

维甲酸对软骨细胞的凋亡及其 IGFBP-6 表达的影响

郭磊 赵玉岩 朱世博 张世亮 刘魁 高晓宇

中图分类号: R681.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)06-0377-04

摘要: 目的 探讨维甲酸对软骨细胞凋亡功能的影响及细胞内胰岛素样生长因子结合蛋白 6 (insulin-like growth factor binding protein 6, IGFBP-6) 的表达规律。方法 胰酶消化法体外培养兔的软骨细胞, 全反式维甲酸 (ATRA) 作用软骨细胞株, 细胞免疫化学观察软骨细胞中 II 型胶原的合成和分泌变化, 流式细胞仪检测软骨细胞株细胞凋亡率, 采用 RT-PCR 半定量分析软骨细胞中 IGFBP-6 mRNA 的表达; 应用 Western 印迹杂交鉴定软骨细胞中 IGFBP-6 蛋白质的表达。结果 1×10^{-6} mol/L 剂量的 ATRA 作用软骨细胞 24 h, ATRA 抑制了软骨细胞中 II 型胶原的分泌; 1×10^{-6} mol/L 剂量的 ATRA 使软骨细胞凋亡率增加 250%, 出现明显亚二倍体峰 (凋亡细胞峰), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ATRA 使软骨细胞中 IGFBP-6 mRNA 和蛋白质的表达分别增加了 128% 和 195%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 维甲酸负性调节软骨细胞分泌功能, 促进软骨细胞凋亡, 维甲酸可能通过调控靶基因 IGFBP-6 的基因转录和翻译, 发挥对软骨细胞的促凋亡作用。

关键词: 维甲酸; 软骨细胞; 细胞凋亡; IGFBP-6; 基因表达

Up-regulation of retinoic acid induces on cell apoptosis and expression of IGFBP-6 in chondrocyte GUO

Lei, ZHAO Yuyan, ZHU Shibo, et al. Department of Orthopedic Surgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of retinoic acid (RA) on cell apoptosis and gene regulation of insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP-6) in rat chondrocyte. **Methods** Chondrocyte from rat were cultured with all trans retinoic acid (ATRA) at 1×10^{-6} mol/L for 24 hours. The cell immunocytochemistry method and flow cytometry were used to measure the 2-collagenous and the cell apoptosis in ATRA-treated chondrocyte; The IGFBP-6 mRNA and protein level in chondrocyte were detected by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Western blotting analysis. **Results** The 2-collagenous in chondrocyte were down-regulated by ATRA at 1×10^{-6} mol/L. The cell apoptosis in chondrocyte exposed to ATRA at 1×10^{-6} mol/L increased 250%, compared with control group ($P < 0.05$). The IGFBP-6 mRNA and protein level in ATRA-treated chondrocyte were increased 128% and 195%, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** Retinoic acid may be down-regulated the secretion and cell proliferation, but up-regulated the cell apoptosis of chondrocyte *in vitro*. Retinoic acid may possess the up-regulation on cell apoptosis through the effect on genetic transcription and translation of IGFBP-6.

Key words: Retinoic acid; Chondrocyte; Apoptosis; IGFBP-6; Gene expression

骨性关节炎是一种老年人群中常见病, 是以关节软骨降解为特征的退行性关节疾病, 病因迄今尚未阐明。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30500414); 辽宁省教育厅高等学校科学研究项目 (05L508, 20061010)

作者单位: 110001 沈阳市, 中国医科大学附属第一医院骨科 (郭磊、赵玉岩、张世亮、刘魁、高晓宇); 沈阳市益民医院骨外科 (朱世博)

通讯作者: 郭磊, E-mail: G572@sina.com

近年来研究表明, 以软骨细胞为主的细胞凋亡与骨关节炎的发生、发展密切相关^[1]。在骨的微环境中, 有许多生长因子和代谢类物质参与调控骨细胞的代谢, 其中 IGFs 家族重要成员胰岛素样生长因子结合蛋白 6 (Insulin-like growth factor binding protein 6, IGFBP-6) 具有重要调节作用^[2]。维甲酸类物质是维生素 A 的衍生物, 在调控多种组织和细胞的形态发生、增殖分化及凋亡代谢等方面具

有广泛的生物学活性。阐明细胞凋亡的发生机制、基因与分子的调控,应从细胞凋亡入手。笔者于2006年3月至2007年3月进行动物及体外细胞实验,探讨骨关节炎发生机制以及如何通过调控细胞凋亡而有效地防治骨关节炎,观察维甲酸对软骨细胞凋亡功能的调控作用及细胞内 IGFBP-6 基因的表达规律,为骨性关节炎的病因学研究及生物学治疗提供干预靶点。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

