

·论著·

炎症因子诱导星形胶质细胞凋亡及机制探讨

刘杰波

(深圳市罗湖区人民医院儿科,广东深圳518000)

[摘要] 目的 探讨LPS,IL-1,TNF α 所致星形胶质细胞(AC)凋亡的机制及途径。方法 原代培养的新生SD大鼠前脑AC分为正常对照组、炎症组(LPS+IL-1+TNF α)与预处理组(L-NMMA预处理30min后加入LPS+TNF α +IL-1)。培养72h后,MTT测定AC活力;分光光度计测定细胞培养上清中NO $_2^-$ /NO $_3^-$ 含量;电镜、流式细胞术检测细胞凋亡;Western Blot检测胞浆内细胞色素C的表达;原位杂交检测AC Caspase-3 mRNA表达。结果 预处理组细胞活力明显高于炎症组(0.81 \pm 0.29 vs 0.46 \pm 0.15),差异有显著性($P < 0.01$)。炎症组AC活力与其分泌的一氧化氮(NO)呈负相关($r = -0.604$, $P < 0.05$)。预处理组凋亡率[(15.2 \pm 7.9)%]低于炎症组[(29.7 \pm 10.4)%], $P < 0.05$ 。预处理组胞浆内细胞色素C的含量较炎症组明显减少(14784 \pm 2096 vs 31049 \pm 3784), $P < 0.01$ 。炎症组的Caspase-3 mRNA表达强于预处理组。结论 LPS,IL-1,TNF α 可导致细胞活力下降。其细胞活力的下降与其分泌的NO增多有关。增多的NO可导致AC凋亡;NO导致的AC凋亡可能与细胞色素C凋亡途径有关。

[中国当代儿科杂志,2003,5(4):339-342]

[关键词] 星形胶质细胞;凋亡;一氧化氮

[中图分类号] Q813 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)04-0339-04

Mechanism of Cytokine-Induced Apoptosis of Astrocytes in Rats

Jie-Bo LIU. Department of Pediatrics, Luohu District Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518000, China
(Email: jieboliu@hotmail.com)

Abstract: **Objective** To study the mechanism of LPS, IL-1 and TNF α -induced apoptosis of astrocytes in rats. **Methods** The astrocytes of the neonatal rat were cultured in vitro and randomly assigned into the inflammation group (treated with LPS, IL-1 and TNF α), pre-treatment group (L-NMMA was administrated half an hour before treatment with LPS, IL-1 and TNF α) and normal control group. The cell viability was assayed by MTT; apoptosis was evaluated by electron microscope and flow cytometry; nitric oxide (NO) content was measured by spectrophotometer; cytochrome C content in cytoplasm was measured by Western Blot and Caspase-3 mRNA expression was detected by hybridization in situ. **Results** The cell viability in the pre-treatment group was significantly higher than that of the inflammation group (0.81 \pm 0.29 vs 0.46 \pm 0.15), $P < 0.01$. There was a negative correlation between the cell viability and NO content produced by astrocytes in the inflammation group ($r = -0.604$, $P < 0.05$). The apoptosis rate of the pre-treatment group was lower than that of the inflammation group [(15.2 \pm 7.9)% vs (29.7 \pm 10.4)%; $P < 0.05$]. The cytochrome C content in cytoplasm of astrocytes of the pre-treatment group (14784 \pm 2096) decreased compared with that of the inflammation group (31049 \pm 3784) ($P < 0.01$). The expression of Caspase-3 mRNA in the inflammation group was intensified compared with that of the pre-treatment group. **Conclusions** Cytokines may lead to decrease of viability of astrocytes through increasing NO content produced by astrocytes. The increase of NO content can induce astrocyte apoptosis, which is related to the release of the cytochrome C from mitochondria to cell plasma, and activating the expression of Caspase-3 mRNA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(4): 339-342]

