

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.46.006 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

潘剑英, 沈俊, 张荣凯, 李智富, 蔡道章. 基于线粒体 PCR 基因芯片的骨关节炎发病机制[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(46): 8575-8582.

基于线粒体PCR基因芯片的骨关节炎发病机制*★

潘剑英, 沈俊, 张荣凯, 李智富, 蔡道章

文章亮点: ①实验利用线粒体 PCR 功能芯片技术研究骨性关节炎软骨细胞中线粒体基因的差异表达, 探讨骨性关节炎的发病机制, 寻找可能作为早期诊断骨性关节炎的生物学标记和早期干预的靶点。②采用针对特定通路和生物学过程设计的线粒体 PCR 功能分类芯片的方法, 可以减少很多复杂的数据分析, 直接在相关功能分类基因中筛选 84 个线粒体相关基因的差异表达, 这些基因不仅包括电子传递链和氧化磷酸化需要的代谢产物, 维持线粒体膜极化和电位需要的离子, 而且与细胞凋亡通路相关的线粒体基因也会反应在此芯片上, 此类凋亡基因可能与骨性关节炎的发病机制密切相关, 并且可能作为早期诊断骨性关节炎的生物学标记物和早期干预的靶点。

关键词: 骨性关节炎; 线粒体 PCR 芯片; 线粒体; 基因; 凋亡; 发病机制; 代谢; 组织构建

摘要

背景: 软骨细胞具有修复受损软骨组织和维持软骨完整性的重要作用。线粒体功能障碍与细胞凋亡、老化和骨关节炎的病理过程密切相关。

目的: 通过线粒体 PCR 芯片技术研究骨性关节炎软骨细胞中线粒体基因的差异表达。

方法: 收集骨性关节炎患者及正常成人车祸后截肢者的关节软骨细胞, 经过细胞的提取和培养、RNA 提取和质量检测、mRNA 提取和 cDNA 合成等处理后进行实时定量 PCR 检测。

结果与结论: 所检测到的 84 个与线粒体相关的待检测基因中有 18 个线粒体基因在骨性关节炎中发生了显著改变。以骨性关节炎患者软骨细胞线粒体基因相对正常成人软骨细胞线粒体基因的表达倍数表示基因表达的改变情况, 其中倍数改变和倍数调节均大于 2 的上调基因有 BBC3, BCL2, SLC25A37 等 15 个, 倍数改变小于 0.5 和倍数调节小于 -2 的下调基因有 CPT1B, SLC25A16, SLC25A24 共 3 个。18 个线粒体差异基因功能分类如下: 膜极化和电位: BCL2, BCL2L1, TP53, UCP1, UCP3; 线粒体转运功能: BCL2, BCL2L1, CPT1B, FXC1 (TIMM10B), MFN2, STARD3, TP53, UCP1, UCP3; 小分子转运功能: SLC25A16, SLC25A2, SLC25A24, SLC25A31, SLC25A37; 靶蛋白: FXC1 (TIMM10B), MFN2; 线粒体蛋白转入: COX18, FXC1 (TIMM10B); 内膜转运: FXC1 (TIMM10B), TIMM17B; 线粒体裂变和融合: COX18, MFN2; 线粒体局限化: MFN2; 凋亡基因: BBC3, BCL2, BCL2L1, SOD2, P53。结果表明, 骨性关节炎软骨细胞中线粒体发生了明显的能量代谢功能障碍。

中山大学附属第三医院关节外科, 广东省广州市 510630

潘剑英★, 男, 1983年生, 汉族, 湖南省人, 2012年中山大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事关节外科临床工作。
storm0132002@163.com

通讯作者: 蔡道章, 博士, 博士生导师, 教授, 主任医师, 中山大学附属第三医院关节外科, 广东省广州市 510630
dao Zhang cai@medmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)46-08575-08

收稿日期: 2012-08-08
修回日期: 2012-10-15
(20111224009/
WJ·W)

A mitochondrial PCR gene chip based study on the pathogenesis of osteoarthritis

Pan Jian-ying, Shen Jun, Zhang Rong-kai, Li Zhi-fu, Cai Dao-zhang

Abstract

BACKGROUND: Chondrocytes play a significant role in repairing damaged cartilage tissue as well as in maintaining the integrity of the cartilage. Mitochondria are involved in a large amount of biochemical processes, and mitochondrial impairment has a closed relationship with cell apoptosis, senescence and pathological process of osteoarthritis.

OBJECTIVE: To detect the differential expression of mitochondrial genes by using gene chip based mitochondrial gene analyses.

METHODS: Articular chondrocytes were collected from healthy people and osteoarthritis patients, then extracted and cultured followed by RNA isolation and quality assessment, mRNA isolation and strand cDNA synthesis. After all, real-time quantitative PCR was performed.

