神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001396

氧糖剥夺损伤诱导星形胶质细胞分泌 IL-10 的机制初探

吕泽宇,何慕兰,石 霞,张 赟,杨 亭,李廷玉,陈 洁

(重庆医科大学附属儿童医院儿童营养研究中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,重庆 400014)

【摘 要】**目的**:探讨氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)损伤诱导星形胶质细胞分泌白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)的可能机制。**方法**:培养并鉴定原代星形胶质细胞,体外建立 OGD 损伤模型,分别利用 siTLR2(Toll-like receptor-2,TLR2)腺病毒、NF-κB(NF-kappa B)抑制剂 PDTC 干预,qRT-PCR 和 ELISA 分别检测损伤细胞 IL-10 的表达水平,Western blot 检测损伤细胞 TLR2、磷酸化 NF-κB p65(p-NF-κB p65)蛋白表达水平。免疫荧光检测 OGD 损伤细胞中 NF-κB p65 的亚细胞定位。**结果**:免疫荧光观察发现分离培养的原代星形胶质细胞纯度可达 90%以上。经体外 OGD 损伤处理后,OGD 损伤组 TLR2、p-NF-κB p65 的蛋白表达水平[(1.16 ± 0.10),(1.01 ± 0.08)]与 IL-10 的 mRNA 及蛋白表达水平[(0.00 ± 0.00),(513.01 ± 34.47)]较正常对照组[(0.49 ± 0.08),(0.23 ± 0.09),(0.00 ± 0.00),(381.89 ± 22.26)]均明显升高(P=0.001,P=0.000,P=0.026,P=0.005),且 p65 蛋白在细胞核内表达增加。siTLR2 腺病毒感染组 OGD 损伤的星形胶质细胞中 TLR2、p-NF-κB p65 的蛋白表达水平[(0.36 ± 0.13),(0.38 ± 0.10)]与 IL-10 的 mRNA 及蛋白表达水平[(0.00 ± 0.00),(567.05 ± 50.57)]较对照组[(1.33 ± 0.42),(0.92 ± 0.28),(0.00 ± 0.00),(703.60 ± 12.97)]明显降低(P=0.019,P=0.034,P=0.004,P=0.011)。与 OGD 处理组[(1.24 ± 0.23),(0.00 ± 0.00),(769.23 ± 23.37)] 相比,PDTC 干预可有效降低 p-NF-κB p65 蛋白 (0.26 ± 0.07) 与 IL-10 的 mRNA 及蛋白表达水平[(0.00 ± 0.00),(598.92 ± 42.73)](P=0.002,P=0.000,P=0.046),但并未影响 TLR2 的表达水平变化[(1.11 ± 0.24),(1.09 ± 0.94)](P=0.949)。**结论**:OGD 损伤可激活 TLR2/NF-κB 信号通路诱导星形胶质细胞分泌 IL-10。

【关键词】星形胶质细胞;白细胞介素-10;氧糖剥夺;Toll 样受体 2;核因子-κB

【中图分类号】R741.02;R392.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-10

Oxygen glucose deprivation injury induces IL-10 secretion from astrocytes and its mechanism

Lü Zeyu, He Mulan, Shi Xia, Zhang Yun, Yang Ting, Li Tingyu, Chen Jie

(Children's Nutrition Research Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Techmology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders)

【Abstract】***Objective***: To investigate the potential mechanism involved in interleukin (IL-10) secretion from astrocytes when being treated with oxygen glucose deprivation(OGD). ***Methods***: Primary astrocytes isolated from neonatal Sprague Dawley rats were cultivated and identified as usual methods. After being suffered from OGD injury, the cultured astrocytes were treated with either vehicle, siTLR2 (Toll-like receptor-2, TLR2) or PDTC(a NF-κB inhibitor), respectively. First, real-time PCR and ELISA techniques were employed to examine the levels of IL-10 transcription and expression in the OGD-injured astrocytes. Next, the protein levels of TLR2 and p-NF-κB p65 among these OGD-injured astrocytes were detected using Western blot. In addition, the subcellular distribution of NF-κB p65 in OGD-injured astrocytes was tested with immunofluorescence. ***Results***: Immunofluorescence revealed that the isolated primary cultured astrocytes reached a high purity more than ninety percent. Compared with the control group[(0.49 ± 0.08), (0.23 ± 0.09), (0.00 ± 0.00), (381.89 ± 22.26)], OGD treatment not only upregulated the TLR2, p-NF-κB p65 and IL-10 expression levels [(1.16 ± 0.10), (1.01 ± 0.08), (0.00 ± 0.00), (513.01 ± 34.47)] among these astrocytes (P=0.001, P=0.000, P=0.026, P=0.005), but also increased the protein expression level of NF-κB p65 in the nucleus. However, TLR2 siRNA effectively

作者介绍:吕泽宇,Email:617043483@qq.com,
研究方向:儿童营养与肠道黏膜免疫,干细胞免疫调节。

通信作者:陈 洁,Email:jchen010@foxmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81300522、81271385)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170912.1122.012.html (2017-09-12)

reduced the TLR2 expression level and prevented OGD-induced p-NF-κB p65 and IL-10 upregulation[(0.36 ± 0.13), (0.38 ± 0.10), (0.00 ± 0.00), (567.05 ± 50.57)] when compared with those in siTLR2-untreatment group [(1.33 ± 0.42), (0.92 ± 0.28), (0.00 ± 0.00), (703.60 ± 12.97)]. Additionally, PDTC also dramatically decreased p-NF-κB p65 and IL-10 expression levels[(0.26 ± 0.07), (0.00 ± 0.00), (598.92 ± 42.73)] without affecting TLR2 expression in OGD-injured astrocytes(1.09 ± 0.94) comparing with those in OGD group[(1.24 ± 0.23), (0.00 ± 0.00), (769.23 ± 23.37), (1.11 ± 0.24)](P=0.002, P=0.000, P=0.046, P=0.949). ***Conclusion***: TLR2/NF-κB signaling pathway may mediate OGD-induced IL-10 secretion from astrocytes.

