

IL-1 β 对小鼠软骨细胞中 c-myc 蛋白表达的影响

王宁 龙迪 孟晓娜

【摘要】 目的 通过观察不同浓度 IL-1 β 对软骨细胞 c-myc 蛋白表达的影响,探讨 IL-1 β 在骨关节炎软骨损伤中的作用及机制并寻找有效治疗骨关节炎的方法。**方法** 选用 20 只 C57BL/6 小鼠,体外进行关节软骨细胞的分离及原代培养;将原代培养的软骨细胞分为 4 组: A 组为空白对照组,采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 常规培养基培养; B、C、D 组为 IL-1 β 处理组,分别用含有 1、10 和 100 ng/ml IL-1 β 的常规培养基培养,12 h 后进行实验分析。采用 Western blot 和流式细胞仪检测法,观察各组 c-myc 蛋白表达情况及细胞凋亡情况。**结果** 原代培养细胞 24 h 后开始贴壁,呈圆形或多角形,传至第 4 代、第 5 代细胞体积变大,逐渐成为梭形,甲苯胺蓝染色为软骨细胞内见蓝紫色异染颗粒。与对照组相比较,不同浓度 IL-1 β 处理组软骨细胞 c-myc 蛋白表达水平逐渐增高,呈剂量依赖性 ($P<0.05$);与对照组相比较,不同浓度 IL-1 β 处理组软骨细胞凋亡率逐渐增高,呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。**结论** 实验体外分离小鼠关节软骨,可成功获得高纯度,且传至 3 代以内活性率超过 90% 的软骨细胞;IL-1 β 可以按照剂量依赖方式上调软骨细胞 c-myc 蛋白的表达,同时增加软骨细胞凋亡率,说明 IL-1 β 可能通过 c-myc 蛋白诱导软骨细胞凋亡。

【关键词】 软骨细胞; 白细胞介素 1 β ; 印迹法,蛋白质; 流式细胞术; 分离培养

Effects of IL-1 β on protein expression of c-myc in chondrocytes of mouse WANG Ning, LONG Di, MENG Xiao-na. Department of Bone, Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China
Corresponding author: WANG Ning, Email: www.wang666@sina.com

【Abstract】 Objective Through the investigation on the effect of IL-1 β on c-myc protein expression in chondrocytes of mouse, to explore the role and mechanism of IL-1 β in osteoarthritic cartilage injury and to find an effective method for the treatment of osteoarthritis. **Methods** Chondrocytes were isolated from twenty C57BL/6 mice and cultured *in vitro*; the primary cultured chondrocytes were divided into 4 groups: A group, which was the control group, was cultured in conventional medium (RPMI-1640 containing 10% FBS); B, C, D groups, which were the IL-1 β -treated groups, were cultured in conventional culture medium containing 1, 10 and 100 ng/ml IL-1 β , respectively. After 12 h culture, experimental analysis were performed. Western Blot and flow cytometry method were used to observe the expression changes of c-myc protein and the apoptosis rate of each group. **Results** After 24 h, the primary cultured cells started to be adherent with rounded or polygonal shapes; Volume of cells began to be exaggerated at 4th or 5th cell passage, spindle-shaped. The blue-violet iso dye particles could be seen in the cells by toluidine blue staining; Compared with control group, the c-myc protein levels were gradually increased in a dose-dependent manner ($P<0.05$) when the cells were treated with IL-1 β of different concentrations; compared with control group, the apoptosis rate of chondrocytes challenged to IL-1 β of different concentrations were increased significantly, in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion** Chondrocytes can be successfully obtained with high purity and the viability of them is 90% above at 3rd cell passage; c-myc protein can be up-regulated by IL-1 β in a dose dependent manner and simultaneously the apoptosis rate are also increased correspondingly, indicating that chondrocyte apoptosis could be induced by IL-1 β through c-myc protein changes.

