

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

腦膜炎相關大腸桿菌感染神經膠細胞之分子機轉的研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-038-056-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：臺北醫學大學醫事技術學系

計畫主持人：吳雪霞

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 10 月 28 日

中樞神經與身體其他組織最大的不同點在於其有血腦障蔽 ( blood-brain barrier ) 保護著。血腦障蔽是由特化的腦血管內皮細胞 ( brain microvascular endothelial cells )、基底膜 ( basement membrane )、外皮細胞 ( pericytes ) 和神經膠細胞 ( glial cells ; 包括 astrocytes 及 microglia ) 所組成 (Bradbury, 1985)。腦血管內皮細胞為確保限制分子的傳送與其他組織的血管內皮細胞有很大的差異：一是腦血管內皮細胞間有 tight junctions 將細胞緊密的連接著，使腦血管內皮表現出高達 1000 至 2000 ohm/cm<sup>2</sup> 的電阻，反觀其他組織的血管內皮則只有 3 至 30 ohm/cm<sup>2</sup> 的電阻。另一是腦血管內皮細胞內胞飲小泡 ( pinocytotic vesicles ) 非常稀少，粒線體含量高 ( Pardridge W.M.,1999 )。基底膜是由腦血管內皮細胞與神經膠細胞所分泌的分子組成，這些分子包括 laminin，第四型膠原 ( collagen type IV )，proteoglycans 以及 fibronectin。外皮細胞則與微血管的收縮有關，其功能相當於平滑肌，同時外皮細胞也已被證實能表現類似巨噬細胞的活性 ( Thomas W.E.,1999 )。

神經膠細胞屬於中樞神經內生性的巨噬細胞，主要的功能為維持中樞神經的恆定。神經膠細胞藉著細胞膜上的 pattern recognition receptors 辨識微生物，啟動吞噬、細胞毒殺等作用，以清除外來的侵入者。在正常健康的情況下，神經膠細胞缺少吞噬的活性，其細胞膜上與巨噬細胞功能有關的分子或接受器例如 Complement receptor type 3 ( CR3 )、LPS ( lipopolysaccharide ) receptor CD14 等的表現量極低。此時神經膠細胞會促使腦血管內皮細胞 HT7、UEA-1 lectin-binding sites 和血管收縮素接受器 ( angiotensin receptors ) 等分子表現量增加，促進腦血管內皮細胞間 tight junctions 的形成，進而限制藥物或內生性的物質進入腦部，甚至免疫細胞的浸潤也降至最低 ( Alexandre Prat, 2001 )。在主要組織相容抗原 ( major histocompatibility complex antigens ) 表現量低，抗原呈獻細胞 ( antigen-presenting cells ) 少的情況下，使中樞神經系統幾乎成了免疫隔離區 ( immunosecluded site ) (Hafler and Weiner, 1987; Wekerle et al., 1986)。當中樞神經發生感染時，遇到內在的 ( 由受壓或受損細胞所傳出的訊息 ) 或外來的 ( 病原體 ) 刺激，神經膠細胞會被活化，CR3、CD14 的表現量會增加 ( Gehrman et al.,1995; Nadeau and Rivest, 2000 )，神經膠細胞將會作出即時的反應，參與調節非特異性的發炎反應、先天的與適應性的免疫反應 ( innate and adaptive immune responses )，以使組織修復。為了具備這一切的功

能，神經膠細胞需經由活化的過程，獲得分化成熟的標幟與作用細胞的特性。活化後的神經膠細胞會產生與發炎反應相關的分子，包括有細胞素（cytokines）、chemokines、prostanoids、細胞毒素（cytotoxic molecules）和 adhesion / costimulatory molecules 等，這些中介物交互形成一複雜的調控網絡，進而引起一連串的發炎反應，使腦血管內皮細胞活化，血腦障蔽的通透性增加，免疫細胞的浸潤與常駐，甚至嚴重時會破壞血腦障蔽以及使腦組織受損（Martin G. Tauber and Bernhard Moser, 1999）。

