

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.008

红细胞诱导 BV-2 小胶质细胞制作脑出血吞噬模型的研究*

王若男¹ 赵德喜^{2△} 孙晓舟¹ 崔洪玉¹ 吴九如³

(1 长春中医药大学中医学院 吉林 长春 130117; 2 长春中医药大学附属医院脑病科 吉林 长春 130021;

3 长春中医药大学针灸推拿学院 吉林 长春 130000)

摘要 目的:观察不同储存时间、不同比例的红细胞(RBC)与小鼠 BV-2 小胶质细胞共培养不同时间对 BV-2 吞噬 RBC 的影响。**方法:**将用阿氏液保存 1 天、7 天、14 天、21 天、30 天的小鼠 RBC 按照 5:1、10:1、20:1、40:1 的比例加入 BV-2 小胶质细胞中,共培养 1 h、3 h、6 h、9 h,应用流式细胞术观察 BV-2 对于 RBC 的吞噬情况。**结果:**加入不同保存时间的 RBC 与 BV-2 小胶质细胞共培养均可见到吞噬情况,其中保存 28 天的效果最明显;加入不同比例的 RBC 与 BV-2 小胶质细胞共培养,均出现吞噬情况,其中 40:1 最明显;RBC 与 BV-2 小胶质细胞共培养各时间点均可观察到吞噬情况,其中 6 小时最明显。**结论:**应用 RBC 诱导小鼠 BV-2 小胶质细胞制作大鼠脑出血体外模型,选择保存 28 天 RBC 与 BV-2 小胶质细胞的比例为 40:1 共培养 6 小时,此时 BV-2 小胶质细胞吞噬清除 RBC 的效果最明显。

关键词:红细胞;小胶质细胞;脑出血;吞噬**中图分类号:**R-33;R743.34 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)06-1038-05

RBC Induced Microglia of BV-2 to Produce Intracerebral Hemorrhage Phagocytosis Model*

WANG Ruo-nan¹, ZHAO De-xi^{2△}, SUN Xiao-zhou¹, CUI Hong-yu¹, WU Jiu-ru³

(1 Changchun University Of Chinese Medicine the college of traditional Chinese medicine, Changchun, Jilin, 130117, China;

2 Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, Jilin, 130021, China;

3 Changchun University Of Chinese Medicine the Acupuncture and massage, Changchun, Jilin, 130000, China)

ABSTRACT Objective: Observe the influences that BV-2, co-cultured with mice' glial cell for different time, exerts to the swallowing RBC with different storage time and different proportion. **Methods:** Store mice' RBC with flow cytometry for 1 day, 7 days, 14 days, 21 days and 30 days respectively. Add the stored RBC into BV-2 glial cell with the proportion of 5:1, 10:1, 20:1 and 40:1. Co-culture them for 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, and observe the swallowing condition between BV-2 and RBC. **Results:** The swallowing phenomenon can be observed after adding RBC with different stored time into BV-2 glial cell. The phenomenon is the most obvious after storing for 28 days; After co-culturing BV-2 and RBC with different proportion, the swallowing phenomenon is also observed. In which the phenomenon is the most obvious with the proportion of 40:1. The swallowing phenomenon can be observed in each co-culture time, in which the phenomenon is the most obvious after 6 h. **Conclusions:** Apply RBC to induce BV2 glial cell making in vitro intracerebral hemorrhage model. Choose RBC which stored for 28 days and co-culture it with BV-2 for 6h with proportion of 40:1. Thus, the swallowing phenomenon between BV2 glial cell and RBC is the most obvious.

Key words: RBC; BV-2; Intracerebral Hemorrhage; Swallowing**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R743.34 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2020)06-1038-05

前言

脑出血 (Intracerebral hemorrhage, ICH) 为卒中第二大类型, 占住院卒中患者的 18.8%~47.6%, 本病起病急骤, 病情凶险, 致残、致死率高, 预后不良^[1,2]。脑出血后数分钟后血液流入颅内形成血肿占位, 浸润组织产生炎症反应^[3]引发神经功能障碍^[4]。血肿的主要成分为红细胞 (RBC)^[5], 小胶质细胞 (Microglia,

