文章编号:1000-5404(2012)08-0719-04

论著

核心蛋白聚糖抑制人软骨细胞MMP13基因表达的体外研究

陈 亮,熊 雁,王子明,王爱民 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所骨科)

[摘要] **目的** 体外原代细胞培养人正常关节软骨细胞,观察不同浓度的外源性核心蛋白聚糖(decorin, DCN)对软骨细胞基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteases 13,MMP13)表达的影响。**方法** 采用胰蛋白酶和Ⅱ型胶原酶结合消化法分离培养人透明软骨细胞,观察体外培养的软骨细胞形态,阿尔新蓝染色和Ⅱ型胶原免疫组化鉴定透明软骨细胞,从基因水平(实时定量PCR)检测不同浓度的外源性DCN(对照组:0,A组:2.5 μg/ml,B组:25 μg/ml,C组:250 μg/ml)作用下透明软骨细胞对MMP13、X型胶原(Collagen X)表达的影响。**结果** ①正常透明软骨细胞培养呈多角型,扁平状,换液培养5 d时,细胞呈多边形、星形等,排列紧密呈"铺石板"样。②本法分离培养的原代透明软骨细胞的阿尔新蓝染色和Ⅱ型胶原免疫组化均为阳性。③随着外源性DCN浓度(0~250 μg/ml)的不断增大,Collagen X的表达明显降低($P<0.01$),且成剂量依赖关系(A:0.78±0.03,B:0.71±0.04,C:0.63±0.01),MMP13的表达则在DCN高浓度组(250 μg/ml)时明显降低(0.85±0.02,$P<0.01$)。**结论** 外源性DCN抑制透明软骨细胞的Collagen X的表达且成剂量依赖关系,高浓度(250 μg/ml)对MMP13的表达起明显抑制作用。表明外源性DCN可能通过抑制透明软骨细胞肥大化抑制软骨细胞MMP13的表达。

[关键词] 透明软骨细胞;核心蛋白聚糖;细胞外基质;基因表达
[中图法分类号] R322.71;R343;R394.3 [文献标志码] A

Decorin inhibits MMP13 gene expression in human chondrocytes: an *in vitro* study

Chen Liang, Xiong Yan, Wang Ziming, Wang Aimin (Department of Orthopedics, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of different exogenous decorin (DCN) levels on matrix metalloproteases 13 (MMP13) gene expression in normal human articular chondrocytes primarily cultured *in vitro*. **Methods** Human hyaline chondrocytes were isolated and cultured with trypsin and type 2 collagenase in combination with digestion to observe their morphology. The cells were identified with Alcian blue staining and type 2 collagen immunohistochemistry. Effect of different exogenous DCN levels (0, 2.5, 25 and 250 μg/ml) on expression of MMP13 and collagen X in hyaline chondrocytes was detected by RT-PCR. **Results** The cultured normal hyaline chondrocytes were polygonal and flat in shape, and turned into polygonal and star in shape in 5 d after they were cultured with another medium and closely arranged as a "stone shop". Alcian blue staining and type 2 collagen immunohistochemistry were positive for primarily cultured hyaline chondrocytes. The expression of collagen X was significantly decreased (0.78±0.03, 0.71±0.04, 0.63±0.01) with the increasing exogenous DCN level (0 to 250 μg/ml) in a dose-dependent manner ($P<0.01$), while the MMP13 expression significantly decreased (0.85±0.02) at the highest DCN level (250 μg/ml, $P<0.01$). **Conclusion** Exogenous DCN inhibits expression of collagen X in hyaline chondrocytes in a dose-dependent manner and high DCN level (250 μg/ml) plays a significant role in inhibiting the expression of MMP13, which indicates that exogenous DCN inhibits the MMP13 expression in hyaline chondrocytes by suppressing their hypertrophy.

