

神经疾病发病机制研究

DOI:10.11699/cyxb20130611

中枢神经系统炎症对抗原递呈细胞白细胞介素-27 表达影响

黄 琦, 秦新月

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨在炎症因子与凋亡细胞刺激下对中枢神经系统抗原递呈细胞白细胞介素(interleukin, IL)-27 的表达调控。**方法:**用脂多糖(lipo-polysaccharide, LPS)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和 X 射线诱导凋亡细胞对小鼠小胶质细胞和骨髓源树突状细胞刺激。采用实时定量 PCR 法,检测不同刺激组小胶质细胞和树突状细胞 p28 基因 mRNA 的转录水平。Western blot 法检测不同刺激组细胞 IL-27 蛋白表达水平。**结果:**LPS 刺激和 LPS 与 IFN- γ 共刺激的小胶质细胞和树突状细胞 p28 mRNA 表达与空白组相比明显升高(小胶质细胞: $P_{LPS\ 0.50\ \mu g/ml}=0.029$; $P_{LPS+IFN-\gamma}=4\times 10^{-7}$;树突状细胞: $P_{0.50\ \mu g/ml}=0.021$; $P_{LPS+IFN-\gamma}=8\times 10^{-7}$),凋亡细胞预刺激组 p28 基因 mRNA 转录水平明显低于 LPS 和 IFN- γ 刺激组,差异有统计学意义(小胶质细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=1.2\times 10^{-4}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=1\times 10^{-7}$;树突状细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=3\times 10^{-4}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=2\times 10^{-7}$)。IL-27 蛋白表达水平在 LPS 和 IFN- γ 刺激组明显增加(小胶质细胞: $P_{LPS\ 0.25\ \mu g/ml}=0.022$; $P_{LPS+IFN-\gamma}=8\times 10^{-7}$;树突状细胞: $P_{LPS\ 0.50\ \mu g/ml}=0.021$; $P_{LPS+IFN-\gamma}=2\times 10^{-7}$),在凋亡细胞预刺激组表达下降(小胶质细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=9.6\times 10^{-5}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=3\times 10^{-7}$;树突状细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=0.001$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=1.1\times 10^{-5}$)。**结论:**中枢抗原递呈细胞在 LPS 和 IFN- γ 刺激下 IL-27 p28 mRNA 和 IL-27 蛋白表达增加,吞噬凋亡细胞后 IL-27 p28 mRNA 和 IL-27 蛋白表达下降。

【关键词】小胶质细胞;树突状细胞;凋亡细胞;抗原递呈细胞;白细胞介素-27**【中国图书分类法分类号】**R392.11;R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-12-07

作者介绍:黄 琦,Email:freemighthuang@163.com,

研究方向:神经病学免疫。

通信作者:秦新月,Email:qinxinyue@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81271307)。

- [3] Zhang X, Liu W, Niu X, et al. Systemic administration of catalpol prevents D-galactose induced mitochondrial dysfunction in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473(3): 224-228.
- [4] Zhu H F, Wan D, Luo Y, et al. Catalpol increases brain angiogenesis and up-regulates VEGF and EPO in the rat after permanent middle cerebral artery occlusion[J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(5): 443-453.
- [5] Liang J H, Du J, Xu L D, et al. Catalpol protects primary cultured cortical neurons induced by Abeta(1-42) through a mitochondrial-dependent caspase pathway[J]. *Neurochem Int*, 2009, 55(8): 741-746.
- [6] Pellow S, Chopin P, File S E, et al. Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1985, 14(3): 149-167.
- [7] 李广诚, 杨 聘, 董克礼. 两种不同老年痴呆模型鼠学习记忆能力和探索行为的比较[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2008, 17(2): 109-110.
- Li G C, Yang P, Dong K L. A comparative study on spatial learning and memory and explore behavior between two kinds of Alzheimer's disease model[J]. *Chinese Journal of Behavioral Medical and Brain Science*, 2008, 17(2): 109-110.
- [8] Götz J, Ittner L M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(7): 532-544.
- [9] 宗园媛, 王晓映, 王海林, 等. APP/PS 双转基因阿尔茨海默病小

- 鼠模型的老年斑及行为学动态分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(9): 8-12.
- Zong Y Y, Wang X Y, Wang H L, et al. Continuous analysis of senile plaque and behaviors in APP/PS1 double-transgenic gene mouse model of Alzheimer disease[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2008, 18(9): 8-12.
- [10] Zhang X L, An L J, Bao Y M, et al. D-galactose administration induces memory loss and energy metabolism disturbance in mice: Protective effects of catalpol[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(8): 2888-2894.
- [11] 刘 硕, 胡雅儿, 夏宗勤. 小鼠脑内注射 A β 25-35 记忆和 M 受体变化及梓醇的调节作用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2007, 27(8): 945-948.
- Liu S, Hu Y E, Xia Z Q. Changes of memory and M receptor injection of A β 25-35 into basal ganglion region of forebrain and effect of catalpol[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2007, 27(8): 945-948.
- [12] 奚耕思, 张武会. 抑郁症发生机制研究进展[J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(6): 64-71.
- Xi G S, Zhang W H. Research advances on mechanisms of depression[J]. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(6): 64-71.