MG) 是颅内的巨噬细胞^[6], 在脑血肿清除过程中的起主要作用, 可吞噬 RBC、清除 RBC 裂解产物, 减轻炎症反应^[7]。目前, 大多数 RBC 与小胶质细胞制作的脑出血后小胶质细胞吞噬模型^[8]应用的是原代提取的小胶质细胞, 操作繁琐, 培养时间长, 纯度低。因此, 有必要探索更为简便的造模方法, 选取合适的造模比例和时间。

BV-2 小胶质细胞为小鼠神经胶质瘤细胞株, 可传代培养,

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81774224); 吉林省教育厅 " 十三五 " 科学技术项目 (JKH20181247KJ)

作者简介: 王若男 (1989-), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 中医内科学脑病, 脑出血, 电话: 15754345580, E-mail: 871684963@qq.com

△ 通讯作者: 赵德喜 (1962-), 男, 博士研究生, 主任医师, 主要研究方向: 中医内科学脑病方向, E-mail: zdx02@163.com

(收稿日期: 2019-10-27 接受日期: 2019-11-22)

纯度高。文献报道,脑出血体外模型^[9]的评判标准为脑出血造模后小胶质细胞是否能够吞噬清除 RBC。在此基础上,本文应用 BV-2 细胞株代替原代提取小胶质细胞进行脑出血体外实验的造模。旨在通过观察不同储存时间、不同比例的 RBC 与小鼠 BV2 小胶质细胞共培养不同时间对 BV-2 吞噬 RBC 的影响,分析影响小胶质细胞吞噬红细胞的可能机制,为完善体外脑出血模型建立提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 BV-2 小胶质细胞由索莱宝生物技术有限公司提供。

1.1.2 主要试剂与材料 MEM 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技技术有限公司,青霉素/链霉素(160 万 u/100 mL)购自 Sigma 公司,倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司,高内涵活细胞分析仪产自 Perkin Elmer 公司,新鲜小鼠红细胞购自武汉大学细胞库,CFDA-SE 活细胞染料购自 Biosharp 公司,PKH26 活细胞染料购自 Sigma 公司,Hoechst 33342 活细胞核染料购自碧云天公司,Trypsin 购自 Biosharp 公司,流式细胞仪产自 Beckman Coulter 公司,流式管购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BV-2 细胞复苏,37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养细胞,每 2 天换液,待细胞覆盖培养瓶平底 80%左右即可传代,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 RBC 与 BV-2 小胶质细胞共培养 取生长良好的 BV-2 细胞制成单细胞悬液,用细胞计数板计数并调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。恒温培养箱中培养 24 小时,弃上清,空白组加入 200 μ L 的 MEM 完全培养基,模型组加入按照 RBC:BV-2(40:1)加入小鼠红细胞,每组设三复孔。将 96 孔板置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 6 h。

1.2.3 电子显微镜观察 用倒置显微镜下观察小胶质细胞吞噬红细胞现象。

1.2.4 免疫荧光观察 取出 96 孔板,弃培养液,PBS 清洗 3 次,4%多聚甲醛室温固定 40 min,TritonX-100 通透 10 min,室温封闭 1 h,CD11b 孵育过夜,FITC 二抗 4℃避光孵育 40min,DAPI 染核。用共聚焦显微镜对图片进行采集,并对小胶质细胞行 X,Y,Z 三个方向的逐层扫描,拍摄小胶质细胞的连续图像^[9]。

1.2.5 流式细胞术检测不同条件对于 RBC 诱导 BV-2 小胶质细胞吞噬^[10]现象的影响 (1)流式细胞术检测 RBC 的不同保存时间对于 RBC 诱导 BV-2 小胶质细胞吞噬现象的影响

将 PKH 26 标记的小胶质细胞用细胞计数板计数并调整细胞浓度为 15×10^4 个/mL,接种于 6 孔板中,每孔 1 mL,放入恒温培养箱培养 12 小时,使其贴壁。将 BV-2 细胞分为 1 d、7 d、14 d、21 d、30 d 五组,把用 CFSE 标记各天龄的 RBC 加入到铺满 PKH26 标记的小胶质细胞的 6 孔板中,令 BV-2 与不同天龄的 RBC 共培养 6 h。共培养结束后,用 PBS 洗去上清中未被吞噬的 RBC,离心获取沉淀的细胞;用流式细胞仪进行检测。PKH26 标记小胶质细胞选择 PE 通道,CFSE 标记 RBC 选择 FITC 通道。未吞噬 RBC 的小胶质细胞显示为 PE+,在 Q2 象限;吞噬了 RBC 的小胶质细胞显示为 PE+ CFSE+,在 Q4 象

