

骨髓间充质干细胞抑制小胶质细胞介导的炎症反应

张凯华¹, 王飞², 胡慧敏¹, 黄华¹, 安沂华^{2,3}

(1. 首都医科大学, 北京市神经外科研究所, 北京 100050; 2. 首都医科大学, 北京三博脑科医院, 北京 100093;
3. 武警总医院细胞移植科, 北京 100039)

【摘要】 目的 研究骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMMSCs)对小胶质细胞介导的炎症反应的抑制作用。方法 实验分为四组: 组一: 小胶质细胞(BV2)生长于DMEM(High Glucose)培养液中; 组二: BV2细胞生长于加入脂多糖(LPS)的上述培养液中; 组三: BV2细胞、BMMSCs共培养于加入LPS的上述培养液中; 组四: 骨髓间充质干细胞(BMMSCs)生长于加入LPS的上述培养液中。观察BV2细胞的生长状态、电镜超微结构变化及其分泌的炎症因子TNF- α 表达量的变化。结果 光镜下BV2细胞密度依次为: 组一>组三>组二, 组四中BMMSCs生长状态良好; 电镜下可见组二BV2细胞内出现大量肿胀及空泡化的线粒体、内质网等细胞器, 少见生长活跃多核仁细胞, 同时可见大量崩解细胞, 组三细胞状态明显好于组二; BV2细胞分泌的炎症因子TNF- α 表达量依次为组二>组三>组一>组四。结论 BMMSCs抑制小胶质细胞介导的炎症反应, 进而发挥神经保护作用。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 小胶质细胞; 炎症反应

【中图分类号】 Q95-33, R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0001-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.000

Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit inflammatory response of microglial cells

ZHANG Kai-hua¹, WANG Fei², HU Hui-min¹, HUANG Hua¹, AN Yi-hua^{2,3}

(1. Capital Medical University Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China;

2. Capital Medical University, Beijing Sanbo Brain Hospital, Beijing 100093;

3. Department of Stem Cell Transplantation, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039)

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC) on the inflammatory response of microglial cells. **Methods** The samples were divided into four groups. Group I: microglial (BV-2) cells were cultured in DMEM (high glucose). Group II: BV-2 cells were cultured in DMEM containing lipopolysaccharide (LPS). Group III: BV-2 cells and BMMSCs were co-cultured in DMEM. Group IV: BMMSCs were cultured in DMEM containing LPS. The growth state and ultrastructure of BV-2 cells were observed and the changes of TNF- α expression were detected. **Results** Different cell densities of BV-2 cells were observed under the optical microscope in an order from high level to low level: group I > group III > group II. The expressions of TNF- α were: group II > group III > group I. Ultrastructural observation of BV-2 cells showed that there were a large number of swollen mitochondria and endoplasmic reticulum, some of them showed vacuolization. No BV-2 cells with multiple nucleoli were found in the group II indicating the absence of active cell growth. At the same time, cytolysis was observed only in the group II. The growth of BV-2 cells in the group III was better than that in the group II. **Conclusions** BMMSCs can inhibit inflammatory response

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:81341043);北京市自然科学基金(编号:7122028);广东省战略性新兴产业核心技术攻关项目(编号:2011A081401003)。

【作者简介】 张凯华(1986-),男,神经外科硕士,研究方向为神经系统损伤与修复, E-mail: zhanyue00@126.com

【通讯作者】 安沂华,教授,主任医师,博士生导师,研究方向为神经系统损伤与修复, E-mail: riveran@163.com

of microglial cells, therefore, play a neuroprotective role.

【Key words】 Bone marrow mesenchymal stem cells; Microglia; Inflammatory response

骨髓间充质干细胞(BMMSCs)是一种能够自我复制和多向分化的非造血多能干细胞^[1,2]。近十余年来,已有大量实验证明了 BMMSCs 的多向分化潜能、免疫调节特性、定向迁移能力和其与组织工程材料联合移植用于修复各系统器官损伤的应用前景^[3]。小胶质细胞是定居于中枢神经系统,参与调节固有免疫和适应性免疫应答的主要效应细胞。近来的研究表明,BMMSCs 移植可能通过调节小胶质细胞(MG)介导的免疫炎症反应发挥神经保护作用^[4],其具体机制有待进一步研究。本研究旨在通过体外细胞实验探讨 BMMSCs 是否能够抑制小胶质细胞介导的炎症反应,进而发挥神经保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞

本实验所采用的小胶质细胞是首都医科大学神经科学研究所赠送的 BV2 细胞系;所采用的实验动物是 SPF 级 2 周龄雄性 SD 大鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2009-0017】;无菌手术在北京市神经外科研究所动物实验室进行【SYXK(京)2013-0009】。

