

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2018.07.008

· 基础研究 ·

Ski 对脂多糖诱导大鼠星形胶质细胞炎症因子释放的影响

王明^{1,2}, 杨新乐¹, 陈铁戈^{1,2}, 张东亮^{1,2}, 巩朝阳^{1,2}, 向高^{1,2}, 刘开鑫^{1,2}, 张海鸿¹

1. 兰州大学第二医院骨科, 甘肃兰州市 730030; 2. 兰州大学甘肃省骨关节疾病研究重点实验室, 甘肃兰州市 730030

通讯作者: 张海鸿。E-mail: zhanghaihong1968@sina.com

基金项目: 1. 甘肃省自然科学基金项目 (No. 17JR5RA238); 2. 兰州大学第二医院“萃英科技创新”基金项目 (No. CY2017-MS06)

摘要

目的 探讨 Ski 对激活星形胶质细胞炎症因子分泌的影响。**方法** 从 3 日龄 Sprague-Dawley 大鼠大脑皮质分离星形胶质细胞, 分为空白对照组、阴性对照组、siRNA 组, siRNA 组沉默 Ski 基因。48 h 后, 采用 Western blotting 和免疫荧光染色检测 Ski 表达; 再以脂多糖激活星形胶质细胞 24 h。ELISA 检测各组细胞中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的浓度。**结果** siRNA 组 Ski 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$); 激活后, TNF- α 、IL-1 β 浓度显著减少 ($P < 0.001$)。**结论** Ski 可能参与星形胶质细胞炎症反应。**关键词** Ski; RNA 干扰; 脂多糖; 炎症; 星形胶质细胞; 大鼠

Role of Ski in Inflammatory Factor Release in Activated Astrocytes

WANG Ming^{1,2}, YANG Xin-le¹, CHEN Tie-ge^{1,2}, ZHANG Dong-liang^{1,2}, GONG Zhao-yang^{1,2}, XIANG Gao^{1,2}, LIU Kai-xin^{1,2}, ZHANG Hai-hong¹

1. Department of Orthopedics, the Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China; 2. Lanzhou University Key Laboratory of Orthopedics of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730030, China

Correspondence to ZHANG Hai-hong. E-mail: zhanghaihong1968@sina.com**Supported by** Gansu Natural Science Foundation (No. 17JR5RA238) and the Second Hospital of Lanzhou University Funding (No. CY2017-MS06)

Abstract

Objective To investigate the effect of Ski on the secretion of inflammatory cytokines from activated astrocytes.**Methods** Astrocytes were obtained from cerebral cortex of a three-day old Sprague-Dawley rat and cultured in vitro.

They were divided into blank group, control group and siRNA group. The Ski gene was silenced in siRNA group.

The expression of Ski was tested with Western blotting and immunofluorescence 48 hours later. Then the astrocytes were stimulated with lipopolysaccharide for 24 hours. The secretion of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in activated astrocytes was detected with ELISA.**Results** The expression of Ski protein reduced in the siRNA group ($P < 0.001$), as well as the secretion of TNF- α and IL-1 β ($P < 0.001$).**Conclusion** Ski may play a role in inflammatory response of astrocyte.**Key words:** Ski; RNA interference; lipopolysaccharide; inflammation; astrocytes; rats

[中图分类号] R741 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2018)07-0802-05

[本文著录格式] 王明, 杨新乐, 陈铁戈, 等. Ski 对脂多糖诱导大鼠星形胶质细胞炎症因子释放的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(7): 802-806.

CITED AS: Wang M, Yang XL, Chen TG, et al. Role of Ski in inflammatory factor release in activated astrocytes [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2018, 24(7): 802-806.

