

氧糖剥夺对小鼠小胶质细胞 NKG2D 受体及其配体表达的影响*

刘琳¹ 李晶莹¹ 曹丽丽² 杜俊蓉¹

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 成都大学基础医学院, 四川 成都 610106)

【摘要】 目的 探究自然杀伤细胞活化受体(NKG2D)在氧糖剥夺损伤小胶质细胞中的表达变化及炎症反应中的潜在作用。方法 建立小鼠神经元细胞 HT22 氧糖剥夺(OGD)模型,造模 19 小时后复氧复糖,分别收集正常条件培养基(Control)和 OGD 培养基(Model)刺激小鼠 BV2 小胶质细胞。CCK-8 法检测 HT22 和 BV2 细胞活性;qPCR 检测 BV2 细胞中 NKG2D 受体信号通路及炎症因子表达;ELISA 法检测 BV2 细胞培养上清中炎症因子含量。结果 OGD 可介导 HT22 神经元细胞存活率明显下降($P < 0.01$),但 OGD 上清对 BV2 细胞活性无明显影响($P > 0.05$)。与 Control 组比较, NKG2D 受体及其 H60 配体、接头蛋白 DAP10 的 mRNA 表达水平明显上升($P < 0.01$),但 RAE-1 与 MULT1 配体未见明显变化($P > 0.05$);同时,肿瘤坏死因子(TNF- α)在 Model 组 BV2 细胞中的 mRNA 水平及培养基中的蛋白含量均明显上升($P < 0.01$)。结论 氧糖剥夺可诱导 BV2 细胞 H60/NKG2D、下游效应器 DAP10 及炎症因子表达。提示 NKG2D 受体信号通路可能在脑缺血后小胶质细胞的炎症反应中发挥重要作用。

【关键词】 氧糖剥夺;小胶质细胞;NKG2D 受体及其配体;神经炎症;缺血性脑卒中

【中图分类号】 R743.31 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2021.11.003

Expression of NKG2D receptor and its ligands in mouse microglia after oxygen glucose deprivation injury

LIU Lin¹, LI Jingying¹, CAO Lili², DU Junrong¹

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. Basic Medical School, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression changes of Natural Killer Group 2 member D (NKG2D) signaling pathway in microglia of mice after oxygen-glucose deprivation injury and its potential role in microglia inflammatory response. **Methods** A mouse neuronal HT22 oxygen-glucose deprivation (OGD) Model was established (HT22-model group). After 19 hours of modeling, the cells were oxygenated and glycosylated, and normal conditioned media (Control) and OGD media (Model) were collected to stimulate mouse BV2 microglia cells. The cell viability of HT22 and BV2 cells was detected by CCK-8 assay. NKG2D receptor signaling pathway and inflammation mediators expression in BV2 cells were detected by qPCR. The content of inflammation mediators in supernatant of BV2 cell culture was determined by ELISA. **Results** The survival rate of HT22 neurons was significantly decreased by OGD ($P < 0.01$), but the cell viability of BV2 cells was not affected by OGD supernatant ($P > 0.05$). Compared with the Control group, the mRNA expression levels of NKG2D receptor, its H60 ligand and adaptor protein DAP10 were significantly increased ($P < 0.01$), but there were no significant changes in RAE-1 and MULT1 ligand ($P > 0.05$). Meanwhile, the mRNA level and the protein content of BV2 cells of tumor necrosis factor (TNF- α) in Model group were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Oxygen-glucose deprivation can induce the expression of H60/NKG2D, downstream effector DAP10 and inflammation mediators in BV2 cells. These results suggest that the NKG2D receptor signaling pathway may play an important role in the inflammatory response of microglia after cerebral ischemia.

