

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.17.002

缺氧复氧对滑膜细胞 IGF-IGFBP-3 以及线粒体的影响 *

周思齐 施家奇 蔡伟松 张宇标 李皓桓[△]

(武汉大学人民医院骨科 湖北 武汉 430060)

摘要 目的:探讨氧波动环境对原代成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)胰岛素样生长因子-1(insulin growth factor-1, IGF-1)、胰岛素样生长因子结合蛋白-3(insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3)及线粒体的影响。**方法:**分离并鉴定正常人滑膜细胞,再对滑膜细胞进行分组:对照组、缺氧/再充氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)干预组。采用实时定量 PCR 检测滑膜细胞中 IGF-1、IGFBP-3 的 mRNA 水平;Western blot 检测滑膜细胞中 IGF-1、IGFBP-3 的蛋白水平;流式细胞仪检测线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential, MMP)以及线粒体通透性转换孔(Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP)的变化。**结果:**与对照组比较, H/R 干预组的相对 IGF-1 和 IGFBP-3 的 mRNA 水平和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),膜电位水平降低($P<0.05$),线粒体通透性转换孔开放。**结论:**氧波动环境可促进 IGF-1 和 IGFBP-3 的表达及细胞线粒体损伤,其可能是骨关节炎(OA)发病的重要机制之一。

关键词:成纤维样滑膜细胞; IGF-1; IGFBP-3; 线粒体

中图分类号: R-33; R686.7; R684 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)17-3209-05

Effects of Hypoxia and Reoxygenation on IGF-1, IGFBP-3 and Mitochondria in Synovial Cells*

ZHOU Si-qi, SHI Jia-qi, CAI Wei-song, ZHANG Yu-biao, LI Hao-huan[△]

(Department of Orthopedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of oxygen-induced fluctuations on the expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3 and the change of mitochondria. **Methods:** Synovial cells were isolated and identified, which were divided into control group and Hypoxia/ Reoxygenation (H/R) intervention group. The mRNA levels of IGF-1 and IGFBP-3 in synoviocytes were detected by real-time quantitative PCR; The protein levels of IGF-1 and IGFBP-3 in synoviocytes were detected by Western blot; The mitochondrial membrane potential and mitochondrial permeability transition pore was detected by flow cytometry. **Results:** Compared with the control group, the mRNA and protein levels of IGF-1 and IGFBP-3 in the H/R intervention group were significantly increased ($P<0.05$); the membrane potential was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$) and openness of mitochondrial permeability transition pore. **Conclusion:** The fluctuating environment of oxygen can promote the expression of IGF-1 and IGFBP-3 and the mitochondrial damage, which would be a possible mechanism of osteoarthritis(OA).

Key words: Fibroblast-like synoviocyte; IGF-1; IGFBP-3; Mitochondria

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R686.7; R684 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)17-3209-05

前言

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一类多见于中老年人的以关节软骨慢性退变为主,继发关节缘骨赘和滑膜慢性炎症为特征的关节疾病。滑膜作为 OA 病损的靶组织,一直未予以重视。滑膜是关节囊的内层,FLS 是滑膜的主要成分,损伤条件下 FLS 产生的炎性介质、氧自由基、细胞因子和蛋白酶等可以直接作用于软骨细胞导致软骨退变^[1]。缺氧/复氧(H/R)是 OA 发病机制中的重要特征,体内关节器官常常处于动态波动氧分压环境。正常运动过程中,关节经历组织缺氧与再充氧过程^[2];生理条件下的缺氧再充氧过程可能对耐受低氧的软骨细胞作

用轻微,但会导致需氧的滑膜细胞呼吸功能障碍,使线粒体损伤而产生自由基。本研究旨在模拟 OA 病理状态的"温和缺氧"环境(O_2 浓度 40 mmHg),通过观察有氧代谢提供能量的滑膜细胞中 IGF-线粒体损伤级联生物学效应,深入了解 OA 的病理生理发生机制,为后期的 OA 防治提供前期理论工作基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 高糖培养基 (Hyclone), 胎牛血清 (Gibco 公司), 胰蛋白酶(武汉科瑞公司) 青霉素-链霉素双抗(杭州吉诺生物医药技术有限公司), RT-PCR 逆转录 (Fermentas), SYBR

* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(ZRMS2017000057)

作者简介:周思齐(1992-), 硕士, 主要研究方向:骨关节疾病的临床与基础研究, E-mail: 1032759008@qq.com

[△] 通讯作者:李皓桓(1976-), 博士, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向:骨关节炎的基础与临床研究, E-mail: lihaohuan@whu.edu.cn

(收稿日期:2018-04-04 接受日期:2018-04-30)

GREEN PCR master(Roche),RNA 提取试剂 Trizol(武汉谷歌生物科技有限公司),SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(武汉谷歌生物科技有限公司),线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 (Solaibio),线粒体通透性转换孔试剂盒(BestBio),Vimentin,CD90/Thy-1、IGF-1、IGFBP-3 一抗 (Abcam),IGF-1,IGFBP-3 及内参 GAPDH 引物由武汉谷歌生物科技有限公司代为合成。

1.2 方法

1.2.1 FLS 的分离培养 滑膜组织取自武汉大学人民医院骨外科行关节镜下部分半月板切除术的患者。取出的滑膜组织保存于无菌的生理盐水中,用冰盒运送至武汉大学人民医院中心实验室,在超净台进行操作处理。将组织用无菌的 PBS 漂洗数次,除去脂肪和其他不相关组织,并以眼科剪剪成 1 mm^3 的碎块后,放入培养瓶中。再加入用 DMEM 高糖培养基配制的 II 型胶原酶 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 约 2 mL 消化过夜。待消化完成后,以 $1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,去掉上清液,将收集到的滑膜细胞和残留组织块,以 DMEM/F12 完全培养液(含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素双抗)重悬,接种至 25 cm^2 培养瓶,于饱和湿度、5% CO_2 培养箱中培养。此后,每隔 24 h 更换一次完全培养

液,连续培养 72 h。

1.2.2 FLS 免疫荧光鉴定 将 FLSs 用 4%多聚甲醛固定,用 PBS 洗涤并用 Triton X-100 和 5%BSA 的溶液渗透 1 h。将滑膜细胞与兔波形蛋白(Vimentin)和 CD90/Thy-1 一抗于 4°C 孵育过夜,后用 PBS 洗涤 3 次,然后在室温下与 FITC 和 CY3 二抗温育 2 h,最后用 DAPI 复染。使用 Olympus 显微镜拍摄图像,并使用 Image J 软件进一步分析。

1.2.3 缺氧 / 再灌注(Hypoxia/reperfusion.H/R)干预的建立及实验分组 实验分为对照组(正常人滑膜细胞组)及 H/R 干预组,H/R 干预:通过调控多台常规细胞培养箱,分别设置常规培养条件(37°C , 5% CO_2)以及缺氧培养条件(37°C , 5% CO_2 , 1% O_2),轮流将 FLS 培养器皿置于缺氧条件 2 h,常规条件 2 h,重复进行 3 个循环。

1.2.4 RT-PCR 检测 FLS 的 IGF-1、IGFBP-3 mRNA 水平 用 Trizol 提取 FLSs 总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA。引物见表 1,qRT-PCR 反应体系见表 2,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量。

表 1 实时定量 pcr 分子引物
Table 1 Real-time PCR primers

gene		sequence
IGF-1	sense	5'-CCCACAGGGTATGGCTCCAGCA-3'
	antisense	5'-CTACATCCTGTAGTCTTGTGTTTCCT-3'
IGFBP-3	sense	5'-CAGCTCCAGGAAATGCTAGTG-3'
	antisense	5'-CTACGGCAGGGACCATATTC-3'
GAPDH	sense	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCA-3'
	antisense	5'-CCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3'

表 2 RT-PCR 反应体系
Table 2 RT-PCR reaction system

Reagent	Reacting dose (μL)
SYBR Premix Ex Taq II ($2\times$)	12.5
PCR former primer	1.0
PCR reverse primer	1.0
cDNA template	2.0
DEPC-Treated Water	8.5
Total	25

