

文章编号:1004-7220(2009)03-0165-04

## 机械压应力作用下 IL-1 $\alpha$ 与 TNF- $\alpha$ 对滑膜细胞 MMP-2, -9 活性的影响

王业全<sup>1</sup>, 陈文琦<sup>1</sup>, 钱宇娜<sup>1</sup>, 罗自维<sup>1</sup>, 汤振宇<sup>1</sup>, 薛茹月<sup>1</sup>, 张瑾<sup>1</sup>, 宋国立<sup>1,2</sup>, 吕永钢<sup>1</sup>, 杨力<sup>1</sup>

(1. 重庆大学生物工程学院国家“111计划”基地 & “生物流变科学与技术”教育部重点实验室, 重庆 400044;

2. Departments of Orthopaedics and Bioengineering, University of California, San Diego, CA 92093-0412, USA)

**摘要:** 目的 通过研究机械压应力作用下炎症因子对滑膜细胞 MMP-2, -9 活性的影响, 探讨滑膜组织在前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 机械性损伤过程中所起的作用。方法 利用等双轴拉伸装置对滑膜细胞施加 12% 模拟机械损伤的压应力以及施加炎症因子 IL-1 $\alpha$  与 TNF- $\alpha$ , 通过明胶酶谱法检测 MMP-2, -9 的活性。结果 12% 机械压应力使 MMP-2 的活性增加了 122%, TNF- $\alpha$  对 MMP-2 的活性有着明显的时间依赖性增加, 而 IL-1 $\alpha$  则没有; IL-1 $\alpha$  与 TNF- $\alpha$  共同作用则对 MMP-2, -9 活性有着显著增加。结论 机械压应力与炎症因子对 MMP-2, -9 的活性有着显著的协同作用, 机械压应力与炎症因子能够增加滑膜细胞 MMP-2, -9 的活性, 因此滑膜组织可能参与调节关节腔内微环境以及膝关节组织损伤与修复的过程。

**关键词:** 机械压应力; IL-1 $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ; MMP-2; MMP-9

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

## Effects of IL-1 $\alpha$ and TNF- $\alpha$ on the activities of MMP-2, -9 under mechanical compression in human synoviocytes

WANG Ye-quan<sup>1</sup>, CHEN Wen-qi<sup>1</sup>, QIAN Yu-na<sup>1</sup>, LUO Zi-wei<sup>1</sup>, TANG Zhen-yu<sup>1</sup>, XUE Ru-yue<sup>1</sup>, ZHANG Jin<sup>1</sup>, SUNG KL- Paul<sup>1,2</sup>, LÜ Yong-gang<sup>1</sup>, YANG Li<sup>1</sup>. (1. '111' Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, Bioengineering College & Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. Departments of Orthopaedics and Bioengineering, University of California, San Diego, CA 92093-0412, USA)

**Abstract: Objective** To explore the role of synovium in the process of anterior cruciate ligament (ACL) injury by studying the effects of inflammatory on the activities of MMP-2, -9 under mechanical compression in human synoviocytes. **Method** We used an equi-biaxial stretch chamber with 12% mechanical injury compression and inflammatory factors (IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ ) in human synoviocytes, and detected the activities of MMP-2, -9 under different conditions by zymography. **Result** Mechanical compression increased the MMP-2 production by 122% under 12% compression. In addition, TNF- $\alpha$  can also elevate the activity of MMP-2 in a time dependent way, while IL-1 $\alpha$  cannot. However, mixture of these two factors dramatically increased MMP-2, -9 production. Mechanical injury had a strong synergistic effect on MMP-2, -9 productions with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . **Conclusions** Mechanical and inflammatory factors can elevate the activities of MMP-2, -9. Thus, synovium might involve in regulating the micro-environment of joint cavity and the injury/healing process of knee joint tissue.

