

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.34.006

## 组织蛋白酶 S 对 RA 软骨细胞分泌 II 型胶原的研究\*

赵进军<sup>1</sup>, 黄琴<sup>1</sup>, 任昊<sup>1</sup>, 欧阳晴晴<sup>1</sup>, 毋静<sup>2</sup>, 杨敏<sup>1△</sup>

(南方医科大学:1. 南方医院风湿免疫科;2. 珠江医院风湿免疫科, 广州 510515)

**[摘要]** **目的** 通过对滑膜成纤维细胞、滑膜巨噬细胞、肥大细胞和软骨细胞的共培养, 以发现对类风湿关节炎(RA)软骨细胞分泌 II 型胶原(C II)影响最大的细胞类型和作用机制。**方法** 选用 C57BL/6 小鼠进行胶原诱导的关节炎(CIA)造模, 原代培养上述 4 种细胞, 并进行共培养。分别加入组织蛋白酶 S 的特异性抑制剂(LHVS)和非特异性抑制剂(E64), 加入肥大细胞的激活剂(C48/80)和膜稳定剂色甘酸二钠(DSCG)等。分别检测培养上清液及软骨细胞中组织蛋白酶 S 和 C II 的表达。**结果** 巨噬细胞和肥大细胞表达组织蛋白酶 S, 而滑膜成纤维细胞不表达。用肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )激活的滑膜成纤维细胞对软骨细胞 C II 的表达无影响, 巨噬细胞与软骨细胞共培养时可减少 C II 水平[(8.79 $\pm$ 2.79)ng/mL], 软骨细胞对照组为(17.75 $\pm$ 2.84)ng/mL, 但抑制组织蛋白酶 S 后 C II 恢复[LHVS 组为(16.15 $\pm$ 3.05)ng/mL, E64 组为(12.55 $\pm$ 2.64)ng/mL]。在肥大细胞与软骨细胞共培养时, 激活的肥大细胞可明显减少软骨细胞分泌 C II [(9.82 $\pm$ 0.42)ng/mL], 共培养对照组为(26.09 $\pm$ 3.34)ng/mL, 抑制组织蛋白酶 S 后, 软骨细胞分泌 C II 水平恢复[分别为(30.21 $\pm$ 2.57)ng/mL 和(29.68 $\pm$ 2.15)ng/mL]。检测各组软骨细胞中 C II 的 mRNA, 未发现各组间有差异。**结论** 巨噬细胞和肥大细胞是组织蛋白酶 S 的两个主要来源, 组织蛋白酶 S 可能是破坏软骨细胞分泌的 C II 的主要因素。

**[关键词]** 肥大细胞; 巨噬细胞; 软骨细胞; II 型胶原; 组织蛋白酶 S**[中图法分类号]** R593.22**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)34-4345-04**Study of Cathepsin S on type II collagen secreted by RA chondrocytes\***ZHAO Jinjun<sup>1</sup>, HUANG Qin<sup>1</sup>, REN Hao<sup>1</sup>, OUYANG Qingqing<sup>1</sup>, WU Jing<sup>2</sup>, YANG Min<sup>1△</sup>

(1. Department of Rheumatology and Immunology, Nanfang Hospital; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

