

胰岛素样生长因子-1 保护人终板软骨细胞的作用机制

路磊¹ 张涛¹ 朱大安¹ 何勇¹ 谢建新¹ 方斌^{1△}

[摘要] 目的:明确胰岛素样生长因子-1(IGF-1)保护人终板软骨细胞的作用机制。方法:从腰椎爆裂性骨折患者的终板分离原代终板软骨细胞,用 IGF-1 刺激原代终板软骨细胞,检测 COL2A1、SOX9 和 MMP13 的 mRNA 水平和蛋白表达水平;用 IGF-1 刺激原代终板软骨细胞,检测 PI3K 活性、AKT 和 p-AKT 蛋白表达,以及 ERK1/2 和 p-ERK1/2 的蛋白表达;IGF-1 联合 PI3K 抑制剂 LY 294002 或 ERK1/2 抑制剂 AG-126 处理原代终板软骨细胞,再次检测 COL2A1、SOX9 和 MMP13 的蛋白表达,明确其上下游关系。结果:IGF-1 可以诱导 COL2A1 和 SOX9 上调表达,并抑制 MMP13;此外,IGF-1 增高 PI3K 活性,并上调 p-AKT 和 p-ERK1/2;IGF-1 上调 COL2A1 的作用依赖于 PI3K-AKT 信号通路的激活,而 IGF-1 诱导 SOX9 上调和 MMP13 下调依赖于 ERK1/2 的活化。结论:IGF-1 激活 PI3K-AKT 信号通路和 ERK1/2 通路,调节终板软骨细胞功能性蛋白的表达,为椎间盘退变的治疗提供理论依据。

[关键词] 椎间盘退变;终板软骨细胞;胰岛素样生长因子-1

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)07-0011-05

Mechanism of Protective Role of Insulin Growth Factor-1 in Human Endplate Chondrocytes

LU Lei¹ ZHANG Tao¹ ZHU Daan¹ HE Yong¹ XIE Jianxin¹ FANG Bin^{1△}

¹ Department of Orthopedics, Shaoxing Central Hospital, Shaoxing 312030, Zhejiang China.

Abstract Objective: To identify the underlying mechanism of protective role of insulin growth factor-1 (IGF-1) in endplate chondrocytes. **Methods:** Primary endplate chondrocytes were isolated from the endplate of patients with lumbar burst fracture. The cells were treated with IGF-1 followed by detecting the expression of COL2A1, SOX9 and matrix metalloproteinase 13 (MMP13), as well as the activity of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and the expression of AKT, p-AKT, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and p-ERK1/2. Next, we treated the cells with PI3K inhibitor LY 294002 or ERK1/2 inhibitor AG-126 in the presence of IGF-1 to explore the underlying mechanism. **Results:** IGF-1 induced upregulation of COL2A1 and SOX9 and downregulation of MMP13 in primary endplate chondrocytes. In addition, IGF-1 could activate PI3K-AKT signaling pathway and ERK1/2. Further investigation revealed that IGF-1-induced upregulation of COL2A1 depended on PI3K-AKT signaling pathway, while IGF-1-induced activation of ERK1/2 was responsible for the upregulation of SOX9 and downregulation of MMP13 in primary endplate chondrocytes. **Conclusion:** Activation of PI3K-AKT and ERK1/2 by IGF-1 may involve in the expression of functional proteins in endplate chondrocytes, providing a theoretical basis for treatment of intervertebral disc degeneration.

Keywords: intervertebral disc degeneration; endplate chondrocytes; insulin like growth factor-1

脊柱是人体承重的主要结构,临床中椎间盘退变是引起脊柱相关疾病(如椎间盘突出症、椎管狭窄和脊

椎骨性关节炎)的主要原因^[1]。终板软骨细胞是椎间盘的主要构成细胞,通过分泌细胞外基质和相关细胞因子维持椎间盘功能稳态。因此以终板软骨细胞作为研究目标,寻找关键靶点将有助于针对性治疗。

胰岛素样生长因子-1(Insulin like Growth Factor-1, IGF-1)是一种功能多样的生长因子,具有抑制软骨细胞

基金项目:绍兴市公益性技术应用研究计划项目(2018C30137)

¹ 浙江绍兴市中心医院骨科(浙江 绍兴,312030)

