

A 25-35 刺激对海马神经细胞株 NG108-15 Toll 样受体 3、4 表达的影响

赵保胜, 马群, 艾璐, 王秀丽, 刘永刚, 刘勇*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 研究 A 刺激对小鼠神经细胞株 NG108-15 Toll 样受体(TLR) 3、TLR4 mRNA 表达的影响。方法: A 刺激 NG108-15 细胞, 24 h 后, 取细胞培养上清液, ELISA 法测定炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 含量, 荧光定量 PCR 法测定 TLR3、TLR4 mRNA 表达量的变化。结果: A 诱导 NG108-15 细胞分泌 TNF- α 、IFN- γ 的量较正常对照组明显增多(均 $P < 0.01$); A 可诱导 NG108-15 细胞 TLR3、TLR4 mRNA 表达增强, 与空白对照组相比, 均 $P < 0.01$ 。结论: A 刺激可体外诱导 NG108-15 细胞 TNF- α 、IFN- γ 分泌增多, 诱导 TLR3、TLR4 mRNA 表达增强, 提示 A 致阿尔茨海默病(AD)作用可能与免疫性炎症及 TLRs 信号转导通路有关。

[关键词] β -淀粉样蛋白; NG108-15; Toll 样受体; 肿瘤坏死因子- α ; 干扰素- γ

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0178-03

Effects of A 25-35 on the Expression of Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 4 in NG108-15 Cells

ZHAO Bao-sheng, MA Qun, AI Lu, WANG Xiu-li, LIU Yong-gang, LIU Yong*
(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] Objective: To investigate the influences of A 25-35 on the TLR3 and TLR4 mRNA. **Method:** NG108-15 cell line was stimulated with A 25-35, the supernatant was collected 24 hours later and the inflammatory factors TNF- α and IFN- γ were quantitatively measured, the changes in the mRNA expression of TLR3 and TLR4 were detected by real-time PCR. **Result:** A induced the over-secreting of TNF- α 、IFN- γ and over-expression of TLR3 and TLR4 mRNA ($P < 0.01$). **Conclusions:** A induced the over-secreting of inflammatory factors and over-expression of TLR3 and TLR4, indicating the action of A in causing AD disease might be affiliated with the immune inflammation and the TLRs signaling pathway.

[Key words] β -Amyloid; NG108-15; toll-like receptors; TNF- α ; IFN- γ

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是当今社会严重威胁老年人的四大疾病之一,其发病原因与机理尚不清楚,近些年来,免疫性炎症在 AD 发病中的作用越来越受到人们的重视和关注^[1-2]。Toll 样受体(TLRs)作为一种跨膜的膜式识别受体,参与机体一系列免疫反应,介导了炎症的病理过程。建立稳定可靠的 AD 体外细胞模型是筛选和评价抗

AD 药物的必要途径之一。NG108-15 为小鼠神经细胞瘤与大鼠神经胶质细胞杂交产生的一种细胞株,在生物学上保持了一定的神经元特性,而在细胞增殖与传代方面保留了肿瘤细胞无限增殖的特点,国内外已广泛用于 AD 等与认知、记忆相关的实验研究中^[3-4]。本研究探讨 A 刺激海马神经细胞株后 TLR3、TLR4 表达的变化情况,以期从免疫性炎症角度建立 AD 新的体外细胞模型。

1 材料

1.1 细胞株 NG108-15(小鼠神经细胞瘤与大鼠

[收稿日期] 2009-11-02

[通讯作者] * 刘勇, Tel: (010) 84738656; E-mail: yliu0126@yahoo.com.cn

神经胶质细胞瘤融合的细胞) 细胞株, 购于中国医学科学院基础医学研究所。

1.2 试剂 A 25-35 (MW: 1060.3), 美国 Sigma 产品, 批号 058K8728; 甲基 唑基四唑 (MTT) 为美国 Biomol 公司产品; DMEM 高糖培养基和胎牛血清为美国 GIBCO 产品, 批号分别为 1345538、613551; 次黄 呤、氨基蝶呤、胸武均为美国 Sigma 产品; TNF- α , IFN- γ 试剂盒购于 R&D 公司, 批号分别为 EIA05896、20090312。TrizolRNA 提取试剂盒、DEPC 处理水、RNAsafe、Oligo(dT) 15、dNTP 均购于北京天根生物医学科技有限责任公司; Erasol 购自北京赛百盛基因技术有限公司; M-MLV Reverse Transcriptase, Promega 产品, 批号 16644223; SYBR Premix Ex Taq 定量 PCR 试剂盒购于大连宝生物工程公司, 批号 BK8305。TLR3, TLR4, β -actin 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 仪器 DU730 型核酸定量仪, 美国 BECKMAN 公司; 琼脂糖水平电泳仪, 北京市六一仪器厂; SYNGENE-GeneGenius 全自动凝胶成像系统, 北京百晶生物技术有限公司; 900 型超低温冰箱, 美国 Thermo Forma 公司; 7300 型荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司。BB16 型 CO₂ 培养箱, 德国 Heraeus 公司; 550 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; 5417C/R 型高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; OLYMPUS-CK 光学显微镜, 日本 OLYMPUS 公司。

