

肿瘤坏死因子对体外培养三叉神经节细胞的影响

姚育智¹, 赵利¹, 张越¹, 韩良², 王烈成², 王元银¹

摘要 目的 体外培养完整三叉神经节(TG)组织,建立一种能够易于控制的类似于TG的体内活性体系。探讨肿瘤坏死因子(TNF)- α 对体外培养TG细胞中降钙素基因相关肽(CGRP)的影响。**方法** 将SD大鼠麻醉后取双侧TG,将一部分样本用4%多聚甲醛固定,然后通过HE染色观察其与体外培养TG的神经元之间形态学差异。其余的TG分为常规培养组和添加TNF- α 培养组,再通过免疫组化和Western blot观察常规培养组和添加TNF- α 培养组TG细胞中CGRP的水平变化,分析TNF- α 对体外培养TG细胞的影响。**结果** 与新鲜分离组相比,体外培养的TG神经元细胞未发生明显的组织细胞水肿、变性、坏死和细胞凋亡等病理学改变。TNF- α 培养组与常规培养组相比,TNF- α 可使CGRP表达水平上调,且CGRP阳性反应细胞数表达水平显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 细胞形态学分析结果显示离体培养的TG组织方法可行,且易于实施形态学和分子生物学研究;TNF- α 可使离体培养的TG细胞CGRP表达水平显著增加。

关键词 三叉神经痛;三叉神经节;离体培养;肿瘤坏死因子 α ;降钙素基因相关肽

中图分类号 R 745.11; R 392.12

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0343-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.008

三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)是累及面部三叉神经一支或几支感觉分布区反复发作的阵发性剧烈疼痛,长期以来为医学界所重视。目前用以研究TN发病机制的模型多采用眶下神经慢性缩窄环模型分离单侧大鼠三叉神经分支眶下神经(inferior orbital nerve, ION)行缩窄术(chronic constriction injury, CCI)^[1-2],但其环扎松紧度以及造模成功的时间难以掌握。研究^[3]证明体外培养的三叉神经

节(trigeminal ganglion, TG)和背根神经节的细胞保留了神经元细胞体、神经纤维和部分神经鞘膜、髓鞘等主要结构组织。完整的神经节离体培养易于控制实验条件,可以很好地模拟炎性状态下神经源性疼痛^[4]。有文献^[5-6]报道TN发作时以降钙素基因相关肽(Calcitonin gene related peptide, CGRP)为代表的血管活性肽类物质(CGRP是一种促痛神经肽)明显升高。该课题组前期的临床试验报道^[7]指出:相同年龄的TN患者清晨空腹静脉血血清中白介素-1 β (interleukin, IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 水平均明显高于健康对照组。因此炎症因子也可能是TN的致病因素之一。

该研究主要观察大鼠TG组织离体培养后的神经元细胞与急性分离后新鲜的神经元细胞状态的变化,以及加入TNF- α 培养后,以CGRP为代表的血管活性肽类物质的变化规律,旨在寻求一种制作简单、成功率高、易观察及易掌握的体外TN模型,建立一种能够控制的实验鼠体内环境过程的生物活性体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年健康雄性SD大鼠18只,清洁级,由安徽医科大学实验动物中心提供,(200 \pm 20)g。常规饲养,室温控制在(25 \pm 1) $^{\circ}$ C。

1.1.2 主要实验药品与试剂 胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);B-27生长因子、PVDF膜和DMEM(美国Invitrogen公司);ECL超敏发光试剂盒(美国Thermo公司);Tris-HCl pH 6.8、Tris-HCl pH 8.8、一抗稀释液、RIPA细胞裂解液(江苏碧云天生物技术研究所)。

1.2 方法

1.2.1 TG的急性分离 取正常SD大鼠18只,在麻醉下断头处死,暴露TG及其各分支,取出双侧完整的TG。在冷的PBS(pH 7.4)中剔除TG周围的血管、脂肪等结缔组织,取6只大鼠的双侧TG,放入4%多聚甲醛固定24h,用于HE染色。其余的12只大鼠的TG用于体外培养。

