

几丁质酶-3 样蛋白 1 对脂多糖诱导小鼠骨骼肌卫星细胞炎症损伤相关分子表达的影响

李福星 盛志勇 周仪华 李婧滢 许建宁

南昌大学第二附属医院重症医学科, 江西南昌 330006

通信作者: 许建宁, Email: 0102091@sohu.com

【摘要】 目的 探讨在脓毒症模型中几丁质酶-3 样蛋白 1 (CHI3L1) 介导骨骼肌干细胞损伤的潜在机制。**方法** 用 6 种浓度的脂多糖 (LPS) 刺激体外培养的小鼠骨骼肌卫星细胞, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和细胞增殖与毒性试剂盒 (CCK-8) 筛选出细胞处理最佳浓度。构建 CHI3L1 过表达和干扰载体转染骨骼肌卫星细胞, 采用聚合酶链反应 (PCR)、蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 验证转染效率。将细胞按随机数字表法分为空白对照组 (不加任何干预的细胞)、模型组 (LPS 刺激未转染的细胞)、过表达 CHI3L1 组 (LPS 刺激转染了 CHI3L1 过表达质粒的细胞)、过表达 CHI3L1 对照组 (LPS 刺激转染了空载质粒的细胞)、干扰 CHI3L1 组 (LPS 刺激转染了 CHI3L1 干扰序列的细胞)、干扰 CHI3L1 对照组 (LPS 刺激转染了 CHI3L1 干扰序列阴性对照的细胞)。采用 ELISA 检测细胞外天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的含量; 采用 Western blotting 检测细胞中 IL-1 β 、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化 Akt (p-Akt) 的蛋白表达水平。**结果** 根据 CCK-8 和 ELISA 检测结果筛选出最佳浓度为 5 mg/L 的 LPS 进行后续实验, 且 PCR、Western blotting 证实转染有效。与空白对照组比较, 模型组细胞外 IL-1 β 、caspase-1 含量和细胞中 Akt、p-Akt、IL-1 β 的蛋白表达水平均明显升高 [IL-1 β (ng/L): 11.22 ± 0.55 比 8.63 ± 0.63 , caspase-1 (pmol/L): 9.47 ± 0.22 比 8.65 ± 0.15 , Akt/GAPDH: 1.36 ± 0.12 比 1.06 ± 0.15 , p-Akt/GAPDH: 0.78 ± 0.07 比 0.09 ± 0.01 , IL-1 β /GAPDH: 1.38 ± 0.12 比 0.18 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$]。与模型组、过表达 CHI3L1 对照组比较, 过表达 CHI3L1 组细胞外 IL-1 β 、caspase-1 含量和细胞中 p-Akt、IL-1 β 的蛋白表达均明显升高 [IL-1 β (ng/L): 14.93 ± 0.97 比 11.22 ± 0.55 , 9.38 ± 0.40 , caspase-1 (pmol/L): 10.35 ± 0.03 比 9.47 ± 0.22 , 8.46 ± 0.24 , p-Akt/GAPDH: 1.21 ± 0.04 比 0.78 ± 0.07 , 0.63 ± 0.04 , IL-1 β /GAPDH: 1.87 ± 0.08 比 1.38 ± 0.12 , 1.51 ± 0.17 , 均 $P < 0.05$]。与模型组、干扰 CHI3L1 对照组比较, 干扰 CHI3L1 组细胞外 IL-1 β 和 caspase-1 含量及细胞中 p-Akt、IL-1 β 的蛋白表达均明显降低 [IL-1 β (ng/L): 8.98 ± 0.73 比 11.22 ± 0.55 , 10.44 ± 0.65 , caspase-1 (pmol/L): 7.61 ± 0.63 比 9.47 ± 0.22 , 8.37 ± 0.38 , p-Akt/GAPDH: 0.50 ± 0.04 比 0.78 ± 0.07 , 0.94 ± 0.06 , IL-1 β /GAPDH: 0.77 ± 0.02 比 1.38 ± 0.12 , 1.13 ± 0.07 , 均 $P < 0.05$]。**结论** CHI3L1 可能通过 caspase-1 和 IL-1 β 介导脓毒症模型中小鼠骨骼肌干细胞的损伤; CHI3L1 可能参与了调控骨骼肌干细胞中 Akt 的信号通路, 而对 STAT3 信号通路无明显影响。

【关键词】 几丁质酶-3 样蛋白 1; 脓毒症; 骨骼肌干细胞; 白细胞介素-1 β ; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1

基金项目: 江西省自然科学基金面上项目 (20202BAB206058)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210108-00043

Effects of chitinase-3-like protein 1 on the expression of inflammatory damage-related molecules in mouse skeletal muscle satellite cells induced by lipopolysaccharide

Li Fuxing, Sheng Zhiyong, Zhou Yihua, Li Jingying, Xu Jianing

Department of Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Corresponding author: Xu Jianing, Email: 0102091@sohu.co

