DOI: 10.16016/j.1000-5404.201408147

论著

Smad7在Sox9增强BMP2成软骨效应中的作用

赵 辰,黄 伟,梁 熙,廖军义,周 年,胡 宁,赵 智,简长春 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科)

[摘要] **目的** 探讨Smad7在Sox9增强BMP2成软骨效应中的作用和机制。**方法** 将小鼠骨髓间充质干细胞(C3H10T1/2)作为种子细胞,重组腺病毒Ad-BMP2和/或Ad-Sox9感染细胞,Ad-GFP感染细胞为对照。采用Real-time PCR、免疫细胞化学和Western blot分别检测感染后各组Smad7 mRNA表达水平和蛋白表达水平。采用Real-time PCR检测与Smad7相关因子MMP13与OPN mRNA的表达。**结果** BMP2+Sox9组感染细胞7、11 d时,Smad7 mRNA和蛋白表达水平均明显低于BMP2组($P<0.05$);免疫细胞化学染色结果显示,BMP2+Sox9组Smad7染色明显弱于BMP2组;同时BMP2+Sox9组中与软骨最终成熟因子OPN与MMP13的表达均低于BMP2组($P<0.05$)。**结论** 在BMP2诱导间充质干细胞成软骨分化中,高表达的Smad7可被Sox9抑制,并抑制Smad7相关因子MMP13与OPN表达,从而解除了Smad7对BMP2成软骨的抑制作用,阻止了软骨细胞最终成熟骨化,有利于保持软骨发育与正常状态。

[关键词] 软骨;Sox9;BMP2;Smad7
[中图法分类号] R322.71;R329.21;R329.26 [文献标志码] A

Role of Smad7 in Sox9-potentiated and BMP2-induced differentiation of mouse mesenchymal stem cells into chondrocytes

Zhao Chen, Huang Wei, Liang Xi, Liao Junyi, Zhou Nian, Hu Ning, Zhao Zhi, Jian Changchun (Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of Smad7 (mothers against decapentaplegic homolog 7) in bone morphogengetic protein 2 (BMP2)-induced chondrogenic differentiation which was potentiated by Sox9 (sex determing region Y-related high mobility group-box gene 9) and investigate the underlying mechanism. **Methods** Mouse bone marrow mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 was transfected with recombinant adenoviruses Ad-GFP (as control), Ad-BMP2, Ad-Sox9 and Ad-BMP2 + Ad-Sox9 respectively. The expression of Smad7 at mRNA and protein levels was measured by real-time PCR, immunocytochemical staining and Western blot analysis. Real-time PCR and Western blot analysis was also used to detect the expression of Smad7 related factors MMP13 and osteopontin (OPN). **Results** When the C3H10T1/2 cells were transfected with recombinant adenoviruses Ad-BMP2 + Ad-Sox9 for 7 and 11 d, the mRNA and protein expression of Smad7 was significantly lower than in the cells transfected by Ad-BMP2 ($P<0.05$), and similar results were also found by immunocytochemical staining. What's more, the over-expression of Sox9 also effectively reduced the expression of MMP13 and OPN at mRNA and protein levels than the Ad-BMP2-transfected cells ($P<0.05$). **Conclusion** In the BMP2-induced chondrogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells, the over-expression of Smad7 is suppressed by Sox9, so is the expression of Smad7 related factors, MMP13 and OPN. Thus, the inhibitory effect of Smad7 on chondrogenic differentiation is relieved, which prevent the maturation of chondrocyts and then keep the normal status of chondrocyts in development.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31070875,8371972)
[通信作者] 黄 伟,E-mail:huangwei68@263.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1535.117.html(2014-12-05)

[**Key words**] bone morphogengetic protein 2; Smad7; Sox9; cartilage

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31070875, 8371972). Corresponding author: Huang Wei, E-mail: huangwei68@263.net

