

论著·实验研究

PR-957 对 A1 反应性星形胶质细胞形成的影响

戴淑馨 王宇 林丽芳 袁天明

(浙江大学医学院附属儿童医院新生儿科, 浙江 杭州 310003)

[摘要] **目的** 探讨 PR-957 对 A1 反应性星形胶质细胞形成的影响。**方法** 取出生 1 d 内的雌性大鼠脑皮质培养出原代星形胶质细胞, 将细胞分为对照组、LPS 组及 LPS+PR-957 组。LPS 组给予 5 $\mu\text{mol/L}$ LPS 处理 48 h, LPS+PR-957 组先用 PR-957 (终浓度 200 nmol/L) 处理 1 h, 再用 5 $\mu\text{mol/L}$ LPS 处理 48 h。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测补体 3 (C3, A1 反应性星形胶质细胞标记物) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α); 采用实时荧光定量 PCR 法检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖 6 (glypican 6, Gpc6)、SPARC 样 1 (SPARC-like 1, Sparcl1) 和脂质运载蛋白 2 (lipocalin 2, lcn2) mRNA 的相对表达量。上述各实验均独立重复 3 次。**结果** 对照组几乎不表达 C3, LPS 组与 LPS+PR-957 组 C3 水平高于对照组, 但 LPS+PR-957 组的 C3 水平低于 LPS 组 ($P<0.05$)。TNF- α 的表达结果与 C3 一致。与对照组相比, LPS 组和 LPS+PR-957 组的 Gpc6 mRNA 及 Sparcl1 mRNA 表达水平均降低, lcn2 mRNA 表达水平均升高 ($P<0.001$); 与 LPS 组相比, LPS+PR-957 组的 Gpc6 mRNA 及 Sparcl1 mRNA 表达水平均升高, lcn2 mRNA 表达水平降低 ($P<0.001$)。**结论** LPS 能够诱导星形胶质细胞成为 A1 反应性星形胶质细胞; PR-957 可以抑制 LPS 诱导的 A1 反应性星形胶质细胞形成。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(11): 1110-1115]

[关键词] 脂多糖; PR-957; 补体 3; 肿瘤坏死因子 α ; 星形胶质细胞

Effect of PR-957 on the formation of A1 reactive astrocytes

DAI Shu-Xin, WANG Yu, LIN Li-Fang, YUAN Tian-Ming. Department of Neonatology, Children's Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China (Yuan T-M, Email: yuantianming@zju.edu.cn)

Abstract: Objective To study the effect of PR-957 on the formation of A1 reactive astrocytes. **Methods** The cerebral cortices of 1-day-old female rats were obtained and cultured for primary astrocytes. These cells were divided into 3 groups: control, lipopolysaccharide (LPS), and LPS+PR-957. The LPS group was treated with LPS (at a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours; the LPS+PR-957 group was treated with PR-957 (at a final concentration of 200 nmol/L) for 1 hour and then LPS for 48 hours. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the expression of complement 3 (C3, a marker for A1 reactive astrocytes) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Quantitative real-time PCR was used to determine the relative mRNA expression of glypican-6 (GPC6), SPARC-like 1 (SPARCL1), and lipocalin-2 (LCN2). All the above experiments were repeated three times independently. **Results** C3 expression was almost not observed in the control group, but was observed in both the LPS group and the LPS+PR-957 group, with significantly lower expression observed in the LPS+PR-957 group ($P<0.05$). The expression of TNF- α was consistent with that of C3. Compared with the control group, the LPS and the PS+PR-957 groups had significantly reduced mRNA expression levels of GPC6 and SPARCL1 but significantly increased mRNA expression level of LCN2 ($P<0.001$). Compared with the LPS group, the LPS+PR-957 group had significantly increased mRNA expression levels of GPC6 and SPARCL1 but significantly reduced mRNA expression level of LCN2 ($P<0.001$). **Conclusions** LPS can induce the transformation from astrocytes to A1 reactive astrocytes, and PR-957 can inhibit the formation of LPS-induced A1 reactive astrocytes.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(11): 1110-1115]

Key words: Lipopolysaccharide; PR-957; Complement 3; Tumor necrosis factor alpha; Astrocyte

