DOI:10.16016/j.1000-5404.201504153

甲酰基肽受体 1 对 BV-2 细胞迁移的影响及机制的体外研究

薛 鑫[1],陈星星[1],王 冠[1],郭乔楠[2],刘明永[1],赵建华[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所脊柱外科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院病理科[2])

[摘要] **目的** 探讨甲酰基肽受体 1(formyl peptide receptor 1,FPR1)对 BV-2 细胞迁移的影响及潜在机制。**方法** 免疫荧光染色检测 BV-2 细胞 FPR1 的表达,Transwell 小室实验分别检测浓度为 1、10、50、100、500 nmol/L 的 FPR1 特异性激动剂(formylmethionyl-leucyl-phenylalanine,fMLP)对细胞迁移的影响,划痕实验及 Transwell 小室实验验证 fMLP 促进细胞迁移的作用可以被 FPR1 特异性阻断剂 Boc-MLF 所抑制。Western blot 检测激动剂组、阻断剂组和阻断剂 + 激动剂组 BV-2 细胞经干预后其 FPR1 蛋白和磷酸化细胞外信号调节激酶(phospho-extracellular regulate kinase,p-ERK)蛋白表达量的变化。**结果** 经免疫荧光染色结果显示,BV-2 细胞表达 FPR1,主要位于细胞膜表面。随着 fMLP 浓度的升高,Transwell 迁移实验结果显示 BV-2 细胞的迁移能力明显增加($P<0.05$),呈现出明显的剂量依赖性。100 nmol/L 及 500 nmol/L 激动剂组效果最明显,fMLP 促进 BV-2 细胞迁移的最适浓度为 100 nmol/L。划痕及 Transwell 小室实验结果显示 5 μmol/L 的 Boc-MLF 可显著阻断上述现象($P<0.05$)。fMLP 可以上调 BV-2 细胞中 FPR1 的表达($P<0.05$),并且显著活化胞内 ERK 信号通路,上调 p-ERK 蛋白的表达水平($P<0.05$),Boc-MLF 又可显著抑制上述改变($P<0.05$)。**结论** BV-2 细胞表达 FPR1,且 FPR1 在促进 BV-2 细胞迁移中具有重要作用。

[关键词] FPR1;fMLP;Boc-MLF;细胞迁移;小胶质细胞

[中图法分类号] R322.81; R329-33; R329.24 [文献标志码] A

Formyl peptide receptor 1 promotes migration in mouse microglial cell line BV-2

Xue Xin[1], Chen Xingxing[1], Wang Guan[1], Guo Qiaonan[2], Liu Mingyong[1], Zhao Jianhua[1] ([1]Department of Spine Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of formyl peptide receptor 1 (FPR1) on the migration of BV2 cells and investigate the underlying mechanism. **Methods** The expression of FPR1 receptor in BV-2 cells was detected by immunofluorescence staining. Transwell assay was used to detect the effect of FPR1 receptor specific agonist, formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), at different concentrations (1, 10, 50, 100 and 500 nmol/L) on the alterations of cell migration, while the scratch test and Transwell assay were used to verify the role of fMLP in the promotion of cell migration whether can be inhibited by FPR1 specific antagonist, Boc-MLF, or not. The protein expression of FPR1 was detected by Western blotting in the BV-2 cells stimulated with different concentrations of fMLP. After stimulated with 100 nmol/L fMLP and 5 μmol/L Boc-MLF, the expression of phospho-extracellular regulate kinase (p-ERK) in the cells was detected by Western blotting. **Results** Immunofluorescence staining indicated that FPR1 receptor was expressed in BV-2

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81401016)

