

β-catenin 在 SD 大鼠骨关节炎滑膜组织中的表达及意义

李建柱^{1,2,3}, 李宽新³, 郭二鹏^{1,2,3}, 史东^{1,2,3}, 孙开军^{1,2,3}, 王维山^{1,2*}, 史晨辉^{1,2,3*}

(¹石河子大学临床医学院, 新疆 石河子 832002; ²石河子大学医学院地方病实验室, 新疆 石河子 832002; ³石河子大学医学院第二附属医院/新疆生产建设兵团医院关节脊柱科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:检测并探讨 β 连环蛋白(β-catenin)在不同时期 SD 大鼠骨关节炎(osteoarthritis, OA)滑膜组织中的表达及意义。方法:实验组及对照组各随机选取 45 只 SD 大鼠,实验组行前交叉韧带切断(ACLT)造模,对照组行假手术处理,两组分别于术后 4、8、12 周各处死 15 只,并获取滑膜组织,分别为 4、8、12 周实验组及对照组;通过免疫组化及半定量 RT-PCR 技术检测不同时期实验组和对照组滑膜组织中 β-catenin 蛋白及基因表达水平。结果:免疫组化:β-catenin 蛋白在实验组均有表达,且实验组 4、8、12 周两两相比,β-catenin 蛋白表达随周龄增大而依次增高,均具有显著性差异($P < 0.05$);对照组 4 周、8 周滑膜组织中 β-catenin 蛋白无明显表达,而部分 12 周滑膜组织中 β-catenin 蛋白呈阳性表达。半定量 RT-PCR:β-catenin 从基因水平在实验组滑膜组织中的表达明显高于对照组,且随着时间的延长,其表达量依次增高,4、8、12 周两两比较均有显著性差异($P < 0.05$)。结论:β-catenin 在 OA 滑膜组织中高表达,且表达量随着时间的延长呈现增高趋势,说明 β-catenin 与 OA 的发生及病情进展有关。

[关键词] 骨关节炎;β 连环蛋白;免疫组化;半定量 RT-PCR

[中图分类号] R684.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-155-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150203

Expression and significance of β-catenin in the synovial of SD rat model of osteoarthritis

Li Jianzhu^{1,2,3}, Li Kuanxin³, Guo Erpeng^{1,2,3}, Shi Dong^{1,2,3}, Sun Kaijun^{1,2,3}, Wang Weishan^{1,2*}, Shi Chenhui^{1,2,3*}

(¹Clinical Medical College, Shihezi University, Shihezi 832002; ²Endemic Laboratory, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002; ³Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University/Department of Joint and Spine, Xinjiang Production and Construction Corps Hospital, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and significance of β-catenin in different times of synovial tissue of osteoarthritis SD rat models. **Methods:** Ninety SD rats were divided into experimental and control groups randomly. The anterior cruciate ligament (ACL) was cut off to establish a experimental model, the treatment of control group was similar to the experimental group, transection ACL. Rats were sacrificed at 4, 8 and 12 weeks after surgery, the synovial tissue were obtain, and the expression of protein and gene of β-catenin was measured by immunohistochemistry(IHC) and semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) in different times of experimental groups and control groups. **Results:** Results from IHC showed that β-catenin was expressed in all experimental rats, and the expressions of β-catenin 4/8/12 weeks were different (all $P < 0.05$). The expressions of β-catenin in 4 and 8 weeks were not different in control groups, and the expression of β-catenin was positive in part of the control group in 12 weeks. Semi-quantitative RT-PCR showed that the expression of β-catenin in the experimental group was higher than that of the control group, and the expression increased with the extension of time in the experimental group, and the expression of β-catenin of control groups were different 4/8/12 weeks among ($P < 0.05$). **Conclusion:** β-catenin was expressed in the synovial tissue of OA at a high level. And its level was increased with the extension of time, which indicates that β-catenin plays a critical role in the pathogenesis and progression of osteoarthritis.

