文章编号:1000-5404(2012)17-1741-04

论著

MAPK和NF-κB通路抑制剂对IL-1β诱导滑膜细胞MMP-2活性的影响

陈荣富[1],黄 伟[1],谢 静[2],梁 熙[1],KL Paul Sung[2,3],王春莉[2],符纯锋[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科[1];400044 重庆,重庆大学生物工程学院与国家"111计划"基地[2];CA 92093-0412 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[3])

[摘要] **目的** 研究白介素-1β(Interleukin-1β, IL-1β)对人膝关节滑膜细胞基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2, MMP-2)活性的影响及MAPK和NF-κB信号通路抑制剂对该过程的影响。**方法** 用不同浓度的IL-1β处理体外培养的滑膜细胞72 h,明胶酶谱法检测细胞培养液中MMP-2的活性;选取10 ng/ml的IL-1β单独或分别与4种信号通路抑制剂(NF-κB抑制剂Bay11-7082,MAPK抑制剂SB203580、PD98059和SP600125)处理滑膜细胞,处理后12、24、48、72 h检测MMP-2的活性。**结果** IL-1β随浓度和处理时间的增加明显上调滑膜细胞MMP-2的活性($P<0.05$);与IL-1β处理组比较,Bay11-7082明显抑制了IL-1β诱导MMP-2活性的上调,并使72 h时MMP-2的活性降至13%($P<0.01$);其他抑制剂对IL-1β诱导MMP-2活性上调的影响无统计学差异($P>0.05$)。**结论** IL-1β以时间和剂量依赖方式,通过NF-κB信号通路诱导滑膜细胞MMP-2活性。

[关键词] 白介素-1β;滑膜细胞;基质金属蛋白酶-2;NF-κB
[中图法分类号] R392.11; R392.3; R322.72 [文献标志码] A

Effects of MAPK or NF-κB pathway inhibitors on IL-1β-induced matrix metalloproteinase-2 activity in synovial cells

Chen Rongfu[1], Huang Wei[1], Xie Jing[2], Liang Xi[1], KL Paul Sung[2,3], Wang Chunli[2], Fu Chunfeng[1] ([1]Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China; [2]"111" Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China; [3]Department of Orthopedics and Bioengineering, University of California, San Diego, CA 9209320412, USA)

[**Abstract**] **Objective** To study the effects of interlukin-1β (IL-1β) on the activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in synovial cells from human knee joint, and the effects of MAPK or NF-κB signal pathway inhibitors on IL-1β-induced MMP-2 activity. **Methods** *In vitro* cultured synovial cells were treated with IL-1β at different concentrations, and gelatin zymography was performed to detect MMP-2 activity at 72 h. IL-1β of 10 ng/ml alone or in combination with each of four signal pathway inhibitors (NF-κB inhibitor: Bay11-7082; MAPK inhibitor: SB203580, PD98059 and SP600125) were used to treat the synovial cells, and MMP-2 activity was detected at 12, 24, 48 and 72 h, respectively. **Results** IL-1β significantly increased MMP-2 activity in synovial cells with increased concentration or time ($P<0.05$). Bay11-7082 dramatically inhibited IL-1β-stimulated MMP-2 activity, and the activity was decreased to 13% compared with the IL-1β group ($P<0.01$). However, other inhibitors had no significant effect on the IL-1β-stimulated MMP-2 activity ($P>0.05$). **Conclusion** IL-1β significantly increases MMP-2 activity through NF-κB signal pathway in synovial cells in a dose- and time-dependent manner.

