

文章编号: 1674-8115(2010)09-1084-06

· 论著 ·

IL-1 β 和 TNF- α 对软骨细胞基质降解的影响及相关机制研究

黄金刚¹, 童海骏¹, 刘宏强², 张晓玲^{1,3}

(1. 上海交通大学医学院/中国科学院 上海生命科学研究院健康科学研究所骨科细胞与分子生物学实验室, 上海 200025;
 2. 山西大学 体育学院, 太原 030006; 3. 上海交通大学 医学院附属第九人民医院骨科 上海市骨科内植物重点实验室, 上海 200011)

摘要: 目的 研究白介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 对关节软骨细胞外基质降解的作用及相关分子机制。方法 体外培养大鼠原代关节软骨细胞, 单独或联合使用 IL-1 β 和 (或) TNF- α 刺激软骨细胞, 分别设为 IL-1 β 刺激组、TNF- α 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组; 另设无任何刺激的对照组。在细胞培养 24、48、72 h 时点, 采用倒置显微镜观察软骨细胞外基质的变化; 采用 Real-Time PCR 法检测基质金属蛋白酶-13 (MMP-13)、蛋白聚糖降解酶-1 (Adamts-4) 和蛋白聚糖降解酶-2 (Adamts-5) mRNA 的表达。结果 细胞在培养 48、72 h 时点, 显微镜观察显示对照组与 TNF- α 刺激组的软骨细胞外基质降解情况无明显差异; IL-1 β 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组细胞外基质失染、降解, 细胞形态缩小, 细胞间隙增宽。与对照组比较, 细胞培养 24 h 时点, IL-1 β 刺激组 MMP-13、Adamts-4 和 Adamts-5 mRNA 的表达显著上调 ($P < 0.01$); 而在培养 48、72 h 时点有所下调。IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组与 IL-1 β 刺激组比较, 在培养各时点, MMP-13、Adamts-4 和 Adamts-5 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 IL-1 β 诱导软骨细胞产生大量的 MMP-13、Adamts-4 和 Adamts-5 而直接降解软骨细胞外基质; TNF- α 可能不直接引起软骨细胞外基质的降解。

关键词: 骨关节炎; 基质金属蛋白酶; 蛋白聚糖酶; 白介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2010.09.017

中图分类号: R684.3

文献标志码: A

Effects of IL-1 β and TNF- α on degradation of extracellular matrix of articular chondrocytes and related mechanism

HUANG Jin-gang¹, TONG Hai-jun¹, LIU Hong-qiang², ZHANG Xiao-ling^{1,3}

(1. Laboratory of Orthopaedical Cellular and Molecular Biology, Institute of Health Sciences, Shanghai Jiaotong University School of Medicine & Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China;
 2. College of Physical Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implant, Department of Orthopaedics, The Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) on the degradation of extracellular matrix of articular chondrocytes, and explore the related molecular mechanism. Methods Primary articular chondrocytes were isolated from rat articular chondrocytes, and were stimulated by IL-1 β and TNF- α alone or in combination. IL-1 β stimulation group, TNF- α stimulation group and IL-1 β and TNF- α stimulation group were established, and control group without any stimulation was also established. After treatment for 24 h, 48 h and 72 h, the changes of extracellular matrix of articular chondrocytes were observed by inverted microscope, and Real-time PCR was employed to detect the expression of metalloproteinase-13 (MMP-13), Aggrecanases-1 (Adamts-4) and Aggrecanases-2 (Adamts-5) mRNA. Results After treatment for 48 h and 72 h, it was observed by microscope that there was no significant difference in degradation of extracellular matrix of articular chondrocytes between control group and TNF- α

基金项目: 国家自然科学基金(30811120440); 上海市科委基金(08410701800, 08411950400); 上海市教委重点学科建设基金(J50206)(National Natural Science Foundation of China, 30811120440; Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 08410701800, 08411950400; Shanghai Education Committee Foundation, J50206)。