1.1.2 主要试剂与仪器

细胞培养基 DMEM (high glucose) (Gibco 公司),LPS (Sigma 公司),小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司),奥林巴斯生物显微镜 IX71(奥林巴斯),二氧化碳细胞培养箱(Thermo 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 BMMSCs 的分离、培养及传代

脊椎脱臼法处死 SD 大鼠,严格无菌条件下分离双下肢,DMEM (high glucose) 培养液冲出骨髓,过 200 目细胞筛后,将滤液于 1000 r/min 下离心 5 min,弃去上清液,以含体积分数为 10% 的胎牛血清的 DMEM (high glucose) 培养液重悬沉淀, 1×10^8 / mL 密度接种,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。24 h 后首次半量换液,以后每 3 d 全量换液一次。待贴壁细胞达到 80% 融合后,按 1:2 比例传代。

1.2.2 BV2 细胞的培养、传代

BV2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM

(high glucose) 培养液(同 BMMSCs 所用培养基),在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,每天半量换液一次。待贴壁细胞生长至 80% 融合后,按 1:3 比例传代。

1.2.3 实验分组及各组处理

实验分为 4 组,组一:BV2 细胞以 1×10^6 / mL 的密度接种于加入 DMEM (high glucose) 培养液的六孔板中;组二:BV2 细胞以 1×10^6 / mL 的密度接种于加入 DMEM (high glucose) 培养液的六孔板中,培养液中已预先加入 LPS, LPS 终浓度为 100 ng/mL;组三:将 Transwell 小室放入六孔板中,上室接种 BMMSCs,下室接种 BV2 细胞,细胞密度均为 1×10^6 / mL,两种细胞共培养于预先加入终浓度为 100 ng/mL 的 LPS 的 DMEM (high glucose) 培养液中;组四:BMMSCs 以 1×10^6 / mL 的密度接种于加入 DMEM (high glucose) 培养液的六孔板中,培养液中已预先加入 LPS, LPS 终浓度为 100 ng/mL。实验各组所加培养基均为 2 mL,于同一恒温培养箱内培养 6 h。

1.2.4 观察 BV2 细胞形态变化

光学显微镜下观察比较组一、组二、组三中 BV2 细胞的生长状态,包括贴壁情况、细胞密度、细胞状态等。

1.2.5 观察 BV2 细胞超微结构变化

制备电镜标本,透射电镜下观察比较组一、组二、组三中 BV2 细胞的超微结构,主要包括核仁、线粒体、核糖体等细胞器的状态。

1.2.6 TNF- α 的测定

根据使用说明书,采用 ELISA 方法测定四组中 BV2 细胞炎症因子 TNF- α 的分泌量。

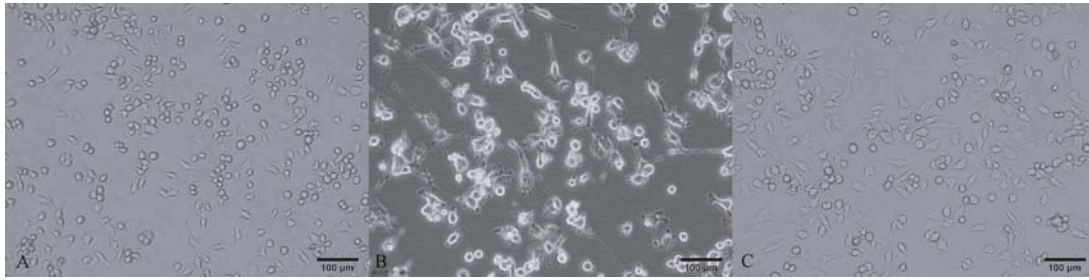
2 结果

2.1 各组中 BV2 细胞生长状态

光镜下观察各组细胞密度依次为:组一 > 组三 > 组二;组一中 BV2 细胞密集,大部分细胞贴壁生长,绝大多数细胞呈典型的梭形形态,少见单个呈悬浮状态细胞,见图 1A;组二中 BV2 细胞稀疏,可见大量呈团块状悬浮状态的细胞团,贴壁细胞数量明显少于组一,同时可见多数细胞体积增大,形态不规则,呈阿米巴样,细胞突起增多增长,见图 1B;组三中 BV2 细胞密度小于组一,大于组二,可见少量呈小团块状悬浮状态的细胞团,较组二明显减少,细胞