**Key words:** Mechanical compression; IL-1 $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ; MMP-2; MMP-9

收稿日期: 2009-05-21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2005CB522703), 高等学校学科创新引智计划(国家“111计划”)(B06023), the OREF Award (USA) 和 NIH AR45635 (USA) 项目。

作者简介: 王业全(1982-), 男, 研究方向: 生物力学与组织修复

通讯作者: 杨力, 教授, 博士生导师, Tel: 13068312997; Fax: (023)65111802; E-mail: liyang@cqu.edu.cn

膝关节在人体结构中起着重要的枢纽作用,是人体最大、结构最复杂的关节。膝关节韧带是膝关节稳定的重要结构,也是多发病变的部位。关节内诸如前交叉韧带、后交叉韧带、关节软骨以及半月板等组织易受不同程度机械损伤,却又具有很差的修复能力。在膝关节损伤后关节液内大量的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)积累被认为是导致其不能自我修复的主要原因。在类风湿关节炎(RA)和骨关节炎(OA)中,滑膜组织是关节腔微环境的主要调控者,会向关节腔中释放大量的MMPs以及炎症因子<sup>[1-3]</sup>。我们的前期研究也发现在前交叉韧带损伤后,滑膜组织可能是关节腔内MMPs的主要调控者<sup>[4]</sup>。本文将用等双轴拉伸装置<sup>[5]</sup>进一步研究机械压应力作用下炎症因子对滑膜细胞MMP-2,-9的活性的影响,探讨滑膜组织在ACL机械性损伤过程中所起的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

人滑膜组织来自正常捐赠者,捐赠者的滑膜组织在24h之内分离出来后用1xPBS洗涤,再切成体积为 $1 \times 2 \times 3 \text{ mm}^3$ 的组织小块,在 $37^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 的条件下悬浮于10%的FBS-DMEM溶液中。在细胞从组织块中长出并长满底部后,组织块被转移到新的培养瓶中从而让剩余的细胞继续生长至满,然后将这些细胞冻存在液氮中备用。细胞在 $37^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 与95%空气的条件下于浓度为10%的FBS培养液(低糖DMEM,0.1 mM 非必需氨基酸,4 mM L-Glu, 抗生素)中生长。

### 1.2 机械压应力加载

首先对等双轴加载腔内的硅胶膜施加12%的预应力,然后用胰蛋白酶将细胞消化并将其接种于等双轴加载腔内硅胶膜上,接种的密度为每腔室 $5 \times 10^6$ 个细胞。经过16h的饥饿后,培养液换为浓度是2%的FBS培养液。在加载之前培养液可被新鲜配置的1%的FBS培养液替代。条件培养液的样本将在加载后8h,24h,48h,72h被采集。

### 1.3 明胶酶谱

样品的MMP-2,-9活性用明胶酶谱检测,样品

与上样缓冲液以1:1的比例混合并在含有10%明胶SDS-PAGE中分离,在110V恒压条件下电泳150min。电泳结束后,将凝胶置于洗脱液(2.5% TritonX-100)中震荡洗脱3次,每次20min;随之用孵育液(50 mmol/L Tris-HCl,1 umol/L NaCl, 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 0.02% Brij35, pH7.6)在 $37^\circ\text{C}$ 的环境下孵育14h,接着用考马斯亮蓝R-250染色1h。最后,用脱色液(30% 甲醇,10% 乙酸)脱色30min, MMPs显示为位于蓝色背景上的透明带。

### 1.4 数据分析

采用SPSS13.0统计分析软件以及单因素方差分析数据,检测各组之间是否存在差异。各组数据显著水平的临界值均为 $P=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 机械压应力对滑膜细胞MMP-2,-9活性的影响

与正常对照组比较,在12%压应力的作用下滑膜细胞MMP-2的活性增加了122%,而MMP-9的活性则没有显著的增加。此外MMP-2在72h内有着显著的时间依赖性增加,48h后72kD pro-MMP-2转化为62kD的active-MMP-2(如图1所示)。

