文章编号:1000-5404(2006)07-0681-04

论著

P物质对脊髓星形胶质细胞活化和炎性因子IL-1β、TNF-α分泌的影响

张 恒[1],周占松[1],刘丽梅[2],杨 忠[3],宋 波[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军泌尿外科中心;[2]西南医院病理学研究所;[3]基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨P物质(P substance, SP)对脊髓星形胶质细胞活化和分泌炎性因子TNF-α、IL-1β的影响。**方法** 体外培养脊髓星形胶质细胞,施加SP刺激后分别应用RT-PCR和Western blot测定胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)mRNA和蛋白的表达,ELISA法检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)分泌的变化。**结果** 10^{-7}mol/L SP的作用下,星形胶质细胞GFAP mRNA和蛋白的表达在0~72 h逐渐升高,与正常对照组相比差异显著($P<0.01$);SP在10^{-9}~10^{-6}mol/L浓度范围内呈浓度依赖性促进星形胶质细胞分泌TNF-α、IL-1β(12 h),与对照组有显著差异($P<0.01$,$P<0.05$),但IL-1β在SP 10^{-6}mol/L作用组下降,与对照组无明显差异($P>0.05$)。**结论** SP刺激下脊髓星形胶质细胞明显活化,分泌炎性致痛因子TNF-α、IL-1β增多,表明周围慢性疼痛可能通过致痛递质SP介导下星形胶质细胞的活化引起脊髓中枢神经炎性痛。

关键词:星形胶质细胞;慢性疼痛;SP;IL-1β;TNF-α
中图法分类号:Q516;R322.81;R392.11 **文献标识码**:A

Activation and excretion of TNF-α and IL-1β of astrocyte of spinal cord stimulated by SP

ZHANG Heng[1], ZHOU Zhan-song[1], LIU Li-mei[2], YANG Zhong[3], SONG Bo[1] ([1]Urinary Surgery Research Center, [2]Department of Pathology, Southwest Hospital, [3]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the influence of SP on the activation and excretion of TNF-α, IL-1β of astrocytes of spinal cord. **Methods** After the astrocytes of spinal cord had been cultured *in vitro* and stimulated by 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6} mol/L SP for 12 h, or 10^{-7} mol/L SP for 0, 24, 48, 72 h, the GFAP expression was investigated by RT-PCR and Western blotting, TNF-α and IL-1β by ELISA. The astrocytes cultured in serum-free medium only containing ITS served as control. **Results** SP (10^{-7}mol/L) promoted the expression of GFAP mRNA and protein in experimental astrocyes of spinal cord gradually on the time range of 0 – 72 h with marked difference with control ($P<0.01$). SP caused a concentration-dependent (10^{-9} – 10^{-6} mol/L, 12 h) increase of TNF-α, IL-1β excretion with marked difference between the experimental and control ($P<0.01$), except for 10^{-6} mol/L SP, which caused no obvious difference of IL-1β excretion. **Conclusion** Stimulated by SP, the astrocytes of spinal cord could be activated and excreted more proinflammatory cytokines such as TNF-α and IL-1β, which indicated that the chronic surrounding pain might result in the inflammation and pain of spinal cord with the transduction of transmitter SP.

Key words: astrocyte; chronic pain; SP; IL-1β; TNF-α

星形胶质细胞在中枢神经系统中具有十分重要的作用,广泛参与结构和功能维持,免疫反应以及神经疾病的发病等病理生理过程。近来发现脊髓星形胶质细胞通过激活分泌炎性致痛因子参与病理性疼痛在脊髓调制过程,可加强疼痛信号在脊髓以上水平的传导[1]。P物质(P substance, SP)是一种重要的参与痛觉调制的神经递质,已有研究表明多种慢性疼痛,如周围的慢性神经痛和内脏痛中的前列腺痛等,均伴有脊髓中枢SP表达升高,但SP作用于脊髓星形胶质细胞是否会引起星形胶质细胞的活化和炎性致痛因子的分泌,从而参与中枢痛觉调制,尚少见相关报道。本实验通过SP作用于体外培养和纯化的脊髓星形胶质细胞,

