中国骨质疏松杂志 2015年11月第21卷第11期 Chin J Osteoporos, November 2015, Vol 21, No. 11
Published online www.wanfangdate.com.cn doi:10.3969/j.issn.1006-7108.2015.11.005

·论著·

胶原蛋白酶诱发兔膝关节骨性关节炎软骨组织中HIF2α表达上调

王莹 吴成爱* 阎国强 陶剑锋 于志坚 赵丹慧
北京市创伤骨科研究所,分子骨科实验室,北京 100035

中图分类号: R681 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7108(2015)11-1318-05

摘要: **目的** 研究低氧诱导因子HIF2α在胶原蛋白酶诱发兔膝关节骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)模型中的表达情况,为下一步以HIF2α为靶点进行OA靶向治疗研究提供实验基础。**方法** 取健康16周龄雄性日本大耳白兔24只,随机分为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组和胶原蛋白酶诱发OA(Collagenase-induced OA, CIOA)组。利用右侧膝关节腔内注射II型胶原蛋白酶(剂量为0.5 mg)方法建立膝关节OA模型。给药后24周处死动物,采用大体形态观察与HE、甲苯胺蓝染色观察关节软骨退变程度,应用微型CT(Micro-CT)观察软骨下骨改变情况,采用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)、蛋白质免疫印迹(Western blotting, WB)和实时荧光定量PCR(quantitative real time PCR, qRT-PCR)检测软骨中HIF2α表达情况。**结果** 大体形态观察结果显示,CIOA组关节面粗糙、糜烂,与溃疡形成,关节囊增厚,滑膜增生。组织病理学检测结果显示,CIOA组关节软骨缺损,软骨细胞数量减少,排序紊乱,有细胞簇聚现象。Micro-CT结果显示,CIOA组软骨下骨可见大量骨赘形成,关节间隙狭窄。IHC结果显示,CIOA组关节软骨中HIF2α蛋白阳性细胞数增加;WB结果显示,CIOA组关节软骨组织中HIF2α蛋白表达显著增加;而qRT-PCR结果显示,HIF2α mRNA表达显著降低。**结论** 在成功建立膝关节OA模型基础上,发现HIF2α在胶原蛋白酶诱发兔膝关节OA软骨中表达上调,其表达调控可能在转录后水平进行。我们的实验结果提示HIF2α特异性抑制剂可能被用于缓解OA发生。

关键词: 骨性关节炎;膝关节;软骨;HIF2α

Up-regulation of HIF2α in collagenase-induced knee osteoarthritis in rabbits

WANG Ying, WU Chengai, YAN Guoqiang, TAO Jianfeng, YU Zhijian, ZHAO Danhui
Department of Molecular Orthopedics, Beijing Institute of Traumatology and Orthopedics, Beijing 100035, China
Corresponding author: WU Chengai, Email: wcha218@hotmail.com

Abstract: Objective To study the expression of hypoxia-inducible factor 2α (HIF2α) in a rabbit collagenase-induced knee osteoarthritis (OA) model. The study may provide experimental evidence that HIF2α serves as a therapeutic target for the treatment of OA of the knee in the future. **Methods** A total of 24 16-week healthy male Japanese white rabbits with long ears were randomly divided into collagenase-induced OA (CIOA) group and phosphate buffered saline (PBS) control group. Rabbits received intra-articular injection of 0.5 mg type II collagenase to establish OA. After 24 weeks of injection, the rabbits were sacrificed. The severity of the articular cartilage degeneration was observed using HE and toluidine blue staining. The subchondral bone was observed using micro-CT. The expression of HIF2α in articular cartilage was detected using immunohistochemistry (IHC), Western blotting (WB), and quantitative real time PCR (qRT-PCR). **Results** Macroscopic results showed a spectrum of lesions in the knee joints in CIOA group, including superficial and deep clefts, erosion, and ulceration of articular cartilage, thickening of the joint capsule, and synovial hyperplasia. Histopathological examination confirmed the loss of articular cartilage of CIOA group, showing a decrease in the number and organization of chondrocytes, and the formation of chondrocyte clusters. Micro-CT demonstrated osteophyte formation and joint space narrowing in the collagenase-treated knee joints. The IHC results showed an increase in the number of HIF2α-positive chondrocytes. WB results showed an increase of HIF2α protein in the articular cartilage of collagenase-treated knee joints. The mRNA level of HIF2α decreased as detected by qRT-PCR. **Conclusion** HIF2α is up-

