

## AGEs 诱导软骨细胞凋亡和影响细胞外基质变化的研究

席 勇<sup>1,2</sup>, 王树金<sup>2</sup>, 李云龙<sup>2</sup>, 夏 炎<sup>2</sup>, 任永信<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>丹阳市人民医院骨科, 江苏 丹阳 212300)

**[摘要]** 目的:明确晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)诱导小鼠关节软骨细胞凋亡情况和影响细胞外基质变化。方法:体外分离培养小鼠软骨关节细胞,给予不同浓度 AGEs 共培养后,分别于 24 h 和 48 h 时间点观察细胞凋亡情况;通过 Western blot 方法检测 I 型胶原、MMP-3、MMP-9 以及 p53 蛋白的表达情况。结果:不同浓度 AGEs 处理软骨细胞 24 h 后,与对照组比较,细胞凋亡率出现升高( $P < 0.05, n=3$ );与 BSA 组比较,200 mg/L 浓度的 AGEs 组细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05, n=3$ ),并且随着 AGEs 浓度和培养时间增加,软骨细胞的凋亡率也增加。200 mg/L 的浓度 AGEs 处理软骨细胞 48 h 后, I 型胶原蛋白的表达显著下降( $P < 0.05, n=3$ );另外,50、100、200 mg/L 的浓度 AGEs 处理软骨细胞 48 h 后, p53、MMP-3、MMP-9 的表达显著高于对照组和 BSA 组( $P < 0.05, n=3$ )。结论:AGEs 能诱导小鼠软骨细胞凋亡,并刺激软骨细胞 p53、MMP-3、MMP-9 表达增多,降低 I 型胶原蛋白表达。

**[关键词]** 骨性关节炎; AGEs; 细胞凋亡; 细胞外基质

**[中图分类号]** R684.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)12-1649-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20141205

## Advanced Glycation End Products induced apoptosis and expression of extracellular matrix in mouse chondrocytes

Xi Yong<sup>1,2</sup>, Wang Shujin<sup>2</sup>, Li Yunlong<sup>2</sup>, Xia Yan<sup>2</sup>, Ren Yongxin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, Danyang People's Hospital, Danyang 212300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of advanced glycation end products (AGEs) on apoptosis and approach the mechanism. **Methods:** The primary cultured mouse chondrocytes were incubated with different concentration of AGEs for 24 h or 48 h. Apoptosis of chondrocytes was detected by FCW; expression of Col I, MMP-3, MMP-9 and p53 was measured by Western blot. **Results:** After the chondrocytes were treatment with AGEs (50, 100, 200 mg/L) for 24 h, the apoptosis was increased compared with the control groups; the maximum stimulation of chondrocytes was 200 mg/L AGEs. After the chondrocytes were treatment with AGEs (50, 100, 200 mg/L) for 48 h, expression of Col was significantly decreased ( $P < 0.05, n=3$ ) while the levels of MMP-3, MMP-9 and p53 were increased, compared to control groups and BSA group. **Conclusion:** AGEs can increase the apoptosis of mouse chondrocytes in a dose-dependent manner, thus damage in chondrocytes via decrease of the expression of extracellular matrix.

**[Key words]** Osteoarthritis; AGEs; apoptosis; extracellular matrix

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(12): 1649-1653]

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨退行性病变为主要病理特征的慢性关节疾病<sup>[1-2]</sup>。软骨细胞是关节软骨唯一的细胞成分,软骨细胞的凋亡和细胞外基质降解参与了骨关节炎的发病。

OA 的确切发病机制尚不明确,与患者的性别、年龄、肥胖程度、关节创伤情况,以及内分泌代谢障碍等因素相关,其中高龄被认为是最主要的致病因素之一<sup>[3]</sup>。晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)是机体内蛋白质以及脂质与葡萄糖发生非酶糖化反应所生成的稳定共价化合物,该物质的形成是缓慢进行且不可逆的。因此,随着年龄的增加,机体内 AGEs 的堆积也相应增多。研

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 2014CB942903)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: renyongxin@aliyun.com

