

摘 要

研究背景及目的

骨关节炎(OA)是一种常见的慢性和年龄相关的退行性关节疾病。2020 年 OA 已经成为全世界致残率最高的疾病之一,给无数家庭及社会造成巨大的负担。该病发病率高,主要好发于中老年人群,65 岁以上人群患病率在 50% 以上。骨性关节炎的临床症状主要包括慢性关节疼痛和活动受限,主要是由滑膜炎、关节软骨退变、骨赘形成和软骨下骨硬化所致。尽管已经确定了一些 OA 的危险因素,如衰老、肥胖和代谢紊乱,但目前还没有有效的干预措施来预防骨性关节炎的进展。当前对于 OA 的治疗,早期主要通过关节腔内注射润滑剂或使用非甾体抗炎药及类固醇等药物缓解症状,减轻关节疼痛和抑制炎症反应,然而以上方法并不能从根本上逆转软骨退变和炎症进程,只能暂时缓解患者部分疼痛和疾病进展,而到了骨关节炎终末期,关节置换成了唯一的方法。尽管目前的药物和再生疗法有很大的前景,但仍然存在局限性。因此寻找更为安全、有效、可靠的 OA 治疗措施成为目前热点和焦点。TXNRD1 主要存在于组织的细胞质中,是目前研究和了解最多的同工酶。它是一种硒蛋白,依赖于 NADPH 从而促进硫氧还蛋白 1 (Trx1)的减少,它涉及细胞增殖、DNA 复制、应激诱导的过早衰老和抗氧化应激。在我们的前期研究中发现 TXNRD1 在 IL-1 β 刺激的小鼠初级软骨细胞和 OA 患者的软骨中显著上调,证明 TXNRD1 在关节软骨稳态和 OA 进展中具有重要作用。然而,在抑制 TXNRD1 后软骨细胞中相关基因的表达情况以及分子机制尚无研究报道。我们通过检索文献发现,抑制 TXNRD1 被证明可以激活 Nrf2 信号通路,并且过去几年的一些研究表明,一个活跃的 Trx 系统,特别是 TXNRD1,对于抑制 Nrf2 的激活是很重要的。因此我们推测:抑制 TXNRD1 主要通过促进 Nrf2 的激活,从而缓解关节软骨细胞外基质的降解进而抑制 OA 的发展。鉴于 TXNRD1 在 OA 中具有非常关键的生物学功能,极有必要阐明 TXNRD1 在 OA 发生发展中的作用及其分子机制。

研究方法

(1) 收集正常截肢患者软骨和 OA 患者软骨并利用免疫组化、Western blot 和 qPCR 检测正常截肢患者软骨和 OA 患者软骨中 TXNRD1 的表达水平。然后利用 IL-1 β 作用于小鼠软骨细胞来构建体外细胞 OA 模型,qPCR 和 Western blot 技术用于检测 TXNRD1 及其细胞外基质相关基因和蛋白表达水平的变化。

(2) 分别利用 TXNRD1 的特异性抑制剂 Auranofin 和 siRNA-TXNRD1 来抑制 TXNRD1, 接着明确抑制 TXNRD1 后对细胞外基质相关蛋白和 Nrf2 以及 HO-1 表达的影响。

(3) 在小鼠软骨细胞中转染 si-Nrf2 并加入 Auranofin, 接着检测软骨细胞表型及其细胞外基质相关蛋白的表达水平变化, 从而进一步明确其具体机制。

(4) 在小鼠软骨细胞中转染 si-TXNRD1 并加入 ML385 (Nrf2 抑制剂), 接着检测软骨细胞表型及其细胞外基质相关蛋白的表达水平变化, 从而进一步明确其具体机制。

(5) 在 DMM 小鼠模型中注射 Auranofin, 利用番红固绿、HE 染色以及免疫组化来检测小鼠软骨表面损伤程度及蛋白表达水平。

研究结果与结论

(1) TXNRD1 的 mRNA 和蛋白水平在 OA 患者关节软骨明显上调, 体外细胞学实验证明, 在 IL-1 β 作用下, TXNRD1 的 mRNA 和蛋白表达水平上调, 且蛋白表达水平呈时间梯度上升。

(2) Auranofin 在安全浓度范围内可以促进 Nrf2 和 HO-1 表达和软骨细胞外基质合成并且抑制细胞外基质的降解。沉默 TXNRD1 可以上调 COL2A1, SOX9 的表达水平同时下调 MMP13, ADAMTS5 的表达水平, 从而维持软骨细胞外基质的稳态。

(3) 沉默 Nrf2 能抑制 Auranofin 对软骨细胞外基质的保护作用; 同样, 抑制 Nrf2 能抵消沉默 TXNRD1 对软骨细胞外基质的保护作用, 提示抑制 TXNRD1 有可能是通过激活 Nrf2 信号通路来发挥对软骨细胞外基质的保护作用。

(4) 在体内注射 Auranofin 后能有效缓解小鼠关节软骨的破坏程度和降低 Nrf2 的表达, 进一步证明抑制 TXNRD1 在 OA 中的作用以及在体内的机制。

关键词: TXNRD1 (硫氧还蛋白还原酶 1), Nrf2 (核相关因子 2), 骨关节炎, 软骨细胞, IL-1 β , 细胞外基质, DMM 模型。

ABSTRACT

Background and objective

Osteoarthritis (OA) is a common degenerative joint condition that worsens with aging. By 2020, OA will surpass diabetes as the fourth most crippling disease in the world, imposing a tremendous financial pressure on families and society. The prevalence of those over 65 years old is over 50%, and the disease has a significant incidence in the middle-aged and older population. Chronic joint pain and restricted mobility are the predominant clinical symptoms of OA, which are primarily driven on by synovitis, articular cartilage deterioration, osteophyte development, and subchondral bone sclerosis. Although aging, obesity, and metabolic problems have all been identified as OA risk factors, there are presently no effective therapies to prevent the progression of OA. The only effective treatment for osteoarthritis (OA) currently is joint replacement. Early treatment of OA involves mainly joint cavity injection lubricant or use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and steroid drugs to alleviate symptoms, reduce joint pain, and inhibit inflammation. However, the above method cannot fundamentally reverse the process of cartilage degeneration and inflammation, can only temporarily relieve partial pain, and disease progression. There are still limitations despite the enormous potential of contemporary medications and regenerative therapies. The seek for OA treatment methods that are safer, more efficient, and reliable has thus taken precedence. TXNRD1 is mainly found in the cytoplasm of tissues and is the most studied and understood isoenzyme. It is a selenoprotein that promotes thioredoxin 1 (Trx1) reduction in an NADPH-dependent manner, and it involves cell proliferation, DNA replication, stress-induced premature senescence, and anti-oxidative stress. In our previous study, we found that TXNRD1 was significantly upregulated in IL-1 β -stimulated mouse primary chondrocytes and in cartilage from OA patients, demonstrating that TXNRD1 has an important role in articular cartilage homeostasis and OA progression. However, no studies have reported the expression of related genes in chondrocytes after TXNRD1 inhibition. Our study revealed that inhibiting TXNRD1 has been shown to activate Nrf2 signaling, and several studies over the past few years showed that an active Trx system, and TXNRD1 in particular, is important for inhibiting Nrf2 activation. Therefore, we speculate that the inhibition of TXNRD1 is mainly activated through the activation of Nrf2, thus alleviating the degradation of the extracellular matrix of the articular cartilage and then inhibiting the development of OA. Given the critical

biological functions of TXNRD1 in OA, it is imperative to elucidate the role of TXNRD1 in the development of OA and its molecular mechanisms.

Research methods

(1) Western blot , qPCR and immunohistochemistry were used to determine the expression level of TXNRD1 in the cartilage tissues of OA patients and normal individuals. IL-1 β was used on mouse chondrocytes to establish vitro OA model, Chondrocytes from mouse were stimulated with IL-1 β for various durations (0, 2, 4, 6 days), and the expression of TXNRD1, COL2a1, ADAMTS5, SOX9, MMP9 and MMP13 were assessed by qPCR and Western Blot.

(2) Auranofin and small interfering RNA(siRNA) were utilized to investigate how inhibition of TXNRD1 affected the IL-1 β -induced ECM degradation and the expression of ECM-related genes. qPCR was originally utilized to examine the mRNA expression levels of MMP9, MMP13, COL2a1 and SOX9. Western Blot was used to measure the expression of MMP13, ADAMTS5, COL2a1 and SOX9 following auranofin treatment or siTXNRD1.

(3) The si-Nrf2 was transfected in mouse chondrocytes, followed by the detection of the changes in the expression levels of the chondrocyte phenotype and ECM-associated proteins, thus further clarifying the specific mechanism.

