

# $\beta$ 淀粉样蛋白受体 PirB 对小鼠星形胶质细胞增殖及反应性增生的影响

赵沅杰<sup>1</sup>, 拓振杰<sup>1</sup>, 尚培骏<sup>1</sup>, 杨锦雯<sup>1</sup>, 张晓华<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>西安医学院公共卫生学院, 陕西西安 710021; <sup>2</sup>厦门大学神经科学研究所/福建省神经退行性疾病及衰老研究重点实验室, 福建厦门 361005

[中图分类号] R741.02 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1115.2023.0529

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 赵沅杰, 拓振杰, 尚培骏, 等.  $\beta$ 淀粉样蛋白受体 PirB 对小鼠星形胶质细胞增殖及反应性增生的影响[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(1): 82-90.

[收稿日期] 2022-05-16 [录用日期] 2022-08-29 [上线日期] 2023-05-29

**[摘要]** 目的 观察 $\beta$ 淀粉样蛋白(A $\beta$ )受体 PirB 对小鼠星形胶质细胞增殖和反应性增生的影响。方法 培养小鼠原代星形胶质细胞, 将细胞分为对照组、A $\beta$ 组、A $\beta$ +0.2  $\mu$ mol/L PEP组、A $\beta$ +0.4  $\mu$ mol/L PEP组、A $\beta$ +Fluspirilene组、A $\beta$ +GFP-LV组和A $\beta$ +mPirB-LV组。分别采用 PirB 的可溶性胞外段 PEP 或 PirB 抑制剂 Fluspirilene 处理星形胶质细胞, 抑制内源性 PirB 受体; 或采用慢病毒转染过表达 PirB 基因, 其后给予 A $\beta_{1-42}$  寡聚体处理。采用 RTCA 和 EdU 法观察细胞增殖情况, Real-time PCR 检测星形胶质细胞反应性增生相关 S-100 钙结合蛋白 B(S-100 $\beta$ )、波形蛋白(Vimentin)、巢蛋白(Nestin)、淀粉样前体蛋白(APP)的 mRNA 表达水平, Western blotting 检测神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达水平。结果 RTCA 法检测结果显示, 给药后各组标准化细胞指数(NCI)值均骤降, 其后逐步升高并趋于平稳。EdU 染色结果显示, 与对照组比较, A $\beta$ 组星形胶质细胞增殖活性明显增强( $P<0.05$ ); 与 A $\beta$ 组比较, A $\beta$ +0.2  $\mu$ mol/L PEP组、A $\beta$ +0.4  $\mu$ mol/L PEP组和 A $\beta$ +Fluspirilene 组细胞增殖活性均明显降低( $P<0.01$  或  $P<0.001$ )。Real-time PCR 检测结果显示, 与对照组比较, A $\beta$ 组 GFAP、S-100 $\beta$ 、Vimentin、Nestin、APP 和 PirB 的 mRNA 表达量均明显增高( $P<0.05$ ); 与 A $\beta$ 组比较, A $\beta$ +0.4  $\mu$ mol/L PEP组 GFAP、S-100 $\beta$ 、Vimentin、Nestin、APP 和 PirB 的 mRNA 表达量均明显下降( $P<0.01$ ); 与 A $\beta$ +GFP-LV组比较, A $\beta$ +mPirB-LV组 GFAP、S-100 $\beta$ 、Vimentin、Nestin、APP 和 PirB 的 mRNA 表达量均明显增高( $P<0.05$ )。Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, A $\beta$ 组 GFAP 表达明显增高( $P<0.05$ ); 与 A $\beta$ 组比较, A $\beta$ +0.4  $\mu$ mol/L PEP组 GFAP 表达明显下降( $P<0.05$ )。结论 PirB 是调节星形胶质细胞反应性增生和增殖的上游分子, 抑制星形胶质细胞 PirB 受体可能是治疗阿尔茨海默病的潜在方法。

**[关键词]** 阿尔茨海默病; 反应性星形胶质细胞增生; PirB; 星形胶质细胞; 增殖

## Effects of A $\beta$ receptor PirB on mouse astrocyte proliferation and reactive astrogliosis

Zhao Yuan-Jie<sup>1</sup>, Tuo Zhen-Jie<sup>1</sup>, Shang Pei-Jun<sup>1</sup>, Yang Jin-Wen<sup>1</sup>, Zhang Xiao-Hua<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Public Health, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China

<sup>2</sup>Institute of Neuroscience/Fujian Provincial Key Laboratory of Neurodegenerative Disease and Aging Research, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

\*Corresponding author, E-mail: xiaohuazhang2017@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81801088), the Youth Talent Fund of Shaanxi University Association for Science and Technology (20200313), the Natural Science Basic Research Plan of Shaanxi Province (2020JQ-881), and the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Project (202111840011)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) receptor PirB on mouse astrocyte proliferation and reactive astrogliosis *in vitro*. **Methods** Mouse primary astrocytes were cultured, and divided into control group, A $\beta$  group, A $\beta$ +0.2  $\mu$ mol/L

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81801088); 陕西省高校科协青年人才托举计划(20200313); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JQ-881); 国家级大学生创新创业训练计划(202111840011)

**[作者简介]** 赵沅杰, 医学学士, 主要从事阿尔茨海默病发病机制和预防方面的研究

**[通信作者]** 张晓华, E-mail: xiaohuazhang2017@163.com

PEP group, A $\beta$ +0.4  $\mu$ mol/L PEP group, A $\beta$ +Fluspirilene group, A $\beta$ +GFP-LV group, and A $\beta$ +mPirB-LV group. The mouse astrocytes were treated with soluble PirB extracellular peptide PEP or PirB inhibitor Fluspirilene, respectively, to inhibit endogenous PirB receptor, or overexpressed PirB gene via lentivirus transfection and then treated with A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomers. The proliferation of astrocytes was observed by RTCA and EdU methods, and the mRNA expression levels of S-100 calcium-binding protein B (S-100 $\beta$ ), Vimentin, Nestin and amyloid precursor protein (APP) associated with reactive astrogliosis of astrocytes were observed by real-time PCR, and the expression level of glial fibrillary acid protein (GFAP) was detected by Western-blotting. **Results** The results of RTCA monitoring showed that normalized cell index (NCI) values of each group decreased sharply after treatment, and then increased gradually and tended to be stable. The results of EdU staining showed that the proliferative activity of astrocytes was significantly enhanced in the A $\beta$  group ( $P<0.05$ ) compared with control group; Compared with A $\beta$  group, cell proliferation activity in A $\beta$ +0.2  $\mu$ mol/L PEP group, A $\beta$ +0.4  $\mu$ mol/L PEP group and A $\beta$ +Fluspirilene group were significantly decreased ( $P<0.01$  or  $P<0.001$ ). The results of real-time PCR showed that compared with control group, mRNA expressions of GFAP, S-100 $\beta$ , Vimentin, Nestin, APP and PirB in A $\beta$  group were significantly increased ( $P<0.05$ ); Compared with A $\beta$  group, mRNA expressions of GFAP, S-100 $\beta$ , Vimentin, Nestin, APP and PirB in A $\beta$ +0.4  $\mu$ mol/L PEP group were significantly decreased ( $P<0.01$ ); Compared with A $\beta$ +GFP-LV group, mRNA expressions of GFAP, S-100 $\beta$ , Vimentin, Nestin, APP and PirB in A $\beta$ +mPirB-LV group were significantly increased ( $P<0.05$ ). The results of Western blotting showed that compared with control group, the expression of GFAP in A $\beta$  group was significantly increased ( $P<0.05$ ); Compared with A $\beta$  group, the expression of GFAP in A $\beta$ +0.4  $\mu$ mol/L PEP group was significantly decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusions** PirB is an upstream molecule which could regulate astrocyte proliferation and reactive astrogliosis, and inhibiting PirB receptor in astrocytes may be a potential treatment for Alzheimer's disease.

