

基础研究

A型激酶锚定蛋白 2 基因表达对生长板软骨细胞功能的影响

李亚伟,徐洁涛,蒋彬,戴瑜亮,李鹏志,李磊,李力,吕国华,王冰

(中南大学湘雅二医院脊柱外科 410011 湖南省长沙市)

【摘要】目的:探讨 A 型激酶锚定蛋白 2(A-kinase anchoring protein 2,AKAP2)基因表达对生长板软骨细胞(growth plate chondrocytes,GPCs)增殖、分化及细胞外基质代谢的影响及作用机制。**方法:**设计 AKAP2 过表达和基因敲除质粒转染 GPCs 对 AKAP2 进行过表达或干扰,构建 AKAP2 过表达阴性对照组(Vector 组)、AKAP2 过表达组(AKAP2 OE 组)、AKAP2 干扰阴性对照组(si-NC 组)、AKAP2 干扰组(si-AKAP2 组)和 AKAP2 OE+U0126 组[U0126:细胞外信号调节蛋白激酶 1/2(extracellular signal regulated kinase 1/2,ERK1/2)通路阻滞剂],记录各组 GPCs 细胞增殖活力及钙盐沉积情况,检测细胞外基质中Ⅱ型胶原 $\alpha 1$ (collagen type II $\alpha 1$,COL2A1)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)、Ⅱ型胶原(collagen type II,COL II)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)和性别决定区 Y 框蛋白 9(SRY-related high-mobility group box gene 9,SOX9)以及 ERK1/2 表达和磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)磷酸化水平,并进行统计学分析。**结果:**与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组细胞内 AKAP2、ALP、COL2A1 基因表达与 AKAP2、PCNA、SOX9、ALP、COL II 蛋白表达及 48h 细胞活力、p-ERK1/2 磷酸化水平均升高,橘红色钙结节显著增多,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 si-NC 组相比,si-AKAP2 组上述相应检测指标均呈降低趋势($P<0.05$)。与 AKAP2 OE 组相比,AKAP2 OE+U0126 组 ALP、COL II A1 基因表达和 PCNA、SOX9、ALP、COL II 蛋白表达及 48h 细胞活力、p-ERK1/2 磷酸化水平均降低,橘红色钙结节减少,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 ERK1/2 基因表达均无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**AKAP2 基因可以通过调控 ERK1/2 信号通路影响软骨细胞增殖、分化和细胞外基质代谢,并可能进一步改变正常的生长板软骨内成骨模式。

【关键词】A 型激酶锚定蛋白 2;软骨细胞;增殖;分化;ERK1/2 信号通路

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2020.12.10

中图分类号:R322.7 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2020)-12-1118-11

Effects on the function of growth plate chondrocytes by A-kinase anchoring protein 2 gene expression/
LI Yawei, XU Jietao, JIANG Bin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2020, 30(12):
1118-1128

【Abstract】 Objectives: To investigate the effect and mechanism of A-kinase anchoring protein 2 (AKAP2) gene expression on the proliferation, differentiation and extracellular matrix metabolism of growth plate chondrocytes (GPCs). **Methods:** Designing AKAP2 overexpression and knockdown plasmids to transfect GPCs for overexpression or interference with AKAP2. The negative control of overexpression group (Vector group), the AKAP2 overexpression group (AKAP2 OE group), the negative control of interference group (si-NC group), the AKAP2 interference group (si-AKAP2 group) and AKAP2 OE+U0126 group [U0126: a blocker of the extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathway] were constructed. GPCs cell proliferation and calcium deposition were recorded. The expression of collagen type II $\alpha 1$ (COL2A1), alkaline phosphatase (ALP), collagen type II (COL II), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), SRY-related high-mobility group box gene 9 (SOX9) and ERK1/2, phosphorylation level of phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) were tested. The data were statistically analyzed. **Results:** Compared with the Vector group, the gene expression of AKAP2, ALP, and

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81601868);中南大学中央高校基本科研业务费专项资金资助(No.206021704)

第一作者简介:男(1982-),主治医师,研究方向:脊柱外科基础与临床

电话:(0731)85295125 E-mail:liyawei1217@csu.edu.cn

通讯作者:王冰 E-mail:bingwang20021972@aliyun.com

COL2A1, and the protein expression level of AKAP2, PCNA, SOX9, ALP, COL II, p-ERK1/2, and cell viability were significantly higher, and calcium nodules significantly increased in the AKAP2 OE group ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the si-AKAP2 group showed the opposite downtrend. Compared with the AKAP2 OE group, the expression of ALP, COL II A1, the protein expression level of PCNA, SOX9, ALP, and COL II, p-ERK1/2, cell viability, and protein deposition of COL II were significantly lower, and significantly decreased in the AKAP2 OE+U0126 group ($P<0.05$). No difference was found in the expression of ERK1/2 ($P>0.05$). **Conclusions:** AKAP2 could affect the proliferation, differentiation and extracellular matrix metabolism of chondrocytes through the ERK1/2 signaling pathway, and it may further change the normal growth plate endochondral bone formation pattern.

【Key words】 A-kinase anchoring protein 2; Chondrocytes; Proliferation; Differentiation; ERK1/2 signal pathway

【Author's address】 Department of Spine Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410011, China

A型激酶锚定蛋白(A-kinase anchoring proteins, AKAPs)是一类参与构成信号复合物的蛋白质,可以精确调控一系列信号转导事件的空间和时间顺序^[1-3]。A型激酶锚定蛋白2(A-kinase anchoring protein 2, AKAP2)是AKAPs中的一员。Panza等^[4]曾报道了1例Kallmann综合征合并脊柱后凸畸形、扁平足、足外翻、双侧第五足趾缺失、足舟骨与距骨间软骨缺失、异常融合和髋关节发育不良等骨骼发育异常的病例,该患者AKAP2基因被一个新发平衡易位t(7;9)(p14.1;q31.3)打断,进一步利用原位杂交技术检测发现AKAP2 mRNA在小鼠胚胎的软骨结构中高水平表达。同样在我们前期研究中,也发现AKAP2基因在一个青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)大家系中发生新杂合错义突变c.2645A>C(p.E882A)^[5],功能预测和保守性分析表明该基因变异有害且高度保守,且AKAP2突变均位于OMIM数据库收录的AIS连锁位点(1S4, 9q31.2-q34.2)区间内^[4,5]。上述结果均提示AKAP2基因在调控骨骼系统发育方面可能发挥着重要作用^[4-6]。

AKAP2存在与细胞信号通路中蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)特异性结合的高度保守PKA结合区,参与PKA特定亚细胞定位和特定目标底物磷酸化过程^[1]。而PKA介导丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的细胞外信号调节蛋白激酶1/2(extracellular signal regulated kinase, ERK1/2)信号通路,是褪黑素信号通路参与软骨细胞的增殖与分化信号途径^[7-9],能够通过调节软骨细胞内环磷酸腺苷