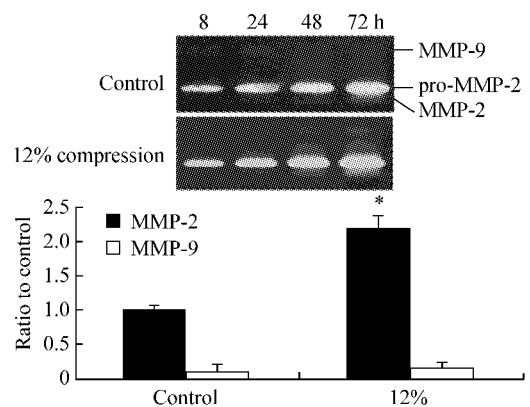


图1 MMP-2活性在滑膜细胞中有着明显的时间依赖性增加。

(a) 样品从等双轴拉伸装置中提取用于酶谱实验。(b) 用Bio-Rad图形软件对酶谱结果进行分析。单因素方差对数据进行分析。\*与对照组比较有显著性差异( $P<0.05$ )

**Fig.1 MMP-2 levels increased in an time-dependent manner in synoviocytes.** (a) Samples were taken from stretch chambers and applied to zymography.(b) MMP-2 quantification of compression samples at 72h with Bio-Rad Image software. Statistic analysis was done by ANOVA method.\* Significant difference with ratio to control ( $P<0.05$ )

## 2.2 IL-1 $\alpha$ 与 TNF- $\alpha$ 对滑膜细胞 MMP-2,-9 活性的影响

与正常对照组比较,50 ng/ml TNF- $\alpha$  使滑膜细胞 MMP-2 的活性增加了 134%,然而 5 ng/ml IL-1 $\alpha$  对 MMP-2 的活性没有显著性影响。TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\alpha$  对 MMP-9 的活性虽然分别增加了 28%,20%,但都没有显著性差异(如图 2 所示)。结果表明,TNF- $\alpha$  能够显著增加 MMP-2 的活性,而 IL-1 $\alpha$  对 MMP-2 活性则没有显著的作用。

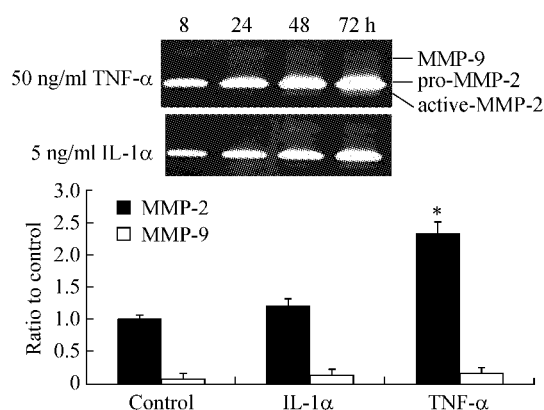


图2 滑膜细胞中 IL-1 $\alpha$  与 TNF- $\alpha$  对 MMP-2,-9 活性的影响。(a) 5 ng/ml IL-1 $\alpha$  和 50 ng/ml TNF- $\alpha$  实验组 MMP-2,-9 的酶谱结果。(b) 单因素方差对数据进行分析。\* 与对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Fig2 Effects of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  on MMP-2,MMP-9 activities in synoviocytes. (a) Representative zymogram for MMP-2,-9 expression in cells with 5ng/ml IL-1 $\alpha$  and 50ng/ml TNF- $\alpha$ .(b) Statistic analysis was done by ANOVA method.\* Significant difference with ratio to control ( $P < 0.05$ )

## 2.3 炎症因子与机械压应力的协同作用对 MMP-2,-9 活性的影响

上述结果表明,5 ng/ml IL-1 $\alpha$  对滑膜细胞 MMP-2,-9 的表达没有显著的影响,而 50 ng/ml TNF- $\alpha$ 对MMP-2的活性有着显著的增加,但对 MMP-9 的表达也没有显著的影响。当 5 ng/ml IL-1 $\alpha$  与 50 ng/ml TNF- $\alpha$  同时作用与滑膜细胞时,如图 3 所示不仅 MMP-2 的活性增加了 240%同时 MMP-9 的活性也显著的增加了 223%更多的 72 kD MMP-2 转化为 62 kD active-MMP-2。

