

凝血酶敏感激素蛋白酶 4/5 在骨性关节炎滑膜中的表达及意义

王京¹, 张琪琪¹, 胡勇¹, 魏伟²

摘要 目的 研究凝血酶敏感激素蛋白酶 4/5(ADAMTS4/5)在骨性关节炎(OA)滑膜组织及滑膜细胞中的表达及意义。**方法** 取 6 例正常者滑膜组织和 6 例 OA 患者滑膜组织, Western blot 法检测标本中 ADAMTS4/5 的表达, 离体培养正常者滑膜细胞。白介素-1β(IL-1β)刺激正常滑膜细胞, 测定滑膜细胞中 ADAMTS4/5 的表达量; IL-1RA(IL-1β 阻滞剂)抑制 IL-1β 后, 测定滑膜细胞中 ADAMTS4/5 的表达量。**结果** ADAMTS4/5 在 OA 患者滑膜组织中表达较正常者滑膜组织均显著增加; IL-1β 刺激滑膜细胞后, ADAMTS4/5 升高, IL-1RA 可明显降低 IL-1β 诱导的滑膜细胞中 ADAMTS4/5 的表达。**结论** IL-1β 可以按照剂量依赖方式正向调节 ADAMTS4/5 的表达; ADAMTS4/5 和 IL-1β 在 OA 病变机制中发挥重要的作用。

关键词 骨性关节炎; ADAMTS4/5; IL-1β; IL-1RA; 滑膜细胞
中图分类号 R 684.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)10-1475-04

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以骨质丢失、骨赘形成、关节畸形等为主要特征的退行性关节病,发病机制尚不明确。目前的观点凝血酶敏感激素蛋白酶 4(aggrecanase4, ADAMTS4)主要是由炎性细胞因子诱导产生^[1]。凝血酶敏感激素蛋白酶 5(aggrecanase5, ADAMTS5)主要是由病理性软骨细胞和滑膜成纤维表达^[2]。ADAMTS4/5 被认为能引起滑膜炎症性反应,最终导致 OA 的发生。白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)是在滑膜炎症反应中比较重要的一种细胞因子,其作用是能够刺激滑膜细胞增殖,产生相关降解酶,从而破坏关节软骨,最终引起关节炎症,与 OA 的发生发展有着密切的关系。目前 ADAMTS4/5 在滑膜组织和细胞中的表达仍存在争议。该研究采用 Western blot 法分别测定滑膜组织、细胞蛋白表达量,旨在探讨 ADAMTS4/5、IL-1β 和 OA 之间的关系。

2015-05-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81173075)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院骨科, 合肥 230022

²安徽医科大学药理研究所, 合肥 230032

作者简介: 王京, 男, 硕士研究生;

胡勇, 男, 博士研究生, 副教授, 责任作者, E-mail: hy.in163@163.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 9 月~2013 年 1 月于安徽医科大学第一附属医院骨科就诊的 OA 患者的滑膜组织 6 例(OA 组),另选因意外损伤导致股骨颈骨折患者的滑膜组织 6 例(对照组)。其中男 4 例,女 8 例;年龄 35~85(57.50±7.35)岁。

1.2 主要仪器 SDS-PAGE 电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Tek 公司); -80℃超低温冰箱(日本三洋公司); Bioshine ChemiQ 4600 荧光及化学发光成像系统(中国 Bioshine 公司); 酶联免疫检测仪、组织匀浆器(上海欧翔科学仪器有限公司); 恒温箱(上海一恒科技有限公司); 显微镜(日本 Olympus 公司); 摆床、离心机(安徽医科大学临床药理研究所提供)。

1.3 主要试剂 20% FBS 培养液、IL-1β、白介素 1 受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1RA)、0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM 培养基、去离子水、分离胶缓冲液、浓缩胶缓冲液、PVDF 膜、TEMED 原溶液、Tris、脱脂奶粉、PBS 缓冲液和吐温 PBS 缓冲液(上海南基生物科技有限公司); 兔抗 ADAMTS4/5 多克隆抗体(英国 Abcam 公司); 山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司); RIPA 缓冲液和 SDS-PAGE 加样缓冲液(中国碧云天生物技术研究所); ECL 显影液(美国 Thermo 公司)。

