

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.13.001

## · 基础研究 ·

SK3 钾通道通过 PI3K/Akt-ERK 通路介导 Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$  复合物所致小胶质细胞激活\*赵琳 于丰祥 谭小芳 宫平 胡竹琴 邱瑜 李娟 $\Delta$ 

(上海交通大学医学院 上海 200020)

**摘要 目的:**探讨 Ca<sup>2+</sup> 激活的小电导 SK3 钾通道在 Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$  复合物(Cu-A $\beta$ )所致小胶质细胞激活中的作用及下游信号通路。**方法:**应用 Cu-A $\beta$  激活 BV2 小胶质细胞,采用 ELISA 和 Amplex Red 试剂盒检测细胞培养上清中肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的含量,应用 qPCR 和 Western blot 检测钾通道 mRNA 和蛋白水平及相关信号通路蛋白的磷酸化。**结果:**(1)应用不同离子通道阻断剂以及不同亚型钾通道阻断剂预处理的实验结果表明,SK3 通道可能介导了 Cu-A $\beta$  所致的小胶质细胞激活。(2) qPCR 和 Western blot 检测结果表明,Cu-A $\beta$  可上调小胶质细胞内 SK3 mRNA 和蛋白表达。(3)通过转染 SK3-siRNA 下调小胶质细胞内 SK3 表达水平,结果表明,下调 SK3 表达后显著抑制 Cu-A $\beta$  所致的小胶质细胞激活。(4)应用特异性信号分子阻断剂预处理的实验结果表明,PI3K/Akt 信号和 ERK 信号均参与了 Cu-A $\beta$  所致的小胶质细胞激活。(5)应用相关信号分子阻断剂预处理的实验结果进一步表明,在介导 Cu-A $\beta$  诱发的小胶质细胞激活过程中,SK3 通道位于 PI3K/Akt-ERK 信号通路的上游。**结论:**SK3 通道通过其下游的 PI3K/Akt-ERK 信号通路介导 Cu-A $\beta$  所致的小胶质细胞炎症反应。

**关键词:**SK3 通道;Cu-A $\beta$  复合物;PI3K/Akt-ERK 信号通路;小胶质细胞

**中图分类号:**R-33;R749.16;R741.02 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)13-2401-06

SK3 Potassium Channels Mediate Microglial Activation Caused by Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$  Complex via the PI3K/Akt-ERK Signaling Pathway\*ZHAO Lin, YU Feng-xiang, TAN Xiao-fang, GONG Ping, HU Zhu-pin, QIU Yu, LI Juan $\Delta$ 

(Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200020, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the role of Ca<sup>2+</sup>-activated small conductance SK3 potassium channels in Cu-A $\beta$  complex-induced microglial activation and the downstream signaling pathway. **Methods:** The Cu-A $\beta$  complex-induced release of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cell culture supernatants were detected using ELISA and the Amplex Red reagent. The levels of mRNA and protein of potassium channels as well as phosphorylation levels of related signaling molecules were detected by qPCR and Western blot. **Results:** (1) The experimental results of pretreatment with different ion channel blockers or potassium channel blockers of different subtypes showed that SK3 channels may mediate microglial activation caused by Cu-A $\beta$  complex. (2) The results of qPCR and Western blot detection showed that Cu-A $\beta$  complex could upregulate SK3 mRNA and protein expression in microglia. (3) The application of SK3-siRNA to knock down SK3 expression showed that the downregulation of SK3 expression significantly inhibited microglial activation caused by Cu-A $\beta$  complex. (4) The experimental results of Western blot detection showed that PI3K/Akt signaling and ERK signaling were involved in microglial activation caused by Cu-A $\beta$  complex. (5) The results of experiments using specific blockers of signaling molecules further showed that SK3 channels may lie upstream of the PI3K/Akt-ERK signaling pathway during the microglial activation induced by the Cu-A $\beta$  complex. **Conclusions:** SK3 channels mediate microglial inflammatory responses induced by Cu-A $\beta$  complex through the downstream PI3K/Akt-ERK signaling pathway.

**Key words:** SK3 channels; Cu-A $\beta$  complex; PI3K/Akt-ERK signaling pathway; Microglia

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R749.16; R741.02 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2023)13-2401-06

## 前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种年龄依赖

性的神经退行性疾病<sup>[1]</sup>,发病机制尚未完全阐明。 $\beta$ -淀粉样肽( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )异常聚集、沉积形成的老年斑(senile plaques, SP)是其最重要病理特征之一<sup>[2-4]</sup>。研究报道,AD 患者脑内 SP

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(82073854)

作者简介:赵琳(1998-),硕士研究生,主要研究方向:神经药理学,E-mail: 13465181637@163.com

$\Delta$  通讯作者:李娟,女,博士,教授,主要研究方向:神经药理学,E-mail: lijuanpharm@163.com

(收稿日期:2023-03-29 接受日期:2023-04-25)

