

· 基础研究 ·

高压环境对 BV2 小胶质细胞 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响

杨帆 李旭声 李娅 刘小瑜 刘梦婷 丁洪光 曾红科
华南理工大学附属广东省人民医院, 广州 510080
通信作者: 曾红科, Email: zenghongke@vip.163.com

【摘要】目的 探究高压对 BV2 小胶质细胞促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响。**方法** 使用自制加压装置干预体外培养的 BV2 小胶质细胞。根据干预压力随机分组包括: 对照组、20 mmHg 组、25 mmHg 组、30 mmHg 组和 35 mmHg 组; 根据干预时间随机分组包括: 对照组、6 h 组、12 h 组、24 h 组。用免疫荧光和 Western Blot 方法检测 TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达变化。**结果** 30 mmHg 的压力处理 BV2 小胶质细胞 24 h 后, TNF- α 和 IL-1 β 的表达明显高于对照组 (均 $P < 0.01$)、6 h 组 (均 $P < 0.01$) 和 12 h 组 (TNF- α : $P < 0.05$; IL-1 β : $P < 0.01$)。30 mmHg 组 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平明显高于对照组 (均 $P < 0.01$)、20 mmHg 组 (均 $P < 0.01$)、25 mmHg 组 (TNF- α : $P < 0.05$; IL-1 β : $P < 0.01$)。30 mmHg 组与 35 mmHg 组比较, TNF- α 和 IL-1 β 的表达差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。**结论** 高压可明显升高 BV2 小胶质细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的表达。

【关键词】 压力; 小胶质细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-1 β

基金项目: 广东省自然科学基金 (2016A030311043, 2017A030313691); 广州市科技计划项目 (A2019135)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.12.009

High pressure increases the express of TNF- α and IL-1 β in BV2 microglia

Yang Fan, Li Xusheng, Li Ya, Liu Xiaoyu, Liu Mengting, Ding Hongguang, Zeng Hongke

Guangdong Provincial People's Hospital, Affiliated to South China University of Technology, Guangzhou 510080, China

Correspondence author: Zeng Hongke, Email: zenghongke@vip.163.com

【Abstract】Objective This study aimed to explore whether high pressure would increase expression of TNF- α and IL-1 β . **Methods** BV2 microglia cells were treated with a self-made device. BV2 microglia cells were randomly divided into five groups according to different pressures: control group, 20 mmHg group, 25 mmHg group, 30 mmHg group, and 35 mmHg group. BV2 microglia cells were randomly divided into five groups according to different intervention time: control group, 6 h group, 12 h group, 24 h group. TNF- α and IL-1 β expression were assessed by Western Blotting or double immunofluorescence. **Results** The 30 mmHg group had the highest expression levels of TNF- α and IL-1 β as compared with control group (both $P < 0.01$), 6 h group (both $P < 0.01$), 12 h group (TNF- α : $P < 0.05$; IL-1 β : $P < 0.01$). 30 mmHg group had the highest expression levels of TNF- α and IL-1 β as compared with control group (both $P < 0.01$), 20 mmHg group (both $P < 0.01$), and 25 mmHg group (TNF- α : $P < 0.05$; IL-1 β : $P < 0.01$). The expression levels of TNF- α and IL-1 β were not different between 30 mmHg group and 35 mmHg group (both $P > 0.05$). **Conclusions** High pressure may increase the expression levels of TNF- α and IL-1 β of microglia.

【Keywords】 Pressure; Microglia; TNF- α ; IL-1 β

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong province (2016A030311043, 201

7A030313691); Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (A2019135)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.12.009

小胶质细胞是中枢神经系统中的巨噬细胞和免疫细胞。生理状态下,小胶质细胞的形态呈分枝状,当受到病理因素刺激后,小胶质细胞被激活,形态转变为阿米巴状或圆形,并产生大量肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)等促炎因子,加重脑组织损伤^[1]。研究表明,在颅内压增高环境下,小胶质细胞被激活并发挥了重要作用,其参与了对神经系统的二次损伤,加重病情^[2]。但在临床上,诸如脑水肿、颅脑外伤、颅内占位等引起颅内压增高环境下,影响小胶质细胞激活和促炎因子表达的因素较多,而其中单一的“压力”因素对小胶质细胞表达 TNF- α 、IL-1 β 有何影响,尚不得而知。本研究旨在探讨高压对体外培养的 BV2 小胶质细胞 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响,为进一步探讨颅内高压诱导中枢神经系统二次损伤的相关机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

