

• 短篇论著 •

脂多糖诱导小胶质细胞活化对多巴胺能神经元的损伤作用

王大 力 赵鹏 刘强 王彦 赵辉 彭延波 杜利清

【摘要】 目的 在建立原代培养多巴胺能神经元和小胶质细胞的基础上,研究脂多糖(LPS)激活的小胶质细胞对多巴胺能神经元的毒性作用及损伤的分子机制。**方法** 通过细胞免疫化学方法检测原代培养的神经元和神经胶质细胞中 TH、OX-42 阳性细胞的表达,以明确原代培养多巴胺能神经元和小胶质细胞的纯度。通过加入不同条件培养液分为 A~E 五组。通过 MTT 方法检测小胶质细胞条件培养液对多巴胺能神经元的毒性作用。通过 Western-blotting 方法检测多巴胺能神经元中 caspase-3、caspase-9 蛋白的表达水平。**结果** 小胶质细胞条件培养液培养 24 h(C 组)、48 h(D 组)后,多巴胺能神经元的存活率分别为 $(87.4 \pm 4.6)\%$ 、 $(87.5 \pm 7.3)\%$,与 A、E、B 三组比较有统计学意义($P < 0.05$);同样 C、D 两组中 caspase-3、caspase-9 蛋白相对表达量分别为 $(30.127 \pm 0.431)\%$ 、 $(30.823 \pm 0.403)\%$ 和 $(29.806 \pm 0.410)\%$ 、 $(31.337 \pm 0.462)\%$,与 A、B、E 组比较有统计学意义($P < 0.05$);B 组中 caspase-9 蛋白相对表达量为 $(14.623 \pm 0.340)\%$,与 A 组比较有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 小胶质细胞的激活是构成多巴胺能神经元损伤的重要环节。

【关键词】 脂多糖类; 小神经胶质细胞; 受体,多巴胺; 损伤机制

帕金森病(Parkinson disease, PD)是常见于中老年人的第二位中枢神经系统退行性疾病,以静止性震颤、肌张力强直和运动迟缓为主要临床表现,其主要病理特征表现为中脑黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性变性坏死。近年来,诸多研究显示激活的小胶质细胞在 PD 的多巴胺能神经元进行性变性过程中起着重要的作用,其活化程度与多巴胺能神经元的死亡变性成正比。小胶质细胞是脑内固有的免疫效应细胞,小胶质细胞活化后可以改变许多蛋白信号分子的异常表达,进而可启动或放大神经元的损伤反应。革兰阴性杆菌细胞壁提取的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是一种强力诱导剂,它可以激活小胶质细胞,并促使小胶质细胞分泌神经毒性物质对神经元细胞产生毒性作用。本实验研究通过 LPS 激活原代培养的小胶质细胞,观察活化的小胶质细胞促进多巴胺能神经元的损伤变性。

一、材料与方法

1. 材料:新生 SD 大鼠,DMEM/F12 完全培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Gibco 公司),0.25%胰蛋白酶(北京赛默飞世尔),无血清培养添加剂 N2(Sigma 公司),碱性成纤维生长因子(bFGF)(Sigma 公司),L-抗坏氨酸-2-磷酸酯倍半镁盐(AA-2P, Sigma 公司),阿糖胞苷(Ara-c, Sigma 公司),小鼠抗大鼠 OX-42 单克隆抗体(美国 Santa cruz 公司)、兔抗大鼠 TH 多克隆抗体(北京中杉金桥公司),兔抗大鼠 caspase-3、caspase-9 多克隆抗体(Sigma 公司),HRP 标记的抗小鼠二抗(Lab Vision 公司),HRP 标记的抗兔二抗(KPL 公司),LPS(Sigma 公司),倒置显微镜,酶标仪。

2. 方法:(1)原代大鼠小胶质细胞的培养、纯化^[1]和鉴定:取新生 48 h 之内的 SD 大鼠,在无菌条件下,剪开颅骨,取全脑置于预冷的 PBS 液中,解剖镜下仔细剥离软脑膜和血管,去除血

