

硒蛋白SelK介导的棕榈酰化对与小胶质细胞吞噬能力相关蛋白表达的影响研究

郭晓萱¹, 黄洪鹏², 贾肖艺¹, 陈长兰^{1*}

¹辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳

²济宁医学院药学院, 山东 日照

收稿日期: 2024年4月12日; 录用日期: 2024年5月10日; 发布日期: 2024年5月20日

摘要

目的: 一些研究中发现, 硒蛋白SelK主要在小胶质细胞等免疫细胞中大量表达, 并能通过与棕榈酰基转移酶ZDHHC6的结合, 介导CD36、IP3R、Calnexin、ASAP2等多个蛋白的棕榈酰化, 而上述蛋白质均与免疫细胞的吞噬功能相关。为此研究硒蛋白SelK的棕榈酰化是否能够促进上述蛋白的表达对于阐明硒蛋白SelK提高免疫细胞吞噬功能的机制具有特殊意义。方法: 对小胶质细胞BV2用硒蛋白SelK过表达/敲减病毒载体进行SelK的过表达/敲减, 收集样品后使用实时定量PCR方法测定CD36和Calnexin mRNA的转录情况, Western blot方法测定目标蛋白的表达变化。结果: 硒蛋白SelK的过表达在提高ZDHHC6的表达同时, 显著促进CD36(吞噬细胞模式识别受体之一)与Calnexin(参与内质网中Ca²⁺向线粒体运输的蛋白质之一)的表达和mRNA转录。并且如预期一样SelK的敲减显著降低上述两种蛋白的蛋白质表达和mRNA转录。结论: 硒蛋白SelK通过促进CD36和Calnexin蛋白的棕榈酰化, 提高吞噬相关蛋白的稳定表达, 从而提高免疫细胞的吞噬功能。

关键词

硒蛋白, 小胶质细胞, 棕榈酰化, 吞噬

Studies on the Effects of Selenoprotein Selk-Mediated Palmitoylation on the Expression of Proteins Related to Phagocytosis of Microglia

Xiaoxuan Guo¹, Hongpeng Huang², Xiaoyi Jia¹, Changlan Chen^{1*}

¹School of Pharmaceutical Science, Liaoning University, Shenyang Liaoning

*通讯作者。

文章引用: 郭晓萱, 黄洪鹏, 贾肖艺, 陈长兰. 硒蛋白 SelK 介导的棕榈酰化对与小胶质细胞吞噬能力相关蛋白表达的影响研究[J]. 药物资讯, 2024, 13(3): 176-186. DOI: 10.12677/pi.2024.133022

²School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao Shandong

Received: Apr. 12th, 2024; accepted: May 10th, 2024; published: May 20th, 2024

Abstract

Objective: Recent studies have found that selenoprotein K (SelK) is mainly expressed in microglia and other immune cells, and can mediate the palmitoylation of CD36, IP3R, Calnexin, ASAP2 and other proteins, which are related to the phagocytosis of immune cells, by binding to palmitoyl-transferase ZDHHC6. Therefore, it is of special significance to study whether the palmitoylation of SelK can promote the expression of the above proteins for elucidating the mechanism of SELK's enhancement of the phagocytosis of immune cells. **Methods:** SelK overexpression/knockdown of microglia BV2 was performed with SelK overexpression/knockdown virus vectors. After collecting samples, real-time quantitative PCR was used to determine the transcription of CD36 and Calnexin mRNA, and Western blot was used to determine the expression of the target proteins. **Results:** Overexpression of SelK increased the expression of ZDHHC6, and significantly promoted the protein expression and mRNA transcription of Calnexin, one of the phagocyte pattern recognition receptors, and CD36, one of the proteins involved in promoting Ca²⁺ transporting from endoplasmic reticulum to mitochondria, in microglia. As expected, SelK knockdown significantly reduced the protein expression and mRNA transcription of the two proteins. **Conclusion:** SelK can promote the palmitoylation of CD36 and Calnexin proteins, improve the stable expression of phagocytic related proteins, and thus enhance the phagocytic function of immune cells.

Keywords

Selenoprotein, Microglia, Palmitoylation, Phagocytosis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

小鼠小胶质细胞(BV2): 小胶质细胞是神经胶质细胞之一, 是正常中枢神经系统中最有代表性的免疫细胞, 其在脑部分布非常广, 其数量占脑内所有胶质细胞的 5%~20%。目前的研究表明, 胶质细胞对中枢神经系统的防御和组织修复有重要意义[1] [2]。通过产生生长因子促进神经元的存活, 并调节内源性免疫系统[3]。此外, 作为促炎细胞因子的主要来源, 小胶质细胞是神经炎症的关键介质, 可以诱导或调节广泛的细胞反应[4] [5]。

小胶质细胞对研究阿尔茨海默病的发生与治疗具有重要意义。目前多数学者认为: β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积的过度产生使得神经胶质细胞过度活化, 引起脑内慢性炎症反应及小胶质细胞吞噬降解功能下降可能是阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)发病的核心病理机制之一[6]。在 AD 脑内处于慢性炎症状况下的微环境, 若损伤因素持续存在, 小胶质细胞持续地激活和致炎性细胞因子持续地过表达, 引起神经元退行性变、局部的小胶质细胞激活及炎症参与的神经元退行性变的持续发展[7] [8] [9], 从而加剧阿尔茨海默病(AD)和多发性硬化(MS)的恶化[10] [11]。因此, 如何在抑制小胶质细胞过度活化产生炎症因子的同时, 提高小胶质细胞的吞噬降解功能可能成为阿尔茨海默病治疗的重要策略。为此研

