

敲减血红素结合蛋白1基因对小胶质细胞BV2增殖、迁移及炎症反应的影响及其机制

冯思凡¹, 李昀峰², 王嘉莹¹, 马福槟¹, 王岩¹

(1. 广东医科大学附属第一医院神经病学研究所 广东省衰老相关脑疾病重点实验室, 广东 湛江 524001; 2. 广东省高州市人民医院神经内科, 广东 高州 525200)

[摘要] **目的:** 探讨血红素结合蛋白1 (HEBP1) 基因下调对小胶质细胞BV2功能的影响, 分析HEBP1在小胶质细胞中发挥的关键作用。**方法:** 构建阴性对照和HEBP1敲减的小干扰RNA (siRNA), 敲减鼠源的小胶质细胞BV2中的HEBP1基因, 获得HEBP1敲减BV2细胞模型。BV2细胞分为si-NC组、si-HEBP1-1组、si-HEBP1-2组和si-HEBP1-3组, 采用实时荧光定量PCR法 (RT-qPCR) 法和Western blotting法检测细胞敲减后HEBP1 mRNA和蛋白表达水平, 筛选出敲减效果最显著的siRNA用于后续实验。采用细胞计数试剂盒8 (CCK-8) 法检测si-NC组和si-HEBP1组BV2细胞增殖活性, 细胞划痕实验检测2组BV2细胞迁移率, 试剂盒检测2组BV2细胞中线粒体膜电位和活性氧 (ROS) 水平, 线粒体呼吸功能测定仪检测2组BV2细胞线粒体呼吸功能。BV2细胞分为si-NC组、si-NC+脂多糖 (LPS) 组、si-HEBP1组和si-HEBP1+LPS组, RT-qPCR法检测各组BV2细胞中HEBP1、白细胞介素 1β (*IL-1 β*)、肿瘤坏死因子 α (*TNF- α*) 和白细胞介素6 (*IL-6*) mRNA表达水平, Western blotting法检测各组BV2细胞中HEBP1蛋白表达水平。**结果:** 携带红色荧光标签CY3的siRNA转染BV2细胞, 转染效率可达90%以上; 与si-NC组比较, si-HEBP1-1组、si-HEBP1-2组和si-HEBP1-3组BV2细胞中HEBP1蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中si-HEBP1-1组降低最明显; 与si-NC组比较, si-HEBP1-1组、si-HEBP1-2组和si-HEBP1-3组BV2细胞中HEBP1 mRNA表达水平均明显降低 ($P < 0.01$), 其中si-HEBP1-1组降低最明显, 提示si-HEBP1-1是HEBP1敲减效果最好的siRNA, HEBP1敲减的BV2细胞模型构建成功。CCK-8法检测, 与si-NC组比较, si-HEBP1组BV2细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 从90 min开始, 2组细胞增殖活性差异更加明显。细胞划痕实验, 与si-NC组比较, si-HEBP1组细胞迁移率明显降低 ($P < 0.05$)。荧光显微镜观察, 与si-NC组比较, si-HEBP1组细胞线粒体膜电位明显降低 ($P < 0.05$); 与si-NC组比较, si-HEBP1组BV2细胞中ROS水平明显升高 ($P < 0.05$)。细胞线粒体呼吸功能测定, 与si-NC组比较, si-HEBP1组BV2细胞基础呼吸值 (ROUTINE) 和细胞质子漏耗氧量 (LEAK) 均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 2组细胞电子传递呼吸值 (ETS) 和剩余耗氧量 (ROX) 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与si-NC组比较, si-HEBP1组BV2细胞三磷酸腺苷 (ATP) 生成量明显减少 ($P < 0.05$)。RT-qPCR法检测, 与si-NC组比较, si-NC+LPS组BV2细胞中*IL-1 β* 、*TNF- α* 和*IL-6* mRNA水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与si-HEBP1组比较, si-HEBP1+LPS组BV2细胞中*IL-1 β* 、*TNF- α* 和*IL-6* mRNA水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与si-NC+LPS组比较, si-HEBP1+LPS组BV2细胞中*IL-1 β* 、*TNF- α* 和*IL-6* mRNA表达水平

[收稿日期] 2025-01-20

[录用日期] 2025-02-22

[基金项目] 广东省科技厅自然科学基金基础与应用基础研究面上项目 (2024A1515011464, 2022A1515010593); 广东医科大学附属第一医院高层次人才科研启动项目 (GCC2021010)

[作者简介] 冯思凡 (1999—), 女, 陕西省咸阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事阿尔茨海默病中小胶质细胞作用及其机制方面的研究。

[通信作者] 王岩, 副研究员, 硕士研究生导师 (E-mail: jwangyan@gdmu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

均明显升高 ($P < 0.01$)。结论: 敲减 *HEBP1* 基因可降低小胶质细胞 BV2 增殖和迁移能力, 并增强对 LPS 刺激的炎症反应, 其机制可能与 BV2 细胞线粒体功能受损和 ATP 产生减少有关。

[关键词] 血红素结合蛋白1; 小胶质细胞; 线粒体功能; 神经炎症; 活性氧; 细胞增殖; 细胞迁移
[中图分类号] R741.02 [文献标志码] A

Effects of heme-binding protein 1 gene knockdown on proliferation, migration, and inflammatory response of microglia BV2 and their mechanisms