2016-12-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271162)

作者单位:¹安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,合肥 230032

²安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:姚育智,男,硕士研究生;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

1.2.2 实验分组 实验分为常规培养组和 TNF- α 培养组, 每组 6 只大鼠, 常规培养组第 6 天后换液, 继续常规培养。后者第 6 天后换液, 在每个培养皿里加入 2 μ l TNF- α (终浓度 10 ng/ml) 培养 1 d。

1.2.3 培养 TG 12 只大鼠急性分离的 TG 放入培养皿中, 用冷的 PBS 反复清洗 3 次以上。置于 6 孔培养板内, 每孔放入 2 个神经节 (同一只大鼠的左右 2 个), 每孔中加入 2 ml DMEM 培养液 (2% B-27、0.05 mg/ml 青霉素、0.05 mg/ml 链霉素、0.1% mg/ml 新霉素、2.5% 胎牛血清), 37 $^{\circ}$ C CO₂ 恒温孵育箱中培养。注意无菌操作。

1.2.4 HE 染色 将 6 只正常大鼠麻醉后断头取双侧 TG 与体外培养的 TG 一起, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后再用流水冲洗, 然后进行脱水和包埋切片。之后将样本先用二甲苯脱尽组织切片中的石蜡, 再经脱水和蒸馏水水化, 即可用碱性染料苏木精染色 5 min, 接着用酸性染料伊红染色 3 min, 经再次脱水后即可在荧光显微镜下观察。

1.2.5 Western blot 检测 TG 细胞中 CGRP 的表达变化 取出 TG, 置于装有 0.8 ml 裂解液的匀浆器中, 再用研磨器研磨使其完全裂解后置于冰上。然后将研磨液加入 1.5 ml EP 管中, 高速涡旋振荡 15 s, 使其充分裂解, 再于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液加入蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 使蛋白变性后, 用 BCA 法检测蛋白浓度; 然后进行电泳、转膜, 5% 脱脂奶粉封闭膜 3 h 后用 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 与 1 : 1 000 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后再与 1 : 10 000 二抗室温孵育 1 h, 再次洗膜后, 用 ECL 发光试剂盒显影, 扫描成像结果用 Image J 软件分析测定其光密度值与相应 β -actin 光密度值之比为其表达量。

1.2.6 免疫组化技术 将常规培养组和 TNF- α 培

养组的 TG 取出, 进行固定、脱水、包埋切片。切片在 65 $^{\circ}$ C 烤箱烤片 2 h, 乙醇脱水后自来水冲洗, 柠檬酸钠溶液高温下修复; PBS 溶液冲洗 3 次, 每次 10 min, 滴加 50 μ l 3% H₂O₂, 室温孵育 10 min; 再用 PBS 洗 3 次, 加一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS 洗 3 次, 加二抗。室温下用 DAB 显色, 各片显色时间尽量保持一致, 冲洗终止显色; 苏木精复染, 脱水透明, 中性树脂胶封片。判断结果: 以细胞出现棕褐色, 周围胞质点状着色较深为阳性表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 两组数据间的比较采用 *t* 检验分析, 免疫组化计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 TG 离体培养与新鲜组织 HE 染色结果

将急性分离的 TG 组织进行纵断面切片, HE 染色密度均匀, 神经纤维光滑连续、粗细较为均匀, TG 细胞膜完整, 胞核大小、形态正常, 核仁清楚 (图 1A)。将常规培养组的 TG 组织进行纵断面切片, 镜下观察: HE 染色密度均匀, 部分神经纤维仍然光滑连续、粗细比较均匀, TG 细胞膜大部分完整, 个别出现细胞萎缩, 空泡状改变; 神经元胞核大小、形态正常, 核仁清楚 (图 1B)。将 TNF- α 培养组的 TG 组织进行纵断面连续切片, 镜下观察细胞形态与常规培养组类似 (图 1C)。表明体外培养的 TG 神经元细胞未发生明显的组织细胞水肿、变性、坏死和细胞凋亡等病理学改变。

