

# 成年关节软骨碎块化后转化生长因子 $\beta 1$ 表达与软骨细胞迁移的关系

https://doi.org/10.12307/2022.219

吴聪, 贾全忠, 刘伦

投稿日期: 2020-06-16

送审日期: 2020-06-20

采用日期: 2021-02-15

在线日期: 2021-08-09

中图分类号:

R459.9; R318; R681.3

文章编号:

2095-4344(2022)08-01167-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

### 文章亮点—

△建立软骨体外损伤模型, 研究软骨碎块后转化生长因子  $\beta 1$  表达与软骨细胞迁移的关系, 希望为以后软骨碎块移植技术在临床上的应用提供理论支撑。



体外模型



干预及培养



观察指标

(1) 获取成年 SD 雄性大鼠后肢膝关节, 采用划格法获取碎块关节软骨颗粒和块状软骨, 复合明胶海绵碎屑及纤维蛋白胶制作体外培养模型;  
(2) 实验分 3 组, 即碎块组、整块组、抑制剂组。

(1) 碎块组和整块组均采用普通细胞培养液进行培养;  
(2) 抑制剂组采用添加外源性转化生长因子  $\beta 1$  抑制剂 Decori 和普通细胞培养液培养。

(1) Transwell 实验检测细胞迁移;  
(2) 鬼笔环肽染色观察细胞微丝骨架 F-actin 的变化;  
(3) 实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 和蛋白的表达;  
(4) 使用分子对接技术探索转化生长因子  $\beta 1$  和 F-actin 之间的关系。

## 文题释义:

**关节软骨损伤:** 由炎症、运动、撞击、疾病或者遗传导致的关节(膝盖、肘部、手部等部位)软骨受损, 引起患者的关节部位肿胀、畸形、错位, 致使患者长期被疼痛困扰, 直接导致患者出现行动障碍, 尚无根治性治疗手段, 该病严重影响患者的生活质量。

**骨软骨碎块移植技术:** 关节软骨经碎块后处理, 能够帮助软骨细胞突破自身致密网状结构的细胞外基质的束缚, 加快细胞骨架重排, 推动软骨细胞运动, 增强软骨细胞的迁移能力, 最大限度地解放自身软骨细胞的自我修复能力。

## 摘要

**背景:** 关节软骨碎块后能增强其修复能力, 其中具体机制尚不明确。

**目的:** 成年关节软骨碎块化后转化生长因子  $\beta 1$  的表达与软骨细胞迁移关系的研究。

**方法:** 收集 30 只 12~15 周龄的 SPF 级成年 SD 雄性大鼠后肢膝关节(共 60 膝), 采用划格法获取碎块关节软骨颗粒(约 1 mm×1 mm×1 mm)和块状软骨(直径约 5 mm, 厚度约 2 mm), 复合明胶海绵碎屑及纤维蛋白胶制作体外培养模型。实验分 3 组, 即碎块组、整块组、抑制剂组。碎块组和整块组均采用普通细胞培养液进行培养, 抑制剂组采用添加外源性转化生长因子  $\beta 1$  抑制剂 Decori 和普通细胞培养液培养。Transwell 实验检测细胞迁移; 鬼笔环肽染色观察细胞微丝骨架 F-actin 的变化; 实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 和蛋白的表达; 使用分子对接技术探索转化生长因子  $\beta 1$  和 F-actin 之间的关系。

**结果与结论:** ① Transwell 实验结果表明, 与整块组相比, 碎块组细胞通过 matrigel 基质胶的数量明显增多 ( $P < 0.05$ ); 与碎块组相比, 抑制剂组细胞通过 matrigel 基质胶的数量明显减少 ( $P < 0.05$ ); ② 鬼笔环肽染色结果表明, 与整块组相比, 碎块组的 F-actin 环状结构明显减少, 逐渐呈现细丝状结构, 细胞中应力纤维明显减少, 细胞间隙明显减小, 软骨损伤逐渐恢复; 与碎块组相比, 抑制剂组 F-actin 环状结构明显增多, 细胞间隙明显增大; ③ 与整块组相比, 碎块组转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 和蛋白的表达水平明显上升 ( $P < 0.05$ ); 与碎块组相比, 抑制剂组转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 和蛋白的表达水平明显下降 ( $P < 0.05$ ); ④ 分子对接模拟中转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 结合形成稳定的复合物, 主要以氢键作用力为主; ⑤ 提示转化生长因子  $\beta 1$  在成年关节软骨碎块化后存在过表达的现象, 并且过表达的转化生长因子  $\beta 1$  能够促进软骨细胞迁移, 促进软骨损伤的修复。

**关键词:** 转化生长因子  $\beta 1$ ; 关节软骨; 碎块; 软骨细胞迁移; F-actin; 转化生长因子  $\beta 1$  抑制剂

## Relationship between transforming growth factor beta1 expression and chondrocyte migration in adult articular cartilage after fragmentation

Wu Cong, Jia Quanzhong, Liu Lun

Department of Orthopedics, Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, Sichuan Province, China

Wu Cong, Master, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, Sichuan Province, China

**Corresponding author:** Wu Cong, Department of Orthopedics, Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, Sichuan Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Fragments of articular cartilage can enhance bone repair ability, the specific mechanism of which is still unclear.

