

· 基础研究 ·

治疗型关节炎护膝对实验性骨关节炎软骨细胞凋亡基因 Bcl-2 及 p53 的影响

林木南¹, 刘献祥², 王水良¹, 兰凤华¹, 李西海², 刘建华¹

(1. 南京军区福州总医院, 福建 福州 350025; 2 福建中医学院)

【摘要】 目的: 通过检测 OA 护膝对日本大耳白兔膝骨性关节炎软骨细胞凋亡基因 Bcl-2、p53 mRNA 表达的影响, 探讨 OA 护膝防治兔膝骨性关节炎软骨细胞凋亡的分子生物学机制。**方法:** 健康 6 月龄日本大耳白兔 54 只, 雌雄各半, 空腹体重 2~2.2 kg, 采用改良 Hulth 法复制膝骨性关节炎模型, 随机分为 6 组, 即正常组、模型组、对照组(微波组)、实验 1 组(电组)、实验 2 组(热组)、实验 3 组(护膝组)。正常组 10 只, 常规饲养; 模型组 9 只, 造模后常规饲养; 对照组 9 只, 微波仪治疗 30 min, 每日 1 次; 实验 1 组 9 只, 电(疏密波)治疗 30 min, 每日 1 次; 实验 2 组 8 只, 热(热软膜)治疗 30 min, 每日 1 次; 实验 3 组 9 只, 电热(OA 护膝)治疗 30 min, 每日 1 次, 连续治疗 16 周时处死。采用荧光定量 RT-PCR 法检测各组膝关节软骨细胞 Bcl-2、p53 mRNA 的表达水平。**结果:** 16 周时, 各组所有抽提的兔关节软骨组织总 RNA 的 OD260/OD280 值均在 1.80~2.00 范围内, 表明 RNA 纯度高。模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组关节软骨细胞 p53 的 mRNA 相对呈高表达, 而关节软骨细胞 Bcl-2 的 mRNA 相对低表达, 与正常组差异有统计学意义($P < 0.01$)。关节软骨细胞 Bcl-2、p53 的 mRNA 相对表达水平, 对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组与模型组差异有统计学意义($P < 0.01$); 对照组、实验 1 组、实验 2 组与实验 3 组差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:** OA 护膝能提高关节软骨细胞 Bcl-2 mRNA 表达, 减弱软骨细胞 p53 mRNA 表达, 从而抑制软骨细胞凋亡, 延缓膝关节软骨的退变。

【关键词】 骨关节炎; 膝; 软骨细胞; 细胞凋亡; 电热针; 动物实验

Effect of OA kneepad on Apoptosis Genes Bcl-2 and p53 expression in articular cartilage cells of experimental knee osteoarthritis LIN Mu-nan, LIU Xian-xiang*, WANG Shui-liang, LAN Feng-hua, LI Xi-hai, LIU Jian-hua. *The Fujian Medical College of TCM, Fuzhou 350025, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To study the effects of kneepad on expression of Bcl-2 and p53 mRNA of chondrocyte in white rabbits with knee osteoarthritis, so as to explore and treatment mechanism of OA kneepad on apoptosis of chondrocytes of rabbits with knee osteoarthritis in molecular degree. **Methods:** Forty-four Japanese healthy 6-month-old rabbits (equal male and female, the weight ranging from 2 to 2.2 kg) were used to establish knee osteoarthritis models by modified Hulth method. The rabbits were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, control group (microwave), experimental group 1 (electricity), experimental group 2 (thermal), experimental group 3 (kneepad). Ten rabbits in the normal group were breed with conventional method; 9 rabbits in the model group were breed with conventional method after model made; 9 rabbits in the control group were treated with microwave for 30 minutes, one time daily; 9 rabbits in the experimental group 1 were treated with electricity (density wave) for 30 minutes, one time daily; 8 rabbits in the experimental group 2 were treated with hot (hot soft membrane) for 30 minutes, one time daily; 9 rabbits in the experiment group 3 were treated with electrothermal (OA kneepad) for 30 minutes, one time daily. All the rabbits were treated for 16 weeks and then sacrificed. The expressions of Bcl-2 and p53 mRNA of chondrocytes in knee joint were detected by using fluorescence quantitative RT-PCR method. **Results:** At the 16th week, the OD260/OD280 value range of total RNA extracted from rabbit articular cartilage tissue in each group were all at 1.80 to 2.00, which indicates high RNA purity. The p53 relative mRNA in articular cartilage cells of model group, the control group, the experimental group 1, group 2, group 3 were overexpressed, and Bcl-2 mRNA expression levels of articular cartilage cells were low expression, and compared with the normal group there were significant differences ($P < 0.01$). Bcl-2, p53 mRNA expression in articular cartilage cells, there were significant differences ($P < 0.01$) between the control group, experimental

