

自噬在骨关节炎软骨细胞退变中的表达变化

廖法学¹, 马广文¹, 常俊¹, 秦昆鹏¹, 王清¹, 尹勇¹, 尹宗生^{1,2}

摘要 目的 探讨自噬在骨关节炎(OA)软骨细胞中的表达及意义。方法 收集临床OA及正常骨关节软骨标本各6例,分为OA组和对照组。免疫组化法检测自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链3(LC3)和Beclin-1在软骨组织中表达情况。分离关节软骨细胞并在低氧环境下培养,采用瞬时转染绿色荧光蛋白LC3(GFP-LC3)在激光共聚焦显微镜下观察各组软骨细胞自噬变化,并用Western blot法检测软骨细胞中LC3蛋白表达情况。结果 OA组软骨组织中LC3蛋白和Beclin-1蛋白的表达显著高于对照组($P < 0.05$);在OA组发现大量自噬颗粒形成,OA组GFP-LC3细胞阳性率显著高于对照组;OA组软骨细胞中LC3蛋白从LC3-I向LC3-II转换表达显著高于对照组。结论 自噬在OA软骨细胞退变的过程中起着重要作用,为OA发病机制的研究提供新的方向。
关键词 自噬;骨关节炎;软骨细胞;退变
中图分类号 R 684.3; R 361+.3
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1077-04

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨的变性、破坏、骨赘形成及关节间隙变窄为特征的退变性关节疾病,OA致残率高,是影响人们健康的最严重问题之一^[1]。自噬通过清除受损或功能失调的大分子、细胞器来维持细胞内稳态,自噬失调引起活性氧增加和基因表达异常,进一步导致细胞死亡^[2]。研究^[3-4]显示自噬在正常软骨中处于保护机制,以避免老化、外伤所引起的细胞死亡,通过诱导小鼠OA模型,检测ULK1蛋白、Beclin-1蛋白、微管相关蛋白轻链3(light chain 3, LC3)的表达减少。增强细胞自噬作用可能作为一种新的途径来延缓OA软骨细胞的退变^[5]。为进一步研究自噬在OA软骨退变中的机制,该研究收取临床OA软骨标本并分离培养原代软骨细胞,检测自噬蛋白表达及自噬形成在两组中的差异,为OA发病机制提供新的

研究方向。

1 材料与方法

1.1 病例资料 实验中所有软骨标本均来自安徽医科大学第四附属医院在2013年接受全膝或全髋关节置换手术的患者,并经过安徽医科大学第四附属医院伦理委员会同意。6例膝OA患者(OA组),其中男2例,女4例;年龄65~76岁(68.7 ± 4.5)岁。6例股骨颈骨折患者(对照组),其中男3例,女3例;年龄65~76岁(67.7 ± 3.6)岁,两组年龄经过 t 检验比较,差异无统计学意义。OA组患者既往体健,否认风湿、类风湿性关节炎、膝部外伤手术史,符合OA临床表现、影像学诊断标准。对照组患者既往体健,否认既往关节疾病史,此次股骨颈骨折患者,根据影像学、临床表现排除OA。

1.2 主要试剂 兔源抗LC3蛋白多克隆抗体、兔源抗Beclin-1蛋白多克隆抗体、兔源抗GAPDH多克隆抗体购自英国Abcam公司;BCA蛋白定量试剂盒、Western blot试剂盒购自美国Pierce公司;DAB试剂盒购自武汉博士德公司;DMEM培养基、Lipofectamine 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司;绿色荧光蛋白轻链3(green fluorescent protein-light chain3, GFP-LC3)购自美国OriGene公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 软骨组织中LC3、Beclin-1蛋白表达检测 标本经固定,脱钙,常规切片后脱蜡,一部分常规HE染色,一部分经过封闭内源性过氧化酶,应用微波炉暴露抗原后封闭内源性生物素,加5%山羊血清阻断非特异性抗体的结合。分别加兔源抗LC3蛋白多克隆抗体(1:200 4℃过夜)和兔源抗Beclin-1蛋白多克隆抗体(1:400 4℃过夜)。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG,37℃孵育30 min,加DAB溶液显色10 min,苏木精复染,脱水,透明,干燥,中性树脂封片,镜检观察。在40倍光镜下,每张切片随机选取10个不重叠的视野,人工计数阳性着色细胞,每个样本观察5张不同切片,每组样本细胞阳性率结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行统计分析。

