

自噬基因微管相关蛋白 1 轻链 3 参与模型兔激素性股骨头缺血坏死的发生与发展

https://doi.org/10.12307/2022.930

马海龙¹, 赵振群², 刘万林², 孙军¹

投稿日期: 2021-12-01

采用日期: 2022-01-18

修回日期: 2022-03-02

在线日期: 2022-03-21

中图分类号:

R459.9; R318; R681.8

文章编号:

2095-4344(2022)32-05167-06

文献标识码: B

文章快速阅读:



新西兰大耳白兔, 分为 3 组

分组及造模:

- (1) 对照组: 单纯肌肉注射生理盐水;
- (2) 股骨头坏死组: 肌肉注射甲基强的松龙;
- (3) 3-甲基腺嘌呤组: 肌肉注射甲基强的松龙 + 3-甲基腺嘌呤;
- (4) 各组均注射 4 次, 每周 1 次。

检测:

- (1) 光镜下计数各组空缺陷骨陷窝;
- (2) RT-PCR 检测各组细胞内微管相关蛋白 1 轻链 3 (MAP1LC3) 基因的表达;
- (3) Western Blot 鉴定各组 MAP1LC3 蛋白表达。

结论:

- (1) 自噬基因 MAP1LC3 参与了兔模型激素性股骨头缺血坏死;
- (2) 3-甲基腺嘌呤抑制了 MAP1LC3 的表达, 可以抑制激素性股骨头缺血坏死的发生及发展。

文题释义:

自噬基因微管相关蛋白 1 轻链 3: 是哺乳动物细胞中参与自噬的特异性基因, 通过与 III 型磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶 (Class III PI3K) 形成复合体来调节其他自噬相关基因编码蛋白, 然后在自噬前体结构中定位, 调节自噬活性。

3-甲基腺嘌呤: 是一种细胞自噬抑制剂, 它通过抑制 Class III PI3K 来抑制自噬体的形成, 从而抑制自噬过程。

摘要

背景: 激素性股骨头缺血坏死至今仍是很棘手的难题, 关于其发病机制的研究仍然具有重要意义。

目的: 探讨在兔激素性股骨头缺血坏死模型中, 自噬基因微管相关蛋白 1 轻链 3 所发挥的作用及 3-甲基腺嘌呤对其的影响。

方法: 健康 5 月龄新西兰大耳白兔 36 只, 随机分成 3 组, 每组 12 只。对照组单纯肌肉注射生理盐水, 2 mL/只, 每周 1 次, 共 4 次; 股骨头坏死组肌肉注射甲基强的松龙 4 mg/kg, 每周 1 次, 共 4 次; 3-甲基腺嘌呤组肌肉注射甲基强的松龙 4 mg/kg, 之后随即肌肉注射 3-甲基腺嘌呤 2 μL/只, 每周 1 次, 共 4 次。实验第 1, 2, 3, 4 周, 各组每次分别处死 3 只兔, 取双侧后肢股骨头。光镜下计数各组空缺陷骨陷窝; 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞内微管相关蛋白 1 轻链 3 基因的表达, Western blot 鉴定各组微管相关蛋白 1 轻链 3 蛋白表达。

结果与结论: ① 光镜观察结果显示: 与对照组相比, 股骨头坏死组和 3-甲基腺嘌呤组标本空缺陷骨陷窝率均显著升高 ($P < 0.05$), 但 3-甲基腺嘌呤组上升率低于股骨头坏死组 ($P < 0.05$); ② 股骨头坏死组的微管相关蛋白 1 轻链 3 mRNA 呈高表达, 同时表达量较 3-甲基腺嘌呤组高 ($P < 0.05$), 表示细胞自噬激活, 3-甲基腺嘌呤对这一过程起到抑制作用; ③ 结果检测到模型中微管相关蛋白 1 轻链 3 的表达, 证实了细胞自噬在激素性股骨头缺血坏死发病过程中发挥了一定作用; 3-甲基腺嘌呤抑制了微管相关蛋白 1 轻链 3 的表达, 可以抑制激素性股骨头缺血坏死的发生及发展。

关键词: 激素性股骨头缺血坏死; 自噬; 微管相关蛋白 1 轻链 3; 3-甲基腺嘌呤; 动物模型

缩略语: 激素性股骨头缺血坏死: steroid-induced avascular necrosis of femoral head, SANFH; 微管相关蛋白 1 轻链 3: microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3

Microtubule-associated protein 1 light chain 3 is involved in the occurrence and development of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in a rabbit model

Ma Hailong¹, Zhao Zhenqun², Liu Wanlin², Sun Jun¹

¹Department of Pediatric Orthopedics, Anhui Provincial Children's Hospital, Children's Hospital of Anhui Medical University, the Fifth Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230051, Anhui Province, China; ²Department of Pediatric Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Ma Hailong, MD candidate, Attending physician, Department of Pediatric Orthopedics, Anhui Provincial Children's Hospital, Children's Hospital of Anhui Medical University, the Fifth Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230051, Anhui Province, China

Zhao Zhenqun, MD, Chief physician, Master's supervisor, Department of Pediatric Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

¹ 安徽医科大学第五临床医学院, 安徽医科大学附属省儿童医院骨科, 安徽省儿童医院骨科, 安徽省合肥市 230051; ² 内蒙古医科大学第二附属医院小儿骨科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

