

初级纤毛在调控软骨细胞自噬中的作用研究

向威 许涛

【摘要】 目的 探究初级纤毛和自噬在软骨细胞中的表达关系,以及调控初级纤毛表达对软骨细胞自噬的影响。方法 首先通过免疫荧光染色检测软骨细胞中自噬小体和初级纤毛的表达水平及二者在软骨细胞分裂周期中的定位表达关系;通过使用无血清培养基诱导初级纤毛表达,水合氯醛破坏纤毛结构后,统计分析初级纤毛发生率、长度和自噬的表达,Western blot法检测初级纤毛和自噬相关蛋白IFT88、Beclin1和LC3- I/II的表达情况。结果 软骨细胞中存在初级纤毛和自噬的共表达,初级纤毛的表达率为(62.16±11.74)%,长度为(2.342±0.392) μm,单个细胞内自噬的相对表达量为26.38±5.31;在软骨细胞分裂周期中,自噬小体的数量、大小和分布会随着初级纤毛的解聚和重构发生变化;无血清培养基可诱导初级纤毛表达率上调,促进纤毛延长,同时会上调软骨细胞自噬水平及IFT88、Beclin1和LC3-II的表达,而水合氯醛破坏纤毛结构后,初级纤毛表达率和长度下调,细胞自噬表达下调,同时抑制IFT88、Beclin1和LC3-II蛋白的表达。结论 在软骨细胞中存在初级纤毛和自噬的定位表达关联性,调控初级纤毛的表达会影响软骨细胞的自噬水平。

【关键词】 软骨;初级纤毛;自噬

Role of primary cilia in the regulation of autophagy in chondrocytes. XIANG Wei*, XU Tao. *Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: XU Tao, E-mail: xutao0101@yeah.net

【Abstract】 Objective To explore the expression relationship between primary cilia and autophagy in chondrocytes, and to detect the effect of regulating primary cilia expression on autophagy of chondrocytes. **Methods** Immunofluorescence staining was used to detect the expression of autophagosomes and primary cilia in chondrocytes, and their localization and expression relationship during cells division cycle. Then, primary cilia were induced by serum-free medium and destroyed by chloral hydrate. Primary cilia incidence, length and autophagy expression were analyzed and their related proteins IFT88, Beclin1 and LC3- I/II were detected by Western blotting. **Results** Primary cilia and autophagy could be co-expressed in chondrocytes. The incidence of primary cilia was (62.16±11.74)% and the length was (2.342±0.392) μm, and the relative expression of autophagy was 26.38±5.31 in a single cell. The number, size and distribution of autophagosomes could change with the disassembly and assembly of primary cilia during cell cycle. Serum free medium could induce primary cilia expression, promote prolongation, and up-regulate the autophagy level of chondrocytes and their related proteins IFT88, Beclin1 and LC3- II expression. But after disrupting cilia structure by chloral hydrate, the incidence and length of primary cilia were reduced, the expression of autophagy was down-regulated, and the expression of IFT88, Beclin1 and LC3- II proteins was inhibited. **Conclusion** There exist a localization and expression correlation between primary cilia and autophagy in chondrocytes, and regulation primary cilia expression could influence the level of autophagy in chondrocytes.

【Key words】 Chondrocyte; Primary cilia; Autophagy

软骨作为具有生物力学特性的组织,具有缓冲外界应力负荷、维持关节正常活动、促进软骨内成骨等多种功能,在维持力学平衡和促进骨骼发育等方

面具有重要作用^[1]。但由于软骨组织内缺乏血供,组织分化程度较高,细胞增殖能力有限。目前,软骨细胞如何适应包括应力、缺氧等多种微环境变化的机制仍不清楚。

初级纤毛作为由微管结构组成的细胞“天线”,是一种特殊的细胞感受器,能感受微环境中各种理化刺激,参与多种信号通路转导,使细胞对外界变化作出适应性反应^[2]。近来,初级纤毛在骨骼系统发育中的作用逐渐被认识,其能参与软骨力学适应、细

