

KAT7 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进软骨细胞衰老

王康¹,李颖¹,徐诺¹,郭婷婷¹,陈云¹,曾旭冉¹,孙丽奇¹,许浩宸¹,魏伟¹,严尚学^{1,2}

(安徽医科大学¹临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,
安徽省抗炎免疫药物协同创新中心,²实验动物中心,合肥 230032)

摘要 目的 构建白细胞介素-1 β (IL-1 β)诱导的大鼠关节软骨细胞(ACs)炎症模型,研究炎症刺激下赖氨酸乙酰转移酶7(KAT7)的表达水平与ACs衰老之间的关系。方法 使用II型胶原酶消化大鼠膝关节软骨获取原代ACs并鉴定;IL-1 β 诱导建立ACs炎症模型,分别通过感染腺相关病毒或转染小干扰RNA过表达或敲低ACs中KAT7的水平,另设阴性对照组。Transwell实验检测细胞的迁移能力;衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色衰老细胞;Western blot(WB)检测细胞内KAT7、II型胶原蛋白(Col II)、基质金属蛋白酶13(MMP13)、肿瘤蛋白53(p53)、周期蛋白依赖激酶抑制因子1A(p21)蛋白表达;对阴性对照组和KAT7过表达组细胞进行转录组测序,WB验证京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析得到的相关信号通路。结果 与对照组相比,IL-1 β 刺激后大鼠ACs的SA- β -Gal染色阳性细胞数增多,Col II表达减少,MMP13和p53表达增加,细胞迁移能力降低,同时细胞内KAT7的表达也增加。与阴性对照组相比,KAT7过表达组细胞SA- β -Gal染色阳性细胞数增多,Col II表达减少,MMP13、p53和p21表达增加,细胞迁移能力减弱。与阴性对照组相比,敲低炎症模型ACs内KAT7的表达后细胞SA- β -Gal染色阳性细胞数减少,Col II表达增加,MMP13、p53和p21表达减少,细胞迁移能力增强。KEGG富集分析结果显示,磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路呈活化状态,相较于阴性对照组,KAT7过表达组细胞内磷酸化AKT(p-AKT)/AKT和磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)/mTOR的相对蛋白表达水平增加,KAT7敲低组细胞内p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR的相对蛋白表达水平降低。结论 高表达KAT7的大鼠ACs发生衰老并出现骨关节炎表型,其机制可能与KAT7激活PI3K/AKT/mTOR信号通路有关。

关键词 骨关节炎;关节软骨细胞;KAT7;细胞衰老;PI3K/AKT/mTOR

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1506-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.020

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨退变为主要病理特征的关节疾病,与衰老、肥胖、创伤和机械负荷等多种因素相关^[1]。尽管OA与衰老过程密切相关,但其具体发生机制尚不明确,可认为是最初的刺激使部分细胞发生衰老,衰老细胞具有衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP),可释放炎症因子、趋化因子、生长因子和蛋白酶,这些因子会影响正常细胞,促使它们也进入衰老状态,进而导致整个微环境内的组织病变^[2],引起OA。一项基于全基因组CRISPR/

Cas9筛选技术的研究^[3]表明赖氨酸乙酰转移酶7(lysine acetyltransferase 7, KAT7)是新的衰老调控基因。课题组前期研究^[4]证明KAT7在过度复制的小鼠关节软骨细胞(articular chondrocytes, ACs)以及老龄小鼠膝关节软骨组织中高表达,使用KAT7抑制剂能有效缓解小鼠ACs的复制性衰老。本实验使用白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)诱导建立大鼠ACs炎症模型,模拟OA患者ACs所处环境,探究炎症刺激下KAT7表达与ACs衰老之间的关系,同时利用转录组测序技术寻找KAT7可能影响的下游信号通路,在细胞层面阐明KAT7促进ACs衰老的部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 大鼠原代ACs提取于4周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量约120 g,购自安徽医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(皖)2022-001。本实验已通过安徽医科大学临床药理研究所动物实

2025-03-21 接收

基金项目:国家自然科学基金重点项目(编号:82430114);安徽省转化医学研究院科研基金重点项目(编号:2023zhyx-B14)

作者简介:王康,男,硕士研究生;

魏伟,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

严尚学,男,研究员,博士生导师,通信作者,E-mail: yanshx@163.com

伦理审查委员会批准(批号:PZ-2023-026)。为排除过度复制对细胞衰老的影响,本实验只使用第3代 ACs。

1.2 试剂与仪器 IL-1 β 购自美国 PeproTech 公司;腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)和小干扰 RNA(small interfering RNA, si-RNA)购自通用生物(滁州)股份有限公司;甲苯胺蓝、结晶紫染液购自北京索莱宝科技有限公司;衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;KAT7、II型胶原蛋白(collagen type II, Col II)、肿瘤蛋白 53(tumor protein p53, p53)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)/mTOR、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)一抗购自美国 NOVUS 公司;周期蛋白依赖激酶抑制因子 1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21)一抗购自武汉爱博泰克生物科技公司;磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)/AKT 一抗购自美国 CST 公司。光学显微镜购自日本 Olympus 公司;化学发光成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的分离与培养 CO₂ 处死大鼠后用剪刀剪下膝关节,转移到超净台内含 1% 双抗的 PBS 中进行后续操作。用手术器械刮下膝关节上的关节软骨,剪碎后连同 PBS 离心,弃上清液,加入 5 mg/mL 的 II 型胶原酶于培养箱中消化过夜。次日,在消化液中加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基终止消化,使用 40 μ m 滤网过滤消化液,离心后使用 DMEM/F12 完全培养基混悬细胞沉淀,转移到培养瓶中进行后续培养。

