

CysLT2 受体拮抗剂 HAMI3379 抑制 LPS 诱导小鼠小胶质瘤细胞系的炎症反应

顾胜龙¹, 李明星¹, 应苗法¹, 方三华², 饶跃峰^{3*}, 赵蕊^{1*}

(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 药剂科, 浙江 杭州 310016; 2. 浙江大学医学院 公共技术平台, 浙江 杭州 310058; 3. 浙江大学医学院附属第一医院 药剂科, 浙江 杭州 310003)

摘要:目的 探究半胱氨酰白三烯 2 (CysLT2) 受体拮抗剂 HAMI3379 对 LPS 诱导小鼠小胶质细胞 (BV-2) 炎症反应的调控作用及其可能的作用机制。方法 体外培养 BV-2, 将 BV-2 分为对照组、LPS (100 ng/mL) 组、HAMI3379 (0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/mL}$) 组和 LPS+HAMI3379 组。CCK-8 法检测 BV-2 细胞的增殖; ELISA 检测细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 的含量; Western-blot 检测 PKC α 、IKB α 、NF- κ B p50 和 p65 蛋白的表达。结果 LPS 能够激活 BV-2 细胞, 促进其细胞的增殖 ($P < 0.05$); 显著增加细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的分泌, 减少 IL-10 的分泌 ($P < 0.05$); 且显著上调 PKC α 、IKB α 、p65 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$)。CysLT2 受体拮抗剂 HAMI3379 能够显著减轻上述变化 ($P < 0.05$)。结论 CysLT2 受体拮抗剂 HAMI3379 能够抑制 LPS 激活 BV-2 细胞, 抑制炎症反应, 其作用机制可能与抑制 PKC α /NF- κ B 信号通路有关。

关键词: CysLT2 受体; HAMI3379; 炎症反应; PKC α /NF- κ B 信号通路

中图分类号: R966 文献标志码: A

CysLT2 receptor antagonist HAMI3379 inhibits LPS-induced inflammation in mice microglia line BV-2

GU Sheng-long¹, LI Ming-xing¹, YING Miao-fa¹, FANG San-hua², RAO Yue-feng^{3*}, ZHAO Rui^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016; 2. Core Facilities, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058; 3. Department of Pharmacy, the first Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

Abstract: Objective To investigate the role and possible mechanism of CysLT2 receptor antagonist HAMI3379 on the inflammatory response of mouse microglia (BV-2) induced by LPS. **Methods** BV-2 cells were divided into control group, LPS (100 ng/mL) group, HAMI3379 (0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{mol/mL}$) group and LPS+HAMI3379 group. The proliferation of BV-2 cells was detected by CCK-8 assay. The contents of cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-10 were measured by ELISA assay. Western blot was used to detect the expression of PKC α , IKB α , NF- κ B p50 and p65 protein. **Results** LPS significantly induced the activation of BV-2 cells and promoted proliferation of cells ($P < 0.05$). The secretion of inflammatory factors IL-1 β and TNF- α was significantly increased and the secretion of

收稿日期: 2019-03-22 修回日期: 2019-07-04

基金项目: 国家自然科学基金 (81872213); 浙江省自然科学基金 (LYY19H310010); 浙江省公益技术应用研究计划 (2016C33131)

* 通信作者 (corresponding author): 3201039@zju.edu.cn; raoyf@zju.edu.cn

IL-10 was obviously reduced in cell supernatant ($P < 0.05$). The expression of PKC α , IKB α and p65 proteins were significantly up-regulated ($P < 0.05$). The CysLT2 receptor antagonist HAMI3379 was able to reduce these changes.

Conclusions The CysLT2 receptor antagonist HAMI3379 may inhibit the activation of BV-2 cells induced by LPS and reduce the inflammatory response, and the possible mechanism is related to the inhibition of PKC α /NF- κ B signaling pathway.

