

· 基础研究 ·

膝痹康含药血清对兔软骨细胞中 MMP-3 的影响

李英周¹, 惠初华²

(1. 浙江省上虞市中医院, 浙江 上虞 312300; 2. 江苏省苏州市中医院, 江苏 苏州 215003)

摘要 目的:探讨膝痹康对 IL-1 诱导的兔软骨细胞中 MMP-3 蛋白含量及 MMP-3mRNA 表达的影响。**方法:**把软骨细胞随机分为空白组(A 组); 模型组(B 组)及低、中、高剂量组(C、D、E 组)并加以培养、干预。用酶联接免疫吸附剂测定(ELISA)法检测细胞 MMP-3 蛋白含量,再用两步法 RT-PCR 法检测 MMP-3mRNA 的表达水平。**结果:**空白对照组正常关节软骨细胞 MMP-3 蛋白含量及 MMP-3mRNA 表达量低于模型对照组,低、中、高剂量组 MMP-3 蛋白含量及 MMP-3mRNA 表达量相对于模型组明显降低 ($P < 0.01$)。其中中剂量组 MMP-3mRNA 表达量最低 ($P < 0.01$)。**结论:**膝痹康含药血清可以抑制 MMP-3 的蛋白含量和 MMP-3mRNA 的表达水平,这可能是膝痹康中药延缓膝 OA 软骨退变,防止骨性关节炎的重要作用机制之一。

关键词 膝痹康 软骨细胞 基因表达 MMP-3 兔

The empirical study on the effect of blood serum contained with Xibikang intervening matrix metalloproteinase-3 of cartilage cell Li Ying-zhou*, HUI Reng-hua. * Traditional Chinese Medical Hospital of Shang yu City, Shangyu 312300, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: We study the mechanism of the protection of Xibikang Prescription to chondrocytes induced by IL-1. **Methods:** The number of chondrocytes gained from wet cartilage, viability, multiplication and morphologic changes were observed. Chondrocytes were divided into different groups, XBK was added to subculture cells and its influence on protein levels of matrix metalloproteinase-3 was examined by ELISA method, and the influence on matrix metalloproteinase-3 mRNA expression were examined by RT-PCR method. **Results:** The levels of matrix metalloproteinase-3 protein and matrix metalloproteinase-3 mRNA expression of the model control group was higher than that of the blank control group ($P < 0.01$). The levels of high, middle and low dosage of Xibikang Prescription groups was lower than that of the model control group ($P < 0.05$). and middle dosage of Xibikang Prescription groups was the most marked difference with the model control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Xibikang can effectively inhibit the levels of matrix metalloproteinase-3 protein and matrix metalloproteinase-3 mRNA expression. It plays a role in the mechanism of chondrocyte protection. It is effective to knee osteoarthritis patients.

Keywords Chondrocytes; Gene Expression; Drugs, Chinese Herbal

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见的危害老年人健康的慢性进行性疾病,其病理基础是关节软骨的退变,虽然目前 OA 的发病机制尚不清楚,但近年研究发现,OA 关节软骨细胞外基质合成与降解失衡是造成关节软骨变性的重要原因之一。而基质金属蛋白酶 (MMPs) 是具有降解几乎所有细胞外基质功能的一族酶,这些酶底物的不同可分为 3 组:胶原酶 (MMP-1, MMP-8 和 MMP-13)、明胶酶 (MMP-2 和 MMP-9) 和基质溶解素 (MMP-3 和 MMP-10)。其中 MMP-3 是细胞外基质降解的一个非常重要的酶,能降解包括层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、明胶和 III ~ V 型胶原^[1]。除了直接作用外, MMP-3 还可通过激活潜在的前胶原间接影响软骨的降解,其在 OA 中的作用越来越受到重视。膝痹康是目前应用于我院骨伤

科临床中常用的中药,在临床上已取得较好的疗效,并且在以往实验研究中,我们已从组织学、组织形态学、分子学等不同角度证实该方能够延缓骨关节炎的发病进程。本实验主要从细胞分子学和细胞基因学的方面进一步观察膝痹康对 IL-1 诱导的软骨细胞中 MMP-3 蛋白含量及 MMP-3mRNA 表达影响的研究,将有助于加深对其作用机制的认识。

1 材料和方法

1.1 实验动物与药物 4 周龄新西兰大白兔 4 只 (上海中医药大学实验动物中心提供),用于分离原代软骨细胞;成年新西兰大白兔 4 只 (由上海中医药大学实验动物中心提供),体重 2.5 kg,用于制备兔含药血清。膝痹康 (由川乌、制南星、地龙、丹参、刺五加、薏苡仁等药物组成) 上述药物由苏州市中医

医院中药室提供。

1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基(Gibco) 新生牛血清(杭州四季青公司)胰蛋白酶(Promega) II型胶原酶(Gibco) 青霉素(上海先锋药业公司) 链霉素(华北制药股份有限公司) PBS 平衡液 兔 MMP-3ELISA 检测试剂盒(American ADL 公司) RT-PCR 两步法试剂盒。

