

# 促血小板生成素在小胶质细胞炎症模型中的表达与信号通路研究

李乔俊<sup>1</sup> 邹丽萍<sup>2</sup> 王建文<sup>2</sup>

(1. 解放军总医院第一附属医院儿科, 北京 100048; 2. 解放军总医院儿内科, 北京 100001)

**[摘要]** 目的 初步探讨促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小胶质细胞炎症模型中的信号转导通路。方法 以0.5和1.0 μg/mL浓度的LPS刺激体外培养小鼠小胶质细胞(BV2细胞)建立炎症模型,采用实时荧光定量PCR法检测细胞内TPO及ERK mRNA水平;Western blot法检测TPO及ERK蛋白水平;使用ELISA方法测定细胞培养液中IL-6和TPO的含量。结果 LPS干预后能显著增加BV2细胞内TPO及ERK mRNA和蛋白水平的表达,尤其以浓度为1.0 μg/mL的LPS干预12 h时,二者的表达水平达到最高峰;且二者的表达呈显著正相关。结论 ERK1/2信号转导通路参与了BV2细胞炎症损伤中的TPO的活化作用。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13(4):340-343]

**[关键词]** 促血小板生成素;脂多糖;ERK信号通路;小胶质细胞

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)04-0340-04

## Signal transduction pathway mediated by thrombopoietin in the inflammation model of microglia

LI Qiao-Jun, ZOU Li-Ping, WANG Jian-Wen. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of the People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100048, China (Email: qiaojunl@sohu.com)

**Abstract: Objective** To explore the signal transduction pathway mediated by thrombopoietin (TPO) in the inflammation model of microglia induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The inflammation model of microglia BV2 cells was prepared by LPS of 0.5 and 1.0 μg/mL stimulation. The expression of TPO and ERK mRNA in BV2 cells was detected by real time quantitative PCR. Western blot was used to evaluate the expression of TPO and ERK protein in BV2 cells. TPO and IL-6 contents in the culture supernatant fluid were measured using ELISA. **Results** LPS stimulation increased significantly the mRNA and protein expression of TPO and ERK in BV2 cells, especially at the concentration of 1.0 μg/mL for 12 hrs stimulation. There was a significant positive correlation between the mRNA and protein expression of TPO and ERK. **Conclusions** Signal transduction pathway of ERK1/2 participates in the activation of TPO in inflammatory injury of BV2 cells. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(4):340-343]

**Key words:** Thrombopoietin; Lipopolysaccharide; ERK signal pathway; Microglial

促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)及其相应受体c-mpl分布广泛,在中枢神经系统、肝脏、心脏、平滑肌等器官和组织都有存在<sup>[1]</sup>。TPO具有神经营养因子的活性。最近研究表明TPO在中枢神经系统中具有神经元保护作用<sup>[2-3]</sup>,但其具体机制不清。细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal regulated kinases 1/2, ERK1/2)是促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的成员之一,能被多种炎性刺激所激活,并对炎症的发生、发展起重要调控作用<sup>[4]</sup>。因此,研究中枢神经系统内ERK1/2信号通路对TPO的调控作用,

有助于进一步明确TPO在中枢神经系统中的作用机制,探讨ERK特异性抑制剂的药理学作用及分子基础,对中枢神经系统感染性疾病的防治具有积极的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

BV2细胞(小鼠小胶质细胞)购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心,DMEM高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰酶消化液均购自北京尚柏生

[收稿日期]2010-12-18; [修回日期]2011-03-15  
[作者简介]李乔俊,女,硕士,主治医师。

物医学有限公司;RT-PCR 相关试剂:RNA 抽提试剂盒、Ribonuclease Inhibitor、M-MLV Reverse Transcriptase 及 BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit Manual 试剂盒均购自日本 Takara 公司;Western blot 相关试剂:山羊抗 TPO、p-ERK、 $\beta$ -actin 一抗与兔抗山羊二抗均购自美国 Santa Cruz 公司, SuperECL Plus 超敏发光液购自江苏碧云天生物科技公司。台式冷冻离心机(湘仪离心机厂,型号:TGL-16)、Line-gene 荧光定量 PCR 检测系统(杭州博日科技有限公司)、紫外分光光度计 UV-2000(尤尼柯仪器有限公司)、电泳仪及转膜仪(J-MAX 公司,型号: MV-3、ST-2)。

