

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 雌性 Wistar 大鼠 (150~200 g)、重组大鼠 IL-11、胎牛血清、DMEM/F12 细胞培养基、II型胶原酶、AG490、PD98059 兔抗大鼠 PMP22、兔抗大鼠 MBP、兔抗大鼠 MPZ、兔抗大鼠 pJAK2、兔抗大鼠 pSTAT3、兔抗大鼠 GAPDH、羊抗兔 HRP、羊抗兔 IgG (Dylight488)、GoScript™ 逆转录试剂盒 (Promega)、GoTaq® qPCR 试剂盒 (Promega)、罗氏 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪等。

1.2 方法

1.2.1 SCs 培养和纯化 大鼠 5 只, 颈椎脱臼处死后取双侧坐骨神经约 1.5 cm, 采用酶消化法培养 SCs^[11]。大致步骤为:解剖显微镜下仔细剥除神经外膜。将神经剪碎, 体积约 1 mm³。加入 II 型胶原酶, 浓度 0.1%, 体积约为神经组织体积 20 倍。在二氧化碳培养箱中充分混合消化 35~45 min 至无明显组织块。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞, 轻轻吹打使细胞充分混匀, 接种于层黏连蛋白包被的 25 cm² 细胞培养瓶中, 密度为 $(3.1 \pm 0.17) \times 10^5$ 个/mL。采用低浓度胶原酶差速消化法提纯 SCs^[12]。大致步骤为:体外培养 48 h 后, 移除未贴壁的细胞及组织碎片, 加入 0.05% II 型胶原酶 (0.1 mL/cm²) 37 °C 消化 35~40 min 后水平轻轻晃动培养瓶使 SCs 与瓶底分离, 收集细胞悬液于 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入含有 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞, 接种于培养瓶中, 密度为 $(1.8 \pm 0.12) \times 10^5$ 个/mL。48 h 后, 重复上述过程, 进行 SCs 第二次纯化。

1.2.2 S100β 染色鉴定 SCs 4%多聚甲醛固定细胞 30 min, 磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 漂洗 3 次, 每次 5 min。加入 0.3% Triton X-100 透膜。加入兔抗大鼠 S100β (1:200), 4 °C 过夜。磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入荧光二抗 (羊抗兔 IgG, 1:300, Dylight488), 室温下避光孵育 2 h, 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min。DAPI 甘油封片。共聚焦显微镜观察及拍照。

1.2.3 Real time RT-qPCR 取纯化后的 SCs, 将其培养基换为含 0.1%FBS 的 DMEM/F12 培养 12 h。随后加入相应浓度的 IL-11 (0、0.5、1.0、1.5 μg/mL) 继续培养 12 h。Trizol 法提取细胞总 mRNA, 利用 GoScript™ 逆转录试剂盒得到 cDNA。采用 GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒和罗氏 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪定量分析目的基因的表达量。相应引物序列为: MBP, F: 5'-AGAGTCCGACGAGCTTCAG A-3', R: 5'-CAGGTACTTGGATCGCTGTG-3'; MPZ,

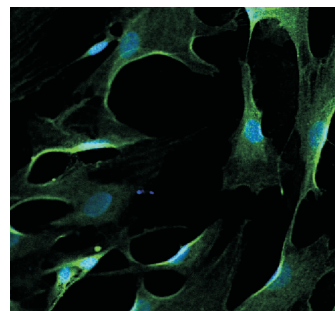
F: 5'-TCTCAGGTCACGCTCTATGTC-3', R: 5'-GCCA GCAGTACCGAATCAG-3'; PMP22, F: 5'-CCCAACT CCCAGCCACCA- TG-3', R: 5'-TCATTTCGCGTTTCC GCAGGATC-3'; gp130 F: GCCCTTGGGAATGTCTCC TCAGAG R: TCTTCCATATG - AGCCGTGCAGACC GAPDH, F: 5'-GTATGTCGTGGAGTCTACTGGCGT-3', R: 5'-TACTCCTTGGAGGCCATGTA- GGCC-3'。各目的基因的表达量由 GAPDH 基因表达量校准, 采用 $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ 法计算各目的基因的相对含量^[13]。

