

自由基与软骨基质胶原蛋白类型改变*

张法浩 程天蓉 常淑云 许善锦 王夔

(北京医科大学药学院, 北京 100083)

摘要 本文利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 定量研究了体外培养的软骨细胞和软骨组织基质中 II 型胶原蛋白的含量。结果表明氧自由基 ($\cdot O_2$ 和 $\cdot OH$) 和具有自由基性质的物质 (黄腐酸, 镰刀菌毒素) 可使软骨细胞合成, 分泌异常的非 II 型的胶原蛋白, 同时, 硒化合物可明显地抑制此种效应。

关键词: 自由基; 软骨细胞; 胶原蛋白

正常的软骨组织中含有丰富的由软骨细胞合成分泌的 II 型胶原蛋白。在某些因素影响下, 体外培养的软骨细胞分化异常, 表现在合成分泌出非 II 型的胶原蛋白^[1,2], 在我国大骨节病研究中, 也发现患者软骨胶原蛋白有异常改变^[3], 已引起了注意。

黄腐酸 (Fulvic acid, FA) 和镰刀菌毒素 (Fusarium toxin, FT) 是大骨节病的两个主要致病因子, 可引起软骨细胞和胶原蛋白的氧化性损伤^[4,5]。但是, FA 和 FT 是否可引起软骨细胞表达特征发生改变, 并导致软骨基质中胶原蛋白类型异常, 还未见定量的研究报道。本文利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳特异溴化氰裂解条带, 从蛋白质水平上定量地研究了 FA, FT 及活性氧自由基对软骨基质胶原蛋白类型改变的影响以及含硒化合物的抑制作用。

材料与方 法

一、材料

I 型和 II 型胶原蛋白 (Collagen, Sigma), 黄嘌呤氧化酶 (XOD, Sigma), 十二烷基硫酸钠 (SDS, Sigma), RPM 1640 培养基 (Sigma), 丙烯酰胺, 溴化氰均购自 Sigma 公司; 黄腐酸 (FA) 和镰刀菌毒素 (FT) 分别由中科院生态环境中心和微生物研究所提供, 其它试剂均为国产市售分析纯。

实验用来亨鸡胚购自北京生物制品研究所。

二、方法

1. 软骨细胞和组织块培养

取 12 天来亨鸡胚长肢骨骺端软骨, 经酶消化剥离除去骨膜等软组织^[6], 切成 1×1 mm 小软骨块, 在含有 10% 小牛血清, $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸及 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 2-氨基丙腈的 RPM 1640 培养

* 国家“八五”科技攻关课题。本文为姚军、马梅学士论文的一部分
收稿日期: 1992-03-11; 修回日期: 1993-05-22

基中进行组织块培养(8块/cm²)。或将软骨块分散成细胞,在同样条件下进行细胞培养(5.0×10⁶ cells/mL)。

2. 胶原蛋白分离提取

软骨细胞及软骨组织块经培养10天后,分别从软骨组织和细胞外基质中经酸溶(0.5 mol/L 乙酸),酶溶(100μg/mL 胃蛋白酶),盐析等步骤^[7]提取出并制得干燥的胶原蛋白。

3. 胶原蛋白溴化氰裂解

将1.0mg 胶原蛋白溶于0.5mL 甲酸中,通氮气1h,加入12.5mg 溴化氰,60°C 下密闭振荡50min,室温下放置24h后冷冻干燥。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用垂直板型电泳,参照文献^[8]方法加以改进:分离胶为恒浓度10%,浓缩胶浓度为5.7%,电极液(pH7.4)含0.025 mol/L Tris,0.1% SDS,溴化氰裂解的胶原蛋白溶于样品液中(8mg 蛋白/mL,pH6.8,0.065 mol/L Tris,3.3% SDS,10%甘油,5%巯基乙醇及0.001% 溴酚蓝)。50mA 电泳4—6h,考马斯亮蓝R-250染色,岛津CS-910双波长薄层扫描仪扫描,得光密度扫描图。

