

孕期雌鼠摄入超量咖啡因对胎鼠软骨内骨化的影响及其机制

刘侃 王秋明 史许锋 陶涛 王焕萍 武海英*

(河南省人民医院产科, 郑州 450003)

[摘要] **目的** 探讨孕期雌鼠摄入超量咖啡因对胎鼠软骨内骨化的影响及其分子机制。**方法** 在孕第 9~20 天, 咖啡因暴露组 Wistar 孕鼠每天灌胃 120 mg/kg 咖啡因, 对照组灌胃相同体积的蒸馏水。将孕 20 d 的孕鼠脱颈处死, 取出胎鼠, 测量两组胎鼠体长; 分离胎鼠股骨远端, 测量股骨远端软骨长度, 并制备原代软骨细胞, 分别用咖啡因 (0.1、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$)、胰岛素样生长因子 1 (IGF-1, 100 $\mu\text{g/L}$) 和细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 抑制剂 (10 $\mu\text{mol/L}$) 进行处理, 收获细胞进行凋亡、mRNA 和蛋白质分析。**结果** 与对照组相比, 咖啡因暴露组胎鼠的体长和股骨长均显著下降 ($P<0.05$), 血清皮质酮水平显著提高 ($P<0.05$)。咖啡因暴露组胎鼠软骨细胞肥大区的 IGF-1、增殖细胞核抗原 (PCNA) 和性别决定区 Y 框蛋白 9 (SOX9) 表达均较对照组显著降低 ($P<0.05$)。在体外实验中, 咖啡因处理以剂量依赖性的方式降低了原代软骨细胞中 IGF-1、PCNA、SOX9 mRNA 和 p-ERK 蛋白表达, 外源性 IGF-1 则能逆转咖啡因诱导的这些变化, 而外源性 IGF-1 的作用则被 ERK 抑制剂降低 (均 $P<0.05$)。**结论** 产前咖啡因暴露通过抑制软骨细胞增殖导致胎鼠股骨远端变短, 软骨细胞肥厚区延长。软骨细胞中的 IGF-1/MAPK/ERK 信号通路可能部分参与咖啡因对软骨细胞增殖的不利影响。

[关键词] 咖啡因暴露; 软骨发育; 实时定量聚合酶链反应; 大鼠

[中图分类号] R339.2 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2021.03.019

Effect of excessive caffeine intake on fetal cartilage ossification in female rats during pregnancy and its mechanism

LIU Kan, WANG Qiu-ming, SHI Xu-feng, TAO Tao, WANG Huan-ping, WU Hai-ying*

(Department of Obstetrics, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of excessive caffeine intake on fetal cartilage ossification in female rats during pregnancy and its mechanism. **Methods** From gestational day (GD) 9 to GD 20, the pregnant Wistar rats in caffeine exposure group were intragastrically administered 120 mg/kg day caffeine, and the control group was administered the same volume of distilled water. The pregnant mice were sacrificed at day 20, and the body length of the fetal mice was measured. The distal femur of fetal rats was isolated, the length of distal femur cartilage was measured, and primary chondrocytes were prepared. The cells were treated with caffeine (0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$), insulin-like growth factor 1 (IGF-1, 100 $\mu\text{g/L}$) and extracellular regulated protein kinases (ERK) inhibitor (10 $\mu\text{mol/L}$), respectively. Then the cells were harvested for apoptosis, gene and protein analysis. **Results** Compared with the control group, the body length and femur length of the fetuses in the caffeine exposed group decreased significantly ($P<0.05$), and the serum corticosterone levels increased significantly ($P<0.05$). Immunohistochemical analysis showed that the expressions of IGF-1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and sex determining region Y box protein 9 (SOX9) in mast chondrocyte area of caffeine exposed group were significantly lower than those of control group ($P<0.05$). *In vitro*, caffeine treatment reduced the expression of IGF-1, PCNA, SOX9 mRNA and p-ERK protein in primary chondrocytes in a concentration-dependent manner, while exogenous IGF-1 could reversed these changes induced by caffeine, and the effect of exogenous IGF-1 was reduced by ERK inhibitors (all $P<0.05$). **Conclusion** Prenatal caffeine exposure leads to shortening of the long bones of the fetus and prolongation of the hypertrophy by inhibiting the proliferation of chondrocytes. The IGF-1/MAPK/ERK

[收稿日期] 2020-08-25 **[修回日期]** 2021-01-04

[基金项目] 2018 年度河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (2018020417)

[作者简介] 刘侃 (1986—), 女 (汉族), 河南省濮阳市人, 主治医师, 硕士。

* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

E-mail: ezsrl201@163.com Tel: (0371) 87160344

signaling pathway in chondrocytes may be partially involved in the adverse effects of caffeine on chondrocyte proliferation.

