

IL-6 促进小鼠小胶质细胞系 BV2 坏死性凋亡

郑建滨, 吴少华*, 黄玉景

宁德师范学院附属宁德市医院 麻醉科, 福建 宁德 352100

摘要:目的 探究在神经炎症反应中小胶质细胞凋亡的调控机制。方法 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠小胶质细胞系 BV2, 构建神经炎症反应细胞模型, 使用白介素-6(IL-6)拮抗剂塞妥昔单抗(siltuximab)处理 LPS 诱导的 BV2 细胞。CCK-8 法检测细胞增殖; 流式细胞测量术检测细胞凋亡; ELISA 检测 IL-6 与 TNF- α 含量; RT-qPCR 检测 BV2 细胞 M1 极化标志物 IL-1 β 、IFN- γ 与 M2 极化标志物 CD206、Arg-1 表达; Western blot 检测 JAK-STAT3 信号通路关键蛋白及坏死性凋亡相关蛋白(RIP1)和 RIP3 表达。**结果** LPS 诱导后 BV2 细胞的增殖活力下降, 凋亡增加, 炎症因子 IL-6 与 TNF- α 含量增加($P<0.01$)。M1 极化标志物 IL-1 β 、IFN- γ 表达增加($P<0.01$), M2 极化标志物 CD206、Arg-1 表达减少($P<0.01$)。JAK-STAT3 通路关键蛋白磷酸化增加($P<0.01$), RIP1、RIP3 蛋白表达增加($P<0.01$)。IL-6 拮抗剂 siltuximab 处理细胞后, JAK-STAT3 通路关键蛋白磷酸化减少($P<0.01$), RIP1、RIP3 蛋白减少($P<0.01$)。**结论** 在神经炎症反应中 IL-6 可能激活 JAK-STAT3 信号通路促进小鼠小胶质细胞的坏死性凋亡。

关键词: 神经炎症反应; 坏死性凋亡; 小胶质细胞; 脂多糖; 塞妥昔单抗

中图分类号: R614 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.10.1562

IL-6 promotes necrotic apoptosis of mouse microglia cell line BV2

ZHENG Jianbin, WU Shaohua*, HUANG Yujing

Department of Anesthesiology, Ningde Municipal Hospital of Ningde Normal University, Ningde 352100, China

Abstract: Objective To explore the regulatory mechanism of microglia apoptosis in neuroinflammation. **Methods** LPS was used to establish mouse microglia cell line BV2 cells as a neuroinflammatory microglia model, IL-6 antagonist siltuximab was applied to treat LPS-induced BV2 cells. CCK-8 was used to detect the proliferation of cells. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. ELISA kit was used to detect the content of pro-inflammatory related factors IL-6 and TNF- α . The expression of M1 polarization markers IL-1 β , IFN- γ and M2 polarization markers CD206, Arg-1 in BV2 cell was detected by qRT-PCR. The expression of JAK-STAT3 signaling pathway key proteins and necroptosis related proteins RIP1 and RIP3 was detected by Western blot. **Results** After LPS induction, the proliferation of BV2 cells decreased, apoptosis increased, and the contents of inflammatory factors IL-6 and TNF- α increased ($P<0.01$). The expression of M1 polarization markers IL-1 β and IFN- γ increased, and the expression of M2 polarization markers CD206 and Arg-1 decreased ($P<0.01$). The phosphorylation of JAK-STAT3 key protein increased, and the relative protein expression of RIP1 and RIP3 ($P<0.01$). After treatment with IL-6 antagonist siltuximab, phosphorylation of JAK-STAT3 key proteins decreased, and RIP1 and RIP3 protein decreased ($P<0.01$). **Conclusions** IL-6 may activate JAK-STAT3 signaling pathway to promote necroptosis of mouse microglia in neuroinflammation.

Key words: neuroinflammation; necroptosis; microglia; lipopolysaccharide; siltuximab

收稿日期: 2022-10-26 修回日期: 2023-05-11

基金项目: 宁德师范学院校级专项资助计划(2022Y1004)

* 通信作者(corresponding author): 379876379@qq.com

神经炎性反应常导致神经损伤和死亡,并驱动多种神经退行性疾病(如阿尔茨海默病和帕金森病)的进展和恶化,以及视网膜变性^[1],因此调控神经炎性反应成为神经退行性疾病的一种有希望的策略,因为它有可能阻止神经损伤的持续发生。

