

网络出版时间: 2019-09-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.018.html>

IL-1 β 对华勒变性早期雪旺细胞增殖与凋亡的影响

罗晓荷¹, 陈刚², 王宜梅³, 王炜², 朱飞¹

摘要 目的 探讨周围神经系统华勒变性(WD)早期白细胞介素-1 β (IL-1 β)对雪旺细胞(SCs)增殖和凋亡的影响,并研究相关作用机制。方法 取6~8周龄健康雄性SD大鼠双侧坐骨神经制备WD体外模型,分别给予0 ng/ml IL-1 β (对照组)和5 ng/ml IL-1 β (实验组)干预培养。培养48 h后免疫荧光染色检测SCs增殖标志物Ki67表达情况;Tunel法细胞凋亡染色检测细胞凋亡情况。培养24 h Western blot检测B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白和Bcl-2关联X蛋白(Bax)的蛋白表达。结果 免疫荧光染色显示干预48 h后实验组Ki67阳性率高于对照组($P < 0.05$);Tunel法染色显示干预

48 h后实验组SCs凋亡率较对照组降低($P < 0.05$);Western blot显示干预24 h后实验组较对照组中SCs凋亡抑制蛋白Bcl-2/凋亡促进蛋白Bax表达量比例升高($P < 0.05$)。结论

WD早期适当浓度IL-1 β 具有促进SCs增殖和抑制SCs凋亡的积极作用,并认为IL-1 β 可通过Bcl-2/Bax通路抑制SCs凋亡。

关键词 白细胞介素-1 β ;雪旺细胞;华勒变性;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号 R 741.02

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1579-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.017

2019-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81601700)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院整形外科, 合肥 230022

² 上海交通大学附属第九人民医院整复外科, 上海 200011

³ 南昌大学第一附属医院整形美容科, 南昌 330006

作者简介: 罗晓荷, 女, 硕士研究生;

朱飞, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfzfx@163.com;

陈刚, 男, 主治医师, 博士, 责任作者, E-mail: chengang0626@foxmail.com

再生医学作为极具潜力的新兴医学领域,通过修复、替换或再生器官和组织的方式恢复受损组织的功能^[1]。人类具有有限的再生修复组织和器官的能力,当周围神经损伤后即发生华勒变性(wallerian degeneration, WD),损伤处残存的雪旺细胞(schwann cells, SCs)的数量和增殖分化能力是影响神经再生修复的关键因素。在此过程中SCs去分化,分泌大量生长因子,促进轴突生长和髓鞘形成,

Preliminary study on the resistance of *Acinetobacter baumannii* and mechanism of drug efflux pumps

Zhao Yayun, Wang Xinling, Zhu Yunzhu et al

(Dept of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the distribution of efflux pump gene and its relationship with drug resistance.

Methods The minimal inhibitory concentration (MIC) of 18 antimicrobial agents against 26 multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates were determined by dilution method and disk diffusion method respectively. *adeB*, *adeJ*, *macB*, *emrB*, *abeS*, *abeM*, *craA* efflux pump genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Quantitative gene real-time PCR was performed to investigate the expression of efflux pump genes. **Results**

All twenty-six multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* showed highly resistant to 18 antimicrobial agents and three of them were tigecycline-resistant isolates. The detectable rate of clinically isolated multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* strains of *adeJ* and *abeM* were 100% (26/26), and the detection rates of *abeS*, *adeB* and *craA* were 96.15% (25/26) and 92.31% (24/26), 84.62% (22/26), respectively. The detection rate of efflux pump gene *macB* and *emrB* was more than 80%. The average expression levels of *macB* of tigecycline-resistant strains was 5.8-fold than that of the standard strain. **Conclusion** The detection rate of efflux pump gene *macB*, *emrB*, *craA* in multi-drug resistant *Acinetobacter* are higher, and the expression of *macB* is related to tigecycline resistance.

