

· 论 著 ·

敲除大麻素 II 型受体影响 APP/PS1 小鼠前额叶皮质小胶质细胞功能与激活 PI3K/Akt/mTOR 通路有关

袁蜜蜜¹, 刘坤璐¹, 陈美桦¹, 陈浩正¹, 史敬璞², 李 锦¹, 孙家广³, 王 勃¹

(1. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850;
2. 河北医科大学第四医院麻醉科, 河北 石家庄 050000; 3. 邢台市人民医院麻醉科, 河北 邢台 054000)

摘要:目的 研究大麻素 II 型受体(CB2R)基因敲除对阿尔茨海默病(AD)小鼠发病前期空间学习与记忆能力的影响,并从分子水平探讨可能的作用机制。方法 C57BL6/J 小鼠根据基因型分为野生型对照组(WT)、CB2R 敲除组(CB2^{-/-}),模型组(APP/PS1)和模型+CB2R 敲除组(APP/PS1*CB2^{-/-}),采用 Morris 水迷宫实验检测 4 月龄小鼠的空间学习与记忆能力,ELISA 检测小鼠脑内 β 淀粉样蛋白(A β)₁₋₄₂和 A β ₁₋₄₀含量,实时荧光定量 PCR 法检测前额叶皮质和海马脑区炎症因子白细胞介素 6(IL-6),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达水平,免疫荧光法检测小胶质细胞形态变化,Western 印迹法检测小鼠脑内炎症相关信号通路中磷酸酰肌醇 3 激酶(PI3K)蛋白表达水平及蛋白激酶 B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)蛋白磷酸化水平。结果 与 APP/PS1 组相比,APP/PS1*CB2^{-/-}组小鼠在 Morris 水迷宫实验中的潜伏期、目标象限停留时间和穿台次数无显著差异,提示 CB2R 敲除并不影响 APP/PS1 小鼠的空间学习与记忆能力;与 APP/PS1 组相比,APP/PS1*CB2^{-/-}组小鼠前额叶皮质 A β ₁₋₄₂含量和 IL-6 mRNA 表达水平均显著性升高($P < 0.05$);APP/PS1 组小鼠前额叶皮质小胶质细胞形态呈阿米巴状样,APP/PS1*CB2^{-/-}组小鼠小胶质细胞形态发生明显改变,呈细长分支状;与 APP/PS1 组小鼠相比,APP/PS1*CB2^{-/-}组小鼠前额叶皮质 PI3K 蛋白表达水平及 Akt 和 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高($P < 0.05$),ERK1/2 和 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平无显著差异。结论 CB2R 敲除影响 APP/PS1 小鼠前额叶皮质小胶质细胞的功能,可能与激活 PI3K/Akt/mTOR 通路有关。

关键词: 大麻素 II 型受体; 阿尔茨海默病; 小胶质细胞; 神经源性炎症

中图分类号: R964, R963

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)09-0649-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.09.002

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种常见的神经退行性疾病。据估计,AD 患者占全世界痴呆病例的 60%~70%。神经源性炎症是 AD 发病早期的一个重要原因^[1],AD 患者中炎症标志物水平升高及与天然免疫功能相关的 AD 风险基因的确认,均表明神经炎症在 AD 发病机制中发挥重要作用^[2]。小胶质细胞是中枢神经系统的主要免疫细胞,在维持中枢神经系统稳态、调控神经发生和调节突触功能等方面发挥重要作用^[3]。越来越多的研究表明,小胶质细胞及其参与的神经炎症在

AD 发生发展过程中发挥至关重要的作用^[2,4],且小胶质细胞的不同表型在 AD 不同发展阶段可发挥不同的作用^[5],通过调整 AD 不同发展阶段不同脑区小胶质细胞的表型以改善 AD 症状已成为治疗 AD 的一种策略^[2]。

内源性大麻素系统(endocannabinoid system, EC)包括大麻素 I 型受体(cannabinoid receptor type 1, CB1R)和 CB2R、内源性大麻素及合成与分解这些化合物的酶^[6]。CB2R 主要存在于外周循环免疫细胞、脾细胞和巨噬细胞等。AD 模型小鼠脑内出现炎症或应激损伤时,小胶质细胞 CB2R 特异性高表达^[7-8]。

本课题组前期研究结果发现,CB2R 激动剂 JWH-015 可通过调节小胶质细胞介导的脑内炎症反应,参与 AD 模型小鼠(APP/PS1 小鼠)学习和记

基金项目:国家自然科学基金(81471233)

作者简介:袁蜜蜜,硕士研究生,主要从事神经精神药理学研究,E-mail:M137814@126.com

通讯作者:王 勃,E-mail:wangbo1@bmi.ac.cn;孙家广,E-mail:369978012@qq.com

忆能力的改变^[9]。本研究用敲除 *CB2R* 的 APP/PS1 小鼠模型探讨 AD 发病早期 *CB2R* 对 AD 模型小鼠学习与记忆能力的影响及其可能的分子机制,并尝试为 AD 的早期预防提供有益线索。

