论著

文章编号:1000-5404(2012)16-1600-04

共培养下后交叉韧带成纤维细胞中MMPs的基因表达

王春莉[1],梅 虎[1],谢 静[1],蒋稼欢[1],尹 琳[1],陈 诚[3],符纯锋[3],KL Paul Sung[1,2] (400044 重庆,重庆大学生物工程学院国家"111计划"基地[1];9209320412 美国 圣迭亚哥,美国加州大学圣迭亚哥分校骨科与生物工程系[2];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科[3])

[摘要] **目的** 研究后交叉韧带(posterior cruciate ligament, PCL)成纤维细胞与滑膜细胞共培养下,2种细胞之间的交流对PCL成纤维细胞中基质金属蛋白酶MMP-1、2、3表达及活性的影响。**方法** 分为共培养组和单培养组:①用显微镜观察共培养24 h后细胞的活性和迁移率。②分别培养6 h后,提取总RNA,逆转录PCR;实时荧光定量PCR对人后交叉韧带成纤维细胞MMP-1、2、3基因的表达进行半定量和定量分析。③共培养处理1、2、3 d后收集培养上清液,用明胶酶谱法检测MMP-2的活性。**结果** 共培养使PCL细胞和滑膜细胞较单层细胞培养迁移率分别增高了(43.1±0.1)%和(76.2±0.2)%($P<0.01$)。与单培养相比,共培养组明显增加了MMP-2的基因表达,但降低了MMP-1、3的基因表达。酶谱结果表明共培养增加了MMP-2活性($P<0.05$)。**结论** 共培养能够促进细胞的迁移以及调节细胞中MMP-1、2、3的表达情况。

[关键词] 后交叉韧带;滑膜;共培养;基质金属蛋白酶

[中图法分类号] R322.73;R329-33;R394.2 [文献标志码] A

Matrix metalloproteinase expression in posterior cruciate ligament fibroblasts co-cultured with synovial cells

Wang Chunli[1], Mei Hu[1], Xie Jing[1], Jiang Jiahuan[1], Yin Lin[1], Chen Cheng[3], Fu Chunfeng[3], KL Paul Sung[1,2] ([1]"111" Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China; [2]Department of Orthopedics and Bioengineering, University of California, San Diego, CA 9209320412, USA; [3]Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2 and MMP-3 in posterior cruciate ligament (PCL) fibroblasts co-cultured with synovial cells. **Methods** Human PCL fibroblasts were co-cultured with synovial cells and the monocultures of human PCL fibroblasts and synovial cells were assigned as control. Cell viability and migration were observed by microscopy after 24 h incubation. Total RNA was isolated after 6 h incubation and the expression of MMPs was analyzed by semi-quantitative PCR and quantitative real-time PCR. Gelatin zymography was applied to detect the MMP-2 activity in culture supernatants collected at 1, 2 and 3 d after incubation. **Results** As compared with the monocultures, the migration rates of the human PCL fibroblasts and synovial cells in the co-culture increased by (43.1±0.1)% and (76.2±0.2)%, respectively ($P<0.01$). The mRNA expression levels of MMP-1 and MMP-3 in the PCL fibroblasts co-cultured with synovial cells were lower than those in the PCL fibroblasts monoculture. However, PCL fibroblasts-synovial cells interaction significantly increased the expression and activity of MMP-2 in the PCL fibroblasts ($P<0.05$). **Conclusion** The differential expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-3 in human PCL fibroblasts co-cultured with synovial cells indicates that cell-cell interaction and cross-talking are associated with PCL fibroblasts wound healing and have potential clinical value for curing injured PCL.