1.2.5 Western Blot 分析 FLS 的 IGF-1、IGFBP-3 蛋白表达水平 消化离心收集 FLSs,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗两遍,离心收集细胞沉淀,加入一定量的裂解液于冰上裂解 30 min。裂解后于 4°C 12000 rpm 离心 15 min 收集细胞总蛋白。加入一定量蛋白上样缓冲液 100°C 煮沸变性 15 min 之后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(12%, SDS-PAGE)。电泳完毕后将蛋白转移至 $4.5\text{ }\mu\text{m}$ 聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。再将 PVDF 膜经 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 IGF-1、IGFBP-3 一抗孵育过夜。孵育完毕后,将 PVDF 膜经 TBST 缓冲液 (TRIS-HCL 平衡盐缓冲液 +Tween) 清洗 3 次,再用二抗室温避光孵育 1 h。然后用 TBST 缓冲液清洗条带 3 次,采用 Odyssey 红外激光成像系统进行扫膜,并用凝胶图象

的处理系统分析目标条带的分子量及光密度值。

1.2.6 流式细胞仪检测 FLS 线粒体膜电位 消化离心收集细胞,重悬于 0.5 mL 细胞培养液中,加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,颠倒数次混匀。于细胞培养箱中 37°C 避光孵育 20 min。孵育期间按照每 1 mL JC-1 染色缓冲液($5\times$)加入 4 mL 蒸馏水的比例,配制适量的 JC-1 染色缓冲液($1\times$),并放置于冰浴。 37°C 孵育结束后, $600\times\text{ g}$ 4°C 离心 3~4 min, 沉淀细胞。离心后,用 JC-1 染色缓冲液($1\times$)洗涤 2 次。最后,加入 0.5 mL JC-1 染色缓冲液($1\times$)重悬细胞,流式细胞仪分析。

1.2.7 流式细胞仪检测 FLS 线粒体通透性转换孔 将 FLSs 制备成单细胞悬液使其密度为 $1\times 10^5/\text{cell}$, 向样品中加入 BB-cellProbeTMCA1 探针和淬灭剂并在 37°C 避光孵育 15 min,孵育结束后向每管中加入 3 mL MPTP 染色 Buffer($1\times$),离心收集细胞,最后加入流式合适的染色缓冲液重悬细胞,流式分析仪检测。

1.3 统计学分析

应用 SPSS20.0 软件的 Student's t-test 进行统计学分析,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。检验水准 $P=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FLS 原代培养及免疫荧光鉴定

贴壁滑膜细胞呈梭形,生长状态良好(图 1A),免疫荧光鉴定显示波形蛋白(Vimentin)和 CD90/Thy-1 呈阳性(图 1B、C),证明所培养的细胞为 FLS。

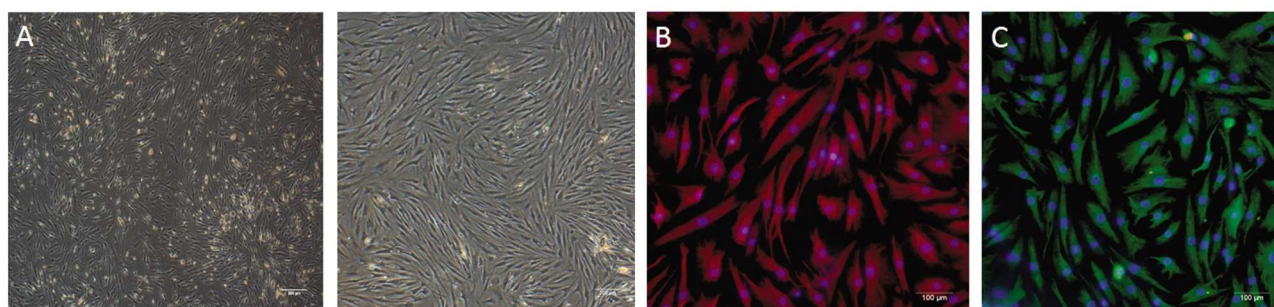


图 1 成纤维样滑膜细胞原代培养及免疫荧光鉴定

Fig.1 Primary culture of fibroblast-like synoviocytes and immunofluorescence identification

Note: A: FLS; B: Vimentin(+); C: CD90 / Thy-1(+).

