

## cofilin对软骨细胞骨架及表型的影响

刘仁峰<sup>1</sup>, 陈诚<sup>2</sup>, 吴江怡<sup>2</sup>, 杨柳<sup>2</sup>, 宋雄波<sup>2</sup>, 黄术<sup>1</sup>, 刘宝荣<sup>1</sup>

1. 湖南师范大学第一附属医院骨科医学中心, 湖南 长沙 410005; 2. 第三军医大学西南医院关节外科, 重庆 400038

**【摘要】目的:**研究丝切蛋白(cofilin)表达对软骨细胞表型及骨架的影响。**方法:**通过siRNA及质粒转染分别构建cofilin低表达和高表达模型,对表达不同水平cofilin的软骨细胞进行细胞骨架及相关蛋白的检测,以研究cofilin对软骨细胞表型及骨架方面的影响。**结果:**降低cofilin蛋白表达后,鬼笔环肽染色后观察到的软骨细胞骨架变得更为紧凑,在细胞延伸方向的肌动蛋白密度相对对照组更密集,同时软骨细胞中I型胶原蛋白(COLI)表达稍增高(137.42%±25.14%),结果无统计学意义( $P>0.05$ ),II型胶原蛋白(COLII)表达明显降低(19.96%±14.59%),结果有统计学意义( $P<0.05$ );增加软骨细胞cofilin表达,软骨细胞骨架的免疫荧光强度较对照组稍暗,且分布稍广,COLI表达降低(44.47%±21.67%),结果有统计学意义( $P<0.05$ ),COLII表达稍增高(116.16%±13.18%),结果无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论:**cofilin蛋白对软骨细胞骨架具有重要的作用,cofilin蛋白的表达有助于软骨细胞维持其软骨细胞特性,cofilin蛋白表达的降低将导致软骨细胞特性的改变,这些改变在软骨损伤相关疾病的发病机制中扮演着重要的角色,将来有望通过调节这种改变来治疗软骨损伤,但其需要更进一步的研究去阐明相关机制与原理。

**【关键词】**丝切蛋白;软骨细胞;细胞骨架;转染

**【中图分类号】**R318.04;R329

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2020)01-0107-08

## Effects of cofilin on the cytoskeleton and phenotype of chondrocytes

LIU Renfeng<sup>1</sup>, CHEN Cheng<sup>2</sup>, WU Jiangyi<sup>2</sup>, YANG Liu<sup>2</sup>, SONG Xiongbo<sup>2</sup>, HUANG Shu<sup>1</sup>, LIU Baorong<sup>1</sup>

1. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Hu'nan Normal University, Changsha 410005, China; 2. Department of Joint Surgery, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China

**Abstract: Objective** To study the effect of cofilin expression on the phenotype and skeleton of chondrocytes. **Methods** The low- and high-level cofilin expression models were constructed by siRNA and plasmid transfection. The cytoskeletons and related proteins in chondrocytes which had different level of cofilin expression were detected for studying the effects of cofilin on the phenotype and skeleton of chondrocytes. **Results** After reducing cofilin expression, the cytoskeleton of chondrocytes observed after phalloidin staining became more compact, and the actin density in the cell extension direction was denser than that of control group. Meanwhile the expression of COLI in chondrocytes which was 137.42%±25.14% was slightly increased, without statistical significance ( $P>0.05$ ), but the expression of COLII which was 19.96%±14.59% was significantly decreased, with statistical significance ( $P<0.05$ ). When increasing cofilin expression in chondrocytes, the immunofluorescence intensity of the cytoskeleton was slightly weaker than that of control group, and the distribution was slightly wider. Meanwhile the expression of COLI which was 44.47%±21.67% was decreased, with statistical significance ( $P<0.05$ ), and the expression of COL II which was 116.16%±13.18% was slightly increased, without statistical significance ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Cofilin which helps chondrocytes maintain their characteristics plays an important role in the cytoskeleton of chondrocyte. The decreased expression of cofilin will lead to the change of chondrocyte characteristics, resulting in cartilage damage-related diseases. It could be a potential therapeutic method to treat cartilage damage by regulating the expression of cofilin, but further researches are required to clarify the relevant mechanisms.

**Keywords:** cofilin; chondrocyte; cytoskeleton; transfection

**【收稿日期】**2019-06-12

**【基金项目】**国家自然科学基金(81572107);湖南省科技厅重点研发计划—社发支撑领域项目(2015SK20471);湖南师范大学临床医学院仁术科研发展基金资助项目(2015-15)

**【作者简介】**刘仁峰,在读硕士研究生,研究方向:骨与关节、运动医学、软骨组织再生, E-mail: 524412608@qq.com

**【通信作者】**刘宝荣,主任医师,研究方向:骨与关节、运动医学, E-mail: lbr9391@163.com

## 前言

研究表明骨性关节炎(OA)的发生与患者软骨细胞基因表达和代谢异常相关<sup>[1-4]</sup>,而由肌动蛋白为主组成的细胞骨架的变化是多种细胞生理活动的基础,涉及细胞代谢的多个方面<sup>[5]</sup>。肌动蛋白丝的动态重组即细胞骨架的变化受多种蛋白和信号分子的调控<sup>[6]</sup>,其中肌动蛋白解聚因子/丝切蛋白家族(ADF/cofilin 家族)被证实在细胞骨架调控中扮演重要作用<sup>[1]</sup>。