2.2 CGRP 蛋白表达量的变化 Western blot 检测结果显示, 与常规培养组相比, TNF- α 培养组的蛋白表达量明显升高, 差异有统计学意义 (*t* = 8.97, *P* < 0.001)。见图 2。

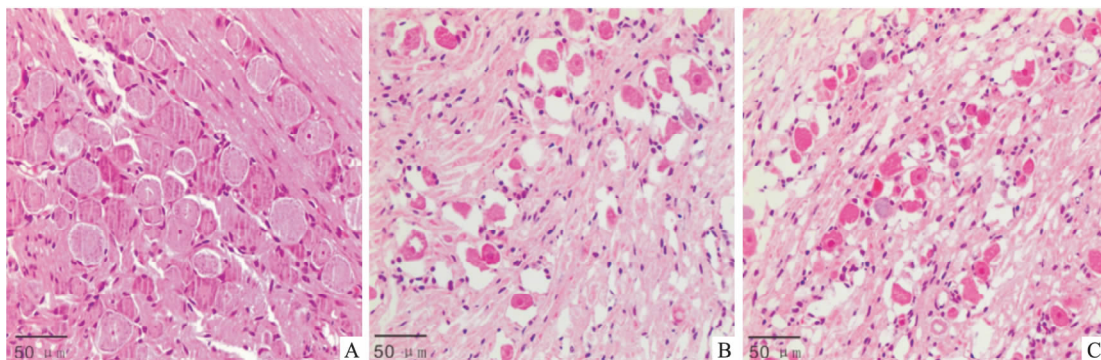


图 1 大鼠三叉神经节神经元 HE 染色 $\times 400$

A: 新鲜分离 TG; B: 常规培养的 TG; C: 添加 TNF- α 培养组

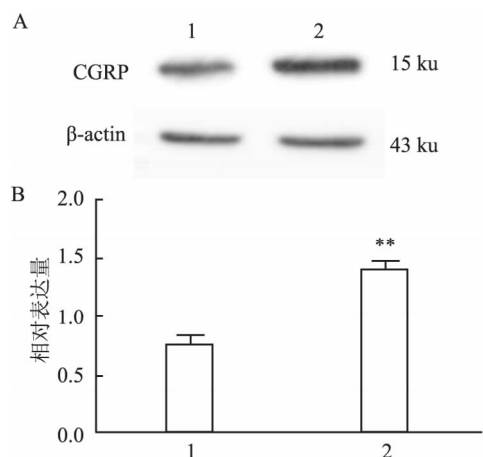


图2 TNF- α 对体外培养TG的CGRP水平的影响

A: Western blot 检测的典型结果; B: CGRP 表达量的统计结果;

1: 常规培养组; 2: TNF- α 培养组; 与常规培养组相比较: ** $P < 0.01$

2.3 CGRP 免疫组化染色的结果

2.3.1 CGRP 免疫阳性细胞表达的变化 免疫组化染色显示常规培养组和 TNF- α 培养组的 TG 细胞中均有 CGRP 免疫反应阳性表达, CGRP 阳性细胞出现棕褐色, 胞体染色深浅不一, 部分细胞中心部位着色浅, 周围胞质点状着色较深, 且选择性的高表达在中、小直径的 TG 神经元细胞中。常规培养组(图 3A) CGRP 免疫反应阳性表达量相对较低, 而 TNF- α 培养组(图 3B) CGRP 免疫反应阳性表达量显著增高。