自体软骨移植是一种治疗软骨缺损的理想方法。与传统手术相比,自体软骨移植的患者能获得长期预后和更高的功能要求。但由于自体软骨来源有限且术中取材易导致创伤,该技术的推广应用受到了限制[1]。目前采用基因诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)成软骨分化,构建"生物工程软骨"有望弥补这些不足,该领域已成为软骨修复的研究热点[2]。骨形态蛋白2(bone morphogengetic protein 2,BMP2)是目前公认的诱导MSCs成软骨分化的良好而又安全的诱导因子[3-4]。然而BMP2在诱导MSCs成软骨的同时还上调了不利于成软骨的因子,如上调了软骨抑制因子Smad7(mothers against decapentaplegic homolog 7),它可破坏成软骨进程以及软骨细胞的稳定性[5-6]。因此,联合应用其他因子去增强BMP2成软骨效应,可能是消除这一不利因素的有效策略。本课题组前期研究发现了一个"增强因子"——人性别决定区Y框蛋白9(sex determing region Y-related high mobility group-box gene 9,Sox9)可在明显增强BMP2诱导成软骨进程的同时,抑制软骨细胞骨化,但单独运用Sox9却不能发挥这些作用,其作用机制不明[7]。本研究拟初步探明Smad7是否是Sox9协同BMP2成软骨的作用靶点之一,即Sox9增强BMP2成软骨效应是否与其下调Smad7有关,以期为揭示BMP2基因强化生物工程软骨的机制和临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与重组腺病毒

采用小鼠骨髓间充质干细胞株(C3H10T1/2)以及人胚肾293细胞株(HEK293),重组腺病毒Ad-BMP2、Ad-Sox9,对照重组腺病毒Ad-GFP均由美国芝加哥大学分子肿瘤研究室主任何通川教授惠赠。

1.2 主要试剂

胎牛血清(FBS)购自Bionid公司,DMEM培养基和胰蛋白酶均购自HyClone公司,青链霉素、蛋白酶抑制剂(PMSF)、细胞裂解液、鼠单克隆GAPDH抗体、SDS蛋白上样缓冲液、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG抗体等均购自上海碧云天生物技术有限公司,TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒、SYBR Green Supermix购自美国Bio-Rad公司,Real-time PCR引物皆由上海生工公司合成,引物序列参见表1。鼠单克隆抗体Smad7购自美国Santa Cruz公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG抗体购自美国Abcam公司,免疫细胞化学试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司。

表1 Real-time PCR中所用引物序列及片段大小

基因	引物序列(5′→3′)	片段大小(bp)
Sox9	正义链:AGCTCACCAGACCCTGAGAA	200
	反义链:TCCCAGCAATCGTTACCTTC	
BMP2	正义链:ACCAGACTATTGGACACCAG	174
	反义链:AATCCTCACATGTCTCTTGG	
Smad7	正义链:AAGATCGGCTGTGGCATC	230
	反义链:CCAACAGCGTCCTGGAGT	
OPN	正义链:CCTCCCGGTGAAAGTGAC	124
	反义链:CTGTGGCGCAAGGAGATT	
MMP13	正义链:GGAGCATGGCGACTTCTAC	208
	反义链:GAGTGCTCCAGGGTCCTT	
GAPDH	正义链:CTACACTGAGGACCAGGTTGTCT	123
	反义链:TTGTCATACCAGGAAATGAGCTT	

1.3 方法

1.3.1 重组腺病毒扩增 采用浓度为10%胎牛血清和1%青链霉素的DMEM培养基,在75 cm^2细胞培养瓶中培养HEK293细胞,待细胞汇合度达60%~70%时加入适量腺病毒感染。4~5 d后,荧光显微镜下可见带有荧光的细胞比率接近90%,显微镜下观察HEK293细胞变圆,有40%~50%细胞脱落漂浮后,收集细胞悬液并低速离心,弃去上清液,在液氮与37 ℃水浴中反复冻融,裂解细胞,然后高速离心后收集细胞裂解液上清,测试病毒滴度后并保存。

1.3.2 C3H10T1/2细胞的培养及诱导分化 C3H10T1/2细胞用含10%胎牛血清和1%青链霉素的完全培养基在75 cm^2细胞培养瓶中进行培养,待细胞生长至30%~40%时(传代后约24 h),分为等量4组,分别加入适量Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-Sox9、Ad-BMP2+Ad-Sox9病毒悬液感染细胞,以4组间具有相同荧光强度,且细胞生长状态良好作为病毒用量,感染24 h后在荧光显微镜下观察,一般感染率控制在40%~50%。

1.3.3 细胞总RNA的提取 按1.3.2的方法在6孔板中培养细胞,培养至所需时间,弃去培养液。用PBS清洗2次后,每孔加入1 mL TRIzol试剂,反复吹打5 min使细胞充分裂解,将混合液移至1.5 mL EP管,室温放置5 min后加入200 μL氯仿,剧烈振荡15 s,室温放置3 min。4 ℃低温离心,13 000 r/min,

