

医学康复

· 基础研究 ·

探究早期兔膝关节炎中 ERK 信号通路对细胞自噬的作用

师婕, 张钰, 许秀峰, 胡丽芳, 赵巧珍, 陈琛, 黄丹, 李锦, 陈焕, 陈立早

【摘要】 目的:探究细胞外调节蛋白激酶(ERK)抑制剂 U0126 对早期兔膝关节炎(OA)中细胞自噬的作用。**方法:**将 24 只雄性大白兔随机分为对照组、OA 组和 OA+U0126 组各 8 例,对照组不接受任何干预措施,OA 组和 OA+U0126 组均用木瓜蛋白酶行双膝关节炎造模 3d,OA+U0126 组于 7d 后将 U0126 注射到双膝关节腔,15d 时处死兔。3 组实验兔均进行大体观察,取双膝股骨内侧髁,通过甲苯胺蓝染色半定量分析糖胺聚糖(GAG);根据苏木精-伊红(HE)和番红-固绿染色,采用国际骨关节炎研究学会(OARSI)总分评价 OA 严重程度;蛋白免疫印迹分析检测每组中磷酸化的 EPK(P-ERK)、金属蛋白酶 3(MMP3)、UNC-51 样激酶 1(ULK1)、自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3II/LC3I 的含量。**结果:**3 组白兔实验前后的体重以及体重的变化各组两两比较差异无统计学意义。对照组软骨表面光滑较薄,色泽明亮,未见裂隙,触之较硬,关节滑膜未见增生和水肿等,关节液无渗出;OA+U0126 组与对照组比较,软骨色泽稍暗,膝关节软骨表面稍增厚,关节内滑液明显增多;OA 组软骨增厚变粗糙最明显,滑液最多。OA 组明显可见软骨表面增厚出现裂隙,软骨细胞增生,细胞基质失染以及细胞排列紊乱和簇集等典型骨关节炎改变;OA+U0126 组软骨增厚、细胞增生排列紊乱等改变比 OA 组轻。实验后,OA+U0126 组和 OA 组 GAG 含量均低于对照组(均 $P<0.05$);OA+U0126 与 OA 组比较,GAG 含量升高($P<0.01$)。OA+U0126 组和 OA 组 OARSI 评分均明显高于对照组(均 $P<0.05$);OA+U0126 组与 OA 组比较,OARSI 评分降低($P<0.01$)。OA+U0126 组和 OA 组 MMP3、P-ERK 含量较对照组均升高(均 $P<0.05$),LC3II/LC3I、ULK1 和 Beclin1 含量较对照组均降低(均 $P<0.05$)。OA+U0126 组与 OA 组比较,P-ERK、MMP3 含量均降低(均 $P<0.05$),LC3II/LC3I、ULK1 和 Beclin1 含量均升高(均 $P<0.05$)。**结论:**U0126 通过减少 MMP3 促进细胞自噬,延缓骨关节炎的进程。

【关键词】 骨关节炎;自噬;ERK;U0126

【中图分类号】 R49;R684.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2020.01.001

Effect of ERK inhibitor on autophagy at the early stage of osteoarthritis in rabbits Shi Jie, Zhang Yu, Xu Xiufeng, et al. Department of Rehabilitation Medicine, Changsha Central Hospital, Changsha 410011, China