[**Key words**] hyaline chondrocytes; decorin; extracellular matrix; gene expression

Supported by the Innovative Foundation of Third military Medical University (40116-1193). Corresponding author: Wang Aimin, E-mail: trauma2@163.com

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种以关节软骨的破坏,软骨下骨改建和滑膜炎为特征的导致关节紊乱的慢性退行性疾病[1]。目前的治疗主要集中在缓解症状,包括非药物、药理、外科手术,但都不能控制疾病的进展[2]。研究表明,软骨基质的合成代谢和分解代谢的不平衡、细胞外基质的分解代谢增强导致软骨的

[基金项目] 第三军医大学科研创新基金(40116-1193)
[通信作者] 王爱民,E-mail:trauma2@163.com

丢失在骨关节炎起着重要作用[3]。核心蛋白聚糖(decorin, DCN)是小的富含亮氨酸的蛋白聚糖,是小分子蛋白聚糖家族(small leucine rich proteoglycans, SLRP)中的一员,广泛存在于Ⅰ型和Ⅱ型胶原的基质中[4],参与发挥重要的生物学功能,如基质的组构,调控细胞的黏附、迁移和增殖[5-7]。DCN的分解片段在退化的关节软骨中明显增多[8]。在骨关节炎早期,关节软骨的DCN的基因表达受到抑制[9];而在骨性关节炎晚期,关节软骨中的DCN含量减少而DCN的转录和翻译水平上调[10]。这些结果提示,DCN对骨性关节炎的发生、发展有重要作用。目前认为细胞外基质的分解代谢增强是导致骨关节炎的重要因素,但是DCN对软骨细胞外基质的分解代谢影响还不清楚,故本实验通过对人正常软骨细胞进行体外原代培养,观察不同浓度的外源性DCN对软骨细胞基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteases 13, MMP13)及软骨细胞肥大化(Collagen X)的基因表达的影响,探讨DCN影响软骨细胞外基质的分解代谢的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本院所关节四肢外科2011年1-5月因股骨颈骨折施行人工全髋关节置换术中切除,全层关节软骨标本5例,患者年龄63~87(77.2±9.01)岁,其中男性2例,女性3例。标本获取得到医院伦理委员会批准,并经患者本人知情同意。

1.2 人关节软骨的细胞分离与培养

采用胰蛋白酶和Ⅱ型胶原酶结合消化法分离培养人透明软骨细胞。将获得的关节软骨组织,在无菌条件下浸入PBS液漂洗数次,2.5 g/L胰蛋白酶(Gibco公司)消化15 min后,再次去除关节软骨周围多余组织。PBS液漂洗后剪碎关节软骨组织呈1 mm^3碎块,用含10%胎牛血清的0.2% Ⅱ型胶原酶(Gibco公司)消化15~20 h,消化后将细胞悬液以150目不锈钢滤网过滤,1 000 r/min离心5 min,PBS液漂洗再离心后台盼蓝染色计数,以5.5×10^5/孔接种于盛有适量DMEM/F12(其中含10%胎牛血清,100 U/ml青霉素,100 μg/ml链霉素)培养液的12孔细胞培养孔板,置于CO_2培养箱中培养(温度37 ℃,饱和湿度,5% CO_2)。24 h后视细胞贴壁情况更换培养液,以后每2~3天换液1次。倒置显微镜下观察细胞生长情况。培养细胞至80%融合时(第5天),分别加入外源性DCN(Sigma公司)溶解液,使其培养液浓度为0(对照组)、2.5(A组)、25(B组)、250 μg/ml(C组),24 h后备用。

1.3 人关节软骨细胞体外培养鉴定

1.3.1 阿尔新蓝染色 取培养5 d原代软骨细胞,PBS洗2遍,4%多聚甲醛固定20 min,PBS洗2遍,1%阿尔新蓝染液染色15 min,蒸馏水冲洗。

1.3.2 Ⅱ型胶原免疫组化 取分离提纯计数后的原代软骨细胞种在可放入12孔板的盖玻片上,5 d后取出固定,固定方法同阿尔新蓝染色。正常山羊血清封闭液,室温封闭20 min。滴加1∶50稀释的Ⅱ型胶原单克隆抗体(Sigma公司),4 ℃孵育过夜。滴加生物素化二抗,室温孵育1 h。滴加SABC试剂,室温20 min。DAB显色剂显色,显微镜观察控制染色时间,脱水,封片。

1.4 原代软骨细胞的RNA的提取及反转录

在无RNA酶污染条件下,分别用Trizol提取培养6 d原代软骨细胞RNA,按照TaKaRa公司试剂盒说明进行反转录和扩增,扩增条件:94 ℃变性40 s,58 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,30次循环,最后72 ℃延伸10 min。