【Key words】primary astrocytes; interleukin-10; oxygen glucose deprivation; Toll-like receptor-2; nuclear factor κB

新生儿缺氧缺血性脑损伤（hypoxic-ischemic brain damage, HIBD）是在围生期阶段由各种因素引起缺氧窒息，进而造成的新生儿脑损伤，是新生儿期最为常见的一种神经系统疾病[1]。尽管目前有许多可以改善 HIBD 结局的治疗方法，例如高压氧治疗法、亚低温疗法、神经保护疗法、中草药治疗等，但这些治疗方法并非特效，治疗效果存在一定的局限性[2-4]。

HIBD 发生后，氧气和葡萄糖对新生儿大脑的供应不足，可触发一系列的生化事件，包括细胞凋亡、神经炎症、兴奋性毒性作用、氧化应激等病理生理改变，从而导致中枢神经系统结构和功能的损伤[5-6]。众所周知，Toll 样受体（Toll-like receptors, TLRs）是连接获得性免疫与天然免疫的桥梁，而 TLR2 在小胶质细胞、星形胶质细胞及少突胶质细胞中均有表达[7]。越来越多的研究显示，在 HIBD 疾病中，由 Toll 样受体 2（Toll-like receptor-2, TLR2）介导的免疫应答扮演着十分重要的地位。Stridh 等[8]发现 HIBD 小鼠损伤 6 h 和 24 h 后，TLR2 表达上调；并且 TLR2 基因敲除小鼠和野生型小鼠相比，其大脑梗死面积明显减小。Ziegler 等[9]的研究也发现在缺血脑组织中，TLR2 的表达显著上调，TLR2 下游相关基因同时被激活。TLR2 在胞内含有终端反向重复序列同源性结构，通过与胞内一系列相关蛋白结合，诱导核因子（nuclear factor kappa B, NF-κB）等 TLRs 信号通路，从而触发机体先天性免疫应答，导致多种炎性因子、趋化因子、共刺激分子等多种效应分子的表达[10]。本课题组前期研究发现，HIBD 损伤可明显上调脑组织中 TLR2 的表达水平，同时 IL-10 的分泌水平也随之增加[11]。

白细胞介素-10（interleukin-10, IL-10）是由 Fiorentino 等[12]首次提出，此后有研究表明 IL-10 具有抗凋亡的作用[13]。体内研究发现，中脑动脉闭塞的大鼠在术后 3 h 通过尾静脉或侧脑室给予 IL-10 可明显减小脑梗死面积[14]。星形胶质细胞是中枢神经系统数量最多的细胞，在大脑中发挥多种重要作用，包括调控神经突触的形成与功能，调节大脑供血，并与内皮细胞共同调控血脑屏障的稳定[15]。大脑缺血后，星形胶质细胞可分泌多种细胞因子和神经营养因子以保护神经元免受损害，其中包括 IL-10 与胶质细胞来源的神经营养因子（glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF）等[16-17]。因此，本研究拟通过体外氧糖剥夺（oxygen glucose deprivation, OGD）损伤模型，探讨 OGD 损伤后诱导星形胶质细胞分泌 IL-10 的可能分子机制，为星形胶质细胞在神经损伤疾病中的作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 培养基、EBSS 购自 Hyclone 公司；胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）购自 BioInd 公司；多聚赖氨酸购自 Sigma 公司；Tryple 购自 Gibco 公司；总 RNA 提取试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白定量试剂盒购自 Bioteke 公司；cDNA 逆转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司；SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天公司；大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒购自 Promega 公司；细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物公司；PDTC 购自 Sigma 公司；小鼠抗大鼠 GFAP 抗体购自 Abcam 公司；DAPI 购自碧云天公司；兔抗大鼠 TLR2 抗体购自 Sigma 公司；兔抗大鼠 NF-kB p65 或 p-NF-κB p65 抗体购自 CST 公司；鸡抗小鼠二抗、羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司；引物均由华大基因有限公司合成。

1.2 仪器

CO_2 细胞培养箱、超净工作台、RNA 浓度测定仪、ELISA 酶标仪、超低温冰箱、RNA 浓度测定仪购自 Thermo 公司；CFX 定量 PCR 仪器、凝胶电泳系统、蛋白转膜系统购自 Bio-

Rad公司；细胞培养板、细胞培养皿购自 Corning 公司；高速离心机购自 Sigma 公司；倒置荧光显微镜购自 Nikon 公司；恒温水浴箱购自华普达科教公司。

