

ADAMTS-4 与 TAK1 在骨关节炎软骨组织中表达的相关性研究

张琪琪¹, 胡 勇¹, 周 定¹, 丁 辉¹, 阙玉康¹, 魏 伟²

摘要 目的 探讨带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-4 (ADAMTS-4) 与转化生长因子 β 激活激酶 1 (TAK1) 在骨关节炎 (OA) 软骨组织中的相关性表达。方法 采用病例对照研究, 分别利用免疫组织化学法和 Western blot 法检测 ADAMTS-4、TAK1 在 OA 组及正常对照组软骨组织中的表达情况, 同时研究二者在 OA 中表达的相关性。结果 ADAMTS-4 和 TAK1 在 OA 组表达均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$); 二者在 OA 软骨组织中的表达呈正相关 ($r = 0.469$, $P < 0.05$)。结论 ADAMTS-4 与 OA 软骨病变的发生发展密切相关, 活化的 TAK1 可能致 OA 软骨组织中 ADAMTS-4 的高表达。TAK1 可以作为 OA 治疗的新靶点。

关键词 骨关节炎; 软骨组织; ADAMTS-4; TAK1

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)03-0343-04

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种进行性关节软骨退变性疾病, 其病理特征为关节软骨破坏和关节周围骨赘的形成。聚蛋白多糖的丢失引起软骨细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成与分解代谢的失衡是 OA 软骨破坏的重要机制之一^[1]。近年来研究^[2]显示 ADAMTS-4, 即带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-4, 在人 OA 的聚蛋白多糖的降解中起着主要作用。许多信号通路参与 OA 的发病过程, 这些信号通路通过级联放大作用, 导致 ECM 中相关蛋白酶及炎症成分变化引起软骨破坏; 其中丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 途径和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 途径在 OA 发病中发挥重要作用^[3]。转化生长因子 β 激活激酶 1 (mitogen-activated protein kinase, TAK1) 是 MAP3K 家族

的成员之一, 其处于这两条信号通路的上游分支点上, 可被多种促炎性细胞因子激活^[4]。该研究旨在探讨 ADAMTS-4、TAK1 在 OA 和正常软骨中的表达情况, 了解二者在 OA 软骨中的发病作用及相互关系, 探讨 OA 发病机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2012 年 8 月 ~ 2013 年 4 月在安徽医科大学第一附属医院骨科二病区的住院患者。① OA 组: 因膝骨关节炎而行全膝关节置换术中取材的关节软骨标本, 共 20 例 (男 5 例, 女 15 例), 年龄 49 ~ 82 (65.9 ± 9.22) 岁。纳入标准: OA 患者诊断符合美国风湿病学会 (ACR) 2001 年推荐的膝关节 OA 诊断标准^[5]。② 正常对照组: 因股骨颈骨折而行全髋关节置换术或者因急性外伤致下肢截肢术中取材的软骨标本, 共 10 例 (男 3 例, 女 7 例), 年龄 52 ~ 76 (64.2 ± 9.44) 岁。纳入标准: 术前 X 线检查关节软骨面光滑, 并术后病理学诊断关节无病变。所有新鲜标本一部分以 10% 中性福尔马林液固定, 另外一部分标本离体后置于生理盐水的标本盒中, 迅速转移到 -80°C 冰箱保存备用。

1.2 试剂与仪器 兔抗 ADAMTS-4 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司); 兔抗 TAK1 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); Elivision 免疫组化两步法检测试剂盒 (福建迈新公司); RIPA 组织裂解液和 SDS-PAGE 加样缓冲液 (中国碧云天生物技术研究所); 山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司); ECL 显影液 (美国 Thermo 公司); Bioshine ChemiQ4600 荧光及化学发光成像系统 (中国 Bioshine 公司); Motic BA600 Mot-7.5 型自动显微镜 (中国 Motic 公司)。