Key words *Acinetobacter baumannii*; efflux pump; resistance mechanisms

从而促进神经的再生修复^[2]。同时,受损的周围神经系统产生白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和其他炎症因子,参与一系列免疫应答反应。既往研究^[3-4]证明 IL-1 β 在组织再生过程中发挥多种作用。例如促进血管平滑肌的增殖,促进髓核细胞增殖等。由此推断,除了参与 WD 中的免疫应答作用,IL-1 β 对 SCs 的增殖和凋亡也具有一定影响。该研究将观察周围神经系统 WD 早期 IL-1 β 对 SCs 增殖和凋亡的影响,并探讨其相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄清洁级雄性 SD 大鼠 18 只,体质量 220~260 g,饲养环境温度为 18~26℃,相对湿度为 40%~70%,由上海交通大学附属第九人民医院中心实验室提供。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清 FBS、DMEM 高糖培养液购自美国 Invitrogen 公司;三抗(100 \times 青霉素、链霉素、两性霉素 B)购自美国 GIBCO 公司;重组大鼠 IL-1 β 购自美国 R&D Systems 公司;96 孔培养板、6 孔培养板、90 mm 培养皿、50 ml 离心管购自美国 BD 公司;RIPA 裂解液购自连云港碧云天公司;anti-Ki67 antibody、anti-Bax antibody、anti-Bcl-2 antibody 购自美国 Abcam 公司;Tunel 法凋亡检测试剂盒购自美国罗氏公司。

1.1.3 主要仪器 仪器:流式细胞仪购自美国 BD 公司;CO₂ 培养箱购自德国 HERAEUS 公司;光学显微镜购自日本 Olympus 公司;立体解剖显微镜购自日本 Carl Zeiss Jena 公司;超净工作台购自苏州净化设备厂;离心机购自上海手术器械公司;酶联免疫检测仪购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 体外 WD 模型的制备 参照 Thomson et al^[5]于 1993 年报道的 *vitro* Wallerian degeneration 制备方法,并根据实验需要进行了改进所制备的体外 WD 模型。制备过程:将 6~8 周龄健康雄性 SD 大鼠麻醉后处死,75% 酒精浸泡消毒,于超净台俯卧位固定,暴露坐骨神经全长,切取大鼠坐骨神经全长,立体解剖显微镜下去除神经外膜,将神经分成絮状神经丝,置于含 10% 胎牛血清 FBS 和 100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素、0.25 mg/ml 两性霉素 B 的 DMEM 培养液中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱进行体外培养。

1.2.2 免疫荧光染色法检测增殖标记 Ki67 表达情

况 将去除神经外膜的大鼠坐骨神经组织离体后于体外 WD 模型中培养,给予不同浓度 IL-1 β 干预(0 ng/ml 和 5 ng/ml)。干预培养 48 h,收集坐骨神经组织样本,PBS 洗涤 2 次;4% 多聚甲醛固定 15 min;弃除固定液,PBS 洗涤 3 次;1% BSA 封闭液封闭 60 min;加入 200 μ l Ki67 一抗(1:100 稀释)4℃ 孵育过夜;PBS 洗涤 3 次;加入荧光标记的二抗,避光 37℃ 孵育 60 min;PBS 洗涤 3 次;加入 DAPI(1:1000)避光 37℃ 孵育 60 min,PBS 洗涤 3 次;抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并计数。

1.2.3 Tunel 法细胞凋亡染色 去除神经外膜的大鼠坐骨神经组织离体后于体外 WD 模型中培养,给予不同浓度 IL-1 β 干预(0 ng/ml 和 5 ng/ml)。干预培养 48 h,收集坐骨神经组织样本,PBS 洗涤 2 次;4% 多聚甲醛固定 15 min;弃除固定液,PBS 洗涤 3 次;用 0.1% 枸橼酸钠缓冲液配 0.1% 的 Triton X-100,冰上孵育 2 min;PBS 浸泡 3 次;加入 Tunel 反应液,37℃ 避光孵育 1 h;PBS 避光浸泡 2 次;DAPI 染核,37℃ 避光孵育 30 s;PBS 避光浸泡 3 次;荧光封片剂封片,荧光显微镜下观察并计数,Tunel 试剂标记红色和 DAPI 标记的蓝色同时阳性才被认为是凋亡细胞。