1.3 方法

1.3.1 原代星形胶质细胞的培养 SD 大鼠购自重庆医科大学实验动物中心，在重庆医科大学附属儿童医院动物中心 IVC 级饲养。取 3 日龄新生大鼠的大脑皮层组织，转至装有 DMEM/F12 培养基的培养皿中，剪碎、吹打成细胞悬液状，200 目细胞筛过滤后转移至 15 mL 离心管中，112 g 离心 5 min 后，弃上清，加入 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬，将细胞悬液转入含有 8 mL DMEM/F12 培养基（含 10% FBS）的 10 cm 培养皿（0.1 mg/mL 浓度的多聚赖氨酸铺板）中，37 ℃、5%CO_2 孵箱中培养。每 3 天更换 1 次新鲜培养基，待细胞融合度达到 70%~80%时可用胰酶消化并按 1:2 的比例传代，传代后的细胞可用于后续实验。

1.3.2 免疫荧光检测 将星形胶质细胞接种到 6 孔板中，每孔 5×10^4 个细胞。24 h 后显微镜下观察细胞状态良好，可对其进行细胞免疫荧光鉴定。首先用含 0.5% Tween 20 的洗膜缓冲液（TBST）洗细胞 3 次，配制固定液（甲醇:冰乙酸=3:1）固定细胞，4 ℃孵育 20 min。TBST 洗细胞 3 次，利用 0.3%的 Triton X-100 孵育 10 min（打孔）。TBST 洗细胞 3 次后，应用 5% BSA（TBST 加 5% Bovine Serum Albumin，BSA）封闭 1 h。TBST 洗细胞 3 次，GFAP 或 NF-κB p65 一抗（浓度为 1:50）孵育，4 ℃过夜。次日复温 1 h 后，TBST 洗细胞 3 次，二抗（鸡抗小鼠或鸡抗兔，1:200）避光孵育细胞 30~45 min。TBST 洗细胞 3 次，DAPI（浓度为 1:800）染色 3~5 min 后，立即在倒置荧光显微镜下观察荧光。

1.3.3 OGD 损伤模型构建及干预 将生长状态良好的 P1 星形胶质细胞接种于 6 孔板中，每孔 5×10^5 个细胞。24 h 后镜下观察细胞状态良好后，将原先的 DMEM/F12 培养基更换为 EBSS 培养基（无糖和血清的培养基），5%O_2、95% N2 的条件下培养 60 min，随后将 EBSS 更换回新鲜的 DMEM/F12（含 10% FBS）培养基。同时以上述未处理的细胞作为对照组（正常对照组）。OGD 损伤前后均于光镜下观察正常细胞及损伤细胞的形态。在 OGD 模型的基础上，以 siTLR2 腺病毒感染星形胶质细胞，同时以 RFP 腺病毒作为对照。同样 OGD 损伤后，以终浓度为 20 μmol/L 的 PDTC 干预星形胶质细胞，以 OGD 组作为对照。siTLR2 腺病毒与 PDTC 干预 48 h 后，收取细胞及上清进行后续实验。

1.3.4 ELISA 检测细胞因子 IL-10 的分泌 按照 Promega 公司的大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒说明书进行操作。收集各组细胞，用 RIPA 裂解液（含有 1% PMSF）收取总蛋白，测定蛋白浓度。将 ELISA 试剂盒提前取出使其温度平衡至室温，根据实验需要准备样本和标准品，分别将样本与不同浓度的标准品加入相应反应孔（100 μL/孔），空白孔加入等体积的样本稀释液，封板胶封板，室温孵育 90 min 后洗涤液洗板 4 次；生物素标记的二抗（100 μL/孔）孵育 60 min 后洗板 4 次；加入酶结合物工作液（100 μL/孔）孵育 30 min 后洗板 4 次；加入 TMB 显色液（100 μL/孔），室温避光孵育 15~30 min，每孔加入 50 μL 终止液后，立即用酶标仪于 450 nm 波长下检测吸光度（absorbance，A）值。

1.3.5 qRT-PCR 检测相关 mRNA 表达水平变化 按照 BioTeke 公司的总 RNA 提取说明书提取细胞总 RNA。采用 Thermo RNA 系统检测各处理组细胞 mRNA 的浓度。根据检测得出的 RNA 浓度，计算各试剂所需体积。严格按照 Takara 反转录试剂盒的实验步骤将 mRNA 反转录为 cDNA。所用体系为 10 μL（总 RNA 500 ng，5×PrimeScript Buffer 2 μL，加入 RNase free ddH_2O 至总体积为 10 μL）。逆转录反应条件如下：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，4 ℃保存。逆转录后将得到的 cDNA 稀释 5 倍，-40 ℃保存备用。用于检测 IL-10 mRNA 表达水平的引物序列为 F:GTCAGCCAGACCCACATGC，R:TGGCAACCCAAGTAACCCT，是由北京华大基因公司合成。qRT-PCR的反应体系包括：2×Mix 10 μL，上下游引物各 0.8 μL，cDNA 2 μL，RNA free H_2O 6.4 μL；反应条件为：预变性：95 ℃，30 s；变性：95 ℃，5 s；退火延伸：60 ℃，30 s；共 40 个循环。每个样本设置 3 个复孔，各实验均重复 3 次，以 GAPDH 作为内参，检测各组样本的 mRNA 表达水平。

1.3.6 Western blot 检测相关蛋白的表达 用含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，用 BCA 试剂盒及酶标仪检测蛋白质的浓度，经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将蛋白转移至 0.45 μm PVDF 膜上，5% BSA 室温孵育 1 h 后，一抗（TLR2 1:1 000；p-NF-κB p65 1:1 000；β-actin 1:800）4 ℃过夜，次日二抗室温孵育 1 h，ECL 方法显色（均以 β-actin 作为内参）。