FENG Sifan¹, LI Yunfeng², WANG Jiaying¹, MA Fubin¹, WANG Yan¹

(1. Institute of Neurology, Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Age-Related Cardiac and Cerebral Diseases, Zhanjiang 524001, China; 2. Department of Neurology, People's Hospital, Gaozhou City, Guangdong Province, Gaozhou 525200, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of heme-binding protein 1 (*HEBP1*) down-regulation on the function of microglia BV2, and to clarify the key role of *HEBP1* in the microglia. **Methods:** Negative control and *HEBP1* knockdown small interfering RNA (siRNA) were constructed to knockdown *HEBP1* gene in mouse-derived microglial BV2, and the *HEBP1* knockdown BV2 cell models were obtained. The BV2 cells were divided into si-NC group, si-*HEBP1*-1 group, si-*HEBP1*-2 group, and si-*HEBP1*-3 group. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of *HEBP1* mRNA and protein in the BV2 cells after knockdown; the siRNA with the most significant knockdown effect was selected for subsequent experiments. The proliferation abilities of the cells in si-NC group and si-*HEBP1* group were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and the cell migration rates were assessed by scratch assay; the cellular mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) levels were detected by kits; the cellular mitochondrial respiratory function was detected by mitochondrial respirometer. The BV2 cells were divided into si-NC group, si-NC+ lipopolysaccharide (LPS) group, si-*HEBP1* group, and si-*HEBP1*+LPS group. RT-qPCR method was used to detect the expression levels of *HEBP1*, interleukin-1 β (*IL-1 β*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), and interleukin-6 (*IL-6*) mRNA in the BV2 cells in various groups, and Western blotting method was used to detect the expression levels of *HEBP1* protein in the BV2 cells in various groups. **Results:** When the BV2 cells were transfected with siRNA carrying with red fluorescence tag CY3, the transfection efficiency was above 90%; compared with si-NC group, the expression levels of *HEBP1* protein in the BV2 cells in si-*HEBP1*-1 group, si-*HEBP1*-2 group, and si-*HEBP1*-3 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially in si-*HEBP1*-1 group. Compared with si-NC group, the expression levels of *HEBP1* mRNA in the BV2 cells in si-*HEBP1*-1 group, si-*HEBP1*-2 group, and si-*HEBP1*-3 group were significantly decreased ($P < 0.01$), especially in si-*HEBP1*-1 group; indicating that si-*HEBP1*-1 was the siRNA with best *HEBP1* knockdown effect, and the *HEBP1* knockdown BV2 cell model was successfully constructed. The CCK-8 results showed that compared with si-NC group, the proliferation activities of the BV2 cells in si-*HEBP1* group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); from 90 min, the differences in proliferation activities of the BV2 cells in two groups were obvious. The cell scratch experiment results showed that compared with si-NC group, the cell migration rate in si-*HEBP1* group was significantly decreased ($P < 0.05$). The fluorescence microscope results showed that compared with si-NC group, the mitochondrial membrane potential of the BV2 cells in si-*HEBP1* group was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with si-NC group, the ROS level in the BV2 cells in si-*HEBP1* group was significantly

increased ($P < 0.05$). The mitochondrial respiration function testing results showed that compared with si-NC group, routine respiration (ROUTINE) and leak respiration (LEAK) in si-HEBP1 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and electron transfer system capacity (ETS) and residual oxygen consumption (ROX) had no significant differences ($P > 0.05$); the ATP amount was decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with si-NC group, the expression levels of *IL-1 β* , *TNF- α* , and *IL-6* mRNA in the BV2 cells in si-NC+LPS group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with si-HEBP1 group, the expression levels of *IL-1 β* , *TNF- α* , and *IL-6* mRNA in the BV2 cells in si-HEBP1+LPS group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with si-NC+LPS group, the expression levels of *IL-1 β* , *TNF- α* , and *IL-6* mRNA in the BV2 cells in si-HEBP1+LPS group were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Knockdown of *HEBP1* gene can decrease the proliferation and migration abilities of the microglia BV2 and increase inflammatory response to LPS stimulus, and their mechanisms may be related to mitochondrial function damage and decreased ATP production of the BV2 cells.

KEYWORDS Heme-binding protein 1; Microglia; Mitochondrial function; Neuroinflammation; Ractive oxygen species; Cell proliferation; Cell migration

血红素结合蛋白1 (heme-binding protein 1, HEBP1) 是一种线粒体相关蛋白, 主要位于线粒体外膜附近^[1]。研究^[2]显示: HEBP1作为血红素结合蛋白在血红蛋白合成过程中发挥关键作用。HEBP1可以参与血红素代谢, 并与血红素结合以调节线粒体动力学, 而线粒体动力学对维持脑内神经回路至关重要。通过其结合血红素的能力, HEBP1还可能参与血红素在神经元中的转运, 对血红素的浓度变化起到缓冲和调节的作用^[3]。近年来更深入的研究^[1, 3-5]发现: HEBP1通过裂解产物甲酰肽受体样2配体 (formylpeptide receptor-like-2 ligand, F2L) 以减轻神经炎症和促进组织修复, 并且与线粒体连接位点和棘形成系统复合体 (mitochondrial contact site complex, MICOS) 相互作用调控线粒体功能, 在线粒体损伤和天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶 (cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase) 级联启动之中扮演着重要角色。HEBP1是F2L的前体, 而F2L是甲酰肽受体2 (formylpeptide receptor 2, FPR2) 的配体^[6-8], 研究^[9-11]证实: 当小胶质细胞受到刺激时, FPR2的表达会显著增加, 提示炎症刺激下的小胶质细胞与HEBP1蛋白有关联。小胶质细胞是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中一类来源于卵黄囊的特化巨噬细胞, 可以吞噬并清除死亡细胞, 也被普遍认为是CNS中最重要常驻免疫细胞^[12]。目前研究^[11]仅发现小胶质细胞通过表达FPR2调节自身功能, HEBP1是否参与小胶质细胞发挥中枢免疫功能还有待进一步研究。本研究