四川绵阳四〇四医院骨科, 四川省绵阳市 621000

第一作者: 吴聪, 男, 1974 年生, 四川省绵阳市人, 汉族, 硕士, 副主任医师, 主要从事关节外科方面的研究。

通讯作者: 吴聪, 硕士, 副主任医师, 四川绵阳四〇四医院骨科, 四川省绵阳市 621000

https://orcid.org/0000-0003-4350-3954 (吴聪)

引用本文: 吴聪, 贾全忠, 刘伦. 成年关节软骨碎块化后转化生长因子  $\beta 1$  表达与软骨细胞迁移的关系 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(8):1167-1172.

2022, 26(8):1167-1172.



**OBJECTIVE:** To investigate the relationship between transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) expression and chondrocyte migration in adult fragmented articular cartilage.

**METHODS:** Hind limbs (60 knees) from 30 male Sprague-Dawley rats of 12–15 weeks old, SPF grade, were aseptically collected, and the articular cartilage particles (about 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm) and massive cartilage blocks (approximately 5 mm in diameter and 2 mm in thickness) were obtained by cross-cutting method. *In vitro* culture model of composite gelatin sponge crumb and fibrin glue was established. There were three experimental groups: fragment group, whole block group, and inhibitor group. Both the fragment group and the whole group were cultured in a common cell culture medium, and the inhibitor group was treated with an exogenous TGF- $\beta 1$  inhibitor, Decori, and a common cell culture solution. Transwell assay was used to detect cell migration. Phalloidin staining was used to observe the change of F-actin. The expression of TGF- $\beta 1$  mRNA and protein was detected by qRT-PCR and western blot, respectively. Molecular docking technique was used to explore the relationship between TGF- $\beta 1$  and F-actin.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Transwell assay results showed that the number of cells passing through matrigel increased significantly in the fragment group compared with the whole block group ( $P < 0.05$ ). Compared with the fragment group, the number of cells passing through matrigel in the inhibitor group was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The phalloidin staining results indicated that the F-actin ring structures were significantly reduced in the fragment group compared with the whole block group. Filamentous structures gradually formed with stress fibers in the cells being significantly reduced, the intercellular space being significantly reduced, and cartilage damage recovering gradually. Compared with the fragment group, the F-actin ring structures were significantly increased in the inhibitor group, presenting with the intercellular space evidently enlarging. Compared with the whole block group, the expression levels of TGF- $\beta 1$  mRNA and protein increased significantly in the fragment group ( $P < 0.05$ ); compared with the fragment group, the expression levels of TGF- $\beta 1$  mRNA and protein decreased significantly in the inhibitor group ( $P < 0.05$ ). In the molecular docking simulation, TGF- $\beta 1$  was combined with F-actin to form a stable complex, which was mainly based on hydrogen bonding force. Findings from this study indicate that TGF- $\beta 1$  can overexpress in adult fragmented articular cartilage, and the overexpression of TGF- $\beta 1$  can promote chondrocyte migration and promote cartilage.

**Key words:** transforming growth factor- $\beta 1$ ; articular cartilage; fragment; chondrocyte migration; F-actin; transforming growth factor  $\beta 1$  inhibitor

**How to cite this article:** WU C, JIA QZ, LIU L. Relationship between transforming growth factor beta1 expression and chondrocyte migration in adult articular cartilage after fragmentation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(8):1167-1172.

## 0 引言 Introduction

关节软骨损伤是临床最常见的关节病之一，一般由软骨骨关节炎、运动创伤以及骨性关节炎等因素引起<sup>[1]</sup>，如得不到及时有效的治疗可导致患者的关节疼痛、畸形，甚至行动障碍，严重影响患者的生活质量。有研究报道软骨损伤后的修复治疗是世界性的难题<sup>[2]</sup>，软骨损伤后，软骨细胞的自我修复能力有限，保守治疗（如低密度超声、敷用膏药等）在短期内难以帮助软骨细胞突破自身致密网状结构的细胞外基质的束缚，软骨细胞的迁移能力改善受限，软骨损伤修复缓慢，不能有效缓解患者疼痛<sup>[3]</sup>，由此软骨损伤修复的外科手术处理日渐成为关节软骨损伤治疗的热点。许多研究已经证明成年关节软骨碎块化处理后，损伤区域的修复效应得到增强<sup>[4]</sup>，因此软骨碎块移植技术有望解决软骨损伤后的修复问题；但是关节软骨碎块后能增强其修复能力，其中具体机制尚不明确。转化生长因子  $\beta 1$  作为一种多功能蛋白在骨组织中含量丰富，有报道称转化生长因子  $\beta 1$  在关节软骨损伤后软骨组织中表达异常的现象<sup>[5]</sup>。大量的动物实验证实，在软骨损伤发生早期转化生长因子  $\beta 1$  过表达，并且与细胞表面受体结合进入细胞核，通过基因调节抑制关节软骨细胞的变性、凋亡<sup>[6]</sup>。有学者报道称转化生长因子  $\beta 1$  与软骨细胞的迁移密切相关<sup>[7]</sup>。此次研究通过建立软骨体外损伤模型，来分析软骨碎块后转化生长因子  $\beta 1$  的表达与软骨细胞迁移的关系，希望为以后骨软骨碎块移植技术在临床上的应用提供理论支撑。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 实验动物体外实验，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

