

MANF 对 A2 型反应性星形胶质细胞增殖、凋亡的影响

刘锐, 丁振飞, 戴策, 钟林, 汪萧和, 尹宗生, 高维陆

摘要 目的 探讨中脑星形胶质细胞源性神经营养因子(MANF)对脊髓A2型反应性星形胶质细胞(RAS)增殖及凋亡的影响。方法 取SD大鼠脊髓组织进行星形胶质细胞的分离及培养,并采用免疫荧光技术鉴定细胞。采用白细胞介素-1 β (IL-1 β)刺激星形胶质细胞制备A2型RAS,作为实验组,并用未处理组做空白对照组。然后采用免疫荧光染色法对制备的A2型RAS进行鉴定。将制备完成的细胞分成Control组和MANF组,以不同浓度(0、0.5、1、2 μ g/ml)的MANF蛋白及不同的作用时间(12、24、36、48 h)处理细胞,采用CCK-8法检测在450 nm处的吸光度。取一定浓度的MANF蛋白(1 μ g/ml)处理细胞,同样分为Control组和MANF组,采用EdU法验证对A2型RAS增殖能力的影响。采用TUNEL法验证对A2型RAS凋亡的影响。结果 免疫荧光结果显示IL-1 β 可以刺激星形胶质细胞向A2型转化;CCK-8、EdU增殖实验结果显示,MANF蛋白干预后,细胞增殖能力均显著高于对照组($P < 0.05$);TUNEL凋亡实验显示经MANF蛋白干预后,凋亡细胞明显减少($P < 0.05$)。结论 MANF蛋白对A2型RAS具有促进增殖、抑制凋亡的作用。

关键词 中脑星形胶质细胞源性神经营养因子; A2型反应性星形胶质细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 651.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1511-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.001

星形胶质细胞在神经系统中所占的比例最大,在神经胶质细胞中分布最为广泛,也是胶质细胞中体积最大的一种。中枢神经系统中的星形胶质细胞能够对不同性质的刺激做出不同的反应,活化为具有消极作用的A1型反应性星形胶质细胞(reactive astrocytes, RAS)和有积极作用的A2型RAS^[1]。有研究^[2]表明,白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)可以使星形胶质细胞向A2型RAS转化。中脑星形

胶质细胞源性神经营养因子(mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, MANF)是近年来新发现的一种分泌型蛋白,存在于内质网和高尔基体中。MANF能够在多种细胞中发挥生物学功能^[3]。但其在脊髓损伤中对RAS的影响却未见相关文献报道。该研究拟通过在体外进行大鼠脊髓星形胶质细胞的培养,并制备A2型RAS,采用不同浓度的MANF处理,并检测其对A2型RAS增殖、凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 胎牛血清、DMEM/F12培养基(美国Gibco公司);重组MANF蛋白、小鼠抗S100A10单克隆抗体(美国R&D Systems公司);CCK-8试剂(上海陶素生化科技有限公司);链霉素-青霉素、EdU试剂盒、TUNEL试剂盒(上海Beyotime生物技术公司);兔抗GFAP单克隆抗体(美国Abcam公司)。倒置荧光显微镜(德国蔡司公司),酶标仪(美国PE公司)。

1.2 实验动物 SPF级SD大鼠50只,3~4周龄,雌雄不拘,由安徽省实验动物中心提供。

1.3 方法

1.3.1 星形胶质细胞的制备 SD大鼠脱颈处死后,在无菌条件下取出脊髓组织,迅速转入含有冰预冷的PBS液的培养皿中,用眼科剪将组织块剪成1 mm \times 1 mm \times 1 mm大小,反复吹打后经200目细胞筛过滤,滤液收集于15 ml离心管中,转入离心机离心5 min,转速为800 r/min,然后弃上清液,加入含有10%胎牛血清的DMEM/F12星形胶质细胞培养液2 ml,之后用枪头反复吹打细胞悬液使其重悬均匀。将细胞密度调整为 5×10^5 /ml,分装接种到培养瓶,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱内培养。培养至第14天,将细胞瓶固定于37 $^{\circ}$ C恒温摇床,120 r/min振荡18 h。弃去培养基,以新鲜的培养基洗涤培养瓶2遍。加入胰酶,当细胞由多角形变成圆形,细胞间隙变大,胞体变亮,小心弃去胰酶。加入新鲜的培养基将细胞重悬成单细胞悬液,置于