[Key words] Caffeine exposure; Chondrogenesis; Real-time PCR; Rat

咖啡因的安全问题一直是人们关注的重点^[1]。流行病学和动物实验表明,咖啡因可引起生殖和发育毒性,包括宫内发育迟缓 (intrauterine growth restriction, IUGR)^[2-4]。此外,产前咖啡因暴露可直接作用于生长板软骨细胞,降低基质合成,抑制肥厚分化,导致骨骼生长延迟^[5]。因此,产前摄入咖啡因可能会对胎儿骨骼的发育产生影响,而其中机制尚不完全清楚。研究发现,胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 在胎儿生长发育中起着主导作用^[6,7],且 IGF-1 的表达与软骨细胞的增殖、分化和基质合成的调节有关^[8]。因此,本研究拟通过对孕期大鼠进行大剂量咖啡因暴露,检测大剂量咖啡因暴露对胎鼠软骨内骨化的影响,以测试咖啡因在骨骼中可能的发育毒性;并通过体外实验,分别采用咖啡因低、中、高剂量、咖啡因+IGF-1、咖啡因+IGF-1+细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 抑制剂进行处理后,做免疫组织化学及 Real-time PCR 检测,分析探讨咖啡因对软骨细胞中 IGF-1 表达的影响,为进一步探讨软骨内骨化机制和临床治疗提供依据。

材料和方法

1. 药物和试剂

咖啡因购自美国 Sigma Aldrich 公司。ERK 抑制剂 (PD184161, 批号: P218100, 纯度: ≥99.0%) 购自美国 R&D Systems 公司。IGF-1 (791-MG-050) 购自英国 Abcam 公司。Dead End™ 比色法 TUNEL 系统购自美国 Promega 公司。大鼠皮质酮 ELISA 试剂盒购自美国 Assaypro 公司。兔抗 IGF-1、兔抗性别决定区 Y 框蛋白 9 (sex determining region Y box protein 9, SOX9)、兔抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、兔抗 ERK 和兔抗磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK) 均购自美国 Santa Cruz 公司。DAB 染色试剂盒购自丹麦 Dako 公司。用于细胞培养的试剂包括 Hank 平衡盐溶液 (HBSS)、PBS 缓冲液、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、II 型胶原酶和 Dulbecco 改良 Eagle 培养基购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。TRIzol 试剂盒、反转录和 Real-time PCR 试剂盒购自日本 Takara Biotechnology 公司。所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自上海贝博生物科技公司。

2. 动物和实验分组

SPF 级健康雄性 (体质量 260~300 g) 及雌性

(180~220 g) Wistar 大鼠, 2 月龄, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物许可证号: SCXK (沪) 2016-0005。所有动物实验程序均按照中国动物福利国际合作委员会实验动物护理和使用指南进行。适应性饲养 1 周后, 每晚 6 时, 2 只雌性大鼠与 1 只雄性大鼠合笼过夜, 次日清晨检查雌鼠阴道栓或阴道涂片镜检, 查到阴栓或精子之日为受孕 0 d。将怀孕的大鼠转移到个体笼中, 随机分为对照组 (n=8) 和咖啡因暴露组 (n=8)。在孕第 9 天, 咖啡因暴露组每天经口灌胃咖啡因 (120 mg/kg), 对照组灌胃相同体积的蒸馏水, 至孕第 20 天结束。

3. 取材及组织学分析

将孕期 20 d 的孕鼠脱颈处死, 取出胚胎。伸直胎鼠, 起自小鼠两耳连线中点, 终至体尾相接处, 测量两组胎鼠体长。并分离胎鼠股骨远端。分离出的股骨远端浸泡在 4% 多聚甲醛溶液中, 置于 4 ℃ 冰箱中固定过夜, 经处理后包埋于石蜡中, 切片, 厚 6 μm, 行 HE 染色, 通过光学显微镜目镜分化测量染色后股骨骨髓肥大区软骨长度。对于免疫组织化学染色, 用梯度乙醇对切片进行脱蜡和水化处理。切片与一抗孵育, 4 ℃ 过夜。兔抗 IGF-1 (1:100), 兔抗 SOX9 (1:100) 和兔抗 PCNA (1:100)。用 DAB 染色试剂盒测定过氧化物酶活性。使用 Dead End™ 比色法 TUNEL 系统进行凋亡检测, 低倍镜下随机数 5 个以上视野, 每个视野数 50~100 个细胞, 计算凋亡细胞所占百分率。

4. 原代软骨细胞培养及凋亡分析

将孕 20 d 的孕鼠脱颈处死, 取出胚胎, 分离胎鼠股骨远端^[4]。具体操作为: 解剖股骨远端, 清除结缔组织, 入 2.2 g/L II 型胶原酶溶液, 37 ℃ 孵育 30 min。去除杂质后, 用新鲜 II 型胶原酶溶液进一步消化软骨 3 h。将上述软骨细胞以 4×10⁴ 细胞/孔的密度接种于 6 孔板中, 并在含有 5% FBS、10⁵ IU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素和 50 mg/L L-抗坏血酸的 DMEM/F12 中培养。初代培养, 培养基中呈现大量圆形软骨细胞, 具有强折光性。培养 24 h 后细胞基本完成铺伸, 软骨细胞呈散在三角形、多角形贴附于培养皿底。传代 2 次后, 软骨细胞增长至爬满底时软骨细胞可变为梭形, 细胞集中并呈放射样呈簇生长, 细胞内胞质分布均匀, 核大而圆, 说明软骨细胞培养成功, 将传代 2 次的软骨细胞分成 6 组: 对照组 (DMSO 溶媒处理)、咖啡因 0.1 μmol/L 处理组、咖啡因 1 μmol/L 处理组、咖啡因 10 μmol/L 处理组、咖啡因 (10 μmol/L)+IGF-1 (100 μg/L) 处理组和咖

啡因 (10 $\mu\text{mol/L}$) + IGF-1 (100 $\mu\text{g/L}$) + ERK 抑制剂 (PD184161, 10 $\mu\text{mol/L}$) 处理组。上述各组均培养 48 h, 然后收获细胞进行 mRNA 和蛋白质分析。所有实验独立重复 3 次。