究能够提高小胶质细胞吞噬降解功能的方法和机制具有重要意义。

硒(Se)是人类和哺乳动物必不可少的微量元素,在人体蛋白质翻译过程中以硒代半胱氨酸(Selenocysteine, Sec)的形式插入氨基酸序列中形成硒蛋白(selenoprotein) [12]。人体内共有 25 种硒蛋白,其中一部分是位于内质网上的膜蛋白,硒蛋白 K (Selenoprotein K, SELENOK, SelK)是一种分子量为 12 kDa 的位于内质网和高尔基体上的膜蛋白。一些学者研究也发现,硒蛋白 SelK 主要在巨噬细胞、小胶质细胞等免疫细胞中大量表达[13] [14]。Verma S 等[15]的进一步研究表明, SelK 在小鼠脾脏等免疫组织中的表达量最高,敲除 SelK 基因的小鼠体内免疫细胞的多种功能发生障碍,免疫力减弱,由此推测硒蛋白 SelK 与小胶质细胞的吞噬降解功能有关。但是硒蛋白 SelK 增强免疫细胞功能的机制一直是亟待解决的重要问题之一。

近期研究发现硒蛋白 SelK 与棕榈酰基转移酶 ZDHHC6 具有很强的结合能力,并且能够通过 ZDHHC6 的结合促进 CD36 [16] [17] [18]、三磷酸肌醇受体 IP3R [19] [20] [21]、类凝集素伴侣钙联蛋白 Calnexin [22] [23] [24]和 ASAP2 [25]等与免疫细胞吞噬降解功能密切相关蛋白质的棕榈酰化。CD36 为脂肪酸转位酶和免疫细胞模式识别之一,能够提高免疫细胞对吞噬底物的识别能力[18] [26], CD36 在免疫细胞中高表达[16]。IP3R 为内质网钙库钙离子通道蛋白之一,除了能够促进内质网中 Ca^{2+} 向细胞质释放外还能够增强向线粒体释放,从而通过促进线粒体中 ATP 产生提高免疫细胞吞噬能力[22] [27] [28]。Calnexin 棕榈酰化后通过与线粒体相关内质网膜上蛋白质 SERCA2b 的结合维持线粒体的功能提高免疫细胞的吞噬功能[22] [23] [29]。而 ASAP2 的棕榈酰化能够使免疫细胞的细胞骨架蛋白发生有利于吞噬的改变[25] [30]。而关于硒蛋白 SelK 介导的 CD36 和 Calnexin 棕榈酰化是否促进这两种蛋白质表达和 mRNA 转录水平的升高尚没有人进行研究,上述研究对阐明硒蛋白 SelK 提高免疫细胞吞噬降解功能的机制及在防治阿尔茨海默病方面的作用具有重要意义。

2. 材料与方法

2.1. 细胞株

实验中用到的免疫细胞是小鼠小胶质细胞(BV2),购买自国家生物医学实验细胞资源库。

2.2. 主要试剂

2.2.1. SelK 过表达腺病毒载体

委托汉恒生物科技(上海)有限公司构建硒蛋白 SelK 过表达腺病毒载体, pHBAD-EF1-MCS-3flag-CMV-RFP 载体图谱信息见图 1,目的基因片段为 SelK-Eco/Nhe: TCCAGACCCGGGACCGCCACC 以及 GATCAGCTCGCTCATGCTAGC。

2.2.2. SelK 敲减慢病毒载体

委托上海吉凯基因科技有限公司构建硒蛋白 SelK 敲减慢病毒载体(RNA 干扰载体),目的基因 RNA 干扰慢病毒载体使用的是 GV298,载体元件顺序为 U6-MCS-Ubiquitin-Cherry-IRES-puromycin (图 2),针对 SelK 设计的靶点序列为 CGAAGAATGGGTAGGATCA。

2.3. 实验方法

2.3.1. 构建 BV2 细胞的硒蛋白 SelK 过表达/减表达模型

使用硒蛋白 SelK 过表达腺病毒载体转染免疫细胞 BV2,在荧光显微镜下考察其对免疫细胞转染,Western blot 验证过表达后的 SelK 的表达量是否上调。

使用硒蛋白 SelK 减表达慢病毒载体转染免疫细胞 BV2,在荧光显微镜下考察其对免疫细胞转染,

Western blot 验证过表达后的 SelK 的表达量是否下调。

通过 SelK 的表达量变化确定模型构建成功后, 考察 SelK 主要的降解酶 Calpain 表达量的变化, 进而考察棕榈酰化修饰相关的 ZDHHC6、CD36 和 Calnexin 表达量的影响。

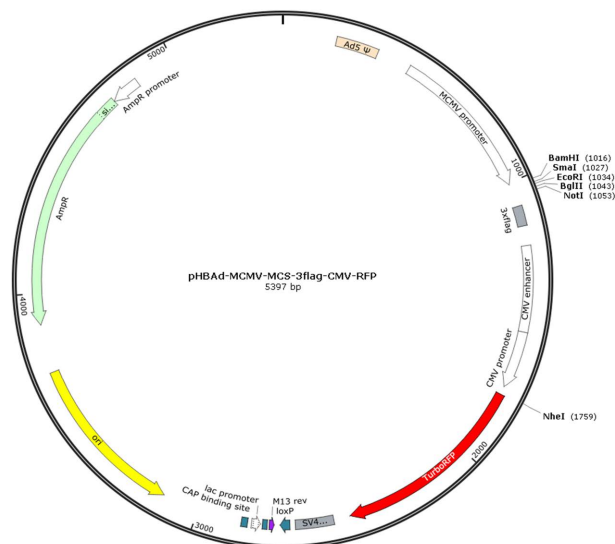


Figure 1. Mapping of the SelK overexpression adenoviral vector
图 1. SelK 过表达腺病毒载体图谱