结 果 与 讨 论

一、Ⅱ型胶原蛋白含量与电泳光度扫描峰

本文首先测定了七组标准Ⅰ型和Ⅱ型胶原蛋白混合样品(Ⅱ型胶原蛋白含量分别为0,20,40,50,60,80,100%)。经溴化氰裂解,电泳及薄层扫描得电泳光度扫描峰(Fig. 1)。

由Fig. 1可见,B峰($\alpha_1(\text{I})\text{CB}7+8+\alpha_1(\text{II})\text{CB}11$)面积(S_B)与样品中Ⅰ型或Ⅱ型胶原蛋白含量未呈好的相关性,尽管A峰($\alpha_1(\text{II})\text{CB}10$)面积(S_A)与Ⅱ型含量呈正相关,但由于电泳过程中样品的损失可带来较大误差,也不能单独利用来定量计算。但经处理发现, S_A 与 S_B 之比(S_A/S_B)与样品中Ⅱ型胶原蛋白含量(CGⅡ%)呈很好的线性关系(Fig. 2),其关系式为:

$$S_A/S_B=0.0095\times\text{CGⅡ}\%+0.0075 \quad (r=0.98)$$

并且与样品多少无关(20~100μg),灵敏度较高(20μg),重现性好($P<0.01$)。因此,利用此方法测定混合样品中Ⅱ型胶原蛋白含量是可行的,简便实用的。

二、软骨基质中Ⅱ型胶原蛋白含量变化

在软骨细胞和软骨组织的培养过程中,分别加入FA(由大骨节病区饮水中提取,15ppm)、FA*(由非病区饮水中提取,15ppm),FT(50ppm),XOD/HX($10^{-4}\text{unit}\cdot\text{mL}^{-1}/10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和Fe(Ⅱ)-EDTA($0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。由软骨细胞外基质和软骨组织中提取的胶原蛋白经测定可见(Table 1),外源性毒物(FA,FA*,FT)与活性氧自由基(XOD/HX,Fe(Ⅱ)-EDTA)具有同样或相似的效应,使软骨细胞合成分泌的Ⅱ型胶原蛋白含量非常显著地降低,但在同样实验条件下,培养的软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白含量降低程度远低于细胞外基质的改变,这可能与外源性毒物的作用时间较短,还未攻击至组织深层有关。

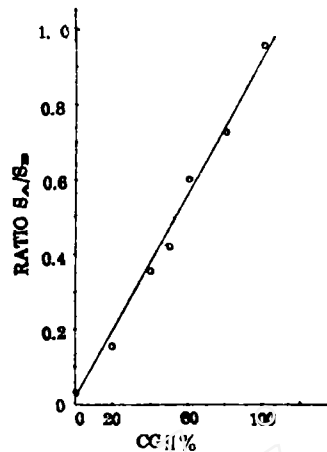
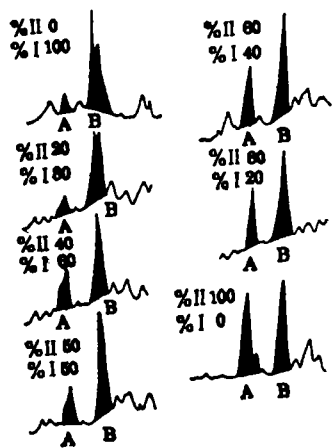


Fig. 1 Spectrophotometric Scans of the standard mixture of type I and type II collagen from the SDS-polyacrylamide gels

Fig. 2 Ratio(S_A/S_B) vs percentage of type II collagen

Table 1 The percentage of type II collagen(CG II %)

	Control	FA	FA*	FT	XOD/HX	Fe(II)-EDTA
Cell matrix	104	7.1	5.1	8.3	5.5	6.5
Cartilage	100	72	70	62	/	52