第一作者: 马海龙, 男, 1989 年生, 安徽省亳州市人, 汉族, 2016 年内蒙古医科大学毕业, 安徽医科大学在读博士, 主治医师, 主要从事小儿骨科临床工作与激素性股骨头坏死发病机制基础研究。

并列第一作者: 赵振群, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事激素性股骨头坏死发病机制基础研究。

通讯作者: 孙军, 硕士, 教授, 博士生导师, 安徽医科大学第五临床医学院, 安徽医科大学附属省儿童医院骨科, 安徽省儿童医院骨科, 安徽省合肥市 230051

并列通讯作者: 刘万林, 硕士, 教授, 博士生导师, 内蒙古医科大学第二附属医院小儿骨科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030
https://orcid.org/0000-0002-6633-8720 (马海龙)

基金资助: 国家自然科学基金 (81360273), 项目负责人: 刘万林; 国家自然科学基金 (81460331), 项目参与人: 赵振群、刘万林;

国家自然科学基金 (81560349), 项目负责人: 刘万林; 国家自然科学基金 (81760391), 项目负责人: 赵振群

引用本文: 马海龙, 赵振群, 刘万林, 孙军. 自噬基因微管相关蛋白 1 轻链 3 参与模型兔激素性股骨头缺血坏死的发生与发展 [J].

中国组织工程研究, 2022, 26(32):5167-5172.



Ma Hailong and Zhao Zhenqun contributed equally to this work.

Corresponding author: Sun Jun, Master, Professor, Doctoral supervisor, Department of Pediatric Orthopedics, Anhui Provincial Children's Hospital, Children's Hospital of Anhui Medical University, the Fifth Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230051, Anhui Province, China

Co-corresponding author: Liu Wanlin, Master, Professor, Doctoral supervisor, Department of Pediatric Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Steroid-induced avascular necrosis of the femoral head is still a difficult problem, and it is of great significance to study its pathogenesis.

OBJECTIVE: To discuss the role of autophagy gene microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3) in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head and the effect of 3-methyladenine on MAP1LC3.

METHODS: A total of 36 healthy New Zealand white rabbits, aged 5 months, were randomly divided into 3 groups, with 12 rabbits in each group. Control group was given intramuscular injection of normal saline, 2 mL per rabbit, once a week, four times in total. Model group was given intramuscular injection of 4 mg/kg methylprednisolone, once a week, four times in total. 3-Methyladenine group was given intramuscular injection of 4 mg/kg methylprednisolone followed by intramuscular injection of 3-methyladenine, 2 μ L per rabbit, once a week, four times in total. Three animals from each group were sacrificed at 1, 2, 3, and 4 weeks for sampling. The femoral heads of the bilateral hindlimbs were taken. Empty bone lacunae were counted under optical microscope. mRNA and protein expression levels of MAP1LC3 were detected by RT-PCR and western blot assay, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the rate of empty lacunae increased significantly in the model and 3-methyladenine groups ($P < 0.05$), but the rate of empty lacunae was significantly lower in the 3-methyladenine group than the model group ($P < 0.05$). The expression of MAP1LC3 mRNA in the model group was higher than that in the 3-methyladenine group ($P < 0.05$), indicating the activation of autophagy is inhibited by 3-methyladenine. These findings indicate that MAP1LC3 is expressed in the animal model, confirming that autophagy plays a certain role in the pathogenesis of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head; 3-methyladenine inhibits the expression of MAP1LC3 and reduces the occurrence and development of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head.

Key words: steroid-induced avascular necrosis of the femoral head; autophagy; MAP1LC3; 3-methyladenine; animal model

Funding: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 81360273 (to LWL), 81460331 (to ZZQ and LWL [project participants]), 81560349 (to LWL) and 81760391 (to ZZQ)

How to cite this article: MA HL, ZHAO ZQ, LIU WL, SUN J. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 is involved in the occurrence and development of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in a rabbit model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(32):5167-5172.

0 引言 Introduction

激素性股骨头缺血坏死 (steroid-induced avascular necrosis of femoral head, SANFH) 的研究至今仍是很棘手的难题, 关于其发病机制仍存在争议, 但对于自噬型程序性细胞死亡在 SANFH 中的作用机制尚未完全明确。就 SANFH 早期骨细胞、成骨细胞的病理改变及其潜在原因, 特别是细胞的死亡方式及其可逆转因素一直未能明确, 至今仍有许多质疑^[1-5]。近年, 研究者更多倾向于关注基因表达与调控在疾病中的作用^[6-8], 而程序性细胞死亡 (凋亡型与自噬型) 理论亦逐渐受到重视^[6-10]。已有学者开始对骨细胞、成骨细胞凋亡型程序性细胞死亡在 SANFH 中的作用进行了初步探讨, 对其发病机制有了新的认识^[11]。对于自噬型程序性细胞死亡在 SANFH 中的作用, 目前已有部分报道, 研究的重点内容是寻找及明确其发病机制。近年来, 相关工作更多的集中于促血管生长因子及其差异表达基因的研究。作者的前期研究结果表明, 激素对股骨头节段血管中血小板衍生生长因子与血管内皮生长因子的超强抑制而引起的血供中断与 SANFH 存在关联性, 诸多促血管生长因子及差异表达基因的调控在 SANFH 中发挥着重要作用^[12-16]。

