

sKlotho 通过调控 RIP1 的表达对缺血性脑卒中的改善作用

石雨妍 魏璇 张思怡 曹欣瑶 毕芳芳

西安培华学院 陕西西安 710125

摘要: 目的: 探讨 sKlotho 通过调控 RIP1 的表达对缺血性脑卒中的改善作用, 从新的视角深入了解缺血性脑卒中后 sKlotho 的变化规律及作用, 阐明 sKlotho 参与缺血性脑卒中后 RIP1 表达调控的分子机制, 对深化缺血性脑卒中的病理过程理解和设定临床干预靶点奠定基础。方法: 将健康雄性 C57BL/6 鼠 40 只, 随机平均分为对照组 (Sham)、模型组 (MCAO)。采用 Real-time PCR、Western blotting、免疫组化染色等方法检测 sKlotho、RIP1 蛋白和 mRNA 的表达变化; 采用 Co-IP 方法检测 sKlotho 和 RIP1 蛋白的相互作用。结果: Klotho 在 MCAO 模型小鼠脑部水平降低 ($P < 0.05$), 过表达 Klotho 能有效抑制神经元死亡并缓解脑损伤和神经功能障碍。MCAO 模型神经元呈现坏死性凋亡蛋白 RIP1 和 MLKL 激活等坏死性凋亡改变, 过表达 Klotho 促进 RIP1 降解 ($P < 0.05$), 并减轻了神经元坏死性凋亡。结论: Klotho 促进 RIP1 降解、抑制神经元坏死性凋亡可能是其脑卒中后脑保护作用的重要方式。

关键词: sKlotho; RIP1; 缺血性脑卒中

世界每年约有 1500 万人罹患卒中, 近 600 万人死于该病, 近 50 万人遗留终身残疾, 其已成为继痴呆后致残的第二位因素^[1]。缺血性脑卒中约占临床上脑卒中总数的 60%~80%, 可反复发作, 有一定的致残率和致死率, 因给患者遗留不同程度的神经功能障碍, 其突发性、严重性和不可预测性给患者和家属带来了严重的生理和心理负担。因此相关机制和治疗策略一直是神经科学领域的研究焦点。大量的基础和临床研究致力于干预卒中中病理相关的信号分子, 以开拓有效的神经保护治疗^[3-5]。

为了解决这个问题, 本项目拟在以往研究基础上, 利用小鼠 MCAO 模型, 综合运用分子生物学等体内、外手段, 从新的视角深入了解缺血性脑卒中后 sKlotho 的变化规律及作用, 阐明 sKlotho 参与缺血性脑卒中后 RIP1 表达调控的分子机制, 对深化缺血性脑卒中的病理过程理解和设定临床干预靶点奠定基础。

一、材料与方法

1. 材料

(1) 动物

SPF 级、12 周龄 C57BL/6 雄鼠, 体重 22 ~ 25g, 西安培华学院中心实验室提供。

(2) 试剂

β -actin antibody (abcam), Klotho antibody (abcam),

HRP Conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary antibody (abcam), RIP1 antibody (abcam), PVDF 膜 (millipore), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天), 蛋白 Marker (碧云天), 增强型 ECL 化学发光检测试剂盒 (天根), DEPC 水 (碧云天), 5x qRT SurperMix (天根), 2xTaq Master Mix (天根), DNA marker (碧云天), 琼脂糖 (碧云天), SYBR Green Master Mix (天根), 其它化学试剂均为国产分析纯。

2. 方法

(1) 免疫印迹实验

1. 提取组织总蛋白: (1) 切取 10mg 左右脑组织, 置于 EP 管中; (2) 加入相应量的 RIPA 裂解液; (3) 用 CPX130 超声破碎仪超声破碎组织; (4) 在冷冻离心机中 (8000g/min,) 离心 10min 取上清; (5) 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度; (6) 加入适量的 5x SDS PAGE loading buffer 至终浓度为 1x, 99℃加热 5min, 即为组织总蛋白提取液。

2. 蛋白印迹: (1) 电泳: 根据蛋白含量上样, 101V、90 min; (2) 转膜: 电泳完成后, 按照白板-滤纸-PVDF 膜 (使用前在甲醇中活化 15min)-凝胶-滤纸-黑板的顺序置于夹子中, 加入预冷的 1x Transfer buffer, 100V、90 min; (3) 封闭: 5%脱脂牛奶封闭 2h; (4) 抗体孵育: 4℃摇床孵育过夜; (5) 曝光: ECL 发光液于暗房中曝光。

