doi:10.11659/jjssx.12E017035

·基础研究·

大鼠骨关节炎模型的建立及软骨组织中 MMP-13 和ADAMTS-5的表达

祁 雷,姚运峰,李子煜,吴 晗,荆珏华 (安徽医科大学第二附属医院骨科,安徽 合肥 230000)

[摘 要] **目的** 评价大鼠膝关节内侧副韧带离断与内侧半月板切除制作骨关节炎(OA)模型方法的可行性,探讨 MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白在大鼠骨关节炎模型软骨中的表达情况。**方法** SD 大鼠 40 只按随机数字法分为模型组($n=30$)和假手术组($n=10$),模型组采用膝关节内侧副韧带离断与内侧半月板切除制作膝 OA 模型,假手术组打开膝关节囊后缝合。模型组于术后4、6、8周处死大鼠,假手术组于术后 8 周处死大鼠。取大鼠关节软骨组织,分别采用 Western blot 技术及免疫组化方法测定软骨组织中 MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达情况。**结果** 模型组术后 4 周即可见软骨退变,术后 6 周和 8 周时退变进一步加重,假手术组无明显软骨退变,各组相比大鼠关节软骨评分差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示,MMP-13 及 ADAMTS-5 蛋白表达在假手术组水平均较低。MMP-13 造模 4 周开始升高,持续升高到第 6 周,第 8 周较之前降低。造模 4 周、造模 6 周和造模 8 周各组蛋白表达比较差异有统计学意义($P<0.05$)。ADAMTS-5 造模 6 周开始升高,造模 8 周维持之前表达水平。造模 4 周分别与造模 6 周和造模 8 周相比,蛋白表达差异有统计学意义($P<0.05$)。造模 6 周大鼠关节软骨组织中蛋白表达和造模 8 周相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。免疫组化检测蛋白表达趋势与 Western blot 检测结果一致。**结论** 采用膝关节内侧副韧带离断与内侧半月板切除的方法可建立动物 OA 模型;MMP-13 和 ADAMTS-5 在 OA 发病过程中的不同时期表达水平有明显变化,需要进一步的研究来探讨其相关信号通路。

[关键词] 骨关节炎;基质金属蛋白酶;关节软骨;动物模型

[中图分类号] R864.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-12-10

Establishment of rat osteoarthritis model and the expression of MMP-13 and ADAMTS-5 in cartilage tissue

QI Lei, YAO Yun-feng, LI Zi-yu, WU Han, JING Jue-hua (Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230000, China)

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of making the osteoarthritis(OA) model in the medial collateral ligament and the medial meniscus excision in rats, and to explore the mechanism of MMP-13 and ADAMTS-5 protein in the cartilage of rat osteoarthritis models. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into model group($n=30$) and sham operation group($n=10$). The knee joint OA model was made from the medial collateral ligament of the knee and the medial meniscus, and the sham operation group was sutured after opening the capsule of the knee joint. Rats in the model group were killed at 4, 6, and 8 weeks after the operation, and the sham operation group died of the rats at 8 weeks after the operation. The articular cartilage tissue of rats was taken. The expression level of MMP-13 and ADAMTS-5 protein in cartilage tissue was detected by Western blot and immunohistochemistry. **Results** Cartilage degeneration was observed in the model group 4 weeks after operation, and degeneration was further aggravated at 6 and 8 weeks. There was no significant degeneration in the sham operation group. There was a significant difference in the articular cartilage score between the two groups($P<0.05$). The results of Western blot detection showed that the protein expression of MMP-13 and ADAMTS-5 was low in the sham operation group. The MMP-13 model began to rise for 4 weeks, and continued to rise in the 6th week, and the 8th week was lower than that of the previous one. The protein expression had significant difference in all groups at 4 weeks, 6 weeks and 8 weeks($P<0.05$). The ADAMTS-5 model began to rise for 6 weeks, and the expression level was maintained before the model was maintained for 8 weeks. The protein expression at 4 weeks compared to that at 6 weeks and 8 weeks had significant difference($P<0.05$). The protein expression in rat articular cartilage tissue at 6 weeks and 8 weeks had no significant difference($P>0.05$). The expression trend of immunohistochemical detection protein was consistent with that of Western blot. **Conclusion** The animal model of OA can be established by using the method of medial collateral ligament dissection and medial meniscectomy. The expression level of MMP-13 and ADAMTS-5 in different stages of OA has changed significantly. Further research is needed to explore its related signaling pathways.