[△]通信作者 E-mail: llxjmua@163.com

凋亡的作用^[2]。此外,IGF-1 参与软骨细胞的分化过程^[3]。研究表明椎间盘退变患者血清 IGF-1 水平显著降低^[4],因此 IGF-1 的这些作用可能使其成为治疗椎间盘退行性变的潜在分子。作为细胞外基质的主要成分, Collagen II 在椎间盘退变中逐渐减少,加速椎间盘退变的发生^[5]。SOX9 和 Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13)是调节 Collagen II 的两个关键分子,研究证实 SOX9 有助于 Collagen II 的合成,而 MMP13 促进 Collagen II 的降解^[6-8]。研究提示 IGF-1 可能通过不同信号通路调控大鼠终板软骨细胞 Collagen II 和 MMP13 的表达^[9]。本研究旨在明确 IGF-1 调节人终板软骨细胞 Collagen II, SOX9 和 MMP13 表达的机制。

1 材料与方法

1.1 受试对象

选取 6 名就诊于绍兴市中心医院的腰椎爆裂性骨折患者,均为男性,年龄 20~30 岁,既往体健。涉及的操作遵照本院医学伦理委员会的相关规定,入选患者均被告知实验目的并签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器

0.2%胰蛋白酶,0.002%胶原酶(Sigma,美国),100 μ m 细胞筛网(BD Biosciences,美国),胎牛血清和 DMEM 培养基(Gibco,美国),TRIzol(Ambion,美国),SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(Takara,日本),引物(生工,中国),CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、小鼠抗 β -actin 一抗、辣根过氧化物酶耦合二抗、DAPI 染色液、Cy3 标记山羊抗兔 IgG 和 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(碧云天,中国),PVDF 膜(Millipore,美国),兔抗 Collagen II 一抗、兔抗 SOX9 一抗、兔抗 MMP13 一抗、兔抗 p-AKT 一抗、兔抗 p-AKT(phospho T308)一抗、Phospho-PI3K p85 + Total In-Cell ELISA 试剂盒(Abcam,美国),兔抗 ERK1/2 一抗、兔抗 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)一抗(Cell Signaling Technology,美国),反转录仪、实时定量 PCR 仪、电泳仪、转膜仪、化学发光仪和酶标仪(Bio-Rad,美国)。

1.3 方法

1.3.1 原代终板软骨细胞分离 手术过程中取出终板软骨组织,用刀片刮除髓核和纤维环,加入无菌生理盐水,将其转移至细胞培养室的无菌操作台,用无菌剪将组织剪碎,再用 0.2%胰蛋白酶消化 20 min,0.002%胶原酶消化 24 h。用细胞筛网过滤后 PBS 洗涤细胞,将细胞接种于含有 10%血清的 DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C 常规培养。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 总 RNA 的提取用 TRIzol,经反转录后获得 cDNA,用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒进行实时荧光定量,程序设定为 95 $^{\circ}$ C

10 min,然后 40 个循环为 95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达。COL2A1:正义链 5'-GGT GTA AGA GCC GCT GAG TG-3',反义链 5'-CCA TCC GGT ATT AGG GTC GC-3'。SOX9:正义链 5'-GGA GAA ACC GAG GTT GGA GG-3',反义链 5'-GGA GAT AGC TTG TCC GGT GG-3'。MMP13:正义链 5'-AGA CTG CAT TTC TCG GAG CC-3',反义链 5'-CTT GCC AAT CCT GAT GAT GCG-3'。GAPDH:正义链 5'-AGA CCA CAG TCC ATG CCA TC-3',反义链 5'-CAG GGC CCT TTT TCT GAG CC-3'。

1.3.3 蛋白免疫印迹 收集处理过的原代终板软骨细胞,用 RIPA 裂解,BCA 法蛋白浓度定量;蛋白样品用 SDS-PAGE 凝胶分离,然后转至 PVDF 膜;PVDF 膜用 5%脱脂奶粉封闭 2 h;一抗在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育;TBST 洗膜后,用辣根过氧化物酶耦合的二抗在室温孵育 PVDF 膜 2 h;ChemDocTM XRS+ System 仪器检测目的条带。

1.3.4 细胞活力测定 原代终板软骨细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数约 8 000 个,培养 24 h 后不同浓度 LY 294002 和 AG-126 处理 24 h,然后更换培养液,每孔 100 μ L 培养基加入 10 μ L CCK-8 反应液,培养 2 h 后用酶标仪测定,波长设定 450 nm。

