

基础研究

酸环境对大鼠髓核细胞自噬及功能的影响

江立波,王会仁,张其琛,李熙雷

(复旦大学附属中山医院骨科 200032 上海市)

【摘要】目的:观察酸环境下髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)中卵巢癌 G 蛋白偶联受体 1(ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1, OGR1)和自噬相关蛋白 LC3 的表达水平,探讨自噬激活机制,初步分析其对细胞功能的影响。**方法:**取 SD 大鼠正常髓核组织,分离培养 NPCs,甲苯胺蓝、阿利新染色和Ⅱ型胶原免疫荧光检测鉴定 NPCs。扩增培养 NPCs,取第 2 代 NPCs,在 pH 值为 6.2、6.4、6.8、7.0、7.2 和 7.4 的培养基中培养 24h,免疫荧光观察 NPCs 中 OGR1 的表达情况,Western blotting 检查细胞中 OGR1 和 LC3-Ⅱ蛋白表达水平;在 pH 值为 6.4 的培养基中培养 0、3h、6h、12h、24h、48h 后,采用 Western blotting 检测 NPCs 中 LC3-Ⅰ和 LC3-Ⅱ蛋白表达水平。构建 3 个不同靶点的 OGR1 干扰序列,检测最合适滴度慢病毒,用最适滴度慢病毒转染 NPCs,使用 Western blotting 和 Real-time PCR 检测不同干扰序列的沉默效果,选取最适干扰序列构建 OGR1-shRNA 慢病毒载体。取第 2 代 NPCs,分为 4 组:正常组(DMEM 培养基)、pH 值 6.4 培养基组(空白组)、pH 值 6.4 培养基空载体组(空载体组)、pH 值 6.4 培养基 OGR1-shRNA 慢病毒转染组(转染组),培养 24h 后用 Western blotting 检测 LC3-Ⅱ和 p62 蛋白表达水平;Alcian 染色观察 NPCs 中蛋白多糖的表达情况。**结果:**(1)分离培养的细胞高表达蛋白多糖和Ⅱ型胶原,符合 NPCs 表型。(2)OGR1 蛋白表达水平与培养基 pH 值相关,pH 值<7.0 时,OGR1 和 LC3-Ⅱ蛋白表达水平显著性升高($P<0.05$),pH 值 6.4 时表达量最高。(3)在 pH 值 6.4 的培养基中培养时,细胞中 LC3-Ⅰ和 LC3-Ⅱ的表达量与培养时间有关,24h 时达高峰,48h 仍较高。(4)3 个干扰序列对 OGR1 均有沉默作用,与对照组比较有显著性差异($P<0.05$),OGR1-shRNA1 沉默效果最佳。(5)转染组细胞在 pH 值 6.4 的培养基中培养 24h 后,LC3-Ⅱ表达水平显著性低于空载体组($P<0.05$);p62 表达水平显著性高于空载体组($P<0.05$);蛋白多糖的表达低于空载体组($P<0.05$)。**结论:**酸环境可促进大鼠 NPCs 中 OGR1 蛋白表达和自噬水平升高,OGR1 介导了细胞自噬的激活,并影响 NPCs 的生物学功能。

【关键词】髓核细胞;酸环境;卵巢癌 G 蛋白偶联受体 1;自噬;细胞功能;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.07.10

中图分类号:Q813.5, R681.5 文献标识码 A 文章编号:1004-406X(2019)-07-0641-09

Acid environment effected on autophagy and function of nucleus pulposus cells in rat/JIANG Libo, WANG Huiren, ZHANG Qichen, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(7): 641-649

【Abstract】 Objectives: To explore the autophagy activation and cell function of nucleus pulposus cells(NPCs) effected by acid environment, through observing the expression levels of ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1(OGR1) and autophagy-related protein LC3 in rat. **Methods:** NPCs in normal nucleus pulposus tissues of SD rats were isolated and cultured, which were then identified by toluidine blue, alixin staining and Ⅱ collagen immunofluorescence. The cells were expanded, and the second generation NPCs were cultured in medium with pH 6.2, 6.4, 6.8, 7.0, 7.2 and 7.4 for 24h. Immunofluorescence was used to observe the expression of OGR1 in NPCs. Western blotting was used to examine OGR1. After incubation at pH 6.4 for 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, the expression levels of LC3-Ⅰ and LC3-Ⅱ in NPCs were detected by Western blotting. The OGR1 interference sequences of three different targets were constructed, and the most suitable titer lentivirus was detected. NPCs cells were transfected with the optimal titer lentivirus, and the silencing effects of different interference sequences were detected by Western blotting and Real-time PCR. The interfer-

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81702177),国家自然科学基金面上项目(81771501)

第一作者简介:男(1986-),医学博士,研究方向:脊柱外科,椎间盘退变的机制

电话:(021)64041990 E-mail:jiang.libo@zs-hospital.sh.cn

通讯作者:李熙雷 E-mail:li_xi_lei@126.com

ence series were used to construct the OGR1-shRNA lentiviral vector. The second generation NPCs were divided into 4 groups: normal group(DMEM medium), pH 6.4 medium group(blank group), pH 6.4 medium empty vector group (empty vector group), pH 6.4 medium OGR1-shRNA lentiviral transfection group(transfection group), and the expressions of LC3-II and p62 protein were detected by Western blotting after 24 hours of culture. Alcian staining was used to observe the expression of proteoglycan in NPCs. **Results:** (1)The isolated cultured cells highly expressed proteoglycan and type II collagen, which were consistent with the NPCs phenotype. (2)The expression level of OGR1 protein was correlated with the pH value of the medium. When the pH value lower than 7.0, the expression levels of OGR1 and LC3-II protein significantly increased($P<0.05$), and the expression level was the highest at pH 6.4. (3)When cultured in a medium with a pH of 6.4, the expression levels of LC3-I and LC3-II in the cells were related to the culture time, which peaked at 24h and remained high at 48h. (4)Three interfering sequences had silent effect on OGR1, which was significantly different from the control group($P<0.05$), and OGR1-shRNA1 had the best silencing effect. (5)After the cells were cultured for 24 hours in the medium with pH 6.4 in the transfection group, the expression level of LC3-II was significantly lower than that in the empty group ($P<0.05$); the p62 expression in the transfection group was significantly higher than that in the empty vector group($P<0.05$). The expression of proteoglycan in the transfection group was lower than that in the empty group ($P<0.05$). **Conclusions:** The acid environment can promote OGR1 protein expression and autophagy of NPCs in rats. OGR1 mediates the activation of autophagy and affects the function of NP cells.

