

· 基础论著 ·

酸诱导酸敏感离子通道对佐剂性关节炎大鼠 关节软骨细胞内 Ca^{2+} 运动的影响

袁凤来 李霞 金成 姜东林 何庆龙 苏强

【摘要】 目的 探讨酸敏感离子通道(ASICs)与酸诱导的大鼠佐剂性关节炎(AA)关节软骨细胞 Ca^{2+} 运动的关系。**方法** 雄性SD大鼠12只,分为正常组($n=6$)和AA模型组($n=6$)。模型组大鼠制备AA模型,体外培养AA关节软骨细胞,应用 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fluo-3/AM 孵育培养的细胞,激光共聚焦显微镜检测有、无细胞外液以及PCTX对细胞外pH 6.0酸作用所致AA关节软骨细胞内 Ca^{2+} 荧光强度动态及 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)变化。**结果** 在无细胞外钙环境中,酸未引起AA关节软骨细胞 Ca^{2+} 变化,平均荧光值为 45.63 ± 16.38 。而在胞外液有 Ca^{2+} 的情况下,pH 6.0可引起AA关节软骨细胞 Ca^{2+} 短暂性升高(149.56 ± 25.39),与无钙组比较明显增加($P < 0.01$);PCTX对pH 6.0诱导AA关节软骨细胞 Ca^{2+} 内流明显抑制作用($60.85 \pm 28.73, P < 0.01$)。**结论** ASICs参与酸诱导的经AA关节软骨细胞 Ca^{2+} 内流,可能与关节软骨破坏有关。

【关键词】 关节炎,实验性; 离子通道; 软骨,关节; 显微镜检查,共焦; 钙离子

Effects of acid sensing ion channels on the Ca^{2+} movement induced by acid in rat articular chondrocytes with adjuvant arthritis YUAN Feng-lai, LI Xia, JIN Cheng, JIANG Dong-lin, HE Qing-long, SU Qiang. Institute of Integrative Chinese and Western Medicine, The Third Affiliated Hospital of Nantong University, Wuxi 214041, China
Corresponding author: YUAN Feng-lai, Email: bjfq88@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between acid sensing ion channels and Ca^{2+} movement induced by pH 6.0 in articular chondrocytes in rats with adjuvant arthritis. **Methods** Twelve male SD rats were used for these studies. The rats were divided at random into normal group ($n=6$) and AA model group ($n=6$). Adjuvant arthritis was induced in rats in AA model group and articular chondrocytes obtained from AA rats were cultured *in vitro*. The cultured AA articular chondrocytes were incubated with the calcium ion -sensitive fluorescent indicator fluo-3/AM, and then using the Laser Scanning Confocal Microscopy technique recording intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in chondrocytes caused by pH 6.0 or PCTX when cells were immersed in the buffer with or without Ca^{2+} . **Results** Our results as following, the rapid decrease in extracellular pH 6.0 with Ca^{2+} -free buffer was not found to induce a conspicuous increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in articular chondrocytes of AA rats. Increased Ca^{2+} intensity was 45.63 ± 16.38 . The rapid decrease in extracellular pH 6.0 with Ca^{2+} -containing buffer was found to induce a conspicuous increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in articular chondrocytes of AA rats, increased Ca^{2+} intensity was 149.56 ± 25.39 ($P < 0.01$). PCTX almost completely blocked the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase observed at low pH in AA rat articular chondrocytes, increased Ca^{2+} intensity was 60.85 ± 28.73 ($P < 0.01$). **Conclusion** ASICs mediate acid-induced acid-induced increase in intracellular calcium in rat articular chondrocytes and it may be related with breakdown of articular cartilage.

【Key words】 Arthritis, experimental; Ion channels; Cartilage, articular; Microscopy, confocal; Ca^{2+}

类风湿关节炎(RA)是一种自身免疫性疾病,其主要病理特点是滑膜细胞增生,衬里层增厚,多种炎性细胞浸润,血管翳的形成以及软骨和骨组织的破坏,最终

导致关节畸形和功能丧失。关节软骨和骨组织的破坏是致残的根本原因,因此积极寻找导致关节软骨破坏及骨组织病理生理改变的关键环节是防治该病的重点^[1]。

酸敏感离子通道(acid-sensing ion channels, ASICs)是一类由胞外酸化所激活的阳离子通道,属于 Deg/EnaC 家族中的一个成员,主要通透 Na^+ 和 Ca^{2+} ^[2]。目前,已发现了6个ASICs亚基,它们在外周和中枢神经系统中广泛表达。另有研究结果表明,ASICs能够对某

