

肝 X 受体 α 在小胶质细胞激活致神经元损伤中的作用研究

崔卫刚^a, 马玉琪^a, 路德荣^b

(新乡医学院 a.基础医学院; b.第三附属医院, 河南 新乡 453003)

摘要:[目的] 研究肝 X 受体 α (LXR α)在小胶质细胞激活致神经元损伤中的作用.[方法] 小鼠小胶质细胞株(BV2 细胞)置于 6 孔培养板培养,分为对照组、 $A\beta$ 组、干扰组、干扰+ $A\beta$ 组、假干扰+ $A\beta$ 组.应用倒置显微镜观察各组 BV2 细胞的形态学变化,Western blot 方法检测 LXR α 蛋白表达变化,ELISA 检测各组上清液中 COX-2、iNOS 的表达水平.收取 BV2 细胞上清液作为条件培养基用来培养人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y 细胞),并通过 CCK-8 和免疫荧光法检测 SH-SY5Y 细胞的存活率和凋亡蛋白 Bax 表达情况.[结果] 与对照组相比, $A\beta$ 组及干扰组的 BV2 细胞表现为胞体变圆变大,细胞突起减少,呈阿米巴样活化状态,LXR α 蛋白水平明显下调($P < 0.05$),细胞上清液 COX-2、iNOS 的表达含量明显升高($P < 0.05$), $A\beta$ 处理组和干扰组的细胞上清液明显引起 SH-SY5Y 细胞存活率降低、凋亡蛋白 Bax 表达增加($P < 0.05$).与假干扰+ $A\beta$ 组相比,干扰+ $A\beta$ 组的细胞胞体变大,突起减少,LXR α 蛋白表达减少,COX-2、iNOS 的表达增加,干扰+ $A\beta$ 组的细胞上清液导致 SH-SY5Y 细胞存活率降低,Bax 表达增加($P < 0.05$).[结论] LXR α 参与调控 $A\beta$ 诱导的小胶质细胞激活及炎症因子的释放,在 AD 的炎症机制中发挥重要作用.

关键词:阿尔茨海默病;肝 X 受体;小胶质细胞;炎症

中图分类号:R322

文献标志码:A

阿尔茨海默病(AD)的病理特征表现为老年斑沉积、神经元纤维缠结和神经炎症反应.有研究显示,老年斑沉积后可激活小胶质细胞,小胶质细胞活化后释放大量的炎症因子,加重神经元损伤.因此,小胶质细胞介导的炎症反应在 AD 的病理过程中发挥着重要作用^[1].

肝 X 受体(liver x receptors, LXRs)在细胞和机体调节胆固醇稳态和抗炎方面发挥着重要的作用,因首先在肝 cDNA 库筛出而被命名.LXRs 包括 LXR α (LXR α)和 LXR β (LXR β)两种亚型,二者有 77% 的同源性^[2].LXRs 分布广泛,LXRs 在肝脏、脂肪组织、神经组织等表达较高^[3].LXRs 的不同亚型在体内起的作用不同,LXR β 缺失小鼠表现出中枢性尿崩症,与肾脏水通道-1 相关^[4].LXR α 缺失加重缺血再灌注引起的左室扩大,死亡率也明显增加^[5].在结直肠癌,LXR α 通过 EGFR 调控癌细胞的增殖^[6].在 LXR β (-/-)小鼠,视网膜内有 $A\beta$ 沉积但在神经节细胞没有发生自噬和凋亡^[7].研究显示,LXRs 能调控炎症反应,如 LXR α 激动剂 T0901317 通过诱导巨噬细胞从 M1 型向 M2 型转化而发挥抗动脉粥样硬化作用^[8].但在 AD 疾病中,LXRs 的哪种亚型能调控小胶质细胞的活化,尚未见报道.本实验以小胶质细胞系 BV2 细胞为研究对象,探究 $A\beta$ 诱导 BV2 细胞活化后,LXRs 的 LXR α 亚型是否发生变化,并通过功能缺失的方法探讨 LXR α 干扰后对 BV2 细胞分泌炎症因子 COX-2 及 iNOS 表达的影响,并探究 $A\beta$ 刺激下 LXR α 对神经元细胞凋亡的影响,从而评价 LXR α 对 AD 脑内炎症反应的调控作用及对神经元的保护作用.