ADF/cofilin 家族自 20 世纪 80 年代首次被发现以来,已经被广泛证实存在于所有真核生物中,并且在多种细胞的生长、分化、迁移等具有重要作用<sup>[7-10]</sup>。ADF/cofilin 家族的作用主要表现在其与肌动蛋白结合的能力,它们通过对肌动蛋白的两种形态—纤丝(F-actin)和单体(G-actin)的解聚和聚合作用导致细胞骨架的变化,继而影响细胞功能<sup>[3, 7, 11-12]</sup>。而目前对 cofilin 的研究大部分集中在神经、肿瘤及成骨细胞方面<sup>[10, 13]</sup>,对于软骨细胞中的作用报道甚少。本研究通过对软骨细胞中 cofilin 不同表达水平的研究,进一步阐明 cofilin 在软骨细胞表型及骨架方面的作用,同时为 OA 发生与发展的机制及治疗 OA 与软骨损伤等相关疾病的治疗提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新西兰大白兔购自第三军医大学实验动物房;DMEM 培养基、OPTI-MEM-I 无血清培养基、Trizol 购自 Invitrogen 公司;标准胎牛血清购自天津 TBD 公司;II 型胶原蛋白酶、甘氨酸购自 Sigma 公司;青霉素/链霉素、4% 多聚甲醛、牛血清白蛋白(BSA)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自 Beyotime 公司;Rabbit Anti-cofilin antibody、Rabbit Anti-Collagen I antibody、Rabbit Anti-Collagen II antibody、Anti-actin antibody、Alexa Fluor® 594 标记的山羊抗兔 IgG、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 购自 abcam 公司;Triton X-100、Tween-20、盒装无酶枪头购自 Biosharp 公司;Rhodamine Phalloidin 购自 Life 公司;质粒小量提取试剂盒购自 omega 公司;丙烯酰胺、双甲叉丙烯酰胺购自 Amresco 公司;10% APS、氨苄青霉素、LB 液体培养基、LB 固体培养基购自 SOLAR BIO 公司;X-tremeGENE siRNA Transfection、X-TREMEGENE HP DNA TRANSF. REAG、Transcriptor-cDNA-Synth-kit、FS Essential DNA Green Master 购自 Roche 公司;细胞裂解液 RIPA、PMSF、BAC 试剂盒、SDS-PAGE 缓冲液购自碧

云天公司;Western ECL Substrate 购自 Thermo scientific 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 软骨细胞分离及培养** 软骨样品取自 3 月龄新西兰大白兔膝关节,所有操作由第三军医大学动物伦理委员会批准。取双膝关节,于超净台中用手术刀削取双侧股骨髁软骨,用含 1% 青霉素/链霉素的 PBS 洗 3 次,0.025% II 型胶原酶(Sigma)消化 9 h,40  $\mu$ m 细胞过滤器过滤,1 000 r/min 离心 5 min,离心后将细胞沉淀收集重悬于 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培养基中,接种在 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养,48 h 后,首次换液,以后每 2 d 换液直至细胞长满 90% 后传代,以第 2 代(P2)软骨细胞为种子细胞。

**1.2.2 软骨细胞转染** (1)细胞准备:取出处于对数生长长期的第 2 代(P2)软骨细胞,吸掉原来的培养液,用无菌 PBS 清洗细胞。加入 2 mL 胰酶消化液消化细胞,显微镜下观察所有细胞完全皱缩变圆后,加入含 10% 血清的培养基终止消化。收集细胞悬液于 15 mL 离心管中,1 000 r/min 室温离心 5 min。弃去上清,加入无抗生素含 10% 血清培养基重悬细胞,用细胞计数板进行细胞计数,以  $2 \times 10^5$  细胞/孔的密度接种到 6 孔培养板上,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养,转染前取出无抗生素培养的细胞置于倒置显微镜下观察,融合率达到转染要求时(siRNA 转染融合率达 50%,质粒转染融合率达 80%),弃除旧的培养基,以每孔 2 mL 加入新的无抗生素培养基,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养,8 h 后开始转染。

(2)siRNA 转染:以转染 siRNA 为实验组,转染 NC 为对照组。开始前将枪头、去核酸酶的 EP 管、试管架等放入无菌操作台,用紫外线照射 30 min。按说明书,转染前温育 Optimen I Reduced Serum Medium,以及将 X-tremeGENE siRNA 转染试剂、siRNA 及 NC RNA(由上海生工公司设计合成)置于 25  $^{\circ}$ C 室温条件下平衡,取出转染试剂,对无酶 EP 管做好标记,将转染试剂和 siRNA 用无血清的 Optimen I 按说明书的体积于 EP 管中稀释,按 5:1 的比例将转染试剂和 siRNA 混合成转染复合物,复合物在 25  $^{\circ}$ C 下孵育 20 min,以六孔板每孔滴加 200  $\mu$ L 转染复合物(总体积 2.20 mL)、96 孔板每孔滴加 30  $\mu$ L 转染复合物(总体积 0.18 mL),混匀后将细胞培养板置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。48 h 后提取 mRNA 用于检测基因表达,72 h 后进行蛋白表达相关检测。siRNA 序列如表 1 所示。