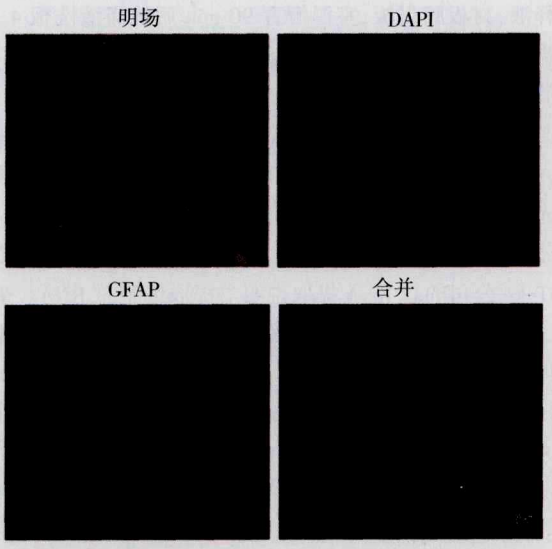
1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析，实验结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。组间比较用两独立样本检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

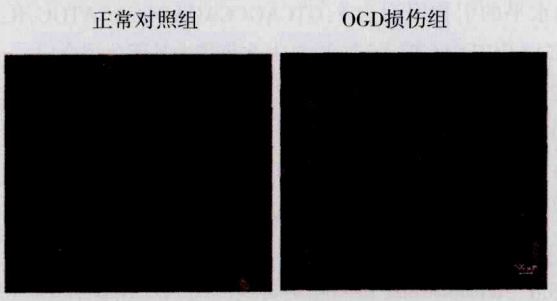
2 结 果

2.1 大鼠原代星形胶质细胞鉴定与体外 OGD 损伤模型的建立

大鼠原代星形胶质细胞的形态如图 1A 所示：星形胶质细胞呈扁平状且胞体较大，细胞质伸出少量宽扁的星状突起，核大居中，呈卵圆形。镜下可见 90%以上的星形胶质细胞被 GFAP 特异性染色，胞质显红色荧光。提示培养的原代星形胶质细胞纯度较高，可用于后续实验研究。OGD 损伤后，倒置显微镜下观察，可见损伤后的星形胶质细胞分布稀疏，胞体形态缩小，突起细长，折光度明显增高，培养基上出现少量漂浮坏死细胞（图 1B）。



A. 倒置荧光显微镜下观察大鼠原代星型胶质细胞的形态



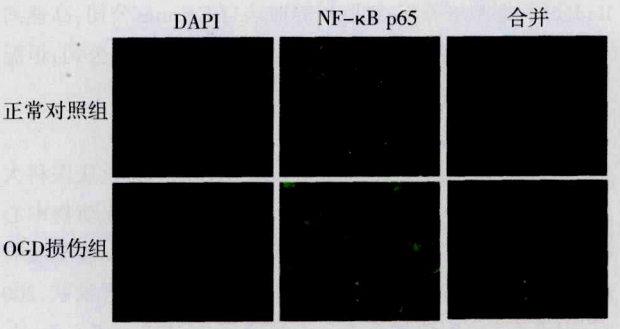
B. OGD 损伤前后原代星形胶质细胞的形态

图 1 大鼠原代星形胶质细胞鉴定及 OGD 损伤后细胞形态变化

Fig.1 Identification of the rat's primary astrocytes and the morphological changes of the primary astrocytes following oxygen-glucose deprivation(OGD)

2.2 OGD 损伤后星型胶质细胞中 TLR2、p-NF-κB p65 及 IL-10 的表达变化

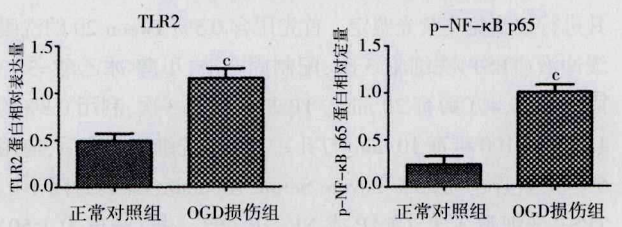
免疫荧光检测结果发现，在未经 OGD 损伤的正常对照组星形胶质细胞中 NF-κB p65 主要分布于胞质，而 OGD 损伤后的星形胶质细胞核中可见 NF-κB p65 的表达（图 2A）。Western blot 检测结果显示（图 2B），OGD 损伤后星形胶质细胞中 TLR2 及磷酸化 NF-κB p65（p-NF-κB p65）的蛋白表达水平均较未损伤组（正常对照组）有明显增高，进一步量化分析结果如图 2C 与 2D 所示，TLR2、p-NF-κB p65 蛋白表达水平在正常对照组[(0.49 ± 0.08)，(0.23 ± 0.09)]和 OGD 损伤组[(1.16 ± 0.10)，(1.01 ± 0.08)]间差异具有统计学意义（t=9.016，P=0.001；t=0.752，P=0.000）。qRT-PCR 及 ELISA 方法检测发现，OGD 损伤组[(0.00 ± 0.00)，(513.01 ± 34.47)]星形胶质细胞 IL-10 的 mRNA 及蛋白表达水平较未损伤组[(0.00 ± 0.00)，(381.89 ± 22.26)]明显升高（t=6.112，P=0.026；t=5.535，P=0.005）（图 2E、F）。提示 OGD 损伤可诱导星形胶质细胞高表达 IL-10。



