

骨关节炎关节软骨自然退变过程中 Dvl2 及 β -catenin 表达变化

刘兴振^{1a}, 范洁², 李甲^{1b}, 蔡柯^{1b}, 李大河^{1b}, 徐卫东^{1b}, 赵东宝^{1a*} (1.第二军医大学附属长海医院, a.风湿免疫科, b.关节外科, 上海 200433; 2.解放军杭州疗养院, 杭州 310007)

摘要: 目的 探讨 Dishevelled (Dvl)和 β -catenin 在骨关节炎(osteoarthritis, OA)关节软骨细胞自然退变中的表达情况。方法 将膝关节置换的 OA 患者关节软骨细胞进行体外分离培养, 采用自然传代的方法建立关节软骨退变模型。倒置显微镜观察 P2、P6 代关节软骨细胞的形态, 流式细胞仪检测软骨细胞的凋亡情况。利用 Q-PCR 及 Western blot 法检测 Dvl2 和 β -catenin 基因和蛋白的表达情况。结果 成功分离并进行体外培养 OA 患者关节软骨细胞。P2 代关节软骨细胞呈三角形或多角形; P6 代时形态则变为梭形, 并出现明显的纤维化。P6 代时凋亡率(16.34%)显著高于 P2 代的凋亡率(8.63%)。P2 代 Dvl2 的 mRNA 相对表达量为 P6 代的 3.629 倍($P=0.004$), 蛋白表达量为 P6 代的 2.548 倍($P=0.03$), β -catenin 的 mRNA 相对表达量为 P6 代的 5.087 倍($P=0.001$), 蛋白表达量为 P6 代的 4.4 倍($P=0.003$)。结论 OA 关节软骨细胞在体外自然退变过程中, 凋亡增多, Dvl2 及 β -catenin 表达则呈下降趋势。Dvl 及 Wnt/ β -catenin 在软骨细胞中的功能有待进一步研究。

关键词: Wnt 通路; 骨性关节炎; 软骨细胞; β -catenin; Dishevelled2

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)11-1355-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.001

Expression of Dvl2 and β -Catenin in Natural Degeneration Process of Osteoarthritis Articular Cartilage

LIU Xingzhen^{1a}, FAN Jie², LI Jia^{1b}, QI Ke^{1b}, LI Dahe^{1b}, XU Weidong^{1b}, ZHAO Dongbao^{1a*} (1.Changhai Hospital, The Second Military Medical University, a.Department of Rheumatology, b.Department of Joint Surgery, Shanghai 200433, China; 2.Department of Psychology, Hangzhou Sanatorium of PLA, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the expression changes of dishevelled (Dvl) and β -catenin in natural degeneration process of osteoarthritis(OA) articular cartilage. **METHODS** The articular chondrocytes from the patients with OA who underwent knee replacement were isolated and cultured *in vitro*. Using natural passage way to create a model of articular cartilage degeneration. The morphological of articular cartilage cells were observed under inverted microscope and the apoptosis of chondrocytes were detected by flow cytometry. Use Q-PCR and Western blot to test the genes and proteins expression of Dvl2 and β -catenin. **RESULTS** Successfully isolated and cultured OA articular chondrocytes *in vitro*. The articular chondrocytes of P2 generation was triangular or polygonal; morphological was fusiform of P6 generation, and appeared significant fibrosis. Apoptosis rate of P6 generation was significantly higher than P2 generation(16.34% vs 8.63%). P2 generation's Dvl2 mRNA relative expression levels was P6 generation's 3.629-fold ($P=0.004$), and protein expression levels was 2.548-fold($P=0.03$); β -catenin mRNA relative expression levels was P6 generation's 5.087-fold ($P=0.001$), and protein expression levels was 4.4-fold ($P=0.003$). **CONCLUSION** In the process of OA articular chondrocytes natural degeneration *in vitro*, apoptosis is increased and Dvl2 and β -catenin expression are declining. The function of Dvl and Wnt/ β -catenin in chondrocytes requires further study.