(3)质粒转染:以转染含 cofilin 基因的质粒为实验组,转染空白质粒为对照组。按说明书,转染前温育 Optimen I Reduced Serum Medium,以及将 X-TREMEGENE HP DNA TRANSF. REAG 转染试

表 1 siRNA 序列  
Tab.1 siRNA sequences

编号	方向	碱基序列
CFL-182	Sense	GCGUCAUCAAGGUGUUCAATT
	Antisense	UUGAACACCUUGAUGACGCTT
CFL-237	Sense	GGUGAAGAAGCGCAAGAAGTT
	Antisense	CUUCUUGCGCUUCUUCACCTT
CFL-173	Sense	UCUCUGACGGCGUCAUCAATT
	Antisense	UUGAUGACGCCGUCAGAGATT
NC	Sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	Antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

表 2 引物序列  
Tab.2 Primer sequences

引物	方向	碱基序列
GAPDH	Forward	CGACATCAAGAAGGTGGTGA
	Reverse	ATCGAAGGTGGAGGAGTGG
cofilin	Forward	TGAATGATTGCCGATATGCT
	Reverse	AAGCCATTCACTTGCCATTC
Collagen typeI	Forward	CAATCACGCCTCTCAGAACA
	Reverse	TCGGCAACAAGTTCAACATC
Collagen typeII	Forward	CAACAACCAGATCGAGAGCA
	Reverse	CCAGTAGTCACCGCTCTTCC

剂、含 cofilin 基因的质粒和空白质粒(均由上海生工公司设计合成)置于 25℃室温条件下平衡,取出转染试剂,对 EP 管做好标记,将质粒用无血清的 Optimem I 按说明书的浓度在 EP 管中稀释,以转染试剂比质粒量 3:1 的比例向稀释液中加转染试剂混匀成转染复合物,将复合物在 25℃下孵育 20 min,以六孔板每孔滴加 200 μL 转染复合物(总体积 2.20 mL)、96 孔板每孔滴加 10 μL 转染复合物(总体积 0.11 mL),混匀后将细胞培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。48 h 后提取 mRNA 用于检测基因表达,72 h 后进行蛋白表达相关检测。

**1.2.3 免疫荧光** 经转染 72 h 后,将实验组和对照组的细胞弃除培养基,以 4% 的多聚甲醛固定细胞 15 min;冷的 PBS 洗 3 次,每次 5 min;0.2% 的 Triton X-100 通透 10 min,PBST 洗 3 次,每次 5 min;用含 1% BSA 和 1% 甘氨酸的 PBS 室温下封闭 60 min;洗涤后,分别加 1:100 稀释的 Rabbit Anti-cofilin antibody、Rabbit Anti-CollagenI antibody、Rabbit Anti-Collagen II antibody,4℃孵育过夜;PBST 洗 3 次,每次 5 min,分别加 1:200 稀释的 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 或 1:500 稀释的 Alexa Fluor® 594 标记的山羊抗兔 IgG,避光下室温孵育 60 min;PBST 洗 3 次,每次 5 min,分别加入 1:40 稀释的鬼笔环肽(Phalloidin),避光下室温孵育 30 min;PBST 洗 3 次,每次 5 min,DAPI 染色 10 min;洗涤后,镜下观察。

**1.2.4 RT-PCR** 根据说明书用 TRIzol(Invitrogen)提取总 RNA,按 Transcriptor-cDNA-Synth-kit 逆转录试剂盒要求将 RNA 逆转录成 cDNA。基因引物设计(由上海生工公司设计合成)如表 2 所示。使用罗氏公司的 FS Essential DNA Green Master PCR 试剂盒,按照试剂说明书在 20 μL 的反应体积中进行实时 PCR。

**1.2.5 蛋白免疫印迹(WB)** 经转染 72 h 后,将实验组和对照组的细胞弃除培养基,PBS 缓慢清洗掉培养液后,置于冰上,每个 6 孔板加 200 μL 裂解液(RIPA)及蛋白酶抑制剂(PMSF),冰上裂解 5 min;用离心管收集裂解后产物,在 4℃下 12 000 rpm 离心 15 min;收集上清液,置于-80℃或直接用 BCA Protein Assay Kit 进行蛋白定量。将定量后以样品与 5×SDS 上样缓冲液按 4:1 的比例混合,100℃煮 10 min 使蛋白变性。

**电泳:**将制备好的含有 12% 分离胶和 5% 浓缩胶的玻璃板加入电泳夹卡紧,放入电泳槽,加入足够电泳液后按 20 μL 等量蛋白上样,确保样品不外溢。启动电泳装置,以 80 V 跑过浓缩胶后转换电压至 120 V 跑分离胶,待溴酚蓝跑至胶板底部刚好没有跑出(约 1.5 h)后终止电泳。