Keywords: osteoarthritis; matrix metalloproteinase; articular cartilage; animal model

[基金项目] 安徽省自然科学基金(1608085MH167);安徽医科大学第二附属医院博士科研启动基金(2012BKJ014)

[通信作者] 荆珏华,E-mail:jhjpaper@sina.com

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种慢性、进行性、退行性关节病变,是临床上常见的关节疾病之一。该病的发病率与年龄和性别密切相关,病变主要累及全身的大关节,膝关节是其好发关节之一。OA 的发病机制目前尚未完全明了,其病理变化主要是关节软骨的丢失及软骨下骨的硬化。OA 中关节软骨细胞外基质的降解、合成失衡,进而导致软骨细胞凋亡最终引起软骨丢失。构成软骨基质的骨架部分是主要是Ⅱ型胶原蛋白和聚蛋白多糖。一直以来,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMPs)家族被认为是降解Ⅱ型胶原和聚蛋白多糖的经典酶类,但近年来研究表明,带有血小板凝血酶敏感蛋白结构域的解聚素与金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif,ADAMTS)家族也在 OA 的发病中起着重要的作用。在软骨细胞外基质的降解过程中,尤其是 MMP-13 和 ADAMTAS-5 发挥着重要作用[1]。本研究采用大鼠膝关节内侧副韧带离断联合内侧半月板切除术制作动物 OA 模型,并使用 Western blot 技术和免疫组化方法检测 MMP-13 和 ADAMTAS-5 蛋白在造模不同时期表达的变化,旨在用此模型对 OA 发病机制进行进一步探讨,以期能为临床早期预防、治疗 OA 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

SD 雌性大鼠 40 只,体质量(225 ±25)g,购自安徽医科大学动物实验中心(合格证号:皖医实动准字第 01 号)。实验于安徽医科大学第二临床学院科研实验中心实施,大鼠自由进食水,昼夜节律 12 h∶12 h。实验过程严格遵循安徽省实验动物管理条例执行。抗 MMP-13 抗体、抗 ADAMTS-5 抗体(英国 Abcam 公司);抗 β-actin 抗体(中国 Biosharp 公司);辣根酶标记羊抗小鼠/兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);手术器械(安徽医科大学第二附属医院中心手术室提供);显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.2 动物模型的制作

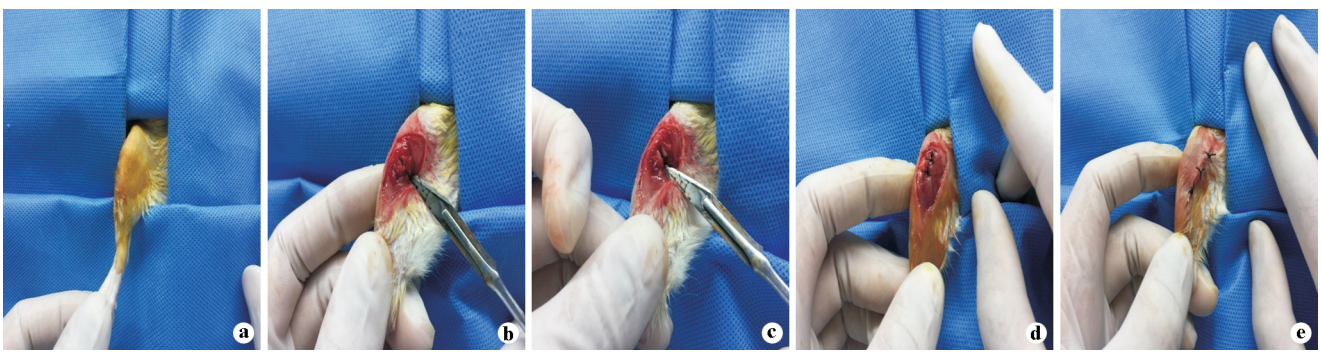
用电脑产生随机数字,将大鼠随机分为模型组 30 只和假手术组 10 只。大鼠用 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉成功后,取仰卧位固定于手术台上,术区常规备皮、消毒、铺巾。选取 30 只模型组大鼠行右膝内侧副韧带离断加内侧半月板切除术建立右膝 OA 模型。手术步骤:右膝关节内侧切口切开皮肤,直视下切断并剪掉部分内侧副韧带,进入关节腔。将髌骨脱位推向外侧,膝关节屈曲位,切除内侧半月板。碘伏、生理盐水冲洗切口,使用 4-0 缝线逐层关闭切口(图 1)。另 10 只行右膝关节切开术,不破坏关节内部结构,作为假手术组。术后 2 h 所有大鼠清醒,正常进食水。术后每天每只大鼠肌肉注射青霉素 20 万 u 预防感染,连续应用 3 d。

1.3 退变关节软骨大体观察

模型组大鼠分别于术后 4、6、8 周处死,每次处死 10 只。假手术组于术后 8 周处死。解剖术侧膝关节,观察内侧胫骨平台关节面的病理改变,按照以下评分标准进行评分:关节面光整为 0 分;关节面粗糙为 1 分;关节面糜烂为 2 分;关节面溃疡为 3 分;软骨剥脱为 4 分[2]。