## 1.2 方法

1.2.1 BV2 细胞培养及传代 将储存在液氮中的 BV2 细胞取出置于 37℃ 水浴中解冻,离心后收集细胞,用含 10% 胎牛血清和 100 U 青、链霉素的 DMEM 高糖培养基重悬细胞,并稀释到合适的浓度接种至培养瓶,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中进行培养。待细胞生长到 80% ~ 90% 之后,弃除培养液,PBS 洗涤 2 ~ 3 次,0.25% 胰酶消化 3 ~ 5 min,DMEM 培养液重悬细胞,并按 1:3 的比例进行传代,接种至 T25 的培养瓶中,移入 37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中进行培养。

1.2.2 实验分组 取对数生长期的 BV2 细胞进行实验,实验共分以下 6 组:①空白 12 h 组;②LPS 0.5  $\mu$ g/mL 12 h 组;③LPS 1  $\mu$ g/mL 12 h 组;④空白 24 h 组;⑤LPS 0.5  $\mu$ g/mL 24 h 组;⑥LPS 1  $\mu$ g/mL 24 h 组;LPS 溶液预先用 PBS 稀释到合适的浓度。LPS 刺激 BV2 细胞建立胶质细胞炎症模型<sup>[5]</sup>。

1.2.3 各组细胞培养液内 IL-6、TPO 蛋白的表达及细胞内 TPO、ERK mRNA 表达水平的检测 双抗夹 ELISA 法检测细胞培养液内 IL-6、TPO 表达水平:细胞以  $1 \times 10^6$ /mL 的浓度接种至 6 孔板,每孔加入 200  $\mu$ L 生理盐水,反复冻融使细胞裂解,各取 100  $\mu$ L 培养液用于 IL-6、TPO 水平的检测。具体步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行。待反应结束,在酶标仪 450 nm 处读取各孔 OD 值。以 OD 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线。根据样品的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。重复 3 次。

采用实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR)进行检测 TPO、ERK mRNA 表达。细胞以  $1 \times 10^6$ /mL 的浓度接种至 6 孔板,用 PBS 清洗 2 ~ 3 次。每孔加入 1 mL 的 RNA 抽提液,充分裂解,提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测量 A260/A280,鉴定 RNA 纯度及

浓度。根据 GenBank 中 TPO、ERK 及 GAPDH 的基因序列设计引物用于荧光定量 PCR 检测(表 1)。反应条件为:(1) 95℃ 预变性 2 min,进行 1 个循环。(2) 95℃ 变性 20 s;58℃ 退火 25 s;72℃ 延伸 30 s,共进行 45 个循环。(3) 65 ~ 95℃ 终延伸 20 s(步进 0.5℃/s),进行 1 个循环。反应结束后,电脑自动分析荧光信号并将其转换为 Ct 值,Ct 值是指每个反应管内的荧光信号达到设定的域值是所经历的循环数。采用相对定量方式表示各标本 TPO、ERK 与 GAPDH 的  $\Delta$ Ct, $\Delta$ Ct = Ct 目的基因-Ct 内参基因。再在所检测的标本中任意选择一  $\Delta$ Ct 值为参照因子,依据  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct 目的基因- $\Delta$ Ct 参照因子,计算  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}。Z<sub>2</sub> -  $\Delta\Delta$ Ct 表示所检测样品相对于作为参照因子样品的目的基因的表达倍数。重复 3 次。

表 1 小鼠 TPO、ERK 及 GAPDH 的基因引物序列

基因	引物序列	扩增长度
TPO	上游引物:5'- TTCCTTGATGCTTCCACTGTGTAC -3'	112 bp
	下游引物:5'-GGCGCTCCACTGCTTGTAA-3'	
ERK	上游引物:5'-GCTCAGAGGACTGGACGAGTTC-3'	110 bp
	下游引物:5'- CTGAAAGGCTCAAAGGAGTCAAGA-3'	
GAPDH	上游引物:5'- CATGCCCTCCAAGGAGTAAGAA-3'	150 bp
	下游引物:5'- CTAGCCCCCTCTGTTGTTATG-3'	