2015-04-22 接收

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(编号:20123420110002);安徽医科大学校科学研究基金(编号:2013xkj046)

作者单位:安徽医科大学¹第四附属医院骨科、²第一附属医院关节与骨肿瘤外科,合肥 230032

作者简介:廖法学,男,硕士,医师;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: yinzongsheng@sina.com

1.3.2 原代软骨细胞分离、鉴定及传代培养 在无菌条件下取 OA 组和对照组软骨组织,在离心管内加入新鲜的 0.25% 胰蛋白酶,切成碎粒,加入 II 型胶原酶消化,离心弃上清液,收集细胞,加入 10% DMEM 培养液移入培养皿中,48 h 后换液去除未贴壁的细胞,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内继续培养 24 h,显微镜下观察。将原代细胞采用甲苯胺蓝染色以便鉴定。待细胞贴壁达 80% 左右,加 0.05% 胰蛋白酶消化,收集该细胞悬浮液,离心弃上清液,制成细胞悬浮液,并计数,然后按比例进行传代培养。

1.3.3 GFP-LC3 质粒瞬时转染及激光共聚焦显微镜下检测自噬细胞 按 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书操作,分别调 OA 组和对照组软骨细胞浓度 1×10^5 个/ml 密度接种于 12 孔板中,用不含抗生素培养液进行培养过夜,细胞融合度达 60% ~ 70%,进行 GFP-LC3 质粒瞬时转染;各组软骨细胞转染 24 h 后,将 12 孔板放入 2% O₂ 浓度环境下培养 24 h,将 12 孔板中玻片取出,点一滴防淬灭剂于玻片上,然后将其置于载玻片上,周围用中性树胶封片,在激光共聚焦显微镜下进行观察。将含有 5 个及以上绿色荧光颗粒细胞定义为 GFP-LC3 阳性细胞,采用阳性着色细胞计数法,对结果进行分析统计。

1.3.4 Western blot 法检测 LC3 蛋白从 LC3-I 型向 LC3-II 型转换 提取两组细胞总蛋白,应用 Bradford 法测蛋白浓度,调整两组蛋白浓度相同,将两组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后将蛋白从凝胶转移到 NC(硝酸纤维素)膜上,进行 Western blot 法检测,即经 5% 脱脂奶粉(PBS 配置)4 ℃ 封闭过夜,依次加入兔源抗 LC3 蛋白多克隆抗体(1:2 000,4 ℃ 过夜)及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG,室温作用 1 h,充分洗涤后 ECL 发光,观察结果。采用 Image J 软件对蛋白条带的灰度值进行分析,并将待检测蛋白条带的灰度值与同一样品内参蛋白(GAPDH 作为内参蛋白)的灰度值进行比较。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 *t* 检验进行比较。

2 结果

2.1 自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 在软骨组织中表达 采用免疫组化法检测软骨上层区域(包括软骨浅表和中层)中的自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 在两组标本中表达情况。首先对软骨标本常规 HE 染色,OA 组关节软骨表面粗糙,软骨细胞核固缩、裂解、坏死,偏于一侧,软骨细胞排列紊乱,符合 OA 表

现;对照组关节软骨表面光滑,软骨细胞排列整齐,细胞核清晰,染色均匀,软骨基质分布匀称。两组标本免疫组化结果见图 1,采用阳性着色细胞计数法,结果分析见图 2。在 OA 组中 LC3、Beclin-1 蛋白表达细胞阳性率为 $(50.3 \pm 4.2)\%$ 和 $(64.4 \pm 6.6)\%$,相比于对照组 $(24.3 \pm 3.6)\%$ 和 $(31.8 \pm 6.9)\%$ 表达增高,差异均有统计学意义($t = 11.51, 8.36, P < 0.05$)。