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2018.06.011

基金项目:国家自然科学基金(81772440)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院骨科(向威);
430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复科
(许涛)

通信作者:许涛, E-mail: xutao0101@yeah.net

胞增殖和分化发育等调控过程^[3-5]。目前,探究初级纤毛在软骨发育和相关疾病发生中的作用逐渐成为研究热点。

自噬是一种受基因调控的细胞能量代谢过程,主要通过降解代谢废物或衰老的细胞器来改善细胞的营养代谢状态,使细胞适应微环境的变化,维持内稳态并有效应对应激^[6,7]。软骨组织由于缺乏血供,细胞获取营养的途径有限,其营养代谢水平与外界环境的变化密切相关,高度依赖自噬介导的能量代谢再利用效应^[8]。自噬在软骨细胞的适应机制中同样也扮演着重要的作用。

初级纤毛和自噬作为两种不同的细胞适应机制,其二者是否存在相互作用、共同影响软骨细胞对外界环境的适应机制仍不清楚,因此,本研究旨在探讨初级纤毛和自噬在软骨细胞中的表达关系及可能的交互机制。

材料与方法

一、实验材料

新生 SD 大鼠购自华中科技大学同济医学院附属同济医院实验动物中心,自噬荧光染色试剂盒购自美国 AAT Bioquest 公司,水合氯醛、DMEM/F12 培养基、CY-3 标记羊抗鼠荧光二抗、凝胶配制试剂盒、ECL 显色液、小鼠来源 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗均购自武汉博士德公司,兔来源 IFT88 抗体购自三鹰公司,兔来源 Beclin1 和 LC3- I / II 抗体购自美国 CST 公司,小鼠来源 acetylated- α -tubulin 抗体购自美国 Sigma 公司。

二、实验方法

(一)原代软骨细胞的分离及培养

新生 3 d 的 SD 大鼠处死后剪取下肢,分离截取膝关节软骨,剔除软组织后剪成 1 mm³ 大小,适量胰酶 37 °C 消化 30 min 后离心,在沉淀物中加入适量 II 型胶原酶置于培养箱中消化约 6~8 h。筛除残渣,取滤液离心弃上清,用培养基重悬细胞团并转移至培养瓶中,于 5% CO₂, 37 °C 培养箱常规培养。

(二)初级纤毛和自噬的免疫荧光双标染色

将软骨细胞分为对照组、无血清培养基诱导组和水合氯醛干预组,将软骨细胞分别经常规培养、无血清培养基饥饿 6 h 和 40 μ mol/L 水合氯醛干预 24 h 后进行免疫荧光双标染色。将细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后用 0.1% 的 Triton X-100 破膜 10 min,再用 5% 的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 1 h,将 acetylated- α -tubulin 抗体以 1:300 稀

释后加入细胞板 4 °C 孵育过夜。弃一抗后洗涤 3 遍,加入荧光二抗室温避光孵育 1 h,再加入 4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (4,6-diamino-2-phenyl indole, DAPI) 避光孵育 10 min,磷酸缓冲液 (phosphate balanced solution, PBS) 洗涤后加入以 1:500 配制的 Cell Meter™ Autophagy 自噬小体荧光染色工作液,置于培养箱中避光孵育 20 min 后用洗涤缓冲液洗涤,置于荧光显微镜下观察。分别在不同的通道中拍照记录同一视野下细胞核、初级纤毛和自噬小体的表达情况,再用软件 Image J (1.44P, National Institutes of Health, 美国) 合成并分析相关图片。

(三)Western blot

软骨细胞分别经常规培养、无血清培养基饥饿 6 h 和 40 μ mol/L 水合氯醛干预 24 h 后提取总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,取 20 μ g 总蛋白进行电泳,转膜至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜后以 5% BSA 封闭 1 h,分别加入一抗 IFT88 (1:500)、Beclin1 (1:1 000)、LC3- I / II (1:1 000)、GAPDH (1:300),4 °C 摇床过夜后用三乙醇胺缓冲盐 + Tween 20 溶液 (tris - buffered saline and tween 20, TBST) 洗涤 3 遍,室温孵育辣根过氧化物酶标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗 (1:5 000) 1 h, TBST 洗涤后用增强化学发光法 (enhanced chemiluminescent, ECL) 显色系统检测。