【Key words】 Nucleus pulposus cells; Acidic environment; Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1; Autophagy; Cellular function; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China

随着椎间盘退变,终板逐渐钙化,导致终板途径的营养渗透障碍,纤维环外 1/3 层的血管营养供应也进一步减少,造成椎间盘营养供应障碍,最终导致椎间盘缺血缺氧,此时髓核细胞(nucleus pulposus cells,NPCs)无氧代谢增加,乳酸清除减少,乳酸储积(质子增多、酸化),形成酸环境。另一方面,髓核组织中大量糖胺多糖(glycosaminoglycan,GAG)含有的阴离子也会吸引 H^{+} ,pH 值可以从健康时的 7.0~7.2 降为退变时的 5.7~6.5^[2-4]。卵巢癌 G 蛋白偶联受体 1(ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1,OGR1)是细胞感受胞外质子(H^{+})浓度变化的一种受体,在 pH 值 7.8 时失活,pH 值 6.8 时完全激活^[5,6]。自噬是细胞在应激环境中的一种自我保护机制,LC3 是评价自噬的常用标志物。但是在酸环境下,自噬的激活机制以及自噬的具体作用尚不得而知。由于 OGR1 可能与 NPCs 在酸环境下的表现密切相关,我们推测酸可能是通过 OGR1 来调控细胞内的一系列信号通路,最终激活自噬,帮助 NPCs 适应周围的应激环境。本研究旨在观察酸环境对 NPC 自噬和生物学功能的影响,并探讨其相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验对象

本研究得到了复旦大学附属中山医院伦理委员会的批准。选取上海医学院动物房提供的 40 只 Sprague-Dawley (SD)大鼠,3 月龄,250g 左右,雌雄不限。每次使用 5 只 SD 大鼠进行原代 NPCs 培养,共进行了 8 次 NPCs 培养。

1.2 主要试剂

Alcian 粉末、II 型胶原酶、雷帕霉素和 Bafilomycin A1 购买自美国 Sigma Aldrich 公司; Collagen II 抗体、OGR1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记的二抗、BCA 试剂盒、RIPA 和苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 蛋白酶抑制剂购自上海碧云天公司; ShRNA-OGR1 的质粒购自上海吉玛基因公司; SYBR GreenDRR041A 购自日本 Takara 公司;逆转录试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司; Pluronic F-127 购自美国 Hayward 公司。

1.3 大鼠 NPCs 的分离、培养和鉴定

水合氯醛安乐死大鼠,在 75%酒精中浸泡 5min,取出整段腰椎(L1~L5),使用眼科剪剔除软组织。在超净工作台,用磷酸缓冲液(PBS)冲洗至少 3 次,在显微镜下取出髓核组织,1000 转/min 离心 5min,去上清后用 PBS 清洗 3 次。在 37℃用

0.25%胰蛋白酶(trypsin)消化 30min,用含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 终止消化后,再 0.1%的Ⅱ型胶原酶在 37℃消化 4h。离心后,直接铺在培养瓶底部进行培养,加入含有 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基进行培养,每隔 3d 换液 1 次。细胞传至第二代后使用甲苯胺蓝、阿利新染色以及免疫荧光进行鉴定。后续实验均使用第 2 代 NPCs 进行实验。

1.4 pH 值对 OGR1 表达的影响

取第 2 代 NPCs,以每孔 1×10^5 的密度接种于 6 孔培养板中,在 pH 值为 7.4、7.2、7.0、6.8、6.4、6.2 的培养基中培养 24h, PBS 洗 3 次后用 4%多聚甲醛固定,加 0.1% Triton X-100 孵育 15min,用 2% BSA 封闭 1h;加入相应的一抗(OGR1 和Ⅱ型胶原, Santa Cruz CA, 1:200),放置在 4℃冰箱孵育过夜,加入 Alexa Fluor-594 (红色荧光)标记的相应二抗 (Molecular Probes, Beijing Office, China, 1:50)孵育 30min, DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, USA)复染 20min, 室温下水溶性封片后在倒置荧光显微镜下观察并拍照,分析 OGR1 荧光强度。每个浓度设置 3 个重复孔。

1.5 不同 pH 值环境下 OGR1 和 LC3 的表达

使用含有 1%的 PMSF 的 RIPA 提取 NPCs 中的总蛋白,应用 BCA 方法来测定蛋白浓度;总蛋白加到十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)中进行电泳分离蛋白,然后通过湿转的方法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride)膜上(BIO-RAD USA)。用 5%的脱脂牛奶封闭 2h 后,使用 OGR1、p62 和 LC3-Ⅱ一抗(1:1000 稀释)在 4℃冰箱中孵育过夜, TBST 清洗 3 遍,使用辣根过氧化物酶标记的二抗在常温下孵育 2h 后,使用 ECL 发光液(Thermo 公司)在成像系统(Perkin Elmer, USA)上进行曝光,使用 AlphaEaseFC 4.0 软件对蛋白条带进行半定量分析。