[通信作者] 赵建华,E-mail: zhaojianhua1964@yahoo.com
刘明永,E-mail: 670199844@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.020.html(2015-11-24)

cells, mainly located in the cell membrane. With the increase of fMLP doses, Transwell assay showed that the migration of BV-2 cells was enhanced significantly ($P<0.05$) in a dose-dependent fashion. The 100 and 500 nmol/L fMLP showed most obvious effect, while the optimal fMLP concentration to promote BV-2 cell migration was 100 nmol/L. The scratch test and Transwell assay verified that those above effects could be inhibited by 5 μmol/L Boc-MLF ($P<0.05$). The specific FPR1 agonist, fMLP up-regulated the FPR1 receptor expression in BV-2 cells ($P<0.05$), activated ERK signaling pathway, and increased p-ERK protein expression significantly ($P<0.05$). The FPR1 specific antagonist Boc-MLF inhibited the above changes significantly ($P<0.05$). **Conclusion** FPR1 receptor is expressed in the BV-2 cells, and FPR1 plays an important role in the promotion of BV-2 cells migration.

[**Key words**] formyl peptide receptor 1; formylmethionyl-leucyl-phenylalanine; Boc-MLP; migration; ERK signal pathway

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81401016). Corresponding author: Zhao Jianhua, E-mail: zhaojianhua1964@yahoo.com; Liu Mingyong, E-mail: 670199844@qq.com

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)发病率高、致残率高、病死率低,往往导致损伤节段以下肢体严重的功能障碍,严重影响患者生活质量。SCI 后恢复期局部免疫反应对于神经组织损伤和神经功能恢复具有"双刃剑"中的有利作用,为神经功能的恢复所必需[1]。小胶质细胞(microglia)是中枢神经系统(central nervous system,CNS)的单核-巨噬细胞,是 CNS 固有的吞噬细胞,是中枢神经系统中的第一道也是最主要的一道免疫防线[2]。作为 SCI 后的主要炎症细胞,小胶质细胞在 SCI 后局部的浸润、聚集和吞噬功能与其预后密切相关。而炎症细胞的迁移是通过病原或者自体来源的趋化因子与相应的 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor,GPCR)结合而实现的,甲酰基肽受体(formylpeptide receptors, FPRs)是以趋化炎症细胞为主要功能的受体[3-4]。人类 FPRs 包括 FPR1、FPR2 和 FPR3,小鼠 FPR1 是人 FPR1 的类似物。目前 FPR1 与小胶质细胞迁移之间的关系及其机制尚不清楚。本研究以 FPR1 为切入点,基于 BV-2 小鼠小胶质细胞系,利用其特异性激动剂(formylmethionyl-leucyl-phenylalanine,fMLP)及特异性阻断剂(Boc-MLF)等药理学手段,结合 Transwell、划痕实验及 Western blot 技术,探索 FPR1 与小胶质细胞迁移之间的关系及其可能机制,以期为临床 SCI 后的治疗及功能康复提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

BV-2 细胞系购于上海斯信生物科技有限公司,改良型 1640 培养基(HyClone 公司,美国),胎牛血清、Transwell 小室(Millipore 公司,美国),fMLP 及 Boc-MLF、FPR1 抗体(R&D 公司,美国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司,北京),ERK 抗体及磷酸化细胞外信号调节激酶(phospho-extracellular regulate kinase,p-ERK)抗体、山羊抗兔 IgG 抗体(Abcam 公司,美国)。二氧化碳培养箱(Thermo Forma 公司,美国),Western blot 电泳仪、转膜仪(六一公司,北京),倒置荧光显微镜(Olympus 公司,美国),低温离心机、多功能酶标仪(Thermo scientific 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 BV-2 细胞培养 BV-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的改良型 1640 培养基中,37 ℃、5% CO_2 孵育箱中生长,隔日换液,待贴壁细胞生长铺满瓶底时用 0.25% 胰酶消化离心后,进行传代培养。

1.2.2 BV-2 细胞 FPR1 免疫荧光鉴定 取对数期生长的 BV-2 细胞经胰酶消化后以 3×10^5/mL 接种于激光共聚焦培养皿中,置于细胞孵育箱中培养,待细胞生长状态及细胞密度适宜后,弃掉培养基,用 PBS 洗涤 3 次,加入 4% 多聚甲醛 200 μL 固定 30 min,PBS 洗涤 3 次,正常山羊血清室温封闭 2 h,加入 FPR1 抗体(1∶1 000)100 μL,4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,暗室中加入荧光二抗(1∶200),室温孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次,加入 DAPI 染核 15 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,甘油封片后,激光共聚焦显微镜下拍照。