污,吸走液体,再把全脑移入另一 PBS 液中冲洗,剪去脑干,保留大脑半球、中脑及胼胝体。转移至青霉素小瓶,充分剪碎脑组织,加入 30~50 倍组织体积 0.25%胰酶消化 60 min,经 200 目细胞筛过滤,将滤液移至离心管中,加 DMEM/F12 完全培养基终止消化,离心力 178 g 离心 5 min,弃上清,沉淀物重悬于含适量血清的培养基中,静置 30 min 以差速贴壁去除成纤维细胞。将细胞悬液接种到经多聚 L-赖氨酸处理的 T75 细胞培养瓶中,2 d 后换液 1 次,其后 5 d 不换液,2 d 后换液 1 次,至第 11 天,吸除培养瓶中的培养液,加入盐酸利多卡因溶液(用 PBS 溶液配制至 12 mmol/L 的工作浓度,调 pH 至 7.2~7.4,0.22 μm 滤膜过滤除菌,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱待用),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内静置 10 min,轻摇培养瓶 2~3 min,镜下观察待大量细胞悬浮后,收集细胞悬液,离心力 178 g/7 min 离心收集细胞,接种于预先涂布多聚 L-赖氨酸的培养瓶,过夜后完全换液 1 次。细胞爬片后,4%多聚甲醛固定 2 h, PBS 冲洗 3 次 \times 3 min,以小鼠抗大鼠 OX-42 单克隆抗体滴定、过夜, PBS 冲洗、苏木精复染、显微镜观察拍片,成片的细胞呈 OX-42 免疫反应强阳性,即为小胶质细胞。

(2)高纯度大鼠多巴胺能神经元的培养和鉴定^[2]:取孕 12 d SD 大鼠,经无菌操作取胚胎鼠脑,切取中脑腹侧部分剪碎,置于约含 0.5 ml 取材液(2:1 的 DMEM/F12、2 g/L 碳酸氢钠、20 g/L B27、10 g/L N2、0.2 g/L DNase)的 1.5 ml EP 管中,分别用 1 ml 和 0.2 ml 的枪头反复吸吹 15 次,静置 3 min,去除沉淀,加入适量(1~5 ml)培养液(2:1 DMEM/F12、2 g/L 碳酸氢钠、20 g/L B27、10 g/L N2、10 ml/L FBS、20 $\mu\text{g/L}$ bFGF、100 $\mu\text{mol/L}$ AA-2P),玻璃移液管吹吸分散悬浮细胞,调整细胞浓度后接种在预先用多聚赖氨酸包被的 25 cm^2 培养瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后吸除全部培养液,加入无血清培养液培养,隔天更换半量培养液,培养 5 d 后吸除全部培养液,换培养液(Neurobasal、20 g/L B27、10 ml/L FBS、100 $\mu\text{mol/L}$ AA-2P、9 g/L 谷氨酰胺),隔天更换半量培养液,第 10 天换液并加入终浓度为 7 $\mu\text{mol/L}$ 的阿糖胞苷,此后 2~3 d 换液一次。同样,细胞爬片后,4%多聚甲醛固定 2 h, PBS 冲洗 3 次 \times 3 min,以兔抗大鼠 TH 多克隆抗体滴定、过夜, PBS 冲洗、苏木精复染、显微镜观察拍

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.08.057

作者单位:063000 河北唐山,河北联合大学附属医院神经内科二病区(王大 力、赵鹏、彭延波);中国医学科学院放射医学研究所辐射评价室(刘强、王彦、杜利清);天津商业大学天津市食品生物技术重点实验室(赵辉)

通讯作者:杜利清,Email:duliquing2004@126.com

片,成片的细胞呈TH免疫反应强阳性,即为多巴胺能神经元。

(3)小胶质细胞条件培养液的收集及活化的小胶质细胞免疫化学鉴定:将小胶质细胞分为四种条件培养,第一种(A组)培养方法,加常规培养液,37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h;第二(B组)、三(C组)、四(D组)种培养方法,培养液中均加入终浓度为10 mg/ml的LPS,37℃、5% CO₂培养箱中分别培养12 h、24 h、48 h;离心力715 g、5 min收集各组培养液,作为条件培养液,储存于4℃待用。将培养液中加入LPS的小胶质细胞爬片,进行免疫细胞化学鉴定,观察小胶质细胞的形态变化。