基金项目: 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室开放课题 (编号: 2008J1004-57), 福建省中医药科研重点课题 (编号: WZ-ZG0601)

通讯作者: 刘献祥 Tel: 0591-22861988 E-mail: liuxianxiang@163.com

group 1, group 2, group 3 and model group. The results between the control group, experimental group 1, group 2 and group 3 had significant differences ($P < 0.01$). **Conclusion:** OA-kneepad can up-regulate the mRNA expression of Bcl-2 as well as down-regulate the mRNA expression of p53, thereby to inhibit the apoptosis of cartilage cells and delay the degeneration of articular cartilage changes.

Key words Osteoarthritis, knee; Chondrocytes; Apoptosis; Electroacupuncture, thermal; Animal experimentation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(9):688-691 www.zggszz.com

研究表明影响关节软骨细胞凋亡调控基因有 Bcl-2、Bax、p53、cmyc、Caspase-3、Fas 等，其中 Bcl-2、p53 在关节软骨细胞凋亡中发挥了重要作用^[1-2]。本实验通过观察治疗型关节炎护膝（简称 OA 护膝）对兔膝骨性关节炎（osteoarthritis, OA）软骨细胞凋亡调控基因 Bcl-2 及 p53 的影响来探讨延缓软骨退变的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 取健康 6 月龄日本大耳白兔 54 只，雌雄各半，空腹体重 2~2.2 kg，由无锡市惠山江南动物实验中心提供，合格证书：SCXK(苏)2002-0006。

1.2 主要仪器设备 PE 2400 PCR 扩增仪, Perkin-Elmer 公司生产。荧光定量 PCR 仪 (iCycler iQ[®] Multicolor Real-Time PCR Detection System), BIO-RAD 公司生产。Fluor-S 凝胶成像系统 (Fluor-S[™] Multi-Imager), BIO-RAD 公司生产。冷冻高速离心机 (TGL-18R), 珠海黑马 (Hema) 医学仪器公司生产。微量核酸-蛋白定量仪 (Bio-Photometer), Eppendorf 公司生产。台式高速离心机 (TGL-16B 型), 上海安亭科学仪器厂生产。MDT-380AT 型超低温冰箱, 日本三洋公司生产。

1.3 主要试剂 RNA later[™] 购自 QIAGEN 公司。DEPC 试剂, 泰京公司提供。RNA 抽提 TRIzol 试剂, Invitrogen 公司提供。Reverse Transcription System 逆转录试剂盒, Promega 公司提供。DNA 分子量 Marker、PCR 试剂盒, TaKaRa 公司提供。SYBR Premix Ex Taq[™] 荧光定量 PCR 试剂, TaKaRa 公司提供。兔 β-Actin、Bcl-2 和 p53 基因 cDNA 引物, 上海生工生物工程公司合成。兔软骨组织取自不同实验组的兔关节。

1.4 动物分组及实验方法

1.4.1 动物分组及处理方法 将所有动物精确称重后按抽签法随机分为 2 组: 正常组 (10 只) 和手术组 (44 只)。采用改良 Hulth 法造模^[3], 取兔膝关节内侧入路, 切断内侧副韧带, 摘除内侧半月板, 切断前交叉韧带。术后连续 3 d 青霉素 20 万 U 肌注, 每日 2 次。术后将手术组按抽签法随机分为 5 组, 即: 模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组, 共 6 组。正常组 10 只, 未造模, 常规饲养, 未行治疗; 模型组 9 只, 造模后常规饲养, 未行治疗; 对照组 9 只, 微波仪治疗, 每日 1 次, 每次 30 min; 实验 1 组 9 只, 电 (疏密波) 治疗, 每日 1 次, 每次 30 min; 实验 2 组 8 只, 热 (热软膜) 治疗, 每日 1 次, 每次 30 min; 实验 3 组 9 只, 电热 (OA 护膝) 治疗, 每日 1 次, 每次 30 min。采用一笼一兔喂养, 自 7 d 后开始每日强迫兔活动 30 min, 连续 16 周。

