

Ilk 对 LPS 诱导小鼠乳腺上皮细胞分泌炎性因子的影响

王玉坤^{1,2}, 杨航³, 冯将^{1,2}, 魏玉好^{1,2}, 易琼², 王鲁^{2*}

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省生化工程中心, 贵阳 550025; 3. 河南金泰生物技术股份有限公司, 郑州 450000)

[收稿日期] 2016-10-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0059-05 [中图分类号] S852.331

[摘要] 为探究 Ilk 对 LPS 诱导小鼠乳腺上皮细胞 (MECs) 分泌炎性因子 IL-8、TNF- α 的影响, 采用 siRNA 技术筛选最佳转染条件, qPCR 法和 ELISA 法检测 siRNA 转染后下游蛋白 Akt1 的表达来评价 Ilk 沉默, ELISA 法检测 Ilk 沉默后对小鼠 MECs 分泌炎性因子 IL-8、TNF- α 的影响。结果显示: 选用 Ilk-mus-595 片段的 20 nM 转染组可极显著抑制 Ilk 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$), 转染效率最好, 达 84.83%; Ilk 转染后可显著减少 LPS 介导的 Akt1 mRNA 的转录和蛋白表达 ($P < 0.05$); 可显著减少 LPS 介导的 TNF- α 分泌 ($P < 0.05$), 但各组 IL-8 的量无变化 ($P > 0.05$)。结果提示: 利用 siRNA 成功转染的 Ilk 可以影响细胞内 Akt1 的表达, 降低细胞分泌的 TNF- α 含量, Ilk 可能与小鼠 MECs 的抗炎有关, 可作为靶基因进行更加深入的研究, 以期为乳腺炎症的治疗提供新的思路及数据参考。

[关键词] 乳腺上皮细胞; Ilk 基因; 炎性因子

Effects of ILK on Secretion of IL-6 and TNF- α in LPS-stimulated Mammary Epithelial Cell

WANG Yu-kun^{1,2}, YANG Hang³, FENG Jiang^{1,2}, WEI Yu-hao^{1,2}, YI Qiong², WANG Lu^{2*}

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Biochemical Engineering Center of Guizhou Province, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

3. Henan Jintai Biological Stock Limited Corporation, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: To investigate the effect of Ilk on secretion of IL-8 and TNF- α in LPS-stimulated mammary epithelial cells (MECs), Ilk gene was transfected with RNA interference, then the best transfection concentration was obtained by real-time quantitative RT-PCR. Meanwhile, the transfection efficiency was evaluated by the Akt1 relative transcript levels assayed by RT-PCR and the content of Akt1 protein measured by ELISA. The content of IL-8 and TNF- α in the mouse MECs were measured by ELISA. The results showed that the transfection efficiency of Ilk-mus-595 in 20 nM was highest (84.83%), which could significantly inhibited Ilk

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260618; 31470128)

作者简介: 王玉坤, 硕士研究生, 从事中兽医学及中药药理研究。

通讯作者: 王鲁。E-mail: wanglu7007@163.com

mRNA expression ($P < 0.01$). When the mouse MECs was transfected with siRNA of Ilk and stimulated with LPS, compared with the control group, the expression of Akt1 mRNA and protein was significantly reduced after the silence of Ilk gene ($P < 0.05$). The secretion of TNF- α was prominently reduced ($P < 0.05$), but there was no change ($P > 0.05$) on the IL-8 content in each group. These results indicated that the silence of Ilk could change the expression of Akt1 and reduce the secretion of TNF- α in LPS-stimulated MECs, which proved that its anti-infection effect maybe related to Ilk, so Ilk could be chosen as a target gene to further explore the immune function of mouse MECs. Which can provide new train of thought and experimental data for treatment of mammary gland inflammation and provide theoretical basis for the development and application of new drugs.