2.2 缺氧复氧增强 FLS 的 IGF-1、IGFBP-3 表达

将 FLS 分为对照组、H/R 干预组,实时定量 PCR 分析靶基因 IGF-1、IGFBP-3 的 mRNA 表达水平,可发现 H/R 干预组的

基因表达水平高于对照组($P < 0.05$;图 2A)。Western Blot 检测 IGF-1、IGFBP-3 的蛋白表达水平,结果显示 H/R 干预之后,IGF-1、IGFBP-3 的蛋白表达水平增高($P < 0.05$;图 2B)。

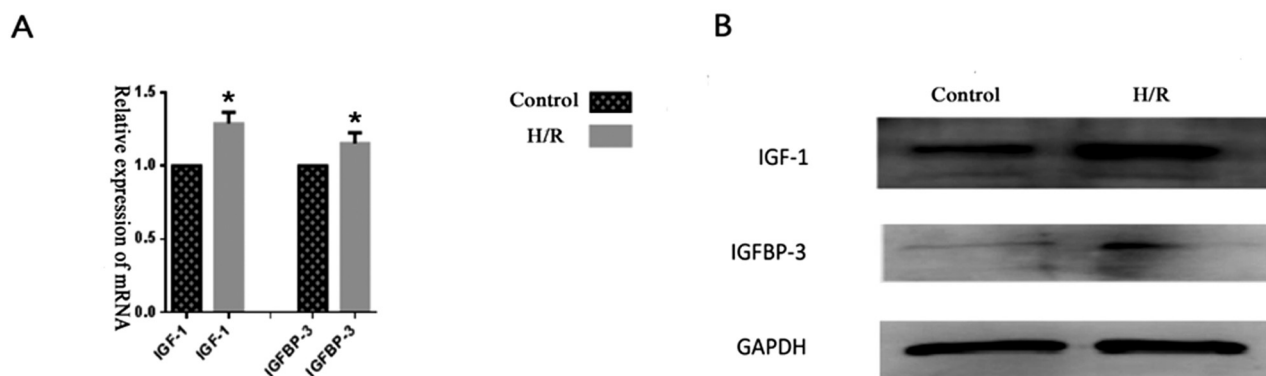


图 2 H/R 干预后 IGF-1、IGFBP-3 基因和蛋白表达水平

Fig.2 Levels of IGF-1, IGFBP-3 Gene and Protein Expression after H/R Intervention

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, compared with the control group.