[Key words] osteoarthritis; β-catenin; immunohistochemistry; semi-quantitative RT-PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02):155-159]

[基金项目] 国家自然科学基金(81160225, 81260453, 81360451);新疆兵团医药卫生专项资助(2013BA020);兵团国际交流与合作专项资助(2012BC002, 2011BC004);兵团科技创新团队专项基金(2014CC002)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: gksch7890@sina.com ; wwsmc2002@sina.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)又称退行性关节炎,是以关节软骨的进行性破坏,关节边缘和软骨下骨骨质再生,关节滑膜充血及炎性细胞浸润为主要病理学改变的慢性关节病。并以骨骼肌的慢性疼痛及关节活动功能障碍为主要临床表现^[1]。关节所有组织如滑膜、软骨、软骨下骨等均参与 OA 病变过程,而它们的病理生理学改变具有相关性^[2]。有报道称 OA 的发病与年龄、肥胖、遗传、机械应力及创伤有关,65 岁以上人群中 OA 患病率高达 30%~50%^[3]。但由于 OA 的病因和发病机制尚未完全阐明,临床治疗局限于对症处理和改善功能障碍,仍缺乏特异性治疗手段。因此,对 OA 病因学的研究在现代生物医学中显得尤为重要。

近年来,随着分子生物学的发展,对 OA 发病机制的认识已深入到分子水平。大量研究证实,Wnt 信号通路通过调节胚胎期软骨发育,以及出生后软骨发生、成骨细胞和破骨细胞生成、软骨内成骨、骨重塑、骨折修复等过程,调控骨骼系统相关疾病和骨代谢^[4]。而 Papathanasiou 等^[5]研究证明,经典的 Wnt/ β 连环蛋白(β -catenin)信号通路在 OA 软骨细胞中是激活的,并观察到 β -catenin 的 mRNA 在 OA 软骨细胞中的表达增高。本实验通过免疫组织化学及半定量 RT-PCR 技术分别检测 β -catenin 蛋白及基因在不同时期实验组及对照组 SD 大鼠滑膜组织中的表达,并探讨 β -catenin 与 OA 发生、发展的关系,进一步为 OA 的防治提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

3 月龄雄性 SD 大鼠 90 只(新疆维吾尔自治区实验动物研究中心),体重 200~250 g,随机选取 45 只为实验组,另 45 只为对照组。实验组大鼠行右膝关节前交叉韧带切断(ACLT),对照组进行假手术处理。

1.2 方法

1.2.1 建立 SD 大鼠 ACLT-OA 模型

实验组与对照组大鼠均选用苯巴比妥钠(300 mg/kg)腹腔注射进行麻醉,选取大鼠右膝关节进行手术,常规术区备皮、消毒,取髌旁内侧切口显露膝关节,髌骨向外侧脱位并屈曲膝关节显露前交叉韧带,切断前交叉韧带,行抽屉试验确认前交叉韧带已完全切断,彻底止血,将髌骨复位,缝合关节腔,伤口给予敷料包扎。对照组为假手术组,同

样方式进入关节腔,对前交叉韧带不做任何处理,闭合关节腔并包扎伤口。所有大鼠术后均连续肌注青霉素 3 d(20 万 U/d)预防感染。

1.2.2 获取滑膜组织标本

分别于术后 4、8、12 周处死大鼠,并获取右膝关节滑膜组织,置于液氮及 -80°C 冰箱中保存待用。各组部分实验标本石蜡包埋并切片,进行免疫组化实验,剩余标本继续 -80°C 冰箱中保存,提取总 mRNA,用于半定量 RT-PCR 实验。

1.2.3 免疫组化

1.2.3.1 免疫组化相关步骤

石蜡切片脱蜡、水化,3%过氧化氢溶液灭活过氧化物酶并在高压锅内进行抗原修复,正常山羊血清封闭液封闭抗原,以 1:100 比例稀释一抗体(ab32572,Abcam 公司,美国),滴加 50 μl 一抗后置于 4°C 冰箱过夜。次日 PBS 冲洗后滴加二抗(PV-6001 抗兔二步法试剂盒,北京中杉公司), 37°C 孵育 30 min, DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分化后脱水透明、封片。