【Abstract】 Objective To explore the potential mechanism of chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1) involved in skeletal muscle stem cell injury induced by sepsis. **Methods** Six different concentrations of lipopolysaccharide (LPS) were used to stimulate mouse skeletal muscle satellite cells cultured *in vitro*. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and cell counting kit-8 (CCK-8) were used to determine the optimal concentration. The overexpression and interference vectors of CHI3L1 were constructed to transfect skeletal muscle satellite cells, and the transfection efficiency was verified by polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting. The cells were randomly divided into blank control group (cells without any intervention), model group (LPS-stimulated untransfected cells), overexpressing CHI3L1 group (LPS-stimulated cells transfected with CHI3L1 plasmid), overexpressing CHI3L1 control group [LPS-stimulated cells transfected with negative control (NC) plasmid], CHI3L1 interference group [LPS-stimulated cells transfected with CHI3L1 small interfering RNA (siRNA)], CHI3L1 interference control group (LPS-stimulated cells transfected with CHI3L1-siRNA NC). The levels of extracellular caspase-1 and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by ELISA. The protein expressions of intracellular IL-1 β , signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3),

protein kinase B (Akt) and phosphorylated Akt (p-Akt) were detected by Western blotting. **Results** According to the results of CCK-8 and ELISA, the best concentration of 5 mg/L LPS was selected for the subsequent experiment. The transfection was validated by PCR and Western blotting. Compared with the blank control group, the levels of extracellular IL-1 β , caspase-1 and the protein expressions of intracellular Akt, p-Akt, and IL-1 β were significantly increased in the model group [IL-1 β (ng/L): 11.22 ± 0.55 vs. 8.63 ± 0.63 , caspase-1 (pmol/L): 9.47 ± 0.22 vs. 8.65 ± 0.15 , Akt/GAPDH: 1.36 ± 0.12 vs. 1.06 ± 0.15 , p-Akt/GAPDH: 0.78 ± 0.07 vs. 0.09 ± 0.01 , IL-1 β /GAPDH: 1.38 ± 0.12 vs. 0.18 ± 0.03 , all $P < 0.05$]. Compared with the model group and the overexpressing CHI3L1 control group, the levels of extracellular IL-1 β , caspase-1 and the protein expressions of intracellular p-Akt and IL-1 β were significantly increased in the overexpressing CHI3L1 group [IL-1 β (ng/L): 14.93 ± 0.97 vs. 11.22 ± 0.55 , 9.38 ± 0.40 , caspase-1 (pmol/L): 10.35 ± 0.03 vs. 9.47 ± 0.22 , 8.46 ± 0.24 , p-Akt/GAPDH: 1.21 ± 0.04 vs. 0.78 ± 0.07 , 0.63 ± 0.04 , IL-1 β /GAPDH: 1.87 ± 0.08 vs. 1.38 ± 0.12 , 1.51 ± 0.17 , all $P < 0.05$]. Compared with the model group and the CHI3L1 interference control group, the levels of extracellular IL-1 β , caspase-1 and the protein expressions of intracellular p-Akt and IL-1 β were significantly decreased in the CHI3L1 interference group [IL-1 β (ng/L): 8.98 ± 0.73 vs. 11.22 ± 0.55 , 10.44 ± 0.65 , caspase-1 (pmol/L): 7.61 ± 0.63 vs. 9.47 ± 0.22 , 8.37 ± 0.38 , p-Akt/GAPDH: 0.50 ± 0.04 vs. 0.78 ± 0.07 , 0.94 ± 0.06 , IL-1 β /GAPDH: 0.77 ± 0.02 vs. 1.38 ± 0.12 , 1.13 ± 0.07 , all $P < 0.05$]. **Conclusions** CHI3L1 may mediate the damage of skeletal muscle stem cells in sepsis by increasing the expression of caspase-1 and IL-1 β . CHI3L1 may be involved in the regulation of Akt signaling pathway in skeletal muscle stem cells, but has no significant effect on STAT3 signaling pathway.

[Key words] Chitinase-3-like protein 1; Sepsis; Skeletal muscle stem cells; Interleukin-1 β ; Caspase-1

Fund program: Natural Science Foundation of Jiangxi Province of China (20202BAB206058)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210108-00043

