

# 脂多糖干预建立体外星形胶质细胞活化模型的实验研究

孟宪栋 亢君君 张海锋

730050 兰州,解放军联勤保障部队第九四〇医院综合内科(孟宪栋); 710032 西安,空军军医大学神经科学研究所(亢君君、张海锋)

通信作者:孟宪栋, Email: MengxdLZ@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.01.004

**【摘要】目的** 探讨脂多糖(LPS)对星形胶质细胞凋亡和活力的影响,建立活化星形胶质细胞模型。**方法** 取刚出生 1 d 大鼠(P1)大脑进行细胞培养、传代,获得高纯度星形胶质细胞,接种于培养板,进行 LPS(1  $\mu$ g/ml)干预,设立对照,继续培养 24 ~ 72 h。按实验要求,细胞凋亡检测分组: LPS-24 h 组、对照-24 h 组、LPS-72 h 组、对照-72 h 组,使用 TUNNEL 法检测各组星形胶质细胞凋亡,并计算凋亡率;细胞活力检测分组: LPS-0 h 组、LPS-24 h 组、LPS-72 h 组,使用 MTT 法测定各组星形胶质细胞活力; LPS 干预分组: LPS 干预组和对照组,星形胶质细胞行 GFAP 免疫组化染色。**结果** LPS-24 h 组星形胶质细胞凋亡率为(7.00  $\pm$  2.23)%,对照-24 h 组为(3.26  $\pm$  1.22)%,两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); LPS-72 h 组星形胶质细胞凋亡率为(36.40  $\pm$  5.32)%,对照-72 h 组为(4.00  $\pm$  1.59)%,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); LPS-0 h 组星形胶质细胞活力为(100.23  $\pm$  5.34)%, LPS-24 h 组星形胶质细胞活力为(91.42  $\pm$  9.88)%, LPS-72 h 组星形胶质细胞活力为(51.21  $\pm$  4.58)%, LPS-72 h 组与其余两组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。LPS 干预 24 h,星形胶质细胞增生、肥大,突起增多。**结论** LPS(1  $\mu$ g/ml)干预 24 h,星形胶质细胞没有出现明显细胞凋亡和下降的细胞活力,但是形态上出现活化特征,建立了一种星形胶质细胞活化模型。

**【关键词】** 脂多糖类; 星形胶质细胞; 炎症; 细胞凋亡; 活力

**基金项目:** 甘肃省自然科学基金项目(145RJZA039)

## Experimental study on establishment of an in vitro activated astrocyte model by intervention of lipopolysaccharide

Meng Xiandong, Kang Junjun, Zhang Haifeng

Comprehensive Medical Department, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China (Meng XD); Department of Neurobiology, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China (Kang JJ, Zhang HF)

Corresponding author: Meng Xiandong, Email: MengxdLZ@163.com

**【Abstract】Objective** To explore the effect of lipopolysaccharide (LPS) on apoptosis and viability of astrocytes, and to establish an activated astrocyte model. **Methods** High purity astrocytes were obtained from the brain of 1-day-old rats (P1). The astrocytes were inoculated on the culture plates and treated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 24 to 72 hours. According to the experimental requirements, apoptosis was detected using TUNNEL separately in LPS-24 h, control-24 h, LPS-72 h, control-72 h, and then apoptosis rates were calculated; while viability was detected using MTT separately in LPS-0 h, LPS-24 h, and LPS-72 h. Astrocytes were treated with GFAP immunohistochemistry in LPS treatment group and control group. **Results** The apoptosis rate was (7.00  $\pm$  2.23)% in LPS-24 h group and (3.26  $\pm$  1.22)% in control-24 h group, and there was no significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ); the apoptosis rate was (36.40  $\pm$  5.32)% in LPS-72 h group and (4.00  $\pm$  1.59)% in control-72 h group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ); the viability of astrocyte was (100.23  $\pm$  5.34)%, (91.42  $\pm$  9.88)%, (51.21  $\pm$  4.58)% separately in LPS-0 h group, LPS-24 h group, and LPS-72 h group. There was significant difference between LPS-72 h group and other two groups ( $P < 0.05$ ). After 24 hours of LPS intervention, astrocytes proliferated, enlarged, and their processes increased. **Conclusions** Treated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 24 hours, astrocytes did not show obvious apoptosis and decreased viability, but showed activation in morphology. A model of activated astrocytes might be established.