RESULTS AND CONCLUSION: Among 84 mitochondrial genes, 18 genes were unambiguously identified as significantly altered in osteoarthritis: 15 of them (BBC3, BCL2, SLC25A37, etc.) were up-regulated at both fold changes and fold regulation > 2, and three of them (CPT1B, SLC25A16, SLC25A24) were down-regulated at fold change < 0.5 and fold regulation < 2. The grouping of 18 functional genes is as follows: membrane polarization & potential: BCL2, BCL2L1, TP53, UCP1, UCP3; mitochondrial transport: BCL2, BCL2L1, CPT1B, FXC1 (TIMM10B), MFN2, STARD3, TP53, UCP1, UCP3; small molecule transport: SLC25A16, SLC25A2, SLC25A24, SLC25A31, SLC25A37; targeting proteins to mitochondria: FXC1 (TIMM10B), MFN2; mitochondrion protein import: COX18, FXC1 (TIMM10B); inner membrane translocation: FXC1 (TIMM10B), TIMM17B;

Department of Bone and Joint Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Pan Jian-ying★, Master, Physician, Department of Bone and Joint Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China storm0132002@163.com

Corresponding author: Cai Dao-zhang, Doctor, Doctoral supervisor, Professor, Chief physician, Department of Bone and Joint Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China dao Zhangcai@medmail.com

Supported by: the National "863" Plan of China, No. 2008AA02Z437*

Received: 2012-08-08 Accepted: 2012-10-15

mitochondrial fission & fusion: COX18, MFN2; mitochondrial localization: MFN2; apoptotic genes: BBC3, BCL2, BCL2L1, SOD2, P53. These findings indicate that mitochondrial energy metabolism dysfunction occurs obviously in osteoarthritis chondrocytes.

Pan JY, Shen J, Zhang RK, Li ZF, Cai DZ. A mitochondrial PCR gene chip based study on the pathogenesis of osteoarthritis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(46): 8575-8582.

0 引言

骨性关节炎是常见的与年龄相关的退行性骨关节疾病,主要表现为基质的降解和细胞的死亡,从而逐渐破坏关节软骨的完整性。软骨细胞作为关节软骨中惟一的细胞,具有修复受损软骨组织和维持软骨完整性的重要作用,在骨性关节炎发病过程中起着至关重要的作用。正常人软骨细胞凋亡发生率较低,且凋亡数量随年龄的增加而相应增多,而骨性关节炎关节软骨中有过度的软骨细胞发生凋亡。

线粒体是最复杂和最重要的细胞器之一,主要由外膜、膜间隙、内膜和间质组成。线粒体参与大量、广泛的生物化学过程,与细胞凋亡、老化和一系列的病理过程密切相关,包括帕金森病、阿尔茨海默病和骨性关节炎等。软骨细胞线粒体的功能改变在骨性关节炎的发病过程中起到了重要作用,线粒体功能障碍可涉及与软骨退行性变化相关的一系列通路,包括氧化性应激反应,软骨细胞生物合成和增长反应不充分,上调软骨细胞因子诱导的炎症反应和基质分解代谢,病理性软骨基质钙化,促进软骨细胞的死亡等等^[1-5]。其中许多研究表明,线粒体在细胞凋亡中的作用十分重要,凋亡发生时,尽管线粒体在表面形态上没有明显的变化,但是其超微结构已发生变化,导致通透性转换孔(permeability transition, PT)开放,外膜通透性增高,位于膜间隙的可溶性蛋白被释放到细胞质中,其中包括细胞色素C(cyt-C)、线粒体促凋亡蛋白(Smac)、凋亡诱导因子(AIF)以及内切核酸酶G(endo G)等,这些蛋白或激活半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase)途径,或独立的与细胞核内染色体作用,引起细胞凋亡。Blanco等^[6]近期证实骨性关节炎软骨细胞中线粒体的功能障碍可能起始于mtDNA(Mitochondrial DNA)的突变或者来自于促炎症调节因子的直接作用,如:细胞因子类、前列腺素类、活性氧和一氧

化氮, mtDNA的突变和氧化性应激反应对老化性疾病如骨性关节炎密切相关,并且认为mtDNA可能作为诊断骨性关节炎的生物学标记物。

PCR芯片是研究一组特异性基因表达水平的理想方法。PCR芯片结合了实时定量PCR的优点和芯片的高通量,是研究者开展研究的得力工具。实验利用线粒体PCR功能芯片技术研究骨性关节炎软骨细胞中线粒体基因的差异表达,探讨骨性关节炎的发病机制,寻找可能作为早期诊断骨性关节炎的生物学标记和早期干预的靶点。采用针对特定通路和生物学过程设计的线粒体PCR功能分类芯片的方法,可以减少很多复杂的数据分析,直接在相关功能分类基因中筛选84个线粒体相关基因的差异表达,这些基因不仅包括电子传递链和氧化磷酸化需要的代谢产物,维持线粒体膜极化和电位需要的离子,而且与细胞凋亡通路相关的线粒体基因也会反应在此芯片上,此类凋亡基因可能与骨性关节炎的发病机制密切相关,并且可能作为早期诊断骨性关节炎的生物学标记物和早期干预的靶点,国内外未见相关报道。

实验通过线粒体基因芯片分析骨性关节炎患者与正常成人软骨细胞线粒体基因的表达差异,探寻可能的早期诊断骨性关节炎的生物学标记与早期干预靶点。

1 对象和方法

设计: 基因学实验。

时间及地点: 实验于2010年7月至2011年11月在中山大学肝脏病实验室完成。

对象: 采用3例本院收治的骨性关节炎患者(女2例,男1例,年龄分别为62, 58, 72岁)的软骨细胞作为骨性关节炎组,3例本院收治的因车祸截肢的患者(男2例,女1例,年龄分别为48, 27, 46岁)的软骨细胞作为对照组。

