

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.16.002

文章编号: 1005-8982(2016)16-0006-06

论著

S100A11-RAGE 通过 P38MAPK 信号转导通路调控小鼠骨关节炎软骨细胞肥大和细胞外基质代谢

赵晓, 黄飞麒, 姚乃婕, 陈扬声

(广东药科大学附属第一医院 正骨科, 广东 广州 510080)

摘要:目的 探讨 S100A11-RAGE 通过 P38MAPK 信号转导通路对小鼠骨关节炎软骨细胞肥大和细胞外基质代谢的调控。**方法** 不同浓度的外源性 S100A11(0、1.25、2.50、5.00 及 10.00 $\mu\text{g/ml}$)与小鼠软骨细胞孵育 48 h,检测基质金属蛋白酶 13(MMP-13)、ADAMTS-5 以及 II 型、X 型胶原蛋白表达,以筛选作用最显著的 S100A11 浓度。加入不同浓度 Anti-P38(0、1.25、2.50、5.00 及 10.00 $\mu\text{g/ml}$)与小鼠软骨细胞预孵育 12 h 后,再加入作用最强的外源性 S100A11 孵育(10 $\mu\text{g/ml}$)48 h,检测 MMP-13、ADAMTS-5 以及 II 型、X 型胶原蛋白表达。**结果** 小鼠软骨细胞 MMP-13、ADAMTS-5 以及 X 型胶原蛋白表达随外源性 S100A11 浓度的增加而增加,且明显高于对照组;而 II 型胶原蛋白表达随外源性 S100A11 浓度的增加而减少,且明显低于对照组。加入 Anti-P38 预处理后,MMP-13、ADAMTS-5 以及 X 型胶原蛋白表达均明显低于 S100A11 单独处理组,而 II 型胶原蛋白表达明显高于 S100A11 单独处理组。**结论** 外源性 S100A11 通过与 RAGE 结合,并经 P38MAPK 信号转导通路诱导软骨细胞肥大和细胞外基质的降解,其机制可能与通过 P38MAPK 信号转导通路诱导 MMP-13、ADAMTS-5 以及 X 型胶原蛋白表达,并降低 II 型胶原蛋白表达。

关键词: S100A11-RAGE;P38MAPK 信号转导通路;软骨细胞肥大;细胞外基质代谢

中图分类号: R684

文献标识码: A

Regulation of *S100A11-RAGE* on hypertrophy and extracellular matrix metabolism of chondrocytes by *p38MAPK* signal pathway in mice

Xiao Zhao, Fei-qi Huang, Nai-jie Yao, Yang-sheng Chen

(Department of Bone Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To investigate the regulation of *S100A11-RAGE* on the hypertrophy and extracellular matrix metabolism of chondrocytes by *P38MAPK* signal pathway in mice. **Methods** Different concentrations of exogenous *S100A11* and cartilage cells were incubated for 48 h. Expressions of *MMP-13*, *ADAMTS-5*, type II and type X collagen were detected by PCR, Western Blot and immunohistochemistry, respectively. Anti-P38 and cartilage cells were incubated for 12 h, and then incubated 48 h after exogenous *S100A11* was added. Expressions of *MMP-13*, *ADAMTS-5*, type II and type X collagen were detected. **Results** The expression of *MMP-13*, *ADAMTS-5* and type X collagen of cartilage cells increased with the increase of the concentration of exogenous *S100A11*, and was significantly higher than that of the control group. The expression of type II collagen decreased with the increase of the concentration of exogenous *S100A11*, and was significantly lower than that of the control group. After the addition of Anti-P38, the expressions of *MMP-13*, *ADAMTS-5* and type X collagen were significantly lower than that of *S100A11* alone treatment group, and the expression of type II collagen was significantly higher than that of *S100A11* alone treatment group. **Conclusions** *S100A11-RAGE* can regulate the hypertrophy and extracellular matrix

degradation of chondrocytes in mice, and the mechanism may be related to the induced *MMP-13*, *ADAMTS-5* and type X collagen expression and reduce type II collagen expression through the P38 MAPK signal pathway.