Key words: Astrocyte; Apoptosis; Nitric oxide

星形胶质细胞(astrocyte, AC)在中枢神经系统中占有非常重要的地位。它通过对各种神经生长因

[收稿日期] 2002-09-10; [修回日期] 2003-04-30

[作者简介] 刘杰波(1968-),男,博士,主治医师。主攻方向:小儿神经系统疾病。

[通讯作者] 刘杰波,深圳市罗湖区人民医院儿科,邮编:518000。

子和细胞因子的刺激起反应,营养神经元。同时在神经系统中又起支撑神经元、维持突触联系等作用。AC的改变常导致脑组织正常结构和功能的改变,可导致神经系统退行性病变的发生。

炎症因子是儿童神经系统中最常见的刺激因素之一,参与儿童神经系统感染性疾病的病理生理过程^[1,2]。在神经系统感染性疾病的脑组织与脑脊液中主要有IL-1和TNF- α 增高^[1],它们对AC的损伤是目前研究的热点之一。本研究采用LPS,IL-1,TNF- α 共同刺激AC,观察其凋亡、凋亡机制及与自分泌NO之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体,山羊抗兔IgG SABC免疫组化试剂盒,DAB显色试剂盒(以上均为博士德公司提供)。L-NMMA,LPS(Sigma公司);IL-1,TNF- α (Pepeo TECH EC公司)。小鼠抗大鼠细胞色素C单克隆抗体(NeoMarkers公司)。兔抗小鼠二抗由博士德公司提供。一氧化氮试剂盒由晶美生物工程有限公司提供。酶联免疫检测仪(DG3022型);全自动酶标仪(Elx800,Bio-Tek Instruments Inc);紫外分光光度计(Backman U600)。电泳仪(SCR-300型);垂直电泳槽(DYY-III 28A型);电转移电泳槽(DYY-III型);透射电镜(HITACHI,H-600型);流式细胞计数仪(美国420型)。

1.2 实验方法

1.2.1 新生大鼠前脑AC培养方法 无菌条件下取出生1 d Sprague-Dawley大鼠前脑,D-Hanks液中除去血污与脑膜和血管。将脑组织在无菌小瓶剪碎,用0.25%胰酶消化后灭活胰酶,200 g/min离心10 min,吸取上层,加入含20% FCS的培养液(DMEM高糖型培养基,另含HEPES 10 mmol/L,谷氨酸 2 mmol/L,胰岛素 4 U/L,青霉素 10^5 U/L,链霉素100 mg/L),吹打制成单细胞悬液。通过200目钢网过滤,调整细胞密度至 1×10^6 /ml,然后接种至培养瓶(涂鼠尾胶)或培养板(涂多聚赖氨酸)。在37 $^{\circ}$ C,饱和湿度,5% CO₂/95%空气的CO₂培养箱中培养。培养4~5代后进行GFAP的免疫细胞化学鉴定细胞纯度。

1.2.2 LPS,IL-1,TNF- α 对神经胶质细胞活力的影响 在细胞密度为 1×10^4 /ml~ 1×10^5 /ml的培养板中把培养的细胞分为正常组、炎症组(LPS +

TNF- α + IL-1)及L-NMMA预处理组。每组内有24个样本。加入LPS,IL-1,TNF- α ,L-NMMA的量分别为100 μ g/L,10 μ g/L,10 μ g/L和0.5 mmol/L。干预72 h后,吸取上清-20 $^{\circ}$ C保存留做NO₂⁻/NO₃⁻测定,在培养板中加入无血清培养基,然后进行MTT分析。吸去上述干预后的96孔板中含血清培养基,加入200 μ l无血清培养基,同时加入MTT 20 μ l,37 $^{\circ}$ C培养4 h,吸去上清后加入二甲基亚砷150 μ l,充分摇匀15 min后在发射波长490 nm处用酶标仪测定。细胞活力换算公式:细胞活力 = 处理孔OD₄₉₀值/正常组OD₄₉₀值。