1.2.4 Western blotting 取纯化后的 SCs, 将其培养基换为含 0.1%FBS 的 DMEM/F12 培养 12 h 进行饥饿处理。随后加入相应浓度的 IL-11 于细胞培养基中培养 12 h。在应用信号通路抑制剂的实验中, 分别在加入 IL-11 之前 6 h 和 2 h 用 AG490 和 PD98059 预处理 SCs。用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液裂解细胞。4 °C, 12 000 r/min 离心 20 min 后取上清液, 与上样缓冲液按 5:1 混合后 100 °C 变性 10 min。10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 每空上样 15 μg。电泳完成后, 将凝胶上的蛋白电转至 PVDF 膜上, 加入 5%的脱脂牛奶室温封闭 30 min。随后加入相应的一抗 (兔抗, 工作浓度 1:3000, 4 °C 过夜) 及二抗 (HRP 标记的羊抗兔 IgG, 1:6000, 室温 1 h)。设 GAPDH 内参照, 洗膜后用 ECL 化学发光法检测结果, 采用 Image J 凝胶分析软件分析结果。

1.3 统计学处理 SPSS22.0 统计软件进行数据处理。Real time RT-qPCR 结果和 Western blotting 灰度值均由 GAPDH 校正, 分析结果均以平均值±标准误表示。各组间数据采用独立样本 *t* 检验比较, 差异有统计学意义为 **P*<0.05, ***P*<0.01。NS, 无明显差别。

2 结果

2.1 SCs 的观察和鉴定 体外培养的 SCs 包体呈梭形, 向两端发出双极或三级突起。SCs 特异性标记物 S100β 免疫荧光染色显示, 经过上述培养和纯化



绿色荧光为 S100β, 代表 SCs; DAPI 染细胞核 (蓝色)

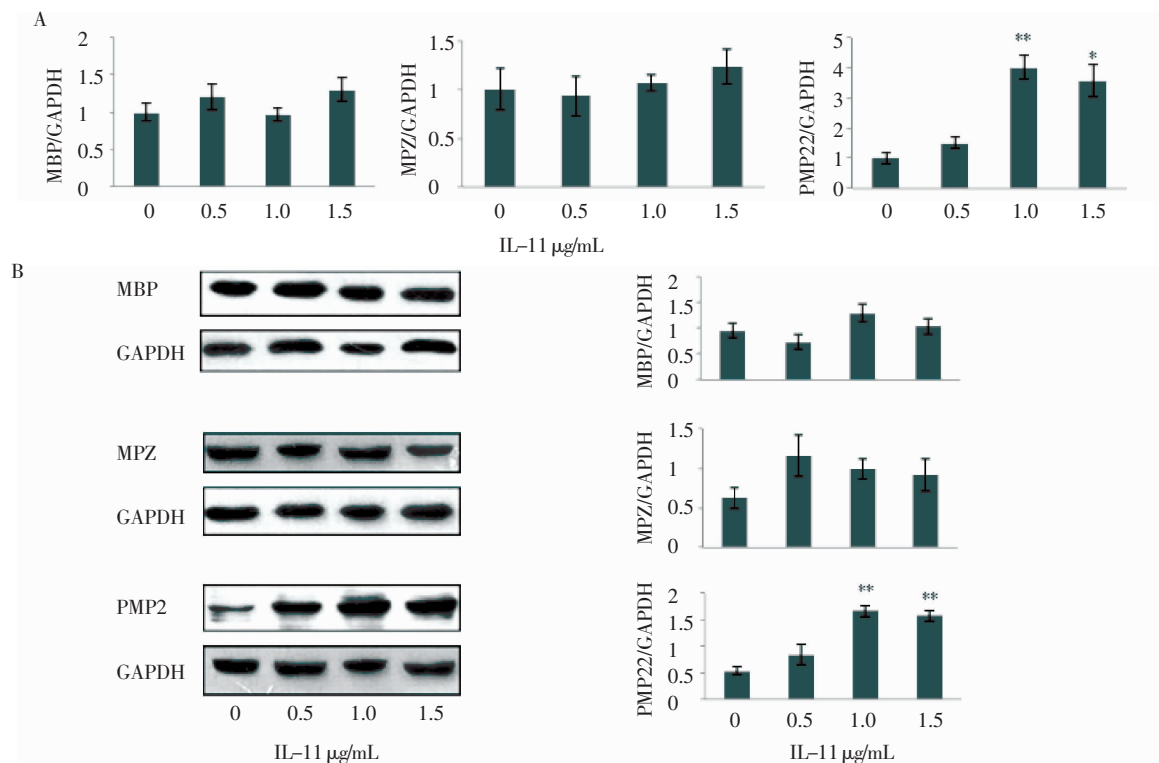
图 1 雪旺细胞 S100β 免疫荧光染色 (×400)

