文章编号:1000-5404(2008)22-2065-04

论著

炎性介质脂多糖、γ干扰素活化星形胶质细胞效应

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]医学遗传学教研室,[2]生理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究炎性介质脂多糖(LPS)、γ干扰素(IFN-γ)刺激离体星形胶质细胞的效应。**方法** LPS、IFN-γ刺激离体培养纯化的小鼠星形胶质细胞,ELISA检测细胞分泌TNF-α,Griess法测定NO浓度,激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)检测细胞内游离钙浓度([Ca^{2+}]i)。**结果** LPS(500 ng/ml)、IFN-γ(100 U/ml)刺激星形胶质细胞24 h后,NO和TNF-α的分泌显著升高,联合应用有协同作用;延长IFN-γ作用时间,分泌量升高。CLSM检测LPS、IFN-γ刺激24 h后的星形胶质细胞[Ca^{2+}]i的荧光值,显示荧光相对值比正常细胞明显升高;LPS、IFN-γ急性刺激正常培养细胞发现[Ca^{2+}]i振荡上升;而作用于IFN-γ刺激24 h后的细胞,[Ca^{2+}]i上升明显减缓。**结论** LPS、IFN-γ可以活化星形胶质细胞,表现为[Ca^{2+}]i升高,TNF-α和NO分泌上调。

关键词: 脂多糖;γ干扰素;星形胶质细胞;活化
中图法分类号: R329.25;R338.1;R392.11 **文献标识码:** A

Activation of cultured mouse astrocytes by LPS and IFN-γ

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, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of inflammatory chemokine LPS and/or IFN-γ on astrocytes. **Methods** After LPS and IFN-γ applied to the purified cultured mouse astrocytes, TNF-α and nitric oxide (NO) secreted from astrocytes and intracellular calcium concentration ([Ca^{2+}]i) were detected by ELISA, Griess and confocal laser scanning microscopy, respectively. **Results** Treatment with LPS (500 ng/ml) or IFN-γ (100 U/ml) for 24 h significantly increased the concentration of TNF-α and NO. Coadministration of LPS and IFN-γ showed a synergistic effect on the astrocytes. By using Ca^{2+} imaging, we found that [Ca^{2+}]i signal was significantly increased after LPS and/or IFN-γ treatment for 24 h. Also, acute treatment with LPS or IFN-γ could evoke Ca^{2+} oscillations. In contrast, after application of these stimuli over 24 h, the Ca^{2+} signal was increased more slowly. **Conclusion** Application of LPS and/or IFN-γ evoked TNF-α and NO secretion and [Ca^{2+}]i elevation in cultured astrocytes, suggesting that astrocytes could be activated by LPS and IFN-γ.

Key words: LPS; IFN-γ; astrocytes; activation

在神经炎性疾病或脑内感染时,常常伴随星形胶质细胞的炎性反应。星形胶质细胞参与脑内炎性病变的发生、发展,其具体作用是免疫抑制还是免疫活化,目前尚无定论,但可以肯定的是其在脑内受炎性刺激后将发生反应性变化,并参与脑内的免疫调控作用。星形胶质细胞受炎性刺激的反应性变化,通常称为细胞活化,表现生物学功能的改变。本实验利用LPS、IFN-γ刺激离体培养纯化的星形胶质细胞,观察细胞内钙离子的变化、细胞因子TNF-α以及NO分泌,探讨炎性刺激对星形胶质细胞的活化作用,旨在深入研究神经炎性疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

培养基DMEM(高糖)购自美国Gibco公司;胎牛血清(FCS)购自HyClone公司;吗啡购自沈阳第一制药厂;Fluo-4/AM、Pluronic F-127购自MolecularProbes公司;LPS(*E. coli* O_{111}:

基金项目: 国家自然科学基金海外青年学者合作研究基金(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,男,四川省峨眉山市人,博士,讲师,主要从事神经免疫方面的研究。电话:(023) 68752253-266
通信作者: 白 云,E-mail:geneby@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2008-01-17;**修回日期:** 2008-04-07

B_4)、胰蛋白酶、Hepes 均购自 Sigma 公司;LPS、IFN-γ 购自美国 BD Pharmigen 公司;小鼠 TNF-α ELISA 试剂盒购自美国 BD Pharmigen 公司;NO 检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 主要仪器

超净工作台(苏州净化设备公司),恒温空气摇床(中国科学院武汉科学仪器厂),CO_2孵箱(美国 Thermo Forma 公司),解剖显微镜(重庆光电仪器有限公司),倒置显微镜和照相系统、激光共聚焦显微镜(德国 Leica)。