1.2.3 NO₂⁻/NO₃⁻的测定 72 h后正常组和炎症组的细胞培养上清检测NO₂⁻/NO₃⁻,参照试剂盒说明进行。一氧化氮浓度(μ mol/L) = 测定管OD值/标准管OD值 $\times 100$ μ mol/L。

1.2.4 凋亡细胞电镜观察 PBS清洗炎症组干预72 h后的AC 3次,用细胞刮刮下细胞,加入同体积的2.5%戊二醛预固定15 min,2 000 g/min离心5 min,去上清,加入2.5%戊二醛吹散细胞并固定。把固定的细胞吸入有琼脂的空槽中,1 000转/min离心10 min,切下含有细胞的琼脂块,用1%的锇酸后固定30 min,常规脱水、渗透、包埋、超薄切片、铀铅染色,透射电镜下观察。

1.2.5 胞浆中细胞色素C的提取与Western Blot分析 把培养的AC分为正常组、炎症组、预处理组,每组内样本数为3个。每个样本所用细胞数约 $2 \sim 3 \times 10^7$ 个。上述细胞离心后去上清,加入预冷的4倍体积的细胞裂解液(含有20 mmol/L HEPES,250 mmol/L蔗糖,10 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L PMSF,2 μ g/ml抑肽酶,10 μ g/ml亮氨酸),在冰上放置15 min后使细胞膨胀,然后用Dounce匀浆器轻轻研磨数次,放置入1.5 ml的EP管中4 750 g/min离心10 min,以沉淀未破碎细胞和细胞核,上清在4 17 000 g/min离心60 min,以沉淀线粒体。上清蛋白定量后-20 $^{\circ}$ C保存。Western Blot分析如下:取100 μ g的总蛋白加入1 \times SDS加样缓冲液(10% SDS 0.2 ml,1%溴酚兰 0.1 ml,1 mmol/L DTT 0.5 ml,丙三醇 0.1 ml,1 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 ml)至终体积50 μ l,水中煮沸10 min使蛋白质变性,聚丙烯酰胺凝胶电泳后。取下醋酸纤维素膜,用含1%小牛血清白蛋白的PBST(500 ml PBS加入吐温-20 200 μ l)封闭非特异性结合位点,加入小鼠抗大鼠细胞色素C单抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBST洗3次后加入含碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠二抗 PBST

4 下过夜。然后 PBST 洗去未结合的二抗,10 min $\times 3$ 次。把洗净的膜放入 10 ml 碱性磷酸酶缓冲液中,并加入 66 μ l NBT(70%二甲基甲酰胺 10 ml 加 0.5 g NBT)和 33 μ l BCIP 显色。通过凝胶成像分析系统进行灰度扫描。

1.2.6 Caspase-3 mRNA 的原位杂交 把培养细胞分为炎症组、预处理组,每组 4 个样本,用上述炎症因子干预 72 h 后取出。0.1 mol/L PBS 洗 2 min $\times 3$ 次。4%多聚甲醛/0.1 mol/L PBS(含有 1/1 000 DEPC)室温固定后水洗。新鲜配制的 0.5% H_2O_2 /甲醛室温处理 30 min 以灭活内源性过氧化酶,洗涤 3 次。玻片上滴加含 3%柠檬酸的胃蛋白酶,37 $^{\circ}C$ 消化 60 s 暴露 mRNA 核酸片断,置杂交盒预杂交。恒温箱 37 $^{\circ}C$ 2 h。每张玻片加 20 μ l Caspase-3 探针的杂交液。用保护膜盖在玻片上。恒温箱 42 $^{\circ}C$ 杂交过夜。37 $^{\circ}C$ 2 \times SSC 充分洗涤 15 min $\times 2$ 次。滴加封闭液。加生物素化鼠抗地高辛 20 μ l,120 min。0.5 mol/L PBS 5 min 洗 4 次。使用 DAB 显色试剂盒显色 20 min。苏木素复染后水洗、脱水、透明、封片。

1.3 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以上数据均用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计。两组之间比较用 t 检验,相关性分析用直线相关分析。

