

· 基础研究 ·

白质星形胶质细胞内 S100A4 蛋白对小鼠背根神经节细胞突起生长的影响

方征宇 熊亮 黄晓琳 Kozlova-Aldskogius Elena 王建枝

【摘要】目的 研究离体条件下白质星形胶质细胞及其表达的 S100A4 蛋白对小鼠背根神经节 (DRG) 细胞突起生长的影响。**方法** 用对照 siRNA 或 S100A4 siRNA 转染纯的白质星形胶质细胞, 3 d 后与成年小鼠 DRG 细胞共同培养 6, 12, 18, 24 h, 采用免疫荧光化学方法观察 DRG 细胞突起的生长情况。**结果** 在多聚-L-赖氨酸包被的盖玻片上, 成熟的 DRG 细胞能较好地存活, 但在培养 24 h 内未见有突起长出。与白质星形胶质细胞共培养 6 h, 各组 DGR 细胞均未长出突起; 共同培养 12, 18, 24 h, 各组 DGR 细胞长出突起, 且突起长度随共同培养时间的延长而增加; S100A4 siRNA 转染组 DRG 细胞突起明显长于培养相同时间的对照 siRNA 转染组。**结论** 白质星形胶质细胞促进小鼠 DRG 细胞突起生长, 而星形胶质细胞内的 S100A4 蛋白抑制该作用。

【关键词】 神经再生; 背根神经节; 钙结合蛋白; siRNA; 细胞培养

Effects of S100A4 expressed in white matter astrocytes on sensory neurite outgrowth in vitro FANG Zheng-yu, XIONG Liang, HUANG Xiao-lin, Elena KOZLOVA, WANG Jian-zhi. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】Objective To investigate the role of white matter astrocytes and their specific protein S100A4 in sensory neurite outgrowth in vitro. **Methods** White matter astrocyte cultures expressing S100A4 were prepared. Dissociated adult dorsal root ganglion (DRG) cells were placed on the top of the astrocytes and co-cultured for 6, 12, 18, 24 hours. Small interfering S100A4 RNA was used to eliminate S100A4 expression. The growth of DRG cell neurites on S100A4-silenced and S100A4-expressing astrocytes was compared. **Results** 12, 18 and 24 hours after the co-culture with S100A4-expressing or S100A4-silenced astrocytes, neurite growth from the DRG cells was observed. Neurite outgrowth was significantly greater in S100A4 siRNA treated cultures compared to control siRNA treated white matter astrocyte cultures. **Conclusion** These findings suggest that white matter astrocytes are able to support axonal regeneration and, furthermore, that administration of small interfering S100A4 RNA provides strong additional support for axon regeneration.

【Key words】 Nerve regeneration; Dorsal root ganglion; Calcium-binding protein; siRNA; Cell culture

在成年哺乳动物中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 内, 损伤的轴突难以再生的主要原因之一是它们所处的环境抑制其生长, 而这种环境很大程度由白质内的少突胶质细胞和髓磷脂蛋白分子构成。除此之外, 白质内还有大量的星形胶质细胞 (astrocyte, Ast)。Kozlova 等^[1,2] 研究发现, 白质 Ast 特异性地表达 S100A4 蛋白, 一种酸性可溶性钙结合蛋白; 背根神经损伤导致白质退行性变时, 该蛋白表达明显升高。这一结果提示, 在退行性变的白质内, 表达增加的 S100A4 蛋白可能对 Ast 的功能以及受损轴突在 CNS 内的再生产生影响。本研究采用星形胶质细胞-神经

元共培养技术和 siRNA 技术, 观察白质 Ast 及其表达的 S100A4 蛋白对小鼠背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 细胞突起生长的影响, 为临床上神经再生修复提供新的思路和实验依据。现将结果报道如下。

材料与方法

一、细胞培养

(一) 白质 Ast 的制备与培养

出生后 4 d 的新生 Wistar 大鼠由 Uppsala University 实验动物中心提供。按照 Kozlova 等^[3] 建立的方法制备白质 Ast, 简述如下。

