

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.04.002

## 转 GGCX 基因治疗兔骨性关节炎的体外实验研究\*

汪文玉,付晓玲<sup>△</sup>,陈睿,陈伟高,吴建雄  
(南昌大学第二附属医院骨科 330006)

**[摘要]** **目的** 探索 GGCX 基因对兔骨性关节炎软骨细胞 MMP13 的影响及其在兔骨性关节炎软骨退变中的作用。**方法** 取体质量(2.0±0.2)kg 日本大耳兔 6 只,随机分为 3 组,每组设立一只对照兔,分别在 2、4、6 周使用膝前交叉韧带切断术构建模型,6 周后模型兔构建成功,分离关节软骨,经消化分离后将软骨细胞接种到 6 孔细胞培养板,将软骨细胞分为空白组、阴性对照组(转染不含 GGCX 基因慢病毒)、转染组(转染含 GGCX 基因慢病毒)3 组。转染组均以 Lipofectamine™ 2000 为转染媒介。用 PCR 法及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 GGCX 和 MMP13 的表达。**结果** 转染组 GGCX 有较高的表达水平;转染组 MMP13 的表达水平降低,且二者与空白组及阴性对照组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** GGCX 基因过表达可明显降低其软骨细胞 MMP13 的表达,为将基因治疗运用于体外骨性关节炎提供实验基础。

**[关键词]** 软骨,关节;骨关节炎;GGCX 基因;基质金属蛋白酶 13

**[中图分类号]** R332

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)04-0436-03

## An in vitro study on rabbit osteoarthritis gene therapy with GGCX gene\*

Wang Wenyu, Fu Xiaoling<sup>△</sup>, Chen Rui, Chen Weigao, Wu Jianxiong

(Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To research the effect of GGCX gene on MMP13 in rabbit osteoarthritis cartilage cells and investigate its effect on osteoarthritis cartilage degeneration. **Methods** Six Japanese big ear rabbits weighted (2.0±0.2)kg were randomly divided into three groups, each group seted a rabbit as control. Anterior cruciate ligament transection method was used to build osteoarthritis cartilage degeneration model at second, forth, sixth week. Articular cartilage was separated successfully after the model were built, cartilage cells were divided from articular cartilage and cultured in 6-well cell culture plate. Cartilage cells were divided into blank group, negative control group and transfection group. PCR method and Western blot were conducted to detect GGCX and MMP13 expressed at the level of mRNA and protein. **Results** Compare with blank group and negative control group, the expressin level of GGCX increased, while the MMP13 expression level dcreased( $P<0.05$ ). **Conclusion** Over expression of GGCX gene can obviously decrease the expression of MMP13, it provide experimental basis for osteoarthritis of the in vitro gene therapy.

**[Key words]** cartilage, articular; osteoarthritis; GGCX gene; matrix metalloproteinases 13

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是最为常见的关节炎之一,尤以中老年发病最多<sup>[1]</sup>。骨关节炎的核心是关节面软骨的退行性改变,会造成相应的关节骨质、关节囊、滑膜及关节的其他结构的累及,为慢性、无菌性、进行性侵犯关节的疾病,目前国内外仍未见满意的治疗方法<sup>[2]</sup>。目前基因转移技术已较为成熟,能作用于靶细胞使其表达软骨生长调控因子,使之能够有效促进软骨生长及基质的合成<sup>[3]</sup>。近些年来,国内外开始出现用基因来进行基因治疗的新方法,但使用  $\gamma$ -谷氨酰羧化酶(GGCX)转基因治疗 OA 的实验研究并未见报道。本研究即通过观察 GGCX 基因转染的兔骨性关节炎软骨细胞中 MMP13 的表达及其在 OA 治疗中的作用,为 OA 基因治疗方面提供新的思路及对策。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 3 个月龄大小的健康雄性日本大耳白兔 6 只,体质量约(2.0±0.2)kg,南昌龙平兔业有限公司提供。

**1.2 主要材料与仪器** 建立该模型手术所需的器械、药品及材料均由南昌大学医学院实验室提供, MMP13 一抗抗体、免疫组织化学染色试剂盒均购自南昌中洪博元生物技术有限公

司,免疫组织化学技术所需的设备与材料由南昌大学第二附属医院实验室提供, GGCX 慢病毒由上海市诺辰生物公司包装并生产。

## 1.3 方 法

**1.3.1 模型动物制备** 将兔随机分为 3 组,每组 2 只,每组设立一只对照兔,不切断前交叉韧带,实验组剪除兔右膝毛,经耳缘静脉麻醉后清洗暴露出右膝皮肤,消毒行右膝前交叉韧带切断术,生理盐水冲洗后给予切口缝合。实验肢体不固定,术后给予抗菌药物预防感染,24~29℃ 环境下分别喂养 2、4、6 周后处死,观察模型构建情况。

