

崔雨沙,路欣,李峰. 疾病相关小胶质细胞在阿尔兹海默症发病中的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 132-136.

Cui YS, Lu X, Li F. The role of disease-associated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 132-136.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.05.021

疾病相关小胶质细胞在阿尔兹海默症发病中的作用研究

崔雨沙¹, 路欣², 李峰^{3*}

(1.首都医科大学基础医学院 2016 级五年制临床医学专业, 北京 100069;

2.首都医科大学基础医学实验教学中心形态学实验室, 北京 100069;

3.首都医科大学神经生物学系, 北京脑重大疾病研究院, 北京神经再生修复研究重点实验室, 北京 100069)

【摘要】 作为大脑固有免疫细胞,小胶质细胞在阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)的发病过程中发挥着不可替代的作用。过去的研究一直使用传统 M1、M2 分型来解释小胶质细胞的功能,但随着技术的发展,我们现在可以从细胞转录组学或基因组学、蛋白组学等方面来更加全面地认识小胶质细胞,而不是仅仅靠几个标志基因来对小胶质细胞进行分型。疾病相关的小胶质细胞(disease associated microglia, DAM)就是从细胞转录组学的角度建立的小胶质细胞亚型,这一亚型的确立对于构建小胶质细胞新的分型意义重大,并且预测了许多新的 AD 危险位点,对于下一步研究至关重要。

【关键词】 阿尔兹海默症;小胶质细胞;疾病相关小胶质细胞

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 05-0132-05

The role of disease-associated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease

CUI Yusha¹, LU Xin², LI Feng^{3*}

(1. 2016 Undergraduate, Major in five-year Clinical Medicine, School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China. 2. Morphological Laboratory of Experimental

Teaching Center of Basic Medicine, School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069. 3. Neurobiology Department, Beijing Institute for Brain Disorders; Beijing Center of

Neural Regeneration and Repair, Capital Medical University, Beijing 100069)

【Abstract】 Microglia, which are innate immune cells in the brain, play an irreplaceable role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. The M1/M2 model has previously been used to explain the function of microglia. However, advances in technology, especially in cell transcriptome genomics, i. e., proteomics, have enabled a more comprehensive understanding of microglia. Disease-related microglia, one of the subtypes established from the perspective of the cell transcriptome, is of great significance for the construction of new subtypes of microglia. Indeed, this subtype may facilitate the prediction of many new AD risk sites in future research.

【基金项目】首都医科大学学生科研创新项目资助(XSKY2019001)。

【作者简介】崔雨沙(1998—),女,本科生,研究方向:阿尔兹海默症发病机制在小胶质细胞方面的研究。E-mail: 13126986866@163.com

【通信作者】李峰,女,博士,讲师,研究方向:神经退行性疾病发病机制研究。E-mail: gylfsd@126.com

【Keywords】 Alzheimer's disease; microglia; disease-associated microglia

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种年龄相关的神经退行性疾病,组织学表现为 A β 斑块沉淀以及神经纤维缠结和神经炎症的形成^[1]。AD 患者危险基因位点很大一部分位于小胶质细胞^[2],如 Trem2、Apoe 等;而小胶质细胞是大脑主要的免疫细胞,与神经退行性疾病的发生息息相关。以往对小胶质细胞的研究大多采用 M1、M2 分型的方式对其功能进行解释^[3]。但随着现在技术的进步,如全基因组测序、表观遗传学分析等,我们对小胶质细胞和疾病的认识更加深入和全面,这一分型已经不能满足我们的需求。利用单细胞测序等方法,从细胞转录组角度,最近发现了一种新的小胶质细胞亚型——疾病相关的小胶质细胞 (disease associated microglia, DAM),它在 AD 晚期担任着重要的保护作用,为 AD 疾病的治疗带来了新的曙光。本文综述了近年来小胶质细胞在 AD 发病中的研究进展,特别从小胶质细胞的分型进行归纳总结,以期对广大研究工作者更多启发。