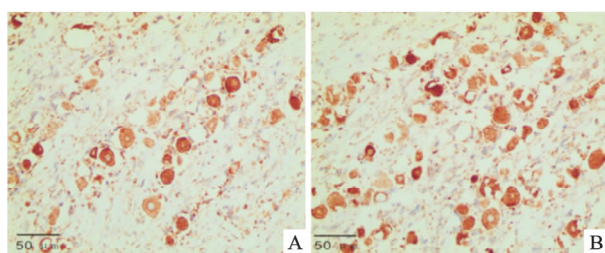


图3 离体培养大鼠 TG 细胞的 CGRP

免疫组化反应阳性细胞表达 $\times 400$

A: 常规培养组; B: TNF- α 培养组

2.3.2 CGRP 免疫组化切片的图像分析 对免疫组化切片图像进一步统计学分析, 结果显示 TNF- α 培养组的 CGRP 阳性反应细胞数的平均面积变化不明显, 而平均光密度、平均积分光密度以及平均灰度值均显著高于常规培养组($P < 0.01$)。见表 1。

3 讨论

周围神经损伤后通常会导致异常性疼痛和痛觉

表1 常规培养组和添加 TNF- α 培养组
免疫组化统计学分析比较($n=4, \bar{x} \pm s$)

项目	常规培养组	TNF- α 培养组
CGRP 阳性细胞表达面积	3.788 \pm 1.023	4.336 \pm 1.031
平均光密度	0.348 \pm 0.104	0.481 \pm 0.038 **
积分光密度	5.845 \pm 1.449	11.838 \pm 1.425 **
平均灰度	86.299 \pm 8.184	129.741 \pm 4.791 **

与常规培养组比较: ** $P < 0.01$

过敏等相关的神经性疼痛, 许多研究^[8]表明, 如 TNF- α 等促炎细胞因子会在神经损伤后释放到本地环境, 并可以作为信号分子启动一些潜在的级联反应。最早是在免疫系统中显示由炎症因子作为信号分子引发的级联反应, 主要是 IL-1 β 和 TNF- α 这两种炎症因子, 从胶质细胞中释放, 调节着神经元的信号传导通路。从巨噬细胞和小胶质细胞中释放的 TNF- α , 刺激 p38 丝裂原通过细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated kinase1/2, ERK1/2)、p38 蛋白以及氨基端激酶 (jun n-terminal kinase, JNK) 激活蛋白激酶类 (p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK) 途径^[8-9] 促进 cAMP 反应元件的结合, 即 CREB 的磷酸化, CREB 作为一个转录因子, 调节着 CGRP 蛋白的合成、储存和释放^[10], 这些分泌途径在神经炎性疼痛的发生和发展过程中起到重要作用。

传统 TG 模型主要根据机械损伤的周围病变学说建立的 ION-CCI 模型, 其具有代表性的组织学改变与临床三叉神经痛相类似, 即三叉神经的脱髓鞘变化^[11]。之前本课题组根据炎症学说利用炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 经大鼠眶下孔注射建立 TG 模型, 经过触须机械痛阈测定、神经组织电镜观察显示, 同样也可使大鼠 TG 产生类似三叉神经痛症状和病理学变化^[12], 同时通过注射法造模也排除了外科手术对实验造成的干扰。进一步提示了炎症因子与三叉神经痛发病有一定关联。细胞出现空泡萎缩等衰老现象的原因非常复杂, 近年来, 许多学者提出了各种假说, 但其本质和机制仍不清楚。在本研究中体外培养的 TG 组织, 对于个别细胞出现衰老的现象可以用细胞衰老的外部干扰学说解释, 原因可能为部分细胞在从体内到体外培养环境的适应过程中, 其自由基受到外源性的干扰而引起的细胞衰老现象, 但并不影响其良好的整体细胞状态, 与文献^[3]回顾结果相一致。

本研究通过细胞形态学观察显示常规培养液培养 1 周的 TG 神经元与新鲜的大鼠 TG 神经元相比

较无明显差异,说明 TG 离体培养方法切实可行。在此前提下,免疫组化结果显示两组均有 CGRP 免疫反应阳性细胞表达,但 TNF- α 培养组的 CGRP 免疫反应阳性细胞表达量明显高于常规培养组,且选择性的高表达在中、小直径的 TG 神经元细胞中。Western blot 显示 TNF- α 培养组中 CGRP 高表达,而常规培养组中表达率较低,揭示了 TNF- α 的刺激可使体外培养的 TG 中 CGRP 表达量增加,与大鼠三叉神经眶下支皮下注射炎症因子 TNF- α 使 CGRP 免疫反应阳性神经元数增加等报道^[13] 结果相一致。大鼠 TG 整体培养的方法简便易行,其优点是易于运用形态学和分子生物学等方法检测致三叉神经痛因素对神经节神经元功能活动改变的发生机制和药物作用靶点分析等。

