

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.05.001

• 基础研究 •

天冬酰胺内肽酶和胶质细胞在创伤性脑损伤中的激活 *

马小莉¹ 赵昕爽² 蔡曙光³ 张昊哲² 张义欢² 宋明柯^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025;

2 上海交通大学医学院 2019 级临床医学专业五年制三大班 上海 200025;

3 上海交通大学医学院 2019 级儿科学专业二大班 上海 200025)

摘要 目的:创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)缺乏安全有效的治疗手段,亟须寻找新的干预靶点。天冬酰胺内肽酶(asparaginyl endopeptidase, AEP)在免疫和神经系统疾病中起重要作用,本研究观察了小鼠 TBI 模型中 AEP 的激活和变化,探讨 AEP 对脑损伤和修复的意义。**方法:**控制性皮层撞击法在小鼠右半球制作 TBI 损伤,在造模后的不同时间点,测定受损脑组织内的乳酸含量和 AEP 的活性变化,免疫荧光化学染色观察 TBI 之后 3 天的胶质细胞活化,以及 AEP 在其中的表达。**结果:**TBI 造成乳酸在受损脑组织内逐渐堆积,导致小胶质细胞和星形胶质细胞的反应性活化和增生,AEP 的上调和激活出现在 TBI 的继发性脑损伤阶段,AEP 在小胶质细胞和星形胶质细胞内均出现上调。**结论:**AEP 有可能参与调控 TBI 引发的胶质细胞活化,在神经损伤和修复中发挥重要作用。

关键词:创伤性脑损伤;天冬酰胺内肽酶;小胶质细胞;星形胶质细胞;神经保护

中图分类号:R-33;R651.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)05-801-06

Activation of the Asparaginyl Endopeptidase (AEP) and Glial Cells
in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury *MA Xiao-li¹, ZHAO Xin-shuang², CAI Shu-guang³, ZHANG Hao-zhe², ZHANG Yi-huan², SONG Ming-ke^{1Δ}

(1 Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China;

2 The third class of the five-year program of clinical medicine in 2019, Shanghai Jiaotong University School of Medicine,

Shanghai, 200025, China; 3 The second class of the program of pediatric medicine in 2019,

Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: There is a lack of effective treatment for traumatic brain injury (TBI), and it is needed to find new intervention targets. The asparaginyl endopeptidase (AEP) plays an important role in immune and neurological diseases, and this study observed the activation and changes of AEP in a mouse TBI model to explore the significance of AEP on brain injury and repair. **Methods:** Controlled cortical impact was used to create TBI damage in the right cerebral hemisphere of mice, and the lactate content and AEP activity changes in the damaged brain tissue were measured at different time points after modeling, and the activation of glial cells and the expression of AEP in TBI were observed by immunofluorescence chemical staining 3 days after TBI. **Results:** TBI causes lactate to accumulate in damaged brain tissue, resulting in reactive activation and proliferation of microglia and astrocytes. The upregulation and activation of AEP occur in the secondary brain injury stage of TBI, and AEP is upregulated in both microglia and astrocytes. **Conclusions:** AEP has the potential to play an important role in nerve injury and repair by participating in the regulation of glial cell activation triggered by TBI.

Key words: Traumatic Brain Injury; Asparaginyl Endopeptidase; Microglia; Astrocytes; Neuroprotection

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R651.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)05-801-06

前言

创伤性颅脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)是世界范围最主要的致死、致残疾病之一,多见于坠落、物体撞击、交通事

故和战争打斗等对头部造成的伤害。2019 年的一份报告显示全球每年有超过 5000 万人遭受 TBI^[1],我国的 TBI 患者数量超过世界上大多数国家^[2]。目前临床针对 TBI 的治疗手段非常有限,通常以外科手术治疗为主,辅以对症治疗药物,但是不能有

* 基金项目:国家自然科学基金项目(8247050413,91949116);上海市科学技术委员会科技发展基金项目

作者简介:马小莉(1997-),女,硕士研究生,主要研究方向:神经药理学,E-mail: mxl99@outlook.com

Δ 通讯作者:宋明柯,男,博士生导师,研究员,主要研究方向:神经药理学,E-mail: mksong@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2023-11-25 接受日期:2023-12-21)