1.6 pH 值 6.4 环境下不同时间处理后 LC3 的表达

使用 pH 值 6.4 的培养基处理细胞,观察不同时间下 NPCs 中 LC3 的表达。具体方法同 1.5。

1.7 慢病毒 OGR1-shRNA 转染沉默 OGR1 表达

根据本课题前期研究^[7],针对 OGR1 基因序列,利用 Pubmed 网站中提供的 OGR1 RNA 干扰

序列,设计 3 个 RNAi 靶点序列,由上海吉玛基因公司设计合成慢病毒。实验前一天分别接种 $(3 \sim 5) \times 10^3$ 个靶细胞于 96 孔培养板每孔中,细胞的融合率为 40%~60%。在 96 孔板中设置不同的 MOI (multiply of infection) 值, MOI 值呈梯度变化,把 1×10^8 TU/ml 的病毒加入到培养基中稀释成不同的 MOI 值。感染前为细胞换液,吸去细胞上清,吸取不同浓度梯度的 1×10^8 TU/ml 的病毒。病毒感染后 12h 左右,在显微镜下观察细胞状态。为避免细胞状态变差,在感染后的 24h 吸取病毒液体,加入新鲜的培养基。72~96h 后,在荧光显微镜下观察细胞中荧光情况。根据荧光的表达量和细胞的活力,得出最适合 NPCs 的 MOI 值。通过预实验确定细胞接种密度 70%,不需要添加 Polybrene, MOI 值为 100。感染方法同上。感染后 72h 后观察荧光表达,确认感染成功。

1.8 不同 OGR1-shRNA 转染后 OGR1 mRNA 和蛋白的表达

将细胞分为 Control 组、NC-shRNA 组、OGR1-shRNA1 组、OGR1-shRNA2 组和 OGR1-shRNA3 组,分别为无处理、转染 NC-shRNA、转染 OGR1-shRNA1、转染 OGR1-shRNA2 和转染 OGR1-shRNA3。使用 Real-time PCR 方法分析各组 OGR1 mRNA 表达水平。按试剂盒说明操作,通过 TRIzol 提取 NPCs 的总 RNA,进行浓度和纯度测定后,使用 1 μ g 的总 RNA 进行逆转录来合成 cDNA。制备 20 μ l 的反应体系,分别是 2 μ l 的 2 倍稀释的 cDNA, 10 μ l 2 $\times$ 的 SYBR Premix Ex Taq 的混合液, 0.2 μ mol/L 的引物, 无菌水进行补足。引物如表 1 所示。将上述 20 μ l 的反应体系加入 8 联管中,放到 LightCycler 实时定量 PCR 系统(Roche, Mannheim, Germany)进行反应,反应程序为:95℃预变性 10min, 95℃变性 15s, 56℃退火 1min, 72℃延伸 1min, 共 40 个循环。反应结束后导出 Ct 值,并根据内参基因 GAPDH 进行标准化, mRNA 的半定量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行计算。应用 Western blotting 检测蛋白表达。

1.9 OGR1 沉默后 NPCs 中 LC3-Ⅱ和 P62 蛋白的表达

NPCs 分为对照组、pH6.4 处理组、pH6.4+NC-shRNA1 处理组和 pH6.4+OGR1-shRNA1 处理组。NPCs 在 24 孔板铺板,细胞密度达 70%~80%左右,过夜后进行实验。4%多聚甲醛固定细胞

10min, PBS 清洗 3 次, 1% 的 Alcian 染液 (使用乙酸配制) 1ml, 室温下孵育 30mins, 在倒置显微镜下观察 NPCs 中蛋白多糖表达情况。

1.10 统计学方法

数据使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料使用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组以上的比较采用单因素方差分析 (Analysis of Variance, ANOVA), 组间的两两比较应用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 NPCs 分离培养和鉴定

分离培养的细胞在相差显微镜下呈现梭形或多个角形(图 1a)。阿利辛蓝、甲苯胺蓝染色及胶原细胞免疫荧光证实细胞呈现出软骨样细胞的结果, 分别表现为蓝色、紫色和绿色荧光(图 1b~d), 说明细胞含有较多的蛋白多糖和 II 型胶原, 符合 NPCs 表型。

2.2 不同 pH 值下 NPCs 中 OGR1 的表达

不同 pH 值的培养基中体外培养 NPCs 的情况见图 2 和表 2。在细胞胞浆和胞膜上均可以观察到蛋白表达, 尤其是胞膜上。细胞表达的 OGR1 蛋白量与培养基的 pH 值相关, pH 值 6.8、6.4、6.2 培养基中培养的 NPCs 中 OGR1 的表达显著性高

表 1 Real-time PCR 的引物序列

Table 1 Primers for Real-time PCR

基因名称 Gene		引物序列 Sequences (5'-3')
OGR1-shRNA1	正向 Forward	CCGGCTTTGGGTACTTGCAGATCAACTCGAGTTGATCTGCAAGTACCCAAAGTTTTTG
	反向 Reverse	AATTCAAAAACCTTTGGGTACTTGCAGATCAACTCGAGTTGATCTGCAAGTACCCAAAG
OGR1-shRNA2	正向 Forward	CCGGCCTCCTCTATGAGAACATTTACTCGAGTAAATGTTCTCATAGAGGAGGTTTTTG
	反向 Reverse	AATTCAAAAACCTCCTCTATGAGAACATTTACTCGAGTAAATGTTCTCATAGAGGAGG
OGR1-shRNA3	正向 Forward	CCGGGCGAGGAGCCTGAATTGTTAACTCGAGTTAACAATTCAGGCTCCTCGCTTTTTG
	反向 Reverse	AATTCAAAAAGCGAGGAGCCTGAATTGTTAACTCGAGTTAACAATTCAGGCTCCTCGC
GAPDH	正向 Forward	TGATTCTACCCACGGCAAGT
	反向 Reverse	AGCATCACCCATTGATGT

