

研究论文

乙酰胆碱通过作用于 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体抑制大鼠小胶质细胞炎症反应

蒋永莹, 李霖, 沈卫星, 邱一华, 彭聿平*

南通大学医学院生理学系, 南通 226001

摘要: 小胶质细胞是中枢神经系统中主要的免疫细胞。本研究旨在探讨乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)抑制小胶质细胞炎症反应的具体机制。原代培养Sprague-Dawley (SD)大鼠小胶质细胞, 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导建立炎症反应模型, ACh处理24 h后, 用Western blot检测多种炎症因子、胰岛素样生长因子1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1)和 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7nAChR$)的蛋白表达, 用ELISA检测多种炎症因子和IGF-1的释放情况, 用慢病毒转染沉默 $\alpha 7nAChR$ 后观察ACh作用的变化。结果显示, LPS可促进小胶质细胞的激活, 上调诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)蛋白表达, 增加白介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的表达和释放, 减少神经营养因子IGF-1的表达和释放, ACh能逆转LPS的这些作用; LPS可下调小胶质细胞的 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达, ACh逆转该作用; $\alpha 7nAChR$ -shRNA慢病毒转染小胶质细胞后, ACh对抗LPS的作用消失。以上结果提示, ACh对抗LPS诱导的小胶质细胞炎症反应的保护作用是通过 $\alpha 7nAChR$ 实现的, 这为今后神经炎症疾病的治疗提供了新的治疗靶点。

关键词: 乙酰胆碱; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体; 小胶质细胞; 脂多糖

中图分类号: R338

Acetylcholine suppresses microglial inflammatory response in rats via acting on microglial $\alpha 7nAChR$

JIANG Yong-Ying, LI Lin, SHEN Wei-Xing, QIU Yi-Hua, PENG Yu-Ping*

Department of Physiology, Medical School, Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract: Microglia are the main immune cells in the central nervous system. In the present study, the mechanism for acetylcholine (ACh) inhibiting microglial inflammatory response was investigated. Primary culture of microglia was isolated from cerebral cortex of Sprague-Dawley (SD) rats. Lipopolysaccharide (LPS) was used to activate the microglia to induce inflammatory response, and then the microglia were treated with ACh for 24 h. Protein expressions of several inflammatory factors, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$) were detected by Western blot. Release of inflammatory factors and IGF-1 into media was detected by ELISA. After $\alpha 7nAChR$ gene silence was achieved by lentivirus-transfection of $\alpha 7nAChR$ -shRNA, the change of ACh effect was observed. The results showed that LPS induced microglial activation, up-regulated inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression, increased the expressions and release of IL-1 β and TNF- α , and decreased the expression and release of the neurotrophic factor, IGF-1. ACh could reverse these effects of LPS. Meanwhile, LPS reduced the protein expression of $\alpha 7nAChR$ on the microglial cells, whereas ACh could reverse the effect. Silencing of $\alpha 7nAChR$ gene in microglia abolished the ability of ACh to inhibit LPS-induced inflammatory responses. These results suggest that ACh exerts its protection against LPS-induced microglial inflammation via acting on $\alpha 7nAChR$ on microglia, which may provide a novel target for the treatment of neuro-inflammatory diseases.

Key words: acetylcholine; $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors; microglia; lipopolysaccharide

Received 2017-06-30 Accepted 2017-11-01

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81570410), "Six Big Talent Peak" Project of Jiangsu Province, China (No. 2015-WSN-007) and the Field of Natural Science Fund Project of Nantong University, China (No. 15Z03).

