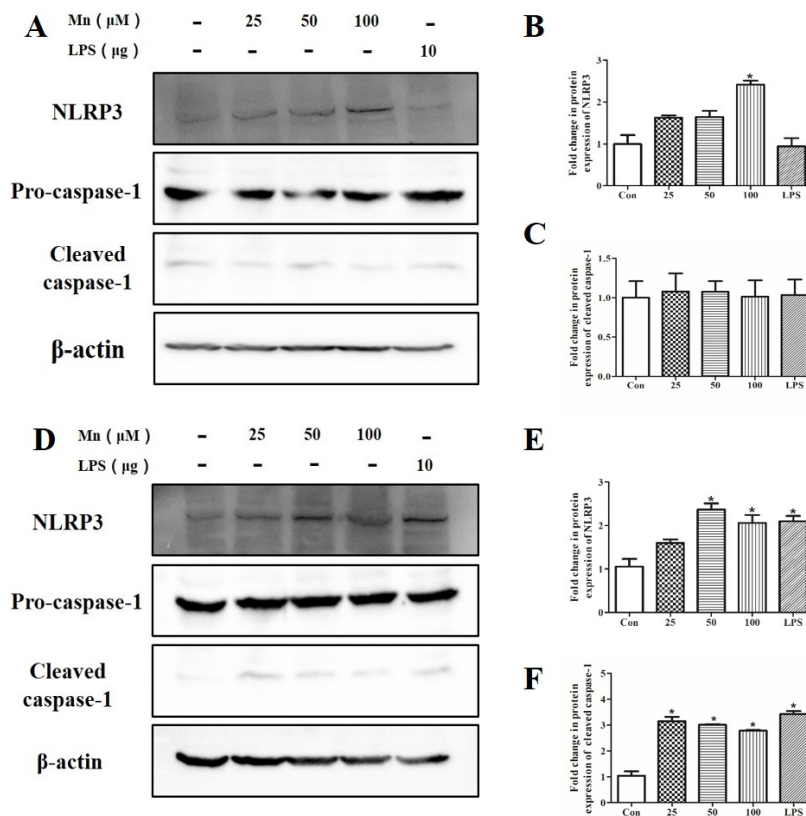


图 2-6 锰暴露 BV2 小胶质细胞后 NLRP3 及其相关分子在蛋白水平的变化

A: 染锰 3h 后 BV2 小胶质细胞中 NLRP3、cleaved caspase-1 在蛋白水平的变化；B-C 分别为 A 中 NLRP3 及 cleaved caspase-1 的蛋白表达进行的灰度分析；D: 染锰 6h 后 BV2 小胶质细胞中 NLRP3、cleaved caspase-1 在蛋白水平的变化。（* $P < 0.05$ vs. Con）

3.1.6 锰诱导 BV2 小胶质细胞 NLRP3 及其相关分子在 mRNA 水平的变化

1) 锰诱导 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 在 mRNA 水平表达升高；

使用 qRT-PCR 方法检测锰作用 BV2 小胶质细胞 3、6h 后 NLRP3 在 mRNA 水平的变化（图 2-7），结果发现，锰可以诱导 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 在 mRNA 水平

有所升高。与对照组相比，100 μ M 锰作用 BV2 小胶质细胞 3h 后其 NLRP3 在 mRNA 水平会有所增加且具有统计学意义 ($P < 0.05$)；与对照组相比，在 25 μ M、50 μ M、100 μ M 浓度的锰及 10 μ g LPS 作用 6h 后，NLRP3 在 mRNA 水平有明显增加且具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

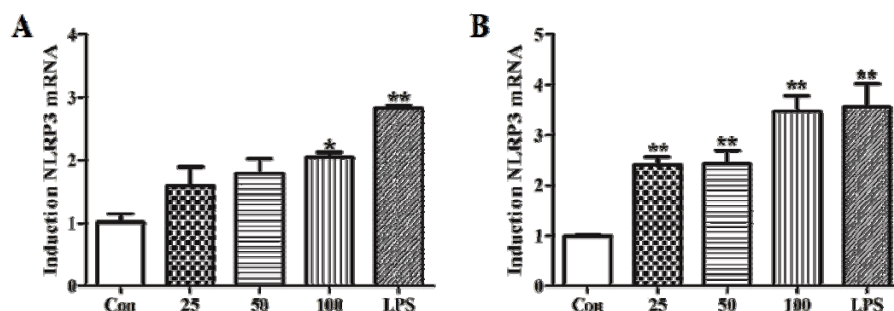


图 2-7 锰暴露 BV2 小胶质细胞后 NLRP3 及其相关分子在 mRNA 水平的变化

A: 不同浓度锰暴露 BV2 小胶质细胞 3h 后 NLRP3 在 mRNA 水平的变化；B: 不同浓度锰暴露 BV2 小胶质细胞 6h 后 NLRP3 在 mRNA 水平的变化。(* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con)

3.2 干涉 NLRP3 表达对锰诱导的炎性因子释放的改变

3.2.1 筛选最终使用的 siRNA-NLRP3

运用 Western blot 方法检测购买于上海吉玛公司的 3 种 siRNA-NLRP3，以此来确定 siRNA 对 NLRP3 的干涉效率 (图 2-8)。最终发现与对照组、阴性对照组以及其它两组 siRNA-NLRP3 相比 siRNA2052 对 NLRP3 的干涉效率最高与其它几组相比较发现由 siRNA2052 处理过的 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 在蛋白水平表达最低，因此提示 siRNA2052-NLRP3 是 3 种 siRNA 中最能够抑制 NLRP3 表达的 siRNA，因此选择 si2052-NLRP3 继续后续的实验。

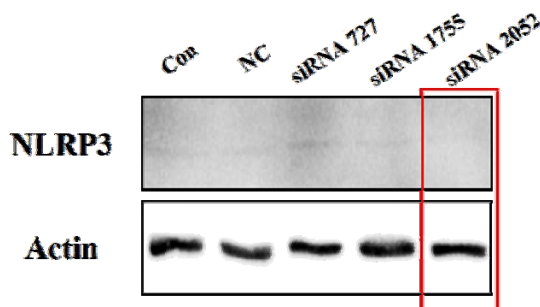


图 2-8 Western blot 方法检测 3 种 siRNA-NLRP3 的干涉效率

3.2.2 干涉 NLRP3 对锰诱导的 NLRP3 表达的影响

运用 Western blot 方法检测 siRNA2052-NLRP3(之后简称为 siNLRP3)干涉 NLRP3 后对锰诱导产生的 NLRP3 炎症体活性的影响 (图 2-9), 结果发现, 在正常情况下锰及 LPS 可以诱导 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 及 caspase-1 的活性形式 cleaved caspase-1 在蛋白水平的表达有所增加, 且与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。运用锰 (100 μ M 浓度的锰) 和 LPS (10 μ g) 刺激已使用 siNLRP3 的 BV2 小胶质细胞, 结果发现, 干涉 NLRP3 后 NLRP3 及 cleaved caspase-1 表达均有所下降, 且与阴性对照 (NC) 组相比, 其下降水平具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明干涉效果良好。

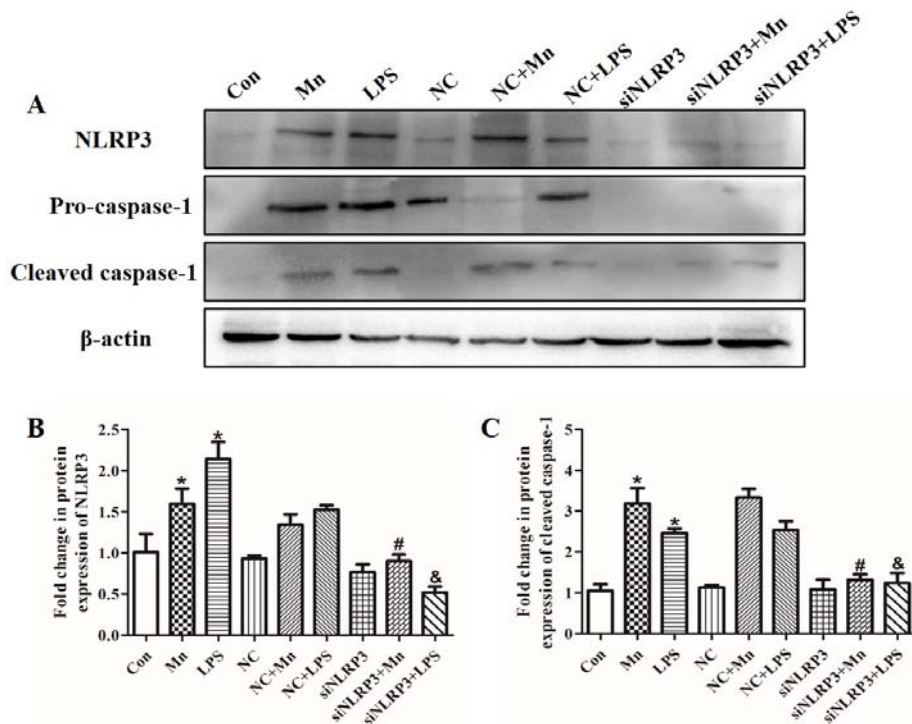


图 2-9 Western blot 方法检测干涉 NLRP3 对锰暴露后 NLRP3 炎症体活化的影响

A: 干涉 NLRP3 可以抑制锰诱导 NLRP3 炎症体活化; B-C: 灰度值分析结果。

(* $P < 0.05$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. NC+Mn; & $P < 0.05$ vs. NC+LPS)

3.2.3 干涉 NLRP3 对锰诱导的炎性因子释放的影响

1) 干涉 NLRP3 对锰诱导 BV2 小胶质细胞 IL-1 β 表达的影响

继续运用 Western blot 方法检测 siNLRP3 干涉 NLRP3 后对锰诱导产生的成熟 IL-1 β 的影响(图 2-10), 结果发现, 正常情况下锰可以诱导 BV2 小胶质细胞成熟 IL-1 β 在蛋白水平明显增加, 且与对照组相比具有统计学意义。干涉 NLRP3 后使用相同浓

度的锰及 LPS 并不能促使 BV2 小胶质细胞中成熟 IL-1 β 在蛋白水平有所升高。结果提示,抑制 NLRP3 对锰诱导的 BV2 小胶质细胞释放的成熟 IL-1 β 在蛋白水平也有一定抑制作用。

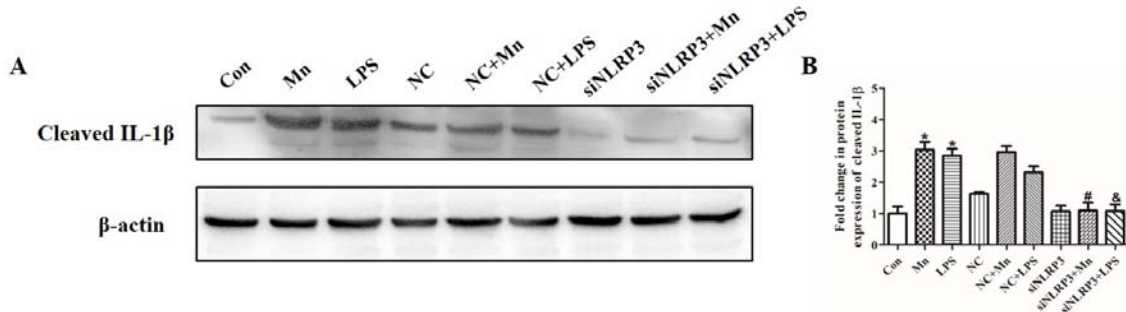


图 2-10 干扰 NLRP3 对 BV2 小胶质细胞在锰暴露后的 IL-1 β 蛋白水平的影响

A: 干扰 NLRP3 可以抑制锰诱导 BV2 小胶质细胞 IL-1 β 在蛋白水平的表达;

B: 灰度值分析结果。(* $P < 0.05$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. NC+Mn; & $P < 0.05$ vs. NC+LPS)

运用 ELISA 方法检测 siNLRP3 干扰 NLRP3 的表达后对锰作用 BV2 小胶质细胞 6h 所产生的炎症因子表达的影响 (图 2-11)。结果发现, Mn 组及 LPS 组与对照组相比均可以诱导 BV2 小胶质细胞释放 IL-1 β , 与对照组相比明显增加且具有统计学意义 ($P < 0.01$)。然而在 siNLRP3 干扰 NLRP3 表达后可以抑制锰诱导 BV2 小胶质细胞炎症因子的释放, 炎症因子的释放量明显下降且与阴性对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。此结果提示, 抑制 NLRP3 将会降低锰诱导 BV2 小胶质细胞所产生的 IL-1 β 。

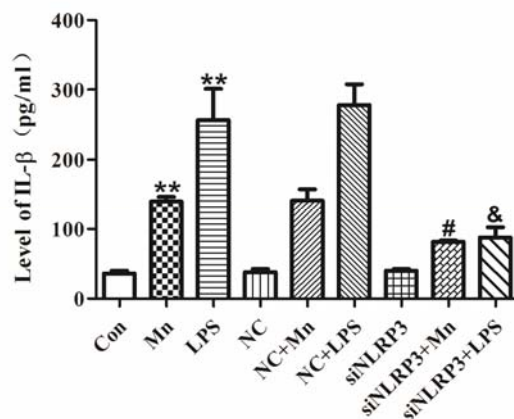


图 2-11 干扰 NLRP3 对 BV2 小胶质细胞在锰暴露后的 IL-1 β 表达的影响

(* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. NC+Mn; & $P < 0.05$ vs. NC+LPS)

2) 干扰 NLRP3 对锰诱导 BV2 小胶质细胞 IL-18 表达的影响

运用 ELISA 方法, 对锰暴露干扰 NLRP3 的 BV2 小胶质细胞所释放的 IL-18 进行检测, 结果发现正常情况下锰和 LPS 作用 6h 均可以促使 BV2 小胶质细胞释放 IL-18, 且与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.01$), 干扰 NLRP3 后再使用锰作用 6h 后 IL-18 的表达与对照组及阴性对照组相比有明显下降 (图 2-12), 结果提示干扰 NLRP3 可以抑制锰诱导的 BV2 小胶质细胞所产生的 IL-18。

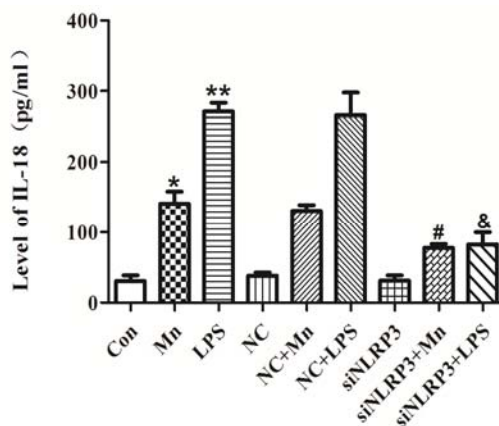


图 2-12 干扰 NLRP3 对 BV2 小胶质细胞在锰暴露后的 IL-18 表达的影响

(* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con, # $P < 0.05$ vs. NC+Mn; & $P < 0.05$ vs. NC+LPS)

