

# 锰暴露诱导 BV2 小胶质细胞环氧合酶 2 表达变化

王晓静, 曹子鹏, 赵芳, 王迪雅, 苏鹏, 康蓓佩, 骆文静

第四军医大学军事预防医学系劳动与环境卫生学教研室, 陕西西安 710032

**摘要目的**观察锰暴露诱导 BV2 小胶质细胞活化过程中 COX2 分子表达的变化。

**方法**实验中 BV2 细胞分 3 组, 为对照组, 50 $\mu$ M 锰暴露组和 100 $\mu$ M 锰暴露组,

分别处理 12h, 24h 和 48h。免疫荧光化学染色方法观察 BV2 细胞锰暴露

24h 后的活化情况, 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western Blot 法分别检

测 COX2 分子 mRNA 和蛋白表达水平的改变。**结果**免疫荧光化学染色结果显示,

锰暴露 24h 后 BV2 小胶质细胞形态发生改变, 细胞胞体变大变圆, 突起变短或

消失, 活化细胞占总细胞数的比例增加 ( $P<0.05$ ); 实时定量 PCR 结果显示,

锰暴露 12h 和 24h 后 COX2mRNA 水平增加 ( $P<0.05$ ); Western Blot 结果显

示, 锰暴露 24h 和 48h 后 COX2 蛋白表达水平增加 ( $P<0.05$ )。**结论**锰暴露能

够诱导 BV2 细胞 COX2 分子表达增加, COX2 可能参与了锰诱导小胶质细胞活化的过程。

**关键词:** 锰; BV2 细胞; 环氧合酶 2; 神经炎症

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81230063)。

作者简介: 王晓静 (1989- ), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事重金属神经毒理学研究工作。

通讯作者: 骆文静 E-mail: luowenj@fmmu.edu.cn; 曹子鹏 E-mail: czpeng@fmmu.edu.cn.

## The **expressional**alteration of cyclooxygenase2 induced by manganese exposure**in microglia BV2 cells**

Wang Xiao-jing, Cao Zi-peng, Zhao Fang, Wang Di-ya, Su Peng, Kang Bei-pei,

Luo Wen-jing

Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health,

Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

Corresponding author: Cao Zi-peng, E-mail:czpeng@fmmu.edu.cn

**Abstract:****Objective**To investigate the expressional alteration of COX2 in the activation of microglia BV2 cells induced by heavy metal manganese. **Methods**The BV2 cells in the experiments were divided into 3 groups, the control group, 50μM manganese exposure group and 100μM manganese exposure group. The treatment time is 12h, 24h and 48h. Immunofluorescence assay was applied to show the activated BV2 cells that were induced by manganese exposure after 24h. Fluorescence real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western Blot were performed to detect the quantitative alteration of COX2 in mRNA level and in protein level respectively. **Results** The morphological form of BV2 cells changed when treated by manganese after 24h. Cell bodies became larger and round while the processes became shorter or disappeared. Activated cells accounted for the part of total cells increased ( $P<0.05$ ). The results of qRT-PCR showed that the COX2 mRNA was upregulated after 12h and 24h manganese exposure ( $P<0.05$ ). And the results of Western Blot demonstrated that the COX2 protein was upregulated after 24h and 48h when treated by manganese ( $P<0.05$ ). **Conclusion**The expression of molecule COX2 increased in BV2 cells when treated by manganese; and COX2 may play a role in the activation of mouse microglia cells induced by manganese exposure.

