

网络出版时间: 2019-1-3 17:25 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.013.html>

siRNA 可降低 IL-1 β 刺激椎间盘细胞所致凋亡敏感性

韩敦富, 尹荷珊, 王延, 王鹏云, 汪震, 魏超时, 明

摘要 目的 明确 siRNA 是否可降低大鼠椎间盘细胞对 IL-1 β 预刺激导致的凋亡敏感性, 并初步探讨其机制。方法 用阴性对照 siRNA 转染原代大鼠腰椎间盘细胞后, 用含 10 ng/ml IL-1 β 的 1% 胎牛血清(FBS)培养基和被转染椎间盘细胞共培养, 分别在 4、8、16、32 h 检测其对 Fas 受体(Fas)表达的影响。利用 Fas-siRNA 和阴性对照 siRNA 分别对原代大鼠椎间盘细胞进行转染 48 h 后, 实验分组和处理: 共分 5 组, N、N-20 ng、N-IL 为阴性对照 siRNA 转染细胞, Si-20 ng、Si-IL 为 Fas-siRNA2 转染的细胞。N 为对照组, 只加 1% FBS 培养基; N-20 ng 和 Si-20 ng 在 1% FBS 培养基培养 8 h 后, 更换为含 20 ng/ml Fas 配体(FasL)的 1% FBS 培养基; N-IL 和 Si-IL: 与 10 ng/ml IL-1 β 在 1% FBS 培养基中培养 8 h 后, 更换为含 20 ng/ml FasL 的 1% FBS 培养基; 以上各组加入 20 ng/ml FasL 后均继续培养 24 h, 观察细胞的凋亡情况, Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测各组细胞凋亡率, RT-PCR、Western blot 分别检测 Fas mRNA 和蛋白表达水平。结果 ① 与 10 ng/ml IL-1 β 共培养的阴性对照 siRNA 转染细胞的 Fas mRNA 在 4 h 时开始升高, 但 32 h 时才出现统计学差异; 而蛋白检测各时间点均未出现表达差异。② 经 IL-1 β 预处理的 Si-IL、N-IL 细胞组较相应的未经 IL-1 β 预处理的 Si-20 ng、N-20 ng 细胞组, 细胞凋亡率均升高; Fas-siRNA 转染的 Si-IL 细胞组较阴性 siRNA 转染的 N-IL 细胞组的细胞凋亡率明显下降。③ 细胞凋亡率与 Fas 的表达具有相关性。结论 siRNA 可降低大鼠椎间盘细胞对 IL-1 β 预刺激导致的凋亡敏感性, 但其确切机制尚需进一步研究。

关键词 椎间盘细胞; 凋亡; siRNA; IL-1 β ; RNA 干扰

中图分类号 R 318.04

2018-08-31 接收

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(编号: 2011HW102)

作者单位: 山东省淄博市中心医院脊柱外科, 淄博 255036

作者简介: 韩敦富, 男, 副主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: handunfu@126.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0064-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.013

炎症因子特别是 IL-1 β 在椎间盘退变过程中发挥了很大的促进作用, 涉及到诸多方面^[1-2]。最近的研究^[3]表明, IL-1 β 不仅能够导致营养缺乏状态下椎间盘细胞的凋亡, 而且还可以大大提高椎间盘细胞对 Fas Ligand 介导的凋亡敏感性^[4]。Cui et al^[4]研究同时还发现, IL-1 β 可以上调死亡受体 Fas mRNA 的表达。然而, 关于 IL-1 β 预刺激增强了椎间盘细胞对 Fas L 的凋亡敏感性的原因却未作深究。

该研究力图利用 RNAi 的方法对这一原因进行探讨并检验能否利用这一技术降低椎间盘细胞对炎症因子刺激而导致的凋亡敏感性, 并对其机制作初步探讨。为保持与 Cui et al^[4]实验结果的一致性, 本部分实验仍然采用了 SD 大鼠椎间盘内层纤维环+髓核交界区细胞。