基金项目:国家自然科学基金(81330043);国家自然科学基金(81472139);北京市优秀人才青年骨干个人项目(2014000021469G221)
* 通讯作者:吴成爱,Email: wcha218@hotmail.com

万方数据

regulated in a rabbit model of collagenase-induced knee OA, and its expression is regulated at the post-transcriptional level. Our results suggest that HIF2α inhibitors should be applied to treat knee OA.

Key words: Osteoarthritis; Knee joint; Cartilage; HIF2α

OA是一种好发于膝关节等关节部位的慢性退行性骨关节病,以关节软骨细胞变性、II型胶原纤维逐渐丧失以及骨质增生为主要病理特征,其发病率高,是人类致残的主要病因之一。OA发病与外伤、炎症、遗传等多种因素相关,但OA的确切发病机制至今尚未明确。低氧诱导因子HIF2α在调节软骨细胞代谢和维持软骨基质稳态中发挥重要作用[1]。近年来研究显示,HIF2α参与人骨性关节炎软骨破坏的病理过程。本实验通过建立胶原蛋白酶诱发兔膝关节OA模型,检测膝关节软骨组织中HIF2α mRNA和蛋白表达情况,为下一步以HIF2α为靶点进行靶向治疗骨性关节炎研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:健康16周龄雄性日本大耳白兔24只,清洁级,封闭群,体质量1.8~2 kg,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。常规饲料喂养(饲料由北京积水潭医院动物实验室提供),饲养温度20℃~25℃,湿度50%~70%。所有动物实验均经过北京积水潭医院动物研究委员会批准。

1.1.2 主要试剂和仪器

表1 主要试剂仪器及来源

Table 1 The source of the main materials and equipments

主要试剂及仪器	来源
II型胶原酶	美国Sigma公司
全蛋白提取试剂盒	南京凯基生物科技发展有限公司
Braford蛋白含量检测试剂盒	南京凯基生物科技发展有限公司
anti-HIF2α抗体	美国Abcam公司
HRP标记羊抗兔IgG二抗	北京普利莱基因技术有限公司
蛋白电泳预制胶	美国Invitrogen公司
PVDF膜	德国Merck Millipore公司
Trizol	美国Invitrogen公司
逆转录试剂盒	美国Promega公司
qPCR试剂盒	美国Promega公司
HIF2α和β-actin引物	上海生工合成
Skyscan1172高分辨率Micro-CT系统	比利时SkyScan公司
组织匀浆器	美国PRO公司
ABI 7500 Real time PCR仪	美国Applied Biosystems公司

1.2 方法

1.2.1 家兔膝关节骨性关节炎模型的建立:按照随机、对照、均衡原则分为PBS对照组和CIOA实验组,每组12只。利用0.05 ml/kg剂量的复方氯胺酮注射液对实验动物实施肌肉注射麻醉。经常规备皮后,使动物侧卧于手术台上,无菌条件下对实验动物右侧后肢膝关节分别进行关节腔内注射无菌PBS(pH7.4)或0.5 mg II型胶原蛋白酶(溶解于PBS,并经过0.22 μm过滤器过滤除菌),于造模后24周切取膝关节胫骨平台和股骨髁的新鲜软骨,用冰预冷的1×PBS洗涤软骨组织,一部分用于提取关节软骨总蛋白,另一部分用于总RNA提取。

1.2.2 组织病理学检测:用生理盐水冲洗经10%多聚甲醛固定的膝关节标本3次,将其置于30%甲酸水溶液中脱钙两周,完全脱钙后,分别于内侧胫骨平台中部和髁间嵴矢状面切开膝关节标本取材,经常规脱水、透明、浸蜡、包埋。4 μm切片,常规脱蜡至水后,行苏木精-伊红(HE)染色和甲苯胺蓝染色。

