

## · 基础研究 ·

## 软骨细胞生物钟在大鼠骨关节炎发病中的作用

陈颖颖<sup>1</sup> 李冬霞<sup>1</sup> 张丽宁<sup>1</sup> 胡 琪<sup>1</sup> 周 丽<sup>1</sup>  
罗 莎<sup>1</sup> 周同亮<sup>2</sup> 杜梦梦<sup>1</sup> 陶庆文<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 探索软骨细胞生物钟基因及蛋白表达在骨关节炎(OA)发病中的作用,为 OA 临床时辰医疗提供实验依据。**方法** 选用雄性 SPF 级 SD 大鼠 27 只,随机分为正常组、模型组、盐酸氨基葡萄糖组 3 组,每组 9 只。其中正常组不干预,模型组采用 Hulth 法手术干预,盐酸氨基葡萄糖组采用 Hulth 法手术造模,术后每天使用盐酸氨基葡萄糖 25 mg/kg 灌胃,连续灌胃 28 天。造模成功后采用 HE 染色及 Mankin's 评分评价软骨情况;采用 RT-PCR 检测 *bmal1*、*per1*、*cry1* mRNA 水平;Western Blot 法检测 BMAL1、PER1、CRY1 蛋白表达水平。**结果** 通过 HE 染色及 Mankin's 评分可知,模型组采用 Hulth 法造模之后,其表现符合 OA 标准,在采用盐酸氨基葡萄糖治疗之后,OA 状态有所改善;RT-PCR 及 Western Blot 结果显示,与正常组比较,模型组大鼠 *bmal1* mRNA 及 BMAL1 蛋白表达量降低,*per1*、*cry1* mRNA 及 PER1、CRY1 蛋白表达量升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,盐酸氨基葡萄糖组大鼠 *bmal1* mRNA 及 BMAL1 蛋白表达量升高,*per1*、*cry1* mRNA 及 PER1、CRY1 蛋白表达量降低( $P<0.05$ )。**结论** 软骨细胞生物钟基因及蛋白变化贯穿于 OA 发病与向愈的整个过程,其中 OA 的发生伴随着软骨细胞生物钟的紊乱,OA 的恢复伴随着软骨细胞生物钟的恢复。

**关键词** 软骨细胞;骨关节炎;动物模型;生物钟

**The Role of Chondrocyte Clock in the Pathogenesis of Osteoarthritis in Rats** CHEN Ying-ying<sup>1</sup>, LI Dong-xia<sup>1</sup>, ZHANG Li-ning<sup>1</sup>, HU Qi<sup>1</sup>, ZHOU Li<sup>1</sup>, LUO Sha<sup>1</sup>, ZHOU Tong-liang<sup>2</sup>, DU Meng-meng<sup>1</sup>, and TAO Qing-wen<sup>1</sup> 1 Department of Traditional Chinese Rheumatology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029); 2 Clinical Research Institute of China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the roles of cartilage cell clock genes and protein expressions in the pathogenesis of osteoarthritis (OA), providing experimental basis for clinical OA treatment. **Methods** Twenty-seven male SPF-grade SD rats were randomly divided into three groups, a normal group, a model group, and glucosamine hydrochloride group, 9 rats in each group. Rats in the normal group received no intervention. Rats in the model group received Hulth surgical intervention. And those in glucosamine hydrochloride group received Hulth surgical modeling and glucosamine hydrochloride (25 mg/kg) by gastrogavage for 28 successive days. HE staining and Mankin's score were used to evaluate the cartilage after successful modeling. The expression levels of *bmal1*, *cry1*, and *per1* genes and proteins were detected by RT-PCR and Western Blot. **Results** Results of HE staining and Mankin's score showed that the performance of the model group met OA standard after modelled with Hulth method, and the OA status was improved after treatment with glucosamine hydrochloride. Results of RT-PCR and Western Blot showed that, as compared with the normal group, the expression levels of *bmal1* gene and protein decreased and the expression levels of *cry1* and *per1* gene and protein increased in the model group ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the expressions of *bmal1* gene and protein increased, while the expressions of *cry1* and *per1* gene and protein decreased in glucosamine hydrochloride group ( $P<0.05$ ). **Conclusion**

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 81704050);国家自然科学基金面上项目(No. 81673941)

作者单位:1. 中日友好医院中医风湿病科(北京 100029); 2. 中日友好医院临床研究所(北京 100029)

通讯作者:陶庆文, Tel: 010-84205051, E-mail: taoqg1@sina.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20191030. 274

Changes in chondrocyte clock genes and proteins run through the whole process of OA onset and healing, in which the occurrence of OA is accompanied by the disorder of chondrocyte clock, and the recovery of OA is accompanied by the recovery of chondrocyte clock.