危重患者经常发生被称为重症监护病房获得性衰弱 (intensive care unit-acquired weakness, ICU-AW) 的神经病变和 (或) 肌肉病变, 导致住院病死率增加, 住院时间及机械通气时间延长, ICU 后长期衰弱和其他疾病及生活质量下降, 并且 ICU-AW 与较差的 5 年生存率独立相关^[1-3]。脓毒症是导致重症患者发生 ICU-AW 的重要原因^[4-5]。近期来有研究表明, 脓毒症患者因为骨骼肌干细胞受损而出现长期的肌无力^[6-9]。骨骼肌干细胞通常被称为卫星细胞, 在正常情况下是静止的, 但在肌肉损伤时, 可以被激活进入细胞周期, 然后增殖、分化, 以修复受损的肌纤维^[10]。几丁质酶-3 样蛋白 1 (chitinase-3-like protein 1, CHI3L1) 属于 18 糖基水解酶家族, 在原核生物和真核生物中常见, 可由巨噬细胞、中性粒细胞、成纤维细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞等多种细胞分泌^[11]。越来越多的证据表明, CHI3L1 参与了组织重塑和炎症过程^[12]。本课题组前期的研究表明, CHI3L1 在脓毒症小鼠骨骼肌组织中呈高水平表达, 下调 CHI3L1 水平可减轻骨骼肌干细胞的损伤^[13]。本研究采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激体外培养的小鼠骨骼肌卫星细胞, 通过 CHI3L1 质粒和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 调控细胞中 CHI3L1 的表达, 观察天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、蛋白激酶 B

(protein kinase B, Akt)、磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt) 表达水平的变化, 以期阐明在脓毒症模型中 CHI3L1 参与骨骼肌干细胞损伤的潜在机制, 从而为脓毒症的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验细胞及主要试剂: 小鼠骨骼肌卫星细胞及原代骨骼肌卫星细胞基础培养基 (上海赛百慷公司), LPS (北京索莱宝公司), 小鼠 IL-1 β 、caspase-1 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (江苏酶免实业公司), 脂质体 3000 (美国 Invitrogen 公司), IL-1 β 、STAT3、CHI3L1 一抗 (美国 Affinity 公司), Akt、p-Akt 一抗 (美国 CST 公司), 山羊抗兔二抗 (中杉金桥公司)。

1.2 细胞培养: 细胞用 0.25% 胰酶 (含 0.02% 乙二胺四乙酸) 消化后离心 3 min, 重悬后接种于 37℃、5% 二氧化碳 (carbon dioxide, CO₂) 培养箱中继续培养。

1.3 LPS 最佳浓度的筛选: 待细胞贴壁后, 分 6 组加入 0.5、1、5、10、50、100 mg/L 不同浓度的 LPS, 空白对照组只加基础培养基, 24 h 后用 ELISA 检测细胞上清液中 IL-1 β 水平, 用细胞增殖与毒性试剂盒 (cell counting kit-8, CCK8) 检测细胞增殖情况。具体操作方法: 将待测的 96 孔板细胞每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 每组设置 6 个平行孔, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h, 酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的吸光度 (absorbance, A) 值。

1.4 载体构建: 在美国国家生物技术信息中心查

找 CHI3L1 的基因编码序列,构建 CHI3L1 过表达载体 CHI3L1-pcDNA3.1。设计好目的基因的模拟剂序列后交由通用生物系统(安徽)有限公司合成 3 条干扰序列 CHI3L1-siRNA-1、CHI3L1-siRNA-2、CHI3L1-siRNA-3 及阴性对照 siRNA。

1.5 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,并经本院医学伦理委员会批准(审批号:2020-032)。

1.6 细胞转染及分组处理

1.6.1 细胞转染:当培养细胞密度达 70% 时,准备转染。以 125 μ L Opti-MEM 培养基分别稀释 2.5 μ g 质粒和 12.5 μ L siRNA (siRNA 干粉溶解至每吸光度 125 μ L),混匀后室温孵育 5 min;用 5 μ L 脂质体 3 000 以 125 μ L Opti-MEM 培养基稀释。然后,将上述两种混合物混匀,室温孵育 15 min,将混合液滴加到 6 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 4~6 h,将培养基更换为含 20% 胎牛血清的完全培养基;48 h 后进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)验证,选择效率最佳的 siRNA 进行后续实验。

1.6.2 细胞分组及处理:将培养好的细胞按随机数字表法分为 6 组,①空白对照组:用原代骨骼肌卫星细胞基础培养基常规培养;②模型组:加入 5 mg/L LPS 刺激细胞;③过表达 CHI3L1 组:转染 CHI3L1 过表达质粒后加入 5 mg/L LPS 刺激细胞;④过表达 CHI3L1 对照组:转染空载质粒后加入 5 mg/L LPS 刺激细胞;⑤干扰 CHI3L1 对照组:转染阴性对照 siRNA 后加入 5 mg/L LPS 刺激细胞;⑥干扰 CHI3L1 组:转染 CHI3L1-siRNA-1 后加入 5 mg/L LPS 刺激细胞;细胞转染后继续培养 48 h 加入 LPS 刺激 24 h,然后收集细胞用 Western blotting 检测蛋白表达水平,收集上清液用 ELISA 检测 caspase-1 和 IL-1 β 含量。

1.7 荧光定量 PCR 检测 CHI3L1 mRNA 表达:用超纯 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,利用上海生物工程股份有限公司合成的引物序列,根据反转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板,在荧光定量 PCR 仪上检测 CHI3L1 mRNA 表达。

