

引文格式:邵敬芝,杜珊珊,张莉蓉,张凤妍. 乳脂肪球表皮生长因子8(MFG-E8)对脂多糖诱导小胶质细胞炎症反应的抑制作用及其机制[J]. 眼科新进展, 2021, 41(10):910-914. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0191

【实验研究】

乳脂肪球表皮生长因子8(MFG-E8)对脂多糖诱导小胶质细胞炎症反应的抑制作用及其机制[△]

邵敬芝 杜珊珊 张莉蓉 张凤妍

作者简介:邵敬芝 (ORCID: 0000-0002-8900-4838), 女, 1985 年 4 月出生, 河南开封人, 博士。主要研究方向: 白内障与眼底病。E-mail: shaozi402@163.com
通信作者:张凤妍 (ORCID: 0000-0002-4138-689X), 女, 1964 年 7 月出生, 河南郑州人, 二级教授、主任医师, 博士研究生导师。主要研究方向: 白内障、青光眼、眼外伤等。E-mail: zhangfengyanx@aliyun.com

收稿日期:2021-04-18
修回日期:2021-06-15
本文编辑:盛丽娜
基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81970785);河南省医学科技攻关联合共建项目(编号:2018020065)
作者单位:450052 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院眼科(邵敬芝, 杜珊珊, 张凤妍); 450000 河南省郑州市, 郑州大学基础医学院药理学部(张莉蓉)

【摘要】 目的 探讨乳脂肪球表皮生长因子8(MFG-E8)对脂多糖(LPS)诱导小胶质细胞(BV-2 细胞)炎症反应的抑制作用,并探讨可能作用机制。**方法** CCK-8 法检测 0~200 mg·L⁻¹ MFG-E8 对细胞活力影响。建立 LPS 诱导 BV-2 细胞视网膜膜变性体外模型,分为对照组、LPS 组、LPS + MFG-E8 组、LPS + LY294002 组和 LPS + PDTC 组。倒置显微镜观察 BV-2 细胞的形态改变,ELISA 检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达变化,Western blot 检测 TNF-α 和白细胞介素-6(IL-6)的蛋白表达变化,及 PI3K-Akt 和 NF-κB 相关通路蛋白表达变化。**结果** 0 mg·L⁻¹、10 mg·L⁻¹、50 mg·L⁻¹、100 mg·L⁻¹ 和 200 mg·L⁻¹ 的 MFG-E8 对 BV-2 细胞的活性无明显影响,细胞活力差异无统计学意义(P>0.05);MFG-E8 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞形态变化具有一定的逆转作用;ELISA 检测结果显示,LPS 组 BV-2 细胞中 TNF-α 的含量较对照组明显升高(P<0.001),LPS + MFG-E8 组 BV-2 细胞中 TNF-α 的含量较 LPS 组显著下降(P<0.001)。Western blot 检测结果显示,LPS 组 BV-2 细胞中 TNF-α 和 IL-6 蛋白相对表达量均显著高于对照组(均为 P<0.05),LPS + MFG-E8 组 BV-2 细胞中 TNF-α 和 IL-6 蛋白相对表达量均较 LPS 组明显降低(均为 P<0.05)。LPS 组 BV-2 细胞中 NF-κB p-p65 蛋白相对表达量明显高于对照组,p-PI3K、p-Akt 蛋白相对表达量均明显低于对照组(均为 P<0.001);LPS + MFG-E8 组 BV-2 细胞中 NF-κB p-p65 蛋白相对表达量较 LPS 组明显降低,p-PI3K、p-Akt 蛋白相对表达量均较 LPS 组明显升高(均为 P<0.001)。**结论** MFG-E8 可能是通过抑制 NF-κB 信号通路的激活,从而减轻 LPS 诱导的小胶质细胞炎症反应。
【关键词】 乳脂肪球表皮生长因子8;小胶质细胞;炎症反应;脂多糖
【中图分类号】 R774