作者简介:张 恒(1976-),男,贵州省瓮安县人,博士研究生,医师,主要从事慢性前列腺炎方面的研究。电话:(023)68753416,E-mail: Montest44@hotmail.com
通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186
收稿日期:2005-10-21;修回日期:2005-12-19

采用 RT-PCR、Western blot 和 ELISA 分别检测星形胶质细胞特异性标志物 GFAP 表达和炎性因子 IL-1β，TNF-α 分泌的变化，以了解 SP 是否通过脊髓星形胶质细胞的活化参与疼痛在脊髓初级中枢的调制和神经炎性痛反应。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DME/F-12 培养基和小牛血清购自 Hyclone 公司，RNA 提取试剂 Tripure Isolation Regent 购自德国宝灵曼公司，引物合成及 RT-PCR 试剂盒购自上海生工生物工程公司，抗 GFAP 抗体购自武汉博士德公司，二抗购自 Santa Cruzs 公司，化学发光剂购自 Signaling 公司，ELISA 试剂盒购自 Diaclone 公司，其他试剂均为分析纯，所用溶液均以超纯水配置。

1.2 大鼠脊髓星形胶质细胞的培养

取 2～3 d 的 SPF 大鼠（乳鼠），消毒固定后，剖开椎管取出脊髓组织，清洗、剥离脊膜后扯碎，0.125% 的胰蛋白酶反复消化，离心收集细胞，在含有 10% 小牛血清的 DMEM/F-12 培养基中于 37 ℃、5% CO_2 中培养，3 d 换液 1 次，取 7～9 d 的细胞，换液后置 37 ℃恒温摇床振摇过夜（200 r/ min，约 12 h），去上清（主要含少突胶质细胞和小胶质细胞），轻洗 1 遍，所得细胞即是贴壁较牢的星形胶质细胞，经胰酶消化重悬后，按实验所需细胞密度接种至培养瓶或 6 孔板。取生长第 3 代的细胞用于实验。

1.3 实验分组

将第 3 代的星形胶质细胞按 1×10^6/ml，1 ml 完全随机平行接种至 6 孔板，按如下分组进行实验：对照组：仅加含 ITS 的无血清培养液；实验组：分别设 4 个浓度组，SP 组浓度为 10^{-9}～10^{-6} mol/L，作用时间均为 12 h，用于 IL-1β，TNF-α 的 ELISA 检测。对照组：仅加含 ITS 的无血清培养液；实验组：分别设 0、24、48、72 h 4 个时相，SP 浓度为 10^{-7} mol/L，用于 GFAP 的 RT-PCR 和 Western blot 检测。

1.4 RT-PCR 检测 GFAP mRNA 的表达

用 Tripure 提取 RNA，然后进行 cDNA 逆转录，PCR 扩增，产物用 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳，用 Quantity One 4.4 软件对电泳图像进行分析，用目的片段的积分光密度（IOD）与外参照 β-actin 比值来反映 mRNA 表达量的相对高低。

引物序列及循环条件为：GFAP 正义链：5′-TACTACATCGCCCTCCACATCC-3′；反义链：5′-CAAGTGCTGAGAATCAAGCTCC-3′（495 bp）。循环条件：94 ℃ 30 s→60 ℃ 1 min→68 ℃ 2 min→68 ℃ 10 min，35 循环。β-actin 正义链：5′-ATGAGGATCCTCACCGAGCGAGCGCGGCTACAGC-3′；反义链：5′-ACACCACTGTGTTGGCGTACAGGTCTTTGC-3′（321 bp）。循环条件：94 ℃ 30 s→60 ℃ 20 s→72 ℃ 30 s→72 ℃ 5 min，30 循环。