Key words: CysLT2 receptor; HAMI3379; inflammation; PKC α /NF- κ B signaling pathway

脑缺血损伤是一个复杂的病理生理过程,在脑血管病中,缺血性脑损伤约占 80%,其发病率高、致残率高和病死率高的特点,与心脏病、肿瘤构成人类的三大致死病因,严重影响着人类的健康和生质量^[1]。常见的发病机制包括能量代谢障碍、细胞内钙超载、兴奋氨基酸毒性、氧化应激损伤、炎性反应及神经细胞凋亡等^[2-3]。小胶质细胞的活化在脑缺血损伤后细胞免疫及炎性反应过程中扮演着重要的作用,活化的小胶质细胞释放大量的炎性因子、NO 及过氧化物,导致神经元的凋亡,凋亡的神经元细胞能够激活小胶质细胞,引起炎性反应的恶性循环发生^[4]。

5-脂氧酶产物半胱氨酰白三烯 (Cysteinyl leukotriene, CysLT) 是一类重要的炎性介质,在外周和中枢均具有调节免疫、炎性反应及组织的修复作用。研究发现,在大鼠局灶性脑缺血损伤后,CysLT1 和 CysLT2 表达增加,CysLT1 受体拮抗剂孟鲁司特 (montelukast)、普鲁司特 (pranlukast) 能够抑制 CysLT1 的表达,减轻炎性反应及神经元损伤,改善脑缺血损伤^[5-6]。另有研究发现,采用 100 ng/mL LPS 处理 BV-2 细胞 24 h,CysLT2 的表达显著上调,诱导炎性反应的发生及神经元的损伤^[7]。目前,已出现的 CysLT2 受体拮抗剂较少,选择性拮抗剂 HAMI3379 对炎性反应的调控及作用机制仍不明确。本研究主要探究 CysLT2 受体抑制剂 HAMI3379 对 LPS 诱导小胶质细胞炎性反应的调控作用及其可能的作用机制,以期将来脑缺血损伤治疗药物的开发提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂: CysLT2 受体抑制剂 HAMI3379 (Cayman 公司); LPS (Sigma Aldrich 公司); DMEM 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (Dojindo 公司); 小鼠 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 ELISA 试剂盒 (酶免

试剂盒商城); BCA 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); Iba1 抗体 (Novus 生物制品公司); PKC α 、IKB α 、NF- κ B p50 和 p65、 β -actin 抗体 (Proteintech 公司)。

1.1.2 细胞: 小鼠小胶质瘤细胞系 BV-2 (上海泽叶生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养与分组: 于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于含有 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养 BV-2 细胞;待细胞贴壁培养 24 h 后,更换成含有 LPS 的完全培养基继续培养 24 h 或 HAMI3379 预培养 30 min。将 BV-2 分为 6 组: 对照组、LPS (100 ng/mL) 组、HAMI3379 (0.01、0.1 和 1 μ mol/mL) 组、LPS+ HAMI3379 组。

1.2.2 免疫荧光染色鉴定 BV-2 细胞: 将 BV-2 细胞接种至 24 孔板,进行细胞爬片,置于恒温培养箱中培养 24 h,弃去培养基,PBS 洗 2 次,向各孔加入 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min,弃去固定液,PBS 洗 3 次;加入 0.5% Triton-X100 室温透化 30 min,弃去透化液,PBS 洗 3 次;加入 10% 驴血清封闭 30 min,去封闭液,加入 Iba1 山羊多克隆抗体 (1:300),4 °C 过夜孵育;加入 Cy3 标记的驴抗山羊 II 抗,37 °C 恒温培养箱中孵育 1 h;DAPI 染核液避光复染 15 min,将盖玻片置于载玻片上,封片,荧光倒置显微镜拍照观察。

1.2.3 CCK-8 法检测 BV-2 细胞的增殖率: 取对数增殖期的 BV-2 细胞制成细胞悬液,调整细胞浓度并接种至 96 孔板,5 \times 10³ 个/孔,置于培养箱中贴壁培养 24 h;换成不含胎牛血清的 DMEM 培养 16~18 h,然后按照实验分组,加入 HAMI3379 预培养 30 min,换成含有 LPS 的培养基继续培养 24 h;待培养结束,向各孔加 10 μ L 的 CCK-8 溶液,置于培养箱中孵育 1 h,用酶标仪测量各孔在 450 nm 处的吸光度 A 值,并计算细胞的增殖率。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

1.2.4 ELISA 检测 BV-2 细胞上清液中细胞因子的水平:取对数增殖期的 BV-2 细胞接种至 6 孔板, 5×10^4 个/孔, 置于培养箱中贴壁培养 24 h; 加入 HAMI3379 预培养 30 min, 换成含有 LPS 培养基继续培养 24 h; 收集细胞上清液, $1\ 500\ \text{r/min}$ 离心 15 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行试验, 检测上清液中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10 的含量。