1.3.2 大鼠 ACs 的鉴定 待培养板内的细胞长至 60% 密度时停止培养,弃培养基,先用 PBS 清洗,4% 多聚甲醛固定 30 min,再用 0.1% 甲苯胺蓝染色 1 h,最后使用无水乙醇迅速清洗 1 次,重新加入 PBS,光学显微镜下观察拍摄。

1.3.3 大鼠炎症模型 ACs 的建立 以在 6 孔板内培养的细胞为例,待细胞密度达到 60% 时,弃培养基,PBS 清洗后更换含 IL-1 β 的 DMEM/F12 完全培养基继续培养 24 h 成模。

1.3.4 大鼠 ACs 内 KAT7 的过表达和敲低 以在

6 孔板内培养的细胞为例,待细胞密度达到 60% 时对其进行 AAV 感染或 si-RNA 转染操作。感染时,每孔加入 0.2 μ L 滴度为 1×10^{10} 的 AAV,另加聚凝胺辅助感染。转染时,每孔 1/4 的培养基替换为 Opti-MEM 培养基,加入 si-RNA 和 Lip3000 进行转染。感染或转染均设阴性对照(NC)组。蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)实验验证细胞过表达 KAT7(oe-KAT7)或敲低 KAT7(si-KAT7)是否成功。

1.3.5 Transwell 实验检测细胞迁移能力 在 Transwell 培养板下层加入含 20% 胎牛血清的培养基,套上小室。使用无血清培养基混悬细胞并加入相应试剂,混匀后垂直滴加到小室中,放入培养箱中继续培养。48 h 后取出培养板,用 PBS 清洗小室,4% 多聚甲醛固定 20 min,再用 0.1% 结晶紫染色 30 min,最后用 PBS 清洗后倒置于光学显微镜下观察拍摄。

1.3.6 SA- β -Gal 的检测 在含细胞爬片的培养板中培养细胞,给药干预 24 h 后弃培养基,先用 PBS 清洗,再按试剂盒步骤用固定液固定 15 min,换染色液置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中染色 48 h,最后置爬片于载玻片上使用光学显微镜观察拍摄。

1.3.7 WB 检测相关蛋白的表达 将给药干预 24 h 的细胞于冰上裂解,收集裂解液离心取上清液,再混入上样缓冲液通过金属浴使蛋白变性。制胶上样时,先后经过电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗、洗膜等操作后,在显影仪下曝光蛋白。

1.4 统计学处理 使用 Graphpad Pism 9.5 软件进行分析操作,数值结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于呈正态分布的数据,两组间的比较使用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 ACs 的形态与鉴定 如图 1A 所示,经过 II 型胶原酶消化分离得到并培养至第 3 代的大鼠 ACs 贴壁后形态饱满,大小均匀,多近似圆形和短梭形,成簇聚集,呈“铺路石”样排布。经甲苯胺蓝染色后胞质变为浅蓝色,胞内遍布蓝紫色异染颗粒,细胞核也被染为更深的蓝紫色(图 1B)。

2.2 大鼠 ACs 炎症模型的建立 如图 2A 所示,经不同浓度的 IL-1 β 刺激后,大鼠 ACs 中 SA- β -Gal 染色相比对照组均增强(均 $P < 0.001$),提示衰老细胞数增多。WB 结果(图 2B)显示,与对照组相比,不同浓度的 IL-1 β 刺激均使大鼠 ACs 中的 Col II 蛋白表达减少($P < 0.01, 0.05, 0.01$),MMP13 表达水平增加($P < 0.001, 0.01, 0.001$),细胞衰老标志蛋白

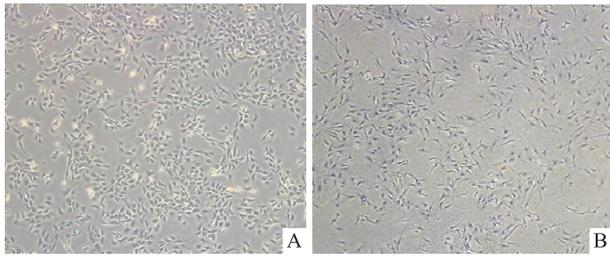


图1 大鼠 ACs 的形态与鉴定 ×100

Fig.1 Morphology and identification of rat ACs ×100

A: ACs under bright-field microscopy; B: ACs after toluidine blue staining.

p53 的表达水平也增加 ($P < 0.01, 0.01, 0.05$)。选

取 20 ng/mL 的 IL-1 β 刺激组进行 Transwell 实验, 结果(图 2C)显示, 经 IL-1 β 刺激后, 大鼠 ACs 活力降低 ($P < 0.001$), 与对照组相比, 细胞迁移能力降低。同时, 见图 2D, 与对照组相比, 经不同浓度的 IL-1 β 刺激后大鼠 ACs 中 KAT7 的表达均上升(均 $P < 0.05$)。结合各项实验结果, 选取浓度为 20 ng/mL 的 IL-1 β 诱导建立 ACs 炎症模型用于后续实验。

