

## 血液疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000506

# 细胞内外环境中凝溶胶蛋白水平对中性粒细胞趋化功能的影响

王 颖, 孙 妮, 刘书婷, 王寿勇

(重庆医科大学附属儿童医院麻醉科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

**【摘要】目的:**研究细胞内外环境中凝溶胶蛋白水平变化对中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)趋化功能的影响。**方法:**成年 SD 大鼠, 麻醉后采集血液标本, 分离 PMN, 制成  $1 \times 10^7$  个/ml 悬液。在 Transwell 细胞培养系统中进行趋化实验, 分别在上、下室培养基中加入重组凝溶胶蛋白, 或者采用电穿孔方法向 PMN 中分别转入凝溶胶蛋白及其抗体, 观察 PMN 趋化功能的变化。**结果:**在 Transwell 上、下室加入凝溶胶蛋白, 以及向 PMN 中转入凝溶胶蛋白, 趋化至下室的 PMN 数量和趋化指数均没有明显改变( $P>0.05$ ); 向 PMN 中转入凝溶胶蛋白抗体后, 趋化至下室的 PMN 数量减少, 趋化指数降低( $P<0.05$ )。**结论:**细胞外凝溶胶蛋白水平改变, 或向细胞内导入外源性凝溶胶蛋白, 均不能影响 PMN 的趋化能力, 但向细胞内导入凝溶胶蛋白抗体, 可以抑制 PMN 的趋化功能。

**【关键词】**凝溶胶蛋白; 嗜中性粒细胞; 趋化作用; 细胞骨架

**【中图分类号】**R614.1

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2014-08-02

## Effects of extra and intracellular gelsolin levels on polymorphonuclear neutrophil chemotaxis

Wang Ying, Sun Ni, Liu Shuting, Wang Shouyong

(Department of Anesthesiology, The Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education, Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation for Child Development and Disorders)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effects of intracellular or extracellular gelsolin level on N-formylmethionyl-leucyl phenylalanine (fMLP) induced rat polymorphonuclear neutrophil (PMN) chemotaxis. **Methods:** PMN neutrophils were isolated from rat venous blood. Freshly prepared PMN suspension was seeded to the upper chamber of Transwell culture system and recombinant gelsolin was added to the upper or lower chamber to investigate the effect of gelsolin on PMN chemotaxis. Recombinant gelsolin or anti-gelsolin antibodies were transfected into PMN with electroporation method and the chemotaxis function was observed respectively. Cell counts in lower chamber were recorded in real time. **Results:** There was no obvious difference in PMN chemotaxis, regardless of gelsolin was added in the upper or lower chamber or transfected into cytoplasm. However, the rate of chemotaxis and chemotaxis index of PMN electrotransfected with anti-gelsolin antibodies was decreased significantly. **Conclusion:** Changing intracellular or extracellular gelsolin level exerts an effect on fMLP induced PMN chemotaxis; but electrotransfection with anti-gelsolin antibodies intracellularly inhibits fMLP-induced rat PMN chemotaxis.

**【Key words】**gelsolin; polymorphonuclear neutrophil; chemotaxis; cytoskeleton

中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)

作者介绍: 王 颖, Email: echowyg@hotmail.com,

研究方向: 麻醉生理学。

通信作者: 王寿勇, Email: wangshyong@126.com。

基金项目: 重庆市科委资助项目 (编号: cstc2013jcyjA10024)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150309.0014.003.html>

(2015-03-09)

是体内数目最多的炎症细胞, 在包括体外循环<sup>[1-2]</sup>、内毒素<sup>[3]</sup>、感染<sup>[4-5]</sup>等各种因素导致的局部或者全身性炎症反应中, PMN 的定向趋化是炎症反应的始动环节和组织损伤的重要因素。调节 PMN 的趋化运动可能成为调控炎症反应或组织损伤的新策略。细胞运动依赖于细胞骨架的重排, 后者本质上是反复

发生的微丝聚合和解聚。凝溶胶蛋白是目前已知效应最强的微丝切割蛋白,它通过切割、加帽、去帽、成核作用调节肌动蛋白微丝的聚合与解聚,影响细胞骨架的重组,并最终调控细胞运动<sup>[6-8]</sup>。研究发现,凝溶胶蛋白在高迁移性细胞中,表达丰度较高<sup>[9-10]</sup>,在凝溶胶蛋白基因敲除后,多种细胞的运动能力受到显著抑制<sup>[11-12]</sup>。但是,凝溶胶蛋白基因是维持机体正常生理功能所必须的一种功能基因,基因敲除作为一种不可逆手段,将面临生殖、细胞分化与运动、凝血、组织再生等多种功能障碍<sup>[13-14]</sup>。本研究拟以体外分离培养的大鼠 PMN 为对象,初步研究改变细胞培养基中凝溶胶蛋白水平,或者采用电穿孔法改变细胞内凝溶胶蛋白水平来调控 PMN 趋化功能的可行性。

