

溶血磷脂酸对小胶质细胞活化和吞噬功能的影响

付佩彩, 喻志源, 刘淼, 唐荣华, 王伟, 骆翔

【摘要】 目的:观察溶血磷脂酸(LPA)对小胶质细胞活化及其吞噬功能的影响。方法:小胶质细胞系 BV2 细胞复苏后传代培养,取对数生长期细胞分为对照组和 LPA 组,LPA 干预 30 min 后各组加入 FITC 标记的葡聚糖,在干预后 1 h、2 h 后收取细胞,用流式细胞仪测定各孔 FITC-葡聚糖微粒吞噬率及荧光强度。结果:LPA 干预 1 h 时,吞噬率较对照组明显增加($P<0.05$),2 h 时两组细胞吞噬率达到最高值。LPA 干预后 1 h 及 2 h 时,吞噬荧光强度较对照组明显增加($P<0.01$),而且吞噬率与荧光强度的乘积较对照组亦明显增加($P<0.01$)。结论:LPA 可提高 BV2 细胞活化及吞噬功能,提示 LPA 在小胶质细胞活化及吞噬过程中发挥了重要作用。

【关键词】 溶血磷脂酸;小胶质细胞;FITC-葡聚糖;流式细胞术

【中图分类号】 R49;R34 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2012.03.002

Effect of LPA on activation and endocytosis of microglia FU Pei-cai, YU Zhi-yuan, LIU Miao, et al. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective: To observe the effect of lysophosphatidic acid (LPA) on activation and endocytosis of microglia. Methods: BV2 cells in exponential phase were randomly divided into two groups: control group and LPA group. At time points (1 h and 2 h), cells were harvested for later use. FCM was used to detect the phagocytic rate of FITC-dextran and the fluorescence intensity. Results: As compared with control group, the phagocytic rate of FITC-dextran in LPA group was significantly increased at 1 h ($P<0.05$). At 2 h, the phagocytic rate of FITC-dextran reached the peak in both two groups. At time points (1 h and 2 h), as compared with control group, the fluorescence intensity in LPA group was increased ($P<0.01$) and the product of phagocytic rate and fluorescence intensity in LPA group was significantly higher than that of control group ($P<0.01$). Conclusion: LPA can promote activation and endocytosis of microglia *in vitro*, suggesting the roles of LPA in activation and endocytosis of microglia.

【Key words】 LPA; microglia; FITC-dextran; FCM

小胶质细胞为 CNS 原位免疫细胞,在 CNS 损伤后,小胶质细胞被迅速募集到损伤区域,分泌炎症因子促进组织进一步损伤^[1],同时活化的小胶质细胞吞噬死亡细胞及髓磷脂碎片,表现出促进组织损伤恢复的功能。溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)为类生长因子的脂类信号分子,与 CNS 损伤密切相关,它既是反应 CNS 受损程度的预警因子,也可作为致病因子促进 CNS 进一步损伤^[2]。本研究采用 LPA 对小胶质细胞系 BV2 细胞进行干预,检测 BV2 细胞活化及

吞噬功能改变,以探讨 LPA 在 CNS 损伤中对小胶质细胞活化和吞噬功能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 BV2 细胞系(华中科技大学同济医学院提供),DMEM/高糖培养基、胎牛血清(购自美国 Hyclone 公司),胰蛋白酶(购自美国 GIBCO 公司),多聚赖氨酸、LPA、异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(FITC-葡聚糖, NM = 40000)和 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(购自美国 sigma 公司),小鼠抗 Iba1(购自美国 Wako 公司),CY3 标记羊抗兔 IgG(购自美国 Jackson 公司)。

1.2 方法 ① BV2 细胞复苏及传代培养:液氮冻存的 BV2 细胞,37 °C 迅速复苏后用含 10% 胎牛血清的

基金项目:国家自然科学基金项目(81000521,81030021)

