

烟碱型乙酰胆碱受体在离体海马小胶质细胞上的表达与定位

贾思远 雷露雯 王克万 王勇

【摘要】 目的 探讨烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)在体外培养海马小胶质细胞上的表达和定位。方法 取新生 SD 大鼠的海马组织,进行胶质细胞的混合培养,然后分离纯化小胶质细胞,采用免疫荧光染色检测 CD11b/c 进行小胶质细胞的鉴定;采用 RT-PCR 和免疫荧光双标分别检测 $\alpha 7$ -nAChR 在小胶质细胞中的表达和定位。结果 免疫荧光染色显示分离纯化的细胞表达小胶质细胞特异性抗体 CD11b/c;RT-PCR 能扩增出长度为 450 bp 的 $\alpha 7$ -nAChR 目的条带,免疫荧光双标检测显示小胶质细胞 CD11b/c 和 $\alpha 7$ -nAChR 染色阳性,分别呈红色和绿色荧光,叠加后呈棕黄色,且细胞膜荧光信号较强。结论 $\alpha 7$ -nAChR 在体外培养的海马小胶质细胞中能正常表达,定位在细胞膜的功能性 $\alpha 7$ -nAChR 较丰富。

【关键词】 海马; 小胶质细胞; 烟碱型乙酰胆碱受体

【中图分类号】 R329.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)08-0761-03

Expression and localization of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors on rat hippocampal microglial cells JIA Si-yuan*, LEI Lu-wen, WANG Ke-wan, WANG Yong. *Department of Burns, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Corresponding author: WANG Yong, Email: yongwh2005@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression and distribution of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$ -nAChR) on rat hippocampal microglial cells. **Methods** Mixed primary glial cells obtained from the cerebral cortex of 1-day-old rats were cultured for 7-9 days, and the microglial cells were purified. The expression of $\alpha 7$ -nAChR at the protein and mRNA levels on the microglia cells was detected using double immunolabeling with anti-CD11b/c antibody and RT-PCR, respectively. **Results** The resting microglial cells harvested from mixed primary glial culture presented with ramified surface covered with spines, which may serve as a unique feature for identifying microglial cells. A band of 450-bp corresponding to $\alpha 7$ -nAChR was specifically amplified by RT-PCR. Double immunolabeling showed colocalization of $\alpha 7$ -nAChR and CD11b/c on the cultured hippocampal microglial cells. **Conclusion** $\alpha 7$ -nAChR can be normally expressed in rat hippocampal microglial cells in *in vitro* culture.

【Key words】 Hippocampus; Microglia; $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors

颅脑手术或其他原因引起的颅脑损伤常伴颅内炎性反应,参与中枢炎性反应的细胞包括透过血脑屏障的外周血白细胞和中枢神经系统固有的巨噬样小胶质细胞。小胶质细胞在中枢神经系统中分布较广,起着支持、营养、保护及损伤修复等重要作

用,是神经系统不可缺少的组成部分。但小胶质细胞激活释放的炎性介质也可引起一系列病理反应,进一步加重对大脑的损害。所以,削弱小胶质细胞引起的过度的炎性反应是减少继发性脑损伤的重要措施。研究表明,激活巨噬细胞烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)可减少炎性介质的分泌,从而抑制外周炎性反应^[1,2]。因中枢神经系统中的小胶质细胞与外周巨噬细胞具有相似性^[3],所以中枢神经系统中小胶质细胞 $\alpha 7$ -nAChR 的表达以及能否通过激活这种受体从而抑制炎性介质的分泌,减轻炎性损伤的问题备受关注。目前关于小胶质细胞 $\alpha 7$ -nAChR 的表

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.08.002

基金项目:国家自然科学基金(30471928);广东省自然科学基金(07005203)

作者单位:510282 广州,南方医科大学珠江医院烧伤科(贾思远),药剂科(雷露雯、王勇);510515 广州,南方医科大学南方医院神经外科(王克万)

