

内质网应激与非折叠蛋白反应激活对骨骼肌纤维免疫行为的调控作用

黄静雯¹ 张任飞² 菅晓婷¹ 廖钊宏¹ 蓝海强¹
黄涛¹ 胡稷杰^{3*} 廖华^{1*}

(1. 南方医科大学基础医学院人体解剖学教研室, 广州 510515;
2. 绵阳市第三人民医院检验科, 四川 绵阳 612000;
3. 南方医科大学南方医院创伤骨科, 广州 510515)

[摘要] **目的** 探讨干扰素- γ (IFN- γ) 诱导的炎症环境中, 骨骼肌纤维内质网应激 (ERS) 与非折叠蛋白反应 (UPR) 的激活对肌纤维免疫行为的调控作用。**方法** 体外培养的 C57BL/6 小鼠原代成肌干细胞, 经马血清分化成多核肌管后分成以下 10 组: 1. 对照组; 2. IFN- γ 组; 3. 衣霉素 (TM) 组; 4. 毒胡萝卜素 (TG) 组; 5. IFN- γ +4-苯基丁酸 (4-PBA) 联合处理组; 6. IFN- γ +TG+4-PBA 联合处理组; 7. IFN- γ +4 μ 8c 联合处理组; 8. IFN- γ +TG+4 μ 8c 联合处理组; 9. IFN- γ +GSK2606414 联合处理组; 10. IFN- γ +TG+GSK2606414 联合处理组, 并进行对应的处理。利用 Real-time PCR 检测相关肌细胞因子基因水平; 免疫荧光观察 UPR 关键分子: 真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α)、肌醇需要酶 1 α (IRE1 α)、转录激活因子 6 (ATF6) 在肌纤维内的表达; Western blotting 检测肌细胞相关免疫分子和肌细胞因子及 UPR 关键分子; Luminex 分析肌纤维内促炎症的肌细胞因子的蛋白水平。**结果** IFN- γ 诱导的炎症环境中, 肌纤维 H-2K^b、H2-Ea、Toll 样受体 3 (TLR3) 以及 p-eIF2 α 、p-IRE1 α 表达上调; 添加 UPR 抑制剂 4-PBA 的分组肌纤维 H-2K^b、H2-Ea、TLR3 以及肌细胞因子的表达较 IFN- γ 组下调, 添加 IRE1 α 特异性抑制剂 4 μ 8c 的分组上述分子表达较 IFN- γ 组亦下调, 而添加蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 特异性抑制剂 GSK2606414 的分组则无明显变化。**结论** IFN- γ 诱导的炎症环境中, UPR-IRE1 α 通路激活并抑制肌纤维免疫相关分子合成, 从而进一步抑制肌纤维介导的免疫反应, 有利于肌再生。

[关键词] 肌纤维; 内质网应激; 非折叠蛋白反应; 肌醇需要酶 1 α ; 原代细胞培养; 免疫印迹法; 小鼠

[中图分类号] R685.4 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2022.06.006

Regulation effect of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response activation on skeletal muscle fiber immune behavior

HUANG Jing-wen¹, ZHANG Ren-fei², JIAN Xiao-ting¹, LIAO Zhao-hong¹, LAN Hai-qiang¹,
HUANG Tao¹, HU Ji-jie^{3*}, LIAO Hua^{1*}

(1. Department of Human Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2. Laboratory Department, Mianyang Third People's Hospital, Sichuan Mianyang 621002, China;
3. Department of Orthopaedics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effects of activated endoplasmic reticulum stress (ERS) and unfolded protein response (UPR) on the immune behavior of the stressed muscle fibers in inflammatory environments induced by interferon- γ (IFN- γ). **Methods** The myogenic precursor cells (MPCs) of C57 BL/6 mice cultured *in vitro* were differentiated into multinucleated myogenic tubes by horse serum and then to set up: 1. Control group; 2. IFN- γ group; 3. Tunicamycin group; 4. Thapsigargin group; 5. IFN- γ and 4-phenylbutyrate (4-PBA) combined treatment group; 6. IFN- γ , TG and 4-PBA combined treatment group; 7. IFN- γ and 4 μ 8c combined treatment group; 8. IFN- γ , TG and

[收稿日期] 2021-03-15 **[修回日期]** 2021-11-18

[基金项目] 国家自然科学基金 (81572102); 广东省自然科学基金 (2019A1515011305); 广州市科技计划项目 (202002030497); 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515010010)

[作者简介] 黄静雯 (1997—), 女 (汉族), 安徽省宣城市人, 在读硕士研究生。

* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

E-mail: hua-liao@163.com Tel: (020) 62789092

E-mail: hjj0610@163.com Tel: (020) 62789092

4 μ 8c combined treatment group; 9. IFN- γ and GSK2606414 combined treatment group; 10. IFN- γ , TG and GSK2606414 combined treatment group. The level of myokines gene was detected by Real-time PCR. The expression of UPR key molecules including eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α), inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α) and activating transcription factor 6 (ATF6) in muscle fibers was observed by immunofluorescence. Western blotting was used to detect immune molecules related to muscle cells, myokines and key molecules of UPR. Luminex analyzed the levels of pro-inflammatory myokines in muscle fibers. **Results** The expression of H-2K^b, H2-Ea, Toll like receptor 3 (TLR3), p-eIF2 α and p-IRE1 α were up-regulated in IFN- γ induced inflammatory environment. The expression of H-2K^b, H2-Ea, TLR3 and myokines in the group with UPR inhibitor 4-PBA was down-regulated compared with IFN- γ group, and the expression of these molecules in the group with IRE1 α specific inhibitor 4 μ 8c was down-regulated compared with the IFN- γ group. The addition of protein kinase R-like endoplasmic reticulum (PERK) specific inhibitor GSK2606414 showed no significant change. **Conclusion** In IFN- γ induced inflammatory environment, the UPR-IRE1 α pathway activates and inhibits the synthesis of muscle fiber immune-related molecules, which further inhibits the muscle fiber mediated immune response and facilitates muscle regeneration.

