DOI:10.16016/j.2097-0927.202302029

ATG5 通过细胞自噬调控Ⅱ型胶原表达的实验研究

邓 琳[1],先梦麟[1],杨玉有[1],耿娜娜[1],邝 彪[2],郭风劲[1] 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院骨科[2]

[**摘要**] **目的** 探究自噬相关蛋白 ATG5 通过影响自噬功能调控软骨细胞中Ⅱ型胶原的表达水平。**方法** GEO 数据库下载 13 例人软骨组织样本的转录组数据分析 ATG5 和 COL2A1 表达的相关性。雷帕霉素(Rapamycin,Rapa)和巴佛洛霉素 A1(Bafilomycin A1,BafA1)处理人软骨细胞 C28/I2,Western blot 及免疫荧光检测Ⅱ型胶原(CollagenⅡ,COL2)的表达水平。构建人源 COL2A1 启动子质粒,双荧光素酶报告实验检测过表达 ATG5 对 COL2A1 启动子转录活性的影响。mRFP-GFP-LC3 自噬双标腺病毒动态监测过表达和敲低 ATG5 后自噬流的变化。Western blot 检测过表达或敲低 ATG5 后 Rapa 及 BafA1 对 COL2、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ表达水平的影响。**结果** GEO 数据库相关性分析结果显示在人软骨组织中 ATG5 和 COL2A1 的 mRNA 表达呈现正相关;Rapa 和 BafA1 分别显著促进和抑制 C28/I2 细胞 COL2 的表达($P<0.05$);成功构建人源 COL2A1 启动子质粒,并用双荧光素酶报告实验证实过表达 ATG5 上调 COL2A1 启动子转录活性($P<0.01$);自噬双荧光病毒处理后,过表达 ATG5 组 LC3-GFP 荧光淬灭($P<0.01$),自噬激活;敲低 ATG5 后,LC3-GFP 荧光增强($P<0.05$),自噬抑制;Rapa 促进过表达 ATG5 上调的 COL2 和 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的表达($P<0.05$),BafA1 显示与 Rapa 相反的作用($P<0.05$)。**结论** 过表达 ATG5 上调Ⅱ型胶原的表达,且 ATG5 调控Ⅱ型胶原的表达依赖于细胞自噬。

[**关键词**] 骨关节炎;软骨细胞;Ⅱ型胶原;细胞自噬;ATG5

[**中图法分类号**] R394-33; R394.3; R684.302 [**文献标志码**] A

ATG5 regulates type Ⅱ collagen expression by modulation of autophagy

DENG Lin[1], XIAN Menglin[1], YANG Yuyou[1], GENG Nana[1], KUANG Biao[2], GUO Fengjin[1] [1]Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the regulative effect of autophagy-related protein ATG5 on the expression of type Ⅱ collagen in human chondrocytes through affecting autophagy function. **Methods** Transcriptome data of 13 human cartilage tissue samples were downloaded from GEO database to analyze the correlation between ATG5 and COL2A1 expression. Western blotting and immunofluorescence assay were used to detect the expression of type Ⅱ collagen (Collagen Ⅱ, COL2) in human chondrocytes C28/I2 after rapamycin (Rapa) and bafilomycin A1 (BafA1) treatment. Human COL2A1 promoter plasmid was constructed, and dual-luciferase reporter assay was applied to detect the effect of overexpression of ATG5 on COL2A1 promoter activity. mRFP-GFP-LC3 autophagy dual fluorescent virus was used to dynamically monitor the changes in autophagic flux of C28/I2 cells with overexpression and knockdown of ATG5. Western blotting was used to detect the effects of Rapa and BafA1 on COL2, LC3Ⅱ/LC3Ⅰ expression levels after overexpression or knockdown of ATG5. **Results** The results of correlation analysis showed a positive

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81871769);重庆市博士后研究项目特别资助(2020-379-46)

[**通信作者**] 郭风劲,E-mail: guo.fengjin@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

correlation between the mRNA expression of ATG5 and COL2A1 in human chondrocytes samples. Rapa and BafA1 significantly promoted and inhibited the expression of COL2 in C28/I2 cells ($P<0.05$), respectively. The human COL2A1 promoter plasmid was successfully constructed, and the transcriptional activity of the COL2A1 promoter was up-regulated by the overexpression of ATG5 ($P<0.01$). Treatment with autophagy dual-fluorescence virus resulted in LC3-GFP fluorescence quenching after overexpression of ATG5 ($P<0.01$), suggesting autophagy activation; and a greater fluorescence intensity of LC3-GFP was observed after knockdown of ATG5 ($P<0.05$), demonstrating autophagy inhibition. Rapa obviously promoted the expression of COL2 and LC3Ⅱ/LCⅠ, which were up-regulated by ATG5 ($P<0.05$), but BafA1 showed the opposite effect of Rapa ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of ATG5 up-regulates the expression of type Ⅱ collagen, and the regulation of ATG5 on the expression of type Ⅱ collagen depends on autophagy in chondrocytes.

[**Key words**] osteoarthritis; chondrocytes; type Ⅱ collagen; autophagy; ATG5

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81871769) and the Special Postdoctoral Science Foundation of Chongqing (2020-379-46). Corresponding author: GUO Fengjin, E-mail: guo.fengjin@cqmu.edu.cn

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种多发于中老年人群的关节疾病,常发病于膝、脊柱、髋、踝等负重大、活动多的关节,严重危害中老年人的身心健康[1-3]。OA 的病理特点为关节软骨变性破坏,其中软骨细胞损伤和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的进行性降解是主要的病理特征[4-5]。软骨细胞外基质主要由蛋白多糖和胶原组成,其中Ⅱ型胶原(collagen Ⅱ, ColⅡ)是维持软骨组织完整性和刺激软骨细胞生长和再分化的主要功能蛋白[6]。研究表明Ⅱ型胶原表达水平的下调会加速骨关节炎的进程,因此,维持Ⅱ型胶原的正常表达对于预防和治疗骨关节炎至关重要[7-8]。

细胞自噬是一种普遍存在的细胞生存机制,通过将细胞内需要水解的细胞质大分子和衰老细胞器输送到溶酶体进行降解和循环,以维持细胞的正常稳态[9]。已有研究表明,在骨关节炎患者的损伤软骨组织中,自噬水平下调,ULK1、LC3 等自噬标志物的表达降低,同时软骨细胞凋亡增加,说明自噬水平与骨关节炎的发生和发展密切相关[10]。同时,自噬作为真核细胞的一种自我修复的保护机制,正常激活可以一定程度上促进软骨合成代谢,缓解细胞焦亡,为软骨细胞的生长提供有益的微环境,缓解骨关节炎的进程[11]。

研究报道 ATG5 是自噬过程中的一个关键基因,它与 ATG12/16L、LC3 等自噬相关蛋白共同参与自噬小体的延伸,推动自噬的进程[12]。研究发现,软骨细胞特异性敲除 ATG5 基因会导致软骨细胞活力下降,增殖速度减慢,更多的软骨细胞死亡,细胞外基质中蛋白多糖和胶原的分解增加,Ⅱ型胶原的表达下调[13]。这些结果表明,ATG5 通过调节软骨细胞的代谢和细胞外基质的合成在软骨细胞中发挥着重要的生理功能。本研究旨在探讨 ATG5 是否可以调控Ⅱ型胶原的表达,以及该调控过程与细胞自噬的关系,更好地理解骨关节炎的发病机制,有望为骨关节炎的临床诊疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