小胶质细胞存在于脑和脊髓中,参与中枢神经系统的炎性反应过程^[2],并且在体内平衡和疾病的交叉路口发挥细胞毒性和细胞保护作用^[3-5]。脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的M1小胶质细胞通过产生促炎介质来增强炎性反应^[3]。坏死性凋亡是一种会引发炎性反应的坏死细胞死亡的形式,活化的小胶质细胞/巨噬细胞也诱导慢性炎性反应部位的坏死性凋亡,从而形成正反馈环^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞:小鼠小胶质细胞系 BV2(中国典型培养物保藏中心)。

1.1.2 试剂:RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司),LPS (Sigma-Aldrich 公司),IL-6 拮抗剂 siltuximab(Selleck Chemicals 公司),CCK-8 反应试剂(碧云天生物技术公司),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),PrimerScript RT Master Mix,SYBR Premix Ex Taq (Takara 公司),BCA 蛋白质测定试剂盒与 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher Scientific 公司)。蛋白抗体(p-STAT3、STAT3、p-JAK、JAK、RIP1、RIP3、GAPDH 一抗和羊抗兔二抗 IgG)(Abcam公司)。

1.2 方法

1.2.1 BV2 细胞的分组与处理:BV2 细胞培养于 RPMI 1640 培养基添加 10% 胎牛血清的培养其中,每 24 h 更换 1 次培养基,当达到 70%~80%汇合时,

对细胞进行传代培养或冷冻保存。为建立小胶质细胞神经炎性反应体外模型,使用 1 μg/mL LPS 处理 BV2 细胞 24 h,进一步使用 1 μg/mL 的 IL-6 拮抗剂 siltuximab 处理细胞 24 h^[5]。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖:将细胞接种到 96 孔板中(3×10³ 个细胞/孔)并在 37 ℃ 下培养。分别培养 0、24、48 和 72 h 后,向每个孔中加入 10 μL CCK-8 反应试剂。37 ℃ 孵育 4 h 后,检测 450 nm 处的吸光度,绘制细胞增殖曲线。

1.2.3 流式细胞测量术检测细胞凋亡:调整细胞浓度为 5×10⁸/L,加入 5 μL annexin V-APC and 5 μL 7-AAD,在室温避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.4 RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平:按照说明书,使用 Trizol 试剂从培养的细胞中分离出总 RNA。用 PrimerScript RT Master Mix 将 1 μg RNA 反转录为 cDNA。然后根据说明书用 SYBR Premix Ex Taq 在 ABI 7500 上进行 RT-qPCR 实验,Gapdh 作为内参,通过 2^{-ΔΔCt}^[6] 法分别计算基因的相对表达量。PCR 引物(表 1)。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达水平:提取各组细胞蛋白,按 BCA 蛋白质测定试剂盒说明书测定蛋白质浓度,将提取的蛋白加入上样缓冲液,95 ℃ 煮 10 min,每个蛋白样本分别取 30 μg 经聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳电压 80 V 转 120 V;湿转,转 PVDF 膜电压 100 mV,时间 45~70 min;5% BSA 室温封闭 1 h,4 ℃ 与一抗孵育过夜。TBST 漂洗 3 次,辣根过氧化物酶结合的二抗,常温孵育 1 h,TBST 充分洗涤后以 ECL 法显色,Bio-OAdGelEZ 成像仪显影。目的条带采用 Image J 软件进行吸光度值分析。一抗:p-STAT3 (1 : 1 000); STAT3 (1 : 1 000); p-JAK (1 : 1 000); JAK (1 : 1 000); RIP1(1 : 1 000);

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequence of RT-qPCR

gene	forward(5'-3')	reverse(5'-3')
IL-1β	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
Ifn-γ	TGAACGCTACACACTGCATCTTGG	CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG
Cd206	CTTCGGGCCTTTGGAATAAT	TAGAAGAGCCCTTGGGTTGA
Arg-1	CTTGCTTGCTTCGGAAGCTC	GGAGAAGGCGTTTGCTTAGTTC
Gapdh	ATGACCACAGTCCATGCCATC	GAGCTTCCCGTTTCAGCTCTG

RIP3(1 : 1 000);GAPDH(1 : 1 000)。二抗:羊抗兔 IgG(1 : 5 000)。以目的蛋白/内参蛋白吸光度比值的 $\bar{x}\pm s$ 来表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析,GraphPad Prism 8.0 软件进行图片制作。经 Shapiro-Wilk 检验数据呈正态分布,数据均采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组之间的比较采用 One-way Anova 方差分析,事后检验采用 Tukey's multiple comparisons test。*P* 为双侧检验。

