

研究报告

Research Report

S100A9 通过 TLR4/NF- κ B 信号通路活化星形胶质细胞促进炎症反应

周鑫¹ 白巧¹ 张小印¹ 叶柳² 彭彦¹ 唐勇¹ 刘永刚^{1*}

1 重庆医科大学基础医学院, 干细胞与组织工程研究室, 重庆, 400016; 2 重庆医科大学附属第一医院生殖医学中心, 重庆, 400016

* 通信作者, liu.yonggang@cqmu.edu.cn

摘要 为探讨 S100A9 诱导星形胶质细胞活化及促炎机制, 本研究采用不同浓度 S100A9 蛋白作用于小鼠星形胶质细胞 24 h, CCK-8 检测星形胶质细胞增殖; 划痕实验检测细胞迁移能力; RT-qPCR 检测胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, *GFAP*) 和补体 *C3* mRNA 表达水平; ELISA 检测细胞上清液中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 蛋白水平; 细胞转录组测序筛选出 TLR4/NF- κ B 信号通路; Western blot 检测细胞中 TLR4、MYD88、P65 和 PP65 蛋白含量; TLR4/NF- κ B 信号通路的活化情况验证。结果表明, 与对照组相比, 5 μ g/mL S100A9 对星形胶质细胞有明显的促进增殖和迁移的作用; S100A9 可以显著上调活化标志物 *GFAP*、*C3* 以及炎症因子 IL-6、TNF- α , 并上调细胞表达 TLR4、MYD88、P65 和 PP65 蛋白水平; 应用 TLR4 受体抑制剂 TAK-242 和 NF- κ B 通路抑制剂 BAY11-7082 可以显著逆转星形胶质细胞活化及炎症因子的分泌。综上所述, S100A9 促进星形胶质细胞的增殖和迁移, 通过 TLR4/NF- κ B 信号通路促进星形胶质细胞 A1 型活化及分泌炎症因子促进炎症反应。

关键词 S100A9; 星形胶质细胞; 炎症; NF- κ B; TLR4

S100A9 Activates Astrocytes Through TLR4/NF- κ B Signaling Pathway to Promote Inflammation

Zhou Xin¹ Bai Qiao¹ Zhang Xiaoyin¹ Ye Liu² Peng Yan¹ Tang Yong¹ Liu Yonggang^{1*}

1 Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; 2 Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016

* Corresponding author, liu.yonggang@cqmu.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.041.001103

Abstract To investigate the mechanism of S100A9 inducing astrocyte activation and promoting inflammation, mouse astrocytes were treated with different concentrations of S100A9 protein for 24 h. CCK-8 was used to detect the astrocyte proliferation rate; scratch test was applied to detect the migration ability; the mRNA levels of glial fibrillary acidic protein (*GFAP*) and complement *C3* were tested by RT-qPCR; the protein levels of IL-6 and TNF- α were detected by ELISA in the culture supernatant; the signaling pathway was screened by transcriptional sequencing; the protein level of TLR4, MyD88, P65 and PP65 were evaluated by Western blot; the activation of TLR4/NF- κ B signaling pathway was verified. The results showed that 5 μ g/mL S100A9 promoted the proliferation and migration of astrocytes compared to the control group; S100A9 significantly up-regulated the protein level of IL-6, TNF- α , *GFAP*, *C3*, TLR4, MYD88, P65 and PP65; addition of TAK-242 and BAY11-7082, the inhibitors of TLR4 and NF- κ B pathway respectively, can significantly reverse the activation of astrocytes and the production of inflammatory factors. In summary, S100A9 promotes A1 astrocyte activation through activating TLR4/NF- κ B signaling pathway to enhance inflammatory response.

基金项目: 本研究由重庆市前沿与应用基础研究项目 (cstc2015jcyjA10034) 资助

引用格式: Zhou X., Bai Q., Zhang X.Y., Ye L., Peng Y., Tang Y., and Liu Y.G., 2022, S100A9 activates astrocytes through TLR4/NF- κ B signaling pathway to promote inflammation, *Genomics and Applied Biology*, 41(5):1103-1111. (周鑫, 白巧, 张小印, 叶柳, 彭彦, 唐勇, 刘永刚, 2022, S100A9 通过 TLR4/NF- κ B 信号通路活化星形胶质细胞促进炎症反应, 基因组学与应用生物学, 41(5):1103-1111.)

Keywords S100A9; Astrocyte; Inflammations; NF- κ B; TLR4

神经炎症是急性创伤性脑损伤、感染、脑梗死和多种慢性神经退行性疾病等的重要病理特征(Liddlelow and Barres, 2017)。研究显示,适度的神经炎症有利于神经系统的发育和损伤后修复,过度强烈或持续的神经炎症会对神经组织造成损伤,并参与阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)、多发性硬化(multiple sclerosis, MS)、帕金森病(Parkinson disease, PD)等疾病的发生发展(Kwon and Koh, 2020)。

星形胶质细胞是参与中枢神经系统炎症反应的细胞之一,约占胶质细胞总数的 80% (Linnerbauer et al., 2020)。星形胶质细胞除了对神经元起支持、营养、保护和修复等作用外,还具有维持离子和水的稳态、参与神经递质循环、传导免疫信号等更加广泛的功能(Sofroniew et al., 2020)。创伤、感染和自身免疫性炎症反应都会诱发星形胶质细胞激活及增生。激活的星形胶质细胞通常分为 A1 损伤型和 A2 保护型。研究显示脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可以诱导 A1 型星形胶质细胞,使其失去正常星形胶质细胞的功能,释放炎症因子及细胞毒性因子,导致神经元和少突胶质细胞损伤(Ryu et al., 2019)。