**Key words:** Manganese; BV2 cells; Cyclooxygenase 2; Neuroinflammation

锰 (Manganese, Mn) 是人体必需的一种微量元素, 在体内发挥重要的生理功能。但锰摄入过多也会对机体造成严重危害。在诸多行业中, 例如锰开采、电焊条生产、干电池制造等, 工人可能因长期接触锰烟尘而引起慢性锰中毒。锰主要经呼吸系统吸入人体, 通过全身血液循环转移到富含线粒体的器官, 对中枢神经系统、消化系统、泌尿系统等均会造成伤害, 其中, 尤以对中枢神经系统的危害最为突出<sup>[1,2]</sup>。Guilart 等<sup>[3]</sup>的研究发现, 过量锰暴露会导致认知障碍及神经心理异常等神经综合征。还有研究发现, 锰中毒不仅会减少小鼠神经元发生的数量, 还会导致其学习记忆能力的下降<sup>[4]</sup>。

小胶质细胞 (Microglia, MG) 是一种广泛分布于中枢神经系统的细胞, 也是中枢神经系统损伤后最早发生反应的细胞类型, 小胶质细胞广泛分布于大脑和脊髓中, 占中枢神经系统胶质细胞总数的 5%-20%。生理条件下小胶质细胞处于静息状态, 而在病理条件下小胶质细胞可从静息状态迅速增殖并活化, 发挥吞噬效应, 产生多种细胞因子和趋化因子, 参与脑损伤的病理生理过程<sup>[5,6]</sup>。环氧合酶 2 (COX2) 是诱导型环氧合酶, 可以催化花生四烯酸 (AA) 生成血栓素和前列腺素, 并且是这一反应的限速酶。在特定的病理生理条件下, COX2 由生长因子及致炎细胞因子诱导产生, 是参与介导细胞多种生理功能的多效酶, 能够影响细胞增殖、细胞粘附和免疫监视等<sup>[7]</sup>。

本研究通过锰暴露诱导小鼠 BV2 小胶质细胞活化, 采用实时定量 PCR 和 Western Blot 法检测 COX2 分子 mRNA 和蛋白表达的变化, 探讨 COX2 分子表达改变在锰暴露诱导小胶质细胞活化中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

胎牛血清购于四季青公司; DMEM 培养基、青-链霉素和 Trypsin-EDTA 购于 Gibco 公司; MTT、DMSO、MnCl<sub>2</sub> 购于 Sigma 公司; Hoechst 33342 染色试剂、Sample Buffer、组织细胞裂解液购于碧云天生物公司; BSA 购于舟鼎国生物技术有限公司; 反转录和 PCR 试剂购于 Takala 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 发光剂购于 Pierce 公司; PVDF 膜购于 Millipore 公司; COX2 抗体购于

Cell Signaling Technology 公司； $\beta$ -actin 抗体购于 Sigma 公司；Forma Series II 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购于 Thermo Fisher Scientific 公司；Infinite F200 型酶联免疫检测仪购于 Tecan 公司；BX51 荧光显微镜购于 Olympus 公司；ABI 7500 实时定量 PCR 仪购于 Applied Biosystems 公司；Mini Protean 蛋白电泳系统购于 Bio-Rad 公司；FluorChem FC2 凝胶成像仪购于 Alpha Innotech 公司。

## 1.2 细胞培养<sup>[8]</sup>

小鼠小胶质细胞 BV2 细胞购于中国科学院上海细胞资源中心。消化吹打制成细胞悬液后，用液体 DMEM 培养基（含 10%胎牛血清和 1%青-链霉素）培养，置于温度为 37℃、CO<sub>2</sub> 含量为 5%、湿度饱和的孵箱中。每 48h 进行一次更换培养液，细胞贴壁生长至 80-90%时传代。

## 1.3 MTT 法检测细胞增殖<sup>[9]</sup>

利用 MTT 法检测细胞增殖，通过绘制细胞生长曲线确定最佳接种密度。取贴壁生长的 BV2 细胞消化后吹散混匀，制成细胞悬液，然后接种于 6 个 96 孔板中，每板分为 4 组，每组设 6 个复孔，每组内各孔分别种 4000、6000、8000、10000 个细胞。每板分别于培养箱内培养 12h、24h、36h、48h、60h、72h 后取出，然后在每孔中加入 20  $\mu$ L MTT 溶液，在 37℃孵箱中继续孵育 4h。之后弃去上清，在每孔中加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷（DMSO），酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其吸光度值（A），计算细胞活力，绘制细胞生长曲线。