KEY WORDS: Wnt signaling pathway; osteoarthritis; chondrocytes; β -catenin; Dishevelled 2

骨关节炎(osteoarthritis, OA)为慢性退行性疾病, 以关节软骨破坏、滑膜炎及骨赘形成为主要病理改变, 关节软骨的退变为主要因素。早期对于 OA 发病机制的研究多集中在生物力学及炎症因子方面, 随着对 OA 认识的深入, 与退变相关的基因及信号通路逐渐成为研究的热点^[1]。Wnt 信号

通路调控着软骨细胞的增殖、分化以及细胞表型的维持^[2], 在软骨的形成及退变中发挥着重要的调控作用, 因此也成为近年来研究的热点。

Dishevelled (Dvl)和 β -catenin 都是 Wnt 通路中关键蛋白, 当胞外 Wnt 蛋白与胞膜上的 Frizzled 及 LRP-5/6 结合后, 激活 Dvl 蛋白; Dvl 抑制 Axin

基金项目: 国家自然科学基金(81273284, 81471607, 81671595)

作者简介: 刘兴振, 男, 博士, 主治医师 Tel: 15900613491
任医师 Tel: (021)3115687 E-mail: dongbaozhao@163.com

E-mail: xzliu7@163.com

*通信作者: 赵东宝, 男, 博士, 教授, 主

上的 GSK-3 β , 导致 β -catenin 去磷酸化后大量聚集并入核, 发挥调节下游基因转录的作用^[3]。虽然目前已有一些关于 β -catenin 与软骨退变的研究, 但结论随着软骨部位、种属来源、疾病模型不同而不同。另外, 目前还没有关于 Dvl 在 OA 患者关节软骨中的表达及与退变关系的研究。为了探究 Dvl 及 Wnt/ β -catenin 通路在 OA 关节软骨病变中可能发挥的作用, 本研究收集了膝关节置换 OA 患者的关节软骨, 体外分离培养后通过自然传代方式建立 OA 关节软骨体外退变模型。通过对 OA 关节软骨自然退变模型 Dvl 和 β -catenin 基因及蛋白表达情况的检测, 探讨了 Wnt 信号通路在 OA 的发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 OA 患者关节软骨细胞分离与培养

膝关节组织均取自上海长海医院关节外科行膝关节置换的 OA 患者。手术室获取标本后迅速移至超净台, 用刀片将关节面软骨组织刮下, 一部分留作病理检查(HE 染色), 一部分置于含 10% 双抗的 PBS 中清洗 3 次。将洗净的软骨置于 2 mL EP 管中, 用眼科剪将滑膜组织剪至 2~3 mm³, 加入 0.5 g·L⁻¹ 的 II 型胶原酶置于 37 °C 温箱。每 6~8 h 用 200 目滤网收集细胞离心后加入含 10% FBS 的 DMEM(Gibco)培养, 2~3 d 换液。待细胞长满皿底后进行传代。镜下观察记录关节软骨细胞形态变化并拍照。另外, 用相同方法提取 SD 大鼠关节软骨细胞作为正常对照, 进行形态及生长特性的对比。

1.2 关节软骨细胞鉴定

首先通过 HE 染色对获取的关节软骨进行病理检查, 确定标本为关节软骨组织后再对 II 型胶原酶消化获得的软骨细胞进行 II 型胶原免疫荧光检测, 从而对软骨细胞进行鉴定。将培养至 2~3 代的软骨细胞传至放有灭菌玻片的 48 孔板中, 待细胞贴壁融合至 50% 左右时, 固定液常温固定细胞 30 min, 加入适量穿膜液清洗玻片 2~3 次。II 型胶原一抗 4 °C 孵育过夜后, 再用穿膜液清洗玻片 2~3 次, 加入二抗 37 °C 孵育 30 min, 清洗后加入 DAPI 然后封片。荧光显微镜下进行观察。

1.3 流式细胞仪检测关节软骨细胞凋亡

给 P2、P6 代关节软骨细胞更换新鲜培养基, 24 h 后收集上清, 用胰酶将细胞消化后加入完全培养基终止消化, 与收集的上清一起 1 500 r·min⁻¹

离心 5 min。吸掉培养基后用 PBS 重悬并洗 2 遍。弃掉培养基后用 200 μ L Buffer 重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-APC 进行染色, 室温避光放置 15 min。上机检测前加入 5 μ L PI 染剂, 然后使用流式细胞仪进行凋亡检测。

1.4 Q-PCR 检测 Dvl2 和 β -catenin 基因的相对表达

用 PBS 将细胞洗 3 遍, 加入适量 Trizol(Life)提取总 RNA, 利用反转录试剂盒(TaKaRa)将 RNA 反转录为 cDNA。采用 SYBR Green(TaKaRa)反应体系进行目的基因 Q-PCR 的检测(LightCycler 480 高通量 Q-PCR 仪)。用所得 CP 值计算 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 然后计算目的 mRNA 的相对表达量。上述实验使用至少 3 位 OA 患者的关节软骨细胞进行重复。所用引物序列为: Dvl2 5'-CTGCCCACTTTCTCCTACCAAT-3'(正向), 5'-CCATCGCTAGTCCCACCTTGCT-3'(反向); β -catenin 5'-GCCAAGTGGGTGGTATAGAG-3'(正向)和 5'-GCTGGGTATCCTGATGTGC-3'(反向); GAPDH 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3'(正向), 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'(反向)。引物均由上海生工代为合成。