[收稿日期] 2019-06-10; [接受日期] 2019-09-27

[基金项目] 国家自然科学基金 (81571466)。

[作者简介] 戴淑馨, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 袁天明, 男, 副教授。Email: yuantianming@zju.edu.cn。

星形胶质细胞是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中的重要细胞, 参与 CNS 的多种生理功能, 例如血脑屏障形成和维持、突触发生、神经传递、代谢调节和支持突触传递^[1]。创伤、感染、神经变性和局部缺血等病理性刺激使它们的形态和基因表达发生巨大的变化, 被称为反应性星形胶质细胞^[2]。反应性星形胶质细胞的功能一直是一个争论的主题, 以前的研究表明它们既可以阻碍又可以促进 CNS 损伤恢复。尚不清楚这些细胞在哪种情况下可能有帮助或有害, 并且关于它们的功能仍存在许多问题。2017年 Liddelow 等^[3]提出 CNS 损伤过程中的反应性星形胶质细胞发挥有益还是有害功能取决于引起反应性星形胶质细胞的刺激; 该研究认为根据损伤或疾病的性质至少有两种亚型的反应性星形胶质细胞, 一种有害, 另一种有益。感染诱导的反应性星形胶质细胞失去了基本的生理功能并伤害神经元及少突胶质细胞, 对 CNS 有害, 称为 A1 反应性星形胶质细胞。缺血诱导的反应性星形胶质细胞分泌许多神经营养因子, 对神经元具有保护作用, 称为 A2 反应性星形胶质细胞。了解反应性星形胶质细胞的多维作用有可能有助于开发新的治疗策略, 以减轻不同类型 CNS 损伤的程度。本研究的目的是确认感染因子脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激产生的反应性星形胶质细胞是 A1 反应性星形胶质细胞, 并提出能抑制 A1 反应性星形胶质细胞形成的物质。

根据单细胞数据, 补体 3 (complement 3, C3) 在 A1 反应性星形胶质细胞中被特异性上调, 被认为是 A1 反应性星形胶质细胞的标记物^[4]。正常的星形胶质细胞具有分泌磷脂酰肌醇蛋白聚糖 6 (glypican 6, Gpc6) 及 SPARC 样 1 (SPARC-like 1, Sparcl1) 促进兴奋性突触形成的生理功能^[5-6], 失去部分生理功能的 A1 反应性星形胶质细胞可能会减少甚至不分泌 Gpc6 及 Sparcl1, 因此将 Gpc6 与 Sparcl1 纳入本研究进行检测。此外, 反应性星形胶质细胞释放的肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 与脂质运载蛋白 2 (lipocalin 2, lcn2) 能促进神经元凋亡^[7-8], 因此也被纳入本研究进行检测。

免疫蛋白酶体在炎症反应中具有关键作用^[9]。PR-957 是免疫蛋白酶体亚基低分子量多肽 7 (low

molecular mass polypeptide 7, LMP7) 的特异性抑制剂, 能抑制促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-23 和 IL-2 的表达并缓解小鼠实验性结肠炎与关节炎的病情^[10-11]。并且 PR-957 在动物模型中的药效浓度为 2 mg/kg, 远远低于其半数致死量的浓度 (30 mg/kg), 临床转化能力强^[11]。在阿尔茨海默病模型鼠脑组织中发现高表达的 LMP7^[12-13]。LPS 刺激下的星形胶质细胞也表达 LMP7^[14]。因此我们猜测 PR-957 能抑制 LPS 诱导的 A1 反应性星形胶质细胞形成。

在本研究中, 首先用 LPS 刺激星形胶质细胞, 确证是否产生 A1 反应性星形胶质细胞, 并在此基础上观察 PR957 能否抑制 A1 反应性星形胶质细胞形成。

1 材料与方法

1.1 材料

高糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司), CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), LPS (美国 Sigma 公司), PR-957 (美国 Selleck 公司), 大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (美国 Rapidbio 公司), 大鼠 C3 ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), RNeasyMini 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司), Prime Script™ 逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司), 兔抗胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体 (英国 Abcam 公司), 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate isomer, FITC) 标记的山羊抗兔抗体 (美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 原代星形胶质细胞培养与分组

