

NF- κ B 通路在 TNF- α 调控软骨细胞 MMPs/TIMPs 比例中的作用研究*

蔡林奕, 孔祥丽, 谢强, 谢静 Δ

四川大学口腔疾病研究国家重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 探索核因子- κ B(NF- κ B)对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导下软骨细胞中基质金属蛋白酶家族(MMPs)与基质金属蛋白酶组织抑制剂家族(TIMPs)比值的影响。方法 采用胰酶消化法从1日龄小鼠的膝关节处提取软骨细胞。HE染色以显示软骨细胞形态;半定量PCR用于分析TNF- α 诱导下bay11-7082对软骨细胞中MMPs和TIMPs基因表达的影响,酶谱用于鉴定TNF- α 和bay11-7082作用后明胶酶活性的改变。结果 TNF- α 能使MMPs和TIMPs的基因表达上调($P < 0.05$)。MMPs(除外MMP-1)与TIMPs的比值均出现上调($P < 0.05$)。Bay11-7082能抑制TNF- α 诱导下MMPs和TIMPs的表达上调,并能使MMPs/TIMPs上调的比值下降到接近于正常软骨细胞的水平。酶谱检测明胶酶的变化,也有一致的发现。结论 TNF- α 诱导下MMPs与TIMPs比值的上升可在一定程度上解释骨关节炎(OA)中软骨基质的过度降解。用bay11-7082阻断NF- κ B途径可能为OA的治疗提供方案。

【关键词】 软骨细胞 肿瘤坏死因子- α 核因子- κ B 基质金属蛋白酶家族 基质金属蛋白酶组织抑制剂家族

The Effects of NF-kappa B Signalling on the TNF-alpha-induced Ratios of MMPs to TIMPs in Chondrocytes CAI Lin-yi, KONG Xiang-li, XIE Qiang, XIE Jing Δ . State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: Xiejing2012@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the influence of the NF- κ B inhibitor (bay11-7082) on tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)-induced different ratios of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in chondrocytes. **Methods** Chondrocytes were isolated from the knee joint of a 1-day old mouse by trypsin digestion method. Hematoxylin-Eosin (HE) stain was used to show the morphology of isolated chondrocytes; Semi-quantitative PCR was applied to analyze the influence of bay11-7082 on gene expressions of TNF- α -induced MMPs and TIMPs in chondrocytes; Zymography was used to elucidate activities of the gelatinases induced by TNF- α and/or bay11-7082. **Results** TNF- α up-regulated gene expressions of the MMPs and TIMPs ($P < 0.05$). The ratios of MMPs/TIMPs were mostly increased except the part of MMP-1. Bay11-7082 could reduce TNF- α -induced MMPs and TIMPs gene expressions, and could make the increased ratio of MMPs/TIMPs dropped to the normal level of chondrocytes. Similar results were observed at the protein level of the gelatinases by zymography. **Conclusion** TNF- α -induced high ratios of MMPs/TIMPs could partially explain over-degradation of cartilage extracellular matrix in osteoarthritis (OA). Blockage of NF- κ B with bay11-7082 might provide a possible therapeutic strategy for the OA deterioration.

【Key words】 Chondrocyte TNF- α NF- κ B MMPs TIMPs

骨关节炎(OA)的主要特点是关节软骨的进行性损伤和降解^[1]。软骨细胞是关节软骨内的唯一细胞,能参与旧细胞外基质(ECM)的降解和新ECM的合成。在OA病变中,ECM稳态被打破,最终导

致关节功能的丧失^[2]。

软骨细胞异常可使分解性细胞因子和蛋白酶活化而导致稳态失衡^[3]。软骨基质的降解由基质金属蛋白酶家族(MMPs)和基质金属蛋白酶组织抑制剂家族(TIMPs)调控,作为OA进程的关键炎症细胞因子,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在此过程中发挥重要作用^[4]。MMPs是一类蛋白水解酶,根据底物的特异性将MMPs分为四大类:胶原酶(MMP-1、-8和-13)、明胶酶(MMP-2和-9)、间质降解素(MMP-3、-10和-11)和膜型基质金属蛋白酶^[5]。迄今为止,

* 四川大学口腔疾病研究国家重点实验室自主研究课题(No. SKLOD201527)、四川大学青年教师科研启动基金(No. 2015SCU11013)和四川大学大学生创新创业训练计划(No. 201510610117)资助

