

学校编码: 10384

密级 \_\_\_\_\_

学号: 24520091152998

# 厦 门 大 学

## 硕 士 学 位 论 文

### 尼古丁通过 PI3K/Akt 信号通路保护大鼠软骨细胞抵抗白介素-1 诱导的细胞凋亡

Nicotine protects rat chondrocytes against interleukin-1beta-induced apoptosis through PI3K/Akt signaling

指导教师姓名:

专业名称: 外科学(关节外科)

论文提交日期: 2012年4月

论文答辩日期: 2012年5月

评 阅 人: \_\_\_\_\_

201 年 月

2012年5月

尼古丁通过 PI3K/Akt 信号通路保护大鼠软骨细胞抵抗白介素-1

诱导的细胞凋

郑欣鹏

指导教师

夏春

教授

厦门大学

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于     年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

目的：探索尼古丁对 IL-1 $\beta$  诱导的大鼠 OA 软骨细胞（模拟 OA 软骨细胞）的调节作用，观察是否能够通过激活软骨细胞内 PI3K/Akt 信号通路而抑制 OA 软骨细胞凋亡、维持其存活；同时结合大鼠 OA 动物模型检测尼古丁对 OA 软骨组织损伤的影响，为将来临床上应用尼古丁预防与治疗 OA 的可能机制提供理论依据。

方法：体外实验：（1）软骨细胞分离培养：从新生大鼠关节软骨中分离出软骨细胞，使用特殊染色及免疫组化对其进行鉴定，并使其与软骨细胞凋亡诱导调节剂 IL-1 $\beta$  (10ng/ml)共培养 2 小时，模拟体外 OA 软骨细胞。（2）软骨细胞生存能力检测：经尼古丁处理后，四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法（MTT）检测软骨细胞活性。（3）软骨细胞凋亡率检测：采用流式细胞仪荧光素碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）单标法检测软骨细胞晚期凋亡率。（4）PI3K/Akt 通路及相关信号分子的检测：蛋白免疫印迹法（Western blotting）检测 Akt, p-Akt 及其下游信号分子 bcl-x1、bcl-2 和 p70S6，核糖体 S6 激酶的蛋白分泌水平；反转录 RCR（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction）检测 Akt<sub>1</sub>-mRNA 的表达水平。体内试验：（1）大鼠膝关节动物模型建立：通过右膝关节前交叉韧带切除+内侧半月板切除术构建大鼠骨性关节炎（OA）模型。（2）尼古丁对大鼠骨性关节炎关节软骨作用观察：关节腔注射尼古丁，组织学与免疫组化技术评估大鼠骨性关节炎关节软骨形态结构变化及与 PI3K/Akt 信号通路相互关系。

结果：（1）体外实验：经分离的细胞甲苯胺蓝着色胞浆染成浅蓝色，可见 1-3 个核仁，呈紫蓝色；细胞周围亦有少量异染颗粒出现，II 型胶原呈强阳性表达，细胞浆内有黄染颗粒，胞核基本无着色；尼古丁可刺激由 IL-1 $\beta$  诱导的大鼠骨性关节炎软骨细胞的活性而抑制其凋亡。对大鼠骨性关节炎软骨细胞处以尼古丁可上调 p-Akt 蛋白表达水平，但却未能提高 Akt<sub>1</sub>-mRNA 的表达水平。进一步的实验检测到尼古丁可增强部分 Akt 下游分子：p70S6、核糖体 S6 激酶、bcl-x1、bcl-2、TIMP-1 的表达，但是却抑制了 MMP-13 的表达。（2）体内试验：大鼠骨性关节炎关节腔注射尼古丁促进损伤软骨表面的修复，增加了表面软骨的厚度，

同时提高了 p-Akt 的蛋白表达。

结论：尼古丁可部分通过激活 PI3K/Akt 信号通路保护由 IL-1 $\beta$  诱导的大鼠骨性关节炎模型软骨细胞的细胞凋亡；同时减缓骨性关节炎导致的关节软骨组织的损伤。为此，尼古丁通过关节腔注射将有望成为骨性关节炎的一种预防与治疗试剂。

**关键词：**尼古丁 白介素-1 $\beta$  软骨细胞 凋亡 骨性关节炎

厦门大学博硕士论文摘要库



## Abstract

**Objective.** To identify the effects of nicotine on chondrocyte apoptosis in rat osteoarthritis (OA) which induced by IL-1 $\beta$  and the mechanism in vitro and in vivo. To observe that it is feasible to inhibit chondrocyte apoptosis and keep chondrocyte survival in rat osteoarthritis (OA) via activating PI3K/Akt signaling pathway. Meanwhile, combining together that the protective effect of nicotine on OA cartilage tissue damage, to provide the potential theoretical foundation for preventing and healing OA in clinic with nicotine in the future.