2021-07-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81871785, 81672161)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院关节外科, 合肥 230022

作者简介: 刘锐,男,硕士研究生;

高维陆,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:

weiqiang83@163.com

37 ℃、5% CO₂ 培养箱内继续培养。

1.3.2 星形胶质细胞的鉴定 待细胞融合度达到80%左右时,经4%多聚甲醛室温固定、0.3% TritonX-100 室温下通透,正常羊血清工作液室温封闭后,加入兔抗 GFAP 单克隆抗体 4 ℃ 过夜,再加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG,避光保存,室温孵育 1 h。DAPI 避光孵育染核 20 min,滴加抗荧光淬灭封片甘油,封片后荧光显微镜观察。

1.3.3 A2 型 RAS 的制备及鉴定 取对数生长期的星形胶质细胞,在细胞培养基中加入终浓度为 10 ng/ml 的 IL-1β,放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养。细胞培养 3 d 后,行免疫荧光染色,方法同上,所用一抗为兔抗 GFAP 单克隆抗体和小鼠抗 S100A10 单克隆抗体,二抗为 FITC 标记的羊抗兔 IgG 和 TRITC 标记的羊抗小鼠 IgG。以未经 IL-1β 处理的星形胶质细胞为对照组。

1.3.4 CCK-8 实验 取生长正常的 A2 型 RAS 接种至 96 孔板中,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度的(0、0.5、1、2 μg/ml) MANF 蛋白,放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,弃各孔培养基,向每孔加入 90 μl 培养基、10 μl CCK-8 溶液继续培养 4 h。而后再用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度,该实验重复 3 次。采取同上的方法,加入终浓度 1 μg/ml MANF 蛋白,分别在 12、24、36、48 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度,该实验重复 3 次。

1.3.5 5-乙炔基-2-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 掺入试验 取生长状态正常的 A2 型 RAS 接种至 24 孔板中,细胞贴壁后分 3 组进行试验,空白组只加细胞,Control 组加入 2 × 的 EdU,MANF 组加入 2 × 的 EdU 和终浓度 1 μg/ml 的 MANF 蛋白,继续培养 24 h 后进行荧光检测。该实验重复 3 次。

1.3.6 TUNEL 实验 取生长状态正常的 A2 型 RAS 接种至 24 孔板中,细胞贴壁后分为 2 组,空白对照组不做任何处理,MANF 组加入终浓度 1 μg/ml 的 MANF 蛋白,继续培养 24 h 后,加入 TUNEL 检测液孵育 60 min 后进行荧光检测。该实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 软件进行数据分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脊髓星形胶质细胞的培养与鉴定

大鼠脊髓星形胶质细胞分离培养 14 d 后用倒置显微镜观察细胞基本铺满培养皿底(图 1A),将细胞瓶固定于 37 ℃ 恒温摇床,120 r/min 振荡 18 h 后传代,第 2 天可见纯化的星形胶质细胞呈星形,从胞体发出许多长而分支的突起(图 1B)。免疫荧光结果显示绝大多数细胞呈 GFAP 阳性,显绿色荧光(图 2)即为星形胶质细胞。DAPI 染核,胞核呈蓝色,为总细胞数,可见星形胶质细胞纯度较高。