Δ 通信作者, E-mail: Xiejing2012@scu.edu.cn

只有 MMP-1 和-13 因能直接降解 ECM 成分而被认为是病理性软骨细胞中 MMPs 的典型成员^[6]。与三螺旋结构的胶原相比,其他家族成员对变性后的胶原有更强的降解能力(特别是 MMP-2 和-9)。TIMPs 是 MMPs 的生理性抑制剂,能与 MMPs 结合从而抑制其蛋白降解功能。TIMP-1 能抑制 MMP-1、-3、-9 和-13 的活性;TIMP-2 也能抑制不同的 MMPs,特别是 MMP-2;TIMP-3 通过与 ECM 结合而发挥作用;TIMP-4 能抑制 MMPs 的活化,特别是与软骨降解相关的家族成员^[7]。目前,MMPs 和 TIMPs 的功能尚未完全弄清,均需进一步研究。

近年来,信号通路假说多用于解释 OA 中软骨的病变,即认为 OA 的病理改变是一系列信号途径相互作用的结果^[8]。核因子- κ B(NF- κ B)途径是 OA 中软骨组成和结构改变的最重要途径之一^[9]。到目前为止,已有研究表明炎症反应所引起的 MMP-1 和 MMP-13 基因表达的上调依赖 NF- κ B 的活化^[7,9]。但 TNF- α 诱导下 NF- κ B 途径活化所致其他成员(例如明胶酶)的变化及 MMPs/TIMPs 比例的变化尚未完全清楚。

本研究通过检测 TNF- α 诱导下软骨细胞中 MMPs 和 TIMPs 各成员的不同表达,分析 NF- κ B 途径特异性抑制剂对 MMPs/TIMPs 比值的影响,试图用 MMPs 与 TIMPs 的相互作用解释软骨的不可逆降解,以期对 OA 治疗提供可能的方案。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

苏木精-伊红染色(HE 染色)试剂盒(北京碧云天);6 孔板(Corning, NY, USA);TNF- α (Peprotech, NJ, USA);RNA 抽提试剂盒(Qiagen, CA, USA);cDNA 合成试剂盒(Mbi, MD, USA);PCR 试剂盒(Mbi, MD, USA);bay11-7082(Sigma, St. Louis, MO, USA);全蛋白提取试剂盒(南京凯基);BCA 试剂盒(南京凯基)。

倒置显微镜(Olympus IX70, Japan);光密度计(Bio-rad);Thermo-cycler(Bio-Rad, CA, USA);Bio-Tek ELx800(Bio-Tek, VT, USA)。

1.2 实验动物

清洁级 C57 小鼠,1 日龄,购于四川大学实验动物中心。

1.3 细胞培养

软骨细胞取自 1 日龄小鼠的膝关节。用 0.25% 胰酶消化 30 min,再用 0.5% II 型胶原酶消

化 3 h。在软骨细胞悬浮液中加入等体积含 10% 胎牛血清(FBS)、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基。离心后,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基使软骨细胞再次悬浮。接种到培养瓶中,放入体积分数为 5% 的 CO₂、37 °C 孵箱中培养。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组及处理 实验分为空白对照组, TNF- α 处理组(TNF- α 的浓度分别为 1、5、10、20 和 50 ng/mL),bay11-7082 处理组(bay11-7082 的浓度分别为 10、20 和 30 μ mol/L),TNF- α 与 bay11-7082 共处理组(TNF- α 浓度为 20 ng/mL, bay11-7082 浓度为 20 μ mol/L)。

将软骨细胞接种于 6 孔板,弃去含 10% FBS 的 DMEM 培养基,用含 2% FBS 的 DMEM 培养基饥饿细胞 12 h,再换成含 1% FBS 的 DMEM 培养基,此时立即进行 TNF- α 或 bay11-7082 的处理。在基因表达方面,不同浓度的 TNF- α 或 bay11-7082 作用 2 h 后,收集 1 mL 细胞裂解物用于后期的半定量 PCR;在蛋白表达方面, TNF- α 或 bay11-7082 作用 12、24、48 和 72 h 后,收集 1 mL 培养基用于酶谱实验。

1.4.2 HE 染色 原代软骨细胞接种于培养瓶 12、36 和 120 h 后,在倒置显微镜下观察细胞增殖情况,并采集图像。对软骨细胞进行实验分组并做相应处理,随后采用 HE 染色试剂盒进行 HE 染色。用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定贴壁细胞 1 h,随后清洗。按照试剂盒说明书操作,干燥后中性树脂封片,在倒置显微镜下观察软骨细胞形态,并采集图像。