[**Key words**] interlukin-1β; synovial cell; matrix metalloproteinase-2; NF-κB

Supported by the Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-2-054). Corresponding author: Huang Wei, E-mail: huangwei68huangwei@163.com

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)损伤已成为临床主要的运动相关疾病之一,受损的ACL自我修复能力较差,常不能满意地恢复膝关节的稳定性[1],其生物学机制尚不完全清楚。既往研究[2-3]表明,ACL损伤后关节滑液中大量炎性细胞因子如白介素-1β(interlukin-1β,IL-1β)及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的积累可能是导致其难以自身修复主要的原因之一。MMPs是一类锌依赖性的蛋白水解酶,通过降解多种细胞外基质而参与组织的损

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研项目(2011-2-054)
[通信作者] 黄 伟,E-mail:huangwei68huangwei@163.com

伤与重塑。其中,MMP-2 表达或活性的增加被认为与 ACL 较差的修复能力密切相关[4]。既往研究发现,IL-1β 可调控多种细胞中 MMP-2 的表达或活性,如血管内皮细胞[5]、肺成纤维细胞等[6]。但是,滑膜组织作为 ACL 损伤后关节腔内 MMPs 的主要贡献者[7],IL-1β 对滑膜细胞 MMP-2 活性影响的研究却甚少。本研究通过揭示 IL-1β 对滑膜细胞 MMP-2 活性的影响,以及不同信号通路抑制剂对该过程的调控,试图寻求 ACL 损伤后难以自身修复可能的机制及缓解措施。

1 资料与方法

1.1 实验材料

选取我院 2011 年 5 – 11 月收治并行截肢术的车祸伤患者,获取截肢肢体正常膝关节滑膜标本 6 例,其中女性 3 例,男性 3 例,年龄 25 ~ 42 岁。无菌条件下用剪刀和镊子剪取滑膜组织,置于盛有 DMEM 液的培养瓶中备用。经医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 滑膜细胞的分离培养

滑膜细胞的培养采用组织培养法分离培养,参照文献[8]。无菌条件下,用含双抗的 1 × PBS 液反复冲洗滑膜组织。将组织剪成约 2 mm × 2 mm × 2 mm 的小块,均匀铺置于培养瓶中。向培养瓶中加入含 10% FBS 的高糖 DMEM 液,在 5% CO_2 和 37 ℃的孵育箱内恒温培养。每 3 天换液 1 次,待细胞爬移出组织并生长至 90% 左右融合状态时,胰酶消化 1∶3传代。反复传代贴壁培养以去除其中混杂的细胞,选用第 4 代的滑膜细胞进行实验。

1.3 IL-1β 及信号通路抑制的处理

实验分为 3 步:①浓度梯度的 IL-1β 处理:分别用 0、1、5、10、25、50 ng/ml 的 IL-1β 处理滑膜细胞,处理后 72 h 提取细胞培养液行明胶酶谱检测 MMP-2 的活性。②IL-1β 处理的时间梯度:选取合适浓度的 IL-1β 处理滑膜细胞,分别于处理后 12、24、36、48、72 h 检测 MMP-2 的活性。③IL-1β 及信号通路抑制剂的处理,分为空白对照组、IL-1β 组、IL-1β + 3 μmol/L SB203580(p38 抑制剂)组、IL-1β + 10 μmol/L SP600125(JNK 抑制剂)组、IL-1β + 50 μmol/L PD98059(ERK 抑制剂)组、IL-1β + 30 μmol/L Bay11-7082(NF-κB 抑制剂)组,分别于处理后 12、24、48、72 h 检测 MMP-2 的活性。

1.4 明胶酶谱检测 MMP-2 的活性

收集细胞培养上清液,BCA 法蛋白定量。将 10 μg 上清液蛋白样品与上样缓冲液以 1∶1体积混合,在 110 V 恒压、含 10% 明胶的 SDS-PAGE 中电泳 150 min。电泳结束后取出凝胶,2.5% TritonX-100 震荡洗脱 20 min × 3 次;再用孵育液 37 ℃恒温孵育 16 h。将凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h,脱色液脱色凝胶至条带清晰可见。凝胶成像分析系统 GS-800 扫描凝胶,并用 Quantity One 软件测量各条带的光密度值,进行相对定量。

