

# TRPV4 影响软骨细胞退变的初步研究

沈雪<sup>1</sup>, 张琥<sup>1</sup>, 陈德塔<sup>2</sup>, 曹月龙<sup>1</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属市中医院, 上海 200071)

**【摘要】** 目的: 探讨并验证瞬时受体电位香草素受体 4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 影响软骨细胞的退变。方法: 取新生 SD 大鼠软骨细胞, 甲苯胺蓝染色和阿利新蓝染色鉴定; 通过白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 构建体外软骨细胞炎症模型, 采用 TRPV4 抑制剂处理炎症条件下软骨细胞, 经荧光定量 PCR(real-time PCR, PCR) 法检测软骨细胞中 TRPV4、基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)、血小板反应蛋白整合素金属蛋白酶-5(A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5, ADAMTS-5)、一氧化氮合酶 2(nitric oxide synthase 2, NOS2)、II 型胶原  $\alpha$ 1(collagen, type II,  $\alpha$ 1, Col2 $\alpha$ 1) 和软骨蛋白聚糖 (aggrecan, Acan)mRNA; 通过 TRPV4 不同浓度过表达质粒处理原代软骨细胞, 筛选最佳过表达剂量, 并经 RT-PCR 法检测最佳 TRPV4 过表达剂量下软骨细胞中 TRPV4、MMP-13、ADAMTS-5、NOS2、Col2 $\alpha$ 1、Acan mRNA 表达情况。结果: 甲苯胺蓝染色和阿利新蓝染色鉴定提取细胞为原代软骨细胞。RT-PCR 显示, 经 TRPV4 抑制剂处理后炎症条件下软骨细胞中 TRPV4、MMP-13、ADAMTS-5、NOS2 mRNA 的表达明显下降 ( $P < 0.05$ ), Col2 $\alpha$ 1 mRNA、Acan mRNA 的表达升高 ( $P < 0.05$ ); 经 0.8 ng $\cdot\mu$ l<sup>-1</sup> TRPV4 过表达质粒处理的软骨细胞中 Col2 $\alpha$ 1、Acan mRNA 表达情况明显下降 ( $P < 0.05$ ), NOS2 mRNA 的表达升高 ( $P < 0.05$ ), MMP-13、ADAMTS-5 mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 抑制 TRPV4 的表达能下调软骨细胞退变相关基因表达。

**【关键词】** 膝骨关节炎; 软骨退变; TRPV4

中图分类号: R684.3

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2023.10.015

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Preliminary study of TRPV4 affects chondrocyte degeneration

SHEN Xue<sup>1</sup>, ZHANG Hu<sup>1</sup>, CHEN De-ta<sup>2</sup>, CAO Yue-long<sup>1</sup> (1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT Objective** To explore and verify that transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) affects chondrocyte degeneration. **Method** Neonatal SD rats were selected, primary chondrocytes were extracted, and identified by toluidine blue staining and alcian blue staining; an in vitro chondrocyte inflammation model was constructed by IL-1 $\beta$ , and TRPV4 inhibitor was used to treat chondrocytes under inflammatory conditions, and the chondrocytes were treated by RT-PCR method was used to detect matrix metalloproteinase 13 (MMP-13), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5, (ADAMTS-5), nitric oxide synthase 2 (NOS2), Collagen, type II  $\alpha$ 1 (Col2 $\alpha$ 1) and aggrecan (Acan) mRNA in chondrocytes; primary chondrocytes were treated with different concentrations of TRPV4 overexpression plasmid, and the optimal overexpression dose was screened. The mRNA expressions of TRPV4, MMP-13, ADAMTS-5, NOS2, Col2 $\alpha$ 1 and Acan in chondrocytes under the optimal TRPV4 overexpression dose were detected. **Results** Toluidine blue staining and Alcian blue staining identified the extracted cells as primary chondrocytes; RT-PCR showed that TRPV4, MMP-13, ADAMTS-5, NOS2 mRNA in chondrocytes treated with TRPV4 inhibitor under inflammatory conditions. The expression of Col2 $\alpha$ 1 mRNA was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression of Col2 $\alpha$ 1 mRNA was increased ( $P < 0.05$ ). Although there was no significant difference in the expression of Acan mRNA, the overall trend was also increasing. The expression of Col2 $\alpha$ 1 and Acan mRNA in chondrocytes was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression of NOS2 mRNA was increased ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference in MMP-13 and ADAMTS-5 ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Inhibiting the expression of TRPV4 can down-regulate the expression of genes related to chondrocyte degeneration.