1.4.2 兔关节软骨组织取材及保存 麻醉成功后, 打开术侧膝关节腔, 用锐利手术刀从股骨内髁负重面及胫骨平台内侧面切取关节软骨标本, 注意保护好关节软骨的完整性。兔软骨组织离体后, 剪碎并立即置入含 RNA later[™] 试剂的 Eppendorf (Ep) 管中, 使软骨组织充分浸泡后, 4 °C 冰箱保存过夜再移

入 -20 °C 冰箱长期保存。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 兔关节软骨组织总 RNA 抽提 依 TRIzol 试剂操作说明进行。取适量 RNA later[™] 试剂保存的兔软骨组织, 置入匀浆器中充分研磨后, 加入 1 ml TRIzol 再稍微匀浆并转移至 1.5 ml Ep 管中, 室温静置 5 min; 每管加氯仿 200 μl, 激烈混匀后静置分层, 4 °C 12 000 r pm 离心 15 min; 转移上清至一新 1.5 ml Ep 管, 加 500 μl 异丙醇室温沉淀 10 min, 4 °C 12 000 r pm 离心 10 min; 75% 乙醇 (DEPC 水配制) 洗沉淀 1 次, 风干, 溶于适量无 RNA 酶水中。每一 RNA 样品取适量紫外分光光度计定量, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 其余 -80 °C 保存待用。

1.5.2 cDNA 合成 用 Promega 公司的 “Reverse Transcription System” 从总 RNA 中逆转录合成 cDNA。每样品约 1 μg RNA 于 70 °C 预变性 10 min; 冰上骤冷后加 10× 逆转录缓冲液 2 μl, 1 μl OligodT (0.5 μg/μl), 25 mM MgCl₂ 4 μl, 10 mM dNTP 2 μl, RNasin 0.5 μl (40 U/μl), AMV 0.6 μl (25 U/μl), 无 RNA 酶水补至总体积 20 μl, 42 °C 反应 60 min, 95 °C 灭活 5 min, 冰上骤冷, 置 -20 °C 冰箱保存。

1.5.3 常规 PCR 扩增 取逆转录产物 3 μl, 置 0.2 ml Ep 管中, 分别加入 10×PCR 缓冲液 5 μl, 2 mM dNTP 2.5 μl, 兔内对照 rbActin 基因 cDNA 上、下游引物 (rbActin1 和 rbActin1) 各 0.25 μl (浓度 10 mM), rbBcl-2 基因 cDNA 上、下游引物 (rbBcl-2-1 和 rbBcl-2-2) 各 0.5 μl (浓度 10 mM), rTaq 酶 1.25 U, 加 ddH₂O 至终体积 25 μl, 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环。最后 72 °C 再延伸 5 min, 10 μl 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, Bio-Rad 公司 Fluor-S 凝胶成像系统拍照。rbp53 基因 cDNA 扩增体系和循环条件同上。兔内对照 rbActin、rbBcl-2 和 rbp53 基因全部 PCR 引物序列及扩增片段大小见表 1。

1.5.4 兔 rbActin、rbBcl-2 和 rbp53 cDNA 的荧光定量 PCR 标准曲线的制备 采用 TaKaRa 公司的 SYBR[®] Premix Ex-Taq[™] 荧光定量 PCR 试剂盒, 取同一 cDNA 样品, 分别作 1/8、1/4、1/2 和 1 的 4 个稀释度, 并将其同一基因的理论拷贝数视为 1、2、4 和 8。荧光定量 PCR 反应体系如下:

2×SYBR Mixture	12.5 μl
混合上下游引物 (10 μM)	0.5 μl
cDNA	1.0 μl
ddH ₂ O	11 μl
	共 25 μl

荧光定量 PCR 循环条件均为: 95 °C 10 s, 95 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s 的条件下循环 40 次。

1.5.5 各实验组 rbBcl-2 和 rbp53 mRNA 相对表达水平的荧光定量 RT-PCR 实时荧光定量 RT-PCR 反应体系同 1.5.4,

表 1 兔 rbActin、rbBcl-2 和 rbp53 基因 RT-PCR 引物
Tab.1 rbActin, rbBcl-2 and rbp53 gene RT-PCR primer of rabbit

