

文章编号:1000-5404(2013)04-0355-03

## 短篇论著

# 脑创伤后大鼠血清作用下小胶质细胞主要组织相容性复合物 II 的表达

马栋斌<sup>1</sup>, 闫 华<sup>2</sup>, 苏 心<sup>2</sup>, 亢建民<sup>2</sup> (300070 天津, 天津医科大学研究生院<sup>1</sup>; 300060 天津, 天津市环湖医院神经外科<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 观察大鼠脑创伤后,不同时间点的血清刺激体外培养的大鼠小胶质细胞后 MHC- II 分子的表达。方法 采用改良 Feeney 自由落体法构建大鼠颅脑损伤模型,20 只 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组 5 只、假手术组 5 只和创伤组 10 只,创伤组按伤后时间分为 2、4、8、16、24 h 5 个采血点,在伤后不同时间点采用眼眶取血法,取静脉血离心后得血清刺激原代培养的大鼠小胶质细胞,培养 24 h 后流式细胞仪测定小胶质细胞 MHC- II 的表达。结果 正常大鼠脑内小胶质细胞一般为静息状态,MHC- II 微量表达;假手术组有较低表达;创伤组各个时间点均有表达,且随着时间的推移,MHC- II 表达增高。创伤组与对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 大鼠脑损伤后的血清可使小胶质细胞 MHC- II 的表达增高。

**[关键词]** 颅脑损伤;小胶质细胞;MHC- II

**[中图分类号]** R-332;R394.2;R651.15

**[文献标志码]** A

中枢神经系统(central nervous system, CNS)因被血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)保护、缺乏淋巴系统和免疫细胞而被称为“免疫豁免”区域,但脑内很多疾患的发生、发展中均伴有免疫反应<sup>[1]</sup>。

小胶质细胞(microglia, MG)在中枢神经系统分布较广,占胶质细胞的 10%~20%,在 CNS 中起着支持、营养、保护及修复等重要功能,是神经系统中具有代表性的免疫细胞<sup>[2]</sup>。既往在神经退行性疾病和感染方面,对小胶质细胞研究较多。据报道,体外培养的小胶质细胞在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的作用下可以被激活而释放 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  以及其他多种炎性分子<sup>[3]</sup>。主要组织相容性复合物 II (major histocompatibility complex, MHC- II)具有向 CD4<sup>+</sup>T 细胞的受体提呈抗原肽的能力,在启动 CD4<sup>+</sup>T 细胞的应答中,表达于活化后小胶质细胞表面的 MHC- II 起关键作用<sup>[4]</sup>。

本实验拟建立大鼠外伤模型,用外伤后不同时间点的血清刺激原代培养的小胶质细胞,观察小胶质细胞表达 MHC- II 的情况,旨在为提高颅脑外伤临床治疗,改善患者预后提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验动物 出生 24 h 内 SD 大鼠 42 只,健康成年 SD 大鼠 20 只,雌雄各半,体质量(300 $\pm$ 20)g,购自解放军军事医

学科学院第四研究所,动物在安静、温暖、避强光的环境中饲养。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM/F12 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),兔抗大鼠 iba1 多克隆抗体(Santa Cruz 公司),DAPI(武汉博士德公司),FITC 标记的小鼠抗大鼠 MHC- II (eBioscience 公司),流式细胞仪(BD 公司)。

1.1.3 动物分组 20 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 3 组,分别为对照组 5 只、假手术组 5 只及创伤组 10 只。

### 1.2 方 法

1.2.1 颅脑创伤模型的建立 创伤组 SD 大鼠经水合氯醛(1 mg/kg)腹腔注射麻醉后,剪去头部毛发固定大鼠,矢状正中切开头皮,暴露顶部,于右侧中线旁 2 mm、冠状缝后 4 mm 处,用牙科钻钻一直径约 5 mm 骨窗。采用改良 Feeney 自由落体法制作颅脑损伤动物模型,缝合头皮,消毒后放回笼内饲养,正常喂养;假手术组除不打击外,余处理同创伤组;对照组单纯麻醉不致伤。各组大鼠经眼眶静脉取血后,离心得血清,按组号放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

1.2.2 小胶质细胞的原代培养 取 42 只出生 24 h 内的 SD 大鼠在无菌条件下剪开颅骨,取出脑组织至盛有加糖 D-Hanks 液的培养皿中仔细剔除表面血管和脑膜组织;用剪刀剪碎脑组织块(1~3 mm),加入比组织块总量多 10~20 倍的胰酶,在 37 $^{\circ}$ C 条件下用吸管反复吹打至消化液变混浊;加入完全培养液(DMEM 培养液 + 10% 胎牛血清)终止消化,再次吹打制成单细胞悬液,将细胞悬液转移至消毒离心管中,配平;800 r/min (半径 13.5 cm)离心 10 min,弃上清;经 200 目筛网过滤后,接种入 21 个 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶,置于培养箱中,37 $^{\circ}$ C 条件下培养;7 d 后更换 1 次培养液,以后不换液培养,并在倒置显微镜下观察细胞的生长和存活情况。

1.2.3 小胶质细胞的分离、纯化 细胞培养 10~12 d 后,用无血清 DMEM/F12 培养基配制盐酸利多卡因注射液至工作浓

[通信作者] 亢建民, E-mail: kangjianmin168@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121211.1308.004.html> (2012-12-11)

度(12 mmol/L)。加入盐酸利多卡因溶液3~5 min后,即可见位于上层的小胶质细胞开始悬浮,37℃、5% CO<sub>2</sub>培养10 min后可见大量细胞悬浮,用恒温振荡器37℃振荡1 h。收集细胞悬液,1 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心5 min,收集细胞,接种于预先埋植盖玻片的培养皿中,余细胞接种于21个25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,30 min后完全换液1次,去除未贴壁细胞。

1.2.4 小胶质细胞的鉴定 细胞爬片经PBS充分洗涤后,多聚甲醛固定30 min,PBS漂洗3次,每次5 min;0.3% Triton X-100室温孵育15 min以破膜;PBS漂洗3次,每次5 min,10%山羊血清封闭;加入兔抗大鼠iba1多克隆抗体,4℃过夜;PBS漂洗3次,每次5 min;加FITC标记的山羊抗兔IgG二抗,避光、37℃孵育1 h;PBS漂洗3次,每次5 min,加DAPI(1:5 000)5 min,PBS漂洗3次,每次5 min,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 小胶质细胞与血清共培养 21个培养瓶随机分成7组,对照组、假手术组和创伤后2、4、8、16、24 h,每组3个。每个培养瓶中加入制得的血清500 μL,37℃、5% CO<sub>2</sub>培养24 h。

1.2.6 MHC-II表达变化的检测 中止培养,0.125%胰酶消化细胞,计数的每个样品含10<sup>6</sup>个细胞,PBS洗涤细胞2次,以1 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心5 min。留取细胞沉淀,分别加入FITC标记小鼠抗大鼠MHC-II单克隆抗体1 μg,阴性对照加入同型对照抗体1 μg,重悬细胞,避光30 min后,以PBS洗2次,加入样品稀释液500 μL,采用流式细胞仪检测。

### 1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 13.0统计软件行独立样本*t*检验。

## 2 结果

### 2.1 胶质细胞混合培养

细胞接种培养24 h开始贴壁,混合胶质细胞培养至7~8 d时,小胶质细胞、成纤维细胞开始生长增多,倒置显微镜下可见细胞分层明显。其中下层为呈多角形的星形胶质细胞,上层主要为散在分布的小胶质细胞,大部分胞体小、折光性强、以圆形多见(图1)。

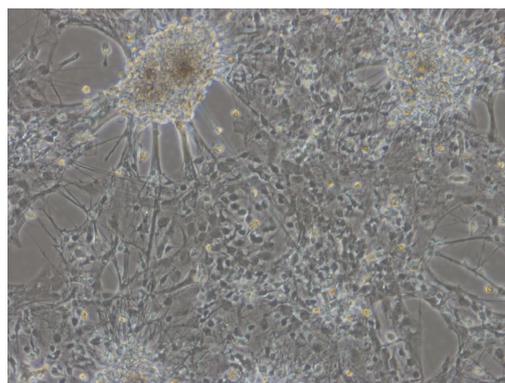


图1 后代细胞培养第8天后混合胶质细胞分层情况细胞分层观察(倒置显微镜×100)

### 2.2 分离培养的小胶质细胞的鉴定结果

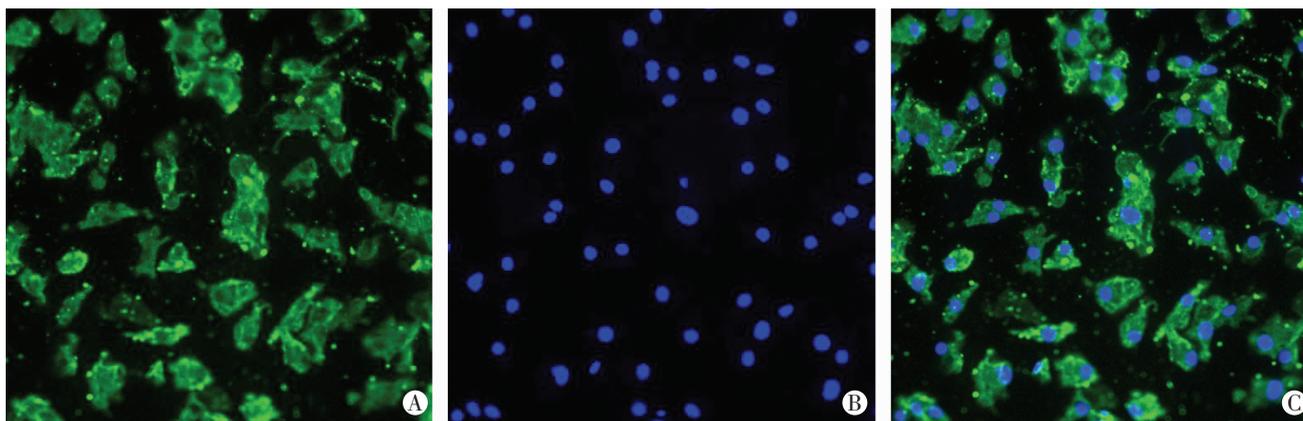
小胶质细胞经免疫荧光检测,iba1抗体染色阳性细胞≥90%。见图2。

### 2.3 流式细胞仪检测MHC-II类分子的表达

在对照组中,MHC-II阳性的有微量表达,表达率为(8.7±1.5)%;假手术组有少量表达,表达率为(11.7±1.1)%;二者比较无统计学差异( $P > 0.05$ );创伤组中:2 h的表达率为(56.9±2.4)%,4 h的表达率为(70.0±1.5)%,8 h的表达率为(78.2±5.3)%,16 h的表达率为(83.0±1.8)%,24 h的表达率为(86.2±1.1)%,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

脑外伤后局部发生创伤性炎症反应,其主要包括炎性细胞浸润和炎性因子的产生、释放,并由此引起血脑屏障的破坏,继发性脑水肿,氧自由基和一氧化氮的产生。小胶质细胞在脑创伤后继发性脑水肿和神经元损伤中可能起重要作用<sup>[5]</sup>。静息状态下的小胶质细胞胞质浓缩,有多个细长突起,一些特异性的膜分子(如MHC-II、补体受体CR3等)低水平表达,胞质内无吞噬体及非特异性酶活性,不产生自由基,无吞噬能



A: iba1染色;B: DAPI染色;C: A、B融合像  
图2 小胶质细胞纯化后的鉴定结果(荧光显微镜×200)

力降。细胞只是通过简单的吞饮起到清除代谢产物,维护组织稳定的净化作用<sup>[6]</sup>。当其受到激活后会产生大量的超阴离子、一氧化氮、兴奋性氨基酸、神经毒素及细胞因子导致神经元死亡,加重中枢神经系统的病理损伤<sup>[7]</sup>。本实验将大鼠脑外伤后的血清与小胶质细胞共培养的期间发现小胶质细胞的形态发生了变化,表现为:形态清楚,胞体变大,突起伸长变粗,突起上可见到小棘,胞体呈“阿米巴”或“变形虫”状,随激活时间的不同,细胞形态和数量有变化。这与文献<sup>[8]</sup>报道的是相一致的。

小胶质细胞作为中枢神经系统的抗原呈递细胞,可以表达 MHC- II,并被 CD4<sup>+</sup>T 细胞识别。激活后的 CD4<sup>+</sup>T 细胞克隆增殖并合成和分泌大量各种细胞因子,这些效应因子各自通过作用于胶质细胞或者神经元促进其他炎症分子的产生,促成了炎症反应形成和炎性产物水平持续升高,并贯穿于整个病理过程<sup>[9]</sup>。

本研究结果显示,在大鼠脑外伤后的血清刺激原代小胶质细胞 24 h 后,对照组的 MHC- II 极少表达。假手术组中 MHC- II 有较低表达,我们分析可能有以下几点原因:①局部伤口产生炎症因子释放入血。大鼠头部伤口愈合的过程中势必产生炎症反应,少量某些炎性因子(TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )可以进入血循环。有研究表明,IFN- $\gamma$ 受体明显而稳定的在静息小胶质细胞上表达,脑内注射 IFN- $\gamma$ 时,可诱导小胶质细胞 MHC- II 分子的表达<sup>[10]</sup>;②切皮、磨颅骨的过程可能引起大鼠应激反应,造成体内内分泌的改变。神经-内分泌-免疫是一个相互联系的复杂网络,任何一个环节发生了改变都会影响到整个网络。我们推测假手术模型得建立可能影响某些其他激素、神经递质、细胞因子的变化,致使组织细胞内 cAMP、cGMP 水平的变化,从而启动某些 MHC- II 基因转录通路,使小胶质细胞表达 MHC- II<sup>[11]</sup>。

本组研究结果还发现,创伤组小胶质细胞的 MHC- II 表达显著上调,与脑外伤后炎症因子大量释放密切相关。颅脑创伤后,血脑屏障遭到破坏,脑组织暴露在血液中,一方面,在胚胎发育过程中与机体免疫系统隔离的“脑抗原”被血液中免疫细胞所识别;另一方面,外伤后,机体全身炎症反应和激活的补体系统产生的各种细胞因子、微小蛋白会激活中枢神经系统内的免疫细胞,从而对脑细胞发起攻击。活化后的小胶质细胞还可表达 OX40L,后者与 CD4<sup>+</sup>T 细胞上的

OX40 相互作用可促进 T 细胞的增殖存活和记忆性 T 细胞产生,从而影响细胞免疫和免疫耐受。我们推测脑外伤后大鼠的血清中含有一些能让小胶质细胞活化的因子或蛋白,并且随着外伤后时间的推移,一段时间内这些物质在血液中的浓度是升高的,使得小胶质细胞 MHC- II 表达具有一定时间依赖性。

小胶质细胞的活化并不是由单一因素引起的,可能与多种机制相关,本实验只是探讨了其中一个方面。相信随着小胶质细胞免疫方面作用的深入研究,我们或许可以通过抑制小胶质细胞活化、建立免疫耐受等方法达到减少继发性脑损伤的目的,有助于未来为提高临床治疗颅脑损伤提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1] 吴瑞,刘玲,彭正午,等. IgG 刺激诱发的小胶质细胞 Toll 样受体 4 表达及细胞因子分泌[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(3): 201-203, 207.
- [2] 周杰,章翔,蒋晓帆,等. 白藜芦醇对脑创伤后小胶质细胞激活的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007, 6(1): 39-43.
- [3] Olson J K, Miller S D. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs[J]. J Immunol, 2004, 173(6): 3916-3924.
- [4] 柏秀娟,张绪清. MHC II 类反式激活因子在上调 HepG2 细胞 HLA II 类分子表达中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2019-2022.
- [5] 缪星宇,刘晓斌,岳青,等. 去铁胺对大鼠脑出血后小胶质细胞活化的抑制及其继发性神经损伤的保护作用[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(7): 970-975.
- [6] Wojtera M, Sikorska B, Sobow T, et al. Microglial cells in neurodegenerative disorders[J]. Folia Neuropathol, 2005, 43(4): 311-321.
- [7] 杨蕴天,江新梅,林世和. P $\alpha$ P105-132 作用下体外小胶质细胞的活化及其 IL-8 的产生[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(23): 3502-3504.
- [8] 周杰,章翔,蒋晓帆,等. 大鼠脑创伤后小胶质细胞激活的时程及形态变化研究[J]. 中国临床神经外科杂志, 2006, 11(4): 226-229.
- [9] 陈实,朱刚. 缺氧增加小鼠小胶质细胞 IRAK-4 的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(12): 1151-1153.
- [10] 王丽虹,程化坤. 小胶质细胞的免疫功能[J]. 国外医学:免疫学分册, 2005, 28(1): 37-40.
- [11] 张小森,李庆国. 颅脑损伤后神经内分泌改变的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(8): 1114-1116.

(收稿:2012-10-16;修回:2012-11-09)

(编辑 王小寒)