【Key words】 Chondrocytes; Interleukin-1 β ; Blotting, Western; Flow cytometry; Isolated culture

骨关节炎(osteoarthritis)是以关节软骨退行性变、关节边缘、软骨下骨继发性骨质增生为病理特征的慢性致残性疾病,是人类最常见的关节疾病之一,严重威胁着中老年人健康。然而,关于骨关节炎的病因、发病机制至今尚不十分明确。

研究表明,白细胞介素1(interleukin-1, IL-1)是骨关节炎中主要的炎症因子之一,可以引起关节软骨基质的降解,并起到快速促炎作用,加剧骨吸收^[1]。IL-1 β 可以抑制软骨细胞增殖,促进细胞释放其他炎症因子^[2]、抑制与软骨细胞表型分化相关的基因表达^[3]。IL-1 β 能够诱导软骨细胞凋亡^[4],进一步加重关节软骨的破坏。

软骨损伤和退变首先表现为软骨细胞代谢的改变,较X线变化早3~5年^[5]。随着分子生物学技术的发展,细胞凋亡(apoptosis)在骨关节炎发病机制中的意义有了较为深入的研究,骨关节炎者软骨组织细胞凋亡明显。多个实验利用多种方式通过对骨关节炎患者及正常人关节标本的研究发现,软骨损伤后出现软骨退变且同时存在凋亡,凋亡在骨关节炎发病机制中起重要作用且与骨关节炎预后相关^[6]。c-myc基因是细胞原癌基因,位于人8q24,由3个外显子和2个内含子组成。c-myc的表达产物c-myc蛋白可诱导细胞凋亡。在类风湿关节炎和骨关节炎的病损软骨中c-myc的表达和原位末端标记的阳性细胞与疾病的程度密切相关^[7]。

目前,对c-myc在骨关节炎疾病中表达的情况与IL-1 β 之间的关系研究未见报道,同时软骨细胞的培养也是多年来人们研究的热点之一,因此,本实验采用胰蛋白酶和II型胶原酶结合消化法分离C57BL/6小鼠关节软骨细胞,建立了一种简便易行的软骨细胞体外分离、培养、鉴定体系,以获取高纯度、高活性的关节软骨细胞。采用Western blot方法通过观察不同浓度IL-1 β 对软骨细胞C-Myc蛋白表达的影响,应用流式细胞术检测IL-1 β 处理后各组软骨细胞凋亡情况,将细胞凋亡与c-myc表达情况建立起联系,探讨IL-1 β 在骨关节炎软骨损伤中的作用及机制并寻找有效治疗骨关节炎的方法,为继续研究关节损伤的发病、诊断、治疗提供重要依据。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物:1周龄C57BL/6小鼠20只(由中国医科大学实验动物部提供),雌雄不分,体重(18 $\pm$ 2)g。

2. 主要试剂和仪器:DMEM培养基,胰蛋白酶和

II型胶原酶(Sigma),0.4%台盼蓝染色液(Gibco),青霉素、链霉素(山东鲁抗医药有限公司),胎牛血清(Gibco),倒置显微镜(Olympus),超净台(苏州净化仪器厂),CO₂培养箱(美国REVCO),垂直电泳槽、电泳仪(上海天能公司),兔抗小鼠IL-1 β 一抗(北京博奥森公司),兔抗小鼠c-myc一抗(北京博奥森公司),多克隆鼠抗人GAPDH一抗(Sigma),辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德公司)