1.2.5 Western-blot 检测 PKC α 、IKB α 、NF- κ B p50 和 p65 蛋白的表达:取对数增殖期的 BV-2 细胞接种至 6 孔板, 5×10^4 个/孔, 置于培养箱中贴壁培养 24 h; 加药处理 24 h; 待培养结束后, 收集细胞, 加入 RIPA 液裂解细胞, $14\ 000\ \text{r/min}$ 离心 10 min; 取上清液, BCA 试剂盒测量蛋白的浓度, 取 30 μg 蛋白液与上样缓冲液(4 : 1)混合, 10%的 SDS-PAGE 分离蛋白, 采用湿法转膜将目标蛋白转移到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭 2 h, 孵育 PKC α 、IKB α 、p50、p65、 β -actin(1 : 1 000)兔多克隆抗体(1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 II 抗, 室温孵育 1 h, ECL 法化学发光; 采用 Image J 软件对蛋白条带进行

吸光度值分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计学分析。所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。

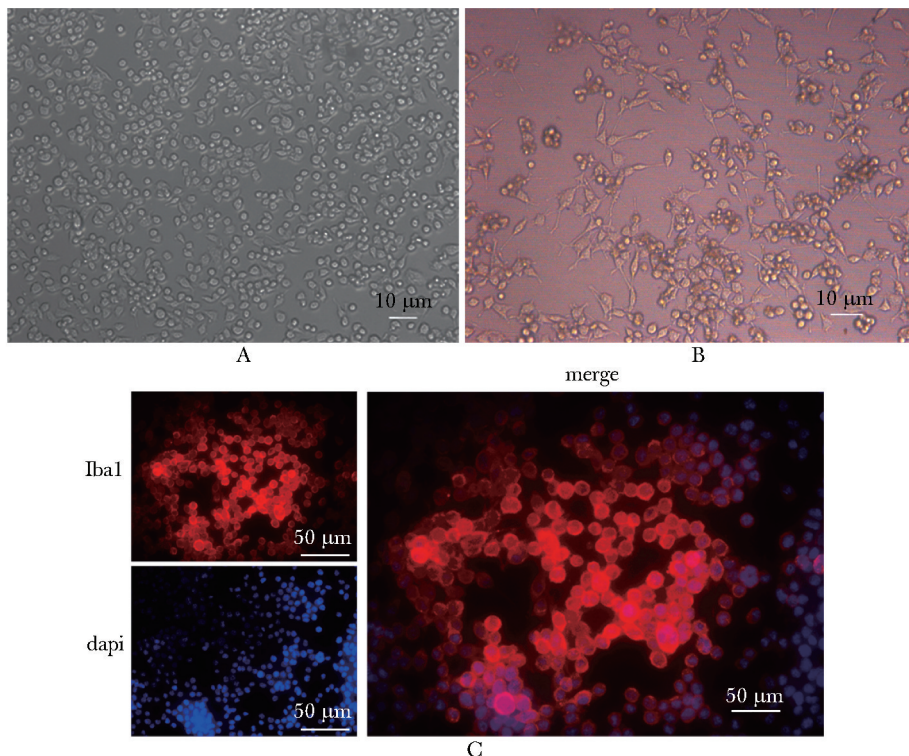
2 结果

2.1 BV-2 细胞的培养及鉴定

BV-2 细胞贴壁后, 少部分呈分支状(图 1A); BV-2 细胞经 LPS 激活后胞体变大变圆, 轴突增加, 呈阿米巴样(图 1B); 用小胶质细胞特异的 Iba1 抗体进行荧光染色, 在荧光倒置显微镜下观察, 细胞质呈红色荧光, 细胞核被染成蓝色(图 1C)。

2.2 HAMI3379 对 LPS 诱导 BV-2 细胞增殖的影响

与对照组相比, LPS 能够显著增加 BV-2 细胞的增殖率($P < 0.05$); 与 LPS 组相比, 用 HAMI3379 预处理 BV-2 细胞 30 min 后, 细胞的增殖率显著降低($P < 0.05$), LPS+ HAMI3379 (1 $\mu\text{g/mL}$) 对 BV-2 细胞增殖抑制作用最大(表 1)。



A. morphology of adherent culture of BV-2 cells; B. morphology when BV-2 cells were activated; C. morphology of BV-2 cells were observed by immunofluorescence staining

图 1 BV-2 细胞的形态学观察和免疫鉴定

Fig 1 Morphological observation and immunological identification of BV-2 cells

表 1 LPS 和 HAMI3379 对 BV-2 细胞增殖的影响
Table 1 Effect of LPS and HAMI3379 on the proliferation of BV-2($\bar{x}\pm s$, %, $n=5$)

group	proliferation rate
control	1.000
LPS(100 ng/mL)	1.722±0.206*
HAMI3379(0.01 μg/mL)	1.011±0.138 [#]
HAMI3379(0.1 μg/mL)	0.985±0.201 [#]
HAMI3379(1 μg/mL)	1.143±0.083 [#]
LPS+ HAMI3379(0.01 μg/mL)	1.062±0.065 [#]
LPS+ HAMI3379(0.01 μg/mL)	0.857±0.135 [#]
LPS+ HAMI3379(1 μg/mL)	0.658±0.069* [#]

* $P<0.05$ compared with control group; [#] $P<0.05$ compared with LPS group.

