中国骨质疏松杂志 2012年4月第18卷第4期 Chin J Osteoporos, April 2012, Vol 18, No. 4
Published online www.wanfangdate.com.cn doi:10.3969/j.issn.1006-7108.2012.04.002

·论著·

实验骨关节炎大鼠退变软骨基因表达谱的初步分析

张百挡 梁祖建

中图分类号：R684.3 文献标识码：A 文章编号：1006-7108(2012)04-0300-05

摘要：目的 探讨大鼠骨关节炎模型与正常对照组软骨退变基因表达差异，从基因网络角度探讨骨关节炎的发病机制。**方法** 通过切断大鼠右膝交叉韧带、内侧副韧带，建立骨关节炎动物模型，采用代表28000个不同基因的Genomic Instrumentation Services公司芯片检测骨关节炎和正常大鼠右膝关节软骨的基因表达，对差异基因表达进行生物信息学分析。**结果** 大鼠骨关节炎软骨退变有显著差异表达的基因406个，其中305个基因上调，101个基因下调。差异表达基因涉及生长因子、发育、肥胖、能量代谢、信号传导、免疫等方面的基因群。**结论** 骨关节炎软骨退变基因表达谱存在软骨细胞凋亡相关的基因表达异常，信号传导过程异常、免疫相关基因的表达下调、多个转录因子的普遍上调等特征，为研究骨关节炎在基因水平上的病理变化提供了基础。

关键词： 基因芯片；骨关节炎

Preliminary analysis of degenerative cartilage gene expression profile in experimental osteoarthritis rats

ZHANG Baidang, LIANG Zujian, The Affiliated Orthopedic Hospital of Guangzhou Traditional Chinese Medicine University, Guangzhou 510240, China
Corresponding author: LIANG Zujian, Email: liangzujian@sohu.com

Abstract: Objective To investigate the difference of degenerative cartilage gene expression profile between arthritic rats and normal controls, and to explore the pathogenesis of osteoarthritis from gene network view. **Methods** Arthritic animal model was established by cutting off cruciate ligament and medial collateral ligament of the right knee joint. The gene expression in arthritic or normal articular cartilage of rat right knee was measured using a gene chip by Genomic Instrumentation Services. The differential gene expression was analyzed based on information biology. **Results** A total of 406 differentially expressed genes were identified in degenerative rat arthritic cartilage, and among them there were 305 up-regulated genes and 101 down-regulated genes. Differentially expressed genes involved gene group of growth factor, growth, obesity, energy metabolism, signal transduction, and immunity. **Conclusion** Gene expression profile of degenerative osteoarthritic cartilage is characterized by differentially expressed genes related to chondrocyte apoptosis, signal transduction abnormality, down-regulated immunity-related genes, and many up-regulated transcription factors. This provides a basis for researching osteoarthritis pathological change at gene level.

Key words: Gene chip; Osteoarthritis

骨关节炎(Osteoarthritis OA)是在力学因素和生物学因素的共同作用下导致软骨细胞、细胞外基质、软骨下骨三者降解和合成失衡的一种慢性、进展性关节疾病[1]。目前关于OA发病和病理机制仍不清楚。为探究OA关节软骨破坏病理改变的分子生物学机制，笔者于2008年10月~2010年4月通过切断大鼠膝交叉韧带、内侧副韧带，建立大鼠骨关节炎模型，采用基因芯片技术检测骨关节炎和正常大鼠右膝关节软骨的基因表达，对差异基因表达进行生物信息学分析，以期从基因网络角度探讨骨关节炎的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验对象

清洁级健康雌性4月龄未孕SD大鼠12只，体重

基金项目：广州中医药大学科学研究基金项目(09CX088、2007C082)

作者单位：510240 广州，广州中医药大学附属骨伤科医院
通讯作者：梁祖建，Email:liangzujian@sohu.com

万方数据

260±20g（由广州中医药大学实验动物中心提供）。

1.2 实验分组与造模

采用randrom软件随机分为正常组与模型组，每组6只，用10%水合氯醛溶液按0.33ml/100g腹腔注射，5min后麻醉完全，模型组切断右膝交叉韧带、内侧副韧带，行抽屉试验阳性后彻底止血，逐层缝合。伤口在缝合前滴入少量的青霉素溶液。