## 1.2.4 细胞内 TPO 和 p-ERK 蛋白表达水平的检测

采用 Western blot 法进行检测。BV2 细胞以  $5 \times 10^6$ /mL 的浓度接种至 6 孔板,预冷的 PBS 洗涤 2 ~ 3 次,每孔加入 150  $\mu$ L 的蛋白裂解液裂解 15 min,提取细胞总蛋白,以 BCA 法进行蛋白定量。经 5% 积层胶和 12% 分离胶进行不连续的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质。电泳结束后,采用半干转法将蛋白质转移到 PVDF 膜上,脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,一抗(抗 TPO、p-ERK)均以 1:200 的浓度稀释,4℃ 孵育过夜,二抗以 1:3000 的浓度室温孵育 2 ~ 3 h,ECL 化学发光法显色成像,KODAK Image Station 2000MM 成像系统采集图像,获得图像用图像处理软件 LabWorks 测定并分析条带灰度值以检测 TPO、p-ERK 的表达水平。实验设立  $\beta$ -actin 为内参,重复 3 次。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对于符合正态分布的两变量采用 Pearson 相关分析法,若不符合正态分布则改用 Spearman 相关分析。多组间比较采用 One Way-ANOVA 分析法,组间两两比较采用 Bonferroni 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

本研究分别采用 LPS 0.5 和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  刺激 12 h、24 h, ELISA 检测发现 BV2 细胞培养液内 IL-6 明显升高 ( $F = 134.518, P < 0.01$ ), 证明小胶质细胞炎症模型的成功建立, 见图 1。

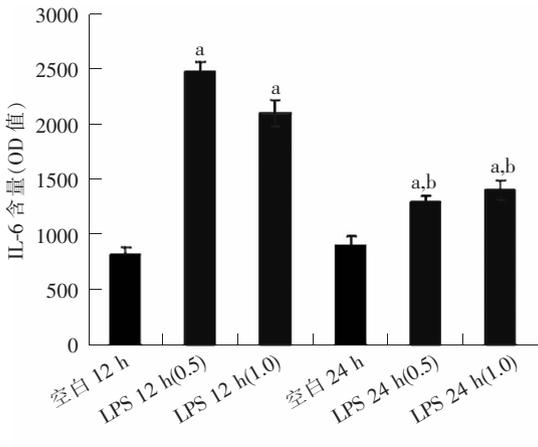


图 1 BV2 细胞培养液内 IL-6 的表达情况 a: 与空白 12 h 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与空白 24 h 组比较,  $P < 0.05$

### 2.1 ELISA 检测 BV2 细胞培养液内 TPO 的表达

采用浓度为 0.5 和 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 处理细胞 12 ~ 24 h, 能明显增加细胞培养液内 TPO 的表达水平, TPO 的表达水平在 12 h 时最高, 随后逐渐下降, 但 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组 24 h 时表达水平仍高于空白对照组 ( $F = 2268.165, P < 0.01$ )。见图 2。

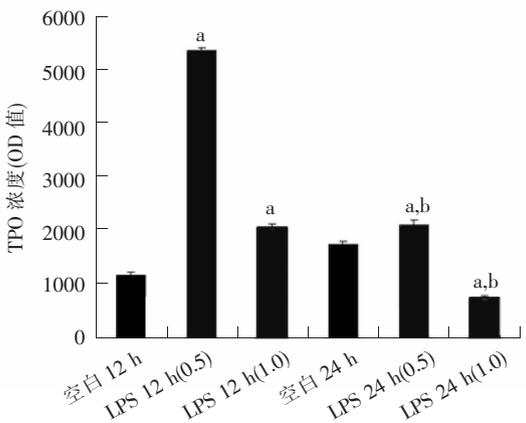


图 2 BV2 细胞培养液内 TPO 的表达情况 a: 与空白 12 h 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与空白 24 h 组比较,  $P < 0.05$