2.3 HAMI3379 对细胞上清液中炎症因子含量的影响

与对照组相比, LPS 能够显著增加细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 的含量, 降低 IL-10 的含量 ($P<0.05$); 1 μ g/mL HAMI3379 能够显著降低 IL-1 β 的含量 ($P<0.05$)。与 LPS 组相比, LPS+ HAMI3379 组 IL-1 β 、TNF- α 的含量显著降低, IL-10 的含量显著增加 ($P<0.05$) (图 2)。

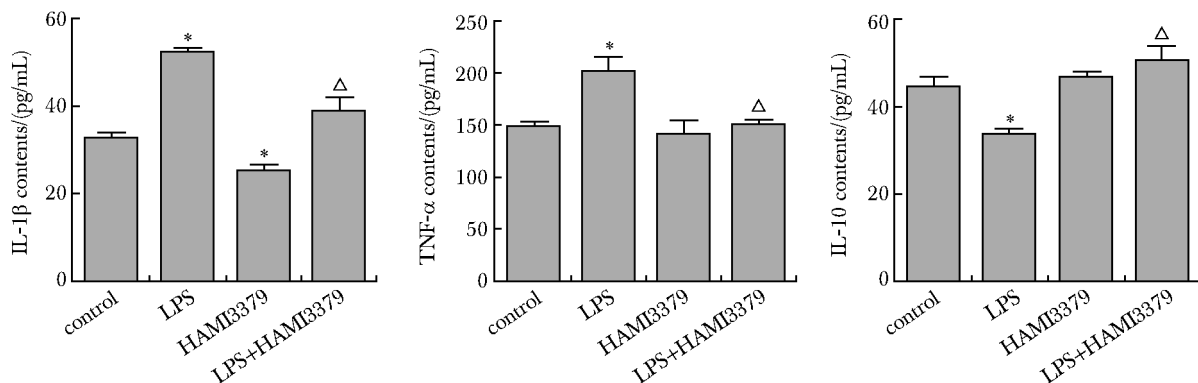
2.4 HAMI3379 对 LPS 诱导 BV-2 细胞中 PKC α 、IKB α 、NF- κ B p50、p65 蛋白表达水平的影响

与对照组相比, LPS 能够显著上调 PKC α 、IKB α 、p65 蛋白的表达 ($P<0.05$), 但对 p50 蛋白的表达无显著性改变; 与 LPS 组相比, HAMI3379+LPS