三、统计学方法

用 SPSS 20.0 软件 (IBM 公司, 美国) 分析各组实验数据,用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表述数据,多组间比较采用单因素方差分析,定义 $P < 0.05$ 表示结果差异有统计学意义。

结 果

一、软骨细胞内存在初级纤毛和自噬的共表达

免疫荧光双标染色 (图 1) 发现,在软骨细胞中存在由乙酰化的 α -Tubulin 聚合而成的初级纤毛结构,正常软骨细胞的初级纤毛的发生率为 (62.16 \pm 11.74)%, 长度为 (2.342 \pm 0.392) μ m, 同时大量的自噬小体散在分布于胞质中,细胞内平均表达水平为 26.38 \pm 5.31, 说明在软骨细胞中可以同时存在初级纤毛和自噬的共表达。

二、初级纤毛和自噬在软骨细胞周期中存在定位表达关系

研究发现,初级纤毛在结构上与有丝分裂周期中的中性粒同源,可随着细胞分裂周期的进行不断地发生微管的解聚、重构和乙酰化修饰^[9]。本研究

中我们通过免疫荧光染色记录细胞周期过程中纤毛和自噬的表达定位(图2)发现:当软骨细胞进入有丝分裂周期,首先核膜、核仁消失,染色体浓聚于中间赤道板,初级纤毛解聚形成的微管重新聚合成纺锤丝并分布于染色体两极,此时细胞内自噬小体数量表达增多,颗粒增大,均匀分布于细胞质中。随着分裂进行,纺锤丝的牵动使着丝点分裂,继而牵引染色体向细胞两极移动,同时胞浆内的自噬小体也会随之向细胞两极反向移动,并且自噬小体的移动与微管的结构有关,可以呈放射状分布于微管的末端,随着分裂的进行而被均匀牵拉于细胞两极。当染色体完全分裂,新的细胞核形成,细胞膜重建开始,纺锤丝微管又重新聚合为初级纤毛样结构,此时自噬小体体积变小,其分布由细胞两极向胞质内均匀分散。当有丝分裂完成,细胞体积增大,初级纤毛又重新分布于细胞表面,胞质内自噬小体的数量和大小又恢复正常。因此,在软骨细胞的细胞周期中,初级纤毛的解聚和重构过程会同时伴有胞质内自噬的定位和表达,也发生周期性的变化。

三、调控初级纤毛的表达能影响软骨细胞的自噬水平

为了明确初级纤毛是否会影响软骨细胞自噬的表达调控,我们通过无血清培养基诱导初级纤毛表达,水合氯醛破坏初级纤毛结构,探究在不同初级纤毛表达水平下软骨细胞自噬的表达变化。如图3所示,无血清培养基诱导初级纤毛表达上调并

促进纤毛长度延长,同时能上调细胞自噬小体的表达。而水合氯醛破坏纤毛结构后,纤毛的表达水平和长度均下调,同时自噬小体的表达也受到抑制。Western blot 实验结果证实(图4),无血清培养基能上调初级纤毛内转运蛋白复合体IFT88的表达,同时上调自噬相关蛋白LC3- II、Beclin1的表达,而水合氯醛干预后,LC3- II和Beclin1的表达则被抑制。以上结果说明,初级纤毛和自噬的表达水平和功能蛋白之间的表达关系均呈明显相关性,初级纤毛结构的完整性影响软骨细胞自噬的表达水平,二者可能存在交互作用机制、共同参与软骨的发育调控过程。

