

肿瘤坏死因子- α 对少突胶质前体细胞的影响及其机制的研究*卢玉仙¹,夏春林²,高 薇¹,徐益荣¹,王 峰¹

(1.盐城卫生职业技术学院,江苏盐城 224005;2.苏州大学医学部人体解剖学暨细胞神经生物学教研室,江苏苏州 215123)

[摘要] **目的** 探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)对少突胶质前体细胞(OPC)的作用及机制,为脑室周围白质软化(PVL)的治疗提供策略。**方法** 将分离纯化的 OPC 分为空白对照组、TNF- α 组、肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)抗体组,将 50 ng/mL TNF- α 作用于 TNF- α 组、TNFR1 抗体组,免疫荧光化学检测 OPC 的分化情况,四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 3 组细胞的相对活力,RT-PCR 检测细胞 TNFR1 的 mRNA 水平的表达情况。**结果** 与空白对照组和 TNFR1 抗体组相比,TNF- α 组 OPC 的细胞活力明显下降($P < 0.05$),并且不能沿着少突胶质谱系细胞进行分化,即分化为原少突胶质细胞。TNF- α 组 TNFR1 的 mRNA 表达明显的上调,空白对照组和 TNFR1 抗体组的 mRNA 表达无明显的变化。**结论** TNF- α 主要通过 TNFR1 引起 OPC 的凋亡,抑制 OPC 分化。

[关键词] 肿瘤坏死因子 α ;少突胶质前体细胞;肿瘤坏死因子受体 1;脑室周围白质软化

[中图分类号] R742.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)16-2173-03

The effect of TNF- alpha on oligodendrocyte progenitor and its mechanism*

Lu Yuxian¹, Xia Chunlin², Gao Wei¹, Xu Yirong¹, Wang Feng¹

(1. Yancheng Institute of Health Sciences, Yancheng, Jiangsu 224005, China; 2. Department of Anatomy and Cellular Neurobiology, Medical College of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on the oligodendrocyte progenitor, and provide a strategy for the treatment of Periventricular leukomalacia. **Methods** The purified oligodendrocyte progenitor were divided into three groups: blank control group, TNF- α group and anti- TNFR1 group. TNF- α group and anti- TNFR1 group were treated with TNF- α , the differentiation of OPC were detected by immunocytochemical method, the relative viability of cells in three groups were measured by MTT assay, the levels of TNFR1 gene was observed with RT-PCR. **Results** The relative cell viability of TNF- α group was significantly decreased($P < 0.05$) and did not turn into cells called pro- oligodendrocyte. TNF- α group increased the expression of TNFR1 mRNA, and there were no differences in the expression of TNFR1 mRNA between the blank control group and anti- TNFR1 group. **Conclusion** TNF- α could induced OPC apoptosis and inhibited the differentiation of OPC through the TNFR1.

[Key words] tumor necrosis factor-alpha; oligodendrocyte progenitor; tumor necrosis factor receptor type 1; periventricular leukomalacia

脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)是早产儿脑白质损伤的一种主要的病理类型。流行病学和动物实验研究均表明宫内感染及缺血缺氧是早产儿 PVL 发生的主要因素。宫内感染后免疫应答细胞被激活分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、活性氧(ROS)等炎性细胞因子,这些因子能损伤少突胶质细胞特别是少突胶质前体细胞(oligodendrocyte progenitor, OPC)^[1]。脑缺血缺氧后,小胶质细胞被激活募集的同时细胞因子 TNF- α 、IL-1b, IL-6 和 TGF- β 1 表达增加,OPC 的数量明显减少^[2]。由此可见,TNF- α 在 PVL 发生过程中起着重要的作用。PVL 大多数发生在妊娠的 23~32 周,Back 等^[3]通过观察无脑损伤早产儿的脑组织证实这个时期 OPC 占据少突胶质谱系细胞的大多数,当前体细胞沿着少突胶质谱系细胞逐渐分化成熟时,早产儿罹患 PVL 的危险性降低。Tsui 等^[4]也证实了 PVL 主要导致围产期的 OPC 损伤。因此,本研究在成功的纯化培养 OPC 的基础上,主要采用 TNF- α 刺激 OPC,观察细胞的分化及凋亡情况,探讨少突胶质细胞凋亡的通路,进而为下一步 PVL 的治疗及保护策略提供依据^[5]。

