

## 全反式维甲酸通过增强调节性 T 细胞的抑炎效应 发挥对多巴胺能神经元的保护作用

潘宏旭, 方亮娟

中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

**摘要:**目的 探讨全反式维甲酸(ATRA)对帕金森病(PD)小鼠多巴胺能神经元的作用及其机制。方法 将野生型小鼠随机分为 MPTP 对照组与 ATRA + MPTP 组,造模前后进行行为学检测,流式细胞学技术检测外周 T 淋巴细胞亚群,实时定量 PCR 法检测脉络丛黏附分子和中脑黑质区炎症因子的表达,免疫荧光法检测黑质区胶质细胞活化及多巴胺能神经元存活情况。结果 经 ATRA 预处理的 PD 小鼠外周调节性 T 细胞(Tregs)数目增多[(2.3 ± 0.21)%;  $P < 0.05$ ]。PD1 表达上调[CD4+: (4.65 ± 0.61)%; CD8+: (3.50 ± 0.31)%;  $P < 0.05$ ]。黏附分子(Icam-1: 0.37 ± 0.13; Vcam-1: 0.32 ± 0.06)及炎症因子(IL-6: 0.16 ± 0.05; TNF-α: 0.29 ± 0.12)相对表达均下调( $P < 0.05$ )。黑质区胶质细胞活化减少,多巴胺能神经元存活率提高。小鼠的协调能力[转棒停留总时间:(157.5 ± 24.5)s]及自主运动能力[运动总距离:(42.58 ± 2.96)m]均得到改善( $P < 0.05$ )。结论 ATRA 可能通过增强 Tregs 的抑炎效应,间接发挥多巴胺能神经元保护作用。

**关键词:** 帕金森病;全反式维甲酸;调节性 T 细胞;神经炎症反应;多巴胺能神经元

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2017.05.014

## All-trans retinoic acid exerts a protective effect on dopaminergic neurons by enhancing the anti-inflammatory effect of regulatory T cells

PAN Hong-Xu, FANG Liang-Juan. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: FANG Liang-Juan, E-mail: fangliangjuan@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on dopaminergic neurons in mice with Parkinson's disease (PD) and related mechanisms. **Methods** Wild-type mice were randomly divided into 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) control group and ATRA + MPTP group. The behavioral test was performed before and after modeling. Flow cytometry was used to measure peripheral T lymphocyte subsets, real-time quantitative PCR was performed to measure the expression of adhesion molecules in the choroid plexus and inflammatory factors in the substantia nigra, and immunofluorescence assay was used to evaluate the activation of glial cells and the survival of dopaminergic neurons in the substantia nigra. **Results** The PD mice pretreated with ATRA had a significant increase in the number of peripheral regulatory T cells (2.3% ± 0.21%,  $P < 0.05$ ). There was a significant increase in the expression of PD1, with 4.65% ± 0.61% in CD4+ regulatory T cells and 3.50% ± 0.31% in CD8+ regulatory T cells ( $P < 0.05$ ). There were significant reductions in the relative expression of adhesion molecules Icam-1 (0.37 ± 0.13) and Vcam-1 (0.32 ± 0.06) and inflammatory factors interleukin-6 (0.16 ± 0.05) and tumor necrosis factor-α (0.29 ± 0.12) ( $P < 0.05$ ). In the substantia nigra, the activation of glial cells was reduced, and the viability of dopaminergic neurons was increased. There were significant improvements in coordinate ability (total time spent on the rotating rod: 157.5 ± 24.5 s) and autonomic activity (total movement distance: 42.58 ± 2.96 m) in mice. **Conclusions** ATRA exerts a protective effect on dopaminergic neurons by enhancing the anti-inflammatory effect of regulatory T cells.

**Key words:** Parkinson disease; all-trans retinoic acid; regulatory T cell; neuroinflammatory response; dopaminergic neuron

收稿日期:2017-06-22;修回日期:2017-10-12

作者简介:潘宏旭(1994-),男,硕士研究生,主要从事神经变性病相关方面研究。

通信作者:方亮娟(1985-),女,住院医师,助理研究员,博士,主要从事神经变性病与神经免疫学相关研究。E-mail:fangliangjuan@163.com。