1.2.3 Transwell 小室细胞迁移实验 ①检测 FPR1 在 BV-2 细胞迁移中的作用。将 Transwell 小室放入 24 孔板中,上室加入 200 μL 无血清细胞悬液,每孔细胞约 10 000 个。空白对照组:下室加入含有 10% 胎牛血清的培养基 500 μL。激动剂组:下室分别加入含不

同浓度 fMLP(1、10、50、100、500 nmol/L)的培养基 500 μL。②验证 fMLP 促进 BV-2 细胞迁移的作用可被 Boc-MLF 所抑制。实验共分为 4 组。空白对照组、激动剂组及阻断剂组的 Transwell 上室分别加入含 10 000 个细胞的无血清培养基 200 μL。激动剂组:下室加入含 100 nmol/L fMLP 的培养基 500 μL;阻断剂组:下室加入含 5 μmol/L Boc-MLF 的基础培养液 500 μL;阻断剂组 + 激动剂组:预先用含 5 μmol/L Boc-MLF 的培养基干预 20 min,用 PBS 洗涤 3 遍后,换用无血清培养基悬浮细胞后接种于 Transwell 上室,细胞量约为 10 000 个,下室加入含 100 nmol/L fMLP 的培养基 500 μL。37 ℃、5% CO_2 条件下培养 48 h 后,用棉签擦除 Transwell 上室膜上的细胞后,将小室置于 4% 多聚甲醛中固定 20 min,0.1% 结晶紫染色 15 min,用 PBS 漂洗 3 次,室温下静置 24 h 后,显微镜下随机挑选 5 个视野,计数迁移到下室的细胞数,并计算每个视野的平均迁移细胞数。

1.2.4 细胞划痕实验 划痕实验进一步验证 FPR1 在 BV-2 细胞迁移中的作用可被 Boc-MLF 所抑制,将 BV-2 细胞接种至 24 孔板中,预先用含 10% 胎牛血清培养基培养至细胞铺满孔板底部,用 20 μL 枪头在各孔中心划 1 条宽度相等的划痕,用 PBS 漂洗刮落的细胞。分组情况、药物浓度及处理方法同 1.2.3,在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养,分别于 0、24 h 在倒置显微镜下拍照。

1.2.5 Western blot 检测 将 BV-2 细胞随机分为空白对照组、激动剂组、阻断剂组、阻断剂 + 激动剂组。激动剂组:含 100 nmol/L fMLP 的培养基干预 20 min;阻断剂组:含 5 μmol/L Boc-MLF 的培养基干预 20 min;激动剂 + 阻断剂组:预先用含 5 μmol/L Boc-MLF 的培养基干预 20 min 后,用 PBS 洗涤 3 遍,再加入含 5 μmol/L Boc-MLF 的培养基干预 20 min。收集各组处理后的细胞,提取总蛋白,采用 Western blot 检测各组 FPR1、p-ERK、t-ERK 蛋白表达水平,BCA 测定蛋白浓度;取等量蛋白(20 μg),上样,电泳跑胶,转膜目的蛋白至 PVDF 膜后 0.5% BSA 封闭 2 h;加入一抗 FPR1(1∶1 000)、p-ERK(1∶1 000)、t-ERK(1∶1 000)、Tubulin(1∶1 000)4 ℃过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,二抗为 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG(1∶5 000)室温孵育 2 h,洗膜 3 次,每次 10 min;加显色剂,Chemi Doc XR + 紫外凝胶成像仪扫描成像,条带分析测定使用 Image Lab 程序。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 15.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析。

