DOI:10.16016/j.1000-5404.201601132

白藜芦醇促进软骨细胞肥大化的作用机制研究

唐翔宇[1],曹 震[2],董世武[2],武继民[1] (300161 天津,军事医学科学院卫生装备研究所[1];400038 重庆,第三军医大学生物医学工程学院生物医学材料学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨白藜芦醇(resveratrol,RES)对软骨前体细胞 ATDC5 肥大化的影响及其可能机制。**方法** 通过 CCK-8 法研究不同浓度 RES 对 ATDC5 细胞活性的影响。建立软骨肥大化诱导体系,根据活性实验的安全浓度,设立对照组(0 μmol/L)和 RES 组(1 μmol/L)。qRT-PCR 和 Western blot 法确定肥大化相关因子 RUNX2、MMP13 和 COLX 表达变化;甲苯胺蓝和免疫组化分析细胞外基质粘多糖及 COLX、RUNX2 表达;利用 qRT-PCR 检测软骨细胞肥大化经典通路 WNT、IHH 和 FGF 中相关因子的表达变化。**结果** RES 安全使用浓度为 1 μmol/L;与对照组相比,在肥大化诱导 14 d 后,RES 组 ATDC5 细胞肥大化水平明显提升;RES 组肥大化相关基因表达量在 3、7、14 d 时明显增加;WNT 和 IHH 途径中促肥大化因子 β-catenin 和 GLI2 的表达水平在 RES 组较对照组升高,而 GLI3 表达水平下降。FGF 途径中 PI3K 的表达水平较对照组没有变化。**结论** RES 通过激活 β-catenin 及 GLI2,抑制 GLI3,促进 RUNX2 表达,实现促进 ATDC5 肥大化的目的。

[关键词] 软骨前体细胞;白藜芦醇;肥大化;软骨内成骨
[中图法分类号] R285.5; R322.71; R329.2 [文献标志码] A

Effect of resveratrol on chondrocyte hypertrophy and related mechanism

Tang Xiangyu[1], Cao Zhen[2], Dong Shiwu[2], Wu Jimin[1] ([1]Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin, 300161; [2]Department of Biomedical Material Sciences, School of Biomedical Engineering, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of resveratrol (RES) on hypertrophic differentiation of pre-chondrocyte cells (ATDC5) and related mechanism. **Methods** ATDC5 cells were treated with basal culture medium with different concentrations of RES for 24 h and 48 h, followed by CCK-8 assay. The hypertrophy inducing system was established. ATDC5 cells were divided into control group (0 μmol/L) and RES group (1 μmol/L). The expression levels of hypertrophy-related factors including RUNX2, MMP13 and collagens X (COLX) were detected using qRT-PCR and Western blotting. Toluidine blue staining for GAG and immunohistochemistry for COLX and RUNX2 were performed. Expression levels of altered transcriptional factors and key molecules in canonical chondrogenic pathways including WNT, IHH and FGF were examined by qRT-PCR. **Results** RES with concentration below 1 μmol/L had no toxic effect in this experiment. After induction with hypertrophy medium for 14 d, the hypertrophy of ATDC5 cells was increased after RES treatment. The treated ATDC5 cells showed a significant increase both at the mRNA and protein levels of hypertrophy-related genes including RUNX2, MMP13 and COLX on day 3, day 7, and day 14. The expression levels of β-catenin and GLI2 in the RES group were increased and that of GLI3 was decreased significantly. Expression of PI3K was not changed in the RES group. **Conclusion** RES promotes hypertrophy of ATDC5 cells by up-regulating β-catenin and GLI2, down-regulating GLI3 and promoting expression of RUNX2.

[**Key words**] pre-chondrocyte cells; resveratrol; hypertrophy; endochondral ossification

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30970724, 31271007) and the Natural Science Foundation of Tianjin (13JCZDJC33400). Corresponding author: Wu Jimin, E-mail: jiminwu@outlook.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30970724, 31271007);天津市自然科学基金(13JCZDJC33400)
[通信作者] 武继民,E-mail:jiminwu@outlook.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160407.0836.017.html(2016-04-07)