2.3 缺氧复氧降低 FLS 线粒体膜电位

将 FLS 分为对照组、H/R 干预组,用流式细胞仪检测 FLS

线粒体膜电位,可发现与对照组比较,H/R 干预组线粒体膜电位水平降低,见图 3($P < 0.05$)。

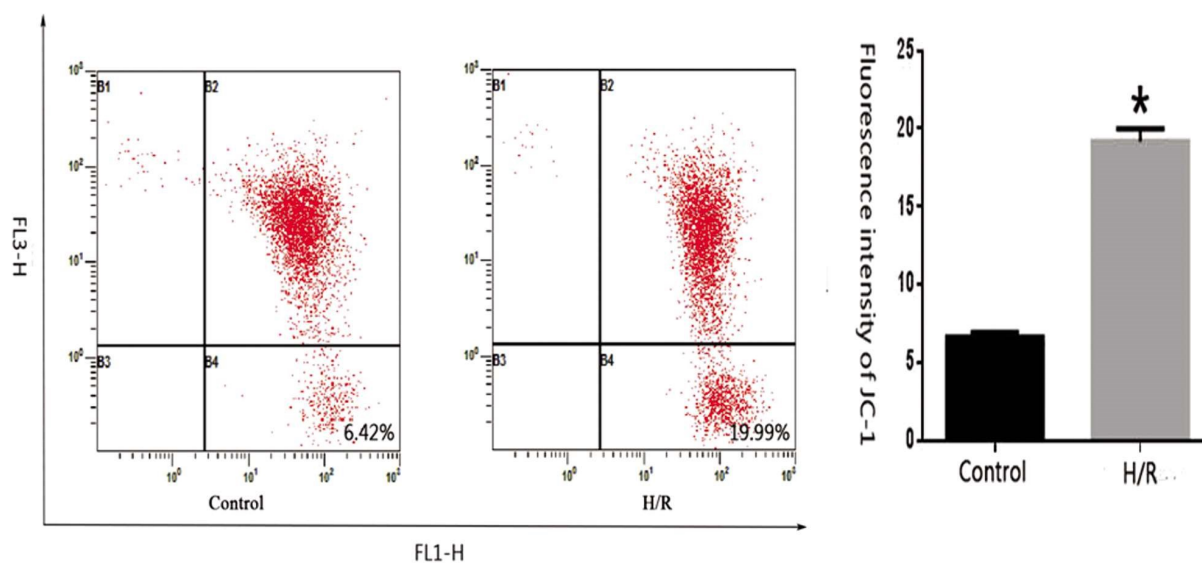


图 3 成纤维样滑膜细胞线粒体膜电位

Fig.3 Fibroblast-like synoviocyte mitochondrial membrane potential

2.4 缺氧复氧激活线粒体通透性转换孔

线粒体通透性转换孔参与凋亡过程中线粒体组分的释放,并在细胞存活和凋亡中发挥重要作用。BBcellProbe™ CA1 探针是活细胞的荧光染料,可使包括线粒体在内的细胞质发出强

烈的绿色荧光。加入探针淬灭剂后,细胞质的荧光淬灭,仅留下线粒体荧光。图 5 显示,对照组线粒体荧光强度高于 H/R 干预组,表明 H/R 组线粒体通透性转换孔开放率显著高于对照组 ($P<0.05$)。