引物名称	引物序列 5'→3'	扩增片段(bp)	参考基因(GenBank No.)
rbActin1:	5'-CCGCGCTCGTCTCGACAAC-3'	184	AF404278
rbActin2:	5'-AGGGTGAGGATGCCTCTCTT-3'		
rbBcl-2-1:	5'-AAGCTGTACAGAGGGGCTA-3'	256	DQ529234
rbBcl-2-2:	5'-GACGGTAGCGACGAGAGAAG-3'		
rbp53-1:	5'-CCTCACCATCATCACACTGG-3'	281	X90592
rbp53-2:	5'-GCTCTCGGAACATCTCGAAC-3'		

反应条件均为:95 ℃ 10 s,95 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s 的条件下循环 40 次后,再行溶解曲线分析以确认 PCR 扩增的特异性。每一实验重复 3 次,每次做 3 个重复孔,取各次实验的 $\bar{x} \pm s$ 为计算基因相对表达量的 Ct 值,并以 *t* 检验行差异显著性分析。基因表达的相对定量方法为:以 rbActin 基因 mRNA 的表达为内参照,每一处理组 6 份标本,首先依据公式 $\Delta Ct = Ct_{\text{靶基因}} - Ct_{\text{rbActin}}$, 分别计算各实验组和对照组中每一份标本各靶基因的 ΔCt 。

1.6 统计学分析 各项检测指标采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,定量资料采用方差分析与 SNK 法,应用 SPSS 11.0 for Window 软件包进行统计学处理。

2 结果

2.1 兔关节软骨组织总 RNA 鉴定 见图 1。所有抽提的兔关节软骨组织总 RNA 经微量核酸-蛋白定量仪定量,且 OD260/OD280 值均在 1.80~2.00 范围内,表明 RNA 纯度高,无蛋白和 DNA 污染。1%琼脂糖凝胶电泳的结果(部分如图 1)显示,各样品 28 s 和 18 s 条带清晰,表明总 RNA 完整性较好,可用于后续的实验。

2.2 各组兔关节软骨组织中 Bcl-2 和 p53 mRNA 表达的常

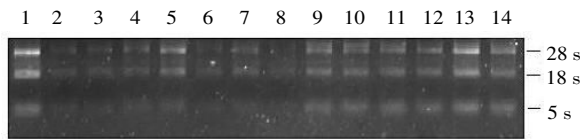


图 1 兔关节软骨组织总 RNA 1%琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.1 Results of 1% agarose gel electrophoresis of total RNA in cartilage tissue of rabbit articular cartilage

规 RT-PCR 分析 各组与正常组和模型组兔关节软骨组织总 RNA 逆转录后,经 Bcl-2 和 p53 基因 cDNA 特异引物扩增,RT-PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳结果如图 2-3 所示。各组兔关节软骨组织中 Bcl-2 基因的 mRNA 的表达水平从高到低依次为:正常组>实验 3 组>实验 2 组、实验 1 组、对照组>模型组。但对照组、实验 1 组、实验 2 组的 Bcl-2 基因 mRNA 的表达水平无明显差异。而 p53 基因 mRNA 的表达水平从高到低依次为:模型组>对照组、实验 1 组、实验 2 组>实验 3 组>正常组。但对照组、实验 1 组、实验 2 组的 p53 基因 mRNA 的表达水平无明显差异。

2.3 各组兔关节软骨组织中 Bcl-2 和 p53 mRNA 相对表达水平的荧光定量 RT-PCR 分析 见表 2。

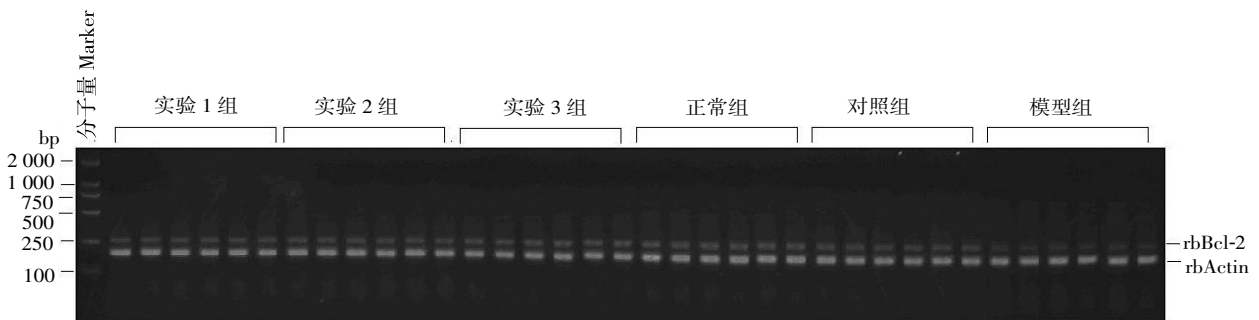


图 2 Bcl-2 mRNA 表达的常规 RT-PCR 分析
Fig.2 Routine RT-PCR analysis of Bcl-2 mRNA expression