1.4.3 半定量 PCR 按试剂盒说明提取软骨细胞 RNA 并纯化、定量后,使用试剂盒逆转录合成 cDNA。在 Thermo-cycler 上进行半定量 PCR。表 1 为各基因的引物序列(以 GAPDH 和 β -actin 作为双内参)。半定量 PCR 反应体系为 25 μ L,含有 1 μ L cDNA。每次循环包括变性 94 °C 30 s,退火 55~65 °C 30 s,延长 72 °C 30 s,循环次数 25~28 次。PCR 产物在 Tris 硼酸-乙二胺四乙酸缓冲液中电泳,溴化乙锭染色并显色。Quantity One 4.6.3 软件用于分析光密度(OD)值,以目的基因与内参基因 OD 值的比值作为目的基因的表达量。最后以空白对照组的表达量为 1,计算各组相对此组的基因表达量。

1.4.4 酶谱实验 0.05% 明胶酶谱可用于检测培养基中软骨细胞分泌的 MMP-2 和-9 的活性。按试

表 1 半定量 PCR 的引物序列: *GAPDH*、 β -actin、*MMPs* 和 *TIMPs*Table 1 Primers of house keeping gene (*GAPDH* & β -actin), *MMPs* and *TIMPs* designed for semi-quantitative PCR

mRNA	Primer pairs (5'-3')	Melting temperature/ °C
<i>GAPDH</i> (266 bp)	Forward GGTGAAGGTCGGTGTGAACG Reverse CTCGCTCCTGGAAGATGGTG	57.4
β -actin (233 bp)	Forward GTCCTCACCTCCCAAAAG Reverse GCTGCCTCAACACCTCAACCC	57.4
<i>MMP-1</i> (106 bp)	Forward TCATACTACCATCCTGCGACTC Reverse TCACCTCTAAGCCAAAGAAAAGA	55
<i>MMP-2</i> (110 bp)	Forward ATGTGTCTTCCCCTTCACTTTC Reverse GGTCATCATCGTAGTTGGTTGT	55
<i>MMP-3</i> (113 bp)	Forward AAGGTCTGGGAGGAGGTGAC Reverse CCATCAAAAGGGACAAAGTCTC	55
<i>MMP-9</i> (111 bp)	Forward CTCCCCAAAGACCTGAAAAC Reverse GACTGCTTCTCTCCCATCATCT	55
<i>TIMP-1</i> (145 bp)	Forward CTGGCATCCTCTTGTGTGCTATC Reverse AAGGTGGTCTCGTTGATTCTG	60
<i>TIMP-2</i> (101 bp)	Forward TCTGAAGTCTGGTAGCCTGTGA Reverse ACCGTTTCTTTGGGGTTTCT	60
<i>TIMP-3</i> (104 bp)	Forward CAGGGAGTGTGAGTGTTAGGT Reverse TGGGGAAGAAGTATGCTGTC	60
<i>TIMP-4</i> (109 bp)	Forward CTTGCGATGTGTGCTATGGTAG Reverse TTGAGACAGTGGGAGTAGGAGAT	60

试剂盒说明提取软骨细胞蛋白并测量蛋白浓度。加入蛋白样品和蛋白分离缓冲液,在 100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离(凝胶中聚合有 0.05% 明胶)。结束后在蛋白水解缓冲液中孵育 12~16 h。考马斯亮蓝染色 1 h,脱色后光密度计扫描条带,Quantity One 4.6.3 定量。以空白对照组 12 h 激活态(MMPs 的活性形式)条带的 OD 值为 1,计算各组各时点激活态的比率,比率增高则活性上升。因 pro-MMP-9 和 pro-MMP-2 的活性只有其激活状态,即 MMP-9 和 MMP-2 的 10%,故 MMP-9 和 MMP-2 的条带密度是其前体蛋白条带密度的 10 倍^[10]。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方

差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

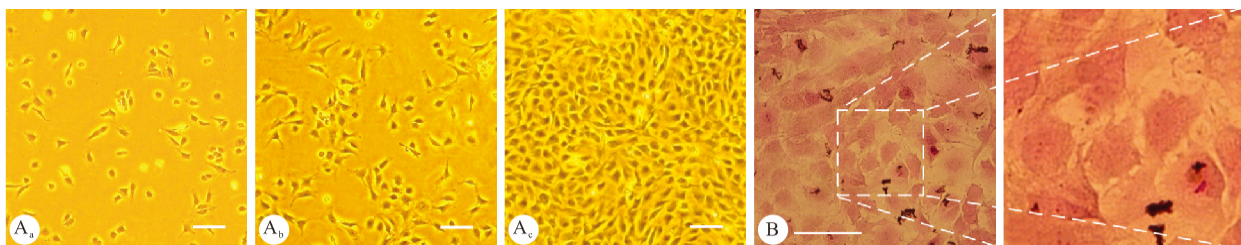
2 结果

2.1 细胞活性

接种于培养瓶 12、36 和 120 h 后,在倒置显微镜下观察原代软骨细胞,增殖情况良好;融合度较高时,细胞活性尚好(图 1A)。HE 染色鉴定表明本实验所使用的各个剂量的 TNF- α 及 bay11-7082 均对软骨细胞无毒性(图 1B)。