**[Abstract]** **Objective** To co-culture synovioblast, synovial macrophages, mastocyte and chondrocyte in order to find the cellular type with greatest impact on secreting type II collagen in RA chondrocytes and its mechanism. **Methods** C57BL/6 mice were selected for constructing the CIA animal model, and mouse synovial fibroblasts, peritoneal macrophages, bone marrow-derived mast cells and articular chondrocytes were performed the primary culture and co-culture. Specific inhibitors of Cathepsin S (LHVS) and non-specific inhibitors (E64) were added, and the mast cell activators (C48/80) and membrane stabilizers (DSCG) were added. The supernatant and chondrocytes were collected and the expression of cathepsin S and type II collagen were detected. **Results** Cathepsin S was expressed in macrophages and mast cells, but not expressed in synovial fibroblasts. Synovial fibroblasts activated with TNF- $\alpha$  had no effect on the expression of type II collagen in chondrocytes. Macrophages and chondrocytes co-culture could decrease the amount of type II collagen [(8.79 $\pm$ 2.79)ng/mL], while which in the control group was (17.75 $\pm$ 2.84)ng/mL, but the amount of type II collagen recovered after Cathepsin S inhibition [(16.15 $\pm$ 3.05 ng/mL in the LHVS group and (12.55 $\pm$ 2.64) ng/mL in the E64 group)]. When chondrocytes and mast cells were co-cultured, the type II collagen amount secreted by chondrocytes was significantly decreased in activated mastocyte [(9.82 $\pm$ 0.42)ng/mL, which in the co-culture control group were [(26.09 $\pm$ 3.34)ng/mL], but the type II collagen amount secreted by chondrocytes was back to original amount after inhibiting Cathepsin S [(30.21 $\pm$ 2.57ng/mL and (29.68 $\pm$ 2.15)ng/mL respectively). mRNA of type II collagen in chondrocytes was detected by RT-PCR, but no difference was found. **Conclusion** Macrophages and mast cells are two major sources of cathepsin S, and Cathepsin S might be the main factor disrupting the type II collagen secreted by chondrocytes.

**[Key words]** mast cells; macrophage; chondrocyte; type II collagen; Cathepsin S

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)发病机制复杂,至少有 8 种类型细胞参与,包括肥大细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、T 细胞<sup>[1]</sup>、B 细胞<sup>[2]</sup>、树突状细胞<sup>[3]</sup>、软骨细胞和破骨细胞。在正常滑膜中肥大细胞约占滑膜表面细胞的 3%;而在 RA 患者滑膜中肥大细胞数量可占到滑膜表面细胞的 5%,说明肥大细胞在 RA 疾病中起重要作用<sup>[4]</sup>。RA 的主要病理改变是关节软骨和骨的破坏。因此,针对 RA 的治疗,除控制炎症外,就是寻求保护软骨的方法。软骨基质主要由 II、IX、XI 胶原组成,其中 II 型胶原(C II)的半衰期最长<sup>[5]</sup>。本研究将肥大细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和软骨细胞共培养,以期发现对软骨细胞分泌 C II 影响最大的细胞类型。由于肥大细胞可分泌多种蛋白酶,本研究拟通过肥大细胞的稳定剂、激活剂和酶抑制剂,以期发现组织蛋白酶 S 是否对 C II 的破坏存在作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物与试剂** 本实验所用动物均为 8~9 周龄 C57BL/6 雌性小鼠,在 SPF 级动物所饲养,符合南方医科大学动物管理条例,用胶原诱导的关节炎(CIA)进行造模,造模成功后进行原代细胞的培养。DMEM 培养基, RPMI 1640 培养基,胎牛血清购自 Gibco 公司;IV 型胶原酶,色甘酸二钠(DSCG),肥大细胞的激活剂(C48/80),脂多糖(LPS)购自 Sigma 公司;Anti-Cathepsin S 抗体、Anti-Collagen II 抗体,GAPDH 抗体购自 Abcam 公司;组织蛋白酶 S 的 ELISA 试剂盒购自 LifeSpan 公司;C II ELISA 试剂盒购自武汉华美;Transwell 培养板购自 Corning;其余均为国产分析纯。LHVS 由哈佛大学的施国平教授赠送。

## 1.2 方法

**1.2.1 4 种原代细胞的培养方法** 滑膜成纤维细胞和关节软骨细胞的原代培养使用 0.3% 的 IV 型胶原酶消化法。腹腔巨噬细胞使用 3% 的 Thioglycollate 肉汤。骨髓源性肥大细胞的原代培养使用终浓度为 10 g/mL 的重组小鼠 IL-3 和 SCF 刺激。