限。计算方法:PE+CFSE+ 小胶质细胞占总小胶质细胞数量百分比(%)=Q4/(Q2+Q4)。(2)流式细胞术检测 RBC 与 BV-2 的不同比例对于 RBC 诱导 BV-2 小胶质细胞吞噬现象的影响 将用 PKH26 标记的小胶质细胞用细胞计数板计数并调整细胞浓度为 15×10^4 个/mL,接种于 6 孔板中,每孔 1 mL,放入恒温培养箱培养 12 小时,使其贴壁。将 BV-2 细胞分为 5:1、10:1、20:1、40:1 四组,加入用 CFSE 标记的 RBC 加入到铺满 PKH26 标记的小胶质细胞的 6 孔板中,令 BV-2 与不同比例的 RBC 共培养 6 h。共培养结束后,用 PBS 洗去上清中未被吞噬的 RBC,离心获取沉淀的细胞;用流式细胞仪进行检测,检测方法同上。(3)流式细胞术检测 RBC 与 BV-2 的共培养不同时间对于 RBC 诱导 BV-2 小胶质细胞吞噬现象的影响 将用 PKH26 标记的小胶质细胞用细胞计数板计数并调整细胞浓度为 15×10^4 个/mL,接种于 6 孔板中,每孔 1 mL,放入恒温培养箱培养 12 小时,使其贴壁。将 BV-2 细胞分为 1h、3h、6h、9h 四组,加入用 CFSE 标记的 RBC 加入到铺满 PKH26 标记的小胶质细胞的 6 孔板中,令 BV-2 与 RBC 共培养 1h、3h、6h、9h。共培养结束后,用 PBS 洗去上清中未被吞噬的 RBC,离心获取沉淀的细胞;用流式细胞仪进行检测,检测方法同上。

1.3 统计学处理

所得数据经 Prism7 统计软件进行处理,结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察 BV-2 与 RBC 共培养

倒置显微镜下观察小胶质细胞吞噬红细胞现象,在 20 倍倒置显微镜下,观察到 RBC 被小胶质细胞包裹在体内,见图 1(A)。

2.2 免疫荧光观察 BV-2 与 RBC 共培养

用共聚焦显微镜对图片进行采集,并对小胶质细胞行 X,Y,Z 三个方向逐层扫描,拍摄小胶质细胞的连续图像。CD11bPE 将小胶质细胞标记为橙红色,CFDA-SE 将 RBC 标记为绿色,Hoechst 33342 将小胶质细胞核标记为蓝色。被小胶质细胞吞噬的红细胞,周围被红色荧光包裹。而在细胞外的红细胞却没有被红色荧光包裹,如图 1(B)。

2.3 流式细胞术观察 BV-2 小胶质细胞吞噬 RBC 的结果

2.3.1 RBC 不同保存时间对 BV-2 小胶质细胞吞噬 RBC 的影响 保存 1 d、7 d、14 d、21 d 和 30 d 各组红细胞与 BV-2 共培养的吞噬率分别为(6.25 \pm 0.44)%、(11.24 \pm 1.38)%、(15.60 \pm 1.81)%、(21.05 \pm 1.45)%和(27.35 \pm 1.05)%。经单因素方差分析,不同保存时间的 RBC 与 BV-2 共培养的吞噬率比较差异有统计学意义($P < 0.005$),以 30 天龄的红细胞与 BV-2 共培养吞噬率最高,且吞噬率与红细胞的保存时间呈正相关,如图 2。