3) 干扰 NLRP3 对锰诱导 BV2 小胶质细胞 TNF- α 表达的影响

运用相同方法, 对锰暴露干扰 NLRP3 的 BV2 小胶质细胞所释放的 TNF- α 进行检测, 结果发现干扰 NLRP3 后再使用锰作用 6h 后 TNF- α 的表达与对照组及阴性对照组相比有明显下降 (图 2-13), 结果提示干扰 NLRP3 可以抑制锰诱导的 BV2 小胶质细胞所产生的 TNF- α 。

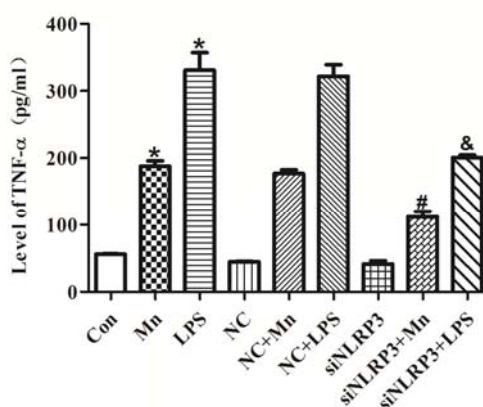


图 2-13 干扰 NLRP3 对 BV2 小胶质细胞在锰暴露后的 TNF- α 表达的影响

(* $P < 0.05$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. NC+Mn; & $P < 0.05$ vs. NC+LPS)

3.3 运用 qRT-PCR 方法检测干涉 NLRP3 后炎症因子在 mRNA 水平的变化

运用 qRT-PCR 方法检测 siNLRP3 干涉 NLRP3 表达后对锰诱导的 BV2 小胶质细胞释放的 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 在 mRNA 水平的影响 (图 2-14), 结果显示, 正常情况下与对照组相比, 锰和 LPS 可以诱导 BV2 小胶质细胞产生的 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 在 mRNA 水平有明显增加, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。但使用 siNLRP3 干涉 NLRP3 后锰和 LPS 的刺激不再使 BV2 小胶质细胞产生的 IL-1 β 在 mRNA 水平有所增加。

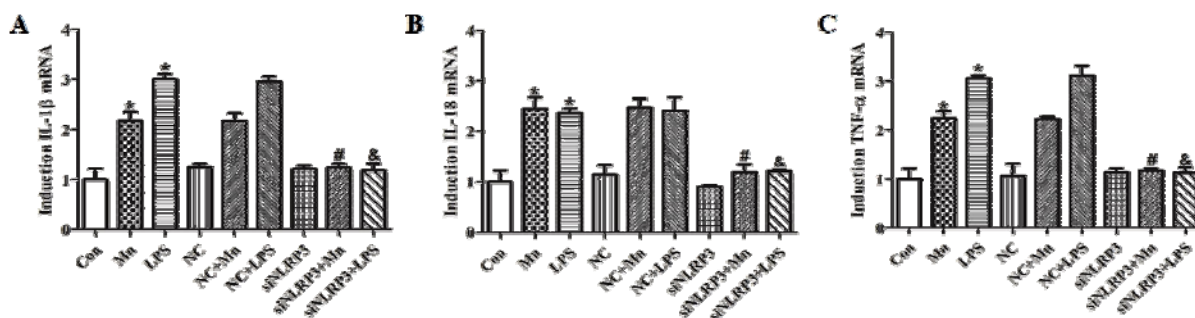


图 2-14 干涉 NLRP3 对锰诱导 BV2 小胶质细胞炎症因子释放在 mRNA 水平的影响

(* $P < 0.05$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. NC+Mn; & $P < 0.05$ vs. NC+LPS)

4 讨论

在第一部分的实验中, 我们已经证明了过量的锰暴露能有效的活化小胶质细胞, 并释放促炎症因子 IL-1 β 、IL-18 以及 TNF- α 。然而, 锰是如何诱导小胶质细胞活化并释放促炎症因子参与固有免疫反应的分子调控机制尚不清楚。

在中枢神经系统中, 固有免疫反应作为神经免疫系统的第一道防线, 发挥了重要的作用[191]。其中, 三种主要的免疫相关细胞 (包括: 小胶质细胞, 巨噬细胞, 星形细胞) 通过 PRRs 识别来自于外界以及细胞内的病原相关分子模式 (PAMPs) 以及来自于宿主源性的危险相关分子模式 (DAMPs), 从而激活固有免疫防御反应。小胶质细胞作为中枢神经系统中特殊的也是最重要的免疫细胞, 能表达一系列的 PRRs, 包括 Toll 样受体 (TLRs), Nod 样受体 (NLRs) 等[83]。一旦识别到组织的损伤或有害物的入侵, 小胶质细胞将迁移至受损部位并活化, 一方面其发挥类似于吞噬细胞的作用, 吞噬有害物质或细胞碎片; 另一方面其激活固有免疫反应, 释放大量促炎症因子 (包括细胞因子, 炎症趋化因子, 活性氧族等), 引起神经的炎症反应[108]。

在正常的生理状态下，促炎症因子一般处于静息状态。例如促炎症因子 IL-1 β 来说，常以非活性状态存在【36KDa，又称为 IL-1 β 前体（pro-IL-1 β ）】与细胞质中，而在受到刺激的情况下，IL-1 β 发生活化，裂解为活性形式（17KDa，又称为成熟的 IL-1 β ）。研究表明，处于静息状态的 pro-IL-1 β 通过加工、裂解最终变成成熟的 IL-1 β 需要一系列相关分子的介导和调控[192]。NLRP3/caspase-1 炎症体目前被认为是调控 IL-1 β 、IL-18 等炎性因子成熟释放的重要分子平台。NLRP3 炎症复合体隶属于 NLRs 家族，由 NLRP3 支架，ASC（PYCARD）接头蛋白以及活化剪切的 caspase-1 三部分组成[193]。NLRP3 受体具有广泛的识别性，参与并介导了多种疾病引起的固有免疫反应，与多种神经性疾病（包括感染，急性无菌性的脑损伤，慢性神经退行性疾病）的病理发生关系密切。在急性感染引起的神经性疾病中，多种 PAMPs（包括病毒：日本脑炎病毒、西尼罗河病毒等，细菌：肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌等）能激活中枢神经系统中小胶质细胞的 NLRP3 炎症复合体[82]。而在慢性非感染性引起的神经炎症中，小胶质细胞和巨噬细胞内的 NLRP3 炎症复合体能被多种病理性的蛋白质（包括 A β ， α -synuclein，朊病毒蛋白）所激活。活化的 NLRP3 首先发生寡聚化，然后募集接头蛋白 ASC，通多 CARD 结构域与 PYD 结构域相互作用，进一步激活 caspase-1。caspase-1 在静息状态下为前体 caspase-1（45KDa，又称为 pro-caspase-1），发生活性反应后即裂解为两种具有酶活性的四聚体复合物，caspase-1 p10 和 caspase-1 p20（分别为 20Kda 和 10K da 又称为 casp-1 p20 和 casp-1 p10），具有功能的 caspase-1 进一步加工 pro-IL-1 β 为成熟的 IL-1 β ，并释放于细胞外，发挥作用[194]。

既然 NLRP3 炎症复合体在促炎性因子的成熟释放过程中发挥着关键作用，那么在锰暴露诱导的小胶质细胞释放炎性因子 IL-1 β 、IL-18 以及 TNF- α 的过程中是否也发挥了关键作用呢？我们首先通过免疫组织荧光染色，观察了锰暴露后 NLRP3 炎症体的表达改变，发现与对照组相比较，锰暴露能够诱导小鼠海马脑区 NLRP3 表达增强。另外，我们又通过 Western blot 实验对小鼠海马组织中 NLRP3/caspase-1 复合炎症体中的 NLRP3 以及 cleaved caspase-1 蛋白进行了检测，同样发现锰暴露能够诱导 NLRP3 炎症体的表达增强。同样的结论我们在体外实验中，即锰暴露对 BV2 小胶质细胞的影响中得以验证。BV2 小胶质细胞锰暴露后能够显著增强验证 NLRP3/caspase-1 炎症复合体 NLRP3 以及 cleaved caspase-1 蛋白的表达。并且 NLRP3/caspase-1 炎症体的表达与锰暴露具有一定的时间剂量依赖效应，即随着锰浓

度的升高, NLRP3/caspase-1 炎症复合体表达升高, 呈浓度正相关性。为了进一步验证 NLRP3 炎症体在锰暴露诱导小胶质细胞炎性因子释放中的重要作用, 我们通过 RNA 干扰的方式有效的下调了 BV2 小胶质细胞 NLRP3 的表达, 结果发现当 NLRP3 下调后, 锰暴露所诱导的 caspase-1 的活化形式以及下游炎性因子 (IL-1 β 、IL-18) 的释放受到抑制。以上结果提示 NLRP3 炎症体参与了锰暴露所诱导的小胶质细胞炎性因子的释放过程并在其中发挥着关键作用。在这里不得不指出的是, 在我们下调了 NLRP3 炎症体的表达后, 我们不仅发现了 NLRP3/caspase-1 炎症复合体直接介导的促炎症因子 IL-1 β 表达下调, 还发现了 TNF- α 表达同样下调。之前的文献报道指出, TNF- α 的加工成熟和释放由 TLRs 家族所调控, 而作为 NLRs 的家族成员 NLRP3 在下调后同样能够引起锰暴露介导的 TNF- α 表达降低, 其中的具体机制尚不明确也未见报道, 也许在锰暴露这种特殊的形式中, NLRP3 也参与了 TNF- α 的调控, 这个问题给我以后毕业的研究提供的重要的线索。

在本部分实验中, 我们延续上一部分实验揭示的锰暴露能够诱导小胶质细胞活化以及释放大量的促炎性因子这一现象, 对锰诱导小胶质细胞释放炎性因子的具体机制进行了深入研究。发现 NLRP3/caspase-1 炎症复合体的形成在锰诱导小胶质细胞释放炎性因子 IL-1 β 、IL-18 过程中发挥了非常重要的作用。既然 NLRP3/caspase-1 炎症复合体炎症体参与了锰暴露的小胶质细胞活化以及促炎性因子的释放, 细胞内诸多因素 (ROS, 自噬, Ers 等) 也均能够调控 NLRP3/caspase-1 炎症复合体形成活化, 在本研究中锰暴露又是通过何种方式调控 NLRP3/caspase-1 炎症复合体的形成活化的呢? 在第三部分实验中, 我们将进行具体细致的阐述。

实验三 锰诱导的自噬溶酶体功能紊乱对 NLRP3 炎症体的影响

在上一部分实验中我们通过对锰暴露体内体外模型中 NLRP3 炎症体的检测,发现锰暴露能够引起 NLRP3 炎症体表达的增高,并且通过 Western blot 检测不同时间点 NLRP3 的改变与 BV2 小胶质细胞炎性因子的释放相对比,发现 NLRP3 炎症体的表达增加早于锰诱导的炎性因子 IL-1 β 、IL-18 的释放,提示 NLRP3 炎症体可能参与了小胶质细胞炎性因子释放的过程。为了证实以上的观点,我们运用干涉 RNA 技术对 BV2 小胶质细胞进行了 NLRP3 蛋白干扰,使其 NLRP3 蛋白表达水平降低。对 NLRP3 低表达的 BV2 小胶质细胞进行锰处理后发现,与未做 RNA 干涉处理相比,BV2 小胶质细胞锰暴露后 caspase-1 活化受到抑制,炎性因子 IL-1 β 、IL-18 的释放降低。进一步说明了 NLRP3 炎症体是锰暴露诱导小胶质细胞炎性因子释放的关键分子。研究 NLRP3 炎症体在锰暴露所致小胶质细胞活化以及炎性因子释放中的作用及其具体分子机制将会对锰暴露所致的神经系统损伤提供重要的理论依据。因此,在本部分的实验中,我们将继续深入研究锰暴露所致 NLRP3 炎症体活化的具体机制,探寻锰所致 NLRP3 升高的上游分子,为完全阐明锰的神经毒性提供分子基础。

追述调控 NLRP3 炎症体的上游分子,不难发现诸多因素(细胞内 ROS 的增多、K⁺的浓度改变、细胞内 ATP 水平降低以及自噬的抑制等)均能够影响 NLRP3 炎症体的活化[195]。我们团队在前期的研究中发现,锰暴露能够显著抑制黑质致密部多巴胺神经元内自噬的水平。提示锰暴露与自噬关系紧密,很有可能在本研究中 NLRP3 炎症体的活化就是通过锰介导的自噬功能紊乱而引起的。为了证明我们的假设,在本部分实验中我们对锰诱导的自噬与 NLRP3 炎症体的相互关系进行了系统的研究,并分别评价了自噬不同阶段的降解过程对于 NLRP3 炎症体以及锰介导的炎性因子释放的影响。为锰暴露诱导 NLRP3 炎症体增加的分子机制提供了重要的理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器设备

透射电镜

ZEISS (德国)

超低温冰箱 (MDF-U73V)

SANYO (日本)

冰柜 (J2X0000707)	Haier (中国)
激光共聚焦显微镜	Nikon (日本)
超声破碎仪 (VCX105)	SONICS&MATERIALS 公司 (美国)
荧光显微镜	ZEISS (德国)
抽吸泵 (WP6122050)	MILLIPORE 公司 (美国)
DNA/RNA 定量仪 (NANODROP 2000C)	Thermo scientific 公司 (美国)
96 孔板离心机 (LMC-3000)	Grant-bio 公司 (美国)
低温离心机 (5804R)	Eppendorf 公司 (美国)
紫外分光光度计 (UV-2550)	SHIMADZU (日本)
全能型凝胶成像系统 (Universal HoodIII)	BIO-RAD (美国)
酶标仪 (Infinite F200)	TECAN (美国)
制冰机 (SIM-F140)	SANYO (日本)
摇床 (ZD-9550)	Kylin-Bell Lab instruments (中国)
基因扩增仪 (7500 Fast Real-Time PCR system)	Applied Biosystems (美国)
蛋白垂直蛋白电泳系统 (Universal/300)	BIO-RAD (美国)
梯度 PCR 仪	Biometra TGRADIENT (美国)
超纯水机 (Milli-Q)	MILLIPORE (美国)
液氮生物容器 (YDS-100B-125)	成都金凤 (中国)
高压灭菌器 (MLS-3750)	SANYO (日本)
电热恒温水浴锅 (HH-2)	科伟 (中国)
室温离心机 (5430)	Eppendorf 公司 (美国)
超净工作台 (SW-CJ-1F)	苏州净化 (中国)
二氧化碳培养箱 (3423)	Thermo scientific (美国)
生物显微镜 (IX71)	OLYMPUS (日本)
激光共聚焦显微镜	Nikon (日本)

1.2 主要试剂抗体

多聚甲醛 (DH610)	科昊 (中国)
BCA 蛋白反应试剂盒	Thermo (美国)
RIPA 裂解液 (中)	碧云天生物技术公司 (中国)
TEMED	Gibco (美国)
组织蛋白酶 B (CTSB 12216-1-AP)	Protein tech (美国)
Beclin-1 Rabbit mAb (3495)	Cell Signaling Technology (美国)
LC3B Antibody (#2775)	Cell Signaling Technology (美国)
Bafilomycin A1 (88899-55-2)	美仑生物 (中国)
Atg5 Rabbit mAb (#12994)	Cell Signaling Technology (美国)
SQSTM1/p62 Antibody (#5114)	Cell Signaling Technology (美国)
Anti-CIAS1 / NALP3 抗体 (ab4207)	Abcam (美国)
Anti-caspase-1 抗体 (ab108362)	Abcam (美国)