2.2 TNF- α 作用下软骨细胞中 *MMPs* 和 *TIMPs* 的基因表达

半定量 PCR 结果表明(图 2),随着 TNF- α 剂量的增加,*MMPs* 的表达上调,但 *MMP-1* 的变化不

图 1 新生小鼠关节软骨中分离到的软骨细胞的形态 (Bar: 70 μ m)Fig 1 Morphology of the chondrocytes isolated from the neonatal mouse articular cartilage (Bar: 70 μ m)

A: Cellular proliferation of the primary chondrocytes after isolation at 12 (a), 36 (b) and 120 h (c); B: Morphology of chondrocytes stained by HE

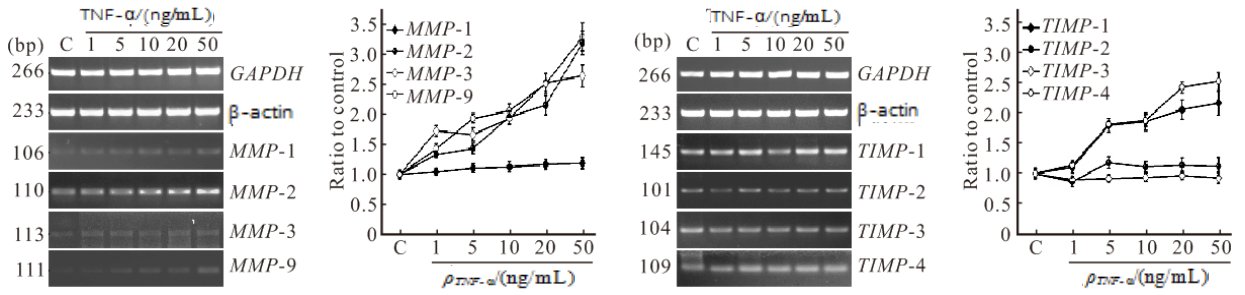


图 2 TNF-α 处理软骨细胞后 MMPs 与 TIMPs 基因表达的变化

Fig 2 Different gene expressions of MMPs and TIMPs in chondrocytes induced by TNF-α (C: Control group)

大;TIMPs 的表达亦上调,其中 TIMP-1 和 TIMP-4 上调明显。进行 MMPs/TIMPs 比值比较发现, TNF-α 作用后 MMP-1/TIMP-1、MMP-1/TIMP-4 的比值下降,但 MMP-2/TIMP-2、MMP-9/TIMP-1 和 MMP-3/TIMP-1 的比值上升[以 TNF-α 20 ng/mL 浓度组为例,与正常比值相比分别上调(2.86 ± 0.20)倍,(1.52 ± 0.19)倍,(1.21 ± 0.16)倍,见图 3]。

2.3 Bay11-7082 对 TNF-α 诱导的 MMPs 和 TIMPs 基因表达的抑制作用

半定量 PCR 结果(图 4)表明,随着 bay11-7082 剂量的增加,MMPs 和 TIMPs 基因的表达逐渐降低,但 TIMPs 下降不如 MMPs 下降明显。与空白对照组相比,共处理组软骨细胞中 MMPs/TIMPs 的比值均有一定程度下调。与 bay11-7082 单独处理组相比,共处理组中 MMP-9/TIMP-1 和 MMP-3/TIMP-4 上升(P < 0.05),但与空白对照组相比差异无统计学意义。

