

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00495

· 论 著 ·

## 髓核细胞中活化 T 细胞核因子对 ADAMTS-4 启动子的调控作用

曹 鹏<sup>△</sup>, 杨 晨<sup>△</sup>, 田 野, 高 阳, 胡津铨, 袁 文\*

第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 观察活化 T 细胞核因子(NFAT)-1、4、5 在髓核细胞中对聚蛋白聚糖酶 ADAMTS-4 启动子活性的影响, 初步探讨椎间盘退变可能的分子机制。**方法** 将 ADAMTS-4-p $\beta$ -gal-Basic 质粒经限制性内切酶 *Xho* I 及 *Hind* III 酶切后插入到 PGL3-Basic 质粒中, 经筛选后获得纯化的 PGL3-ADAMTS-4 质粒。离体培养后, 使用 Lipofectamine 2000 系统进行转染实验, 将 NFAT-1、NFAT-4、NFAT-5 以及 DN-TonEBP 质粒和 PGL3-ADAMTS-4 质粒共转染大鼠髓核细胞。将正常髓核细胞和转染后的髓核细胞分别作为对照组和实验组。用双荧光素酶报告基因检测系统测髓核细胞中 NFAT-1、NFAT-4、NFAT-5 对 ADAMTS-4 基因启动子活性的影响。**结果** 构建了 ADAMTS-4 基因双荧光素酶报告质粒, 发现 2 个 NFAT 结合元件。与对照组相比, 转染 NFAT-1 的髓核细胞中 ADAMTS-4 启动活性被抑制 ( $P < 0.05$ ), 而转染 NFAT-4、NFAT-5 以及 DN-TonEBP 的髓核中 ADAMTS-4 启动子活性改变无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** NFAT-1 可调控 ADAMTS-4 的表达, 可能在椎间盘生理以及退变过程中对蛋白聚糖的含量起重要调控作用, 为椎间盘退变的生物学治疗提供了一个新的策略。

**[关键词]** ADAMTS-4; 活化 T 细胞核因子; 椎间盘; 髓核细胞

**[中图分类号]** R 681.53

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2014)05-0495-05

### Role of nuclear factor of activated T-cells in regulating ADAMTS-4 promoter activity in nucleus pulposus cells

CAO Peng<sup>△</sup>, YANG Chen<sup>△</sup>, TIAN Ye, GAO Yang, HU Jin-quan, YUAN Wen\*

Department of Orthopedic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the regulatory effect of nuclear factor of activated T-cells(NFAT)-1, 4, 5 on ADAMTS-4 promoter activity in nucleus pulposus cells, so as to discuss the underlying molecular mechanism of intervertebral disc degeneration. **Methods** The ADAMTS-4-p $\beta$ -gal-Basic was inserted into PGL3-Basic vector after double digestion by the restriction enzyme *Xho* I and *Hind* III. The purified PGL3-ADAMTS-4 plasmid was obtained through screening. Rat nucleus pulposus cells were cultured *in vitro* and, via Lipofectamine2000 transfection reagent, transfected with NFAT-1, NFAT-4, NFAT-5 or DN-TonEBP expressing plasmids with or without appropriate backbone vector and 175 ng ADAMTS-4 promoter. The normal cells were taken as controls and transfected cells were taken as treatment group. Dual-Luciferase<sup>TM</sup> reporter assay system was used to detect the effect of NFAT-1, 4, 5(TonEBP) on ADAMTS-4 promoter activity. **Results** We successfully constructed PGL3-ADAMTS-4 plasmid and identified two NFAT-Bind elements in the promoter. Compared with the control group, ADAMTS-4 promoter activity was significantly inhibited in NFAT-1 group ( $P < 0.05$ ). While the activities of ADAMTS-4 promoter in NFAT-4, NFAT-5 and DN-TonEBP groups showed no significant changes ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** NFAT-1 can regulate ADAMTS-4 expression, which may play a role in modulating aggrecan content in the intervertebral disc physiology and/or intervertebral disc degeneration, providing a new strategy for biological treatment of intervertebral disc degeneration.

**[Key words]** ADAMTS-4; nuclear factor of activated T-cells; intervertebral disk; nucleus pulposus cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(5): 495-499]

**[收稿日期]** 2013-10-09 **[接受日期]** 2014-04-09

**[基金项目]** 上海市科委国际合作项目(13430721000). Supported by International Cooperation Program of Shanghai Science and Technology Committee(13430721000).