根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗

机构管理条例》^[7], 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书, 研究方案获本医院伦理委员会批准。

骨性关节炎组: 按照美国风湿病学会的诊断标准^[8]确诊膝关节骨性关节炎疾病。

膝关节骨性关节炎诊断标准:

膝关节炎临床诊断标准:

- ①患者前 1 个月大多数时间有膝痛。
- ②关节活动时骨响声。
- ③晨僵时间小于 30 min。
- ④年龄大于或等于 38 岁。
- ⑤膝检查有骨性肥大。

满足①+②+③+④条, 或①+②+⑤条或①+④+⑤者, 可诊断为膝关节炎。

膝关节炎临床及放射学诊断标准:

- ①前 1 个月大多数时间有膝痛。
- ②X 射线示关节边缘骨赘。
- ③关节液实验室检查符合骨关节炎。
- ④年龄大于或等于 40 岁。
- ⑤晨僵小于 30 min。
- ⑥关节活动时骨响声。

满足①+②条或①+③+⑤+⑥条, 或①+④+⑤+⑥条者, 可诊断膝关节炎。

骨性关节炎组纳入标准: 符合上述膝关节骨性关节炎诊断标准者, 年龄在 40-60 岁之间, 无全身性、系统性或感染性疾病。

骨性关节炎组排除标准: 有透明质酸治疗史, 6 个月内口服非类固醇类消炎镇痛药, 有心脑血管疾病者, 有自身免疫系统疾病者, 有慢性肝肾功能损害者。

对照组:

纳入标准: 健康成年人车祸伤后行截肢手术者。

对照组排除标准: 有慢性膝关节疼痛病史者, 有脑血管疾病者, 有自身免疫系统疾病者, 有慢性肝肾功能损害者。

材料:

线粒体 PCR 基因芯片检测的试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胰蛋白酶, II 型胶原酶	天津灏洋公司
实时定量 PCR 芯片试剂	美国 SuperArray 公司
高速冷冻离心机	德国 eppendorf 公司
超微量分光光度计, mRNA 磁珠, cDNA 第一链合成试剂盒	美国 Thermo 公司
实时定量 PCR 仪, 普通 PCR 仪	美国 Life 公司
恒温水浴锅	上海一恒公司
低速离心机	上海安亭公司

方法:

软骨细胞的提取和培养: 选取无透明质酸治疗史的膝关节炎患者, 在其知情同意的情况下, 通过膝关节置换获取软骨。将置换中取出的关节软骨收集在 PBS 中, 反复清洗除去软骨表面的血液以及可能误带的滑膜组织后, 剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右的组织块, 用 PBS 清洗 2 次, 转入无菌离心管中, 加入 4 倍体积的体积分数 0.2% II 型胶原酶溶液及 1 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶溶液, 置于 37 °C 水浴中轻微振荡消化, 直至软骨组织块基本消失、溶液变混浊为止。1 000 r/min, 离心 5 min 弃上清液, PBS 洗涤细胞 (1 000 r/min, 5 min) 2 次, 弃上清, 加入低糖 DMEM 培养基 (含体积分数 10% 胎牛血清, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 U/mL), 计数细胞, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度将细胞悬液接种于 25 mL 塑料培养瓶中, 再置于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 每隔 2 d 换液 1 次。当原代细胞融合并覆盖瓶底 80% 以上时, 用体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:2 比例传代接种进入传代培养, 培养条件同原代培养。

软骨细胞 RNA 提取: 在细胞培养盘中加入 Trizol 试剂裂解细胞, 匀浆后孵育 5 min, 加入氯仿, 4 °C 下离心 12 000×g, 15 min, 离心后混合液体将分为下层的红色酚氯仿相, 上层的无色 RNA 水相。将水相转移到新离心管中, 与异丙醇混合以沉淀其中的 RNA, 混匀后于 4 °C 12 000×g 离心 10 min, 此时可见 RNA 胶状沉淀块。移去上清液, 加入体积分数 75% 乙醇, 4 °C, 7 500×g 离心 5 min, 清洗 RNA 沉淀后去除乙醇溶液, 空气中干燥 RNA 沉淀后重新溶解 RNA 沉淀。获得的 RNA 溶液保存于 -70 °C。

软骨细胞 RNA 质量检测: 采用紫外吸收测定法, 使用 NanoDrop[®] ND-1000 测定 RNA 浓度和纯度, 测量前先用溶解 RNA 时的 DEPC 水调零。操作方法如下: 滴加 1 μL DEPC 水或者 RNA 样品至测量基座的表面。液滴会自动在上下基座之间形成液柱并自动完成测定, RNA 浓度及质量的各种参数将在电脑中自动生成文件。一次测定完成后, 用柔软的擦镜纸擦去上下基座表面上的样本液, 便可进行下一个样品的测量。

软骨细胞 mRNA 抽取: 将探针退火反应物全部加入含漂洗好的磁珠 (SA-PMPs) 管中, 用磁性分离架捕获 SA-PMPs, 去上清, 用 0.1×SSC, 每次 0.3 mL 洗 4 次。将 SA-PMPs 重新悬浮在 0.1 mL RNase-free 水中, 用磁性分离架捕获 SA-PMPs, 将洗脱的 mRNA 吸入另一个新的 Eppendorf 管中。将 SA-PMPs 再悬浮于 0.15 mL