15 min。吸取上清加入 600 μL 异丙醇混匀,室温放置 10 min。4 ℃低温离心,13 000 r/min,10 min,管底可见白色沉淀,吸弃上清,加入 75% 乙醇 1 mL 洗涤沉淀。4 ℃低温离心,10 000 r/min,5 min,弃上清,待其空干,加入 25 μL DEPC 水溶解 RNA,检测 RNA 浓度。

1.3.4　RNA 逆转录反应体系　将总 RNA 500 ng、5 × Iscript 反应缓冲液 2 μL、Iscript 逆转录酶 0.5 μL 加入 EP 管,nuclease freewater 补足至 10 μL。PCR 设定反应条件:25 ℃ 5 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min,4 ℃ 保持。

1.3.5　Real-time PCR　按 1.3.2 的方法在 6 孔板中培养 C3H10T1/2 细胞,分别于第 3、7、11 天提取细胞总 RNA,逆转录后行 Real-time PCR,检测第 3、7、11 天 Smad7 与 11 d OPN 与基质金属蛋白酶 13(MMP13)mRNA 相对表达水平。反应体系:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,58 ℃ 5 s,40 次;58 ~ 95 ℃每次上升 0.5 ℃绘制溶解曲线。GAPDH 做内参,每次反应设 3 个平行复孔和无模板阳性对照(NTC),NTC 未出现特异性扩增曲线。

1.3.6　免疫细胞化学染色　按 1.2.2 的方法在 24 孔板中培养 C3H10T1/2 细胞,诱导分化 11 d 后,弃去培养基,PBS 清洗细胞 2 次后,4% 多聚甲醛固定 30 min,之后按免疫细胞化学试剂盒说明行 Smad7 免疫细胞化学染色。

1.3.7　Western blot 检测　按 1.2.2 的方法在 6 孔板中培养 C3H10T1/2 细胞,到达计划时间时,分别收集 3 d BMP2 组、Sox9 组与 7 d Ad-BMP2、Ad-Sox9、Ad-BMP2 + Ad-Sox9、Ad-GFP 细胞并提取总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定法测定所获得的蛋白浓度。经 SDS-PAGE 蛋白电泳(每孔上样量约 60 μg 总蛋白)、半干转印、5% 脱脂奶粉封闭 1 h、4 ℃摇床孵育目标一抗过夜、洗膜、室温孵育二抗 2 h 后,化学发光检测,使用 Quantity One 软件进行图像采集。

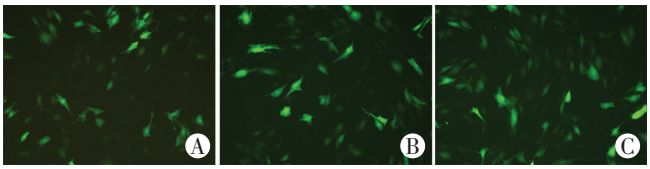
1.4　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行随机区组设计的方差分析,组间两两比较 t 检验。

2　结果

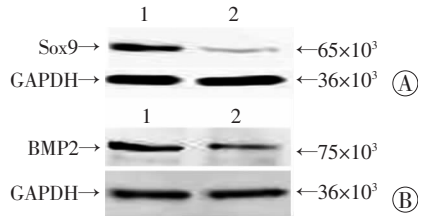
2.1　重组病毒感染间充质干细胞后目的基因表达

24 h 后,Ad-BMP2、Ad-Sox9、Ad-BMP2 + Ad-Sox9 及 Ad-GFP 感染 C3H10T1/2 的感染率达 40% ~ 50%,细胞生长状态良好,可持续至感染后 11 d(图 1),表明重组腺病毒可有效感染 C3H10T1/2。Western blot 检测结果表明,目的基因 BMP2、Sox9 均成功转入 C3H10T1/2 细胞并可稳定有效表达(图 2)。



A:BMP2 组;B:Sox9 组;C:GFP 组

图 1　Ad-BMP2、Ad-Sox9 及 Ad-GFP 感染 C3H10T1/2 细胞后的荧光蛋白表达　(荧光显微镜 ×100)