1.3 星形胶质细胞的分离纯化和鉴定

BALB/C 近交系小鼠(本校实验动物中心)2 d 龄,雌雄不拘,共 16 只。星形胶质细胞培养步骤:消毒断头,取出大脑,剥去除软脑膜,分离出大脑皮层,剪碎后用 0.125% 胰酶消化,将细胞数调整为(3 ~ 5) × 10^5 ml^{-1} 种植于培养瓶内,5% CO_2、37 ℃孵箱内培养。传代筛选纯化,用免疫组化法检测 GFAP 阳性细胞达 95% 以上时可进行实验检测。

1.4 实验分组

对照组(Control,未刺激的星形胶质细胞培养);LPS(500 ng/ml)刺激组;IFN-γ 刺激组(100 U/ml);IFN-γ(100 U/ml) + LPS(500 ng/ml)联合刺激组。上述各刺激组可以根据实验设定不同时相点。

1.5 细胞内钙测定

激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)检测:荧光探针 Fluo-4/AM 的激发波长 494 nm,发射波长 516 nm,检测细胞内游离钙动态变化时一般先扫描静息状态 1 ~ 2 幅,约 60 s 后加入一定浓度的处理因素(本实验主要为稀释的各种炎性刺激因子,并对各组细胞进行即时加入),在同一视野继续扫描,观察细胞质内 Ca^{2+} 浓度的动态变化;本实验中扫描间隔多采用 5 ~ 12 s,图像幅数 30 ~ 70 幅不等。实验过程中以恒温台维持细胞温度环境为 37 ℃。结果分析处理:实验结果以图表示,Ca^{2+} 图像经激光共聚焦图像分析软件 TCS-NT165123 进行数据处理,换算成皮层细胞内 Ca^{2+} 荧光强度变化曲线,并对曲线中绝对荧光强度峰值与基线差值用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

1.6 培养细胞分泌 TNF-α、NO 浓度的检测

收集各组细胞培养的上清(各组细胞同步培养,细胞传代后次日换液,然后分时段加入刺激因子,分别作用 48、24、12 h,同步设立对照组),-70 ℃下保存待测。离心去除细胞碎片,按 m-TNF-α 的双抗体夹心法 ELISA 检测试剂盒说明,检测上清中 TNF-α 浓度,反应同时设无包被物、无一抗、无 HRP-链霉亲和素的阴性对照孔,每组设立 3 个复孔。采用常规 Griess 法测定培养细胞上清中 NO 浓度,在检测前离心去除细胞碎片,按 NO 的检测试剂盒说明进行操作检测。

1.7 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差齐性和配对资料 t 检验。

2 结果

2.1 星形胶质细胞形态学和 GFAP 表达

星形胶质细胞反复贴壁筛选之后,细胞形态逐渐变得单一,为梭形或星形;细胞质丰富,核大境界清楚,染色质浅、均匀,有 1 ~ 2 个核仁,居于核中央;GFAP 染色阳性。经 LPS(500 ng/ml)、IFN-γ(100 U/ml)刺激后,星形胶质细胞形态、GFAP 表达和细胞增殖与正常对照比较未见明显变化。

2.2 细胞因子的分泌

2.2.1 不同炎性因子刺激星形胶质细胞分泌 TNF-α 和 NO 的变化 正常培养的星形胶质细胞在未受刺激的条件下,NO 和 TNF-α 分泌极低;炎性介质 LPS(500 ng/ml)、IFN-γ(100 U/ml)刺激星形胶质细胞 24 h 后,分泌 NO 和 TNF-α 明显升高($P < 0.01$),二者联合刺激也具有相互协同促进作用($P < 0.01$,表 1)。可见炎性介质可以刺激星形胶质细胞,并分泌 NO 和 TNF-α,发挥活化效应。

表 1 不同炎性介质刺激后星形胶质细胞分泌 NO 和 TNF-α 的水平

组别	TNF-α (pg/ml)	NO(μmol/L)
对照组	1.3 ± 0.4	0.5 ± 0.1
LPS 组	23.2 ± 2.1[a]	18.3 ± 1.2[a]
IFN-γ 组	51.2 ± 3.5[a]	25.6 ± 3.9[a]
IFN-γ + LPS 组	65.3 ± 2.8[ab]	43.1 ± 6.3[ab]

a:$P < 0.01$,与对照组比较;b:$P < 0.01$,与 IFN-γ 组比较

2.2.2 IFN-γ 刺激星形胶质细胞不同时相点分泌 TNF-α 和 NO 100 U/ml IFN-γ 刺激星形胶质细胞,结果显示随着刺激时间的延长,TNF-α 和 NO 分泌量逐渐升高,星形胶质细胞分泌 TNF-α 和 NO 与炎性刺激时程有关(表 2)。

