

抑制软骨细胞线粒体自噬增加 MMP-1 和 MMP-13 表达

丁振飞¹, 常俊¹, 黄威², 曹乐³, 王涛³, 饶先亮¹, 尹宗生³

摘要 目的 体外观察环孢素 A (CsA) 抑制软骨细胞线粒体自噬后对骨关节炎 (OA) 相关蛋白基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) 和基质金属蛋白酶 13 (MMP-13) 表达的影响。方法 分离、培养临床上诊断为 OA 患者的膝关节软骨细胞, 采用甲苯胺蓝染色、II 型胶原免疫荧光染色法对软骨细胞进行鉴定。以白介素-1β (IL-1β) 刺激软骨细胞及 CsA 抑制线粒体自噬, 分为只加培养基的空白对照组、混有 IL-1β 的培养基组、混有 IL-1β + CsA 的培养基组。用 Mitotracker Deep Red (MTR) 标记线粒体与 Lysotracker green (LTG) 标记自噬体的免疫荧光共定位以及 Tom20 蛋白表达量检测线粒体自噬水平; 用 Real-time PCR 和 Western blot 法分别检测软骨细胞中 MMP-1、MMP-13 的 mRNA 和蛋白的表达。结果 IL-1β 组较对照组 MTR 和 LTG 荧光共定位增加, 线粒体外膜蛋白 Tom20 表达降低 ($P < 0.05$), 线粒体自噬增加, MMP-1、MMP-13 的 mRNA 和蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。与 IL-1β 组相比, IL-1β + CsA 组 MTR 和 LTG 荧光共定位减少, Tom20 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), 线粒体自噬减少, MMP-1、MMP-13 的 mRNA 和蛋白表达均增加 ($P < 0.05$)。结论 在体外 CsA 可以抑制软骨细胞线粒体自噬, 抑制线粒体自噬使 OA 相关蛋白 MMP-1 和 MMP-13 的表达增加。

关键词 骨关节炎; 线粒体自噬; 软骨细胞; MMP-1; MMP-13; 环孢素 A

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2018)04 - 0600 - 05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.04.022

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨的变性为主要特征的关节退行性疾病。OA 发病率、致残率高, 给社会和家庭带来沉重负担。OA 的软骨退变机制复杂, 在软骨细胞中线粒体不仅为细胞产生能量, 而且介导其他关键的生物学行为, 它可

从细胞自噬、老化、细胞死亡等多个方面影响 OA 发生发展^[1-2]。线粒体功能失调严重影响软骨细胞存活, 线粒体受损是 OA 发病的关键环节^[3-4]。受损线粒体主要通过线粒体自噬 (mitophagy) 降解, 因此 mitophagy 成为保持线粒体的数量及质量稳定, 维持软骨细胞内环境稳态及存活重要调节机制^[5]。另外 mitophagy 可降低 OA 治病因子活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生和炎症因子的激活^[6-7]。但是目前 mitophagy 在 OA 病程中的作用机制尚未明确, 所以本研究通过环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 抑制软骨细胞 mitophagy, 观察对 OA 相关蛋白基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 和基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 表达的影响, 从而深入探讨 mitophagy 在 OA 中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 所用软骨来自安徽医科大学第一附属医院在 2016 年 10 月 ~ 2017 年 6 月接受全膝关节置换手术的患者, 所有患者均符合 OA 的诊断标准^[8]。取术中截取的关节软骨标本放入盛有生理盐水的无菌盒中, 送往实验室处理。

1.2 主要试剂与药物 II 型胶原蛋白抗体 (英国 Abcam 公司); 鼠源抗 GAPDH 单克隆抗体 (美国 Proteintech Group 公司); MMP-1、Tom20 抗体 (万类生物科技公司); MMP-13 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); MMP-1、MMP-13、GAPDH 引物序列 (上海生工生物工程股份有限公司); Lysotracker (美国 Life Technologies 公司); Mitotracker、TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); CsA (美国 MedChemExpress 公司); PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)。

1.3 方法

1.3.1 原代软骨细胞分离、培养及分组 在超净工作台用手术刀片将软骨削成薄片, 用含有双抗的 PBS 洗 3 遍, 剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小组织粒, 移入离心管中离心弃上清液, 加入 3 倍体积的

2018 - 01 - 02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81171173); 安徽医科大学校科学研究基金 (编号: 2015xkj042)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第四附属医院骨科, 合肥 230022