2.4 TNF-α 对明胶酶活性的增强及 bay11-7082 对其的抑制作用

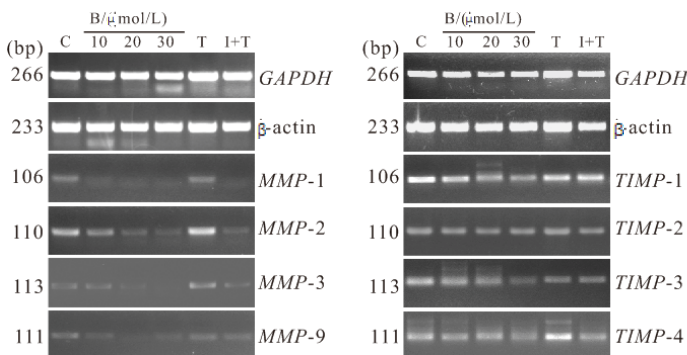


图 4 TNF-α(20 ng/mL)存在与否时,bay11-7082 阻断 NF-κB 途径对软骨细胞中 MMPs 与 TIMPs 比值的影响

Fig 4 Blockage of NF-κB by bay11-7082 showed different ratios of MMPs/TIMPs in chondrocytes with or without TNF-α (20 ng/mL) incubation

B: Bay11-7082; C: Control group; T: TNF-α 20 ng/mL group; I: Inhibitor group (bay11-7082 20 μmol/L); I+T: Inhibitor (bay11-7082 20 μmol/L) plus TNF-α (20 ng/mL) group. # P < 0.05, * P < 0.025

酶谱结果(图 5)表明,随着 TNF-α 剂量的增加、作用时间的延长,MMP-2 和-9 的活性逐渐增强。所加 TNF-α 为 50 ng/mL、作用 72 h 时,MMP-2 的活性较空白对照组增加 574%。TNF-α 处理软

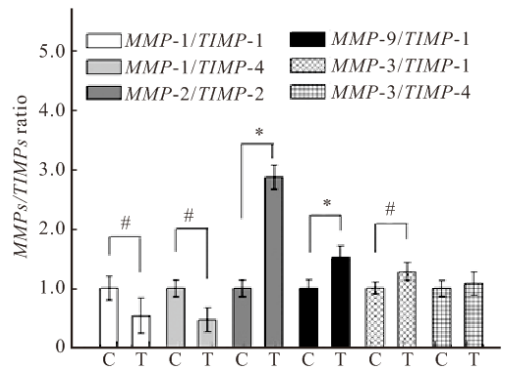
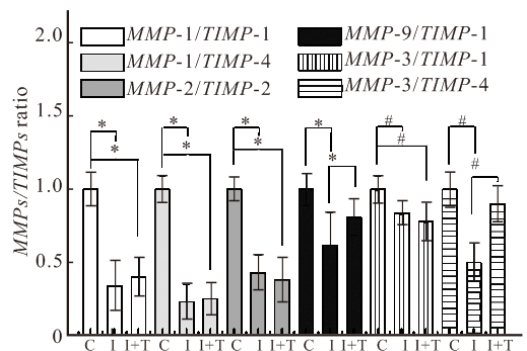


图 3 20 ng/mL TNF-α 处理软骨细胞后 MMPs/TIMPs 基因比值的变化

Fig 3 Ratios of MMPs/TIMPs showed the influence of 20 ng/mL TNF-α on the balance of ECM proteases