作者简介: 王明(1993-), 男, 汉族, 陕西咸阳市人, 硕士研究生, 主要研究方向: 脊柱脊髓损伤。通讯作者: 张海鸿, 男, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 脊柱脊髓损伤。

中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤与神经炎症有密切关系^[1-2]。神经炎症反应过程以神经胶质细胞激活和外周免疫细胞侵入为特征^[3]。星形胶质细胞是CNS内数量最多、分布最广的免疫效应细胞,不仅在正常CNS发挥许多功能,而且在CNS损伤及疾病中发挥重要作用^[4-5]。星形胶质细胞通过产生炎症因子,如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)等发挥作用^[6]。研究星形胶质细胞在炎症反应中的作用,对CNS损伤后功能恢复有重要意义。

Ski癌基因在1986年首次被认定为Sloan-Kettering病毒基因组中的转化蛋白质,诱导鸡胚成纤维细胞转化^[7-8]。Ski是一种进化保守蛋白,参与细胞增殖、分化、转化和肿瘤的发展过程^[9],在肝脏再生、血管平滑肌的增殖和骨骼肌的分化、伤口愈合等领域发挥重要作用^[10]。本课题组前期研究发现,脂多糖可诱导星形胶质细胞中Ski蛋白表达上调^[11],推测Ski可能与CNS炎症反应有关。本实验采用RNA干扰技术沉默Ski基因,观察Ski对脂多糖诱导大鼠星形胶质细胞中炎症因子的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

SPF级3日龄Sprague-Dawley大鼠,由甘肃省中医药大学动物实验中心提供。

脂多糖(L6259):美国SIGMA公司。小鼠抗大鼠Ski单克隆抗体(G8) sc-33693:美国SANTA CRUZ公司。Ski干扰RNA及阴性对照: THERMOFISHER公司合成。Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent: THERMOFISHER公司。FBS: 德国PAN-BIOTECH GMBH公司。DMEM/F12培养基、胰蛋白酶: 美国GIBCO公司。RIPA裂解液、BCA蛋白定量检测试剂盒、TritonX-100和SDS: 碧云天公司。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体、GAPDH多克隆抗体: 美国PROTEINTECH公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG、RBITC标记山羊抗兔或小鼠IgG、山羊封闭血清、PVDF膜(0.45 μ m): SOLAR BIO公司。ECL试剂盒: 美国MILLOPORE公司。ELISA试剂盒: NEOBIOSCIENCE公司。

1.2 原代大鼠星形胶质细胞的培养和纯化

Sprague-Dawley大鼠置于75%乙醇中浸泡3 min。细胞操作台上迅速取出大脑皮质,置DMEM/F12液中

漂洗,剥离脑膜和血管。将脑皮质置于盛有胰酶的培养皿中剪碎,吹打至组织块消散,37℃温箱胰酶消化3 min;转至离心管中,加完全培养基4 ml,1500 r/min离心8 min。弃上清,加DMEM/F12完全培养基4 ml,反复吹打,制成均一细胞悬液,种植于细胞培养瓶中,37℃、5% CO₂培养箱中培养。每3天换液,培养9~10 d,至细胞融合贴满瓶壁。封口后37℃恒温旋转摇床210 r/min摇床6 h,除去悬浮细胞和贴壁不牢的细胞,传代培养。

1.3 细胞分组及处置

纯化后的细胞分为空白对照组、阴性对照组和siRNA组。siRNA组采用siRNA沉默Ski基因48 h。参照文献^[12],以浓度1 μ g/ml脂多糖刺激细胞24 h^[13],收集细胞培养上清液,ELISA检测炎症因子表达。

转染前24 h,用胰酶消化细胞、计数,接种于细胞培养皿中,至细胞密度达80%。siRNA组采用siRNA Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent将Ski-siRNA转入星形胶质细胞,阴性对照组采用siRNA Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent将阴性对照-siRNA(negative control-siRNA, NC-siRNA)转入星形胶质细胞,空白对照组仅加入siRNA Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent。