(责任编辑:关蕴良)

Regulation of interleukin-27 in brain antigen-presenting cells by central nervous system inflammation

HUANG Qi, QIN Xinyue

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To explore how inflammatory factors and apoptotic cells regulate central nervous system (CNS) antigen-presenting cells (APCs) related cytokine-interleukin-27 (IL-27) expression in inflammation. **Methods:** qRT-PCR was used to measure and compare IL-27 p28 mRNA relative expression in mice microglia cells and bone marrow derived dendritic cells (BMDCs), treated with lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ) and X-ray induced apoptotic cells. Western blot was performed to detect IL-27 expression in different stimuli groups. **Results:** Expressions of IL-27 p28 mRNA and IL-27 were up-regulated when microglia cells and BMDCs being treated with LPS and increased expressions of IL-27 p28 and IL-27 were in relation with LPS dosages. Expressions of IL-27 p28 mRNA and IL-27 were significantly up-regulated when microglia cells and BMDCs being treated with IFN- γ plus LPS (microglia cells: $P_{LPS\ 0.50\ \mu g/ml}=0.029$, $P_{LPS+IFN-\gamma}=4\times 10^{-7}$; BMDCs: $P_{0.50\ \mu g/ml}=0.021$, $P_{LPS+IFN-\gamma}=8\times 10^{-7}$). Expressions of IL-27 p28 mRNA and IL-27 were significantly down-regulated when microglia cells and BMDCs being pre-treated with apoptotic cells (microglia cells: $P_{LPS+apoptotic\ cells}=1.2\times 10^{-4}$, $P_{IFN-\gamma+LPS+apoptotic\ cells}=1\times 10^{-7}$; BMDCs: $P_{LPS+apoptotic\ cells}=3\times 10^{-4}$, $P_{IFN-\gamma+LPS+apoptotic\ cells}=2\times 10^{-7}$). **Conclusions:** LPS and IFN- γ can up-regulate IL-27 expression in CNS APCs. IL-27 expression is suppressed when CNS APCs phagocytosis of apoptotic cells.

[Key words] microglia cell; dendritic cell; apoptotic cell; antigen-presenting cell; interleukin-27

在很多神经系统疾病中均存在不同程度炎症, 已有研究证明, 中枢神经系统炎症中受炎症介质、炎症趋化因子以及细胞因子影响, 使神经元缺失加重, 如阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化、脑脊髓膜炎、艾滋病所致痴呆、脑外伤和中风等^[1]。炎症中伴随退行性变与炎性细胞浸润, 在中枢神经系统内产生大量凋亡细胞, 其主要成分为浸润的 T 淋巴细胞^[2]。

小胶质细胞是大脑固有的单核巨噬细胞, 并且是中枢神经系统抗原递呈细胞重要组成部分, 在降解和清除脑部神经细胞碎片与凋亡细胞中起重要作用^[3]。树突状细胞在免疫系统内专职于捕获抗原, 处理并呈递给 T 淋巴细胞, 诱导免疫耐受或获得性免疫^[4]。中枢神经系统抗原递呈细胞在神经系统炎症时, 产生大量细胞因子和炎症趋化因子, 如白细胞介素 (interleukin, IL)-12、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等, 激活周边小胶质细胞和星状细胞, 并且募集外周免疫细胞进入脑实质^[5]。

IL-27 是 IL-12 家族新发现的成员之一, 和家族其他成员类似, 由 2 个不同亚基组成: 即 p28 亚基和可溶性细胞因子受体 EB 诱导基因 3 (epstein-barr virus induced gene3, EB13)^[6]。其中 IL-35 和 IL-27 都具有 EB13 亚基^[7], p28 是 IL-27 所独有的亚基。在中枢神经系统, IL-27 可由激活的抗原递呈细胞, 如小胶质细胞和树突状细胞在受炎症刺激时产生,

在自身免疫疾病和宿主抗感染过程中起着重要作用^[8]。

已有实验证明, 在炎症过程中 IL-27 表达上升。并有报道称在中枢神经系统中会产生大量的凋亡细胞, 而凋亡细胞对中枢神经系统抗原递呈细胞 IL-27 的表达影响尚无相关报道。本实验拟通过用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、IFN- γ 以及 X 射线诱导凋亡细胞模拟中枢神经系统炎症环境, 分别刺激小胶质细胞与骨髓来源树突状细胞 (bone marrow derived dendritic cells, BMDCs), 运用实时定量 PCR 和 Western blot 等方法, 测定中枢神经系统抗原递呈细胞 IL-27 p28 亚基和 IL-27 表达受炎症介质和凋亡细胞的影响。旨在研究中枢神经系统炎症以及凋亡细胞对中枢抗原递呈细胞中细胞因子 IL-27 的表达影响, 为进一步的调控机制研究以及临床应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生 C57BL/6 小鼠 8 只 (饲养与实验许可号 B00005887: 1), 均为 1~3 d。C57BL/6 小鼠 4 只 (饲养与实验许可号 B00005887: 1), 雌雄各 2 只, 均为 10~12 周。饲养于圣路易斯大学动物实验中心空气层流饲养室, 不限食物与水摄入。实验过程符合《实验室动物饲养和使用条例》(美国国立卫生研究院颁布号 85-23, 1985 年修订)。