1.8 Western blotting 检测 Akt、STAT3、IL-1 β 、p-Akt 的蛋白表达:取各组细胞加入细胞裂解液,作用 30 min 后,4℃ 离心 10 min,取上清液即可获得总蛋白。用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行十二烷

基苯磺酸钠凝胶电泳 1~2 h,湿法转膜 30~90 min。加入 CHI3L1、IL-1 β 、STAT3、Akt、p-Akt 一抗溶液孵育,4℃ 过夜;再加入二抗室温孵育 1~2 h。在膜上滴加电化学发光曝光液,凝胶成像系统中曝光。用 Image lab 软件分析各蛋白条带灰度值,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参照,计算目的蛋白的相对表达量。

1.9 统计学分析:使用 SPSS 19.0 统计软件分析数据。符合正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组数据符合正态性和方差齐性采用 *t* 检验,多组数据采用方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 处理细胞最佳浓度的筛选(表 1):与空白对照组比较,随着 LPS 浓度的升高细胞活性升高,在 LPS 浓度为 1 mg/L、5 mg/L 时 IL-1 β 水平显著升高,根据以上结果以及实验目的,筛选出最佳浓度 5 ng/L 的 LPS 进行后续实验。

表 1 不同浓度 LPS 刺激后小鼠骨骼肌卫星细胞的增殖活性及细胞上清液中 IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(个)	细胞存活率(%)	IL-1 β (ng/L)
空白对照组	3	100.00 $\pm$ 2.87	10.33 $\pm$ 0.28
LPS 0.5 mg/L 组	3	110.94 $\pm$ 8.92 ^a	10.99 $\pm$ 0.71
LPS 1 mg/L 组	3	113.30 $\pm$ 2.91 ^a	14.57 $\pm$ 1.70 ^a
LPS 5 mg/L 组	3	119.03 $\pm$ 6.85 ^a	14.63 $\pm$ 2.22 ^a
LPS 10 mg/L 组	3	118.62 $\pm$ 3.02 ^a	10.44 $\pm$ 0.56
LPS 50 mg/L 组	3	118.86 $\pm$ 4.90 ^a	11.20 $\pm$ 0.95
LPS 100 mg/L 组	3	126.66 $\pm$ 3.22 ^a	13.66 $\pm$ 0.16 ^a

注:LPS 为脂多糖,IL-1 β 为白细胞介素 1 β ;与空白对照组比较,^a $P<0.05$

2.2 PCR 验证转染效率(图 1):与空白对照组及过表达阴性对照组比较,CHI3L1 过表达组中 CHI3L1 mRNA 表达明显升高;与干扰阴性对照组比较,siRNA-1、siRNA-2 干扰组 CHI3L1 mRNA 表达呈下降趋势(均 $P<0.05$),说明 CHI3L1 转染有效。

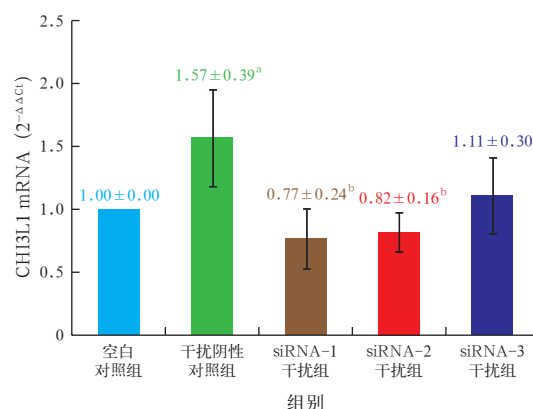
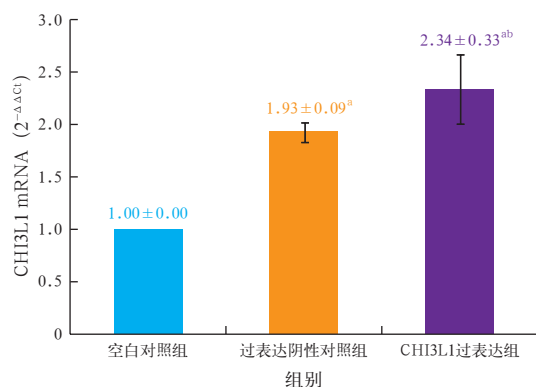
2.3 Western blotting 验证转染效率(图 2):与空白对照组及过表达阴性对照组比较,CHI3L1 过表达组中 CHI3L1 蛋白表达明显升高;与空白对照组及干扰阴性对照组比较,siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 干扰组 CHI3L1 的蛋白表达均呈下降趋势,以 siRNA-1 组的干扰效果最好(均 $P<0.05$),说明 CHI3L1 转染有效,因此用于后续实验。