1 材料与方法

1.1 实验材料

BV2 细胞和 SH-SY5Y 细胞购自上海细胞库.DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司),RIPA 裂解

收稿日期:2020-02-18;修回日期:2020-05-02.

基金项目:国家自然科学基金(U1804185);河南省科技厅项目(192102310346).

作者简介(通信作者):崔卫刚(1978-),男,河南新乡人,新乡医学院副教授,博士,研究方向为神经退行性疾病,E-mail: weigangcui1978@126.com.

液(中国碧云天公司),COX-2 和 iNOS 的 ELISA 检测试剂盒(中国武汉晶美生物),兔抗 Bax 一抗(中国碧云天公司).

1.2 细胞培养和分组

BV2 细胞按 2×10^5 接种于 6 孔板,用 DMEM+10%FBS 培养基,置 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养,2 d 传代 1 次.siRNA-LXR α 购于 Santa Cruz 公司,转染实验步骤参照说明书进行.当 BV2 细胞贴壁达 80%时,取 $1 \mu\text{L}$ siRNA 双链溶于 $100 \mu\text{L}$ siRNA 转染培养基成溶液 A,取 $6 \mu\text{L}$ siRNA 转染试剂用 $100 \mu\text{L}$ siRNA 转染培养基稀释成溶液 B,溶液 B 和溶液 A 混匀,室温孵育 30 min.AB 混合液中加入 0.8 ml 转染培养基,混匀后加到 BV2 细胞中孵育,4 h 后换成 DMEM+10%FBS 培养基继续孵育 24 h 进行后续实验.实验分组如下:对照组、AB 组(加入 $25 \mu\text{mol/l}$ A β 25-35 孵育 4 h)、干扰组(siRNA LXR α)、干扰+A β 组(siRNA LXR α +A β 25-35 孵育 4 h)、假干扰+A β 组(control siRNA +A β 组,假干扰后用 A β 25-35 进行处理 4 h)共 5 组.

1.3 酶联免疫吸附法(ELISA)

各组 BV2 小胶质细胞经处理后,取细胞上清液,ELISA 试剂盒检测 COX-2 和 iNOS 的蛋白水平,按照说明书步骤进行.

1.4 蛋白印迹法检测 LXR α 的表达

收集不同组的细胞,用 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min,裂解好的细胞悬液置于 4°C 离心机中 12 000 r/min 离心 15 min,取上清即为细胞总蛋白.用 BCA 法测定蛋白浓度.取 $20 \mu\text{g}$ 细胞蛋白和上样缓冲液混均匀并煮沸 5 min,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳.电泳后转膜至 PVDF 膜,然后用 5%脱脂牛奶封闭 2 h.之后加入 LXR α (1:1 000)和 GAPDH(1:2 000)一抗 4°C 孵育过夜,然后加入相应二抗室温孵育 1 h.用 ECL 发光试剂观察表达情况并用 IMAGE J 软件进行量化.

1.5 CCK-8 方法测定各组 SH-SY5Y 细胞的存活率

在 96 孔板内以每孔 10^4 个细胞的密度接种,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养 24 h 后,根据分组情况分别进行处理.收集各组 BV2 细胞上清液,用 BV2 细胞上清液培养 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,然后每孔取 $100 \mu\text{L}$ 培养基与 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂避光孵育,2 h 后通过酶标仪测定 450 nm 处 OD 值.