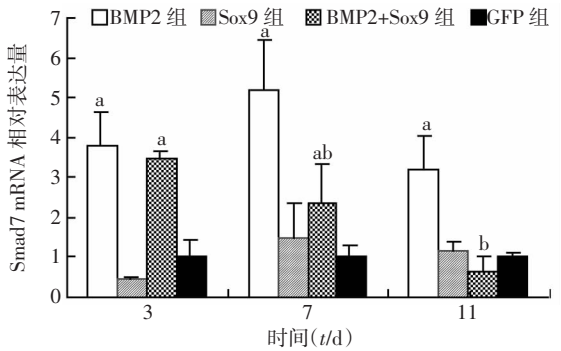


A:Sox9 蛋白表达　1: Sox9 组;2:GFP 组;B: BMP2 蛋白表达　1:BMP2 组;2:GFP 组

图 2　Western blot 检测各组重组腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞目的蛋白表达水平

2.2　Sox9 与 BMP2 联合对 Smad7 mRNA 表达水平的影响

相应的重组病毒感染 C3H10T1/2 后,检测发现在 BMP2 组(3、7、11 d)与 BMP2 + Sox9 组(3、7 d)中,其 Smad7 mRNA 表达水平均明显高于同时间点 GFP 组($P < 0.05$)。第 7、11 天,BMP2 + Sox9 组 Smad7 mRNA 表达明显低于 BMP2 组($P < 0.05$),提示高表达 Sox9 可有效抑制 BMP2 上调的 Smad7 mRNA 表达。以上结果表明,BMP2 在诱导成软骨进程的同时上调了 Smad7,联用 Ad-Sox9 后,高表达 Sox9 可有力抑制 Smad7 mRNA 的表达,其中 7、11 d 效果最明显($P < 0.05$,图 3)。

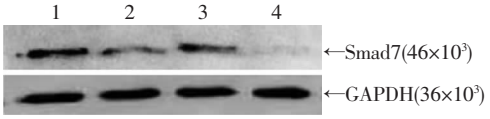


a:$P < 0.05$,与同时间 GFP 组比较;b:$P < 0.05$,与同时间 BMP2 组比较

图 3　Real-time PCR 检测 Sox9 和 BMP2 对 Smad7 mRNA 表达水平的影响

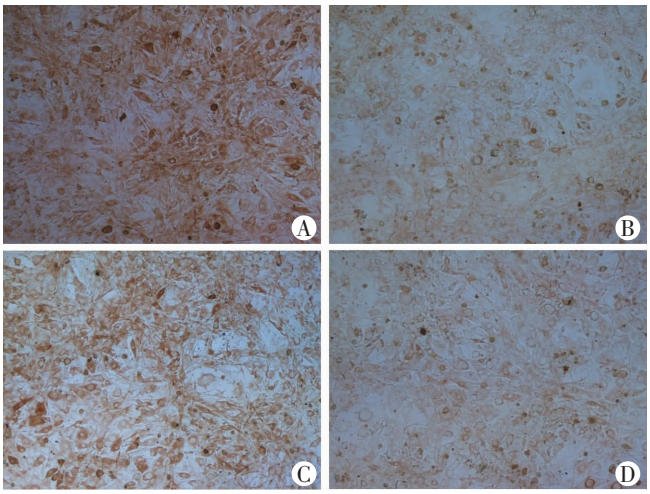
2.3 Sox9与BMP2联合对Smad7蛋白水平表达的影响

相应的重组腺病毒感染C3H10T1/2细胞第7天，与GFP组相比，BMP2组Smad7蛋白表达明显升高；而BMP2+Sox9组中Smad7蛋白表达明显弱于BMP2组；Sox9组染色深度与GFP组比无显著差异，但显著低于BMP2组和BMP2+Sox9组。免疫细胞化学染色与Western blot检测获得相似的结果（图4、5），表明Sox9可在蛋白水平抑制BMP2诱导下的Smad7高表达。