5. Real-time PCR 检测

使用 Trizol 试剂分别提取体外培养的胎鼠软骨细胞 (详见方法 4.)。使用 First Strand cDNA Synthesis Kit 将 200 ng 纯化的总 RNA 反转录成 cDNA。用 QuantStudio 3&5 Real-time PCR 系统 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 进行 Real-time PCR。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算每个基因的相对表达, 并用 GAPDH 进行归一化。用于 Real-time PCR 扩增的引物序列如下: GAPDH (正向引物: 5'-GCAAGTTCAA CGGCACAG-3'; 反向引物: 5'-GCCAGTAGACTC CACGACA-3'), IGF-1 (正向引物: 5'-CAGACCTA GCAGACACCATG-3'; 反向引物: 5'-GCTTGGAC ATGAAGGCTTTG-3'), PCNA (正向引物: 5'-AAA CAAGCCTTTCAAGGGGC-3'; 反向引物: 5'-CAC ATCGAGCCACGAACCTT-3'), SOX9 (正向引物: 5'-TGTGTCCCTTGCCCTGACTACT-3'; 反向引物: 5'-TGTTTCACGGTCTGCAGTTCC-3')。

6. Western blotting 分析

将体外培养的胎鼠软骨细胞 (详见方法 4.) 放入 RIPA 缓冲液中, 并在冰上裂解 30~45 min。在 BCA 定量后, 加入等量蛋白质裂解物 (40 μg /泳道) 并在 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上分离, 然后转移到硝酸纤维素滤膜上, 用兔抗 ERK (1:1000)、兔抗 p-ERK (1:1000) 或兔抗 GAPDH (1:1000) 抗体孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。在与 HRP 标记的二抗孵育后, 按照制造商的方案通过增强的化学发光产生印迹, 并通过暴露于 Fusion FX 系统 (法国 Vilber Lourmat 公司) 显现。用 Quantity One 4.6 分析软件 (美国 Bio-Rad Laboratories) 分析电泳凝胶中蛋白质的量。

7. 数据处理

使用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析。数据表示为均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)。采用独立 Student's *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验对不同组进行比较。统计学意义设为 $P<0.05$ 。

结 果

1. 咖啡因暴露对胎鼠股骨长度及组织学的影响

与对照组比较, 咖啡因暴露组胎鼠体长、股骨远端长度 (图 1A) 及软骨细胞区细胞凋亡数量 (图 1B) 均显著降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。与对照组比较, 咖啡因暴露组股骨骨骺肥大区软骨长度显著升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 表 1。

2. 咖啡因暴露对胎鼠血清皮质酮和肥大软骨细胞区 IGF-1、SOX9 和 PCNA 表达的影响

免疫组织化学分析结果显示, 对照组与咖啡因暴露组胎鼠肥大软骨细胞区的 IGF-1 表达分别为 2.13 ± 0.52 、 1.34 ± 0.21 ; PCNA 表达分别为 1.44 ± 0.41 、 0.97 ± 0.26 ; SOX9 表达分别为 12.3 ± 2.65 、 8.17 ± 2.54 , 差异均有统计学意义 ($P<0.05$, 图 2A~2C)。ELISA 检测结果显示, 咖啡因暴露组皮质酮水平为 589.63 ± 39.48 , 显著高于对照组 386.17 ± 43.64 , 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

3. 咖啡因对原代软骨细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 结果显示, 咖啡因 (0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$) 处理的软骨细胞凋亡率以浓度依赖性方式高于对照组 ($P<0.05$, 图 3A~3C)。与 IGF-1 和 ERK 共处理后, 咖啡因 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 IGF-1 (100 $\mu\text{g/L}$) 和咖啡因 (10 $\mu\text{mol/L}$) + IGF-1 (100 $\mu\text{g/L}$) + ERK 抑制剂 (10 $\mu\text{mol/L}$) 共处理组的凋亡率明显低于咖啡因 (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理组 (均 $P<0.05$, 图 3D~3F)。

4. 咖啡因对软骨细胞凋亡相关因子 mRNA 表达的影响

结果显示, 咖啡因处理以剂量依赖性的方式降低了原代软骨细胞中 IGF-1、PCNA 和 SOX9 mRNA 表达, 与对照组 (咖啡因浓度 0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 咖啡因浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 IGF-1、PCNA 和 SOX9 mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$, 图 4A~4C)。与咖啡因 (10 $\mu\text{mol/L}$) + IGF-1 (100 $\mu\text{g/L}$) 治疗组相比, 咖啡因浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 IGF-1、PCNA 和 SOX9 mRNA 表达均显著降低, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$, 图 4D~4F)。

表 1 咖啡因暴露对胎鼠股骨长度及组织学的影响

Table 1 The effects of caffeine exposure on femur length and histology of fetal rats				
组别 groups	胎鼠体长 (cm) length of fetal rat (cm)	股骨远端长度 (mm) distal femoral length (mm)	骨骺肥大区软骨长度 (μm) cartilage length of epiphyseal hypertrophic zone (μm)	软骨细胞区细胞凋亡数量 (%) apoptosis in chondrocytes (%)
对照组 control group	5.36 \pm 0.11	4.28 \pm 0.35	91.27 \pm 7.62	58.33 \pm 5.41
咖啡因暴露组 caffeine exposed group	4.77 \pm 0.15	3.54 \pm 0.40	109.57 \pm 12.34	36.29 \pm 2.92