1.5 Western blot 检测 GFAP 的表达

培养星形胶质细胞到达实验时间后，用冷的 Tris 缓冲盐溶液洗涤，冰上每孔加入 500 μl 的细胞裂解液 1 × RIPA buffer（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，150 mmol/L NaCl，10 ml/L Triton X-100，1 g/L SDS，10 g/L 脱氧胆酸，5 mmol/L EDTA，使用前加入 5 g/L Aprotinin，2.0 mmol/L PMSF），冰上孵育 10 min，刮取细胞并转移至 1.5 ml 的离心管，超声粉碎（500 W、5 s×5 次），10 000 r/min 离心 5 min，取上清保存，用 Folin-酚法测定总蛋白浓度，制备 12% 的分离胶和 4% 浓缩胶，每孔上样（20 μg）进行 SDS-PAGE 电泳，浓缩胶 80 V，分离胶 120 V，取适当大小的凝胶和 PVDF 膜在 50 V 电压下转膜，丽春红观察转膜效果，PVDF 膜置于 5% 去脂奶粉中封闭，依次加入一抗（1∶500），二抗（1∶1 000）杂交，室温下振荡封闭，化学发光显色，用 Quantity One 4.4 软件分析图像，采用积分光密度值相对比较蛋白的表达。

1.6 ELISA 法检测 IL-1β、TNF-α 的分泌

到达实验时间后收集每孔培养上清液，－80 ℃保存。按试剂盒的说明进行 ELISA 法检测，基本操作步骤如下：彻底混匀将要使用的试剂，设立好空白和阳性对照，在样品孔中依次加入 100 μl 标准品和样品，每孔加入 50 μl 稀释好的生物素标记的检测因子的抗体，封闭，向每孔加入 100 μl 稀释好的链霉亲和素标记的 HRP，再封闭，孵育，洗板，加入底物溶液，在不透光的铝盒中孵育，每孔加入 100 μl 硫酸终止反应，在酶标仪上以 492 nm 为主波长，读取吸光度值，绘制标准曲线并读取每孔待测因子的浓度。含量用 ng/ml 来表示。

1.7 统计学分析

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计分析软件对数据进行随机区组间方差分析。

2 结果

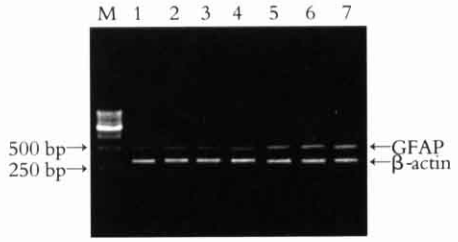
2.1 SP 对星形胶质细胞 GFAP mRNA 表达的影响

从各组细胞中提取的总 RNA，经过逆转录，PCR 扩增，所得产物和外参照在 1.8% 的琼脂糖凝胶中电泳，在 495 bp 和 321 bp 处可见两条扩增带，分别为 GFAP 和 β-actin。结果显示，在 SP（10^{-7} mol/L）的作用下，星形胶质细胞内 GFAP 的表达在 0～72 h 逐渐升高，与正常对照组相比差异显著（$P<0.01$）（表 1，图 1）。

表 1 SP（10^{-7} mol/L）作用不同时间星形胶质细胞 GFAP mRNA 的表达（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
SP 组	0.331 ± 0.041	0.611 ± 0.064[ab]	0.736 ± 0.069[ab]	0.856 ± 0.056[ab]
对照组	0.331 ± 0.041	0.382 ± 0.037	0.409 ± 0.062	0.471 ± 0.074

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 0 h 组比较



M：标准；1：0 h 组；2－4：对照组 24、48、72 h；5－7：实验组 24、48、72 h

图 1 GFAP mRNA 的 RT-PCR 结果

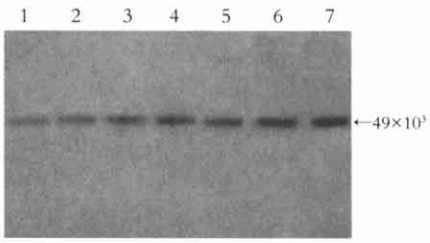
2.2　SP 作用下星形胶质细胞 GFAP 的表达

Western blot 结果显示 SP 促进星形胶质细胞的 GFAP 表达在 0～72 h 逐渐升高，与正常对照组有显著性差异（$P<0.01$）（表 2，图 2）。