中富含金属离子<sup>[5,6]</sup>,其中  $\text{Cu}^{2+}$  可与  $\text{A}\beta$  配位结合而诱导后者构象改变,从而与  $\text{A}\beta$  共聚集,形成神经毒性  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{A}\beta$  复合物 ( $\text{Cu-A}\beta$ ),从而参与 AD 发病机制<sup>[7-9]</sup>。脑内小胶质细胞(microglia, MG)介导的神经炎症反应在 AD 发病机制中发挥关键作用。我们的前期研究发现,  $\text{Cu-A}\beta$  可促进 MG 激活及其介导的神经元损伤,该作用强于  $\text{A}\beta$  自聚集物<sup>[10]</sup>。然而,  $\text{Cu-A}\beta$  激活 MG 的机制目前仍不清楚。

$\text{Ca}^{2+}$  激活的钾通道 ( $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels, KCa)参与 MG 功能调控<sup>[11-13]</sup>;研究表明, SK3 小电导 KCa 在内毒素所致 MG 激活及神经元损伤中发挥重要作用<sup>[14,15]</sup>。然而,其是否参与  $\text{Cu-A}\beta$  所致 MG 激活目前尚不清楚。因此,本研究拟应用细胞和分子生物学技术,确定 SK3 是否参与介导  $\text{Cu-A}\beta$  所致 MG 炎症反应,并探讨了其下游信号通路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验试剂 小鼠 BV2 小胶质细胞株购自北京协和细胞库;胎牛血清、DMEM、双抗(青霉素和链霉素)购自美国 Gibco 公司;氯化铜( $\text{CuCl}_2$ )、谷氨酰胺及 PKC 激酶抑制剂 calphostin C(CC)购自美国 Sigma 公司;人  $\beta$  淀粉样肽 1-40( $\text{A}\beta$ )购自美国 Invitrogen 公司;六氟异丙醇(HFIP)购自比利时 Acros organics 公司;TNF- $\alpha$  酶联吸附免疫检测试剂盒(ELISA)购自杭州联科生物技术股份有限公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒、Amplex<sup>TM</sup> Red 过氧化氢检测试剂盒购自美国 Thermo 公司;小鼠 SK3 siRNA 及转染试剂购自美国 Santa Cruz 公司;四乙胺(TEA)、河豚毒素(TTX)、硝苯地平(NIF)、4-氨基吡啶(4-AP)、蜂毒明肽(Apamin)、Tamapin (Tam)、Triarylmethane-34 (TRAM-34)购自上海皓元生物医药科技有限公司;RIPA 裂解液、SB203580 (SB)、SP600125 (SP)、LY294002 (LY)及 U0126 (U) 购自上海碧云天生物技术有限公司;Akt、p-Akt、ERK1/2、p-ERK1/2、p65、p-p65、 $\beta$ -actin 及山羊抗兔 IgG 二抗(1:1000)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.2 实验仪器 生物安全柜购自美国 Nuair 公司;二氧化碳培养箱、多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司;SDS 电泳槽、电转仪购自美国 Bio-Rad 公司;低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;奥德赛扫描仪购自美国 LI-COR 公司;real-time PCR 仪购自澳大利亚 Corbett 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 BV2 细胞培养 配制含 10%胎牛血清+DMEM 培养基+1%双抗+1%谷氨酰胺的完全培养基。从液氮中取出冻存管,在 37℃水浴融化,800 rpm 离心 5 分钟,加入新鲜完全培养液形成细胞悬液,置于培养箱中培养(37℃,5%  $\text{CO}_2$ )。当细胞密度达到 80%-90%时进行细胞传代,以扇形吹打方式,吹打细胞,使之从瓶壁脱落,形成细胞悬液。吸取适量的细胞悬液(传代比例为 1:10),接种于新的含新鲜培养液的培养瓶内,并放入培养箱进行培养。

1.2.2 细胞 siRNA 转染 接种细胞至 6 孔板中,细胞汇合度达到 80%时进行转染。将配置好的溶液 A(已稀释的 siRNA)和溶液 B(已稀释的转染试剂)均匀混合,室温静置 30 分钟,在溶液 A 和溶液 B 的混合物中,加入转染培养基,加入至含有

1 mL 的完全培养基中,孵育 18 小时,而后更换新鲜的完全培养基,24 小时后完成细胞转染。

1.2.3  $\text{Cu-A}\beta$  制备 使用 1 mL 的 HFIP 溶解 1 mg 的  $\text{A}\beta_{1-40}$ , 室温静置 1-2 小时,使用氮吹仪在高纯氮下慢速吹干,随后加入 DMSO 进行溶解,制备  $\text{A}\beta_{1-40}$  贮备液。应用超纯水制备  $\text{Cu-Cl}_2$  贮备液。将  $\text{CuCl}_2$  和  $\text{A}\beta_{1-40}$  按照 1:1 的摩尔比例进行混合,使用 pH 为 6.6 的 HEPES 缓冲液稀释至需要浓度,在 37℃恒温条件下孵育 24 小时,得到  $\text{Cu-A}\beta$  (10  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ :10  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{1-40}$ )。