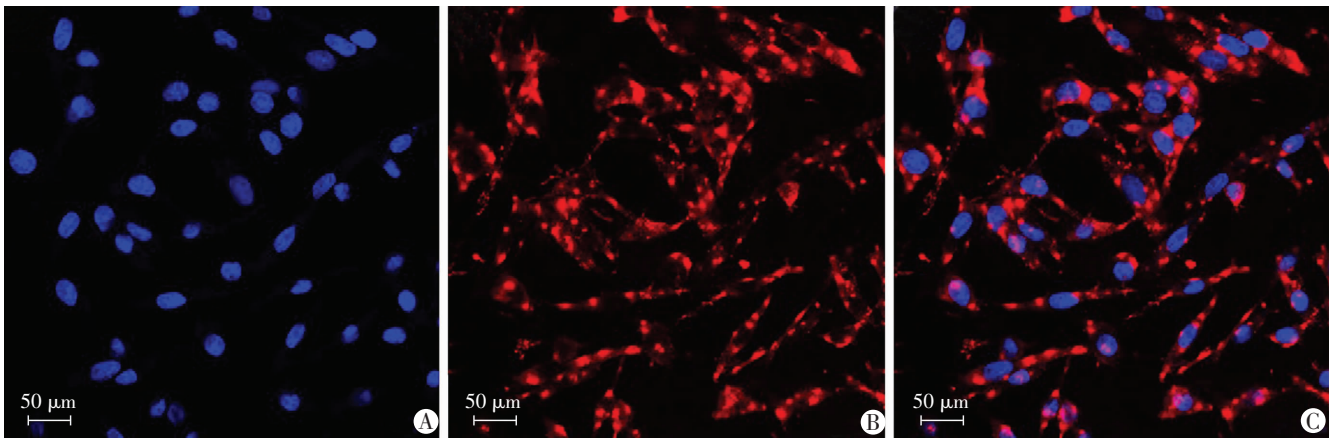
2 结果

2.1 BV-2 细胞中 FPR1 的鉴定

经免疫荧光染色鉴定:BV-2 细胞 FPR1 表达呈阳性(图 1)。

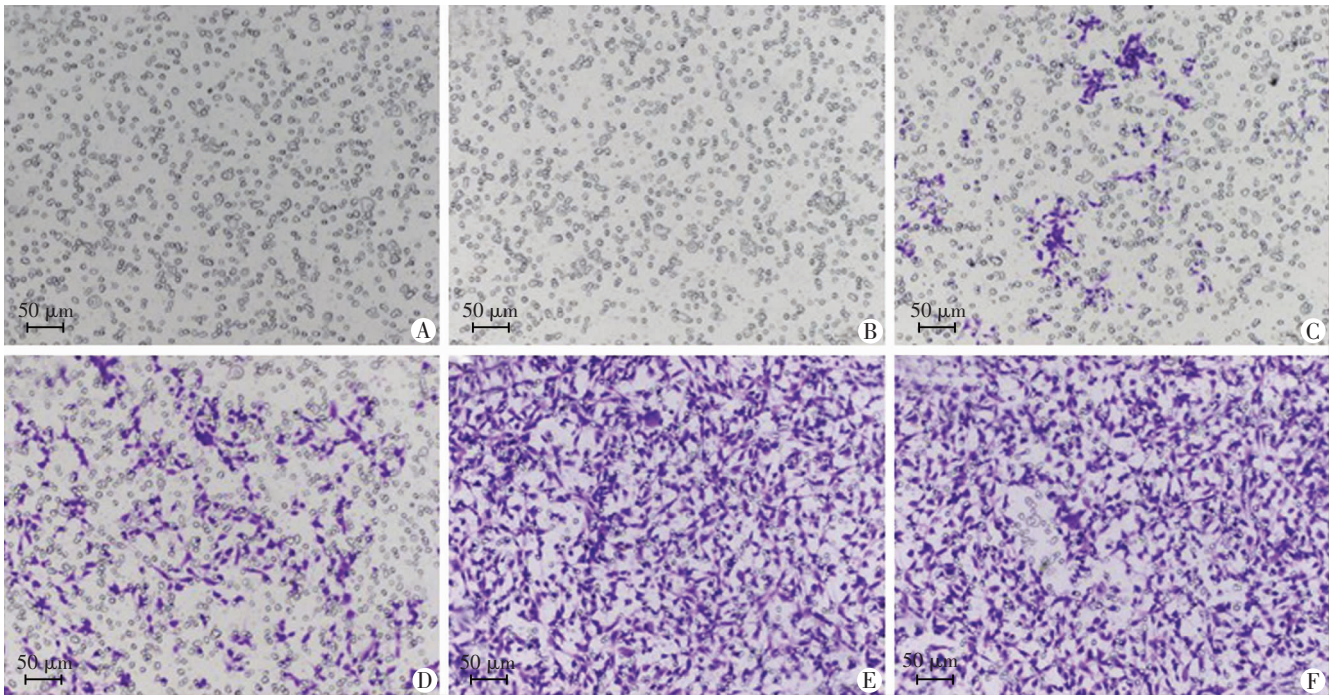
2.2 Transwell 实验检测 fMLP 对 BV-2 细胞迁移的影响

使用不同浓度 FPR1 特异性激动剂 fMLP(1、10、50、100、500 nmol/L)干预 BV-2 细胞 48 h 后,倒置相差显微镜观察显示:随着 fMLP 浓度的增高,除 1 nmol/L 组外,从 Transwell 上室迁移下室的细胞数量明显高于空白对照组($P<0.05$,$P<0.01$)。其中 100 nmol/L 组和 500 nmol/L 组效果显著,fMLP 促 BV-2 细胞迁移的适宜浓度为 100 nmol/L(图 2、3)。