2.2 软骨细胞鉴定 为了鉴定体外分离的原代软骨细胞,通过甲苯胺蓝染色法来鉴定细胞,形态学观察结果显示:原代培养的软骨细胞甲苯胺蓝染色以浅蓝色为主,根据软骨细胞分泌的蛋白多糖的染色鉴定为软骨细胞。实验中所用两组细胞均为软骨细胞,见图 3。

2.3 低氧对体外培养软骨细胞自噬变化影响 采用体外低氧环境下培养软骨细胞,为了观察细胞自噬变化,将带有 GFP-LC3 的质粒转入软骨细胞,在激光共聚焦显微镜下观察发现:在 OA 组发现大量自噬颗粒形成,见图 4A,OA 组 GFP-LC3 细胞阳性率为 $(45.3 \pm 8.4)\%$,而对照组软骨细胞阳性率为 $(20.1 \pm 5.9)\%$,差异有统计学意义($t = 6.01, P < 0.05$)。随后 Western blot 法检测结果显示:OA 组软骨细胞 LC3 蛋白从 LC3-I 向 LC3-II 转换增加,提示自噬水平升高。见图 5。

3 讨论

LC3 蛋白属于自噬相关蛋白家族中的一员,参与自噬过程中的不同阶段^[6],Beclin-1 蛋白控制自噬过程,其过度表达可持续增加自噬泡数量^[7],检测 LC3 和 Beclin-1 蛋白的表达可以判断细胞自噬的活性。本研究结果表明 OA 组软骨组织中自噬相关蛋白高表达,这一结果与 Caramés et al^[3] 和 Wu et al^[8] 研究结果不一致,研究显示在 OA 组软骨组织中自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin-1 的表达显著下降。考虑有两种原因:① OA 组可能是严重的 OA,由于关节软骨严重磨损所致软骨细胞的减少;② 对照组年龄比较小,平均年龄分别为 22.4 岁和 55 岁。而本研究与 Sasaki et al^[9] 的研究结果是一致的,在动物模型中的结果也证实了本研究的结果^[10-11]。通过免疫组化法和 Western blot 法检测显示在鼠 OA 模型软骨细胞中 LC3-II 蛋白显著高于正常鼠软骨细胞。本研究为了模拟体内关节软骨的低氧环境,在 2% O₂ 浓度环境下培养软骨细胞,在 OA 软骨细胞中自噬活性增强,这一结果与 Caramés et al^[3] 是一致的。