2 结果

已传 5 代后的细胞,GFAP 阳性率均大于 95%。炎症组的细胞活力(0.46 \pm 0.15)明显低于预处理组的细胞活力(0.81 \pm 0.29),差异有显著意义($P < 0.01$)。且炎症组细胞活力与其分泌的 NO 呈负相关($r = -0.604$, $P < 0.05$)。

炎症组电镜下观察可见有凋亡细胞产生。表现为细胞微绒毛消失,体积变小,核固缩、移位、细胞间失去连接,甚至凋亡小体形成。通过流式细胞计数发现预处理组细胞凋亡率[(15.2 \pm 7.9)%]明显少于炎症组[(29.7 \pm 10.4)%],差异有显著性($P < 0.05$)。

炎症组胞浆内细胞色素 C 的含量(31 049 \pm 3 784)明显高于预处理组(14 784 \pm 2 096),差异有显著性($P < 0.01$)。正常胶质细胞胞浆内几乎无细胞色素 C 的表达。

炎症组 Caspase-3 mRNA 的表达强于预处理组。见图 1。

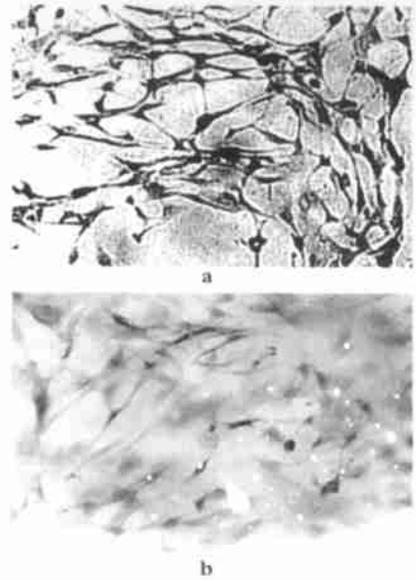


图 1 炎症组 Caspase-3 mRNA 表达强于预处理组($\times 300$)
Figure 1 The expression of Caspase-3 mRNA in LPS group was stronger than that of the pre-treatment group ($\times 300$)
a. LPS group; b. pre-treatment group

3 讨论

原代培养的 AC 经过多次传代后,一些成纤维细胞、血管内皮细胞、神经元、小胶质细胞等渐渐减少,最终 AC 占主要地位,本实验 AC 特异性的 GFAP 阳性率大于 95%,符合研究要求。

本研究发现 LPS,IL-1, TNF- α 作用于 AC 后,NO 生成增多,细胞活力明显降低,且细胞活力与 NO 浓度呈负相关。L-NMMA 是一种精氨酸类似物,被公认为 NOS 抑制剂,它能抑制内皮型、神经元型、诱导型一氧化氮合酶的活性^[8]。而在 AC 被炎症因子干预前 30 min 加入 L-NMMA,NO 的分泌明显减少,细胞活力高于炎症组。从而说明炎症因子作用下自分泌的 NO 是导致细胞活力下降的原因之一。

目前有研究认为 NO 可诱导数种细胞的凋亡^[9,10],能否导致 AC 凋亡仍有争议。电镜对单个细胞凋亡现象的检测被认为是“金指标”。通过电镜,我们观察到炎症组 AC 核固缩、核偏移,胞浆浓缩,细胞器完整,细胞周围有凋亡小体形成。说明在 LPS,IL-1, TNF- α 共同作用下 AC 有凋亡现象发生。流式细胞计数是一种以定量为主的凋亡检测方法。本实验通过 PI 染色后细胞通过流式细胞仪检测细胞核亚二倍体核型峰,发现上述炎症因子可以导致 AC 的凋亡,L-NMMA 可减少凋亡。因而说明