乙醚麻醉后, 用 70% 的乙醇消毒, 取脑, 沿冠状面在海马水平取 4 mm 厚的脑片, 置于含 10% 小牛血清的 Dulbecco's MEM 培养基内。

解剖显微镜下分离出胼胝体, 用含 0.2% 葡萄糖的 PBS 清洗后, 置于磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科 (方征宇、黄晓琳); 华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸内科 (熊亮); Uppsala University, Department of Neuroscience (Kozlova-Aldskogius Elena); 华中科技大学同济医学院病理生理学系 (王建枝)

通讯作者: 黄晓琳

saline, PBS)内(含 10 mg/ml 胰蛋白酶, 1 mg/ml 脱氧核糖核酸酶和 5 mg/ml MgSO_4), 37℃ 孵育 3 min。

再次用 PBS 清洗, 用注射器机械分离组织, 然后 1 200 × g 离心 1 min, 收集细胞。

使细胞悬浮于含 0.2% 葡萄糖的 PBS 内, 然后将细胞悬液加入非连续梯度 Percoll 内(2.5 ml 30% 的 Percoll 加 2.5 ml 60% 的 Percoll)。Percoll 是一种包有乙烯吡咯烷酮的硅胶颗粒, 不穿透生物膜, 对细胞无毒性, 因此广泛用于分离细胞、亚细胞成分、细菌及病毒。4℃ 条件下, 1 200 × g 离心 10 min 后, Ast 富集于培养基和 30% Percoll 的界面。

吸出 Ast, 使之悬浮于含 0.2% 葡萄糖的 PBS 内, 4℃ 条件下, 1 200 × g 离心 10 min, 再将细胞团悬于 DMEM 培养基内(含 10% 小牛血清, 3% 葡萄糖), 细胞密度调至 1×10^5 个/ml 后接种于培养瓶内。用免疫组织化学方法鉴定培养的细胞, 胶质纤维酸性蛋白(gial fibrillary acidic protein, GFAP)和 S100A4 均呈阳性的细胞为白质 Ast。本法培养的细胞中 GFAP 和 S100A4 均呈阳性的细胞占 98%。培养 10 d 后细胞可用于实验。

(二) DRG 细胞的制备与培养

GFP-tau 转基因小鼠由 John Mason 博士(University of Edinburgh)馈赠。用水合氯醛麻醉后, 迅速取出 DRG, 放入 200 μl 0.125% 胶原酶内(胶原酶用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基稀释), 置于 37℃、5% CO_2 的培养箱内消化 1 h 又 20 min。用 DMEM 清洗后, 轻柔地捣碎组织, 将分散的 DRG 细胞加入培养有白质 Ast 的培养板内, 每孔加 3×10^3 个 DRG 细胞。

二、基因沉默

根据 Kozlova 等^[2]的方法使 Ast 内的 S100A4 基因表达沉默。S100A4 siRNA 正义链、反义链的序列分别为 5'-GGGUGACAAGUUCAGCUGtt-3' 和 5'-CAGCUUGAACUUGUCACCCtc-3'。S100A4 siRNA 和阴性对照 siRNA (Silencer Negative Control #1 siRNA) 购自 Ambion 公司 (Austin, TX)。根据说明书, 用 Lipofectamine 2000 转染 siRNA, 37℃ 转染 5 h 后更换新鲜培养液, 3 d 后, S100A4 siRNA 转染组和阴性对照 siRNA 转染组的 Ast 与 DRG 细胞共培养。S100A4 siRNA 处理的 Ast 不表达 S100A4 蛋白, 阴性对照 siRNA 处理的 Ast 仍表达 S100A4 蛋白。