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.13.120

基金项目:国家自然科学基金(81101372;81270011)

作者单位:214041 江苏无锡,南通大学第三附属医院中西医结合研究所

通讯作者:袁凤来,Email:bjfq88@163.com

些病理反应如局部缺血、炎症、癫痫等产生响应^[3]。值得注意的是,在这些病理反应中共同的特点是组织酸化,激活的 ASICs 导致胞外 Ca^{2+} 内流并激发各种病理生理效应。我们在前期研究发现大鼠关节软骨细胞中有 ASICs 的表达^[4],并在大鼠佐剂性关节炎(AA)中高表达^[5]。进一步研究发现通过抑制 AA 大鼠关节软骨细胞 ASICs 的表达,能明显升高 AA 大鼠关节软骨细胞基质成分 II 型胶原和蛋白多糖聚糖体表达量,提示抑制关节软骨细胞 ASICs 的表达对关节软骨具有保护作用^[6]。本实验拟在此基础上观察阻断 AA 大鼠关节软骨细胞 ASICs 关节软骨细胞内细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的改变,旨在探讨 ASICs 介导 AA 大鼠关节软骨细胞损伤的分子机制,为 RA 治疗及寻找其治疗新靶点提供实验依据。

材料与方 法

一、材料

1. 动物的选择及分组: Sprague-Dawley (SD) 大鼠,雌雄不限,体重 (160 ± 20) g,由安徽医科大学实验动物中心提供。合格证号:皖医实动准字第 01 号。将大鼠随机分成模型组 ($n=6$) 和正常组 ($n=6$)。实验室温度控制在 $20 \sim 25$ °C,湿度在 $50\% \sim 60\%$,自由饮水。

2. 药品与主要试剂:医用卡介苗(上海生物制品研究所产品);弗氏完全佐剂(卡介苗 80 °C 灭活后,与高压灭菌的液状石蜡充分碾磨、混匀配成 10 g/L 的乳剂);胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所产品);DMEM 培养粉、胰蛋白酶、II 型胶原酶、Amiloride(美国 Sigma 公司产品);Fluo-3/AM, F-127(美国 Biotium 公司产品);Psalmopoeus cambridgei, PCTX(美国 Yarnell AZ 公司产品)。

3. 主要仪器与设备:电子天平 JT12001(上海精天电子仪器厂产品);电热恒温水浴锅(GSY-8 北京市医疗设备厂意成公司产品);高速离心机 TGL-16H(珠海黑马医学仪器有限公司产品);水套式 CO_2 培养箱 shal-lab2323(广州南方生化医学仪器有限公司产品);电子显微镜 XDS-1B(重庆光电仪器总公司产品);洁净工作台 SW-CJ-1F(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产品);激光共聚焦显微镜(Leica SP5,德国徕卡公司产品)。

二、方法

1. AA 大鼠模型的诱导:大鼠左侧后足跖皮内注射弗氏完全佐剂(即为卡介苗 80 °C、 1 h 灭活后与高压灭菌的液状石蜡充分碾磨混匀配成 10 mg/ml 的乳剂) 0.1 ml 致炎,造成 AA 大鼠模型。

2. 关节软骨取材与培养:26 d 后,大鼠于麻醉下断头处死,浸入 $0 \sim 4$ °C 的 0.1% 苯扎氯铵液中浸泡消毒

10 min,于膝关节正中纵行切开皮肤,分离肌肉,充分暴露膝关节。无菌条件下取双侧后肢膝、髌关节面软骨,置于 D-Hanks 液中漂洗 2 次,并用眼科剪将软骨剪碎至 1 mm³ 大小,继续用 D-Hanks 液漂洗 2 次。吸去漂洗液,加入 0.25% 胰蛋白酶溶液,并置入 37 °C、 5% CO_2 孵箱中消化 30 min,中途振荡几次。吸出胰蛋白酶溶液,加入 0.3% II 型胶原酶溶液,置入 37 °C、 5% CO_2 孵箱中继续消化 3 h。每隔 1 h 更换 II 型胶原酶溶液 1 次。用离心管收集各次消化液, 2000 r/min 离心 10 min,去除上清液。用加了青霉素及链霉素的 Hanks 液洗 1 次,以同样方法再离心 1 次。过 120 目筛目,去除上清液。用含 10% FBS 的 DMEM 培养液制成细胞悬液。将细胞悬液接种于 24 孔培养板(1 ml)及 96 孔培养板中。置于 37 °C、 5% CO_2 孵箱中培养 48 h。倒置显微镜下观察并照相。原代细胞长满后传代培养。用于实验的软骨细胞为第 1~2 代的传代细胞。