效改善相关功能障碍^[3,4]。TBI 损伤过程分为原发性和继发性脑损伤两个阶段,原发性脑损伤是机械外力对脑组织造成的直接破坏,包括脑震荡、脑挫裂伤、颅内出血、弥漫性轴索损伤等。继发性脑损伤是由原发性损伤触发的一系列的分子、细胞和生物化学反应,包括血脑屏障破坏、兴奋性神经毒性、细胞内钙超载、氧化应激、线粒体损伤和炎症反应,以及免疫和代谢功能失调,临床体征常表现为脑肿胀、脑水肿及脑疝等^[5-7]。继发性脑损伤不仅加重原发性脑损害,长期还会引发神经退行性改变,易导致脑萎缩、慢性创伤性脑病、癫痫、应激障碍和抑郁症等后遗症,也增加痴呆和帕金森氏病的风险^[8-10]。TBI 原发性脑损伤多为难以挽救的组织损坏,继发性脑损伤是一个可以部分逆转的病理进程,然而,国内外有关继发性脑损伤的治疗研究尚未获得突破,探索新的神经保护方法和干预靶点是 TBI 治疗研究的重点方向。

天冬酰胺内肽酶 (asparaginyl endopeptidases, AEP) 是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶,由 Legumain (LGMN) 基因编码,在肿瘤、免疫和神经系统疾病中起着至关重要的作用^[11,12]。在缺血性脑卒中、阿尔茨海默病(AD)和帕金森氏病(PD)的实验研究中,AEP 参与神经退行性病变的发生发展过程^[11,13,14]。首先,健康脑组织内的 AEP 表达水平较低,在脑衰老、神经兴奋性毒性或缺血缺氧不利条件刺激下,AEP 的表达出现增高,其蛋白水解酶活性明显上调。已知能被 AEP 水解的底物较多,包括淀粉样前体蛋白 APP、微管相关蛋白 tau、 α -突触核蛋白 (α -Syn) 和 TDP-43 等^[15,16]。近年来研究进展表明,激活的 AEP 对这些神经退变相关的蛋白分子执行病理性剪切,结果促进 tau 蛋白磷酸化和神经纤维缠结,增加 β -淀粉样蛋白肽(A β)的生成和增强 α -Syn 的神经毒性,导致神经突触丧失和多巴胺神经细胞死亡,最终诱导 AD 和 PD 样病变^[11,17]。另外,有研究发现 AEP 通过参与 Toll 样受体(TLRs)蛋白的剪切和信号转导,促使脑组织内的小胶质细胞发生活化 and 诱发神经炎症,导致神经元变性坏死和认知功能障碍^[18-20]。反过来,在上述神经退变模型中应用遗传学和药理学方法抑制 AEP 酶活性,则可以抑制 tau、APP、TDP-43 和 α -Syn 的病理性剪切,减少神经毒性和降低炎症反应,改善模型动物的认知功能障碍。以上研究进展说明 AEP 在神经系统损伤和退行性病变过程中发挥重要作用。

TBI 增加慢性创伤性脑病、痴呆症和帕金森症的患病风险,越来越多的证据表明 TBI 患者容易出现神经退行性疾病和认知缺陷。TBI 会诱发脑组织中乳酸水平增加,这有助于需酸性条件诱导的 AEP 酶原成熟和活化。有研究在 TBI 诱导大鼠海马依赖性认知缺陷模型中发现,海马中 AEP 的活性水平显著升高,并且与 tau 蛋白的高度磷酸化水平相关^[21]。对 AD 三转基因小鼠模型(3xTg-AD)施加重复性轻度 TBI 损伤后,AEP 的活性水平同样出现升高,也与 tau 蛋白过度磷酸化密切相关^[22]。有研究提出 TBI 通过激活相关的转录因子增加 AEP 的表达,激活的 AEP 对 APP 和 tau 蛋白实施病理性剪切加工,导致 A β 生成增多和 Tau 蛋白过度磷酸化,以及诱导神经炎症和神经毒性,引发 AD 样病理改变和认知功能损害^[23,24]。在 TBI 模型中应用药物或遗传学手段抑制 AEP 的激活,则能减少上述病理性改变和改善认知功能障碍,说明 AEP 可能是干预 TBI 继发性脑损伤和神经退变的潜在靶点,经由 AEP 激活和底物降解产

生的病变分子及其病理作用值得深入探究。

当下有关 AEP 在 TBI 中的病理作用研究刚刚起步,相关论文报道较少^[23],有许多尚未解决的问题。例如,TBI 损伤周围脑组织 AEP 激活的时程,小胶质细胞和星形胶质细胞中 AEP 的激活状况。本研究针对这些科学问题,采用控制性皮层撞击法(controlled cortical impact, CCI)在小鼠右脑半球制作 TBI 损伤,初步探究了 AEP 在 TBI 中的激活状况,为后续研究 AEP 在 TBI 继发性脑损伤中的病理作用提供了研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 C57BL/6J 小鼠,SPF 级,由上海交通大学医学院实验动物中心提供,普通环境饲养。小鼠随机分为实验组和假手术对照组,每组 4~5 只,所有动物实验操作均按相关规定进行,实验结束后按照国家动物福利法处死。