Ski-siRNA序列: 正义5'-GCC CUG AUU CGA GAC AGC UUC UAC U-3'; 反义5'-AGU AGA AGC UGU CUC GAA UCA GGG C-3'。NC-siRNA序列: 正义5'-UUG UGG CCU GUU AGC UUC AGA GCG A-3'; 反义5'-UCG CUC UGA AGC UAA CAG GCC ACA A-3'。

参照说明书提供的方法进行操作,细胞转染48 h后,采用Western blotting及免疫荧光染色检测Ski表达。

1.4 免疫荧光染色

将原代星形胶质细胞接种于盖玻片后,用GFAP多克隆抗体行免疫荧光染色,荧光显微镜下计数GFAP阳性细胞数和总细胞数,以阳性细胞数占总细胞数的百分数计为星形胶质细胞的纯度。星形胶质细胞纯度达95%以上符合实验要求。

细胞转染48 h后,用Ski单克隆抗体行免疫荧光染色,荧光显微镜下观察Ski沉默效果。

PBS清洗接种于盖玻片的细胞3遍,4%多聚甲醛固定30 min; PBS洗3遍,0.3% TritonX-100通透20 min, PBS洗3次; 10%山羊血清封闭30 min; 吸干封

闭液，滴加兔抗大鼠 GFAP 多克隆抗体(1：100)或小鼠抗大鼠 Ski 单克隆抗体(1：100)，4℃冰箱孵育过夜。PBS 洗 3 次，避光加 RBITC 标记山羊抗兔 IgG (1：300)或山羊抗小鼠 IgG (1：300)，37℃温箱避光孵育 90 min。PBS 清洗 3 次，滴加 DAPI，避光室温孵育 20 min，PBS 洗 2 次。甘油封片，荧光显微镜下观察。

1.5 Western blotting

转染 48 h 后，各组细胞 PBS 洗 2 次，加 RIPA 裂解液裂解细胞 30 min，提取蛋白；BCA 检测总蛋白量后，行 10% SDS-PAGE 电泳，湿转至甲醇浸透的 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉 37℃封闭 2 h。TBST 洗 3 次，每次 10 min。加入 Ski (1：200)、GAPDH (1：2500)一抗，4℃过夜；TBST 洗膜 3 次；37℃下滴加山羊抗小鼠二抗(1：5000)，孵育 2 h；TBST 洗膜 3 次；滴加发光液，通过 X 胶片获得蛋白信号，Image J 软件分析条带灰度值，计算目的蛋白与内参 GAPDH 蛋白条带的相对灰度。每组测 3 次。

1.6 ELISA

收集各组星形胶质细胞培养上清液，用 ELISA 试剂盒按照操作说明书检测 TNF-α 和 IL-1β 的浓度。每

组设 3 个复孔，每个复孔测 3 次，取均值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 体外培养细胞形态及纯度鉴定

取纯化后的细胞少许种植于多聚赖氨酸包被的玻璃片上，24 h 后观察细胞贴壁良好。GFAP 免疫荧光染色，镜下观察 GFAP 阳性细胞数占总细胞数百分比 95%，符合实验要求(图 1)。

2.2 Ski 沉默效果

2.2.1 免疫荧光染色

siRNA 组 Ski 表达量较空白对照组和阴性对照组降低，空白对照组和阴性对照组 Ski 表达无明显差异(图 2)。

2.2.2 Western blotting

siRNA 组 Ski 蛋白表达水平比空白对照组和阴性对照组显著降低($P<0.001$)；空白对照组和阴性对照组 Ski 表达无显著性差异($P>0.05$)。见图 3、表 1。