1.3.5 PI3K 活性测定 原代终板软骨细胞接种于 96 孔板,常规培养 24 h,细胞更换培养并给予 IGF-1 处理 1 h 后,吸出培养液,加入 8%甲醛溶液固定 20 min;PBS 清洗细胞后用 Quenching Buffer 孵育细胞 20 min;再次清洗细胞,用抗体封闭液在室温孵育细胞 1 h,然后用试剂盒中一抗在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜孵育细胞;PBS 清洗后室温孵育二抗 1 h,再用 Developing Solution 孵育细胞 20 min,加入终止液,然后用酶标仪在 450 nm 波长处读数。

1.3.6 细胞免疫荧光 原代终板软骨细胞接种于细胞培养皿,常规培养 24 h,给予 IGF-1 处理 1 h,用 PBS 轻轻清洗培养皿后加入 4%多聚甲醛固定 10 min,然后用 0.1% Triton X-100 进行破膜处理,PBS 清洗后用山羊血清室温封闭 30 min,将一抗(1:200)滴加培养皿,覆盖细胞表面,在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜孵育;PBS 清洗培养皿后吸干液体,滴加荧光素标记的二抗(1:200),室温避光放置 1 h 后再次清洗,接着用 DAPI 染料(1:500)进行细胞核染色,室温避光孵育 10 min 后用 PBS 清洗培养皿,滴加甘油,在共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.4 统计学方法

数据输入 GraphPad Prism 5.01 软件,以 $\bar{x} \pm s$ 来表示数据,并用非参数 t 检验进行数据分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-1 调节终板软骨细胞功能性蛋白表达

分离出人原代终板软骨细胞,用不同浓度 IGF-1 刺激 24 h,发现 IGF-1 以浓度依赖性方式上调 COL2A1 的 mRNA 表达,尤以大于 20 ng/mL 浓度作用明显,差异有统计学意义(图 1a, $P<0.05$),因此用 20 ng/mL 浓度进行后续研究。发现 IGF-1 可以显著

增加 SOX9 的 mRNA 水平,差异有统计学意义(图 1b, $P<0.001$);并降低 MMP13 的 mRNA 表达,差异有统计学意义(图 1c, $P<0.001$)。同样,检测了上述三个分子的蛋白表达水平,结果与 IGF-1 刺激原代终板软骨细胞后 COL2A1, SOX9 和 MMP13 的 mRNA 表达相一致(图 1d)。这些体外实验的结果提示 IGF-1 具有调节终板软骨细胞功能性蛋白的作用。

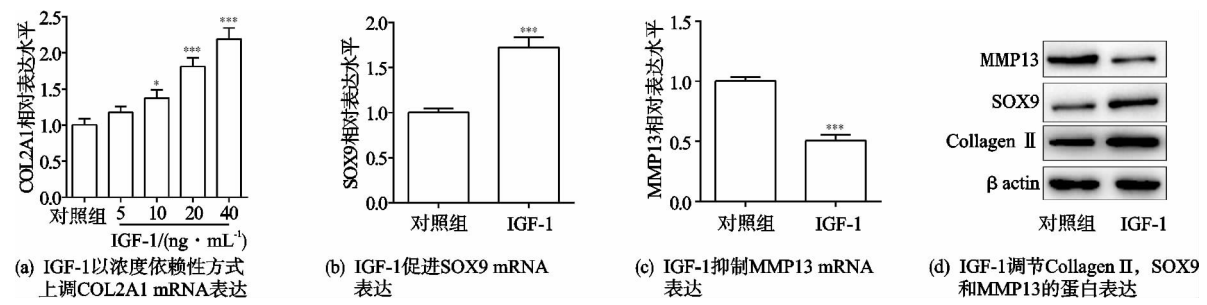


图 1 IGF-1 调节人原代终板软骨细胞 COL2A1, SOX9 和 MMP13 表达(* $P<0.05$, ** $P<0.001$)

2.2 IGF-1 激活终板软骨细胞 AKT 和 ERK1/2 信号

用 IGF-1 处理原代终板软骨细胞不同时间,观察 AKT 和 ERK1/2 的活化情况。Western Blot 结果显示 IGF-1 作用 1 h 后 AKT 和 ERK1/2 明显激活,即 p-AKT 和 p-ERK1/2 的蛋白表达上调(图 2a)。用 IGF-1 处理细胞 1 h,检测 AKT 上游分子 PI3K 的活性,实验结果提示 IGF-1 明显升高 PI3K 活性(图 2b, $P<$