**[作者简介]** 曹 鹏, 博士, 主治医师. E-mail: mdpinocao@163.com; 杨 晨, 硕士生. E-mail: yangchenspine@163.com

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886029, E-mail: yuanwenspine@gmail.com

椎间盘退变是导致椎间盘突出以及其他脊柱疾病的病理基础,而细胞外基质成分的改变,如聚蛋白聚糖(aggreacan)的降解,是椎间盘退变的重要表现之一<sup>[1]</sup>。含有血小板凝血酶敏感蛋白结构域的解聚素与金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase thrombospondin type I motifs, ADAMTS)家族成员中的ADAMTS-4是目前公认最重要的聚蛋白聚糖酶,研究表明它在软骨以及椎间盘退变的过程中有重要作用<sup>[2-3]</sup>。本研究通过分析人ADAMTS-4基因启动子片段后,发现该启动子中含有2个活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)家族结合位点。进一步采用双荧光素酶报告基因检测系统,检测了髓核细胞中NFAT-1、4、5对ADAMTS-4启动子活性的影响,探讨椎间盘退变的分子机制,以期能为椎间盘退变的生物治疗提供依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人ADAMTS-4 promoter in P $\beta$ -gal-Basic vector 获赠于 Dr. Thirunavukkarasu (Lilly Research Labs),限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 均购自 New England Biolabs 公司, pRL-TK 海肾荧光素酶质粒、Dual Luciferase<sup>TM</sup> Reporter Assay System、pSV $\beta$ -galactosidase 质粒、质粒提纯试剂盒、T<sub>4</sub> DNA 连接酶均购自 Promega 公司,胰酶-EDTA、DMEM 培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司, Lipofectamine2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒均购自 Qiagen 公司。

1.2 PGL3-ADAMTS-4 基因质粒构建方法 用 *Xho* I 及 *Hind* III 两种内切酶将 3.5 kb ADAMTS-4 启动子片段从 ADAMTS-4-p $\beta$ -gal-Basic 质粒中切出,同时将 PGL3 空载体的上游和下游分别切开。琼脂糖凝胶电泳后,用 Qiagen DNA 提取试剂盒及 Qiagen DNA 纯化试剂盒对所得 DNA 片段进行提取,纯化。在 16℃ 下,用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶体系将 ADAMTS-4 启动子片段与 PGL3 空载体连接,转化入大肠杆菌体内,涂布于含氨苄青霉素的琼脂糖(agarose)细菌培养板后,再置于 37℃ 的培养箱过夜。利用接入 ADAMTS-4 启动子片段后的 PGL3 表达氨苄青霉素耐药基因的特性,挑取有效存活细菌,将其克隆、摇菌、过柱后获得纯化质粒,并用

DNA 电泳方法来确认成功构建正确质粒。

1.3 髓核细胞的分离和培养 用 Risbud 实验室分离椎间盘髓核细胞法<sup>[4]</sup>,分离大鼠髓核细胞获取原代细胞后,将其放在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中,孵育 48 h 后换液,以后每 2 d 换 1 次液体,按时观察细胞形态。当细胞生长满大约 80% 培养皿时,按 1:3 的比例进行传代。消化:取待传代细胞培养瓶(皿),加入适量 0.25% 胰蛋白酶-EDTA,加入培养液终止消化,离心后弃去培养液,加入新鲜培养液后,按 1:3 比例进行传代。冻存:髓核细胞消化后,加入 1 mL 冻存液(DMEM+20%胎牛血清+10%DMSO)中,转移到冻存管后放入-80℃冰箱,24~48 h 后放入液氮箱中。复苏:将细胞迅速在 37℃ 水浴箱中融化,移至加有新鲜培养液的试管内,1 200 r/min 离心 2 min,加入新鲜培养液后,转移至培养瓶后放入细胞培养箱内培养,次日换液。

1.4 荧光素酶报告基因检测 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual-Luciferase<sup>TM</sup> reporter Assay System Promega)来检测荧光素酶基因表达:每孔细胞中加入裂解液 50  $\mu$ L,室温下摇床裂解细胞 35~40 min,以 10  $\mu$ L 细胞裂解悬液加入萤火虫荧光素酶底物 50  $\mu$ L,读取荧光表达,再加入海肾荧光素酶底物 50  $\mu$ L,读取荧光表达,以海肾荧光素酶与底物反应读数作为校正内参,二者比值即为获得校正后的读数。