构建*HEBP1*敲减的鼠源小胶质细胞BV2模型, 通过细胞实验分析HEBP1下调对小胶质细胞增殖活性、迁移能力和应对刺激时的炎症因子的影响, 并通过评估线粒体功能探讨线粒体受损导致能量供应下降、进而影响小胶质细胞功能的机制, 为明确HEBP1在神经系统小胶质细胞中发挥的生物学功能提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 BV2细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 采用含10%胎牛血清和1%青-链霉素复合试剂的MEM细胞培养基, 于恒温37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。MEM细胞培养基、Opti-MEM培养基、胎牛血清、1%青-链霉素复合试剂和胰酶均购自美国Gibco公司, 转染试剂Lipofectamine RNAiMAX和BCA蛋白浓度定量试剂盒购自美国Thermo公司, RIPA蛋白裂解液、细胞计数试剂盒8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测试剂盒、线粒体膜电位JC-1检测试剂盒和线粒体超氧化物检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司, 蛋白酶抑制剂混合片剂 (protease inhibitor cocktail tablets, PICT) 购自瑞士Roche公司, 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 购自北京索莱宝科技有限公司, 增强化学发光底物 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒购自苏州新赛美生物科技有限公司, TRIzol试剂购自美国Ambion公司, 反转录试剂盒和SYBR Green PCR试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司, 寡霉素和鱼藤酮购自上海麦克林生化科技有限

公司, 抗霉素A购自上海懋康生物科技有限公司, 羰基氰化物间氯苯腙(carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone, CCCP)购自美国Sigma公司。C600多功能成像仪购自美国Azure Biosystems公司, ABIQS6P荧光定量PCR仪购自美国Thermo公司, Oxygraph-2K线粒体呼吸测定系统购自奥地利Oroboros公司, 奥林巴斯FV3000共聚焦显微镜购自日本奥林巴斯公司。

1.2 小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 构建、转染和细胞分组 采用汉恒生物科技(上海)有限公司构建鼠源HEBP1的siRNA, 根据说明书操作, 加入125 μL 的二乙基焦碳酸酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)进行混合, 待充分溶解后混匀分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。于6孔细胞培养板中种植BV2细胞, 控制每个孔细胞数量大致相同, 待细胞贴壁且生长状态良好同时密度达到60%~70%时, 将细胞分别转染si-NC和si-HEBP1。BV2细胞分为si-NC组、si-HEBP1-1组、si-HEBP1-2组和si-HEBP1-3组, 分别转染si-NC、si-HEBP1-1、si-HEBP1-2和si-HEBP1-3 siRNA, 在3组敲减HEBP1的siRNA中筛选出敲减效果最显著的siRNA, 用于后续实验。转染24 h后通过荧光显微镜观察siRNA的转染效率, 采用Western blotting法和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法验证HEBP1蛋白和mRNA表达水平, 若敲减组HEBP1蛋白表达下调, 则说明细胞模型构建成功, 可开展下一步实验。siRNA引物序列见表1。

1.3 RT-qPCR法检测各组BV2细胞中HEBP1、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)mRNA表达水平 BV2细胞分为si-NC组、si-NC+脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)组、si-HEBP1组和si-HEBP1+LPS组, 首先将细胞分别转染si-NC和si-HEBP1 siRNA, 细胞转染siRNA 24 h后, 在si-NC组和si-HEBP1组同时加入LPS刺激24 h, LPS刺激浓度为100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 随后弃掉培养基, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗3次, TRIzol提取细胞RNA, 使用反转录试剂盒将RNA反转录获取cDNA, 通过两步荧光染料嵌合RT-qPCR法和荧光定量PCR仪检测细胞中mRNA表达水平, 以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组BV2细胞

中HEBP1、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平。引物序列见表2。

表1 HEBP1 siRNA引物序列
Tab. 1 Primer sequences of HEBP1 siRNA

Primer	Sequence(5'-3')
Si-HEBP1-1	F: CUGUGGAAGUGACAGACAATT R: UUGUCUGUCACUCCACAGTT
Si-HEBP1-2	F: CUUUUGCCGUGUUUCCCAATT R: UUGGAAACACGGCAAAAGTT
Si-HEBP1-3	F: CCAGUGAUGAGAGUGUGAATT R: UUCACACUCUCAUCACUGGTT
Si-NC	F: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

表2 RT-qPCR引物序列
Tab. 2 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequence(5'-3')
HEBP1	F: CTGTTCGGGAGCGTGGAAA R: CAGTAGCAAAGTGGCCCTT
IL-1 β	F: GGGCCTCAAAGGAAAGAATCT R: GAGGTGCTGATGTACCAGTTGG
IL-6	F: TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC R: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF- α	F: GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG R: TTGGTGGTTTGTGAGTGTGAG
GAPDH	F: AAGAGGGATGCTGCCCTTAC R: TACGGCCAAATCCGTTACA

1.4 Western blotting法检测各组BV2细胞中HEBP1蛋白表达水平 BV2细胞分为si-NC组、si-HEBP1-1组、si-HEBP1-2组和si-HEBP1-3组, si-NC组转染si-NC siRNA, si-HEBP1 3组分别转染si-HEBP1-1、si-HEBP1-2和si-HEBP1-3 siRNA, 转染24 h后, 裂解细胞提取蛋白。将蛋白配平至等质量等体积, 然后加入Loading Buffer, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热10 min。蛋白样品上样, 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 电泳结束之后将蛋白转印至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温下封闭1 h, 分别用一抗HEBP1(1:500)和 α -Tubulin(1:2000)孵育, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜; 次日, 将条带用TBST缓冲液洗涤3次, 每次10 min。羊抗兔IgG(1:5000)孵育条带, 室温1 h, TBST缓冲液洗涤3次。采用蛋白成像系统检测条带上蛋白表达情况, Image J软件分析蛋白条带灰度值, 以 α -Tubulin内参, 计算目的

蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.5 CCK-8法检测2组BV2细胞增殖活性 BV2细胞分为 si-NC 组和 si-HEBP1 组。细胞转染 24 h 后消化并重悬, 均匀铺在 96 孔细胞培养板内, 每孔 2×10^3 个细胞, 铺板 24 h 后, 按 9:1 比例将 MEM 完全培养基与 CCK-8 试剂混合, 避光环境下每孔加入 100 μ L 混合液, 用锡纸包裹放进培养箱中培养, 使用酶标仪每 30 min 于波长 450 nm 处测定吸光度 (A) 值, 以 A 值代表细胞增殖活性。

1.6 细胞划痕实验检测2组BV2细胞迁移率

BV2 细胞分为 si-NC 组和 si-HEBP1 组。BV2 细胞转染 24 h, 待细胞密度不低于 95% 时, 孔板背面标记划线, 在孔板中对细胞做划痕处理, 采用 PBS 缓冲液洗涤漂浮细胞, 更换为无血清或者低浓度血清的 MEM 细胞培养基, 在光学显微镜下对细胞进行拍照记录, 随后将细胞重新放入培养箱中培养, 24 h 后再次拍照记录, 采用 Image J 软件对拍摄的照片进行处理和分析, 计算 2 组细胞迁移率。细胞迁移率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.7 试剂盒检测2组BV2细胞中线粒体膜电位和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平

BV2 细胞分为 si-NC 组和 si-HEBP1 组。细胞培养于培养皿中, 转染 24 h 后, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 将细胞培养液与 JC-1 染色工作溶液按照 1:1 的比例混合, 每个小皿加入 1 mL 混合染色液, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 20 min, 随后弃掉染色液并用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 最后加入 2 mL 细胞培养液。使用荧光显微镜采集图像, Image J 软件分析细胞荧光强度。在正常情况下, 细胞具有较高的线粒体膜电位, JC-1 染料会聚集于线粒体基质中, 呈现红色荧光; 一旦细胞线粒体功能受损, 线粒体膜电位下降, JC-1 无法聚集, 会呈现绿色荧光。线粒体膜电位 = 红色荧光强度 / 绿色荧光强度 $\times 100\%$ 。

细胞培养于培养皿中, 转染 24 h 后, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 将细胞培养液与线粒体超氧化物检测试剂盒染色溶液按照 1:1 的比例混合, 每个小皿加入 1 mL 混合染色液, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 20 min, 随后弃掉染色液并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 最后加入 2 mL 细胞培养液。ROS 可以通过氧化线粒体超氧化物检测试剂盒荧光探针呈现红色荧光。使用荧光显微镜采集图像, Image J 软件分析细胞红色

荧光强度, 以细胞红色荧光强度代表细胞中 ROS 水平。

1.8 线粒体呼吸功能测定仪检测2组BV2细胞线粒体呼吸功能

BV2 细胞分为 si-NC 组和 si-HEBP1 组。BV2 细胞转染 24 h 后, 采用胰酶消化, 消化完成后进行离心, 用无血清培养基重悬细胞, 并记录细胞数量, 以 1×10^6 个为宜。随后将细胞悬液加入到线粒体呼吸功能测定仪的实验舱中, 耗氧量平稳后观察完整细胞的基础呼吸值 (routine respiration, ROUTINE), 然后同步注射 5 mmol \cdot L $^{-1}$ 寡霉素 1 μ L, 观察细胞质子漏耗氧量 (leak respiration, LEAK)。待耗氧量稳定后, 分次向舱内注射 1 mmol \cdot L $^{-1}$ CCCP 解偶联剂 1 μ L, 观察最大电子传递呼吸值 (electron transfer system capacity, ETS)。最后, 依次向舱内注射 1 mmol \cdot L $^{-1}$ 鱼藤酮 1 μ L 和 5 mmol \cdot L $^{-1}$ 抗霉素 A 1 μ L, 待耗氧量曲线稳定后, 观察非线粒体呼吸的剩余耗氧量 (residual oxygen consumption, ROX)。实验过程中加入三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 合酶抑制剂寡霉素之后的耗氧量相当于细胞生成 ATP 的耗氧量, ROUTINE 值和 LEAK 值的差值可以作为间接反应线粒体 ATP 生成量的指标。实验中 2 个实验舱分别加入 si-NC 组和 si-HEBP1 组细胞, 同时进行实验操作, 共进行 3 次独立实验。

1.9 统计学分析 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析。各组细胞中 HEBP1 蛋白表达水平, 细胞中 *HEBP1*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 和 *IL-6* mRNA 表达水平, 细胞迁移率, 细胞增殖活性, 线粒体呼吸功能指标、线粒体膜电位和线粒体中 ROS 水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

