

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.46.011 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

李彦林, 王国梁, 曹斌, 何川, 高岗, 陈文栋, 马珂, 许鹏, 杨光. 体外阻断基质细胞衍生因子1/CXC趋化因子受体4信号通路后人关节软骨组织II型胶原和聚集蛋白聚糖的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(46): 8607-8610.

体外阻断基质细胞衍生因子1/CXC趋化因子受体4信号通路后人关节软骨组织II型胶原和聚集蛋白聚糖的表达*☆

李彦林, 王国梁, 曹斌, 何川, 高岗, 陈文栋, 马珂, 许鹏, 杨光

文章亮点: 采用 CXC 趋化因子受体 4 的特异性拮抗剂 AMD3100 可阻断基质细胞衍生因子 1/CXC 趋化因子受体 4 信号通路, 使软骨细胞 II 型胶原和聚集蛋白聚糖表达水平及分泌量降低, 延缓关节软骨退变。

关键词: 骨性关节炎; 基质细胞衍生因子 1/CXC 趋化因子受体 4 信号通路; AMD3100; II 型胶原; 聚集蛋白聚糖

摘要

背景: 基质细胞衍生因子 1/CXC 趋化因子受体 4 信号通路在骨关节炎的发病中起关键作用。

目的: 探讨 AMD3100 体外阻断基质细胞衍生因子 1/CXC 趋化因子受体 4 信号通路后对培养的关节软骨组织 II 型胶原、聚集蛋白聚糖 mRNA 表达及 II 型胶原蛋白表达的影响。

方法: 将骨关节炎软骨和创伤性截肢患者正常软骨分别分为 3 个小组即实验组, 实验对照组, 空白对照组。将其置于含基质细胞衍生因子 1 和 AMD3100, 含基质细胞衍生因子 1 和 MAB310, 只含基质细胞衍生因子 1 的培养液培养。

结果与结论: 实验组软骨组织内的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖 mRNA 表达量、II 型胶原蛋白含量高于实验对照组和空白对照组 ($P < 0.05$)。可见基质细胞衍生因子 1 通过基质细胞衍生因子 1/CXC 趋化因子受体 4 信号通路诱导人关节软骨中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的降解; AMD3100 可阻断该信号通路及减少软骨中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的降解, 延缓关节软骨组织的退变; AMD3100 不能使已退变的骨关节炎软骨内的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖含量恢复到正常水平。

昆明医学院第一附属医院运动医学学科, 云南省昆明市 650031

李彦林☆, 男, 1969 年生, 云南省马龙县人, 汉族, 2000 年华西医科大学毕业, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事骨关节炎防治的研究。
yanlinli1969@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)46-08607-04

收稿日期: 2012-02-17
修回日期: 2012-03-27
(20111217008/M · T)

Expression of type II collagen and aggrecan in human articular cartilage tissues after blocking stromal cell derived factor-1/chemokine receptor 4 signal pathway *in vitro*

Li Yan-lin, Wang Guo-liang, Cao Bin, He Chuan, Gao Gang, Chen Wen-dong, Ma Ke, Xu Peng, Yang Guang

Abstract

BACKGROUND: Stromal cell derived factor-1(SDF-1)/chemokine receptor 4 (CXCR4) signal pathway plays a key role in the pathogenesis of osteoarthritis.

OBJECTIVE: To explore the effect of SDF-1/CXCR4 signal pathway on the expression of type II collagen and aggrecan mRNA of the synthesis in human articular cartilage after blocking the SDF-1/CXCR4 signal pathway with AMD3100.

METHODS: The cartilage blocks from osteoarthritis patients who had total knee replacement and normal cartilage blocks from patients who had traumatic amputation were collected and divided into three groups: experimental group, experimental control group and blank control group. The three groups were cultured in the nutrient solution containing of SDF-1 and AMD3100, SDF-1 and MAB310, as well as SDF-1 only, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The expressions of type II collagen and aggrecan mRNA, as well as type II collagen content in the experimental group was higher than those in the experimental control group and blank control group ($P < 0.05$). These results suggest that SDF-1 can induce the degradation of type II collagen and aggrecan through the SDF-1/CXCR4 signaling pathway. Besides, AMD3100 can block SDF-1/CXCR4 signal pathway and reduce the degradation of type II collagen and aggrecan, and therefore slow down the degeneration of articular cartilage. But AMD3100 cannot recover type II collagen and aggrecan in osteoarthritis cartilage to normal levels

Li YL, Wang GL, Cao B, He C, Gao G, Chen WD, Ma K, Xu P, Yang G. Expression of type II collagen and aggrecan in human articular cartilage tissues after blocking stromal cell derived factor-1/chemokine receptor 4 signal pathway *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(46): 8607-8610.