0.001)。为了进一步明确 Western Blot 的结果,进行细胞免疫荧光实验。图 2c 的结果显示 IGF-1 处理 1 h 后,原代终板软骨细胞中的绿色荧光强度增加,即 p-AKT 表达增加。同样,IGF-1 明显增强红色荧光,即 p-ERK1/2 表达增加;而且发现在 IGF-1 的作用下, p-ERK1/2 出现细胞核转位(图 2d)。以上结果提示 IGF-1 可以促进 PI3K-AKT 和 ERK1/2 信号通路活化。

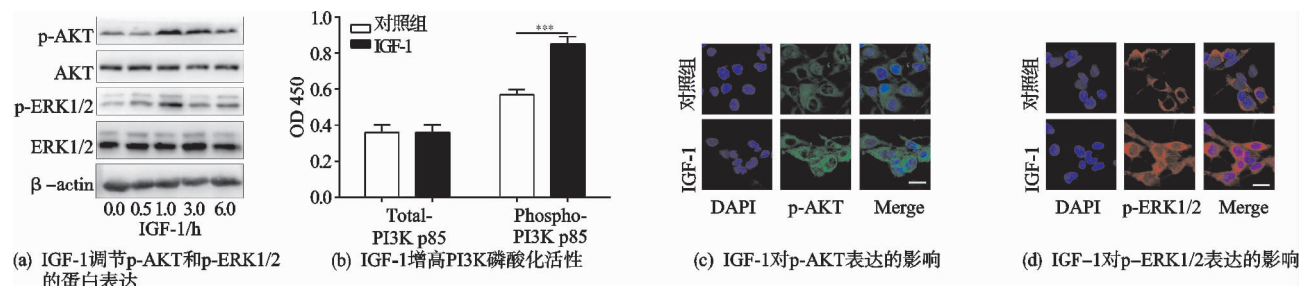


图 2 IGF-1 激活 PI3K-AKT 和 ERK1/2 通路(*** $P<0.001$)

2.3 Collagen II 是 PI3K-AKT 下游分子, SOX9 和 MMP13 是 ERK1/2 下游分子

为了明确 Collagen II, SOX9 和 MMP13 是否受到 PI3K-AKT 信号通路和 ERK1/2 信号的调节,进行如下实验。首先用不同浓度 PI3K 抑制剂 LY 294002 处理原代终板软骨细胞,当其浓度大于 500 nmol/L 时细胞活力受到抑制(图 3a, $P<0.05$)。同样,发现当 ERK1/2 抑制剂 AG-126 浓度大于 50 μ mol/L 时,细胞活力下降(图 3b, $P<0.05$)。因此,后续实验以 LY 294002 浓度为 200 nmol/L 和 AG-126 浓度为 25 μ mol/L 进行研究。图 3c 的结果

显示 LY 294002 抑制 AKT 活化,并降低 Collagen II 的蛋白表达;而 IGF-1 诱导的 SOX9 上调和 MMP13 下调并未受到 LY 294002 的影响。此外,AG-126 明显抑制了 p-ERK1/2 的上调表达,同时降低了 IGF-1 诱导的 SOX9 上调,增加了 MMP13 的表达,但 IGF-1 诱导的 Collagen II 上调并未受到 AG-126 的明显影响(图 3d)。

因此,结果提示 IGF-1 诱导原代终板软骨细胞 Collagen II 的上调表达依赖于 PI3K-AKT 信号通路,而 IGF-1 诱导的 SOX9 和 MMP13 表达异常依赖于 ERK1/2 信号通路。