1.2.3.2 免疫组化评判标准

按切片的染色强度评分:不着色为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、棕褐色为 3 分;再将每张切片随机选取 5 个高倍视野,按阳性细胞所占百分比评分:阴性为 0 分,阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为 1 分、 $10\% <$ 阳性细胞数 $\leq 50\%$ 为 2 分、 $50\% <$ 阳性细胞数 $\leq 75\%$ 为 3 分、 $> 75\%$ 为 4 分;阳性细胞数评分乘染色强度评分即为乘积分数,将乘积分数 ≤ 4 分定为阴性、 > 4 分定为阳性。所有切片均采用双盲法由 2 位病理医师独立阅片,进行结果评定。

1.2.4 半定量 RT-PCR 相关步骤

TRIzol 法提取总 RNA,用微量紫外分光光度计测 RNA 的浓度,1%凝胶电泳确定 RNA 片段的完整性。采用逆转录试剂盒(Qiagen218161)合成双链 cDNA。取 2 μl cDNA 为模板,与 β -catenin 的引物混合,选取 GAPDH 为内参(引物序列见表 1),用美国 Bio-Rad 公司 CFX96 梯度循环 PCR 仪进行扩增。反应体系 25 μl ,经过 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 70°C 延伸 30 s, 扩增 35 个循环后 72°C 延伸 10 min。用美国 Bio-Rad HC-Pac Power 电泳仪及美国 Bio-Rad 公司 sub-cell 水平电泳槽,取 5 μl PCR 产物上样电泳。在 Bio-Rad 凝胶图像系统下观察目的基因(β -catenin)的表达情况,通过 Quantity One 4.62 软件对电泳条带进行灰度值分析,根据公式: β -catenin mRNA 相对表达量=目的

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primers sequences

名称	引物 (5'→3')	产物长度(bp)
β-catenin	上游引物 AAACAAGATGATGCTGTGCC	506
	下游引物 ACTGCACAAACAGTGAATGGTATT	
GAPDH	上游引物 ATGGTGAAGGTCGGTGTGAA	969
	下游引物 CACCACCCTGTTGCTGTAGC	

基因条带积分光密度(IOD)/内参条带 IOD。

1.3 统计学方法

实验所得数据应用 SPSS17.0 软件处理, 计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计数资料以例表示, 免疫组化同时期实验组与对照组及不同时期实验组两两比较采用 χ^2 检验, 半定量 RT-PCR 结果同时期实验组与对照组比较采用 *t* 检验, 实验组组间比较通过单因素方差分析进行统计学分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测滑膜组织中 β-catenin 蛋白的表达

实验组 β-catenin 蛋白阳性染色多呈棕黄色或棕褐色, 主要定位于细胞质及细胞核内, 对照组早期滑膜组织中 β-catenin 蛋白无明显表达, 而部分 12 周对照组滑膜组织中 β-catenin 呈阳性表达(图1)。结果显示: 4、8、12 周各 15 例实验组滑膜组织中, β-catenin 蛋白阳性表达例数分别为 4 例、10 例、15 例; 而 15 例 4 周对照组滑膜组织中均无 β-catenin

蛋白阳性表达, 8 周对照组中仅有 1 例表达阳性, 12 周出现 9 例滑膜组织 β-catenin 蛋白高表达; 结果表明 4、8、12 周实验组与对照组滑膜组织中 β-catenin 蛋白表达有差异($P < 0.05$, 表 2), 实验组表达明显高于对照组; 且实验组 4、8、12 周比较, β-catenin 蛋白阳性表达有显著性差异($P < 0.001$, 表 2)。

2.2 半定量 RT-PCR 检测滑膜组织中 β-catenin 基因的表达

实验组滑膜组织中均检测到 β-catenin mRNA 的表达(图 2), 结果显示 β-catenin 在实验组与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 表 3), 即 β-catenin mRNA 在实验组表达高于对照组; 而 4、8、12 周实验组组间比较通过单因素方差分析, 结果显示 P 值均 < 0.05 , 表明 β-catenin mRNA 在 OA 滑膜组织中随着时间的延长, 其表达量逐渐增高。

