

· 论 著 ·

小胶质细胞 NF- κ B 与 AQP4 协同表达的研究郑 超¹, 吴海涛², 孙晓川^{2 Δ}

(1. 重庆市江北区第一人民医院神经外科 400020; 2. 重庆医科大学附属第一医院神经外科 400016)

摘要:目的 观察原代培养的小胶质细胞划痕损伤后 NF- κ B 与水通道蛋白质 4(AQP4)表达的相关性。方法 原代培养小胶质细胞,用免疫细胞化学鉴定其特异性表面标记物巨噬细胞分化抗原-1(Mac-1)抗体。采用划痕致伤构建细胞损伤模型。于伤后 12 h 及 1、3、5、7 d 用 RT-PCR 检测 NF- κ B mRNA 的表达,Western blot 检测 AQP4 蛋白的表达。结果 伤后 12 h, NF- κ B、AQP4 表达不显著,1 d 时表达达高峰,后逐渐降低,5、7 d 时几乎无表达。结论 致伤后, NF- κ B 与 AQP4 的表达具有协同性,炎症反应在创伤后脑水肿的发生、发展中发挥了重要作用。

关键词:小神经胶质细胞;NF- κ B;水通道蛋白质 4;协同表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.012

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)01-0030-02

The study of coordinate expression of NF- κ B and AQP4 on microglial cells postinjuryZheng Chao¹, Wu Haitao², Sun Xiaochuan^{2 Δ}

(1. Department of Neurosurgery, the First People's Hospital of Jiangbei District, Chongqing 400020, China;

2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the coordinate expression of NF- κ B and AQP4 on microglial cells postinjury. **Methods** Microglial cells were removed from 1-day-old newborn rat the cultured in vitro, Mac-1 was identified with immunocytochemistry method. Cell injury model was constructed by scarification. On the time point 12 h and 1, 3, 5, 7 d after injury, the expression of NF- κ B mRNA was detected by RT-PCR. On the same time point the expression of AQP4 was detected with Western blot. **Results** 12 h after injury, the expression of NF- κ B could hardly be observed. The maximal expression of NF- κ B was detected at 1 d postinjury. Afterwards, it declined gradually. The expression of AQP4 was analogous to NF- κ B. **Conclusion** The expression of NF- κ B and AQP4 is of coordination, which indicates that traumatic inflammatory response contributes to cerebral edema posttrauma.

Key words: microglial; NF-kappa; Aquaporin4; coordinate expression

创伤性脑水肿是创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)后主要的继发性病理改变之一,也是导致颅内压增高和伤者死亡的主要原因。近年来,水通道蛋白 4(aquaporin 4, AQP4)与创伤性脑水肿的相关性逐渐引起人们重视。另有研究^[1]表明,TBI 急性期的炎症反应加重了脑组织水肿,介导了继发性的组织损伤。本实验拟从介导炎症反应重要的转录因子——核因子- κ B(NF- κ B)与 AQP4 的协同表达进行初步探讨。

1 材料与与方法

1.1 小胶质细胞的原代培养 取出生 2 d 内的 sprague-dawley 乳鼠 4 只(购自北京大学医学部),按 McCarthy 和 De Velis^[2]创立的区别接种技术,分离纯化小胶质细胞,并对其特异性表明标志物巨噬细胞分化抗原-1(Mac-1)抗体进行检测。

1.2 细胞划痕损伤模型的建立 参照文献^[3]的方法,将纯化的小胶质细胞计数达 $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 后,以细小的微量移液器塑料滴头于各培养孔内划痕培养小胶质细胞,划痕长度为 20 mm,划痕间距为 3~4 mm,四横四竖共八条划痕,每孔划痕位置尽量保持一致,划痕宽度约 1 mm。

1.3 半定量 RT-PCR 检测 NF- κ B mRNA 的表达 分别在伤后 12 h 及 1、3、5、7 d 向细胞培养板中加入 TaKaRa RNAsiso Reagent,反转录至 cDNA;查阅 Genebank,设计 NF- κ B 引物序列如下:上游引物 5'-TGT CAC TCA GGC TCT TCA CCC A-3',下游引物 5'-TAG GCT CCC GTA TGC CCT CAC C-3',使用 Taq Mix (广州东盛公司),PCR 扩增,片段长度 350 bp;GAPDH 上游引物序列 5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT

GGT GAA-3',下游引物序列 5'-TCC TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT-3',片段长度 249 bp;取 PCR 扩增产物 5 μ L,1%琼脂糖凝胶电泳,运用凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)成像并进行分析,结果以 NF- κ B/GAPDH 吸光度比值表示。

1.4 Western blot 检测 AQP4 蛋白的表达 分别在伤后 12 h 及 1、3、5、7 d 向细胞培养板中滴加细胞裂解液(购自上海生工),冰浴匀浆,离心取上清液;用 BCA 法定量蛋白浓度,取 30 μ g 上样于 SDS-PAGE 中电泳 2 h,转移到 PVDF 膜,室温封闭 2 h;加入 AQP4 多克隆抗体(购自武汉博士德,1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜,加入 HRP 标记的二抗(1:4000),室温孵育 1 h,加 ECL 试剂显色;采用 4.1 版本 Quantity one 软件(美国 Bio-Rad 公司)分析各条带面积灰度值, β -action 表达水平为内参照。

1.5 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,变量之间的相关性采用直线相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小胶质细胞的分离、培养、鉴定结果 通过小胶质细胞原代培养,纯化后的细胞纯度达 95% 以上。倒置显微镜进行形态学观察及免疫细胞化学方法观察其特异性化学标志物 Mac-1 抗体,均确认为小胶质细胞无误,见封 3 图 1~3。

2.2 伤后小胶质细胞 NF- κ B mRNA 表达的变化 伤后 12 h NF- κ B 表达不明显,1 d 时表达水平达到最高峰,3 d 时表达量逐渐回落,5、7 d 几乎无表达,见图 4。

2.3 伤后 AQP4 蛋白表达的变化 伤后 12 h AQP4 蛋白表达不明显,1 d 时表达水平达高峰,从第 3 天开始,表达量逐渐

Δ 通讯作者,电话:(023)89011151;E-mail:sunxch1445@gmail.com.

回落,见图 5。



1: 伤后 12 h; 2: 伤后 1 d; 3: 伤后 3 d; 4: 伤后 5 d; 5: 伤后 7 d。

图 4 小胶质细胞 NF- κ B mRNA 表达的检测结果

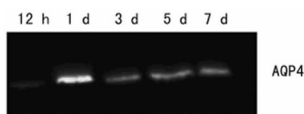


图 5 小胶质细胞 AQP4 蛋白表达的检测结果

2.4 伤后不同时间点小胶质细胞 NF- κ B mRNA 和 AQP4 蛋白表达的相关性 伤后 12 h 及 1、3、5、7 d NF- κ B mRNA 和 AQP4 蛋白表达变化趋势相同,两者具有明显的相关性,见封 3 图 6。

3 讨 论

AQP4 是分布在脑组织的主要水通道蛋白,具有选择性水转运功能^[4]。Gresz 等^[5]研究结果显示,AQP4 mRNA 在胶原纤维酸性蛋白(GFAP)免疫活性阴性及阳性细胞上都有表达,提示小胶质细胞也可能表达少量 AQP4。AQP4 通常以四聚体的形式发挥生物学效应,具有高速转运水的能力,比其他 AQPs 对水的通透性高 3~4 倍。

TBI 后中枢神经系统(CNS)的细胞释放具有神经毒性的内源性炎症因子,引发继发性炎症反应,可促进脑水肿的发生。颅内创伤性炎症反应过程包括细胞因子的活化,补体系统的激活,趋化因子、黏附分子的分泌和白细胞聚集等。Schuhmann 等^[6]研究鼠皮质冲击伤后脑脊液白三烯与脑水肿、脑细胞炎症反应的关系,发现白三烯 B₄(LTB₄)的变化与白细胞侵入的时间过程相一致,提示 LTB₄ 与细胞毒性水肿密切相关。Lu 等^[7]观察到鼠闭合性头外伤后广泛的小胶质细胞表面抗原上调,包括补体 3 受体(CR3)和主要组织相容性复合物(MHC) II 级抗原,以及星型细胞免疫反应增强伴血-脑屏障(BBB)的破坏。Whalen 等^[8]发现细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血小板选择素的同时缺失可以显著减轻创伤后脑水肿,但没有改善伤后脑功能,黏附分子在脑水肿产生机制中的作用似乎不依赖于脑内白细胞的聚集。