Department of Sport Medicine, First Affiliated Hospital of Kunming Medicine College, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Li Yan-lin☆, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Department of Sport Medicine, First Affiliated Hospital of Kunming Medicine College, Kunming 650031, Yunnan Province, China
yanlinli1969@yahoo.com.cn

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30860286*

Received: 2012-02-17
Accepted: 2012-03-27

0 引言

骨关节炎是以关节软骨基质的降解伴关节周围新骨形成及骨反应为特点的一种滑膜关节病^[1]。关节软骨基质的主要成分为胶原(其中以II型胶原为主,约占总量的90%)。当骨关节炎病变发生时,聚集蛋白聚糖和II型胶原遭到破坏,导致关节软骨的结构和功能发生改变,最终造成关节功能的丧失。因此,本实验对正常成人及骨关节炎患者膝关节软骨块进行体外培养,采用CXC趋化因子受体4的特异性拮抗剂AMD3100阻断基质细胞衍生因子1/CXC趋化因子受体4信号通路,了解软骨组织内II型胶原,聚集蛋白聚糖的表达水平。

1 材料和方法

设计: 对比观察实验。

时间及地点: 实验于2009年11月至2011年3月在昆明医学院第一附属医院实验中心完成。

材料: 取12例因骨关节炎行膝关节置换患者的软骨组织块(Mankin评分为0或1),均符合Altman等的骨关节炎诊断标准。纳入标准:年龄>60岁,女性患者。排除标准:肝肾疾病、结缔组织病、内分泌疾病、严重的心血管疾病及肿瘤患者。

另取12例因创伤性截肢膝关节患者的正常软骨组织块。取材获得患者的知情同意,实验符合《医疗机构管理条例》的相关要求。

主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
基质细胞衍生因子1、AMD3100、MAB310、单克隆鼠抗人II型胶原	美国 Sigma 公司
HRP 标记羊抗鼠二抗	KPL 公司
低温超高速离心机	美国 Heraeus 公司
酶标板自动读数仪	美国 BIO-RAD 公司

方法:

主要溶液的配制: 将配制好的DMEM液从4℃低温冰箱中取出,立即进行37℃水浴复温,待DMEM液复温后,取100 mL,加入10 μg的基质细胞衍生因子1,使基质细胞衍生因子1的质量浓度为100 μg/L。然后在此基础上配制3种培养液,培养液1中含有浓度为1 000 nmol/L的AMD3100;培养液2中含有浓度为1 000 nmol/L的MAB310;培养液3仅含有浓度为

1 000 nmol/L的基质细胞衍生因子1。

软骨组织获取及分组: 分别将低温保存的软骨组织分成骨关节炎软骨组及正常软骨组,每组又分为3个小组。软骨块置入12孔培养板中,每孔3块,加入培养液1作为实验组,加入培养液2为实验对照组,加入培养液3作为空白对照组,各组放入37℃CO₂培养箱进行培养,培养液以覆盖过软骨表面为准。于培养2 d及4 d后收集软骨组织做相关检测。

PCR引物设计与合成: 检索NCBI GeneBank 数据库,找到人II型胶原、蛋白聚糖的基因序列,设计并合成各基因引物。

各基因引物序列和所扩增的DNA片段长度:

	PCR 引物序列	DNA 片段
II型胶原 (HA133089)	上游 CCA GTT GGG AGT AAT GCA AGG A 下游 ACA CCA GGT TCA CCA GGT TCA	123 bp
蛋白聚糖 (HA107098)	上游 AGC AGT CAC ACC TGA GCA GCA 下游 GTT CAG GCC GAT CCA CTG GTA	89 bp