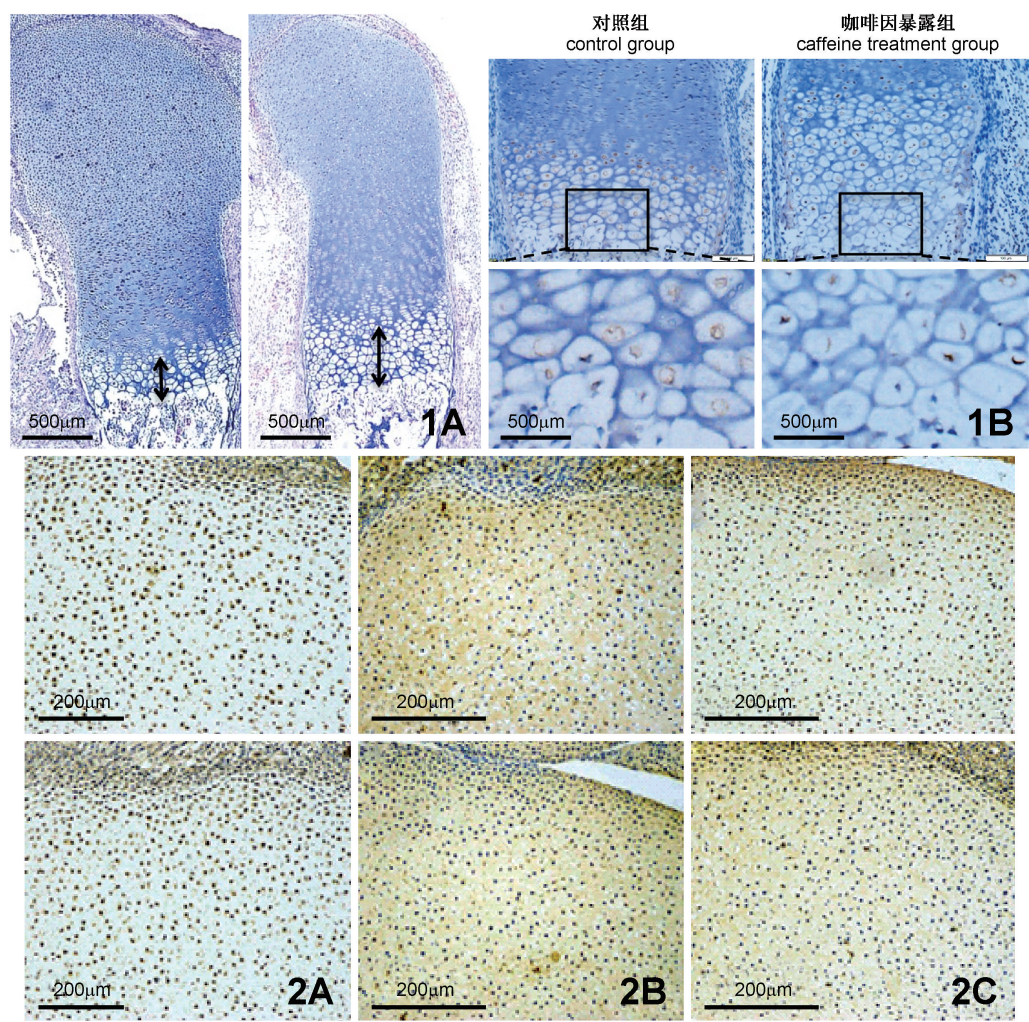


图 1 咖啡因暴露对胎鼠股骨远端长度及细胞凋亡的影响
A 为对照组和咖啡因暴露组的胎鼠股骨远端典型 HE 染色图像,标尺示 500 μm;B 为对照组和咖啡因暴露组胎鼠股骨远端 TUNEL 染色
图 2 对胎鼠肥大软骨细胞区 IGF-1、SOX9 和 PCNA 表达的影响 标尺示 200 μm
A 为 IGF-1 的代表性免疫组织化学图像;B 为 PCNA 的代表性免疫组织化学图像;C 为 SOX9 的代表性免疫组织化学图像
Fig.1 Effects of caffeine exposure on femur length and low maintenance apoptosis in fetal rats
A, Representative HE staining images of distal femur from control group and caffeine exposure group, Bar= 500 μm; B, TUNEL staining of the distal femur of fetal rats in the control group and the caffeine exposure group
Fig.2 The effect on fetal rat the expression of IGF-1, SOX9 and PCNA in hypertrophic chondrocyte area Bar=200 μm
A, Representative immunohistochemical image of IGF-1; B, Representative immunohistochemical image of PCNA; C, Representative immunohistochemical image of SOX9

5. 咖啡因对软骨细胞凋亡相关因子蛋白表达的影响

结果显示,咖啡因处理以剂量依赖性的方式降低了原代软骨细胞中 IGF-1、PCNA 和 SOX9 蛋白表达,与对照组(咖啡因浓度 0 μmol/L)相比,咖啡因浓度 10 μmol/L 组 IGF-1、PCNA 和 SOX9 蛋白表达均显著降低,差异有统计学意义(均 $P<0.05$,图 5A, 5B)。与咖啡因(10 μmol/L)+IGF-1(100 μg/L)治疗组相比,咖啡因浓度 10 μmol/L 组 IGF-1、PCNA 和 SOX9 蛋白表达均显著降低,差异有统计学意义(均 $P<0.05$,图 5C,5D)。

讨 论

在过去的 10 年中,人们发现健康和疾病的发展

起源,即早期发展,对后来的生活有重要影响^[9]。流行病学证据表明,怀孕期间摄入 300 mg/d 的咖啡因与 IUGR 风险增加有关^[10]。虽然怀孕期间摄入的咖啡因在剂量和来源方面有所不同,但它与增加低出生体重和早产的风险有关。之前的研究表明,在孕第 9~20 天服用 30 mg/(kg·d)咖啡因可以诱导大鼠后代关节损伤^[11]。根据人和大鼠之间的剂量转换(人:大鼠的体表面积比为 1:6.17),大鼠每天摄取 30 mg/kg 咖啡因等于每天消耗 1.3~2.3 杯咖啡(假设每杯含有 100~150 mg 咖啡因),这可以在我们的日常生活中实现。因此,为了获得稳定的 IUGR 子代大鼠,本研究采用 120 mg/(kg·d)咖啡因暴露诱导大鼠 IUGR 模型,这对于阐明软骨发育毒