促炎因子 S100A9 属于 S100 家族中的一员,不仅在肠炎、红斑狼疮和类风湿性关节炎等炎症性疾病中升高,而且与中枢神经系统多种神经退行性疾病有关(Toleikis et al., 2021)。Horvath 等(2016)通过分析 84 名处于不同阶段痴呆症患者的脑脊液,发现 S100A9 蛋白在 AD 患者血清中显著增加,并且可以作为 AD 神经炎症反应的早期标志物。研究发现, S100A9 与 AD 鼠的学习和记忆障碍有关,敲除 S100A9 基因可以显著减轻 AD 鼠记忆损害和神经病理改变(Kim et al., 2014)。这些数据表明 S100A9 参与了 AD 的发病,但潜在的机制有待深入研究。课题组前期结果(廖键梅等, 2018)显示 S100A9 可以促进星形胶质细胞释放炎症因子,但具体机制不清楚。因此,本研究围绕 S100A9 可能促进星形胶质细胞 A1 型活化、增殖和迁移及促进炎症因子的分泌进行实验研究,为更好地理解 S100A9 的致病机理提供理论和实验依据。

1 结果

1.1 星形胶质细胞的培养与鉴定

按本实验室常规方法分离 C57BL/6 新生鼠大

脑皮质细胞,并贴壁生长 24 h,更换培养基并继续培养 6~7 d。显微镜下可见细胞分层铺满瓶底,晃动去除上层细胞,将下层细胞消化传代。3~4 d 后形成均一的扁平、多角形细胞,对星形胶质细胞特异性抗原胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)进行免疫荧光染色,对细胞核进行 DAPI 复染,细胞质呈绿色荧光为星形胶质细胞,经计算星形胶质细胞数量占总细胞数量的比率可达到 95% 左右(图 1)。

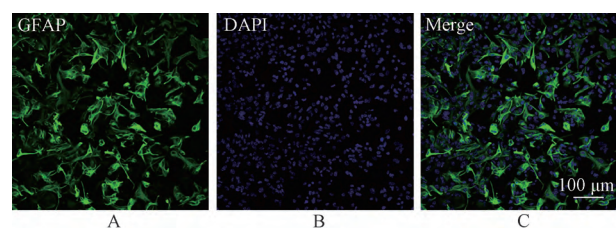


图 1 星形胶质细胞的免疫荧光鉴定

注:A:绿色荧光标记 GFAP;B:蓝色荧光标记细胞核;C:A、B 组合($\times 200$)

Figure 1 Immunofluorescence identification of astrocytes

Note: A: GFAP was labeled with green fluorescence; B: Blue fluorescence labeled nucleus; C: A, B combination ($\times 200$)

1.2 S100A9 促进星形胶质细胞增殖及迁移

取不同浓度的 S100A9 刺激星形胶质细胞 24 h, Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测细胞增殖效应。与对照组相比,浓度为 1 μ g/mL 和 5 μ g/mL S100A9 组促进细胞增殖(图 2C), 10 μ g/mL 和 20 μ g/mL S100A9 对细胞没有显著促增殖效应,故本实验选用 5 μ g/mL 进行后续实验。S100A9 促进细胞迁移进入划痕区域(图 2A),与对照组相比,划痕区域的面积由 80% 缩小到 40%(图 2B),具有统计学意义($P < 0.01$)。以上结果提示 S100A9 可以诱导星形胶质细胞增殖和迁移,可能参与形成胶质瘢痕。

1.3 S100A9 促进细胞表达 A1 反应性星形胶质细胞标志物及分泌炎症因子

S100A9 刺激星形胶质细胞 24 h 后进行转录组测序,按照 $\log_2FC < -1$ 或 $\log_2FC > 1$ 及 $FDR < 0.05$ 标准筛选出上调基因 639 个,下调基因 258 个(图 3A),A1 反应性星形胶质细胞标志基因 *Steap4*、*H2-T23*、*H2-D1*、*Psm8*、*Lcn2*、*Timp1*、*Cxcl10*、*Gbp2* 和 *C3* 均上调(图 3B),炎症反应相关基因上调(表 1)。细胞表达 GFAP、C3 mRNA 较对照组明显升高,白细

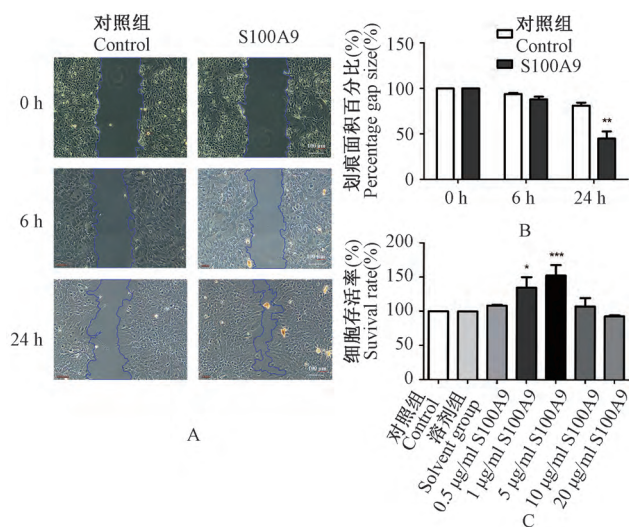


图2 S100A9 促进星形胶质细胞增殖及迁移

注:A: S100A9 处理组与对照组星形胶质细胞在划痕后 0、6、24 h 拍摄的具有代表性的相位图像; B: 直方图表示 24 h 划痕间隙面积的百分比(0 小时间隔被认为是 100%); C: 不同浓度的 S100A9(0.5、1、5、10、20 μ g/mL) 处理细胞 24 h, CCK-8 检测星形胶质细胞的存活率; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 2 S100A9 promotes the proliferation and migration of astrocytes