1.3 模型建立的动物及细胞需求

1.3.1 动物

具体方法同实验一。

1.3.2 所使用的细胞系

具体方法同实验一。

1.4 实验用试剂配制

具体方法同实验一。

2 方法

2.1 运用透射电镜观察染锰小鼠海马

具体灌注方法同前，使用 0.9%NaCl 快速灌注后，使用 4%多聚甲醛进行慢速灌注，待完整取出小鼠大脑后，将其分组放入透射电镜专用固定液（4%多聚甲醛+2%戊二醛，此实验过程中，透射电镜灌注液、固定液均领于神经生物学教研室电镜中心）中，做好标记，4°C 保存，尽快送往神经生物学教研室电镜中心进行电镜样品的制备，进行预约，之后按约定前往进行电镜观察。

2.2 Western blot 检测自噬相关蛋白的表达

具体方法同实验一。

2.3 qRT-PCR

具体方法同实验一。

2.4 运用透射电镜观察染锰 BV2 小胶质细胞

- 1) 将 BV2 小胶质细胞以 3×10^6 个/ml 的密度种入 10cm 细胞培养皿中，进行正常的细胞培养；
- 2) 24h 后，给 BV2 细胞按照之前的方法配制并加入锰刺激液（100 μ M），6h 后，收取上清及消化下的细胞，室温离心，1250rpm，5min；
- 3) 离心后弃上清，加入从电镜中心领回的固定液，对离心后的细胞团块进行固定，与组织电镜一样，将处理好的样品送往神经生物学教研室电镜中心，进行预约并前往进行电镜观察。

2.5 建立染锰 BV2 细胞的 Atg5 siRNA 模型（转染实验）

从上海吉玛订购的 siRNA oligo 及 Negative control（之后简称为 NC），具体序列如下：

名称	序列 (5'-3')
Atg5 (mouse)	sense: GGCAUUAUCCAAUUGGCCUACUGUU
	antisense: AACAGUAGGCCAAUUGGAUAAUGCC
Negative control	sense: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	antisense: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

具体转染方法同前。但由于在实验二中验证了 NC（Negative Control，阴性对照）对 NLRP3 炎症体及炎症因子的释放没有过多的影响，因此此部分实验不设 NC 组，将 siAtg5 处理后结果均和对照组相比。

2.6 运用 Western blot 方法检测染锰小鼠海马组织及染锰 BV2 小胶质细胞中自噬相关分子在蛋白水平的变化

具体方法同实验一。

2.7 运用 qRT-PCR 方法检测染锰小鼠海马组织及染锰 BV2 小胶质细胞中自噬相关分子在 mRNA 水平的变化

具体方法同实验一，使用引物购于奥科鼎盛公司，具体序列如下：

名称	序列 (5'-3')
Atg5 (mouse)	Forward: AAGCACCTAGTCACACCACATCCA
	Reverse: CACGTGTGAGTGATGGTGGCITT
Actin	Forward: AGCCAATGTAACGTAGCCAATCC
	Reverse: GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA

2.8 统计学分析

具体方法同实验一。

3 结果

3.1 锰作用后自噬溶酶体功能发生紊乱

3.1.1 透射电镜结果显示锰可以诱导染锰小鼠海马组织发生溶酶体功能障碍

运用透射电镜观察染锰小鼠海马组织中溶酶体的变化（图 3-1），结果发现，锰暴露能够导致小鼠海马脑区的神经元细胞及小胶质细胞的溶酶体受到损伤，对照组溶酶体数量以及密度较锰暴露组相比数量较少，密度较低，且染锰组溶酶体出现空泡，

说明溶酶体功能发生障碍。次级溶酶体数量增多提示锰暴露能够引起溶酶体降解能力降低，降解物在溶酶体内蓄积增多，溶酶体功能异常。

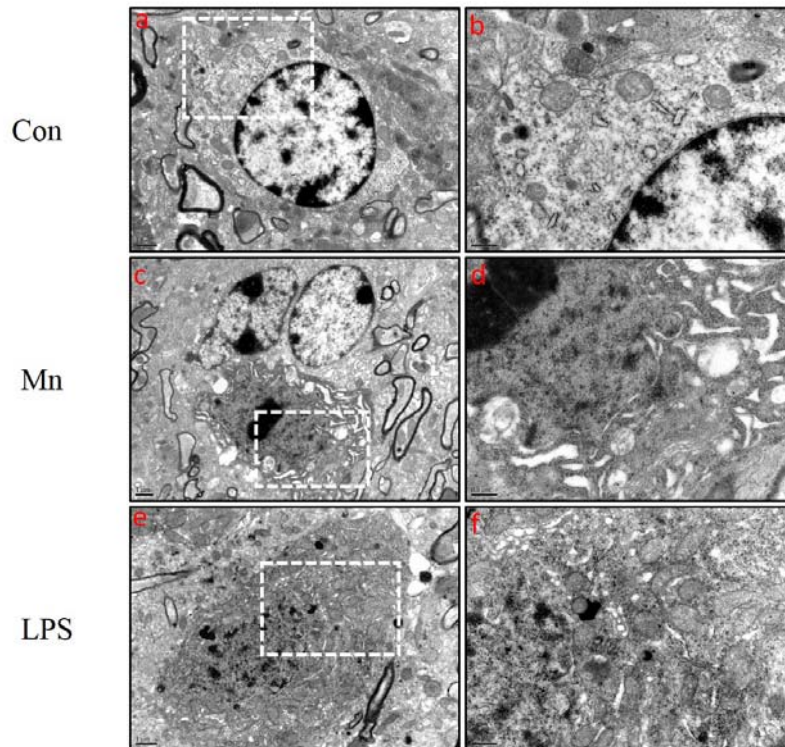


图 3-1 透射电镜检测染锰小鼠海马组织发现溶酶体功能障碍
(a, c, e Bar = 1 μ m; b, d, f Bar = 0.5 μ m)

3.1.2 Western blot 结果显示锰可以诱导小鼠海马组织中自噬相关蛋白的升高

Western blot 方法检测锰暴露后小鼠海马组织中自噬相关蛋白的表达 (图 3-2)，结果显示锰暴露后可以诱导小鼠海马组织中自噬相关蛋白 Beclin 1、Atg 5、LC3 II、p62、Cathepsin B 均有所升高，对灰度值分析发现染锰组与对照组相比灰度值明显升高，且具有统计学意义 ($P < 0.05$) 提示锰暴露可使小鼠海马脑区溶酶体发生功能障碍。

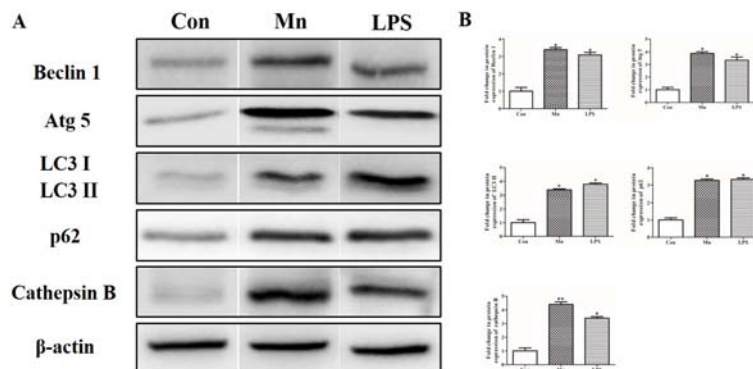


图 3-2 Western blot 方法检测染锰小鼠海马组织自噬相关蛋白的表达

A: 染锰海马组织自噬相关蛋白的表达; B: 灰度值分析结果 (* $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con)

3.1.3 锰可以诱导染锰 BV2 小胶质细胞发生溶酶体功能障碍

运用透射电镜检测染锰 BV2 小胶质细胞溶酶体的变化 (图 3-3)。结果发现, 锰暴露同样使得 BV2 小胶质细胞的溶酶体受到损伤, 染锰组、LPS 组溶酶体出现空泡, 说明溶酶体功能发生障碍。

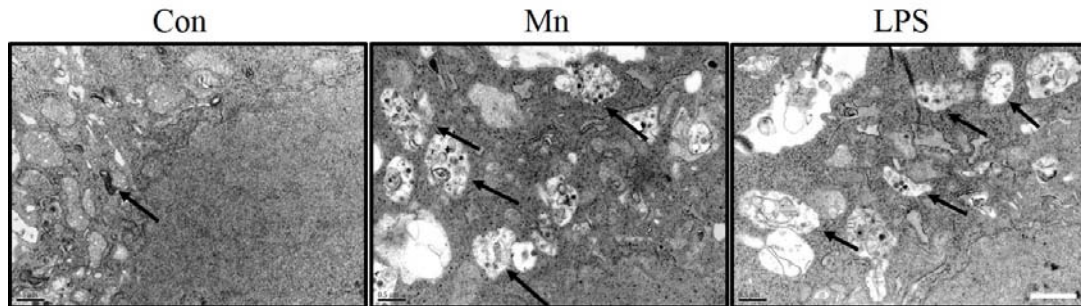


图 3-3 透射电镜检测 BV2 小胶质细胞溶酶体 (Bar = 0.5 μ m)

3.1.4 免疫细胞化学染色结果显示锰可以诱导染锰 BV2 小胶质细胞中 LC3 表达升高

运用免疫细胞化学染色方法检测锰暴露 6h 后 BV2 小胶质细胞中 LC3 的表达(图 3-4), 结果发现与对照组相比染锰组 BV2 小胶质细胞中 LC3 的荧光强度有所增强, 提示锰可以促使 BV2 小胶质细胞中 LC3 表达增加, 提示 BV2 小胶质细胞溶酶体功能可能发生障碍。

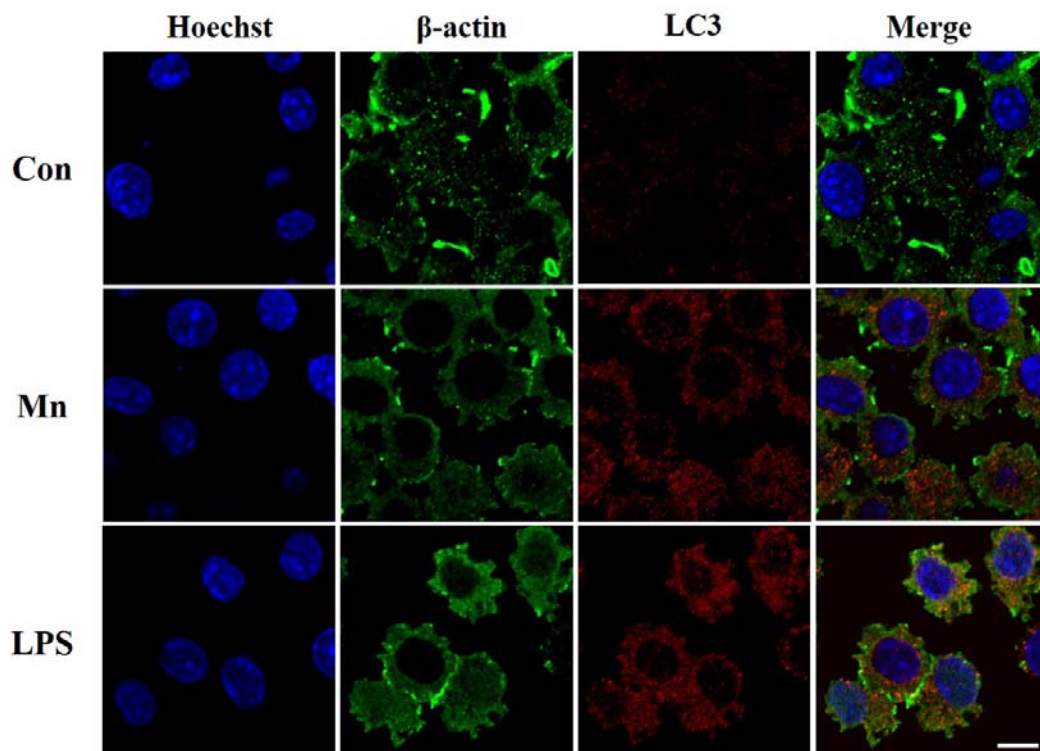


图 3-4 免疫细胞化学染色方法检测锰暴露对 BV2 小胶质细胞 LC3 表达的影响 (Bar: 600X)

3.1.5 Western blot 结果显示锰可以诱导 BV2 小胶质细胞中自噬相关蛋白的升高

Western blot 方法检测锰暴露 BV2 小胶质细胞诱导细胞中自噬相关蛋白变化的情况 (图 3-5), 结果发现锰暴露可以促使 BV2 小胶质细胞中自噬相关蛋白 Beclin 1、Atg 5、LC3 II、p62 以及 Cathepsin B 有所升高, 对结果的灰度值进行分析发现与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)

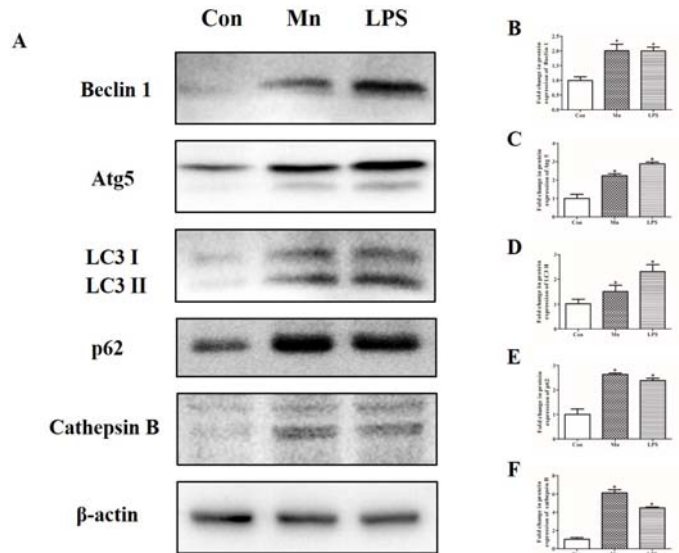


图 3-5 Western blot 方法检测自噬相关蛋白的表达

A: Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin 1、Atg 5、LC3 II、p62、Cathepsin B 的变化;

B: 灰度分析结果 (* $P < 0.05$ vs. Con)

3.2 干涉自噬反应对 NLRP3 表达的抑制作用

3.2.1 Atg5 干涉 RNA 干涉效应验证

运用 Western blot 方法对购于上海吉玛公司的 siRNA-Atg5 的干涉效果进行验证 (图 3-6), 结果发现与对照组、阴性对照组相比 siAtg5 组中 Atg5 在蛋白水平的表达有所下降且具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 siRNA 的干涉效果良好。

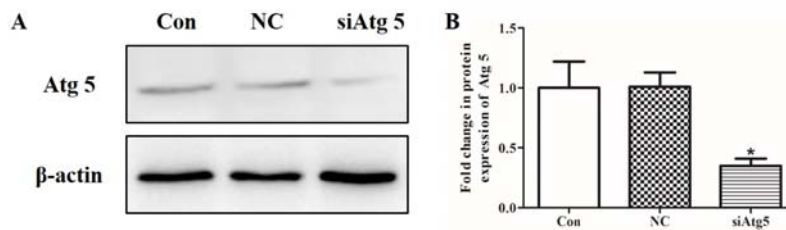


图 3-6 Western blot 方法检测 Atg5 siRNA 的干涉效果

A: 干涉 Atg 5 后 Atg5 在蛋白水平的表达; B: 灰度分析结果 (* $P < 0.05$ vs. Con)