讨 论

初级纤毛和自噬作为调节细胞生命活动的两种重要适应机制,对维持细胞的生长发育、能量代谢和结构功能稳定均至关重要。在软骨组织中,由于长期处于低氧的微环境中,同时还承受着各种形式的应力刺激,那么软骨细胞是如何适应这样多变的环境呢?以往的研究发现,初级纤毛和自噬在软骨细胞的适应机制中都扮演着重要作用,例如:初级纤毛的表达、结构及功能的异常均能导致软骨的异常分化发育^[3,4,10],而在骨关节炎等软骨相关疾病中可以伴有细胞自噬的异常表达^[7],但是二者是否存在交互作用共同影响软骨细胞对微环境的适应过程尚无报道。在本研究中,通过免疫荧光双标染色,我们发现正常的软骨细胞中均存在一定水平的

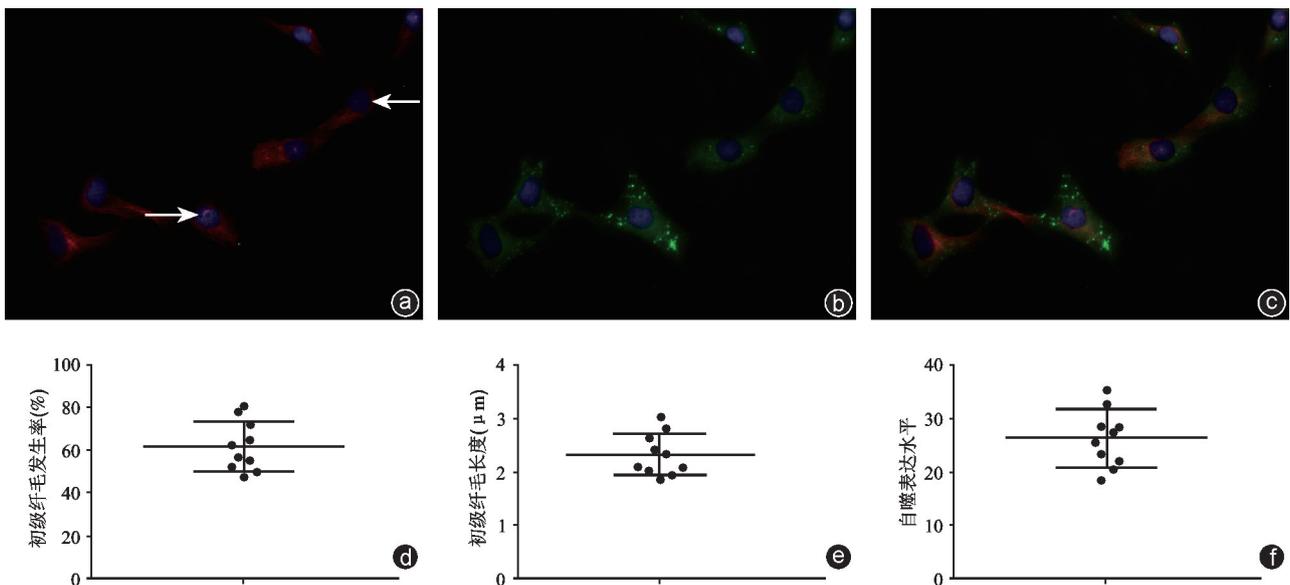


图1 软骨细胞中初级纤毛和自噬的表达情况 a:初级纤毛(白色箭头);b:自噬小体(绿色颗粒);c:合并图;d:初级纤毛发生率;e:初级纤毛长度;f:单个细胞内自噬的表达水平