作者简介: 黄金刚(1984—), 男, 硕士; 电子信箱: jgh_87@126.com。

通讯作者: 张晓玲, 电子信箱: xlzhang@sibs.ac.cn。

stimulation group, while extracellular matrix of articular chondrocytes in IL-1 β stimulation group and IL-1 β and TNF- α stimulation group was unstained and degraded with expanded cell spaces. Compared with control group, the expression of MMP-13, Adamts-4 and Adamts-5 mRNA in IL-1 β stimulation group significantly increased after treatment for 24 h ($P < 0.01$), and decreased after treatment for 48 h and 72 h. There was no significant difference in the expression of MMP-13, Adamts-4 and Adamts-5 mRNA between IL-1 β stimulation group and IL-1 β and TNF- α stimulation group after treatment for 24 h, 48 h and 72 h ($P > 0.05$). **Conclusion** IL-1 β can directly degrade extracellular matrix of articular chondrocytes through up-regulation of expression of MMP-13, Adamts-4 and Adamts-5, while TNF- α can not directly degrade extracellular matrix of articular chondrocytes.

Key words: osteoarthritis; metalloproteinase; aggrecanase; interleukin-1 β ; tumour necrosis factor- α

骨关节炎是严重危害人类健康的一大疾病,其临床病理特征之一是软骨破坏和软骨细胞外基质降解。软骨组织基质由两大主要成分组成,分别是Ⅱ型胶原和蛋白聚糖。Ⅱ型胶原可以被胶原酶或基质金属蛋白酶(metalloproteinase, MMPs)降解,其中具有最高降解效率的是MMP-13^[1]。蛋白聚糖被蛋白聚糖酶(Aggrecanases)降解,其中Aggrecanases-1(Adamts-4)和Aggrecanases-2(Adamts-5)的表达量和分解效率最高^[2-3]。有研究^[4]在关节炎患者的关节液中发现高浓度的前炎症因子白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α),它们被认为是在关节炎发病机制中起关键作用的促炎症性细胞因子。过去人们认为,IL-1 β 和TNF- α 都有促进软骨细胞分解代谢及降解细胞外基质的作用;但Joosten等^[5]研究发现,在小鼠Ⅱ型胶原诱导的骨关节炎模型中,用抗体中和IL-1 β 后可以阻止软骨和骨破坏,而抗体中和TNF- α 后只能减轻滑膜炎症,并不能改善软骨破坏。Zwerina等^[6]用IL-1(IL-1 α 和IL-1 β)完全敲除TNF转基因小鼠,发现TNF过表达虽然能引起滑膜炎症,但未出现软骨破坏,说明TNF可能并不直接引起软骨细胞外基质降解。同时,虽然IL-1和TNF的阻断剂在临床治疗中使用,但它们之间的相互作用研究较少^[6]。因此,本研究拟用IL-1 β 和TNF- α 单独或联合使用,刺激正常的大鼠软骨细胞,检测MMP-13、Adamts-4和Adamts-5的表达,从体外细胞学水平初步探讨这两种细胞因子在软骨细胞外基质降解过程中的独立作用和相互作用情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠,雄性,体质量200 g左右,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。动物生产许可证号为SCXK(沪)2007-0005;使用许可证

号为SYXK(沪)2008-0060。

1.1.2 试剂和仪器 胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶、甲苯胺蓝(Sigma);DMEM/F12培养基(Hyclone);胎牛血清(Gibco);细胞计数仪和TRIzol(Invitrogen);Nano-Drop 2000(Thermo & Scientific);PCR反应体系和反转录试剂盒(Fermentas);PCR仪(Eppendorf);Real-Time PCR kit(Takara);Real-Time PCR仪(Roche LightCycler 480)。

1.2 方法

1.2.1 原代软骨细胞分离与培养 将5只SD大鼠用断颈法处死,75%乙醇消毒10 min,在超净台中无菌条件下用手术刀片切取膝关节胫骨平台软骨,放入PBS中洗2~3次。把软骨尽量切成1 mm³的碎块,收集在50 mL离心管中,加入0.25%的胰蛋白酶5 mL;放置于37℃细胞培养箱中消化30 min,倒掉胰酶消化液;加入5 mL PBS洗2次,倒掉缓冲液。加入0.2%的Ⅱ型胶原酶10 mL,放置于37℃细胞培养箱中消化4~5 h,将悬浊液倒入120目不锈钢滤筛网滤去软骨组织,过滤的液体以1 000 r/min离心10 min,轻轻吸除消化液,加入PBS漂洗1次,加入8 mL含有10%胎牛血清和1%双抗的DMEM/F12完全培养基,震荡混合制成细胞悬液,均匀地种植于30 mm培养皿中。倒置显微镜观察软骨细胞生长情况。