1 材料与方法

1.1 试剂和主要仪器

鼠尾裂解液和 DNA Marker,北京博迈德公司; 2×Taq PCR Master Mix,美国 ApexBio 公司;蛋白激酶 K,美国 Merck 公司;琼脂糖,北京擎科生物公司;Star Green safe Nucleic Acid Dye,北京康润诚业公司;PCR 引物,上海生工生物公司;人 β 淀粉样蛋白 1-40 (amyloid β -protein 1-40, $A\beta_{1-40}$) 和人 $A\beta_{1-42}$ ELISA 试剂盒,美国 Invitrogen 公司;RNA 提取试剂盒,德国 Qiagen 公司;逆转录试剂盒,日本 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 预混液 (Power Up SYBR Green Master Mix) 试剂盒,美国 Sigma 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝公司;Triton-100、Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(二抗)和封片剂(含 DAPI),北京中杉金桥公司;兔抗小鼠磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、磷酸化 Akt (phosphorylated-Akt, p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTOR、细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)、p-ERK1/2、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、p-p38 MAPK 和 β 肌动蛋白单克隆抗体(一抗)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(二抗),美国 CST 公司;兔抗小鼠离子钙接头蛋白 1 (ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1) 多克隆抗体(一抗),日本 Wako 公司。

Morris 水迷宫实验系统 (SLY-WMS),北京翰林苑公司;梯度 PCR 扩增仪 (Veriti™ 96 - Well Thermal Cycler),美国 Thermo 公司;实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96™ Optics Module),美国 Bio-Rad 公司;多功能酶标仪 (Synergy H1),美国 Bio Tek 公司;恒温冰冻切片机 (CM 1950),德国莱卡公司;激光共聚焦显微镜 (LSM 880),德国 Carl Zeiss 公司。

1.2 实验动物

APP/PS1 转基因小鼠 (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})

和全身性 *CB2R* 基因敲除 (*Cnr2*^{tm1Dgen/J}, *CB2*^{-/-}) 小鼠,雄性,体重 24~26 g,均购自美国 Jackson 实验室。APP/PS1 小鼠与 *CB2*^{-/-} 小鼠交配获得 APP/PS1**CB2*^{-/-} 小鼠,野生型 (wild type, WT) 对照小鼠为 C57BL/6/J 背景下非转基因同窝小鼠。小鼠由军事科学院军事医学研究院实验动物中心饲养繁殖,饲养环境温度 20~22℃,湿度 40%~60%,12/12 h 明暗循环,光照时间 8:00~20:00,小鼠每笼 5~6 只,自由摄食饮水。所有实验遵循军事科学院军事医学研究院实验动物伦理委员会的规定。

1.3 小鼠基因型鉴定

小鼠出生约 21 d 时,剪下 2~3 mm 鼠尾,加入鼠尾裂解液、20 g·L⁻¹ 蛋白激酶 K 和 β -巯基乙醇,55℃ 水浴过夜。逆转录 PCR 反应体系包括 2×Taq PCR Master Mix,上、下游引物 10 μ mol·L⁻¹ 和 DNA 模板。扩增条件:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,58℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 2 min。基因引物序列见表 1,扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。逆转录 PCR 扩增后基因型片段中 *CB2*^{+/+} 引物扩增产物长度约为 385 bp 的为 WT 小鼠;*CB2*^{-/-} 引物扩增产物长度约为 550 bp 的为 *CB2*^{-/-} 小鼠; β 淀粉样前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 引物扩增长度约为 377 bp,早老素 1 (presenilin-1, PS1) 引物扩增长度约为 608 bp,同时 377, 385 和 608 bp 3 条电泳条带均存在的为 APP/PS1 小鼠;而同时 377, 550 和 608 bp 3 条电泳条带均存在的为 APP/PS1**CB2*^{-/-} 小鼠。

Tab.1 Primers used in reverse transcription PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
APP	F: AGGACTGACCACTCGACCAG
	R: CGGGGGTCTAGTTCTGCAT
PS1	F: AATAGAGAACGGCAGGAGCA
	R: GCCATGAGGGCACTAATCAT
<i>CB2</i> ^{+/+}	F: GGAGTTCAACCCCATGAAGGAGTAC
	R: GACTAGAGCTTTGTAGGTAGGCGGG
<i>CB2</i> ^{-/-}	F: GGGGATCGATCCGTCCTGTAAGTCT
	R: GACTAGAGCTTTGTAGGTAGGCGGG

APP: β -amyloid precursor protein; PS1: presenilin-1; *CB2*^{+/+}: cannabinoid receptor type 2 (*CB2*) wild type; *CB2*^{-/-}: *CB2* mutant.

