

·实验研究论著·

初级纤毛参与成纤维细胞生长因子 18 介导的软骨细胞增殖和表型调控的机制研究

陶风华¹ 蒋婷² 向威¹

【摘要】 目的 探究初级纤毛在成纤维细胞生长因子 18(fibroblast growth factor 18, FGF 18)介导的软骨细胞增殖和表型调控中的作用及机制。**方法** 通过 CCK8 法和免疫荧光染色检测不同浓度 FGF18 对大鼠软骨细胞增殖和初级纤毛表达的影响;设置对照组、FGF18 组、水合氯醛组 and FGF18+水合氯醛组,通过免疫荧光染色检测初级纤毛表达,甲苯胺蓝染色检测细胞外基质分泌,Live/dead 实验检测细胞活性,qPCR 检测成软骨相关基因 COL II 和 SOX9 的表达变化,Western blot 检测细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、表型蛋白 COL II 和细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)通路蛋白表达。**结果** 不同浓度 FGF18 对软骨细胞增殖均有促进作用,20 ng/ml 时效应最明显;FGF18 能下调初级纤毛的发生率(0 ng/ml, 77.91%±5.53%; 5 ng/ml, 52.91%±5.61%; 10 ng/ml, 42.12%±5.20%; 20 ng/ml, 36.53%±4.88%; 40 ng/ml, 33.44%±5.98%),但上调其平均长度[0 ng/ml, (1.63±0.67) μm; 5 ng/ml, (2.67±0.90) μm; 10 ng/ml, (2.71±0.97) μm; 20 ng/ml, (2.76±1.37) μm; 40 ng/ml, (2.79±1.13) μm];FGF18 能维持细胞活性并促进细胞外基质分泌,上调 COL II 和 SOX9 基因表达;但水合氯醛破坏初级纤毛结构后,纤毛发生率为(9.10±2.44)%,活细胞占比为 72.86%±2.95%,水合氯醛+FGF18 组纤毛发生率为(10.01±2.23)%,活细胞占比为(76.94±5.62)%,相比对照组[纤毛发生率为(77.91±5.53)%,活细胞占比为(96.81±1.38)%]和 FGF18 组[纤毛发生率为(36.53%±4.88)%,活细胞占比为(96.29±2.17)%]均明显降低,同时,FGF18 的促增殖和促基质分泌作用受到抑制,COL II 和 SOX9 基因表达下调;FGF18 能促进 CyclinD1、COL II 蛋白表达,并上调 P-ERK/T-ERK 的比值,破坏纤毛结构则抑制 FGF18 对相关蛋白的促表达效应。**结论** FGF18 能促进软骨细胞增殖和维持软骨表型,并且初级纤毛参与 FGF18 介导的软骨细胞生长发育调控。

【关键词】 成纤维细胞生长因子 18;初级纤毛;软骨细胞

Involvement of primary cilia in fibroblast growth factor 18 - mediated regulation of chondrocyte proliferation and phenotype maintenance. TAO Feng - hua¹, JIANG Ting², XIANG Wei¹. ¹Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; ²Department of Neurological Rehabilitation, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: XIANG Wei, E-mail: xiangwei_13@whu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the role and mechanism of primary cilia in fibroblast growth factor 18 (FGF18)-mediated regulation of chondrocytes proliferation and differentiation development. **Methods** CCK-8 assay and immunofluorescence staining were used to detect the effects of different concentrations of FGF18 on chondrocytes proliferation, and the expression and length changes of primary cilia *in vitro*. Then the ciliary structure was destroyed by chloral hydrate, and the following groups were set up: the control group, FGF18 group, chloral hydrate group and FGF18+chloral hydrate group. The expression of primary cilia was detected by immunofluorescence staining, and the extracellular matrix secretion was examined by toluidine blue staining, as well as cell viability was measured by Live/dead assay. The expression of phenotype gene COL II and SOX9 was detected by qPCR. The expression levels of proliferating protein CyclinD1, phenotype protein COL II and ERK signaling pathways were detected by Western blotting. **Results** Different concentrations of FGF18 could promote chondrocytes proliferation, and the promoting effect was most obvious at 20 ng/ml. Different

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2020.01.013

基金项目:国家自然科学基金(81902300),中央高校基础科研业务费专项资金(2042019kf0064)