Fig 1 Immunofluorescence staining of Schwann cells cultured from adult rat sciatic nerve (×400)

过程,最终 SCs 的纯度在 95%以上。见图 1。

2.2 IL-11 上调 SCs 中 PMP22 mRNA 含量并促进 PMP22 蛋白表达 在经纯化后得到的 SCs 的培养基中加入不同浓度的 IL-11 (0、0.5、1.0、1.5 $\mu\text{g/mL}$), 12 h 后检测 SCs 中髓鞘碱性蛋白 (MBP)、髓鞘蛋白零 (MPZ)、PMP22 的 mRNA 和蛋白含量变化。Real time RT-qPCR 结果显示与对照组相比经 IL-11 处

理的 SCs 中 MBP 和 MPZ mRNA 的含量并没有明显变化; 但当 IL-11 浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可以观察到 SCs 中 PMP22 mRNA 含量明显提高 ($n=3$, $P=0.002$; $n=3$, $P=0.011$) (图 2A)。Western blotting 结果同样显示当 IL-11 浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, SCs 中 PMP22 蛋白含量显著升高 ($n=3$, $P=0.001$; $n=3$, $P=0.001$) (图 2B)。



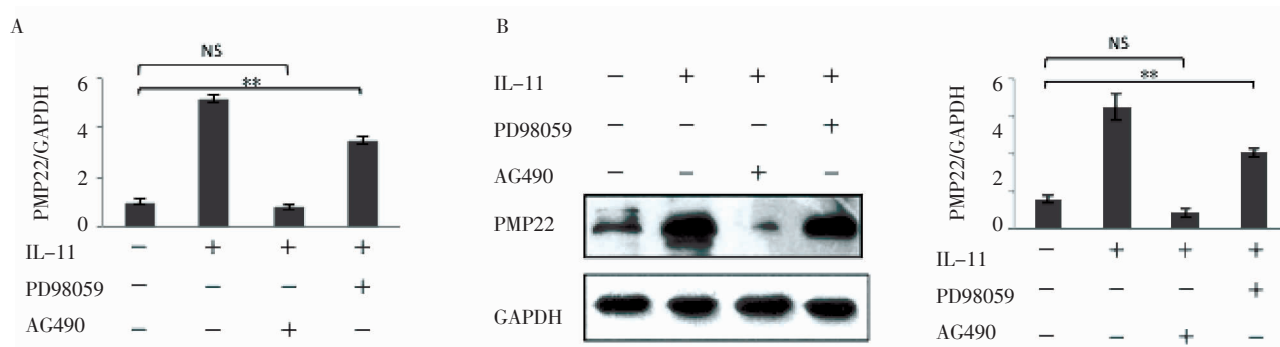
* $P<0.05$, ** $P<0.01$

图2 IL-11 上调 SCs 中 PMP22 的表达水平

Fig 2 IL-11 up-regulated the expression level of PMP22 in SCs

2.3 JAK2/STAT3 通路在 IL-11 促进 SCs 合成 PMP22 过程中的重要作用 本研究中分别用 JAK 抑制剂 AG490 (50 μmol , 6 h) 和 MAPKK 抑制剂 PD98059 (25 μmol , 2 h) 预处理 SCs, 随后再向培养基中加入 IL-11 (1.0 $\mu\text{g/mL}$, 12 h)。观察 SCs 中 PMP22 的表达情况。结果见图 3A, Real time RT-qPCR 结果

提示: PD98059 并没有抑制 IL-11 对 SCs 中 PMP22 表达的促进作用, 而在经 AG490 预处理的 SCs 中, IL-11 对 PMP22 表达的促进作用被显著抑制 ($n=3$, $P=0.005$); Western blotting (图 3B) 结果进一步证实 AG490 可有效抑制 IL-11 对 PMP22 表达的促进作用 ($n=3$, $P=0.007$)。