表 2　SP（10^{-7}mol/L）作用下不同时间脊髓星形胶质细胞 GFAP 的表达（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
SP 组	11.77 ± 1.73	15.00 ± 1.59[ab]	17.87 ± 1.33[ab]	18.76 ± 1.09[ab]
对照组	11.77 ± 1.73	12.90 ± 1.63	14.12 ± 1.71	14.96 ± 1.63

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 0 h 组比较



1：0 h 组；2－4：24 h、48 h、72 h 对照组；5－7：24 h、48 h、72 h 实验组

图 2　GFAP 的 Western blot 结果

2.3　SP 对星形胶质细胞分泌 IL-1β 和 TNF-α 的影响

SP 在 10^{-9}～10^{-6}mol/L 浓度范围内呈浓度依赖性促进星形胶质细胞分泌 IL-1β 和 TNF-α（12 h），各组与对照相比差异显著（$P<0.01$，$P<0.05$），但 IL-1β 的分泌在 10^{-6}mol/L 组反而下降，与正常对照没有显著差异（$P>0.05$）（表 3）。

表 3　不同浓度 SP 作用 12 h 星形胶质细胞分泌 IL-1β 和 TNF-α 的变化（$n=3$，ng/ml，$\bar{x}\pm s$）

组别		IL-1β	TNF-α
对照组		0.122 ± 0.017	0.231 ± 0.018
SP	10^{-9} mol/L	0.147 ± 0.013[b]	0.338 ± 0.016[a]
	10^{-8} mol/L	0.185 ± 0.015[a]	0.457 ± 0.034[a]
	10^{-7} mol/L	0.209 ± 0.014[a]	0.505 ± 0.040[a]
	10^{-6} mol/L	0.130 ± 0.015	0.557 ± 0.019[a]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

神经星形胶质细胞在中枢神经系统具有极其重要的作用，如神经系统功能的维持、信息传递，神经免疫及神经组织的发育与再生修复等，特别是近年来发现它参与痛觉在中枢的调制，和慢性疼痛的产生和持续有明显关系[2]，其功能受许多神经体液因子的调节，目前引起广泛重视的有 P 物质、谷氨酸和各种炎性因子，如 IL-10、IFN-γ、IL-2 和 NGF 等[3]，周围慢性疼痛可能通过这些递质和因子的作用影响脊髓星形胶质细胞的功能，从而参与慢性疼痛在脊髓初级中枢的传导和调制。

SP 是广泛分布于中枢和周围神经系统以及组织器官的神经活性十一肽，对其分子结构和合成都已了解，其结构为 Arg^{1}-Pro^{2}-Lys^{3}-Pro^{4}-Gln^{5}-Gln^{6}-Phe^{7}-Phe^{8}-Gly^{9}-Leu^{10}-Met^{11}-NH。其受体主要为 G 调节蛋白耦联受体 NK-1、-2 和/或-3，SP 具有多种物学效应，如致痛、降压、血管扩张和毛细血管通透性增加等，而且还可以通过作用于免疫细胞引起神经源性炎症反应[4]。研究表明，在多种慢性疼痛中，SP 作为疼痛递质通过感觉神经传入纤维向上传递至脊髓中枢，参与疼痛在脊髓中枢的传导和调制[5]，SP 除作用于神经细胞外，是否也能通过激活星形胶质细胞和小胶质细胞等中枢的免疫细胞启动神经源性炎症反应，尚不十分清楚，在该实验中，可以观察到一定浓度的 SP（10^{-7}mol/L）刺激脊髓星形胶质细胞，可以引起星形胶质细胞特异性标志物 GFAP 的表达在 0～72 h 逐渐升高，表明 SP 可以促进星形胶质细胞明显活化。