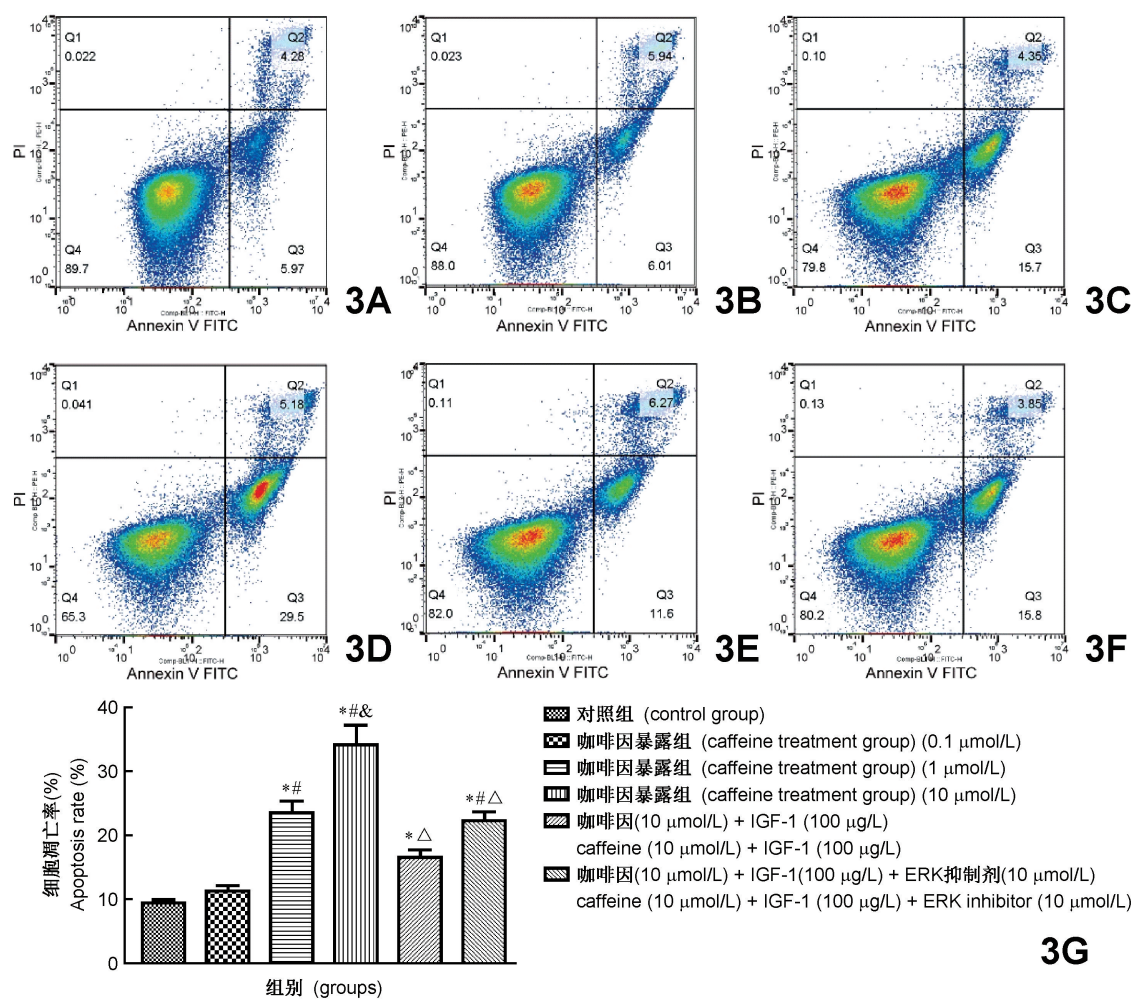


图3 Annexin V/PI检测咖啡因对软骨细胞凋亡的影响
A~F分别为对照组、咖啡因(0.1 $\mu\text{mol/L}$)治疗组、咖啡因(1 $\mu\text{mol/L}$)治疗组、咖啡因(10 $\mu\text{mol/L}$)治疗组、咖啡因(10 $\mu\text{mol/L}$)+IGF-1(100 $\mu\text{g/L}$)处理组、咖啡因(10 $\mu\text{mol/L}$)+IGF-1(100 $\mu\text{g/L}$)+ERK抑制剂(PD184161, 10 $\mu\text{mol/L}$)处理组;G为Annexin V/PI染色定量分析;与对照组相比, * $P<0.05$;与咖啡因(0.1 $\mu\text{mol/L}$)治疗组相比, # $P<0.05$;与咖啡因(1 $\mu\text{mol/L}$)治疗组相比, & $P<0.05$;与咖啡因(10 $\mu\text{mol/L}$)治疗组相比, $\Delta P<0.05$