² 安徽医科大学附属安徽省立医院骨科, 合肥 230001

³ 安徽医科大学第一附属医院骨科, 合肥 230022

作者简介: 丁振飞, 男, 硕士研究生;

尹宗生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

0.25% 胰蛋白酶 37 °C 恒温消化 0.5 h, 离心弃去胰蛋白酶液体, 加入含血清的培养液中中止胰蛋白酶消化; 弃上清液, 加入 2 倍体积的 0.1% II 型胶原酶 37 °C 消化 8~12 h。先以 500 r/min 离心 5 min, 此时消化下来的细胞悬浮在上清液中, 取上清液, 再以 1 500 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬转入培养瓶中常规培养, 剩余软骨再加入 2 倍体积的 0.1% II 型胶原酶 37 °C 继续消化 8~12 h, 以同样方法收集细胞直至所有软骨全部消化。待贴壁细胞融合率达到 80% 左右时, 弃掉培养基, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化, 按比例进行传代培养。本实验均使用第二代软骨细胞并分为 3 组: 空白对照组、IL-1 β (10 ng/ml) 组、IL-1 β (10 ng/ml) + CsA (5 μ mol/L) 组, 待细胞融合至 60%~80% 时给予干预处理 24 h。

1.3.2 软骨细胞鉴定 在 24 孔板中用玻片进行细胞爬片, 分别进行甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫荧光染色。① 甲苯胺蓝染色: 倾去培养基, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 去除甲醛再以 PBS 洗 3 次, 1% 甲苯胺蓝染色 30 min 后 PBS 洗 3 次, 取出爬片在倒置光镜下观察拍照。② II 型胶原免疫荧光染色: 用上述同样方法固定细胞, 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min, PBS 洗 3 次, 滴加正常山羊血清室温封闭 30 min; 吸水纸吸掉封闭液, 滴加 II 型胶原抗体 (1:400), 湿盒中 4 °C 孵育过夜; 37 °C 复温 30 min, PBS 洗 3 次, 加入异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的二抗 (1:100), 湿盒中 37 °C 避光孵 1 h, PBS 洗 3 次, 用抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜下观察采集图像。

1.3.3 MTR 和 LTG 荧光探针染色 在 24 孔板中培养各组细胞, 吸除培养液, 加入 37 °C 预热的 Mito Tracker Deep Red (100 nmol/L) 工作液染色, 37 °C 孵育 20 min。吸除染液, 加入 37 °C 预热的 LysoTracker Green (75 nmol/L) 工作液。37 °C 孵育 1.5 h, 使用 PBS 替换上述染色液, 置于荧光显微镜下观察。

1.3.4 Real-time PCR 测定 mRNA 的表达 分别采用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 测量浓度后用逆转录试剂盒获取 RT 反应液进行 PCR 反应, 根据 TaKaRa 试剂盒说明书配 20 μ l 反应体系, 所用引物序列如下 GAPDH: F: 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3', R: 5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'; MMP-1: F: 5'-AAATAGTGGCCAGTGGTTG-3', R: 5'-CATCAGGCACTCCACATC-3'; MMP-13: F: 5'-GACTTCCCAGGAATTGGTGA-3', R: 5'-TGACGCGAACA-

TACGGTTA-3', 反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 引物退火 5 s, 60 °C 延伸反应 34 s, 共进行 40 个循环, 溶解阶段温度设置为: 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 95 °C、15 s。反应终止后根据所测 Ct 值, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出 mRNA 的相对表达量。

1.3.5 Western blot 法检测蛋白表达 处理细胞后提取各组细胞总蛋白, 应用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 将蛋白样品与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 \times) 4:1 混合, 经水浴锅煮沸使蛋白变性, 将适量各组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后用电转仪转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 将载有蛋白的 PVDF 膜移入有一定比例稀释好一抗的孵育盒中, 一抗稀释比例分别为 MMP-13 (1:100)、MMP-1 (1:500) 和 Tom20 (1:500), 4 °C 过夜, TBST 洗膜后加入稀释好的二抗室温孵育 2 h, 配 ECL 工作液, 凝胶成像仪中显影。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析 (ANOVA), 两组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞鉴定结果 甲苯胺蓝染色: 培养的细胞经染色后呈紫蓝色, 细胞基质呈蓝色, 胞内及细胞周围有蓝紫色异染颗粒, 说明所培养细胞可合成蛋白聚糖 (图 1A)。II 型胶原免疫荧光染色: 可见所有细胞胞质和胞膜呈鲜亮的绿色荧光, 细胞核区域未见明显绿色荧光, 证明所培养细胞可合成 II 型胶