实验动物为1月龄中国白兔,体重500 g左右,由本校动物实验中心提供(Ⅱ级动物)。试剂Ⅱ型胶原酶、胎牛血清、胰蛋白酶、DMEM、TRIZOL RNA 抽提试剂均为 Gibco 公司(美国)产品,四甲基偶氮唑蓝(MTT)Ⅱ型胶原单抗、全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA)碘化丙锭(Propidium iodide, PI)均为 Sigma 公司(美国)产品, M-MLV 逆转录试剂盒和 PCR 试剂为 Promega 公司(美国)产品, IGFBP-6、 β -actin 引物由上海生工生物工程有限公司合成,兔抗鼠多克隆 IGFBP-6 抗体为 Santa 公司(美国)产品, GAPDH 为上海生物通公司产品。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞分离及培养:无菌条件下,取兔股骨髓软骨,在20%胎牛血清的DMEM中漂洗,0.2%Ⅱ型胶原酶消化,37℃的5% CO₂培养箱中消化6 h,1500 r/min 离心5 min,弃上清,过滤后在20%胎牛血清的DMEM进行原代培养。

1.2.2 维甲酸诱导软骨细胞凋亡:软骨细胞常规培养于10%的DMEM(含有10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素),在37℃、5% CO₂培养箱中贴壁生长。培养24 h达对数生长期进行 ATRA 作用实验。ATRA 溶于 DMSO。实验分组:第1组为对照组,加入等体积的 DMSO, DMSO 终体积不超过0.1%,此浓度的 DMSO 对细胞生长无明显影响;第2组:给予 1×10^{-6} mol/L ATRA。用药后24 h收集细胞。

1.2.3 细胞免疫化学检测Ⅱ型胶原的变化:软骨细胞培养致第10 d,密度为 1×10^4 /mL 时,采用细胞爬片技术,待细胞近汇合时取下载玻片, PB 浸泡3次(每次5 min),3%过氧化氢室温下孵育10 min, PBS 浸泡3次(每次5 min),10%正常山羊血清室温下封闭20 min后,倾去血清,滴加1:100的Ⅱ型胶原单抗,4℃下过夜;PBS浸泡3次(每次5 min),滴加1:

30的二抗,37℃孵育30 min后, PBS 浸泡3次(每次5 min),滴加1:300的辣根酶标记链酶卵白素,37℃孵育30 min,再 PBS 浸泡3次(每次5 min);DAB 显色,自来水冲洗,复染,封片。

1.2.4 流式细胞仪检测软骨细胞凋亡:收集经 ATRA 诱导培养的细胞,1000 r/min 离心3 min,弃上清,70%酒精固定,离心弃酒精,悬于4℃ PBS 过夜,加0.6 mL PI 染液,避光染色30 min,应用 Bacton Dickonson FACScan 流式细胞仪测定细胞周期。FL2-H(PI 的荧光值)测定 DNA 含量,采用 CELLQuest 软件进行细胞周期分析。

1.2.5 细胞总 RNA 提取及 RT-PCR:按 Total RNA Isolation System 说明,分别提取软骨细胞的总 RNA,采用 M-MLV 逆转录试剂盒说明将细胞总 RNA 的 mRNA 逆转录成 cDNA,引物为 Oligo dT。PCR 体系:25 μ L 体系中 cDNA 2 μ L,1 $\times$ PCR 缓冲液,15 mmol/L MgCl₂,4种 dNTPs 各25 μ mol/L,引物50 pmol/L, Taq 酶1 U。引物序列:IGFBP-6 引物序列上游为5'-CTC TCC TCC TGC CCT GTT CTA-3',下游引物5'-CAT GGT CAG GGT TTG TGC CC-3',扩增片段584 bp; β -actin 上游引物:5'-AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC-3',下游引物5'-AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA-3',扩增片段299 bp。PCR 反应条件同前^[3]。PCR 产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳1 h,电压为80 V,将凝胶置 GDS8000 凝胶自动成像仪中,采用 Gels work-ID 软件进行图像扫描及灰度处理,分别对目的基因及内对照 β -actin 的扩增产物进行半定量分析,目的基因的 mRNA 表达量等于基因灰度值/ β -actin 灰度值。