通信作者:王勇,Email: yongwh2005@163.com

达与功能的研究多为皮层小胶质细胞^[4],海马小胶质细胞 $\alpha 7$ -nAChR 的定位研究鲜见报道。 $\alpha 7$ -nAChR 的表达受许多因素的影响,即便是同种细胞在不同脑区其表达也不完全相同^[5],因此本研究利用 RT-PCR、免疫荧光双标技术从基因转录和蛋白水平分别探讨 $\alpha 7$ -nAChR 在海马小胶质细胞上的表达和定位,以期为防止和治疗脑损伤后继发性炎症损害提供实验基础和新的思路。

材料和方法

一、材料

新生 SD 大鼠由南方医科大学实验动物中心提供(合格证号:粤监证字 2006A051,2006B023)。DMEM/F12 高糖培养基购于美国 Hyclone 公司,新生胎牛血清和羊血清、胰蛋白酶/EDTA 购于美国 Gibco 公司,L-谷氨酰胺、多聚赖氨酸均购于美国 Sigma 公司,小鼠抗大鼠 CD11b/c 单克隆抗体、兔抗大鼠 $\alpha 7$ -nAChR 购于英国 Serotec 公司,DEXAS 标记的羊抗小鼠 IgG 和 FITC 标记的羊抗兔 IgG 购于美国 Calbiochem 公司。反转录试剂盒购于日本 TOYOBO 公司,PCR 试剂购于中国大连宝有限公司,PCR 引物由上海基康公司合成,RNA 提取试剂购于美国 Invitrogen 公司。

二、小胶质细胞的分离纯化

参照 McCarthy 和 de Vellis^[6]方法进行大鼠海马小胶质细胞的混合培养。取新生 1~2 d 内 SD 大鼠,用 75%乙醇浸泡消毒后,无菌条件下迅速取出大脑,在 D-Hanks 液中清洗并剔除脑膜和血管,分离海马,经 1.25 g/L 胰蛋白酶 37 °C 水浴消化 5 min,用完全培养基终止消化,1000 r/min 离心 5 min,弃上清后制成细胞悬液,接种至预先用多聚赖氨酸包被的细胞培养瓶中,于 37 °C、5%CO₂ 孵箱中培养,每 2~3 天换液。待混合培养细胞生长 7~9 d,用 12 mmol/L 利多卡因分离纯化小胶质细胞。分离纯化的小胶质细胞放入 37 °C、5%CO₂ 孵箱培养,每 2~3 天换液。

三、免疫荧光细胞化学法鉴定小胶质细胞

经纯化的小胶质细胞培养于盖玻片上,培养 3 d 后经 PBS 充分洗涤,40 g/L 多聚甲醛室温下固定 30 min;0.01 mol/L PBS 清洗,加入 0.3%的 TritonX-100 室温下作用 30 min;0.01 mol/L PBS 清洗,以 10%羊血清在 37 °C 条件下封闭 30 min;加入小鼠抗大鼠 CD11b/c 单克隆抗体,4 °C 孵育 48 h;0.01 mol/L PBS 液清洗,加入 DEXAS 红色荧光标记的羊抗小鼠 IgG 二抗,避光,37 °C 作用 1~2 h 后应用荧光显微镜

(激发光波长为 490 nm,发射光波长为 520 nm)观察并拍照。

四、RT-PCR 检测小胶质细胞 $\alpha 7$ -nAChR mRNA 的表达

1. 总 RNA 提取:Trizol 体系提取总 RNA,用 1 g/L DEPC 水溶解,其 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0,得到的 RNA 浓度较高,应用 1.2%琼脂糖电泳,100 V 电压,检测 RNA 的完整性。