研究表明, 自噬型细胞死亡的发生机制主要与激素、饥饿、缺血缺氧、氧化应激、钙稳态失衡、线粒体功能障碍等有关^[17]。如果自噬调控机制出现失调, 会出现如肿瘤、炎症性疾病、自身免疫病等多种疾病, 并在其发生过程中观察到细胞过度自噬型死亡。CARPENTER 等^[18]通过研究证实, 皮肤水痘带状疱疹病毒感染与内质网应激相关, 最终导致 LC3 高表达与细胞自噬型死亡发生。研究结果表明, 编码自噬相关蛋白的重要基因有很多, 其中微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3) 是

编码自噬相关蛋白的重要基因^[17], 其编码的蛋白定位于前自噬泡和自噬泡膜表面, 它是在 2 条泛素样蛋白的加工修饰过程中形成自噬体。HERBST 等^[19]在研究移植抗宿主病时发现, MAP1LC3 基因高表达, 进而引起细胞自噬, 而 3-甲基腺嘌呤能够抑制细胞自噬发生。

此次研究采用建立 SANFH 动物模型的方法进行实验, 在使用激素诱导出 SANFH 动物模型的基础上, 光学显微镜观察各组组织细胞缺血坏死情况; 利用实时荧光定量 PCR 法检测骨细胞、成骨细胞中 MAP1LC3 mRNA; Western blot 定量检测 MAP1LC3; 对模型组动物肌肉注射 3-甲基腺嘌呤, 观察其是否可以抑制骨细胞、成骨细胞自噬型细胞死亡, 以及对 MAP1LC3 mRNA 与蛋白表达的影响, 探索 SANFH 发病机制的新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 计数资料采用 χ^2 检验, 组间比较独立样本 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 6 月至 2018 年 6 月在内蒙古医科大学分子病理实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康 5 月龄新西兰大耳白兔 36 只, 体重 2.0-2.5 kg, 雌雄不限, 标准饮食, 单笼饲养, 购自陕西省西安市迪乐普生物资源开发有限公司, 合格证编号: 6100160000083。实验方案经内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: 2013086。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 实验用主要试剂 MAP1LC3 及内参 β -actin 引物均购

自于生工生物工程(上海)股份有限公司;实时荧光定量PCR相关试剂盒均购自于天根生化科技(北京)有限公司;MAP1LC3兔单克隆抗体、内参 β -actin兔单克隆抗体、荧光二抗均购自于Cell Signaling公司;Western blot相关试剂盒均购自于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。生理盐水由内蒙古医科大学第二附属医院提供,甲基强的松龙购自法玛西亚普强公司,3-甲基腺嘌呤购自Selleck公司。

1.4 实验方法

1.4.1 造模及取材 将36只新西兰大耳白兔按雌雄随机分配分成3组,每组12只。对照组单纯肌肉注射生理盐水,2 mL/只,每周1次,共4次;股骨头坏死组肌肉注射甲基强的松龙4 mg/kg,每周1次,共4次;3-甲基腺嘌呤组,肌肉注射甲基强的松龙4 mg/kg,之后随即肌肉注射3-甲基腺嘌呤2 μ L/只,每周1次,共4次。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	建造实验所需动物模型
选择动物的条件	健康5月龄新西兰大耳白兔36只,体质量2.0-2.5 kg,不限雌雄
模型与所研究疾病的关系	在使用激素诱导激素性股骨头缺血坏死动物模型的基础上,取模型股骨头标本,探讨激素性股骨头缺血坏死的发病机制
动物来源及品系	新西兰兔,购自西安市迪乐普生物资源开发有限公司
造模技术描述	对照组单纯肌肉注射生理盐水,2 mL/只,每周1次,共4次;股骨头坏死组肌肉注射甲基强的松龙4 mg/kg,每周1次,共4次;3-甲基腺嘌呤组,肌肉注射甲基强的松龙4 mg/kg,之后随即肌肉注射3-甲基腺嘌呤2 μ L/只,每周1次,共4次
动物数量及分组方法	将36只新西兰大耳白兔按雌雄随机分配分成3组,每组12只
造模成功评价指标	大体观察及光镜下观察到骨组织及骨细胞坏死情况
造模后观察指标	骨陷窝检测;实时荧光定量PCR检测MAP1LC3 mRNA表达;Western blot检测MAP1LC3蛋白表达水平
造模后动物处理	根据内蒙古医科大学实验室要求统一处理
伦理委员会批准	内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准,批准号为2013086

在实验第1,2,3,4周麻醉后采用耳缘静脉注射空气栓塞法处死,每组每次处死3只。半无菌条件下取出双侧后肢的股骨头:左侧股骨头固定在体积分数40%的中性甲醛溶液中,苏木精-伊红染色后光镜观察组织学表现;右侧股骨头标本置于液氮中保存,进行MAP1LC3的mRNA与蛋白表达、自噬型细胞死亡检测。