*Corresponding author. Tel: +86-513-85051704; E-mail: yppeng@ntu.edu.cn

一直以来,小胶质细胞被看作是中枢神经系统中主要的免疫细胞^[1]。在正常生理情况下,小胶质细胞表现为静息状态,而在局部缺血、肿瘤和中风等病理条件下,小胶质细胞迅速被激活并分泌各种细胞因子,包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和白介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)等^[2-4]。不少研究指出,脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可以诱导小胶质细胞激活从而产生炎症反应^[5-7]。过去十年内已经证实,迷走神经刺激可以显著地调节免疫系统^[8],而“胆碱能抗炎通路”这一概念越来越多地受到关注^[9-11]。此外,各种各样的神经递质受体,如烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 被发现存在于神经元和胶质细胞中^[12],nAChRs 的活化可以保护神经胶质细胞,例如对抗氧化应激、细胞凋亡及神经炎症反应从而保护星型胶质细胞^[13-16]。因此,本研究利用 LPS 诱导小胶质细胞建立炎症反应模型,进一步探讨乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 调控小胶质细胞炎症反应的机制。

在 nAChR 的各个亚型当中, $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors, $\alpha 7$ nAChRs) 在脑内神经元和非神经元细胞 (包括小胶质细胞、星型胶质细胞、少突前体细胞和内皮细胞) 均有表达^[17-19]。有研究表明,尼古丁或 ACh 可以通过 $\alpha 7$ nAChRs 通路呈剂量依赖性抑制 LPS 诱导的 TNF- α 生成和小胶质细胞活化^[19]。Noda 等的研究也显示,LPS 的神经毒性作用可以使小胶质细胞活化并产生炎症因子,而用尼古丁处理小胶质细胞可以对抗这种作用^[3]。在此基础上,为了明确 ACh 是否通过作用于小胶质细胞的 $\alpha 7$ nAChR 来抑制炎症反应,本研究检测 ACh 对 LPS 诱导的小胶质细胞活化的影响,观察 ACh 对小胶质细胞上 LPS 所致 $\alpha 7$ nAChR 表达变化的作用,并探讨慢病毒转染沉默 $\alpha 7$ nAChR 后 ACh 的作用变化,以期为神经炎症疾病的治疗提供潜在的靶点。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 兔抗 $\alpha 7$ nAChR 单克隆抗体、兔抗 TNF- α 多克隆抗体、兔抗诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 多克隆抗体、山羊抗胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 多克隆抗体和兔抗 OX-42 多克隆抗体购自 Abcam 公司;小鼠抗 OX-42 单克隆抗体购自 AbD

Serotec 公司;小鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司;山羊抗 IL- 1β 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG、FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG、DyLight 594 标记的山羊抗兔 IgG 购自 Jackson 公司;Alexa Fluor 594 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 Cell Signaling Technology 公司;DyLight 800 标记的驴抗山羊 IgG 购自 Rockland 公司;DMEM/F12 高糖培养基、胎牛血清和山羊血清购自 Gibco 公司;shRNA-lentivirus 干扰慢病毒载体由上海吉凯生物公司构建;大鼠 IL- 1β ELISA 检测试剂盒、大鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒购自 eBioscience 公司;大鼠 IGF-1 ELISA 检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.2 小胶质细胞培养 本研究所用动物实验方案均获得南通大学伦理委员会批准 (批准号:20160316-002)。取出生 1 天的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠大脑皮层,经 0.25% 胰酶在 37 °C 培养箱中消化 15 min,每隔 3 min 振荡一次,胎牛血清终止消化后,将细胞重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基中并按 5×10^5 /cm² 接种于培养瓶中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。9~10 d 后在 37 °C 恒温摇床上分别以 240 r/min 摇 4 h 后,将上清悬浮细胞接种于 6 孔培养板中,即为原代培养的小胶质细胞,24 h 后更换新鲜的 DMEM/F12 完全培养基,继续培养 2 d,加入 LPS (100 ng/mL) 作用 2 h 后,加入 1×10^{-9} 或 1×10^{-7} mol/L ACh 作用 24 h。细胞随机分组如下:未作任何处理的小胶质细胞组 (control 组)、LPS 处理的小胶质细胞组 (LPS 组)、LPS 联合不同浓度的 ACh 处理的小胶质细胞组 (LPS+ 1×10^{-9} mol/L ACh 组和 LPS+ 1×10^{-7} mol/L ACh 组) 和单独 ACh 处理的小胶质细胞组 (1×10^{-9} mol/L ACh 和 1×10^{-7} mol/L ACh 组)。

