

光基因技术选择性调控星形胶质细胞内 钙离子水平的研究

魏文洁^{a,b}, 苏醒^a, 谢敏杰^a, 王伟^a, 骆翔^a, 喻志源^a

摘要 目的:研究光敏感通道蛋白(ChR2)选择性调控星形胶质细胞,对其细胞内钙离子水平的影响。**方法:**离体培养SD大鼠星形胶质细胞,采用慢病毒载体Lenti-GFAP-ChR2-YFP感染星形胶质细胞后,钙离子荧光探针Rhod-2 AM作为钙离子活动的指示,以470 nm波长的蓝光刺激星形胶质细胞,实时在共聚焦荧光下检测星形胶质细胞钙离子活动。**结果:**成功将光敏感通道蛋白(ChR2)表达在星形胶质细胞;激活光敏感通道ChR2后,引起星形胶质细胞内钙信号活动,钙离子水平增加。**结论:**以光敏感通道ChR2为核心的光基因技术可运用于调控星形胶质细胞钙离子活动。

关键词 光基因技术;光敏感通道2;星形胶质细胞;钙离子

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2020.04.001

魏文洁, 苏醒, 谢敏杰, 等. 光基因技术选择性调控星形胶质细胞内钙离子水平的研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(4): 187-189, 197.

Effect of Selective Optogenetic Regulation on Astrocyte Intracellular Calcium WEI Wen-jie^{a,b}, SU Xing^a, XIE Min-jie^a, WANG Wei^a, LUO Xiang^a, YU Zhi-yuan^a. *a. Department of Neurology, b. Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China*

Abstract Objective: To study the effect of selective optogenetic regulation by Channelrhodopsin2 (ChR2) on intracellular calcium levels in astrocytes. **Methods:** Astrocytes were cultured from SD neonate rats, and a lentiviral vector, Lenti-GFAP-ChR2-YFP, was used to transduce cultured astrocytes. Astrocytes were stimulated using blue light with a wavelength of 470 nm, and intracellular calcium signals, as indicated by the fluorescent Ca²⁺ indicator Rhod-2 AM, were recorded in real time by confocal fluorescence microscopy. **Results:** ChR2 was successfully expressed in astrocytes. Photostimulation of ChR2 in astrocytes led to the activation of intracellular calcium signaling and an increase in calcium levels. **Conclusion:** The use of ChR2 as an essential element of optogenetics could be a powerful tool in the regulation of calcium in astrocytes.

Key words optogenetics; Channelrhodopsin2; astrocyte; Ca²⁺

星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的一类胶质细胞^[1]。它通过细胞膜上的各类受体和通道,维持离子平衡、ATP和谷氨酸稳态等,维系大脑的微环境,对神经元具有营养、支持、修复和保护的作用^[2,3]。星形胶质细胞还具有调控神经元突触形成及信息传递的功能^[4,5]。星形胶质细胞通过钙信号与神经网络发生双向通信^[6,7]。在各种生理、病理情况下,星形胶质细胞细胞内钙离子浓度增加,产生钙波震荡,释放各种胶质递质(如谷氨酸、ATP、D-丝氨酸等)并发挥相应的调控作用^[8,9]。星形胶质细胞参与各种神经系统疾病的发病及修复,是治疗的重要靶点之一。

化学药物治疗神经系统疾病,常因缺乏细胞类型特异性而带来很多副作用。光基因技术将光学技术与现代遗传学结合,将具

有兴奋或抑制作用的光敏感通道,靶向性地导入特定的细胞或组织,以达到特异性地调控的目的^[10]。其中光敏感通道2(Channelrhodopsin2, ChR2)是光遗传学中核心的技术工具之一^[11,12]。

本研究拟采用光基因调控技术,将ChR2选择性地表达在星形胶质细胞中,探讨该方法用于研究星形胶质细胞钙信号通路及星形胶质细胞与其它细胞的相互作用的前景和意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