1.3 饲养环境

术后分笼饲养，术后连续3日给予青霉素溶液4万单位/日肌注。所有大鼠均喂养在恒温、恒湿的清洁环境中，环境温度为(25±1)℃，湿度为70%，每天12h光照/黑暗，任意进食饲养者提供的大鼠标准饲料和自来水。

1.4 标本处理与实验方法

术后3月切取大鼠右膝关节软骨保存于RNAIN保护液中，冰冻运输。参照Trizol法分别提取总RNA，测定RNA样品浓度和总量，探针标记，采用QIAquick PCR Purification Kit纯化cDNA，采用QIAGEN RNeasy minikit进行才cRNA纯化，采用QIAGEN RNeasy minikit进行探针纯化。纯化后的探针采用分光光度计进行荧光量测定。按照实验要求将变性的探针进行芯片杂交，洗涤。

1.5 扫描和数据处理

利用扫描仪（Generation Ⅲ array scanner, Amersham Pharmacia）进行扫描；用ImageQuant软件显示扫描图像，用ArrayVision软件分析扫描图像，将图像转化为基于荧光强度的数字信号（Imagequant 5.0; Array Vision 6.0），用DMVS、MIDAS软件分析芯片实验数据。

2 结果

2.1 造模后软骨病理改变情况

术后16周，大鼠右膝关节可见软骨表层溃疡样改变，软骨表层细胞缺失，细胞排列紊乱，软骨有裂隙存在，延伸至放射层、钙化层，个别标本可见部分软骨整体缺失，说明造模成功。

2.2 RNA抽提结果

电泳结果显示两个样品总RNA均有清晰的18S和28S条带，没有明显的降解发生，A260/A280比值基本符合要求，见图1。扩增片段长度为373bp。样品处理结果见表1。

2.3 探针标记和芯片杂交扫描结果

杂交后芯片荧光信号强度较高，背景均一，没有明显缺陷，符合芯片结果分析的标准。见图2。

表1 样品RNA基本信息

样品编号	A260	A280	A260/A280 Ratio	RNA浓度 (μg/μl)	RNA总量 (μg)
正常组	1.72	0.85	2.02	6.86	102.90
模型组	1.13	0.57	1.98	4.50	135.00

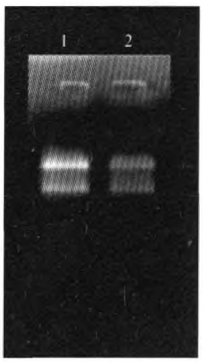

图1 样品总RNA电泳图（1为正常组 2为模型组）

图2 正常组与模型组双色荧光标记叠加图

2.4 OA大鼠关节软骨差异表达基因

差异表达基因筛选标准Ratio值≥2或≤0.5，经筛选分析，发现OA表达差异的基因共有406条，其中305条基因上调，101条基因下调。结果见表2、3。

3 讨论

骨关节炎是以关节软骨降解为特征的退行性关节疾病。关节软骨破坏是OA特征性的病理学改变，OA的发病机制与关节软骨变化密切相关。关节软骨是由软骨基质和软骨细胞组成的特殊的结缔组织，其破坏常开始于软骨表面的局灶性损伤，继而出现软骨基质的代谢变化，再发展为更大范围的软骨破坏。遗传学研究表明OA属于多基因、多因子遗传病[2]。目前我们已经积累了大量有关OA的单个基因的结构和功能信息，着眼OA的病理改变，诠释OA多基因的互作关系，对于探讨OA的发病机制具有重大的意义。基因组计划（human genome project HGP）的完成及多个物种基因组的完全测序，为系统地研究基因功能及相关遗传病提供了极大的帮助。基因芯片具有高度并行性、高通量、微型化和自动化的特点，能同时进行疾病多基因的高密度检测。基因芯片技术为阐明OA的多基因功能和作用提供了新的契机。本次芯片研究发现，差异表达基因涉及生长因子、细胞因子、发育、肥胖、能量代谢、信号传导、免疫等方面的基因群。骨关节炎软骨退变基因表达谱存在软骨细胞凋亡相关的基因表达异常，信号传导过程异常、免疫相关基因的表达下调、多个转录因子的普遍上调待等特征。