1.3 含药血清的制备 膝痹康由川乌、地龙、制南星、丹参、刺五加、薏苡仁等中药组成,水煎浓缩为含生药 $1\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液备用。取 4 只成年新西兰大白兔,雌雄各半,分药物组和空白组,按标准体重折算动物的等效剂量。药物组兔以 $4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重灌入上述中药液。每天早晚灌胃 2 次,空白组同样条件下,灌胃等量生理盐水。连续灌胃 3 d。两组兔分别于末次灌胃后 1 h 采血;无麻醉状态下,注射器心脏取血,放置 1 h 左右。3000 r 离心 30 min。分离得含药血清和空白血清, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min 水浴灭活,在超净工作台用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜器过滤除菌,分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

1.4 兔关节软骨细胞分离和培养 参考文献^[2-3] 获得传一代软骨细胞,用 DMEM 培养液(含体积分数为 10% 的血清)稀释成 $2 \times 10^8\text{ L}^{-1}$, 24 孔培养板中接种 2 板,每孔 1 mL。置二氧化碳培养箱中培养(体积分数为 0.05 CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 体积分数为 0.95 空气,饱和湿度)。

1.5 实验分组 实验采用 2 代软骨细胞,用 DMEM 培养液(含体积分数为 10% 的血清)稀释成 $2 \times 10^8\text{ L}^{-1}$,在 48 孔培养板中接种 30 孔,每孔 0.2 mL,接种两板。置 CO_2 培养箱中培养(体积分数为 0.05 CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 饱和湿度),培养 24 h 后细胞贴壁,再施加含药血清干预,培养孔随机分为 5 组,每组 6 孔,每孔加相应的培养液 0.2 mL。空白组(A 组)加含正常兔血清 20% DMEM 培养液;模型组(B 组)加含正常兔血清 20% DMEM 培养液(含 $\text{IL-1 } 10\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$);低剂量组(C 组)加含有 5% 药物的血清及 15% 正常兔血清的 DMEM 培养液(含 $\text{IL-1 } 10\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$);中剂量组(D 组)加含有 10% 药物的血清及 10% 正常兔血清的 DMEM 培养液(含 $\text{IL-1 } 10\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$);高剂量组(E 组)加含有 20% 药物的血清的 DMEM 培养液(含 $\text{IL-1 } 10\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.6 MMP-3 蛋白含量的检测 培养 72 h 后收集各

空上清液,根据 MMP-3 检测试剂盒上说明书方法通过多动能酶标仪检测各孔 OD 值,再根据制备的标准曲线计算样本中 MMP-3 的含量。

1.7 RT-PCR 测定 MMP-3mRNA 表达 采用 TRIZOL(Gibco 公司)法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。引物序列如下:

MMP-3 为 5'-GCCAAGAGATGCTGTTGATG-3' 和 5'-AGGTCTGTCAAGCGTTGTA-3' (363bp),内参照 Gapdh:5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3' 和 5'-ATGAGGTCCACCACCCTGTT-3' (444 bp)。取 100 ng 总 RNA,按两步法 RT-PCR 试剂盒说明进行操作,反应条件如下: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $93\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,进行 35 个循环,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。扩增产物各取 $8\text{ }\mu\text{L}$,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,天能 GIS 凝胶图像处理系统摄影(上海天能科技有限公司),相应 PCR 分析软件对 MMP-3mRNA 含量进行半定量分析。

1.8 统计学分析 应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,实验结果以均数 \pm 标准差表示,均数间差异采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞中 MMP-3 蛋白含量比较 如表 1 所示,空白对照组正常关节软骨细胞 MMP-3 蛋白含量低于模型对照组,低、中、高剂量含药血清组可降低 MMP-3 蛋白含量($P < 0.01$)。其中中剂量含药血清组可明显降低 MMP-3 蛋白含量($P < 0.01$)。

表 1 对软骨细胞中 MMP-3 蛋白含量影响的结果 $\bar{x} \pm s$

组别	n	MMP-3 含量($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
A 组	6	14.4 ± 1.9
B 组	6	$25.7 \pm 2.4^{1)}$
C 组	6	$17.1 \pm 1.2^{3)}$
D 组	6	$17.2 \pm 1.1^{3)}$
E 组	6	$20.4 \pm 1.4^{2)}$

注 1)B 组与 A 组比较, $P < 0.01$; 2)E 组与 B 组比较, $P < 0.05$; 3)C、D 组与 B 组比较, $P < 0.01$

2.2 软骨细胞 MMP-3mRNA 表达水平相对值的比较 如表 2 所示,空白对照组正常关节软骨细胞 MMP-3mRNA 表达量低于模型对照组,低、中、高组含药血清组 MMP-3mRNA 表达量明显降低($P < 0.01$)。其中中剂量组 MMP-3mRNA 表达量最低($P < 0.01$)。

