

· 论 著 ·

SOX2 基因对骨关节炎软骨细胞凋亡的影响研究

张玉昌^{1*} 赵萍¹ 慕向前¹ 蒋宜伟²

1. 甘肃省中医院/甘肃中医药大学第一附属医院骨科, 甘肃 兰州 730050

2. 甘肃中医药大学中医临床学院中医骨伤基础教研室, 甘肃 兰州 730030

中图分类号: R684.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 12-1773-05

摘要: **目的** 探讨 SOX2 基因对人骨关节炎(OA)软骨细胞凋亡的影响及机制。**方法** 以正常软骨组织作为对照,通过 Western blotting 检测 OA 软骨组织 SOX2 蛋白表达。从人 OA 中分离软骨细胞,参照 LipofectamineTM 2000 说明将重组体 pcDNA3.1-SOX2 及空载体 pcDNA3.1 转染软骨细胞,并设置空白对照组。AG490 作为 JAK2/STAT3 信号通路抑制剂,各组细胞处理 48 h,通过流式细胞术、ROS 试剂盒分别检测各组细胞凋亡率及 ROS 水平。Western blotting 检测 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 的蛋白相对表达量。**结果** 人 OA 软骨组织 SOX2 表达明显低于在正常软骨组织表达(0.065 ± 0.009 vs 0.313 ± 0.028 , $P < 0.05$)。转染 pcDNA3.1-SOX2 的 OA 软骨细胞 SOX2 表达明显高于空白组(0.556 ± 0.048 vs 0.122 ± 0.013 , $P < 0.05$)。pcDNA3.1-SOX2 可明显降低 OA 软骨细胞凋亡率(3.11 ± 0.42 vs 8.54 ± 0.68)及 ROS 水平(23.46 ± 2.15 vs 52.67 ± 4.41),上调 p-JAK2(0.142 ± 0.013 vs 0.065 ± 0.009)和 p-STAT3 表达(0.218 ± 0.020 vs 0.126 ± 0.015)($P < 0.05$),AG490(15.23 ± 1.13 vs 8.15 ± 0.62)可诱导 OA 软骨细胞凋亡,而 pcDNA3.1-SOX2 可减弱 AG490 对 OA 软骨细胞凋亡促进作用($P < 0.05$)。**结论** SOX2 可抑制 OA 软骨细胞凋亡,其机制可能与激活 JAK2/STAT3 信号通路有关。

关键词: 骨关节炎;软骨细胞;SOX2 基因;凋亡;JAK2/STAT3 信号通路

Effect of SOX2 gene on apoptosis of chondrocytes in patients with osteoarthritis

ZHANG Yuchang¹, ZHAO Ping¹, MU Xiangqian¹, JIANG Yiwei²

1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Gansu Traditional Chinese Medicine University, Lanzhou 730050

2. Department of Basic Teaching and Research of Traditional Chinese Medicine Bone Trauma, Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China

* Corresponding author: ZHANG Yuchang, Email: 16663085@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of SOX2 gene overexpression on chondrocyte apoptosis of human osteoarthritis (OA). **Methods** Normal cartilage tissue was used as control. Western blotting was used to detect the expression of SOX2 in OA cartilage tissue. Chondrocytes were isolated from human OA and recombinant pcDNA3.1-SOX2 and empty vector pcDNA3.1 were transfected into the chondrocytes according to LipofectamineTM 2000. The blank group was set up. AG490 was used as JAK2/STAT3 signal pathway inhibitor. Cells were treated for 48 h. The apoptotic rate and ROS level were detected with flow cytometry and ROS kit, respectively. Western blotting was used to detect the expression of JAK2, p-JAK2, STAT3, and p-STAT3 protein. **Results** The expression of SOX2 in human OA cartilage tissue was significantly lower than that in normal cartilage tissue (0.065 ± 0.009 vs 0.313 ± 0.028 , $P < 0.05$). The expression of SOX2 in OA chondrocytes transfected with pcDNA3.1-SOX2 was significantly higher than that in blank group (0.556 ± 0.048 vs 0.122 ± 0.013 , $P < 0.05$). pcDNA3.1-SOX2 significantly reduced the apoptotic rate (3.11 ± 0.42 vs 8.54 ± 0.68) and ROS level (23.46 ± 2.15 vs 52.67 ± 4.41) of OA chondrocyte, but promoted the expression of p-JAK2 (0.142 ± 0.013 vs 0.065 ± 0.009) and p-STAT3 (0.218 ± 0.020 vs 0.126 ± 0.015) ($P < 0.05$), AG490 (15.23 ± 1.13 vs 8.15 ± 0.62) significantly induced apoptosis of OA chondrocytes. pcDNA3.1-SOX2 weakened the apoptotic effect of AG490 on OA chondrocytes ($P < 0.05$). **Conclusion** SOX2 inhibits the apoptosis of OA chondrocytes and protects OA from injury. The mechanism is related to the activation of JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words: osteoarthritis; chondrocytes; SOX2 gene; apoptosis; JAK2/STAT3 signaling pathway