视网膜变性疾病是一类致盲性眼病,具有家族遗传特性,进展缓慢且不可逆^[1]。近年来越来越多的实验研究显示,免疫系统介导的神经炎症反应在视网膜变性疾病中发挥重要作用^[2-3]。小胶质细胞是神经系统的固有免疫细胞,对神经系统发育、免疫微环境的调节具有重要作用^[4-6]。在视网膜变性过程中,小胶质细胞发挥了双刃剑的作用。一方面,活化的小胶质细胞能够吞噬细胞碎片等代谢性毒物质发挥细胞免疫作用;另一方面,持续活化的小胶质细胞释放大量的促炎因子,引发炎症损伤反应,进而损害周围的神经细胞,加速视网膜变性进程。因此,调节小胶质细胞的免疫活性是视网膜变性疾病的重要治疗策略之一。

乳脂肪球表皮生长因子8(MFG-E8)是乳汁脂肪小球表面具有免疫源性的亲脂性糖蛋白^[7]。研究发现,在炎症反应、自身免疫性疾病、老年性疾病和肿瘤中,MFG-E8 发挥多种功能^[8-10]。MFG-E8 抑制 Aβ42 诱导的原代小鼠大脑小胶质细胞的炎症反应^[9,11],外源性 MFG-E8 减少促炎细胞因子的释放进而保护外伤性脑损伤引起的神经元功能损害^[12]。炎症因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素(IL)在小胶质细胞中的表达随着 MFG-E8 的增加或

减少而增加或减少^[13]。本研究通过体外培养小胶质细胞来探讨 MFG-E8 对脂多糖(LPS)诱导的小胶质细胞炎症反应的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基、PDTC、LY294002 (美国 Sigma 公司);胎牛血清(FBS)(美国 Genial 公司);LPS、2.5 g·L⁻¹ 胰蛋白酶、RIPA 裂解液、细胞计数试剂盒-8、兔抗小鼠 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(碧云天生物技术有限公司);MFG-E8、ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);兔抗小鼠 NF-κB p65 抗体、NF-κB p-p65 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体、PI3K 抗体、p-PI3K 抗体、TNF-α 抗体、IL-6 抗体(英国 Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小胶质细胞的来源及培养 小胶质细胞(BV-2 细胞)购于上海吉凯基因化学技术有限公司,培养于含体积分数 10% FBS、10 g·L⁻¹ 青链霉素的 DMEM 培养液中,接种于 T25 培养瓶,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中。隔天换液,待细胞生长融合至 80% 以上进行消化传代。

1.2.2 细胞活力测定 采用 CCK-8 法测定细胞活

力。将BV-2细胞以每孔 10×10^3 个接种于96孔板,每组设置3个复孔;待细胞贴壁后,分别用含有 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MFG-E8培养液继续培养24 h;加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ WST-8溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育4 h,测定450 nm波长处细胞的光密度。

1.2.3 实验分组 将培养处于对数期的BV-2细胞随机分5组,分别为:对照组:完全培养基培养的细胞;LPS组:含 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS的培养液培养的细胞;LPS + MFG-E8组:先用 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MFG-E8作用于BV-2细胞2 h后,再更换为含有 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS的培养液继续培养;LPS + LY294002组:先用含 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的LY294002(P13K-AKT信号通路抑制剂)培养液培养细胞2 h后,再更换为含有 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS的培养液继续培养;LPS + PDTC组:先用含 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PDTC(NF- κ B信号通路抑制剂)培养液培养细胞2 h后,再更换为含有 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS的培养液继续培养。各组分处理后续培养48 h用于后续实验。

1.2.4 ELISA检测TNF- α 表达 收集对照组、LPS组及LPS + MFG-E8组细胞上清液,根据TNF- α ELISA试剂盒的操作说明进行操作,450 nm波长处测量各组细胞的光密度,根据标准品浓度曲线计算出各组样品中TNF- α 的实际质量浓度。

1.2.5 Western blot检测炎症因子表达及信号通路蛋白表达 收集对照组、LPS组、LPS + MFG-E8组、LPS + LY294002组和LPS + PDTC组细胞,冰上裂解提取蛋白,BCA法进行蛋白定量,加上样缓冲液于水浴锅中加热进行蛋白变性。配置 $120\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的分