2.3.2 RBC 与 BV-2 不同比例对于 BV-2 小胶质细胞吞噬 RBC 的影响 RBC 与 BV-2 按照 5:1 比例共培养组的吞噬率为(7.43 \pm 0.77)%;10:1 比例共培养组的吞噬率为(13.89 \pm 1.65)%;20:1 比例共培养组的吞噬率为(18.42 \pm 0.84)%;40:1 比例共培养组的吞噬率为(26.82 \pm 1.81)%。经单因素方差分析,不同比例的 RBC 与 BV-2 共培养的吞噬率比较差异有统计学意义($P < 0.005$),以 RBC 与 BV-2 按 40:1 比例共培养组的吞噬率最高,且吞噬率与红细胞比例依赖性上升(图 3)。

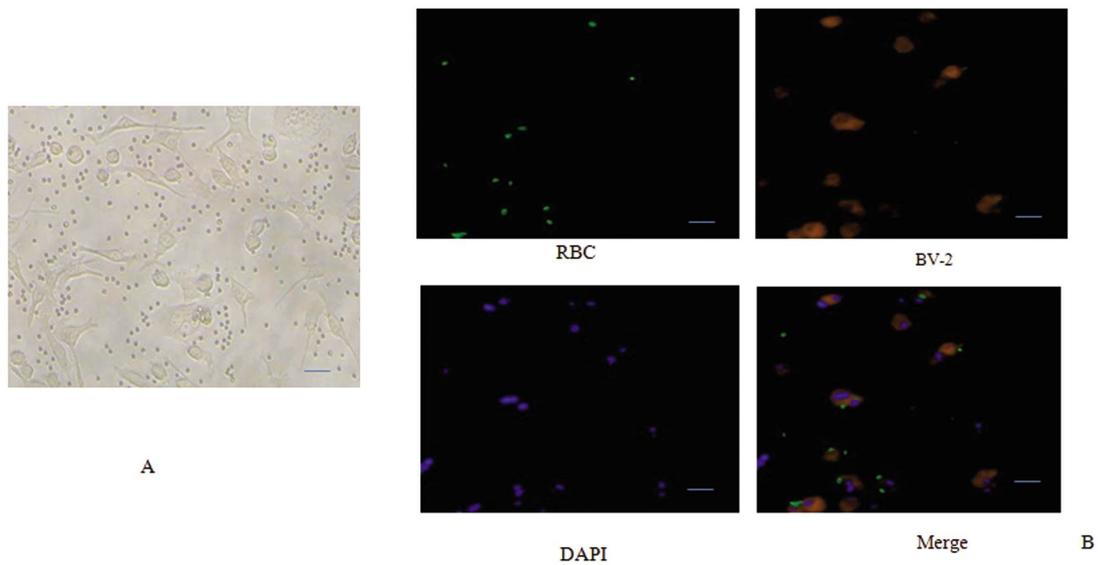


图 1 BV-2 小胶质细胞吞噬 RBC
Fig.1 BV-2 microglia phagocytosed RBCs. Scale bars=10 m

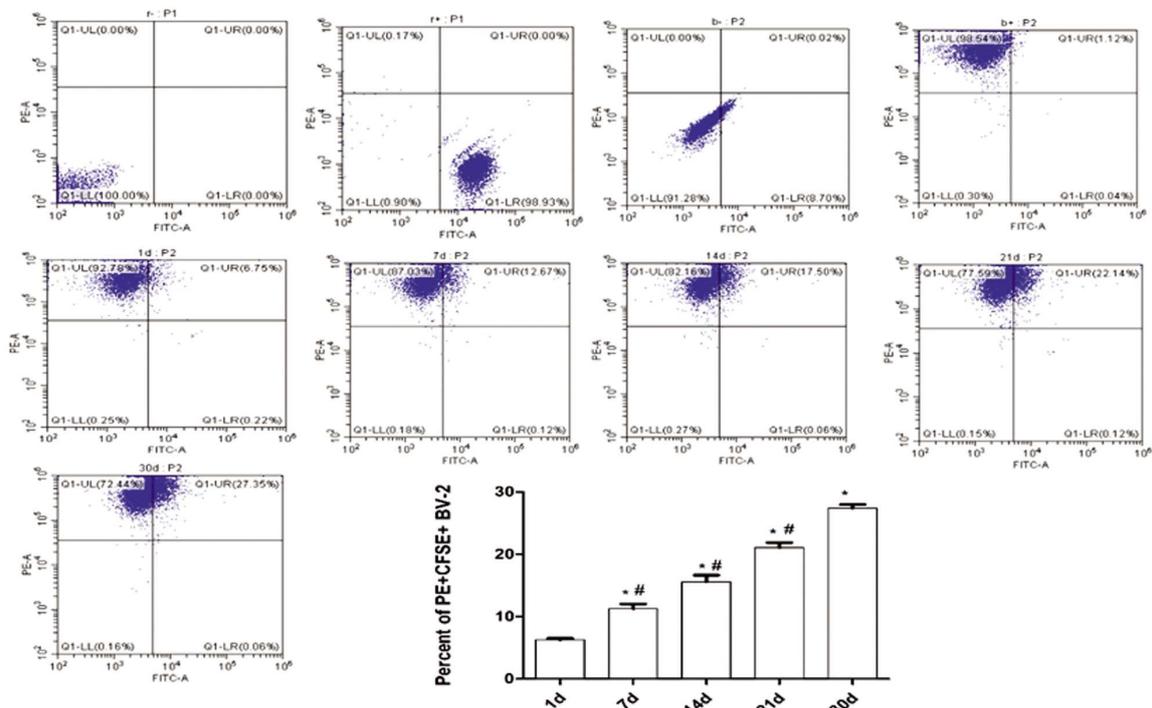


图 2 不同保存时间的 RBC 对于 BV-2 小胶质细胞吞噬 RBC 的影响
Fig.2 Effects of different preservation time RBCs on phagocytosis of RBCs by BV-2 microglia cells
Note: * $P < 0.01$ compared with 1 d; # $P < 0.05$ compared with 30 d.

