

# 鹅去氧胆酸抗脂多糖诱导的BV2小胶质细胞炎症反应作用及机制研究

杨金鸽<sup>1,2</sup> 唐婷婷<sup>3</sup>

1. 江西医学高等专科学校 医学美容教研室 江西 上饶 334000

2. 上饶市中心医院 医学美容科 整形外科 江西 上饶 334000

3. 天津爱丽诺整形美容医院皮肤科 天津 300000

**摘要:** **目的:** 探究鹅去氧胆酸抗脂多糖诱导的BV2小胶质细胞炎症反应作用及机制,旨在为相关人员的研究工作提供参考资料。**方法:** 实验于25~100 μmol/L CDCA预处理BV2细胞2小时,在此之后利用200 μg/L LPS处理,时间为22h,经Griess法测定NO,经Western blot检测COX-2和iNOS蛋白,经RT-PCR分析TNF-α、IL-6、IL-1β和TGR5 mRNA。应用Western blot,开展1hLPS处理后的NF-κB、IκBα和Akt磷酸化水平检测,免疫荧光用于观察NF-κB核内转移。**结果:** 相较于对照组,模型组的NO含量显著升高,COX-2和iNOS蛋白表达增强,TNF-α、IL-6和IL-1β mRNA上调,TGR5 mRNA表达表现出了降低趋势,其主要伴随NF-κB信号通路的激活。CDCA处理有效逆转上述变化,应用该法能够在极大程度上降低炎症因子表达量以及NO含量,抑制NF-κB信号通路激活,上调TGR5 mRNA。**结论:** CDCA能对LPS诱导的BV2细胞的炎症反应进行有效抑制,其作用机制可能与激活TGR5、抑制Akt/NF-κB通路激活有关。

**关键词:** 小胶质细胞; 鹅去氧胆酸; 神经炎症

在中枢神经系统中,小胶质细胞是关键的免疫细胞,对维持大脑稳态和调节神经损伤反应至关重要<sup>[1]</sup>。LPS与多种神经退行性疾病相关,能对小胶质细胞进行诱导产生炎症反应,但过度炎症可能使疾病加剧<sup>[2]</sup>。作为一种具有抗炎和神经保护作用的胆汁酸,CDCA能对免疫反应和代谢途径进行调节,但其对小胶质细胞炎症反应的具体影响和机制尚需进一步研究。本研究旨在针对CDCA对LPS诱导的BV2小胶质细胞炎症反应的作用及其潜在机制开展深入性分析,详情如下。

## 1 试剂和仪器

选用由Sigma和大连美仑提供的CDCA、LPS和Dex,将其配制为储备液后稀释使用。DMSO、磺胺、盐酸萘乙二胺及磷酸由Sigma和国药集团提供。DMEM培养基和胎牛血清由大连美仑和Gibco供应。一抗和二抗由CST公司提供,PCR引物由上海捷瑞提供。实验设备包括Thermo的超净台和细胞培养箱,Sonics的超声破碎仪,Olympus的显微镜,跃进医疗的恒温水浴锅,以及Applied Biosystems的实时定量PCR仪。

### 1.1 方法

BV2细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,密度为 $1.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,24孔板每孔接种500 μL,培养过

夜。分组包括正常对照、LPS处理、CDCA和Dex与LPS联合处理组。非对照组预处理2小时后,用LPS培养22小时。细胞形态通过显微镜观察记录。NO含量通过Griess试剂测定,依据 $\text{NaNO}_2$ 标准曲线计算。COX-2和iNOS蛋白水平通过Western印迹法测定,Tanon Image软件分析。TNF-α、IL-6、IL-1β和TGR5 mRNA水平通过qPCR测定,GAPDH标准化。NF-κB、IκBα和Akt蛋白磷酸化水平同样通过Western印迹法测定。NF-κB分布通过免疫荧光染色和荧光显微镜观察。

### 1.2 统计学原理

采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用t检验;计数资料以率(%)表示,采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 鹅去氧胆酸抑制LPS诱导的BV2细胞NO产生

相较于对照组,BV2细胞培养基中NO含量会因LPS而显著增加( $P < 0.01$ )。LPS诱导的NO含量经由CDCA(25、50、100 μmol/L)和Dex的处理而显著降低( $P < 0.01$ ),由此表明,对于LPS诱导的NO产生,CDCA具有抑制效应。

表1 CDCA对LPS诱导的BV2细胞培养中一氧化氮(NO)产生的影响

组别	浓度	一氧化氮(NO)产生量( $\mu\text{mol/L}^{-1}$ )
正常对照组	0 μmol/L	1.00±0.15

**课题:** 江西省教育厅科学技术研究课题

编号: GJJ2205806

续表:

组别	浓度	一氧化氮 (NO) 产生量 ( $\mu\text{mol/L}^{-1}$ )
LPS组	-	16.48+0.35**
LPS+CDCA 25组	25 $\mu\text{mol/L}$	10.83+0.37 <sup>##</sup>
LPS+CDCA 50组	50 $\mu\text{mol/L}$	9.21+0.25 <sup>##</sup>
LPS+CDCA 100组	100 $\mu\text{mol/L}$	6.28+0.51 <sup>##</sup>
LPS+地塞米松组	-	7.46+0.27 <sup>##</sup>

备注: \*\*  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , 与LPS处理组比较。

### 2.2 鹅去氧胆酸对BV2细胞形态变化的影响

在正常生理条件下, BV2小胶质细胞表现为分枝形态。细胞形态因LPS刺激导致转变为圆形阿米巴状。经CDCA (25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和Dex处理后, 细胞形态部分恢复至分枝状, 暗示CDCA可能对LPS诱导的细胞形态改变能够产生抑制作用。

### 2.3 鹅去氧胆酸对BV2细胞TGR5 mRNA表达的影响

实验结果表明, LPS处理使BV2细胞中TGR5 mRNA的表达得到显著降低 ( $P < 0.01$ )。CDCA (25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 能使TGR5 mRNA水平得到显著增加 ( $P < 0.01$ ), 而Dex对TGR5 mRNA表达无显著影响。这提示CDCA可能通过对TGR5 mRNA表达的促进, 进而对BV2细胞的免疫反应进行调节。

详细见表2。

表2 鹅去氧胆酸对BV2细胞TGR5 mRNA表达的影响

组别	TGR5 mRNA表达值 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
正常对照组	1.00±0.27
LPS组	0.25±0.05**
LPS+CDCA 25组	0.59±0.05 <sup>##</sup>
LPS+CDCA 50组	0.66±0.13 <sup>##</sup>
LPS+CDCA 100组	0.62±0.09 <sup>##</sup>
LPS+地塞米松组	0.40±0.08

备注: \*\*  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , 与LPS处理组比较。

### 2.4 鹅去氧胆酸抑制LPS诱导的BV2细胞中COX-2和iNOS蛋白表达

实验结果表明, 相较于对照组, BV2细胞中COX-2和iNOS蛋白的表达经由LPS处理得到显著增加 ( $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ )。LPS诱导的COX-2和iNOS蛋白表达经由CDCA (25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和Dex处理得到显著降低 ( $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ ), 由此提示CDCA具有抗炎作用。

### 2.5 鹅去氧胆酸对BV2细胞信号蛋白磷酸化的影响

BV2细胞中NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$ 和Akt的磷酸化水平经由LPS处理得到显著提升 ( $P < 0.01$ )。CDCA (25-100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和Dex能使这些蛋白的磷酸化得到显著降低, 特别是

在50和100  $\mu\text{mol/L}$  CDCA及Dex处理组中, I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化水平的降低更为显著 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 暗示通过干预信号传导途径, CDCA可能对炎症反应具有抑制作用。

### 2.6 鹅去氧胆酸抑制LPS诱导的BV2细胞NF- $\kappa$ B核转位

免疫荧光分析显示, 对照组BV2细胞中NF- $\kappa$ B主要位于细胞质。NF- $\kappa$ B因LPS处理导致转移至细胞核。CDCA (25-100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和Dex处理使NF- $\kappa$ B主要保持在细胞质中, 由此表明, LPS诱导的NF- $\kappa$ B核转位能够通过CDCA得到减少。

### 2.7 鹅去氧胆酸降低LPS诱导的BV2细胞促炎因子mRNA表达

qPCR结果表明, LPS诱导使TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$  mRNA水平得到了显著增加 ( $P < 0.01$ )。CDCA (25-100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和Dex处理能够使这些mRNA水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 由此暗示CDCA具有抗炎潜力。

表3 鹅去氧胆酸降低LPS诱导的BV2细胞促炎因子mRNA表达

组别	TNF- $\alpha$ mRNA表达	IL-6 mRNA表达	IL-1 $\beta$ mRNA表达
正常对照组	1.00±0.23	1.00±0.29	1.00±0.37
LPS组	25.16±4.03**	393.8±50.02**	42.92±5.22**
LPS+CDCA 25组	11.07±1.61 <sup>##</sup>	186.73±15.83 <sup>##</sup>	15.54±4.94 <sup>##</sup>
LPS+CDCA 50组	13.03±1.67 <sup>##</sup>	174.78±5.31 <sup>##</sup>	8.89±2.84 <sup>##</sup>
LPS+CDCA 100组	10.34±2.16 <sup>##</sup>	151.98±21.86 <sup>##</sup>	11.13±1.46 <sup>##</sup>
LPS+Dex组	6.41±1.89**	84.99±11.31 <sup>##</sup>	0.72±0.15 <sup>##</sup>