[**Key words**] Muscle fiber; Endoplasmic reticulum stress; Unfolded protein response; Inositol requiring enzyme 1 α ; Primary cell culture; Western blotting; Mouse

外源或内源性应激会导致细胞内质网错误折叠蛋白聚集,诱发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER Stress, ERS),为消除细胞应激,恢复内质网稳态,非折叠蛋白反应(unfolded protein responses, UPR)迅速启动^[1]。研究发现,UPR 的功能多样,除传统认知的功能外,既与先天免疫和抗原呈递^[2]等功能相关,又被认为参与骨骼肌的修复再生过程,并调节肌肉的重塑^[3,4]。但在骨骼肌修复的前一阶段——炎症期,肌纤维内源 UPR 是否调节炎症进展进而影响其修复尚缺乏相关研究。因此,本实验通过体外实验分析干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 诱导的持续促炎状态是否激活肌纤维内源 ERS,筛选显著性变化的 UPR 反应信号通路,并探讨活化的 UPR 通路对肌纤维免疫行为的调控,从控制骨骼肌炎症的角度探索促进损伤骨骼肌修复和再生的新的治疗思路。

材料和方法

1. 小鼠原代成肌细胞的培养、分化及分组处理

1.1 小鼠原代成肌细胞的提取、培养和分化:参照以往文献^[5],取 C57BL/6 乳鼠[2~5 d 龄,购自南方医科大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK (粤)2016-0041],使用无菌器械摘取小鼠四肢骨骼肌,消化过滤并接种细胞。利用差贴技术去除杂细胞,从而获取原代小鼠成肌干细胞(myogenic precursor cells, MPCs),37℃、5%CO₂ 培养 24 h,为诱导细胞分化为多核肌管,于 DMEM 中添加 2% 马血清,继续培养 72 h。

为鉴别提取的原代细胞是否为 MPCs,参考相关文献^[6],使用兔抗配对盒蛋白 7 (paired box 7, Pax7) 多克隆抗体(1:200, Abcam 公司, ab187339) 孵育培养 24 h 的原代细胞爬片;为鉴定 MPCs 的分

化情况^[7],使用兔抗肌细胞生成素(myogenin) 多克隆抗体(1:500, Santa Cruz 公司, sc-576)、兔抗肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MyHC) 多克隆抗体(1:500, Bioss, bs-10904R) 孵育添加 2% 马血清分化培养 72 h 的细胞爬片。

1.2 实验分组和处理:为检测 IFN- γ 诱导肌纤维上调免疫分子表达、肌细胞因子释放以及 UPR 启动情况,将细胞分组并给予相应处理后继续培养 24 h 和 48 h。分组与处理如表 1 所示。其中衣霉素(tunicamycin, TM)、毒胡萝卜(thapsigargin, TG) 为 ERS 的激动剂;4-苯基丁酸(4-phenylbutyrate, 4-PBA) 为 UPR 抑制剂;4 μ 8c 为肌醇需求因子(inositol-requiring enzyme 1 alpha, IRE1 α) 抑制剂;GSK2606414 为蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 抑制剂。

2. 免疫荧光检测 UPR 启动情况

将各组细胞经 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗后采用 2% BSA 室温封闭 30 min。为检测 UPR 启动情况,使用 IRE1 α 多克隆抗体(1:500, Novus 公司, NB100-2324SS); 兔抗磷酸化真核起始因子 2 α (phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α , p-eIF2 α) (phospho Ser51) 多克隆抗体(1:200, Abcam 公司, ab32157); 鼠抗活性转录因子(activating transcription factor 6, ATF6) 单克隆抗体(5 g/L, Novus 公司, NBP1-40256SS) 孵育对照组、IFN- γ 组、TM 以及 TG 组的细胞爬片,4℃ 孵育过夜。室温避光孵育荧光二抗: Cy3 标记山羊抗兔 IgG (1:500, 上海碧云天生物技术有限公司, A0516), Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG (1:500, 上海碧云天生物技术有限公司, A0428) 以及 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (1:500, 上海碧云天生物技术有限公司, A0568)];Olympus BX51 荧光显微镜观察。

表 1 分组与处理
Table 1 Group and treatment

分组 groups	处理 treatment
对照组 (control group)	不做任何处理 (untreated)
干扰素- γ 组 interferon- γ (IFN- γ) group	IFN- γ (60 mg/L, R&D, 485-MI-100)
衣霉素组 tunicamycin (TM) group	TM (1 g/L, Santa Cruz, 11089-65-9)
毒胡萝卜素组 thapsigargin (TG) group	TG (0.2 mmol/L, Santa Cruz, 67526-95-8)
IFN- γ +4-PBA 联合处理组 IFN- γ and 4-PBA combined treatment group	IFN- γ , 4-PBA (10 mmol/L, Selleck, S3592)
IFN- γ +TG+4-PBA 联合处理组 IFN- γ , TG and 4-PBA combined treatment group	IFN- γ , TG, 4-PBA
IFN- γ +4 μ 8c 联合处理组 IFN- γ and 4 μ 8c combined treatment group	IFN- γ , 4 μ 8c (50 mmol/L, Selleck, S7272)
IFN- γ +TG+4 μ 8c 联合处理组 IFN- γ , TG and 4 μ 8c combined treatment group	IFN- γ , TG, 4 μ 8c
IFN- γ +GSK2606414 联合处理组 IFN- γ and GSK2606414 combined treatment group	IFN- γ , GSK2606414 (1 mmol/L, Selleck, S7307)
IFN- γ +TG+GSK2606414 联合处理组 IFN- γ , TG and GSK2606414 combined treatment group	IFN- γ , TG, GSK2606414

3. Western blotting 检测免疫分子表达及 UPR 的启动

提取各组细胞总蛋白,将总蛋白与上样缓冲液按比例混合,100 ℃ 加热 5 min。采用 BCA 法测定总蛋白浓度,调整样品蛋白浓度至 5 g/L 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,120V 电泳直至目的蛋白分离,90V 将蛋白转移到 PVDF 膜,2%BSA 封闭后使用:小鼠抗 Toll 样受体 3 (Toll-like receptors 3, TLR3) 单克隆抗体 (1:1000, Novus 公司, NBP2-24875), 兔抗主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC I) 多克隆抗体 (H-2K^b, 1:1000, Abcam 公司, ab93364), 小鼠抗主要组织相容性复合体 II (major histocompatibility complex II, MHC II) (H2-Ea, 1:400, Santa Cruz 公司, sc-32247), 兔抗 IRE1 α 多克隆抗体 (1:2000, Novus 公司, NB100-2324SS), 兔抗 p-eIF2 α (phospho Ser51) 多克隆抗体 (1:500, Abcam 公司, ab32157), 小鼠抗 eIF2 α 单克隆抗体 (1:1000, Abcam 公司, ab5369), 小鼠抗 ATF6 单克隆抗体 (5 g/L, Novus 公司, NBP1-40256SS), 兔抗 GAPDH 单克隆抗体 (1:5000, 杭州弗德生物科技有限公司, FD0063) 4 ℃ 孵育过夜。TBST 漂洗后采用 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5000, 北京索莱宝生物科技有限公司, SE134)、羊抗小鼠 IgG (1:2000, 北京索莱宝生物科技有限公司, SE131) 二抗室温孵育 2 h, 使用增强化学发光 (ECL) 检测试剂 (Applygen Technological 公司) 观察蛋白条带, Image J v1.42 软件分析灰度值, 与 GAPDH 比较计算相对表达量。