RNase-free的水中, 重复以上捕获和洗涤步骤。

软骨细胞cDNA合成: 首先配制混合物: 质量浓度 500 mg/L oligo(dT) 181 μ L; 总RNA 0.5 μ g; 10 mmol/L dNTP Mix 1 μ L; 灭菌水 13 μ L。将混合物 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min后, 冰上放置至少1 min。短暂离心后, 在离心管中依次加入: 5X First-Strand Buffer 4 μ L; 0.1 mol/L DTT 1 μ L; RNase Ihibitor 1 μ L; SuperScript. III RT 1 μ L。混合均匀后, 50 $^{\circ}$ C 温育60 min和70 $^{\circ}$ C 温育 15 min使酶失活。最后每20 μ L cDNA加91 μ L灭菌水混匀, 置冰浴待用或-20 $^{\circ}$ C 保存。

实时定量PCR: 在5 mL管或多通道槽配制总体积 1 100 μ L的混合液, 2X SuperArray PCR master mix 550 μ L; 已稀释的cDNA 102 μ L; ddH₂O 448 μ L。打开 PCR Array上的膜, 加10 μ L混合液到PCR Array对应的每个孔中, 盖上盖子密封PCR Array。设置实时定量PCR程序, 10 min, 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 95 $^{\circ}$ C, 1 min, 60 $^{\circ}$ C(收集荧光), 40 cycles。最后将PCR Array置于实时定量PCR仪进行PCR反应。

数据分析: 采用 $\Delta\Delta$ Ct 方法计算每个处理组中的每个通路相关基因的 Δ Ct。

Δ Ct (group 1) = average Ct - average of HK genes' Ct for group 1 array.

Δ Ct (group 2) = average Ct - average of HK genes' Ct for group 2 array.

计算2个PCR Array(或两组)中每个基因的 $\Delta\Delta$ Ct。

$\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (组2) - Δ Ct (组1)

组1是对照, 组2是实验组。

通过 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}计算组2与组1对应基因的表达差异。

主要观察指标: 线粒体PCR基因芯片表达数据、差异基因功能分析数据。

统计学分析: 应用SPSS 13.0统计学软件采集和处理数据。组间均数的比较采用两样本t 检验和方差分析法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

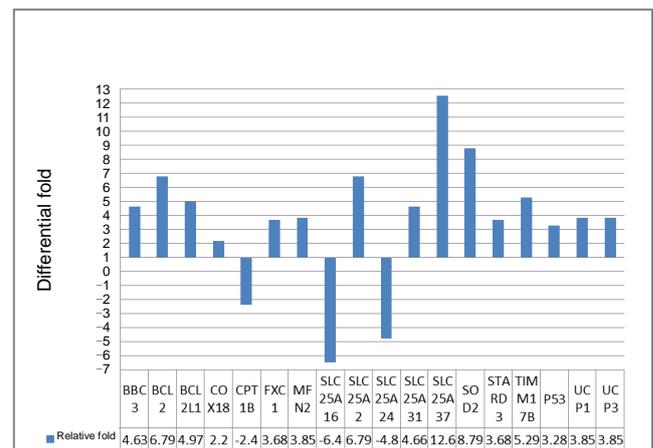
2.1 线粒体PCR芯片基因表达数据 采用线粒体功能分类芯片的方法, 实验可检测84个与线粒体相关的基因差异表达情况。针对特定通路和生物学过程设计的芯片, 减少很多复杂的数据分析, 直接在相关功能分类基因中筛选差异表达的基因。所检测到的84个与线粒体相关的待检测基因中有18个线粒体基因在骨性关节炎中发生了显著改变。以骨性关节炎患者软骨细胞线粒体基

因相对正常成人软骨细胞线粒体基因的表达倍数表示基因表达的改变情况, 其中倍数改变和倍数调节均大于2的上调基因有BBC3, BCL2, SLC25A37等15个, 倍数改变小于0.5和倍数调节小于-2的下调基因有CPT1B, SLC25A16, SLC25A24共3个。检测结果见表1, 图1, 2。