**[Key words]** Alzheimer's disease; reactive astrogliosis; PirB; astrocytes; proliferation

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,以渐进性记忆障碍、失语、失用、人格行为改变等症状为主要表现<sup>[1-3]</sup>。AD病程缓慢,呈进行性发展,随着患病时间增加,疾病严重程度也不断加深<sup>[4-5]</sup>。AD的典型病理特征主要为 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ , A $\beta$ )沉积引起的细胞外老年斑、Tau蛋白过度磷酸化导致的神经原纤维缠结、神经元突触丢失和星形胶质细胞反应性增生等<sup>[4]</sup>。AD的发病机制尚不明确,也缺少有效的治疗和预防手段。随着人口老龄化的加重,AD逐渐成为威胁老年人身心健康的疾病之一<sup>[6]</sup>。星形胶质细胞在中枢神经系统分布广泛<sup>[7-9]</sup>,在中枢神经系统发生损伤时常反应性增生<sup>[7-10]</sup>。反应性增生的星形胶质细胞可能对神经元产生“保护”或“毒性”两种不同效应<sup>[9,11]</sup>,调节其增生过程可能成为治疗AD的潜在路径。成对免疫球蛋白样受体B(paired immunoglobulin-like receptor B, PirB)属于I型跨膜糖蛋白,是A $\beta$ <sub>1-42</sub>寡聚体的受体。既往研究显示, PirB可抑制神经元轴突再生和树突棘修剪<sup>[12]</sup>; PirB过表达可在LPS诱导的大鼠脑内炎症中导致突触减少,损害学习记忆功能<sup>[13]</sup>。上述研究提示PirB可能成为AD的潜在治疗靶点,但其在星形胶质细胞中的作用尚不清楚。本研究观察PirB对小鼠星形胶质细胞增殖和反应性增生的影响,旨在为探索PirB作为AD潜在治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂及仪器** D-Hanks液(无Ca<sup>2+</sup>、无Mg<sup>2+</sup>)、甘氨酸溶液(G8200,北京索莱宝科技有限公

司); 4%多聚甲醛(G1101-500 ml, 武汉赛维尔生物); 异丙醇溶液(天津天力化学试剂有限公司); DEPC水(B501005-0500, 上海生工生物工程); DMEM-高糖培养基(美国HyClone公司); DMEM/F12完全培养基(美国Gibco公司); 聚-D-赖氨酸氢溴酸盐(PDL, 美国Sigma-Aldrich公司); 兔抗神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体(ab68428)、兔抗GFAP单克隆抗体、山羊抗兔辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)抗体(英国Abcam公司); 山羊抗兔Fluo488抗体(SA00003-1, 美国Proteintech公司); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(BD5010, 美国Bioworld公司); 无水二甲亚砜(DMSO)(D2650-100ml, 美国Sigma公司); 重组人A $\beta$ <sub>1-42</sub>、HFIP(AG968-1MG)、化学发光HRP底物(WBKL50100)(美国Millipore公司); Trizol、限制性内切酶Nde I和Hind III、TaKaRa反转录试剂盒、TaKaRa qPCR试剂盒(日本Takara公司); EdU试剂盒[Cell-Light EdU Apollo567 In Vitro Kit(100T), 广州锐博生物]; 0.1 ml八连管(KG2541, 美国Kirgen公司); 10%磷酸酶抑制剂(4906845001, 德国Roche公司); 1%蛋白酶抑制剂(36978, 美国赛默飞世尔科技公司); RIPA裂解液(P0013B, 上海碧云天); H-7650透射电子显微镜(日本日立公司); eStain2.0蛋白快染仪(美国GenScript生物科技公司); RTCA分析仪(xCelligence RTCA DP, 杭州艾森生物); SDS-PAGE胶电泳(蛋白marker)、NanoDrop One(ND-ONEC-W)、PCR仪(Veriti96 PCR)、Real-Time PCR仪(StepOnePlus)(美国赛默飞世尔科技公司);

ChemiDoc Touch 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

**1.2 方法** 选用小鼠星形胶质细胞,采用 PirB 抑制剂氟司必林(Fluspirilene)<sup>[14]</sup>或可溶性的 PirB 胞外段 PirBex(PEP)<sup>[15]</sup>抑制 PirB 与 A $\beta$  的结合,并采用慢病毒转染纯化的星形胶质细胞、过表达 PirB 基因,观察 PirB 对小鼠星形胶质细胞增殖和反应性增生的影响。本研究经西安医学院伦理审查委员会审核(20180309)。

**1.2.1 细胞分组与给药** 将小鼠星形胶质细胞分为对照组、A $\beta$  组、A $\beta$  +0.2  $\mu$ mol/L PEP 组、A $\beta$  +0.4  $\mu$ mol/L PEP 组、A $\beta$  +Fluspirilene 组、A $\beta$  +GFP-LV 组和 A $\beta$  +mPirB-LV 组。(1)A $\beta$  组,当细胞融合率达 60% 时给予 2  $\mu$ mol/L A $\beta$  处理。(2)A $\beta$  +0.2  $\mu$ mol/L PEP 组、A $\beta$  +0.4  $\mu$ mol/L PEP 组和 A $\beta$  +Fluspirilene 组,分别在 A $\beta$  给药前 1 h 加入 0.2、0.4  $\mu$ mol/L 的 PEP 或 2  $\mu$ mol/L Fluspirilene。(3)A $\beta$  +GFP-LV 组和 A $\beta$  +mPirB-LV 组,当细胞融合率达到 50% 时将培养基换液至原来体积的一半,加入 10  $\mu$ l/ml 慢病毒进行转染,4 h 后更换新鲜培养基,24 h 后加入 2  $\mu$ mol/L A $\beta$ 。(4)对照组给予相同体积的 DMSO 处理。病毒为汉恒生物科技(上海)有限公司包装,滴度为 10<sup>8</sup> TU/ml。

**1.2.2 小鼠星形胶质细胞的培养、纯化和传代** 原代星形胶质细胞取自 C57BL/6 新生小鼠的大脑皮层和海马(出生 24 h 以内)。培养的小鼠星形胶质细胞融合率达到 90% 后进行摇床纯化。将细胞悬液接种于若干 PDL 包被的 T25 培养瓶或培养皿,传代培养。采用 GFAP 免疫荧光法鉴定小鼠星形胶质细胞的纯度。选取 10 个视野,采用 Image Pro Plus 软件对 GFAP 和 DAPI 阳性细胞分别计数,计算细胞 GFAP 阳性率。