Note: A: Phase contrast images which were taken at 0, 6 and 24 h after scratching in astrocyte in the presence of S100A9; B: The histogram represents the percentage gap size in 24 h (0 h gap was considered 100%); C: The survival rate of astrocytes was detected by CCK-8 after treated with different concentrations of S100A9(0.5, 1, 5, 10, 20 μ g/mL) for 24 h; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的释放较对照组明显升高 ($P < 0.01$) (图 3C~F)。转录组测序结果及 RT-qPCR 和 ELISA 结果均提示 S100A9 诱导形成 A1 反应性星形胶质细胞并促进其分泌炎症因子。

1.4 S100A9 上调星形胶质细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路

对转录组测序结果进行 KEGG 通路富集分析, 发现核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路和 TOLL 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 富集率较高(图 4A)。Western blot 检测 S100A9 刺激星形胶质细胞表达 TLR4、MYD88、P65、PP65 蛋白水平(图 4B)。与对照组相比, 实验组蛋白水平均增加, 其中 5 μ g/mL S100A9 浓度组增加显著, 与阳性对照 LPS 组趋势一致(图 4C~F), 具有统计学意义($P < 0.01$)。

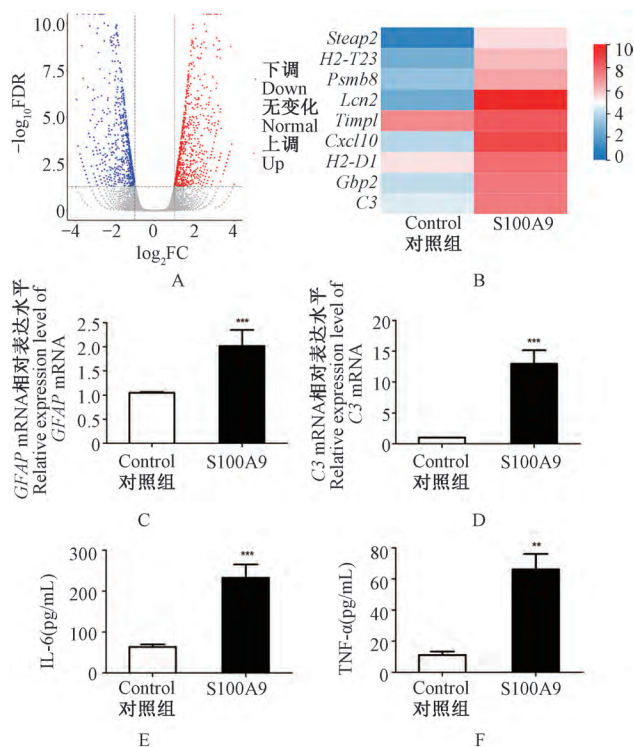


图3 S100A9 诱导形成 A1 反应性星形胶质细胞

注:A: 火山图上调及下调的基因; B: 表达量聚类热图示 A1 反应性星形胶质细胞标志基因; C, D: RT-qPCR 检测细胞表达 GFAP、C3 mRNA 水平; E, F: ELISA 检测细胞表达 IL-6、TNF- α 蛋白水平; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3 S100A9 induces the formation of A1 reactive astrocyte.

Note: A: Volcanogram showed up-regulated and down-regulated gene; B: The expression of A1 reactive astrocyte marker gene; C, D: The mRNA expression level of GFAP, C3 was measured by RT-qPCR; E, F: The protein expression level of IL-6, TNF- α was measured by ELISA; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

1.5 抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路下调 A1 反应性星形胶质细胞标志物及炎症因子

分别使用 TLR4 受体抑制剂 TAK-242、晚期糖基化终产物受体 (the Receptor of Advanced Glycation Endproducts, RAGE) 抑制剂 FPS-ZM1 以及 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 作用细胞 2 h, 再加入 5 μ g/mL S100A9 作用 24 h, 检测 GFAP、C3 mRNA 相对表达水平(图 5A、B)。与对照组相比, BAY11-7082 组和 TAK-242 组细胞表达 GFAP 和 C3 mRNA 显著降低, 但 FPS-ZM1 组细胞表达 C3 mRNA 无降低趋势。BAY11-7082 组和 TAK-242 组细胞表达 IL-6 和 TNF- α 蛋白均下调(图 5C、D), 但 FPS-ZM1 对 S100A9 刺激细胞分泌 TNF- α 无改善作用。以上实