1.2 主要试剂及仪器

SYBR Green PCR mater mix、大肠杆菌 0217:B8 LPS、琼脂糖、D-Hanks 液、DMEM 高糖培养液、RPMI1640 培养液、谷氨酰胺溶液、青霉素、链霉素溶液、胎牛血清、胰酶、PBS 缓冲液和重组鼠 GM-CSF 均购自 Sigma-Aldrich 公司;1 kb Plus DNA Ladder、TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司;重组鼠 IFN- γ 、鼠 IL-4 购自 Genzyme 公司。辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的鼠抗 β -actin 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、兔抗 IL-27 多克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司;牛血清白蛋白购自 Bio-Rad 公司;7500 快速实时 PCR 系统购自 AB(Applied Biosystem)公司。

1.3 细胞

1.3.1 凋亡细胞的制备 人外周白血病 T 细胞(Jurkat 细胞)购于美国标准生物收藏中心,培养于含 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、链霉素和 10%未灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养液。参照 Jang 等^[9]用 X 线诱导 Jurkat 细胞成为凋亡 T 细胞。先将 Jurkat 细胞在培养液中预培养 3 d,后用 Precision X-ray Inc 公司 X 线生物学辐照器,使用 9000 RADs,320 kV,距照射源 32 cm,照射 14 min,照射后的 Jurkat 细胞在 37 °C 培养 9 h 成为凋亡 T 细胞。

1.3.2 原代小胶质细胞分离培养与实验 原代小鼠小胶质细胞分离培养主要参照 Li 等的方法^[10]并进行改良。将新生鼠脑组织取出,在 D-Hanks 液中润洗并将脑组织切碎。将切碎的脑组织中加入胰酶并吹打消化至混浊,加入高糖 DMEM 完全培养液(含 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、链霉素和 10%灭活胎牛血清)终止消化。将悬液通过 70 μ m 细胞滤网去除碎片。将滤液在 4 °C,150 g 离心 10 min,用高糖 DMEM 完全培养液重悬,接种至培养瓶,并加入重组鼠集落刺激因子(0.5 ng/ml),在 37 °C、5%CO₂ 培养 1 周。在 37 °C 恒温培养摇床过夜(120 r/min),将小胶质细胞、少突胶质细胞同星形胶质细胞分离。将分离的细胞接种至培养皿培养 3 h,将未贴壁的少突胶质细胞弃去,分离出小胶质细胞接种至 6 孔培养板(分为空白组、LPS 刺激组、凋亡 T 细胞刺激组、凋亡 T 细胞+LPS 刺激组、IFN- γ +LPS 刺激组、凋亡 T 细胞+LPS+IFN- γ 刺激组)。培养 20 h 更换培养液,培养 24 h 在相应孔中加入已诱导的凋亡 T 细胞共同培养,作为预处理,凋亡 T 细胞与孔内细胞数量比为 2:1。培养 30 h 后在相应孔加入鼠 IFN- γ (10 ng/ml),培养 40 h 在相应孔中加入不同剂量 LPS,分别为 0.25、0.50、1.00、2.00 μ g/ml。培养 46 h 后收集各组细胞,利用 TRIZOL 试剂提取 RNA,或 50 h 收集各组细胞,利用裂解液提取细胞总蛋白。

1.3.3 BMDCs 的分离培养与实验 将小鼠用 CO₂ 处死,剥离后腿股骨,浸泡在 75%酒精中 2 min,用 RPMI1640 培养液(不完全培养液)清洗。剪除股骨两端,向骨髓腔内注入不完全培养液 5 ml 将细胞冲出。将冲出的细胞在不完全培养液中重悬混匀,将悬浊液在 4 °C 1 000 r/min 下离心 10 min,弃去上清并用红细胞裂解液重悬。2 min 后加入 PBS 缓冲液,在 4 °C 1 000 r/min 下离心 5 min,弃去上清。使用完全培养液(RPMI1640 中含 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、链

霉素和 10%灭活胎牛血清)重悬。将重悬的细胞接种至培养皿,并加入集落刺激因子(10 ng/ml)与 IL-4(10 ng/ml)培养 7 d。将分化好的 BMDCs 接种至 6 孔培养板中,培养 20 h 更换培养液,培养 24 h 在相应孔中加入已诱导的凋亡 T 细胞共同培养,作为预处理,凋亡 T 细胞与孔内细胞数量比为 2:1。培养 30 h 后在相应孔加入鼠 IFN- γ (10 ng/ml),培养 40 h 在相应孔加入不同剂量 LPS,分别为 0.25、0.50、1.00、2.00 μ g/ml。培养 46 h 后收集各组细胞,利用 TRIZOL 试剂提取 RNA,或 50 h 收集各组细胞,利用裂解液提取细胞总蛋白。