3 讨论

骨关节炎(OA)是一种全球常见的关节疾病, 累及很大一部分成年人。它是由遗传、代谢、生物化

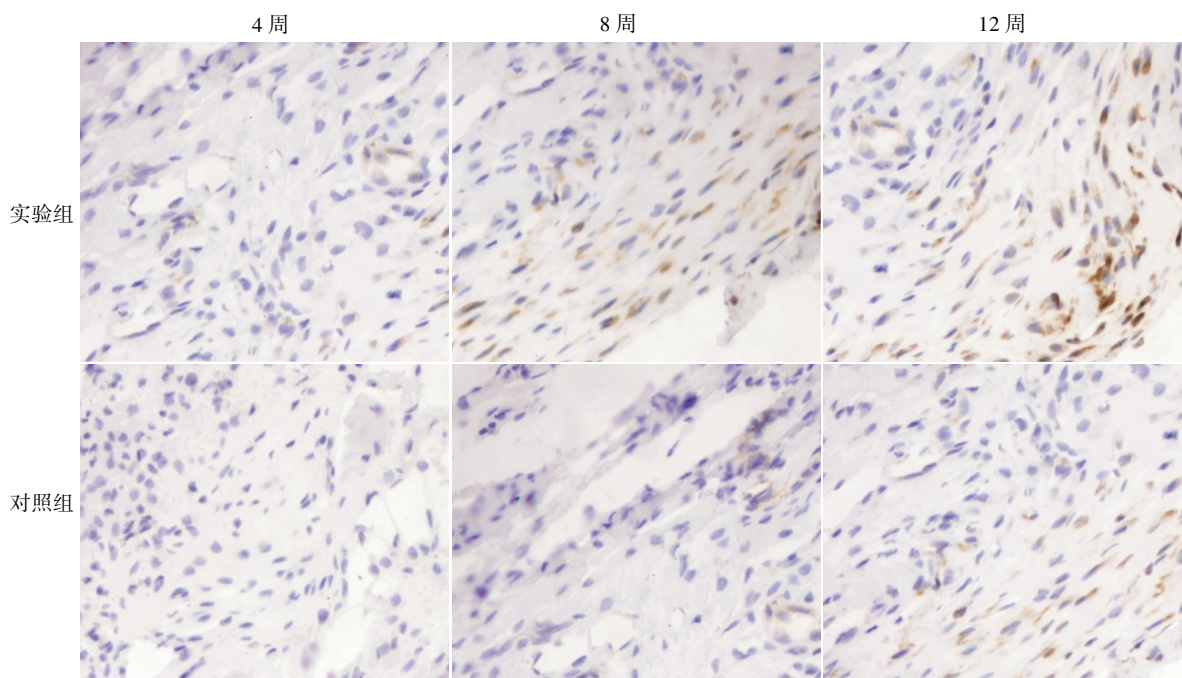


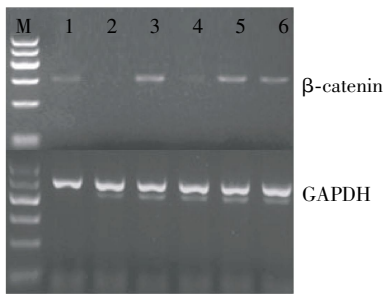
图 1 β-catenin 蛋白在各组滑膜组织中的表达(×200)

Figure 1 The expression of β-catenin in the synovial of 4、8、12 weeks experimental and control groups

表 2 4、8、12 周实验组与对照组滑膜组织中 β -catenin 蛋白表达情况

Table 2 The expression of β -catenin in the synovial of 4,8,12 weeks experimental and control groups (n=15)

组别	β -catenin 蛋白阳性表达例数			χ^2 值	P 值
	4 周	8 周	12 周		
实验组	4	10	15	17.640	<0.001
对照组	0	1	9		
χ^2 值	4.615	11.627	7.500		
P 值	0.032	0.001	0.006		