1.2.2 软骨细胞传代培养 分离的原代软骨细胞3~4 d后长到90%左右融合,即进行传代。PBS清洗,胰酶消化,离心收集,细胞计数仪计数,按照6×10⁶/mL种植于一个30 mm培养皿中。传代培养的第3代软骨细胞按照1×10⁶/孔接种于6孔板。

1.2.3 IL-1 β 和TNF- α 刺激软骨细胞及分组 接种于6孔板的软骨细胞培养1 d,大致长到100%融合,用含1%双抗、不含血清的DMEM/F12培养基培养24 h,每3孔细胞作为一组,分为4组。对照组:无任何刺激;IL-1 β 刺激组:用含有10 ng/mL IL-1 β 的无

血清培养基培养; TNF- α 刺激组: 用含有 50 ng/mL TNF- α 的无血清培养基培养; IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组: 用同时含有 10 ng/mL IL-1 β 和 50 ng/mL TNF- α 的无血清培养基培养。在细胞培养 24、48、72 h 时点于倒置显微镜下拍照观察细胞生长情况, 同时收集各组细胞并提取 RNA。

1.2.4 甲苯胺蓝染色 取出 6 孔培养板中的盖玻片, 用 PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 用 1% 甲苯胺蓝染色 30 min, 迅速用无水乙醇漂洗 1 次, 空气中干燥, 脱水、透明、封片后光学显微镜观察染色情况。

1.2.5 RNA 提取和反转录 吸取 6 孔培养板中的培养基, 每孔加入 1 mL TRIzol, 按照说明书提取软骨总 RNA。用 NanoDrop 2000 测 RNA 浓度; 根据 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 和 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 判断 RNA 质量, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 2.0 ~ 2.2, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 在 2.0 ~ 2.4 说明 RNA 质量好, 无蛋白和盐的污染。根据 RNA 浓度, 取 1 μg 总 RNA, 1 μL Oligo-dT (100 $\mu\text{mol/L}$), 加 DEPC 水至 12.5 μL , 充分混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 立即置于冰上 (≥ 1 min); 加 5 \times 反转录缓冲液 4 μL 、dNTP (浓度均为 10 mmol/L) 2 μL 、200 IU 的反转录酶 1 μL 、RNase 抑制剂 0.5 μL , 置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 保存 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.6 Real-Time PCR 法检测 MMP-13、Adamts-4 和 Adamts-5 的表达 将反转录的 cDNA 稀释 5 倍, 进行 Real-Time PCR。扩增体系 10.0 μL : SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times) 5.0 μL , PCR 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.2 μL , PCR 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.2 μL , 稀释的 cDNA 模板 2.0 μL , 灭菌超纯水 2.6 μL 。样品混合后于 Real-Time PCR 仪上反应。Real-Time PCR 引物如下, β -actin: 5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACCA-3' (上游), 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3' (下游); Adamts-4: 5'-CCCGGAATGGTGGAAAGTATT-3' (上游), 5'-TCTTCACGGAAAGGTCAATGCT-3' (下游); Adamts-5: 5'-CACGACCCTCAAGAACCTTTGC-3' (上游), 5'-TCACATGAATGATGCCACATAA-3' (下游); MMP-13: 5'-TACCCATTGATGGGCCTTCTGGT-3' (上游), 5'-CCAAGCTCATGGCAGCAACAATA-3' (下游)。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 25 s, 扩增 50 个循环。溶解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$ 0 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 0 s; 溶解曲线为单一峰说明是特异性扩增。灭菌超纯水作为阴性对照, 每个模板做 3 个复孔, β -actin 作为内参, 结果使用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[7] 分析。

1.3 统计学处理

采用 Excel 2007 软件计算各基因的相对表达量, Sigma Plot 10 软件做柱状图, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 原代大鼠膝关节软骨细胞形态学观察

分离的原代大鼠膝关节软骨细胞贴壁生长, 稀疏生长状态下的软骨细胞边缘出现突起, 可见伪足伸出, 细胞呈不规则三角形、四边形等多边形, 软骨细胞外分泌有大量的基质。致密生长状态下的软骨细胞相互排列紧密, 特别紧密处软骨细胞融合成典型铺路石样。软骨细胞经甲苯胺蓝染色, 可见细胞都被染色, 且颜色较深, 细胞外基质有蛋白多糖处也被染色。软骨细胞在刺激前生长良好, 未发现形态异常的细胞(图 1)。

