文章编号:1000-5404(2014)09-0919-04

论著

手术诱导的小鼠骨关节炎模型中关节软骨 MMP-13 表达上调

唐浚洲,苏 楠,周思儒,李晓刚,谢杨丽,陈 林 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,骨代谢修复中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 观察小鼠骨关节炎模型中关节软骨组织中基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase 13,MMP-13)表达水平的变化,探讨其与关节损伤之间的关系。**方法** 在小鼠原代软骨细胞培养中用IL-1β诱导炎症细胞外环境,采用RT-PCR检测MMP-13的表达水平。手术诱导不稳定的内侧半月板(destabilization of the medial meniscus,DMM)建立小鼠骨关节炎模型,观察术后5周和10周小鼠关节软骨组织变化情况,并用免疫组化检测MMP-13在受损的关节软骨中的表达。**结果** 用IL-1β处理的原代软骨细胞中MMP-13的mRNA表达明显较高($P<0.01$)。DMM术后小鼠关节软骨出现骨关节炎表现,且术后10周小鼠关节损伤程度较术后5周小鼠严重。免疫组化结果显示术后5周小鼠软骨组织中MMP-13的表达高于对照组;术后10周软骨组织中MMP-13进一步增高。**结论** 在小鼠骨关节炎模型发病过程中,MMP-13作为一个具有软骨破坏性的标志分子在关节软骨中持续高表达,在骨关节炎发生过程中起重要作用。

[关键词] 骨关节炎;关节软骨;基质金属蛋白酶13;小鼠
[中图法分类号] R345; R363.21; R684.3 [文献标志码] A

Increased expression of MMP-13 in articular cartilage in surgically induced osteoarthritis mice

Tang Junzhou, Su Nan, Zhou Siru, Li Xiaogang, Xie Yangli, Chen Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Center of Bone Metabolism and Repair, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the change of matrix metalloproteinases 13 (MMP-13) expression in the articular cartilage of osteoarthritis mice and investigate its correlation with articular injury. **Methods** Murine articular chondrocytes were isolated from neonatal mice and cultured primarily, and then treated with 10 ng/mL interleukin-1β (IL-1β) for 24 h. The mRNA expression of MMP-13 was detected by quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. A total of 30 C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups, normal control ($n=10$), osteoarthritis group 1 ($n=10$) and osteoarthritis group 2 ($n=10$). The osteoarthritis model was induced by surgical destabilization of the medial meniscus (DMM). Ten mice of the model group 1 were killed in 5 weeks after surgery, while the other 10 of group 2 were in 10 weeks. The articular cartilage was observed histologically, and the expression level of MMP-13 in impaired articular cartilage was measured by immunohistochemical assay. **Results** IL-1β induced increased mRNA expression of MMP-13 in primary cultured murine articular chondrocytes. Articular cartilage in mice with DMM surgery exhibited features of osteoarthritis, and the injury became more severe with the time elapsing. Immunohistochemical assay showed that the expression of MMP-13 was enhanced in 5 weeks after DMM surgery, and continually increased in 10 weeks post-operatively. **Conclusion** MMP-13, as a chondro-destructive marker, is of high expression in the articular cartilage, and plays an essential role in the process of osteoarthritis.

[**Key words**] osteoarthritis; articular cartilage; matrix metalloproteinase 13; mice

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81030036), the Key Project of State Key Laboratory (SKLZZ200902) and the Spontaneous Project of State Key Laboratory (SKLZZ201017). Corresponding author: Chen Lin, E-mail: linchen70@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81030036);国家重点实验室重点项目(SKLZZ200902);国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ201017)
[通信作者] 陈 林,E-mail: linchen70@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1427.002.html(2014-01-02)