2.4 siRNA 介导的 CHI3L1 基因沉默可减少骨骼肌卫星细胞外 IL-1 β 和 caspase-1 的含量(表 2):与

空白对照组比较,模型组细胞外 IL-1 β 和 caspase-1 含量均明显升高(均 $P<0.05$);与模型组、过表达 CHI3L1 对照组比较,过表达 CHI3L1 组 IL-1 β 和 caspase-1 含量均明显升高(均 $P<0.05$);与模型组、

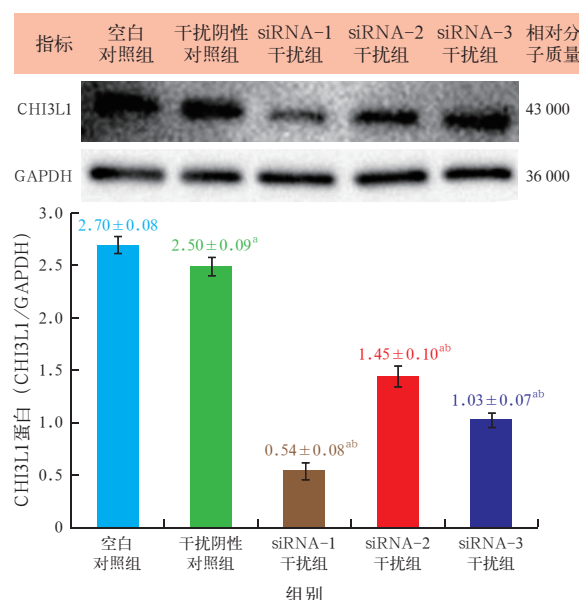
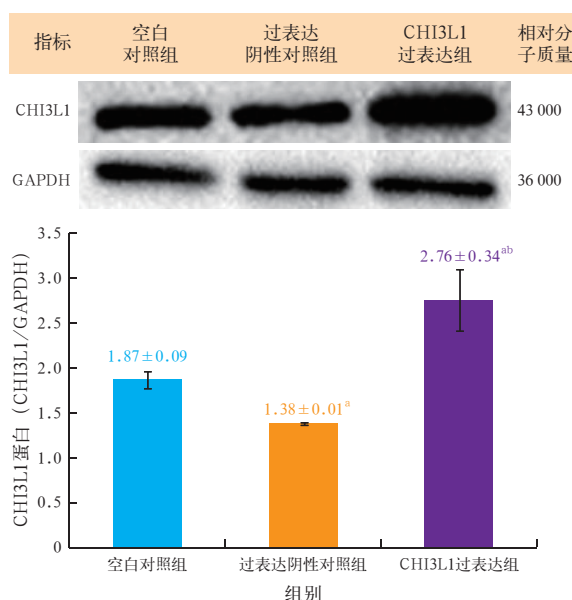
干扰 CHI3L1 对照组比较,干扰 CHI3L1 组 IL-1 β 和 caspase-1 含量均明显降低(均 $P<0.05$)。

2.5 siRNA 介导的 CHI3L1 基因沉默可减少骨骼肌卫星细胞中 IL-1 β 和 p-Akt 的蛋白表达(表 2;



注: CHI3L1 为几丁质酶-3 样蛋白 1;与空白对照组比较, ^a $P<0.05$;与阴性对照组比较, ^b $P<0.05$

图 1 转染后各组小鼠骨骼肌卫星细胞中 CHI3L1 mRNA 表达水平比较



注: CHI3L1 为几丁质酶-3 样蛋白 1, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与空白对照组比较, ^a $P<0.05$;与阴性对照组比较, ^b $P<0.05$

图 2 转染后各组小鼠骨骼肌卫星细胞中 CHI3L1 蛋白的表达

表 2 各组小鼠骨骼肌卫星细胞外 IL-1 β 、caspase-1 含量及细胞中 STAT3、Akt、IL-1 β 、p-Akt 的蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	IL-1 β (ng/L)	caspase-1 (pmol/L)	STAT3/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH	IL-1 β /GAPDH
空白对照组	3	8.63 ± 0.63	8.65 ± 0.15	0.85 ± 0.13	1.06 ± 0.15	0.09 ± 0.01	0.18 ± 0.03
模型组	3	11.22 ± 0.55 ^a	9.47 ± 0.22 ^a	0.96 ± 0.07	1.36 ± 0.12 ^a	0.78 ± 0.07 ^a	1.38 ± 0.12 ^a
过表达 CHI3L1 对照组	3	9.38 ± 0.40 ^b	8.46 ± 0.24 ^b	0.81 ± 0.06 ^b	1.05 ± 0.07 ^b	0.63 ± 0.04 ^{ab}	1.51 ± 0.17 ^a
过表达 CHI3L1 组	3	14.93 ± 0.97 ^{abc}	10.35 ± 0.03 ^{abc}	0.48 ± 0.01 ^{ab}	0.99 ± 0.03 ^b	1.21 ± 0.04 ^{abc}	1.87 ± 0.08 ^{abc}
干扰 CHI3L1 对照组	3	10.44 ± 0.65 ^a	8.37 ± 0.38 ^b	0.94 ± 0.05	0.95 ± 0.06 ^b	0.94 ± 0.06 ^{ab}	1.13 ± 0.07 ^{ab}
干扰 CHI3L1 组	3	8.98 ± 0.73 ^{bd}	7.61 ± 0.63 ^{abd}	0.66 ± 0.05 ^{ab}	0.95 ± 0.07 ^b	0.50 ± 0.04 ^{abd}	0.77 ± 0.02 ^{abd}