(4) ML385 (Nrf2 inhibitor) was used to explore the mechanism of si-TXNRD1 on cartilage ECM, and Western blot was used to detect the expression level changes of the chondrocyte phenotype and its ECM-associated proteins, so as to further clarify the specific mechanism.

(5) Auranofin was injected into the DMM mouse model, and the degree of cartilage surface damage and protein expression level were measured by HE staining, Safranin O/fast green staining and immunohistochemistry.

Results and Conclusions

(1) The mRNA and protein levels of TXNRD1 were significantly upregulated in the articular cartilage of OA patients, and in vitro cytology experiments demonstrated that the mRNA and protein expression levels were upregulated under IL-1 β treatment, and the protein expression level increased in a time gradient.

(2) Auranofin promote the expression of Nrf2 and HO-1 and the synthesis of extracellular matrix and inhibit the degradation of extracellular matrix in the safe concentration range. Silencing TXNRD1 can up-regulate the expression levels of

COL2A1 and SOX9 and down-regulate the expression levels of MMP13 and ADAMTS5, thus maintaining the homeostasis of chondrocyte extracellular matrix.

(3) Silencing Nrf2 inhibited the protective effect of auranofin on cartilage ECM; similarly, inhibiting Nrf2 counteracts the protective effect of siTXNRD1, suggesting that TXNRD1 inhibition may exert the protective effect on cartilage extracellular matrix by activating Nrf2 signaling pathway.

(4) Injection of auranofin into the knee joint of mice effectively alleviated the degree of articular cartilage destruction and reduced the expression of Nrf2, further supporting the role of TXNRD1 inhibition in OA and its mechanism in vivo.

Key words: TXNRD1, Nrf2, Osteoarthritis, chondrocytes, IL-1 β , extracellular matrix, DMM model.

目 录

第 1 章 引言	1
1.1 OA 的研究现状	1
1.2 硫氧还蛋白还原酶 1 (thioredoxin reductase 1, TXNRD1) 在骨关节炎中的作用	1
1.3 Nrf2 信号通路 与骨关节炎	2
1.4 Nrf2 与 TXNRD1 在骨关节炎中的关系探讨	3
第 2 章 TXNRD1 在骨关节炎中的表达水平以及抑制 TXNRD1 保护细胞外基质作用的研究	4
2.1 实验材料	4
2.1.1 临床标本及患者资料的收集	4
2.1.2 软骨细胞来源	4
2.1.3 主要仪器设备	4
2.1.4 主要试剂	5
2.1.5 实验所需试剂的配制	6

2.2 实验方法	7
2.2.1 临床软骨标本的取材及保存	7
2.2.2 软骨标本的包埋切片	7
2.2.3 软骨组织的 RNA 提取	8
2.2.4 软骨组织蛋白的提取	8
2.2.5 免疫组化染色	8
2.2.6 RNA 提取, 逆转录及实时荧光定量 PCR	9
2.2.7 小鼠原代软骨细胞提取与培养	9
2.2.8 siRNA 瞬时转染	10
2.2.9 总蛋白提取及蛋白浓度测定	10
2.2.10 免疫印迹试验	11
2.2.11 高密度培养及甲苯胺蓝染色	12
2.2.12 统计学分析	12
2.3 实验结果	13
2.3.1 TXNRD1 在人 OA 软骨中表达上调	13
2.3.2 TXNRD1 在 IL-1 β 诱导的小鼠原代软骨细胞中表达上调	14
2.3.3 Auranofin 抑制 ECM 降解	15
2.3.4 TXNRD1 参与调控 ECM 相关基因的表达	17
2.4 讨论	18
第3章 抑制 TXNRD1 通过激活 Nrf2 信号通路从而保护骨关节炎细胞外基质的机制研究	20
3.1 实验材料	20
3.1.1 软骨细胞来源	20
3.1.2 体内动物实验	20
3.1.3 主要仪器设备	20
3.1.4 主要试剂	21
3.1.5 实验所需试剂的配制	22
3.2 实验方法	22
3.2.1 OA 小鼠模型的构建	22
3.2.2 软骨标本的包埋切片	23
3.2.3 免疫组化染色	23
3.2.4 HE 染色	23

3.2.5 番红 O 固绿染色	23
3.2.6 细胞免疫荧光	23
3.2.7 小鼠原代软骨细胞提取与培养	24
3.2.8 总蛋白提取及蛋白浓度测定	24
3.2.9 免疫印迹试验	24
3.2.10 统计学分析	24
3.3 实验结果	24
3.3.1 抑制 TXNRD1 通过激活 Nrf2 通路维持小鼠软骨细胞 ECM 的稳态	24
3.3.2 Auranofin 可减轻 DMM 诱导的 OA 小鼠模型的进展	28
3.4 讨论	30
4.1 结论	31
4.2 展望	31
致谢	33
参考文献	35
攻读学位期间的研究成果	40
综述	41

中英文缩略词表

缩写	英文全称	中文全称
OA	Osteoarthritis	骨关节炎
TXNRD1	Thioredoxin Reductase 1	硫氧还蛋白还原酶 1
Nrf2	Nuclear factor 2	核因子 2
ECM	Extracellular Matrix	细胞外基质
COL2a1	Collagen type 2	II 型胶原蛋白
SOX9	Recombinant Sex Determining Region Y Box Protein 9	重组性别决定区 Y 框蛋白 9
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs	带有血小板凝血酶敏感蛋白样 模体的解整链蛋白金属蛋白酶
MMPs	Matrix Metalloproteinases	基质金属蛋白酶
IL-1 β	Interleukin-1 β	白细胞介素-1 β
DMM	Destabilization of the Medial Meniscus	内侧半月板不稳定
HO-1	Heme Oxygenase 1	血红素氧化酶 1
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸
NQO-1	NAD (P)H dehydrogenase quinone 1	NAD (P)H 脱氢酶醌 1
ARE	Antioxidate Response Element	抗氧化反应元件
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
PBS	Phosphate Buffer solution	磷酸盐缓冲液
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM 培养基
CCK-8	Cell counting kit-8	细胞计数试剂盒-8
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase	诱导型一氧化氮合酶
COX-2	Cyclooxygenase 2	环氧合酶 2
NO	Nitric Oxide	一氧化氮
PGE2	Prostaglandin E2	前列腺素 E2
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚

中英文缩略词表

缩写	英文全称	中文全称
WB	Western-Blot	蛋白免疫印迹
TBST	Tris Buffered Saline Tween	洗膜缓冲液
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate crystals	十二烷基磺酸钠
AP	Ammonium Persulphate	过硫酸铵
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	反转录-聚合酶链式反应
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
HE	Haematoxylin and Eosin	苏木素和伊红
OARSI	Osteoarthritis Research Society International	国际骨关节炎研究协会

第 1 章 引言

1.1 OA 的研究现状

骨关节炎（Osteoarthritis, OA）是一种以关节软骨退变为病理基础的慢性关节疾病，该疾病主要以慢性疼痛和关节活动障碍为主要临床表现，严重影响着患者的生活质量^[1]。据统计，2020 年 OA 已经成为全球第四大致残疾病，该病主要好发于中老年人群，且 65 岁以上的老年人患病率已经超过 50%^[2-3]。高患病率给社会和国家造成了巨大的经济压力和医疗负担^[4]。另外，随着人口老龄化的进展和肥胖人数的增多，对 OA 的早期诊断和治疗提出了更高更新的要求^[5]。

目前对于 OA 的治疗主要有药物治疗和手术治疗。在骨关节炎早期主要采用药物治疗，对乙酰氨基酚和非甾体抗炎药是治疗 OA 的主要药物，可以一定程度的减轻关节疼痛和抑制炎症反应，或者通过关节腔注射润滑补充剂也可以缓解症状；而到了终末期 OA，最常见的治疗方式是采用关节置换等外科手术干预^[6-7]。然而，以上方法存在潜在的副作用，药物治疗可能会对胃肠道、肝脏和肾脏产生一定的影响；手术治疗也可能存在感染、血栓等术后并发症。另外，以上方法并不能从根本上逆转软骨退变的进展，只能暂时缓解患者的疼痛等症状^[8-11]。因此，进一步研究 OA 的发病因素和探索 OA 的发病机制十分有必要，并且寻找更为安全、有效、可靠的 OA 治疗措施，寻找正确的干预靶点也成为了目前的热点和焦点，对 OA 的治疗具有十分重要的意义。