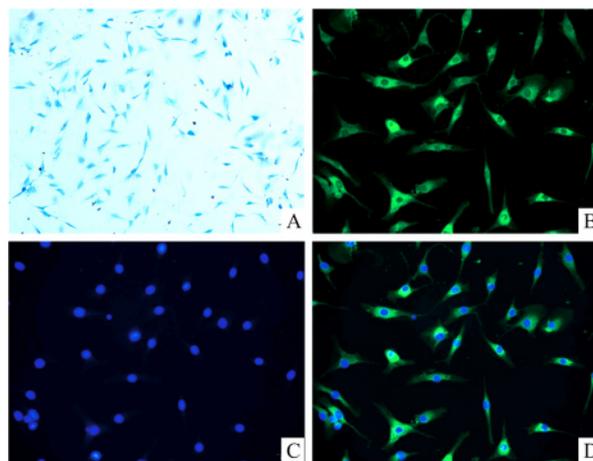


图 1 软骨细胞鉴定

A: 甲苯胺蓝染色 $\times 200$; B-D: II 型胶原蛋白免疫荧光染色 (B 图为 II 型胶原免疫荧光, C 图为 DAPI 荧光染色, D 图为 B、C 组合图) $\times 400$

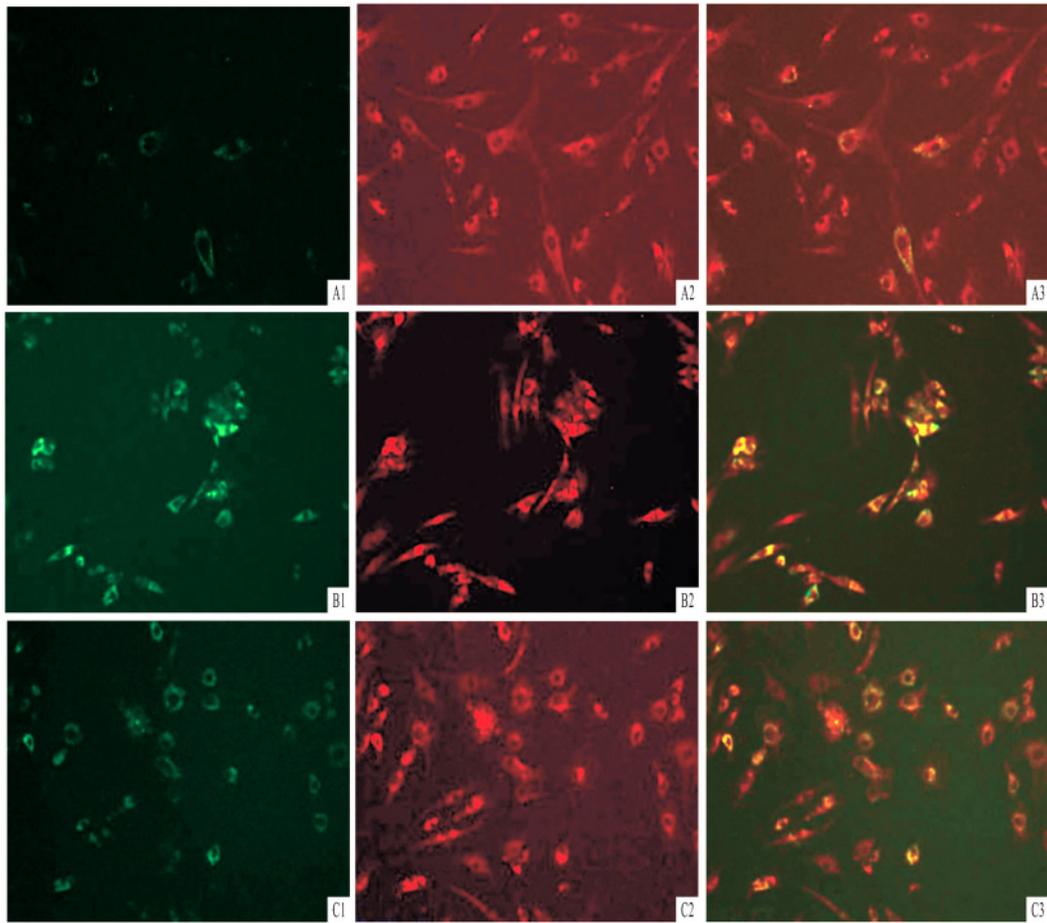


图2 免疫荧光共定位检测 mitophagy 的表达 ×400
A: 对照组; B: IL-1β 组; C: IL-1β + CsA 组; 1: LTG 染色; 2: MTR 染色; 3 为 1、2 组合图