3.2.2 免疫细胞化学检测干涉 Atg5 后对锰暴露 BV2 小胶质细胞的自噬相关蛋白 LC3 的影响

免疫细胞化学染色检测运用 Atg5 siRNA 处理后的 BV2 小胶质细胞在锰作用 6h 后 LC3 的表达 (图 3-7), 结果发现, 正常情况下锰可以诱导 BV2 小胶质细胞中 LC3 的荧光强度增强, 使用 siAtg5 处理 BV2 小胶质细胞后再进行锰暴露 6h, LC3 的荧光强度与锰组相比有所下降, 提示 siAtg5 可以抑制锰作用下产生的 LC3。

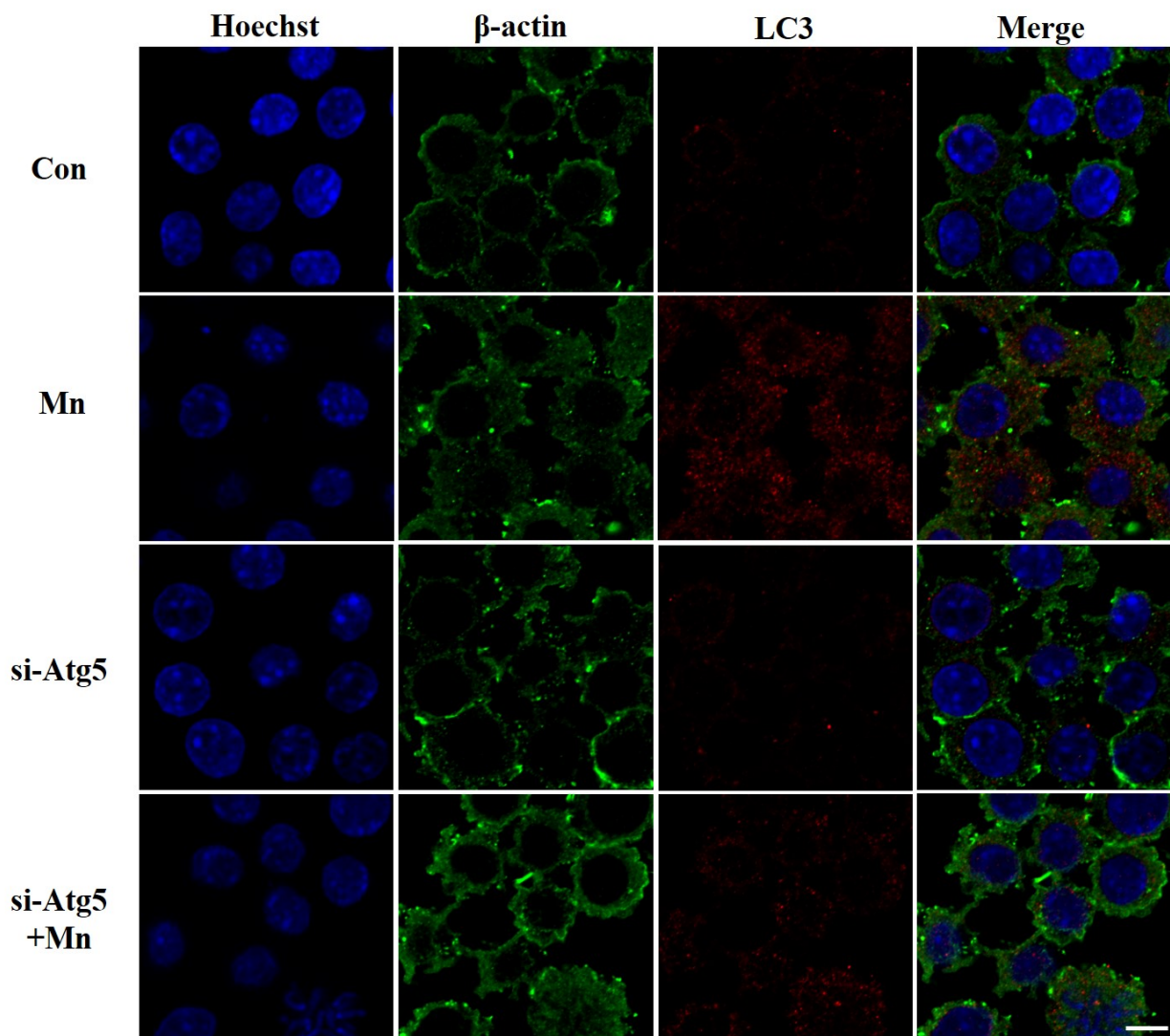


图 3-7 免疫荧光化学染色检测锰暴露 siAtg5 处理后的 BV2 小胶质细胞中 LC3 的表达

(Bar: 600X)

3.2.3 Western blot 方法检测干涉 Atg5 表达后对锰暴露 BV2 小胶质细胞的自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白的影响

Western blot 方法检测干涉 Atg5 对锰暴露 BV2 小胶质细胞中自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白表达的影响 (图 3-8), 由于在实验二中验证了 NC (Negative Control, 阴性对照) 对 NLRP3 炎症体及炎性因子的释放没有过多的影响, 因此此部分实验不设 NC 组, 将 siAtg5 处理后结果均和对照组相比, 结果显示使用 siAtg5 对 BV2 小胶质细胞进行处理后可使锰诱导升高的自噬相关蛋白 Atg 5、LC3 II、Beclin 1 有所下降, 且与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$) 但是对 NLRP3 炎症体相关蛋白并没有过多的影响。

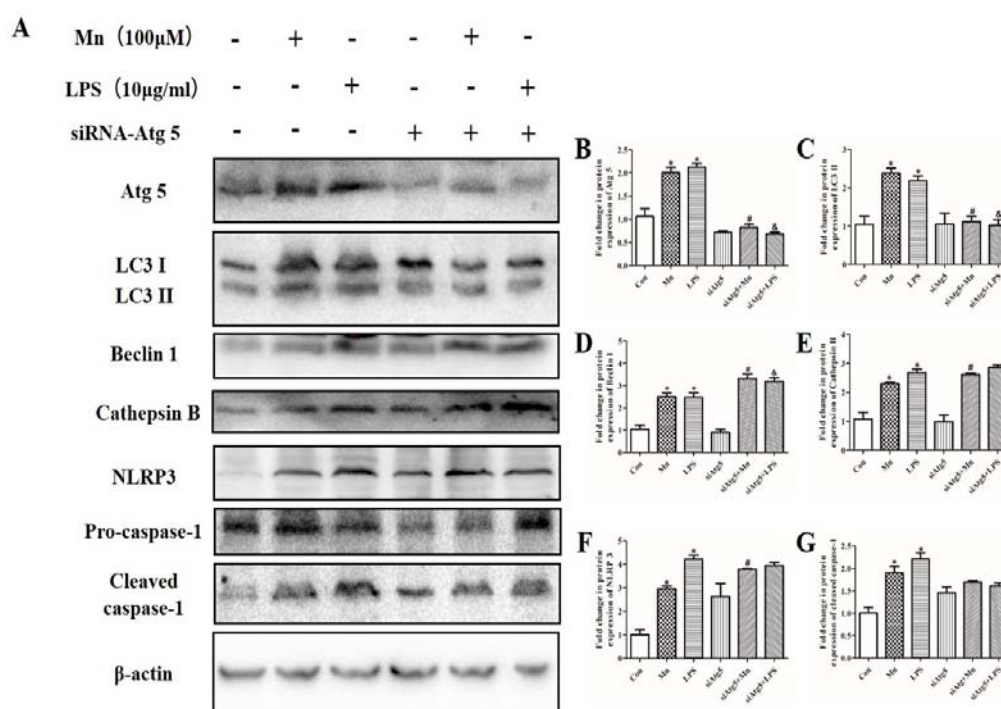


图 3-8 干涉 Atg5 对锰暴露 BV2 小胶质细胞自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白表达的影响

A: 干涉 Atg 5 后锰对自噬相关蛋白变化的影响; B-G: 分别为 Atg5、LC3II、Beclin 1、Cathepsin

B、NLRP3、cleaved caspase-1 的灰度分析结果

(* $P < 0.05$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. Mn; & $P < 0.05$ vs. LPS)

3.2.4 Western blot 方法检测干涉 Atg5 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放的成熟 IL-1β 在蛋白水平表达的影响

Western blot 方法检测干涉 Atg5 对锰诱导的成熟 IL-1β 的释放在蛋白水平的影响 (图 3-9), 结果显示, 正常情况下, 锰可以诱导 BV2 小胶质细胞所释放的成熟 IL-1β

在蛋白水平有所增加，与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)；干涉 Atg5 对锰诱导产生的成熟 IL-1 β 释放在蛋白水平没有过多的影响。提示 siAtg5 不会影响锰诱导产生的成熟 IL-1 β 。

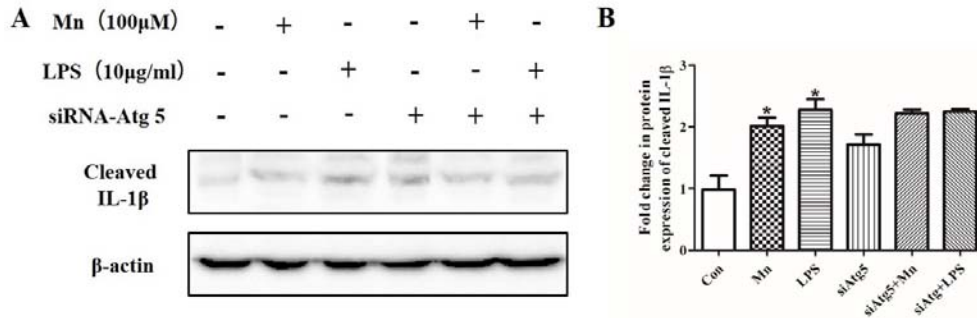


图 3-9 Western blot 方法检测干涉 Atg5 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放的成熟 IL-1 β 在蛋白水平的影响

(* $P < 0.05$ vs. Con)

3.2.5 ELISA 方法检测干涉 Atg5 对锰诱导 BV2 小胶质细胞产生的成熟 IL-1 β 、IL-18 表达的影响

运用 ELISA 方法检测干涉 Atg5 对锰诱导 BV2 小胶质细胞产生的 IL-1 β 、IL-18 的影响 (图 3-10)。结果显示，正常情况下，锰可以诱导 BV2 小胶质细胞所释放的 IL-1 β 、IL-18 有所增加，且与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)；干涉 Atg5 对锰诱导产生的成熟 IL-1 β 、IL-18 释放没有过多的影响。提示 siAtg5 不会影响锰诱导产生成熟的 IL-1 β 、IL-18。

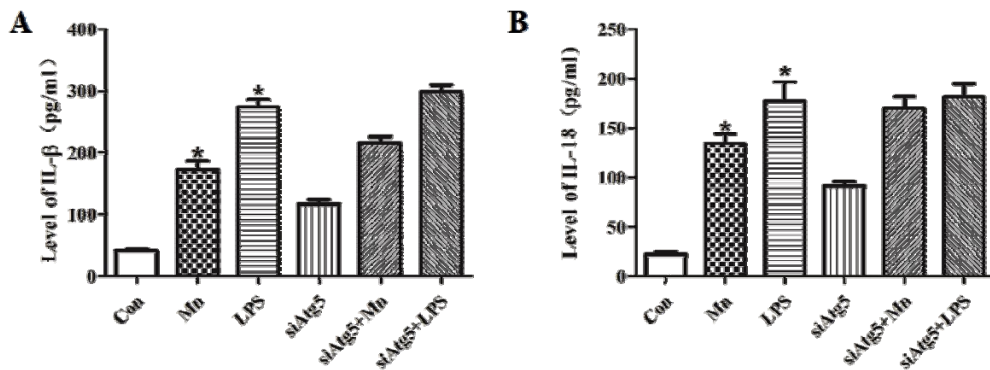


图 3-10 ELISA 方法检测干涉 Atg5 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放成熟 IL-1 β 、IL-18 的影响

(* $P < 0.05$ vs. Con)

3.2.6 免疫细胞化学染色检测 Baf A1 对锰诱导 BV2 小胶质细胞产生的 LC3 的影响

运用免疫细胞化学染色方法检测 Baf A1 对锰诱导的 BV2 小胶质细胞中的 LC3 表达的影响, 结果发现, 正常情况下锰可以诱导 BV2 小胶质细胞中自噬相关蛋白 LC3 的表达有所增加, 加入 Baf A1 后这一现象有所加剧, LC3 的荧光强度与单独锰作用组相比有所升高, 提示 Baf A1 可以抑制自噬体和溶酶体结合的过程, 从而抑制自噬体的降解, 加剧自噬体的蓄积。

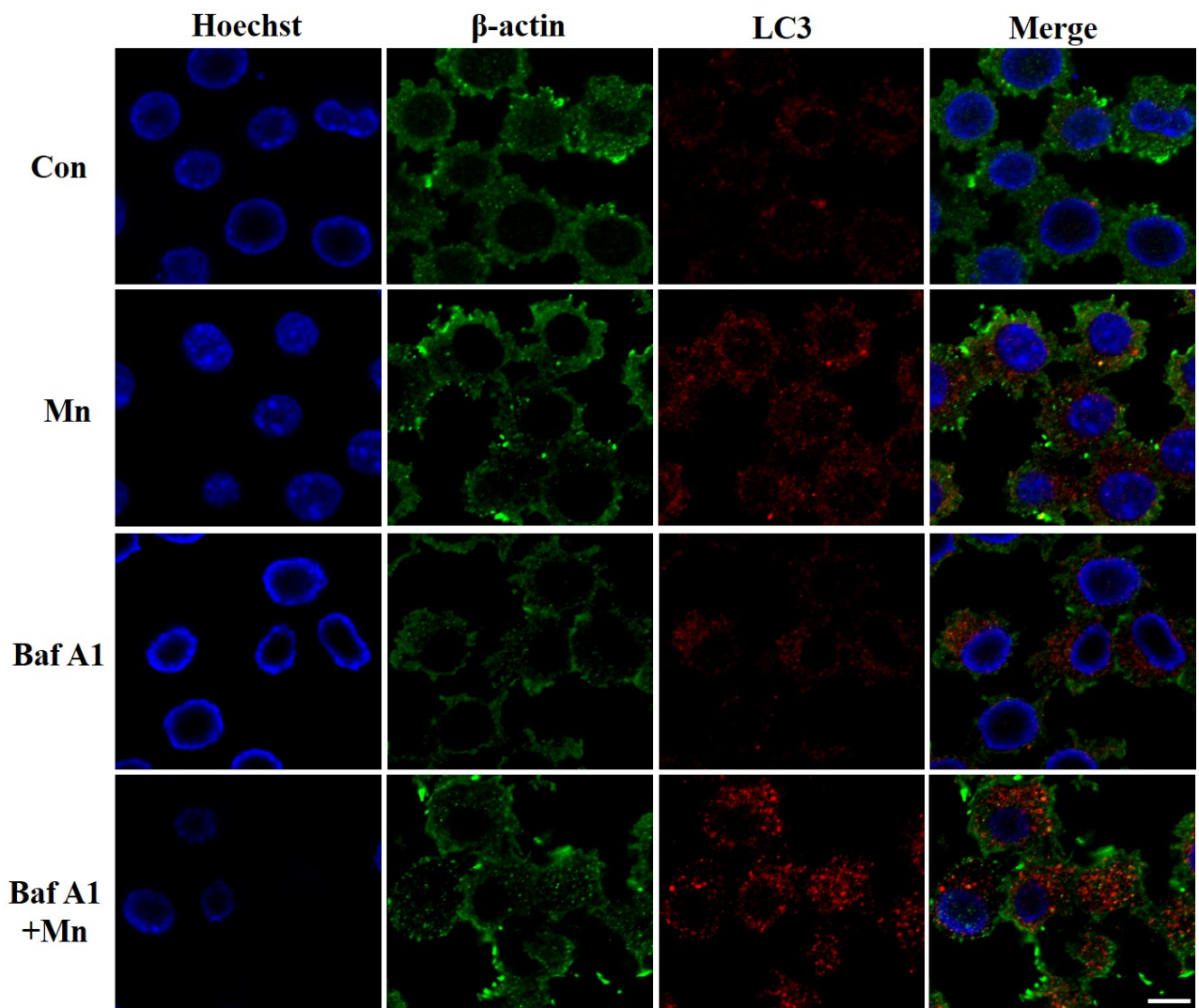


图 3-11 免疫细胞化学染色检测 Baf A1 对锰诱导的 BV2 小胶质细胞 LC3 表达的影响

(Bar: 600X)

