

脂多糖刺激小胶质细胞分泌 Pro-cathepsin L 及对神经元凋亡的影响

张辉 刘桂冬 楼跃 肖勤 陈生弟

【摘要】 目的 观察脂多糖刺激对小胶质细胞系 BV-2(BV-2 细胞)分泌 Pro-cathepsin L 和神经元凋亡的影响。方法 通过脂多糖刺激 BV-2 细胞产生炎症反应建立炎症细胞模型,Western blotting 法分别观察脂多糖刺激前后 BV-2 细胞条件培养液中 Pro-cathepsin L 表达水平,以及经 Cathepsin L 抑制剂预处理前后多巴胺能神经元细胞系 PC-12(PC-12 细胞)活化 Caspase-3 表达变化。结果 脂多糖刺激 BV-2 细胞 1 和 3 h 后,Pro-cathepsin L 表达水平显著增加,与刺激前比较差异均有统计学意义($P = 0.015, 0.021$)。与 BV-2 细胞共培养并经脂多糖刺激 1 和 3 h 后,PC-12 细胞活化 Caspase-3 表达水平升高,且显著高于刺激前水平(均 $P = 0.000$);经 Cathepsin L 抑制剂预处理及脂多糖刺激 1 和 3 h 后,PC-12 细胞活化 Caspase-3 表达水平下降,且显著低于单纯脂多糖刺激组($P = 0.005, 0.001$)。结论 小胶质细胞在炎症反应条件下可向细胞外释放 Pro-cathepsin L,促进神经元表达活化型 Caspase-3,在神经变性疾病发生发展中发挥重要作用。

【关键词】 脂多糖类; 小神经胶质细胞; 溶酶体; 组织蛋白酶类; 细胞凋亡; 细胞,培养的
DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2011.01.015

The release of lysosomal Pro-cathepsin L of BV-2 cells upon lipopolysaccharide stimulation and its toxicity to neurons ZHANG Hui, LIU Guidong, LOU Yue, XIAO Qin, CHEN Shengdi. Department of Neurology and Neurology Institute, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Corresponding authors: XIAO Qin (Email: xiaoqin67@medmail.com.cn); CHEN Shengdi (Email: chen_sd@medmail.com.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the secretion of lysosomal Pro - cathepsin L and its contribution to neuronal apoptosis upon lipopolysaccharide (LPS) stimulation. **Methods** The effect on the release of Pro - cathepsin L in BV - 2 cells upon LPS stimulation was determined by Western blotting. Dopaminergic cell line PC-12 cells were cultured with conditioned medium collected from BV-2 cells upon LPS stimulation, then the activated Caspase - 3 expression in PC - 12 cells was determined by Western blotting. After combination with Cathepsin L inhibitor (iCL) and LPS, the activated Caspase-3 expression in PC-12 cells was observed. **Results** The secretion of Pro-cathepsin L was increased significantly at 1 and 3 h upon LPS stimulation in BV-2 cells ($P = 0.015, 0.021$). Expression of activated Caspase-3 in PC-12 cells co-cultured with conditioned medium collected from BV-2 cells upon LPS stimulation at 1 and 3 h was increased ($P = 0.000$, for all). However, pretreatment with iCL in BV-2 cells could partially reverse Caspase-3 activation ($P = 0.005, 0.001$). **Conclusion** Inflammation increases secretion of Pro - cathepsin L in microglia, which can induce the Caspase-3 activation of neurons, which may participate in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

【Key words】 Lipopolysaccharides; Microglia; Lysosomes; Cathepsins; Apoptosis; Cells, cultured

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30872728)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科,
上海交通大学医学院神经病学研究所

通信作者:肖勤(Email: xiaoqin67@medmail.com.cn); 陈生弟
(Email: chen_sd@medmail.com.cn)