**【Key words】** Lipopolysaccharides; Astrocytes; Inflammation; Apoptosis; Viability

**Fund program:** Natural Science Foundation of Gansu Province (145RJZA039)

传统认为癫痫本质上是脑神经元过度兴奋和超同步化放电,但是研究发现异常星形胶质细胞增生是颞叶癫痫患者和癫痫持续状态动物模型的主要特征,并且发现在癫痫中存在炎症反应,认为炎症过程参与癫痫发生<sup>[1-2]</sup>。星形胶质细胞是炎症相关因子的重要来源,同时也是炎症分子作用的靶点,通过激活星形胶质细胞上特定受体,可以加剧胶质增生,增强促癫痫发生信号<sup>[3]</sup>。脂多糖作为经典的促炎剂可以促进炎症发生,那么用脂多糖干预星形胶质细胞是否可以建立一种癫痫研究的离体细胞模型?本研究用脂多糖干预培养中的星形胶质细胞,探讨星形胶质细胞凋亡和细胞活力改变,为建立体外癫痫研究模型奠定基础。

### 一、材料与方法

1. 实验动物:刚出生1 d SD大鼠(空军军医大学动物实验中心),不限雌雄。实验获空军军医大学动物伦理委员会批准。

2. 主要试剂:细胞培养等常规试剂(GIBCO);DMEM培养基(Invitrogen);脂多糖(LPS)(Sigma);GFAP抗体(Sigma);凋亡检测试剂盒(Takara Bio);MTT检测试剂盒(Beyotime)。

3. 主要仪器:细胞培养箱(Thermo);激光共聚焦显微镜(Olympus)。

4. 方法:(1)星形胶质细胞原代培养:将出生1 d大鼠浸泡于75%酒精消毒30 s,取出大鼠无菌剪刀断头,从枕骨大孔处剪开颅骨,将鼠脑取出放在预冷D-Hanks液中,利用眼科剪在显微镜下分离脑膜和血管,剥离大脑半球后,将其移入无菌培养皿中,剪碎脑组织,加胰蛋白酶(0.25%),将组织置于孵育箱中,37℃下消化10 min。消化完毕后,将组织移入离心管中,加10%胎牛血清(FBS)的DMEM使消化终止,使用抛光吸管反复吹打组织,待组织混合均匀后,离心管放在预冷离心机(1 000 r/min, 10 min),弃掉上清后加入10% FBS的DMEM培养基,使细胞重悬。过滤后收集滤液,离心(1 000 r/min, 10 min),收集沉淀。重悬细胞后行细胞计数,将细胞种植于培养瓶(多聚赖氨酸铺底)。置入细胞培养箱(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)。细胞长满瓶底时,将培养瓶固定于水平摇床(37℃, 260 r/min),持续18 h。(2)星形胶质细胞传代培养:首先将10% FBS的DMEM培养基从4℃冰箱取出,室温下放置30 min。将培养瓶中原先培养基倒掉,用D-Hanks液洗细胞2次去掉残留FBS,以至于不影响消化。冲洗后加入0.25%胰酶,镜下观察,有2/3细胞脱离瓶壁时,加10% FBS的DMEM培养基中止消化,用抛光吸管吹打瓶