1~6: 分别代表 4 周实验组, 4 周对照组, 8 周实验组, 8 周对照组, 12 周实验组, 12 周对照组。

图 2 β -catenin 在实验组(1、3、5)和对照组(2、4、6)滑膜组织中的表达情况

Figure 2 The expression of β -catenin in the synovial of experimental and control groups

表 3 同时期实验组与对照组滑膜组织中 β -catenin mRNA 的表达

Table 3 The expression of β -catenin mRNA in same period experimental and control groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周
实验组	0.489 \pm 0.051	0.676 \pm 0.050	0.738 \pm 0.026
对照组	0.064 \pm 0.021	0.130 \pm 0.020	0.674 \pm 0.052
t 值	29.61	38.83	4.25
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

学及生物力学因素的相互作用导致关节软骨破坏而引起的^[6]。OA 的发病率约占总人口的 10%，一般随着年龄的增长 OA 的患病率会逐渐增加，软骨细胞的代谢异常和退行性变是 OA 的主要病理改变^[7]。大量研究证实，Wnt 信号通路的激活直接或间接引起包括细胞与化学因子分泌、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)表达、细胞基质合成、生长因子反应调节等一系列细胞反应，而这些反应在 OA 起病和进展过程中发挥重要作用，因此人们预测 Wnt/ β -catenin 信号通路可能成为 OA 治疗的新靶标^[8]。

在 Wnt/ β -catenin 信号通路激活过程中，首先 Wnt 与受体复合物结合，受体复合物包括低密度脂

蛋白受体相关蛋白(LRP)如 LRP5/6 以及卷曲蛋白(Fz)家族。当 Wnt 与受体复合物结合时，使细胞内散乱蛋白(Dvl)活化，轴蛋白(Axin)与 LRP5/6 的胞质尾区结合。作为一种蛋白支架，Axin 上结合着含有数个蛋白成分的降解复合体，可调节细胞内 β -catenin 的水平，它的关键组成是糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)，Dvl 的活化可抑制 GSK3 β 中丝氨酸-9 的磷酸化。在正常情况下，GSK3 β 可磷酸化 β -catenin，磷酸化的 β -catenin 经泛素-蛋白酶体途径分解，使细胞质内 β -catenin 蛋白量保持在低水平。当 Wnt 与 Fz/LRP 结合，信号通过 Dvl 抑制 GSK3 β 活性，抑制 β -catenin 的分解并在细胞内聚集，促使 β -catenin 转移至细胞核内，进而与转录因子(TCF)/淋巴增强因子(LEF)结合，调节 cyclin D1、c-myc、MMPs 等数个靶基因的表达^[9]。

目前动物实验和人体标本试验已经证实 Wnt/ β -catenin 信号通路在 OA 中起重要作用^[10]。Bodine 等^[11]研究发现抑制分泌型卷曲相关蛋白的表达能激活 Wnt/ β -catenin 信号通路从而使软骨形成和软骨重塑增加，导致 OA 的发生。在生物化学水平，OA 的主要特点是产生大量的基质降解酶，而基质金属蛋白酶(MMPs)尤为突出，有研究发现 Wnt/ β -catenin 通路的关键蛋白“LRP5”的抑制剂可以使膝关节 OA 软骨细胞中 MMP-13 mRNA 的表达量明显下降^[5]。另有研究将 Wnt/ β -catenin 信号通路与 OA 关系集中于骨关节炎滑膜方面。Nakamura 等^[12]采用实时 PCR 分析技术研究发现，在骨关节炎的滑膜组织中存在大量 Wnt7b 上调，进一步利用原位混合法和免疫组化法同样发现在膝关节骨关节炎样本中 Wnt7b 存在于关节软骨和滑膜中。Dell'Accio 等^[13]应用免疫组化检测正常软骨时很少发现 Wnt16 和 β -catenin 表达，而在中度至重度 OA 关节中，两者表达显著上调。本研究通过免疫组化检测到实验组滑膜组织中 β -catenin 蛋白均有表达，且随着时间的延长，阳性表达数明显增多，组内相比差异有统计学意义($P < 0.05$)，而部分 12 周对照组滑膜组织 β -catenin 蛋白出现高表达，这与 Nakamura 等^[12]的研究结果基本一致。基于以上研究，有学者提出在骨关节炎关节、软骨及滑膜组织中 Wnt 家族蛋白增多，可能通过信号通路，引起 β -catenin 相应的改变，继而影响目的基因转录水平，引发下游某些因子变化，比如尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)及 MMPs 的增高，最终影响软骨细胞代谢，从而起 OA 的发生^[14]。