**KEYWORDS** Knee osteoarthritis; Cartilage degeneration; TRPV4

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81373665); 国家自然科学基金资助项目(编号: 81973874); 上海市慢性筋骨病临床医学研究中心(编号: 20MC1920600)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No.81373665)

通讯作者: 曹月龙 E-mail: ningtcm@126.com

Corresponding author: CAO Yue-long E-mail: ningtcm@126.com

膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是目前全球范围内致残率、致畸率较高的进行性慢性关节疾病之一,主要以软骨细胞减少、关节基质破坏降解为特征<sup>[1]</sup>。瞬时受体电位香草素受体 4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)是瞬时感受器电位离子通道香草酸受体亚家族成员,在软骨、骨和滑膜等多种肌肉骨骼组织中高度表达<sup>[2]</sup>。并且 TRPV4 可介导炎症性细胞因子,例如白介素-1(interleukin-1, IL-1)或肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及其下游效应物,引起的关节软骨退变导致的软骨细胞外基质降解<sup>[3]</sup>。本研究为了明确 TRPV4 与软骨退变之间的联系,利用过表达质粒技术以及抑制剂技术,通过过表达和抑制表达 2 个层面双向验证 TRPV4 与软骨细胞退变之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

重组大鼠白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )蛋白(R&D 公司,美国),达尔伯克改良伊格勒培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)(Gibco 公司,美国),10%胎牛血清(Gibco 公司,美国),双抗(Gibco 公司,美国),0.25%胰酶(Gibco 公司,美国),胶原酶 II 型(DIYIBIO 公司,中国),磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(Corning 公司,美国),Trizol(ambion 公司,美国),逆转录酶(Takara 公司,日本),扩增酶(Takara 公司,日本),TRPV4 抑制剂(Selleck 公司,美国),TRPV4 过表达质粒(上海捷瑞生物,中国)。

### 1.2 细胞培养及分组

**1.2.1 原代软骨细胞提取及培养** 选取新生 SD 大鼠 [购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(沪)2018-0006] 放置 75%乙醇中浸泡 10 min,分离膝关节处未骨化的透明软骨。用刀片剔除周围组织,钝性分离软骨后,放入含有 1%链霉素和青霉素的 PBS 缓冲液培养皿中。待全部透明软骨收集完毕后,剔除残余的软组织,转移至新的培养皿中,用含有 1%链霉素和青霉素 PBS 缓冲液清洗 3 遍。将洗净的软骨块移入新的培养皿中,用刀片将软骨块切碎,随之加入 5 ml 含 0.2% II 型胶原酶的 PBS 中,并转移至 15 ml 离心管中。用 1.5 ml 巴士吸管进行充分吹打混匀后,置于 37 °C 摇床中孵育 3~4 h,期间每间隔 1 h 使用巴士吸管进行吹打 1 次。等待离心管中细胞呈现絮状物样,无明显大块组织漂浮,提示消化完毕,提取液体以 1 000 r/min 转速离心 5 min。离心结束后,弃上清,加入 2 ml 含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 对细胞进行重悬处理。将细胞混悬液分至

100 mm 的培养皿中,并置于培养箱中培养(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>),每 2 d 进行 1 次换液,显微镜下观察当细胞长至 80%时,以 1:4 比例进行传代处理。本研究已通过上海中医药大学实验动物福利与伦理委员审查(伦理批号:PZSHUTCM190322003)。

**1.2.2 TRPV4 抑制剂处理软骨细胞** 取 3~5 代软骨细胞以每孔 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞铺板 24 孔板,培养 24 h 贴壁后,待细胞密集度达到 60%以上处理。分别予以 PBS 处理(CON 组),IL-1 $\beta$  (20 ng $\cdot$ ml<sup>-1</sup>) 干预(IL-1 $\beta$  组),IL-1 $\beta$  (20 ng $\cdot$ ml<sup>-1</sup>) 联合 TRPV4 抑制剂(10 nm $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 干预(TRPV4 抑制剂组)。全培养基培养孵育 24 h 后收集细胞。