4. Luminex 检测肌细胞因子的分泌

对照组和干扰素处理组培养分化的肌纤维

24 h/48 h 后,弃去培养基,添加无血清的基础培养基继续培养 12 h, 收集上清, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清。采用 Luminex xMap technology with Bio-Rad Bio-Plex 200 apparatus (Bio-Rad Laboratories 公司, H-Wayen, China) 分析细胞因子, 上机检测荧光强度, 计算与优化。检测内容包括嗜酸粒细胞趋化因子 (eotaxin)、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10)、IL-12 (p40)、IL-12 (p70)、IL-17A、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、巨噬细胞炎症蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α)、巨噬细胞炎症蛋白 1 β (macrophage inflammatory protein 1 β , MIP-1 β)、正常 T 细胞分泌的活性调节蛋白 (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, RANTES) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)。

5. Real-time PCR 检测肌细胞因子的表达

采用 Trizol 试剂提取各组总 RNA。反转录后进行 Real-time PCR, 以 GAPDH 为内参照基因, 分别检测 IL-1 β 、IL-6、MCP-1、MIP-1 α 等目的基因。内参及引物序列如表 2 所示。

6. 统计学分析

使用统计学软件 SPSS 20.0 分析实验数据, 计量资料采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析 (One-Way ANOVA) 以及独立样本 *t* 检验, *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

表 2 PCR 引物
Table 2 PCR Primers

基因 genes	引物序列(5'→3') primer sequence(5'→3')
IL-1β	正义引物(sense primer): CACCTTTTGACAGTGATGAG 反义引物(anti-sense primer): CACAATGAGTGATACTGCCT
IL-6	正义引物(sense primer): GGTCTTCTGGAGTACCATAG 反义引物(anti-sense primer): AGCTTATCTGTTAGGAGAGC
MCP-1	正义引物(sense primer): AAGCTGTAGTTTTGTCACC 反义引物(anti-sense primer): AATGTATGTCTGGACCCATT
MIP-1α	正义引物(sense primer): CTGCCCTTGCTGTTCTTC 反义引物(anti-sense primer): CAAAGCGTCTGGTTTCA
GAPDH	正义引物(sense primer): CTCTGCTCCTCCCTGTTC 反义引物(anti-sense primer): CAATCTCCACTTGCCACT

结 果

1. 原代成肌干细胞以及分化肌管的鉴定

提取的原代小鼠成肌干细胞(MPCs),培养 24 h 后镜下可观察到梭型贴壁细胞(图 1A),免疫荧光显示,大部分细胞 Pax7 表达阳性,提示提取的细胞是具有成肌特性的 MPCs(图 1B),继续培养 72 h 后,光学显微镜下可观察到细而长的多核肌管的出现(图 1C),经免疫荧光标记成肌细胞分化标志物肌球蛋白重链(MyHC)、肌细胞生成素(myogenin)可见分化形成的肌管(图 1D, 1E)。

2. IFN-γ 诱导肌纤维上调免疫分子表达和肌细胞因子释放

与对照组相比,IFN-γ 组肌细胞内 MHC I 分子

H-2K^b、MHC II 分子 H2-Ea 及 TLR3 蛋白水平显著上调(图 2A, 2B), IL-1、IL-6、MCP-1、RANTES、MIP-1α、MIP-1β 等一系列促炎的肌细胞因子蛋白水平显著上调(图 3)。

3. IFN-γ 激活肌纤维 ERS,上调 UPR 信号

与对照组相比,IFN-γ 组细胞内 eIF2α、IRE1α 蛋白磷酸化水平显著上调,但 ATF6 蛋白表达无显著变化(图 4A, 4C, 图 5); TM 组和 TG 组的 p-eIF2α、p-IRE1α 蛋白水平均显著上调,其中 TG 组的 ATF6 蛋白水平也有着显著上调,因此,后续实验中使用 TG 作为内质网应激激动剂处理细胞(图 4B, 4D, 5)。

4. 内源性 UPR-IRE1α 信号通路干预肌细胞免疫功能

与对照组相比,IFN-γ 组和 IFN-γ、TG 联合处理组的肌纤维内 p-eIF2α、p-IRE1α 蛋白水平均上调,

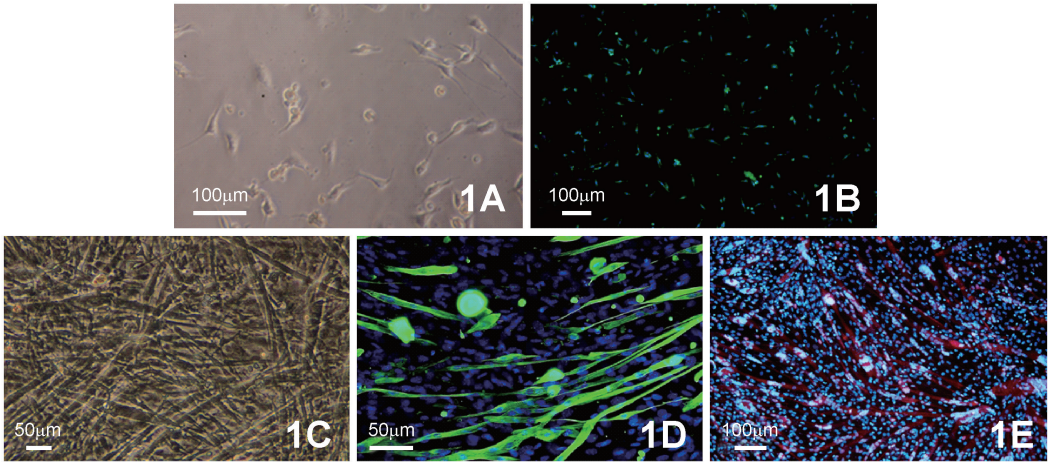


图 1 成肌干细胞 Pax7 及肌管 MyHC、肌细胞生成素的表达情况
A.倒置显微镜下,成肌干细胞形态学变化,标尺为 100μm; B.免疫荧光染色,绿色标记 Pax7,阳性细胞为成肌干细胞,标尺示 100 μm; C.倒置显微镜下,已分化肌管的形态学变化,标尺示 50 μm; D、E. 免疫荧光分别标记成肌细胞分化相关分子(MyHC、myogenin),阳性细胞即为分化肌管; D. 标尺示 50μm; E. 标尺示 100μm