1.2.4 ELISA 实验 800 rpm 离心 10 分钟,得到细胞培养上清。分别加入 100  $\mu\text{L}$  稀释的标准品和细胞培养上清,300 转/分钟,室温孵育 2 小时。弃掉液体,加入 300  $\mu\text{L}$  洗液洗板,洗涤,拍干,并且加入 100  $\mu\text{L}$  检测抗体,300 转/分钟,室温孵育 30 分钟。重复洗涤。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  显色底物 TMB,避光孵育 5 分钟;加入 100  $\mu\text{L}$  终止液。在酶标仪 450 nm、570 nm 进行双波长检测进行检测。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 570 nm 测定值。

1.2.5 Western blot 实验 在孔板中加入 RIPA 裂解液,进行细胞蛋白的提取,使用 BCA 试剂盒进行蛋白含量的测定。进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳,使用 50  $\mu\text{g}$  变性的蛋白样品上样,依次进行电泳、转膜(200 mA,2 小时)、封闭(5%脱脂牛奶,室温,2 小时)、一抗孵育(4℃,过夜)、二抗孵育(室温,2 小时)、曝光显影。使用 Image J 软件进行定量分析。

1.2.6 qPCR 实验 使用 TRIZOL 进行总 RNA 的提取,并且测定其浓度,通过逆转录得到 cDNA 进行 PCR 反应。SK1 引物序列上游:5'-TACCACGATAAGCAGGAAGTGA-3',下游:5'-GCCAGTGAGCAGACACACAC-3';SK2 引物序列上游:5'-GTGGACAATGGAGCAGATGACT-3',下游:5'-GGATGATAGCACACACCAGTA-3';SK3 引物序列上游:5'-CTCCTCTCTCTTTGTTTCTTCA-3',下游:5'-CCTCTCTCTTTGTTTCTTCA-3';GAPDH 引物序列上游:5'-TCAACAGCAACTCCCCTCTTCCA-3',下游:5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCGATTCA-3'。在 95℃5 秒,60℃20 秒,40 个循环的条件下,进行 PCR 反应,采用 Ct 法计算各样品的平均 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  进行计算基因表达量。

1.2.7  $\text{H}_2\text{O}_2$  的测定 在 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$  含 50  $\mu\text{M}$  Red reagent 和 10 U/mL HRP 的 KRPG 反应液(145 mM NaCl,5.7 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ,4.86 mM KCl,0.54 mM  $\text{CaCl}_2$ ,1.22 mM  $\text{MgSO}_4$ ,5.5 mM Glucose),在 37℃下孵育 10 分钟;每孔加入标准品和 KRPG 溶液稀释的细胞悬液( $1.5 \times 10^4$ ),室温避光孵育 30 分钟后,测量 560 nm 处的吸光度,根据标准曲线计算  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度。

### 1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析并制作图表。两组以上的比较应用单因素 ANOVA 进行统计分析。 $P < 0.05$  即认为具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 SK3 通道介导 $\text{Cu-A}\beta$ 诱发的 MG 激活

在 BV2 细胞中,分别使用钾通道、钠通道和钙通道阻断剂 TEA(10 mM)、TTX(500 nM)和 NIF(10  $\mu\text{M}$ )预处理,然后观察

Cu-A $\beta$  的激活作用。结果表明,TEA 预处理组细胞在 Cu-A $\beta$  (5  $\mu$ M) 刺激后 TNF- $\alpha$  的释放较 Cu-A $\beta$  处理组显著降低 ( $P<0.01$ ), 见图 1A。上述结果提示钾通道可能介导了 Cu-A $\beta$  对 MG 的激活作用。随后分别使用电压门控钾通道(Kv 通道)、小电导 KCa 通道(SK 通道,包括 SK1、SK2 和 SK3)和中电导 KCa(IK/KCa3.1)阻断剂 4-AP(1 mM;阻断 Kv 通道)、Apamin (200 nM,阻断 SK1、SK2 和 SK3)<sup>[14]</sup>、Tam(250 pM,抑制 SK2;

10 nM,抑制 SK2 和 SK3)<sup>[14]</sup>、TRAM-34(10  $\mu$ M;阻断 KCa3.1) 预处理,然后观察 Cu-A $\beta$  的激活作用。结果表明,较 Cu-A $\beta$  处理组,Apamin 和 Tam(10 nM)预处理组 TNF- $\alpha$  的释放量显著降低 ( $P<0.05$ ),见图 1B。 $H_2O_2$  的检测结果也表明,Apamin 和 Tam (10 nM) 预处理组在 Cu-A $\beta$  刺激后  $H_2O_2$  的释放量较 Cu-A $\beta$  处理组显著降低 ( $P<0.01$ ),见图 1C。上述结果提示 SK3 可能介导了 Cu-A $\beta$  对 MG 的激活作用。