2 方法

2.1 小鼠海马神经细胞株 NG108-15 细胞的培养 细胞用含 10% 胎牛血清、15% HAT 的 DMEM 完全培养基培养, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养至细胞覆盖率达 90% 以上时传代, 生长状态良好的细胞用于实验研究。

2.2 A 25-35 对 NG108-15 细胞损伤的影响 调细胞浓度至 2 $\times 10^5$ 个 \cdot mL⁻¹, 接种于 96 孔板, 加 A 刺激, 使其终浓度分别为 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 μ mol \cdot L⁻¹。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h, 吸上清液, ELISA 法测定 TNF- α 含量; 每孔加 20 μ L 浓度为 5 mg \cdot mL⁻¹ 的 MTT 染液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4 h, 弃上清, 加入 200 μ L/孔 DMSO, 充分振荡, 酶标仪上于 570nm 处测定 OD 值。

2.3 A 25-35 不同浓度对 NG108-15 细胞分泌炎症因子的影响 调整细胞浓度为 3.2 $\times 10^5$ 个 \cdot mL⁻¹, 接种于 24 孔板, 每孔 0.96 mL, A 组加终浓度为 5

μ mol \cdot L⁻¹ 的 A 进行刺激, 空白对照组加等量的 DMEM 培养基。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。吸上清液, ELISA 法测定 TNF- α 、IFN- γ 含量, 提取细胞 RNA, 用于 Real-time PCR。

2.4 A 25-35 对 NG108-15 细胞 TLR3, TLR4 mRNA 表达的影响 PBS 冲洗细胞 3 次, 按试剂盒操作说明书提取 mRNA, 行逆转录, 荧光定量 PCR 仪测定 TLR3, TLR4 mRNA 的表达。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s 变性, (95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s) \times 45 个循环, 同时做熔点曲线。引物序列如表 1。

表 1 引物序列一览表

引物	意义链	序列 (5'-3')	产物长度 /bp
TLR-3	Sense:	TGCCTTGGTCCCAAGCCTTCAACGA	469
	Anitsense:	TGGCCCGAAAACCTTCTCTCAACGGA	
TLR-4	Sense:	CGCTTTCAGCTTIGCCTTCATTAC	555
	Anitsense:	TGCTACTTCCTTGTGCCCTGTGAG	
β -actin	Sense:	GTACCCAGCATGTCTGACA	201
	Anitsense:	CTCCTGCTGTCTCATCCACATC	

2.5 数据统计 用相对定量法进行计算, 公式如下^[5]:

$$Ct = (Ct_{\text{样本}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{受试组}} - (Ct_{\text{样本}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{对照组}}$$

计算各样本的 2^{-Ct}, 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组与组之间进行 *t* 检验。

3 结果

3.1 A 25-35 不同浓度对 NG108-15 细胞活性及其分泌的 TNF- α 水平的影响 从表 2 数据可知, A 除 0.625 μ mol \cdot L⁻¹ 外, 其他浓度均对细胞活性产生明显影响, 且随着剂量的增加, 细胞活性逐渐减弱, 显示出一定的量-毒关系。

随着 A 浓度的递减, 诱导 NG108-15 分泌 TNF- α 量也依次递减, 表现出一定的量-效关系, 但 20 μ mol \cdot L⁻¹ 组 TNF- α 较 10 μ mol \cdot L⁻¹ 组反而降低, 分析其原因, 可能因 A 毒性过强, 细胞活性过于降低, 影响 TNF- α 分泌所致。

根据以上结果, 结合文献资料, 确定 5 μ mol \cdot L⁻¹ 为 A 刺激细胞的适宜浓度。

3.2 A 25-35 对 NG108-15 细胞炎症因子及 TLR3、TLR4 mRNA 表达的影响 表 3 数据表明, 正常 NG108-15 细胞分泌少量的 TNF- α 、IFN- γ 。A 刺激可诱导 NG108-15 细胞 TNF- α 、IFN- γ 的过分泌, 与空白对照组相比, 有非常显著性差异(均 $P < 0.01$),

结果表明 A 可诱导该细胞的炎症反应。

数据还表明,正常 NG108-15 细胞表达一定量的 TLR3、TLR4。A 刺激可诱导 NG108-15 细胞 TLR3、TLR4 mRNA 的过表达,与空白对照组相比,有非常显著性差异(均 $P < 0.01$)。结果提示,A 诱导的炎症反应可能与 TLRs 信号转导通路有关。

