

鹿茸基于 TGF- β /Smads 信号通路调控骨关节炎大鼠软骨 相关基因/蛋白表达的研究

卢 贺, 李 政, 任香儒, 欧传双, 李长树, 李 雳

深圳平乐骨伤科医院 (深圳市坪山区中医院) 广东深圳

【摘要】目的 研究鹿茸基于 TGF- β /Smads 信号通路对骨关节炎大鼠软骨相关基因/蛋白表达的影响。方法 选择 30 只健康雌性 SD 大鼠, 体重(220 \pm 15)g, 随机分为 2 组, 对照组及研究组, 每组 15 只。结论 骨性关节炎发病的重要机制之一与软骨细胞内的 smad2、3、6、7 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) 基因及蛋白的异常表达密切相关; 中药鹿茸可调控腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) 的表达影响软骨细胞内 TGF- β /Smads 信号通路中关键靶点 Smad2、3、6、7 基因及蛋白的表达来修复关节软骨, 以此达到治疗骨关节炎的作用。

【关键词】骨关节炎; 鹿茸; 软骨; 信号转导

【基金项目】2019 年度深圳市坪山区卫生系统科研项目, 资助类项目, 《鹿茸基于 TGF- β /Smads 信号通路调控 OA 大鼠软骨形成的作用机制研究》(项目编号: 201903)

Deer antler regulates cartilage-related gene/protein expression in rats with osteoarthritis based on TGF- β /Smads signaling pathway

He Lu, Zheng Li, Xiangru Ren, Chuanshuang Ou, Changshu Li, Li Li

Shenzhen Pingle Orthopaedic Hospital (Shenzhen Pingshan Hospital of Traditional Chinese Medicine) Shenzhen Guangdong

【 Abstract 】 Objective To study the effect of deer antler on the expression of cartilage-related genes/proteins in osteoarthritis rats based on TGF- β /Smads signaling pathway. **Methods** Thirty healthy female SD rats with a body weight of (220 \pm 15) g were selected and randomly divided into 2 groups, the control group and the research group, with 15 rats in each group. **Conclusion** One of the important mechanisms of osteoarthritis is related to smad2, 3, 6, 7 nitrilase 1 (Nit1), osteoinductive factor (Ogn), adiponectin (Adipoq) and peroxidase in chondrocytes. The abnormal expression of proliferator-activated receptor γ (PPR γ) gene and protein is closely related; Chinese medicine deer antler can regulate nitrilase 1 (Nit1), osteoinductive factor (Ogn), adiponectin (Adipoq), peroxisome The expression of proliferator-activated receptor γ (PPR γ) affects the expression of key target Smad2, 3, 6, 7 genes and proteins in the TGF- β /Smads signaling pathway in chondrocytes to repair articular cartilage, so as to achieve the treatment of osteoarthritis. effect.

【Keywords】 Osteoarthritis; Deer antler; Cartilage; Signal transduction

骨关节炎是老年人最常见的关节疾病, 其主要病变特征包括进展性的软骨退变、滑膜炎、软骨下骨及周围肌肉的改变, 并常伴随关节疼痛, 研究认为软骨细胞凋亡和细胞外基质丢失、异常重建是骨关节炎发病过程中软骨退变的主要原因。骨关节炎尚无根治

的方法, 西医早期治疗多为抗炎镇痛等改善症状的措施, 不能控制疾病的进程, 且部分药物毒副作用明显, 不能长期服用。

中药鹿茸性温、甜味、咸味、肝肾, 具有补肾养阳、强身健骨、调理冲动、抗创面毒的作用。我们组

的初步研究表明,鹿茸对骨性关节炎大鼠有明显的治疗作用,可能通过增加软骨细胞中 TGF- β 受体的表达来促进骨性关节炎大鼠软骨的修复。然而,疾病的发生和发展是一个复杂的过程,生物分子是疾病的结构基础和功能单元。因疾病的发病机制复杂,临床难以从单个细胞因子及其信号转导途径中找出其生物学发病机制和治疗的关键靶点。要全面、协调地认识和认识生物病机,就必须从不同层次、不同角度对生物病机进行整合。基因组学研究是在分子水平上研究复杂疾病的发生机制和系统间的关系。近年来,随着基因组学的飞速发展,特别是高密度芯片等各种高通量技术的发展,积累了大量的调控数据^[1-2]。本研究的目的是在转录组测序的基础上,分析鹿茸治疗大鼠骨关节炎后基因表达的差异及其对相关信号通路的影响,以期在鹿茸在治疗骨关节炎方面找寻新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选取中山大学动物实验中心提供的 30 只雌性 SPF 级 SD 大鼠,体重在(220 \pm 15)g,将它们任意分为对照组及研究组,每组 15 只,由专人负责饲养和管理。