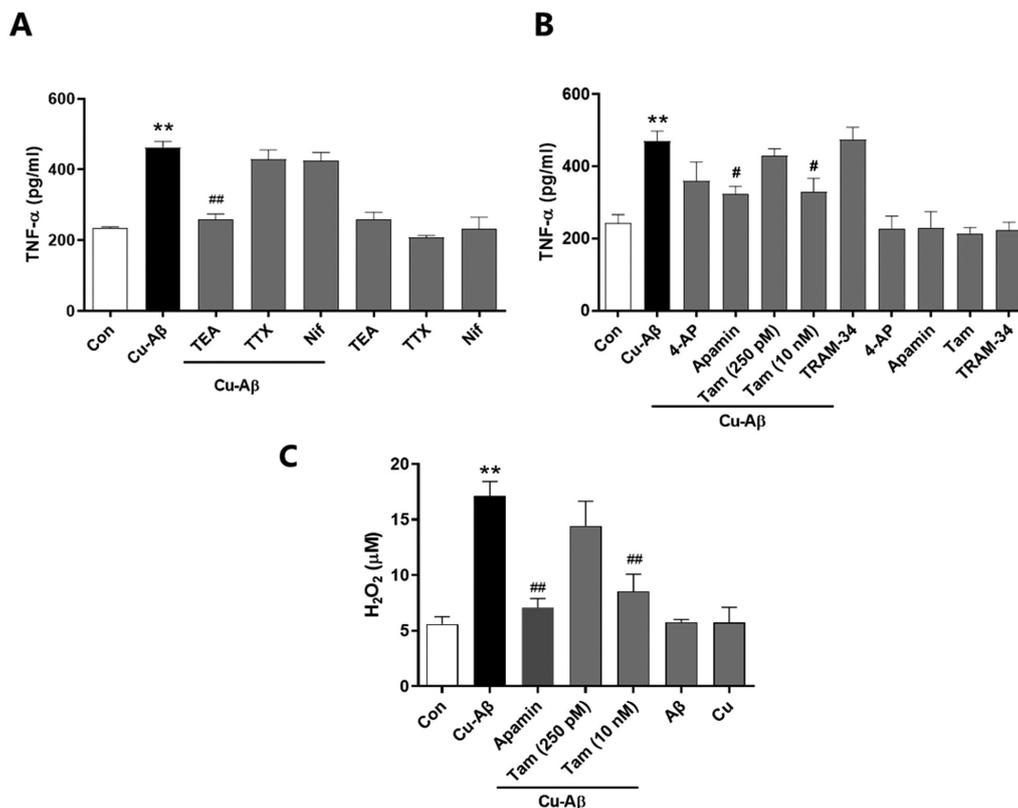


图 1 SK3 通道介导 Cu-A $\beta$  所致的小胶质细胞激活

Fig.1 SK3 channels mediate microglial activation caused by Cu-A $\beta$

Note: Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=3. \*\* $P<0.01$ , compared with control group. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , compared with Cu-A $\beta$  group.

## 2.2 Cu-A $\beta$ 促进 MG 内 SK3 表达

通过 qPCR 和 Western blot 检测 Cu-A $\beta$ (5  $\mu$ M)刺激后 SK 通道 mRNA 和蛋白表达水平,结果显示,相较于对照组,Cu-A $\beta$

刺激 BV2 细胞后,SK3 通道的 mRNA 和蛋白表达水平显著增加 ( $P<0.01$ ),见图 2A-B。

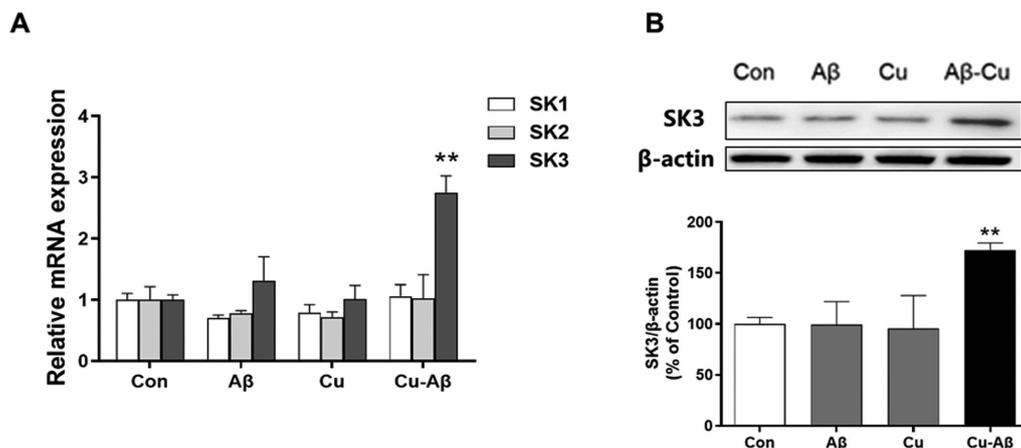


图 2 Cu-A $\beta$  对 MG 内 SK3 表达的影响

Fig.2 Effect of Cu-A $\beta$  on SK3 expression in microglia

Note: Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=3. \*\* $P<0.01$ , compared with control group.