[**Key words**] posterior cruciate ligament; synovial; co-culture; matrix metalloproteinase

Supported by Innovation and Attracting Talents Program for College and University ("111" Project, B06023) and the Tackling Project for Sci & Tech Research of Chongqing (CSTC2008AB5). Corresponding author: KL Paul Sung, E-mail: klpsung@bioeng.ucsd.edu

[基金项目] 高等学校学科创新引智计划(国家"111计划")(B06023);重庆市科技攻关项目(CSTC2008AB5)

[通信作者] KL Paul Sung,E-mail: klpsung@bioeng.ucsd.edu

后交叉韧带(posterior cruciate ligament, PCL)是稳定膝关节的重要结构[1]。目前PCL损伤及修复机制尚不清楚,其损伤治疗基本上都依赖于临床重塑手术[2],然而60%以上患者对手术结果并不满意[1]。细胞外基质的过快降解是导致韧带自我修复困难最主要的原因之一。细胞外基质的降解主要由基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)调控[3]。MMPs是属于锌离子依赖性酶家族成员,其催化区含有1个Zn^{2+}结合部位。该家族成员几乎能够降解细胞外基质中的所有蛋白成分,按照其作用底物特异性主要分为三大类:胶原酶、明胶酶、基质溶解素,其代表成员依次为MMP-1、MMP-2、MMP-3[4]。MMPs在机械损伤后的组织愈合、重建中起核心作用[5],韧带组织损伤后过量MMPs的积累是韧带组织损伤后不能自我修复的主要原因。因此,对PCL进行MMPs分子机制的研究对摸索PCL损伤修复机制是非常重要的。由于PCL由滑膜包裹[6],为了最大限度地模拟体内微环境,首要任务是建立PCL成纤维细胞与滑膜细胞共培养体系,研究共培养条件下细胞之间的交流对MMPs表达的影响,为后续更深入的分子机制研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

2009年10月至2011年11月重庆医科大学附属第一医院骨科收治4例因外伤行下肢截肢治疗患者,年龄25~42岁,男女各2例。经医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。无菌条件下取出截肢患者正常的后交叉韧带组织和滑膜组织($n\geq4$),用含有双抗的1×PBS多次冲洗,解剖刀剔除组织表面多余的外周组织,用眼科剪将组织剪成2 mm×2 mm×2 mm组织块,置于含有DMEM液(含10%胎牛血清、50 μg/ml抗坏血酸)的培养瓶中(PCL:低糖DMEM液;滑膜:高糖DMEM液),在37 ℃、5% CO_2的孵育箱内进行细胞培养,待细胞长满瓶底部后,将组织块移到新的培养瓶中,换以10%胎牛血清的DMEM继续培养,而剩余的细胞继续长满瓶底,冻存、传代以备用于实验。实验中的细胞一般是在传代到2~5代时使用。

1.2 共培养(co-culture)及细胞形态学观察

参照文献[7-8],将PCL细胞以1×10^5/L种于6孔板中,1×10^4/L的滑膜细胞种于Tanswell中;或滑膜细胞种于6孔板中,PCL细胞种于Transwell中。置于5% CO_2、37 ℃细胞孵箱中培养12 h后换液,待细胞贴壁后,用含2%胎牛血清的DMEM饥饿细胞24 h。将种有滑膜细胞或PCL细胞的Transwell套入种有PCL细胞或滑膜细胞的6孔板中形成Transwell上、下室使细胞在其中共培养。将种于6孔板中共培养和单培养的PCL培养6 h后提取其总RNA进行实验。倒置相差显微镜观察细胞大小、形态、生长特点及排列方式等。

1.3 细胞划痕愈合实验

参照文献[9],实验分为2大组,每大组分为2小组。PCL细胞组:①PCL细胞单培养;②PCL细胞与滑膜细胞共培养(PCL细胞培养于Transwell下室,滑膜细胞培养于Transwell上室)。滑膜细胞组:①滑膜细胞单培养;②滑膜细胞细胞与PCL共培养(滑膜细胞培养于Transwell下室,PCL细胞培养于Transwell上室)。用1 ml无菌枪头分别在PCL细胞组与滑膜细胞组中的单培养组和共培养组的6孔板底部长满的细胞上迅速而轻轻地划1道竖痕,PBS冲洗去掉脱落的细胞,继续培养。显微镜下观察划痕修复的过程,于0、24 h拍照记录,并分别测量单培养组和共培养组在0、24 h的相对痕距,比较不同组细胞迁移率的差异。

1.4 常规聚合酶链式反应(semi-quantitative PCR)