1.3 免疫组织化学检测 ADAMTS-4、TAK1 表达及分布特点

1.3.1 免疫组化步骤 福尔马林固定后的关节软骨经 10% EDTA 脱钙后, 常规脱水, 石蜡包埋, 以 $3 \sim 4 \mu\text{m}$ 厚度连续切片, 制备 HE 及免疫组化切片。其中免疫组化操作步骤如下: 65°C 烤箱烤 24 h, 二甲苯、梯度乙醇脱蜡水化; 胰酶 37°C 下行抗原修复

2013-10-14 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 安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032

作者简介: 张琪琪, 男, 硕士研究生;

胡 勇, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hy_in163@163.com;

魏 伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

30 min,滴加内源性过氧化物阻滞剂过氧化氢(H_2O_2)、分别滴加一抗(ADAMTS-4 稀释浓度为 1:200, TAK1 稀释浓度为 1:300) 4℃冰箱过夜;滴加生物素标记的二抗,DAB 显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察。

1.3.2 免疫组化结果判断 使用 Motic BA600 Mot-7.5 型自动显微镜对各组免疫组化结果进行扫描拍照,再采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对各免疫组化结果图片进行积分光密度(integral optical density, IOD)检测和分析。每张切片随机选取 5 个高倍镜视野($\times 200$),选取细胞质呈棕黄色颗粒的软骨细胞为阳性结果进行标记,以此自动检测所有视野的阳性结果。以参数平均积分光密度(integrated optical density average, IA)代表蛋白的颗粒密度。

1.4 Western blot 法检测软骨中 ADAMTS-4、TAK1 表达 在冰浴条件下 0.05 g 软骨组织在 499 μ l RIPA 组织裂解液、1 μ l 苯甲磺酰氟中研磨、裂解 30 min。将裂解液移至 1.5 ml EP 管中,14 000 r/min 离心 15 min,取上清液 100 μ l,加入 25 μ l 5% SDS 上样缓冲液,煮沸 10 min,用 10%的 SDS-PAGE 凝胶电泳 2 h,蛋白质转移至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶 37℃封闭 1.5 h,加入兔抗 ADAMTS-4 一抗(1:200)、兔抗 TAK1 一抗(1:300)及鼠抗 β -actin 一抗(1:500)孵育 4℃过夜,加入山羊抗兔标记二抗(1:40 000)、山羊抗鼠标记二抗(1:50 000)孵育 2 h,TPBS 清洗 3 次及 PBS 清洗 1 次后加 ECL 液显影,扫描仪中成像。运用 Image J 软件分析各组 Western blot 条带计算灰度值。以 β -actin 蛋白的灰度值为内参,计算二者比值即为灰度值比值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据分析结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 t 检验,两种指标之间的关系采用 Spearman 秩相关性分析。

2 结果

2.1 ADAMTS-4 和 TAK1 在软骨组织中的表达

HE 染色结果显示:正常对照组软骨表面光滑,软骨细胞位于软骨陷窝内,逐层呈规则排列。而 OA 组软骨表面不平整,有裂隙,软骨细胞排列紊乱,外形不规则,可见簇集的软骨细胞和退变肥大的软骨细胞。免疫组化结果显示:在 OA 软骨组织中,ADAMTS-4 主要表达于软骨细胞胞质内,可见大量棕黄

色颗粒,细胞膜黄染,特别是固缩退变的软骨细胞更明显。而正常对照组阳性细胞数量明显减少,其表达量较低,二者比较差异有统计学意义($t = 7.81, P < 0.01$)。TAK1 在 OA 软骨细胞、一些炎性细胞内均有表达,细胞内可见棕黄色颗粒。在正常对照组软骨的分布部位与 OA 组相似,但数量明显减少,染色强度明显降低,二者比较差异有统计学意义($t = 4.58, P < 0.01$)。见图 1、2 和表 1。