**Methods.** In vitro, Chondrocytes were freshly isolated from newly born rat, Then Chondrocytes were exposed to IL-1 $\beta$  (10ng/mL) for 2h which being used as a modulating and chondrocyte apoptosis inducing agent meanwhile were identified with ammonium methylbenzene blue and II collagen immunohistochemistry technology. After treating with nicotine, the viability of chondrocytes were analyzed by MTT assay and the percentage of later apoptotic cell death was surveyed by propidium iodide signal-labeling FACS analysis. The expression of Akt, phosphorylation of Akt, downstream protein targets of activated Akt, bcl-xl, bcl-2 and phosphorylation of p70S6, ribosomal S6 kinase were detected by Western blotting. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to measure the expression of Akt<sub>1</sub>-mRNA. In vivo, Morphology observation was performed to evaluate the effect of nicotine on the repair of cartilage surface in rat OA model induced by anterior cruciate ligament transaction+medial meniscus excind (ACLT+MMx) in right knees via PI3K/Akt pathway .

**Results.** In vitro, cells cytoplasm which isolated from SD rat was stained with ammonium methylbenzene blue, and it show that cytoplasm was light blue, 1-3 indigo nucleolus, a little metachromatic granule around the cells, meanwhile the cells expressed a strong positive II collagen, claybank granules in the cytoplasm but free coloring at nucleus. Nicotine could promote cell activity and inhibit cell apoptosis of IL-1 $\beta$ -stimulated rat OA chondrocytes. Treatment of rat OA chondrocytes for nicotine upregulated protein expression level of p-Akt in OA model Chondrocytes but not at Akt<sub>1</sub>-mRNA. Furthermore, increased the expression of p70S6 kinase, ribosomal S6 kinase, bcl-xl, bcl-2, TIMP-1 but inhibited expression of MMP-13. In vivo,

interestingly,nicotine could increase the thickness of surface of articular cartilage and repaired the injured of surface of articular cartilage in rat OA model as well as upregulating the expression phosphorylation of Akt.

Conclusion. Nicotine could prevent chondrocyte from apoptosis in the IL-1 $\beta$ -stimulated rat osteoarthritis model partly via phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt pathway and slow damage of articular cartilage caused by OA.Nicotine may therefore be a potential therapeutic and prevented agent for intraarticular injection in the treatment of OA.

**Keywords:**Nicotine;Interleukin-1 $\beta$ ;Chondrocyte;Apoptosis; Osteoarthritis

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
引言.....	1
第一部分 体外实验 .....	5
4.1.1 实验一:软骨细胞的分离、培养与鉴定 .....	5
实验二 —— 实验五	
4.1.2 实验二:尼古丁对 IL-1 $\beta$ 诱导的大鼠 OA 软骨细胞的调控作用.....	13
4.1.3 实验三:尼古丁激活对 IL-1 $\beta$ 诱导的大鼠 OA 软骨细胞 PI3K/Akt 信号通路 .....	22
4.1.4 实验四: 尼古丁通过 PI3K/Akt-Bcl-2 细胞信号通路抑制由 IL-1 $\beta$ 诱导 OA 软骨细胞的凋亡 .....	24
4.1.5 实验五: 尼古丁通过 PI3K/Akt/p70S6K/S6 细胞信号通路增强由 IL-1 $\beta$ 诱导 OA 软骨细胞的蛋白分泌 .....	25
4.1.6 讨论 .....	28
第二部分 体内实验 .....	30
4.2.1 实验一: 骨关节炎 (OA) 动物模型的建立.....	30
4.2.2 实验二: 关节腔注尼古丁对 OA 软骨组织基质及 p-akt 表达的影响....	39
4.2.3 讨论 .....	46
第三部分 结论 .....	48
参 考 文 献 .....	49
综 述.....	55
攻读硕士学位期间发表文章及待发表的文章.....	59
致 谢.....	61