1.4 方法

1.4.1 滑膜细胞的分离、培养以及传代 采用组织块法,标本在无菌条件下处理后(滴加 2 滴含 20% FBS 培养液),将组织块剪碎成约 1 mm×1 mm×1 mm 大小,使用 20% FBS 处理后放置于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中约 3 h。翻转培养瓶,使组织块浸没于培养液中,继续培养当检测细胞数值达到 1×10⁵ 个/ml 时,传代至 24 孔培养板中待用。

1.4.2 组织蛋白鉴定

1.4.2.1 组织的取材 经术前谈话已经获得患者本人和家属同意后,标本取自安徽医科大学第一附属医院关节外科中心髋、膝关节置换的患者,共取出 12 例,标本为新鲜滑膜组织,带无菌手套后使用手

术刀片剔除脂肪等非滑膜组织后,所取标本分为两组,所有标本袋上需注明患者详细信息。正常组(供细胞蛋白鉴定)和 OA 组(供组织蛋白鉴定)分别放置于无菌 EP 管及含生理盐水的标本袋中,后于 -80 ℃ 冰箱冻存。

1.4.2.2 组织蛋白提取 取对照组及 OA 组各 1 g,电子称精确测量后平均分为 4 组(加入约 2.5 ml 的蛋白裂解液),使用组织匀浆器小心充分研磨(冰浴条件下),直至完全研磨至无固态物质存留即加入 1.5 ml EP 管标序。分别取 40 μl 蛋白样品至标序为 1、2、3、4 的 EP 管中,1、3 号设为对照组,2、4 号设为 OA 组。加 Loading Buffer 缓冲液煮沸 10 min,冷却后,于 -80 ℃ 冰箱保存。

1.4.2.3 细胞蛋白提取 滑膜细胞传代至 60 mm 培养皿中,待细胞充分融合,收集细胞,弃培养基,加入 PBS 2 ml 清洗培养皿 1 次,弃 PBS。0.05% 胰酶 2 ml 处理,37 ℃ 温育 1 min。镜下观察细胞变形后,将细胞转移至一个 1.5 ml EP 管中,10 000 r/min 离心 3 min,4 ℃ 条件下弃 EP 管上清液,1 ml 预冷的 PBS 清洗沉淀,10 000 r/min 离心 3 min,4 ℃ 条件下 PBS 清洗 1 次弃上清液,-80 ℃ 冻存待裂解,向细胞沉淀中加入 200 μl RIPA 缓冲液,混匀后冰上放置 40 min,10 000 r/min 离心 15 min,4 ℃,将上清液(约 250 μl)转移至一个新的 EP 管中。

1.4.2.4 Western blot 法测定滑膜组织蛋白表达水平 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质,转移至 PVDF 膜上,37 ℃ 条件下 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,用 ADAMTS4/5 抗体(1:200),β-actin(1:1 000)孵育,4 ℃ 过夜,加入山羊抗兔标记二抗(1:10 000),37 ℃ 温育 1 h,ECL 底物化学发光显影,检测各样本中 ADAMTS4/5 蛋白灰度值,分别与对应的 β-actin 蛋白灰度值比较,计算两者比值。

1.4.2.5 Western blot 法检测滑膜细胞蛋白表达水平 采集的蛋白样品(-20 ℃)冻存后,10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质,转移至 PVDF 膜上,37 ℃ 条件下 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,用 ADAMTS4/5 抗体(1:100),β-actin(1:500)孵育,4 ℃ 过夜,加入山羊抗兔标记二抗(1:5 000),37 ℃ 温育 0.5 h,ECL 底物化学发光显影,检测各样本中 ADAMTS4/5 蛋白灰度值,分别与对应的 β-actin 蛋白灰度值比较,计算两者比值。

1.4.3 IL-1β 与 IL-1RA 对滑膜细胞蛋白表达的测定

1.4.3.1 IL-1β 诱导对照组滑膜细胞 对照组滑膜细胞贴壁生长后,更换 DMEM 培养基(含 0.1%

BSA)继续培养 24 h,更换 DMEM 培养基(含 1、10 ng/ml IL-1β),各浓度分别做 8 个复孔,分别为试验组 2、3;对照组为试验组 1。作用时间为 6 h,检测各样本中 ADAMTS4/5 蛋白灰度值,分别与对应的 β-actin 蛋白灰度值比较,计算两者比值。