## 1.4 免疫荧光化学染色检测锰暴露后 BV2 细胞的形态变化<sup>[8]</sup>

利用免疫荧光化学染色法检测 BV2 小胶质细胞的形态变化。取对数生长期的 BV2 细胞，消化离心后吹匀制成细胞悬液，种在多聚赖氨酸包被的玻片上，待细胞贴壁后加 MnCl<sub>2</sub> 刺激（锰离子浓度分别为 0、50、100 $\mu$ M），继续培养 24h 后，吸走培养液，用 0.01M 的 PBS 液洗片。用 4%多聚甲醛冰上固定 30min，再次用 PBS 洗片。然后使用 0.5%的 Triton X-100 冰上透化细胞 15 min，再次 PBS 洗片。用 5% BSA 溶液室温封闭，加入用 5% BSA 溶液稀释（CD68 1:500），置于湿盒中 4℃过夜。次日用 PBS 洗片，加入荧光二抗（1:500），避光室温孵育 2 h。之后用滤纸吸走二抗，滴加 Hoechst33342，室温避光孵育 20 min，PBS 洗片。用 70%甘油避光封片，在荧光显微镜下观察并拍照。

### 1.5 荧光实时定量 PCR 测定锰暴露后 BV2 细胞 COX2 分子的 mRNA 水平<sup>[9]</sup>

取对数生长期的 BV2 细胞，消化离心后吹匀制成细胞悬液，接种于六孔板，待细胞贴壁后加氯化锰（锰离子浓度分别为 0、50、100 $\mu$ M），刺激 12h、24h 后用 TRIZOL 法提取细胞总 RNA。按照 Takala 反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录成 cDNA。样品 cDNA 使用 FastStart Universal SYBR Green Master 在 ABI 7500 Real-time PCR 仪上进行 PCR 扩增。COX2 引物序列为：5'-CTG GAA CAT GGA CTC ACT CAG TTT G-3'（上游），5'-AGG CCT TTG CCA CTG CTT GTA-3'（下游）；GAPDH 引物序列为：5'-AAA TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC-3'（上游），5'-CAA CAA TCT CCA CTT TGC CAC TG -3'（下游）。PCR 反应条件为：95 $^{\circ}$ C 预变性 30s，然后按 95 $^{\circ}$ C 30s、60 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 30s 进行 50 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

### 1.6 蛋白质印迹法测定锰暴露后 BV2 细胞 COX2 分子的蛋白水平<sup>[8]</sup>

取对数生长期的 BV2 细胞，消化离心后吹匀制成细胞悬液，接种于直径为 10cm 的培养皿中。待细胞贴壁后加氯化锰（锰离子浓度分别为 0、50、100 $\mu$ M），继续培养 24 h 和 48h。然后加入细胞裂解液，冰上裂解 30min，超声裂解 30 s。然后低温离心 15min，取上清液。蛋白样品定量后，加入 6 $\times$ SDS 样品缓冲液，煮沸 5min。SDS-PAGE 电泳法分离蛋白，电转，将 PVDF 膜用 5%BSA 溶液室温封闭 1h，并加入一抗中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜（COX2 1:200，actin 1:1000）。次日加相应二抗，室温孵育 2 h，使用凝胶成像仪采集免疫印迹条带图像，以目标蛋白与内标蛋白的积分吸光度（IA）的比值表示蛋白的相对表达量。

### 1.7 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。采用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析，对照组与实验组的组间比较采用 Dunnett-t 检验，不同组别样本均数两两之间的比较采用 SNK-q 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BV2 细胞增殖活力的变化趋势

将 BV2 细胞在 96 孔板中以不同密度（4000、6000、8000、10000 个/孔）

接种，分别培养 12、24、36、48、60、72h 后，MTT 法检测细胞增殖情况。随着培养时间的延长，各组细胞增殖活力呈上升趋势，绘制细胞增殖活力变化趋势图（图 1）。统计分析结果显示，当 BV2 细胞密度为 6000 个/孔时，12 h~72 h 时间段细胞增殖活力随时间增加上升明显，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），后续实验细胞接种密度为在 96 孔板中为  $6\times10^3$  个/孔。根据接种底面积计算，在六孔板中接种密度为  $1.8\times10^5$  个/孔， $10\text{cm}^2$  中接种密度为  $1\times10^6$  个/皿。