表1 与炎症相关基因

Table 1 Genes related to inflammation

基因名	功能描述	对照组 FPKM			转录模式
Gene symbol	Function description	Control FPKM	S100A9 FPKM	log ₂ FC	Transcription mode
<i>IL-1α</i>	编码白细胞介素 1α,参与炎症反应	0.14	34.92	7.96	上调
	Encoding interleukin 1α,involved in inflammatory response				
<i>IL-6</i>	编码白细胞介素 6,参与炎症反应	0.22	7.38	5.07	
	Encoding interleukin 6,involved in inflammatory response				
<i>TNF</i>	编码肿瘤坏死因子	0.19	17.57	6.53	
	Encoding tumor necrosis factor				
<i>TNFαIP2</i>	编码肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 2,作为炎症介质发挥作用	9.48	266.43	4.81	
	Encoding tumor necrosis factor-alpha inducible protein 2, as an inflammatory mediator				
<i>TNFαIP3</i>	编码肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3,作为炎症介质发挥作用	2.61	26.25	3.33	
	Encoding tumor necrosis factor-alpha inducible protein 3, as an inflammatory mediator				
<i>Cxcl1</i>	编码趋化因子配体 1,参与炎症反应	0.11	219.55	10.96	
	Encoding chemokine ligand 1,involved in the inflammatory response				
<i>Cxcl10</i>	编码趋化因子配体 10,参与炎症反应	13.93	3 665.24	8.04	
	Encoding chemokine ligand 10, involved in the inflammatory response				
<i>Ccl2</i>	编码趋化因子配体 2,参与炎症反应	6.28	1 299.9	7.69	
	Encoding chemokine ligand 2,involved in the inflammatory response				
<i>Ccl3</i>	编码趋化因子配体 3,参与炎症反应	0.32	121.27	8.57	
	Encoding chemokine ligand 3,involved in the inflammatory response				
<i>Ccl4</i>	编码趋化因子配体 4,参与炎症反应	0.47	17.91	5.25	
	Encoding chemokine ligand 4,involved in the inflammatory response				
<i>Ccl5</i>	编码趋化因子配体 5,参与炎症反应	1.69	563.99	8.38	
	Encoding chemokine ligand 5,involved in the inflammatory response				

注:FPKM:每千个碱基的转录每百万映射读取的读数,代表基因的表达水平

Note: FPKM: Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, represents the level of gene expression

验结果表明 S100A9 通过 TLR4/NF-κB 信号通路活化 A1 反应性星胶细胞,并促进炎症因子的释放,加重疾病的发生。

2 讨论

越来越多的证据表明 S100A9 蛋白与多种神经退行性疾病相关,但其在神经退行性疾病进展中的作用及潜在机制不清楚。星形胶质细胞受外界刺激可诱导其 A1 或 A2 型活化,其中 A1 反应性星形胶质细胞一方面分泌多种抑制神经生长的因子和炎症因子,另一方面星形胶质细胞的增生迁移形成胶质瘢痕会抑制神经元轴突再生长及轴突重塑,对进一

步恶化脑内的神经炎症起重要作用(Pereira et al., 2019)。神经退行性疾病中 A1 反应性星形胶质细胞的大量存在表明神经炎症可能参与神经退行性变(Urso et al., 2021)。有研究显示(Wang et al., 2018),急性创伤性脑损伤患者脑组织中存在活化的星形胶质细胞和大量的 S100A9 蛋白,并认为 S100A9 是创伤性脑损伤诱发老年痴呆的启动因素。这与我们前期实验中尚未出现行为学改变的 8 月龄 APP/PS1 转基因小鼠高表达 S100A9 和星形胶质细胞活化有相似之处,提示促炎因子 S100A9 可能与 A1 反应性星形胶质细胞活化、增殖和迁移有关。本研究结果显示 5 μg/mL S100A9 对星形胶质细胞有明显的促