1 小胶质细胞在正常状态和 AD 疾病中的作用

小胶质细胞大约占人类大脑所有细胞的 0.5% 到 16.6%,是大脑中最主要的免疫细胞,起源于胚胎七到八天的原始骨髓祖细胞,由卵黄囊分化而来,和循环系统的单核细胞相互独立^[4]。正常状态下,小胶质细胞可以在没有外周造血细胞输入的情况下进行自我更新并且保持固有数量^[5]。作为大脑中的免疫细胞,小胶质细胞主要通过表面的受体不断感受周边的病原体、凋亡神经元等刺激,从而做出相应反应,起到维持大脑内环境稳态的功能。它也有许多不同于吞噬细胞的功能,如修剪突触、促进神经元再生、组织轴突的投射等^[3],对于大脑的发育至关重要。AD 疾病状态时,小胶质细胞会被激活,激活的小胶质细胞主要有两方面的作用,一方面参与炎症反应,在 A β 刺激下使 NF- κ B 等转录因子活化,从而引起一系列炎症因子的转录,产生炎症因子如 IL-1 β 、TNF α ^[6]等,介导炎症反应;另一方面小胶质细胞可以介导 A β 的吞噬,减少 A β 沉积^[7],还可以通过 Trem2 形成小胶质细胞屏障^[8],最终减少 A β 对 AD 病人的危害,延缓病情发展。随着疾病的分期不同,小胶质细胞起的作用亦不相同。AD 的疾病病程主要可以被分为三期,AD 初期为 A β 斑块的形成期,这一期小胶质细胞可以通过炎症小体 NLRP3 中的 ASC (apoptosis-associated

speck-like protein containing a CARD) 来协助 A β 蛋白聚集以及在大脑中播散,并且产生一些炎症因子来促进 A β 斑块的形成,因此在这一期的炎症反应主要为有害的作用;AD 中期为 A β 斑块沉积期,这一期 A β 斑块增加,小胶质细胞通过 Trem2 介导形成小胶质细胞屏障来抑制 A β 斑块的扩散,防止其毒害周围的神经元,起着神经保护性的作用;AD 末期为 TAU 蛋白沉积、A β 蛋白达到稳定的时期,这一期神经元的死亡增加,活化的小胶质细胞在清除死亡神经元的过程中诱导了炎症反应以及星形胶质细胞的活化,造成更多神经元的死亡,形成一个恶性循环^[9]。

2 传统的小胶质细胞分型——M1、M2 型小胶质细胞

为了解释小胶质细胞的复杂功能,传统观念把小胶质细胞分为 M1、M2 两型,而这一分型最初是从外周吞噬细胞分型借用来的。研究者们发现吞噬细胞在 T 细胞分泌的两种炎症因子 IFN γ 和 IL-4 的诱导下,会产生两种完全不同的细胞表型:M1 和 M2 型,它们的表面标志物以及功能都不相同,反映了吞噬细胞在多种免疫环境下可以产生不同的表型来发挥作用。但小胶质细胞作为大脑特有的免疫细胞,它的来源、生存环境、结构特点以及所发挥的作用都和吞噬细胞不一致,因此,简单地把吞噬细胞分型引入到小胶质细胞是不科学的。为了验证这一观点,我们使用单细胞 RNA 测序的方法去分析脑部创伤模型小鼠大脑中的小胶质细胞,结果确实无法找到只表达 M1 型或 M2 型标志基因的小胶质细胞^[3]。所以,M1、M2 型小胶质细胞并没有转录谱以及其他科学依据的支持,这一分型的合理性值得怀疑。为了克服其局限性,我们需要寻找一个新的、合理的小胶质细胞分型,来指导我们接下来的道路。

3 一种新的小胶质细胞类型——疾病相关小胶质细胞

脱离原有利用细胞标志物来对小胶质细胞进行分型的思路,最近的单细胞 RNA 测序技术帮助我们客观地认识免疫细胞的类型及其状态,提供了一个从转录组方面定义细胞类型的新工具。利用此方法,2017 年 Keren-Shaul 等^[10]发表的文献介绍了在阿尔兹海默症 5XFAD 转基因小鼠模型中发现的

一种 AD 小鼠特有的小胶质细胞——疾病相关小胶质细胞(DAM),它在这一疾病模型的病理晚期特异性的出现而不在野生型小鼠中出现,主要标志物为 CD9、CD11、Clec7a 和 CD63,定位于 A β 斑块附近。Keren-Shaul 等^[10]的研究发现,与稳态小胶质细胞相比,DAM 有着截然不同的基因型,出现一些基因的下调如 Cx3cr1;也有一些基因的上调如 Apoe、Lpl、CD9、Cst7、Trem2,是一种新的小胶质细胞类型。DAM 高表达脂代谢和吞噬相关基因,可以吞噬 A β 蛋白,帮助大脑清除 A β 沉积,起保护性作用。但在 AD 后期,由于 A β 活化了炎症小体,而炎症小体的 ASC 可以协助 A β 斑块的沉积^[10],DAM 反而会加速病情发展。除 5XFAD 小鼠,在其他神经退行性病变小鼠模型如 ALS、APP 小鼠也有 DAM 的存在^[11],但这些 DAM 是否为同一种小胶质细胞,还需要进一步的探究。