Key words: MECs; Ilk; cytokine

整合素连接激酶(integrin-linked kinase, Ilk)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在全身多种组织均表达,可参与生物体内多种信号通路并发挥着关键作用^[1]。目前研究表明,Ilk作为一种癌基因与许多肿瘤的形成、凋亡、黏附、增殖、侵袭和转移密切相关^[2],研究还表明 Ilk 与 LPS 介导肿瘤细胞高表达炎性细胞因子 IL-6 有关^[3]。有文献报道乳腺上皮细胞(MECs)在病原微生物侵入乳腺时,能分泌细胞炎性因子,如 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α ^[4],进而趋化中性粒细胞进入乳腺感染区,抵抗病原菌的感染^[5],产生炎性因子与 LPS 刺激有关^[6]。通过基因芯片技术发现,在 LPS 刺激下小鼠 MECs 上 Ilk mRNA 的表达发生了显著变化^[7],然而,Ilk 与 LPS 诱导乳腺上皮细胞分泌细胞炎性因子 TNF- α 和 IL-8 是否相关却未见报道。本研究利用 Ilk siRNA 转染小鼠乳腺上皮细胞沉默 Ilk 基因,探讨 Ilk 的表达对 LPS 诱导小鼠乳腺上皮细胞分泌 IL-8 和 TNF- α 的影响,以期找到与乳腺炎症相关的关键靶点,这对乳腺炎症等相关疾病的治疗具有重要的意义,也为新药的开发和应用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物 SPF 级 3 月龄的妊娠中期昆明小白鼠,体重(32 \pm 2)g,购自解放军第三军医大学实验动物中心(动物许可证号:SCXK(渝)2012-0003),由贵州大学贵州省生化工程中心 SPF 级动物实验室(动物许可证号:SYXK(渝)2013-0001)饲养。

1.2 试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FCS),

Thermo scientific 公司;小鼠表皮生长因子(rhEGF),SAB 公司;胰岛素(Insulin)、L-谷氨酰胺、霍乱毒素(CT)、脂多糖(LPS),Sigma 公司;I 型胶原酶和 II 型胶原酶,Solarbio 公司;Power SYBR Green PCR Master Mix, AB 公司;动物组织/细胞 RNA 提取试剂盒,2 \times EsTaq MasterMix,北京康为世纪生物科技有限公司;mouse TNF- α ELISA kit、mouse IL-8 ELISA kit,武汉基因美生物公司;

1.3 实验仪器 ThermoFisher 8000 储水型 CO₂ 细胞培养箱、MultiskanGo 型全波段酶标仪, Thermo 公司;qTOWER 实时荧光定量 RT-PCR 仪,德国 jena 公司;T100 Thermal Cycler 温度梯度 PCR 仪、Gel-Doc XR+ 凝胶成像系统,BIO-RAD 公司。

2 方法

2.1 细胞的制备 参照文献方法^[4],选用 3 月龄的妊娠中期昆明小鼠 1 只,压颈处死小鼠,解剖并分离小鼠乳腺组织,用眼科剪将乳腺组织剪为 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小的组织块。用混合酶消化液 8 mL 将乳腺组织转移到 25 mL 的三角锥形瓶中,密封放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中消化 1 h,终止消化后将细胞消化液用细胞筛(160 目)过滤,收集滤液,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,在离心管中加入适量含 10% FCS/DMEM/F12 培养液悬浮细胞团。采用差速贴壁法纯化细胞后,将细胞悬液重新转移入细胞培养瓶中,置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中静置培养,隔 24 h 换液 1 次,培养 4 d。

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 筛选 Ilk 的 siRNA 最佳转染条件 按 2.1 项方法制备小鼠 MECs,将 100

$\mu\text{L } 5 \times 10^5$ 个/mL 的细胞悬液加入 24 孔细胞培养板中,另加培养液 400 μL ,在 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱培养 24 h,使用动物组织/细胞 RNA 提取试剂盒提取细胞的 RNA,尽快用 TIANScriptcDNA 第一链合

成试剂盒将提取的 RNA 逆转录,并于 -80 $^\circ\text{C}$ 保存备用。从 GeneBank 获得 Ilk 基因序列,使用 Primer 5.0 设计引物,以 Gapdh 为内参基因,采用梯度 PCR 技术检测基因的最佳退火温度(表 1)。