C: Control group; T: TNF-α 20 ng/mL group. * P < 0.05, # P < 0.025



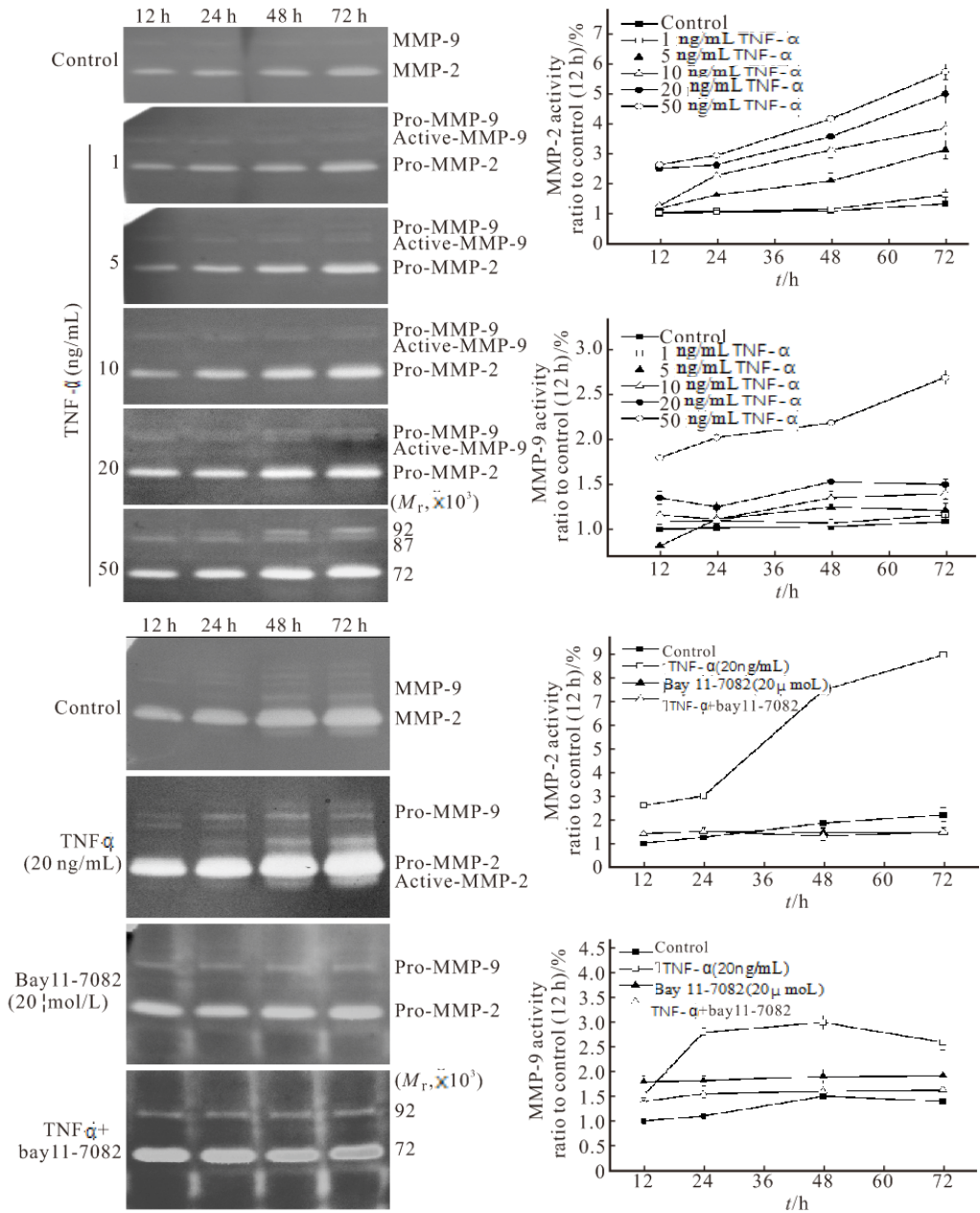


图 5 Bay11-7082 存在与否时, TNF- α 作用后软骨细胞中 MMP-2 和-9 的活性变化

Fig 5 Activity of MMP-2 and -9 in chondrocytes induced by TNF- α with or without bay11-7082 incubation

骨细胞并添加 bay11-7082 后,发现 MMP-2 和-9 的分泌明显下降,检测不出其活性形式而只检测到其前体蛋白。因此,同时应用 bay11-7082 和 TNF- α 时, bay11-7082 能使 MMP-2 和-9 在 TNF- α 作用后上调的活性下降至正常水平。

3 讨论

本研究通过分析 TNF- α 作用下软骨细胞中 MMPs 与 TIMPs 的比例变化,试图进一步阐明 OA 早期炎症阶段的病理改变。结果发现:①在基因水平, TNF- α 作用后 MMPs 与 TIMPs 的比值较正常时普遍上升(除外 MMP-1/TIMP-1 和 MMP-1/

TIMP-4);②NF- κ B(p65)的特异性抑制剂 bay11-7082 能使 TNF- α 作用后 MMPs 与 TIMPs 上调的比例恢复至正常水平或低于正常水平;③ bay11-7082 能使 TNF- α 作用后上调的 MMP-2 蛋白活性恢复至正常水平。

关节软骨由致密的 ECM 和软骨细胞组成。其基质主要包括胶原、蛋白多糖和水^[11]。软骨细胞通过抵抗凋亡、直接调控 ECM 的合成和降解而在维持软骨功能方面发挥关键作用^[12]。

人关节软骨的稳态由细胞因子介导的合成代谢和分解代谢这一相互平衡的过程所维持^[13]。合成性生长因子,如转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)可促进蛋

白聚糖的合成和装配^[14];分解性细胞因子,如 TNF- α 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 能激活分解代谢应答^[15]。在 OA 中,这种平衡发生改变,分解代谢占据主导地位^[3]。有研究表明,OA 患者普遍存在关节软骨的磨损,主要表现为 II 型胶原和蛋白聚糖的降解^[16]。