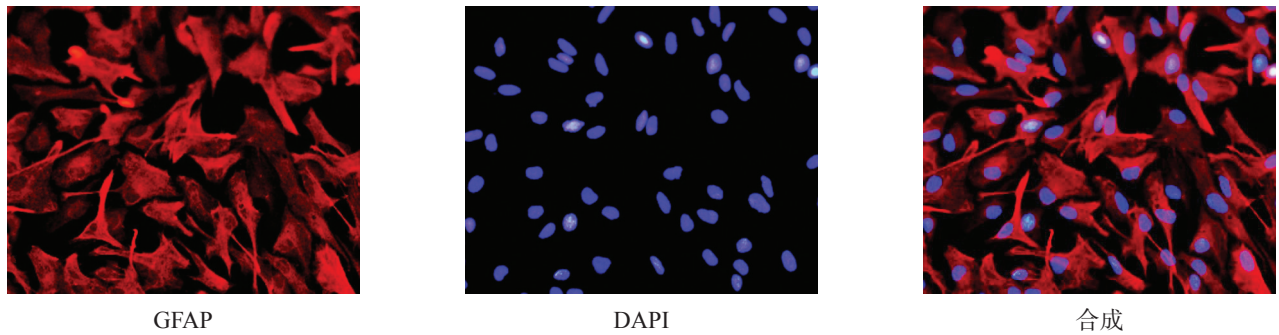


图1 体外培养细胞纯度鉴定(GFAP免疫荧光染色, 200×)

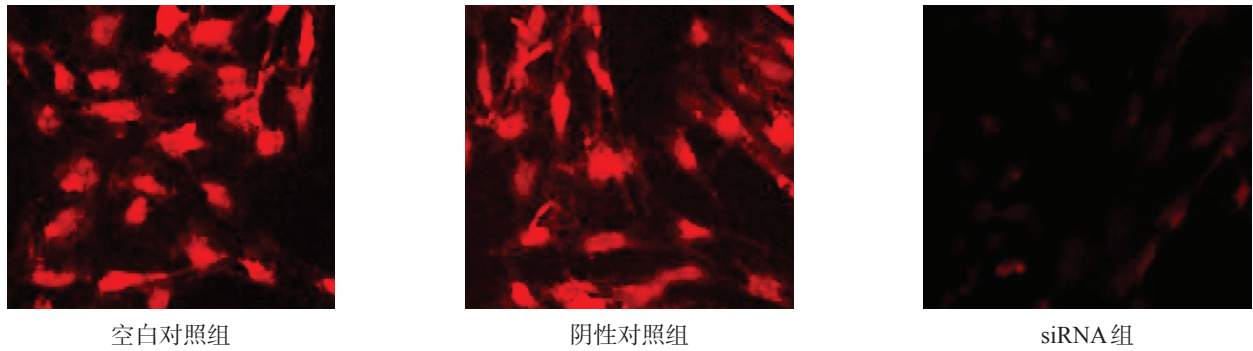


图2 细胞 Ski 沉默效率(Ski免疫荧光染色, 100×)

表 1 各组 Ski 表达

组别	n	Ski
空白对照组	3	0.904±0.018 ^a
阴性对照组	3	0.834±0.036
siRNA 组	3	0.294±0.023
F		155.353
P		<0.001

注：a. 与阴性对照组比较， $P=0.233$

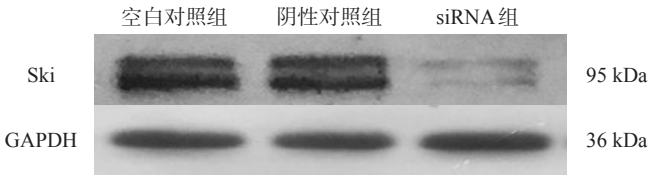


图 3 各组 Ski 表达(Western blotting)

2.3 脂多糖刺激后 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌

siRNA 组 TNF- α 和 IL-1 β 浓度显著低于空白对照组和阴性对照组($P<0.001$)，空白对照组与阴性对照组之间无显著性差异($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组 TNF- α 和 IL-1 β 浓度比较(pg/ml)

组别	n	TNF- α	IL-1 β
空白对照组	3	362.558±35.286 ^a	774.044±52.161 ^b
阴性对照组	3	336.530±23.839	677.517±54.790
siRNA 组	3	117.302±38.215	260.566±41.828
F		49.891	89.695
P		<0.001	<0.001