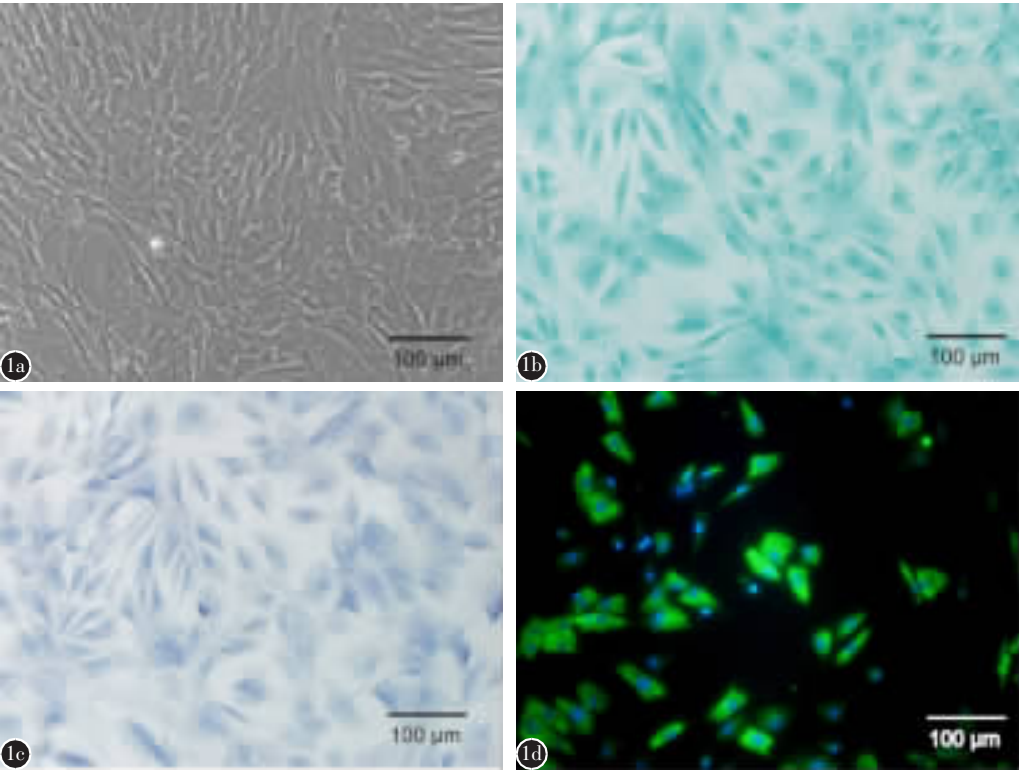


图 1 椎间盘髓核细胞的鉴定 a 相差显微镜下髓核细胞 b 甲苯胺蓝染色 c 阿利辛染色 d II 型胶原免疫组化
Figure 1 Identification of nucleus pulposus cells in intervertebral disc a Nucleus pulposus cells under phase contrast microscope b Toluidine blue staining c Alexin staining d Type II collagen immunohistochemistry

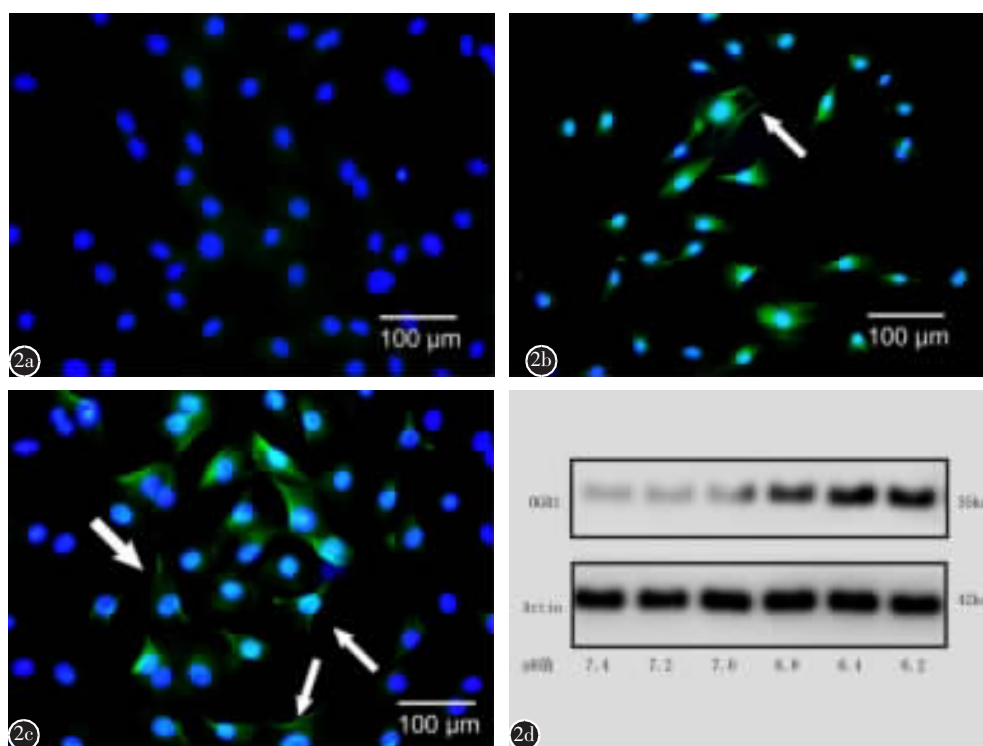


图 2 不同 pH 值条件下 NPCs 中 OGR1 的表达情况 a pH 值 7.4 组免疫荧光 b pH 值 6.4 组免疫荧光 c pH 值 6.2 组免疫荧光 d Western-blotting 分析不同 pH 值条件下 NPCs 中 OGR1 的表达

Figure 2 Expression of OGR1 in nucleus pulposus tissue at different pH values a pH 7.4 group immunofluorescence b pH 6.4 group immunofluorescence c pH 6.2 group immunofluorescence d Western-blotting analysis of OGR1 expression in NPCs under different pH conditions

于 pH 值 7.0、7.2 和 7.4 培养基培养的 NPCs ($P<0.05$)。

2.3 不同 pH 值下 NPCs 中 LC3 的表达

不同 pH 值培养基体外培养 NPCs 的情况见表 2 和图 3。细胞表达的 LC3-II 蛋白量与培养基的 pH 值相关, pH 值 6.8、6.4 培养基中培养的 NPCs 中 LC3-II 的表达显著性高于 pH 值 7.0、7.2 和 7.4 培养基培养的 NPCs ($P<0.05$), pH 值 6.2 组稍有降低, 但仍然高于 pH 值 7.4 组 ($P<0.01$)。选择 pH 值 6.4 进行后续的实验。