Fig.1 Expression of Pax7 in myogenic precursor cells and MyHC and myogenin in myotubes
A, Under inverted microscope, morphological change of undifferentiated muscle stem cells, Bar=100 μm; B, Immunofluorescent staining, green labeled Pax7, positive cells were myoblast stem cells, Bar=100 μm; C, Under inverted microscope, morphological change of differentiated myotube, Bar=50 μm; D and E, Immunofluorescence labeled myoblast differentiation related molecules (MyHC and myogenin), and the positive cells were differentiated myotubes, Bar=50 μm in D and Bar=100 μm in E

并且 IFN- γ 、TG 联合处理组的作用更加显著(图 6A,6B);在上述两组基础上添加 UPR 抑制剂 4-苯基丁酸(4-phenylbutyrate, 4-PBA)(即 IFN- γ 、4 μ 8c 联合处理组以及 IFN- γ 、TG、4 μ 8c 联合处理组),上述蛋白水平的上调趋势被矫正(图 6A,6B)。同时,检测肌纤维免疫相关分子发现,IFN- γ 组较对照组,肌纤维内 H-2K^b、H2-Ea 及 TLR3 的表达上调,然而 IFN- γ 、TG 联合处理组的蛋白表达水平较 IFN- γ 组明显下调(图 6A,6B);在上述两组基础上添加 4-PBA, H-2K^b、H2-Ea 及 TLR3 蛋白的下调趋势被完全矫正(图 6A,6B)。此外,与 IFN- γ 组相比,IFN- γ 、TG 联合处理组上述分子基因水平下调,IFN- γ 、4-PBA 联合处理组以及 IFN- γ 、TG、4-PBA 联合处理组均有明显上调(图 7)。

内质网跨膜蛋白肌醇需求酶 1(inositol requiring enzyme 1, IRE1)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)和活化转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)介导 3 条经典的 UPR 通路,为判断 UPR 反应抑制肌纤维免疫行为是经由 UPR-PERK/

eIF2 α , 还是 UPR-IRE1 α 通路,我们进一步采用 IRE1 α 抑制剂 4 μ 8c、PERK 抑制剂 GSK2606414 分别阻断 UPR-IRE1 α 及 UPR-PERK/eIF2 α 通路。与 IFN- γ 组相比,IFN- γ 、4 μ 8c 联合处理组肌纤维内 H-2K^b、H2-Ea 及 TLR3 蛋白水平显著上调(图 8A, 8C)。然而,IFN- γ 、GSK2606414 联合处理组以及 IFN- γ 、TG、GSK2606414 联合处理组的上述蛋白表达水平与 IFN- γ 处理组相比,不具有统计学差异(图 8B,8D)。

讨 论

1. 内源性 UPR-IRE1 α 信号通路激活抑制肌细胞免疫行为

我们前期研究证实,胫骨前肌局部注射心肌毒素(cardiotoxin, CTX),可诱导损伤骨骼肌肌组织内 eIF2 α 及 IRE1 α 激活。为探讨肌纤维内 eIF2 α 及 IRE1 α 激活及其作用,本实验采用体外培养成肌干细胞进行进一步研究。实验发现,在 IFN- γ 诱导的炎症环境下,肌细胞会表达一系列的肌细胞因子以及包括 MHC I、MHC II 和 TLR3 在内的免疫分子,这

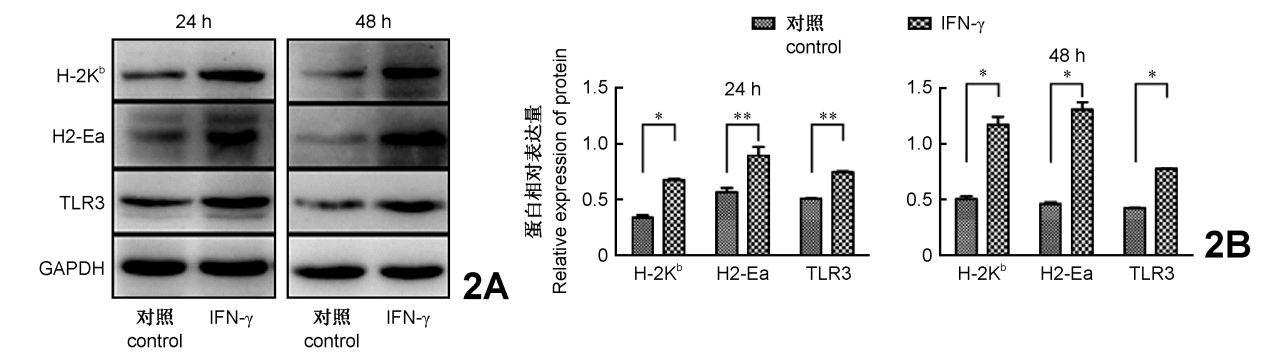


图2 IFN- γ 诱导的炎症环境中肌纤维免疫分子 H-2K^b、H2-Ea 及 TLR3 蛋白的表达
A. Western blotting 检测肌纤维免疫分子 H-2K^b、H2-Ea 及 TLR3 蛋白的表达;B.统计图,蛋白质的相对表达量以目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值表示; ** $P<0.01$, * $P<0.05$
Fig.2 Expression of immune molecules H-2K^b, H2-Ea and TLR3 in the environment of inflammation induced by IFN- γ
A, Western blotting detected the expression of immune molecules H-2K^b, H2-Ea and TLR3; B, Statistical graph, the relative protein expression level was expressed as gray value of target protein/GAPDH; ** $P<0.01$, * $P<0.05$