底,以便使剩余星形胶质细胞从瓶壁脱离,显微镜下计数板计数后,将细胞接种至多聚赖氨酸铺底的75 ml培养瓶中,置于细胞培养箱(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)中培养。(3)星形胶质细胞纯度鉴定:6孔板内预先放置多聚赖氨酸包被的细胞爬片,星形胶质细胞传代培养后,以 $1.0 \times 10^5$ /ml密度种植在培养板培养,放入培养箱孵育(37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 24 h)。4%多聚甲醛固定细胞爬片30 min, 0.01% PBS洗30 min,然后将爬片移入封口膜铺底的6孔板,行GFAP免疫荧光检测,在含有小鼠抗GFAP抗体(1:2 000)中过夜,然后用Alexa Fluor 594-抗小鼠IgG(1:400)避光孵育4 h。核用HOECHST标记。抗淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜下,随机取5个不重叠视野,拍照,计算星形胶质细胞纯度。(4)脂多糖干预和分组:取传至第3代星形胶质细胞,分别接种于6孔和96孔培养板,在培养箱中培养2~3 d,按加入药物分组:①对照组:加入不含脂多糖培养基;②脂多糖干预组:加入含脂多糖(1 μg/ml)培养基。加药后在细胞培养箱中,继续培养24 h和72 h。细胞凋亡检测分组:脂多糖-24 h组、对照-24 h组、脂多糖-72 h组、对照-72 h组;细胞活力检测分组:脂多糖-0 h组、脂多糖-24 h组、脂多糖-72 h组。脂多糖-0 h组为加入脂多糖之前进行细胞活力测定。脂多糖干预分组:脂多糖干预组和对照组。(5)TUNNEL法检测星形胶质细胞凋亡:脂多糖干预24 h和72 h,分别取出干预组和对照组6孔板,去掉培养基后,加4%多聚甲醛固定30 min。PBS液洗片后,将细胞爬片移入封口膜铺底的6孔板内,然后加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温反应20 min,封闭内源性过氧化物酶。PBS液洗后,加0.1%蛋白酶K(4℃, 2 min)反应,随后加入反应混合液(37℃, 避光60 min)。加过氧化物酶50 μl(37℃, 60 min)反应。在光学显微镜下,加入DAB显色剂50 μl,控制反应时间。凋亡显示清晰时, PBS液冲洗终止反应,用甲基绿轻度衬染、晾干,用中性树胶封片,光学显微镜下阅片。细胞中有棕褐色颗粒者为凋亡细胞。随机选取5个视野,计算各组星形胶质细胞凋亡率。星形胶质细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/细胞总数×100%。(6)MTT法测定星形胶质细胞活力:在96孔板中测定细胞活力。脂多糖干预24 h、72 h,每个点分别设对照,另外设定5个孔为设备校正。干预组每孔(n=5)加入200 μl含脂多糖的培养基,对照组加入不含脂多糖的培养基,将培养板置于细胞孵育箱中(37℃),分别孵育24 h和72 h,在各时间点用无血清DMEM充分漂洗,最后加入10% FBS的DMEM培养基200 μl,然后,每孔加入20 μl

MTT(5 mg/ml)工作液,培养4 h,吸去上清,加二甲基亚砷 150  $\mu$ l,固定后震荡 10 min,甲臞溶解,测定A490值。校正孔加DMSO无MTT。细胞活力(%)=干预组细胞A490值/对照组细胞A490值  $\times$  100%。(7)星形胶质细胞-GFAP免疫组化:脂多糖干预24 h,分别取出干预组和对照组6孔板,去掉培养基后,4%多聚甲醛固定细胞爬片30 min,0.01% PBS洗30 min,然后将爬片移入封口膜铺底的6孔板,行GFAP免疫荧光检测,加小鼠抗GFAP抗体(1:2 000)4  $^{\circ}$ C过夜,加Alexa Fluor 594-抗小鼠IgG(1:400)4 h,封片,激光共聚焦显微镜观察、拍照。

5. 统计学方法:使用SPSS 16.0进行统计分析。数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )的方式进行表示,方差分析比较两组数据之间的差异,多组两两比较使用SNK法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. 脂多糖干预星形胶质细胞对细胞凋亡和活力的影响:见图1(见本期封三),表1、2。LPS干预星形胶质细胞24 h,可见部分棕色细胞核(图1B),对照组偶见棕色细胞核(图1A);LPS干预72 h,棕色细胞核数量明显增加(图1D),并且棕色加深,对照组偶见棕色细胞核(图1C)。干预24 h,脂多糖-24 h组星形胶质细胞凋亡率为与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );干预72 h,脂多糖-72 h组星形胶质细胞凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。脂多糖干预72 h,细胞活力明显下降,与干预前及24 h时比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2. 脂多糖干预对星形胶质细胞形态的影响:见图2(见本期封三)。因脂多糖干预72 h,星形胶质细胞出现大量凋亡,细胞活力下降,因此,没有对其进行GFAP免疫荧光检测。脂多糖干预24 h,GFAP免疫荧光检测显示,干预组星形胶质细胞较对照组出现染色加深、增生肥大以及突起明显增多,在形态学上出现活化特征。

**讨论** 研究认为脑神经元损伤、功能失调及异常连接是癫痫的主要发病因素<sup>[4]</sup>。因此,既往多数关于抗癫痫药物研究均靶向脑神经元。然而,越来越多的证据表明,星形胶质细胞与脑神经元之间的异常信号,在驱动网络过度兴奋中起重要作用<sup>[5]</sup>。增生的星形胶质细胞是颞叶癫痫患者海马硬化的主要病理特征,并且星形胶质细胞功能失调也可能与癫痫发生有关,星形胶质细胞在癫痫发生的病理生理过程中发挥重要作用。