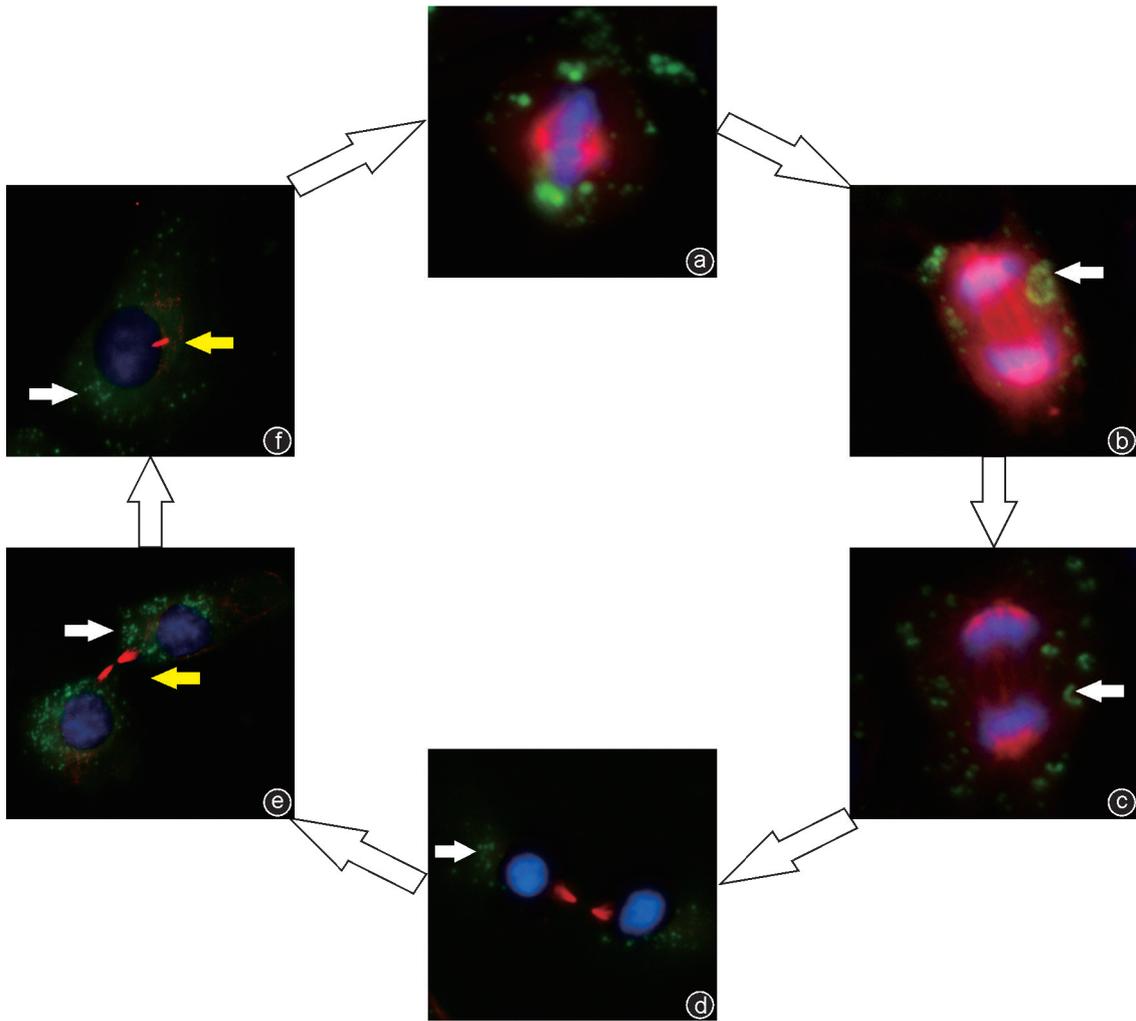


图2 初级纤毛和自噬在软骨细胞周期中的定位表达关系(黄色箭头表示初级纤毛,白色箭头表示自噬小体) a~d:分裂期;e~f:分裂间期

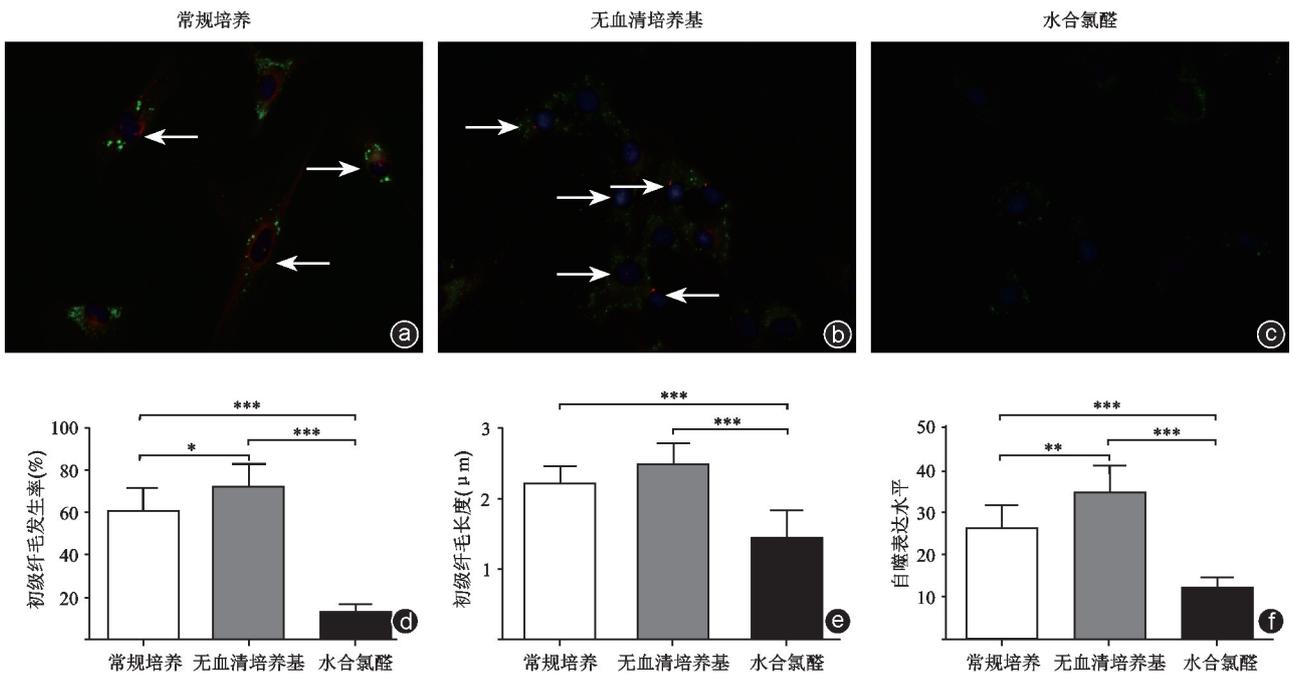


图3 调控初级纤毛对自噬表达的影响 a~c:初级纤毛和自噬的荧光双染色;d:初级纤毛的发生率;e:初级纤毛的长度;f:单个细胞内自噬的表达水平(