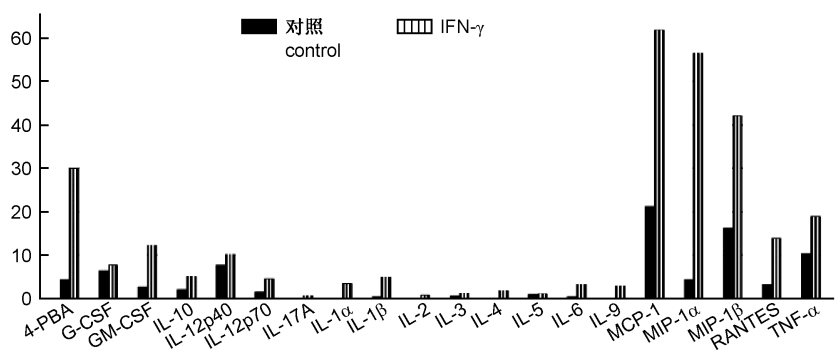


图3 IFN- γ 诱导的炎症环境中肌细胞因子的表达
Fig.3 Expression of myokines in the environment of inflammation induced by IFN- γ

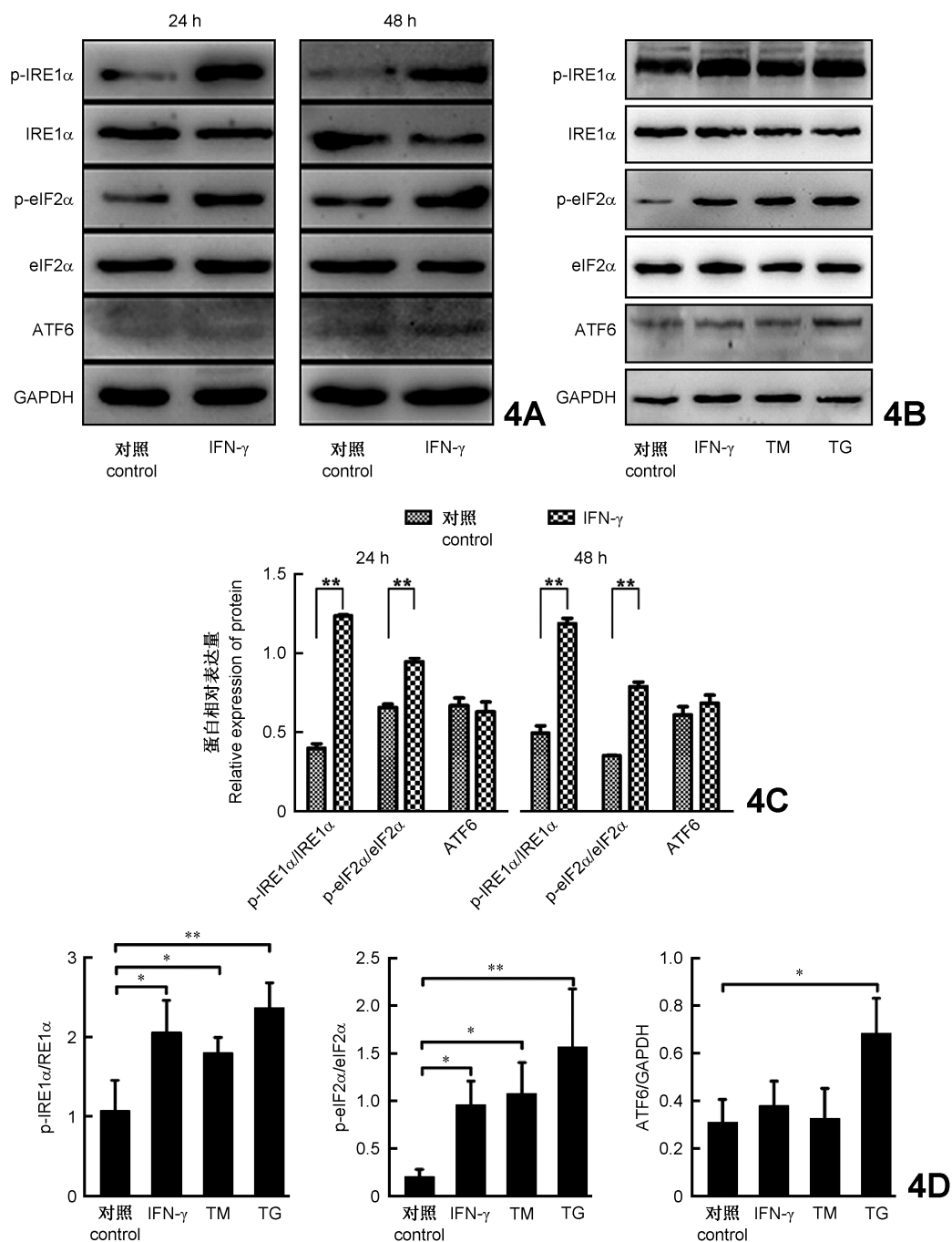


图 4 IFN- γ 诱导的炎症环境中,肌纤维 ERS 激活,并上调 UPR-IRE1 α 、UPR-PERK/p-eIF2 α 轴信号
A. Western blotting 检测促炎刺激诱导肌纤维 ERS 及 UPR 激活;B. Western blotting 检测显示 ERS 诱导剂 TM 或 TG 进一步上调细胞内 p-eIF2 α 、p-IRE1 α 和 ATF6 蛋白表达;C.图 A 的统计图,蛋白质的相对表达量以目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值或磷酸化目的蛋白灰度值/未磷酸化蛋白灰度值表示, ** $P<0.01$;D.图 B 的统计图,蛋白质的相对表达量以目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值或磷酸化目的蛋白灰度值/未磷酸化蛋白灰度值的比值表示; * $P<0.05$, ** $P<0.01$
Fig.4 In the environment of inflammation induced by IFN- γ , intracellular ERS are activated and upregulated UPR-IRE1 α , UPR-PERK/P-EIF2 α
A, Western blotting detected the activation of ERS and UPR induced by pro-inflammatory stimulation; B, Western blotting showed that ERS inducers TM or TG further up-regulated the expression of p-EIF2 α , p-IRE1 α and ATF6;
C, The statistical graph of Fig.A, the relative protein expression level was expressed as gray value of target protein/GAPDH or phosphorylated (P)/Not phosphorylation,compared with the control group, ** $P<0.01$; D, The statistical graph of Fig.C, the relative protein expression level was expressed as gray value of target protein/GAPDH or phosphorylated (P)/Not phosphorylation,compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