1.5 Western blot 法检测 Dvl2 和 β -catenin 蛋白的表达

用 PBS 将 2 位 OA 患者的关节软骨细胞洗 3 遍, 加入适量裂解液及蛋白酶抑制剂, 冰上放置 10 min 后于 4 °C 离心机 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清。取少量上清用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。电泳转膜后将 PVDF 膜放入 5% BSA 室温封闭 2 h 后于摇床上用 TBST 洗膜 5 min $\times$ 3 次。一抗 4 °C 摇床孵育过夜后用 TBST 洗膜 5 min $\times$ 3 次, 加入二抗室温孵育 2 h。洗膜后显影, 根据内参条带灰度值调整上样量, 重复实验。

1.6 统计学方法

Q-PCR 及凋亡部分使用至少 3 位 OA 患者的关节软骨细胞进行重复验证。而 Western blot 部分则采用 2 位 OA 患者的关节软骨细胞进行重复。获得的数据采用 SPSS 18 进行统计分析。采用两独立样本 *t* 检验进行数据比较, 以 *P*<0.05 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 关节软骨细胞形态及鉴定

OA 患者关节软骨 HE 染色见软骨细胞增生变性及基质的黏液样变。酶消化后 SD 大鼠膝关节软骨细胞呈球形, 24 h 即有大量细胞贴壁。72 h 后

细胞变为圆形或椭圆形,并可成簇重叠生长,Ⅱ型胶原免疫荧光阳性。OA 患者关节软骨多为三角形或多角形,也有一些呈梭形,Ⅱ型胶原免疫荧光也为阳性。结果见图 1。

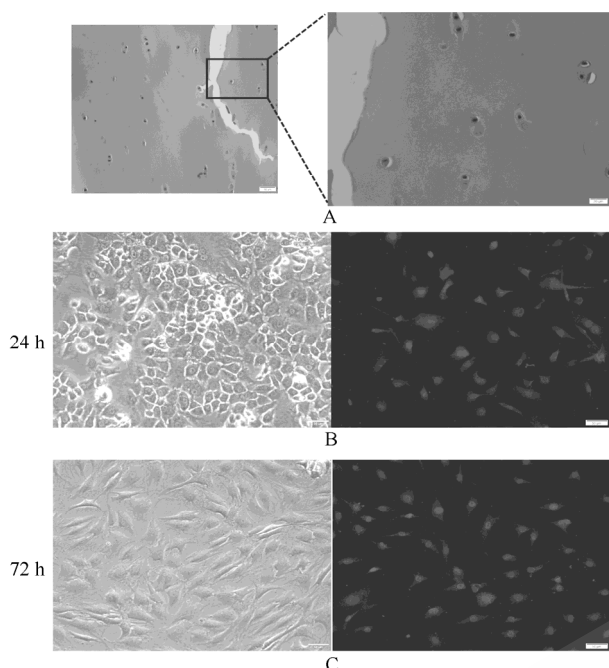


图 1 关节软骨 HE 染色(左图 200 $\times$, 右图 400 $\times$)及细胞形态(200 $\times$)

A-关节软骨; B-细胞形态(24 h); C-细胞形态(72 h)。

Fig. 1 HE staining (left 200 $\times$, right 400 $\times$) and cell morphology of articular cartilage(200 $\times$)

A-articular cartilage; B-cell morphology(24 h); C-cell morphology(72 h)。

2.2 自然退变关节软骨细胞形态及凋亡的变化

OA 关节软骨细胞传至 P2、P3 时,细胞倍增加快,细胞又呈三角形或多角形,也可出现成簇现象。随着体外传代次数的增加,显微镜下可见关节软骨细胞由三角形或多角形逐渐变为梭形,并出现明显的纤维化。见图 2。

流式细胞仪检测 P2 代的凋亡率为 8.63%,传至 P6 代时凋亡率则增至 16.34%。提示随着体外传代次数的增加,关节软骨细胞出现凋亡增加现象。

2.3 自然退变关节软骨细胞 Dvl2 及 β -catenin 表达的变化

Q-PCR 结果提示,随着体外传代次数的增加,Dvl2 及 β -catenin 的 mRNA 相对表达量均显著下降。P2 代 Dvl2 的 mRNA 相对表达量为 P6 代的 3.629 倍($P=0.004$); P2 代 β -catenin 的 mRNA 相对表达量为 P6 代的 5.087 倍($P=0.001$)。结果见图 3。