(cAMP)水平,经PKA介导ERK1/2通路参与调节软骨细胞生理过程^[7-9],在软骨内成骨中发挥重要作用^[10]。既往研究证实,ERK1/2信号通路参与软骨细胞增殖和分化等多种生理过程的调控^[11-16]。因此,我们推测AKAP2基因可能经软骨细胞内ERK1/2信号通路将胞外信号向核内传导而影响软骨细胞的增殖与分化的生理过程。本研究旨在探讨AKAP2基因表达对生长板软骨细胞(growth plate chondrocytes, GPCs)增殖、分化和细胞外基质代谢的调控作用,以及对软骨细胞内ERK1/2信号通路蛋白及其磷酸化影响,以期初步了解AKAP2基因在骨骼系统生长发育中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

人源P4代GPCs由中南大学湘雅二医院医学实验研究中心提供。涉及的操作已获得中南大学湘雅二医院医学伦理委员会审核批准(No: 2016219),涉及的患者及其家属均被告知研究目的并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(维森特,加拿大),0.25% Trypsin-EDTA (Kccell, 中国), GlutaMAX-I(赛默飞, 美国), DMEM培养基(Kccell, 中国), 过表达质粒/siRNA(诺睿, 中国), 甲苯胺蓝(索莱宝, 中国), 抗II型胶原抗体(CUS-ABIO, 美国), 抗AKAP2抗体(Bioss, 美国), 抗碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)抗体(Abcam, 美国), 抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(Abcam, 美国), 抗性

别决定区 Y 框蛋白 9 (SRY-related high-mobility group box gene 9, SOX9) 抗体 (Abcam, 美国), 抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (Affinity, 美国), 抗 ERK1/2 抗体 (Santa Cruz, 美国), 抗聚集蛋白聚糖 (Aggrecan) 抗体 (Abcam, 美国), 抗磷酸化 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 1/2 (p-ERK1/2) 抗体 (Santa Cruz, 美国), 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 羊抗兔二抗 (Abcam, 美国), lipo3000 (Invitrogen, 美国), Trizol (Invitrogen, 美国), RNase-Free 水 (生工, 中国), RIPA 裂解液 (碧云天, 中国), BCA 试剂盒 (碧云天, 中国), 0.45 μ m 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) (碧云天, 中国), 电致化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 发光液 (Millipore, 美国), 逆转录试剂盒 (Genecopoeia, 美国), SYBR Green (Takara, 日本), 四甲基偶氮唑盐法 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 细胞增殖检测试剂盒 (Sigma, 美国), DMSO (沪试, 中国), Opti-MEM 培养基 (Invitrogen, 美国), 茜素红染色液 (索莱宝, 中国), U0126 (MCE, 美国), 多功能酶标仪 (PerkinElmer, 美国), 细胞程序降温盒 (NALGENE, 美国), PCR 仪 (TADVANCED, 德国)。

1.3 细胞培养及转染

(1) 将复苏后的人源 GPCs 使用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 48h; (2) 弃去培养基, PBS 洗涤, 0.25% Trypsin-EDTA 消化, 加入完全培养基终止消化, 将细胞悬液调整为 5×10⁴ 个/ml; (3) 在 6 孔板中每孔加入 1ml 细胞悬液, 置于 37℃培养箱中过夜培养; (5) 将悬液调整为 5×10⁵ 个/ml, 随机分为 5 组: AKAP2 过表达阴性对照组 (Vector 组)、AKAP2 过表达组 (AKAP2 OE 组)、AKAP2 干扰阴性对照组 (si-NC 组)、AKAP2 干扰组 (si-AKAP2 组) 和 AKAP2 OE+U0126 组 (U0126 为 ERK1/2 通路阻滞剂); (6) A 液: 将待转染的 Vector (9 μ g)、AKAP2 (9 μ g)、si-NC (300pmol) 和 si-AKAP2 (300pmol) 分别用 375 μ l 无血清的 Opti-MEM 培养基稀释, 混匀 (每孔转染质粒 3 μ g 或 si-RNA 100pmol) (引物序列见表 1); (7) B 液: 将 36 μ l lipo3000 用 1.5ml 无血清的 Opti-MEM 培养基稀释, 混匀 (每孔转染需 3 μ l lipo3000);

(8) 将 5 组 375 μ l 的 A 液分别与 375 μ l 的 B 液混合, 混匀, 室温静置 5min; (9) 将 5 组混合好的 750 μ l 转染液, 以每孔 250 μ l 加入相应组中; (10) 将培养板置入培养箱培养 6h。

1.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative-polymerase chain reaction, qPCR) 检测细胞中目标基因表达量

(1) 取转染好的细胞, 弃去培养基, 每孔加入 1ml Trizol, 裂解细胞 15min; (2) 将 Trizol 转移至 RNase-Free 管中, 每管加 0.2ml 氯仿, 充分震荡 15s, 室温静置 10min; (3) 12000×g 离心 10min, 将上清小心转移至新的 RNase-Free 管中 (约 500 μ l); (4) 每管中加入等量异丙醇, 摇动混匀, 室温静置 10min; (5) 12000×g 离心 10min, 弃去上清, 每管加入 1ml 75%酒精 (RNase-Free) 洗涤沉淀; (6) 7500×g 离心 5min, 弃去上清, 静置 5min; (7) 每管加入 50 μ l RNase-Free 水, 溶解沉淀; (8) 测定 RNA 浓度, 将 RNA 反转录为 cDNA; (9) 以 cDNA 为模板, 检测各组细胞中 AKAP2、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、II 型胶原 α 1 (collagen type II alpha 1, COL2A1)、细胞外信号调节蛋白激酶 ERK1 和 ERK2 基因表达量。引物序列见表 1。

1.5 MTT 检测细胞增殖

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
AKAP2 OE vector F	CCCAAGCTTATGCGCTGCCCCAGCCC
AKAP2 OE vector R	CCGGAATTCTTATTCGTTGCTCTTCTCTCTCTG
Si-NC sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
Si-NC antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
Si-AKAP2 sense	GCAUGAUUGACAAAGCAAATT
Si-AKAP2 antisense	UUUGCUUUGUCAAUCAUGCTT
QPCR-AKAP2 F	GACAACATCAGTGACAGCGGG
QPCR-AKAP2 R	CACTAAATGACTTGGAGACGCCT
QPCR-ALP F	GTGAACCGCAACTGCTACTC
QPCR-ALP R	GAGCTGCGTAGCGATGTCC
QPCR-COL2A1 F	TGGACGATCAGCGCAAACC
QPCR-COL2A1 R	GCTGCGGATGCTCTCAATCT
QPCR-ERK1 F	CTACACGCAGTTGCACTACAT
QPCR-ERK1 R	CAGCAGGATCTGGATCTCCC
QPCR-ERK2 F	TACACCAACCTCTCGTACATCG
QPCR-ERK2 R	CATGTCTGAAGCGCAGTAAGATT
QPCR-GAPDH F	ACAGCCTCAAGATCATCAGC
QPCR-GAPDH R	GGTCATGAGTCCTCCACGAT