1.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

使用 TRIZOL 法提取各组细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,以其为模板进行 PCR 扩增。引物序列如下:鼠 IL-27 p28 基因上游:5'-CTCTGCTTCCTCGCTACCAC-3',下游:5'-GGGGCAGCTTCTTTTCTTCT-3',PCR 产物大小 200 bp;鼠 GAPDH 基因上游:5'-AATGGGGTGAGCGGGTCT-3',下游:5'-ACCCGTTTGGCTCCACCCTT-3',PCR 产物大小 100 bp。引物由 Integrated DNA Technologies(IDT)公司合成。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 33 个循环;72 °C 再延伸 10 min。

1.5 实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)测定 IL-27 p28 mRNA 表达

取逆转录合成的 cDNA 与去离子水 1:3 稀释后,分别将稀释的 cDNA 与引物(10 μ mol/L,与 RT-PCR 相同引物)混和,目标产物为鼠 IL-27 p28 和 GAPDH cDNA,再加入 SYBR Green PCR master mix,用去离子水将总体积定量为 10 μ l。将混合物放入 7500 快速实时 PCR 系统中反应分析。PCR 反应条件为:50 °C 2 min,95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 60 s,共循环 40 次。QRT-PCR 计算公式:①改变的倍数=2^{- $\Delta\Delta$ CT};② $\Delta\Delta$ CT=(CT_{内参}-CT_{靶基因平均值})-(CT_{第一孔内参}-CT_{第一孔靶基因平均值})。为减小实验中出现的系统误差与操作误差,QRT-PCR 中反应 cDNA 一般每个样品需要有 3 个生物平行(平行培养)和 3 个数学平行(同样的 cDNA 做 3 个 PCR 反应),数据使用 Graphpad Prism 软件分析作图。

1.6 各组细胞中 IL-27 蛋白表达的检测

采用 Western blot 法,使用 BSA 将蛋白定量,经 SDS-PAGE 分离后,电转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,在含 5%脱脂牛奶的 TBST 液中室温下封闭 1 h。加入兔抗 IL-27 多克隆抗体(1 μ g/ml),4 °C 孵育过夜;TBST 液洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:5 000 含 5%脱脂牛奶的 TBST 液稀释),室温孵育 1 h。TBST 液洗涤 4 次,每次 10 min,ECL 显影分析。将 PVDF 膜放入蛋白印记膜再生液中在 50 °C 下孵育 30 min,用 TBST 液洗涤 3 次,每次 10 min,在含 5%脱脂牛奶 TBST 液中室温下封闭 1 h,加入 HRP 标记的鼠抗 β -actin 单克隆抗体(1 μ g/ml)室温下孵育 1 h,TBST 液洗涤 4 次,每次 10 min,ECL 显影分析。为验证结果的准确及稳定,每次实验均重复 3~4 次。

1.7 统计学分析

实验数据使用 IBM SPSS 20.0 计算并用 Graphpad Prism 分析作图,采用均数 $\pm$ 样本标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采

用方差分析,两两比较采用 $LSD-t$ 法,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。Western blot 图均采用 Image J 做灰度分析并用 Graphpad Prism 作图。

2 结果

2.1 IL-27 p28 mRNA 表达及变化

通过计算 IL-27 p28 CT 值/GAPDH CT 值比值(表 1、表 2 中所列出的值为与 GAPDH 相比之后的相对值,无单位)。

表 1 小胶质细胞和 BMDcs 针对不同剂量 LPS IL-27 p28 亚基 mRNA 转录水平改变 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 IL-27 p28 mRNA relative expressions in microglia cells and BMDcs treated with different dosages of LPS ($\bar{x} \pm s$)

分组	小胶质细胞	BMDcs
空白组	1.69 ± 0.49	0.76 ± 0.34
LPS(0.25 μg/ml)	51.55 ± 11.70 ^{a1}	52.94 ± 4.90 ^{b1}
LPS(0.50 μg/ml)	80.47 ± 9.29 ^{a2}	138.51 ± 64.84 ^{b2}
LPS(1.00 μg/ml)	151.13 ± 55.93	326.32 ± 77.50
LPS(2.00 μg/ml)	184.39 ± 61.92 ^{a3}	600.57 ± 82.46 ^{b3}

a1: 与空白组相比, $P=0.139$; a2: 与空白组相比, $P=0.029$; a3: 与 1.0 μg/ml 组相比, $P=0.305$; b1: 与空白组相比, $P=0.325$; b2: 与空白组相比, $P=0.021$; b3: 与 1.0 μg/ml 组相比, $P=0.000$

表 2 小胶质细胞和 BMDcs 针对不同刺激 IL-27 p28 亚基 mRNA 转录水平改变 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 IL-27 p28 mRNA relative expressions in microglia cells and BMDcs treated with different stimuli ($\bar{x} \pm s$)