**1.2.3 TRPV4 质粒转染软骨细胞浓度筛选** 取 3~5 代软骨细胞以每孔 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞铺板 24 孔板,培养 24 h 贴壁后,待细胞密集度达到 60%以上开始转染。分别予以 PBS 处理(Blank 组),TRPV4 过表达质粒联合 Lipo2000 干预(TRPV4 过表达组),单纯 Lipo2000 干预(Lipo 组)。配制质粒液如下,50  $\mu$ l 无血清无双抗培养基+不同体积 TRPV4 质粒,配制浓度为 0.2、0.4、0.8、1.6 ng $\cdot$  $\mu$ l<sup>-1</sup>。配置转染液,50  $\mu$ l 无双抗培养基+1  $\mu$ l Lipo2000 转染剂,室温静置 5 min。将转染液与质粒液混合静置 20 min;弃上清,加入无血清无双抗的细胞培养基,并每孔加入 100  $\mu$ l 混合液,孵育 5 h 后换含血清完全培养基培养,24 h 后收集细胞。

**1.2.4 软骨细胞 TRPV4 过表达质粒处理** 取 3~5 代软骨细胞以每孔 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞铺板 24 孔板,培养 24 h 贴壁后,待细胞密集度达到 60%以上处理。分别予以 PBS 处理(Blank 组),0.8 ng $\cdot$  $\mu$ l<sup>-1</sup> TRPV4 过表达质粒干预(TRPV4 过表达组)。全培养基培养孵育 24 h 后收集细胞。

### 1.3 观察项目与方法

**1.3.1 软骨细胞形态学观察** 选取第 3 代软骨细胞,放置倒置显微镜下观察软骨细胞的形态和生长状况,并使用摄像软件拍下 100 倍下第 3 代软骨细胞形态。

**1.3.2 软骨细胞鉴定** 选取第 3 代软骨细胞,进行甲苯胺蓝染色、阿利新蓝染色,取出培养的软骨细胞,弃旧培养液,并加入 1 ml PBS 洗 2 次,加入浓度为 4%多聚甲醛室温下固定摇晃 1 h 后,弃上液再加入 1 ml PBS 洗 2 次,每次 2 min。分别加入 1%甲苯胺蓝染液和阿利新蓝染液,放置于孵育箱中,37 °C 孵育 2 h,去除染液,加入 1 ml PBS 洗 2 次,每次 2 min,随后放置于倒置显微镜下观察软骨细胞并拍照。

**1.3.3 各组软骨细胞相关基因表达** 观察各组软骨细胞中 TRPV4,基质金属蛋白酶-13(matrix metal-

loptidase 13, MMP-13), 血小板反应蛋白解整合素金属肽酶-5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5, ADAMTS-5), 一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2), II 型胶原  $\alpha 1$  (collagen, type II,  $\alpha 1$ , Col2 $\alpha 1$ ) 和软骨蛋白聚糖 (aggrecan, Acan) mRNA 表达情况。吸弃 6 孔板内旧培养基, 移液枪吸取 1ml PBS 轻轻洗涤细胞 2 次。每孔加入 1 ml Trizol, 提取总 RNA, 保证 RNA 纯度在 1.8~2.1 之间。根据 TAKARA 逆转录试剂盒说明书以 20  $\mu$ l 体系进行逆转录为 cDNA, 并放置 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。根据 TAKARA 荧光定量 PCR 说明书, 使用 Step One Plus 系统进行运行分析, 获取 CT 值, 并使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析基因相对表达量。

**1.3.4 TRPV4 质粒转染浓度筛选** 吸弃 6 孔板内旧培养基, 移液枪吸取 1ml PBS 洗涤细胞 2 次。每孔加入 1 ml Trizol, 提取总 RNA, 保证 RNA 纯度在 1.8~2.1 之间。方法同 1.3.3 TAKARA 逆转录。

**1.3.5 TRPV4 过表达质粒转染后软骨细胞相关基因表达** 吸弃 6 孔板内旧培养基, 移液枪吸取 1 ml PBS 洗涤细胞 2 次。每孔加入 1 ml Trizol, 提取总 RNA, 保证 RNA 纯度在 1.8~2.1 之间。根据 TAKARA 逆转录试剂盒说明书以 20  $\mu$ l 体系进行逆

转录为 cDNA, 并放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。根据 TAKARA 荧光定量 PCR 说明书, 使用 Step One Plus 系统进行运行分析, 获取 CT 值, 并使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析基因相对表达量。引物列表见表 1。

**1.4 统计学处理**

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。所有数据以 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 符合正态分布, 各组软骨细胞内基因表达和 TRPV4 质粒转染梯度浓度筛选数据采用单因素方差分析 (ANOVA), 方差齐采用 LSD 方法检验, 方差不齐则用 Dunnett's T3 方法检验,  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。TRPV4 过表达质粒转染后软骨细胞相关基因表达数据采用两样本  $t$  检验方法, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。不符合正态分布的定性资料采用非参数检验。