3. 关节软骨细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定:取培养板中的盖玻片, Hanks 液冲洗 2 遍,用 100 μl 的 Fluo-3/AM 与 F-127 混合作液(10 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-3/AM, 0.02% F-127)滴于盖玻片上, 37 °C 避光孵育 40 min, Hanks 液再次冲洗玻片 3 遍,洗去多余染料,保留少许 Hanks 液平衡细胞 10 min,于 10 min 内进行细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 检测。当测定在有钙液下细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 时,将 Hanks 换为 D-Hanks 液。预先向培养皿中加入 1 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin 和 10 $\mu\text{mol/L}$ MK801 的台式液分别耗竭 Ca^{2+} 池内的钙离子以及阻断钙离子通道,将细胞置于激光共聚焦显微镜下动态扫描 20 s,用微量加样器将已经调好的 pH 值(pH 6.0)的细胞外液加注到盖玻片上,镜下取 $8 \sim 9$ 个细胞,动态观察胞内钙荧光强度变化。另一组预先向培养皿中加入 25 ng/ml PCTX,实验时加入已调好的 pH 值(pH 6.5)的细胞外液,镜下取 $8 \sim 9$ 个细胞,动态观察胞内钙荧光强度变化。利用激光共聚焦显微镜系统(Zeiss LSM-510, Germany)扫描记录细胞内荧光强度,每 6 s 扫描 1 次,共 10 min,激发波长为 488 nm、发射波长 $505/550$ nm。利用 CLSM 所配备的数据与图像处理软件定量分析细胞荧光强度值。

三、统计学分析

数据分析应用 SPSS 11.0 软件处理,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 无钙液中(D-Hanks 液)细胞外酸对 AA 关节软骨细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响(图 1):当细胞外液为 D-Hanks 缓冲液时, pH 6.0 的细胞外液未能引起 AA 关节软骨