【Key words】 Oxygen-glucose deprivation; Microglia; NKG2D receptor and its ligands; Neuroinflammation

小胶质细胞是大脑神经系统的固有免疫细胞。在脑缺血发生后,小胶质细胞迅速向损伤部位迁移,通过释放炎性介质加重神经炎症,进一步加重缺血后的脑损伤^[1-2]。大量研究表明,小胶质细胞的过度激活在脑缺血炎症反应中发挥关键作用^[3-4]。但是,目前基于神经炎症的干预策略均未能实现临床转化。自然杀伤细胞活化受体(Natural killer group 2 member D, NKG2D)是 C 型凝集素样受体 NKG2 家族的重要成员,主要表达于 NK 细胞、NKT 细胞、CD8⁺ αβT 及部分 γδ T 等多种免疫细胞^[5-6]。NKG2D 可识别多种配体,这些配体属于主要组织相容性复合体 I 类分子相关蛋白(MHC-I)以及另一类 MHC-I 类相关分子 ULBP^[7-8]。研究表明,NKG2D 配体是参与各种炎症反应的应激诱导分子^[9]。感染或炎症刺激上调 NKG2D 配体表达,与 NKG2D 结合后,通过接头蛋白 DAP10 传递活化信号,激活下游 PI3K 和 GRB2 进而引发免疫炎症反应^[10-11]。但是,目前尚未见 NKG2D 与脑缺血后小胶质细胞炎症反应的相关性报道。氧葡萄糖剥夺(Oxygen-glucose deprivation, OGD)是体外诱导缺血性损伤的常用模型^[12]。本实验通过建立小鼠海马 HT22 神经元细胞 OGD 模型,进一步检测 HT22-OGD 上清刺激小鼠 BV2 小胶质细胞后 NKG2D 信号通路的变化和炎症反应,以探究 NKG2D 在脑缺血后小胶质细胞炎症反应中的潜在作用。

1 材料与方 法

1.1 主要材料和仪器 小鼠海马神经元 HT22 细胞系、BV2 小胶质细胞系(广州吉妮欧生物科技有限公司),DMEM 培养基、Cell Counting Kit-8 试剂(Wako),TNF-α 小鼠 ELISA 试剂盒(达科为生物技术有限公司)。iMark 酶标仪(Bio-Rad),BDS200 倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司),Micro Drop 超微量分光光度计(BIO-DL),LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 仪(Roche)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞 OGD 模型建立 HT22、BV2 细胞常规培养于 DMEM 完全培养基,培养条件为 5% CO₂、37℃。HT22 细胞弃原培养加入无糖 DMEM 培养基,95% N₂ 和 5% CO₂、37℃ 条件培养 19 小时,复氧复糖 24 小时后收集 HT22 上清(OGD conditioned medium, OGD CM),正常条件下培养上清(Normal CM)作为对照组。将 BV2 细胞分为 Model 组和 Control 组,分别用 OGD CM 和 Normal CM 进行刺激。HT22、BV2 细胞分别接种于 96 孔板,经造模处理后,每孔加入 10 μL CCK8 溶液,继续培养 1 小时后于 450 nm 波长处测定吸光度(OD)值,按公式计算细

胞存活率:OD sample/OD control mean×100%。

1.2.2 ELISA 法测定促炎因子含量 分别收集 HT22 神经元细胞的 Normal CM 和 OGD CM 刺激 BV2 细胞后的培养基上清,3500r/min 离心 15 分钟后收集上清,按照 ELISA 试剂盒说明书,检测 TNF-α 含量。

1.2.3 qPCR 测定 NKG2D 受体信号通路及炎症产物的 mRNA 水平 采用 Trizol 试剂提取 BV2 细胞 RNA,逆转录为 cDNA 后用于 qPCR 测定 NKG2D、H60、MULT1、RAE-1、DAP10 及炎症产物 TNF-α 的 mRNA 水平表达量,并归一化为 GAPDH,使用 2^{-ΔΔCT}方法来分析目的基因的 mRNA 相对表达水平。参照文献设计 PCR 引物序列^[13-17],见表 1。

表 1 定量 PCR 引物序列
Table 1 qPCR primer sequence

Gene	Primer sequence forward (5'-3')	Primer sequence reverse (5'-3')
GAPDH	AGCGAGACCCCACT AACATC	GGTTCACACCCATCA CAAAC
NKG2D	ACCGAAAGTTACTG TGGCC	AGCCTGGCTCTCATA CCAGT CCT- CATATCTTTCTCTAG
H60	GATGAACAGCATAG CATCTACT	GTTCT CACATCGCAAATGCA AATGCAAATAAT
RAE-1	ATGGCCAAGGCAGC AGTGACCAAG	CTGAACACGTCTCAG GCACT
MULT1	CAATGTCTCTGTCC TCGGAA	ACCATCTTCTTGGGC AGGC
DAP10	GCGGTCATGTCACT CCTAATTG	TTGGTGGTTTGTGA GTGTGAG
TNF-α	GACGTGGAACCTGGC AGAAGAG	