1.4 Western blot 法检测大鼠关节软骨中 MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白的表达水平

取下大鼠膝关节软骨,剪碎研磨,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法进行总蛋白定量,100 ℃ 水浴 10 min,使样本蛋白变性,与蛋白上样缓冲液混匀后进行电泳、转膜,取出 PVDF 膜用 TBST 溶液洗涤。体积分数 8% 的脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗后置入 4 ℃ 冰箱过夜,次日用 TBST 溶液洗膜。加入二抗室温下孵育 1.5 h,再次用 TBST 洗膜。ECL 法显色,显影仪显影。使用 Image J 测定灰度值,以 β-actin 作为内参,目的蛋白与 β-actin 的灰度比值作为其相对表达水平。



a:右膝术区消毒铺巾;b:切断内侧副韧带、切开关节囊;c:切除内侧半月板;d:缝合关节囊;e:缝合皮肤

图 1 手术造模步骤

1.5 免疫组化检测大鼠关节软骨中 MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白的表达水平

大鼠膝关节标本用 4% 多聚甲醛固定 12 h,10% EDTA 脱钙 12 周后石蜡包埋,进行常规组织石蜡切片,4 μm 组织切片脱蜡,二甲苯、梯度酒精水化,将切片放置在烧开的柠檬酸中,冷却至室温,取出切片。PBS 冲洗,滴加 MMP-13 和 ADAMTS-5 兔抗鼠一抗试剂,4 ℃孵育过夜;PBS 冲洗,滴加二抗,37 ℃温箱孵育 20 min; PBS 冲洗,滴加 DAB 显色,显微镜下适时终止,自来水冲洗 5 min, 苏木素复染1 min,37 ℃温箱至干,加入封片剂封片。参照 Pelletier 等[3]的方法,显微镜下观察,每个切片随机取 3 个视野,每个高倍视野计数 100 个细胞,取观察结果的平均值进行计算。阳性细胞为软骨细胞被染成棕褐或棕黄色,计数阳性细胞的百分率,阳性细胞率 =(阳性细胞数/所计数细胞总数)×100%。

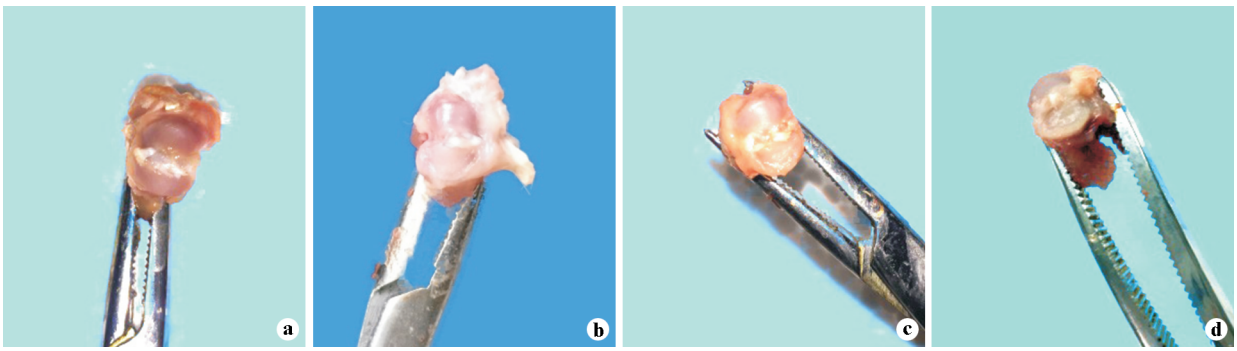
1.6 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行统计学分析处理和作图,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行比较分析,组间两两比较采用 Tukey 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

假手术组胫骨平台软骨面平整光滑,关节软骨无破坏,关节边缘无骨赘形成。模型组造模术后 4 周胫骨平台内侧关节软骨面失去正常光泽,透明度下降,软骨面不规则;术后 6 周可见胫骨内侧平台软骨面粗糙糜烂,色泽灰暗,周围可见少量骨赘形成;术后 8 周软骨磨损进一步加重内侧平台出现软骨缺损,软骨下骨质裸露,内侧平台周围有大量骨赘形成(图 2)。各组评分两两之间比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1、图 3。

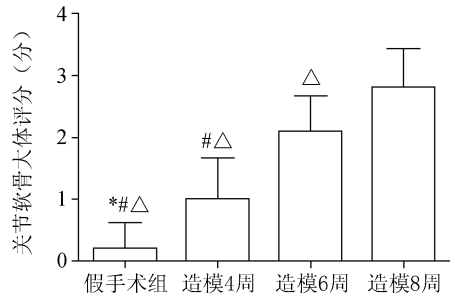


a:假手术组;b:造模 4 周;c:造模 6 周;d:造模 8 周

图 2 不同组别软骨大体

表 1 不同组别关节软骨损伤评分(只)

组别	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
假手术组	8	2	0	0	0
造模 4 周	2	6	2	0	0
造模 6 周	0	1	7	2	0
造模 8 周	0	0	3	6	1



