

白介素 1 受体拮抗剂及转化生长因子 β 1 对兔膝关节骨性关节炎(OA) 的治疗研究 *

樊志强 庞 炜[△] 杨连甲 文艳华 王海鹏 张小平 周 勇 范清宇

(第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038)

摘要 目的 通过关节腔内注射白介素 1 受体拮抗剂(IL-1Ra)及转化生长因子 β 1(TGF- β 1) ,观察其对骨性关节炎的治疗作用。方法 :16 只 3-4 个月龄新西兰大白兔(雌雄不限)随机分为四组 ,每组四只 ,分为正常组 ,对照组 ,IL-1Ra 组 ,TGF- β 1 组 ,正常组仅打开左膝关节腔 ,剩余三组均给予左膝关节前交叉韧带离断术(anterior cruciate ligament transection ACLT)。四周后 IL-1Ra 组给予关节腔内注射 IL-1 Ra 5g/ml ,TGF- β 1 组给予关节腔内注射 TGF- β 1 50mg/ml ,每周两次 ,连续四周 ,正常组及对照组未采取任何措施。术后八周时采用空气栓塞法处死全部实验动物 ,取股骨远端长约 1cm ,固定后切片行细胞形态学观察。结果 :大体肉眼观察 :对照组股骨远端软骨面颜色变暗并稍显粗糙 ,可见少量软骨脱落 ,其余两组关节软骨大体形态均接近正常。镜下观察 :TGF- β 1 组软骨细胞增生明显 ,软骨细胞排列较正常软骨细胞排列轻度紊乱。IL-1Ra 组软骨细胞增生数量未及 TGF- β 1 组明显 ,软骨细胞排列也不及 TGF- β 1 组规则。IL-1Ra 组及 TGF- β 1 组软骨细胞形态接近正常软骨细胞 ,基质染色接近正常。两组软骨膜表面光滑 ,无纤维细胞形成 ,软骨膜下未见纤维化。对照组软骨细胞数量明显减少且排列紊乱 ,软骨细胞形态发生改变 ,可见软骨细胞凋亡 ,镜下可见软骨细胞核浓缩、裂解 ,并可见新生软骨形成 ,突出于正常软骨膜表面 ,软骨膜表面下方可见血管翳及纤维母细胞形成 ,出现轻度纤维化。基质染色不均匀且染色较淡。结论 :IL-1Ra 及 TGF- β 1 关节腔内注射均能有效抑制骨性关节炎关节软骨的退变并增加软骨细胞再生 ,促进软骨基质合成 ,延缓骨性关节炎的发病进程。

关键词 :骨性关节炎 ;白介素受体拮抗剂 ;转化生长因子 ;关节软骨

中图分类号 :R684.3 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)13-2447-04

Interleukin-1 Receptor Antagonist and Transforming Growth Factor- β 1 for Rabbits with Osteoarthritis*

FAN Zhi-qiang ,PANG Wei[△] ,YANG Lian-jia ,WEN Yan-hua ,WANG Hai-peng ,ZHANG Xiao-ping ,ZHOU Yong ,FAN Qing-yu
(The Fourth Military Medical University ,Shanxi,Xi'an 710038 ,China)

ABSTRACT Objective: To observation the treatment of rabbit osteoarthritis by vivo interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). **Methods:** A total of 16 three to four- month -old New Zealand white rabbits were divided randomly into four experimental groups. Group one (normal group) received only opened the left articular cavity. Those in another three groups(IL-1Ra group,TGF- β 1 group and control group) received anterior cruciate ligament transection (ACLT). Four weeks later, IL-1Ra group,TGF- β 1 group were given vivo interleukin-1 receptor antagonist and transforming growth factor- β 1 twice one week and another groups did nothing. All animals were sacrificed eight weeks later after surgery. The samples were stained for tissue slice. **Results:** In general visual study IL-1Ra group, TGF- β 1 group and control group the articular cartilage close to normal. Control group cartilage is stramineous and can find amotic. Observation by microscope: in IL-1Ra group, TGF- β 1 group and control group cartilage cell proliferation obviously and arrange orderly, the control group cartilage cell decreased and chaos and can find fibroplasia. **Conclusion:** By vivo interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) can effectively inhibit degeneration of articular cartilage cell increase articular cartilage cell regeneration avilably. This will release clinical symptoms so to delay the process of osteoarthritis.