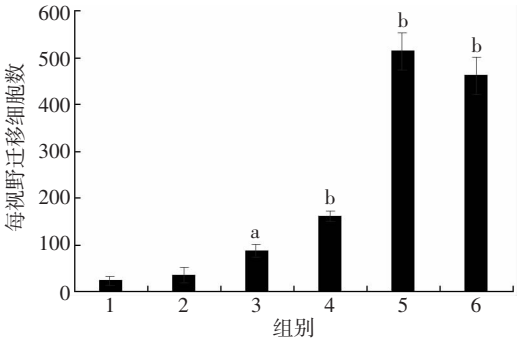
A:细胞核(蓝色);B:FPR1 膜表达(红色);C:融合

图 1 免疫荧光染色观察 BV-2 细胞表达 FPR1 (激光共聚焦显微镜)



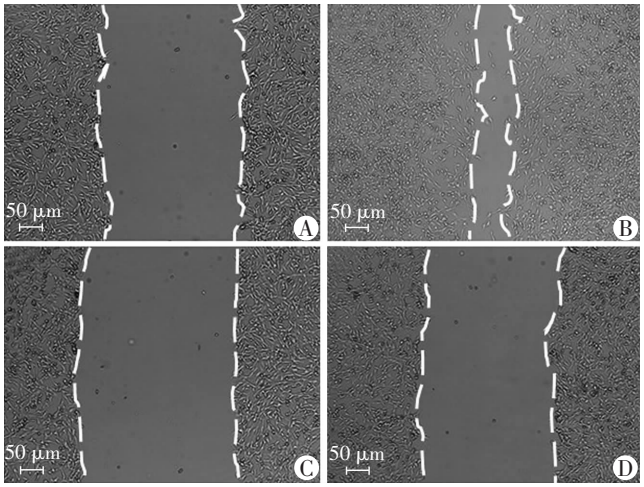
A:空白对照组;B~F:激动剂组(分别为 FPR1 特异性激动剂 fMLP 终浓度为 1、10、50、100、500 nmol/L)

图 2　Transwell 证实 fMLP 能够促进 BV-2 细胞的迁移　(结晶紫)



1:空白对照组;2~6:激动剂组(分别为 FPR1 特异性激动剂 fMLP 终浓度为 1、10、50、100、500 nmol/L)　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较