1.2 模型的建立与给药

常规喂养 7 天后,对研究组大鼠构建双侧膝关节骨性关节炎疾病模型,对照组不做任何处置,模型制成后给予研究组大鼠 6 周中药鹿茸灌喂,将鹿茸饮片加生理盐水配制成溶液,给药剂量为 0.043g/100ml,对照组每日 1 次给予等量等时长的生理盐水灌喂。

1.3 指标检测

灌喂结束后,处死大鼠,选取二组大鼠的单侧膝关节组织保存备用。

(1) 大鼠膝关节病理观察

沿正中矢状面剖开大鼠膝关节组织,用乙醇脱水、生物透明剂透明、浸蜡后石蜡包埋,连续切取厚 4.0-5.0 μ m 的切片,捞片后染色^[4],在显微镜中观察,记录二组大鼠膝关节软骨的病损情况。

(2) 大鼠软骨 TGF- β 、Smad2、3、6、7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) 蛋白表达水平的免疫印迹探究 SDS-PAGE 凝胶电泳法提取大鼠软骨蛋白。分别用兔抗大鼠单克隆抗体、兔单克隆抗体 3、兔单克隆抗体 6、兔单克隆抗体 7 和羊单克隆抗体 IgG。比较两组膝关节软骨

TGF- β 、Smad2、3、6、7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) 蛋白的相对表达。

(3) 聚合酶链反应检测大鼠软骨 TGF- β 、Smad2、3、6、7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) mRNA 在液氮中将二组大鼠关节软骨组织研磨成粉,提取总 RNA,并检测 RNA 浓度及纯度,合格后进行 cDNA 的逆转录;然后分别对 TGF- β 、Smad2、3、6、7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) mRNA 进行引物设计,内参照基因选择 GAPDH,按扩增试剂盒中的说明书配制以 cDNA 为模板的 20 μ l PCR 反应体系,最后再对比分析二组大鼠软骨 TGF- β 、Smad2、3、6、7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) mRNA 表达水平。

1.4 数据分析

采用华大基因多组学 Dr.Tom 数据分析系统进行差异基因分析、基因分类和富集分析;对差异基因使用京都基因和基因本体进行分析;计算 P 值,当 P 值小于 0.05 时,代表差异有统计学上的价值。

2 结果

2.1 大鼠膝关节病理观察

对照组关节软骨 4 层结构紊乱严重,潮汐线模糊,软骨表面溃疡缺损,纤维改变,细胞数量弥漫增加,细胞簇分布紊乱,软骨细胞巢多,钙化层细胞消失。研究组软骨层、髓腔出现皮下骨增生,大鼠关节软骨细胞呈 4 层排列,软骨表面稍粗糙,无明显糜烂或损伤改变,部分表面细胞减少,肥大细胞层细胞多呈背靠背双细胞排列。未观察到明显的聚类,中层细胞略有增加,分布稍不均匀,无明显的细胞巢结构、钙化层和潮线结构。

2.2 TGF- β 、Smad2、3、6、7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) 蛋白的表达水平。

二组大鼠 TGF- β 、Smad2、3、6、7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子 (Ogn)、脂联素 (Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPR γ) 蛋白相对表达量方差齐,组间比较差异有统计

学意义,研究组 TGF-β、Smad2、3 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子(Ogn)较正常对照组升高($P < 0.05$)。Smad6、7, 脂联素(Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPRγ)较正常对照组降低($P < 0.05$)。

2.3 TGF-β、Smad2、3、6、7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子(Ogn)、脂联素(Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPRγ)mRNA 的表达水平。