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

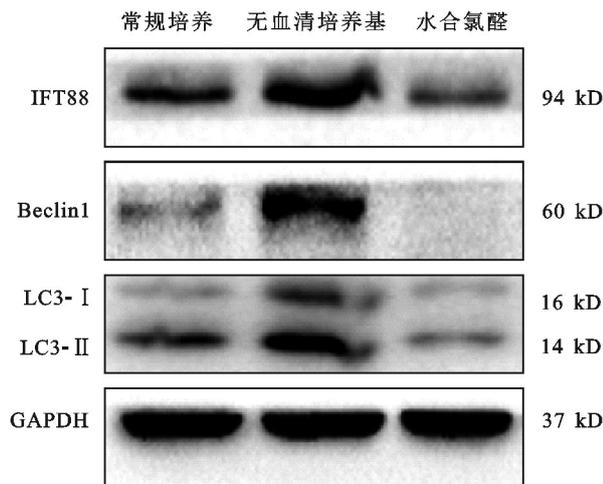


图4 调控初级纤毛对IFT88、Beclin1和LC3-I/II蛋白表达的影响

初级纤毛和自噬表达,并且二者可以共表达于同一细胞中。而在软骨细胞分裂周期中,初级纤毛的解聚和重构过程同时伴有自噬小体大小、数量和分布的周期性变化,说明初级纤毛和自噬可能共同参与了软骨细胞生长发育的调控过程。