本研究采用出生 1 d 内的雌性大鼠脑皮质培养出原代星形胶质细胞^[15], 利用免疫荧光技术鉴定细胞纯度^[2]后进行后续实验。动物实验获得浙江大学动物伦理委员会批准 (ZJU2015-103-02)。细胞实验分为对照组、LPS 处理组 (LPS 组)、LPS+PR-957 共同处理组 (LPS+PR-957 组)。对照组行常规培养, LPS 组给予 LPS 处理, LPS+PR-957 组先用 PR-957 (终浓度 200 nmol/L) 处理 1 h 后再给予 LPS 干预, PR-957 作用浓度及时间的选择参照产品说明书。

1.3 免疫荧光技术鉴定星形胶质细胞

在 12 孔板中放入玻片, 将 5×10^5 /mL 的细胞

悬液 1 mL 滴于玻片上培养,待细胞长满玻片时取出细胞爬片。PBS 漂洗细胞爬片上残余的血清蛋白 (37℃, 3 min × 3 次), -20℃ 的 4% 多聚甲醛固定细胞, PBS 漂洗 3 min × 3 次。1% Triton 作用 25~30 min, PBS 漂洗 5 min × 2 次。羊血清封闭 37℃, 20 min。加入兔抗 GFAP 一抗 (1:1000), 4℃ 孵育过夜。第 2 天 4℃ PBS 漂洗 3 min × 5 次, 加入羊抗兔 FITC 二抗 (1:100), 37℃ 孵育 1 h, 37℃ PBS 漂洗 5 min × 3 次。凉干封片 (封闭液 pH 8.5), 荧光倒置显微镜下观察。

1.4 CCK-8 法检测细胞存活情况

调整细胞悬液浓度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$, 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 使每孔细胞数达 2000 (边缘孔用无菌 PBS 填充)。将培养板放入培养箱中 (5% CO_2 , 37℃) 培养 24 h 后, 分为对照组和 LPS 组, 向不同浓度 LPS 组各孔中分别加入 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 LPS 10 μL , 对照组加入等量生理盐水, 在培养箱中培养 24 h。取最佳刺激浓度 LPS 组和对照组细胞在培养箱中分别培养 24、48、72 h。在培养结束前 6 h, 向各孔中加入 10 μL CCK-8 溶液。以空白孔 (培养基 + CCK-8 溶液) 调零, 在酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司) 上于 450 nm 波长处检测各孔吸光度 (OD) 值。细胞存活率计算方法: 细胞存活率 = 干预前细胞 OD 值 / 干预后细胞 OD 值 × 100%。实验独立重复 3 次。

1.5 ELISA 法检测 C3 及 TNF- α 水平

使用 ELISA 试剂盒检测各组 C3 及 TNF- α 水平, 实验步骤按厂家提供的说明书操作。在酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司) 上于 450 nm 波长处检测各孔 OD 值, 记录结果, 将 OD 值与标准曲线比较得出含量值, 实验独立重复 3 次。

1.6 实时荧光定量 PCR 法检测 Gpc6、Sparcl1 和 lcn2 mRNA 的表达

按照 RNeasyMini 试剂盒提供的方法提取各组待测细胞的 RNA。按照 Prime Script™ 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。特异性扩增引物由上海桑尼生物科技有限公司设计并合成 (表 1)。按照 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书进行实时荧

光定量 PCR (qRT-PCR)。反应体系 (20 μL): SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL , 上下游引物各 0.8 μL , cDNA 模板 2.0 μL , dH_2O 6.4 μL 。反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 30 个循环。根据测得的 Ct 值, 计算 Gpc6、Sparcl1 和 lcn2 mRNA 的相对表达量, 结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{实验组目的基因的平均值} - \text{实验组 GAPDH 平均值}) - (\text{对照组目的基因的平均值} - \text{对照组 GAPDH 平均值})$ 。实验独立重复 3 次。