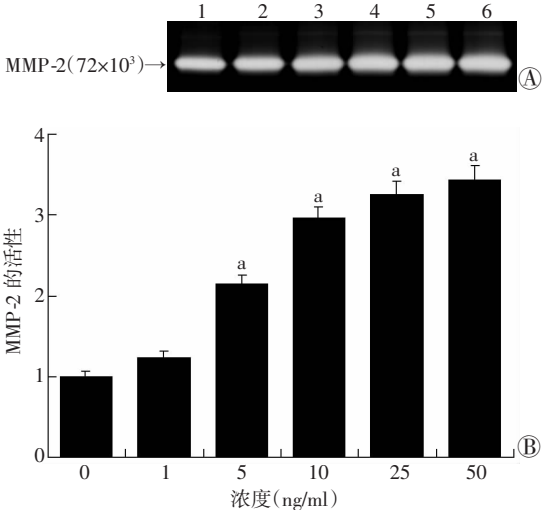
1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,Dunnett-t 检验进行各实验组与对照组的比较,多个均数间的两两比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 IL-1β 呈浓度依赖性增加滑膜细胞 MMP-2 的活性

1 ng/ml IL-1β 处理滑膜细胞 72 h 后轻度增高 MMP-2 活性,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。而 5、10、25、50 ng/ml IL-1β 分别使滑膜细胞 MMP-2 的活性较对照组增加 115%、196%、225% 和 243%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。提示 IL-1β 对人滑膜细胞 MMP-2 的活性具有促进作用,且呈浓度依赖性。根据此结果,选取 10 ng/ml 为后续实验的干预浓度(图 1)。

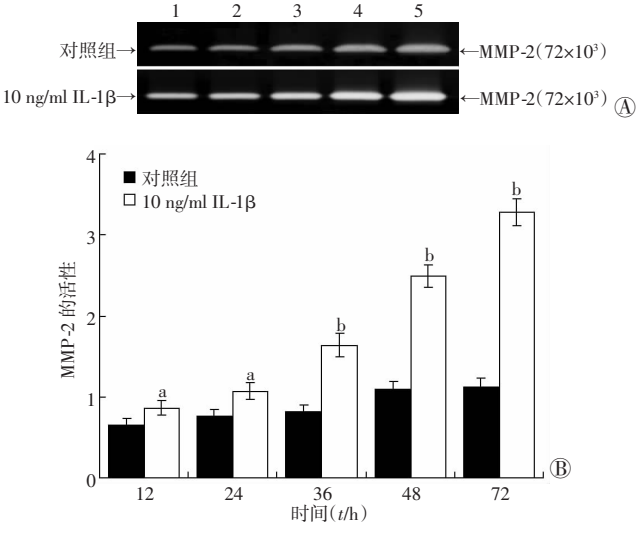


A:明胶酶谱 1 ~ 6:0、1、5、10、25、50 ng/ml IL-1β;B:半定量分析 a:$P < 0.01$,与 0 ng/ml IL-1β 组比较

图 1 不同浓度 IL-1β 对滑膜细胞 72 h 时 MMP-2 活性的影响

2.2 10 ng/ml IL-1β 呈时间依赖性地增加滑膜细胞 MMP-2 的活性

10 ng/ml IL-1β 处理滑膜细胞 12、24、36、48、72 h,MMP-2 的活性分别较相应时间点的对照组增高了 32%、41%、102%、128% 和 193%,差异均具有统计学意义($P < 0.01$,图 2)。