*:与造模 4 周相比,$P<0.05$;#:与造模 6 周相比,$P<0.05$;△:与造模 8 周相比,$P<0.05$

图 3 各组关节软骨损伤评分

2.2 MMP-13 在各组软骨组织中的表达结果

Western blot 结果显示,MMP-13 在假手术组大鼠膝关节软骨组织中呈低水平表达;在造模 4 周组大鼠膝关节软骨组织中的表达增加;在造模 6 周组大鼠膝关节软骨组织中的表达水平持续增加;在造模 8 周组大鼠膝关节软骨组织中的表达水平较造模 6 周组有所下降,但高于假手术组及造模 4 周组水平,见图 4。各组蛋白表达水平两两之间比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 5。免疫组化结果显示假手术组关节软骨细胞中可见少量 MMP-13 蛋白的表达,模型组的关节软骨细胞中可见 MMP-13 蛋白的表达,软骨细胞的胞质可见棕黄色着色,且造模 6 周组较造模 4 周组阳性细胞百分比增加,造模 8 周组阳性细胞百分比较造模 6 周组减少,但高于假手术组及造模 4 周组水平,见图 6。各组蛋白表达水平两两之间比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 7。

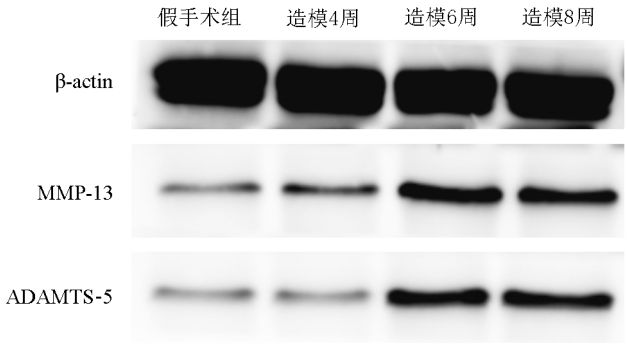
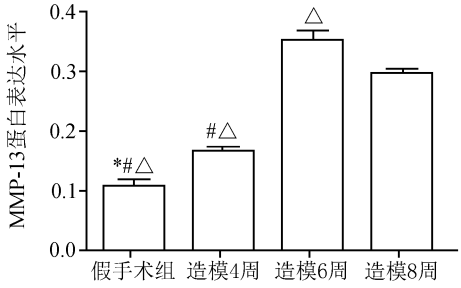
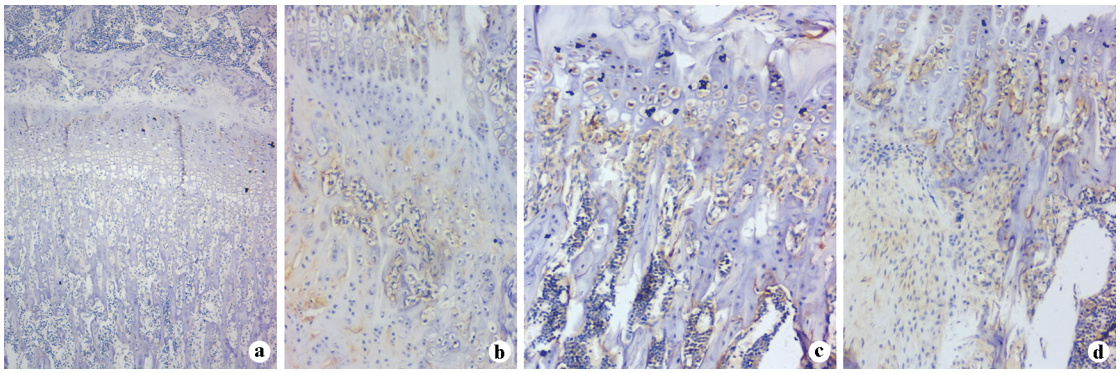


图 4 各组蛋白印记图



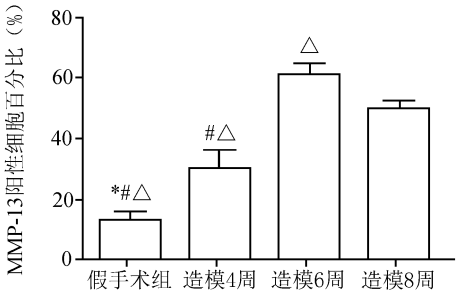
*:与造模 4 周相比,$P<0.05$;#:与造模 6 周相比,$P<0.05$;△:与造模8 周相比,$P<0.05$

图 5 Western blot 检测各组标本 MMP-13 表达水平



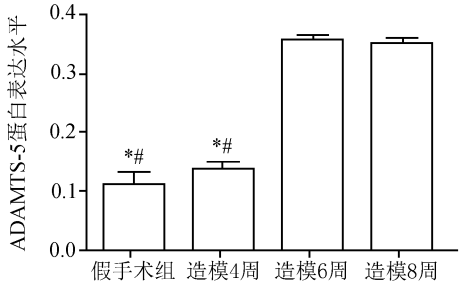
a:假手术组;b:造模 4 周;c:造模 6 周;d:造模 8 周

图 6 各组 MMP-13 蛋白免疫组化图(×100)