【Abstract】 Objective: To explore the effect of extracellular signal regulated kinase (ERK) inhibitor U0126 on autophagy at the early stage of osteoarthritis in rabbits. **Methods:** We randomly and equally assigned 24 male rabbits into control group, OA group and OA+U0126 group. In control group rabbits were not given any treatments; in OA group and OA+U0126 group, rabbits were treated with intra-articular injection of papain into the knees for 3 days. Then we conducted intra-articular injection of U0126 into the rabbits in OA+U0126 group after 7 days. Fifteen days later, all rabbits were sacrificed for general observation of the knees. Medial condyle cartilages were excised for histological observation and Western blotting. Semiquantitative analysis of glycosaminoglycan (GAG) was performed according to toluidine blue staining. The OARSI scoring system was introduced to assess the severity and extent of OA by HE staining and Safranin O and Fast green staining. We also analyzed the levels of phosphorylated ERK (P-ERK), matrix metalloproteinase-3 (MMP3), UNC-51-like kinase 1 (ULK1), autophagy related protein Beclin1 and LC3II/I by Western blotting. **Results:** The average weights of rabbits in each group before the study and at the execution had no significant difference. Compared to the control group whose cartilages showed a thin, light, hardened and smooth surface without fissures, proliferation and edema in synovium or exudation of joint fluid,

OA+U0126 group exhibited a slight dark and thicken surface with an increase of joint fluid. Representative OA changes could be seen in OA group, which was characterized by thick and tough cartilage surface, cell disorientation and clustering tendency, as well as a loss of dying of matrix and proliferation of chondrocytes.

基金项目:长沙市科技计划项目(kq1706012)

收稿日期:2018-12-24

作者单位:长沙市中心医院康复医学科,长沙 410007

作者简介:师婕(1988-),女,医师,主要从事骨关节和神经康复方面的研究。

通讯作者:陈立早,c13908466360@163.com

However, these changes were attenuated in OA+U0126 group compared to OA group. Contents of GAG in OA group and OA+U0126 group were significantly lower than in the control group ($P<0.05$), and GAG content in OA+U0126 group was significantly higher than in OA group ($P<0.01$). OARSI scores in OA group and OA+U0126 group were significantly higher than in the control group ($P<0.05$), and those in OA+U0126 group were significantly lower than in OA group ($P<0.01$). Compared to the control group, levels of MMP3 and P-ERK were increased, while LC3II/I, ULK1 and Beclin1 were decreased in OA group and OA+U0126 group ($P<0.05$). In contrast to OA group, OA+U0126 group had a lower level of MMP3 and P-ERK and a higher level of LC3II/I, ULK1 and Beclin1 ($P<0.05$). **Conclusions:** Our study demonstrated that U0126, an ERK inhibitor, could relieve the OA process by reducing MMP3 and promoting autophagy.

【Key words】 osteoarthritis; autophagy; extracellular regulated protein kinases; U0126

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一类好发于老年人的慢性退行性骨关节病变^[1-3]。在多种物理及生化因素的刺激下,金属蛋白酶、II型胶原和蛋白聚糖等细胞外基质的渗出增多,引起软骨结构的退变,由此诱发骨关节炎的典型表现^[4-6]。中晚期骨关节炎的病理过程不可逆,因此目前研究者专注探索早期骨关节炎的治疗方法^[7]。近年来,细胞自噬被认为能抑制骨关节炎中某些蛋白的形成,如金属蛋白酶3(Metalloproteinase-3, MMP-3)、活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)、白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1)等,因此在骨关节炎以及其他年龄相关的疾病中,细胞自噬的激活减弱可能为其重要因素之一^[8-12],这启发了研究者们靶向调节细胞自噬很可能成为一种新型治疗骨关节炎的方法。UNC-51样激酶1(UNC-51-like Kinase 1, ULK1), Beclin1和微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3, LC3)是细胞自噬中的关键蛋白,其中我们认为ULK1是启动者, Beclin1是调控者, LC3是执行者。

研究发现,细胞外调节蛋白激酶(Extracellular regulated protein kinases, ERK)信号转导通路对细胞自噬具有调控作用^[13-16],但小鼠睾丸支持细胞系中,致癌物质林丹介导的ERK信号通路却抑制了自噬的发生。因此,不同疾病中ERK信号通路对细胞自噬的作用不一致。本研究首次探索骨关节炎中ERK信号通路对细胞自噬的作用,并进一步明确ERK信号通路的作用机制。本研究方案采用ERK信号通路抑制剂U0126行双膝关节腔注射的方式,以兔为研究对象,探索ERK途径在骨关节炎中对MMP3和细胞自噬的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取24只4个月龄的健康新西兰雄性大白兔为研究对象,平均体重2kg左右,随机分为3组,对照组、OA组和OA+U0126组,每组8只。