表1 软骨细胞线粒体差异表达的基因
Table 1 Differential expression of mitochondrial genes

Symbol	$2^{-\Delta\Delta$ Ct		Fold change OA/NC	P value	Fold up- or down-regulation OA/NC
	OA	NC			
BBC3	4.7 \times 10 ⁻⁴	1.0 \times 10 ⁻⁴	4.63	0.003	4.63 \uparrow
BCL2	3.5 \times 10 ⁻³	5.1 \times 10 ⁻⁴	6.79	0.000	6.79 \uparrow
BCL2L1	2.5 \times 10 ⁻²	5.0 \times 10 ⁻³	4.97	0.016	4.97 \uparrow
COX18	3.4 \times 10 ⁻⁴	1.5 \times 10 ⁻⁴	2.20	0.011	2.20 \uparrow
CPT1B	1.9 \times 10 ⁻³	4.4 \times 10 ⁻³	0.42	0.008	-2.38 \downarrow
FXC1	5.1 \times 10 ⁻³	1.4 \times 10 ⁻³	3.68	0.015	3.68 \uparrow
MFN2	2.5 \times 10 ⁻⁴	6.4 \times 10 ⁻⁵	3.85	0.001	3.85 \uparrow
SLC25A16	6.0 \times 10 ⁻⁴	3.8 \times 10 ⁻³	0.16	0.045	-6.44 \downarrow
SLC25A2	4.3 \times 10 ⁻⁴	6.4 \times 10 ⁻⁵	6.79	0.030	6.79 \uparrow
SLC25A24	6.8 \times 10 ⁻³	3.2 \times 10 ⁻²	0.21	0.038	-4.77 \downarrow
SLC25A31	3.0 \times 10 ⁻⁴	6.4 \times 10 ⁻⁵	4.66	0.001	4.66 \uparrow
SLC25A37	1.4 \times 10 ⁻¹	1.1 \times 10 ⁻²	12.55	0.006	12.55 \uparrow
SOD2	1.5 \times 10 ⁻¹	1.7 \times 10 ⁻²	8.79	0.049	8.79 \uparrow
STARD3	4.3 \times 10 ⁻⁴	1.2 \times 10 ⁻⁴	3.68	0.026	3.68 \uparrow
TIMM17B	3.9 \times 10 ⁻²	7.3 \times 10 ⁻³	5.29	0.008	5.29 \uparrow
P53	2.9 \times 10 ⁻²	8.9 \times 10 ⁻³	3.28	0.047	3.28 \uparrow
UCP1	2.5 \times 10 ⁻⁴	6.4 \times 10 ⁻⁵	3.85	0.001	3.85 \uparrow
UCP3	2.5 \times 10 ⁻⁴	6.4 \times 10 ⁻⁵	3.85	0.001	3.85 \uparrow

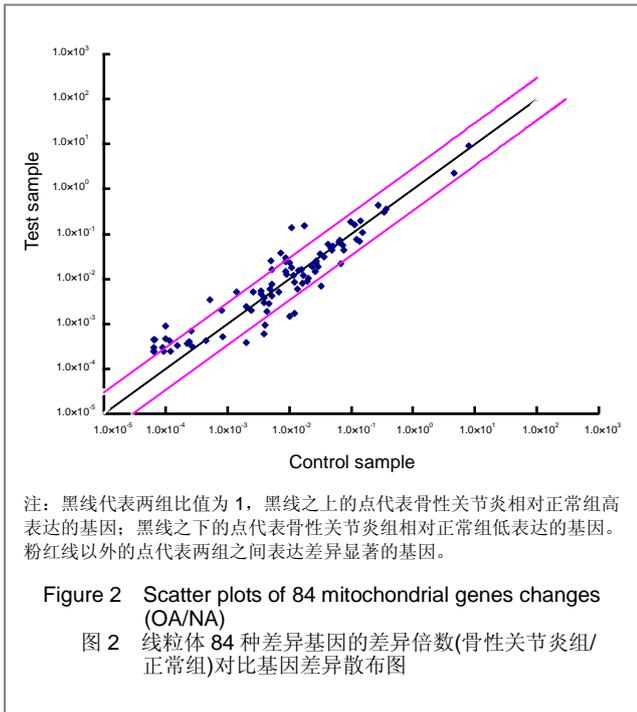
\uparrow : up-regulation; \downarrow : down-regulation



注: 黑线代表两组比值为1, 黑线之上的点代表骨性关节炎相对正常组高表达的基因; 黑线之下的点代表骨性关节炎组相对正常组低表达的基因。粉红色线以外的点代表两组之间表达差异显著的基因。

Figure 1 Profile fold change of significantly differential mitochondrial genes (OA/NA)

图1 骨性关节炎组/正常组软骨线粒体显著差异基因差异倍数柱状图



2.2 线粒体差异基因功能分类 结果显示, 18 个线粒体基因在骨性关节炎中发生了显著改变, 其中倍数改变和倍数调节均大于 2 的上调基因有 15 个, 倍数改变小于 0.5 和倍数调节小于 -2 的下调基因有 3 个。

根据 RefSeq 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) 对上述基因进行功能分类如下:

膜极化和电位: BCL2, BCL2L1, TP53, UCP1, UCP3。

线粒体转运功能: BCL2, BCL2L1, CPT1B, FXC1 (TIMM10B), MFN2, STARD3, TP53, UCP1, UCP3。

小分子转运功能: SLC25A16, SLC25A2, SLC25A24, SLC25A31, SLC25A37。

靶蛋白: FXC1 (TIMM10B), MFN2。

线粒体蛋白转入: COX18, FXC1 (TIMM10B)。

内膜转运: FXC1 (TIMM10B), TIMM17B。

线粒体裂变和融合: COX18, MFN2。

线粒体局限化: MFN2。

凋亡基因: BBC3, BCL2, BCL2L1, SOD2, P53。

3 讨论

软骨细胞线粒体的功能改变在骨性关节炎的发病过程中起到了重要作用。线粒体功能障碍可涉及与软骨退行性变化相关的一系列通路, 包括氧化性应激反应, 软骨细胞生物合成和增长反应不充分, 上调软骨细胞因子诱导的炎症反应和基质分解代谢, 病理性软骨基质钙

化, 促进软骨细胞的死亡等。

近年来 CNKI 数据库关于软骨细胞和线粒体相关研究的文献如下(按被引频次排列):