**转膜:**将电泳完毕的 PAGE 凝胶与 PVDF 膜、滤纸、海绵组装成三明治结构;固定好三明治结构,以恒流 200 mA 在 4℃条件下转膜 2 h;将 PVDF 膜放置到 5% BSA 中封闭 1 h;封闭完毕后,倒掉 5% BSA,加配制好的 cofilin 抗体稀释液(1:500)孵育,4℃过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加二抗稀释液(1:1 000)在摇床上室温孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。将 ECL 曝光液 A、B 两溶液以 1:1 混匀,避光滴加到 PVDF 膜上,均匀覆盖整张膜 2 min 后,放入曝光仪检测观察并拍照记录。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 20 统计软件进行统计分析,所有数据表示用均数±标准差表示,非配对 *t* 检验也用于分析两组之间的显著差异,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

为了确保 siRNA 的干扰效果,我们分别构建了 3 种 siRNA:CFL-182 号、CFL-237 号、CFL-173 号,按照 siRNA



转染方案进行转染,筛选出具有明显干扰效果的 siRNA,在荧光镜和光镜合成图中可以看出转染后 3 种 siRNA 的荧光均聚集于细胞核处(图 1),对 3 种 siRNA 转染后进行 cofilin 基因 PCR 检测,发现转染 CFL-182 号、CFL-237 号、CFL-173 号 3 种 siRNA 后 cofilin 基因表达分别为对照组表达的 69.61%±2.77%、86.85%±7.12% 和 47.12%±2.12%,对比而言 CFL-173 号 siRNA 具有较好的干扰效果( $P<0.05$ ),故以 CFL-173 号 siRNA 作为后续实验干扰的工具 siRNA。

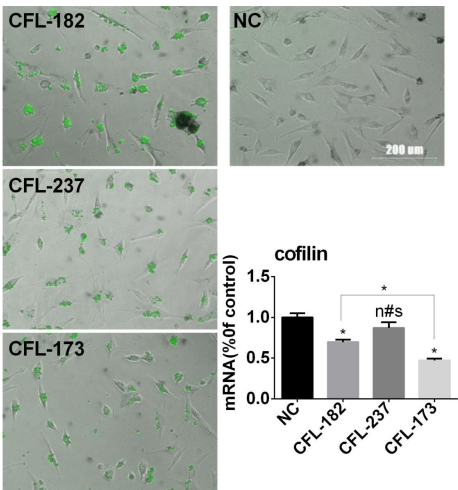


图1 低表达模型选择

Fig.1 Low-level expression model selection

带有绿光标记的 siRNA 转染后处于细胞核和细胞质中,转染后测定转录的 cofilin mRNA 比较,\*表示  $P<0.05$ ,n#s 表示  $P>0.05$

用 CFL-173 号 siRNA 转染兔软骨细胞后对 cofilin 蛋白进行免疫荧光检测,实验组的 cofilin 蛋白较 NC 组荧光强度降低,这与 PCR 及 WB 检测相一致 ( $P<0.05$ ),说明 cofilin 蛋白表达确实降低,实验干扰效果明显(图 2)。免疫荧光图细胞骨架鬼笔环肽染色发现,当降低 cofilin 蛋白表达后,细胞骨架荧光强度较对照组强,荧光分布较为集中,对照组荧光分布较松散(图 2),与此同时,对软骨细胞去分化基因(COLI)和成熟软骨细胞特异性标记物(COLII)的表达进行检测,发现降低 cofilin 蛋白表达后,COLI 表达稍增高( $137.42\%\pm25.14\%$ ),结果无统计学意义( $P>0.05$ ),COLII 表达明显降低( $19.96\%\pm14.59\%$ ),结果有统计学意义( $P<0.05$ )(图 3)。

为了进一步明确 cofilin 蛋白对软骨细胞骨架及表型的影响,随后我们将带有可表达 cofilin 基因的质粒转染兔软骨细胞,以增加 cofilin 蛋白表达,发现 cofilin 蛋白表达增加后,细胞骨架的免疫荧光强度较对照组稍暗,且分布稍广(图 4),对 COLI、COLII 检测发现,增加 cofilin 蛋白表达后,COLI 表达降低( $44.47\%\pm21.67\%$ ),结果有统计学意义( $P<0.05$ ),COLII 表达稍增高( $116.16\%\pm13.18\%$ ),结果无统计学意义( $P>0.05$ )(图 5)。