1.4 实验分组

实验小鼠按照基因型分组,分为 WT 组、*CB2R* 敲除组 (*CB2*^{-/-})、模型组 (APP/PS1) 和模型+*CB2R* 敲除组 (APP/PS1**CB2*^{-/-}),每组 10 只。饲养到 4 月龄时进行 Morris 水迷宫实验。结束行为实验,各组小鼠在麻醉、生理盐水灌流后,分别取前额叶皮质

和海马脑区,液氮速冻,-80℃保存,用于组织蛋白和基因表达水平的检测。

1.5 Morris 水迷宫实验

连续 5 d,每天 4 次将小鼠分别从 Morris 水迷宫 4 个象限边缘中点面壁放入水中,令其自由探索,寻找平台。在 60 s 内,若小鼠登上平台并停留 10 s,视为成功登上平台,并记录潜伏期;若未能成功登上平台,则人工将小鼠引导至平台,并停留 10 s,其潜伏期记录为 60 s。小鼠每天进入水迷宫的象限随机且不同,计算每天 4 次训练的平均潜伏期。第 6 天时去除水下平台,从第 III 象限将小鼠放入水池内,记录 60 s 内穿过原隐藏平台位置的次数和目标象限的停留时间^[10]。

1.6 ELISA 检测小鼠前额叶皮质和海马 A β 含量

取冰冻的脑组织匀浆,4℃,5000×g 离心 5 min,取上清液,依照 ELISA 试剂盒说明书检测前额叶皮质和海马中 A β ₁₋₄₂ 和 A β ₁₋₄₀ 含量。

1.7 RT-qPCR 检测小鼠脑内炎症因子 IL-6, TNF- α 和 iNOS mRNA 表达水平

用 RNA 提取试剂盒提取小鼠前额叶皮质和海马脑区的总 RNA,逆转录为 cDNA。RT-qPCR 反应参照预混液使用说明进行,引物序列见表 2。扩增条件:95℃预变性 1 min;95℃变性 45 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 20 s,40 个循环;72℃延伸 10 min。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算待测基因 mRNA 相对表达水平。

Tab.2 Primers used in real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR)

Gene	Primer sequence(5'-3')
IL-6	F: TGCAAGAGACTTCCATCCAGTT
	R: GAAGTAGGGAAGGCCGTGG
TNF- α	F: GCACCACCATCAAGGACTC
	R: TGAGACAGAGGCAACCTGAC
iNOS	F: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
	R: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC
GAPDH	F: ACTCCACTCACGGCAAATTC
	R: TCTCCATGGTGGTGAAGACA

IL-6: interleukin-6; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; iNOS: inducible nitric oxide synthase; GAPDH: glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase.

1.8 免疫荧光法检测小胶质细胞形态

行为学实验结束后,将小鼠麻醉,4% 多聚甲醛灌流后取全脑。4% 多聚甲醛固定 6 h,蔗糖溶液梯度脱水,冰冻切片(厚度 20 μ m)。快速抗原修复液修复 10 min, PBS 洗 3 次,加兔抗小鼠 Iba1 抗体(1:50)4℃孵育过夜, PBST 洗 3 次,加 Alexa Fluor 488

标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:100),室温避光孵育 1 h, PBST 洗 3 次,最后用含 DAPI 的封片剂封片固定,使用 LSM 880 激光共聚焦拍照。

1.9 Western 印迹法检测小鼠脑内炎症信号通路相关蛋白表达水平

取小鼠前额叶皮质组织提取总蛋白,用 BCA 试剂盒进行定量,用 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入一抗(抗 PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38 MAPK、p38 MAPK 和 β 肌动蛋白抗体,稀释比均为 1:5000)4℃孵育过夜。清洗后,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:5000),室温孵育 1 h, ECL 显色,凝胶成像系统显影拍照,用 Image J 软件分析蛋白条带积分吸光度值。以目的蛋白条带与内参蛋白条带积分吸光度比值表示目的蛋白相对表达水平,以磷酸化蛋白条带与其总蛋白条带积分吸光度比值表示蛋白磷酸化水平。

1.10 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.3.0 软件进行实验结果数据的统计学分析和作图,计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用双因素方差分析进行差异显著性检验,采用 Turkey 检验进行组间两两比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果

小鼠基因型鉴定结果如图 1 所示,1 和 2 号小鼠出现 385 bp 的特异性条带,为 WT 小鼠;3 和 4 号小鼠出现 550 bp 的特异性条带,为 CB2^{-/-} 小鼠;5 和 6 号小鼠分别出现 377,608 和 385 bp 的特异性条带,为 APP/PS1 小鼠;7 和 8 号小鼠分别出现 377,608 和 550 bp 的特异性条带,为 APP/PS1*CB2^{-/-} 小鼠。