## 1 对象与方法

### 1.1 实验动物

成年 SD 大鼠 40 只,雌雄不拘,体质量约 250~300 g,由重庆医科大学动物实验中心提供。实验动物生产使用许可证号:SCXK(渝)2012-0001。采血前自由进食进水。

### 1.2 实验设备和药品

台式冷冻离心机(湘仪 TDL-5M),Bio-Rad 电穿孔仪(Gene Pulser Xcell),Transwell 细胞培养系统(Coring),淋巴细胞分离液(Sigma,Histopaque-1083),Dextran 500(Pharmacia),红细胞裂解液(天根),重组凝溶胶蛋白(Cytoskeleton),凝溶胶蛋白多克隆抗体(兔源性抗鼠、抗人凝溶胶蛋白,Genetex),山羊抗兔 IgG(碧云天),DAPI(碧云天),Triton X-100(Solarbio),Albumin Bovine V(Solarbio),无血清 1640 培养基(Gibco),N-甲酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(N-formylmethionyl-leucyl phenylalanine,fMLP,Sigma 公司),10%水合氯醛,肝素钠注射液等。

### 1.3 实验动物采血及 PMN 分离

SD 大鼠采用腹腔注射水合氯醛麻醉,仰卧位固定,下腔静脉采血,肝素(10 IU/ml)抗凝。将新鲜采集静脉血加入等体积 D-Hanks 液混匀后,叠加于等体积淋巴细胞分离液液面之上。400 g 离心 30 min,液体分为 4 层。取底层液与两倍体积 6% Dextran 500/D-Hanks 液混匀,37 ℃恒温水浴 30 min。

取上层混浊液,离心,弃上清,加入 6 倍细胞沉淀体积的 4 ℃红细胞裂解液,裂解 15 min,期间振荡试管。离心,PMN 细胞沉淀用 D-Hanks 液洗涤 3 次。台盼蓝拒染法检测活细胞所占比例 $\geq 95\%$ ,瑞氏吉姆萨染色法检测 PMN 所占比例 $\geq 95\%$ ,进行下一步实验。

### 1.4 实验分组及处理

PMN 沉淀用 1640 无血清培养基稀释成  $1 \times 10^7$  个/ml 悬液,分别实施实验 1 和实验 2(见表 1、表 2),研究细胞外和细胞内凝溶胶蛋白水平改变对 PMN 趋化功能的影响。实验在 Transwell 细胞培养系统进行,实验中 PMN 始终接种于上室,细胞由上室向下室趋化,重复次数为 5 次,方案见表 1、2。

表 1 实验 1

Tab.1 Experiment 1

| 分组 | 上室培养基                | 下室培养基                 |
|----|----------------------|-----------------------|
| B  | 1640 无血清培养基          | 1640 无血清培养基           |
| C  | 1640 无血清培养基          | fMLP+1640 无血清培养基      |
| E1 | 1640 无血清培养基          | gelsolin +1640 无血清培养基 |
| E2 | gelsolin+1640 无血清培养基 | fMLP+1640 无血清培养基      |

注:B:空白对照;C:阳性对照;E1:Transwell 下室加入凝溶胶蛋白(gelsolin);E2:Transwell 上室加入凝溶胶蛋白(gelsolin),蛋白与 PMN 直接作用;gelsolin:凝溶胶蛋白;fMLP:N-甲酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸

### 1.5 电转染

在实验 2 中,将 PMN 悬液与相应蛋白混匀,置于 4 cm 电转杯中。4 ℃冰水浴 30 min 后开始电转,调节电转仪参数为电压 200 V,脉冲 3 次,持续时间 10 ms,间隔时间 10 s。电转完成后 37 ℃水浴孵育 1 h,离心去除死细胞和未结合蛋白。