骨组织的形成有膜内成骨和软骨内成骨两种形式,其中软骨内成骨在骨骼发育过程中起主要作用[1]。了解软骨内成骨过程有助于理解人类骨骼疾病、骨损伤及骨修复的病理生理机制。间充质干细胞在膜内成骨过程中直接形成骨组织,而在软骨内成骨的过程中,骨髓间充质干细胞经历了分化为软骨细胞的中间过程。软骨内成骨开始于骨髓间充质干细胞聚集,之后骨髓间充质干细胞向软骨分化。软骨细胞成熟、增殖,并排列成生长板结构,成熟的软骨细胞会继续分化呈现肥大化表型。最后,肥大化软骨细胞发生终末分化继而凋亡。在此期间,血管组织侵入软骨细胞肥大化区域,新的骨组织替代肥大化软骨组织,形成骨骼[2]。因此,软骨细胞肥大化在软骨内成骨过程中作用显著,寻求促进软骨细胞肥大化的方法,有助于利用"软骨内成骨"途径修复骨缺损。

白藜芦醇(resveratrol,RES)是一种植物源非黄酮类多酚化合物。作为一种天然抗氧化剂,RES 已被用于心血管保护[3]和癌症的治疗[4]。近年来,在骨组织中对 RES 的研究越发广泛[5-6]。在骨骼系统中,RES 有促进纵骨生长的潜力[7]。也有研究发现,RES 通过抑制 PPARγ 通路,减少脊髓损伤小鼠骨流失[8]。这些结果提示 RES 在成骨过程中具有重要作用。而其对软骨细胞的作用,尤其是软骨细胞肥大化的影响尚少见报道。因此,本研究利用软骨细胞肥大化诱导培养体系,探讨 RES 对 ATDC5 细胞肥大化进程的影响,并对其可能机制进行了初探。

1 材料与方法

1.1 细胞及细胞培养

ATDC5 细胞株购于中科院上海细胞所。使用含 90% DMEM/F12,10% FBS 培养基,于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养 ATDC5 细胞。待 ATDC5 细胞融合率达到 90% 时传代。诱导 ATDC5 肥大化分化时,将 ATDC5 细胞铺于 6 孔板中,待细胞贴壁 8 h 后,使用含地塞米松 1%,100 ng/L T3 的软骨肥大化诱导培养基[9],并置于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养 14 d。在软骨培养体系中,设置对照组(0 μmol/L RES)及 RES 组(1 μmol/L RES),每 2 天更换新鲜肥大诱导培养基及 RES。

1.2 CCK-8 细胞活力检测

将 ATDC5 细胞以 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板。待细胞贴壁后,换以不同浓度(0、0.1、0.5、1、5、10、20 μmol/L) RES(Sigma Aldrich)培养基培养 24 和 48 h。将 10 μL Cell Counting Kit-8(CCK-8, Dojindo Laboratories)加入每孔,于 37 ℃孵育 4 h。使用分光光度计读取 450 nm 波长下每孔光密度值。以无细胞,含 CCK-8 溶液孔作为空白对照。根据试剂盒使用手册计算细胞增殖与光密度之间对应关系。

1.3 qRT-PCR

使用 TRIzol(TaKaRa Bio)提取培养于 6 孔板中细胞总 mRNA,并进行浓度测定。使用 PrimeScrip RT reagent Kit(TaKaRa Bio)逆转录每份样品 1 μg 总 mRNA。检测软骨及肥大化软骨细胞相关基因 ColX、MMP13、RUNX2 以及 β-catenin mRNA 表达水平,并使用 GAPDH 为内参基因。引物由华大基因合成,序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列
GAPDH	正义链:5′-GTTGTCTCCTGCGACTTCA-3′ 反义链:5′-GGTGGTCCAGGGTTTCTTA-3′
COLX	正义链:5′-CTTTCTGGGATGCCGCTTGT-3′ 反义链:5′-GGGTCGTAATGCTGCTGCCTA-3′
MMP13	正义链:5′-TTGATGCCATTACCAGTCTCCG-3′ 反义链:5′-CACGGGATGGATGTTCATATGC-3′
RUNX2	正义链:5′-CCAACTTCCTGTGCTCCGTG-3′ 反义链:5′-ATAACAGCGGAGGCATTTCG-3′
β-catenin	正义链:5′-GAGTCTGAAGTCGGGACCAC-3′ 反义链:5′-GATCGTCGGCTGGAACAC-3′
GLI2	正义链:5′-GTCACCAAGAAACAGCGTAA-3′ 反义链:5′-GATGGCTTTGATATGTAGGC-3′
GLI3	正义链:5′-ACAGCTCTACGGCGACTG-3′ 反义链:5′-GCATAGTGATTGCGTTTC-3′
PI3K	正义链:5′-CTCACGCAGGACACTTTG-3′ 反义链:5′-GTTGGTGGGTTGTTGGTT-3′