2.4 酸环境下 NPCs 中 LC3 的表达

在 pH 值 6.4 的培养基中培养 3h, NPCs 中 LC3 即开始增加, 随着培养时间延长不断增加, 6h 时显著性大于对照组, 24h 和 48h 时显著性大于 0h 组 (表 3, $P<0.05$)。

2.5 OGR1-shRNA 慢病毒的转染效果

OGR1-shRNA 慢病毒转染 1 周后, MOI 为 100, 收集转染后的 NPCs 行 Western blotting 检测。OGR1-shRNA1、OGR1-shRNA2 和 OGR1-shRNA3 沉默 OGR1 后, OGR1 蛋白的表达相对

表 2 不同 pH 值条件下 NPCs 中 OGR1 和 LC3-II 蛋白的表达

Table 2 Expression of OGR1 and LC3-II protein in NP cells under different pH conditions

pH 值 pH value	OGR1/ β -actin	LC3-II/ β -actin
7.4	0.29 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.10
7.2	0.351 $\pm$ 0.11	0.22 $\pm$ 0.07
7.0	0.402 $\pm$ 0.08	0.31 $\pm$ 0.076
6.8	0.903 $\pm$ 0.08 ^①	0.89 $\pm$ 0.10 ^①
6.4	1.16 $\pm$ 0.19 ^①	0.99 $\pm$ 0.11 ^①
6.2	0.94 $\pm$ 0.16 ^①	0.46 $\pm$ 0.11 ^①

注: ①与 pH 值 7.0 组、7.2 组和 7.4 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with pH 7.0, 7.2 and 7.4 group, $P<0.05$

NC-shRNA 和对照组明显降低 (表 4、图 4, $P<0.01$), 尤其是 OGR1-shRNA1 转染后蛋白表达下降最明显, 后续的实验选择使用 OGR1-shRNA1。

2.6 OGR1 沉默后酸环境下 NPCs 中 LC3-II 和 p62 的表达水平

pH 值 6.4 培养基处理后的细胞, 相对于 NC-shRNA 转染的细胞, OGR1-shRNA1 转染的细胞

LC3-II/ β -actin 的表达明显降低;而 p62 则相对的升高,在细胞内发生积聚(图 5、表 5, $P<0.01$)。
2.7 OGR1-shRNA1 降低自噬水平后对 NPCs 蛋

白多糖水平的影响
NPCs 外基质中主要是蛋白多糖,蛋白多糖的检测主要由 Alcian 染色进行检测。在正常培养基

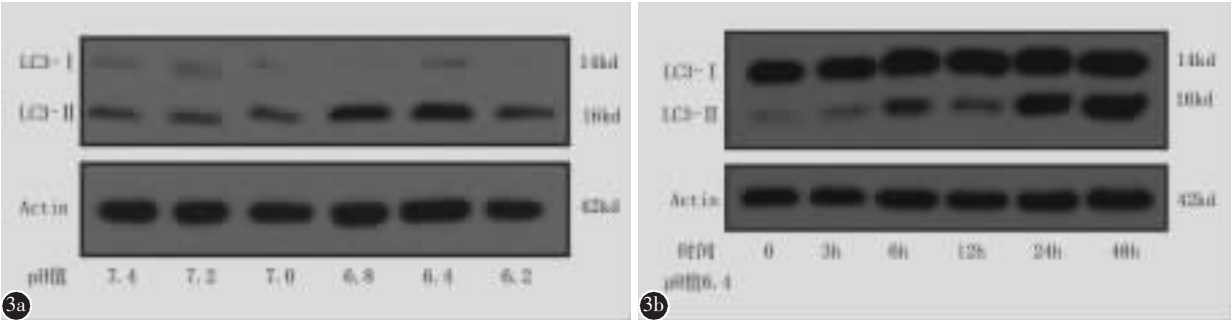


图 3 a 不同 pH 值条件下培养 NPCs 24h 后,Western-blotting 分析细胞中 LC3 蛋白表达情况 b pH 值 6.4 的培养基培养不同时间后,Western-blotting 分析细胞中 LC3 蛋白表达情况

Figure 3 a Expression of LC3 protein in NPCs under different pH values for 24 hours by Western -blotting b Western-blotting analysis of LC3 protein in cells treated with pH 6.4 medium for different time

表 3 pH 值 6.4 培养基培养不同时间 NPCs 中 LC3-II 蛋白的表达

Table 3 Expression of LC3-II protein in NP cells treated with pH 6.4 medium for different time

时间(h) Time	LC3- II/ β -actin
0	0.24 $\pm$ 0.08
3	0.31 $\pm$ 0.06
6	0.49 $\pm$ 0.21 ^①
12	0.50 $\pm$ 0.22 ^①
24	0.99 $\pm$ 0.1 ^①
48	1.02 $\pm$ 0.17 ^①

注:①与 0h 组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with 0h group, $P<0.05$

表 4 不同 OGR1-shRNA 转染后 NPCs 中 OGR1 蛋白和 mRNA 的表达

Table 4 Expression of OGR1 protein and mRNA after OGR1-shRNA silencing

	OGR1/ β -actin (Protein)	OGR1/GAPDH (mRNA)
对照组 Control	0.85 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.11
NC-shRNA	0.89 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.17
OGR1-shRNA1	0.18 $\pm$ 0.08 ^①	0.17 $\pm$ 0.06 ^①
OGR1-shRNA2	0.22 $\pm$ 0.09 ^①	0.66 $\pm$ 0.18 ^①
OGR1-shRNA3	0.45 $\pm$ 0.07 ^①	0.42 $\pm$ 0.10 ^①

注:①与对照组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with the control group, $P<0.05$