1.4.2 光镜下组织形态学观察 取固定在体积分数40%中性甲醛溶液中的左侧股骨头,在10%EDTA脱钙液中微波脱钙,梯度乙醇脱水,石蜡包埋标本组织块,制成切片,厚4 μ m,苏木精-伊红染色,中性树胶封固制成切片。首先在400倍率下观察空缺骨陷窝形态,并留取图像,在100倍率下,随机选5个视野,每个视野依次计数50个骨陷窝,数出空缺骨陷窝数,求出空缺骨陷窝占骨陷窝的百分数,取5组数据

的均值,即为该切片的空缺骨陷窝率。每个标本随机选取3张切片计算空缺骨陷窝率,取各组3个标本所有切片的平均值为该组的空缺骨陷窝率。

1.4.3 实时荧光定量PCR检测标本内MAP1LC3 mRNA水平 从液氮中取出冻存的股骨头组织,电子天平迅速称取50 mg组织加入1 mL TRNzol于6孔板的每孔中,用匀浆仪进行匀浆处理后室温放置5 min至其完全裂解;将匀浆液置于12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心10 min,取上清液移入另一新的1.5 mL EP管中;将0.2 mL氯仿加入,将管盖盖好,震荡、摇晃,然后放在冰上孵育5 min;然后以1 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心15 min,将上清液转移到另一新的1.5 mL EP管中;再加入等体积异丙醇,混匀后冰上孵育10 min;然后以12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心5 min,倒掉上清液;加入1 mL体积分数75%的无水乙醇洗涤沉淀,保存在4 $^{\circ}$ C环境下,震荡,使其混合充分;7 500 r/min 4 $^{\circ}$ C离心5 min,抽掉上清液,此时可见白色沉淀附着于管底;室温放置晾干,约15 min;加入80 μ L RNase-Free ddH₂O,在EP管中溶解RNA(-80 $^{\circ}$ C冰箱)保存;在55-60 $^{\circ}$ C下孵育3-5 min,使RNA溶解充分。

MAP1LC3的上游引物序列为5'-GAT GTC CGA CTT ATT CGA GAG C-3',下游引物序列为5'-TTG AGC TGT AAG CGC CTT CTA-3',目的片段为363 bp;内参 β -Actin的上游引物序列为5'-ACT CGT CAT ACT CCT GCT-3',下游引物序列为5'-GAA ACT ACC TTC AAC TC-3',目的片段132 bp。

将获得的RNA溶液在冰上反转录为cDNA,将所得的cDNA溶液与引物溶液混合,配置反应体系,移入八连管,放入ABI 7500 Fast荧光定量PCR仪,按照说明设置反应程序,数据用PCR仪原机软件进行分析。

1.4.4 Western blot检测MAP1LC3蛋白表达水平 将储存在液氮中的右侧股骨头取出后用电子天平称质量,放入研磨器中,然后加入少量液氮研磨股骨头组织,用预冷的刮勺将研碎后的骨组织刮入离心管中,每加入1 g/mL的骨组织,就要同时加入10 g/mL组织蛋白提取试剂(含有蛋白酶抑制剂),然后放在冰上裂解30 min,后1 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心15 min,总蛋白在上清液中,所以收集上清液,即可测定蛋白浓度(BCA法)。制备10%分离胶,将蛋白样本和蛋白上样缓冲液混合,加入上样孔内,80 V电泳1 h,160 V电泳1.5 h,将NC膜与分离胶紧贴,135 mA转膜1.5 h,转好的NC膜在稀释的内参蛋白和MAP1LC3蛋白一抗(1:1 000)溶液中4 $^{\circ}$ C孵育过夜,在稀释的荧光二抗(1:500)溶液中孵育1 h,放入ODESSY荧光红外扫描系统中检测目的蛋白的表达情况。分别测量每个标本中内参蛋白和MAP1LC3蛋白条带的灰度值,计算每个标本灰度值比值=灰度值MAP1LC3/灰度值 β -actin,取3个标本灰度值比值平均值为该组的平均灰度值比值。

1.5 主要观察指标 ①光镜下组织形态学观察;②荧光定量PCR检测组织中MAP1LC3 mRNA表达水平;③Western blot检测标本组织中MAP1LC3蛋白的表达水平。

1.6 统计学分析 文章统计学方法已经内蒙古医科大学第二附属医院赵振群专家审核。应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料采用 χ^2 检验, 组间比较独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 将 36 只新西兰大耳白兔随机分成 3 组, 实验过程无脱失, 均进入结果分析。

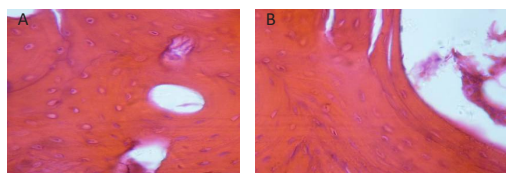
2.2 光镜观察股骨头病理切片改变 对照组各周股骨头病理切片上股骨头软骨下区空隙骨陷窝率均在正常范围内 (8%–12%); 股骨头坏死组、3- 甲基腺嘌呤组各周股骨头病理切片上股骨头软骨下区空隙骨陷窝率均高于正常范围 (8%–12%), 股骨头坏死组各周股骨头病理切片上股骨头软骨下区空隙骨陷窝率均明显高于 3- 甲基腺嘌呤组, 见表 1。

表 1 | 各组标本中骨陷窝率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)
Table 1 | Rate of empty lacunae under optical microscope in each group