三、免疫荧光染色

DRG 细胞与白质 Ast 共同培养 6, 12, 18, 24 h, 固定 20 min(固定液成分为 4% 多聚甲醛加 14% 饱和苦味酸), 然后用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。免疫荧光染色步骤如下: (1) 滴加健康山羊血清封闭液, 室温下封闭 1 h, 甩去多余液体; (2) 滴加一抗 4℃ 过夜, 一抗为

小鼠抗 GFAP 单克隆抗体(1:500), 兔抗 S100A4 多克隆抗体(1:700); (3) PBS 洗 3 次, 每次 10 min; (4) 室温下二抗孵育 4 h, 二抗为德克萨斯红标记的驴抗小鼠 IgG(1:80), Cy3 标记的驴抗兔 IgG(1:500); (5) PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 封片。在 Nikon Eclipse E800 显微镜(日本, Nikon 公司)下观察, 用 Nikon DXM1200F 数码相机(日本, Nikon 公司)拍照。所用抗体均购自 Jackson ImmunoResearch 公司。

四、DRG 细胞突起长度的测量

DRG 细胞与 Ast 共同培养 6, 12, 18, 24 h 后, 固定, PBS 清洗, 封片, 在 Zeiss Axiovert S100 倒置荧光显微镜下观察。按照 Rönn 等^[4]的方法, 使用 Process Length 系统(Protein Laboratory)测量 DRG 细胞再生突起的长度。

五、免疫印迹

白质 Ast(3×10^5 个)种于直径 60 mm 的培养皿内。16 h 后, 移去培养基, 加入 2.5 ml 新鲜无血清 DMEM 培养基, 培养 24 h, 收集条件培养基, 用 Centrifon YM-3(Amicon)浓缩 30 倍。取 300 μl 浓缩的条件培养基, 加入十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)凝胶加样缓冲液(100 mmol/L 的 Tris · HCl、200 mmol/L 的二硫苏糖醇、4% SDS、0.2% 溴酚蓝和 20% 甘油, pH = 6.8), 煮沸 10 min, 经 14% 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 室温下封闭 1 h, 然后用兔抗 S100A4 多克隆抗体 4℃ 孵育过夜, 洗膜后与辣根过氧化物酶标记的 IgG 室温孵育 4 h。洗膜后加入 ECL 增强化学发光试剂反应 1 min, 立即用 Kodak 底片曝光。封闭液、辣根过氧化物酶标记的 IgG 和增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂均购自 KPL 公司。用 25 ng 重组 S100A4 蛋白作为阳性对照。

六、统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件对实验数据进行分析, 所有数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 2 组间比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