PT-PCR检测: 培养48, 96 h后,采用PT-PCR方法检测软骨组织内II型胶原、聚集蛋白聚糖mRNA表达量。

Western blot检测: 培养48, 96 h后,采用Western blot检测II型胶原蛋白表达水平。

统计学分析: 采用SPSS 17.0软件包对测定值进行方差分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 RT-PCR检测结果 各组软骨组织II型胶原,聚集蛋白聚糖mRNA表达量经方差分析表明:同一软骨组相同时间点实验组与实验对照组及空白对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$),同一软骨组不同时间点实验组之间比较差异无显著性意义($P > 0.05$),不同软骨组同一时间点同一小组之间比较差异有显著性意义($P < 0.05$),见表1, 2。

2.2 Western blot检测结果 在蛋白水平,各组不同时间段软骨组织内II型胶原水平,皆有不同程度变化,见图1。其灰度分析值采用方差分析进行统计学比较,结果示:同一软骨组相同时间点实验组与实验对照组及空白对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$),同一软骨组不同时间点实验组之间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。不同软骨组同一时间点同一小组之间比较

差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表3。

表1 各组II型胶原mRNA表达量比较
Table 1 Comparison of type II collagen mRNA expression levels of each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Group	Osteoarthritis cartilage group		Normal cartilage group	
	2 d	4 d	2 d	4 d
Experimental	3.80±0.05	3.67±0.10	4.53±0.10 ^b	4.59±0.12 ^c
Experimental control	2.99±0.09 ^a	2.83±0.14 ^a	3.75±0.09 ^{ab}	3.66±0.13 ^{ac}
Blank control	1.00±0.00 ^a	0.52±0.03 ^a	1.84±0.11 ^{ab}	0.78±0.06 ^{ac}

^a $P < 0.05$, vs. experimental group; ^b $P < 0.05$, vs. Osteoarthritis cartilage group after cultured for 2 h; ^c $P < 0.05$, vs. Osteoarthritis cartilage group after cultured for 4 h

表2 各组聚集蛋白聚糖mRNA表达量比较
Table 2 Comparison of aggrecan mRNA expression levels of each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Group	Osteoarthritis cartilage group		Normal cartilage group	
	2 d	4 d	2 d	4 d
Experimental	4.00±0.16	4.06±0.29	4.56±0.21 ^b	4.60±0.26 ^c
Experimental control	3.17±0.11 ^a	3.25±0.11 ^a	3.81±0.09 ^{ab}	3.84±0.15 ^{ac}
Blank control	1.00±0.00 ^a	0.50±0.05 ^a	1.99±0.08 ^{ab}	0.81±0.07 ^{ac}

^a $P < 0.05$, vs. experimental group; ^b $P < 0.05$, vs. osteoarthritis cartilage group after cultured for 2 h; ^c $P < 0.05$, vs. osteoarthritis cartilage group after cultured for 4 h

表3 各组II型胶原蛋白表达量比较
Table 3 Comparison of type II collagen expression levels of each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Group	Osteoarthritis cartilage group		Normal cartilage group	
	2 d	4 d	2 d	4 d
Experimental	0.68±0.08	0.65±0.07	0.90±0.08 ^b	0.86±0.10 ^c
Experimental control	0.47±0.06 ^a	0.24±0.07 ^a	0.65±0.09 ^{ab}	0.46±0.07 ^{ac}
Blank control	0.19±0.02 ^a	0.02±0.01 ^a	0.44±0.07 ^{ab}	0.22±0.07 ^{ac}

