

· 基础研究 ·

细胞自噬在酒精性股骨头坏死中的作用及相关机制研究

陶振宇, 张月雷, 陈华, 孙辽军

(温州医科大学附属第二医院, 浙江 温州 325027)

摘要 **目的:**探讨细胞自噬在酒精性股骨头坏死中的作用及相关机制。**方法:**将 15 只 1 月龄 SPF 级 C57 小鼠随机分为空白对照组、酒精组及雷帕霉素-酒精组, 每组 5 只。空白对照组喂食饮用水 6 周, 腹腔内注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 不含雷帕霉素的溶剂; 酒精组喂食含 30% 酒精的饮用水 6 周, 腹腔内注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 不含雷帕霉素的溶剂; 雷帕霉素-酒精组喂食含 30% 酒精的饮用水 6 周, 腹腔内注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的雷帕霉素溶液。腹腔内注射每天 1 次, 连续注射 2 周。酒精干预 6 周后, 获取各组小鼠右侧股骨头, 行微型 CT 平扫后将股骨头制成切片, 苏木素-伊红染色后在显微镜下观察股骨头组织形态, 并计算空骨陷窝百分比(总细胞凋亡率)。取 MC3T3-E1 细胞, 传代培养至第 3 代, 经含酒精浓度为 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 α -MEM 培养基孵育后, 采用 CCK8 法检测其相对生长率。将培养好的第 3 代 MC3T3-E1 细胞随机分为 4 组, 分别以普通 α -MEM 培养基(正常组)、含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒精的 α -MEM 培养基(含酒精组)、含 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷帕霉素的 α -MEM 培养基(含雷帕霉素组)、含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒精和 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷帕霉素的 α -MEM 培养基(含酒精-雷帕霉素组)培养, 连续培养 24 h; 采用 Western blot 法检测 MC3T3-E1 细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)-I、LC3-II、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、Beclin1 蛋白表达量。**结果:**①股骨头 CT 扫描结果。空白对照组小鼠股骨头骨小梁大体形态良好, 分布均匀, 未见软骨下坏死带形成; 酒精组小鼠股骨头软骨下坏死带形成, 骨小梁闭塞, 髓腔内骨小梁变细、稀疏、断裂, 骨皮质增厚; 雷帕霉素-酒精组小鼠股骨头 CT 影像学表现介于酒精组与空白对照组之间, 可见髓腔内部分骨小梁出现断裂萎缩, 软骨下骨部分坏死形成。②显微镜下股骨头组织形态观察结果。空白对照组小鼠股骨头骨小梁形态良好, 未见空骨陷窝、脂肪细胞及脂质沉积, 无组织坏死、纤维化; 酒精组小鼠股骨头骨小梁稀疏、紊乱, 脂肪细胞增多, 骨细胞内脂质沉积, 可见大量空骨陷窝形成, 局部组织坏死、纤维化, 细胞数目减少; 雷帕霉素-酒精组小鼠股骨头部分骨小梁出现断裂、萎缩, 可见少量空骨陷窝形成。③总细胞凋亡率。空白对照组总细胞凋亡率为 $(6.06 \pm 1.93)\%$, 酒精组为 $(63.9 \pm 9.63)\%$, 雷帕霉素-酒精组为 $(34.0 \pm 5.82)\%$; 3 组总细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义($F=192.800, P=0.000$); 进一步两两比较, 酒精组和雷帕霉素-酒精组总细胞凋亡率均大于空白对照组($P=0.000, P=0.000$), 酒精组总细胞凋亡率大于雷帕霉素-酒精组($P=0.000$)。④不同浓度酒精干预后 MC3T3-E1 细胞相对生长率。在含酒精浓度为 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 α -MEM 培养基中培养 24 h 后 MC3T3-E1 细胞相对生长率比较, 差异有统计学意义($1.00 \pm 0.00, 0.88 \pm 0.04, 0.67 \pm 0.09, 0.31 \pm 0.04, 0.28 \pm 0.02$; $F=106.900, P=0.001$)。未经酒精干预的 MC3T3-E1 细胞相对生长率高于浓度为 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酒精干预后的 MC3T3-E1 细胞相对生长率($P=0.011, P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。⑤MC3T3-E1 细胞中 LC3-II/LC3-I 的比值及 mTOR、Beclin-1 的蛋白表达。4 组小鼠 MC3T3-E1 细胞中 LC3-II/LC3-I 的比值比较, 组间差异有统计学意义($1.16 \pm 0.10, 0.71 \pm 0.06, 1.50 \pm 0.06, 1.23 \pm 0.05$; $F=86.600, P=0.000$); 正常组 MC3T3-E1 细胞中 LC3-II/LC3-I 的比值高于含酒精组($P=0.000$), 低于含雷帕霉素组($P=0.000$), 与含酒精-雷帕霉素组比较差异无统计学意义($P=0.166$); 含酒精组 MC3T3-E1 细胞中 LC3-II/LC3-I 的比值低于含雷帕霉素组及含酒精-雷帕霉素组($P=0.000, P=0.000$); 含雷帕霉素组 LC3-II/LC3-I 的比值高于含酒精-雷帕霉素组($P=0.000$)。4 组小鼠 MC3T3-E1 细胞中 mTOR 蛋白表达量比较, 组间差异有统计学意义($1.13 \pm 0.10, 1.23 \pm 0.06, 0.34 \pm 0.03, 0.63 \pm 0.05$; $F=167.800, P=0.000$); 正常组 MC3T3-E1 细胞中 mTOR 蛋白表达量低于含酒精组($P=0.033$), 高于含雷帕霉素组及含酒精-雷帕霉素组($P=0.000, P=0.000$); 含酒精组 MC3T3-E1 细胞中 mTOR 蛋白表达量高于含雷帕霉素组及含酒精-雷帕霉素组($P=0.000, P=0.000$), 含雷帕霉素组 mTOR 蛋白表达量低于含酒精-雷帕霉素组($P=0.000$)。4 组小鼠 MC3T3-E1 细胞中 Beclin-1 蛋白表达量比较, 组间差异有统计学意义($0.97 \pm 0.08, 0.67 \pm 0.01, 1.11 \pm 0.08, 1.06 \pm 0.04$; $F=42.400, P=0.000$); 正常组 MC3T3-E1 细胞中 Beclin-1 蛋白表达量高于含酒精组, 而与含雷帕霉素组、含酒精-雷帕霉素组比较, 组间差异均无统计学意义($P=0.077, P=0.127$); 含酒精组 MC3T3-E1 细胞中 Beclin-1 蛋白表达量低于