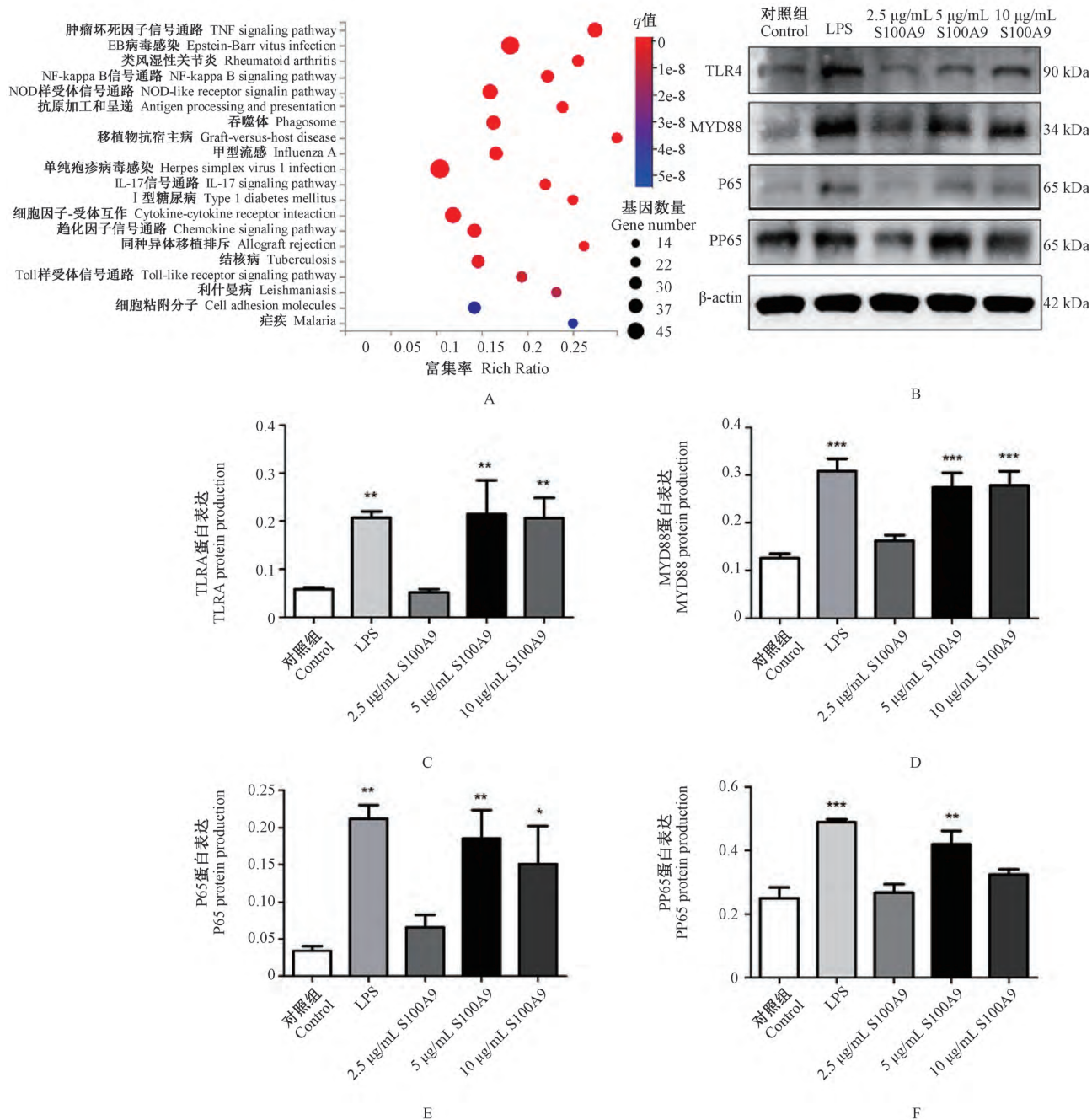


图4 S100A9上调星形胶质细胞TLR4/NF- κ B信号通路

注:A:KEGG通路富集气泡图;B:星形胶质细胞表达PP65、P65、MYD88和TLR4蛋白的条带图;C~F:定量分析TLR4、MYD88、P65和PP65蛋白含量;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

Figure 4 S100A9 up-regulates astrocyte TLR4/NF- κ B signaling pathway

Note: A: KEGG pathway enrichment bubble diagram; B: Western blot bands of astrocytes expressing PP65, P65, MYD88 and TLR4 proteins; C~F: Quantitative analysis of protein expression level of TLR4, MYD88, P65 and PP65; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

进增殖和迁移作用,但是随着浓度升高,增殖效应降低甚至可能抑制增殖。S100A9促增殖作用与Wu等(2018)的报道类似,抑制增殖作用可能与大量使用S100A9导致 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 剥夺有关(廖键梅等,

2018),也可能与S100A9刺激后产生大量TNF- α 因子有关。

本研究进行转录组测序发现,与对照组相比实验组细胞表达A1型星形胶质细胞的特异性基因

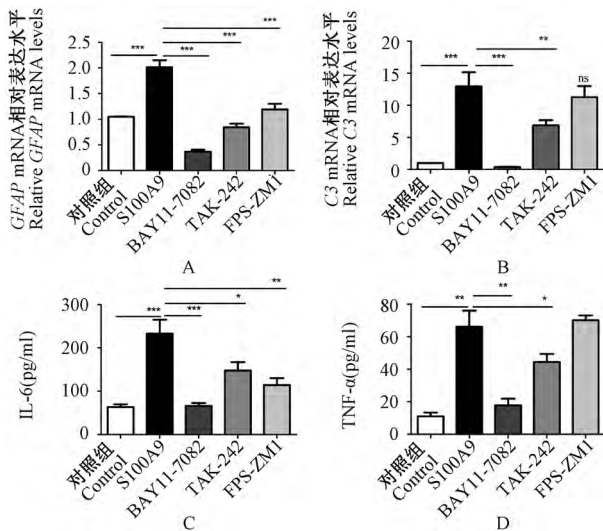


图5 抑制TLR4/NF-κB信号通路下调A1反应性星形胶质细胞标志物及炎症因子

注:A,B:RT-qPCR检测对照组、S100A9组、BAY11-7082组、TAK-242组、FPS-ZM1组中GFAP、C3 mRNA相对表达水平;C,D:ELISA检测IL-6、TNF-α蛋白水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 5 Inhibition of TLR4/NF-κB signaling pathway down-regulates A1 reactive astrocyte markers and inflammatory factors
Note: A,B: RT-qPCR was used to detect the relative expression levels of GFAP and C3 mRNA in control, S100A9, BAY11-7082, TAK-242 and FPS-ZM1 groups; C,D: ELISA was applied to detect the expression of IL-6 and TNF-α protein levels; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Steap4、*H2-T23*、*H2-D1*、*Psm8*、*Lcn2*、*Timp1*、*Cxcl10*、*Gbp2* 和 *C3* 显著上调。GFAP 是星形胶质细胞中间丝的主要成分,研究发现,在多种神经系统疾病中,当没有明显的神经元死亡时就可以检测到 GFAP 增加,它是星形胶质细胞活化的早期指标 (Escartin et al., 2021)。本研究结果显示 S100A9 促进星形胶质细胞表达 GFAP,提示星形胶质细胞处于活化状态。补体系统参与宿主早期抗感染免疫反应,C3 是补体系统中含量最高的因子,活化 C3 是放大补体级联反应的关键步骤。并且,本研究结果显示,S100A9 刺激星形胶质细胞显著上调 C3 基因水平,结果与 Lid-delow 等(2017)研究发现的一致,即在中枢神经系统中 A1 型星形胶质细胞特异性表达 C3,而在缺血 A2 型星胶细胞中未表达。此外,在转录组差异基因中筛选出的 11 个与促炎反应相关的基因均上调,包括 *IL-1α*、*IL-6*、*TNF*、*TNFαIP2* 和 *TNFαIP3*;细胞趋化因子 *CXCL1*、*CXCL10*、*CCL2*、*CCL3*、*CCL4* 和 *CCL5*。ELISA 验证 IL-1 和 IL-6 的蛋白上调与转录组数据库