重组腺病毒 Ad-siATG5 及 pcDNA-ATG5 质粒由本实验室前期构建[14]。RPMI1640、DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自 Gibco;抗体:GAPDH、CollagenⅡ、LC3B、ATG5 购自武汉三鹰生物技术有限公司(Proteintech);自噬激动剂和抑制剂:雷帕霉素(Rapamycin, Rapa)(Solarbio)、巴佛洛霉素 A1 (Bafilomycin A1, BafA1)(Selleck)、SYBR qPCR mix (Vazyme)、PVDF 膜(Millipore)、Trizol(Thermo Scientific)、八连管(Thermo Scientific)、RIPA 裂解液(强)(Beyotime)、DH5α 感受态细胞(TaKaRa)、逆转录 RT Master Mix (MCE)、质粒提取试剂盒(Omega)、mRFP-GFP-LC3 自噬双标腺病毒(汉恒生物)、双荧光素酶报告检测试剂盒 Dual-Luciferase® Reporter Assay System(Promega)。

1.2 方法

1.2.1 ATG5 和 COL2A1 相关性的数据库分析 使用 Gene Expression Omnibus 数据库(GEO database, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)中的 GSE10024[15]和 GSE183954[16]表达矩阵数据。这些数据包含 13 例来自正常软骨组织样本的表达值信息。进一步分析 ATG5 和 COL2A1 的 mRNA 表达值之间的相关性,探究它们之间的可能关联。使用 Graphpad Prism 9 软件对数据进行统计分析,计算它们之间的相关系数和显著性水平。

1.2.2 细胞培养 人软骨细胞 C28/I2 由美国纽约大学医学院刘传聚教授惠赠,293T 人胚肾细胞由本实验室保存。将 C28/I2 细胞培养在含 10%胎牛血清的培

养基中,置于温度为 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养,待细胞生长至 85%密度时进行传代培养,用于后续实验。

1.2.3 免疫荧光 C28/I2 细胞贴壁生长后约 85%密度时,加入胰酶消化并将细胞接种至细胞爬片,待细胞贴壁后加入 Rapa 作用 6 h、BafA1 作用 24 h 后加入 4%多聚甲醛固定细胞,依次进行 0.5% TritonX-100 通透 10 min,ddH_2O 水洗,COL2 一抗 4 ℃过夜(1∶200),ddH_2O 水洗,荧光二抗室温避光孵育 4 h,ddH_2O 水洗,DAPI 避光孵育 5min,抗荧光衰减封片剂封片后,共聚焦显微镜下拍摄结果[17-21]。

1.2.4 自噬双荧光病毒实验 C28/I2 细胞贴壁生长后约 85%密度时,加入胰酶消化并将细胞接种至细胞爬片,待细胞贴壁后加入自噬双标腺病毒(mRFP-GFP-LC3)感染 C28/I2 细胞 6 h 后换液,24 h 后显微镜下观察到红绿荧光说明病毒感染成功,观察不同处理后 LC3-GFP 荧光强度,当自噬溶酶体形成后,酸性环境使 GFP 荧光淬灭,而 mRFP 荧光不受影响,自噬溶酶体呈现红色荧光。将 LC3-GFP 与 mRFP 荧光强度的比值进行统计分析,反映 LC3 进入自噬溶酶体的水平。

细胞分组如下。①Rapa 激活软骨细胞自噬验证:Rapa 激活软骨细胞自噬分为 0、6、12 h 组。加入 Rapa(25 μmol/L)分别作用于 C28/I2 细胞 0、6、12 h 时观察 LC3-GFP 荧光强度[17]。②BafA1 抑制软骨细胞自噬验证:BafA1 抑制软骨细胞自噬分为 0、12、24、36、48 h 组。加入 BafA1(500 nmol/L)分别作用于 C28/I2 细胞 0、12、24、36、48 h 时观察 LC3-GFP 荧光强度[17]。③过表达 ATG5 激活软骨细胞自噬:过表达 ATG5 与自噬激活剂、抑制剂共处理分为 NC 组(对照组)、pcDNA-ATG5 组、pcDNA-ATG5+Rapa 组、pcDNA-ATG5+BafA1 组。用 pcDNA-ATG5 质粒转染细胞,6 h 更换完全培养基后加入 Rapa(25 μmol/L)处理 6 h、BafA1(500 nmol/L)处理 24 h 后观察 LC3-GFP 荧光强度[17]。④敲低 ATG5 抑制软骨细胞自噬:Ad-siATG5 与自噬激活剂、抑制剂共处理分为 NC 组(对照组)、Ad-siATG5 组、Ad-siATG5+Rapa 组、Ad-siATG5+BafA1 组。用 Ad-siATG5 腺病毒感染细胞,24 h 后显微镜下观察到荧光说明病毒感染成功,加入 Rapa(25 μmol/L)处理 6 h、BafA1(500 nmol/L)处理 24 h 后观察 LC3-GFP 荧光强度[17]。

1.2.5 pGL3-COL2A1 启动子重组质粒的构建 在 NCBI 查询人 COL2A1 基因启动子序列(Gene ID:1280),根据 COL2A1 基因启动子区-1267→+285 区间的编码序列设计引物,扩增 COL2A1 基因启动子,目的片段大小约为 1 500 bp,琼脂糖凝胶电泳鉴定片段大小后切胶回收。将 pGL3-basic 载体质粒进行双酶切(Mlu Ⅰ、BgI Ⅱ),酶切后的 pGL3-basic 载体质粒为 4 818 bp,将上述回收的 PCR 产物片段(1 500 bp)连接入线性化载体,转化涂板后挑取单克隆菌落,加 LB 培养基 37 ℃摇床培养 12~16 h,提取质粒送北京擎科生物科技有限公司进行测序验证。

1.2.6 Western blot 检测相关蛋白表达 接种 C28/I2 细胞于 6 孔板中,待细胞长满约 85%密度时,按 1.2.4 细胞分组作相应处理,RIPA 裂解液提取细胞蛋白,SDS-PAGE 胶分离,300 mA 恒流,103/min 转移目的蛋白至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,anti-GAPDH(1∶7 500),其余一抗(1∶1 000)4 ℃过夜,TBST 洗膜,孵育二抗羊抗兔(1∶10 000)室温 2 h,TBST 洗膜,ECL 显影。

1.2.7 qPCR 检测 C28/I2 细胞接种于 6 孔板中,待密度约 85%时转染 pcDNA-ATG5 质粒,48 h 后加 TRIzol 裂解细胞提取 RNA,将 RNA 参照试剂盒说明书逆转录为 cDNA,进行 qPCR 实验。COL2 正义链:5′-TGGACGATCAGGCGAAACC-3′,反义链:5′-GCTGCG-GATGCTCTCAATCT-3′;GAPDH 正义链:5′-GGAGCG-AGATCCCTCCAAAAT-3′,反义链:5′-GGCTGTTGTCA-TACTTCTCATGG-3′。