3.2.7 Western blot 方法检测 Baf A1 对锰暴露 BV2 小胶质细胞的自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白的影响

Western blot 方法检测运用 Baf A1 抑制自噬后对锰暴露 BV2 小胶质细胞的自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白的影响 (图 3-12), 结果发现, 加入 Baf A1 抑制自噬后自噬相关蛋白 Beclin 1、Atg 5、LC3 II 的表达均有一定水平的升高, 但是 p62、cathepsin B、NLRP3 炎症体相关蛋白并没有过多的改变。

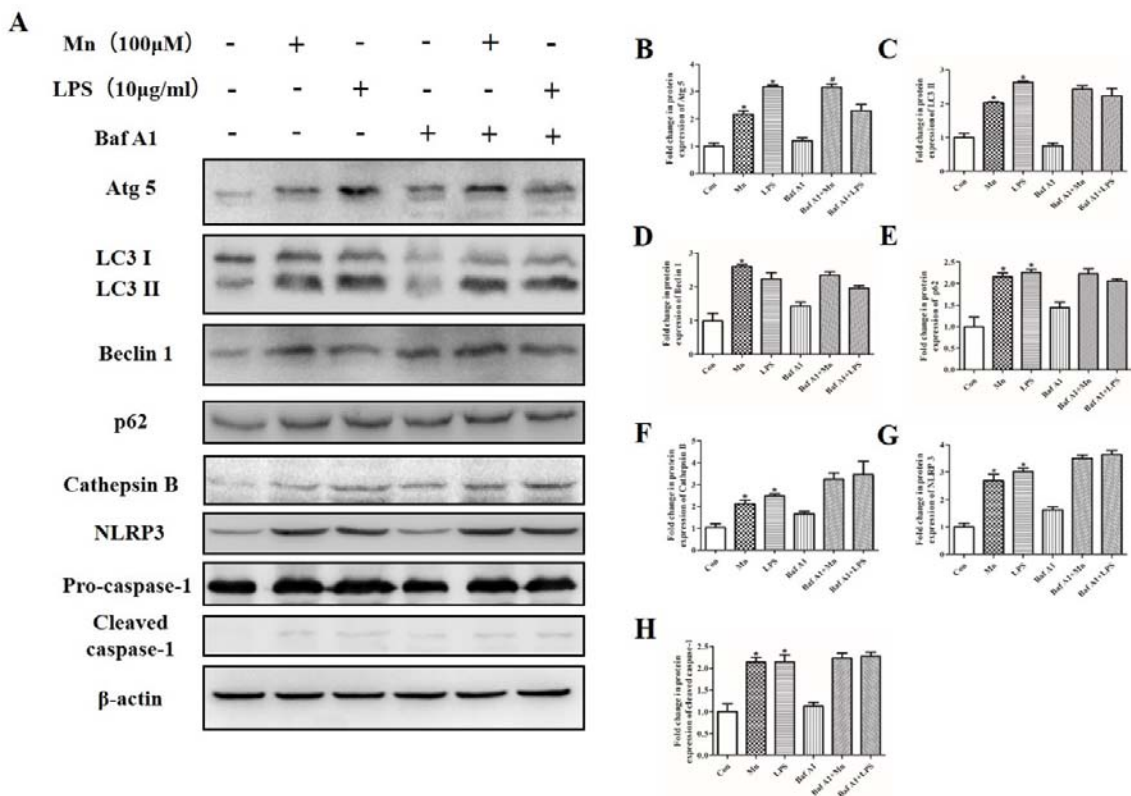


图 3-12 Western blot 方法检测 Baf A1 对锰暴露 BV2 小胶质细胞中自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白表达的影响

A: 自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白的 western blot 结果; B-H: 分别为 Atg 5、LC3 II、Beclin 1、p62、Cathepsin B、NLRP3、cleaved caspase-1 的灰度分析结果 (* $P < 0.05$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. Mn)

3.2.8 Western blot 方法检测 Baf A1 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放成熟的 IL-1 β 在蛋白水平的影响

Western blot 方法检测运用 Baf A1 对锰暴露 BV2 小胶质细胞释放成熟 IL-1 β 在蛋白水平的影响 (图 3-13)。结果发现, 加入 Baf A1 对锰诱导 BV2 小胶质细胞所释放的成熟的 IL-1 β 在蛋白水平没有过多的影响。

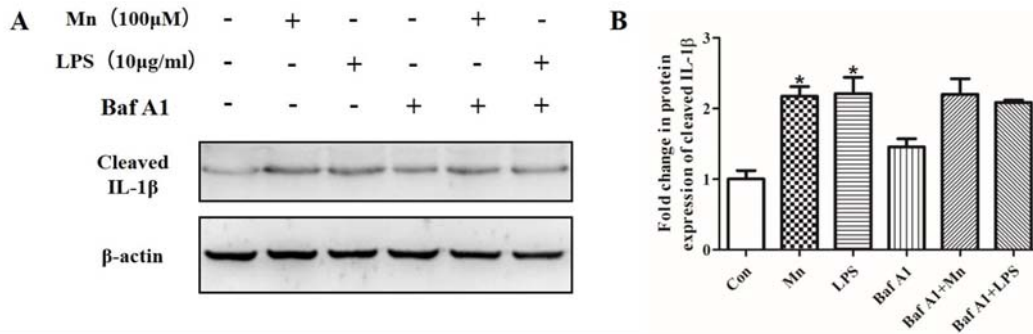


图 3-13 Western blot 方法检测 Baf A1 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放成熟的 IL-1 β 在蛋白水平的改变

A: 加入 Baf A1 对锰作用 BV2 小胶质细胞产生的成熟 IL-1 β 在蛋白水平的表达;
B: 灰度分析结果 (* $P < 0.05$ vs. Con)

3.2.9 ELISA 方法检测 Baf A1 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放成熟的 IL-1 β 、IL-18 表达的影响

ELISA 方法检测运用 Baf A1 抑制自噬对锰作用 6h 后 BV2 小胶质细胞释放 IL-1 β 、IL-18 的影响 (图 3-13)。结果发现, 加入 Baf A1 对锰诱导 BV2 小胶质细胞所释放的 IL-1 β 、IL-18 没有过多的影响。

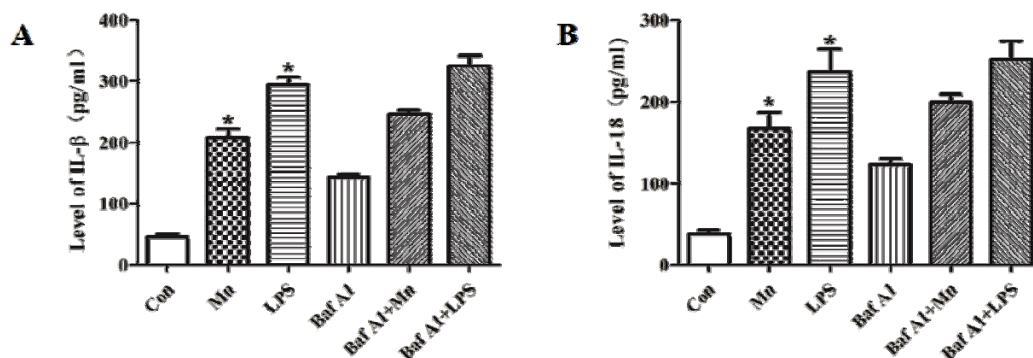


图 3-13 ELISA 方法检测 Baf A1 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放成熟的 IL-1 β 、IL-18 的影响

A: IL-1 β 的 ELISA 结果; B: IL-18 的 ELISA 结果 (* $P < 0.05$ vs. Con)

3.2.10 Western blot 方法检测 NH₄Cl 对锰暴露 BV2 小胶质细胞的自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白表达的影响

运用 NH₄Cl 抑制组织蛋白酶 B 的释放，Western blot 方法检测加入 NH₄Cl 对锰暴露 BV2 小胶质细胞的自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白表达的影响（图 3-14）。结果显示，加入 NH₄Cl 对锰暴露 BV2 小胶质细胞中的自噬相关蛋白 Atg5、LC3 II、Beclin 1、均不存在抑制作用；但是 NH₄Cl 对染锰 BV2 小胶质细胞中的 Cathepsin B 以及 NLRP3 炎症体相关蛋白却具有抑制作用，且与单独锰作用组相比具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

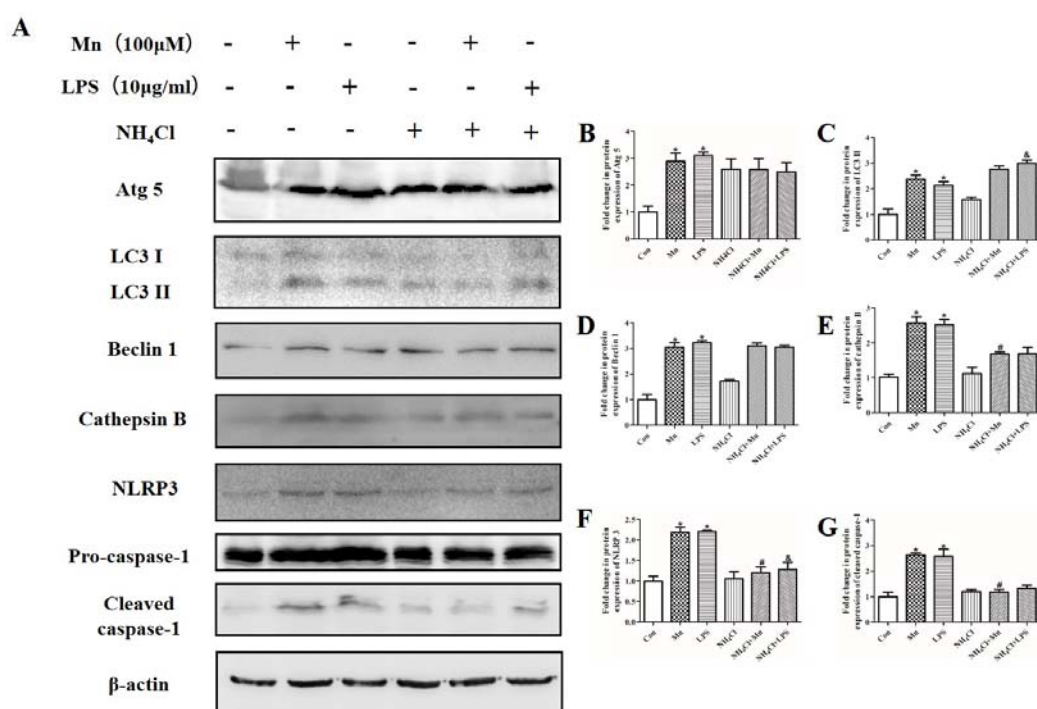


图 3-14 NH₄Cl 对锰暴露 BV2 小胶质细胞中自噬相关蛋白以及 NLRP3 炎症体相关蛋白的影响

A: 自噬相关蛋白及 NLRP3 炎症体相关蛋白的 Western blot 结果；B-G: 分别为 Atg 5、LC3 II、Beclin 1、Cathepsin B、NLRP3、cleaved caspase-1 的灰度分析结果

(* $P < 0.05$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. Mn; & $P < 0.05$ vs. LPS)

3.2.11 Western blot 方法检测 NH₄Cl 对锰诱导的 NLRP3 炎症体介导的 BV2 小胶质细胞释放 IL-1 β 在蛋白水平的影响

运用 Western blot 检测 NH₄Cl 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放的成熟 IL-1 β 在蛋白水平的影响(图 3-15)。结果显示 NH₄Cl 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放的成熟 IL-1 β

在蛋白水平存在抑制作用，且灰度分析结果发现，这种加入测 NH_4Cl 与锰共同作用组与单独锰作用组相比灰度值有所下降且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

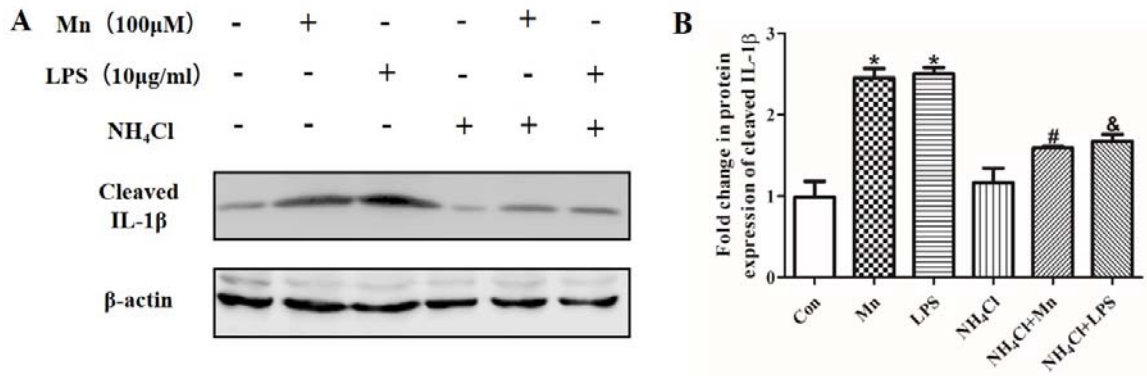


图 3-15 NH_4Cl 对锰诱导 BV2 小胶质细胞所释放的成熟 IL-1 β 在蛋白水平的影响

A: 加入 NH_4Cl 与锰共同作用 BV2 小胶质细胞所产生的成熟 IL-1 β 在蛋白水平变化;

B: 灰度分析结果 (* $P < 0.05$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. Mn; & $P < 0.05$ vs. LPS)