*:与造模 4 周相比,$P<0.05$;#:与造模 6 周相比,$P<0.05$;△:与造模8 周相比,$P<0.05$

图 7 各组 MMP-13 阳性细胞率



*:与造模 6 周相比,$P<0.05$;#:与造模 8 周相比,$P<0.05$

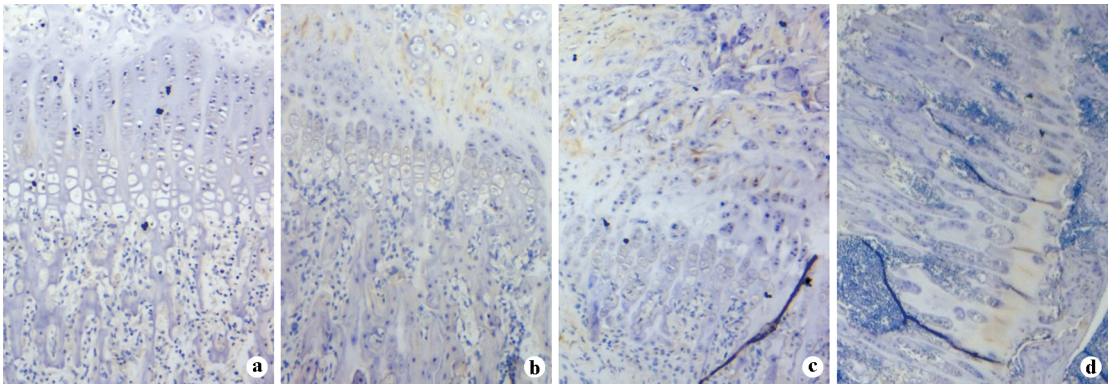
图 8 Western blot 检测各组 ADAMTS-5 表达水平

2.3 ADAMTS-5 在各组软骨组织中的表达结果

Western blot 结果显示,ADAMTS-5 在假手术组及造模 4 周组大鼠膝关节软骨组织中呈低水平表达;在造模 6 周组大鼠膝关节软骨组织中的表达水平增加;在造模 8 周组大鼠膝关节软骨组织中的表达水平基本维持在造模 6 周组的水平,但高于假手术组及造模 4 周组水平,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 8。免疫组化结果显示,假手术组及造模 4 周组关节软骨细胞中 ADAMTS-5 几乎不表达,造模 6 周组及造模 8 周组关节软骨细胞中可见少量 ADAMTS-5 蛋白的表达,软骨细胞的胞质可见棕黄色着色,见图 9。造模 6 周组与造模8周组阳性细胞百分比差异无统计学意义($P>0.05$),但均高于假手术组及造模 4 周组水平($P<0.05$),见图 10。

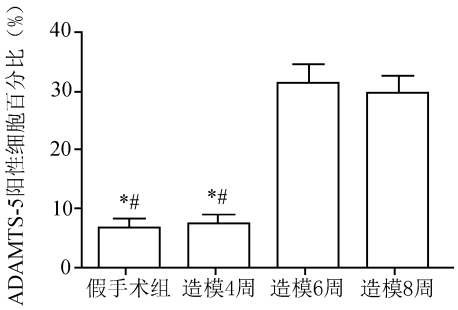
3 讨论

OA 现已成为 21 世纪社会的主要负担之一,疾病的进展将导致关节的疼痛、无力甚至功能丧失。OA 的病理变化包括关节软骨、软骨下骨、滑膜及相邻的支撑结缔组织不同程度的退变及炎症性改变[4]。临床上获取的 OA 标本主要是来源于 OA 晚期关节置换患者,即使同为 OA 晚期的标本,不同患者具体标本病变程度也存在差别。因此构建动物模型有利于对 OA 不同病变时期的研究。



a:假手术组;b:造模4周;c:造模6周;d:造模8周

图9 各组 ADAMTS-5 蛋白免疫组化图(×100)