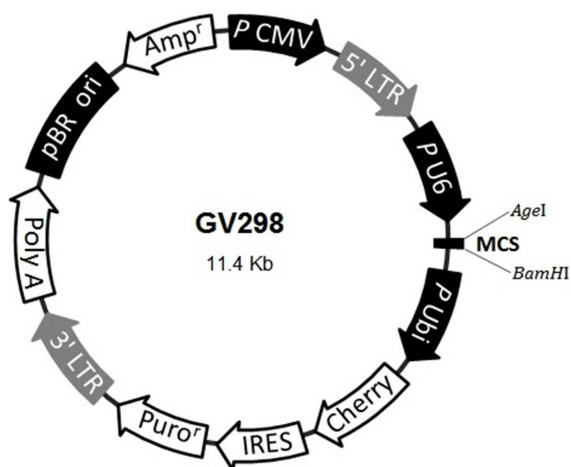


Figure 2. Mapping of the SelK knockdown lentiviral vector
图 2. SelK 敲减慢病毒载体图谱

2.3.2. CCK8 法测定细胞存活率

细胞存活率使用 CCK8 法试剂盒(Dojindo, 日本)进行测定, 首先将 BV2 细胞以 5×10^4 的细胞密度, 接种到 96 孔板中, 每组 6 个复孔, 24 小时后进行梯度 MOI(复感染指数, 代表病毒对细胞的感染能力)病毒转染, 同时设置病毒载体阴性对照组(negative control, NC)。感染 24 h 后换为 CCK-8 试剂与全培养基(体积比 1:9)混合工作液, 37°C 温箱孵育 30 min, 使用酶标仪测量 96 孔板在 450 nm 处吸光度后, 将相应的吸光度值代入到(实验孔 - 对照组)/(对照组 - 空白孔)再乘以 100% 即可得到细胞存活率, 其中实验孔含培养基、CCK-8 试剂、细胞和病毒, 对照组含培养基、CCK-8 试剂和细胞, 空白孔含培养液和 CCK-8 试剂, 不含细胞和病毒。

2.3.3. 实时定量 PCR

用 1 mL 的 TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国)在冰盒上吹打 6 孔板内的细胞。使用氯仿、异丙醇和 75% 乙醇提取并纯化细胞总 RNA。使用带有 gDNA Eraser 的 PrimeScript™ RT 试剂盒(Takara, 日本)进行 cDNA 逆转录。使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Takara, 日本)在 Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR 检测系统 (BioRad, 美国)上进行实时定量 PCR 分析。扩增产物的步骤如下: 95°C 30 s, 40 循环: 95°C 5 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s。PCR 引物是用 PrimerBank 设计的。所用引物序列见表 1 (5'-3')。

Table 1. The primer sequences

表 1. 引物序列

名称	序列(5'-3')
β -actin-Forward	TTCCTTCTGGGTATGGAATG
β -actin-Reverse	GAGCAATGATCTTGATCTTCA
SelK-Forward	CCATGGAGAGTGTCTTTCCTAACT
SelK-Reverse	CCATCGTCGTATCTGGAATCAG
CD36-Forward	TTGCAGGTCCATCTATGCTGA
CD36-Reverse	TTATTTTCCCGTCACTTGGGA
Calnexin-Forward	CAACAGGGGAGGTTTATTGCTTT
Calnexin-Reverse	TCCCACTTTCATCATTTATGGC

2.3.4. Western Blot

使用含有 1% PMSF (100 mM)、1% 蛋白酶和磷酸酶抑制剂的全蛋白提取试剂盒(凯基, 中国)提取 6 孔板内的细胞的全蛋白, 在冰上充分裂解后离心, 收集蛋白上清液。用 BCA 蛋白定量分析试剂盒(凯基, 中国)测定蛋白质浓度, 然后将蛋白上清液与 5×SDS-PAGE Loading buffer 混合, 在 100°C 下煮沸 10 min。

等量蛋白质样品经 12.5% SDS-PAGE 电泳分离后转移到 0.2 μ m 疏水性 PVDF 转印膜(Millipore, 美国)上。浸泡在 QuickBlock™ 快速封闭液(碧云天, 中国)中室温孵育 20 min, 将抗体盒置于 4°C 冰箱孵育一抗过夜, 其中用一抗稀释液配置的一抗稀释比例如下: β -actin (1:10000, 正能, 中国), SelK (2 μ g/mL, ProSci, 美国), Calnexin (1:10000, 三鹰, 中国), Calpain 2 (1:5000, 三鹰, 中国), CD36 (1:1000, 三鹰, 中国), ZDHHC6 (1:1000, 赛默飞, 美国)。转天回收一抗后用 TBST 缓冲液冲洗条带 3 次。然后, 用过氧化物酶结合的山羊抗兔 IgG (1:5000, 中杉金桥, 中国)在室温下孵育 1 h, 再用 TBST 缓冲液清洗 3 次。使用 Pro-light HRP 化学发光试剂盒(亚科因, 中国)检测目标蛋白, 并用 Bio-Rad Multi 化学发光系统显色。

β -actin 作为对照, 用于归一化各蛋白的相对表达量。使用 Image Lab 分析软件(Bio-Rad, 美国)对条带进行量化分析。

2.3.5. 统计分析

每组 n = 3, 数据以平均值 \pm SEM 表示。使用 GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, 美国)进行统计分析和图形表示, 并通过单因素方差分析进行评估, 然后进行 Tukey 检验, p < 0.05 被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. SelK 过表达/敲减病毒对 BV2 细胞形态学的影响