2.2 CB2R 敲除不影响 APP/PS1 小鼠空间学习与记忆能力

Morris 水迷宫实验结果(图 2)显示,与 WT 组相比,CB2^{-/-} 小鼠潜伏期、目标象限停留时间和穿越平台次数均无统计学差异;与 APP/PS1 组相比,APP/PS1*CB2^{-/-} 小鼠潜伏期、目标象限停留时间和穿越平台次数亦均无统计学差异。由此提示,CB2R 敲除不影响 APP/PS1 小鼠的空间学习与记忆能力。

2.3 CB2R 敲除升高 APP/PS1 小鼠前额叶皮质 A β ₁₋₄₂ 含量

ELISA 结果(图 3)显示,与 WT 小鼠相比,APP/PS1

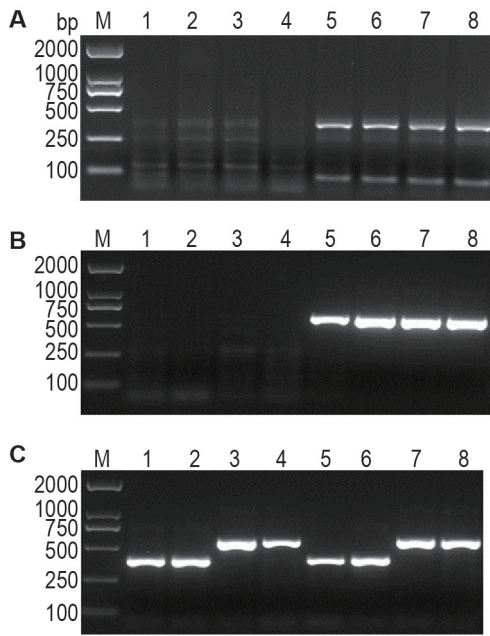


Fig.1 Genotype identification of mice by primers of **APP(A)**, **PS1(B)** and **CB2(C)** by reverse transcription PCR. M: marker; lanes 1–2: mice of wild type mice; lanes 3–4: mice of $CB2^{-/-}$ mice; lanes 5–6: APP/PS1 mice; lanes 7–8: APP/PS1* $CB2^{-/-}$ mice.

小鼠前额叶皮质和海马中 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 含量均显著升高 ($P < 0.01$)；与 $CB2^{-/-}$ 小鼠相比，APP/PS1* $CB2^{-/-}$ 小鼠前额叶皮质和海马中 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 含量均显著升高 ($P < 0.01$)；与 APP/PS1 小鼠相比，APP/PS1* $CB2^{-/-}$ 小鼠前额叶皮质中 $A\beta_{1-42}$ 含量显著升高 ($P < 0.05$)，海马中 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 含量无统计学差异。

2.4 $CB2R$ 敲除升高 APP/PS1 小鼠前额叶皮质 $IL-6$ mRNA 表达水平

RT-qPCR 结果(图 4)显示，与 $CB2^{-/-}$ 小鼠相比，APP/PS1* $CB2^{-/-}$ 小鼠前额叶皮质 $IL-6$ mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)；与 APP/PS1 小鼠相比，

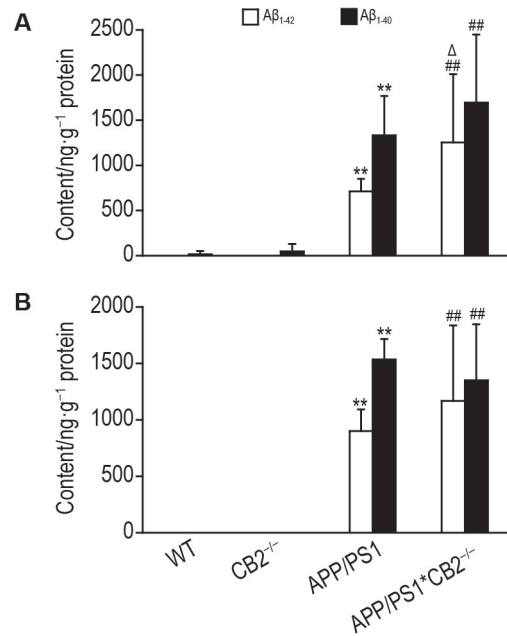


Fig.3 Effect of $CB2R$ knockout on contents of amyloid β -protein 1-42 ($A\beta_{1-42}$) and $A\beta_{1-40}$ in prefrontal cortex (A) and hippocampus (B) of WT and APP/PS1 mice by ELISA. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. ** $P < 0.01$, compared with WT group; ## $P < 0.01$, compared with $CB2^{-/-}$ group; $\Delta P < 0.05$, compared with APP/PS1 group.