小胶质细胞约占神经细胞总量的 20%，是中枢神经系统的免疫细胞。激活后的小胶质细胞具有双重作用：一方面，可分泌脑源性神经营养因子(BDNF)、谷胱甘肽等发挥神经保护作用；另一方面，在病理情况下，释放大量包括活性氧自由基(ROS)、一氧化氮(NO)、蛋白酶及细胞因子等细胞毒性分子。由小胶质细胞介导的炎症反应已经成为神经变性疾病如帕金森病(PD)、阿尔茨海默病(AD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)发生发展的重要影响因素^[1-3]。脂多糖(LPS)是革兰阴性杆菌细胞壁成分之一，为经典的小胶质细胞激活剂。被激活的小胶质细胞表面能表达主要组织相容性复合物(MHC)、溶酶体膜标志蛋白 ED1 等激活标志物^[4]，并合成分泌溶酶体组织蛋白酶(cathepsins)。后者是一种能够在膜结合的核糖体内合成的氨基末端(N末端)糖基化前体蛋白，其在溶酶体中通过一系列蛋白水解酶作用将前体蛋白裂解为成熟的溶酶体酶；当机体发生炎症反应时，溶酶体膜通透性改变，使 Cathepsins 直接参与细胞凋亡。文献最早报道的 Cathepsin D 是干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[5]，以及化疗药物多柔比星和依托泊苷刺激细胞凋亡的最终执行者^[6]。Cathepsin B 则有激活促炎性因子 Caspase-1 和 Caspase-11 的作用^[7-8]，降解 Bcl-2 家族中 Bid 蛋白而致线粒体内细胞色素 C(Cyt C)释放，引起细胞凋亡^[9-10]。因此，由溶酶体和细胞膜不完整所导致的 Cathepsins 异常定位在神经变性疾病的发病中起重要作用。Cathepsin L 在真核细胞中广泛表达，是半胱氨酸蛋白酶的一种，在抗原递呈、肿瘤浸润和代谢、骨质重吸收、与生长相关的细胞内蛋白和分泌蛋白降解过程中发挥重要作用。已有研究提示，Cathepsin L 可能参与细胞凋亡过程，其机制与激活神经元内关键凋亡蛋白 Caspase-3 有关^[11]。基因组学研究发现，Cathepsin L 和 Cathepsin B 均参与小胶质细胞在 β -淀粉样蛋白(β A β)激活下所介导的神经元死亡过程。而且，在体外培养的大脑皮质神经元实验中，还可见 β A β 刺激产生的凋亡级联反应被选择性 Cathepsin L 抑制剂(iCL)所阻断^[12]。因此提示，Cathepsin L 是 β A β 刺激产生的凋亡级联反应的成员之一。除此之外，分泌至细胞外的 Cathepsin L 前体蛋白(pro-cathepsin L)可以作用于多种细胞外基质，降解基质成分，从而影响细胞生存，并且有利于肿瘤细胞的转移^[13-14]。鉴于此，本研究旨在观察脂多糖激活小胶质细胞后

Pro-cathepsin L 表达水平的变化，及其对神经元激活 Caspase-3 的影响。

材料与方法

一、材料

1. 细胞株来源 小鼠源性小胶质细胞系 BV-2 (BV-2 细胞)由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。大鼠源性肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系 PC-12 即多巴胺能神经元细胞系 PC-12(PC-12 细胞)，购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。实验所用细胞株为源自细胞库的 P2 代细胞，经扩增、冻存后进行实验，传代至 P10 时因细胞老化弃掉不用，再取 P3 代细胞株继续进行扩增实验。

2. 主要试剂 DMEM 培养液(含体积分数为 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)购自美国 Invitrogen 公司。脂多糖由美国 Alexis Biochemicals 公司提供。二甲亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司。Cathepsin L 抑制剂(NapSul-Ile-Trp-CHO)为美国 Biomol 公司产品。免疫试剂中 I 抗[为羊抗小鼠 Cathepsin L 多克隆抗体(1:800)，以及兔抗大鼠 Caspase-3(1:1000)和小鼠抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin, 1:2500)单克隆抗体]购自美国 Santa Cruz 公司和 Cell Signaling Technology 公司；II 抗[为辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗羊 IgG(1:8000)、羊抗兔 IgG(1:10000)以及羊抗小鼠 IgG(1:25000)]为美国 Cell Signaling Technology 公司产品，二辛可宁酸(BCA)蛋白定量试剂盒、化学发光显色试剂盒均由美国 Pierce 公司提供。蛋白质提取液[含有 Tris-base(pH 值为 7.50)40 mmol/L、氯化钠 150 mmol/L、乙二胺四乙酸(EDTA)1 mmol/L、体积分数为 1% Triton X-100、硫酸钠 0.20 mmol/L 和苯甲基磺酰氟(PMSF)0.10 mmol/L]由上海交通大学医学院神经病学研究所自行配制。

3. 主要仪器 CS-15R 低温高速离心机购自美国 Beckman Coulter 公司。Safire-2 多功能酶标仪购自瑞士 Tecan 公司。垂直电泳仪和转膜槽由美国 Bio-Rad 公司提供。Image Station-4000MM Pro 成像系统为日本 Kodak 公司产品。