2. RT-PCR:以提取的 RNA 为模板进行逆转录,反应体系总体积为 20 μ L,含 mRNA 8 μ L、去离子水 3 μ L、5 \times 逆转录缓冲液 4 μ L、dNTP 混合液 2 μ L、RNase 抑制剂 1 μ L、寡聚脱氧胸苷 Oligo(dT) 1 μ L、Rever Tra Ace 逆转录酶 1 μ L。反应条件为:30 °C 10 min,42 °C 45 min,99 °C 5 min,4 °C 5 min。以逆转录反应产物 cDNA 为模板进行扩增, $\alpha 7$ -nAChR 扩增引物序列:上游:5'-CATTGACGTTTCGCTGGT TCC-3',下游:5'-ATGGTG CTGGCGAAGTATTG-3',扩增片段长度为 450 bp,同时以 β -actin 为参照,引物序列:上游:5'-GTCGACAACGGCTCCGGCAT G-3',下游:5'-CTCTTGCTCTGGGCTCG TCGC-3'扩增片段长度为 158 bp。扩增反应体系为 50 μ L,其中 cDNA 20 μ L,聚合酶混合体系 25 μ L,正义引物 1 μ L,反义引物 1 μ L,加灭菌水至 50 μ L。PCR 反应条件是 94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,56 °C 1 min,68 °C 45 min,共 40 个循环,72 °C 7 min。用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

五、免疫荧光双标检测 $\alpha 7$ -nAChR 在小胶质细胞上的表达和定位

采用免疫荧光双标细胞化学染色检测小胶质细胞 $\alpha 7$ -nAChR 的表达。同时加入的一抗为小鼠抗大鼠单克隆抗体 CD11b/c 和兔抗大鼠 $\alpha 7$ -nAChR 抗体,二抗分别为 DEXAS 红色荧光标记的羊抗小鼠 IgG 和 FITC 标记的羊抗兔 IgG,在激发光波长为 490 nm、发射光波长为 520 nm 的荧光显微镜下观察红色荧光,在激发光波长为 470 nm、发射光波长为 490 nm 的荧光显微镜下观察绿色荧光,并通过荧光显微镜自带软件进行叠加。

结 果

一、海马小胶质细胞的鉴定

正常情况下小胶质细胞处于静息状态,胞体小,突起细长,呈分枝状。免疫荧光细胞化学染色显示细胞特异性抗体 CD11b/c 染色阳性,呈红色荧光,表明分离纯化培养的细胞为小胶质细胞(图 1)。

二、RT-PCR 检测小胶质细胞 $\alpha 7$ -nAChR

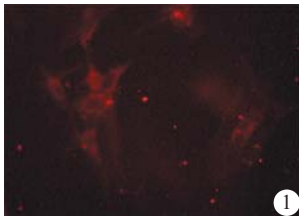
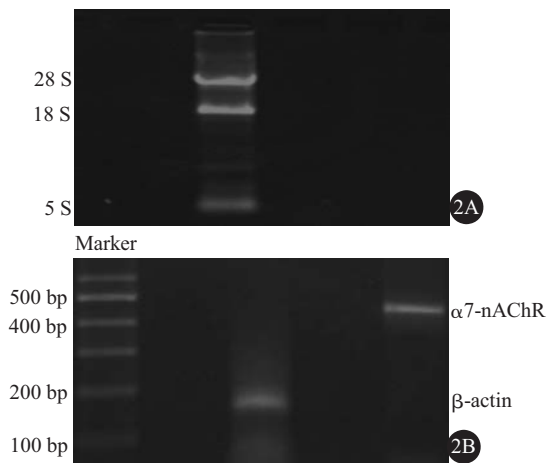


图 1 免疫荧光染色检测海马小胶质细胞 CD11b/c 的表达($\times 400$)

Fig.1 Fluorescence microscopy of cultured hippocampal microglials with anti-CD11b/c antibody ($\times 400$)

mRNA 的表达

从纯化的小胶质细胞中提取的 RNA,经甲醛变性凝胶电泳可见 28 S、18 S、5 S 三条明显的条带(图 2A),无 DNA 污染。以该 RNA 进行逆转录后所获得的 cDNA 为扩增模板,用特异性引物进行 PCR,结果可见 450 bp 的 $\alpha 7$ -nAChR 目的条带及 158 bp 的内置性参照 β -actin 条带(图 2B)。