1.2 主要仪器

小鼠脑立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司);低速高速离心机(德国 Eppendorf 公司);手持式小型组织研磨器(天根生化科技(北京)有限公司);Leica TCS SP8 Confocal System (德国 Leica 公司);小动物保温箱(美国 Lyon Technologies 公司);多功能酶标仪 VarioskanFlash(美国 Thermo 公司);37℃ 孵育箱(上海一恒科学仪器有限公司);精细颅脑损伤器 PinPoint? PCI3000(美国 Hatteras Instruments Inc 公司)。

1.3 主要试剂

乳酸(LD)测试盒(南京建成,A019-2-10);Iba1 抗体(abcam, ab178847);GFAP 抗体 (CST, 3670S);LGMN 抗体 (赛默飞, PA587990);荧光二抗(Jackson);AEP 标准品(以色列 Prospec 公司);底物 Cbz-Ala-Ala-Asn-AMC(上海吉尔生化有限公司);Triton X-100(上海源叶生物科技有限公司);防淬灭封片液(上海碧云天生物技术有限公司);DAPI 染色液(上海碧云天生物技术有限公司);BCA 蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.4 小鼠控制性脑皮质撞击模型 (controlled cortical impact, CCI)的制备

采用异氟烷吸入方法麻醉小鼠,异氟烷诱导小鼠麻醉的浓度为 3-4%,维持浓度为 1-1.5%。待完全麻醉后,剔除小鼠头部毛发,暴露头皮。将小鼠俯卧位固定于脑立体定位仪,要求头顶尽量呈水平位,固定要求牢固可靠。剪去颅顶部毛发,碘伏消毒头部皮肤。在头部正中形成约 2.0 cm 纵形切口,分离骨膜,暴露前囟及冠状缝、矢状缝,将切口右侧皮肤下拉或向内轻微折叠,充分暴露手术视野。使用微型颅钻,以右侧冠状缝和人字缝之间、中线旁开 2 mm 为中心点形成直径为 2.5 mm 骨窗,骨窗需略大于撞击头,用尖镊轻轻挑开、去除骨片,暴露硬脑膜。调节撞击杆,置于硬脑膜,并与骨窗平面垂直,调节装置固定高度打击脑区,从而形成顶叶脑挫裂伤,撞击后应迅速移开撞击杆,避免二次损伤。假手术对照组小鼠除了不进行颅脑撞击外,其他手术操作与实验组小鼠一致。手术范围内充分止血和消毒后用组织胶水缝合头皮。

1.5 乳酸含量的检测

分别于 TBI 后的第 1、2、3、5 和第 7 天,裂解脑组织细胞,

并使用乳酸(LD)测试盒提取并检测乳酸含量。使用 4%水合氯醛(0.1 mL/10 g)对小鼠进行麻醉,直至尾捏试验无反应说明小鼠充分麻醉。采用断头剪开枕骨大孔的方式取出损伤周围脑组织,并放入匀浆管中。准确称量脑组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水,用眼科剪剪碎脑组织,在冰上用手持匀浆机对脑组织进行机械匀浆直至无大块脑组织沉。4℃,2500 rpm,离心机离心 10 分钟,取上清液(10%匀浆上清液)进行测定,同时取部分脑匀浆进行 BCA 蛋白定量测试样品的蛋白浓度。设置空白管、标准管和测定管,根据分组不同,分别加入一定量蒸馏水、标准品、待测样本、酶工作液、显色剂;混匀,于 37℃水浴准确反应 10 分钟,加入终止液,使用酶标仪测定波长 530 nm 的吸光值。根据计算公式计算样品中乳酸的含量。

1.6 酶活性检测

别于 TBI 后的第 6、12、24 小时(h)和 2、3、5、7 天(d),裂解脑组织细胞,检测受损脑组织周围 AEP 的酶活性。取出损伤周围脑组织并准确称量,按照 100 mg/mL 的剂量加入 activation buffer, AEP 标准品用 activation buffer 稀释 20 倍。在冰上用手持匀浆机对脑组织进行匀浆。吸取部分脑匀浆进行 BCA 蛋白定量测试样品的蛋白浓度。其余脑匀浆和 AEP 标准品稀释液放到 37℃培养箱孵育 6 h。停止孵育后取出脑组织匀浆和 AEP 标准品,用 assay buffer 稀释脑匀浆和 AEP 标准品形成酶溶液。称取适量 Cbz-Ala-Ala-Asn-AMC 底物,溶于 DMSO 中形成 200 μ M 的底物溶液。在黑色 96 孔平底微孔板中加入 50 μ L 底物,再加入 50 μ L 组织样品和 AEP 标准品。将 96 孔板放入酶标仪中检测,激发波长:380 nm,发射波长:460 nm,间隔 3 分钟,总时长 45 分钟。AEP 活性用 45min 时的荧光强度减去 0 min 的荧光强度并除以浓度来表示。