(1)0.25% Trypsin-EDTA 消化转染后的各组细胞,加入完全培养基终止消化;(2)取 96 孔板 2 块(记为 A 和 B),每块 96 孔板均接种各组细胞,每组 6 孔,每孔 3000 个细胞,过夜培养,使细胞贴壁;(3)取出 96 孔板 A,弃去培养基,每孔添加新鲜培养基 180 μ l,每孔加入 20 μ l MTT 溶液(5mg/ml),此时记为 0h,继续培养 4h;(4)取出 96 孔板 A,弃去培养基,PBS 洗涤。每孔加入 150 μ l DMSO,充分震荡 10min,使用酶标仪在 490nm 波长处测定吸光值;(5)48h 后,取出 96 孔板 B,弃去培养基,每孔添加新鲜培养基 180 μ l,每孔加入 20 μ l MTT 溶液(5mg/ml),此时记为 48h,继续培养 4h;(6)弃去培养基,PBS 洗涤。每孔加入 150 μ l DMSO,充分震荡 10min,使用酶标仪在 490nm 波长处测定吸光值。

1.6 蛋白质免疫印迹(Western blot,WB)检测细胞中目标蛋白表达量

(1)各组每孔加入 1ml RIPA 裂解液(含 1m MPSMF),冰上裂解细胞 30min;(2)将裂解液转移至 RNase-Free 管中,使用 BCA 法测定蛋白浓度,用细胞裂解液将各组蛋白浓度调整至相同;(3)每管加入 6 $\times$ DNA 上样缓冲液,于沸水中煮 5min,使蛋白变性;(4)配置 SDS-PAGE 凝胶;(5)点样,120V 电泳,溴酚蓝跑至胶底时停止电泳;(6)使用 90V 电泳 1h,将蛋白转移至 PVDF 膜上;(7)5% BSA 室温封闭 1h;(8)将稀释后的抗体 ALP (1:1000)、II 型胶原(collagen type II, COL II)(1:500)、AKAP2 (1:1000)、PCNA (1:5000)、SOX9 (1:2000)、GAPDH (1:5000)、p-ERK1/2 (1:500)、ERK1/2(1:500)分别与 PVDF 膜于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;(9)TBST 洗膜 3 次,每次 5min;(10)将稀释后的二抗(1:5000)与 PVDF 膜室温孵育 1h;(11)TBST 洗膜 3 次,每次 5min;(12)将化学发光液与 PVDF 膜孵育,在化学发光成像系统中曝光。使用 ImageJ 软件测定蛋白条带吸光度进行统计分析。

1.7 免疫荧光检测细胞中 COL II 蛋白表达

(1)在培养板中将已爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗 3 次,每次 3min;(2)用 4%的多聚甲醛固定爬片 15min,PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3min;(3)PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3min,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加正常山羊血清,室温封闭 30min;(4)每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗(COL II 抗体 1:100)并放入湿盒,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;(5)加荧光

二抗:PBST 浸洗爬片 3 次,每次 3min,滴加荧光二抗(1:200),湿盒中 20~37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 浸洗爬片 3 次,每次 3min;(6)复染核:滴加 DAPI(1:500)避光孵育 5min;(7)用吸水纸吸干爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.8 茜素红染色观察细胞钙盐沉积能力

所有组细胞转染诱导处理 14d 后,用茜素红染色实验检测各组细胞钙盐沉积情况。(1)弃去培养基,PBS 洗涤,每孔加入 500 μ l 4%多聚甲醛溶液固定 10min;(2)弃去固定液,PBS 洗涤。每孔加入茜素红染色液。37 $^{\circ}$ C 避光培养 20min;(3)弃去染色液,双蒸水充分洗涤,待样品风干,观察拍照。

1.9 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 软件 (Version 25.0, IBM Corporation, Armonk, NY) 进行处理,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态分布数据多组间均数差异显著性采用方差分析检验,组间数据比较采用独立样本 t 检验;非正态分布数据采用参数检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 AKAP2 过表达对软骨细胞增殖分化的影响

①qPCR 结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组细胞内 AKAP2、ALP 和 COL2A1 mRNA 表达升高($P < 0.05$);与 si-NC 组相比,si-AKAP2 组细胞内 AKAP2、ALP 和 COL2A1 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。表明细胞转染 AKAP2 过表达及干扰有效,过表达 AKAP2 可促进 ALP、COL2A1 基因表达,而干扰 AKAP2 可抑制细胞中的 ALP、COL2A1 基因表达(图 1a)。②MTT 结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组 48h 细胞活力升高;与 si-NC 组相比,si-AKAP2 组 48h 细胞活力降低($P < 0.05$)。表明过表达 AKAP2 可促进细胞增殖,而干扰 AKAP2 可抑制细胞增殖(图 1b)。③WB 结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组细胞内 AKAP2、COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白表达升高($P < 0.05$);与 si-NC 组相比,si-AKAP2 组细胞内 AKAP2、COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白表达降低($P < 0.05$)。表明过表达 AKAP2 可促进 COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白表达,而干扰 AKAP2 可抑制细胞中 COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白表达(图 1c、d)。④免疫荧光实验结果显

示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组细胞内 COL II 蛋白表达升高($P<0.05$);与 si-NC 组相比,si-AKAP2 组细胞内 COL II 蛋白表达降低($P<0.05$)(图 2a)。表明过表达 AKAP2 可促进 COL II 蛋白表达,而干扰 AKAP2 可抑制细胞中 COL II 蛋白表达。⑤茜素红染色结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组细胞橘红色钙结节增多($P<0.05$);与 si-NC 组相比,si-AKAP2 组细胞橘红色钙结节减少($P<0.05$),该结果表明过表达 AKAP2 可促进 GPCs 钙盐沉积,而干扰 AKAP2 可抑制 GPCs 钙盐沉积(图 2b)。

2.2 AKAP2 过表达对软骨细胞 ERK1/2 磷酸化水平的影响

①qPCR 结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2

OE 组 ERK1、ERK2 基因表达无明显变化($P>0.05$);与 si-NC 组相比,si-AKAP2 组 ERK1、ERK2 基因表达无明显变($P>0.05$)。表明 AKAP2 对软骨细胞中 ERK1、ERK2 mRNA 表达水平无调节作用(图 3a)。②WB 结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组 ERK1/2 蛋白表达无明显变化($P>0.05$),但 p-ERK1/2 升高($P<0.05$);与 si-NC 组相比,si-AKAP2 组 ERK1/2 蛋白表达无明显变化($P>0.05$),但 p-ERK1/2 降低($P<0.05$)。表明过表达 AKAP2 可促进细胞中 ERK1/2 磷酸化水平,干扰 AKAP2 可抑制细胞中 ERK1/2 磷酸化水平(图 3b、c)。