1.5 统计学处理 所有的实验独立重复 3 次,用 *t* 检验进行组间比较,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 ADAMTS-4 启动子体外扩增、酶切以及鉴定结果 ADAMTS-4-p $\beta$ -gal-Basic 质粒被限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 进行酶切后的产物,再分别经 0.8% 琼脂糖电泳后,在紫外灯下可见 0.8~4.5 kb 不等的条带。选取 3.5 kb 的 ADAMTS-4 启动子片段作为目的基因,使用 Qiagen DNA 提取试剂盒及纯化试剂盒对所得 DNA 片段进行提取、纯化。纯化后的 PGL3-ADAMTS-4 promoter 质粒,再次用内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切,可见 4.6 kb 的线性 PGL3-Basic 质粒和 3.5 kb 的 ADAMTS-4 启动子片段(图 1),证实质粒构建成功。

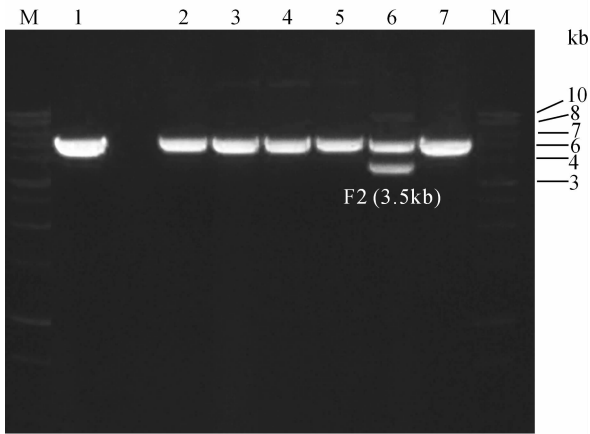


图1 重组质粒的酶切鉴定

**Fig1 Identification of plasmid PGL3-ADAMTS4 promoter after digestion by *Xho* I and *Hind* III**

Restriction enzyme was used to digest plasmid PGL3-ADAMTS4 promoter(1-7) again, and F2(3.5 kb) was successfully obtained. M: DNA marker; 1: PGL3-Basic; 2: PGL3-813; 3: PGL3-1203; 4: PGL3-1813; 5: PGL3-2209; 6: PGL3-3508; 7: PGL3-4524

**2.2 ADAMTS-4 启动子片段分析** 对获取的3.5 kb ADAMTS-4 启动子片段进行测序,并且使用 JASPAR 数据库<sup>[5]</sup>来研究该3.5 kb ADAMTS-4 启动子序列中是否存在 NFAT 的结合位点。分析结果显示在3.5 kb ADAMTS-4 启动子转录起始点上游-707~-702 bp 和-3 098~-3 093 bp 处有2个 NFAT 结合位点,即“GGAAAA”序列。除此之外,还可见 ADAMTS-4 启动子片段中存在着多个 NF- $\kappa$ B, Runx 等结合位点(图2)。

**2.3 NFAT-1 和 NFAT-4 对 ADAMTS-4 启动子的调控作用** 使用 NFAT-1、NFAT-4 表达质粒分别转染大鼠髓核细胞。相比于正常的髓核细胞,转染150 ng NFAT-1 质粒后 ADAMTS-4 启动子活性读数为  $0.61 \pm 0.01$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而在转染50、100、150 ng NFAT-4 后,相比于正常的髓核细胞,ADAMTS-4 启动子活性读数分别为  $0.89 \pm 0.13$ 、 $0.7 \pm 0.098$ 、 $0.97 \pm 0.24$ , 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.4 渗透压以及 NFAT-5/TonEBP 对 ADAMTS-4 启动子活性的调控作用** 分别检验了在标准渗透压和450 osm 渗透压状态下 ADAMTS-4 启动子活性。结果显示,与标准渗透压条件下培养的髓核细胞相比,高渗条件下培养的髓核细胞中 ADAMTS-4 启

