

反式维甲酸诱导大鼠关节软骨细胞的退变

胡鸿扬^{1,2} 薛艳^{1,2} 曹月龙^{1,2} 庞坚^{1,2} 郑昱新^{1,2} 丁道芳^{1,2△}

[摘要] 目的:观察反式维甲酸(TRA)对体外培养大鼠软骨细胞的生长增殖、形态和软骨退变相关基因表达的影响。方法:取出生 24 h SD 大鼠关节处软骨,Ⅱ型胶原酶多次消化后获得原代软骨细胞,取 P1 代细胞进行实验。对照组软骨细胞于体积分数为 10% 的胎牛血清(FBS)的高糖 DMEM 培养基中进行培养,而 TRA 组是在对照组培养基的基础上加入 10 μ mol TRA 进行培养。培养 24 h 后,观察细胞形态变化,MTT 法检测两组细胞的增殖情况,Western Blot 检测Ⅱ型胶原和 MMP13 的表达,DMMB 法测定细胞中 GAG 的含量,定量 PCR 检测 ADAMTS5, MMP9, A-can, Sox9, COLX 和 ALP 的表达。结果:TRA 组的软骨形态由原来的多角形变成长梭形,且 TRA 组抑制软骨细胞的增殖,同时下调基质蛋白Ⅱ型胶原, A-can, GAG 含量及转录因子 Sox9 表达,上调 MMP13, MMP9, ADAMTS5, COLX 及 ALP 的表达。结论:TRA 具有促进软骨退变的作用,可用于建立体外软骨退变模型。

[关键词] 反式维甲酸;细胞增殖;软骨退变;细胞形态

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)08-0001-04

Establishment of Articular Chondrocyte Degeneration of Rats by Trans Retinoic Acid

HU Hongyang^{1,2} XUE Yan^{1,2} CAO Yuelong^{1,2} PANG Jian^{1,2} ZHENG Yuxin^{1,2} DING Dao-fang^{1,2△}

¹ Shi's Center of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

² Institute of Traumatology & Orthopedics, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.

Abstracts Objective: To investigate the effects of trans retinoic acid(TRA) on the chondrocyte' proliferation, morphology, and the expression levels of cartilage degeneration associated gene in rat chondrocytes in vitro. **Methods:** Chondrocyte was cultured from articular cartilages of newly born (within 24 h) SD rats, and digested with type Ⅱ collagenase. Chondrocyte at passage one was used for the experiment. The chondrocyte was cultured with H-DMEM medium containing 10% FBS in Control group, and H-DMEM medium containing 10% FBS plus 10 μ mol trans retinoic acid in TRA group. The morphology change was investigated under phase contrast microscope after chondrocyte were treated with trans retinoic acid for 24 h. Chondrocytes' proliferation was detected by MTT method, and the protein expression levels of type Ⅱ collagen and MMP13 were examined by Western-blot. The GAG contents in chondrocytes were detected by DMMB method. The mRNA levels of ADAMTS5, MMP9, A-can, Sox9, ALP and ColX were detected by real-time PCR. **Results:** The cell morphology was changed from polygon to fibro-like chondrocytes in TRA group compared to control group, and the proliferation of chondrocytes in TRA group were inhibited. The results showed that the expression levels of type Ⅱ collagen, A-can, GAG and Sox9 were decreased while the expression levels of MMP13, MMP9, ADMATS5, COLX and ALP were up-regulated in TRA group compared with control group. **Conclusion:** It was proved that TRA could be used as an efficient inducer in establishing OA model in vitro which induces chondrocytes' degeneration.

Keywords: trans retinoic acid (TRA); cell proliferation; chondrocytes' degeneration; cell morphology

基金项目:国家自然科学基金项目

(81073114, 81072830, 81503598)

¹ 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心
(上海, 201203)

² 上海市中医药研究院骨伤科研究所

△通信作者 E-mail: d. wilhel@qq. com

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种退行性关节疾病,发病率与年龄呈正相关,多见于 60 岁以上的人群。OA 目前尚缺乏有效的治疗手段,其病理改变主要累及整个关节,包括滑膜增生、软骨变性和软骨下骨硬化等,最终导致关节软骨的破坏以及软骨下的骨赘