1.2.6 细胞总蛋白质提取及 Western 印迹杂交:细胞裂解液裂解软骨细胞,超声波处理,12000 r/min 离心2 min,取上清,测定总蛋白含量。已溶解于加样缓冲液的总蛋白质经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,100 V 电泳转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭液封闭2 h,用1:300稀释 IGFBP-6 抗体(兔抗鼠多克隆抗体, Santa 公司,美国)进行 Western 蛋白印迹杂交,40℃孵育过夜。1:300稀释的二抗(碱性磷酸酶偶联的羊抗小鼠 IgG, Santa 公司,美国)孵育2 h,采用 DAB 显色试剂盒显影并检测,以 GAPDH 作为内对照,目的蛋白的表达量等于蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。

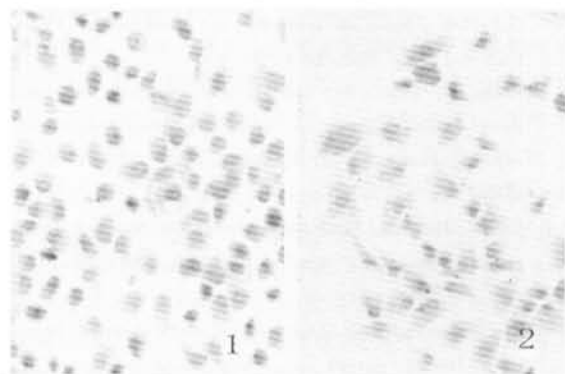
1.3 统计学处理

RT-PCR 和 Western 印迹杂交每个实验组检测5次,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,资料比较采用 *t* 检验,细胞凋亡率采用方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 维甲酸对软骨细胞分泌及凋亡功能的影响

以 1×10^{-6} mol/L 剂量的 ATRA 作用软骨细胞 24 h, 细胞内 II 型胶原的合成和分泌明显减少(图 1); 流式细胞仪检测软骨细胞凋亡, 1×10^{-6} mol/L 剂量的 ATRA 能够明显促进软骨细胞的凋亡, 出现明显亚二倍体峰(凋亡细胞峰), 凋亡率增加 250% (表 1), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



1: 对照组; 2: 实验组, 1×10^{-6} mol/L 的 ATRA 作用软骨细胞 24 h
图 1 维甲酸对软骨细胞合成 II 型胶原的抑制作用(200 ×)

应用细胞免疫化学方法观察维甲酸对软骨细胞合成 II 型胶原的影响, 以 1×10^{-6} mol/L 剂量的 ATRA 作用软骨细胞 24 h, 软骨细胞的数量及 II 型胶原明显减少。

表 1 维甲酸对软骨细胞凋亡功能和 IGFBP-6 表达的影响

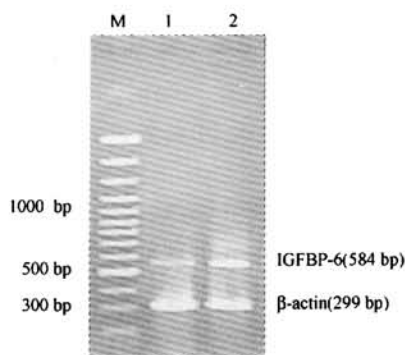
group	n	apoptosis (%)	IGFBP-6 mRNA	IGFBP-6 protein
control	5	6 ± 2.5	0.18 ± 0.06	0.22 ± 0.08
ATRA	5	21 ± 3.8^a	0.41 ± 0.11^a	0.65 ± 0.28^a

注: 实验组加入 1×10^{-6} mol/L 的 ATRA 作用软骨细胞 24 h; 两组比较, $^a P < 0.05$

2.2 维甲酸对 IGFs 家族基因 IGFBP-6 表达的调控作用

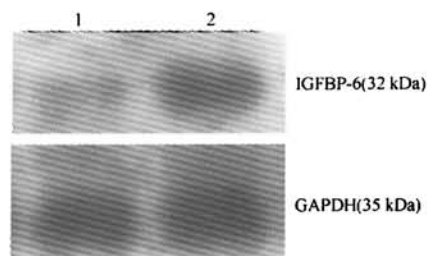
实验组加入 1×10^{-6} mol/L 的 ATRA, 证实软骨细胞中有 IGFBP-6 mRNA 的表达(图 2), 而且显示 1×10^{-6} mol/L 的 ATRA 作用软骨细胞 24 h 后, 细胞内的 IGFBP-6 mRNA 的表达水平明显增加(图 2 及表 1), 从而证实了 ATRA 在转录水平对 IGFBP-6 表达的促进作用。本研究采用 Western 印迹杂交分析测定软骨细胞中 IGFBP-6 蛋白质的表达规律, 见图 3 和表 1, 实验组以 1×10^{-6} mol/L 的 ATRA 作用软骨

细胞 24 h, 使 IGFBP-6 蛋白质的表达增加 195%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 进而表明在基因翻译水平上, ATRA 对 IGFBP-6 的正性调控作用。