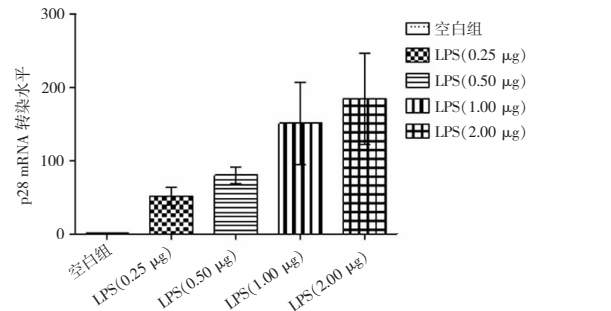
分组	小胶质细胞	BMDcs
空白组	1.65 ± 0.61	1.27 ± 0.23
LPS刺激组	205.23 ± 30.94 ^{a1}	475.08 ± 63.51 ^{a3}
凋亡 T 细胞刺激组	10.48 ± 2.47	20.69 ± 13.68
凋亡 T 细胞+LPS 刺激组	66.08 ± 22.19 ^{b1}	122.67 ± 36.14 ^{b3}
IFN-γ+LPS 刺激组	539.02 ± 57.14 ^{a2}	1019.10 ± 159.73 ^{a4}
凋亡 T 细胞+LPS+IFN-γ 刺激组	129.37 ± 29.66 ^{b2}	322.66 ± 107.93 ^{b4}

LPS刺激用量为 1 μg/ml; a1: 与空白组相比。a1: $P=3 \times 10^{-6}$; a2: $P=4 \times 10^{-7}$; a3: $P=2 \times 10^{-5}$; a4: $P=8 \times 10^{-7}$; b1: 抑制效果与刺激组相比。b1: $P=1.2 \times 10^{-4}$; b2: $P=1 \times 10^{-7}$; b3: $P=3 \times 10^{-4}$; b4: $P=2 \times 10^{-7}$

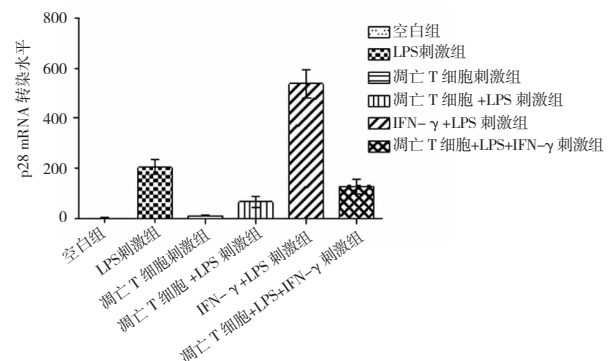
2.1.1 小鼠小胶质细胞 IL-27 p28 基因 mRNA 转录水平

空白组 p28 基因 mRNA 仅有低水平转录;凋亡 T 细胞刺激组中 p28 基因 mRNA 转录水平和空白组相比差异无统计学意义($P=0.730$);在 LPS 不同剂量刺激组,可见 p28 mRNA 表达升高且存在剂量依赖关系(与空白组相比差异具有统计学意义,0.50 μg/ml 组, $P=0.029$)。但到达一定剂量(1.0 μg/ml)后, p28 mRNA 转录水平上升并不明显(LPS 1.0 μg/ml 组与 LPS 2.0 μg/ml 组相比差异无统计学意义, $P=0.305$)。LPS (1.0 μg/ml) 和 IFN-γ 共同刺激组 p28 mRNA 转录水平升高(与空白组相比差异具有统计学意义, $P=4 \times 10^{-7}$);在凋亡 T 细胞+LPS 刺激组和凋亡 T 细胞+LPS+IFN-γ 刺激组 p28

mRNA 转录水平下降,并且与 LPS 刺激组+LPS 和 IFN-γ 刺激组相比,对 p28 mRNA 转录水平抑制具有统计学意义($P_{LPS+凋亡细胞}=1.2 \times 10^{-4}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=1 \times 10^{-7}$)。见图 1。



A. 小胶质细胞经不同剂量 LPS 刺激



B. 小胶质细胞经不同条件刺激

图 1 小胶质细胞 p28 亚基基因 mRNA 转录水平

Fig.1 mRNA transcription levels of p28 in microglia cells

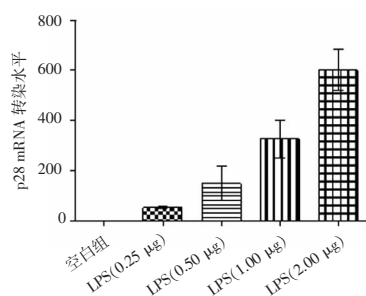
2.1.2 小鼠 BMDcs IL-27 p28 基因 mRNA 转录水平 空白组 p28 基因 mRNA 仅有低水平转录,凋亡 T 细胞刺激组中 p28 基因 mRNA 转录水平稍有升高(与空白组相比无差异, $P=0.103$);在 LPS 不同剂量刺激组, p28 mRNA 转录水平升高且存在剂量依赖关系(与空白组相比具有统计学意义,0.50 μg/ml 组, $P=0.021$)。IFN-γ+LPS (1.0 μg/ml)刺激组 p28 mRNA 转录水平明显升高(与空白组相比有统计学意义, $P=2 \times 10^{-5}$);在凋亡 T 细胞+LPS 刺激组与凋亡 T 细胞+LPS+IFN-γ 刺激组 p28 mRNA 转录水平下降,下降程度与 LPS 刺激组及 IFN-γ+LPS 刺激组比较,对 p28 mRNA 转录水平抑制具有统计学意义($P_{LPS+凋亡细胞}=3 \times 10^{-4}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=2 \times 10^{-7}$)。见图 2。