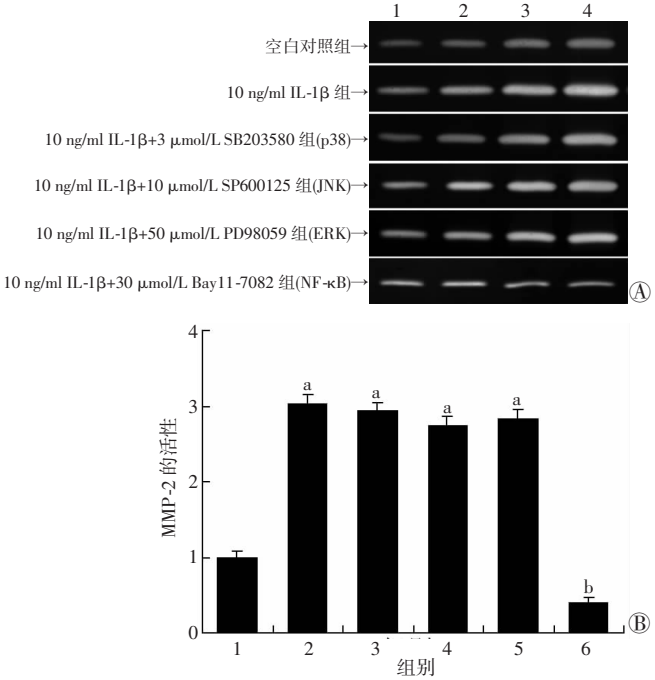


A:明胶酶谱 1:12 h,2:24 h,3:36 h,4:48 h,5:72 h;B:半定量分析 a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与相应时间点的对照组比较

图 2 10 ng/ml IL-1β 在不同时间点对滑膜细胞 MMP-2 活性的影响

2.3 信号通路抑制剂对 IL-1β 诱导滑膜细胞 MMP-2 活性的影响

如图 3,在 10 ng/ml IL-1β 处理条件下,p38 抑制剂 SB203580、JNK 抑制剂 SP600125 和 ERK 抑制剂 PD98059 轻微降低了 IL-1β 诱导 MMP-2 活性的增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。而 NF-κB 抑制剂 Bay11-7082 明显抑制了 IL-1β 诱导的 MMP-2 活性的增加,与 10 ng/ml IL-1β 处理组比较,Bay11-7082 使 72 h 时 MMP-2 的活性降至 13%,差异具有统计学意义($P<0.01$)。



A:明胶酶谱 1:12 h,2:24 h,3:48 h,4:72 h;B:72 h 半定量分析 1:空白对照组,2:10 ng/ml IL-1β 组,3:10 ng/ml IL-1β + 3 μmol/L SB203580 组,4:10 ng/ml IL-1β + 10 μmol/L SP600125 组,5:10 ng/ml IL-1β + 50 μmol/L PD98059 组,6:10 ng/ml IL-1β + 30 μmol/L Bay11-7082 组 a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 10 ng/ml IL-1β 组比较

图 3 IL-1β 和信号通路抑制剂对滑膜细胞 MMP-2 活性的影响

3 讨论

组织的损伤和修复始终伴有旧细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的降解和新 ECM 的合成,两者在正常组织中受到多种因素如 MMPs 及其抑制剂 TIMPs 的精确调控而保持动态平衡。其中,MMP-2 又称明胶酶 A,通过降解包括Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ型胶原等多种 ECM 而在许多生物学反应中起重要作用,如组织重塑与修复、血管基底膜的降解等[9-10]。

滑膜组织是 ACL 损伤后关节内微环境变化的主要调控者之一。本研究发现,未处理的正常滑膜细胞即可分泌少量的 MMP-2,这可能与其维持正常 ECM 合成和降解间的平衡有关。IL-1β 作为 ACL 损伤后炎症反应中重要的炎性细胞因子之一,能显著刺激滑膜细胞 MMP-2 的活性,并呈浓度和时间依赖性增加。该结果与 Zhang 等[11]的报道类似:IL-1β 明显增加类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞中 MMP-2 的表达。既往研究表明,其他细胞因子如 TNF-α 也能促使滑膜细胞 MMP-2 活性的增加[8],且 IL-1β 和 TNF-α 还能协同刺激 ACL 成纤维细胞中 MMP-2 活性的增强[2]。据报道,高活性的 MMP-2 可进一步激活 MMPs 家族的其他成员,使关节滑液中总 MMPs 的基质降解活性增强,从而促进其对 ECM 的降解[6]。这些结果提示,ACL 损伤后产生的炎性细胞因子可作用于关节内多种组织细胞,使其分泌的 MMP-2 活性增加,从而可能成为 ACL 损伤后难以自身修复的机制之一。但是,IL-1β 诱导滑膜细胞 MMP-2 活性增加的机制目前尚不清楚。既往研究表明,有多条信号通路参与 MMPs 的表达,其中主要包括 MAPK(p38、ERK、JNK)和 NF-κB 通路[12]。特异性地抑制这些通路能否缓解 MMP-2 活性的增加,从而为 ACL 损伤后的修复提供新的思路已成为目前关注的焦点。