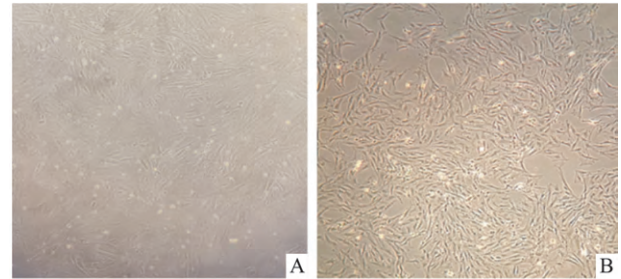


图 1 大鼠脊髓星形胶质细胞 ×40
A: 星形胶质细胞原代 14 d; B: 纯化后传代 2d 的星形胶质细胞

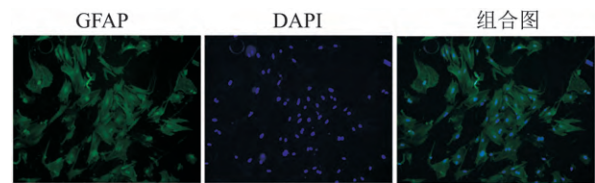


图 2 星形胶质细胞的鉴定 ×100

2.2 A2 型 RAS 的鉴定 根据 A2 型 RAS 特定表达 S100A10 的特性,应用细胞免疫荧光方法染色结果显示 IL-1β 处理的实验组可见 A2 型 RAS 特异性蛋白 S100A10 被染成红色,未处理空白对照组仅有少量红色,DAPI 复染后细胞核呈蓝色,提示绝大多数细胞为 A2 型 RAS。见图 3。

2.3 MANF 蛋白对 A2 型 RAS 增殖具有时间和浓度依赖性 CCK-8 结果显示,不同浓度的 MANF 蛋白(0.5、1、2 μg/ml)对 A2 型 RAS 具有促进增殖的作用(图 4A),而且不同作用时间(12、24、36、48 h)促进增殖的能力不同(图 4B),呈时间和浓度依赖性 (*P* < 0.05);当浓度达到 2 μg/ml 时促增殖的效果最好,与对照组比较差异有统计学意义(*t* = 9.951, *P* < 0.05),在 12 h 的细胞增殖活力与对照组相比,差异无统计学意义。

2.4 MANF 蛋白对 A2 型 RAS 增殖有促进作用 为了研究 MANF 对 A2 型 RAS 增殖的影响,进行了 EdU 掺入试验,分析细胞增殖情况。结果显示与对照组(25.5%)相比,MANF 组(44.5%)的 EdU 阳性细胞数量增加了(图 5、6),这些数据表明 MANF 对