1.2 硫氧还蛋白还原酶 1 (thioredoxin reductase 1, TXNRD1) 在骨关节炎中的作用

OA 的主要病理生理特征是细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 的降解和稳态异常导致关节软骨退变。ECM 是软骨细胞的外部支架，正常的软骨 ECM 主要由 II 型胶原蛋白 (Type II Collagen, COL2A1) 及蛋白聚糖 (Aggrecan) 组成^[12-14]。另外，由于关节软骨成分的独特性，软骨细胞在维持软骨 ECM 的稳定和再生发挥至关重要的作用^[15]。同时，软骨细胞生长、分化和凋亡的一系列信号转导都与细胞外基质紧密相关^[16-17]。IL -1 β 诱导的代谢可促进细胞外基质降解相关基因 (MMPs) 和含血小板反应蛋白基序的解整合素和金属蛋白酶 (ADAMTS) 的表达^[18-19]。在 MMPs 和 ADAMTS 中，MMP9、MMP13 和 ADADMT5 在细胞外基质

破坏中发挥重要作用,主要通过促进 ECM 降解从而促进 OA 的发生发展。此外,IL-1 β 可引起软骨细胞炎性细胞因子的释放和促炎基因的表达,从而抑制 ECM 主要成分(聚集蛋白聚糖和 II 型胶原)的形成^[20-21]。在 OA 中,软骨基质合成和降解的平衡被打破,导致疾病进展和临床症状。因此,有效抑制 ECM 降解相关基因的表达可能是维持软骨完整性和内环境稳态的潜在策略。

在本研究中,我们收集了非 OA 患者的正常软骨和 OA 患者的软骨标本,发现相比于正常软骨,OA 患者软骨中 TXNRD1 的表达水平存在明显上调,同时在体外细胞学实验中验证了小鼠软骨细胞在 IL-1 β 的刺激下, TXNRD1 的表达水平明显上升。而在加入 TXNRD1 抑制剂 Auranofin 或者沉默 TXNRD1 基因后,软骨 ECM 降解得到了明显减轻。此外,我们通过构建内侧半月板失稳 (destabilization of the medial meniscus, DMM) 小鼠模型,并在其关节腔内注射 Auranofin,结果显示小鼠软骨表面破坏程度明显减轻。通过以上实验可以证明无论是在体内还是体外,抑制 TXNRD1 在保护 OA 软骨 ECM 和维持关节软骨稳态中发挥重要作用。但是其中的具体机制尚不清楚,也无相关文献报导。因此,极有必要阐明 TXNRD1 在 OA 发生发展中的作用及其分子机制,从而为 OA 的诊治提供潜在的干预靶点。

1.3 Nrf2 信号通路与骨关节炎

核因子(红系衍生 2)样蛋白 2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, Nrf2) 作为调节抗氧化防御系统的一种关键转录因子^[22]。主要通过控制位于其靶基因启动子区域的抗氧化反应元件(AREs)来激活其下游基因的表达,包括抗氧化酶血红素加氧酶 1 (HO-1)和 NAD(P)H:醌氧化还原酶 1 (NQO1)^[23]。Nrf2 活性受多种蛋白修饰过程调控,如 keap1 介导的泛素化降解、蛋白激酶 C/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)介导的磷酸化等^[24]。Nrf2/ARE 的激活已被证明是 OA 进程中主要的软骨保护因子,对各种炎症刺激和氧化应激相关疾病具有保护作用^[25-26]。最近一项使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂的研究表明,激活 Nrf2 可以预防 OA。此外,在 OA 的实验模型中,Nrf2 敲除小鼠显示出比野生型小鼠更严重的软骨损伤,这表明 Nrf2 激活具有软骨保护潜力^[27]。一项体外研究表明, Nrf2 在保护软骨细胞免受 IL-1 β 诱导的氧化应激和凋亡中起关键作用^[28]。富含多酚和类黄酮的一些植物化学物质之前已被报道可以发挥保护细胞和组织损伤的作用,主要方式是激活 Nrf2 和诱导 HO-1 等细胞保护酶^[29-30]。基于以上研究结果,我们认为 Nrf2 信号通路在延缓 OA 进展中扮演着重要角色。

1.4 Nrf2 与 TXNRD1 在骨关节炎中的关系探讨

过去几年的许多研究表明, 一个有活性的 Trx 系统, 特别是 TXNRD1, 对于抑制 Nrf2 激活是重要的。一些研究表明, 通过营养性硒缺乏^[31-32]或通过条件敲除 Sec 插入硒蛋白所需的 tRNASec 基因 (Trsp), 细胞总硒蛋白库减少, 导致 Nrf2 的强烈激活, 并诱导各种 II 相和抗氧化酶的产生^[33-34]。研究还表明, Nrf2 诱导表型特别依赖于管家硒蛋白 (如 TrxR1) 表达的缺乏^[35], 另外几项基于细胞和动物的研究已经证实, TrxR1 活性降低 导致 Nrf2 激活。例如, Fourquet 等人提出 shRNA 介导的 TrxR1 敲低可以促进 H₂O₂ 介导的 Keap1 在 Cys151 的氧化以及 Nrf2 的稳定^[36], 因此表明 Trx 系统减少分子间二硫可能是一个重要的关闭信号。此外, 在 siRNA 介导的 TrxR1 敲低或抑制的 Clara 细胞中^[37], 或在 TXNRD1 特异性敲除小鼠的肝细胞中^[38], 观察到 Nrf2 稳定和反式激活。Nrf2 对 TrxR1 的靶向作用也在 TXNRD1 敲除小鼠胚胎成纤维细胞中观察到^[39-40]。综上所述, 这些观察结果强烈提示 TrxR1 和 Nrf2 之间存在直接的功能联系, 这不能仅用 TrxR1 活性丧失后氧化应激的增加来解释。

第 2 章 TXNRD1 在骨关节炎中的表达水平以及抑制 TXNRD1 保护细胞外基质作用的研究

2.1 实验材料

2.1.1 临床标本及患者资料的收集

收集因外伤需要截肢的正常软骨和行膝关节置换术的 OA 关节软骨标本共 12 例，正常软骨和 OA 软骨标本各 6 例。本研究得到南昌大学第一附属医院伦理委员会批准，并且在取样前告知病人并签署知情同意书。

2.1.2 软骨细胞来源

将刚出生的 C57BL/6J 的小鼠处死，用 75% 酒精消毒 30 分钟，并在无菌条件下用器械将肌肉，筋膜，股骨和胫腓骨分离，从关节处分离出软骨组织，将其放在装有 PBS 的培养皿中，剪成大小约 1mm 的碎块，之后将碎块转移到 15mL 离心管中，并用含双抗的 PBS 反复清洗 3 遍，接着往离心管中加入 0.25% 胰蛋白酶约 3 mL，放在 37℃ 的恒温摇床中震荡消化大约 1h。消化完成后离心机中离心 5 分钟，弃上清液后加入 0.2% II 型胶原酶溶液 5 mL，继续放在 37℃ 的恒温摇床中消化 4h。离心结束后用 100 目筛网过滤，过滤后将液体转移至 15 mL 离心管内，放入离心机内离心 5min。弃上清液，用 DMED 培养基重新悬浮细胞转移到培养瓶中，在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养，每隔 2-3 天换一次液，在显微镜下观察细胞形态和生长情况。

2.1.3 主要仪器设备

CO₂ 细胞培养箱 美国 Thermo 公司

微量移液器 德国 Eppendorf 公司

石蜡组织切片机 德国 Leica 公司

普通显微镜 日本 Nikon 公司

实时荧光定量 PCR 仪 美国 Bio-Rad 公司

电泳仪 美国 Bio-Rad 公司

纯水仪 美国 Millipore 公司
电热烘箱 山东博科生物产业有限公司
生物安全柜 苏州安泰空气技术有限公司
-80℃超低温冰箱 海尔公司
低温离心机 德国 Eppendorf 公司
酶标仪 美国 Bio-Rad 公司
恒温水浴锅 苏州力意达仪器科技有限公司
超净工作台 山东博科生物产业有限公司
脱水机 DIAPATH
电子天平 瑞士 Mettler Toledo 公司
高压蒸汽灭菌锅 山东博科生物产业有限公司
化学发光凝胶成像系统 美国 Thermo 公司
细胞冻存管 美国 Gbico 公司
组织研磨仪 上海净信实业发展有限公司
液氮罐 成都金凤液氮容器有限公司