表 1 qPCR 的引物序列及退火温度

基因	引物序列(5'→3')	退火温度/ $^\circ\text{C}$	基因序列号
Ilk	上游 TGT TGT GAA GGT GCT GAA GG	56	NM_010562
	下游 CCA GTG TGT GAT GAG GCT TG		
Akt1	上游 TAC TCA TTC CAG ACC CAC GAC C	56	NM_001165894
	下游 CAG ACA CAA TCT CCG CAC CAT A		
Gapdh	上游 GCA ACT CCC ACT CTT CCA	-	NM_008084
	下游 GTC CAG GGT TTC TTA CTC C		

表 2 siRNA 序列

siRNA 片段名称	siRNA 序列(5'→3')
Ilk - mus - 595	正义链 GCC AGA AUC UCA ACC GUA UTT
	反义链 AUA CGG UUG AGA UUC UGG CTT
Ilk - mus - 763	正义链 GGC AGG GCA AUG AUA UUG UTT
	反义链 ACA AUA UCA UUG CCC UGC CTT

根据 NCBI 数据库中小鼠 Ilk 的 mRNA 序列设计了 2 条 siRNA 片段(表 2)。于转染前 24 h,接种适当数量的小鼠 MECs 至 24 孔细胞培养板中,待细胞生长至 30% ~ 50% 融合时,分别将转染片段加入细胞,使其各组终浓度分别为 50 nM、30 nM、20 nM,另设空白对照组,转染培养 24 h 后,按照 2.2 项方法提取各孔细胞总 RNA,将获得的总 RNA 反转录成 cDNA,并于 -80 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

10 μL 反应体系中,加入 5 μL SYBR Green, 2 μL 模板 cDNA, 0.8 μL 引物,用无 RNase 的水补充体积至 10 μL 。然后进行 PCR 反应和荧光测定。荧光定量 RT-PCR 反应程序:95 $^\circ\text{C}$ 预热 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 自变性开始三步为一个循环,共设 40 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min,使产物延伸完全。反应结束后自 50 ~ 95 $^\circ\text{C}$ 绘制溶解曲线。测定结果使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量,计算转染效率,根据转染率筛选最佳转染条件。其中:(1) $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct 目的基因} - \text{Ct 内参})_{\text{转染后}} - (\text{Ct 目的基因} - \text{Ct 内参})_{\text{转染前}}$;(2) 转染率 = $1 - 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

2.3 Ilk 转染效果评价

2.3.1 实时荧光定量 RT-PCR 检测 Ilk 转染后下游蛋白 Akt1 mRNA 表达量 将适当浓度的小鼠 MECs 细胞接于 12 孔细胞培养板(共接 2 块板),待其生长至 50% 融合,设置 4 个实验组:转染组、NC

组、脂质体组、正常对照组,转染组选用 RT-PCR 结果筛选出的最佳有效 siRNA 的浓度,NC 组(阴性对照组)选用 NC 片段,脂质体组只选用转染的质粒。转染 24 h 后,抽去各孔中的培养基,加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含 LPS 生长培养液,继续培养 24 h。按 2.2 项抽提各孔的总 RNA,反转录,采用实时荧光定量 RT-PCR 测定 Akt1 mRNA 的转录量。

2.3.2 ELISA 法检测 Ilk 转染后细胞内 Akt1 蛋白量 按 2.3.1 项方法对小鼠 MECs 采用相同处理,培养完成后,每孔取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书的方法,分别测定细胞内 Akt1 的蛋白量。

2.4 ELISA 法检测 Ilk 转染后细胞分泌 TNF- α 、IL-8 量 按 2.3.1 项方法对小鼠 MECs 采用相同处理,培养完成后,每孔取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书的方法,分别测定细胞分泌的 TNF- α 、IL-8 的含量。