**1.2 时间及地点** 于 2019 年 1–5 月在四川绵阳四 O 四医院骨科完成。

**1.3 材料**

**1.3.1 实验动物** 12–15 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠共计 30 只，体质量 280–320 g，由四川绵阳四 O 四医院实验动物实

验中心提供，许可证号：2019-0005A。依照四川绵阳四 O 四医院实验动物管理办法，室温下标准饲料、自由饮水、分笼（4 笼）适应性饲养 1 周后用于实验。此次实验操作以及目的经四川绵阳四 O 四医院动物伦理委员会批准，许可证号：IACUC（川）2019-0097。

**1.3.2 主要试剂和仪器** DMEM 培养基（TOYOBO），Trizol 试剂盒（TaKaRa），I、III 型胶原兔多克隆抗体（美国 Abcam 公司），麻醉剂、转化生长因子  $\beta 1$  抗体、鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体（美国 Jackson 公司），Transwell 小室（美国 BD 公司），反转录试剂盒、Western blot 试剂盒（美国 Sigma 公司），全蛋白抽提试剂盒（德国 QIAGEN 公司），PBS（美国 Amresco 公司），转化生长因子  $\beta 1$  抑制剂重组人核心蛋白聚糖（Decorin，上海生工生物工程技术服务有限公司），FITC-鬼笔环肽染色剂（美国 Corning 公司），苏净 Airtech 超净工作台（北京六一仪器厂），SANYO MCO-15AC 细胞培养箱（美国强生公司），荧光显微镜（日本三菱公司），5810R 型高速离心机（日本岛津公司），Roche R480 实时荧光定量 PCR 仪（美国 Promega 公司）。

**1.4 方法**

**1.4.1 大鼠软骨采集** 所有大鼠均适应性喂养 7 d，参照文献 [2] 的方法麻醉后将大鼠经耳缘静脉注射 10 mL 空气以气栓法处死。无菌操作剥离完整后肢膝关节（共 60 膝），打开膝关节囊，显微镜下逐层清除周围组织，充分暴露膝关节胫骨端、股骨端。更换手术器械，无菌手套，采用划格法以颗粒大小约 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 取股骨髁、滑车、胫骨平台 3 处的全层软骨颗粒（碎块），同时从股骨髁直接切下 5 mm $\times$ 2 mm $\times$ 1 mm 的软骨片作为整块对照。取下的软骨依次用 PBS、生理盐水、无菌水洗净血细胞后备用。

**1.4.2 体外培养标本制作** 用无菌注射器抽取 2 mL 预配置的凝血酶原 + 氯化钙混合溶液浸湿到明胶海绵碎屑，将明胶海绵以一定厚度均匀平铺在培养基中，使用显微镊夹软骨颗粒 / 整块在氯化钙溶液中浸湿后平铺在明胶海绵碎屑中，加入 100 mL 充分溶解的纤维蛋白，室温下无菌避光放置 10–

15 mm，保证纤维蛋白原与凝血酶充分反应，凝至胶冻状。将软骨 / 明胶海绵 / 纤维蛋白胶冻状复合物以预消毒的显微剪剪成大小约 5 mm×5 mm×2 mm 块状模型，体外培养标本制作完成。

#### 组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	建立软骨碎块模型
选择动物的条件:	SD 大鼠, 雄性, 12-15 周龄, 体质量 280-320 g
模型与所研究疾病的关系:	研究碎块软骨应用到关节软骨损伤修复的可能性
动物来源及品系:	SD 大鼠由四川绵阳四 O 四医院实验动物实验中心提供
造模技术描述:	打开膝关节囊, 显微镜下逐层清除周围组织, 充分暴露膝关节胫骨端、股骨端。更换手术器械, 无菌手套, 采用划格法以颗粒大小约 1 mm×1 mm×1 mm 取股骨髁、滑车、胫骨平台 3 处的全层软骨颗粒 (碎块), 同时从股骨髁直接切下 5 mm×2 mm×1 mm 的软骨片作为整块对照
动物分组方法:	实验软骨标本分为整块组、碎块组、抑制剂组
造模成功评价指标:	软骨 / 明胶海绵 / 纤维蛋白胶冻状复合物以预消毒的显微剪剪成大小 5 mm×5 mm×2 mm 的块状模型, 体外培养标本制作完成
造模后观察指标:	细胞迁移以及转化生长因子 $\beta 1$ 在标本中的表达
伦理委员会批准:	实验操作以及目的经四川绵阳四 O 四医院动物伦理委员会批准, 批准号为 IACUC(川)2019-0097