原蛋白(图1B-D)。II型胶原蛋白与蛋白聚糖是软骨细胞标志性分泌物,两种染色均证明本实验所培养的细胞均为软骨细胞。

2.2 LTG、MTR 双色荧光探针染色检测 mitophagy MTR 是一种线粒体的红色荧光探针,用于活细胞线粒体的特异性荧光染色,LTG 是一种自噬体的绿色荧光探针,用于细胞内自噬体的荧光染色,两者进行荧光共定位可以检测 mitophagy 的发生情况。在荧光显微镜下 MTR 将线粒体标记为红色,LTG 将自噬体标记为绿色,自噬体与线粒体共定位时显现为黄色标记。在对照组几乎无明显的黄色标记,IL-1β 组可见大量的黄色标记,而 IL-1β + CsA 组只有少量黄色标记,见图2。

2.3 各组细胞 MMP-1、MMP-13 的 mRNA 表达 Real-time PCR 结果显示:与空白对照组比较,IL-1β 组、IL-1β + CsA 组的 MMP-1、MMP-13 的 mRNA 表达量均显著增高($P < 0.01$),与 IL-1β 组比较,IL-1β + CsA 组 MMP-1、MMP-13 的 mRNA 表达量显著

高于 IL-1β 组($P < 0.01$)。各组间比较差异有统计学意义($F = 715.22, P < 0.01; F = 617.49, P < 0.01$) ,见图3。

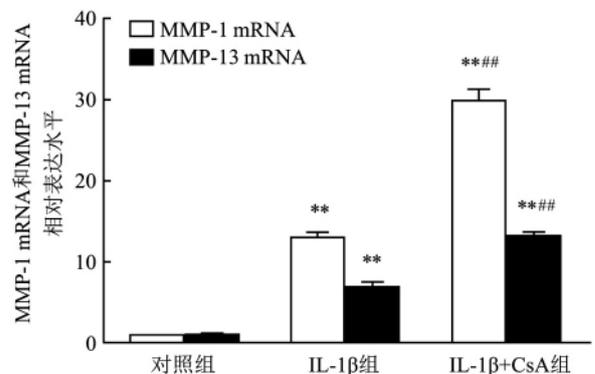


图3 MMP-1、MMP-13 mRNA 在软骨细胞中的表达
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 IL-1β 组比较: ### $P < 0.01$

2.4 各组细胞 MMP-1、MMP-13 和 Tom20 蛋白表达量 Western blot 结果显示与空白对照组比较,IL-

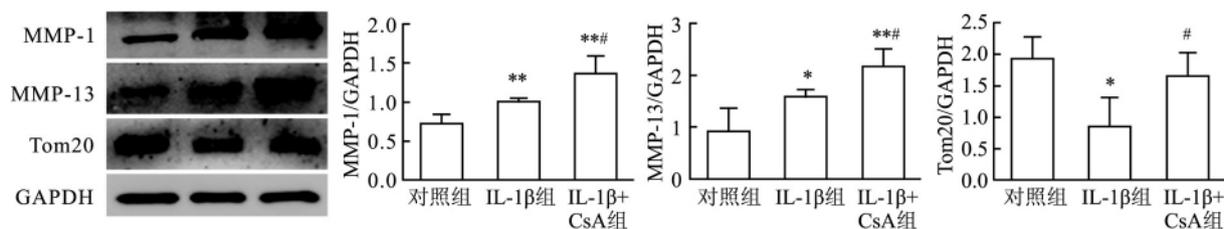


图4 MMP-1、MMP-13和Tom20蛋白在软骨细胞中的表达
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与IL-1β组比较: # $P < 0.05$