1.2.8 荧光素酶活性检测 293T 细胞接种于 12 孔板,待细胞贴壁生长约 70%密度时使用 PEI 进行转染,设置 4 组,每组 3 个复孔,分别为阴性对照组(pGL3-basic 质粒:500 ng);阳性对照组(pGL3-control 质粒:500 ng);COL2A1 组(pGL3-COL2A1 质粒:500 ng);ATG5+COL2A1 组(pGL3-COL2A1 质粒、pcDNA-ATG5 质粒各 500 ng);ATG5+BafA1+COL2A1 组(质粒用量同 ATG5+COL2A1 组,转染后加入 BafA1 处理细胞 24 h)。所有实验组和对照组细胞转染 24 h 后,按照试剂盒说明加入裂解液室入温裂解 10 min,离心 20 s(12 000 r/min),吸取上清液至新的 EP 管中,避光下依次加入 LAR Ⅱ和 Stop & Glo® Reagent 使用 Promega GloMax® Luminometer 单管发光检测仪进行检测,得到的 RLUs 为荧光比值,反映样品荧光素酶的活性,即启动子的活性。

1.3 统计学分析

数据处理软件为 GraphPad Prism 9。计量资料表示为 $\bar{x}\pm s$,采用独立样本 t 检验及单因素方差分析的方法,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验独立重复 3 次。

2 结果

2.1 人软骨组织样本中 ATG5 和 COL2A1 表达呈正相关

GEO 数据库相关性分析结果显示,在 13 例人软骨组织样本中 ATG5 和 COL2A1 的 mRNA 表达水平呈现正相关($r^2=0.623\ 2$,$P<0.05$)。

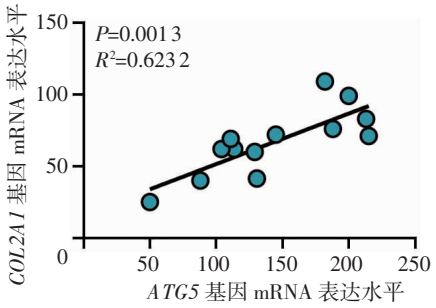


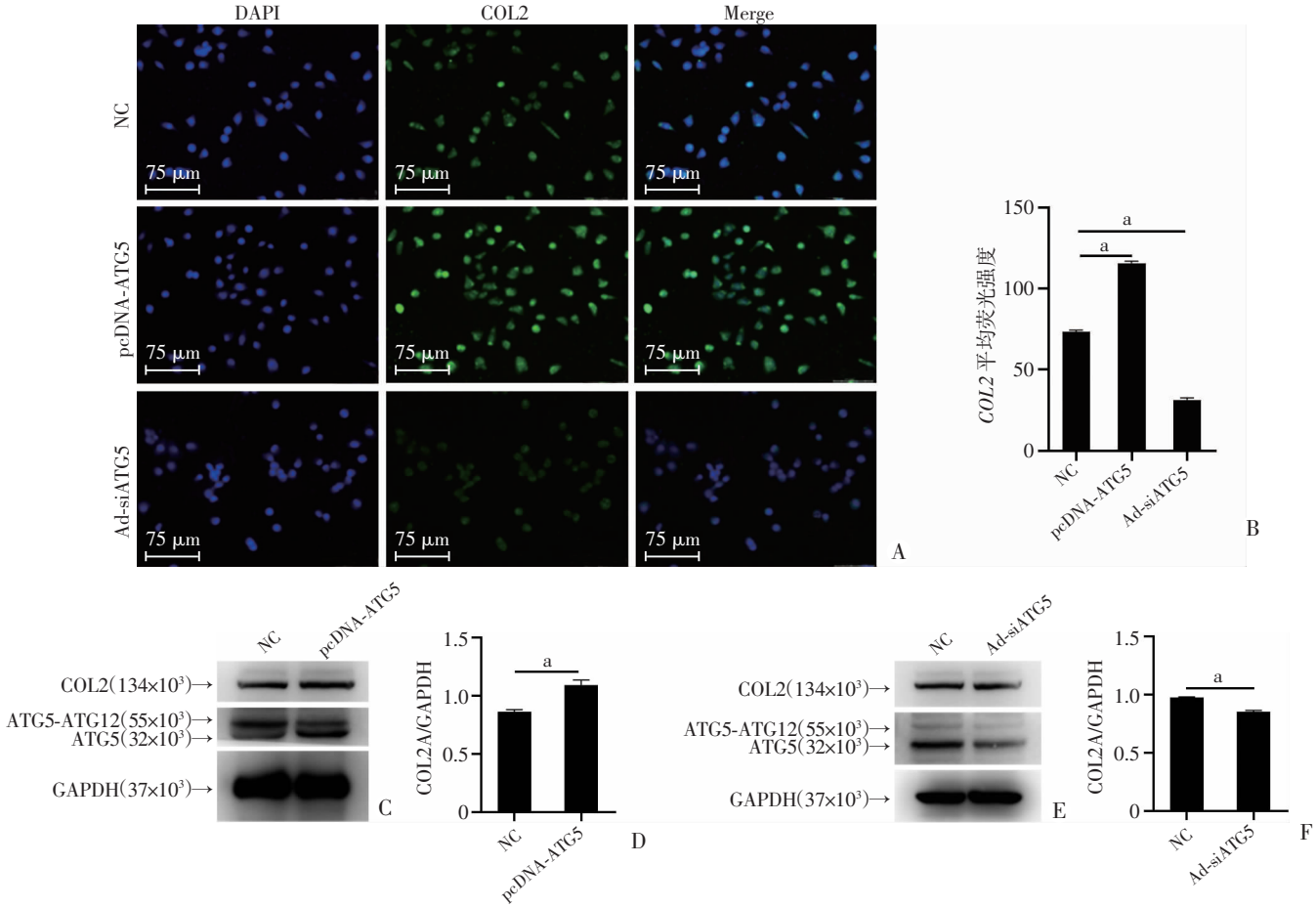
图 1 人正常软骨组织样本中 ATG5 和 COL2A1 基因表达值相关性分析

2.2 软骨细胞中 ATG5 上调 COL2A1 的表达水平

为了探究 ATG5 是否调控Ⅱ型胶原的表达,在 C28/I2 细胞中转染 pcDNA-ATG5 过表达质粒,免疫荧光结果显示相较于对照组(NC),过表达 ATG5 后 COL2荧光强度明显升高(P<0.01),敲低ATG5表达后 COL2 荧光强度显著下降(P<0.01,图 2A、B)。Western blot 结果显示过表达 ATG5 成功,且显著促进 COL2 的表达(图 2C、D);腺病毒 Ad-siATG5 成功感染 C28/I2 细胞且敲低 ATG5 的表达后,相较于对照组(NC),COL2 的表达水平也随之下降(图 2E、F)。