二、方法

1. 关节软骨细胞的分离与培养:分别脱颈处死20只小鼠。无菌条件下用骨剪截取双侧膝关节。置于无菌平皿中,刮除周围滑膜组织,D-Hanks液冲洗。手术刀片削下关节表面的肌肉软骨,用眼科剪刀剪成约2mm $\times$ 2mm $\times$ 2mm的碎块,D-Hanks液漂洗3次。将组织块移入锥形瓶,再加入5ml 0.25%胰蛋白酶,于37℃恒温振荡消化30min,弃上清,D-Hanks液洗3次,再加入5ml 0.2%II型胶原酶,继续行37℃恒温振荡消化,经连续观察可见,消化3h后,肉眼仍然可见锥形瓶中有少许组织块,又经过振荡消化,已看不到组织块,即得到细胞悬液,此时时间为4.5h。这其中每隔1h收集1次细胞,以防止因消化时间过久而降低活性^[8]。将细胞悬液移入15ml离心管,1200r/min,离心8min,弃上清,D-Hanks液洗3次,以150目尼龙网过滤至无菌培养瓶。加含体积分数为10%胎牛血清、100U/ml青霉素、100U/ml链霉素的DMEM培养基。

2. 关节软骨细胞的培养及观察:将消化所得的细胞悬液以(2~3) $\times$ 10⁶个细胞/ml接种于25cm²培养瓶中,共接种3瓶,每瓶加5ml含10%FBS的RPMI-1640细胞培养基,置37℃,5%CO₂,饱和湿度培养箱中培养,24h后,细胞逐渐贴壁,隔日换液1次。待倒置显微镜观察软骨细胞汇合成片,长满大部分培养瓶壁后,倾去培养液,D-Hanks液洗细胞,加入0.25%胰蛋白酶2ml,室温静置5~10min,在倒置显微镜下观察到细胞重新变成圆形或多边形,个别细胞开始浮游,加入D-Hanks液终止消化,吹打细胞使其形成软骨细胞悬液,1200r/min离心8min,收集细胞,接种培养,于37℃,5%CO₂培养箱继续培养。

3. 检测关节软骨细胞的活细胞率:健康的正常细胞能够排斥台盼蓝,死亡的细胞可被台盼蓝染成蓝色。取0.18ml细胞悬液加入至含有20 μ l的0.4%台盼蓝染色液的离心管中,混匀,吸出滴于血球计数板,3min内分别计数活细胞、死亡细胞数量。按公式:活细胞率(%)=活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数) $\times$

100%。

4. 不同浓度的 IL-1 β 作用: 将传代培养的软骨细胞弃去培养液, D-Hanks 液冲洗 2 遍, 0.25% 胰蛋白酶消化传代至平底 24 孔培养板, 贴壁后, 更换含 IL-1 β 1、10、100 ng/ml 的培养基, 每一浓度作用 1 孔, 另设 1 孔空白对照组, 继续作用至 12 h, 进行后续实验。

5. Western blot 法检测 c-myc 蛋白表达: 裂解液裂解细胞, 11 000 r/min 离心 20 min, 取上清。蛋白定量将样品都稀释至 3 μ g/ μ l, 各取 20 μ l 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜, TBS 洗 2 次, 每次 5 min, 5% BSA 封闭过夜, 加入兔抗小鼠 c-myc (1:500) 室温孵育 4 h, TBS 洗 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的羊抗兔 II 抗 (1:10 000), 室温孵育 2 h, TBS 洗 30 min 后, 发光仪发光。抗小鼠 GAPDH 作为内参。Quantity one 图像分析系统进行蛋白条带灰度分析, 测目标蛋白和内参 GAPDH 蛋白的电泳条带灰度积分, 以二者比值代表目标蛋白的相对表达量, 分析结果。以上实验重复三次。

6. 采用流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡: 收集各组细胞, 吹打成单细胞悬液移入 FCM 检测专用试管, 1200 r/min 离心 10 min, 弃上清, 如此重复 2 次, 将细胞重悬于 200 μ l 结合缓冲液, 加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l 的 PI, 轻轻混匀, 避光反应 15 min, 加入 300 μ l 结合缓冲液, 1 h 内上流式细胞仪行细胞凋亡检测, CellQuest 软件进行分析。以上实验重复三次。

