文章编号:1000-5404(2006)10-1029-03

论著

原代培养的小鼠星形胶质细胞 CD46、CD55、CD59 的表达及炎症刺激因子对其的影响

陈雪丹[1],白 云[1],熊加祥[2],宋 敏[1] (第三军医大学基础医学部:[1]医学遗传学教研室,[2]生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 通过体外培养小鼠大脑皮层星形胶质细胞,明确补体调节蛋白 CD46、CD55、CD59 在原代小鼠大脑皮层星形胶质细胞上的表达情况,及炎症因子对 CD46、CD55、CD59 表达的影响,为研究补体系统在 AD 中的作用打下基础。**方法** 原代纯化培养小鼠星形胶质细胞,用 RT-PCR,免疫荧光的方法,分别在 mRNA 水平、蛋白质水平,检测炎症因子刺激前以及 LPS、IFN-γ 单独或协同刺激后,CD46、CD55、CD59 的表达情况。**结果** RT-PCR 检测到 CD59 mRNA 的表达,CD46、CD55 的表达不明确,未刺激组和刺激组无明显差别;免疫荧光结果示 CD59 阳性,CD46、CD55 弱阳性。**结论** 保护素 CD59 在原代小鼠星形胶质细胞上显著表达,可能可以保护星形胶质细胞免受补体的溶破效应的杀伤。

关键词:CD46、CD55、CD59;原代小鼠星形胶质细胞
中图法分类号:R322.81;R329-33;R329.11 **文献标识码**:A

Expression of CD46, CD55, and CD59 on primary murine astrocytes and effect of inflammation factors on it

CHEN Xue-dan[1], BAI Yun[1], XIONG Jia-xiang[2], SONG Min[1] ([1]Department of Molecular Genetics, [2]Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the expression of complement regulatory protein CD46, CD55, and CD59 on primary murine pallium astrocytes and the effect of inflammatory factors on it in order to lay the foundation for studying the complement system in AD. Methods The primary murine astrocytes were cultured and purified. The expression of CD46, CD55, and CD59 on the levels of mRNA and protein was assayed by immunofluorescence before and after the stimulation of LPS and IFN-γ. Results The expression of CD59 mRNA was confirmed, but the expression of CD46 and CD55 was indefinite. There was no significant difference between stimulation and non-stimulation groups. Immunofluorescence results indicated that CD59 was positive, while CD46 and CD55 were weakly positive. Conclusion Protectin CD59 expresses copiously on primary murine astrocytes, which presumably protects astrocytes from the lysis of complement.

Key words: CD46; CD55; CD59; primary murine astrocytes

补体系统在机体的免疫系统中担负抗感染和免疫调节作用,并参与免疫病理反应。补体的激活是一种高度有序的级联反应,从而发挥广泛的生物学效应。体内的补体调节因子可与不同的补体成分相互作用,使补体激活与抑制处于精细的平衡状态。膜辅蛋白(membrane cofactor protein, CD46)作为清除 C3、C5 转化酶的 I 因子的辅助因子发挥作用。促衰变因子(decay accelerating factor, CD55)直接结合 C3b、C4b,促进 C3 和 C5 转化酶的自身衰变。保护素(protectin, CD59)通过结合 C8,调节 C5b-9 复合物的形成和功能,还可以与 C9 结合并限制其多聚性,从而阻止 C9 的装配及其插入膜内,防止攻膜复合物 MAC 对同种或自身细胞的溶解破坏。

星形胶质细胞是 CNS 主要的胶质细胞,有许多与 CNS 稳态相关的重要物理特性。已有文献报道 AD 患者脑中有大量补体活化,星形胶质细胞增生,神经元丢失却比较严重。另有文献报道,脑部聚集的 Aβ 可以激活补体旁路途径[1],那么 CD46、CD55 和 CD59 这 3 种重要的补体调控蛋白在补体活化过程中是否发挥作用?补体对脑内细胞的溶破杀伤作用是否受到它们的调节?为此我们需要先明确这 3 种补体调节蛋白在脑内是否存在,炎症因子是否对其有何影响?为此我们原代培养了小鼠星形胶质细胞,以 LPS、IFN-γ 单独以

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:陈雪丹(1980-),女,湖北省松滋市人,硕士研究生,主要从事神经免疫方面的研究。电话:(023)68753670
通讯作者:白 云,电话:(023)68752258,E-mail: geneby@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-11-29;**修回日期**:2006-03-24