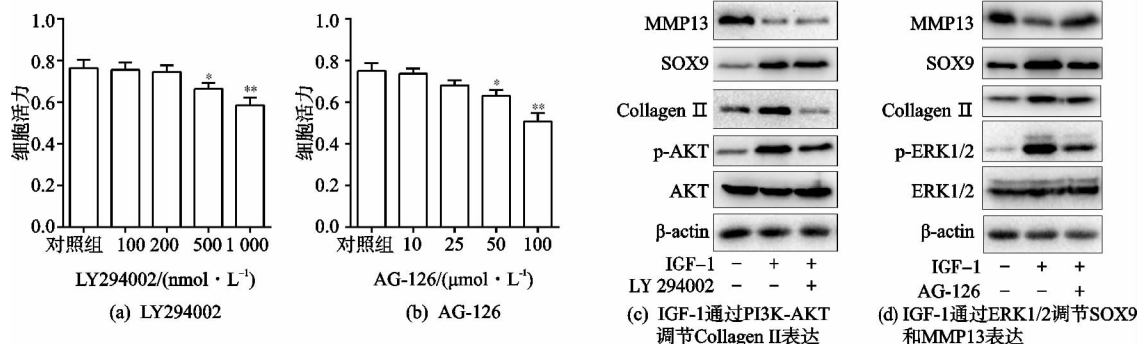


图3 IGF-1 调节 COL2A1, SOX9 和 MMP13 表达的机制 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

3 讨论

临床中椎间盘退变是引起颈背部疼痛的主要原因之一^[10-11],然而现有的治疗手段并不能在患者中取得满意的疗效,手术治疗仅在缓解症状中发挥一定作用^[12]。由于椎间盘退变的生物学改变和潜在机制并未明确,致使其治疗存在困难^[13]。

椎间盘的主要结构是富含蛋白聚糖和 Collagen II 的髓核、富含 Collagen I 的纤维环和软骨终板¹²。研究发现椎间盘退变患者的髓核祖细胞和粘多糖成分显著减少^[14-15],这可能是引起椎间盘退变的重要因素。椎体终板硬化导致终板孔隙及密度均减少,严重阻碍养分向终板软骨细胞输送,增加椎间盘退变的风险^[16-17],其中软骨终板是主要的支撑结构。研究显示 IGF-1 是促进软骨组织生长和分化的关键因子,并能促进软骨细胞合成蛋白聚糖^[18-20]。Liu 等^[4]发现椎间盘退变患者 IGF-1 及其受体降低,细胞学实验表明 IGF-1 可能通过抑制 MMP13 控制椎间盘退变加重。在耳软骨细胞中,使用小干扰 RNA 沉默 IGF-1 导致 PI3K-AKT 信号通路失活,阻断细胞外基质合成并抑制 Collagen II 表达^[18]。笔者发现外源性加入 IGF-1 促进人终板软骨细胞的 Collagen II 和 SOX9 上调,抑制 MMP13 表达,提示 IGF-1 有保护人终板软骨细胞的作用。Tan 等^[8]研究表明,PI3K-AKT 信号激活可以缓解椎间盘退变,与 SOX9 和 Collagen II 的上调相关,在软骨细胞中 SOX9 是 Collagen II 的正向调控因子^[7]。而抑制 MMP13 可以减缓 Collagen II 降解,并有利于间充质干细胞向软骨细胞分化^[6],提示 MMP13 是 Collagen II 的负向调控因子。本实验进一步揭示 IGF-1 激活 PI3K-AKT 信号通路促进终板软骨细胞 Collagen II 上调,通过 ERK1/2 信号通路促进 SOX9 上调并抑制 MMP13 表达,提示两条不同的信号通路参与人终板软骨细胞 Collagen II 的表达。除了在软骨细胞中发挥重要作用,IGF-1 还可以调控髓核细胞进而影响椎间盘退变进程。Tao 等^[21]发现 IGF-1 协同 TGF-β3 增加髓核源性间充质干细胞的活力,并促进其向髓核细胞分化和细胞外基质生物合成,

有助于椎间盘再生,而这些作用依赖于 ERK 信号通路的激活。在髓核细胞和纤维环细胞共培养体系中,有序地释放 IGF-1 和 BMP-2 可促进细胞增殖,增加细胞外基质^[22]。以上的研究表明 IGF-1 在不同方面发挥保护椎间盘的作用。

综上所述,本研究在人原代终板软骨细胞中初步探讨了 IGF-1 调节功能性蛋白 Collagen II, SOX9 和 MMP13 的分子机制,发现 PI3K-AKT 和 ERK1/2 两条信号通路参与其中。这一结果进一步明确了 IGF-1 保护终板软骨细胞的作用,为临床治疗椎间盘退变提供了理论依据和潜在靶点。