2.2 各组小鼠小胶质细胞和 BMDcs IL-27 蛋白表达水平

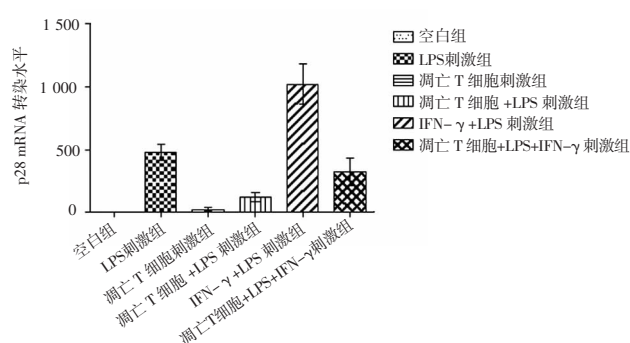
Western blot 结果显示,小鼠小胶质细胞和 BMDcs 在空白组 IL-27 蛋白有基础表达,凋亡 T 细胞刺激组 IL-27 蛋白的表达量与空白组相比无明显增多;小胶质细胞在 LPS 刺激组 IL-27 蛋白表达和 p28 mRNA 表达趋势一致,即随着剂量增加 IL-27 表达相应增加($P_{LPS 0.25 \mu g/ml}=0.022$)但在 1.0 μg/ml 组和 2.0 μg/ml 组相比,IL-27 增加不明显($P_{LPS 2.0 \mu g/ml}=0.724$)。BMDcs 在 LPS 刺激组随着剂量增加,IL-27 表达和 p28 mRNA 表达趋势一致($P_{LPS 0.50 \mu g/ml}=0.011$),并表现出剂量依赖关系($P_{LPS 2.0 \mu g/ml}=0.039$)。LPS (1.0 μg/ml) 和 IFN-γ 共刺激组 IL-27 表达和空白组相比明显增加,条带明显增粗(小胶质细胞: $P=$

8×10^{-7} ; BMDCs: $P=2 \times 10^{-7}$); 在凋亡 T 细胞刺激组 IL-27 蛋白表达量与原刺激组相比明显降低(均重复 3、4 次)(小胶质

细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=9.6 \times 10^{-5}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=3 \times 10^{-7}$; BMDCs: $P_{LPS+凋亡细胞}=0.001$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=1.1 \times 10^{-5}$)。见图 3、4。



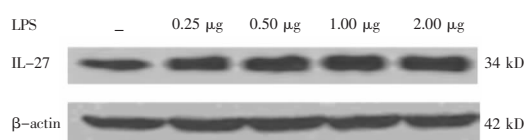
A. BMDCs 经不同剂量 LPS 刺激



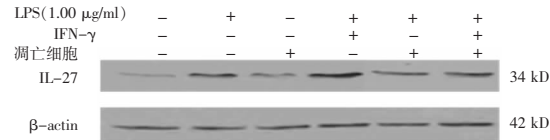
B. BMDCs 经不同条件刺激

图 2 BMDCs p28 亚基因 mRNA 转录水平

Fig.2 mRNA transcription levels of p28 in BMDCs



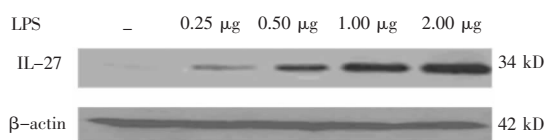
A. 小鼠小胶质细胞经不同剂量 LPS 刺激 IL-27 蛋白表达



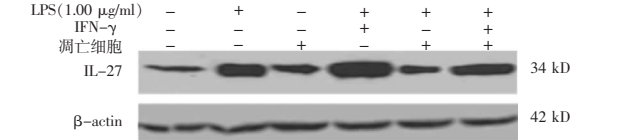
B. 小鼠小胶质细胞不同刺激条件下 IL-27 蛋白表达

图 3 小鼠小胶质细胞 IL-27 蛋白表达

Fig.3 Expressions of IL-27 in mice microglia cells



A. 小鼠 BMDCs 经不同剂量 LPS 刺激 IL-27 蛋白表达



B. 小鼠 BMDCs 不同刺激条件下 IL-27 蛋白表达

图 4 小鼠 BMDCs IL-27 蛋白表达

Fig.4 Expressions of IL-27 in BMDCs

3 讨论

在中枢神经系统炎症发生时,外周树突状细胞会通过血脑屏障,作为抗原递呈细胞诱导并激活 T 细胞。伴随炎症进展,在炎症因子以及细胞因子刺激下树突状细胞会分泌多种细胞因子,并演变为调节性 T 细胞^[11]。同时小胶质细胞会分泌多种细胞因子、炎症趋化因子、营养因子,参与细胞间信号传递以及调节炎症反应^[12]。所以在中枢神经系统,小胶质细胞和树突状细胞在免疫调节与炎症进展中起着非常重要的作用。