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2014KYB160)

通讯作者:孙辽军 E-mail:sunlj797110@163.com

含雷帕霉素组及含酒精-雷帕霉素组($P=0.000, P=0.000$);含雷帕霉素组 MC3T3-E1 细胞中 Beclin-1 蛋白表达量高于含酒精-雷帕霉素组($P=0.004$)。结论:细胞自噬在酒精性股骨头坏死的病变过程中可能发挥着非常重要的保护作用。酒精刺激引起的细胞自噬水平的降低可能是引起股骨头坏死的原因之一,其作用机制可能与酒精刺激影响自噬关键调控分子 mTOR、Beclin1 的表达有关。

关键词 股骨头坏死;自噬;西罗莫司;小鼠;动物实验

Roles of cell autophagy in alcohol – induced osteonecrosis of the femoral head and its related mechanisms of action:an experimental study

TAO Zhenyu, ZHANG Yuelei, CHEN Hua, SUN Liaojun

The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective:To explore the roles of cell autophagy in alcohol – induced osteonecrosis of the femoral head (ONFH) and its related mechanisms of action. **Methods:**Fifteen 1 – month – old SPF – grade C57 mice were randomly divided into blank control group, alcohol group and rapamycin (RAPA) – alcohol group, 5 mice in each group. The mice in blank control group, alcohol group and RAPA – alcohol group were fed with drinking water, drinking water added with 30% alcohol and drinking water added with 30% alcohol for 6 weeks respectively, and were intraperitoneal injected with solvent (5 mg/kg) without RAPA, solvent (5 mg/kg) without RAPA and RAPA solution (5 mg/kg) respectively. The intraperitoneal injection was performed once a day for consecutive 2 weeks. After six – week alcohol intervention, the right femoral heads were obtained from mice of each group and were sectioned after micro – CT plain scanning. The tissue morphology of femoral heads were observed under microscope after hematoxylin – eosin (HE) staining, and the percentage of empty bone lacuna (total cell apoptosis rate) was calculated. MC3T3 – E1 cells were fetched out from femoral head tissues for subculturing. The relative growth rate (RGR) of the third – generation MC3T3 – E1 cells was measured by using CCK8 method after the cells were cultured in α – MEM culture medium supplemented with alcohol with concentrations of 0, 25, 50, 100 and 200 mmol/L respectively. The third – generation MC3T3 – E1 cells were randomly divided into 4 groups and were cultured for continuous 24 hours in normal α – MEM culture medium (normal group), α – MEM culture medium supplemented with alcohol with concentration of 100 mmol/L (alcoholic group), α – MEM culture medium supplemented with RAPA with concentration of 100 nmol/L (RAPA group), and α – MEM culture medium supplemented with alcohol and RAPA with concentration of 100 mmol/L and 100 nmol/L (alcoholic – RAPA group) respectively. The protein expressions of microtubule – associated protein 1 light chain 3 (LC3) – I, LC3 – II, mammalian target of rapamycin (mTOR) and Beclin1 in MC3T3 – E1 cells were detected by using Western blot assays. **Results:**The results of CT scanning on femoral heads showed that (1) the trabecular bones had good gross morphology and were uniformly distributed, and no subchondral necrotic zone was found in femoral heads in blank control group; (2) the subchondral necrotic zone, occluded trabecular bones, increased bone cortex and thin, sparse and fractured intramedullary trabecular bones were found in femoral heads in alcoholic group; (3) the CT imaging manifestations of femoral heads of mice in RAPA – alcohol group were between alcoholic group's and blank control group's, and some fractured and atrophic trabecular bones were found in medullary cavity and partial osteonecrosis of subcartilaginous bone formed. The results of morphological observation on femoral heads under the microscope showed that (1) the trabecular bone had good morphology and no empty bone lacuna, adipocyte, lipid deposition, tissue necrosis and fibrosis were found in femoral heads in blank control group; (2) the trabecular bones were sparse and disordered, and the adipocytes increased in number, and lipidosis was found in bone cells, meanwhile, a large number of empty bone lacuna formed, and necrosis and fibrosis were found in partial tissues, and cells decreased in number in femoral heads in alcoholic group; (3) some fractured and atrophic trabecular bones and a small number of empty bone lacuna were found in femoral heads in RAPA – alcohol group. The total cell apoptosis rates of blank control group, alcohol group and RAPA – alcohol group were 6.06 ± 1.93 , 63.9 ± 9.63 and 34.0 ± 5.82 % respectively. There was statistical difference in the total cell apoptosis rates between the 3 groups ($F=192.800, P=0.000$). Further pairwise comparison showed that the total cell apoptosis rates were higher in alcohol group and RAPA – alcohol group compared to blank control group, and were higher in alcohol group compared to RAPA – alcohol group ($P=0.000, P=0.000; P=0.000$). After 24 – hour cultivation in α – MEM culture medium supplemented with alcohol with concentrations of 0, 25, 50, 100 and 200 mmol/L, there was statistical difference in RGR of MC3T3 – E1 cells ($1.00 \pm 0.00, 0.88 \pm 0.04, 0.67 \pm 0.09, 0.31 \pm 0.04, 0.28 \pm 0.02; F=106.900, P=0.001$). The RGR of MC3T3 – E1 cells without alcohol intervention was higher than that of MC3T3 – E1 cells intervened by alcohol with concentrations of 25, 50, 100 and