1.2.3 Micro-CT扫描与三维重建:膝关节标本经保湿后被置于Skyscan1172型Micro-CT系统样本仓中进行扫描,扫描条件为:扫描分辨率6.8 μm,旋转步长0.4°,管电压85 kV,管电流118 μA,曝光时间1700 ms,0.5 mm铝过滤器,对同一标本采用NRECON软件重构获得1000张不同截面1600×1600像素图片。将标本的完整膝关节骨组织作为感兴趣区域(Region of interest, ROI),采用CTAn(v.1.14.4)软件完成图像二值化(阈值75-255),并进行三维重建;采用CTVol(v.2.2)软件显示三维图像。

1.2.4 HIF2α免疫组织化学染色:常规切片(多聚赖氨酸贴片)脱蜡至水,微波抗原修复10分钟,3% H_2O_2室温孵育10分钟,山羊血清室温封闭15分钟后加入一抗(工作浓度1:200)4℃过夜,HRP标记二抗(工作浓度1:200)室温15分钟,DAB显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.2.5 WB检测HIF2α蛋白表达:根据说明书配制全蛋白提取液,将软骨组织置于全蛋白提取液中,利用匀浆器于冰上破碎软骨组织。匀浆后,采用Braford比色法测定样品蛋白浓度。将50μg蛋白样品行聚丙烯酰氨凝胶电泳分离,电泳结束后采用湿转法将蛋白从凝胶转移至PVDF膜。然后将PVDF膜依次用5%脱脂奶粉(用1×PBS-1‰Tween配制)室温封闭1小时、anti-HIF2α抗体4℃孵育过夜

万方数据

以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗室温孵育 30 分钟,最后利用 ECL 显色法,于暗室中用 X 光片曝光,根据条带强弱选取不同的曝光时间,经显影、定影,即可观察结果。

1.2.6 qRT-PCR 检测 HIF2α mRNA 表达:采用 Trizol 法常规提取关节软骨总 RNA,经逆转录获得 cDNA 第一链,然后行 qRT-PCR 进行 40 个循环扩增,同时追加溶解曲线反应检测引物特异性。引物序列如下:*HIF2α* 上游引物:5'-GAAGTATCCACCACCACTTGAG-3',*HIF2α* 下游引物:5'-GCTCCCAGCATCAAAGAAGA-3';*β-actin* 上游引物:5'-GCTTCTAGGCGGACTGTTAG-3',*β-actin* 下游引物:5'-CGAATAAAGCCATGCCAATCTC-3'。

1.2.7 统计学分析:qRT-PCR 结果以"平均值 ± 标准差(n = 3)"的形式显示。采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析,组间比较采用双尾 *t* 检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 关节软骨大体形态学观察

如图 1 所示,正常关节软骨表面光滑,色泽明亮,呈瓷白色,关节囊无增生,滑膜无增生,滑液量少,透明。CIOA 组关节软骨表面粗糙,色泽晦暗,表面有糜烂及溃疡形成,负重区关节表面软骨剥脱,形成缺损,软骨下骨质暴露,周围软骨增厚变软,关节囊增厚,伴有滑膜增生,滑液量多,呈黄褐色。