1.2 对照组 不接受任何干预措施;OA组和OA+

U0126组予以连续3d双膝关节腔注射0.1ml 4%的木瓜蛋白酶造模;OA组于造模后15d处死;OA+U0126组:造模7d后;予以0.1ml 100μmol/ml的ERK抑制剂U0126连续3d双膝关节腔注射,于造模后15d处死。

1.3 评定标准 ①大体观察:观察实验前后每组兔子毛色的光泽度及体重变化,造模处局部有无红肿发热及坏死,每组兔子自由活动情况和生命体征等。切取双膝股骨内侧髌进行肉眼观察:关节软骨色泽是否暗淡,表面是否光滑,有无增厚、坏死及粘连;滑膜有无增生、粘连;关节液的色泽、量;关节腔内有无粘连等变化。②组织学观察:取每组实验兔双侧股骨内侧髌关节面软骨为实验标本,给予4%多聚甲醛固定并至脱钙完全。随后行常规石蜡包埋和连续病理切片,分别进行苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin Staining, HE)染色、甲苯胺蓝及番红-固绿染色,光镜下观察软骨的形态变化、细胞簇集及排列是否整齐、基质染色及软骨表面裂隙及纤维化等情况。通过甲苯胺蓝染色半定量分析糖胺聚糖(Glycosaminoglycan, GAG)。采用双盲法按国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)软骨病理变化评分标准^[17]。OARSI评分根据HE和番红-固绿染色,计算分期(0~4期)×分级(0~5级)的总分来评价OA严重程度。且OARSI评分小于12分被定义为骨关节炎早期;OARSI分级为1级时,关节软骨即有早期退变。OARSI评分的分数越高,则说明骨关节炎病变越严重。③蛋白免疫印迹:按蛋白免疫印迹法测定样品中的蛋白浓度,经电泳、转膜、封闭、一抗、二抗孵育以及ECL显色曝光后,通过图像分析软件IPP6进行灰度分析检测空白对照组、OA组和OA+U0126组中MMP3、磷酸化的ERK(P-ERK)、ULK1、自噬相关蛋白Beclin1和LC3II/LC3I的灰度值。

1.4 统计学方法 采用Graph Pad Prism 7软件进行统计学处理,计量资料采用以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对照组、OA组和OA+U0126组首先用K-S法检验正态分

布,多组间比较用单因素方差分析,方差齐用配对 t 检验,方差不齐用 Mann-Whitney U 秩和检验进行两两比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。实验中所有研究对象均纳入了统计学分析,避免了偏倚。

2 结果

2.1 大体观察 3组兔子实验前后的体重以及体重的变化各组两两比较差异无统计学意义,见表1。对照组软骨表面光滑较薄,色泽明亮,未见裂隙,触之较硬;关节滑膜未见增生和水肿等;关节液无渗出。OA+U0126组与对照组比较,软骨色泽稍暗,膝关节软骨表面稍增厚,关节内滑液明显增多。OA组软骨增厚变粗糙最明显,滑液最多。

表1 3组兔子的体重比较

kg, $\bar{x} \pm s$

组别	n	实验前	实验后	实验前后体重变化
对照组	8	1.93±0.05	2.36±0.08	2.16±0.06
OA组	8	1.99±0.05	2.38±0.07	2.17±0.06
OA+U0126组	8	2.00±0.06	2.44±0.07	2.20±0.07