离胶和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓缩胶,将等量等质的蛋白样品加入上样孔行凝胶电泳,PVDF转膜,脱脂奶粉封闭,孵育一抗(NF- κ B p65、NF- κ B p-p65、Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K、TNF- α 、IL-6及GAPDH,稀释浓度均为1:1000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,二抗(稀释浓度为1:1000)室温孵育1 h,凝胶成像仪曝光,用ImageJ软件分析荧光强度。

1.3 统计学方法 采用SPSS 24.0统计学软件进行分析,数据均呈正态分布,均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间的比较采用单因素方差分析检验,两组数据间的比较采用 t 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度MFG-E8处理后细胞的活力 CCK-8法检测结果显示,经 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MFG-E8培养24 h后,各组BV-2细胞活力分别为(95.39 ± 2.83)%、(93.88 ± 2.84)%、(93.95 ± 4.61)%、(94.22 ± 3.72)%和(93.88 ± 3.35)%,差异无统计学意义($F=0.099,P=0.980$)。

2.2 MFG-E8对LPS诱导BV-2细胞形态的影响

光学显微镜下观察可见,对照组BV-2细胞呈静息状态,细胞大小均匀,呈长梭形,胞体细长,胞体两侧有细长的突起分支;LPS组BV-2细胞的胞体呈圆形,细胞表面的分支变短变粗,没有长的突起,呈阿米巴样;LPS + MFG-E8组BV-2细胞形态较LPS组有一定改善,部分细胞的胞体两侧伸出细长的分支(图1)。

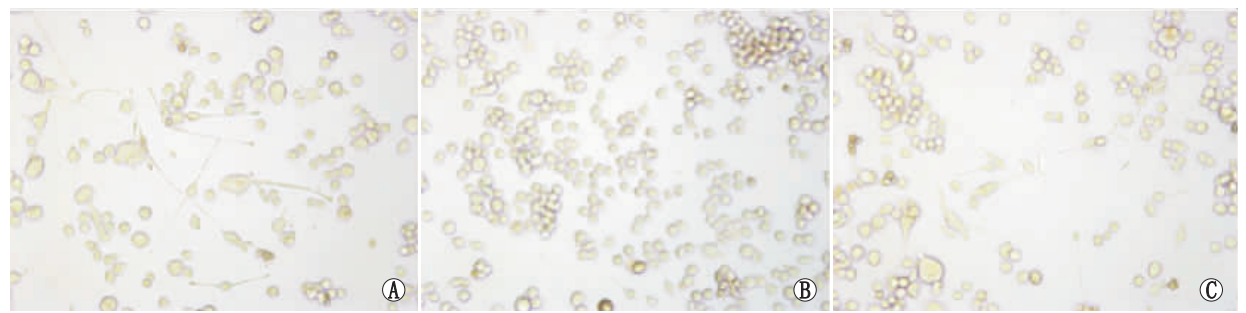


图1 各组BV-2细胞形态($\times 200$) A:对照组;B:LPS组;C:LPS + MFG-E8组。

2.3 MFG-E8对LPS诱导小胶质细胞炎症因子表达的影响 ELISA检测结果显示,对照组、LPS组及LPS + MFG-E8组细胞上清液中TNF- α 的表达量分别为(111.16 ± 4.25) $\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(772.43 ± 21.32) $\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(235.10 ± 45.67) $\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$,总体比较差异有统计学意义($F=434.8,P<0.001$)。两两比较结果显示,与对照组比较,LPS组BV-2细胞上清液TNF- α 的表达量明显增高($t=52.68,P<0.001$);与LPS组比较,LPS + MFG-E8组BV-2细胞上清液

TNF- α 的表达量大幅度下降($t=18.47,P<0.001$)。

Western blot检测结果显示,对照组、LPS组及LPS + MFG-E8组中TNF- α 、IL-6蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=8.999,53.190,P=0.016,0.000$)。两两比较结果显示,与对照组比较,LPS组BV-2细胞中TNF- α 、IL-6蛋白相对表达量均明显增高(均为 $P<0.05$);与LPS组比较,LPS + MFG-E8组BV-2细胞中TNF- α 、IL-6蛋白相对表达量均明显下降(均为 $P<0.05$)(图2)。