究发现,糖尿病患者体内血糖水平控制很好后骨关节炎病变仍然会继续进展<sup>[4]</sup>。进一步研究发现,软骨细胞表面表达晚期糖基化终末产物受体 RAGE(receptor for advanced glycation end products, RAGE),与 AGEs 结合后,诱导细胞内活性氧(ROS)大量产生,活化核因子(NF)- $\kappa$ B,诱导炎症因子及黏附分子的产生,但 AGEs 对软骨细胞损伤的具体机制目前尚不明确,同时缺少干预 AGEs 的有效药物<sup>[5-6]</sup>。因此,研究 AGEs 对软骨细胞损伤的具体机制并找到有效的干预方法,防治 AGEs 所致的 OA 病变是 OA 研究的主要任务。本实验拟采用 AGEs 干预小鼠软骨细胞,观察 AGEs 诱导软骨细胞凋亡以及影响细胞外基质的变化,并探讨 AGEs 诱导的细胞凋亡与相关凋亡蛋白表达情况,明确 AGEs 在 OA 发病过程中的作用,进而为寻找有效干预 OA 的理论提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康昆明种小鼠,SPF级,5~7 d龄(南京医科大学动物中心)。完全培养基 DMEM、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司,美国),牛血清白蛋白(BSA,武汉碧云天公司),II型胶原酶(collagenase type II)、抗基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-3 抗体、MMP-9 抗体、抗小鼠 I 型胶原抗体、抗 p53 抗体、GAPDH 等抗体(SCT公司,美国),Annexin V/FITC 细胞凋亡试剂盒(Roche公司,瑞士)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 AGEs 制备

BSA 浓度为 5 g/L,葡萄糖浓度为 50 mmol/L,充分溶解于 pH7.4 的 PBS,过滤除菌,37℃ 无菌避光孵育 16 周,PBS 溶液透析出未结合的葡萄糖,将无葡萄糖的 BSA 作为阴性对照。荧光光谱分析并鉴定 AGEs 浓度。

#### 1.2.2 小鼠关节软骨细胞分离,培养及干预

小鼠断颈处死,无菌条件下取小鼠下肢骨,0.25%的胰酶,37℃ 消化 2 h。弃上清中的成纤维细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 II 型胶原酶于 37℃ 消化 4 h,离心弃上清,收软骨细胞,PBS 洗涤 2 次,置 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,按照  $3 \times 10^5$  个/ml 接种于培养瓶中,5% CO<sub>2</sub> 培养箱,37℃ 持续培养 48 h,软骨细胞贴壁生长良好,备用。

#### 1.2.3 细胞分组与干预

将处于对数生长期的细胞按照  $1 \times 10^5$  个/ml 接种入 6 孔板中培养 12 h,待细胞贴壁后换无血清培养基同步化饥饿 8 h。分组:对照组:空白培养基培养;AGE 组:分别按照 50、100、200 mg/L 的浓度加入 AGEs;BSA 组:分别按照 50、100、200 mg/L 的浓度加入 BSA,每组设 3 个复孔,24、48 h 时间点收集细胞,用于检测细胞凋亡以及胞内蛋白表达情况。

#### 1.2.4 流式细胞法检测软骨细胞凋亡情况

将软骨细胞接种于 6 孔板,收集不同的诱导条件下培养 24 h 和 48 h 的细胞。根据试剂盒说明书,分别加入 Annexin V Binding Buffer 悬浮细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml,加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l Propidium Iodide 混匀,避光,室温反应 10 min,上机检测。

#### 1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

收集培养 48 h 的细胞,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 冰上裂解细胞 20 min。 $13\ 000\ g$  离心 10 min,取上清,CBA 方法测定蛋白浓度,5 $\times$ 上样缓冲液混匀,冰上静止 10 min,煮沸 5 min,待用。40  $\mu$ g/孔,上样。12% 的 SDS-PAGE,100 V 恒压电泳 50 min,300 mA 60 min 转移至 PVDF 膜,2% 的 BSA 室温封闭 1 h,一抗(1:1 000)4℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min,用 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 15 min,ECL 显色,图像采用 Bio-Rad 化学发光成像系统进行分析。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行数据统计分析,各组数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),实验组与对照组比较采用, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 AGEs 诱导小鼠关节软骨细胞凋亡情况

50、100、200 mg/L 的浓度 AGEs 处理软骨细胞 24 h 后,与对照组比较,AGEs 处理组细胞的凋亡率升高( $P < 0.05, n=3$ );与 BSA 组比较,200 mg/L 浓度的 AGEs 组细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05, n=3$ ),50、100 mg/L 浓度组的细胞凋亡率没有差异。200mg/L AGEs 处理软骨细胞 48 h 后,无论与对照组还是 BSA 组比较,细胞凋亡率均有显著性差异( $P \leq 0.05, n=3$ ,图 1)。该结果表明随着 AGEs 浓度和培养时间增加,软骨细胞的凋亡率也增加;