及协同刺激，用 RT-PCR 和免疫荧光的方法检测 3 种补体调节蛋白的表达，以明确 3 种重要补体调节蛋白在脑部的表达及炎症因子对其刺激情况，为进一步研究补体系统在脑部炎症病变中的作用提供线索。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

新生昆明小鼠 4 只（出生 2 d 内）为本室饲养。兔抗小鼠 CD46、CD55、CD59 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。FITC-羊抗兔 IgG 购自北京中山公司，RT-PCR 试剂盒购自天为时代公司。LPS *E. coli* O111B5 购自 Sigma 公司。IFN-γ 购自 BD 公司。RNA 提取 Tripure 购自天为时代。血清购自 Hyclone 公司，使用前经 56 ℃热灭活。

1.2 小鼠原代星形胶质细胞分离培养

75% 乙醇浸泡消毒皮肤，处死小鼠，无菌条件下弯头镊取出大脑皮质，预冷的 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次，解剖显微镜下剔除脑膜和血管等结缔组织，放入 0.25% 胰酶、0.04% EDTA 混合液中，吸管吹打消化细胞 2～3 min，肉眼未见细胞团块时用含 10 % 胎牛血清的 IMDM 培养液终止消化，1 000 r/min，离心8 min，弃掉上清，加入新鲜培养液，置于一次性培养瓶内（25 cm^2），视细胞贴壁情况第 2 天、第 3 天换液，培养至 7～10 d 时，可见星形胶质细胞铺满瓶底，上层可见小胶质细胞及混杂较少的少突胶质细胞，37 ℃摇床 180 r/min，振荡 18 h，弃去上清，将瓶底细胞传代培养，传至 4～5 代时，免疫荧光鉴定星形胶质细胞纯度，进行下一步功能实验。

1.3 RT-PCR 检测 mRNA 水平

实验分为未刺激组、LPS 刺激组、IFN-γ 刺激组、LPS + IFN-γ 刺激组（LPS、IFN-γ 均为 100 IU/ml，刺激 24 h 后收集细胞），Tripure 提取 mRNA，逆转录成 cDNA 后，分别用 3 对引物扩增，CD46：上游 5′-CTGTCGCAGAAGGAAGAG-3′，下游 5′-ATAAACTGGAGGCTTGGT-3′，扩增片段 889 bp；CD55：上游 5′-CTCTGTTGCTGCTGTCCC-3′，下游 5′-CGAATAATATGCCGGTTG-3′，扩增片段 477 bp；CD59：上游 5′-CATCTTACTCCTGCTGCTTC-3′，下游 5′-ATTGGTCCATAATGATCTCAC-3′，扩增片段 211 bp。CD59 的扩增为 94 ℃预热 10 min，94 ℃变性 1 min，53 ℃退火 40 s，每个循环降 0.5 ℃，72 ℃延伸 1 min，10 个循环后以 48 ℃的退火温度进行 20 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min，CD55 和 CD46 的循环步骤同 CD59 一样，只是将退火温度改为从 55 ℃降到 50 ℃。

1.4 免疫荧光检测 CD46、CD55、CD59 的表达

将传至 4 代的星形胶质细胞种在多聚赖氨酸包被的盖玻片上，待细胞爬满玻片 90% 时取出，PBS 漂洗 3 次，4% 多聚甲醛固定 30 min，漂洗 3 次，山羊封闭血清 37 ℃封闭 30 min，漂洗 3 次，分别加入兔抗小鼠 CD46、CD55、CD59 的一抗（1∶200），4 ℃过夜，漂洗 3 次，加入 FITC 标记抗兔的二抗（1∶100），37 ℃孵育 2～4 h，漂洗 3 次，荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 免疫荧光鉴定星形胶质细胞