文献	作者	来源	被引频次
骨髓间质干细胞向软骨细胞表型定向诱导分化的实验研究	夏万尧等	中华整形外科杂志	59
实验性骨折愈合中钙化与骨化的超微结构观察(兼论成纤维细胞的成骨作用)	柴本甫等	中华创伤杂志	37
人骨髓间质干细胞作为骨、软骨组织工程种子细胞的实验研究	庞永刚等	细胞与分子免疫学杂志	28
脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)致鸡胚软骨细胞损伤及硒的保护效应	彭双清等	中国地方病学杂志	23
镰刀菌毒素对软骨细胞的损伤及硒的保护作用	彭双清等	中国地方病防治杂志	19
氟对人胎儿的影响	何汉等	中国地方病防治杂志	19
偏侧咀嚼大鼠髁突组织学及嚼肌超微结构的研究	黄洋等	口腔医学研究	17
人胚颞颌关节软骨细胞培养及生物学特性研究	焦岩涛等	华西口腔医学杂志	14
硒对 T-2 毒素引起培养软骨细胞超微结构与功能改变的拮抗作用	李生广等	生物化学杂志	14
青少年特发性脊柱侧凸患者脊柱前后柱生长软骨的超微结构研究	朱锋等	电子显微学报	11

近年来 CNKI 数据库关于软骨细胞和线粒体相关研究的文献如下(按被下载量次排列):

文献	作者	来源	下载量
膝骨关节炎软骨病理改变的分子生物学机制及中药干预研究	韩清民	广州中医药大学	871
蜂毒素协同 TRAIL 诱导人肝细胞癌细胞凋亡的实验研究	汪晨	第二军医大学	540
骨炎定对体外培养软骨细胞的影响	杨运东	广州中医药大学	462
生脉成骨胶囊治疗激素性股骨头坏死的骨修复机理研究	徐传毅	广州中医药大学	424
蜈蚣三七提取物抗类风湿性关节炎分子免疫机理的研究	邴飞虹	湖北中医药大学	397
巴戟天多糖对体外培养兔软骨细胞增殖和凋亡的影响	黄涛	福建中医药大学	341
复方六味地黄丸治疗骨性关节炎的实验研究	梁文清	山东中医药大学	309
单味中药骨碎补对兔膝关节软骨细胞凋亡作用的实验研究	金连峰	辽宁中医药大学	275
骨关节炎软骨细胞凋亡的信号传导	高萌萌等	中国老年学杂志	272
通络生骨胶囊结合生物力学原理治疗骨性关节炎临床与实验研究	刘和波	广州中医药大学	265

近年来CNKI数据库关于软骨细胞和线粒体相关研究的文献如下(按发表时间排列):

文献	作者	来源	发表时间
人脐带间充质干细胞超微结构观察	乔淑敏等	中国实验血液学杂志	2012-04-20
透明质酸对人骨关节炎软骨细胞保护机制的探讨	李化光等	实用医学杂志	2012-04-10
间充质干细胞在儿童异基因造血干细胞移植中的应用研究	乔淑敏	苏州大学	2012-03-01
RNA 干扰沉默 BAX 基因抑制大鼠软骨细胞凋亡及其可能机制	李宇等	基础医学与临床	2012-02-05
术后早期活动对同种异体关节移植后关节软骨保护作用的实验研究优先出版	李翔等	中国修复重建外科杂志	2011-12-15
原代培养差速贴壁法分离纯化大鼠腰椎间盘髓核细胞	孙浩林等	中国组织工程研究与临床康复	2011-11-12
肉鸡胫骨软骨发育不良早期不同阶段超微结构观察	田文霞等	中国畜牧兽医学学会家畜内科学分会第七届代表大会暨学术研讨会论文集(下册)	2011-11-04
脱氧雪腐镰刀菌烯醇致幼年鼠骨及关节软骨损伤差异的实验研究	李群伟等	中国预防医学杂志	2011-10-15
线粒体细胞色素 c 介导的 caspase-9 激活通路参与大骨节病关节软骨细胞凋亡的发生机制	刘江涛等	西安交通大学学报(医学版)	2011-09-05
透骨消痛胶囊含药血清对软骨细胞活性与线粒体凋亡通路及细胞外基质的影响	吴追乐等	福建中医药大学	2011-06-01

目前, 国内外学者越来越重视软骨细胞线粒体作用

的研究, Ruiz-Romero 等^[4]通过双向电泳和 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定的蛋白质组学方法分析了 6 例骨性关节炎患者和 6 例对照组的软骨细胞线粒体蛋白质差异性改变, 发现 73 个蛋白发生显著性改变, 这些蛋白的功能包括: 能量的产生, 线粒体膜完整性的保持, 自由基的去除等等, 并指出线粒体中氧化还原反应的平衡被打破是骨性关节炎发病机制的重要组成部分^[9-12]。Cillero-Pastor 等^[13]探讨线粒体呼吸链在软骨细胞发生炎症反应中所发挥的作用, 结果显示线粒体呼吸链的 complexes III, IV 受到抑制后通过 Ca²⁺ 交换后生成活性氧, 激活核转录因子 KB 等途径, 产生大量的前列腺素 E₂, 从而诱导炎症应答。Blanco 等^[6]近期提出线粒体的功能障碍可能起始于 mtDNA (Mitochondrial DNA) 的突变或者来自于促炎症调节因子的直接作用, 如: 细胞因子类、前列腺素类、活性氧和一氧化氮。mtDNA 的突变和氧化性应激反应对老化性疾病如骨性关节炎密切相关, 可能作为诊断骨性关节炎的生物学标记物。

