

· 基础医学 ·

文章编号: 1002 - 0217(2018) 01 - 0007 - 04

脂多糖对部分神经胶质细胞 NgR 表达的实验研究

王清萍, 张士发

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 儿科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 观察脂多糖诱导早产鼠小胶质细胞和少突胶质前体细胞 NgR 的表达及变化, 了解 NgR 表达在 TLR-4 介导的神经胶质细胞释放炎性细胞因子中的作用。**方法:** 采用振荡和差速贴壁法体外纯化培养 MG 和 OPCs, 分别用特异性抗体 CD11b 和 O4 做细胞鉴定; 用实时荧光定量 PCR 检测各组 MG、OPCs 的 NgR 和 MG 的 TLR-4 基因表达情况, 并用 ELISA 测各组 TNF- α 的含量。**结果:** LPS 诱导后较其他对照组及处理组 MG 的 TLR-4 表达水平和 MG、OPCs 的 NgR 表达水平均增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 各组 MG 经 LPS 诱导后较其对照组及处理组的 TNF- α 的含量增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 细菌感染使 MG 和 OPCs 的 NgR 表达增高; 脂多糖诱导小胶质细胞表达大量 TLR-4 需要 NgR 的介导; TLR-4 可能存在上调 NgR 基因表达的作用。

【关键词】少突胶质前体细胞; 小胶质细胞; Nogo 受体; Toll 样受体 4; 肿瘤坏死因子 α

【中图分类号】R 329 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.01.003

Experimental study on the NgR expression in some glial cells induced by lipopolysaccharide

WANG Qingping, ZHANG Shifa

Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To observe NgR expression and changes in oligodendrocyte precursor cells and microglia cells after induction with lipopolysaccharide (LPS), and explore the role of NgR expression in releasing inflammatory cytokines by glial cells mediated by Toll-like receptor-4 (TLR-4). **Methods:** Microglia (MG) and oligodendrocytes precursor cells (OPCs) were purified and cultured *in vitro* technique by using modified shaking and adherence methods. Immunocytochemical analysis was performed to identify the cultured cells by CD11b and O4 antibody, respectively. Real-time quantitative PCR was used to detect the NgR expression in MG and OPCs as well as TLR-4 in MG, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) content was measured with ELISA in each group. **Results:** The expression of TLR-4 in MG as well as NgR in OPCs and MG in LPS-induced groups were significantly higher than that in control group and intervention group. The difference was significant ($P < 0.05$). TNF- α level in LPS-induced group was significantly higher than that in both control and intervention groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Bacteria infection may facilitated NgR expression in OPCs and MG, and TLR-4 expression in large quantity induced by LPS requires NgR mediation. The findings suggest that TLR-4 could the role to up-regulate the expression of NgR gene.

【Key words】oligodendrocytes precursor cells; microglia; NgR; Toll-like receptor-4; TNF- α

随着围产医学的发展及新生儿重症监护 (neonatal intensive care unit, NICU) 技术的不断提高, 早产儿的出生率和存活率越来越高, 导致早产儿神经系统后遗症^[1] (认知、行为障碍、视听功能异常和脑瘫) 发病率逐年增加, 从而影响早产儿的生存质量, 给家庭社会带来严重的负担。

早产儿和低出生体质量儿脑损伤主要原因是早产儿脑白质损伤 (white matter damage, WMD)^[2]。脑白质主要是由星形胶质细胞、少突胶质细胞和轴突共同组成。少突胶质前体细胞 (oligodendrocytes

precursor cells, OPCs) 对缺氧、炎性介质、谷氨酸毒性等多种损伤较其他阶段的少突胶质细胞敏感, 所以 OPCs 是早产儿 WMD 的关键性靶细胞。在细菌感染时, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 与小胶质细胞 (microglia, MG) 上的特异性受体 TLRs 结合, 使其激活, 被激活的小胶质细胞分泌大量肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、活性氮 (reactive nitrogen species, RNS)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、NO 等免疫应答分子, 直接损伤少突胶质细胞特别

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2013A252)

收稿日期: 2017-09-18

作者简介: 王清萍 (1978-), 女, 住院医师, (电话) 13955384513, (电子信箱) 406090769@qq.com;

张士发, 男, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, (电子信箱) wuhuzhangsf@163.com, 通信作者。