参考文献

- [1] CENTENO C J, FLEISHMAN J. Degenerative disc disease and pre-existing spinal pain[J]. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62(4): 371-372.
- [2] WANG J, CAO W, NIU F. Adenoviral vector expressing IGF-1 protects murine chondrogenic ATDC5 cells against hydrogen peroxide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis[J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40(5): 585-595.
- [3] HORITA M, NISHIDA K, HASEI J, et al. Involvement of ADAM12 in chondrocyte differentiation by regulation of TGF-beta1-induced IGF-1 and RUNX-2 expressions[J]. *Calcif Tissue Int*, 2019, 105(1): 97-106.
- [4] LIU Z, ZHOU K, FU W, et al. Insulin-like growth factor 1 activates PI3K/Akt signaling to antagonize lumbar disc degeneration[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(1): 225-232.
- [5] ZHANG Z Q, WANG C S, YANG P, et al. Mesenchymal stem cells induced by microencapsulated chondrocytes on repairing of intervertebral disc degeneration[J]. *Orthop Surg*, 2018, 10(4): 328-336.
- [6] BERTRAM H, BOEUF S, WACHTERS J, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors suppress initiation and progression of chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(6): 881-892.
- [7] OTERO M, PENG H, HACHEM K E, et al. ELF3 modulates type II collagen gene (COL2A1) transcription in

- chondrocytes by inhibiting SOX9-CBP/p300-driven histone acetyltransferase activity[J]. *Connect Tissue Res*, 2017,58(1):15-26.
- [8] TAN Y, YAO X, DAI Z, et al. Bone morphogenetic protein 2 alleviated intervertebral disc degeneration through mediating the degradation of ECM and apoptosis of nucleus pulposus cells via the PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2019,43(1):583-592.
- [9] ZHANG M, ZHOU Q, LIANG Q Q, et al. IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009,17(1):100-106.
- [10] KROCK E, CURRIE J B, WEBER M H, et al. Nerve growth factor is regulated by toll-like receptor 2 in human intervertebral discs[J]. *J Biol Chem*, 2016,291(7):3541-3551.
- [11] RISBUD M V, SCHOEPFLIN Z R, MWALE F, et al. Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells; recommendations of the spine research interest group at the 2014 annual ORS meeting[J]. *J Orthop Res*, 2015,33(3):283-293.
- [12] SIVAN SSWACHTEL E, ROUGHLEY P. Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014,1840(10):3181-3189.
- [13] KEPLER C K, PONNAPPAN R K, TANNOURY C A, et al. The molecular basis of intervertebral disc degeneration[J]. *Spine J*, 2013,13(3):318-330.
- [14] ANTONIOU J, STEFFEN T, NELSON F, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration[J]. *J Clin Invest*, 1996,98(4):996-1003.
- [15] SAKAI D, NAKAMURA Y, NAKAI T, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc[J]. *Nat Commun*, 2012,3:1264.
- [16] GALBUSERA F, MIETSCH A, SCHMIDT H, et al. Effect of intervertebral disc degeneration on disc cell viability; a numerical investigation[J]. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, 2013,16(3):328-337.
- [17] GULLBRAND S E, PETERSON J, MASTROPOLO R, et al. Low rate loading-induced convection enhances net transport into the intervertebral disc in vivo[J]. *Spine J*, 2015,15(5):1028-1033.
- [18] CHEN X, ZHANG R, ZHANG Q, et al. Microtia patients; auricular chondrocyte ECM is promoted by CGF through IGF-1 activation of the IGF-1R/PI3K/AKT pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019,234(12):21817-21824.
- [19] SHI S, KELLY B J, WANG C, et al. Human IGF-I propeptide A promotes articular chondrocyte biosynthesis and employs glycosylation-dependent heparin binding[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018,1862(3):567-575.
- [20] 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*, 2017,21(20):4493-4500.
- [21] TAO Y, ZHOU X, LIANG C, et al. TGF-beta3 and IGF-1 synergy ameliorates nucleus pulposus mesenchymal stem cell differentiation towards the nucleus pulposus cell type through MAPK/ERK signaling[J]. *Growth Factors*, 2015,33(5/6):326-336.
- [22] AKYUVA Y, KAPLAN N, YILMAZ I, et al. Delivering growth factors through a polymeric scaffold to cell cultures containing both nucleus pulposus and annulus fibrosus[J]. *Turk Neurosurg*, 2019,29(2):180-193.

(收稿日期:2019-10-01)