PCR扩增试剂由MBI公司提供,PCR扩增仪由Bio-Rad公司提供。反应体系为25 μl,引物序列见表1。Master Mix 12.5 μl,Primer正负引物各1 μl,cDNA 1 μl,RNase-free water 9.5 μl。解链94 ℃,30 s;退火58 ℃,30 s;延伸72 ℃,30 s;循环数28~35个,2%琼脂糖电泳,紫外光下获得电泳结果。

表1 逆转录PCR和实时定量PCR中基因的引物序列

基因	上游	下游	引物片段
GAPDH	5′-TCATAGACAAGATGGTGAAGGTC-3′	5′-TGGGTAGAGTCATACTGGAACAT-3′	138 bp
MMP-1	5′-GGCTGAAAGTGACTGGGAAACC-3′	5′-TGCTCTTGGCAAATCTGGCGTG-3′	170 bp
MMP-2	5′-ACCGGGATAAGAAGTATGGATT-3′	5′-GTCATCATCGTAGTTGGTTGTG-3′	179 bp
MMP-3	5′-GACAAAGGATACAACAGGGAC-3′	5′-TGAGTGAGTGATAGAGTGGG-3′	122 bp

1.5 实时荧光定量PCR

PCR扩增试剂为TaKaRa公司提供的200次装试剂盒,所用引物同1.4。基本步骤:SYBR Green 12.5 μl,Primer各1 μl,cDNA 1 μl,RNase-free water 9.5 μl。解链94 ℃,15 s;退火58 ℃,15 s;延伸72 ℃,15 s;循环数控制在40个循环。本实验中扩增效率最高达96.8%,最低为94.0%。

1.6 明胶酶谱检测MMP-2的活性

分别在单培养和共培养条件下,在培养(1% FBS DMEM)12、24、48、72 h收集细胞培养上清液,样品与上样缓冲液1∶1混合。110 V恒压条件下,在含有10%明胶的SDS-PAGE中电泳150 min,然后将凝胶予以洗脱液(2.5% Triton X-100)震荡洗脱20 min×3次;37 ℃环境下孵育液(50 mmol/L Tris-HCl,1 μmol/L NaCl, 5 mmol/L $CaCl_2$,0.02% NaN_3, pH 7.6)孵育16 h。考马斯亮蓝R-250将凝胶染色1 h后,脱色液(30%甲醇,10%乙酸)脱色至透明条带清晰。用凝胶成像系统GS-800扫描凝胶,Quantity One软件测量各条带的光密度值,进行相对定量。

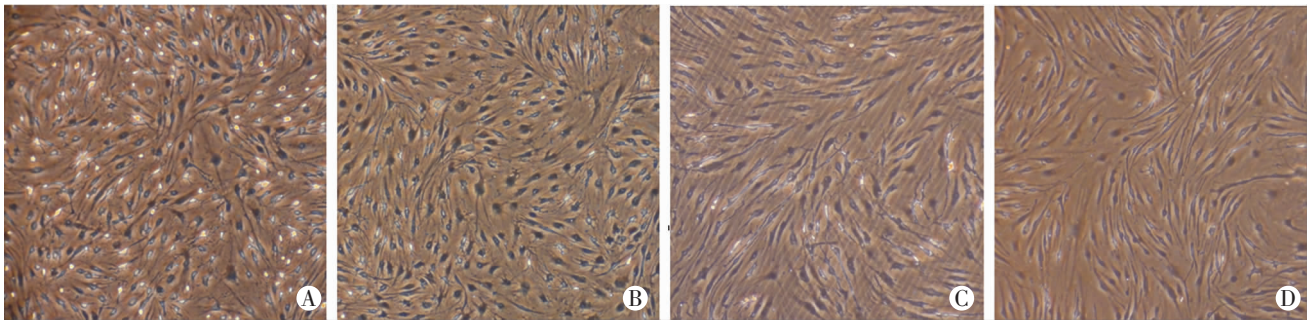
1.7 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