结果一致。以上证据显示 S100A9 与 A1 型星形胶质细胞激活和增殖以及释放炎症因子相关。

本研究对差异基因进行 KEGG 通路富集分析,发现 NF-κB 通路和 TOLL 样受体通路富集率较高,于是筛选出该通路后续验证。NF-κB 信号通路控制细胞因子的产生和细胞存活,并与神经炎症以及星形胶质细胞和小胶质细胞的神经炎症反应密切相关 (Liu et al., 2019)。P65 蛋白属于核转录因子 NF-κB 家族的一员,磷酸化的 P65 是 NF-κB 被激活的直接证据。TLR4 是 TOLL 样受体家族的一员,属于病原体微生物相关模式识别受体,表达于细胞膜 (Li et al., 2021)。MYD88 作为 TOLL 样受体信号通路中的一个关键接头分子,在传递上游信息中具有重要的作用。本研究结果显示实验组细胞表达 TLR4、MYD88、P65 和 PP65 蛋白,与 LPS 阳性对照组上调趋势一致,且在 5 μg/mL S100A9 组蛋白增加最显著。使用 TLR4 和 NF-κB 的抑制剂后细胞表达活化标志物及炎症因子均显著降低,证实抑制 TLR4 和 NF-κB 可以逆转星形胶质细胞活化及炎症因子的产生。通常认为 S100A9 作用于细胞膜上 TLR4 和 RAGE 受体,从而引起下游效应,但本研究抑制 RAGE 受体对于抑制 A1 型激活和炎症因子的释放并未起明显作用,因此我们认为 S100A9 主要通过激活星形胶质细胞 TLR4 受体而不是 RAGE 受体起作用。

综上所述,S100A9 与 TLR4 受体相互作用激活下游 MYD88 信号分子,进一步激活 NF-κB 信号通路,促进星形胶质细胞 A1 型活化,释放 IL-6 和 TNF-α 为代表的炎症因子,促进炎症反应。S100A9 作为神经退行性疾病的生物标志物 (Carter et al., 2019),了解 S100A9 的致病机制有利于促进新的治疗方法的发展以降低中枢神经系统的损伤,干扰 S100A9 的作用机制可能是一种潜在的治疗方法。

3 材料与方法

3.1 实验动物和试剂

C57BL/6 小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,动物饲养、实验和处理经重庆医科大学伦理委员会审查批准(批准号 2021077),动物许可证号 SYXK (渝)2018-0003。PDL 多聚赖氨酸、胰蛋白酶和双抗购于碧云天试剂公司;CCK-8 试剂盒购于博士德试剂公司;抗体购于 Abcam 试剂公司;实时荧光定量 PCR 相关试剂购于 Takara 试剂公司;FPS-ZM1、TAK-242 和 BAY11-7082 抑制剂购于 MCE 试剂公司。

3.2 星形胶质细胞分离培养及鉴定

出生 24 h 内的 C57BL/6 新生小鼠以 75% 酒精浸泡消毒 5 min, 取头依次剥离头皮及颅骨暴露脑组织, 取出脑置于预冷无菌 PBS 中。剔除脑膜及血管, 胰酶消化 15 min 后用含血清的培养液终止消化。吹打至无明显组织块, 离心后加入含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM/F12 完全培养液重悬。使用差速贴壁法去除成纤维细胞, 接种于提前包被多聚赖氨酸的培养皿中。放入 95% 湿度、5% CO₂、37 °C 孵箱中培养 6~7 d, 进行传代培养, 取 P2 代细胞鉴定后备用。

3.3 细胞免疫荧光

制备细胞爬片, 使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 加入 0.1% Triton-100 溶液通透 15 min, PBS 洗涤 3 次。加入 0.1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 2 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤 5 min, 重复 3 次。二抗 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 洗涤后滴加含 DAPI 的抗荧光猝灭剂, 封片, 使用荧光显微镜观察拍照。

3.4 重组 S100A9 蛋白表达纯化

将 PET28a-S100A9 重组质粒转化导入 BL21 (DE3) 感受态大肠杆菌, 挑取单克隆菌落进行培养测序, 并与 NCBI Gene 数据库中人的 *S100A9* 基因序列比对。将转化成功的菌液进行扩增培养, IPTG 诱导蛋白表达。使用镍柱亲和色谱纯化蛋白, 进行考马斯亮蓝染色及 Western blot 验证。最后进行梯度透析浓缩, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 保存于 -80 °C。

3.5 CCK-8 法检测细胞活性

于 96 孔板中每孔接种 10 000 个细胞, 空白孔不含细胞。过夜贴壁后, 实验组加入浓度分别为 0.5、1、5、10、20 μ g/mL S100A9 的 DMEM/F12 培养液作用细胞 24 h, 对照组加入等量的 DMEM/F12, 每组设置 3 个重复孔。加入 CCK-8 溶液 37 °C 避光孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度, 细胞存活