作者单位:1. 武汉大学人民医院骨科,武汉 430060;2. 武汉大学中南医院神经康复科,武汉 430071

通信作者:向威, E-mail: xiangwei_13@whu.edu.cn

concentrations of FGF18 could down-regulate the expression of primary cilia (0 ng/ml: 77.91%±5.53%; 5 ng/ml: 52.91%±5.61%; 10 ng/ml: 42.12%±5.20%; 20 ng/ml: 36.53%±4.88%; 40 ng/ml: 33.44%±5.98%), but increase their average lengths [0 ng/ml: (1.63±0.67) μ m; 5 ng/ml: (2.67±0.90) μ m; 10 ng/ml: (2.71±0.97) μ m; 20 ng/ml: (2.76±1.37) μ m; 40 ng/ml: (2.79±1.13) μ m]. FGF18 could facilitate the maintenance of cells viability, promote cartilage extracellular matrix secretion, and enhance the expression of COL II and SOX 9 genes. After destroying the structure of primary cilia by chloral hydrate, the incidence of primary cilia in chloral hydrate group was (9.10±2.44)%, and the proportion of living cells was (72.86±2.95)%. Further, the incidence of cilia in the chloral hydrate+FGF18 group was (10.01±2.33)%, and the percentage of living cells was (76.94±5.62)%, which were obviously reduced as compared with the control group [for ciliary incidence: (77.91±5.53)%; for ration of living cells: (96.81±1.38)%] and FGF18 group [for ciliary incidence: (36.53±4.88)%; for ratio of living cells: (96.29±2.17)%]. The promoting effects of FGF18 on the proliferation of chondrocytes were inhibited after disturbing ciliary structure by chloral hydrate, and these results were statistically different ($P < 0.05$). Meanwhile, the promoting effect of FGF18 on cartilage matrix secretion was inhibited, and the expression of COL II and SOX 9 genes was down-regulated. FGF18 could promote the expression of proliferative protein CyclinD1 and phenotype protein COL II, as well as up-regulate the ratio of P-ERK/T-ERK. But the disruption of ciliary structure could inhibit the promoting effects of FGF18 on CyclinD1, COL II and P-ERK.

Conclusion FGF18 can promote the proliferation and maintain the phenotype of chondrocytes, and primary cilia are involved in FGF18-mediated chondrocytes growth and development regulation.

【Key words】 Fibroblast growth factor 18; Primary cilia; Chondrocyte

骨关节炎是一类因软骨损伤退变引起的关节疾病,常伴有软骨基质的分解代谢增强和不恰当的损伤修复,其病理表现主要为进行性的软骨丢失,软骨下骨硬化和骨赘形成,能引起受累关节的疼痛和功能障碍,影响病人生活质量^[1]。目前,药物治疗虽然能够缓解骨关节炎引起的疼痛症状,但却不能阻断其疾病进程。而改善疾病的骨关节炎药物(disease-modifying osteoarthritis drugs, DMOADs)能够通过抑制软骨的分解代谢,同时促进合成代谢来阻断软骨组织的退变并且促进其再生,不仅能缓解疼痛症状,还能促进软骨结构改善和功能恢复,具有重要的研究意义^[2]。

成纤维细胞生长因子 18(fibroblast growth factor 18, FGF18)是成纤维细胞生长因子家族中的一类亚型,在调控骨骼系统的发育过程中扮演着非常重要的作用。研究发现,FGF18能够维持软骨细胞内稳态稳定,减少因软骨损伤导致的软骨厚度和体积的丢失,并且促进软骨损伤的愈合及再生软骨的整合^[3,4]。FGF18主要通过成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR3)结合参与 FGF 信号通路转导来发挥其生长发育调控作用^[5]。与其他 DMOADs 相比,FGF18对软骨细胞的促合成代谢作用伴有较少的副反应,如较少引起骨赘形成、软骨钙化和炎症等^[6]。目前 FGF18在临床应用的价值不断得到重视,但是其改善骨关节炎的潜在机制仍有待进一步研究。

初级纤毛作为凸出于细胞表面的“天线”样结构,是一类具有特殊功能的细胞器,能够参与感受细

胞微环境中的理化刺激并介导多种信号通路的转导,其组装聚合过程还与细胞周期相关,参与细胞的生长发育调控^[7]。前期研究发现,初级纤毛能够作为调节生长板功能和骨骼系统发育重要的信号转导枢纽^[8]。同时,初级纤毛参与细胞新陈代谢,与代谢相关的细胞自噬具有明显的关联性^[9]。并且初级纤毛结构和功能的完整性还能够影响力学刺激对软骨细胞生长发育的调控^[10]。

本研究探究了不同浓度的 FGF18对软骨细胞增殖和分化的影响,通过使用水合氯醛调控初级纤毛结构,再结合 FGF18干预,探索 FGF18在不同纤毛表达条件下对软骨细胞生长发育的影响,旨在阐明初级纤毛在 FGF 18调控软骨细胞发育中的作用及机制。

材料与方 法

一、实验材料与仪器

SD大鼠乳鼠购自武汉大学人民医院实验动物中心,水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司,胎牛血清购自美国 Gibco Life Technologies 公司,小鼠源 acetylated- α -tubulin 抗体购自美国 Sigma 公司,DMEM/F12 细胞培养基、小鼠源 GAPDH 抗体、兔源 CyclinD1 抗体、CY-3 标记的荧光二抗、辣根过氧化物酶标记的二抗、Western blot 凝胶配制试剂盒、ECL 显色液、甲苯胺蓝染液、CCK8 等均购自武汉博士德公司,兔源 COL II 抗体购自英国 Abcam 公司,兔源 ERK 和 P-ERK 抗体购自美国 CST 公司,Live/dead 试

剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,PCR 逆转录试剂盒和 SYBR-Green DNA 聚合酶均购自日本 Toyobo 公司,细胞培养箱购自中国香港 Heal Force 公司,荧光显微镜为美国赛默飞公司的 EVOS FL Auto 全自动细胞成像系统。

二、实验方法

(一)细胞培养

取新生 3 d 的 SD 大鼠乳鼠,处死后分离膝关节软骨,剪碎成 1 mm³ 大小软骨块,加入胰酶,37 ℃ 消化 30 min,离心后弃上清,加入 II 型胶原酶 37 ℃ 消化 6 h 后将细胞悬液离心弃上清,培养基重悬后转移至细胞培养瓶,置于 5%CO₂,37 ℃ 培养箱培养。

(二)CCK8 实验

胰酶消化软骨细胞,96 孔板中每孔加入约 2 000 个细胞,设置 5 个不同浓度的 FGF18 组(0 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、40 ng/ml),依次加入相应浓度 FGF18 重组细胞因子,分别干预细胞 48 h 和 72 h。检测时每孔更换成 100 μl 新鲜培养基并加入 10 μl CCK8 溶液,37 ℃ 培养箱中孵育 90 min 后于 450 nm 波长下检测吸光度值(OD 值)。

(三)免疫荧光染色

将不同浓度的 FGF18 干预软骨细胞 48 h 后弃培养基,4%多聚甲醛固定 15 min 后加入 0.1% 浓度 TritonX-100 破膜,10 min 后加入 5% 的牛血清白蛋白室温封闭 1 h。加入以 1:300 稀释的小鼠源 acetylated-α-tubulin 抗体,4 ℃ 孵育过夜,用磷酸盐缓冲液洗涤 3 遍后加入荧光二抗,室温孵育 1 h,随后加入 4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamino-2-phenylindole, DAPI),室温下避光孵育 10 min 后于荧光显微镜下观察。

根据不同浓度的 FGF18 干预软骨细胞后 CCK8 和免疫荧光染色结果,选取最佳浓度设置为 FGF18 组,另外设置对照组、水合氯醛组(40 μmol/L)、水合氯醛+FGF18 组,均在干预软骨细胞 48 h 和 72 h 后进行 CCK8 实验,干预软骨细胞 48 h 后进行免疫荧光染色,实验步骤同上。

(四)甲苯胺蓝染色

将上述不同分组的药物干预软骨细胞 72 h 后弃培养基,加入 4%多聚甲醛固定 15 min,再加入甲苯胺蓝染液室温孵育 15 min,弃染液后用磷酸盐缓冲液洗涤 3 遍,用相机拍照观察细胞染色情况。

(五)Live/dead 实验

在 10 ml 磷酸盐缓冲液中加入 20 μl 2 mmol/L 的 EthD-1 储备溶液,震荡混匀后再加入 5 μl 4 mmol/L

的钙黄绿素 AM 储备液,震荡混匀后得到浓度为 2 μmol/L 钙黄绿素 AM 和 4 μmol/L EthD-1 的工作液。软骨细胞经不同分组药物干预 48 h 后弃培养基,用磷酸盐缓冲液洗涤 3 遍后加入工作液,37 ℃ 培养箱中避光孵育 5 min,荧光显微镜下拍照观察。

(六)Western blot 实验

软骨细胞经不同分组的药物干预 48 h 后提取总蛋白,取 20 μg 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜后,用 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h,分别加入 CyclinD1(1:200)、COL II(1:1 000)、ERK(1:1 000)、P-ERK(1:1 000)、GAPDH(1:300)一抗,4 ℃ 孵育过夜后用三乙醇胺缓冲液+Tween 20 溶液(tris-buffered saline and tween 20, TBST)洗涤 3 遍,再在室温下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。

(七)RT-PCR 实验

软骨细胞经不同分组药物干预 48 h 后,用 Trizol 法提取总 RNA,根据试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA,在八联管中配制 20 μl 的反应体系进行 RT-PCR,其中包括 1 μl cDNA、1 μl 引物、10 μl SYBR-Green DNA 聚合酶和 8 μl 去 RNA 酶水,引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

基因	引物序列
COL II	F:5'-TCCTCCGTCTACTGTCCA-3' R:5'-ACTTACCGGTGTGTTTCG-3'
SOX 9	F:5'-TCGGGGCTCTACTCCACCT-3' R:5'-TCTGTCACCATTTGCTCTTC-3'
GAPDH	F:5'-CTGCTCCTCCCTGTTCTA-3' R:5'-CAATGTCCACTTTGTGAC-3'