A. 倒置显微镜下观 NF-κB p65 在 OGD 损伤星形胶质细胞内的分布（箭头指示细胞核内表达的 p65）

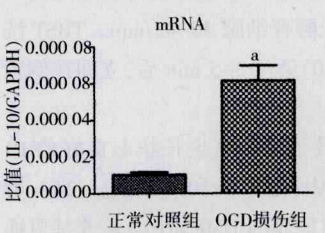


B. TLR2、p-NF-κB p65 蛋白表达电泳图

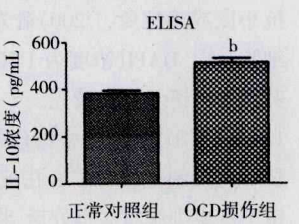


C. TLR2 蛋白表达的量化分析

D. p-NF-κB p65 蛋白表达的量化分析



E. IL-10 mRNA 表达水平变化



F. ELISA 检测 IL-10 表达水平

a：与正常对照组比较，P < 0.05；b：与正常对照组比较，P < 0.01；c：与正常对照组比较，P < 0.001

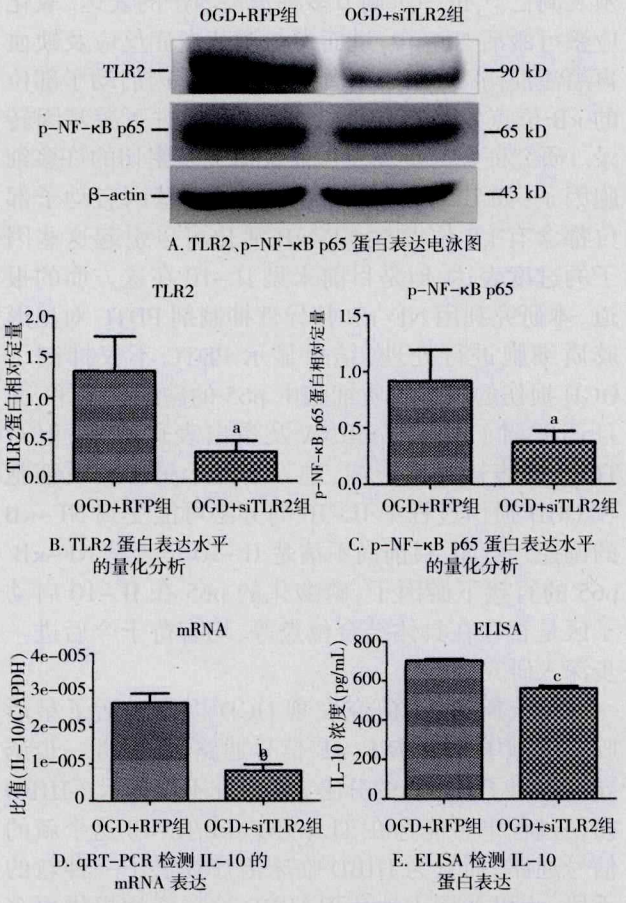
图 2 OGD 损伤后星形胶质细胞中 TLR2、p-NF-κB p65 及 IL-10 的表达变化

Fig.2 Changes of TLR2 and phosphorylated NF-κB p65 protein expressions, and IL-10 mRNA and protein expressions in the OGD-injured astrocytes

2.3 siTLR2 感染后细胞中 TLR2、p-NF-κB p65 及 IL-10 的表达变化

siTLR2 腺病毒感染 OGD 损伤的星形胶质细胞后，经 Western blot 检测，可见 OGD+siTLR2 组 TLR2、p-NF-κB p65 蛋白表达水平均较 OGD+RFP 组明显降低（图 3A），OGD+RFP 组[(1.33 ± 0.42)，(0.92 ± 0.28)]和 OGD+siTLR2 组[(0.36 ± 0.13)，(0.38 ± 0.10)]组间差异具有统计学意义（t=3.807，P=0.019；t=3.180，P=0.034）（图 3B、C）。同时，利用 qRT-PCR 及

ELISA检测上述两组损伤星形胶质细胞中 IL-10 的表达水平，发现 OGD+siTLR2 组[(0.00 ± 0.00)，(567.05 ± 50.57)]中的 IL-10 的 mRNA 和蛋白表达水平也明显降低（t=0.607，P=0.004；t=4.529，P=0.011）于 OGD+RFP 组[(0.00 ± 0.00)，(703.60 ± 12.97)]（图 3D、E），与 TLR2、p-NF-κB p65表达变化趋势基本一致。表明下调 TLR2 可能抑制了 NF-κB p65 的磷酸化，从而降低了 IL-10 的分泌。