基金项目: 甘肃省青年科技基金计划项目(编号:1308RJYA050)

* 通信作者: 张玉昌, Email: 16663085@qq.com

近些年 OA 发病率呈现明显的上升趋势^[1], OA 的病因及发病机制尚未明确,也无有效的干预手段。已有大量研究发现 OA 软骨细胞凋亡率明显高于非 OA 软骨细胞,OA 软骨细胞凋亡是其发生的关键^[2]。因此,抑制 OA 软骨细胞凋亡已成为 OA 非手术治疗药物开发的研究热点。SOX2 是 SOX 家族的一个成员,目前研究多集中于肿瘤方面,在关节炎中的研究很少^[3]。有研究显示,OA 组织 SNHG5 和 SOX2 表达明显降低,miR-26a 表达明显升高,LncRNA SNHG5/miR-26a/SOX2 信号可增强 OA 软骨细胞的增殖^[4]。JAK/STAT 是细胞内一条重要的信号转导通路,参与细胞损伤、凋亡、氧化应激等过程。激活 JAK2/STAT3 信号通路可降低 OA 软骨细胞凋亡,增强抗氧化能力^[5-6]。因此,本研究旨在探讨表达 SOX2 基因对 OA 软骨细胞凋亡影响。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本研究所需标本均取自 2017 年 1 月至 6 月甘肃中医药大学第一附属医院骨科收治的 10 例全膝关节置换的 OA 患者。取材位置为股骨髁内、外髁负重过度区的关节软骨组织。其中男性 4 例,女性 6 例,年龄为 44.8~70.7 岁,平均年龄为 (61.7±6.4) 岁。正常骨关节软骨标本来源于同期甘肃中医药大学第一附属医院因膝关节骨折收治住院、排除既往关节病史的患者,取患者股骨髁关节软骨组织,共 10 例,其中男性 5 例,女性 5 例,年龄 27.5~35.2 岁。所有样本采集经过患者知情同意及医院伦理委员会通过。所有标本均在离体后 2 h 取关节软骨组织,于液氮中保存。

1.2 试剂和仪器

FBS 及 DMEM 培养基为美国 Gibco;小鼠抗人 SOX2 抗体、小鼠抗人 JAK2 抗体、小鼠抗人 p-JAK2 抗体、小鼠抗人 STAT3 抗体和小鼠抗人 p-STAT3 抗体及 HRP 标记的羊抗鼠二抗为美国 CST;ROS 试剂盒为美国 Sigma;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒、流式细胞仪为美国 BD。

1.3 OA 软骨细胞及正常关节软骨细胞的分离培养

无菌条件下切碎 OA 软骨组织及正常关节软骨组织 (1 mm×1 mm×1 mm),胶原酶消化后,使用含 10% FBS 及青链霉素的 DMEM 培养基终止消化,过 22 目滤筛,除去沉渣,离心,弃去上清,加无血清培养基重悬细胞。计数细胞后转移至培养瓶中,于 5% CO₂、37 °C 培养箱培养。每 3 d 换液 1 次,观察

到细胞达 95% 生长融合时,使用胰酶消化后传代。

1.4 Western blotting

在 OA 软骨组织及 OA 软骨细胞中加入适量裂解液,于冰上裂解反应 30 min,离心,收集上清,BCA 法测定上清中蛋白浓度。配置 5% 浓缩胶及 12% 分离胶,经 SDS-PAGE、转 PVDF 膜、5% 脱脂奶粉封闭后,洗膜,加小鼠抗人 SOX2 抗体、小鼠抗人 JAK2 抗体、小鼠抗人 p-JAK2 抗体、小鼠抗人 STAT3 抗体和小鼠抗人 p-STAT3 抗体 (皆为 1:1 000 稀释),4 °C 孵育过夜,加 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (1:3 000 稀释),37 °C 孵育 1 h,洗膜,加 ECL 发光液,凝胶成像仪成像。Quantity-One 软件进行灰度值分析。目的蛋白相对表达量为目的条带灰度值与内参 GAPDH 灰度值比值。实验重复 3 次。