时间	对照组	股骨头坏死组	3- 甲基腺嘌呤组	F 值	P 值
第 1 周	7.53±0.61	19.06±2.17 ^a	12.01±1.59 ^{ab}	28.48	0.001
第 2 周	10.23±0.42	36.02±2.56 ^a	25.12±3.01 ^{ab}	66.86	0.000
第 3 周	10.46±1.68	40.02±1.01 ^a	31.20±1.98 ^{ab}	310.43	0.000
第 4 周	11.86±2.62	42.06±1.03 ^a	35.02±2.54 ^{ab}	136.02	0.000

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与股骨头坏死组比较, ^b $P < 0.05$

股骨头坏死组第 2 周时的典型股骨头病理切片见图 1, 从切片上可清晰观察到骨坏死, 可见骨小梁结构极其紊乱, 分布稀疏、较正常骨小梁变细, 有的已发生断裂, 甚至出现碎片; 造血细胞数量减少; 成骨细胞排列不规则; 切片中可观察到大量的空隙骨陷窝; 骨髓内的脂肪细胞体积较大, 有的甚至融合在一起, 形成泡状表现。3- 甲基腺嘌呤组第 2 周时股骨头病理切片上骨坏死情况较股骨头坏死组轻。



图注: 图 A 示股骨头坏死组出现大量空隙骨陷窝; B 示 3- 甲基腺嘌呤治疗组出现空隙骨陷窝, 但较股骨头坏死组轻

图 1 | 造模第 2 周光镜下兔股骨头组织病理切片 (苏木精 - 伊红染色, $\times 400$)

Figure 1 | Pathological sections of rabbit femoral head under optical microscope at 2 weeks after modeling (hematoxylin-eosin staining, $\times 400$)

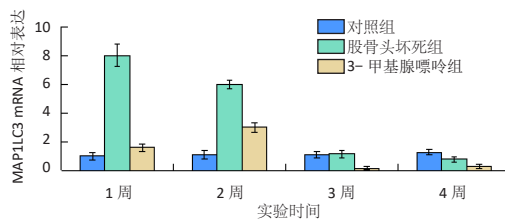
2.3 实时荧光定量 PCR 检测 MAP1LC3 mRNA 在组织中的表达 应用实时荧光定量 PCR 检测 MAP1LC3 mRNA 的表达, MAP1LC3 主要表达在细胞浆, 结果显示: 在实验的前 3 周, 股骨头坏死组标本内 MAP1LC3 mRNA 的表达均较对照组增高; 但随着用药时间的延长, 股骨头坏死组 MAP1LC3 mRNA 表达量逐渐下降, 而对照组 MAP1LC3 mRNA 表达量略有升高; 至第 4 周股骨头坏死组 MAP1LC3 mRNA 表达量低于对照组; 3- 甲基腺嘌呤组 MAP1LC3 mRNA 表达量均低于股骨头坏死组。采用单因素方差分析检验不同时间段 3 组标本中

MAP1LC3 mRNA 表达差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 采用 t 检验进行各组之间的比较, 第 1 周对照组与 3- 甲基腺嘌呤组之间差异无显著性意义, 第 3 周对照组与股骨头坏死组之间差异无显著性意义, 其余各组间差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 见表 2 及图 2。

表 2 | 各组股骨头标本中 MAP1LC3 的 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 | mRNA expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 in rabbit femoral head in each group

时间	对照组	股骨头坏死组	3- 甲基腺嘌呤组	F 值	P 值
第 1 周	0.99±0.28	7.99±0.78 ^a	1.59±0.27 ^b	64.140	0.000
第 2 周	1.09±0.28	6.00±0.29 ^a	3.00±0.32 ^{ab}	48.260	0.000
第 3 周	1.09±0.24	1.14±0.23	0.17±0.10 ^{ab}	8.243	0.002
第 4 周	1.27±0.18	0.78±0.19 ^a	0.27±0.15 ^{ab}	5.637	0.000

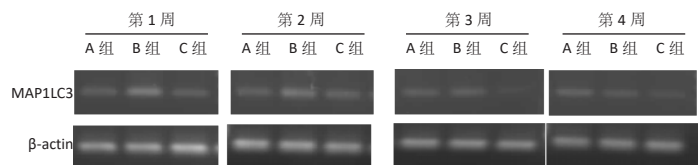
表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与股骨头坏死组比较, ^b $P < 0.05$



图注: 股骨头坏死组 LMAPP1LC3 mRNA 的表达较对照组增高; 3- 甲基腺嘌呤组较股骨头坏死组表达降低

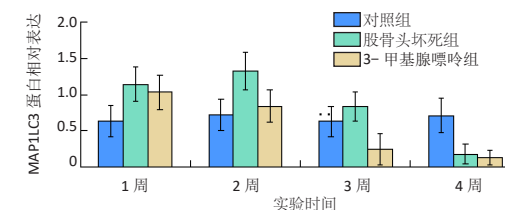
图 2 | 各组股骨头标本中 MAP1LC3 的 mRNA 表达
Figure 2 | mRNA expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 in the femoral head in each group