**1.2.2 软骨细胞和滑膜成纤维细胞共培养** 软骨细胞和滑膜成纤维细胞共培养分 4 组:软骨细胞对照组、软骨细胞+滑膜成纤维细胞组、软骨细胞+滑膜成纤维细胞+TNF- $\alpha$  低剂量刺激组(终浓度 10  $\mu$ g/mL)、软骨细胞+滑膜成纤维细胞+TNF- $\alpha$  高剂量(终浓度 100  $\mu$ g/mL)刺激组。选取 Transwell 小室 12 孔板,每组设 3 个复孔,细胞按  $3 \times 10^5$ /mL 浓度加入 Transwell 小室,共培养 24 h 和 48 h。

**1.2.3 软骨细胞和巨噬细胞共培养** 软骨细胞和巨噬细胞共培养分 4 组:软骨细胞对照组、软骨细胞+巨噬细胞激活组(LPS 的终浓度为 100 ng/mL)、软骨细胞+巨噬细胞+LHVS(终浓度 10 ng/mL)组、软骨

细胞+巨噬细胞+E64(终浓度 20  $\mu$ mol/L)组。巨噬细胞和软骨细胞分别按  $2 \times 10^6$ /mL 和  $3 \times 10^5$ /mL 浓度加入 Transwell 小室的内孔,其中巨噬细胞的激活使用 LPS(终浓度 100 ng/mL),共培养 24 h 和 48 h。

**1.2.4 软骨细胞和肥大细胞共培养** 软骨细胞和肥大细胞共培养分 6 组:软骨细胞对照组、软骨细胞+肥大细胞共培养对照组、软骨细胞+肥大细胞+DSCG(终浓度 10  $\mu$ mol/L)组、软骨细胞+肥大细胞+C48/80(终浓度 5  $\mu$ g/mL)组、软骨细胞+肥大细胞+LHVS 组、软骨细胞+肥大细胞+E64 组。肥大细胞和软骨细胞分别按  $1 \times 10^6$ /mL 和  $3 \times 10^5$ /mL 浓度加入 12 孔板,共培养 24 h 和 48 h。

**1.2.5 ELISA 检测培养上清液中组织蛋白酶 S 和 C II 的表达** 培养上清液中组织蛋白酶 S 和 C II 的 ELISA 检测方法按试剂盒说明书进行,每个样品检测 3 次。

**1.2.6 RT-PCR 检测软骨细胞中 C II mRNA** RT-PCR 检测软骨细胞中 C II mRNA:提取总 RNA,检测总 RNA 的完整性,去除 DNA,加入 PCR 引物(C II A1:5'-CCT GTT CTG AGA GGT CTT CCT G,5'-AAT ACC AGC AGC TCC CCT CT,GAPDH:5'-AGA AGG TGG TGA AGC AGG CAT C,5'-CGA AGG TGG AAG AGT GGG AGT T),反应后每一个样品目的基因扩增的循环数(Ct)都依据 GAPDH 做校正。