率 = [(实验孔 OD - 空白孔 OD) / (对照孔 OD - 空白孔 OD)] $\times$ 100%。

3.6 划痕实验

将 P2 代星形胶质细胞以 5×10^5 个/mL 的密度种植于含 10% FBS DMEM/F12 培养基的 6 孔板中。细胞贴壁后使用 200 μ L 枪头在单层细胞上纵向划痕, 用无菌 PBS 洗去脱落细胞。实验组加入含 2% FBS 和 5 μ g/mL S100A9 DMEM/F12 培养基, 对照组加入仅含 2% FBS DMEM/F12 培养基, 分别于划痕后的 0、6、24 h 在倒置显微镜下观察并拍照, 使用 Image J 对划痕愈合率进行分析, 划痕面积百分比 (%) = 不同时间段划痕面积 / 0 h 划痕面积 $\times$ 100%。

3.7 ELISA 检测 IL-6 和 TNF- α 蛋白含量

制备小鼠星形胶质细胞悬液, 于 96 孔板中每孔接种 10 000 个细胞。设置对照组、S100A9 组、BAY11-7082 组、TAK-242 组和 FPS-ZM1 组, 每组设置 3 个重复孔。细胞贴壁后分别加入 BAY11-7082、TAK-242 和 FPS-ZM1 提前处理 1 h, 再加入 S100A9, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 24 h。将不同分组细胞上清液加入包被了特异性抗体的孔板中, 再加入抗体工作液反应 1 h, 洗涤后加入 ABC 工作液反应 30 min, 加入显色液 37 °C 避光孵育 20 min, 最后加入终止液终止反应。使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度, 通过绘制标准曲线求出上清液中 IL-6 和 TNF- α 的含量。

3.8 细胞转录组测序

将 2×10^6 个星形胶质细胞接种于 6 cm 细胞培养皿中。细胞贴壁后加入 5 μ g/mL S100A9 作为实验组, 对照组不含 S100A9, 继续培养 24 h。弃培养液, 加入 1.5 mL 无菌 PBS 洗涤细胞。加入 500 μ L TRIZOL, 吹散细胞团块使细胞充分裂解, 转移到无酶无菌的细胞冻存管中, 放入液氮速冻, 保存于 -80 °C。重复 3 次。将样品寄送到华大基因生物公

表 2 RT-qPCR 引物序列

Table 2 The primers designed for RT-qPCR

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>S100A9</i>	ACCATCATCGACACCTTCCATCAATAC	TTACTTCCCACAGCCTTTGCCATG
<i>GFAP</i>	CTATGAGGAGGAAGTTCCG	CTTAGACCGATACCACTC
<i>C3</i>	TACTCCCAATGTCCTACGGC	TCCTTACTGGCTGGAATCTTGA
<i>β-actin</i>	TGCTGTCCCTGTATGCCTCTGG	ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG

司测序。

3.9 Western blot 检测蛋白含量

收取细胞加入裂解液,充分裂解后离心收集蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。配制 SDS-PAGE 凝胶,电泳电压 100 V,约 90 min 可见蓝色线条移动到玻璃板底端。电转电流 200 mA,100 min。室温封闭 2 h,一抗孵育 4 ℃ 过夜,HRP 标记 IgG 二抗室温孵育 1 h。最后加入发光液使用 BIO-RAD 成像分析仪曝光,使用 Image J 软件量化分析。

3.10 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达水平

用 TRIZOL 法提取总 RNA 并测定浓度。去除基因组 DNA,以反转录合成的 cDNA 为模板,*S100A9*、*GFAP* 和 *C3* 基因的引物见表 2,以 β -actin 为内参进行实时荧光定量 PCR 反应,实验重复 3 次,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量。

3.11 统计分析

所有数据通过 prism-GraphPad 7.0 统计学软件分析处理,数据用均数 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

作者贡献

周鑫是本研究的实验设计和实验研究的执行人,完成数据分析、论文写作;白巧、张小印、叶柳、彭彦和唐勇参与实验设计和试验结果分析;刘永刚指导实验设计、数据分析和论文定稿修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

参考文献

Carter S.F., Herholz K., Rosa-Neto P., Pellerin L., Nordberg A., and Zimmer E.R., 2019, Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease, *Trends Mol. Med.*, 25 (2): 77-95.

Escartin C., Galea E., Lakatos A., O'Callaghan P., Petzold G.C., Serrano-Pozo A., Steinhäuser C., Volterra A., Carmignoto G., Agarwal A., Allen N.J., Araque A., Barbeito L., Barzilai A., Bergles D.E., Bonvento G., Butt A.M., Chen W.T., Cohen-Salmon M., Cunningham C., Deneen B., De Strooper B., Diaz-Castro B., Farina C., Freeman M., Gallo V., Goldman J.E., Goldman S.A., Gotz M., Gutierrez A., Haydon P.G., Heiland D.H., Hol E.M., Holt M.G., Iino M., Kastanenka K.V., Kettenmann H., Khakh

B.S., Koizumi S., Lee C.J., Liddel S.A., MacVicar B.A., Magistretti P., Messing A., Mishra A., Molofsky A.V., Murai K.K., Norris C.M., Okada S., Olie S.H.R., Oliveira J.F., Panatier A., Parpura V., Pekna M., Pekny M., Pellerin L., Perea G., Perez-Nievas B.G., Pfrieger F.W., Poskanzer K.E., Quintana F.J., Ransohoff R.M., Riquelme-Perez M., Robel S., Rose C.R., Rothstein J.D., Rouach N., Rowitch D.H., Semyanov A., Sirko S., Sontheimer H., Swanson R.A., Vitorica J., Wanner I.B., Wood L.B., Wu J., Zheng B., Zimmer E.R., Zorec R., Sofroniew M.V., and Verkhratsky A., 2021, Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions, *Nat. Neurosci.*, 24(3): 312-325.