由表 1 可见,大鼠软骨 TGF-β、Smad2、3、6、

7, 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子(Ogn)、脂联素(Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPRγ)mRNA 相对表达量方差不齐,采用 t 检验进行组间比较,结果显示差异有统计学上的价值($P < 0.01$), mRNA 表达水平比较,研究组 TGF-β、Smad2、3 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子(Ogn)较正常对照组升高($P < 0.05$)。Smad6、7, 脂联素(Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPRγ)较正常对照组降低($P < 0.05$),见表 2。

表 1 大鼠软骨 GAPDH、SmadmRNA CT 值对比

组别	GAPDH	SMAD	SMAD3	SMAD6	SMAD7	
对照组	19.99±0.16	40.14±0.31	35.65±0.26	32.62±0.83	32.60±0.29	
研究组	16.62±0.04	30.60±0.12	29.24±0.35	32.40±0.47	32.19±0.41	
组别	GAPDH	TGF-β	Nit1	Ogn	PPRγ	Adipoq
对照组	19.99±0.16	42.14±0.21	37.65±0.16	32.62±0.83	22.60±0.19	31.62±0.43
研究组	16.62±0.04	30.40±0.52	28.24±0.45	32.40±0.47	22.19±0.63	33.40±0.57

表 2 大鼠软骨 mRNA 相对表达量对比

组别	SMAD2	SMAD3	SMAD6	SMAD7	TGF-β	Nit1	Ogn	PPRγ	Adipoq
对照组	0.01±0.03	1.46±0.42	18.76±9.83	14.72±4.63	1.46±0.42	2.26±0.42	3.23±0.12	17.72±4.83	15.46±9.23
研究组	0.28±0.03	12.06±3.31	1.78±0.49	1.65±0.48	0.28±0.03	14.06±3.31	15.16±0.34	2.62±0.18	1.28±0.59

3 讨论

目前,骨关节炎的发病机制尚不清楚,没有有效的延缓骨关节炎的治疗方法。骨关节炎属中医“骨痹”范畴,中医认为骨性关节炎以“肝肾亏虚”为病机之本。中医鹿茸具有补肾健骨之功效,可用于骨关节炎早期的药物治疗。我们课题组前期利用中医古籍数据库检索文献研究、组织病理检测、聚合酶链式反应实验(PCR)和蛋白免疫印迹实验(WB)检测技术动物实验验证了中药鹿茸对早期 OA 的治疗作用,其通过促进关节软骨形成发挥对 OA 大鼠膝关节损伤软骨的修复作用[1-2],但其具体作用机理尚未明确。TGF-β/Smads 信号转导通路主要是指 Smads 蛋白转导的 TGF-β 超家族信号转导通路,它对细胞增殖、分化、转移、凋亡、存活等具有重要的调控作用,同时能够促进胚胎发育、组织修复和血管新生等[3-4],其中 Smads 蛋白转导的 TGF-β 和 BMPs 是最主要的两条信号通路。在 TGF-β/Smads 信号通路中,TGF-β 首先结合细胞膜表面的 TGF-β II 型受体,形成异源二聚体复合物,然后通过 II 型受体在 I 型受体

GS 区磷酸化,再激活 TGF-β I 型受体,活化的 TβR I 在羧基末端保守区 SS(MPV)S 基序两个丝氨酸残基之间磷酸化 R-Smads,再与 Co-Smad 结合成为转录复合物,转录到细胞核内,调控靶基因的转录。同时 I-Smad 通过与激活的 I 型受体结合来阻止 Smad2 和 Smad3 的磷酸化,抑制 TGF-β 的信号转导。本研究结果显示,鹿茸干预后大鼠关节软骨,对照组 Smad6、7、脂联素(Adipoq)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPRγ)的表达量升高显著,TGF-β、Smad2、3 腈水解酶 1 (Nit1)、骨诱导因子(Ogn)的表达量降低明显;研究组则与之相反。

脂联素(Adipoq)是已知的唯一与肥胖呈负相关的脂肪因子[5],脂联素在 OA 发病中的作用仍存在争议,脂联素在 OA 早期患者的血清中呈高水平状态,而在 OA 晚期患者中却呈低表达水平[6]。在本研究中鹿茸干预后软骨细胞脂联素表达水平上调,但上调表达的脂联素在治疗大鼠骨关节炎中所起到的具体作用尚不清楚。有文献报道脂联素可上调细胞 Smad7、BMP-7 的表达[7],而 Smad7 和 BMP-7 又具有抑制