二、实验方法

1. 细胞培养和实验分组 (1)脂多糖刺激小胶质细胞系 BV-2 建立细胞模型：BV-2 细胞采用 DMEM 培养液进行培养，置 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5%二

氧化碳孵育箱中培养 48 h 后,胰蛋白酶消化 1 min,采集细胞接种于 6 孔板,细胞密度 0.30×10^6 /孔,培养 24 h 后加入脂多糖 200 ng/ml 进行刺激,分别处理 0 h(对照组)、1 h 和 3 h 后收集培养液用于 Western blotting 检测,观察小胶质细胞培养液 Pro-cathepsin L 表达水平的变化。(2)经 Cathepsin L 抑制剂预处理的 BV-2 细胞条件培养液对多巴胺能神经元细胞系 PC-12 激活 Caspase-3 的影响:BV-2 细胞接种于 6 孔板中,细胞密度 0.30×10^6 /孔,培养 24 h 后任意选择 3 孔加入 20 μ mol/L Cathepsin L 抑制剂,继续培养 12 h 后加入脂多糖 200 ng/ml 分别刺激 0、1 和 3 h (iCL + LPS 组);另外 3 孔未加 Cathepsin L 抑制剂的 BV-2 细胞同样加入脂多糖 200 ng/ml 分别刺激 0、1 和 3 h(LPS 组)。取不同处理组 BV-2 细胞条件培养液,离心半径 7 cm、离心速度 1000 r/min 离心 5 min,去除细胞碎片后加至 PC-12 细胞中。多巴胺能神经元细胞系 PC-12 培养方法与 BV-2 细胞相同,置 DMEM 培养液中,37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 二氧化碳孵育箱培养 48 h,胰蛋白酶消化 1 min,接种于 6 孔板,细胞密度 0.30×10^6 /孔。24 h 后弃培养液,加入经不同处理的 BV-2 细胞条件培养液,继续孵育 24 h,提取总蛋白进行 Western blotting 检测,检测活化 Caspase-3 表达水平。

2. Western blotting 法检测 Pro-cathepsin L 和 Caspase-3 表达 (1)PC-12 细胞总蛋白提取:分别收集不同处理组 PC-12 细胞,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 1 min($\times 3$ 次),每孔加入 100 μ l 蛋白质提取液,刮下细胞、置 1.50 ml 离心管,冰上裂解 30 min,离心半径 7 cm、11 580 r/min 高速离心 30 min,取上清备用,BCA 法行蛋白质定量检测。(2)电泳与转膜:取 30 μ g 总蛋白,以质量分数为 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离。积层胶 80 V,电泳 30 min;分离胶 120 V,电泳 90 min;300 mA 转膜 2 h,质量分数为 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。(3)特异性电泳条带检测与定量分析:弃封闭液,再分别加入兔抗大鼠 Caspase-3 单克隆抗体和小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体(I 抗),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次);加入辣根过氧化物酶标记的 II 抗,室温孵育 1 h,磷酸盐缓冲液冲洗 10 min($\times 3$ 次),化学发光显色试剂盒显色。所得图像采用 Image Station-4000MM Pro 成像系统分析。(4)检测脂多糖刺激后 BV-2 细胞 Pro-cathepsin L 表达变化:收集经脂多糖刺激 0、1 和 3 h 的 BV-2 细胞

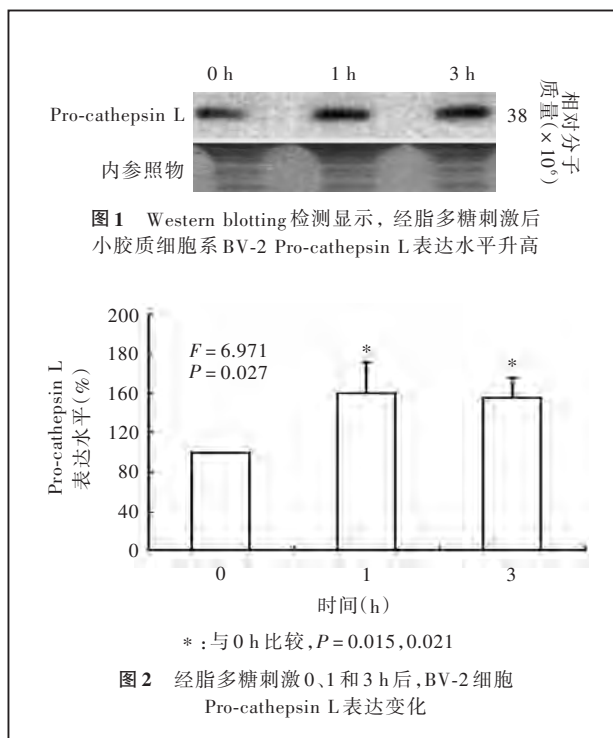
条件培养液,离心半径 7 cm、1000 r/min 离心 5 min,去除细胞碎片,取上清行 Western blotting 实验,检测 Pro-cathepsin L 表达变化,其蛋白质上样量以考马斯亮蓝(CBB)染膜标定。其余步骤同上。