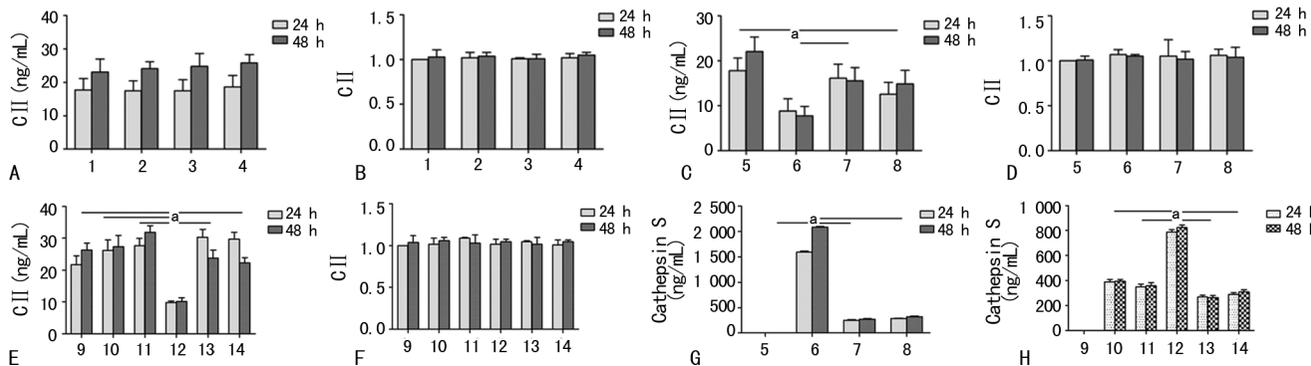
**1.2.7 Western blot 检测组织蛋白酶 S 的表达** 用 lysis buffer 冰上裂解细胞,获得总蛋白,常规方法进行电泳、转膜、封闭、抗体、显色等。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 ANOVA 进行统计分析,组间比较采用 Newman-Keuls 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞共培养时 C II 的表达** 小鼠关节软骨细胞和滑膜成纤维细胞共培养用 TNF- $\alpha$  刺激时,C II 表达的结果见图 1A,各组间没有统计学差异。软骨细胞和腹腔巨噬细胞共培养时 C II 表达的结果见图 1C,软骨+巨噬细胞激活组与其他组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),加用组织蛋白酶 S 的抑制剂后,LHVS 和 E64 组 C II 的表达均升高,与软骨细胞对照组间差异无统计学意义。软骨细胞和骨髓源性肥大细胞共培养时 C II 表达的结果见图 1E,软骨+肥大+C48/80 组与其他各组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而在加入组织蛋白酶 S 的抑制剂后,C II 的表达恢复正常。

**2.2 细胞共培养时组织蛋白酶 S 的表达** 软骨细胞和腹腔巨噬细胞共培养时组织蛋白酶 S 表达的结果见图 1G,软骨+巨噬细胞激活组与其他组间差异有



A: 小鼠软骨细胞与滑膜成纤维细胞共培养时 C II 的 ELISA 结果; B: 小鼠软骨细胞与滑膜成纤维细胞共培养时 C II 的 RT-PCR 结果; C: 小鼠软骨细胞与巨噬细胞共培养时 C II 的 ELISA 结果; D: 小鼠软骨细胞与巨噬细胞共培养时 C II 的 RT-PCR 结果; E: 小鼠软骨细胞与肥大细胞共培养时 C II 的 ELISA 结果; F: 小鼠软骨细胞与肥大细胞共培养时 C II 的 RT-PCR 结果; G: 巨噬细胞与软骨细胞共培养时组织蛋白酶 S 的 ELISA 结果; H: 肥大细胞与软骨细胞共培养时组织蛋白酶 S 的 ELISA 结果; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ; 1: 软骨; 2: 软骨+滑膜; 3: 软骨+滑膜+TNF 低; 4: 软骨+滑膜+TNF 高; 5: 软骨; 6: 软骨+巨噬; 7: 软骨+巨噬+LHVS; 8: 软骨+巨噬+E64; 9: 软骨; 10: 软骨+肥大; 11: 软骨+肥大+DSCG; 12: 软骨+肥大+C48/80; 13: 软骨+肥大+LHVS; 14: 软骨+肥大+E64

图 1 细胞共培养结果

统计学意义( $P < 0.05$ ), 加用组织蛋白酶 S 的抑制剂后, LHVS 和 E64 组内组织蛋白酶 S 的表达均降低。软骨细胞和肥大细胞共培养时组织蛋白酶 S 表达的结果见图 1H, 软骨+巨噬细胞激活组与其他各组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 加用组织蛋白酶 S 的抑制剂 LHVS 和 E64 后, 组织蛋白酶 S 表达降低, 与软骨+肥大对照组间差异无统计学意义。

**2.3 细胞共培养时 RT-PCR 结果** 本研究对软骨细胞和其他 3 种类型的细胞共培养, 进行了 C II 的 RT-PCR 检测, 不管是和滑膜成纤维细胞(图 1B), 腹腔巨噬细胞(图 1D), 还是和骨髓源性肥大细胞(图 1F), 各组间均差异无统计学意义。