1 材料与方法

1.1 实验动物 3 月龄 SD 大鼠, 雌雄不限(中山大学动物实验中心提供)。

1.2 主要试剂及仪器 DMEM-F12 培养基(美国 Gibco 公司); 特优级胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 重组大鼠 Fas Ligand(美国 R&D Systems 公司); Fas-siRNA(广州市锐博生物科技有限公司); RT-PCR 试剂盒(PrimeScriptTM RT-PCR Kit, 日本 TaKaRa 公司); PCR 引物(上海生工生物工程公司); β -actin 单克隆抗体、Fas 单克隆抗体(anti-Rat)、蛋白 Marker(美国 Newmarker 公司); 碘化丙

levels in the transfection group. MTT assay and flow cytometry were respectively used to evaluate the proliferation and apoptosis of SW480 colon cancer cells after transfection for 24 hours. **Results** The relative expression of Omentin-1 mRNA and the OD value in the transfection group were decreased and the apoptotic rate was significantly higher than that of the other three groups($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the relative expression of Omentin-1, the OD value and apoptosis rate in negative group and MAX group were not significantly difference($P > 0.05$). **Conclusion** Omentin-1 gene silencing inhibits proliferation and promotes the apoptosis of human SW480 colon cancer cells.

Key words colon cancer; Omentin-1; RNA interference

啶、Annexin V-FITC (奥地利 Bender MedSystems 公司); 流式细胞仪 (EpicsALtra, 美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 SD 大鼠椎间盘细胞分离和培养 按 Cui et al^[4] 培养方法, 10% 水合氯醛麻醉 SD 大鼠, 取 L3-L6 椎间盘, 显微镜下分离取出内层纤维环 + 髓核交界区组织, PBS 缓冲液冲洗、切碎、转移、胰蛋白酶消化、过滤、离心, 最后以 1×10^6 /ml 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 鉴定结果见图 1。

1.4 细胞准备和 siRNA 转染

1.4.1 Fas-siRNA 序列 采用已被验证能有效沉默 Fas mRNA 的序列: ACCAAAUGCAAGAAACAAA dTdT (正义链) dTdT UGGUUUACGUUCUUGUUU (反义链)^[5]。

1.4.2 转染细胞 转染前 1 d 将铺满培养瓶 80% ~ 90% 原代 SD 大鼠椎间盘细胞进行传代, 以 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ /孔的密度接种于 6 孔板中。采用 Lipofectamine 2000 + Opti MEM I 脂质体转染法转染。采用阴性对照 siRNA, 转染后 48 h 培养基更换培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.5 实验分组及细胞处理

1.5.1 IL-1 β (10 ng/ml) 在不同时间点对阴性 siRNA 转染的大鼠椎间盘细胞 Fas 表达的影响 转染后 48 h 的椎间盘细胞, 共设 5 组均更换为 1% FBS 培养基, 加 10 ng/ml IL-1 β 分别培养 0、4、8、16、32 h, RT-PCR 检测 Fas mRNA 表达, Western blot 检测 Fas 蛋白表达水平。

1.5.2 IL-1 β 刺激后的椎间盘细胞与 FasL 共培养后 Fas 表达及凋亡情况观察 转染后 48 h 的椎间盘细胞分为 5 组: N: 作为对照组, 阴性对照 siRNA

转染细胞不加 FasL 培养在 1% FBS 培养基中 (在 8 h 后重新更换 1% FBS 培养基); N-20 ng: 阴性对照 siRNA 转染细胞加 1% FBS 培养基中培养 8 h 后, 重新更换 1% FBS 培养基, 加入终浓度为 20 ng/ml FasL; N-IL: 阴性对照 siRNA 转染细胞与 10 ng/ml IL-1 β 预培养 8 h 后 (1% FBS 培养基), 重新更换 1% FBS 培养基, 加入终浓度为 20 ng/ml FasL; Si-20 ng: Fas-siRNA 转染细胞加 1% FBS 培养基中培养 8 h 后, 重新更换 1% FBS 培养基, 加入终浓度为 20 ng/ml FasL; Si-IL: Fas-siRNA 转染细胞与 10 ng/ml IL-1 β 预培养 8 h 后 (1% FBS 培养基), 重新更换 1% FBS 培养基, 加入终浓度为 20 ng/ml FasL; 加入终浓度为 20 ng/ml FasL 后再共培养 24 h。即 siRNA 转染后 80 h 后, 细胞进行 Annexin V-FITC/碘化丙啶双染或提取总 RNA 和总蛋白, 分别检测以下指标。同时采用 Hoechst 33258 染色评估细胞凋亡情况, 以相互验证细胞凋亡评测情况。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 RT-PCR 检测 Fas 的 mRNA 表达水平 TRIzol 法提取总 RNA, 两步法 RT-PCR 进行扩增, 收集 PCR 产物用于琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统进行拍照, 图像分析软件进行光密度扫描分析。Fas 上、下游引物为 5'-GCATCTTTGAGGGTTTGA-3', 5'-CATTTGGTGTGCTGGTTC-3'; 退火温度 50 °C, 产物长度 409 bp。