### 1.6 电转染效率验证

采用免疫荧光法:取电转染后 PMN 样品,PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤。Triton X-100 破膜 10 min,加入 5%BSA 于 37 ℃下封闭 30 min。在验证凝溶胶蛋白转染效率实验中,先向 PMN 中加入兔抗鼠凝溶胶蛋白抗体,4 ℃过夜。次日取出,复温 30 min,PBS 洗涤。再加入山羊抗兔 IgG(二抗),避光 37 ℃孵育 1 h,PBS 洗涤;在验证凝溶胶蛋白抗体转染效率实验中,直接向 PMN 中加入山羊抗兔 IgG,其余实验步骤同前。抗体孵育完毕,加入 5  $\mu\text{g/ml}$  DAPI 作用 10 min 后,离心,PBS 洗涤。调节 PMN 至  $10^7/\text{ml}$ ,滴片,封片镜检。所得照片用 Image-Pro Plus 6.0 测定荧光光密度。

表 2 实验 2

Tab.2 Experiment 2

| 分组  | 电穿孔 (2 $\mu\text{g/ml}$ ) | 上室培养基       | 下室培养基            |
|-----|---------------------------|-------------|------------------|
| EB  | BSA                       | 1640 无血清培养基 | 1640 无血清培养基      |
| EC  | BSA                       | 1640 无血清培养基 | fMLP+1640 无血清培养基 |
| EE1 | 凝溶胶蛋白                     | 1640 无血清培养基 | fMLP+1640 无血清培养基 |
| EE2 | 凝溶胶蛋白抗体                   | 1640 无血清培养基 | fMLP+1640 无血清培养基 |

注:EB:空白对照;EC:阳性对照;EE1:电穿孔转入凝溶胶蛋白;EE2:电穿孔转入凝溶胶蛋白抗体

1.7 趋化实验

趋化实验在 Transwell 小室进行,将装有 PMN 细胞悬液的 Transwell 小室置于 37 ℃ 充有 5%CO<sub>2</sub> 的恒温孵箱内,2 h 后取出,移去上室,静置 30 min,在 200 倍显微镜下随机选择 5 个视野拍照计数,计算趋化指数(chemotatic index,CI)。CI=各观察组趋化至下室的细胞总数/各空白对照组趋化至下室的细胞总数。

1.8 统计学方法

使用 SPSS 19.0 进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用方差分析。两两比较时,若方差齐,选择 Tukey HSD 检验,若方差不齐,采用 Dunnett T3 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 样本质量

成功获得达到实验要求的大鼠 PMN 悬液,台盼蓝染色

示活细胞数均在 95%以上,瑞氏吉姆萨染色示 PMN 占 95%以上,样本符合实验设计要求。

2.2 细胞外凝溶胶蛋白水平改变对 PMN 趋化功能的影响

在实验 1 中,B 组及 E1 组仅有少量 PMN 趋化至下室,C 组及 E2 组有大量 PMN 趋化至下室。与 B 组比较,E1 组趋化细胞数及趋化指数差异无统计学意义( $P>0.05$ ),C 组及 E2 组趋化细胞数明显增多,趋化指数明显升高( $P<0.05$ ),但 C 组及 E2 组之间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 3。

2.3 细胞内凝溶胶蛋白水平改变对 PMN 趋化功能的影响

在实验 2 中,EB 组仅有少量 PMN 趋化至下室。与 EB 组比较,EC 组、EE1 组趋化细胞数明显增多,趋化指数明显增高( $P<0.05$ )。与 EC 组比较,EE2 组趋化细胞数减少,趋化指数降低( $P>0.05$ ),见表 4。

2.4 电转染效率

空白对照和电转 BSA 后,PMN 内无或仅有极微弱荧光显示,电转染凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白抗体后,PMN 内出现较强绿色荧光,细胞轮廓显示清晰,表明目的蛋白电转成功,见图 1、表 5、表 6。

表 3 细胞外凝溶胶蛋白水平改变对 PMN 趋化功能的影响  
Tab.3 Effects of extracellular gelsolin level on PMN chemotaxis