**1.4.3 实验分组处理** 实验分为 3 组, 即整块组、碎块组及抑制剂组, 共 60 膝, 每组 20 膝。整块组制备软骨整块 / 明胶海绵 / 纤维蛋白胶冻状复合物, 普通培养液培养; 碎块组制备软骨碎块颗粒 / 明胶海绵 / 纤维蛋白胶冻状复合物, 普通培养液培养; 抑制剂组制备软骨碎块颗粒 / 明胶海绵 / 纤维蛋白胶冻状复合物, 普通培养液 +100  $\mu\text{g/L}$  Decorin(转化生长因子  $\beta 1$  抑制剂)培养。将各组标本放入含有灭活体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 g/L 链霉素的 DMEM 培养基中, 生化培养箱中培养 (培养条件 37  $^{\circ}\text{C}$ , 体积分数 5% $\text{CO}_2$ ), 平均 2 d 更换培养液 1 次。

**1.4.4 Transwell 实验检测细胞迁移** 待各组标本标准培养 6 周后, 取出各组 10% 的组织标本, 弃掉培养液, 并在实验前 12 h 更换为无血清培养基, 将 40  $\mu\text{L}$  matrigel 基质胶铺于 Transwell 小室中, 消化细胞并用 1  $\mu\text{L}$  PBS 清洗 2 遍, 将 500  $\mu\text{L}$  完全培养基加入 24 孔板, 将各组 10% 的组织标本制成细胞重悬液, 向 Transwell 小室中加 200-250  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 保证下层完全培养基与 Transwell 小室间无气泡。置于培养箱内正常培养 24 h, 加用甲醇配制、PBS 稀释的 0.1% 结晶紫染液 500  $\mu\text{L}$  进行染色, 室温避光 15 min, PBS 漂洗后用棉棒擦 Transwell 小室内部, 倒置晾干, 置于倒置荧光显微镜下观察显穿过膜的细胞并拍照计数。

**1.4.5 鬼笔环肽染色观察细胞微丝骨架 F-actin 的变化** 待各组标本标准培养 6 周后, 取出各组 20% 的组织标本, 体积分数 10% 的甲醛固定 30 min, 然后 PBS 冲洗, 预冷冰醋酸上透膜 20 min, 37  $^{\circ}\text{C}$  下封闭, 加入一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  温育过夜, PBS 冲洗 10 min, 加入 FITC- 鬼笔环肽染色剂, 孵育 4 h, 在 LEICA 激光共聚焦显微镜下观察细胞微丝骨架。

**1.4.6 实时荧光定量 PCR 检测转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 的表达** 待各组标本标准培养 6 周后, 取出各组 10% 的组织标本, 各组标本总 RNA 依据 Trizol 法提取, 常规手段检测 RNA 条带的完整性以及 RNA 纯度, 取 1  $\mu\text{g}$  RNA 进行反转录, 按照 PrimeScrip 反转录试剂盒要求进行反转录成 cDNA。依据 AceQ qPCR SYBR Green Mix 说明书配置 PCR 反应所需的反应液, 反应条件为: ①预变性: 75  $^{\circ}\text{C}$ , 120 s; ②变性: 90  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min; ③退火: 60  $^{\circ}\text{C}$ , 60 s; ④延伸 72  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; ⑤ PCR 仪采集荧光信号 40 个循环, U6 作为内参, 上游引物为 5'-GCA GCT TGG TGC ACA CCT AG-3', 下游引物为 5'-GGA GCT GCT GTG ACA TCC AT-3'; 转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 上游引物为 5'-GCT CCT CTT AGG GGC CAC T-3', 下游引物为 5'-ATT GGG GAC CCT TAG GCC AT-3', 相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  表示。每个样本独立重复实验 3 次。

**1.4.7 Western blotting 检测转化生长因子  $\beta 1$  蛋白的表达** 待各组标本标准培养 6 周后, 取出各组 10% 的组织标本, 弃掉培养液, 冰上裂解 30 min 后, 离心获得上清, 采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 每个样品取 50  $\mu\text{g}$ , 然后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、加入封闭液 4 泳过夜孕育, 然后分别加入一抗 (转化生长因子  $\beta 1$ )(1 : 1 500), 孕育 1 h, 洗涤加入抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1 : 10 000), DAB 显色, 以 GAPDH 作为内参表示蛋白的相对表达水平。

**1.4.8 在线生物数据库探索转化生长因子  $\beta 1$  和 F-actin 之间的关系** 从蛋白相互作用信息网站 <https://string-db.org/> 和 <http://genemania.org/> 探寻人体中转化生长因子  $\beta 1$  和 F-actin (DMTN) 的蛋白质相互作用网络 (PPI 网络); 从生物蛋白结构信息库中搜索转化生长因子  $\beta 1$  和 F-actin 的模拟分子结构, 采用 AUTODOCK8.5 程序对转化生长因子  $\beta 1$  进行添加氢键、去除水及原始配体等预处理, 输入 AUTODOCK-VINA 软件进行分子对接模拟, 对两分子进行构象和位置的全局搜索, 运用 LAMARCKIAN 遗传算法, 依据最低结合能来确定最稳定的结合构象。