1β组、IL-1β + CsA组的MMP-1、MMP-13蛋白表达量均显著增高($P < 0.05$);与IL-1β组比较,IL-1β + CsA组MMP-1、MMP-13蛋白表达量显著高于IL-1β组($P < 0.05$),各组间比较差异有统计学意义($F = 13.48, P < 0.01$; $F = 16.45, P < 0.01$);同时与空白对照组比较,IL-1β组Tom20蛋白表达量显著降低($P < 0.05$);而与IL-1β组比较,IL-1β + CsA组Tom20蛋白表达量显著增高($P < 0.05$),见图4。

3 讨论

OA的发病机制并未完全明确,可能与生物力学改变、软骨细胞老化、细胞内自由基、金属蛋白酶降解等相关。基质金属蛋白酶在OA的滑膜、软骨组织均可产生,可降解软骨基质致软骨破坏,也是众多细胞因子作用的重要环节。其中MMP-1在正常软骨中则很少表达,而在OA软骨中的表达明显升高。MMP-1可作用于Gly906-Leu907的肽键,从而裂解软骨基质的主要成分II型胶原蛋白,从而促进OA软骨的退变。与MMP-1同属于胶原酶的MMP-13不仅可与MMP-1作用相同的位点裂解II型胶原蛋白,而且可对裂解之后的II型胶原小片段进行二次裂解。在众多基质金属蛋白酶亚型中,MMP-13是最有效的II型胶原降解酶,其降解速率可达到MMP-1的十倍之多,与OA相关性较高^[9]。在众多促炎因子中,IL-1β在启动和促进OA进展中具有重要作用。IL-1β不仅可通过上调可诱导一氧化氮合酶与环氧化酶2进而促进一氧化氮、前列腺素E2的分泌^[10],而且可促进基质金属蛋白酶分泌参与OA发生发展。在本研究中,采用IL-1β刺激OA软骨细胞MMP-1、MMP-13表达增多,这与Santangeol et al^[11]干预结果相一致。

OA病理上可累及整个关节内所有组织,关节软骨细胞则处在一个低氧、炎症刺激的微环境中,炎症的激活和低氧均可损伤线粒体,受损线粒体主要通过特异性的标记蛋白迁移并形成自噬体,最终与

溶酶体融合降解,这个过程称为mitophagy^[5,12]。mitophagy机制并未完全明确,但是研究^[13-14]表明受损的线粒体可通过线粒体通透性转换使线粒体去极化,从而与自噬体融合发生mitophagy。CsA能与位于线粒体基质空间中亲环蛋白D结合从而特异性的抑制线粒体通透性转换从而减少mitophagy的发生。Tom20为线粒体外膜蛋白受体,定位于线粒体上稳定表达,当mitophagy发生增多时表达降低。本研究结果显示当OA软骨细胞受IL-1β刺激之后,LTG、MTR荧光染色共定位明显增多,Tom20蛋白减少,说明软骨细胞内mitophagy发生增加。在正常状态下,细胞内基础性mitophagy水平很低,起到了维持细胞内稳态的作用,但在IL-1β刺激下,线粒体受损增多,mitophagy会增强以清除受损线粒体保护细胞免受损伤。而当加有mitophagy抑制剂CsA后,LTG、MTR荧光染色共定位相对IL-1β组减少,Tom20蛋白也相对增加,说明mitophagy被抑制,但MMP-1、MMP-13表达进一步增多,提示抑制OA软骨细胞mitophagy可使MMP-1、MMP-13表达上调,进一步促进OA的发展。

受损的线粒体可介导细胞程序性死亡,mitophagy通过清除受损的线粒体使其选择性的隔离和降解,防止进一步的损伤,维持细胞内环境稳定,mitophagy功能障碍与多种老龄化病变相关^[15]。因此,笔者推测抑制mitophagy的发生使受损的线粒体无法有效的清除,致使受损线粒体堆积并继续产生大量活性氧、炎症因子激活、细胞色素C等对软骨细胞有害的物质,进一步促进MMP-1和MMP-13表达。本研究初步揭示软骨细胞中mitophagy的抑制可增加OA相关蛋白MMP-1和MMP-13表达,说明mitophagy在OA进展中有一定保护作用,但具体分子机制及作用途径并不明了,而且本研究为体外实验,对于复杂多变的体内环境有待进一步探索。