三、统计学分析

每组实验至少重复 3 次,数据分析采用 SPSS 20.0 软件(IBM 公司,美国),数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、不同浓度 FGF18 促进软骨细胞增殖活性

以不同浓度的 FGF18 分别干预软骨细胞 48、72 h, CCK8 细胞活性检测结果如图 1 所示,不同浓度的 FGF18 对软骨细胞均表现出促增殖活性作用,并且呈现一定的浓度依赖性,在 20 ng/ml 时促增殖

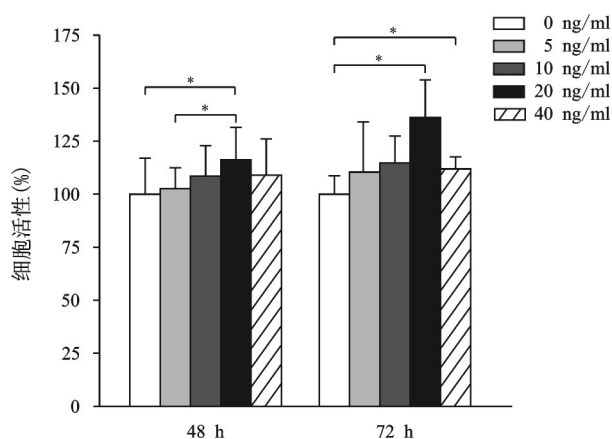


图1 不同浓度 FGF18 对软骨细胞增殖活性的影响(* $P < 0.05$)

活性最为明显,与 0 ng/ml 组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

二、不同浓度 FGF18 影响软骨细胞初级纤毛表达水平和长度变化。

以不同浓度 FGF18 干预软骨细胞 48 h 后通过荧光染色检测初级纤毛表达水平(图 2),0 ng/ml 时初级纤毛发生率为(77.91 ± 5.53)%,长度为(1.63 ± 0.67) μm ; FGF18 浓度为 5 ng/ml 时,初级纤毛发生率为(52.91 ± 5.61)%,长度为(2.67 ± 0.90) μm ; FGF18 浓度为 10 ng/ml 时,初级纤毛发生率为(42.12 ± 5.20)%,长度为(2.71 ± 0.97) μm ; FGF18 浓度为 20 ng/ml 时,初级纤毛发生率为(36.53 ± 4.88)%,长度为(2.76 ± 1.37) μm ; FGF18 浓度为 40 ng/ml 时,初级纤毛发生率为(33.44 ± 5.98)%,长度为(2.79 ± 1.13) μm 。与

0 ng/ml 组相比,各浓度组初级纤毛表达水平和长度的差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

三、初级纤毛参与 FGF18 对软骨细胞增殖和表型的调控

根据前面实验结果,选择 FGF18 组中 FGF18 的浓度为 20 ng/ml。如图 3 所示,FGF18 组干预 48 h、72 h 后软骨基质的分泌增多,有效维持软骨细胞活性和软骨表型。而水合氯醛组初级纤毛表达明显下调($9.10\% \pm 2.44\%$),凋亡软骨细胞比例增加(活细胞占比为 $72.86\% \pm 2.95\%$),而水合氯醛+FGF18 组初级纤毛的表达水平没有明显变化($10.01\% \pm 2.23\%$),同时伴有一定比例的细胞凋亡(活细胞占比为 $76.94\% \pm 5.62\%$),相比对照组(纤毛发生率为 $77.91\% \pm 5.53\%$,活细胞占比为 $96.81\% \pm 1.38\%$)和 FGF18 组(纤毛发生率为 $36.53\% \pm 4.88\%$,活细胞占比为 $96.29\% \pm 2.17\%$)均明显降低,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05)。

CCK8 细胞活性实验的结果显示,FGF18 组软骨细胞的增殖活性上调,而当水合氯醛破坏纤毛结构后,不论是否再加入 FGF18,软骨细胞的增殖活性较 FGF18 组均明显受到抑制,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05)。此外,破坏初级纤毛结构能够明显抑制 FGF18 对软骨基质的促分泌作用,并且明显下调软骨表型相关基因 COL II 和 SOX9 的表达,结果与 FGF18 组相比,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05)。