2.5 统计学处理 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS17.0 统计分析软件进行处理,组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著,具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 Ilk 的 siRNA 最佳转染条件筛选结果 结果如图 1、图 2 显示,与空白组比较,各转染组 Ilk mRNA 的表达量均显著下降 ($P < 0.05$)。其中 Ilk

-mus-595 片段在 50 nM、30 nM、20 nM 浓度下的转染效率分别为 76.97%、63.52%、84.83%，与空白组相比 *Ilk* 的 mRNA 表达均被极显著抑制 ($P < 0.01$)；*Ilk-mus-763* 片段在 50 nM、30 nM、20 nM 的转染效率分别为 51.29%、53.90%、37.88%，其中 50 nM 和 30 nM 浓度下与空白组相比 *Ilk* 的 mRNA 表达均被极显著抑制 ($P < 0.01$)，20 nM 浓度下 *Ilk* 的 mRNA 表达被显著抑制 ($P < 0.05$)。比较各组转染率，*Ilk-mus-595* 片段的 20 nM 浓度下转染率最高。

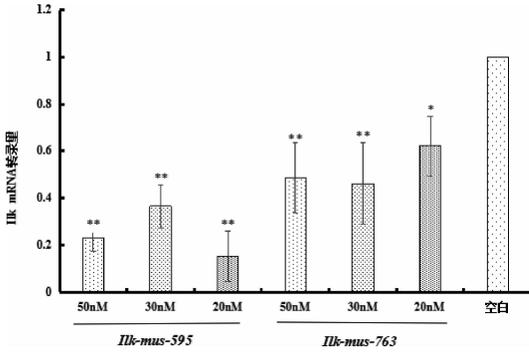


图1 RT-PCR法检测 *Ilk* 相对转录水平

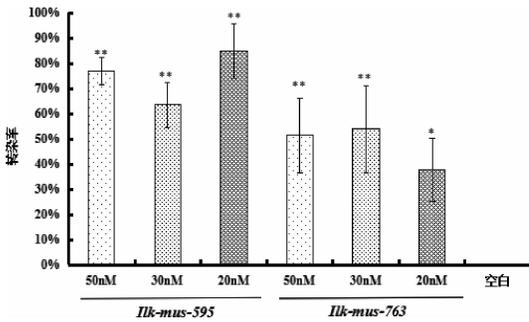


图2 *Ilk-mus-595* 和 *Ilk-mus-763* 片段各组小鼠 MECs 转染率

(* * 与空白组相比, $P < 0.01$; * 与空白组相比, $P < 0.05$)

3.2 *Ilk* 转染后对下游蛋白 Akt1 影响的结果

3.2.1 *Ilk* 转染后 Akt1 mRNA 表达量结果 如图3所示,与对照组相比,转染组中 Akt1 的 mRNA 表达量降低了 20.2%,且差异显著 ($P < 0.05$),而 NC 组和脂质体组的表达量与对照组相比基本没有变化。

3.2.2 *Ilk* 转染后细胞内 Akt1 蛋白量结果 如图4显示,同对照组相比,转染组 Akt1 的含量显著性降低 ($P < 0.05$),而 NC 组和脂质体组的蛋白量与对照组相比基本没有变化。

3.3 *Ilk* 转染后细胞分泌 TNF- α 、IL-8 量的结果

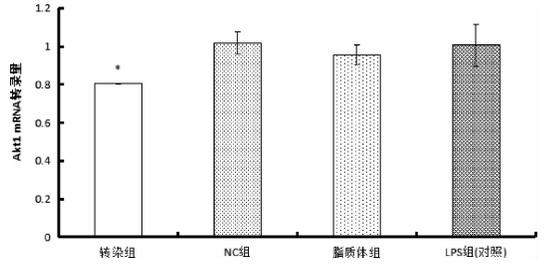


图3 RT-PCR法检测 Akt1 相对转录水平

(* * 与对照组相比, $P < 0.01$; * 与对照组相比, $P < 0.05$)