1.6.2 Western blot 检测 Fas 的蛋白表达水平 于各时间点用 RIPA 裂解液分别提取总蛋白备用; 制备凝胶、上样、电泳、转膜; 免疫杂交: 转膜后 PVDF 膜孵育 Fas 一抗 4 °C 过夜 (稀释度均为 1:1 000); 1 × PBST 洗涤, 室温孵育 β -actin 二抗 (抗稀释度

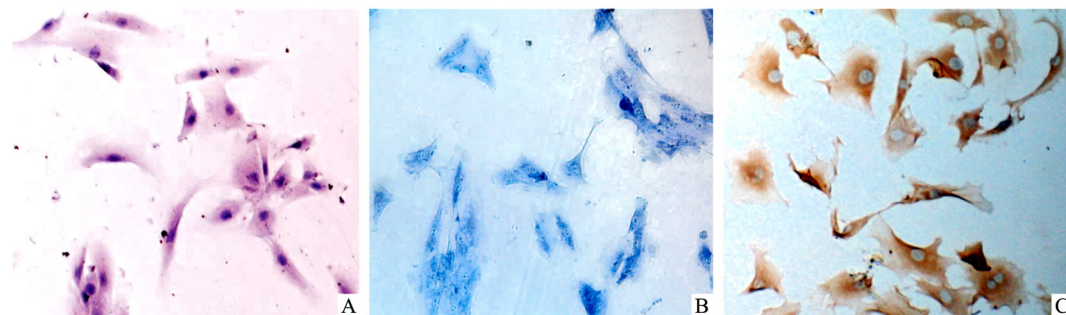


图 1 原代内层纤维环 + 纤维环与髓核交界区细胞鉴定 $\times 100$

A: HE 染色显示细胞呈多角形或短梭形, 核为圆形或椭圆形, 位于胞质中央, 呈蓝紫色; B: 甲苯胺兰染色显示基质蓝染, 核仁亦呈蓝色着色; C: II 型胶原免疫细胞化学染色显示细胞质染成棕黄色, 细胞核基本不着色

1 : 1 000) 1 h; 曝光显影、照像留底; 图像分析系统计算条带的灰度 × 面积值。各组 Fas 条带值同相应的 β -actin 条带值的比值表示目的蛋白的表达水平。

1.6.3 流式细胞仪测定细胞凋亡率 用 Annexin V-FITC/碘化丙啶双染,流式细胞仪分析凋亡率。胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,离心收集全部细胞,每管加入膜联蛋白结合缓冲液 195 μ l 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后,再加入 10 μ l 碘化丙啶,混匀,避光、室温反应 5 min,EpicsALtra 流式细胞仪分析得到细胞凋亡率。

1.7 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-1 β (10 ng/ml) 在不同时间点对阴性对照 siRNA 转染的大鼠椎间盘细胞 Fas 表达的影响

RT-PCR 结果显示,10 ng/ml 的 IL-1 β 和阴性对照 siRNA 转染的大鼠椎间盘细胞共培养,在 4 h 开始 Fas mRNA 就有所上调,但仅 32 h 时和对照相比有统计学差异(图 2)。Western blot 法检测 Fas 蛋白表达水平无明显差异,可见 10 ng/ml 的 IL-1 β 对阴性对照 siRNA 转染的大鼠椎间盘细胞 Fas 蛋白表达影响作用不明显。

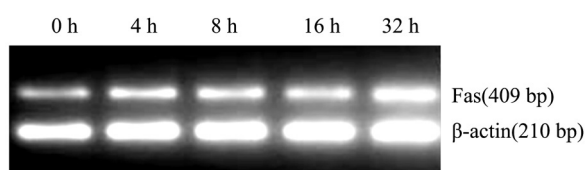


图 2 RT-PCR 法检测 IL-1 β (10ng/ml) 在不同时间点对阴性对照 siRNA 转染的大鼠椎间盘细胞 Fas mRNA 表达的影响

2.2 IL-1 β 刺激后的椎间盘细胞与 FasL 共培养后 Fas 表达及凋亡情况

2.2.1 RT-PCR 检测 Fas 的 mRNA 表达水平 10 ng/ml IL-1 β 刺激 8 h 后,和 20 ng/ml FasL 共培养 24 h,RT-PCR 检测结果显示,si-20 ng、si-IL 组较对照组 Fas mRNA 的表达分别降低了 70%、40.6%;而 N-20 ng、N-IL 组较对照组 Fas mRNA 的表达均升高,分别是对照组的 1.53 倍、1.99 倍。各组之间比较差异均有统计学意义(图 3) ($P < 0.05$)。