TBI 可导致死亡或残疾,但临床上对于 TBI 的治疗及控制的方法却很有限^[9]。近年来随着对 TBI 后脑水肿发病机制的深入研究,炎症细胞因子在 TBI 中的作用成为研究热点。目前炎症细胞因子已发展成为一个家族,它包括白细胞介素(ILs)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(INF)、生长因子(GFs)、化学趋化因子等,其中与脑水肿关系最密切的包括 IL-1 β 、TNF- α 。小胶质细胞是脑内参与炎症反应的主要免疫细胞^[10],细胞因子在正常情况下不能通过 BBB,但在脑损伤时 BBB 往往被破坏,同时细胞因子也可直接损害 BBB,并且它还可通过饱和转运机制进入脑内^[11]。TBI 后早期, BBB 通透性的增加是参与脑水肿形成的重要因素。炎症细胞因子可通过被破坏的 BBB 或直接破坏 BBB,使其通透性增加,直接或间接作用于神经细胞和神经胶质细胞,诱发其分泌更多的细胞因子或使其表面表达更多的细胞因子受体,引起脑细胞肿胀,释放各种神经毒性因子(如氧自由基),从而加重 BBB 的破坏和细胞膜的损伤,产生和加重血管源性及细胞毒性脑水肿。

NF- κ B 是由两个蛋白亚基(p50 和 p65)组成的二聚体,在胞浆中还有一种相对分子质量为 36 000~37 000 的蛋白,对

NF- κ B 具有抑制作用,成为 I- κ B(inhibitory kappa B,I- κ B)。I- κ B 与 NF- κ B 结合成三聚体。有研究显示 NF- κ B 广泛参与炎症介质和前炎症介质、黏附分子、趋化因子和一些炎症相关酶类等基因的调控^[12]。正常时,一般处于静止状态,当受到某些理化刺激时,通过特定的蛋白激酶,使 I- κ B 磷酸化后降解,NF- κ B 得以激活,NF- κ B 活化后诱导多种炎症因子,进而编码相应产物。在这些 NF- κ B 的诱导物中,促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 反过来又能直接刺激 NF- κ B,形成正反馈环。

本实验以小胶质细胞为研究对象。小胶质细胞是定居脑内的巨噬细胞,数量约占脑内胶质细胞总数的 4%~10%。最近的一项研究表明,神经毒性物质,例如 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein,APP)通过募集酪氨酸激酶和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)介导原代小胶质细胞和一种单核细胞系的促炎症激活^[13]。据报道,直接损伤可诱导小胶质细胞的活化、增生和肥大^[14];由于活化的神经胶质细胞产生细胞因子,后者又进一步刺激胶质细胞增生,因此两者形成一种恶性循环^[15]。

本实验观察到 NF- κ B 和 AQP4 的表达时相基本吻合,且表达高峰时相为伤后 1、3 d,这与临床上 TBI 后脑水肿第一个高峰时相即伤后 24 h 是吻合的。推测 NF- κ B 这一核转录因子在伤后的表达促进了 AQP4 的协调表达,共同促进 TBI 后脑水肿的发生。这一发现,也为临床通过抑制 NF- κ B 而减轻脑水肿提出了依据,但仍需要做进一步的基础和临床研究。

参考文献:

- [1] Nimmo AJ, Cernak I, Heath DL, et al. Neurogenic inflammation after human brain contusion[J]. *Neurosurgery*, 1998, 42: 291-298.
- [2] McCarthy KD, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglia cell cultures from rat cerebral tissue[J]. *J Cell Biol*, 1980, 85(3): 890-902.
- [3] 黄卫东, 费舟, 章翔, 等. 体外培养大鼠脑皮层神经元机械性损伤模型的建立[J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(4): 307-309.
- [4] 黄敏东. 创伤性脑水肿的分子机制[J]. *广东医学*, 2007, 28(1): 161-162.
- [5] Gresz V, Kwon TH, Hurley P, et al. Identification and location of aquaporin water channels in human salivary glands[J]. *American Journal of Physiology*, 2001, 281(1): 247-254.
- [6] Schuhmann MU, Mkohtarzadeh M, Stichtenoth DO, et al. Temporal profiles of cerebrospinal fluid leukotrienes, brain edema and inflammatory response following experimental brain injury[J]. *J Neurol Res*, 2003, 25(5): 481-491.
- [7] Lu J, Moochhala S, Kaur C, et al. Cellular inflammatory response associated with breakdown of the blood-brain barrier after closed head injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2001, 8(4): 399-408.
- [8] Whalen MJ, Carlos TM, Dixon CE, et al. Reduced brain edema after traumatic brain injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion molecule[J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 67(2): 160-168.
- [9] 杨叶荷. 水通道蛋白 4 与脑水肿的研究进(下转第 33 页)

黏液性、脓性分泌物及坏死组织积聚^[4]。而鼻窦黏膜增厚、息肉样变、黏膜囊肿、黏液囊肿、积液等病理改变在各鼻窦所占比例不同:(1)筛窦以黏膜息肉样变、黏液囊肿多见;(2)上颌窦常见鼻窦积液、黏膜肥厚、黏膜囊肿;(3)额窦、蝶窦在鼻窦炎中受累较轻,常见黏稠液体滞留^[5]。上述改变在放射影像中大都表现为均匀密度增高。CT 值在软组织范围内,难以准确区分病理情况,仅有少数典型的囊肿病例,放射检查可以明确,但不易区分是黏膜囊肿或是黏液囊肿^[6]。

本组 11 例真菌性鼻窦炎术前诊断 10 例,误诊 1 例。典型真菌性鼻窦炎 CT 显示窦腔不均匀软组织密度影,多单侧发生,以上颌窦多见,伴有不规则斑块状或点状钙化灶,CT 值由软组织密度到骨密度不等^[7]。范围广泛或较少见的侵袭性真菌性鼻窦炎显示受累部位骨质受压变形、缺损,与内翻性乳头状瘤、恶性淋巴瘤难以鉴别^[8]。在这种情况下,CT 值作为组织密度的标志对确定病变性质很有意义。手术记录及病理所见与 CT 影像高度一致,为程度不等的褐色真菌团块、泥沙样病变及积液、黏膜肥厚。菌丝团块内真菌代谢产生的钙盐颗粒形成影像中的点状钙化灶^[9]。

本组肿瘤共 6 例,恶性肿瘤 4 例,其中 3 例为非霍奇金淋巴瘤,1 例为鳞状细胞癌,2 例为内翻性乳头状瘤。其中 2 例恶性淋巴瘤术前误诊为慢性鼻窦炎,1 例内翻性乳头状瘤术前诊断为慢性炎性病变。窦腔内出现软组织肿块是良、恶性肿瘤早期共有的征象,邻近窦壁骨质破坏虽然主要见于恶性肿瘤^[10],但在某些良性肿瘤中亦可见到,只有侵犯窦外软组织才是恶性肿瘤特有的表现。所以在良、恶性肿瘤的鉴别诊断中,关键在于邻近骨质有无破坏^[11]。骨质破坏分为侵入性骨质破坏和骨改建,在侵入性骨质破坏中骨骼很快被侵蚀和破坏,主要见于鳞状细胞癌和某些肉瘤^[12]。骨改建是反映肿瘤缓慢生长过程中,在邻近肿瘤的骨内面被侵蚀的同时,骨外面又有新骨形成,结果形成了骨骼被肿瘤推移或绕肿瘤成弓形^[13]。这种表现常见于良性肿瘤,但也见于某些低度恶性或生长慢的恶性肿瘤。鼻窦非霍奇金淋巴瘤虽属恶性肿瘤,但 CT 检查无明显骨质破坏,或仅仅出现虫蚀状骨质吸收以及骨壁被肿瘤推移、骨质密度减低等良性占位为常见的 CT 表现,与癌常见的溶骨性破坏有明显区别^[14]。鼻窦非霍奇金淋巴瘤仅表现为窦腔密度均匀增加,无明显骨质破坏。结合文献资料:早期非霍奇金淋巴瘤浸润性生长,受累黏膜粗糙,接触性出血,部分骨质吸收,无明显骨质破坏及缺损,继发上颌窦、筛窦、蝶窦黏脓性分泌物滞留^[15]。正是因为非霍奇金淋巴瘤的上述特征,本组出现 2 例误诊病例,这 2 例 X 光及 CT 片均显示上颌窦腔均匀密度增