Kim 等[6]发现 LPS 和 SP 可以刺激培养小鼠大脑星形胶质细胞炎性因子 TNF-α 和 IL-1β 的分泌，本实验进一步证实 SP 可在 10^{-9}～10^{-6}mol/L 范围内呈浓度依赖性促进脊髓星形胶质细胞分泌炎性致痛因子 TNF-α、IL-1β。过高浓度的 TNF-α 能明显损伤人皮层神经元，高表达 TNF-α 的转基因小鼠可发生严重的炎症、脑病和神经退行性病变[7]，因此高浓度的 TNF-α 在中枢被视为一种神经毒性多肽。星形胶质细胞在 LPS 等的刺激下可分泌 TNF-α，也存在 TNF-α 的受体，TNF-α 主要通过与细胞上受体 p55 结合后，激活磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C，释放出甘油二酯（DAG）而发挥多种生物学作用，如促进 NF-κB 的激活，诱导细胞产生氧自由基等。IL-1 是具有广泛生物学活性的多肽，主要分为 IL-1α 和 IL-1β，其中 IL-1β 由 153 个氨基酸残基组成，分子量为 17.5×10^{3}。多种细胞均可分泌 IL-1β，如单核细胞、巨噬细胞，成纤维细胞、内皮细胞、胶质细胞、上皮细胞等。IL-1β 参与免疫和炎症反应、具有致热和致痛的作用。可促进 T 细胞和 B 细胞活化，增强自然杀伤细胞的杀伤活性，IL-1β 可诱导多种炎性致痛物质如 TNF-α、IL-6，前列腺素和 NO 表达等[8]。中枢神经系统中的 IL-1β 等炎性因子主要由胶质细胞产生[9]，星形胶质细胞分泌 IL-1β，而且 IL-1β 可作用于星形胶质细胞分泌其他炎性因子，如 IL-6 和 TNF-α[10]。IL-1β 参与中枢的免疫反应且对中枢有营养作用，同时高浓度的 IL-1β 也可在中枢引起致炎

和致痛反应。

因此，脊髓星形胶质细胞在神经递质 SP 的作用下，明显活化并分泌炎性因子 TNF-α，IL-1β，表明周围慢性疼痛中可能存在脊髓星形胶质细胞在 SP 的介导下活化，致使局部形成一个炎性环境，导致神经炎性痛反应，从而参与痛觉在脊髓中枢的调制。

参考文献：

[1] WATKINS L R, MILLIGAN E D, MAIER S F. Glial activation: a driving force for pathological pain[J]. Trends Neurosci, 2001, 24(8): 450-455.

[2] WIESELER-FRANK J, MAIER S F, WATKINS L R. Glial activation and pathological pain[J]. Neurochem Int, 2004, 45(2-3): 389-395.

[3] CACCAMO D, CAMPISI A, MARINI H, *et al*. Glutamate promotes NF-kappaB pathway in primary astrocytes: protective effects of IRFI 016, a synthetic vitamin E analogue[J]. Exp Neurol, 2005, 193(2): 377-383.

[4] TEIXEIRA R M, DUARTE F S, DE-LIMA T C. Behavioral and immunological effects of substance P in female and male mice[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2004, 79(1): 1-9.

[5] JANG J H, NAM T S, PAIK K S, *et al*. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat[J]. Neurosci Lett, 2004, 360(3): 129-132.

[6] KIM H M, LEE E H, NA H J, *et al*. Effect of Polygala tenuifolia root extract on the tumor necrosis factor-alpha secretion from mouse astrocytes[J]. J Ethnopharmacol, 1998, 61(3): 201-208.

[7] STALDER A K, CARSON M J. PAGENSTECHER A, *et al*. Late-onset chronic inflammatory encephalopathy in immune-competent and severe combined immune-deficient (SCID) mice with astrocyte-targeted expression of tumor necrosis factor[J]. Am J Pathol, 1998, 153(3): 767-783.

[8] CHOWDHURY T T, BADER D L, LEE D A. Dynamic compression counteracts IL-1 beta-induced release of nitric oxide and PGE2 by superficial zone chondrocytes cultured in agarose constructs[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(9): 688-696.