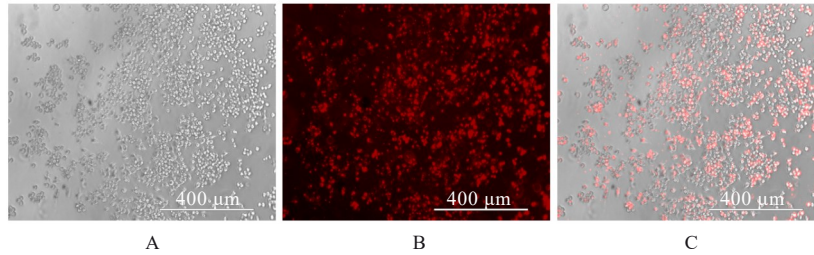
2 结果

2.1 敲减 HEBP1 基因 BV2 细胞中 HEBP1 mRNA 和蛋白表达水平

荧光显微镜观察显示: 携带红色荧光标签 CY3 的 siRNA 转染 BV2 细胞, 转染效率可达 90% 以上。Western blotting 法检测结果显示: 与 si-NC 组比较, si-HEBP1-1 组、si-HEBP1-2 组和 si-HEBP1-3 组 BV2 细胞中 HEBP1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中 si-HEBP1-1 组降低最明显; RT-qPCR 法检测结果显示: 与 si-NC 组比较, si-HEBP1-1 组、si-HEBP1-2 组和 si-HEBP1-3 组 BV2 细胞中 *HEBP1* mRNA 表达水

平均明显降低 ($P < 0.01$), 其中 si-HEBP1-1 组降低最明显。提示 si-HEBP1-1 是 *HEBP1* 敲减效果最

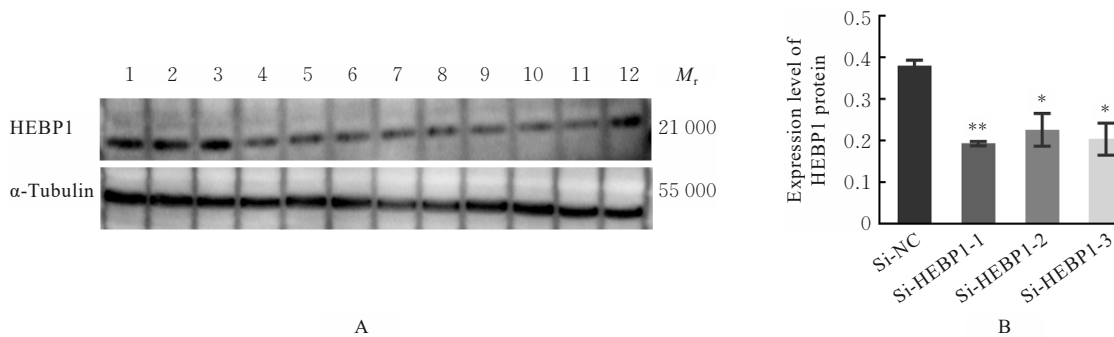
好的 siRNA, *HEBP1* 敲减的 BV2 细胞模型构建成功。见图 1、图 2 和表 3。



A: Bright field; B: Fluorescent field; C: Merge.

图 1 *HEBP1* 敲减的 BV2 细胞中 siRNA 转染效率

Fig. 1 Transfection efficiency of siRNA in BV2 cells with *HEBP1*-knockdown



Lane 1-3: Si-NC group; Lane 4-6: Si-HEBP1-1 group; Lane 7-9: Si-HEBP1-2 group; Lane 10-12: Si-HEBP1-3 group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with si-NC group.

图 2 *HEBP1* 敲减的 BV2 细胞中 *HEBP1* 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of *HEBP1* proteins in BV2 cells with *HEBP1*-knockdown

表 3 各组 BV2 细胞中 *HEBP1* mRNA 表达水平

Tab. 3 Expression levels of *HEBP1* mRNA in BV2 cells in various groups ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Group	<i>HEBP1</i> mRNA
Si-NC	1.00 ± 0.05
Si-HEBP1-1	0.01 ± 0.03*
Si-HEBP1-2	0.30 ± 0.14*
Si-HEBP1-3	0.38 ± 0.12*

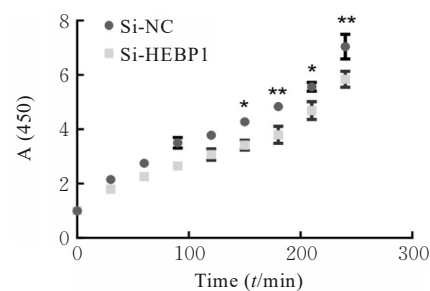
* $P < 0.01$ vs si-NC group.

2.2 2组 BV2 细胞的增殖活性 CCK-8 法检测结果显示: 与 si-NC 组比较, si-HEBP1 组 BV2 细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 从 90 min 开始, 2 组细胞增殖活性差异更加明显。见图 3。

2.3 2组 BV2 细胞迁移率 细胞划痕实验结果表明: 与 si-NC 组 ($41.82\% \pm 6.14\%$) 比较, si-HEBP1 组 BV2 细胞 24 h 内划痕愈合程度缓慢, 细胞迁移率

($18.76\% \pm 3.50\%$) 明显降低 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.4 2组 BV2 细胞线粒体膜电位 荧光显微镜观察显示: 与 si-NC 组 ($2.52\% \pm 0.25\%$) 比较, si-HEBP1 组细胞线粒体膜电位 ($2.26\% \pm 0.14\%$) 明显降低 ($P < 0.05$)。见图 5。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

图 3 2组 BV2 细胞增殖活性

Fig. 3 Proliferation activities of BV2 cells in two groups

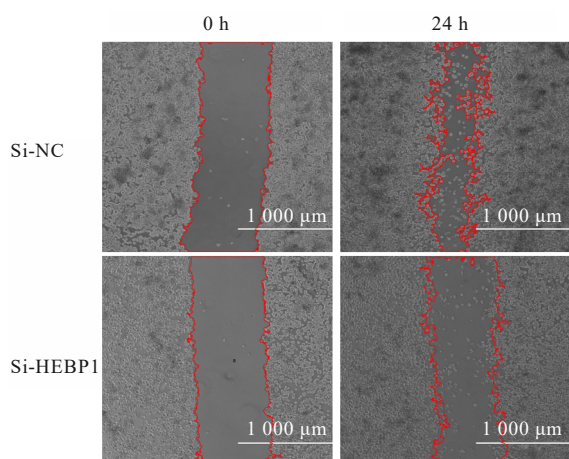


图4 细胞划痕实验检测2组细胞迁移情况

Fig. 4 Migration of cells in two groups detected by scratch assay

2.5 2组BV2细胞中ROS水平 荧光显微镜观察显示:与si-NC组(134.53 ± 12.77)比较,si-HEBP1组BV2细胞中ROS水平(153.07 ± 5.22)

