

· 论 著 ·

## LPS 预激神经胶质细胞培养上清对神经元的影响

谢泽锋<sup>1</sup> 苏芸<sup>2</sup> 蒋治武<sup>2</sup> 许燕璇<sup>2</sup> 辛岗<sup>2\*</sup> 李康生<sup>2\*</sup>

**摘要** 目的 探讨神经胶质细胞经过脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)预激后,其培养上清对神经元功能的影响。方法 体外培养神经元与神经胶质细胞,免疫荧光法进行纯度鉴定。神经胶质细胞分为 4 组:未刺激对照组、0.01  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组、1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组、预刺激组(先采用 0.01  $\mu$ g/ml LPS 刺激 18h 后,再用 1  $\mu$ g/ml LPS 刺激 24h)。经过相应处理后收获各组条件培养上清,分别加入到神经元中,与神经元共同孵育 24h 后收集细胞与培养上清。采用 CCK-8 试剂盒与 ELISA 法检测神经元的存活率和分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平。结果 星形胶质细胞预刺激组条件培养上清作用于神经元后,细胞存活率下降,与 0.01  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组比差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。小胶质细胞各组条件培养上清作用于神经元后,细胞存活率变化不明显( $P > 0.05$ )。在星形胶质细胞各刺激组上清作用下,神经元产生 TNF- $\alpha$  的水平,各 LPS 处理组培养上清刺激下水平升高,其中 1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组升高明显,与对照组和 0.01  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组比差异具有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。产生 IL-6 的水平亦升高,与对照组比亦均具有统计学差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。并且,预刺激组较 1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组上清作用后,产生 IL-6 水平较低( $P < 0.05$ )。各组小胶质细胞条件培养上清作用于神经元后,产生 TNF- $\alpha$  的水平,预刺激组水平升高明显,与对照组比差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。对于 IL-6 水平,变化趋势同 TNF- $\alpha$ ,但各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 LPS 预激参与重新调配了神经胶质细胞分泌活性介质的作用,培养上清中这些分子相互制约或是协同,对神经元产生有可能是保护或是损伤效应。

**关键词** 神经元;脂多糖;神经胶质细胞

中图分类号 R-33 文献标识码 A 文章编号:1009-9727(2012)6-652-04

Effects of neuroglia cultured supernatants with LPS-priming on neurons. XIE Ze-feng<sup>1</sup> SU Yun<sup>2</sup> JIANG Zhi-wu<sup>2</sup> XU Yan-xuan<sup>2</sup>. (1. The first affiliated hospital Shantou University Medical College, Shantou Guangdong Province, 515041 2. Department of Microbiology and Immunology Shantou University Medical College, Shantou Guangdong Province, 515041)

**Abstract** Objective To study the effects of glia cultured supernatants with LPS-priming on neurons' viability and secretion activity. Methods Neurons and glia (mainly referring to astrocytes and microglia) were cultured in vitro and identified by immunofluorescence. Thereafter, these glial cells were divided into 4 groups: LPS-primed group, 0.01  $\mu$ g/ml of LPS treated group, 1  $\mu$ g/ml of LPS treated group and non-treated group. The LPS-primed group was preconditioned with 0.01  $\mu$ g/ml of LPS for 18 hours and re-treated with a higher dose of LPS (1  $\mu$ g/ml LPS) for 24 hours. Then all cultured supernatants of 4 groups were collected and were used to treat the neurons for 24 hours in vitro. The cytotoxicity and secretion ability of proinflammatory cytokines were determined by CCK-8 kit and ELISA respectively. Results The cytotoxicity of neurons was decreased by the treatment with the astrocyte supernatant of LPS-primed group, there was significant difference statistically if compared with 0.01  $\mu$ g/ml and 1  $\mu$ g/ml of LPS groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). The cytotoxicity showed no profound variation after the treatment with the microglia supernatants of 4 groups ( $P > 0.05$ ). As for TNF- $\alpha$  levels, it was increased by the treatment with the astrocyte supernatant of LPS-primed group, 0.01  $\mu$ g/ml of LPS treated group, 1  $\mu$ g/ml of LPS treated group, particularly in 1  $\mu$ g/ml of LPS treated group, statistical difference was found when compared with 0.01  $\mu$ g/ml of LPS treated group and non-treated group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). IL-6 levels were increased after the treatment with the astrocyte supernatants of LPS-primed group, 0.01  $\mu$ g/ml of LPS treated group, 1  $\mu$ g/ml of LPS treated group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, after the treatment with the microglia supernatants of LPS-primed group, TNF- $\alpha$  level was increased profoundly when compared with non-treated group ( $P < 0.01$ ). Though IL-6 levels exhibited an increasing trend, no significant difference was found in statistically between groups ( $P > 0.05$ ). Conclusion There were diverse effects (including protection or injury) of cultured supernatants from astrocytes and microglia on the cytotoxicity and secretion ability in the neurons because of the readjustment of bioactive molecules with LPS preconditioning in target cells.