当 5 ng/ml IL-1 $\alpha$  与 50 ng/ml TNF- $\alpha$  作用于滑

膜细胞时,并同时对其施加 12% 机械压应力,MMP-2,-9 的活性比单因子以及双因子共同作用时都有显著增加,与正常对照组比较分别增加了 402%,340%。结果表明,IL-1 $\alpha$  与 TNF- $\alpha$  对滑膜细胞 MMP-2,-9 活性有着明显的协同作用,同时机械压应力与炎症因子的协同作用更显著。

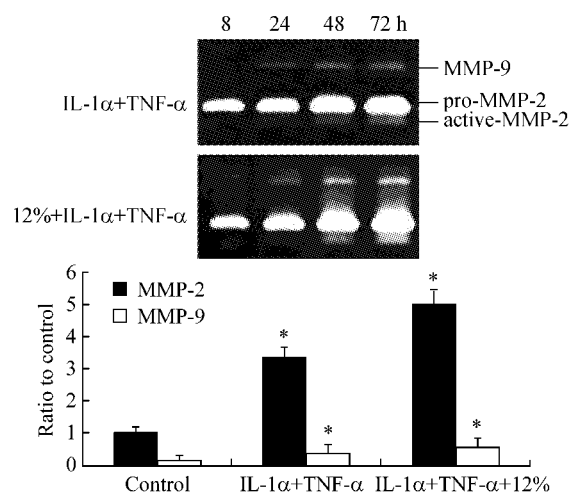


图3 (a) 炎症因子(5 ng/ml IL-1 50 ng/ml TNF-同时作用滑膜细胞时能够显著增加 MMP-2,-9 的表达,机械损伤与炎症因子对诱导 MMP-2,-9 的表达有着很强的协同作用。(b) 单因素方差对数据进行分析。\* 与对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Fig3 (a) The two inflammatory factors mixed (5 ng/ml IL-1 + 50 ng/ml TNF- ) dramatically increased MMP-2,-9 productions, mechanical injury had a synergistic effect with inflammatory factors on inducing MMP-2,-9 expressions in synoviocytes. (b) Statistic analysis was done by ANOVA method.\* Significant difference with respect to control ( $P < 0.05$ )

## 3 讨论

在组织损伤与修复过程中都要伴随着旧的胞外基质降解以及新的胞外基质的合成。组织中这种蛋白的消化与合成是一个非常复杂的调控过程。调控这一过程对韧带的修复能力有着很大的影响。组织重塑过程中胞外基质的降解与合成的动态平衡是由 MMPs 以及它的抑制剂 TIMPs 调节的。总体来说,在组织降解过程中 MMPs 的作用远远大于 TIMPs,相反的情况在组织修复过程中同样存在<sup>[6]</sup>。在膝关节韧带损伤后关节液内大量的 MMPs 积累被认为是其不能自我修复的主要原因。我们的动物 ACL 损伤模型也证明滑膜组织比损伤的 ACL 释放更多的 72kD 的 MMP-2,并且大量酶原形式的 MMP-2 转

化为活化形式的 MMP-2<sup>[4]</sup>。我们的研究表明机械压应力对滑膜细胞 MMP-2 的活性有着明显的时间依赖性增加,并有部分的 MMP-2 的酶原形式转化为活化形式。这也说明在 ACL 损伤后关节液中大量的 MMPs 不仅仅是损伤的 ACL 释放的,滑膜组织也对其有贡献。