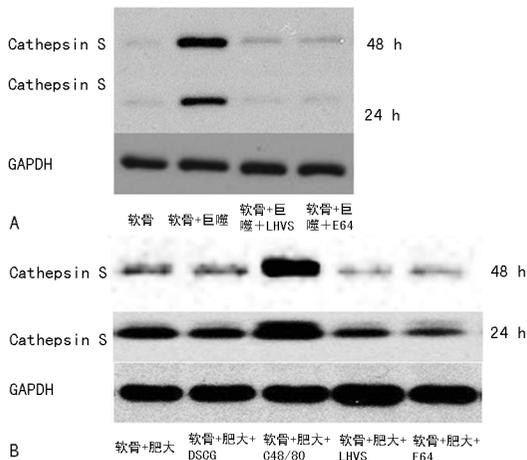
和 E64 可以抑制其表达。

### 3 讨论

组织蛋白酶 S 是一种属于木瓜蛋白酶超家族的半胱氨酸蛋白酶, 在抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APCs) 上高度表达, 它对多种蛋白具有催化水解活性, 特别是 MHC II 恒定链 (invariant chain, Ii) 和细胞外基质成分 (弹性蛋白和胶原)。已证实组织蛋白酶 S 参与多种疾病, 如阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、哮喘、慢性阻塞性肺病、肿瘤、骨关节炎、神经痛和多种自身免疫性疾病<sup>[6-7]</sup> 等。但目前对组织蛋白酶 S 在 RA 中的作用研究较少<sup>[8]</sup>。

组织蛋白酶 S 的底物广泛<sup>[9]</sup>, 最引起人们兴趣的是它的高弹性蛋白水解活性<sup>[10]</sup>。但在类风湿关节炎中可能无关弹性蛋白的降解, 因为在骨和软骨的细胞外基质中弹性蛋白水平极低。但组织蛋白酶 S 有潜在的蛋白聚糖降解活性, 特别是在中性和酸性 pH 中具有强大的水解软骨聚集蛋白聚糖能力<sup>[11]</sup>。组织蛋白酶 S 在 RA 关节的滑膜巨噬细胞上表达, 在炎症过程中分泌蛋白酶入软骨基质, 可能会破坏形成功能性软骨的软骨聚集蛋白聚糖-C II 网状组织的完整性<sup>[12]</sup>。但目前很少有人研究组织蛋白酶 S 对软骨细胞分泌 C II 的影响<sup>[13]</sup>。

本研究共进行了 4 种原代细胞的培养, 包括小鼠滑膜成纤维细胞、腹腔巨噬细胞、关节软骨细胞和骨髓源性肥大细胞。发现软骨细胞在与滑膜成纤维细胞共培养时, 软骨细胞分泌 C II 的量无变化。而软骨细胞与巨噬细胞共培养时, 及软骨细胞与肥大细胞的共培养时, 均发现 C II 的量减少, 尤其是在肥大细胞被其激活剂 (C48/80) 激活后。该研究证实巨噬细胞和肥大细胞是组织蛋白酶 S 的主要来源, 本研究在该研究中当加入组织蛋白酶 S 的特异性抑制剂 (LHVS) 及非特异性抑制剂 (E64) 后, C II 的量恢复到正常



A: 软骨细胞和巨噬细胞共培养时的结果; B: 软骨细胞和肥大细胞共培养时的结果

图 2 组织蛋白酶 S 的 Western blot 结果

**2.4 Western blot 结果** 本研究对软骨细胞和腹腔巨噬细胞共培养、软骨细胞和骨髓源性肥大细胞共培养, 提取总蛋白, Western blot 结果见图 2。巨噬细胞和肥大细胞分别被 LPS 和 C48/80 激活后, 组织蛋白酶 S 的表达升高, 而用组织蛋白酶 S 的抑制剂 LHVS