2.1.4 主要试剂

DMEM/F12 培养基 美国 Gibco 公司
总 RNA 提取试剂盒 北京全式金生物技术有限公司
Trizol 北京全式金生物技术有限公司
逆转录试剂盒 日本 TaKaRa 公司
PCR 试剂盒 日本 TaKaRa 公司
无水乙醇 国药集团化学试剂有限公司
甲醇 西陇化工股份公司
蛋白酶抑制剂 北京普利莱基因技术有限公司
磷酸酶抑制剂 北京普利莱基因技术有限公司
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 武汉博士德生物工程有限公司
EDTA 抗原修复液 武汉赛维尔生物科技有限公司
Loading Buffer 北京索莱宝生物科技有限公司
DAB 显色剂 武汉赛维尔生物科技有限公司
Marker 标记蛋白 美国 Thermo 公司
脱脂奶粉 武汉博士德生物工程有限公司
吐温-20 北京索莱宝生物科技有限公司
过硫酸铵 北京索莱宝生物科技有限公司
胰蛋白酶 北京索莱宝生物科技有限公司

4%多聚甲醛 武汉赛维尔生物科技有限公司
羊抗兔 IgG 武汉博士德生物工程有限公司
羊抗鼠 IgG 武汉博士德生物工程有限公司
兔抗小鼠 MMP13 抗体 武汉博士德生物工程有限公司
兔抗小鼠 SOX9 抗体 武汉博士德生物工程有限公司
兔抗小鼠 ADAMTS5 抗体 武汉博士德生物工程有限公司
兔抗小鼠 Collagen II抗体 武汉博士德生物工程有限公司
小鼠抗小鼠 GAPDH 抗体 武汉博士德生物工程有限公司
细胞冻存液 北京索莱宝生物科技有限公司
PBS 磷酸盐缓冲溶液 北京索莱宝生物科技有限公司
DMSO（二甲基亚砷） 美国 Sigma 公司
II型胶原酶 北京索莱宝生物科技有限公司
胎牛血清 美国 Gibco 公司
硝酸纤维素膜 NC 膜 美国 Millipore 公司
CCK-8 试剂盒 武汉博士德生物工程有限公司
超敏 ECL 化学发光检测试剂盒 上海百赛生物技术股份有限公司
青霉素-链霉素双抗 北京索莱宝生物科技有限公司
IL-1 β 美国 PeproTech 公司
RIPA 裂解液 北京普利莱基因技术有限公司
BCA 蛋白曲线测量试剂盒 美国 Thermo 公司
甲苯胺蓝染色试剂盒 北京索莱宝生物科技有限公司
一抗二抗稀释液 武汉博士德生物工程有限公司
中性树胶 国药集团化学试剂有限公司
Triton X-100 北京索莱宝生物科技有限公司
Auranofin 美国 MedChemexpress(MCE)公司
ML385 美国 MedChemexpress(MCE)公司

2.1.5 实验所需试剂的配制

（1）软骨细胞培养基的配制：紫外消毒超净台以及所需器械和耗材 30 min，取 47.5 mL DMEM 培养基倒入离心管中，再向其中加入 2.5 mL 胎牛血清，混匀后封口膜封口，储存于 4℃冰箱，在下次使用前恢复至室温。

（2）Auranofin 溶液配制：配制浓度为 10 mM 的 Auranofin 母液：将 Auranofin 的粉末（5 mg）在 4℃离心 5 min，常规紫外消毒超净台 30 min，将 DMSO 加入粉末中混匀，分装至 EP 管中，在-80℃冰箱内冻存以备后续实验使用。

(3) ML385 溶液配制：配制浓度为 10 mM 的 ML385 母液：将 ML385 的粉末（5 mg）在 4℃离心 5 min，将 DMSO 倒入粉末中混匀，分装后在-80℃冰箱内冻存，以备后续实验使用。

(4) 蛋白裂解混合液的配制：按照 RIPA 裂解液：蛋白酶抑制剂（50X）=49:1 的比例配制蛋白裂解混合液。

(5) 0.2% II 型胶原酶溶液的配制：II 型胶原酶粉末离心 5 min 后倒入离心管中，再加入 DMEM/F12 无血清培养基振荡摇匀，置于-20℃冰箱以备后续试验使用。

(6) 细胞冻存液配制：取 100 μ L 二甲基亚砷（DMSO）溶液与 900 μ L FBS 充分混匀，可用于软骨细胞冻存。

(7) TBST 缓冲液配制：取 2.42 g Tris 和 8.8 g NaCl，加入 1000 mL 去离子水，并加入 1 mL Tween-20，充分混匀后室温保存，可用于洗膜。

2.2 实验方法

2.2.1 临床软骨标本的取材及保存

在手术室收集因外伤需要截肢的正常软骨和膝关节置换的 OA 软骨标本各 6 例并获取所有患者的临床资料。软骨标本取下后将其分为两部分，一部分放入液氮保存，另一部分用生理盐水清洗干净后剪成小片状并用 4%多聚甲醛固定 24 h。

2.2.2 软骨标本的包埋切片

(1) 多聚甲醛固定完成后，将标本放在 EDTA 脱钙液中进行脱钙，每 3 天换一次脱钙液，直至脱钙完全。针头能无阻力刺进软骨表面则为脱钙完成。

(2) 脱水浸蜡：脱好钙的软骨用 PBS 洗 3 遍后按以下步骤进行脱水：先分别 75%酒精处理 4 h，85%酒精处理 2 h，90%酒精处理 1 h，95%酒精处理 1 h，无水乙醇 I 处理 30 min，无水乙醇 II 处理 30 min，接着分别用苯醇处理 5-10 min，二甲苯 I 处理 10 min，二甲苯 II 处理 10 min，最后分别用 65℃融化石蜡 I 1 h，65℃融化石蜡 II 处理 1 h 和 65℃融化石蜡 III 处理 1 h。

(3) 包埋：将处理后的标本放入组织包埋机中，滴入融化石蜡来包裹组织，随后将包埋框放在冷冻机上冷却 1 h，待凝固后取出。

(4) 切片：将蜡块放在石蜡切片机上进行旋转切片，切好后将组织摊平，用载玻片将其捞起，随后 60℃烘箱内烤片，烤干后取出常温保存备用。

2.2.3 软骨组织的 RNA 提取

- (1) 首先在研钵中倒入液氮，再将剪碎的组织标本在研钵中磨成粉末，接着将粉末倒入装有 Trizol 溶液的离心管中，充分混合摇匀。
- (2) 冰上静置 5 min 后加入 Trizol 五分之一体积的氯仿剧烈震荡 30 s
- (3) 取上层溶液加入到新的离心管中并加入 Trizol 二分之一体积的异丙醇，静置 10 min 后 15000 g 离心 12 min。
- (4) 离心后弃上清液，按 Trizol 1:1 比例加入 75% 乙醇，充分混匀后 15000 g 离心 12 min。
- (5) 弃去上清液室温干燥 10 min，然后加入 RNAfree 水，保存于 -80℃ 备用。

2.2.4 软骨组织蛋白的提取

- (1) 首先在研钵中倒入液氮，再将剪碎的组织标本在研钵中磨成粉末，之后加入适量配制好的蛋白裂解液，裂解后放在 4℃ 摇床上继续裂解 2 h。接着将 EP 管放进高速冷冻离心机中（4℃，12000 转/min）离心 12 min 后，用移液器转移上清液至新的 EP 中。
- (2) 蛋白浓度测定：用 PBS 将样品进行稀释同样的倍数，同时配制好标准品的浓度。准备做 BCA 定量的试剂盒并计算需要的工作液总量，按照 A 液：B 液=50:1 的比例配制工作液，充分混匀。将 BSA 标准品以及待测蛋白样品各 20 μL 分别加入到 96 孔板中，然后每孔加入 200 μL 配制好的 BCA 工作液，充分混匀后盖上 96 孔板盖，37℃ 孵育 30 min，在 3-5 min 内完成检测。用酶标仪在 562 nm 处检测每个孔内的吸光度，做好记录，并根据标准曲线公式计算蛋白浓度。
- (3) 蛋白质变性：用 Loading Buffer (6X) 将样品配成混合液后 100℃ 煮沸 10 min。接着按体积分装后放入 -20℃ 冰箱保存备用。

2.2.5 免疫组化染色

1. 提前将切片放置于烘干箱中 60℃ 烘烤 2 h。之后放于二甲苯 I 15 min，二甲苯 II 15 min，再放入二甲苯 III 中浸泡 15 min，接着用梯度乙醇（100%、95%、85%、75%）复水，每个梯度浸泡 5 min，最后用流动自来水冲洗。
2. 用 PBS 将切片洗三次，每次 5 min；之后将洗好的切片置于煮沸的枸橼酸盐缓冲液（0.01 mol/L，pH 6.0）中行微波抗原修复 15 min；接着将高压锅置于流动自来水下冲洗 10 min 降温，再打开锅盖冷却后将切片取出，PBS 缓冲液洗 3 遍。
3. 此时用组化笔在组织周围画一个圈，滴加 3% 的 H₂O₂，室温避光孵育 10 min 阻断内源过氧化物酶。随后使用 1×PBS 洗三次，每次 5 min。
4. 甩干 PBS 后滴加 BSA，封闭 30 min，接着甩掉封闭液后加入一抗在湿盒内 4℃ 封闭过夜。