A. Real time RT-qPCR 分析结果; B. Western blot 分析结果。 ** $P<0.01$, NS, 无显著差别

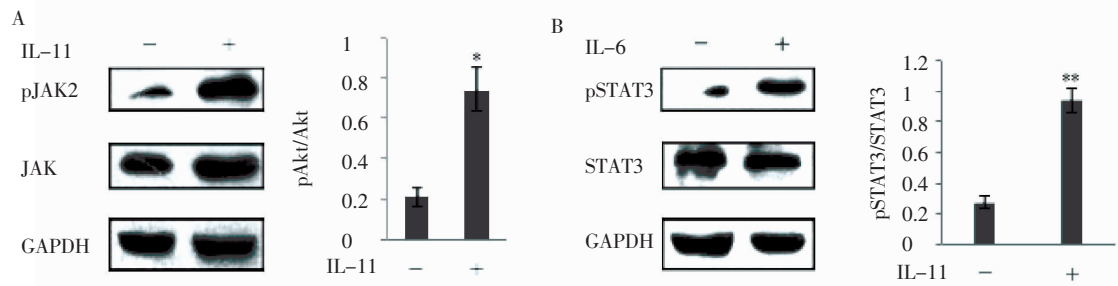
图3 JAK2 特异性抑制剂 (AG490) 和 MAPKK 特异性抑制剂 (PD98059) 对 IL-11 促进 SCs 中 PMP22 表达的影响

Fig 3 Effects of JAK2 and MAPK inhibitors on IL-11 induced PMP22 expression

为进一步证实上述结果,本研究检测了 IL-11 处理过的 SCs 中 pJAK2(Y1007+Y1008)和 pSTAT3(Y705)含量的变化。Western blotting 结果显示与对照组相比经过 IL-11 (1.0 $\mu\text{g/mL}$, 12 h) 处理的 SCs 中 pJAK2 和 pSTAT3 含量明显提高 ($n=3, P=0.011; n=3, P=0.002$), 而总 JAK2 和 STAT3 含量则无明显变化 (图 4)。提示 IL-11 可以通过激活 SCs 胞中 JAK2/STAT3 通路促进 PMP22 的合成。

2.4 gp130 在 IL-11 促进 SCs 中 PMP22 表达的作

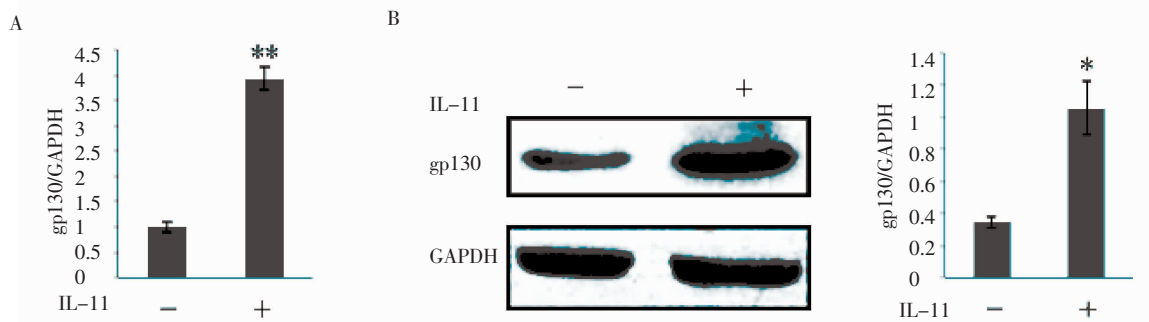
用 为了进一步验证 IL-11 是否也是通过结合 gp130 来激活 JAK2/STAT3 信号通路以增强 SCs 中 PMP22 的合成, 本研究通过 Real time RT-qPCR 和 Western blotting 的方法检测经过 IL-11 处理的 SCs 中 gp130 的表达变化。Real time RT-qPCR 结果(A) 和 Western blotting 分析结果(B)均显示在经过 IL-11 处理的 SCs 中 gp130 的表达量呈现明显提高($n=3, P=0.001; n=3, P=0.020$)(图 5)。结果提示, IL-11 可通过结合 gp130 以激活 JAK2/STAT3 信号通路促进 SCs 中 PMP22 的表达。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 经 IL-11 处理后, SCs 中 JAK2 和 STAT3 磷酸化情况