**1.3.2 软骨细胞的培养** 兔骨性关节炎模型构建成功后,将实验兔子处死,对双膝进行消毒并将其完全离断,用乙醇浸泡后将膝关节放入含有双抗的二氨基联苯胺(PBS)中;在超净台内将关节软骨面进行分离并切取软骨,将软骨剪碎成 1 mm<sup>2</sup> 大小,放入盛有消化酶的试管内进行消化;37℃ 恒温水浴振荡。45 min 后取上清,离心收集细胞,重复 4 次;将细胞重悬于 DMEM 完全培养基中,按一定密度接种于培养瓶中,置于 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养箱培养,隔天换液;倒置显微镜观察软骨细胞

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81301561)。 作者简介:汪文玉(1987-),住院医师,硕士,主要从事骨与关节疾病的研究。

△ 通信作者, E-mail: 417603614@qq.com。

融合成片,长满大部分培养瓶壁后,进行消化后传代扩增培养。实验中发现软骨细胞从第 3 代开始出现去分化、纤维化现象,因此,在本次研究中,均选用培养的第一代骨性关节炎软骨细胞进行试验。

**1.3.3 产生慢病毒颗粒** 将 GGCX-pSIH1-H1-copGFP 质粒与 pPACKH1TM Lentivector Packaging 试剂盒按比例混合,应用 Lipofectamine™ 2000 试剂共转染 293T 细胞。收集细胞上清液,按比例稀释再感染新的 293T 细胞,检测慢病毒的滴度。

**1.3.4 慢病毒感染软骨细胞** 首先分为 3 组,空白组:不进行转染;阴性对照组:转染不含 GGCX 的慢病毒;转染组:转染含有 GGCX 的慢病毒。将待转染的软骨细胞用含双抗液(1×10 U/L)的 D-hanks 液漂洗,酶两步消化法分离原代人关节软骨细胞,然后接种于 25 cm 培养瓶内(5 mL/瓶),置于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,待细胞贴壁达 85%~90%后加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA(1:1)的消化液进行传代培养。接种处于对数生长期的细胞到 96 孔细胞培养板,每孔 2×10<sup>3</sup> 个细胞,使用 F-12+10% 胎牛血清(FBS)的完全培养基,添加病毒液,37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 的条件下正常培养。转染 1 d 后运用显微镜对其进行观察,以判定转染效率。转染效率达 90% 之后进行后续实验。

**1.3.5 PCR 分析 GGCX 和 MMP13 mRNA 的表达** 引物序列信息如表 1。

表 1 各基因 PCR 引物序列

基因		引物序列(5'-3')
GGCX	正向	TATGTCATGCTGGCCAGCA
	反向	TGAAGAGGGCTCCCAGCT
MMP13	正向	GGAAGACTTCCAGTTTGCAG
	反向	CCGCATCTCGGTTGTTTCA
β-actin	正向	TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG
	反向	AGTGCACGTGGACATCCG

将培养细胞消化、离心、弃上清,下层细胞加入生理盐水后破碎,提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明配制逆转录反应体系 20 μL,逆转录反应的条件:37 ℃ 1 h;95 ℃ 5 min;灭活鼠白血病病毒(MMLV)。将逆转录的 cDNA 进行 PCR 扩增,运用自带软件 ABI Prism 7500 SDS Software 分析得到的结果。

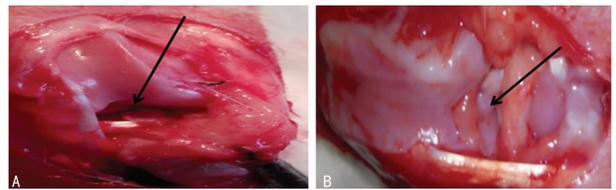
**1.3.6 Western blot** 提取总蛋白,进行蛋白定量,制备 PAGE 胶,进行上样及电泳,将胶缓慢移进缓冲液,剪大小相同的硝酸纤维素膜(NC),甲醇浸泡 2 min,水洗 3 min,最后用缓冲液平衡 12 min。在恒流 350 mA 条件下,转膜 40 min。膜封闭,一、二抗孵育,最后进行显色检测目的蛋白 GGCX 和 MMP13 的表达。

