

· 论 著 ·

人脑挫裂伤后早期小胶质细胞PD-L1的表达

乔战东 刘雷震 贾利云 李经纶 刘 伟 曹付强 姚安会 王本瀚

【摘要】目的 探讨人脑挫裂伤后早期小胶质细胞程序性细胞死亡因子1配体(PD-L1)的表达变化。**方法** 收集2013~2015年手术治疗的脑挫裂伤组织标本15例,其中伤后6 h 5例,伤后12 h 4例,伤后1 d 3例,伤后4 d 3例;另选择3例肿瘤全切术中切除颞极组织作为对照组。采用HE染色及免疫荧光染色分析炎症细胞浸润情况,以及小胶质细胞PD-L1的表达情况。**结果** HE染色结果显示,与对照组脑组织相比,脑挫裂伤后6、12 h未见到明显的炎症细胞浸润;随着损伤时间的延长,浸润的来自血液中的炎症细胞明显增加($P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示,与对照组脑组织相比,脑挫裂伤后6 h表达PD-L1的小胶质细胞阳性细胞数明显升高($P<0.01$);随着损伤时间的延长,表达PD-L1的小胶质细胞阳性细胞数进一步升高($P<0.05$)。**结论** PD-L1可能参与了人脑挫裂伤后的炎症反应。

【关键词】 脑挫裂伤;小胶质细胞;细胞程序性细胞死亡因子1配体;炎症反应

【文章编号】 1009-153X(2016)04-0216-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1⁵; Q 786

PD-L1 expression in microglial cells early after contusion and laceration of human brain

QIAO Zhan-dong^{1, 2}, LIU Lei-zhen^{1, 2}, JIA Li-yun³, LI Jing-lun¹, LIU Wei¹, CAO Fu-qiang¹, YAO An-hui¹, WANG Ben-han¹. 1, Department of Neurosurgery, The 153rd Central Hospital, PLA, Zhengzhou 450042, China; 2, Xinxiang Medical School, Xinxiang 453003, China; 3, Department of Medical Genetics and Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

【Abstract】Objective To explore the changes in programmed death-1 ligand (PD-L1) expression in microglia cells early after contusion and laceration of human brain. **Methods** Eighteen cerebral tissues specimens, of which 3 were normal cerebral tissues, 5, 4, 3 and 3 were contused and lacerated cerebral tissues 6 hours, 12 hours, 1 day and 4 days after the brain injury respectively, were fixed by perfusion of 4% paraformaldehyde. Frozen sections were made for H-E and immunofluorescent staining and then the number of infiltrating inflammatory cells and the expression of PD-L1 in the microglial cells were determined. **Results** The results of H-E staining showed that the number of infiltrating inflammatory cells in the contused and lacerated cerebral tissues 1 day after injury was significantly more than those in the normal cerebral tissues ($P<0.05$), and the number of infiltrating inflammatory cells significantly increased as the time increased after injury ($P<0.05$). The results of immunofluorescent staining that the number of PD-L1 positive microglial cells in the contused and lacerated cerebral tissues 6 hours after injury was significantly more than those in the normal cerebral tissues ($P<0.05$), and the number of PD-L1 positive microglial cells significantly increased as the time increased after injury ($P<0.05$). **Conclusions** It is suggested that PD-L1 may be involved in the inflammation after human cerebral contusion and laceration and the intervention of the PD-1/PD-L1 signaling pathway may be a new method to treat the human cerebral contusion and laceration.

【Key words】 Brain contusion and laceration; Microglial cell; Programmed death-1 ligand; Expression

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是一个重要的全球性问题,每年大约有一千万的人受到TBI的影响,是世界各地卫生保健系统亟待解决的重大难题^[1]。TBI病理过程包括原发性损伤和继发性损伤,后者是指直接损伤引起的一系列细胞及生物化学的级联反应,是导致TBI死亡的主要原因^[2]。炎症反应是继发性损伤过程中最重要的病理过程,严重影响TBI的预后^[3]。TBI后继发性损伤的确切机理尚