1.7 免疫荧光实验

使用 4%水合氯醛(0.1 mL/10g)对小鼠进行深度麻醉,用 0℃的生理盐水和 4%多聚甲醛进行心脏灌注固定。脑组织经过蔗糖脱水以及 OCT 胶包埋后,使用低温恒温切片机将脑组织切成 20 μ m 的冠状切片。脑切片在室温下用 4%甲醛固定 10 分钟, PBS 洗三次,随后用 0.1% Triton X-100 在 PBS 中进行 10 分钟透化, PBS 洗三次,室温封闭 1 小时, IBA1/GEAP/LGMN 一抗 4℃过夜孵育。次日,用 PBS 洗三次,切片在室温避光环境下孵育荧光二抗(1:200, Jackson)1.5 小时,然后用 DAPI 染色液染细胞核 10 分钟。使用徕卡 SP8 共聚焦显微镜拍摄和分析照片。

1.8 统计学分析

数据以平均值和标准误差(mean $\pm$ s.e.m)表示,使用 Prism 9 软件分析。两组间比较采用 t 检验,单因素方差分析(one-way ANOVA)评估两组以上的组间的差异, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TBI 损伤周围脑组织的乳酸堆积情况

TBI 损伤后,损伤局部处于缺氧环境下,丙酮酸进入三羧酸循环的结合率降低,不能彻底氧化而直接还原为乳酸,所以 TBI 后会逐渐出现乳酸堆积。为检测 TBI 后乳酸堆积情况,此

实验在小鼠 TBI 之后的第 1、2、3、5 和第 7 天,检测了实验组以及假手术组(sham control, 术后第 7 天检测)受损脑组织周围的乳酸含量(浓度),发现乳酸水平从第 3 天开始显著高于假手术组,至少持续至第 7 天(图 1)。说明乳酸堆积是一个逐渐累积的过程,也为需酸性条件激活的蛋白酶和离子通道提供了酸性环境。

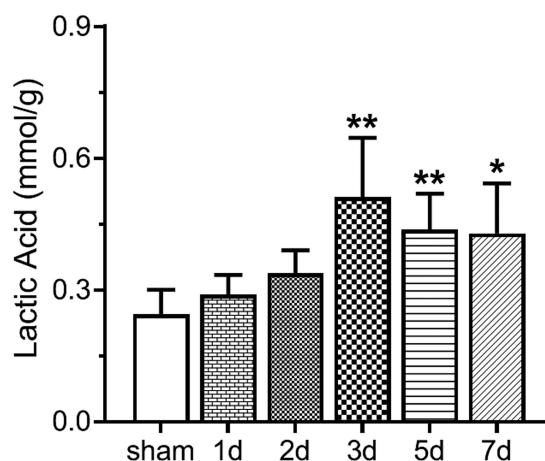


图 1 TBI 受损脑组织周围乳酸 Lactic Acid 含量(浓度)

Fig.1 The concentration of Lactic acid around TBI damaged brain tissue

Note: Data were expressed as mean $\pm$ s.e.m. n = 4-5.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with sham control.

2.2 TBI 损伤周围脑组织 AEP 的活性变化

实验小鼠分为 2 组:假手术组、TBI 模型组。在小鼠接受 TBI 手术损伤后不同时间点,取出 TBI 损伤周围的脑组织样品制作组织匀浆,采用 AEP 酶活检测的生物化学方法,测定其中 AEP 的酶活性变化。脑组织样品的采集时间点为 TBI 后第 6、12、24 h 和 2、3、5、7 d,一共 7 个检测时间点。假手术组小鼠也在手术后设置了相同的 7 个检测时间点,以用作严格对照。在每个时间点,假手术组和 TBI 模型组各有 4-5 只实验动物。检测结果表明,TBI 损伤或者假手术操作后的 6-24 小时这段时间内,2 组动物脑组织样品中 AEP 的活性均未出现明显增加,两组样品的 AEP 酶活性之间也无显著区别(图 2)。TBI 后第 2-7 天的检测结果表明,两组脑组织样品中的 AEP 酶活性都出现增加,假手术组的增加可能是去除颅骨的操作造成的,但 TBI 造成的 AEP 活性增加远高于假手术操作组,前者在 2、3、5、7 天的酶活性分别是后者的 2.7、4.5、7.2 和 4.9 倍左右。