动子活性读数为  $0.43 \pm 0.042$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。分别将50、100、150 ng 的 DN-TonEBP 质粒转染处于高渗透压条件下培养的髓核细胞中,相比于未转染 DN-TonEBP 的髓核细胞,转染了 DN-TonEBP 的髓核细胞中 ADAMTS-4 启动子活性的读数分别为  $0.53 \pm 0.09$ 、 $0.46 \pm 0.05$ 、 $0.52 \pm 0.07$ , 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。为了进一步验证 NFAT-5/TonEBP 是否对 ADAMTS-4 的转录具有调控作用,我们分别将50、100、150 ng 的 NFAT-5/TonEBP 表达质粒转染髓核细胞,相比于正常的髓核细胞,其 ADAMTS-4 启动子活性读数分别为  $0.89 \pm 0.08$ 、 $0.73 \pm 0.15$ 、 $0.80 \pm 0.11$ , 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

ADAMTS 是一种新型  $Zn^{2+}$  依赖性分泌型金属蛋白酶,广泛存在于哺乳动物和无脊椎动物中。ADAMTS-4 是生物体中最重要的聚蛋白聚糖酶,在髓核中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子能够通过 MAPK、NF- $\kappa$ B 信号转导通路诱导表达导致聚蛋白聚糖分解,在椎间盘退变的过程中发挥作用<sup>[6]</sup>。NFAT 家族包括 NFAT-1~4 以及 NFAT-5/TonEBP,其中 NFAT-1~4 由  $Ca^{2+}$  信号调节,NFAT-5 则通过渗透压的改变而被激活。NFAT 在软骨细胞以及髓核细胞中也有表达,具有促进软骨退变的作用<sup>[7-8]</sup>,并且在软骨细胞中 NFAT-1 上调了 ADAMTS-4 启动子活性<sup>[9]</sup>。

本实验克隆了3.5 kb 人 ADAMTS-4 基因启动子片段,成功构建了 ADAMTS-4 基因双荧光素酶报告质粒。对该启动子序列进行分析,结果显示在该启动子转录起始点上游有2个 NFAT 结合元件。NFAT-1 转染髓核细胞,数据显示在髓核细胞中 NFAT-1 下调了 ADAMTS-4 启动子活性,该结果与软骨细胞中<sup>[7-8]</sup>的并不一致。由于在不同的组织或者细胞型中,NFATs 可以与不同的转录因子结合形成不同的转录复合体或者激活其他的转录因子,从而对启动子活性产生不同的影响<sup>[10]</sup>,推测在髓核细胞和软骨细胞中,NFAT 可能结合了不同的转录因子从而对 ADAMTS-4 的转录产生相反的作用。Tomita 等<sup>[11]</sup>的研究已经证实 NFAT-4 通过上调骨形态发生蛋白2的表达促进软骨分化以及聚蛋白聚

-3 164 GCGGTCACTCTTACTGAGGGCGTTTCTCCACAGCTCCTGGCTGGCTTTTCTAGGAGCGAGCAAGGGAA  
**Runx** **NFAT**  
 AATTGCCGTTCTCGGTGGGGCAGATACTTCGTGCTCTCTCGCCGAGCCCGCTGCGTATCTTGAAACG  
 CGCGCGCTTCTTCCCTACTCCCTTCCGCCTTGGCCGCCCTCATGCTTTAGTCCTGCTCTCGGATTGTA

-2 954 TCTGAGCCCTGCCCTTATAGGGTAGCCCCAGGCTTTGCCAATTACTTTCCCACTCACTGAATCCAAAGAC  
 AGGAGTTGGGAAAGCCAGCTAAATTTCCAGATGTCAAAAATGAGATGGAGAAAGGAGCCCTAAGTGGGGC  
 TGGGCGGTCTGAGAGCTCCCGCCAAACAAAAAAGAAATAGGATGCCAAGGCCGCCGCATTGGT

-2 744 GGTGCGGAGGGAGTGTGCGGGTGTGTAGGAGCCACCTCATCCAGATGGGGAGTGGAGTCTCTGTG  
**Runx**  
 GGTGACCTGACATCTCCAGGCTTCCGAACTACAGAATCACAGACCAGGAAGCGCCCTTAGAGATG  
 CCTCACACCCCACTTCCGTCTGCGTACGCCCTTTTTCCCTAACGTCTTTCTGACCTGCTATAGCCCTC  
**AP-1**