(4)MTT检测多巴胺能神经元活性:将培养瓶中的多巴胺能神经元经消化、细胞计数、浓度稀释,以每孔3000个细胞、每孔100 μl,分五组均匀接种到96孔板上,每组设置5个复孔,周边空白孔加等量PBS液进行封闭以消除边缘效应,37℃、5% CO₂培养箱中培养,24 h后把四种条件培养液分别加入A、B、C、D四组中,每孔加100 μl条件培养液,E组向多巴胺能神经元混合培养液中加入终浓度为10 mg/ml的LPS,总培养液为200 μl,继续37℃、5% CO₂培养箱中培养,48 h后每孔加30 μl MTT,37℃、5% CO₂培养箱中培养,4 h后倒掉96孔板中的液体,吸干残余液体,每孔加150 μl二甲基亚砜(DMSO),用酶标仪在630 nm、492 nm下测定各孔OD值,实验组OD值=OD₆₃₀-OD₄₉₂,存活率=实验组OD值/对照组OD值×100%。

(5)Western-blotting检测caspase-3、caspase-9蛋白表达水平:用上述五组的培养方法分别对多巴胺能神经元在培养瓶中进行培养,培养48 h后经消化、低速离心收集细胞、加蛋白裂解液、低温高速离心收集好蛋白,用BCA法测定蛋白浓度,计算出蛋白加样量。紧接着进行Western-blotting,其实验步骤简述如下:配分离胶、配浓缩胶、样品和上样缓冲液混合后经PCR仪95℃、10 min变性、安装电泳槽进行电泳(恒压100 V跑浓缩胶、恒压110 V跑分离胶)、转膜(按阴极-滤纸-胶-膜-滤纸-阳极放置)、5%封闭液4℃过夜、摇床孵育一抗2 h、TBST洗膜3×10 min、摇床孵育二抗1 h、显影,将蛋白图像扫描到电脑上,通过Quantity One软件进行定量分析,结果以蛋白的相对量表示。

3. 统计学分析:采用SPSS 13.0软件处理,所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间计量资料比较采用完全随机设计的方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

二、结果

1. OX-42、TH免疫细胞化学染色法鉴定:通过对新生SD大鼠原代细胞的培养,经过细胞免疫化学鉴定,OX-42阳性细胞为小胶质细胞,细胞体较小,突触较长,呈分枝状。TH阳性细胞为多巴胺能神经元,细胞体呈梭形或锥形,胞浆呈棕褐色,细胞核大而圆。见图1、2。

小胶质细胞是由未加LPS的培养液培养24 h的形态,细胞呈典型的分枝状,突触较长,提示小胶质细胞处于静止状态,见图3。图4~6中的小胶质细胞是由加有LPS的培养液分别培养12 h、24 h、48 h后的形态,细胞由典型的分枝状活化为阿米巴样,提示小胶质细胞处于激活状态。其中图4中可见未活化的小胶质细胞,提示用加有LPS的培养液培养12 h未能完全激活静止的小胶质细胞,图5、6提示培养24 h之后可以完全活化静止的小胶质细胞。

2. MTT检测多巴胺能神经元存活率(表1):A组为正常对照组,多巴胺能神经元存活率最高,与C、D两组比较有统计学意义($P < 0.05$)。E组为直接向多巴胺能神经元中加入终浓度为10 mg/ml LPS,与C、D两组比较有统计学意义($P < 0.05$)。不同

时间收集的小胶质细胞条件培养液对多巴胺能神经元的存活率以12 h的B组最高,B组与C、D两组比较有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 不同条件各组的多巴胺能神经元存活率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	OD值	存活率(%)
A组	1.534 ± 0.143	100
B组	1.471 ± 0.108	96.9 ± 13.2
C组	1.339 ± 0.114	87.4 ± 4.6
D组	1.334 ± 0.039	87.5 ± 7.3
E组	1.519 ± 0.144	99.2 ± 7.8

注:存活率:C组与A、E、B组比较, P 均 < 0.05 ;D组与A、E、B组比较, P 均 < 0.05

3. Western-blotting结果分析:将蛋白图像扫描到电脑上,通过Quantity One软件进行等高线定量分析法,结果以蛋白的相对量表示,见图7,表2。对照组A中有微量caspase-3、caspase-9蛋白表达,与对照组相比,E、B组蛋白表达水平未见明显增加;与A、E、B相比,C、D两组蛋白明显增加(P 均 < 0.05)。