DAM 主要由凋亡的神经元和髓鞘碎片等诱导产生,磷脂酰丝氨酸为 DAM 识别凋亡细胞的靶点^[12]。这些可以诱导 DAM 产生的物质,有学者把它们称为神经变性相关分子模式(neurodegeneration-associated molecular patterns, NAMP),类似于外周诱导吞噬细胞活化的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP),包括死亡神经细胞凋亡体、髓鞘碎片、脂类降解产物、神经退行性疾病和衰老所形成的细胞外蛋白聚集(如 A β)等。识别 NAMP 需要 DAM 上相应的受体,如 Trem2、TAM(Tyro3/Axl/Mer)、嘌呤受体 P2Y12,它们分别介导不同的功能^[13]。对于这些受体的深入研究,可以帮助我们更好的理解 DAM 在 AD 及其他神经退行性病变中的作用。

3.1 DAM 的分型

小胶质细胞在神经退行性疾病中的作用是多方面的,疾病晚期的小胶质细胞亦然。Rangaraju 等^[14]2018 年发表的文献以 CD11b 为主要标志物筛选疾病晚期的小胶质细胞,然后通过整合小胶质细胞转录组数据集和验证研究,发现了促炎和抗炎两类小胶质细胞。其中抗炎的小胶质细胞以 CD44、CD45 和 CD274 为标志,主要富集参与碳水化合物和脂质代谢、胆固醇外排、抗原呈递、氧化还原酶活性和衰老/自噬的胞浆蛋白相关基因,可以被 NF- κ B、Stat1、P53 和 RelA 调控;促炎的小胶质细胞以 CXCR4 为标志,主要富集促炎功能相关基因,包括免疫信号、细胞增殖、粘附、抗原呈递、钙内流和细胞因子的产生等,可以被 LXR α/β 和 Atf-1 调控。这两类小胶质细胞高表达 DAM 的特征基因,在阿

尔兹海默症 5XFAD 转基因小鼠分离的 DAM 中,也可以根据细胞标志找到这两类小胶质细胞,因此,这两类小胶质细胞为 DAM 的两个亚型,分别命名为促炎 DAM 和抗炎 DAM。这两个 DAM 亚型均在 Trem2 的下游出现,抑制 Trem2 后便不会产生这两种小胶质细胞亚型^[14]。

但是 DAM 为病理晚期出现的小胶质细胞类型,无法解释小胶质细胞的转录组随着时间是如何变化的。为了探查不同疾病时期小胶质细胞的转录组,Mathys 等^[15]的研究对 AD 小鼠模型不同病理阶段的小胶质细胞分别进行了单细胞 RNA 测序及分析。文献结果表明在病理早期的小胶质细胞高表达 DNA 复制和修复以及细胞周期相关的基因,其上调的基因主要与细胞增殖分裂相关,小胶质细胞在神经退行性病变中的增殖反应主要在这一阶段完成;而病理晚期的小胶质细胞上调的基因主要为免疫反应相关的基因。病理晚期的小胶质细胞按照转录组的不同又可以分为两类,一类为 1 型干扰素诱导的基因模块,调控抗病毒和干扰素应答反应,主要与神经元的 DNA 损伤有关,神经元 DNA 的损伤可以诱导出此类小胶质细胞;一类为 2 型干扰素诱导的 MHC II 类基因模块,主要以 T 细胞非依赖的方式发挥作用,可以放大神经退行性病变的症状^[15]。比较这一分型中病理早期小胶质细胞与 DAM 基因的异同,发现病理早期小胶质细胞的基因与 DAM 相似性不高。而病理晚期小胶质细胞基因变化与 DAM 大致相同;在 DAM 上调的 278 个基因中,202 个都在病理晚期的小胶质细胞中上调。但是许多抗病毒和干扰素反应相关的基因在病理晚期的小胶质细胞中上调而不在 DAM 中上调^[15]。关于病理晚期的小胶质细胞在疾病中是起一个保护性还是伤害性或中立性的作用,目前还不清楚,需要进一步的探究。