3.2.12 ELISA 方法检测 NH_4Cl 对锰诱导的 NLRP3 炎症体介导的 BV2 小胶质细胞炎症因子释放的影响

ELISA 方法检测运用 NH_4Cl 对锰作用 6h 后 BV2 小胶质细胞释放 IL-1 β 、IL-18 的影响 (图 3-16)。结果发现，正常情况下单独锰作用可以诱导 BV2 小胶质细胞释放大量 IL-1 β 和 IL-18，且与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.01$)；加入 NH_4Cl 可以抑制锰诱导 BV2 小胶质细胞所释放的 IL-1 β 、IL-18，与单独锰作用组相比，具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

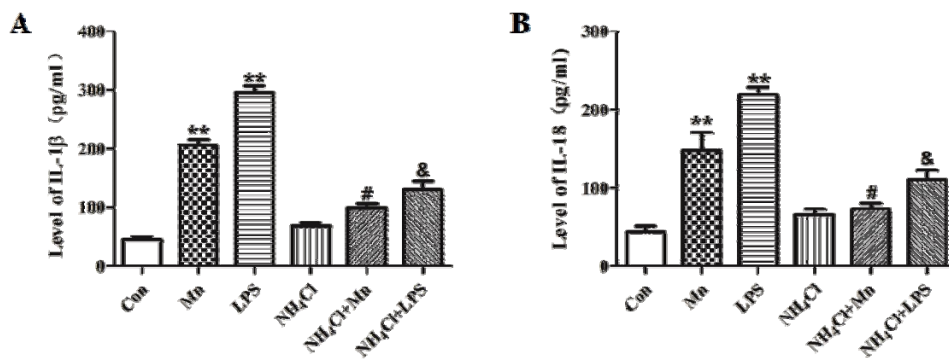


图 3-16 ELISA 方法检测 NH_4Cl 对锰诱导 BV2 小胶质细胞释放 IL-1 β 、IL-18 的影响

A: IL-1 β 的 ELISA 结果; B: IL-18 的 ELISA 结果

(** $P < 0.01$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. Mn; & $P < 0.05$ vs. LPS)

4 讨论

自噬是细胞维持内环境稳定重要的生理过程。自噬的发生对细胞的存活发挥着至关重要的作用[196]。当细胞内营养匮乏时就会诱导细胞自噬的发生，除此之外其它原因，包括变性或聚积的蛋白、细胞器的损伤、ROS、缺氧以及应激等亦能够引起自噬发生的增高[197]。自噬分为大自噬、小自噬以及分子伴侣介导的自噬三种，在本课题中我们所研究的为大自噬，简称自噬。自噬的形成过程包括自噬的启动、延伸、与溶酶体的融合和降解几个重要阶段[142]。自噬的相关基因参与和调控着自噬各个阶段的形成过程。当自噬的发生处于紊乱状态时，则会诱发许多疾病的发生。研究表明，许多神经系统疾病的发生都与自噬功能的异常相关，PD、AD、WD 等均发现体内自噬降解过程异常[198]。

我们课题组以往的研究表明，锰暴露能够导致 SD 大鼠黑质纹状体通路自噬功能的降低，因此影响了多巴胺能神经元的功能，最终导致 SD 大鼠的运动能力损伤[81]。我们在前一部分结果中发现 NLRP3 炎症体的活化是锰介导小胶质细胞释放炎性因子的重要部分。因此继续围绕 NLRP3 炎症体的上游调控机制进行深入研究，有助于揭示锰暴露所致的小鼠学习记忆能力损伤的具体分子机制。研究表明，自噬的形成与 NLRP3 炎症体的形成关系密切，两者存在一定的负相关性。当自噬水平处于抑制状态时，NLRP3 炎症体可以活化。结合以上所阐述的两点，锰暴露所诱导的 NLRP3 炎症体活化很可能是通过抑制自噬水平来实现的。我们首先检测了锰暴露后，小鼠海马脑区自噬水平的改变。通过 TEM 进行了观察，发现锰暴露后，能够引起海马脑区小胶质细胞自噬泡大量的堆积，期间降解产物增加，溶酶体处于高致密的病理状态，同样的结果在 LPS 阳性对照组中也有所发现。这充分证实了锰暴露后，小鼠海马脑区小胶质细胞的自噬降解功能处于紊乱状态。在自噬体发生的过程中 Beclin 1、Atg5、LC3II 等自噬相关分子发挥着重要作用，这些分子的表达同样也反映了自噬体的形成。我们运用 Western blot 检测了小鼠海马组织中自噬相关蛋白的改变，结果提示，自噬体相关蛋白 Beclin 1、LC3II、Atg5 等表达增加，提示锰暴露诱导了自噬体在细胞内的堆积。p62 蛋白是自噬降解的伴侣蛋白，当自噬体形成后就会与具有降解功能的溶酶体进行融合，形成自噬溶酶体，最终依靠溶酶体的组织蛋白酶类将其降解消化[199]。p62 蛋白的在细胞内蓄积增多则反映自噬体不能被溶酶体降解，

不能够完成最后自噬降解的过程。在实验中，我们同样运用 Western blot 检测了小鼠海马组织中 p62 蛋白水平的改变，结果发现在锰暴露后小鼠海马组织中 p62 水平也显著升高。结合 LC3II、Beclin 1 以及 Atg5 的表达增高，我们可以得出这样的结论：锰暴露促使了海马脑区自噬体的形成，但却阻断了溶酶体降解的过程，导致大量的自噬体，包含降解产物的溶酶体聚积与细胞质中，引起了自噬溶酶体降解过程的紊乱。

为了验证我们得出的结果的可靠性，我们在体外模型中（锰暴露的 BV2 小胶质细胞）也进行了自噬水平的检测。TEM 检测发现锰暴露组与对照组相比，自噬体在胞质内大量堆积，溶酶体处于病理状态，其结构受到损伤。免疫细胞化学染色结果提示锰暴露导致大量 LC3 标记的自噬体蓄积与细胞之中。Western blot 对自噬相关蛋白 Beclin 1、Atg5、LC3II、p62 也进行了检测。与体内的研究结果一致，即自噬相关蛋白显著增高，同样 p62 蛋白水平也发现显著升高，提示我们自噬体未得到正常的降解，导致大量的自噬体蓄积与胞质中。在检测自噬相关蛋白的同时，我们也观察了组织蛋白酶 B 的表达情况，结果发现，锰暴露能够诱导体内体外小胶质细胞组织蛋白酶 B 表达水平升高。组织蛋白酶 B 的表达增高可能是由于锰能够进入了小胶质细胞的溶酶体内（溶酶体是锰细胞内蓄积的主要细胞器之一），溶酶体为了能够使得外源性的锰离子得以快速清除，代偿性的提高了其降解异物的能力，导致组织蛋白酶 B 的大量产生，而这些大量产生的组织蛋白酶 B 对锰的清除不能发挥有效作用，再者，锰对溶酶体的结构产生了一定的破坏作用，进而导致组织蛋白酶 B 的外泄，引起溶酶体功能降低，最终导致细胞内形成的自噬体不能正常的降解。结合以上的结果我们不难得出这样的结论：锰暴露引起了小胶质细胞自噬溶酶体功能的紊乱。

研究表明自噬功能受到抑制则会对 NLRP3 的活化发挥促进作用。在本部分实验中，我们证实了锰暴露能够引起自噬溶酶体功能异常，导致自噬不能正常进行。可见锰暴露所诱导的自噬溶酶体功能紊乱参与调控了 NLRP3 炎症体的增多。众所周知，自噬的形成过程主要包括自噬体的启动和延伸、自噬体与溶酶体的融合和降解。那么锰诱导的 NLRP3 炎症体增多究竟是自噬的哪个环节所导致的呢？

我们首先对自噬体的启动和延伸这一阶段进行了论证，在锰暴露过程中，导致了 Beclin 1、Atg5、以及 LC3II 的大量增多，是否自噬体的大量蓄积参与诱导了锰介导的 NLRP3 炎症体的活化？我们运用 RNA 干扰技术，在体外实验中将 BV2 小胶质

细胞的 Atg5 蛋白表达降低，这样就抑制了 BV2 小胶质细胞自噬体形成的关键环节，使得 LC3 的募集以及自噬体膜的延伸处于停滞状态。阻止自噬体的形成然后进行锰暴露刺激有利于观察是否因锰暴露所致的自噬体增多这一环节诱导 NLRP3 炎症体发生活化的。我们运用免疫细胞荧光染色技术观察了当 Atg5 被干涉后，锰暴露所致的 LC3 标记的自噬前体蓄积与细胞质中的现象得以改变，由于在实验二中我们发现了 NC (Negative Control, 阴性对照) 对 NLRP3 炎症体及炎性因子的释放没有过多的影响，因此此部分实验不设 NC 组，此部分 siAtg5 处理后结果均和对照组相比，Western blot 结果证实了 LC3I 向 LC3II 转化受到抑制，结果提示干涉 Atg5 有效的控制了锰暴露诱导的自噬前体增加的事实。通过 Western blot 我们检测了 Atg5 干涉后锰暴露与未干涉组两者之间 NLRP3 炎症复合体相关分子的改变，结果发现，干涉组与未干涉组在锰暴露后对 NLRP3 炎症复合体相关蛋白 NLRP3、cleaved caspase-1 并没有显著影响。其下游介导所释放的炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 也未发生改变。以上结果提示，干预自噬体形成的 Atg5 蛋白并不能阻止锰暴露所诱导的 NLRP3 炎症体的活化，锰暴露所导致的自噬前体（自噬的启动和延伸阶段）在细胞内的增加并不是自噬诱导 NLRP3 活化的关键环节。

接下来我们对自噬体与溶酶体融合降解这一环节进行了干预。Bafilomycin A1 (Baf A1) 是一种质子泵抑制剂，研究表明 Baf A1 能够抑制自噬体与溶酶体的结合并且抑制溶酶体的酸化，它是抑制自噬发生的一种重要化学物质[164]。在本实验中我们运用 Baf A1 与锰同时处理，目的是抑制自噬过程中自噬体与溶酶体融合和降解这一阶段，进一步加重了锰暴露诱导自噬体增多，观察 NLRP3 炎症体的活化是否发生促进作用。由于目前没有针对自噬发生的激动剂，尤其是促进自噬体降解的物质，因此只能选择自噬体与溶酶体的抑制剂，间接说明自噬体与溶酶体融合和降解环节与 NLRP3 炎症体活化之间的关系。分析结果我们不难看出，加入 Baf A1 后，锰暴露所诱导的 NLRP3 炎症体相关蛋白 NLRP3、cleaved caspase-1 表达并无显著影响，由炎症体所产生的炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 也未发生改变，虽然 Baf A1 处理后加剧了自噬体的进一步蓄积，但这些蓄积的自噬体并未促进 NLRP3 炎症体的活化，说明自噬体与溶酶体结合及降解阶段异常也不是锰诱导 NLRP3 炎症体活化的关键环节。

回顾文献我们发现，组织蛋白酶 B 能够对 NLRP3 炎症体起到激活的作用[104]。在这里我们发现锰暴露能够导致溶酶体的功能紊乱，组织蛋白酶 B 的大量释放，是

否溶酶体功能异常所释放的组织蛋白酶 B 就是锰诱导 NLRP3 炎症体活化增强的关键呢？我们运用 NH_4Cl 处理 BV2 小胶质细胞， NH_4Cl 能够抑制溶酶体的酸化，使得组织蛋白酶 B 表达降低。运用 NH_4Cl 和锰共同处理 BV2 小胶质细胞后发现，锰暴露所致的组织蛋白酶 B 表达降低，而自噬相关蛋白的表达确未有所改变，与对照组相比依旧呈高表达状态。进一步检测 NLRP3 炎症体相关蛋白 NLRP3、cleaved caspase-1 的表达发现， NH_4Cl 与锰共同处理组较锰单独处理组相比，NLRP3 炎症体相关蛋白表达受到抑制，另外通过 ELISA 检测得出的炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 也发生了表达降低。以上的结果提示，组织蛋白酶 B 在锰诱导的 NLRP3 炎症体活化以及炎性因子释放过程中发挥着重要作用。

在此部分实验中我们分别运用 Atg5 siRNA、Baf A1 以及 NH_4Cl 对锰诱导自噬溶酶体功能紊乱的几个阶段分别进行了干预，目的是找寻调控锰诱导 NLRP3 炎症体活化的关键环节。结果提示，锰暴露所导致的自噬溶酶体功能异常及其释放的组织蛋白酶 B 是介导 NLRP3 发生的重要因素。结合前两部分实验，我们得到了这样的结论：锰进入细胞后，大量的蓄积于溶酶体中，直接或间接引起溶酶体组织蛋白酶 B 的释放，使得自噬溶酶体功能发生异常，进而促进了 NLRP3 炎症体的活化，最后诱导炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 等的释放，造成了小鼠海马脑区神经元的损伤，引起学习记忆能力降低。我们的研究围绕锰如何诱导胶质细胞活化释放炎性因子这一问题，探讨了 NLRP3 在锰诱导小胶质细胞炎性因子释放过程中的关键作用，并进一步深入的揭示了自噬溶酶体功能紊乱是介导 NLRP3 炎症体活化的关键因素，其中溶酶体功能异常以及释放的组织蛋白酶 B 在自噬介导 NLRP3 炎症体活化过程中发挥着决定性作用。为锰暴露诱导胶质细胞活化的分子机制填补了充实的数据，为今后锰暴露损伤神经系统学习记忆能力的临床治疗提供了理论基础。

小 结

本课题通过建立 C57 小鼠的亚急性锰中毒体内模型以及锰暴露 BV2 小胶质细胞体外模型。研究了锰暴露所诱导的小胶质细胞活化及其释放的炎性因子在锰介导的学习记忆损伤中的重要作用；揭示了 NLRP3/caspase-1 炎症体活化是锰作用小胶质细胞活化后释放炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 的关键环节；深入地阐明了锰暴露导致的自噬溶酶体功能紊乱与 NLRP3/caspase-1 炎症体活化之间的紧密关系；并进一步研究锰暴露所诱导的自噬功能紊乱调控 NLRP3/caspase-1 炎症体活化的具体分子机制，最终为锰的神经毒性的防护和治疗提供关键靶点和理论依据。本课题所论证的观点如下：

1. 锰暴露不但能够影响小鼠运动能力的下降，而且还能够损伤海马脑区所调控的学习记忆能力水平降低。锰暴露所诱导的小胶质细胞的活化及其释放的炎性因子 IL-1 β 、IL-18 以及 TNF- α 可能与学习记忆能力降低紧密相关；

2. 锰暴露能够诱导体内外小胶质细胞 NLRP3 炎症体相关蛋白的表达升高。提示 NLRP3 炎症体的激活可能是锰暴露诱导小胶质细胞释放炎性因子的关键分子。NLRP3 低表达后，能够抑制锰暴露诱导的 NLRP3 炎症体活化，同时下调了炎性因子 IL-1 β 、IL-18 以及 TNF- α 的释放，证实了 NLRP3 炎症体在锰诱导小胶质细胞释放炎性因子的过程中具有重要的作用；