2 结果

2.1 LPS 诱导建立小胶质细胞炎症反应模型

LPS 诱导后,BV2 细胞的增殖活力显著降低($P<0.01$)(图 1A),而 BV2 细胞凋亡显著增加($P<0.01$)(图 1B)。此外,促炎因子 IL-6 与 TNF- α 均含量增加($P<0.01$)(图 1C)。

2.2 LPS 诱导小胶质细胞 M1 极化

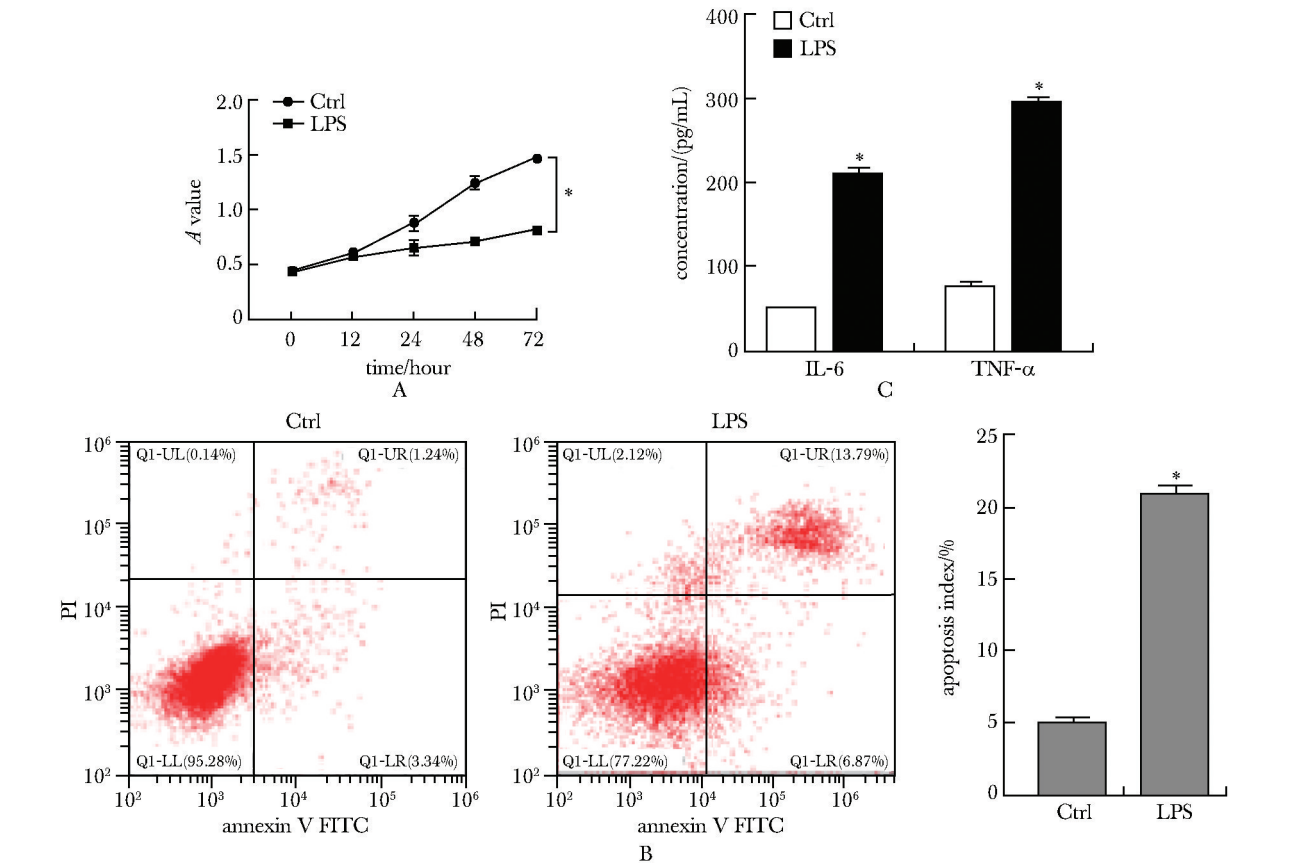
LPS 诱导后,M1 极化标志物 IL-1 β 和 IFN- γ 表达上调,而 M2 极化标志物 CD206 和 Arg-1 表达下调($P<0.01$)(图 2)。

2.3 IL-6 激活 JAK-STAT3 通路调节神经炎症反应中小胶质细胞坏死性凋亡

LPS 诱导促进了 JAK-STAT3 信号通路的磷酸化,上调坏死性凋亡相关蛋白 RIP1 和 RIP3($P<0.01$);但使用 IL-6 拮抗剂塞妥昔单抗处理后,上述蛋白表达变化均被部分逆转($P<0.01$)(图 3)。