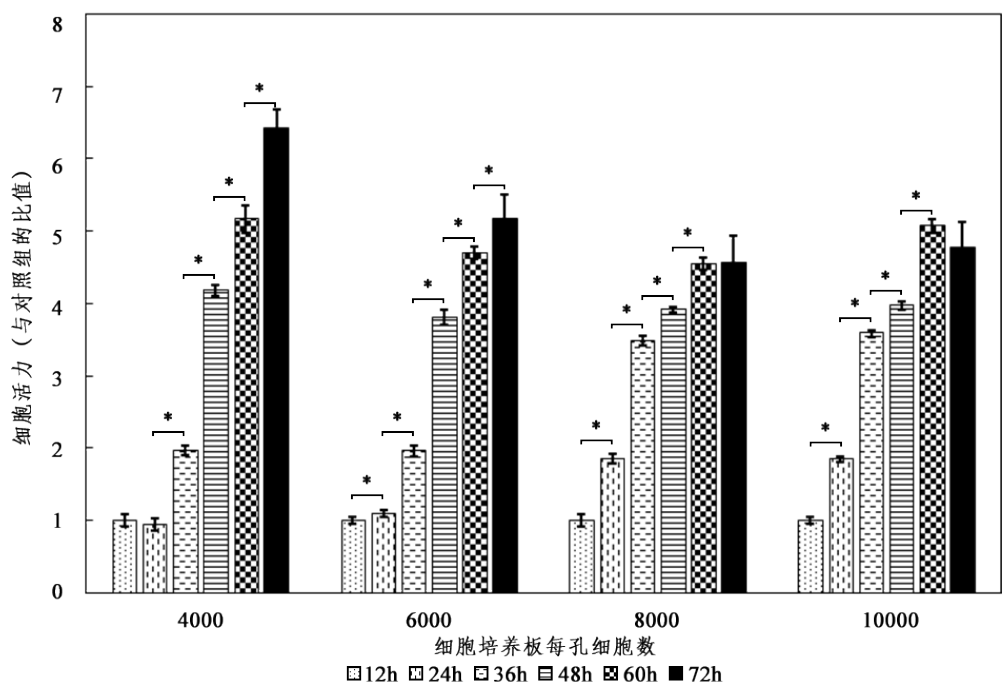


图 1 BV2 细胞增殖活力变化趋势图

(\*表示  $P<0.05$ )

## 2.2 锰暴露后 BV2 细胞形态发生变化

CD68 蛋白是小胶质细胞的特异表达蛋白，因此采用免疫荧光染色法标记 CD68 显示小胶质细胞，Hoechst33342 标记细胞核。结果表明（图 2A），与对照组相比，锰暴露 24h 后 BV2 细胞形态发生改变，由静息态转变为活化状态，细胞胞体变大变圆，突起变短或消失（箭头指示形态明显变化的细胞）。从对照组、 $50\mu\text{M}$  锰暴露组、 $100\mu\text{M}$  锰暴露组分别随机取 10 个视野，分别计数总细胞数和活化细胞数，并计算活化细胞比例后进行统计学分析。结果显示，实验