形态以梭形为主,阿米巴样细胞较组二明显减少,见图 1C。组四中 BMMSCs 生长密集,贴壁生长,形态

不规则,呈梭形、纺锤形和多角形,见图 2。

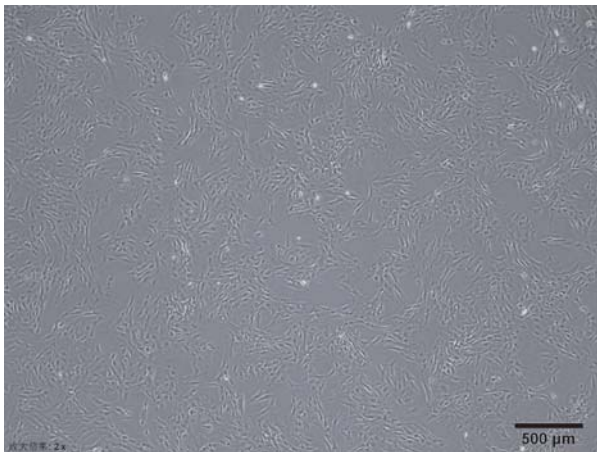


注:A. 生长于普通 DMEM(High Glucose)培养液中的 BV2 细胞;B. 生长于加入脂多糖(LPS)的 DMEM 培养液中的 BV2 细胞;C. 与 BMMSCs 共培养于加入 LPS 的 DMEM 培养液中的 BV2 细胞。(Bar = 100μm)

图 1 BV2 细胞光镜下形态特征

Note: A. BV2 cells cultured in DMEM (high glucose). B. BV2 cells cultured in DMEM (high glucose) containing LPS. C. BV2 cells co-cultured with BMMSCs in DMEM (high glucose). Bar = 50 μm.

Fig. 1 Microscopic appearance of BV2 cells



注:生长于加入 LPS 的 DMEM 培养液中的 BMMSCs (Bar = 500 μm)

图 2 BMMSCs 光镜下形态

Note: BMMSCs cultured in DMEM (high glucose) containing LPS. Bar = 500 μm.

Fig. 2 Microscopic appearance of BMMSCs

2.2 各组 BV2 细胞超微结构改变

电镜下观察各组细胞可见,组一中可见部分分裂活跃的多核细胞,多数细胞胞核正常大小,核浆比例大致正常,线粒体、内质网稍肿胀,少见空泡样变,游离核糖体密集,可见大量有翻译功能的多聚核糖体,见图 3A;组二中 BV2 细胞内未见到多核细胞,可见胞核处于固缩、碎裂、溶解状态的凋亡细胞,部分存活细胞中可见核浆比例倒置,线粒体出现明显肿胀或者固缩,空泡样变较其他两组明显多见,游离核糖体相对稀疏,但是少见多聚核糖体,见图 3B;组三中 BV2 细胞内少见多核细胞,未见到处于固缩、碎裂、溶解状态的凋亡细胞,偶见核浆比例倒置细

胞,线粒体、内质网形态正常,肿胀、固缩线粒体少见,空泡样变明显少于组二,游离核糖体密集,多聚核糖体多于组二、少于组一,见图 3C。因光镜下明确组四中为典型的 BMMSCs,与 BV2 细胞超微结构比较无意义,所以未做该组电镜切片。

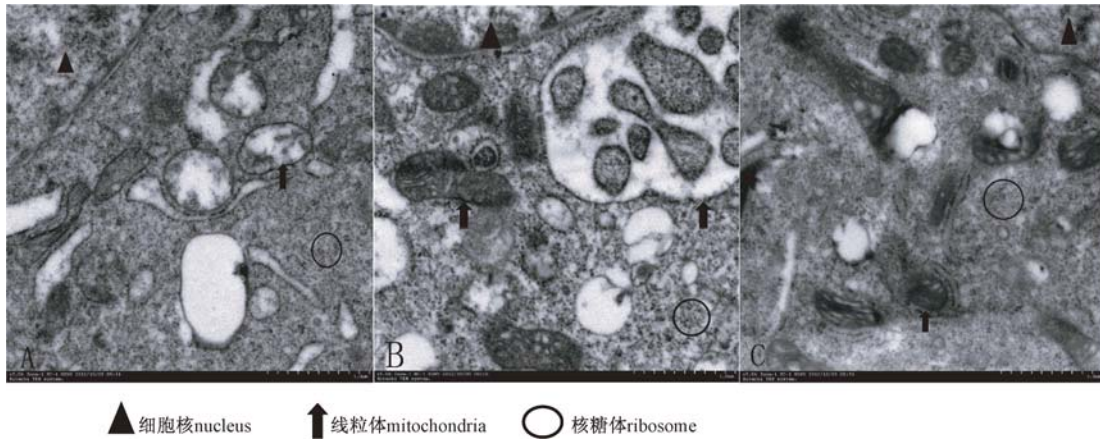
2.3 ELISA 方法检测 TNF-α

采用 ELISA 方法,严格按照说明书方法检测四组细胞上清液中的 TNF-α,结果显示组三 TNF-α 浓度明显低于组二;未被 LPS 诱导激活的组一与不含小胶质细胞的组四浓度明显低于组二、组三,两组相比无统计学意义,见图 4。