明显升高($P < 0.05$)。见图6。

2.6 2组BV2细胞线粒体呼吸功能指标 细胞线粒体呼吸功能测定结果显示:与si-NC组比较,si-HEBP1组BV2细胞ROUTINE值和LEAK值均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),2组细胞ETS值和ROX值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。ATP生成量分析结果显示:与si-NC组比较,si-HEBP1组BV2细胞ATP生成量明显降低($P < 0.05$)。见图7和表4。

2.7 各组BV2细胞中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平 RT-qPCR检测结果显示:与si-NC组比较,si-NC+LPS组BV2细胞中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平均明显升高($P < 0.01$)。与si-HEBP1组比较,si-HEBP1+LPS组BV2细胞中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平均明显升高($P < 0.01$)。与si-NC+LPS组比较,si-HEBP1+LPS组BV2细胞中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平均明显升高($P < 0.01$)。见表5。

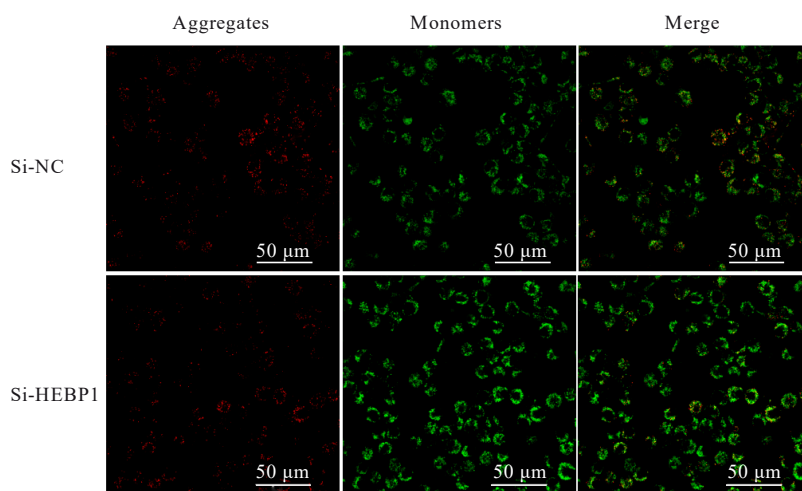


图5 2组BV2细胞线粒体膜电位检测荧光图

Fig. 5 Fluorescence images of mitochondrial membrane potential detection in BV2 cells in two groups

3 讨论

在CNS中,小胶质细胞作为常驻免疫细胞发挥着双刃剑的作用。一方面,小胶质细胞通过吞噬和清除多余神经元及突触,参与神经回路的发育^[13-15],分泌神经营养因子滋养邻近神经元^[16],并通过内吞作用快速清除凋亡细胞碎片及其他外源性有害物质,从而维持CNS的稳态,促进神经元存活和神经元祖细胞(neural progenitor cells, NPCs)的增殖与成熟^[14, 17]。因此,小胶质细胞凭借对细胞外

微环境的动态监测,在CNS组织保护、损伤应答和病原体防御等方面发挥着至关重要的作用^[18-20]。另一方面,小胶质细胞还会以促炎方式对蛋白质聚集体和死亡神经元作出应答,释放炎症介质,对邻近神经元产生不利影响^[16, 21-22]。本研究结果显示:与si-NC组比较,在HEBP1下调状态下,小胶质细胞增殖活性和细胞迁移率均明显降低。鉴于小胶质细胞需要迅速迁移到病变区域以清除受损组织来执行免疫监视功能^[23],HEBP1下调会大幅削弱小胶质细胞的免疫功能,降低其对微环境的快速感知