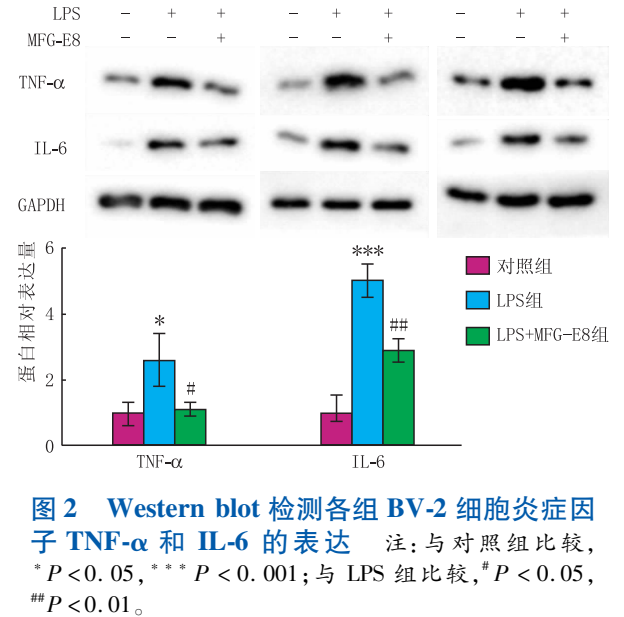


图2 Western blot 检测各组 BV-2 细胞炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的表达 注:与对照组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 LPS 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.4 MFG-E8 抑制 LPS 诱导小胶质细胞炎症反应的机制 对照组、LPS 组、LPS + MFG-E8 组、LPS + LY294002 组、LPS + PDTC 组 5 组 BV-2 细胞中炎症因子相关 NF-κB 信号通路 p-p65 蛋白及 PI3K/Akt 信号通路 p-Akt、p-PI3K 蛋白相对表达量差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),而 NF-κB p65、Akt、PI3K 蛋白相对表达量 5 组间差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。两两比较结果显示,与对照组比较,LPS 组 BV-2 细胞 NF-κB p-p65 蛋白相对表达量升高,p-Akt 及 p-PI3K 蛋白相对表达量下降(均为 $P < 0.001$)。与 LPS 组比较,LPS + MFG-E8 组 BV-2 细胞 NF-κB p-p65 蛋白相对表达量下降,p-Akt 及 p-PI3K 蛋白相对表达量均升高(均为 $P < 0.001$);与 LPS 组比较,LPS + LY294002 组 BV-2 细胞 NF-κB p-p65、p-Akt 及 p-PI3K 蛋白相对表达量均无显著变化(均为 $P > 0.05$);与 LPS 组比较,LPS + PDTC 组 BV-2 细胞 NF-κB p-p65 蛋白相对表达量下降,p-Akt 及 p-PI3K 蛋白相对表达量均升高(均为 $P < 0.001$) (图 3、图 4)。