2.3 oe-KAT7 对大鼠 ACs 衰老及 OA 表型的影响

收集 AAV 感染后的细胞蛋白进行 WB 实验(图 3A), 经 AAV 感染的 ACs 内 KAT7 表达水平比阴性对照(oe-NC)组显著上升 ($P < 0.001$), 提示细胞 KAT7 过表达成功。细胞 SA- β -Gal 染色结果(图

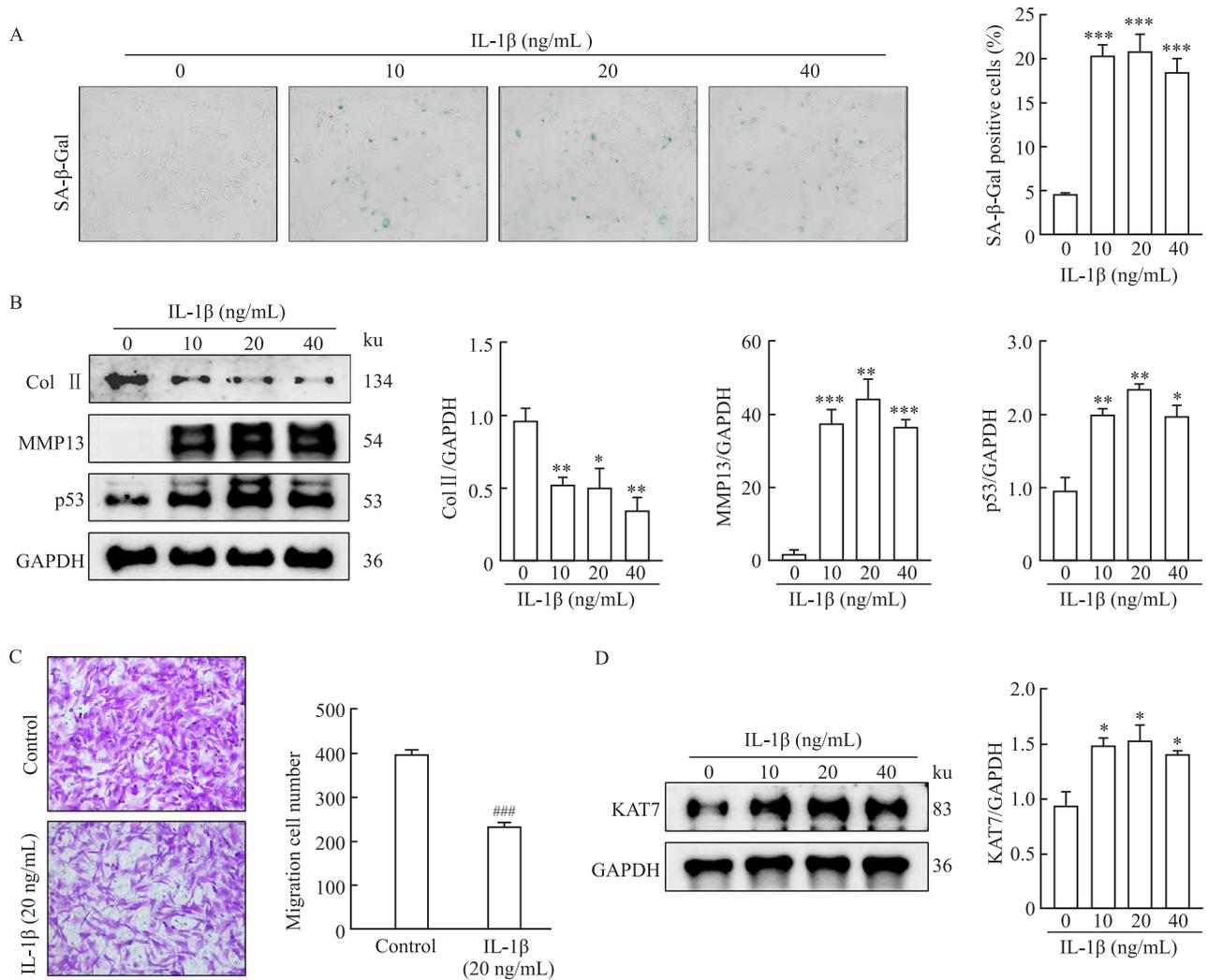


图2 IL-1 β 对大鼠 ACs 衰老及 OA 表型的影响

Fig.2 The effects of IL-1 β on senescence and OA phenotype in rats ACs

A: The effects of IL-1 β on SA- β -Gal staining in rat ACs and statistical analysis ×200; B: The effects of IL-1 β on the protein expression of Col II, MMP13 and p53 in rat ACs and statistical analysis; C: The effects of IL-1 β on the migration ability of rat ACs and statistical analysis ×200; D: The effects of IL-1 β on the protein expression of KAT7 in rat ACs and statistical analysis; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs IL-1 β (0 ng/mL) group; ### $P < 0.001$ vs Control group.