1.3 $\alpha 7$ nAChR-shRNA 转染小胶质细胞 按上述方法获得原代培养的小胶质细胞后,在 DMEM/F12 完全培养基中加入携带 $\alpha 7$ nAChR-shRNA 或者无义序列 (Scr-shRNA) 慢病毒,按照感染复数 MOI = 10 TU/细胞进行转染,6 h 后将培养上清更换为新鲜的完全培养基,置于 37 °C 培养箱中继续培养。72 h 后将细胞置于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 GFP 的表达情况以验证转染效率,转染效率达 90% 以上即可进行下一步实验。对转染病毒后的小胶质细胞抽提蛋白,检测 $\alpha 7$ nAChR 的表达以验证沉默效率。同时加入 LPS (100 ng/mL) 作用 2 h 后,加入 1×10^{-7} mol/L ACh 作用 24 h。细胞随机分为 5 组:

未作任何处理的小胶质细胞组 (control 组)、LPS 处理的小胶质细胞组 (LPS 组)、LPS 联合 1×10^{-7} mol/L ACh 处理的小胶质细胞组 (LPS+ACh 组) 和 LPS 联合 ACh 处理的慢病毒转染的小胶质细胞组 (Scr-shRNA+LPS+ACh 组和 $\alpha 7nAChR$ -shRNA+LPS+ACh 组)。

1.4 Western blot 分析 将 6 孔培养板中的小胶质细胞上清弃去, PBS 洗细胞 2 遍, $1 \times$ SDS 细胞蛋白裂解液按 $60 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入培养板裂解细胞, 将细胞裂解物收集入一离心管中, 超声 5 s 3 次, $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 吸取上清于一新的离心管中, 进行蛋白总量测定, $-70\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。蛋白样品与 $4\times$ 上样缓冲液混合, $100\ ^\circ\text{C}$ 水浴 5 min, 置冰上冷却, 采用 12% SDS-PAGE 垂直电泳进行分离, 每组上样量为 $45\ \mu\text{g}$, 电压 $80\sim 120\ \text{V}$, 电泳至溴酚蓝移动到电泳板底部停止。Bio-Rad 湿转系统 $200\ \text{mA}$ 、 $40\ \text{min}$ 转膜 1 h, 用 5% 脱脂奶粉封闭 $1\sim 2\ \text{h}$, 再分别用兔抗 TNF- α 多克隆抗体 (1:300)、山羊抗 IL-1 β 多克隆抗体 (1:100)、山羊抗 IGF-1 多克隆抗体 (1:100)、兔抗 OX-42 多克隆抗体 (1:2 000)、兔抗 $\alpha 7nAChR$ 单克隆抗体 (1:2 000)、兔抗 iNOS 多克隆抗体及小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (1: 2 000) 室温孵育 2 h, $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜。TBST 洗涤后分别加入荧光标记山羊抗兔 IgG (1:5 000)、荧光标记驴抗山羊 IgG (1: 5 000) 或荧光标记羊抗小鼠 IgG (1: 5 000) 室温孵育 1 h。TBST 洗涤 $5\ \text{min} \times 4$, Odyssey 双红外激光扫描系统扫描并分析条带平均灰度值, 各目的蛋白与内参 β -actin 的比值表示各目的蛋白的相对表达量。

1.5 细胞免疫荧光 弃去培养上清后, 将细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 $3 \times 5\ \text{min}$, 室温下封闭 ($0.01\ \text{mol}/\text{L}$ PBS $9.7\ \text{mL}$, 山羊血清 $0.3\ \text{mL}$, Triton X-100 $30\ \mu\text{L}$) 30 min, 弃去封闭液, 滴加抗 OX-42 抗体 (1:200)、抗 $\alpha 7nAChR$ 抗体 (1:200), $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 将孵育一抗的玻片拿出, $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 $5\ \text{min} \times 3$, 室温下二抗孵育 4 h, $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 $5\ \text{min} \times 3$, 置于德国 Leica 公司的 DML 型荧光显微镜下观察拍片。