**2 结果**

**2.1 软骨细胞形态观察**

在倒置显微镜下观察, 消化分离软骨块所获得的软骨细胞在未贴壁的情况下呈现透亮圆球形, 且细胞处于悬浮状态。放置培养箱中静置培养 1 h 后, 有一小部分细胞贴壁生长, 颜色变暗并呈扁圆形生长 (图 1a); 待细胞培养 24 h 后, 培养皿中的软骨细胞基本都已贴壁, 并呈扁平短梭形、三角形及多角形

表 1 引物序列表

Tab.1 Primer sequence table

基因名称	种属	前引物	后引物
TRPV4	大鼠	CTGAGGGACAAGTGGCGTAAGTTC	ACTGGCTGATAGTAGGCTGTGAGG
MMP-13	大鼠	ATACGAGCATCCATCCCAGACC	AACCGCAGCACTGAGCCTTTTTC
ADAMTS-5	大鼠	TCCTCTTGCTGGCTGACTCTTCC	TGGTCTCGATGCTTGCATGACTG
NOS2	大鼠	GAGACGCACAGGCAGAGGTTG	AGCAGGCACACGCAATGATGG
Col2 $\alpha 1$	大鼠	AGGTGACCGTGTGACAAGG	TTTCTCCACCAAGGCCAGG
Acan	大鼠	GCCTCCCTGATCCACTGTCC	ATGTCAGAGGGCGATGTGGG

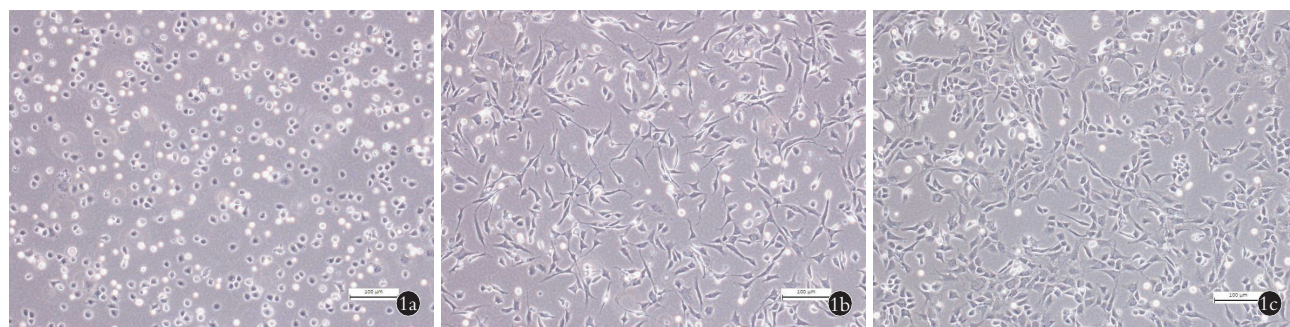


图 1 软骨细胞形态学观察 ( $\times 100$ ) 1a. 原代软骨细胞铺板 1 h 后未贴壁状态下呈扁圆形 1b. 原代软骨细胞铺板 24 h 后贴壁状态下呈扁平短梭形、三角形及多角形等不同形态 1c. 原代软骨细胞铺板 48 h 后贴壁状态下呈典型的“铺路石”状

Fig.1 Morphological observation of chondrocytes 1a. Primary chondrocytes were flat and round under 100  $\times$  times microscope without adhesion for 1 h 1b. primary chondrocytes were flat and short spindle, triangular and polygonal under 100  $\times$  times microscope 24 h after laying 1c. Primary chondrocytes showed typical "paving stone" shape under 100  $\times$  times microscope after 48 h

等不同形态(图 1b);待培养 48 h 后软骨细胞增殖速度加快,已经基本铺满皿底,细胞呈典型的“铺路石”状,细胞形态仍为扁圆形、三角形及多角形等不同形态(图 1c)。提示提取的原代大鼠软骨细胞的细胞活性较好,生长情况稳定,可以用于后续实验。

