论著

文章编号:1000-5404(2005)20-2020-04

星形胶质细胞抑制T细胞增殖及机制探讨

熊加祥[1,2],白 云[1],宋 敏[1],许雪青[1],王艳艳[1],杨晓亚[1] (第三军医大学基础医学部:[1]分子遗传学教研室,[2]生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 初步探讨星形胶质细胞影响T细胞增殖作用及机制。**方法** 利用分离培养小鼠原代星形胶质细胞,以LPS和IFN-γ刺激细胞活化,用RT-PCR方法检测非活化与活化状态的星形胶质细胞B7.2、B7.1、MHCⅡ和B7-H1等免疫分子的表达情况;将不同状态的细胞分别与PHA刺激活化的小鼠T细胞进行共培养,观测其对T细胞增殖的影响,并分析可能的机制。**结果** 小鼠原代星形胶质细胞在非活化状态下组成性表达B7.2和B7-H1 mRNA,在LPS和IFN-γ刺激活化24 h后B7-H1的表达减少,而同时诱导表达MHCⅡ和B7.1 mRNA,而TNF-α作用不明显;非活化的星形胶质细胞对PHA刺激活化的T细胞增殖具有明显的抑制作用,而活化的星形胶质细胞的抑制作用减弱。**结论** 小鼠星形胶质细胞在非活化及活化状态下对T细胞增殖具有不同的作用,其机制可能与其表达不同的免疫分子有关。

关键词:星形胶质细胞;免疫分子;T细胞;增殖

中图法分类号:R329.28;R338.1;R392.12 **文献标识码**:A

Mechanisms of inhibiting T-cell proliferation induced by astrocytes

XIONG Jia-xiang[1,2], BAI Yun[1], SONG Min[1], XU Xue-qing[1], WANG Yan-yan[1], YANG Xiao-ya[1] ([1]Department of Molecular Genetics, [2]Department of Physiology, Collelle of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of astrocytes on T cell proliferation, and make a preliminary exploration of the mechanisms underlying these effects. Methods Primary cultured mouse astrocytes were activated by 500 ng/ml LPS, 100 U/ml IFN-γ and 100 U/ml TNF-α, then the expressions of B7.2, B7.1, MHC Ⅱ and B7-H1 were tested in activated and non-activated astrocytes by RT-PCR. After PHA-activated T cells were co-cultured with the different astrocytes, the T cell proliferation and the expressions of B7.2, B7.1, MHC Ⅱ and B7-H1 were examined. Results B7.2 mRNA and B7-H1 mRNA were constitutively expressed in non-activated mouse astrocytes. MHC Ⅱ and B7.1 mRNA expression was observed and B7-H1 mRNA expression decreased in astrocytes in 24 h after these cells were activated by LPS and IFN-γ, but not TNF-α. In contrast to the weaker effect induced by the activated astrocytes, the non-activated astrocytes had a significant inhibitory effect on PHA-stimulated T cell proliferation. Conclusion Mouse astrocytes under activated and non-activated states have different effects on T cell proliferation, the mechanisms of which may attribute to the expression of different immune molecules in astrocytes.

Key words: astrocytes; immune molecules; T cell; proliferation

传统上,中枢神经系统(central nervous system, CNS)被认为是免疫赦免区,作为大脑内最多的细胞群,星形胶质细胞长期以来一直认为只是起支持和营养作用,而其免疫功能一直为人们所忽视。随着研究的深入,越来越多的证据表明胶质细胞除了具有构成血脑屏障(blood brain barrier, BBB),参与神经递质代谢和影响突触信息传递,与神经细胞共同构成中枢神经系统(CNS)立体调控网络,维持CNS内稳态[1]等重要生理功能外,还具有免疫调节功能。

脑内星形胶质细胞在正常和炎性刺激作用下具有不同的免疫调控角色,参与调控T细胞增殖活化或失能凋亡,从而影响中枢神经系统免疫性疾病的发生和发展。探讨星形胶质细胞与T细胞相互作用的分子

基金项目:国家自然科学基金海外青年学者合作研究基金资助项目(30228018),第三军医大学校管课题(200503)
Supported by the National Natural Science Foundation of China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars (30228018) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (200503)

作者简介:熊加祥(1972-),男,四川省峨眉山市人,博士研究生,讲师,主要从事神经免疫方面的研究。电话:(023)68753925

通讯作者:白 云,电话:(023)68752258,E-mail: geneby@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-04-28;**修回日期**:2005-09-05