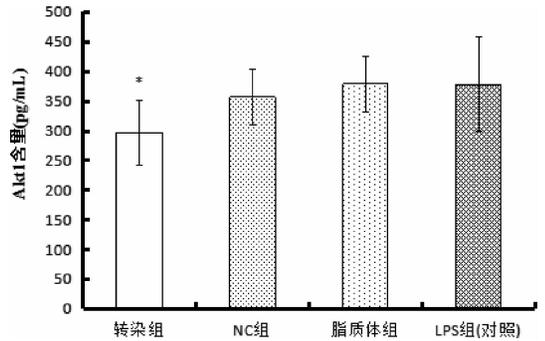


图4 ELISA法检测细胞分泌 Akt1 的水平

如图5显示,同对照组相比,转染组 TNF- α 的含量显著性降低 ($P < 0.05$),而 NC 组和脂质体组与对照组相比基本无变化;图6结果显示,同对照组相比,转染组 IL-8 的含量无显著性降低 ($P > 0.05$),不具有统计学意义,NC 组和脂质体组与对照组相比基本无变化。

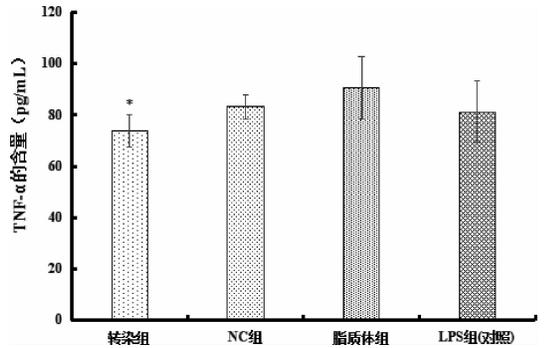


图5 各组 TNF- α 含量

4 讨论与小结

整合素连接激酶在全身的多种组织广泛表达,尤其在骨骼肌和心脏中高表达,因其自身三个结构域作用,使得 *Ilk* 成为整合素信号通路中的关键激酶,介导细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 对细胞的调控,从而参与细胞的增殖、迁移、葡萄糖代

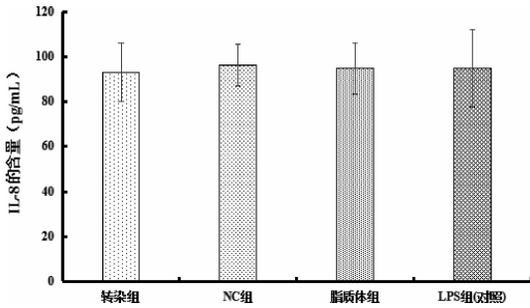


图6 各组 IL-8 含量

(* 与对照组相比, $P < 0.05$)

谢等多个方面的调控^[8],还与血管发育、肿瘤血管生成、神经系统发育、心肌肥厚以及细胞免疫等相关^[9]。研究还表明 Ilk 与 LPS 介导肿瘤细胞高表达炎性细胞因子 IL-6 有关。LPS 是存在于革兰氏阴性菌上的 PAMP,它能与免疫细胞膜上的模式受体相互作用,激活胞内 TLR4 信号通路相关分子的活化。通过基因芯片技术,发现 LPS 可引起 PI3K/Akt 信号通路的活化^[7],提示 TLR4 信号通路可能与 PI3K/Akt 信号通路可能会相互影响,调节机体免疫应答。因此猜测,PI3K/Akt 信号通路也可能调控细胞因子的分泌,因 Ilk 分子是该通路的主要参与者,为此尝试探究 Ilk 能否成为调控关键炎性细胞因子分泌的新靶向基因。