1.6 免疫荧光化学染色

取各组处理后的 SH-SY5Y 细胞玻片,用 0.01 mol/L PBS 清洗 $5 \text{ min} \times 3$ 次并用 -20°C 甲醇固定 10 min.清洗后加入兔抗 Bax 一抗(1:200),置 4°C 冰箱中孵育 24 h.PBS 清洗 $10 \text{ min} \times 3$ 次后加入荧光 Alexa Fluor 594 标记 IgG 二抗室温孵育 2 h,PBS 清洗后用甘油封片剂封片并在荧光显微镜下观察、拍照.

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示.多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 A β 处理及 RNA 干扰后 BV2 细胞的形态变化

倒置显微镜观察发现,对照组的 BV2 细胞形态规则,胞体呈细长形或椭圆形,从胞体发出多条细长而有分支的突起,细胞间相互交织成簇,处于静止状态.A β 组、干扰组及干扰+A β 组的 BV2 细胞,表现为细胞胞体变圆变大,明显呈阿米巴样改变,细胞突起减少,细胞间连接消失(见图 1).

2.2 Western blot 检测各组 BV2 细胞的 LXR α 蛋白表达

用 Western blot 方法分别检测各组细胞的 LXR α 蛋白表达水平变化.结果显示,与对照组相比,A β 组和干扰组的 LXR α 表达水平明显下降,差异有统计学意义.与假干扰+A β 组相比,干扰+A β 组的 LXR α 表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见图 2).

2.3 LXR α 对 BV2 细胞相关炎症因子的影响

提取各组细胞培养液,用 ELISA 方法检测炎症因子 COX-2 和 iNOS 的表达变化.结果显示,与对照组相

比, A β 组和干扰组的炎症因子 COX-2 和 iNOS 的表达明显升高, 差异有统计学意义. 与假干扰+A β 组相比, 干扰+A β 组的 COX-2 和 iNOS 的表达明显升高, 差异有统计学意义(见表 1).

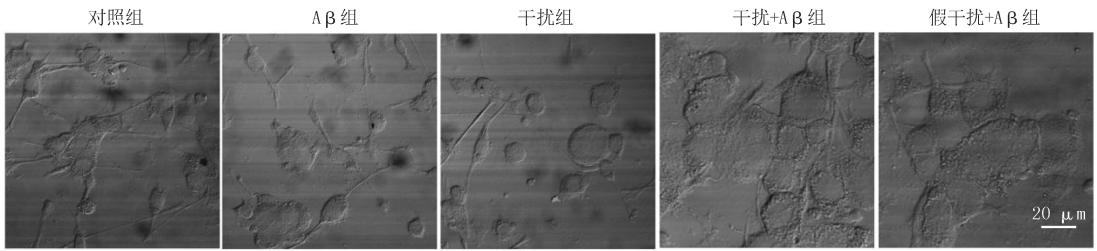
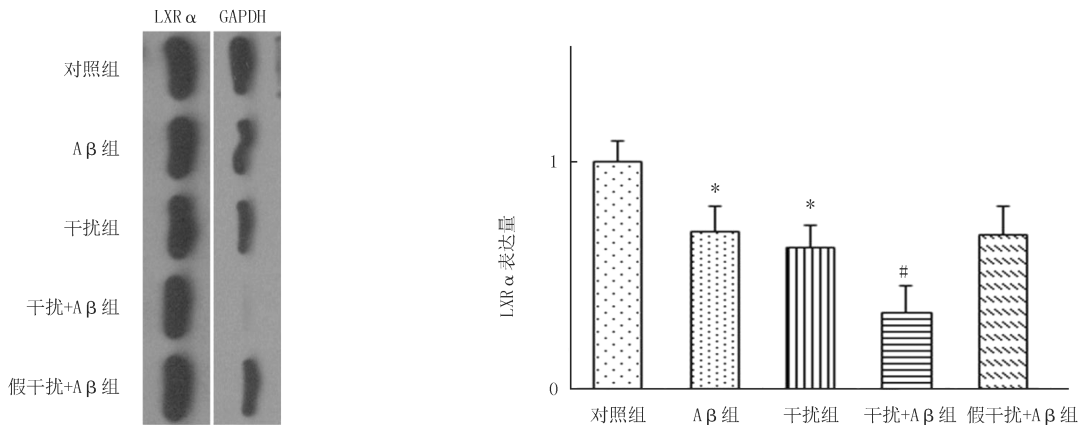


图1 BV2小胶质细胞倒置显微镜结果

Fig.1 The results of inverted microscope of BV2 microglia



*与对照组比较, * $P < 0.05$; #与假干扰+A β 组比较, # $P < 0.05$.