1.6 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 细胞培养上清按照 ELISA 试剂盒说明书分别检测致炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和神经营养因子 IGF-1 的浓度。

1.7 统计学分析 结果用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 来表示。应

用 SPSS 19.0 统计软件进行统计检验, 多组间差异用单因素方差分析 (ANOVA) 进行检验, 两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS促进小胶质细胞的激活、增加炎症因子的表达和释放、但减少神经营养因子IGF-1的表达和释放, ACh能逆转LPS的作用

为了证实 LPS 能促进小胶质细胞的激活, 我们检测了大鼠小胶质细胞中标志性的表面分子 OX-42 和相关细胞因子 iNOS、IL-1 β 、TNF- α 和 IGF-1 的蛋白表达含量, 并检测了小胶质细胞培养上清中 IL-1 β 、TNF- α 和 IGF-1 的含量。结果显示, 单独应用 LPS 能使小胶质细胞中 OX-42 蛋白表达显著增加, 炎症因子 iNOS 的表达和 IL-1 β 、TNF- α 的表达及释放增加, 而神经营养因子 IGF-1 的表达和释放减少, 加入 ACh 后可以逆转 LPS 的上述作用, 且高浓度 ACh ($1 \times 10^{-7}\ \text{mol}/\text{L}$) 的作用更显著 (图 1)。

2.2 LPS下调小胶质细胞 $\alpha 7nAChR$ 表达, 而ACh可逆转该作用

为证明 ACh 对小胶质细胞的作用机制, 我们用免疫荧光双标法检测小胶质细胞上 $\alpha 7nAChR$ 的表达。图 2A 即为小胶质细胞表达 $\alpha 7nAChR$ 的免疫荧光图, 图中可清晰看到绿色标记的 OX-42 (代表小胶质细胞) 和红色标记的 $\alpha 7nAChR$ 大部分重合, 说明小胶质细胞可显著表达 $\alpha 7nAChR$ 。Western blot 结果显示, LPS 可以使小胶质细胞中 $\alpha 7nAChR$ 的蛋白表达减少, 加入 ACh 后能逆转 LPS 的作用, 同样高浓度 ACh ($1 \times 10^{-7}\ \text{mol}/\text{L}$) 的作用更显著 (图 2B)。

2.3 $\alpha 7nAChR$ -shRNA慢病毒转染小胶质细胞后, ACh对抗LPS的作用消失

为了进一步证明 ACh 对抗 LPS 的作用是通过 $\alpha 7nAChR$ 实现的, 用 $\alpha 7nAChR$ -shRNA 慢病毒对小胶质细胞进行转染, 之后再分别加入 LPS 和 $1 \times 10^{-7}\ \text{mol}/\text{L}$ ACh, 检测相关细胞因子的表达和分泌。结果显示, $\alpha 7nAChR$ 沉默后, LPS 同样使小胶质细胞中 OX-42 显著增加, 炎症因子 iNOS 的表达和 IL-1 β 、TNF- α 的表达及释放增加; 神经营养因子 IGF-1 的表达和分泌减少。而 ACh 对抗 LPS 的作用消失 (图 3)。