高糖 DMEM 培养基 (cat. No. 8117046)、澳洲胎牛血清 (cat. No. FBS-52A) 购于美国 Gibco 公司。TNF- α (cat. No. 11948)、IL-1 β (cat. No. ab9722)、 β -actin (cat. No. 3700S)、Iba1 (cat. No. ab178847) 等一抗抗体购于 Cell Signaling Technology 公司和 abcam 公司。山羊抗兔 IgG (cat. No. A23320)、山羊抗鼠 IgG (cat. No. A23210) 驴抗兔荧光二抗 (cat. No. A31572)、驴抗鼠荧光二抗 (cat. No. ab150129) 购于 Cell Signaling Technology 公司和 abcam 公司。PBS (cat. 10.)、TBS 粉末购于武汉博士德生物公司。甘氨酸 (cat. No. 1275GR500)、Tnis (cat. No. 115GR500)、SDS (cat. No. 3250GR500) 购于德国 Biofross 公司。甲醇购于广州化学试剂公司。4% 多聚甲醛购于广州一科生物科技有限公司。

1.2 细胞和分组

实验用细胞为 BV2 小胶质细胞 (齐氏生物, 中国, cat. No. 7-1502)。齐氏生物提供的 BV2 小胶质细胞是用携带癌基因 v-raf/v-myc 的反转录病毒 J2 感染原代培养的小鼠小胶质细胞而获得的永生细胞系,该细胞系不仅高度纯化,而且基本具备了原代培养的小胶质细胞的形态学、表型以及各项功

能特点,并广泛应用于各项研究^[3]。使用自制加压装置干预体外培养的 BV2 小胶质细胞。30 mmHg (1 mmHg=0.133 kpa) 的压力干预 BV2 小胶质细胞,根据干预时间随机分组包括:对照组、6 h 组、12 h 组、24 h 组;应用不同压力干预 BV2 小胶质细胞 24 h,随机分组包括:对照组、20 mmHg 组、25 mmHg 组和 30 mmHg 组和 35 mmHg 组。

1.3 Western Blot 检测

按总蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白。干预结束后吸弃细胞培养基并用 37 $^{\circ}$ C PBS 漂洗 3 遍;加入总蛋白提取液,冰上静置 15 min,冰上刮取细胞;低温高速离心后取上清即为提取的蛋白。用 BCA 蛋白检测试剂盒,检测蛋白浓度,用组织裂解液把各组蛋白浓度配平到 1 μ g/ μ L。100 $^{\circ}$ C 变性蛋白后按顺序将蛋白样品加入上样孔中,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。结束电泳后,将凝胶中的蛋白通过湿转到 PVDF 膜上;用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h;将 PVDF 膜裁剪后分别放入 IL-1 β 、TNF- α 、 β -actin 抗体工作液中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;第二天室温孵育二抗 1 h 后,ImageQuant LAS 500 显影仪曝光显影,FluorChem 8900 软件分析各条带灰度值。

1.4 免疫荧光检测

制作 BV2 小胶质细胞玻璃爬片,干预结束后吸弃细胞培养基并用 PBS 漂洗;4% 多聚甲醛固定爬片 20 min;5% BSA (含 0.1% Triton X-100) 室温封闭 30 min;加入一抗 TNF- α (1:100)、IL-1 β (1:100)、Iba1 (1:100),4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜;第二天加入二抗 (1:100),室温条件下孵育 1 h;用抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI) 封片;置于荧光显微镜下拍照。

1.5 统计学方法

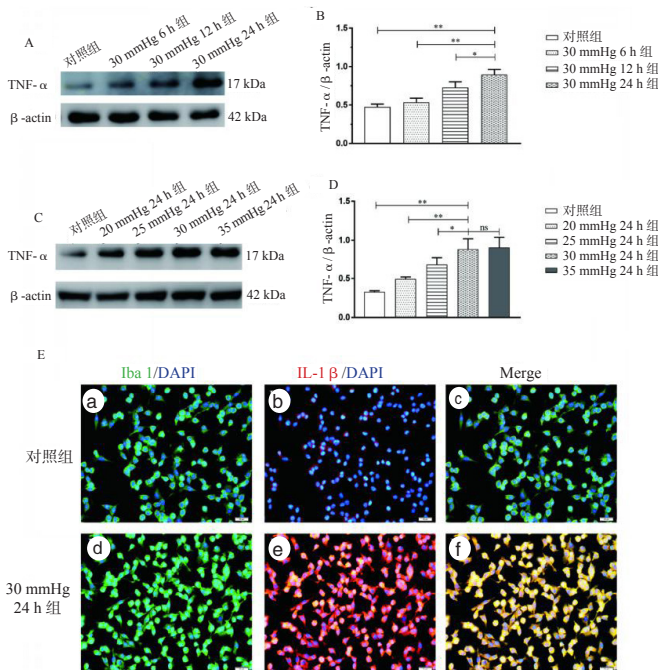
实验数据采用 SPSS 20.0 进行统计分析。数据采用均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。多组数据间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高压上调 BV2 小胶质细胞 TNF- α 的表达