机制将为研究和治疗神经免疫性疾病奠定基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和试剂盒

DMEM 培养基(GIBCO)，LPS 和 PHA(Sigma)，RNA 提取液 Tripure(BD)，RT-PCR 试剂盒(TAKARA)。重组 IFN-γ、TNF-α 抗体(BD)：大鼠抗小鼠 B7-H1 抗体(eB)，PE 标记的亲和素(BD)，生物素化的兔抗鼠 GFAP、HRP 标记山羊抗大鼠 IgG、HRP 标记的链酶卵白素、DAB 试剂盒均购于北京中山公司。

1.2　细胞培养

1.2.1　原代星形胶质细胞培养　　首先混合培养小鼠大脑神经细胞，5～7 d 后采用摇床筛选和贴壁分离培养纯化星形胶质细胞，GFAP 鉴定细胞纯度达 95% 以上。

1.2.2　小鼠脾脏 T 淋巴细胞分离培养　　拉颈处死小鼠，无菌取脾；冲洗研磨；200 目滤网收集细胞悬液；用淋巴细胞分离液分离得到单个核细胞。尼龙毛柱分离 T 淋巴细胞。进行流式检测 CD3 阳性细胞率达到 85% 以上方满足实验要求。

1.3　细胞活化及混合培养

1.3.1　细胞活化　　上述分离的小鼠 T 淋巴细胞利用丝裂原 PHA(Sigma)刺激(50 μg/ml)24 h。星形胶质细胞种植于 96 孔板内，待细胞生长良好，细胞数达 1×10^4 后，分别加入 LPS (500 ng/ml)，IFN-γ(100 U/ml)，TNF-α(100 U/ml)刺激培养 24 h，使其活化。

1.3.2　细胞共培养　　不同条件刺激后的星形胶质细胞中加入丝裂原刺激后的 T 细胞(5×10^5/ml)，未刺激的 T 细胞(normal 组)为对照，共培养 24 h 后，进行 T 细胞增殖检测。

1.3.3　T 细胞增殖检测　　收集上述待测 T 细胞置入 96 孔板内，加入 CCK-8(cell counting Kit-8，同仁化学研究所)10 μl，孵箱内孵育 3 h 后，MODEL550 酶标仪检测，激发波长为 450 nm。

1.4　RT-PCR 检测

LPS、IFN-γ、TNF-α 刺激星形胶质细胞活化如前所述，24 h 后收集细胞，用 Tripure 提取总 RNA，检测 D_{260}/D_{280} 在 1.80 以上。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增相应的目的产物。循环系数：94 ℃预热 5 min，94 ℃变性 40 s，58 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，35 个循环后，最后72 ℃延伸 10 min 后结束，产物经琼脂凝胶电泳检测。

引物(上海生物化学工程公司合成)：B7.1，5′-GTCGTCATCGTTGTCATCATCA-3′ 和 5′-GCACGGTGCTGAAAGAA-3′，产物大小为 210 bp；B7.2，5′-CCTCCTTGTGATGCTGCTCA-3′和 5′-GCTCTCACTGCCTTCACTCTG-3′，产物大小为 184 bp；B7-H1，5′-AAGCCTCAGCACAGCAACTT-3′ 和 5′-ACATCATTCGCTGTGGCGTT-3′，产物大小为 392 bp；MHC Ⅱ，5′-GCATCCGAGCCTGAAGAG-3′和 5′-GGTTTACTACAGAGCGAAGACA-3′，产物大小为 440 bp；GAPDH，5′-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3′ 和 5′-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3′，产物大小为 837 bp。

1.5　免疫细胞化学检测星形胶质细胞 B7-H1 分子的表达

将原代星形胶质细胞培养于放置了盖玻片的 12 孔板中，刺激同前，24 h 后取出已爬满(约 90%)细胞的盖玻片，4% 多聚甲醛固定 1 h，漂洗，正常山羊血清封闭，加入 1∶400 大鼠抗小鼠 B7-H1 0.05 ml，37 ℃孵育 1 h，漂洗后，加入 1∶400 HRP 标记山羊抗大鼠 IgG 37 ℃孵育 1 h，漂洗，DAB 显色。