高,不具特征性。

参考文献:

- [1] 雷雨萌. 鼻窦冠状位 CT 扫描在鼻内镜鼻窦手术中的应用价值[J]. 医学理论与实践, 2005, 18(1): 58-59.
- [2] 石贵宝, 李建飞. 上颌窦病变的 X 线平片 CT 诊断分析[J]. 医用放射技术杂志, 2004, 7: 90-91.
- [3] 徐广玲. 鼻窦病变的 X 线与 CT 诊断价值比较[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(5): 89-90.
- [4] Aouad R, Moutran H, Rassi S. Laryngotracheal disruption after blunt neck trauma[J]. Am J Emerg Med, 2007, 25(9): 1084.
- [5] Stewart MG, Johnson RF. Chronic sinusitis: Symptom and CT scan[J]. Curr Opin Otolaryngol: Head Neck Surg, 2004, 12(1): 27-29.
- [6] 方旭华, 刘玉茹, 银文杰. CT 对鼻窦囊肿的诊断价值[J]. 现代临床医学, 2006, 32(4): 267-268.
- [7] 郑星. 真菌性鼻窦炎的 CT 诊断[J]. 浙江实用医学, 2008, 13(1): 55, 60.
- [8] Delgado JM, Swain RE, Kingdom TT, et al. Computed tomographic findings in patients with invasive fungal sinusitis[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003, 129: 236-240.
- [9] Stringer SP, Ryan MW. Chronic invasive fun rhinosinusitis[J]. Otolaryngol Clin Noah AM, 2000, 3: 375-387.
- [10] 赵玉年, 崔怀萍, 顾慷. 30 例鼻窦恶性肿瘤影像分析[J]. 肿瘤基础与临床, 2008, 21(3): 234-235.
- [11] 杨本涛, 王振常, 刘莎, 等. 鼻窦骨肉瘤的 CT 和 MRI 诊断[J]. 中华放射学杂志, 2007, 41(10): 1062-1065.
- [12] 秦江波, 张辉, 王俊波. MRI 和 CT 对鼻腔鼻窦恶性肿瘤的诊断价值[J]. 基层医学论坛, 2008, 12(34): 1119-1121.
- [13] Park HR, Min SK, Cho HD, et al. Osteosarcoma of the ethmoid sinus[J]. Skeletal Radiol, 2004, 33(3): 291-294.
- [14] 郑芳, 宋利平, 靳宏星, 等. 鼻腔原发淋巴瘤的 CT 诊断价值(附 26 例报道)[J]. 实用医学影像杂志, 2004, 5(3): 137-138.
- [15] 张青松, 杨滨, 曾强. 鼻腔、鼻窦非霍奇金淋巴瘤的早期诊断[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 16(5): 249-252.

(收稿日期: 2010-01-09 修回日期: 2010-05-10)

(上接第 31 页)

- 展[J]. 中国医药导报, 2008, 5(6): 21-22.
- [10] 陈实, 朱刚. 缺氧对小鼠小胶质细胞 IRA K21 表达的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(11): 1186-1188.
 - [11] 耿艺, 刘荣耀, 王健, 等. 水通道蛋白 4 在创伤性脑水肿中的表达及其对血脑屏障通透性的影响[J]. 中华临床医师杂志, 2009, 3(5): 762-770.
 - [12] 罗真春, 黄燕, 秦开秀, 等. 核转录因子- κ B 在急性肺损伤小鼠中的动态表达[J]. 重庆医学, 2009, 38(16): 2005-2006.

- [13] Snodag CM, Combs CK. Amyloid precursor protein mediates proinflammatory activation of monocytic lineage cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 14456-14463.
- [14] Perry WH, Gordon S. Macrophages and the nervous system[J]. Int Rev Cytol, 1991, 125: 203-244.
- [15] Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19: 819-834.

(收稿日期: 2010-01-14 修回日期: 2010-06-23)