Key words: Osteoarthritis; IL-1Ra; TGF; Articular cartilage

Chinese Library Classification(CLC): R684.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)13-2447-04

骨性关节炎(osteoarthritis ,OA)是指主要以关节软骨受损 ,软骨下骨和关节边缘骨赘形成相关的一组特异性疾病 ,最常累及的病变部位为髌、膝等关节。骨关节炎的主要病理表现是关节软骨、骨质的退行性变及伴随的骨质增生。在骨关节炎的早期 ,大体观察可见关节软骨明显增厚 ,表面轻微粗糙 ,软骨颜色

变暗而且失去正常软骨光泽。关于骨关节炎的确切发病原因至今仍未最终明确 ,目前主要认为其发病与年龄增加、机械磨损、免疫反应、细胞因子、关节力线改变等多种因素有关 ,而其中年龄的增加被认为是骨关节炎最主要的发病因素^[1,2]。目前对于骨性关节炎临床治疗早期主要以缓解患者疼痛、改善患者生活质量

* 基金项目 :军队医药卫生科技项目(LXH-2006010)

作者简介 樊志强

[△]通讯作者 庞炜 ,主任医师 ,硕士生导师 ,研究方向 :创伤骨科 ,退行性骨病。Email :Pangwei88@yahoo.com.cn

(收稿日期 :2011-03-21 接受日期:2011-04-16)

及延缓病情进展为主。而对于晚期的骨性关节炎,外科矫形特别是人工关节置换是唯一的有效手段。目前人工关节置换主要以髌、膝关节为主,且因为其费用昂贵、使用寿命有限等因素,其使用仍受到一定程度的限制,尤其是对于年轻患者面临后期的多次人工关节翻修。目前对于骨性关节炎的临床治疗,特别是早期治疗缺少有效的手段。随着分子生物学等相关基础学科的研究进展,细胞因子对于骨性关节炎的治疗逐渐成为研究热门。其中主要以 TGF- β 1、IL-1Ra 等为研究热点。TGF- β 1 是一类具有多种功能的细胞因子,可以通过多种途径促进软骨细胞增生,促进软骨基质合成^[3]。IL-1Ra 作为 IL-1 的特异性抑制剂,可以与 IL-1 特异性结合,阻断其生物活性的表达,有效减少 IL-1 介导的炎症反应,从而减缓骨性关节炎发病过程中软骨的退变^[4]。本实验通过兔膝关节前交叉韧带离断术,构建骨性关节炎动物模型,模拟骨性关节炎的早期病变过程。给予病变关节腔内注射 TGF- β 1、IL-1Ra,从减少软骨退变和软骨基质分解,增加软骨细胞增生和基质合成层面进行研究,为细胞因子对于骨性关节炎的临床治疗进行探讨。

1 材料与方法

1.1 动物模型构建及分组

取 3-4 个月龄新西兰大白兔 1 只(雌雄不限),术前称重。兽用速眠新 号(军事医学科学院)1ml/kg 肌肉注射麻醉成功后,兔仰卧位固定于解剖台,使用脱毛剂除去左侧后肢皮毛,75%酒精常规消毒后肢皮肤。无菌条件下,取膝关节前内侧切口长约 2cm,逐层切开皮肤、皮下组织,沿髌韧带内侧进入,打开关节囊,寻找并暴露前交叉韧带。正常组动物仅打开左侧膝关节腔,不骚扰关节内部。其余三组均在直视下使用眼科剪离断前交叉韧带。逐层缝合至皮肤。术后不固定手术侧肢体,置于标准动物笼中分笼饲养,自由活动及进食,不采取强迫活动。青霉素 4 万 μ (每日一次,连续 5 天)肌肉注射预防感染。所有实验动物术后均未出现切口感染。术后观察实验动物状态良好,进食正常,双后肢未出现力量明显差异表现,无关节明显肿胀及梭形的关节腔积液表现。