200 mmol/L ($P = 0.011, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$). There was statistical difference in the ratio of LC3 - II to LC3 - I in MC3T3 - E1 cells of mice between the 4 groups ($1.16 \pm 0.10, 0.71 \pm 0.06, 1.50 \pm 0.06, 1.23 \pm 0.05; F = 86.600, P = 0.000$). The ratio of LC3 - II to LC3 - I in MC3T3 - E1 cells was lower in alcoholic group and was higher in RAPA group compared to normal group ($P = 0.000; P = 0.000$), and there was no statistical difference between normal group and alcoholic - RAPA group ($P = 0.166$). The ratio of LC3 - II to LC3 - I in MC3T3 - E1 cells was lower in alcoholic group compared to RAPA group and alcoholic - RAPA group, and was higher in RAPA group compared to alcoholic - RAPA group ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000$). There was statistical difference in the protein expression of mTOR in MC3T3 - E1 cells between the 4 groups ($1.13 \pm 0.10, 1.23 \pm 0.06, 0.34 \pm 0.03, 0.63 \pm 0.05; F = 167.800, P = 0.000$). The protein expression of mTOR in MC3T3 - E1 cells was higher in alcoholic group and was lower in RAPA group and alcoholic - RAPA group compared to normal group ($P = 0.033; P = 0.000, P = 0.000$). The protein expression of mTOR in MC3T3 - E1 cells was higher in alcoholic group compared to RAPA group and alcoholic - RAPA group, and was lower in RAPA group compared to alcoholic - RAPA group ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000$). There was statistical difference in the protein expression of Beclin - 1 in MC3T3 - E1 cells between the 4 groups ($0.97 \pm 0.08, 0.67 \pm 0.01, 1.11 \pm 0.08, 1.06 \pm 0.04; F = 42.400, P = 0.000$). The protein expression of Beclin - 1 in MC3T3 - E1 cells was higher in normal group compared to alcoholic group, and there was no statistical difference between normal group and RAPA group and between normal group and alcoholic - RAPA group ($P = 0.077, P = 0.127$). The protein expression of Beclin - 1 in MC3T3 - E1 cells was lower in alcoholic group compared to RAPA group and alcoholic - RAPA group, and was higher in RAPA group compared to alcoholic - RAPA group ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.004$). **Conclusion:** Cell autophagy may play a very important protective role in the pathological process of alcohol - induced ONFH. The decreased autophagy level caused by alcohol stimulation may be one of the reasons for causing ONFH, and its mechanism of action may be related to the influence of alcohol stimulation on the expression of key regulatory molecules (mTOR and Beclin1) in autophagy.

Keywords femur head necrosis; autophagy; sirolimus; mice; animal experimentation

股骨头坏死 (osteonecrosis of the femoral head, ONFH) 是以骨的活性成分死亡为主要改变的病理过程^[1-5]。该病主要分为创伤性 ONFH 和非创伤性 ONFH 两大类,前者主要因髋部外伤引起,而后的致病因素以激素或酒精最为常见。目前对于酒精性 ONFH 的确切发病机制尚不十分清楚。自噬是维持细胞正常功能的一个重要机制,其调控异常可导致各类疾病的发生^[6]。目前已有研究证实细胞自噬是软骨对自身的一种重要保护机制,软骨细胞的自噬水平随着机体衰老的进程而逐渐降低,因而体内细胞自噬水平降低被认为是引起关节软骨退变的重要原因之一^[7-10]。但在酒精性 ONFH 进程中是否也存在细胞自噬水平的改变,以及细胞自噬是否在 ONFH 的进展过程中也发挥着重要作用,目前尚无定论。本研究主要探讨细胞自噬在酒精性 ONFH 中的作用及其机制,以为防治 ONFH 提供新的思路和依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 1 月龄健康雄性 SPF 级 C57 小鼠 15 只,体质量 20 ~ 25 g,由温州医科大学茶山动物中心提供,实验动物许可证号:SYXK(浙)2016 - 0006。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验试剂与仪器 MC3T3 - E1 细胞(浙江美谷

生物有限公司),雷帕霉素(美国 Sigma 公司),CCK8 细胞活性检测试剂盒、RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白含量测定试剂、SDA - PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), α - MEM 液体培养基[赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司],苏木素 - 伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒(北京索来宝公司),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule - associated protein 1 light chain 3, LC3) B 抗体、Beclin - 1 抗体、 β - actin 抗体(美国 Cell Signal Technology 公司),ECL 发光液(美国 Invitrogen 公司),聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、超纯水净化系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模和取材 适应性喂养 1 周后将 15 只 1 月龄 SPF 级 C57 小鼠随机分为空白对照组、酒精组、雷帕霉素 - 酒精组,每组 5 只。将雷帕霉素溶于酒精中制成浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,过滤消毒后,重悬(0.25% 聚乙二醇,0.25% 吐温 80)成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的雷帕霉素溶液。空白对照组喂食饮用水 6 周,每天腹腔内注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 不含雷帕霉素的溶剂(酒精过滤消毒后,采用 0.25% 聚乙二醇、