Fig.3 Annexin V/PI was used to detect the effect of caffeine on chondrocyte apoptosis
A-F, Vehicle control group, caffeine (0.1 $\mu\text{mol/L}$) treatment group, caffeine (1 $\mu\text{mol/L}$) treatment group, caffeine (10 $\mu\text{mol/L}$) treatment group, caffeine (10 $\mu\text{mol/L}$) + IGF-1 (100 $\mu\text{g/L}$) treatment group, caffeine (10 $\mu\text{mol/L}$) + IGF-1 (100 $\mu\text{g/L}$) + ERK inhibitor (PD184161, 10 $\mu\text{mol/L}$) treatment group; G, Annexin V/PI staining quantitative data analysis; Compared with the control group, * $P<0.05$; Compared with the caffeine (0.1 $\mu\text{mol/L}$) treatment group, # $P<0.05$; Compared with the caffeine (1 $\mu\text{mol/L}$) treatment group, & $P<0.05$; compared with the caffeine (10 $\mu\text{mol/L}$) treatment group, $\Delta P<0.05$

性及其分子机制是合理的。

关节软骨的形成主要发生在胚胎发生过程中,出生后随着年龄的增长,关节软骨的厚度和细胞数量逐渐减少。因此,成人关节软骨的质量与胚胎时期软骨的发育密切相关。正常的细胞外基质为软骨提供了合适的机械性能,并决定了正常软骨的质量^[12]。SOX9是关节软骨形成的关键转录因子^[13]。本研究的数据显示,咖啡因暴露组胎鼠的体长和股骨长均显著下降,并且关节软骨中SOX9的含量显著降低,这意味着咖啡因可能导致发育不良和胎儿关节软骨质量差。PCNA被认为是细胞增殖相关的关键指标^[14]。本研究发现,在孕第20天时咖啡因

暴露组胎鼠关节软骨中PCNA表达较对照组显著降低,而血清皮质酮浓度高于对照组。据文献报道,咖啡因及其主要代谢物(例如黄嘌呤、可可碱和茶碱)促进了绵羊和大鼠甾体激素的产生^[15]。此外,先前的研究证实,咖啡因可以增加人肾上腺皮质细胞系NCIH295A中皮质酮分泌的产生,高水平皮质酮能抑制肾上腺细胞的增殖^[16]。这些结果表明,咖啡因暴露对关节软骨细胞增殖有抑制作用,其可能通过咖啡因的直接作用和肾上腺皮质类固醇激素合成的改变引起。

IGF-1信号通路对于软骨发育至关重要。它可以通过ERK/MAPK途径的磷酸化促进软骨细胞增

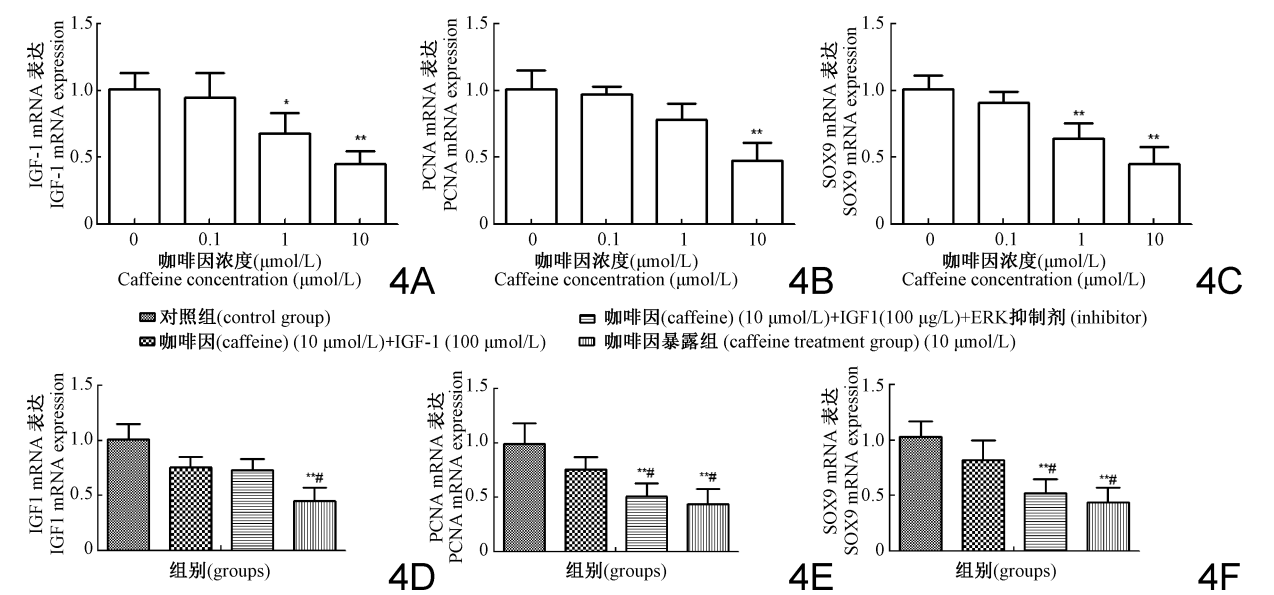


图4 Real-time PCR 检测咖啡因对软骨细胞中 IGF-1 信号的影响
A~C 为不同浓度(0.1 μmol/L、1 μmol/L 和 10 μmol/L) 咖啡因对 IGF-1 (A)、PCNA (B) 和 SOX9 (C) mRNA 表达的影响;D~F 为咖啡因(10 μmol/L)、外源 IGF-1 (100 μg/L) 和 PD184161 (10 μmol/L) 对 IGF-1 (D)、PCNA (E) 和 SOX9 (F) mRNA 表达的影响;与对照组(咖啡因浓度 0 μmol/L)相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与咖啡因(10 μmol/L) + IGF-1 (100 μg/L) 治疗组相比, # $P<0.05$
Fig.4 QRT-PCR was used to detect the effect of caffeine on IGF-1 signal in chondrocytes
A-C, The effects of different concentrations of caffeine (0.1 μmol/L, 1 μmol/L and 10 μmol/L) on IGF-1 (A), PCNA (B) and SOX9 (C) mRNA expression; D-F, The effects of caffeine (10 μmol/L), exogenous IGF-1 (100 μg/L) and PD184161 (10 μmol/L) on the expression of IGF-1 (D), PCNA (E) and SOX9 (F) mRNA; Compared with the control group (caffeine concentration 0 μmol/L), * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with caffeine (10 μmol/L) + IGF-1 (100 μg/L), # $P<0.05$