三、统计分析方法

应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。所得实验数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

于 DMEM 培养液中加入脂多糖刺激 BV-2 细胞 1 和 3 h 后,分泌至细胞外的 Pro-cathepsin L 明显增加(图 1),且高于对照组,差异具有统计学意义($P = 0.015, 0.021$;图 2)。



经脂多糖刺激 0、1 和 3 h 后,BV-2 细胞与多巴胺能神经元细胞系 PC-12 共培养 24 h,其结果显示,与脂多糖刺激前(0 h)相比,刺激 1 和 3 h 后 PC-12 细胞活化 Caspase-3 表达水平升高(图 3),且差异具有统计学意义(均 $P = 0.000$,图 4)。而经 Cathepsin L 抑制剂预处理,再分别以脂多糖刺激 BV-2 细胞 1 和 3 h 后,iCL + LPS 组活化 Caspase-3 表达水平均显著降低(图 3),且低于 LPS 组,差异有统计学意义($P = 0.005, 0.001$;图 5)。

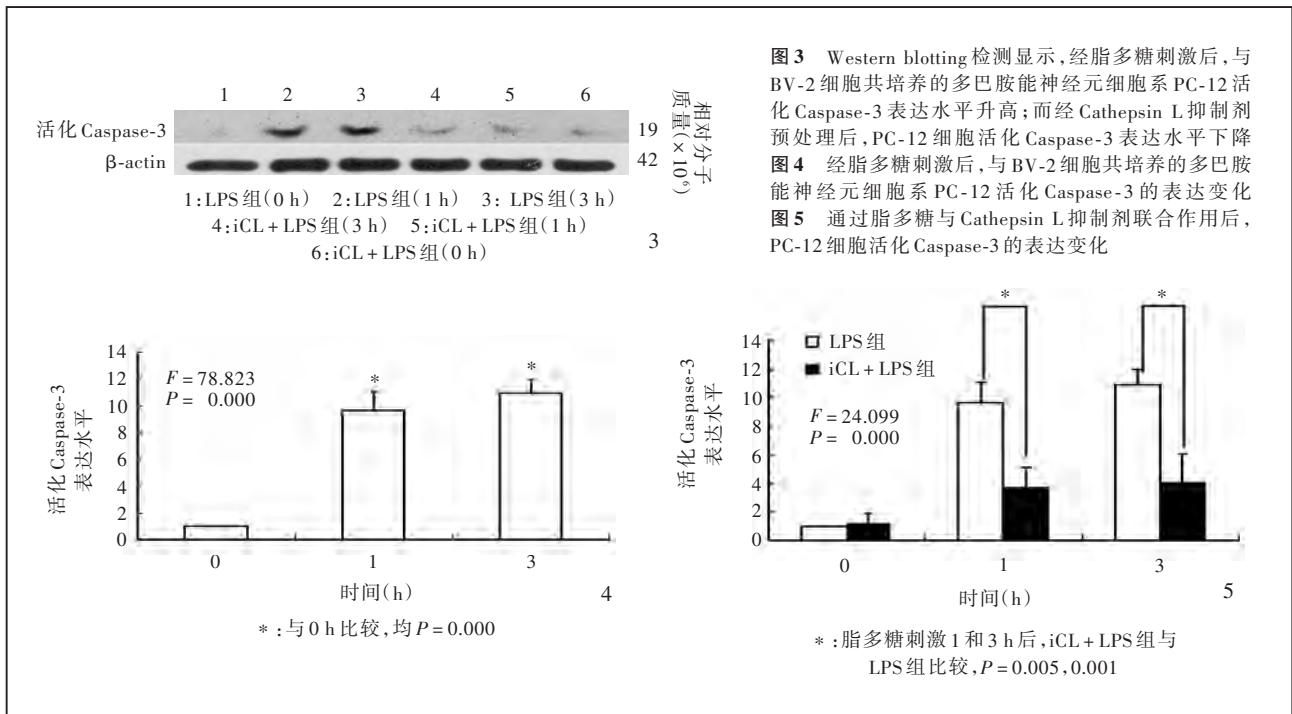


图3 Western blotting 检测显示,经脂多糖刺激后,与 BV-2 细胞共培养的多巴胺能神经元细胞系 PC-12 活化 Caspase-3 表达水平升高;而经 Cathepsin L 抑制剂预处理后,PC-12 细胞活化 Caspase-3 表达水平下降
 图4 经脂多糖刺激后,与 BV-2 细胞共培养的多巴胺能神经元细胞系 PC-12 活化 Caspase-3 的表达变化
 图5 通过脂多糖与 Cathepsin L 抑制剂联合作用后,PC-12 细胞活化 Caspase-3 的表达变化

讨 论

小胶质细胞在神经变性疾病中的作用越来越受到重视,大量研究聚焦于小胶质细胞与神经元的相互作用。目前研究表明,溶酶体和细胞膜不完整而致溶酶体 Cathepsins 异常改变在神经变性疾病发病中发挥重要作用。溶酶体是细胞清除系统的细胞器,主要发挥蛋白质降解作用,而小胶质细胞则是溶酶体半胱氨酸蛋白酶如 Cathepsin B 和 Cathepsin L 的重要来源^[15]。据研究显示,Cathepsin B 是 Aβ 激活小胶质细胞引起神经元死亡的重要调节物质,而选择性 Cathepsin B 抑制剂则对缺血引起的神经损伤具有保护作用^[16-17]。