1.2 IL-1Ra、TGF- β 1 试剂的稀释

将 IL-1Ra 及 TGF- β 1 粉剂贮存管放入低温高速离心机 2000 rpm 离心 5 分钟后,使用其配套稀释液稀释溶解稀释。之后以 0.01mol 磷酸盐缓冲液(PBS)稀释为含 IL-1Ra 5mg/L, TGF- β 1 50mg/L 的工作液。加入 0.1%牛血清白蛋白液防止细胞因子降解。使用移液管将工作液 1ml 分装于冻存管,置于 -20℃ 冰箱保存。使用时取出室温下放置 30min 后给予实验动物关节腔内注射。动物模型构建四周后给予 IL-1 组、TGF- β 1 组关节腔内分别注射 IL-1Ra 及 TGF- β 1 工作液(每次 1ml,每周 2 次)。

1.3 标本采集及处理

关节腔内注射 IL-1Ra、TGF- β 1 四周后,空气栓塞法处死所有实验动物。全长切开左下肢皮肤,离断膝关节与髌关节,剥离附着于膝关节周围的肌肉及韧带后留取全长股骨,咬骨钳取股骨远端长约 1cm 作为标本,取材过程中注意避免伤及关节软骨面。取材后的标本按实验分组立即置于 4%多聚甲醛-0.1molPBS 固定液中固定,固定 1 周后常规脱水、石蜡包埋。连续切片,片厚 8 μ m。

1.4 统计学方法

SPSS12.0 统计软件对数据做统计分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 t 检验,检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 肉眼大体观察

大体观察可见 IL-1Ra 组、TGF- β 1 组关节软骨颜色接近正常,大体标本观察可见关节软骨颜色稍变暗,表面无软骨脱落及缺损。对照组关节软骨呈现轻微灰白色,并可见少量散在点状软骨缺损。所有标本均未见骨质增生及骨赘形成,各组之间膝关节周围滑膜未见异常。

2.2 显微镜下观察

将标本蜡块包埋、切片,行苏木精-伊红染色及甲苯胺蓝染色,按照 wakitani 法评分标准的组织学结果评分表进行评分。设 4 项观察指标:细胞形态学、基质染色(异染性)、表面规则性、与周围软骨整合度。

2.2.1 HE 染色组织切片观察

正常组(图 A1)关节软骨细胞结构清晰,软骨细胞排列正常,软骨膜表面光滑。TGF- β 1 组(图 B1)软骨细胞增生明显,软骨细胞排列较正常但较正常软骨细胞排列紊乱。IL-1Ra 组(图 C1)软骨细胞增生数量未及 TGF- β 1 组明显,软骨细胞排列也能较 TGF- β 1 组紊乱。IL-1Ra 组及 TGF- β 1 组软骨细胞形态接近正常软骨细胞,镜下观察两组均未见软骨细胞死亡迹象,基质染色接近正常。软骨膜表面光滑,无血管翳及纤维母细胞形成。对照组(图 D1)接近骨性关节炎早期典型病理改变,软骨细胞数量明显减少且排列紊乱,软骨细胞形态发生改变,可见软骨细胞凋亡,镜下可见软骨细胞核浓缩、裂解。软骨膜表面粗糙,可见软骨膜脱落,裂隙形成,导致关节软骨缺损,并可见新生软骨膜形成,突出于正常软骨膜表面,软骨膜表面下方纤维增生,纤维母细胞形成,轻度纤维化。图 1。

2.2.2 甲苯胺蓝染色组织切片观察

正常组(图 a1)关节软骨甲苯胺蓝染色基质均一,呈现均匀蓝紫色,软骨细胞呈蓝黑色。TGF- β 1、IL-1Ra 组(图 b1)及 IL-1Ra 组(图 c1)组软骨甲苯胺蓝染色着色接近正常关节软骨,可见少量散在染色不均匀区域。对照组(图 d1)基质染色不均,可见染色缺失区域,且着色较淡。图 2。