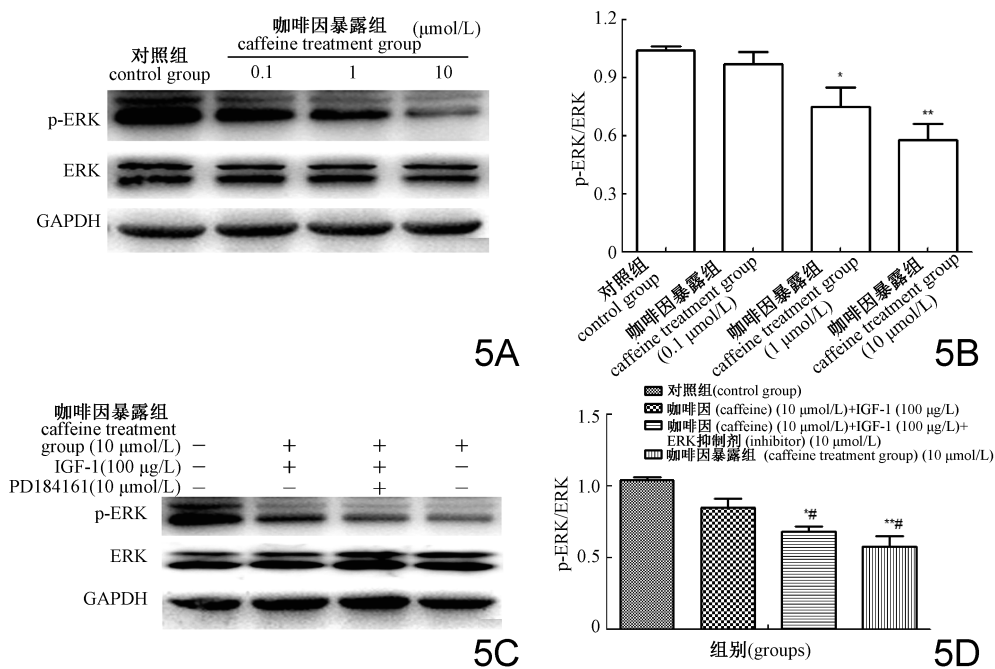


图5 Western blotting 分析咖啡因影响软骨细胞凋亡的潜在分子机制
A 和 B 为不同浓度(0.1 μmol/L、1 μmol/L 和 10 μmol/L) 咖啡因对 ERK 和 p-ERK 蛋白表达的影响;C 和 D 为咖啡因(10 μmol/L)、IGF-1 (100 μg/L) 和 PD184161 (10 μmol/L) 对 ERK 和 p-ERK 蛋白表达的影响;与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与咖啡因(10 μmol/L) + IGF-1 (100 μg/L) 治疗组相比, # $P<0.05$
Fig.5 Western blotting analysis was used to detect the potential molecular mechanism of caffeine on chondrocyte apoptosis
A, B, The effects of different concentrations (0.1 μmol/L, 1 μmol/L and 10 μmol/L) of caffeine on the expression of ERK and p-ERK; C, D, The effects of caffeine (10 μmol/L), IGF-1 (100 μg/L) and PD184161 (10 μmol/L) on the expression of ERK and p-ERK; Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with caffeine (10 μmol/L) + IGF-1 (100 μg/L) treatment group, # $P<0.05$

殖以及刺激 SOX9 表达,进而增加软骨基质和蛋白多糖的合成,以维持透明软骨的特征^[17]。许多研究表明,IGF-1 信号通路在内分泌系统调节中起着关键作用,参与调节各种细胞的增殖。例如,在乳腺癌细胞中,当 IGF-1 被抑制时,ERK 磷酸化和细胞增殖减少^[18]。在成骨细胞中,激活 IGF-1 受体可以增加 ERK 磷酸化,促进细胞增殖^[19]。研究还表明,IGF-1 信号通路参与了肾上腺皮质细胞的增殖过程^[17]。大量的研究也表明,活化 MAPK/ERK 对肾上腺皮质细胞增殖和有丝分裂是必要的^[20]。本研究中,我们观察到咖啡因暴露组胎鼠软骨细胞肥大区的 IGF-1 表达降低。此外,研究证实,咖啡因对原代软骨细胞中 IGF-1、PCNA 和 SOX9 的表达有剂量依赖性的抑制作用,当加入 IGF-1 后抑制作用减弱。同时,咖啡因能下调 p-ERK 信号,但下调作用被外源性 IGF-1 逆转,而外源性 IGF-1 的作用则被 ERK 抑制剂降低。因此,研究推测,母亲咖啡因过度暴露引起的 IGF-1/p-ERK 信号通路的变化介导了对后代软骨细胞增殖的抑制作用,并可能影响胎鼠肾上腺的代偿性生长,尤其是皮质酮合成。