### 3 讨论

细胞骨架是存在于真核细胞中的蛋白纤维网架

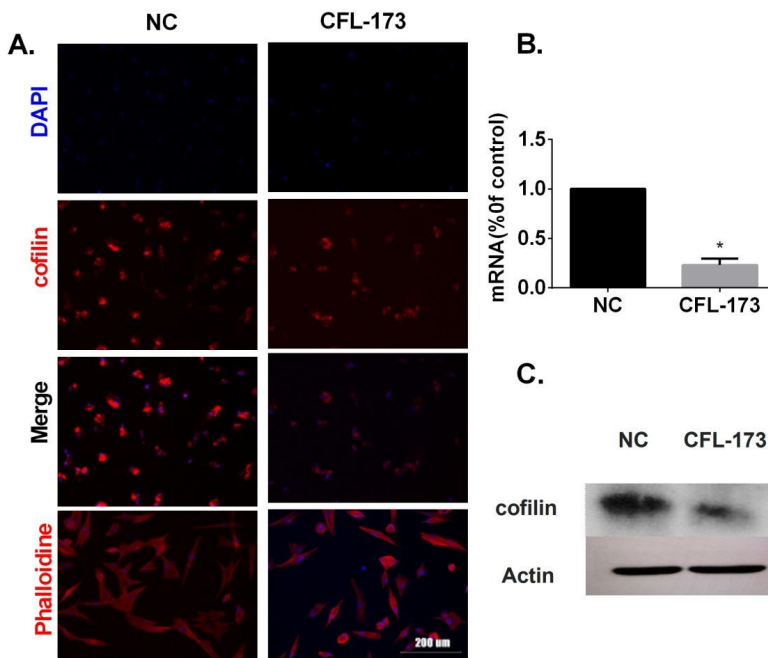


图2 低表达模型中 cofilin 表达及细胞骨架改变情况

Fig.2 Cofilin expressions and cytoskeletons in low-level expression model

A: 低表达后的细胞荧光图,cofilin(红色)、细胞骨架(Phalloidine 染红色)、细胞核(蓝色);  
B: cofilin mRNA 检测对比图;C: cofilin 蛋白 WB 图。\*表示  $P<0.05$

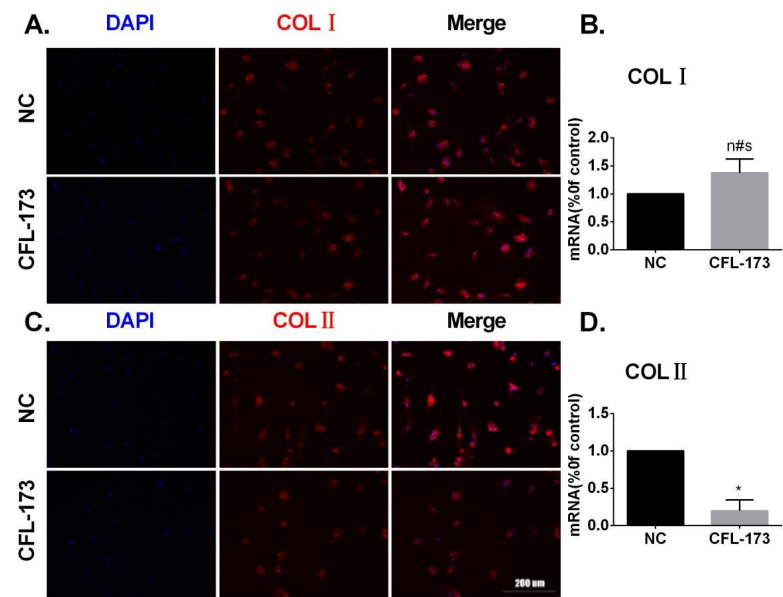


图3 低表达模型 COLI 和 COLII 表达情况

Fig.3 Expressions of COLI and COLII in low-level expression model

A:低表达后 COLI免疫荧光图,COLI(红色)、细胞核(蓝色);B:COLI mRNA 表达对比图;C:低表达后 COLII免疫荧光图,COLII(红色)、细胞核(蓝色);D:COLII mRNA 表达对比图。\*表示  $P<0.05$ , $n\#s$  表示  $P>0.05$

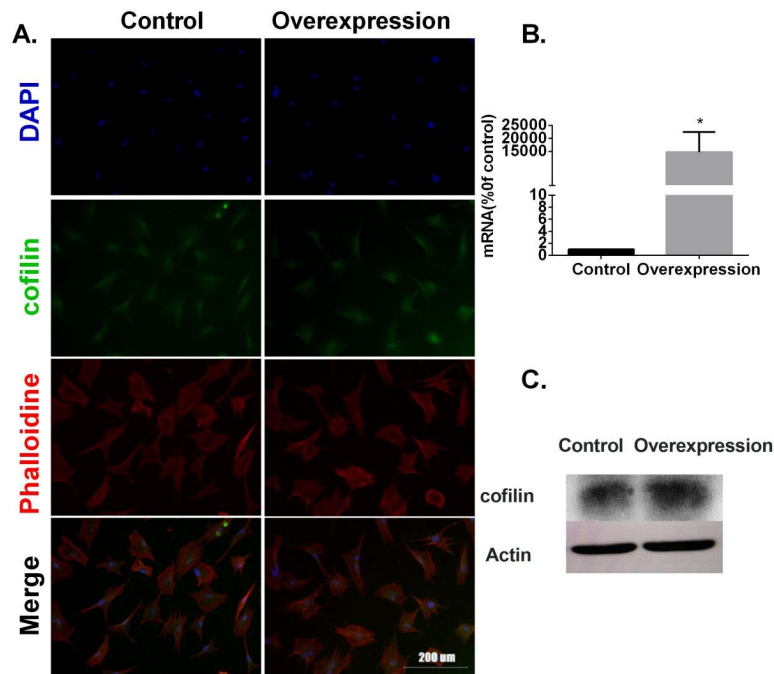


图4 高表达模型中 cofilin 表达及细胞骨架改变情况

Fig.4 Cofilin expression and cytoskeleton in high-level expression model

A:高表达后的细胞荧光图,cofilin(绿色)、细胞骨架(Phalloidine 染红色)、细胞核(蓝色);B:cofilin mRNA 检测对比图;C:cofilin 蛋白 WB 图。\*表示  $P<0.05$