1.4.3.2 IL-1RA 降低 IL-1β 诱导水平 试验组 1、试验组 4(IL-1RA 500 ng/ml + IL-1β 10 ng/ml)、试验组 5(IL-1RA 500 ng/ml + IL-1β 10 ng/ml)。IL-1RA 预处理作用时间为 2 h,后用 IL-1β 继续作用 24 h,检测各样本中 ADAMTS4/5 蛋白灰度值,分别与对应的 β-actin 蛋白灰度值比较,计算两者比值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量资料用单因素方差分析 ANOVA 比较,多组间均数采用 LSD 两两比较。

2 结果

2.1 滑膜组织中 ADAMTS4/5 的表达情况 OA 组 ADAMTS4/5 的表达明显高于对照组($F = 422.911, 905.154, P < 0.01$)。提示 ADAMTS4/5 在 OA 滑膜中高表达。见图 1。

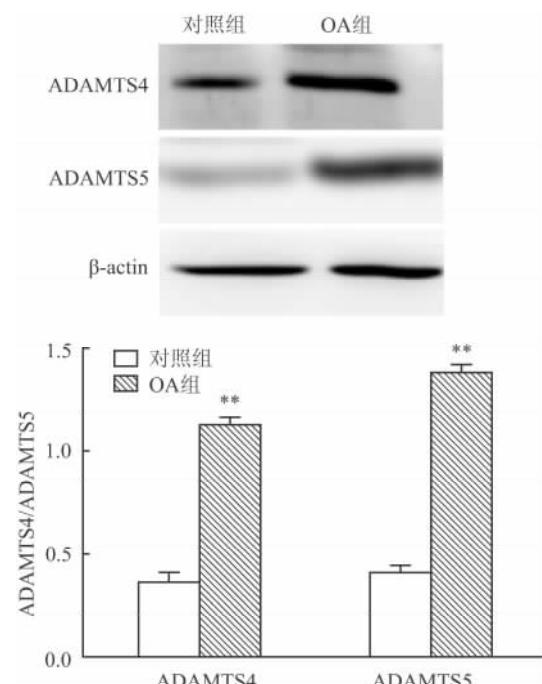


图 1 Western blot 法检测 ADAMTS4/5 的表达
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 滑膜细胞蛋白表达水平 IL-1β 作用滑膜细胞后,随着剂量的增加,ADAMTS4 的表达量增加但不明显,ADAMTS5 的表达量明显增加($F = 60.100, P < 0.01$),提示 ADAMTS5 的表达随着 IL-1β 刺激

量增加呈逐渐升高的趋势($P < 0.01$)。见图2。

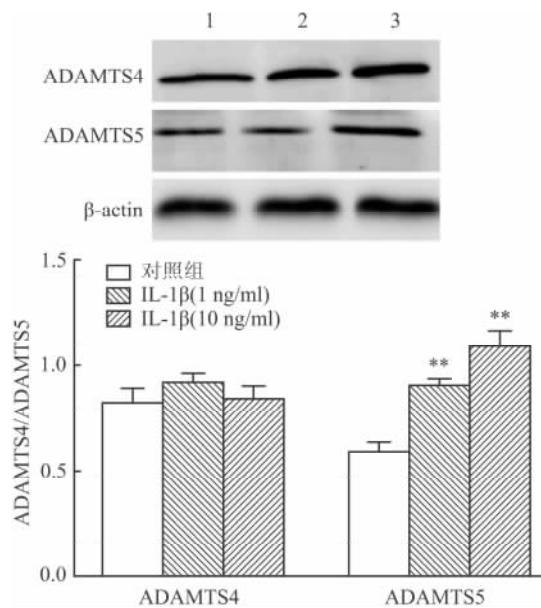


图2 Western blot法检测各组ADAMTS4/5的表达

1:对照组;2:IL-1 β (1 ng/ml);3:IL-1 β (10 ng/ml);与对照组比较: $**P < 0.01$

2.3 正常滑膜细胞的形态 倒置显微镜下观察,细胞核呈卵圆形,位于细胞中间,边界清楚,核仁清晰可见;IL-1 β 作用后细胞数量发生明显变化,而使用IL-1RA后数量未见明显变化。见图3。