2.2 关节软骨光镜下观察 OA组明显可见软骨表面增厚出现裂隙,软骨细胞增生,细胞基质失染以及细胞排列紊乱和簇集等典型骨关节炎改变。OA+U0126组软骨增厚、细胞增生排列紊乱等改变比OA组轻。见图1,2,3。实验后,OA+U0126组和OA组GAG含量均低于对照组(均 $P<0.05$);OA+U0126与OA组比较,GAG含量升高($P<0.01$)。OA+U0126组和OA组OARSI评分均明显高于对照组(均 $P<0.05$);OA+U0126组与OA组比较,OARSI评分降低($P<0.01$)。见表2。

2.3 蛋白免疫印迹 实验后,OA+U0126组和OA组P-ERK、MMP3含量较对照组均升高(均 $P<0.05$),LC3II/LC3I、ULK1和Beclin1含量较对照组均降低(均 $P<0.05$)。OA+U0126组与OA组比较,P-ERK、MMP3含量均降低(均 $P<0.05$),LC3II/LC3I、ULK1和Beclin1含量均升高(均 $P<0.05$)。见图4和表3。

表2 3组兔实验后GAG含量与OARSI评分比较 $\bar{x} \pm s$

分组	n	GAG(IOD)	OARSI评分(分)
对照组	8	0.244±0.007	0.500±0.270
OA组	8	0.123±0.005 ^a	9.750±0.850 ^a
OA+U0126组	8	0.179±0.006 ^{ab}	5.250±0.280 ^{ab}

与对照组比较,^a $P<0.05$;与OA组比较,^b $P<0.01$

表3 3组蛋白免疫印迹结果比较

$\bar{x} \pm s$

分组	n	P-ERK	MMP3	LC3II/LC3I	ULK1	Beclin1
对照组	8	0.20±0.01	0.16±0.01	2.32±0.08	0.36±0.01	0.40±0.01
OA组	8	0.45±0.03 ^a	0.28±0.02 ^a	0.75±0.04 ^a	0.17±0.01 ^a	0.16±0.01 ^a
OA+U0126组	8	0.30±0.02 ^{ab}	0.22±0.02 ^{ab}	1.05±0.06 ^{ab}	0.29±0.01 ^{ab}	0.29±0.02 ^{ab}

与对照组比较,^a $P<0.05$;与OA组比较,^b $P<0.05$

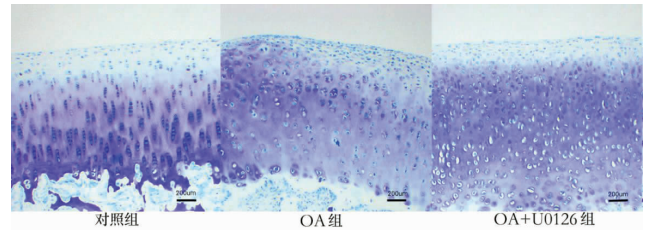


图1 甲苯胺蓝染色(倍数:10×10)

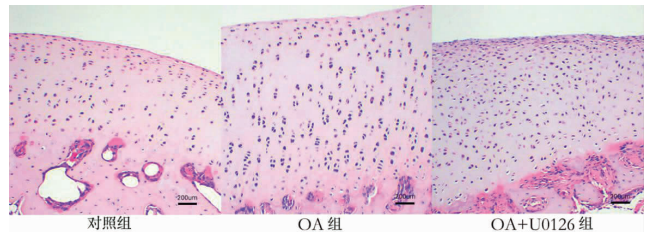


图2 HE染色(倍数:10×10)

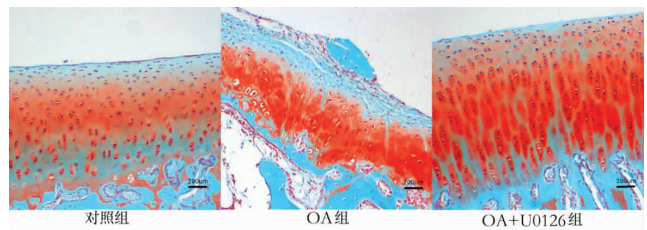


图3 番红-固绿染色(倍数:10×10)