0.25%吐温 80 配置的用于溶解雷帕霉素的溶剂),连续注射 2 周;酒精组喂食含 30% 酒精的饮用水 6 周,每天腹腔内注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 不含雷帕霉素的溶剂,连续注射 2 周;雷帕霉素-酒精组喂食含 30% 酒精的饮用水 6 周,每天腹腔内注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的雷帕霉素溶液,连续注射 2 周。干预 6 周后将小鼠处以安乐死,从其右侧大腿部切开皮肤、皮下组织,剥离股骨周围肌肉,完整获取各组小鼠右侧股骨头,微型 CT 平扫后将股骨头用 10% 甲醛固定、用 10% 乙二胺四乙酸二钠溶液脱钙,石蜡包埋切片。

2.2 模型鉴定 用微型 CT 平扫各组小鼠右侧股骨头,观察股骨头组织形态。将切片置于 55°C 烤箱 30 min 后浸润于二甲苯中 10 min,更换新的二甲苯后再次浸润 10 min;用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;用无水乙醇及梯度浓度酒精水化,再次用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;苏木素染色 10 min,用清水洗去多余的染色液 10 min;蒸馏水洗 10 s,1% 盐酸乙醇褪色分化 5 s,伊红染色 1 min 左右后用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;再次使用梯度浓度酒精脱水。脱水完成后使用二甲苯透明 5 min,用中性树胶封片,光学显微镜下观察股骨头组织形态。于高倍镜下任选 5 个视野,每个视野内计数 50 个骨陷窝,计算空骨陷窝百分比,以此表示总细胞凋亡率。空骨陷窝百分比 = 空骨陷窝数/骨陷窝数 $\times 100\%$ 。

2.3 不同浓度酒精干预下 MC3T3-E1 细胞相对生长率测定 采用 CCK8 法检测 MC3T3-E1 细胞相对生长率。在 α -MEM 培养基中,传代培养 MC3T3-E1 细胞至第 3 代后,将其计数稀释后以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中,细胞贴壁后弃培养液,加入含酒精浓度为 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照组)、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 α -MEM 培养基,孵育 24 h,孵育时使用封口膜封闭 96 孔板,防止酒精挥发。处理完成后,再将 $10 \mu\text{L}$ 的 CCK8 反应液加入到每个孔中,将 96 孔板用封口膜封闭后置入 37°C 的培养箱中再孵育 1 h。将 96 孔板从培养箱中取出,用酶标仪以 450 nm 波长检测样品吸光度值 (OD 值),计算 MC3T3-E1 细胞相对生长率。细胞相对生长率 = (实验组 OD 值 - 培养基 OD 值)/(对照组 OD 值 - 培养基 OD 值)。

2.4 MC3T3-E1 细胞分组 根据预实验所得出的

最佳酒精干预浓度 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及最佳孵育时间 (24 h),将培养好的第 3 代 MC3T3-E1 细胞随机分为 4 组,分别以普通 α -MEM 培养基 (正常组)、含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒精的 α -MEM 培养基 (含酒精组)、含 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷帕霉素的 α -MEM 培养基 (含雷帕霉素组)、含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒精和 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷帕霉素的 α -MEM 培养基 (含酒精-雷帕霉素组) 培养,均连续培养 24 h。

2.5 MC3T3-E1 细胞中 LC3-I、LC3-II、mTOR、Beclin-1 的蛋白表达检测 采用 Western blot 法。在每个面积为 16 cm^2 的 MC3T3-E1 细胞培养皿中加入 $200 \mu\text{L}$ 预冷的 RIPA 裂解液,同时加入 1% 的蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟。用细胞刮刀收集细胞,并用移液枪将细胞转移至离心管中,并反复吹打混匀后,于预先准备好的冰上放置 20 min。在 4°C 下离心 5 min (转速 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径 8 cm),取上清液,得到总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,根据样本总蛋白浓度测定的结果,加入相应体积的总蛋白样品与 5 倍蛋白质凝胶电泳上样缓冲液,轻轻混合,沸水中煮 5 min 使蛋白变性,制备成蛋白样品,立即插入冰中待用;将样品轻轻加至凝胶孔中,电泳仪设置成稳压状态,接通电源,将电压调至恒压 80 V,当蛋白至分离胶中时使用 120 V 恒压。当蛋白样本电泳至胶的最下端时结束电泳。采用半干转的方式将蛋白转膜至 PVDF 膜上,其中 LC3B 抗体使用直径 $0.22 \mu\text{m}$ 的 PVDF 膜,Beclin-1、mTOR 和 β -actin 使用直径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的 PVDF 膜。转膜完成后用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min,将转移膜置于封闭液中,室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1 h;将一抗 (LC3B、mTOR、Beclin-1) 用封闭液稀释 (抗体稀释度均为 1:300,内参 β -actin 抗体稀释度为 1:1000)。将封闭后的膜直接放入一抗工作液中,注意反应面必须被一抗工作液完全覆盖, 4°C 下摇床反应过夜。洗净一抗后放入二抗工作液 (稀释度为 1:3000) 中,室温、避光下在摇床中缓慢摇晃 60 min,用 TBST 洗去游离二抗。ECL 试剂的 A 液、B 液等体积混合,制成显影反应液,滴加液体至 PVDF 膜上直至覆盖整张膜,避光反应 2 min 后曝光拍照。应用 Image Lab 图像处理软件分析目的蛋白和内参 β -actin 条带灰度值,计算机自动读取并记录每条条带的灰度值。