是 OPCs^[3],使脑白质髓鞘化受损,最终髓鞘发育不良。Nogo-A 是在中枢神经系统髓磷脂中发现的一种抑制轴突生长的蛋白,与其受体复合体 NgR 结合,将信号传入细胞内,导致细胞内 Rho/Rho 激酶的活化,调控多种细胞的增殖、分化、凋亡/坏死。最近研究发现,Nogo-A 和 NgR 还存在于中枢神经系统发育阶段的神经前体细胞中,对神经前体细胞分化和神经突触生长及可塑性变化具有调控作用^[5]。感染是否影响 MG 和 OPCs 上的 NgR 表达及炎症因子的释放而引起脑白质的损伤,目前机制尚不明确。本实验采用细胞体外培养,应用脂多糖诱导,观察 NgR 在 MG 和 OPCs 的表达情况及 TLR-4 在 MG 的表达情况,并监测相关炎症因子,初步探讨 NgR 的表达在 TLR-4 介导的神经胶质细胞释放炎性细胞因子中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 健康 5 月龄 SD 孕鼠,SPF 级,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,动物自由进食水。实验主要试剂 CD11b-FITC (Biolegend), O4-PE (美国 R&D 公司),脂多糖(LPS, Biosharp), TLR4 抑制剂 TAK-242(日本 Takeda 制药有限公司),RNA 抽提试剂(Trizol) (Takara 公司),逆转录试剂盒(Takara 公司),TNF- α ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。

1.2 方法

1.2.1 早产 SD 大鼠 OPCs 和 MG 的分离培养和鉴定 取孕 16~17 d 的 SD 大鼠,在颈部皮下注射米非司酮 150 μ g/只诱导早产,在孕 22 d 前出生大鼠为早产鼠,在无菌条件下取早产 SD 大鼠脑皮质,再采用振荡法结合差速贴壁法获取 OPCs 和 MG。分别用特异性抗体 CD11b 和 O4 对 MG 和 OPCs 进行细胞免疫组织化学鉴定。

1.2.2 特异性 NgR shRNA 慢病毒感染 MG 和 OPCs 将(1~2) $\times 10^5$ 个细胞种于 6 孔培养板中。培养 1 d 后将 1 mL 的病毒液加入到 6 孔板中,轻柔混匀,加入 6~8 μ L Polybrene。培养基和病毒等试剂充分混匀后,把细胞板放回培养箱孵育。培养 6~8 h 后观察细胞状态,加入 1 mL 的新鲜培养基。感染 24 h 后更换新鲜的培养基。

1.2.3 共同培养、分组和诱导 取培养 2 d 的 MG 和 OPCs,在 Transwell 共培养系统中进行共培养,将 MG 加入 Transwell 上室,OPCs 加入下室。分别在 Transwell 下室内加入无血清化学条件培养基进行孵育(无血清培养基含有胰岛素、去铁转铁蛋白、bFGF、PDGF)。分组:第 1 组:OPCs 单独培养对照组。

在培养板的每孔加入与对照组 LPS 等量的 DMEM/F12 培养液;第 2 组:OPCs 单独培养诱导组。在培养板的每个孔中加入脂多糖 100 μ g/L;第 3 组:MG 和 OPCs 共同培养对照组。在 Transwell 上室内加入和对照组 LPS 等量的 DMEM/F12 培养液;第 4 组:MG 和 OPCs 共同培养诱导组。在 Transwell 上室内加入脂多糖 100 μ g/L;第 5 组:OPCs 和 MG 共同培养加 TLR-4 抑制剂诱导组。先在上室中加入 100 μ g/L 的 TAK-242,24 h 后再加入脂多糖 100 μ g/L;第 6 组:NgRshRNA 转染 OPCs 共同培养诱导组。将慢病毒转染的 OPCs 细胞置于 Transwell 下室,MG 置于上室共同培养,在上室内加入脂多糖 100 μ g/L;第 7 组:NgRshRNA 转染 MG 单独培养诱导组。将慢病毒转染的 MG 细胞培养液中加入脂多糖 100 μ g/L。加入 LPS 孵育 48 h 后,分别收集各组培养液上清和细胞进行相关检测。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 OPCs、MG 的 NgR 和 MG 的 TLR-4 基因的表达情况