由于小胶质细胞对外来物质非常敏感, 采用质粒作为表达载体转染过程非常容易造成细胞的异常活化, 而病毒载体则影响很小, 因此设计了针对小鼠小胶质细胞转染的 SelK 过表达腺病毒载体以及 SelK

敲减慢病毒载体。图 3(A)为空白组的小胶质细胞的细胞形态以及转染情况示例(无荧光); 图 3(B)为 SelK 过表达组的小胶质细胞的细胞形态以及转染情况; 图 3(C)为 SelK 敲减组的小胶质细胞的细胞形态以及转染情况。在普通明场显微镜下观察到给予病毒(MOI 100)后的小胶质细胞形态稍有变化, 有活化的可能, 因此病毒剂量需要调低。

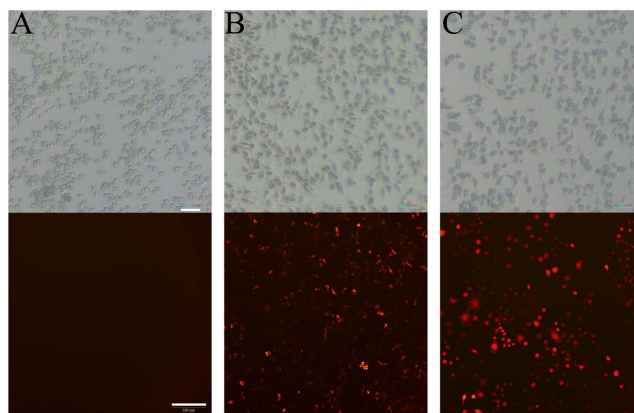


Figure 3. Transfection of SelK overexpression/knockdown adenovirus vector. (A) Examples of cell morphology of microglia in the Control group. (B) Examples of cell morphology and transfection of microglia in SelK overexpression group (MOI 100). (C) Examples of cell morphology and transfection of microglia in SelK knockdown group (MOI 100)

图 3. SelK 过表达/敲减腺病毒载体转染情况(A) 空白组小胶质细胞的细胞形态以及转染情况示例。(B) SelK 过表达组小胶质细胞的细胞形态以及转染情况示例(以 MOI 100 为例)。(C) SelK 敲减组小胶质细胞的细胞形态以及转染情况示例(以 MOI 100 为例)

3.2. SelK 过表达/敲减病毒对 BV2 细胞活性的影响

由于观察到 MOI 100 下细胞形态变化, 因此需要利用 CCK8 来检测病毒载体对细胞存活率的影响, 来摸索一个对细胞“安全”的转染范围。通过图 4(A)可以观察到, 小胶质细胞对于接种梯度浓度的 SelK 过表达腺病毒转染后, MOI 在 200 以内细胞存活率均在半数以上, MOI 在 100 以内细胞存活率均接近 100%。通过图 4(B)可以观察到, 不同浓度梯度的 SelK 敲减慢病毒载体对细胞存活率基本没影响。因此综合考虑, MOI 应选在 100 以内用于后续实验, 除空白组外, 将病毒转染的分组分为 MOI 25、50、75 和 100。

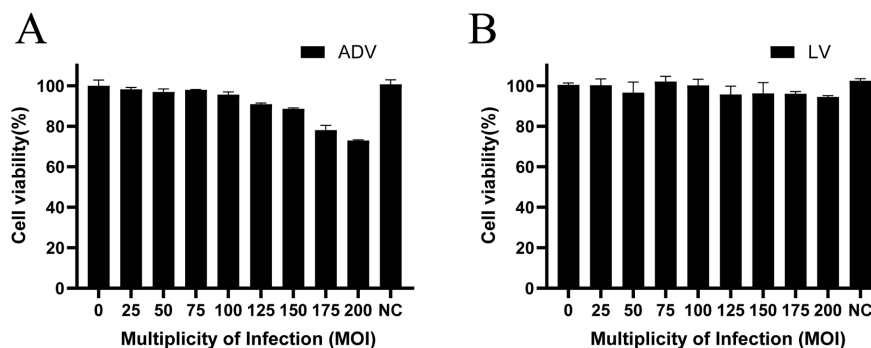


Figure 4. Effect of SelK overexpression/knockdown adenovirus vector transfection on BV2 survival of microglia. (A) Effect of SelK overexpression adenoviral vector on microglial survival. (B) Effect of SelK knockdown lentiviral vector on microglial survival

图 4. SelK 过表达/敲减腺病毒载体转染对小胶质细胞 BV2 存活率的影响。(A) SelK 过表达腺病毒载体对小胶质细胞存活率的影响。(B) SelK 敲减慢病毒载体对小胶质细胞存活率的影响

3.3. SelK 过表达/敲减病毒对 BV2 细胞分泌的 SelK mRNA 与蛋白表达量的影响

如图 5(A)、图 5(B)所示, 通过 RT-qPCR 实验测定小胶质细胞中 SelK 的变化, 实验中设置了转染了空载体的阴性对照(Negative control)组, 实验发现, 阴性对照组与空白组(Control)对细胞 SelK 的表达没有影响, SelK 过表达组的小胶质细胞 mRNA 样品在 MOI 25 时就表达出更多的 SelK。紧接着, 利用小胶质细胞的蛋白质样品, 通过 Western Blot 实验观察到转染 SelK 过表达病毒后会表达出更多的 SelK 蛋白。同样地, SelK 敲减组的小胶质细胞样品在 MOI 25 时开始表达出更少的 SelK mRNA 与蛋白(图 5(C)、图 5(D))。实验结果符合病毒转染后的预期, 可以继续用来验证。