Keywords: S100A11 -RAGE; P38MAPK signaling pathway; chondrocyte hypertrophy; extracellular matrix metabolism

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种慢性进行性骨关节疾病,其发病率随年龄的增长而显著增加,流行病学研究显示,55岁以上中老年人 OA 发病率为 44%~70%,而 65 岁以上人群中男性发病率为 60%,而女性达 70%^[1]。OA 的病因机制较为复杂,受年龄、遗传、创伤及代谢等多种因素的影响,而年龄是引起 OA 发病和进展的最重要的危险因素之一^[2]。随着我国人口老龄化的加剧,OA 的发病呈日益增高的趋势,所以对于 OA 的防治具有十分重要的意义。有研究认为,OA 是由于多种炎症介质和基质成分等生物性因素,通过与其受体特异性地结合将信号传递进细胞核,启动炎症基因和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的转录表达,最终导致关节软骨细胞肥大和细胞外基质代谢失调^[3]。

已有研究证实,晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)及其受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)能通过直接或经由不同的细胞内信号转导通路参与包括类风湿性关节炎、糖尿病肾病、骨质疏松、阿尔茨海默病以及冠状动脉粥样硬化性心脏病等多种疾病的发生、发展^[4]。但 RAGE 在 OA 的发生、发展中起到何种作用,尚不十分清楚,有研究认为这可能与 AGEs/RAGE 触发活化促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导通路有关^[5]。P38 信号转导途径是 MAPK 途径的一种,研究显示,P38MAPK 信号转导通路与软骨细胞表型维持和细胞分化,软骨细胞的肥大、钙化和凋亡,软骨细胞基质金属蛋白酶的合成以及炎症因子的产生等密切相关。S100 蛋白被认为是一组钙离子传感器,通过钙离子信号转导途径在细胞增殖、分化、黏附、运动、基因表达及凋亡过程中发挥重要作用。其家族成员 S100A4、S100A6 和 S100A13 等已被证实可促进骨肉瘤的侵袭、转移^[6-8]。S100 蛋白的另一家族成员 S100A11 则参与多种细胞内的活性调节^[9],在胃癌、结肠癌和乳腺癌等肿瘤的发生、发展中的作用已有较多研究^[9-11]。研究显示,当软骨细胞受到白细胞介素 1 等促炎症因子刺激时 S100A11 会释放到软骨细胞外与 RAGE 结合,从而促进软骨细胞肥大。本研究

旨在通过外源性 S100A11 及 P38MAPK 信号转导通路相关抑制剂,作用于小鼠软骨细胞后对 MMP-13、ADAMTS-5 及 II 型和 X 型胶原蛋白表达的影响,以探明 S100A11-RAGE 和 P38MAPK 信号转导通路对小鼠软骨细胞肥大和细胞外基质代谢的调控,旨在揭示 OA 的发病机制,为研发有效的防治药物开辟新的思路,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RMIP 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Hyclone 公司,美国),II 型胶原蛋白酶(Gibico 公司,美国),S100A11、anti-RAGE、anti-P38 (Santa Cruz 公司,美国),MMP-13、ADAMTS-5 以及 II 型、X 型胶原蛋白单克隆抗体、非免疫性山羊血清、荧光二抗(Santa Cruz 公司,美国),TRIzol (Invitro-gen 公司,美国),PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),逆转录试剂盒(ABI Applied Biosystems 公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠软骨细胞的培养 无菌条件下,麻醉后取小鼠髌关节和膝关节处软骨,剪成 1 mm³ 小块,转移至培养瓶内,加入 0.25% 的胰蛋白酶,5% 二氧化碳 CO₂、37℃ 培养箱中孵育 1 h,弃去胰蛋白酶,加入 0.2% 的 II 型胶原蛋白酶,继续孵育消化。2 h 后,收集消化液,1 000 r/min 离心 5 min,所得细胞接种于含 10% FBS 的 RMIP 1640P 培养基,5% 二氧化碳 CO₂、37℃ 培养箱中培养。实验用细胞为 1~3 代。

1.2.2 实验分组与干预 在小鼠软骨细胞中加入不同浓度的外源性 S100A11 (0、1.25、2.50、5.00 及 1000 μg/ml),孵育 48 h 后,检测 MMP-13 和 ADAMTS-5 以及 II 型和 X 型胶原蛋白的表达,以筛选作用最显著的 S100A11 浓度。

在小鼠软骨细胞中加入 Anti-P38 (0、1.25、2.50、5.00 及 10.00 μg/ml),孵育 12 h 后,再加入前面筛选出的作用最显著的 SA00A11 浓度 (10 μg/ml)。孵育 48 h 后,检测 MMP-13 和 ADAMTS-5 以及 II 型和 X 型胶原蛋白的表达,以观察阻断 P38MAPK 信号转导通路后,对小鼠软骨细胞肥大和细胞外基质代谢的