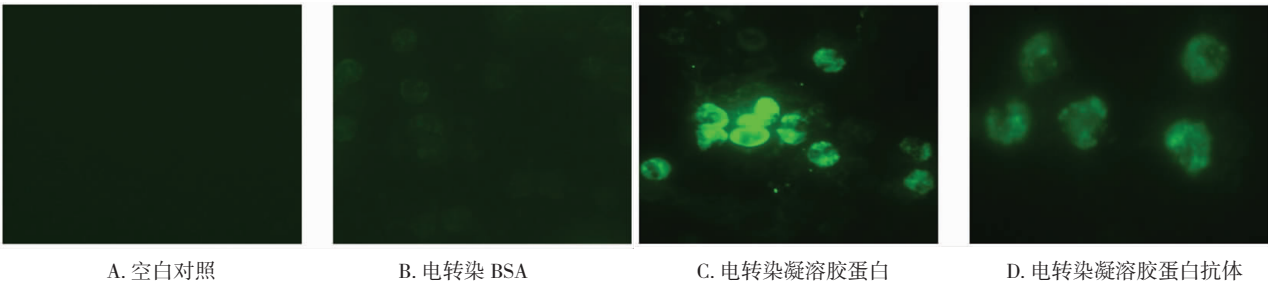
| 组别  | 趋化至下室的细胞数                | P 值   | F 值    | P 值   | 趋化指数 (CI)                | P 值   | F 值    | P 值   |
|-----|--------------------------|-------|--------|-------|--------------------------|-------|--------|-------|
| B组  | 306 ± 60                 | —     |        |       | 1                        | —     |        |       |
| C组  | 1 333 ± 222 <sup>a</sup> | 0.001 | 64.437 | 0.000 | 4.41 ± 0.78 <sup>a</sup> | 0.003 | 90.432 | 0.000 |
| E1组 | 338 ± 90                 | 0.981 |        |       | 1.14 ± 0.35              | 0.905 |        |       |
| E2组 | 1 298 ± 203 <sup>a</sup> | 0.001 |        |       | 4.26 ± 0.23 <sup>a</sup> | 0.000 |        |       |

注:a,与 B 组比较, $P<0.05$

表 4 细胞内凝溶胶蛋白水平改变对 PMN 趋化功能的影响  
Tab.4 Effects of intracellular gelsolin level on PMN chemotaxis

| 组别   | 趋化至下室的细胞数              | P 值   | F 值    | P 值   | 趋化指数 (CI)                | P 值   | F 值    | P 值   |
|------|------------------------|-------|--------|-------|--------------------------|-------|--------|-------|
| EB组  | 192 ± 46               | —     |        |       | 1                        | —     |        |       |
| EC组  | 614 ± 93 <sup>a</sup>  | 0.000 | 42.808 | 0.000 | 3.32 ± 0.87 <sup>a</sup> | 0.000 | 29.703 | 0.000 |
| EE1组 | 745 ± 134 <sup>a</sup> | 0.000 |        |       | 3.94 ± 0.64 <sup>a</sup> | 0.000 |        |       |
| EE2组 | 329 ± 34 <sup>b</sup>  | 0.000 |        |       | 1.76 ± 0.29 <sup>b</sup> | 0.002 |        |       |

注:a,与 EB 组比较, $P<0.05$ ;b,与 EC 组比较, $P<0.05$



A. 空白对照 B. 电转染 BSA C. 电转染凝溶胶蛋白 D. 电转染凝溶胶蛋白抗体

注:空白对照:PMN 样本仅接受电场作用,未转入任何蛋白;电转染 BSA:PMN 样本转入 BSA

图 1 电转染后 PMN 免疫荧光 (400 ×)

Fig.1 Verification of electrotransfection efficiency (400 ×)

表 5 电转染凝溶胶蛋白后大鼠 PMN 荧光光密度的比较

Tab.5 Comparison on fluorodensitometry of PMN transfected with gelsolin

| 分组    | 平均荧光光密度<br>( $10^{-5}$ )   | P 值   | F 值    | P 值   |
|-------|----------------------------|-------|--------|-------|
| FB1 组 | 0                          | —     |        |       |
| FC1 组 | 191 ± 19                   | 0.000 | 83.480 | 0.000 |
| FG1 组 | 6 327 ± 1 525 <sup>a</sup> | 0.000 |        |       |

注:FB1 组:PMN 样本仅接受电场作用,未转入任何蛋白;FC1 组:PMN 样本电转入 BSA;FG1 组:PMN 样本电转入凝溶胶蛋白;a,与 FC1 组比较, $P<0.05$

表 6 电转染凝溶胶蛋白抗体后大鼠 PMN 荧光光密度的比较

Tab.6 Comparison on fluorodensitometry of PMN transfected with anti-gelsolin

| 分组    | 平均荧光光密度<br>( $10^{-5}$ ) | P 值   | F 值     | P 值   |
|-------|--------------------------|-------|---------|-------|
| FB2 组 | 0                        | —     |         |       |
| FC2 组 | 0                        | —     | 352.451 | 0.000 |
| FG2 组 | 3 129 ± 372 <sup>a</sup> | 0.000 |         |       |