三、统计学方法

应用 SPSS 12.0 统计软件进行分析处理, 实验数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 分离、培养的细胞形态观察: 分离的软骨细胞有较强的折光性, 倒置显微镜下观察, 细胞 24 h 后开始贴壁生长, 呈圆形或多角形, 圆形的细胞核居细胞中央且胞质丰富。随着培养时间的延长, 个别细胞开始浮游。传代后 2~8 h 第 1 代细胞贴壁, 且增殖速度加快, 3~4 d 铺满培养瓶。如图 1 所示。关节软骨细胞的活细胞率经检测, 消化所得的活细胞占总细胞比例约为 90%, 活细胞比例很高, 可继续进行实验。

2. 不同浓度的 IL-1 β 正向调节 c-myc 基因的表达: Western blot 结果显示, 与对照组相比, IL-1 β 以剂量依赖方式对 c-myc 基因蛋白水平可正向调节, 浓度在 100 ng/ml 时, 表达量最明显 (图 2)。

3. 流式细胞仪定量分析 c-myc 基因蛋白表达: 不

同浓度 IL-1 β 作用 12 h 下的细胞凋亡率分别为 3.20% $\pm$ 1.12%、8.12% $\pm$ 2.34%、14.03% $\pm$ 5.67%, 与空白对照组正常培养情况下细胞自发凋亡率 (1.14% $\pm$ 1.03%) 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。并随着 IL-1 β 浓度的增加凋亡细胞率显著增加 (图 3, 表 1)。

表 1 不同浓度 IL-1 β 对软骨细胞凋亡率的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

IL-1 β	凋亡率
0 ng/ml(A 组)	1.14 $\pm$ 1.03
1 ng/ml(B 组)	3.20 $\pm$ 1.12 ^a
10 ng/ml(C 组)	8.12 $\pm$ 2.34 ^{ab}
100 ng/ml(D 组)	14.03 $\pm$ 5.67 ^{abc}

注: 与 A 组相比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组相比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组相比较, ^c $P < 0.05$

讨 论

关节软骨可减轻关节反复滑动中关节的摩擦, 具有润滑及耐磨损的特性, 并且吸收机械性震荡。传统的观念认为是因为这样如此反复而长期、严重的关节利用导致了不可避免的关节炎, 而现代观念认为骨关节炎在机械损伤基础上还有生物因素所致, 最终导致组织结构与力学性质的丧失。因此, 体外培养软骨细胞研究其生物学性状则成了关键, 并且许多分子生物学技术广泛适用于小鼠。本实验采用, 0.25% 胰蛋白酶和 0.2% II 型胶原酶联合搅拌消化法, 4.5 h 可获取大量高活性、高纯度的 C57BL/6 小鼠关节软骨细胞。

原代软骨细胞贴壁较慢, 24~36 h 才逐渐贴壁, 其分裂增殖也相对较慢; 而传代后贴壁和增殖的速度会很快增加, 一般在 8 h 左右。有研究表明这可能与原代细胞在消化分离时受到一定的机械或化学性的损害有关。

已经有证据表明, IL-1 在软骨细胞的降解、退变过程中起到最重要的分解作用^[9]。IL-1 是一种有效的基质金属蛋白酶 (MMP) 诱导剂, 能促使 MMP 产生, 而 MMP 对基质的溶解作用明显^[10]。有研究^[11-12]报道滑膜关节腔内注射 IL-1 可引发蛋白多糖的降解和软骨细胞的破坏, 可抑制软骨细胞合成具有透明软骨细胞变性, 引起软骨缺损和软骨的生物力学改变。鉴于以上原因, IL-1 被用于诱导骨关节炎模型的产生^[13]。

原癌基因 c-myc 位于人 8q24, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 它的表达与细胞增殖、分化和凋亡相关^[14]。c-myc 的主要作用是参与转录, 而在转录过程中可以是激活启动而诱导细胞周期进程和分化, 也可以是抑制启动而阻止细胞分化产生凋亡, 这与 c-myc 蛋白分子结构中诱导增殖和凋亡的活性结构区重叠有关^[15]。文献^[16]报道 IL-1 β 可以明显抑制髌状突软骨细