2.3.3 不同共培养时间对于 BV-2 小胶质细胞吞噬 RBC 的影响 RBC 与 BV-2 共培养 1 h 组的吞噬率为 $(6.47 \pm 1.17)\%$; 共培养 3 h 组的吞噬率为 $(12.41 \pm 2.15)\%$; 共培养 6 h 组的吞噬率为 $(23.01 \pm 2.63)\%$; 共培养 9 h 组的吞噬率为 $(15.74 \pm 2.32)\%$ 。经单因素方差分析, 不同比例的 RBC 与 BV-2 共培养的吞噬率比较差异有统计学意义 ($P < 0.005$), 以 RBC 与 BV-2 共培养组 6 h 组的吞噬率最高, 且与该组相比 (图 4), 共培养 9 h 组吞噬率下降 ($P < 0.005$)。

3 讨论

颅内血管因为各种因素破裂出血造成脑出血^[11], 溢出的血

液在颅内形成血肿, 血肿与脑出血的整个病程息息相关。血肿压迫脑组织引起初期的神经系统症状, 溢出的血液及血肿产物引起周围组织的细胞毒性、兴奋毒性、氧化和炎症通路等激活^[12], 造成继发损伤。而小胶质细胞在此过程中起着至关重要的作用^[13,14]。

脑水肿的主要成分为红细胞, 红细胞在脑组织内裂解成为凝血酶和血红蛋白^[15,16] (Hb), Hb 被氧化生成血红素, 血红素氧化成为高氯血红素^[17], 高氯血红素 (15) 一旦进入组织后, 在血红素加氧酶 (HO)^[18,19] 作用下降解为胆绿素、CO 和铁, 在红细胞裂解过程中的各类产物均会神经细胞损伤。小胶质细胞^[20] (MG) 是中枢神经系统 (CNS) 的巨噬细胞, 主要功能包括免疫

