

周期性机械应力通过 IGF1R 调控兔关节软骨细胞增殖和细胞外基质合成实验研究

胡海¹, 刘旭卓², 刘沛然¹, 刘泽霖¹

(1. 黑龙江中医药大学附属第二医院哈南分院骨科, 黑龙江 哈尔滨 150000; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院骨二科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

【摘要】目的: 探讨周期性机械应力下胰岛素样生长因子 1 型受体 (IGF1R) 对兔关节软骨细胞增殖和细胞外基质 (ECM) 合成的影响。**方法:** 分离培养 1 只新西兰白兔的关节软骨细胞, 分为对照组、加压组、加压 + IGF1R 阻断组, 3 组细胞分别在无周期性机械应力条件下、周期性机械应力场中、加入 5 $\mu\text{mol/L}$ IGF1R 特异性抑制剂 OSI-906 后于周期性机械应力场中培养 1 h。采用 CCK8 法检测各组软骨细胞增殖率, 采用 Western blot 法检测各组软骨细胞中 IGF1R、Aggrecan、II 型胶原 (Col-II)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 (p-AKT) 蛋白表达量。**结果:** 加压组软骨细胞增殖率明显高于对照组 ($P < 0.05$); 加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞增殖率明显低于加压组 ($P < 0.05$), 但与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 软骨细胞 IGF1R、Aggrecan、Col-II、PI3K、p-AKT 蛋白表达量比较, 加压组和加压 + IGF1R 阻断组明显高于对照组 ($P < 0.05$), 加压 + IGF1R 阻断组明显低于加压组 ($P < 0.05$)。**结论:** 周期性机械应力通过上调兔关节软骨细胞中 IGF1R, 将机械信号转化为生物化学信号, 激活 PI3K/Akt 信号通路, 从而促进兔关节软骨细胞增殖和 ECM 合成。

【关键词】 周期性机械应力; 胰岛素样生长因子 1 型受体; 兔; 关节软骨细胞; 细胞增殖; 细胞外基质; PI3K/Akt 信号通路

【中图分类号】 R363 **【文献标志码】** A

Chondrocyte proliferation and matrix synthesis by periodic mechanical stress via IGF1R in rabbit

HU Hai¹, LIU Xu-zhuo², LIU Pei-ran¹, LIU Ze-lin¹

(1. Department of Orthopaedics, Hanan branch of the Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of traditional Chinese Medicine, Harbin 150000; 2. Second Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of traditional Chinese Medicine, Harbin 150001, Heilongjiang, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the chondrocyte proliferation and matrix synthesis by periodic mechanical stress via insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) in rabbits. **Methods:** The chondrocytes of a New Zealand white rabbit were divided into control group, pressure group and pressure + IGF1R suppressor group. The control group was cultured under the condition of no periodic mechanical stress for 1h, the pressure group was cultured in the periodic mechanical stress for 1h, and the pressure + IGF1R suppressor group was cultured in the periodic mechanical stress for 1h after adding 5 $\mu\text{mol/L}$ IGF1R specific suppressor OSI-906. CCK8 method was used to detect the proliferation rate of chondrocytes in each group. Western blot was used to detect the expression levels of IGF1R, Aggrecan, collagen-II (Col-II), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), and phosphorylated serine/threonine kinase (p-AKT) in each group. **Results:** The proliferation rate of chondrocytes in pressure group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The proliferation rate of chondrocytes in pressure + IGF1R suppressor group was significantly lower than that in the pressure group ($P < 0.05$), while no significant difference was found between pressure + IGF1R suppressor group and control group ($P > 0.05$). The expression levels of IGF1R, Aggrecan, Col-II, PI3K, and p-AKT proteins in chondrocytes in pressure group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The expression levels of IGF1R, Aggrecan, Col-II, PI3K, and p-AKT proteins in chondrocytes among three groups were the highest in the pressure group, followed by pressure + IGF1R suppressor group and control group, with statistic difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Periodic mechanical stress can promote proliferation and ECM synthesis of chondrocytes by up regulating IGF1R, transforming mechanical signals into biochemical signals and activating PI3K/Akt signal pathway.