表2 各组caspase-3和caspase-9蛋白相对表达量比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	caspase-3	caspase-9	β -actin
A组	9.673 ± 0.541	8.243 ± 0.416	31.840 ± 0.300
B组	9.770 ± 0.212	14.623 ± 0.340	31.283 ± 0.499
C组	30.127 ± 0.431 ^a	29.806 ± 0.410 ^a	29.303 ± 0.490 ^a
D组	30.823 ± 0.403 ^a	31.337 ± 0.462 ^a	31.200 ± 0.332
E组	9.563 ± 0.506	8.177 ± 0.287	31.823 ± 0.554

注:^a:分别与A、E、B三组比较, P 均 < 0.05

三、讨论

近年的研究显示,PD患者脑内存在小胶质细胞的活化反应。很早之前研究PD机制,主要以动物实验为主,这就存在很多不确定的影响因素,随着不断地探索及技术的进步,人们趋向建立细胞模型,以排除一些不确定因素,此时主要是以一些类似多巴胺神经元功能的肿瘤细胞(如PC12)为主研究对象,即使这样,也达不到研究PD机制的细胞模型要求,随后出现了神经元细胞与小胶质细胞共培养,但是纯度不是很高,为精确细致地研究PD发病机制,常常需要在单细胞水平上对神经细胞进行生理生化特性的探讨。因此,高纯度、高质量地进行神经细胞原代培养是进行下一步研究的关键。OX-42是小胶质细胞表面的补体Ⅲ型受体(CR3),是小胶质细胞的特异性抗体。TH是多巴胺能神经元胞体中合成的一种重要限速酶,在PD发生发展中起着重要作用,被认为是多巴胺能神经元的标志^[3]。我们运用新生大鼠通过纯化小胶质细胞培养方法和高纯度多巴胺能神经元培养方法,经细胞免疫化学法检测到高纯度、高质量的小胶质细胞和多巴胺能神经元。正如本研究结果显示,图1中OX-42阳性细胞为小胶质细胞,呈分枝状;图2中TH阳性细胞是多巴胺能神经元,呈梭形或锥形。

LPS是革兰阴性杆菌细胞壁主要成分,是一种经典而高效的小胶质细胞活化激动剂^[4]。通过与小胶质细胞上的LPS蛋白结合,从而激活小胶质细胞,并使其表达和释放多种细胞因子和