3 讨论

BV2 细胞是一种基本具备原代培养的小胶质细胞的形态学、表型以及各项功能特点,相对较易培养的成熟细胞系^[5],广泛应用于研究中枢神经系统免疫炎症反应方面的体外研究。LPS 可以诱导 BV2 细胞激活,建立 BV2 细胞介导的神经炎症和毒性的经典细胞模型^[6]。BMMSCs 的免疫调节特性及其临床应用也已被大量动物实验及临床前期研究证实^[7]。本研究通过体外细胞实验探讨 BMMSCs 在 LPS 激活的 BV2 细胞介导的免疫炎症反应中发挥的作用。

研究发现,BMMSCs 可以明显影响 LPS 诱导活化的小胶质细胞的生长状态、超微结构及炎症因子的分泌。相同培养条件下,被同浓度的 LPS 诱导活化后,光镜下可见共培养组的 BV2 细胞无论从细胞密度、贴壁情况,还是呈团块状悬浮状态的失活细胞的数量,均明显好于非共培养的 BV2 细胞组,说明



注:A. 生长于普通 DMEM (High Glucose) 培养液中的 BV2 细胞;B. 生长于加入脂多糖(LPS)的 DMEM 培养液中的 BV2 细胞;C. 与 BMMSCs 共培养于加入 LPS 的 DMEM 培养液中的 BV2 细胞。

图 3 BV2 细胞超微结构特征

Note: A. BV2 cells cultured in DMEM (high glucose). B. BV2 cells cultured in DMEM (high glucose) containing LPS. C. BV 2cells co-cultured with BMMSCs in DMEM (high glucose).

Fig. 3 Ultrastructural features of the BV2 cells

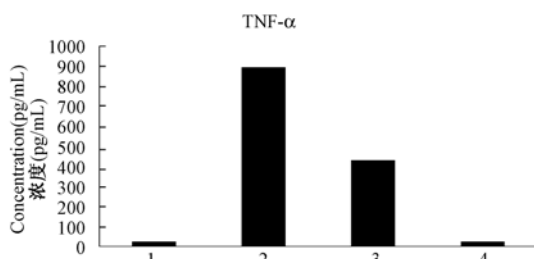


图 4 四组细胞上清液中的 TNF- α 分泌量比较

Fig. 4 The quantity of TNF- α in the supernatant fluid of four groups

相同程度的 LPS 诱导激活条件下, BMMSCs 可以减轻炎症反应对 BV2 细胞的损伤程度。透射电镜下比较前三组细胞超微结构可见, 共培养组内处于核固缩、核碎裂、核溶解状态的细胞明显少于 LPS 激活 BV2 细胞组, 说明相同程度的 LPS 诱导激活条件下, BMMSCs 可以抑制炎症反应所导致的 BV2 细胞凋亡。与共培养组和单纯 BV2 细胞组相比, LPS 激活 BV2 细胞组中呈肿胀或固缩状态的线粒体明显增多, 核糖体密度明显减低, 有翻译功能的多聚核糖体数目明显减少, 说明相同程度的 LPS 诱导激活条件下, BMMSCs 可以减轻炎症反应对 BV2 细胞结构及功能的影响, 因为细胞维持自身存活及进行分裂增殖等功能的过程中需要正常结构的线粒体提供能量, 同时需要正常结构的核糖体作为细胞内蛋白质合成的分子机器, 保证细胞各种功能的实现等等。以上均说明 BMMSCs 能够减轻炎症反应过程中小胶质细胞受到的炎性损伤。

TNF- α 是一种具有代表性的炎症介质, 在中枢神经系统炎症反应中发挥关键作用^[8]。它由小胶质细胞产生并对小胶质细胞发挥细胞毒作用^[9]。本实验结果显示, 共培养组较 LPS 激活 BV2 细胞组 TNF- α 有明显降低, 说明 BMMSCs 可以通过非细胞间接触的方式减少 BV2 细胞分泌的炎症因子, 减轻炎症反应的程度, 对小胶质细胞介导的炎症反应起到抑制作用。国外虽然已有动物实验证明 BMMSCs 移植可以减少组织周围炎症因子 TNF-1 α 、IL1 β 等的表达量, 但是并没有证明炎症因子的减少是 BMMSCs 直接作用于小胶质细胞引起的, 还是通过作用于其他细胞, 比如中枢神经系统数量最多的星形胶质细胞来发挥作用, 也没有证明这种作用是通过细胞间接触的方式还是旁分泌等其他的方式发挥作用。