万方数据

表2 OA大鼠关节软骨差异最为显著的上调基因表

基因代码	基因描述	基因代码	基因描述
Thrsp	thyroid hormone responsive protein	Prg4_predicted	proteoglycan 4, (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein, camptodactyly, arthropathy, coxa vara, pericarditis syndrome) (predicted)
Cdc6_predicted	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae) (predicted)	Ext1_predicted	exostoses (multiple) 1 (predicted)
Cdc42	GTPase-activating protein (predicted) Cdgap_predicted	Hspb1	heat shock 27kDa protein 1
Rn30015844	testis nuclear RNA-binding protein	Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Rpgrip1_predicted	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 (predicted)	Olr742_predicted	olfactory receptor gene Olr742
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Fndc1_predicted	fibronectin type III domain containing 1 (predicted)
Rn30003462	alpha-1 type I collagen	Rn30000325	Ng3 protein
Rn30020187	RT1 class I, M6, gene 2	Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A
Rn30007862	similar to WD repeat domain 11 protein	Lox	lysyl oxidase
Rn30020940	similar to usherin	Lamb1-1_predicted	laminin B1 subunit 1 (predicted)
Atp1a2	ATPase, Na^+/K^+ transporting, alpha 2 polypeptide	Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
Cacnb1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	Mt3	metallothionein 3
RGD1306242 _predicted	similar to Probable serine protease HTRA4 precursor (predicted)	MGC15854	hypothetical protein MGC15854
Rn30025748	similar to ORF7	Ilf3	interleukin enhancer binding factor 3
Col3a1	collagen, type III, alpha 1	DDR2	discoidin domain receptor family, member 2
Col5a2	collagen, type V, alpha 2	Snrpn	small nuclear ribonucleoprotein N
Rn30024298	similar to 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) (PLA-X polypeptide)	Il11ra1	interleukin 11 receptor, alpha chain 1
Col1a2	procollagen, type I, alpha 2	MMP-13	matrix metallopeptidase 13 (collagenase 3)
Rn30004175	similar to Chromosome-associated kinesin KIF4A (Chromokinesin)	Gp38	glycoprotein 38
Serpinf1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F), member 1	Il8rb	interleukin 8 receptor, beta
Ctgf	connective tissue growth factor	Cyp21a1	cytochrome P450, subfamily 21A, polypeptide 1
Rnase6	ribonuclease, RNase A family, k6	Serpini2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade I, member 2
Col2a1	procollagen, type II, alpha 1	Egr4	early growth response 4
HIF-1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Csnk2a2 _predicted	casein kinase II, alpha 2, polypeptide (predicted)
Zfp67_predicted	zinc finger protein 67 (predicted)	Cst3	cystatin C
Cstb	cystatin B	Cpz	carboxypeptidase Z
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma	Acdc	adipocyte complement related protein of 30 kDa
Rn30021101	lysosomal-associated membrane protein 3 (predicted)	Rn30009968	platelet-derived growth factor receptor-like (predicted)
PRKCQ	protein kinase C, theta		

表3 OA大鼠关节软骨差异最为显著的下调基因表

基因代码	基因描述	基因代码	基因描述
G6pc	glucose-6-phosphatase, catalytic	Slc24a2	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2
Ctsh	cathepsin H	G6pc3	glucose 6 phosphatase, catalytic, 3
Aasdhppt _predicted	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyltransferase (predicted)	Lgals9	lectin, galactose binding, soluble 9
Selenbp1	selenium binding protein 2	Rn30006244	Rho GTPase activating protein 9 (predicted)
Hist3h3_predicted	histone 3, H3 (predicted)	Son_predicted	Son cell proliferation protein (predicted)
Prox1_predicted	prospero-related homeobox 1 (predicted)	Asf1a_predicted	ASF1 anti-silencing function 1 homolog A (S. cerevisiae) (predicted)
Nritp	ion transporter protein	Shmt1_predicted	serine hydroxymethyl transferase 1 (soluble) (predicted)
Mt1a	Metallothionein	Srpk2_predicted	serine/arginine-rich protein specific kinase 2 (predicted)
Fgf11	fibroblast growth factor 11	Prss32_predicted	protease, serine, 32 (predicted)
Ucp2	uncoupling protein 2	Grid2ip_predicted	glutamate receptor, ionotropic, delta 2 (Grid2) interacting protein 1 (predicted)
Hprt	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	Prss1	pancreatic trypsin 1
Rn30002477	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1 (predicted)	Tst	thiosulfate sulfurtransferase
Pcdha13	protocadherin alpha 13	Tsta3_predicted	tissue specific transplantation antigen P35B (predicted)
Lmx1a_predicted	LIM homeobox transcription factor 1 alpha (predicted)	Ltb	lymphotoxin B
Gpr88	G-protein coupled receptor 88	Igf1	insulin-like growth factor 1
Ddb1	damage-specific DNA binding protein 1	Ccng1	cyclin G1
Sepx1_predicted	selenoprotein X 1 (predicted)	Lsp1_predicted	lymphocyte specific 1 (predicted)
Capns1	calpain, small subunit 1	Atp13a_predicted	ATPase type 13A (predicted)
Obscn	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	Atp11a_predicted	ATPase, class VI, type 11A (predicted)
Pcdhb5_predicted	protocadherin beta 5 (predicted)	Rn30004329	similar to mKIAA0716 protein