总之,本研究通过体内和体外实验初步阐明了产前咖啡因暴露对胎鼠骨骼发育迟缓的作用机制。结果表明,产前咖啡因暴露导致胎鼠股骨远端变短,软骨细胞肥厚区延长,其原因很可能是由于软骨细胞增殖抑制所致。软骨细胞中的 IGF-1/MAPK/ERK 信号通路可能部分参与咖啡因对软骨细胞增殖的不利影响。本研究为探讨咖啡因的发育毒性机制,解释胎儿疾病的发育起源,指导优生学提供了有价值的研究依据,具有重要的现实意义。

参 考 文 献

[1] Zhou B, Huang H. Identification and evolutionary analysis of carbamoyl phosphate synthase family genes in cocoa and coffee [J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37 (2): 867-873. (in Chinese)
周波, 黄和. 可可、咖啡等植物中氨基甲酰磷酸合成酶家族基因鉴定和进化分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37 (2): 867-873.
[2] Hvolgaard MS, Obel C, Olsen J, et al. Maternal caffeine consumption during pregnancy and behavioral disorders in 11-year-old offspring: a danish national birth cohort study[J]. J Pediatr, 2017, 189:120-127.
[3] Peacock A, Hutchinson D, Wilson J, et al. Adherence to the caffeine intake guideline during pregnancy and birth outcomes: a prospective cohort study[J]. Nutrients, 2018, 10(3):319.
[4] Tie K, Zhang X, Tan Y, et al. Intrauterine low-functional programming of IGF-1 by prenatal nicotine exposure mediates the susceptibility to osteoarthritis in female adult rat offspring [J]. FASEB J, 2016, 30(2):785-797.
[5] Liu SH, Chen C, Yang RS, et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats[J]. J Orthop Res, 2011, 29 (6):954-960.
[6] Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, et al. Insulin-like growth

factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review) [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2):579-584.
[7] Duan FF, Liu L, Huang HG, et al. Effects of nicotine exposure during pregnancy on adrenal dysfunction and gender differences in adult offspring rats induced by high-fat diet [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2017, 33 (11): 1530-1534. (in Chinese)
段芳芳, 刘莲, 黄鹤归, 等. 孕期尼古丁暴露加重高脂饮食所致成年子代大鼠肾上腺功能紊乱及其性别差异[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(11):1530-1534.
[8] Wei FY, Lee JK, Wei L, et al. Correlation of insulin-like growth factor 1 and osteoarthritic cartilage degradation: a spontaneous osteoarthritis in guinea-pig [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(20):4493-4500.
[9] Zou KX, Ding GL, Huang HF. Advances in research into gamete and embryo-fetal origins of adult diseases[J].Sci China Life Sci, 2019, 62(3):360-368.
[10] Cao HJ, Liu JP. Systematic review on the correlation between caffeine intake during pregnancy and abortion [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2014, 30 (12): 945-950. (in Chinese)
曹卉娟, 刘建平. 孕期咖啡因摄入与流产相关性分析性研究系统综述[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2014, 30(12):945-950.
[11] Zhao Z, Qin J, Pei LG, et al. Articular damages in multi-generational female offspring due to prenatal caffeine exposure correlates with H3K9 deacetylation of TGFβ signaling pathway[J]. Toxicology, 2020, 442:152533.
[12] Lin JJ, Zeng H, Xiao DM, et al. Effects of resveratrol activating PI3K/Akt signaling pathway on extracellular matrix synthesis of chondrocytes [J]. Chinese Journal of Orthopedics, 2017, 25 (13): 1220-1224. (in Chinese)
林健静, 曾晖, 肖德明, 等. 白藜芦醇激活 PI3K/Akt 信号通路对软骨细胞细胞外基质合成的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2017, 25(13):1220-1224.
[13] Wang W, Feng Y, Aimaiti Y, et al. TGFβ signaling controls intrahepatic bile duct development may through regulating the Jagged1-Notch-Sox9 signaling axis[J]. J Cell Physiol, 2017, 233 (8):5780-5791.
[14] Liu M, Xie WW, Zheng W, et al. Targeted binding of estradiol and ESR1 regulates chondrocyte proliferation through ERK signaling pathway [J]. Journal of Southern Medical University, 2019, 39(2): 134-143. (in Chinese)
刘敏, 谢巍伟, 郑维, 等. 雌二醇与 ESR1 靶向结合通过 ERK 信号通路调控软骨细胞的增殖[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(2):134-143.
[15] Temple JL, Ziegler AM. Gender differences in subjective and physiological responses to caffeine and the role of steroid hormones [J]. J Caffeine Res, 2011, 1(1):41-48.
[16] Ping J, Lei YY, Liu L, et al. Inheritable stimulatory effects of caffeine on steroidogenic acute regulatory protein expression and cortisol production in human adrenocortical cells[J]. Chem Biol Interact, 2012, 195(1):68-75.
[17] Pei LG, Yuan C, Guo YT, et al. Prenatal caffeine exposure induced high susceptibility to metabolic syndrome in adult female offspring rats and its underlying mechanisms[J]. Reprod Toxicol, 2017, 71:150-158.
[18] You DJ, Mander S, Park CR, et al. NME1L negatively regulates IGF-1-dependent proliferation of breast cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2016, 117(6):1454-1463.
[19] Sbaraglini ML, Molinuevo MS, Sedlinsky C, et al. Saxagliptin affects long-bone microarchitecture and decreases the osteogenic potential of bone marrow stromal cells[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 727(1):8-14.
[20] Otis M, Gallo-Payet N. Role of MAPKs in angiotensin II-induced steroidogenesis in rat glomerulosa cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 265(2):126-130.

(编辑 张艳)