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种慢性非炎症性退行性疾病,以关节软骨的退行性变、继发性骨质增生等为主要特征,临床表现以关节疼痛或变形及关节的活动受限为特点,多发于中老年人群[1]。影响OA最常见的危险因素有性别、年龄、原发的关节损伤、肥胖、遗传易感性以及力学因素[2]。骨关节炎的发病率随着年龄的增长逐渐升高,但其发病机制至今尚不清楚。OA的发生不仅是一个机械磨损的过程,更是一个由关节内炎症介质介导的异常的关节组织重建的过程,并且这个过程涉及软骨的降解、滑膜炎症、骨的畸形等[3]。近年来研究表明基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMPs)在骨关节炎发病及进展中发挥着极其重要的作用[3],然而MMPs在小鼠骨关节炎模型中的研究尚少。本研究利用小鼠作为研究对象,构建小鼠骨关节炎模型,检测小鼠关节软骨组织中的MMP-13的表达情况,探究其与关节损伤之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级健康雄性C57BL/6J小鼠30只,体质量20~30 g,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。将小鼠进行随机编号并随机分成3组:对照组、实验1组、实验2组,每组10只小鼠,饲养1周适应实验环境后开始进行实验。多聚甲醛、EDTA等购自Sigma公司,免疫组化所用MMP-13抗体购自ProteinTech公司。RNA反转录试剂盒、定量PCR反应试剂盒均购自TaKaRa公司。定量PCR仪器为MX3000P。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原代软骨组织的采集与处理 将新生小鼠(5 d)处死后,在显微镜下采集小鼠膝关节软骨组织,分离、消化、接种后培养至合适的细胞密度,再加入IL-1β(10 ng/mL)处理24 h,接着提取细胞RNA,反转录成cDNA,最后通过RT-PCR检测MMP-13表达。

1.2.2 Real-time PCR检测MMP-13表达 采用Trizol法提取小鼠原代软骨细胞总mRNA,按照反转试剂盒说明书进行逆转录反应并配置反应体系,利用MX3000P定量PCR仪检测MMP-13的表达和变化,各样本目的基因的表达强度利用其对应的内参基因(环孢素A结合蛋白Cyclophillin A)的量进行校正,每次均设3个复孔。PCR引物序列:内参Cyclophilin A基因上游引物:5′-CGAGCTCTGAGCACTGGAGA-3′,下游引物:5′-TGGCGTGTAAAGTCACCACC-3′,扩增产物长度82 bp;MMP-13基因上游引物:5′-CTTCTTCTTGTTGAGCTGGACTC-3′,下游引物:5′-CTGTGGAGGTCACTGTAGACT-3′,扩增产物长度173 bp。扩增条件为95 ℃ 30 s;[95 ℃ 5 s(变性),57 ℃ 20 s(退火),72 ℃ 15 s(延伸)]×40个循环;95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s,MX3000P定量PCR仪自动计算样本的Ct值和目的基因相对含量。

1.2.3 小鼠骨关节炎模型造模 本研究采用显微外科技术诱导不稳定的内侧半月板(destabilization of the medial meniscus,DMM)手术构建小鼠膝关节炎模型。因为内侧半月板胫骨韧带切断后将导致内侧半月板的不稳定,可以成功构建小鼠骨关节炎模型[4]。手术主要步骤如下:将小鼠固定、消毒后,用显微刀片切开髌骨韧带内侧,暴露关节腔;钝性分离股骨髁间的脂肪垫,暴露髁间区域,使得内侧半月板胫骨韧带能够被观察到;用显微刀片挑断内侧半月板胫骨韧带,缝合组织与皮肤。术中应注意避免损伤关节软骨,术后不固定手术肢体,笼内自由活动,腹腔注射青霉素预防感染;对照组小鼠不做处理。手术5周后处死实验1组动物,10周后处死实验2组动物,对照组小鼠与实验2组小鼠同期处死。取小鼠膝关节进行组织切片,采用藏红固绿染色,显微镜下观察软骨组织学特征;组织切片用免疫组化的方法观察MMP-13在小鼠关节软骨的表达情况。