2.3 U0126 对软骨细胞增殖分化的影响

①qPCR 结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2

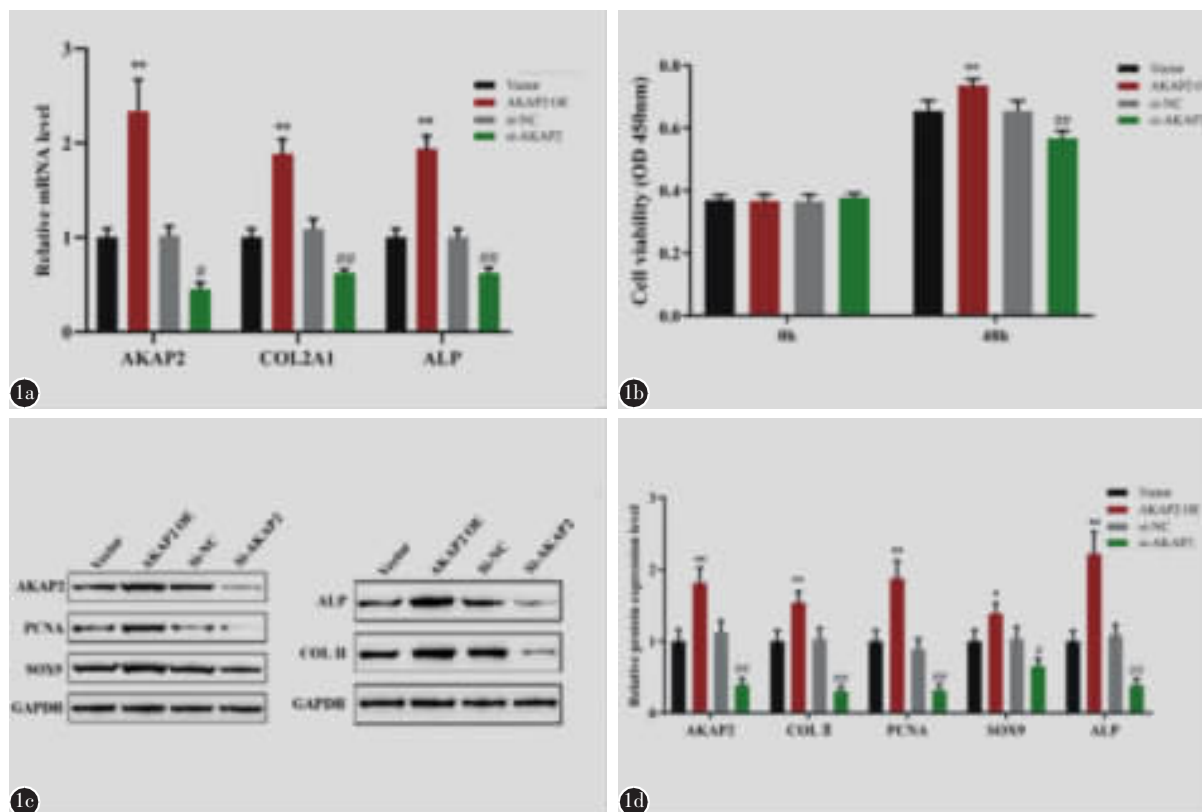


图 1 a qPCR 结果显示,AKAP2、COL2A1 和 ALP mRNA 在 AKAP2 OE 组表达增加,在 si-AKAP2 组表达减少 b MTT 结果表明 AKAP2 过表达能够促进 GPCs 增殖 c、d WB 检测显示 AKAP2、COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白在 AKAP2 过表达组表达增加,在 AKAP2 抑制组表达减少 (**与 Vector 组比较, $P<0.01$;#与 si-NC 组比较, $P<0.05$;;与 si-NC 组比较, $P<0.01$)

Figure 1 a qPCR results showed that the expression of AKAP2, COL2A1 and ALP mRNA increased in the AKAP2 OE group, and decreased in the si-AKAP2 group b MTT results showed that AKAP2 overexpression could promote the proliferation of GPCs c, d WB detection showed AKAP2 The expression of COL II, PCNA, SOX9 and ALP protein increased in the AKAP2 overexpression group, and decreased in the AKAP2 inhibition group (**Compared with Vector group, $P<0.01$; # Compared with si-NC group, $P<0.05$; ## Compared with si-NC group, $P<0.01$)