图2 各组BV2细胞的LXR α 蛋白表达变化

Fig.2 Changes of LXR α protein expression in BV2 cells of each group

2.4 各组 BV2 细胞上清液对 SH-SY5Y 神经元的影响

收集 BV2 细胞上清液与 SH-SY5Y 细胞共培养, 用 CCK-8 检测细胞存活率, 并用 Western blot 检测细胞凋亡蛋白 Bax 表达. 结果显示, 与对照组相比, A β 组和干扰组的条件培养基使 SH-SY5Y 细胞的存活率显著下降, 凋亡蛋白 Bax 表达增加, 差异有统计学意义. 与假干扰+A β 组相比, 干扰+A β 组所获得的条件培养基使 SH-SY5Y 细胞的存活率显著下降, 凋亡蛋白 Bax 表达显著增加, 差异有统计学意义, 说明干扰+A β 组具有更强的神经毒性(见图 3, 表 2).

表 1 各组 BV2 细胞上清液
COX-2 和 iNOS 比较

Tab.1 Comparison of COX-2 and iNOS among various groups

组别	COX-2 OD 值	iNOS OD 值
对照组	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.13
A β 组	1.28 \pm 0.13*	1.27 \pm 0.08*
干扰组	1.25 \pm 0.13*	1.29 \pm 0.11*
干扰+A β 组	1.70 \pm 0.16#	1.65 \pm 0.14#
假干扰+A β 组	1.31 \pm 0.11	1.23 \pm 0.06

注: * 与对照组比较, * $P < 0.05$; # 与假干扰+A β 组比较, # $P < 0.05$.

表 2 各组 BV2 细胞条件培养基对 SH-SY5Y 细胞存活率的比较

Tab.2 Comparison of percentage of cell survival rate in SH-SY5Y cells after conditioned medium treatment

组别	细胞存活率/%
对照组	100.00 \pm 11.04
A β 组	76.00 \pm 6.32*
干扰组	70.20 \pm 10.47*
干扰+A β 组	52.80 \pm 7.95#
假干扰+A β 组	74.80 \pm 9.96

注: * 与对照组比较, * $P < 0.05$; # 与假干扰+A β 组比较, # $P < 0.05$.