2.2 不同刺激条件下软骨细胞外基质降解情况

四组细胞在培养 48、72 h 时点, 甲苯胺蓝染色显示微镜观察显示, 对照组、TNF- α 刺激组之间没有明显差别, 细胞排列紧密, 细胞及胞外基质均被着色。IL-1 β 刺激组及 IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组均发生相似的变化, 细胞外基质失染、降解, 细胞形态缩小, 细胞间隙增宽。四组细胞都被染色, 贴壁生长正常, 未见死亡细胞(图 2)。

2.3 不同刺激条件下 MMP-13 mRNA 的表达

在培养 24、48、72 h 时点, 与对照组比较, IL-1 β 刺激组、TNF- α 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组的 MMP-13 mRNA 表达量上升, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 其中, TNF- α 刺激组在培养 24、48、72 h 时点的 MMP-13 mRNA 表达量小幅上升; IL-1 β 刺激组 MMP-13 mRNA 的表达量上升明显, 在培养 24 h 时点约为对照组的 1 800 倍, 48、72 h 时点有所下降。IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组与 IL-1 β 刺激组比较, 在培养 24、48、72 h 时点, MMP-13 mRNA 表达量的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.4 不同刺激条件下 Adamts-4 mRNA 的表达

培养 24 h 时点, 与对照组相比, IL-1 β 刺激组、TNF- α 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组 Adamts-4 mRNA 表达量上升, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 其中 TNF- α 刺激组小幅上升, 而 IL-1 β 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组上升较为明显。在培养 48 h 时点, IL-1 β 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组 Adamts-4 mRNA 的表达量分别为对照组的 2 倍

和 3 倍 ($P < 0.05$) ,但 TNF- α 刺激组与对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在培养 72 h 时点, IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组 Adamts-4 mRNA 的表达量约为对照组的 2.5 倍 ($P < 0.01$) ,而 IL-1 β 刺激组和

TNF- α 刺激组与对照组的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组与 IL-1 β 刺激组比较, 在培养 24、48、72 h 时点, Adamts-4 mRNA 表达量的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4)。