Dvl2 及 β -catenin 蛋白表达的变化与 mRNA 水

平变化一致。P2 代 Dvl2/GAPDH 灰度值为 0.999 ± 0.043 , P6 代 Dvl2/GAPDH 灰度值为 0.391 ± 0.004 , P2 代蛋白表达量为 P6 代的 2.548 倍($P=0.03$); P2 代 β -catenin/GAPDH 灰度值为 0.371 ± 0.002 , P6 代 β -catenin/GAPDH 灰度值为 0.084 ± 0.001 , P2 代 β -catenin 蛋白表达量为 P6 代的 4.4 倍($P=0.003$),结果见图 3。提示自然退变关节软骨细胞 Dvl2 及 β -catenin 表达呈下降趋势。

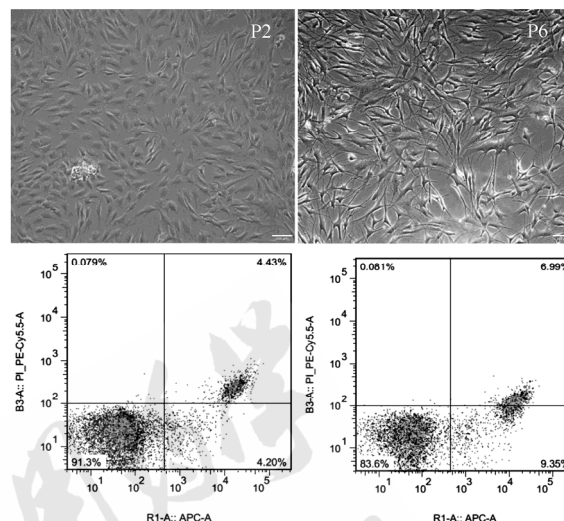


图 2 OA 关节软骨细胞形态(200 $\times$)及凋亡的变化

Fig. 2 Changes in articular cartilage cell morphology(200 $\times$) and apoptosis

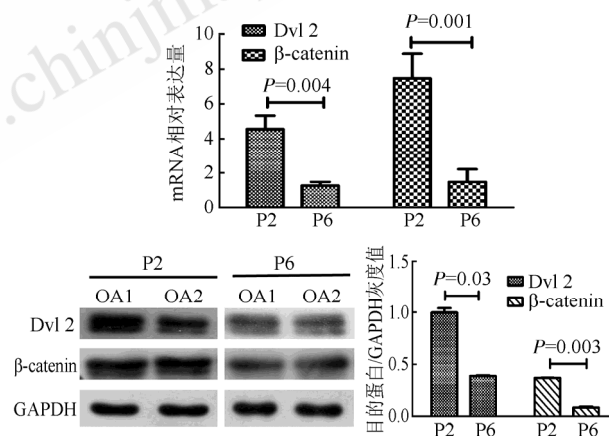


图 3 关节软骨细胞 Dvl2 及 β -catenin 表达的变化

Fig. 3 Changes in Dvl2 and β -catenin expression of articular cartilage

3 讨论

虽然 OA 关节软骨经过体外分离培养,其所处的微环境发生了很大变化,但是体外自然传代模型一定程度上依然可以反映 OA 进展中关节软骨的退变过程。随着关节软骨细胞体外传代次数的增加,其生物学特性和表型都会出现明显的变化^[4]。

本研究在未予任何干预的情况下只是通过简单的体外自然传代方法,建立了关节软骨退变模型,并发现 OA 关节软骨细胞在自然传代的过程中出现凋亡增加,Dvl2、 β -catenin 基因及蛋白表达量明显下降。

关节软骨细胞凋亡与软骨退变及 OA 发生发展关系密切,且有多条信号通路的参与^[5-6]。但 Wnt/ β -catenin 通路中凋亡关系研究还相对较少。在 Col2a1-ICAT 转基因小鼠模型中, β -catenin 被抑制后小鼠出现 OA 样的软骨退变及软骨细胞凋亡增加^[7]。小鼠的关节软骨细胞中凋亡抑制基因 Bcl-2 和 Bcl-x 表达较少,而凋亡基因 caspase 9 和 caspase 3/7 则表达增多。本研究中随着软骨细胞退变和凋亡增加, β -catenin 表达下降与上述现象一致。提示 Wnt/ β -catenin 通路在维持软骨生长及功能方面具有重要的作用。但另外一项研究提示, β -catenin 下游重要的转录因子 TCF4 过表达后软骨细胞凋亡明显增加^[8]。郑权等^[9]研究发现在终板软骨细胞体外自然退变模型中, β -catenin 表达逐渐增高,Wnt/ β -catenin 通路也呈激活状态。上述研究提示 Wnt/ β -catenin 在软骨凋亡和退变的调控作用比较复杂,随着软骨部位、种属来源不同而不同,还需要进一步深入研究。对 Wnt/ β -catenin 通路进行简单的上调或者下调并不是一个好的治疗策略,需要对其重要组份和具体蛋白进行深入研究。