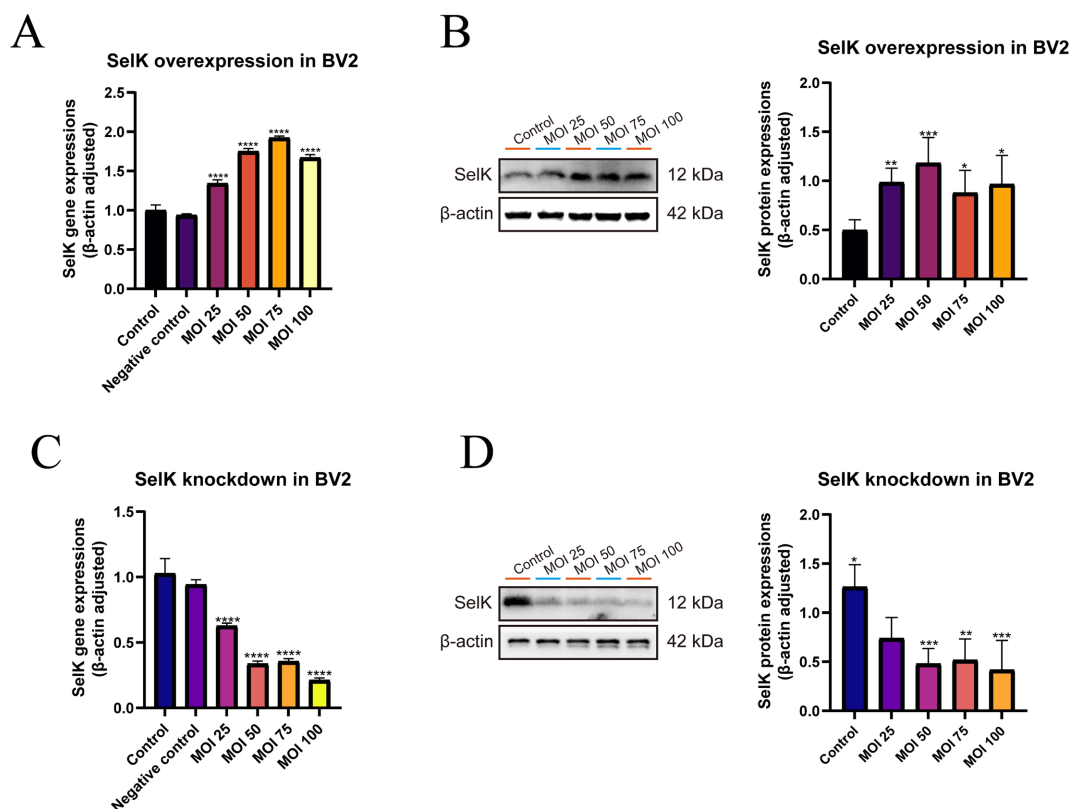


Figure 5. Effect of SelK overexpression/knockdown virus vector transfection on SelK expression in microglia BV2. (A) Statistical results of SelK overexpression adenoviral vector on mRNA in microglia. (B) Representative bands and statistical results of immunoblotting of SelK overexpression adenoviral vector on microglia protein expression. (C) Statistical results of SelK knockdown lentiviral vector on microglia mRNA. (D) Representative bands and statistical results of immunoblotting of microglia protein expression by SelK knockdown lentiviral vector. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ or **** $P < 0.0001$ vs. Control

图 5. SelK 过表达/敲减病毒载体转染对小胶质细胞 BV2 中 SelK 表达的影响。(A) SelK 过表达腺病毒载体转染小胶质细胞 mRNA 的统计结果。(B) SelK 过表达腺病毒载体转染的小胶质细胞蛋白表达量的免疫印迹代表条带及统计结果。(C) SelK 敲减慢病毒载体转染的小胶质细胞 mRNA 的统计结果。(D) SelK 敲减慢病毒载体转染的小胶质细胞蛋白表达量的免疫印迹代表条带及统计结果。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 或 **** $P < 0.0001$ vs. Control 组

3.4. SelK 过表达/敲减病毒对 BV2 细胞分泌的棕榈酰基转移酶 ZDHHC6 表达的影响

如图 6(A)所示, 随 SelK 蛋白的增多, SelK 过表达组的小胶质细胞样品在 MOI 50 以后表达出更多的 ZDHHC6 蛋白。同样地, 随 SelK 蛋白的减少, SelK 敲减组的小胶质细胞样品在 MOI 50 时开始表达出更少的 ZDHHC6 蛋白(图 6(B))。实验结果证明 ZDHHC6 的表达量会随着 SelK 表达量的多少而变化。

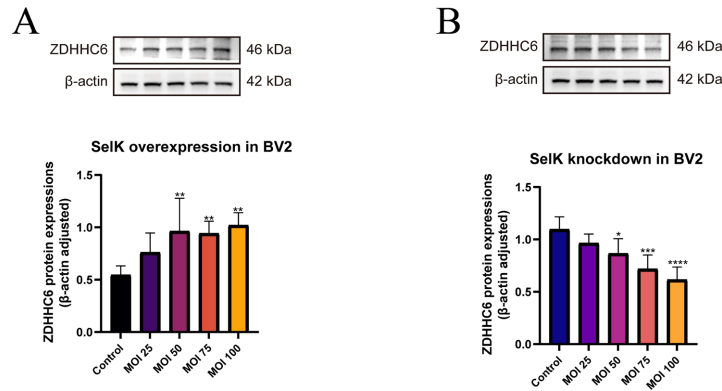


Figure 6. Effect of SelK overexpression/knockdown on the expression of ZDHHC6 in microglia BV2. (A) Representative bands and statistical results of immunoblotting of ZDHHC6 protein expression in microglia transfected with SelK overexpressing adenoviral vector. (B) Representative bands of immunoblotting and statistical results of ZDHHC6 protein expression in microglia transfected with SelK knockdown lentiviral vector. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ or **** $P < 0.0001$ vs. Control