(2) 实时定量聚合酶链式反应 (qPCR)

1. 提取总 RNA: (1) 抽提: 称取 50mg 左右的组织, 加入 1ml Trizol。(2) 分相: 加入氯仿 (氯仿: Trizol=1:5), 上下颠倒 15 次混匀, 室温放置 10min, 4℃, 12000 rpm, 离心 15min, 小心吸取上清液; (3) 总 RNA 沉淀: 加入异丙醇 (异丙醇: 氯仿 =1:1), 上下颠倒 15 次混匀, 室温下静止 10min, 4℃, 12000rpm, 离心 10min, 弃上清; (4) 总 RNA 清洗: 加入 500 μl 预冷的 75% 乙醇, 涡旋震荡 10s, 4℃, 7500g, 离心 5min, 去上清; (5) 总 RNA 保存: 室温下倒置于滤纸上, 干燥 RNA。最后用 40 μl DEPC 水溶解沉淀, 55℃ 孵育 10min。使用微量分光光度计测量 RNA 浓度, 保存至 -80℃。

2. 合成总 cDNA: 将 RNA 样品用 DEPC 稀释至同一浓度 (500 ng/μl); 加入 5 × qRT SuperMix 和 RNase free ddH₂O, 95℃, 10min, 50℃, 30min, 85℃, 5min 即得总 cDNA。

3. qPCR: 预变性 95℃, 10min; 变性 95℃, 10s; 退火 60℃, 30s; 延伸 72℃, 30s; 40 个循环, 即可得 qPCR 数据。

4. 统计学分析

采用 SPSS18.0 统计软件。采用单因素方差分析, 结果以 “Mean ± SD” 表示。当 P < 0.01 时, 差异极显著, 有统计学意义。

二、结果

1. MCAO 后 Klotho、RIP1 表达

从图 1 得出, WB 实验结果显示与 Sham 组相比, MCAO 组 Klotho 蛋白表达明显降低, RIP1 蛋白表达明显升高 (A), 差异极显著 (P < 0.01)。qPCR 实验结果显示 Klotho mRNA 水平降低, RIP1 mRNA 水平升高 (B), 差异极显著 (P < 0.01)。

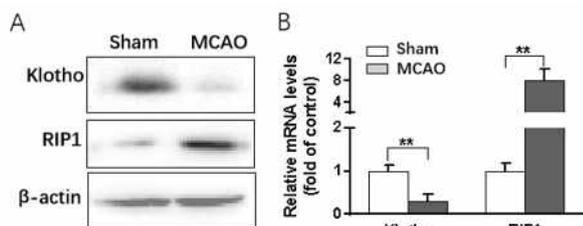


图 2. MCAO 后 Klotho、RIP1 表达 ** 与 Sham 比较: P<0.01

2. MCAO 后 坏死样凋亡相关蛋白表达

从图 2 得出, WB 实验结果显示与 Sham 组相比, MCAO

组坏死性凋亡相关蛋白 RIP1、RIP3、MLKL、Caspase8 表达增加 (A, B), 差异极显著 (P < 0.01)。

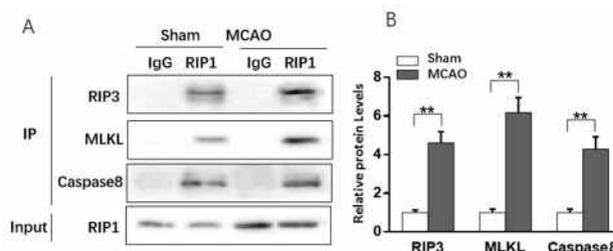


图 2. MCAO 后坏死样凋亡相关蛋白表达 ** 与 Sham 比较: P<0.01

3. Klotho 过表达后 RIP1 蛋白表达

从图 3 得出, WB 实验结果显示过表达 Klotho 后, RIP1 蛋白表达减少 (A, B), 差异极显著 (P < 0.01)。

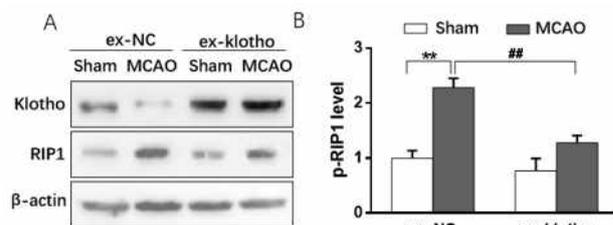


图 3. Klotho 过表达后 RIP1 蛋白表达 **, ## 与 Sham 比较:

P<0.01

三、讨论

缺血性卒中 (cerebral ischemic stroke, CIS), 也称脑梗塞, 指由于脑的供血动脉狭窄或闭塞、供血不足导致的脑组织坏死的总称^[9]。

神经元死亡是 CIS 后脑损伤的主要病理改变, 呈现被动性坏死或多种主动性死亡, 其中坏死性凋亡 (Necroptosis) 是一种调控性细胞死亡方式, 主要由受体相互作用蛋白 1 (Receptor-interacting protein 1, RIP1) 调控^[10]。RIP1 是受体相互作用蛋白激酶家族的一员, 参与了决定细胞 “生死存亡” 的多种重要信号通路。研究表明, 干预 RIP1 蛋白表达或阻断 RIP1 与 RIP3 分子复合物的形成, 可在 CIS 动物模型中发挥显著的脑保护作用, 而对机体其他系统功能无明显的毒副作用。作为生命进程不可缺少的重要蛋白之一, Klotho 介导多种生理及病理信号转导, 参与生长, 分化等生理过程, 在脑缺血、阿尔茨海默病、帕金森等疾病的发生与进展中发挥重要作用。本研究以此为出发点, 推测 Klotho 可能通过

RIP1 功能影响 CIS 后神经元坏死性凋亡, 具有较为可靠的理论基础和预实验依据, 并对深入理解 CIS 后神经元坏死性凋亡的调控方式及扩展 Klotho 的临床应用价值具有重要的指导意义。

参考文献

- [1]. Cho, S.M., et al., Risk Factors of Ischemic and Hemorrhagic Strokes During Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation: Analysis of Data From the Extracorporeal Life Support Organization Registry. *Crit Care Med*, 2021. 49(1): p. 91–101.
- [2]. Martins, I.J., Anti-Aging Genes Improve Appetite Regulation and Reverse Cell Senescence and Apoptosis in Global Populations. *Advances in Aging Research*, 2018. 05(01): p. 9–26.
- [3]. Goossens, V., et al., Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(18): p. 8115–9.
- [4]. Dowling, J.P., et al., Kinase-independent function of RIP1, critical for mature T-cell survival and proliferation. *Cell Death Dis*, 2018. 7(9): p. e2379.
- [5]. Nikseresht, S., F. Khodaghali, and A. Ahmadiani, Protective effects of ex-527 on cerebral ischemia-reperfusion injury through necroptosis signaling pathway attenuation. *J Cell Physiol*, 2020. 234(2): p. 1816–1826.
- [6]. Linkermann, A., et al., Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant*, 2015. 13(11): p. 2797–804.
- [7]. Blackwell, K., et al., Two coordinated mechanisms underlie tumor necrosis factor alpha-induced immediate and delayed IkappaB kinase activation. *Mol Cell Biol*, 2020. 33(10): p. 1901–15.
- [8]. Zemirli, N., et al., The E3 ubiquitin ligase RNF121 is a positive regulator of NF-kappaB activation. *Cell Commun Signal*, 2019. 12: p. 72.
- [9]. Ando, K., et al., PIDD death-domain phosphorylation by ATM controls prodeath versus prosurvival PIDDosome signaling. *Mol Cell*, 2012. 47(5): p. 681–93.
- [10]. Upton, J.W., W.J. Kaiser, and E.S. Mocarski, DAI/ZBP1/DLM-1 Complexes with RIP3 to Mediate Virus-Induced Programmed Necrosis that Is Targeted by Murine Cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe*, 2021. 26(4): p. 564.

基金项目:

2023 年西安培华学院大学生创新创业训练计划项目
“sKlotho 调控受体相互作用蛋白 1 表达在缺血性脑卒中的作用及机制研究” (PHDC2023069)
“陕西省教育厅一般专项科学研究计划项目 (3JK0585)”