形成,从而使患者的生活质量严重下降^[1-3]。

目前保护关节软骨退变是中医药防治 OA 的研究重点,而构建有效的软骨退变模型则是研究的一个重要前提。相关研究表明,维生素 A(Vitamin A,VA)及其活性形式反式维甲酸(Trans Retinoic Acid,TRA),是骨骼发育和软骨的调节剂。维生素 A 在一系列氧化酶作用下转化变成 TRA,在不同组织和细胞类型上均可发现其受体表达,TRA 和受体结合可以诱导软骨细胞的终末分化和细胞外基质改变,从而导致软骨细胞退变,直至骨关节炎的发生^[4]。因此探讨 TRA 诱导大鼠关节软骨细胞的退变作用机制,可以为构建软骨细胞退变模型提供新的方法,也能进一步为中医药防治 OA 的研究提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 新生 SD 大鼠 10 只购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK(沪 2008-0016)。

1.1.2 药物与试剂 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗、磷酸盐缓冲液片剂均购自于 Biowest 公司;Ⅱ型胶原酶(美国 Sigma 公司);GAPDH(CST2118S);山羊抗兔二抗(货号 7074P2)购自美国 CST 公司;RIPA 裂解液、PMSF 购自上海碧云天公司;BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司);MTT(美国 Sigma 公司);trizol(Invitrogen 公司);AMV 逆转录酶(Takara 公司);DMMB 试剂盒(Biocolor 公司)。

1.1.3 仪器 CO₂ 培养箱,英国 RS Biotech 公司生产;倒置显微镜,日本 Olympus-IX71 生产;流式细胞仪,美国 Beckman Coulter 公司生产;SYNERGY2 多功能酶标仪,美国基因公司生产。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞培养和形态学观察 采用本研究所已经成熟的软骨细胞培养方法,将 10 只新生 24 h SD 大鼠颈颈椎处死并用 75%酒精浸泡 5 min,取出四肢关节处软骨,剔除残留的血管和结缔组织后用眼科剪剪成 1 mm³ 大小软骨块,在 37 ℃培养箱用 ECKMAN 0.1%的Ⅱ型胶原酶消化 1 h,重复 3~4 次,收集消化的细胞悬液,1 000 r/min 离心 10 min 后弃胶原酶,高糖 DMEM 培养基(含 10%FBS 及双抗)重悬细胞,接种于培养皿,隔日换液。3~4 d 后,细胞铺满皿底,胰酶消化传代培养,取 P1 代细胞进行实验。实验组加入 10 μmol TRA,24 h 后在倒置显微镜下观察软骨细胞的密度与形态。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖情况 将细胞用胰酶消化后,以 2 000 个/孔接种于 96 孔培养板。分别于

含 10%FBS 的 DMEM 中及加入 10 μmol TRA 的含 10%FBS 的 DMEM 中培养,培养 24,48 及 72 h 后,PBS 漂洗 2 遍,每孔加入 100 μL 无血清培养液及含 5 g/L 的 MTT 试剂 20 μL,培养箱中培养 4 h 后,加入 150 μL 的 DMSO,以 DMSO 调零,室温振荡混匀 10 min 后,酶标仪 490 nm 波长下测定各孔 OD 值。

1.2.3 Western Blot 法检测蛋白表达 蛋白样品处理:原代细胞传代 24 h 后,对照组和实验组(TRA 组)分别培养于含 10%FBS 的 DMEM 及含 10%FBS + 10 μmol TRA 的 DMEM 中。24 h 后裂解细胞和蛋白浓度测定,蛋白变性后备用。Western Blot 测定:蛋白样品电泳和转膜,封闭液为 10%BSA,室温封闭 1 h;一抗用封闭液 1:1 000 稀释,4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 4 次,每次 10 min;二抗室温孵育 1 h,二抗用 TBST 1:20 000 稀释,TBST 洗膜 4 次,每次 10 min;化学发光法检测,X 线胶片曝光显影。

1.2.4 DMMB 法检测细胞中蛋白多聚糖 GAG 含量

按照 DMMB 试剂盒操作,计数 1×10⁵ 细胞和裂解于木瓜蛋白酶裂解液中,于 65 ℃水浴中放置 3 h,样品 10 000g 离心 10 min,吸取 100 μL 上清液和 1 mL 染色液,混匀后置于摇床上摇动 30 min,样品 12 000g 离心 10 min.小心吸掉上清液,加入 0.5 mL 解离液,混匀后在波长 656 nm 的酶标仪上检测每组吸光度值,根据标准曲线计算 GAG 的含量。

1.2.5 实时 PCR 检测基因表达 原代软骨细胞培养 24 h,抽提总 RNA 及浓度测定,取 2 μg RNA 逆转录,进行实时 PCR 检测。按照说明书进行实时 PCR 检测,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,见表 1。