1.5 实时定量PCR检测

使用MX3000P仪进行,实时定量PCR反应试剂盒为TaKaRa公司提供(SYBR™ Premix Ex *Taq*™ Kit,日本)[11]。检测对照组和各实验组Collagen X、MMP 13的mRNA表达。引物均由Invitrogen公司合成(表1)。扩增条件为95 ℃ 120 s;95 ℃ 20 s(变性),57℃ 30 s(退火),72 ℃ 30 s(延伸)45个循环;95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s。PCR反应体系配制及扩增条件设置参照定量PCR反应试剂盒说明书进行,所有反应做3个复孔。MX3000P仪自动给出熔解曲线分析,得到扩增曲线、熔解曲线和样本的循环阈值(cycle threshold, Ct)值。GAPDH为内参基因。

表1 定量PCR引物序列

名称	引物序列	基因号
GAPDH 正义链	5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′	NM_002046.3
反义链	5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′	NM_002046.3
Col10a1 正义链	5′-TCCAATGTGAGTACACACAGAG-3′	NM_000493
反义链	5′-ACTAGAAATTCAAGAGAGGCTT-3′	NM_000493
MMP13 正义链	5′-GAATTAAGGAGCATGGCGA-3′	NM_002427
反义链	5′-GGATGTTTAGGGTTGGGGT-3′	NM_002427

1.6 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行独立样本t检验。

2 结果

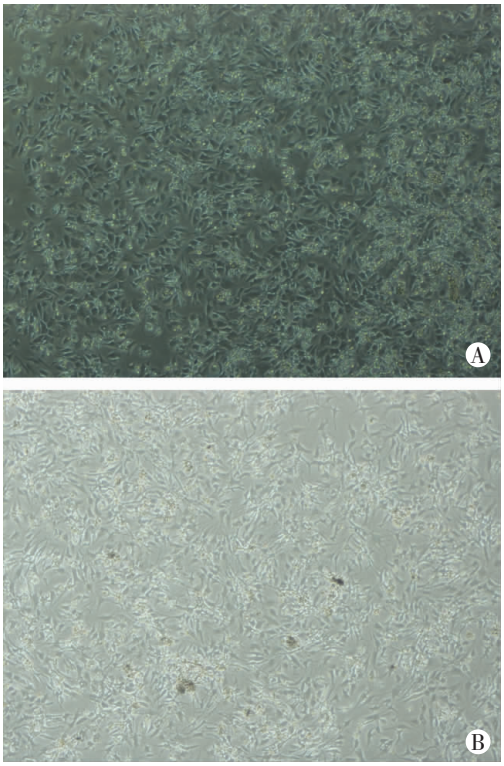
2.1 形态学观察

刚分离下来的原代软骨细胞大小均一,呈折光性较强的球形。原代软骨细胞通常在24 h陆续贴壁,原代软骨细胞贴壁后,呈多角型、扁平状,细胞质丰富,圆形的细胞核居细胞中央,有2~3个清晰可见的核仁,部分区域软骨细胞呈集落生长。原代软骨细胞经2~3次换液培养5 d时,细胞呈多边形、星形等,排列紧密呈"铺石板"样,第7天后出现去分化现象,细胞逐渐演变成长梭形,有数个指状突起,呈成纤维形态(图1)。

2.2 阿尔新蓝染色及Ⅱ型胶原免疫组化

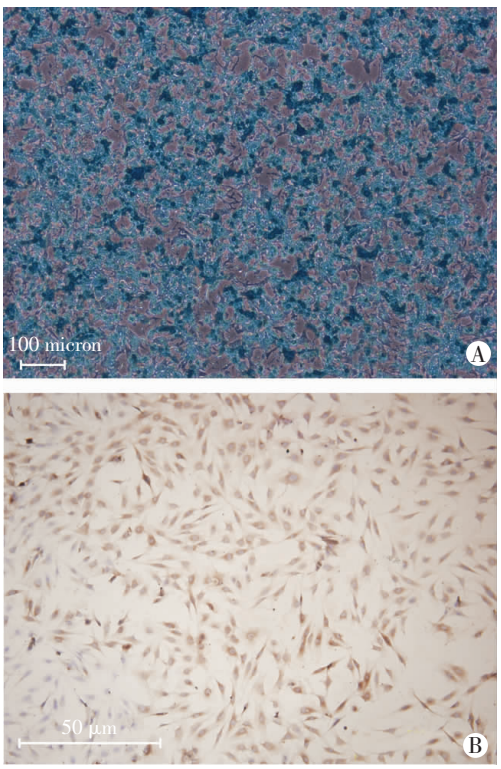
阿尔新蓝染色法及Ⅱ型胶原免疫组化法对体外培养的原代软骨细胞进行染色,发现阿尔新蓝染色及Ⅱ型胶原免疫组化染色均为阳性。正常软骨细胞单层生长区和多层生长区域阿