影响。

1.2.3 PCR 检测 MMP-13 和 ADAMTS-5 mRNA 表达 提取总细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA。参照文献^[4], 设计 MMP-13、ADAMTS-5 以及 G3PDH 的引物, 由上海吉玛制药技术有限公司合成。MMP-13 正向引物: 5'-CTTGATGCCATTACCGTC-3', 反向引物: 5'-GGTTGGGAAGTTCTGGCCA-3'。ADAMTS-5 正向引物: 5'-TATGACAAGTGC GGAGTATG-3', 反向引物: 5'-TTCAGGGCTAAATAGGCAGT-3'。GAPDH 正向引物: 5'-CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3', 反向引物: 5'-CGTCAAAGGTGGAGGAGTGG-3'。PCR 扩增参数: 94℃变性 30 s、60℃退火 30 s、72℃延伸 30 s, 共 32 个循环, 最后 72℃延伸 7 min。

1.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达 收集各组细胞, PBS 淋洗后加入放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液裂解 30 min, 刮离细胞转移至离心管, 20 000 r/min 离心 30 min, 取上清液置入 -20℃冰箱冷冻保存备用。分别以 50 μg 等量总蛋白上样, 经 8% SDS-PAGE 电泳分离, 转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, TBST 淋洗, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加入一抗, 4℃孵育过夜; TBST 淋洗, 加入辣根过氧化物酶标记的荧光二抗, 37℃孵育 1 h; TBST 淋洗, DAB 显色。

1.2.5 免疫细胞化学检测 II 型和 X 型胶原蛋白表达 取对数生长的小鼠软骨细胞按 1×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 将 2% 多聚赖氨酸包被处理的玻片置于孔中以进行细胞爬片; 培养 24 h 后, 待细胞紧贴玻片, 取出玻片, PBS 淋洗, 95% 酒精固定; PBS 淋

洗, 加过氧化物酶阻断剂, 37℃孵育 30 min; PBS 淋洗, 加非免疫性山羊血清, 37℃封闭 30 min; PBS 淋洗, 加一抗, 4℃孵育过夜; PBS 淋洗, 加二抗, 37℃孵育 30 min; PBS 淋洗, DAB 染色, 苏木精复染, 95% 酒精脱水, 透明, 封片, 每张切片任选 5 个视野, 采用 Image Pro plus 6.0 软件进行半定量分析, 测量每张切片阳性染色灰度值^[5]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

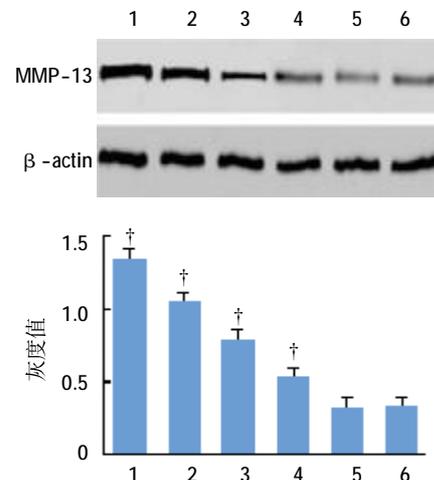
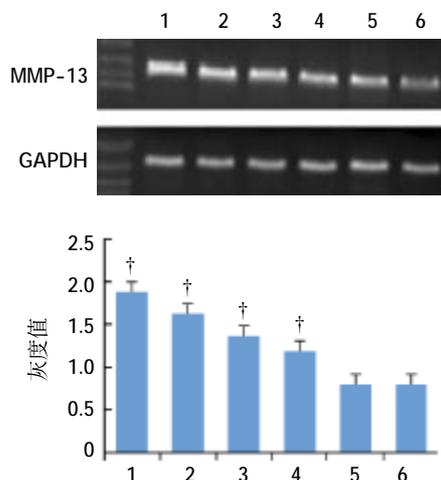
2 结果