均由上海捷瑞生物工程有限公司合成荧光定量 PCR 需要的 NgR、TLR-4 上下游引物。同时合成内参基因 GAPDH 序列上下游引物 NgR Forward: 5'-CGCATCTCTTTCTGCATGGC-3', Reverse: 5'-GTG-CAAGAGGAGACGGTCAA-3', TLR-4 Forward: 5'-GCTGGTTGCAGAAAATGCCA-3', Reverse: 5'-AGGAGTACCTCTATGCAGGG-3', GAPDH Forward: 5'-ACTTTGGCATCGTGGAAGGG-3', Reverse: 5'-ACTTGGCAGGTTTCTCCAGG-3'。①细胞总 RNA 的提取:按 RNA 提取试剂说明书操作,Trizol 提取总 RNA,所提取 RNA 的 OD260/OD280 值在 1.8~2.0 之间。②RNA 逆转录反应体系和程序:5 \times PrimeScript RT Master Mix 2 μ L + Total RNA 3 μ L + RNase Freed H₂O 7 μ L,逆转录反应条件:37 $^{\circ}$ C, 15 min(逆转录反应);85 $^{\circ}$ C, 5 s(逆转录酶的失活反应)。③聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)反应体系:SYBR Premix Ex TaqTM II (2 \times) 12.5 μ L + PCR Forward Primer (10 μ mol/L) 1 μ L + PCR Reverse Primer(10 μ mol/L) 1 μ L + DNA 模板 2 μ L + ddH₂O 8.5 μ L,预变性(重复 1 次:95 $^{\circ}$ C, 30 s);退火:PCR 反应(重复 40 次,95 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s);溶解。用 real-time PCR 仪(ABI Step One Plus real-time PCR, Bio-Rad)获得目的基因和内参基因 Ct 值。④实验均重复 3 次,结果以 2^{- $\Delta\Delta$ ct} 值反映目的基因 mRNA 的表达水平。

1.2.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 TNF- α 含量 培养细胞 48 h 后,收集上清。按照试剂盒说明

书操作步骤检测细胞分泌 TNF- α 的含量。

1.3 统计学处理 采用统计软件包 SPSS 18.0 进行统计分析,以均数土标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光法观察早产 SD 大鼠的 MG 和 OPCs

在倒置显微镜下观察纯化后的小胶质细胞,呈多态性,其中以圆形、分枝状多见(如图 1)。观察纯化后的少突胶质细胞前体,培养 12 h 左右细胞就开始贴壁生长,培养 3 d 后,细胞胞体呈小圆形,有两个或三个突起(如图 2)。

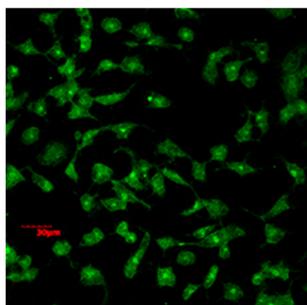


图 1 CD11b-FITC 免疫荧光染色阳性的小胶质细胞

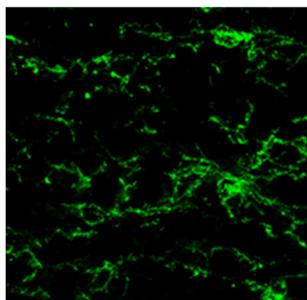


图 2 O4-PE 免疫荧光染色阳性的小胶质前体细胞

2.2 脂多糖刺激和慢病毒干扰后 MG 的 TLR-4 mRNA 的表达情况 结果显示第 4 组 MG 的 TLR-4 mRNA 的表达水平高于第 3、5、7 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),第 7 组与第 3 组差异无统计学意义(表 1)。

表 1 各组中 MG 的 TLR-4 基因 mRNA 的表达强度比较

组别	MG 的 TLR-4 mRNA 表达强度
OPCs 和 MG 共同对照组	0.4005 \pm 0.2384 ^a
OPCs 和 MG 共同培养诱导组	1.2010 \pm 0.3553 ^b
OPCs 和 MG 共同培养加 TLR-4 抑制剂诱导组	0.1023 \pm 0.4543 ^c
NgRShRNA 转染 MG 单独培养诱导组	0.4896 \pm 0.2006 ^a
<i>F</i>	11.54
<i>P</i>	0.03