**1.2.3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 寡聚体的制备** 将 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 配成 1 mmol/L 的 DMSO 溶液。加入 0.01 mol/L PBS 缓冲液制成 0.1 mmol/L A $\beta$ <sub>1-42</sub> 储存液。置于 22  $^{\circ}$ C 孵育 16 h,4  $^{\circ}$ C 孵育 24 h,12 000 r/min 离心 10 min,取上清即为 A $\beta$  储备液。储备液分装冻存于 -20  $^{\circ}$ C。BCA 法定量并在透射电镜下观察。A $\beta$ <sub>1-42</sub> 寡聚体采用非变性 SDS-PAGE 胶电泳,eStain2.0 蛋白快染仪进行考马斯亮蓝染色。

**1.2.4 PirB 胞外段原核表达与纯化** (1) PirB 胞外段基因扩增及引物设计。采用 PAS(PCR-based Accurate Synthesis)方法,根据 PirB 胞外段序列(mPirB)设计全长拼接引物,正义序列:5'-ATCGCCGAAAGGCACACTTA-3';反义序列:5'-GCAGGGATCTTAGATTCTGTGCT-3'。引物序列由西安迈博睿生物技术有限公司合成。(2)重组质粒的构建。使用两个限制性内切酶对 Nde I(酶切位点 CATATG)和 Hind III(酶切位点

AAGCTT)分别对 pCZN1 载体和 PCR 回收产物进行酶切处理。(3)重组质粒载体转化至大肠杆菌。(4)IPTG 诱导重组菌融合蛋白的表达。(5)包涵体蛋白的变性。(6)融合蛋白的 Ni 柱亲和纯化。

**1.2.5 RTCA 实验检测细胞生长率** 取 10  $\mu$ l 细胞悬液进行细胞计数,并按照 1:1.5 接种于 16 孔板(每孔约 2000 个细胞),置于 RTCA 分析仪内。18 h 后,细胞给药处理,置于 RTCA 仪内继续检测细胞生长情况。

**1.2.6 EdU 检测细胞增殖情况** 采用 EdU 试剂盒检测细胞增殖情况。随机选择荧光显微镜下 10 个视野,计算 EdU 阳性细胞率。EdU 阳性细胞率(%)=EdU 阳性细胞数/Hoechst33342 标记的总细胞数 $\times$ 100%。

**1.2.7 Real-time PCR 检测 S-100 钙结合蛋白 B(S-100 $\beta$ )、波形蛋白(vimentin)、巢蛋白(nestin)、淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的 mRNA 表达水平** Trizol 法提细胞 RNA。用 TaKaRa 反转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA。采用 TaKaRa qPCR 试剂盒进行扩增。以小鼠 GAPDH 为内参,引物及引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for qPCR

基因	引物序列
Vimentin	正义: 5'-GCTGCTAACTACCAGGACACTATT-3'
	反义: 5'-CGAAGGTGACGAGCCATCT-3'
Nestin	正义: 5'-GGAAGAGTAGAAGATGAGCCAGAG-3'
	反义: 5'-AAGGGAGTAGAGTCAGGGAGAG-3'
S-100 $\beta$	正义: 5'-AGAATCAAGGCAGACTACCAACA-3'
	反义: 5'-ATGGCAAGCAGGTGTAAGGAT-3'
APP	正义: 5'-CTGCTGACCGAGGACTGAC-3'
	反义: 5'-GCATCCATCTTCACTTCCGAGA-3'
GFAP	正义: 5'-ACAGACTTTCTCCAACCTCCA-3'
	反义: 5'-CAGGGCTCCATTTTCAATC-3'

S-100 $\beta$ . S100 钙结合蛋白 B; APP. 淀粉样前体蛋白

**1.2.8 Western blotting 检测小鼠星形胶质细胞 GFAP 蛋白表达水平** 细胞给药后 48 h 提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。以肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参蛋白。配置 SDS-PAGE 胶,12% 分离胶,5% 浓缩胶,每个梳孔上 20  $\mu$ g 蛋白样品,80 V 电泳 30 min,110 V 电泳 1.5~2.0 h。恒流 180 mA 湿转 120 min。5% 脱脂奶粉封闭 60 min。采用兔抗 GFAP 多克隆抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。1 $\times$ TBST 溶液漂洗 3 次,每次 10 min。采用山羊抗兔 HRP 抗体室温摇床孵育 2 h。1 $\times$ TBST 溶液漂洗 3 次,每次 10 min。最后加入 Immobilon Western 化学发光 HRP 底物反应液进行化

学发光。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资料符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠星形胶质细胞形态观察** 在光学显微镜下观察培养的小鼠原代(P0)和P1代星形胶质细胞,P0代星形胶质细胞胞体呈多边形或三角形,胞体呈暗背景,周围有光晕。相较原代细胞,P1代星形胶质细胞胞体扁平,分枝明显,细胞之间建立了更加密

切的联系(图1)。

**2.2 小鼠星形胶质细胞纯度鉴定** 免疫荧光法检测结果显示,小鼠星形胶质细胞GFAP阳性率 $>98\%$ (图2)。

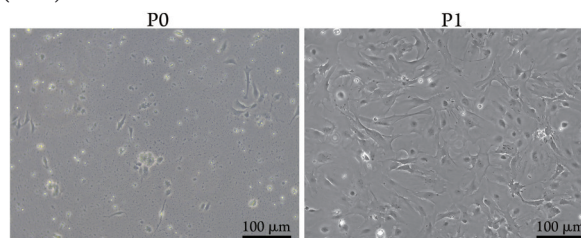


图1 原代(P0)和P1代小鼠星形胶质细胞形态

Fig.1 Morphology of P0 and P1 mouse astrocytes

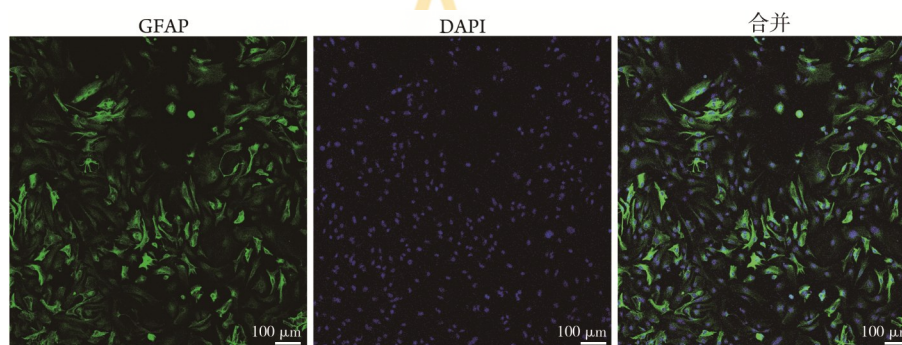


图2 免疫荧光法检测小鼠星形胶质细胞GFAP阳性率

Fig.2 Immunofluorescence assay for GFAP positive rate of mouse astrocytes

**2.3  $A\beta_{1-42}$ 寡聚体形态观察和分子量验证** 电镜下观察结果显示,大部分 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体直径 $<100\text{ nm}$ (图3)。采用梯度SDS-PAGE胶对 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体进行电泳、考马斯亮蓝染色和脱色处理,最终得到清晰的蓝色条带(图4)。大部分 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体分子量为 $50\sim 75\text{ kD}$ ,少部分 $>75\text{ kD}$ 。