2.1 不同浓度 S100A11 对 MMP-13 和 ADAMTS-5 表达的影响

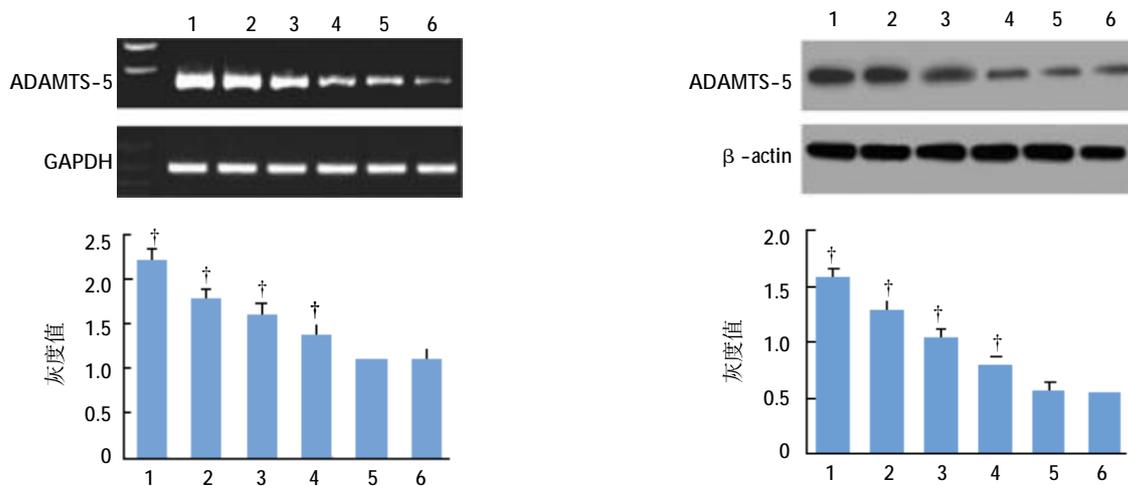
不同浓度外源性 S100A11 孵育 48 h 后, 小鼠软骨细胞 MMP-13 和 ADAMTS-5 mRNA 及其蛋白的表达较对照组显著上调 ($P=0.031, 0.022$ 和 0.009), 且其表达呈浓度依赖性增加, 以 S100A11 为 $10 \mu\text{g/L}$ 时表达最强。见图 1。

2.2 不同浓度 S100A11 对 II 型和 X 型胶原蛋白表达的影响

II 型胶原蛋白免疫细胞化学染色灰度值随 S100A11 浓度增大而增大, 且明显低于对照组 ($P=0.000$) (见图 2A); X 型胶原蛋白灰度值随 S100A11 浓度增大而减小, 且明显高于对照组 ($P=0.026$) (见图 2B)。提示随 S100A11 浓度增大, II 型胶原蛋白表达逐渐减少, 明显低于对照组 ($P=0.007$); 而 X 型胶原蛋白表达逐渐增加, 明显高于对照组 ($P=0.018$)。