2.6 数据统计 采用 SPSS20.0 统计软件对所得数

据进行统计学处理,不同浓度酒精干预后 MC3T3 - E1 细胞相对生长率的比较及 4 组小鼠 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II/LC3 - I 的比值及 mTOR、Beclin - 1 蛋白表达的组间整体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD - *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 股骨头组织形态 ①CT 扫描结果:空白对照组小鼠股骨头骨小梁大体形态良好,分布均匀,未见软骨下坏死带形成[图 1(1)];酒精组小鼠股骨头软骨下坏死带形成,骨小梁闭塞,髓腔内骨小梁变细、稀疏、断裂,骨皮质增厚[图 1(2)];雷帕霉素 - 酒精组小鼠股骨头 CT 影像学表现介于酒精组与空白对照组之间,可见髓腔内部分骨小梁出现断裂萎缩,软骨下骨部分坏死形成[图 1(3)]。②显微镜下观察结果:空白对照组小鼠股骨头骨小梁形态良好,未见空骨陷窝、脂肪细胞及脂质沉积,无组织坏死、纤维化[图 2(1)];酒精组小鼠股骨头骨小梁稀疏、紊乱,脂肪细胞增多,骨细胞内脂质沉积,可见大量空骨陷窝形成,局部组织坏死、纤维化,细胞数目减少[图 2(2)];雷帕霉素 -

酒精组小鼠股骨头部分骨小梁出现断裂、萎缩,可见少量空骨陷窝形成[图 2(3)]。

3.2 总细胞凋亡率 空白对照组总细胞凋亡率为 $(6.06 \pm 1.93)\%$,酒精组为 $(63.9 \pm 9.63)\%$,雷帕霉素 - 酒精组为 $(34.0 \pm 5.82)\%$;3 组总细胞凋亡率比较,差异有统计学意义 ($F = 192.800, P = 0.000$);进一步两两比较,酒精组和雷帕霉素 - 酒精组总细胞凋亡率均大于空白对照组 ($P = 0.000, P = 0.000$),酒精组总细胞凋亡率大于雷帕霉素 - 酒精组 ($P = 0.000$)。

3.3 不同浓度酒精干预后 MC3T3 - E1 细胞相对生长率 不同浓度酒精干预 24 h 后 MC3T3 - E1 细胞相对生长率比较,差异有统计学意义 ($F = 106.900, P = 0.001$)。未经酒精干预的 MC3T3 - E1 细胞相对生长率高于浓度为 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酒精干预后的 MC3T3 - E1 细胞相对生长率 ($P = 0.011, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$)。见表 1、图 3。