备注: \*\*  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , 与LPS处理组比较。

## 3 讨论

BV2细胞中NO的释放和iNOS蛋白表达能够通过CDCA被显著抑制, 令氧化应激损伤得以减少, 并降低COX-2蛋白表达, 减少前列腺素合成, 对CDCA减轻炎症反应的潜力给予了证实。在mRNA水平, CDCA减少TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 等促炎因子表达, 阻断炎症信号传导。通过影响NF- $\kappa$ B信号通路中的关键分子, 如抑制NF- $\kappa$ B核转位和Akt激活, CDCA可能发挥抗炎作用。同时, 通过上调TGR5表达, CDCA可能会激活其抗炎通路, 对LPS诱导的BV2细胞激活产生抑制效果。这些发现表明, 通过对关键信号通路的调节, CDCA能够对炎症反应进行抑制<sup>[3]</sup>。

作为中枢神经系统 (CNS) 的关键防线, 小胶质细胞负责维持大脑稳态和响应损伤。其参与突触修剪和神经元功能调节, 在病理条件下, 其激活能发挥免疫防御作用。通过如TLRs等感应受体, 小胶质细胞对外来货损伤信号急性识别并响应, 激活后迁移至损伤或感染部位, 释放炎症介质, 包括促炎和抗炎因子。小胶质细胞

激活初期能够为病原体的清除和组织修复提供帮助,但过度或持续激活可能导致神经损伤。其会与血脑屏障(BBB)的内皮细胞产生相互作用,参与BBB的维护,炎症状态下可能会对BBB的完整性造成影响,使神经炎症得到加剧<sup>[4]</sup>。在神经炎症中,小胶质细胞具有双重作用,既是保护者也是潜在的破坏者。

作为一种有效的先天免疫诱导剂,LPS常用于通过激活小胶质细胞来对神经炎症进行模拟。本研究中,LPS用于诱导BV2小胶质细胞产生炎症反应,进而对CDCA的抗炎活性进行评估。实验显示,CDCA能够对LPS诱导的促炎因子表达产生显著的抑制作用,降低NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平,以及iNOS和COX-2蛋白表达,这使CDCA的抗炎潜力得到了证实。LPS诱导的BV2细胞模型为CDCA抗炎机制的理解和新治疗策略的开发提供了重要工具<sup>[5]</sup>。

通过上调TGR5 mRNA表达,CDCA可能会对TGR5介导的抗炎通路进行激活,从而发挥抗神经炎症作用。作为一种G蛋白偶联受体,已知在调节代谢和抑制NF- $\kappa$ B信号通路中,TGR5扮演重要角色,有助于促进抗炎因子如IL-10的产生。学者们认为,对于炎症疾病的治疗,TGR5是有前景的靶点,CDCA的这一作用机制提供给抗感染治疗新的策略和分子靶点<sup>[6-7]</sup>。

综上所述,CDCA能对LPS诱导的BV2细胞的炎症

反应进行有效抑制,其作用机制可能与激活TGR5、抑制Akt/NF- $\kappa$ B通路激活有关。

#### 参考文献

- [1]朱晗.熊胆粉及其胆汁酸成分抗脂多糖诱导的小胶质细胞炎症作用及机制研究[D].上海中医药大学,2020.
- [2]王俊力,邵卫,杨运等.脂多糖通过TLR4-MyD88信号通路诱导BV2小胶质细胞激活模型的建立[J].华中科技大学学报(医学版),2020,49(01):45-49.
- [3]唐相龙. LOC339524基因在脂多糖诱导BV2小胶质细胞炎症反应中的作用及机制研究[D].中国人民解放军陆军军医大学,2019.
- [4]李培锋,关红,赵红霞等.鹅去氧胆酸的平喘及抗炎作用机理研究[J].中国中药杂志,2004(04):65-68.
- [5]胡志娟,任路平,王超等.鹅去氧胆酸对高果糖喂养致大鼠脂质肾毒性中纤维化、炎症和氧化应激的影响[J].中国老年学杂志,2014,34(11):3088-3091.
- [6]李磊,刘畅,毛伟等.牛磺鹅去氧胆酸对糖皮质激素受体的激活作用[J].动物医学进展,2019,40(07):82-86.
- [7]R. Gill, Timothy V Gabor et al. The MYC-Associated Protein CDCA7 Is Phosphorylated by AKT To Regulate MYC-Dependent Apoptosis and Transformation[J]. Molecular and Cellular Biology :2012. 498 - 513.