注: IL-1 β 为白细胞介素-1 β , caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, STAT3 为信号转导和转录激活因子 3, Akt 为蛋白激酶 B, p-Akt 为磷酸化 Akt, CHI3L1 为几丁质酶-3 样蛋白 1, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与空白对照组比较, ^a $P<0.05$;与模型组比较, ^b $P<0.05$;与过表达 CHI3L1 对照组比较, ^c $P<0.05$;与干扰 CHI3L1 对照组比较, ^d $P<0.05$

图 3): 与空白对照组比较, 模型组细胞中 Akt、p-Akt、IL-1 β 的蛋白表达均明显升高(均 $P < 0.05$), 而 STAT3 的蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较, 过表达 CHI3L1 对照组、过表达 CHI3L1 组、干扰 CHI3L1 组 STAT3、Akt 的蛋白表达均降低; 与模型组、过表达 CHI3L1 对照组比较, 过表达 CHI3L1 组细胞中 p-Akt、IL-1 β 的蛋白表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$); 与模型组、干扰 CHI3L1 对照组比较, 干扰 CHI3L1 组 p-Akt、IL-1 β 的蛋白表达明显降低(均 $P < 0.05$)。



Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, STAT3 为信号转导和转录激活因子 3, p-Akt 为磷酸化蛋白激酶 B, IL-1 β 为白细胞介素-1 β , Akt 为蛋白激酶 B, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 Western blotting 检测各组小鼠骨骼肌卫星细胞中 STAT3、p-Akt、IL-1 β 、Akt 的蛋白表达水平

3 讨论

CHI3L1 被认为是脓毒症的生物标志物, 并与病情严重程度呈正相关^[14]。目前有关脓毒症引起的骨骼肌细胞损伤中, 探索 CHI3L1 生物学和生理学功能方面的研究还很有限。本课题组前期研究显示, CHI3L1 可加重脓毒症小鼠骨骼肌组织损伤, 而沉默 CHI3L1 可能促进肌卫星细胞的增殖、抑制其凋亡^[13]。因此, 本研究的目的是进一步探讨 CHI3L1 在脓毒症骨骼肌干细胞损伤中的作用机制。本研究显示, CHI3L1 可能通过 caspase-1 和 IL-1 β 导致脓毒症时小鼠骨骼肌卫星细胞的损伤, CHI3L1 可能参与了调节骨骼肌卫星细胞中 Akt 的信号通路, 而对 STAT3 信号通路无明显影响。

本研究显示, LPS 可以诱导骨骼肌卫星细胞 caspase-1 和 IL-1 β 的表达, 而 siRNA 介导的 CHI3L1 基因沉默可减少 caspase-1 和 IL-1 β 表达。caspase-1 是天冬氨酸特异性半胱氨酸家族成员之一, IL-1 β 前体可通过 caspase-1 酶转化为有生物活性的 IL-1 β ^[15], caspase-1 也参与了其他促炎细胞

因子的激活, 最显著的是 IL-18。中和 IL-1 和 IL-18 进而减轻炎症反应, 可降低脓毒性休克患者的病死率^[16]。阻断 caspase-1 可抑制脑细胞焦亡, 降低脓毒症小鼠血清和脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 的表达, 减轻脓毒症相关性脑病^[17]。caspase-1 介导的外周血单个核细胞焦亡与脓毒症的严重程度及患者 28 d 病死率呈正相关^[18]。IL-1 β 是脓毒症时产生的最重要促炎细胞因子之一^[6-7], IL-1 β 可介导自身生成, 并诱导多种促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的表达, 在脓毒症及脓毒性休克中发挥重要作用^[19-20]。IL-1 导致 ICU-AW 可能包括但不限于以下机制: IL-1 与 Ry 受体 1 联合, 阻断肌浆网钙离子的释放^[21], 上调诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达, 促进氧化损伤^[22], 刺激骨骼肌细胞中 IL-6 的生成^[23]和前列腺素 E2 的产生及蛋白水解^[24], 使泛素基因表达上调^[25], 抑制蛋白合成^[26], 诱导骨骼肌蛋白水解^[27]。因此, 下调 CHI3L1 的表达可能通过减少 caspase-1、IL-1 介导的炎症损伤、蛋白降解及细胞焦亡等来减轻脓毒症中骨骼肌细胞和肌卫星细胞损伤。