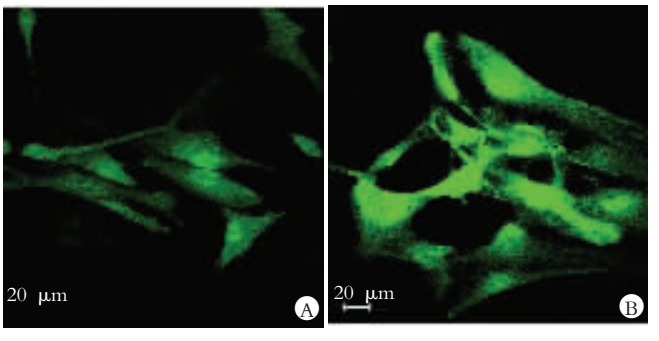
表 2 IFN-γ 刺激不同时相点的星形胶质细胞分泌 NO 和 TNF-α

组别	TNF-α (pg/ml)	NO(μmol/L)
对照组	1.4 ± 0.5	0.5 ± 0.1
IFN-γ 组 12 h	30.5 ± 2.8[a]	13.8 ± 3.1[a]
24 h	48.2 ± 3.3[b]	28.5 ± 3.6[ab]
48 h	84.6 ± 2.8[ac]	41.1 ± 5.7[ac]

a:$P < 0.01$,与对照组比较;b:$P < 0.01$,与 12 h 组比较;c:$P < 0.01$,与 24 h 组比较

2.3 细胞内钙的变化

2.3.1 LPS、IFN-γ 刺激 24 h 后星形胶质细胞[Ca^{2+}]i 变化 炎性因子 LPS 或(和)IFN-γ 刺激培养星形胶质细胞,24 h 后 CLSM 检测细胞内钙的荧光值,结果显示各组刺激都能引起细胞内钙离子的荧光相对值明显升高($P < 0.01$,表 3),其荧光分布主要集中在细胞核内以及胞体,突起部分相对较弱(图 1)。



A:对照组;B:IFN-γ 刺激 24 h

图 1 CLSM 检测星形胶质细胞[Ca^{2+}]i 变化

表 3　炎性介质刺激胶质细胞后[Ca^{2+}]i 变化的荧光相对值

组别	12 h	24 h	48 h
LPS 组	87 ± 23[a]	116 ± 25[a]	114 ± 29[a]
IFN-γ 组	87 ± 21[a]	121 ± 37[a]	95 ± 35[a]
LPS + IFN-γ 组	87 ± 26[a]	115 ± 28[a]	99 ± 32[a]

a:$P<0.01$,与对照组[LPS 对照组:(48 ± 11);IFN-γ 对照组:(50 ± 12);LPS + IFN-γ 对照组:(46 ± 8)]比较

2.3.2　LPS、IFN-γ 急性刺激星形胶质细胞后[Ca^{2+}]i 的动态变化

2.3.2.1　急性刺激正常培养的星形胶质细胞　　LPS 或(和)IFN-γ 急性刺激星形胶质细胞,CLSM 动态观察细胞内钙荧光强度的变化,结果显示 IFN-γ、LPS 及二者联合刺激后均可见细胞内荧光值急速振荡上升(图 2),提示星形胶质细胞受炎性刺激[Ca^{2+}]i 反应性升高。

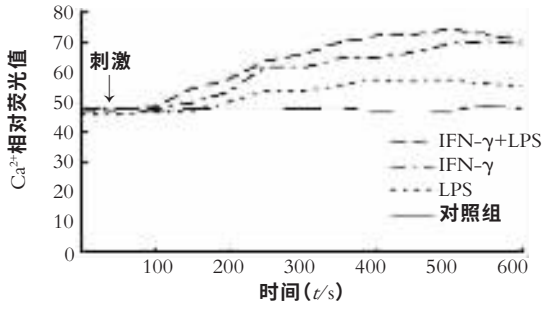


图 2　炎性介质急性刺激影响星形胶质细胞[Ca^{2+}]i 的变化

2.3.2.2　急性刺激 IFN-γ 作用 24 h 后的星形胶质细胞　　经 IFN-γ 刺激培养 24 h 后的星形胶质细胞,再经 IFN-γ 急性刺激,细胞内的荧光值升高速度下降,表现为细胞反应的降低。但应用其他刺激因素 LPS,又可以促进细胞内荧光值的振荡上升,上升速度相对较缓慢,提示活化后的星形胶质细胞对炎性刺激敏感性的下降(图 3)。