A. TLR2、p-NF-κB p65 蛋白表达电泳图

B. TLR2 蛋白表达水平的量化分析

C. p-NF-κB p65 蛋白表达水平的量化分析

D. qRT-PCR 检测 IL-10 的 mRNA 表达

E. ELISA 检测 IL-10 蛋白表达

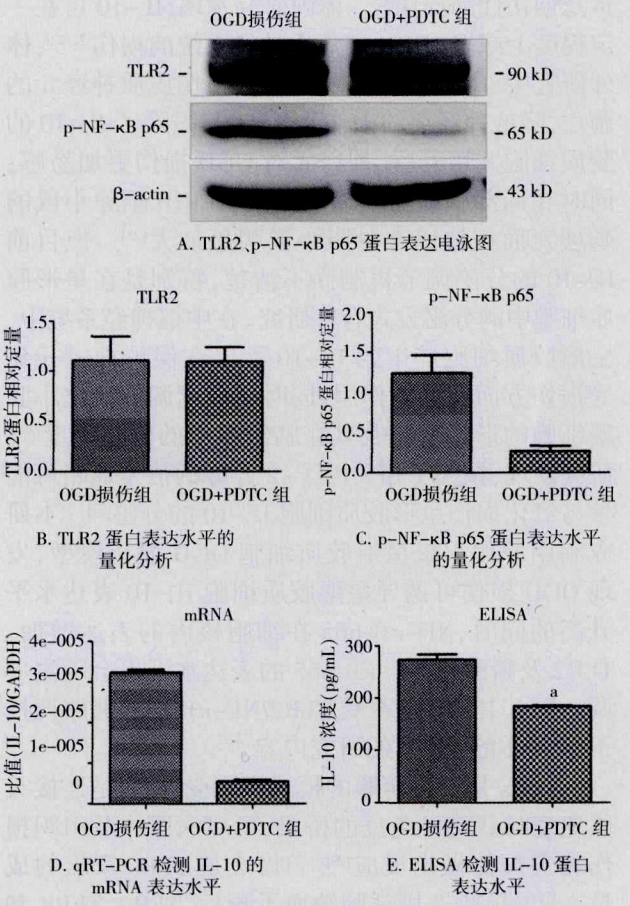
a：与 OGD+RFP 组比较，P < 0.05；b：与 OGD+RFP 组比较，P < 0.01；c：与 OGD+RFP 组比较，P < 0.001

图 3　Ad-siTLR2 感染后，OGD 损伤的星形胶质细胞中 TLR2、p-NF-κB p65 及 IL-10 的表达变化

Fig.3　Changes of TLR2, p-NF-κB p65 and IL-10 expressions in the OGD astrocytes infected with Ad-siTLR2

2.4　PDTC 处理后细胞中 TLR2、p-NF-κB p65 及 IL-10 的表达变化

经 NF-κB 抑制剂 PDTC 处理后，Western blot 检测结果如图 4A 所示，OGD+PDTC 组(0.26 ± 0.07)中的 OGD 损伤星形胶质细胞的 p-NF-κB p65 蛋白表达水平明显低于 PDTC 未处理组[OGD 组，(1.24 ± 0.23)]，两组间差异具有统计学意义（t=7.167，P=0.002）（图 4C）。但 TLR2 蛋白表达水平在 PDTC 处理组(1.09 ± 0.94)或未处理组(1.11 ± 0.24)之间并无明显变化（t=0.068，P=0.949）（图 4A、B）。qRT-PCR 及 ELISA 检测发现，PDTC 处理组[(0.00 ± 0.00)，(598.92 ± 42.73)]的 mRNA（图 4D）及蛋白（图 4E）表达水平较 PDTC 未处理组[(0.00 ± 0.00)，(769.23 ± 23.37)]明显降低，PDTC 处理可明显下调 OGD 损伤星形胶质细胞中 IL-10 mRNA 及蛋白表达水平（t=34.079，P=0.000；t=4.493，P=0.046）。上述结果提示，OGD 损伤诱导星形胶质细胞分泌 IL-10 可能受到 p-NF-κB p65 的调控。



A. TLR2、p-NF-κB p65 蛋白表达电泳图

B. TLR2 蛋白表达水平的量化分析

C. p-NF-κB p65 蛋白表达水平的量化分析

D. qRT-PCR 检测 IL-10 的 mRNA 表达水平

E. ELISA 检测 IL-10 蛋白表达水平

a：与 OGD 组比较，P < 0.05；b：与 OGD 组比较，P < 0.01；c：与 OGD 组比较，P < 0.001

图 4　PDTC 处理后 OGD 损伤星型胶质细胞中 TLR2、p-NF-κB p65 及 IL-10 的表达变化

Fig.4　Changes of TLR2, p-NF-κB p65 and IL-10 expressions in the OGD astrocytes treated by PDTC

3　讨　论

HIBD 在新生儿期死亡率高，即使是存活下来的患儿也会存在一系列急慢性神经系统后遗症，给家庭社会均带来沉重的负担，而目前的治疗方法仍存在一定的局限性[18-19]，相关致病机制也有待深入研究。鉴于本课题组前期研究发现，HIBD 大鼠脑组织中 IL-10 的分泌与 TLR2 及 NF-κB 的表达变化趋

势密切相关[11]，本研究将大鼠原代星形胶质细胞用于体外实验，并采用能有效反映体内脑部缺氧缺血性损伤病理变化的 OGD 模型模拟体内 HIBD 损伤，揭示星形胶质细胞来源的 IL-10 的可能分泌机制。

IL-10 是一种多效性的细胞因子，通常作为抗炎因子，在许多中枢神经系统疾病中扮演重要角色，如自身免疫性脑脊髓炎、大脑中动脉闭塞、兴奋性中毒及创伤性脑损伤[20]。体内研究发现，IL-10 可在一定程度上减轻 HIBD 疾病后神经系统的损伤[21-22]；体外研究中，IL-10 也可减少 OGD 损伤皮质神经元的凋亡，降低神经突的损伤[23-24]。当与敲除了 IL-10 的胶质细胞共培养后，神经元对 OGD 损伤更加易感；同时在局部脑缺血模型中发现，IL-10 敲除小鼠的脑梗死面积较正常对照小鼠明显加大[25]。但目前 IL-10 的分泌调节机制尚不清楚，特别是在星形胶质细胞中的分泌方式有待研究。在中枢神经系统中，星形胶质细胞产生的 IL-10 不仅在保护神经元免受损伤方面有重要作用，同时还可以调节活化小胶质细胞的形态变化及其在脑组织中的分布密度[26]。研究发现，核因子相关因子-2 介导的信号通路可能参与氧化损伤星形胶质细胞 IL-10 的分泌[27]。本研究利用原代大鼠星形胶质细胞 OGD 损伤模型，发现 OGD 损伤可诱导星形胶质细胞 IL-10 表达水平升高的同时，NF-κB p65 在细胞核内的表达增加，TLR2 及磷酸化 NF-κB p65 的表达水平也会随之上调。那么 IL-10 是否受 TLR2/NF-κB 信号通路调控正是本研究所涉及的研究内容。