1 材料与与方法

1.1 材料 新生(P₀~P₂)SD 大鼠由盐城卫生职业技术学院

实验动物中心提供;PDGF 和 bFGF 购于 Peprotech 公司, TNF- α 购于 Sigma 公司,兔抗鼠肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1) 购于 R&D 公司,小鼠抗 O4 单抗购于 Sigma 公司,FITC 标记的羊抗小鼠 IgM, DMSO 购于 Sigma, Trizol 和逆转录试剂盒购于 Gibco, Taq 聚合酶购于上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 OPC 分离及培养 混合胶质细胞培养参照李春鹏等^[6]的培养方法,新生 SD 大鼠,心脏放血,取出大脑皮层,置于预冷的 D-Hank's 液中,在解剖显微镜下剔除脑膜和血管等结缔组织。将大脑皮层制成单细胞悬液,经离心、重悬及过滤后以 3×10^5 cell/cm² 的密度接种于培养瓶中,于培养箱中孵育 30 min,以去除成纤维细胞,再接种于包被 PDL 的培养瓶中。培养至第 7~9 d 可见细胞分两层,OPC 位于上层。将培养 7~9 d 的混合胶质细胞置于 37 °C 气浴恒温振荡器中,180 r/min 预振荡 2 h,去除上层的小胶质细胞。加入完全培养液置于培养箱中孵育 2 h 后再过夜振荡 18 h,以分离上层的 OPC。将振荡后脱落细胞 1 000 r/min 离心 5 min,用完全培养液重悬后接种于未包被 PLL 的培养瓶中,差速贴壁 30 min,去除混杂的小胶质细胞。收集未贴壁的 OPC 以 1×10^5 cell/cm² 接种于包被 PDL 的 96 孔板,培养液为 DMEM/F12、2% B27、10 ng/mL

PDGF、10 ng/mL bFGF。

1.2.2 OPC 分化的检测 将处于对数生长期 96 孔板的 OPC 分为 3 组, (1) TNF- α 组: OPC 加入含有 TNF- α (50 ng/mL) 的生长因子培养液 200 μ L 孵育 48 h 后, 换成含有 30 ng/mL T3 和 5 ng/mL CNTF 的无血清的培养液继续培养 2 d; (2) TNF- α +TNFR1 抗体组: 取兔抗鼠 TNFR1 中和抗体作用于 OPC 30 min 后, 其后处理方法同单纯 TNF- α 组; (3) 空白对照组: 除不加 TNF- α 外, 其余培养条件均相同。0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 5 min \times 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 1 h。弃去血清, 加入小鼠抗 O4 的抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 漂洗 5 min \times 3 次加入 FITC 标记二抗, 室温下避光反应 60 min。PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 缓冲甘油封片后于荧光显微镜下观察 O4 的表达情况。

1.2.3 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测细胞的存活率 将处于对数生长期 96 孔板的 OPC 分为 3 组, 分组方法同上, 只是不加入促分化的 T3 和 CNTF。每孔加入 20 μ L MTT, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 形成紫色结晶然后吸去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 室温下避光放置在摇床上震荡 10 min, 待镜下观察到紫色结晶全部溶解后, 以酶联免疫检测仪测定各孔光密度 (OD), 计算细胞的存活率。存活率 ($\bar{x}\pm s$)% = 实验组细胞 OD/对照组细胞 OD \times 100%。

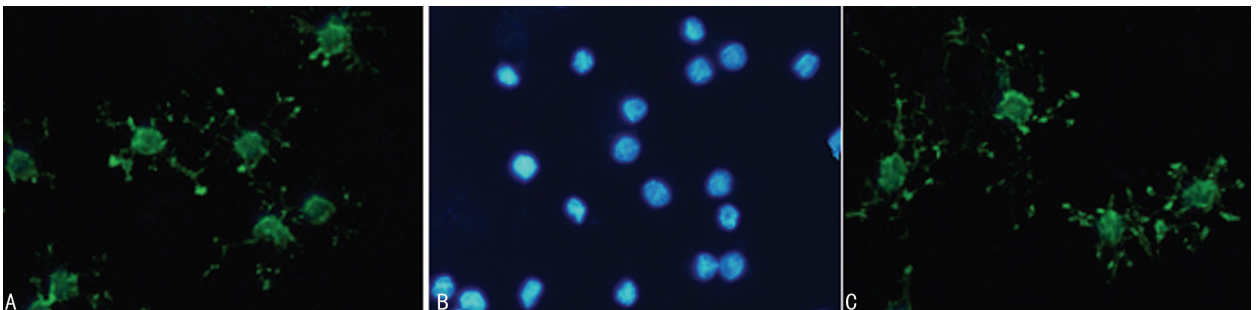
1.2.4 RT-PCR 检测 分别收集上述 3 组细胞, 用 Trizol 法