3. 锰暴露能够导致自噬溶酶体功能的异常。锰暴露可以诱导自噬体相关蛋白 Beclin 1、Atg5、LC3 的表达增加，以及 p62 蛋白的升高。提示锰暴露诱导了自噬体的蓄积。通过电镜观察溶酶体的形态发现，溶酶体结构改变，内容物增多，组织蛋白酶 B 表达增加，进一步说明溶酶体的功能可能受到了锰的抑制；

4. 干预自噬体启动和延伸的重要自噬相关蛋白 Atg5 的表达并不能阻止锰暴露所诱导的 NLRP3 炎症体的活化以及炎性因子的释放。提示，锰暴露所导致的自噬前体（自噬的启动和延伸阶段）在细胞内的增加并不是自噬诱导 NLRP3 活化的关键环节。

5. 运用 Baf A1 干预自噬体与溶酶体的结合后，可以加剧锰诱导的自噬体在细胞内的蓄积，但并不能影响 NLRP3 炎症体的活化以及炎性因子的释放，说明自噬体与溶酶体结合及降解阶段的异常也不是锰诱导 NLRP3 炎症体活化的关键因素。

6. 运用 NH₄Cl 抑制溶酶体酸化降低其组织蛋白酶 B 的表达后，抑制了锰暴露诱导的 NLRP3 炎症体活化以及炎性因子的释放。结果证实，溶酶体功能异常以及释放的组织蛋白酶 B 在锰介导 NLRP3 炎症体活化过程中发挥着决定性作用。

参考文献

1. Erikson KM, Syversen T, Aschner JL, Aschner M. Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environmental toxicology and pharmacology* 2005; **19**: 415-21.
2. Inoue T, Majid T, Pautler RG. Manganese enhanced MRI (MEMRI): neurophysiological applications. *Reviews in the neurosciences* 2011; **22**: 675-94.
3. Archibald FS, Tyree C. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of biochemistry and biophysics* 1987; **256**: 638-50.
4. Chen LW, Yung KL, Chan YS. Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease. *Current drug targets* 2005; **6**: 821-33.
5. Cotzias GC, Greenough JJ. The high specificity of the manganese pathway through the body. *J Clin Invest* 1958; **37**: 1298-305.
6. Mena I, Marin O, Fuenzalida S, Cotzias GC. Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover. *Neurology* 1967; **17**: 128-36.
7. Josephs KA, Ahlskog JE, Klos KJ et al. Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity. *Neurology* 2005; **64**: 2033-9.
8. Mergler D, Baldwin M. Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update. *Environmental research* 1997; **73**: 92-100.
9. Pal PK, Samii A, Calne DB. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 1999; **20**: 227-38.
10. Lee JW. Manganese intoxication. *Archives of neurology* 2000; **57**: 597-9.
11. Koller WC, Lyons KE, Truly W. Effect of levodopa treatment for parkinsonism in welders: A double-blind study. *Neurology* 2004; **62**: 730-3.
12. Roth JA. Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganese and parkinsonism. *Neuromolecular Med* 2009; **11**: 281-96.
13. Huang CC, Chu NS, Lu CS et al. Long-term progression in chronic manganese: ten years of follow-up. *Neurology* 1998; **50**: 698-700.
14. Huang CC, Chu NS, Lu CS et al. Chronic manganese intoxication. *Archives of neurology* 1989; **46**: 1104-6.
15. Bouabid S, Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A. Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. *Journal of Neurochemistry* 2016; **136**: 677-91.
16. O'Neal SL, Zheng W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports* 2015; **2**: 315-28.
17. Sikk K, Haldre S, Aquilonius SM, Taba P. Manganese-Induced Parkinsonism due to Ephedrone Abuse. *Parkinson's disease* 2011; **2011**: 865319.
18. Frisbie SH, Ortega R, Maynard DM, Sarkar B. The concentrations of arsenic and other toxic elements in Bangladesh's drinking water. *Environmental health perspectives* 2002; **110**: 1147-53.
19. Khan K, Wasserman GA, Liu X et al. Manganese exposure from drinking water and children's

- academic achievement. *Neurotoxicology* 2012; **33**: 91-7.
20. Khan K, Factor-Litvak P, Wasserman GA et al. Manganese exposure from drinking water and children's classroom behavior in Bangladesh. *Environmental health perspectives* 2011; **119**: 1501-6.
 21. Bouchard M, Laforest F, Vandelac L et al. Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environmental health perspectives* 2007; **115**: 122-7.
 22. Lucchini RG, Guazzetti S, Zoni S et al. Tremor, olfactory and motor changes in Italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission. *Neurotoxicology* 2012; **33**: 687-96.
 23. Rahil-Khazen R, Bolann BJ, Myking A, Ulvik RJ. Multi-element analysis of trace element levels in human autopsy tissues by using inductively coupled atomic emission spectrometry technique (ICP-AES). *J Trace Elem Med Biol* 2002; **16**: 15-25.
 24. Liu Y, Byrne P, Wang H et al. A compact DD neutron generator-based NAA system to quantify manganese (Mn) in bone in vivo. *Physiological measurement* 2014; **35**: 1899-911.
 25. Subramanian KS, Meranger JC. Graphite furnace atomic absorption spectrometry with nitric acid deproteinization for determination of manganese in human plasma. *Analytical chemistry* 1985; **57**: 2478-81.
 26. Krebs N, Langkammer C, Goessler W et al. Assessment of trace elements in human brain using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Trace Elem Med Biol* 2014; **28**: 1-7.
 27. Foradori AC, Bertinchamps A, Gulibon JM, Cotzias GC. The discrimination between magnesium and manganese by serum proteins. *The Journal of general physiology* 1967; **50**: 2255-66.
 28. Aisen P, Aasa R, Redfield AG. The chromium, manganese, and cobalt complexes of transferrin. *J Biol Chem* 1969; **244**: 4628-33.
 29. Aschner M, Gannon M. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain research bulletin* 1994; **33**: 345-9.
 30. Aschner M, Aschner JL. Manganese transport across the blood-brain barrier: relationship to iron homeostasis. *Brain research bulletin* 1990; **24**: 857-60.
 31. Moos T, Morgan EH. The significance of the mutated divalent metal transporter (DMT1) on iron transport into the Belgrade rat brain. *J Neurochem* 2004; **88**: 233-45.
 32. Andersen ME, Gearhart JM, Clewell HJ, 3rd. Pharmacokinetic data needs to support risk assessments for inhaled and ingested manganese. *Neurotoxicology* 1999; **20**: 161-71.
 33. Brenneman KA, Wong BA, Buccellato MA et al. Direct olfactory transport of inhaled manganese ((54)MnCl(2)) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; **169**: 238-48.
 34. Aschner M, Erikson KM, Herrero Hernandez E, Tjalkens R. Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology. *Neuromolecular Med* 2009; **11**: 252-66.
 35. Murphy VA, Wadhvani KC, Smith QR, Rapoport SI. Saturable transport of manganese(II) across the rat blood-brain barrier. *J Neurochem* 1991; **57**: 948-54.
 36. Rabin O, Hegedus L, Bourre JM, Smith QR. Rapid brain uptake of manganese(II) across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 1993; **61**: 509-17.
 37. Schroeder HA, Balassa JJ, Tipton IH. Essential trace metals in man: manganese. A study in homeostasis. *Journal of chronic diseases* 1966; **19**: 545-71.
 38. O'Neal SL, Hong L, Fu S et al. Manganese accumulation in bone following chronic exposure in

- rats: steady-state concentration and half-life in bone. *Toxicology letters* 2014; **229**: 93-100.
39. Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed* 2004; **17**: 544-53.
 40. Jiang Y, Zheng W, Long L et al. Brain magnetic resonance imaging and manganese concentrations in red blood cells of smelting workers: search for biomarkers of manganese exposure. *Neurotoxicology* 2007; **28**: 126-35.
 41. Morello M, Canini A, Mattioli P et al. Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. *Neurotoxicology* 2008; **29**: 60-72.
 42. Herrero Hernandez E, Valentini MC, Discalzi G. T1-weighted hyperintensity in basal ganglia at brain magnetic resonance imaging: are different pathologies sharing a common mechanism? *Neurotoxicology* 2002; **23**: 669-74.
 43. Garcia SJ, Gellein K, Syversen T, Aschner M. A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat. *Toxicol Sci* 2006; **92**: 516-25.
 44. Gwiazda RH, Lee D, Sheridan J, Smith DR. Low cumulative manganese exposure affects striatal GABA but not dopamine. *Neurotoxicology* 2002; **23**: 69-76.
 45. Struve MF, McManus BE, Wong BA, Dorman DC. Basal ganglia neurotransmitter concentrations in rhesus monkeys following subchronic manganese sulfate inhalation. *American journal of industrial medicine* 2007; **50**: 772-8.
 46. Prohaska JR. Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiol Rev* 1987; **67**: 858-901.
 47. Newland MC. Animal models of manganese's neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1999; **20**: 415-32.
 48. Kumar KK, Aboud AA, Patel DK et al. Optimization of fluorescence assay of cellular manganese status for high throughput screening. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 2013; **27**: 42-9.
 49. Kalia K, Jiang W, Zheng W. Manganese accumulates primarily in nuclei of cultured brain cells. *Neurotoxicology* 2008; **29**: 466-70.
 50. Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; **221**: 131-47.
 51. Kwakye G, Paoliello M, Mukhopadhyay S et al. Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease: Shared and Distinguishable Features. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2015; **12**: 7519-40.
 52. Olanow CW. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; **1012**: 209-23.
 53. Avila DS, Benedetto A, Au C et al. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 2012; **52**: 1903-10.
 54. Lebda MA, El-Neweshy MS, El-Sayed YS. Neurohepatic toxicity of subacute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopene. *Neurotoxicology* 2012; **33**: 98-104.
 55. Eller M, Williams DR. alpha-Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2011; **49**: 403-8.
 56. Andre C, Truong TT, Robert JF, Guillaume YC. Effect of metals on herbicides-alpha-synuclein association: a possible factor in neurodegenerative disease studied by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2005; **26**: 3256-64.
 57. Giese A, Levin J, Bertsch U, Kretzschmar H. Effect of metal ions on de novo aggregation of

- full-length prion protein. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; **320**: 1240-6.
58. Jobling MF, Huang X, Stewart LR et al. Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126. *Biochemistry* 2001; **40**: 8073-84.
 59. Levin OS. ["Ephedron" encephalopathy]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni SS Korsakova / Ministerstvo zdavookhraneniia i meditsinskoi promyshlennosti Rossiiskoi Federatsii, Vserossiiskoe obshchestvo nevrologov [i] Vserossiiskoe obshchestvo psikiat* 2005; **105**: 12-20.
 60. Hung YH, Bush AI, Cherny RA. Copper in the brain and Alzheimer's disease. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 2010; **15**: 61-76.
 61. Barron KD. The microglial cell. A historical review. *Journal of the neurological sciences* 1995; **134 Suppl**: 57-68.
 62. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain research Developmental brain research* 1999; **117**: 145-52.
 63. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; **10**: 1387-94.
 64. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 119-45.
 65. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 775-87.
 66. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; **39**: 151-70.
 67. Cuadros MA, Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Progress in neurobiology* 1998; **56**: 173-89.
 68. Davalos D, Grutzendler J, Yang G et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; **8**: 752-8.
 69. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological psychiatry* 2015; **77**: 43-51.
 70. Gjoneska E, Pfenning AR, Mathys H et al. Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature* 2015; **518**: 365-9.
 71. Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* 2009; **64**: 110-22.
 72. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology* 2013; **39**: 3-18.
 73. Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. *Developmental neuroscience* 2011; **33**: 199-209.
 74. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 2012; **493**: 674-8.
 75. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis* 2011; **42**: 360-7.
 76. Cho SH, Sun B, Zhou Y et al. CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2011; **286**: 32713-22.

77. Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 2014; **7**: 1028-48.
78. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 2001; **101**: 249-55.
79. Wakselman S, Bechade C, Roumier A et al. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 2008; **28**: 8138-43.
80. Dentesano G, Straccia M, Ejarque-Ortiz A et al. Inhibition of CD200R1 expression by C/EBP beta in reactive microglial cells. *J Neuroinflammation* 2012; **9**: 165.
81. Zhao F, Cai T, Liu M et al. Manganese Induces Dopaminergic Neurodegeneration via Microglial Activation in a Rat Model of Manganism. *Toxicological Sciences* 2008; **107**: 156-64.
82. Shi F, Yang L, Kouadir M et al. The NALP3 inflammasome is involved in neurotoxic prion peptide-induced microglial activation. *J Neuroinflammation* 2012; **9**: 73.
83. Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2014; **15**: 84-97.
84. Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci* 2009; **29**: 3518-28.
85. Eyo UB, Wu LJ. Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural Plast* 2013; **2013**: 456857.
86. Samuels SE, Lipitz JB, Dahl G, Muller KJ. Neuroglial ATP release through innexin channels controls microglial cell movement to a nerve injury. *The Journal of general physiology* 2010; **136**: 425-42.
87. Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2010; **7**: 354-65.
88. Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS letters* 2011; **585**: 3798-805.
89. Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *Journal of neuroscience research* 2005; **81**: 302-13.
90. Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 1998; **22**: 72-85.
91. Smith ME, Hoerner MT. Astrocytes modulate macrophage phagocytosis of myelin in vitro. *Journal of neuroimmunology* 2000; **102**: 154-62.
92. Downer EJ, Cowley TR, Cox F et al. A synthetic NCAM-derived mimetic peptide, FGL, exerts anti-inflammatory properties via IGF-1 and interferon-gamma modulation. *J Neurochem* 2009; **109**: 1516-25.
93. Downer EJ, Cowley TR, Lyons A et al. A novel anti-inflammatory role of NCAM-derived mimetic peptide, FGL. *Neurobiology of aging* 2010; **31**: 118-28.
94. Aloisi F, De Simone R, Columba-Cabezas S et al. Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *J Immunol* 2000; **164**: 1705-12.
95. Fujita H, Tanaka J, Maeda N, Sakanaka M. Adrenergic agonists suppress the proliferation of microglia through beta 2-adrenergic receptor. *Neuroscience letters* 1998; **242**: 37-40.

96. Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci* 2006; **26**: 3813-20.
97. Kiyota T, Okuyama S, Swan RJ et al. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010; **24**: 3093-102.
98. Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012; **2**: a006346.
99. Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A et al. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPARgamma agonist rosiglitazone. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2013; **44**: 3498-508.
100. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature reviews Molecular cell biology* 2003; **4**: 95-104.
101. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 991-1045.
102. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology* 2007; **28**: 429-36.
103. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 2008; **28**: 285-7.
104. Gross O, Poeck H, Bscheider M et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 2009; **459**: 433-6.
105. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G et al. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Current biology : CB* 2007; **17**: 1140-5.
106. Watanabe H, Gaide O, Petrilli V et al. Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *The Journal of investigative dermatology* 2007; **127**: 1956-63.
107. Poyet JL, Srinivasula SM, Tnani M et al. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 2001; **276**: 28309-13.
108. Jiang W, Lv H, Wang H et al. Activation of the NLRP3/caspase-1 inflammasome in human dental pulp tissue and human dental pulp fibroblasts. *Cell Tissue Res* 2015; **361**: 541-55.
109. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; **440**: 228-32.
110. Mayor A, Martinon F, De Smedt T et al. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol* 2007; **8**: 497-503.
111. Kahlenberg JM, Dubyak GR. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *American journal of physiology Cell physiology* 2004; **286**: C1100-8.
112. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 2007; **26**: 433-43.
113. Halle A, Hornung V, Petzold GC et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature Immunology* 2008; **9**: 857-65.
114. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008; **9**: 847-56.