参考文献

- [1] Wu L, Liu H, Li L, et al. Mitochondrial pathology in osteoarthritis-

- ic chondrocytes [J]. *Curr Drug Targets* ,2014 ,15(7) : 710 - 9.
- [2] Blanco F J , Rego I , Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol* ,2011 ,7(3) : 161 - 9.
- [3] Roach H I. The complex pathology of osteoarthritis: even mitochondria are involved [J]. *Arthritis Rheum* ,2008 ,58(8) : 2217 - 8.
- [4] Blanco F J , Lopez-Armada M J , Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis [J]. *Mitochondrion* ,2004 ,4(5 - 6) : 715 - 28.
- [5] Twig G , Hyde B , Shirihai O S. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view [J]. *Biochim Biophys Acta* ,2008 ,1777(9) : 1092 - 7.
- [6] Zhong Z , Umemura A , Sanchez-Lopez E , et al. NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria [J]. *Cell* ,2016 ,164(5) : 896 - 910.
- [7] Bin-Umer M A , McLaughlin J E , Butterly M S , et al. Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2014 ,111(32) : 11798 - 803.
- [8] 邱贵兴. 骨关节炎诊治指南(2007年版) [J]. *中华关节外科杂志(电子版)* 2007 ,1(4) : 281 - 5.
- [9] Mitchell P G , Magna H A , Reeves L M , et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage [J]. *J Clin Invest* ,1996 ,97(3) : 761 - 8.
- [10] El Mansouri F E , Chabane N , Zayed N , et al. Contribution of H3K4 methylation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human osteoarthritis chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum* ,2011 ,63(1) : 168 - 79.
- [11] Santangelo K S , Nuovo G J , Bertone A L. *In vivo* reduction or blockade of interleukin-1 β in primary osteoarthritis influences expression of mediators implicated in pathogenesis [J]. *Osteoarthritis Cartilage* ,2012 ,20(12) : 1610 - 8.
- [12] Kim I , Rodriguez-Enriquez S , Lemasters J J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy [J]. *Arch. Biochem Biophys* ,2007 ,462(2) : 245 - 53.
- [13] Rodriguez-Enriquez S , Kim I , Currin R T , et al. Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes [J]. *Autophagy* ,2006 ,2(1) : 39 - 46.
- [14] Elmore S P , Qian T S , Lemasters J J. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes [J]. *FASEB J* ,2001 ,15(12) : 2286 - 7.
- [15] Green D R , Galluzzi L , Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging [J]. *Science* ,2011 ,333(6046) : 1109 - 12.

The inhibition of mitophagy can increase the expression of osteoarthritis-related MMP-1 and MMP-13 in chondrocyte

Ding Zhenfei¹ , Chang Jun¹ , Huang Wei² , et al

(¹Dept of Orthopaedics , The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022;

²Dept of Orthopaedics , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of mitophagy inhibited by cyclosporin A (CsA) on the expression of osteoarthritis-related matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in chondrocyte. **Methods** Chondrocytes of cartilage were obtained from OA patients undergoing arthroplastic surgery for total knee joint replacement. Toluidine blue staining and type II collagen immunofluorescence staining were applied to identify chondrocytes. CsA inhibited mitophagy under the condition of interleukin-1 β (IL-1 β) stimulated chondrocytes. Chondrocytes was divided into normal group, IL-1 β group and IL-1 β + CsA group. Immunofluorescence localization was performed for mitochondria labeled with Mitotracker Deep Red (MTR), autophagosomes labeled with Lysotracker green (LTG) to observe mitophagy. Real-time PCR was used to measure the expression of mRNA of MMP-1 and MMP-13. Western blot was used to measure the expression of proteins of Tom20, MMP-1 and MMP-13. **Results** Compared with the normal group, the IL-1 β group had a significant increase immunofluorescence colocalization of MTR and LTG, a significant decrease in the expression of the mitochondrial outer membrane protein Tom20 ($P < 0.05$), and a significant increase in the expression of the mRNA and proteins of MMP-1 and MMP-13 (both $P < 0.05$). Compared with the IL-1 β group, the IL-1 β + CsA group had a significant reduction in the immunofluorescence colocalization of MTR and LTG, a significant increase in the expression of protein Tom20 ($P < 0.05$), and a significantly greater increase in the expression of the mRNA and proteins of MMP-1 and MMP-13 (both $P < 0.05$). **Conclusion** CsA can inhibit the degree of mitophagy in chondrocyte, and the inhibition of mitophagy can increase expression of osteoarthritis-related MMP-1 and MMP-13.

Key words osteoarthritis; mitophagy; chondrocyte; MMP-1; MMP-13; cyclosporin A