

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.01.016

论著·实验研究

整合素 β_8 在星形胶质细胞氧糖剥夺后 对 TGF- $\beta 1$ 的活化影响

李晋辉 李德渊 陈大鹏 母得志 屈艺

(四川大学华西第二医院儿科 / 华西儿童医学中心,
出生缺陷相关妇女儿童疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨在氧糖剥夺(OGD)后,星形胶质细胞中整合素 β_8 (β_8) 的表达对转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 活化的影响。**方法** 体外培养星形胶质细胞, OGD 模拟缺氧缺血。免疫细胞化学法检测 β_8 蛋白在星形胶质细胞中的表达及分布, Western blot 定量检测 OGD 处理后复氧 12 h、1 d 及 2 d 时 β_8 蛋白表达的变化。建立星形胶质细胞与荧光素酶报道细胞(TMLC)共培养体系, 利用 RNA 干扰技术抑制星形胶质细胞 β_8 表达, 观察 β_8 对 TGF- $\beta 1$ 活化的影响。**结果** β_8 主要分布于星形胶质细胞的胞浆和树突; 星形胶质细胞中 β_8 蛋白表达在复氧后 12 h 即有增加, 1 d 时达高峰; 星形胶质细胞与 TMLC 共培养体系在复氧后各时间点 TGF- $\beta 1$ 活性增高趋势与星形胶质细胞 β_8 表达趋势相似, 抑制 β_8 表达后, TGF- $\beta 1$ 活性在各时间点均显著降低。**结论** 新生鼠在缺血缺氧时, 星形胶质细胞高表达的 β_8 对中枢神经系统中 TGF- $\beta 1$ 的活化起重要调控作用。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(1): 73-76]

[关键词] 缺氧缺血; 星形胶质细胞; 整合素; 转化生长因子; 新生大鼠

Effect of integrin β_8 on TGF- $\beta 1$ activation in astrocytes with oxygen glucose deprivation

LI Jin-Hui, LI De-Yuan, CHEN Da-Peng, MU De-Zhi, QU Yi. Department of Pediatrics, West China Second Hospital, Sichuan University; West China Children's Medical Center; Key Laboratory of Obstetric & Gynecologic and Pediatric Diseases and Birth Defects of Ministry of Education, Chengdu 610041, China (Qu Yi, Email: quyi712002@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effect of β_8 expression on transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) activation in astrocytes with oxygen glucose deprivation (OGD). **Methods** Astrocytes were cultured and then subjected to OGD to generate hypoxia-ischemia (HI) model *in vitro*. Immunocytochemistry was used to detect the expression and distribution of β_8 in normoxia cultured cells. β_8 protein expression was quantified by Western blot at 12 hours, 1 day and 2 days after OGD. Astrocytes and luciferase reporter cells (TMLC) were co-cultured. β_8 RNA interference system was established to specifically inhibit β_8 expression in cultured astrocytes. TGF- $\beta 1$ activation was then detected in the co-culture system. **Results** β_8 was mainly located in the cytoplasm and neurites of astrocytes. OGD resulted in increase of β_8 protein expression at 12 hours after reoxygenation in astrocytes, which was peaked at 1 day after reoxygenation. TGF- $\beta 1$ activation was in accordance with β_8 expression in astrocyte-TMLC co-culture system after reoxygenation. After the inhibition of β_8 , TGF- $\beta 1$ activation was significantly reduced in all time points. **Conclusions** The highly expressed β_8 plays important roles in the regulation of TGF- $\beta 1$ activation in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(1): 73-76]

Key words: Hypoxia-ischemia; Astrocyte; Integrin; Transforming growth factor; Neonatal rats

缺氧缺血(HI)是新生儿时期引起神经系统损伤的重要原因, 对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)

发病机制及防治的研究具有重要意义。星形胶质细胞是中枢神经系统(CNS)中数量最多的神经细

[收稿日期] 2013-06-17; [接受日期] 2013-07-15

[基金项目] 国家重大科学研究计划项目(2013CB967404); 国家自然科学基金(31171020、81172174、81270724、81100457); 四川省科技厅科技支撑项目(2010SZ0280、2013SZ0031); 国家临床重点专科(儿科新生儿专业)建设项目。