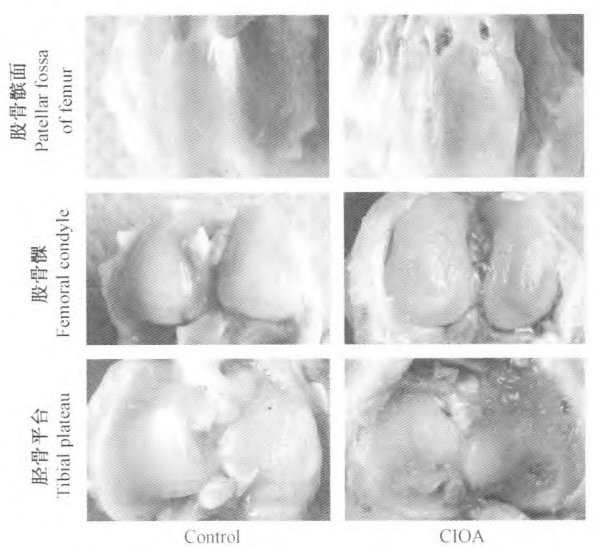

图 1 胶原蛋白酶诱发兔膝关节 OA 关节大体形态观察结果

Fig. 1 Gross morphologic observation results of the knee joints in CIOA group

2.2 关节软骨 HE 染色和甲苯胺蓝染色结果

常规行 HE 染色和甲苯胺蓝染色后,如图 2 所示,与对照组相比,肉眼可见 CIOA 组关节软骨缺损,软骨下骨质暴露,骨质增生形成骨赘。进一步于光镜下观察,CIOA 组关节软骨组织缺损,软骨层变薄,甲苯胺蓝染色均质性差,有失染现象;软骨细胞数量减少,排列层次紊乱,有细胞簇聚现象(图 3)。

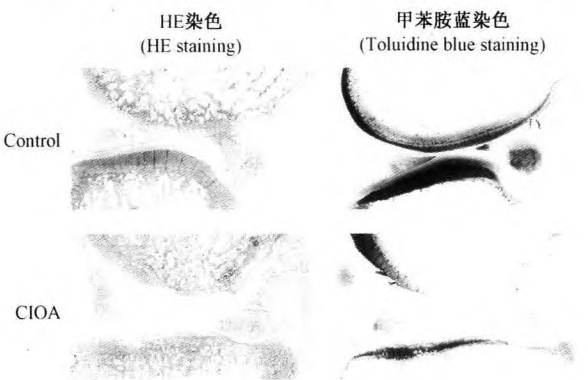

图 2 HE 和甲苯胺蓝染色肉眼观察结果

Fig. 2 Macroscopic observation results of HE staining and toluidine blue staining

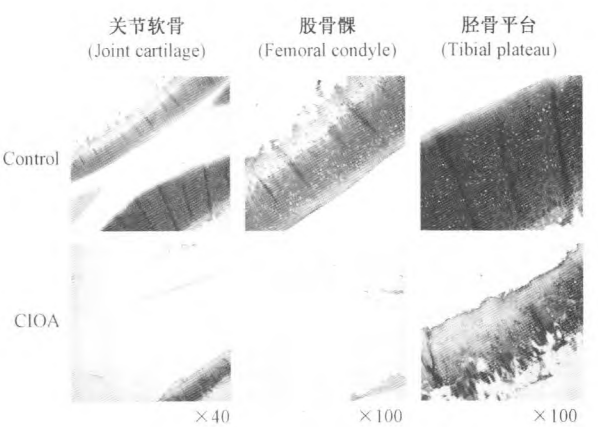

图 3 甲苯胺蓝染色光镜下观察结果

Fig. 3 Light microscopic observation results of toluidine blue staining

2.3 Micro-CT 三维重建图

如图 4 所示,与对照组相比,CIOA 组关节软骨下骨可见大量骨赘形成,关节间隙一定程度狭窄。

2.4 IHC 检测 HIF2α 蛋白表达

与对照组相比,CIOA 组注射药物侧膝关节软骨细胞中 HIF2α 蛋白阳性细胞数增加(图 5)。

2.5 WB 检测 HIF2α 蛋白表达

与对照组相比,CIOA 组注射药物侧膝关节软骨组织中 HIF2α 蛋白表达显著增加(图 6)。

万方数据

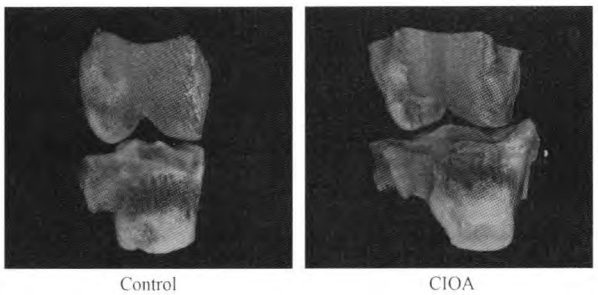

图 4 对照组和 CIOA 组膝关节三维重建图像

Fig. 4 Three-dimensional image reconstruction of the knee joints in control group and CIOA group.