TLRs 是一种跨膜的模式识别受体[28]，是连接天然免疫与获得性免疫的桥梁，可对病原体及组织损伤相关配体做出反应[29]。TLR2 是 TLRs 家族的成员。小鼠短暂性局部脑缺血干预后，TLR2、TLR4 和 TLR9 mRNA 表达水平均有上调，然以 TLR2 mRNA 表达上调最为显著，说明 TLR2 在缺血缺氧损伤中发挥重要作用[30]。Kim 等[31]研究表明，HSP60 可增加 TLR2 的表达水平，诱导 TLR2 依赖性的凋亡。而 TLR2 敲除可下调缺血脑组织的促炎因子表达，降低凋亡相关因子 caspase 8 的表达[32]。通过抑制TLR2/4-NF-κB 信号通路及下游相关基因，如肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）及 IL-1β 可减轻局部脑缺血模型大鼠的炎症反应及脑损伤[33]。TLR2 在中枢神经系统星形胶质细胞内高表达，通过 MyD88 途径进行信号转导[13,34]。在 IRAK-1 和 IRAK-4 参与下，TLR2 激活 NF-κB，引起 IL-1、IL-6、TNF-α 等细胞因子和炎症介质的产生[24,35-36]。本研究进一步利用 siTLR2 腺病毒下调星形胶质细胞中 TLR2 的表达后，发现 OGD 损伤的星形胶质细胞中 p-NF-κB p65 和 IL-10 的表达水平也随之降低，表明星形胶质细胞中 TLR2 表达水平会影响 p-NF-κB p65 和 IL-10 的表达变化。

NF-κB 是一种多效性转录因子，研究表明 NF-κB 信号机制是机体发挥天然免疫的第一道防线的核心部分[37]。NF-κB 作为一种重要的转录因子，参与调节天然免疫与获得性免疫、氧化应激、细胞增殖及凋亡[38]，进一步调节多种炎性因子的表达。氧化应激可激活 NF-κB，进而参与调节炎症反应及缺血再灌注损伤[39]。NF-κB 能够与多种基因启动子部位的 κB 位点发生特异性结合，从而促进下游基因转录。研究证实与免疫及炎症反应关系密切的许多细胞因子（如 IL-1、IL-6）、粘附分子等基因启动子部位都含有 kB 位点[40]，NF-κB 活化可以引起这些因子的过度表达，但是目前未见 IL-10 在这方面的报道。本研究利用 NF-κB 特异性抑制剂 PDTC 对星形胶质细胞进行处理，结果显示 PDTC 不仅抑制了 OGD 损伤的星形胶质细胞中 p65 的磷酸化水平，而且还下调了 IL-10 mRNA 及蛋白表达水平，但对 TLR2 的表达并不影响，进一步提示星形胶质细胞在 OGD 损伤过程中 IL-10 的分泌可能受到 NF-κB 的调控。然而，目前尚不清楚 IL-10 是否是 NF-κB p65 的直接下游因子，磷酸化的 p65 在 IL-10 启动子区是否存在具体结合位点等，均有待于今后进一步深入研究。

综上所述，本研究发现 OGD 损伤激活了星形胶质细胞中 TLR2/NF-κB 信号通路，从而进一步诱导细胞因子 IL-10 的分泌。本研究不仅提示了HIBD 损伤过程中可能存在 TLR2/NF-kB/IL-10 这个新的信号通路，而且为 HIBD 临床治疗提供了一种新的手段，为更加深入地认识 HIBD 这一疾病提供更多的实验信息。然而在体内 HIBD 疾病过程中，是否存在 TLR2/NF-κB/IL-10 这一信号通路，又发挥着怎样的生物学功能，均需要进一步深入探索和研究。

参 考 文 献

[1] Calvert JW, Zhang JH. Pathophysiology of an hypoxic-ischemic insult during the perinatal period[J]. Neurol Res, 2005, 27(3): 246-260.

[2] Feng Z, Liu J, Ju R. Hyperbaric oxygen treatment promotes neural stem cell proliferation in the subventricular zone of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(13): 1220-1227.

[3] Liu J, Litt L, Segal MR, et al. Outcome-related metabolomic patterns from 1H/31P NMR after mild hypothermia treatments of oxygen-glucose deprivation in a neonatal brain slice model of asphyxia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(2): 547-559.

[4] Wintermark P. Current controversies in newer therapies to treat

birth asphyxia[J]. Int J Pediatr, 2011, 2011: 848413.

[5] Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia[J]. Ann Neurol, 2011, 69(5): 743-758.

[6] Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Ann Neurol, 2012, 72(2): 156-166.