次日拿出切片盒复温 1 h, 1×PBS 洗三次, 每次 5 min; 甩干后滴加二抗覆盖组织, 室温孵育 1 h。

5. 用 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 显微镜下观察控制反应强度, 自来水终止反应; 漂洗 5 min。

6. 切片经苏木素 1 min, 流水冲洗 3 次, 盐酸酒精分化 20 s, 流水冲洗 10 min。

7. 将染好的切片经系列乙醇脱水、二甲苯透明后 (与第一天过缸的顺序相反), 使用中性树脂胶封片。最后在显微镜下观察染色情况, 记录数据并分析。

2.2.6 RNA 提取, 逆转录及实时荧光定量 PCR

(1) 从数箱中取出细胞后用冰 的 PBS 洗两遍, 加入 1 mL Trizol 后用移液枪吹打细胞并转移至 1.5 mL EP 管中。冰上静置 10 min 后加入 200 μ L 氯仿, 持续颠倒混匀 30 s。置于冰上 5 min, 离心机 12000 rpm 10 min, RNA 在上层水相。使用移液器将上层水相转移到新的 EP 管中 (操作过程中不要吸到白色絮状物), 紧接着加入 0.5 mL 异丙醇并颠倒混匀, 冰上静置 5 min (很重要) 后离心机 12000 rpm 10 min 进行离心。离心后, 在管底见到的白色絮状物即为 RNA。弃去上清后加入 75%乙醇 1 mL, 颠倒混匀, 离心 (12000 rpm, 5 min)。倒掉上清, 接着 12000 rpm 短暂离心, 尽量吸除液体 (注意不要把 RNA 吸掉)。在室温条件下静置 10 min, 加入 20-40 μ L DEPC 水溶解 RNA。使用分光光度计测 RNA 浓度, 取其中 1-2 μ g 做逆转录, 其余 -80 °C 冻存。

(2) 按顺序加入 1 μ L Anchored Oligo (dT) 20 Primer、1 μ L gDNA Remover、1 μ L TransScriptII RT/RI Enzyme Mix、10 μ L Reaction Mix 和 1 μ g 样本 RNA, 其余用无核酶水补齐 20 μ L 体系, 配好后混匀。将其放入逆转录仪内进行逆转录, 设定参数先 50°C 孵育 15 min, 再 85°C 加热 5 s。(反应体系为 20 μ L)。

(3) 利用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒和 ABI StepOnePlus System PCR 仪进行 qPCR, 补齐 20 μ L 反应体系并加入八联管内, 混匀后放入仪器并设置参数为:

1. 95 °C 变性 5 秒 40 个循环, 2. 60 °C 延伸 30 s。每个实验重复 3 次。

2.2.7 小鼠原代软骨细胞提取与培养

将出生 3 天以内的小鼠处死, 在 75%酒精中消毒 30 min, 并在无菌条件下用器械将肌肉, 筋膜, 股骨和胫腓骨分离, 从关节处分离出软骨组织, 将其放在装有 PBS 的培养皿中, 剪成大小约 1mm 的碎块, 之后将碎块转移到 15 mL 离心管中, 并用含双抗的 PBS 反复清洗 3 遍, 接着往离心管中加入 0.25% 胰蛋白酶约 3 mL, 放在 37 °C 的恒温摇床中震荡消化大约 1 h。消化完成后离心机中离心 5 min, 弃上清液后加入 0.2% II 型胶原酶溶液 5 mL, 继续放在 37°C 的恒温摇床中消化 4 h。离心结束后用 100 目筛网过滤, 并将过滤后的液体转移

至 15 mL 离心管内，放入离心机内离心 5 min。弃上清液，用 DMED 培养基重新悬浮细胞转移到培养瓶中，在 37 °C、5 % CO₂、的细胞培养箱内培养，每隔 2-3 天换一次液，在显微镜下观察细胞形态和生长情况。

2.2.8 siRNA 瞬时转染

(1) 将细胞铺板后培养 24 h，细胞密度约 50 % 左右可以进行转染。

(2) 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 由锐博生物技术有限公司负责合成，具体靶序列如下：

基因名称	种属	序列
TXNRD1-siNC	Mouse	5'-CAGCCAAATTTGACAAGAA-3
TNNRD1-siRNA1	Mouse	5'-GAACATGGTATCAAGTTTA-3
TXNRD1-siRNA2	Mouse	5'-GCTCCAATGTCAAATGTGA-3

基因名称	种属	序列
Nrf2-siNC	Mouse	5'-CAGGACTACAGTCCCAGCA-3
Nrf2-siRNA1	Mouse	5'-CCACCGCCAGGACTACAGT-3
Nrf2-siRNA2	Mouse	5'-GATGGACTTGGAGTTGCCA-3

2.2.9 总蛋白提取及蛋白浓度测定

(1) 细胞总蛋白的提取：细胞经过不同的处理后，将 6 孔板中的培养基去除，并用预冷的 PBS 洗 3 遍，吸干残留的 PBS（所有操作均在冰上进行，避免蛋白降解）。每孔加入适量配制好的蛋白裂解液，冰上裂解 30 min，裂解后利用细胞刮匙刮下细胞，刮好后将混合液转移至 1.5 mL EP 管中，之后放在 4 °C 摇床上继续裂解 1 h。接着将 EP 管放进高速冷冻离心机中（4 °C，12000 转/min）离心 12 min 后，用移液器转移上清液至新的 EP 中。

(2) 蛋白浓度测定：用 PBS 将样品进行稀释同样的倍数，同时配制好标准品的浓度。准备做 BCA 定量的试剂盒并计算需要的工作液总量，按照 A 液：B 液=50:1 的比例配制工作液，充分混匀。将稀释好的 BSA 标准品和待测蛋白样品各 20 μL 分别加入到 96 孔板中，紧接着每孔加入 200 μL 配制好的 BCA 工作液，充分混匀后盖上 96 孔板盖，37 °C 孵育 30 min，在 3-5 min 内完成检测。用酶标仪在

562 nm 处检测每个孔内的吸光度，做好记录，并根据标准曲线公式计算蛋白浓度。

(3)蛋白质变性:用 Loading Buffer (6X)将样品配成混合液后 100 °C煮沸 10 min。接着按体积分装后放入-20 °C冰箱保存备用。

2.2.10 免疫印迹试验

2.2.10.1 配胶

1. 配置分离胶:根据不同的需要体积配置胶,通常为 7.5 mL 分离胶和 2.5 mL 浓缩胶;加入一定量的 H₂O, Tris-Cl, 30%丙烯酰胺, SDS, AP, TEMED 混匀后加入玻璃板,注意不要有气泡,留出灌注浓缩胶所需空间(梳子的齿长再加 1 cm);
2. 水封:分离胶上轻轻加入水使隔绝空气防止氧气扩散进入凝胶而抑制聚合反应,凝胶与水出现明显折射面时说明分离胶凝固好(约 15 min)。倒掉水,并用滤纸吸干残水;
3. 配置浓缩胶:按照配方混匀后加入,垂直插入梳子,避免气泡,凝固约 30 min。
4. 胶的保存:用 marker 笔标记胶的浓度、日期和所有者,用保鲜膜封胶,并且胶之间要有分隔,最后放入 4°C。

2.2.10.2 电泳

1. 将样品取出后煮沸 3 min 并离心,把胶正确地放入电泳槽中,轻轻地将梳子拔出并观察是否有电泳液渗漏。
2. 将煮好的蛋白样品取出,用移液器将样品缓缓加入至加样孔中(上样量为 30 μg)并在样品两侧加样孔各加入 3.5 μL 的 marker。
3. 打开电源,先将电压调至 80 V 跑上层胶,约 30 min 后,当 marker 条带进入分离胶分离后将电压调至 120 V,在观察到溴酚蓝跑到分离胶底部时终止电泳,准备转膜。

2.2.10.3 转膜和封闭

1. 准备一个大盘,玻璃棒,镊子,转膜夹和海绵,将电转液倒入大盘将海绵和滤纸浸润。滤纸 7×9 cm。
2. 戴好手套后用尺子测量目的蛋白所在条带并根据胶的大小剪取合适大小的 NC 膜。
3. 轻轻撬开转膜后的玻璃板,按照所需蛋白进行切胶,切胶动作要迅速,切好后放在夹子上的滤纸上面,再盖上 NC 膜,用玻璃棒来回擀动以消除中间的气泡,再将滤纸和海绵垫盖上去后合并转膜夹。