2.3 统计学分析

按照 Wakitani 法^[5]评分标准的组织学结果评分表进行评分。设 4 项观察指标:细胞形态学、基质染色(异染性)、软骨表面规则性、与周围软骨整合度。SPSS12.0 统计软件对数据做统计分析。结果显示实验组的在细胞形态学、基质染色、软骨表面的规则性及于周围软骨的整合度方面均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(表 1)

3 讨论

目前构建动物 OA 的模型方法众多,手术干预因为效果明显、构建成功所需周期较短且构建成功率高等原因被广泛采用。前交叉韧带对维持膝关节的前方稳定起到至关重要的作用。前交叉韧带的主要的力学作用体现在限制胫骨过度前移及过度旋转,限制膝关节过伸和膝关节伸直位时的侧向活动。生物力学研究表明^[6]在前交叉韧带断裂后,膝关节的关节软骨压

表 1 各组动物术后 8 周的软组织学评分(n=12 $\bar{x} \pm s$)
Table 1 The score of histological evaluation of animals at 8 weeks after opeartion (n=12 $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	细胞形态学 Cell morphology	基质异染性 Mitrix staining	表面规则性 Suface regulation	软骨整合度 Intergration of cartilage
TGF-β 1 组 TGF-β 1Group	0.81± 0.32	1.21± 0.47	0.75± 0.34	0.35± 0.51
IL-1Ra 组 IL-1Ra Group	0.95± 0.54	1.35± 0.50	0.97± 0.51	0.47± 0.50
对照组 Control Group	3.35± 0.78	4.36± 0.64	1.36± 0.64	0.78± 0.62

注 :TGF-β1 组和 IL-1Ra 组分别与实验组比较 P 值<0.05
Note :TGF-β1group and IL-1Ra group are respectively compared with control group.P<0.05

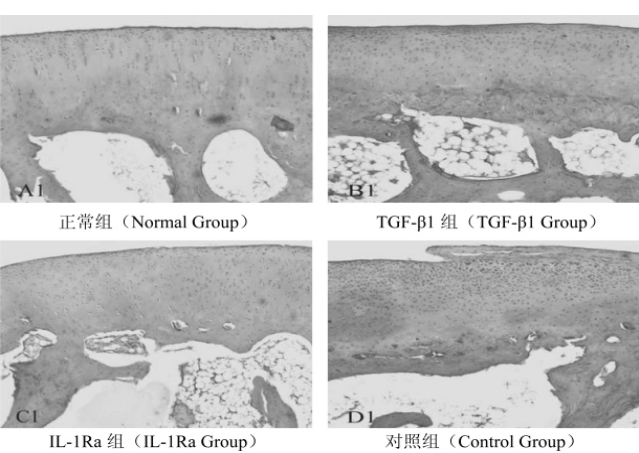


图 1 两组组织切片甲苯胺蓝染色显微镜观察×100
Figure 1 The tissue slices under light microscope in each group(Toluidine blue staining)× 100

力传导紊乱 ,关节软骨面的剪切应力发生局部改变 ,而应力的改变最终将导致关节软骨退行性改变如关节软骨面的磨损变薄 ,软骨细胞数目的减少 ,软骨细胞排列顺序紊乱及基质降解等表现。Stoop 等^[7]切断 Wistar 大鼠的膝关节前交叉韧带 ,分别在术后第 2、3 天以及术后 2 周、4 周时等不同的时间点处死实验动物 ,Wistar 大鼠的膝关节软骨取材进行大体及细胞学、免疫组化等研究发现 ,在前交叉韧带切断术后 ,关节软骨的最早退变发生在软骨细胞的表浅层 ,同时伴有软骨基质轻度异常改变。术后 2 周时 ,在软骨细胞的浅表层出现了软骨细胞数量减少 ,并且伴有软骨细胞肿胀 ,软骨细胞表层下出现纤维细胞 ,轻度纤维化出现。术后 4 周时 ,关节软骨的退行性改变更深一步的家中。免疫组化研究显示 ,在关节软骨出现纤维化的区域 ,型胶原纤维的变性降解产物染色明显加深 ,胶原酶分裂产物染色与变性 型胶原纤维分布大致相同。