1：BMP2组；2：Sox9组；3：BMP2+Sox9组；4：GFP组

图4 Western blot检测感染第7天时各组Smad7蛋白表达水平

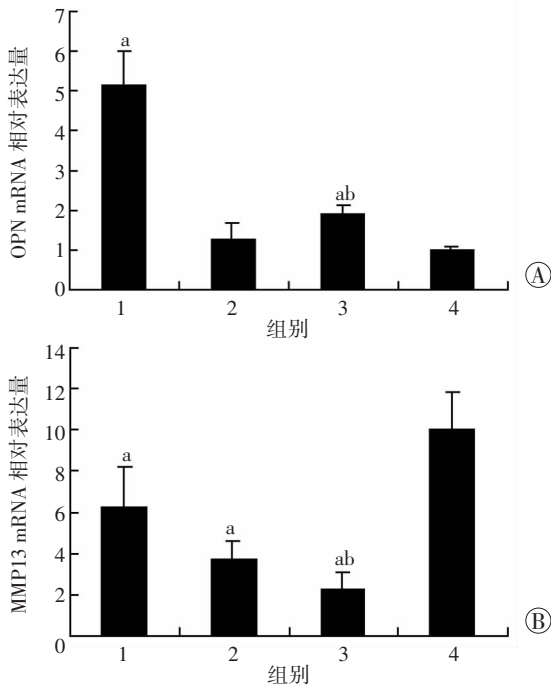


A：BMP2组；B：Sox9组；C：BMP2+Sox9组；D：GFP组

图5 免疫细胞化学染色观察感染第7天时各组Smad7表达情况 （S-P ×200）

2.4 Sox9协同BMP2诱导MSCs软骨分化时OPN与MMP13 mRNA的表达变化

重组腺病毒感染C3H10T1/2后，提取7 d样本中mRNA，逆转录后行Real-time PCR，检测结果显示，BMP2组OPN基因水平表达明显高于GFP组（$P<0.05$），而BMP2+Sox9组中OPN表达量明显低于BMP2组（$P<0.05$）。MMP13在BMP2组中表达明显低于GFP组（$P<0.05$），而BMP2+Sox9组比BMP2组中MMP13表达更低（$P<0.05$，图6）。这表明Sox9显著抑制BMP2诱导下OPN的表达，并协同BMP2抑制了MMP13的表达。



1：BMP2组；2：Sox9组；3：BMP2+Sox9组；4：GFP组

a：$P<0.05$，与GFP组比较；b：$P<0.05$，与BMP2组比较

图6 Real-time PCR检测Sox9和BMP2对OPN（A）与MMP13（B）mRNA表达水平的影响

3 讨论

由于软骨组织缺乏血液供应，自我修复能力弱，临床传统的治疗方法不能为软骨缺损患者提供长期良好的预后。软骨移植技术，尤其是自体软骨移植虽然可提供良好的预后，但因软骨来源不足和创伤性取材，临床应用受到限制。基因强化的“生物工程软骨”可为软骨移植提供充足的修复材料，已成为研究热点。

BMP2因可有效地诱导MSCs成软骨分化而受到广泛关注。如在裸鼠皮下注射感染了Ad-BMP2的MSCs，可形成软骨结节[7]，而BMP2敲除鼠则无法形成正常软骨[8]。Jain等[9]也进一步研究证明了BMP2诱导成软骨的能力。此外BMP2已被美国FDA批准应用于脊柱手术中，其生物安全性已得到保证，因此BMP2在构建生物工程软骨方面具有广阔的应用前景。但BMP2在诱导软骨分化的同时也诱导了MSCs成骨进程[10]，并且上调了一系列抑制软骨形成的因子，从而阻碍了软骨的分化与稳定。故通过联合运用其他因子，去除或减弱以上不良因素，增强BMP2成软骨效应，可能是优化BMP2诱导的“生物工程软骨”的好方法。

我们前期研究发现，联合应用Sox9可有效提高BMP2成软骨能力，增强Col2al和Aggrean等一系列成

软骨因子表达,在强化 BMP2 诱导软骨化的同时抑制了成骨因子表达,维持软骨稳定表型[7],然而其作用机制尚不明确。Smad7 作为 BMP2 下游的重要软骨抑制因子,在 BMP2 诱导下表达明显升高,在软骨化进程中起到了重要作用[3]。Smad7 能通过阻断 Smad1/5/8 通路与 MAPK 通路抑制 BMP2 诱导的软骨化进程。高表达 Smad7 的小鼠,其软骨化进程受到完全抑制,说明 Smad7 可有效抑制干细胞软骨分化[10]。而敲除 Smad7 后小鼠生长板中软骨细胞最终成熟障碍,肥大区域加大,软骨细胞分化停滞,说明 Smad7 在软骨细胞最终分化中起到了重要作用[11]。研究发现,高表达 Sox9 可增强 BMP2 成软骨,同时抑制软骨细胞骨化,减小生长板肥大区域[7]。这一系列现象提示 Smad7 可能是 Sox9 协同 BMP2 成软骨的作用靶点之一。研究不同表达水平 Smad7 对 BMP2 诱导软骨化进程的影响将有利于进一步了解 Smad7 的作用。然而由于同时采用腺病毒表达 Smad7,Sox9 与 BMP2 细胞模型难以维持。Iwai 等[10]研究发现高表达的 Smad7 可通过抑制 Smad1/5/8 与 P38 通路有力阻断 BMP2 诱导的软骨化。由于腺病毒表达水平难以控制,过高表达 Smad7 可能完全阻断 BMP2 诱导的软骨化进程,无法观察过程中各因子变化。因此本研究采用在 BMP2 诱导下内源性高表达 Smad7 的间充质干细胞为模型,观察 Smad7 在软骨化全过程中的作用,分析 Sox9 对其在 BMP2 诱导成软骨过程中的影响与作用。