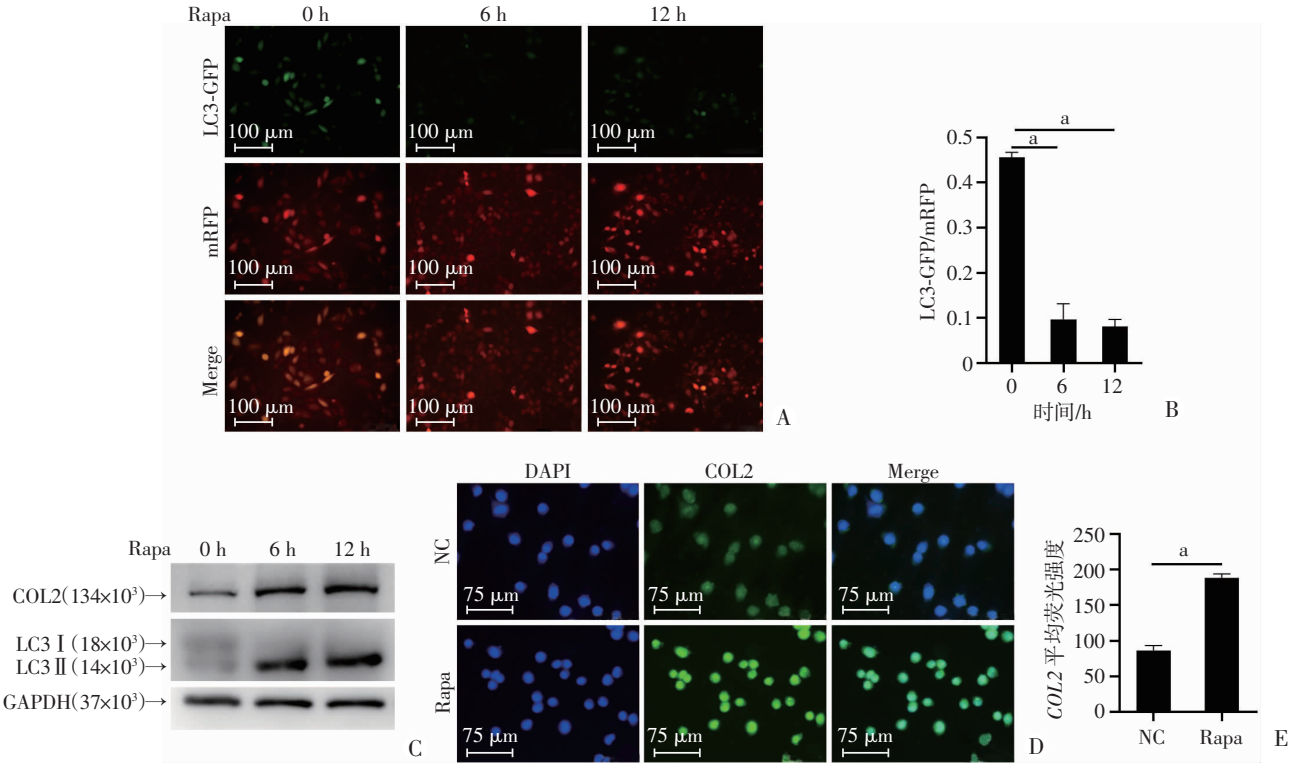
2.3 软骨细胞中激活自噬后 COL2 表达水平上升

为了探究 ATG5 对 COL2 表达的调控作用与细胞自噬的关系,利用 mRFP-GFP-LC3 自噬双标腺病毒对自噬流进行定量分析,结果显示在加入 Rapa 处理 6 h 和 12 h 后,LC3-GFP 荧光均发生淬灭,自噬小体和溶酶体融合成为自噬溶酶体,自噬激活(P<0.01,图 3A、B)。Western blot 结果显示 COL2、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ 表达水平随 Rapa 激活自噬的作用时间延长同步升高(P<0.01,图 3C)。免疫荧光结果再次证实,与对照组(NC)相比,Rapa 处理 6 h 激活自噬后,COL2 的荧光强度显著增强(P<0.01,图 3D、E)。



A:免疫荧光检测 C28/I2 细胞中转染 pcDNA-ATG5 质粒及 Ad-siATG5 腺病毒后 COL2 的表达水平;B:COL2 荧光强度的定量分析;C:Western blot 检测 C28/I2 细胞转染 pcDNA-ATG5 质粒后 COL2 的表达水平;D:COL2 表达水平的定量分析;E: Western blot 检测 C28/I2 细胞转染 Ad-siATG5 腺病毒后 COL2 的表达水平;F:COL2 表达水平的定量分析;a: P<0.01

图 2 ATG5 调控 COL2A1 的表达水平



A:自噬双荧光病毒实验检测 Rapa 刺激 C28/I2 细胞 6、12 h 后 LC3-GFP 荧光强度;B:LC3-GFP/mRFP 相对荧光强度定量分析;C:Western blot 检测 Rapa 刺激 C28/I2 细胞 6、12 h 后 COL2、LC3 的表达水平;D:免疫荧光检测 Rapa 刺激 C28/I2 细胞 6 h 后 COL2 的表达水平;E: COL2 荧光强度的定量分析;a: $P<0.01$