SPF级新生24 h内的SD大鼠乳鼠,购于华中科技大学同济医学院实验动物中心。DMEM/F12、胎牛血清、胰蛋白酶购于美国Hyclone公司,多聚赖氨酸购于美国

作者单位

华中科技大学同济医学院附属同济医院 a. 神经内科, b. 肿瘤科
武汉 430030

基金项目

国家自然科学基金面上项目(No. 81771341);
国家自然科学基金青年项目(No. 81600990);
湖北省自然科学基金(No. 2017CFB705)
收稿日期 2019-12-20
通讯作者 喻志源
zhiyuan_yu@126.com

Sigma公司,小鼠抗大鼠 GFAP 抗体、钙离子荧光探针 Rhod-2 AM购于美国 Neomarkers 公司,FITC 标记羊抗兔 IgG 购于美国 Jackson ImmunoResearch 公司。慢病毒载体 Lenti-GFAP-ChR2-YFP 受赠于中国科学院深圳先进技术研究院王立平教授课题组。

1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞的原代培养和纯化鉴定 在无菌条件下取乳鼠大脑,D-hank's液漂洗3遍,冰上取皮质组织置于冰D-hank's液中;剪碎、吹打分散为细胞悬液,200目筛网过滤;800 rpm、4℃离心8 min,去除上清,用全培养基(DMEM/F12培养液+20%胎牛血清)重悬;调整细胞悬液中细胞密度为 $3.5\times 10^5/\text{mL}$,接种于多聚赖氨酸(0.1 mg/mL)包被过的培养瓶中,置于37℃、95%O₂、5%CO₂培养箱中培养;2~3 d换液1次;约7 d后,37℃恒温摇床摇动过夜,去除非星形胶质细胞;待细胞生长汇合至90%~95%时,按1:2~3传代至新培养瓶培养或按所需密度接种于多聚赖氨酸包被过的盖玻片中培养。实验所用细胞为传2代细胞。

当细胞爬片中星形胶质细胞融合率约80%时,弃去培养基,-20℃预冷冰甲醇于室温下固定细胞15 min,PBS漂洗3次,0.2% Triton X-100破膜15 min,5% BSA室温封闭1 h,小鼠抗大鼠 GFAP 抗体(1:200)4℃孵育过夜,PBS漂洗3次,FITC 标记羊抗小鼠 IgG 抗体(1:200)避光室温孵育1 h,PBS漂洗3次,DAPI 染核室温10 min,PBS漂洗3次,50%甘油封片,荧光显微镜进行观察,采集图片。

1.2.2 慢病毒感染星形胶质细胞 准备细胞:将状态良好的星形胶质细胞传代接种到多聚赖氨酸(0.1mg/mL)包被的6孔板中。细胞计数后,进行铺板。每孔加入2 mL 传代细胞全培养基(DMEM/F12 培养液+10%胎牛血清)。保证感染病毒时融合效率约为40%。病毒感染:感染前,弃去原培养基,每孔加入2 mL 无血清培养基。每孔加入慢病毒1 μL(滴度为 1×10^9 TU/mL),轻摇匀。放回37℃、95%O₂、5%CO₂培养箱中培养。感染24 h后全量换成传代细胞全培养基。72 h后观察荧光表达,用于后续光刺激试验。转染慢病毒载体 Lenti-GFAP-ChR2-YFP 的为实验组,转染空载体的为对照组。

1.2.3 细胞钙成像技术 染料孵育:取成功感染慢病毒的星形胶质细胞,用37℃平衡温度的PBS洗涤2次,于细胞孵育箱内PBS孵育10 min。加入 Rhod-2 AM(终浓度5 μmol/L),37℃孵育20 min。PBS洗涤细胞3次后,PBS孵育30 min脱酯,上机检测。挑出细胞