**KEYWORDS** chondrocyte; osteoarthritis; animal model; biological clock

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种常见的关节退行性病变,中医学认为,肾虚为其发病之本,在肾虚基础上感受风、寒、湿邪为发病之标。现代医学认为其发病是多种因素综合作用的结果。近几年,孟庆军研究团队发现,在软骨细胞中存在生物钟基因,其能调控软骨细胞的磨损与修复过程,维持着“休息时软骨修复”与“运动时软骨磨损”之间的平衡。该生物钟基因及蛋白的表达受昼夜节律的影响,当其表达出现紊乱之时,软骨的磨损与修复失衡,从而诱发 OA<sup>[1-3]</sup>。

盐酸氨基葡萄糖是临床用于治疗 OA 效果较好的药物,因此在本实验中选择盐酸氨基葡萄糖为阳性药物,采用盐酸氨基葡萄糖干预 OA 大鼠,检测正常大鼠、OA 大鼠以及采用盐酸氨基葡萄糖治疗后的 OA 大鼠的生物钟基因及蛋白,观察此三者的生物钟差异,明确生物钟在 OA 发病及向愈中的表达变化,为 OA 临床时辰医疗提供实验依据。

## 材料与方法

1 动物 选用 6 周龄无特殊病原体级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 27 只,由中国药品生物制品鉴定所提供[动物许可证号:SCXK(京)2014-001],在北京中日友好医院临床研究所清洁级动物室喂养[实验动物室许可证号:SYXK(京)2016-0043],本实验通过本院伦理委员会审核(No. 160209)。

2 药物 盐酸氨基葡萄糖,每粒含有盐酸氨基葡萄糖 0.24 g,辅料为明胶空心胶囊,北京康必得药业有限公司生产,批号:05170519。

3 主要试剂及仪器 逆转录试剂盒,美国 Promega 公司生产,批号:A3500;Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒,日本 ToYoBo 公司生产,批号:QPK-201;引物合成由广州复能 Genecopoeia 合成;BMAL1(批号:ab231793)、PER1(批号:ab136451)、 $\beta$ -actin(批号:ab8227)均由英国 Abcam 公司生产;CRY1 抗体,美国 Proteintech 公司生产(批号:13474-1-AP);羊抗兔二抗,英国 Abcam 公司生产(批号:ab6721)。旋转式组织脱水机(型号:4634)、组织包埋机(型号:5235)、石蜡溶蜡箱(型号:PM-401)、舒式切片机(型号:CRM-44)均为樱花病理仪器株式会

社产品;双人显微镜(型号:BH-2),日本 Olympus 产品;Nanno Drop(型号:NDoneC),美国 Thermo 公司产品;基因扩增仪(型号:TC-220),美国 MJ Research 产品;Applied Biosystems PCR 仪(型号:ABI7500),美国 ABI 公司产品;Bio-Rad 电泳仪(型号:042BR03674)、Bio-Rad 酶标仪(型号:721BR16681),均为美国 Bio-Rad 公司产品。