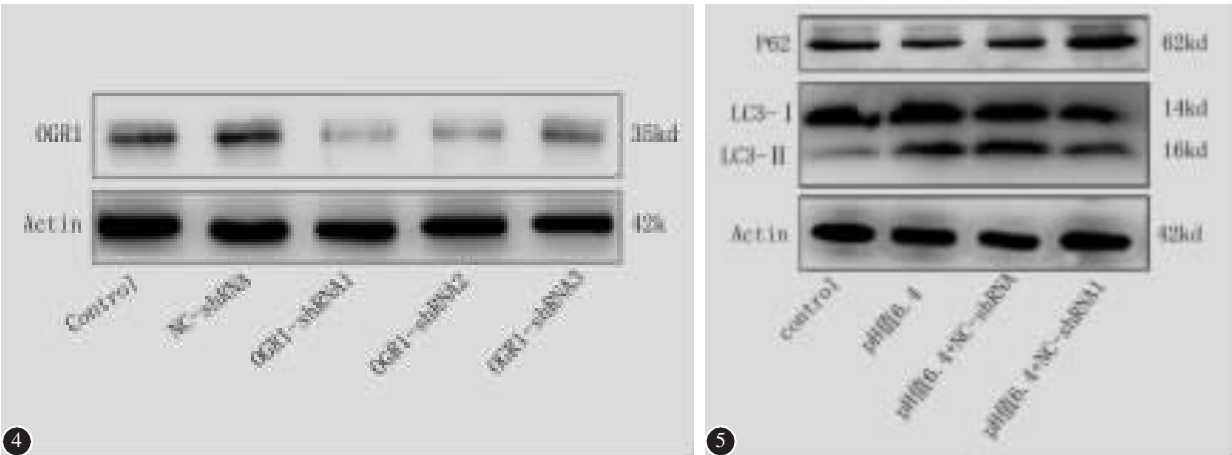


图 4 不同 OGR1-shRNA 转染后 NPCs 中 OGR1 蛋白的表达水平 图 5 OGR1-shRNA1 沉默前后 NPCs 中 LC3 和 P62 蛋白的表达

Figure 4 Expression levels of OGR1 protein after silencing of three OGR1-shRNAs Figure 5 Expression of LC3 and P62 protein in nucleus pulposus cells after OGR1 silencing

培养条件下, NPCs 中可见大量浅蓝的蛋白多糖, pH 值 6.4 培养基处理 24h, 浅蓝的蛋白多糖表达降低(图 6a, b)。与单纯 pH6.4 组比较, 使用 NC-shRNA 并不会影响蛋白多糖的表达, 但是 OGR1-shRNA1 转染组与 NC-shRNA 组比较细胞中蛋白多糖的表达明显降低(图 6c, d)。

表 5 OGR1-shRNA 沉默前后 LC3-Ⅱ 和 P62 蛋白的表达

Table 5 Expression of OGR1 and LC3-Ⅱ protein in NP cells under different pH conditions

	LC3-Ⅱ/β-actin	P62/β-actin
对照组 Control	0.23±0.07	0.99±0.18
pH 6.4组 pH 6.4 group	0.74±0.13	0.79±0.14
pH 6.4+NC-shRNA 组 pH 6.4+NC-shRNA group	0.74±0.13	0.78±0.14
pH 6.4+OGR1-shRNA1 组 pH 6.4+OGR1-shRNA1 group	0.42±0.16 ^①	1.04±0.11 ^①

注: ①与 pH 值 6.4+NC-shRNA 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with pH 6.4+NC-shRNA group, $P<0.05$

3 讨论

OGR1 是 OGR1 亚家族(G2A、TDAG8、GPR4 及 OGR1) 的一种, 而 OGR1 亚家族是卵巢癌 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCR) 家族的一种。质子作用受体后, OGR1 家族负责细胞内各种信号传递, 进而调控胞内许多病理生理反应, 被称为质子感知受体^[8-10]。在骨骼肌肉系统, OGR1 被发现在骨组织中高表达, 并参与破骨细胞的分化、生存和功能, 以及成骨细胞的分化和骨生成^[8, 11]。在酸性环境下, OGR1 介导了大鼠破骨细胞的存活; 用 OGR1 的选择性拮抗物 Cu^{2+} 处理细胞, 或用 siRNA 抑制 OGR1 的表达时, 此现象被减弱^[12, 13]。本课题组前期研究发现 OGR1 通过下游 Ca^{2+} 通路介导酸性环境下软骨细胞的凋亡^[7]。本研究中, 我们发现 OGR1 在正常的 NPCs 中表达水平并不高, 但在酸环境下表达量明显升高。这可能是因为, 酸环境激活了 NPCs 膜上的 OGR1 水平, 促进 OGR1 的转录和翻译, 也进一步证明其在 NPCs 面对酸环境中的作用。