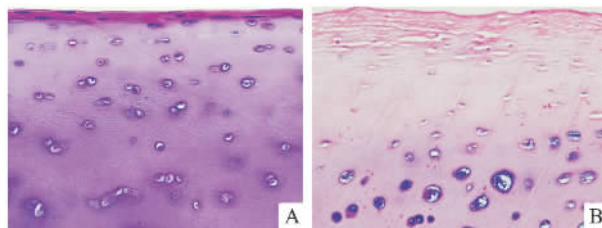


图 1 正常对照组和 OA 组软骨 HE 染色结果 HE $\times 200$

A: 正常对照组; B: OA 组

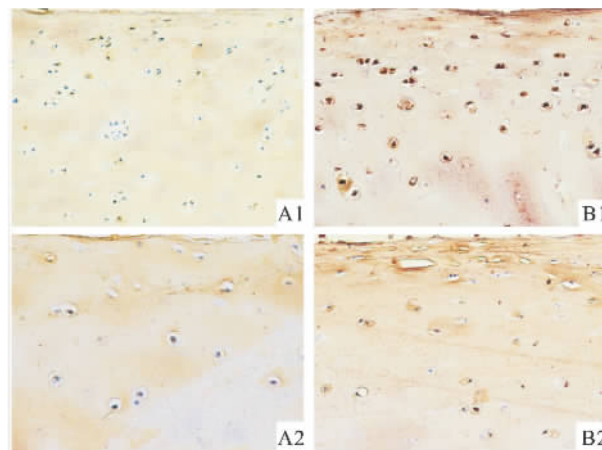


图 2 正常对照组和 OA 组软骨中 ADAMTS-4 和 TAK1 的表达 Elivision $\times 200$

A: 正常对照组; B: OA 组; 1: ADAMTS-4; 2: TAK1

表 1 ADAMTS-4 和 TAK1 在正常对照组及 OA 组软骨中的表达($\bar{IA} \pm s$)

组别	n	ADAMTS-4	TAK1
正常对照	10	0.09 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.09
OA	20	0.42 $\pm$ 0.12 **	0.30 $\pm$ 0.11 **

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

Western blot 法结果提示:OA 患者软骨组织中 ADAMTS-4 表达高于正常对照组,经统计学分析,OA 组与正常对照组灰度值比值比较,差异有统计学意义($t = 5.27, P < 0.01$); TAK1 在 OA 软骨组织

中表达也高于正常对照组,经统计学分析,两组灰度值比值比较差异有统计学意义($t = 6.25, P < 0.01$)。部分 OA 组和正常对照组电泳结果见图 3。

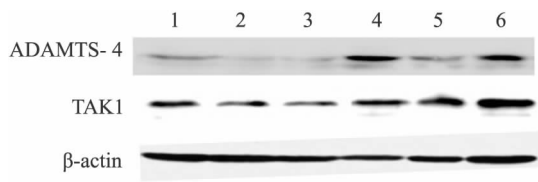


图3 Western blot 法检测 ADAMTS-4 和 TAK1 在正常对照组及 OA 组软骨中的表达
1~3: 正常对照组; 4~6: OA 组

2.2 ADAMTS-4 和 TAK1 在 OA 软骨组织中表达的相关性分析 OA 软骨中 ADAMTS-4 及 TAK1 的 IA 值明显高于正常对照组($P < 0.01$)。20 例 OA 患者软骨组织中, TAK1 阳性表达的 IA 值为 0.30 ± 0.11 , ADAMTS-4 阳性表达的 IA 值为 0.42 ± 0.12 , 经相关分析结果表明,在 OA 软骨组织中 TAK1 和 ADAMTS-4 的表达呈正相关($r = 0.469, P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