爬片,固定于专用皿上。采用LED光照系统激发 ChR2,波长为470 nm,频率为10 Hz,占空比为1:2,LED亮灭时间比为50 ms:50 ms。400倍物镜观察,在同一视野下,每复孔随机采集6个随机视野,每视野下随机选择4~6个细胞进行实时荧光记录。扫描间隔为1.5 s,记录总时间为25 min。首先进行基线记录120 s,然后打开光刺激系统,在光照刺激下连续记录荧光变化。同样的方法进行3次独立实验,每次各组设立3个复孔。2组各采集100个细胞的钙信号变化数据。每个细胞在干预点前120 s的数据取平均数作为基线水平;各时间点的数据除以基线值,得到相对变化值;数据按照干预点对齐,将各时间点数据(共200个样本)综合后进行统计学分析。

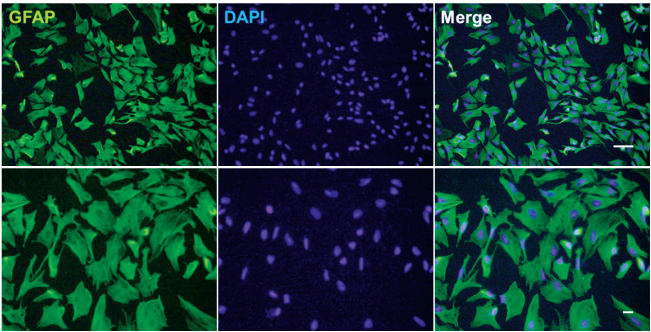
1.3 统计学处理

采用SPSS17.0软件,计数资料以率表示。

2 结果

2.1 星形胶质细胞的培养与鉴定

星形胶质细胞接种24~48 h后开始贴壁,折光性较弱,细胞生长缓慢,3~5 d后,细胞生长速度加快,折光性增强,向周围铺展,部分细胞开始伸出伪足。约7~9 d后,细胞融合率可接近100%。细胞呈梭型、多边形或不规则形,以星形胶质细胞为主,含有少量的小胶质细胞和少突胶质细胞。恒温震荡摇床过夜培养可去除大部分小胶质细胞和少突胶质细胞。原代星形胶质细胞经传代后,生长更加迅速,细胞胞体变大,分枝多,多呈不规则形,小胶质细胞及少突胶质细胞几乎不可见。星形胶质细胞标记抗体 GFAP 免疫荧光染色结果显示,细胞计数星形胶质细胞占有所有细胞的98%以上,见图1。



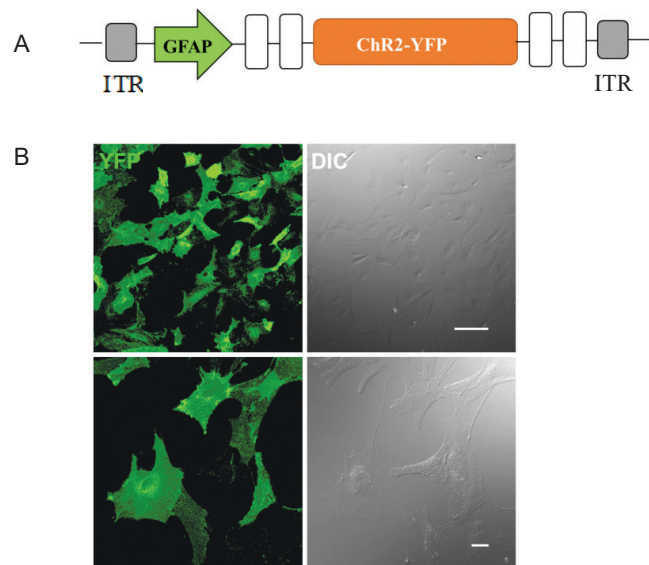
注:绿色荧光为GFAP,蓝色为细胞核DAPI染色;GFAP阳性细胞占总细胞的98%以上(荧光显微镜,bar=100 μm)