**1.5 主要观察指标** 观察细胞的迁移数量以及转化生长因子  $\beta 1$  在标本中的表达情况; 采用在线数据库以及分子对接模拟技术探讨细胞迁移的机制。

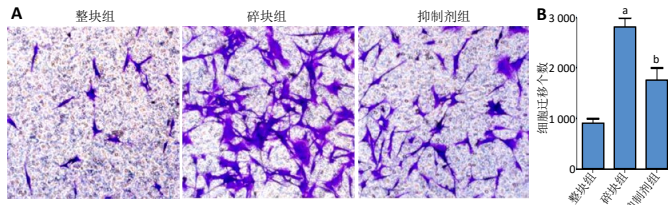
**1.6 统计学分析** 数据统计采用 SPSS 19.0 软件, 作图工具采用 Graphpad 5.01, 两组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 共有 30 只 SD 大鼠进行实验, 取后膝关节, 共 60 膝, 分为 3 组, 每组 20 个标本。由于取膝用作实验, 实验人员技术纯熟, 无脱失。

**2.2 Transwell 实验检测细胞迁移** Transwell 实验结果见图 1, 与整块组相比, 碎块组细胞通过 matrigel 基质胶的数量明显增多 ( $P < 0.05$ ); 与碎块组相比, 抑制剂组细胞通过 matrigel 基质胶的数量明显减少 ( $P < 0.05$ ), 推断碎块化处理后可增强软骨细胞的迁移能力。



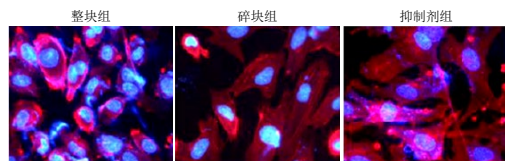


图注：图 A 为结晶紫染色 ( $\times 400$ )；整块组迁移细胞数量较少，碎块组迁移数量最为丰富，抑制剂组细胞迁移数量明显减少。图 B 中，与整块组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与碎块组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 1 | Transwell 实验检测各组标本中细胞的迁移能力

Figure 1 | Transwell assay detection of cell migration ability in each group of specimens

2.3 鬼笔环肽染色观察各组细胞微丝骨架的变化 细胞微丝骨架 F-actin 是软骨细胞结构和功能的基础，细胞运动、凋亡等生理活动都是通过微丝骨架 F-actin 的重排来完成的。此次研究用鬼笔环肽染色来观察各组细胞微丝骨架 F-actin 的变化，结果见图 2。



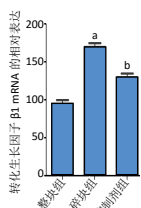
图注：整块组中 F-actin 呈现较强的红色荧光，环绕在胞质周围，发生重排的蛋白较少；碎块组 F-actin 明显减少，发生重排的蛋白增强，细胞间隙明显减少；抑制剂组中 F-actin 重排的部分明显少于碎块组

图 2 | 鬼笔环肽染色观察各组标本中细胞微丝骨架 F-actin 的变化 ( $\times 400$ )

Figure 2 | Changes in cell microfilament skeleton F-actin in each group of specimens observed using phalloidin staining ( $\times 400$ )

整块组 F-actin(图中红色部分)形成环状主要分布在细胞质膜周围，细胞边缘显示较强的荧光，F-actin 重排构成的应力纤维增多，细胞变圆，胞膜有回缩、内陷现象，较大的缝隙清晰可见；与整块组相比，碎块组的 F-actin 环状结构明显减少，逐渐呈现细丝状结构，细胞中应力纤维明显减少，细胞间隙明显减小，软骨损伤逐渐恢复；与碎块组相比，抑制剂组 F-actin 环状结构明显增多，细胞间隙明显增大。

2.4 各组标本中转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 和蛋白的表达 实时荧光定量 PCR 检测各组标本转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 的表达见图 3。与整块组相比，碎块组转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 表达明显上升 ( $P < 0.05$ )；与碎块组相比，抑制剂组转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 表达明显下降 ( $P < 0.05$ )。

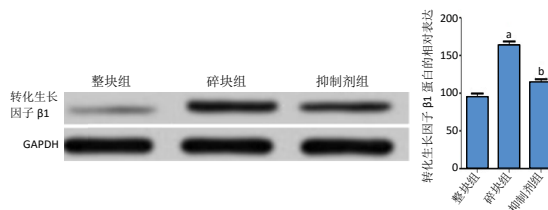


图注：与整块组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与碎块组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 | 实时荧光定量 PCR 检测各组标本中转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 的表达

Figure 3 | qRT-PCR detection of the mRNA expression of transforming growth factor  $\beta 1$  in each group of specimens

Western blot 检测结果见图 4。与整块组相比，碎块组转化生长因子  $\beta 1$  的表达明显上升 ( $P < 0.05$ )；与碎块组相比，抑制剂组转化生长因子  $\beta 1$  的表达明显下降 ( $P < 0.05$ )；说明碎块处理后可增强转化生长因子  $\beta 1$  的 mRNA 和蛋白表达。