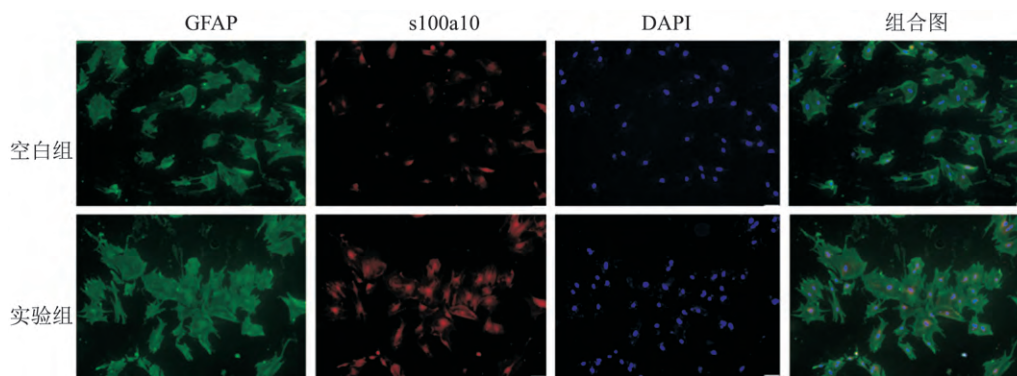


图3 A2型RAS细胞的鉴定 ×100

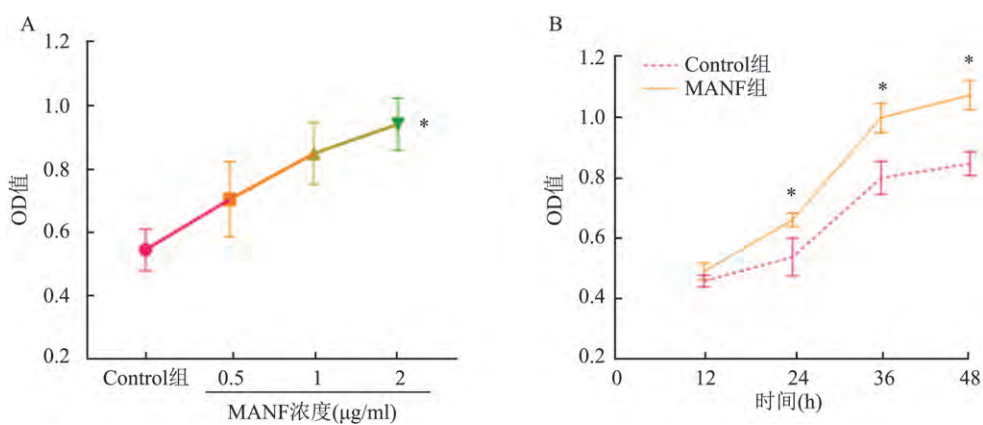


图4 MANF蛋白对A2型RAS增殖的影响

A: 不同浓度MANF对A2型RAS的影响; B: 不同作用时间对A2型RAS的影响; 与Control组比较: * $P < 0.05$

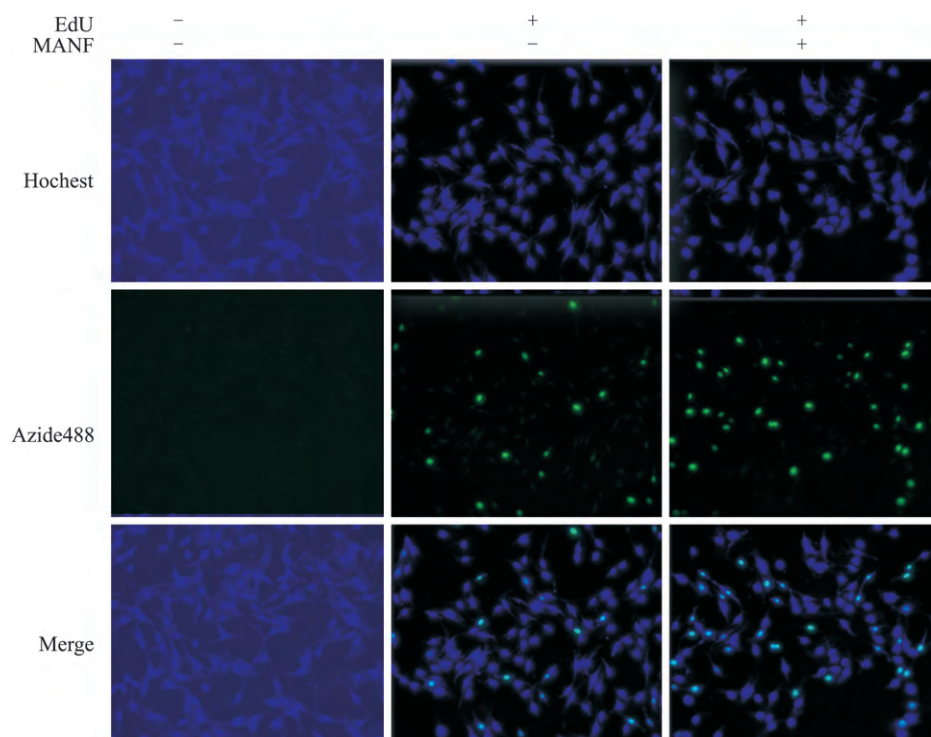


图5 EdU检测细胞增殖的效果图 ×100

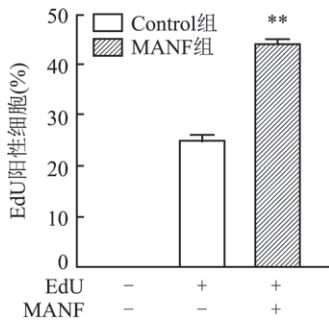


图6 EdU 阳性细胞所占的比例
与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

A2 型 RAS 增殖具有促进作用。

2.5 MANF 蛋白对 A2 型 RAS 凋亡具有抑制作用

为了研究 MANF 对 A2 型 RAS 的凋亡的影响,因此进行 TUNEL 分析细胞凋亡的情况。图 7 为倒置显微镜下明场拍摄的 A2 型 RAS,图 8 为 TUNEL 染色阳性细胞与 Control 组(凋亡的阳性对照)细胞相比,MANF 组的细胞中仅观察到少量 TUNEL 阳性染色,这表明 MANF 可以抑制细胞凋亡。