表 1 相关因子引物序列

引物名称		引物序列(5'-3')
A-can	上游:	GCAGGGATAACGGACTGAAG
	下游:	GAGTAAAGTGGTCATAGTTCAGCTTG
MMP9	上游:	GGTCAGGTTTAGAGCCACGA
	下游:	GGTCAGGTTTAGAGCCACGA
Sox9	上游:	ATCTTCAAGGCGCTGCAA
	下游:	CGGTGGACCCTGAGATTG
ADAMTS5	上游:	AGCCATCCTGTTCACCAGAG
	下游:	CATTCCCAGGGTGTACAT
ALP	上游:	GCACAACATCAAGGACATCG
	下游:	TCAGTTCTGTTCTTGGGGTACAT
ColX	上游:	CCCTATTGGACCACCAGGTA
	下游:	ACTGCTTGGCTGGGAGGT
GAPDH	上游:	TTCAACGGCACAGTCAAGG
	下游:	CTCAGCACCAGCATCACC

1.3 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS15.0 软件进行统计分析,组间差异采用单因素方差分析中 LSD-*t* 检

验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞形态观察

培养 24 h 后, 对照组细胞呈多角形、短梭形等形态, 紧密排列成铺路石状, TRA 组细胞形态逐渐细长, 见图 1。

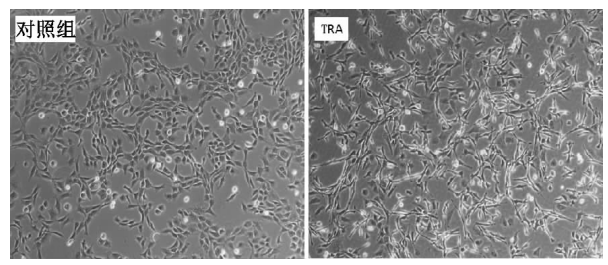


图 1 倒置显微镜下两组细胞形态观察(100×)

2.2 软骨细胞增殖检测

软骨细胞传代 24 h 后, 分别于普通培养基及含 TRA 培养基中培养。提取总蛋白检测代表细胞增殖的增殖细胞核抗原(PCNA)表达, 以 GAPDH 为内参对照。结果显示相对于对照组, TRA 组的 PCNA 表达下调, 见图 2A。同时 MTT 法连续观察这两组细胞在 24 h, 48 h 和 72 h 增殖情况, 检测代表增殖的 490 nm 处的吸光度值。统计结果和 PCNA 蛋白表达的结果相一致, 见图 2B。

图 2 说明 TRA 对增殖细胞核抗原(PCNA)的表达具有下调作用。图 2B 为 MTT 法分别检测 24, 48

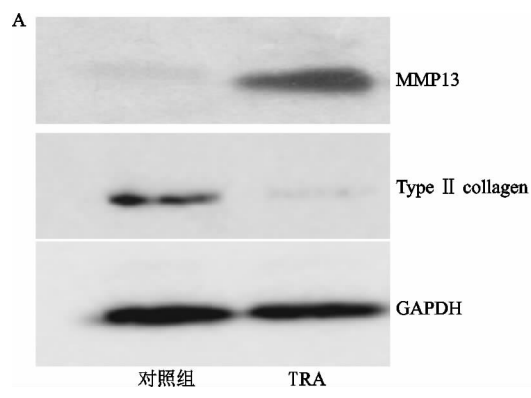


图 3 TRA 对 II 型胶原、基质金属蛋白酶 13(MMP13)蛋白及氨基聚糖(GAG)的表达影响

2.4 基因 mRNA 水平检测

软骨细胞传代 24 h 后, 加入 10 μmol 的 TRA 继续培养 24 h 后, 提取总 RNA, 定量 PCR 检测含 I 型血小板反应蛋白的解聚素和金属蛋白酶 5 (ADAMTS5)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、蛋白多聚糖 Aggrecan(A-can)、Sox9(SRY-related high mobility group-box gene9)、X 型胶原(COLX)和碱性磷酸酶(ALP)的 mRNA 的表达。和对照组相比, ADAMTS5, MMP9, COLX 和 ALP 在 TRA 的作用下, 均表达提高。和对照组比较, A-can 和 Sox9 基因在 TRA 的干预下, 表达均下调, 见图 4。

及 72 h 两组细胞增殖, TRA 组 OD490 值明显低于对照组。与正常对照组(10% FBS 组)比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 II 型胶原、基质金属蛋白酶 13(MMP13)蛋白及氨基聚糖(GAG)的表达