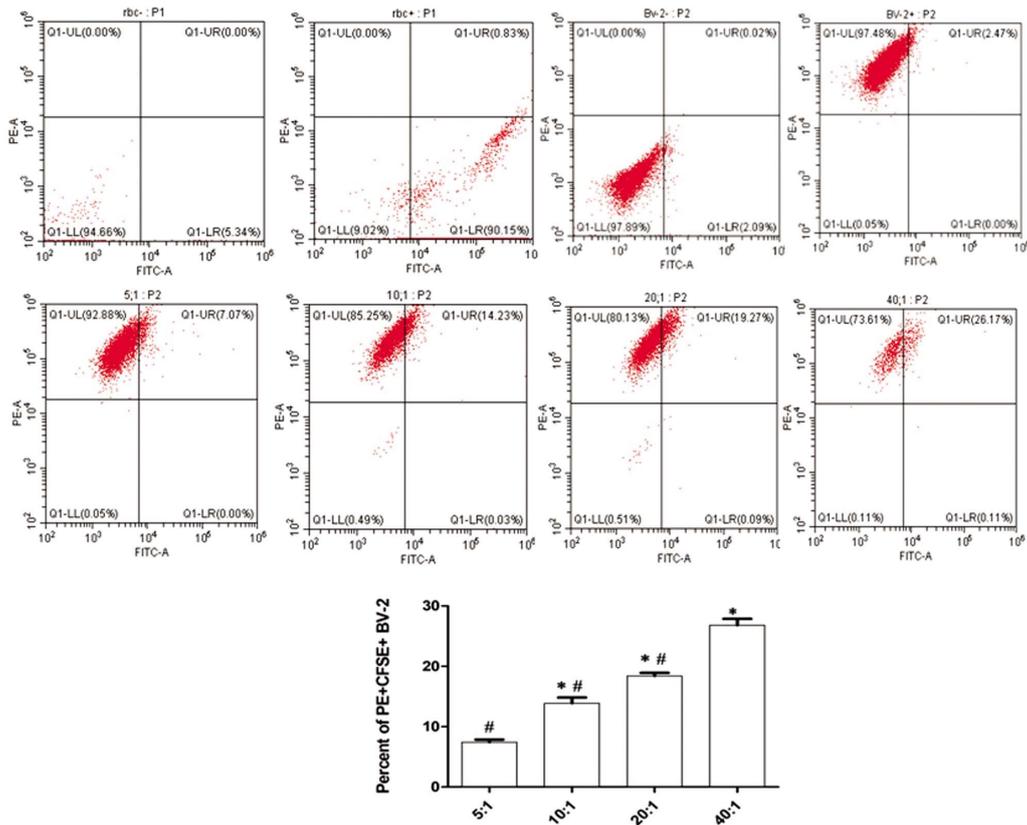


图3 RBC 与 BV-2 不同比例于 BV-2 小胶质细胞吞噬 RBC 的影响

Fig.3 Effects of different proportions of RBCs and BV-2 microglia on phagocytosis of RBCs by BV-2 microglia cells
* $P < 0.01$ compared with 5:1; # $P < 0.05$ compared with 40:1.