炎症和癫痫是相互联系的,炎症促进脑神经元过度兴奋和癫痫发作,而神经胶质细胞免疫炎性功

表1 脂多糖对星形胶质细胞凋亡影响(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡率
脂多糖-24 h	7.00 $\pm$ 2.23
对照-24 h	3.26 $\pm$ 1.22
脂多糖-72 h	36.40 $\pm$ 5.32 <sup>a</sup>
对照-72 h	4.00 $\pm$ 1.59
F值	219.409
P值	< 0.001

注:与对照-72 h组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

表2 脂多糖对星形胶质细胞活力的影响(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	星形胶质细胞活力
脂多糖-0 h	100.23 $\pm$ 5.34
脂多糖-24 h	91.42 $\pm$ 9.88
脂多糖-72 h	51.21 $\pm$ 4.58 <sup>ab</sup>
F值	69.653
P值	< 0.001

注:与脂多糖-0 h组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与脂多糖-24 h组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

能失调是诱发或导致癫痫发作的常见因素。另一方面,急性癫痫发作会上调小胶质细胞和星形胶质细胞促炎细胞因子产生,从而触发下游炎性介质级联反应。因此,癫痫发作和炎性介质形成反馈回路,相互促进<sup>[6]</sup>。脑损伤后会出现炎症,以及反应性星形胶质细胞增生,作为对应激或损伤的反应,星形胶质细胞由静息状态转向活化状态,这是机体为限制损伤和维持内环境稳定的基本反应。星形胶质细胞可被多种因素激活,包括多种病原体、脂多糖和氧化应激,星形胶质细胞激活产生炎性细胞因子和环氧合酶-2<sup>[7]</sup>。小胶质细胞和星形胶质细胞可以促进或抑制脂多糖诱导的神经炎症<sup>[8]</sup>。研究显示全身给予中等剂量的脂多糖,可以引起星形胶质细胞活化<sup>[9]</sup>。并且神经胶质纤维酸性蛋白mRNA的表达也受脂多糖的调节<sup>[10]</sup>。脂多糖触发小胶质细胞和星形胶质细胞释放活性氧和促炎细胞因子<sup>[11]</sup>。炎症信号不仅可以通过小胶质细胞激活来放大,也可以通过星形胶质细胞来放大<sup>[12]</sup>。被病原或非感染因素激活后,星形胶质细胞释放各种炎性因子,抗炎分子和炎性因子会同时出现,但是当正常的反馈机制无法消除炎症时,胶质细胞释放的炎性因子反过来也促进自身活化,这种循环在癫痫发生中发挥重要作用。在包括中枢神经系统损伤在内的许多情况下,炎症和内在修复过程之间存在平衡,从而影响功能恢复<sup>[13]</sup>。大鼠脑皮质暴露于脂多糖,迅速诱导了脑神经元兴奋性增加,导致癫痫发作<sup>[14]</sup>。

Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)存在于中

枢神经系统,在小胶质细胞、神经元和星形胶质细胞上均有表达,主要在促炎性细胞因子的产生中发挥作用<sup>[15]</sup>。TLRs表达于体外培养的人星形胶质细胞,包括TLR2、TLR3及TLR4<sup>[16]</sup>。星形胶质细胞TLR3持续性表达,然而TLR2、TLR4表达在不同研究结果不一致<sup>[16-17]</sup>,可能是细胞来源和培养条件不同所致。星形胶质细胞可表达大量的TLR3受体,脂多糖与其结合,激活NF- $\kappa$ B通路<sup>[18]</sup>,导致星形胶质细胞大量增殖,并释放TNF- $\alpha$ 、IL-1等炎性因子。有研究显示脂多糖是TLR4的主要配体<sup>[19]</sup>,因此本研究采用经典的致炎剂脂多糖干预星形胶质细胞,模拟在体星形胶质细胞病理变化过程。