4. 将夹好的夹子放入转膜槽中，按照“黑对黑，白对红”进行组装，之后将转膜液倒入转膜槽中，直到浸没夹板，盖好盖子，将槽放在充满冰的冰盒中进行转膜，转膜条件为 200 mA 恒流转膜，转膜时间长短按分子量大小确定。
5. 转膜完成后，将膜用 5% 脱脂牛奶中进行封闭，于摇床上室温封闭约 90 min。

2.2.10.4 一抗二抗的孵育及显色反应

1. 封闭完成后，用 TBST 摇洗 10 min。
2. 将稀释好的一抗和 NC 膜放在孵育盒中置于 4 °C 冰箱中进行孵育过夜（15 h 以上）。
3. 孵育过夜后，回收一抗，用 TBST 清洗膜 3 次，每次 10 min。清洗之后加入配制好的二抗放在摇床上常温孵育 1 h。
4. 二抗孵育完之后，用 TBST 清洗膜 3 次，每次 10 min。
5. 将 ECL 化学发光液按 1:1 配制好，然后把膜上液体用纸吸干，放入发光液中浸没，接着把膜放入化学发光凝胶系统进行成像，显影。使用 ImageJ 软件进行分析，并做好详细记录。

2.2.11 高密度培养及甲苯胺蓝染色

为了评估 TXNRD1 的抑制剂 Auranofin 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞外基质的影响，我们对小鼠软骨细胞进行高密度培养和甲苯胺蓝染色。培养好的软骨细胞用胰蛋白酶消化后对其进行细胞计数，以 2×10^4 /cm² 的密度将软骨细胞用完全培养基重悬，轻轻将 10 μ L 置于 24 孔细胞培养板的正中间，结束后放入孵箱内培养，待细胞完全贴壁后加入提前配制好的培养基，每组设置 3 个副孔，每隔一天换液一次，培养 7-9 天。之后吸尽培养基后用冰的 PBS 缓冲液轻轻洗涤 3 遍。4 % 多聚甲醛固定细胞 30 min 后加入甲苯胺蓝染液 约 500 μ L 使染液覆盖住细胞，染色约 5 min 后吸去染液，用 PBS 缓冲液清洗残余染液，利用显微镜拍照记录。

2.2.12 统计学分析

该研究中计量资料以均数 $\pm$ 标准差描述两组间均数比较采用 t 检验；多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。所有实验都至少重复 3 次，当 $P < 0.05$ 时，可以认为差异具有统计学意义。数据统计分析采用 SPSS 23.0 软件。Western blot 条带灰度值应用 ImageJ 软件分析。绘图采用 GraphPad Prism 8.0 软件。

2.3 实验结果

2.3.1 TXNRD1 在人 OA 软骨中表达上调

2.3.1.1 TXNRD1 的 mRNA 和蛋白表达水平在 OA 患者中显著上调

为了明确 TXNRD1 在骨关节炎病理生理过程中的表达水平是否发生变化，我们在临床上收集了正常软骨和 OA 软骨，通过提取 OA 软骨和正常软骨的 mRNA，逆转录为 cDNA 后利用 qPCR 检测组织中 TXNRD1 和其他 ECM 相关基因的表达水平。我们发现 OA 软骨中 TXNRD1 的 mRNA 水平明显高于正常组 ($P < 0.05$)。另外，MMP9 和 MMP13 的 mRNA 水平在 OA 组也是明显增高 ($P < 0.05$)，而 COL2A1 和 SOX9 的 mRNA 表达水平在 OA 组中则降低 ($P < 0.05$) (图 1.1A)。此外，我们还提取了正常软骨和 OA 软骨的总蛋白，并检测了 TXNRD1 的蛋白水平的变化，结果显示，TXNRD1 的蛋白表达水平在 OA 组明显高于正常软骨组 ($P < 0.05$) (图 1.1B, C)。

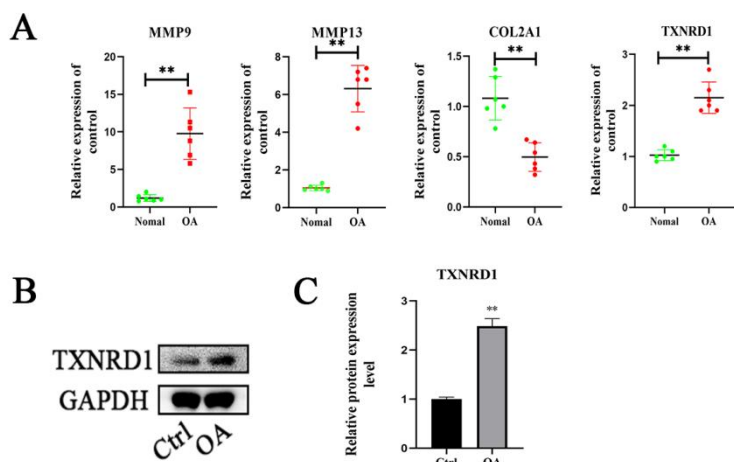


图 1.1 TXNRD1 的 mRNA 和蛋白表达水平在 OA 患者中显著上调。(A)通过 qPCR 检测 OA 软骨和正常软骨中 TXNRD1、MMP9、MMP13 和 COL2a1 的表达。(B) Western blot 检测 OA 软骨和正常软骨中 TXNRD1 蛋白表达水平。(C) Western blot 结果定量分析。

2.3.1.2 免疫组化检测显示 TXNRD1 表达在 OA 患者中显著升高

取软骨标本经过石蜡切片后，通过免疫组化染色观察 TXNRD1 在 OA 软骨和正常软骨中表达的变化，我们发现在 OA 软骨组中 TXNRD1 阳性细胞显著多于正常软骨组，这表明 TXNRD1 的表达水平在 OA 患者的软骨中上调 ($P < 0.05$) (图 1.2D,E)。

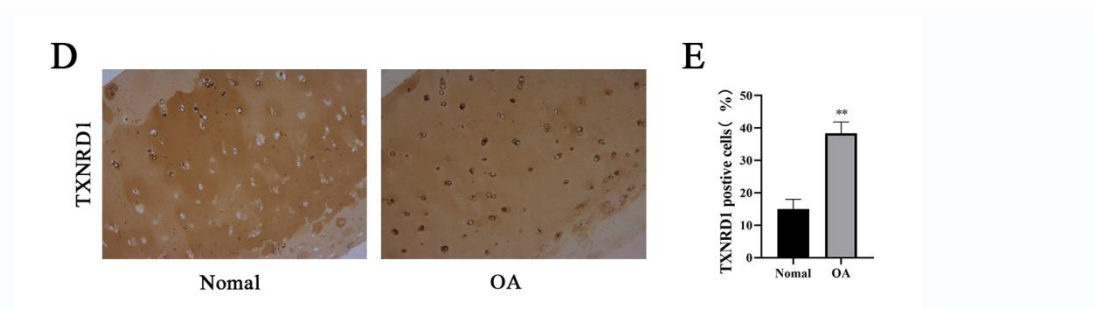


图 1.2 TXNRD1 在 OA 软骨和正常软骨中的表达。(D)免疫组化检测 TXNRD1 在 OA 软骨和正常软骨中的表达。(E)免疫组织化学结果的定量分析。

2.3.2 TXNRD1 在 IL-1 β 诱导的小鼠原代软骨细胞中表达上调

2.3.2.1 原代软骨细胞在炎症因子 (IL-1 β) 刺激下, TXNRD1 的 mRNA 水平上调

为了进一步证明 TXNRD1 在体外 OA 模型中的表达水平,我们利用 IL-1 β 刺激小鼠原代软骨细胞模拟细胞的 OA 模型。IL-1 β 是破坏软骨稳态,促进软骨细胞外基质降解的主要细胞因子,常用来诱导细胞 OA 模型。我们通过检测 MMP13, MMP9, COL2A1 和 SOX9 的表达来检测细胞 OA 模型是否成功的构建。在用 IL-1 β 刺激软骨细胞 48 h 后,提取细胞内的 RNA 并检测它们的表达水平。结果显示软骨细胞在 IL-1 β 刺激 48 h 后 MMP9, MMP13 的 mRNA 表达水平上升,而 COL2A1 和 SOX9 的表达水平则下降(图 2.1A)。