APP/PS1* $CB2^{-/-}$ 小鼠前额叶皮质 $IL-6$ mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)，海马 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $iNOS$ mRNA 表达水平无统计学差异。

2.5 $CB2R$ 敲除改变 APP/PS1 小鼠前额叶皮质小胶质细胞形态

免疫荧光检测结果(图 5)显示，WT 组小鼠前额叶皮质小胶质细胞胞体较小，突起呈现较长的分支状结构。 $CB2^{-/-}$ 组小胶质细胞形态无明显差异。APP/PS1 组小胶质细胞的胞体较大，突起和分支变短变粗，呈现出阿米巴状样形态。APP/PS1* $CB2^{-/-}$ 组小胶质细胞形态有明显差异，胞体较小，突起明显以细、长分支结构为主。

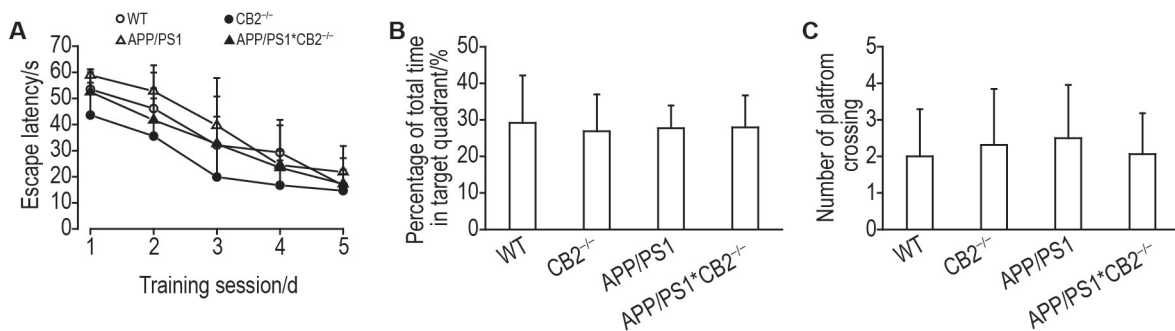


Fig.2 Effect of $CB2R$ knockout on escape latency (A), percentage of total time spent in target quadrant (B) and numbers of platform crossing (C) in WT and APP/PS1 mice by Morris water maze test. $\bar{x} \pm s$, $n=8$.

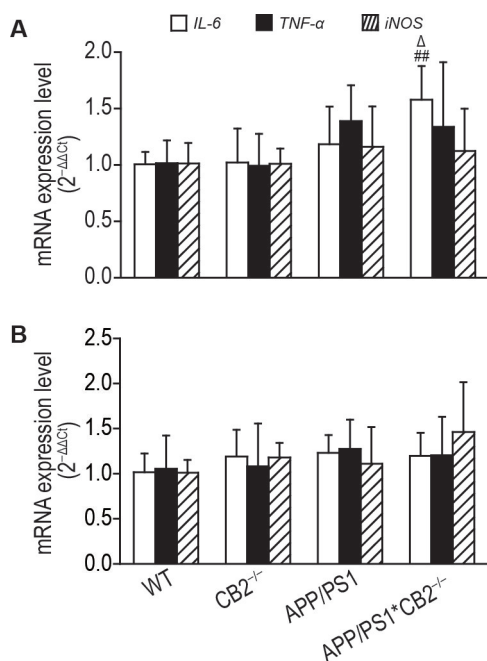


Fig.4 Effect of *CB2R* knockout on mRNA expressions of *IL-6*, *TNF-α* and *iNOS* in prefrontal cortex (A) and hippocampus (B) of WT and APP/PS1 mice by RT-qPCR. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. ## $P < 0.01$, compared with *CB2*^{-/-} group; $\Delta P < 0.05$, compared with APP/PS1 group.

2.6 *CB2R* 敲除升高 APP/PS1 小鼠前额叶皮质中 PI3K 蛋白水平及 Akt 和 mTOR 磷酸化水平

Western 印迹结果(图 6)显示,与 WT 相比较, *CB2*^{-/-} 组小鼠前额叶皮质 PI3K 蛋白水平及 Akt,

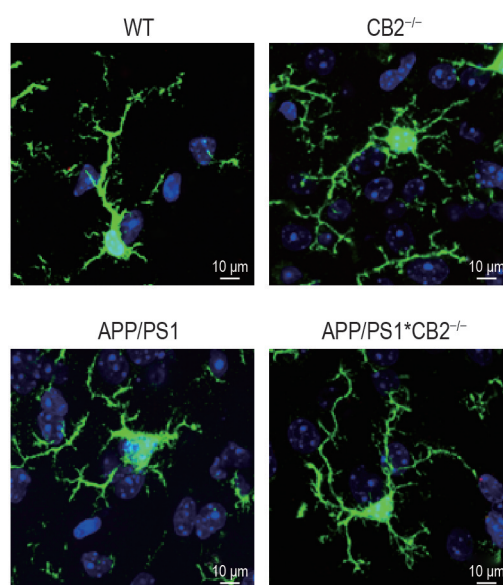


Fig. 5 Effect of *CB2R* knockout on morphological changes in microglia in prefrontal cortex of WT and APP/PS1 mice by immunofluorescence assay. Green and blue represent ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) and DAPI.