3B)表明,oe-KAT7组细胞内SA- β -Gal染色增强($P < 0.01$),提示衰老细胞数量增加。Transwell结果(图3C)显示,与oe-NC组相比,oe-KAT7可使大鼠ACs的迁移能力降低($P < 0.001$)。WB结果(图3D)显示,与oe-NC组相比,oe-KAT7组细胞内Col II蛋白表达减少($P < 0.05$),MMP13、p53、p21蛋白表达水平均得到上调($P < 0.001, 0.01, 0.001$)。

2.4 si-KAT7对大鼠炎症模型ACs衰老及OA表型的影响 收集si-RNA转染后的细胞蛋白进行WB实验(图4A),经si-RNA转染的炎症模型ACs内KAT7表达水平相较阴性对照(si-NC)组下降($P < 0.05$),提示细胞内KAT7的表达的敲低。相比于IL-1 β + si-NC组,si-KAT7减少了炎症模型ACs内SA- β -Gal阳染细胞数($P < 0.05$)(图4B),同时Transwell实验显示使其迁移能力(图4C)得到提升($P < 0.01$)。此外,WB结果(图4D)显示,si-KAT7组炎症模型ACs内Col II蛋白表达增加($P < 0.01$),细胞内MMP13、p53、p21蛋白表达水平均降低($P < 0.001, 0.05, 0.001$)。

2.5 KAT7表达水平对大鼠ACs中PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响 收集AAV感染获得的细胞样本进行转录组测序,京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析显示大量基因富集到磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/AKT信号通路(图5A),针对这一结果对此通路中p-AKT/AKT蛋白及下游靶蛋白p-mTOR/mTOR进行WB检测,获得以下结果(图5B):与oe-NC组相比,oe-KAT7组细胞内p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR的相对蛋白比值增加(均 $P < 0.01$),提示PI3K/AKT/mTOR信号通路被激活;si-KAT7可降低炎症模型ACs内p-AKT/AKT与p-mTOR/mTOR的相对蛋白比值(均 $P < 0.05$),抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路。

3 讨论

衰老与OA发展进程中的炎症反应相互影响,是导致OA的重要原因。目前观点认为,细胞衰老是细胞在多种压力下出现的一种自我保护机制,在

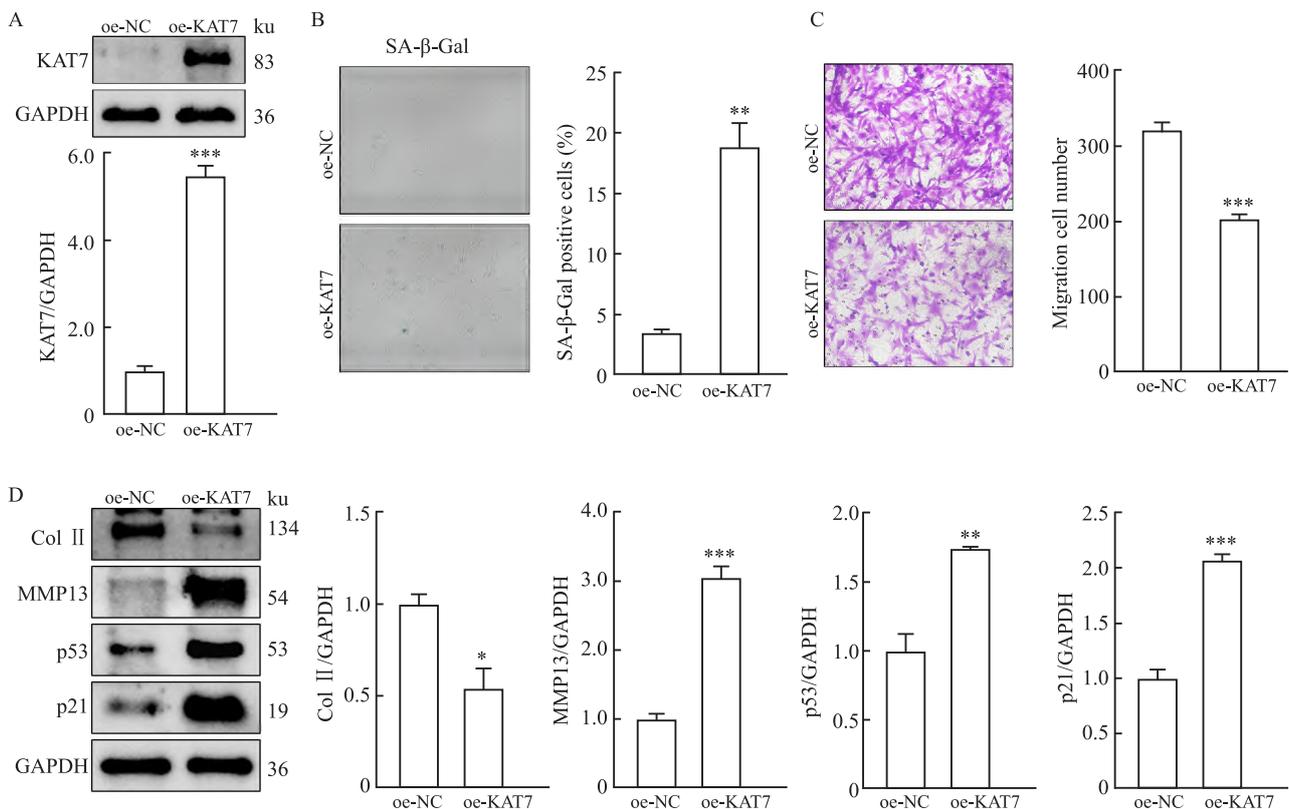


图3 oe-KAT7对大鼠ACs衰老及OA表型的影响

Fig. 3 The effects of oe-KAT7 on senescence and OA phenotype in rat ACs

A: Over-expression of KAT7 in rat ACs infected by AAV; B: The effects of oe-KAT7 on SA- β -Gal staining in rat ACs and statistical analysis $\times 200$; C: The effects of oe-KAT7 on the migration ability of rat ACs and statistical analysis $\times 100$; D: The effects of oe-KAT7 on the protein expression of Col II, MMP13, p53 and p21 in rat ACs and statistical analysis; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs oe-NC group.