体系,主要由微丝、微管和中间纤维组成。细胞骨架是一个动态的复杂结构,执行多种细胞功能<sup>[3, 12, 14]</sup>。肌动蛋白是所有真核细胞中必不可少和普遍存在的细胞骨架成分,其解聚和聚合对于细胞的生理功能是必需的,涉及细胞分裂、运动、粘附和细胞形态等<sup>[5, 15-16]</sup>。已经有研究报道 cofilin 蛋白在肿瘤、神经

等疾病中与正常细胞之间存在表达差异,而目前对 cofilin 的研究大部分集中在神经、肿瘤及成骨细胞方面,对于软骨细胞中的作用报道甚少,所以本研究主要通过构建不同 cofilin 表达水平的软骨细胞,进一步阐明 cofilin 对软骨细胞表型及骨架方面的影响,初步探讨 cofilin 在软骨相关疾病中的作用。

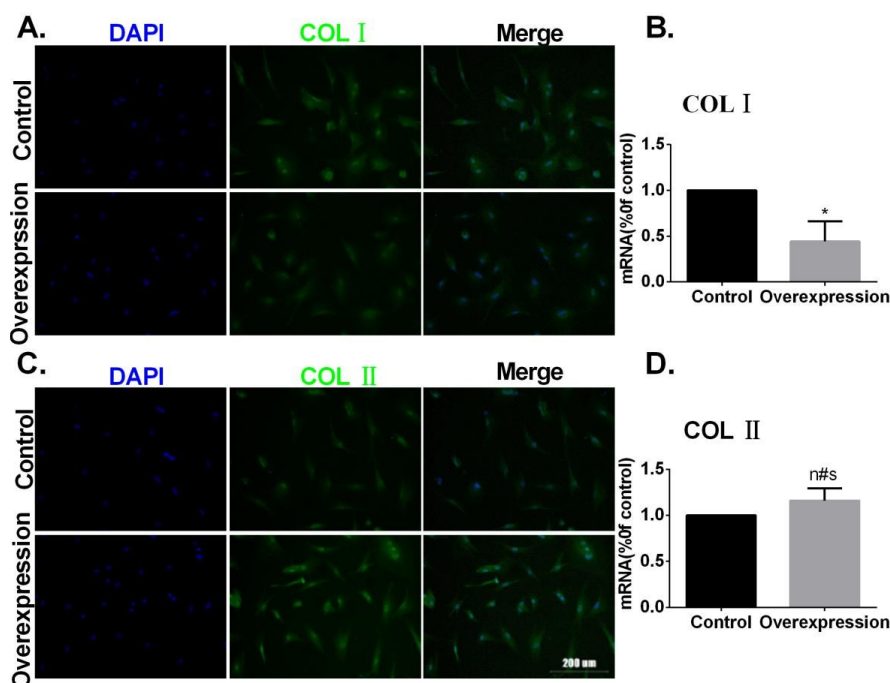


图5 高表达模型中COLI和COLII表达情况

Fig.5 Expressions of COLI and COLII in high-level expression model

A:高表达后COLI免疫荧光图,COLI(绿色)、细胞核(蓝色);B:COLI mRNA表达对比图;C:低表达后COLII免疫荧光图,COLII(绿色)、细胞核(蓝色);D:COLII mRNA表达对比图。\*表示 $P<0.05$ ,n#s表示 $P>0.05$

P2代兔软骨细胞在培养基中呈现短梭形、多角形生长,细胞骨架肌动蛋白在延伸方向呈现较为密集分布,在本研究中发现,当cofilin蛋白表达降低后,兔软骨细胞骨架变得更为紧凑,在细胞延伸方向的肌动蛋白密度相对对照组更密集,在免疫荧光图中表现出鬼笔环肽染色后光强度更强,而在增强cofilin蛋白表达后其荧光强度相对降低,这可能与cofilin蛋白解聚和聚合肌动蛋白丝相关<sup>[12]</sup>。肌动蛋白解聚和聚合表现为G-肌动蛋白单体和纤维状的F-肌动蛋白之间的转变,其目前被广泛认可的动力学原理是基于“踏板原理”,即细丝倒刺末端(BEs)生长而尖端(PEs)解聚的机制<sup>[17]</sup>。肌动蛋白细胞骨架的动力学和力学等性质由一系列肌动蛋白结合蛋白调节,并受多种信号传导途径的控制,其中ADF/cofilin家族被证实普遍存在于真核生物,是正常细胞中肌动蛋白动力学的关键调控因子<sup>[11, 18-19]</sup>。当cofilin蛋白减少时,其解聚肌动蛋白的速度相对较慢,即F-actin解聚为G-actin缓慢,表现为细胞骨架荧光强度增强,反之,当其增加时解聚肌动蛋白丝的速度相对较快,即F-actin解聚为G-actin加快,表现为细胞骨架的荧光强度减弱,这与Parreno等<sup>[20]</sup>研究一致。