## 2.2 软骨细胞鉴定

阿利新蓝和甲苯胺蓝染色进行细胞学鉴定。阿利新蓝属于阳离子染料,是显示酸性黏液物质最特异的染料,染料分子中带正电荷的盐键和酸性黏液物质中带负电荷的酸性基团结合而呈蓝色,因软骨细胞内富含酸性黏多糖,所以可用于软骨细胞的鉴定<sup>[4]</sup>。通过对原代细胞阿利新蓝染色,选取第 3 代的原代软骨细胞贴壁培养 24 h 后,细胞均贴壁牢固,后经阿利新蓝染色,在倒置显微镜下观察到细胞核呈深蓝色,胞浆呈浅蓝色,提示所提取的细胞可分泌大量蛋白多糖,并可能是软骨细胞(图 2a)。

甲苯胺蓝染色原理是其除了 2 个发色团,另外含有 2 个助色团,能够促使其染料生成电离成盐类,有助于发色团对其组织的染色力,可染细胞核,让其呈蓝色,甲苯胺蓝法呈强碱性,更利于软骨组织的着色<sup>[5]</sup>。通过对原代细胞甲苯胺蓝染色,选取第 3 代的

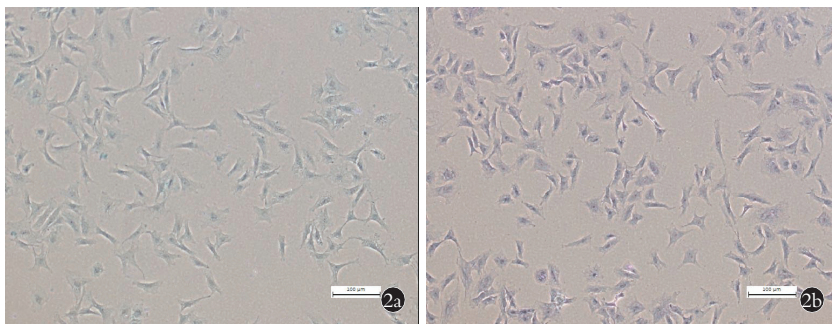


图 2 原代软骨细胞形态学染色鉴定(×100) 2a. 阿利新蓝染色示细胞核呈深蓝色,胞浆呈浅蓝色 2b. 甲苯胺蓝染色示细胞核呈深紫色,胞浆呈浅紫色

Fig.2 Identification of primary chondrocytes by morphological staining 2a. Primary chondrocytes stained with Alcian blue staining had dark blue nucleus and light blue cytoplasm under 100 × magnification 2b. Primary chondrocytes stained with Toluidine blue staining showed dark purple nucleus and light purple cytoplasm under 100 × magnification

原代细胞贴壁培养 24 h 后,原代细胞各部位观察结果同阿利新蓝染色相似,但颜色更深(图 2b),推断所提取软骨块的细胞为原代软骨细胞。

## 2.3 各组软骨细胞相关基因表达情况

与 CON 组比较,IL-1β 组中 Col2α1、Acan mRNA 表达下降 ( $P < 0.05$ ),而 TRPV4、MMP-13、ADAMTS-5、NOS2 mRNA 的表达升高 ( $P < 0.05$ ),提示加入白介素干预软骨细胞后,引起软骨细胞退变。TRPV4 抑制剂组与 IL-1β 组比较,TRPV4、MMP-13、ADAMTS-5、NOS2 mRNA 的表达下降 ( $P < 0.05$ ),Col2α1 mRNA 的表达升高 ( $P = 0.004$ ),Acan mRNA 表达虽然总体下降不明显,但差异仍具有统计学意义 ( $P = 0.046$ )。见表 2。提示在白介素干预下,加入 TRPV4 抑制剂可能对软骨细胞的退变有缓解作用。

## 2.4 TRPV4 质粒转染梯度浓度筛选

将软骨细胞分为空白组(Blank 组),转染试剂组(Lipo 组),0.2、0.4、0.8、1.6  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  TRPV4 质粒组,通过 RT-PCR 检测其中 TRPV4 过表达情况。其中 1.6  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  TRPV4 质粒组因为浓度过高,导致培养的软骨细胞几乎接近凋亡,故检测中排除这一组。TRPV4 表达量分别为:Blank 组  $1.049 \pm 0.147$ ,Lipo 组  $1.213 \pm 0.353$ ,0.2  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  组  $115.259 \pm 50.681$ ,0.4  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  组  $196.306 \pm 26.822$ ,0.8  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  组  $8623.574 \pm 654.294$ 。与 Blank 组比较,0.2、0.4、0.8  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  TRPV4 质粒组中 TRPV4 mRNA 表达均上升 ( $P = 0.008, 0.000, 0.007$ );Lipo 组差异无统计学意义 ( $P = 0.856$ )。而与 Lipo 组比较,0.2、0.4、0.8  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  TRPV4 质粒组中 TRPV4 mRNA 表达均明显上升 ( $P = 0.008, 0.000, 0.007$ )。其中 0.8  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  TRPV4 质粒组促使 TRPV4 过表达程度最高。故选取 0.8  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  TRPV4 质粒组用于后续 PCR 检测。