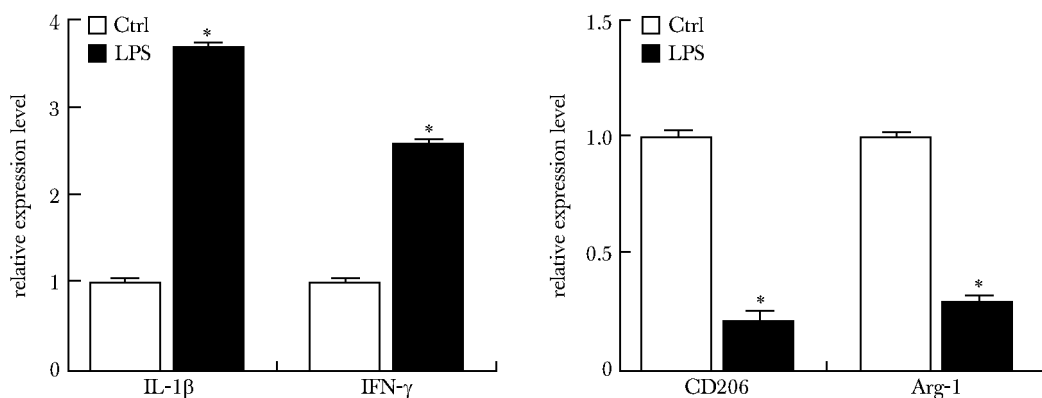
3 讨论

与其他中枢神经系统的细胞不同,小胶质细胞来源于卵黄囊中的造血干细胞,是对中枢神经系统病原体或损伤做出反应的初级细胞。类似于巨噬细胞,小胶质细胞可极化为 M1 表型(例如被 LPS 诱导)以产生促炎介质^[7]。相反,抗炎细胞因子



A. the cell proliferation was detected by CCK-8 assay; B. flow cytometry was used to detect cell apoptosis; C. ELISA assay was used to detect the content of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α ; * $P<0.01$ compared with Ctrl.

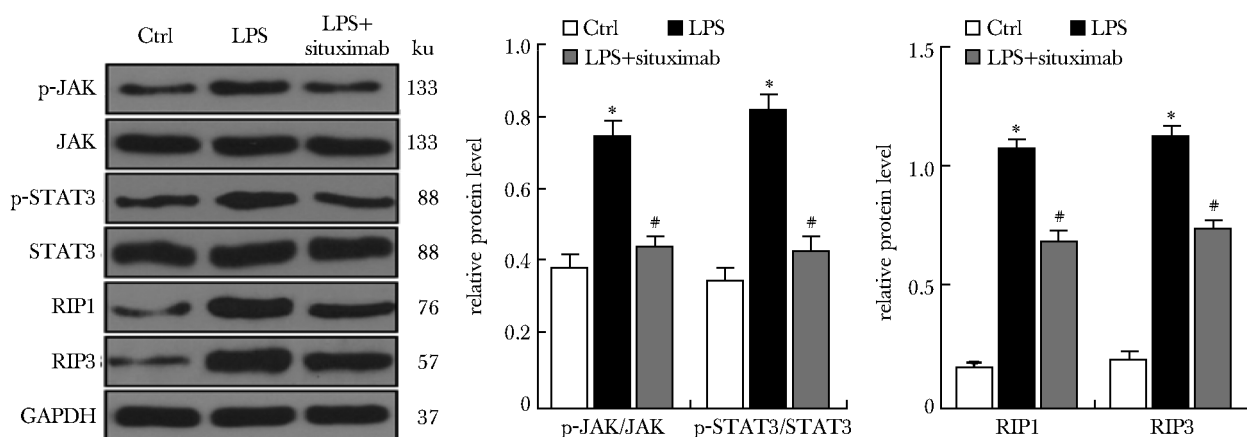
图1 LPS 诱导建立小胶质细胞炎症反应模型
Fig 1 LPS-induced microglial inflammation model ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



The expression of M1 polarization markers IL-1β and IFN-γ and M2 polarization markers CD206 and Arg-1 in BV2 cells was detected by RT-qPCR ($\bar{x} \pm s, n = 3$); * $P < 0.01$ LPS compared with Ctrl.

图2 LPS 诱导小胶质细胞 M1 极化

Fig 2 LPS induced microglia M1 polarization ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



LPS-induced BV2 cells were treated with IL-6 antagonist siltuximab, and the phosphorylation of key proteins in the JAK-STAT3 pathway and the expression of necroptosis-related proteins RIP1 and RIP3 were detected by Western blot; * $P < 0.01$ compared with Ctrl; # $P < 0.01$ compared with LPS.