本研究发现,p38 抑制剂 SB203580、JNK 抑制剂 SP600125 和 ERK 抑制剂 PD98059 对 IL-1β 诱导的 MMP-2 活性的增加无明显影响,表明 IL-1β 可能并不是通过 p38、JNK 或 ERK 信号通路诱导滑膜细胞 MMP-2 活性的增加。Kim 等[13]也发现,抑制 MAPK 信号通路并不能调控类风湿性关节炎滑膜细胞中 MMPs 的表达。而 NF-κB 抑制剂 Bay11-7082 对 IL-1β 诱导 MMP-2 活性的增加呈完全抑制状态,且滑膜细胞本身的分泌功能也受到抑制。该结果提示,NF-κB 虽然能显著降低 IL-1β 诱导的 MMP-2 活性,并可能成为 ACL 损伤后潜在的治疗靶点之一,但它的作用可能并不是完全特异性地作用于 IL-1β 引起的通路变化,还可能存在对滑膜细胞内部本身的通路直接影响的结果,其具体分子机制尚需进一步研究。

综上所述,本研究表明 IL-1β 呈浓度和时间依赖性地增加滑膜细胞 MMP-2 的活性,而 NF-κB 的抑制剂 Bay11-7082 显著抑制了 IL-1β 诱导的 MMP-2 活性的增加。进一步研究及体内实验将有助于阐明炎症因子对 MMP-2 的调控机制,并可能为 ACL 损伤后的修复提供新的思路。

参考文献:

[1] Meunier A, Odensten M, Good L. Long-term results after primary repair or non-surgical treatment of anterior cruciate ligament rupture: a randomized study with a 15-year follow-up [J]. Scand J Med Sci Sports, 2007, 17(3): 230-237.

[2] Wang Y, Tang Z, Xue R, *et al*. Combined effects of TNF-α, IL-1β, and HIF-1α on MMP-2 production in ACL fibroblasts under mechanical stretch: an *in vitro* study [J]. J Orthop Res, 2011, 29(7): 1008-1014.

[3] 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.
[4] Zhou D, Lee H S, Villarreal F, *et al*. Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: an *in vitro* study on human ACL and MCL fibroblasts [J]. J Orthop Res, 2005, 23(4): 949-957.
[5] Mountain D J, Singh M, Menon B, *et al*. Interleukin-1beta increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells: role of PKCalpha/beta1 and MAPKs[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(2): C867-C875.
[6] 杨娜, 朱运奎, 李继东,等. IL-1β对人肺成纤维细胞增殖及MMP-2表达的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(7): 1285-1288.
[7] 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.
[8] Wang Y, Yang L, Zhang J, *et al*. Differential MMP-2 activity induced by mechanical compression and inflammatory factors in human synoviocytes[J]. Mol Cell Biomech, 2010, 7(2): 105-114.
[9] Page-McCaw A, Ewald A J, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(3): 221-233.
[10] Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, *et al*. Matrix metalloproteinases [J]. Curr Med Chem, 2010, 17(31): 3751-3768.
[11] Zhang Y, Dong J, He P, *et al*. Genistein inhibit cytokines or growth factor-induced proliferation and transformation phenotype in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis[J]. Inflammation, 2012, 35(1): 377-387.
[12] Tang Z, Yang L, Xue R, *et al*. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after a mechanical injury: involvement of the p65 subunit of NF-kappaB[J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(5): 709-716.
[13] Kim K S, Oh-da H, Choi H M, *et al*. Pyrrolidine dithiocarbamate, a NF-kappaB inhibitor, upregulates MMP-1 and MMP-13 in IL-1beta-stimulated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 613(1/3): 167-175.