115. Dostert C, Guarda G, Romero JF et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One* 2009; **4**: e6510.
116. Newman ZL, Leppla SH, Moayeri M. CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. *Infect Immun* 2009; **77**: 4327-36.
117. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 9035-40.
118. Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology* 2016; **13**: 148-59.
119. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell* 1997; **90**: 797-807.
120. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular cell* 2003; **11**: 591-604.
121. Shoham NG, Centola M, Mansfield E et al. Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 13501-6.
122. Xue Y, Daly A, Yngvadottir B et al. Spread of an inactive form of caspase-12 in humans is due to recent positive selection. *American journal of human genetics* 2006; **78**: 659-70.
123. Takaoka A, Wang Z, Choi MK et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007; **448**: 501-5.
124. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; **458**: 514-8.
125. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 629-40.
126. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y et al. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *The Journal of experimental medicine* 2009; **206**: 79-87.
127. Duncan JA, Gao X, Huang MT et al. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J Immunol* 2009; **182**: 6460-9.
128. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009; **458**: 509-13.
129. Ramos HJ, Lanteri MC, Blahnik G et al. IL-1beta signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1003039.
130. Kumar M, Roe K, Orillo B et al. Inflammasome adaptor protein Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) is critical for the immune response and survival in west Nile virus encephalitis. *J Virol* 2013; **87**: 3655-67.
131. Zaremba J, Losy J. Interleukin-18 in acute ischaemic stroke patients. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 2003; **24**: 117-24.
132. Qu Y, Misaghi S, Newton K et al. Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol* 2011; **186**: 6553-61.
133. Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ et al. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J Neurosci* 2010; **30**: 15811-20.

134. Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 2001; **21**: 7046-52.
135. Gris D, Ye Z, Iocca HA et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol* 2010; **185**: 974-81.
136. Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T et al. Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One* 2013; **8**: e55375.
137. Craft JM, Watterson DM, Hirsch E, Van Eldik LJ. Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. *J Neuroinflammation* 2005; **2**: 15.
138. Shaftel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA et al. Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1595-604.
139. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 2007; **282**: 2871-9.
140. Shpilka T, Welter E, Borovsky N et al. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. *The EMBO journal* 2015; **34**: 2117-31.
141. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research* 2014; **24**: 92-104.
142. Boland B, Kumar A, Lee S et al. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2008; **28**: 6926-37.
143. Cardenas C, Miller RA, Smith I et al. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell* 2010; **142**: 270-83.
144. Dooley HC, Razi M, Polson HE et al. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell* 2014; **55**: 238-52.
145. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; **451**: 1069-75.
146. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 2013; **495**: 389-93.
147. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Current biology : CB* 2012; **22**: R29-34.
148. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell* 2009; **20**: 1981-91.
149. Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 2012; **150**: 1196-208.
150. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R et al. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010; **141**: 290-303.
151. Benjamin D, Hall MN. mTORC1: turning off is just as important as turning on. *Cell* 2014; **156**: 627-8.
152. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; **149**: 274-93.
153. Deng S, Wang M, Yan Z et al. Autophagy in retinal ganglion cells in a rhesus monkey chronic

- hypertensive glaucoma model. *PLoS One* 2013; **8**: e77100.
154. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of cell science* 2004; **117**: 2805-12.
155. Moreau K, Fleming A, Imarisio S et al. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun* 2014; **5**: 4998.
156. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A et al. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology* 2005; **171**: 87-98.
157. Sarkar S, Floto RA, Berger Z et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of cell biology* 2005; **170**: 1101-11.
158. Rubinsztein DC, Bento CF, Deretic V. Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases. *The Journal of experimental medicine* 2015; **212**: 979-90.
159. Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM et al. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Human molecular genetics* 2006; **15**: 433-42.
160. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human molecular genetics* 2002; **11**: 1107-17.
161. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J et al. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 2003; **278**: 25009-13.
162. Lam KK, Zheng X, Forestieri R et al. Nitazoxanide stimulates autophagy and inhibits mTORC1 signaling and intracellular proliferation of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002691.
163. Mealer RG, Murray AJ, Shahani N et al. Rhes, a striatal-selective protein implicated in Huntington disease, binds beclin-1 and activates autophagy. *J Biol Chem* 2014; **289**: 3547-54.
164. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T et al. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function* 1998; **23**: 33-42.
165. Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST et al. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Current biology : CB* 2007; **17**: 1561-7.
166. Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA. The Cl⁻/H⁺ antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* 2008; **453**: 788-92.
167. Leisle L, Ludwig CF, Wagner FA et al. CIC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl⁻/1H⁺-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *The EMBO journal* 2011; **30**: 2140-52.
168. Rybalchenko V, Ahuja M, Coblentz J et al. Membrane potential regulates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) dependence of the pH- and Ca²⁺-sensitive organellar two-pore channel TPC1. *J Biol Chem* 2012; **287**: 20407-16.
169. Breton S, Brown D. Regulation of luminal acidification by the V-ATPase. *Physiology (Bethesda, Md)* 2013; **28**: 318-29.
170. Maxson ME, Grinstein S. The vacuolar-type H⁺-ATPase at a glance - more than a proton pump. *Journal of cell science* 2014; **127**: 4987-93.
171. Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang HG. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One* 2010; **5**: e15394.
172. Kim SH, Munemasa Y, Kwong JM et al. Activation of autophagy in retinal ganglion cells. *Journal of neuroscience research* 2008; **86**: 2943-51.

173. Billington RA, Genazzani AA, Travelli C, Condorelli F. NAD depletion by FK866 induces autophagy. *Autophagy* 2008; **4**: 385-7.
174. Hanamsagar R, Torres V, Kielian T. Inflammasome activation and IL-1beta/IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia. *J Neurochem* 2011; **119**: 736-48.
175. Scharl M, McCole DF, Weber A et al. Protein tyrosine phosphatase N2 regulates TNFalpha-induced signalling and cytokine secretion in human intestinal epithelial cells. *Gut* 2011; **60**: 189-97.
176. Chuang SY, Yang CH, Chou CC et al. TLR-induced PAI-2 expression suppresses IL-1beta processing via increasing autophagy and NLRP3 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 16079-84.
177. Scharl M, Hruz P, McCole DF. Protein tyrosine phosphatase non-receptor Type 2 regulates IFN-gamma-induced cytokine signaling in THP-1 monocytes. *Inflammatory bowel diseases* 2010; **16**: 2055-64.
178. Saitoh T, Fujita N, Jang MH et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 2008; **456**: 264-8.
179. Hazell AS, Normandin L, Norenberg MD et al. Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. *Neuroscience letters* 2006; **396**: 167-71.
180. Liao SL, Ou YC, Chen SY et al. Induction of cyclooxygenase-2 expression by manganese in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 2007; **50**: 905-15.
181. Chang JY, Liu LZ. Manganese potentiates nitric oxide production by microglia. *Brain research Molecular brain research* 1999; **68**: 22-8.
182. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**: 57-69.
183. Filipov NM, Seegal RF, Lawrence DA. Manganese potentiates in vitro production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *Toxicol Sci* 2005; **84**: 139-48.
184. Bae JH, Jang BC, Suh SI et al. Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells. *Neuroscience letters* 2006; **398**: 151-4.
185. Kim J, Kim JM, Kim YK et al. Dopamine transporter SPECT of a liver cirrhotic with atypical parkinsonism. *Industrial health* 2007; **45**: 497-500.
186. Dodd CA, Filipov NM. Manganese potentiates LPS-induced heme-oxygenase 1 in microglia but not dopaminergic cells: role in controlling microglial hydrogen peroxide and inflammatory cytokine output. *Neurotoxicology* 2011; **32**: 683-92.
187. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 2010; **37**: 510-8.
188. Jang BC. Induction of COX-2 in human airway cells by manganese: role of PI3K/PKB, p38 MAPK, PKCs, Src, and glutathione depletion. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2009; **23**: 120-6.
189. Bowman AB, Kwakye GF, Herrero Hernandez E, Aschner M. Role of manganese in neurodegenerative diseases. *J Trace Elem Med Biol* 2011; **25**: 191-203.
190. Afeseh Ngwa H, Kanthasamy A, Gu Y et al. Manganese nanoparticle activates mitochondrial

- dependent apoptotic signaling and autophagy in dopaminergic neuronal cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; **256**: 227-40.
191. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 2014; **14**: 463-77.
192. Hafner-Bratkovic I, Bencina M, Fitzgerald KA et al. NLRP3 inflammasome activation in macrophage cell lines by prion protein fibrils as the source of IL-1beta and neuronal toxicity. *Cell Mol Life Sci* 2012; **69**: 4215-28.
193. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; **140**: 821-32.
194. Yamasaki K, Muto J, Taylor KR et al. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem* 2009; **284**: 12762-71.
195. Hoegen T, Tremel N, Klein M et al. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol* 2011; **187**: 5440-51.
196. Kiriyama Y, Nochi H. The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 26797-812.
197. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011; **469**: 323-35.
198. Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain* 2008; **131**: 1969-78.
199. Wang C, Chen S, Yeo S et al. Correction: Elevated p62/SQSTM1 determines the fate of autophagy-deficient neural stem cells by increasing superoxide. *The Journal of cell biology* 2016; **212**: 879.

个人简历和研究成果

个人信息:

姓 名: 王迪雅

性 别: 女

民 族: 汉

出生年月: 1988 年 08 月

籍 贯: 山西省方山县

学习及工作经历:

2006.09-2010.06 第三军医大学 学士

2010.09-2013.06 第四军医大学军事预防医学系劳动与环境卫生学教研室 硕士

2013.09-至今 第四军医大学军事预防医学系劳动与环境卫生学教研室 博士

研究成果及发表论文情况:

1. Xingshun Qi , **Diya Wang** ,Chunping Su, Hongyu Li ,Xiaozhong Guo .Hepatic resection versus transarterial chemoembolization for the initial treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. Oncotarget; IF:6.359 (共同第一作者)
2. Wenkai Jiang, Haipeng Lv, Haijing Wang, **Diya Wang**, Shukai Sun, Qian Jia, Peina Wang, Bing song, Longxing Ni. Activation of the NLRP3/caspase-1 inflammasome in human dental pulp tissue and human dental pulp fibroblasts. Cell and Tissue Research; IF:3.5
3. Xingshun Qi , Lei Liu , **Diya Wang** , Hongyu Li , Chunping Su , Xiaozhong Guo .Hepatic resection alone versus in combination with pre- and post-operative transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. Oncotarget ; IF:6.359 (共同第一作者)

4. Peng Su ,jianbin Zhang , Siwang Wang , Michael Aschner , Zipeng Cao, Fang Zhao , **Diya Wang**, Jingyuan Chen, Wenjing Luo. Genistein alleviates lead-induced neurotoxicity in vitro and in vivo: Involvement of multiple signaling pathways. *Neurotoxicology* ; IF:3.379
5. **Diya Wang**, Jianbin Zhang, Wenkai Jiang, Zipeng Cao, Tongjian Cai, Michael Aschner, Wenjing Luo. The role of NLRP3/caspase-1 inflammasome mediated neuroinflammation and autophagy dysfunction in Manganese-induced hippocampal-dependent impairment of learning and memory ability. *Autophagy*; IF: 11.753 (under review)
6. 维生素 E 抑制锰诱导的 PC12 细胞毒性的实验研究。王迪雅，蔡同建，赵芳，姚婷，陈景元，骆文静【J】实用预防医学，2012.10
7. NLRP3/Caspase-1 炎症体通路在人牙髓成纤维细胞中表达的初步检测。蒋文凯，童忠春，王迪雅，倪龙兴。【J】牙体牙髓牙周病学杂志，2013.1

参与国科金：

1. 课题名称：低剂量铅锰联合暴露致学习记忆损伤的机制研究
课题来源：国家自然科学基金重点项目
课题编号：81230063
课题负责人：陈景元
2. 课题名称：p21 在锰诱导的小胶质细胞活化中的作用及机制研究
课题来源：国家自然科学基金青年项目
课题编号：81001256
课题负责人：赵芳

致 谢

我喜欢五月，因为从 2010 年入校开始硕士生涯后，每年的这个时候我都看着师兄师姐们忙碌而充实的准备着自己的毕业，细心整理的实验结果，精心书写的大论文，用心制作的答辩幻灯，仿佛注定了这将是如夏花一样灿烂的收获的季节。回首我的硕士博士生活，六年的时间成就了我从对科研的茫然对实验的不理解到现今的升华。而促使我蜕变的核心力量就是我敬爱的导师骆文静教授，她用她严谨的科研态度，求真求实的科研理念，孜孜不倦的引领着我，指导着我。她不仅关心我们的课题进程，也关心我们的生活点滴，不仅为我们在实验中遇到的瓶颈找出路想办法，也为我们在日常生活中遇到的困难费心力谋对策，所以一直以来她不仅作为导师指导我们的课题工作，更像亲人一样关心我们的成长。所以在这里我要衷心的感谢她，希望我这个学生有朝一日也能够成为她的骄傲。感谢陈景元主任为学科平台建设付出的心血、以及一直以来的对我的关心与帮助。我还要感谢劳卫大家庭中的每一位成员，他们见证了我从初出大学校园的稚嫩到现在的成长，并且在我成长的道路上给予了我温暖的关心与帮助，也是因为有大家的帮助才有现在顺利完成学业的我，尤其要感谢我的辅导老师张建彬博士，感谢他一直以来对我的关心与帮助，他用他敏锐的科研思路、严谨的科研态度以及完善的实验技术耐心指导我在科研道路上的每一步。

最后，我要由衷的感谢我亲爱的家人，我的父亲王临平、母亲苏春萍用他们的爱与包容为我提供了温暖的家的港湾，在我生活上遇到困难，实验遇到问题，课题进行不顺、心情烦躁时，他们永远耐心的做我的坚强后盾，为我成长的每一步保驾护航，也一直用他们无私的爱支持着我，鼓励着我。父母的爱永远是最无私最无限的，硕士博士这 6 年的时间见证了我的成长更见证了我的父亲母亲为我的成长而操碎的心，所以我一定会更加努力，让自己在今后有能力为他们遮挡风雨。我还要感谢我亲爱的婆婆李晓红，以及我已故的公公蒋晓明，我的公公是第四军医大学 79 级的毕业生，一直以来他对工作的认真对家庭热爱都是我们学习的榜样，公公的突然离世为我们全家带来了无限的伤感与遗憾，而我们又因为学业的忙碌无法长期陪伴

我的婆婆，但是她用她的坚强努力的过好每一天，让我和爱人能够全身心投入学业与工作，同样用她无私的爱支持我和爱人的生活与工作。最后要感谢的是我的爱人蒋文凯博士，我们从硕士阶段在一起到博士阶段结婚，六年的时间见证了我们从爱情到亲情的矢志不渝，不论生活上工作上遇到多大的困难他都守护着我，陪伴着我。生活中他照顾我、爱护我，工作中他尽全力给予我课题的建议与实验的帮助，用他的耐心为我解决实际困难与问题。因为有你们，我也会更加努力，让我成为更好的自己！