酸是 NPCs 面对的主要应激微环境之一, 因

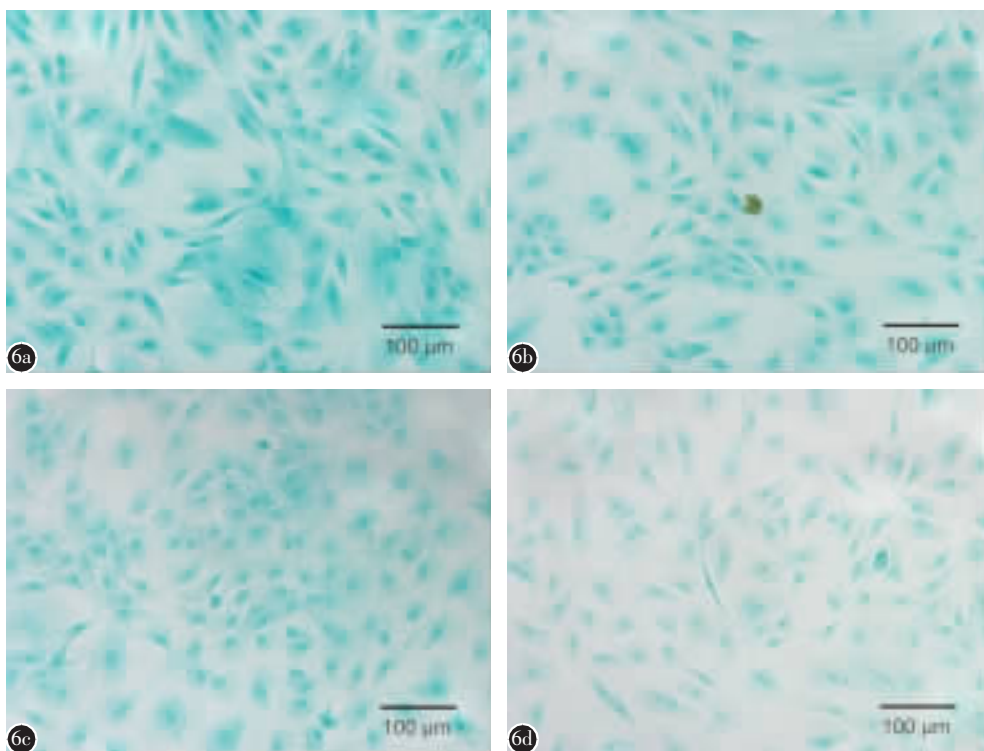


图 6 OGR1 沉默前后 NPCs 中的蛋白多糖的表达 a 对照组 b pH 值 6.4 处理组 c pH 值 6.4+NC-shRNA1 处理组 d pH 值 6.4+OGR1-shRNA1 处理组

Figure 6 Proteoglycan expression in NP cells after OGR1 silencing a Control group b pH 6.4 treatment group c pH 6.4+NC-shRNA treatment group d pH 6.4+OGR1-shRNA1 treatment group

此酸与椎间盘退变密切相关。在酸环境中, NPCs 表达糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)的表达和金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP-1)相对于正常的培养基下降 90%, 细胞凋亡明显增加^[14]。然而 NPCs 是否有内在代偿机制去适应长期的酸化的应激微环境? 近期有研究发现, 自噬是细胞适应酸化微环境的重要代偿机制^[15]。自噬通过自噬溶酶体降解细胞内结构异常或者数量异常的蛋白质和细胞器来保护细胞抵御周围环境的变化^[15]。我们前期的研究亦发现饥饿环境下自噬保护 NPCs 的凋亡^[16], 盐酸氨基葡萄糖可以促进 NPCs 的自噬并防止细胞的凋亡和改善细胞的功能^[17]。在本实验中, 我们发现自噬随着培养基 pH 值降低而明显增加, 当 pH 值 6.4 作用 24h 后, NPCs 的 LC3-II 表达水平最高。

酸环境下细胞中自噬是如何激活的尚不得而知。Xie 等^[18]发现内质网应激可能参与肺癌细胞在酸环境中的自噬激活。在恶性黑色素瘤的自噬激活过程中, 酸可明显抑制 mTOR 信号通路, 证实 mTOR 可能参与酸环境下自噬的激活^[19]。近期, 细胞膜上受体与自噬的相互关系得到越来越多的关注。有研究发现^[20], GPCR、T1R1/T1R3 是感知细胞营养状态和氨基酸利用情况的直接受体, 沉默 T1R1/T1R3 后可以促进 H9C2 心肌细胞的自噬。瞬时受体电位阳离子通道 1 (transient receptor potential canonical channel-1, TRCP1) 介导上皮细胞和神经元细胞上 Ca^{2+} 的内流, 调节下游的一系列新通路激活自噬, 沉默 TRCP1 表达后降低自噬水平。本实验中, OGR1-shRNA 沉默 NPCs 中 OGR1 基因表达后可降低酸诱导的自噬水平, 并导致 p62 在细胞内积聚, 证实 OGR1 可能感知细胞外酸环境, 并通过细胞内一系列的信号途径激活自噬。但是 OGR1 下游的一系列信号通路需要将来进一步深入研究。

低 pH 值的微环境往往会引起细胞活力和功能的降低。在 pH 值 6.8 和 6.5 的培养基中, 恶性黑色素瘤细胞的活力和数量明显减少^[19], 而肺癌细胞内的 ROS 水平则明显升高^[18]。在低 pH 值培养基中孵育 24~72h 后, 肺癌细胞发生细胞活力下降和细胞周期阻滞^[15]。NPCs 在酸性环境中蛋白聚糖的表达明显下降^[14], 自噬与应激环境下细胞的活力密切相关^[15, 18, 19], 抑制自噬水平后, 软骨细胞、纤维环细胞和 NPCs 的凋亡均升高^[16, 21, 22]。而在细胞功能方面, 抑制 IL-1 β 作用下的软骨细胞自

噬水平, II 型胶原和蛋白多糖明显下降, 而促进自噬水平则会升高细胞外基质的表达^[23]。本研究中, 沉默 OGR1 表达降低自噬水平后, OGR1 水平进一步下降, 证实自噬在酸环境下的 NPCs 中具有一定的作用, 而且 OGR1 可能参与其中。由于氧化应激可以引起细胞外基质的降解并损害细胞功能, 自噬往往具有降低细胞氧化应激水平^[24]。因此自噬对 NPCs 功能的影响可能是通过酸环境下氧化应激水平。

本研究发现 OGR1 表达与细胞外环境的 pH 值的降低成正比。酸促进 NPCs 中 LC3-II 水平的升高, 并且具有时间和剂量的依赖性, 筛选出 pH 值 6.4 培养基作用 24h。OGR1-shRNA1 慢病毒沉默 OGR1 表达后, 酸环境下的 NPCs 中 LC3-II 水平明显下降, p62 则发生积聚。最后观察 NPCs 功能时发现, pH 值 6.4 的培养基降低细胞中蛋白多糖的表达, 而 OGR1 沉默降低自噬水平进一步破坏 NPCs 的功能。所有上述的证据证实 OGR1 是酸环境下 NPCs 自噬激活的重要参与者, 并且自噬对于 NPCs 的功能具有重要的作用。酸环境可促进 NPCs 中 OGR1 的表达, 并呈现 pH 值依赖性。低 pH 培养基可以明显促进 NPCs 自噬。OGR1-shRNA 沉默 OGR1 水平后可明显降低酸诱导的自噬。OGR1-shRNA 沉默 OGR1 水平可以逆转自噬对酸环境下 NPCs 功能的保护作用, OGR1 沉默后 NPCs 蛋白多糖的水平明显下降。说明酸环境下 OGR1 介导的自噬对 NPCs 具有一定的保护作用, 为将来椎间盘退变的防治提供了一定的研究基础。