3.2 DAM 相关的关键位点

3.2.1 Trem2 和 DAM

Trem2 是 AD 的一个主要风险基因,基于单细胞测序的研究发现,Trem2 可以决定 DAM 表型的出现。稳态的小胶质细胞通过两步变为 DAM:第一步为不依赖于 Trem2 的过程,在这一步稳态小胶质细胞的关卡基因如 Cx3cr1 和 P2ry12/P2ry13 下调,而一些 AD 相关的基因如 B2m、Apoe 上调,小胶质细胞转变为中间态 DAM;第二步为依赖 Trem2 的过程,小胶质细胞 Trem2 高表达,吞噬和脂代谢相关的基因如 Cst7 和 Lpl 高表达,转变为最终的 DAM^[16]。关于 Trem2 介导 DAM 转型的具体机制,有研究发现 Trem2 可以通

过激活 mTOR 通路来调节小胶质细胞的代谢,促进小胶质细胞的生长增殖。如果敲除 Trem2, mTOR 会被抑制,而长期的 mTOR 缺陷会导致整体小胶质细胞功能障碍、细胞存活率和增殖率降低。因此 Trem2 可能是通过维持第一步活化的小胶质细胞的活化状态以及生存状态来实现第二步的转变的^[17],而不是通过介导一种新的基因型的变化。

3.2.2 APOE 和 DAM

APOE 是一种能够结合和运输胆固醇以及脂质的蛋白,在人类有 APOE2、APOE3、APOE4 三种亚型。其中 APOE4 的纯合子可以使 AD 的发病率提高 12 倍;APOE2 则可以延迟遗传性 AD 的发病年龄;APOE3 与 AD 发病无明显相关性。APOE 在稳态的小胶质细胞中表达量很低,但在 DAM 中 APOE 表达却大幅增加,是 DAM 中表达量上调幅度最大的基因之一。用凋亡的神经元去激活小胶质细胞,可以通过 Trem2 诱导出 APOE 的活化,进而调控 APP-PS1 和 SOD1 小鼠中小胶质细胞的类型转换,使小胶质细胞向 DAM 的方向转变,形成促进 DAM 转型的 Trem2-APOE 轴;若把 APOE 或 Trem2 敲除,小胶质细胞便不会向 DAM 方向转变^[18]。从亚型的层面研究 APOE,发现 APOE4 的表达可以使小胶质细胞对于受伤的神经元有更高的攻击性,促进静息态小胶质细胞转变为 DAM,所以在 TREM2-APOE 轴起主要作用的 APOE 亚型可能为 APOE4^[19]。

3.2.3 IRF1、LXR β 和 CEBP α

在促炎和抗炎 DAM 发现之后,有研究对小胶质细胞的转录组数据进行网络分析,确定了几个可以调节小胶质细胞类型转变的转录因子,分别为 CEBP α 、IRF1 和 LXR β 。CEBP α 、IRF1 和 LXR β 都可以调节 DAM 的核心基因如 Apoe、Axl、Clec7a、Tyrobp 和 Trem2,很大程度上决定了稳态小胶质细胞向 DAM 的转型。其中 IRF1 调节稳态小胶质细胞、促炎 DAM、抗炎 DAM 三个模块的基因,在小胶质细胞反应中起双重作用;CEBP α 和 LXR β 则主要调节稳态小胶质细胞和抗炎 DAM 的基因,起保护作用。除了调节促炎和抗炎 DAM 表型,CEBP α 、IRF1 和 LXR β 还可以下调小胶质细胞介导的神经元突触修剪相关的基因,而 IRF1 和 LXR β 可以上调吞噬相关的基因,增强小胶质细胞对 A β 的吞噬,因此 IRF1 和 LXR β 可能通过介导从稳态小胶质细胞的突触修剪功能向 AD 的吞噬清除功能的转变,来促进促炎 DAM 表型的生成^[20]。

3.2.4 其他 DAM 危险基因

除上述位点外,还陆续发现了许多其他与 DAM

相关的危险位点。(1)CD33 和 TYROBP/DAP12 分别为 Trem2 上游和下游的分子,且在 DAM 中表达量大幅增加^[14]。(2)膜受体 ABCA7、Tyro3/Axl/Mer (TAM)、CX3CR1 与 P2Y12 等分别可以结合 A β 蛋白、凋亡神经元、补体与细胞外 ADP 等,对于 DAM 的功能至关重要。(3)细胞激酶 RIPK1 可以介导一部分小胶质细胞的基因变化,促使小胶质细胞向 DAM 的转型^[21]。(4)基因分析发现了一些调节 DAM 表型的基因,其中 Apoe, Hla-dqa1 可以促进促炎 DAM 的表达;Ms4a4e, Hla-dqb1 和 Trem2 促进抗炎 DAM 表达;Bin1, Cnn2, Picalm 和 Sorl1 促进稳态小胶质细胞基因表达^[14]。(5)许多基因的变异可以增加疾病发生的风险如 TYROBP、GRN 等,另一些基因如 MS4A6A、PLCG2、PICALM 等的变异则可以对疾病起保护性作用,而这些基因都与 DAM 有很强的相关性,在 DAM 中的表达量与稳态小胶质细胞相比差异显著^[13]。