帕金森病 ( Parkinson ’ s disease , PD ) 的主要病理学特征为黑质致密部多巴胺能神经元的变性死亡以及  $\alpha$ -突触核蛋白 ( alpha-synuclein ,  $\alpha$ -syn ) 的错误折叠和异常聚集 ; 主要生化改变为纹状体区多巴胺递质降低 , 也是临床症状的根源所在<sup>[1]</sup>。PD 发病机制复杂 , 目前认为与环境因素 ( 如 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 , MPTP ) 和遗传因素相关 , 但尚不能完全阐明。

越来越多的研究表明炎症反应参与 PD 的发生和发展<sup>[2,3]</sup>。在神经系统疾病中 , 调节性 T 细胞 ( regulatory T cells , Tregs ) 可以直接抑制活化的小胶质细胞 , 诱导其凋亡 ; 还可以分泌多种免疫抑制因子如 TGF- $\alpha$  和 IL-10 , 下调小胶质细胞表面 MHC I/II 分子的表达 , 从而减少炎症反应 , 间接发挥神经元保护作用<sup>[4]</sup>。PDL1- PD1 配体受体通路以及一些环境因素 , 如芳烃受体激动剂和全反式维甲酸 ( all-trans retinoic acid , ATRA ) 等 , 能够诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化为 Tregs , 此外 , ATRA 还能稳固 Tregs 表型<sup>[5]</sup>。

脉络丛是血脑屏障 ( blood brain barrier , BBB ) 的重要组成部分 , 当脑组织损伤时 , BBB 通透性增高 , 外周血免疫细胞浸润至 CNS , 发生免疫反应 , 促进脑组织修复 , 但过度的免疫反应反而会加重脑组织损伤<sup>[6]</sup>。

综上 , 本研究通过探索 ATRA 在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中的抑炎作用及其机制 , 期望为 PD 发病机制及治疗方法的研究提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

健康雄性 C57BL6 小鼠 , 8 周龄 , 体重 22 ~ 25 g , 购自湖南斯莱克景达实验动物公司。在中南大学医学遗传学实验室动物实验中心适应性饲养 1 周后进行实验。实验方案获得中南大学实验动物伦理委员会批准。抗小鼠 CD3 ( FITC , 553061 ) 、 CD4 ( Pacific Blue , 558107 ) 、 CD8 ( PE-Cy7 , 552877 ) 、 CD25 ( PerCP-Cy5.5 , 551071 ) 、 Foxp3 ( PE , 560408 ) 、 PD1 ( PE , 551892 ) 抗体和红细胞裂解液 ( 555899 ) 购自美国 BD 公司 ; MPTP 粉末 ( M0896 ) 、 ATRA 粉末 ( R2625 ) 购自美国 Sigma 公司 ; cDNA 试剂盒和 SYBR Green qPCR Mix 购自美国 Selleck 公司 ; Icam-1 、 Vcam-1 、 TNF- $\alpha$  、 IFN- $\gamma$  、 IL-6 、  $\beta$ -actin 和 GAPDH 等引物由上海生工生物工程公司合成。序列如下表所示 :

表 1 引物序列

基因		序列
Icam-1	forward	5'-AGATCACATTACGGTGTGGCTA-3'
	reverse	5'-AGCTTTGGGATGGTAGCTGGAAGA-3'
Vcam-1	forward	5'-TGTGAAGGGATTAACGAGGCTGGA-3'
	reverse	5'-CCATGTTTCGGGCACATTTCCACA-3'
TNF- $\alpha$	forward	5'-GCCTCTTCTCATTCCTGCTT-3'
	reverse	5'-CTCCTCCACTTGGTGGTTTG-3'
IFN- $\gamma$	forward	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3'
	reverse	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
IL-6	forward	5'-CAAAGCCAGAGTCCTTCAGA-3'
	reverse	5'-GATGGTCTTGCTCTTAGCC-3'
$\beta$ -actin	forward	5'-CACGATGGAGGGCCGGACTCATC-3'
	reverse	5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'
GAPDH	forward	5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3'
	reverse	5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠 PD 模型制备 流程如图 1 所示 , ATRA 溶于 DMSO 后以 8 mg/kg 进行腹腔注射 , 隔日注射 1 次 , 连续 4 次 , 对照组等量注射 DMSO ; MPTP 溶于生理盐水后进行腹腔注射 ( 20 mg/kg ) , 每日注射 1 次 , 共注射 5 d , 对照组等量注射生理盐水。注射完成后继续饲养 21 d。