图 6. SelK 过表达/敲减对小胶质细胞 BV2 中 ZDHHC6 表达的影响。(A) SelK 过表达腺病毒载体转染的小胶质细胞中 ZDHHC6 蛋白表达量的免疫印迹代表条带及统计结果。(B) SelK 敲减慢病毒载体转染的小胶质细胞中 ZDHHC6 蛋白表达量的免疫印迹代表条带及统计结果。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 或 **** $P < 0.0001$ vs. Control 组

3.5. SelK 过表达/敲减病毒对 BV2 细胞分泌的清道夫受体 CD36 和钙粘蛋白 Calnexin 表达的影响

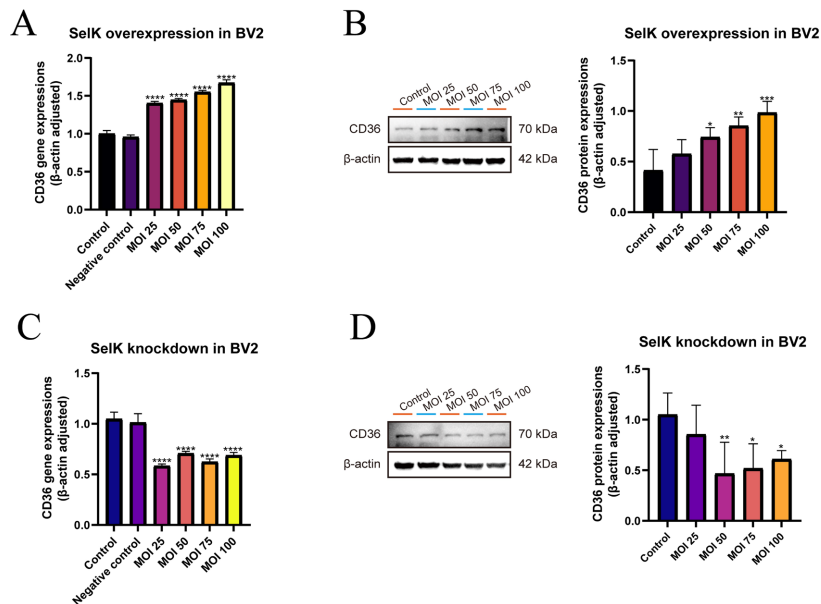


Figure 7. Effect of SelK overexpression/knockdown on the expression of Calnexin in microglia BV2. (A) Statistical results of CD36 mRNA in microglia transfected with SelK overexpression adenovirus vector. (B) Representative bands and statistical results of CD36 protein expression in microglia transfected with SelK overexpression adenoviral vector. (C) Statistical results of CD36 mRNA in microglia transfected with SelK knockdown lentiviral vector. (D) Representative bands and statistical results of CD36 protein expression in microglia transfected with SelK knockdown lentiviral vector. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ or **** $P < 0.0001$ vs. Control

图 7. SelK 过表达/敲减对小胶质细胞 BV2 中 CD36 表达的影响。(A) SelK 过表达腺病毒载体转染小胶质细胞中 CD36 编码 mRNA 的统计结果。(B) SelK 过表达腺病毒载体转染的小胶质细胞中 CD36 蛋白质表达量的免疫印迹代表条带及统计结果。(C) SelK 敲减慢病毒载体转染小胶质细胞中 CD36 编码 mRNA 的统计结果。(D) SelK 敲减慢病毒载体转染小胶质细胞中 CD36 蛋白质表达量的免疫印迹代表条带及统计结果。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 或 **** $P < 0.0001$ vs. Control 组