[7] Lehnardt S, Henneke P, Lien E, *et al. A mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of* theTLR2/MyD88 pathway in microglia[J]. J Immunol, 2006, 177(1): 583-592.

[8] Stridh L, Smith PL, Naylor AS, et al. Regulation of toll-like receptor 1 and -2 in neonatal mice brains after hypoxia-ischemia[J]. J Neuroinflammation, 2011, 8: 45.

[9] Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, et al. TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(3): 574-579.

[10] Imler JL, Hoffmann JA. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of Drosophila[J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(1): 16-22.

[11] Gu Y, Zhang Y, Bi Y, et al. Mesenchymal stem cells suppress neuronal apoptosis and decrease IL-10 release via the TLR2/NFκB pathway in rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. Mol Brain, 2015, 8(1): 65.

[12] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones[J]. J Exp Med, 1989, 170(6): 2081-2095.

[13] 刘 楠, 杜厚伟, 陈荣华, 等. 白介素 10 对脑缺血大鼠神经细胞凋亡的作用研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(6): 498-500.

[14] Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, et al. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke[J]. Neurosci Lett, 1998, 251(3): 189-192.

[15] Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits[J]. Physiol Rev, 2014, 94(4): 1077-1098.

[16] Carlsson Y, Leverin AL, Hedtj?rn M, et al. Role of mixed lineage kinase inhibition in neonatal hypoxia-ischemia[J]. Dev Neurosci, 2009, 31(5): 420-426.

[17] Cheng H, Huang SS, Lin SM, et al. The neuroprotective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor in fibrin glue against chronic focal cerebral ischemia in conscious rats[J]. Brain Res, 2005, 1033(1): 28-33.

[18] Liu J, Litt L, Segal MR, et al. Outcome-related metabolomic patterns from 1H/31P NMR after mild hypothermia treatments of oxygen-glucose deprivation in a neonatal brain slice model of asphyxia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(2): 547-559.

[19] Wintermark P. Current controversies in newer therapies to treat birth asphyxia[J]. Int J Pediatr, 2011, 2011: 848413.

[20] Villacampa N, Almolda B, Vilella A, et al. Astrocyte-targeted production of IL-10 induces changes in microglial reactivity and reduces motor neuron death after facial nerve axotomy[J]. Glia, 2015, 63(7): 1166-1184.

[21] Liu N, Chen R, Du H, et al. Expression of IL-10 and TNF-alpha in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells[J]. Cell Mol Immunol, 2009, 6(3): 207-213.

[22] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 683-765.

*[23] Sharma S, Yang B, Xi X, et al. IL-10 directly protects cortical neu*rons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways[J]. Brain Res, 2011, 1373: 189-194.

[24] Lin L, Chen H, Zhang Y, et al. IL-10 protects neurites in oxygen-glucose-deprived cortical neurons through the PI3K/Akt pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0136959.

[25] Grilli M, Barbieri I, Basudev H, et al. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(7): 2265-2272.

[26] Villacampa N, Almolda B, Vilella A, et al. Astrocyte-targeted production of IL-10 induces changes in microglial reactivity and reduces motor neuron death after facial nerve axotomy[J]. Glia, 2015, 63(7): 1166-1184.

[27] Segev-Amzaleg N, Trudler D, Frenkel D. Preconditioning to mild oxidative stress mediates astroglial neuroprotection in an IL-10-dependent manner[J]. Brain Behav Immun, 2013, 30: 176-185.

[28] Kawai T, Akira S. TLR signaling[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(5): 816-825.

[29] Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease[J]. Trends Neurosci, 2011, 34(5): 269-281.

[30] Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, et al. TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(3): 574-579.

[31] Kim YS, Koh JM, Lee YS, et al. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-regulation of toll-like receptors[J]. Bone, 2009, 45(1): 68-76.

[32] Winters L, Winters T, Gorup D, et al. Expression analysis of genes involved in TLR2-related signaling pathway: inflammation and apoptosis after ischemic brain injury[J]. Neuroscience, 2013, 238: 87-96.

[33] Tu XK, Yang WZ, Chen JP, et al. Curcumin inhibits TLR2/4-NF-kappaB signaling pathway and attenuates brain damage in permanent focal cerebral ischemia in rats[J]. Inflammation, 2014, 37(5): 1544-1551.

[34] Stridh L, Smith PL, Naylor AS, et al. Regulation of toll-like receptor 1 and -2 in neonatal mice brains after hypoxia-ischemia[J]. J Neuroinflammation, 2011, 8: 45.

[35] Grilli M, Barbieri I, Basudev H, et al. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(7): 2265-2272.

[36] Segev-Amzaleg N, Trudler D, Frenkel D. Preconditioning to mild *oxidative stress mediates astroglial neuroprotection in an IL-10-de*pendent manner[J]. Brain Behav Immun, 2013, 30: 176-185.

[37] Caamano J, Hunter CA. NF-kappa B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3): 414-429.

[38] Gilmore TD. Introduction to NF-kappa B: players, pathways, perspectives[J]. Oncogene, 2006, 25(51): 6680-6684.

[39] Ozcan L, Otunctemur A, Polat EC, et al. Selective nuclear factor kappa b(NF-κB) inhibitor, pyrrolidium dithiocarbamate prevents, long-term histologic damage in ischemia-reperfusion injuries after delayed testicular torsion[J]. Urol J, 2016, 13(3): 2702-2706.

[40] Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C. NF-kappa B and the innate immune Response[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(1): 52-58.

（责任编辑：方 济）