Akt 与炎症反应密切相关, 激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt 信号通路可显著增加 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)的表达, 促进炎症因子的释放, 抑制 PI3K/Akt 信号通路可改善脓毒症小鼠急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[28-29]。抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/Akt 通路可能减轻脓毒症所致急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)^[30]。CHI3L1 可通过 PI3K/Akt 磷酸化在辅助性 T 细胞 2(helper T cell 2, Th2)炎症和 M2 巨噬细胞极化中发挥关键作用, 导致食物过敏^[31]。CHI3L1 在结肠上皮细胞激活 Akt 信号通路中起重要作用, 从而促进慢性结肠炎的发生^[32]。Janus 激酶(Janus kinase, JAK)-STAT 途径广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫炎症调节等过程, 是众多细胞因子信号转导的重要途径^[33]。CHI3L1 协同激活感染性结肠炎模型小鼠肠上皮细胞中 IL-6 介导的 STAT3 磷酸化, 促进革兰阴性菌感染性结肠炎的发生^[34]。本研究显示, LPS 刺激骨骼肌卫星细胞中 Akt、p-Akt 表达增加, 而对 STAT3 表达无显著影响, 下调 CHI3L1 水平可降低 p-Akt 的表达, 因此, CHI3L1 可能通过激活卫星细胞中 Akt 信号通路而