图 3　Transwell 检测的定量分析结果



A:空白对照组;B:激动剂组;C:阻断剂组;D:阻断剂+激动剂组

图 4　划痕实验检测 FPR1 对 BV-2 细胞的迁移能力的影响
(倒置相差显微镜)

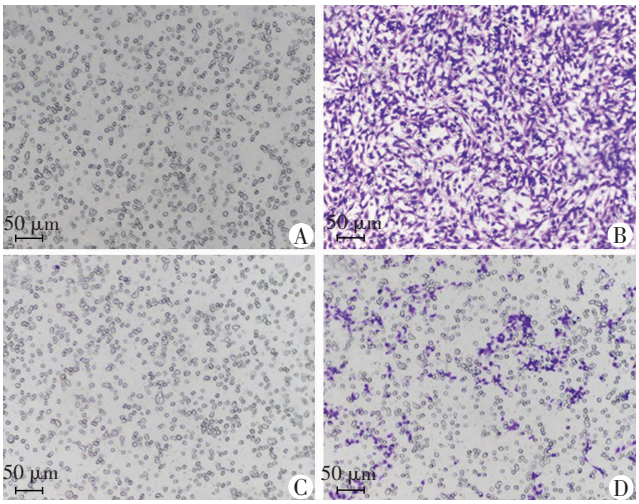
2.3　划痕实验检测 FPR1 对 BV-2 细胞迁移的影响

为了验证 FPR1 是否对 BV-2 细胞的迁移起到促进作用,我们采用划痕实验,结果证实:与空白对照组相比,100 nmol/L fMLP 的激动剂组能够显著促进 BV-2 细胞的迁移,5 μmol/L 的 Boc-MLF 阻断剂能抑制 FPR1 促进迁移的作用(图 4)。通过测量 24 h 后细胞迁移到划痕区域的相对面积,证实激动剂组是空白对照组的(2.94±0.56)倍,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4　Transwell 实验检测 FPR1 对 BV-2 细胞迁移的影响

为了进一步验证 FPR1 对 BV-2 细胞的迁移作用,我们采用 Transwell 实验再次验证划痕实验所得结果。100 nmol/L fMLP 的激动剂组较空白对照组能够显著促进 BV-2 细胞的迁移,其促进迁移的效应能被阻断剂

所抑制(图5)。根据48 h后迁移的相对细胞数得出,激动剂组是空白对照组的(11.71±0.16)倍,差异有统计学意义($P<0.01$)。此结果与细胞划痕实验结果一致,表明FPR1在BV-2细胞迁移中具有重要的作用。

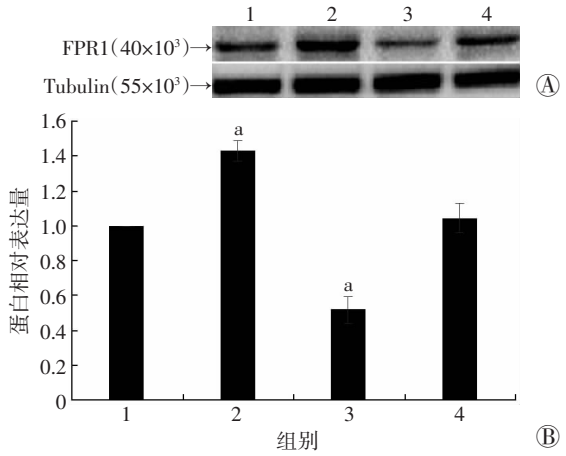


A:空白对照组;B:激动剂组;C:阻断剂组;D:阻断剂+激动剂组

图5 Transwell实验检测FPR1对BV-2细胞迁移能力的影响(倒置相差显微镜)

2.5 BV-2细胞中FPR1蛋白表达水平可影响BV-2细胞的迁移

各组细胞经分别干预后,Western blot检测结果显示(图6):与空白对照组相比,激动剂组FPR1蛋白表达水平升高($P<0.01$);阻断剂+激动剂组的FPR1蛋白表达水平相比激动剂组降低($P<0.01$)。这表明fMLP可以上调BV-2细胞FPR1蛋白的表达水平,此作用又可被Boc-MLF所抑制,证实激活FPR1可增强BV-2细胞的迁移。