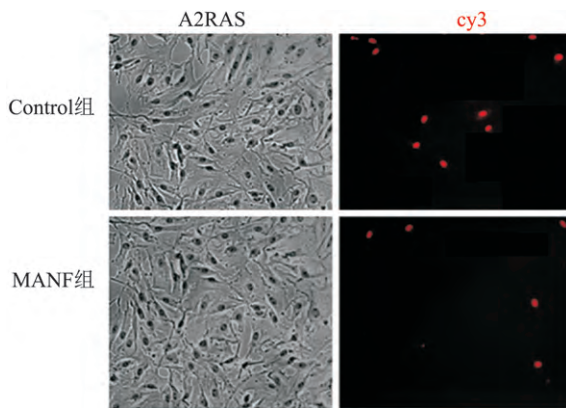


图7 TUNEL 检测细胞凋亡的效果图 ×200

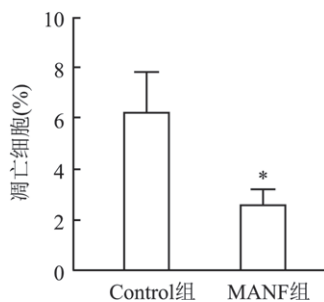


图8 凋亡细胞所占比例
与 Control 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

星形胶质细胞在中枢神经系统中所占的比例最

大,是维持中枢神经系统结构和生理功能的基础。星形胶质细胞对缺血、感染、创伤及退行性改变等各种形式的中枢神经系统损害都能迅速做出反应,在形态和功能上发生剧烈的变化,形成 RAS^[4]。最近,有研究者在制备了炎性和缺血性病损两种不同性质的中枢神经系统损伤小鼠模型后,分离培养两种损伤模型小鼠的 RAS,研究者将炎性病损诱导产生的 RAS 命名为 A1 型 RAS,缺血性病损诱导产生的 RAS 命名为 A2 型 RAS。其中 A1 型 RAS 上调许多经典的补体级联基因,这些基因对突触具有破坏性,因此推测 A1 型 RAS 可能发挥消极的作用。而 A2 型 RAS 能够分泌多种神经营养因子,因此推测 A2 型 RAS 可能发挥积极的作用^[5]。有研究^[6]表明, A2 型 RAS 能够促进抗炎细胞因子转化生长因子 β 的表达。该因子有助于轴突形成和神经保护的作用。