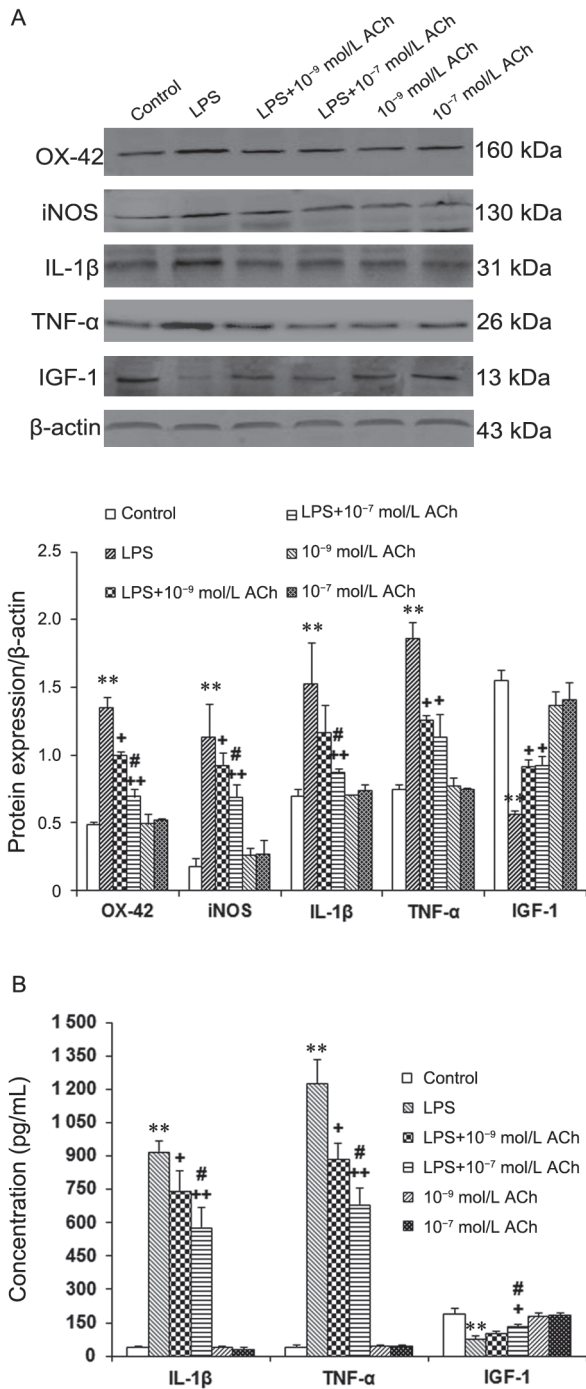


图 1. 乙酰胆碱(ACh)逆转脂多糖(LPS)所致小胶质细胞的激活
 Fig. 1. Acetylcholine (ACh) reversed lipopolysaccharide (LPS)-induced microglia activation. *A*: Protein expressions of OX-42, inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor α (TNF-α) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) detected by Western blot. *B*: Contents of IL-1β, TNF-α and IGF-1 in culture medium detected by ELISA. Mean ± SD, *n* = 3 (*A*) or 6 (*B*). ***P* < 0.01 vs control; +*P* < 0.05, ++*P* < 0.01 vs LPS; #*P* < 0.05 vs LPS+10⁻⁹ mol/L ACh.