研究发现,Akt1 作为 Ilk 重要的作用底物,其上游基因 Ilk 的激活能直接引起 Akt1 的磷酸化。据报道,肿瘤抑制因子 PTEN 突变的人前列腺癌细胞中 Ilk 活化可引起 Akt1 的磷酸化;而抑制 Ilk 可以抑制 Akt1 的磷酸化,并诱导细胞周期停滞进而发生凋亡^[10]。有报道 PI3K 异性抑制剂可以显著的抑制 LPS 刺激后肝脏内 Akt1 活化,并降低肝细胞核 SREBP-1c 的活化,说明 LPS 可以通过 TLR4 和 PI3K 信号通路介导肝脏 Akt1 的磷酸化^[11];另有研究表明 LPS 刺激过表达 ILK 的 A549 细胞后,细胞因子的表达也呈现显著的增高,提示外源性炎症因子 LPS 与 A549 细胞表面 TLR4 结合后,促进了 A549 细胞产生炎性细胞因子 IL-6^[12]。这一系列研究都表明 PI3K/Akt 信号通路与 LPS 刺激信号通路的活化关系密切,也为本试验研究奠定了理论基础。

为了明确 Ilk 基因的沉默是否会影响 LPS 刺激下小鼠 MECs 中 PI3K/Akt 信号通路的活化,本试验利用 siRNA 转染技术抑制了基因 Ilk 的表达,结果显示与 LPS 刺激组相比,转染组显著下调了 Akt1 的

mRNA 的转录水平,这说明 Ilk 表达被抑制之后影响了下游 Akt1 的表达;通过检测转染后的蛋白水平,结果显示其表达量有所下降,说明 Ilk 的表达抑制,会对其下游的靶点 Akt1 产生一定的影响,这与肿瘤细胞的报道一致^[9]。PI3K/Akt 信号通路会受到干扰,是否会影响炎症因子的表达? 本研究进一步测定了 TNF- α 和 IL-8 的含量,结果发现基因 Ilk 表达被抑制后,上清液中 IL-8 含量几乎没有变化;而 TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.05$)。结果说明,抑制基因 Ilk 的表达,从而抑制了其下游基因 Akt1 的活性,PI3K/Akt 信号通路的下调对 TLR4 信号通路的持续活化有一定的干扰作用,进而抑制 NF- κ B 的活化,最终降低细胞分泌细胞因子 TNF- α 的减少,进而可减轻 LPS 引起小鼠 MECs 炎症反应时对细胞的损伤。然而其为何只影响 TNF- α 的分泌,对 IL-8 分泌没有影响的现象有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 储昭节,周健,惠延年. ILK siRNA 对高浓度葡萄糖诱导的人 LECs 增生和上皮向间质转化的抑制作用[J]. 眼科研究, 2009, 27(5): 353-357.
- [2] 赵勇. ILK-整合素信号传导通路中的关键激酶[J]. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23(6): 366-369.
- [3] 刘璟,陈全,陈炎,等. ILK 对 LPS 诱导肺癌 A549 细胞分泌免疫逃逸相关因子的影响[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(4): 291-295.
- [4] 易琼. 小鼠乳腺上皮细胞的体外培养及其天然免疫功能的探究[D]. 贵阳:贵州大学, 2012.
- [5] Pareek R, Wellnitz O, VanDorp R, et al. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells[J]. J Appl Genet, 2005, 46(2): 171-177.
- [6] 李欣,李中改,张小艺,等. 金英黄归汤对 LPS 介导乳腺上皮细胞 TLR4 信号通路中相关因子的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(3): 609-614.
- [7] 杨航. 小鼠乳腺上皮细胞 TLR4 信号途径的研究[D]. 贵阳:贵州大学, 2013.
- [8] 王晓红. ILK 在 SD 大鼠皮肤烧伤创面愈合过程中的作用[D]. 贵阳:暨南大学, 2014.
- [9] Ho B, Bendeck M P. Integrin linked kinase (Ilk) expression and function in vascular smooth muscle cell[J]. Cell Adh Migr, 2009, 3(2): 174-176.
- [10] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3207-3212.
- [11] 张志辉. TLR4/MyD88 介导的 PI3K/Akt 信号在调节小鼠肝脏糖脂代谢中的作用[D]. 安徽:安徽医科大学, 2013.
- [12] 孙晓杰,林梁,赵玫,等. ILK 与 HSP90 相互作用对乳腺癌细胞迁移影响及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(3): 161-165.

(编辑:侯向辉)