星形胶质细胞在致炎剂脂多糖作用下变得活化,表现为细胞肥大,神经胶质纤维酸性蛋白表达增加<sup>[20-21]</sup>。在本研究中,脂多糖干预星形胶质细胞24 h,星形胶质细胞出现以上细胞活化的特征性改变。为了能使脂多糖干预星形胶质细胞活化的同时,而不引起明显细胞死亡,我们对脂多糖干预浓度和时间进行了探索。在预实验中发现,10~100  $\mu$ g/ml脂多糖干预星形胶质细胞24 h可导致大量细胞死亡、脱片,因此采用1  $\mu$ g/ml脂多糖干预星形胶质细胞。本研究发现在体外培养星形胶质细胞时,脂多糖干预24 h,没有引起明显的细胞凋亡和活力下降,而脂多糖干预72 h,星形胶质细胞存在明显凋亡,同时细胞存活率也明显下降。因此,脂多糖(1  $\mu$ g/ml)干预星形胶质细胞24 h,可以作为研究星形胶质细胞的体外活化的细胞模型,为研究活化星形胶质细胞的受体表达、功能变化奠定基础。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 文章整体设计及撰写为孟宪栋,细胞培养为孟宪栋、亢君君、张海锋

### 参 考 文 献

- [1] Vezzani A, French J, Bartfai T, et al. The role of inflammation in epilepsy[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(1): 31-40. DOI: 10.1038/nrneurol.2010.178.
- [2] Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 144. DOI: 10.1186/s12974-018-1192-7.
- [3] Aronica E, Crino PB. Inflammation in epilepsy: clinical observations[J]. *Epilepsia*, 2011, 52 Suppl 3: 26-32. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2011.03033.x.
- [4] Farrell JS, Wolff MD, Teskey GC. Neurodegeneration and Pathology in Epilepsy: Clinical and Basic Perspectives[J]. *Adv Neurobiol*, 2017, 15: 317-334. DOI: 10.1007/978-3-319-57193-5\_12.
- [5] Nikolic L, Nobili P, Shen W, et al. Role of astrocyte purinergic signaling in epilepsy[J]. *Glia*, 2020, 68(9): 1677-1691. DOI: 10.1002/glia.23747.
- [6] Sanz P, Garcia-Gimeno MA. Reactive Glia Inflammatory Signaling Pathways and Epilepsy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4096. DOI: 10.3390/ijms21114096.
- [7] Sawikr Y, Yarla NS, Peluso I, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The Preventive and Therapeutic Potential of Polyphenolic Nutraceuticals[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, 108: 33-57. DOI: 10.1016/bs.apesb.2017.02.001.
- [8] Sfera A, Gradini R, Cummings M, et al. Rusty Microglia: Trainers of Innate Immunity in Alzheimer's Disease[J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 1062. DOI: 10.3389/fneur.2018.01062.
- [9] Saito M, Chakraborty G, Hui M, et al. Ethanol-Induced Neurodegeneration and Glial Activation in the Developing Brain[J]. *Brain Sci*, 2016, 6(3): 31. DOI: 10.3390/brainsci6030031.
- [10] Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker[J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(6): 364-374. DOI: 10.1016/j.tins.2015.04.003.
- [11] Magrone T, Marzulli G, Jirillo E. Immunopathogenesis of neurodegenerative diseases: current therapeutic models of neuroprotection with special reference to natural products[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(1): 34-42. DOI: 10.2174/138161212798919057.
- [12] Liu LR, Liu JC, Bao JS, et al. Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1024. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01024.
- [13] DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation; the devil is in the details[J]. *J Neurochem*, 2016, 139 Suppl 2: 136-153. DOI: 10.1111/jnc.13607.
- [14] Rodgers KM, Hutchinson MR, Northcutt A, et al. The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures[J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 9): 2478-2486. DOI: 10.1093/brain/awp177.
- [15] Abg Abd Wahab DY, Gau CH, Zakaria R, et al. Review on Cross Talk between Neurotransmitters and Neuroinflammation in Striatum and Cerebellum in the Mediation of Motor Behaviour[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 1767203. DOI: 10.1155/2019/1767203.
- [16] Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 8071-8089. DOI: 10.1007/s12035-016-0297-1.
- [17] Crack PJ, Bray PJ. Toll-like receptors in the brain and their potential roles in neuropathology[J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(6): 476-480. DOI: 10.1038/sj.icb.7100103.
- [18] Zhang J, Yu C, Zhang X, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 37. DOI: 10.1186/s12974-017-1052-x.
- [19] Eisenstein TK. The Role of Opioid Receptors in Immune System Function[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2904. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02904.
- [20] Shigetomi E, Saito K, Sano F, et al. Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 996. DOI: 10.3390/ijms20040996.
- [21] Zamnian JL, Xu L, Foo LC, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(18): 6391-6410. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.

(收稿日期: 2020-10-03)

(本文编辑: 戚红丹)