【Key words】 Periodic mechanical stress; Insulin-like growth factor 1 receptor; Rabbit; Chondrocyte; Cell proliferation; Extracellular matrix; PI3K/Akt signaling pathway

基金项目: 黑龙江省中医药科研项目 (ZHY19-039)

作者简介: 胡海 (1980-), 男, 硕士, 主治医师。E-mail: huhai7963@163.com

通讯作者: 刘泽霖。E-mail: 15478150@qq.com

骨关节炎是一种退行性关节疾病,以关节软骨细胞凋亡和关节软骨细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)损失为主要病理特点^[1]。既往研究^[2]显示,周期性机械应力对关节软骨细胞增殖和 ECM 合成具备促进作用。胰岛素样生长因子 1 型受体(insulin like growth factor type 1 receptor, IGF1R)是蛋白酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, PTKs)家族的重要成员,具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、调节细胞恶性转化等生物学作用^[3]。以往研究^[4]报道,周期性机械应力能够上调关节软骨细胞中的 IGF1R 表达,但周期性机械应力是否通过 IGF1R 对关节软骨细胞增殖和细胞外基质合成进行调控尚不清楚。本研究就周期性机械应力通过 IGF1R 对兔关节软骨细胞增殖和 ECM 合成的影响及其机制进行了分析,以期为临床防治骨关节炎提供理论支持,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新西兰白兔 1 只, SPF 级, 雌性, 6 周龄, 购于北京四环科宝制药有限公司, 生产许可 SYXK(京)2018-0025。

1.2 方法

1.2.1 兔软骨细胞分离与培养 于无菌环境中取新西兰白兔关节软骨, 用眼科剪将软骨剪成絮状, PBS 缓冲液(上海萌桢生物科技有限公司)冲洗, 0.25% 胰蛋白酶(上海北诺生物科技有限公司)消化 0.5 h, 弃上清, 0.2% II 型胶原酶(上海研谨生物科技有限公司)消化 4 h, 弃上清, 采用细胞离心机(北京华夏莱博仪器仪表有限公司, 型号: jw-1024hr), 1 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基(上海微科生物技术有限公司), 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温箱(北京博康斯科技有限公司)培养, 培养 48 h 换液, 当细胞生长密度达 90% 时进行消化、传代, 取第 3 代软骨细胞进行后续实验。

1.2.2 实验分组与干预 取对数生长期的第 3 代软骨细胞分为对照组、加压组、加压 + IGF1R 阻断组, 分别接种于 6 孔细胞培养板上($1 \times 10^6 / \text{cm}^2$)。对照组在无周期性机械应力条件下培养 1 h, 加压组于周期性机械应力场中培养 1 h, 加压 + IGF1R 阻断组加入 5 $\mu\text{mol/L}$ IGF1R 特异性抑制剂 OSI-906(上海源叶生物科技有限公司)后于周期性机械应力场中培养 1 h^[4]。各组培养 1 h 后继续培养 48 h 进行后续检测。构建周期性机械应力场方法如下: 借助压力传感器连通往复式增压泵与旋转式生物反应器

(美国 Celdyne 公司, 型号: HFB40), 构建用于灌注式培养软骨细胞的周期性机械应力场, 本次研究频率设定为 0.1 Hz, 压力设定为 0 ~ 200 kPa。