综上所述, 本实验结果表明: BMMSCs 能够通过非细胞间接触的方式抑制小胶质细胞介导的炎症反应, 减少小胶质细胞分泌的炎症因子的表达, 维持小胶质细胞正常结构和功能, 进而发挥神经保护作用。虽然大量的研究已经报道过 BMMSCs 的免疫抑制作用, 但其潜在机制仍然不是很清楚, 我们的研究说明 BMMSCs 能够通过某种或某几种可通过扩散方式穿越 Tranwell 膜的可溶性因子发挥其对免疫炎症反应的抑制作用, 细胞间接触并不是间充质干细胞发挥抗炎作用的前提条件。本研究虽然初步证实了 BMMSCs 对小胶质细胞介导的炎症反应的抑制作用, 但是 BMMSCs 的数量与其发挥抑制效应的关系

及随着时间推移 BMMSCs 抑制效应强弱的变化都有待于进一步研究,这些研究将为我们揭开 BMMSCs 发挥免疫抑制效应的作用机制的神秘面纱提供线索、指明方向。

参 考 文 献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411):143-147.
- [2] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001, 226(6):507-520.
- [3] Ohishi M, Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2010, 109(2):277-282.
- [4] Ohtaki H, Ylostalo J H, Foraker J E, et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(38):14638-14643.
- [5] Henn A, Lund S, Hedtjarn M, et al. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation[J]. ALTEX, 2009, 26(2):83-94.
- [6] Nam KN, Choi YS, Jung HJ, et al. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(4):493-499.
- [7] Patel SA, Sherman L, Munoz J, et al. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2008, 56(1):1-8.
- [8] Stoll G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS[J]. Prog Neurobiol, 1999, 58(3):233-247.
- [9] Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, et al. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines[J]. J Immunol, 1995, 154(2):944-953.

[收稿日期] 2013-12-11

会讯

中英首届实验动物福利伦理国际论坛在北京召开

由中国实验动物学会实验动物福利伦理专业委员会和英国内政部共同主办、北京实验动物行业协会承办的"中英首届实验动物福利伦理国际论坛"于 2014 年 3 月 25 日至 27 日在北京举行。论坛由英国全球合作基金项目资助。

论坛以"提升实验动物福利伦理管理规范和技术水平"为宗旨,从实验动物福利伦理管理法规与技术标准、人员培训和技术资质认定、善待实验动物、动物保护和 3R 理念实践等相关的国际合作议题进行广泛而深入的探讨,通过借鉴国际公认的管理经验和先进的科技成果,以期推动我国实验动物福利伦理管理和科技水平的快速提升。

论坛特邀了十余名国际知名专家和多位国内专家进行专题报告,并与与会者进行交流。首届论坛的主要议题包括:

- 1) 中国实验动物福利伦理及审查国家标准的建立和研讨;
- 2) 促进药物安全评价善待动物的指南和发展规划研讨;
- 3) 停止化妆品不必要动物实验的战略研讨;

3 月 25 日,与会代表和专家首先参观了丹麦 Novo Nordisk 在北京的符合欧洲标准的现代化实验动物设施。晚上,应英方的邀请,论坛代表参加了英国驻华大使馆在大使官邸举行的盛大冷餐招待会。中方包括台湾共计 80 多名与会专家学者和 10 多名来自英国、丹麦、美国、新加坡、荷兰等国的专家应邀参加。英国大使馆公使 Andrew Key 和论坛中方执行主席,国家人口计生委科研所研究员,中国实验动物学会实验动物福利伦理专业委员会主任孙德明研究员先后发表了热情洋溢的讲话,对中英双方进一步加强科技交流,推动国际实验动物福利伦理事业的健康发展和科技文明进步,都充满了信心。

26 日至 27 日,论坛大会学术报告正式举行。来自国内外科技、教育、农业、医疗卫生、生物医药、化工、环保、质量认证和管理以及军事医学等相关行业的专家学者共计 120 余人参加了论坛。

论坛取得了丰富的科技交流成果和圆满的预期效果。中英双方对首届论坛均给予了高度评价,并决定继续进行更深入的交流合作,英方将予以论坛继续的支持,并初步商定:"中英第二届实验动物福利伦理国际论坛"将于 2015 年 3 月在北京举办。

中国实验动物学会实验动物福利伦理专业委员会供稿