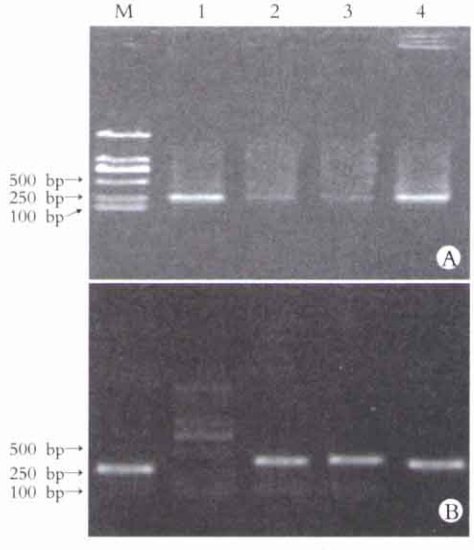
免疫荧光鉴定星形胶质细胞胶质酸性原纤维（glial fibrillary acidic protein，GFAP）细胞纯度超过 95%，符合实验要求。

2.2 RT 结果示目的片段扩增条带

CD59 扩增条带清晰，大小正确，刺激组和未刺激组无明显差异，CD46、CD55 未见明显扩增条带，见图 1。

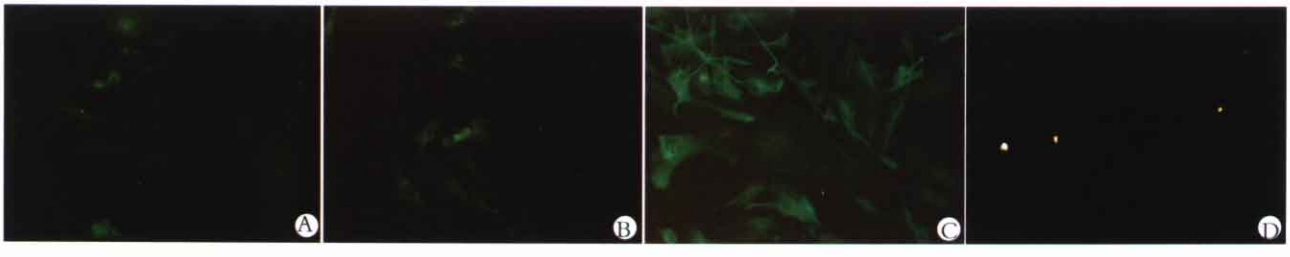
2.3 免疫荧光检测 CD46、CD55、CD59 的表达

免疫荧光结果示 CD46、CD55 与阴性对照组比未见明显表达，CD59 荧光强度明显高于对照组，说明其蛋白表达明确，阴性对照组未见阳性表达，见图 2 。



M：DL2000；1：未刺激；2：LPS + IFN-γ 刺激；3：LPS 刺激；4：IFN-γ 刺激；A：CD59. M：DL2000；1：IFN-γ 刺激；2：LPS 刺激；3：LPS + IFN-γ；4：未刺激；B：β-actin.

图 1 CD59、β-actin、CD46、CD55 PCR 扩增结果



A：CD46；B：CD55；C：CD59；D：未加一抗阴性对照组

图 2 免疫荧光检测 CD46、CD55、CD59 结果及未加一抗阴性对照 （×200）

3 讨论

补体在机体抵御外来入侵病菌中发挥积极防御作用,是天然免疫的重要成分,可以识别和清除通过受损血脑屏障入侵 CNS 的感染性物质,同时不断有证据显示,CNS 内不受控制的补体生物合成及激活在几种神经退行性疾病中加重了神经元的丢失[2],而补体调节蛋白使其对自身细胞免遭补体攻击,其中比较重要的有 CD46、CD55、CD59。其中 CD46 辅助 I 因子降解 C3b 和 C4b,将其裂解为 C3bi 或 C4c 和 C4d,从而使 C3b/4b 形成 C3 转化酶的能力消失。CD55 通过其 SCR 与 C3b/4b 结合,加速经典和替代途径 C3/C5 转化酶的衰变。CD59 经由与补体 C8、C9 的结合阻止补体膜攻击复合物的形成。

脑内补体的活化以及调控分子和补体受体在中枢神经系统内的表达对脑的内环境稳定和免疫防御具有重要作用,但同时也成为脑内炎症和变性疾病的重要致病因子。目前认为,补体系统的活化伴随着 AD 的整个病理过程, 补体系统介导的损害是 Aβ 细胞毒性作用机制中的重要环节之一[3]。