2.3 TBI 周围脑组织小胶质细胞和星形胶质细胞的激活

小胶质细胞和星形胶质细胞在 TBI 和缺血性脑损伤所致的病理变化中发挥重要作用,且小胶质细胞和星形胶质细胞均有 AEP 表达,为探究 AEP 的上调和激活是否与这两种胶质细胞的活化有关,我们通过免疫荧光化学染色方法观察了 AEP 在小胶质细胞和星形胶质细胞中的表达。离子钙结合衔接分子 1 (IBA1)是小胶质细胞特有的标记物,胶质纤维酸性蛋白(GFAP)主要存在于成熟的星形胶质细胞,实验采用抗 IBA1、GFAP 和 AEP 的抗体,在 TBI 后第 3 天对脑组织切片进行了免疫荧光化学染色。图 3 所示,在假手术组小鼠的大脑皮层,小胶质细胞(IBA1+)的体积较小、分支较少,而 TBI 脑组织周围

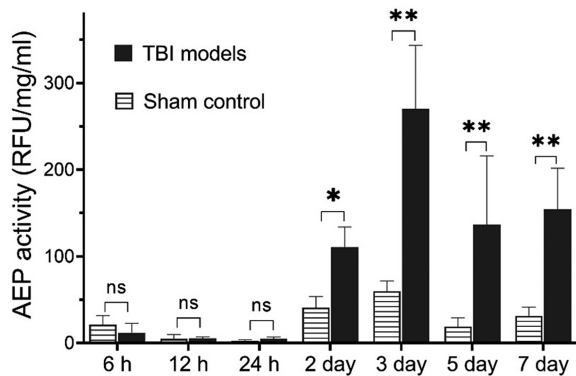


图2 TBI后不同时间受损周围脑组织内 AEP 的活性变化

Fig.2 The enzymatic activity of the asparaginyl endopeptidase (AEP) in damaged brain tissue

Note: Data were expressed as mean $\pm$ s.e.m. n = 4-5; ns: 无统计学差异;

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with sham control mice.

的小胶质细胞体积变大、分支增多,视野中 IBA1 阳性细胞的数量明显增多。并且,AEP 的阳性染色与 IBA1 相重叠,说明 AEP 伴随小胶质细胞激活而增多。

图4显示,假手术对照组大脑皮层的星形胶质细胞(GFAP+)胞体呈现为星形,有少量突起,视野中 GFAP 阳性细胞的数量较少;TBI 脑组织周围的星形胶质细胞胞体增大变长、突起变厚,视野中 GFAP 阳性细胞因增生而数量变多,是反应性激活的形态。同样,AEP 的阳性染色与 GFAP 相重叠,说明 AEP 在星形胶质细胞中的表达也出现增加。

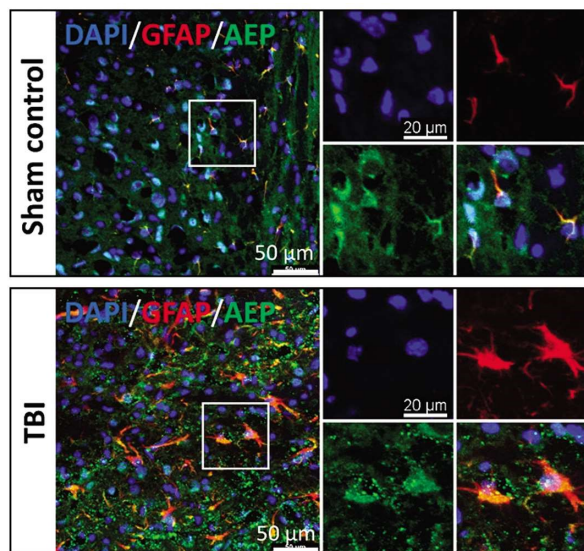


图4 TBI后受损脑组织周围星形胶质细胞的激活

Fig.4 The activation of astrocytes around damaged brain tissue after TBI compared with sham control

Note: scale-50 μ m and 20 μ m.