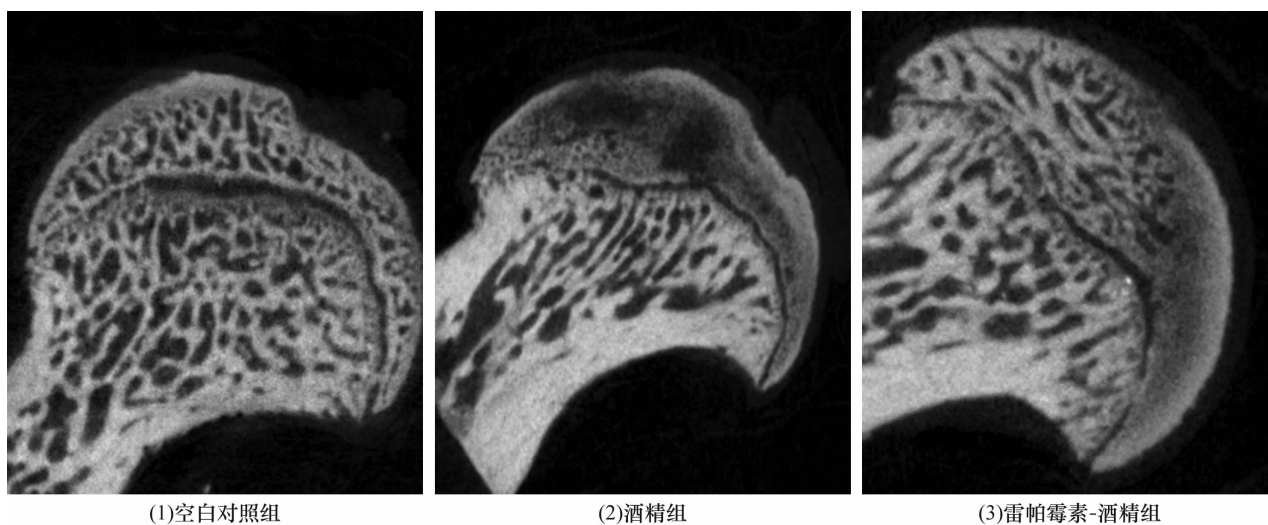


图 1 各组小鼠股骨头 CT 片

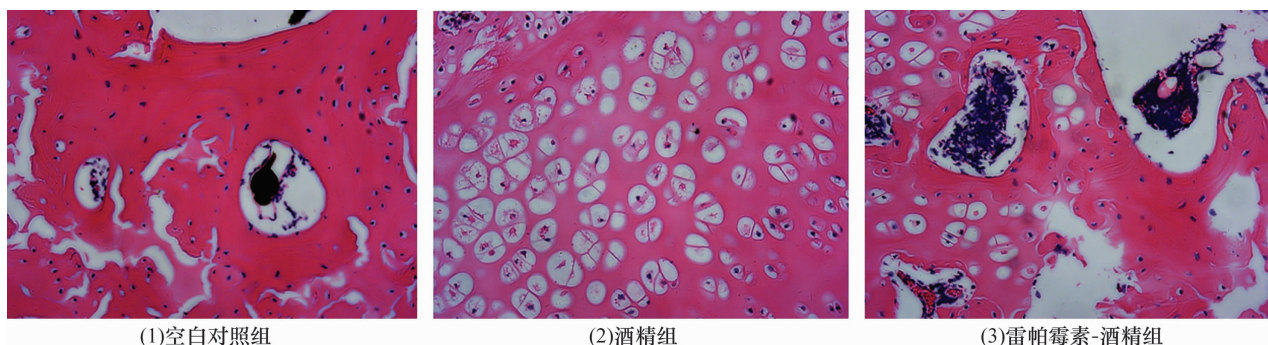


图 2 显微镜下各组小鼠股骨头组织形态(HE 染色 $\times 400$)

表 1 不同浓度酒精干预 24 h 后 MC3T3 - E1 细胞相对生长率

酒精浓度 (mmol · L ⁻¹)	0	25	50	100	200
MC3T3 - E1 细胞相对生长率 ($\bar{x} \pm s$)	1.00 ± 0.00	0.88 ± 0.04	0.67 ± 0.09	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.02

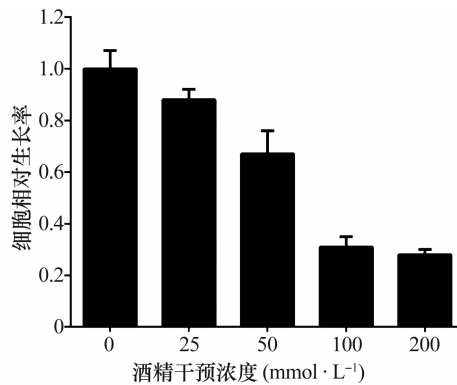


图 3 不同浓度酒精干预 24 h 后 MC3T3 - E1 细胞相对生长率

3.4 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II / LC3 - I 的比值及 mTOR、Beclin - 1 蛋白表达 4 组小鼠 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II / LC3 - I 的比值比较, 组间差异有统计学意义; 正常组 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II / LC3 - I 的比值高于含酒精组 ($P = 0.000$), 低于含雷帕霉素组 ($P = 0.000$), 与含酒精 - 雷帕霉素组比较差异无统计学意义 ($P = 0.166$); 含酒精组 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II / LC3 - I 的比值低于含雷帕霉素组及含酒精 - 雷帕霉素组 ($P = 0.000, P = 0.000$); 含雷帕霉素组 LC3 - II / LC3 - I 的比值高于含酒精 - 雷帕霉素组 ($P = 0.000$)。4 组小鼠 MC3T3 - E1 细胞中 mTOR 蛋白表达量比较, 组间差异有统计学意义; 正常组 MC3T3 - E1 细胞中 mTOR 蛋白表达量低于酒精组 ($P = 0.033$), 高于含雷帕霉素组及含酒精 - 雷帕霉素组 ($P = 0.000, P = 0.000$); 含酒精组 MC3T3 - E1 细胞中 mTOR 蛋白表达量高于含雷帕霉素组及含酒精 - 雷帕霉素组 ($P = 0.000, P = 0.000$), 含雷帕霉素组 mTOR 蛋白表达量低于含酒精 - 雷帕霉素组 ($P = 0.000$)。4 组小鼠 MC3T3 - E1 细胞中 Beclin - 1 蛋白表达量比较, 组间差异有统计学意义; 正常组 MC3T3 - E1 细胞中 Beclin - 1 蛋白表达量高于含酒精组, 而与含雷帕霉素组、含酒精 - 雷帕霉素组比较, 组间差异均无统计学意义 ($P = 0.077, P = 0.127$); 含酒精组 MC3T3 - E1 细胞中 Beclin - 1 蛋白表达量低于含雷帕霉素组及含酒精 - 雷帕霉素组 ($P = 0.000, P = 0.000$); 含雷帕霉素组 MC3T3 - E1 细胞中 Beclin - 1 蛋白表达量高于含酒精 - 雷帕霉素组 ($P = 0.004$)。见图 4 至图 6、表 2。

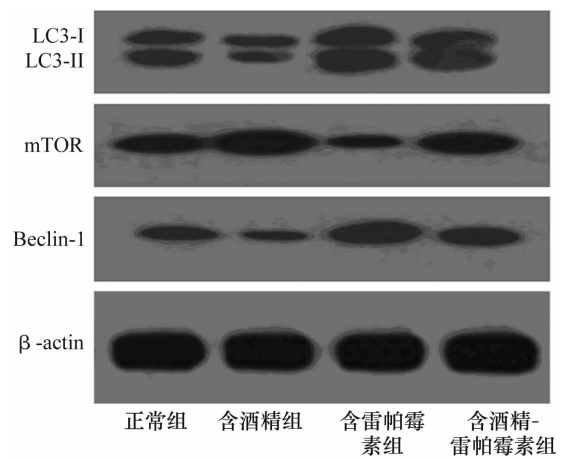


图 4 4 组小鼠 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 I、LC3 II、mTOR、Beclin - 1 蛋白表达
LC3: 微管相关蛋白 1 轻链 3; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