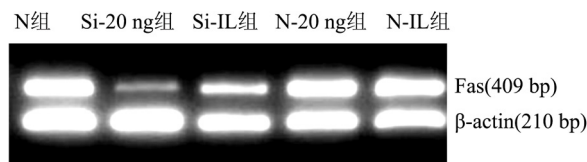


图 3 RT-PCR 检测 FasL 对转染细胞 Fas mRNA 的表达影响

2.2.2 Western blot 检测 Fas 的蛋白表达水平 10 ng/ml IL-1 β 刺激 8 h 后,和 20 ng/ml FasL 共培养 24 h,Western blot 检测结果显示,si-20 ng、si-IL 组较对照组 Fas 蛋白的表达分别降低了 37.8%、25.8%;而 N-20 ng、N-IL 组较对照组 Fas 蛋白的表达均升高,分别是 27.9%、37.2%。si-20 ng、si-IL、N-20 ng、N-IL 组与对照组之间比较差异均有统计学意义(图 4、表 1) 结果与 RT-PCR 结果相一致。

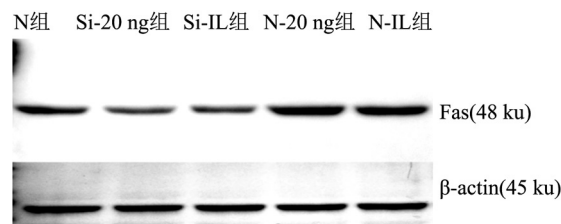


图 4 Western blot 法检测 FasL 对转染细胞 Fas 蛋白表达变化的影响

表 1 Western blot 检测 Fas 的蛋白表达水平的组间比较统计分析结果($\bar{x} \pm s$)

组别	蛋白表达水平	各组与 N 组比较 F 值
N	0.90 ± 0.05	—
Si-20 ng	$0.57 \pm 0.03^*$	-0.33
Si-IL	$0.67 \pm 0.04^*$	-0.23
N-20 ng	$1.14 \pm 0.10^{* \#}$	0.24
N-IL	$1.23 \pm 0.12^{* \#}$	0.33

与 N 组比较: * $P < 0.05$; 与 Si-IL 组比较: # $P < 0.05$

2.2.3 流式细胞仪测定细胞凋亡率 Fas-siRNA 转染后的细胞 si-20 ng、si-IL 组较相同 FasL 浓度共培养的 N-20 ng、N-IL 组凋亡率明显降低(图 5);但 Fas-siRNA 转染后的细胞 si-20 ng 组与 si-IL 组之间、si-20 ng 组与对照组之间细胞凋亡率统计分析仍然存在差异(表 2)。

3 讨论

既往研究^[5-9]表明,Fas/FasL 凋亡系统是椎间盘细胞的主要凋亡途径,并且该凋亡途径的启动是

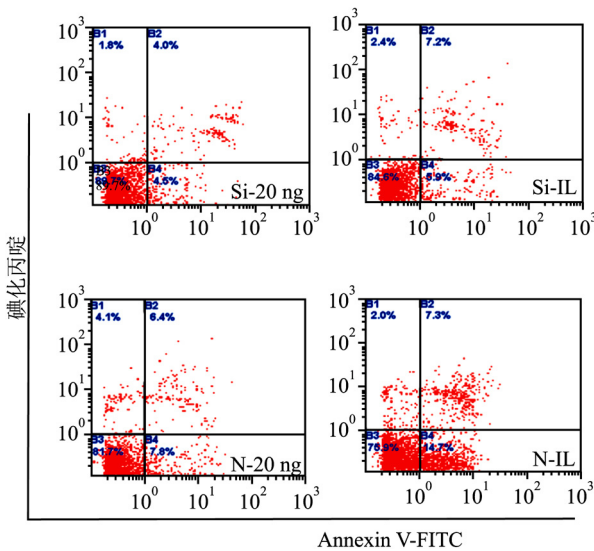


图5 流式细胞仪检测 FasL 对转染细胞凋亡率的影响

表2 流式细胞仪测定细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率	各组与 N 组比较 <i>F</i> 值
N	3.70 \pm 0.49	
Si-20 ng	4.75 \pm 0.60	1.05
Si-IL	5.93 \pm 0.17*	2.23
N-20 ng	8.22 \pm 0.95* #	4.52
N-IL	13.68 \pm 1.50* #	9.98