1.2.2 行为学检测 转棒实验借助小鼠转棒仪 ( 意大利 UGO 公司 ) , 前 3 天训练 , 第 4 天检测 , 以 20 rpm 的速度起始运动 , 记录小鼠在转棒仪上停留的时间 ; 旷场实验采用开口的黑色木盒和 Animal Video Tracking Analysis Software 等设备记录小鼠移动总距离、跨越方格总数和周边时间。

1.2.3 外周血免疫细胞检测 分离小鼠脾脏 , 制成单细胞悬液。分两管 , 每管取  $1 \times 10^6$  个细胞。第一管加入抗小鼠 CD3 、 CD4 、 CD8 和 CD25 荧光抗体 , 第二管加入抗小鼠 CD3 、 CD4 、 CD8 和 PD1 荧光抗体 , 避光静置 1 h , 在 PBS 中洗涤两次。第一管加入破膜液 , 4℃ 过夜后加入抗小鼠 Foxp3 荧光抗体 , 避光静置 1 h , 在 PBS 中洗涤两次。洗涤完成后上流式细胞仪 ( FACS Canto II , 美国 BD 公司 ) 进行检测。全部数据采用 FlowJo 10.0 软件进行分析。

1.2.4 实时定量 PCR ( real time quantitative polymerase chain reaction , RT-qPCR ) MPTP 注射完成 21 d 后 , 取小鼠脑组织 , 分离黑质以及脉络丛 , 按照试剂盒说明书提取总 RNA , 逆转录生成 cDNA 后行 PCR 扩增与荧光检测。RT-qPCR 反应程序为 : 95℃ 5 min , 94℃ 20 s , 60℃ 20 s , 72℃ 20 s , 循环 40 次。

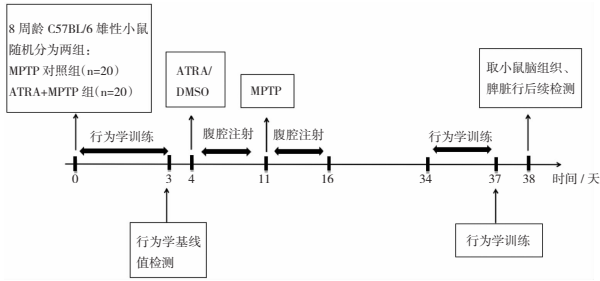


图 1 实验方案

1.2.5 小鼠脑组织病理切片检测 具体方法参考郭彦杰等的研究<sup>[7]</sup>。所使用一抗包括:兔抗鼠 GFAP ( ab53554, Abcam )、兔抗鼠 Iba-1 ( ab178847, Abcam ) 和鸡抗鼠 TH ( ab76442, Abcam );二抗包括:山羊抗兔荧光抗体 ( Alexa Fluor® 488, ab150077, Abcam ) 和山羊抗鸡荧光抗体 ( Alexa Fluor® 647, ab150175, Abcam )。采用荧光共聚焦显微镜 ( E800, Nikon ) 显微分析染色结果。

1.3 统计学方法

本实验相关结果均应用 Prism 5 软件进行数据分析,以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,各组之间比较采用单因素方差分析,并用 t 检验进行两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATRA 对 PD 小鼠行为学的影响

在给予 MPTP 后,小鼠出现震颤、竖毛、行动缓慢和活动减少等 PD 典型症状。ATRA + MPTP 组小鼠在转动棒上停留平均时间为 ( $157.50 \pm 24.46$ ) s,较 MPTP 对照组 ( $120.88 \pm 30.43$ ) s 显著延长;与

转棒实验结果相似,ATRA + MPTP 组小鼠平均移动距离为 ( $42.58 \pm 2.96$ ) m,优于 MPTP 对照组小鼠 ( $37.76 \pm 2.79$ ) m,差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。以上行为学结果表明 ATRA 可以改善 PD 小鼠的活动度,但仍未恢复至基线水平。见表 2。

表 2 MPTP/ATRA + MPTP 处理前后小鼠行为学的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组		停留时间/s	移动距离/m
MPTP 对照组	基线值	$257.50 \pm 17.70$	$52.97 \pm 2.57$
	最终值	$120.88 \pm 30.43^*$	$37.76 \pm 2.79^*$
ATRA + MPTP 组	基线值	$256.38 \pm 16.44$	$52.79 \pm 2.29$
	最终值	$157.50 \pm 24.46^*$	$42.58 \pm 2.96^*$
P 值		$<0.05$	$<0.05$