1.4 甲苯胺蓝及免疫组化染色

肥大化诱导 ATDC5 细胞 14 d 后,使用 4 ℃ PBS 清洗细胞 2 次,使用 4% 多聚甲醛固定 30 min,再用 4 ℃ PBS 清洗 2 次。使用 1% 甲苯胺蓝染料(Sigma Aldrich)对细胞染色室温孵育 30 min,后使用 PBS 清洗 2 次。免疫组化样品在固定后使用 H_2O_2(ZSGB-BIO),山羊血清(ZSGB-BIO)各孵育 10 min。使用对应一抗(Abcam)在合适浓度于 4 ℃过夜。然后按免疫组化试剂盒使用手册进行操作,并使用 Image-Pro plus 6.0 进行图像分析。

1.5 Western blot 分析

肥大化诱导培养 ATDC5 细胞达 3、7、14 d 时,使用 4 ℃PBS 清洗细胞 2 次后,用 RIPA(Beyotime)裂解液于 4 ℃冰上裂解 30 min。使用 BCA 试剂盒(Beyotime)检测各细胞裂解液蛋白浓度。使用 8% SDS-丙

烯酰胺凝胶,以 20 μg/孔上样并转膜于 0.2 μm PVDF 膜(Millipore)。使用5%脱脂奶粉封闭膜 2 h,并按照各目的蛋白分子量大小进行剪膜。分别使用 COLX、RUNX2 一抗(Abcam),于 4 ℃过夜孵育,后用二抗(Abcam)室温孵育 2 h。洗净二抗后,使用 DAB(Beyotime)试剂盒显影。

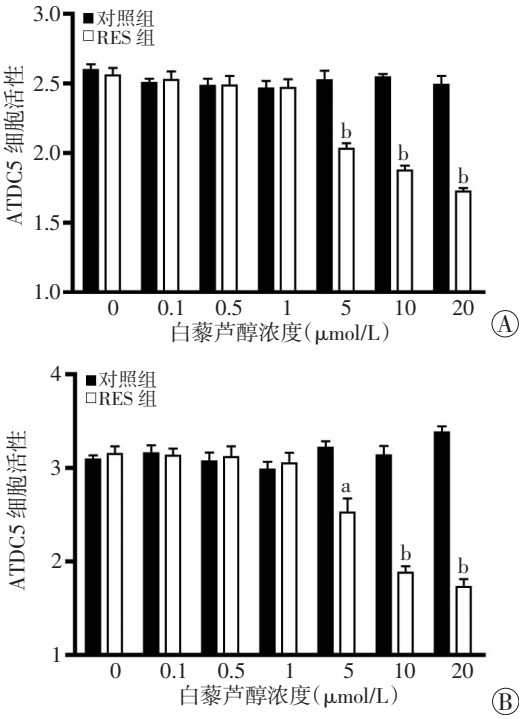
1.6 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间使用双尾,非成对 t 检验进行差异性分析。

2 结果

2.1 CCK-8 检测 RES 对 ATDC5 细胞活性的影响

通过 CCK-8 法分析不同浓度(0、0.1、0.5、1、5、10、20 μmol/L)RES 对 ATDC5 细胞活性的影响(图 1)。结果显示,RES 浓度低于 1 μmol/L 时,其对 ATDC5 活性没有影响。而 RES 浓度高于 5 μmol/L 时,ATDC5 活力受到抑制(24 h, $P<0.01$; 48 h, $P<0.05$)。所以本实验中采取 1 μmol/L RES 作为实验安全浓度。

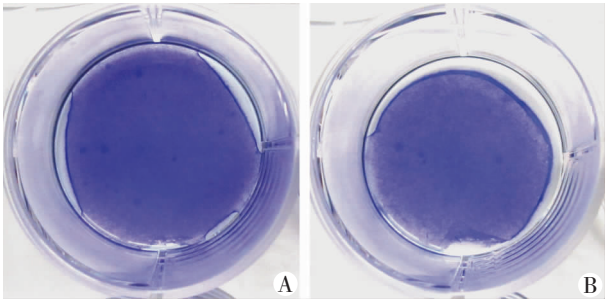


A:培养 24 h;B:培养 48 h;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 RES 组比较