*:与造模6周相比,$P<0.05$;#:与造模8周相比,$P<0.05$

图10 各组 ADAMTS-5 阳性细胞率

OA 模型的建立方法较多,主要包括关节制动、关节腔内注射药物、关节手术等方法[6]。关节制动造模周期较长,关节腔内注射药物会影响局部代谢微环境,相较于这两者关节手术的方法具有造模可靠、造模周期短等优点。经典的手术方式有 Hulth 法,该造模方法是比较常用的,通过切断膝关节的内侧副韧带 + 切断前后交叉韧带 + 切除内侧半月板来构建 OA 模型[7]。但该方法由于关节结构破坏多,导致关节极度不稳,模型窗口期短,且不同研究人员造模效果差异较大。国内外学者纷纷在此基础上进行改良,改良法中研究者们采用较多的是单纯切断前交叉韧带方法,但该方法造模周期相对较长。我们通过离断膝关节内侧副韧带,破坏了膝关节正常的正常力学轴线造成膝关节不稳,进一步切除内侧半月板可以去除其缓冲作用,增加了股骨内髁及内侧胫骨平台关节软骨面之间的摩擦,使内侧关节软骨局部承受的压力变大,从而加速其发生退变,很好地模拟了人类 OA 的发生和发展的病变过程。我们观察到假手术组胫骨平台关节软骨面光滑,色泽红润。在造模术后 4 周组胫骨内侧平台软骨面变得粗糙、失去光泽,造模术后 6 周组胫骨内侧平台形成糜烂并伴有骨赘生成,而在造模术后 8 周组则以关节面溃疡剥脱并伴有大量骨赘形成为主要特征。我们认为造模术后 4 周、6 周、8 周成功地复刻了 OA 病变的早、中、晚期病理特征,本实验采用内侧副韧带离断 + 内侧半月板切除的手术方式成功构建了大鼠膝 OA 模型。

OA 是一种复杂的疾病,其发病机制目前尚不完全清楚。主要包括生物力学及代谢因素的改变,这些改变可造成关节软骨组织的代谢失衡,进而导致关节软骨的进行性丢失,骨赘形成以及继发的软骨下骨的改变[4-5]。OA 的发病机制是近几年的研究热点,与关节炎的发生和发展有关的细胞因子及相关蛋白有很多,涉及的主流学说主要包括细胞因子学说、金属蛋白酶学说、自由基学说、骨内压增高学说等[8]。软骨组织由软骨细胞和细胞外基质(extracllular matrix,ECM)组成。ECM 既是软骨细胞赖以生存的微环境,又在力学的传导中起到一定的缓冲作用。ECM 的生成和降解失衡是导致软骨退变的重要原因之一。ECM 由软骨细胞合成和分泌,主要由Ⅱ型胶原、聚蛋白多糖、透明质酸、硫酸软骨素和水分组成。正常生理条件下 ECM 的合成和降解处于一种动态平衡状态 ,在 OA 的发生发展过程中,这种平衡被打破,软骨细胞的生存环境遭到破坏[9-10]。单从金属蛋白酶学说观点来看,MMPs 家族和 ADAMTS 家族在 ECM 的降解过程中发挥着重要作用。MMPs 不同亚型对 ECM 各种成分的降解能力存在效率的差异,家族成员中 MMP-13 可以强有力的降解软骨基质中的Ⅱ型胶原及聚蛋白多糖。ADAMTS-5 是降解聚蛋白多糖最重要的酶之一,在降解软骨聚蛋白多糖的过程中起重要作用。Hoshi 等[11]进行了一项研究,他们先是采用外科手术方式诱导大鼠的 OA 模型,然后再往关节腔内注射 MMP-13 和 ADAMTS-5 的小干扰 RNA,观察 OA 模型关节软骨退变的情况。通过组间比较,他们认为 MMP-13 和 ADAMTS-5 在关节软骨退变中最起着至关重要的作用。

MMP-13 又称胶原酶 3,已有研究表明,OA 患者体内 MMP-13 高表达,提示增高的 MMP-13 与软骨降解

有关[12-13]。吴宏斌等[14]采用兔膝关节前交叉韧带切断构建OA模型,通过对标本软骨中MMP-13的表达检测,发现对照组表达量很低,造模4周组表达率明显增高,但造模8周组表达率却明显下降。马文明等[15]研究了MMP-13在大鼠前交叉韧带切断加内侧半月板切除的OA模型中的表达情况,他们认为MMP-13在OA早期表达增高,中重度期后出现明显下降趋势。唐浚洲等[16]分析了手术诱导的内侧不稳定半月板小鼠OA模型中关节软骨组织中MMP-13表达水平的变化,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。本研究证明了MMP-13在OA早期软骨组织中表达升高,中期持续升高,晚期下降,与相关研究基本一致[14-16],分析其原因可能是晚期软骨细胞凋亡过多,数量减少,MMP-13分泌不足所致。