[作者简介] 李晋辉, 女, 博士, 讲师。

[通信作者] 屈艺, 女, 博士, 研究员。

胞之一。近年来,越来越多的研究表明,星形胶质细胞除了参与早期的血管发育,还参与了CNS损伤后修复的调控,有十分重要的调控作用^[1-2]。然而,星形胶质细胞是一种附着生长细胞,必须在整合素的介导下,与周围基质及细胞相互粘着才能存活和生长。整合素 $\alpha_5\beta_1$ 是星形胶质细胞表达的主要整合素之一,因此可能对其功能起重要调控作用。转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)具有调节细胞生长、分化、调控炎症反应等作用^[3],以无活性的潜伏态形式分泌,在CNS中尤其是HI时,对其活化途径仍不完全清楚。 β_8 是位于细胞表面的主要TGF- β 受体,研究表明,上皮细胞表达的 β_8 可激活TGF- β_1 ^[4]。然而,在CNS中, β_8 是否也是激活TGF- β_1 的关键因素,目前尚不十分清楚。

在体外培养环境中,氧糖剥夺(OGD)模拟HI后星形胶质细胞 β_8 表达是否诱导性增高?表达增高的 β_8 能否诱导TGF- β_1 活化水平增高,从而影响一系列下游调节蛋白高表达?本课题组认为这一连锁反应是新生儿HIBD细胞修复的重要机制之一。这一假设亟待进一步证实,也是本研究的核心内容。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

清洁级新生3 d(P3) Sprague-Dawley(SD)大鼠,雌雄不限,平均体重12 g,由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。兔抗大鼠 β_8 及 β -actin多克隆抗体、山羊抗兔IgG多克隆抗体购自Santa Cruz公司,ABC免疫化学试剂盒购自VECTOR Laboratories, DAB显色试剂盒购自KPL公司,荧光素酶分析试剂盒购自Promega公司,抗TGF- β_1 抗体1d11购自R&D公司。Western blot用兔抗大鼠 β_8 多克隆抗体参照文献^[5]以KLH偶联合成多肽(N'-EIKMDISKLN-C')免疫动物获得。 β_8 siRNA及对照 siRNA已由既往实验获得^[6],直接用于本实验。

1.2 原代星形胶质细胞培养

参照文献进行原代培养^[7]。将新生大鼠脑膜及血管组织分离后,取脑皮质并将其剪碎,加入含0.25%胰蛋白酶的PBS液中,37℃消化5~10 min后,加入10%胎牛血清(FBS)终止消化。通过75 μ m不锈钢筛网过滤,收集细胞悬液,加入DMEM培养基柔和吹打数次后以1200 rpm/min,离心5 min,去上清液后加入培养液(高糖DMEM培

养基+10%FBS),于二氧化碳培养箱中(37℃,5%CO₂)饱和湿度培养。接种3 d后更换培养液,以后每两天半量换液1次。培养约15 d即为成熟星形胶质细胞。

1.3 体外模拟缺氧缺血

OGD体外模拟HI。将成熟星形胶质细胞培养基更换为无糖DMEM培养基,将细胞置于通混合气(5%CO₂+95%N₂)的缺氧装置中,体外模拟HI。6 h后更换为原培养液,并以正常条件继续培养,模拟复氧。以未接受OGD处理的细胞作为对照,分别采集对照组及复氧后12 h、1 d、2 d细胞标本进行后续实验。

1.4 星形胶质细胞与荧光素酶报道细胞共培养

待荧光素酶报道细胞(TMLC)在96孔板中贴壁后,将培养中的星形胶质细胞以相同密度接种于生长有TMLC的96孔板中。以高糖培养液,于37℃、5% CO₂孵箱中培养。共培养2 d后,光镜下观察星形胶质细胞覆盖于TMLC之上生长,满足后续实验要求。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 免疫细胞化学检测 β_8 表达及分布 收集正常生长的星形胶质细胞爬片,0.01M PBS清洗后,4%多聚甲醛固定。3%H₂O₂封闭内源性过氧化物酶10 min,10%山羊血清37℃孵育20 min,滴加兔抗大鼠 β_8 抗体(1:500)4℃孵育过夜。滴加山羊抗兔IgG 37℃孵育30 min,加入ABC 37℃孵育30 min, DAB显色试剂盒显色,显微镜下观察。