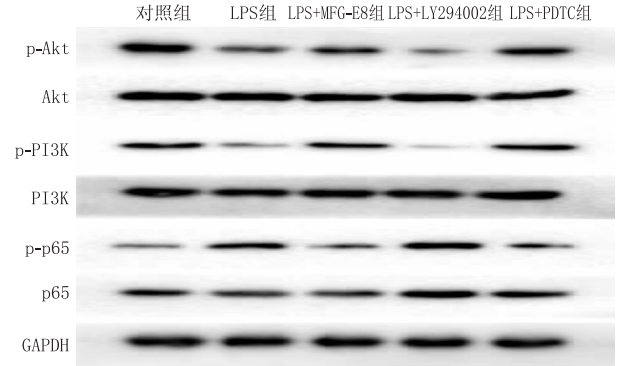


图3 Western blot 检测各组 BV-2 细胞中信号通路相关蛋白表达

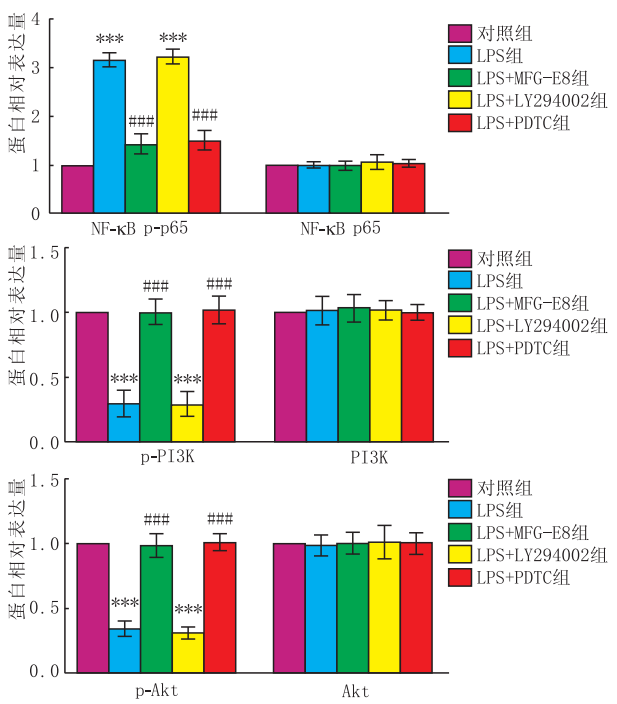


图4 各组 BV-2 细胞中信号通路相关蛋白相对表达量对比 注:与对照组比较, *** $P < 0.001$;与 LPS 组比较, ### $P < 0.001$ 。

3 讨论

小胶质细胞作为体内的固有免疫细胞,是中枢神经系统最重要的一道免疫防线。正常视网膜组织中小胶质细胞处于静息状态,有长的突起,维持视网膜内的神经系统稳态。当变性疾病发生时,小胶质细胞被迅速激活,突起消失,呈阿米巴样,发挥吞噬作用的同时释放大量的炎症因子 TNF-α、IL-6 等加重炎症反应^[14]。根据发挥作用的不同,活化的小胶质细胞可分为 M1 型和 M2 型。M1 型细胞可产生大量炎症因子,从而破坏细胞外基质,进而破坏病原体及细胞的完整性,使其易于被吞噬^[15-16];M2 型细胞不仅能吞噬细胞碎片及代谢产物,而且能分泌抑制炎症的细胞因子,发挥保护机体的作用^[17]。适度的神经炎症反应对机体有一定的保护作用,但持续慢性的促炎因子的分泌会产生级联放大效应,加快疾病的发生发展^[5]。在本研究中,LPS 激活小胶质细胞,使小胶质细胞由静息状态转变为阿米巴样状态,ELISA 检测结果显示,BV-2 细胞上清液 TNF-α 的含量增多,Western blot 检测结果也显示,细胞中炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的表达增加。表明 LPS 诱导小胶质细胞表达,刺激炎症因子的分泌。干预小胶质细胞激活,减少促炎因子的释放,对防治神经炎症为主要病理的视网膜变性疾病具有重要意义。

MFG-E8 是乳汁脂肪小球表面具有免疫源性的亲脂性糖蛋白,主要分布于乳腺小管顶端的分泌细

胞,也存在于巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、树突状细胞以及胰腺细胞等^[7]。在炎症反应、自身免疫性疾病、老年性疾病和肿瘤中,MFG-E8在缓解炎症、改善预后、促进伤口愈合、动脉重塑、增强致瘤性和肿瘤代谢中发挥多种功能^[8,10,18]。在小鼠模型中,重组MFG-E8能抑制内毒素诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子的分泌,并通过降低炎症介质的产生发挥抗炎作用^[19-20]。本研究采用CCK-8法检测不同浓度MFG-E8作用下小胶质细胞的生存活力,结果显示,不同浓度MFG-E8作用下小胶质细胞的生存活力没有明显差异。当MFG-E8作用于LPS诱导的BV-2细胞后,小胶质细胞炎症因子TNF- α 及IL-6的分泌减少,细胞的炎症反应降低。以上研究结果说明,MFG-E8可明显抑制LPS诱导的小胶质细胞炎症反应。