### 2.2 RT-PCR 检测 BV2 细胞内 TPO 和 ERK mRNA 表达

经 LPS 干预 12 h 后, BV2 细胞内 TPO 及 ERK

mRNA 的表达显著增加。但随着 LPS 干预时间的延长, TPO 及 ERK mRNA 的表达有所下降, LPS 干预 24 h 时表达较 12 h 的水平有所下降, 但仍高于空白对照组 ( $F$  值分别为 2131.683 和 660.974,  $P < 0.01$ )。其中, 浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 干预细胞 12 h 时, TPO 及 ERK mRNA 的表达水平最高 (图 3)。且 TPO 与 ERK mRNA 水平呈正相关 ( $r = 0.915, P < 0.01$ )。

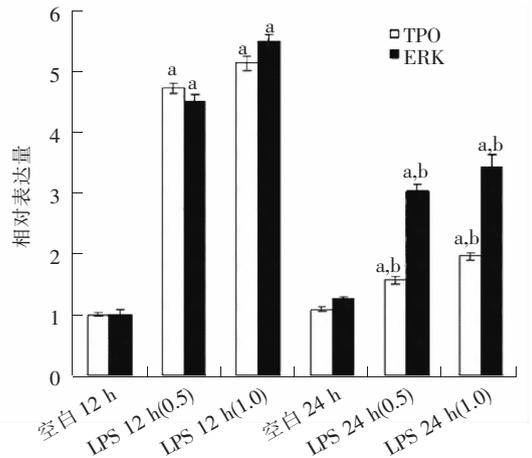


图 3 BV2 细胞内 TPO 和 ERK mRNA 表达 a: 与空白 12 h 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与空白 24 h 组比较,  $P < 0.05$

### 2.3 Western blot 检测 TPO 及 p-ERK 蛋白

本研究发现, 浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 干预 12 h 后, TPO 及 p-ERK 的蛋白表达均明显高于空白对照组。其余各组与空白对照组相比, 蛋白水平虽有增加的趋势, 但差异无统计学意义 (图 4、5)。Pearson 相关分析显示, TPO 与 p-ERK 蛋白表达水平亦呈显著正相关 ( $r = 0.795, P < 0.01$ )。

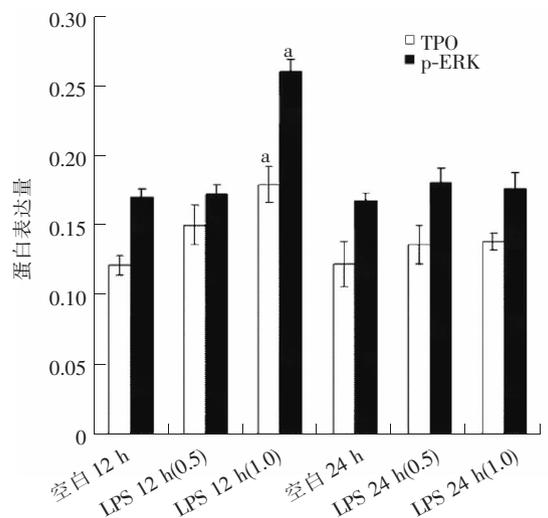


图 4 检测 BV2 细胞内 TPO 和 p-ERK 蛋白表达 a: 与空白 12 h 组比较,  $P < 0.05$

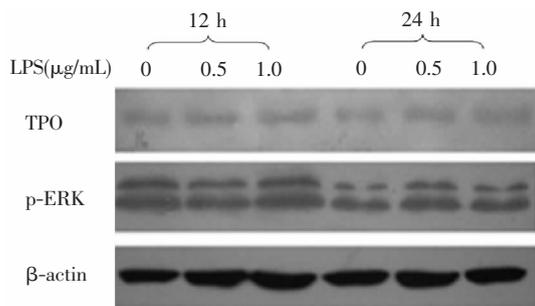


图5 Western blot 检测 TPO 及 p-ERK 蛋白表达

### 3 讨论

完整的 TPO 分子是一个具有 353 个氨基酸的多肽,其 C 末端的 39 个氨基酸片段与神经营养因子具有同源性<sup>[6]</sup>。近期研究发现,TPO 对胚胎神经细胞的前凋亡、神经干细胞定向分化和成熟神经细胞具有明显的保护作用<sup>[2,7]</sup>。对于受损神经细胞,TPO 与神经细胞表面 c-mpl 结合后,可能起到类似神经营养因子的作用<sup>[8-9]</sup>。本研究发现,LPS 干预后 BV2 细胞内 TPO mRNA 及蛋白的表达均显著增加,尤其以浓度为 1.0 µg/mL 的 LPS 干预细胞 12 h 时的表达水平达到最高峰;随着干预时间延长至 24 h ,TPO mRNA 及蛋白的表达逐渐下降。说明 LPS 能显著增加胶质细胞内 TPO 的表达,而 TPO 的代偿增加对于维持细胞的正常结构及功能均有一定的作用。