注:FB2 组:PMN 样本仅接受电场作用,未转入任何蛋白;FC2 组:PMN 样本电转入 BSA;FG2 组:PMN 样本电转入凝溶胶蛋白抗体;a,与 FC2 组比较, $P<0.05$

### 3 讨 论

本研究发现,在 Transwell 培养实验中,细胞外给予凝溶胶蛋白,或向细胞内转入凝溶胶蛋白,对趋化至下室的 PMN 数量均没有影响。但是,向细胞内转入凝溶胶蛋白抗体后,在 fMLP 趋化下进入下室的 PMN 细胞数明显减少。

电转染技术通过瞬间强电场脉冲,在细胞膜上形成瞬时孔隙,使大分子物质如抗体等得以进入细胞,同时不影响细胞和大分子物质活性<sup>[15-16]</sup>。本研究中免疫荧光结果显示,电穿孔实验后 PMN 呈现出了高强度荧光,细胞轮廓清晰,形态正常,表明目标蛋白质分子被转入细胞中。同时,趋化实验中,电转后的 PMN 表现出良好的趋化能力,表明细胞活性未受到明显不良影响,电转染技术用于本实验研究是恰当的。

细胞运动的实质是细胞骨架的重排,凝溶胶蛋白在细胞骨架重排中起着关键作用。因此,很容易理解凝溶胶蛋白对细胞运动的调控作用。Serrander 等<sup>[17]</sup>研究发现,凝溶胶蛋白基因缺失会导致 IgG 介导的 PMN 黏附和摄取功能被选择性抑制。Witke 等<sup>[13]</sup>

发现,向凝溶胶蛋白基因敲除小鼠腹腔注射硫酸物质,其腹腔渗出液中 PMN 数量明显减少,同时其 PMN 在 Boyden 小室的趋化能力也受到明显抑制。Oikonomou 等<sup>[18]</sup>发现凝溶胶蛋白基因敲除后,小鼠肺支气管灌洗液中 PMN 数量明显减少。Becker 等<sup>[19]</sup>发现,凝溶胶蛋白对保护肺血管屏障,抑制缺血导致的肺血管渗出也有重要作用。这些研究表明抑制凝溶胶蛋白的功能可以调节 PMN 的运动。但是,敲除凝溶胶蛋白基因可能影响个体正常生长发育的其它功能,如凝血、血管再生、创伤愈合等<sup>[13,20]</sup>。除了基因敲除外,RNA 干扰技术(siRNA)也可定向沉默特定基因功能。但有研究显示,在活体实验动物上采用 siRNA 技术,能够激活动物体内天然免疫系统,引起淋巴细胞和血小板减少,导致动物体重明显减轻<sup>[21-23]</sup>。因此,本研究通过电穿孔技术,向 PMN 内导入凝溶胶蛋白抗体,希望通过与胞内凝溶胶蛋白结合,抑制其对细胞骨架的调节作用,从而抑制 PMN 的趋化能力。结果发现,导入凝溶胶蛋白抗体后,PMN 趋化效率明显降低,Transwell 下室细胞数明显减少,这说明在不影响细胞正常基因组功能情况下,通过抑制凝溶胶蛋白功能来调控 PMN 趋化活性具有一定可行性。这与 Van den Abbeele 等的研究结果<sup>[24]</sup>可以获得相互印证。

Christofidou-Solomidou 等<sup>[25]</sup>发现血浆中给予充足凝溶胶蛋白,可以减轻高氧导致的小鼠肺部炎症反应,降低肺泡灌洗液中 PMN 数量。这显示细胞外给予凝溶胶蛋白也可能对细胞运动产生调控效应。但本实验发现在培养基中加入凝溶胶蛋白并未改变大鼠 PMN 的趋化能力。这可能暗示细胞外凝溶胶蛋白对 PMN 运动的调控,可能还需要生理情况下其它血浆成分的参与。

本实验还发现,以电转染技术向 PMN 中导入凝溶胶蛋白,对 fMLP 诱导的 PMN 趋化作用并没有明显影响。推测可能与以下原因有关:其一,重组凝溶胶蛋白的空间分子构型,离体培养细胞内环境改变等,导致外源性凝溶胶蛋白未获得激活;其二,在 fMLP 刺激下,已经达到了 PMN 最大趋化能力。因此,进一步研究外源性凝溶胶蛋白空间分子构型和分子动力学,或选择其它刺激效应相对温和的趋化因子,可能获得不同的研究发现。