在对软骨相关表达基因的检测发现,软骨细胞骨架的改变将导致软骨细胞表型发生改变,cofilin表达的降低则会导致软骨细胞COLII表达降低,COLI

有增加趋势,即软骨细胞丧失软骨细胞的特性去分化,而cofilin表达的增加将导致COLI表达降低,使COLII表达增加,软骨细胞更趋于保持软骨细胞的本质特征。过往研究表明II型胶原是健康的透明软骨细胞外基质中定量最丰富的胶原蛋白类型,并且可变剪接产生不同的同种型<sup>[21]</sup>,软骨细胞分泌的COLII和粘多糖在软骨细胞外基质中形成一道纤维网架来支持和保护软骨细胞,它维持着细胞的稳定形态,赋予关节的正常力学特征,基质结构特征和含量中的任何异常,都会导致OA的发生<sup>[3-4]</sup>。当这层保护防线被破坏时则将导致软骨细胞的损伤,有发现报道II型胶原的降解在OA中起着关键的作用,OA特征在于关节软骨的退化,OA中软骨细胞分泌COLII的功能降低,退化成主要合成分泌COLI的纤维软骨,纤维网架的破坏导致骨的暴露和由于疼痛的发作而丧失运动能力<sup>[22-24]</sup>,通过药物增加cofilin的表达,继而使得COLII表达增加或许可以用来预防和治疗软骨损伤及OA,当然蛋白表达受多方面的因素调控,需要进一步研究来明确其中的复杂关系。

关节软骨是一种组织,其特征在于其自我修复的内在能力差。这种组织经常在创伤或OA中发生改变,目前医疗界对于软骨细胞的修复大多采用自体软骨细胞体外扩增后再自体移植,或干细胞体外增殖分化再移植<sup>[21, 25-26]</sup>。本研究中观察到在二维培养中的软骨细



胞形态在初始状态比较趋向于圆形和椭圆形,分布面积相对小,随着细胞在培养皿中的生长和传代,细胞呈现出向多边形、多触角变化,分布面积变大,这说明软骨细胞在体外培养存在着去分化的趋势,这与以往报道相一致<sup>[23, 27-30]</sup>。这意味着目前自体软骨细胞体外移植入体内的细胞并没有很好地保持软骨细胞的细胞特性,这势必将影响软骨细胞的修复效果,故可尝试在体外培养扩增的时候添加增加 cofilin 蛋白表达的相关药物以维持软骨细胞体外培养时的特性。当然细胞骨架改变是一个很复杂的过程,本研究的内容仅是其中 cofilin 对细胞骨架调节一个节点的初步研究,单纯的 cofilin 表达数量上的变化并不能完全解释细胞骨架和表型的改变,cofilin 对细胞骨架调节还涉及到 cofilin 磷酸化、相关骨架调节蛋白辅助调节以及调节通路等问题<sup>[31-35]</sup>,具体的相关机制和原理还需接下来进一步的深入研究。

综上所述,cofilin 蛋白对软骨细胞骨架具有重要的作用,cofilin 蛋白的表达有助于软骨细胞维持其软骨细胞特性,cofilin 蛋白表达的降低将导致软骨细胞特性的改变,这些改变在软骨损伤相关疾病的发病机制中扮演着重要的角色,并且将来有望可以通过调节这种改变来治疗软骨损伤,但其需要更进一步的研究去阐明相关机制与原理。希望通过对软骨细胞骨架相关调节因素的研究,能通过改变相关因素使软骨细胞更好地保持或恢复其特性,以期更好地预防和治疗软骨损伤相关疾病。