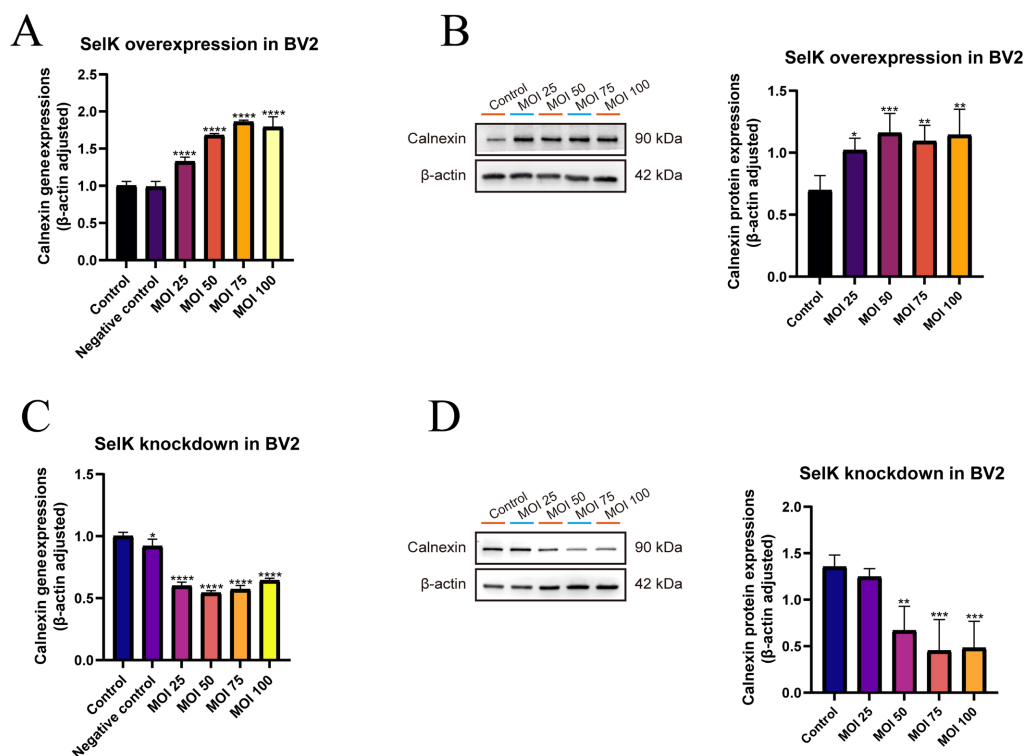


Figure 8. Effect of SelK overexpression/knockdown on the expression of Calnexin in microglia BV2. (A) Statistical results of Calnexin mRNA in microglia transfected with SelK overexpression adenovirus vector. (B) Representative bands and statistical results of Calnexin protein expression in microglia transfected with SelK overexpression adenoviral vector. (C) Statistical results of Calnexin mRNA in microglia transfected with SelK knockdown lentiviral vector. (D) Representative bands and statistical results of Calnexin protein expression in microglia transfected with SelK knockdown lentiviral vector. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ or **** $P < 0.0001$ vs. Control

图 8. SelK 过表达/敲减对小胶质细胞 BV2 中 Calnexin 表达的影响。(A) SelK 过表达腺病毒载体转染小胶质细胞中 Calnexin 编码 mRNA 的统计结果。(B) SelK 过表达腺病毒载体转染的小胶质细胞中 Calnexin 蛋白质表达量的免疫印迹代表条带及统计结果。(C) SelK 敲减慢病毒载体转染小胶质细胞中 Calnexin 编码 mRNA 的统计结果。(D) SelK 敲减慢病毒载体转染小胶质细胞中 Calnexin 蛋白质表达量的免疫印迹代表条带及统计结果。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 或 **** $P < 0.0001$ vs. Control 组

如图 7、图 8 所示,在给予 SelK 过表达病毒载体后,随 SelK 表达量的增加,小胶质细胞 BV2 中 CD36 和 Calnexin 的 mRNA 与蛋白质表达量均大幅升高(CD36, 图 7(A) & 7(B))和(Calnexin, 图 8(A) & 8(B))。

在给予 SelK 敲减病毒载体后,随 SelK 表达量的减少,小胶质细胞 BV2 中 CD36 和 Calnexin 的 mRNA 与蛋白质表达量均大幅下降(CD36, 图 7(C) & 7(D))和(Calnexin, 图 8(C) & 8(D))。实验结果证明 CD36 和 Calnexin 的表达量与 SelK 以及 ZDHHC6 蛋白表达量的多少正相关。

4. 讨论

由上述实验结果可以得出: 硒蛋白 SelK 的过表达可以显著提高与棕榈酰化修饰相关的 ZDHHC6 的蛋白质表达和 mRNA 转录,进而显著提高小胶质细胞与吞噬功能直接相关的吞噬细胞模式识别受体 CD36 的表达和 mRNA 转录,同时促进与 Ca^{2+} 转运相关的钙粘蛋白 Calnexin 的稳定表达和 mRNA 转录。并且如预期一样在 SelK 敲减的小胶质细胞中 CD36 和 Calnexin 的蛋白质表达和 mRNA 转录水平显著下降。再结合前人关于硒蛋白 SelK 能促进 CD36 和 Calnexin 等蛋白 S-棕榈酰化的研究结果,可以看出,硒蛋白 SelK 是通过棕榈酰基转移酶 ZDHHC6 促进 CD36 和 Calnexin 蛋白的棕榈酰化,显著提高 CD36 和 Calnexin 蛋白的稳定表达,从而提高免疫细胞的吞噬功能的。