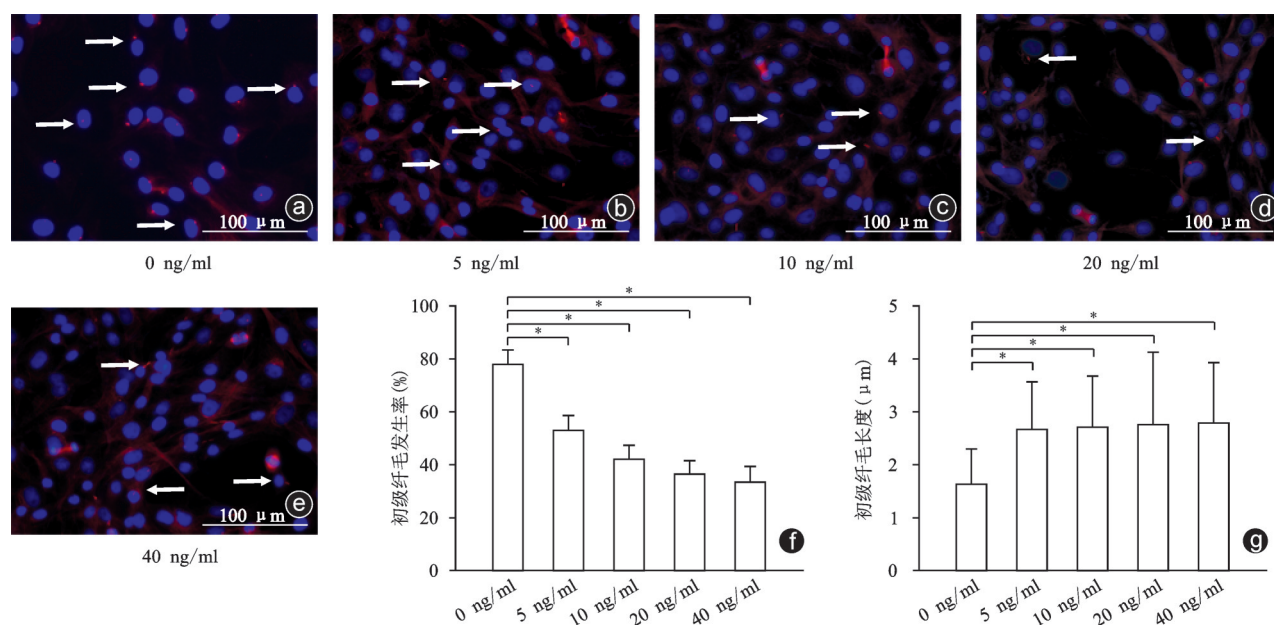


图2 不同浓度 FGF18 对初级纤毛表达水平和长度变化的影响 a~e:初级纤毛的荧光染色;f:不同浓度组初级纤毛的发生率;g:不同浓度组初级纤毛的长度(* $P < 0.05$)