图3 IL-6 激活 JAK-STAT3 通路调节神经炎症反应中小胶质细胞坏死性凋亡

Fig 3 IL-6 activated JAK-STAT3 pathway to regulate necroptosis of microglia in neuroinflammatory response ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IL-4 在鼠卒中模型中引起保护性 M2 小胶质细胞群的形成^[8]。控制小胶质细胞的 M1/M2 极化的介质有望调节神经炎症反应。

在神经炎症反应条件下,小胶质细胞释放炎症细胞因子,如 TNF-α、IL-6 和 IL-1β,导致神经炎症反应患者的突触功能障碍和神经元死亡^[9]。IL-6 是神经血管功能障碍、神经退行性变和(或)神经炎症反应的重要介质。JAK/STAT3 的早期激活主要由小胶质细胞中的 IL-6 诱导,并有助于疾病的发展^[10]。STAT3 是 JAK/STAT 信号家族的成

员,在中枢神经系统中表达,其活性磷酸化形式在中枢神经系统损伤后上调,并参与小胶质细胞炎症反应^[10]。这与本实验中所探究的结果相一致。

坏死细胞的死亡也可以是一个受调控的过程,这就是所谓的坏死性凋亡^[11]。坏死性凋亡由含坏死体的受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1, RIP1)、RIP3 和混合谱系激酶结构域样蛋白 (MLKL) 介导。在某些病理条件下,RIP1 将被激活,并通过 RIP 同型相互作用基序 (RIP homotypic interaction motif, RHIM) 与

RIP3 结合,形成淀粉样蛋白复合物,称为复合物 IIb。复合物 IIb 中活化的 RIP3 进一步磷酸化下游分子 MLKL,在质膜上形成寡聚体和聚集体,通过质膜破裂和细胞溶解引起坏死性凋亡。随后,大量的细胞内容物如损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 被释放,引起继发性炎症反应加重组织损伤^[12-13]。而

本研究观察到拮抗 IL-6 后,可以抑制小胶质细胞的坏死性凋亡。

本研究仅仅只在细胞层面探究了 IL-6 介导的 JAK/STAT3 通路可以影响小胶质细胞的坏死性凋亡。在今后研究中,将进一步在动物实验中验证该通路调控机制,以期为临床上小胶质细胞相关疾病的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] 高凡凯,薛国芳. 神经炎症作为癫痫发生中治疗靶点及生物标志物的研究进展[J]. 脑与神经疾病杂志, 2022, 30: 526-529.
- [2] 顾艳兰,赵思远,陆秋霞,等. 小鼠小胶质细胞内 SENP3 介导的神经炎症在创伤性脑损伤中的作用机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38: 1161-1168.
- [3] Lian L, Zhang Y, Liu L, *et al.* Neuroinflammation in ischemic stroke: focus on microRNA-mediated polarization of microglia[J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 13: 612439.doi: 10.3389/fnmol.2020.612439.
- [4] Tao Y, Murakami Y, Vavvas D G, *et al.* Necroptosis and neuroinflammation in retinal degeneration [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 911430. doi: 10.3389/fnins.2022.911430.
- [5] Nguyen PL, Bui BP, Duong M, *et al.* Suppression of LPS-induced inflammation and cell migration by azelastine through inhibition of JNK/NF- κ B pathway in BV2 microglial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22.doi: 10.3390/ijms22169061.
- [6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($-\Delta\Delta C_T$) Method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [7] Saijo K, Glass C K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 775-787.
- [8] Zhao X, Wang H, Sun G, *et al.* Neuronal interleukin-4 as a modulator of microglial pathways and ischemic brain damage[J]. *J Neurosci*, 2015, 35: 11281-11291.
- [9] Liu TW, Chen CM, Chang KH. Biomarker of neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23.doi: 10.3390/ijms23084148.
- [10] Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, *et al.* TNF- α -sensitive brain pericytes activate microglia by releasing IL-6 through cooperation between I κ B-NF κ B and JAK-STAT3 pathways [J]. *Brain Res*, 2018, 1692: 34-44.
- [11] Yu Z, Jiang N, Su W, *et al.* Necroptosis: a novel pathway in neuroinflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 701564.doi: 10.3389/fphar.2021.701564.
- [12] Sun L, Wang H, Wang Z, *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase[J]. *Cell*, 2012, 148: 213-227.
- [13] Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, *et al.* MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates [J]. *Cell Rep*, 2014, 7: 971-981.