组 PKC α 、IKB α 、p50 和 p65 蛋白的表达水平均显著降低 ($P<0.05$) (图 3)。

3 讨论

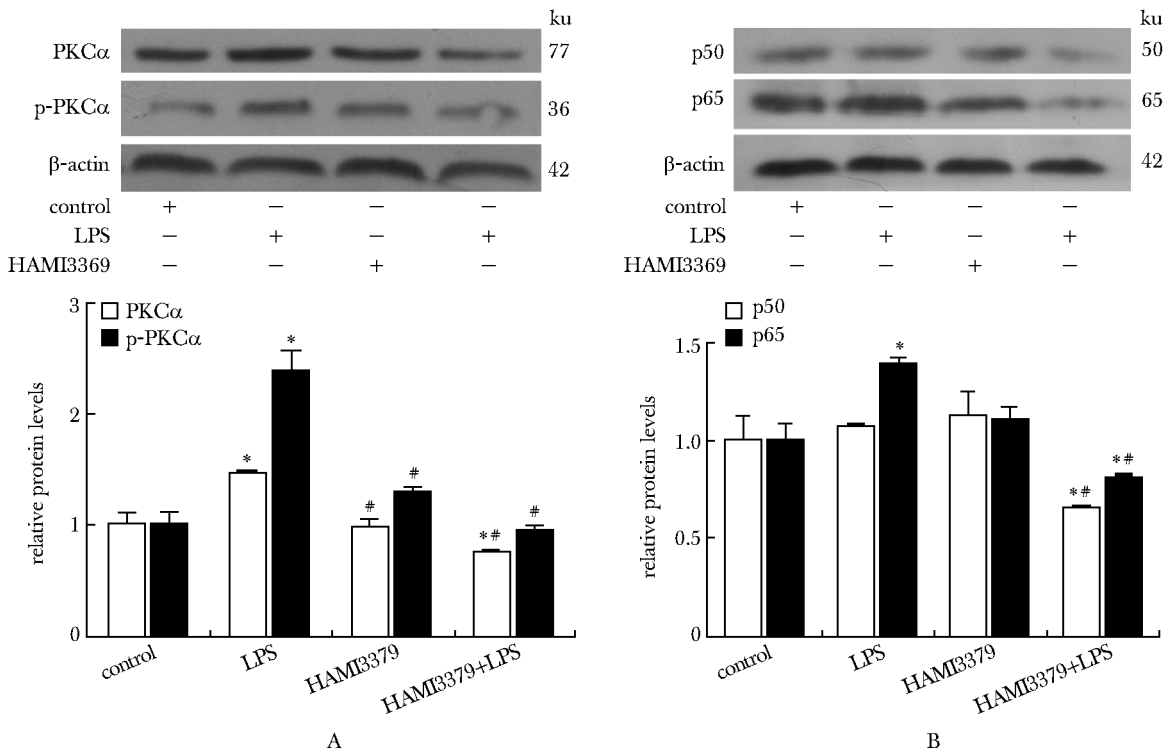
正常情况下, 小胶质细胞呈分枝状, 细长的突起感受周围微环境变化, 通过免疫监视、突触修剪及产生神经营养因子如 BDNF、IGF-1 调控神经元的分化和凋亡, 维持中枢神经系统动态平衡。在脑缺血损伤后, 小胶质细胞迅速活化, 由分枝状变成阿米巴样, 向损伤的中心区迁移, 且释放大量的炎症因子如白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 及细胞间细胞黏附分子 (intercellular cell adhesion molecule, ICAM) 等, 诱导炎症反应的发生, 引起神经元的凋亡^[8]。在该研究中, 发现 LPS 刺激 BV-2 细胞 24 h 后, 小胶质细胞的形态变为阿米巴样, 呈激活状态。已有的研究发现, 核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 等信号通路参与了脑缺血损伤的发生过程^[9]。NF- κ B 是脑缺血损伤后炎症反应发生的关键因子, 脑缺血损伤发生后, NF- κ B 信号被激活并转移至细胞核, 促进 ICAM 的表达及介导炎症因子的分泌。另有研究发现, LPS 能够诱导 BV-2 细胞的激活, 茴香醇通过下调 NF- κ B 和 JNK 信号通路, 抑制 BV-2 细胞的活化, 产生抗炎作用^[10]。



* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with LPS group

图 2 HAMI3379 对细胞上清液中细胞因子释放的影响

Fig 2 Effect of HAMI3379 on the release of cytokines in the supernatant($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



A. the relative protein levels of PKC α and p-PKC α ; B. the relative protein levels of p50 and p65; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with LPS group

图3 HAMI3379 对 BV-2 细胞中 PKC α 、IKB α 、p50 和 p65 蛋白的表达水平的影响

Fig 3 Effect of HAMI3379 on the expression levels of PKC α , IKB α , p50 and p65 proteins in BV-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

已有的研究证实, CysLT2 受体介导了脑缺血损伤后炎症反应及神经损伤的调控。在氧和葡萄糖剥夺的星形胶质细胞中, CysLT1 和 CysLT2 受体表达上调, CysLT1 受体促进细胞的增殖, CysLT2 受体介导细胞的凋亡^[11]。另外, LPS 与受体作用会诱导炎症反应的发生; 在 LPS 刺激的 BV-2 细胞中, CysLT2 受体的表达上调并转移至细胞核, 促进炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的释放, 诱导神经元的凋亡, 沉默 CysLT2 能够逆转此结果^[7]。在 MACO 法构建大鼠脑缺血损伤模型中, 腹腔注射 CysLT2 拮抗剂 HAMI3379 能够减轻脑梗死体积, 抑制炎症因子的释放, 减轻神经元的损伤^[12]。

本研究发现, LPS 能够刺激 BV-2 细胞的活化, 促进细胞的增殖, 细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 的含量显著增加, 炎症和免疫抑制因子 IL-10 的分泌显