### 2.3 下调 SK3 表达抑制 Cu- Aβ 所致的 MG 激活

接下来我们考察了应用 SK3 siRNA 下调 MG 内 SK3 表达后 Cu-Aβ 的激活作用。Western blot 检测转染 SK3-siRNA 后 BV2 内 SK3 的蛋白表达水平, 结果显示, SK3-siRNA 处理组

SK3 的蛋白表达水平较对照组显著降低( $P<0.01$ ), 见图 3A-B。ELISA 检测结果显示, 较于 Cu-Aβ(5 μM)处理组, SK3-siRNA 处理后 Cu-Aβ 诱发的 TNF-α 释放量显著降低( $P<0.05$ ), 见图 3C。

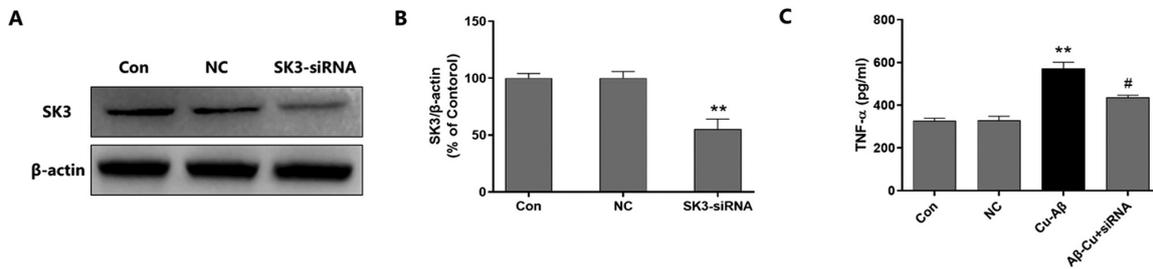


图3 下调 SK3 表达抑制 Cu- Aβ 所致的 MG 激活

Fig.3 Knock-down of SK3 expression attenuates Cu-Aβ-induced microglial activation

Note: Data are shown as mean ± SEM, n=3. \*\* $P<0.01$ , compared with control group. # $P<0.05$ , compared with Cu-Aβ group.

### 2.4 PI3K/Akt 信号和 ERK 信号参与 Cu-Aβ 所致的 MG 激活

随后探讨了 Cu-Aβ 诱发 MG 激活的胞内信号通路。分别应用 PI3K、ERK1/2、p38、JNK 和 PKC 阻断剂 LY (25 μM)、U (10 μM)、SB(7 μM)、SP(7 μM)和 CC(7 μM)预处理 BV2 细胞, 观察 Cu-Aβ 所致的 MG 激活。结果显示, LY(PI3K 阻断剂)和 U(ERK1/2 阻断剂)预处理能够显著抑制 Cu-Aβ(5 μM)诱导的 TNF-α 释放( $P<0.01$ ), 图 4A。同样, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的检测结果也表

明, 分别应用 LY 和 U 预处理后, Cu-Aβ 诱发的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放量较 Cu-Aβ 处理组显著降低( $P<0.01$ ), 见图 4B。上述结果提示 PI3K/Akt 信号和 ERK 信号均参与了 Cu-Aβ 致 MG 激活作用。随后应用 Western blot 检测了 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化水平, 结果显示, Cu-Aβ 刺激 BV2 细胞后 5-120 分钟内, Akt 和 ERK1/2 的磷酸化水平显著增加( $P<0.05$ ), 并呈现时间依赖性, 图 4C-D。