本次实验利用线粒体 PCR 功能芯片探讨骨性关节炎软骨细胞中线粒体基因的差异表达。采用针对特定通路和生物学过程设计的线粒体功能分类芯片的方法, 可以减少很多复杂的数据分析, 直接在相关功能分类基因中筛选 84 个与线粒体相关差异表达的基因, 这些基因不仅包括电子传递链和氧化磷酸化需要的代谢产物, 维持线粒体膜极化和电位需要的离子, 而且与细胞凋亡通路相关的基因也会反应在此芯片上, 此类凋亡基因可能与骨性关节炎的发病机制密切相关。

线粒体的融合、分裂与细胞凋亡密切相关, 线粒体融合能抑制细胞凋亡, 而线粒体分裂则参与诱发凋亡, 促进线粒体融合的蛋白高表达或主导线粒体分裂的分子受抑制都与细胞凋亡有关, 这暗示细胞凋亡与线粒体破碎密切相关。线粒体可通过融合与分裂来调整膜的通透性和稳定性, 从而决定细胞的生存与否^[12]。Mfn (mitofusin gene) 即线粒体融合蛋白基因, 其编码 Mfn1 和 Mfn2 两种分子, 均匀分布于线粒体外膜, 在维持线粒体形态的动态平衡中起重要作用。线粒体融合是一个复杂的过程, 包括线粒体在胞质中运动、线粒体膜的改变、外膜的融合、内膜的对接和融合、线粒体 DNA 和基质的混合。Mfn1 或 Mfn2 基因剔除后小鼠由于线粒体融合效率下降而导致线粒体片段化, 线粒体的移动能力减弱, 线粒体形态也发生明显变化^[14]。虽然它们的功能有一定的相似之处, 但又有不同之处, Mfn1 在线粒体融合的前期膜结合中起决定作用, Mfn2 的主要作用是在融合的后期有利于维持线粒体的管状形态^[15]。可以理解为 Mfn1

的作用更倾向于促进线粒体的融合, Mfn2的作用更倾向于融合的后期抑制细胞的凋亡。研究发现, 几乎在所有的凋亡细胞中, Mfn2与Bax 共定位^[16], 它可以导致促凋亡分子 Bax 活化延迟, 减缓线粒体凋亡途径的重要凋亡因子细胞色素 C 的释放和抑制凋亡^[17]。实验结果显示, 骨性关节炎组较正常对照组的Mfn2明显上调, 其作用主要是维持尚且存活的线粒体的管状形态, 阻止线粒体的功能障碍, 因而保护软骨细胞免遭凋亡, 这可能是体内自主反馈性调节的结果, 推测可能作为骨性关节炎早期诊断的生物学标记物和早期干预的靶点, 但其确切的作用机制还有待于进一步研究。

在骨性关节炎的软骨细胞凋亡研究中, Kim等^[18-19]发现骨性关节炎患者软骨细胞Bcl-2明显增高, 他们还认为Bcl-2在骨性关节炎软骨受损区域 (尤其是接近裂隙处), 可能通过上调 Bcl-2 的表达来对抗软骨细胞的凋亡^[19]。Erlacher等^[20]在转录和蛋白水平对骨关节炎患者及健康成年关节软骨中 Bcl-2 的表达进行过研究也发现, 骨关节炎患者 Bcl-2 mRNA 的表达较高, 认为机体对凋亡的调控是通过上调Bcl-2表达保护软骨细胞免遭凋亡。但是, 目前在软骨细胞的凋亡研究中没有发现caspase-3和Fas的表达^[21]。Whiteman等^[22-23]对软骨细胞凋亡途径的研究也发现其不依赖于caspase-3和Fas, 而是依赖Bax。因此, 软骨细胞的凋亡途径很可能不存在死亡受体途径而只有线粒体途径。因此软骨细胞的凋亡调控中Bcl-2的作用就更加重要。目前国内外关于线粒体通透性改变的研究主要是集中Bcl-2与Bax比例失调上。现在很多学者的研究都表明在体内Bcl-2家族成员通常以Bcl-2/Bax二聚体的形式发挥作用, 参与了软骨细胞凋亡的调节, Bcl-2抑制细胞凋亡, 而Bax与Bcl-2的作用相反。如Bcl-2过量, 形成Bcl-2二聚体, 那么细胞就存活, 如Bax过量, 形成Bax二聚体, 那么细胞就走向凋亡。但也有研究发现^[20], 骨性关节炎患者关节软骨细胞的Bax mRNA表达上调的同时, Bcl-2 mRNA表达也显著增高, 认为人体是通过上调Bcl-2表达保护软骨细胞免遭凋亡, 这是体内自主反馈性调节的结果^[24-26]。本次实验结果中线粒体Bcl-2基因明显升高, 与国外文献报道结果一致。

p53, Bax与Bcl-2在细胞凋亡的调控作用方面密切相关, 呈拮抗关系。p53基因是一种转录调节因子, 具有控制DNA复制、阻止细胞增殖、诱导易感细胞发生凋亡等作用, Hashimoto等^[27]研究指出, p53表达升高, 转录活性提高, 凋亡信号开始启动。同时, p53调节凋亡诱导蛋白1(p53AIP-1), 此蛋白可促进DNA的损害,