著降低, 且 PKC α 、IKB α 和 p65 的表达也显著增加; 采用 CysLT2 受体拮抗剂 HAMI3379 单独处理 BV-2 细胞, 细胞因子 TNF- α 、IL-10 的含量及 p50、p65 的表达改变均无统计学意义, 但 IL-1 β 的含量显著降低; HAMI3379 预处理 BV-2 细胞 30 min, 再用 LPS 处理 BV-2 细胞 24 h, HAMI3379 能够显著抑制 LPS 诱导的细胞增殖, 抑制细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的分泌, 抗炎因子 IL-10 的分泌增加, 且抑制 PKC α 、IKB α 、p50、p65 蛋白的表达; 由此可知, LPS 通过活化 PKC α /NF- κ B 信号通路, 促进炎症因子的释放, 诱导炎症反应。

综上所述, HAMI3379 能够抑制 LPS 诱导的小胶质细胞增殖, 抑制促炎因子的释放; 其作用机制是 HAMI3379 通过抑制 PKC α /NF- κ B 信号通路的活化, 抑制 LPS 与其受体的相互作用, 发挥抗炎作用。

参考文献:

- [1] van Sloten TT, Stehouwer CDA. Carotid Stiffness: a novel cerebrovascular disease risk factor[J]. *Pulse*, 2016, 4: 24-27.
- [2] Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire[J]. *Neurol Sci*, 2012, 33: 223-237.
- [3] Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2002, 35: 67-86.
- [4] Patel AR, Ritzel R, McCullough LD, *et al.* Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2013, 5: 73-90.
- [5] Zhao R, Shi W, Zhang Y, *et al.* Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, attenuates chronic brain injury after focal cerebral ischaemia in mice and rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63: 550-557.
- [6] Zhang YJ, Zhang L, Ye YL, *et al.* Cysteinyl leukotriene receptors CysLT1 and CysLT2 are upregulated in acute neuronal injury after focal cerebral ischemia in mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27: 1553-1560.
- [7] Chen L, Yang Y, Li C, *et al.* CysLT2 receptor mediates lipopolysaccharide-induced microglial inflammation and consequent neurotoxicity in vitro[J]. *Brain Res*, 2015, 1624: 433-445.
- [8] Lee R, Lee M, Wu C, *et al.* Cerebral ischemia and neuroregeneration[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13: 373-385.
- [9] Uchino H, Morota S, Hirabayashi G, *et al.* Molecular mechanism of ischemic brain injuries and perspectives of drug therapies for neuroprotection[J]. *Masui*, 2007, 56: 248-270.
- [10] Xiang B, Xiao C, Shen T, *et al.* Anti-inflammatory effects of anisalcohol on lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia via selective modulation of microglia polarization and down-regulation of NF- κ B p65 and JNK activation[J]. *Mol Immunol*, 2018, 95: 39-46.
- [11] Huang X, Zhang W, Li C, *et al.* Activation of CysLT receptors induces astrocyte proliferation and death after oxygen-glucose deprivation[J]. *Glia*, 2008, 56: 27-37.
- [12] Shi QJ, Wang H, Liu ZX, *et al.* HAMI 3379, a CysLT2R antagonist, dose- and time-dependently attenuates brain injury and inhibits microglial inflammation after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Neuroscience*, 2015, 291: 53-69.

新闻点击

轻微脑损伤会损害嗅觉

发表在《脑损伤》杂志上一篇加拿大蒙特利尔大学领头的研究显示,轻度的脑震荡能暂时影响嗅觉并触发长期焦虑。

这项研究发现,意外事故造成的轻微脑震荡,比如从自行车上摔下来,摔倒在滑雪道上,或滑冰摔倒,总之是撞到了头部,都可能会产生嗅觉的短期障碍,同时伴随出现焦虑。蒙特利尔大学的研究人员说,很多人在他们生命中的某个时候会有轻微的脑震荡,如果意识到有嗅觉障碍应该及时告诉医生。

这项研究包括 20 例轻微脑震荡患者和 22 名四肢瘫痪但无脑震荡的对照组。在 24 h 内,有半数以上的轻度脑震荡患者出现嗅觉减退。一年后,脑震荡患者的嗅觉恢复正常(大部分在 6 个月内),但他们的焦虑率明显高于对照组(65%)。研究人员说,患者报告任何嗅觉丧失是很重要的,因为这会引起医生的重视,进行更密切的随访,以了解嗅觉和焦虑的丧失是否持续,这将有助于确定脑震荡的严重程度。

刘晓菡 译

薛惠文 编