**Key words** LPS; Neurons; Neuroglia

基金项目 国家自然科学基金项目(No.81001340, 30771988) 广东省医学科研基金项目(No.B2010211) 汕头市科技计划(No.2009-70)  
作者单位 1. 汕头大学医学院第一附属医院 广东 汕头 515041; 2. 汕头大学医学院微生物学与免疫学教研室 广东 汕头 515041  
作者简介 谢泽锋(1978~) 男, 硕士, 主治医师, 主要从事心、脑血管疾病中免疫调节的研究。  
\* 通讯作者 E-mail: kslu@stu.edu.cn E-mail: greenxiner@163.com

本研究拟采用脂多糖 (Lipopolysaccharide LPS) 预刺激大脑神经胶质细胞(主要是星形胶质细胞与小胶质细胞), 收集各组条件培养上清后与神经元进行共孵育, 观察上清对于神经元损伤和分泌细胞因子功能的影响。由于研究显示 LPS 耐受在减轻疾病炎症反应中有积极的作用, 而本研究中的探讨将为 LPS 耐受在神经系统疾患中的实际应用提供更丰富的实验依据, 并为预防与治疗这些神经疾病提供更多具有潜在实用价值的信息。

## 1 材料与方法

1.1 材料 LPS(*Escherichia coli* O111:B4) 购自美国 Sigma 公司, 0.25% 胰酶、DMEM/F12、B27、抗生素、Neurobasal 培养液购自美国 GIBCO 公司; 胎牛血清购自四季青公司, 抗 beta-III-tubulin 抗体、FITC 标记抗 IgG 二抗购自 Abcam 公司, TNF- $\alpha$ 、IL-6 ELISA 试剂盒购自深圳达科为生物公司, CCK-8S 试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。

## 1.2 方法

1.2.1 神经细胞原代培养 选取孕 14-17d C57BL/6 胎鼠, 分离大脑皮层, 经 0.25% 胰酶消化、吹打、离心、重悬、过滤后加入种植液 (DMEM/F12+1% 抗生素 +1% 谷氨酰胺 +10% 胎牛血清) 培养 6h 后, 换饲养液 (Neurobasal+10% FBS+2% B27+1% 抗生素 +1% 谷氨酰胺) 培养 64h, 可获得纯培养的原代神经细胞, 用于后续实验。

1.2.2 神经细胞鉴定 采用免疫荧光法进行鉴定, 抗 beta-III-tubulin 抗体标记神经元。观察 10 个随机视野, 计数 500 个细胞, 计算荧光阳性细胞的百分比。

1.2.3 神经胶质细胞条件培养上清的收集 新生 C57BL/6 小鼠按照文献<sup>[1,2]</sup>分离纯化大脑皮质星形胶质细胞与小胶质细胞。细胞分为未刺激对照组、0.01  $\mu$ g/ml LPS、1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组、预刺激组 (先用 0.01  $\mu$ g/ml LPS 刺激 18h 后再用 1  $\mu$ g/ml LPS 刺激 24h)。收获各组培养上清, 等量加到神经元中, 孵育 24h 后收集神经元与培养上清, 以加入饲养液培养的神经元作为空白对照孔。

1.2.4 神经元的细胞毒作用 采用 CCK-8 (Cell counting kit-8) 试剂盒检测条件培养上清处理后神经元的存活率, 步骤按照说明书进行。存活率 = (处理组吸光度 - 空白对照组吸光度) / (未刺激对照组吸光度 - 空白对照组吸光度)  $\times$  100%。

1.2.5 条件培养上清处理后神经元产生 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平的检测 采用 IL-6 和 TNF- $\alpha$  ELISA

试剂盒检测, 具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析 数据以 Mean  $\pm$  SEM 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大脑皮层神经细胞纯培养与鉴定 典型成熟的神经元具有大而清晰的核, 其主要特征为, 具有圆锥形长突起, 轴突的直径全长均一, 而树突的直径从胞体向末梢逐渐变细。培养第 5d, 采用抗神经元特异的 beta-III-tubulin 进行染色, 计数 500 个细胞, 荧光染色阳性细胞占 93% (图 1)。