2.4 Western blot 检测骨组织中 MAP1LC3 蛋白表达水平 提取模型组织中蛋白适量, 选取参照物: 内参 (β -actin), 定量分析蛋白表达, 结果见图 3。计算灰度值比值 = 灰度值 MAP1LC3 / 灰度值 β -actin, 结果见图 4, 进行单因素方差分析, 结果见表 3。



图注: 实验前 2 周股骨头坏死组 MAP1LC3 蛋白表达水平高于另外两组。A、B、C 组分别为对照组、股骨头坏死组及 3- 甲基腺嘌呤组

图 3 | 各组股骨头标本中 MAP1LC3 蛋白的表达
Figure 3 | Protein expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 in the femoral head in each group



图注: 第 1, 2 周股骨头坏死组 MAP1LC3 蛋白表达水平显著高于对照组和 3- 甲基腺嘌呤组; 第 3, 4 周各组比较差异无显著性意义

图 4 | Western blot 检测各组股骨头组织 MAP1LC3 蛋白表达
Figure 4 | Protein expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 in the femoral head in each group detected by western blot assay

表 3 | 各组股骨头标本中 MAP1LC3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 | Protein expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 in the femoral head in each group

时间	对照组	股骨头坏死组	3-甲基腺嘌呤组	F 值	P 值
第 1 周	0.61±0.15	1.16±0.20 ^a	1.01±0.16 ^b	8.360	0.018
第 2 周	0.64±0.14	1.38±0.16 ^a	0.82±0.14 ^b	5.450	0.045
第 3 周	0.62±0.16	0.84±0.12	0.35±0.12	1.063	0.403
第 4 周	0.62±0.20	0.25±0.18	0.21±0.12	1.129	0.384

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与股骨头坏死组比较, ^b $P < 0.05$

在实验前 2 周, 3 组标本中 MAP1LC3 蛋白表达水平差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 而在实验的后 2 周 3 组标本之间结果差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。对结果进行 t 检验发现, 第 1 周 3 组之间结果差异均有显著性意义; 对照组与股骨头坏死组之间 MAP1LC3 蛋白表达差异有显著性意义 ($P=0.064$, $P < 0.05$), 股骨头坏死组 MAP1LC3 蛋白表达明显增多; 股骨头坏死组与 3-甲基腺嘌呤组 MAP1LC3 蛋白表达差异也有显著性意义 ($P=0.016$, $P < 0.05$), 3-甲基腺嘌呤组标本内 MAP1LC3 蛋白表达下降, 且接近对照组 ($P=0.534$, $P > 0.05$)。在实验第 2 周该趋势表现结果与第 1 周相似, 股骨头坏死组 MAP1LC3 蛋白表达明显增多 ($P=0.072$, $P < 0.05$), 3-甲基腺嘌呤组 MAP1LC3 蛋白表达明显下降 ($P=0.048$, $P < 0.05$), 且接近对照组 ($P=1.582$, $P > 0.05$)。在实验的后 2 周, 3 组间 MAP1LC3 蛋白表达水平相比差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

短期大量或长期糖皮质激素的使用可以引起 SANFH, 通过很多方式破坏股骨头血液供应, 使股骨头骨细胞和骨髓成分变性、坏死, 最终导致股骨头的正常结构发生变化, 晚期多可伴有骨小梁压缩断裂, 破坏髓关节功能, 最终给患者正常生活带来不可逆的损伤, 其特点是致残率高、预后较差, 股骨头缺血坏死的发病机制至今仍没有统一的定论。近年研究发现, 细胞自噬既参与了人体多种正常的生理过程, 同时也与多种病理过程息息相关, 包括细胞的衰亡、胰岛素的抵抗、癌症及其他疾病的发生发展等, 类似于是一把双刃剑的存在, 一定强度范围内的细胞自噬在维持细胞内环境稳态、细胞存活方面都起着至关重要的作用^[20]。有学者认为细胞自噬不仅是必要的, 并且至少在某些情况下, 也足以延长寿命。细胞自噬是一种涉及细胞内组分自身降解的重要过程, 调节方式多样, 对于其检测和监测方法仍没有统一的定论^[21]。研究发现, 自噬可激活成骨细胞的分化过程^[22], 当缺乏溶酶体硫酸酯酶时, 可激活自噬致使骨质发育异常, 另外, 自噬也可参与保护成熟骨骼的形成过程^[23]。大剂量糖皮质激素可增强破骨细胞的分化, 致使其对骨的吸收活性增强, 破坏正常骨细胞^[24], 糖皮质激素可打破骨重塑平衡, 既促进破骨细胞的分化, 也加强了对骨质的吸收, 从而阻碍骨的修复和重建。在股骨头缺血坏死的发病过程中, 股骨头局部的缺血缺氧改变可引起骨细胞、成骨细胞发生一系列病理变化, 因此自噬与 SANFH 之间也存在着紧密的联系。