(**收稿**:2012-02-27;**修回**:2012-05-10)
(编辑 汪勤俭)

经验交流

文章编号:1000-5404(2012)17-1744-01

^{131}I复治甲亢的实验室标准探讨

吴 平,易吉秀,李 华,容若惠子 (409000 重庆 黔江,黔江中心医院内分泌科)

[**关键词**] 甲状腺功能亢进症;^{131}I复治;甲状腺功能减退症;标准
[**中图法分类号**] R581.105 [**文献标志码**] B

^{131}I治疗甲亢后的主要并发症是甲状腺功能减退症(甲减),且发生率较高[1]。临床发现,在第1次用^{131}I治疗甲亢后,复治时(6个月),甲状腺激素水平较正常值高1倍以内的患者,6~12个月后甲状腺激素水平可自行降至正常;若进行第2次治疗患者甲减的发生率明显增高。我们猜测是由于首次^{131}I治疗后残留的甲状腺组织受到^{131}I辐射作用,使其功能继续下降,不能完全恢复。我们的方法是测定^{131}I复治时及1年后的甲亢患者甲状腺激素水平值,试图通过统计分析的方法找出复治的分界点,为制订较精确的^{131}I复治甲亢实验室标准做一个初步的探索。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2009年2月至2011年6月我科门诊收治的符合纳入标准的甲状腺功能亢进症患者30例,其中男性19例,女性11例,年龄16~65岁,均无严重的其他系统并发症。纳入标准:①《临床诊疗指南内分泌学分册》(人民卫生出版社,2009年版)诊断标准;②无治疗禁忌证,如妊娠、哺乳期、心肌梗死、严重的肝肾疾病等;③首次^{131}I治疗后6个月复查时,甲状腺激素未恢复正常,但在正常值1倍以下。排除标准:①甲状腺摄碘率≤50%者;②^{131}I一次性治愈患者(含甲减患者)。

1.2 方法

采用电化学发光法(罗氏2010电化学发光检测仪)测定治疗前、复治时、1年后FT_3、FT_4。

1.3 统计学方法

采用SAS 8.1统计软件对第1次^{131}I治疗后复治时及未治疗1年后的甲亢患者甲状腺激素水平值进行回归分析。从样本返回的数据散点图看,自变量和因变量之间符合一定的线性关系,采取了线性回归模型。

2 结果

复治时FT_3(设定为变量x_1)平均值为11.700 67 pmol/L,FT_4(设定为变量t_1)平均值为31.792 pmol/L;未治1年后FT_3(设定为变量x_2)平均值为4.981 pmol/L,FT_4(设定为变量t_2)平均值为16.962 67 pmol/L。以上数据均符合线性方程:

FT_3(pmol/L): $x_2 = 0.224\ 3x_1 + 2.356$,$FT_4$(pmol/L): $t_2 = 0.161\ 74t_1 + 13.780\ 61$

根据我院正常甲功范围:FT_3:3.10~6.8 pmol/L,FT_4:12~22 pmol/L,考虑该约束与线性方程的交点得:$0.224\ 3x_1 + 2.356 \leqslant 6.8$,$0.161\ 74t_1 + 13.780\ 61 \leqslant 22$

解出的结果为$x_1 \leqslant 19.812\ 75$ pmol/L, $t_1 \leqslant 50.818\ 54$ pmol/L。

(下转1749页)

[**通信作者**] 吴 平,E-mail:826784603@qq.com