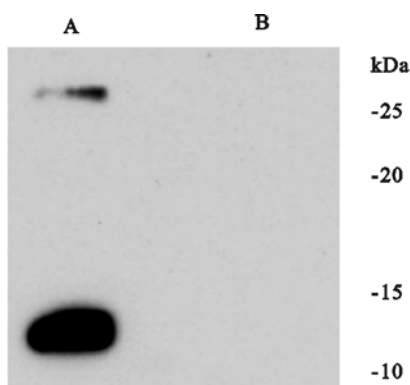
一、多聚-L-赖氨酸对 DRG 细胞突起生长的影响

首先, 将成熟的 DRG 细胞种在多聚-L-赖氨酸包被的盖玻片上。成熟的 DRG 细胞能在该条件下较好地存活, 但是在培养 24 h 内观察不到有神经突起长出。

二、阴性对照 siRNA 处理的白质星形胶质细胞对 DRG 细胞突起生长的影响

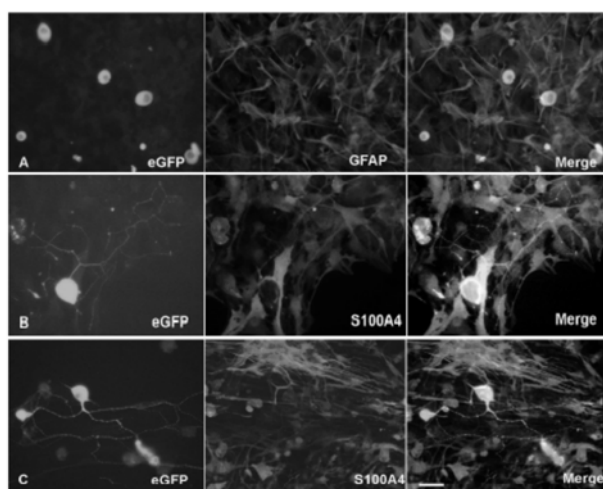
用阴性对照 siRNA 转染后, 白质 Ast 仍表达 S100A4 蛋白。培养白质 Ast 24 h 的条件培养基经浓

缩后,做免疫印迹检测,未见 S100A4 阳性条带。提示白质 Ast 仅在胞内表达 S100A4 蛋白,而不向胞外分泌(图 1)。与表达 S100A4 蛋白的 Ast 共培养 6 h, DRG 细胞没有长出突起(图 2A);共培养 12 h, DRG 细胞长出细短的突起(图 2B);共培养 18 h, DRG 细胞的突起继续增长;共培养 24 h, 可以观察到许多细长的突起(图 2C, 3A)。提示培养的白质 Ast 可以促进成熟的 DRG 细胞突起生长。



A. 为重组 S100A4 蛋白, 上样量为 25 ng
B. 为浓缩的白质星形胶质细胞条件培养基

图 1 白质星形胶质细胞条件培养基内 S100A4 蛋白的免疫印迹检测



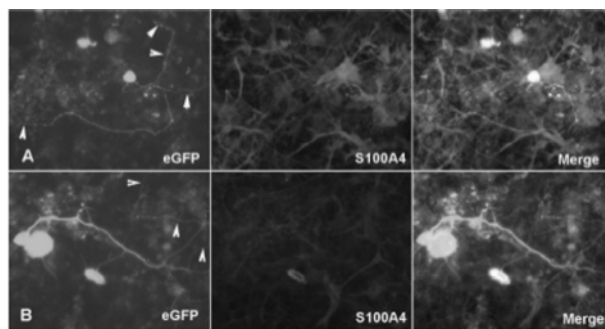
A. 为阴性对照 siRNA 处理的白质星形胶质细胞与 DRG 细胞共同培养 6 h
B. 为共培养 12 h
C. 为共培养 24 h

绿色荧光为 eGFP, 红色荧光为 GFAP 或 S100A4, 黄色为叠加后的图像
图 2 阴性对照 siRNA 处理的白质星形胶质细胞对 DRG 细胞突起生长的影响($\times 200$)

三、S100A4 siRNA 处理的白质星形胶质细胞对 DRG 细胞突起生长的影响

用 S100A4 siRNA 转染白质 Ast 3 d 后, 该细胞不表达 S100A4 蛋白(图 3B)。此时, 将成熟 DRG 细胞与该 Ast 共同培养。共同培养 6 h, DRG 神经元没有长出可见的突起。共同培养 12 h, DRG 神经元长出可

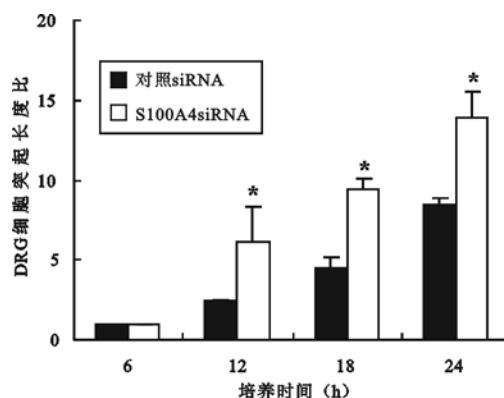
见突起。共同培养 24 h, 可以看到 DRG 细胞长出许多粗而且长的神经突起(图 3B)。根据 Rönn 等^[3]建立的方法, 使用 Process Length 系统(Protein Laboratory)测量各实验组、各时间点 DRG 细胞突起长度, 经比较发现, S100A4 siRNA 处理组的神经突起长度要明显长于相应时间点阴性对照 siRNA 处理组($P < 0.05$), 详见图 4。这提示, 细胞内 S100A4 基因表达沉默后, 白质 Ast 能更好地促进 DRG 细胞突起生长。