在动物模型及体外模型研究中发现,小胶质细胞在诱导因素刺激作用下,NF- κ B等炎症相关信号通路被激活,释放炎症因子,重组MFG-E8能通过降低NF- κ B的核转录下调下游炎症介质的产生而发挥抗炎作用^[19-20]。Shi等^[9]认为,MFG-E8通过降低NF- κ B及上调PI3K-Akt的表达抑制A β 42诱导的原代小鼠大脑小胶质细胞的炎症反应,进而降低细胞毒性,为阿尔茨海默病的治疗提供理论基础。本研究发现,LPS可以诱导NF- κ B信号通路的激活,同时抑制PI3K/Akt信号通路的活性;而MFG-E8作用下,与LPS组相比,NF- κ B信号通路蛋白因子p-p65的表达下降,而PI3K/Akt信号通路蛋白因子p-Akt和p-PI3K的表达均升高。当NF- κ B信号通路抑制剂PDTC联合LPS作用于BV-2细胞时,NF- κ B p-p65蛋白的相对表达量降低,同时p-Akt和p-PI3K蛋白的相对表达量升高;当PI3K信号通路抑制剂LY294002联合LPS作用于BV-2细胞时,p-Akt和p-PI3K蛋白的相对表达量均降低,但NF- κ B p-p65蛋白的相对表达量没有明显变化。根据以上结果,我们推断MFG-E8主要通过抑制NF- κ B信号通路发挥作用。

综上,本研究结果显示,MFG-E8对LPS诱导的小胶质细胞炎症反应有抑制作用,其机制可能与抑制NF- κ B信号通路有关。本研究为开发延缓和阻止视网膜变性疾病发生发展的药物提供了参考依据。

参考文献

- [1] VELERI S, LAZAR C H, CHANG B, SIEVING P A, BANIN E, SWAROOP A. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models[J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(2): 109-129.
- [2] BIAN B, ZHAO C, HE X, GONG Y, REN C, GE L, et al. Exosomes derived from neural progenitor cells preserve photoreceptors during retinal degeneration by inactivating microglia[J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1748931.
- [3] YANG W, XIONG G Y, LIN B. Cyclooxygenase-1 mediates neuroinflammation and neurotoxicity in a mouse model of retinitis pigmentosa[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 306.
- [4] MCCARTHY C A, WIDDOP R E, DELIYANTI D, WILKINSON-BERKA J L. Brain and retinal microglia in health and disease: an unrecognized target of the renin-angiotensin system[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(8): 571-579.
- [5] KARLSTETTER M, EBERT S, LANGMANN T. Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models[J]. *Immunobiology*, 2010, 215(9/10): 685-691.
- [6] DENG X L, FENG L, WANG Z X, ZHAO Y E, ZHAN Q, WU X M, et al. The Runx1/Notch1 signaling pathway participates in M1/M2 microglia polarization in a mouse model of temporal lobe epilepsy and in BV-2 cells[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(9): 2204-2216.
- [7] CHEYUO C, AZIZ M, WANG P. Neurogenesis in neurodegenerative diseases: role of MFG-E8[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 569.
- [8] HE Y, LAWLOR N T, NEWBURG D S. Human milk components modulate toll-like receptor-mediated inflammation[J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(1): 102-111.
- [9] SHI X, CAI X, DI W, LI J, XU X, ZHANG A, et al. MFG-E8 selectively inhibited A β -induced microglial M1 polarization via NF- κ B and PI3K-Akt pathways[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 7777-7788.
- [10] NI Y Q, ZHAN J K, LIU Y S. Roles and mechanisms of MFG-E8 in vascular aging-related diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101176.
- [11] XU X, ZHANG A, ZHU Y, HE W, DI W, FANG Y, et al. MFG-E8 reverses microglial-induced neurotoxic astrocyte (A1) via NF- κ B and PI3K-Akt pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 904-914.
- [12] GAO Y Y, ZHANG Z H, ZHUANG Z, LU Y, WU L Y, YE Z N, et al. Recombinant milk fat globule-EGF factor-8 reduces apoptosis via integrin β 3/FAK/PI3K/AKT signaling pathway in rats after traumatic brain injury[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 845.
- [13] LIU Y, YANG X, GUO C, NIE P, LIU Y, MA J. Essential role of MFG-E8 for phagocytic properties of microglial cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55754.
- [14] LI Z, ZENG Y, CHEN X, LI Q, WU W, XUE L, et al. Neural stem cells transplanted to the subretinal space of RD1 mice delay retinal degeneration by suppressing microglia activation[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(6): 771-784.
- [15] VARNUM M M, IKEZU T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, 60(4): 251-266.
- [16] CHAVEZ-GALAN L, OLLEROS M L, VESIN D, GARCIA I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169(+) and TCR(+) macrophages[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 263.
- [17] WU F, LUO T, MEI Y, LIU H, DONG J, FANG Y, et al. Simvastatin alters M1/M2 polarization of murine BV2 microglia via Notch signaling[J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 316: 56-64.
- [18] WU J, YANG H, CHENG J, ZHANG L, KE Y, ZHU Y, et al. Knockdown of milk-fat globule EGF factor-8 suppresses glioma progression in GL261 glioma cells by repressing microglial M2 polarization[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 8679-8690.
- [19] AZIZ M, JACOB A, MATSUDA A, WU R, ZHOU M, DONG W, et al. Pre-treatment of recombinant mouse MFG-E8 down-regulates LPS-induced TNF- α production in macrophages via STAT3-mediated SOCS3 activation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27685.
- [20] MATSUDA A, JACOB A, WU R, ZHOU M, NICASTRO J M, COPPA G F, et al. Milk fat globule-EGF factor VIII in sepsis and ischemia-reperfusion injury[J]. *Mol Med*, 2011, 17(1/2): 126-133.