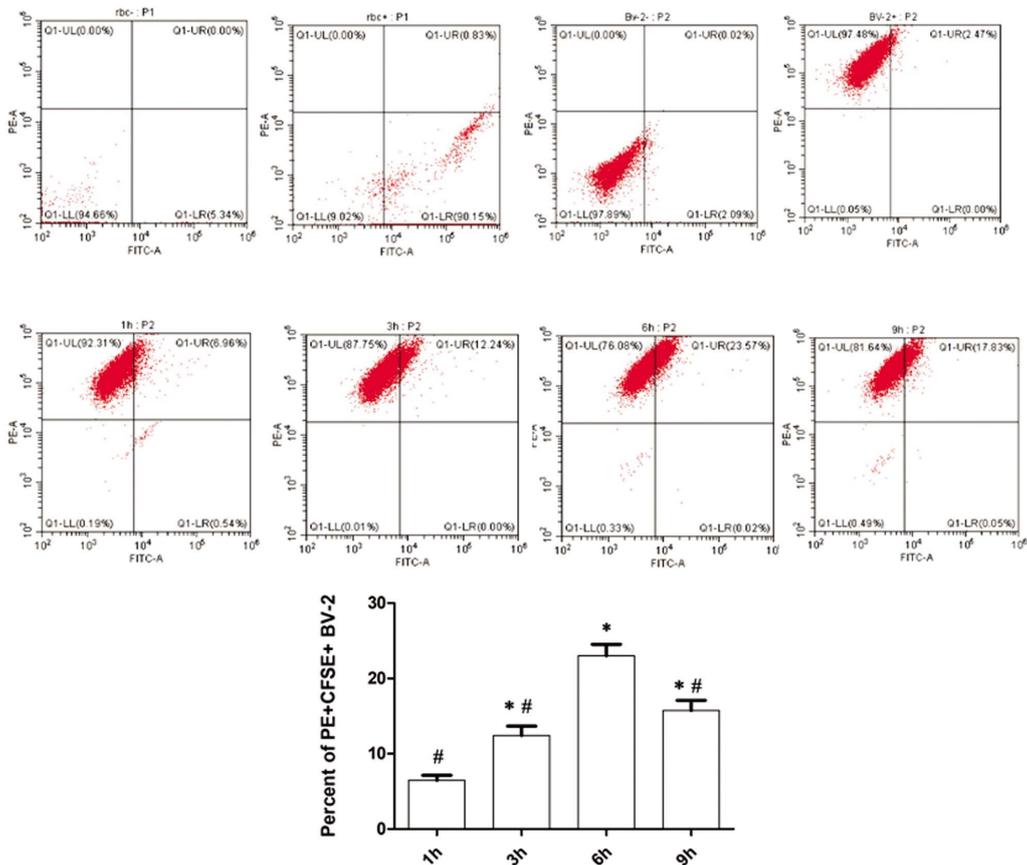


图4 不同共培养时间对于 BV-2 小胶质细胞吞噬 RBC 的影响

Fig.4 Effects of different co-culture time on phagocytosis of RBCs by BV-2 microglia cells
* $P < 0.01$ compared with 1 h; # $P < 0.05$ compared with 6 h.

监视、防御、抗原提呈、吞噬和神经分泌^[21,22],起着维护和保护神经的作用^[23]。在机体正常情况下,调控神经元兴奋性、参与突触形成与修剪、吞噬细胞碎片和营养支持^[24]小胶质细胞向组织碎片迁移,进而吞噬清除,以保持内环境稳态,当小胶质细胞受到刺激即被激活,活化的小胶质细胞在脑出血的病理过程中具有双重作用^[25]。ICH 发生后,溢出血管的血液成分通过不同途径激活小胶质细胞,研究显示在脑出血发病后几分钟内小胶质细胞就被激活^[26],活化的小胶质细胞向血肿附近聚集,通过吞噬红细胞、RBC 裂解碎片及坏死组织^[27],减轻血肿占位,降低炎症因子表达和氧化应激反应^[28]。小胶质细胞还能分泌脑源性神经营养因子(BDNF)、TGF- β 等神经保护因子,来促进神经生长^[29],重建神经-血管单元,促进疾病后期的神经自我修复功能。然而 ICH 后小胶质细胞^[30]同样会引起细胞因子、趋化因子、亚铁离子等免疫相关物质,加重病灶周围脑组织损伤。

既往脑出血的体外细胞模型,多选用原代提取的小胶质细胞,其操作相对繁琐,饲养时间长,数量少,纯度差。本文在此基础上,选择神经胶质瘤细胞株代替原代小胶质细胞,显微镜及免疫荧光观察,均确定 BV-2 细胞株可吞噬小鼠红细胞。并用流式细胞术对红细胞的放置时间、共培养比例及时间做了筛选。RBC 与 BV-2 小胶质细胞共培养制作脑出血体外模型与 RBC 的衰老程度、比例及其共培养时间相关。

综上所述,发现 30 天龄的红细胞按照 40:1 的比例与 BV-2 小胶质细胞共培养 6 小时,其吞噬率最高。本模型既可用于研究脑出血后血肿的内源性清除机制,还能研究小胶质细胞激活后的相关炎症通路及小胶质细胞自噬,应用广泛,值得推广。

参考文献(References)