1.5.2 Western blot检测缺氧缺血后 β_8 蛋白表达

取对照组及复氧后12 h、1 d及2 d的细胞,0.25%胰酶消化及离心后收集细胞沉淀,蛋白裂解液抽提细胞蛋白。取上清,BCA法测蛋白浓度,各孔加入100 μ g蛋白样品电泳,转膜,5%小牛血清封闭液封闭1 h,加入兔抗大鼠 β_8 多克隆抗体(1:100)。TBST洗膜3次,二抗室温孵育1 h, TBST洗膜3次, ECL显色,用Gel-pro凝胶成像分析软件测定条带的积分光密度值(IOD),并计算目的蛋白和内参 β -actin的IOD比值,即为相对光密度。

1.5.3 TGF- β_1 活性的检测 在星形胶质细胞和TMLC共培养体系中,TMLC已被转染且能稳定表达与TGF- β_1 起反应的启动子(PAI-1),当PAI-1被TGF- β_1 激活后,可启动其下游的虫媒荧光素酶表达^[8],TGF- β_1 活性由荧光素酶强度反映。将共培养体系中的星形胶质细胞与TMLC共同行OGD

处理6 h后复氧, 设未接受 OGD 处理组(对照组)和复氧后 12 h、1 d、2 d 组共 4 组, 每组根据不同的处理方式再分为 3 个亚组: (1) $\beta_8^{+/+}$ /TMLC 共培养组($\beta_8^{+/+}$ 组); (2) $\beta_8^{-/-}$ /TMLC 共培养组($\beta_8^{-/-}$ 组); (3) 1d11(10 $\mu\text{g/mL}$)处理的 $\beta_8^{+/+}$ /TMLC 组(anti-TGF- β 组)。其中, $\beta_8^{-/-}$ 表示经 RNA 干扰的星形胶质细胞, $\beta_8^{+/+}$ 表示正常培养的星形胶质细胞。参照试剂盒说明书检测, 酶标仪读取荧光素酶数值。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件包对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$), 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 β_8 蛋白在星形胶质细胞中的表达及分布

细胞免疫化学染色发现, 常氧状态下, 星形胶质细胞即有大量 β_8 蛋白表达, β_8 主要分布于星形胶质细胞的胞浆和树突。见图 1。

2.2 氧糖剥夺后星形胶质细胞 β_8 蛋白表达的变化

将未接受 OGD 处理的对照组 β_8 蛋白表达判读结果定为 1, 复氧后各时间点结果以相对于对照组的倍数来表示。Western blot 结果显示, 星形胶质细胞中 β_8 蛋白表达在复氧后 12 h 即有增加, 为对照组的 1.3 倍($P < 0.01$); 1 d 时表达达高峰, 为对照组的 2.3 倍($P < 0.01$); 后表达缓慢下降, 至复氧后 2 d 时仍维持在较高水平, 为对照组的 1.9 倍($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 β_8 对 TGF- β 1 活化的调控

将未接受 OGD 处理的对照组 β_8 蛋白表达判读结果定为 1, 复氧后各时间点结果以相对于对照组的倍数来表示。荧光素酶检测结果显示, 复氧后 12 h、1 d 和 2 d 的荧光素酶强度分别为对照组的 1.5 倍、1.9 倍和 1.3 倍(均 $P < 0.01$), 其活性增高趋势与复氧后各时间点星形胶质细胞 β_8 蛋白表达趋势相似。阻断 TGF- β 1 后, 对照组及各时间点荧光素酶的强度分别下降 87%、84%、76%和 75%(均 $P < 0.01$)。阻断 β_8 后, 对照组及各时间点荧光素酶的强度分别下降 63%、57%、65%和 60%(均 $P < 0.01$)。以上结果提示星形胶质细胞表达的 β_8 与 TGF- β 1 的活化有关。见图 3。

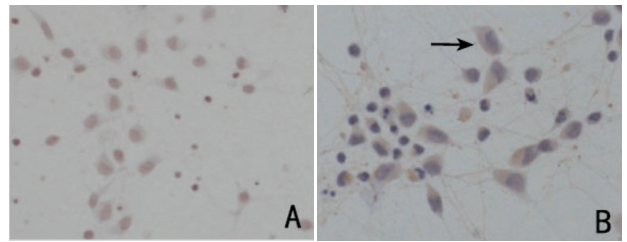


图1 免疫细胞化学检测 β_8 在星形胶质细胞中的分布及表达(DAB 显色, $\times 400$) 图 A 为常氧状态下星形胶质细胞, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照; 图 B 为常氧状态下星形胶质细胞 β_8 表达, 箭头所示胞浆及树突显示棕黄色颗粒为 β_8 阳性表达。