在对外周巨噬细胞和树突状细胞等抗原递呈细胞的研究中发现,由 LPS 和 IFN- γ 对 IL-27 的诱导,是通过依赖髓样分化因子(myeloid differentiation factor, MyD)88 和不依赖 MyD88 2 种方式完成的。其中 LPS 主要通过 Toll 样受体 4,诱导 IL-27 的表达,分别通过衔接蛋白 Trif 和衔接蛋白 MyD88 所介导。衔接蛋白 Trif 分别会通过干扰素调节因子(interferon regulatory factor, IRF)3 作用于 p28 启动子水平,对 p28 亚基启动子进行正向的表达调控,衔接蛋白 Trif 本身也会直接在启动子水平促进 EBI3 的表达^[13];而衔接蛋白 MyD88 通过核因子- κ B(nuclear factor, NF- κ B)、c-Rel、p50、p65 对 p28 亚基启动子进行正向的表达调控,同时在启动子水平促进 EBI3 的表达^[14]。IFN- γ 诱导 p28 表达是主要通过 IFN- γ 受体 (IFN- γ R),但不通过 NF- κ B,依赖 IRF1 在 p28 启动子水平正向调控其表达^[15]。

通过已有研究证明,在正常的中枢神经系统,抗原递呈细胞 IL-27 的表达量很低^[16],在脑部弓形虫慢性感染所产生的炎症中,抗原递呈细胞中 EBI3 亚基表达水平有 3 倍的升高,而 p28 亚基表达水平有近 500 倍升高。在体外实验中,中枢神经系统抗原递呈细胞受到 LPS 和 IFN- γ 刺激诱导时,p28 亚基表达水平有 2 000 倍的升高^[17]。在机体内环境免疫系统调节中,EBI3 可被病原体和宿主源的炎症刺激(包括 LPS、与 CD40 的链接反应或暴露于炎症性因子)所上调^[18]。而 IL-27 作为分泌型蛋白,其亚基 p28 鲜有单独分泌出细胞,而是与 EBI3 共同分泌出细胞。通过这种方式,在免疫反应中 IL-27 的分泌与免疫作用被严格的控制起来^[19]。由此可见,p28 亚基与 EBI3 亚基在调节 IL-27 表达时都起着重要作用。IL-27 在平衡有效的免疫反应和免疫病理损伤

上,有重要的影响^[20]。经抗原细胞分泌出的 IL-27 可以促进早期的 Th1 细胞分化,但随后会抑制 Th1 细胞, Th2 细胞和 Th17 细胞的反应,起到免疫抑制的作用^[21],进而保护机体免于收到进一步过度的免疫攻击与损伤。

在本实验中,通过对原代小胶质细胞与 BMDCs 使用 LPS 后,可观察到 p28 mRNA 转录水平如以往报道中所述高于空白组,并且其 mRNA 转录水平和 LPS 存在剂量依赖关系。IL-27 蛋白表达水平变化和 p28 mRNA 转录水平变化一致,即在 LPS 刺激后表达上升,同时存在与 LPS 的剂量依赖关系。使用 IFN- γ 和 LPS 共同刺激后,p28 mRNA 转录水平明显升高,伴随 IL-27 蛋白表达量明显提高。并且在 mRNA 水平与蛋白水平,p28 和 IL-27 表达量明显高于同剂量 LPS (1 μ g/ml)刺激组或大剂量 LPS (2 μ g/ml)刺激组。通过本实验结果可证明,在中枢神经系统所特有的抗原递呈细胞—小胶质细胞的 IL-27 表达调控也存在类似于外周巨噬细胞和树突状细胞的方式,即包括依赖 MyD88 和不依赖 MyD88 两种。并且,小胶质细胞和外周巨噬细胞相似,通过 IFN- γ 亦可以使其产生激发效应,从而使细胞因子 IL-27 表达量明显上调^[22]。

在实验性自生免疫性脑脊髓炎模型中,有近 50% 的浸润 T 细胞发生凋亡。在急性脱髓鞘性脑脊髓炎病例死后尸检发现有近 30% 的 T 细胞发生凋亡^[23]。并有研究发现,体内吞噬细胞在识别与吞噬凋亡 T 细胞后,会引起激活的巨噬细胞和单核细胞 IL-12 表达下降,并且影响 T 细胞的激活与作用,进而对体内的免疫反应产生调控作用^[24]。在中枢神经系统,小胶质细胞吞噬凋亡的 T 细胞,会使其 IL-12、IFN- γ 、TNF- α 分泌下降,并且使其刺激 T 细胞扩增的能力明显减弱^[25]。而小胶质细胞在吞噬凋亡细胞后对其 IL-27 的影响却无相关的报道与研究。

IL-27 作为 IL-12 家族成员之一,在本实验中,通过使用 X 射线照射诱导成为的凋亡 T 细胞分别对原代小胶质细胞和 BMDCs 进行预刺激后,顺序使用 IFN- γ 和 LPS 刺激,结果显示 IL-27 p28 mRNA 转录水平和培养液空白组相比无明显上升,与原刺激组相比表达明显受到抑制。在蛋白表达水平受到凋亡细胞预刺激的实验组 IL-27 表达水平和原刺激组相比明显下降。