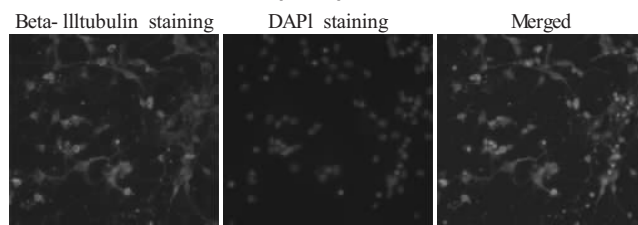
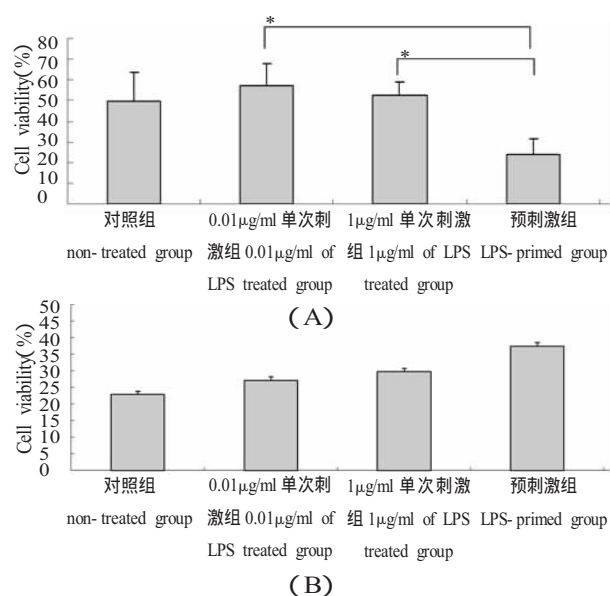


图 1 小鼠神经元原代培养 ( $\times 400$ )

Fig 1 Identification of neurons ( $\times 400$ )

2.2 神经胶质细胞条件培养上清对神经元细胞毒性作用 经 LPS 刺激或预刺激后神经胶质细胞条件培养上清作用于神经元细胞, 采用 CCK-8 试剂盒检测其对神经元的毒性作用。结果显示, 星形胶质细胞预刺激组条件培养上清作用于神经元后, 细胞存活率下降, 与 0.01  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ) (见图 2A)。对于小胶质细胞各组条件培养上清作用于神经元后, 细胞存活率变化不明显 ( $P > 0.05$ ) (见图 2B)。

2.3 神经胶质细胞条件培养上清对神经元产生细胞因子的作用 在 0.01  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组、1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组、预刺激组星形胶质细胞培养上清作用下, 神经元产生 TNF- $\alpha$  的水平, 其中 1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组升高明显, 与对照组和 0.01  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组比差异具有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。星形胶质细胞各刺激组上清作用下, 神经元产生 IL-6 的水平亦升高, 与对照组比均具有统计学差异 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 并且, 预刺激组较 1  $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组上清作用后, 产生 IL-6 水平较低 ( $P < 0.05$ ) (图 3A、3B)。各组小胶质细胞条件培养上清作用于神经元后, 刺激组产生 TNF- $\alpha$  与 IL-6 水平均有升高趋势 (见图 3C、3D)。另外, 对于 TNF- $\alpha$  水平, 预刺激组水平升高明显, 与对照组比差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 对于 IL-6 水平, 变化趋势同 TNF- $\alpha$ , 但各组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