表 2 各组软骨细胞相关基因表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Comparison of related gene of chondrocytes among groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	孔数	TRPV4	Acan mRNA	ADAMTS-5	Col2α1	MMP-13	NOS2
CON 组	3	1.177±0.746	1.027±0.310	1.102±0.514	1.560±0.196	0.459±0.187	5.309±6.521
IL-1β 组	3	3.237±0.830**	0.314±0.027*	11.915±4.064**	0.896±0.072**	21.681±12.518**	13 189.308±2 658.236**
TRPV4 抑制剂组	3	1.541±0.444##	0.488±0.104#	7.084±1.354#	1.210±0.052##	21.537±8.140##	3 312.426±1 455.800##
F 值		17.075	16.467	52.290	30.027	181.289	61.016
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 CON 组比较,\*\*  $P < 0.01$ ,\*  $P < 0.05$ ;与 IL-1β 组相比较,##  $P < 0.01$ ,#  $P < 0.05$

### 2.5 TRPV4 质粒转染软骨细胞中相关基因表达

与 Blank 组比较,原代软骨细胞中 Col2α1、Acan mRNA 表达下降 ( $P=0.003, 0.009$ )。而 NOS2 mRNA 的表达升高 ( $P=0.000$ ),说明了 TRPV4 可能参与了软骨细胞的损伤,影响软骨细胞退变及功能。而 MMP-13、ADAMTS-5 与 Blank 组比较,差异无统计学意义 ( $P=0.960, 0.080$ )。见表 3。提示在没有白介素干预下,单纯 TRPV4 转染可能并不会引起金属蛋白酶的改变。

### 3 讨论

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是影响中老年健康的常见疾病,OA 的病理学特征主要呈现为慢性持续性的炎症浸润,而长期的炎症浸润容易导致软骨下骨钙化进而促进关节软骨硬化,导致关节活动不利<sup>[6]</sup>。而 OA 的产生,主要是因为关节中滑膜因为长期的炎性浸润导致滑膜增生影响关节正常的功能运动,而长期的炎性反应也会促使软骨的钙化和退变,进而影响整个关节的功能<sup>[6-7]</sup>。而软骨细胞凋亡和细胞外环境改变是导致软骨退变影响 OA 进展最重要的特征性病理改变。研究发现<sup>[8]</sup>,细胞外基质的分解和合成与软骨细胞的增殖与凋亡存在一定的动态平衡关系,炎症反应会导致这种关系平衡被破坏,引起不可修复的关节软骨损伤,引起 OA 症状。所以抑制炎症反应,保护软骨细胞是缓解关节炎进一步发生的解决途径。

#### 3.1 TRPV4 影响关节炎的进展

TRPV4 是瞬时感受器电位离子通道香草酸受体亚家族成员,在软骨、骨和滑膜等多种肌肉骨骼组织中高度表达<sup>[2]</sup>。OA 的产生起始因素是早期促炎细胞因子引起的关节软骨退变导致的软骨细胞外基质降解,并且 TRPV4 可介导炎性细胞因子,例如 IL-1 或 TNF-α 及其下游效应物<sup>[3]</sup>。当细胞外基质降解可造成局部低渗透压微环境<sup>[9]</sup>,低渗透压环境可以快速激活 TRPV4 离子通道,使细胞外钙离子迅速内流,激活细胞内信号通路<sup>[3]</sup>。介导信号通路 NF-κB 的激活,增加白细胞介素等炎性因子的表达,抑制 II 型胶原和蛋白聚糖的生成,进一步加速降解软骨细胞外基质和软骨的损伤破坏,如此形成一个循环,从

而促进关节炎的进展<sup>[10]</sup>。姚旺祥等<sup>[11]</sup>研究表明,膝骨关节炎患者的软骨组织中 TRPV4 蛋白含量与 TRPV4 阳性细胞率显著高于正常软骨组织,提示 TRPV4 表达升高可能与 OA 进展有关。探索 TRPV4 与关节炎的关系显得尤为重要。