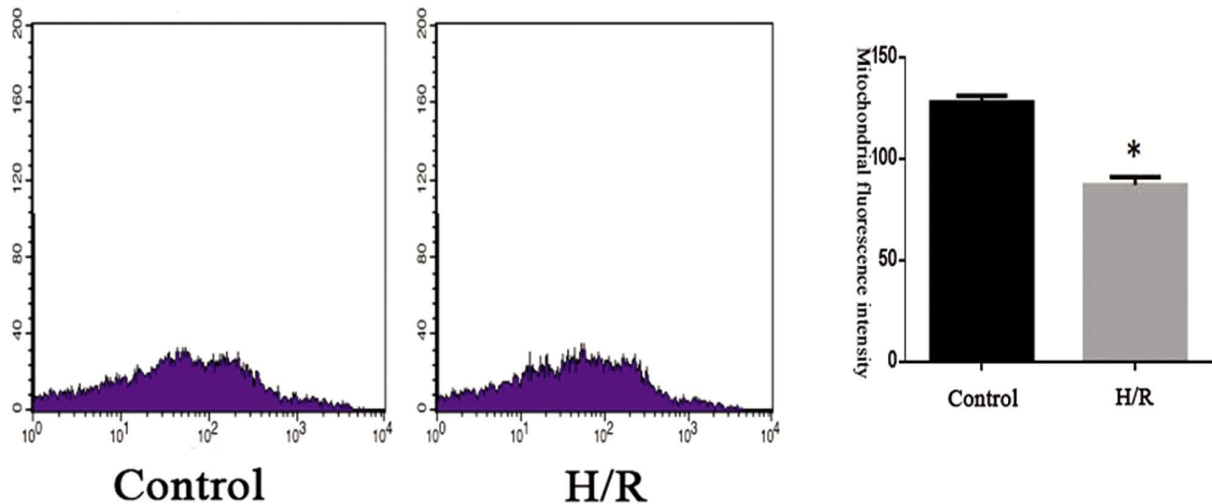


图 4 成纤维样滑膜细胞线粒体通透性转换孔

Fig.4 Fibroblast-like synoviocytes mitochondrial permeability transition pores

3 讨论

骨关节炎是常见的以关节软骨慢性退变为特征的关节疾病,其发生机理与衰老、创伤、过度劳损、肥胖、遗传、细胞因子异常、关节营养的降低、自由基损伤、自身免疫损伤反应、生物力学异常等多种因素有关^[3]。随着社会人口老龄化进程的加速,OA 的发病率逐年升高,近年来,膝关节和髋关节骨性关节炎已成为全球致残的第 11 位主要原因^[45]。OA 病损不仅影响关节软骨的完整性,还包括骨、韧带、肌肉、半月板及滑膜等组织^[6]。滑膜炎症在骨关节炎(OA)的发病机制和进展中起着重要作用,即使在 OA 早期阶段既有滑膜炎症的参与。急性或者慢性损伤早期可作用于正常滑膜,反复 H/R 损伤(通过肿胀或者暂时性组织缺氧)过程启动 ROS 的生成,局部产生大量氧自由基参与细胞内与细胞外氧化损伤反应,并最终出现持续性滑膜炎症。越来越多的研究表明活化的成纤维细胞样滑膜细胞在 OA 发病机制中发挥重要作用,Cheneviergobeaux 等^[7]研究发现 H/R 干预可上调 OA 关节滑膜细胞中一氧化氮合酶(iNOS)活性的证据,从而使滑膜细胞一氧化氮(NO)产生增加,NO 是滑膜炎中的重要促炎介质。在正常情况下,FLS 分泌的两种重要分子润滑素和透明质酸(HA),有助于保护和维持关节软骨的完整性,减少关节表面的摩擦^[89]。损伤条件下 FLS 产生的炎性介质、氧自由基、细胞因子和蛋白酶等可以直接作用于软骨细胞导致软骨退变^[10-12]。

胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3)与 OA 发病、病程进展相关。IGFBP-3 是胰岛素样生长因子结合蛋白家族 (insulin-like growth factor binding proteins, IGFBPs)的一员,它以糖基化形式存在于体内各类细胞中,可由多种细胞分泌。IGFBP-3 被发现能通过多种细胞信号通路诱导细胞凋亡。既往研究发现胰岛素样生长

因子-1(insulin growth factor-1, IGF-1)与 IGF-1 受体相结合,启动酪氨酸激酶信号通路,激活下游的丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)途径,从而促进细胞的增殖、抑制细胞凋亡^[13,14]。OA 患者的关节液中存在 IGFBP-3 蛋白酶解的抑制因子,阻断了 IGFBP-3 的水解,促进 OA 病情发展^[15]。IGFBP 可通过与 IGF-1 受体竞争结合 IGF-1,从而抑制 IGF-1 的生物活性,消除其促细胞增生的效应,加速细胞凋亡^[16]。然而,后续又有研究发现:即使定向阻断了 IGF-1 与 IGF-1 受体的作用之后,IGFBP-3 依然对细胞具有诱导凋亡的能力,因此猜测 IGFBP-3 可能主要是通过另一条 IGF 非依赖作用途径来诱导细胞凋亡^[17]。

前期研究发现:软骨细胞凋亡与线粒体跨膜电位下降有关。而跨膜电位的下降,可能与线粒体的膜通透性上升相关。线粒体膜通透性上升引起细胞色素 c 外泄,后者通过结合 dATP,形成复合物 Apaf-1,激活 Caspase9/3 通路,诱导细胞凋亡。IGFBP-3 可通过与 RXR α 特异性结合,使 Nur77 从细胞核易位至线粒体表面而造成线粒体膜通透性上升,使线粒体释放细胞色素 c,激活 Caspase-9/3, Caspase-3 诱导细胞凋亡^[18-20]。然而,前述研究存有一些不足:组织缺氧是 OA 病损过程中的重要事件,此前的研究是在标准恒定氧分压的细胞培养环境中所完成,并未考虑到组织缺氧在 OA 病损中的作用。故我们模拟了滑膜细胞生理状态下的 H/R 环境,观察以有氧代谢提供能量的滑膜细胞中 IGF- 线粒体损伤级联生物学效应,结果发现在 H/R 条件下,滑膜细胞 IGF-1、IGFBP-3 表达较对照组升高,线粒体膜电位水平降低,线粒体通透性转换孔开放,从而导致滑膜细胞损伤。本研究的不足在于未检测 H/R 条件下活性氧(ROS)的产生,及其对软骨细胞具体的作用机制。