**1.4 统计学处理** 运用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组样本均数用方差齐性检验进行比较,组间运用单因素方差分析,依据方差齐性检查结果选择合适的检验方法做两两比较:方差齐采用 LSD 法、方差不齐采用 Dunnett's T3 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 兔 OA 模型构建** 实验兔 6 周后造模成功,如图 1 可见兔膝关节滑膜增生,前交叉韧带断裂,关节间隙变窄,关节面变

得毛糙,关节软骨面有不同程度磨损。



A: 转染组切断前交叉韧带图片;B: 6 周后兔 OA 模型图片。

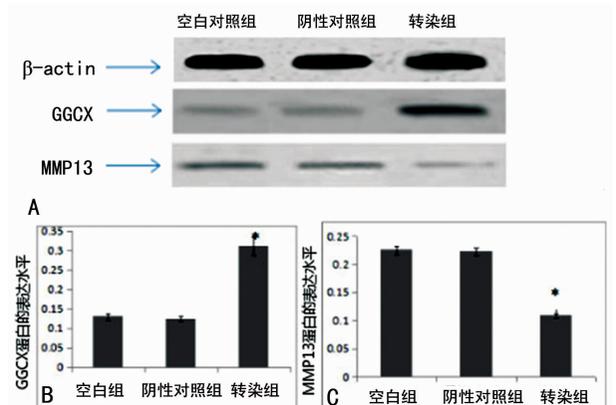
图 1 兔骨关节炎模型的构建

**2.2 实时定量 RT-PCR 结果** 转染组 GGCX 表达水平较空白组、阴性对照组明显升高;MMP13 在转染组中的表达水平较空白组及阴性对照组明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),空白组和阴性对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组中 GGCX、MMP13 mRNA 相对表达量( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	GGCX	MMP13
空白组	1	1
阴性对照组	1.084 ± 0.121	1.122 ± 0.068
转染组	6.620 ± 0.423	0.103 ± 0.024

**2.3 Western blot 检测结果** Western blot 方法检测各组中 GGCX、MMP13 的水平,运用单因素方差分析法,结果显示:转染组中 GGCX 水平明显高于空白组及阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。空白组和阴性对照组相比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。转染组中的 MMP13 水平与空白组及阴性对照组相比较低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );空白组和阴性对照组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。各个组蛋白的表达结果与 mRNA 的表达水平相一致。



A: 各组中不同蛋白的表达情况;B: GGCX 在各组中的表达分析图;C: MMP13 在各组中的表达分析图。

图 2 Western blot 方法检测转染后各组细胞 GGCX、MMP3 蛋白的表达情况

**3 讨 论**

目前应用病毒载体能够成功地把基因转染到细胞中,慢病毒载体有转染率高、可转染不分裂细胞、基因可长期表达等优势<sup>[4]</sup>,而且国外已有以慢病毒为载体的基因治疗报道<sup>[5]</sup>。可获得较高的效率,从而缩短了临床应用的距离。

羟化的基质 GLA 蛋白(cMGP)是软骨组织中钙化的强烈抑制蛋白,能够调节软骨的钙化和动脉的钙化,GGCX 为 MGP

羧基化过程中的关键酶,它的缺失能使 cMGP 减少,从而使之减弱对钙离子晶体形成的抑制作用<sup>[6]</sup>。研究发现正常膝关节和原发性膝关节 OA 的软骨中均有 GGCX 表达,但骨性关节炎中 GGCX 明显降低;而且 GGCX 的表达与关节软骨的退变程度有关,随着退变程度的加重,GGCX 表达逐渐降低<sup>[7]</sup>,因此 GGCX 可以抑制 OA 的发生发展,本研究与文献报道相符。

MMP 家族(MMPs)为一种重要酶类,在细胞外基质的生理性和病理性降解过程中起重要作用<sup>[8]</sup>;MMP13 为 MMPs 一员,可对各种胶原进行有效降解,可分解胶原三螺旋结构<sup>[9]</sup>。软骨的退变主要由 II 型胶原纤维降解引起,而 MMP13 也称胶原酶 13,其降解 II 型胶原的能力是其他胶原酶的 10~30 倍<sup>[10]</sup>,并且其他许多 MMPs 亚型对 II 型胶原的降解也需要通过它们起作用。并且 Hamamura 等<sup>[11]</sup>、Kneer 等<sup>[12]</sup>研究发现 MMP13 在 OA 关节软骨损害中起一定的作用,通过免疫组织化学方法检测到 MMP13 在 OA 组织中存在高表达现象,且 MMP13 表达水平与 OA 的严重程度正相关。因此,MMP13 具有促进骨性关节炎发生发展的作用。