注：与阴性对照组比较，a. $P=0.372$; b. $P=0.121$

3 讨论

炎症反应是 CNS 损伤及退变性疾病发展过程中重要的病理反应^[1-2]；在 CNS 病理过程中，抑制炎症反应可能有助于减少细胞损伤，促进神经功能恢复^[14]。

过去认为活化的小胶质细胞是炎症因子的主要来源细胞^[15]。但近来研究发现，星形胶质细胞在炎症反应中也发挥重要作用。在活化的星形胶质细胞中，促炎因子，如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 显著升高^[16]。这些细胞因子既可以诱导神经元变性，刺激胶质瘢痕形成，阻碍神经元修复再生^[17]，又能进一步活化胶质细胞，使其产生更多的细胞因子和炎症介质，加重炎症反应^[18]。在众多促炎因子中，TNF- α 和 IL-1 β 是关键炎症因子，介导上游和下游多条炎症反应信号通路，引起炎症级联反应^[19]。

脂多糖是革兰氏阴性菌胞壁的主要成分，是有效的全身炎症诱导因子，可用于体外模拟革兰氏阴性细菌感染引发的炎症反应^[20]。星形胶质细胞存在 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)，脂多糖可与 TLR4

结合发挥致炎作用，并活化星形胶质细胞^[21]。

Ski 参与神经系统发育、造血细胞的增殖和分化、肿瘤发生、肌肉分化及再生等多种病理生理过程^[22]。我们前期研究发现，脂多糖可诱导星形胶质细胞中 Ski 表达上调，具有时间和浓度依赖性^[11]；Ski 还对星形胶质细胞增殖和迁移发挥重要作用^[23]。另有研究发现^[24]，Ski 与转化生长因子 β 信号通路的调控有关，而此通路广泛参与神经系统炎症反应过程^[25]。我们推测，Ski 可能通过调节星形胶质细胞炎症反应，进一步影响星形胶质细胞的增殖和迁移。

脂多糖刺激可使星形胶质细胞炎症因子生成显著升高，TNF- α 可进一步促进星形胶质细胞产生趋化因子，并且促进其他炎症细胞因子(如 IL-1 β 、IL-6)的产生，而 IL-1 β 又能加强 TNF- α 的作用，导致炎症反应迅速放大^[26-27]。

本研究采用 siRNA 技术，将特异针对 Ski 序列的 siRNA 转染大鼠星形胶质细胞，结果显示，星形胶质细胞 Ski 表达显著降低；随着 Ski 表达下调，星形胶质细胞 TNF- α 和 IL-1 β 分泌明显减少，提示 Ski 在星形胶质细胞介导炎症反应方面起重要作用。

综上所述，利用 siRNA 靶向干预 Ski 基因，可抑制炎症因子的分泌，阻止炎症效应的级联放大，从而可能为 CNS 损伤治疗提供新的干预靶点。

本研究证明，Ski 可能是一种调节活化星形胶质细胞炎症因子释放的新型分子。但 Ski 调节星形胶质细胞炎症反应过程的具体机制仍需进一步研究。进一步研究将探讨 Ski 调节星形胶质细胞炎症因子释放的信号通路，为治疗 CNS 炎症相关疾病寻找新的途径。

[参考文献]

[1] Mietto BS, Mostacada K, Martinez AM. Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 251204.

[2] Lukovic D, Stojkovic M, Moreno-Manzano V, et al. Concise review: reactive astrocytes and stem cells in spinal cord injury: good guys or bad guys? [J]. Stem Cells, 2015, 33(4): 1036-1041.

[3] Messmer K, Reynolds GP. An in vitro model of inflammatory neurodegeneration and its neuroprotection [J]. Neurosci Lett, 2005, 388(1): 39-44.

[4] Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis [J]. Neurosci Lett, 2014, 565: 30-38.

[5] Sofroniew MV. Astroglialosis [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 7(2): a020420.