收稿日期:2011-12-16

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科,武汉 430030

作者简介:付佩彩(1987-),女,硕士研究生,主要从事胶质细胞和脊髓损伤方面的研究。

通讯作者:骆翔,副教授。

DMEM/高糖培养基培养,当细胞达到90%融合时用0.25%胰酶消化细胞后传代培养。②分组:调整BV2细胞悬液中细胞密度为 1×10^6 /ml,接种于多聚赖氨酸(0.1mg/ml)包被过的6孔板中,于37℃5%CO₂培养箱培养24h后,细胞处于对数生长期(70%融合)应用于实验。其中对照组在实验开始时换用新鲜培养基,LPA组换用含10 μM LPA的新鲜培养基,LPA加入30 min后各组加入FITC-葡聚糖(1.0 mg/ml),避光培养1及2 h后用于检测,实验同时设置不含荧光微粒组,以作为流式细胞仪检测时阴性对照。③流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测BV2细胞吞噬FITC-葡聚糖变化:干预1 h、2 h后,弃上层培养基,PBS清洗后胰酶消化细胞,含血清的培养基中和后离心1000转×5 min,弃上层液体,PBS重悬清洗两遍后,细胞沉淀溶于200 μl PBS溶液。FCM检测BV2细胞吞噬FITC-葡聚糖的吞噬率及荧光强度。吞噬率表示吞噬荧光微粒的细胞数占总细胞数的百分比;荧光强度表示吞噬荧光微粒的细胞平均含荧光微粒的多少;两者的乘积为平均每个细胞所含的荧光强度,即平均荧光强度。

1.3 统计学方法 采用SPSS 10.0统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

传代培养的BV2细胞贴壁后呈梭形,至细胞生长呈80%融合,突起明显增多延长。将BV2细胞做Iba1免疫荧光染色,证明传代培养的BV2细胞表达小胶质细胞特异性抗原Iba1。见图1 a~c。

PA干预BV2细胞1 h时,吞噬FITC-葡聚糖的吞噬率较对照组明显增加,2 h时2组细胞吞噬率达到最高值(M=98%),2组间差异无统计学意义。LPA干预后1 h及2 h时,吞噬荧光强度较对照组明显增加,而且吞噬率与荧光强度的乘积(即平均荧光强度)较对照组亦明显增加。见图2 a~b,3 a~c。

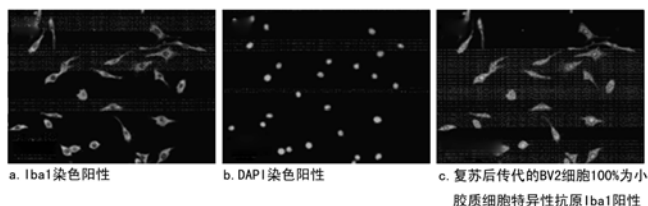


图1 a~c BV2细胞的小胶质细胞特性鉴定(×400)

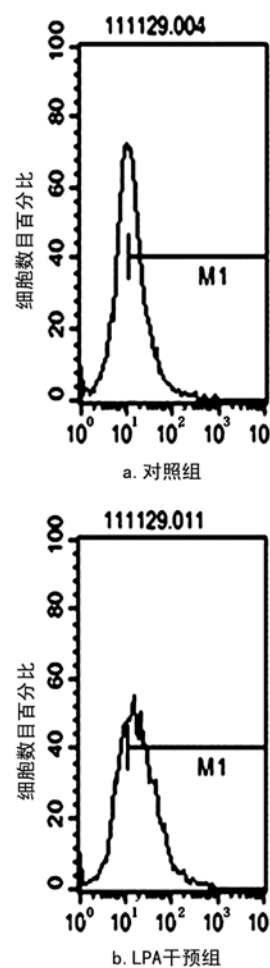
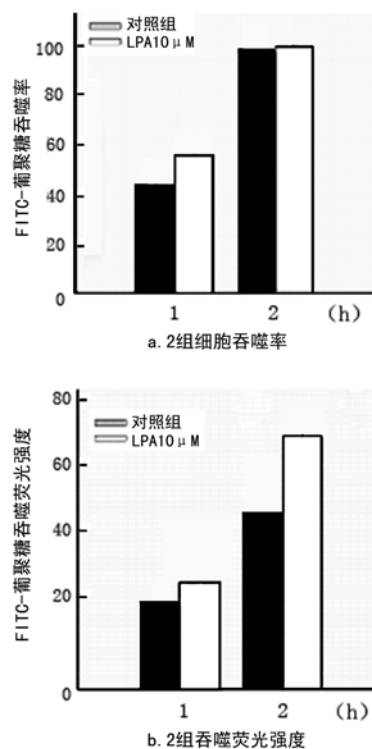