2A:小胶质细胞总 RNA 电泳图;2B:RT-PCR 产物电泳图

图 2 RT-PCR 检测海马小胶质细胞中 $\alpha 7$ -nAChR mRNA 的表达

Fig.2 RT-PCR analysis of $\alpha 7$ -nAChR mRNA expression in rat microglial cells

三、免疫荧光双标检测 $\alpha 7$ -nAChR 在小胶质细胞上的表达

荧光显微镜下可见小胶质细胞特异性抗体 CD11b/c 呈红色荧光(图 3A), $\alpha 7$ -nACh 呈绿色荧光(图 3B),经图像叠加后发现, $\alpha 7$ -nACh 信号与小胶质细胞特异性信号一致,叠加后信号呈棕黄色,且细胞膜荧光信号较强(图 3C),提示定位在细胞膜的功效



3A:CD11b/c 呈红色荧光;3B, $\alpha 7$ -nACh 呈绿色荧光;3C:3A,3B 叠加后图片

图 3 免疫荧光双标检测 $\alpha 7$ -nAChR 在海马小胶质细胞上的表达与定位($\times 400$)

Fig.3 Expression and localization of $\alpha 7$ -nAChR on cultured hippocampal microglial cells ($\times 400$)

能性 $\alpha 7$ -nAChR 较丰富。

讨 论

小胶质细胞是长驻中枢神经系统的单核吞噬细胞家族的成员之一,在促进受损脑组织的修复方面发挥重要作用^[7,8]。但是持续激活的小胶质细胞释放大炎症因子又能对正常组织造成损害,加重神经损伤。有研究显示激活巨噬细胞 $\alpha 7$ -nAChR 能抑制炎症反应^[9]。因此,探讨参与中枢炎症反应的小胶质细胞是否也具有与巨噬细胞一样的功能性 $\alpha 7$ -nAChR 具有十分重要的意义。

为此,本课题组采用 McCarthy 和 de Vellis^[6]建立的经典方法进行小胶质细胞混合培养,并参照目前小胶质细胞培养方法的新进展进行改良,当混合细胞培养至 7~9 d 时,利用利多卡因对混合培养的小胶质细胞进行分离纯化;对分离所得的小胶质细胞用其特异性抗体 CD11b/c 免疫荧光染色鉴定,细胞均呈现阳性反应;与此同时,笔者以正常羊血清代替一抗作为阴性对照研究,结果未发现任何阳性信号,表明所获得的细胞为小胶质细胞。

对成功分离的小胶质细胞,笔者探讨了小胶质细胞 $\alpha 7$ -nAChR 的基因转录情况。参照文献^[9],以逆转录后获得的 cDNA 为模板,在 $\alpha 7$ -nAChR 特异性引物条件下进行扩增,结果获得期望长度的产物片段。后经产物片段测序显示,其序列与 $\alpha 7$ -nAChR 序列一致。这说明体外培养的海马小胶质细胞能表达 $\alpha 7$ -nAChR mRNA,但功能性的 $\alpha 7$ -nAChR 后必须在转录后经过翻译以及翻译后修饰才能形成,因此仅从 mRNA 水平证明 $\alpha 7$ -nAChR 在小胶质细胞中的存在还不够,必须在蛋白水平进一步证明。

为明确 $\alpha 7$ -nAChR 在小胶质细胞上的表达和定位,本研究采用了免疫荧光双标进行检测,用抗 CD11b/c 单克隆抗体和抗 $\alpha 7$ -nAChR 抗体为一抗,阴性对照用羊血清代替一抗,二抗分别为针对抗 CD11b/c 的红色荧光标记与针对抗 $\alpha 7$ -nAChR 抗体的绿色荧光标记的 IgG,研究结果中绿色荧光信号

(下转 772 页)