注: \* 表示最终值与基线值之间差异存在统计学意义, $P < 0.05$ 。

2.2 ATRA 对 PD 小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响

流式细胞学结果分析表明,ATRA 预处理的 PD 小鼠脾脏 Tregs (  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  ) 百分比均值为  $2.31 \pm 0.21$ ,较 MPTP 对照组的  $1.19 \pm 0.05$  增多 ( $P < 0.05$ )。我们还发现,经 ATRA 预处理后,脾脏  $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 淋巴细胞相对数目均减少,百分比分别为  $17.40 \pm 0.48$ 、 $10.88 \pm 0.50$ ,而未经 ATRA 处理组分别为  $21.08 \pm 1.33$ 、 $13.14 \pm 0.76$ ,提示 ATRA 可能通过某种途径抑制  $CD4^+ / CD8^+$  T 细胞的增殖和活化。进一步研究表明,有抑制 T 细胞增殖活化及分泌炎性介质作用的负向调控因子 PD1 在 ATRA 预处理的 PD 小鼠中表达上调,分别为 ( $4.65 \pm 0.61$ ) % (  $CD4^+$  )、( $3.50 \pm 0.31$ ) % (  $CD8^+$  ) ( $P < 0.05$ ),提示 ATRA 处理组小鼠免疫功能处于抑制状态。见表 3。

表 3 不同亚群间 T 淋巴细胞相对数目的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	Tregs	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+ PD1^+$	$CD8^+ PD1^+$
MPTP 对照组	$1.19 \pm 0.05$	$21.08 \pm 1.33$	$13.14 \pm 0.76$	$2.70 \pm 0.20$	$2.44 \pm 0.13$
ATRA + MPTP 组	$2.31 \pm 0.21$	$17.40 \pm 0.48$	$10.88 \pm 0.50$	$4.65 \pm 0.61$	$3.50 \pm 0.31$
P 值	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$

2.3 PD 小鼠脑组织黑质促炎因子表达的变化

促炎因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  对神经元均有毒害作用。RT-qPCR 结果显示 ATRA + MPTP 组小鼠脑黑质 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 相对表达量分别为  $0.16 \pm 0.05$  和  $0.29 \pm 0.12$ ,与 MPTP 对照组的  $1.04 \pm 0.20$  和  $1.02 \pm 0.13$  相比,显著下调 ( $P < 0.05$ ),表明 ATRA 可通过下调促炎因子的表达减少 PD 小鼠脑内炎症反应。见表 4。

2.4 ATRA 对 PD 小鼠脑组织脉络丛黏附分子表达的影响

表达于 BBB 的 Icam-1 和 Vcam-1 是促进外周白细胞中枢迁移的重要黏附分子。RT-qPCR 结果分析如表 4 显示,MPTP 对照组 Icam-1 和 Vcam-1 相对表达量分别为  $1.04 \pm 0.20$  和  $1.01 \pm 0.09$ ,而 ATRA + MPTP 组相对表达量下降至  $0.37 \pm 0.13$  他  $0.32 \pm 0.06$  ( $P < 0.05$ )。IFN- $\gamma$  为促进 Icam-1

和 Vcam-1 表达的关键上游分子,本研究发现 IFN- $\gamma$  在 ATRA + MPTP 组小鼠脉络丛中的相对表达量为  $0.77 \pm 0.08$ , 低于 MPTP 对照组  $1.01 \pm 0.09$ , 未发现差异存在统计学意义,其原因可能是由于上

游分子 IFN- $\gamma$  的表达在检测时已出现下调,提示我们后续需设立多个时间点进一步研究。因此,ATRA 预处理小鼠 BBB 的黏附分子表达下调,外周淋巴细胞中枢迁移受限。

表 4 黏附分子与促炎因子相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	IL-6	TNF- $\alpha$	Icam-1	Vcam-1	IFN- $\gamma$
MPTP 对照组	$1.04 \pm 0.20$	$1.02 \pm 0.13$	$1.04 \pm 0.20$	$1.01 \pm 0.09$	$1.01 \pm 0.09$
ATRA + MPTP 组	$0.16 \pm 0.05$	$0.29 \pm 0.12$	$0.37 \pm 0.13$	$0.32 \pm 0.06$	$0.77 \pm 0.08$
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	NS