#### 3.2 抑制 TRPV4 可以影响软骨细胞炎性条件下相关基因的表达

关节炎发生中炎症因子 IL-1β 被认为是参与 OA 发病机制中 1 个关键的细胞因子,其可单独诱导软骨细胞产生炎症反应和分解代谢细胞外基质的作用,并且也可与其他细胞介质结合,并作用于关节软骨和关节的其他部分,影响关节炎的发生发展<sup>[12-13]</sup>。故本实验选用 IL-1β 作为刺激软骨细胞模拟软骨细胞 OA 环境。而 II 型胶原蛋白和聚蛋白多糖酶是软骨基质中主要成分,其表达和凋亡可以作为反应软骨退变程度的指标,其活性的降低将导致细胞外基质再生紊乱,最终导致软骨退化,也最能代表关节炎发生发展的进程<sup>[14]</sup>,所以通过 RT-PCR 检测 II 型胶原蛋白和聚蛋白多糖酶作为评判软骨细胞生物活性状态的指标,而 MMP-13 和 ADAMTS-5 这两种金属蛋白酶来评判软骨细胞损伤状态,通过检测 NOS2 的表达水平来评判炎症反应的程度。

首先,通过构建原代大鼠软骨细胞,甲苯胺蓝染色及阿利新蓝染色共同鉴定所提取的细胞为软骨细胞。通过 IL-1β 构建了体外关节炎炎症模型,使用炎症因子干预软骨细胞,发现 NOS2、MMP-13、ADAMTS-5 均有所上升,而 Col2α1 和 Acan 表达下降,提示炎症模型构建成功,期间又发现 TRPV4 表达明显上升。猜想是否 TRPV4 与关节炎的发生发展存在一定的关系。于是对于炎症条件下干预的软骨细胞给予 TRPV4 抑制剂,通过 RT-PCR 检测上升相关指标后,发现当 TRPV4 被抑制时,NOS2、MMP-13、ADAMTS-5 也被抑制了,而 Col 2α1 和 Acan 表达上升,提示炎症状态下抑制 TRPV4 可以抑制软骨细胞炎症反应,改善软骨细胞活性。

#### 3.3 单纯过表达 TRPV4 相关基因表达的影响

为了明确 TRPV4 的作用,通过构建过表达质粒,将软骨细胞中 TRPV4 进行过表达,发现 NOS2

表 3 TRPV4 转染后软骨细胞与 Blank 组相关基因表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.3 Comparison of related gene of chondrocytes between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	孔数	Acan mRNA	ADAMTS-5	Col2α1	MMP-13	NOS2 mRNA
Blank 组	3	1.019±0.248	0.744±0.066	1.007±0.140	1.003±0.096	1.073±0.420
TRPV4 转染组	3	0.314±0.062	0.478±0.186	0.196±0.167	0.997±0.162	385.059±43.696
t 值		4.784	2.333	6.457	0.053	-15.220
P 值		0.009	0.080	0.003	0.960	0.000

表达上升,而 Col2 $\alpha$ 1 和 Acan mRNA 表达下降,提示激活 TRPV4 的表达会引起软骨细胞活性下降引发退变。ADAMTS-5 和 MMP-13 表达趋势上升但差异无统计学意义。在炎症条件下,TRPV4 对 ADAMTS-5 和 MMP-13 表达影响较明显。这与张力等<sup>[15]</sup>使用 LPS 诱导人软骨细胞炎症反应后通过使用 TRPV4 抑制剂后发现,MMP-1、MMP-3、MMP-13 表达有所下调一致。但其未补充 TRPV4 过表达后的金属蛋白酶家族基因表达情况,本研究探索了非炎症条件下 TRPV4 过表达对软骨细胞中金属蛋白酶家族的影响,发现单纯过表达 TRPV4 似乎不会对 MMP-13 及 ADAMTS-5 有所影响,具体的深入机制仍需大量实验证实。

综上所述,在关节炎中,软骨细胞经炎症刺激引发的退变可能与 TRPV4 的表达相关,抑制 TRPV4 可以缓解软骨细胞炎症反应,并且缓解软骨细胞退变,这为今后缓解软骨退变提供新的方法。