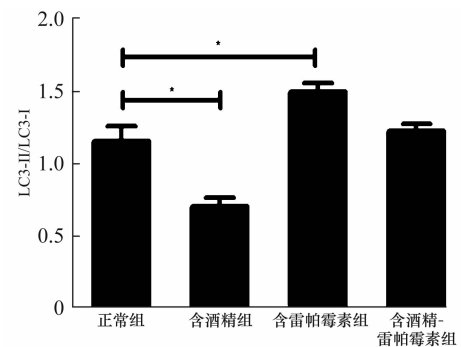


图 5 4 组小鼠 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II / LC3 - I 的比值
LC3: 微管相关蛋白 1 轻链 3

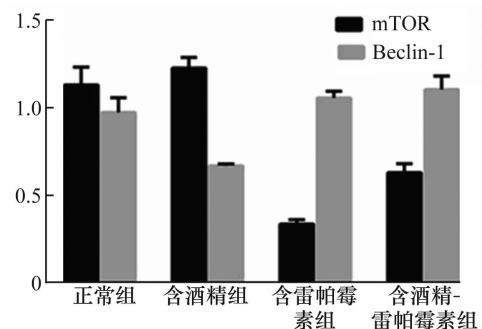


图 6 4 组小鼠 MC3T3 - E1 细胞中 mTOR、Beclin - 1 蛋白表达
mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

4 讨论

ONFH 属中医学“骨痹”“骨痿”“骨蚀”“历节风”“髌骨痹”等范畴。中医学认为该病由风、寒、湿、热等外邪侵袭人体, 痹阻经络, 气血运行不畅所致^[3]。有研究认为, ONFH 的发病本质在于股骨头血供中断或受损, 导致骨细胞凋亡^[11]。目前对于酒精性 ONFH 的发病机理存在诸多学说, 如骨质疏松、骨内高压、血

表 2 4 组小鼠 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II/LC3 - I 的比值及 mTOR、Beclin - 1 蛋白表达量 $\bar{x} \pm s$

组别	LC3 - II/LC3 - I	mTOR	Beclin - 1
正常组	1.16 ± 0.10	1.13 ± 0.10	0.97 ± 0.08
含酒精组	0.71 ± 0.06	1.23 ± 0.06	0.67 ± 0.01
含雷帕霉素组	1.50 ± 0.06	0.34 ± 0.03	1.11 ± 0.08
含酒精 - 雷帕霉素组	1.23 ± 0.05	0.63 ± 0.05	1.06 ± 0.04
F 值	86.600	167.800	42.400
P 值	0.000	0.000	0.000

LC3:微管相关蛋白 1 轻链 3;mTOR:哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

管内凝血、骨细胞毒素作用、骨细胞凋亡、脂肪代谢紊乱等学说^[1-5],但其确切发病机制尚不十分清楚。现已有研究证实,细胞自噬是软骨自身的一种重要保护机制,而自噬降低被认为是引起关节软骨退变的重要原因之一^[7-10]。Zhang 等^[12]研究发现,在低氧及无血清的情况下间充质干细胞可以通过提高自噬水平来促进自身存活。另外,Xia 等^[13]通过体外骨细胞培养发现,在激素引起骨细胞变性、凋亡的过程中,自噬也起到了非常重要的保护作用,抑制自噬后骨细胞的死亡数明显增加。因而我们推测细胞自噬在酒精性 ONFH 的病变过程中也可能发挥着非常重要的作用。

本实验采用浓度为 30% 的酒精喂食小鼠,构建酒精性 ONFH 模型。模型建立后将获取的股骨头组织用 HE 染色,在显微镜下观察股骨头组织形态,结果显示,在酒精干预下,酒精组小鼠股骨头中脂肪细胞增多、骨细胞内脂质沉积,股骨头骨小梁稀疏、紊乱,空骨陷窝计数增多,且多于空白对照组及酒精与雷帕霉素组;从微型 CT 检查结果看,单纯酒精饲喂后构建的小鼠酒精性 ONFH 模型中,股骨头软骨下坏死带形成,骨小梁闭塞,髓腔内骨小梁变细、稀疏、断裂,出现骨皮质增厚的现象,但是腹腔内注射雷帕霉素后,股骨头大体形态良好,部分骨小梁出现断裂、萎缩,软骨下坏死带明显少于单纯酒精喂食的小鼠。

在体外实验中,我们通过 Western blot 法检测自噬相关蛋白 mTOR、Beclin1 和 LC3 在 MC3T3 - E1 细胞中的表达量,结果显示含酒精组 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II/LC3 - I 的比值及 Beclin - 1 蛋白含量较其他组均显著降低,而 mTOR 蛋白表达量较其他组明显升高;含酒精 - 雷帕霉素组 MC3T3 - E1 细胞中 LC3 - II/LC3 - I 的比值明显高于含酒精组,而 mTOR 蛋白表达量低于含酒精组。由此可见,单纯酒精刺激可以引起细胞自噬水平的降低,而雷帕霉素可以与酒精抑制自噬的作用相拮抗。