提取总 RNA, 逆转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板, 用特定引物进行 PCR 扩增。TNFR1 引物, 上游: 5'-ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC-3', 下游: 5'-TAC ACA CGG TGT TCT GTT TCT CC-3', 扩增片段 332 bp。GAPDH 引物, 上游: 5'-ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG-3', 下游: 5'-CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC-3', 扩增片段 528 bp。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物经 1.5% 凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 经 Bio-Rad 全自动凝胶成像处理仪记录图像并进行分析, 以目的产物条带与内参条带灰度值之比表示目的基因 mRNA 的相对表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异采用 *t* 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组 OPC 分化的鉴定 免疫荧光细胞化学染色显示, 空白对照组及 TNF- α +TNFR1 中和抗体组的 OPC 细胞在含有 T3 和 CNTF 生长因子培养液培养后, 胞体从原有两极或三级状突起发出许多分支, 分化成细胞表面 O4 标记阳性的原少突胶质细胞。TNF- α 组的 OPC 细胞在含有 T3 和 CNTF 生长因子培养液培养后, 胞体的突起出现断裂, 培养液中漂浮的细胞碎片增多, O4 标记阴性, 见图 1。



A: 空白对照组; B: TNF- α 组; C: TNF- α +TNFR1 抗体组。

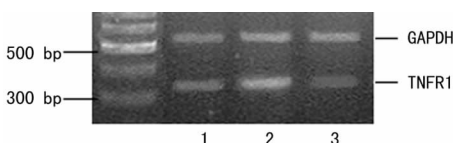
图 1 OPC 分化的鉴定

2.2 3 组 OPC 细胞活力的观察 MTT 法检测 3 组细胞的相对活力, OPC 细胞加入 50 ng/mL TNF- α 刺激 48 h 后, 培养液中出现悬浮细胞及大量的细胞碎片, 细胞出现凋亡相对活力明显下降 (54.78 ± 3.83)%。预先经过 TNFR1 中和抗体处理的 OPC, TNF- α 对其活力无明显的影响, 见表 1。

表 1 3 组 OPC 细胞存活率的比较 (%)

组别	OPC 细胞存活率
空白对照组	98.23 \pm 2.47
TNF- α 组	54.78 \pm 3.83
TNF- α +TNFR1 抗体组	97.89 \pm 2.36
F	21.62
P	<0.01

2.3 TNFR1 在 3 组细胞中的表达 OPC 细胞加入 50 ng/mL TNF- α 刺激 48 h 后, TNFR1 的 mRNA 表达水平明显增加, 见图 2。



1: 空白对照组; 2: TNF- α 组; 3: TNF- α +TNFR1 抗体。

图 2 OPC 中 TNFR1 的表达

3 讨 论

少突胶质谱系细胞表面存在着 TNF 受体 1 (p55, TNFR1) 和 TNF 受体 2 (p75, TNFR2) 两种亚型, 两型受体均为跨膜糖蛋白, 他们胞外配体结构域具有同源性, 但胞内结构域同源性低, TNFR1 胞质区含有死亡结构域 (death domain, DD), 主要诱导细胞的凋亡, TNFR2 不含有 DD, 而是包含 TIM 结构域, 主要通过死亡因子受体相关因子结合介导细胞激活和生存的信号通路^[7-9], 保护细胞促进髓鞘的形成^[10]。TNFR1 在同一细胞中可以触发两种相反的反应, 即促进细胞生存和加速细胞凋亡。促进细胞生存的途径主要是通过核因子 NF- κ B 信号通路, 而促进细胞凋亡的通路主要通过肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域 (TRADD) 募集 Fas 相关死亡结构域 (FADD)^[11]。由此可见, TNF- α 对 OPC 具体作用机制较为复杂。虽然关于 TNF- α 对 OPC 的作用已经被广泛的研究, 但具体 TNF- α 对 OPC 通过何种机制及通路起作用还不十分明确。

本实验通过 TNF- α 刺激 OPC, 研究 TNF- α 对 OPC 的存活及分化的影响。结果显示, TNF- α 引起 OPC 的凋亡从而进一步影响 OPC 向原少突胶质细胞分化。由此可见, TNF- α 作用于新生 SD 大鼠体外培养的 OPC, 主要通过 TNFR1 结合通过 TRADD 募集 Fas FADD 促进细胞的凋亡。至于在何种条件下通过 NF- κ B 信号通路促进 OPC 生存的途径, 还有待于进一步研究。预先使用 TNFR1 中和抗体作用于 OPC, 通过