图 1 不同浓度 RES 对 ATDC5 细胞活性的影响

2.2 RES 抑制 ATDC5 细胞胞外粘多糖表达情况

通过甲苯胺蓝染色的方法检测细胞外粘多糖含量变化。与对照组(0.153 ± 0.011)相比,使用含 1 μmol/L RES(0.111 ± 0.056)肥大化诱导培养基的 ATDC5 细胞表达更少($P=0.03$)的胞外粘多糖(图 2)。提示 RES 促进了 ATDC5 肥大化进程,从而减少细胞外粘多糖表达。



A:对照组;B:RES 组

图 2 甲苯胺蓝染色观察肥大诱导 14 d 细胞外粘多糖变化

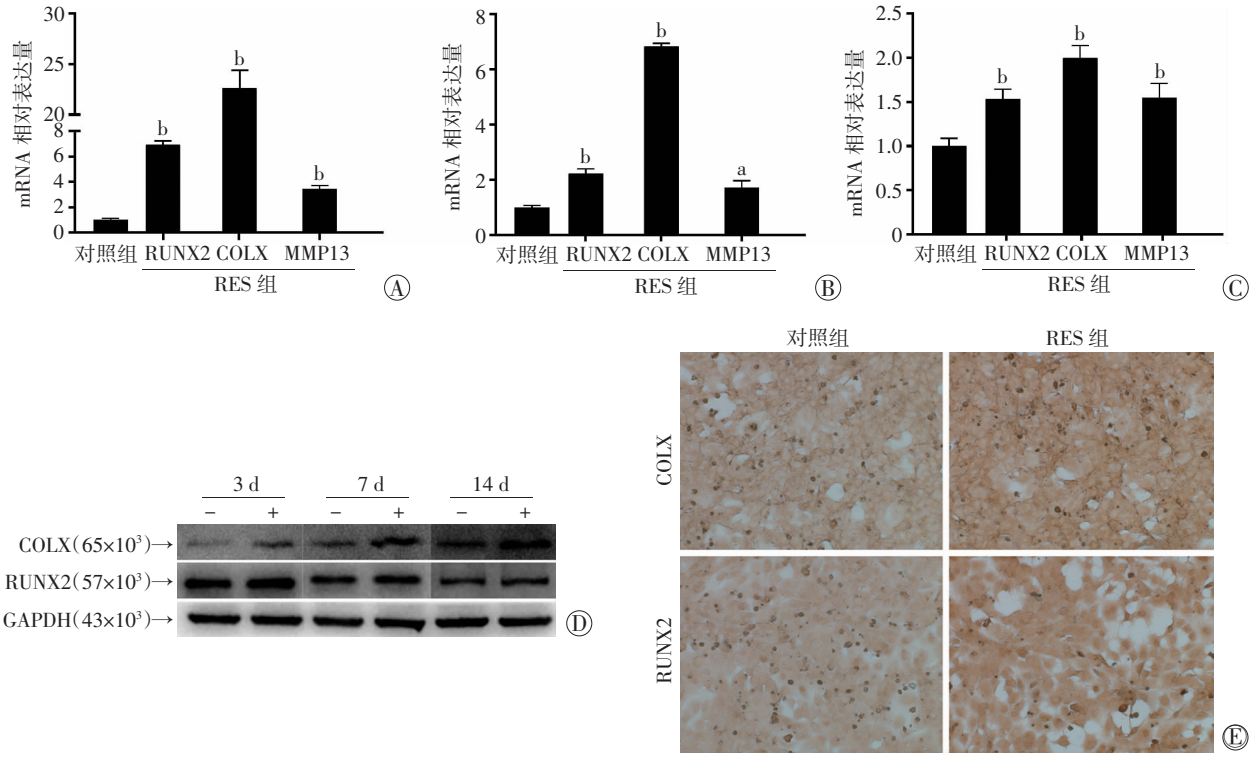
2.3 RES 促进 ATDC5 细胞肥大化相关基因表达情况

为了进一步阐明 RES 促进肥大化过程的机制,采用 qRT-PCR 方法检测了肥大化软骨细胞相关基因的表达水平。RES 处理组在 3、7、14 d RUNX2、COLX 和 MMP13 表达水平均高于对照组(图 3A ~ C)。但随时间推移,肥大化相关基因表达较对照组增势减缓。结果提示,RES 在促进软骨细胞肥大化早期作用更为明显。