## 【参考文献】

- [1] BERNSTEIN B W, BAMBURG J R. ADF/cofilin: a functional node in cell biology[J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(4): 187-195.
- [2] OSER M, CONDEELIS J. The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia[J]. J Cell Biochem, 2009, 108(6): 1252-1262.
- [3] BLAIN E J. Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(1): 1-15.
- [4] 宋雄波, 吴江怡, 黄木, 等. 调节软骨细胞骨架蛋白对成软骨表型的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(21): 2137-2141.  
SONG X B, WU J Y, HUANG S, et al. Effects of cytoskeleton modulation on phenotypes of rabbit chondrocytes[J]. Journal of Third Military Medical University, 2015, 37(21): 2137-2141.
- [5] ETIENNE-MANNEVILLE S, HALL A. Rho GTPases in cell biology[J]. Nature, 2002, 420(6916): 629-635.
- [6] PANTALONI D, LE CLAINCHE C, CARLIER M F. Mechanism of actin-based motility[J]. Science, 2001, 292(5521): 1502-1506.
- [7] BAMBURG J R, BERNSTEIN B W. Actin dynamics and cofilin-actin rods in Alzheimer disease[J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2016, 73(9): 477-497.
- [8] BELLENCHI G C, GURNIAK C B, PERLAS E, et al. N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex[J]. Genes Dev, 2007, 21(18): 2347-2357.
- [9] BAMBURG J R, HARRIS H E, WEEDS A G. Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain[J]. FEBS Lett, 1980, 121(1): 178-182.
- [10] KANELLOS G, FRAME M C. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance[J]. J Cell Sci, 2016, 129(17): 3211-3218.
- [11] BAMBURG J R, WIGGAN O P. ADF/cofilin and actin dynamics in disease[J]. Trends Cell Biol, 2002, 12(12): 598-605.
- [12] PARRENO J, NABAVI N M, ANDREJEVIC K, et al. Interplay between cytoskeletal polymerization and the chondrogenic phenotype in chondrocytes passaged in monolayer culture[J]. J Anat, 2017, 230(2): 234-248.
- [13] SUN W, YAN H, QIAN C, et al. Cofilin-1 and phosphoglycerate kinase 1 as promising indicators for glioma radiosensitivity and prognosis[J]. Oncotarget, 2017, 8(33): 55073-55083.
- [14] DOS R C, CHHABRA D, KEKIC M, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments[J]. Physiol Rev, 2003, 83(2): 433-473.
- [15] CHHABRA D, DOS REMEDIOS C G. Cofilin, actin and their complex observed *in vivo* using fluorescence resonance energy transfer[J]. Biophys J, 2005, 89(3): 1902-1908.
- [16] POLLARD T D, BORISY G G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments[J]. Cell, 2003, 112(4): 453-465.
- [17] CARLIER M F, PERNIER J, MONTAVILLE P, et al. Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(16): 3051-3067.
- [18] CARLIER M F, RESSAD F, PANTALONI D. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin[J]. J Biol Chem, 1999, 274(48): 33827-33830.
- [19] BAMBURG J R. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15: 185-230.
- [20] PARRENO J, NABAVI NIAKI M, ANDREJEVIC K, et al. Interplay between cytoskeletal polymerization and the chondrogenic phenotype in chondrocytes passaged in monolayer culture[J]. J Anat, 2017, 230(2): 234-248.
- [21] BRANLY T, CONTENTIN R, DESANCÉ M, et al. Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation: influence of culture time, transforming growth factors and type I collagen siRNAs on the differentiation index[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 435.
- [22] DESANCÉ M, CONTENTIN R, BERTONI L, et al. Chondrogenic differentiation of defined equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for use in cartilage repair therapy[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 537.
- [23] AURICH M, HOFMANN G O, BEST N, et al. Induced redifferentiation of human chondrocytes from articular cartilage lesion in alginate bead culture after monolayer dedifferentiation: an alternative cell source for cell-based therapies?[J]. Tissue Eng Part A, 2018, 24(3-4): 275-286.
- [24] ZHONG D, CHEN X I, ZHANG W, et al. Excessive tensile strain induced the change in chondrocyte phenotype[J]. Acta Bioeng Biomech, 2018, 20(2): 3-10.
- [25] 杨君君, 陈诚, 杨柳, 等. 人髌下脂肪垫干细胞与骨关节炎软骨细胞间接共培养可促进其向软骨细胞分化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(2): 196-201.  
YANG J J, CHEN C, YANG L, et al. Indirect coculture of human infrapatellar fat pad-derived stem cells with osteoarthritic chondrocytes induces their chondrogenesis[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2017, 33(2): 196-201.
- [26] 吴江怡, 王富友, 杨柳, 等. 软骨仿生基质体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞样细胞[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015,

- 31(11): 1502-1505.
- WU J Y, WANG F Y, YANG L, et al. Chondrocytic biomimetic matrix materials-induced differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells *in vitro*[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2015, 31(11): 1502-1505.
- [27] JIN G, KIM H. Efficacy of collagen and alginate hydrogels for the prevention of rat chondrocyte dedifferentiation[J]. J Tissue Eng, 2018, 9: 1013437005.
- [28] JEYAKUMAR V, NICULESCU-MORZSA E, BAUER C, et al. Platelet-rich plasma supports proliferation and redifferentiation of chondrocytes during *in vitro* expansion[J]. Fron Bioeng Biotech, 2017, 5: 75.
- [29] 黄术, 杨君君, 吴江怡, 等. 细胞骨架结构改变对软骨细胞表型的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2017, 34(12): 1287-1292.
- HUANG S, YANG J J, WU J Y, et al. Effects of cytoskeleton changes on chondrocyte phenotype[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2017, 34(12): 1287-1292.
- [30] 宋雄波, 吴江怡, 黄术, 等. 二维及微团培养法对软骨细胞表型的影响[J]. 重庆医学, 2016, 45(11): 1456-1458.
- SONG X B, WU J Y, HUANG S, et al. Effects of 2D culture and micropellet culture on the chondrocyte phenotype[J]. Chongqing Medicine, 2016, 45(11): 1456-1458.
- [31] OSTROWSKA Z, MORACZEWSKA J. Cofilin-a protein controlling dynamics of actin filaments[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017, 71: 339-351.
- [32] CHIN S M, JANSEN S, GOODE B L. TIRF microscopy analysis of human Cof1, Cof2, and ADF effects on actin filament severing and turnover[J]. J Mol Biol, 2016, 428(8): 1604-1616.
- [33] ZHANG L, JIANG G, ZHAO X, et al. Dimethyloxalylglycine promotes bone marrow mesenchymal stem cell osteogenesis *via* Rho/ROCK signaling [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(4): 1391-1403.
- [34] TILVE S, DIFATO F, CHIEREGATTI E. Cofilin 1 activation prevents the defects in axon elongation and guidance induced by extracellular alpha-synuclein[J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 16524.
- [35] CHEN B, WANG Y. Cofilin rod formation in neurons impairs neuronal structure and function[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2015, 14(4): 554-560.

(编辑:陈丽霞)