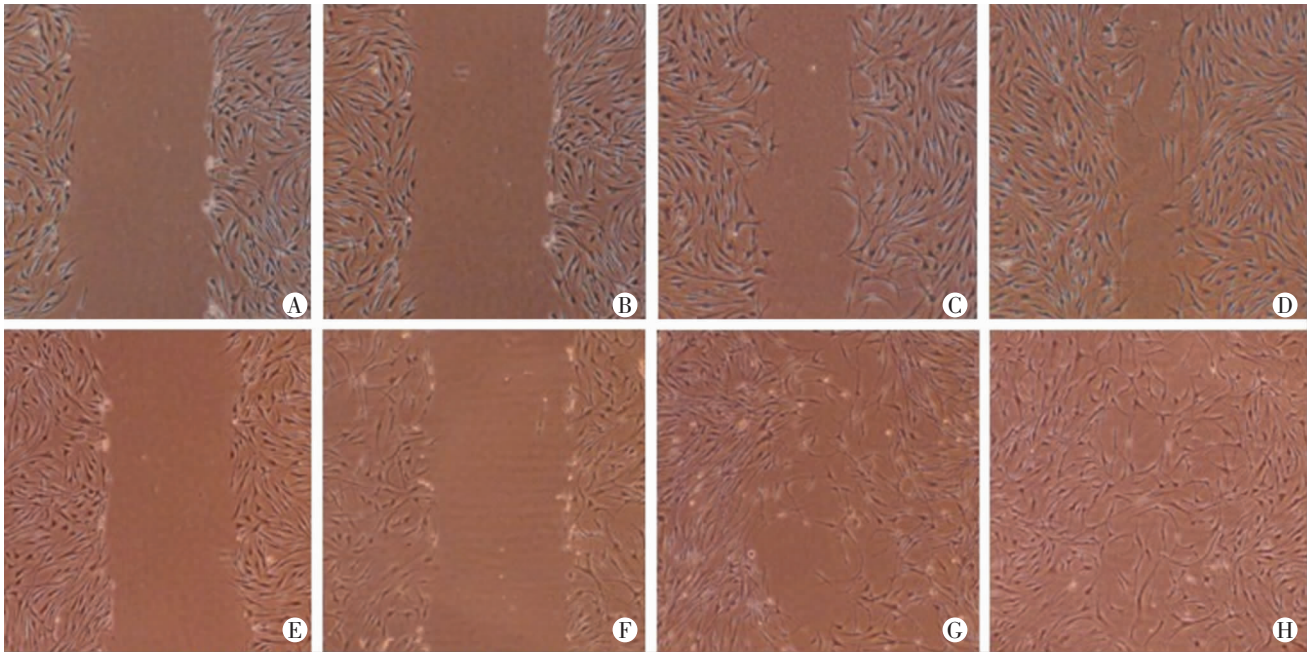
2.1 单培养和共培养下细胞形态观察

相比单细胞培养,PCL和滑膜细胞在共培养环境下,保持了更好的细胞状态或活性。单培养组在培养液营养不足时,细胞开始出现变圆的亮点,表明细胞的贴壁能力已经开始下降;而共培养组的细胞即使在培养液营养不足的条件下,细胞的贴壁依旧紧密,核大呈卵圆形位于细胞中央(图1)。说明,在共培养的条件下,PCL和SC细胞有交流且相互影响,维持细胞的正常形状。



A:PCL细胞单培养;B:PCL细胞共培养;C:滑膜细胞单培养;D:滑膜细胞共培养

图1 饥饿培养24 h后单培养和共培养下细胞形态观察 (倒置显微镜 ×40)



A:PCL细胞单培养0 h;B:PCL细胞共培养0 h;C:PCL细胞单培养24 h;D:PCL细胞共培养24 h;E:滑膜细胞单培养0 h;F:滑膜细胞共培养0 h;G:滑膜细胞单培养24 h;H:滑膜细胞共培养24 h

图2 单培养和共培养条件下的PCL细胞和滑膜细胞的迁移情况(倒置显微镜 ×40)