注:NS 为差异无统计学意义。

2.5 PD 小鼠黑质多巴胺能神经元存活及胶质细胞活化情况

免疫荧光结果显示,ATRA 预处理的 PD 小鼠黑质区 GFAP 与 Iba-1 表达量降低,提示活化的星形胶质细胞和小胶质细胞数目较少;与之相反,ATRA

预处理的 PD 小鼠 TH + 神经元数量较多,未经 ATRA 预处理的 PD 小鼠多巴胺能神经元死亡率高(图 2)。上述结果表明,ATRA 起着保护多巴胺能神经元的作用。

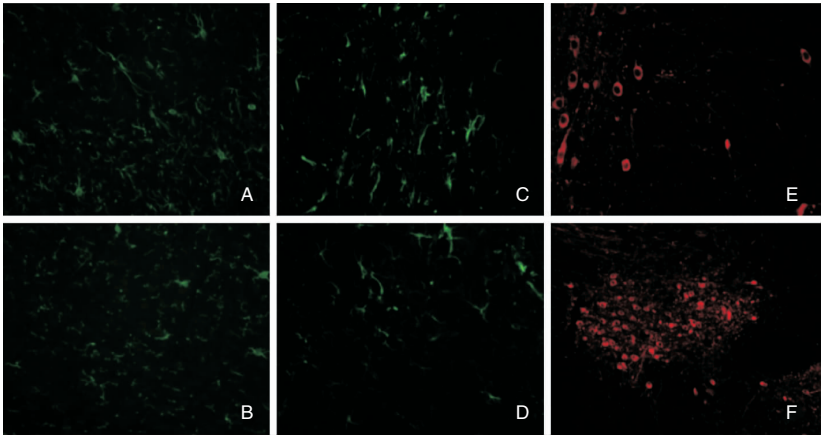


图 2 PD 小鼠脑组织黑质内胶质细胞活化情况及多巴胺能神经元存活情况

注:A:MPTP 对照组活化的星形胶质细胞,标记物为 GFAP;B:ATRA + MPTP 组活化的星形胶质细胞,标记物为 GFAP;C:MPTP 对照组活化的小胶质细胞,标记物为 Iba-1;D:ATRA + MPTP 组活化的小胶质细胞,标记物为 Iba-1;E:MPTP 对照组多巴胺能神经元,标记物为 TH;F:ATRA + MPTP 组多巴胺能神经元,标记物为 TH。

3 讨论

对 PD 患者尸检发现,疾病早期即出现小胶质细胞增殖与活化,随着疾病的进展,多巴胺能神经元变性死亡程度与促炎因子表达水平息息相关<sup>[8]</sup>。由此可见,减少中枢神经系统持续慢性炎症反应,是延缓甚至阻止多巴胺能神经元进行性死亡的策略之一。

ATRA 是维生素 A 的中间代谢产物,具有很强的诱导细胞分化及免疫调节作用,目前在治疗急性早幼粒细胞白血病和骨髓异常增生等血液系统恶性疾病中有较好的临床应用<sup>[9]</sup>。ATRA 能够诱导

Tregs 分化并稳定其表型<sup>[10]</sup>,同样,本研究也表明 ATRA 能够促进 PD 小鼠外周 Tregs 的增殖分化,进而抑制 CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化。PD1 及其配体 PDL1 属于协同刺激分子,PD1 激活后招募酪氨酸磷酸化酶 SHP2 和 SHP1 到 PD1 的胞内区,抑制 TCR 信号传导,负向调节细胞活化<sup>[11]</sup>。本研究发现,经 ATRA 预处理的 PD 小鼠,外周 PD1 表达上调,小鼠处于免疫功能抑制状态。

脉络丛是白细胞浸润至中枢的通道,由白细胞归巢和转运因子介导,包括 Icam-1、Vcam-1、cxcl-10 和 ccl-2 等<sup>[12]</sup>,并受 IFN- $\gamma$  信号通路调控<sup>[13]</sup>。

在本研究中,经 ATRA 预处理的 PD 小鼠脉络丛 Icam-1 和 Vcam-1 表达下调,可能与 Tregs 数量增多,进而抑制脉络丛 IFN- $\gamma$  信号通路有关。但是,实验组和对照组 IFN- $\gamma$  表达差异无统计学意义,其可能的原因是 IFN- $\gamma$  信号通路的作用具有时效性,当其下游信号即 Icam-1 和 Vcam-1 表达出现改变时,上游信号分子 IFN- $\gamma$  表达的改变已不明显,因此,提示研究者进行进一步深入研究时应设置时间对照组,比较 ATRA 作用不同时间点时 IFN- $\gamma$  的表达情况。