参考文献

- [1] Deseure K, Hans G H. Chronic constriction injury of the rat's infraorbital nerve (IoN-CCI) to study trigeminal neuropathic pain [J]. *J Vis Exp*, 2015, 21(103): 78-105.
- [2] Deseure K, Hans G. Behavioral study of non-evoked orofacial pain following different types of infraorbital nerve injury in rats [J]. *Physiol Behav*, 2015, 1138: 292-6.
- [3] Kristiansen K A, Edvinsson L. Neurogenic inflammation: a study of rat trigeminal ganglion [J]. *J Headache Pain*, 2010, 11(6): 485-95.
- [4] Tajti J, Kuris A, Vécsei L, et al. Organ culture of the trigeminal ganglion induces enhanced expression of calcitonin gene-related peptide *via* activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 [J]. *Cephalalgia*, 2011, 31(1): 95-105.
- [5] Hansen J M, Hauge A W, Olesen J, et al. Calcitonin gene-related peptide triggers migrainelike attacks in patients with migraine with aura [J]. *Cephalalgia*, 2010, 30(10): 1179-86.
- [6] Nardin R. Randomized, controlled trial of telcagepant for the acute treatment of migraine [J]. *Neurology*. 2010, 74(12): 1007.
- [7] 黄姗姗,徐文华,马腾飞,等. 三叉神经痛患者部分促炎因子水平变化及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(5): 711-3.
- [8] Schäfers M, Svensson C I, Sommer C, et al. Tumor necrosis factor- α induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(7): 2517-21.
- [9] Zhuang S, Demirs J T, Kochevar I E. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(34): 25939-48.
- [10] Oprea A, Kress M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin [J]. *Neurosci*, 2000, 20(16): 6289-93.
- [11] Deseure K, Hans G H. Chronic constriction injury of the rat's infraorbital nerve (IoN-CCI) to study trigeminal neuropathic pain [J]. *J Vis Exp*, 2015, (103): e53167.
- [12] 马腾飞,王霁蕾,黄姗姗,等. 经眶下孔注射相关炎症因子制造大鼠三叉神经痛模型的实验研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(6): 753-6.
- [13] Kuzawińska O, Lis K, Cudna A, et al. Gender differences in the neurochemical response of trigeminal ganglion neurons to peripheral inflammation in mice [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2014, 74(2): 227-32.

Effect of tumor necrosis factor on cultured trigeminal ganglion

Yao Yuzhi, Zhao Li, Zhang Yue, et al

(College of Stomatology, Anhui Medical University;

Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective The integral trigeminal ganglia (TG) of rat can be cultured to set up a biological activity system similar to the internal environment which can be easily treated during experiment and to investigate the effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels. **Methods** Trigeminal ganglia were acutely isolated from anesthetized rats. Among them, a portion of samples were fixed with 4% paraformaldehyde, and the neuronal morphology was observed between the isolated and cultured TG by HE staining. The remaining samples were divided into normal culture group and cultured with TNF- α group. Then the levels of CGRP between normal culture group and treatment with TNF- α group in TG cells were detected by immunohistochemistry and Western blot was used to analyze the effects of TNF- α . **Results** Compared with the group of freshly isolated, cultured TG cells didn't significantly appear in tissue edema, degeneration, necrosis and apoptosis and other pathological changes. TNF- α could upregulate the expression of CGRP and CGRP positive cells expression levels were significantly increased compared with normal culture group ($P < 0.05$). **Conclusion** The morphological results