- [6] Cerbai F, Lana D, Nosi D, et al. The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45250.
- [7] Li Y, Turck CM, Teumer JK, et al. Unique sequence, Ski, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene [J]. J Virol, 1986, 57(3): 1065-1072.
- [8] Stavnezer E, Barkas AE, Brennan LA, et al. Transforming Sloan-Kettering viruses generated from the cloned v-Ski oncogene by in vitro and in vivo recombinations [J]. J Virol, 1986, 57(3): 1073-1083.
- [9] Bonnon C, Atanasoski S. c-Ski in health and disease [J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 51-64.
- [10] 周开升, 朱彦东, 张海鸿, 等. Ski 在神经系统中的作用及机制的研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(7): 797-800.
- [11] 赵鑫, 郭永强, 王明, 等. 脂多糖对大鼠星形胶质细胞 Ski 蛋白表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(5): 514-519.
- [12] Gong P, Xu X, Shi J, et al. Phosphorylation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1 in astrocytic inflammation: a possible role in inhibiting production of inflammatory cytokines [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81747.
- [13] Cheng KY, Liu Y, Han YG, et al. Follistatin-like protein 1 suppressed pro-inflammatory cytokines expression during neuroinflammation induced by lipopolysaccharide [J]. J Mol Histol, 2017, 48(2): 63-72.
- [14] Cerciati M, Unkila M, Garcia-Segura LM, et al. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro [J]. Glia, 2010, 58(1): 93-102.
- [15] Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, et al. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype [J]. Eur J Neurosci, 2011, 34(1): 3-11.
- [16] Sofroniew MV. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators [J]. Neuroscientist, 2014, 20(2): 160-172.
- [17] Barnett SC, Lington C. Myelination: do astrocytes play a role? [J]. Neuroscientist, 2013, 19(5): 442-450.
- [18] Cheeran MC, Hu S, Sheng WS, et al. Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection [J]. J Neurovirol, 2005, 11(6): 512-524.
- [19] Zhang X, Shi LL, Gao X, et al. Lentivirus-mediated inhibition of tumour necrosis factor- α improves motor function associated with PRDX6 in spinal cord contusion rats [J]. Sci Rep, 2015, 5: 8486.
- [20] Zhang X, Wang J, Qian W, et al. Dexmedetomidine inhibits tumor necrosis factor- α and interleukin 6 in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes by suppression of c-Jun N-terminal kinases [J]. Inflammation, 2014, 37(3): 942-949.
- [21] Heiman A, Pallott A, Heary RF, et al. Toll-like receptors in central nervous system injury and disease: a focus on the spinal cord [J]. Brain Behav Immun, 2014, 42: 232-245.
- [22] Li P, Liu P, Xiong RP, et al. Ski, a modulator of wound healing and scar formation in the rat Skin and rabbit ear [J]. J Pathol, 2011, 223(5): 659-671.
- [23] Zhao X, Wang XW, Zhou KS, et al. Expression of Ski and its role in astrocyte proliferation and migration [J]. Neuroscience, 2017, 362: 1-12.
- [24] Prunier C, Pessah M, Ferrand N, et al. The oncoprotein Ski acts as an antagonist of transforming growth factor- β signaling by suppressing Smad2 phosphorylation [J]. J Biol Chem, 2003, 278(28): 26249-26257.
- [25] Makwana M, Jones LL, Cuthill D, et al. Endogenous transforming growth factor β 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS [J]. J Neurosci, 2007, 27(42): 11201-11213.
- [26] Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response [J]. Neuron Glia Biol, 2011, 7(1): 47-53.
- [27] Street ME, Miraki-Moud F, Sanderson IR, et al. Interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 modulate insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) secretion in colon cancer epithelial (Caco-2) cells [J]. J Endocrinol, 2003, 179(3): 405-415.

(收稿日期:2018-04-19 修回日期:2018-05-17)