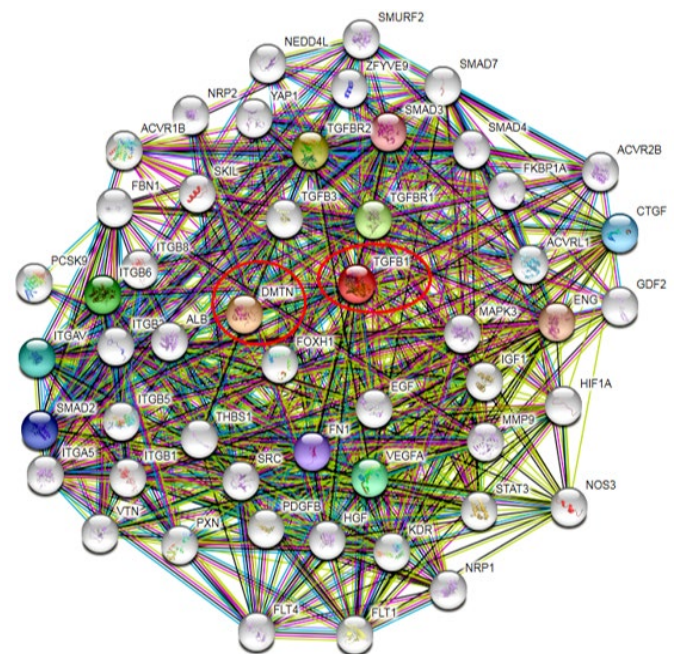


图注：与整块组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与碎块组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 4 | Western blot 检测转化生长因子  $\beta 1$  蛋白的表达

Figure 4 | Western blot detection of the expression of transforming growth factor  $\beta 1$  in each group of specimens

2.5 转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 表达的蛋白质相互作用 生物数据库 <https://string-db.org/> 结果显示，转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin(DMTN) 的蛋白质相互作用见图 5。



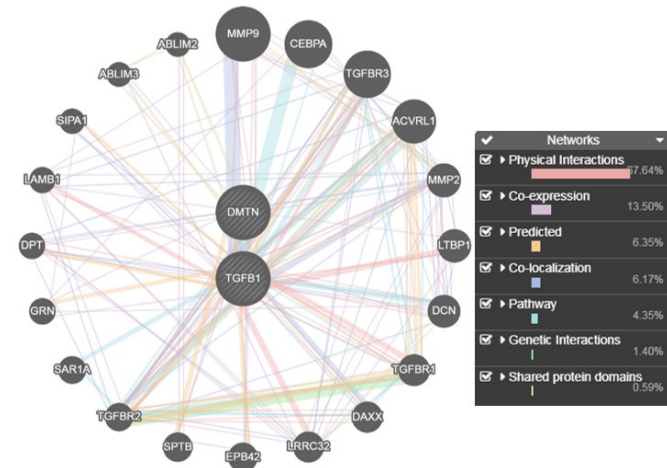
图注：F-actin 在线数据库 STRING 中的 ID 号为 DMTN，图中为基于 STRING 构建的 TGF- $\beta 1$  和 F-actin 相互作用网络

图 5 | 转化生长因子  $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ ) 与 F-actin(DMTN) 的蛋白质相互作用

Figure 5 | Protein-protein interaction of transforming growth factor  $\beta 1$  with F-actin

转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 存在十分复杂的网络关系。genemania.org 数据库结果见图 6，转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 在物理性结合以及体内的共表达、基因定位之间等方面都存在明显的相关性。

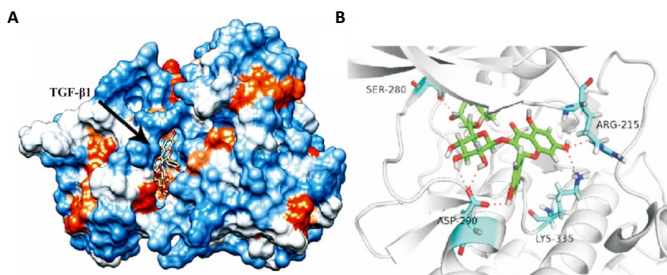
2.6 转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 的分子对接模拟 采用 AUTODOCK-VINA 软件对转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 进行分子对接模拟，转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 的结合的表面模拟模型见图 7A，计算得到转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 的结合力为  $-41.020$  kJ/mol。转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 的结合的丝带模型见图 7B，两者相连接的 3 个氢键长度分别为 0.23, 0.24, 0.26 nm。可推断转化生长因子  $\beta 1$  与 F-actin 结合形成稳定的复合物，主要以氢键作用力为主。



图注: genemania.org 数据库结果显示 TGF-β1 和 F-actin(DMTN) 作用的物理性为 67.64%, 可靶向调控多种蛋白的表达

图 6 | 转化生长因子 β1(TGF-β1) 与 F-actin 的作用的物理性、共表达情况

Figure 6 | The physical properties and co-expression of transforming growth factor β1 and F-actin



图注: 图 A 中箭头所指为在分子对接模拟中 TGF-β1 与 F-actin 的结合位点; 图 B 所示为 TGF-β1 与 F-actin 结合的丝带模型的氢键位置