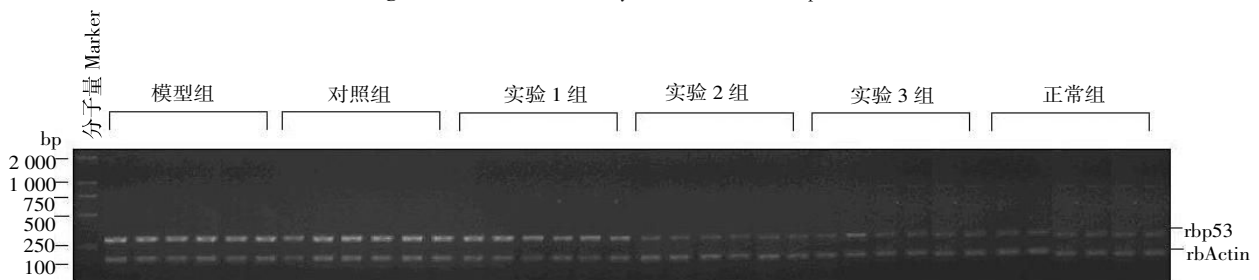


图 3 p53 mRNA 表达的常规 RT-PCR 分析
Fig.3 Routine RT-PCR analysis of p53 mRNA expression

表 2 各组 Bcl-2 和 p53 mRNA 相对表达水平的荧光定量 RT-PCR 的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of fluorescent quantitative RT-PCR of Bcl-2 and p53 mRNA relative expression among six groups

组别	标本数	Bcl-2	p53
正常组	6	4.61±0.12	1.93±0.14
模型组	6	1.37±0.11	5.61±0.18
对照组	6	2.94±0.12	4.37±0.11
实验 1 组	6	2.81±0.07	4.25±0.15
实验 2 组	6	2.78±0.10	4.06±0.12
实验 3 组	6	3.50±0.14	3.11±0.13

注: Bcl-2, 与正常组比较, 模型组 $Q=71.19, P<0.01$; 对照组 $Q=36.70, P<0.01$; 实验 1 组 $Q=39.55, P<0.01$; 实验 2 组 $Q=40.21, P<0.01$; 实验 3 组 $Q=24.39, P<0.01$ 。与模型组比较, 对照组 $Q=34.50, P<0.01$; 实验 1 组 $Q=31.64, P<0.01$; 实验 2 组 $Q=30.98, P<0.01$; 实验 3 组 $Q=46.80, P<0.01$ 。与实验 3 组比较, 实验 1 组 $Q=15.16, P<0.01$; 实验 2 组 $Q=15.82, P<0.01$ 。p53, 与正常组比较, 模型组 $Q=63.59, P<0.01$; 对照组 $Q=42.16, P<0.01$; 实验 1 组 $Q=40.09, P<0.01$; 实验 2 组 $Q=36.81, P<0.01$; 实验 3 组 $Q=20.39, P<0.01$ 。与模型组比较, 对照组 $Q=21.43, P<0.01$; 实验 1 组 $Q=23.50, P<0.01$; 实验 2 组 $Q=26.78, P<0.01$; 实验 3 组 $Q=43.20, P<0.01$ 。与实验 3 组比较, 实验 1 组 $Q=19.70, P<0.01$; 实验 2 组 $Q=16.42, P<0.01$ 。

Note: Bcl-2, compared to the normal group, model group, $Q=71.19, P<0.01$; control group, $Q=36.70, P<0.01$; experiment group 1, $Q=39.55, P<0.01$; experiment group 2, $Q=40.21, P<0.01$; experiment group 3, $Q=24.39, P<0.01$. Compared to model group, control group, $Q=34.50, P<0.01$; experiment group 1, $Q=31.64, P<0.01$; experiment group 2, $Q=30.98, P<0.01$; experiment group 3, $Q=46.80, P<0.01$. Compared to the experimental group 3, experimental group 1, $Q=15.16, P<0.01$; experimental group 2, $Q=15.82, P<0.01$. p53, compared to the normal group, model group, $Q=63.59, P<0.01$; control group, $Q=42.16, P<0.01$; experiment group 1, $Q=40.09, P<0.01$; experiment group 2, $Q=36.81, P<0.01$; experiment group 3, $Q=20.39, P<0.01$. Compared to model group, control group, $Q=21.43, P<0.01$; experiment group 1, $Q=23.50, P<0.01$; experiment group 2, $Q=26.78, P<0.01$; experiment group 3, $Q=43.20, P<0.01$. Compared to experimental group 3, experimental group 1, $Q=19.70, P<0.01$; experimental group 2, $Q=16.42, P<0.01$ 。