1987 年,LeviStrauss 等[4]首先证明 ,原代培养的小鼠星形胶质细胞及细胞系能够产生补体成分 C3 和 B 因子。Gasque 等[2]证实原代培养的人胚胎星形胶质细胞和星形胶质细胞来源的肿瘤细胞 T98G、CB193 能够合成并分泌经典激活途径的 C1q、C1r、C1s、C4、C2、C3,旁路激活途径的 C3、BF、DF、P 和终末溶解成分 C5、C6、C7、C8、C9,用聚集的 Aβ42 肽培养大鼠皮层星形胶质细胞,可以诱导反应性形态学改变,神经胶质 RNA 和蛋白的选择性上调,炎症细胞因子的增多。Aβ 也可刺激诱生形一氧化氮合酶 mRNA 水平上升和 NO 释放[5]。星形胶质细胞可以分泌补体,而 Aβ 肽可以与 C1q 胶原样结构域内的位点特异结合[6],启动 AD 脑内经典补体途径的激活。为明确这 3 种补体调节蛋白在小鼠脑内是否存在,炎症因子是否对其有何影响,本研究用 LPS、IFN-γ 单独以及协同刺激,从 RT 和组化的水平看这 3 种补体调节蛋白均与未刺激组无明显区别,与文献[7]报道相似,说明这两种细胞因子刺激后,补体调节蛋白表达没有相应增加,此种情况下细胞是否易受补体攻击需进一步实验验证。

AD 患者脑内经典补体通路的蛋白 C1r、C1s、C5、C6、C7、C8、C9 和正常人相比有 2.35 ~ 16.3 倍的上调表达,而补体调节蛋白 C1 抑制因子和 CD59 的上调表达要明显低于它,只有 1.12 到 1.17 倍[8],而老年斑周围却有大量活化的星形胶质细胞,这是否意味着补体调节蛋白的表达在 AD 患者脑内星形胶质细胞上的增加是高于补体蛋白的增高水平的? 而神经元易受攻击与其上补体调节蛋白的表达是否也有关系? AD 患者大脑神经元丢失比较严重,Swedish double mutation KM670/671NL 转基因小鼠与 AD 患者相比,两者 Aβ 组化染色呈强阳性,均有大量激活的星形胶质细胞,不同之处在于此转基因小鼠大脑中无神经纤维缠结,小胶质细胞激活亦很少,补体蛋白的免疫组化染色很弱,在 AD 患者大脑中所检测的结果均较强[9]。也提供一些思考,补体调节蛋白在其中有否发挥其保护作用? 本实验从 mRNA 和蛋白水平检测了原代培养的小鼠星形胶质细胞,明确了 CD59 在其上的表达,而 CD46、CD55 未见表达,LPS、IFN-γ 刺激前后未见显著差异,提示这两种炎性细胞因子不能引起星形胶质细胞表达膜性补体调节蛋白的上调。我们的结果为进一步研究补体系统在 AD 等脑部炎症病变中的作用提供了线索,也为对这 3 种重要补体调节蛋白分子在 AD 中的理解提供了线索,同时还需进一步功能实验。

参考文献:

[1] BRADT B M, KOLB W P, COOPER N R. Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide[J]. J Exp Med, 1998, 188(3): 431 - 438.

[2] GASQUE P, DEAN Y D, MCGREAL E P, *et al*. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS[J]. Immunopharmacology, 2000, 49(1-2) : 171 - 186.

[3] YASOJIMA K, SCHWAB C, MCGEER E G, *et al*. Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain [J]. Am J Pathol, 1999, 154(3): 927 - 936.

[4] LEVI-STRAUSS M, MALLAT M. Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation[J]. J Immunol, 1987, 139(7): 2361 - 2366.

[5] HU J, AKAMA K T, KRAFFT G A, *et al*. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release [J]. Brain Res , 1998, 785(2): 195 - 206.

[6] JIANG H, BURDICK D, GLABE C G, *et al*. Beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain[J]. J Immunol , 1994, 152(10): 5050 - 5059.

[7] ROGERS C A, GASQUE P, PIDDLESDEN S J, *et al*. Expression and function of membrane regulators of complement on rat astrocytes in culture [J]. Immunology, 1996, 88(1): 153 - 161.

[8] YASOJIMA K, MCGEER E G, MCGEER P L. Complement regulators C1 inhibitor and CD59 do not significantly inhibit complement activation in Alzheimer disease[J]. Brain Res, 1999, 833(2): 297 - 301.

[9] SCHWAB C, HOSOKAWA M, MCGEER P L. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease [J]. Exp Neurol, 2004, 188(1): 52 - 64.

(编辑　张大春)