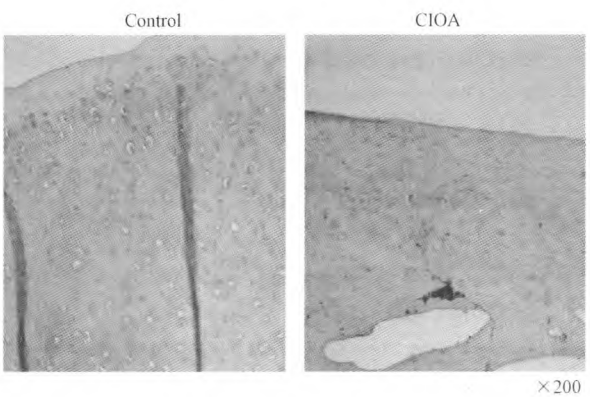

图 5 胶原酶对兔关节软骨细胞中 HIF2α 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of collagenase on protein expression of HIF2α in rabbit articular chondrocytes.

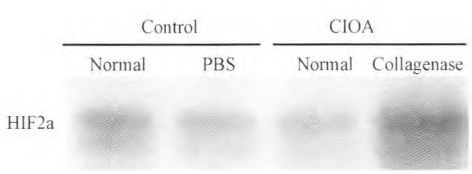

图 6 胶原酶对兔关节软骨组织中 HIF2α 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of collagenase on protein expression of HIF2α in rabbit articular cartilage

2.6 qRT-PCR 检测 HIF2αmRNA 表达

为了探讨 HIF2α 蛋白表达调控是否是在转录水平进行，我们实施了 qRT-PCR 实验。结果如图 7 所示，与蛋白表达情况不一致，CIOA 组注射药物侧膝关节软骨组织中 HIF2αmRNA 表达水平显著降低。

3 讨论

在本研究中，我们在建立胶原蛋白酶诱发兔膝关节 OA 模型的基础上，发现低氧诱导因子 HIF2α 在 OA 软骨组织中表达上调，进一步研究发现其表达可能受转录后水平调控。

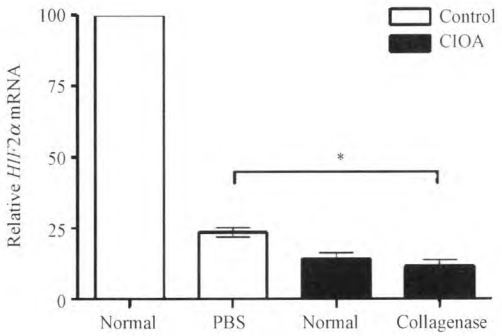

图 7 胶原酶对兔关节软骨组织中 HIF2α mRNA 表达的影响（* 代表 $P<0.05$）

Fig. 7 Effect of collagenase on mRNA expression of HIF2α in rabbit articular cartilage（* $P<0.05$）.

正常软骨稳态表现为细胞外基质成份合成和降解之间的微妙平衡，从而保持关节功能完整[2]。研究认为，OA 是由于关节合成代谢和降解代谢稳态失衡所致，而代谢失衡与氧化应激密切相关[3]。通常情况下，关节软骨暴露于氧含量相对较低的环境中，软骨表面氧含量约为 10%，而最深处软骨组织的氧含量低至约 1%[4]，因此，氧被认为是调节软骨代谢活动的一个重要参数。在软骨退变过程中，由于关节软骨纤维性颤动和/或软骨下骨产生微裂缝，该氧含量梯度被破坏[5]，从而有助于 OA 的发生发展。