图 7 | 转化生长因子 β1(TGF-β1) 与 F-actin 的分子对接模拟结果

Figure 7 | Molecular docking simulation results of transforming growth factor β1 and F-actin

### 3 讨论 Discussion

关节软骨主要包括胶原纤维、骨架蛋白、水以及软骨细胞等, 属于透明软骨, 长期劳损、磨损和细微损伤均可导致关节软骨损伤<sup>[8]</sup>。IKOMA 等<sup>[9]</sup> 研究报道, 软骨损伤直径超过 3 mm 后, 软骨组织的自我愈合能力受限, 最终会导致患者的行动障碍。常用的关节灌洗手术、钻孔微骨手术、磨削成型手术不能使所有的患者受益, 随着细胞培养技术、生命材料科学以及外科器官移植手术的发展, 国内外致力于从分子水平研究新手段, 比如软骨碎块移植手术来修复软骨损伤。

软骨细胞主要由微管、微丝以及连接蛋白构成骨架结构<sup>[10]</sup>, 细胞骨架的稳定维系着细胞的各个生理活动, 而细胞运动、迁移是一个复杂生物物理过程, 主要通过细胞骨架的重排来完成的<sup>[11]</sup>, 尤其是细胞的微丝骨架 F-actin 在细胞运动、迁移中发挥了关键的作用<sup>[12]</sup>。宋登新等<sup>[13]</sup> 采用双向免疫电泳实验证实, 软骨损伤后软骨骨架蛋白的表达存在明显的差异。有研究证实骨架蛋白结构紊乱是软骨细胞无序凋亡、软

骨损伤难以修复的生物结构基础<sup>[14]</sup>。此次研究中用 Transwell 实验以及鬼笔环肽染色结果发现, 与整块组相比, 碎块组细胞通过 matrigel 基质胶的数量明显增多 ( $P < 0.05$ ), 碎块组的 F-actin 环状结构明显减少, 逐渐呈现细丝状结构, 细胞中应力纤维明显减少, 说明碎块化处理后能促进软骨细胞的迁移以及阻止细胞骨架结构的紊乱。

转化生长因子 β1 广泛存在于骨组织中, 研究表明转化生长因子 β1 可促进细胞增殖、分化以及成纤维细胞和巨噬细胞的聚集, 与组织的修复和再生过程关系密切<sup>[15]</sup>。研究表明, 在关节软骨中, 转化生长因子 β1 的高表达在软骨细胞外基质合成、分化、黏附以及迁移中发挥了重要作用<sup>[16]</sup>。WANG 等<sup>[17]</sup> 研究证实, 在体外培养 C57BL 小鼠的关节软骨细胞时, 外源性添加转化生长因子 β1 能明显增强软骨细胞间隙链蛋白的表达, 促进软骨细胞的迁移。HORITA 等<sup>[18]</sup> 敲除转化生长因子 β1 基因的表达后, 软骨细胞的迁移受限, 糖尿病小鼠的软骨损伤恢复明显减慢, 伤口愈合延缓。

此次研究中采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测各组标本中转化生长因子 β1 mRNA 和蛋白的表达水平, 结果发现与整块组相比, 碎块组转化生长因子 β1 的 mRNA 和蛋白的表达水平明显上升 ( $P < 0.05$ ), 说明碎块后干预能改变软骨组织中转化生长因子 β1 的转录与蛋白的表达水平, 以转化生长因子 β1 抑制剂作为对照组, 与碎块组相比, 抑制剂组转化生长因子 β1 mRNA 和蛋白的表达水平明显下降 ( $P < 0.05$ ); 这与之前的研究一致, 结合基因聚类热点分析和 GO 注释分析结果表明, 碎块化处理后, 碎块软骨中转化生长因子 β1 的表达水平明显上调。与碎块组相比, 抑制剂组细胞通过 matrigel 基质胶的数量明显减少 ( $P < 0.05$ ), 抑制剂组 F-actin 环状结构明显增多, 细胞间隙明显增大, 推断转化生长因子 β1 的表达可能影响 F-actin 骨架的变化, 在线生物数据库显示转化生长因子 β1 与 F-actin 在体内的表达存在明显的相互作用关系, 采用分子对接技术显示转化生长因子 β1 和 F-actin 在结构上存在特异性结合位点, 两蛋白以氢键作用力形成稳定的复合体, 在软骨细胞迁移中发挥作用, 修复关节软骨损伤。

此次研究的优点在于, 提出进行关节碎块干预后能促进软骨细胞迁移及软骨损伤的修复, 为软骨损伤的治疗提供了一个新的思路, 未来有望针对转化生长因子 β1 的分子以及软骨组织、细胞的生物学特性来设计靶向治疗手段<sup>[19]</sup>。但是考虑到体外实验与体内实验的差异, 以及基础动物实验和临床推广应用的差异, 患者是否适合靶向治疗, 如何将靶向治疗和化疗药物联用, 怎样将多种靶向药物联合使用以达到更好的治疗效果, 还需要更深入的研究。