1.5 转染

以 0.5×10⁵ 个/孔接种生长至对数期的 OA 软骨细胞于 6 孔板,于 5% CO₂、37 °C 恒温细胞培养箱培养 24 h,使转染时细胞达 70%~80% 的生长融合度,参照 Lipofectamine™2000 试剂盒说明书,分别制备空载体 pcDNA3.1 及 pcDNA3.1-SOX2 与 Lipofectamine™2000 的复合物,并设置仅加入脂质体的为空白对照组,将复合物加入 6 孔板各组相应的孔内,继续培养 48 h,收集细胞,用于后续研究。

1.6 流式细胞术检测 OA 软骨细胞凋亡率

收集各组细胞,PBS 洗涤细胞,1×Binding buffer 重悬细胞,调整细胞浓度为 (2~5)×10⁵ 个/mL,取 195 μL 细胞悬液和 5 μL Annexin V-FITC,混匀,室温孵育 10 min,PBS 洗涤细胞,1×Binding buffer 重悬细胞,加入 10 μL PI,1 h 内通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测 OA 软骨细胞 ROS 含量

参照 ROS 检测试剂盒说明,不含 FBS 的 DMEM 培养液稀释 DCFH-DA。将接种好细胞的 6 孔板培养液除去,每孔加 DCFH-DA 1 mL (终浓度 10 μmol/L),常规孵育 20 min,不含 FBS 的 DMEM 培养液洗涤细胞,胰酶消化后收集细胞,通过流式细胞仪检测各组细胞的荧光强度。实验重复 3 次。

1.8 抑制 STAT3 信号对 OA 软骨细胞凋亡的影响

使用 STAT3 信号通路抑制剂 AG490 (10 μmol/L) 处理软骨细胞,细胞分为空白组、AG490 组和 pcDNA3.1-SOX2+AG490 组,处理 48 h,预冷 PBS 洗涤细胞,1×Binding buffer 重悬细胞,参照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒检测各组细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS21.0 软件进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据采用独立样本 t 检验,多组差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 判断差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 OA 软骨组织 SOX2 表达

以正常软骨组织作为对照,通过 Western blotting 检测人 OA 软骨组织 SOX2 蛋白表达,结果如图 1 所示,人 OA 软骨组织 SOX2 表达明显低于在正常软骨组织表达($P < 0.05$)。

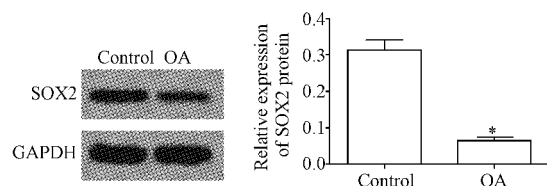


图 1 SOX-2 在 OA 软骨组织的表达

Fig.1 Expression of SOX-2 in cartilage tissue of OA

注:与正常软骨组织比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 pcDNA3.1-SOX2 转染 OA 软骨细胞效果

如图 2 所示,pcDNA3.1-SOX2 转染 OA 软骨细

胞 48 h 后,SOX2 蛋白表达明显高于空白组($P < 0.05$),而转染 pcDNA3.1 后细胞 SOX2 表达与空白组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

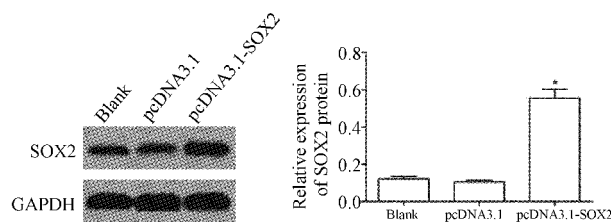


图 2 Western blotting 检测 pcDNA3.1-SOX2 转染 OA 软骨细胞后 SOX2 蛋白表达

Fig.2 SOX2 protein expression in OA chondrocytes transfected with pcDNA3.1-SOX2 detected by Western blotting