ERK1/2 是 MAPK 信号转导通路家族中的一员,MAPK 信号通路广泛参与了多层次的细胞调节,直接控制着细胞的分化、增殖及凋亡等。同时在炎症的发生和发展中也起着重要的作用。MAPK 信号转导通路将信号由细胞外传导入细胞内,调节基因表达,导致大量炎症因子产生释放;这些释放的炎症产物能继续作用于周围的神经细胞,进而产生和放大炎症反应,形成毒性正反馈循环。研究发现 ERK1/2 信号通路介导了应激刺激、细菌产物、炎症递质等引起的细胞反应,表明 ERK1/2 的激活与炎症反应也有着密切关系<sup>[10]</sup>。同时,大量的研究表明,ERK 通路能促进神经胶质细胞产生神经营养因子以保护神经元,并促进神经干细胞的增殖<sup>[10]</sup>。本研究结果也证实,LPS 干预 BV2 细胞后能明显激活

ERK1/2 信号通路,表现在 ERK mRNA 及蛋白表达均显著增加。说明 ERK1/2 信号通路确实参与了中枢神经系统感染过程的信号转导。通过进一步的相关分析发现,无论是在 mRNA 水平还是在蛋白水平,TPO 与 ERK 的表达水平呈现明显的正相关,推测 ERK 信号通路的激活可能参与了 LPS 干预后 BV2 细胞内 TPO 的活化,这也可能是 TPO 在中枢神经系统内发挥作用的其中一条途径。至于其具体作用机制的明确尚待进一步的研究探讨。

### [参 考 文 献]

- [1] Dame C, Wolber E, Freitag P, Holfmann D, Bartmann P, Joachim B. Thrombopoietin gene expression in the developing human central nervous system[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 143(2): 217-223.
- [2] 杨默,夏文杰,李桂霞,庞雅轩,戚其威,李志光,等. 中枢神经系统表达 TPO 受体的初步研究(英文)[J]. 中国实验血液学杂志, 2004(04): 494-501.
- [3] 夏文杰,项鹏,杨默,冯国培,罗广平,张丽蓉,等. 血小板生成素 thrombopoietin 对神经保护作用的体外研究[J]. 热带医学杂志, 2007(07):622-625.
- [4] Jiang Y, Liu AH, Zhao KS. The signal transduction pathways of mitogen-activated protein kinase[J]. J First Mil Med Univ, 1999, 19(1): 59-62.
- [5] Zhang J, Freyer D, Rung O, Im AR, Hoffmann O, Dame C. Inflammation stimulates thrombopoietin (Tpo) expression in rat brain-derived microvascular endothelial cells, but suppresses Tpo in astrocytes and microglia[J]. J Interferon Cytokine Res, 2010, 30(7):465-469.
- [6] Li B, Pan H, Winkelmann JC, Dai W. Thrombopoietin and its alternatively spliced form are expressed in human amygdala and hippocampus[J]. Blood, 1996, 87(12): 5382-5388.
- [7] Ehrenreich H, Hasselblatt M, Knerlich F. A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(3): 862-871.
- [8] Digiacylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappa β signalling cascades[J]. Nature, 2005, 412(6): 641-647.
- [9] Zhu Y, Culmsee C, Klumpp S, Kriegelstein J. Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1, 2 signaling pathways[J]. Neuroscience, 2004, 123(4): 897-906.
- [10] Dziarke R, Jin YP, Gupta D. Differential activation of extracellular signal-regulated kinase ( ERK ) 1, ERK2 ,p38 and c-Jun N-terminal kinase mitogen activated protein kinase by bacterial peptidoglycan [J]. Infect Dis, 2006, 174(4):777 -785.

( 本文编辑:王庆红 )