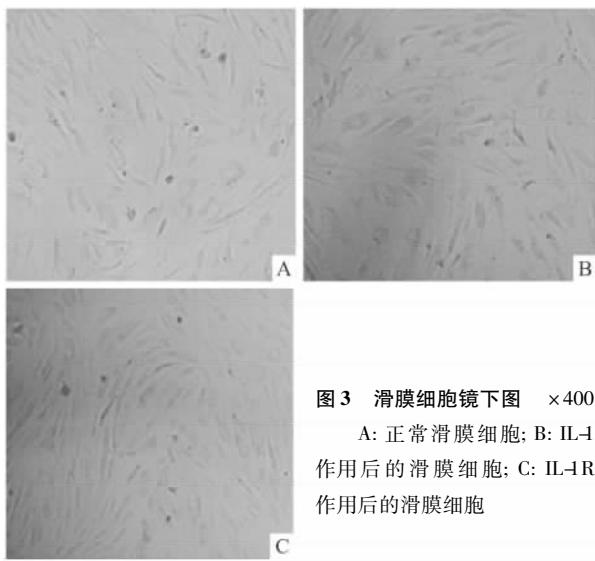


图3 滑膜细胞镜下图 $\times 400$

A:正常滑膜细胞;B:IL-1 β 作用后的滑膜细胞;C:IL-1RA作用后的滑膜细胞

2.4 IL-1RA对IL-1 β 诱导水平的影响 IL-1 β 刺激人滑膜细胞后,ADAMTS4/5的表达量均高于对照组,使用IL-1RA抑制后,ADAMTS4和ADAMTS5的表达量均明显降低,结果显示IL-1RA可以降低IL-1 β 诱导水平。见图4。

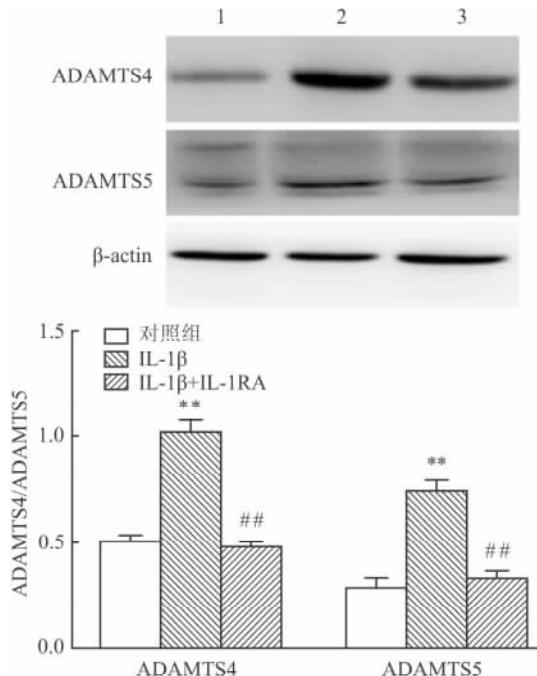


图4 Western blot法检测ADAMTS4/5的表达

1:对照组;2:IL-1 β ;3:IL-1 β +IL-1RA;与对照组比较: $**P < 0.01$;与IL-1 β 比较: $##P < 0.01$

3 讨论

OA的产生是一个多种因素共同参与作用的过程,目前治疗方法是使用以缓解疼痛及对抗炎症反应的药物与为主,如非甾体抗炎药或类固醇激素。但目前国内尚无根治OA的方法,并且在治疗OA上存在许多争议,因此找到治疗OA的新靶点或者靶向治疗药物显得尤为重要。

研究^[3]显示,在体外培养的正常人或动物的滑膜细胞中仅有少量的IL-1 β ,但是在人OA的滑膜组织提取的细胞上清液中却能检测出高表达的IL-1 β 。ADAMTS又被称为蛋白聚糖酶,是国内外这些年克隆提取的新型酶类,属新的金属蛋白酶家族成员^[4],是带有凝血酶敏感蛋白样模体的裂解素。在白介素1家族中IL-1 β 与IL-1RI(白细胞介素1受体I型)的结合力最低,但IL-1RA与IL-1RI的结合力几乎不可逆转,因此IL-1RA被认为是IL-1 β 较为有效的抑制剂^[5]。ADAMTS的家族成员中,特别是存在于人或动物软骨和滑膜组织中的蛋白聚糖酶1/2,又被分别称为ADAMTS4/5。被认为是可以降解关节软骨的一类。

研究^[6-7]表明,IL-1对ADAMTS5 mRNA的表达没有或仅有轻微影响。在动物实验方面用IL-1或维甲酸处理牛滑膜,并不改变ADAMTS4/5 mRNA的表达^[2]。在人滑膜细胞培养中,Bondeson et al^[8]