水平,说明组织蛋白酶 S 可能是 C II 量减少的主要因素。但细胞培养上清中 C II 量减少是由于分泌减少还是分泌后被破坏需进一步研究。随后收集各组软骨细胞,裂解提取 RNA 后进行 C II 的 RT-PCR 检测,发现各组间 RT-PCR 水平相似,说明 C II 在转录水平上未发生变化,因此认为 C II 主要是在合成后受到破坏。当然,本研究中还存在不足,即未对组织蛋白酶 S 的活性进行检测,不能反映组织蛋白酶 S 在病变中的功能变化,这将是下一步研究的重点。

从本研究上看,巨噬细胞和肥大细胞均对软骨细胞分泌 C II 的影响较大,他们可能是影响软骨功能的主要细胞类型,而在抑制了组织蛋白酶 S 功能后,C II 的分泌量恢复正常,说明组织蛋白酶 S 很有可能是 C II 破坏的主要因素,因此针对组织蛋白酶 S 的特异性治疗有可能是未来研究的方向。

### 参考文献

- [1] DAVIGNON J L, RAUWEL B, DEGBOE Y, et al. Modulation of T-cell responses by anti-tumor necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: a review[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 229.
- [2] KERKMAN P F, FABRE E, VAN DER VOORT E I, et al. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(6): 1170-1176.
- [3] NEHMAR R, MARIOTTE A, DE CAUWER A, et al. Therapeutic perspectives for interferons and plasmacytoid dendritic cells in rheumatoid arthritis[J]. *Trends Mol Med*, 2018, 24(4): 338-347.
- [4] SUURMOND J, VAN DER VELDEN D, KUIPER J, et al. Mast cells in rheumatic disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 778: 116-124.
- [5] VERZIJL N, DEGROOT J, THORPE S R, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39027-

39031.

- [6] MENG Z, EDMAN M C, HSUEH P Y, et al. Imbalanced Rab3D versus Rab27 increases cathepsin S secretion from lacrimal acini in a mouse model of Sjogren's Syndrome[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(11): 942-954.
- [7] RUPANAGUDI K V, KULKARNI O P, LICHTNEKERT J, et al. Cathepsin S inhibition suppresses systemic lupus erythematosus and lupus nephritis because cathepsin S is essential for MHC class II-mediated CD4 T cell and B cell priming[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(2): 452-463.
- [8] WEITTOFT T, LARSSON A, MANIVEL V A, et al. Cathepsin S and cathepsin L in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis with and without autoantibodies[J]. *Rheumatology*, 2015, 54(10): 1923-1928.
- [9] SEVENICH L, BOWMAN R L, MASON S D, et al. Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(9): 876-888.
- [10] WU H X, CHENG X W, HU L A, et al. Cathepsin S activity controls Injury-Related vascular repair in mice via the TLR2-Mediated p38MAPK and PI3K-Akt/p-HDAC6 signaling pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(8): 1549-1557.
- [11] PANWAR P, DU X, SHARMA V, et al. Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(8): 5940-5950.
- [12] JIE L G, HUANG R Y, SUN W F, et al. Role of cysteine rich angiogenic inducer 61 in fibroblast like synovial cell proliferation and invasion in rheumatoid arthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 917-923.
- [13] WILKINSON R D, WILLIAMS R, SCOTT C J, et al. Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential[J]. *Biol Chem*, 2015, 396(8): 867-882.

(收稿日期: 2018-06-18 修回日期: 2018-10-23)

(上接第 4344 页)

- from saurus cernuus [J]. *Tetrahedron Letters*, 1983, 24: 4947-4950.
- [12] KWON D Y, LEE H E, WEITZEL D H, et al. Synthesis and biological evaluation of manassantin analogues for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  inhibition[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(19): 7659-7671.
- [13] DONADELLI M, DANDO I, FIORINI C, et al. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(7): 1171-1190.

- [14] WU S, JIANG F, WU H, et al. Prognostic significance of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  expression in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4846-4852.
- [15] LAI F, LIU Q, LIU X, et al. LX6090-a novel manassantin A derivative-limits breast cancer growth through hypoxia-inducible factor-1 inhibition[J]. *Oncol Targets Ther*, 2016, 24(9): 3829-3840.

(收稿日期: 2018-06-18 修回日期: 2018-10-19)