4 参考文献

1. Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, et al. Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response[J]. J Orthop Res, 1988, 6(6): 777-792.
2. Ichimura K, Tsuji H, Matsui H, et al. Cell culture of the intervertebral disc of rats: factors influencing culture, proteoglycan, collagen, and deoxyribonucleic acid synthesis[J]. J Spinal Disord, 1991, 4(4): 428-436.
3. Kitano T, Zerwekh JE, Usui Y, et al. Biochemical changes associated with the symptomatic human intervertebral disk [J]. Clin Orthop Relat Res, 1993, 293: 372-377.
4. Diamant B, Karlsson J, Nachemson A. Correlation between lactate levels and pH in discs of patients with lumbar rhizopathies[J]. Experientia, 1968, 24(12): 1195-1196.
5. Jorgetti V, Drueke TB, Ott SM. Role of proton receptor OGR1 in bone response to metabolic acidosis[J]. Kidney Int,

- 2016, 89(3): 529–531.
6. Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, et al. Proton-sensing G-protein-coupled receptors[J]. *Nature*, 2003, 425(6953): 93–98.
 7. Yuan FL, Wang HR, Yuan W, et al. Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 is involved in acid-induced apoptosis of endplate chondrocytes in intervertebral discs [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(1): 67–77.
 8. Yuan FL, Zhao MD, Jiang LB, et al. Molecular actions of ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 caused by extracellular acidification in bone[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 22365–22373.
 9. Okajima F. Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(11): 2263–2271.
 10. Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors[J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 354.
 11. Kato K, Morita I. Promotion of osteoclast differentiation and activation in spite of impeded osteoblast-lineage differentiation under acidosis: effects of acidosis on bone metabolism [J]. *Biosci Trends*, 2013, 7(1): 33–41.
 12. Pereverzev A, Komarova SV, Korcok J, et al. Extracellular acidification enhances osteoclast survival through an NFAT-independent, protein kinase C-dependent pathway[J]. *Bone*, 2008, 42(1): 150–161.
 13. Frick KK, Krieger NS, Nehrke K, et al. Metabolic acidosis increases intracellular calcium in bone cells through activation of the proton receptor OGR1 [J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(2): 305–313.
 14. Razaq S, Wilkins RJ, Urban JP. The effect of extracellular pH on matrix turnover by cells of the bovine nucleus pulposus[J]. *Eur Spine J*, 2003, 12(4): 341–349.
 15. Wojtkowiak JW, Rothberg JM, Kumar V, et al. Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 3938–3947.
 16. 江立波, 张小磊, 徐华梓, 等. 细胞自噬对饥饿环境下椎间盘髓核细胞的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(7): 1302.
 17. Jiang L, Jin Y, Wang H, et al. Glucosamine protects nucleus pulposus cells and induces autophagy via the mTOR-dependent pathway[J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(11): 1532–1542.
 18. Xie WY, Zhou XD, Li Q, et al. Acid-induced autophagy protects human lung cancer cells from apoptosis by activating ER stress[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 339(2): 270–279.
 19. Marino ML, Pellegrini P, Di Lernia G, et al. Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(36): 30664–30676.
 20. Wauson EM, Zaganjori E, Lee AY, et al. The G protein-coupled taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy[J]. *Mol Cell*, 2012, 47(6): 851–862.
 21. Lopez de Figueroa P, Lotz MK, Blanco FJ, et al. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(4): 966–976.
 22. Shen C, Yan J, Jiang LS, et al. Autophagy in rat annulus fibrosus cells: evidence and possible implications[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(4): R132.
 23. Sasaki H, Takayama K, Matsushita T, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expressions in human chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 64(6): 1920–1928.
 24. Ishibashi H, Tonomura H, Ikeda T, et al. Hepatocyte growth factor/c-met promotes proliferation, suppresses apoptosis, and improves matrix metabolism in rabbit nucleus pulposus cells in vitro[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(4): 709–716.
- (收稿日期:2018-10-24 末次修回日期:2019-06-28)
(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)
(本文编辑 卢庆霞)
-
- (上接第 640 页)
6. Wang J, Chen H, Cao P, et al. Combined anterior-posterior fixation and fusion for completely dislocated hangman's fracture: a retrospective analysis of 11 cases[J]. *Clin Spine Surg*, 2017, 30(8): E1050–E1054.
 7. Al-Mahfoudh R, Beagrie C, Woolley E, et al. Management of Typical and Atypical Hangman's Fractures[J]. *Global Spine J*, 2016, 6(3): 248–256.
 8. Hur H, Lee JK, Jang JW, et al. Is it feasible to treat unstable Hangman's fracture via the primary standard anterior retropharyngeal approach[J]. *Eur Spine J*, 2014, 23(8): 1641–1647.
 9. Wang S, Wang Q, Yang H, et al. A novel technique for unstable Hangman's fracture: lag screw-rod (LSR) technique[J]. *Eur Spine J*, 2017, 26(4): 1284–1290.
 10. Duggal N, Chamberlain RH, Perez-Garza LE, et al. Hangman's fracture: a biomechanical comparison of stabilization techniques[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2007, 32(2): 182–187.
 11. Bristol R, Henn JS, Dickman CA. Pars screw fixation of a hangman's fracture: technical case report [J]. *Neurosurgery*, 2005, 56(1 Suppl): E204, E204.
 12. 陈语, 项良碧, 刘军, 等. Hangman 骨折及其内固定三维有限元模型的建立[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2012, 27(5): 389–392.
 13. 谢雁春, 项良碧, 陈语, 等. Hangman 骨折及内固定术生物力学评价与临床应用[J]. *创伤与急危重病医学*, 2014, 2(1): 30–33.
 14. 黄磊, 姜为民, 罗宗平, 等. 用于 Hangman 骨折治疗的椎弓根拉力螺钉的设计与生物力学测试[J]. *中华骨科杂志*, 2013, 33(11): 1141–1146.
- (收稿日期:2019-04-08 修回日期:2019-06-08)
(英文编审 郑国权/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)