1.2.4 评价及检测

1.2.4.1 造模评价 取小鼠膝关节组织后采用藏红固绿染色法染色,显微镜下观察软骨组织学特征并进行评价。

1.2.4.2 免疫组化检测关节软骨MMP-13表达 关节组织的石蜡切片用二甲苯脱蜡,然后用序列浓度酒精复水,用3%的H_2O_2消除内源性过氧化氢酶的活性,接着用胰酶孵育来修复抗原,最后用山羊血清封闭。切片用兔来源的MMP-13多克隆抗体(1∶50稀释;ProteinTech公司)孵育过夜。用磷酸盐缓冲液洗净切片后,用辣根过氧化物酶标记的抗体孵育,接着用二氨基联苯胺显色,用甲基绿复染。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行独立样本t检验。

2 结果

2.1 IL-1β诱使小鼠关节原代软骨细胞MMP-13 mRNA水平上调

Real-time PCR结果显示,以对照组MMP-13表达为1,小鼠原代关节软骨细胞中加入IL-1β处理,可明显提高MMP-13的表达(3.89 ± 0.39,$P < 0.01$)。提示关节软骨处于OA的情况下,其MMP-13的表达可能会上调。

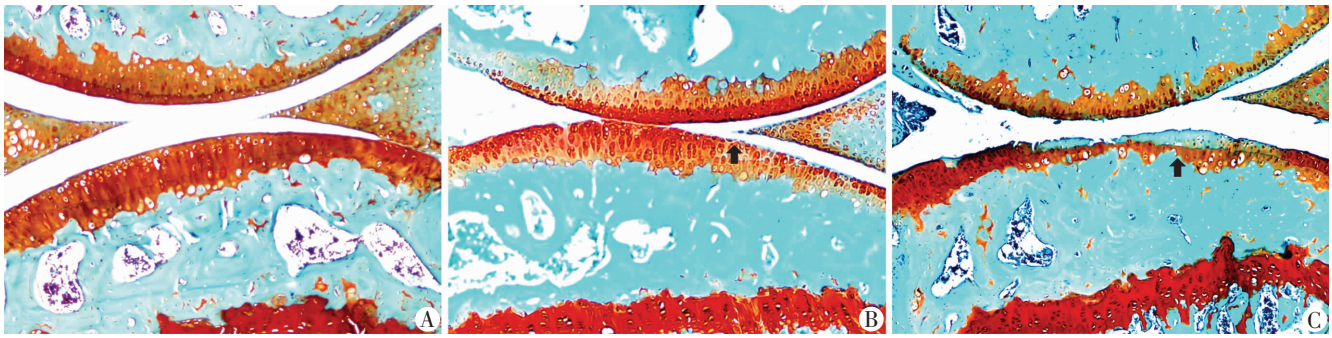
2.2 小鼠骨关节炎模型建立后组织学观察

小鼠手术后0.5~1 h内清醒,进食与状态良好,术后伤口愈合良好,无感染发生。术后2~3 d实验组手术关节腔出现肿胀,4~5周后膝关节明显肿大突起,后逐渐消失。术后膝关节不稳,有异常活动。对照组小鼠膝关节未见异常。

对照组关节软骨组织藏红固绿染色可发现:关节面平滑,软骨基质染成红色,基质较丰厚,无缺损部位,关节软骨各层细胞排列规律,可观察到潮线;实验组软骨发生退变,实验1组已出现基质丢失,缺损部位位于关节面浅层,实验2组基质明显丢失,缺损部位越过潮线,侵袭到钙化的关节软骨部位,潮线出现破坏甚至消失(图1)。