1.2.3 指标检测 (1) 采用 CCK8 法检测各组软骨细胞增殖率: 取方法 1.3 下的各组软骨细胞, 吸掉上清液, 每孔加入 100 μL CCK-8 溶液(武汉艾美捷科技有限公司), 37 °C 恒温箱孵育 4 h, 采用酶标仪(美国 BioTek 公司, 型号: ELx800NB)测定 450 nm 波长下吸光度(optical density, OD)值。增殖率 = (处理组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。(2) 采用 Western blot 法检测各组软骨细胞中 IGF1R、Aggrecan、II 型胶原(Collagen II, Col-II)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、磷酸化丝氨酸苏氨酸激酶(phosphorylated serine threonine kinase, p-AKT)蛋白表达量: 取方法 1.3 下的各组软骨细胞, 吸掉上清液, 裂解, 离心, 提取蛋白, 测定蛋白浓度, 电泳, 转膜, 封闭, 加入 1:200 稀释的 IGF1R 单克隆抗体一抗(北京百奥莱博科技有限公司)、1:200 稀释的 Aggrecan 单克隆抗体一抗(上海优宁维生物科技股份有限公司)、1:200 稀释的 Col-II 单克隆抗体一抗(上海群己生物科技有限公司)、1:200 稀释的 PI3K 单克隆抗体一抗(北京百奥莱博科技有限公司)、1:200 稀释的 p-AKT 单克隆抗体一抗(武汉博欧特生物科技有限公司)、1:200 稀释的 GAPDH 单克隆抗体一抗(北京嘉美纽诺生物科技有限公司), 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗, 加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(北京泽平科技有限责任公司), 37 °C 孵育 1 h, ECL 发光试剂盒(上海泽叶生物科技有限公司)对 PVDF 膜进行曝光显影, 凝胶成像扫描分析系统(美国 BIO-RAD 公司)测定目的蛋白与内参蛋白的灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白的灰度值之比计算 IGF1R、Aggrecan、Col-II、PI3K、p-AKT 蛋白表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 snk-q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组软骨细胞中 IGF1R 蛋白表达量比较

加压组软骨细胞中 IGF1R 蛋白表达量明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞中 IGF1R 蛋白表达量明显低于加压组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞中 IGF1R 蛋白表达量与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、

图 1。

表 1 各组软骨细胞中 IGF1R 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IGF1R
对照组 (n=6)	0.38 ± 0.11
加压组 (n=6)	1.45 ± 0.36*
加压 + IGF1R 阻断组 (n=6)	0.40 ± 0.12#

* P < 0.05, 与对照组比较; #P < 0.05, 与加压组比较。

2.2 各组软骨细胞增殖率比较

加压组软骨细胞增殖率明显高于对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞增殖率明显低于加压组, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞增殖率与对照组比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 2。

表 2 各组软骨细胞增殖率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖率 (%)
对照组 (n=6)	56.72 ± 2.38
加压组 (n=6)	92.89 ± 5.13*
加压 + IGF1R 阻断组 (n=6)	57.46 ± 2.77#

* P < 0.05, 与对照组比较; #P < 0.05, 与加压组比较。

2.3 各组软骨细胞中 Aggrecan、Col- II 蛋白表达量比较

加压组、加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞中 Aggrecan、Col- II 蛋白表达量明显高于对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞中 Aggrecan、Col- II 蛋白表达量明显低于加压组, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 3、图 1。

表 3 各组软骨细胞中 Aggrecan、Col-II 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Aggrecan	Col- II
对照组 (n=6)	1.05 ± 0.46	1.12 ± 0.53
加压组 (n=6)	2.48 ± 0.98 ^a	2.92 ± 1.02*
加压 + IGF1R 阻断组 (n=6)	1.78 ± 0.63* [#]	2.05 ± 0.69* [#]

* P < 0.05, 与对照组比较; #P < 0.05, 与加压组比较。

2.4 各组软骨细胞中 PI3K、p-AKT 蛋白表达量比较

加压组、加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞中 PI3K、p-AKT 蛋白表达量明显高于对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞中 PI3K、p-AKT 蛋白表达量明显低于加压组, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 4、图 1。

表 4 各组软骨细胞中 PI3K、p-AKT 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K	p-AKT
对照组 (n=6)	0.45 ± 0.10	0.50 ± 0.13
加压组 (n=6)	1.68 ± 0.88*	1.72 ± 0.91*
加压 + IGF1R 阻断组 (n=6)	1.01 ± 0.52* [#]	1.09 ± 0.42* [#]