1.2.4 Western blot 检测 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 关联 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 蛋白表达 去除神经外膜的大鼠坐骨神经组织经体外 WD 模型中不同浓度 IL-1 β 干预(0 ng/ml 和 5 ng/ml)后 24 h 收集样本,提取组织总蛋白,通过 BCA 法检测蛋白浓度并调整样品蛋白浓度后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移到聚偏二氟乙烯 PVDF 膜,放入 5% BSA 中封闭 1 h,加入一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,显影仪扫描。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。实验所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,每一实验重复 3 次($n=3$),两样本均数间比较用两样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-1 β 对体外 WD 模型中 SCs 增殖的影响 不同浓度 IL-1 β 干预培养 48 h 后,免疫荧光标记的 Ki67 均主要位于细胞核内;5 ng/ml 浓度的 IL-1 β 干预后,大鼠坐骨神经组织中 SCs Ki67 表达量较 0 ng/ml 浓度组有所升高(图 1)。统计两组 SCs 的 Ki67 阳性率显示,5 ng/ml 浓度组 Ki67 阳性率较 0

ng/ml 浓度组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 不同浓度 IL-1 β 干预后 SCs Ki67 阳性细胞和凋亡细胞比例 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

项目	0 ng/ml 组	5 ng/ml 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
Ki67 阳性率 (%)	17.33 \pm 8.02	64.00 \pm 9.85	-6.264	0.003
凋亡率 (%)	36.67 \pm 9.07	11.67 \pm 4.51	4.274	0.013

2.2 IL-1 β 对体外 WD 模型中 SCs 凋亡的影响

Tunel 阳性主要位于细胞核内; 5 ng/ml IL-1 β 干预 48 h 后, 大鼠坐骨神经组织中 SCs Tunel 表达量较 0 ng/ml 浓度组有所降低, 见图 2。统计两组 SCs 的 Tunel 阳性率显示 5 ng/ml 浓度组 Tunel 阳性率较 0 ng/ml 浓度组降低, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 IL-1 β 对体外 WD 模型中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况的影响 不同浓度 IL-1 β 干预培养 24 h 后, 用 Western blot 检测大鼠坐骨神经组织样本中

Bax 和 Bcl-2 表达量, 并以 β -actin 作为内参。实验重复 3 次, 分别检测 5 ng/ml 浓度组和 0 ng/ml 浓度组体外 WD 模型中 Bcl-2 和 Bax 表达量, 统计分析两组体外 WD 模型中 Bcl-2 和 Bax 表达量差异, 见图 3、表 2: 5 ng/ml 浓度组较 0 ng/ml 浓度组 SCs 凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达量升高 ($P < 0.05$); 5 ng/ml 浓度组较 0 ng/ml 浓度组凋亡促进蛋白 Bax 表达量降低 ($P < 0.05$)。这与 Tunel 法凋亡染色结果一致。进一步统计 Bcl-2/Bax 比例的差异, 分析显示 5 ng/ml 组较 0 ng/ml 组中 SCs 凋亡抑制蛋白 Bcl-2/凋亡促进蛋白 Bax 表达量比例升高 ($P < 0.05$)。

表 2 不同浓度 IL-1 β 干预后 SCs 中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量及其比值 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

项目	0 ng/ml 组	5 ng/ml 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
Bcl-2/ β -actin	0.248 \pm 0.053	0.408 \pm 0.060	-3.456	0.026
Bax/ β -actin	0.397 \pm 0.064	0.245 \pm 0.058	3.052	0.038
Bcl-2/Bax	0.632 \pm 0.137	1.716 \pm 0.404	-4.397	0.012