4 分组、造模及干预方法 将 27 只大鼠按随机数字表分为正常组、模型组、盐酸氨基葡萄糖组,每组 9 只。除正常组外,其余两组均先用 Hulth 法<sup>[4]</sup>进行 OA 造模,即:将大鼠以 10% 水合氯醛 4 mL/kg 麻醉,备皮及消毒,取髌韧带做横向切口,切断髌韧带,向内侧切断内侧副韧带,取下内侧半月板,切断前后交叉韧带。双层缝合伤口,每只局部肌肉注射青霉素 16 万 U,连续注射 3 天。术后正常组和模型组每天以生理盐水 3 mL/只灌胃,盐酸氨基葡萄糖组每天以盐酸氨基葡萄糖 25 mg/kg 灌胃,连续 28 天后采用 10% 水合氯醛 4 mL/kg 麻醉,进行大鼠心脏取血,所得血液经 1 700 r/min, 10 min, 4 ℃ 离心,分离血清 -80 ℃ 保存备用;冰上取手术侧膝关节,提取膝关节软骨至于 -80 ℃ 备用以提取 RNA 及蛋白质。

## 5 观察指标与检测方法

5.1 大鼠关节软骨评价 大鼠膝关节行 HE 染色及 Mankin's 评分(即对病理结果进行量化),评分参照参考文献[4]。

5.2 bmal1、cry1、per1 mRNA 表达量 采用 RT-PCR 检测。以 1:1 000 DEPC 水浸泡刀片,将软骨从膝关节处剔除,将其放于研钵中加入液氮研磨成粉末,研磨的粉末平均分成两份,均收集于 2 mL 平底离心管中,一份用于提取 RNA,一份用于提取蛋白质。使用软骨 RNA 提取试剂盒提取软骨 RNA,提取后测量 RNA 浓度;浓度达标者使用逆转录试剂盒进行逆转录,最后进行 PCR 操作,具体引物序列见表 1。

BMAL1、CRY1、PER1 蛋白表达量 采用 Western Blot 检测。以 RIPA 裂解液裂解上述提取的软骨粉末,裂解时间 30 min,充分裂解之后离心吸取上清,以 BCA 试剂盒测量蛋白浓度,调整浓度为 1  $\mu$ g/ $\mu$ L 后加入上样缓冲液煮沸 5 min,待样品冷却至室温后上样电泳。电泳之后进行转膜操作,注意黑胶白膜,避

表 1 bmal1、per1、cry1、 $\beta$ -actin 引物序列

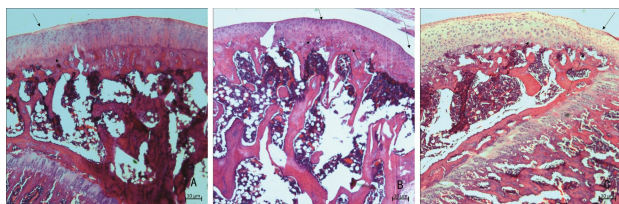
| 名称             | 引物序列                          | 引物长度(bp) |
|----------------|-------------------------------|----------|
| bmal1          | 上游:5'-GGCGTCGGGACAAAATGAAC-3' | 20       |
|                | 下游:5'-TGCTGAACAGCCATCCTGAG-3' |          |
| per1           | 上游:5'-GGACAACCCGCTACCACTG-3'  | 20       |
|                | 下游:5'-GGCCAGAGCATACTGGAGTG-3' |          |
| cry1           | 上游:5'-GTCCTAAGAGGCTTCCCTGC-3' | 20       |
|                | 下游:5'-ATTCAGTCGACTTGCCTCGG-3' |          |
| $\beta$ -actin | 上游:5'-GAGGGAAATCGTGCCTGA-3'   | 20       |
|                | 下游:5'-CTGGAAGGTGGACAGTGA-3'   |          |

免气泡。转膜成功后敷抗体,显色。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,对于满足正态分布的数据,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;对于分布非正态的数据,采用非参数检验。采取 95% 可信区间,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组大鼠膝关节软骨情况比较(图 1) 正常组大鼠关节 HE 染色可见软骨表面光滑,软骨厚度正常,潮线规则且完整;模型组大鼠软骨表面欠光滑,软骨变薄,潮线不规则;盐酸氨基葡萄糖组大鼠可见软骨表面光滑,软骨厚度基本正常,但不均匀,潮线基本规则。



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为盐酸氨基葡萄糖组;图中箭头为阳性标记

图 1 各组大鼠膝关节软骨情况比较 (HE,  $\times 50$ )