三、硒化合物的抑制作用

硒具有清除体内自由基,保护细胞膜的功能。本文实验结果表明,在培养基中加入少量 Na_2SeO_3 (0.1ppm) 同样也可抑制外源性毒物对软骨细胞的攻击和损伤,从而使基质中 II 型胶原蛋白含量升高,但是对不同的外源性物质其抑制效果有差异 (Table 2)。

Table 2 The inhibitory effect of Se(IV) compound on the type change of collagen (CG II %)

	Control	FA	FA*	FT	XOD/HX	Fe(II)-EDTA
Cell matrix	106	27.2	56.6	47.2	61.2	/
Cartilage	102	78.5	84.3	68.3	/	88.4

四、讨 论

黄腐酸(FA),镰刀菌毒素(FT)及氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$)都不同程度地影响软骨细胞正常基因表达,使其合成分泌的特异 II 型胶原蛋白含量降低,从而可能导致软骨组织的正常生理功能的异常改变。FA 和 FT 分子含有许多苯醌式结构单元,在一定的条件下可被还原活化为

半醌自由基^[9],并能诱导大鼠肝细胞释放出活性氧自由基^[10]。另外,实验结果也表明了FA和FT对Ⅱ型胶原蛋白含量的影响相同于活性氧自由基,另外具有清除自由基功能的Se(Ⅳ)化合物也同样能抑制其作用。因此,本文认为FA和FT可能是通过自由基而作用于软骨细胞的,另外在诸多可影响软骨细胞正常基因表达的因素中,自由基是否是一共同因子,值得深入研究。

相同浓度的分别由大骨节病区和非病区饮水中提取的黄腐酸(FA)对软骨细胞合成异常胶原蛋白的影响效应是相同的,并没有地域差别。但是,硒化合物对非病区FA的抑制效果却明显强于对病区FA的抑制,这可能是由于不同来源的FA与硒的作用方式或程度不同,从而影响到FA的生物学效应。同时,这也是不同地域的FA致病作用不同的可能原因之一。

参 考 文 献

- 1 Abbott J, Holtzer H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, **59**:1144—1149
- 2 Deshmukh M, et al. *Biochem Biophys Acta*, 1977, **499**:28—35
- 3 杨春林. 中国科学院生态环境中心博士论文, 1991, 50—60
- 4 Wang W Z, et al. *J Environ Sci (China)*, 1991, **3**(4):79—86
- 5 Wang C X, et al. *J Environ Sci (China)*, 1991, **3**(4):55—59
- 6 王维哲,等. 中国地方病学杂志, 1982, **1**:271—275
- 7 Trelstad R L. *Lab Invest*, 1977, **36**:501—512
- 8 Shawn W, et al. *Analyt Biochem*, 1985, **145**:277—285
- 9 Peng A, et al. *J Environ Sci (China)*, 1991, **3**(4):5—14
- 10 张法浩,等. 科学通报, 1993, **38**(13):1230—1233

Effects of Free Radicals on the Collagen Type Change in Cartilage Matrix

Zhang, Fa-hao Cheng, Tian-rong Chang, Shu-yun Xu, Shan-jin Wang, Kui
(School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083)

Abstract In this paper, a method of determining the percentage of type Ⅱ collagen in extracellular matrix of cultured chondrocytes or cartilage tissue in terms of the spectrophotometric densities of specific cyanogen bromide peptide bonds on SDS-polyacrylamide gels has been used. The results show that the free radical generating systems, including Fe(Ⅱ)-EDTA, Xanthine Oxidase-Xanthine, Fulvic acid and Fusarium toxin, can cause chondrocytes to synthesize and secrete mainly type Ⅰ collagen instead of the normal type Ⅱ collagen. In addition, The collagen type change can be inhibited by Se(Ⅳ) compounds.

Key words: Free radical; Collagen; Chondrocyte