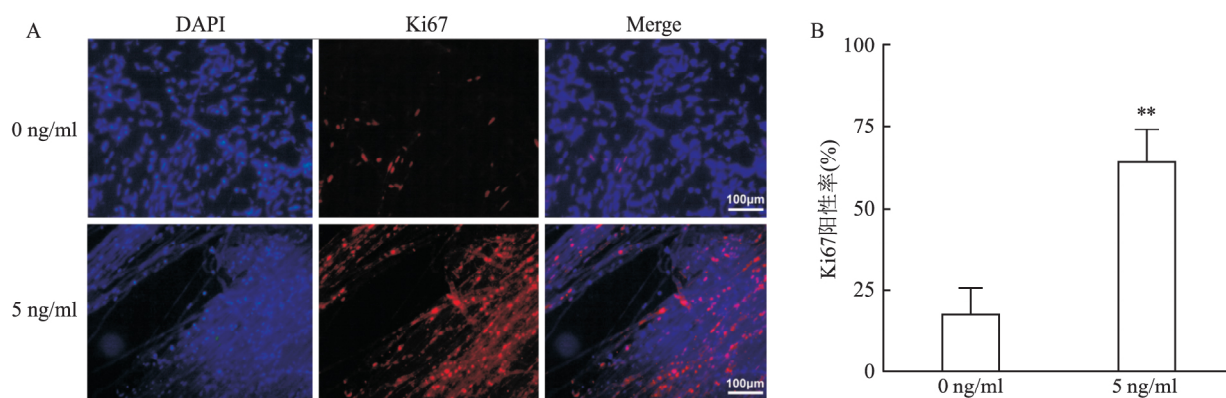


图 1 不同浓度 IL-1 β 干预 48 h 后 SCs Ki67 表达情况

A: 免疫荧光染色 $\times 100$; B: SCs Ki67 阳性率; 与 0 ng/ml 组比较: ** $P < 0.01$

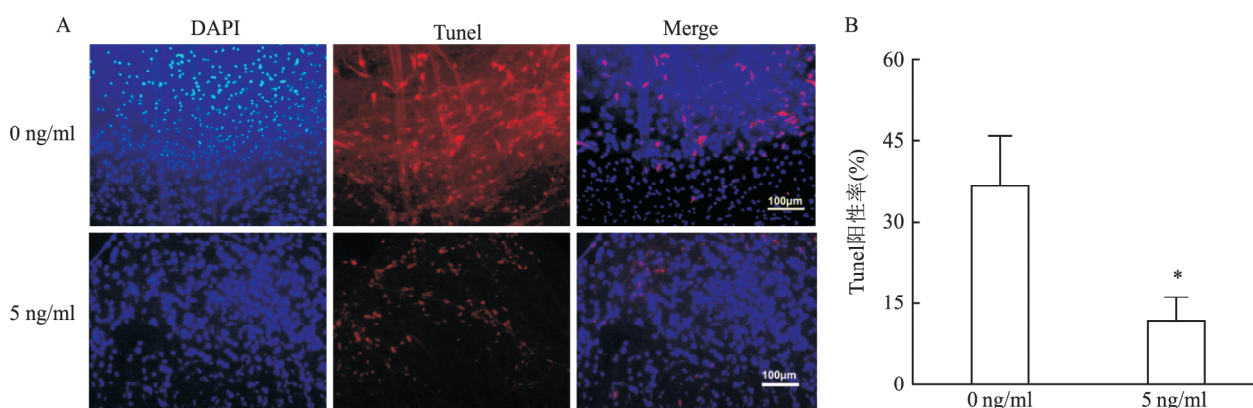
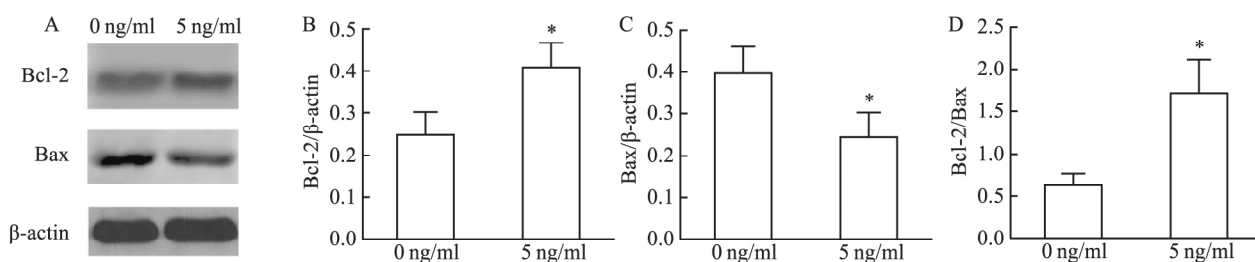