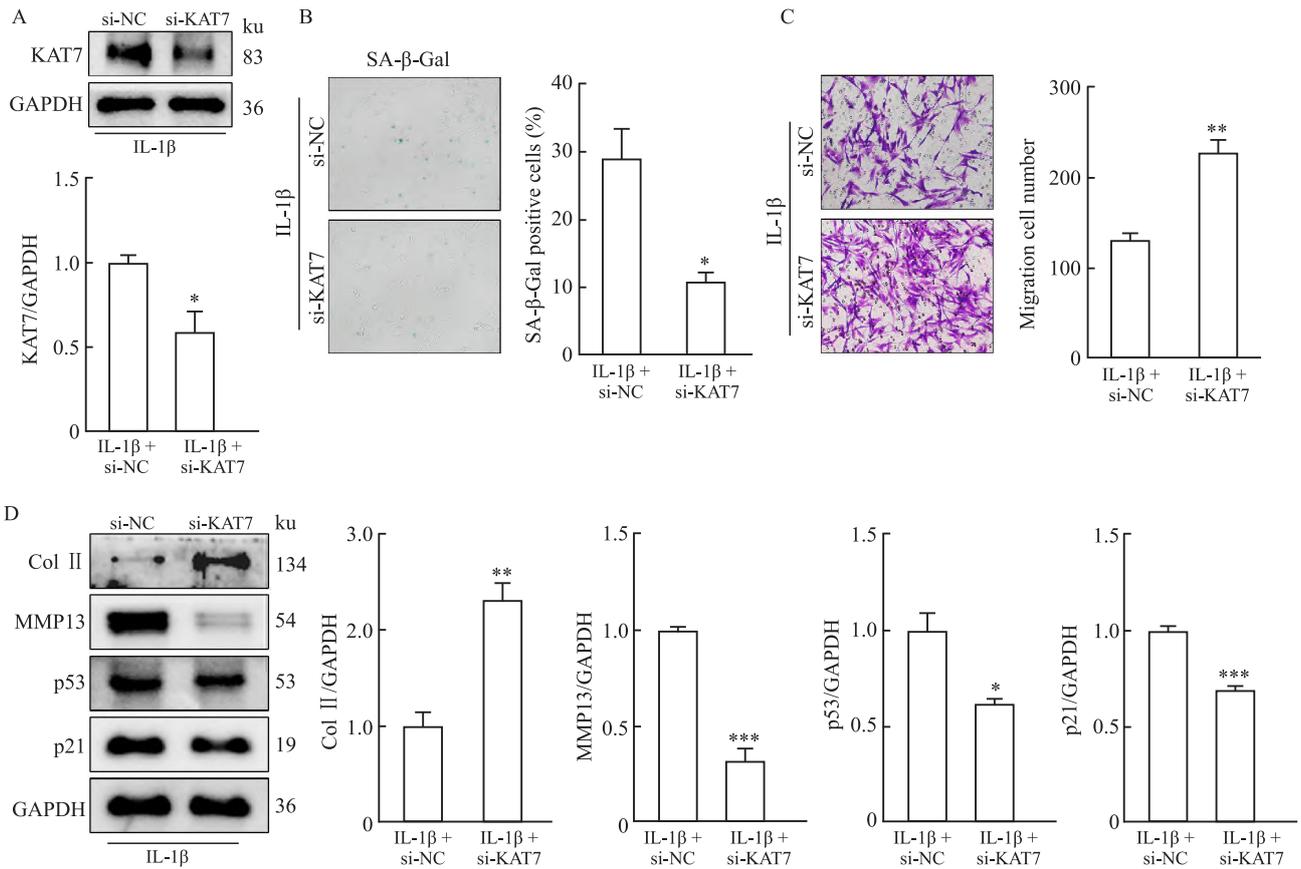


图4 si-KAT7 对大鼠炎症衰老模型 ACs 衰老及 OA 表型的影响

Fig. 4 The effects of si-KAT7 on senescence and OA phenotype in inflammatory aging model of rats ACs

A: Knockdown of KAT7 expression in rat ACs of the inflammatory model via si-RNA transfection; B: The effects of si-KAT7 on SA-β-Gal staining in inflammatory model of rat ACs and statistical analysis ×200; C: The effects of si-KAT7 on the migration ability of rat ACs in inflammatory model and statistical analysis ×100; D: The effects of si-KAT7 on the protein expression of Col II, MMP13, p53 and p21 in inflammatory model of rat ACs and statistical analysis; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs IL-1β + si-NC group.