MAP1LC3 是哺乳动物细胞中参与自噬的特异性基因^[25], 通过与 III 型磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶形成复合体来调节其他自噬相关基因编码蛋白, 然后在自噬前体结构中定位, 调节自噬活性。IDIKIO 等^[26] 研究发现, 肝癌与前列腺癌组织中 MAP1LC3 基因 mRNA 表达水平明显增高, 并可能因其可调控细胞自噬而成为癌症治疗的靶点。EZAKI 等^[27] 通过动物实验研究发现, 胰岛素通过调控肝细胞自噬而促进糖异生, 从而维持正常血糖, 同时 MAP1LC3 也在变化, 可通过检测 LC3 II /LC3 I 比值来说明自噬变化程度。GAMBERI 等^[28] 通过实验发现, 用脂联素基因敲除小鼠的骨骼肌 LC3 II 表达, 可使 LC3 II 表达下降, 说明 LC3 II 的表达升降与细胞自噬存在紧密关联。学者们通过实验认为 3-甲基腺嘌呤是 III 型磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶 (hVps30) 的抑制剂, 可通过切断自噬泡与溶酶体的结合, 从而阻止自噬体形成过程, 通过调节细胞自噬可以治疗心血管疾病。总之, 自噬受很多因素的调控, 激素、缺血缺氧、氧化应激、线粒体损伤等均可引起细胞 MAP1LC3 基因表达增强, 从而导致细胞过度的自噬型死亡, 进而引起疾病的发生发展, 而这一过程受到 3-甲基腺嘌呤的调控。作者推测, 在 SANFH 模型中, 由于应用激素及其导致的细胞缺血缺氧极有可能引起骨细胞与成骨细胞某种形式的自噬, 3-甲基腺嘌呤可以阻断形成自噬体, 进而干扰 MAP1LC3 蛋白活性, 达到抑制自噬型细胞死亡的目的。针对这些问题, 此次研究通过激素诱导兔股骨头坏死, 诱导出股骨头骨细胞、成骨细胞自噬的发生, 并使用 3-甲基腺嘌呤自噬抑制剂抑制自噬, 光镜下计数各组空缺骨陷窝, 应用实时荧光定量 PCR 检测 MAP1LC3 mRNA 的表达, 应用 Western blot 免疫印迹法检测骨细胞、成骨细胞中 MAP1LC3 蛋白的表达量。

结果发现, 3 组股骨头的大体形态无明显差异; 应用光学显微镜观察激素诱导股骨头坏死股骨头病理切片可见典型的骨坏死, 骨小梁结构不规则, 骨小梁变得细而稀, 坏死主要集中在股骨头软骨下, 骨陷窝出现细胞空缺, 骨髓内脂肪细胞体积增大变形, 骨髓内脂肪细胞核消失, 有的破裂融合成脂肪囊泡。LC3 是哺乳动物参与自噬的特异性基因, 包括 LC3 I (18 kD) 和 LC3 II (16 kD) 2 种形式。由于细胞中 LC3 的含量和自噬泡的数目呈正相关关系, 因此它可作为检测自噬的标记物。当股骨头骨细胞因激素诱导引起自噬时, 细胞内 LC3 的总含量会明显增多。实时荧光定量 PCR 实验结果显示: MAP1LC3 在激素诱导股骨头缺血坏死标本中的表达程度要显著强于对照组。作为细胞自噬发生的特异性标志物, MAP1LC3 在激素诱导组中的表达显著强于对照组, 说明激素诱导股骨头缺血坏死中细胞自噬的发生与发展是显著增强的, 进一步表明 MAP1LC3 mRNA 的高表达状态, 可能存在自噬型细胞死亡。随着激素用量的继续增加, 可能出现股骨头完全坏死的情况, 致使在第 4 周中出现激素诱导股骨头坏死组 MAP1LC3 mRNA 表达量低于对照组的情况, 3-甲基腺嘌呤治疗组中 MAP1LC3 mRNA 表达量一直较低, 表明 3-甲基腺嘌呤在该自噬型细胞死亡过程中可能起到抑制作用。Western

blot 免疫印迹法蛋白分析实验鉴定骨细胞中 MAP1LC3 蛋白表达量结果显示:与 3-甲基腺嘌呤治疗组相比,激素诱导组中 MAP1LC3 蛋白表达水平较高,3-甲基腺嘌呤治疗组 MAP1LC3 蛋白水平与对照组相近。进一步证实激素可能导致股骨头的自噬性死亡,而且 3-甲基腺嘌呤对于激素性股骨头坏死中自噬型细胞死亡可能起到抑制作用。根据以上实验结果可以认为:大剂量糖皮质激素的使用可以明显诱导骨细胞自噬的发生发展;而在 SANFH 的过程中,细胞自噬又在一定程度上、或者某一阶段参与并促进了 SANFH 的发展进程,并最终导致了股骨头的缺血坏死。正如作者之前所推测的那样,细胞自噬很有可能是 SANFH 的重要发病机制。

由上可以得出以下结论,在兔股骨头缺血坏死模型中,激素可使股骨头骨细胞、成骨细胞自噬型死亡,同时也可以使其中 MAP1LC3 的 mRNA 与蛋白高表达,而这一系列自噬型细胞死亡过程可以通过 3-甲基腺嘌呤得到抑制。此次研究为体内实验,存在一定的局限性,可能受本体以及其他因素的影响,因此细胞培养将成为下一步研究的重点。

致谢:感谢内蒙古医科大学第二附属医院刘万林、白锐、赵振群老师对本次课题研究的帮助与支持;感谢内蒙古医科大学分子病理实验室牛丽丽老师对我的指导与帮助。

作者贡献:刘万林、赵振群负责实验设计;马海龙负责实验实施、撰写论文;马海龙、赵振群负责指标测定;孙军负责行政支持,对文章内容做批评性审阅;马海龙对文章负责。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

出版规范:该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] 刘万林,郭文通,李文琪,等.激素性股骨头缺血坏死与前凝血状况的相关性研究[J].中华实验外科杂志,1999,16(4):377.