Dvl 是 Wnt 通路中游重要的调控蛋白,尽管其在成骨细胞和破骨细胞中已经有了一些研究^[10],但目前还缺少关于 Dvl 在软骨中功能的相关研究。在本研究的关节软骨退变模型中 Dvl 与 β -catenin 变化一致,即随着传代次数的增加 Dvl 表达呈现明显的下降趋势。提示 Dvl 依赖 Wnt/ β -catenin 通路发挥一部分调控软骨生长的作用。但是,由于 3 个特殊结构域的存在,Dvl 可以与几十种蛋白相互作用,其功能也要比 β -catenin 复杂的多。研究发现 Dvl 不仅可以与 P65 相互作用抑制 NF- κ B 通路^[11],还可以与 ZNRF3/RNF43 相互作用从而抑制 Wnt 通路自身^[12]。为了进一步挖掘 Dvl 对关节软骨细胞及 OA 的影响,本课题组已经将 Dvl2 过表达慢病毒质粒转染入 OA 关节软骨细胞后进行了转录组测序工作。希望通过后续深入的研究能够对 Dvl 在关节软骨中的作用有更深入的理解。

总之,Dvl 及 Wnt/ β -catenin 通路在关节软骨中发挥着重要而精细的调控作用,还需要在不同疾病、种属、部位中进行全面深入的研究。对其功能的深入研究也将为我们提供全新的视角去认识 OA 等软骨退变性疾病的发生、发展,从而为相关疾病的治疗提供新的思路和方法。

REFERENCES

- [1] PEFFERS M, LIU X, CLEGG P. Transcriptomic signatures in cartilage ageing [J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(4): R98. Doi: 10.1186/ar4278.
- [2] YASUHARA R, OHTA Y, YUASA T, et al. Roles of beta-catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells [J]. *Lab Invest*, 2011, 91(12): 1739-1752.
- [3] MAEDA K, TAKAHASHI N, KOBAYASHI Y. Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(1): 15-23.
- [4] KANG S W, YOO S P, KIM B S. Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage [J]. *Biomed Mater Eng*, 2007, 17(5): 269-276.
- [5] DAI X, LI Y, ZHANG R, et al. Effects of sodium selenite on c-Jun N-terminal kinase signalling pathway induced by oxidative stress in human chondrocytes and c-Jun N-terminal kinase expression in patients with Kashin-Beck disease, an endemic osteoarthritis [J]. *Br J Nutr*, 2016, 115(9): 1547-1555.
- [6] HUANG Z M, DU S H, HUANG L G, et al. Leptin promotes apoptosis and inhibits autophagy of chondrocytes through upregulating lysyl oxidase-like 3 during osteoarthritis pathogenesis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(7): 1246-1253.
- [7] ZHU M, CHEN M, ZUSCIK M, et al. Inhibition of beta-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(7): 2053-2064.
- [8] MA B, ZHONG LEILEI, CLEMENS A, et al. T cell factor 4 is a pro-catabolic and apoptotic factor in human articular chondrocytes by potentiating nuclear factor- κ B signaling [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(24): 17552-17558.
- [9] ZHENG Q, XU H G, ZHANG X L, et al. Expression and significance of Wnt/ β -catenin signaling pathway *in vitro* natural degeneration model of endplate chondrocytes in rats [J]. *Nat Med J China(中华医学杂志)*, 2014, 94(31): 2464-2467.
- [10] LIU X Z, FAN J, ZHAO D B. Research progress of regulating effects of Dvl on bone erosion in rheumatoid arthritis by crosstalk between Wnt and NF- κ B signalling pathway [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2015, 32(11): 1404-1408.
- [11] DENG N, YE Y, WANG W, et al. Dishevelled interacts with p65 and acts as a repressor of NF- κ B-mediated transcription [J]. *Cell Res*, 2010, 20(10): 1117-1127.
- [12] JIANG X, CHARLAT O, ZAMPONI R, et al. Dishevelled promotes Wnt receptor degradation through recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 ubiquitin ligases [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(3): 522-533.

收稿日期: 2016-04-08