#### 参考文献

- [1] 戴守达,陈刚,周正顺. 膝骨性关节炎药物治疗进展[J]. 医学综述,2020,26(2):331-335.  
DAI S D, CHEN G, ZHOU Z S. Progress of drug treatment of knee osteoarthritis[J]. Med Recapitul, 2020, 26(2):331-335. Chinese.
- [2] 吴静,程全艺,杨梦成,等. TRPV4 通道及其与疾病关系的研究进展[J]. 生命的化学,2018,38(6):809-814.  
WU J, CHENG Q Y, YANG M C, et al. Research progress of TRPV4 channel and its relationship with diseases[J]. Chem Life, 2018, 38(6):809-814. Chinese.
- [3] MCNULTY A L, LEDDY H A, LIEDTKE W, et al. TRPV4 as a therapeutic target for joint diseases[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2015, 388(4):437-450.
- [4] VINOD E, KACHROO U, AMIRTHAM S M, et al. Comparative analysis of fresh chondrocytes, cultured chondrocytes and chondroprogenitors derived from human articular cartilage[J]. Acta Histochem, 2020, 122(1):151462.
- [5] 管大凡. hBMP2/hVEGF165 双基因腺病毒转染 BMSCs 复合多孔 n-HA/PA66 修复兔桡骨缺损的实验研究[D]. 新乡:新乡医学院,2016.  
GUAN D F. The study of BMSCs transfected by hVEGF165 and hBMP2 double gene adenovirus combined with multihole n-HA/PA66 to repair the radius defect of rabbit[D]. Xinxiang: Xinxiang Medical University, 2016. Chinese.
- [6] 刘韦,张勇,耿德春,等. 酪氨酸激酶抑制剂化合物干预胶原诱导关节炎模型炎症细胞浸润及软骨破坏[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(24):3783-3787.  
LIU W, ZHANG Y, GENG D C, et al. Intervention of inflammatory cell infiltration and cartilage destruction of the knee joints in mouse models of collagen-induced arthritis by small molecule tyrosine kinase inhibitors[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2015, 19(24):3783-3787. Chinese.
- [7] 李云泽,赵序利. 骨性关节炎发病机制研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志,2016,22(10):728-733.  
LI Y Z, ZHAO X L. Research progress on pathogenesis of osteoarthritis[J]. Chin J Pain Med, 2016, 22(10):728-733. Chinese.
- [8] 王伟峰. 雷公藤红素在骨关节炎中的作用及其机制研究[D]. 济南:山东大学,2019.  
WANG W F. The effect and corresponding molecular mechanisms of celastrol in osteoarthritis[D]. Jinan: Shandong University, 2019. Chinese.
- [9] MIHARA H, SUZUKI N, BOUDAKA A A, et al. Transient receptor potential vanilloid 4-dependent calcium influx and ATP release in mouse and rat gastric epithelia[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(24):5512-5519.
- [10] SADOWSKA A, KAMEDA T, KRUPKOVA O, et al. Osmosensing, osmosignalling and inflammation; how intervertebral disc cells respond to altered osmolarity[J]. Eur Cell Mater, 2018, 36:231-250.
- [11] 姚旺祥,戴晗豪,董佩龙,等. TRPV4 在骨关节炎与正常软骨中的表达差异及意义[J]. 中国修复重建外科杂志,2020,34(1):63-68.  
YAO W X, DAI H H, DONG P L, et al. Differential expression of transient receptor potential vanilloid receptor 4 protein in osteoarthritis and normal cartilages[J]. Chin J Reparative Reconstr Surg, 2020, 34(1):63-68. Chinese.
- [12] CHOI M C, JO J, PARK J, et al. NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction[J]. Cells, 2019, 8(7):734.
- [13] 杨琛,李兴勇,黄琛,等. 白细胞介素类促炎因子在膝骨性关节炎发病机制中的研究进展[J]. 甘肃医药,2020,39(11):980-983.  
YANG C, LI X Y, HUANG C, et al. Research progress of interleukin proinflammatory factors in pathogenesis of knee osteoarthritis[J]. Gansu Med J, 2020, 39(11):980-983. Chinese.
- [14] BOULANGER M J, CHOW D C, BREVNOVA E E, et al. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex[J]. Science, 2003, 300(5628):2101-2104.
- [15] 张力,王培民,殷松江,等. TRPV4 通道在膝骨关节炎软骨细胞中的功能表达[J]. 中国现代医学杂志,2019,29(23):17-22.  
ZHANG L, WANG P M, YIN S J, et al. Functional expression of TRPV4 channels in chondrocytes of knee osteoarthritis[J]. China J Mod Med, 2019, 29(23):17-22. Chinese.

(收稿日期:2022-11-01 本文编辑:朱嘉)