Inhibiting effect and mechanism of MFG-E8 on lipopolysaccharide-induced microglial inflammatory response

SHAO Jingzhi¹, DU Shanshan¹, ZHANG Lirong², ZHANG Fengyan¹

1. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

2. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Corresponding author: ZHANG Fengyan, E-mail: zhangfengyanx@aliyun.com

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect and mechanism of milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) on lipopolysaccharide (LPS)-induced microglia (BV-2 cell) inflammatory response. **Methods** The effect of 0–200 mg · L⁻¹ MFG-E8 on cell viability was detected by CCK-8 kits. An *in-vitro* model of LPS-induced BV-2 cell retinal degeneration was established, dividing into five groups: control group, LPS group, LPS + MFG-E8 group, LPS + LY294002 group and LPS + PDTC group. The morphological change of BV-2 cells was observed by inverted microscope. The expression change of tumor necrosis factor α (TNF- α) was detected by ELISA. The changes in protein expression levels of TNF- α , interleukin-6 (IL-6), PI3K-AKT and NF- κ B related pathways associated protein were detected by Western blot. **Results** Different concentrations of MFG-E8 (0 mg · L⁻¹, 10 mg · L⁻¹, 50 mg · L⁻¹, 100 mg · L⁻¹ and 200 mg · L⁻¹) had no significant effect on the viability of BV-2 cells ($P > 0.05$). MFG-E8 could reverse the morphological changes of BV-2 cells induced by LPS. ELISA results revealed that the concentration of TNF- α in BV-2 cells in the LPS group was significantly higher than that in control group ($P < 0.001$). Compared with the LPS group, the concentration of TNF- α in BV-2 cells was significantly decreased in LPS + MFG-E8 group ($P < 0.001$). Western blot showed that the relative protein expression levels of TNF- α and IL-6 in the LPS group were significantly higher than those in control group (both $P < 0.05$). Compared with the LPS group, the relative protein expression levels of TNF- α and IL-6 were significantly decreased in LPS + MFG-E8 group (both $P < 0.05$). The relative protein expression level of NF- κ B p-p65 in BV-2 cells in LPS group was significantly higher than that in the control group, while the relative protein expression levels of p-P13K and p-Akt were obviously lower than those in the control group (all $P < 0.001$). The relative protein expression level of p-p65 in BV-2 cells in LPS + MFG-E8 group was lower than that in the LPS group, while the relative protein expression levels of p-P13K and p-Akt were obviously higher than those in the LPS group (all $P < 0.001$). **Conclusion** MFG-E8 may alleviate LPS-induced microglial inflammatory response by inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway.

[Key words] milk fat globule epidermal growth factor 8; microglial cell; inflammatory response; lipopolysaccharide