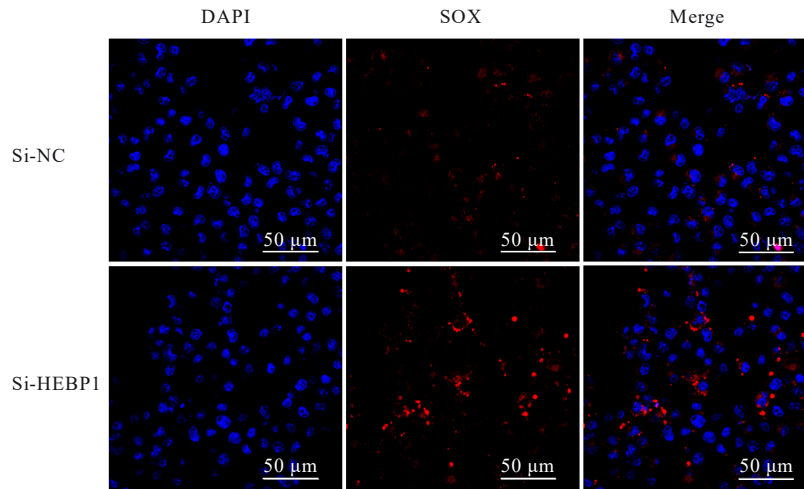


图6 2组BV2细胞中ROS检测荧光图

Fig. 6 Fluorescence images of ROS detection in BV2 cells in two groups

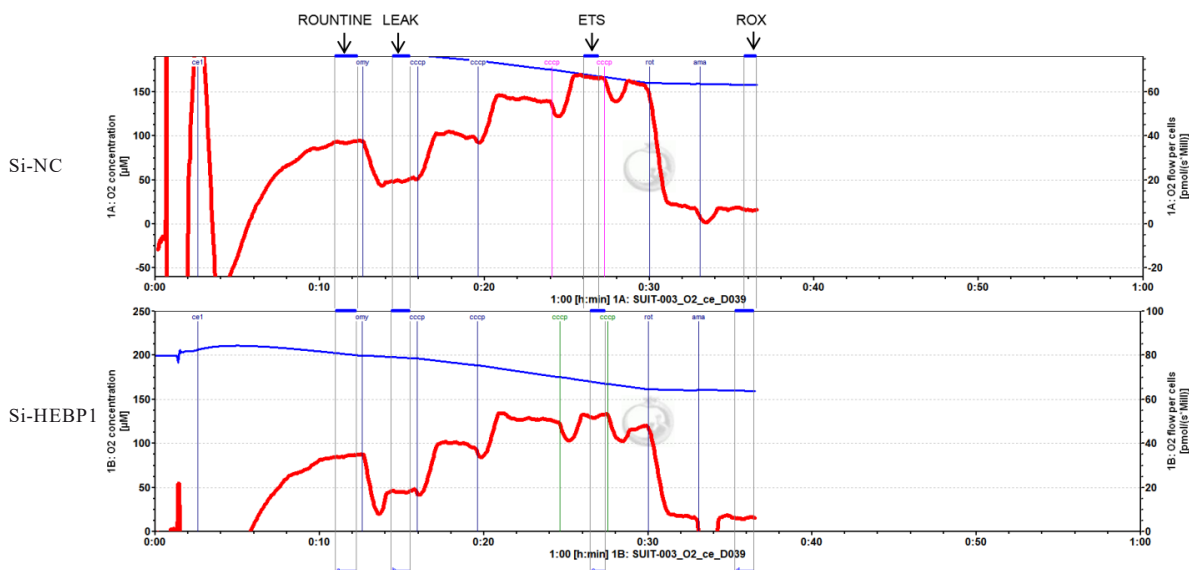


图7 2组BV2细胞线粒体呼吸功能变化图

Fig. 7 Diagram of mitochondrial respiratory function changes of BV2 cells in two groups

表4 2组BV2细胞线粒体呼吸耗氧量和ATP生成量

Tab. 4 Mitochondrial respiratory oxygen consumption and ATP production of BV2 cells in two groups

($n=3, \bar{x} \pm s, \text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ per million cells)

Group	ROUTINE	LEAK	EST	ROX	ATP
Si-NC	36.44±0.80	19.31±0.31	72.35±18.08	5.57±1.35	17.06±0.57
Si-HEBP1	32.99±1.37*	17.94±0.40**	54.06±2.16	5.16±0.73	15.04±1.11*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

力和迅速应答能力。此外, 研究^[6]显示: HEBP1可能通过产生F2L抑制神经炎症并促进组织修复。本研究结果表明, HEBP1下调会导致小胶质细胞对刺激的反应性增加, 炎症因子转录分泌增多, 进

一步加剧炎症发展。然而, 这一现象是否与HEBP1下调导致的F2L产生减少有关, 仍有待深入探讨。

线粒体被视作细胞的“能量工厂”, 其对细胞能量代谢的调控起着关键作用^[24]。对于小胶质细胞

表5 各组BV2细胞中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平Tab. 5 Expression levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 mRNA in BV2 cells in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	IL-1 β	TNF- α	IL-6
Si-NC	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.05
Si-HEBP1	0.94 \pm 0.48	1.22 \pm 0.38	2.21 \pm 1.15
Si-NC+LPS	1 139.35 \pm 211.34*	10.22 \pm 3.58*	174.96 \pm 37.05*
Si-HEBP1+LPS	2 447.83 \pm 476.00 Δ #	19.15 \pm 2.38 Δ #	309.17 \pm 44.25 Δ #

* $P<0.01$ vs si-NC group; $\Delta P<0.01$ vs si-HEBP1 group; # $P<0.01$ vs si-NC+LPS group.

胞而言,其维持免疫功能所需的高能量消耗亦受线粒体能量代谢的调节^[25]。在大脑的生理环境下,葡萄糖主要通过糖酵解和氧化磷酸化2种途径为小胶质细胞提供能量支持,其中氧化磷酸化是小胶质细胞静息状态下的主要供能方式;而炎症或应激刺激会导致小胶质细胞从原本的休眠状态转变为反应状态,此过程通常伴随线粒体功能障碍,进而导致ATP产生不足^[26-28]。小胶质细胞线粒体功能一旦受损,还会引发线粒体膜电位降低以及ROS过度产生。这种改变可能是多种因素共同促成的,例如线粒体结构改变或者电子传递链功能受损等等。线粒体膜电位降低不但会对线粒体的能量代谢过程产生影响,还会干扰其正常机制,使小胶质细胞难以维系免疫作用,最终导致细胞功能紊乱。过量ROS产生则会对细胞造成氧化应激损伤,进一步加重细胞功能障碍,严重时甚至会造成细胞死亡,形成恶性循环^[25, 29]。本研究针对HEBP1敲减的小胶质细胞进行了线粒体膜电位和ROS水平检测,证实HEBP1蛋白表达下调会导致小胶质细胞线粒体膜电位下降,ROS生成增加,进而引发细胞中严重的线粒体功能障碍。此外,HEBP1蛋白表达下调还会使小胶质细胞线粒体呼吸功能显著下降,ATP生成减少。从能量供应与细胞功能关联的角度推测,小胶质细胞增殖和迁移能力下降导致细胞功能障碍这一变化可能与细胞线粒体受损,能量供应不足密切相关。这一结论不仅丰富了小胶质细胞能量代谢的调控机制,也为深入探究小胶质细胞功能异常相关疾病的发病机制提供了新的见解和理论依据。