NO对AC细胞活力的影响与其导致的细胞凋亡有关。

目前细胞凋亡的途径主要有3个:线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径。NO导致凋亡的途径与P53的激活、JNK/SPAK与P38激酶的激活、神经酰胺产生、细胞色素C的释放、内质网途径^[11]等因素有关。近年来线粒体在神经系统凋亡中的作用也日益重视。胞浆内细胞色素C的表达是线粒体途径的一个主要步骤,本研究发现AC在炎症因子干预后胞浆内细胞色素C明显增多,而应用L-NMMA后,胞浆内细胞色素C的含量减少,并结合Caspase-3 mRNA原位杂交的实验结果,提示NO可使细胞色素C从线粒体释放入胞浆,导致Caspase-3 mRNA的表达增多及凋亡发生。本研究严格按照细胞色素C的提取方法进行^[12],并用正常细胞作为阴性对照组,Western Blot显色结果提示阴性对照组几乎不表达细胞色素C,说明本实验结果是可靠的。

炎症因子导致星形胶质细胞分泌NO,而自分泌的NO可导致细胞凋亡。但抑制NO并不能完全抑制细胞活力下降与凋亡,说明炎症因子导致AC损害的机制复杂,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 俞燕,杨于嘉,黄芩芩,地塞米松对大鼠感染性脑水肿细胞因子的影响[J]. 湖南医科大学学报,2000,25(6):519-521.

[2] Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Adipose tissue as a source of inflammatory cytokines in health and disease: Focus on end-stage renal disease [J]. *Kidney Int Suppl*, 2003, 84: 65-68.

[3] Wright K, Kolios G, Westwick J, et al. Cytokine-induced apoptosis in epithelial HT-29 cells is independent of nitric oxide formation. Evidence for an interleukin-13-driven phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival mechanism [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(24): 17193-17201.

[4] Smith SC, Guilbert LJ, Yui J, et al. The role of reactive nitrogen/oxygen intermediates in cytokine-induced trophoblast apoptosis [J]. *Placenta*, 1999, 20(4): 309-315.

[5] Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, et al. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitric [J]. *Circ Res*, 1999, 85(9): 829-840.

[6] Leist M, Gantner F, Kunstle G, et al. Cytokine-mediated hepatic apoptosis [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1998, 133: 109-155.

[7] Murakami K, Nakamura Y, Yoneda Y. Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes [J]. *Neuroscience*, 2003, 117(1): 37-42.

[8] Perner A, Andresen L, Normark M, et al. Expression of nitric oxide synthases and effects of L-arginine and L-NMMA on nitric oxide production and fluid transport in collagenous colitis [J]. *Gut*, 2001, 49(3): 387-394.

[9] Ghatan S, Larner S, Kinoshita Y, et al. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(2): 335-347.

[10] Suk K, Lee J, Hur J, et al. Activation-induced cell death of rat astrocytes [J]. *Brain Res*, 2001, 900(2): 342-347.

[11] Ansky V, Ratter F, Lampel S, et al. Inhibition of nitric-oxide-mediated apoptosis in Jukat leukemia cells despite cytochrome c release [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 265(2): 274-282.

[12] Rheaume E. The large subunit of replication factor C is a substrate for Caspase-3 in vitro and is cleaved by a Caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis [J]. *EMBO J*, 1997, 16(21): 6346-6353.

(本文编辑:俞燕)

(上接第330页)

[3] 皮光环,杨锡强,魏钰书,等. 静脉注射免疫球蛋白对川崎病患儿TH1/TH2的影响[J]. 中华儿科杂志,2002,40(2):75-77.

[4] Martin Mateos MA. Respiratory syncytial virus infection and asthma [J]. *Allergol Immunopathol*, 2001, 29(3): 140-146.

[5] 杨锡强. 小儿哮喘的免疫学发病机制及其对策[J]. 中国当代儿科杂志,2001,3(5):487-490.

[6] 狄亚珍,夏萍,陈伟君,等. 高危哮喘儿血清中IL-4、IFN-及总IgE的测定及其临床意义[J]. 临床儿科杂志,2000,18(4):222-223.

[7] 马煜,陈育智,吴谨准,等. 应用卡介菌多糖核酸注射液治疗儿童哮喘的研究[J]. 临床儿科杂志,2002,20(4):224-226.

(本文编辑:俞燕)