HIF2α 是一种重要的介导低氧适应性反应的转录因子，通过激活血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、烟酰胺磷酸核糖转移酶（nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT）[6]、白介素-6（Interleukin-6, IL-6）[7]、诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）[8]和基质金属蛋白酶-13（MMP-13）[8]等多种低氧反应性基因的表达，以维持低氧条件下的关节软骨氧稳态。研究显示，HIF2α 在骨性关节炎患者关节软骨中呈现高表达[8,9]。此外，软骨细胞特异性表达 HIF2α 编码基因 *EPAS1* 转基因小鼠发生自发性的软骨破坏，而 *EPAS1* 基因杂合性缺失能够抑制内侧半月板不稳定或者胶原酶诱发的小鼠软骨破坏[8]。上述研究表明，HIF2α 参与骨性关节炎的发生，而研究 HIF2α 在 OA 软骨破坏中的表达尤为重要。关节腔内注射胶原蛋白酶可成功建立 OA 模型，并且该造模法具有简单、成功率高等优点，是经

万方数据

典的 OA 实验模型。本研究造模后 24 周观察到胫骨平台以及股骨髁软骨糜烂、缺损,以及软骨下骨增生等明显的骨性关节炎病理改变。此外,我们通过 IHC 和 WB 方法在软骨组织中检测 HIF2α 表达情况,结果显示 CIOA 组注射胶原酶这一侧的膝关节软骨组织/细胞中 HIF2α 蛋白表达水平显著升高,这一结果与 Yang 等人的研究结果类似,至少表明 HIF2α 参与胶原酶诱发的骨性关节炎的发生。我们进一步通过 qRT-PCR 检测 HIF2α mRNA 表达情况,以判断胶原酶诱导的 HIF2α 蛋白表达上调是否是由于其 mRNA 表达水平升高所致。结果与预期相反,胶原酶处理的软骨组织中 HIF2α mRNA 表达水平显著低于 PBS 对照组,提示胶原酶诱导的 HIF2α 蛋白表达调节主要是在蛋白质水平进行调节。研究显示,低氧是重要的调节 HIF2α 表达的因素之一,低氧处理能够上调 HIF2α 蛋白表达,其核心机制为泛素化降解途径被抑制[10]。我们推测,在本研究中,由于软骨组织完整性被破坏,可能通过改变关节软骨所处的氧环境,最终导致 HIF2α 蛋白泛素化降解程度降低,然而这一推论仍有待于进一步研究。

综上,我们的研究表明 HIF2α 可能参与胶原酶诱发的 OA 发生,进一步提示 HIF2α 可能是一种重要的 OA 药物治疗靶点。此外,我们的研究提示 HIF2α 特异性抑制剂可能被用于缓解 OA 发生。

【参 考 文 献】

[1] Zhang, F. J., W. Luo. Role of HIF-1α and HIF-2α in osteoarthritis[J]. Joint Bone Spine, 2014, doi: 10.1016/j.jbspin.2014.10.003. [Epub ahead of print]

[2] Mariani, E., L. Pulsatelli. Signaling pathways in cartilage repair[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(5): 8667-98.

[3] Strobel, S., M. Loparic. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(2): R34.

[4] Silver IA. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1975, 271(912): 261-72.

[5] Grimshaw, M. J. and R. M. Mason. Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2000, 8(5): 386-92.

[6] Yang, S., J. H. Ryu. NAMPT (visfatin), a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha, is an essential catabolic regulator of osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2013, doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204355. [Epub ahead of print]

[7] Ryu, J. H., S. Yang, et al. Interleukin-6 plays an essential role in hypoxia-inducible factor 2alpha-induced experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(9): 2732-43.

[8] Yang, S., J. Kim. Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction[J]. Nat Med, 2010, 16(6): 687-93.

[9] Giatromanolaki, A., E. Sivridis, et al. Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(4): R193-201.

[10] Melanie, J. P., W. F. Paul. A Gain-of-function Mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis[J]. N Engl J Med, 2008, 358(2): 162-168.

(收稿日期:2015-03-26)

万方数据