相同字母组之间比较 $P > 0.05$; 不同字母组之间比较 $P < 0.05$ 。

2.3 各组 TNF- α 的含量情况 结果显示第 4 组 TNF- α 的释放量高于其他 6 组,差异有统计学意义

($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组中 TNF- α 含量的比较

组别	TNF- α 含量 pg/mL
OPCs 单独培养对照组	9.6408 \pm 0.6607 ^a
OPCs 单独培养诱导组	10.6483 \pm 0.3490 ^a
OPCs 和 MG 共同培养对照组	21.7436 \pm 1.6115 ^b
OPCs 和 MG 共同培养诱导组	130.0370 \pm 1.5246 ^c
OPCs 和 MG 共同培养加 TLR-4 抑制剂诱导组	83.6709 \pm 1.9950 ^d
NgRShRNA 转染 OPCs 共同培养诱导组	107.0324 \pm 2.8725 ^e
NgRShRNA 转染 MG 单独培养诱导组	100.5844 \pm 2.9576 ^f
<i>F</i>	2049.22
<i>P</i>	0.00

相同字母组之间比较 $P > 0.05$; 不同字母组之间比较 $P < 0.05$ 。

2.4 脂多糖刺激和慢病毒干扰后小胶质细胞的 NgR mRNA 的表达情况 结果显示第 4 组 MG 的 NgR mRNA 的表达水平低于第 3、5、7 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),第 7 组与第 3 组差异无统计学意义(表 3)。

表 3 各组中 MG 的 NgR 基因 mRNA 的表达强度比较

组别	MG 的 NgR mRNA 的表达强度
OPCs 和 MG 共同培养组	0.1048 \pm 0.0305 ^a
OPCs 和 MG 共同培养诱导组	1.0758 \pm 0.1859 ^b
OPCs 和 MG 共同培养加 TLR-4 抑制剂诱导组	0.4195 \pm 0.1121 ^c
NgRShRNA 转染 MG 单独培养诱导组	0.1145 \pm 0.0441 ^a
<i>F</i>	47.01
<i>P</i>	0.00

相同字母组之间比较 $P > 0.05$; 不同字母组之间比较 $P < 0.05$ 。

2.5 脂多糖刺激和慢病毒干扰后少突胶质细胞前体的 NgR mRNA 的表达情况 结果显示第 2、4、5 组 OPCs 的 NgR mRNA 的表达水平高于第 1、3、6 组,差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 4)。

表 4 各组中 OPCs 的 NgR 基因 mRNA 的表达强度比较

组别	OPCs 的 NgR mRNA 的表达强度
OPCs 单独培养对照组	1.0243 \pm 0.2729 ^a
OPCs 单独培养诱导组	3.2343 \pm 0.4183 ^b
OPCs 和 MG 共同培养对照组	0.4053 \pm 0.1253 ^c
OPCs 和 MG 共同培养诱导组	10.9138 \pm 0.3910 ^d
OPCs 和 MG 共同培养加 TLR-4 抑制剂诱导组	3.8903 \pm 0.4886 ^e
NgRShRNA 转染 OPCs 共同培养诱导组	0.7659 \pm 0.2766 ^a
<i>F</i>	393.03
<i>P</i>	0.00

相同字母组之间比较 $P > 0.05$; 不同字母组之间比较 $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来大量实验研究表明宫内感染是早产儿脑损伤的重要原因^[6],宫内感染引起的早产儿脑损伤可能与多种细胞因子增多有关。LPS 可被 MG/巨噬细胞表面的 TLRs 识别,激活 TLR4-NF- κ B 通路从而引起炎症介质(如 TNF- α)的上调,并释放、分泌一系列免疫应答分子、神经毒性物质产生细胞毒性作用,对脑损伤有重要的作用^[7-8]。TNF- α 是炎症反应的主要因子,也可以引起其他大多细胞因子的释放,并可抑制 OPCs 的分化成熟,还可以诱导凋亡最后引起髓鞘损害和轴突病变,从而导致早产儿脑白质损伤^[9]。

本实验结果显示,LPS 刺激 MG 后,MG 的 TLR-4 mRNA 表达量和 TNF- α 释放量增高,并高于 OPCs 和 MG 共同对照组及 TLR-4 抑制剂处理组。证明 TLR-4 作为脂多糖的特异性受体,参与了 LPS 激活 MG 活化并释放 TNF- α 的过程,TLR-4 抑制剂可以减轻 MG 的炎症反应及对神经细胞的损伤。NgRshRNA 转染 MG 单独培养诱导组 MG 的 TLR-4 mRNA 表达量低于共同培养诱导组,但和共同培养对照组差异无统计学意义。说明脂多糖诱导 MG 表达大量 TLR-4 的需要 NgR 的介导,其具体机制尚需进一步探讨。