图2 a~b LPA干预后1h时2组BV2细胞吞噬FITC-葡聚糖百分比及荧光强度比较



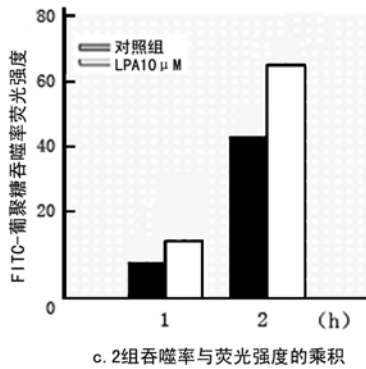


图3 a~c LPA干预后1h和2h时2组细胞吞噬率、荧光强度以及吞噬率与荧光强度的乘积比较

3 讨论

小胶质细胞是主要的免疫细胞,对 CNS 损伤具有双重作用,活化的小胶质细胞可吞噬死亡细胞碎片,限制炎症病灶扩大^[3-4],并且分泌小胶质细胞源性神经营养因子,对 CNS 损伤起到保护作用^[5-6],但过度活化的小胶质细胞亦可导致神经损伤^[7],其主要利弊及具体机制仍未完全明确。LPA 是血清中的正常组分之一,炎症细胞、神经细胞、血小板、损伤细胞和内皮细胞受到各种刺激后均可生成,通过内分泌和旁/自分泌的方式释放,在 CNS 受损后可反映血小板活化程度,与 CNS 损伤关系密切,但其机制未明确^[3-4]。本研究通过细胞吞噬率和荧光强度来反映小胶质细胞系 BV2 细胞吞噬功能,结果显示在 1 h 时 LPA 组吞噬率及荧光强度均明显高于对照组;在 2 h 时 2 组吞噬率均达到峰值,2 组间差异无统计学意义,但此时 LPA 组荧光强度明显高于对照组,同时 1 和 2 h 时 LPA 组平均荧光强度均明显高于对照组。由此可见,LPA 加快小胶质细胞系 BV2 细胞吞噬荧光微粒速度,促进荧光强度显著提高,即 LPA 促进小胶质细胞系 BV2 细胞吞噬功能的增强。

已知 LPA 为 Rho 的非特异性激动剂,可通过 G12/13 蛋白激活 Rho/ROCK 信号通路^[8]。CNS 中小胶质细胞表达 Rho/ROCK^[9],在外周损伤的研究中,亦显示 Rho/ROCK 信号通路参与巨噬细胞吞噬、迁移及炎性分泌作用^[10]。Rho/ROCK 信号通路主要生理功能为调节细胞骨架蛋白的合成、降解、移动和收缩,并在影响细胞分泌和增殖等方面起到重要作用。因此,我们推测 LPA 促进小胶质细胞吞噬功能可能是

通过激活 Rho/ROCK 通路所致。

本研究结果提示 LPA 促进小胶质细胞的吞噬功能,可能对组织损伤恢复起到有利作用,小胶质细胞的活化机制及其调控方法为进一步了解 CNS 损伤后 LPA 的作用提供了实验依据。

【参考文献】

- [1] Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, et al. The P2Y12 receptor regulates microglia activation by extracellular nucleotides[J]. *Nature Neurosci*, 2006, 9(12):1512-1519.
- [2] Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92(6):1086-1094.
- [3] Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, et al. Role of microglia in the central nervous system's immune response[J]. *Neurol Res*, 2005, 27(7):685-691.
- [4] Chan CC. Inflammation: beneficial or detrimental after spinal cord injury[J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2008, 3(3):189-199.
- [5] Iannotti C, Ping ZY, Shields CB, et al. A neuroprotective role of glial cell line-derived neurotrophic factor following moderate spinal cord contusion injury[J]. *Exp Neurol*, 2004, 189(2):317-332.
- [6] Namiki J, Kojima A, Tator CH. Effect of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 on functional recovery and regeneration after spinal cord injury in adult rats[J]. *J Neurotrauma*, 2000, 17(12):1219-1231.
- [7] Gonzalez R, Glaser J, Liu MT, et al. Reducing inflammation decreases secondary degeneration and functional deficit after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2003, 184(1):456-463.
- [8] Kyoko N, Deron H, Tetsuji M. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors[J]. *Neurosciences*, 2009, 9(1):15-23.
- [9] Ryousuke F, Yan M, Hiroshi U. Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and brain-derived neurotrophic factor gene expression are mediated by ATP release in primary microglia [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2008, 107(1):152-160.
- [10] Elizabeth JF, Carole H, Samuel D. A role for nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve[J]. *Neuron*, 2007, 53(5):649-662.