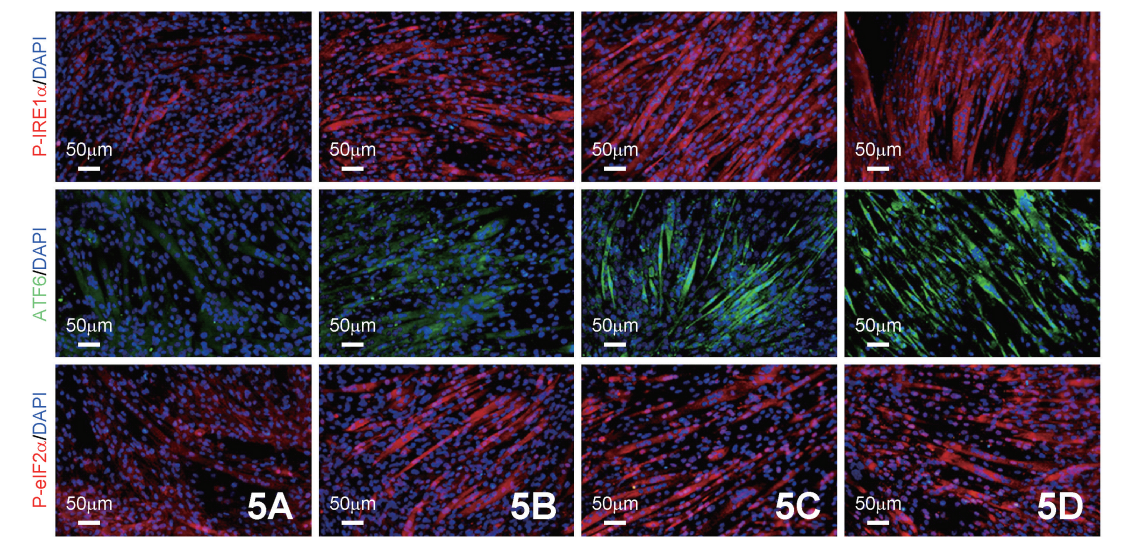


图5 免疫荧光染色检测 IFN- γ 诱导的炎症环境中,肌纤维 UPR-IRE1 α 、UPR-PERK/p-eIF2 α 轴信号激活并上调

标尺示 50 μ m

A. 对照组; B. IFN- γ 组; C. TM 组; D. TG 组

Fig.5 Immunofluorescent staining detected in the environment of inflammation induced by IFN- γ , the UPR-IRE1 α , UPR-PERK/p-eIF2 α were activated and upregulated Bar= 50 μ m

A, Control group; B, IFN- γ group; C, TM group; D, TG group

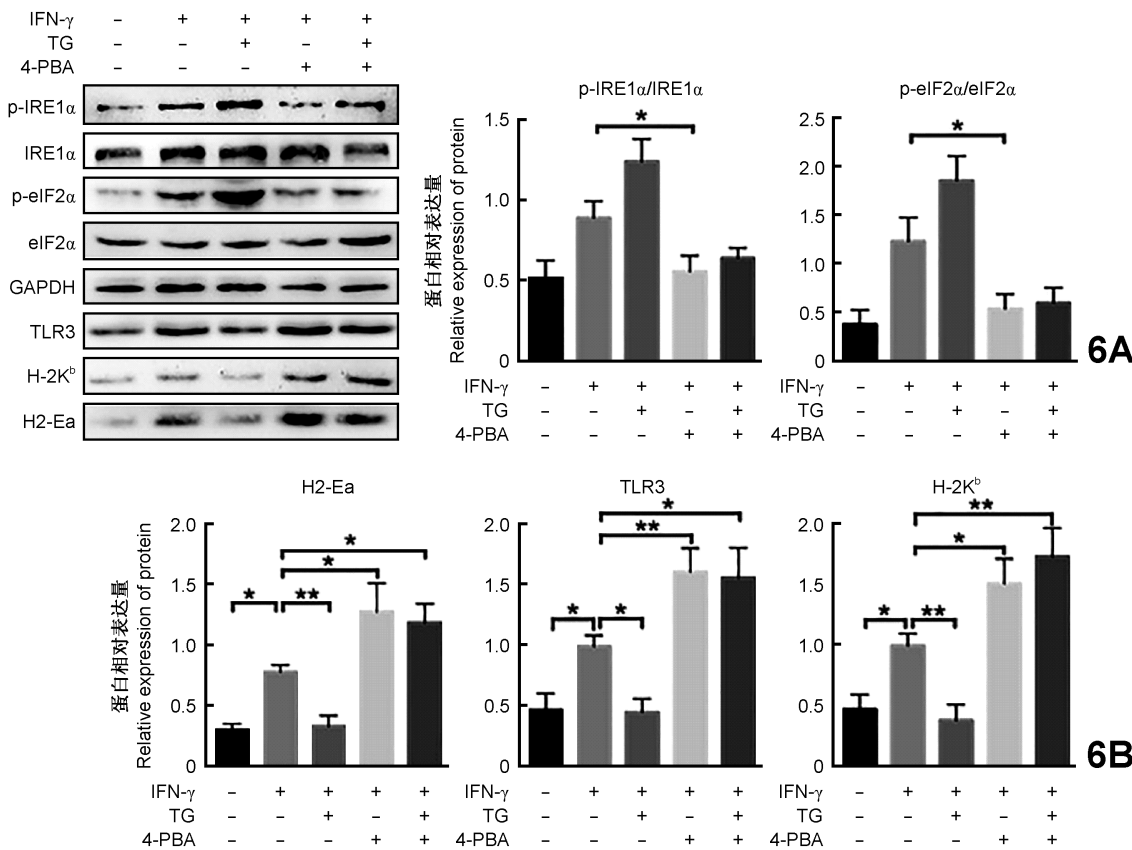


图6 UPR 信号通路下调肌细胞免疫功能

A. Western blotting 检测肌纤维 p-eIF2 α 、p-IRE1 α 以及免疫分子蛋白水平; B.图 A 的统计图,蛋白质的相对表达量以目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值或磷酸化目的蛋白灰度值/未磷酸化蛋白灰度值表示; ** $P<0.01$, * $P<0.05$

Fig.6 UPR signal pathway down-regulates myocyte immune function

A, Western blotting detected the levels of p-eIF2 α , p-IRE1 α and immune molecular proteins in muscle fibers; B, The statistical graph of Fig.A, the relative protein expression level was expressed as gray value of target protein/GAPDH or phosphorylated/not phosphorylation; ** $P<0.01$, * $P<0.05$