注:与空白组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 转染 pcDNA3.1-SOX2 后 OA 软骨细胞凋亡率

pcDNA3.1-SOX2 转染 OA 软骨细胞 48 h,通过 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒检测各组细胞凋亡率,结果如图 3 所示,与空白组比较,pcDNA3.1-SOX2 组细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$)。

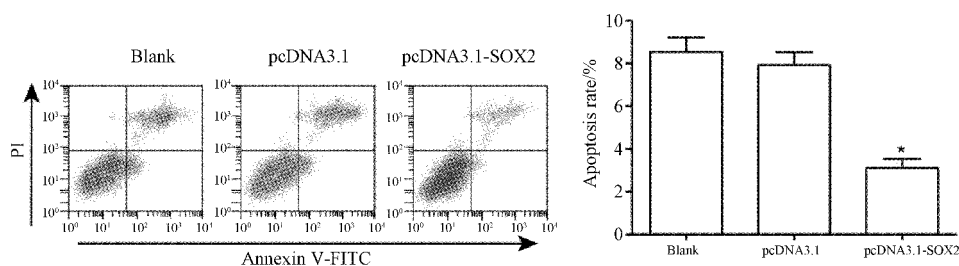


图 3 过表达 SOX2 对 OA 软骨细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of SOX2 overexpression on apoptosis of OA chondrocytes

注:与空白组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 转染 pcDNA3.1-SOX2 后 OA 软骨细胞 ROS 水平

使用 ROS 试剂盒,通过流式细胞术检测转染 pcDNA3.1-SOX2 48 h 的各组 OA 软骨细胞 ROS 含量,结果如图 4 所示,与空白组比较,pcDNA3.1-SOX2 组 ROS 水平明显降低($P < 0.05$)。

2.5 转染 pcDNA3.1-SOX2 后 OA 软骨细胞 JAK2/STAT3 信号通路的影响

通过 Western blotting 检测各组细胞 JAK2、p-

JAK2、STAT3 和 p-STAT3 表达,结果如图 5 所示,与空白组比较,pcDNA3.1-SOX2 组 p-JAK2 和 p-STAT3 表达明显升高($P < 0.05$)。3 组间 JAK2 和 STAT3 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 抑制 JAK2/STAT3 信号通路对 OA 软骨细胞凋亡的影响

如图 6 所示,AG490 可明显诱导 OA 软骨细胞凋亡,而转染 pcDNA3.1-SOX2 可减弱 AG490 对 OA 软骨细胞凋亡促进作用($P < 0.05$)。

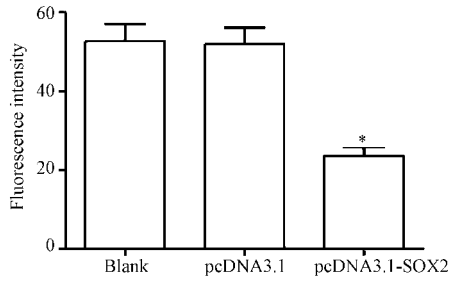


图 4 过表达 SOX2 对 OA 软骨细胞 ROS 水平的影响

Fig.4 Effect of SOX2 overexpression on ROS level in OA chondrocytes

注:与空白组比较, * $P < 0.05$ 。

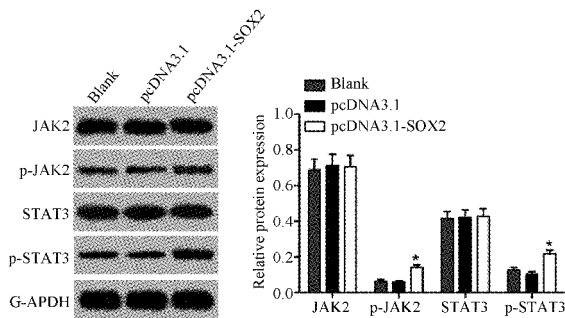


图 5 过表达 SOX2 对 OA 软骨细胞 JAK2/STAT3 信号通路的影响

Fig.5 Effect of SOX2 overexpression on JAK2/STAT3 signaling pathway in OA chondrocytes

注:与空白组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

软骨细胞凋亡在 OA 发生发展过程中发挥重要作用。OA 软骨细胞表型改变、数量减少及软骨厚度变薄等因素均与软骨细胞凋亡存在密切关系^[7]。在 OA 发生发展中存在软骨细胞凋亡,而软骨细胞