用某种抑制剂阻断肿瘤坏死因子- α 的活性,结果显示 ADAMTS4/5 的表达受到明显抑制,文献^[9] 报道在软骨细胞的培养中,用 IL-RA 可以阻滞 IL-1 和肿瘤坏死因子- α 的诱导作用。本研究结果显示 ADAMTS4/5 在 OA 滑膜组织中均高表达; IL-1 β 可诱导人正常滑膜细胞的增殖,能够产生高表达的 ADAMTS4/5; 不同剂量的 IL-1 β 作用滑膜细胞后,ADAMTS4 表达量增加不明显,ADAMTS5 表达的量逐渐增加,提示两种酶表达水平有差异; IL-RA 能够抑制 IL-1 β 诱导细胞蛋白表达,但因为没有设立精确时间点及 IL-1 β 作用时间不同导致统计分析结果出现不一致。

研究^[10-12] 显示 p38-TAK1-NF- κ B 信号通路可能参与调节 ADAMTS4/5 的表达。由于经费及时间限制,未能进一步讨论。找出信号通路中的作用靶点和特异性抑制剂,为治疗 OA 提供新的依据显得尤为重要。在 OA 的研究中,仍有很多问题尚待解决。ADAMTS4 和 ADAMTS5 在软骨中的表达及相关机制,在人体其他组织中蛋白聚糖酶起到的作用等均有待于进一步研究证实。

参考文献

- [1] Moulharat N, Lesur C, Thomas M, et al. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes *in vitro* [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(4) : 296 - 305.
- [2] Fosang A J, Rogerson F M, East C J, et al. ADAMTS-5: the story so far [J]. *Eur Cell Mater*, 2008, 15(9) : 11 - 26.
- [3] 张银刚,薛金山,刘 壶,等.外源性玻璃酸钠对骨关节炎患者
- [4] Stevens A L, Wheeler C A, Tannenbaum S R, et al. Nitric oxide enhances aggrecan degradation by aggrecanase in response to TNF-alpha but not IL-1beta treatment at a post-transcriptional level in bovine cartilage explants [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(4) : 489 - 97.
- [5] 邵俊杰,张先龙,蒋 壢. IL-1 在骨关节炎发病机制中的作用及相关基因治疗 [J]. *国际骨科学杂志*, 2007, 28(5) : 309 - 22.
- [6] Bau B, Gebhard P M, Haag J, et al. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes *in vivo* and *in vitro* [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(10) : 2648 - 57.
- [7] Tortorella M D, Malfait A M, Deccico C, et al. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase2) in a model of cartilage degradation [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9(6) : 539 - 52.
- [8] Bondeson J, Wainwright S D, Lauder S, et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6) : R187.
- [9] Woodell-May J, Matuska A, Oyster M, et al. Autologous protein solution inhibits MMP-13 production by IL-1 β and TNF α -stimulated human articular chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(9) : 1320 - 6.
- [10] Ulrichs P, Lemmens I, Lavens D, et al. MAPPIT (mammalian protein-protein interaction trap) analysis of early steps in toll-like receptor signalling [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 517: 133 - 44.
- [11] 张 炜,袁金铎,安利国.由不同接头分子介导的 Toll 样受体信号通路 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(4) : 544 - 46.
- [12] 王贤波,蒋 青. p38 MAPK 信号转导途径在关节软骨细胞中的激活和作用 [J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(1) : 178 - 84.

The expression and significance of thrombin-sensitive hormone protease4/5 in osteoarthritis synovial

Wang Jing, Zhang Qiqi, Hu Yong, et al

(Dept of Orthopedicst, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To research the expression of thrombin sensitive hormone protease 4 (ADAMTS4/5) in the OA synovial tissue and cells. **Methods** 6 cases of OA synovial tissue and 6 cases of normal synovial tissue were taken during the operation. The expression quantity of specimen ADAMTS4/5 in cases was measured by Western blot, respectively. The normal group and OA group synovial cells were cultured *in vitro*. The normal group synovial cells were induced by IL-1 β or IL-1 β blockers (IL-1 RA). The expression quantity of ADAMTS4/5 were measured by the supernatant fluid. **Results** ADAMTS4/5 in OA synovial tissue expressed significantly than the normal group. The group of IL-1 β was obviously higher, IL-1 RA could block IL-1 β and induce synovial cells to produce ADAMTS4/5. **Conclusion** ADAMTS4/5 and IL-1 β play an important role in synovial tissue inflammatory change; IL-1 β can be in accordance with the dose-response manner positive adjustment ADAMTS4/5 expression.

Key words osteoarthritis; ADAMTS4/5; IL-1 β ; IL-1 RA; synovial cells