另外,本研究还采用半定量 RT-PCR 技术从基因水平检测 β-catenin mRNA 在实验组及对照组的表达。结果显示 β-catenin mRNA 在 OA 滑膜组织中随着时间的延长,表达依次增高,且 4、8、12 周实验组组间比较通过单因素方差分析,结果显示 P 值均 < 0.05 ,差异有统计学意义,同免疫组化检测结果一致,因此可以认为 β-catenin 与 OA 的发病及进展有一定关系,而且 β-catenin 可能是 OA 早期发病的重要标志,而 12 周对照组滑膜组织中 β-catenin 也出现高表达,可能与对照组 SD 大鼠随着年龄及体重的增加,本身关节已经出现退行性变有关,而 β-catenin 与 OA 关系的进一步研究,有望成为 OA 早期防治的重要理论依据。

[参考文献]

- [1] Felson DT. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*,2009,11 (2): 203-210
- [2] 杜小红,代晓霞,熊咏民,等. Wnt/β-连环蛋白在骨关节炎信号通路中的作用 [J]. *国外医学. 医学地理分册*,2009,30(4):196-199
- [3] Pulsatelli L,Addimanda O,Brusi V, et al. New findings in osteoarthritis pathogenesis;therapeutic implications [J]. *Ther Adv Chronic Dis*,2013,4(1):23-43
- [4] Hoepfner LH,Secreto FJ,Westendorf JJ. Wnt signaling as a Therapeutic target for bone diseases [J]. *Expert Opin Ther Targets*,2009,13(4):485-496
- [5] Papataniasiou I,Malizos KN,Tsezou A. Low-density lipoprotein receptor-related protein5(LRP5)expression in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2010,28(3):348-353
- [6] Goldring MB,Otero M,Tsuchimochi K,et al. Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism [J]. *Ann Rheum Dis*,2008,67 (Suppl 3): 75-82
- [7] Wills AK,Black S,Cooper R,et al. Life course body mass index and risk of knee osteoarthritis at the age of 53 years:evidence from the 1946 British birth cohort study[J]. *Ann Rheum Dis*,2012,71(5):655-660
- [8] Alcaraz MJ,Megias J,Garcia-Armandis I,et al. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis [J]. *Biochem Pharmacol*,2010,80(1):13-21
- [9] Chun JS,Oh H. Wnt signaling in cartilage development and degeneration[J]. *BMB Rep*,2008,41(7):485-494
- [10] Olkku A,Mahonen A. Calreticulin mediated ghccorticoid receptor export is involved in beta-catenin translocation and Wnt signalling inhibition in human osteoblastic cells[J]. *Bone*,2009,44(4):555-565
- [11] Bedine PV,Stauffer B,Ponce-de-Leon H,et al. A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1stimulates bone formation[J]. *Bone*, 2009,44(6):1063-1068
- [12] Nakamura Y,Nawata M,Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders[J]. *Am J Pathol*,2005,167(1):97-105
- [13] Dell'accio F,De Bari C,Eltawil NM,et al. Identification of the molecular response of articular cartilage to injury,by microarray screening;Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*,2008,58(5):1410-1421
- [14] 陈少坚,郭风劲. Sox9 基因促软骨形成作用机制研究进展[J].*国际骨科学杂志*,2010,2(1):65-67

[收稿日期]2014-08-30

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。