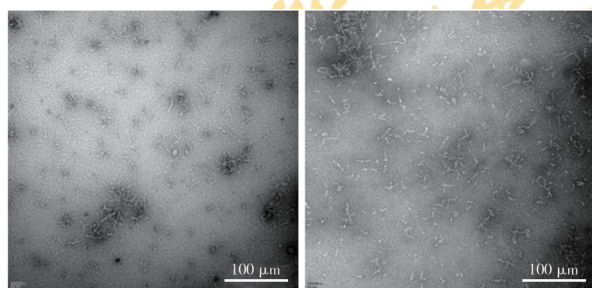


图3  $A\beta_{1-42}$ 寡聚体电镜图

Fig.3 Transmission electron microscopy observation of  $A\beta_{1-42}$  oligomer

**2.4 PirB胞外段原核表达与蛋白纯化** 为得到大量的目的蛋白,将编码PirB胞外段蛋白的核酸序列导入大肠杆菌表达系统中进行原核表达、纯化和鉴定。经SDS-PAGE电泳分析和Western blotting检测,PirB胞外段蛋白分子量为 $69.9\text{ kD}$ ,与其理论分子量一致(图5)。

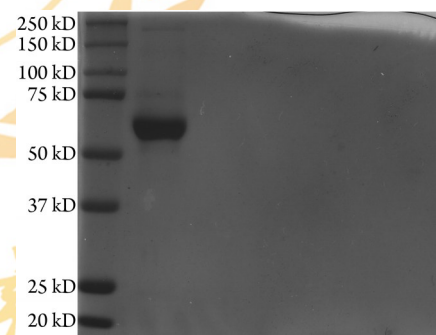
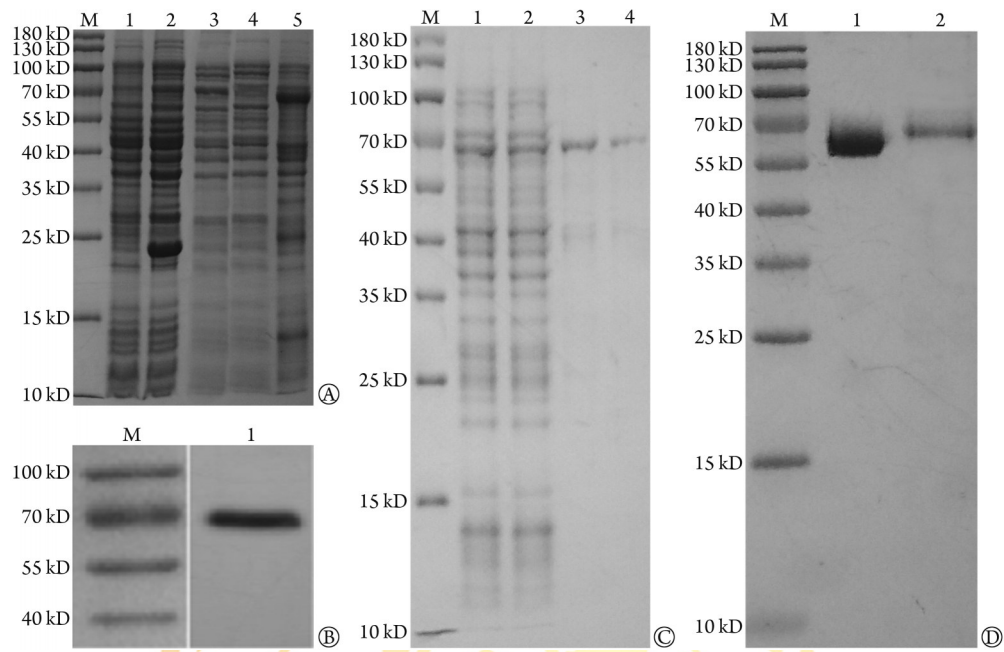


图4  $A\beta_{1-42}$ 寡聚体蛋白电泳后考马斯亮蓝染色

Fig.4 Coomassie blue staining of  $A\beta_{1-42}$  oligomer protein

**2.5 PEP对小鼠星形胶质细胞生长速率的影响** 采用RTCA法72 h实时监测星形胶质细胞标准化细胞指数(normalized cell index, NCI)值。18 h时分别给药,给药后的起始阶段,各组的NCI值表现为骤降,再逐步升高;随着细胞孵育时间增加,细胞的增殖曲线趋于平稳(图6)。

**2.6 不同药物处理对星形胶质细胞增殖的影响** EdU染色法检测结果显示,与对照组比较, $A\beta$ 组细胞增殖活性明显增强( $P<0.05$ );与 $A\beta$ 组比较, $A\beta+0.2\ \mu\text{mol/L PEP}$ 组( $P=0.0037$ )、 $A\beta+0.4\ \mu\text{mol/L PEP}$ 组( $P=0.0002$ )和 $A\beta+\text{Fluspirilene}$ 组( $P=0.0021$ )细胞增殖活性均明显降低( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ ,图7)。



PirB. 成对免疫球蛋白样受体B; A. 蛋白表达鉴定 SDS-PAGE 分析; M. 蛋白质分子质量标准; 1. pCZN1 诱导(空载); 2. 未诱导; 3. 诱导后; 4. 诱导破碎后上清; 5. 诱导破碎后沉淀。B. Western blotting 检测; M. 蛋白质分子质量标准; 1. 纯化后样品。C. 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析; M. 蛋白质分子质量标准; 1. 破碎后处理样品; 2. 流出; 3—4. 洗脱。D. 蛋白 SDS-PAGE 鉴定分析; M. 蛋白质分子质量标准; 1. 0.5 mg/ml BSA; 2. 纯化后样品

图5 PirB胞外段蛋白的原核表达、纯化与鉴定

Fig.5 Prokaryotic expression, purification and identification of PirB extracellular protein

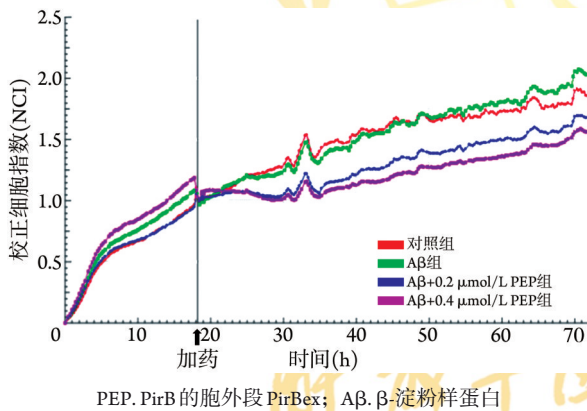


图6 PEP对给予A $\beta$ 的小鼠星形胶质细胞增殖影响的RTCA检测结果

Fig.6 RTCA detection of the effect of PEP on the proliferation of mouse astrocytes given A $\beta$