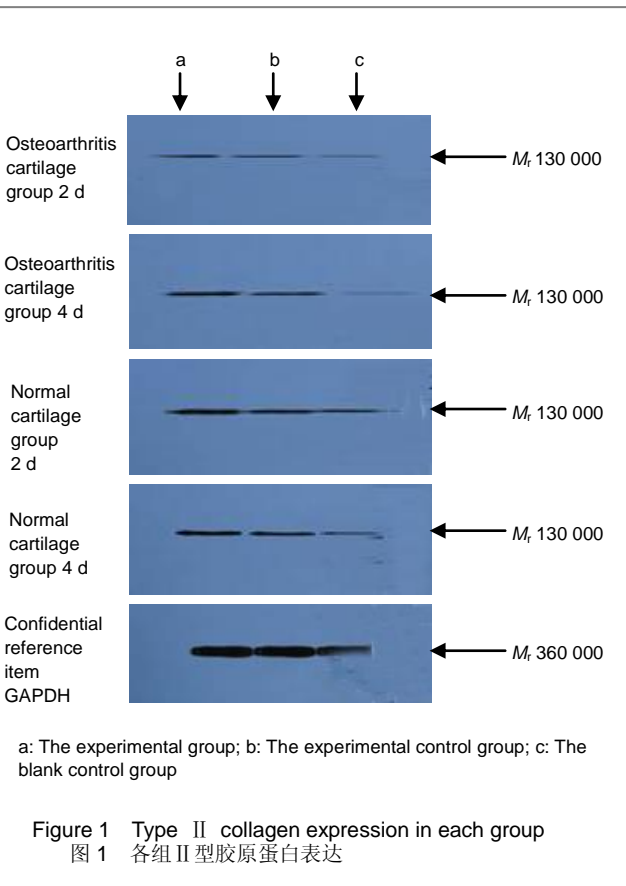
^a $P < 0.05$, vs. experimental group; ^b $P < 0.05$, vs. osteoarthritis cartilage group after cultured for 2 h; ^c $P < 0.05$, vs. osteoarthritis cartilage group after cultured for 4 h

3 讨论

基质细胞衍生因子1又称趋化因子, 是小分子的细胞因子, 属于趋化因子蛋白家族。经免疫组化检测表明骨关节炎患者的关节软骨表层及深层皆有CXC趋化因子受体4存在^[1]。基质细胞衍生因子1是CXC趋化因子受体4的惟一配体, CXC趋化因子受体4也是基质细胞衍生因子1的惟一生理受体^[2]。基质细胞衍生因子1与CXC趋化因子受体4信号通路激活后, 就能激活细胞外信号调节酶(Erk)及相关激酶(p38MAP kinase)的信号路, 从而诱导软骨细胞释放基质金属蛋白酶3, 9及13的释放, 这些因子皆能诱导关节软骨破坏^[3-4]。

目前认为骨关节炎的发生主要是细胞外基质的动态平衡破坏所致, 即降解超过合成^[5]。软骨的细胞外基质是由胶原等异源物质组成的复杂网状结构, 称为间隙结缔组织^[6-7], 在细胞与细胞之间起机械支持和连接作用, 也对细胞与细胞之间的信号传递起作用^[6-7]。细胞外基质的主要成分是胶原和聚集蛋白聚糖, 胶原主要是II型胶原, 约占胶原总量的90%, 胶原和聚集蛋白聚糖对维持关节软骨的弹性及硬度具有重要用, II型胶原属间质胶原, II型胶原构成纤维网架结构中的主体, 具有很强的抗张性^[8], 聚集蛋白聚糖使软骨具有抵抗压力和分散负荷的能力^[9]。骨关节炎疾病的主要特点是细胞外基质的降解超过其合成, 其中细胞外基质的重要成分聚集蛋白聚糖的丢失被认为是关节炎的主要早期表现, 聚集蛋白聚糖核心蛋白特定定位点断裂产生的片断可在骨关节炎患者的软骨及关节液中检测到^[10], 初期关节软骨表面的纤维样改变与软骨基质中小分子聚集蛋白聚糖的丢失相关^[11], 聚集蛋白聚糖的丢失导致胶原酶对II型胶原和聚集蛋白聚糖的剪切和降解增加^[12], 从而导致关节软骨退变。