不完全清楚。活化的小胶质细胞、活化的星形胶质细胞和浸润的淋巴细胞是炎症反应的主要参与者,发挥着神经保护和神经损害的双重作用^[3]。程序性细胞死亡因子1(programmed death-1, PD-1)信号通路是重要的免疫调控通路,调节巨噬细胞和淋巴细胞的活性及细胞因子的分泌^[4]。我们之前的研究结果表明,PD-1参与调节脊髓损伤后小胶质/巨噬细胞的极化,进而影响脊髓损伤的预后^[5]。本文探讨PD-1配体(programmed death-1 ligand, PD-L1)在人脑挫裂伤后不同时间点的挫伤脑组织表达情况。

1 资料和方法

1.1 标本收集 收集2013~2015年手术治疗的脑挫裂

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.04.008

作者单位:450042 郑州,解放军第153中心医院神经外科(乔战东、刘雷震、贾利云、李经纶、刘 伟、曹付强、姚安会、王本瀚);450001 郑州,郑州大学基础医学院医学遗传与细胞生物学教研室(贾利云)

通讯作者:王本瀚, E-mail: wangbenhan@sina.com

伤患者的挫伤脑组织标本 15 例,其中伤后 6 h 5 例,伤后 12 h 4 例,伤后 1 d 3 例,伤后 4 d 3 例。另选择 3 例肿瘤全切术中切除颞极组织作为对照。所有标本的收集及用途均获得解放军第 153 医院伦理委员会同意,并经过患者家属签字同意。

1.2 组织制备 将标本取出后,用 4%多聚甲醛(pH=7.4)4 ℃固定,然后置于含 25%蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中 4 ℃保存,直至标本沉底。用恒冷箱切片机(德国 Leica 公司,CM1900)行连续矢状切片,片厚 20 μm。

1.3 组织切片染色

1.3.1 HE 染色 切片室温晾置 2 h,常规行苏木精液染色,盐酸酒精脱色,伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯固定,中性树胶封片,Olympus BX-51 显微镜观察并照相。400 倍镜下,每张染色切片随机选取 6 个部位采集图像,并用 image tool 软件对炎症细胞数进行统计。

1.3.2 免疫荧光染色 PD-L1 与小胶质细胞标志物 Iba-1 或神经元标志物 NeuN 或星形胶质细胞标志物 GFAP 免疫荧光染色。切片置入无 Triton 含 1%胎牛血清的封闭液室温封闭 30 min,然后用 0.01%的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)浸洗 3 次,每次 5 min。分别加入山羊抗人 Iba-1(1:200,美国 Abcam 公司)、小鼠抗人 NeuN(1:100,美国 Millipore 公司)、小鼠抗人 GFAP(1:1000,美国 Millipore 公司)和兔抗人 PD-L1(1:100,美国 Abcam 公司)的一抗孵育,室温过夜(16~

24 h),0.01%磷酸盐缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,然后加入相应的含有 Cy3 标记的驴抗山羊 IgG(1:800,美国 Molecular Probes 公司),TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:800,美国 Abcam 公司),Alexa Fluor 488 标记的驴抗兔 IgG(1:800,美国 Molecular Probes 公司)的二抗,室温避光孵育 2 h。磷酸盐缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,加入 Hoechst33342(1:10000,美国 Invitrogen 公司),室温避光孵育 20 min,用 0.01%磷酸盐缓冲液清洗后以 50%甘油溶液封片,并用荧光显微镜 BX-51 观察,400 倍镜下,随机选取 4 个视野进行照相。以 PD-L1、Iba-1 和 Hoechst33342 三者都为阳性作为表达 PD-L1 的小胶质细胞。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 12.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 Turkey 检验, $P < 0.05$ 时有显著性差异。

2 结果

2.1 HE 染色结果 与对照组脑组织相比,脑挫裂伤后 6、12 h 挫伤脑组织未见到明显的炎症细胞浸润;随着时间的延长,浸润的来自血液中的炎症细胞明显增加($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 免疫荧光染色结果 与对照组脑组织相比,脑挫裂伤后 6 h 挫伤脑组织表达 PD-L1 的小胶质细胞阳性细胞数明显升高($P < 0.01$),伤后 12 h 进一步升高($P < 0.05$);伤后 1 d 与 12 h 无明显变化($P > 0.05$);伤后 4 d 较伤后 1 d 有明显增加($P < 0.05$)。见图 2。