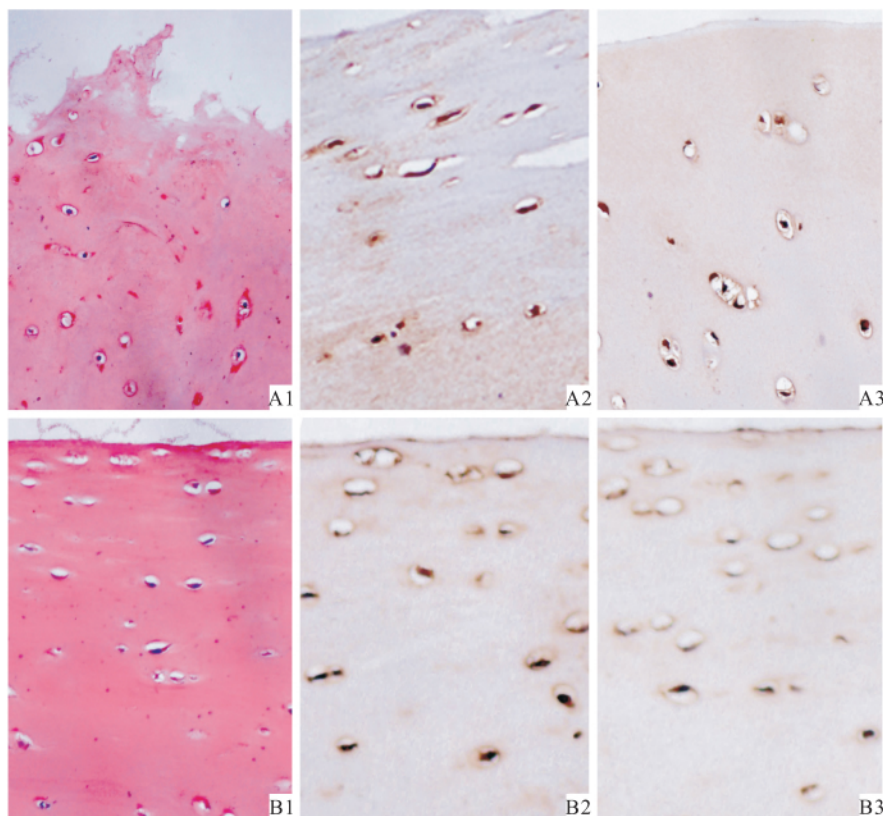


图1 LC3、Beclin-1 蛋白在软骨组织中的表达 ×200

A: OA 组; B: 对照组; 1: HE 染色; 2: 免疫组化法检测 LC3 蛋白表达; 3: 免疫组化法检测 Beclin-1 蛋白表达

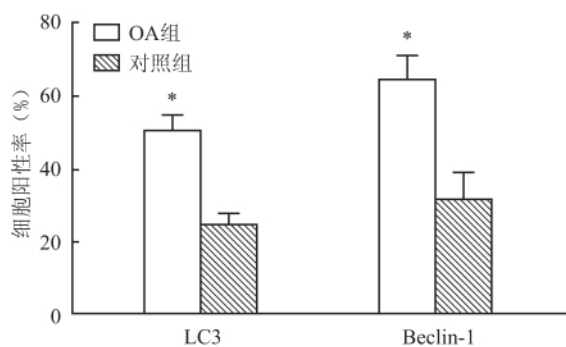


图2 两组 LC3、Beclin-1 蛋白在软骨组织中细胞阳性率的比较

与对照组比较: * $P < 0.05$

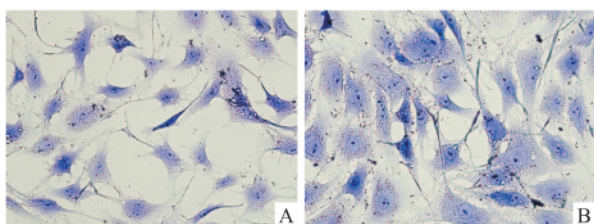


图3 软骨细胞甲苯胺蓝染色结果 ×400

A: OA 组; B: 对照组

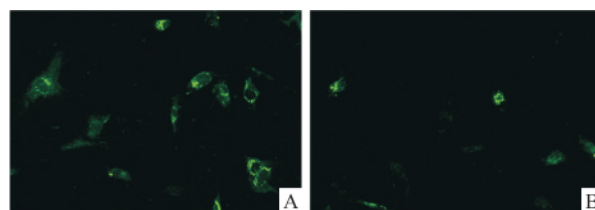


图4 GFP-LC3 转染软骨细胞后激光共聚焦显微镜观察 ×400

A: OA 组软骨细胞自噬活性; B: 对照组软骨细胞自噬活性

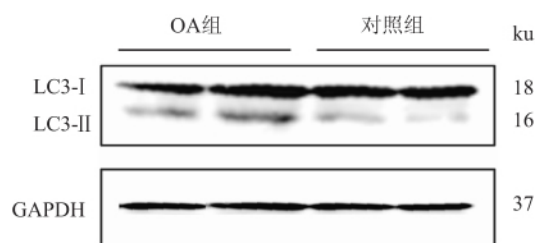


图5 Western blot 法检测两组软骨细胞中 LC3 蛋白表达

本研究结果提示自噬可能在 OA 中起破坏性作用。目前对于 OA 晚期细胞死亡形态变化, 一直存

在争议。Aigner et al^[12] 认为在 OA 软骨细胞中凋亡并不是十分普遍的现象, 研究显示 OA 软骨细胞随年龄增长而减少不到 5%。Roach et al^[13] 认为软骨细胞的衰老与传统的细胞凋亡有区别, 对 OA 中软骨细胞发生凋亡产生了质疑, 软骨细胞是以一种

Chondroptosis 形态,是有别于细胞凋亡的另一种死亡类型。自噬也称为 II 型程序性细胞死亡,这种形式的细胞死亡区别于细胞凋亡,其表现为细胞质中涌现大量包裹着细胞器的空泡样结构,以及溶酶体对空泡内成分的降解^[14]。

由此看来,自噬对 OA 软骨细胞可能会导致细胞程序性死亡。OA 是退变性关节疾病,可以通过调控软骨细胞自噬水平,以延缓软骨老化及 OA 病程发展。

参考文献

- [1] Arden N, Nevitt M C. Osteoarthritis: epidemiology [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006, 20(1): 3–25.
- [2] Lotz M, Caramés B. Autophagy: a new therapeutic target in cartilage injury and osteoarthritis [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2012, 20(4): 261–2.
- [3] Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(3): 791–801.
- [4] Caramés B, Hasegawa A, Taniguchi N, et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(4): 575–81.
- [5] Lotz M, Caramés B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(10): 579–87.
- [6] Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, et al. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(7): 226.
- [7] Luo S, Rubinstein D C. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(2): 268–77.
- [8] Wu C, Zheng J, Yao X, et al. Defective autophagy in chondrocytes with Kashin-Beck disease but higher than osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014; 22(11): 1936–46.
- [9] Sasaki H, Takayama K, Matsushita T, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(6): 1920–8.
- [10] Bohensky J, Terkhorn S P, Freeman T A, et al. Regulation of autophagy in human and murine cartilage: hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5): 1406–15.