Marijnissen 等^[8]通过比较几组 OA 动物模型的构建方法后得出 ,Hulth 模型组软骨破坏较严重 ,类似 OA 中晚期 ,此种模型更加适合如关节软骨修补、关节置换手术等外科手术治疗 OA 方面实验研究。化学药物注射模型所引起的软骨基质分解代谢强烈 ,其病程及组织病理学变化与关节不稳定所导致骨关节炎差异较大 ,与临床 OA 的病理表现相差甚远。ACLT 模型组软骨破坏相对较轻 ,类似 OA 早中期 ,ACLT 模型能全面反映 OA 软骨早期退行性变化的病理过程 ,适合骨性关节炎发病

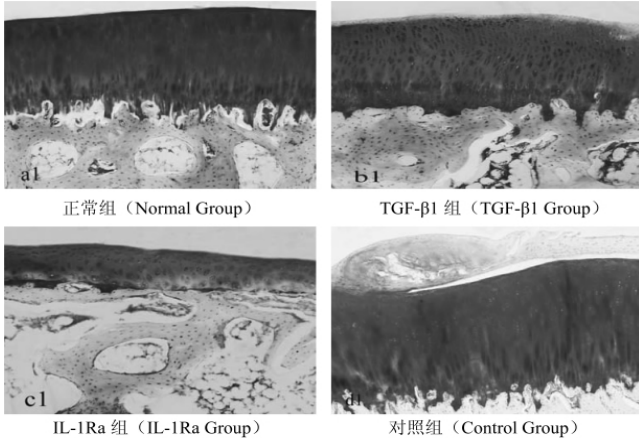


图 2 两组组织切片苏木精 - 伊红染色显微镜观察×100
Figure 2 The tissue slices under light microscope in each group(HE staining)× 100

机制、药物治疗方面试验研究。

ACLT 法构建 OA 动物模型的优点是手术简单 ,在操作准确的前提下对膝关节软骨基本无创伤。同时前交叉韧带切除诱发的软骨病变表现为早中期改变 ,能较好地模拟人类骨性关节炎早期病理变化 ,这一模型广泛用于 OA 早期病变时软骨代谢障碍和组成成分紊乱的研究 ,同时为抗骨性关节炎的药物筛选提供评价。

随着分子生物学等相关基础学科的进展 ,对于 IL-1 和 TGF-β 的信号传导途径、生物学作用等相关方面进行了深入的研究 ,对于其在 OA 发病过程中作用机制有了新的认识 and 了解 ,成为治疗 OA 的研究热门之一。很多研究提示 IL-1 是引起 OA 的重要炎症介质^[9,10]。IL-1 在体内可以通过一氧化氮合酶促进 NO 的合成 ,而 NO 可以抑制蛋白聚糖和 型胶原纤维及 IL-1 的特异性抑制剂 IL-Ra 的合成 ,同时 NO 还可以减弱软骨细胞抵御损伤的能力 ,抵抗 TGF-β 等促软骨细胞增生因子的活性^[11]。IL-1 还可以促进 MMPs 的合成与释放 ,MMPs 是一种蛋白水解酶 ,包括有胶原酶、基质溶解素和明胶酶。胶原酶的主要作用是降解胶原纤维。基质溶解素可以降解蛋白多糖 ,明胶酶可以降解纤维结合素^[12]。在人工全膝关节置换术中收集的关节软骨中 NO、MMPs、PGE2 等的表达显著高于正常软骨。动物实验也证明 ,在 OA 动物病变部位给予 IL-Ra 能够有效延缓关节软骨结构改变 ,抑制软骨细胞的退变和凋亡 ,降低软骨基质的