软骨细胞传代 24 h 后, 加入 10 μmol 的 TRA 继续培养 24 h, 提取总蛋白检测软骨细胞基质蛋白 II 型胶原和对其起分解调控作用的 MMP13 的表达。结果表明: 相对于对照组, 在 TRA 的作用下, II 型胶原发生降解, 即表达下调; MMP13 表达上调, 见图 3A。软骨细胞内 GAG 的含量的变化和 II 型胶原的表达相一致, 见图 3B。

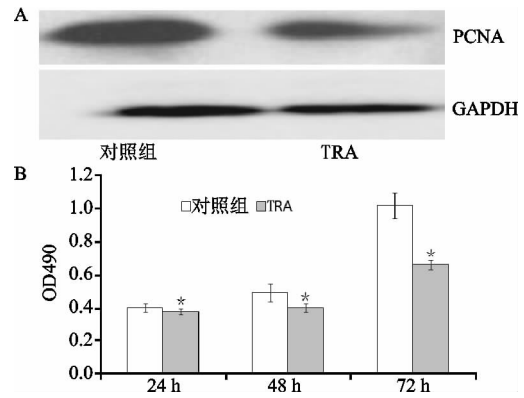
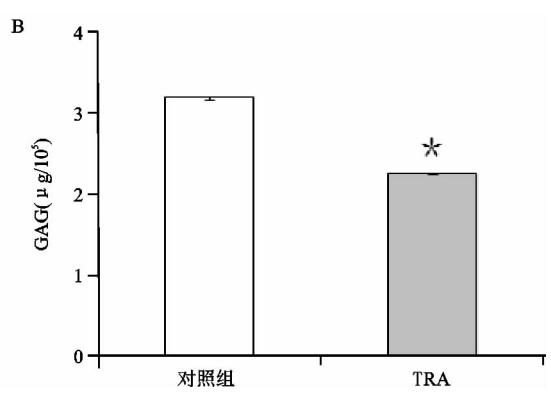


图 2 TRA 对软骨细胞增殖的影响



3 讨论

关节软骨细胞外基质的丢失是导致 OA 和其他炎性关节炎的共同原因, 正常的软骨结构是由细胞外基质如 II 型胶原和可聚蛋白聚糖(以 A-can 为主)组成, 基质的成分通过基质降解酶不断进行更新和重塑, 基质的降解和合成同时进行, 从而维持软骨结构的完整^[5-7]。由于软骨细胞分化, 伴随相关退变基因表达上调, 最终细胞外基质发生降解^[8-11]。本研究主要就软骨细胞形态改变、生长增殖和基因表达这三个方面对 TRA 诱导的软骨退变情况进行观察和对比。

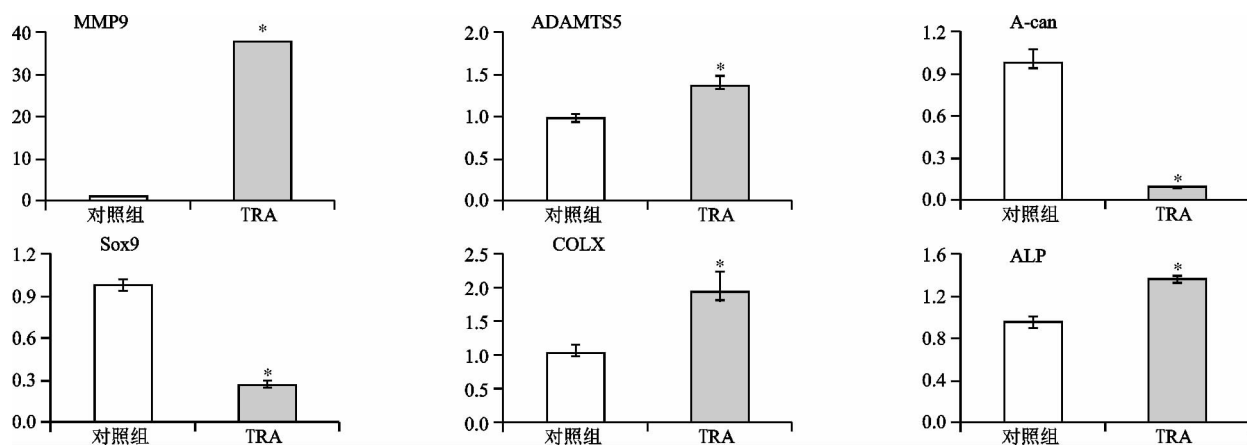


图4 TRA对ADAMTS5, MMP9, A-can, Sox9, COLX和ALP基因的mRNA的表达影响

在软骨细胞形态方面,TRA干预软骨细胞24 h后,软骨细胞形态发生显著改变,细胞由多角形变成长梭形,这一变化表明软骨细胞已失去其原有的形态特征。这与骨关节炎发生过程中,关节软骨细胞发生纤维化和肥大化的形态变化一致^[12]。