[9] LEDEBOER A, SLOANE E M, MILLIGAN E D, *et al*. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation[J]. Pain, 2005, 115(1-2): 71-83.

[10] 李兰英，孙 云，庞智玲. 几种激素和 IL-1β 对人脑星形胶质细胞 IL-6、TNF-α 分泌的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志，2001，8(2)：112-115.

（编辑 薛国文）

（上接 680 页）

骨骨髓虽增生活跃，但粒红比增大，红系相对少。后行第 2 次髂骨骨髓活检仍提示：骨髓增生减低，故诊断考虑：①意义未明的单克隆免疫球蛋白血症；②获得性纯红再障。入院后曾给予安雄、复方皂矾丸、促红细胞生长素等治疗 3 个月无效，需间断输注红细胞。诊断明确后加环孢霉素 A(CsA)胶囊，起始剂量 3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，根据全血环孢霉素浓度及肝肾功情况逐渐增大剂量，最大剂量为 250 mg/d。1 个月后，在 2 周内未输红细胞情况下，血红蛋白稳定在 53 g/L 左右，网织红计数上升至 0.7%，血红蛋白上升至 69 g/L 时患者出院，院外跟踪随访，用 CsA 2 个月时，查血红蛋白 110 g/L，IgG 11.8 g/L，目前仍在随访中。

讨论

伴单克隆免疫球蛋白(IgG)血症的 PRCA 的发病机制目前仍不明确[1,2]，根据 McGuire 等[3]的研究发现，近一半 PRCA 患者其红细胞发育停滞的主要原因是血浆存在红细胞生成抑制因子，此因子定位于 IgG 片段，这种 IgG 抑制因子在补体参与下仅损害红系祖细胞，对其他细胞系无损害。当血浆 IgG 增多，体内免疫功能紊乱，IgG 抑制因子通过抑制 CFU-E 及 BFU-E，从而抑制红细胞生成，而 IgG 自身也有可能破坏红系祖细胞，促进 PRCA 的发展。近年来通过基础和临床药物研究表明 T 细胞介导的细胞免疫异常也是 PRCA 的主要发病机制之一。关于治疗目前尚无标准的统一方案。本例患者口服 CsA 显著有效，与文献[4]记载一致，CsA 是一种特异性的免疫抑制剂，它可以阻断 T 细胞的增殖，还可使血清中的红系 IgG 抑制因子减少，具有体液和细胞免疫的双重抑制效应，这也从侧面说明此病的发病的确与免疫功能紊乱有关。

从本例患者诊断过程中，我们总结经验，贫血原因待查患者，应常规查免疫球蛋白、T 亚群及 T 细胞功能，以检查患者是否有免疫异常；对于老年患者，出现骨髓增生不良，怀疑纯红再障或再障时，尽早做胸骨穿刺，以排除干扰。

关键词：纯红再障；单克隆免疫球蛋白血症

中图法分类号：R556.5 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] TSURUMI S, NAKAMURA Y, TADOKORO J, *et al*. Small lymphocytic lymphoma during the course of pure red cell aplasia[J]. Rinsho Ketsueki, 2002, 43(11): 1020-1022.

[2] ALTER R, JOSHI S S, VERDIRAME J D, *et al*. Pure red cell aplasia associated with B cell lymphoma: demonstration of bone marrow colony inhibition by serum immunoglobulin[J]. Leuk Res, 1990, 14(3): 279-286.

[3] McGUIRE W A, YANG H H, BRUNO E, *et al*. Treatment of antibody-mediated pure red cell aplasia with high-dose intravenous gamma globulin[J]. N Engl J Med, 1987, 317(16): 1004-1008.

[4] DJALDETTI M, BLAY A, BERGMAN M, *et al*. Pure red cell aplasia—a rare disease with multiple causes[J]. Biomed Pharmacother, 2003, 57(8): 326-332.

（编辑 栾 嘉）