2 各组大鼠 Mankin's 评分比较(表 2) 与正常组比较,模型组 Mankin's 评分升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,盐酸氨基葡萄糖组 Mankin's 评分下降 ( $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠 Mankin's 评分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | <i>n</i> | Mankin's 评分              |
|---------|----------|--------------------------|
| 正常      | 9        | 0.15 $\pm$ 0.13          |
| 模型      | 9        | 10.72 $\pm$ 0.75 *       |
| 盐酸氨基葡萄糖 | 9        | 4.75 $\pm$ 0.28 $\Delta$ |

注:与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,  $\Delta$   $P < 0.05$ ;下表同

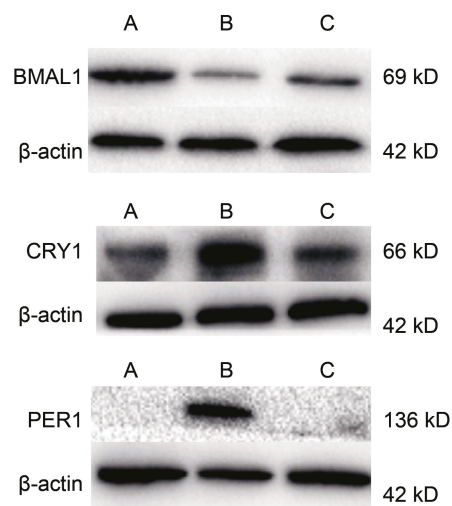
3 各组大鼠 bmal1、cry1、per1 mRNA 表达水平比较(表 3) 与正常组比较,模型组 bmal1 mRNA 表达水平下降, cry1、per1 mRNA 表达水平升高

( $P < 0.05$ );与模型组比较,盐酸氨基葡萄糖组 bmal1 mRNA 的表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), cry1、per1 mRNA 表达水平下降 ( $P < 0.05$ )。

表 3 各组大鼠 bmal1、cry1、per1 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | <i>n</i> | bmal1                    | cry1                     | per1                     |
|---------|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常      | 9        | 1.00 $\pm$ 0.00          | 1.00 $\pm$ 0.00          | 1.00 $\pm$ 0.00          |
| 模型      | 9        | 0.65 $\pm$ 0.22 *        | 1.81 $\pm$ 0.42 *        | 2.05 $\pm$ 0.19 *        |
| 盐酸氨基葡萄糖 | 9        | 0.83 $\pm$ 0.57 $\Delta$ | 0.94 $\pm$ 0.29 $\Delta$ | 0.92 $\pm$ 0.43 $\Delta$ |

4 各组大鼠 BMAL1、CRY1、PER1 蛋白表达水平比较(图 2,表 4) 与正常组比较,模型组 BMAL1 蛋白表达水平下降,CRY1、PER1 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,盐酸氨基葡萄糖组 BMAL1 蛋白的表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), CRY1、PER1 蛋白表达水平下降 ( $P < 0.05$ )。



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为盐酸氨基葡萄糖组

图 2 各组大鼠 BMAL1、CRY1、PER1 蛋白表达电泳图

表 4 各组大鼠 BMAL1、CRY1、PER1 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | <i>n</i> | BMAL1                    | CRY1                     | PER1                     |
|---------|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常      | 9        | 1.00 $\pm$ 0.00          | 1.00 $\pm$ 0.00          | 1.00 $\pm$ 0.00          |
| 模型      | 9        | 0.32 $\pm$ 0.17 *        | 3.34 $\pm$ 0.43 *        | 5.63 $\pm$ 0.65 *        |
| 盐酸氨基葡萄糖 | 9        | 0.78 $\pm$ 0.23 $\Delta$ | 1.74 $\pm$ 0.29 $\Delta$ | 1.98 $\pm$ 0.66 $\Delta$ |

## 讨 论

OA 是一种常见的关节退行性病变,随着年龄增长,其发病率也逐渐提高。近年来孟庆军研究团队发现,软骨细胞生物钟参与了 OA 的发生、发展。哺乳动物的生物钟系统由母钟和子钟构成,母钟存在于下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nuclei, SCN),子钟位于各外周组织中<sup>[5-7]</sup>。该系统主要由 4 个蛋白及两个