2.7 各组小鼠星形胶质细胞反应性增生相关基因 *GFAP*、*S-100 $\beta$* 、*Vimentin*、*Nestin*、*APP* 表达水平比较 Real-time PCR 检测结果显示, 与对照组比较, A $\beta$  组 *GFAP*( $P=0.0060$ )、*S-100 $\beta$* ( $P=0.0339$ )、*Vimentin* ( $P=0.0282$ )、*Nestin*( $P=0.0004$ )、*APP*( $P=0.0080$ )和 *PirB* ( $P=0.0091$ )mRNA 相对表达量均明显增高; 与 A $\beta$  组比较, A $\beta$ +0.4  $\mu\text{mol/L}$  PEP 组 *GFAP*( $P=0.0084$ )、*S-100 $\beta$*  ( $P=0.0024$ )、*Vimentin*( $P=0.0064$ )、*Nestin*( $P=0.0014$ )、*APP*( $P=0.0012$ )和 *PirB*( $P=0.0239$ )mRNA 相对表达量均

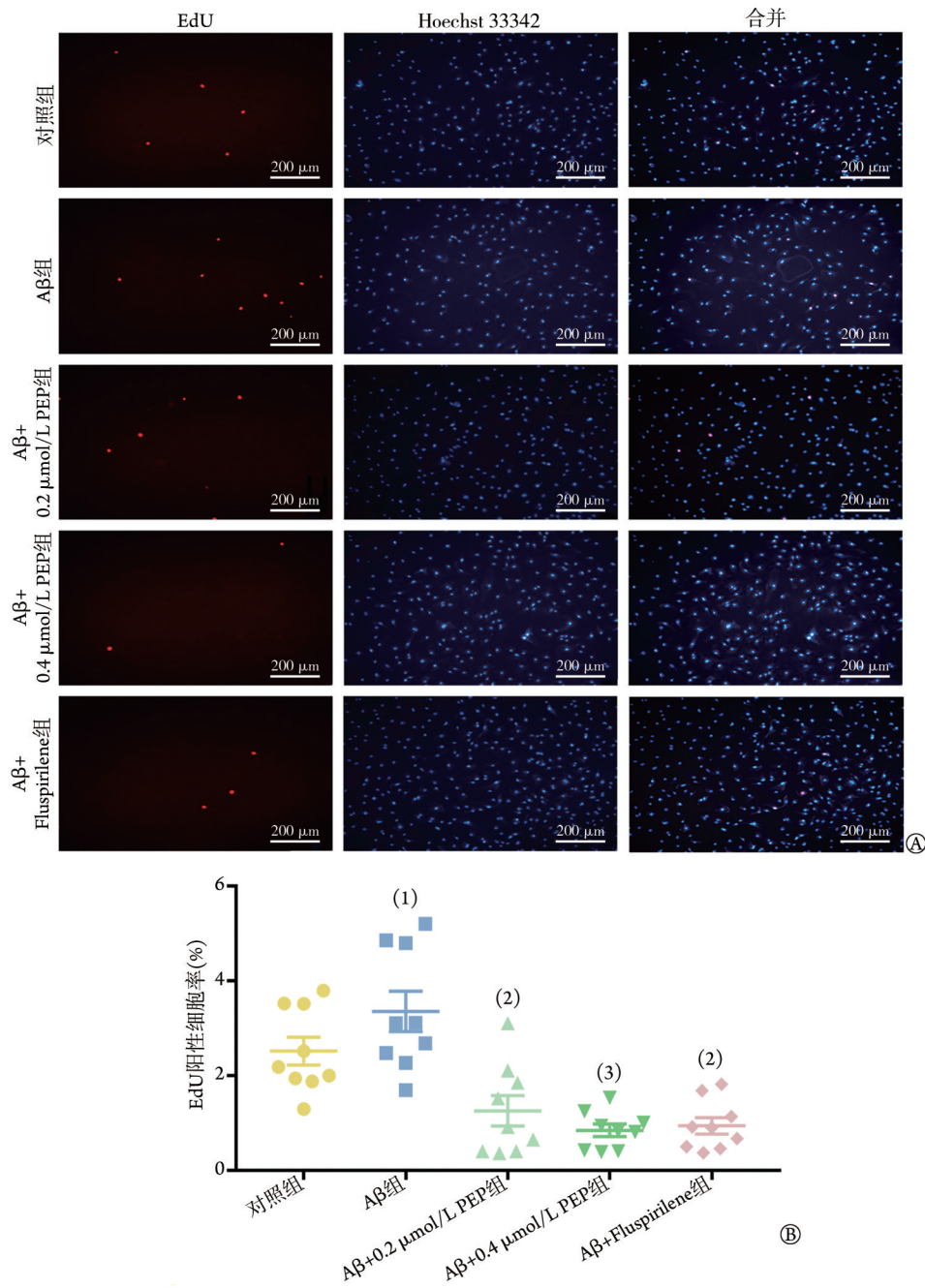
明显下降(图8)。

与 A $\beta$ +GFP-LV 组比较, A $\beta$ +mPirB-LV 组 *GFAP* ( $P=0.0015$ )、*S-100 $\beta$* ( $P=0.0043$ )、*Vimentin*( $P=0.0003$ )、*Nestin*( $P=0.0374$ )、*APP*( $P=0.0424$ ) 和 *PirB*( $P<0.0001$ ) mRNA 相对表达量均明显增高(图8)。

2.8 PirB 对小鼠星形胶质细胞 *GFAP* 蛋白表达的影响 Western-blotting 检测结果显示, 与对照组比较, A $\beta$  组 *GFAP* 表达明显增高( $P<0.05$ ); 与 A $\beta$  组比较, A $\beta$ +0.4  $\mu\text{mol/L}$  PEP 组 *GFAP* 表达明显下降( $P<0.05$ , 图9)。

### 3 讨论

星形胶质细胞是中枢神经系统分布广、数量多、高度分化的细胞, 对神经系统正常功能起重要作用, 包括参与突触传递、维持血脑屏障的稳定性、分泌神经营养因子和离子缓冲等<sup>[7-9]</sup>。中枢神经系统发生损伤时星形胶质细胞会产生一系列变化, 表现为细胞胞体变肥大, 周围突起增多、延展、胞浆丰富, 细胞生长率显著提高, 这一过程即为反应性星形胶质细胞增生<sup>[10]</sup>。神经炎症和缺血会诱导出两种不同类型的反应性星形胶质细胞, 分别称为 A1 型和 A2 型<sup>[9,11]</sup>。A1 型反应性星形胶质细胞分泌炎症因子, 如白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\alpha$ 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和补体 C1q, 对神经突触



PEP. PirB的胞外段PirBex; Fluspirilene. PirB抑制剂氟司必林; Aβ. β-淀粉样蛋白; A. EdU成像, 蓝色细胞为Hoechst 33342染色, 红色细胞为EdU染色; B. EdU染色检测星形胶质细胞增殖定量图; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ ; 与Aβ组比较, (2) $P < 0.01$ , (3) $P < 0.001$