尔新蓝色细胞染色呈浅蓝色,集落样生长区域和多层生长区域的中心部分细胞外基质呈蓝染,Ⅱ型胶原免疫着色为浓棕黄色,呈阳性,证实其透明软骨细胞特性(图 2)。



A:培养 5 d;B:培养 7 d

图 1 倒置相差显微镜观察透明软骨细胞的培养(×100)



A:阿尔新蓝染色;B:Ⅱ型胶原免疫组化

图 2 倒置相差显微镜观察体外培养的原代软骨细胞(×100)

2.3 实时定量 PCR 检测原代软骨细胞相关基因 mRNA表达

随着外源性 DCN 浓度的不断增大(0、2.5、25、250 μg/ml),Collagen X 的表达明显降低($P<0.01$)且成剂量依赖关系(A 组为 0.78 ± 0.03,B 组为 0.71 ± 0.04,C 组为 0.63 ± 0.01),MMP13 的表达则在 DCN 高浓度组(250 μg/ml)时明显降低(0.85 ± 0.02,$P<0.01$)。

3 讨论

关节软骨属于透明软骨,自身没有血供,无淋巴引流,无神经分布,作为承重材料,能承受冲击力和剪切力。软骨细胞是关节软骨唯一的细胞成分,这些细胞合成并维持着细胞外基质,包括胶原蛋白和蛋白聚糖。胶原蛋白占软骨干质量的 50% ~60%,构成网状结构维持着软骨的形状。Ⅱ型胶原是软骨主要的胶原蛋白,占全部胶原蛋白的 90% ~98%,提供了软骨组织的抗拉强度。蛋白聚糖主要是软骨聚集蛋白聚糖(aggrecan),能在软骨基质维持大量水分子,使软骨组织能够抵御压力和分散负荷[12]。软骨细胞在骨关节炎软骨表现为异常表型并且积极地合成多种软骨降解酶,如 MMPs 和 ADAMTSs[13-14]。在软骨,蛋白聚糖的丢失是可以逆转的,但胶原的降解是不可逆的,这就意味着一旦胶原降解,软骨不能修复。MMP13 是软骨中主要胶原酶,而且同时具有降解蛋白聚糖的能力[15]。因此,对这种酶的调控在骨关节炎的预防和治疗上都显得非常重要。本实验发现:外源性 DCN 在高浓度组(250 μg/ml)能明显抑制 MMP13 的基因表达,这就为骨关节炎的预防和延缓疾病进程提供了新的策略和理论依据;另一方面,外源性 DCN 在中低浓度组(25、2.5 μg/ml)虽然不能明显抑制 MMP13 的表达,但却可以明显抑制 Collagen X 的表达(Collagen X 是软骨细胞肥大的标准标记[16]),说明在中低浓度的外源性 DCN 具有潜在骨关节炎保护作用。

DCN 通过其核心蛋白能与转化生长因子 $\beta_{1,2,3}$(TGF-$\beta_{1,2,3}$)结合[17],并且抑制其活性[18]。在正常关节软骨,只有很少有活性的 TGF-β,而在骨性关节炎时 TGF-β 增多[12]。作为保护因素,TGF-β 不仅能促进蛋白多糖的合成,而且还能抵消白细胞介素-1β(IL-1β)介导的蛋白多糖合成抑制[19],然而 TGF-β 在关节组织中的这种保护作用呈年龄依赖性[20]。通过进一步研究发现:TGF-β 通过激活 ALK5(activin-like kinase 5)受体和下游 SMAD2/3 信号通路,抑制软骨细胞肥大而发挥对关节软骨的保护作用;另一方面,TGF-β 作用于 ALK1(activin-like kinase 1)受体并激活下游 SMAD1,