降解,减少骨赘的形成,并能缓解 OA 引起的跛行等症状^[13]。TGF- β 1 在软骨发生和调节关节软骨方面起着重要作用,能够促进多潜能间充质干细胞分化成为前软骨细胞,前软骨细胞进一步分化成为软骨细胞。研究发现,在人的前软骨细胞分化前阶段,浓缩状态的间充质干细胞表达 TGF- β mRNA,而在软骨细胞的终末期,肥大的软骨细胞则没有表达^[14]。TGF- β 在软骨发育的早期,对于细胞与细胞以及细胞与基质间的平衡起着维持作用。TGF- β 在软骨的增殖中也起着重要的调节作用,其可以促进软骨细胞 DNA 的合成和软骨细胞数量的增加^[15]。此外,TGF- β 还起着维持软骨基质的正常状态的作用^[16]。软骨基质是维持关节软骨正常功能的重要部分,主要有胶原纤维和蛋白多糖组成。胶原纤维以网状结构排列并固定蛋白多糖,而软骨细胞包埋在上述结构中。TGF- β 能在转录水平上激活、胶原的表达^[17]。同时,TGF- β 还可以抑制 MMPs 等炎症分子^[18]。基于以上研究,本实验选用 IL-1Ra 和 TGF- β 1,观察其对 OA 的治疗作用。

但是也有研究发现,构建动物 OA 模型后,应用转染 TGF- β 1 基因的腺病毒注入病变膝关节腔,虽然增加了软骨细胞的增殖能力以及软骨基质的合成代谢,但却也发现了潜在的缺陷,在正常组中观察到关节软骨的局部纤维化和软骨的过增生现象,推测可能与软骨细胞中 TGF- β 1 基因的过表达有关^[19]。另有研究显示,TGF- β 1 基因过度表达会引起关节滑膜增生肥大和骨刺形成^[20]。

综上所述,IL-1 和 TGF- β 1 在关节软骨的生长发育以及正常生物学状态的维持中发挥着非常重要的作用,但是由于它们的调节作用的复杂性以及对软骨影响的两面性,都增加了对其进一步认识的困难程度。目前细胞因子治疗 OA 仅局限于动物实验和体外细胞水平,离人体临床实验阶段还有很大的距离,细胞因子治疗的安全剂量、使用的时间节点等问题还需要进一步的深入研究探索,细胞因子应用于临床治疗 OA 还需要大量的研究来奠定基础。然而,细胞因子治疗 OA 的前景广阔,随着生命科学的发展,有望在不久的将来为临床治疗 OA 提供一条全新的途径。

本实验采用 ACLT 法成功构建了兔膝关节 OA 模型,而且在构建成功的动物模型观察发现其 OA 病变处于早期阶段,更适用于对 OA 药物治疗方面的研究,为进一步的 IL-1Ra 和 TGF- β 1 关节腔内注射治疗 OA 奠定了坚实的基础。然后,通过对实验标本的进一步细胞学观察得出,IL-1Ra 和 TGF- β 1 能够有效抑制 OA 发病过程中关节软骨细胞的退变及软骨基质的降解,增加软骨细胞的增殖能力,维持软骨细胞的正常生物学形态,对于维持关节软骨的正常功能起非常重要的作用,为 IL-1Ra 和 TGF- β 1 用于临床治疗 OA 提供了进一步的依据。

但是由于 OA 发病机制以及细胞因子对于软骨细胞及软骨基质作用的复杂性,要进一步明确 IL-1Ra 和 TGF- β 1 对于 OA 的治疗还需要我们做更进一步的工作,比如增大样本量、延长观察时间以及细胞因子之间的相互作用等。其次,由于实验动物本身的局限性,对于 IL-1Ra 和 TGF- β 1 对 OA 引起的疼痛等临床症状的治疗还有待进一步认识。

参考文献(References)

[1] Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2009, 11(3):227-236

[2] Robertson CM, Pennock AT, et al. Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14:471-476

[3] 杨渊. TGF- β 的结构、受体及信号转导[J]. 国外医学分子生物学分册, 1998, 20(6):256-259

YANG Yuan. The structure, receptor and signal transduction of TGF- β [J]. Foreign Medical Sciences (Section Molecular Biology), 1998, 20(6):256-259

[4] Frisbie DD, Ghivizani SC, Martel-Pelletier J, et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene [J]. Gene Ther, 2002, 9(1):12-20