多种生物学过程中具有积极作用,之后衰老细胞可被免疫系统清除。随着年龄的增长或刺激的持续,免疫系统清除衰老细胞的能力减弱,衰老细胞将在组织环境中不断积聚^[5]。细胞衰老后出现细胞周期阻滞,影响到相关效应通路,表现为细胞核内 p53 和 p21 蛋白表达的增加,同时细胞活力下降,溶酶体中 SA-β-Gal 增多,衰老细胞还会持续分泌 SASP 因子,诱导周围环境组织的病变^[6]。细胞衰老与表观遗传变化也存在密切联系,KAT7 作为一种组蛋白乙酰转移酶,它主要负责组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化,常作为癌症治疗靶点进行的研究。此外,KAT7 还能够影响胚胎发育、免疫调节、干细胞更新和蛋白质泛素化等功能^[7-8]。对 KAT7 的深入研究表明,人类干细胞 KAT7 失活能够延缓细胞衰老的表型,抑制 KAT7 表达可缓解小鼠肝细胞衰老,延长早衰小鼠的寿命^[3];敲除或抑制 KAT7 能够减少心脏因衰

老而引起的炎症和氧化应激^[9];过表达 KAT7 可使正常间充质干细胞衰老^[10]。以上研究在多种细胞类型上证明了 KAT7 与细胞衰老的相关性,也表明了 KAT7 作为衰老靶点基因在多种衰老相关疾病治疗上的潜力。本研究结果显示,IL-1β 刺激诱导的炎症模型 ACs 发生衰老,出现 OA 表型,细胞内 KAT7 表达增加。过表达 KAT7 后,大鼠 ACs 内衰老标志蛋白 p53 和 p21 表达增加,SA-β-Gal 阳染细胞增多,细胞发生衰老;细胞的迁移能力下降,成熟软骨细胞更新受损软骨的能力减弱;SASP 因子 MMP13 蛋白被大量表达,加速了软骨细胞外基质的降解,其重要组分 Col II 大量流失,ACs 出现 OA 表型。敲低炎症模型 ACs 中 KAT7 的表达后,大鼠 ACs 的衰老和 OA 表型都得到缓解。

转录组测序结果显示,过表达 KAT7 激活了很多与炎症反应相关的通路:PI3K/AKT 信号通路、

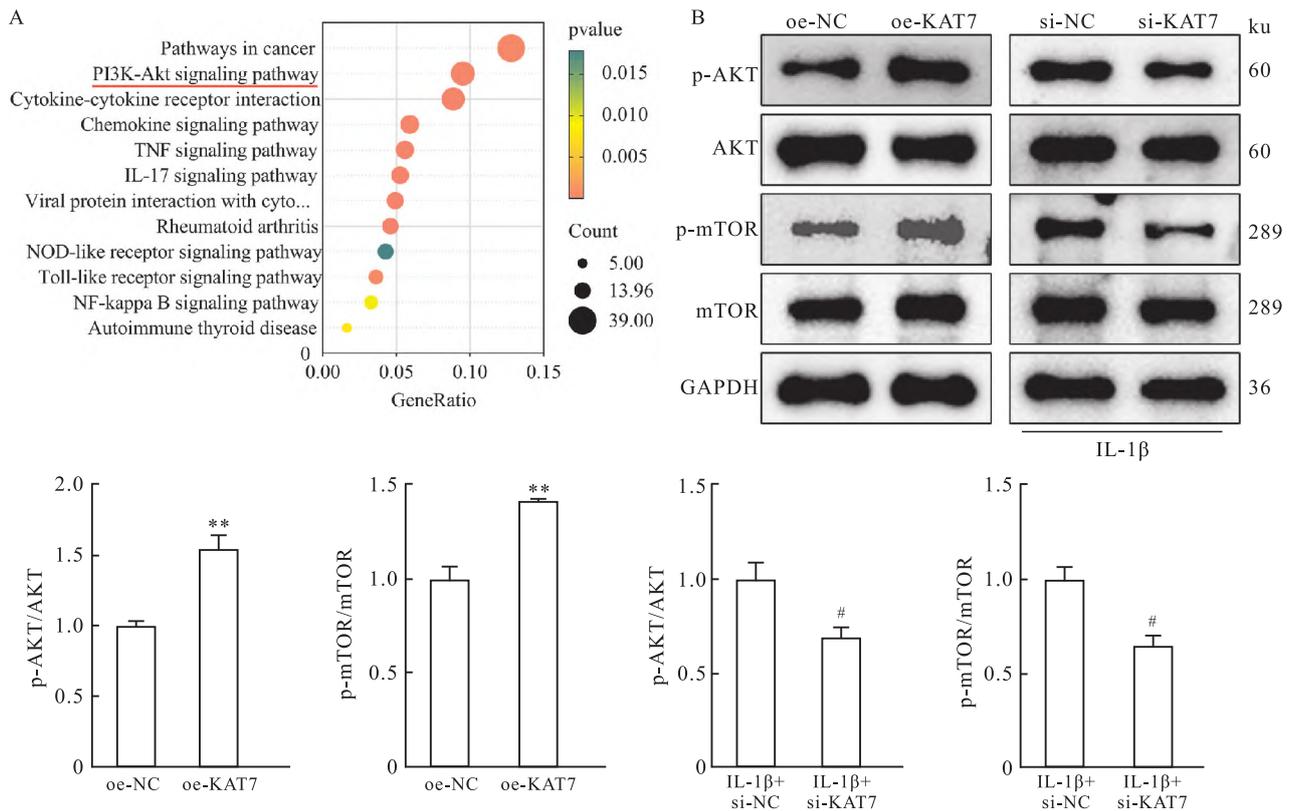


图5 KAT7 表达水平对大鼠 ACs 中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

Fig. 5 The effect of KAT7 expression level on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rats ACs

A: KEGG signaling pathway enrichment analysis; B: The effects of KAT7 on the protein expression of p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR in rat ACs and statistical analysis; ** $P < 0.01$ vs oe-NC group; # $P < 0.05$ vs IL-1 β + si-NC group.