表 1 目的基因和 GAPDH 的引物序列

名称	序列	片段长度
Gpc6	上游引物 5'-CCGCTTTCGACCCTACAACC3-' 下游引物 5'-GACACTGTGCTGCATGGTCC3-'	100 bp
Sparcl1	上游引物 5'-GTTCTTCACAGATTCTAACC-3' 下游引物 5'-TTTACTGCTCTGTCAACTG-3'	106 bp
lcn2	上游引物 5'-GATTGCTCAGCTTTGCCAAGT-3' 下游引物 5'-CATTGGTCGGTGGGAACAG-3'	115 bp
GAPDH	上游引物 5'-TCAAGAAGGTGCTGAAGCAG-3' 下游引物 5'-AGGTGGAAGAATGGGAGTTG-3'	133 bp

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用两样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 星形胶质细胞的鉴定

GFAP 是星形胶质细胞的标记物^[16], 故用免疫荧光法检测 GFAP 对原代星形胶质细胞进行鉴定。显微镜下观察细胞生长状态良好, 从胞体发出许多长而分支的突起, 呈星状。通过 GFAP/DAPI 的百分比计算可得, 星形胶质细胞的纯度达 98%, 见图 1。

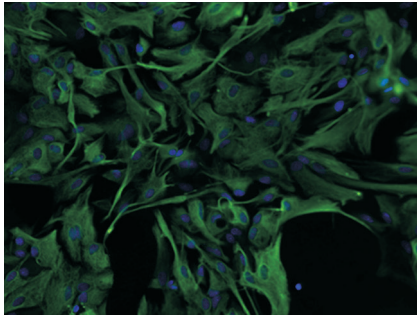


图 1 原代星形胶质细胞的免疫荧光鉴定 (×100)

GFAP (绿色) 是星形胶质细胞的标记物。镜下细胞生长状态良好, 呈星状, 从胞体发出许多长而分支的突起。通过 GFAP/DAPI 的百分比计算可得, 星形胶质细胞的纯度达 98%。

2.2 不同浓度 LPS 对星形胶质细胞增殖活性的影响

LPS (5 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 24 h 后星形胶质细胞的存活率高于对照组 ($P<0.05$), 1、10 $\mu\text{mol/L}$ LPS 刺激 24 h 后星形胶质细胞的存活率与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。提示 5 $\mu\text{mol/L}$ LPS 对星形胶质细胞的增殖活性增加效果最显著, 因此选择 5 $\mu\text{mol/L}$ LPS 进行后续实验。见表 2。

表 2 不同浓度 LPS 刺激 24 h 后星形胶质细胞存活率比较 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	星形胶质细胞存活率
对照组	103 $\pm$ 11
LPS 1 $\mu\text{mol/L}$	135 $\pm$ 13
LPS 5 $\mu\text{mol/L}$	160 $\pm$ 20 ^a
LPS 10 $\mu\text{mol/L}$	101 $\pm$ 15
<i>F</i> 值	15.86
<i>P</i> 值	<0.001

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.3 LPS 不同干预时间对星形胶质细胞增殖活性的影响

5 $\mu\text{mol/L}$ LPS 刺激 24、48、72 h, 分别与同一时间点对照组比较, 星形胶质细胞存活率均增加 ($P<0.05$), 且 48 h 组星形胶质细胞存活率增加幅度最显著, 因此选择 LPS 刺激星形胶质细胞 48 h 进行后续实验。见表 3。

表 3 LPS 干预不同时间星形胶质细胞的存活率与对照组比较 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	103 $\pm$ 17	107 $\pm$ 18	111 $\pm$ 13
LPS 组	161 $\pm$ 21	181 $\pm$ 15	163 $\pm$ 11
<i>t</i> 值	6.432	10.524	8.392
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 各组细胞 C3 的表达情况

C3 是 A1 反应性星形胶质细胞的标志物^[17], 通过检测 C3 来判断 A1 反应性星形胶质细胞的形成情况。ELISA 检测结果显示: 各组 C3 含量比较, 差异有统计学意义 ($F=377.53, P<0.001$)。其中对照组几乎不含 C3 (13 $\pm$ 5 ng/mL); LPS 组 C3 含量 (2006 $\pm$ 125 ng/mL) 高于对照组 ($P<0.001$); 与 LPS 组相比, LPS+PR-957 组 C3 含量 (713 $\pm$ 94 ng/mL) 减少 ($P<0.001$)。表明 LPS 诱导 A1 反应性星形胶质细胞形成, PR-957 能部分抑制 LPS 诱导的 A1 反应性星形胶质细胞形成。