图1 大鼠皮质星形胶质细胞鉴定

2.2 慢病毒成功感染星形胶质细胞

Lenti-GFAP-ChR2-YFP 为携带有 GFAP 启动子的

慢病毒载体,光敏感通道蛋白ChR2在GFAP启动子的控制下,选择性地表达于星形胶质细胞中,并且携带有黄色荧光蛋白(YFP)标记,见图2A。Lenti-GFAP-ChR2-YFP感染星形胶质细胞后约4 d,感染效率高达90%~100%,见图2B。



注:(A)Lenti-GFAP-ChR2-YFP慢病毒载体的结构示意图;(B)星形胶质细胞感染Lenti-GFAP-ChR2-YFP后的自发荧光在激光共聚焦显微镜下的显像(bar=100 μm)

图2 ChR2高效地表达于星形胶质细胞

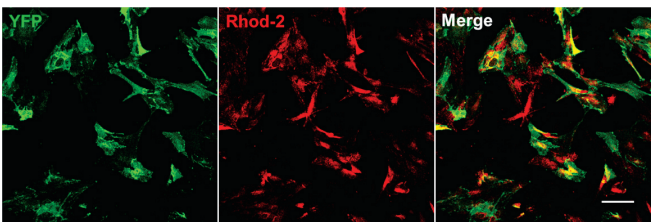
2.3 激发光敏感通道可引起星形胶质细胞内钙离子浓度升高

本研究应用了钙离子荧光探针Rhod 2-AM来指示细胞内钙离子活动,见图3。实验组细胞在接受光照刺激后,随即出现细胞内钙离子浓度的增加;在光照停止后,细胞内钙离子浓度少许回落后,又继续上升,见图4A。对照组细胞在接受光照刺激后,并不出现明显的胞内钙离子浓度变化,见图4B。

3 讨论

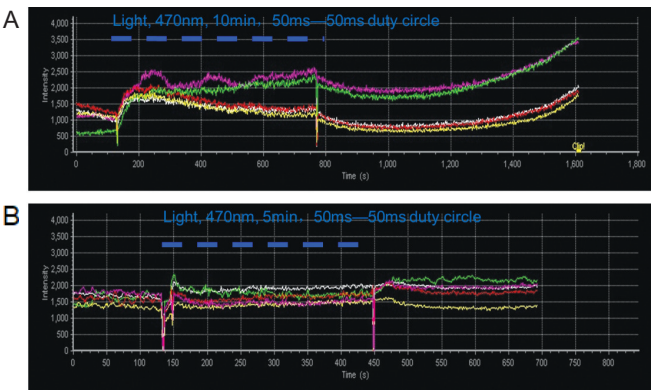
星形胶质细胞所有大脑细胞的20%~40%^[13]。星形胶质细胞作用广泛,如维持细胞外离子稳态、介导神经递质清除、调控突触形成/清除,并参与神经元及血管内皮功能的调控等^[4,9,14]。星形胶质细胞钙信号被发现后^[15],研究者们首次提出星形胶质细胞可能参与神经回路功能^[16]。

星形胶质细胞并不属于电兴奋性细胞。第二信使Ca²⁺活动是星形胶质细胞活动的重要形式之一。星形胶质细胞钙离子升高与胶质递质、大脑血流调节、神经元活性等有关^[17]。在病理情况下,胶质递质的释放可引起神经元兴奋性增加和细胞死亡^[18]。



注:绿色荧光为感染慢病毒载体后的自发荧光,红色荧光为Rhod-2-AM显示的细胞内钙离子(bar=100 μm)