图 2 不同浓度 IL-1 β 干预 48 h 后 SCs 凋亡情况

A: 免疫荧光染色 $\times 100$; B: SCs Tunel 阳性率; 与 0 ng/ml 组比较: * $P < 0.05$

图3 不同浓度 IL-1 β 干预 24 h 后 SCs 中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况A: Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达; B: Bcl-2; C: Bax; D: Bcl-2/Bax; 与 0 ng/ml 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

在周围神经损伤发生 WD 的过程中,损伤处残存的 SCs 自发去分化和增殖,促进髓鞘形成和轴突再生。同时,受损的周围神经系统产生的 IL-1 β 等多种炎症因子在神经损伤修复的过程中发挥重要作用。既往研究^[6]表明 IL-1 β 可增加损伤区域 SCs 神经生长因子的表达量,促进神经元存活及轴突生长,并诱导巨噬细胞清除髓鞘碎片,从而促进周围神经再生。但 IL-1 β 对 SCs 增殖和凋亡作用的研究鲜有报道。

Ki67 是一种核抗原,作为细胞增殖的特异性和敏感性标志物,是检测细胞增殖的可靠指标。Ki67 在 G0 期和 G1 早期无表达,于 G1 中后期开始表达,位于细胞核周围区 S 期、G2 期表达逐渐增加, M 期达到峰值^[7]。本研究通过免疫荧光染色标记坐骨神经 WD 早期过程中 SCs Ki67,并量化分析 IL-1 β 干预前后其表达的阳性率差异。本研究显示适当浓度 IL-1 β 干预后 SCs Ki67 表达量增加, Ki67 阳性率升高,可见 IL-1 β 具有促进坐骨神经 WD 早期 SCs 增殖的作用。

检测细胞增殖情况后,本研究进一步采用 Tunel 法凋亡细胞染色检测并分析 IL-1 β 干预前后细胞凋亡率差异。结果显示适当浓度 IL-1 β 可降低坐骨神经 WD 早期 SCs 凋亡率,抑制其细胞凋亡。细胞凋亡是由基因调控的细胞自主的程序性死亡。通常,促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间的平衡是确定细胞是否经历凋亡的关键点^[8]。Bcl-2 蛋白家族则在其中扮演着重要角色,根据对细胞凋亡调控作用的不同及同源结构的不同,将 Bcl-2 蛋白家族分为 3 个亚组,一组具有抗凋亡作用,其他两组具有促凋亡作用, Bax 和 Bcl-2 是该家族的主要成员,其在人体细胞中的作用受到广泛关注^[9]。Bax 和 Bcl-2 是同源基因, Bcl-2 具有抗细胞凋亡作用。Bax 是 Bcl-2 的

拮抗基因,对 Bcl-2 具有拮抗作用。Bcl-2 对细胞凋亡的影响与 Bcl-2 和 Bax 比例的变化密切相关,两者比例的改变决定了凋亡信号刺激后细胞发生凋亡或存活的最终命运^[10]。Bcl-2 基因可在多种正常细胞的刺激和发育中表达,但在成熟或凋亡细胞中不表达或最低限度表达。研究^[11]表明 Bcl-2 通过多种途径联合作用调节细胞凋亡,其机制主要包括:抑制促凋亡细胞色素 C 从线粒体释放后进入细胞质;抗氧化作用和维持细胞内钙离子的平衡;阻止细胞质中的细胞色素 C 激活 caspase,抑制 DNA 裂解^[12]。Bax 是一种关键的促凋亡蛋白,主要存在于细胞质,发生凋亡时, Bax 易位到线粒体膜,形成同源二聚体促进凋亡,当与 Bcl-2 形成异源二聚体时,凋亡作用则被抑制。

通过 Western blot 检测显示,适当浓度 IL-1 β 干预后 WD 早期抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量增加,促凋亡蛋白 Bax 表达量降低。统计结果显示适当浓度 IL-1 β 干预后 WD 早期 SCs Bcl-2/Bax 表达量比例升高。这与 Tunel 法凋亡细胞染色结果一致表明适当浓度 IL-1 β 可抑制坐骨神经 WD 早期 SCs 的凋亡。