A

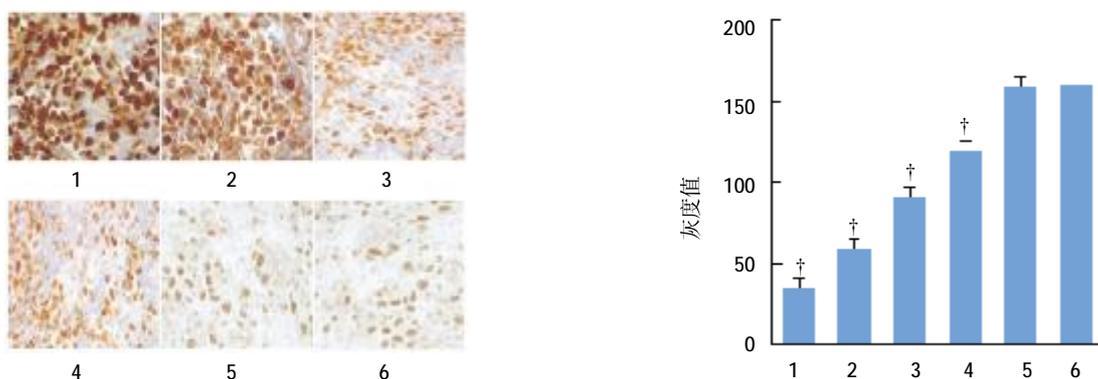


B

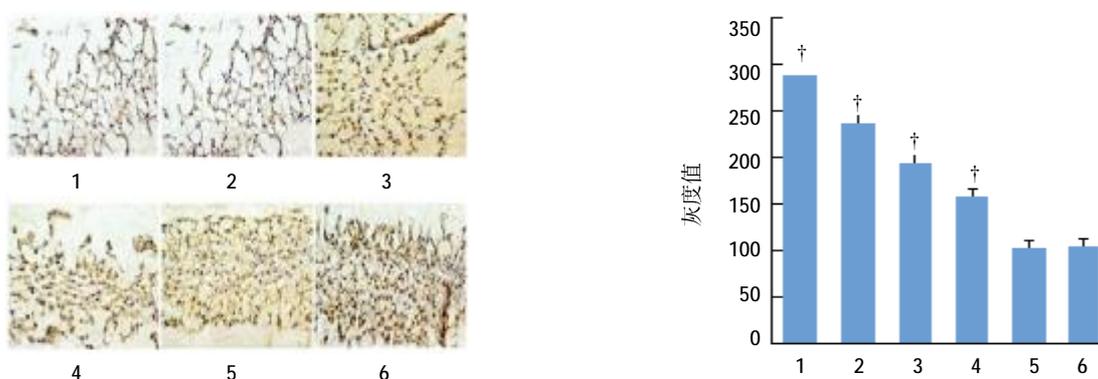
A: MMP-13 mRNA 和蛋白的表达; B: ADAMTS-5 mRNA 和蛋白质的表达

各组处理浓度: 1: 10.00 μ g/ml; 2: 5.00 μ g/ml; 3: 2.50 μ g/ml; 4: 1.25 μ g/ml; 5: 0 μ g/ml; 6: 正常组。† 与 5 组和 6 组比较, $P < 0.05$; PCR: MMP-13 mRNA, 445 kb; ADAMTS-5: 100 kb; β -actin: 200 bp; Western blot: MMP 13: 54 kD; ADAMTS-5: 75 kD; GAPDH: 37 kD

图 1 PCR 和 Western blot 检测不同浓度 S100A11 处理后小鼠软骨细胞 MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达, 条带图下面对应的是条带灰度值的柱状图



A



B

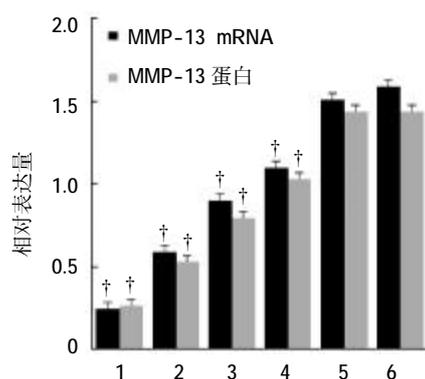
A: II 型胶原蛋白 ($\times 100$); B: X 型胶原蛋白 ($\times 50$)

各组处理浓度: 1: 10.00 μ g/ml; 2: 5.00 μ g/ml; 3: 2.50 μ g/ml; 4: 1.25 μ g/ml; 5: 0 μ g/ml; 6: 正常组。† 与 5 组和 6 组比较, $P < 0.05$

图 2 免疫组织化学检测分析不同浓度 S100A11 处理对小鼠软骨细胞 II 和 X 型胶原蛋白表达的影响, 右图为对应灰度值的柱状图

2.3 Anti-P38 对 MMP-13 和 ADAMTS-5 表达的影响

不同浓度 Anti-P38 孵育 12 h 后, 再加入 SA00A11 (10.00 $\mu\text{g/ml}$) 孵育 48 h, 检测 MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达。结果显示, MMP-13 和 ADAMTS-5 的 mRNA 及蛋白的表达随 Anti-P38 浓度的增加而减少, 且明显低于 S100A11 单独处理组 ($P=0.004$)。见图 3。

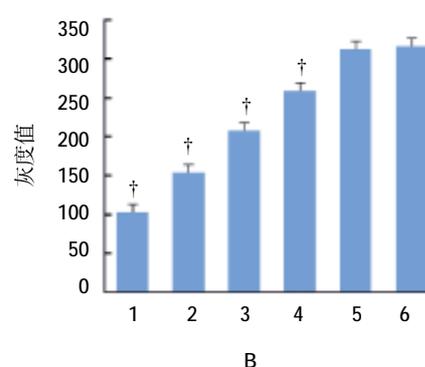
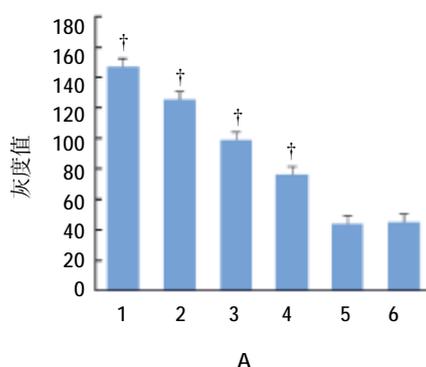
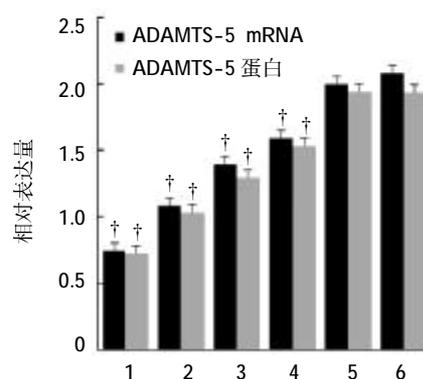