图 3 自噬激活剂 Rapa 处理软骨细胞后 COL2 的表达水平

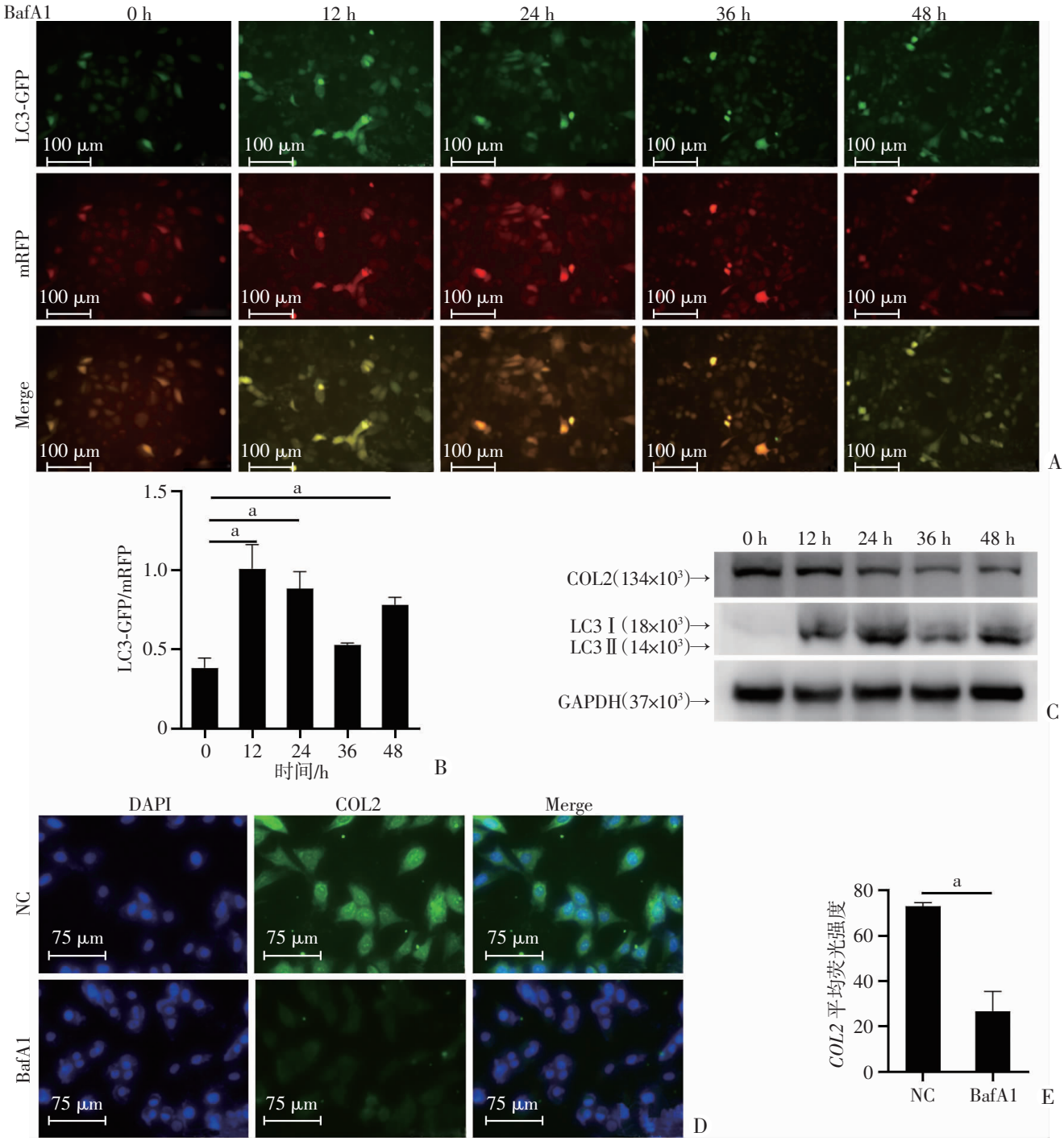
2.4 软骨细胞中抑制自噬后 COL2 表达水平下降

利用 mRFP-GFP-LC3 自噬双标腺病毒对自噬流进行追踪,在加入自噬抑制剂 Baf A1 处理 12 h 和 24 h 后,LC3-GFP 荧光显著增强,提示自噬抑制($P<0.01$,图 4A、B)。进一步在 C28/I2 细胞中加入自噬抑制剂 Baf A1 处理不同时间后,Western blot 检测显示随 Baf A1 处理时间延长,自噬逐渐被抑制,COL2 表达水平同步降低(图 4C)。免疫荧光结果显示,与对照组(NC)相比,在加入 Baf A1 抑制自噬后,COL2 的荧光强度明显减弱($P<0.01$,图 4D、E)。

2.5 软骨细胞中过表达 ATG5 上调 COL2 的转录与表达依赖于细胞自噬

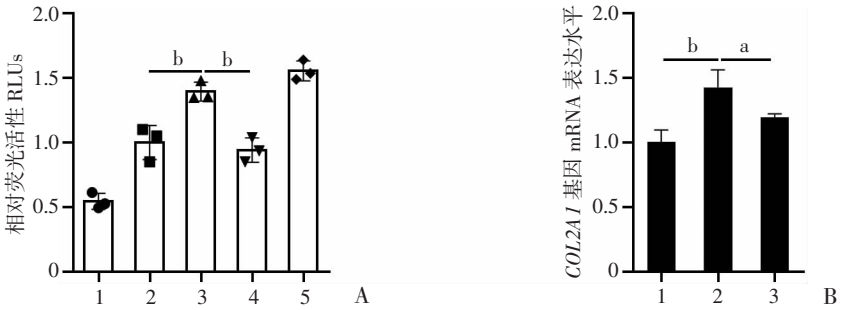
为了进一步探究 ATG5 对 COL2 转录与表达的调控与自噬的关系,成功构建了人 COL2A1 启动子质粒并验证其具有转录活性。双荧光素酶实验结果显示,共转染 pcDNA-ATG5 过表达质粒和 COL2A1 启动子质粒组的荧光强度显著高于单独转染 COL2A1 启动子质粒组($P<0.01$),表明过表达 ATG5 明显上调 COL2A1 启动子的转录,而加入 BafA1 抑制自噬后 COL2A1 转录活性下降($P<0.01$,图 5A)。qPCR 结果显示,转染 pcDNA-ATG5 过表达质粒后上调 COL2 的 mRNA 水平($P<0.01$),加入 BafA1 抑制细胞自噬的同时,进一步抑制了 ATG5 过表达对 COL2 的上调作用($P<0.05$,图 5B),说明 ATG5 上调 COL2A1 的转录和 mRNA 表达依赖于细胞自噬。

利用 mRFP-GFP-LC3 自噬双标腺病毒追踪自噬流,结果显示过表达 ATG5 后 LC3-GFP 荧光发生淬灭($P<0.01$),提示自噬激活,Rapa 进一步使绿色荧光发生淬灭($P<0.05$),说明 Rapa 促进过表达 ATG5 激活的自噬;而自噬抑制剂 BafA1 联合 pcDNA-ATG5 处理组相较于过表达 ATG5 组,绿色荧光增强,提示 BafA1 通过抑制溶酶体功能抑制自噬,进而抑制过表达 ATG5 激活的自噬($P<0.01$,图 6A、B)。Western blot 结果显示,相较于 NC 组,过表达 ATG5 能够明显上调 COL2 和 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的表达($P<0.01$);Rapa 进一步促进过表达 ATG5 上调的 COL2 和 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的表达($P<0.05$);而自噬抑制剂 BafA1 则抑制 ATG5 上调的 COL2、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的表达($P<0.01$,图 6C、D)。