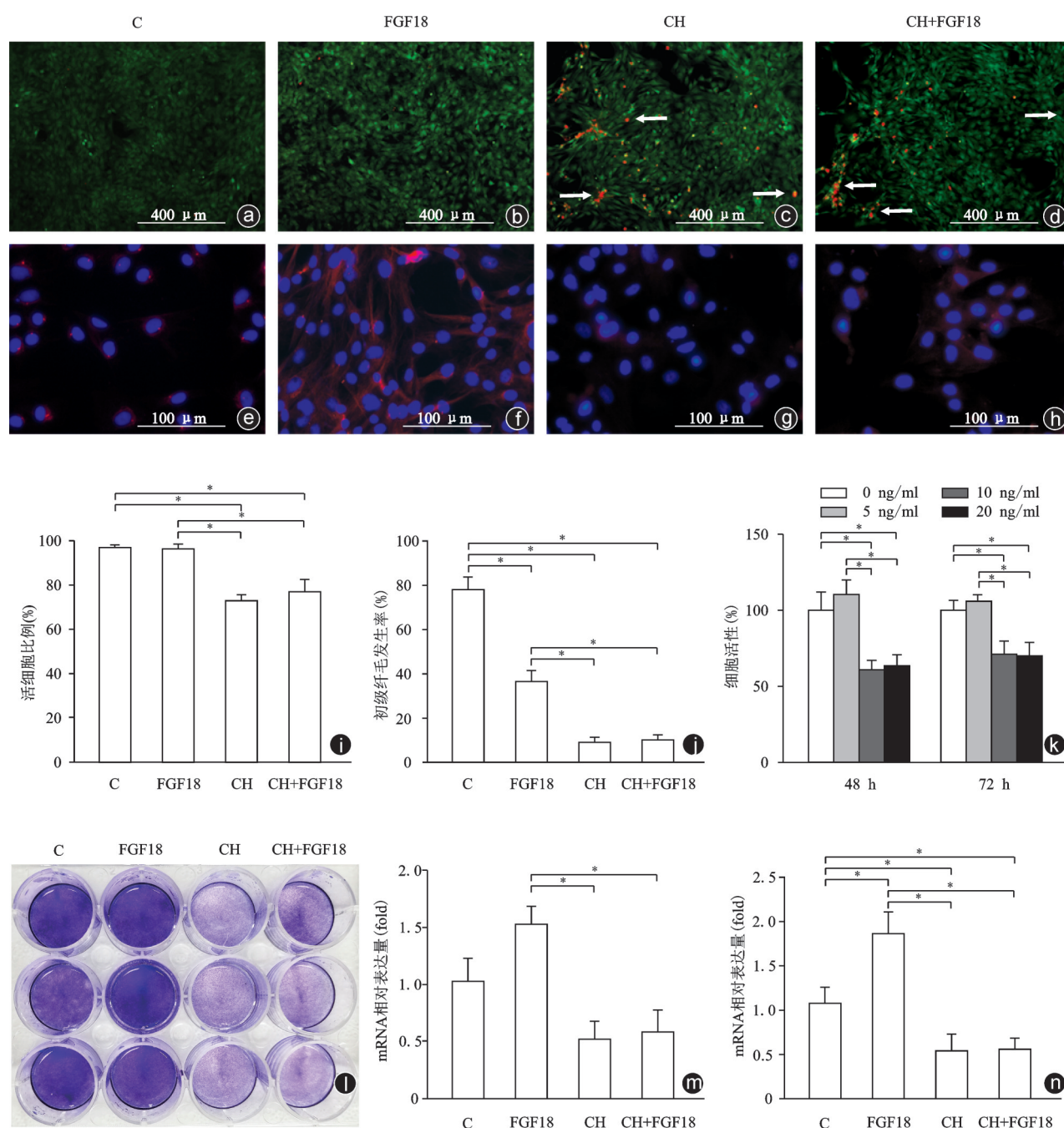


图3 初级纤毛参与FGF18对软骨细胞增殖和分化发育的调控 a~d: Live/dead 荧光染色; e~h: 初级纤毛的荧光染色; i: 活细胞所占比例; j: 初级纤毛的发生率; k: 药物干预 48 h 和 72 h 后细胞增殖活性; l: 甲苯胺蓝染色; m: 药物干预后表型相关基因 COL II 的 mRNA 相对表达量; n: 药物干预后表型相关基因 SOX9 的 mRNA 相对表达量 (C: 对照, CH: 水合氯醛, * $P < 0.05$)

四、ERK 通路参与 FGF18 对软骨发育的调控

如图 4 所示, 20 ng/ml FGF18 能够明显促进增殖蛋白 CyclinD1 和表型蛋白 COL II 表达增加, 而水合氯醛破坏初级纤毛结构后, FGF18 对相关蛋白的促表达作用受到抑制, 与对照组和 FGF18 组相比, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。与此同时, FGF18 能维持 P-ERK 的表达, 并且呈上调趋势; 破坏纤毛结构后, P-ERK 的表达降低, 此时再加入 FGF18 时, 其对 P-ERK 的促表达效应明显受到抑制。与

FGF18 组相比, 水合氯醛组中 P-ERK/T-ERK 的比值均明显下降, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

讨 论

FGF18 作为成纤维细胞生长因子家族中的重要成员, 是一种具有潜力可以改善骨关节炎疾病的药物, 对调控软骨细胞的生长发育具有非常重要的作用, 同时因其具有较少的副作用, 表现出重要的临床应用价值, 但是目前对 FGF18 调控软骨发育机制

的认识仍十分有限。研究发现,FGF18能够作为软骨合成代谢的促进因子。体内环境中,FGF18广泛分布于软骨膜和关节间隙,可以作为软骨细胞增殖的启动因子,促进胞内物质的合成代谢^[11]。FGF18能特异性结合FGFR3活化FGF信号通路来调控软骨基质的合成及分泌,进而调控软骨发育^[6]。FGF18还能参与调控骨髓间充质干细胞的软骨诱导分化,促进软骨基质的分泌并且延缓细胞向终末期肥大软骨细胞分化^[12]。FGF18还能参与骨关节炎软骨组织的再生修复,延缓软骨退变。例如,FGF18可以通过调控PI3K-AKT信号传导减弱白细胞介素1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)诱导的细胞凋亡,同时增强线粒体融合和裂变,恢复线粒体功能并减少炎症因子诱导的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)产生^[6]。FGF18能够促进骨关节炎软骨细胞II型胶原表达并分泌更多的透明软骨细胞基质,促进功能化的软骨再生^[11]。在关节腔内注射FGF18能延缓创伤性关节炎软骨退变,增加软骨厚度,而FGF18在体内的抗分解代谢效应可以通过调控金属蛋白酶组织抑制因子1(tissue inhibitors of metalloproteinase-1,

Timp1)的表达来发挥效应^[13]。而在骨关节炎病人中,关节腔内注射FGF18能减少软骨厚度与体积的丢失,并且呈一定的浓度依赖性^[14]。目前,FGF18在临床的应用价值不断得到重视,深入认识其软骨保护作用机制具有重要的研究价值。