Western blot 检测了肥大化相关蛋白 RUNX2 和 COLX 在蛋白水平含量的变化。与 mRNA 表达水平类似,在含有 RES 肥大化诱导培养 3、7、14 d 后,其蛋白表达量较对照组均有提升(图 3D)。免疫组化检测了 RES 组与对照组 14 d RUNX2 和 COLX 的表达变化。结果显示,RES 组 RUNX2 和 COLX 表达水平更高(图 3E)。提示,RES 提高了 ATDC5 细胞肥大分化水平。

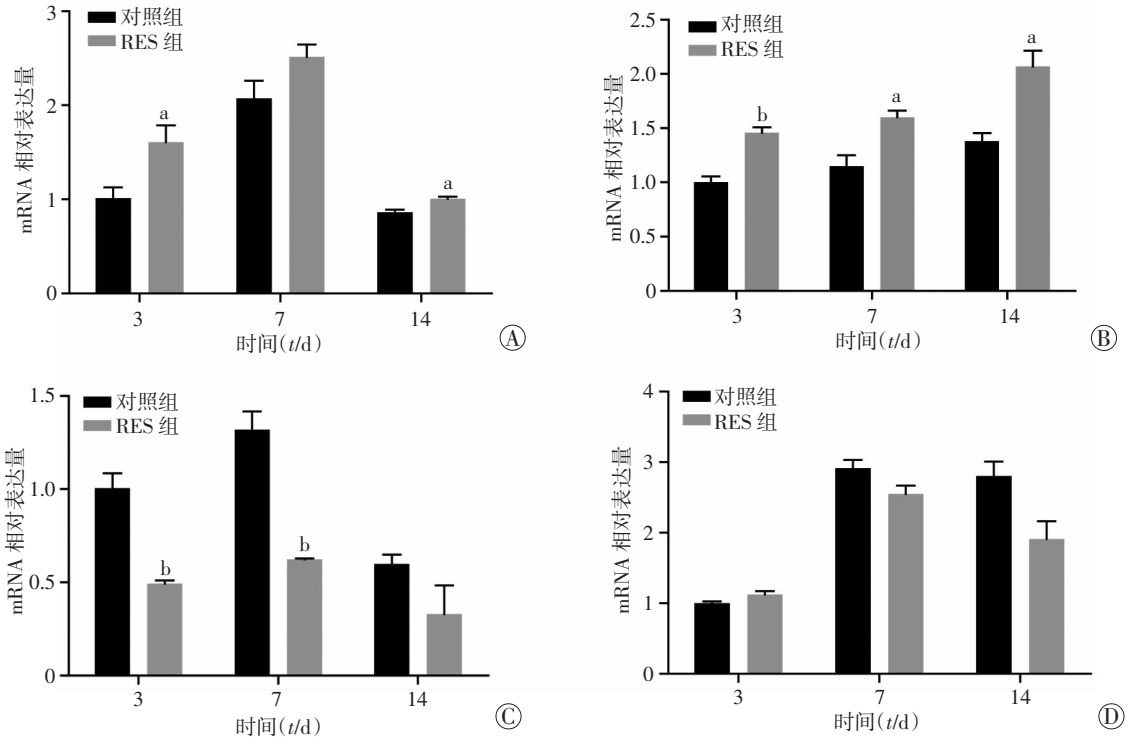
2.4 RES 通过上调 β-catenin 和 GIL2 信号促进 ATDC5 细胞肥大化

在 T3 存在的肥大化诱导培养基中,RES 明显促进了 ATDC5 细胞的肥大化进程。通过 qRT-PCR 的方法检验了软骨细胞肥大向分化过程中涉及的经典信号通路。发现在 RES 组中 β-catenin 的表达水平分别在 3、14 d 明显上升(图 4A)。结果提示,RES 通过促进 WNT/β-catenin 途径中 β-catenin 的表达,促进 ATDC5 肥大分化。另外,RES 组中 GLI2 的表达水平在第 3、7、14 天均高于对照组,而 GLI3 表达水平与之相反(图 4B、C)。由此推测,RES 激活了 IHH 通路,从而促进细胞整体向肥大化分化。而在检测促进软骨细胞肥大化通路中关键因子 PI3K 时,发现 PI3K 表达在 3、7、14 d 均没有变化(图 4D)。这一结果提示,PI3K 分子可能未参与 RES 介导的 ATDC5 细胞肥大化过程。