高浓度的 AGEs 加剧了软骨细胞的凋亡。

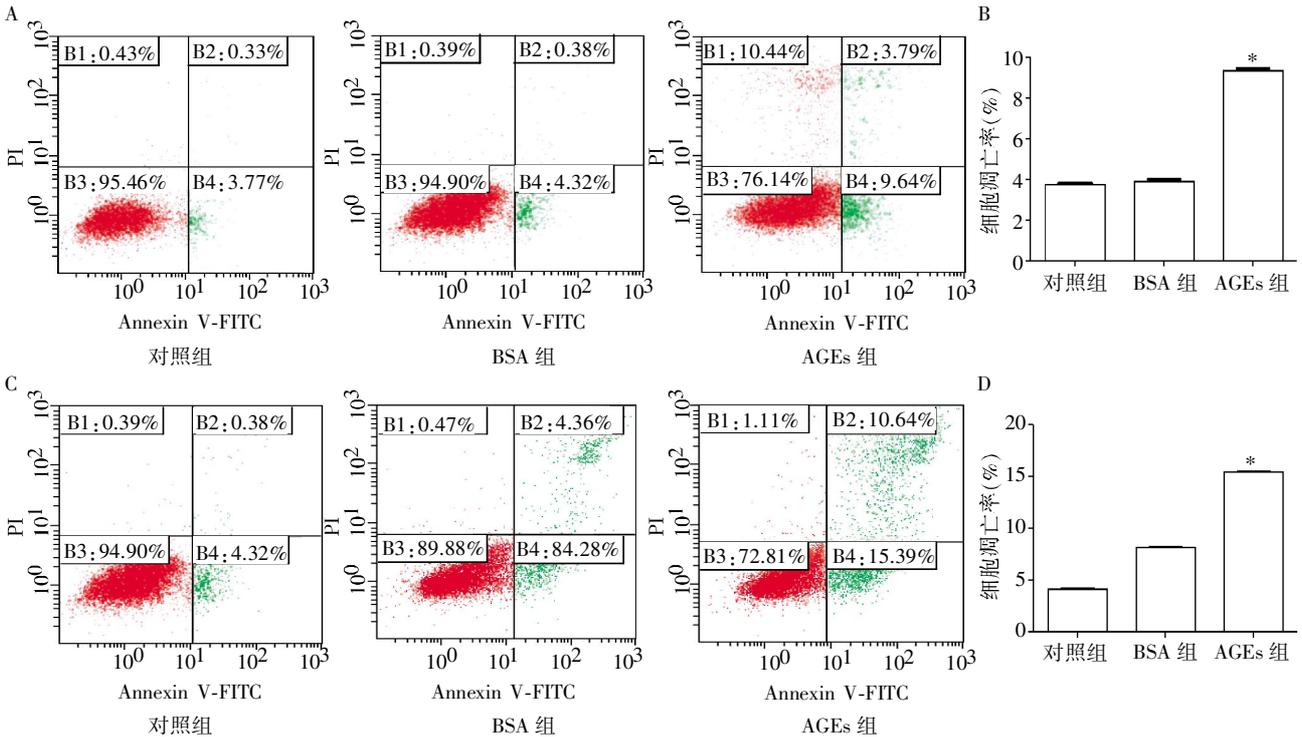
## 2.2 高浓度的 AGEs 降低软骨细胞 I 型胶原蛋白的表达

与对照组和 BSA 组比较, 200 mg/L 的浓度 AGEs 处理软骨细胞 48 h 后, I 型胶原蛋白的表达显著下降 ( $P \leq 0.05, n=3$ , 图 2, 而 50、100 mg/L 浓度的 AGEs 组与 BSA 组比较无统计学差异, 但显著