本研究结果显示,BMP2 诱导 MSCs 第 3、7、11 天时,Smad7 mRNA 明显升高,而 Sox9 与 BMP2 联合应用时,在 7 d 与 11 d,Smad7 表达较 BMP2 单用组明显降低,提示 Sox9 可能下调了 BMP2 诱导的 Smad7 mRNA 表达;Sox9 与 BMP2 联合处理 11 d,Smad7 蛋白水平明显低于 BMP2 组,显示 Sox9 有效抑制了 BMP2 诱导下的 Smad7 蛋白水平的表达。结合前期我们的研究:Sox9 与 BMP2 联用可明显上调 Col2al 等软骨形成因子表达这一现象[7],可以认为 Sox9 可能通过抑制 Smad7 这一重要软骨负性因子,上调了 BMP2 下游的成软骨因子表达,增强了 BMP2 诱导软骨形成的能力。MMP13 与 OPN 是软骨化过程中重要负性因子,其表达与 Smad7 密切相关。OPN 是成骨重要标志因子,其表达升高提示软骨矿化进入软骨内成骨阶段[11];MMP13 能起到分解 Col2al 的作用,是促进软骨基质降解,破坏软骨形态的重要因子[12-13]。两者表达的升高提示软骨细胞最终成熟,丧失软骨表型而逐渐被矿化。有研究发现,Smad7 敲除鼠生长板内软骨最终成熟受到抑制,使得软骨细胞维持稳定[6],该过程伴有 MMP13 与 OPN 因子在生长板内明显下调,提示 Smad7 表达与 MMP13 与 OPN 因子变化密切相关。我们前期研究发现 Sox9 可通过抑制成骨因子 ALP 与 Runx2 的表达,进而抑制软骨细胞肥大矿化[7]。为了进一步探讨 Sox9 对 Smad7 在软骨成熟方面的作用,我们关注了与 Smad7 密切相关的 MMP13 与 OPN 因子,发现感染 11 d 时,高表达 Sox9 抑制 Smad7 表达的同时,也抑制了 OPN 和 MMP13 的表达,阻碍了软骨内骨化的进程。Wang 等[12]也研究发现:BMP2 可抑制 MMP13 表达,使 MMP13 维持在相对低的水平,加入 Sox9 可进一步增强 BMP2 抑制 MMP13 的作用。这些研究结果均提示:Sox9 可能通过抑制 Smad7 及其成软骨负性相关因子的表达,阻断了软骨细胞最终成熟与矿化,维持了软骨形态。

综上所述,本研究初步探明了 Sox9 增强 BMP2 诱导成软骨的作用可能与其抑制了 Smad7 有关,即 Sox9 可抑制 BMP2 诱导下高表达的成软骨负性调控因子——Smad7 的表达,从而进一步增强了 BMP2 成软骨的效应。Sox9 在优化 BMP2 成软骨效应的同时,抑制软骨细胞的终末分化进程,保持了软骨细胞形态和基质的稳定。Smad7 可能是 Sox9 发挥这些功效的作用靶点。然而由于 Smad7 作用的多样性与复杂性,不同表达水平的 Smad7 对 BMP2 诱导的软骨化是否起到不同作用尚待研究。Smad7 在 Sox9 增强 BMP2 诱导的软骨化的详尽机制还有待进一步探索。

参考文献:

[1] Steinert A F, Noth U, Tuan R S. Concepts in gene therapy for cartilage repair[J]. Injury, 2008, 39(Suppl 1): S97-S113.

[2] Steinert A F, Ghivizzani S C, Rethwilm A, *et al*. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage[J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(3): 213.