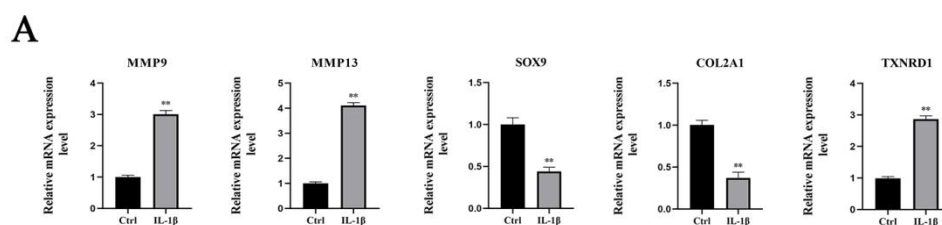


图 2.1 TXNRD1 的 mRNA 在 IL-1 β 刺激的小鼠软骨细胞中的表达。(A) qPCR 检测 TXNRD1、MMP9、MMP13、COL2a1 和 SOX9 mRNA 表达水平。

2.3.2.2 原代软骨细胞在炎症因子 (IL-1 β) 时间梯度刺激下, TXNRD1 的蛋白表达随着时间推移逐渐增加

接下来我们在蛋白水平上进一步探讨在 IL-1 β 时间梯度刺激下对软骨细胞中 TXNRD1 及其 ECM 相关蛋白表达水平的影响。我们将软骨细胞种板在 6 孔板中,用 IL-1 β (10 ng/mL) 分别刺激 0, 2, 4, 6 天,在第 6 天提取总蛋白,然后利用 Western blot 技术检测 TXNRD1, MMP13, ADAMTS5, COL2A1 和 SOX9 的蛋白表达量,结果显示:随着 IL-1 β 刺激时间的延长,软骨细胞

TXNRD1, MMP13, ADAMTS5 的表达水平逐渐上升, 而 COL2A1 和 SOX9 的表达水平则逐渐下降 (图 2.2B,C)。

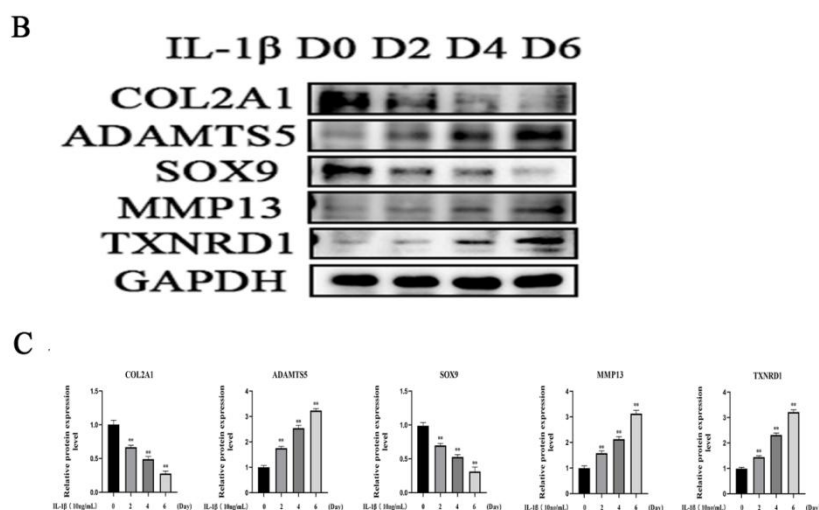


图 2.2 TXNRD1 的蛋白质在 IL-1 β 刺激的小鼠软骨细胞中的表达水平。(B)小鼠软骨细胞用 IL-1 β (10 ng/mL)刺激, Western blot 检测 TXNRD1、MMP13、ADAMTS5、COL2a1 和 SOX9 蛋白表达水平。(C) Western blot 结果的定量分析。

2.3.3 Auranofin 抑制 ECM 降解

2.3.3.1 Auranofin 对软骨细胞发挥作用的最佳浓度范围

为了明确 Auranofin 在软骨细胞中的安全浓度范围, 我们利用 CCK8 来检测不同浓度的 Auranofin 对软骨细胞活性的影响, 从而确定 Auranofin 在软骨细胞中的最佳作用浓度范围。结果显示, 无论是在 24 h 还是 48 h, Auranofin 的浓度在 0.4 μ M 以内吸光度没有明显变化, 一旦浓度超过 0.4 μ M, 细胞吸光度会逐渐降低 (图 3.1A)。以上结果说明 Auranofin 浓度在 0.4 μ M 以后对细胞没有毒性。所以我们后期细胞试验的 Auranofin 浓度都控制在 0.4 μ M 以内。

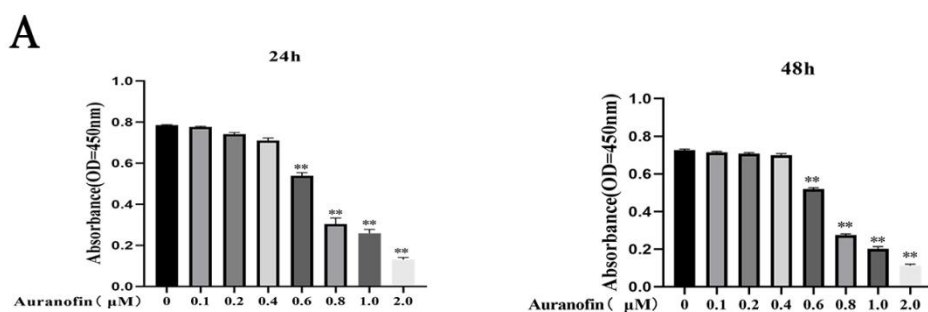


图 3.1 CCK8 检测 Auranofin 的细胞毒性。(A)Auranofin 处理小鼠软骨细胞 24 h 和 48 h 的细胞活力。

2.3.3.2 Auranofin 对 ECM 相关表型的 mRNA 水平的影响

我们应用 qPCR 技术检测软骨细胞在 IL-1 β 刺激后 ECM 相关基因的表达情况，以及在加入 Auranofin 处理后对这些相关基因表达的影响。我们的结果显示，在 IL-1 β 刺激后，MMP9 和 MMP13 的 mRNA 表达明显上升，而 COL2A1 和 SOX9 的表达水平则显著下降。然而，在使用 Auranofin 预处理的情况下，MMP9 和 MMP13 的上升趋势被抑制，同时，COL2A1 和 SOX9 的表达水平也出现回调（图 3.2B）。

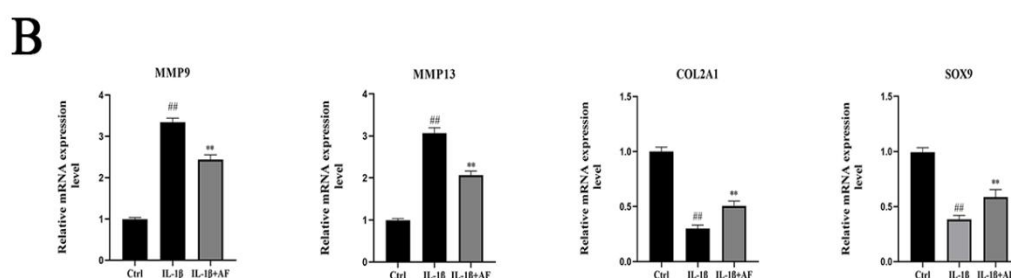


图 3.2 Auranofin 对 ECM 相关表型的 mRNA 水平的影响。(B)qPCR 结果显示，IL-1 β 可上调 MMP9、MMP13 的 mRNA 水平，下调 COL2a1、SOX9 的 mRNA 水平，而 Auranofin 可逆转这一趋势。

2.3.3.3 不同浓度的 Auranofin 对 ECM 相关表型蛋白表达的影响

接着，我们采用 Western blot 技术在蛋白水平上检测 Auranofin 对软骨相关基因的表达的影响。与 qPCR 结果类似，在利用 IL-1 β 对软骨细胞进行处理后，我们发现 COL2A1 和 SOX9 的蛋白表达被抑制，而 ADAMTS5 和 MMP13 的蛋白表达则增强。接着在不同浓度的 Auranofin 处理的情况下，COL2A1 和 SOX9 的表达呈浓度梯度上调，而 MMP13 和 ADAMTS5 的蛋白表达则呈浓度梯度下降（图 3.3C,D），这提示 Auranofin 可能对细胞外基质有一定的保护作用。