万方数据

有证据表明,骨关节炎软骨退变与免疫反应密切相关[3]。本次研究发现骨关节炎软骨退变与免疫相关的4条基因显著差异表达,如:调节人体免疫功能,增强人体的抵抗病毒能力的硒结合蛋白(NM_080892)、金属硫蛋白NM_053968、淋巴细胞毒素B(NM_212507);具有抗沉默而发挥防御功能的Asfl a_predicted(XM_215389)。

软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞成分,广泛介导关节软骨代谢的调节,其凋亡在关节软骨的维持、再建、塑形、更新中起重要作用,是关节软骨退变导致OA的重要机制。生长因子对软骨细胞的生长和分化具有明显的调节作用[4]。本研究结果提示与生长因子相关的11条基因表达差异显著,如调控细胞增殖和骨修复的血小板衍生生长因子(NM_001011921);在软骨细胞和成骨细胞的增殖、分化方面发挥重要作用的结缔组织生长因子(NM_022266);调节成软骨细胞增殖活性的成纤维细胞生长因子11(NM_130816)、5(NM_022211);能直接磷酸化Smad蛋白将BMP信号从受体向细胞核内的靶基因传递过程中起主要作用,并在成软骨细胞和成骨细胞的分化过程中起重要作用的骨形态发生蛋白受体IA(NM_030849);调节细胞生长和分化的早期关键的生长反应因子4基因(NM_019137);对细胞生长呈负性调节的应激反应的生长抑制和DNA损害诱导基因45(NM_024127)。参与体内几乎每个器官的生长和功能及促细胞分化和增殖活性作用的胰岛素样生长因子(NM_178866)。deoxyribonuclease与骨关节炎发病较为密切的interleukin 11 receptor(NM_139116)、白介素增强子结合因子(NM_053412)、白介素-8(NM_017183)。软骨细胞膜上存在着很多离子通道(如Na^+、K^+、Ca^{2+}通道和水通道)并且对细胞的生长、发育、代谢等生物活动有很大影响。同时对于维持细胞内环境稳定,调节细胞内外物质交换起很大作用。本次研究结果发现与离子通道有密切关系的3条基因差异表达,如离子移变的谷氨酸受体(XM_239604)、调节体内钠钾钙平衡的溶质携带物(NM_031743)、具有电压依从性的Cacnb1钙通道(NM_017346)。

细胞外基质、蛋白质降解酶在骨关节炎软骨破坏过程中发挥重要作用。本研究发现与细胞外胶原成分相关的基因有5条,如Rn30003462(XM_213440),Col3a1(NM_032085)、Col5a2(XM_343564)、Col1a2(NM_053356)、Col2a1(NM_012929)。与蛋白质降解酶类有关的基因有6条,如半胱氨酸蛋白酶抑制剂(XM_342263)、Timp1(NM_053819)、MMP-13(NM_002427)、Ctsh(NM_012939)、Cstb(NM_012838)、Cst3(NM_012837)。与结构蛋白有关的基因8条,如纤维结合蛋白(XM_217792)、主要作用细胞骨架蛋白,蛋白激酶和磷酸酶以及激素受体的钙蛋白酶(XM_341824),细胞骨架钙调节蛋白和肌联蛋白(XM_340807)、纤维调节素(XM_345665)、驱动蛋白(XM_234487)、溶酶体膜联合蛋白(NM_001012015)、粘蛋白(XM_213903)、生物体适应环境产生的应激的热休克蛋白(NM_031970)。