5,8信号通路可诱导软骨细胞肥大和合成降解酶(如MMP13)[21]。有意义的是ALK1受体的表达不随老龄化和骨性关节炎减少,而有关节软骨保护作用的ALK5受体表达却在不断减少[22],从而显示了TGF-β在骨关节炎的主导性致病作用[23]。而DCN作为TGF-β天然的拮抗剂,为本实验提供了理论依据。

本实验所使用软骨细胞均是原代培养7 d以内的透明软骨细胞,最大限度地减少了单层培养的软骨细胞去分化带来的影响[24]。本实验发现:外源性DCN明显抑制透明软骨细胞的Collagen X的基因表达且成剂量依赖关系,对MMP13的基因表达在高浓度组(250 μg/ml)时明显抑制。其可能机制为通过DCN与TGF-β结合,减少了透明软骨中TGF-β激活的ALK1受体和下游SMAD1,5,8信号通路,从而抑制软骨细胞肥大,故Collagen X和MMP13的基因表达减少。表明外源性DCN可能通过抑制透明软骨细胞肥大从而抑制软骨细胞MMP13的表达,这一研究结果为骨关节炎的预防和延缓疾病进程提供了新的策略和理论依据。

参考文献:

[1] Alcaraz M J, Megias J, Garcia-Arnandis I, *et al*. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(1): 13 - 21.

[2] Bijlsma J W, Berenbaum F, Lafeber F P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice[J]. Lancet, 2011, 377(9783): 2115 - 2126.

[3] Loeser R F. Articular cartilage nuclear receptors: an emerging target for treatment of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(7): 829 - 831.

[4] Bianco P, Fisher L W, Young M F, *et al*. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues [J]. J Histochem Cytochem, 1990, 38(11): 1549 - 1563.

[5] Gallagher J T. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone [J]. Curr Opin Cell Biol, 1989, 1(6): 1201 - 1218.

[6] Kresse H, Hausser H, Schonherr E. Small proteoglycans[J]. Experientia, 1993, 49(5): 403 - 416.

[7] Iozzo R V. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins [J]. J Biol Chem, 1999, 274(27): 18843 - 18846.

[8] Melrose J, Fuller E S, Roughley P J, *et al*. Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R79.

[9] Lorenz H, Richter W. Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage [J]. Prog Histochem Cytochem, 2006, 40(3): 135 - 163.

[10] Bock H C, Michaeli P, Bode C, *et al*. The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2001, 9(7): 654 - 663.

[11] 周锐, 苏楠, 李灿, 等. 小鼠胫骨骨皮质损伤修复过程中成纤维生长因子受体的表达[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 1024 - 1027.

[12] Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J P, *et al*. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2008, 22(2): 351 - 384.

[13] Wang X, Manner P A, Horner A, *et al*. Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(12): 963 - 973.

[14] Song R H, Tortorella M D, Malfait A M, *et al*. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5 [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(2): 575 - 585.

[15] Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1824(1): 133 - 145.

[16] van-der-Kraan P M, van-den-Berg W B. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2012, 20(3): 223 - 232.

[17] Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen L M, *et al*. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta[J]. Biochem J, 1994, 302(Pt 2): 527 - 534.

[18] Yamaguchi Y, Mann D M, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin [J]. Nature, 1990, 346(6281): 281 - 284.

[19] Lum Z P, Hakala B E, Mort J S, *et al*. Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta [J]. J Cell Physiol, 1996, 166(2): 351 - 359.

[20] Scharstuhl A, van-Beuningen H M, Vitters E L, *et al*. Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice[J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(12): 1095 - 1098.

[21] van-der-Kraan P M, Blaney-Davidson E N, Blom A, *et al*. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(12): 1539 - 1545.

[22] Blaney-Davidson E N, Remst D F, Vitters E L, *et al*. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice[J]. J Immunol, 2009, 182(12): 7937 - 7945.

[23] van-den-Berg W B. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(4): 338 - 341.

[24] Schulze-Tanzil G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair[J]. Ann Anat, 2009, 191(4): 325 - 338.

(收稿:2012-01-12;修回:2012-02-06)

(编辑 龙 亮)