2.3 免疫组化观察小鼠关节软骨MMP-13表达

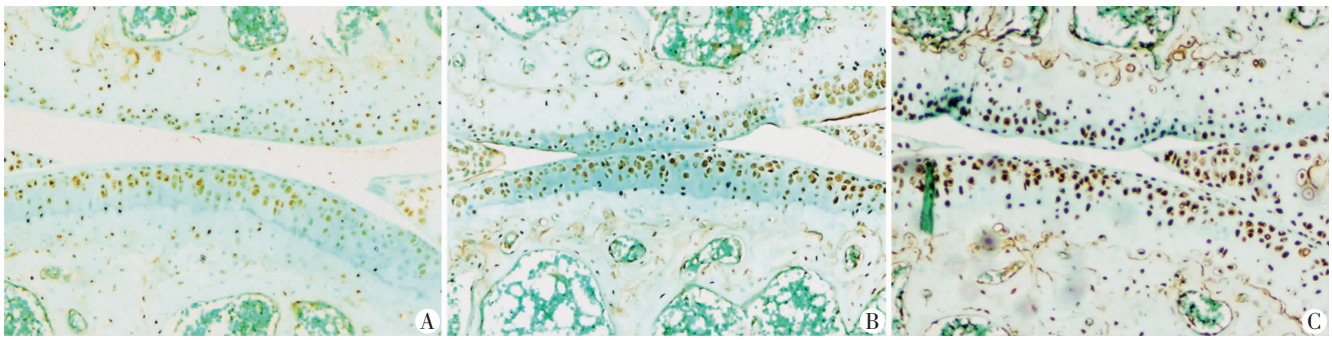
与对照组相比,实验1组小鼠软骨组织中的MMP-13表达与对照组相比明显升高,但较实验2组表达水平低。实验2组小鼠软骨组织中的MMP-13表达水平较对照组与实验1组均明显升高(图2)。



⬆:软骨缺损

A:对照组;B:实验 1 组;C:实验 2 组

图 1　小鼠骨关节炎模型关节面藏红固绿染色观察　(×100)



A:对照组;B:实验 1 组;C:实验 2 组

图 2　免疫组化观察小鼠骨关节炎模型软骨组织中基质金属蛋白酶表达　(S-P ×100)

3　讨论

骨关节炎是最常见的关节炎,也是导致老年人疼痛和残疾的首要病因,以关节软骨的退行性病变、继发性骨质增生为特征。骨关节炎多发生于中年以后人群,其发病率随着患者年龄增加呈增长趋势,膝关节为骨关节炎的好发部位[5]。骨关节炎的发病原因复杂,发病机制至今尚未研究透彻。近年来研究表明细胞外基质的合成与降解失衡是骨关节炎的一个重要特征[6]。其中很多种酶,包括 ADAMTS(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs)、促炎症细胞因子等参与了细胞外基质降解的过程[7]。因此,探明关节软骨细胞在受到刺激时维持稳态的机制就显得非常重要。骨关节炎动物模型是研究骨关节炎发病机制、危险因素及防治方法的重要手段。以前多采用兔、大鼠等动物模型进行研究,但是兔、大鼠等动物繁殖较慢,耗费较大,近年来采用小鼠模型进行研究逐渐增多。已有研究报道雌性小鼠会对手术诱导的关节软骨降解产生抵抗[8],故本研究采用了 C57 雄性小鼠构建膝关节炎模型,探讨小鼠骨关节炎模型中 MMPs 的表达情况。

基质金属蛋白酶 MMPs 是一类含有 Zn^{2+} 的蛋白水解酶,在组织器官的发生、炎症调控以及肿瘤的发生发展、血管新生等多种生理病理过程中发挥着极其重要的作用[9-10]。MMP-13 为基质金属蛋白酶中的胶原酶,主要降解Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型等多种类型间质胶原和蛋白多糖的核心蛋白。越来越多的研究表明 MMPs 等蛋白水解酶参与了软骨组织的降解过程[11-12]。Su 等[13]研究发现骨关节炎中蛋白聚糖及Ⅱ型胶原明显受到破坏,进而影响关节软骨的正常功能。