晚近国内外研究结果提示,溶酶体系统可能与神经变性疾病有关^[18-19];分泌至细胞外的 Pro-cathepsin L 可以作用于多种细胞外基质,降解基质成分,从而影响细胞生存。因此,进一步研究小胶质细胞在脂多糖刺激下分泌 Pro-cathepsin L 的变化及其对神经元凋亡的影响,是本研究的重点。经观察发现,小胶质细胞在炎症反应早期 Pro-cathepsin L 表达水平即明显升高。

在神经变性疾病发生与发展过程中,小胶质细胞于炎症反应早期即发生溶酶体功能失调及溶酶体、细胞膜通透性增加等变化。脂多糖是极其经典的小胶质细胞激活剂,性能十分稳定、可靠,其作用已得到公认。本实验室亦对其作为激活剂开展了

一系列相关实验。在本研究的预实验过程中,我们采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测经脂多糖刺激后 BV-2 细胞诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达水平的变化,并以此作为激活标志,结果显示,经脂多糖刺激 1 和 3 h 后,诱导型一氧化氮合酶表达水平明显升高,证实该细胞模型制备成功。本研究结果显示,脂多糖刺激 1 h 时,小胶质细胞分泌至细胞外的 Pro-cathepsin L 即显著增加。未能在细胞外液检测到成熟型 Cathepsin L,推测可能与成熟型 Cathepsin L 自溶酶体进入细胞外液后稳定性减弱有关。有研究表明,成熟型 Cathepsin L 在 pH 值为 5.50~6.00(新形成的溶酶体的 pH 值)环境中活性最佳,而在中性或弱碱性环境中由于性能极不稳定而易被降解^[20]。在本研究中,我们所采用的小鼠源性小胶质细胞系 BV-2 的条件培养液 pH 值为 6.80~7.30,呈弱碱性,成熟型 Cathepsin L 在这种环境下化学结构可能发生改变而被降解。另有一种可能,是成熟型 Cathepsin L 的分泌具有细胞特异性,小鼠源性小胶质细胞系 BV-2 不分泌成熟型 Cathepsin L。目前对 Pro-cathepsin L 功能进行研究,主要发现其能够降解主要组织相容性复合物的轻链,促进其分子向抗原呈递细胞膜表面转移^[21];作用于多种细胞外基质蛋白,对调节细胞外蛋白质之间的平衡起重要作用^[13-14];促进肿瘤细胞转移;此外还可自我剪切变为成熟型 Cathepsin L 而发挥作用。