骨组织不论其数量和质量、组织成份和细胞活力都会受衰老规律的支配。骨衰老最终表现以骨质增生、骨质疏松等为特征的临床所见。骨衰老是骨生长发育的一种表现[5]。骨生长发育基因主要包括细胞分化、核酸代谢一类的基因,本实验结果发现与生长发育相关差异表达的基因共9条。如加强rRNA功能的核内小分子核蛋白N基因(NM_031117);参与细胞周期调控的细胞周期调节蛋白(NM_012923);参与细胞增殖、分化的XM_221656、XM_340896;作为家族性转录因子调控体内一些基因的表达,决定发育中组织和细胞的特异性分化同源(异位)框转录因子(XM_222902);与细胞正常分化、发育相关的转录因子同源异形盒基因(XM_223067)。在正常软骨的发育中起重要作用的外生骨疣基因(XM_235272);与衰老相关的固醇辅酶A去饱和酶1(NM_139192)、金属硫蛋白(NM_053968)。

肥胖已经公认为是骨关节炎的一个重要因素。本研究发现与肥胖相关的基因有3条,如与肥胖有关的基因Acdc(NM_144744),受多种调节因素控制,在多种生理活动如细胞膜的流动性、脂质代谢和多种疾病如心血管疾病、肥胖具有非常重要的作用的固醇辅酶A去饱和酶1(NM_139192),直接影响人体肥胖和糖尿病的抵抗素(NM_144741)。

细胞信号转导途径的异常变化与OA密切相关[6]。本研究提示与细胞信号传递分子及通路有关的基因有10条,如调节Hedgehog信号的转录因子密切相关的锌指结构(XM_215633),G蛋白共同完成信号传导的蛋白偶联受体(NM_031696),与细胞粘附信号通路有关的NM_001008853。

总之,本实验应用基因芯片技术研究大鼠骨关节炎的基因表达谱,为深入研究OA关节软骨破坏的病理改变的分子生物学机制奠定了一定的基础。

万方数据

【参考文献】

[1] Mallen CD, Peat G, Porcheret M. Osteoarthritis. Br J Gen Pract, 2008, 58(554): 649.

[2] Valdes AM, Spector TD. The contribution of genes to osteoarthritis. Rheum Dis Clin North Am, 2008, 34(3): 581-603.

[3] Mistry D, Oue Y, Chambers MG, et al. Chondrocyte death during murine osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(2): 131-41.

[4] Buckwalter JA, Martin JA, Brown TD. Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. Biorheology, 2006, 43(3-4): 603-9.

[5] Bos SD, Slagboom PE, Meulenbelt I. New insights into osteoarthritis: early developmental features of an ageing-related disease. Curr Opin Rheumatol, 2008, 20(5): 553-559.

[6] Aigner T, Fundel K, Saas J, et al. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. Arthritis Rheum, 2006, 54(11): 3533-3544.

(收稿日期:2011-04-26)

(上接第326页)

[17] Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas P. The role of collagen in bone strength. Osteoporos Int, 2006, 17: 319-336.

[18] Hein G, Weiss C, Lehmann G, et al. Advanced glycation end product modification of bone proteins and bone remodelling: hypothesis and preliminary immunohistochemical findings. Ann Rheum Dis, 2006, 65: 101-104.

[19] Hein G, Wiegand R, Lehmann G, et al. Advanced glycation end-products pentosidine and N epsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. Rheumatol (Oxf), 2003, 42: 1242-1246.

[20] de Liefde II, van der Klift M, de Laet CE, et al. Bone mineraldensity and fracture risk in type 2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. Osteoporos Int, 2005, 16: 1713-1720.

[21] Register TC, Lenchik L, Hsu FC, et al. Type 2 diabetes is not independently associated with spinal trabecular volumetric bone mineral density measured by QCT in the Diabetes Heart Study. Bone, 2006, 39: 628-633.

[22] Mackey DC, Eby JG, Harris F, et al. Prediction of clinical non-spine fractures in older black and white men and women with volumetric BMD of the spine and areal BMD of the hip: the Health, Aging, and Body Composition Study. J Bone Miner Res, 2007, 22(12): 1862-1868.

[23] Engelke K, Adams JE, Armbrecht G, et al. Clinical use of quantitative computed tomography and peripheral quantitative computed tomography in the management of osteoporosis in adults: the 2007 ISCD Official Positions. J Clin Densitom, 2008, 11(1): 123-162.

(收稿日期:2011-11-08)

万方数据