图1 软骨细胞的分离与培养: 1A: 原代培养的透明软骨细胞经消化过夜后, 镜下观察消化液内出现大量的小圆形细胞, 说明消化成功, 软骨细胞接种后, 呈悬浮状态; 1B: 软骨细胞贴壁较慢, 24 h后开始贴壁, 48 h后开始伸展, 原代培养的透明软骨细胞生长较快, 呈圆形或多角形; 1C: 传代细胞生长较为缓慢, 细胞形态变化明显, 圆形或多角形细胞减少, 逐渐转为梭形细胞 ($\times 66$)

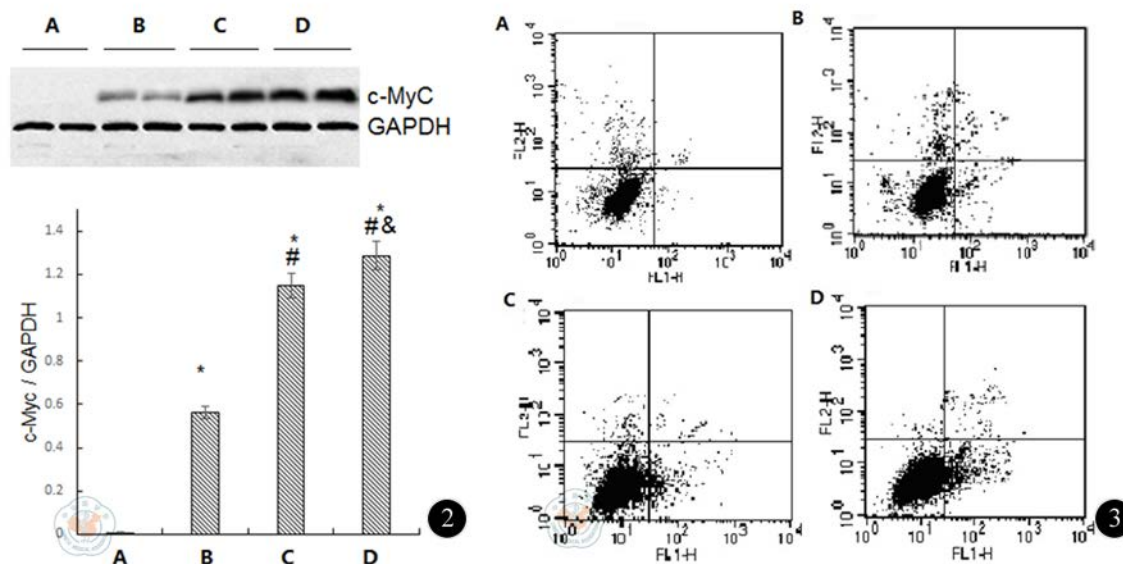


图2 不同浓度的IL-1 β 处理细胞后c-myc蛋白表达情况。A、B、C和D分别代表对照组、1 ng/ml IL-1 β 处理组、10 ng/ml IL-1 β 处理组和100 ng/ml IL-1 β 处理组。与对照组相比较, $^*P<0.05$; 与B组相比较, $^{\#}P<0.05$; 与C组相比较, $^{\&}P<0.05$ 。以GAPDH灰度值为内对照, 相对GAPDH计算各组c-myc蛋白相对含量 图3 不同浓度IL-1 β 处理12 h后各组软骨细胞凋亡情况。A、B、C和D分别代表对照组、1 ng/ml IL-1 β 处理组、10 ng/ml IL-1 β 处理组和100 ng/ml IL-1 β 处理组