mTOR, ERK1/2 和 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平均无统计学差异。与 *CB2*^{-/-} 组相比, APP/PS1**CB2*^{-/-} 组小鼠前额叶皮质 PI3K 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), Akt 和 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 APP/PS1 组相比, APP/PS1**CB2*^{-/-} 组 PI3K 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),

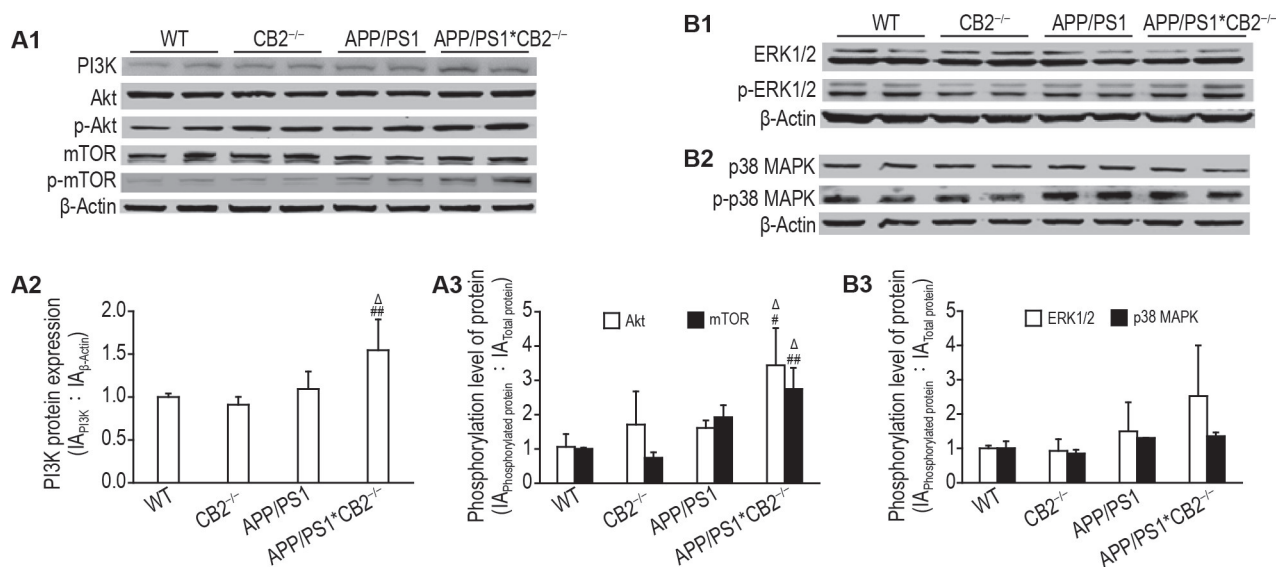


Fig.6 Effect of *CB2R* knockout on expression level of phosphoinositide 3 kinase (PI3K) protein and phosphorylation levels of protein kinase B (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) protein in prefrontal cortex of WT and APP/PS1 mice by Western blotting. A2 and A3 were the semi-quantitative results of A1. B3 was the semi-quantitative result of B1 and B2. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with *CB2*^{-/-} group; $\Delta P < 0.05$, compared with APP/PS1 group.

Akt 和 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$), ERK1/2 和 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平无统计学差异。

3 讨论

Morris 水迷宫实验通过定位航行潜伏期和目标象限探索时间及穿台次数,可以有效评价啮齿类动物空间学习记忆能力^[11],其中涉及到多个脑区的共同参与,包括海马^[10-12]和前额叶皮质^[13],而海马脑区在空间学习记忆中发挥关键的作用。本研究结果表明,与 4 月龄 APP/PS1 小鼠相比,敲除 *CB2R* 并未影响 APP/PS1 小鼠的空间学习与记忆能力。但与 APP/PS1 小鼠相比,4 月龄敲除 *CB2R* 的 APP/PS1 小鼠前额叶皮质 $A\beta_{1-42}$ 含量明显升高, $A\beta_{1-40}$ 含量也有升高的趋势,而海马脑区 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 含量无显著改变,表明 *CB2R* 可能与脑内 $A\beta$ 沉积的病理改变有关,尤其在前额叶皮质脑区更显著,具有明显的脑区特异性。文献报道, $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 含量的变化最早发生在大脑皮质^[14],这与本研究结果一致。因此推测,在 AD 早期,*CB2R* 在前额叶皮质脑区的特异性作用不能显著影响 APP/PS1 小鼠空间学习与记忆能力。为证明该假设,本研究进一步检测了前额叶皮质区小胶质细胞形态和促炎细胞因子表达水平的变化。同样发现,与 APP/PS1 小鼠相比,敲除 *CB2R* 后 APP/PS1 小鼠前额叶皮质 *IL-6* mRNA 表达水平明显增加,海马未发现此变化,进一步表明 *CB2R* 介导的炎症反应具有脑区特异性。本研究采用免疫荧光检测小胶质细胞形态发现,4 月龄 APP/PS1 小鼠前额叶皮质脑区小胶质细胞呈阿米巴样形态,这与文献^[15]报道一致;敲除 *CB2R* 后小胶质细胞形态发生明显改变。小胶质细胞的活化与多种细胞因子的产生和分泌有关,M1 表型小胶质细胞释放促炎细胞因子,包括介导神经毒性的 *IL-6* 和 $TNF-\alpha$ ^[16]。因此推测,在 AD 早期,*CB2R* 可通过调节前额叶皮质小胶质细胞形态和释放促炎因子,参与 AD 神经源性炎症病理过程。