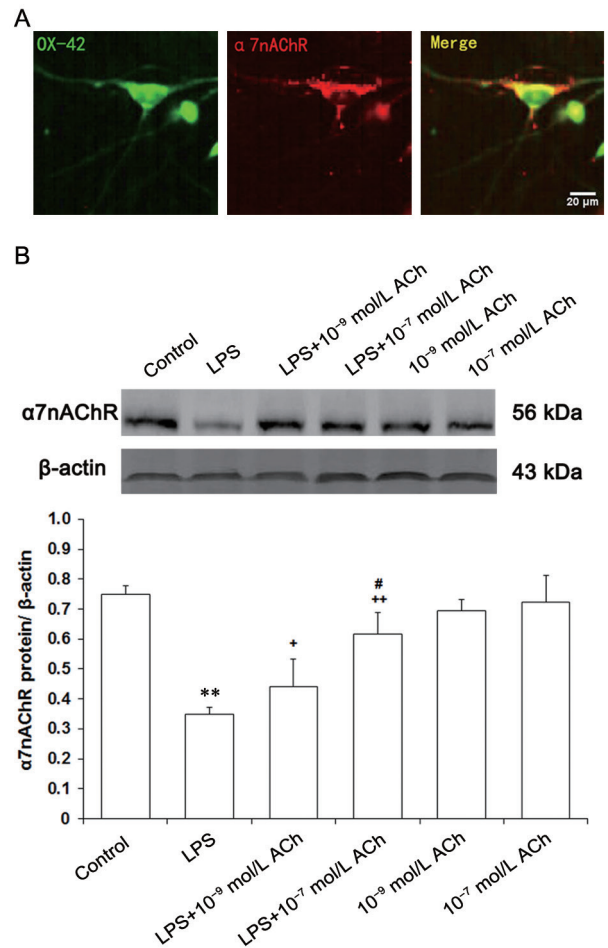


图 2. 乙酰胆碱(ACh)逆转脂多糖(LPS)下调小胶质细胞表达 α7nAChR 的作用
 Fig. 2. Acetylcholine (ACh) reversed lipopolysaccharide (LPS)-induced expression reduction of α7nAChR on microglia. *A*: Typical immunofluorescence figure of a microglia. After 9–10 d of primary culture, α7nAChR expression was detected by immunofluorescence staining. The green represented the microglia labeled with OX-42, the red represented α7nAChR, and the yellow indicated the co-localization of OX-42 and α7nAChR. Scale bar, 20 μm. *B*: Protein expression of α7nAChR detected by Western blot. Mean ± SD, *n* = 4. ***P* < 0.01 vs control; +*P* < 0.05, ++*P* < 0.01 vs LPS; #*P* < 0.05 vs LPS+10⁻⁹ mol/L ACh.

3 讨论

LPS 已被证实可以活化包括小胶质细胞在内的免疫细胞, 从而导致炎症因子的产生^[20]。小胶质细胞被证实是脑内 LPS 的主要反应细胞^[21], 本研究显示, 100 ng/mL LPS 可以使单独培养的小胶质细胞活化, 炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 iNOS 的表达和释放增加, 并使神经营养因子 IGF-1 的表达和释放