## Table of Contents

<b>1.Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>2.Abstract in English.....</b>	<b>III</b>
<b>3.Introduce.....</b>	<b>1</b>
<b>Part 1 In vitro.....</b>	<b>5</b>
4.1.1 Isolate,Culture and Identification of Chondrocytes.....	5
4.1.2 The regulated effects of nicotne in IL-1beta-induced Osteoarthritic Chondrocytes .....	13
4.1.3 Nicotine activate the PI3K/Akt pathway in rat chondrocytes via IL-1beta-induced apoptosis.....	22
4.1.4 Nicotine resistanced rat OA chondrocytes against IL-1beta-induced apoptosis through PI3K/Akt-Bcl-2 signaling.....	24
4.1.5 Nicotine promote protein synthesis of rat OA chondrocytes via IL-1beta-induced apoptosis through PI3K/Akt/ p70S6K/S6 signaling.....	25
4.1.6 Discussion.....	28
<b>Part 2 In vivo.....</b>	<b>30</b>
4.2.1 Establishment of animal model of osteoarthritis in rats .....	30
4.2.2 The effect of intra-articular injection of nicotine on the morphological change of SD rats OA artilage.....	39
4.2.3 Discussion.....	46
<b>Part 3 Conclutions.....</b>	<b>48</b>
<b>5.References.....</b>	<b>49</b>
<b>6.Review.....</b>	<b>55</b>
<b>7.Published and to be published paper.....</b>	<b>59</b>
<b>8.Acknowledgement.....</b>	<b>61</b>

## 引言

在各种各样的软骨组织类型中, 软骨细胞包被于软骨基质中, 是其中唯一的细胞类型, 发挥着各种各样的作用, 包括基质的合成与降解, 从而维持着软骨功能代谢的平衡<sup>[1, 2]</sup>。骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 又称骨关节病、退行性关节炎、增生性关节炎、老年性关节炎, 是一种与年龄相关的常见的关节功能障碍性疾病, 其基本形态改变为: 软骨细胞的丢失、凋亡, 基质的降解, 软骨下骨的重建及滑膜的炎症反应<sup>[3, 4]</sup>。尤其是软骨细胞的凋亡, 在骨性关节炎的发展过程中起了很大的促进作用<sup>[5-7]</sup>。另一方面, 在骨性关节炎的进展过程中, 软骨细胞分泌的致炎因子尤其是白细胞介素  $1-\beta$  (IL- $1\beta$ ) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 加速了这一过程<sup>[7, 8]</sup>。例如 IL- $1\beta$  可诱导软骨细胞的凋亡, 常常被用于骨性关节炎诱导剂<sup>[9-11]</sup>。由于成人骨骼生长停止后, 软骨细胞的缺失和凋亡也缺乏间充质干细胞的分化补充, 因此对于探索调节软骨细胞在细胞信号分子水平的存活及抑制其凋亡的机制过程凸显重要<sup>[2]</sup>。值得关注的一个重要问题是, 骨性关节炎决然不是以往想象的简单的退行性骨关节破坏过程, 其发展过程极有可能是破坏与修复并存的复杂过程。

骨性关节炎是以关节软骨细胞凋亡、细胞外基质降解为主要病理特征。大量的研究集中于基质酶性降解及合成新的基质受到抑制从而导致软骨的破坏, 而对于软骨细胞生存或死亡在 OA 关节软骨降解过程中所起的作用研究甚少, 对于其细胞水平的机制的研究更是少。近年来研究提示, 正常的软骨细胞是维持细胞外基质稳定的必要条件, 而软骨细胞的凋亡是 OA 关节软骨退变的关键因素<sup>[12]</sup>。Hashimoto 及 Heraud 等用流式细胞学及免疫激光细胞分类法(FACS)观察到人正常和 OA 骨性关节炎中软骨细胞的凋亡率存在显著差异, 证实了 OA 关节软骨细胞的凋亡高于正常关节软骨细胞<sup>[13, 14]</sup>。研究发现, OA 软骨细胞凋亡可由两种相互独立途径: NO 和 Fas 两种途径介导, 两者相同的作用结果均可活化 Caspase, 引起细胞核 DNA 降解, 导致靶细胞凋亡<sup>[15]</sup>, 在对 OA 关节软骨细胞凋亡相关原癌基因的研究中发现: Bcl-2 基因家族、P53 基因等也发挥着其调控的作用, Bcl-2 通过抗氧化剂或抑制氧自由基的产生而发挥其抑制细胞凋亡的功能, 而 P53 通过

感知细胞 DNA 损伤, 其靶基因编码产物 P21 可以促使细胞停留在 G1 期, 进行 DNA 损伤修复, 从而有效的保护细胞凋亡<sup>[16, 17]</sup>。