OE组细胞内 ALP、COL2A1 基因表达升高 ($P<0.05$);与 AKAP2 OE 组相比,AKAP2 OE+U0126

组细胞内 ALP、COL2A1 基因表达降低 ($P<0.05$)。表明 U0126 可以减弱过表达 AKAP2 对软骨细胞

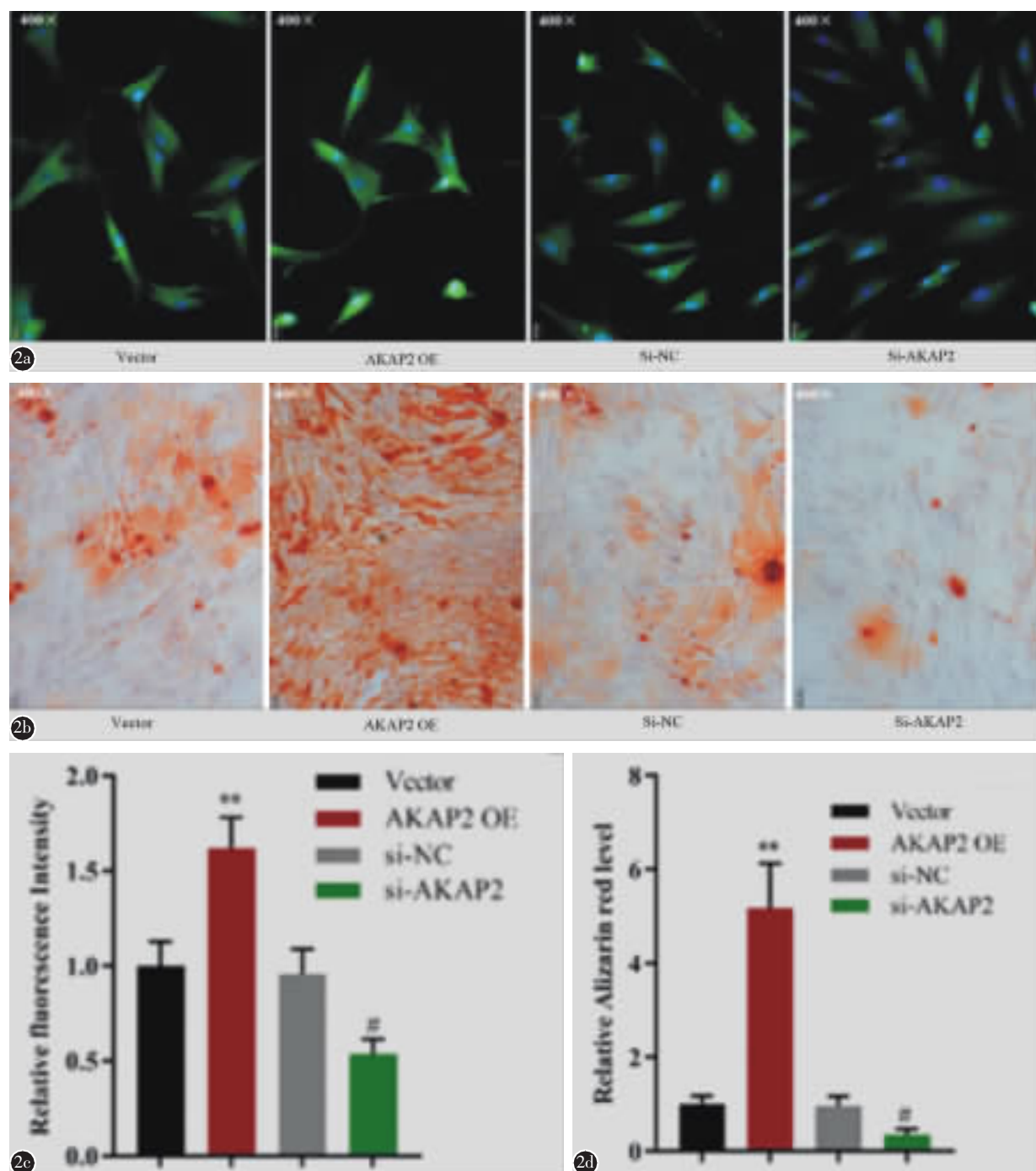


图 2 **a** 免疫荧光检测显示 Vector 组、AKAP2 OE 组、si-NC 组和 si-AKAP2 组 GPCs COL II 蛋白的表达与分布 **b** 茜素红染色检测显示上述各组 GPCs 钙沉积差异 **c,d** COL II 蛋白表达和钙盐沉积能力在 AKAP2 OE 组增加,在 si-AKAP2 组表达减少(**与 Vector 组比较, $P<0.01$;#与 si-NC 组比较, $P<0.05$)

Figure 2 **a** Immunofluorescence detection showed the expression and distribution of GPCs COL II protein in Vector group, AKAP2 OE group, si-NC group and si-AKAP2 group **b** Alizarin red staining showed the difference in calcium deposition of GPCs in the above groups **c, d** COL II protein expression and calcium deposition increased in the AKAP2 OE group, and decreased in the si-AKAP2 group(**Compared with Vector group, $P<0.01$; #Compared with si-NC group, $P<0.05$)

中 ALP 和 COL2A1 mRNA 的促进作用,证实 AKAP2 通过 ERK1/2 调控软骨细胞中 ALP 和 COL2A1 mRNA 的表达(图 4a)。^②MTT 结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组 48h 细胞活力升高($P<0.05$);与 AKAP2 OE 组相比,AKAP2 OE+U0126 组 48h 细胞活力降低($P<0.05$)。表明 U0126 可以减弱过表达 AKAP2 对软骨细胞的增殖促进,证实 AKAP2 通过 ERK1/2 调控软骨细胞增殖(图 4b)。^③WB 结果显示,Vector 组、AKAP2 OE 组和 AKAP2 OE+U0126 组三组细胞 ERK1/2 蛋白表达无明显变化($P>0.05$),但 AKAP2 OE 组 p-ERK1/2、COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白表达升高($P<0.05$);与 AKAP2 OE 组相比,AKAP2 OE+U0126 组 p-ERK1/2、COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白表达降低($P<0.05$)。表明 U0126 可以减弱过表达 AKAP2 对细胞中 ERK1/2 磷酸化水平的促进作用,以及对 COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白表达的促进作用,证实 AKAP2 通过 ERK1/2 调控软骨细胞增殖、分化和细胞外基质代谢(图 4c、d)。^④免疫荧光结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组细胞内 COL II 蛋白表达升高($P<0.05$);与 AKAP2 OE 组相比,AKAP2 OE+U0126 组细胞内 COL II 蛋白表达降低($P<0.05$)。表明 U0126 可以减弱过表达 AKAP2 对软骨细胞中

COL II 蛋白表达的促进作用,证实 AKAP2 通过 ERK1/2 调控软骨细胞中和 COL II 蛋白表达(图 5a)。^⑤茜素红染色结果显示,与 Vector 组相比,AKAP2 OE 组细胞橘红色钙结节增多($P<0.05$);与 AKAP2 OE 组相比,AKAP2 OE+U0126 组细胞橘红色钙结节减少($P<0.05$)。表明 U0126 可以减弱过表达 AKAP2 对 GPCs 钙盐沉积的促进作用证实 AKAP2 通过 ERK1/2 调控 GPCs 肥大性分化和基质矿化(图 5b)。

3 讨论

既往研究发现 AKAP2 在调控骨骼系统发育方面发挥着重要作用^[4-6]。本研究结果进一步显示 AKAP2 可能与软骨细胞增殖、分化和细胞外基质代谢有关。PCNA 是一类只存在于增殖细胞中且阶段性表达的蛋白质,是评价细胞增殖状态的指标之一。不同组别细胞中 PCNA 蛋白表达量和 MTT 实验结果的差异表明软骨细胞中 AKAP2 干扰可抑制软骨细胞增殖;ALP 在成熟的软骨细胞中分泌较少,而在终末分化后的肥大软骨细胞中才开始表达。同样各组细胞 ALP 蛋白表达量和茜素红染色结果的不同也证实软骨细胞中 AKAP2 干扰可延迟体外软骨细胞肥大性分化和基质矿化。SOX9 是调控软骨形成的重要基因之一,参与