凋亡可进一步加剧关节退变^[8-9]。因此,抑制 OA 软骨细胞凋亡对于 OA 治疗具有重要意义。SOX 基因家族是一类以 SRY 基因为代表的基因家族,其家族一些成员与软骨细胞生长密切相关。SOX2 表达与肺癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞生长密切相关^[12-13],但目前 SOX2 在 OA 中研究较少。有研究显示,OA 组织 SNHG5 和 SOX2 表达明显降低,miR-26a 表达明显升高,LncRNA SNHG5/miR-26a/SOX2 信号可增强 OA 软骨细胞的增殖^[4]。因此本研究发现 OA 组织 SOX2 表达明显低于在正常软骨组织表达,将重组体 pcDNA3.1-SOX2 转染 OA 软骨细胞,发现 SOX2 表达明显升高,说明建立的过表达 SOX2 的 OA 软骨细胞模型成功。对 OA 软骨细胞模型凋亡检测发现,OA 软骨细胞凋亡降低。

人体正常情况下,ROS 产生与清除处于动态平衡,而一些病理因素可打破平衡,导致氧化应激的出现。有研究指出,ROS 可直接或间接的破坏软骨细胞外基质,直接损伤软骨细胞,引起细胞凋亡,从而参与 OA 的病理过程^[16-17]。抑制 ROS 生成可明显降低 OA 软骨细胞凋亡^[18-19]。JAK2/STAT3 信号通路与细胞增殖、凋亡、分化等密切相关^[20]。在关节炎发病过程中,磷酸化的 STAT3 水平降低,可通过抑制成纤维样滑膜细胞凋亡、促进 T 细胞存活等加重炎症反应,而激活 JAK2/STAT3 信号通路可明显降低炎症反应^[21-22]。本研究结果显示,过表达 SOX2 可明显上调磷酸化的 JAK2 和 STAT3 表达,提示 SOX2 可能通过激活 JAK2/STAT3 信号通路降低 OA 软骨细胞凋亡。AG490 为 JAK2 特异性抑制剂,AG490 可明显促进软骨细胞凋亡^[23-24]。本研究使用 AG490 处理 OA 软骨细胞,发现细胞凋亡率明显升高,而过表达 SOX2 可减弱 AG490 对软骨细胞凋亡促进作用。说明 SOX2 可能通过激活 JAK2/

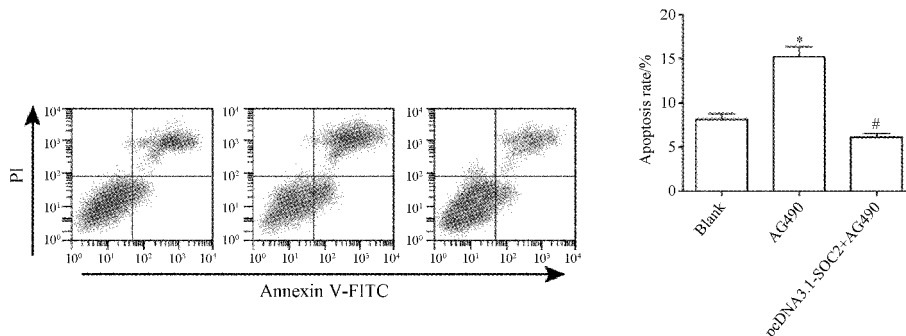


图 6 抑制 JAK2/STAT3 信号通路对 OA 软骨细胞凋亡的影响

Fig.6 Effect of JAK2/STAT3 signaling pathway inhibition on chondrocyte apoptosis in OA

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与 AG490 组比较, # $P < 0.05$ 。

STAT3 信号通路减弱 OA 软骨细胞损伤。

综上所述,SOX2 在 OA 组织表达降低,过表达 SOX2 可明显抑制 OA 软骨细胞凋亡,降低 ROS 水平,激活 JAK2/STAT3 信号通路可能是其机制之一。