图3 Rhod-2 AM指示星形胶质细胞内钙离子信号



注:(A)实验组星形胶质细胞,在接受光刺激后的钙离子信号变化;(B)对照组星形胶质细胞,在接受光刺激后的未检测到钙离子信号变化

图4 激发ChR2可引起星形胶质细胞内钙离子浓度升高

采用光遗传学技术对于钙信号通路及神经回路进行研究^[19],既可避免电刺激的不精确性和侵入性,又可避免药物干预的非特异性^[20]。通过光基因技术选择性调控神经元放电和信息传递,可改变动物认知、奖赏、呼吸、睡眠觉醒等行为^[10,21,22]。ChR2是7次跨膜非选择性阳离子通道蛋白,在强光刺激下,通道打开,细胞外的阳离子进入细胞内形成离子流,即为光电流。ChR2虽然是非选择性阳离子通道,但该通道对不同的阳离子的通透性有所差异:Ca²⁺>Sr²⁺>Ba²⁺>Zn²⁺>Mg²⁺(≈0)。

本研究采用慢病毒载体,在GFAP启动子的控制下,将ChR2导入星形胶质细胞中。波长为470 nm的蓝光刺激细胞后,有效地激发了星形胶质细胞钙波。本研究证实了以ChR2调控星形胶质细胞的可行性。本课题组后续将借助光基因技术,研究选择性地调控星形胶质细胞,是否引起胶质递质的释放,是否引起胶质细胞钙波向神经元的传递,星形胶质细胞通过何种通路调控神经元的活性及功能等问题。

参考文献

[1] Hol EM1, Pekny M2. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system[J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 32: 121-130.
[2] Seifert G, Steinhäuser C. Neuron-astrocyte signaling and epilepsy[J].

工作中,有上述危险因素急性大动脉粥样硬化型脑梗死患者,早期应用TEG检测发现AR,可以通过以下途径改善或减少AR的发生:①积极控制血糖,力争糖化血红蛋白控制在6.5%以内;②转变不良日常行为方式,包括戒烟、戒酒;③针对高Hcy血症患者,给予叶酸及B族维生素的补充;④调整抗血小板用药方案,包括加大阿司匹林剂量或换用/联合P₂Y₁₂抑制剂(氯吡格雷或替格瑞洛)。总之,脑梗死的抗血小板治疗应该采取个体化方案,针对危险因素进行精准医疗,达到最佳防治效果。

参考文献

[1] 孙海欣, 王文志. 我国脑卒中流行状况及其防控策略[J]. 中华神经科杂志, 2017, 50: 881-884.
 [2] 许晶晶, 唐晓芳, 姚懿, 等. 阿司匹林抵抗与环氧化酶-1、环氧化酶-2及血栓烷A₂受体基因多态性相关性研究[J]. 中国循环杂志, 2016, 31: 644-648.
 [3] 王祥, 张鸿. 糖化白蛋白与阿司匹林抵抗的关系[J]. 中国脑血管病杂志, 2017, 14: 491-495.
 [4] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48: 246-257.

[5] MADDEN KP, KARANJIA PN, ADAMS HP Jr, et al. Accuracy of initial stroke subtype diagnosis in the TOAST study. Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment[J]. Neurology, 1995, 45: 1975-1979.
 [6] 相春霞, 陈云霞, 陈景红, 等. 血栓弹力图在缺血性卒中抗血小板治疗中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 23: 158-160.
 [7] Englyst NA, Horsfield G, Kwan J, et al. Aspirin resistance is more common in lacunar strokes than embolic strokes and is related to stroke severity[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28: 1196-1203.
 [8] 徐如祥, 赵浩. 急性缺血性卒中溶栓治疗展望[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17: 114-116.
 [9] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43: 146-153.
 [10] PASALA T, HOO JS, LOCKHART MK, et al. Aspirin resistance predicts adverse cardiovascular events in patients with symptomatic peripheral artery disease[J]. Tex Heart Inst J, 2016, 43: 482-487.
 [11] Soaita I, Yin W, Rubenstein DA. Glycated albumin modifies platelet adhesion and aggregation responses[J]. Platelets, 2017, 28: 682-690.
 [12] Li J, Wang Y, Wang D, et al. Glycated albumin predicts the effect of dual and single antiplatelet therapy on recurrent stroke[J]. Neurology, 2015, 84: 1330-1336.
 [13] CAI GY, ZHOU WJ, LU Y, et al. Aspirin resistance and other aspirin-related concerns[J]. J Neurol Sci, 2016, 37: 181-189.
 [14] 董珍, 朱婷珂, 徐俊. 同型半胱氨酸与痴呆: 国际共识声明[J]. 中国卒中杂志, 2019, 14: 142-148.
 [15] 臧颖卓, 史立信, 王清涛, 等. 急性脑梗死合并高同型半胱氨酸血症患者阿司匹林抵抗及相关因素分析[J]. 脑与神经疾病杂志, 2016, 24: 755-758.