A. 为阴性对照 siRNA 处理组
B. 为 S100A4 siRNA 处理组

绿色荧光为 eGFP, 红色荧光为 S100A4, 黄色为叠加后的图像

图 3 与阴性对照 siRNA, S100A4 siRNA 处理的白质星形胶质细胞共同培养 24 h, DRG 细胞突起生长情况($\times 200$)



注: 同一时间 2 组比较, * $P < 0.05$

DRG 细胞突起长度比 = $\frac{\text{各组、各时间点 DRG 细胞突起长度}}{\text{对照 siRNA 处理组培养 6 h DRG 细胞突起长度}}$

图 4 对照 siRNA, S100A4 siRNA 处理的白质星形胶质细胞对 DRG 细胞突起生长影响的比较

讨 论

本研究结果表明, 白质 Ast 能促进成熟小鼠 DRG 细胞突起生长; 用 siRNA 技术沉默白质 Ast 内 S100A4 基因表达后, 这种促进作用更加明显。一般认为 CNS 白质不利于轴突再生。支持这种观点的主要依据有: 离体条件下髓鞘相关分子可导致生长锥崩解; 在体条件下髓鞘相关分子抑制轴突生长^[5]。然而, Davies 等^[6,7]研究发现, 将 DRG 细胞移植于正常或退行性变的 CNS 胼胝体(主要由白质组成)内, DRG 细胞能再

生出较长的突起。这提示白质可以起到一定的促进轴突再生的作用,但详细的机制尚不清楚。由于已知少突胶质细胞抑制神经突起生长,这就间接提示:CNS 白质中另一类重要的细胞——Ast 有可能为轴突的生长提供支持。Kozlova 等^[3]将神经元与取自脑胼胝体区的白质 Ast 共同培养,以此来模拟 CNS 白质微环境,研究白质 Ast 对神经再生的影响。使用该模型,本研究发现白质 Ast 能促进成熟的 DRG 细胞再生。Tom 等^[8]取出生后 35 d 大鼠大脑制成脑片,然后将成熟的 DRG 细胞与脑片胼胝体结构共同培养,也得出相似的结论。

那么,白质 Ast 通过哪些物质影响神经突起生长呢?我们推测 S100A4 蛋白可能起一定作用。S100A4 蛋白是一种具有 EF 双螺旋结构的酸性可溶性钙结合蛋白。它参与细胞内外的信号传导、细胞间的黏附以及细胞自身的运动等多个生理过程。生理条件下,成年哺乳动物 CNS 内只有白质 Ast 表达 S100A4 蛋白^[2]。目前还不清楚该蛋白在 CNS 内的作用。近期有资料报道机械损伤导致白质退行性变时,Ast 内 S100A4 蛋白表达明显上升^[1],而表达增加的 S100A4 蛋白有可能通过改变 Ast 的功能特征,影响受损的轴突在 CNS 内的再生。离体实验发现,细胞外的 S100A4 蛋白能促进胎鼠海马神经元^[9]和新生鼠脑皮质神经元^[10]轴突生长,提示白质 Ast 有可能通过分泌 S100A4 蛋白来影响成熟小鼠 DRG 细胞突起生长。然而,通过免疫印迹方法,我们没有发现培养过白质 Ast 的培养基内有 S100A4 蛋白,提示在本实验条件下 Ast 并不向培养基分泌该物质。