[2] 马海龙,刘万林.细胞自噬分子机制研究进展[J].内蒙古医科大学学报,2015,37(S1):87-92.

[3] 孟晨阳,刘万林,白锐,等.激素性股骨头缺血性坏死发病机制中的细胞自噬[J].中国组织工程研究,2017,21(8):1280-1287.

[4] 王文选,赵振群,刘万林,等.Becn1 和 MAP1-LC3 在家兔激素性股骨头缺血坏死中表达的实验研究[J].实用骨科杂志,2017,23(9):811-815.

[5] 张煦坚,赵振群,刘万林,等.激素性股骨头缺血坏死发病机制中的内质网应激[J].中国组织工程研究,2021,25(11):1759-1765.

[6] 刘孟初,曹林忠,蒋玮,等.PI3K/AKT/mTOR 信号通路在糖皮质激素性股骨头坏死中的表达与作用[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2021,14(1):87-93.

[7] 孙亮,刘万林,娜日松,等.3-甲基腺嘌呤调控自噬基因 Becn1 可降低模型兔激素性股骨头缺血坏死的发生与发展[J].中国组织工程研究,2019,23(15):2391-2396.

[8] 刘万林,郝廷,冯卫,等.家兔激素性股骨头坏死血管壁中差异表达基因的研究[J].中华创伤骨科杂志,2008,10(11):1058-1061.

[9] 龚瑜林,李云隆,刘万林,等.mTOR 短发卡 RNA 靶向调控血管内皮细胞自噬在激素性股骨头坏死中作用机制[J].中华实验外科杂志,2021,38(7):1234-1237.

[10] 李云隆,赵振群,刘万林,等.激素性股骨头缺血坏死中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对自噬的调控[J].骨与关节损伤杂志,2019,23(12):1921-1929.

[11] ZHAO D, ZHANG F, WANG B, et al. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version) J Orthop Translat. 2020;21:100-110.

[12] CHIKVATIA L, AVAZASHVILI N, OBGAI DZE G, et al. Steroid-induced osteonecroses of femoral head. Georgian Med News. 2020;298(1):21-27.

[13] YOON BH, JONES LC, CHEN CH, et al. Etiologic Classification Criteria of ARCO on Femoral Head Osteonecrosis Part 1: Glucocorticoid Associated Osteonecrosis. J Arthroplasty. 2019;34(1):163-168.e161.

[14] UDDIN MS, TEWARI D, SHARMA G, et al. Molecular Mechanisms of ER Stress and UPR in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol. 2020;57(7):2902-2919.

[15] BARTH S, GLICK D, MACLEOD KF. Autophagy: assays and artifacts. J Pathol. 2010;221(2):117-124.

[16] EZAKI J, MATSUMOTO N, TAKEDA-EZAKI M, et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. Autophagy. 2011;7(7):727-736.

[17] DU J, TENG RJ, GUAN T, et al. Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2012;302(2):383-391.

[18] CARPENTER JE, JACKSON W, BENETTI L, et al. Autophagosome formation during varicella-zoster virus infection following endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. J Virol. 2011;85(18):9414-9424.

[19] HERBST S, SCHAIBLE UE, SCHNEIDER BE. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. PLoS One. 2011;6(5):e19105.

[20] MEHRBOD P, ANDE SR, ALIZADEH J, et al. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. Virulence. 2019;10(1):376-413.

[21] WANG T, HE H, LIU S, et al. Autophagy: A Promising Target for Age related Osteoporosis. Curr Drug Targets. 2019;20(3):354-365.

[22] MOOSAVI MA, DJAVAHERI-MERGNY M. Autophagy: New Insights into Mechanisms of Action and Resistance of Treatment in Acute Promyelocytic leukemia. Int J Mol Sci. 2019;20(14):3559.

[23] QI Z, CHEN L. Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. Adv Exp Med Biol. 2019;1206(1):167-177.

[24] LUHR M, TORGERSEN ML, SZALAI P, et al. The kinase PERK and the transcription factor ATF4 play distinct and essential roles in autophagy resulting from tunicamycin-induced ER stress. J Biol Chem. 2019;294(20):8197-8217.

[25] WECKMAN A, DI IEVA A, ROTONDO F, et al. Autophagy in the endocrine glands. Mol Endocrinol. 2014;52(2):51-63.

[26] IDIKIO HA. Galectin-3 and Beclin1/Atg6 genes in human cancers: using cDNA tissue panel, qRT-PCR, and logistic regression model to identify cancer cell biomarkers. PLoS One. 2011;6(10):e26150.

[27] EZAKI J, MATSUMOTO N, TAKEDA-EZAKI M, et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. Autophagy. 2011;7(7):727-736.

[28] GAMBERI T, MODESTI A, MAGHERINI F, et al. Activation of autophagy by globular adiponectin is required for muscle differentiation. Mol Cell Res. 2016;1863(4):694-702.

(责任编辑:GD, ZN, ZJP)