3 讨论

本研究应用控制性脑皮质撞击法制作小鼠 TBI 模型,对损伤周围的脑组织进行了生物化学检测和形态学鉴定,发现受损脑组织中的乳酸水平逐渐升高,从 TBI 后第3天开始显著高于

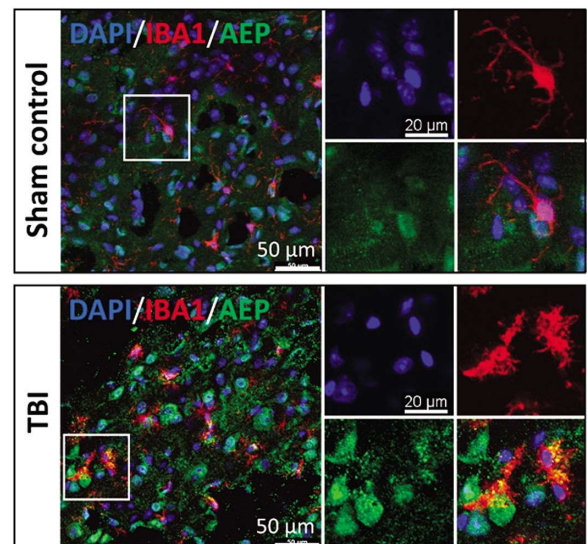


图3 TBI后受损脑组织周围小胶质细胞的激活

Fig.3 The activation of microglia around damaged brain tissue after TBI compared with sham control

Note: scale-50 μ m and 20 μ m.

对假手术对照组。文献报导乳酸增多会导致神经元线粒体的能量代谢增强,产生更多的活性氧和导致神经元氧化应激^[24]。AEP 酶活性在 TBI 后 1 天之内没有明显增加,第 2 天检测到显著升高的 AEP 活性,并且 AEP 的上调至少维持到第 7 天。有研究在同样的小鼠 TBI 模型发现,脑损伤之后 6 个月依然能检测到 AEP 的上调和激活^[23]。可见,脑组织的 AEP 在 TBI 损伤急性期(<2 天)尚未被激活,AEP 的上调和激活主要出现在 TBI 亚急性期和慢性期(≥ 2 天),也就是在继发性脑损伤阶段。AEP 活性变化对 TBI 脑损伤和修复的影响尚不清楚,可能参与继发性脑损伤和炎症反应,也可能参与神经保护和组织修复,以下具体讨论。

AEP 是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶,酶原在内质网组装合成,经高尔基体转运到溶酶体,AEP 水解的底物有 APP、tau、 α -Syn 和 TDP-43 等,所以 AEP 在神经元和胶质细胞内均有表达。本研究结果显示小胶质细胞和星形胶质细胞均含有 AEP 的阳性染色,这两种胶质细胞被 TBI 激活,其中 AEP 的阳性染色信号进一步增强,说明细胞内的 AEP 均出现了上调,AEP 可能参与了小胶质细胞和星形胶质细胞活化过程。既往研究也发现 AEP 参与小胶质细胞活化^[25],例如在小鼠 TBI 模型发现 AEP 持续激活 7 天以上,小胶质细胞同时出现活化和释放炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α ;AEP 基因敲除能显著抑制 TBI 的小胶质细胞炎症反应。在注射 MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶) 或者 A β 1-42 的小鼠模型中发现,AEP 基因敲除能显著降低 MPTP 或者 A β 1-42 诱发的小胶质细胞炎症反应^[26,27],其中的 AEP 可能参与调控了 TLR4/MyD88/NF- κ B 炎症信号通路。TBI 和缺血性脑卒中的继发性脑损伤机制存在相通之处,有研究对大鼠短暂性大脑中动脉闭塞模型(MCAO)的鉴定发现^[25],缺血梗死区周围的小胶质细胞和星形胶质细胞均被大量激活,其中 AEP 的表达水平显著增加,说明 AEP 参与了胶质细胞的反应性激活。由于 AEP 可以从溶酶体转运至胞浆、胞核,还可以经囊泡

转运至细胞质膜,所以活化的胶质细胞可以分泌 AEP 到细胞外,释放到组织间隙和脑脊液发挥细胞外作用,例如文献报导巨噬细胞释放的 AEP 分子具有类似趋化因子的作用,招募外周炎症细胞发生迁移和浸润^[28],促进炎症反应的发展。

在 TBI 继发性脑损伤的过程中,胶质细胞活化是神经炎症反应的重要组成部分。小胶质细胞被受损组织释放的损伤相关分子模式激活后,由静息态 M0 表型转变为 M1 极化促炎激活表型,释放促炎细胞因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 等;同时一部分小胶质细胞通过替代激活途径产生 M2 表型,释放抗炎细胞因子,吞噬和清除坏死的细胞碎片,促进神经修复和神经组织再生^[29]。小胶质细胞极化过程中,AEP 可能参与促炎表型的激活和介导免疫炎症反应,也可能参与小胶质细胞抗炎和吞噬作用。近来,有研究发现心脏常驻的巨噬细胞特异性表达 AEP 基因,在心肌梗塞模型中删除 AEP 基因,会导致巨噬细胞的吞噬能力下降,单核细胞招募增多,抗炎介质减少、促炎介质增多,可见 AEP 对于巨噬细胞清除坏死细胞和控制炎症有重要意义^[30]。小胶质细胞是一种特化的巨噬细胞,未来 TBI 研究需要关注 AEP 在不同表型小胶质细胞中的表达,AEP 的上调与小胶质细胞激活时程的对应关系,AEP 如何参与调控胶质细胞的炎症性活化、吞噬和清除作用,以及调控的上下游信号通路。