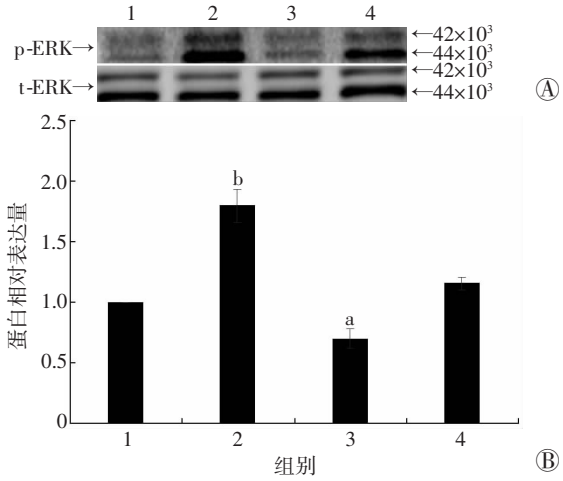


1:空白对照组;2:激动剂组;3:阻断剂组;4:阻断剂+激动剂组
A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图6 Western blot检测各组BV-2细胞中FPR1蛋白的表达

2.6 fMLP通过活化ERK信号通路对细胞迁移的影响

各组细胞经分别干预后,Western blot检测结果显示(图7):与空白对照组相比,激动剂组p-ERK蛋白表达水平升高($P<0.01$);阻断剂+激动剂组的p-ERK蛋白表达水平相比激动剂组则又降低($P<0.05$)。这表明ERK信号通路参与FPR1对BV-2细胞迁移能力的调控。



1:空白对照组;2:激动剂组;3:阻断剂组;4:阻断剂+激动剂组
A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较

图7 Western blot检测各组BV-2细胞中p-ERK、t-ERK蛋白的表达

3 讨论

SCI后的神经功能修复是困扰科学界的难题,以干细胞移植为代表的研究虽然取得了一定进展,但因移植细胞难以存活和分化,导致其临床应用治疗陷入困境。而SCI后局部微环境,尤其是免疫反应状态在其中起着至关重要的作用。小胶质细胞是神经胶质细胞的一种,相当于脑和脊髓中的巨噬细胞,是中枢神经系统的第一道也是最重要的免疫防线。SCI后,小胶质细胞不断清除损坏的神经细胞、斑块及感染性物质,以提供有利于神经再生的微环境、促进轴突和髓鞘再生[5-7]。因此,SCI后小胶质细胞参与的炎症反应对SCI的治疗效果和康复起着至关重要的作用。正常情况下,小胶质细胞的迁移数量和能力有限成为影响SCI后神经功能康复的一个重要因素。鉴于此,如何提高SCI后康复期小胶质细胞的迁移能力和增加小胶质细胞迁移的数量是目前研究的热点和焦点。

本课题组前期研究发现,敲除小鼠FPR基因导致

吞噬性炎症细胞趋化能力障碍,在炎症区聚集减少,吞噬能力降低而导致创伤愈合延缓、细菌清除能力下降而致残率升高[8]。同时,有研究表明炎症细胞浸润、迁移是由病原或自体来源的趋化因子与相应的 G 蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)结合而实现的,FPR1 作为 GPCR 的一种,是炎症细胞趋化的主要功能受体[9-10]。本研究通过体外实验发现 fMLP 对 BV-2 细胞的迁移能力具有促进作用,且具有浓度依赖性,最适浓度为 100 nmol/L,该浓度下的 fMLP 可明显上调 BV-2 细胞中 FPR1 蛋白的表达,并且 p-ERK 的蛋白水平也明显上调,提示在细胞外配体作用的情况下,可通过 FPR1 将信号转导至细胞内部引起 ERK 相关通路蛋白的活化,进而通过一系列内部信号转导通路,最终引起细胞运动蛋白的变化,如 F-actin、Tubulin 等,可增强 BV-2 细胞的运动能力,进而可能为 SCI 后的功能康复起到积极作用。研究表明,SCI 损伤后的小胶质细胞活化可产生两种类型的小胶质细胞:M1 型和 M2 型,脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)和干扰素 γ(interferon-γ,IFNγ)诱导的通过“经典活化的”(classically activated)促炎性 M1 小胶质细胞在 SCI 后起到持续性的损伤作用,而白介素-4(interleukin-4,IL-4)诱导的 M2(alternatively activated)小胶质细胞在 SCI 后起到保护作用而促进轴突再生,对 SCI 的治疗和康复具有重要作用[11]。同时,本课题组前期研究表明:激活 FPR1 可使局部小胶质细胞向 M2 表型转换增多[12]。结合本研究的结果提示:FPR1 的激活不仅可在损伤后功能康复中促进小胶质细胞的迁移能力,而且可促进小胶质细胞的表型转换,从两方面起到积极作用来提高康复效果。