-2 534 CTGGGTAATGGCCAACAGCACGGAAATGTAGTAGCACCAGGAGTCTGATCACAAATCTGTATGGACAAAG  
 ATCTTCCAGCCTTAGAGGCTAGTTCCCTGTTTTCTCCCTCTGCCTCTAAGCCCAACTCCAGCTGGGCCAC  
 CCACCCGTAGAGTTTGTACAACCTCTCCAACCTCTGAGCCTGGAAAGAGGCCTTCCCAGATATCCCTAGA

-2 324 CAGGATCCCAGGGACACAGCCACACAGCAGCCAGCGAGGGTGGAGCAGACAGCCAGGAAGCAGAGATGG  
 TGGAAATCTTCACTGACAGAAAGAGGGGAAAGCCAGACTTCTGGCCTGGGAATTGACCTAATGGGAAT  
 GTACCAAGGGTGGGGCCAGATCTTAGCTGTGGGAACTGACCAGGACTGGGCTAGACAAGGCAGCTGC  
**Runx** **Runx**

-2 114 CACAGAGCCAGGGCAGAGGTTTGGTCCCTCTGTTGTCTCCTCATTCCTTGTCTTTCCCTGGGCCTTCTTTC  
 TATTGTTGAAACACAGCAAATGTGCCATGGTGGTGGGGATGGGAAGGACTGCATTATTATTTGCCTTGAT  
**Runx**  
 CCAGCCTGGGAGAAGTCAGGATAGACTTTGGGCTGCTTGGCCCTGGAGGCAGCTTGAGCTGGGACTGGGG

-1 904 TGGGGGCTCCTGAGGGGCTGCCTAGGACACTGCAGCTTTTGTGCTTCTCCCTGCTGCCAACACCCCA  
**Runx**  
 CACACACTGCTGCAGCCACTCTAAAGCCCTTTGTCTTTCATTGCTTAGTCACCCCTTTGTCTCATCTC  
 AAATAGGGGAGTGGAAAGGGGCAGTAGAGTTCTCTGGTGATAGCTCCTCTTGCCCTGCCCCCTCTGGTC

-1 694 TCCACCCCTTTTCTCCACTCCTCTAGTCCCAGCCCCGTGGCTTAGAACAGGGTCAGGCAAGTGGTGGG  
 TCAAGAGGTGGGTCTGGCAGTCAACAGGGGTGGGTGATCCAGGAAGTATAGGCACCAGGGCAGGTATT  
 ACCGACTGAGCAGGAAGGGAGGGGAAAGGAAGTATTCTGACGGATATGATATCGGGGGACAGGAGGT

-1 484 GACAAAGCAGAGTGAATAGGGGAATAGAGGCAAGAGGAGGTGGTCCACTTCTGGGAAAGGAAAGAGACTG  
 CTGACTGCACCTCCTTCTGGGATTTCTGGGAAACAAGCAGCCAGAGGATGGGGTGGCAGAAATT  
**NF-KB**  
 GCCCTACTTCTGAACCCCTTCTTGCCTTGAGAGTTCATACCCAAAGACCTCTTTCCGAGTTCCTCCTA

-1 274 TCCAAAGCCAAAGGAATAATTTGCTTCCCTTCCCTAACACCACCTTCTCCCTCCAGCCACTTTCCCCAC  
 CCCAGGCAATGGATTTCTCCAGTACCCTAATTTCCCTATATGCACAATGCTGTCTCCACCTCTCCCTG  
 CCCAGGGAGAAATAAAAAGAAAAGATGACTAGATATCCAGGAACCACTGGGTTCTCAGAGCAAGGTGG

-1 064 GGTGGATGGTGGGAGCCAGGTGGGGATTCTCCAGATTGATACTGGGTGAATCTGGGTTCTGAGAGCAA  
**NF-KB**  
 GTCTTGCCTATGCTGGGGCTGGCTGACTTGGGCTGGGGAGGGTTTAGGGCAGTTGGGAGTGGGTAGG  
 AGCAGGGCCAAAAGCCTGGGGGAAGCTACTGGGAGCTGGGCCAGGGAATGGGAGTCAGGAAGTGGGGA

-854 GGGGGAACCTGGGGGAAATGGAGCGGAATGGCTGTTCTGGGCTTTGGAGGGGTGGGTAGTGGTAAC  
 TCAGGAAGGGGATCCTGAGGGAGAGAAGGGACGTTAGAAAAGAGGAGTGCACCCCTGGATCCGCCTTC  
 TATAAAAGGAAAAGTCGTTAACCCTCCTGCCTTGTCTATCTGCCCTCTGTTATGTTTCAATCCAAGCAG  
**NFAT**