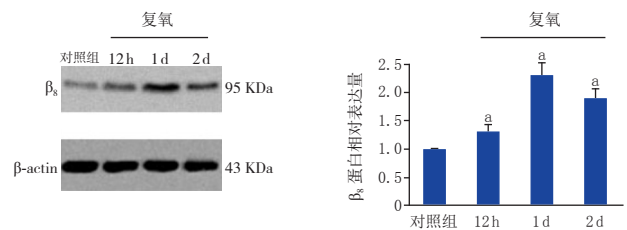


图2 OGD 对星形胶质细胞 β_8 蛋白表达的影响($n=5$) 左图为条带图; 右图为统计结果图, a: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

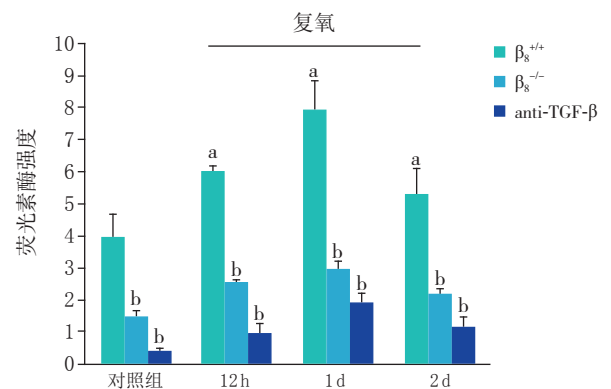


图3 星形胶质细胞/TMLC 共培养体系中荧光素酶强度($n=5$) a: 与对照组 $\beta_8^{+/+}$ 比较, $P < 0.01$; b: 与同组 $\beta_8^{+/+}$ 比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

整合素 $\alpha_v\beta_8$ 是主要的细胞表面受体之一, 并且在 CNS 中仅与 α_v 亚基结合形成异二聚体^[9], 因此本实验中检测 β_8 亚基表达即代表整合素 $\alpha_v\beta_8$ 水平。体内实验发现, β_8 在海马区的免疫活性最强, 主要分布于海马 CA3 区的透明层、起始层和辐射层, CA1 区的起始层和辐射层, 齿状回的分子层和颗粒细胞层^[5]。 β_8 的这种特异性组织分布, 提示其可能在 CNS 中有着特殊的调控作用。现有对 β_8 的研究大都是针对其在胚胎期对血管发育的作用^[10], 然而对其在 CNS 损伤后, 尤其是 HIBD 后

是否参与损伤后修复过程,目前研究甚少。

β_8 在体外原代培养的鼠胶质细胞和人胶质瘤细胞中亦被证实是高表达的整合素亚基之一^[10]。但是,在CNS HI后, β_8 的表达是否会被诱导性表达增高,从而参与损伤后的一系列信号通路?本研究发现, β_8 主要分布于星形胶质细胞的胞浆和树突。OGD后, β_8 表达在星形胶质细胞中明显增高,复氧后约1 d其表达达到高峰,其后缓慢降低,至复氧后2 d仍维持在较高水平。

本课题组既往研究已利用慢病毒载体成功构建了 β_8 RNA干扰系统^[6]。利用该系统特异性干扰星形胶质细胞经 β_8 表达,干扰后2 d达到最大抑制率,其 β_8 蛋白的抑制率可高达84%,该抑制作用至少可持续3 d,因此本研究选择实验周期为3 d以内,从而保证RNA干扰对 β_8 表达的抑制作用。