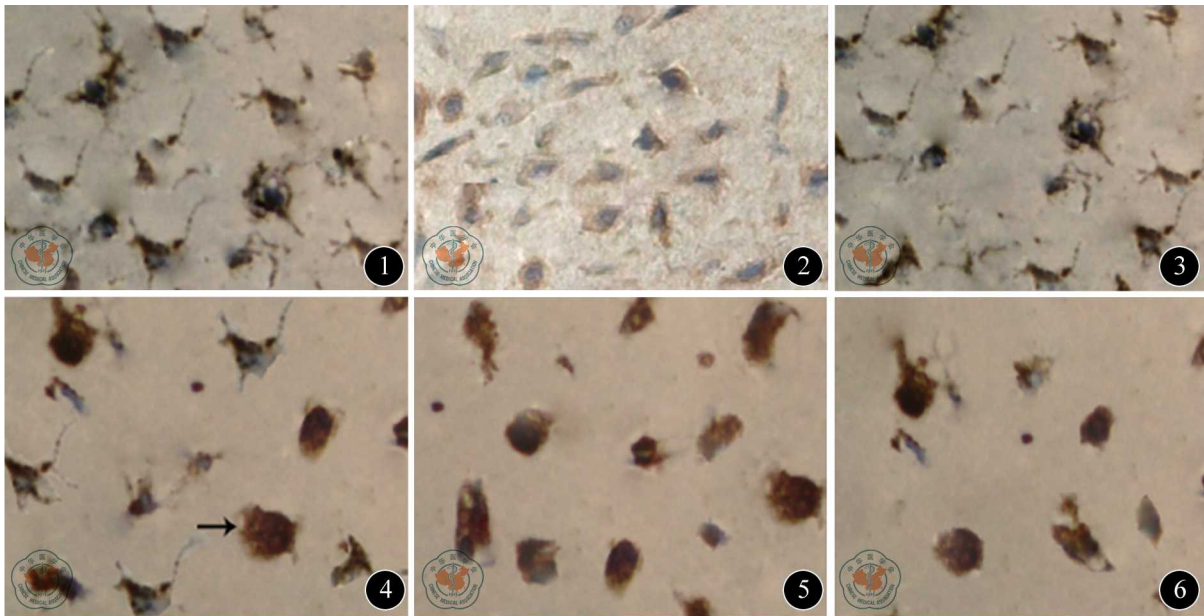


图1 OX-42阳性细胞呈分枝状(×400) 图2 TH阳性神经元呈梭形(×200) 图3 正常对照组,培养24 h(×400) 图4 终浓度10 mg/ml LPS,培养12 h(×400) 图5 终浓度10 mg/ml LPS,培养24 h(×400) 图6 终浓度10 mg/ml LPS,培养48 h(×400)

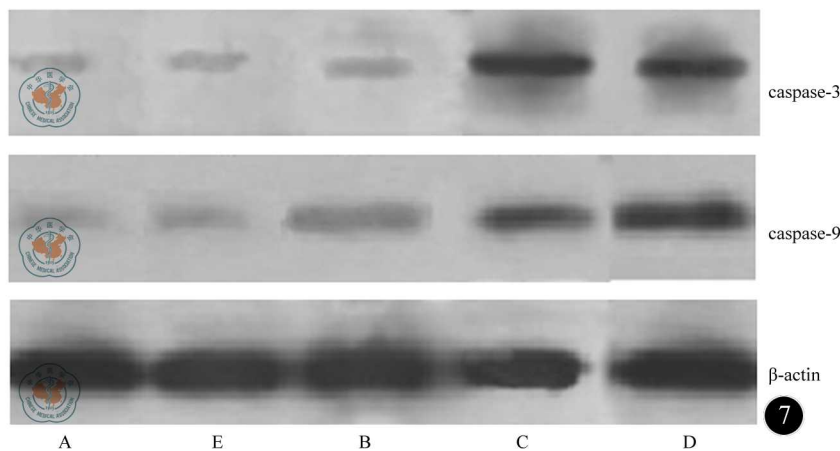


图7 Western-blotting结果分析

细胞毒性物质,通过触发免疫应答、激活多种蛋白酶而发挥杀伤性作用^[5]。本研究结果发现,如图3所示,由未加LPS的培养液培养24 h的细胞呈典型的分枝状,证明小胶质细胞处于静止状态;图4、5、6均用加有LPS的培养液对细胞进行培养不同时间,结果显示,LPS激活后细胞体积增大,胞核大而圆,形成不规则的阿米巴样细胞,提示小胶质细胞处于激活状态。然而,培养12 h组中还有未活化的小胶质细胞,培养24 h之后未见到静止状态的小胶质细胞,结果与Peng等^[6]的离体实验结果一致。此外有研究发现,LPS对神经元没有直接的毒性损伤作用^[7],与本研究结果相符。从本研究的MTT实验结果可以显示,E组为直接向多巴胺能神经元中加入终浓度为10 mg/ml LPS,其多巴胺能神经元存活率为(99.2 ± 7.8)%,与C、D两组比较有统计学意义($P < 0.05$)。因此,多巴胺能神经元的死亡与小胶质细胞活化直接相关联。

小胶质细胞是脑内固有的抗原呈递细胞和主要的免疫效应细胞,通常情况下,小胶质细胞处于静止状态,呈典型的分枝状。小胶质细胞对外界环境刺激十分敏感,当受到炎症、毒性物质刺

激时,可迅速活化为阿米巴样,从而产生大量自由基和神经毒性物质介导神经元的损伤。有研究发现,小胶质细胞的激活先于多巴胺能神经元的丢失,同时非甾体类抗炎药的应用并没有增加PD的风险^[8],其活化程度与多巴胺能神经元的死亡成正比^[9]。从本实验MTT结果可以看出,A组是用未活化的小胶质细胞条件培养液进行神经元培养,结果未见有明显多巴胺能神经元死亡。B、C、D三组是用不同活化程度的小胶质细胞条件培养液进行培养,显示的神经元存活率也不同,三组中神经元存活率较对照A组均降低。其中B组是未完全活化的小胶质细胞条件培养液,与A组比较无统计学意义,这就证实了多巴胺能神经元损伤不仅与活化的小胶质细胞有关,而且还与活化小胶质细胞的数量有密切关系,柏秀娟等^[10]研究发现,只有当多巴胺能神经元数目减少到一定程度,至少要减少50%以上,临床上才可以出现症状,C、D两组为培养24 h后完全活化的小胶质细胞条件培养液,神经元的存活率分别为(87.4 ± 4.6)%、(87.5 ± 7.3)%,与A、B、E三组比较有统计学意义($P < 0.05$)。这就证明,活化的小胶质细胞可导致多巴胺能神经元变性、坏死,是构

成 PD 炎症损伤机制的重要环节。

Cai 等^[11]发现多巴胺能神经元存在细胞凋亡特性。caspase 是相关蛋白酶家族的成员,是细胞凋亡的效应器,也是凋亡的关键酶和执行者,同时也是细胞凋亡蛋白级联反应的必经通路。近年的研究发现^[12],caspase-3、caspase-9 不仅是神经细胞凋亡的执行者,同时也直接参与了神经退行性疾病的致病机制。本实验研究中的 Western-blotting 结果显示,A、E、B 三组仅有微量的 caspase-3、caspase-9 蛋白表达,其中 B 组 caspase-9 蛋白与 A、E 两组比较有统计学意义,而相应的 MTT 结果,B 组与 A、E 无统计学意义,这其实从另一个侧面证实了多巴胺能神经元的损伤在蛋白水平层面的变化早于细胞水平层面的变化,对多巴胺能神经元损伤检测更敏感,但是 B 组 caspase-9 蛋白表达量并不更多,而 C、D 两组蛋白表达量明显增多,可能与大量小胶质细胞激活促进毒性细胞因子的释放,从而激活凋亡蛋白级联反应,使 caspase-3、caspase-9 蛋白表达量显著增加,最终导致细胞凋亡有关。本研究结果提示,抑制小胶质细胞的活化增生可能成为延缓多巴胺能神经元变性死亡的新方法。

参 考 文 献

- [1] 于腾波,程永帅,寇德伟,等. 三种原代小胶质细胞纯化培养方法的对比及分析. 山东医药,2008,48:4-6.
- [2] 白龙梅,李学忠,张志琳,等. 一种高纯度多巴胺能神经元原代培养方法的建立. 细胞与分子免疫学杂志,2008,24:403-405.
- [3] Boado RJ,Zhang Y,Pardridge WM. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. Biotechnol Bioeng,2007,96:381-391.
- [4] Vizuete KL,Merino M,Venero JL,et al. Histamine infusion induces a

selective dopaminergic neuronal death along with an inflammatory reaction in rat substantia nigra. J Neurochem,2000,75:540-552.

- [5] Stence N,Waite M,Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. Glia,2001,33:256-266.
- [6] Peng GS,Li G,Tzeng NS,et al. Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary mid-brain cultures: role of microglia. Brain Res Mol Brain Res,2005,134:162-169.
- [7] Giasson BI,Ischiropoulos H,Lee VM,et al. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Free Radic Biol Med,2002,32:1264-1275.
- [8] Driver JA,Loqroschino G,Lu L,et al. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease: nested case-control study. BMJ,2011,342:d198.
- [9] Cisschetti F,Brownell AL,Williams K,et al. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. Eur J Neurosci,2002,15:991-998.
- [10] 柏秀娟,尚延昌,王炜,等. 帕金森病的研究进展. 现代生物学进展,2010,10:178-181.
- [11] Cai Z,Zhao B,Ratka A. Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. Neuromolecular Med,2011,13:223-250.
- [12] Fasulo L,Ugolini G,Visintin M,et al. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. J Neurochem,2000,75:624-633.

(收稿日期:2011-10-31)

(本文编辑:戚红丹)

王大力,赵鹏,刘强,等. 脂多糖诱导小胶质细胞活化对多巴胺能神经元的损伤作用[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(8):2213-2216.

中 华 临 床 医 师 杂 志