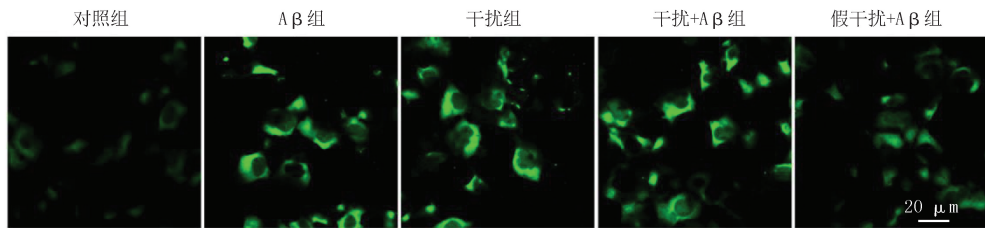


图3 SH-SY5Y细胞Bax免疫荧光染色结果

Fig.3 The immunofluorescence staining results of Bax in SH-SY5Y cells

3 讨 论

AD 是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,目前关于 AD 发病机制的研究有很多,老年斑沉积、神经炎症反应和神经元丢失等均参与 AD 的发生发展.小胶质细胞是介导神经炎症反应的主要细胞,分泌炎症因子从而导致神经元损伤^[9];前期研究显示,小胶质细胞在老年斑周围聚集并活化^[10].活化的小胶质细胞释放大量的炎症因子,如 COX-2, iNOS 和 TNF- α 等加重神经炎症反应^[11].通过调节小胶质细胞炎症因子的释放可对神经元起到保护作用^[12].我们前期也发现,用 LXR α 的激动剂 T0901317 作用于 APP/PS1 转基因 AD 小鼠,AD 小鼠脑内的炎症因子显著减少^[10].为了探讨 LXR α 是否参与 AD 炎症反应过程的调控,本研究采用 A β 25-35 诱导 BV2 小胶质细胞作为炎症模型.结果发现,A β 25-35 处理能够引起 BV2 小胶质细胞胞体变圆变大,明显呈阿米巴样改变.A β 25-35 在诱导 BV2 小胶质细胞产生炎症因子的同时,能够抑制 LXR α 的表达,因此我们推测 LXR α 可能参与了 AD 脑内炎症反应的调控.Ma A 等发现吐曼酸可以通过活化 LXR α 从而抑制 BV2 小胶质细胞的活化^[13],该结果也间接证明了我们的研究,即 LXR α 可能参与了 AD 脑内的炎症反应.为了更进一步明确 A β 诱导的小胶质细胞产生的炎症因子与 LXR α 之间的关系,本实验采用 siRNA 干扰技术沉默 BV2 小胶质细胞中 LXR α 的表达,LXR α 沉默后再用 A β 处理,结果发现与单纯 A β 处理组相比,LXR α 沉默+A β 组的 BV2 小胶质细胞产生的炎症因子 COX-2 和 iNOS 明显增加.因此,我们认为 A β 刺激小胶质细胞后,小胶质细胞内的 LXR α 受到抑制,从而介导炎症因子释放增多.

本实验还发现,已敲低了 LXR α 的 BV2 细胞的上清液具有更大的神经毒性,表现在该组细胞上清液能显著减少 SH-SY5Y 细胞的存活率,并增加凋亡蛋白 Bax 的表达,说明干扰 LXR α 表达的 BV2 细胞的上清液对 SH-SY5Y 细胞具有更强的神经毒性.当小胶质细胞中的 LXR α 表达受抑制后,炎症因子释放增加,加剧 A β 所致的神经毒性,说明 LXR α 具有潜在的神经保护作用,提示在炎症环境下,小胶质细胞中 LXR α 具有保护神经元的功能.但是,我们的条件细胞上清液含有很多未检测的分子物质和更多的与凋亡相关的分子,所以 LXR α 是否会调节更多的分子继而保护神经元有待进一步研究.

综上所述,本文首次在 BV2 细胞水平上证明了 LXR α 参与 A β 诱导的炎症反应过程,表明 LXR α 具有抑制 BV2 细胞炎症分子表达的功能,我们的实验结果为 LXR α 参与调控 AD 炎症反应提供了证据.

参 考 文 献

- [1] BENNETT JP Jr, KEENEY P M, BROHAWN D G. RNA Sequencing Reveals Small and Variable Contributions of Infectious Agents to Transcriptomes of Postmortem Nervous Tissues From Amyotrophic Lateral Sclerosis, Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Subjects, and Increased Expression of Genes From Disease-Activated Microglia[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 235.
- [2] HU X, ZHANG N, FU Y. Role of Liver X Receptor in Mastitis Therapy and Regulation of Milk Fat Synthesis[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2019, 24(1): 73-83.
- [3] HAFIANE A, GASBARRINO K, DASKALOPOULOU S S. The role of adiponectin in cholesterol efflux and HDL biogenesis and metabolism[J]. *Metabolism*, 2019, 100: 153953.
- [4] GABBI C, KONG X, SUZUKI H, et al. Central diabetes insipidus associated with impaired renal aquaporin-1 expression in mice lacking liver X receptor beta[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(8): 3030.
- [5] LIU X, GAO J, XIA Q, et al. Increased mortality and aggravation of heart failure in liver X receptor-alpha knockout mice after myocardial infarction[J]. *Heart Vessels*, 2016, 31(8): 1370.