综合上述, 转化生长因子 β1 在成年关节软骨碎块化后存在过表达的现象, 并且过表达的转化生长因子 β1 能够促进软骨细胞迁移及软骨损伤的修复。但是如何将转化生长因子 β1 的这种作用应用在临床上对软骨损伤进行治疗还有待进一步研究。



**致谢:** 向支持此次研究的课题组成员以及关注研究进展的科室领导表示诚挚的谢意。

**作者贡献:** 吴聪负责实验设计, 贾全忠负责实验实施, 刘伦负责评估。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**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。

**机构伦理问题:** 实验方案经四川绵阳四 O 四医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 IACUC(川)2019-0097。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。

**写作指南:** 该研究遵守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》。

**文章查重:** 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。

**文章外审:** 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。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经四川绵阳四 O 四医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**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。

#### 4 参考文献 References

- [1] BOWLAND P, COWIE RM, INGHAM E, et al. Biomechanical assessment of the stability of osteochondral grafts implanted in porcine and bovine femoral condyles. *Proc Inst Mech Eng H*. 2020;234(2):163-170.
- [2] BEYNNON BD, FIORENTINO N, GARDNER-MORSE M, et al. Combined Injury to the ACL and Lateral Meniscus Alters the Geometry of Articular Cartilage and Meniscus Soon After Initial Trauma. *J Orthop Res*. 2020;38(4):759-767.
- [3] ZHENG Z, XIANG S, WANG Y, et al. NR4A1 promotes TNF  $\alpha$  induced chondrocyte death and migration injury via activating the AMPK/Drp1/mitochondrial fission pathway. *Int J Mol Med*. 2020;45(1):151-161.
- [4] YAUSEP OE, MADHI I, TRIGKILIDAS D. Platelet rich plasma for treatment of osteochondral lesions of the talus: A systematic review of clinical trials. *J Orthop*. 2020;18(1):218-225.
- [5] LI S, NIU G, WU Y, et al. Vitamin D prevents articular cartilage erosion by regulating collagen II turnover through TGF- $\beta$ 1 in ovariectomized rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(2):345-353.
- [6] WANG YJ, SHEN M, WANG S, et al. Inhibition of the TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway protects against cartilage injury and osteoarthritis in a rat model. *Life Sci*. 2017;189(7):106-113.
- [7] WANG Q, ZHOU C, LI X, et al. TGF- $\beta$ 1 promotes gap junctions formation in chondrocytes via Smad3/Smad4 signalling. *Cell Prolif*. 2019;52(2):e12544.
- [8] CALKINS TE, CULVERN C, NAM D, et al. Dilute Betadine Lavage Reduces the Risk of Acute Postoperative Periprosthetic Joint Infection in Aseptic Revision Total Knee and Hip Arthroplasty: A Randomized Controlled Trial. *J Arthroplasty*. 2020;35(2):538-543.
- [9] IKOMA K, KIDO M, MAKI M, et al. Early stage and small medial osteochondral lesions of the talus in the presence of chronic lateral ankle instability: A retrospective study. *J Orthop Sci*. 2020;25(1):178-182.
- [10] PARENTO J, KANDEL R, FOWLER V. Regionally distinct f-actin networks within articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(3):149-150.
- [11] KIM IG, KO J, LEE HR, et al. Mesenchymal cells condensation-inducible mesh scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2016;85(12):18-29.
- [12] ROWLAND CR, COLUCCI LA, GUILAK F. Fabrication of anatomically-shaped cartilage constructs using decellularized cartilage-derived matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2016;91(7):57-72.
- [13] 宋登新, 曹云, 何小文, 等. 退行性骨关节炎软骨细胞差异表达蛋白及功能的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015,32(8):1953-1956.
- [14] LI G, SONG X, LI R, et al. Zyxin-involved actin regulation is essential in the maintenance of vinculin focal adhesion and chondrocyte differentiation status. *Cell Prolif*. 2019;52(1):e12532.
- [15] CHINZEI N, BROPHY RH, DUAN X, et al. Molecular influence of anterior cruciate ligament tear remnants on chondrocytes: a biologic connection between injury and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(4): 588-599.
- [16] ROTHDIENER M, UYNUK-OOL T, SÜPKAMP N, et al. Human osteoarthritic chondrons outnumber patient-and joint-matched chondrocytes in hydrogel culture-Future application in autologous cell-based OA cartilage repair? *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(2):e1206-e1220.
- [17] WANG Q, ZHOU C, LI X, et al. TGF- $\beta$ 1 promotes gap junctions formation in chondrocytes via Smad3/Smad4 signalling. *Cell Prolif*. 2019;52(2):e12544.
- [18] HORITA M, NISHIDA K, HASEI J, et al. Involvement of ADAM12 in Chondrocyte Differentiation by Regulation of TGF- $\beta$ 1-Induced IGF-1 and RUNX-2 Expressions. *Calcif Tissue Int*. 2019;105(1):97-106.
- [19] CHEN Y, WU T, HUANG S, et al. Sustained release SDF-1 $\alpha$ /TGF- $\beta$ 1-loaded silk fibroin-porous gelatin scaffold promotes cartilage repair. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(16):14608-14618.

(责任编辑: GD, ZN, ZH)