1.6　统计学分析

实验结果应用 SPSS 10.0 进行单因素方差分析。

2　结果

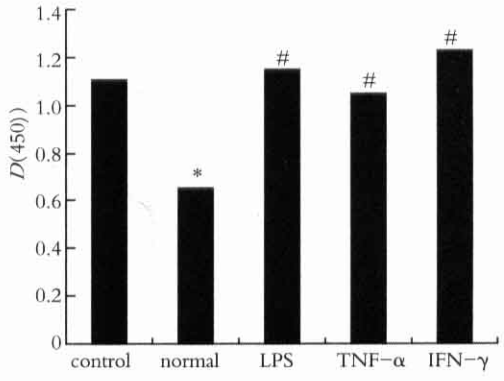
2.1　细胞纯化鉴定

2.1.1　星形胶质细胞的纯化鉴定　　免疫组化及免疫荧光鉴定星形胶质细胞 GFAP，检测结果细胞纯度达 95% 以上，符合共培养和 RT-PCR 实验要求。

2.1.2　T 细胞的纯化鉴定　　经尼龙毛法分离小鼠脾脏 T 淋巴细胞，经流式细胞仪测定 CD3 阳性率达 90% 以上。

2.2　T 细胞增殖变化

T 细胞在丝裂原刺激作用下 24 h 后，相差显微镜下见细胞变大、成团聚集，细胞数目相对未用丝裂原刺激组细胞增多。丝裂原刺激培养 24 h 的 T 细胞分别与正常和经 500 ng/ml LPS、100 U/ml TNF-α、100 U/ml IFN-γ 活化的原代星形胶质细胞共培养 24 h 后发现 T 细胞与正常星形胶质细胞培养后，检测其 D 值相对单独培养比单独 T 细胞培养的对照组明显下降($P<0.01$)。而 LPS、IFN-γ 组则与对照组比较相差不显著($P>0.05$)，与正常组比较则有显著差异($P<0.01$)，见图 1。



*：$P<0.01$，*vs* control；#：$P<0.01$，*vs* normal

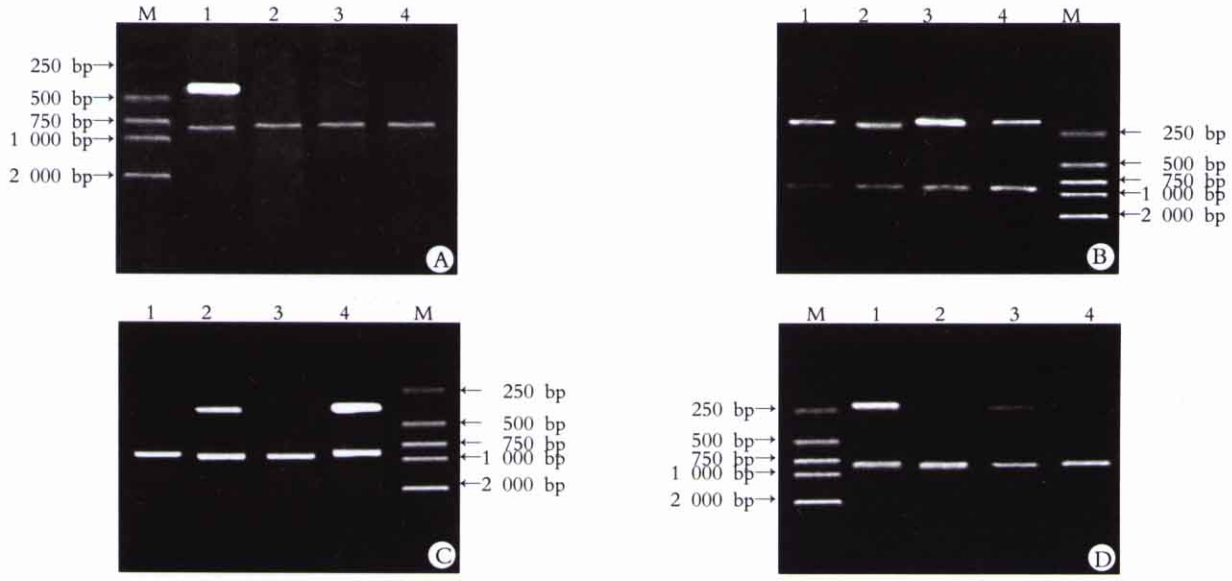
图 1　星形胶质细胞影响 T 细胞增殖变化

Fig 1　Effect of astrocytes on T cell proliferation

2.3　星形胶质细胞表达免疫分子

2.3.1　RT-PCR 检测免疫分子 mRNA 表达　　原代星形胶质细胞及在 500 ng/ml LPS、100 U/ml TNF-α、100 U/ml IFN-γ 刺激作用 24 h 免疫分子 B7.1、B7.2、B7-H1 和 MHC Ⅱ 的表达。经 RT-PCR 后电泳显示 B7.2、B7-H1 的 mRNA 在原代星形胶质细胞膜上组成性表达，而 B7.1 在 LPS 和 IFN-γ 诱导性表达，MHC Ⅱ 仅在 IFN-γ 刺激作用下表达；星形胶质细胞在 LPS 和 IFN-γ 刺激活化 24 h 后 B7-H1 mRNA 的表达消失，见图 2。