组活化细胞比例明显增高，差异有统计学意义（图 2B， $P<0.05$ 。

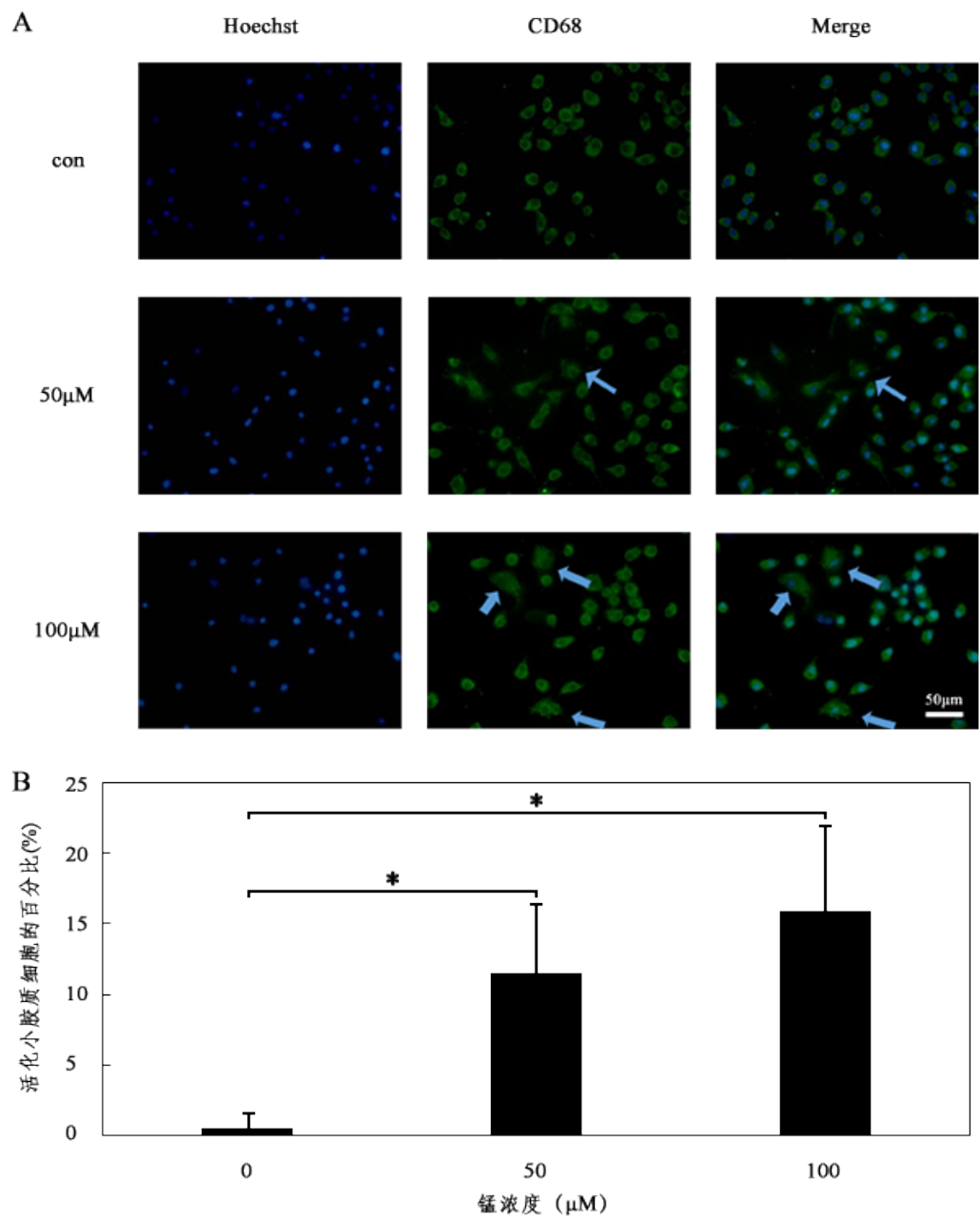


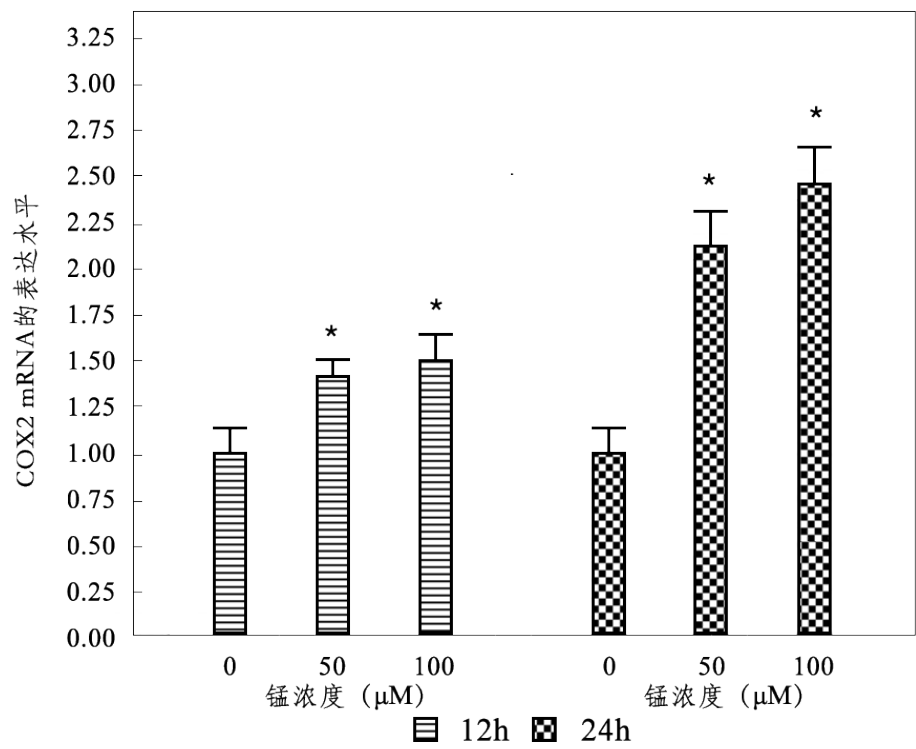
图 2 锰暴露对 BV2 小胶质细胞活化状态的影响

\*表示  $P<0.05$

2.3 锰暴露后 BV2 细胞 COX2 分子 mRNA 水平的改变

采用实时定量 PCR 的方法检测 BV2 细胞锰暴露 12h、24h 后 COX2 分子 mRNA 表达水平的改变。结果显示，与对照组相比，锰暴露后 COX2 分子

mRNA 表达水平均增加 ( $P<0.05$ ), 且随着锰暴露剂量增加 COX2 分子 mRNA 表达水平增加更为显著 (图 3)。



注：\*表示  $P<0.05$

图 3 实时定量 PCR 检测锰暴露后 COX2 分子 mRNA 水平改变()

#### 2.4 锰暴露后 BV2 细胞 COX2 蛋白水平的改变

由于在细胞内 COX2 蛋白表达从 DNA 转录到蛋白翻译约需要 5~10 小时，因此参考文献<sup>[10]</sup>，采用 Western Blot 方法检测 BV2 细胞锰暴露 24h、48h 后 COX2 蛋白表达水平的改变。结果显示 (图 4)，与对照组相比，24h、48h 锰暴露后的 COX2 蛋白表达水平显著增高 ( $P<0.05$ )，而且随着锰暴露剂量的增加，COX2 分子蛋白表达水平增高更为明显。