总之,本研究提示,细胞外凝溶胶蛋白水平改



变,或向细胞内导入外源性凝溶胶蛋白,均不能影响 PMN 的趋化能力,但向细胞内导入凝溶胶蛋白抗体,可以抑制 PMN 的趋化功能。在此基础上,进一步研究抗体进入细胞后发挥调控作用的分子机制,明确电转染后细胞的生物学功能,为探索某些类型炎症反应的防治策略,具有参考价值。

## 参 考 文 献

- [1] Goto Y, Hiramatsu Y, Ageyama N, et al. Cardiopulmonary bypass induces recruitment of bone marrow-derived leukocytes to the lungs in monkeys[J]. *Ann Thorac Surg*, 2014, 97(2): 617–622.
- [2] Rossaint J, Berger C, Van Aken H, et al. Cardiopulmonary bypass during cardiac surgery modulates systemic inflammation by affecting different steps of the leukocyte recruitment cascade[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45738.
- [3] Doyen V, Kassenger Z, Dinh DH, et al. Time course of endotoxin-induced airways inflammation in healthy subjects[J]. *Inflammation*, 2012, 35(1): 33–38.
- [4] Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(2): 169–180.
- [5] Tate MD, Brooks AG, Reading PC. The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice[J]. *Respir Res*, 2008(9): 57.
- [6] Nag S, Larsson M, Robinson RC, et al. Gelsolin: the tail of a molecular gymnast[J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2013, 70(7): 360–384.
- [7] McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, et al. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing[J]. *Nature*, 1993, 364(6439): 685–692.
- [8] Visser MB, Koh A, Glogauer M, et al. *Treponema denticola* major outer sheath protein induces actin assembly at free barbed ends by a PIP2-dependent uncapping mechanism in fibroblasts[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23736.
- [9] Howard T, Chaponnier C, Yin H, et al. Gelsolin-actin interaction and actin polymerization in human neutrophils[J]. *J Cell Biol*, 1990, 110(6): 1983–1991.
- [10] Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation[J]. *J Cell Biol*, 1992, 118(6): 1421–1442.
- [11] Chellaiah M, Kizer N, Silva M, et al. Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength[J]. *J Cell Biol*, 2000, 148(4): 665–678.
- [12] Lader AS, Lee JJ, Cicchetti G, et al. Mechanisms of gelsolin-dependent and -independent EGF-stimulated cell motility in a human lung epithelial cell line[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 307(1): 153–163.
- [13] Witke W, Sharpe AH, Hartwig JH, et al. Hemostatic, inflammatory, and fibroblast response are blunted in mice lacking gelsolin[J]. *Cell*, 1995, 81(1): 41–51.
- [14] Cantù C, Bosè F, Bianchi P, et al. Defective erythroid maturation in gelsolin mutant mice[J]. *Haematologica*, 2012, 97(7): 980–988.
- [15] Lewis KJ, Masterman B, Laffafian I, et al. Minimal impact electroinjection of cells undergoing dynamic shape change reveals calpain activation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(6): 1182–1187.
- [16] Guignet EG, Meyer T. Suspended-drop electroporation for high-throughput delivery of biomolecules into cells[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(5): 393–395.
- [17] Serrander L, Skarman P, Rasmussen B, et al. Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils[J]. *J Immunol*, 2000, 165(5): 2451–2457.
- [18] Oikonomou N, Thanasopoulou A, Tzouvelekis A, et al. Gelsolin expression is necessary for the development of modelled pulmonary inflammation and fibrosis[J]. *Thorax*, 2009, 64(6): 467–475.
- [19] Becker PM, Kazi AA, Wadgaonkar R, et al. Pulmonary vascular permeability and ischemic injury in gelsolin-deficient mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28(4): 478–484.
- [20] Li GH, Arora PD, Chen Y, et al. Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases[J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(5): 999–1025.
- [21] Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, et al. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs[J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(9): 834–839.
- [22] Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7[J]. *Nat Med*, 2005, 11(3): 263–270.
- [23] Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(8): 1002–1007.
- [24] Van den Abbeele A, De Clercq S, De Ganck A, et al. A llama-derived gelsolin single-domain antibody blocks gelsolin-G-actin interaction[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(9): 1519–1535.
- [25] Christofidou-Solomidou M, Scherpereel A, Solomides CC, et al. Recombinant plasma gelsolin diminishes the acute inflammatory response to hyperoxia in mice[J]. *J Invest Med*, 2002, 50(1): 54–60.

(责任编辑:冉明会)