Western Blot 结果显示:30 mmHg 压力处理

BV2 小胶质细胞 24 h 后, TNF- α 的表达明显高于对照组 ($P<0.01$)、6 h 组 ($P<0.01$) 和 12 h 组 ($P<0.05$)。见图 A, B。30 mmHg 组 TNF- α 的表达水平明显高于对照组 ($P<0.01$)、20 mmHg 组 ($P<0.01$)、25 mmHg 组 ($P<0.05$)。30 mmHg 组与 35 mmHg 组比较, TNF- α 的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1C, D。免疫荧光结果显示: 与对照组比较, 30 mmHg 压力处理后 BV2 小胶质细胞红色荧光的表达强度 (TNF- α 的表达) 明显升高。见图 1E。

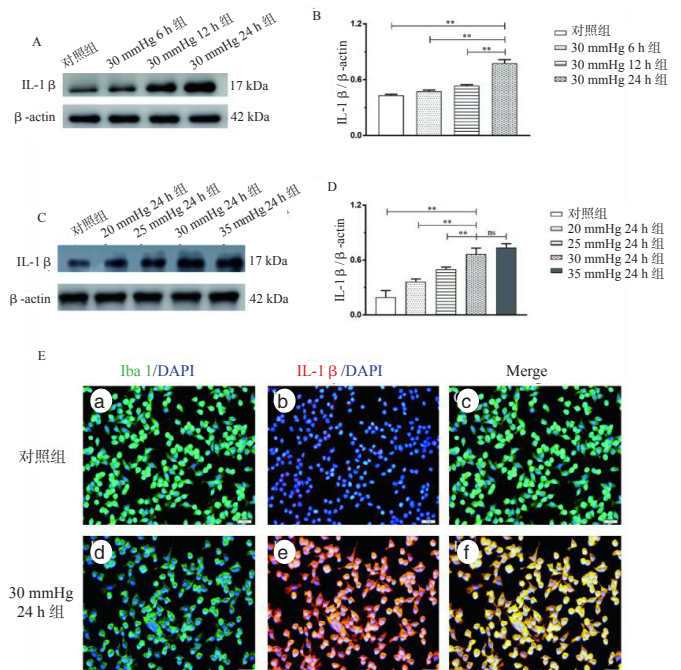


A-D: Western Blot *t* 检测 各组 TNF- α 蛋白表达, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$, $^{ns}P>0.05$; E: Iba1 $^+$ 小胶质细胞 (a, d, 绿色), TNF- α (b, e, 红色), TNF- α 和小胶质细胞的共定位 (c, f); 水平标尺: 10 μ m
图 1 高压上调 BV2 小胶质细胞 TNF- α 的表达 ($n=3$)

Fig 1 High pressure up-regulated TNF- α expression of BV2 microglia

2.2 高压上调 BV2 小胶质细胞 IL-1 β 的表达

Western Blot 结果显示: 30 mmHg 压力处理 BV2 小胶质细胞 24 h 后, IL-1 β 的表达明显高于对照组 ($P<0.01$)、6 h 组 ($P<0.01$) 和 12 h 组 ($P<0.01$)。见图 2A, B。30 mmHg 组 IL-1 β 的表达水平明显高于对照组 ($P<0.01$)、20 mmHg 组 ($P<0.01$)、25 mmHg 组 ($P<0.01$)。30 mmHg 组与 35 mmHg 组比较, IL-1 β 的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 2C, D。免疫荧光结果显示: 与对照组比较, 30 mmHg 压力处理后 BV2 小胶质细胞红色荧光的表达强度 (IL-1 β 的表达) 明显升高。见图 2E。



A-D: Western Blot 检测 各组 IL-1 β 蛋白表达, $^aP<0.01$, $^{ns}P>0.05$; E: Iba1 $^+$ 小胶质细胞 (a, d, 绿色), IL-1 β (b, e, 红色), IL-1 β 和小胶质细胞的共定位 (c, f); 水平标尺: 10 μ m
图 2 高压上调 BV2 小胶质细胞 IL-1 β 的表达 ($n=3$)