多因素造成 ECM 构成成分的改变引起关节软骨的退变及破坏是 OA 发病机制之一。而 ECM 主要由胶原纤维和聚蛋白多糖构成。有文献^[1]报道,聚蛋白多糖使关节软骨具有很好的弹性和抗压性,聚蛋白多糖的丢失被认为在 OA 的发病中起着重要的启动作用。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)能够特异性的降解关节软骨 ECM 中的 II 型胶原、弹力纤维等,长期以来被认为在 OA 进展中起着重要作用^[6];随着对 OA 发病机制的深入研究,发现早期引起软骨降解的酶是聚蛋白多糖酶,而 MMPs 在晚期才起作用。其中 ADAMTS-4 是被广泛认可,具有强大的聚蛋白多糖降解能力^[7]。ADAMTS-4 主要通过作用于软骨蛋白聚糖核心蛋白球间区(IGD)的蛋白水解分裂位点 Glu373-Ala374 发挥作用。有研究^[8]显示,正常者和 OA 患者的软骨组织中均有 ADAMTS-4 表达,且在 OA 软骨组织中表达明显增多,此外 ADAMTS-4 与关节软骨破坏的程度有直接的关系,因此认为 ADAMTS-4 是引起人 OA 软骨降解的主要聚蛋白多糖酶。本研究结果表明 ADAMTS-4 在 OA 组较正常对照组高表达,阳性细胞主要分布于关节软骨浅层及中层退变软骨细胞

中;提示 ADAMTS-4 在 OA 的发生发展中起着重要作用。通过特异性抑制 ADAMTS-4 能够有效控制 OA 的病情进展。

在 OA 病程中,白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、IL-6、IL-17、IL-18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等是参与关节病变的主要促炎性细胞因子^[9]。这些促炎性细胞因子主要是通过多条细胞内信号通路的级联放大作用导致蛋白酶、前炎症因子变化,使软骨 ECM 分解代谢超过合成代谢,引起关节软骨破坏。而在众多的信号转导途径中,MAPKs 信号通路和 NF- κ B 信号通路在 OA 发生发展中起了很重要的作用。Lea et al^[10]研究发现 TAK1 是 MAPKs 信号通路和骨形态蛋白(BMP)信号转导的关键调节分子并且在骨和关节发育中起着一定作用。TAK1 可被上述多种促炎性细胞因子应激信号刺激所激活。在 MAPKs 信号通路中,激活的 TAK1 通过 MEKK3/6、MEKK4/7 调节 JNK 和 p38 蛋白激酶的活性,最终活化核转录因子激活蛋白-1(AP-1),从而引起靶基因的表达;而在 NF- κ B 信号通路中,活化的 TAK1 激活 NF- κ B 诱导激酶(NIK)和 I κ B 激酶(IKK),进而磷酸化 I κ B 介导 NF- κ B 进入细胞核内,影响目的基因的表达。

研究^[11-14]显示在人软骨细胞内,NF- κ B 和 MAPKs 可以上调由 TNF- α 或 IL-1 β 介导的 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 基因和蛋白的表达,抑制 MAPK-ERK1/2 活性可以降低 ADAMTs 和 MMPs 的高表达。Klatt et al^[15]研究发现在 OA 软骨细胞中 TAK1 有一定的表达,抑制 TAK1 基因可以减少下游炎性细胞因子及相关蛋白酶的表达,TAK1 对 AP-1 及 NF- κ B 的活性起着更关键作用。本研究结果显示 20 例 OA 患者 TAK1 表达明显高于正常对照组,且发现浅层软骨细胞呈阳性反应较多,而深层软骨细胞只有少数呈阳性反应或者未见阳性细胞。由此可以推断,TAK1 作为炎症反应中 MAPKs 细胞信号通路和 NF- κ B 信号通路上游重要的激酶,在 OA 发病中可能起着重要作用。

本研究对 OA 软骨组织中的 ADAMTS-4 和 TAK1 的表达进行了相关性分析,初步证实两者呈正相关,提示 ADAMTS-4 与 TAK1 在 OA 软骨病变的发生发展中具有协同作用,这可能与活化的 TAK1 具有调节 ADAMTS-4 表达作用有关。通过干预上游信号分子 TAK1 的活性,将有助于减少相关炎性细胞因子和蛋白酶类等对 OA 病理生理的影