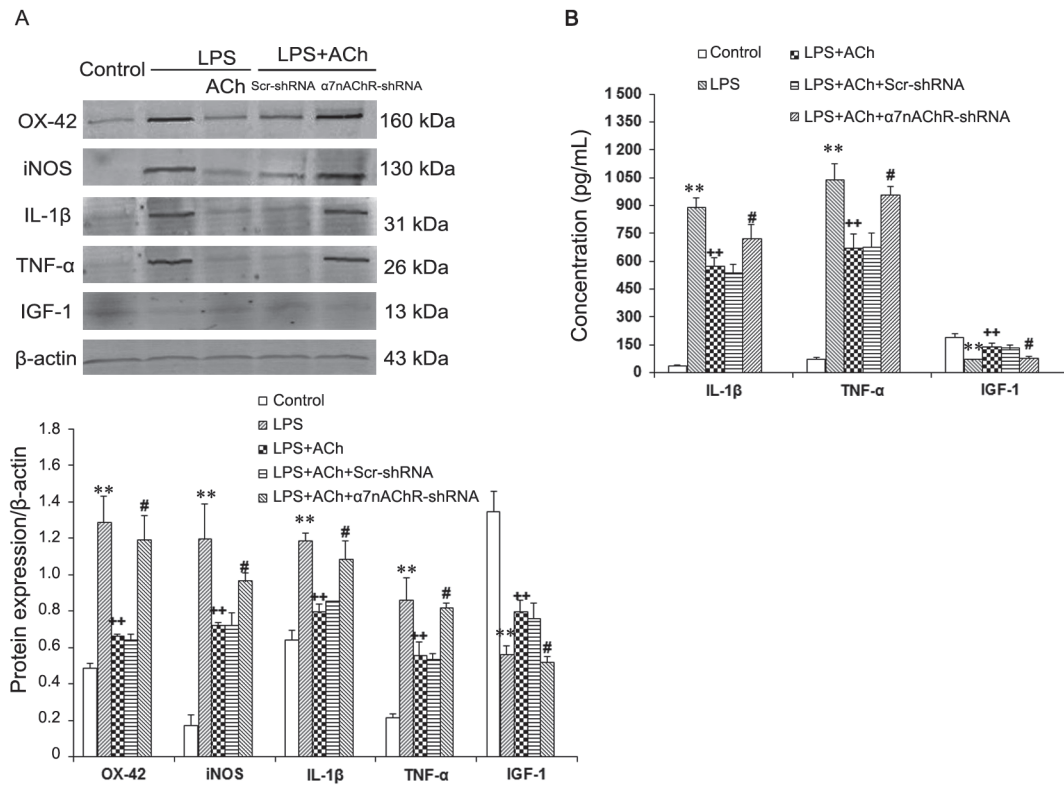


图 3. $\alpha 7nAChR$ -shRNA慢病毒转染小胶质细胞后，乙酰胆碱(ACh)对抗脂多糖(LPS)的作用消失
 Fig. 3. Silencing of $\alpha 7nAChR$ gene in microglia abolished the effect of acetylcholine (ACh) to inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses. The isolated microglia from cerebral cortex of one-day-old neonatal mice were cultured for 48 h, and $\alpha 7nAChR$ lentiviral vector was transfected into the microglia, which were incubated for 72 h. A: Western blot result. B: ELISA result. Mean \pm SD, $n = 3$ (A) or 6 (B). ** $P < 0.01$ vs control; ++ $P < 0.01$ vs LPS; # $P < 0.05$ vs LPS+ACh.

减少。在本研究中，我们选用大鼠小胶质细胞标志性表面分子 OX-42 来标记小胶质细胞，结果显示 LPS 能够使小胶质细胞中 OX-42 的蛋白表达增加，这也表明 LPS 可以使小胶质细胞激活。

ACh 是一种重要的神经递质，其受体被发现广泛存在于神经元和胶质细胞中^[12]，这些受体对中枢神经系统内不同类型的细胞具有多方面的调节和刺激^[22, 23]。而位于神经胶质细胞上的受体对其功能有一定的生理学作用^[18, 19, 24]。有证据表明， $\alpha 7nAChRs$ 在小胶质细胞中大量表达^[25]，且在抑制星型胶质细胞激活中起到一定的作用^[26]。本研究通过检测 $\alpha 7nAChR$ 在小胶质细胞中的表达也证实了这一观点，并进一步显示 LPS 可以使小胶质细胞中 $\alpha 7nAChR$ 的蛋白表达减少，而 ACh 能逆转 LPS 的作用。

为了探讨 ACh 的抗炎作用，我们应用 ACh 作用于 LPS 诱导的小胶质细胞炎症模型中，发现 ACh 能显著抑制 LPS 导致的小胶质细胞激活和炎症因子

的表达和释放增加。这一结果也在类似研究中得到证实：尼古丁可抑制 LPS 诱导的大鼠小胶质细胞中 $\alpha 7nAChR$ 的降低和 TNF 的释放^[12]；ACh 和尼古丁均可抑制 LPS 诱导的小胶质细胞中 TNF- α 释放，并且这一作用是通过 $\alpha 7nAChR$ 介导的^[19]。为了进一步探讨 $\alpha 7nAChRs$ 在 ACh 抗炎机制中的作用，我们采用基因干扰技术将小胶质细胞上的 $\alpha 7nAChR$ 沉默后发现 ACh 对抗 LPS 的作用消失，这一结果从基因的角度验证了 ACh 是通过 $\alpha 7nAChR$ 发挥抗炎作用的，相比用信号转导通路研究方法更为准确和直观。

综上所述，本研究结果表明 ACh 能够有效地抑制 LPS 诱导的小胶质细胞活化以及炎症因子的增加和神经营养因子的降低，而这一作用是通过 $\alpha 7nAChR$ 实现的，这为今后的神经炎症疾病的治疗以及药物合成提供了研究靶点。然而如何通过作用于 $\alpha 7nAChR$ 来有效地进行抗炎治疗还是有待解