非 STAT3 信号通路,继而发挥生物学功能。

但本研究也存在局限性和不足之处:①需要进一步的研究来真正了解 CHI3L1 在骨骼肌干细胞中产生和调控的机制,并详细定义其分子模型,包括其受体和下游一系列靶点;②本研究为体外实验,还需动物实验来验证 CHI3L1 对骨骼肌干细胞的干预效应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fan E, Cheek F, Chlan L, et al. An official American thoracic society clinical practice guideline: the diagnosis of intensive care unit-acquired weakness in adults [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190 (12): 1437-1446. DOI: 10.1164/rccm.201411-2011ST.
- [2] Van Aerde N, Meersseman P, Debaveye Y, et al. Five-year impact of ICU-acquired neuromuscular complications: a prospective, observational study [J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46 (6): 1184-1193. DOI: 10.1007/s00134-020-05927-5.
- [3] 王晓敏, 朱晓萍. ICU 获得性肌无力的发生和诊断及治疗 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32 (8): 1020-1024. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200709-00505.
- [4] Wang XM, Zhu XP. Occurrence, diagnosis, and rehabilitation of intensive care unit-acquired weakness [J]. *Chin Crit Care Med*, 2020, 32 (8): 1020-1024. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200709-00505.
- [5] Weber-Carstens S, Deja M, Koch S, et al. Risk factors in critical illness myopathy during the early course of critical illness: a prospective observational study [J]. *Crit Care*, 2010, 14 (3): R119. DOI: 10.1186/cc9074.
- [6] Winkelman C. The role of inflammation in ICU-acquired weakness [J]. *Crit Care*, 2010, 14 (4): 186. DOI: 10.1186/cc9187.
- [7] Chatre L, Verdonk F, Rocheteau P, et al. A novel paradigm links mitochondrial dysfunction with muscle stem cell impairment in sepsis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863 (10 Pt B): 2546-2553. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.04.019.
- [8] Walsh CJ, Batt J, Herridge MS, et al. Transcriptomic analysis reveals abnormal muscle repair and remodeling in survivors of critical illness with sustained weakness [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29334. DOI: 10.1038/srep29334.
- [9] Rocheteau P, Chatre L, Briand D, et al. Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 10145. DOI: 10.1038/ncomms10145.
- [10] Dos Santos C, Hussain SN, Mathur S, et al. Mechanisms of chronic muscle wasting and dysfunction after an intensive care unit stay. A pilot study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194 (7): 821-830. DOI: 10.1164/rccm.201512-2344OC.
- [11] De Luca G, Ferretti R, Bruschi M, et al. Cyclin D3 critically regulates the balance between self-renewal and differentiation in skeletal muscle stem cells [J]. *Stem Cells*, 2013, 31 (11): 2478-2491. DOI: 10.1002/stem.1487.
- [12] Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (34): 25803-25810.
- [13] Di Rosa M, Distefano G, Zorana K, et al. Chitinases and immunity: ancestral molecules with new functions [J]. *Immunobiology*, 2016, 221 (3): 399-411. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.11.014.
- [14] Li F, Sheng Z, Lan H, et al. Downregulated CHI3L1 alleviates skeletal muscle stem cell injury in a mouse model of sepsis [J]. *IUBMB Life*, 2020, 72 (2): 214-225. DOI: 10.1002/iub.2156.
- [15] Hattori N, Oda S, Sadahiro T, et al. YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis [J]. *Shock*, 2009, 32 (4): 393-400. DOI: 10.1097/SHK.0b013e31819e2c0c.
- [16] Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme [J]. *Science*, 1992, 256 (5053): 97-100. DOI: 10.1126/science.1373520.
- [17] Vanden Berghe T, Demon D, Bogaert P, et al. Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189 (3): 282-291. DOI: 10.1164/rccm.201308-1535OC.
- [18] Xu XE, Liu L, Wang YC, et al. Caspase-1 inhibitor exerts brain-protective effects against sepsis-associated encephalopathy and cognitive impairments in a mouse model of sepsis [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 80: 859-870. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.05.038.
- [19] Wang YC, Liu YK, Liu QX, et al. Caspase-1-dependent pyroptosis of peripheral blood mononuclear cells is associated with the severity and mortality of septic patients [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 9152140. DOI: 10.1155/2020/9152140.
- [20] Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever [J]. *J Infect Dis*, 1990, 161 (1): 79-84. DOI: 10.1093/infdis/161.1.79.
- [21] Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, et al. Into the eye of the cytokine storm [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76 (1): 16-32. DOI: 10.1128/MMBR.05015-11.
- [22] Friedrich O, Yi B, Edwards JN, et al. IL-1 α reversibly inhibits skeletal muscle ryanodine receptor: a novel mechanism for critical illness myopathy? [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50 (6): 1096-1106. DOI: 10.1165/rccm.2013-0059OC.
- [23] Adams V, Nehrhoff B, Späte U, et al. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1 β and NF κ B activation: an in vitro and in vivo study [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 54 (1): 95-104. DOI: 10.1016/s0008-6363(02)00228-6.
- [24] Luo G, Hershko DD, Robb BW, et al. IL-1 β stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF- κ B [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 284 (5): R1249-1254. DOI: 10.1152/ajpregu.00490.2002.
- [25] Goldberg AL, Baracos V, Rodemann P, et al. Control of protein degradation in muscle by prostaglandins, Ca²⁺, and leukocytic pyrogen (interleukin 1) [J]. *Fed Proc*, 1984, 43 (5): 1301-1306.
- [26] Llovera M, Carbó N, López-Soriano J, et al. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle [J]. *Cancer Lett*, 1998, 133 (1): 83-87. DOI: 10.1016/s0304-3835(98)00216-x.
- [27] Cooney RN, Maish GO 3rd, Gilpin T, et al. Mechanism of IL-1 induced inhibition of protein synthesis in skeletal muscle [J]. *Shock*, 1999, 11 (4): 235-241. DOI: 10.1097/00024382-199904000-00002.
- [28] Wondergem R, Graves BM, Li C, et al. Lipopolysaccharide prolongs action potential duration in HL-1 mouse cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303 (8): C825-833. DOI: 10.1152/ajpcell.00173.2012.
- [29] Qiu YM, Huang XJ, Huang LN, et al. 5-HT_{1A} receptor antagonist improves behavior performance of delirium rats through inhibiting PI3K/Akt/mTOR activation-induced NLRP3 activity [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68 (4): 311-319. DOI: 10.1002/iub.1491.
- [30] Liu Y, Zhu JQ, Jin XH, et al. Up-regulation of miR-146b-3p protects septic mice with acute respiratory distress syndrome by inhibiting PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2020, 52 (4): 229-236. DOI: 10.1007/s10863-020-09839-3.
- [31] 王倩, 龚晓莹, 贾佳, 等. 瑞博西林对脓毒症急性肾损伤的肾脏保护作用及机制 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32 (2): 204-209. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200108-00038.
- [32] Wang Q, Gong XY, Jia J, et al. Protective effect and mechanism of Ribociclib on sepsis induced-acute kidney injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2020, 32 (2): 204-209. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200108-00038.
- [33] Kim EG, Kim MN, Hong JY, et al. Chitinase 3-like 1 contributes to food allergy via M2 macrophage polarization [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2020, 12 (6): 1012-1028. DOI: 10.4168/aair.2020.12.6.1012.
- [34] Chen CC, Llado V, Eurich K, et al. Carbohydrate-binding motif in chitinase 3-like 1 (CHI3L1/YKL-40) specifically activates Akt signaling pathway in colonic epithelial cells [J]. *Clin Immunol*, 2011, 140 (3): 268-275. DOI: 10.1016/j.clim.2011.04.007.
- [35] Heneghan AF, Pierre JF, Kudsk KA. JAK-STAT and intestinal mucosal immunology [J]. *JAKSTAT*, 2013, 2 (4): e25530. DOI: 10.4161/jkst.25530.
- [36] Tran HT, Lee IA, Low D, et al. Chitinase 3-like 1 synergistically activates IL6-mediated STAT3 phosphorylation in intestinal epithelial cells in murine models of infectious colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20 (5): 835-846. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000000.

(收稿日期: 2021-01-08)