PI3K/Akt/mTOR 通路在调节神经元树突和轴突延伸、调节突触可塑性及在神经退行性疾病中调控自噬和清除蛋白聚集物方面均发挥重要作用。据报道,AD 患者脑内 PI3K/Akt/mTOR 通路处于失调状态,具体表现为颞叶皮质神经元 Akt 活性增加,mTOR 在丝氨酸残基 2448 位点的磷酸化水平增加^[17]。本研究发现,4 月龄 *CB2R* 敲除的 APP/PS1 小鼠前额叶皮质中 PI3K 蛋白水平及 Akt 和 mTOR

蛋白磷酸化水平均显著升高。AD 患者脑组织 p-ERK1/2 活性异常升高可能与 AD 多方面潜在病理改变有关,包括 $A\beta$ 形成、tau 蛋白磷酸化和神经炎症^[18]。与 APP/PS1 小鼠相比,4 月龄 *CB2R* 敲除的 APP/PS1 小鼠前额叶皮质 p-ERK1/2 表达水平有升高趋势,提示 *CB2R* 介导的炎症信号通路与 MAPK 家族中 ERK1/2 可能相关。有文献报道,6 月龄 APP/PS1 小鼠脑组织中 $A\beta$ 聚集可进一步激活 p38 MAPK, p-p38 MAPK 可诱导 tau 过度磷酸化、NF- κ B 活化、谷氨酸兴奋性毒性、突触可塑性破坏和神经细胞凋亡^[19]。但本研究结果表明,与 APP/PS1 小鼠相比,4 月龄 *CB2R* 敲除的 APP/PS1 小鼠前额叶皮质中 p-p38 MAPK 表达水平并无显著性差异,推测 p-p38 MAPK 表达水平可能与 APP/PS1 小鼠疾病进程相关。

综上所述,在 AD 早期,*CB2R* 主要通过影响前额叶皮质脑区小胶质细胞功能调控脑内炎症反应,其中 PI3K/Akt/mTOR 通路主要参与 *CB2R* 介导的神经源性炎症病理改变。基于 *CB2R* 发挥调节神经源性炎症的重要作用,本研究可为 *CB2R* 作为 AD 早期预防炎症的靶标提供实验依据。

参考文献:

- [1] Forloni G, Balducci C. Alzheimer's disease, oligomers, and inflammation[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(3): 1261-1276.
- [2] Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?[J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172.
- [3] Woodburn SC, Bollinger JL, Wohleb ES. The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 258-273.
- [4] Pascoal TA, Benedet AL, Ashton NJ, et al. Microglial activation and tau propagate jointly across Braak stages[J]. *Nat Med*, 2021, 27(9): 1592-1599.
- [5] Bisht K, Sharma K, Tremblay ME. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress[J]. *Neurobiol Stress*, 2018, 9: 9-21.
- [6] Basavarajappa BS, Shivakumar M, Joshi V, et al. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders[J]. *J Neurochem*, 2017, 142(5): 624-648.
- [7] Wu J, Bie B, Yang H, et al. Activation of the CB2 receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency[J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(3): 791-804.
- [8] Wu J, Hocevar M, Foss JF, et al. Activation of CB2