[5] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage [J]. J Bone Joint Surg (Am). 1994, 6(4):579-592

[6] Silva FS Jr, Yoshinari NH, Castro RR, et al. Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model [J]. Clin Rheumatol. 2009 Feb, (2):109-117

[7] Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, et al. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection [J]. Arthritis Rheum. 2000, 43(9):2121-2131

[8] Marijnissen AC, van Roermund PM, TeKoppele JM, et al. The canine 'groove' model, compared with the ACLT model of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage. 2002, 10(2):145-155

[9] Beauchemin V, Villeneuve L, Rodriguez-Cimadevilla JC, et al. Interleukin-1 production by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: regulation by endogenous interleukin-1 and biological implications [J]. J Cell Physiol, 1991, 148(3):353-361

[10] Blom AB, van der Kraan PM, van den Berg WB. Cytokine targeting in osteoarthritis [J]. Curr Drug Targets, 2007, 8(2):283-292

[11] Da Kalaci A, Yilmaz HR, Aslan B, et al. Effects of hyaluronan on nitric oxide levels and superoxide dismutase activities in synovial fluid in knee osteoarthritis. Clin Rheumatol. 2007, 26(8):1306-1311

[12] Fujita Y, Hara Y, Ochi H, et al. Proinflammatory cytokine activities, matrix metalloproteinase-3 activity, and sulfated glycosaminoglycan content in synovial fluid of dogs with naturally acquired cranial cruciate ligament rupture [J]. Vet Surg, 2006, 35(4):369-375

[13] 马丽, 郭万首, 潘林, 吴东海. 白细胞介素-1 受体拮抗蛋白间接体内转基因对骨性关节炎软骨细胞凋亡的抑制作用 [J]. 中华风湿病学杂志, 2004, 8(5):284-287

MA Li, GUO Wang-shou, PAN Lin, WU Dong-hai. Suppression of chondrocyte apoptosis in the osteoarthritis by interleukin-1Ra ex vivo gene therapy. Chin J Rheumatol, 2004, 18(5):284-287

[14] Han Y, Wei Y, Wang S, Song Y. Cartilage regeneration using adipose-derived stem cells and the controlled-released hybrid microspheres. Joint Bone Spine. 2010, 77(1):27-31

[15] Mueller MB, Fischer M, Zellner J, et al. Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. Cells Tissues Organs. 2010, 192(3):158-166

[16] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily [J]. Science, 2002, 296(5573):1646-1647

(下转第 2408 页)

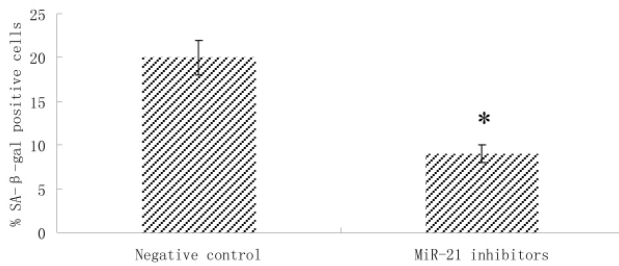


图 6 MiR-21 抑制剂转染对 ADMA 诱导的 HUVEC 衰老的影响

Fig. 6 Effects of transferring miR-21 inhibitors on ADMA-induced senescence of HUVECs

* $P < 0.01$ 与阴性对照组比较

* $P < 0.01$ compared with negative control group

生物学标志物之一。ADMA 是一氧化氮合酶最主要的内源性抑制剂^[6], 研究表明它可加速内皮细胞衰老^[7]。我们目前的研究亦表明 ADMA 可增加 SA-β-Gal 染色阳性内皮细胞数目, 即促进了内皮细胞衰老。因此 ADMA 可能通过促进内皮细胞衰老导致内皮功能失调。