David Zhou 发现在机械损伤的作用下 ACL 成纤维细胞比内侧副韧带 (MCL) 的成纤维细胞释放更多的酶原以及活化形式的 MMP-2。Global MMP 活性检测显示损伤的 ACL 成纤维细胞释放的 MMPs 的活性是 MCL 的 20 倍左右<sup>[7]</sup>。在人的 ACL 损伤后的关节液中发现也有早期的炎症反应<sup>[8]</sup>。我们前期动物 ACL 损伤实验证明在大鼠 ACL 损伤 72 h 后 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  会有大幅的增加<sup>[4]</sup>。本实验进一步表明在滑膜细胞中 TNF- 能够诱导 72kD 的 MMP-2 大量表达并转化为 62 kD 的活化形式,而 IL-1 则不能。然而,当两种因子同时作用于滑膜细胞时不仅有大量的 P-2 的表达, MMP-9 也有显著性的增加。因此研究 ACL 损伤时炎症反应是不可忽略的过程。

本文研究还表明机械损伤与炎症因子有着显著的协同作用,能够诱导大量 MMP-2 以及活化形式的表达,同时对 MMP-9 活性也有着显著的增强。这说明滑膜组织对机械损伤以及炎症因子非常敏感,并且在调节关节液中 MMPs 的表达起着至关重要的作用,在研究膝关节损伤组织修复的过程中滑膜组织是不容忽视的。

(上接第 164 页)

#### 参考文献:

- [1] Tang ZY, Yang L, Wang YQ, *et al.* Contributions of Different Intraarticular Tissues to the Acute Phase Elevation of Synovial Fluid MMP-2 following Rat ACL Rupture [J]. *J Orthop Res*, 2008,26:1-6.
- [2] Xue RY, Yang I, Tang ZY, *et al.* The Profile of MMP and TIMP in Injured Rat ACL [J]. *Molecular and Cellular Biomechanics*, 2009, 146(1):1-10.
- [3] Zhou, D, Lee, HS, Villarreal, F, *et al.* Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: An *in vitro* study on human ACL and MCL fibroblasts [J]. *J Orthop Res*, 2005,23(4), 949-957.
- [4] Girolumo N, Liyod A, McCluskey P, *et al.* Increased matrix

#### 参考文献:

- [1] Distler JH, Jünger A, Huber LC, *et al.* The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005,102(8):2892-2897.
- [2] Sun HB, Yokota H. Reduction of cytokine-induced expression and activity of MMP-1 and MMP-13 by mechanical strain in MH7A rheumatoid synovial cells [J]. *Matrix Biol*, 2002,21(3):263-270.
- [3] Momberger TS, Levick J R, Mason RM. Hyaluronan secretion by synovocytes is mechanosensitive [J]. *Matrix Biol*, 2005,24(8):510-519.
- [4] Tang ZY, Yang L, Wang YQ, *et al.* Contributions of Different Intraarticular Tissues to the Acute Phase Elevation of Synovial Fluid MMP-2 following Rat ACL Rupture [J]. *J Orthop Res*, 2009,27(2):243-248.
- [5] Lee AA, Delhaas T, McCulloch AD, *et al.* An equibiaxial strain system for cultured cells [J]. *Am. J. Physiol*, 1996, 271(4): 1400-1408.
- [6] Welgus HG, Fliszar CJ, Seltzer JL, *et al.* Differential Susceptibility of Type X Collagen to Cleavage by two mammalian interstitial collagenase and 72 KD Type IV collagenase [J]. *J Biol Chem*, 1990,265(23):13521-27.
- [7] Zhou D, Lee HS, Sung KL, *et al.* Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: An *in vitro* study on human ACL and MCL fibroblasts [J]. *J Orthop Res*, 2005,23(4): 949-957.
- [8] Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute cruciate ligament injured knee [J]. *The Knee*, 2003, 10(1): 93-96.

metalloproteinase in the aqueous humor of patients and experimental animals with uveitis [J]. *Curr Eye Res*, 1996, 15:1060-1068.

- [5] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003,92:827-839.
- [6] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69:562-573.
- [7] Foos MJ, Hickox JR, Mansour PG, *et al.* Expression of metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase genes in human anterior cruciate ligament [J]. *J Orthop Res* 2001, 19:642-649.
- [8] Martin HP, The role of matrix metalloproteinases in the activation of mesangial cells [J]. *Transplant Immunology*, 2002, 9:97-100.