2.2 共培养对PCL和滑膜细胞迁移的影响

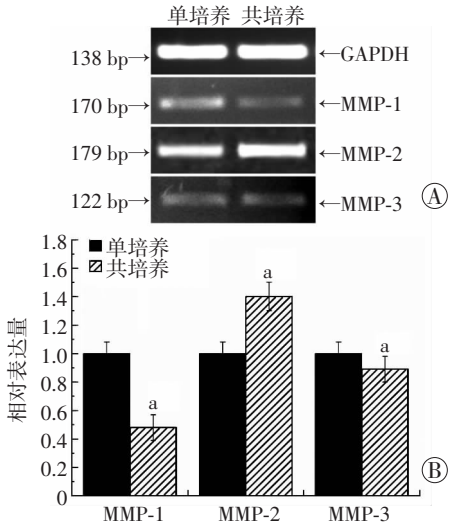
共培养环境明显诱导了PCL细胞的迁移。在PCL细胞中,Transwell上室共培养的滑膜细胞使Transwell下室的PCL细胞迁移率较单层PCL细胞培养增加了(43.1±0.1)%($P<0.01$,图2A);在滑膜细胞中,Transwell上室共培养的PCL细胞使下室的滑膜细胞迁移率较其单培养增加了(76.2±0.2)%($P<0.01$,图2B)。

2.3 共培养下MMP-1、2、3的基因表达

半定量PCR(图3A)结果显示:在磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)表达相对稳定的情况下,相比单培养,共培养增加MMP-2 mRNA的表达,但降低了MMP-1、MMP-3 mRNA的表达。相对荧光定量PCR(图3B)结果也显示出相同的表达趋势:与单培养相比较,共培养组PCL细胞中MMP-2增加了1.4倍,但MMP-1、3却分别降低了48%、89%(均$P<0.05$)。

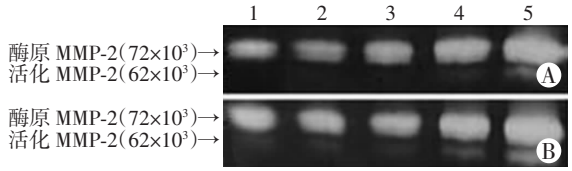
2.4 明胶酶谱结果

与单培养组相比,共培养组增加了MMP-2的活性($P<0.05$);且在共培养下,MMP-2的活化程度更高(图4、表2)。



A:半定量PCR; B:实时荧光定量PCR a:$P<0.05$,与单培养组比较

图3 单培养和共培养6 h PCL细胞中MMP-1、2、3的表达



1：0 h；2：12 h；3：24 h；4：48 h；5：72 h；A：单培养；B：共培养

图 4 明胶酶谱法检测单培养与共培养 PCL 细胞中 MMP-2 活性

表 2 共培养和单培养各时间点 PCL 细胞中 MMP-2 的表达

($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
单培养组	1.0±0.1	1.4±0.2[a]	2.1±0.2[a]	3.0±0.1[a]	4.5±0.2
共培养组	1.0±0.1	1.5±0.3	2.2±0.2	3.6±0.3	5.3±0.4

a：$P<0.05$，与共培养组比较

3 讨论

PCL 自我修复能力较差的原因尚不明确。韧带研究现状表明：韧带组织损伤修复是一个非常复杂的过程，且该过程受到多方面因素的影响[10]，但其组织周围细胞外基质(ECM)的破坏是韧带损伤修复失败最主要的因素。Tang 等[11]通过检测大鼠前交叉韧带损伤模型关节腔内的 MMP-2，证实了 MMP-2 大量积累对组织损伤修复不利。Zhang 等[12]通过检测 MMPs 整个家族成员在前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)和内侧副韧带(medial collateral ligament, MCL)中的差异性表达，进一步证实了 MMPs 的高表达是 ACL 不能像 MCL 那样自我修复的主要原因。