【参 考 文 献】

- [1] Neri S, Guidotti S, Lilli NL, et al. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stromal cells from osteoarthritis patients: In vitro genetic stability and replicative senescence[J]. J Orthop Res, 2017, 35(5): 1029-1037.
- [2] Liu Y, Zhu H, Yan X, et al. Endoplasmic reticulum stress participates in the progress of senescence and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(2): 368-373.
- [3] Mu P, Zhang Z, Benelli M, et al. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53-and RB1-deficient prostate cancer[J]. Science, 2017, 355(6320): 84-88.
- [4] Shen H, Wang Y, Shi W, et al. LncRNA SNHG5/miR-26a/SOX2 signal axis enhances proliferation of chondrocyte in osteoarthritis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(2):191-198.
- [5] Zhao JM, Cheng W, He XG, et al. Long non-coding RNA PICART1 suppresses proliferation and promotes apoptosis in lung cancer cells by inhibiting JAK2/STAT3 signaling [J]. Neoplasia, 2018, 65(5): 779-789.
- [6] Xu X, Lv H, Li X, et al. Danshen attenuates cartilage injuries in osteoarthritis in vivo and in vitro by activating JAK2/STAT3 and AKT pathways[J]. Exp Animals, 2018, 67(2): 127-137.
- [7] Haseeb A, Ansari MY, Haqqi TM. Harpagoside suppresses IL-6 expression in primary human osteoarthritis chondrocytes [J]. J Orthop Res, 2017, 35(2): 311-320.
- [8] Gao H, Song Y, Li D, et al. Saikosaponin a inhibits IL-1 β -induced inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocytes by activating LXR α [J]. Oncotarget, 2017, 8(51): 88941-88950.
- [9] Feng Z, Li X, Lin J, et al. Oleuropein inhibits the IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in human osteoarthritis chondrocytes[J]. Food Funct, 2017, 8(10): 3737-3744.
- [10] Chang T, Xie J, Li H, et al. MicroRNA-30a promotes extracellular matrix degradation in articular cartilage via downregulation of Sox9[J]. Cell Prolif, 2016, 49(2):207-218.
- [11] 张磊, 宁玉辉, 李国顺, 等. 敲低 SOX5 对骨关节炎软骨细胞生物学功能的影响[J]. 中国骨与关节杂志, 2017, 6(12): 932-937.
- [12] Correia LL, Johnson JA, McErlean P, et al. SOX2 drives bronchial dysplasia in a novel organotypic model of early human squamous lung cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(11): 1494-1508.
- [13] Zhou L, Zhao L C, Jiang N, et al. MicroRNA miR-590-5p inhibits breast cancer cell stemness and metastasis by targeting SOX2[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(1): 87-94.
- [14] Yang HL, Korivi M, Chen CH, et al. A ntrodia camphorata attenuates cigarette smoke-induced ROS production, DNA damage, apoptosis, and inflammation in vascular smooth muscle cells, and atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. Environ Toxicol, 2017, 32(8): 2070-2084.
- [15] Umeno A, Biju V, Yoshida Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes [J]. Free Radical Res, 2017, 51(4): 413-427.
- [16] Fu Y, Kinter M, Hudson J, et al. Aging promotes sirtuin 3-dependent cartilage superoxide dismutase 2 acetylation and osteoarthritis[J]. Arthrit Rheumat, 2016, 68(8): 1887-1898.
- [17] Lepetos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(4): 576-591.
- [18] Huang Z, Li J, Du S, et al. Effects of UCP4 on the proliferation and apoptosis of chondrocytes: its possible involvement and regulation in osteoarthritis [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150684.
- [19] Chen K, Yan Y, Li C, et al. Increased 15-lipoxygenase-1 expression in chondrocytes contributes to the pathogenesis of osteoarthritis.[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3109.
- [20] 黄秋兰, 雷荣娥, 覃沁怡, 等. 白细胞介素 9 通过激活信号转导和转录激活因子 3(STAT3)通路促进胰腺癌细胞的增殖和迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(9): 1228-1233.
- [21] Xing R, Jin Y, Sun L, et al. Interleukin-21 Induces Migration and Invasion of Fibroblast-like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis.[J]. Clin Exp Immunol, 2016, 184(2): 147-158.
- [22] Wen H, Yang G, Dong Q. Ellipticine inhibits the proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via the STAT3 pathway [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2017, 39(4): 219-224.
- [23] Li XS, Chen H, Zhen P, et al. JAK2/STAT3 signal pathway mediating curcumin in cartilage cell metabolism of osteoarthritis [J]. Zhongguo Gu Shang, 2016, 29(12): 1104-1109.
- [24] Zhang ZM, Shen C, Li H, et al. Leptin induces the apoptosis of chondrocytes in an in vitro model of osteoarthritis via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3684-3690.

(收稿日期: 2018-11-12;修回日期: 2018-12-07)