低于对照组 ( $P < 0.05, n=3$ )。

## 2.3 AGEs 增加软骨细胞 p53、MMP-3、MMP-9 的表达

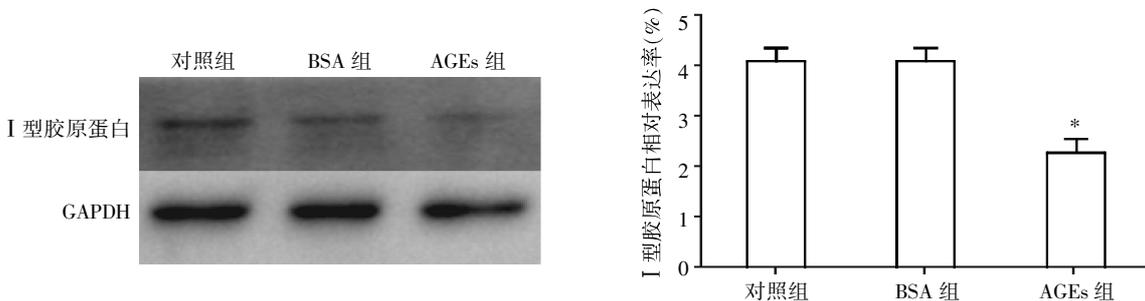
50、100、200 mg/L 的浓度 AGEs 处理软骨细胞 48 h 后, p53、MMP-2、MMP-9 的表达显著高于对照组和 BSA 组 ( $P < 0.05, n=3$ ), 并随着 AGEs 干预浓度增加而增加 (图 3)。



与对照组和 BSA 组比较, \* $P \leq 0.05$  ( $n=3$ )。

图 1 AGEs 处理软骨细胞 24 h (A、B)、48 h (C、D) 后流式细胞仪检测细胞凋亡情况

Figure 1 The apoptosis of chondrocytes treated with AGEs for 24 h (A, B) or 48 h (C, D)