基本环路构成。其中 BMAL1、CLOCK 蛋白构成起激活作用的环路,PER、CRY 蛋白构成起抑制作用的环路<sup>[8-10]</sup>,两个环路共同调控着生物钟的动态平衡。

有研究表明,上述 4 个生物钟蛋白中,BMAL1 蛋白与 OA 关系最为密切,在 OA 患者以及 OA 大鼠模型中均发现其有表达量降低的现象<sup>[10]</sup>。PER 和 CRY 蛋白研究相对较少。

在本实验中可以发现,OA 大鼠中软骨细胞 BMAL1 蛋白降低,cry1、per1 mRNA 及 CRY1、PER1 蛋白升高,这一发现与孟庆军研究团队的研究结果基本相同<sup>[1]</sup>。

在使用盐酸氨基葡萄糖干预 OA 大鼠之后发现,bmal1 mRNA 及 BMAL1 蛋白的表达量较模型组有升高趋势,cry1、per1 mRNA 及 CRY1、PER1 蛋白的表达量有降低趋势,证明了生物钟可能是 OA 发生发展中扮演着重要的角色之一。

中医学认为 OA 与肾虚相关,肾主骨生髓,肾虚则髓不能满,此为发病之本,加之感受外界的风、寒、湿邪,故而会出现骨痹。在《素问·上古天真论》中便有相应的描述:“女子七岁肾气盛,齿更发长……三七肾气平均,故真牙生而长极……丈夫八岁肾气实,发长齿更……五八肾气衰,发堕齿槁……”。这表明肾是调控身体节律的主要脏腑。

本实验表明了生物钟与 OA 发病和向愈之间的关系,这也很好地解释了为什么有的临床患者常常会在固定的时间出现关节痛,由此,亦为今后研究提出新的思考:第一,是否可以将时辰医疗引入 OA 疾病的治疗中来,通过改善生物钟稳态治疗 OA,从而为 OA 治疗提供新的方法<sup>[11]</sup>;第二,是否可以从补肾的角度治疗 OA,同时观察补肾中药对 OA 大鼠软骨细胞生物钟的影响,而为补肾中药治疗 OA 提供临床治疗的理论基础。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] Gossan N, Boot-Handford R, Meng QJ. Ageing and osteoarthritis: a circadian rhythm connection [J]. Biogerontology, 2015, 16(2): 209-219.
- [2] Kc R, Li X, Voigt RM, et al. Environmental disruption of circadian rhythm predisposes mice to osteoarthritis-like changes in knee joint [J]. J Cell Physiol, 2015, 230(9): 2174-2183.
- [3] Guo B, Yang N, Borysiewicz E, et al. Catabolic cytokines disrupt the circadian clock and the expression of clock-controlled genes in cartilage via an NF small, cyrillic B-dependent pathway[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(11): 1981-1988.
- [4] 吕素飞, 徐愿, 阎小萍, 等. 骨痹通方对骨关节炎模型大鼠组织形态学的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(11): 1519-1522.
- [5] Wu T, Jin Y, Ni Y, et al. Effects of light cues on re-entrainment of the food-dominated peripheral clocks in mammals[J]. Gene, 2008, 419(1-2): 27-34.
- [6] Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock [J]. Handb Exp Pharmacol, 2017, (217): 3-27.
- [7] Mohawk JA, Takahashi JS. Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators [J]. Trends Neurosci, 2011, 34(7): 349.
- [8] Huang N, Chelliah Y, Shan Y, et al. Crystal structure of the heterodimeric clock: bmal1 transcriptional activator complex [J]. Science, 2012, 337(6091): 189-194.
- [9] Gossan N, Zeef L, Hensman J, et al. The circadian clock in murine chondrocytes regulates genes controlling key aspects of cartilage homeostasis [J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(9): 2334-2345.
- [10] Dudek M, Gossan N, Yang N, et al. The chondrocyte clock gene bmal1 controls cartilage homeostasis and integrity [J]. J Clin Invest, 2016, 126(1): 365-376.
- [11] 房静, 张媛, 侯芳菲, 等. 时辰药理学研究进展[J]. 天津药学, 2018, 30(3): 70-74, 78.

(收稿: 2019-01-07 在线: 2019-12-20)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