研究表明 NgR 还表达于 CNS 中活化的 MG 和巨噬细胞中,调节这些吞噬细胞的运动^[10],这说明 NgR 在神经炎症性反应中也起一定的作用。国内外关于脑白质 OPCs 及 MG 表达 NgR 的文献极少,目前没有发现有关 NgR 与细胞炎症因子之间的关系的研究。唐军等^[11]通过体外培养 OPCs,发现 OPCs 在缺氧缺血造模后 10 min,NgR 的表达量较正常时增高,并随着缺氧缺血时间的延长,NgR 的表达量进行性增高。

本实验结果显示 MG 经 LPS 诱导后,MG 上的 NgR 的 mRNA 和释放的 TNF- α 较共同对照组增高;TLR-4 抑制剂处理组 MG 的 NgR 的 mRNA 的表达量和释放的 TNF- α 较 OPCs 和 MG 共同培养诱导组减少;提示 TLR-4 可能存在上调 NgR 基因表达的作用,具体机制尚不清楚,需进一步研究。NgR 特异性 ShRAN 转染 MG 单独培养诱导组,MG 的 NgR 的表达和共同对照组差异无统计学意义,此组释放的 TNF- α 较共同培养诱导组减少,但没有 TLR-4 抑制剂处理组降低明显。提示 MG 的 NgR 参与了调节炎症细胞因子 TNF- α 的释放。

本实验结果显示 OPCs 单独培养组经 LPS 诱导后,细胞上的 NgR 的 mRNA 较单独对照组增高,但

TNF- α 差异无统计学意义。NgR 特异性 ShRAN 转染 OPCs 共同培养诱导组,OPCs 的 NgR 较共同培养对照组差异无统计学意义,但 TNF- α 释放量较 OPCs 和 MG 共同培养诱导组减低,说明 OPCs 不是免疫细胞,故 OPCs 不能释放炎症细胞因子,但 OPCs 的 NgR 参与了 MG 释放 TNF- α 的调节。

通过细菌感染致脑白质损伤实验性研究的进一步深入,可以为今后国内外脑白质损伤及后遗症的病因研究提供新的思路,并为预防、治疗脑白质损伤提供新的有效的解决方法,从而减少早产儿的病死率及残疾患儿的出生率,减轻社会及家庭的负担。

【参考文献】

- [1] BACK SA, MILLER SP. Brain injury in premature neonates: a primary cerebral dysmaturation disorder [J]? *Ann Neurol*, 2014, 75 (4): 469 - 486.
- [2] MWANIKI MK, ATIENO M, LAWN JE, *et al.* Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review [J]. *Lancet*, 2012, 379(9814): 445 - 452.
- [3] FALAHATI S, BREU M, WAICKMAN AT, *et al.* Ischemia-induced neuroinflammation is associated with disrupted development of oligodendrocyte progenitors in a model of periventricular leukomalacia [J]. *Dev Neurosci*, 2013, 35(2-3): 182 - 196.
- [4] BORRIE SC, BEAUMER BE, BANDTLOW CE. The Nogo-66 receptor family in the intact and diseased CNS [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(1): 105 - 117.
- [5] SCHWAB ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(12): 799 - 811.
- [6] LAN L, TAO J, CHEN A, *et al.* Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(1): 75 - 80.
- [7] KANG BK, KIM MK, KIM SY, *et al.* Anti-neuroinflammatory effects of *Uncaria sinensis* in LPS-stimulated BV2 microglia cells and focal cerebral ischemic mice [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43 (6): 1099 - 1115.
- [8] MIT SOV E, KACE ROVSKYY M, KREJSEK J, *et al.* Umbilical-cord blood soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes [J]. *Ceska Gynekol*, 2013, 78(4): 365 - 372.
- [9] ALMOLDA B, GONZALEZ B, CASTELLANO B. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011, 16: 1157 - 1171.
- [10] FRY EJ, HO C, DAVID S. A role for Nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve [J]. *Neuron*, 2007, 53(5): 649 - 662.
- [11] 唐军,姚裕家,钟琳. NgR 在新生大鼠少突胶质前体细胞系的表达和缺氧缺血后变化的意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(5): 445 - 448.