TNF 信号通路、IL-17 信号通路、TLR 信号通路、NF- κ B 信号通路等,慢性炎症正是导致细胞衰老的重要因素^[6]。课题组选择了 PI3K/AKT 这条经典信号通路进行后续研究,该通路参与细胞存活、细胞生长和细胞周期等多种进程^[11],其下游靶蛋白 mTOR 更是与衰老密切相关。mTOR 激活可导致细胞代谢异常,造成氧化应激,能抑制细胞自噬,使衰老细胞的清除能力减弱,还会加速干细胞消耗阻碍衰老组织的自我更新,使用雷帕霉素抑制 mTOR 活性能够延长包括哺乳动物在内的多种生物体寿命^[12]。本研究中,过表达 KAT7 使大鼠 ACs 内 p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 的相对蛋白水平增加,激活了 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,促进了 ACs 衰老。敲低炎症模型 ACs 内的 KAT7 表达水平后该通路又被抑制,ACs 衰老得到延缓,OA 表型亦缓解。

综上所述,本研究在细胞层面明确了炎性刺激诱导的 ACs 衰老与 KAT7 表达水平之间的关系,证明高表达 KAT7 可促进大鼠 ACs 衰老并导致 ACs 出现 OA 表型,且这种作用可能是通过激活 PI3K/

AKT/mTOR 信号通路引起的。本研究还需进一步补充,通过体内实验来验证 KAT7 的上述作用,完善结论。此外,还需深入研究 KAT7 影响 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的具体分子机制以及对细胞自噬的影响作用,以期获得 KAT7 促进细胞衰老的更多合理解释。

参考文献

- [1] Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, et al. Synovial inflammation in osteoarthritis progression[J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(5): 258-75. doi:10.1038/s41584-022-00749-9.
- [2] Coryell P R, Diekmann B O, Loeser R F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2021, 17(1): 47-57. doi:10.1038/s41584-020-00533-7.
- [3] Wang W, Zheng Y, Sun S, et al. A genome-wide CRISPR-based screen identifies KAT7 as a driver of cellular senescence[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(575): eabd2655. doi:10.1126/scitranslmed.abd2655.
- [4] 王旭蕾, 储柱平, 王惠敏, 等. KAT7 促进软骨细胞衰老[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(2): 293-7. doi:10.19405/j.

- cnki. issn1000 - 1492. 2024. 02. 018.
- [4] Wang X L, Chu Z P, Wang H M, et al. KAT7 promotes the aging of cartilage cellular senescence[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(2): 293 - 7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.02.018.
- [5] Zhang X X, He S H, Liang X, et al. Aging, cell senescence, the pathogenesis and targeted therapies of osteoarthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 728100. doi: 10.3389/fphar.2021.728100.
- [6] Xie J, Wang Y, Lu L, et al. Cellular senescence in knee osteoarthritis: molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 70: 101413. doi:10.1016/j.arr.2021.101413.
- [7] White J, Derheimer F A, Jensen-Pergakes K, et al. Histone lysine acetyltransferase inhibitors: an emerging class of drugs for cancer therapy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2024, 45(3): 243 - 54. doi:10.1016/j.tips.2024.01.010.
- [8] Su Z, Zhang Y, Tang J, et al. Multifunctional acyltransferase HBO1: a key regulatory factor for cellular functions[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 141. doi:10.1186/s11658 - 024 - 00661 - y.
- [9] Wang B, Li J, Liu L, et al. Insulin sensitivity in the aged heart is improved by down-regulation of KAT7 *in vivo* and *in vitro*[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(3): 276 - 88. doi:10.1080/15384101.2021.2018811.
- [10] Zheng W V, Xu W, Li Y, et al. Anti-aging effect of β -carotene through regulating the KAT7-P15 signaling axis, inflammation and oxidative stress process[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 86. doi:10.1186/s11658 - 022 - 00389 - 7.
- [11] Glaviano A, Foo A S C, Lam H Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 138. doi:10.1186/s12943 - 023 - 01827 - 6.
- [12] Liu G Y, Sabatini D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 183 - 203. doi:10.1038/s41580 - 019 - 0199 - y.