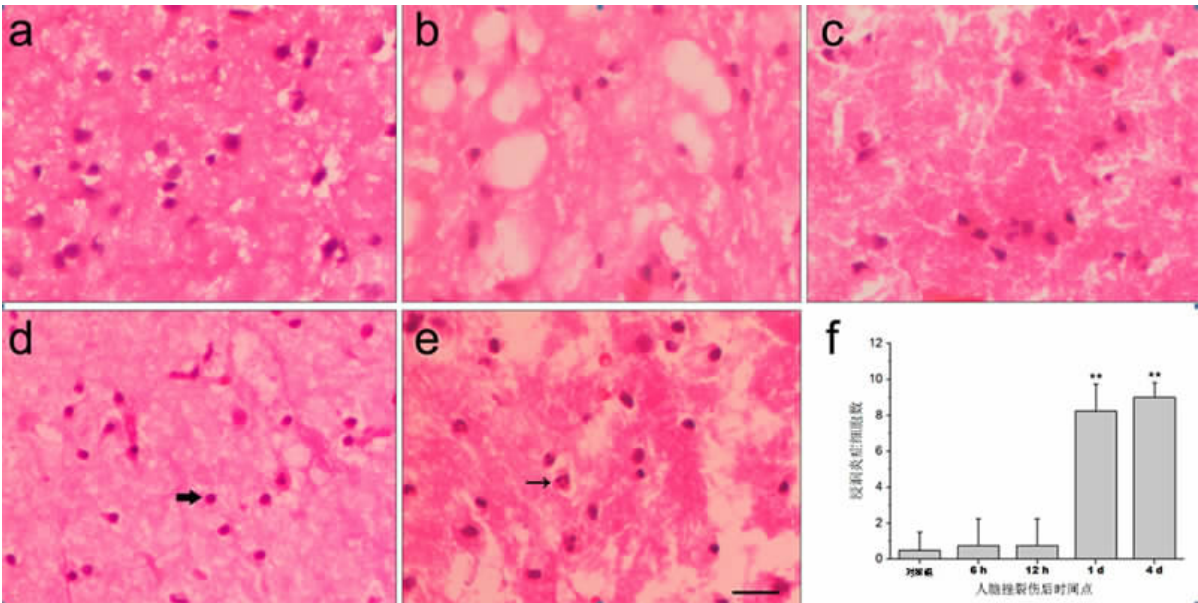


图1 脑挫裂伤后不同时间挫伤脑组织炎症细胞浸润情况(HE染色,×400)

a. 对照组脑组织;b. 伤后 6 h;c. 伤后 12 h;d. 伤后 1 d, ↑ 示淋巴细胞;e. 伤后 4 d, ↑ 示中性粒细胞,标尺为 100 μm;f. 各时间点炎症细胞数比较,与对照组相应值比,** $P < 0.05$