(本文编辑:唐颖馨)

(上接第189页)

Exp Neurol, 2013, 244: 4-10.
 [3] Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, et al. Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex[J]. PLoS Biol, 2014, 12: e1001747.
 [4] Baldwin KT, Eroglu C. Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis[J]. Curr Opin Neurobiol, 2017, 45: 113-120.
 [5] Diniz LP, Tortelli V, Matias I, et al. Astrocyte Transforming Growth Factor Beta 1 Protects Synapses against Aβ Oligomers in Alzheimer's Disease Model[J]. J Neurosci, 2017, 37: 6797-6809.
 [6] Wu XM, Qian C, Zhou YF, et al. Bi-directionally protective communication between neurons and astrocytes under ischemia[J]. Redox Biol, 2017, 13: 20-31.
 [7] Losi G, Mariotti L, Sessolo M1, et al. New Tools to Study Astrocyte Ca²⁺ Signal Dynamics in Brain Networks In Vivo[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 134.
 [8] Makitani K, Nakagawa S, Izumi Y, et al. Inhibitory effect of donepezil on bradykinin-induced increase in the intracellular calcium concentration in cultured cortical astrocytes[J]. J Pharmacol, 2017, 134: 37-44.
 [9] Bazargani N, Attwell D. Astrocyte calcium signaling: the third wave[J]. Nat Neurosci, 2016, 19: 182-189.
 [10] Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience[J]. Nat Neurosci, 2015, 18: 1213-1225.
 [11] Almad A, Maragakis NJ. A stocked toolbox for understanding the role of astrocytes in disease[J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14: 351-362.
 [12] Kim CK, Adhikari A, Deisseroth K. Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience[J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18: 222-235.

[13] Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits[J]. Nat Neurosci, 2015, 18: 942-952.
 [14] Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7: a020370.
 [15] Khakh BS, McCarthy KD. Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7: a020404.
 [16] Smith SJ. Neural signalling. Neuromodulatory astrocytes[J]. Curr Biol, 1994, 4: 807-810.
 [17] Min R, Nevian T. Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses[J]. Nat Neurosci, 2012, 15: 746-753.
 [18] Kawamata H, Ng SK, Diaz N, et al. Abnormal intracellular calcium signaling and SNARE-dependent exocytosis contributes to SOD1G93A astrocyte-mediated toxicity in amyotrophic lateral sclerosis[J]. J Neurosci, 2014, 34: 2331-2348.
 [19] Xie Z, Yang Q, Song D, et al. Optogenetic manipulation of astrocytes from synapses to neuronal networks: A potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases[J]. Glia, 2020, 68: 215-226.
 [20] Welberg L. Techniques: Optogenetics takes more control[J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14: 587.
 [21] Cerritelli S, Hirschberg S, Hill R, et al. Activation of Brainstem Pro-opiomelanocortin Neurons Produces Opioidergic Analgesia, Bradycardia and Bradypnoea[J]. PLoS One, 2016, 11: e0153187.
 [22] Alilain WJ, Li X, Horn KP, et al. Light-induced rescue of breathing after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2008, 28: 11862-11870.

(本文编辑:唐颖馨)