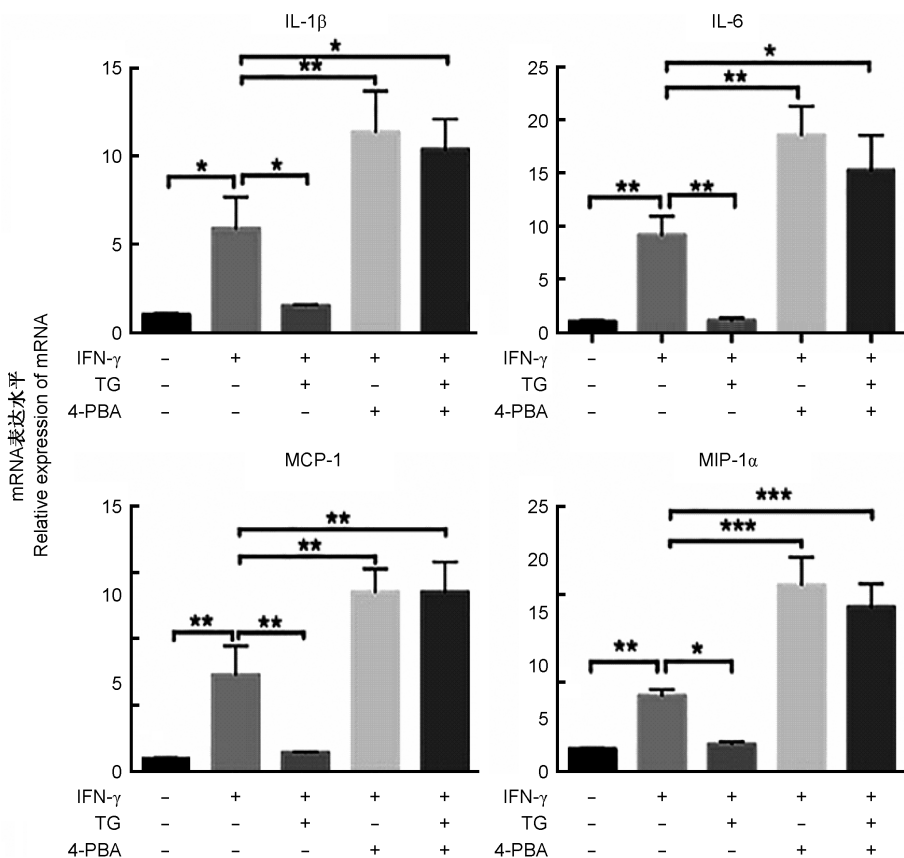


图7 Real-time PCR 分析肌纤维 IL-1 β 、IL-6、MCP-1 及 MIP-1 α 基因水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig.7 Gene levels of IL-1 β , IL-6, MCP-1 and MIP-1 α in muscle fibers were analyzed by Real-time PCR

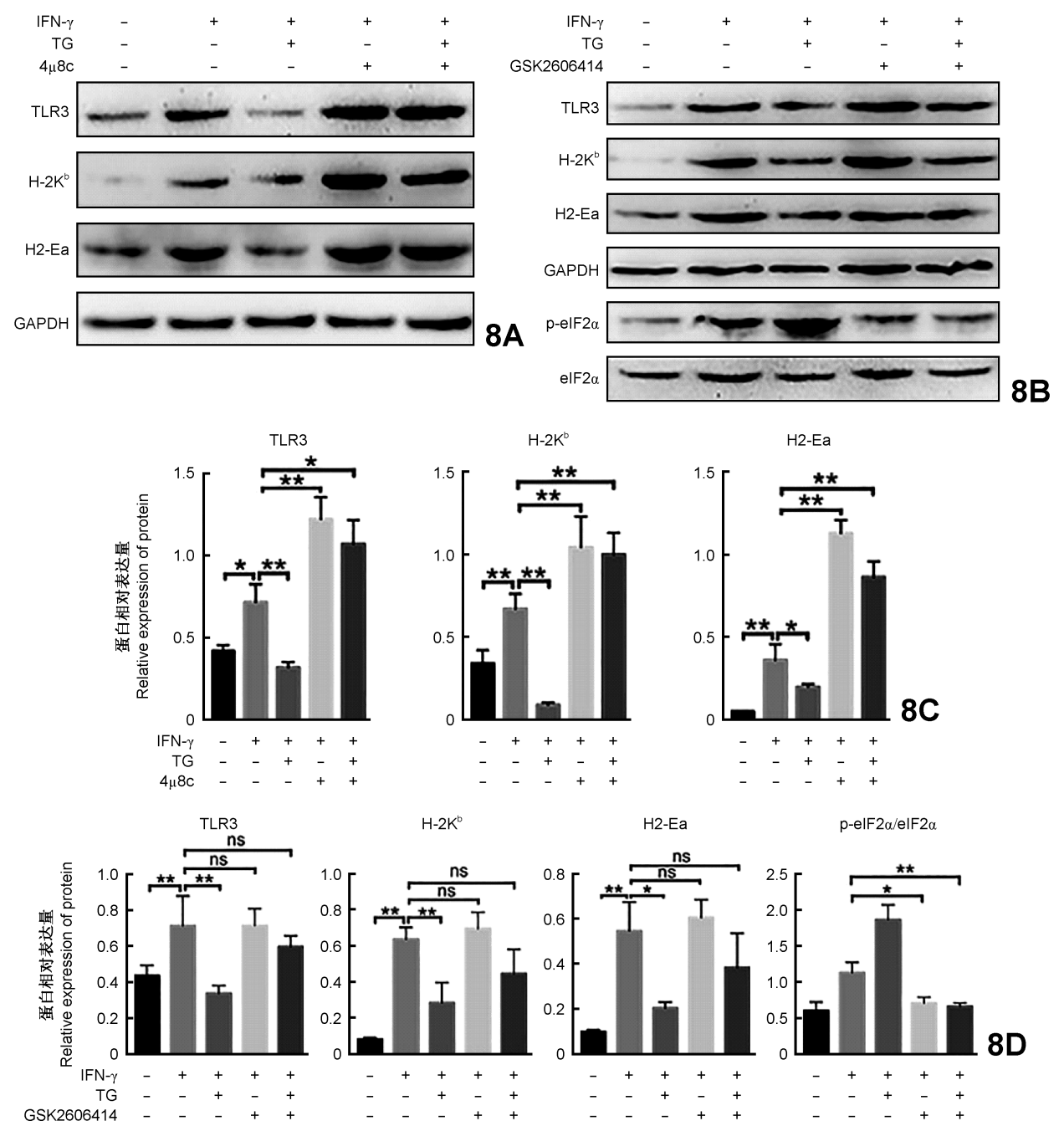
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