LC3 是公认的细胞自噬标志物,自噬形成时,胞浆型 LC3(即 LC3 - I)会酶解掉一小段多肽,转变为(自噬体)膜型(即 LC3 - II),LC3 - II/LC3 - I 比值的大小可估计自噬水平的高低。mTOR 复合体和 Beclin1 复合体是调节细胞自噬的关键分子,它们在自噬的发生过程中发挥了至关重要的作用^[14-15]。目前普遍认为 mTOR 通过两种机制发挥对细胞自噬的调节作用:①mTOR 介导的信号转导作用于下游效应物,如转录起始因子 4E 结合蛋白 1、核糖体蛋白 S6 激酶,启动相关基因转录和翻译,从而控制细胞自噬;②mTOR 激酶直接作用于 Atg 蛋白来调节自噬体的形成^[16-17]。当 mTOR 活性受到抑制时促使细胞自噬发生,当 mTOR 活性增高时自噬被抑制。Beclin1 又称 BECN1,它是酵母自噬相关基因 ATG6 的同系物,也是哺乳动物参与细胞自噬的特异性基因,Beclin1 基因主要通过与Ⅲ型磷脂酰肌醇 3 激酶形成复合体来调节其他 ATG 蛋白在自噬前体结构中定位,调节自噬活性^[18-19]。有研究已证实,通过上调 Beclin1 在哺乳动物细胞中的表达能够刺激自噬的发生,敲除该基因细胞自噬则不能发生^[14,17]。

本研究使用的雷帕霉素是经典的细胞自噬增强剂,自噬的调控途径主要涉及经典的磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白信号途径。而雷帕霉素通过抑制 mTOR,诱导和促进细胞自噬过程,许多因素对自噬的影响均与 mTOR 的活性变化有关^[20-21]。我们在研究中发现用雷帕霉素增强细胞自噬水平后,细胞的凋亡水平以及细胞生长抑制率明显降低,这说明细胞自噬能够一定程度上抑制酒精刺激下的 MC3T3 - E1 细胞的死亡,细胞自噬对成骨细胞(MC3T3 - E1)起着一定的保护作用,这将为治疗酒精性 ONFH 提供新的思路。

本研究结果显示,细胞自噬在酒精性 ONFH 的病变过程中发挥着非常重要的保护作用。酒精刺激引

起的细胞自噬水平的降低可能是引起 ONFH 的原因之一,其作用机制可能与酒精刺激影响自噬关键调控分子 mTOR、Beclin1 的表达有关。今后,提高细胞自噬水平可作为预防或治疗酒精性 ONFH 的重要靶点。

5 参考文献

- [1] 陈志伟,王振涛,李泰贤,等. 酒精相关性股骨头坏死的发病特征分析[J]. 中医正骨, 2017, 29(12): 23-25.
- [2] HERRERA-SOTO JA, PRICE CT. Core decompression for juvenile osteonecrosis [J]. Orthop Clin North Am, 2011, 42(3): 429-436.
- [3] 惠银银,刘又斌,王晶,等. 非创伤性股骨头坏死病因的研究进展[J]. 中医正骨, 2018, 30(2): 33-36.
- [4] MAUREL DB, BOISSEAU N, BENHAMOU CL, et al. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms [J]. Osteoporos Int, 2012, 23(1): 1-16.
- [5] KANG JS, PARK S, SONG JH, et al. Prevalence of osteonecrosis of the femoral head: a nationwide epidemiologic analysis in Korea [J]. J Arthroplasty, 2009, 24(8): 1178-1183.
- [6] YANG Z, KLIONSKY DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822.
- [7] 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.
- [8] LOTZ MK, CARAMÉS B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA [J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(10): 579-587.
- [9] SASAKI H, TAKAYAMA K, MATSUSHITA T, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 1920-1928.
- [10] YANG RT, ZHANG C, LIU Y, et al. Autophagy prior to chondrocyte cell death during the degeneration of Meckel's cartilage [J]. Anat Rec (Hoboken), 2012, 295(5): 734-741.
- [11] 陈镇秋,何伟,魏秋实. 股骨头坏死中医证型与血液学指标的关系研究[J]. 中医正骨, 2013, 25(3): 35-40.
- [12] ZHANG Q, YANG YJ, WANG H, et al. Autophagy activation: a novel mechanism of atorvastatin to protect mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation via AMP-Activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(8): 1321-1332.
- [13] XIA X, KAR R, GLUHAK-HEINRICH J, et al. Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes [J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(11): 2479-2488.
- [14] PATTINGRE S, ESPERT L, BIARD-PIECHACZYK M, et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes [J]. Biochimie, 2008, 90(2): 313-323.
- [15] ESKELINEN EL. New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2008, 266: 207-247.
- [16] SCOTT RC, SCHULDINER O, NEUFELD TP. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the drosophila fat body [J]. Dev Cell, 2004, 7(2): 167-178.
- [17] ROSENFELDT MT, RYAN KM. The role of autophagy in tumour development and cancer therapy [J]. Expert Rev Mol Med, 2009, 11: 36.
- [18] SCARLATTI F, MAFFEI R, BEAU I, et al. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(8): 1318-1329.
- [19] GAYTÁN M, MORALES C, SÁNCHEZ-CRIADO JE, et al. Immunolocalization of beclin 1, a bcl-2-binding, autophagy-related protein, in the human ovary: possible relation to Life span of corpus luteum [J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(2): 509-517.
- [20] KOROLCHUK VI, SAIKI S, LICHTENBERG M, et al. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4): 453-460.
- [21] POÛS C, CODOGNO P. Lysosome positioning coordinates mTORC1 activity and autophagy [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4): 342-344.

(收稿日期: 2018-03-26 本文编辑: 时红磊)