与对照组和 BSA 组比较, \* $P \leq 0.05$  ( $n=3$ )。

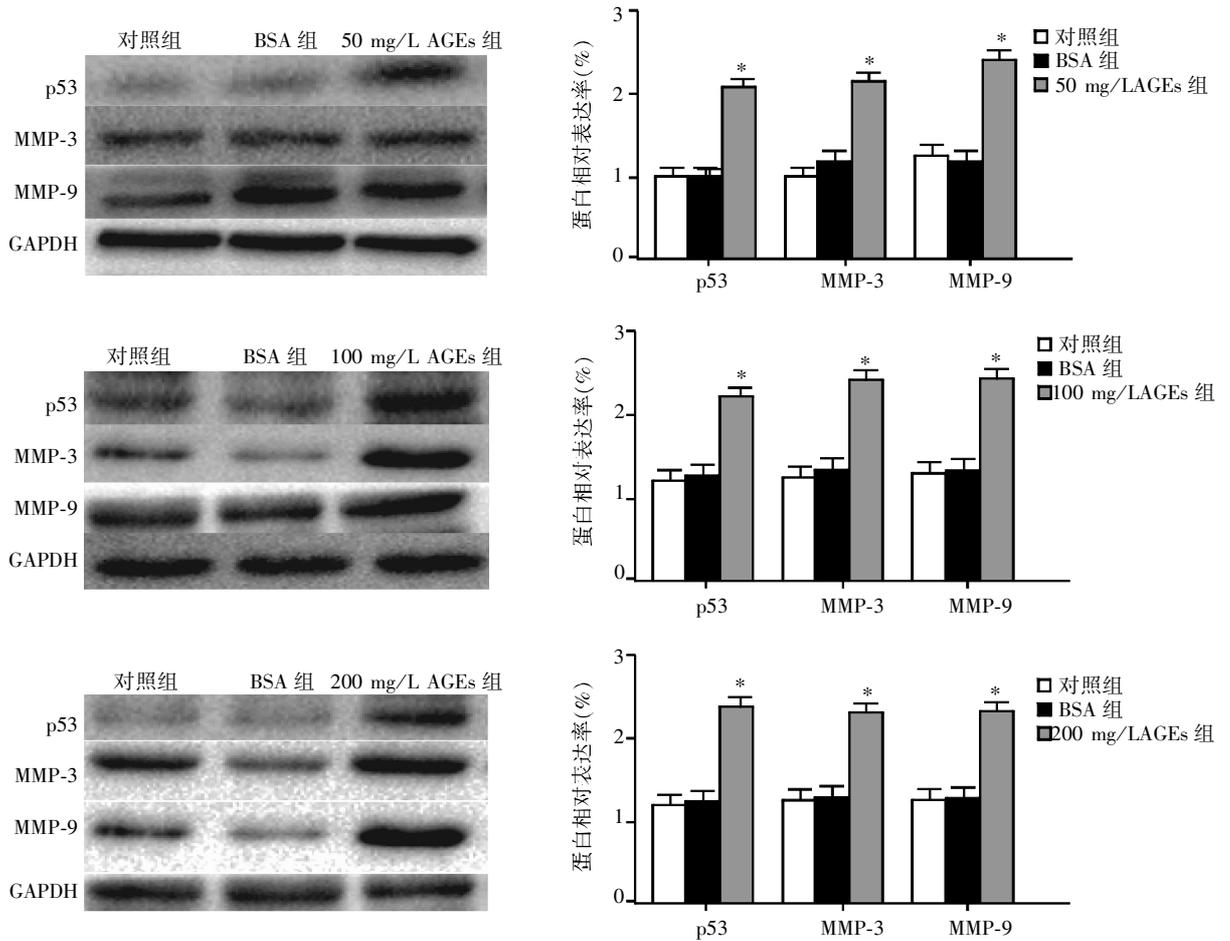
图 2 AGEs 处理软骨细胞 48 h 后 I 型胶原蛋白表达情况

Figure 2 The Collagen I expression of chondrocytes treated with AGEs

## 3 讨论

AGEs 是蛋白质的氨基与糖的醛基发生非酶性糖化氧化反应生成不可逆的终末期产物, 糖尿病或年龄增加都将引起体内 AGEs 水平明显升高<sup>[7]</sup>。研究发现体内 AGEs 的水平与骨关节炎的发病密

切相关<sup>[8]</sup>。OA 发生时, MMP 表达和含量增高, 使得软骨间质的分解增加, 这些软骨间质分子的降解产物则又可促进软骨组织的进一步的降解, 从而形成软骨关节持续性破坏的恶性循环<sup>[9-10]</sup>。分散在软骨基质中的软骨细胞在维持软骨的完整性以及关节软骨的负重方面起着重要作用。以往研究发现, 将关节软骨



与对照组与BSA组比较, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图3 不同浓度的AGEs处理软骨细胞48 h后p53、MMP-3、MMP-9的表达情况

Figure 3 p53, MMP-3, MMP-9 expression in chondrocytes treated with AGEs for 48 h

进行连续切片,发现在病变灶中证实存在软骨细胞凋亡现象<sup>[8]</sup>。在本实验中,不同浓度AGEs处理软骨细胞24 h后,与对照组比较,细胞凋亡率出现升高( $P < 0.05, n=3$ );与BSA组比较,200 mg/L浓度的AGEs组细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05, n=3$ );并且随着AGEs浓度和培养时间增加,软骨细胞凋亡率也增加,证实了外源性AGEs诱导了软骨细胞的凋亡的现象。

软骨细胞凋亡有多种原因造成,如物理、化学、氧化应激等,年龄因素是OA非常重要的危险因素。AGEs形成的糖基化反应在正常机体即缓慢进行,但在老化、氧化应激、高血糖和炎症等状况下,这一反应的速度显著加快。病理学研究证实,AGEs在关节软骨内的水平较机体的其他组织要高,且其与骨关节炎病变严重程度呈高度相关性<sup>[11-13]</sup>。因此,AGEs在体内大量产生与积聚是导致和加速OA病变的重要原因,也是致OA患病的年龄因素

的分子学基础,但其致病机制并不清楚。目前认为AGEs可能通过细胞外和细胞内两种途径导致OA病变,即AGEs可以使关节软骨胶原糖化、交联及基质中蛋白多糖合成减少,从而损伤软骨基质结构和功能<sup>[13-14]</sup>。AGEs致OA的细胞内途径可能是由其受体(RAGE)介导细胞内复杂的信号转导机制而产生的一系列病理反应<sup>[15]</sup>。研究表明,AGEs与软骨细胞上的受体RAGE结合后引起软骨细胞分泌合成IL-1、TNF- $\alpha$ 、MMP9、MMP-13等增加是导致骨关节炎病变的重要病理基础。体外实验发现,AGEs与RAGE结合后诱导细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)大量产生,一方面ROS的产生同时又促进软骨细胞表达更多的RAGE,以及AGEs的进一步产生和积聚,形成恶性循环,使关节出现进行性病变<sup>[16]</sup>;另一方面ROS作为信号分子通过细胞内信号级联反应,引起NF- $\kappa$ B的活化,最终导致靶基因IL-1、MMPs等的表达<sup>[17]</sup>。本研究发