- receptor system restores cognitive capacity and hippocampal Sox2 expression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 811: 12-20.
- [9] 李超, 史敬璞, 王立宽, 等. 大麻素 2 型受体激动剂 JWH-015 对阿尔茨海默病样小鼠认知功能的改善作用及其可能机制[J]. 国际药学研究杂志 (*Journal of Pharmaceutical Research International*). 2017, 44 (6): 537-543.
- [10] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-858.
- [11] Koppel J, Vingtdoux V, Marambaud P, et al. CB2 receptor deficiency increases amyloid pathology and alters tau processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Med*, 2014, 20: 29-36.
- [12] Largo-Barrientos P, Apostolo N, Creemers E, et al. Lowering synaptogyrin-3 expression rescues tau-induced memory defects and synaptic loss in the presence of microglial activation[J]. *Neuron*, 2021, 109 (5): 767-777.
- [13] Shin JD, Tang W, Jadhav SP. Dynamics of awake hippocampal-prefrontal replay for spatial learning and memory-guided decision making[J]. *Neuron*, 2019, 104(6): 1110-1125.
- [14] Jagust W. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19 (11): 687-700.
- [15] Dai XJ, Li N, Yu L, et al. Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20(2): 321-331.
- [16] Qi Y, Klyubin I, Cuello AC, et al. NLRP3-dependent synaptic plasticity deficit in an Alzheimer's disease amyloidosis model *in vivo*[J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 114: 24-30.
- [17] Heras-Sandoval D, Perez-Rojas JM, Hernandez - Damian J, et al. The role of PI3K/Akt/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12): 2694-2701.
- [18] Khezri MR, Yousefi K, Esmaeili A, et al. The role of ERK1/2 pathway in the pathophysiology of Alzheimer's disease: an overview and update on new developments[J/OL]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022 (2022-01-17) [2022-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3503-8057/>. DOI: 10.1007/s10571-022-01191-x.
- [19] Kheiri G, Dolatshahi M, Rahmani F, et al. Role of p38/MAPKs in Alzheimer's disease: implications for amyloid beta toxicity targeted therapy[J]. *Rev Neurosci*, 2018, 30(1): 9-30.

Effect of cannabinoid receptor type 2 knockout on function of microglia in prefrontal cortex of APP/PS1 mice related to activation of PI3K/Akt/mTOR pathway

YUAN Mi-mi¹, LIU Kun-lu¹, CHEN Mei-hua¹, CHEN Hao-zheng¹, SHI Jing-pu², LI Jin¹,
SUN Jia-guang³, WANG Bo¹

(1. State key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Department of Anesthesiology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3. Department of Anesthesiology, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054000, China)

Abstract: OBJECTIVE To evaluate the effect of cannabinoid receptor type 2 (*CB2R*) gene knockout on spatial learning and memory in mice during the early stage of Alzheimer disease (AD) and explore the mechanism at the molecular level. **METHODS** C57BL6/J mice were divided into the normal control group (WT), *CB2R* knockout group (*CB2^{-/-}*), model group (APP/PS1) and model+*CB2R* knockout group (APP/PS1**CB2^{-/-}*) according to their genotypes. Spatial learning and memory in 4-month-old APP/PS1 mice was detected by Morris water maze (MWM) test. The contents of amyloid β -protein 1-42 ($A\beta_{1-42}$) and $A\beta_{1-40}$ in the brain were detected by ELISA. The mRNA levels of inflammatory cytokines in the

prefrontal cortex and hippocampus of mice, such as interleukin-6 (*IL-6*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) and inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), were detected by RT-qPCR. Microglia morphology was detected by immunofluorescence assay. The expression level of phosphoinositide-3-kinase (PI3K) protein and phosphorylation levels of protein kinase B (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) protein in associated inflammation pathways in the brain of mice were detected by Western blotting. **RESULTS** Compared with APP/PS1 mice, there was no significant difference in escape latency, percentage of time spent in the target quadrant and numbers of times of platform crossings in MWM in APP/PS1**CB2*^{-/-} mice, indicating that the knockout of *CB2R* had no effect on spatial learning and memory of APP/PS1 mice. The knockout of *CB2R* significantly increased the content of A β ₁₋₄₂ and the expression of pro-inflammatory cytokines *IL-6* at the mRNA level in the prefrontal cortex of APP/PS1 mice. The morphology of microglia in the prefrontal cortex of APP/PS1 mice was amoeboid, while the morphology of microglia in APP/PS1**CB2*^{-/-} mice was significantly changed, showing elongated branching. The expression level of PI3K protein and phosphorylation levels of Akt and mTOR protein were significantly increased, but there was no significant difference in phosphorylation levels of ERK1/2 or p38 MAPK protein in the prefrontal cortex of APP/PS1**CB2*^{-/-} mice compared with APP/PS1 mice. **CONCLUSION** The knockout of *CB2R* can affect the function of microglia in the prefrontal cortex of APP/PS1 mice, which is associated with the activation of PI3K/Akt/mTOR pathway.

Key words: cannabinoid receptor type 2; Alzheimer disease; microglia; neuroinflammation

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(81471233)

Corresponding author: WANG Bo, E-mail: wangbo1@bmi.ac.cn; SUN Jia-guang, E-mail: 369978012@qq.com

(收稿日期: 2022-06-15 接受日期: 2022-09-05)

(本文编辑: 赵楠)