初级纤毛作为具有多样功能的细胞器结构,被证实能够参与调控软骨组织发育,软骨力学信号转导,软骨相关疾病和软骨肿瘤的发生^[8,10,15,16]。初级纤毛结构和功能的完整性对维持细胞内稳态,调控软骨生长发育至关重要。研究发现,FGFR能够通过细胞内激酶的交互作用来影响初级纤毛的长度和功能^[17]。而调节FGFR3介导的FGF信号能够影响初级纤毛的长度和物质转运功能,初级纤毛是FGF通路中重要的组成部分^[15]。这些研究有助于认识异常的FGF信号和初级纤毛在软骨发育不全和软骨肿瘤发生过程中的作用及机制。而本研究发现,不同浓度的FGF18对体外培养的软骨细胞具有明显的促增殖活性,并且在20 ng/ml浓度时表现出最显著的促增殖效应。初级纤毛作为一种由微管结构聚合而成的细胞器,其在结构上与纺锤体同源,参

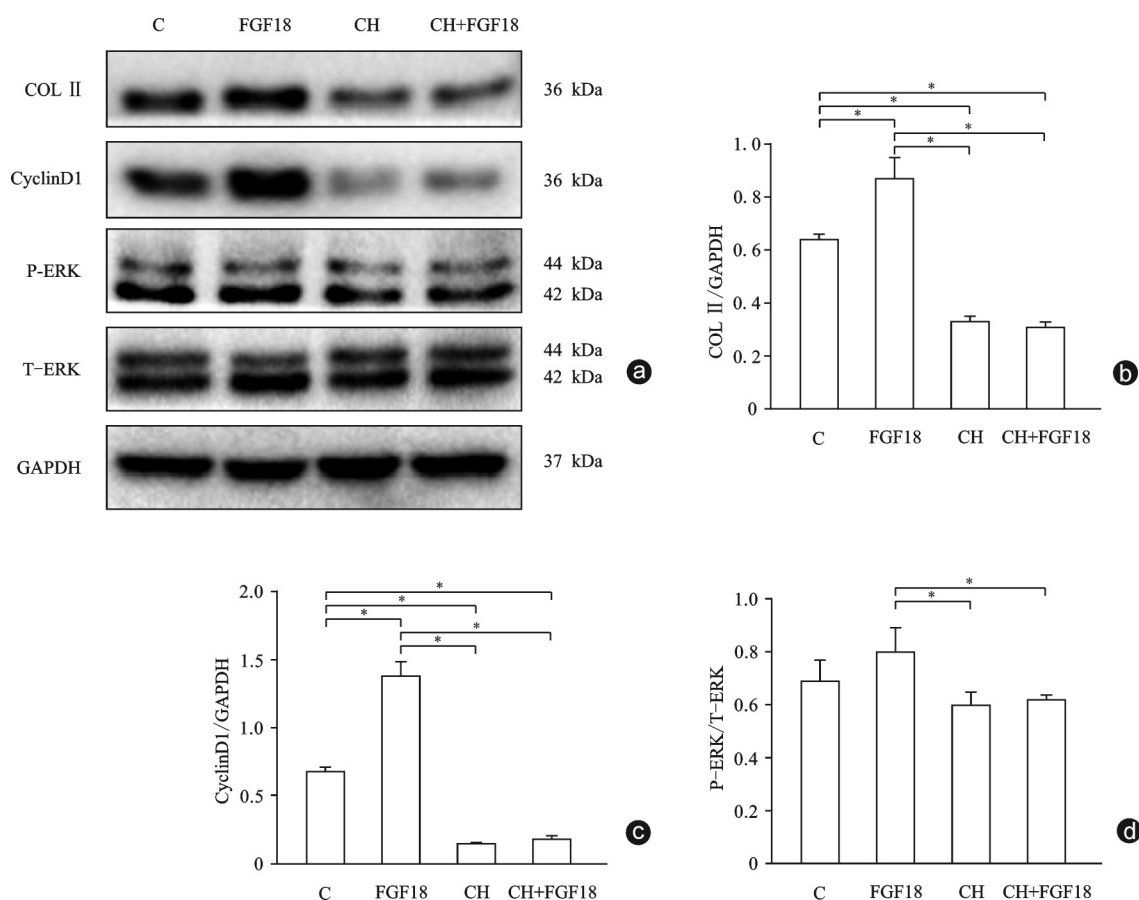


图4 ERK通路参与FGF18对软骨细胞增殖和表型的调控 a:不同组别中表型蛋白COL II、增殖蛋白CyclinD1、通路蛋白P-ERK和T-ERK的表达情况;b:定量分析COL II蛋白的相对表达量;c:定量分析CyclinD1蛋白的相对表达量;d:定量分析P-ERK/T-ERK的蛋白表达比值(C:对照,CH:水合氯醛, $P < 0.05$)