大量的证据表明 MANF 在多种疾病中均具有保护作用,包括脑缺血^[7-8]、心肌梗塞^[9]、视网膜变性^[10-11]。最近有研究^[12]证明其可通过抑制眼部组织炎性细胞因子的表达,从而抑制自身免疫性葡萄膜炎。体外细胞培养实验同样证明 MANF 蛋白能够激活促存活信号通路^[13-14]。本研究以大鼠脊髓星形胶质细胞为研究对象,通过对 A2 型 RAS 的制备,观察不同浓度 MANF 对 A2 型 RAS 增殖活力的影响,结果显示,MANF 可促进脊髓 A2 型 RAS 增殖并抑制其凋亡,从而发挥神经修复作用。本研究可能为脊髓损伤的治疗提供一个新思路,但本研究也存在着一定的不足,MANF 对促进 A2 型 RAS 增殖并抑制其凋亡具体分子机制尚未明确,后续还需进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Liddelov S A, Guttenplan K A, Clarke L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-7.
- [2] Shioh L R, Favrais G, Schirmer L, et al. Reactive astrocyte COX2-PGE2 production inhibits oligodendrocyte maturation in neonatal white matter injury [J]. Glia, 2017, 65(12): 2024-37.
- [3] Yang S, Li S, Li X. MANF: a new player in the control of energy homeostasis, and beyond [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1725.
- [4] Liddelov S A, Barres B A. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential [J]. Immunity, 2017, 46(6): 957-67.
- [5] Zamanian J L, Xu L, Foo L C, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis [J]. Journal Neurosci, 2012, 32(18): 6391-410.
- [6] Sonn I, Nakamura M, Renault-Mihara F, et al. Polarization of re-

- active astrocytes in response to spinal cord injury is enhanced by M2 macrophage-mediated activation of Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(4): 1847–62.
- [7] Airavaara M, Shen H, Kuo C, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats [J]. *J Comp Neurol*, 2009, 515(1): 116–24.
- [8] Mätlik K, Anttila J E, Kuan-Yin T, et al. Poststroke delivery of MANF promotes functional recovery in rats [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(5): p8957.
- [9] Glembotski C C, Thuerauf D J, Huang C, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(31): 25893–904.
- [10] Neves J, Zhu J, Sousa-Victor P, et al. Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina [J]. *Science*, 2016, 353(6294): f3646.
- [11] Lu J, Luo L, Huang D, et al. Photoreceptor protection by mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) [J]. *eNeuro*, 2018, 5(2): 109–18.
- [12] 鲍颖超, 高翔, 徐龙, 等. MANF 在 Lewis 大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎中的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 100–4.
- [13] Zhang J, Cai Q, Jiang M, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor alleviated 6-OHDA-induced cell damage via ROS-AMPK/mTOR mediated autophagic inhibition [J]. *Exp Gerontol*, 2017, 89: 45–56.
- [14] Tseng K, Anttila J E, Khodosevich K, et al. MANF promotes differentiation and migration of neural progenitor cells with potential neural regenerative effects in stroke [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(1): 238–55.

Effects of MANF factor on the proliferation and apoptosis of A2 type reactive astrocytes

Liu Rui, Ding Zhenfei, Dai Ce, et al

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

Abstract Objective To study the effect of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) on the proliferation and apoptosis of A2 type reactive astrocytes (RAS) in the spinal cord. **Methods** The spinal cord of SD rats was taken to separate and culture astrocytes, and the cells were identified by immunofluorescence technology. Interleukin-1 β (IL-1 β) was used to stimulate astrocytes to prepare A2 type RAS as the experimental group; and the untreated group was used as a blank control group. Immunofluorescence was used to identify A2 type RAS. The prepared cells were divided into control group and MANF group. The cells were treated with different concentrations (0, 0.5, 1, 2 μ g/ml) of MANF protein and different action times (12, 24, 36, 48 h), and CCK-8 method was used to detect the absorbance at 450 nm. The cells were treated with a certain concentration of MANF protein (1 μ g/ml) and divided into the control group and the MANF group. The EdU method was used to verify the effect on the proliferation of A2 RAS. The TUNEL method was used to verify the effect on A2 RAS apoptosis. **Results** Immunofluorescence results showed that IL-1 β could stimulate the transformation of astrocytes to type A2; The results of CCK-8 and EdU proliferation experiments showed that after MANF protein intervention, the cell proliferation ability was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$); TUNEL apoptosis experiment showed that after the intervention of MANF protein, apoptotic cells significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** MANF protein can promote proliferation and inhibit apoptosis of A2 RAS.

Key words mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor; type A2 reactive astrocytes; proliferation; apoptosis