综上所述,本研究从 FPR1 出发,基于小胶质细胞的细胞系 BV-2,初步发现 FPR1 的激活可促进 BV-2 细胞的迁移及其潜在的分子机制 ERK,为 SCI 后促进小胶质细胞向损伤部位迁移参与炎症反应提供了一个新靶点,也为 fMLP 向临床应用转化提供了一定的理论依据。同时,本研究也存在不足,FPR1 促进小胶质细胞迁移是否存在其他信号通路,以及缺少动物实验验证。这也是我们下一步研究的方向。

参考文献:

[1] Held K S, Steward O, Blanc C, *et al*. Impaired immune responses following spinal cord injury lead to reduced ability to control viral infection[J]. Exp Neurol, 2010, 226(1): 242-253. DOI:10.1016/j.expneurol.2010.08.036

[2] Spitzbarth I, Bock P, Haist V, *et al*. Prominent microglial activation in the early proinflammatory immune response in naturally occurring canine spinal cord injury [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2011, 70(8): 703-714. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182270f8e

[3] Le Y, Murphy P M, Wang J M. Formyl-peptide receptors revisited[J]. Trends Immunol, 2002, 23(11): 541-548.

[4] Riegger T, Conrad S, Liu K, *et al*. Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS)[J]. Eur J Neurosci, 2007, 25(6): 1743-1747.

[5] Marcondes M C, Furtado G C, Wensky A, *et al*. Immune regulatory mechanisms influence early pathology in spinal cord injury and in spontaneous autoimmune encephalomyelitis[J]. Am J Pathol, 2005, 166(6): 1749-1760.

[6] David S. Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury[J]. Prog Brain Res, 2002, 137: 407-414.

[7] Weinstein J R, Koerner I P, Moller T. Microglia in ischemic brain injury[J]. Future Neurol, 2010, 5(2): 227-246.

[8] Liu M, Chen K, Yoshimura T, *et al*. Formylpeptide receptors are critical for rapid neutrophil mobilization in host defense against Listeria monocytogenes[J]. Sci Rep, 2012, 2:786. DOI:10.1038/srep00786

[9] Devosse T, Dutoit R, Migeotte I, *et al*. Processing of HEBP1 by cathepsin D gives rise to F2L, the agonist of formyl peptide receptor 3[J]. J Immunol, 2011, 187(3): 1475-1485. DOI:10.4049/jimmunol.1003545

[10] Lee H Y, Lee S Y, Shin E H, *et al*. F2L, a peptide derived from heme-binding protein, inhibits formyl peptide receptor-mediated signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(4): 985-990. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.06.001

[11] Kigerl K A, Gensel J C, Ankeny D P, *et al*. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord[J]. J Neurosci, 2009, 29(43): 13435-13444. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009

[12] Liu M, Zhao J, Chen K, *et al*. G protein-coupled receptor FPR1 as a pharmacologic target in inflammation and human glioblastoma[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(3):283-288. DOI:10.1016/j.intimp.2012.07.015

(**收稿**:2015-04-28;**修回**:2015-07-17)

(编辑 龙 亮)