* P < 0.05, 与对照组比较; #P < 0.05, 与加压组比较。

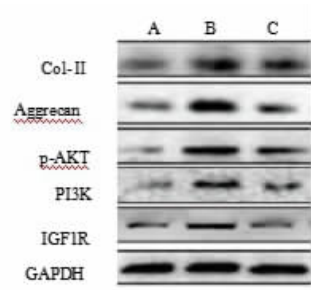


图 1 各组软骨细胞 IGF1R、Aggrecan、Col- II、PI3K、p-AKT 蛋白表达量

注: A 为对照组, B 为加压组, C 为加压 + IGF1R 阻断组。

3 讨论

关节软骨是保障关节运动的最主要结构, 由致密结缔组织的胶原纤维构成。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞成分, 存在于未分布神经、血管、淋巴管的特殊微环境中, 能够感知关节内微环境变化, 合成 Aggrecan、Col- II 等基质大分子物质, 维持软骨组织平衡, 调节关节软骨退变^[5]。有研究^[6]发现, 关节软骨细胞凋亡和 ECM 损失在关节软骨退变过程中发挥非常关键的作用, 骨关节炎软骨细胞增殖活力较正常软骨细胞更弱。因此促进关节软骨细胞增殖和 ECM 合成对关节软骨退变疾病转归具有重要意义。

既往研究^[7]报道, 给予软骨细胞一定程度的机械力学刺激, 可通过动力传导维持软骨细胞活性和促进 Aggrecan、Col- II 合成。已有研究^[2]也证实, 周期性机械应力对关节软骨细胞增殖和 ECM 合成具备促进作用。IGF1R 是一种酪氨酸跨膜蛋白激酶受体, 广泛分布于软骨细胞、骨髓间充质细胞等细胞表面, 包括 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基, IGF1R 可通过其 α 亚基与自身配体 (IGF1、IGF2 等) 结合, 促使 β 亚基上的特定酪氨酸残基磷酸化, 自身被激活, 引起诸多生物学级联反应, 进而参与调控细胞增殖、分化、凋亡、迁移等一系列细胞生物学行为^[8-10]。有研究^[11]发现, 活化的 IGF1R 能够促进骨膜内成骨, 调控软骨细胞增殖, 促进 ECM 合成。近年有学者发现, 软骨细胞中的 IGF1R 激活与机械力学刺激存在关联, 周期性机械应力能够上调软骨细胞中的 IGF1R 表达^[12]。本研究显示, 加压组软骨细胞增殖率及 IGF1R、Aggrecan、Col- II 蛋白表达量显著高于对照组, 加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞增殖率及 IGF1R、Aggrecan、Col- II 蛋白表达量显著低于加压组, 提示周期性机械应力通过上调兔关节软骨细胞中 IGF1R 而促进兔软骨细胞增殖和 ECM 合成, 但周期性机械应力条件下 IGF1R 对兔关节软骨细胞

增殖和 ECM 合成的调控机制尚不明确。PI3K/AKT 信号通路是细胞内重要信号转导通路之一,能够促进细胞增殖、分化、生长、运动,抑制细胞凋亡,与人类多种疾病的发生密切相关^[13-14]。PI3K 是 PI3K/AKT 信号通路中的一种关键酶,由 1 个催化亚基 P110 和 1 个调节亚基 P85 组成,具有丝氨酸/苏氨酸 (Serine/Threonine, Ser/Thr) 激酶活性。AKT 是 PI3K 下游的重要效应子,磷酸化后的 AKT 能够调节蛋白激酶 C 的底物蛋白进而影响细胞生命活动^[15-16]。有研究^[17]显示,PI3K/AKT 信号通路中的 PI3K、p-AKT 异常表达可使细胞失去正常生理功能,使机体呈现病理状态。相关文献报道^[18],白藜芦醇可通过 PI3K/AKT 通路促使软骨细胞恢复正常增殖凋亡,减少软骨细胞外基质缺失。本研究显示,加压组软骨细胞中 PI3K、p-AKT 蛋白表达量显著高于对照组,加压 + IGF1R 阻断组软骨细胞中 PI3K、p-AKT 蛋白表达量显著低于加压组,提示周期性机械应力刺激下 IGF1R 表达上调能够介导 PI3K/Akt 信号通路促进兔关节软骨细胞增殖和细胞外基质合成。