TNFR1 中和抗体结合 TNFR1,有效阻断 TNF- α 与 TNFR1 的结合,TNF- α 主要与 TNFR2 结合,与空白对照组相比 OPC 的活力无明显差别并能沿着少突胶质谱系细胞进行分化。本研究至少证实了 TNF- α 与 TNFR2 结合并不阻碍 OPC 向少突胶质谱系细胞进行分化^[12]。进一步的研究发现,与空白对照组比较 TNF- α 组 OPC 的 TNFR1 表达明显增加,预先加入 TNFR1 中和抗体的 TNF- α 组 TNFR1 的表达下调。提示 TNF- α 主要通过 TNFR1 影响 OPC 的增殖及分化过程,但具体的信号传导还有待于进一步的探讨。在 TNFR1 存在的情况下,TNFR2 所起的作用及相关机制还有待于进一步的阐明。

参考文献

- [1] Sherwin C, Fern R. Acute lipopolysaccharide-mediated injury in neonatal white matter glia: role of TNF- α , IL-1 β , and calcium[J]. *J Immunol*, 2005, 175(1): 155-161.
 - [2] Falahati S, Breu M, Waickman AT, et al. Ischemia-induced neuroinflammation is associated with disrupted development of oligodendrocyte progenitors in a model of periventricular leukomalacia[J]. *Dev Neurosci*, 2013, 35(2/3): 182-196.
 - [3] Back SA, Luo NL, Borenstein NS, et al. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(4): 1302-1312.
 - [4] Tsuji T, Okumura A, Kidokoro H, et al. Differences between periventricular hemorrhagic infarction and periventricular leukomalacia[J]. *Brain Dev*, 2014, 36(7): 555-562.
 - [5] Patel J, Balabanov R. Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8): 10647-10659.
 - [6] 张晔,李春鹏,夏春林,等. 蛋白脂蛋白在两型星形胶质细胞和少突胶质细胞中的表达[J]. *解剖学杂志*, 2006, 29(5): 536-538, 580.
 - [7] Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, et al. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination[J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 9): 2736-2754.
 - [8] Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(6): 1297-1305.
 - [9] Kichev A, Rousset CI, Baburamani AA, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and cell death in the immature central nervous system after hypoxia-ischemia and inflammation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(13): 9430-9439.
 - [10] Fischer R, Wajant H, Kontermann R, et al. Astrocyte-specific activation of TNFR2 promotes oligodendrocyte maturation by secretion of leukemia inhibitory factor[J]. *Glia*, 2014, 62(2): 272-283.
 - [11] Mc Guire C, Beyaert R, Van Loo G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination[J]. *Trends Neurosci*, 2011, 34(12): 619-628.
 - [12] Patel JR, Williams JL, Muccigrosso MM, et al. Astrocyte TNFR2 is required for CXCL12-mediated regulation of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation within the adult CNS[J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 124(6): 847-860.
- (收稿日期:2016-01-18 修回日期:2016-03-06)
-
- (上接第 2172 页)
- changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis[J]. *Bone*, 2006, 38(2): 234-243.
- [10] Stupina TA, Stepanov MA, Teplen'kii MP. Role of subchondral bone in the restoration of articular cartilage[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2015, 158(6): 820-823.
 - [11] Botter SM, van Osch GJ, Waarsing JH, et al. Quantification of subchondral bone changes in a murine osteoarthritis model using micro-CT[J]. *Biorheology*, 2006, 43(3/4): 379-388.
 - [12] Intema F, Sniekers YH, Weinans H, et al. Similarities and discrepancies in subchondral bone structure in two differently induced canine models of osteoarthritis[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(7): 1650-1657.
 - [13] Bolbos RI, Zuo J, Banerjee S, et al. Relationship between trabecular bone structure and articular cartilage morphology and relaxation times in early OA of the knee joint using parallel MRI at 3 T[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(10): 1150-1159.
 - [14] 贺占坤,沈杰威. MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 评价膝关节骨性关节炎的临床研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(32): 3872-3874.
 - [15] Drake FH, Dodds RA, James IE, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(21): 12511-12516.
 - [16] Andersen TL, del COM, Kirkegaard T, et al. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells[J]. *Bone*, 2004, 35(5): 1107-1119.
 - [17] Zhang R, Fang H, Chen Y, et al. Gene expression analyses of subchondral bone in early experimental osteoarthritis by microarray[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32356.
 - [18] Hofstaetter JG, Wang J, Yan J, et al. Changes in bone microarchitecture and bone mineral density following experimental osteonecrosis of the hip in rabbits[J]. *Cells Tissues Organs*, 2006, 184(3/4): 138-147.
 - [19] Hayami T, Zhuo Y, Wesolowski GA, et al. Inhibition of cathepsin K reduces cartilage degeneration in the anterior cruciate ligament transection rabbit and murine models of osteoarthritis[J]. *Bone*, 2012, 50(6): 1250-1259.
 - [20] Zhen G, Wen C, Jia X, et al. Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(6): 704-712.
- (收稿日期:2016-01-11 修回日期:2016-03-22)