微小 RNA-21 对人脐血间充质干细胞增殖和转化生长因子- β 1 表达的影响

王晓培, 王兴兵, 程家凤, 郑茜茜, 鲁雪, 张薇薇

摘要 目的 探讨微小 RNA-21 (miR-21) 对人脐血间充质干细胞 (MSC) 增殖和转化生长因子 (TGF) β 1 表达的影响。方法 体外分离并培养人脐血 MSC, 用 Lipofectamine™ 2000 转染 miR-21 模拟物 (60 μ mol/L)、miR-21 抑制剂 (60 μ mol/L) 和 miR-21 阴性对照 (60 μ mol/L), 空白对照组不做任何处理, MTT 法分析对细胞增殖的影响; qRT-PCR 和 Western blot 检测 TGF- β 1 的表达。结果 与空白对照组和阴性对照组相比, miR-21 过表达明显抑制 MSC 增殖, 沉默 miR-21 明显促进 MSC 增殖; 此外, 过表达 miR-21 靶向抑制细胞中 TGF- β 1 的表达, 而沉默 miR-21 可促进细胞中 TGF- β 1 表达。结论 miR-21 能抑制人脐血 MSC 的增殖, 并下调其 TGF- β 1 的表达。

关键词 微小 RNA-21; 人脐血间充质干细胞; 增殖; 转化生长因子- β 1

中图分类号 R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)03-0347-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.009

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 具有多向分化的潜能, 可以在体外诱导分化成骨细胞、神经细胞、心肌细胞等, 是组织工程种子细胞的重要来源^[1]。而相对于人骨髓 MSC, 人脐血 MSC 作为组织工程种子细胞的来源更为理想。微小 RNAs (miRNAs, miRs) 是一类长为 22~25 个核苷酸序列的内源性、非编码、单链小 RNA 分子, 可通过与目的靶蛋白的 mRNA 的碱基特异性配对, 从而引起目的靶蛋白 mRNA 的降解或抑制其翻译表达, 在转录后

水平对目标基因进行调控^[2-3]。文献^[4]报道微小 RNA 可通过调控一些特殊的转录因子和相关基因的表达来调控 MSC 的活化增殖。Ryu et al^[5]证实高糖通过促进转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 表达刺激人脐血 MSC 活化增殖。已有相关研究^[6]证实, 促进人脐血 MSC 的增殖活化水平, 有利于提高基于 MSC 的移植治疗的有效性。鉴于微小 RNA 和 TGF- β 1 对间充质干细胞增殖的影响, 该研究观察 miR-21 对人脐血 MSC 增殖和 TGF- β 1 表达的影响, 有助于为 MSC 临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 健康足月剖宫产新生儿脐带血 20 份, 由淮南市妇幼保健院提供, 产妇及其家属均知情同意。Lipofectamine™ 2000 Reagent、TRIzol 试剂购于美国 Invitrogen 公司; Opti-MEM® I (1 \times) 购于美国 Life Technologies 公司; miR-21 mimics, EzOmics miRNA qPCR Detection Primer, EzOmics One-Step qPCR 试剂盒购于南通百奥迈科公司; Thermo Fisher Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 和 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 \times) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 免疫印迹一抗购于南京巴傲得生物公司; 二抗购于北京中杉金桥公司; MTT 实验试剂盒购于上海碧云天公司; 合成引物由上海生工生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 人脐血 MSC 分离与培养 人脐血 MSC 按文献^[6]报道的方法进行分离, 并做适当改进。简述如下: 无菌条件下取正常足月剖宫产胎儿的脐血 50~90 ml, 肝素抗凝, 并于 12 h 内将淋巴细胞分离。

2016-12-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81270573)

作者单位: 安徽医科大学附属医院血液科, 合肥 230001

作者简介: 王晓培, 女, 主治医师, 硕士研究生;

王兴兵, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wanxingbing91@hotmail.com

reveal that the integral TG culture is practicable *in vitro*, and will make the study in morphology and molecular biology easy to implement; TNF- α can significantly increase CGRP levels of cultured integral TG.

Key words trigeminal neuralgia; trigeminal ganglion; culture *in vitro*; tumor necrosis factor- α ; calcitonin gene-related peptide