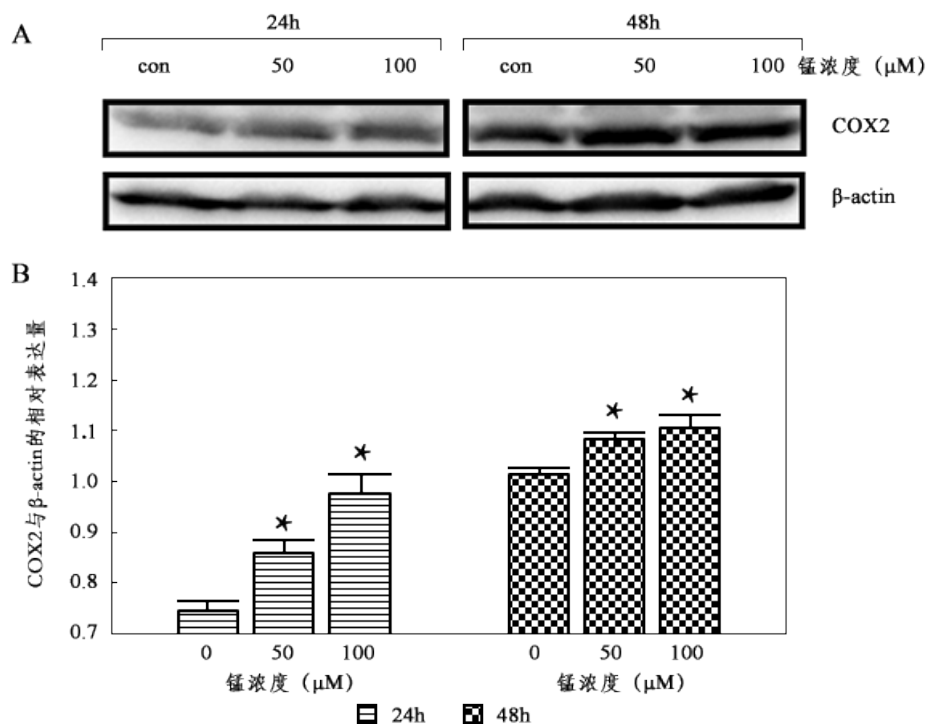


图 4 Western Blot 法检测锰暴露 COX2 分子蛋白水平改变

(A, Western Blot 法检测 COX2 分子蛋白水平的改变；B, 定量分析 COX2 蛋白的改变，\*表示  $P < 0.05$ )

### 3. 讨论

小胶质细胞是中枢神经系统中非常重要的一类细胞，它广泛存在于脑和脊髓中，发挥免疫细胞的功能。在大脑发育早期，神经元之间形成的突触连接数量远大于成年后实际的突触连接数量，其中相当多冗余突触最终是被小胶质细胞修剪而消失的<sup>[11]</sup>。正常的生理状态下，小胶质细胞处于静息状态，而在病理刺激下，小胶质细胞可以迅速活化，参与一系列免疫反应。小胶质细胞在炎症反应中被激活后可以释放活性氧、一氧化氮以及促炎性因子，这些因子可以抑制神经元的发生<sup>[12]</sup>。而 Deierborg 等<sup>[13]</sup>的研究显示，被辅助 T 细胞（Th）激活的小胶质细胞可以释放一些抗炎细胞因子和生长因子。在中枢神经系统急性损伤中，损伤部位周围的小胶质细胞可以很快活化并向损伤部位移动，吞噬变性坏死组织。Ito 等<sup>[14]</sup>的研究发现，在缺血性脑卒中的发生过程中，损伤部位的小胶质细胞活化损伤神经元并吞噬变性坏死的神经元。

锰是人体必须的微量元素之一，是体内某些酶的活性基因、辅助因子或激

活剂，参与体内很多重要的代谢过程<sup>[15]</sup>。同时锰又是常见的生产性毒物和环境污染物，锰暴露职业人群长期接触锰可引起慢性锰中毒。锰的毒性作用主要表现在中枢神经系统，早期主要以神经衰弱综合征为主，晚期则以锥体外系神经障碍为主，但其神经毒性机制尚未完全清楚<sup>[16]</sup>。本实验室前期的研究表明，锰暴露诱导的小胶质细胞活化参与了其神经毒性作用<sup>[17]</sup>。在本研究中，我们进一步证实锰暴露能够刺激小鼠 BV2 小胶质细胞活化，证实小胶质细胞活化在锰神经毒性中发挥了重要作用。

锰刺激小胶质细胞活化的机制尚不清楚。COX2 为诱导型环氧合酶，生理状态下绝大部分组织细胞不表达，而在炎症、肿瘤等病理状态下表达增高，参与多种病理生理过程，细胞膜磷脂通过磷脂酶 A2 途径被水解释放出花生四烯酸，在 COX2 的催化下，合成前列腺素 E2(PGE2)，最后产生系列炎症介质，并通过瀑布式级联反应参与机体各生理、病理过程<sup>[18]</sup>。COX2 也参与了神经系统的许多生理和病理过程，如兴奋性神经元的突触传递、炎症过程、痛觉过敏等<sup>[7]</sup>。本研究采用小鼠 BV2 小胶质细胞，观察锰暴露后细胞形态和 COX2 分子表达的变化。免疫荧光染色结果表明，锰暴露可导致 BV2 细胞形态改变，而实时定量 PCR 和 Western Blot 结果显示，锰暴露诱导了 COX2 分子的表达增加，说明 COX2 蛋白可能在锰暴露引起 BV2 细胞活化过程中发挥了作用，是锰暴露导致神经系统损伤的可能机制之一。锰暴露诱导 COX2 分子表达改变的机制尚需要进一步的研究，以增加对锰神经毒性机制的了解，为预防和治疗锰中毒提供科学依据。