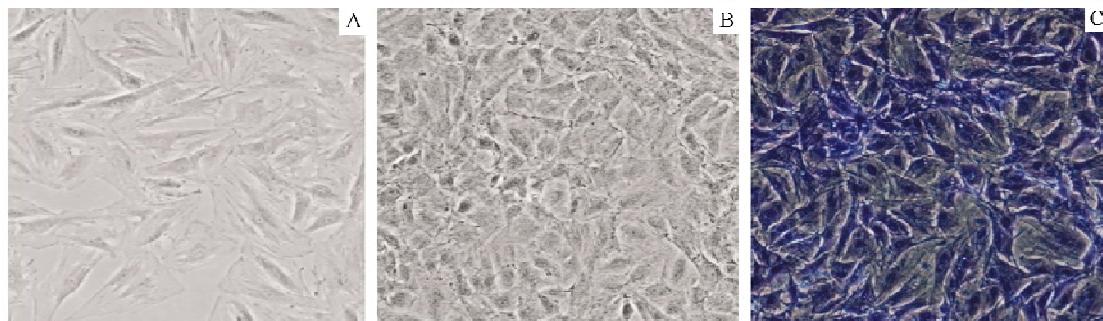


图 1 原代软骨细胞形态 $\times 100$

Fig 1 Morphology of primary chondrocytes $\times 100$

A: 稀疏生长形态; B: 致密生长形态; C: 甲苯胺蓝染色

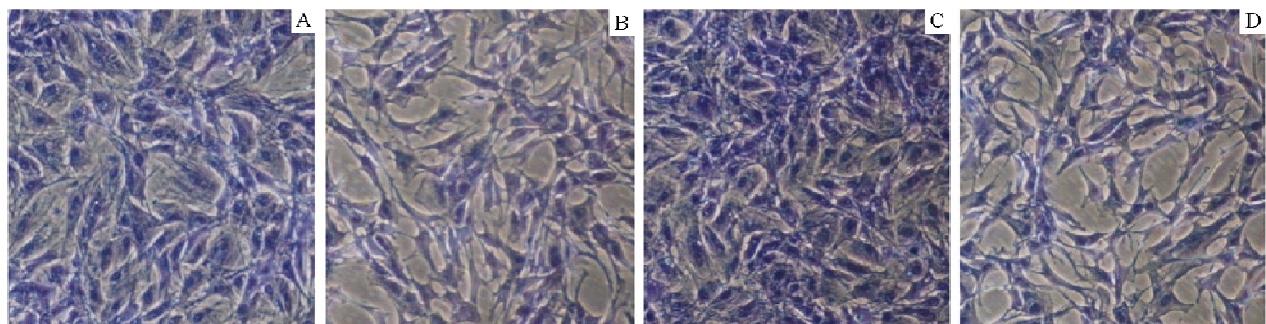


图 2 软骨细胞在刺激 48 h 时点细胞外基质降解情况 甲苯胺蓝染色 $\times 100$

Fig 2 Degradation of extracellular matrix of chondrocytes after treatment for 48 h toluidine blue $\times 100$

A: 对照组; B: IL-1 β 刺激组; C: TNF- α 刺激组; D: IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组

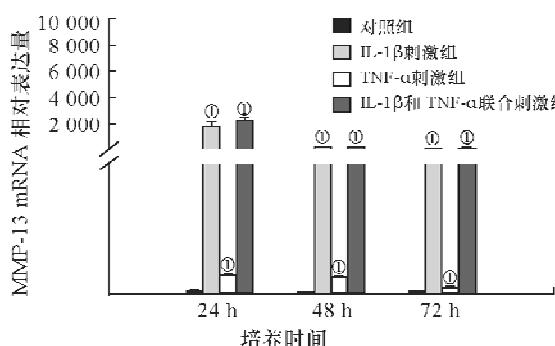


图 3 各组 MMP-13 mRNA 的表达

Fig 3 Expression of MMP13 mRNA in each group

① $P < 0.01$ 与对照组比较

2.5 不同刺激条件下 Adamts-5 mRNA 的表达

与 Adamts-4 mRNA 相似, 在培养 24 h 时点, IL-1 β 刺激组、TNF- α 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组 Adamts-5 mRNA 表达量均较对照组上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ; 其中 TNF- α 刺激组小幅上升, 而

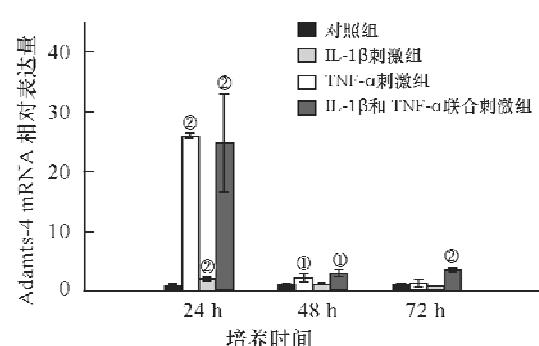


图 4 各组 Adamts-4 mRNA 的表达

Fig 4 Expression of Adamts-4 mRNA in each group

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$ 与对照组比较

IL-1 β 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组上升较为明显。在培养 48 h 时点, IL-1 β 刺激组、IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组 Adamts-5 mRNA 的表达量分别为对照组的 5 倍和 4 倍 ($P < 0.05$) ,但 TNF- α 刺激组与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。在培养

72 h 时点, TNF- α 刺激组 Adamts-5 mRNA 表达低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。在培养 24、48、72 h 时点, IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组与 IL-1 β 刺激组, Adamts-5 mRNA 表达量比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)(图 5)。