A~C:qRT-PCR 检测 3、7、14 d 肥大化相关基因表达;D:Western blot 检测 3、7、14 d 肥大化相关基因表达;E:免疫组化检测肥大诱导第 14 天 COLX 和 RUNX2 表达 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 3 ATDC5 细胞肥大化相关基因变化



A:β-catenin 表达;B:GLI2 表达;C:GLI3 表达;D:PI3K 表达;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 4 qRT-PCR 检测 WNT、IHH 及 FGF 途径相关分子表达

3 讨论

RES 作为一种天然多酚类物质,在多种细胞模型中被证实具有抗炎[10]和抗氧化[11]的作用。因此,研究人员认为 RES 具有治疗多种疾病的潜力,其中,包括骨组织相关疾病[7-8]。本实验中,我们发现 RES 能促进 ATDC5 细胞的肥大化进程,使之软骨内成骨能力增强。这个现象与早期研究发现 RES 饲雌兔能促进骨发育[7]现象一致。在诱导 ATDC5 细胞肥大化的过程中,RES 促进 RUNX2 基因表达。作为受转录因子 RUNX2 直接调控的下游基因[12],COLX 的表达量在 RUNX2 表达升高时增加。RES 促进软骨细胞肥大化标志蛋白 COLX 表达的现象,提示 RES 能够促进细胞肥大化进程。同样,RUNX2 蛋白水平的提升,进一步促进了 MMP13 的表达。MMP13 能够降解构成软骨细胞外基质主要成分的Ⅰ型、Ⅱ型胶原[13]。在本实验中,MMP13 表达量上升可能是 RES 组在诱导 14 d 后细胞外粘多糖含量下降的原因。但也有研究指出,RES 能抑制 hMSC 软骨分化期间 MMP13 表达[14]。提示,RES 参与了整个软骨内成骨过程,促进了软骨分化的同时,也加速了成熟软骨肥大化进程。

前期的诸多研究已证明 WNT[15]、IHH[16]以及 FGF[17]途径在调控软骨细胞肥大化过程中的关键作用。在生长板中,成熟的软骨细胞肥大向分化过程时表达 WNT5A 和 WNT5B。而 $Wnt5a^{-/-}$ 小鼠表现为严重的软骨肥大化停滞[18]。选择性激活小鼠成熟软骨细胞内 WNT 下游分子 β-catenin 的表达,可以得到肥大型软骨细胞[19],说明 β-catenin 在成熟软骨细胞肥大分化过程中扮演重要角色。本研究发现 RES 组 β-catenin 表达量上升,因此我们认为 RES 通过激活 WNT/β-catenin 途径中 β-catenin 的表达促进软骨细胞肥大化。此外,WNT 信号通路还与 FGF 信号通路共同调控软骨细胞肥大化[17]。有研究指出,在兔软骨细胞中,RES 通过 PI3K/Akt 途径促进 COLⅡ表达维持软骨形态[20]。但在诱导软骨细胞肥大化过程中检测 FGF 信号通路中关键因子 PI3K 分子表达时,没有发现 PI3K 表达变化。推测,RES 促肥大化的过程中可能没有通过 FGF/PI3K 途径。前期的研究表明,$IHH^{-/-}$ 小鼠表现出软骨内成骨进程受阻[16]。在调控软骨细胞肥大化过程中,IHH 信号通路下游的 GLI2 和 GLI3 分子扮演相反的角色。Ohba 等[21]发现抑制子形式 GLI3(Glirep)抑制 RUNX2 转录功能,而 GLI2 分子却受到 IHH 下游信号分子 SMO 调控,生成 GLI2A 以促进 RUNX2 表达[22]。这与本研究中的发现一致,推测 RES 也通过激活 IHH 途径内 GLI2,同时抑制 GLI3 达到促进 ATDC5 细胞肥大化的目的。在后续的研究中,将采用干扰相关基因的方法,进一步论证此推测。

总之,本研究证明了 RES 可加速 ATDC5 细胞肥大化进程。RES 有望作为一种潜在药物,应用于基于软骨内成骨的骨损伤修复过程中。

参考文献:

[1] Yang Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009, 19(3): 197-218. DOI: 10.1242/dev.041624

[2] Long F, Ornitz D M. Development of the endochondral skeleton[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(1): a008334. DOI:10.1101/cshperspect.a008334