本组研究在体外实验中,小鼠原代关节软骨在炎症介质 IL-1β 处理后 MMP-13 表达明显增加,提示 MMP-13 在软骨降解中起重要作用,这可能是在关节软骨受到炎症刺激后,重启了异常的软骨重建过程,降解关节软骨的酶生成增加,打破了软骨外基质生成与降解的平衡。在体内实验中,实验组小鼠实施了 DMM 手术诱导了骨关节炎的发生,实验组小鼠关节软骨组织中 MMP-13 较对照组相比表达增加,并且实验 2 组关节损伤程度较实验 1 组严重,而实验 2 组的 MMP-13 的表达较实验 1 组明显增多,这表明 MMP-13 表达水平与关节损伤程度高度相关。其具体机制尚待进一步的研究,可能为:在骨关节炎病理进程中,软骨细胞及滑膜细胞大量分泌 MMPs,导致基质金属蛋白酶与其抑制剂 TIMP 的平衡失调,MMPs 特异性地裂解胶原组织,导致软骨细胞受损。在受到力负荷及炎性因子作用下,关节软骨中的软骨细胞逐渐发生凋亡,最终导致

软骨受损[7,14-15]。

总之,骨关节炎发病机制极其复杂,并且当前对OA的临床治疗策略在干预疾病进展的生化过程方面是失败的,因此,最新的研究开始关注可以减缓软骨降解的潜在生物因子。本研究建立了一个相对稳定并易于评价的小鼠OA模型,并对小鼠膝关节炎模型软骨组织中MMP-13的表达情况进行了初步研究,发现小鼠膝关节炎模型中关节损伤程度与MMP-13的表达密切相关,关节损伤程度越重,MMP-13的表达水平也越高。在以后的研究中,我们可以在稳定的小鼠OA模型中加入可以干预OA发生过程的生物因子,比如MMP-13的抗体或阻滞剂,还可以在转基因小鼠中引入DMM模型。MMPs引起关节损伤所涉及的具体机制仍然有继续研究的必要,由于本研究样本数量偏少,仍有待于扩大样本量进行进一步的验证和研究。

参考文献:

[1] Loeser R F, Goldring S R, Scanzello C R, *et al*. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 1697-1707.

[2] Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, *et al*. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(1): 24-33.

[3] Abramson S B, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(3): 227.

[4] Glasson S S, Blanchet T J, Morris E A. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2007, 15(9): 1061-1069.

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

[6] Ellman M B, Yan D, Ahmadinia K, *et al*. Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(4): 735-742.

[7] Lin A C, Seeto B L, Bartoszko J M, *et al*. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis[J]. Nat Med, 2009, 15(12): 1421-1425.

[8] Ma H L, Blanchet T J, Peluso D, *et al*. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2007, 15(6): 695-700.

[9] Stura E A, Visse R, Cuniasse P, *et al*. Crystal structure of full-length human collagenase 3 (MMP-13) with peptides in the active site defines exosites in the catalytic domain[J]. FASEB J, 2013, 27(11): 4395-4405.

[10] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry[J]. Circ Res, 2003, 92(8): 827-839.

[11] Little C B, Meeker C T, Golub S B, *et al*. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair[J]. J Clin Invest, 2007, 117(6): 1627-1636.

[12] Burrage P S, Mix K S, Brinckerhoff C E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis[J]. Front Biosci, 2006, 11: 529-543.

[13] Su J, Yu J, Ren T, *et al*. Discoidin domain receptor 2 is associated with the increased expression of matrix metalloproteinase-13 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 330(1/2): 141-152.

[14] Schlomann U, Wildeboer D, Webster A, *et al*. The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion[J]. J Biol Chem, 2002, 277(50): 48210-48219.

[15] Cucchiarini M, Terwilliger E F, Kohn D, *et al*. Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 *via* rAAV gene transfer[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8B): 2476-2488.

(**收稿**:2013-11-08;**修回**:2014-01-06)

(编辑　汪勤俭)

参考文献类型及标识

根据GB 3469规定,以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献,其文献类型标识建议采用单字母"A";对于其他未说明的文献类型,建议采用单字母"Z"。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献,建议以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部