表 2 荧光定量 RT-PCR 的结果显示: 各实验组关节软骨组织中 Bcl-2 基因 mRNA 的相对表达水平与正常组和模型组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$); 实验 3 组关节软骨组织中 Bcl-2 基因 mRNA 的相对表达水平与模型组、对照组、实验 1 组和实验 2 组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

正常组的 p53 基因 mRNA 相对表达水平与其余各组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$); 模型组的 p53 基因 mRNA 相对表达水平与其余各组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$); 实验 3 组的 p53 基因 mRNA 相对表达水平与模型组、对照组、实验 1 组和实验 2 组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

上述实验结果揭示了 Bcl-2 与 OA 中软骨细胞凋亡呈负相关, 而 p53 为正相关。同时也说明了护膝组与微波组均能有效抑制软骨细胞凋亡, 从而延缓骨性关节炎病理过程进展, 但护膝组作用更强。结果表明 OA 护膝组疗效明显优于其余各组。

3 讨论

既往对 OA 的研究, 大多数着重于细胞外基质酶性降解和(或)合成新的基质受到抑制而导致软骨的破坏, 很少注重软骨细胞生存或死亡在 OA 关节软骨降解中所起的作用。近年来, 国内外许多学者对 OA 关节软骨组织学研究发现有软骨细胞减少, 而软骨细胞凋亡在其中起到关键作用^[4-6]。

Bcl-2 具有抑制细胞凋亡和延长细胞寿命的功能, 而 p53 可提供限制细胞生长和导致细胞凋亡的关键信号^[7-8]。实验结果表明: 模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组和正常组的 Bcl-2 mRNA 相对表达水平有逐渐增强的趋势, 而 p53 mRNA 相对表达水平有逐渐减弱的趋势, 其中 OA 护膝组表达较为明显, 较造模组有明显差异。实验结果揭示了 Bcl-2、p53 在关节软骨细胞凋亡中发挥了重要作用。

从常规 RT-PCR 及荧光定量 RT-PCR 结果可知: OA 护膝可上调关节软骨细胞 Bcl-2 mRNA 表达, 下调软骨细胞 p53 mRNA 表达, 从而抑制软骨细胞凋亡, 延缓膝骨性关节炎关节软骨细胞及软骨基质的退变。

参考文献

- [1] Iannone F, De Bari C, Scioscia C, et al. Increased Bcl-2/p53 ratio in human osteoarthritic cartilage: a possible role in regulation of chondrocyte metabolism. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(2): 217-221.
- [2] Ruiz-Romero C, López Armada MJ, Blanco FJ. Mitochondrial proteomic characterization of human normal articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(6): 507-518.
- [3] 刘献祥, 李西海, 周江涛. 改良 Hulth 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25(12): 1104-1108.
- [4] Johnson EO, Charchandi A, Babis GC, et al. Apoptosis in osteoarthritis: morphology, mechanisms, and potential means for therapeutic intervention. *J Surg Orthop Adv*, 2008, 17(3): 147-152.
- [5] Lee SW, Song YS, Shin SH, et al. Cilostazol protects rat chondrocytes against nitric oxide-induced apoptosis in vitro and prevents cartilage destruction in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(3): 790-800.
- [6] Pennock AT, Robertson CM, Emmerson BC, et al. Role of apoptotic and matrix-degrading genes in articular cartilage and meniscus of mature and aged rabbits during development of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(5): 1529-1536.
- [7] Okazaki R, Sakai A, Ootsuyama A, et al. Apoptosis and p53 expression in chondrocytes relate to degeneration in articular cartilage of immobilized knee joints. *J Rheumatol*, 2003, 30(3): 559-566.
- [8] Oshima Y, Akiyama T, Hikita A, et al. Pivotal role of Bcl-2 family proteins in the regulation of chondrocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 2008, 283(39): 26499-26508.

(收稿日期: 2009-03-17 本文编辑: 连智华)