[3] Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury[J]. EurJ Pharmacol, 2004, 489(1/2): 39-48. DOI:10.1016/j.ejphar.2004.02.031

[4] Gwak H, Kim S, Dhanasekaran D N, *et al*. Resveratrol triggers ER stress-mediated apoptosis by disrupting N-linked glycosylation of proteins in ovarian cancer cells[J]. Cancer Lett, 2016, 371(2): 347-353. DOI:10.1016/j.canlet.2015.11.032

[5] Bhattarai G, Poudel S B, Kook S H, *et al*. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis[J]. Acta Biomater, 2016, 29: 398-408. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.10.031

[6] Zhao L, Wang Y, Wang Z, *et al*. Effects of dietary resveratrol on excess-iron-induced bone loss *via* antioxidative character[J]. J Nutr Biochem, 2015, 26(11): 1174-1182. DOI:10.1016/j.jnutbio.2015.05.009

[7] Karimian E, Tamm C, Chagin A S, *et al*. Resveratrol treatment delays growth plate fusion and improves bone growth in female rabbits[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67859. DOI: 10.1371/journal.pone.0067859

[8] Wang H D, Shi Y M, Li L, *et al*. Treatment with resveratrol attenuates sublesional bone loss in spinal cord-injured rats [J]. Br J Pharmacol, 2013, 170(4): 796-806. DOI:10.1111/bph.12301

[9] 康菲, 杨波, 闫演飞, 等. miR-145 在间充质干细胞来源软骨细胞肥大化中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11): 1058-1061.

[10] Losada-Barreiro S, Costa M, Bravo-Diaz C, *et al*. Distribution and Antioxidant Efficiency of Resveratrol in Stripped Corn Oil Emulsions[J]. Antioxidants (Basel), 2014, 3(2): 212-228. DOI:10.3390/antiox3020212

[11] Pektas M B, Sadi G, Koca H B, *et al*. Resveratrol Ameliorates the Components of Hepatic Inflammation and Apoptosis in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes[J]. Drug Dev Res, 2016, 77(1):12-19. DOI:10.1002/ddr.21287

[12] Zheng Q, Zhou G, Morello R, *et al*. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression *in vivo*[J]. J Cell Biol, 2003, 162(5): 833-842. DOI:10.1083/jcb.200211089

[13] Fosang A J, Last K, Knauper V, *et al*. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13)[J]. FEBS Lett, 1996, 380(1/2): 17-20. DOI: 10.1016/0014-5793(95)01539-6

[14] Wu G, Wang L, Li H, *et al*. Function of sustained released resveratrol on IL-1beta-induced hBMSC MMP13 secretion inhibition and chondrogenic differentiation promotion[J]. J Biomater Appl, 2016, 30(7): 930-939. DOI:10.1177/0885328215614425

[15] Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, *et al*. Roles of beta-catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells[J]. Lab Invest, 2011, 91(12): 1739-1752. DOI:10.1038/labinvest.2011.144

[16] St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon A P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation[J]. Genes Dev, 1999, 13(16): 2072-2086.

[17] Maruyama T, Mirando A J, Deng C X, *et al*. The balance of WNT and FGF signaling influences mesenchymal stem cell fate during skeletal development[J]. Sci Signal, 2010, 3(123): ra40. DOI:10.1126/scisignal.2000727

[18] Yang Y, Topol L, Lee H, *et al*. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation[J]. Development, 2003, 130(5): 1003-1015. DOI: 10.1242/dev.00324

[19] Zhu M, Tang D, Wu Q, *et al*. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(1): 12-21. DOI: 10.1359/jbmr.080901

[20] Eo S H, Cho H S, Kim S J. Resveratrol regulates type Ⅱ collagen and COX-2 expression *via* the ERK, p38 and Akt signaling pathways in rabbit articular chondrocytes[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(3): 640-648. DOI: 10.3892/etm.2014.1484

[21] Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, *et al*. Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity[J]. Dev Cell, 2008, 14(5): 689-699. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.03.007

[22] Joeng K S, Long F. The Gli2 transcriptional activator is a crucial effector for Ihh signaling in osteoblast development and cartilage vascularization[J]. Development, 2009, 136(24): 4177-4185. DOI:10.1242/dev.041624

(收稿:2016-01-25;修回:2016-03-17)

(编辑 黄 超)