正常情况下,TGF- β 1在体内与潜伏相关蛋白LAP- β 1结合,形成潜伏态TGF- β 1,必须通过激活才能发挥其生物学效应。研究表明,TGF- β 1活化通过蛋白水解途径和非蛋白水解途径两条通路进行^[11]。星形胶质细胞表达的 $\alpha_v\beta_8$ 是潜伏态TGF- β 1的主要细胞表面受体,在体外培养的星形胶质细胞和新鲜分离的胎脑细胞中, β_8 依赖的TGF- β 1活化亦被证实是CNS中主要的TGF- β 1活化通路^[12]。本实验结果表明,在OGD和复氧过程中,将星形胶质细胞与TMLC细胞株共同培养,可明显增高TMLC的荧光素酶强度,而荧光素酶强度即代表TGF- β 1激活水平。直接抑制星形胶质细胞中 β_8 作用,TGF- β 1活性较未阻断前明显下降,提示CNS中TGF- β 1的激活与整合素 β_8 直接相关。此外,OGD后,TGF- β 1活性的增高趋势与星形胶质细胞 β_8 表达增高的趋势一致,而抑制 β_8 后在一定程度上可抑制TGF- β 1活性的增强。以上结果提示, β_8 是CNS缺氧缺血后,诱导TGF- β 1持续活化的关键因素之一。

本研究中,抑制 β_8 后,TGF- β 1活化的抑制率不超过65%,而直接阻断TGF- β 1,其活化抑制率则可高达87%。造成这种差异的原因可能是由于除 β_8 外,还有其他因素参与了TGF- β 1的活化。研究发现,体外培养的人星形胶质细胞除了表达 $\alpha_v\beta_8$ 外,还大量表达 $\alpha_v\beta_5$ 整合素^[13]。 $\alpha_v\beta_5$ 已被证明可在肿瘤细胞中激活TGF- β 1^[14],虽目前尚无证据表明其在CNS中的类似作用,但仍不能完全除外

$\alpha_v\beta_5$ 等因素参与HI后CNS中TGF- β 1的活化。

综上,本研究发现发育期大鼠HIBD时,星形胶质细胞高表达的整合素 β_8 在CNS中对TGF- β 1的活化起关键调控作用。 $\alpha_v\beta_8$ /TGF- β 1通路可能与CNS损伤后自身启动的一系列保护性调控直接相关。

[参 考 文 献]

- [1] Chaboub LS, Deneen B. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development[J]. *Dev Neurosci*, 2012, 34(5): 379-388.
- [2] Ben Achour S, Pascual O. Astrocyte-neuron communication: functional consequences[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(11): 2464-2473.
- [3] Katsuno M, Adachi H, Banno H, et al. Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases[J]. *Curr Mol Med*, 2011, 11(1): 48-56.
- [4] Mu DZ, Cambier S, Fjellbirkeland L, et al. The integrin $\alpha(v)\beta_8$ mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- β 1[J]. *J Cell Biol*, 2002, 157(3):493-507.
- [5] Nishimura SL, Boylen KP, Einheber S, et al. Synaptic and glial localization of the integrin $\alpha(v)\beta_8$ in mouse and rat brain[J]. *Brain Res*, 1998, 791(1-2): 271-282.
- [6] Li JH, Qu Y, Li XH, et al. The role of integrin $\alpha(v)\beta_8$ in neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Neurotox Res*, 2010, 17(4): 406-417.
- [7] Moreno C, Sampieri A, Vivas O, et al. STIM1 and Orai1 mediate thrombin-induced Ca^{2+} influx in rat cortical astrocytes[J]. *Cell Calcium*, 2012, 52(6): 457-467.
- [8] Abe M, Harpel JG, Metz CN, et al. An assay for transforming growth factor- β using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct[J]. *Anal Biochem*, 1994, 216(2): 276-284.
- [9] Mobley AK, McCarty JH. β_8 integrin is essential for neuroblast migration in the rostral migratory stream[J]. *Glial*, 2011, 59(11): 1579-1187.
- [10] Tchaicha JH, Reyes SB, Shin J, et al. Glioblastoma angiogenesis and tumor cell invasiveness are differentially regulated by β_8 integrin[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(20): 6371-6381.
- [11] Kou W, Hu GH, Yao HB, et al. Regulation of transforming growth factor- β 1 activation and expression in the tissue remodeling involved in chronic rhinosinusitis[J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat*, 2012, 74(3):172-178.
- [12] Cambier S, Gline S, Mu DZ, et al. Integrin $\alpha(v)\beta_8$ -mediated activation of transforming growth factor- β by perivascular astrocyte[J]. *Amer J Pathol*, 2005, 166(6): 1883-1894.
- [13] Milner R, Relvas JB, Fawcett J, et al. Development regulation of $\alpha(v)$ integrins produces functional changes in astrocyte behavior[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 18: 108-118.
- [14] Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(1): 9-22.

(本文编辑: 万静)