ADAMTS-5又称聚集蛋白聚糖酶2,与ADAMTS-4的作用一样,在聚蛋白多糖的降解过程中起着重要作用[17],ADAMTS主要在聚集蛋白多糖核心蛋白球间区Glu373和Ala374位点进行水解[18]。ADAMTS-4和ADAMTS-5哪种酶对ECM中聚蛋白多糖降解起主要作用目前尚不明确[19-20]。关于ADAMTS-4的研究较多,而关于ADAMTS-5的研究相对较少,且研究者们关于ADAMTS-5不同时期表达变化的意见不能统一。张恩水等[21]依据MRI及关节镜下分级标准对OA不同时期关节液中ADAMTS-5的表达进行研究,发现ADAMTS-5在OA早、晚期组关节液中表达量高于中期OA组,呈现先下降后上升的趋势,认为ADAMTS-5在骨关节炎早期和晚期软骨破坏中均起作用。冀全博[22]采用关节镜对人软骨标本进行OA分级,对OA软骨中ADAMTS-5的表达进行研究,发现ADAMTS-5的表达在早期受到抑制,在OA进展期持续升高,证明了其在关节软骨ECM降解中的重要作用。本研究表明ADAMTS-5在假手术组关节组骨组织中表达量甚少,在OA早期含量与假手术组比较差异无统计学意义,到中晚期表达时增加,且水平基本维持不变,说明ADAMTS-5的表达与OA的病变过程及程度密切相关。相关研究[21-22]得到不同的结果,我们分析原因可能是OA早期ADAMTS-5主要在滑膜中表达,而中晚期ADAMTS-5主要在关节软骨组织中表达,具体机制有待进一步研究证实。

随着我国人口老龄化的加快,OA的患病率会逐年增高。由于目前的治疗方案并不能够逆转疾病的病程进展,因此OA晚期患者只能行手术治疗,耗费着大量的人力、物力和财力。本研究成功建立了不同时期的大鼠OA模型,发现了不同时期软骨组织中基质降解酶表达的差异,可为基础研究和临床治疗OA提供一定的参考。阐明OA发病机制是国内外学者们的一项艰巨任务,近年来随着细胞生物学和分子生物学的迅速发展,OA的研究已取得了巨大进展。进一步探究OA的发病机制,以期未来能够在病变早期进行可逆性治疗,给众多OA患者带去福音。

[参考文献]

[1] Shen J,Chen D. Recent progress in osteoarthritis research[J]. J Am Acad Orthop Surg,2014,22(7):467-468. doi:10.5435/JAAOS-22-07-467.

[2] 周 凯,罗雪梅,朱明双. 鼠类膝骨关节炎模型评价方法现状分析[J]. 风湿病与关节炎,2015,4(7):66-69. doi:10.3969/j.issn.2095-4174.2015.07.018.

[3] Pelletier JP,Jovanovic D,Fernandes JC,et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase[J]. Arthritis Rheum,2000,43(6):1275-1286. doi:10.1002/1529-0131(199807)41:7<1275::AID-ART19>3.0.CO;2-T.

[4] 祁 雷,姚运峰,荆珏华. 基质金属蛋白酶抑制剂在骨关节炎治疗中应用的研究进展[J]. 齐鲁医学杂志,2017,32(1):111-113. doi:10.13362/j.qlyx.201701038.

[5] 申晓坤,李发祥,王维山,等. 关节镜治疗膝骨关节炎疗效影响因素的回归分析[J]. 局解手术学杂志,2016,25(8):585-588. doi:10.11659/jjssx.10E015112.

[6] 周 炎,邓 明,贺 斌,等. 大鼠诱发性骨关节炎模型构建研究进展[J]. 国际骨科学杂志,2016,37(5):304-310. doi:10.3969/j.issn.1673-7083.2016.05.009.

[7] Rogart J,Barrach H,Chichester C. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis[J]. Osteoarthr Cartilage,1999,7(6):539. doi:10.1053/joca.1999.0258.

[8] 袁普卫,杨 威,康武林,等. 骨性关节炎发病机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(7):902-906. doi:10.3969/j.issn.1006-7108.2016.07.023.

[9] Rahmati M,Nalesso G,Mobasheri A,et al. Aging and osteoarthritis:central role of the extracellular matrix[J]. Ageing Res Rev,2017,40:20-30. doi:10.1016/j.arr.2017.07.004.

[10] Gao Y,Liu S,Huang J,et al. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes[J]. Biomed Res Int,2014,2014(2):1-8. doi:10.1155/2014/648459.

[11] Hoshi H,Akagi R,Yamaguchi S,et al. Effect of inhibiting MMP13 and ADAMTS5 by intra-articular injection of small interfering RNA in a surgically induced osteoarthritis model of mice[J]. Cell Tissue Res,2017,368(2):379-387. doi:10.1007/s00441-016-2563-y.