MMPs 是存在于 ECM 含 Zn²⁺ 的中性肽链内切酶家族,其功能是促进软骨骨转换及软骨降解^[4,10]。MMP-1 能作用于纤维状胶原,其对 III 型胶原的降解能力最强^[17]。MMP-13 活性最强,能切割胶原三螺旋结构,尤其针对 II 型胶原^[17],这也是关节软骨中含量最高的一种胶原。与其他胶原酶相比,MMP-13 对明胶(即胶原酶作用后的变性胶原)有更强的降解能力。因此,MMP-13 能进一步降解胶原酶的初级降解产物。以上这两种胶原酶因其直接而强大的降解软骨 ECM 的能力而在 OA 的病理进程中发挥重要作用^[7,9]。KOSKINEN 等^[17] 的研究指出 MMP-13 降解 II 型胶原的速率是 MMP-1 的 6 倍,MMP-1 主要作用于除 II 型胶原外的其他类型胶原。MMP-3 也能降解多种类型的胶原,且参与其他 MMPs 前体的活化。在目前已知的 3 种基质降解素中,只有 MMP-3 与软骨基质的降解有关。最新研究表明,MMP-3 的特异性很强。一般来说,明胶酶表达于软骨的深部区域^[18],其作用底物主要为明胶。而 MMP-3 在软骨基质更新中的作用甚少被关注。本研究发现,MMP-2、-3 和-9 的基因能在 TNF- α 作用下增长。同时,TNF- α 所引起的 TIMP-1 和-4 基因表达的增加远远大于 TIMP-2 和-3 的增加。本研究发现用 TNF- α 处理软骨细胞后,MMPs/TIMPs 表现出升高趋势,虽然 MMP-1/TIMP-1 和 MMP-1/TIMP-4 的比值下调(这可能是由于 TNF- α 对 MMP-1 的作用不显著所致)。但总的来说,正常 MMPs 和 TIMPs 表达间的平衡会更偏向于 MMPs。也就是说,TIMPs 不能完全阻断 TNF- α 所引起的 MMPs 的上调。由此可见,MMPs 与 TIMPs 比例的增加或许是分解代谢加强的重要因素,并能进一步解释 OA 进程中软骨基质的过度降解。

炎症反应中 MMPs 上调是由多条信号途径激活所致。IL-1 可通过 MAP 激酶途径上调 MMP-1 和-13 的表达。有数据表明,IL-1 β 诱导软骨细胞中 MMP-1 基因表达需 ERK 和 p38 的活化。ERK 的特异性抑制剂与 p38 的特异性抑制剂能下调 IL-1 β 作用后 MMP-1 mRNA 表达的增加^[19]。

MENGSHOL 等^[20] 的研究指出,IL-1 β 作用后 MAPKs 的活化在调控 MMP-13 的基因表达方面发挥着重要作用。另外,IL-1 β 所致的 NF- κ B 途径的活化可激活 MMP-1 和-13 的增强子^[21-22]。本研究发现 TNF- α 能使正常 MMPs 和 TIMPs 表达间的平衡更偏向于 MMPs。而在调控 MMPs 表达的信号通路中,NF- κ B 途径的作用最为显著^[23]。Bay11-7082 是 NF- κ B 通路的特异性抑制剂,已被大量用于 NF- κ B 通路的阻断。在使用 bay11-7082 后,结果显示 MMPs 和 TIMPs 的基因表达均下调,同时 OA 中上调的 MMPs/TIMPs 恢复至正常水平或低于正常水平。在蛋白表达方面,本研究同样证实 bay11-7082 能使 TNF- α 作用后上调的 MMP-2 活性下降。MMPs 的过度表达是 ECM 降解的关键,当 TIMPs 不能完全阻断 MMPs 的过度表达而使 ECM 的代谢失衡时,可诱发或加重 OA 的病理进程。由此我们认为,使用特异性 NF- κ B 抑制剂以下调 MMPs 的过度表达或许能为 OA 提供有效的治疗方案。

本研究还存在着一些不足。首先,软骨细胞取自新生小鼠,并不能真正代表体内的病理性软骨细胞。其次,我们是在用药 72 h 内检测分子水平的变化,这是一个瞬时的应答改变。为了更接近 OA 的慢性病变过程,实验需要更为长期的监测。第三,在 OA 患者的膝关节滑液中,IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子均出现上调,这些生物因子可能共同作用以调节软骨细胞释放的 MMPs 和 TIMPs 的水平。在目前的研究中,我们只分析了 TNF- α 作用下 MMPs 和 TIMPs 的表达变化,并未涉及其他炎症因子。在与临床结论相比较时,这一方面不可忽视。

参 考 文 献

- [1] LE LT, SWINGLER TE, CLARK IM. Review: the role of microRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(8):1963-1974.
- [2] NESIC D, WHITESIDE R, BRITTBERG M, *et al*. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliver Rev*, 2006, 58(2):300-322.
- [3] MONACH PA, WARNER RL, TOMASSON GPA, *et al*. Serum proteins reflecting inflammation, injury and repair as biomarkers of disease activity in ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(8):1342-1350.
- [4] CARMELI E, MOAS M, REZNICK AZ, *et al*. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle; a brief review. *Muscle Nerve*, 2004, 29(2):191-197.
- [5] AL-HIZAB F, CLEGG PD, THOMPSON CC, *et al*.