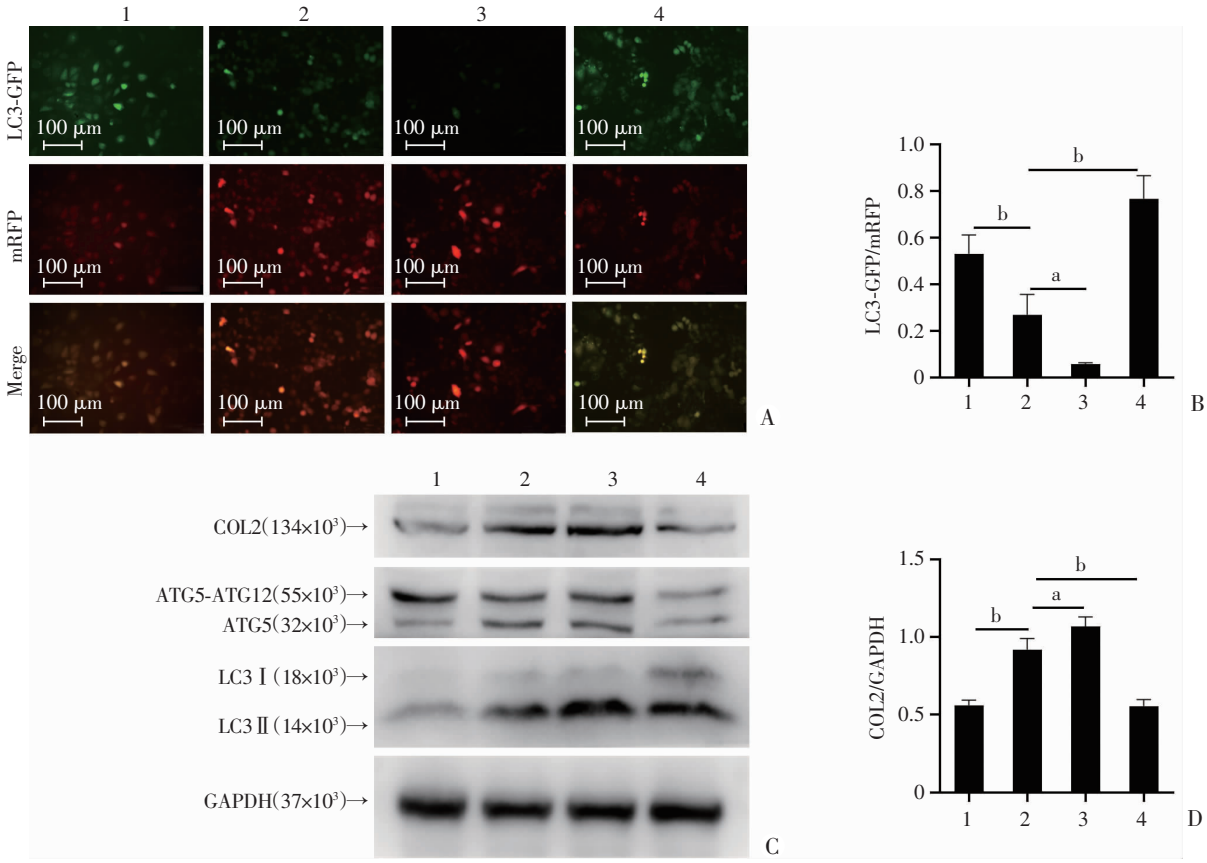
A:自噬双荧光病毒实验检测 BafA1 刺激 C28/I2 细胞 12、24、36、48 h 后 LC3-GFP 荧光强度;B:LC3-GFP/mRFP 相对荧光强度定量分析;C:Western blot 检测 BafA1 刺激 C28/I2 细胞 12、24、36、48 h 后 COL2、LC3 的表达水平;D:免疫荧光检测 BafA1 刺激 C28/I2 细胞 24 h 后 COL2 的表达水平;E: COL2 荧光强度的定量分析;a: $P<0.01$

图 4 自噬抑制剂 BafA1 处理软骨细胞后 COL2 的表达水平



A:双荧光素酶实验　1:pGL3-basic;2:COL2A1 promoter;3:pcDNA-ATG5+COL2A1 promoter;4:pcDNA-ATG5+BafA1+COL2A1 promoter;5:pGL3-control;B:qPCR 检测过表达 ATG5 及联合 BafA1 处理后 COL2 的 mRNA 表达水平　1:NC;2:pcDNA-ATG5;3:pcDNA-ATG5+BafA1;a:$P<0.05$, b: $P<0.01$

图 5　ATG5 促进人 COL2A1 启动子转录活性的双荧光素酶活性实验



1: NC; 2: pcDNA-ATG5; 3: pcDNA-ATG5+Rapa; 4: pcDNA-ATG5+BafA1;a:$P<0.05$, b:$P<0.01$
A:自噬双荧光病毒实验检测过表达 ATG5 后 LC3 的荧光水平;B: LC3-GFP/mRFP 相对荧光强度定量分析;C:Western blot 检测过表达 ATG5 及联合 Rapa 处理后 COL2、LC3 的表达水平;D: COL2 表达水平的定量分析

图 6　人软骨细胞 C28/I2 中过表达 ATG5 增强自噬并上调 COL2 表达

2.6　软骨细胞中敲低 ATG5 的表达抑制自噬进而下调 COL2 的表达

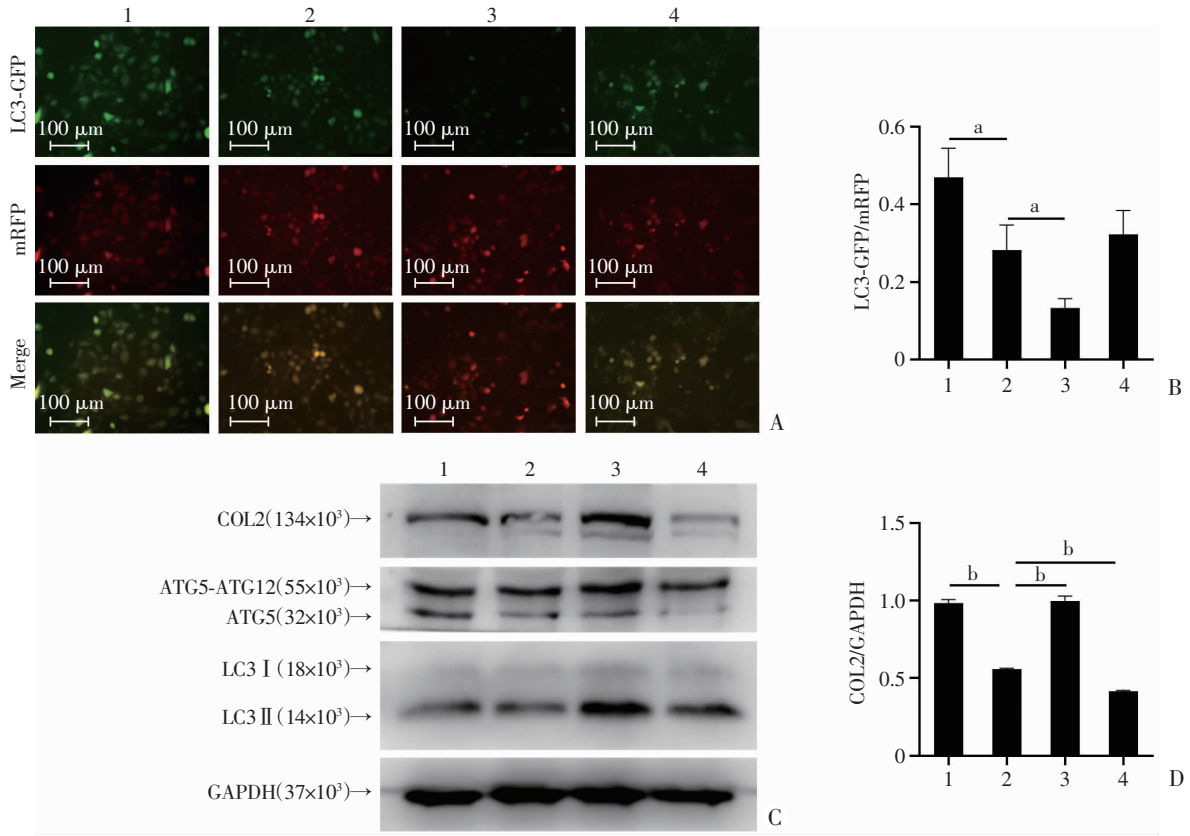
细胞感染自噬双标腺病毒后,敲低 ATG5 的表达水平使自噬小体的延伸及 LC3 聚集受阻,LC3-GFP 绿色荧光减弱($P<0.05$),自噬流受阻;Ad-siATG5 联合 Rapa,相较于 NC 对照组和 siATG5 单处理组,LC3-GFP 绿色荧光淬灭($P<0.05$),自噬部分激活;siATG5 联合自噬抑制剂 BafA1 处理组相较于单独 siATG5 处理组荧光差异不显著(图 7A、B)。Western blot 结果显示,Ad-siATG5 重组腺病毒敲低 ATG5 的表达水平后,相