综上所述,适当浓度的 IL-1 β 可以促进 WD 早期 SCs 的增殖,并增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,降低促凋亡蛋白 Bax 的表达,从而抑制 SCs 凋亡。该研究对探寻局部组织损伤后炎症因子对组织再生的作用具有重要意义,为周围神经再生修复的治疗提供理论基础,值得进一步深入探讨。其确切的作用机制是下一步研究的重点。

参考文献

- [1] Hunsberger J G, Shupe T, Atala A. An industry-driven roadmap for manufacturing in regenerative medicine[J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(8): 564-8.
- [2] Tricaud N, Park H T. Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(22): 4049-

- 57.
- [3] Zhu X, Lin Y, Bacanamwo M, et al. Interleukin-1 beta-induced Id2 gene expression is mediated by Egr-1 in vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res* 2007, 76(1): 141–8.
- [4] 王小虎 吴小涛. IL-1 β 通过 p38、JNK 和 NF- κ B 信号通路促进髓核细胞增殖[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2016, 35(1): 32–6.
- [5] Thomson C E, Griffiths I R, McCulloch M C, et al. *In vitro* studies of axonally-regulated Schwann cell genes during Wallerian degeneration[J]. *J Neurocytol*, 1993, 22(8): 590–602.
- [6] Perrin F E, Lacroix S, Aviles-Trigueros M, et al. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 alpha and interleukin-1 beta in Wallerian degeneration[J]. *Brain*, 2005, 128(Pt 4): 854–66.
- [7] Miller I, Min M, Yang C, et al. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1105–12.
- [8] Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4): 603–19.
- [9] Khodapasand E, Jafarzadeh N, Farrokhi F, et al. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? [J]. *Iran Biomed J*, 2015, 19(2): 69–75.
- [10] Zhang X, Xu X, Litscher G, et al. Study of Guanxinling injection on regulatory mechanism of Bcl-2 and Bax by liquid nitrogen freezing-mediated femoral head necrosis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 4540124.
- [11] 张凯, 吕正梅, 贾雪梅, 等. 褪黑素对高脂饮食小鼠睾丸 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(4): 368–71.
- [12] Chipuk J E, Moldoveanu T, Llambi F, et al. The BCL-2 family reunion[J]. *Mol Cell*, 2010, 37(3): 299–310.

Effect of IL-1 β on proliferation and apoptosis of Schwann cells in the early stage of Wallerian degeneration

Luo Xiaohe¹, Chen Gang², Wang Yimei³, et al

(¹Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Plastic and Reconstructive Surgery, The Affiliated Shanghai Ninth People's Hospital of Shanghai

Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011; ³Dept of Plastic Surgery,

The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

Abstract Objective To investigate the effect of interleukin-1 β (IL-1 β) on Schwann cells proliferation and apoptosis in the early stage of Wallerian degeneration of peripheral nerve system and to explore the related mechanism.

Methods To establish *in-vitro* Wallerian degeneration model from sciatic nerve of healthy male Sprague-Dawley rats aged 6~8 weeks, and treated with 0 ng/ml IL-1 β (control group) and 5 ng/ml IL-1 β (experimental group). Immunofluorescent staining was used to detect the expression of Ki67 in Schwann cells nuclei after culturing for 48 h, the apoptosis of Schwann cells were detected by TUNEL after culturing for 48 h. The expression of Bcl-2 and Bax were detected by Western blot after culture of 24 h. **Results** The positive rate of Ki67 in the experimental group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The apoptosis rate of Schwann cells in the experimental group was significantly lower than that in control group after 48 h ($P < 0.05$). The ration of Bcl-2/Bax expression in Schwann cells was significantly higher than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The appropriate concentration of IL-1 β promotes proliferation and inhibits apoptosis of Schwann cells in early stage of Wallerian degeneration *via* the Bcl-2/Bax signaling pathway.

Key words IL-1 β ; Schwann cells; Wallerian degeneration; cell proliferation; apoptosis