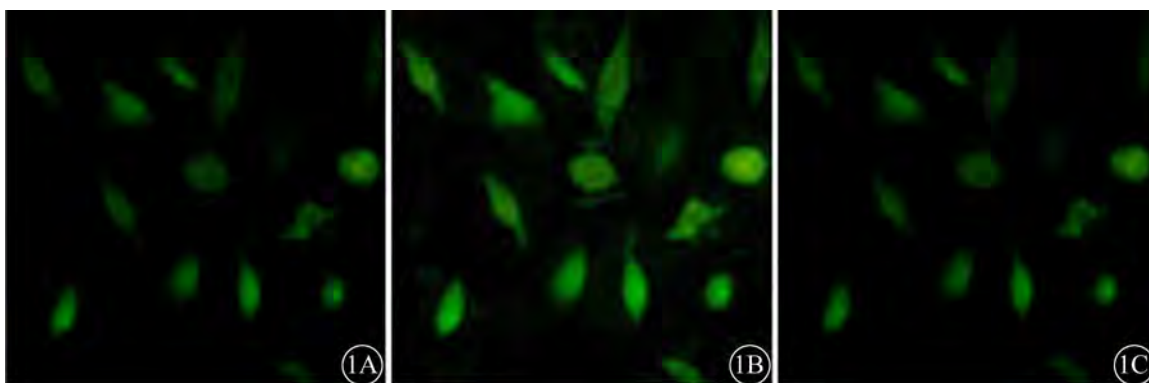


图1 无钙液中酸诱导AA关节软骨细胞[Ca²⁺]_i变化(×200)。1A: 加入酸前; 1B: 加入酸过程中; 1C: 加入酸后

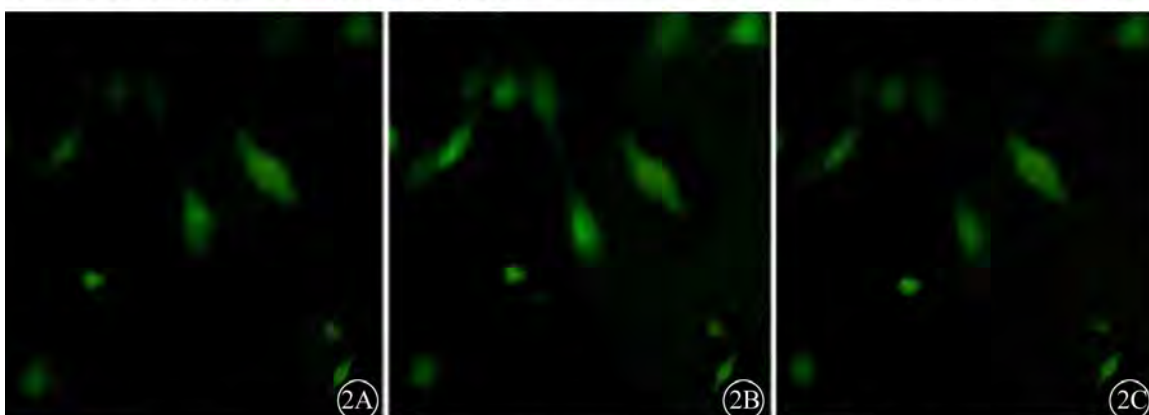


图2 含钙液中酸诱导AA关节软骨细胞[Ca²⁺]_i变化(×200)。2A: 加入酸前; 2B: 加入酸过程中; 2C: 加入酸后

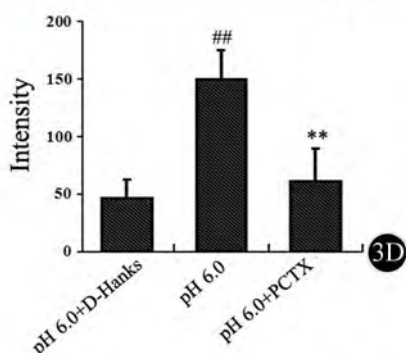
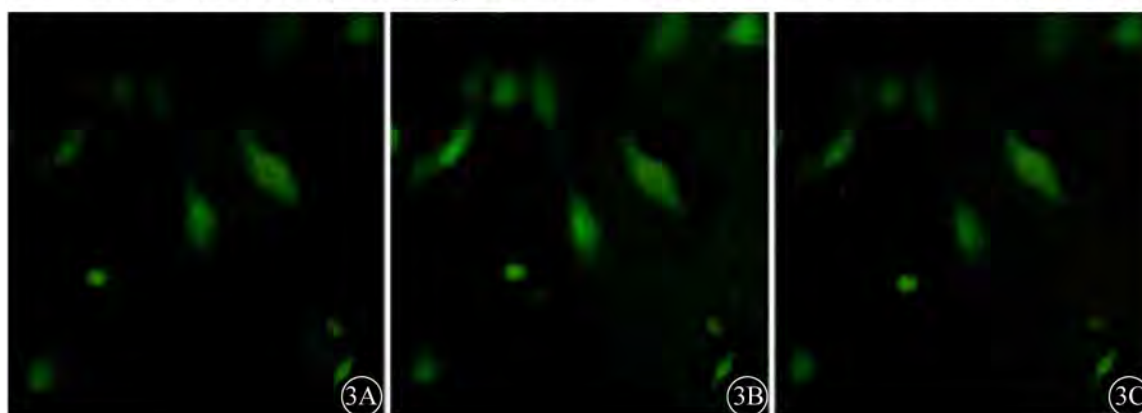


图3 PCTX对含钙液中酸诱导AA关节软骨细胞[Ca²⁺]_i变化。3A: 加入酸前; 3B: 加入酸过程中; 3C: 加入酸后; 3D: 数据分析Ca²⁺荧光值变化; 与pH 6.0+D-Hanks组比较, ##P<0.01; 与pH 6.0比较, **P<0.01

细胞内 Ca²⁺ 荧光强度明显改变。

2. 细胞外酸对 AA 关节软骨细胞[Ca²⁺]_i的影响(图2):在正常含钙液中,pH 6.0的细胞外液能明显增强 AA 关节软骨细胞内 Ca²⁺ 荧光强度,荧光强度随时

间缓慢下降,停止加药后,荧光强度继续下降。

3. PCTX 对 AA 关节软骨细胞[Ca²⁺]_i的影响:为了进一步证实 ASICs 介导 AA 关节软骨细胞 Ca²⁺ 内流产生的影响,采用的 ASICs 特异性阻断剂 PCTX,观察

其对细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。预先向培养皿中加入25 ng/ml PCTX后再加入已调好的pH 6.0的细胞外液可引起 Ca^{2+} 荧光有较弱升高(图3A~3C)。pH 6.0组关节软骨细胞 Ca^{2+} 平均荧光值增高明显(149.56 ± 25.39),与无钙液组(45.63 ± 16.38)比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。PCTX处理组能明显抑制pH 6.0诱导的 Ca^{2+} 平均荧光值(60.85 ± 28.73 , $P < 0.01$)(图3D)。