4 研究展望

显然,从转录组学方面对小胶质细胞进行全面分析,构建小胶质细胞分型可以摆脱传统细胞分型的局限,更加全面和科学的认识小胶质细胞在疾病中的作用。但这一分型体系研究仍在初始阶段,对于小胶质细胞在不同时期是如何被诱导为特异的亚型、不同亚型的小胶质细胞所承担的具体作用,以及这些分型中所预测到的 AD 危险位点所介导的作用都尚未清楚,因此,关于 DAM 的相关研究仍需深入,以期对 AD 开辟新的诊治思路。

参考文献:

- [1] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.
- [2] Pimenova AA, Raj T, Goate AM. Untangling genetic risk for alzheimer's disease [J]. Biol Psychiatry, 2018, 83(4): 300-310.
- [3] Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? [J]. Nat Neurosci, 2016, 19(8): 987-991.
- [4] Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages [J]. Science, 2010, 330(6005): 841-845.
- [5] Waisman A, Ginhoux F, Greter M, et al. Homeostasis of microglia in the adult brain: review of novel microglia depletion systems [J]. Trends Immunol, 2015, 36(10): 625-636.
- [6] Saresella M, La Rosa F, Piancone F, et al. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener, 2016, 11: 23.

- [7] Yeh FL, Wang Y, Tom I, et al. TREM2 binds to apolipoproteins, including APOE and CLU/APOJ, and thereby facilitates uptake of amyloid-beta by microglia [J]. *Neuron*, 2016, 91(2): 328–340.
- [8] Yuan P, Condello C, Keene CD, et al. TREM2 Haplodeficiency in mice and humans impairs the microglia barrier function leading to decreased amyloid compaction and severe axonal dystrophy [J]. *Neuron*, 2016, 90(4): 724–739.
- [9] Shi Y, Holtzman DM. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease; APOE and TREM2 in the spotlight [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(12): 759–772.
- [10] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1276–1290.
- [11] Mrdjen D, Pavlovic A, Hartmann FJ, et al. High-dimensional single-cell mapping of central nervous system immune cells reveals distinct myeloid subsets in health, aging, and disease [J]. *Immunity*, 2018, 48(2): 380–395.
- [12] Krasemann S, Madore C, Cialic R, et al. The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases [J]. *Immunity*, 2017, 47(3): 566–581.
- [13] Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, et al. Disease-associated microglia: a universal immune sensor of neurodegeneration [J]. *Cell*, 2018, 173(5): 1073–1081.
- [14] Rangaraju S, Dammer EB, Raza SA, et al. Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2018, 13(1): 24–38.
- [15] Mathys H, Adai K, Gao F, et al. Temporal tracking of microglia activation in neurodegeneration at single-cell resolution [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(2): 366–380.
- [16] Da M S, Kipnis J. DAMed in (Trem) 2 Steps [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1172–1174.
- [17] Ulland TK, Song WM, Huang SC, et al. TREM2 maintains microglial metabolic fitness in Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 649–663.
- [18] Velez J I, Lopera F, Sepulveda-Falla D, et al. APOE*E2 allele delays age of onset in PSEN1 E280A Alzheimer's disease [J]. *Mol Psychiatry*, 2016, 21(7): 916–924.
- [19] Muth C, Hartmann A, Sepulveda-Falla D, et al. Phagocytosis of apoptotic cells is specifically upregulated in apoE4 expressing microglia *in vitro* [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 181–206.
- [20] Gao T, Jernigan J, Raza S A, et al. Transcriptional regulation of homeostatic and disease-associated-microglial genes by IRF1, LXRbeta, and CEBPalpha [J]. *Glia*, 2019, 67(10): 1958–1975.
- [21] Ofengeim D, Mazzitelli S, Ito Y, et al. RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(41): E8788–E8797.

[收稿日期] 2019-11-05