与 N 组比较: * $P < 0.05$; 与 Si-IL 组比较: # $P < 0.05$

受多种因素影响的。Fas、FasL 的表达部位(正常/非正常)、表达形态(膜态还是可溶性态)、表达水平、二者的多态性、细胞所处的微环境状态、是否有外源因子的存在等等都有可能启动结果的不同。本实验结果也支持这一观点。实验显示,在两组沉默 Fas 基因的椎间盘细胞中,经 IL-1 β 预处理的细胞较未经 IL-1 β 预处理的细胞凋亡率明显增高,差异有统计学意义;而在两组沉默 Fas 基因的椎间盘细胞中,经 IL-1 β 预处理的细胞较未经 IL-1 β 预处理的细胞凋亡率增高幅度明显减小,两组的细胞凋亡率差异无统计学意义。同时,作者还发现椎间盘细胞与 FasL 共培养,无论是否沉默 Fas 基因,其细胞凋亡率和对照组比较均有升高,而未沉默 Fas 基因的椎间盘细胞凋亡率升高更明显;使用 RT-PCR 和 Western blot 分别在 mRNA 和蛋白两个水平检测到 Fas 的表达变化与椎间盘细胞的这种凋亡率具有明显相关性。但是,本研究显示,用 10 ng/ml IL-1 β 和阴性对照 siRNA 转染的大鼠椎间盘细胞进行共培养,在 8 h 时 Fas mRNA 和蛋白检测却都没有

发现明显上调;而与 FasL 共培养后,椎间盘细胞的 Fas 表达反而升高。这一现象表明椎间盘细胞在经 IL-1 β 预处理后确实增加了对 FasL 应答的敏感性,但导致这种凋亡敏感性增加的确切机制尚不明确。该结果同时也再次验证了 FasL 具有上调椎间盘细胞凋亡受体 Fas 表达的作用^[5]。

实验中通过对 Fas mRNA 和蛋白表达结果检测虽未能完全明确经 IL-1 β 预处理后增加了对 FasL 应答敏感性的确切机制。但这一结果提示了 IL-1 β 可能是通过改变 Fas 受体的应答状态而不是上调 Fas 受体的表达而增加椎间盘细胞对 FasL 凋亡应答敏感性的,正是这种 Fas 受体应答状态的变化导致了椎间盘细胞在低水平的 FasL 作用下就会产生高水平的凋亡。而后期细胞凋亡的增加则是凋亡受体 Fas 表达增加的原因,因为 FasL 本身就具有上调 Fas 表达的作用。但这种凋亡敏感性可被 Fas-siRNA 所抑制。这就为利用 RNA 干扰的方法抑制椎间盘退变性疾病提供了可能。

Fas 的表达易受各种因素影响,异常机械应力、过度负荷、创伤等均可上调 Fas 的表达水平从而增加了椎间盘细胞的过度凋亡^[10-12]。综合以前研究结果显示,IL-1 β 不仅能够上调 Fas 的表达水平,而且可以改变 Fas 受体应答状态,从而产生超常的凋亡作用,导致椎间盘组织中细胞数量的减少。本实验从另一个侧面说明了炎症环境对椎间盘细胞超常凋亡的加速作用^[8]。减轻或者抑制椎间盘部位的炎症反应对延缓椎间盘退变可能有着重要作用。

参考文献

- [1] Hoyland J A, Le Maitre C, Freemont A J. Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(6): 809-14.
- [2] Goupille P, Mulleman D, Chevalier X. Is interleukin-1 a good target for therapeutic intervention in intervertebral disc degeneration: lessons from the osteoarthritic experience [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(6): 110.
- [3] Zhao C Q, Liu D, Li H, et al. Interleukin-1 β enhances the effect of serum deprivation on rat annular cell apoptosis [J]. *Apoptosis* 2007, 12(12): 2155-61.
- [4] Cui L Y, Liu S L, Ding Y, et al. IL-1 β sensitizes rat intervertebral disc cells to Fas Ligand mediated apoptosis *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*. 2007, 28(10): 1671-6.
- [5] Han D, Ding Y, Liu S, et al. Double role of Fas ligand in the apoptosis of intervertebral disc cells *in vitro* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, 11: 938-47.