讨 论

近年来因ASICs具有广泛的生理学功能和重要的病理学意义而备受关注,它在体内广泛表达,除了对 Na^+ 有通透性以外,ASIC1a同聚体通道对 Ca^{2+} 也有一定的通透性。ASICs与突触可塑性、长时程增强、学习记忆、痛觉、传导等密切相关,许多病理情况都伴有组织酸化如炎症、脑缺血、癫痫等,局部酸化导致大量ASICs被激活,细胞外大量 Ca^{2+} 内流,引起细胞的损伤^[7]。Xiong等^[8]用膜片钳技术在皮层培养物的完整细胞上记录到ASICs电流,并证明在一定的pH范围内局部缺血通常会引起ASICs电流激活。用特异性阻滞剂PCTX发现,其不仅特异性阻断ASIC1a介导的电流,而且还能特异性抑制细胞内 Ca^{2+} 的超载,使脑缺血灶模型的梗死容积显著减小。

本次实验研究了ASICs对酸诱导的AA关节软骨细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。本次结果显示,在正常含钙液中,pH 6.0的细胞外液能明显升高AA关节软骨 Ca^{2+} 荧光强度,而对无钙液缓冲中,酸性细胞外液对 $[Ca^{2+}]_i$ 几乎无影响,提示关节软骨细胞中的ASICs可能参与酸诱导细胞 Ca^{2+} 内流。为了证实ASICs对 Ca^{2+} 内流的参与,实验观察了ASICs特异性阻滞剂PCTX对关节软骨细胞 Ca^{2+} 内流的影响。结果表明,PCTX使关节软骨细胞内对酸引起的 Ca^{2+} 内流的抑制率明显减小,进一步说明ASICs参与关节软骨细胞 Ca^{2+} 内流过程。

成熟软骨细胞本身的代谢非常活跃,维持关节软骨的正常代谢,在软骨形成、代谢以及修复中起着极其重要的作用。软骨细胞能够感受周围环境的变化而不

断调整细胞外基质的代谢活动。适当的pH值会促进关节软骨细胞和胞外基质的代谢,而不适当的pH值($pH < 6.4$)影响关节软骨细胞的代谢^[9]。1977年Kaise和Edelman在研究糖皮质激素诱导未成熟胸腺凋亡过程中,首先发现细胞凋亡与 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有关。另有研究发现的胞内 Ca^{2+} 水平升高主要与胞膜离子通道开放导致 Ca^{2+} 内流相关,因此,胞外 Ca^{2+} 内流可能是凋亡所必需的^[10]。本实验结果提示,ASICs可能参与关节软骨细胞酸性病理环境下的代谢过程,激活的ASICs导致 Ca^{2+} 内流,引起软骨细胞的代谢异常甚至凋亡,导致关节炎关节软骨破坏,但确切的机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Yuan FL, Chen FH, Lu WG, et al. Acid-sensing ion channel 1a mediates acid-induced increases in intracellular calcium in rat articular chondrocytes. *Mol Cell Biochem*, 2010, 340:153-159.
- [2] Xu TL, Xiong ZG. Dynamic regulation of acid-sensing ion channels by extracellular and intracellular modulators. *Curr Med Chem*, 2007, 14: 1753-1763.
- [3] Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell*, 2004, 118: 687-698.
- [4] 袁凤来, 陈飞虎, 李霞, 等. 大鼠关节软骨酸敏感离子通道(ASICs)的表达. *安徽医科大学学报*, 2007, 42:424-427.
- [5] 袁凤来, 陈飞虎, 黄学应, 等. 酸敏感离子通道在大鼠佐剂性关节炎关节软骨中的表达. *中华风湿病学杂志*, 2008, 12:321-324.
- [6] Yuan FL, Chen FH, Lu WG, et al. Inhibition of acid-sensing ion channels in articular chondrocytes by amiloride attenuates articular cartilage destruction in rats with adjuvant arthritis. *Inflamm Res*, 2010, 59: 939-947.
- [7] Zeng WZ, Liu DS, Duan B, et al. Molecular mechanism of constitutive endocytosis of acid-sensing ion channel 1a and its protective function in acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci*, 2013, 33:7066-7078.
- [8] Xiong ZG, Chu XP, Simon RP. Acid sensing ion channels--novel therapeutic targets for ischemic brain injury. *Front Biosci*, 2007, 12:1376-1786.
- [9] Razaq S, Wilkins RJ, Urban JP. The effect of extracellular pH on matrix turnover by cells of the bovine nucleus pulposus. *Eur Spine J*, 2003, 12:341-349.
- [10] Mansfield K, Pucci B, Adams CS, et al. Induction of apoptosis in skeletal tissues: phosphate-mediated chick chondrocyte apoptosis is calcium dependent. *Calcif Tissue Int*, 2003, 73:161-172.

(收稿日期:2013-03-28)

(本文编辑:张志巍)