Smad2、3 的作用。此外,有学者发现过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)可通过作用于 Smad3 分子抑制 TGF- β /Smad3 信号通路^[8],同时发现脂联素的表达水平与 PPAR γ 呈正相关关系,且脂联素基因启动子区具有可与 PPAR γ 、配体异二聚体结合的特异性反应原件 PPRE,因此推断脂联素亦可能通过某种 PPAR γ 相关途径抑制 TGF- β /Smad3 信号通路 Smad3 的表达^[9]。

腓水解酶 1 被认识是一种代谢修复酶,可水解细胞内脱氨基的谷胱甘肽^[10],NIT1 蛋白启动子区域可与 Smad3 直接结合并招募 Smad2、3 到细胞 TGF- β 受体上,从而激活并与 TGF- β /Smad2、3 信号通路形成正反馈回路关系^[11]。因此推断上调表达的腓水解酶 1 可能是鹿茸影响软骨细胞 TGF- β /Smad 通路中 Smad2、3、6、7 基因及蛋白的表达趋势的原因之一。小亮氨酸富集蛋白家族骨诱导因子(Ogn)可通过直接作用于 TGF- β 信号通路下游而不影响 TGF- β 及 Smad2、3 的磷酸化,从而增强成骨细胞中 TGF- β 信号通路诱导的转录活性及 I 型胶原的表达^[12]。在本团队既往对鹿茸调控 TGF- β /Smad 通路下游分子 Smads 家族中基因/蛋白表达治疗大鼠 OA 的研究中,我们发现鹿茸通过上调 Smad2、3 基因及蛋白表达、下调 6、7 基因及蛋白表达发挥治疗作用,同时推断在鹿茸调控软骨细胞 Smads 家族基因及蛋白表达过程中,除 TGF- β /Smad 信号通路外可能存在其他信号通路共同参与,在此推论下,并结合鹿茸干预 OA 大鼠关节软骨蛋白质组学的研究结果,可推断鹿茸干预后腓水解酶 1、脂联素、骨诱导因子可能是引起 TGF- β /Smad 通路下游分子 Smad2、3、6、7 基因及对应蛋白表达趋势异常变化的调控蛋白。

参考文献

- [1] 卢贺,顾一帆,梁桂平等.鹿茸调控骨关节炎大鼠软骨 Smads 基因/蛋白表达水平的作用研究[J].中华中医药学刊,2018,36(11):6.
- [2] 林志东,卢贺,卢耀鸣等.基于转录组测序分析鹿茸干预骨关节炎大鼠后的基因表达差异[J].中药新药与临床药理,2020,31(7):8.
- [3] Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, et al. Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF1-induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures[J]. Exp Hematol, 2005, 33(8):865-872.
- [4] Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, et al. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 2000, 61(9): 1003-1010.
- [5] Arita, Y., et al., Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 425(3): p. 560-4.
- [6] Koskinen, A., et al., Adiponectin associates with markers of cartilage degradation in osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through mitogen-activated protein kinase pathways. Arthritis Res Ther, 2011. 13(6): p. R184.
- [7] 刘新宇,脂联素对高糖环境下心肌细胞中 TGF- β 1/Smads 传导通路的影响.中西医结合心脑血管病杂志,2016(10):第 1095-1097 页.
- [8] Chen, X., et al., Bone Morphogenetic Protein-7 Antagonizes Myocardial Fibrosis Induced by Atrial Fibrillation by Restraining Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta)/Smads Signaling. Med Sci Monit, 2016. 22: p. 3457-3468.
- [9] Fu, M., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. J Biol Chem, 2001. 276(49): p. 45888-94.

收稿日期: 2022 年 8 月 5 日

出刊日期: 2022 年 9 月 2 日

引用本文: 卢贺,李政,任香儒,欧传双,李长树,李雳,鹿茸基于 TGF- β /Smads 信号通路调控骨关节炎大鼠软骨相关基因/蛋白表达的研究[J],国际医学与数据杂志 2022, 6(4): 18-21
DOI: 10.12208/j.ijmd.20220144

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网(CNKI Scholar)、万方数据(WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS