

· 论著 ·

帕金森病炎症 / 免疫异常细胞模型的建立

周慧芳,薛冰,李艳,牛东滨,王晓民(北京大学神经科学研究所,北京 100083)

摘要: 目的 观察小胶质细胞激活后形态和功能的变化,以探讨活化的小胶质细胞对多巴胺能神经元产生损伤作用的可能机制,阐明帕金森病发病的免疫机制。方法 建立原代小胶质细胞培养、筛选和鉴定的方法,以细菌细胞壁脂多糖为工具药激活小胶质细胞,通过免疫组化、MTT、ELISA 等方法观察小胶质细胞形态、数量和功能的变化。结果 LPS 激活的小胶质细胞体积增大,OX-42 表达上调,释放一氧化氮(Nitric Oxide, NO)、合成超氧阴离子(O_2^-)及分泌细胞因子 TNF- α 量显著增多,而细胞数量无明显改变。结论 激活的小胶质细胞对多巴胺能神经元的损伤作用,可能与释放 NO、 O_2^- 及细胞因子 TNF- α 等细胞毒性物质有关。

关键词: 帕金森病;小胶质细胞;免疫异常;细胞因子;一氧化氮

中图分类号: R742.5 文献标识码: A 文章编号:1671-8925(2003)01-048-04

Inflammatory/immune in vitro model of Parkinson's disease

ZHOU Huifang, XUE Bing, LI Yan, NIU Dongbin, WANG Xiaomin

Neuroscience Institute, Peking University, Beijing 100083, China

Abstract: Objective To investigate the inflammatory mechanisms of Parkinson's disease by observing the morphological and functional changes of activated microglia. **Methods** The methods of culturing, selecting and verifying the primary microglial cells were decided. Microglia were activated with LPS and then immunocytochemistry, MTT and ELISA were applied to the observation of the morphological characters, quantity and functional change of microglia. **Results** After treatment with LPS, it was observed that microglia had an obvious morphological change. The level of NO and superoxide enhanced. Cytokines such as TNF- α released from microglia increased greatly. But their quantity kept stable. **Conclusion** Activated microglia can produce many cytotoxic factors such as NO, superoxide and proinflammatory cytokines, which may be involved in the neurodegeneration.

Key words: Parkinson's disease; microglia; inflammation; cytokine; nitric oxide

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种多发于中老年期的中枢神经系统退变性疾病,其主要病理特征是黑质致密部多巴胺(Dopamine, DA)能神经元进行性死亡,导致纹状体 DA 含量下降。PD 的发病机制至今不清,其中免疫异常学说日益受到关注^[1]。在 PD 患者脑中,小胶质细胞异常激活,主要分布于死亡的 DA 能神经元周围。小胶质细胞的持续异常激活可能对黑质致密部的 DA 能神经元具有损伤作用^[2],但损伤作用的具体机制不明。

本研究通过培养乳鼠原代小胶质细胞,用细菌细胞壁脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为工具药激活小胶质细胞,建立炎症 / 免疫异常细胞模型,观察细胞形态和功能的变化,探讨激活的小胶质细胞对 DA 能神经元产生损伤作用的可能机理,阐明 PD 发病的免疫机制。

收稿日期:2002-09-05

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)-脑功能与脑重大疾病基础研究项目(1999054000)及国家自然科学基金资助项目(30271494)

作者简介:周慧芳(1971-),女,山西晋阳人,1997 年毕业于山西医科大学,北京大学神经科学研究所读博士研究生,电话:010-62091150, E-mail: zhuhf@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

37 ℃ 恒温摇床为德国 Heidolph 公司产品;ELISA 酶标仪及微孔板清洗器为美国 BIO-RAD 公司产品;DMEM/F12 (1:1) 培养基、胰酶和胎牛血清为 GIBCOL 公司产品;LPS、4-甲基偶氮唑蓝(MTT)、(12-)(-十四酸佛波酯(-13-)(-乙酸盐(PMA)、细胞色素 C 及超氧化物歧化酶(SOD)为 SIGMA 公司产品,OX-42 单克隆抗体为 CHEMICON 公司产品,氨基苯磺酸和 N-(1-萘基)乙二胺为 FLUKA 公司产品,SP 免疫组化试剂盒购自北京中山公司,大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒为 ENDOGEN 公司产品;出生 24 h 之内的 Sprague-Dawley(SD)乳鼠由北京大学医学部实验动物科学部提供。

1.2 方法

1.2.1 乳鼠原代小胶质细胞的培养、筛选和鉴定 取出生 24 h 之内的 SD 乳鼠,无菌条件下取全脑,剥除脑膜,切成直径约 1 mm 的小块;加 0.125% 胰酶,37 ℃ 消化 25 min; 200 目细胞筛过滤后,接种在用多聚赖氨酸(12.5 μg/ml)处理过的细胞培养瓶内,密度

为 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$;37℃、5% CO₂条件下培养。2周后将原代培养物置于37℃恒温摇床上,200 r/min震摇4 h,收集脱落到上清液中的细胞,以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度种于6孔板,3 h后换液去除不贴壁的细胞,细胞稳定24 h后进行小胶质细胞特异性标志物OX-42免疫组化染色,对细胞进行鉴定。免疫组化染色步骤按试剂盒说明书进行。OX-42阳性率计数方法为:在相差显微镜下计数5个高倍视野,计算OX-42阳性细胞数占总细胞数的百分比,每次计数3孔,本实验重复3次。

1.2.2 MTT法检测LPS对小胶质细胞数量的影响 基本原理:MTT在活细胞线粒体琥珀酸脱氢酶的作用下,被还原成蓝色甲瓒颗粒,形成量与活细胞数和琥珀酸脱氢酶活性呈正相关。将小胶质细胞接种于96孔板,接种密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$,分别加入0.031、0.062、0.125、0.25、0.5、1 μg/ml LPS,作用24 h后,加入0.5 mg/ml MTT,反应4~6 h,加入助溶剂,37℃过夜。在波长570 nm处测定吸光度。

1.2.3 Griess反应检测一氧化氮(nitric oxide, NO)生成量 基本原理:生物系统中的NO释放后很快转变为NO₂⁻和NO₃⁻,后两者性质稳定,因而可以通过测定NO₂⁻或NO₃⁻来间接反应NO生成量。NO₂⁻在酸性环境下与对氨基苯磺酸起加成反应,其产物与N-(1-萘基)-乙二胺发生反应,反应产物在548 nm处有吸收峰。将小胶质细胞接种于96孔板,接种密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$,分别加入0.031、0.125、0.25、0.5及1 μg/ml LPS,作用24 h,取上清100 μl立刻测定样品中NO₂⁻含量。将NaNO₂溶于DMEM/F12作为标准品,样品或标准品中加入50 μl 1%氨基苯磺酸和50 μl 1% N-(1-萘基)乙二胺,避光反应10 min,在波长570 nm处测吸光度。另外用0.25 μg/ml LPS,分别处理3、6、12、24和48 h,取上清按上述方法测定NO₂⁻含量。

1.2.4 高铁细胞色素C还原法检测超氧阴离子的形成 基本原理:O₂⁻可将高铁细胞色素C还原为亚铁细胞色素C,后者在550 nm处有吸收峰。原代小胶质细胞以 $10^6/\text{ml}$ 的密度种植于96孔板,分别用0.01、0.1和1 μg/ml LPS处理24 h后,用无酚红的Hank's液洗3次,然后加入100 nmol/L PMA和60 μmol/L细胞色素C,部分孔加入300 U/ml SOD,37℃、5% CO₂孵育90 min,570 nm波长下测定吸光度。含SOD孔和不含SOD孔吸光度的差值乘以系数15.87后,即为O₂⁻的含量(nmol)。用0.01 μg/ml LPS分别处理小胶质细胞6、12、24 h后,用上述方法测定O₂⁻含量。

1.2.5 细胞培养上清液中TNF-α含量检测 ELISA基本原理:用特异性单抗包被的酶标板吸附待测抗原,再顺次将生物素标记的单抗、结合辣根过氧化物

酶的链酶卵白素连接于待测抗原,加底物TMB显色,波长450 nm处测吸光度。将小胶质细胞种于96孔板,加入0.25 g/ml LPS,分别作用3、6、12和24 h后,取细胞上清液,-80℃保存,用于TNF-α含量测定。

1.3 统计方法

多组间的比较用One-way ANOVA,继之以Newman Keuls后检验,Prism3.0软件进行统计分析。

2 结果

2.1 OX-42免疫组化染色结果

OX-42阳性信号位于细胞膜表面(图1),统计结果显示:用恒温摇床分离后,OX-42阳性率>95%。静止小胶质细胞,细胞体积较小,OX-42表达水平较低(图1A);0.25 μg/ml LPS处理24 h后,细胞体积增大,OX-42表达水平上调(图1B)。

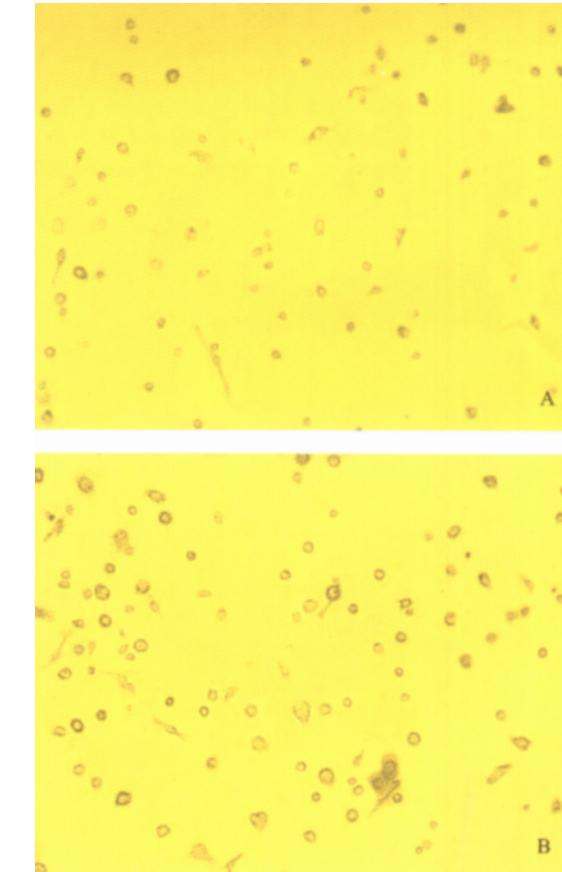


图1 小胶质细胞特异性标志OX-42免疫组化染色结果($\times 100$)
Fig.1 Photograph of OX-42 immunocytochemistry ($\times 100$)
A: Resting microglia. B: Microglia treated with 0.25 μg/ml LPS for 24 h

2.2 MTT法检测LPS对小胶质细胞数量的影响

LPS浓度为1 μg/ml时,OD570与对照组比较差异有显著性($P<0.05$),表明LPS在此浓度可使小胶质细胞数量减少,而0.031、0.062、0.125、0.25、0.5 μg/ml的LPS处理24 h不影响小胶质细胞的活力(图2)。

2.3 Griess 反应检测 NO 生成量

LPS 浓度小于 0.25 μg/ml 时, 随 LPS 浓度增大, NO 释放量很快增加, 达 3.82 μmol/L。LPS 浓度大于 0.25 μg/ml 时, 曲线趋于平缓(图 3)。随后以 0.25 μg/ml LPS 处理小胶质细胞, 可见 NO 释放量随时间延长而增加,LPS 作用 3~6h,NO 释放量变化不大, 以后随时间延长 NO 释放量迅速增加,LPS 作用 48 h,NO 释放量达到 15 μmol/L 左右(图 4)。

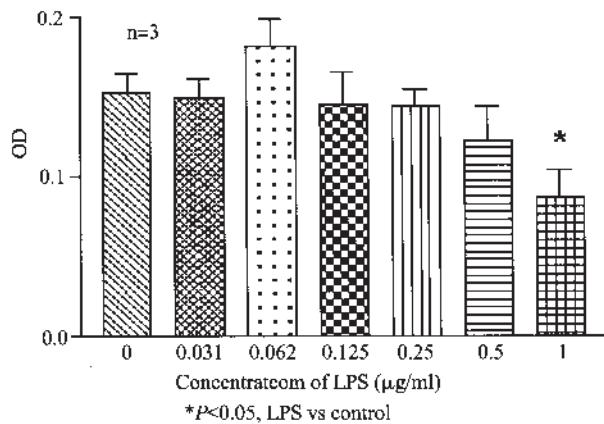


图 2 不同浓度的 LPS 对原代培养的小胶质细胞活力的影响
Fig.2 Effect of LPS on cell viability of primary microglial cell

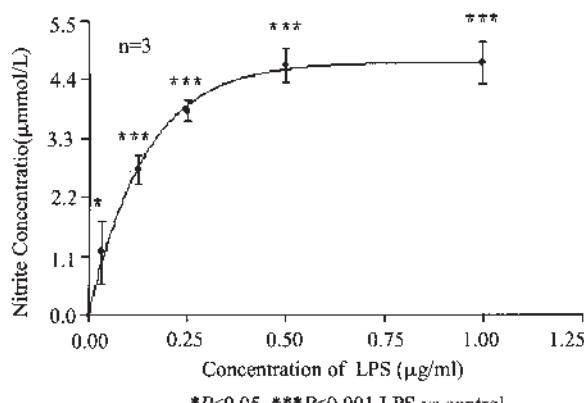


图 3 LPS 刺激原代小胶质细胞释放 NO 的量效曲线
Fig.3 Effect of LPS on nitrite formation in the supernatants of primary microglial cells

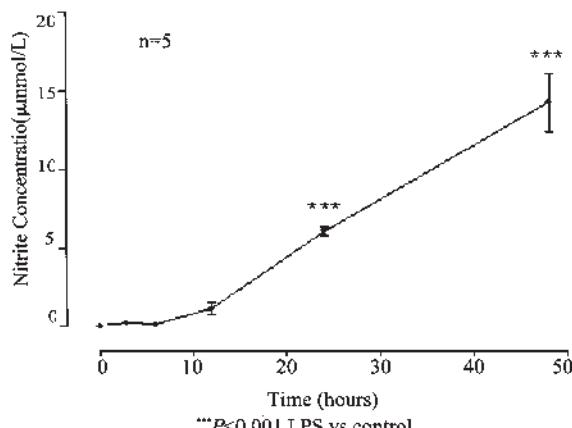


图 4 0.25 μg/ml LPS 刺激原代小胶质细胞释放 NO 的时效曲线
Fig.4 NO release of primary microglia at different time point after 0.25 μg/ml LPS stimulation

2.4 高铁细胞色素 C 还原法检测超氧阴离子的形成

0.01、0.1、1 μg/ml LPS 均可刺激小胶质细胞释放 O₂⁻, 三个剂量之间的差异无显著性(图 5)。随后我们观察了 0.01 μg/ml LPS 作用不同时间 O₂⁻释放量的变化, 可见随时间延长 O₂⁻释放量明显增加(图 6)。

2.5 ELISA 法检测 TNF-α 分泌量

在 12 h 内 TNF-α 释放量随 LPS 作用时间延长明显增加, 12 h 时细胞培养上清液中 TNF-α 的浓度

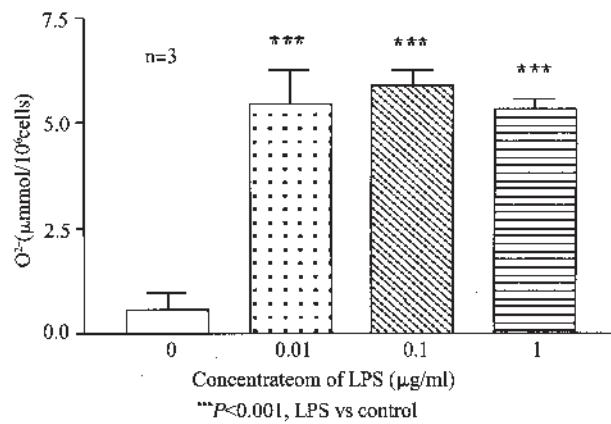


图 5 LPS 刺激原代小胶质细胞释放 O₂⁻的量效曲线
Fig.5 Effect of LPS on O₂⁻ formation in the supernatants of primary microglial cell

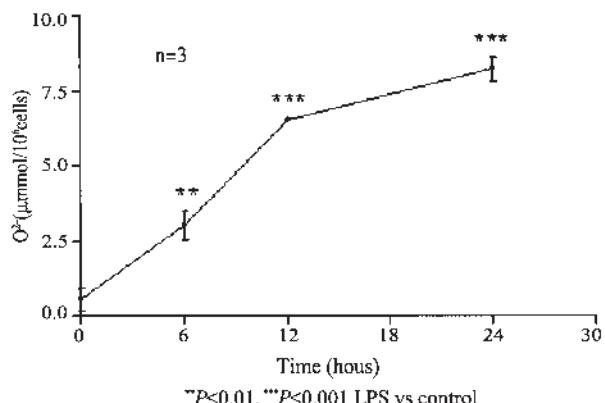


图 6 0.01 μg/ml LPS 刺激原代小胶质细胞释放 O₂⁻的时效曲线
Fig.6 O₂⁻ formation of primary microglia at different time point after 0.01 μg/ml LPS stimulation

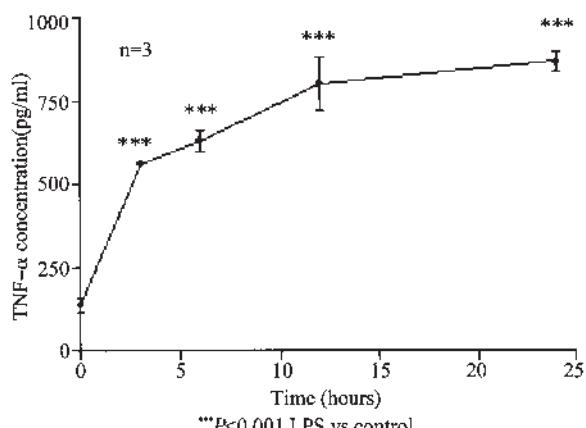


图 7 0.25 μg/ml LPS 刺激原代小胶质细胞释放 TNF-α 的时效曲线
Fig.7 TNF-α release from primary microglia at different time point after 0.25 μg/ml LPS stimulation

约为 801.8 pg/ml。12~24 h, 曲线渐趋平缓, TNF- α 释放量增加速度降低(图 7)。

3 讨论

本实验的基础是建立稳定、高效的小胶质细胞分离纯化方法。目前所用的小胶质细胞分离纯化方法主要有三种:机械吹打、化学消化以及恒温摇床震荡分离。其中恒温摇床震荡分离因效果稳定,可重复性好而得以广泛应用。其主要原理:原代培养物在体外培养 14 d 后,神经元存活极少,星形胶质细胞和小胶质细胞分层生长,星形胶质细胞构成完整的底层,小胶质细胞在其上生长。小胶质细胞贴壁牢固性较差,在恒温摇床震荡处理时首先脱落,从而达到与星形胶质细胞分离的目的。与分离效果密切相关的是摇床的转速和震荡时间,国外各实验室所用的转速和时间不尽相同^[3,4],我们经过摸索发现 200 r/min 震荡处理 4 h 可以达到较好的分离效果,免疫组化结果显示,小胶质细胞的纯度在 95% 以上,且可重复性好,为进一步研究 LPS 对小胶质细胞的激活奠定了基础。

中枢神经系统中的小胶质细胞来源于胚胎期的骨髓单核细胞,是脑内免疫反应的抗原递呈细胞和主要的免疫效应细胞,在中枢神经系统免疫反应过程中发挥着非常关键的作用。正常情况下,脑内的小胶质细胞处于静止状态。在帕金森病、阿尔茨海默病、多发性硬化等神经退变性疾病过程中,小胶质细胞异常激活,它的作用除了吞噬清除变性死亡的神经元外,还分泌促炎因子和神经营养因子,可能参与炎症反应和神经元的修复与再生^[5]。但小胶质细胞在 PD 发病过程中的作用及作用机制尚有争议。所以我们选取小胶质细胞作为研究对象,以 LPS 为工具药激活小胶质细胞,模拟 PD 发病过程中小胶质细胞的改变,以研究小胶质细胞在 PD 发病过程中所起的作用,阐明 PD 发病的免疫机制。

小胶质细胞的形态具有可塑性,在静止状态为分支状,接受损伤信号刺激后细胞体积增大,突起伸长、增多,成为高度分化的小胶质细胞,这是介于静止和激活之间的一种中间状态,它们很快演变为激活的小胶质细胞和脑巨噬细胞^[6],所以可以根据形态的改变协助判断小胶质细胞是否处于激活状态。本实验显示 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 作用 24 h, 可使小胶质细胞的形态发生改变,细胞体积增大,小胶质细胞特异性标志物 OX-42 表达上调,类似于脑巨噬细胞,提示小胶质细胞处于激活状态。

本文结果显示在 LPS 作用下,NO 形成和释放量明显增加。NO 可抑制线粒体复合体 I 的活性,使线粒体合成 ATP 减少,细胞由于能量耗竭而死亡。NO

还可以与超氧阴离子发生反应形成毒性更大的亚硝酸盐自由基,直接攻击细胞的核酸、蛋白质、脂质等生物大分子,引起细胞死亡^[7]。

除 NO 和 O₂⁻ 外,激活的小胶质细胞可分泌多种细胞因子如 TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6、表皮生长因子等,而细胞因子与炎症反应的发生和神经元的损伤修复、再生密切相关。其中 TNF- α 在炎症反应过程中具有非常重要的作用,故我们选取它来进行研究。实验结果证实 LPS 能刺激小胶质细胞分泌 TNF- α , TNF- α 可促进星形胶质细胞和小胶质细胞合成集落刺激因子(colony stimulating factors, CSF)。CSF 可以作为白细胞趋化因子吸引血液循环中的粒细胞和巨噬细胞到达中枢神经系统的炎症部位,参与炎症反应,从而放大了炎症反应^[8]。TNF- α 还可诱导神经元 MHC I 表达上调,使它们易受 MHC I 限制性细胞毒性 T 细胞攻击^[9]。此外,TNF- α 可干扰神经元和星形胶质细胞的电生理特性,体外研究发现 TNF- α 可影响细胞膜电位、细胞内 Ca²⁺ 平衡和长时程增强,因此与炎症过程中的细胞功能异常有关^[10]。

作用时间为 24 h, 浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下时,LPS 对小胶质细胞的数量没有明显的影响。可见 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 作用 24 h, 细胞释放 NO、O₂⁻ 和 TNF- α 增加是由于细胞活化所致,而不是由于细胞数量增加。

本实验摸索了原代小胶质细胞的培养过程,建立了成熟的小胶质细胞的培养,筛选和鉴定方法;证实了 LPS 激活的小胶质细胞体积增大,释放 NO、超氧阴离子和细胞因子 TNF- α 等细胞毒性物质的量增加,这些毒性物质可能参与了 PD 发病过程中 DA 能神经元的退变。本研究结果为深入探讨帕金森病、阿尔茨海默病、多发性硬化等神经系统退变性疾病的发病机理及药物筛选奠定了基础。

参考文献:

- [1] Fiszer U, Piotrowska K, Korlak J, et al. The immunological status in Parkinson's disease [J]. Med Lab Sci, 1991, 48(3): 196~200.
- [2] Abramsky O, Litvin Y. Autoimmune response to dopamine-receptor as a possible mechanism in the pathogenesis of Parkinson's disease and schizophrenia [J]. Perspect Biol Med, 1978, 22(1): 104~114.
- [3] Liu B, Du L, Hong JS. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation [J]. J Pharmacol E, 2000, 293 (2): 607~617.
- [4] Le WD, Rowe D, Xie W, et al. Microglia activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease [J]. J Neurosci, 2001, 21(21): 8447~8455.
- [5] Pocock JM, Liddle AC. Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease [J]. Prog Brain Res, 2001, 132: 555~565.

- chemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal brain: differential distribution of isozyme 1 and 2 [J]. Mol Cell Neurosci, 1992, 3: 559-570.
- [4] Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: An endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system [J]. Neuron, 1996, 16(4): 835-842.
- [5] Pineda J, Kogan JH, Aghajanian GK. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel [J]. J. Neurosci, 1996, 16(4): 1389-1399.
- [6] Bernabeu R, Prince F, Stein ML, et al. Evidence for the involvement of hippocampal CO production in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning [J]. Neuroreport, 1995, 6(3): 516-518.
- [7] Pozzoli G, Mancuso C, Mirtella A, et al. Carbon monoxide as a novel neuroendocrine modulator: inhibition of stimulated corticotropin-releasing hormone release from acute rat hypothalamic explants [J]. Endocrinology, 1994, 135(6): 2314-2317.
- [8] Nathanson JA, Scavone C, Scanlon C, et al. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity [J]. Neuron, 1995, 14(4): 781-794.
- [9] Saller M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent NO synthase [J]. FASEB J, 1991, 291(1): 145-149.
- [10] Leffler CW, Nasletti A, Yu C, et al. Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs [J]. Am J Physiol, 1999, 276(5 Pt 2): H1641-1646.
- [11] Maines MD, Eke BC, Weber CM, et al. Corticosterone has a permissive effect on expression of heme oxygenase-1 CA1-CA3 neurons of hippocampus in thermal-stressed rats [J]. J. Neurochem, 1995, 64(4): 1769-1779.
- [12] Mattson MP. Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise [J]. Ann. NY Acad. Sci, 1994, 15(747): 50-76.
- [13] Shinomura T, Nakao S-I, Mori K. Reduction of depolarization-induced glutamate release by heme oxygenase inhibitor: possible role of carbon monoxide in synaptic transmission [J]. Neurosci Lett, 1994, 166(2): 131-134.
- [14] Mattson MP. Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise [J]. Ann. NY Acad. Sci, 1994, 15(747): 50-76.
- [15] Maines MD. Mice transgenic for heme oxygenase-1 show increased neuronal expression of the protein and decreased lipid peroxidation activity [M]. In Molecular Chaperones and the Heat Shock Protein, ed. C Georgopoulos, S Lindquist, R Morimoto, 1996. p. 231. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab.
- [16] Johnson RA, Colombari E, Colombari DSA, et al. Role of endogenous carbon monoxide in central regulation of arterial pressure [J]. Hypertension, 1997, 30(4): 962-967.
- [17] Kostoglou A I, Costa A, Navarra P, et al. Endotoxin stimulates an endogenous pathway regulating corticotropin-releasing hormone and vasopressin release involving the generation of nitric oxide and carbon monoxide [J]. J Neuroimmunol, 1998, 86(1): 104-109.
- [18] Li X, Clark JD. The role of heme oxygenase in neuropathic and incisional pain [J]. Anesth Analg, 2000, 90(3): 677-682.
- [19] Li X, Clark JD. Heme oxygenase type 2 plays a role in formalin induced nociception [J]. Pain, 2000, 86(1/2): 75-80.
- [20] Takizawa S, Hirabayashi H, Marsushima K, et al. Induction of heme oxygenase protein protects neurons in cortex and striatum but not in hippocampus, against transient forebrain ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(5): 559-569.
- [21] Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice [J]. J Neurochem, 1999, 72(3): 1187-1203.
- [22] Bianco F, Floris R. MRI appearances consistent with haemorrhagic infarction as an early manifestation of carbon monoxide poisoning [J]. Neuroradiology, 1996, 38(1): S70-72.
- [23] Shi Y, Pan F, Li H, et al. Role of carbon monoxide and nitric oxide in newborn infants with postasphyxial hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Pediatric, 2000, 106(6): 1447-1451.

~~~~~

### (上接 51 页)

- [6] Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis [J]. Prog Neurobiol, 1999, 57(6): 563-581.
- [7] Munoz-Fernandez MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system [J]. Prog Neurobiol, 1998, 56(3): 307-340.
- [8] Tweardy DJ, Glazer EW, Mott PL, et al. Modulation by tumor necrosis factor-alpha of human astroglial cell production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) [J]. J Neuroimmunol, 1991, 32(3): 269-278.
- [9] Benveniste EN, Sparacio SM, Bethea JR. Tumor necrosis factor-alpha enhances interferon-gamma-mediated class II antigen expression on astrocyte [J]. J Neuroimmunol, 1989, 25(2-3): 209-219.
- [10] Lynch MA. Age-related impairment in long-term potentiation in hippocampus: a role for the cytokine, interleukin-1 beta? [J]. Prog Neurobiol, 1998, 56(5): 571-589.