大脑中星形胶质细胞的数量是神经元的数倍,生理状况下对神经元有支持和营养作用,星形胶质细胞和周细胞、毛细血管、神经元组成的神经血管单元(NVU),在中枢神经系统生理活动、TBI、缺血性脑损伤和神经退变过程中发挥重要作用,普遍认为星形胶质细胞活化是大脑发生病变的标志,活化一方面产生炎症反应、活性氧和神经毒性自由基,另一方面还具有吞噬坏死组织、结构重塑、促血管生成等神经保护作用^[31,32]。星形胶质细胞和小胶质细胞共同组成免疫监视和修复系统,负责吞噬和清除坏死的细胞、退变的突触和轴突以及毒性蛋白(例如 A β 和 α -Syn),对于维持神经系统稳态至关重要^[32,33]。在心脏的原位巨噬细胞,AEP 通过调节细胞内钙离子浓度促进 LC3-II 依赖性吞噬溶酶体的形成,维持巨噬细胞的吞噬功能^[30,34]。在中枢神经系统,AEP 是否影响星形胶质细胞的活化、炎症反应和吞噬功能,是值得探究的科学问题,然而,目前未见有研究报导 AEP 在星形胶质细胞中的功能和作用。

综上,受损脑组织内 AEP 的上调和激活出现在 TBI 的亚急性期和慢性期,也就是继发性脑损伤阶段;TBI 导致小胶质细胞和星形胶质细胞出现反应性活化和增生,AEP 在这两种细胞内均出现上调和激活。AEP 是否参与调控 TBI 引发的胶质细胞活化,在神经损伤和修复中起什么作用,能否成为调治病变的新靶标,均是未知且重要的科学问题。

参考文献(References)

- [1] JIANG J Y, GAO G Y, FENG J F, et al. Traumatic brain injury in China[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(3): 286-95.
- [2] CHENG P C, YIN P, NING P D, et al. Trends in traumatic brain injury mortality in China, 2006-2013: A population-based longitudinal study [J]. *Plos Med*, 2017, 14(7).
- [3] 朱立清,朱立仓. 创伤性颅脑损伤的治疗及研究进展 [J]. *农垦医学*, 2019, 41(05): 438-40.
- [4] 李春伟,伊志强,李良. 重型创伤性颅脑损伤的治疗进展[J]. *中国微*
- 创外科杂志, 2016, 16(07): 656-60.
- [5] NG S Y, LEE A Y W. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13.
- [6] ZUSMAN B E, KOCHANNEK P M, JHA R M. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury: a Historical Framework for Current Therapy [J]. *Curr Treat Option Ne*, 2020, 22(3).
- [7] SULHAN S, LYON K A, SHAPIRO L A, et al. Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(1): 19-28.
- [8] GLUSHAKOVA O Y, JOHNSON D, HAYES R L. Delayed Increases in Microvascular Pathology after Experimental Traumatic Brain Injury Are Associated with Prolonged Inflammation, Blood-Brain Barrier Disruption, and Progressive White Matter Damage [J]. *J Neurotraum*, 2014, 31(13): 1180-93.
- [9] HAY J R, JOHNSON V E, YOUNG A M H, et al. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans [J]. *J Neuropath Exp Neur*, 2015, 74(12): 1147-57.
- [10] LV C, WANG L, LIU X L, et al. Geniposide Attenuates Oligomeric A β ₁₋₄₂-Induced Inflammatory Response by Targeting RAGE-Dependent Signaling in BV2 Cells [J]. *Current Alzheimer Research*, 2014, 11(5): 430-40.
- [11] SONG M K. The Asparaginyl Endopeptidase Legumain: An Emerging Therapeutic Target and Potential Biomarker for Alzheimer's Disease [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18).
- [12] GAO J, ZHANG W X, CHAI X Q, et al. Asparagine endopeptidase deletion ameliorates cognitive impairments by inhibiting proinflammatory microglial activation in MPTP mouse model of Parkinson disease[J]. *Brain Research Bulletin*, 2022, 178: 120-30.
- [13] TANG T M S, LUK L Y P. Asparaginyl endopeptidases: enzymology, applications and limitations [J]. *Organic & biomolecular chemistry*, 2021, 19(23): 5048-62.
- [14] ZHANG Z, TIAN Y, YE K. δ -secretase in neurodegenerative diseases: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities [J]. *Translational neurodegeneration*, 2020, 9: 1.
- [15] BASURTO-ISLAS G, GRUNDKE-IQBAL I, TUNG Y C, et al. Activation of asparaginyl endopeptidase leads to Tau hyperphosphorylation in Alzheimer disease [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2013, 288(24): 17495-507.
- [16] ZHANG Z, SONG M, LIU X, et al. Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease[J]. *Nature medicine*, 2014, 20(11): 1254-62.
- [17] SHIMONAKA S, MATSUMOTO S E, ELAHI M, et al. Asparagine residue 368 is involved in Alzheimer's disease tau strain-specific aggregation [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2020, 295(41): 13996-4014.
- [18] TOHMÉ M, MANOURY B. Intracellular Toll-like receptor recruitment and cleavage in endosomal/lysosomal organelles [J]. *Methods in enzymology*, 2014, 535: 141-7.
- [19] DESCAMPS D, LE GARS M, BALLOY V, et al. Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1 β secretion, and asparagine endopeptidase are critical

- factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(5): 1619-24.
- [20] VAN DER SLUIS R M, CHAM L B, GRIS-OLIVER A, et al. TLR2 and TLR7 mediate distinct immunopathological and antiviral plasmacytoid dendritic cell responses to SARS-CoV-2 infection[J]. The EMBO journal, 2022, 41(10): e109622.
- [21] LIU Y, GUO C, DING Y, et al. Blockage of AEP attenuates TBI-induced tau hyperphosphorylation and cognitive impairments in rats[J]. Aging, 2020, 12(19): 19421-39.
- [22] HU W, TUNG Y C, ZHANG Y, et al. Involvement of Activation of Asparaginyl Endopeptidase in Tau Hyperphosphorylation in Repetitive Mild Traumatic Brain Injury [J]. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2018, 64(3): 709-22.
- [23] WU Z, WANG Z H, LIU X, et al. Traumatic brain injury triggers APP and Tau cleavage by delta-secretase, mediating Alzheimer's disease pathology[J]. Progress in neurobiology, 2020, 185: 101730.
- [24] ANDERGASSEN D, SMITH Z D, KRETZMER H, et al. Diverse epigenetic mechanisms maintain parental imprints within the embryonic and extraembryonic lineages[J]. Developmental cell, 2021, 56(21): 2995-3005.e4.
- [25] ISHIZAKI T, ERICKSON A, KURIC E, et al. The asparaginyl endopeptidase legumain after experimental stroke [J]. Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2010, 30(10): 1756-66.
- [26] GAO J, ZHANG W, CHAI X, et al. Asparagine endopeptidase deletion ameliorates cognitive impairments by inhibiting proinflammatory microglial activation in MPTP mouse model of Parkinson disease[J]. Brain Res Bull, 2022, 178: 120-30.
- [27] CHEN R, ZHANG Q, YAN Y, et al. Legumain Knockout Protects Against A β (1-42)-Induced AD-like Cognitive Deficits and Synaptic Plasticity Dysfunction Via Inhibiting Neuroinflammation Without Cleaving APP[J]. Molecular neurobiology, 2021, 58(4): 1607-20.
- [28] CLERIN V, SHIH H H, DENG N, et al. Expression of the cysteine protease legumain in vascular lesions and functional implications in atherogenesis[J]. Atherosclerosis, 2008, 201(1): 53-66.
- [29] LOANE D J, KUMAR A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated[J]. Experimental neurology, 2016, 275 Pt 3 (0 3): 316-27.
- [30] JIA D, CHEN S, BAI P, et al. Cardiac Resident Macrophage-Derived Legumain Improves Cardiac Repair by Promoting Clearance and Degradation of Apoptotic Cardiomyocytes After Myocardial Infarction[J]. Circulation, 2022, 145(20): 1542-56.
- [31] ZHOU B, ZUO Y X, JIANG R T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases [J]. CNS neuroscience & therapeutics, 2019, 25(6): 665-73.
- [32] JHA M K, JO M, KIM J H, et al. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation [J]. The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry, 2019, 25(3): 227-40.
- [33] ABDELHAK A, FOSCHI M, ABU-RUMEILEH S, et al. Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders [J]. Nature reviews Neurology, 2022, 18(3): 158-72.
- [34] PAN L, BAI P, WENG X, et al. Legumain Is an Endogenous Modulator of Integrin $\alpha v \beta 3$ Triggering Vascular Degeneration, Dissection, and Rupture[J]. Circulation, 2022, 145(9): 659-74.