M: marker; 1: 对照组; 2: 实验组, 1×10^{-6} mol/L 的 ATRA 作用软骨细胞 24 h

图 2 ATRA 对细胞内 IGFBP-6 mRNA 表达的正性调节作用(PCR 图)



1: 对照组; 2: 实验组, 1×10^{-6} mol/L 的 ATRA 作用软骨细胞 24 h

图 3 ATRA 对细胞内 IGFBP-6 蛋白质表达的上调作用(Western 印迹杂交图)

3 讨论

维甲酸类物质是维生素 A 的衍生物, 在调控多种组织和细胞的形态发生、增殖分化、生长发育及细胞凋亡代谢等方面具有广泛的生物学活性。ATRA 是维生素 A 衍生物在体内的自然存在形式, 具有调节组织代谢、干扰细胞生长、增殖及凋亡等重要生理作用。维生素 A 经细胞内一系列脱氢酶的作用, 生成 ATRA, ATRA 可以与受体结合参与基因表达的调控, 也可与胞浆维甲酸结合蛋白结合经 P450 氧化降解^[4]。本研究中, 应用 ATRA 作用体外培养的软骨细胞, 显示 1×10^{-6} mol/L 剂量的 ATRA 促进了细胞的凋亡, 抑制了软骨细胞合成和分泌 II 型胶原, 从而证实了维甲酸对软骨细胞生长代谢的负性调节作用。

软骨细胞的分化、增殖、分泌功能及凋亡, 已被

一些学者认为是骨骼发育、生长、重塑及维护关节功能的关键环节^[5]。在骨的微环境中,有许多生长因子参与调控软骨细胞的代谢,其中 IGFs 具有重要调节作用^[6]。IGFs 家族是由两种多肽(IGF-I、IGF-2)两种受体及 6 种 IGFBPs 所构成;IGFs 的生物学效应与 IGFBPs 关系密切。IGFBPs 可稳定 IGFs 的水平,使其半衰期延长,但以剂量依赖方式抑制 IGFs 生物活性。IGFBP-6 蛋白 N-末端 GCAEAxxC 结构可以结合 IGF-2 并特异性地抑制其生物活性。IGFBP-6 还通过 C-末端 heparin 位点结合于细胞表面或细胞外基质,可能参与细胞内特定的信号传导途径,发挥负性调控细胞的增殖与凋亡、核糖体的合成、氨基酸的摄入及利用等重要生理过程^[7]。Bienvenu 等^[8]研究发现,IGFBP-6 转基因小鼠出现大脑与小脑发育迟缓,生殖发育异常,且伴有体重降低等改变。本研究显示 1×10^{-6} mol/L 浓度的维甲酸诱导软骨细胞凋亡、负性调节软骨细胞代谢的过程中,IGFBP-6 在基因的转录和翻译水平的表达明显升高。因此我们推测,作为维甲酸的靶基因,IGFBP-6 与软骨细胞生长代谢密切相关,维甲酸调节 IGF 家族成员 IGFBP-6 的表达,可能是其参与软骨组织代谢的作用机制之一。

【参 考 文 献】

[1] Lisignoli G, Grassi F, Zini N, et al. Anti-Fas-induced apoptosis in

chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(8):1800-1807.

[2] Jia D, Heersche JN. Expression of insulin-like growth factor system constituents in differentiating rat osteoblastic cell populations. *Growth Horm IGF Res*, 2002, 12(6):399-410.

[3] Guo L, Zhao YY, Zhao YY, et al. Toxic effects of TCDD on osteogenesis through altering igfbp-6 gene expression in osteoblasts. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(11):2018-2026.

[4] Goma MS, Yee SW, Milbourne CE, et al. Homology model of human retinoic acid metabolising enzyme cytochrome P450 26A1 (CYP26A1): active site architecture and ligand binding. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2006, 21(4):361-369.

[5] Adams CS, Shapiro IM. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13(6):465-473.

[6] Long F, Joeng KS, Xuan S, et al. Independent regulation of skeletal growth by Ihh and IGF signaling. *Dev Biol*, 2006, 298(1):327-333.

[7] De Los Rios P, Hill DJ. Expression and release of insulin-like growth factor binding proteins in isolated epiphyseal growth plate chondrocytes from the ovine fetus. *J Cell Physiol*, 2000, 183(2):172-181.

[8] Bienvenu G, Seurin D, Grellier P, et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 transgenic mice: postnatal growth, brain development, and reproduction abnormalities. *Endocrinology*, 2004, 145(5):2412-2420.

(收稿日期:2007-12-17)