Fig 2 High pressure up-regulated IL-1 β expression of BV2 microglia

3 讨论

小胶质细胞被认为是中枢神经系统的巨噬细胞和免疫细胞, 主要参与中枢神经炎症反应的调节, 是导致中枢神经系统二次损伤的重要原因^[1]。在本研究中, 不同压力梯度处理 BV2 小胶质细胞后, 导致其表达 TNF- α 、IL-1 β 明显上调; 30 mmHg 的压力处理 24 h 后 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平达到峰值。在先前的报道中^[4-5], 青光眼诱发的眼内压升高可导致视网膜上的小胶质细胞激活, 伴随着小胶质细胞的增值、形态呈阿米巴状改变、上调 TNF- α 和 IL-1 β 等促炎促炎因子的表达。而且 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平与眼底神经的损伤程度明显相关。这与本研究高压导致体外培养 BV2 小胶质细胞激活, 上调促炎因子表达的结果一致。

报道显示, 细菌结构物质、异常内源性蛋白、细胞因子和物理刺激等均可激活小胶质细胞^[6-9]。小胶质细胞被激活后可上调促炎因子的表达, 加重神经功能损伤^[10-12]。颅内高压是脑出血、脑梗死、颅内肿瘤等基础疾病的继发改变, 但高压力能否作为独立的物理刺激, 直接激活小胶质细胞, 并促进 TNF- α 、IL-1 β 的表达, 尚未见报道。本研究发现,

当体外培养的 BV2 小胶质细胞暴露于高压环境时,其表达促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 的水平明显升高。提示高压可作为独立的危险因素直接激活大脑小胶质细胞,上调促炎因子的表达。可见,颅内压升高后,大脑小胶质细胞的激活、促炎因子的表达上调,是患者中枢神经炎症反应和神经功能损伤的重要原因。此外,本实验的结果亦提示,在一定范围内,压力越高、加压时间越长,BV2 小胶质细胞 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平越高。因此,在临床工作中,积极的颅内压管理有利于控制患者中枢神经系统炎症反应,恢复神经功能。但本实验只揭示了高压可促进体外培养的小胶质细胞促炎因子的表达,具体的信号通路有待进一步研究。

综上所述,小胶质细胞诱导中枢神经炎症反应是颅内高压患者神经功能损伤的重要原因。本研究证实了高压可上调 BV2 小胶质细胞 TNF- α 、IL-1 β 的表达,为颅内高压患者神经功能损伤的防治提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, et al. Origin and differentiation of microglia[J]. *Front Cell Neurosci*, 2013,7:45. DOI : 10.3389/fncel.2013.00045.
- [2] Lynch MA, Piazza A. Neuroinflammatory changes increase the impact of stressors on neuronal function[J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(1): 303-307. DOI : 10.1042/bst0370303.
- [3] Ding HG, Deng YY, Yang RQ, et al. Hypercapnia induces IL-1 β overproduction via activation of NLRP3 inflammasome: implication in cognitive impairment in hypoxemic adult rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):4. DOI : 10.1186/s12974-017-1051-y.
- [4] Gallego BI, Salazar JJ, Hoz RD, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9(1):92. DOI : 10.1186/1742-2094-9-92.
- [5] Gallego B, Salazar JJ, De Hoz R, et al. Microglia in mice retina contralateral to experimental glaucoma exhibit qualitative signs of activation in all retinal layers[J]. *Acta Ophthalmologica*, 2015, 92(s253):0-0. DOI : 10.1111/j.1755-3768.2014.1673.x.
- [6] Yang X, He G, Hao Y, et al. The role of the JAK2-STAT3 pathway in pro-inflammatory responses of EMF-stimulated N9 microglial cells[J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7:54. DOI : 10.1186/1742-2094-7-54.
- [7] Radler ME, Hale MW, Kent S. Calorie restriction attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation in discrete regions of the hypothalamus and the subfornical organ[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 38:13-24. DOI : 10.1016/j.bbi.2013.11.014.
- [8] Jin S, Kim JG, Park JW, et al. Hypothalamic IL2R2 triggers sickness behavior via a microglia-neuronal axis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:29424. DOI : 10.1038/srep29424.
- [9] Hoogland I, Westhoff D, Engelen-Lee JY, et al. Microglial activation after systemic stimulation with lipopolysaccharide and escherichia coli[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12:110. DOI : 10.3389/fncel.2018.00110.
- [10] Kim MJ, Cho JH, Cho JH P, et al. Impact of hyperthermia before and during ischemia-reperfusion on neuronal damage and gliosis in the gerbil hippocampus induced by transient cerebral ischemia[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 348(1/2):101-110. DOI: 10.1016/j.jns.2014.11.015.
- [11] Fismen L, Hjelde A, Svardal AM, et al. Differential effects on nitric oxide synthase, heat shock proteins and dglutathione in human endothelial cells exposed to heat stress and simulated diving[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2012, 112: 2717-2725.
- [12] Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(1):57-69. DOI : 10.1038/nrn2038.

(收稿日期: 2019-08-02)

(本文编辑: 邵菊芳)