本研究采用 siRNA 技术使白质 Ast 内 S100A4 基因表达“沉默”,发现与之共同培养的 DRG 细胞突起明显增长、增粗,提示白质 Ast 内的 S100A4 蛋白可能抑制神经突起生长。在此之前,同样是使用 siRNA 技术,Takenaga 等^[11]发现,S100A4 基因表达“沉默”后,白质 Ast 的迁移能力明显增强,其金属蛋白酶(metalloproteinases, MMPs) MT1-MMP 和 MMP-9 的合成与活力也增加。由于 MMPs 及其抑制因子对神经元适应 CNS 白质微环境^[12,13],以及轴突再生起重要作用^[14,15],S100A4 蛋白有可能通过调节 MMPs 的活性来影响 CNS 白质内轴突的生长。也就是说,Ast S100A4 基因沉默后,其迁移能力和细胞外 MMPs 活性的增强可明显促进 DRG 细胞突起生长;相反,表达 S100A4 增加的白质 Ast,由于细胞迁移能力以及 MMPs 活性的减弱,神经元突起生长受到抑制。

当然,本研究采用的星形胶质细胞-神经元共培养系统简化了在体条件下复杂的细胞间的相互关系。实际上,少突胶质细胞、小胶质细胞和/或血脑屏障的

变化也有可能影响白质 Ast 对神经突起生长的作用。

综上所述,白质 Ast 能促进感觉神经元突起生长,而胞内的 S100A4 蛋白抑制该作用。发生退行性变的成熟白质可能通过上调 Ast 内 S100A4 的表达,抑制轴突再生。因此,适时运用 siRNA 技术抑制白质 Ast S100A4 基因表达,可帮助受损的轴突在 CNS 白质内生长,为临床上神经再生修复提供新的思路。

参 考 文 献

- 1 Kozlova EN, Lukanidin E. Mts1 protein expression in the central nervous system after injury. *Glia*, 2002, 37:337-348.
- 2 Kozlova EN, Lukanidin E. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein is selectively expressed in white matter astrocytes and is up-regulated after peripheral nerve or dorsal root injury. *Glia*, 1999, 27:249-258.
- 3 Kozlova EN, Takenaga K. A procedure for culturing astrocytes from white matter and the application of the siRNA technique for silencing the expression of their specific marker, S100A4. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2005, 15:59-65.
- 4 Rönn LC, Ralets I, Hartz BP, et al. A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J Neurosci Meth*, 2000, 100:25-32.
- 5 Spencer T, Domeniconi M, Cao Z, et al. New roles for old proteins in adult CNS axonal regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, 13:133-139.
- 6 Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, et al. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*, 1997, 390:680-683.
- 7 Davies SJ, Goucher DR, Doller C, et al. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 1999, 19:5810-5822.
- 8 Tom VJ, Doller CM, Malouf AT, et al. Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter. *J Neurosci*, 2004, 24:9282-9290.
- 9 Novitskaya V, Grigorian M, Kriajevska M, et al. Oligomeric forms of the metastasis related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 2000, 275:41278-41286.
- 10 Pedersen MV, Kohler LB, Grigorian M, et al. The Mts1/S100A4 protein is a neuroprotectant. *J Neurosci Res*, 2004, 77:777-786.
- 11 Takenaga K, Kozlova EN. Role of intracellular S100A4 for migration of rat astrocytes. *Glia*, 2006, 53:313-321.
- 12 Gardner J, Ghorpade A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMP balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. *J Neurosci Res*, 2003, 74:801-806.
- 13 Ahmed Z, Dent RG, Leadbeater WE, et al. Matrix metalloproteinases: degradation of the inhibitory environment of the transected optic nerve and the scar by regenerating axons. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 28:64-78.
- 14 Krekoski CA, Neubauer D, Graham JB, et al. Metalloproteinase-dependent predegeneration in vitro enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts. *J Neurosci*, 2002, 22:10408-10415.
- 15 Shubayev VI, Myers RR. Matrix metalloproteinase-9 promotes nerve growth factor-induced neurite elongation but not new sprout formation in vitro. *J Neurosci Res*, 2004, 77:229-239.

(收稿日期:2006-06-20)

(本文编辑:熊芝兰)