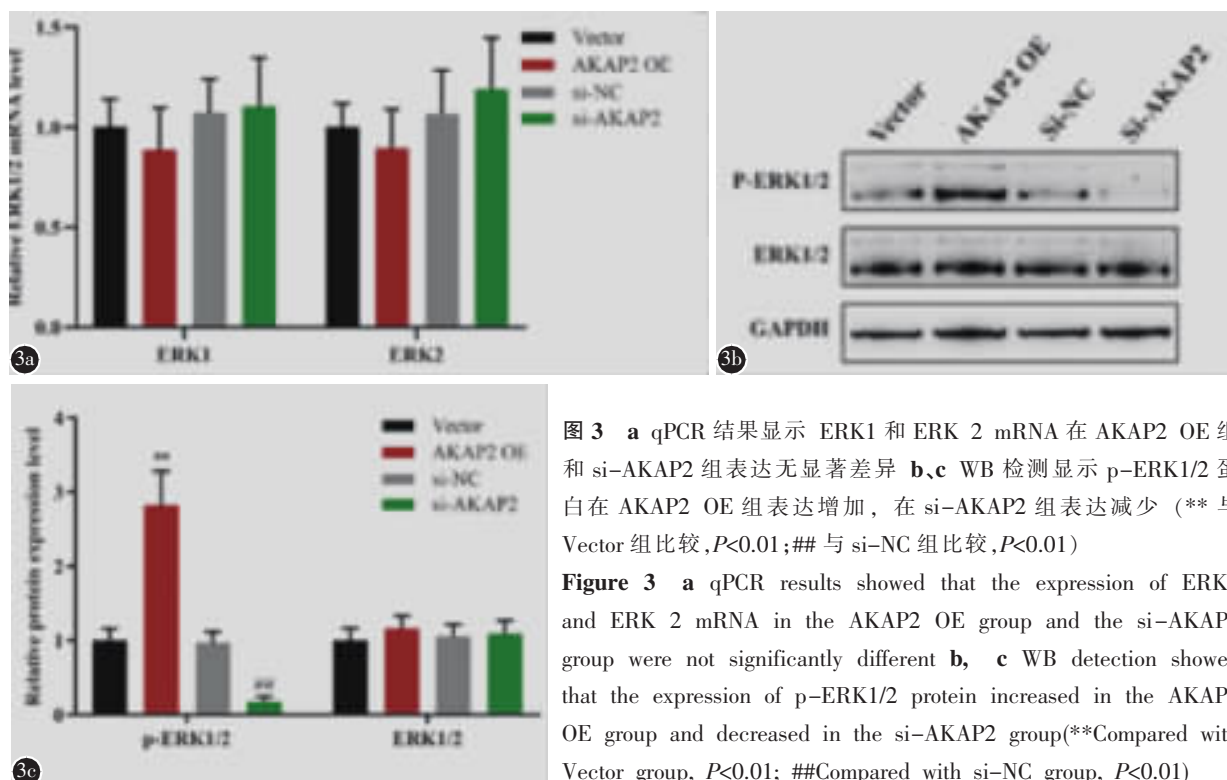


图3 a qPCR 结果显示 ERK1 和 ERK 2 mRNA 在 AKAP2 OE 组和 si-AKAP2 组表达无显著差异 b、c WB 检测显示 p-ERK1/2 蛋白在 AKAP2 OE 组表达增加,在 si-AKAP2 组表达减少(**与 Vector 组比较, $P<0.01$;##与 si-NC 组比较, $P<0.01$)

Figure 3 a qPCR results showed that the expression of ERK1 and ERK 2 mRNA in the AKAP2 OE group and the si-AKAP2 group were not significantly different b, c WB detection showed that the expression of p-ERK1/2 protein increased in the AKAP2 OE group and decreased in the si-AKAP2 group(**Compared with Vector group, $P<0.01$; ##Compared with si-NC group, $P<0.01$)

调控软骨细胞 COL2A1 的细胞特异性激活和表达,并能结合软骨细胞肥大的标志产物 COLX 基因的启动子激活其表达^[17]。RUNX2 参与软骨细胞肥大分化,而 SOX9 可抑制 RUNX2,从而抑制软

骨细胞肥大分化,对维持软骨功能及形态至关重要^[18]。本研究结果显示 AKAP2 过表达组 SOX9、COL2A1 表达均升高。同时软骨细胞 48h 细胞活力升高,而 AKAP2 表达干扰组呈现相反趋势,提

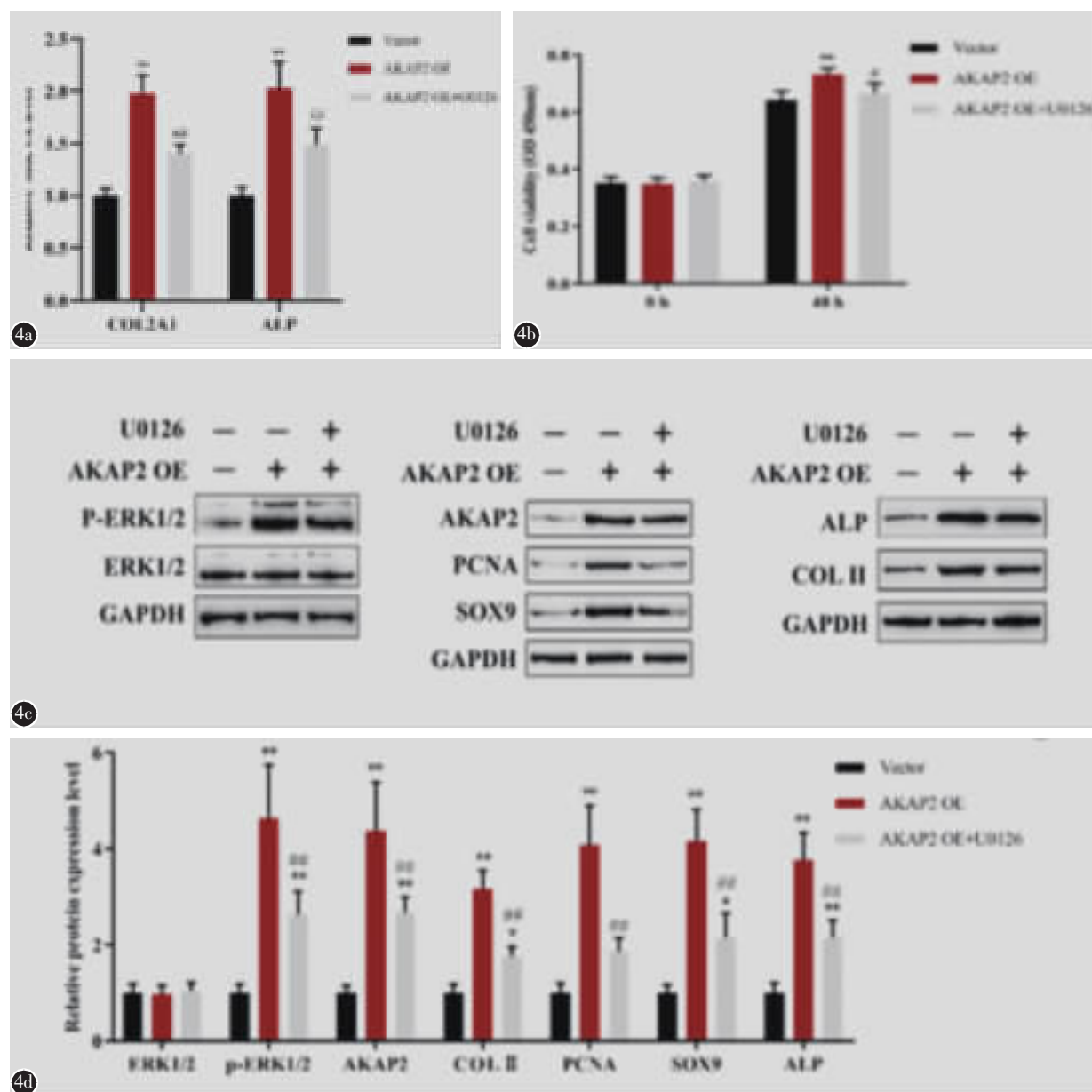


图 4 a qPCR 结果显示 COL2A1 和 ALP mRNA 在 AKAP2 OE 组表达增加,加入 ERK 激酶阻滞剂 U0126 后表达降低 b MTT 结果表明 U0126 能够降低 AKAP2 对 GPCs 增殖的促进作用 c,d WB 检测显示 U0126 能够降低 AKAP2 过表达对 GPCs 中 p-ERK1/2、AKAP2、COL II、PCNA、SOX9 和 ALP 蛋白表达的促进作用(--为 Vector 组;+为 AKAP2 OE 组;++为 AKAP2 OE +U0126 组)(** 与 Vector 组比较, $P<0.01$;# 与 AKAP2 OE 组比较, $P<0.05$;## 与 AKAP2 OE 组比较, $P<0.01$)