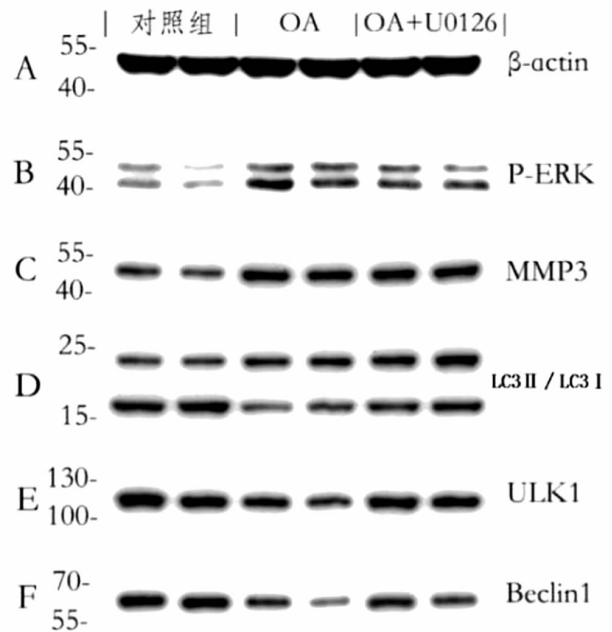


图4 3组蛋白免疫印迹检测结果比较

3 讨论

OARSI评分系统在2016年进一步修改,将分级细化,增加了0.5分、1.5分、2.5分、3.5分及4.5分等区间^[18]。根据新版OARSI评分以及我们之前的研

究结果,木瓜蛋白酶造模后 15d,软骨 OARSI 评分接近 12 分,可作为早期骨关节炎的临界点。因此,本实验设计在木瓜蛋白酶造模 15d 时将新西兰大白兔处死,取股骨内侧髁软骨标本进行研究。研究结果中,每组 OARSI 评分均小于 12 分,证实本实验成功建立了早期骨关节炎模型,而 OA+U0126 组中 OARSI 评分较 OA 组减少,差异具有统计学意义,提示膝关节腔注射 ERK 抑制剂 U0126 可部分逆转骨关节炎病理改变。

MMP3 作为 OA 的标记蛋白之一,与软骨细胞的退变密切相关。ERK 信号通路激活后发生磷酸化,可参与细胞的增殖分化生长等,当 ERK 过度激活时,可抑制细胞增殖及凋亡。本研究中,蛋白免疫印迹结果可见,ERK 抑制剂 U0126 经膝关节腔注射后,OA+U0126 组中 MMP3 含量比 OA 组低;组织学观察发现,OA+U0126 组中软骨表面侵犯、软骨细胞退变等病理改变比 OA 组轻,该结果支持前人对 ERK 信号通路在骨关节炎中作用的结论,证实了 ERK 信号通路在早期骨关节炎中对 MMP3 有调节作用,ERK 抑制剂 U0126 可减少 MMP3 的形成,减少关节软骨退变,抑制软骨细胞凋亡,从而减缓 OA 的发展。反向证明了 ERK 信号通路可加重骨关节炎改变,而且其作用机制与促进 MMP3 的生成密切相关。

本研究通过 ERK 抑制剂 U0126 行兔膝关节腔注射来观察细胞自噬的作用,发现 U0126 抑制后,自噬相关蛋白 Beclin1、ULK1 和 LC3II/LC3I 均明显升高。Beclin1,ULK1 和 LC3II/LC3I 分别于自噬的成核阶段和延长阶段起关键作用。成核阶段,在内质网和高尔基体中,哺乳类动物关键蛋白 mTOR 通过与 ULK1 复合物(ULK1、Atg13、Atg101 和 FIP200 组成)相互作用,将细胞外刺激信号整合成自噬特异性信号,然后 Beclin1 激活与 VPS34 和 VPS15 相组合成复合体,通过与多种自噬相关蛋白结合,从而诱导自噬体的形成。延长阶段,LC3 前体 LC3I 被自噬蛋白 Atg4B 迅速切割,被 Atg7 激活后,与 Atg3 和 Atg5-Atg12-Atg16 复合物连接起来,形成了具有能与自噬体膜相结合能力的 LC3II,从而识别细胞器。随后自噬体继续发育成熟,与溶酶体相融,形成自噬溶酶体并最终降解。本实验结果证明了 ERK 抑制剂 U0126 对细胞自噬的激活作用贯穿于整个自噬过程,ULK1 的改变提示 U0126 很可能在细胞自噬的成核阶段即产生了作用,加强了信号传导,激活了更多 Beclin1,吞噬了凋亡的软骨细胞器和细胞碎片并最终将其清除。由此,反向证明了 ERK 信号通路在早期骨关节炎中可抑制细胞自噬作