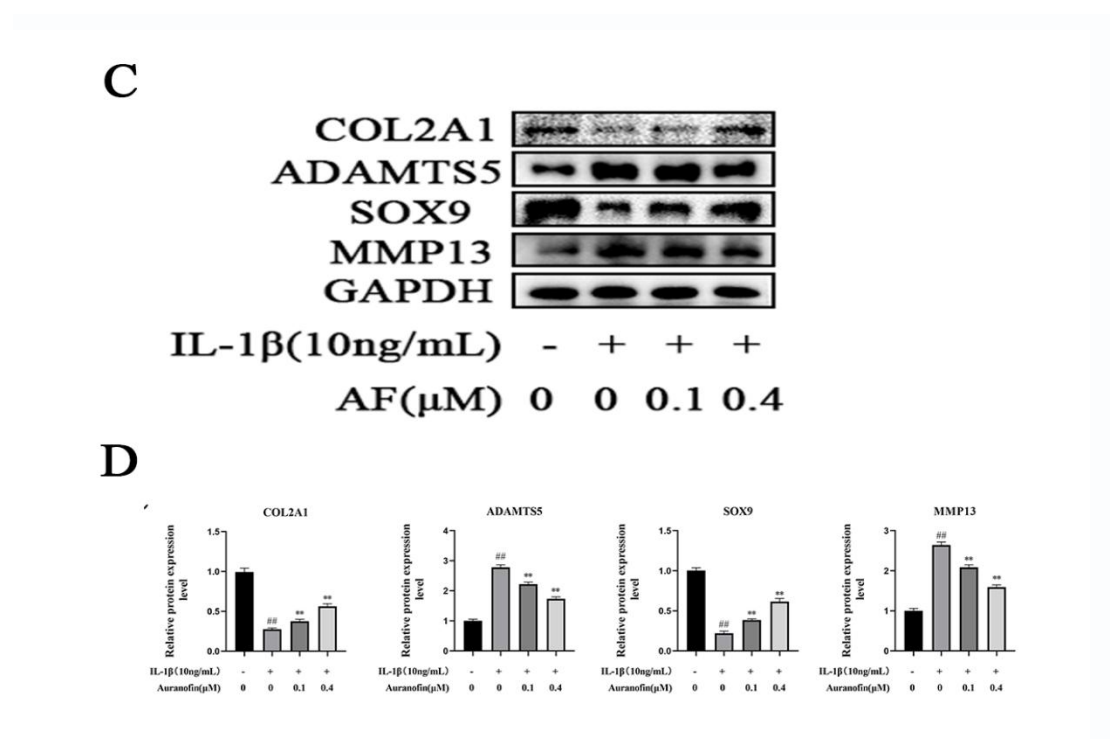


图 3.3 不同浓度的 Auranofin 对 ECM 相关表型蛋白表达的影响。(C-D) Western blot 检测 IL-1β 诱导的软骨细胞中 MMP13、ADAMTS5、COL2a1 和 SOX9 的蛋白表达水平及定量。

2.3.3.4 高密度培养检测 Auranofin 对 ECM 的保护作用

我们在利用高密度培养技术培养软骨细胞后,通过甲苯胺蓝染色来检测细胞外基质的情况。需培养的细胞种在 24 孔板上,分成 4 组,分别是正常组, IL-1β组, IL-1β+低浓度 Auranofin 组, IL-1β+高浓度 Auranofin 组,到一定时间后进行染色,在染色时间相同的情况下,观察染色强度,结果显示,正常组的蓝色最深, IL-1β组染色最浅,而在加入 Auranofin 作用的两组染色强度分别随着浓度的升高而加深(图 3.4E,F)。这进一步证明 Auranofin 对细胞外基质起到一定的保护作用。

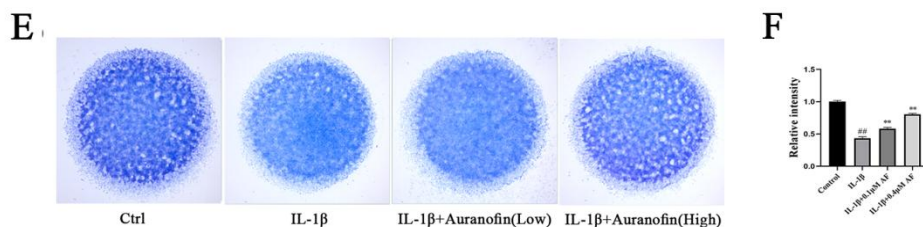


图 3.4 高密度培养检测 Auranofin 对 ECM 的保护作用。(E-F)高密度培养法检测 IL-1β (10 ng/mL)和不同浓度 Auranofin(0、0.1、0.4 mM)培养的软骨细胞甲苯胺蓝染色结果。

2.3.4 TXNRD1 参与调控 ECM 相关基因的表达

前面我们已经证明 TXNRD1 的抑制剂 Auranofin 对软骨细胞外基质的保护作用,接着我们需要证明是因为对 TXNRD1 的抑制从而对细胞外基质产生影响还是因为 Auranofin 本身的药物作用原因,所以我们接下来利用 siRNA 来敲低 TXNRD1,

并检测在敲低 TXNRD1 之后细胞外基质相关基因表达的变化。首先, 我们利用 qPCR 和 Western blot 检测 TXNRD1 的敲低效率, 我们发现 siRNA2 的敲低效率更高 (图 4.1A-C), 所以接下来的实验我们都是用 siRNA2 来进行。接着我们进行了 Western blot 来检测 COL2A1, MMP13, ADAMTS5 和 SOX9 的表达变化, 我们的结果显示, IL-1 β 的刺激可以降低 COL2A1 和 SOX9 的蛋白表达水平, 同时升高 ADAMTS5 和 MMP13 的蛋白表达水平。但是, 在利用 siRNA 敲低 TXNRD1 后, 无论有无 IL-1 β 的刺激, 都可以上调 COL2A1 和 SOX9, 同时降低 ADAMTS5 和 MMP13 的蛋白表达水平 (图 4.1D,E)。这些结果提示 TXNRD1 在软骨细胞外基质降解中发挥着比较重要的作用, 并且抑制 TXNRD1 能有效缓解细胞外基质的降解。

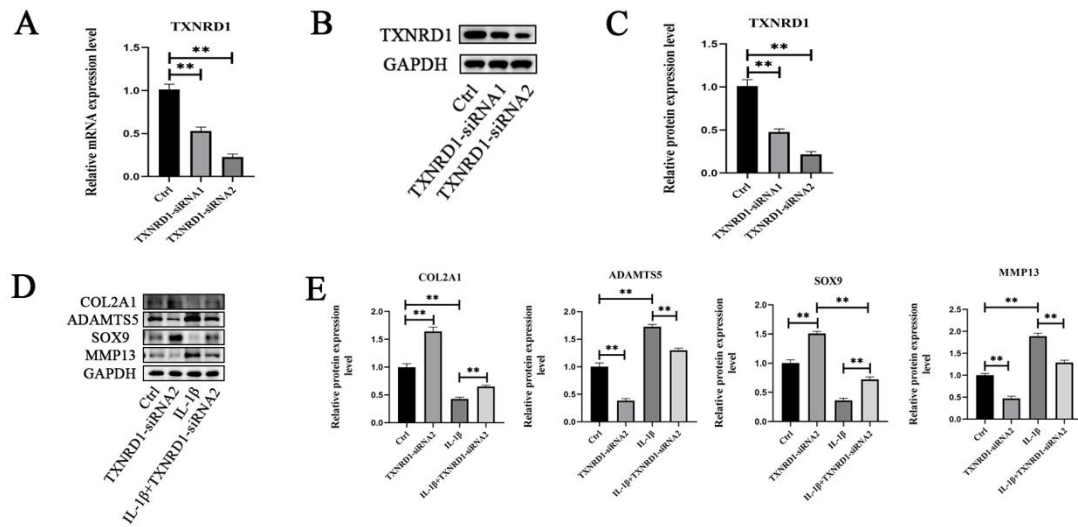


图 4.1 敲低 TXNRD1 抑制小鼠软骨细胞 ECM 降解。(A-B) qPCR 和 Western blot 检测转染 TXNRD1- siRNA1 或 TXNRD1- siRNA2 的软骨细胞中 TXNRD1 mRNA 和蛋白的表达。(C) Western blot 结果的定量分析。(D-E)使用 Western blot 检测软骨细胞中在有或没有 IL-1 β 情况下 (10 ng/mL)的 ADAMTS5, MMP13, COL2a1 和 SOX9 的蛋白表达。

2.4 讨论

OA 的主要特征是软骨损伤, 通常会导致关节疼痛、僵硬和活动障碍, 从而降低患者的生活质量^[41]。OA 的发病因素众多, 同时目前对在 OA 进程中关节软骨的病理变化了解有限。关节软骨是一种无血管组织, 其主要成分是细胞外基质和软骨细胞^[7, 42]。目前有相关证据表明, 关节软骨进行性退化在 OA 中发挥着重要作用, 软骨进行性退化主要是指软骨细胞损伤和软骨细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM) 成分丢失和改变。其中, 细胞外基质的合成与降

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/565201121243011043>