现, 200 mg/L 的浓度 AGEs 处理软骨细胞 48 h 后, I 型胶原蛋白的表达显著下降 ( $P < 0.05, n=3$ ); 另外, 50、100、200 mg/L 的浓度 AGEs 处理软骨细胞 48 h 后, p53、MMP-3、MMP-9 的表达显著高于对照组合 BSA 组 ( $P < 0.05, n=3$ )。

软骨细胞凋亡的信号转导通路十分复杂, 主要涉及的信号通路有 MAPKs 信号转导通路、磷脂酰肌醇-3 激酶(P13K)-Akt 通路、JAKs/STAT1 信号转导通路及 NF- $\kappa$ B 通路。MAPKs 通路是细胞外信号由细胞膜传至细胞核的一条重要信号通路, 包括细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)通路、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)通路、p38 蛋白激酶通路。研究发现, 体外通过 NO 诱导的软骨细胞凋亡过程中, p38 上调 p53 蛋白表达从而引起软骨细胞凋亡, 说明 p53 蛋白的表达的增加与软骨细胞凋亡相关<sup>[13]</sup>。在固定膝关节的野生型老鼠 OA 模型身上, 表现出软骨细胞凋亡增加与 p53 基因上调有着密切的关系<sup>[18]</sup>。

AGES 形成的糖基化反应在正常机体即缓慢进行, 机体几乎不能将其自行清除, 并且 AGEs 对关节软骨的损伤仍会持续存在, 也就使得骨关节炎呈进行性发展。本研究发现 AGEs 能诱导软骨细胞凋亡以及细胞外基质的变化, AGEs 诱导的细胞凋亡与 p53 蛋白的表达上调有关, 揭示 AGEs 在 OA 发病过程中的作用, 探明 AGEs 致骨关节炎病变的机制, 可能成为预防和早期治疗 OA 的有效方法。进而探索新的有效的干预 OA 的方法。

#### [参考文献]

- [1] Basnyat S, Kolasinski SL. Ayurvedic medicine for rheumatoid arthritis [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2014, 16 (8): 435
- [2] Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: Epidemiology [J]. *Best Pract Res Cl Rh*, 2006, 20(1): 3-25
- [3] Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors [J]. *Ann Intern Med*, 2000, 133(8): 635-646
- [4] Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, et al. Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors [J]. *Annals of Internal Medicine*, 2000, 133 (8): 635-646
- [5] Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010, 18 (4): 476-499
- [6] Gemici B, Tan R, Ongut G, et al. Expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric ischemia-reperfusion: Role of Angiotensin II [J]. *Journal of Surgical Research*, 2010, 161(1): 126-133
- [7] Matheson AJ, Perry CM. Glucosamine: a review of its use in the management of osteoarthritis [J]. *Drugs Aging*, 2003, 20(14): 1041-1060
- [8] Neame R, Doherty M. Osteoarthritis update [J]. *Clin Med*, 2005, 5(3): 207-210
- [9] Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2001, 12(2): 69-78
- [10] Chen JH, Chu YL, Cao JL, et al. T-2 toxin induces apoptosis, and selenium partly blocks, T-2 toxin induced apoptosis in chondrocytes through modulation of the Bax/Bcl-2 ratio [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44(4): 567-573
- [11] Heraud F, Heraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2000, 59(12): 959-965
- [12] Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury [J]. *Free Radical Bio Med*, 2000, 28(10): 1456-1462
- [13] Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis [J]. *Biogerontology*, 2002, 3(5): 257-264
- [14] Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(1): 14-21
- [15] Kamata H, Honda S, Maeda S, et al. Reactive oxygen species promote TNF alpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases [J]. *Cell*, 2005, 120(5): 649-661
- [16] Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, et al. Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: Role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase [J]. *Journal of Rheumatology*, 2001, 28(11): 2509-2519
- [17] Lapadula G, Iannone F. Chondrocytes-ECM interactions in human osteoarthritis [J]. *Rheumaderm*, 1999, 455: 413-417
- [18] Del Carlo M, Loeser RF. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species [J]. *Arthritis Rheum-Us*, 2002, 46 (2): 394-403

[收稿日期] 2014-06-19