- [6] LIANG X, CAO Y, XIANG S, et al. LXR α -mediated downregulation of EGFR suppress colorectal cancer cell proliferation[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10): 17391-17404.
- [7] SONG X Y, AUID-Oho, WU W F, et al. Retinal and optic nerve degeneration in liver X receptor beta knockout mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(33): 16507-16512.
- [8] DOU F, CHEN J, CAO H, et al. Anti-atherosclerotic effects of LXR α agonist through induced conversion of M1 macrophage to M2[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(6): 3825-3840.
- [9] 张本峥, 张蒙, 任怡稚, 等. 消退素 D1 通过影响小胶质细胞代谢抑制神经炎症改善阿尔茨海默病认知功能[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019(5): 629-635.
- ZHANG B Z, ZHANG M, REN Y Z, et al. RvD1 improves cognitive function in Alzheimer's disease via influencing microglia metabolism and inhibiting neuroinflammation[J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing, 2019(5): 629-635.
- [10] CUI W, SUN Y, WANG Z, et al. Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice[J]. Neuroscience, 2012, 210: 200-210.
- [11] 郭利晴, 张慧予, 李慧源, 等. 丁苯酞通过诱导自噬调控 BV-2 小胶质细胞炎症反应[J]. 中国医科大学学报, 2020(1): 27-30.
- GUO L Q, ZHANG H Y, LI H Y, et al. Butylphthalide regulates the inflammatory response of BV-2 microglial cells by inducing autophagy[J]. Journal of China Medical University, 2020(1): 27-30.
- [12] MAEZAWA I, NGUYEN HM, DI LJ, et al. Kvl.3 inhibition as a potential microglia-targeted therapy for Alzheimer's disease: preclinical proof of concept[J]. Brain, 2018, 141(2): 596-612.
- [13] MA A, WANG Y, ZHANG Q. Tormentone acid reduces inflammation in BV-2 microglia by activating the liver X receptor alpha[J]. Neuroscience, 2015, 287: 9-14.

Role of liver X receptor α in neuronal damage induced by microglia activation

Cui Weigang^a, Ma Yuqi^a, Lu Derong^b

(a. School of Basic Medicine; b. The Third Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: [Objective] To study the role of LXR α in neuronal damage induced by microglia activation. [Methods] BV2 mouse microglial cell line was cultured in six hole culture plate. LXR α was knocked down by transfection of LXR α -siRNA and stimulated by A β 25-35 for 4 hours. BV2 cells were divided into the following groups, control group: A β group, siRNA group, siRNA + A β group and sham siRNA + A β group. The morphological changes of BV2 cells in each group were observed by inverted microscope, the expression of LXR α protein in BV2 cells in each group was detected by Western blot, and the expression of COX-2 and iNOS in supernatant of each group was detected by ELISA. The supernatant of BV2 cells was used as conditioned medium to culture SH-SY5Y cells, and the survival rate and expression of Bax were detected by CCK-8 and immunofluorescence. [Results] Compared with the control group, BV2 cells in the A β group and the siRNA group showed round and large cell bodies, reduced cell processes and amebic activation, LXR α protein level decreased significantly ($P < 0.05$), the expression of COX-2 and iNOS in supernatant increased significantly ($P < 0.05$), and the supernatant of A β treated group and siRNA group significantly reduced the survival rate of SH-SY5Y cells and increased the expression of apoptosis protein Bax. Compared with sham siRNA + A β group, the cell body of siRNA + A β group became larger, protuberance decreased, LXR α protein expression decreased, COX-2, iNOS expression increased, and the supernatant of siRNA + A β group resulted in the decrease of SH-SY5Y cell survival rate and the increase of Bax expression. [Conclusion] LXR α is involved in the regulation of A β 25-35-induced release of microglial inflammatory factors and plays an important role in the inflammatory mechanism of AD.

Keywords: Alzheimer's disease; liver X receptor; microglia; inflammation

[责任编辑 王凤产 杨浦]