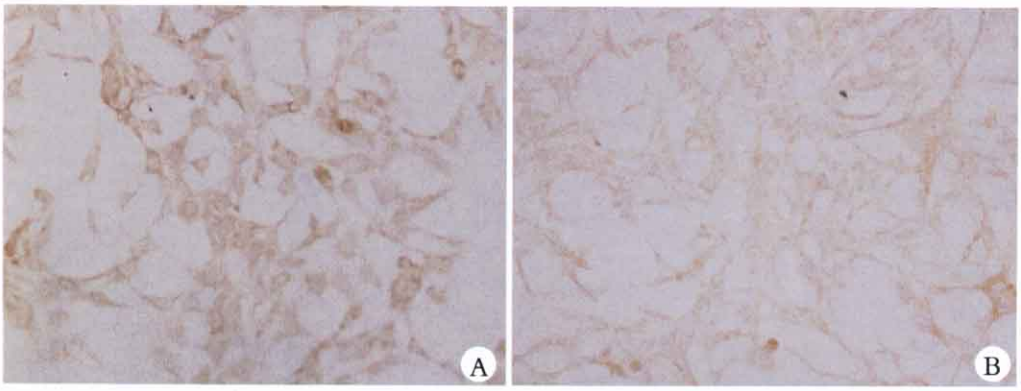
2.3.2　免疫组化检测 B7-H1 分子蛋白表达　　组化染色显示，原代星形胶质细胞组成性表达 B7-H1，在 LPS 或 IFN-γ 刺激作用后其表达下降，见图 3。



A: MHC Ⅱ mRNA, B: B7.2 mRNA, C: B7-H1 mRNA, D: B7.1 mRNA. 1: IFN-γ; 2: TNF-α; 3: LPS; 4: Normal; M: DL2000 marker

图2 免疫分子 MHC Ⅱ、B7.1、B7-H1 和 B7.1 mRNA 在星形胶质细胞上表达

Fig 2 Expression of immue molecules MHC Ⅱ, B7.1, B7-H1 and B7.1 mRNA in astrocytes



A: On nonactivated astrocytes, B: On activated astrocytes

图3 组化染色显示星形胶质细胞表达 B7-H1 (SABC×200)

Fig 3 Expression of B7-H1 on astrocytes by immunohistochemistry (SABC×200)

3 讨论

T 细胞透过血脑屏障进入脑内,其命运取决于脑内的胶质微环境和神经细胞的功能状态,也决定了中枢神经系统免疫性疾病的发生和发展。T 细胞在 CNS 首先遭遇的是星形胶质细胞,星形胶质细胞的功能状态将直接影响和调控 T 细胞增殖活化或失能凋亡。星形胶质细胞对脑内微环境变化相对较敏感,如细胞内外离子(H^+、Ca^{2+}、K^+)浓度的改变、神经递质的变化,外界药物的进入,细胞将出现反应性变化[2,3]。本实验利用 LPS、TNF-α、IFN-γ 刺激星形胶质细胞的活化形式,建立炎症细胞模型,探讨星形胶质细胞对 T 细胞的增殖变化的影响。结果显示星形胶质细胞在静息状态下可抑制 T 细胞的增殖,而活化状态下丧失该功能,并且可促进 T 细胞增殖、活化作用,推测星形胶质细胞在正常状态下发挥大脑的免疫保护作用,活化后担当中枢神经系统的 APC,最后导致中枢神经系统免疫性疾病的出现。