尼古丁, 一种拟胆碱活性的生物碱物质, 是烟草中的主要成分之一<sup>[18]</sup>, 研究发现, 当人体吸烟时体内尼古丁含量较高对人体是有毒性危害作用的, 如引发肺癌等, 但是当浓度维持在较低水平时却是无细胞毒性的<sup>[19]</sup>。以往的研究提示吸烟与慢性骨骼肌炎症有关, 如下腰痛、和椎间盘的降解, 一些学者提出吸烟的复合物中含有致使椎间盘软骨细胞功能丧失并抑制软骨细胞增殖及细胞外基质降解, 然而, 亦有研究者提出相反的观点, 从 Clearwater 的研究数据中显示吸烟者患膝、踝、腕, 脊柱等关节炎的概率较不吸烟者低。Sandmark 的研究中, 吸烟降低了肥胖者骨性关节炎的发展进程。众所周知, 尼古丁可以激活烟碱型的乙酰胆碱受体 (nAChR), 研究发现, 乙酰胆碱受体除表达于可兴奋性细胞类型以外, 其同时可表达于非兴奋性细胞类型, 如: 内皮细胞、单核细胞、关节软骨细胞、骨细胞、上皮细胞等<sup>[20-23]</sup>。Romano 等通过实验发现在肌腱和骨膜发育的早期表达 nAChR $\alpha 7$  亚基, 而亦有研究实验证实 nAChR  $\alpha 1$  亚基存在于原代培养的成骨细胞上, 提示胆碱能神经对骨生理活动可能存在的调控作用。尼古丁可通过激活细胞内的分子信号转导通路抵抗细胞的凋亡, 同时促进多种肿瘤细胞的增值<sup>[24]</sup>。

PKB(蛋白激酶 B, 又称 Akt)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 细胞外因子可通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 后磷酸化 Akt, 使其被激活。Akt 信号通路为一条在很多细胞类型中的经典的抑制细胞凋亡的信号通路, 其在调节软骨细胞凋亡与存活及延缓骨性关节炎的细胞信号调整中发挥着重要作用<sup>[25, 26]</sup>。PKB 是 PI3K 信号转导途径中一个重要的下游靶激酶, 当其 Thr308 位点和 C 末端调节区的 Ser473 位点被磷酸化后, PKB /Akt 便具有活性<sup>[27]</sup>, PI3K/Akt 信号转导途径参与调节细胞生命活动, 其主要的生物学功能为促进细胞生长, 抑制细胞凋亡<sup>[28]</sup>。PI3K/Akt 信号途径的正常表达对关节软骨细胞的增殖、分化具有不可替代的作用。Ulici 等用器官培养并在培养过程中加入 PI3K 抑制剂 LY294002, 结果发现, 其可阻断 PI3K/Akt 信号转导途径使培养的鼠胫骨在体外生长明显减缓<sup>[29]</sup>。在诸多信号转导途径中, PI3K/Akt 信号通路被认为是软骨细胞存活的重要通路, 有抗凋亡途径之称, 近年来备受关注。激活后的 Akt 主要通过对含有丝氨酸残基或苏氨酸残基的底物磷酸化而发挥广泛的生物学效应, 其中已发现有多个 Akt 的底物如 caspase-9、Bad、NF- $\kappa$ B 等从而发挥其抗凋亡、促细胞增殖功能<sup>[30]</sup>。

有研究证实尼古丁可经由  $\alpha$ -7 烟碱型乙酰胆碱受体 ( $\alpha$ -7nAChR) 介导的通过激活 PI3K/Akt 细胞信号通路促进肿瘤细胞系的细胞增值<sup>[31, 32]</sup>。然而, 关于阐明在软骨细胞中尼古丁的调节机制及通过 PI3K/Akt 细胞信号通路对由 IL-1 $\beta$  诱导的骨性关节炎软骨细胞存活与凋亡调节作用的研究和报道等很少见到<sup>[7, 8]</sup>。

综上所述, 软骨细胞凋亡在 OA 的发生发展中扮演重要角色, 其对于软骨基质的合成与分解代谢发挥重要作用, 而此项功能是通过细胞水平信号分子的调节来实现的, 而 PI3K/Akt 信号转导通路的生物学功能与关节软骨细胞的增值及凋亡关系密切, 故而进一步探讨 PI3K/Akt 信号转导通路在 OA 软骨细胞中的变化规律, 有助于更为深入了解 OA 的发病机制, 深入了解 OA 软骨细胞中 PI3K/Akt 途径相关信号分子的变化, 应成为研究的重点。如果能通过药物如尼古丁改变其信号传导途径的活性及方式, 可能为预防和早期治疗 OA 提供有效方法, 进而对提高老年人的生活质量起到重要作用。

本实验中我们提出假设: 是否 PI3K/Akt 细胞信号通路可在由 IL-1 $\beta$  诱导的 SD 大鼠骨性关节炎模型软骨细胞的存活与凋亡中发挥重要作用, 并且尼古丁可能正是通过激活这一经典细胞信号通路保护 SD 大鼠骨性关节炎软骨。

厦门大学博硕士学位论文摘要库



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库