通过本实验发现: 同一软骨组同一时间点实验组软骨中II型胶原和聚集蛋白聚糖mRNA的相对表达量和



II型胶原蛋白的含量均较对照组高;不同时间点相比,实验组软骨中II型胶原和聚集蛋白聚糖mRNA的相对表达量和II型胶原蛋白的含量无明显差异;骨关节炎软骨组同一小组同一时间点软骨中II型胶原和聚集蛋白聚糖mRNA的相对表达量和II型胶原蛋白的含量均低于正常软骨组。其原因可能为:实验对照组中MAB310是基质细胞衍生因子1的非特异性抗体,它通过抵抗基质细胞衍生因子1的趋化作用,从而治疗基质细胞衍生因子1/CXC趋化因子受体4信号通路介导的相关疾病^[13],而实验组中AMD3100为CXC趋化因子受体4特异性拮抗剂^[14],能与CXC趋化因子受体4的第二胞外环状区结合,与其疏水基团的残基结合,特异性阻断CXC趋化因子受体4与其配体基质细胞衍生因子1的结合,阻断基质细胞衍生因子1/CXC趋化因子受体4信号通路的作用,从而抑制细胞外信号调节酶(Erk)及相关激酶(p38MAP kinase)的信号通路,减少基质金属蛋白酶3, 9, 13的释放^[15],其中基质金属蛋白酶3是聚集蛋白聚糖的特异性降解酶,且激活的基质金属蛋白酶3还能使其其他基质金属蛋白酶激活,特别是基质金属蛋白酶9进一步引起II型胶原的降解,基质金属蛋白酶9在中性环境下有活性,具有降解变性I, II, III型胶原的特异能力,基质金属蛋白酶13是目前所知酶中最有效的II型胶原降解酶。由于基质金属蛋白酶3, 9, 13的减少,使II型胶原和聚集蛋白聚糖降解减少。

综上所述,本实验结果提示基质细胞衍生因子1/CXC趋化因子受体4信号通路在骨性关节炎中的起主要作用,若采用CXC趋化因子受体4的特异性拮抗剂AMD3100可阻断基质细胞衍生因子1/CXC趋化因子受体4信号通路,使软骨细胞II型胶原和聚集蛋白聚糖表达水平及分泌量降低,延缓关节软骨退变,也进一步说明基质细胞衍生因子1/CXC趋化因子受体4信号通路可成为阻止关节软骨退变的靶点,这将为骨关节炎的靶向治疗提供依据。

4 参考文献

[1] Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol Suppl.* 2000;60:6-8.
 [2] Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. Stimulation of matrix metalloproteinase 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. *Arthritis Rheum.* 2002;46(1):130-137.
 [3] D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, et al. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol.* 1997;27(7):1788-1793.

[4] Santiago B, Baleux F, Palao G, et al. CXCL12 is displayed by rheumatoid endothelial cells through its basic amino-terminal motif on heparan sulfate proteoglycans. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):R43.
 [5] Creamer P, Hochberg MC. Osteoarthritis. *Lancet.* 1997;350(9076): 503-508.
 [6] Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):422-433.
 [7] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-174.
 [8] Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(6):432-463.
 [9] Arner EC. Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol.* 2002;2(3):322-329.
 [10] Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, et al. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22201-22208.
 [11] Silver FH, Bradica G, Tria A. Relationship among biomechanical, biochemical, and cellular changes associated with osteoarthritis. *Crit Rev Biomed Eng.* 2001;29(4):373-391.
 [12] Zhou HR, Xiao ZL, Liu Y. Shandong Zhongyi Zazhi. 2007;26(4): 261-262.
 周海蓉,肖振良,刘英. 健骨胶囊对兔骨性关节炎病理形态学的影响[J]. *山东中医杂志*, 2007, 26(4): 261-262.
 [13] Tamamura H, Tsutsumi H, Masuno H, et al. Development of low molecular weight CXCR4 antagonists by exploratory structural tuning of cyclic tetra- and pentapeptide-scaffolds towards the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis. *Curr Med Chem.* 2007;14(1):93-102.
 [14] Hatse S, Princen K, Bridger G, et al. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.* 2002;527(1-3):255-262.
 [15] De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(7):581-587.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(30860286)。

作者贡献: 实验设计为第一、二作者, 实验实施为第一、三、四、五、六、七、八、九作者, 实验评估为第一作者, 资料收集为第二作者。第一作者成文, 第二作者审校, 第一作者对文章负责。全部作者采用盲法共同评估, 均受过正规培训。

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: 参与研究的患病个体及其家属同意将其诊疗经过信息用于科学研究, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”; 治疗方案获医院伦理委员会批准。

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。