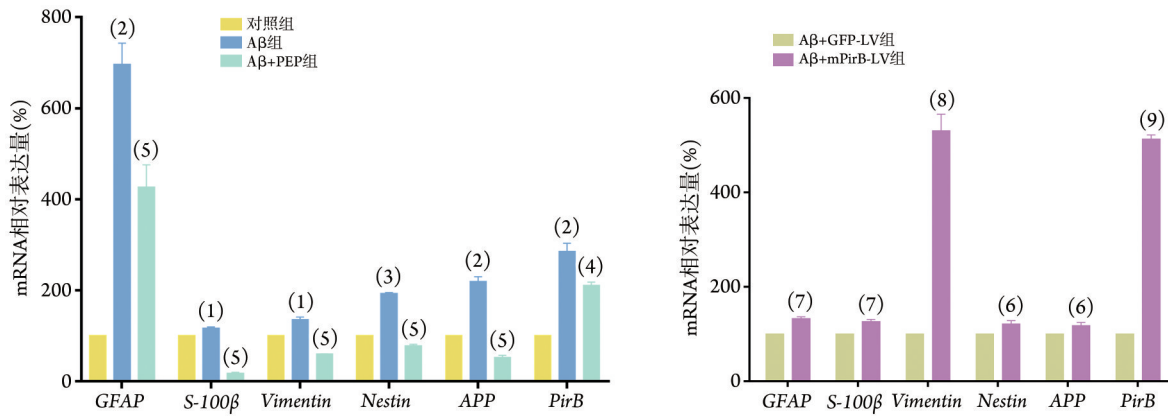
图7 不同给药情况下小鼠星形胶质细胞增殖的EdU检测结果

Fig.7 Proliferation of mouse astrocytes detected by EdU under different drug conditions

有破坏作用, 可诱导神经元和少突胶质细胞死亡; 而A2反应性星形胶质细胞可分泌抗炎性的神经营养因子, 如脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 和胶质细胞源性神经营养因子 (glialcelline-derived neurotrophic factor, GDNF), 对神经元的存活和生长有促进作用<sup>[16-18]</sup>。但近期也有研究指出, 反应性星形胶质细胞很难通过简单的二元表型来描述, 其可能根据不同的外界环境拥有多种

状态<sup>[19]</sup>。反应性星形胶质细胞的“保护”和“毒性”两种不同的效应, 往往与其分泌的物质有密切关系, 如何调节星形胶质细胞反应性增生使之对疾病治疗有益至关重要<sup>[20]</sup>。

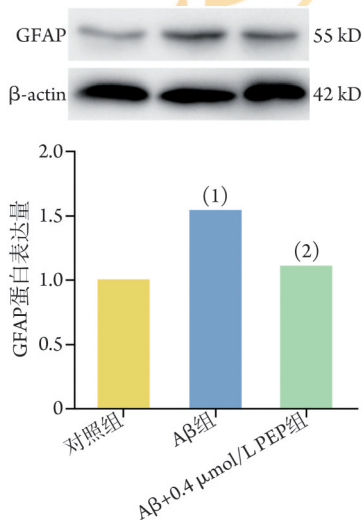
星形胶质细胞活化状态的重要标志是GFAP高表达<sup>[9,19,21]</sup>, 同时, 细胞中其他蛋白质 (如S-100β、Vimentin、Nestin、APP等) 的表达也有所改变<sup>[18,22]</sup>。S-100β是重要的炎症调节因子, S-100β阳性的星形胶质细胞常聚集于神经炎症斑块周围, 参与AD病理



PirB. 配对免疫球蛋白样受体 B; GFAP. 神经胶质纤维酸性蛋白; Vimentin. 波形蛋白; Nestin. 巢蛋白; APP. 淀粉样前体蛋白; PEP. PirB 的胞外段 PirBex; Aβ. β-淀粉样蛋白; 与对照组比较, (1) $P<0.05$ , (2) $P<0.01$ , (3) $P<0.001$ ; 与 Aβ 组比较, (4) $P<0.05$ , (5) $P<0.01$ ; 与 Aβ+GFP-LV 组比较, (6) $P<0.05$ , (7) $P<0.01$ , (8) $P<0.001$ , (9) $P<0.0001$

图 8 各组小鼠星形胶质细胞 GFAP、S-100β、Vimentin、Nestin、APP、PirB 的 mRNA 表达水平比较(Real-time PCR)

Fig.8 Comparison of mRNA levels of GFAP, S-100β, Vimentin, Nestin, APP and PirB in each group of mouse astrocytes (Real-time PCR)



GFAP. 神经胶质纤维酸性蛋白; PEP. PirB 的胞外段 PirBex; Aβ. β-淀粉样蛋白; 与对照组比较, (1) $P<0.05$ ; 与 Aβ 组比较, (2) $P<0.05$

图 9 各组小鼠星形胶质细胞 GFAP 表达水平比较(Western blotting)

Fig.9 Comparison of GFAP expression in each group of mouse astrocytes (Western blotting)

过程的发展。作为重要的中间丝蛋白, GFAP、Vimentin、Nestin 上调均是反应性胶质细胞增生的重要表现<sup>[10,16,23]</sup>。有研究显示,星形胶质细胞能合成和分泌大量 Aβ,是 AD 淀粉样斑块的重要组成部分<sup>[24]</sup>。此外,反应性星形胶质细胞中合成 Aβ 的 3 种成分增加:淀粉样蛋白-β 前体蛋白(AβPP)、β 分泌酶(β-secretase)和 γ 分泌酶<sup>[25-26]</sup>。APP 是一种跨膜蛋白<sup>[27]</sup>,在 AD 中其被 β 分泌酶和 γ 分泌酶水解产生 Aβ,主要包括可溶性 Aβ<sub>1-40</sub>和不可溶性 Aβ<sub>1-42</sub>两种类型<sup>[28]</sup>,其中 Aβ<sub>1-42</sub>可促进具有神经毒性的 Aβ<sub>1-42</sub>寡聚体形成<sup>[29]</sup>。反应性星形胶质细胞增生广泛参与神经

系统疾病的病理发展,有研究显示,在 AD 中,反应性星形胶质细胞数量的增加程度与记忆和认知功能的减弱程度有关,是神经斑块的重要组成部分<sup>[25]</sup>。ALzData 数据库查阅结果显示,GFAP、S-100β、Vimentin、Nestin、APP 等星形胶质细胞反应性相关标志物在 AD 患者大脑内嗅皮层、海马、额叶皮层和颞叶皮层中的表达量较健康对照高。因此,调节星形胶质细胞反应性相关标志物的表达可能是治疗 AD 的潜在方法。寻找星形胶质细胞反应性增生标志物的上游分子非常关键。