较于 NC 组,敲低 ATG5(siATG5)能够明显抑制 ATG5、COL2 和 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ的表达;Rapa 联合 Ad-siATG5 处理时上调 ATG5 表达,同时上调 COL2 和 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ的表达($P<0.01$);BafA1+ Ad-siATG5 处理后,在抑制 ATG5 表达的同时下调 COL2 的表达($P<0.01$,图 7C、D)。

3 讨论

骨关节炎在全球范围内的患者超过 2.4 亿人,具有一定的致残率,目前的治疗手段主要是非甾体抗炎药或关节内注射透明质酸,但只能起到抗炎止痛的作用,因软骨再生较为困难,目前尚无一种具有明确治疗效果的药物[1, 22-23]。本文所研究的 ATG5 是自噬过程中不可或缺的一个关键基因,ATG5 与 ATG12-ATG16L 结合,参与自噬小体的形成及先天抗病毒免疫应答的负调控、淋巴细胞发育和增殖、脂肪细胞分化和凋亡等多种生物学过程[9, 24]。有研究表明,细胞自噬能够影响软骨细胞中Ⅱ型胶原的形成、胞外分泌、成熟等过程[25]。

本文旨在研究自噬相关蛋白 ATG5 对软骨细胞中Ⅱ型胶原基因表达的调控作用。首先我们通过 GEO 数据库中的芯片数据发现 ATG5 的表达与 COL2A1 存在正相关,提示 ATG5 可能调控 COL2A1 的表达水平。为了进一步证实这一分析结果,本研究采用免疫荧光和 Western blot 等技术,在软骨细胞中分别过表达 ATG5 和抑制 ATG5 的表达,逐一观察其对 COL2A1 表达的影响。实验结果显示在软骨细胞中过表达 ATG5 能够上调 COL2 的表达水平,反之抑制 ATG5 的表达使 COL2 表达水平下调。此外,自噬双荧光和免疫印迹等实验进一步证实自噬激活可以上调 COL2 的表达,而自噬的抑制则下调 COL2 的表达。此外,已有研究表明 ATG5 能够调控 NF-κB、p53 等转录因子的活性,其中 ATG5 会与 p65 结合抑制 NF-κB 介导的炎症反应,当 ATG5 表达下调,软骨细胞的早期自噬被抑制,自噬小体的生成受阻,LC3 无法聚集和进入自噬溶酶体,溶酶体无法水解细胞内衰老的细胞器或局部细胞质,进而激活 NF-κB,细胞内 IL-1β、IL-6、TNF-α 等致炎因子水平上升[26-27]。同时,ATG5 表达下调可以通过



1:NC;2:Ad-siATG5;3:Ad-siATG5+Rapa;4:Ad-siATG5+BafA1;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:自噬双荧光病毒实验检测敲低 ATG5 后 LC3 的荧光水平;B:LC3-GFP/mRFP 相对荧光强度定量分析;C:Western blot 检测敲低 ATG5 及联合 BafA1 处理后 COL2、LC3 的表达水平;D:COL2 表达水平的定量分析

图 7 人软骨细胞 C28/I2 中敲低 ATG5 的表达抑制自噬并下调 COL2 表达

调控 BMP、Wnt 等其他信号通路减少Ⅱ型胶原和蛋白多糖的合成,上调多种基质降解金属酶的表达,进而引发骨关节炎[26, 28-29]。本实验进一步证实 ATG5 上调 COL2A1 的转录与表达依赖于细胞自噬;同时,我们发现敲低 ATG5 抑制细胞自噬和 COL2A1 的表达,Rapa 可以上调 siATG5 抑制的自噬与 COL2A1 表达,提示 ATG5 调控自噬和 COL2A1 表达的途径并非特异性调节途径,软骨细胞中还存在其他独立于 ATG5 的替代途径参与调节自噬和 COL2A1 的表达。再次证实了自噬的发生可以通过独立于 ATG5 的替代途径补偿产生,与内质网应激共同组成真核细胞的保护机制,调控细胞的增殖、分化、凋亡、生长等生物学功能[30]。文献报道这一补偿途径可能涉及 ULK1 的磷酸化和 LC3 修饰的缺失[31-32]。

Ⅱ型胶原是软骨细胞外基质中占比最多的胶原蛋白,最初在软骨细胞内合成Ⅱ型前胶原(procollagen Ⅱ,PC Ⅱ),在高尔基体经分泌小泡包被,经过与质膜的融合分泌至细胞外,再通过聚合、二硫键等共价交联成胶原纤维的骨架,再结合蛋白聚糖等成分使软骨具有一定的弹性,起到缓冲、维持软骨组织完整性的作用[33]。已有研究表明,敲除 ATG5 会导致 Caspase 介导的软骨细胞死亡,引发更严重的骨关节炎[34]。软骨细胞自噬会在一定程度上通过控制 ECM 中Ⅱ型胶原的分泌水平来调节骨生长,IL-18 处理软骨细胞后,软骨细胞自噬下调,Ⅱ型胶原和蛋白聚糖表达水平下降,这与我们的结论一致[35]。

综合本研究实验结果,ATG5 对于软骨细胞中Ⅱ型胶原的表达起到了积极的促进作用;ATG5 调控Ⅱ型胶原的表达依赖于细胞自噬;软骨合成过程中胶原的合成、分泌及成熟可能与自噬相关,具体机制还有待进一步探讨和验证。

参考文献:

[1] HAN S. Osteoarthritis year in review 2022: biology[J]. Osteoarthr Cartilage, 2022, 30(12): 1575-1582. DOI: 10.1016/j.joca.2022.09.003.

[2] FUJII Y, LIU L, YAGASAKI L, *et al*. Cartilage homeostasis and osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11): 6316. DOI: 10.3390/ijms23116316.

[3] FAVERO M, BELLUZZI E, ORTOLAN A, *et al*. Erosive hand osteoarthritis: latest findings and outlook[J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(3): 171-183. DOI: 10.1038/s41584-021-00747-3.

[4] RAHMATI M, NALESSO G, MOBASHERI A, *et al*. Aging and osteoarthritis: central role of the extracellular matrix[J]. Ageing Res Rev, 2017, 40: 20-30. DOI: 10.1016/j.arr.2017.07.004.

[5] LU H W, JIA C, WU D Y, *et al*. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) alleviates senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the SIRT1-mTOR signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 865. DOI: 10.1038/s41419-021-04157-x.