細胞素是先天的與適應性的免疫反應主要的調控者，中樞神經發生感染時，組織中浸潤的免疫細胞、巨噬細胞以及神經膠細胞都是細胞素的分泌者，共同參與中樞神經的發炎反應。神經膠細胞所分泌的細胞素中 IL（interleukin）-1，TNF（tumor necrosis factor）- $\alpha$ ，IL-12 和 IL-18 是主要具有發炎活性的細胞素（pro-inflammatory cytokine），IL-1 與 TNF- $\alpha$  能刺激腦血管內皮細胞與神經膠細胞表現黏附分子（adhesion molecules）和 chemokines 的合成，造成白血球自微血管中移出浸潤至中樞神經（Lee and Benveniste, 1999; Sedgwick et al., 2000）。另外在基因轉殖老鼠的實驗中，若在顱內過量表現 TNF- $\alpha$ ，可以觀察到中樞神經組織的壞損與發炎（Akassoglou et al., 1998）；IL-12 和 IL-18 能刺激 NK 細胞與 Th1 T-細胞（Shevach et al., 1999; Shi et al., 2000）。IL-6 同時具有發炎與抗發炎（anti-inflammatory）的活性，它能促進 B-細胞的生長與分化，刺激體液性與細胞性的免疫反應（Frei et al., 1989）。TGF（transforming growth factor）- $\beta$ ，IL-10 以及 IL-1 receptor antagonist（IL-1ra）則具有抗發炎的活性，TGF- $\beta$  和 IL-10 是藉由降低抗原呈現相關分子的表現，減少與發炎反應相關的細胞素、chemokines 的產生，來抑制巨噬細胞/神經膠細胞的活化；同時 TGF- $\beta$  和 IL-10 也能抑制 Th-1 T 細胞中介的免疫反應（Frei et al., 1994; O'Keefe et al., 1999）。

與抗發炎反應相關的分子能避免免疫細胞的補充與活化，而經由 Fas-FasL，TNF-TNF 接受器所引起的細胞計劃性死亡以及細胞毒素，例如含氮的（nitric）和含氧的（oxygen）自由基等是移除免疫作用細胞，終止免疫反應的主要機制（Krammer, 2000; Pender, 2001）。發炎與抗發炎反應調控的平衡以及免疫反應的終止對中樞神經的感染是非常重要的，若抗發炎反應的調控機制以及免疫反應的終止失調或缺失時，則可能會造成中樞神經慢性發炎甚至神經退

化。因此我們非常有興趣研究探討當中樞神經發生感染時，神經膠細胞在調控發炎與抗發炎反應以及終止免疫反應的過程中所扮演的角色。此外神經膠細胞是否也會像在其他組織的巨噬細胞一樣有所謂的 alternatively activation (Goerdts and Orfanos, 1999)，即呈現抗發炎的表現型，其吞噬能力增加但不會產生與發炎反應相關的分子和細胞毒素。

細菌性腦膜炎在抗生素治療以及支持療護均加強的情形下，其致死率仍居高不下，欲改進對細菌性腦膜炎的預後，我們將需要新的治療方針，因此對細菌性腦膜炎的致病機轉詳細了解絕對是必須的。我們以與細菌性腦膜炎相關的大腸桿菌 M88 菌株（自臨床罹患腦膜炎的新生兒腦脊髓液中分離之 K1 菌株）感染 C6 細胞（大白鼠神經膠瘤細胞株），根據我們初步的實驗結果，發現腦膜炎相關的大腸桿菌 M88 菌株不但能黏附於 C6 細胞，並且會進入 C6 細胞內，而此進入的過程會被 cytochalasin D (actin polymerization 抑制劑)、Genistein (protein tyrosine kinase 抑制劑)、Ly294002 (PI 3-kinase 抑制劑) 所抑制。這表示 *Escherichia coli* 進入 C6 細胞內時，需要 actin cytoskeleton 的重組、protein tyrosine kinase 以及 phosphatidylinositol 3-kinase 的活化。此外我們也發現大腸桿菌 M88 菌株進入 C6 細胞，會引起 GM-CSF 以及 IL-6 mRNA 轉錄的增加。