KAT7 promotes chondrocyte senescence by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

Wang Kang¹, Li Ying¹, Xu Nuo¹, Guo Tingting¹, Chen Yun¹,

Zeng Xuran¹, Sun Liqi¹, Xu Haochen¹, Wei Wei¹, Yan Shangxue^{1,2}

(¹*Institute of Clinical Pharmacology, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Drugs,*

²*Laboratory Animal Center, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To establish an interleukin-1 β (IL-1 β) induced inflammatory model of rat articular chondrocytes (ACs), and to investigate the relationship between the expression of lysine acetyltransferase 7 (KAT7) under inflammatory stimulation and the senescence of ACs. **Methods** Primary ACs were obtained by digestion of rat knee cartilage with collagenase type II and identified. The inflammatory model of ACs was induced by IL-1 β . KAT7 was over-expressed or knocked down in ACs by adeno-associated virus infection or small interfering RNA transfection, respectively. A negative control group was set up. Transwell assay was used to detect cell migration ability. Senescent cells were stained with senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal). Western blot (WB) was used to detect the protein expression levels of KAT7, collagen type II (Col II), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), tumor protein p53 (p53) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21). The cells of negative control group and KAT7 over-expression group were performed for RNA sequencing, and WB was used to verify the related signaling pathways obtained by Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. **Results** Compared with the control group, the SA- β -Gal staining was enhanced, the protein expression of Col II decreased, the protein expression of MMP13 and p53 increased, the cell migration ability decreased, and the expression of KAT7 also increased in the ACs of rats after IL-1 β stimulation. Compared with the negative control group, the SA- β -Gal staining was enhanced, the protein expression of Col II decreased, the protein expression of MMP13, p53 and p21 increased, and the cell migration ability decreased in the KAT7 over-expression group. Compared with the negative control group, the SA- β -Gal staining was weakened, the protein expression of Col II increased, the protein expression of MMP13, p53 and p21 decreased, and the cell migration ability was enhanced in the KAT7 knockdown inflammatory model of ACs. KEGG enrichment analysis showed that phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B

网络出版时间:2025-08-18 08:50:33 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20250815.1250.020

IgD 对急性髓系白血病细胞 Molm-13 增殖与凋亡的影响

刘丹彦¹, 张欣¹, 陈梦琴¹, 凌夕¹, 董满玲¹, 吴甜甜¹, 王越业¹, 李涛², 魏伟¹, 吴育晶¹

(¹ 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 合肥 230032;

² 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022)

摘要 **目的** 探讨免疫球蛋白 D(IgD) 对人急性髓系白血病(AML) 细胞株(Molm-13) 活力、增殖、凋亡等功能的作用及其相关机制。**方法** 收集 AML 患者和健康对照者外周血血清, ELISA 法检测 AML 患者和健康对照者外周血血清中 sIgD 的表达情况; 体外设不同浓度的 IgD 处理组, 利用 CCK-8、CFSE 试剂和集落形成实验观察不同浓度的 IgD 对 Molm-13 细胞活力、增殖的影响, 利用凋亡试剂盒检测不同浓度的 IgD 对 Molm-13 细胞凋亡的影响, 利用差异基因分析对 IgD 引起 Molm-13 增殖的相关机制进行初步探索。**结果** AML 患者血清中 sIgD 表达水平高于健康对照者($P < 0.001$), 一定浓度的 IgD 可增加 Molm-13 细胞的活力($P < 0.05$), 促进 Molm-13 细胞的增殖($P < 0.05$), 抑制 Molm-13 细胞的凋亡($P < 0.001$)。 **结论** IgD 有促进 Molm-13 细胞的活力、增殖, 减少凋亡的作用。

关键词 急性髓系白血病; 免疫球蛋白 D; Molm-13 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 969.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1513-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.021

急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML) 是成人最常见的急性白血病, 以髓系细胞异常增殖、分化受阻及正常造血衰竭为特征, 治疗选择有限且预后不良。AML 的发生发展与异常细胞的免疫微环境密切相关, 该环境通过影响免疫细胞功能和诱导免疫紊乱促进白血病进展^[1]。免疫球蛋

白(immunoglobulin, Ig) 是一类关键的免疫效应分子, 有研究发现, 所有类别的 Ig 都在成髓细胞中表达, 且患者血清 Ig 水平升高与不良预后相关^[2]。其中, IgD 是免疫调节的重要参与者, 课题组前期研究^[3] 发现分泌型 IgD (secreted IgD, sIgD) 在急性 T 淋巴细胞白血病(T cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) 患者外周血血清中的表达异常升高, 并可在体外诱导人源 T-ALL 细胞株增殖、抑制凋亡。然而 IgD 在 AML 细胞中的表达及作用尚不明确。该研究通过观察 AML 患者和健康对照者外周血血清中 IgD 水平的表达差异, 检测 IgD 对人源 AML 细胞株(Molm-13) 活力、增殖、凋亡的影响, 探讨 IgD 对 AML 细胞株 Molm-13 功能的影响及参与 AML 发生发展的部分机制。

2025-03-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81603121、81973332); 安徽省科技厅自然科学基金面上项目(编号: 2308085MH311); 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(编号: 2023AH050666)

作者简介: 刘丹彦, 女, 硕士研究生;

吴育晶, 女, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: wuj@ahmu.edu.cn

(PI3K/AKT) signaling pathway was activated. Compared with the negative control group, the relative protein expression levels of phosphorylated protein kinase B (p-AKT)/AKT and phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR)/mTOR in KAT7 over-expression group increased. The relative protein expression levels of p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR in KAT7 knockdown cells decreased. **Conclusion** Rat ACs with high expression of KAT7 exhibit senescence and osteoarthritis phenotype, and the mechanism may be related to the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by KAT7.

Key words osteoarthritis; articular chondrocytes; KAT7; cell senescence; PI3K/AKT/mTOR

Fund programs Key Project of The National Natural Science Foundation of China (No. 82430114); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2023zhyx-B14)

Corresponding authors Wei Wei, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn; Yan Shangxue, E-mail: yan-shx@163.com