PirB 及其人类直系同源蛋白白细胞免疫球蛋白样受体 B2(leukocyte immunoglobulin-like receptor B2, LILRB2)均是 Aβ<sub>1-42</sub>寡聚体的受体,二者功能相似,具有高度的序列同源性,且在神经元和星形胶质细胞中均有表达<sup>[30-33]</sup>。PirB 蛋白属于 I 型跨膜糖蛋白,包含由 6 个免疫球蛋白样结构域(D1-D6)的胞外段、1 个疏水的跨膜段、3 个免疫受体酪氨酸依赖的抑制序列(immunoreceptor tyrosine based inhibitory motifs, ITIMs)和 1 个 ITIMs 样序列组成的胞内段。以往研究显示 PirB 可抑制神经元轴突再生和树突棘修剪<sup>[34]</sup>,参与神经元突触可塑性调节,且可抑制神经干细胞再生和分化<sup>[35]</sup>。PirB 过表达可能在 LPS 诱导的脑内炎症中导致突触丢失,学习记忆功能受损<sup>[36]</sup>,提示 PirB 可能是 AD 的潜在靶点。目前 PirB 在星形胶质细胞中的作用尚不清楚,笔者推测 Aβ 可能作用于星形胶质细胞上的 PirB 受体,进而调节星形胶质细胞反应性增生相关标志物的表达。本研究通过离体实验观察 Aβ 受体 PirB 对星形胶质细胞反应性增生和增殖的影响。结果显示,小鼠星形胶质细胞的 Aβ 受体 PirB 能够调节星形胶质细胞反应性增生,给予星形胶质细胞 PirB 可溶性胞外段 PEP 或 PirB 抑制剂

Fluspirilene 处理, 能够抑制 A $\beta$  诱导的星形胶质细胞增殖和反应性增生; 相反, 在星形胶质细胞过表达 *PirB* 基因后给予 A $\beta$  处理, 星形胶质细胞的反应性增生明显增强。

星形胶质细胞反应性增生是 AD 重要的病理学特征<sup>[35]</sup>。在病理状态下, 反应性星形胶质细胞过度增生, 会在损伤部位形成胶质瘢痕, 抑制轴突再生, 阻碍神经元形态和功能的修复; 释放大炎症因子, 加重炎症反应, 进一步损伤轴突; 降低谷氨酸转运体活性, 谷氨酸盐加重神经元毒性, 促进神经元坏死<sup>[16,36-37]</sup>。本研究采用 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 寡聚体处理小鼠星形胶质细胞, 在体外构建星形胶质细胞 AD 模型; A $\beta$  的分子量为 4514.2 D, 根据图 4 中条带分子量大小, 笔者认为所制备的 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 寡聚体主要为十四聚体或十五聚体。本研究结果显示, 星形胶质细胞出现反应性增生现象, 表现为细胞生长率增高, 反应性星形胶质细胞增生相关标志物表达量上升。GFAP 是星形胶质细胞重要的中间丝蛋白<sup>[38-39]</sup>, S-100 $\beta$  参与星形胶质细胞增殖过程, 二者是星形胶质细胞反应性增生常用的标志物。有研究显示, S-100 $\beta$  表达阳性的细胞在炎症斑块周围聚集, 密度较高, 与 AD 的病理过程关系密切<sup>[40]</sup>。在反应性星形胶质细胞中 APP 的表达量也处于较高水平<sup>[41]</sup>。本研究结果显示, A $\beta$  处理后星形胶质细胞 GFAP、S-100 $\beta$ 、Vimentin、Nestin、APP 表达均增高, 且细胞增殖增强; 提示星形胶质细胞过表达 *PirB* 基因后, 与反应性增生相关的基因表达活跃。综上可以推测, A $\beta$  受体 *PirB* 能够调节星形胶质细胞的反应性增生相关标志物的表达, 抑制 *PirB* 受体可能抑制星形胶质细胞的反应性增生。

*PirB* 与其人类同源物 *LilrB2* 是 A $\beta$  的受体, 表达于神经元与星形胶质细胞中, 调节损伤后突触可塑性, 包括抑制轴突再生和树突棘修剪<sup>[28,30,42]</sup>。树突棘是神经元间形成突触连接的部位, 代表可塑性位点, 敲除 *PirB* 可显著增加视觉皮层树突棘的稳定性和密度, 促进长时程增强(long-term potentiation, LTP), 控制长时程抑制(long-term depression, LTD), 提示 *PirB* 参与调节突触可塑性<sup>[42-43]</sup>。另有研究显示, 髓磷脂相关抑制剂包括 Nogo-A、髓磷脂相关糖蛋白(MAG)和少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(OMgp), 可通过 *PirB* 受体抑制神经元轴突的再生<sup>[28,44-48]</sup>; *PirB* 还可通过 PI3K/Akt/mTOR 通路对轴突的生长产生抑制作用<sup>[47]</sup>。*PirB* 拮抗剂 Fluspirilene 能够降低神经元凋亡, 可溶性 *PirB* 胞外段 PEP 能够透过血脑屏障促进神经再生, 增强小鼠的记忆能力<sup>[33-34]</sup>; 但星形胶质细胞上的 *PirB* 受体的作用尚不清楚。本研究采用 PEP 或 Fluspirilene 抑制星形胶质细胞的 *PirB* 受体, 观察星形胶质细胞反应性增生和增殖的变化, 结果显示, 当

采用 PEP 抑制 A $\beta$  与内源性 *PirB* 蛋白结合时, 星形胶质细胞反应性增生相关标志物 GFAP、S-100 $\beta$ 、Vimentin、Nestin 及 APP 的表达量均下降; 而当过表达 *PirB* 基因时, 星形胶质细胞反应性增生相关标志物的表达量显著上升。这提示 *PirB* 能够促进星形胶质细胞反应性增生。RTCA 和 EdU 检测显示, *PirB* 能够调节星形胶质细胞的增殖, 抑制 *PirB* 时星形胶质细胞增殖和生长率显著降低。这提示 *PirB* 能够促进星形胶质细胞增殖和反应性增生, 从而加重 AD 的病理学症状。

综上所述, 本研究结果显示, *PirB* 与反应性星形胶质细胞增生和增殖密切相关, 可作为进一步探究 AD 发生机制的关键环节; *PirB* 是调节星形胶质细胞反应性增生和增殖的上游分子, 抑制 *PirB* 能够抑制 A $\beta$  引起的星形胶质细胞反应性增生和增殖, 可作为 AD 治疗的潜在靶点。由于本研究仅在细胞层面进行了观察, 在 AD 动物模型中, *PirB* 是否能够调节星形胶质细胞反应性增生尚不清楚, 后续可在 APP/PS1AD 动物模型中检测敲除或过表达 *PirB* 对星形胶质细胞反应性增生及 AD 相关病理学症状的影响。