Horvath I., Jia X., Johansson P., Wang C., Moskalenko R., Steinau A., Forsgren L., Wagberg T., Svensson J., Zetterberg H., and Morozova-Roche L.A., 2016, Pro-inflammatory S100A9 protein as a robust biomarker differentiating early stages of cognitive impairment in Alzheimer's disease, *ACS Chem. Neurosci.*, 7 (1): 34-39.

Kim H.J., Chang K.A., Ha T.Y., Kim J., Ha S., Shin K.Y., Moon C., Nacken W., Kim H.S., and Suh Y.H., 2014, S100A9 knockout decreases the memory impairment and neuropathology in crossbreed mice of Tg2576 and S100A9 knockout mice model, *PLoS ONE*, 9(2): e88924.

Kwon H.S., and Koh S.H., 2020, Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes, *Transl. Neurodegener.*, 9(1): 42.

Liao J.M., Ye L., Huang Q., Tian Y., Hu K., Li X.P., Tang Y., and Liu Y.G., 2018, Experimental study on the effect of S100A9 on the apoptosis of astrocytes in SD rats *in vitro* and its mechanism, *Genomics and Applied Biology*, 37(8): 3652-3659. (廖键梅,叶柳,黄琴,田银,胡凯,李晓朋,唐勇,刘永刚,2018, S100A9 促进体外 SD 大鼠星形胶质细胞凋亡及其机制的实验研究,基因组学与应用生物学,37(8): 3652-3659.)

Liddel S.A., and Barres B.A., 2017, Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential, *Immunity*, 46(6): 957-967.

Liddel S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., Bennett M.L., Münch A.E., Chung W.S., Peterson T.C., Wilton D.K., Frouin A., Napier B.A., Panicker N., Kumar M.,

- Buckwalter M.S., Rowitch D.H., Dawson V.L., Dawson T.M., Stevens B., and Barres B.A., 2017, Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia, *Nature*, 541(7638): 481-487.
- Li L., Acioglu C., Heary R.F., and Elkabes S., 2021, Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases, *Brain Behav. Immun.*, 91: 740-755.
- Liu H.X., Wu X., Luo J.N., Wang X.G., Guo H., Feng D.Y., Zhao L., Bai H., Song M.Y., Liu X.Y., Guo W., Li X., Yue L., Wang B.D., and Qu Y., 2019, Pterostilbene attenuates astrocytic inflammation and neuronal oxidative injury after ischemia-reperfusion by inhibiting NF- κ B phosphorylation, *Front. Immunol.*, 10: 2408.
- Linnerbauer M., Wheeler M.A., and Quintana F.J., 2020, Astrocyte crosstalk in CNS inflammation, *Neuron*, 108(4): 608-622.
- Pereira C.F., Santos A.E., Moreira P.I., Pereira A.C., Sousa F.J., Cardoso S.M., and Cruz M.T., 2019, Is Alzheimer's disease an inflammasomopathy, *Ageing Research Reviews*, 56: 100966.
- Ryu K.Y., Lee H.J., Woo H., Kang R.J., Han K.M., Park H., Lee S.M., Lee J.Y., Jeong Y.J., Nam H.W., Nam Y., and Hoe H.S., 2019, Dasatinib regulates LPS-induced microglial and astrocytic neuroinflammatory responses by inhibiting AKT/STAT3 signaling, *J. Neuroinflammation*, 16(1): 190.
- Sofroniew M.V., 2020, Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity, *Trends Immunol.*, 41(9): 758-770.
- Toleikis Z., Ziaunys M., Baranauskiene L., Petrauskas V., Jaudzems K., and Smirnovas V., 2021, S100A9 alters the pathway of alpha-synuclein amyloid aggregation, *Int. J. Mol. Sci.*, 22(15): 7972.
- Urso D., Gnoni V., Filardi M., and Loggrosino G., 2021, Delusion and delirium in neurodegenerative disorders: an overlooked relationship? *Front. Psychiatry*, 12: 808724.
- Wang C., Iashchishyn I.A., Pansieri J., Nyström S., Klementieva O., Kara J., Horvath I., Moskalenko R., Rofougaran R., Gouras G., Kovacs G.G., Shankar S.K., and Morozova-Roche L.A., 2018, S100A9-driven amyloid-neuroinflammatory cascade in traumatic brain injury as a precursor state for Alzheimer's disease, *Sci. Rep.*, 8(1): 12836.
- Wu M., Xu L., Wang Y., Zhou N., Zhen F., Zhang Y., Qu X.B., Fan H.B., Liu S.H., Chen Y., and Yao R.Q., 2018, S100A8/A9 induces microglia activation and promotes the apoptosis of oligodendrocyte precursor cells by activating the NF- κ B signaling pathway, *Brain Res. Bull.*, 143: 234-245.

(责任编辑 庞晓鑫 甘凤琼)