各组处理浓度: 1: 10.00 $\mu\text{g/ml}$; 2: 5.00 $\mu\text{g/ml}$; 3: 2.50 $\mu\text{g/ml}$; 4: 1.25 $\mu\text{g/ml}$; 5: 0 $\mu\text{g/ml}$; 6: 正常组。† 与 5 组和 6 组比较, $P < 0.05$

图 3 Anti-P38 对 MMP-13 和 ADAMTS-5 mRNA 及相应蛋白表达的影响

2.4 Anti-P38 对 II 型和 X 型胶原蛋白表达的影响

不同浓度 Anti-P38 孵育 12 h 后, 再加入 SA00A11 (10.00 $\mu\text{g/ml}$) 孵育 48 h, 检测 II 型和 X 型胶原蛋白的表达。结果显示, II 型胶原蛋白的表达随 Anti-P38 浓度的增加而减少, 且明显低于 S100A11 单独处理组 ($P=0.001$); X 型胶原蛋白的表达随 Anti-P38 浓度的增加而增加, 且明显高于 S100A11 单独处理组 ($P=0.002$)。见图 4。



各组处理浓度: 1: 10.00 $\mu\text{g/ml}$; 2: 5.00 $\mu\text{g/ml}$; 3: 2.50 $\mu\text{g/ml}$; 4: 1.25 $\mu\text{g/ml}$; 5: 0 $\mu\text{g/ml}$; 6: 正常组。† 与 5 组和 6 组比较, $P < 0.05$

图 4 Anti-p38 对 II 型和 X 型胶原蛋白表达的影响

3 讨论

OA 的病理生理过程主要表现为关节软骨细胞的分解代谢明显大于合成代谢, 导致软骨基质进行性丢失。OA 发病时, 各种基质金属蛋白酶的表达和含量明显增高, 加剧细胞软骨基质的分解, 其中基质金属蛋白酶 MMP-13 对于 II 型胶原蛋白具有强烈的裂解作用, 在 OA 的发生、发展中起着十分重要的作用^[12]。ADAMTS-5 是细胞软骨基质蛋白聚集蛋白聚糖 Aggrecan 的降解酶, 研究发现, OA 患者骨关节中存在 Aggrecan 被大量降解破坏的现象^[13]。II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖 Aggrecan 是软骨基质中的主

要成分, II 型胶原蛋白是构成纤维网架结构的主体, 具有很强的抗张性, 而聚集蛋白聚糖 Aggrecan 对于关节的抗压力和分散负荷等具有重要作用, 两者的表达和凋亡情况是反应软骨退变程度的最好指标^[14]。当软骨细胞分化到增生末期时, X 型胶原蛋白的合成达到顶峰, 提示 X 型胶原与软骨骨化相关; 而在 OA 中, 观察到软骨基质退化后期 X 型胶原蛋白表达的增加^[15]。所以本研究选择 MMP-13、ADAMTS-5 及 II 型和 X 型胶原蛋白作为反映 OA 病变的主要检测指标。

年龄是引起 OA 发病和进展的最重要的危险因素之一。有研究认为, 随着年龄的增加体内大量

AGEs 的产生和堆积是导致和加速年龄相关性 OA 病变的主要原因之一^[6]。其机制可能与 AGEs 与 RAGE 特异性结合并激活细胞内一系列信号转导通路相关。