通过本实验可推断,在小胶质细胞摄取凋亡 T 细胞后,LPS 诱导 IL-27 p28 的通过 TLR4 Trif/MyD88

通路均被阻滞,以及 IFN- γ 诱导 IL-27 p28 的通过 IFN- γ R IRF1 通路亦被阻滞。从而造成细胞 IL-27 p28 表达下降,进而 IL-27 蛋白表达降低。在小胶质细胞和 BMDCs 摄取凋亡 T 细胞后,IL-27 p28 基因在 mRNA 转录水平均被抑制,最终造成细胞内 IL-27 蛋白表达下降。但本实验的结果尚不能明确提示对 p28 表达通路的阻断抑制是通过哪些环节或位点调控造成的。如何明确小胶质细胞和树突状细胞等中枢神经系统抗原递呈细胞在摄取凋亡 T 细胞后,对 IL-27 表达下调影响的具体分子生物学机制以及对自身免疫性疾病病程的影响,尚需进一步的研究与探讨。

参 考 文 献

- [1] Lobsiger C S, Cleveland D W. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11): 1355-1360.
- [2] Mc Guire C, Beyaert R, van Loo G. Death receptor signaling in central nervous system inflammation and demyelination[J]. *Trends Neurosci*, 2011, 34(12): 619-628.
- [3] Hristova M, Cuthill D, Zbarsky V, et al. Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development[J]. *Glia*, 2010, 58(1): 11-28.
- [4] Steinman R M. Lasker basic medical research award. dendritic cells: versatile controllers of the immune system[J]. *Nat Med*, 2007, 13(10): 1155-1159.
- [5] D Mello C, Le T, Swain M G. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(7): 2089-2102.
- [6] Gee K, Guzzo C, Che Mat N F, et al. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders[J]. *Inflamma Allergy Drug Targets*, 2009, 8(1): 40-52.
- [7] Collison L W, Workman C J, Kuo T T, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function[J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 566-569.
- [8] Holley M M, Zhang Y, Lehrmann E, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2)-TLR9 crosstalk dictates IL-12 family cytokine production in microglia[J]. *Glia*, 2012, 60(1): 29-42.
- [9] Jang S S, Kim W D, Park W Y. Melatonin exerts differential actions on X-ray radiation-induced apoptosis in normal mice splenocytes and Jurkat leukemia cells[J]. *J Pineal Res*, 2009, 47(2): 147-155.
- [10] Li J, Ghiani C A, Kim J Y, et al. Inhibition of p53 transcriptional activity: a potential target for future development of therapeutic strategies for primary demyelination[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(24): 6118-6127.
- [11] Bailey S L, Schreiner B, McMahon E J, et al. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4⁺ T (H)-17 cells in relapsing EAE[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(2): 172-180.
- [12] Garden G A, Moller T. Microglia biology in health and disease[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006, 1(2): 127-137.
- [13] Molle C, Goldman M, Goriely S. Critical role of the IFN-stimulated gene factor 3 complex in TLR-mediated IL-27p28 gene expression revealing a two-step activation process[J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1784-1792.
- [14] Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon- γ -mediated pathways[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(1): 141-152.
- [15] Remoli M E, Gafa V, Giacomini E, et al. IFN-beta modulates the response to TLR stimulation in human DC: involvement of IFN regulatory factor-1 (IRF-1) in IL-27 gene expression[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(12): 3499-3508.
- [16] Li J, Gran B, Zhang G X, et al. IL-27 subunits and its receptor (WSX-1) mRNAs are markedly up-regulated in inflammatory cells in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Neurol Sci*, 2005, 232(1-2): 3-9.
- [17] Stumhofer J S, Laurence A, Wilson E H, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(9): 937-945.
- [18] van Seventer J M, Nagai T, van Seventer G A. Interferon-beta differentially regulates expression of the IL-12 family members p35, p40, p19 and EBI3 in activated human dendritic cells[J]. *J Neuroimmunol*, 2002, 133(1-2): 60-71.
- [19] Pflanz S, Timans J C, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells[J]. *Immunity*, 2002, 16(6): 779-790.
- [20] Stumhofer J S, Hunter C A. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27[J]. *Immunol Lett*, 2008, 117(2): 123-130.
- [21] Sweeney C M, Lonergan R, Basdeo S A, et al. IL-27 mediates the response to IFN- β therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells[J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(6): 1170-1181.
- [22] Fernandez-Boyanapalli R, McPhillips K A, Frasch S C, et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in chronic granulomatous disease is reversed by IFN- γ in a nitric oxide-dependent manner[J]. *J Immunol*, 2010, 185(7): 4030-4041.
- [23] Bauer J, Stadelmann C, Bancher C, et al. Apoptosis of T lymphocytes in acute disseminated encephalomyelitis[J]. *Acta Neuropathol*, 1999, 97(6): 543-546.
- [24] Girkontaite I, Urbonaviciute V, Masada D, et al. Apoptotic cell selectively suppress the Th1 cytokine interferon gamma in stimulated human peripheral blood mononuclear cells and shift the Th1/Th2 balance towards Th2[J]. *Autoimmunity*, 2007, 40(4): 327-330.
- [25] Marin-Teva J L, Cuadros M A, Martin-Oliva D, et al. Microglia and neuronal cell death[J]. *Neuron Glia Biol*, 2011, 7(1): 25-40.

(责任编辑: 冉明会)