但 GGCX 与 MMP13 之间是否具有相关性,其是否通过调节 MMP13 的表达来对 OA 的发生发展进行调节国内外未见相关文献报道,本实验研究通过免疫组化检测转染后兔软骨细胞中 GGCX 及 MMP13 表达水平,发现转染组中 GGCX 高表达,而转染组 MMP13 出现低表达,与空白组及阴性对照组比较差异有统计学意义,表明 GGCX 基因成功转染且转 GGCX 基因的兔 OA 软骨细胞中 GGCX 的高表达导致了 MMP13 的低表达。

综上所述,转 GGCX 基因可明显降低其软骨细胞 MMP-13 的表达,且具有降低炎症因子的作用。达到治疗兔 OA 的作用。为将基因治疗运用于体外 OA 提供了良好的实验基础。

## 参考文献

- [1] 肖巍,杜晓红,李曙波,等. 膝骨关节炎发病机制及腔内治疗概述[J]. 中国民族民间医药,2013,22(3):47-48.
- [2] 张平,蔡道章,刘斌,等. 转 IL-1Ra 和 TGF- $\beta$ 1 基因治疗兔骨性关节炎的体外实验研究[J]. 中华关节外科杂志,2011,5(3):335-342.
- [3] 邓尚,陈竹. 关节软骨退行性变基因治疗研究进展[J]. 西部医学,2015,27(6):958-960.
- [4] 张阳. 慢病毒载体的研究进展[J]. 福建医科大学学报,2014(6):407-410.
- [5] Alcaraz MJ, Megías J, García-Arnanidis I, et al. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis[J]. *Biochem Pharmacol*,2010,80(1):13-21.
- [6] Jiang Q, Li Q, Grandpierre AE, et al. Administration of vitamin K does not counteract the ectopic mineralization of connective tissues in Abcc6 (-/-) mice, a model for pseudoxanthoma elasticum[J]. *Cell Cycle*,2011,10(4):701-707.
- [7] 厉亚男. 慢病毒介导 IL-1Ra 基因对人滑膜细胞体外转染的研究[D]. 青岛:青岛大学,2014.
- [8] Reddi Ah. Aging, osteoarthritis and transforming growth factor-beta signaling in cartilage[J]. *Arthritis Res Ther*,2006,8(1):101.
- [9] 付晓玲. GGCX 在原发性膝关节骨性关节炎软骨中的表达及其意义[D]. 长沙:中南大学,2013.
- [10] 长峰,杨开舜. MMP-13、TIMP-1 在兔骨关节炎模型的表达及其意义[J]. 中国现代医生,2009,47(3):39-41.
- [11] Hamamura K, Zhang P, Zhao L, et al. Knee loading reduces MMP13 activity in the mouse cartilage[J]. *BMC Musculoskelet Disord*,2013,14(1):312.
- [12] Kneer W, Rother M, Mazgareanu S, et al. A 12-week randomized study of topical therapy with three dosages of ketoprofen in Transfersomegel (IDEA-033) compared with the ketoprofen-free vehicle (TDT 064), in patients with osteoarthritis of the knee[J]. *J Pain Res*,2013,6:743-753.

(收稿日期:2016-09-18 修回日期:2016-10-20)

(上接第 435 页)

- [J]. *Stroke*,2001,32(11):2658-2664.
- [12] Chen Z, Wen L, Martin M, et al. Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of microRNA-92a[J]. *Circulation*,2015,131(9):805-814.
- [13] Loughheed M, Lum CM, Ling W, et al. High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I / II [J]. *J Biol Chem*,1997,272(20):12938-12944.
- [14] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Acta Med Indones*,2007,39(2):86-93.
- [15] 赵磊,朱开梅,王晓,等. 香蕉皮多酚对高血脂大鼠降血脂作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18

(13):201-204.

- [16] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Prog Lipid Res*,2009,48(1):1-26.
- [17] Umar A, Iskandar G, Aikemu A, et al. Effects of cydonia oblonga miller leaf and fruit flavonoids on blood lipids and anti-oxydant potential in hyperlipidemia rats[J]. *J Ethnopharmacol*,2015,169:239-243.
- [18] 杨华,张知贵,李小慧. 山楂叶总黄酮对高血脂大鼠血脂和血液流变性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):257-259.
- [19] 唐瑛,罗有祖,杨李,等. 藤茶总黄酮对实验性高血脂大鼠的影响[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(10):74.

(收稿日期:2016-09-19 修回日期:2016-10-21)