用,从而加重骨关节炎。

本研究通过抑制 ERK 信号通路,检测细胞自噬 3 个不同阶段的关键蛋白发现,细胞自噬很可能在成核阶段即受到 ERK 信号通路的调控作用,可减轻早期 OA 的病理改变。而本研究为动物实验,可完善体外试验进一步证实研究结论。今后研究将详细探究 ERK 信号通路对细胞自噬的具体作用机制,以及影响骨关节炎发生发展、影响细胞自噬的其他因素,从而为探索骨关节炎的治疗方案提供新思路。

【参考文献】

- [1] 李萍,马燕红.基质金属蛋白酶在骨关节炎中的作用[J].中国康复,2013,(3):218-222
- [2] Claire YJ, Philip GC. The role of synovitis in osteoarthritis[J]. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, 2010, 2(6):349-353.
- [3] Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthritis!) [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2013, 21(1):16-21.
- [4] Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of Osteoarthritis[J]. Rheumatic Disease Clinics of North America, 2013, 39(1):1-19.
- [5] Rousseau JC, Camero P. Biological markers in osteoarthritis[J]. Bone, 2012, 51(2):235-277.
- [6] 谢冰,肖乐,孔瑛,等.游泳运动对大鼠膝关节骨关节炎内质网应激 PERK 表达的影响[J].中国康复,2018,33(5):355-359.
- [7] Jagat RK, Rasika MS, Kuldeep K. Cissus quadrangularis inhibits IL-1 β induced inflammatory responses on chondrocytes and alleviates bone deterioration in osteotomized rats via p38 MAPK signaling[J]. Drug Des. Devel. Ther. 2015, 5(9):2327-2340.
- [8] Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins[J]. Autophagy, 2011, 7(3):279-296.
- [9] Lotz MK, Caramés B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2011, 7(10):579-587.
- [10] Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum. 2010, 62(3):791-801.
- [11] Shi J, Zheng C, Yi Z, et al. Explore the variation of MMP3, JNK, p38 MAPKs, and autophagy at the early stage of osteoarthritis[J]. IUBMB Life, 2016, 68(4):233-32.
- [12] Hiroshi S, Koji T, Takehiko M, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes[J]. Arthritis Rheum. 2012, 64(6):1920-1928.
- [13] Patingre S, Bauvy C, Codogno P. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(19):16657-16674.
- [14] Wang SH, Shih YL, Kuo TC, et al. Cadmium toxicity toward autophagy through ROS-activated GSK-3 β in mesangial cells[J]. Toxicol. Sci., 2009, 108(1): 124-131.
- [15] Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence[J]. FEBS J, 2010, 277(1):2-21.
- [16] Han W, Sun J, Feng L, et al. Autophagy inhibition enhances daunorubicin-induced apoptosis in K562 cells[J]. PLoS One, 2011, 6(12):e28491.
- [17] Pritzker, K P, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging[J]. Osteoarthritis Cartil. 2006, 14(1):13-23.
- [18] Waldstein W, Gay S, Jimenez SA, et al. OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system: A biomechanical evaluation in the human knee[J]. J. Orthop. Res. 2016, 34(1):135-140.