表 2 A 对 NG108-15 细胞活性及 TNF- 水平的影响(均 ± s)

分组	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	OD 值	TNF- / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常对照	—	1.502 ± 0.231	13.77 ± 3.85
A 25-35	20	0.789 ± 0.062 ²⁾	24.35 ± 7.48 ²⁾
	10	1.024 ± 0.223 ²⁾	79.48 ± 16.86 ²⁾
	5	1.103 ± 0.155 ²⁾	49.91 ± 6.30 ²⁾
	2.5	1.148 ± 0.354 ¹⁾	25.67 ± 11.65 ¹⁾
	1.25	1.272 ± 0.176 ¹⁾	24.21 ± 8.60 ¹⁾
	0.625	1.288 ± 0.176	17.38 ± 6.83

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)。

表 3 A 25-35 对 NG108-15 细胞炎症因子及 TLR3、TLR4 mRNA 表达的影响(均 ± s)

分组	TNF- / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	IFN- / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	TLR3 / Ct	TLR4 / Ct
正常对照	30.58 ± 9.22	29.19 ± 6.24	1.008 ± 0.130	1.013 ± 0.168
A	76.02 ± 12.93 ²⁾	95.61 ± 8.71 ²⁾	5.692 ± 1.085 ²⁾	3.058 ± 0.815 ²⁾

4 讨论

AD 是老年人最常见的神经退行性疾病之一,近年来,对 AD 病因提出了许多假说,如 A 脑内过度沉积、tau 蛋白过度磷酸化、过氧化作用、炎症因素、金属与细胞内 Ca^{2+} 超载以及遗传因素等。越来越多的证据表明天然免疫在 AD 病理过程中起着决定性作用。TLRs 是参与机体固有免疫的一类古老蛋白家族。研究表明,TLR4 与机体的免疫性炎症相关,TLR3 则与抗双链 RNA 病毒有关^[6-7]。TLRs 是机体天然免疫反应的第一道屏障,外来因素激活 TLRs 系统后,神经胶质细胞即对这一刺激因素产生反应,并通过分泌炎症因子等其他因子破坏机体细胞,进而产生一系列疾病。临床研究也表明,AD 患者脑内均存在炎症的发生,且用抗炎药物治疗 AD 作用显著^[8]。而参与 AD 的炎症反应是否通过 TLRs 介导完成,目前国内外尚未见报道。

本研究复制了 A 25-35 刺激损伤 NG108-15 细胞的 AD 损伤细胞模型,证实高浓度的 A 25-35 可降低 NG108-15 细胞的活性,同时诱导细胞对 TNF-、IFN- 等炎症因子的表达,表明 A 25-35 诱导 AD

可能与炎症相关,或部分相关。本文还研究了 A 刺激与 TLRs 表达的关联性。结果显示 A 可使 TLR3、TLR4 mRNA 表达增强,表明 A 诱导 AD 发病可能与免疫性炎症有关,这一免疫性炎症可能是通过 TLR3、TLR4 信号转导通路得以形成的。

本结果初步表明 TLRs 介导的免疫性炎症可能参与了 AD 病理形成过程,为从炎症角度防治 AD 提供了一定的实验依据。同时也从 TLRs 角度建立了 AD 体外细胞模型新的评价体系和指标,为从 TLRs 角度研究开发新的抗 AD 药物提供了较好的细胞模型。

[参考文献]

- [1] Matsumoto Y, Watanabe S, Suh YH, *et al.* Effects of intrahippocampal CT105, a carboxyl terminal fragment of beta-amyloid precursor protein, alone/with inflammatory cytokines on working memory in rats[J]. *J Neurochem*, 2002, 82: 234.
- [2] Michael Hull, Barbara Muksch, Ravi shankar Akundi, *et al.* Amyloid peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes [J]. *Neurochemistry International*, 2006, 48: 663.
- [3] 许盈, 刘荣芳, 徐剑文, 等. 冈田酸诱导 NG108-15 细胞 tau 蛋白过度磷酸化过程中 PTEN 蛋白水平的变化[J]. *海峡药学*, 2007, 19(10): 15.
- [4] Monrudee sukma, Michihisa Tohda, Hiroshi watanabe. Chronic treatment with imipram-ine inhibits cell growth and enhances serotonin 2C receptor mRNA expression in NG108-15 cells[J]. *J pharmacol Sci*, 2003, 92: 433.
- [5] Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, *et al.* Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay. Comparison of endpoint and real-time methods[J]. *Anal Biochem*, 2000, 285 (2): 194.
- [6] Zhang X, Shan P, Qureshi S, *et al.* TLR4 deficiency confers susceptibility to lethal oxidant lung injury[J]. *J Immunol*, 2005, 175(8): 4834.
- [7] Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond[J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 140(3): 395.
- [8] McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies [J]. *Neurology*, 1996, 47(2): 425.