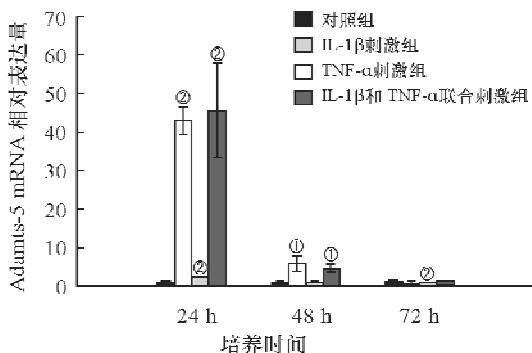


图 5 各组 Adamts-5 mRNA 的表达

Fig 5 Expression of Adamts-5 mRNA in each group

$^{\circ}P < 0.05$, $^{*}P < 0.01$ 与对照组比较

3 讨 论

骨关节炎的一大临床病理特征是软骨破坏, 关节间隙变窄, 其细胞学基础是软骨细胞外基质降解。Ⅱ型胶原和蛋白聚糖是关节软骨的两大主要成分, 占正常关节软骨干重的 90% 左右。Ⅱ型胶原和其他胶原构成关节软骨的网状骨架, 蛋白聚糖和透明质酸相互交联形成毛刷样结构, 将软骨细胞深埋在其中。关节软骨中的蛋白聚糖对于关节功能具有非常重要的意义, 使关节软骨具有很好的弹性和抗压性, 可以承受体质量的巨大压力。蛋白聚糖的降解、丢失诱发炎症反应, 致使关节软骨弹性丧失、含水量减少, 最终导致关节软骨的损毁和关节功能的丧失。

目前发现, 软骨蛋白聚糖的丢失是由于蛋白聚糖中的核心蛋白遭到蛋白水解, 已经在患者、动物模型中找到蛋白聚糖被降解所产生的片段^[8-11]。研究证实, 有两类酶参与这一反应过程, 即 MMPs 和蛋白聚糖酶。MMPs 是由多种结构相似的蛋白构成的一个蛋白酶家族, 其中 MMP-1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-12、-13 和 -14 均可以切割核心蛋白球间区上 Asn³⁴¹-Phe³⁴² 之间的肽键, 产生含有 G1 区的 C 端为 VDIPEN³⁴¹ 的片段^[12-13]。蛋白聚糖酶属 ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) 家族成员, 与蛋白聚糖的代谢有关。有两项研究^[14-15]同时证实, Adamts-5 基因敲除小鼠的骨关节炎动物模型中软骨损伤被抑制, 软骨相对良好。也有研究报道, Adamts-4、-5 双敲除小鼠骨关节炎模

型的软骨损伤病理性总评分也明显低于对照组^[16], Adamts-4、-5 也介导骨关节炎患者软骨蛋白多糖的降解^[17-18]。这说明 Adamts-4、-5 是 Adamts 家族中参与关节炎患者、动物模型中软骨基质降解的两个主要成员。

本研究中, 软骨细胞形态观察及甲苯胺蓝染色结果显示, IL-1 β 能诱导软骨细胞外基质的降解, TNF- α 刺激组与对照组相比无统计学差异; IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组与 IL-1 β 刺激组在基质降解方面有类似的结果, 说明 IL-1 β 是导致软骨细胞外基质降解更为关键的分子。本研究结果与 Zwerina 等^[19]的体内研究结果相似。Zwerina 等发现, 在 IL-1 (IL-1 α 和 IL-1 β) 敲除 TNF 转基因小鼠中, 只出现滑膜炎症, 未出现软骨破坏, 证明 TNF 引起的软骨破坏完全依赖于 IL-1。本研究进一步检测了不同刺激下诱导降解胶原的主要酶 MMP-13 及降解蛋白聚糖的主要酶 Adamts-4、Adamts-5 mRNA 的表达, 发现 IL-1 β 在刺激 24 h 后能同时促进这三种分子的高表达, 分子水平上检测到的结果与细胞水平上观察的结果一致。TNF- α 刺激组虽然也能诱导三种分子表达上调, 但与 IL-1 β 刺激组相比, 在刺激 24 h 时点上调幅度很小, 随后在 48 h 和 72 h 时点表达量基本与对照组相当。在诱导 MMP-13、Adamts-4、Adamts-5 上调方面, IL-1 β 和 TNF- α 联合刺激组与 IL-1 β 刺激组相比没有更大的诱导效应, 说明这两种细胞因子对三种分子的诱导不具有协同效应, 它们经过不同的信号通路而导致不同的结果。IL-1 通过三条不同的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 通路和核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 通路^[20] 激活组织专一性转录因子 Runx2 和普遍的转录因子 AP1^[21], 还有 c-Maf^[22] 与 MMP-13 的启动子区结合, 明显促进其转录。与此类似, IL-1 通过 Ras 蛋白^[23]、细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular regulated kinase 1/2, ERK 1/2)^[24] 和 NF- κ B^[24] 三条通路诱导 Adamts-4 的表达。至于 Adamts-5, 还没有相关通路的报道, 也许与编码其基因的一个增强子有关^[25]。随着时间的延长, 三种酶的表达呈现出不同的特点, 在 IL-1 β 的诱导作用下, MMP13 仍维持较高的水平, Adamts-4、-5 的表达在 48 h 时点降到 5 倍以下, 在 72 h 时点回到正常的生理水平, 提示 MMP-13 在软骨降解过程中持续发挥作用, 而 Adamts-4 和 Adamts-5 可能只在早期发挥作用。