(A)星形胶质细胞条件培养上清对神经元的毒性作用 (B)小胶质细胞条件培养上清对神经元的毒性作用

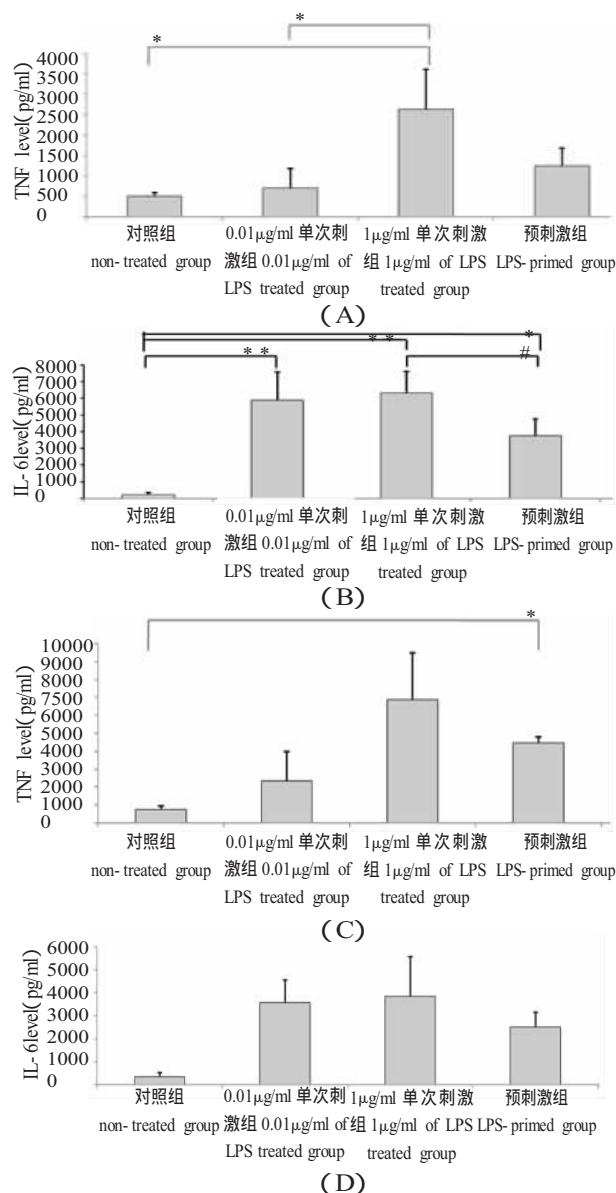
(A)Cytotoxicity effects on neurons by challenged by supernatants of cultured astrocytes;(B)Cytotoxicity effects on neurons by challenged by supernatants of cultured microglia

图2 神经胶质细胞条件培养上清对神经元细胞的毒性作用 (n=4)

Fig 2 Cytotoxicity effects on neurons by supernatants of cultured glia cells with LPS priming (n=4)

### 3 讨论

本研究采用星形胶质细胞和小胶质细胞条件培养上清与神经元共培养,结果发现神经元在星形胶质细胞预刺激组条件培养上清作用下存活率降低,小胶质细胞各组条件培养上清作用后神经元存活率变化不大。虽然有体内实验表明LPS预激可降低某些脑部疾病中的炎症反应,从而发挥一定的保护作用。但由于LPS耐受是一种涉及多分子通路的重新调配过程,是众多调节作用的综合效应。因此,在我们体外进行的前期研究中虽然有些分子的表达有如体内实验一样呈现出抑制效应,但并不说明其一定有利于细胞的存活。正如本研究结果显示星形胶质细胞培养上清的作用并未提高神经元的存活情况。虽然TNF- $\alpha$ 的降低有利于炎症反应的减轻,但对于其他活性分子的表达增加,这些活性分子中也可能具有细胞毒性作用,从而造成神经元的损伤或死亡。已知活化的神经胶质细胞杀伤神经元的机制包括一氧化氮<sup>[3-5]</sup>、超氧化物和过氧化氢、谷氨酰胺、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的过度释放、以及线粒体损伤<sup>[6]</sup>。另一方面,小胶质细胞和星形细胞活化后可释放促炎症因子,但也可以分泌神经营养因子和抗炎因子从而保护神经元<sup>[7]</sup>,因此,多种介质的相互作用,炎症损伤与保护共存,炎症损伤强于



(A)星形胶质细胞条件培养上清对神经元产生TNF- $\alpha$ 的作用 (B)星形胶质细胞条件培养上清对神经元产生IL-6的作用 (C)小胶质细胞条件培养上清对神经元产生TNF- $\alpha$ 的作用 (D)小胶质细胞条件培养上清对神经元产生IL-6的作用

(A)TNF- $\alpha$  level in neurons challenged by supernatants of cultured astrocytes;(B)IL-6 level in neurons challenged by supernatants of cultured astrocytes;(C)TNF- $\alpha$  level in neurons challenged by supernatants of cultured microglia;(D)IL-6 level in neurons challenged by supernatants of cultured microglia

图3 神经胶质细胞条件培养上清对神经元产生细胞因子的作用(n=4)

Fig 3 Cytokine levels in neurons challenged by supernatants of cultured glia cells(n=4)

保护作用,其综合效应就可能最终导致了神经元的损伤或死亡。我们结果中显示小胶质细胞条件培养上清对于神经元存活影响变化不大,这可能与上清中各种因子的变化程度较小有关。这也提示在LPS预激后产