小胶质细胞是 CNS 主要固有免疫细胞,其在黑质部最为密集<sup>[14]</sup>。在 PD 中,慢性刺激导致小胶质细胞持续激活,产生大量氧自由基和多种促炎因子如 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等,并进一步激活小胶质细胞形成恶性循环,加速多巴胺能神经元死亡<sup>[15]</sup>。星形胶质细胞在一定条件下也具有免疫细胞的特征,如表达模式识别受体(Toll 样受体和清道夫受体等)、激活后分泌细胞因子和趋化因子(IL-6、TNF- $\alpha$  和 CCL2 等)、通过 NF- $\kappa$ B 信号通路生成氧自由基诱导神经元死亡<sup>[16-18]</sup>。与上述研究结果一致,我们的研究发现 ATRA 处理的 PD 小鼠黑质区活化的小胶质细胞和星形胶质细胞数量减少,存留的 TH<sup>+</sup> 神经元数量较多;黑质区促炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达下调;功能学检测显示 ATRA 处理 PD 小鼠协调运动能力与自主活动度均得到改善。

综上所述,ATRA 可能通过增强 Tregs 抑炎效应,间接发挥多巴胺能神经元的保护作用,有望成为延缓 PD 进展甚至治疗 PD 的潜在药物之一。

#### 参 考 文 献

- [1] Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2004, 363(9423): 1783-1793.
- [2] Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration [J]. *Science*, 2016, 353(6301): 777-783.
- [3] McKenzie JA, Spielman LJ, Pointer CB, et al. Neuroinflammation as a Common Mechanism Associated with the Modifiable Risk Factors for Alzheimer's and Parkinson's Diseases [J]. *Curr Aging Sci*, 2017, 10(3): 158-176.
- [4] Wang S, Zhang H, Xu Y. Crosstalk between microglia and T cells contributes to brain damage and recovery after ischemic stroke [J]. *Neurol Res*, 2016, 38(6): 495-503.
- [5] Zhou K, Zhong Q, Wang Y C, et al. Regulatory T cells ameliorate intracerebral hemorrhage-induced inflammatory injury by modulating microglia/macrophage polarization through the IL-10/GSK3 $\beta$ /PTEN axis [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(3): 967-979.
- [6] 刘超,李明昌,陈谦学. 血脑屏障结构与功能及其在缺血性脑血管病中的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(6): 564-568.
- [7] 郭彦杰,董素艳,赵文娟,等. 白藜芦醇通过 SIRT1/AMPK 信号通路减轻 MPTP 诱导的小鼠多巴胺能神经元丢失 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(2): 97-102.
- [8] Moehle MS, West AB. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? [J]. *Neuroscience*, 2015, 30(2): 59-73.
- [9] Stevison F, Jing J, Tripathy S, et al. Role of Retinoic Acid-Metabolizing Cytochrome P450s, CYP26, in Inflammation and Cancer [J]. *Adv Pharmacol*, 2015, 7(4): 373-412.
- [10] Zhou X, Kong N, Wang J, et al. Cutting edge: all-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu [J]. *J Immunol*, 2010, 185(5): 2675-2679.
- [11] Hui E, Cheung J, Zhu J, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition [J]. *Science*, 2017, 355(6332): 1428-1433.
- [12] Baruch K, Kertser A, Porat Z, et al. Cerebral nitric oxide represses choroid plexus NF $\kappa$ B-dependent gateway activity for leukocyte trafficking [J]. *EMBO J*, 2015, 34(13): 1816-1828.
- [13] Shechter R, Miller O, Yovel G, et al. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus [J]. *Immunity*, 2013, 38(3): 555-569.
- [14] Yan J, Fu Q, Cheng L, et al. Inflammatory response in Parkinson's disease (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2223-2233.
- [15] Catorce MN, Gevorkian G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(2): 155-164.
- [16] Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity [J]. *Trends Immunol*, 2007, 28(3): 138-145.
- [17] Mckimmie CS, Graham GJ. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(4): 1006-1011.
- [18] Restrepo L, Stafford P, Johnston SA. Feasibility of an early Alzheimer's disease immunosignature diagnostic test [J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 254(1-2): 154-160.