目前 ROS 介导血管内皮细胞衰老已成为较为公认的学说^[8], 而 ADMA 可增加内皮细胞内 ROS 水平, 因此 ADMA 可能通过增加 ROS 水平促进了血管内皮细胞衰老。SOD2 是抵御氧化应激损害的关键酶, 它能促进超氧阴离子代谢, 抑制氧化应激, 减少细胞内 ROS 水平。我们目前的实验发现 ADMA 可显著抑制 HUVEC 中 SOD2 表达, 推测进一步增加了 ROS 水平。然而 ADMA 如何增加 ROS 水平的具体机制仍未完全阐明。

MiR-21 是一类非编码的单链微小 RNA, 已成为肿瘤研究领域的热点^[9, 10]。近来研究表明 miR-21 与心脏多种病理生理过程有关, 参与了心肌肥大增殖、氧化应激、缺血预适应等过程的调控^[11, 12]。最近 Menghini R 等研究发现 miR-21 与内皮细胞衰老关系密切, 衰老的 HUVEC 中 miR-21 表达明显升高^[3]。我们目前的实验结果亦显示 ADMA 在促进 HUVEC 衰老的同时升高了 miR-21 水平, 推测 ADMA 可能通过增加 miR-21 表达而促进血管内皮细胞衰老。我们进一步研究发现, 应用抑制剂沉默 HUVEC 中 miR-21 表达可显著抑制内皮细胞衰老, 首次证实 miR-21 介导了 ADMA 诱导的内皮细胞衰老。为进一步探讨 miR-21 介导 ADMA 诱导的内皮细胞衰老的机制, 我们检测了内皮细胞中 SOD2 的表达, 结果发现 miR-21 抑制剂转染逆转了 ADMA 诱导的 SOD2 表达减少, 而 SOD2 表达增加可导致细胞内 ROS 水平下降, 进一步抑制内皮细胞衰老。因此 ADMA 可能通过增加 miR-21 水平, 进一步抑制 SOD2 表达而诱导内皮细胞衰老。

综上所述, 我们目前的实验表明 ADMA 诱导了 HUVEC 中 miR-21 的表达及内皮细胞衰老, 并首次发现 miR-21 介导了 ADMA 诱导的内皮细胞衰老作用, 其机制可能与其抑制 SOD2 表达有关。

参考文献(References)

- [1] Liao Q, Li X, Zhou S, et al. Estrogen Treatment Inhibits Vascular Endothelial Senescence and Asymmetrical Dimethylarginine(ADMA) in Ovariectomized Rabbits [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 57(2): 174-182
- [2] Fleissner F, Jazbutyte V, Fiedler J, et al. Asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism [J]. Circ Res, 2010, 107(1): 138-143
- [3] Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1 [J]. Circulation, 2009, 120(15): 1524-1532
- [4] Dimri G P, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9363-9367
- [5] Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis [J]. Circ Res, 2007, 100(1): 15-26
- [6] De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule [J]. Med Sci Monit, 2009, 15(4): RA91-101
- [7] Bode-Boger S M, Scalera F, Martens-Lobenhoffer J. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence [J]. Vasc Med, 2005, 10 Suppl 1S65-S71
- [8] Kurz D J, Decary S, Hong Y, et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 11): 2417-2426
- [9] Selcuklu S D, Donoghue M T, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 4): 918-925
- [10] Walter B A, Gomez-Macias G, Valera V A, et al. miR-21 Expression in Pregnancy-Associated Breast Cancer: A Possible Marker of Poor Prognosis [J]. J Cancer, 2011, 2: 67-75
- [11] Cheng Y, Liu X, Zhang S, et al. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4 [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(1): 5-14
- [12] Cheng Y, Zhu P, Yang J, et al. Ischaemic preconditioning regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4 [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(3): 431-439

(上接第 2450 页)

- [17] Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, et al. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection [J]. Arthritis Rheum. 2000, 43(9): 2121-131
- [18] Tsai SH, Sheu MT, Liang YC, et al. TGF-beta inhibits IL-1beta-activated PAR-2 expression through multiple pathways in human primary

synovial cells. J Biomed Sci. 2009;23;16:97

- [19] Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2007, 15(6):597-604
- [20] Yang X, Chen L, Xu X, et al. TGF-beta/Smad-3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage [J]. J Cell Biol, 2001, 153(1):35-46