综上所述,周期性机械应力通过上调兔关节软骨细胞中 IGF1R,将机械信号转化为生物化学信号,激活 PI3K/Akt 信号通路,从而促进兔关节软骨细胞增殖和 ECM 合成。但周期性机械应力条件下 IGF1R 对兔关节软骨细胞增殖和 ECM 合成的调控机制是否还有其他,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈群群,霍少川,周驰,等. 自体富血小板关节腔内注射治疗晚期膝骨关节炎对疼痛及疼痛介质的影响[J]. 川北医学院学报,2019,11(4):1256-1257.
- [2] 许舜,李曾,翟晨骏,等. 周期性机械应力条件下大鼠软骨细胞的蛋白质组学分析[J]. 江苏医药,2016,42(8):869-871.
- [3] Baumgarten SC, Marah A, Chemyong K, et al. IGF1R Expression in Ovarian Granulosa Cells Is Essential for Steroidogenesis, Follicle Survival, and Fertility in Female Mice[J]. 2017,2(7):789-791.
- [4] 葛雨庆,梁文卫,刘久翔,等. 周期性应力下胰岛素样生长因子受体对大鼠软骨细胞功能的影响[J]. 中华关节外科杂志(电子版),2018,12(2):68-75.
- [5] 官剑,谭启钊,赵振达,等. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对大鼠关节软骨细胞蛋白聚糖和蛋白聚糖酶代谢的调节作用[J]. 中国实验动

物学报,2018,14(3):3389-3390.

- [6] 陆志明,杜宇凤,程小玲,等. 抗骨关节炎关节软骨退变的中药单体作用机制研究进展[J]. 中药材,2018,5(10):1085-1088.
- [7] 唐占英,褚立希,胡志俊. 力学刺激对膝骨关节炎软骨细胞作用的分子生物学机制进展[J]. 河北医学,2019,17(2):2231-2234.
- [8] 胡琼英,艾承锦,陈高莉,等. 内皮细胞成纤维生长因子受体 1 缺陷所致 EndMT 调控 TGF β 信号通路诱导上皮细胞 EMT[J]. 中华内分泌代谢杂志,2019,35(11):969-972.
- [9] 周琪,刘昊,都一鸣,等. miR-195 通过下调 IGF-1R 的表达抑制胶质母细胞瘤的增殖和迁移[J]. 现代生物医学进展,2019,1(20):907-911.
- [10] Li JY, Chen HY, Dai WJ, et al. Artificial Intelligence Approach To Investigate the Longevity Drug[J]. Journal of Physical Chemistry Letters,2019,10(17):4947-4961.
- [11] Cassinelli G, Bo LD, Favini E, et al. Supersulfated low-molecular weight heparin synergizes with IGF1R/IR inhibitor to suppress synovial sarcoma growth and metastases[J]. Cancer Letters,2017,415(5):187-197.
- [12] Oberthür R, Seemann H, Gehrig J, et al. Simultaneous inhibition of IGF1R and EGFR enhances the efficacy of standard treatment for colorectal cancer by the impairment of DNA repair and the induction of cell death[J]. Cancer Letters,2017,407(8):9330-9332.
- [13] Lim W, Park S, Bazer FW, et al. Naringenin-Induced Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells Is Mediated via the PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways[J]. Journal of Cellular Biochemistry,2017,118(7):2563-2565.
- [14] Shih YL, Chou HM, Chou HC, et al. Casticin impairs cell migration and invasion of mouse melanoma B16F10 cells via PI3K/AKT and NF- κ B signaling pathways; Shih et al[J]. Environmental Toxicology,2017,32(168):2097.
- [15] Liu C, Wu H, Li Y, et al. SALL4 suppresses PTEN expression to promote glioma cell proliferation via PI3K/AKT signaling pathway[J]. Journal of Neuro-Oncology,2017,135(1):263-272.
- [16] Wu LC, Guo QF, Yang J, et al. Tumor Necrosis Factor Alpha Promotes Osteoclast Formation Via PI3K/Akt Pathway-Mediated Blimp1 Expression Upregulation[J]. Journal of Cellular Biochemistry,2017,118(6):1308-1315.
- [17] Wu J, Sun C, Wang R, et al. Cardioprotective effect of paeonol against epirubicin-induced heart injury via regulating miR-1 and PI3K/AKT pathway[J]. Chemo - Biological Interactions,2018,286(3):1701-1704.
- [18] 林健静,曾晖,肖德明,等. 白藜芦醇激活 PI3K/Akt 信号通路对软骨细胞细胞外基质合成的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2017,2(13):449-452.

(收稿日期:2020-01-13)

学术编辑:罗蕾