- [11] Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, et al. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of osteoarthritis within an experimental model [J]. *Apoptosis*, 2010, 15(5): 631–8.
- [12] Aigner T, Rose J, Martin J, et al. Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology [J]. *Rejuvenation Res*, 2004, 7(2): 134–45.
- [13] Roach H I, Aigner T, Kouri J B. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(3): 265–77.
- [14] Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(12): 1004–10.

Autophagy expression in chondrocytes from a degenerate of osteoarthritis

Liao Faxue, Ma Guangwen, Chang Jun, et al

(Dept of Orthopaedics, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the autophagy expression and examine its significance in chondrocytes from a degenerate of osteoarthritis (OA). **Methods** Cartilage samples were obtained from 12 hospitalized patients in our hospital. They were divided into the OA group ($n=6$) and the control group ($n=6$). Expressions of light chain3 (LC3) and Beclin-1 protein which were main markers of autophagy were analyzed in cartilage tissues by using immunohistochemistry (IHC). Cartilage chondrocytes were isolated and cultured in a hypoxia environment in vivo. The chondrocytes which were transfected with green fluorescent protein-light chain3 (GFP-LC3) plasmid were examined under a laser scanning confocal microscopy. Western blot was used to observe the LC3 protein expression in chondrocytes. **Results** In cartilage tissues LC3 and Beclin-1 protein expressions were markedly increased in OA chondrocytes. A large number of autophagy particle formations were found in the OA group, the percentage of chondrocytes with GFP-LC3 puncta structures was higher in the OA group than the control group. The results revealed a significant increase in the expression of LC3-II protein in the OA group. **Conclusion** Autophagy plays an important pathogenic role in the process of OA chondrocytes degeneration. It offers a new research direction for the pathogenesis of OA.

Key words autophagy; osteoarthritis; chondrocytes; degenerate