[12] Wang M,Sampson ER,Jin H,et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther,2013,15(1):R5. doi:10.1186/ar4133.

doi:10.11659/jjssx.11E017061

·基础研究·

IL-6 诱导鼻咽癌 CNE-2 细胞分泌 IL-10 的机制研究

喻望博[1],潘庆春[1],李四军[1],李 婉[1],毛丽芳[2] (1.川北医学院附属医院耳鼻咽喉科,四川 南充 637000;2.川北医学院附属医院肿瘤科,四川 南充 637000)

[摘 要] **目的** 探讨 IL-6 诱导鼻咽癌 CNE-2 细胞分泌 IL-10 的分子机制。**方法** IL-6 体外刺激鼻咽癌细胞系 CNE-2 细胞,或加入抗 IL-6 受体的抗体和信号通路抑制剂预孵育 1 h,IL-6 再进行刺激,RT-PCR 检测 IL-10 的 mRNA 表达水平,酶联免疫吸附试验检测细胞培养上清中 IL-10 的分泌水平。**结果** 与未刺激组相比,IL-6 刺激的 CNE-2 细胞显著上调 IL-10 的表达和分泌,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),并以剂量和时间依赖的方式增加;加入抗 IL-6 受体的抗体或 NF-κB 抑制剂预孵育后,IL-6 刺激 CNE-2 细胞表达和分泌 IL-10 的水平显著下降,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$)。而 PI3K 抑制剂、p38/MAPK 抑制剂、JNK 抑制剂、STAT3 抑制剂和 MEK1/2 抑制剂对 IL-6 诱导的 IL-10 表达和分泌水平则无明显的影响。**结论** IL-6 经 IL-6R/NF-κB 信号诱导 CNE-2 细胞分泌 IL-10,抑制 IL-6 信号有助于鼻咽癌的临床免疫治疗。

[关键词] 白细胞介素-6;白细胞介素-10;NF-κB;鼻咽癌

[中图分类号] R766.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-11-08

Mechanism of IL-6 induced secretion of IL-10 in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells

YU Wang-bo[1],PAN Qing-chun[1],LI Si-jun[1],LI Wan[1],MAO Li-fang[2] (1.Department of Otorhinolaryngology,the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College,Nanchong Sichuan 637000,China;2.Department of Oncology,the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College,Nanchong Sichuan 637000,China)

Abstract: Objective To study the mechanism of IL-6 stimulated the secretion of IL-10 in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells. **Methods** Nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells were cultured with recombination cytokine IL-6 in vitro,or anti-IL-6 receptor antibody and signal pathway inhibitor were pre-incubated for 1 hour,and then IL-6 were added,the mRNA and protein level of IL-10 were separately detected by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the control group,the expression and secretion of IL-10 in IL-6 stimulated group were significantly increased,which was in a dose and time dependent way,the difference was significant($P<0.01$). Additionally,IL-6 stimulated the expression and secretion of IL-10 by CNE-2 cells were significantly decreased in following pre-incubated with anti-IL-6 receptor antibody or NF-κB inhibitor,the difference was significant($P<0.01$),but such effect was not detected when CNE-2 cells

[通信作者] 毛丽芳,E-mail:maolifang@qq.com

[13] Liang Y,Duan L,Xiong J,et al. E2 regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1β-induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes[J]. Arthritis Res Ther,2016,18(1):105. doi:10.1186/s13075-016-0997-y.

[14] 吴宏斌,杜靖远,胡 勇,等.兔前交叉韧带切断骨关节炎模型中 MMP-1、MMP-13 及 TIMP-1 的 mRNA 表达研究[J].中华风湿病学杂志,2002,6(3):169-173. doi:10.3760/j:issn:1007-7480.2002.03.006.

[15] 马文明,董启榕,谢宗刚,等.MMP-1、MMP-13 在大鼠骨关节炎软骨中的表达[J].中国现代医药杂志,2011,13(3):5-7. doi:10.3969/j.issn.1672-9463.2011.03.002.

[16] 唐浚洲,苏 楠,周思儒,等.手术诱导的小鼠骨关节炎模型中关节软骨 MMP-13 表达上调[J].第三军医大学学报,2014,36(9):919-922. doi:10.16016/j.1000-5404.2014.09.019.

[17] Verma P,Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5:key enzymes in osteoarthritis[J]. J Cell Biochem,2011,112(12):3507-3514. doi:10.1002/jcb.23298.

[18] Hills R,Mazzarella R,Fok K,et al. Identification of an ADAMTS-4 cleavage motif using phage display leads to the development of fluorogenic peptide substrates and reveals matrilin-3 as a novel substrate[J]. J Biol Chem,2007,282(15):11101-11109. doi:10.1074/jbc.m611588200.

[19] Yatabe T,Mochizuki S,Takizawa M,et al. Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4(aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes[J]. Ann Rheum Dis,2009,68(6):1051. doi:10.1136/ard.2007.086884.

[20] Stanton H,Rogerson FM,East CJ,et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage[J]. Nature,2005,434(7033):648.

[21] 张恩水,闫新峰,张 明,等.聚蛋白多糖酶和基质金属蛋白酶在骨关节炎不同时期关节液中的表达[J].山东大学学报(医学版),2012,50(7):87-91. doi:10.6040/j.issn.1671-7554.2012.07.019.

[22] 冀全博.ADAMTS 调控骨关节炎软骨退变基质降解的机制研究[D].北京:中国人民解放军医学院,2015.

(编辑:魏 源)