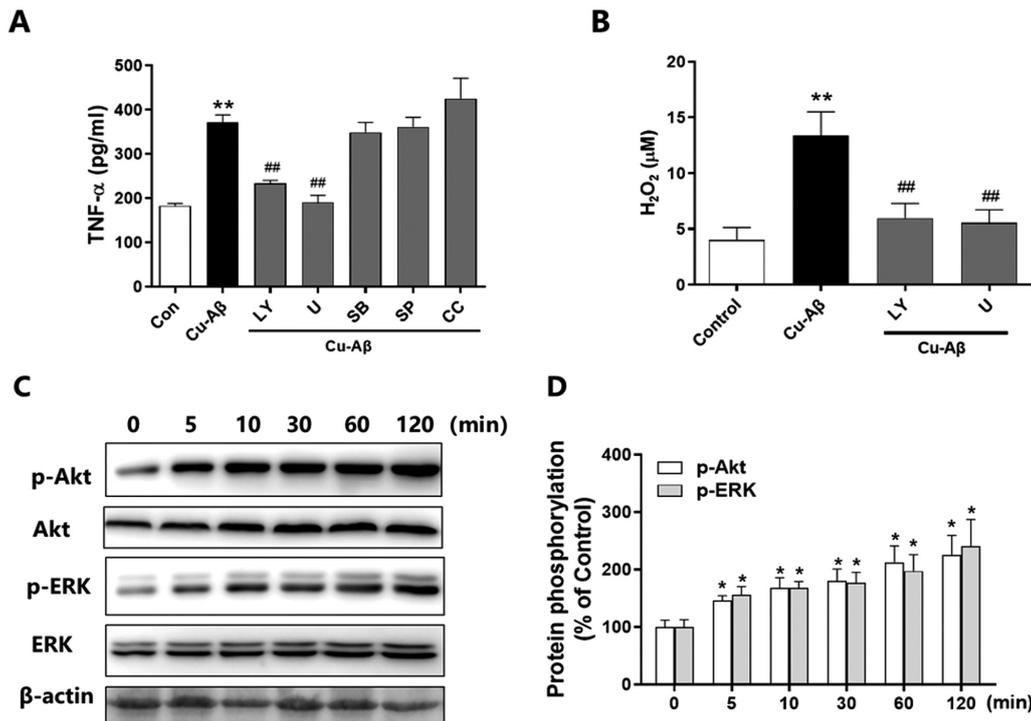


图4 PI3K/Akt 信号和 ERK 信号均参与 Cu-Aβ 所致的 MG 激活

Fig.4 Both PI3K/AKT signaling and ERK signaling are involved in microglial activation caused by Cu-Aβ

Note: Data are shown as mean ± SEM, n=3. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control group, ## $P<0.01$ , compared with Cu-Aβ group.

### 2.5 SK3 通过 PI3K/Akt-ERK 信号通路介导 Cu-Aβ 所致的 MG 激活

我们的前期研究结果表明, Cu-Aβ 致 MG 激活作用伴随 NF-κB 的激活<sup>[10]</sup>。为探究 SK3 通道、PI3K/Akt 和 ERK1/2 与 NF-κB 通路的关系, 我们接下来对其可能的上下游联系进行了

探究。应用 Western blot 检测了 SK 通道、PI3K 和 ERK1/2 阻断剂 Apamin(200 nM)、LY(25 μM)和 U(10 μM)预处理后 Akt、ERK1/2 和 p65 的磷酸化水平。结果显示, 与 Cu-Aβ(5 μM)处理组相比, PI3K 阻断剂 LY 预处理后, ERK1/2 和 p65 蛋白的磷酸化水平显著降低; ERK1/2 阻断剂 U 预处理对 Akt 蛋白的磷

酸化水平无明显影响,但显著降低 p65 的磷酸化水平;SK 通道阻断剂 Apamin 预处理后,Akt,ERK1/2 和 p65 的磷酸化水平均显著降低( $P<0.01$ , $P<0.001$ ),图 5A-B。同样,ELISA 检测结果

显示,与 Cu-A $\beta$  处理组相比,使用了 SK 通道、PI3K、ERK1/2 阻断剂后,Cu-A $\beta$  诱发的 TNF- $\alpha$  释放量显著降低 ( $P<0.05$ ),图 5C。上述结果提示,SK3 通过 PI3K/Akt-ERK 信号通路介导 Cu-A $\beta$  所致的 MG 激活。

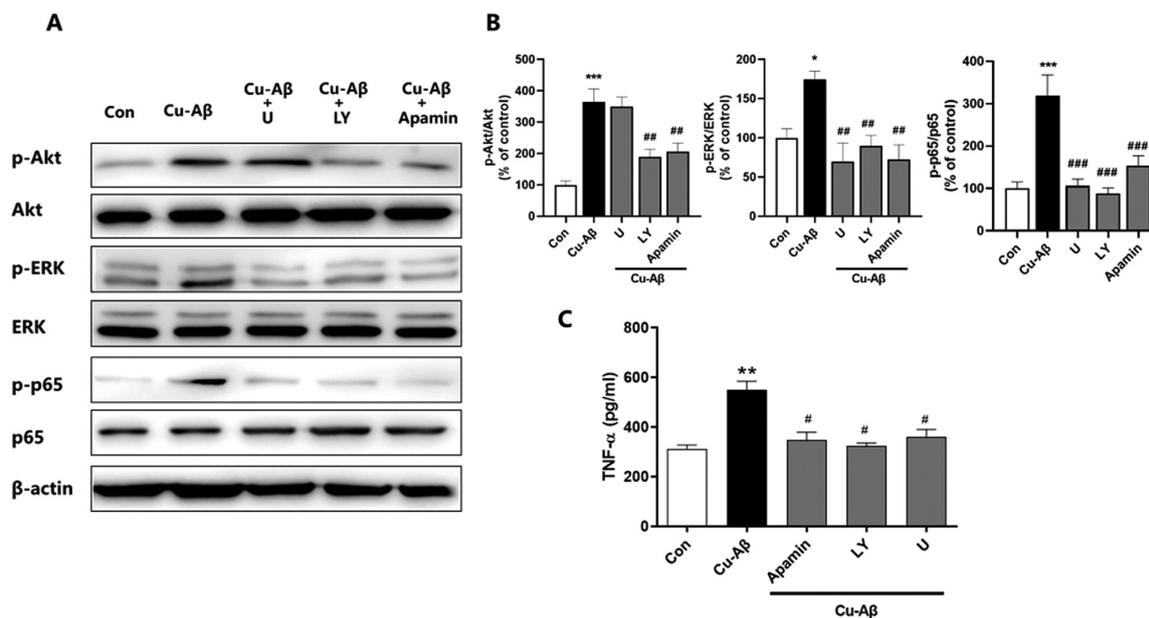


图 5 SK3 通过 PI3K/Akt-ERK 信号通路介导 Cu-A $\beta$  所致的 MG 激活

Fig.5 SK3 mediates Cu-A $\beta$ -induced microglial activation through PI3K/Akt-ERK signaling pathway

Note: Data are shown as mean $\pm$  SEM, n=3. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with control group. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , compared with Cu-A $\beta$  group.