细胞共培养是一种特殊的体外培养方法，能够最大限度地模拟体内微环境，维持体内性状，观察细胞之间的相互交流在调控细胞功能所起到的作用。在膝关节内，PCL 细胞与所覆其表面滑膜细胞之间也存在十分密切的沟通，体外细胞单培养实验将细胞之间的交流切断并不能完全满足体内复杂的微环境。因此，为了更好地模拟体内微环境，本研究建立了 PCL 与滑膜细胞共培养体系，发现共培养体系较单细胞培养保持了更好的细胞生长状态，并且 Transwell 上室共培养的 PCL 细胞或滑膜细胞对下室的滑膜细胞或 PCL 细胞迁移有明显的促进作用。表明正常状态下的 PCL 细胞和滑膜细胞之间存在密切的交流。PCL 和滑膜细胞之间的相互交流对 PCL 损伤修复是否有影响对体外研究 PCL 损伤修复过程的机制非常重要。本研究检测共培养条件下 PCL 细胞中影响组织修复关键酶之一 MMPs 的基因表达情况，发现共培养能够调节 PCL 细胞中 MMP-1、2、3 的表达，与文献报道一致：Sawicki 等[13]共培养角质细胞与成纤维细胞，发现共培养条件下上清液中 MMP-2、9 的表达增高；Tandara 等[14]共培养角质细胞与成纤维细胞，发现共培养也影响了上清液中 MMPs 和 TIMPs 的表达。提示细胞之间的相互作用在损伤修复过程中起着非常重要的作用。根据非接触式共培养的特点推测：在共培养环境下，细胞通过旁分泌的形式分泌了某些细胞因子诱导另一种细胞的迁移速度以及调节 MMP-1、2、3 的基因表达。

本实验创新地采用共培养的方法检测了 PCL 细胞中 MMP-1、2、3 的表达情况，发现 PCL 细胞与滑膜细胞之间的相互交流影响了 MMP-1、2、3 的表达，为后续探索 PCL 损伤修复的机制及治疗方法提供理论依据。

参考文献：

[1] Grassmayr M J, Parker D A, Coolican M R, *et al*. Posterior cruciate ligament deficiency: biomechanical and biological consequences and the outcomes of conservative treatment. A systematic review [J]. J Sci Med Sport, 2008, 11(5): 433-443

[2] Kim Y M, Lee C A, Matava M J. Clinical results of arthroscopic single-bundle transtibial posterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review [J]. Am J Sports Med, 2011, 39(2): 425-434.

[3] Gill S E, Parks W C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(6/7): 1334-1347.

[4] Patruno A, Pesce M, Marrone A, *et al*. Activity of matrix metallo proteinases (MMPs) and the tissue inhibitor of MMP (TIMP)-1 in electromagnetic field-exposed THP-1 cells[J]. J Cell Physiol, 2012, 277(6): 2767-2774.

[5] Foos M J, Hickox J R, Mansour P G, *et al*. Expression of matrix metalloprotease and tissue inhibitor of metalloprotease genes in human anterior cruciate ligament[J]. J Orthop Res, 2001, 19(4): 642-649.

[6] Mariani P P, Becker R, Rihn J, *et al*. Surgical treatment of posterior cruciate ligament and posterolateral corner injuries. An anatomical, biomechanical and clinical review [J]. Knee, 2003,10(4): 311-324.

[7] 宋明宝，于学军，朱光旭，等. 双层共培养模型中缝隙连接在内皮细胞调节平滑肌细胞增殖能力中的作用[J]. 第三军医大学学报，2009, 31(4): 285-289.

[8] 张亚兰，朱静，田杰，等. 骨髓间充质干细胞与胶质瘤细胞非接触共培养后相关生物学特性分析[J]. 第三军医大学学报，2010, 32(7): 630-633.

[9] Wang Y, Tang Z, Xue R, *et al*. Differential response to $CoCl_2$-stimulated hypoxia on HIF-1α, VEGF, and MMP-2 expression in ligament cells [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 360(1/2): 235-242.

[10] Yoshida M, Fujii K. Differences in cellular properties and responses to growth factors between human ACL and MCL cells [J]. J Orthop Sci, 1999, 4(4): 293-298.

[11] Tang Z, Yang L, Wang Y, *et al*. Contributions of different intraarticular tissues to the acute phase elevation of synovial fluid MMP-2 following rat ACL rupture [J]. J Orthop Res, 2009, 27(2): 243-248.

[12] Zhang J, Yang L, Tang Z, *et al*. Expression of MMPs and TIMPs family in human ACL and MCL fibroblasts [J]. Connect Tissue Res, 2009, 50(1): 7-13.

[13] Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, *et al*. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors [J]. Mol Cell Biochem, 2005, 269(1/2): 209-216.

[14] Tandara A A, Mustoe T A. MMP- and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts--impact of coculture and hydration [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2011, 64(1): 108-116.

(**收稿**：2012-02-20；**修回**：2012-03-14)

(编辑 龙 亮)