2.5 各组细胞 TNF- α 的表达情况

ELISA 检测结果显示: 各组 TNF- α 含量比较, 差异有统计学意义 ($F=351.96, P<0.001$)。对照组几乎不含 TNF- α (18 $\pm$ 3 pg/mL); LPS 组 TNF- α 含量 (995 $\pm$ 76 pg/mL) 高于对照组 ($P<0.001$); 与 LPS 组相比, LPS+PR-957 组 TNF- α 含量 (232 $\pm$ 32 pg/mL) 减少 ($P<0.001$)。提示 LPS 刺激使 A1 反应性星形胶质细胞表达 TNF- α , PR-957 能抑制 LPS 对 A1 反应性星形胶质细胞表达 TNF- α 的促进作用。

2.6 各组细胞 Gpc6 mRNA、Sparcl1 mRNA 及 lcn2 mRNA 的表达

与对照组相比, LPS 组和 LPS+PR-957 组的 Gpc6 mRNA 及 Sparcl1 mRNA 表达水平均降低 ($P<0.001$), lcn2 mRNA 表达水平均升高 ($P<0.001$); 与 LPS 组相比, LPS+PR-957 组的 Gpc6 mRNA 及 Sparcl1 mRNA 表达水平均升高 ($P<0.001$), lcn2 mRNA 表达水平降低 ($P<0.001$)。提示 LPS 刺激能减少 A1 反应性星形胶质细胞表达 Gpc6 与 Sparcl1, 增加 A1 反应性星形胶质细胞表达 lcn2, PR-957 能部分抑制 LPS 对 A1 反应性星形胶质细胞的作用。见表 4。

表 4 各组细胞 Gpc6 mRNA、Sparcl1 mRNA 及 lcn2 mRNA 的表达比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Gpc6 mRNA	Sparcl1 mRNA	lcn2 mRNA
对照组	300 ± 5	192 ± 8	1.07 ± 0.13
LPS 组	79 ± 12 ^a	27 ± 9 ^a	54.31 ± 3.27 ^a
LPS+PR-957 组	205 ± 15 ^{a,b}	92 ± 10 ^{a,b}	9.06 ± 1.08 ^{a,b}
<i>F</i> 值	272.57	247.38	624.68
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与 LPS 组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

星形胶质细胞是大脑中数量众多的一类细胞, 是 CNS 免疫应答的重要调节因子, 会被多种因素激活^[18], 例如感染、缺氧。反应性星形胶质细胞的功能目前尚不清楚。Liddelw 等^[3]提出反应性星形胶质细胞的功能是由刺激因素决定的, 认为感染诱导的反应性星形胶质细胞会损伤神经细胞, 称为 A1 反应性星形胶质细胞; 缺氧诱导的反应性星形胶质细胞对神经有保护作用, 称为 A2 反应性星形胶质细胞。探索能够抑制 A1 反应性星形胶质细胞形成的物质能为治疗 CNS 损伤提供策略。

根据单细胞数据, C3 在 A1 反应性星形胶质细胞中被特异性上调, 此外目前没有研究提出其他因子诱导的反应性星形胶质细胞表达 C3, 因此将 C3 当作 A1 反应性星形胶质细胞的标志物^[4]。在本项研究中我们还观察到 A1 反应性星形胶质细胞的其他特征。正常的星形胶质细胞具有分泌 Gpc6 及 Sparcl1 促进兴奋性突触形成的生理功能^[5-6]。失去部分生理功能的 A1 反应性星形胶质细胞可能会减少甚至不分泌 Gpc6 与 Sparcl1, 因此将 Gpc6 与 Sparcl1 当做检测指标。此外, 反应性星形胶质细胞释放的促炎因子 TNF- α 与 lcn2 促进神经元凋亡^[7-8], 因此也被当做检测指标。

炎症环境下, 免疫细胞表达免疫蛋白酶体的亚基 LMP7 参与炎症反应^[19]。星形胶质细胞是脑内的免疫细胞, 在炎症环境下也表达 LMP7^[14]。目前已有针对 LMP7 的靶向抑制剂 PR-957, 它选择性地诱导 LMP7 的 S1 结合口袋的构象变化, 选择性的抑制炎症部位的 LMP7 而不影响其他正常部位。有研究发现, PR-957 能够抑制促炎细胞因子的产生^[20]; 在葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎模