### 3 讨论

在 AD 发生、发展过程中,A $\beta$  的细胞外异常聚集及沉积是早期重要病理事件及神经元损伤病生机制的中心环节<sup>[2]</sup>。研究表明,A $\beta$  聚集并不仅是单纯的自聚集过程,还是一个多种因素诱导的蛋白质变构过程。某些小分子物质如过渡金属离子,如 AD 老年斑中富集的、具有氧化还原活性的 Cu<sup>2+</sup>,可以作为辅因子(cofactor)与 A $\beta$  共聚集,诱导形成 Cu-A $\beta$  共聚集物,直接导致神经元损伤,从而在 AD 发病机制中发挥核心作用<sup>[7]</sup>。MG 作为中枢神经系统的先天免疫细胞<sup>[6]</sup>,其过度激活导致的神经炎症级联反应(可导致 NF- $\kappa$ B 激活及 TNF- $\alpha$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等大量释放)是 AD 神经元损伤的关键机制<sup>[17,18]</sup>。我们的前期研究结果显示,Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$  在不引起直接神经元损伤的剂量下,可诱发 MG 激活及其介导的海马神经元损伤<sup>[10]</sup>。然而,Cu-A $\beta$  通过何种机制促进 MG 激活,目前仍不清楚。因此,本研究对该问题进行了探究。MG 细胞膜离子通道功能失调在 AD 等发病机制中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。本研究应用细胞和分子生物学技术,首次发现 SK3 钾通道可能介导了 Cu-A $\beta$  所致的 MG 激活,该作用可能由其下游的 PI3K/Akt-ERK 信号通路介导。

MG 中表达多种离子通道,包括钾通道、钠通道和钙通道,这些离子通道具有多种功能,可调节 MG 介导的炎症级联反应<sup>[20,21]</sup>。为了探究 Cu-A $\beta$  激活 MG 的机制,我们使用了不同离子通道的阻断剂,发现阻断钾离子通道后,Cu-A $\beta$  诱发的 TNF- $\alpha$  释放显著减少,由此可见,Cu-A $\beta$  诱发的 MG 激活作用可能与钾离子通道有关。钾离子通道又分为电压门控钾离子通道(Kv)和 Ca<sup>2+</sup> 激活钾离子通道(KCa)。其中 KCa 按生物物理

性质和基因同源性又可分为中电导(IK/KCa3.1)和小电导(包括 SK1,SK2 和 SK3)等通道<sup>[22,23]</sup>。因此我们又探究了不同钾通道阻断剂对 Cu-A $\beta$  所致 MG 激活的影响。我们发现,SK1、SK2 和 SK3 通道阻断剂(Apamin)能够显著抑制 Cu-A $\beta$  诱发的 TNF- $\alpha$  释放。另外,阻断 SK2 功能(应用 250 pM Tam 预处理)<sup>[14]</sup>对 Cu-A $\beta$  诱发的 TNF- $\alpha$  释放没有产生明显影响;然而阻断 SK2 和 SK3 功能(应用 10 nM Tam 预处理)<sup>[14]</sup>则显著抑制 Cu-A $\beta$  诱发的 TNF- $\alpha$  释放,并且与 Apamin 处理组没有显著差异。上述结果提示,SK3 可能在 Cu-A $\beta$  所致的 MG 激活中发挥了重要作用。后续我们又分别通过检测 SK3 表达水平和下调 SK3 表达,进一步验证 SK3 的作用。我们发现 SK3 在 Cu-A $\beta$  激活 MG 过程中表达增加;使用 SK3 特异性 siRNA 沉默 SK3 后,Cu-A $\beta$  诱发的 TNF- $\alpha$  释放显著减少。上述一系列结果提示,Cu-A $\beta$  导致的 MG 激活由 SK3 通道介导。

ERK 信号和 PI3K/Akt 信号在胶质细胞相关神经炎症反应中发挥重要作用<sup>[24]</sup>。另外,研究也表明,PI3K/Akt 信号和 ERK 信号在 MG 激活中发挥关键作用<sup>[25]</sup>。后续实验我们应用多种蛋白激酶阻断剂,探究 Cu-A $\beta$  激活 MG 的细胞内信号通路。结果表明,PI3K 和 ERK 阻断剂显著抑制 Cu-A $\beta$  诱发的 TNF- $\alpha$  释放;同时,Cu-A $\beta$  刺激 MG 细胞后,Akt 和 ERK 的磷酸化水平呈现时间依赖性增加。由此我们推测 Cu-A $\beta$  激活 MG 作用与 PI3K-Akt 和 ERK 信号通路有关。前期研究结果表明,Cu-A $\beta$  激活 MG 的作用伴随 NF- $\kappa$ B 的激活(p65 蛋白磷酸化)<sup>[10]</sup>。因此后续实验又探究了 SK3 通道与上述信号通路的关系。结果表明,PI3K 阻断剂可以降低 ERK 和 p65 蛋白的磷酸化,然而 ERK 阻断剂对 Akt 的磷酸化水平无影响,但仍可阻断 p65 的