决的问题。

参考文献

- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91(2): 461–553.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19(8): 312–318.
- Noda M, Kobayashi AI. Nicotine inhibits activation of microglial proton currents via interactions with $\alpha 7$ acetylcholine receptors. *J Physiol Sci* 2017; 67(1): 235–245.
- Streit WJ, Kincaid-Colton CA. The brain's immune system. *Sci Am* 1995; 273(5): 54–55, 58–61.
- Olajide OA, Bhatia HS, de Oliveira AC, Wright CW, Fiebich BL. Inhibition of neuroinflammation in LPS-activated microglia by cryptolepine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 459723.
- Qin L, Li G, Qian X, Liu Y, Wu X, Liu B, Hong JS, Block ML. Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia* 2005; 52(1): 78–84.
- Slusarczyk J, Trojan E, Glombik K, Piotrowska A, Budziszewska B, Kubera M, Popiolek-Barczyk K, Lason W, Mika J, Basta-Kaim A. Anti-inflammatory properties of tianeptine on lipopolysaccharide-induced changes in microglial cells involve toll-like receptor-related pathways. *J Neurochem* 2016; 136(5): 958–970.
- Tracey KJ, Czura CJ, Ivanova S. Mind over immunity. *FASEB J* 2001; 15(9): 1575–1576.
- Martelli D, McKinley MJ, McAllen RM. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Auton Neurosci* 2014; 182: 65–69.
- Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Chavan S, Tracey KJ. Splenic nerve is required for cholinergic anti-inflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(31): 11008–11013.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421(6921): 384–388.
- Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, Andrä M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* 2006; 83(8): 1461–1470.
- Lalo U, Pankratov Y, Parpura V, Verkhratsky A. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of “excitable” molecules in non-excitable cells. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(5): 992–1002.
- Liu Y, Zeng X, Hui Y, Zhu C, Wu J, Taylor DH, Ji J, Fan W, Huang Z, Hu J. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 2015; 91: 87–96.
- Pirttimäki TM, Codadu NK, Awni A, Pratik P, Nagel DA, Hill EJ, Dineley KT, Parri HR. $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: $A\beta$ effects in a pre-clinical Alzheimer's mouse model. *PLoS One* 2013; 8(11): e81828.
- Yu WF, Guan ZZ, Bogdanovic N, Nordberg A. High selective expression of $\alpha 7$ nicotinic receptors on astrocytes in the brains of patients with sporadic Alzheimer's disease and patients carrying Swedish APP 670/671 mutation: a possible association with neuritic plaques. *Exp Neurol* 2005; 192(1): 215–225.
- Hawkins BT, Egleton RD, Davis TP. Modulation of cerebral microvascular permeability by endothelial nicotinic acetylcholine receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(1): H212–H219.
- Sharma G, Vijayaraghavan S. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(7): 4148–4153.
- Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J. Cholinergic modulation of microglial activation by $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J Neurochem* 2004; 89(2): 337–343.
- Johansson S, Bohman S, Radesäter AC, Oberg C, Luthman J. Salmonella lipopolysaccharide (LPS) mediated neurodegeneration in hippocampal slice cultures. *Neurotox Res* 2005; 8(3–4): 207–220.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 2002; 22(7): 2478–2486.
- Shteingauz A, Cohen E, Biala Y, Treinin M. The BTB-MATH protein BATH-42 interacts with RIC-3 to regulate maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 6): 807–812.
- Vallés AS, Barrantes FJ. Chaperoning $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818(3): 718–729.
- Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to com-

- munication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(8): 626–640.
- 25 Parri HR, Hernandez CM, Dineley KT. Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 2011; 82(8): 931–942.
- 26 Liu Y, Hu J, Wu J, Zhu C, Hui Y, Han Y, Huang Z, Ellsworth K, Fan W. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against dopaminergic neuron loss in an MPTP mouse model via inhibition of astrocyte activation. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 98.