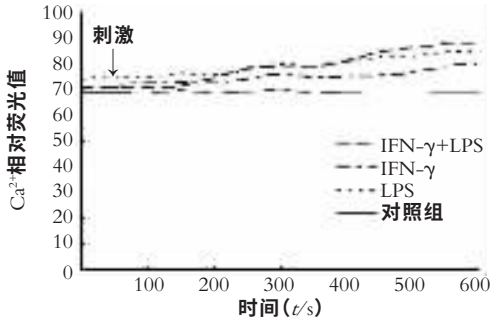


图 3　炎性介质对活化后的星形胶质[Ca^{2+}]i 的影响

3　讨论

星形胶质细胞作为脑内最大最多的胶质细胞,细胞表面不仅具有电压依赖的 Na^+、K^+ 及 Ca^{2+} 通道,而且分布着许多神经递质、神经肽、激素及神经营养因子受体,并能合成及分泌多种神经活性物质,在维持神经元内外环境、免疫调节及信号转导等方面具有重要作用,与中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病密切相关[1]。在病理条件下,星形胶质细胞从静息状态快速向活化状态转变,即“活化”[2],其功能状态将发生改变:如合成与释放神经营养因子,从而调控分泌细胞因子,以及摄取和代谢神经递质等,在中枢神经系统微环境对神经元起保护或毒性作用,具有“双刃”效应。目前认为炎性刺激可导致星形胶质细胞免疫应激性变化,如炎性细胞介质的分泌、免疫共刺激分子的表达等,也是星形胶质细胞活化的典型表现。

脂多糖又称内毒素(endotoxin,Et),为革兰阴性细菌胞壁外膜层的主要成分[3];LPS 作为一种多克隆免疫激发剂来模拟机体免疫激发状态,是研究免疫系统与神经系统之间信息交流的常用模型。直接活化 JAK-STAT 通路中作用最强的细胞因子[4],研究表明 IFN-γ 能激活外周树突状细胞、单核巨噬细胞、血管内皮细胞等,诱导和增加 MHC 分子表达,生成多种新蛋白发挥效应[5]。因此,我们采用常规的免疫刺激模式,用 LPS 和 IFN-γ 刺激星形胶质细胞,观察细胞的反应性变化,即细胞内信号 Ca^{2+},细胞因子 TNF-α 和 NO 分泌,以观察星形胶质细胞的活化,建立炎性活化的细胞模型。

经炎性介质 LPS(500 ng/ml)、IFN-γ(100 U/ml)刺激星形胶质细胞 24 h 后,细胞增殖、细胞形态和 GFAP 表达与正常培养细胞比较无明显差异,但检测 NO 和 TNF-α 的分泌发现明显升高,二者联合刺激也具有相互协同促进作用,可见 LPS 或/和 IFN-γ 可以刺激星形胶质细胞,发挥活化效应。激活后星形胶质细胞对神经元的影响包括两方面:①通过分泌大量的神经营养因子、细胞因子和基质分子促进轴突再生,保护神经元免受损伤,有利于损伤后神经元的功能恢复;②分泌活性分子发挥神经毒性作用,如 NO 分泌增多[6],氧自由基的产生,可引起神经元的损害;TNF-α 的分泌可以共同参与脑内的炎症反应,活化小胶质细胞,加重脑内的炎症变化加速病情的发展。细胞内 Ca^{2+} 在中枢神经系统功能中起着重要作用,参与神经信号的传递和神经递质的释放。LPS 或/和 IFN-γ 刺激星形胶质细胞后,细胞内 Ca^{2+} 明显升高,细胞内钙离子浓度的上升,提示星形胶质细胞功能的上调,如代谢和分泌神经递质的功能,分泌神经营养因子和细胞因子等方面。经 IFN-γ 刺激培养 24 h 后的星形胶质细胞,再经 IFN-γ 急性刺激,细胞内的荧光值微弱升高,细胞反应性的降低;但联合 LPS 刺激,可以加速细胞内荧光值