本研究说明, IL-1 β 能诱导软骨细胞在短期内高

表达降解软骨基质的酶——MMP-13、Adams-4 和 Adams-5, 通过这三种酶的作用, 直接降解基质。MMP-13 可能在软骨基质降解过程中发挥比 Adams-4 和 Adamt-5 更重要的作用, 因为其在刺激 24 h 后的表达量高于后两者, 而且较长时间内维持在较高的表达水平。TNF- α 在软骨基质降解过程中不直接发挥作用, Zwerina 等^[19] 的体内研究结果曾指出, TNF 引起的软骨破坏完全依赖于 IL-1。本研究结果显示, 加入 TNF- α , 并不能增强 IL-1 β 对三种关键基质降解酶的诱导效应, 说明两者在诱导三种酶的表达时没有协同效应。鉴于 IL-1 在关节炎疾病的软骨破坏中具有重要作用, 深入研究其产生这种效应的细胞分子生物学机制可以为今后的药物筛选提供更多靶标, 为临床治疗骨关节炎疾病提供最佳解决方案。

参考文献:

- [1] Dahlberg L, Billinghurst 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.
- [2] Ahbaszade I, Liu RQ, Yang F, et al. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(3): 23443–23450.
- [3] Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins[J]. *Science*, 1999, 284(5420): 1664–1666.
- [4] Hussein MR, Fathi NA, El-Din AM, et al. Alterations of the CD4 (+), CD8 (+) T cell subsets, interleukins-1 β , IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations[J]. *Pathol Oncol Res*, 2008, 14(3): 321–328.
- [5] Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, et al. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation[J]. *J Immunol*, 1999, 163(9): 5049–5055.
- [6] Zwerina J, Redlich K, Polzer K, et al. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(28): 11742–11747.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [8] Madsen SH, Sumer EU, Bay-Jensen AC, et al. Aggrecanase- and matrix metalloproteinase-mediated aggrecan degradation is associated with different molecular characteristics of aggrecan and separated in time *ex vivo*[J]. *Biomarkers*, 2010, 15(3): 266–276.
- [9] Struglics A, Larsson S, Hansson M, et al. Western blot quantification of aggrecan fragments in human synovial fluid indicates differences in fragment patterns between joint diseases[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2009, 17(4): 497–506.
- [10] Fosang AJ, Last K, Stanton H, et al. Generation and novel distribution of matrix metalloproteinase-derived aggrecan fragments in porcine cartilage explants [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(42): 33027–33037.
- [11] Lark MW, Bayne EK, Flanagan J, et al. Aggrecan degradation in human cartilage[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(1): 93–106.
- [12] Stracke J, Fosang A, Last K, et al. Matrix metalloproteinase 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) [J]. *FEBS Lett*, 2000, 478(1–2): 52–56.
- [13] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases—Structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003, 92(8): 827–839.
- [14] Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis[J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 644–648.
- [15] Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage *in vivo* and *in vitro* [J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 648–652.
- [16] Majumdar MK, Askew R, Schelling S, et al. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(11): 3670–3764.
- [17] Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, et al. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(2): 575–585.
- [18] Naito S, Shioiri T, Okada A, et al. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage [J]. *Pathol Int*, 2007, 57(11): 703–711.
- [19] Zwerina J, Redlich K, Polzer K, et al. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(28): 11742–11747.
- [20] Fan Z, Soder S, Ehler S, et al. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage[J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(3): 938–946.
- [21] Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(21): 4361–4372.
- [22] Li T, Xiao J, Wu Z, et al. Transcriptional activation of human MMP-13 gene expression by c-Maf in osteoarthritic chondrocyte[J]. *Connect Tissue Res*, 2010, 51(1): 48–54.
- [23] Ahmad R, Sylvester J, Ahmad M, et al. Adaptor proteins and Ras synergistically regulate IL-1-induced ADAMTS-4 expression in human chondrocytes [J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 5081–5087.
- [24] 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): 1051–1058.
- [25] Barthel KKB, Liu X. A transcriptional enhancer from the coding region of ADAMTS5[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(5): e2184.