[6] CARBALLO C B, NAKAGAWA Y, SEKIYA I, *et al*. Basic science of articular cartilage[J]. Clin Sports Med, 2017, 36(3): 413-425. DOI: 10.1016/j.csm.2017.02.001.

[7] CHARLIER E, DEROYER C, CIREGIA F, *et al*. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA)[J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 49-65. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.02.036.

[8] GUILAK F, NIMS R J, DICKS A, *et al*. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix[J]. Matrix Biol, 2018, 71/72: 40-50. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.05.008.

[9] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery[J]. Cell, 2019, 177(7): 1682-1699. DOI: 10.1016/j.cell.2019.05.026.

[10] MUSUMECI G, CASTROGIOVANNI P, TROVATO F M, *et al*. Biomarkers of chondrocyte apoptosis and autophagy in osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 20560-20575. DOI: 10.3390/ijms160920560.

[11] CARAMES B, HASEGAWA A, TANIGUCHI N, *et al*. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(4): 575-581. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200557.

[12] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective[J]. Cell, 2019, 176(1/2): 11-42. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.048.

[13] TSUJIMOTO R, YURUBE T, TAKEOKA Y, *et al*. Involvement of autophagy in the maintenance of rat intervertebral disc homeostasis: an in-vitro and in-vivo RNA interference study of Atg5[J]. Osteoarthr Cartilage, 2022, 30(3): 481-493. DOI: 10.1016/j.joca.2021.12.004.

[14] PAN Y M, YANG Y Y, FAN M T, *et al*. Progranulin regulation of autophagy contributes to its chondroprotective effect in osteoarthritis[J]. Genes Dis, 2022 DOI: 10.1016/j.gendis.2022.05.031.

[15] ANDREAS K, LÜBKE C, HÄUPL T, *et al*. Key regulatory molecules of cartilage destruction in rheumatoid arthritis: an in vitro study[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(1): R9. DOI: 10.1186/ar2358.

[16] KAWATA M, TERAMURA T, ORDOUKHANIAN P, *et al*. Krüppel-like factor-4 and Krüppel-like factor-2 are important regulators of joint tissue cells and protect against tissue

destruction and inflammation in osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2022: annrheumdis-annrheu2021-221867. DOI: 10.1136/annrheumdis-2021-221867.

[17] 李星月, 尹丹旸, 范梦恬, 等. IRE1α 缺陷通过上调内质网钙稳态蛋白降低软骨细胞的自噬功功能[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(6): 785-793.
LI X Y, YIN D Y, FAN M T, *et al*. IRE1α deficiency impairs autophagy in chondrocytes by upregulating calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein[J]. J South Med Univ, 2022, 42(6): 785-793.

[18] LI Q, YIN Y T, ZHENG Y Q, *et al*. Inhibition of autophagy promoted high glucose/ROS-mediated apoptosis in ADSCs [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 289. DOI: 10.1186/s13287-018-1029-4.

[19] XU L J, CHEN R C, MA X Y, *et al*. Scutellarin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation [J]. Phytomedicine, 2020, 68: 153169. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153169.

[20] SHI Y N, GU C X, ZHAO T T, *et al*. Combination therapy with rapamycin and low dose imatinib in pulmonary hypertension[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 758763. DOI: 10.3389/fphar.2021.758763.

[21] TAN H W S, ANJUM B, SHEN H M, *et al*. Lysosomal inhibition attenuates peroxisomal gene transcription via suppression of PPARA and PPARGC1A levels [J]. Autophagy, 2019, 15(8): 1455-1459. DOI: 10.1080/15548627.2019.1609847.

[22] DEYLE G D, ALLEN C S, ALLISON S C, *et al*. Physical therapy versus glucocorticoid injection for osteoarthritis of the knee[J]. N Engl J Med, 2020, 382(15): 1420-1429. DOI: 10.1056/NEJMoa1905877.

[23] 任昊喆, 牟婧, 赵子璇, 等. 细胞外信号调节蛋白激酶在颞下颌关节骨关节炎髁突软骨退变中的作用[J]. 空军军医大学学报, 2023(6): 490-495.
REN H Z, MOU J, ZHAO Z X, *et al*. Effect of extracellular signal-regulated kinase on condylar cartilage degeneration of temporomandibular joint osteoarthritis[J]. J Air Force Med Univ, 2023(6): 490-495.

[24] BURGER E, ARAUJO A, LÓPEZ-YGLESIAS A, *et al*. Loss of paneth cell autophagy causes acute susceptibility to Toxoplasma gondii-mediated inflammation [J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(2): 177-190.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2018.01.001.

[25] HEO D N, KIM H J, LEE D, *et al*. Comparison of polysaccharides in articular cartilage regeneration associated with chondrogenic and autophagy-related gene expression [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 146: 922-930. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.215.

[26] PENG X, WANG Y T, LI H Y, *et al*. ATG5-mediated autophagy suppresses NF-κB signaling to limit epithelial inflammatory response to kidney injury[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(4): 253. DOI: 10.1038/s41419-019-1483-7.

[27] KIM J, CHEE W Y, YABUTA N, *et al*. Atg5-mediated autophagy controls apoptosis/anoikis via p53/Rb pathway in naked mole-rat fibroblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 528(1): 146-153. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.05.083.

[28] DEVIS-JAUREGUI L, ERITJA N, DAVIS M L, *et al*. Autophagy in the physiological endometrium and cancer[J]. Autophagy, 2021, 17(5): 1077-1095. DOI: 10.1080/15548627.2020.1752548.

[29] LEPETSOS P, PAPAVASSILIOU K A, PAPAVASSILIOU A G. Redox and NF-κB signaling in osteoarthritis[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 132: 90-100. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.025.

[30] ZHENG W, XIE W W, YIN D Y, *et al*. ATG5 and ATG7 induced autophagy interplays with UPR via PERK signaling [J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 42. DOI: 10.1186/s12964-019-0353-3.

[31] URBANSKA K, ORZECHOWSKI A. The secrets of alternative autophagy[J]. Cells, 2021, 10(11): 3241. DOI: 10.3390/cells10113241.

[32] QIAO C M, SUN M F, JIA X B, *et al*. Sodium butyrate causes α-synuclein degradation by an Atg5-dependent and PI3K/Akt/mTOR-related autophagy pathway[J]. Exp Cell Res, 2020, 387(1): 111772. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.111772.

[33] XIA C J, WANG P E, FANG L, *et al*. Activation of β-catenin in Col2-expressing chondrocytes leads to osteoarthritis-like defects in hip joint[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18535-18543. DOI: 10.1002/jcp.28491.

[34] BOUDERLIQUE T, VUPPALAPATI K K, NEWTON P T, *et al*. Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(3): 627-631. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-207742.

[35] BAO J P, CHEN Z G, XU L H, *et al*. Rapamycin protects chondrocytes against IL-18-induced apoptosis and ameliorates rat osteoarthritis[J]. Aging, 2020, 12(6): 5152-5167. DOI: 10.18632/aging.102937.

(收稿:2023-02-07;修回:2023-03-03)
(编辑 张 维)