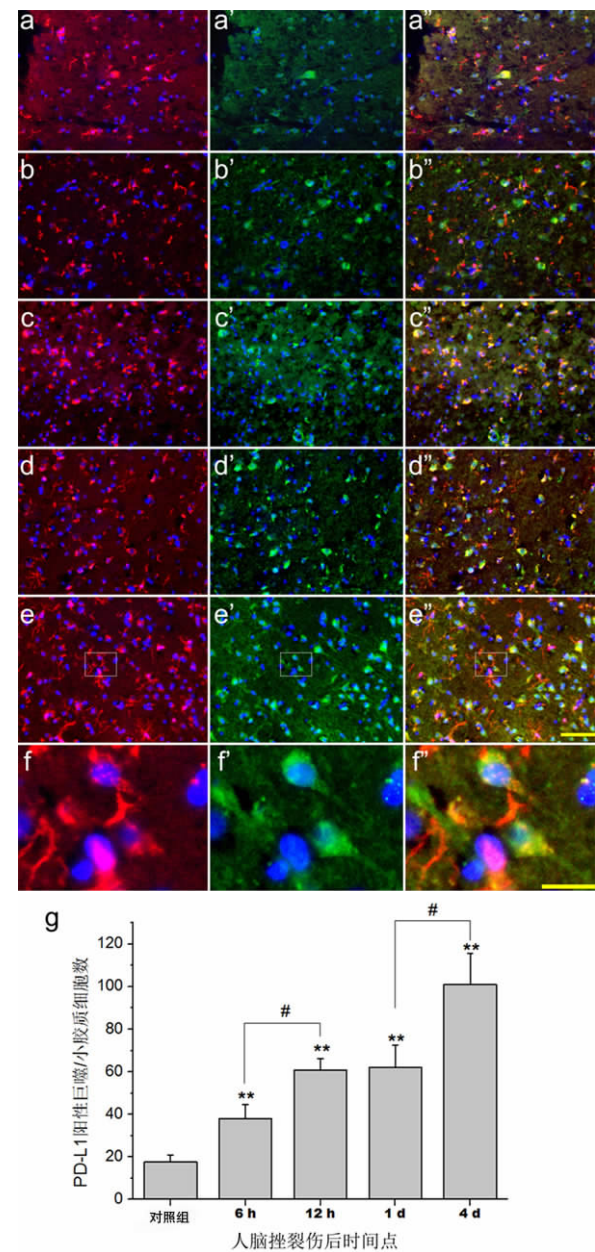


图2 免疫荧光染色观察脑挫裂伤后小胶质细胞表达PD-L1变化
a、a'、a''. 正常组;b、b'、b''. 伤后6 h;c、c'、c''. 伤后12 h;d、d'、d''. 伤后1 d;e、e'、e''. 伤后4 d,标尺示100 μ m;f、f'、f''为e、e'、e''局部放大,标尺示50 μ m;a、b、c、d、e为Iba-1染色;a'、b'、c'、d'、e'为PD-L1染色;a''、b''、c''、d''、e''为Hoechst33342染色;g. 各组PD-L1阳性细胞数比较,与正常组相应值比较,** $P<0.05$;相邻两组之间比较,# $P<0.05$

3 讨论

本文首先用HE染色法确定人脑挫裂伤后挫伤脑组织炎症细胞的浸润情况,明确炎症反应参与继发性脑损伤。本文用免疫荧光双标法初步判定了挫

裂伤早期挫伤脑组织中小胶质细胞PD-L1表达变化。PD-L1的受体为PD-1。PD-1主要表达于小胶质细胞和浸润的T淋巴细胞;而PD-L1表达更为广泛,在小胶质细胞、星形胶质细胞、血管内皮细胞均有表达^[4]。PD-1/PD-L1通过调节和干预这些细胞的功能,影响中枢神经损伤功能。Li等^[6]研究表明,在脑缺血损伤中,PD-L1通过介导转移的调节性T细胞对基质金属蛋白酶-9的抑制作用,对脑组织起保护作用。PD-1与PD-L1结合后,能够抑制T细胞受体介导的淋巴细胞增殖和细胞因子分泌,PD-1/PD-L1信号通路对于CD4⁺和CD8⁺T细胞的功能,尤其是抗病毒免疫方面起关键调节作用,参与中枢神经系统由免疫所引起的脱髓鞘的进程^[7]。本研究显示PD-1/PD-L1可能参与脑挫裂伤后继发性脑损伤的炎症反应。

【参考文献】

[1] Faul M, Coronado V. Epidemiology of traumatic brain injury [J]. *Handb Clin Neurol*, 2015, 127: 3–13.

[2] Williams OH, Tallantyre EC, Robertson NP. Traumatic brain injury: pathophysiology, clinical outcome and treatment [J]. *J Neurol*, 2015, 262(5): 1394–1396.

[3] Chan CC. Inflammation: beneficial or detrimental after spinal cord injury [J]? *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2008, 3 (3): 189–199.

[4] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, *et al*. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677–704.

[5] Yao A, Liu F, Chen K, *et al*. Programmed death 1 deficiency induces the polarization of macrophages/microglia to the M1 phenotype after spinal cord injury in mice [J]. *Neurotherapeutics*, 2014, 11(3): 636–650.

[6] Li P, Mao L, Liu X, *et al*. Essential role of program death 1-ligand 1 in regulatory T-cell-afforded protection against blood-brain barrier damage after stroke [J]. *Stroke*, 2014, 45 (3): 857–864.

[7] Jin YH, Hou W, Kang HS, *et al*. The role of interleukin-6 in the expression of PD-1 and PDL-1 on central nervous system cells following infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus [J]. *J Virol*, 2013, 87(21): 11538–11551.

(2016-02-17收稿,2016-03-03修回)