生的效应中星形胶质细胞可能发挥更显著的作用。

神经元与胶质细胞培养上清共孵育后,无论是 LPS 单次刺激组,或是 LPS 预激组上清均具有上调神经元分泌 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的趋势。如前所述,经 LPS 刺激后条件培养上清中含有不同的活性分子,这些分子可具有活化作用,由此刺激神经元主动释放更多的炎性介质。对于星形胶质细胞 LPS 预激组条件上清的作用,与 1 $\mu$ g/ml LPS 单次刺激组上清作用比,刺激神经元产生 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平降低,这可能与条件上清作用后,神经元存活率下降,数量减少有关。同时,小胶质细胞预刺激组培养上清 TNF- $\alpha$  也有降低趋势。综合两种细胞培养上清作用后神经元分泌功能的总变化趋势,考虑到 LPS 预激对靶细胞的分子表达与信号通路进行了重新调配,在条件上清中的可溶性分子表达谱就可能不一致,而某些负性调节因子的变化在其中调节过程可能起主导作用,由此下调了神经元分泌 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的功能。

另外,星形胶质细胞与小胶质细胞上清作用后,对神经元分泌细胞因子的作用不尽相同,这也进一步说明了 LPS 预激涉及的细胞与分子机制复杂,由于经过重新调配后不同靶细胞的培养上清是多种活性分子的混合体,这些分子的相互制约或是协同,都会对

神经元产生不同的生物学影响,有可能是保护或是损伤效应。

#### 参考文献:

- [1] Wang GF, Zhang J, Li WZ, et al. Apoptosis and Pro-inflammatory Cytokine Responses of Mouse Microglia and Astrocytes Induced by Human H1N1 and Avian H5N1 Influenza Viruses [J]. Cell Mol Immunol 2008, 5(2): 113-120.
- [2] Floden AM, Combs CK. Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype [J]. J Neurosci Methods 2007, 164: 218-224.
- [3] Hao CC. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a NO mechanism [J]. Glia 1996, 16: 276-284.
- [4] Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100 beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes [J]. Neurochem, 1997, 69: 2294-2301.
- [5] Kingham PJ, Cuzner ML, Pocock JM. Apoptotic pathways mobilized in microglia and neurons as a consequence of chromogranin A-induced microglial activation [J]. Neurochem, 1999, 73: 538-547.
- [6] Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate and mitochondria [J]. Molecular Neurobiology, 2003, 27(3): 325-335.
- [7] McGeer PL, Rogers J. Antiinflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease [J]. Neurology, 1992, 42: 447-449.

收稿日期: 2012-03-27 编辑: 谢永慧

(上接第 651 页)

- Lancet 2007, 370(9593): 1137-1145.
- [8] Park CH, Ishinaka M, Takada A, Kida H, et al. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97(H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice [J]. Arch Virol 2002, 147(7): 1425-1436.
  - [9] Nishimura H, Itamura S, Iwasaki T, Kurata T, et al. Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection [J]. J Gen Virol 2000, 81(Pt 10): 2503-2510.
  - [10] Mori I and Y Kimura. Apoptotic neurodegeneration induced by influenza A virus infection in the mouse brain [J]. Microbes Infect, 2000, 2(11): 1329-1334.
  - [11] Wang GF, Li W and K. Li. Acute encephalopathy and encephalitis caused by influenza virus infection [J]. Curr Opin Neurol 2010, 23(3): 305-311.
  - [12] Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease [J]. Lancet 2002, 360(9348): 1831-1837.
  - [13] Farina C, Aloisi F and E. Meinl. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity [J]. Trends Immunol 2007, 28(3): 138-145.
  - [14] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektess S, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. Science 1993, 260(5111): 1130-1132.
  - [15] Minnich JE, Mann SL, Stock M, Stolzenbach, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene delivery protects cortical neurons from dying following a traumatic brain injury [J]. Restor Neurol Neurosci 2010, 28(3): 293-309.
  - [16] Harvey BK, Hoffer BJ and Y. Wang. Stroke and TGF- $\beta$  proteins: glial cell line-derived neurotrophic factor and bone morphogenetic protein [J]. Pharmacol Ther 2005, 105(2): 113-125.
  - [17] O'Shea JJ, Ma A and P. Lipsky. Cytokines and autoimmunity [J]. Nat Rev Immunol 2002, 2(1): 37-45.

收稿日期: 2012-02-15 编辑: 崔宜庆