RAGE 配体除了 AGEs 外还包括 β 淀粉样蛋白、高迁移率族蛋白 1 等等,而 S100A11 也是 RAGE 的配体。为探明 S100A11-RAGE 和 P38MAPK 信号转导通路对小鼠软骨细胞肥大和细胞外基质代谢的调控,本研究首先采用不同浓度的外源性 S100A11 作用于体外培养的小鼠软骨细胞,结果发现随着 S100A11 浓度的增加,小鼠软骨细胞 MMP-13、ADAMTS-5 和 X 型胶原蛋白的表达较对照组显著上调,而 II 型胶原蛋白的表达却逐渐减少。研究证实,外源性 S100A11 能通过 RAGE 结合调控小鼠软骨细胞肥大和细胞外基质代谢。进一步的研究发现,小鼠软骨细胞 MMP-13、ADAMTS-5 和 II 型胶原蛋白的表达随 Anti-P38 浓度的增加而显著减少,而 X 型胶原蛋白的表达却随 Anti-P38 浓度的增加而增加。提示 P38 MARK 抑制剂 Anti-P38 可以显著抑制由外源性 S100A11 诱导的软骨细胞肥大和基质代谢增加。

综上所述,本研究通过体外培养小鼠软骨细胞,初步论证外源性 S100A11 通过与 RAGE 结合,并经 P38MARK 信号转导通路诱导软骨细胞肥大和细胞外基质的降解,从而导致软骨细胞功能障碍,研究旨在揭示 OA 的发病机制,为研发有效的防治药物开辟新的思路。

参 考 文 献:

- [1] ALLEN K D, GOLIGHTLY Y M. Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2015, 27(3): 276 - 283.
- [2] HEIJINK A, GOMOLL A H, MADRY H, et al. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee[J]. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, 2015, 20(3): 1-6.
- [3] JOERN W-P M, SCHLÜTER-BRUST K U, PEER E. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee[J]. *Deutsches Ärzteblatt International*, 2010, 107(9): 152-162.
- [4] ROSENZWEIG D H, QUINN T M, HAGLUND L. Low-frequency high-magnitude mechanical strain of articular chondrocytes activates p38-MAPK and induces phenotypic changes associated with osteoarthritis and pain[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(8): 14427-14441.
- [5] RASHEED Z, HAQI T M. Endoplasmic reticulum stress induces the expression of COX-2 through activation of eIF2 α , p38-MAPK and NF- κ B in advanced glycation end products stimulated human chondrocytes[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2012, 1823(12): 2179-2189.
- [6] 马旭,王岩峰,安贵峰,等. S100A4 基因在不同骨肉瘤细胞和组织中的表达[J]. *大连医科大学学报*, 2011, 33(6): 542-545.
- [7] 王海燕,邹正渝,段亮,等. S100A6 通过 PDK/Akt 信号通路促进人骨肉瘤细胞 143B 增殖和迁移[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(11): 1928-1933.
- [8] 马旭,杨毅欣,王岩峰,等. 体外 RNAi 对 S100A4 基因表达及其对骨肉瘤细胞侵袭、转移能力的影响 [J]. *大连医科大学学报*, 2012, 34(1): 36-41.
- [9] 马陆军. S100A11 和自噬基因 Beclin1 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2012(33): 3266-3271.
- [10] 李春成,贺修胜,王妍,等. S100A11 在结肠癌的表达及其与临床特征的关系[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(2): 338-340.
- [11] 李万锋,张彬,贾泓瑶,等. S100A11 在乳腺癌和癌旁组织中的表达及其与临床特征的关系[J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(4): 539-541.
- [12] CHEN C G, THUILLIER D, CHIN E N, et al. Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible MMP-13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2012, 64(10): 3278 - 3289.
- [13] MIWA H E, GERKEN T A, HUYNH T D, et al. Conserved sequence in the aggrecan interglobular domain modulates cleavage by ADAMTS-4 and ADAMTS-5[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2009, 1790(3): 161-172.
- [14] LITTLE C B, MEEKER C T, GOLUB S B, et al. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(6): 1627-1636.
- [15] ZHENG Q, KELLER B, ZHOU G, et al. Localization of the cis-enhancer element for mouse type X collagen expression in hypertrophic chondrocytes in vivo[J]. *Official Journal of the American Society for Bone & Mineral Research*, 2009, 24(6): 1022-1032.
- [16] CHEN Y J, CHAN D C, CHIANG C K, et al. Advanced glycation end-products induced VEGF production and inflammatory responses in human synoviocytes via RAGE-NF- κ B pathway activation[J]. *Journal of Orthopaedic Research Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 2015, 42(5): 158.

(张蕾 编辑)