Figure 4 a qPCR results showed that the expression of COL2A1 and ALP mRNA increased in the AKAP2 OE group, and decreased after adding ERK kinase blocker U0126 b MTT results showed that U0126 could reduce the promotion of AKAP2 on the proliferation of GPCs c, d WB detection Shows that U0126 can reduce the effect of AKAP2 overexpression on the increase of p-ERK1/2, AKAP2, COL II, PCNA, SOX9 and ALP protein expression in GPCs (-- is Vector group; + is AKAP2 OE group; ++ is AKAP2 OE + U0126 group)(** Compared with Vector group, $P<0.01$; # and ## compared with AKAP2 OE group $P<0.05$; ##Compared with AKAP2 OE group, $P<0.01$)

示 AKAP2 表达在软骨细胞增殖分化和细胞外基质合成等生理过程中具有重要作用。

既往研究表明,ERK1/2 信号通路参与软骨细胞的增殖、分化以及细胞外基质合成等多种生理过程^[11-16,19]。ERK 激酶阻滞剂(U0126)可抑制成纤

维细胞生长因子诱导的 SOX9 水平升高。此外,激活 MAPK/ERK 信号通路可促进软骨细胞增殖,而 ERK1/2 阻滞剂则可抑制软骨细胞的增殖^[11]。本研究结果显示,AKAP2 OE 组、si-AKAP2 组和 AKAP2 OE+U0126 组 ERK1、ERK2 基因表达均

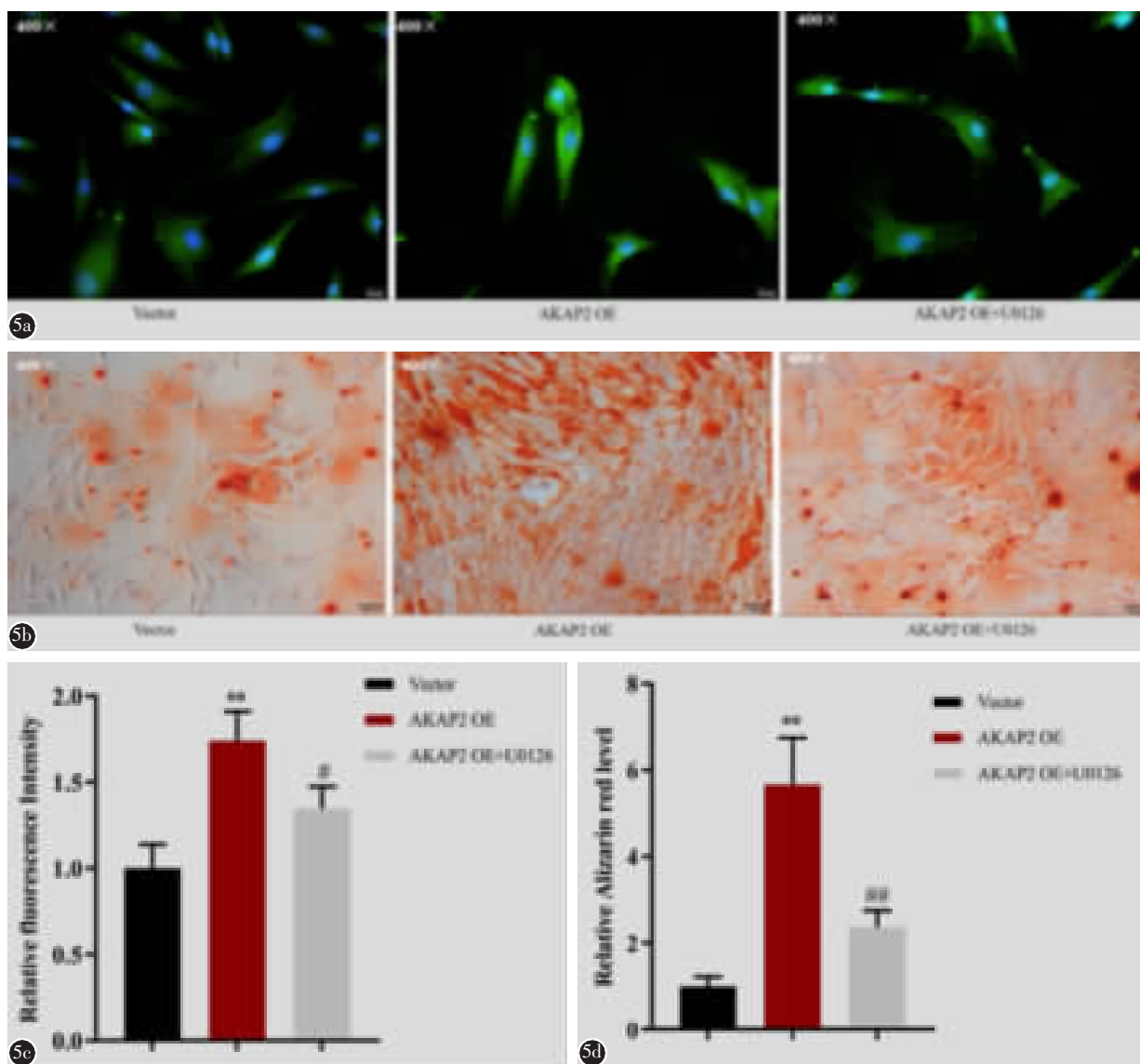


图 5 a 免疫荧光检测显示 Vector 组、AKAP2 OE 组和 AKAP2 OE +U0126 组 GPCs COL II 蛋白的表达与分布 b 茜素红染色检测显示上述各组 GPCs 钙沉积差异 c、d COL II 蛋白表达和钙沉积在 AKAP2 OE 组增加,而 U0126 能够降低 AKAP2 过表达对 GPCs 中 COL II 蛋白表达和钙沉积的增加作用(**与 Vector 组比较, $P<0.01$;#与 AKAP2 OE 组比较, $P<0.05$;##与 AKAP2 OE 组比较, $P<0.01$)

Figure 5 a Immunofluorescence detection shows the expression and distribution of GPCs COL II protein in the Vector group, AKAP2 OE group and AKAP2 OE+U0126 group b Alizarin red staining shows the difference in calcium deposition of GPCs in the above groups c, d COL II protein Expression and calcium deposition increased in the AKAP2 OE group, while U0126 could reduce the effect of AKAP2 overexpression on the increase of COL II protein expression and calcium deposition in GPCs. **Compared with Vector group, $P<0.01$ (#Compared with AKAP2 OE group, $P<0.05$; ##Compared with AKAP2 OE group, $P<0.01$)

无明显变化,证实 AKAP2 对 ERK 基因表达无影响;AKAP2 过表达组细胞 SOX9、COL2A1、PCNA 和 ALP 表达均升高。同时软骨细胞 48h 时细胞活力升高,而 AKAP2 过表达+ERK 阻断剂组则呈现相反趋势,且 ERK1/2 磷酸化水平明显降低。提示 AKAP2 基因突变可能通过影响胞内 ERK1/2 通路蛋白的磷酸化而干扰该信号通路,引起软骨细胞增殖分化和细胞外基质合成失控。