与细胞的分裂周期,在功能上又具有感受外界理化刺激、转导信号分子等多种功能,其表达水平和长度改变能反应细胞新陈代谢和功能的变化。

在本研究中,通过分析软骨细胞初级纤毛的发生率和长度变化时发现,随着 FGF18 浓度的增加,初级纤毛的表达水平逐渐降低,但是其纤毛的平均长度则逐渐增加。这可能是因为 FGF18 能够通过启动细胞进入分裂周期,促进了初级纤毛结构和纺锤体结构的转化,初级纤毛微管解聚并且重新聚合为纺锤体样结构,细胞进入增殖状态,此时细胞代谢活动增加,细胞内物质转运活跃,在纺锤体与初级纤毛周期性转化的同时也在不断强化初级纤毛的物质转运功能,包括对营养物质和信号蛋白的转运,从而又促进纤毛的延长以强化其物质转运、信号转导和理化感受器等功能^[18]。而破坏初级纤毛后,FGF18 对软骨基质的促分泌作用受到抑制,增殖活性受到抑制,凋亡软骨细胞增加,下调软骨表型基因表达,同时在蛋白水平抑制 FGF18 对软骨细胞增殖和表型蛋白的促表达效应。说明破坏初级纤毛结构后,软骨细胞内新陈代谢紊乱,微管结构破坏,无法实现纺锤体和初级纤毛的结构转化,细胞增殖活性受到抑制,而初级纤毛结构的破坏使得其物质转运功能、感受器功能和信号转导功能均受到破坏,也直接影响了软骨细胞对微环境变化的反应和适应能力,并且阻断了纤毛相关信号通路的转导,进而对软骨细胞包括增殖、分化等多种生命活动产生负面调控效应^[19]。因此,初级纤毛结构和功能的完整性可能影响 FGF18 对软骨细胞增殖和表型维持的调控过程,而初级纤毛在软骨细胞内的解聚、重构以及延伸变化可能是影响 FGF18 发挥生物学效应的重要调节因素,也为探究 FGF18 介导的软骨发育调控机制提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2015, 386(9991): 376-387.
- [2] Van Spil WE, Kubassova O, Boesen M, et al. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165: 41-48.
- [3] Chen TM, Chen YH, Sun HS, et al. Fibroblast growth factors: Potential novel targets for regenerative therapy of osteoarthritis [J]. *Chin J Physiol*, 2019, 62(1): 2-10.
- [4] Sennett ML, Meloni GR, Farran AJE, et al. Sprifermin treatment enhances cartilage integration in an in vitro repair model [J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(10): 2648-2656.
- [5] Davidson D, Blanc A, Filion D, et al. Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(21): 20509-20515.
- [6] Yao X, Zhang J, Jing X, et al. Fibroblast growth factor 18 exerts anti-osteoarthritic effects through PI3K-AKT signaling and mitochondrial fusion and fission [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 139: 314-324.
- [7] Satir P. CILIA: before and after [J]. *Cilia*, 2017, 6: 1.
- [8] Moore ER, Jacobs CR. The primary cilium as a signaling nexus for growth plate function and subsequent skeletal development [J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(2): 533-545.
- [9] 向威, 许涛. 初级纤毛在调控软骨细胞自噬中的作用研究 [J]. *骨科*, 2018, 9(6): 474-478.
- [10] Xiang W, Jiang T, Hao X, et al. Primary cilia and autophagy interaction is involved in mechanical stress mediated cartilage development via ERK/mTOR axis [J]. *Life Sci*, 2019, 218: 308-313.
- [11] Gigout A, Guehring H, Froemel D, et al. Sprifermin (rhFGF18) enables proliferation of chondrocytes producing a hyaline cartilage matrix [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(11): 1858-1867.
- [12] Correa D, Somoza RA, Lin P, et al. Sequential exposure to fibroblast growth factors (FGF) 2, 9 and 18 enhances hMSC chondrogenic differentiation [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(3): 443-453.
- [13] Mori Y, Saito T, Chang SH, et al. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(14): 10192-10200.
- [14] Lohmander LS, Hellot S, Dreher D, et al. Intraarticular sprifermin (recombinant human fibroblast growth factor 18) in knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. 2014, 66(7): 1820-1831.
- [15] Kunova Bosakova M, Varecha M, Hampl M, et al. Regulation of ciliary function by fibroblast growth factor signaling identifies FGFR3-related disorders achondroplasia and thanatophoric dysplasia as ciliopathies [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(6): 1093-1105.
- [16] Ho L, Ali SA, Al-Jazrawe M, et al. Primary cilia attenuate hedgehog signalling in neoplastic chondrocytes [J]. *Oncogene*, 2013, 32(47): 5388-5396.
- [17] Kunova Bosakova M, Nita A, Gregor T, et al. Fibroblast growth factor receptor influences primary cilium length through an interaction with intestinal cell kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(10): 4316-4325.
- [18] Joukov V, De Nicolo A. The Centrosome and the Primary Cilium: The Yin and Yang of a Hybrid Organelle [J]. *Cells*, 2019, 8(7): E701.
- [19] Gan H, Xue W, Gao Y, et al. KIF5B modulates central spindle organization in late-stage cytokinesis in chondrocytes [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 85.

(收稿日期: 2019-09-09)

(本文编辑: 龚哲妮)