综上所述,线粒体相关蛋白HEBP1下调会导致小胶质细胞线粒体功能受损,能量供应不足,进而影响细胞增殖和迁移能力。本研究结果为深入理解HEBP1在小胶质细胞中发挥的生理功能提供了依据,也为改善病理状态下小胶质细胞的状态提供参考。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

冯思凡参与实验操作、数据收集、整理分析和论文撰写,李昀峰、王嘉营和马福槟参与实验操作和数据收集,王岩参与实验设计和论文审阅。

[参考文献]

- [1] YAGENSKY O, KOHANSAL-NODEHI M, GUNASEELAN S, et al. Increased expression of heme-binding protein 1 early in Alzheimer's disease is linked to neurotoxicity[J]. eLife, 2019, 8: e47498.
- [2] GOODFELLOW B J, FREIRE F, CARVALHO A L, et al. The SOUL family of heme-binding proteins: Structure and function 15 years later[J]. Coord Chem Rev, 2021, 448: 214189.
- [3] CHUA J J E. HEBP1 - An early trigger for neuronal cell death and circuit dysfunction in Alzheimer's disease[J]. Semin Cell Dev Biol, 2023, 139: 102-110.
- [4] YIN G N. Pericyte-derived heme-binding protein 1 promotes angiogenesis and improves erectile function in diabetic mice[J]. Investig Clin Urol, 2022, 63(4): 464-474.
- [5] NICKEL W, RABOUILLE C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(2): 148-155.
- [6] DEVOSSE T, DUTOIT R, MIGEOTTE I, et al. Processing of HEBP1 by cathepsin D gives rise to F2L, the agonist of formyl peptide receptor 3[J]. J Immunol, 2011, 187(3): 1475-1485.
- [7] GAO J L, GUILLABERT A, HU J Y, et al. F2L, a peptide derived from heme-binding protein, chemoattracts mouse neutrophils by specifically activating Fpr2, the low-affinity N-formylpeptide receptor[J]. J Immunol, 2007, 178(3): 1450-1456.
- [8] MIGEOTTE I, RIBOLDI E, FRANSSSEN J D, et al. Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2[J]. J Exp Med, 2007, 195(12): 1611-1621.

- 2005, 201(1): 83-93.
- [9] CHEN K Q, IRIBARREN P, HU J Y, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(6): 3651-3659.
- [10] CUI Y H, LE Y Y, GONG W H, et al. Bacterial lipopolysaccharide selectively up-regulates the function of the chemotactic peptide receptor formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells [J]. *J Immunol*, 2002, 168(1): 434-442.
- [11] CUI Y H, LE Y, ZHANG X, et al. Up-regulation of FPR2, a chemotactic receptor for amyloid beta 1-42 (a beta 42), in murine microglial cells by TNF alpha [J]. *Neurobiol Dis*, 2002, 10(3): 366-377.
- [12] GOMEZ PERDIGUERO E, KLAPPROTH K, SCHULZ C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors[J]. *Nature*, 2015, 518(7540): 547-551.
- [13] BOTELLA LUCENA P, HENEKA M T. Inflammatory aspects of Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2024, 148(1): 31.
- [14] FROST J L, SCHAFFER D P. Microglia: architects of the developing nervous system [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(8): 587-597.
- [15] SCHAFFER D P, LEHRMAN E K, KAUTZMAN A G, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner[J]. *Neuron*, 2012, 74(4): 691-705.
- [16] CAI Y L, LIU J L, WANG B, et al. Microglia in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease and related therapeutic targets [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 856376.
- [17] HANISCH U K, KETTENMANN H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11): 1387-1394.
- [18] NAYAK D, ROTH T L, MCGAVERN D B. Microglia development and function [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 367-402.
- [19] XIE Z, MENG J, WU Z, et al. The dual nature of microglia in Alzheimer's disease: a microglia-neuron crosstalk perspective[J]. *Neuroscientist*, 2023, 29(5): 616-638.
- [20] YAN H Y, WANG W, CUI T T, et al. Advances in the understanding of the correlation between neuroinflammation and microglia in Alzheimer's disease[J]. *Immunotargets Ther*, 2024, 13: 287-304.
- [21] CALSOLARO V, EDISON P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions[J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(6): 719-732.
- [22] TWAROWSKI B, HERBET M. Inflammatory processes in Alzheimer's disease-pathomechanism, diagnosis and treatment: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6518.
- [23] FITZGERALD K A, KAGAN J C. Toll-like receptors and the control of immunity[J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1044-1066.
- [24] NABI S U, KHAN A, SIDDIQUI E M, et al. Mechanisms of mitochondrial malfunction in Alzheimer's disease: new therapeutic hope [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4759963.
- [25] LI Y, XIA X H, WANG Y, et al. Mitochondrial dysfunction in microglia: a novel perspective for pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 248.
- [26] JOHANNSEN D L, RAVUSSIN E. The role of mitochondria in health and disease [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(6): 780-786.
- [27] KAMATHAM P T, SHUKLA R, KHATRI D K, et al. Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics for Alzheimer's disease: Breaking the memory barrier[J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 101: 102481.
- [28] WANG L X, PAVLOU S, DU X, et al. Glucose transporter 1 critically controls microglial activation through facilitating glycolysis [J]. *Mol Neurodegener*, 2019, 14(1): 2.
- [29] PRADEEPKIRAN J A, REDDY P H. Defective mitophagy in Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101191.