#### 【参考文献】

- [1] 陈婷, 周永学, 王渊, 等. 肠道菌群调节治疗阿尔茨海默病研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2022, 39(4): 387-391.
- [2] 翟雅莉, 贾新, 吴赫, 等. 炎症在阿尔茨海默病发生发展中病理机制研究进展[J]. 临床军医杂志, 2023, 51(9): 988-990.
- [3] 张肖南, 吕亮亮, 李阳, 等. 基于平板电脑对轻度认知障碍患者绘制复杂图形表现的综合评定[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(5): 587-595.
- [4] Masters CL, Bateman R, Blennow K, et al. Alzheimer's disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15056.
- [5] Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease[J]. Eur J Neurol, 2018, 25(1): S9-70.
- [6] 2021 Alzheimer's disease facts and figures[J]. Alzheimers Dement, 2021, 17(3): 327-406.
- [7] Vandenbark AA, Offner H, Matejuk S, et al. Microglia and astrocyte involvement in neurodegeneration and brain cancer[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 298.
- [8] Mira RG, Lira M, Cerpa W. Traumatic brain injury: mechanisms of glial response[J]. Front Physiol, 2021, 12: 740939.
- [9] Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, et al. Beyond the GFAP-astrocyte protein markers in the brain[J]. Biomolecules, 2021, 11(9): 1361.
- [10] Potokar M, Morita M, Wiche G, et al. The diversity of intermediate filaments in astrocytes[J]. Cells, 2020, 9(7): 1604.
- [11] Yu G, Zhang Y, Ning B. Reactive astrocytes in central nervous system injury: subgroup and potential therapy[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 792764.
- [12] Wang J, Zhang Y, Xia J, et al. Neuronal *PirB* upregulated in cerebral ischemia acts as an attractive theranostic target for ischemic stroke[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(3): e007197.
- [13] Deng XH, Ai WM, Lei DL, et al. Lipopolysaccharide induces paired

- immunoglobulin-like receptor B (PirB) expression, synaptic alteration, and learning-memory deficit in rats[J]. *Neuroscience*, 2012, 209: 161-170.
- [14] Cao Q, Shin WS, Chan H, *et al.* Inhibiting amyloid- $\beta$  cytotoxicity through its interaction with the cell surface receptor LirB2 by structure-based design[J]. *Nat Chem*, 2018, 10(12): 1213-1221.
- [15] Mi YJ, Chen H, Guo N, *et al.* Inhibition of PirB activity by TAT-PEP improves mouse motor ability and cognitive behavior[J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 199.
- [16] Liu CY, Yang Y, Ju WN, *et al.* Emerging roles of astrocytes in neurovascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of Alzheimer's disease[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 193.
- [17] Clarke LE, Liddelov SA, Chakraborty C, *et al.* Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(8): E1896-E1905.
- [18] Li T, Chen X, Zhang C, *et al.* An update on reactive astrocytes in chronic pain[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 140.
- [19] Escartin C, Galea E, Lakatos A, *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions[J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(3): 312-325.
- [20] Li K, Li J, Zheng J, *et al.* Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases[J]. *Aging Dis*, 2019, 10(3): 664-675.
- [21] Chen J, He W, Hu X, *et al.* A role for ErbB signaling in the induction of reactive astrogliosis[J]. *Cell Discov*, 2017, 3: 17044.
- [22] Monterey MD, Wei H, Wu X, *et al.* The many faces of astrocytes in Alzheimer's disease[J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 619626.
- [23] de Pablo Y, Marasek P, Pozo-Rodríguez A, *et al.* Vimentin phosphorylation is required for normal cell division of immature astrocytes[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1016.
- [24] Dal Prà I, Whitfield JF, Pacchiana R, *et al.* The amyloid- $\beta_{42}$  proxy, amyloid- $\beta(25-35)$ , induces normal human cerebral astrocytes to produce amyloid- $\beta_{42}$ [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 24(2): 335-347.
- [25] Frost GR, Li YM. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease[J]. *Open Biol*, 2017, 7(12): 170228.
- [26] Zhao J, O'connor T, Vassar R. The contribution of activated astrocytes to Abeta production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 150.
- [27] Zhang T, Chen D, Lee TH. Phosphorylation signaling in APP processing in Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 209.
- [28] Yang YH, Huang LC, Hsieh S W, *et al.* Dynamic blood concentrations of Abeta1-40 and Abeta1-42 in Alzheimer's disease[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 768.
- [29] Zhang L, Yang C, Li Y, *et al.* Dynamic changes in the levels of amyloid-beta42 species in the brain and periphery of APP/PS1 mice and their significance for Alzheimer's disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 723317.
- [30] Vlieg HC, Huizinga EG, Janssen BJC. Structure and flexibility of the extracellular region of the PirB receptor[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(12): 4634-4643.
- [31] Syken J, Grandpre T, Kanold PO, *et al.* PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex[J]. *Science*, 2006, 313(5794): 1795-1800.
- [32] Gou Z, Mi Y, Jiang F, *et al.* PirB is a novel potential therapeutic target for enhancing axonal regeneration and synaptic plasticity following CNS injury in mammals[J]. *J Drug Target*, 2014, 22(5): 365-371.
- [33] Kim T, Vidal GS, Djuricic M, *et al.* Human LirB2 is a  $\beta$ -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model[J]. *Science*, 2013, 341(6152): 1399-1404.
- [34] Liu B, Cheng W, Cheng D, *et al.* PirB functions as an intrinsic suppressor in hippocampal neural stem cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(12): 16062-16071.
- [35] Reichenbach N, Delekate A, Plescher M, *et al.* Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model[J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(2): e9665.
- [36] Yu G, Zhang Y, Ning B. Reactive astrocytes in central nervous system injury: subgroup and potential therapy[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15(15): 792764.
- [37] Heaven MR, Herren AW, Flint DL, *et al.* Metabolic enzyme alterations and astrocyte dysfunction in a murine model of Alexander disease with severe reactive gliosis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21(1): 100180.
- [38] Brenner M, Messing A. Regulation of GFAP expression[J]. *ASN Neuro*, 2021, 13: 1759091420981206.
- [39] Kim R, Healey KL, Sepulveda-Orengo MT, *et al.* Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: From astrocytopathy to astrogliosis[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 87(Pt A): 126-146.
- [40] Saviano A, Casillo GM, Raucci F, *et al.* Supplementation with ribonucleotide-based ingredient (Ribodiet®) lessens oxidative stress, brain inflammation, and amyloid pathology in a murine model of Alzheimer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111579.
- [41] Liang Y, Raven F, Ward JF, *et al.* Upregulation of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  protein precursor in astrocytes both *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Alzheimer's Dis*, 2020, 76(3): 1071-1082.
- [42] Djuricic M, Vidal G S, Mann M, *et al.* PirB regulates a structural substrate for cortical plasticity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(51): 20771-20776.
- [43] Vidal GS, Djuricic M, Brown K, *et al.* Cell-autonomous regulation of dendritic spine density by PirB[J]. *eNeuro*, 2016, 3(5): ENEURO.0089-0016.2016.
- [44] Akbik F, Cafferty WB, Strittmatter SM. Myelin associated inhibitors: a link between injury-induced and experience-dependent plasticity[J]. *Exp Neurol*, 2012, 235(1): 43-52.
- [45] Cafferty WB, Duffy P, Huebner E, *et al.* MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(20): 6825-6837.
- [46] Deng B, Bai F, Zhou H, *et al.* Electroacupuncture enhances rehabilitation through miR-181b targeting PirB after ischemic stroke[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38997.
- [47] Bi YY, Quan Y. PirB inhibits axonal outgrowth *via* the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1093-1098.
- [48] Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, *et al.* PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 967-970.

(责任编辑: 蒋铭敏)