1.3 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用独立样本 *t* 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 OGD 对 HT22 以及 OGD CM 对 BV2 细胞活力的影响 与 HT22-Control 组相比,OGD 19 小时后 HT22-Model 组细胞活力明显降低($P < 0.01$),表明氧糖剥夺对神经元细胞造成明显的损伤。与 BV2-Control 组相比,BV2-Model 组细胞活力无明显变化($P > 0.05$),表明 HT22 OGD CM 不会对 BV2 小胶质细胞的活性造成影响,见图 1。

2.2 OGD CM 诱导 BV2 细胞 NKG2D 受体信号通路表达 qPCR 法检测 OGD CM 刺激 BV2 细胞后 NKG2D 信号通路的表达,相比 BV2-Control 组,BV2-Model 组细胞 NKG2D 受体、配体 H60 以及接头蛋白 DAP10 mRNA 表达量明显上调($P < 0.01$);而配体 MULT1 和 RAE-1 的表达量无明显变化($P > 0.05$),见图 2。

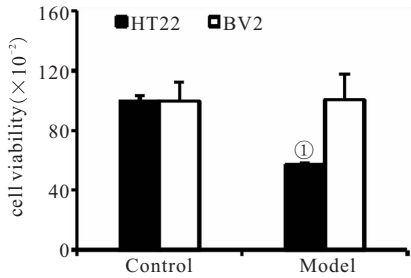


图 1 OGD 对 HT22 细胞以及 OGD CM 对 BV2 细胞活力的影响 (n=6)
Figure 1 Effect of OGD on the viability of HT22 cells and effect of OGD CM on the viability of BV2 cells

注:与对照组比较,①P<0.05

2.3 OGD CM 诱导 BV2 细胞炎症因子的生成

qPCR 法检测 OGD CM 刺激 BV2 细胞后炎症因子的

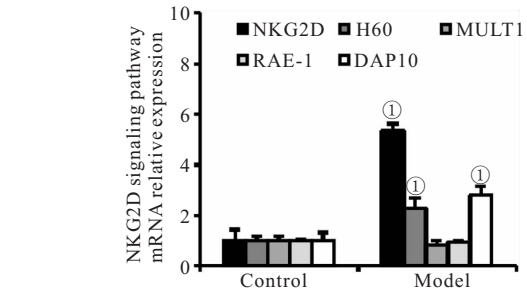
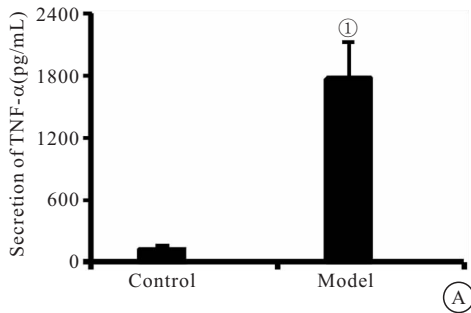


图 2 OGD CM 对 BV2 细胞 NKG2D 信号通路的影响 (n=6)
Figure 2 Effect of OGD CM on mRNA levels of NKG2D signaling pathway in BV2 cells

注:与对照组比较,①P<0.01

表达,相比 BV2-Control 组,BV2-Model 组 TNF-α 的 mRNA 表达水平明显上调(P<0.01),见图 3。

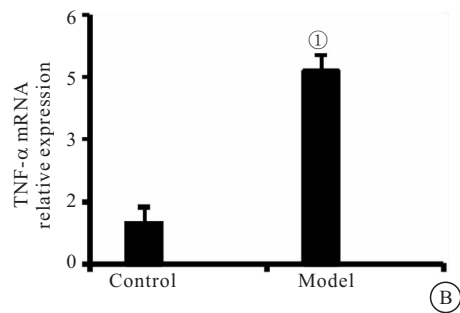


图 3 OGD CM 对 BV2 细胞炎症因子表达的影响 (n=6)