在软骨细胞增殖方面,TRA干预软骨细胞24 h后,反映细胞增殖情况的增殖细胞核抗原PCNA的蛋白表达明显下调。同时连续3 d观察TRA组的细胞增殖情况,TRA均抑制软骨细胞的增殖,和PCNA蛋白表达结果相一致。

在软骨细胞退变基因的表达方面,Sox9是软骨细胞中重要的转录因子,调控软骨细胞中Ⅱ型胶原和蛋白多聚糖的表达,而且在软骨细胞的增殖中,它可以保持细胞表型而抑制软骨细胞退变;GAG在软骨细胞中起到支撑的作用;MMP9参与调控Ⅱ型胶原的表达;MMP13主要通过破坏H型胶原之间的肽链从而使得软骨裂解;蛋白多聚糖A-can主要受到ADAMTS5的调控;COLX和ALP是软骨退变的重要基因,主要调控细胞外基质的降解^[13-17]。因此判断软骨退变的关键在于Ⅱ型胶原、A-can和GAG是否受到降解,及其他相关调控退变的基因表达是否也受到相应影响。结果表明TRA不仅可以显著下调Ⅱ型胶原,A-can,Sox9及GAG的表达,而且同时还使MMP13,MMP9,ADAMTS5,COLX和ALP的表达升高,说明TRA能够通过调控多个软骨细胞退变的相关基因表达,从而促进大鼠关节软骨细胞退变的发生。

通过本研究发现TRA不仅能够明显改变软骨细胞形态,抑制软骨细胞增殖,还能调控软骨退变的相关基因,证明TRA可以成功诱导大鼠关节软骨细胞的退变,也为建立有效的大鼠关节软骨细胞退变模型提供了新的方法和依据。

参考文献

[1] Kroman SL, Roos EM, Bennell KL, et al. Measurement properties of performance-based outcome measures to as-

sess physical function in young and middle-aged people known to be at high risk of hip and/or knee osteoarthritis: a systematic review [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014,22(1):26-39.

- [2] Corbett MS, Rice SJC, Madurasinghe V, et al. Acupuncture and other physical treatments for the relief of pain due to osteoarthritis of the knee: network meta-analysis [J]. Centre for Reviews and Dissemination (UK), 2013, 21(9):1290-1298.
- [3] 张宇,赵永见,周泉,等. IL-1 β 诱导小鼠椎间盘软骨终板细胞炎性退变的细胞模型研究[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(8):665-668.
- [4] Zhang Y, Ross AC. Retinoic Acid and the transcription factor mafB act together [J]. J Cell Biochem, 2013, 114(2):471-479.
- [5] Suri S, Gill SE, Massena de Camin S, et al. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(11):1423-1428.
- [6] Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, et al. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(2):128-149.
- [7] Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006, 20(5):1003-1025.
- [8] Tøeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1824(1):133-145.
- [9] Lin EA, Liu CJ. The role of ADAMTS in arthritis [J]. Protein, 2010, 1(1):33-47.
- [10] Wu CW, Tcheta EV, Mwale F, et al. Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization [J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(4):639-651.

- [11] Dahlberg L, Billingham RC, Manner P, et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1) [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(3):673-682.
- [12] Aigner T, Dudhia J. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis [J]. *Ann Rheum Dis*, 1997, 56(5):287-291.
- [13] Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, et al. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(15):10738-10744.
- [14] Ushijima T, Okazaki K, Tsushima H, et al. CCAAT/enhancer-binding protein β regulates the repression of type II collagen expression during the differentiation from proliferative to hypertrophic chondrocytes [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(5):2852-2863.
- [15] Okubo Y, Reddi AH. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(1):186-190.
- [16] Song Y, Xu K, Yu C, et al. The use of mechano growth factor to prevent cartilage degeneration in knee osteoarthritis [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(3):738-749.
- [17] 李保驰, 王维山, 董金波, 等. MMP-3、MMP-13 在骨性关节炎患者滑膜中的表达及意义 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(6):593-596.

(收稿日期:2018-03-10)