提示该条件下激活了肌纤维的免疫行为;此外,磷酸化的 eIF2 α 及 IRE1 α 蛋白水平也显著上调,ATF6 蛋白表达无显著变化,这与体内实验结果相吻合。UPR 下游信号通路包括了活性转录因子 ATF6 通路,IRE1 α 自磷酸化通路以及 PERK/eIF2 α 通路^[8],但是其特定的 UPR 信号通路是否影响肌纤维自身免疫行为,尚缺乏相关的文献报道。为探讨上述两者之间是否具有相关性,在 IFN- γ 诱导的炎症环境中,采用 4-BPA 阻断 UPR 全部信号通路,结果显示,肌纤维进一步上调免疫分子表达水平;相反,ERS 诱导剂 TG 刺激将抑制肌纤维免疫行为,这提示持续的 ERS 和 UPR 的激活会下调肌细胞的免疫行为。为了判断具体是由 UPR 的哪条通路发挥作用,实验中分别使用 IRE1 α 特异性阻断剂 4 μ 8c 和 PERK 通路特异性阻断剂 GSK2606414 处理 IFN- γ 炎症环境下的肌纤维,发现 IRE1 α 阻断剂 4 μ 8c 能上调肌纤维免疫分子蛋白表达水平,PERK 通路阻断剂 GSK2606414 却不影响肌纤维的免疫分子水平。我们的研究证实,IFN- γ 诱导的炎症环境下,肌纤维通过激活 UPR-IRE1 α 轴抑制免疫相关分子的产生,从而下调肌纤维介导的免疫反应,有利于肌再生。

2. 内源性 UPR 的激活对解决骨骼肌炎症具有积极的作用

骨骼肌作为机体重要的免疫应答场所,自身免疫、感染性肌病、肌内基因治疗等均可触发骨骼肌内的免疫反应^[9]。因此,探讨骨骼肌自身的免疫反应对有效控制骨骼肌炎症,促进损伤骨骼肌修复起到了积极的作用。以往的文献及我们最近的工作^[10]均证实,炎症环境中肌纤维表达 MHC I、MHC II 等在内的多种免疫相关分子,慢性炎性肌损伤患者的肌组织内再生的肌纤维高表达 MHC I 和 MHC II,并伴随大量 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞渗出,一方面推测再生的肌纤维是非专职的抗原呈递细胞,通过对坏死肌细胞释放的自身抗原的呈递或交叉呈递,导致肌纤维的反复再生及破坏^[11];另一方面认为 MHC II 类和 MHC I 类分子可能参与了肌炎的病理状态的启动和维持^[12]。因此,控制肌纤维自身的免疫特性对于解决骨骼肌炎症有着积极的作用。

肌纤维是通过何种途径影响其自身的免疫特征并调节其局部炎症的,最近有研究指出,慢性肌炎患者病理肌组织中的再生肌纤维表达 UPR 标志分子^[13,14]。代谢因素(如脂肪酸)及肌收缩相关因素[如过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)]能诱导肌细胞 UPR 反应^[15]。结合本实验发现,在损伤骨骼肌修复和再生



参 考 文 献

[1] Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress : disease relevance and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(12): 1013-1030.

[2] Bettigole SE, Glimcher LH. Endoplasmic reticulum stress in immunity[J]. Annu Rev Immunol, 2015, 33: 107-138.

[3] Rayavarapu S, Coley W, Nagaraju K. Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle homeostasis and disease [J]. Curr Rheumatol Rep, 2012, 14(3): 238-243.

[4] Vitadello M, Doria A, Tarricone E, et al. Myofiber stress-response in myositis: parallel investigations on patients and experimental animal models of muscle regeneration and systemic inflammation [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(2): R52.

[5] Sciorati C, Monno A, Ascherman DP, et al. Required role of apoptotic myogenic precursors and toll-like receptor stimulation for the establishment of autoimmune myositis in experimental murine models[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(3): 809-822.

[6] Buckingham M, Relaix F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 44: 115-125.

[7] Li P, Liu A, Liu C, et al. Role and mechanism of catechin in skeletal muscle cell differentiation[J]. J Nutr Biochem, 2019, 74: 108225.

[8] Xiang ChCh, Han F, Shi YX. Research on activating transcription factor 6 pathway and its related factors' regulation on unfolded protein reaction in endoplasmic reticulum stress [J]. Acta Anatomica Sinica, 2015, 46(6): 857-861. (in Chinese)
向春晨,韩芳,石玉秀. 内质网应激中活化转录因子6 通路及相关调控因子对未折叠蛋白反应的调控[J]. 解剖学报, 2015, 46(6): 857-861.

[9] De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, et al. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation[J]. Int Immunol, 2000, 12(9): 1329-1335.

[10] Ding M, Huang T, Zhu R, et al. Immunological behavior analysis of muscle cells under IFN- γ stimulation in vitro and in vivo [J]. Anat Rec (Hoboken), 2018, 301(9): 1551-1563.

[11] Wiendl H, Behrens L, Maier S, et al. Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G [J]. Ann Neurol, 2000, 48(4): 679-684.

[12] Englund P, Lindroos E, Nennesmo I, et al. Skeletal muscle fibers express major histocompatibility complex class II antigens independently of inflammatory infiltrates in inflammatory myopathies [J]. Am J Pathol, 2001, 159(4): 1263-1273.

[13] Rayavarapu S, Coley W, Nagaraju K. Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle homeostasis and disease [J]. Curr Rheumatol Rep, 2012, 14(3): 238-243.

[14] Lightfoot AP, Nagaraju K, Mcardle A, et al. Understanding the origin of non-immune cell-mediated weakness in the idiopathic inflammatory myopathies-potential role of ER stress pathways [J]. Curr Opin Rheumatol, 2015, 27(6): 580-585.

[15] Deldicque L, Cani PD, Philp A, et al. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 299(5): E695-E705.

[16] Xiong G, Hindi SM, Mann AK, et al. The PERK arm of the unfolded protein response regulates satellite cell-mediated skeletal muscle regeneration [J]. Elife, 2017, 6: e2287.

(编辑 安晓意)