- [6] 韩敦富,解立俊,吴海燕,等. Fas Ligand 对椎间盘细胞经典凋亡通路中关键因子的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 24(12): 1718–20.
- [7] 李小川,李雷,王欢,等. Fas/FasL 基因在退变腰椎间盘组织中的表达及诱导凋亡作用[J]. 中华医学杂志, 2005, 24(12): 1718–20.
- [8] Park J B, Chang H, Kim K W. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue[J]. Spine, 2001, 26(6): 618–21.
- [9] Park J B, Kim K W, Han C W, et al. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue[J]. Spine, 2001, 26(2): 142–6.
- [10] Chen S Q, Lin J P, Zheng Q K, et al. Protective effects of paeoniflorin against FasL-induced apoptosis of intervertebral disc annulus fibrosus cells via Fas-FasL signalling pathway[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(6): 2351–5.
- [11] Adams M A, Roughley P J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? [J]. Spine, 2006, 31: 2151–61.
- [12] Park J B, Park C. Small interfering RNA-mediated suppression of Fas modulate apoptosis and proliferation in rat intervertebral disc cells[J]. Asian Spine J, 2017, 11(5): 686–93.

siRNA can reduce the apoptotic sensitivity of the rat intervertebral disc cells stimulated by IL-1 β

Han Dunfu, Yin Heshan, Wang Yan, et al

(Dept of Spine Surgery, The Central Hospital of Zibo, Zibo 255036)

Abstract Objective To identify whether siRNA can reduce the apoptotic sensitivity of the rat intervertebral disc (IVD) cells stimulated by IL-1 β *in vitro*, and its potential mechanism. **Methods** The cells transfected with negative control siRNA cocultured with 10 ng/ml IL-1 β in 1% fetal bovine serum (FBS) medium for 4 h, 8 h, 16 h, 32 h respectively. Then the expression of Fas was evaluated by RT-PCR. Forty-eight hours after rat IVD cells transfected with negative control siRNA or Fas-siRNA, the cells were divided into 5 group: N, N-20 ng and N-IL were transfected with negative control siRNA; Si-20 ng and Si-IL were transfected with Fas-siRNA. N set as control, cultured in 1% FBS medium without IL-1 β ; N-20 ng and Si-20 ng, cocultured in 1% FBS medium for 8 h, then replaced the medium with 1% FBS medium containing 20 ng/ml recombinant rat Fas ligand (FasL); N-IL and Si-IL, cocultured in 1% FBS medium containing 10 ng/ml IL-1 β for 8 h, then the medium was replaced with 1% FBS medium containing 20 ng/ml recombinant rat FasL; all the cells were cultured for 24 hours in the condition of 37 °C, 5% CO₂. Apoptosis morphous of the cells was observed by microscope with Hoechst33258 dyeing, apoptosis incidence was evaluated by flow cytometry with double stained with annexin V-FITC and propidium iodide, gene or protein expression levels of Fas was analyzed by RT-PCR or Western blot respectively. **Results** ① The Fas mRNA expression of negative control siRNA transfected rat IVD cells began to increase cocultured with 10 ng/ml IL-1 β in 1% FBS medium for 4 h, but there was no statistical difference in the increased expression of Fas protein among the 3 time point (4 h, 8 h, 16 h). It was until 32 h cocultured with 10 ng/ml IL-1 β that appeared the statistical difference. ② The cell apoptosis incidence of N-IL and Si-IL increased, compared with N-20 ng and Si-20 ng respectively. The cell apoptosis incidence of Si-IL decreased significantly compared with that of N-IL. ③ The cell apoptosis incidence was correlated with the Fas expression. **Conclusion** siRNA can reduce the apoptotic sensitivity of the rat intervertebral disc cells stimulated by IL-1 β , but its exact mechanism still needs further study.

Key words intervertebral disc cell; apoptosis; small interference RNA; interleukin-1 beta; RNA interference