Figure 3 Effect of OGD CM on expression of inflammation mediators in BV2 cells

注:A. 细胞培养基中 TNF-α 的蛋白含量;B. 细胞中 TNF-α 的 mRNA 水平;与对照组比较,①P<0.01

3 讨论

脑卒中是世界范围内致死/致残的疾病之一,其中缺血性脑卒中占绝大部分。缺血性脑卒中病理机制复杂,其中神经炎症在缺血性脑卒中的发生发展过程中发挥重要作用。在缺血性脑卒中初期,脑中常驻的小胶质细胞被激活、外周免疫细胞向缺血脑组织浸润以及多种细胞因子(IL-6、TNF-α 等)产生,从而引发神经炎症反应^[18-20]。研究表明,抑制脑缺血后神经炎症的发生,不仅能有效减轻脑缺血损伤,还能改善其预后^[21]。

本实验建立小鼠海马 HT22 神经元细胞 OGD 模型,收集 HT22 上清刺激 BV2 小胶质细胞,模拟体内脑缺血后小胶质细胞和神经元细胞的相互作用状态。结果显示,与 HT22-Control 组比较,HT22-Model 组细胞活性显著降低,提示 OGD 造模成功。

NKG2D 是一种免疫细胞表面的活性受体,可识别多种配体,研究发现小鼠 NKG2D 配体包括 RAE-1、H60 和 MULT1^[22]。NKG2D 与其配体的相互作用是调节先天性免疫反应和适应性免疫反应的关键。在小鼠体内 NKG2D 主要通过 PI3K/STAT5 和 Syk/

ZAP70 两条信号通路发挥效应^[10,23]。当配体被识别时,含有 NKG2D 的 NK 细胞和 T 细胞被激活,从而导致靶细胞的裂解或是触发细胞因子和趋化因子(如干扰素-γ)的产生,以调节免疫炎症反应^[24]。有研究报道,NKG2D 可在多种器官缺血性损伤炎症反应中发挥重要作用。Calabrese 等^[26]发现激活 NK 细胞表面 NKG2D 可加重肺缺血再灌注损伤,而阻断 NKG2D 受体则可发挥保护作用。Feng 等^[26]报道,小鼠肾脏缺血再灌注可诱导 NKG2D 的配体 RAE-1 表达,从而激活 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞、加重肾损伤。本实验通过建立体外 OGD 模型探究 BV2 细胞中 NKG2D 信号通路的表达,结果表明 BV2-Model 组细胞 NKG2D 受体、配体 H60、下游接头蛋白 DAP10 的 mRNA 水平显著增加。脑缺血发生后,炎性细胞因子的表达显著增加。因此我们检测了 BV2-Model 组细胞培养上清中 TNF-α 的 mRNA 水平和蛋白水平,结果表明,TNF-α 的 mRNA 水平和蛋白水平显著上调。