磷酸化; 阻断 SK 通道功能后 Akt、ERK 和 p65 的磷酸化水平均显著降低。由此提示我们 SK3 通过 PI3K/Akt-ERK 信号通路介导 Cu-A $\beta$  的 MG 激活作用。

综上所述, 本研究证明了小电导 SK3 钾通道介导了 Cu-A $\beta$  激活 MG 的作用, 该作用由其下游的 PI3K/Akt-ERK 信号通路介导。本研究初步探究了 SK3 钾通道在 Cu-A $\beta$  所致 MG 激活作用及机制, 对于解析 AD 神经元退变早期聚集态 A $\beta$  触发的 MG 激活及中枢炎症机制, 并发现可早期干预的分子靶标, 具有较重要理论价值。

#### 参考文献(References)

- [1] Si ZZ, Zou CJ, Mei X, et al. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease: from mechanisms to clinical applications [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(4): 708-715
- [2] Gallardo G, Holtzman DM. Amyloid- $\beta$  and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1184: 187-203
- [3] Ashrafian H, Zadeh EH, Khan RH. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 167: 382-394
- [4] Koller EJ, Ibanez KR, Vo Q, et al. Combinatorial model of amyloid  $\beta$  and tau reveals synergy between amyloid deposits and tangle formation[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2022, 48(2): e12779
- [5] Miller LM, Wang Q, Telivala TP, et al. Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease [J]. *J Struct Biol*, 2006, 155(1): 30-37
- [6] Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, et al. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques [J]. *J Neurol Sci*, 1998, 158(1): 47-52
- [7] Ejaz HW, Wang W, Lang M. Copper Toxicity Links to Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Therapeutics Approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7660
- [8] Duroux C, Hagège A. CE-ICP-MS to probe A $\beta$ 1-42/copper (II) interactions, a complementary tool to study amyloid aggregation in Alzheimer's disease[J]. *Metallomics*, 2022, 14(1): mfab075
- [9] 倪雯雯, 谭小芳, 于丰祥, 等. Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$  复合物与 A $\beta$  单体诱导神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放作用的比较研究[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(08): 1401-1406
- [10] Yu F, Gong P, Hu Z, et al. Cu (II) enhances the effect of Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide on microglial activation [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 122
- [11] Nam YW, Downey M, Rahman MA, et al. Channelopathy of small and intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(2): 259-267
- [12] Yang X, Wang G, Cao T, et al. Large-conductance calcium-activated potassium channels mediate lipopolysaccharide-induced activation of murine microglia[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(35): 12921-12932
- [13] Coccoza G, di Castro MA, Carbonari L, et al. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels modulate microglia affecting motor neuron survival in hSOD1G93A mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 73: 584-595
- [14] Schlichter LC, Kaushal V, Moxon-Emre I, et al. The Ca<sup>2+</sup> activated SK3 channel is expressed in microglia in the rat striatum and contributes to microglia-mediated neurotoxicity in vitro [J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7: 4
- [15] Siddiqui T, Lively S, Ferreira R, et al. Expression and contributions of TRPM7 and KCa2.3/SK3 channels to the increased migration and invasion of microglia in anti-inflammatory activation states [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e106087
- [16] Rajesh Y, Kanneganti TD. Innate Immune Cell Death in Neuroinflammation and Alzheimer's Disease [J]. *Cells*, 2022, 11(12): 1885
- [17] Jorfi M, Maaser-hecker A, Tanzi RE. The neuroimmune axis of Alzheimer's disease[J]. *Genome Med*, 2023, 15(1): 6
- [18] Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?[J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172
- [19] Skaper SD. Ion channels on microglia: therapeutic targets for neuroprotection [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011, 10(1): 44-56
- [20] Sarkar S. Microglial ion channels: Key players in non-cell autonomous neurodegeneration[J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 174: 105861
- [21] Luo L, Song S, Ezenwukwa CC, et al. Ion channels and transporters in microglial function in physiology and brain diseases[J]. *Neurochem Int*, 2021, 142: 104925
- [22] Trombetta-Lima M, Krabbendam IE, Dolga AM. Calcium-activated potassium channels: implications for aging and age-related neurodegeneration[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 123: 105748
- [23] Brown BM, Shim H, Christophersen P, et al. Pharmacology of Small- and Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2020, 60: 219-240
- [24] Rai SN, Dilnashin H, Birla H, et al. The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders [J]. *Neurotox Res*, 2019, 35 (3): 775-795
- [25] Yin P, Wang X, Wang S, et al. Maresin 1 Improves Cognitive Decline and Ameliorates Inflammation in a Mouse Model of Alzheimer's Disease[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 466