Ras-MAPK 途径和 AC-cAMP-PKA 途径是两类重要信号转导途径,两者之间可互相作用^[20]。MAPK 信号通路被细胞外信号激活后,以三级激酶级联的方式将细胞外信号逐级放大,并传入细胞核^[21,22]。丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase,MAPKKK)作为其一级激酶可由 PKA 磷酸化而激活^[20]。PKA 磷酸化靶蛋白是信号通路调控中的关键步骤^[3]。PKA 四聚体由两个调节亚基(R 亚基)和两个催化亚基(C 亚基)组成。全酶以钝化复合体形式存在。细胞外配体于胞膜处结合 G 蛋白偶联受体后进一步激活腺苷酸环化酶,产生的 cAMP 与 R 亚基结合并改变其构象,解离并释放 C 亚基,包含激酶结构域的 C 亚基可以磷酸化细胞内特定蛋白,以调控相关基因的表达。

AKAP2 基因表达异常影响 ERK1/2 通路,继而增殖分化和细胞外基质合成失控,可能进一步导致软骨内成骨模式异常。椎体软骨内成骨是哺乳动物青春期椎体生长主要作用来源^[23],包括软骨细胞的增殖、肥大、成熟钙化及细胞外基质合成等。影像学和组织形态学研究表明,软骨内骨化异常可影响 AIS 患者骨骼生长,且可能是其发病的促进因素^[24-26]。本研究中 ALP 和茜素红染色结果证实软骨细胞中 AKAP2 干扰可延迟体外软骨细胞肥大性分化和基质矿化。而软骨细胞肥大是软骨内骨形成所必需的^[27],软骨细胞退出细胞周期,成为前肥大软骨细胞并最终分化形成肥大软骨细胞^[27],进而分泌成骨细胞分化成熟所需的相关因子^[28]。因此,AKAP2 基因突变可能致使 AKAP2-PKA 信号复合物无法定位特定亚细胞结构,通过影响软骨细胞肥大性分化和基质矿化而造成软骨内骨化异常。

综上所述,AKAP2 基因异常表达可能造成 AKAP2-cAMP-PKA 信号复合物无法准确定位特定的亚细胞结构,进而影响 ERK1/2 通路,造成软

骨细胞的增殖、分化和细胞外基质代谢异常,并可能进一步改变正常的生长板软骨内成骨模式。但仍需进一步体外实验验证 AKAP2 对软骨细胞 cAMP-PKA 途径亚细胞定位的影响,并通过动物模型体内实验验证 AKAP2 基因对软骨内成骨的作用及其机制。

4 参考文献

1. McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD. AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(7): 317-323.
2. Pawson T. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains[J]. Science, 2003, 300(5618): 445-452.
3. Sarma GN, Moody IS, Ilouz R, et al. D-AKAP2: PKA R II: PDZK1 ternary complex structure: insights from the nucleation of a polyvalent scaffold[J]. Protein Sci, 2015, 24(1): 105-116.
4. Panza E, Gimelli G, Passalacqua M, et al. The breakpoint identified in a balanced de novo translocation t (7;9)(p14.1; q31.3) disrupts the A-kinase(PRKA) anchor protein 2 gene (AKAP2) on chromosome 9 in a patient with Kallmann syndrome and bone anomalies[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(3): 429-435.
5. Li W, Li Y, Zhang L, et al. AKAP2 identified as a novel gene mutated in a Chinese family with adolescent idiopathic scoliosis[J]. J Med Genet, 2016, 53(7): 488-493.
6. Kim JJ, Lee HI, Park T, et al. Identification of 15 loci influencing height in a Korean population [J]. J Hum Genet, 2010, 55(1): 27-31.
7. Chen L, He X, Zhang Y, et al. Melatonin receptor type 1 signals to extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 via Gi and Gs dually coupled pathways in HEK-293 cells [J]. Biochemistry, 2014, 53(17): 2827-2839.
8. Rosenzweig DH, Ou SJ, Quinn TM. P38 mitogen-activated protein kinase promotes dedifferentiation of primary articular chondrocytes in monolayer culture[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(4): 508-517.
9. Zhang Y, Gu Z, Qiu G. The association study of calmodulin 1 gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 168106.
10. Olson LE, Ohlsson C, Mohan S. The role of GH/IGF-I-mediated mechanisms in sex differences in cortical bone size in mice[J]. Calcif Tissue Int, 2011, 88(1): 1-8.
11. Hayashi S, Nishiyama T, Miura Y, et al. DeR3 induces cell proliferation through MAPK signaling in chondrocytes of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(7): 903-910.
12. Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation[J]. Pharmacol Res, 2012, 66(2): 105-143.
13. Prasadani I, Mao X, Shi W, et al. Combination of MEK-ERK inhibitor and hyaluronic acid has a synergistic effect

- on anti-hypertrophic and pro-chondrogenic activities in osteoarthritis treatment[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(3): 369-380.
14. Wang X, Li F, Fan C, et al. Analysis of isoform specific ERK signaling on the effects of interleukin-1 β on COX-2 expression and PGE2 production in human chondrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(1): 23-29.
15. Wang X, Li F, Fan C, et al. Effects and relationship of ERK1 and ERK2 in interleukin-1 β -induced alterations in MMP3, MMP13, type II collagen and aggrecan expression in human chondrocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(4): 583-589.
16. Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, et al. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation: divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(3): 279-288.
17. Studer D, Millan C, Öztürk E, et al. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells[J]. *Eur Cell Mater*, 2012, 24: 118-135.
18. Dy P, Wang W, Bhattaram P, et al. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes[J]. *Dev Cell*, 2012, 22(3): 597-609.
19. Lu N, Malesud CJ. Extracellular signal-regulated kinase: a regulator of cell growth, inflammation, chondrocyte and bone cell receptor-mediated gene expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3792.
20. Kostenko S, Shiryayev A, Dumitriu G, et al. Cross-talk between protein kinase A and the MAPK-activated protein kinases RSK1 and MK5[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2011, 31(1): 1-9.
21. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-1912.
22. Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases(MAPKs) made simple[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(22): 3525-3544.
23. Adams SL, Cohen AJ, Lassoova L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(3): 635-641.
24. Siu King Cheung C, Tak Keung Lee W, Kit Tse Y, et al. Abnormal peri-pubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 598 patients[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2003, 28(18): 2152-2157.
25. Guo X, Chau WW, Chan YL, et al. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis: results of disproportionate endochondral-membranous bone growth [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2003, 85(7): 1026-1031.
26. Chu WC, Lam WW, Chan YL, et al. Relative shortening and functional tethering of spinal cord in adolescent idiopathic scoliosis: study with multiplanar reformat magnetic resonance imaging and somatosensory evoked potential [J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2006, 31(1): E19-25.
27. Komori T. Cell death in chondrocytes, osteoblasts, and osteocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2045.
28. Xu J, Li Z, Hou Y, et al. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12): 2527-2535.
- (收稿日期:2020-06-20 末次修回日期:2020-11-03)
(英文编审 谭 啸)
(本文编辑 李伟霞)