的振荡上升,上升速度相对较缓慢,提示活化后的星形胶质细胞对炎性刺激敏感性的下降,究其原因有两点:一是钙的负载达到一定限度,二是细胞对 IFN-γ 作用敏感性下降的结果。研究结果还显示,联合多种刺激因素可以加强细胞反应;TNF-α 的分泌随 IFN-γ 的刺激时间的延长,其浓度不断的升高,而 TNF-α 的促进作用可以作为自身分泌的级联放大作用后的促进作用,长期的刺激作用对于星形胶质细胞影响可能具有更为明显作用。可见炎性刺激信号活化星形胶质细胞,通过"胶质传递"(glia transmission)的方式发挥效应,间接影响神经元的基本功能[7],调控小胶质细胞的活化,参与脑内炎性疾病的发生和发展,说明在炎症反应过程中星形胶质细胞的功能表现是一个复杂和连续反应的过程。

本研究利用炎性因子 IFN-γ 和 LPS 刺激星形胶质细胞,系统观察细胞内钙和细胞因子的变化,建立离体细胞活化模型,为认识星形胶质细胞的功能,深入研究神经退变性疾病、脑老化、外伤、炎症病变及诊断治疗提供实验基础。

参考文献:

[1] 关方霞, 关玉霞, 杨 波, 等. 星形胶质细胞形态学观察在高通量药物筛选水通道蛋白4 抑制剂中的应用[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(5): 870 - 872.

[2] Carpentier P A, Begolka W S, Olson J K, *et al*. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli[J]. Glia, 2005, 49(3): 360 - 374.

[3] Hsu H Y, Wen M H. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression[J]. J Biol Chem, 2002, 277(25): 22131 - 22139.

[4] Choi W H, Ji K A, Jeon S B, *et al*. Anti-inflammatory roles of retinoic acid in rat brain astrocytes: Suppression of interferon-gamma-induced JAK/STAT phosphorylation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329(1): 125 - 131.

[5] Ihle J N. STATs: signal transducers and activators of transcription[J]. Cell, 1996, 84(3): 331 - 334.

[6] Czapski G A, Cakala M, Chalimoniuk M, *et al*. Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(8): 1694 - 1703.

[7] Sykova E. Glia and volume transmission during physiological and pathological states[J]. J Neural Transm, 2005, 112(1): 137 - 147.

(编辑 王小寒)

《中国中医药现代远程教育》杂志征订征稿征广告启事

《中国中医药现代远程教育》杂志是国家中医药管理局主管的国家级中医药科技期刊,中国科技核心期刊,中国科技期刊统计源期刊,中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)、中国期刊全文数据库(CAYED)及中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库、中国期刊网全文数据库收录期刊,每月 8 日出版,全彩印刷,国内统一刊号:CN 11-5024/R,国际刊号:ISSN 1672-2779。

《中国中医药现代远程教育》杂志服务于全国医药卫生及相关行业的科技人员,是我国唯一传播中医药及中医药远程教育资讯的期刊,是中医药科、教、研及大中专学生的教辅,是中医药临床教研人员的益友,也是中医药远程网络教育学员的教参。全国邮局均可征订,国内邮发代号:82-107,国外代号:M-1751,欢迎订阅。凡在当地订阅有困难者,可直接与本刊发行部联系。广告许可证号:京朝工商广字第 8091 号,欢迎刊登广告。

本刊主要栏目分四大版块:临床版块:①临床专著;②薪火传承;③护理讲坛;④临证精华;⑤临床报道;⑥他山之石。科研版块:①学术论著;②实验研究;③科研进展。远教版块:①中远论坛(教育与管理论坛);②远教辅导;③试题解析;④继教讲堂;⑤名师讲座;⑥用药精讲。时政与文化版块:①特稿特讯;②大医精诚;③医海泛舟;④杏林文苑;⑤综合资讯。

来稿应精练、通顺、重点突出,有新意。论著综述一般不超过 5 000 字(含图表、参考文献)。讲座、临床病理(例)讨论类文稿可视情况而定。论著摘要(简报)、病理报告等 800 ~ 2 000 字。来稿请打印,并附光盘,亦可电子邮箱投稿。

来稿请寄:北京市复兴门南大街甲 2 号配楼知医堂 101 室,邮编:100031

在线投稿信箱: Zyyjy2008@126.com, zhongyuan@ichinamd.com

本刊官方网站: http://zhongyuan.itcmedu.com

联系电话:(010)51813289; 51813298 **传真**:(010)51813296