本研究旨在观察小胶质细胞在炎症反应下分泌 Pro-cathepsin L 的变化, 以及抑制其活性后小胶质细胞条件培养液对神经元凋亡的影响。脂多糖刺激小鼠源性小胶质细胞系 BV-2 后, 其条件培养液可诱发神经元发生凋亡, 而 Cathepsin L 特异性抑制剂则可逆转神经元 Caspase-3 的激活。因此, 小胶质细胞溶酶体酶的变化可能在神经变性疾病的发生发展过程中起重要作用, 而 Cathepsin L 亦有可能成为治疗神经变性疾病的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 2006, 312:1389-1392.
- [2] Weiner HL, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6:404-416.
- [3] Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2005, 57:168-175.
- [4] Perry VH, Matyszak MK, Fearn S. Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia*, 1993, 7:60-67.
- [5] Deiss LP, Galinka H, Berissi H, et al. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J*, 1996, 15:3861-3870.
- [6] Wu GS, Saftig P, Peters C, et al. Potential role for cathepsin D in p53 - dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene*, 1998, 16:2177-2183.
- [7] Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, et al. Atractyloside - induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett*, 1998, 438:150-158.
- [8] Schotte P, Van Crielinge W, Van de Craen M, et al. Cathepsin B - mediated activation of the proinflammatory caspase - 11. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251:379-387.
- [9] Stoka V, Turk B, Schendel SL, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis: cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem*, 2001, 276:3149-3157.
- [10] Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, et al. Cathepsin B contributes to TNF - alpha - mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome C. *J Clin Invest*, 2000, 106:1127-1137.
- [11] Ishisaka R, Utsumi T, Kanno T, et al. Participation of a cathepsin L - type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct Funct*, 1999, 24:465-470.
- [12] Boland B, Campbell V. Abeta - mediated activation of the apoptotic cascade in cultured cortical neurones: a role for cathepsin-L. *Neurobiol Aging*, 2004, 25:83-91.
- [13] Jean D, Rousselet N, Frade R. Cathepsin L expression is up-regulated by hypoxia in human melanoma cells: role of its 5'- untranslated region. *Biochem J*, 2008, 413:125-134.
- [14] Jean D, Rousselet N, Frade R. Expression of cathepsin L in human tumor cells is under the control of distinct regulatory mechanisms. *Oncogene*, 2006, 25:1474-1484.
- [15] Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte - derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:3849-3853.
- [16] Gan L, Ye S, Chu A, et al. Identification of cathepsin B as a mediator of neuronal death induced by Abeta - activated microglial cells using a functional genomics approach. *J Biol Chem*, 2004, 279:5565-5572.
- [17] Gray J, Haran MM, Schneider K, et al. Evidence that inhibition of cathepsin - B contributes to the neuroprotective properties of caspase inhibitor Tyr - Val - Ala - Asp - chloromethyl ketone. *J Biol Chem*, 2001, 276:32750-32755.
- [18] Lee DC, Close FT, Goodman CB, et al. Enhanced cystatin C and lysosomal protease expression following 6-hydroxydopamine exposure. *Neurotoxicology*, 2006, 27:260-276.
- [19] Zhang Z, Lee YC, Kim SJ, et al. Production of lysophosphatidylcholine by cPLA2 in the brain of mice lacking PPT1 is a signal for phagocyte infiltration. *Hum Mol Genet*, 2007, 16:837-847.
- [20] Turk B, Dolenc I, Turk V, et al. Kinetics of the pH - induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*, 1993, 32:375-380.
- [21] Gresser O, Weber E, Hellwig A, et al. Immunocompetent astrocytes and microglia display major differences in the processing of the invariant chain and in the expression of active cathepsin L and cathepsin S. *Eur J Immunol*, 2001, 31:1813-1824.

(收稿日期: 2010-12-20)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(六)

进行性核上性麻痹 progressive supranuclear palsy(PSP)

进行性核上性麻痹评价量表

Progressive Supranuclear Palsy Rating Scale(PSPRS)

经颅直流电刺激

transcranial direct current stimulation(tDCS)

α B-晶体蛋白 α B-crystallin(CRYAB)

痉挛性斜颈 cervical dystonia(CD)

径向扩散系数 radial diffusivity(RD)

聚偏二氟乙烯 polyvinylidene fluoride(PVDF)

抗甲状腺过氧化物酶抗体

antithyroid peroxidase antibody(TPOAB)

抗甲状腺球蛋白抗体 antithyroid globulin antibody(TGA)

抗甲状腺微粒体抗体 antithyroid microsome antibody(TMA)

抗原呈递细胞 antigen-presenting cell(APC)

考马斯亮蓝 Coomassie brilliant blue(CBB)

克雅病 Creutzfeldt-Jakob disease(CJD)

快速血浆反应素试验 rapid plasma reagin(RPR)

快速眼动睡眠期行为障碍

rapid eye movement sleep behavior disorder(RBD)