细胞的生长, 并且呈剂量效应关系, 但有关 IL-1 β 诱导体外培养小鼠的软骨细胞凋亡, 应用流式细胞仪的方法进行检测的研究尚未见报道。实验结果显示, 正常对照组透明软骨细胞仅可见少量的凋亡细胞, 而实验组 IL-1 β 1、10、100 ng/ml 作用后凋亡细胞表达逐渐增多, 提示了 IL-1 β 与 c-myc 表达之间的剂量一致关系, 进一步证实了 IL-1 β 可以通过细胞凋亡机制对软骨细胞产生影响, 但其对软骨细胞凋亡的具体作用以及离体培养细胞环境与体内环境之间存在差异对于实验结果的影响, 有待进一步研究。软骨组织的正常代谢凋亡的发生, 依赖于癌基因之间的平衡。因此, 相关的研究有待于进一步探讨, 了解细胞凋亡相关基因参与凋亡过程的机制, 找到相应的控制方法, 将对于我们更好地预防、治疗骨关节炎产生积极影响。本实验中通过 Western blot 及流式细胞仪分析中均有 c-myc 蛋白的阳性表达, 并且存在一定的剂量依赖关系。至于是何种

诱导凋亡的信号和 c-myc 协同导致细胞凋亡还需进一步实验研究。

参考文献

- [1] 代康, 焦凯, 王美青. 细胞因子在骨关节炎软骨病变中的作用. 国际口腔医学杂志, 2012, 39: 491-493.
- [2] Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. J Cell Physiol, 2007, 213: 626-634.
- [3] Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: Prostaglandins and nitric oxide. Clin Orthop Relat Res, 2004 (427 Suppl): S37-S46.
- [4] Schuenrwegh AJ, Dombrecht E, Stevens WJ, et al. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11: 681-687.
- [5] 沈建国. 关节软骨损伤早期的分子生物学诊断. 医学研究生学报, 2010, 23: 1324-1327.
- [6] 许鹏, 靳卫章, 郭雄. 骨关节炎关节软骨细胞凋亡的研究进展. 实用老年医学, 1999, 13: 312-313.
- [7] Yatsugi N, Tsukazaki T, Osaki M, et al. Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with

- degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *J Orthop Sci*, 2000, 5: 150-156.
- [8] 胡炯, 李笑颜, 邓廉夫, 等. 人正常软骨细胞和骨性关节炎软骨细胞体外培养对照研究. *中国中医骨伤科杂志*, 2010, 18: 8-12.
- [9] Singh R, Ahmed S, Malemud CJ, et al. Epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits interleukin-1 β -induced activation of mitogen activated protein kinase subgroup c-Jun N-terminal kinase in human osteoarthritis chondrocytes. *J Orthop Res*, 2003, 21: 102-109.
- [10] Im HJ, Pacione C, Chubinskaya S, et al. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment and interleukin-1 β stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. *J Biol Chem*, 2003, 278: 25386-25394.
- [11] Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, et al. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1997, 40: 1749-1755.
- [12] Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV. Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol*, 2001, 28: 2509.
- [13] James LC, Collins A, John MK, et al. Effects of human recombinant interleukin-1 β on canine articular chondrocytes in three-dimensional culture. *AJVR*, 2000, 60: 766-770.
- [14] Boxer LM, Dang CV. Translocations involving C-myc and C-myc function. *Oncogene*, 2001, 20: 5595.
- [15] Ohmori Y, Tanabe J, Takada S, et al. Functional domains of c-myc involved in the commitment and differentiation of murine erythroleukemia cell. *Oncogene*, 1993, 8: 379-386.
- [16] Davenport-Goodall CL, Boston RC, Kichadson DW. Effects of insulin-like growth factor-II on the mitogenic and metabolic activities of equine articular cartilage with and without interleukin 1- β . *Am J Vet Res*, 2004, 65: 238-244.
- (收稿日期: 2013-11-22)
(本文编辑: 戚红丹)

王宁, 龙迪, 孟晓娜. IL-1 β 对小鼠软骨细胞中 c-myc 蛋白表达的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (24): 11486-11490.