响,因此 TAK1 可以作为 OA 治疗的新靶点,为 OA 的治疗提供新的思路。

综上所述,软骨组织中 ADAMTS-4 和 TAK1 的高表达与 OA 的发生发展有关,活化的 TAK1 可能致 OA 软骨中 ADAMTS-4 的高表达。但 ADAMTS-4 和 TAK1 之间具体的相互作用机制尚不清楚,且 OA 是多因素作用的结果,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J P, et al. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2008, 22(2): 351–84.
- [2] Naito S, Shiomi T, Okada A, et al. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-4) in human osteoarthritic cartilage [J]. *Pathol Int*, 2007, 57(11): 703–11.
- [3] Berenbaum F. Signaling transduction: target in osteoarthritis [J]. *Curr Opin Rheum*, 2004, 16(5): 616–22.
- [4] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911–2.
- [5] 陈百成, 张 静. 骨关节炎 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 18.
- [6] Takaishi H, Kimura T, Dalal S, et al. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13 [J]. *Curr Pharm Biotech*, 2008, 9(1): 47–54.
- [7] Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis [J]. *Cell Biochem*, 2011, 112(12): 3507–14.
- [8] Yatabe T, Mochizuki S, Takizawa M, et al. Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-4) in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(6): 1051–8.
- [9] Charles J M. Anticytokine therapy for osteoarthritis [J]. *Drug Aging*, 2010, 27(2): 95–115.
- [10] Lea M G, Jennifer H J, Loisele A E, et al. TAK1 regulate's cartilage and joint development via the MAPK and BMP signaling pathways [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(8): 1784–97.
- [11] Sondergaard B C, Schultz N, Madsen S H, et al. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation—divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(3): 279–88.
- [12] Da Silva M A, Yamada N, Clarke N M, et al. Cellular and epigenetic features of a young healthy and a young osteoarthritic cartilage compared with aged control and OA cartilage [J]. *J Orthop Res*, 2009, 27(5): 593–601.
- [13] Rasheed A, Judith A, Sylvester J, et al. Adaptor Proteins and Ras synergistically regulate IL-1-induced ADAMTS-4 expression in Human chondrocytes [J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 5081–7.
- [14] Prasadam I, Crawford R, Xiao Y. Aggravation of ADAMTS and matrix metalloproteinases production and role of ERK1/2 pathway in the interaction of osteoarthritic subchondral bone osteoblasts and articular cartilage chondrocytes—possible pathogenic role in osteoarthritis [J]. *J Rheumatol*, 2012, 39(3): 621–34.
- [15] Klatt A R, Klinger G, Neumüller O, et al. TAK1 downregulation reduces IL-1 β induced expression of MMP13, MMP1 and TNF- α [J]. *Biomed Pharmacother*, 2006, 60(2): 55–61.

The correlative study on the expression of ADAMTS-4 and TAK1 in osteoarthritic cartilage tissue

Zhang Qiqi, Hu Yong, Zhou Ding, et al

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

Abstract Objective To investigate the correlative expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif-4 (ADAMTS-4) and TGF-activated kinase 1 (TAK1) in the cartilage tissue of patients with osteoarthritis (OA). **Methods** The case-control study, immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of ADAMTS-4 and TAK1 in cartilage tissue of patients with OA and normal control group, and the expressive correlation between ADAMTS-4 and TAK1 in OA was also analyzed. **Results** Both the expression of ADAMTS-4 and TAK1 in OA group were significantly increased than that in normal control group ($P < 0.01$); there was a positive correlation between the expression of ADAMTS-4 and TAK1 in OA cartilage tissue ($r = 0.469$, $P < 0.05$). **Conclusion** ADAMTS-4 is closely related to the occurrence and progress of OA cartilage. The activated TAK1 may cause the overexpression of ADAMTS-4 in OA cartilage tissue, which can be a new target for OA treatment.

Key words osteoarthritis; cartilage tissue; ADAMTS-4; TAK1