- Microscopic localization of active gelatinases in equine osteochondritis dissecans (OCD) cartilage. *Osteoarthr Cartilage*, 2002, 10(8): 653-661.
- [6] HUANG WS, LI WQ, DEHNADE F, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *J Cell Biochem*, 2002, 85(2): 295-303.
- [7] WANG JJ, HUAN SK, HSIEH KH, *et al.* Inhibitory effect of midazolam on MMP-9, MMP-1 and MMP-13 expression in PMA-stimulated human chondrocytes via recovery of NF-kappaB signaling. *Arch Med Sci*, 2013, 9(2): 332-339.
- [8] MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER JP. New insights into the major pathophysiological processes responsible for the development of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 2005, 34(6 Suppl 2): 6-8.
- [9] FRANK S, PETERS MA, WEHMEYER C, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-3 and matrix metalloproteinase-13 by SUMO-2/3 through the transcription factor NF-kappaB. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(11): 1874-1881.
- [10] XIE J, WANG C, YIN L, *et al.* Interleukin-1 beta influences on lysyl oxidases and matrix metalloproteinases profile of injured anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts. *Int Orthop*, 2013, 37(3): 495-505.
- [11] BLAIN EJ, GILBERT SJ, HAYES AJ, *et al.* Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis. *Matrix Biol*, 2006, 25(7): 398-408.
- [12] KIM HA, CHO ML, CHOI HY, *et al.* The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(7): 2152-2163.
- [13] KIM JH, HUH JE, BAEK YH, *et al.* Effect of Phellodendron amurense in protecting human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(2): 234-242.
- [14] XIE J, JIANG J, ZHANG Y, *et al.* Up-regulation expressions of lysyl oxidase family in Anterior Cruciate Ligament and Medial Collateral Ligament fibroblasts induced by Transforming Growth Factor-Beta 1. *Int Orthop*, 2012, 36(1): 207-213.
- [15] ADAMS SB, SETTON LA, BELL RD, *et al.* Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases in the Synovial Fluid After Intra-articular Ankle Fracture. *Foot Ankle Int*, 2015, 36(11): 1264-1271.
- [16] JALBÁ BA, JALBÁ CS, VLÁDOI AD, *et al.* Alterations in expression of cartilage-specific genes for aggrecan and collagen type II in osteoarthritis. *Rom J Morphol Embryol*, 2011, 52(2): 587-591.
- [17] KOSKINEN A, VUOLTEENAHO K, NIEMINEN R, *et al.* Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients. *Clin Exp Rheumatol*, 2011, 29(1): 57-64.
- [18] RUBENHAGEN R, SCHUTTRUMPF JP, STURMER KM, *et al.* Interleukin-7 levels in synovial fluid increase with age and MMP-1 levels decrease with progression of osteoarthritis. *Acta Orthop*, 2012, 83(1): 59-64.
- [19] RAYMOND L, ECK S, MOLLMARK J, *et al.* Interleukin-1 beta induction of matrix metalloproteinase-1 transcription in chondrocytes requires ERK-dependent activation of CCAAT enhancer-binding protein-beta. *J Cell Physiol*, 2006, 207(3): 683-688.
- [20] MENGSHOL JA, VINCENTI MP, COON CI, *et al.* Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB; differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(4): 801-811.
- [21] RANNOU FO, FRANCOIS M, CORVOL MT, *et al.* Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 2006, 73(1): 29-36.
- [22] ELLIOTT SF, COON CI, HAYS E, *et al.* Bcl-3 is an interleukin-1-responsive gene in chondrocytes and synovial fibroblasts that activates transcription of the matrix metalloproteinase 1 gene. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(12): 3230-3239.
- [23] TANG ZY, YANG L, XUE RY, *et al.* Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after a mechanical injury: involvement of the p65 subunit of NF-kB. *Wound Repair Regen*, 2009, 17(5): 709-716.

(2015-10-16 收稿, 2016-01-31 修回)

编辑 余琳