型中, 使用 LMP7 抑制剂 PR-957 可以明显减轻结肠炎的病理症状, 减少大量细胞因子的产生^[10]; 在小鼠类风湿关节炎模型中, PR-957 能减少细胞浸润、细胞因子及抗体的产生^[11]。因此我们认为 PR-957 可能可以抑制 A1 反应性星形胶质细胞的形成。

本研究使用的感染因素是革兰阴性杆菌细胞壁的 LPS。本研究结果证实正常的星形胶质细胞不表达 C3, LPS 刺激星形胶质细胞表达 C3, 与 Liddelw 等^[3]的研究结果一致。并且, 与对照组的星形胶质细胞对比发现 LPS 刺激后的星形胶质细胞低表达 Gpc6 mRNA 和 Sparcl1 mRNA, 高表达 TNF- α 及神经毒性因子 lcn2 mRNA, 表明 LPS 诱导产生 A1 反应性星形胶质细胞。

此外, 本研究发现与单用 LPS 刺激的星形胶质细胞相比, 用 PR-957 预处理过的星形胶质细胞表达的 C3 减少、Gpc6 mRNA 和 Sparcl1 mRNA 增多、TNF- α 与神经毒性因子 lcn2 mRNA 减少。表明 PR-957 能减少 LPS 对星形胶质细胞的影响, 即 PR-957 能抑制 A1 反应性星形胶质细胞的形成。

综上所述, LPS 诱导产生 A1 反应性星形胶质细胞, PR-957 能抑制 LPS 诱导产生 A1 反应性星形胶质细胞。

[参 考 文 献]

- [1] Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. Astrocytes control synapse formation, function, and elimination[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(9): a020370.
- [2] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology[J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(1): 7-35.
- [3] Liddelw SA, Barres BA. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential[J]. Immunity, 2017, 46(6): 957-967.
- [4] Liddelw SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-487.
- [5] Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, et al. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors[J]. Nature, 2012, 486(7403): 410-414.
- [6] Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, et al. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(32): E440-E449.
- [7] Livne-Bar I, Lam S, Chan D, et al. Pharmacologic inhibition of reactive gliosis blocks TNF- α -mediated neuronal apoptosis[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(9): e2386.
- [8] Bi F, Huang C, Tong J, et al. Reactive astrocytes secrete lcn2

- to promote neuron death[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(10): 4069-4074.
- [9] Koerner J, Brunner T, Groettrup M. Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 50873-50888.
- [10] Basler M, Dajee M, Moll C, et al. Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome[J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 634-641.
- [11] Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(7): 781-787.
- [12] Wagner LK, Gilling KE, Schormann E, et al. Immunoproteasome deficiency alters microglial cytokine response and improves cognitive deficits in Alzheimer's disease-like APPPS1 mice[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2017, 5(1): 52.
- [13] Kamphuis W, Kooijman L, Schettters S, et al. Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around amyloid plaques in a mouse model for Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(10): 1847-1860.
- [14] Zamanian JL, Xu L, Foo LC, et al. Genomic analysis of reactive astroglia[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(18): 6391-6410.
- [15] McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. *J Cell Biol*, 1980, 85(3): 890-902.
- [16] Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia[J]. *Physiol Rev*, 2017, 98(1): 239-389.
- [17] Li S, Uno Y, Rudolph U, et al. Astrocytes in primary cultures express serine racemase, synthesize d-serine and acquire A1 reactive astrocyte features[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 151: 245-251.
- [18] Pekny M, Pekna M, Messing A, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(3): 323-345.
- [19] Mazdeh M, Moradi N, Khoshroo E, et al. Down-regulation of TYK2, CBLB and LMP7 genes expression in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon-beta[J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 314: 24-29.
- [20] Guo Y, Chen X, Li D, et al. PR-957 mediates neuroprotection by inhibiting Th17 differentiation and modulating cytokine production in a mouse model of ischaemic stroke[J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 193(2): 194-206.

(本文编辑: 万静)