本研究通过模拟正常关节缺氧复氧条件,证明滑膜细胞 IGF-1、IGFBP-3 的 mRNA 及蛋白表达水平平均升高,线粒体跨膜

膜电位下降,激活线粒体通透性转换孔,从而导致滑膜细胞损伤,为后期实验提供了理论基础。至于在 H/R 条件下 ROS 的产生,及其对软骨细胞的作用机制以待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthritis!) [J]. *Osteoarthritis & Cartilage*, 2013, 21 (1): 16-21
- [2] Schneider N, Mouithys-Mickalad A L, Lejeune J P, et al. Synoviocytes, not chondrocytes, release free radicals after cycles of anoxia/re-oxygenation [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2005, 334(2): 669-673
- [3] Loeser R F, Goldring S R, Scanzello C R, et al. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64 (6): 1697-1707
- [4] Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2014,73(7): 1323
- [5] Nicholls M A, Fierlinger A, Niazi F, et al. The Disease-Modifying Effects of Hyaluronan in the Osteoarthritic Disease State [J]. *Clinical Medicine Insights Arthritis & Musculoskeletal Disorders*, 2017: 1-10
- [6] Scanzello C R, Goldring S R. The Role of Synovitis in Osteoarthritis pathogenesis[J]. *Bone*, 2012, 51(2): 249
- [7] Cheneviegobeaux C, Simonneau C, Lemarchal H, et al. Effect of hypoxia/reoxygenation on the cytokine-induced production of nitric oxide and superoxide anion in cultured osteoarthritic synoviocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(6): 874-881
- [8] Wang Y, Grodzinsky A J. The Response of Cartilage to Injury[M]. *Post-Traumatic Arthritis*, 2015, 121-133
- [9] Sotres J, Arnebrant T. Experimental Investigations of Biological Lubrication at the Nanoscale: The Cases of Synovial Joints and the Oral Cavity[J]. *Lubricants*, 2013, 1(4): 102-131
- [10] Gibson J S, Milner P I, White R, et al. Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis [J]. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 2008, 455 (4): 563-573
- [11] Pan L, Zhang Y, Chen N, et al. Icarin Regulates Cellular Functions and Gene Expression of Osteoarthritis Patient-Derived Human Fibroblast-Like Synoviocytes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(12): 2656
- [12] Emori T, Hirose J, Ise K, et al. Constitutive Activation of Integrin $\alpha 9$ Augments Self-Directed Hyperplastic and Proinflammatory Properties of Fibroblast-like Synoviocytes of Rheumatoid Arthritis[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 199: 3427-3436
- [13] Zhang Z, Li L, Yang W, et al. The effects of different doses of IGF-1 on cartilage and subchondral bone during the repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits [J]. *Osteoarthritis & Cartilage*, 2016, 25(2): 309-320
- [14] Wei F Y, Lee J K, Wei L, et al. Correlation of insulin-like growth factor 1 and osteoarthritic cartilage degradation: a spontaneous osteoarthritis in guinea-pig [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017: 4493-4500
- [15] Hooshmand S, Juma S, Khalil D A, et al. Women with osteoarthritis have elevated synovial fluid levels of insulin-like growth factor (IGF) -1 and IGF-binding protein-3 [J]. *Journal of Immunoassay*, 2015, 36 (3): 284
- [16] Wardale J, Mullen L, Howard D, et al. An ex vivo model using human osteoarthritic cartilage demonstrates the release of bioactive insulin like growth factor 1 from a collagen-glycosaminoglycan scaffold [J]. *Cell Biochemistry & Function*, 2015, 33(5): 277-284
- [17] Georges R B, Adwan H, Hamdi H, et al. The insulin-like growth factor binding proteins 3 and 7 are associated with colorectal cancer and liver metastasis[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2011, 12(1): 69-79
- [18] Wei Z, Li H H. IGFBP-3 may trigger osteoarthritis by inducing apoptosis of chondrocytes through Nur77 translocation [J]. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2015, 8(12): 15599
- [19] Lee H S, Woo S J, Koh H W, et al. Regulation of Apoptosis and Inflammatory Responses by Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 in Fibroblast-like Synoviocytes and Experimental Animal Models of Rheumatoid Arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66 (4): 863-873
- [20] Zhang X, Li H, Cao Y, et al. Regulation of Inflammatory and Apoptosis Responses by Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 in fibroblast-like synoviocytes of Osteoarthritis [J]. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2017, 10(3): 3024-3032