Fig 4 Levels of JAK2 and STAT3 phosphorylation examined by Western blotting analysis



A. Real time RT-qPCR 分析结果; B. Western blotting 分析结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 5 经 IL-11 处理后 SCs 中 gp130 的表达情况

Fig 5 The expressional level of gp130 in SCs treated with IL-11

3 讨论

本研究证实, IL-11 可以显著提高 SCs 中 PMP22 的表达而对 MBP 和 MPZ 的表达无明显作用。在非神经组织中, IL-11 主要通过 JAK2/STAT3 通路和 RAS/MAPK 通路发挥作用^[14-15]。本研究发现 IL-11 对 SCs 中 PMP22 表达的促进作用可被 JAK 特异性抑制剂 AG490 所抑制, 并且在经过 IL-11 处理的 SCs 细胞中 pJAK2(Y1007+Y1008)和 pSTAT3(Y705) 含量明显高于对照组。上述实验结果表明 IL-11 可通过激活 JAK2/STAT3 通路上调 SCs 中 PMP22 的表达, 但 IL-11 是如何激活 JAK2/STAT3 信号的具体机制仍不明确。近来有研究表明 IL-6 家族(包括白血病抑制因子、IL-6、IL-11、抑瘤素 M、睫状神经生长因子等) 可通过结合其共同受体 gp130

激活 JAK/STAT 通路以促进视网膜神经节细胞轴突生长^[16]。本实验结果显示经过 IL-11 处理的 SCs 中 gp130 表达明显上调。因此我们认为 IL-11 可通过结合 gp130 激活 JAK2/STAT3 信号通路以促进 SCs 中 PMP22 的表达。

PMP22 是一种由 SCs 分泌的糖蛋白四聚体, 是构成外周神经髓鞘的重要组成部分。尽管 PMP22 在髓鞘中含量丰富, 但其生理作用尚未完全阐明。作为髓鞘形成过程中的重要部分, 小鼠出生后和神经再生的过程中 PMP22 含量会明显上调^[17]。研究显示 PMP22 基因缺陷与许多遗传性神经系统病变有关, 如腓骨肌萎缩症 1A 型、遗传性压力敏感性周围神经病变等^[18]。Amici 等^[19]研究发现 PMP22 可与整合 $\alpha 6 \beta 4$ 、层粘连蛋白形成复合体参与 SCs 与细胞外

基质的相互作用,敲除 IL-11 受体 gp130 基因也将导致小鼠外周神经髓鞘退化^[10]。结合以上实验结果可得出 IL-11 很有可能通过 gp130/JAK2/STAT3 信号通路调节 SCs 中 PMP22 的表达进而形成和稳定外周神经髓鞘。

早期研究证实 cAMP 和 microRNA-29a 分别可以在转录层面和转录后层面调节 PMP22 的表达^[20]。但这两种调节过程与本实验结果之间的关系仍有待进一步研究。坐骨神经横断后,背根神经节中 IL-11 mRNA 和 IL-1 的含量在 1 d 之内快速升高,在随后的 1~2 周内逐渐降低^[8,21];Sheu 等^[22]发现在神经断端的近端和远端 STAT3 的磷酸化作用也在 1 d 之内达到峰值,并且持续时间超过 2 周;而 PMP22 mRNA 含量在神经损伤后则迅速下降,1 周后逐渐上升^[23]。因此 IL-11 可能是通过 gp130/JAK2/STAT3 信号通路参与 PMP22 在外周神经损伤后期表达的上调,但关于外周神经损伤后 PMP22 表达迅速下降的机制尚不明确。关于 IL-11 和 gp130/JAK2/STAT3 信号通路在外周神经再生中的具体作用仍有待进一步研究。

综上所述,本研究证实 IL-11 可通过 gp130/JAK2/STAT3 信号通路调节 SCs 中 PMP22 的表达。如果该通路在生物体内的髓鞘形成过程中也具有重要作用,则可将 gp130 作为药物靶点^[24],研制新型药物调控 gp130 的信号以提高治疗外周神经髓鞘病变的效果。同样,在 SCs 移植修复神经损伤的治疗中,也可将 gp130/JAK2/STAT3 作为关键通路,以调控髓鞘的形成。