下调p53可以抑制软骨细胞的凋亡, 提示在骨性关节炎关节软骨中p53介导的细胞凋亡发挥着重要作用。其机制可能在于p53基因表达产物的聚集使Bax的表达增加, 使Bax和Bcl-2的比例失调, 作用于线粒体, 使其膜电位以及通透性改变, 释放细胞色素C, 从而激活caspase-3, 引起细胞凋亡的发生^[28-29]。Iannone等^[30]报道Bcl-2/p53的比例增加可以促进软骨细胞的新陈代谢, 从而拮抗细胞的凋亡, 所以两者之间的平衡对软骨细胞的活性至关重要。

因此, 为了更好地研究软骨细胞的凋亡机制, 探讨p53, Bax与Bcl-2在软骨细胞凋亡机制中所发挥的作用是未来研究的重要课题。

4 参考文献

- [1] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;8(281):1309-1312.
- [2] Finkel T, Holbrook, Oxidants NJ. Oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;11(408):239-247.
- [3] Blanco FJ, Lopez-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion*. 2004;9(4):715-728.
- [4] Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics*. 2009;1(8):172-189.
- [5] Cillero-Pastor B, Caramés B, Lires-Deán M, et al. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2008;8(8):2409-2419.
- [6] Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(3):161-169.
- [7] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.
- [8] Murphy WA Jr, Altman RD. Updated osteoarthritis reference standard. *J Rheumatol Suppl*. 1995;43:56-59.
- [9] Tanaka A, Youle RJ. A chemical inhibitor of DRP1 uncouples mitochondrial fission and apoptosis. *Mol Cell*. 2008;29:409-410.
- [10] Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingberman E, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell*. 2008;14:193-204.
- [11] Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, et al. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:706-716.
- [12] Karbowski M, Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2003;10(8):870-880.
- [13] Cillero-Pastor B, Caramés B, Lires-Deán M, et al. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2409-2419.

- [14] Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 2003; 160(2):189-200.
- [15] Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26185-26192.
- [16] Karbouski M, Lee YJ, Gaume B, et al. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1 and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol.* 2002;159(6):931-938.
- [17] Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 2008;22(12):1577-1590.
- [18] Kim HA, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1528-1537.
- [19] Kim HA, Lee YJ, Seong SC, et al. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2000;27: 455-462.
- [20] Erlacher L, Maier R, Ullrich R, et al. Differential expression of the protooncogene Bcl-2 in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J Rheumatol.* 1995;22(5):926-934.
- [21] Lo MY, Kim HA. Chondrocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide requires caspase activation but not mitochondrial pore transition. *J Orthopaedic Res.* 2004;22: 1120-1125.
- [22] Whiteman M, Armstrong JS, Cheung NS, et al. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. *FASEB J.* 2004;18: 1395-1397.
- [23] Maas S, Warskulat U, Steinhof C. Decreased Fas expression in Advanced-stage bladder cancer is not related to p53 status. *Urology.* 2004;63(2):392-397.
- [24] Shang L, Qin L, Chen LB, et al. Effects of sodium ferulate on human osteoarthritic chondrocytes and osteoarthritis in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;(36):912-918 .
- [25] Lires-Dean B, Carames B, Cillero-Pastor BS, et al. Anti-apoptotic effect of transforming growth factor- β 1 on human articular chondrocytes: role of protein phosphatase 2A. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2008;(16):1370-1378.
- [26] John T, Muller RD, Oberholzer A, et al. Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. *Cytokine.* 2007;(40):226-234.
- [27] Hashimoto S, Nishiyama T, Hayashi S. Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2009;60:2340-2349.
- [28] Kim SJ, Ju JW, Oh CD, et al. ERK21 /2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase23, and differentiation status. *J Biol Chem.* 2002;277(2):1332-1339.
- [29] Kim SJ, Hwang SG, Shin DY, et al. p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NF κ B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2002; 277(36):33501.
- [30] Iannone F, De Bari C, Scioscia C. Increased Bcl-2/p53 ratio in human osteoarthritic cartilage: a possible role in regulation of chondrocyte metabolism. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:217-221.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家 863 计划(2008AA02Z437), 课题名称: 骨关节炎的早期诊断与早期干预。

作者贡献: 潘剑英完成文献撰写, 参与实验设计与并完成实验的统计学分析; 沈俊、张荣凯和李智富参与完成实验; 蔡道章指导课题与实验设计。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》, 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。

文章概要:

文章要点: 通过线粒体基因芯片, 发现 p53, Bax 与 Bcl-2 可能在与骨性关节炎相关的软骨细胞凋亡中发挥重要作用, 具有继续研究的价值。

关键信息: 本项课题为寻找骨性关节炎的早期诊断标志与早期干预靶点提供了线索。

研究的创新之处与不足: 关于线粒体基因表达差异与骨性关节炎的关系的 PCR 芯片研究相对较少。但是转录水平上的差异并不能完全代表蛋白质水平的差异。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。