#### 参考文献：

- [1]郭松超,陆彩玲,李习艺,等.锰致神经元细胞 DNA 损伤作用[J].中国公共卫生,2008, 24(9):1101-1103.
- [2]徐强,董大海,徐文.锰作用下 PC12 细胞的氧化应激机制研究[J].现代生物医学进展,2011,11(3):435-440.
- [3]Guilarte TR. Manganese neurotoxicity:new perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and nonhuman primates [J]. Front Aging Neurosci,2013,5(1):23-32.

- [4]谭国鹤,杨伯宁,谭国富,等. 锰中毒对小鼠海马神经干细胞增殖的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,2007,25(5):282-285.
- [5]Xiao H, Li Du J, Mosig A. Ct3d: tracking microglia motility in 3D using a novel cosegmentation approach [J]. Bioinformatics, 2011, 27(4):564-571.
- [6]Sawada M. Neuroprotective and toxic changes in microglia in neurodegenerative disease [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2009,15(Suppl 1): S39-S41.
- [7]Yang H, Chen C. Cyclooxygenase 2 in synaptic signaling[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(14): 1443-1451.
- [8]苏鹏.Tricellulin 在铅暴露诱导血—脑脊液屏障通透性改变中的作用及机制研究[D].第四军医大学,硕士学位论文,2014.
- [9]康蓓佩,赵芳,苏鹏,等. XIAP 蛋白表达改变在铅诱导小鼠海马神经元细胞损伤中的作用[J].实用预防医学,22(5):513-516.
- [10] Wei J, Du K, Cai Q, et al. Lead induces COX-2 expression in glial cells in a NFAT-dependent, AP-1/NFκB-independent manner [J]. Toxicology,325(1):67-73.
- [11]Huberman AD, Feller MB, Chapman B.Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields[J].Annu Rev Neurosci, 2008, 31: 479-509.
- [12]Vukovic J, Blackmore DG, Jhaveri D, et al. Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches[J]. Neurochem Int, 2011, 59(3): 341-346.
- [13]Deierborg T, Roybon L, Inacio AR, et al. Brain injury activates microglia that induce neural stem cell proliferation ex vivo and promote differentiation of neurosphere-derived cells into neurons and oligodendrocytes[J]. Neuroscience, 2010, 171(4): 1386-1396.
- [14]Ito U, Nagasao J, Kawakami E. Fate of disseminated dead neurons in the cortical ischemic penumbra: ultrastructure indicating a novel scavenger mechanism of microglia and astrocytes[J]. Stroke, 2007, 38(9): 2577-2582.
- [15]王璨,关露超,邓宇,等. 亚硝基化在锰致蛋白二巯基异构酶活性改变中的作用[J]. 实用预防医学, 2015, 22(10): 1153-1156.
- [16]邓宇,王飞,徐斌,等.锰对小鼠黑质多巴胺转运体和受体表达影响的研究[J]. 实用预防医学,2014,21(3):257-260.
- [17]Zhao F, Cai T, Liu M, et al. Manganese Induces Dopaminergic

Neurodegeneration via Microglial Activation in a Rat Model of Manganism[J].  
Toxicol Sci, 2009, 107(1):156–164.

[18]曾雪芳,柳宁,王太林.特异性环氧合酶-2 抑制剂 SC236 诱导肾癌细胞 RCC-949 生物学行为变化的实验研究[J]. 实用预防医学,2011,18(3):428-430.