参考文献:

- [1] Nave K A. Myelination and support of axonal integrity by glia[J]. *Nature*, 2010, 468(7321):244
- [2] Nave K A, Sereda M W, Ehrenreich H. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies -from basic to clinical research[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007,3(8):453
- [3] Stassart R M, Fledrich R, Velanac V, et al. A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(1):48
- [4] Chen Z L, Yu W M, Strickland S. Peripheral regeneration[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2007, 30:209
- [5] Richner M, Ulrichsen M, Elmagaard S L, et al. Peripheral nerve injury modulates neurotrophin signaling in the peripheral and central nervous system[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(3):945
- [6] Elsaedi F, Bembem M A, Zhao X F, et al. Jak/Stat signaling stimulates zebrafish optic nerve regeneration and overcomes the inhibitory actions of Socs3 and Sfpq[J]. *J Neurosci*, 2014,34(7):2632
- [7] Uceyler N, Riediger N, Kafke W, et al. Differential gene expression of cytokines and neurotrophic factors in nerve and skin of patients with peripheral neuropathies[J]. *J Neurol*, 2015,262(1):203
- [8] Ito Y, Yamamoto M, Li M, et al. Temporal expression of mRNAs for neurotrophic cytokines, interleukin-11(IL-11), oncostatin M (OSM), cardiotrophin-1 (CT-1) and their receptors (IL-11Ralpha and OSMRbeta) in peripheral nerve injury[J]. *Neurochem Res*, 2000, 25(8):1113
- [9] Ozaki A, Nagai A, Lee Y B, et al. Expression of cytokines and cytokine receptors in human Schwann cells[J]. *Neuroreport*, 2008,19(1):31
- [10] Steelman A J, Zhou Y, Koito H, et al. Activation of oligodendroglial Stat3 is required for efficient remyelination[J]. *Neurobiol Dis*, 2016,91:336
- [11] Tao Y. Isolation and culture of Schwann cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2013,1018:93
- [12] Jin Y Q, Liu W, Hong T H, et al. Efficient schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment[J]. *J Neurosci Methods*, 2008,170(1):140
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method[J]. *Methods*, 2001,25(4):402
- [14] Ernst M, Thiem S, Nguyen P M, et al. Epithelial gp130/Stat3 functions: an intestinal signaling node in health and disease [J]. *Semin Immunol*, 2014,26(1):29
- [15] Winship A L, Van Sinderen M, Donoghue J, et al. Targeting interleukin-11 receptor- α impairs human endometrial Cancer cell proliferation and invasion in vitro and reduces tumor growth and metastasis in vivo[J]. *Mol Cancer Ther*, 2016,15(4):720
- [16] Pernet V, Joly S, Dalkara D, et al. Long-distance axonal regeneration induced by CNTF gene transfer is impaired by axonal misguidance in the injured adult optic nerve[J]. *Neurobiol Dis*, 2013,51:202
- [17] Notterpek L, Snipes G J, Shooter E M. Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination[J]. *Glia*, 1999,25(4):358
- [18] vanPaassen B W, van der Kooi A J, van Spaendonck-Zwarts K Y, et al. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2014,9:38
- [19] Amici S A, Dunn W A, Murphy A J, et al. Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina[J]. *J Neurosci*, 2006,26(4):1179
- [20] Verrier J D, Lau P, Hudson L, et al. Peripheral myelin protein 22 is regulated post-transcriptionally by miRNA-29a[J]. *Glia*, 2009, 57(12): 1265
- [21] Saab C Y, Shamaa F, El Sabban M E, et al. Transient increase in cytokines and nerve growth factor in the rat dorsal root ganglia after nerve lesion and peripheral inflammation[J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 208 (1/2):94
- [22] Sheu J Y, Kulhanek D J, Eckenstein F P. Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat[J]. *Exp Neurol*, 2000, 166(2):392
- [23] Jung J, Coe H, Michalak M. Specialization of endoplasmic reticulum chaperones for the folding and function of myelin glycoproteins P0 and PMP22[J]. *FASEB J*, 2011,25(11):3929
- [24] Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects [J]. *Br J Pharmacol*, 2008,153(Suppl 1):S414

(2016-05-11 收稿)