星形胶质细胞抑制 T 细胞增殖途径的报道较多,星形胶质细胞膜上的 CD95L 分子将成为脑内的第一

防线，在炎性疾病或脑损伤条件下 CD95L 的表达上调，将对活化的诱导 T 细胞凋亡发挥抑制作用[4,5]；星形胶质细胞通过接触或非接触作用（培养细胞上清）上调活化的 T 细胞表达 CTLA-4，通过 B7/CTLA-4 途径发挥抑制功能，为大脑作为免疫特赦器官提出新的机制[6]，也证实星形胶质细胞在神经炎性疾病中的保护作用；星形胶质细胞诱导调控性 T 细胞减弱 CNS 自发免疫，大鼠 T 细胞与星形胶质细胞孵育后完全失去丝裂原刺激分化增殖能力细胞增殖周期停留在 G_0/G_1 期，IL-2R 的表达下降，IFN-γ 分泌降低，失能的 T 细胞能阻碍正常 T 细胞的丝裂原刺激分化增殖能力和 CNS 的自反应 T 细胞的抗原刺激增殖能力[7]；分离培养 EAE 模型大鼠脑内浸润的单个核细胞（inMNC）和外周淋巴结单个核细胞（lnMNC），来源于正常新生大鼠的星形胶质细胞与上述两种细胞培养可抑制 T 细胞的增殖和 IFN-γ 分泌，抑制 B 细胞 MBP 特异抗体的产生，发挥抑制作用的物质是星形胶质细胞的上清液的作用，而不依赖于细胞之间的相互接触[8,9]。研究者还发现经 IFN-γ 处理后的星形胶质细胞上清液对 T、B 细胞的抑制作用更明显，小胶质细胞则无该作用。由此可见，星形胶质细胞在担当大脑免疫屏障发挥有重要作用，但具体的机制仍不清楚。本实验显示除星形胶质细胞表达 B7 MHC Ⅱ 分子外，还发现细胞组成性表达 B7-H1，并在细胞受到 LPS 和 IFN-γ 刺激作用活化后其表达下降或消失，伴随对 T 细胞增殖抑制作用的丧失。在已有的文献报道中，我们已知 B7-H1 可以通过其受体 PD-1 抑制 T 细胞的增殖，抑制 T 细胞释放 IL-2、IFN-γ。星形胶质细胞是否通过此途径尚未可知。根据我们的实验推测星形胶质细胞对 T 细胞的抑制途径除上述文献报道以外，可能还存在膜分子的抑制途径。

有关星形胶质细胞作为脑内的 APC 已早有报道，但其必须在细胞因子 IFN-γ 刺激作用下表达 MHC Ⅱ 和共刺激分子 B7 在不同等实验模型中，各报道是不一致的。本实验通过 RT-PCR 的方法发现星形胶质细胞在 mRNA 水平组成性表达共刺激 B7.2，IFN-γ 刺激作用下表达 MHC Ⅱ 分子和 B7.1，LPS 在作用下细胞也会表达 B7.1，这些实验结果与文献报道基本一致。星形胶质细胞在活化状态下表达 MHC Ⅱ 和共刺激分子担当非专职 APC，促进 T 细胞的活化增殖，共培养抑制作用消失也与此有关。TNF-α 刺激星形胶质细胞后，不表达共刺激分子 B7.1 和 MHC Ⅱ，且也未发现 B7-H1 表达的变化，但活化后的星形胶质细胞也丧失对 T 细胞增殖抑制作用，其机制还有待于进一步的实验研究。

为更深一步的研究和了解星形胶质细胞抑制 T 细胞通过细胞膜分子途径，还需要在蛋白水平的证实，如利用靶位点的阻断，或干预配体与受体的交互作用，或利用 RNAi 技术沉默星形胶质细胞 B7-H1 基因再进行共培养后观察 T 细胞增殖及其功能的变化，以明确星形胶质细胞通过共抑制分子途径抑制 T 细胞的作用。

参考文献：

[1] Nedergaard M, Ransom B, Goldman S A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain[J]. Trends Neurosci, 2003, 26(10): 523 - 530.

[2] 熊加祥，黎海蒂，李希成. 吗啡对大鼠海马星形胶质细胞[Ca^{2+}]i 的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(3)：251 - 254.

[3] 熊加祥，黎海蒂，吴　旋. 吗啡、纳络酮对培养星形胶质细胞谷氨酸摄取功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1436 - 1438.

[4] Kohji T, Matsumoto Y. Coexpression of Fas/FasL and Bax on brain and infiltrating T cells in the central nervous system is closely associated with apoptotic cell death during autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neuroimmunology, 2000, 106(1 - 2): 165 - 171.

[5] Bechmann I, Steiner B, Gimsa U, *et al*. Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent[J]. J Neuroimmunol, 2002, 132 (1 - 2): 60 - 65 .

[6] Gimsa U, ORen A, Pandiyan P, *et al*. Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152)[J]. J Mol Med, 2004, 82 (6): 364 - 372.

[7] Trajkovic V, Vuckovic O, Stosic Grujicic S, *et al*. Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity[J]. Glia, 2004, 47 (2): 168 - 179.

[8] Xiao B G, Diab A, Zhu J, *et al*. Astrocytes induce hyporesponses of myelin basic protein-reactive T and B cell function [J]. J Neuroimmunol, 1998, 89(1 - 2): 113 - 121.

[9] Sun D, Coleclough C, Whitaker J N. Nonactivated astrocytes downregulate T cell receptor expression and reduce antigen-specific proliferation and cytokine production of myelin basic protein (MBP)-reactive T cells [J]. J Neuroimmunol, 1997, 78(1 - 2): 69 - 78.

（编辑　栾　嘉）