表 2 对软骨细胞 MMP-3mRNA 表达影响的结果 $\bar{x} \pm s$

组别	n	相对强度
A 组	4	1.37 ± 0.04
B 组	4	1.54 ± 0.07 ¹⁾
C 组	4	1.40 ± 0.03 ²⁾
D 组	4	1.39 ± 0.04 ³⁾
E 组	4	1.43 ± 0.04 ²⁾

注 1) B 组与 A 组比较, $P < 0.01$; 2) C、E 组与 B 组比较, $P < 0.05$; 3) D 组与 B 组比较, $P < 0.01$

3 讨论

骨性关节炎是骨科临床上的多发病和常见病, 严重地影响人们的社会生活和工作, 由于其发病机制尚未明确, 故在治疗上还存在诸多需要解决的问题。在研究中发现软骨细胞在骨性关节炎的发病中有很重要的作用, 而软骨细胞体外培养的方法是从细胞水平来探索关节软骨生物学特性, 为研究关节软骨疾病的发病原理及其治疗方法(包括药物治疗)提供了有效而简便的方法。

早期人们认为骨关节炎是一种非炎症性的关节病变, 但是由直接的机械刺激或软骨基质降解产物引起的滑膜炎对疾病的发展还是起到很重要的作用的, 这种炎症状态可以由前炎症细胞因子介导出现的一系列反应而引发。IL-1 是其中最重要的一种, 与骨关节炎软骨基质降解的病理过程密切相关。Fell 等^[4]在 1977 年首次报道关于 IL-1 的生物效应时就是关于 IL-1 调控软骨细胞生物功能的作用。他们发现, IL-1 会刺激软骨细胞产生蛋白水解酶, 确认其具有介导软骨细胞参与软骨变性的作用。现在有很多证据^[5,6]表明前炎症细胞因子中 IL-1 在骨关节炎的病理过程中起到核心作用, 可介导基质金属蛋白酶、蛋白聚糖酶和其他分解基因的表达。由此可见, IL-1 在骨关节炎的发生发展过程中起到重要的作用: IL-1 作为前炎症细胞因子, 能刺激离体培育的软骨细胞产生 MMPs 等, 使其参与到骨关节炎发病的各个环节中去, 同时减少 IL-1 受体拮抗物 IL-1 RA 的合成, 使 IL-1 能持续刺激软骨细胞产生 MMPs 等, 形成一个相对封闭的环路, 持续反复的作用下导致骨关节炎的发生。虽然不能认为这就是骨关节炎的唯一发病机制, 但是 IL-1 和 MMPs 两者对关节软骨两大成分—软骨细胞和基质的影响之大是不能否认和抹杀的, 因此任何能在这一环路中的某一个环节造成中断影响的因素相信都能对骨关节炎的病理进展过程带来有治疗价值的影响。

-3 可降解 IX 型胶原, 这可能与骨关节炎早期胶原网络水肿有关, MMP-3 除了自身的作用直接降解蛋白多糖的核心外, 另一更重要的作用途径是激活 MMP-1, 加速胶原的病理性降解, 也使与透明质酸相连的可聚蛋白多糖由于网络的松解而丢失。OA 和老年性关节软骨的降解始于软骨表层的非自身免疫性降解, 表现为胶原总量减少, 进而导致张力降低, 并易于被金属蛋白酶降解, 这种变化除了发生在软骨表层、中层外, 随着病变进展, 深层亦呈现相似的变化。进一步导致软骨基质的损害及表面结构的不完整性, 形成骨关节炎病变。

在本实验中, 通过观察空白组、模型组以及含药血清组的相比较, 发现 IL-1 可刺激体外培养的软骨细胞产生过多的 MMP-3; 模型组中 MMP-3 的蛋白含量及 MMP-3mRNA 的表达水平明显高于空白组。而 5%、10%、20% 含药血清可显著降低 MMP-3 的蛋白含量及 MMP-3mRNA 的表达水平。综上所述, 膝痹康含药血清可以抑制 MMP-3 的蛋白含量和 MMP-3mRNA 的表达水平, 这可能是膝痹康中药延缓膝 OA 软骨退变, 防止骨性关节炎的重要作用机制之一。

4 参考文献

- [1] Cawston T, Billington C, Cleaver C, et al. The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 878: 120 - 129.
- [2] 宁旭, 尚显文, 尹培荣, 等. 胶原酶一次消化法培养兔软骨细胞[J]. 贵州医药, 2004, 28(6): 490.
- [3] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996.
- [4] Fell HB, Jubb RW. The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture[J]. Arthritis Rheum, 1977, 20: 1359 - 1371.
- [5] 元建洪, 赵庆华, 刘延菊, 等. 白介素-1 对人软骨细胞基质金属蛋白酶-13mRNA 表达的作用[J]. 2005, 3(9): 138 - 140.
- [6] Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers[J]. Rheumatol, 1999, 26(2): 251 - 258.
- [7] Goldring MB, Krane SM. Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells[J]. Biol Chem, 1997, 262: 16724 - 16729.

Keyszer G^[7]发现在实验性骨关节炎的早期, MMP