目前,初级纤毛和自噬的交互机制逐渐成为研究关注的重点。研究表明,初级纤毛相关信号通路可能参与自噬的活性调控,而自噬也能影响纤毛的发生机制。例如,在纤毛相关疾病多囊肾中,多囊蛋白PC1和PC2的突变能导致初级纤毛膜表面离子通道结构异常^[11],还可以伴有细胞内自噬表达减少^[12]。而药物干预也可引起细胞自噬和初级纤毛表达呈平行变化,如化合物BIX-01294和抗疟药甲氟喹均能在诱导细胞自噬的同时促进纤毛的表达和延长^[13,14]。同样的,抑制自噬也可以阻断甲氟喹的初级纤毛促表达效应^[13],以及下调舍曲林介导的初级纤毛发生^[15]。但是,目前也有报道指出初级纤毛和自噬可能存在反向调控,如Silibinin诱导自噬激活会负向调控纤毛相关蛋白IFT88、KIF3a和Ac-tubulin的表达,并降低初级纤毛的长度^[16]。但是在本研究中,我们通过调控初级纤毛的表达发现,诱导软骨细胞内初级纤毛的表达会促进自噬表达,而破坏纤毛结构后自噬的表达则受到抑制,因此,软骨细胞内初级纤毛的表达水平和自噬之间存在同向调控效应,共同参与调控软骨细胞的发育过程。

参 考 文 献

- [1] Gaut C, Sugaya K. Critical review on the physical and mechanical factors involved in tissue engineering of cartilage[J]. Regen Med, 2015, 10(5): 665-679.
- [2] Venkatesh D. Primary cilia[J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2017, 21(1): 8-10.
- [3] Yuan X, Yang S. Deletion of IFT80 impairs epiphyseal and articular cartilage formation due to disruption of chondrocyte differentiation[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e130618.
- [4] Hwang SH, White KA, Somatilaka BN, et al. The G protein-coupled receptor Gpr161 regulates forelimb formation, limb patterning and skeletal morphogenesis in a primary cilium-dependent manner[J]. Development, 2018, 145(1): dev154054.
- [5] Wang Z, Wann AK, Thompson CL, et al. IFT88 influences chondrocyte actin organization and biomechanics[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(3): 544-554.
- [6] Gao T, Guo W, Chen M, et al. Extracellular vesicles and autophagy in osteoarthritis[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 2428915.
- [7] Li YS, Zhang FJ, Zeng C, et al. Autophagy in osteoarthritis[J]. Joint Bone Spine, 2016, 83(2): 143-148.
- [8] Lopez de F, Lotz MK, Blanco FJ, et al. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(4): 966-976.
- [9] Goto H, Inoko A, Inagaki M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(20): 3893-3905.
- [10] Irianto J, Ramaswamy G, Serra R, et al. Depletion of chondrocyte primary cilia reduces the compressive modulus of articular cartilage[J]. J Biomech, 2014, 47(2): 579-582.
- [11] Decaen PG, Delling M, Vien TN, et al. Direct recording and molecular identification of the calcium channel of primary cilia[J]. Nature, 2013, 504(7479): 315-318.
- [12] Belibi F, Zafar I, Ravichandran K, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and autophagy in polycystic kidney disease (PKD) [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300(5): F1235-F1243.
- [13] Shin JH, Bae DJ, Kim ES, et al. Autophagy regulates formation of primary cilia in mefloquine-treated cells[J]. Biomol Ther (Seoul), 2015, 23(4): 327-332.
- [14] Shin JH, Kim PS, Kim ES, et al. BIX-01294-induced autophagy regulates elongation of primary cilia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 460(2): 428-433.
- [15] Kim ES, Shin JH, Park SJ, et al. Inhibition of autophagy suppresses sertraline-mediated primary ciliogenesis in retinal pigment epithelium cells[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e118190.
- [16] Xu Q, Liu W, Liu X, et al. Silibinin negatively contributes to primary cilia length via autophagy regulated by histone deacetylase 6 in confluent mouse embryo fibroblast 3T3-L1 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2016, 420(1-2): 53-63.

(收稿日期: 2018-08-26)