心率变慢、血压降低、各种心律失常、凝血障碍等。本研究结果亦显示,H 组和 H+W 组的 LDH 释放率在从 37℃到 34℃过程中,处于急速下降阶段,34℃至 32℃阶段则下降幅度趋缓,而在 30℃时则有明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),说明星形胶质细胞损伤后的保护作用并没有因为温度的降低而增加,也从一个侧面反映了亚低温对脑损伤的保护作用并不是完全通过单纯的抑制细胞新陈代谢来实现的。但由于脑损伤的机制复杂,研究指标众多,本研究仅侧重于模型的建立及基本指标的应用,更多的机理性研究指标如热休克蛋白 70、即刻早期反应基因、细胞因子、黏附分子等有待进一步的实验研究。

体外星形胶质细胞缺血缺氧损伤炎症模型的建立为研究脑损伤过程中亚低温保护提供了新的数据,同时为进一步研究亚低温对缺血缺氧性脑损伤的各种保护机制提供了新的研究平台。

参 考 文 献

[1] Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, et al. Inflammatory

response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2002, 8(2): 101-105.

[2] Sahuquillo J, Mena Mp, Vilalta A, et al. Moderate hypothermia in the management of severe traumatic brain injury: a good idea proved ineffective[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(18): 2193-2204.

[3] Nagai M, Re DB, Nagata T, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(5): 615.

[4] Giaume F, Kirchhoff F, Matute C, et al. Glia: the fulcrum of brain diseases[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(7): 1324-1335.

[5] Wu BY, Liu RY, So KL, et al. Multi-lipofection efficiently transfected genes into astrocytes in primary culture[J]. *J Neurosci Methods*, 2000, 102(2): 133-141.

[6] Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al. Small differences in intracerebral brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1987, 7(6): 729-738

[7] 江基尧. 亚低温在治疗急性颅脑损伤中的疗效和争议[J]. *中华神经医学杂志*, 2003, 2(4): 244-247.

(收稿日期:2009-06-10)

(本文编辑:王志娟)

(上接 763 页)

表示 $\alpha 7$ -nAChR 存在,红色荧光信号则表明该细胞为小胶质细胞。实验结果证实同一细胞能同时表达这两种信号,细胞膜上荧光信号更强,阴性对照组未出现任何信号,说明体外培养的小胶质细胞能表达 $\alpha 7$ -nAChR,并提示定位在细胞膜的功能性 $\alpha 7$ -nAChR 较丰富。

因颅脑手术和颅脑创伤引起过度的继发性炎症反应不利于患者康复和功能恢复,常需进行抗炎治疗以减轻继发性炎性损害。而本研究结果表明中枢神经系统主要炎性细胞即小胶质细胞可表达功能性 $\alpha 7$ -nAChR,而有报道证明 $\alpha 7$ -nAChR 能有效抑制炎性反应,这为临床上炎症性脑损伤的防治提供了新的理论依据。

参 考 文 献

[1] Tracey KJ. The inflammatory reflex [J]. *Nature*, 2002, 420: 853-859.

[2] Nizri E, Irony TS, Faranesh N, et al. Suppression of neuroinflammation and immunomodulation by the acetylcholinesterase inhibitor

rivastigmine[J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 203(1): 12-22.

[3] Vilhardt F. Microglia: phagocyte and glia cell[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(1): 17-21.

[4] Shytle RD, Mori T, Townsend K, et al. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors [J]. *J Neurochem*, 2004, 89(2): 337-343.

[5] Kharrat R, Servent D, Girard E, et al. The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity[J]. *J Neurochem*, 2008, 107(4): 952-963.

[6] McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. *Cell Biol*, 1980, 85: 890.

[7] Pivneva TA. Microglia in normal condition and pathology[J]. *Fiziol Zh*, 2008, 54(5): 81-89.

[8] 罗晓光,任艳,葛春林,等.活化胶质细胞对 PC12 细胞中 CREB 激活程度影响的研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2007, 6 (11): 1089-1092.

[9] Xu J, Zhu Y, Heinemann SF. Identification of sequence motifs that target neuronal nicotinic receptors to dendrites and axons [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(38): 9780-9793.

(收稿日期:2009-05-15)

(本文编辑:王志娟)