4 结论

氧糖剥夺能促进小胶质细胞 H60/NKG2D/DAP10 信号通路上调及炎症因子产生,提示 NKG2D

信号通路可能在氧糖剥夺的小胶质细胞炎症反应中发挥重要作用,但具体的机制有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] QIN C, ZHOU L Q, MA X T, *et al.* Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke [J]. *Neuroscience bulletin*, 2019, 35(5): 921-933.
- [2] 钟懿, 熊晓星. 缺血性脑卒中后免疫反应及免疫抑制相关研究进展 [J]. *医学综述*, 2021, 27(6): 1046-1051.
- [3] WU C Y, FANG M, KARTHIKEYAN A, *et al.* Scutellarin Attenuates Microglia-Mediated Neuroinflammation and Promotes Astrogliosis in Cerebral Ischemia - A Therapeutic Consideration [J]. *Current medicinal chemistry*, 2017, 24(7): 718-727.
- [4] SHI K, TIAN D C, LI Z G, *et al.* Global brain inflammation in stroke [J]. *The Lancet Neurology*, 2019, 18(11): 1058-1066.
- [5] PRAJAPATI K, PEREZ C, ROJAS L B P, *et al.* Functions of NKG2D in CD8(+) T cells: an opportunity for immunotherapy [J]. *Cellular & molecular immunology*, 2018, 15(5): 470-479.
- [6] ZINGONI A, MOLFETTA R, FIONDA C, *et al.* NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One" [J]. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 476.
- [7] ZUO J, FIYAZ M, PAUL M. The Biological Influence and Clinical Relevance of Polymorphism Within the NKG2D Ligands [J]. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 1820-1820.
- [8] ANTONANGELI F, SORIANI A, CERBONI C, *et al.* How Mucosal Epithelia Deal with Stress: Role of NKG2D/NKG2D Ligands during Inflammation [J]. *Frontiers in immunology*, 2017, 8: 1583.
- [9] MARIOTTE A, BERNARDI L, MACQUIN C, *et al.* NKG2D ligands in inflammatory joint diseases: analysis in human samples and mouse models [J]. *Clinical and experimental rheumatology*, 2021, 39(5): 982-987.
- [10] 曹伟娅, 李存娣, 王健. NKG2D 的结构与功能 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(6): 760-766.
- [11] 王亚曙, 陶琳琳. 免疫受体 NKG2D 及其配体介导的细胞免疫与疾病的关系 [J]. *国际儿科学杂志*, 2019, 46(2): 127-130.
- [12] TORNABENE E, HELMS H C C, PEDERSEN S F, *et al.* Effects of oxygen-glucose deprivation (OGD) on barrier properties and mRNA transcript levels of selected marker proteins in brain endothelial cells/astrocyte co-cultures [J]. *PloS one*, 2019, 14(8): e0221103.
- [13] XUAN X Y, ZHANG J F, HU G M, *et al.* Upregulated expression of NKG2D and its ligands give potential therapeutic targets for patients with thymoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(7): 368-374.
- [14] CHENG F, FENG L, LI S, *et al.* Yisheng Injection Decreases the Expression of H60 and RAE-1 Genes in Ischemic Mice Liver [J]. *Transplantation Proceedings*, 2006, 38(7): 2210-2213.
- [15] GASSER S, ORSULIC S, BROWN E J, *et al.* The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor [J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1186-1190.
- [16] OGASAWARA K, HAMERMAN J A, HSIN H, *et al.* Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice [J]. *Immunity*, 2003, 18(1): 41-51.
- [17] YINGZE, TONG, JIN, *et al.* Meisoidigo Protects Against Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Regulating Microglia/Macrophage Polarization via TLR4/NF- κ B Signaling Pathway [J]. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2019, 13: 553-553.
- [18] 符巍, 马璐, 谭赢, 等. 小胶质细胞在脑出血病理生理学机制中的研究进展 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2021, 21(2): 76-81.
- [19] 蕊黄, 刘志刚. 丙泊酚对缺血性脑损伤脑保护作用机制的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(36): 57-60.
- [20] 李雪丽, 刘钊, 于博文, 等. 缺血性脑卒中中免疫炎症反应机制的研究进展 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2021, 25(3): 352-358.
- [21] MAIDA C D, NORRITO R L, DAIDONE M, *et al.* Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches [J]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(18): 6454.
- [22] WENSVEEN F M, JELEN Ć I Ć V, POLI Ć B. NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness [J]. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 441.
- [23] 张曼, 苏丽萍. NK 细胞的活化信号轴 NKG2D/NKG2DL [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(15): 2241-2244.
- [24] CARAPITO R, BAHRAM S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands [J]. *Immunological reviews*, 2015, 267(1): 88-116.
- [25] CALABRESE D R, AMINIAN E, MALLAVIA B, *et al.* Natural killer cells activated through NKG2D mediate lung ischemia-reperfusion injury [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2021, 131(3): e137047.
- [26] FENG L, CHENG F, YE Z, *et al.* The effect of renal ischemia-reperfusion injury on expression of RAE-1 and H60 in mice kidney [J]. *Transplantation proceedings*, 2006, 38(7): 2195-2198.

(收稿日期: 2021-02-25; 修回日期: 2021-04-13; 编辑: 张翰林)