[3] Nishimura R, Hata K, Ono K, *et al*. Regulation of endochondral ossification by transcription factors[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17: 2657-2666.

[4] Cao X, Chen D. The BMP signaling and *in vivo* bone formation[J]. Gene, 2005, 357(1): 1-8.

[5] Tsumaki N, Yoshikawa H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(3): 279-285.

[6] Estrada K D, Wang W, Retting K N, *et al*. Smad7 regulates terminal maturation of chondrocytes in the growth plate[J]. Dev Biol, 2013, 382(2): 375-384.

[7] Liao J, Hu N, Zhou N, *et al*. Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits BMP2-induced

osteogenic differentiation[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89025.
[8] Nishimura R, Hata K, Matsubara T, *et al*. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors[J]. J Biochem, 2012, 151(3): 247-254.
[9] Jain A, Kebaish K M, Sponseller P D. Factors associated with use of bone morphogenetic protein during pediatric spinal fusion surgery: an analysis of 4817 patients[J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(14): 1265-1270.
[10] Iwai T, Murai J, Yoshikawa H, *et al*. Smad7 inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation and down-regulates p38 MAPK pathways[J]. J Biol Chem, 2008, 283(40): 27154-27164.
[11] Mi M, Jin H, Wang B, *et al*. Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing[J]. Gene, 2013, 512(2): 211-218.
[12] Wang M, Shen J, Jin H, *et al*. Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1240: 61-69.
[13] Johansson N Saarialho-Kere U, Airola K, *et al*. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development[J]. Dev Dyn, 1997, 208(3): 387-397.

(**收稿**:2014-08-21;**修回**:2014-09-20)
(编辑 龙 亮)

个案与短篇

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201408079

非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏 TLR4 的表达

冯新富,范 伟,柳 杨,龚 毅,侯 炬 (550002 贵阳,贵州省人民医院肝胆外科)

[**关键词**] 非酒精性脂肪性肝炎;TLR4;大鼠
[**中图法分类号**] R575.5 [**文献标志码**] B

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是代谢综合征累及肝脏的表现。随着现代生活水平的提高,非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)的发病率增高,由其引起的肝纤维化和肝硬化发病率也有上升趋势。但因其发病机制复杂,迄今为止未找到有效的治疗药物[1-2],探讨其发病机制是当前研究的热点问题。本研究通过观察Toll样受体4(Toll-like receptor 4,TLR4)在非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织的表达,探讨其发病可能机制。

1 资料与方法

1.1 动物模型建立

20只雄性SD大鼠由军事医学科学院实验动物中心提供,体质量140~160 g。分为正常饮食组(对照组,饲料中碳水化合物、脂肪、蛋白质分别占65.5%、10.3%、24.2%)、高脂饮食组[3](模型组,饲料中88%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇,碳水化合物、脂肪、蛋白质分别占总热量的53.0%、27.4%、19.6%),每组10只。模型组给予高脂饲料喂养16周诱发脂肪性肝炎,大鼠自由饮水和进食,分笼(每笼5只)饲养于(20±2)℃明暗各12 h的动物实验室内。于16周给大鼠腹腔注射水合氯醛3 mL/kg,从下腔静脉采血后处死。

1.2 肝组织标本的制备和观察

用多聚甲醛固定肝组织后,制备石蜡切片,HE染色,光学显微镜下观察肝细胞脂肪变性程度、炎症活动度团。根据肝细胞脂肪变性占所获肝组织标本量的范围分为4度(F0~F4):肝细胞脂肪变性<5%为F0;肝细胞脂肪变性在5%~30%为F1;肝细胞脂肪变性在>30%~50%为F2;肝细胞脂肪变性在>50%~75%为F3;肝细胞脂肪变性>75%为F4。所有切片由有经验的病理科医师进行评分,每张切片选取8个高倍视野。

1.3 TLR4 mRNA表达检测

所用PCR引物由威斯腾生物技术公司合成。*Taq*酶、DNase Ⅰ(RNase free)购自TaKaRa公司,RNA提取试剂Tripure reagent购自Roche公司,M-Mulv Reverse Transcriptase购自Promega公司,其余均为国产分析纯试剂。

(下转115页)

[**基金项目**] 贵州省省长基金[黔科教办(2007)04];贵州省科技厅基金[黔科合J(2008)2301]
[**通信作者**] 范 伟,E-mail:zhuyufanwei@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1624.002.html(2014-12-04)