基金项目

本研究得到了国家自然科学基金(编号:31371085 和 81503085)、辽宁省教育厅基金(编号:LYB201610)的资助。

参考文献

- [1] Lloyd, A.F. and Miron, V.E. (2019) The Pro-Remyelination Properties of Microglia in the Central Nervous System. *Nature Reviews Neurology*, **15**, 447-458. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0184-2>
- [2] Villacampa, N. and Heneka, M.T. (2018) Microglia: You'll Never Walk Alone! *Immunity*, **48**, 195-197. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.009>
- [3] 邓小华, 罗学港. 小胶质细胞及其在阿尔茨海默病中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(4): 332-335.
- [4] Pan, X.-D., Zhu, Y.-G., Lin, N., et al. (2011) Microglial Phagocytosis Induced by Fibrillar β -Amyloid Is Attenuated by Oligomeric β -Amyloid: Implications for Alzheimer's Disease. *Molecular Neurodegeneration*, **6**, Article No. 45. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-45>
- [5] 刘玥滢, 杜天舒, 刘瑒, 等. 小胶质细胞介导的吞噬作用在神经退行性疾病中的研究进展[J]. 生理学报, 2022, 74(2): 283-293.
- [6] 韩旭, 梁宇, 周刚. 海马与阿尔茨海默病[J]. 中国医疗前沿(下半月), 2011, 6(3): 21-22.
- [7] Orr, C.F., Rowe, D.B. and Halliday, G.M. (2002) An Inflammatory Review of Parkinson's Disease. *Progress in Neurobiology*, **68**, 325-340. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00127-2)
- [8] Nazem, A., Sankowski, R., Bacher, M., et al. (2015) Rodent Models of Neuroinflammation for Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroinflammation*, **12**, Article No. 74. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0291-y>
- [9] Krstic, D. and Knuesel, I. (2013) Deciphering the Mechanism Underlying Late-Onset Alzheimer Disease. *Nature Reviews Neurology*, **9**, 25-34. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.236>
- [10] 仁富亮, 宋少伟, 李恩东. 神经细胞和小胶质细胞的相互作用与神经变性疾病的关系[J]. 中国卫生产业, 2013(25): 156-157, 159.
- [11] Luchena, C., Zuazo-Ibarra, J., Valero, J., et al. (2022) A Neuron, Microglia, and Astrocyte Triple Co-Culture Model to Study Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **14**, Article 844534. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.844534>
- [12] Pitts, M.W. and Hoffmann, P.R. (2018) Endoplasmic Reticulum-Resident Selenoproteins as Regulators of Calcium Signaling and Homeostasis. *Cell Calcium*, **70**, 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.001>
- [13] Chen, C.-L., Wang, H.-L., Qian, F., et al. (2022) Prominent Effects of Berberine Hydrochloride on Alzheimer's Disease Model Mice. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article 939039. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.939039>
- [14] Meng, X.-L., Chen, C.-L., Liu, Y.-Y., et al. (2019) Selenoprotein SELENOK Enhances the Migration and Phagocytosis of Microglial Cells by Increasing the Cytosolic Free Ca^{2+} Level Resulted from the Up-Regulation of IP_3R . *Neuroscience*, **406**, 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.029>
- [15] Verma, S., Hoffmann, F.W., Kumar, M., et al. (2011) Selenoprotein K Knockout Mice Exhibit Deficient Calcium Flux in Immune Cells and Impaired Immune Responses. *Journal of Immunology*, **186**, 2127-2137. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002878>
- [16] Dobri, A.-M., Dudău, M., Enciu, A.-M., et al. (2021) CD36 in Alzheimer's Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Therapeutic Targeting. *Neuroscience*, **453**, 301-311. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.003>
- [17] Grajchen, E., Wouters, E., van de Haterd, B., et al. (2020) CD36-Mediated Uptake of Myelin Debris by Macrophages and Microglia Reduces Neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, **17**, Article No. 224. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01899-x>
- [18] Hao, J.-W., Wang, J., Guo, H., et al. (2020) CD36 Facilitates Fatty Acid Uptake by Dynamic Palmitoylation-Regulated Endocytosis. *Nature Communications*, **11**, Article No. 4765. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18565-8>
- [19] Ahumada-Castro, U., Bustos, G., Silva-Pavez, E., et al. (2021) In the Right Place at the Right Time: Regulation of Cell Metabolism by IP_3R -Mediated Inter-Organellar Ca^{2+} Fluxes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, Article 629522. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.629522>
- [20] Fredericks, G.J., Hoffmann, F.W., Rose, A.H., et al. (2014) Stable Expression and Function of the Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor Requires Palmitoylation by a DHHC6/Selenoprotein K Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 16478-16483. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417176111>

-
- [21] Appenzeller-Herzog, C. and Simmen, T. (2016) ER-Luminal Thiol/Selenol-Mediated Regulation of Ca²⁺ Signalling. *Biochemical Society Transactions*, **44**, 452-459. <https://doi.org/10.1042/BST20150233>
- [22] Fredericks, G.J. and Hoffmann, P.R. (2015) Selenoprotein K and Protein Palmitoylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, **23**, 854-862. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6375>
- [23] Dallavilla, T., Abrami, L., Sandoz, P.A., *et al.* (2016) Model-Driven Understanding of Palmitoylation Dynamics: Regulated Acylation of the Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin. *PLOS Computational Biology*, **12**, e1004774. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004774>
- [24] Lynes, E.M., Raturi, A., Shenkman, M., *et al.* (2013) Palmitoylation Is the Switch That Assigns Calnexin to Quality Control or ER Ca²⁺ Signaling. *Journal of Cell Science*, **126**, 3893-3903. <https://doi.org/10.1242/jcs.125856>
- [25] Norton, R.L., Fredericks, G.J., Huang, Z., *et al.* (2017) Selenoprotein K Regulation of Palmitoylation and Calpain Cleavage of ASAP2 Is Required for Efficient FcγR-Mediated Phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **101**, 439-448. <https://doi.org/10.1189/jlb.2A0316-156RR>
- [26] Wang, J., Hao, J.-W., Wang, X., *et al.* (2019) DHHC4 and DHHC5 Facilitate Fatty Acid Uptake by Palmitoylating and Targeting CD36 to the Plasma Membrane. *Cell Reports*, **26**, 209-221. E5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.022>
- [27] Ben, S.B., Wang, Q.Y., Xia, L., *et al.* (2011) Selenoprotein dSelK in *Drosophila* Elevates Release of Ca²⁺ from Endoplasmic Reticulum by Upregulating Expression of Inositol 1,4,5-Tris-Phosphate Receptor. *Biochemistry*, **76**, 1030-1036. <https://doi.org/10.1134/S0006297911090070>
- [28] Shchedrina, V.A., Zhang, Y., Labunskyy, V.M., *et al.* (2010) Structure-Function Relations, Physiological Roles, and Evolution of Mammalian ER-Resident Selenoproteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, **12**, 839-849. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2865>
- [29] Lu, C., Qiu, F., Zhou, H., *et al.* (2006) Identification and Characterization of Selenoprotein K: An Antioxidant in Cardiomyocytes. *FEBS Letters*, **580**, 5189-5197. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.065>
- [30] Rosales, C. and Uribe-Querol, E. (2017) Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International*, **2017**, Article ID: 9042851. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>