- 高利. 高血压性脑出血急性期中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国全科医学, 2016, 19(30): 3641-3648
- Duan X, Wen Z, Shen H, et al. Intracerebral Hemorrhage, Oxidative Stress, and Antioxidant Therapy[J]. *Oxidative Med Cell Longevity*, 2016, 2016: 1203285
- Wang J, Dore S. Inflammation after intracerebral hemorrhage [J]. *J Cerebr Blood F Met*, 2007, 27(5): 894-908
- Aronowski J, Zhao X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: Secondary brain injury[J]. *Stroke*, 2011, 42(6): 1781-1786
- Leclerc JL, Lampert AS, Loyola Amador C, et al. The absence of the CD163 receptor has distinct temporal influences on intracerebral hemorrhage outcomes[J]. *J Cerebr Blood F Met*, 2018, 38(2): 262-273
- GRETER M, MERAD M. Regulation of microglia development and homeostasis[J]. *Glia*, 2013, 61(1): 121-127
- Gao Z, Wang J, Thiex R, et al. Microglial activation and intracerebral hemorrhage[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 105: 51-53
- Zhao XR, Gonzales N, Aronowski J. Pleiotropic role of PPAR γ in intracerebral hemorrhage: an intricate system involving Nrf2, RXR, and NF- κ B[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(4): 357-366
- Fang H, Chen J, Lin S, et al. CD36-mediated hematoma absorption following intracerebral hemorrhage: negative regulation by TLR4 signaling[J]. *Immunol*, 2014, 192: 5984-5992
- Zhao X, Grotta J, Gonzales N, et al. Hematoma Resolution as a Therapeutic Target The Role of Microglia/Macrophages [J]. *Stroke*, 2009, 40(3): 92
- Zhou Y, Wang Y, Wang J, et al. Inflammation in intracerebral hemorrhage; from mechanisms to clinical transition [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115: 25-44
- 刘宏丽, 栗静媛. 脑出血后炎症反应的研究[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2019, 27(04): 254-257
- Zhao X, Sun G, Zhang J, et al. Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in microglia/macrophages[J]. *Ann Neurol*, 2007, 61(4): 352-362
- Mracsko E, Veltkamp R. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 388-401
- Babu R, Bagley JH, Di C, et al. Thrombin and hemin as central factors in the mechanisms of intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury and as potential targets for intervention[J]. *Neurosurg Focus*, 2012, 32(4): E8
- Robinson SR, Dang TN, Dringen R, et al. Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke[J]. *Red Rep: Commun Free Radical Res*, 2009, 14(6): 228-235
- Lin S, Yin Q, Zhong Q, et al. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via My D88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage[J]. *Journal of neuroinflammation*, 2012, 9: 46
- Wagner KR, Packard BA, Hall CL, et al. Protein oxidation and heme oxygenase-1 induction in porcine white matter following intracerebral infusions of whole blood or plasma [J]. *Dev Neurosci*, 2002, 24(2-3): 154-160
- 刘明君, 戚基萍. 血红素加氧酶 1 及其产物在脑出血中的作用[J]. *医学综述*, 2019, (18): 3590-3594
- Gao Z, Wang J, Thiex R, et al. Microglial activation and intracerebral hemorrhage[J]. *Acta Neurochirurgica Supplement*, 2008, 105: 51-53
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Erratum: ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells[J]. *Nature immunology*, 2017, 18(8): 51
- Kabba JA, Xu Y, Christian H, et al. Microglia: Housekeeper of the central nervous system [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(1): 53-71
- 孙晓舟, 吴大龙, 刘立明, 等. 脑出血后小胶质细胞介导的血肿清除机制研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(09): 2274-2277
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Erratum: ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells[J]. *Nature immunology*, 2017, 18(8): 951-951
- Hara N, Chijiwa M, Yara M, et al. Metabolomic Analyses of Brain Tissue in Sepsis Induced by Cecal Ligation Reveal Specific Redox Alterations - Protective Effects of the Oxygen Radical Scavenger Edaravone[J]. *Shock*, 2015, 44(6): 578-584
- Yang S S, Lin L, Liu Y, et al. High morphologic plasticity of microglia/macrophages following experimental intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1181-1194
- Wan S, Cheng Y, Jin H, et al. Microglia activation and polarization after intracerebral hemorrhage in mice: the role of protease-activated receptor 1[J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7(6): 478-487
- Yao J, Zheng K, Zhang X. Rosiglitazone exerts neuroprotective effects via the suppression of neuronal autophagy and apoptosis in the cortex following traumatic brain injury [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 6591-6597
- Kabba J A, Xu Y, Christian H, et al. Microglia: Housekeeper of the central nervous system[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(1): 53-71
- Kim G S, Cho S, Nelson J W, et al. Trk B Agonist Antibody Pretreatment Enhances Neuronal Survival and Long-Term Sensory Motor Function Following Hypoxic Ischemic Injury in Neonatal Rats [J]. *Plos One*, 2014, 9(2): e88962