-644 GATCATCTACTCTTTGGGAGTCAACTCCCTGATCACTGTCTCCTTGCCTCCCCAATGTTCTGCCTTTT  
 TACTCTTCCAGCTGCTCAGTTCTATCCTGAGCCATGTCAAGCTACCTCTTTTATTTGTTCTTCCCTCT  
 TGATGCCTCCTTACCTGTTCCCTACCCTCTTTTCTCAGGAGCTCACTCAGTCCCCTCAGCCCTGGAAAC

-434 CAGCCACTAGGGCCAAAGGGCAGCATGAGGGAGCCTTGAGAAAAGAGAGCCATGGTAGGTTAGACTATA  
 AGAGCAGGAATTTCTCCACAGACCGTGATCCTATCTGTGCAATGCCGGCCAGGCCTTCCCTCAGTCTCTG  
 CCTCTCCTGGGCTCTGTCCACAAAAGGGAAAGAGACAGCTGAGGGCTGATTGTGGGGTTTGGGAAA  
**Runx**  
 AGGCTATGTCATCAGCTGGCCAGTGCCTATTATCCATTCCGGCTGCTAGAGATTCCCTCCCTGGGCAA  
**SP-1** **NF-KB**  
 GTCCCATTTTTTTGGGAAGCGATGATACCCCATCTGAGTCCCACCCAGACAGAGCTCAGCTGAGTGGCTTA  
 GAGATCAGCCAATCAATCGCAGAGGCTCACCATGCTTAAAAGAGCTGGCGGAGAGAGGCTGGGGAGAA  
**TATA box**

-14 CCCACAGGGAGACCCACAGACACATATGCACGAGAGACAGAGGAGGAAAGAGACAGAGACAAAGGCAC  
**Runx**  
 AGCGGAAGAAGGCAGAGACAGGGCAGGCACAGAAGCGGCCAGACAGAGTCTACAGAGGGAGAGGCCAG  
 AGAAGCTGCAGAAGACACAGGCAGGGAGAGACAAAGATCCAGGAAAGGAGGGCTCAGGAGGAGAGTTTGG

+197 AGAAGCCAGACCCCTGGGCACCTCTCCAAGCCAAAGGACTAAGTTTTCTCCATTTCTTTAACGGTCTCT  
 CAGCCCTTCTGAAAACCTTTGCCTCTGACCTTGGCAGGAGTCCAAGCCCCAGGCTACAGAGAGGACTTT  
**AP-1**

+337 CCAAAGCTAGGGTGTGGAGGACTTGGTGCCTTAGACGGCCCTCAGTCCCTCCAGCTGCAGTACCAGTGCC  
**ATG**  
**+407**

图 2 3.5 kb ADAMTS-4 启动子序列分析结果

Fig 2 Sequence analysis of 3.5 kb ADAMTS-4 promoter by JASPAR

The consensus NFAT-binding elements containing the sequence “GGAAAA” were located at positions -707 to -702 and -3 098 to -3 093 upstream of the transcription start site. NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

糖产生。我们的结果显示 NFAT-4 对 ADAMTS-4 启动子无调控作用,但文献报道 NFAT-4 通过抑制合成糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 的关键酶——葡萄糖醛酸转移酶的转录活性<sup>[12]</sup>,参与髓核细胞外基质代谢过程,在蛋白聚糖成熟的过程中发挥重要的调控作用。

本研究还检测了髓核细胞中渗透压对 ADAMTS-4 启动子活性的影响,与文献<sup>[13]</sup>的结果一致,高渗透压抑制了 ADAMTS-4 启动子活性。将 DN-TonEBP 在高渗透压条件下共转染髓核细胞,数据显示 DN-TonEBP 并没有解除高渗透压对 ADAMTS-4 启动子的抑制作用,说明在这个过程中高渗透压没有激活 NFAT-5/TonEBP。用 NFAT-5/TonEBP 质粒转染髓核细胞,数据与之前的结果一致,NFAT-5/TonEBP 对 ADAMTS-4 启动子活性没有明显影响。我们推测与既往报道中高渗透压激活 NFAT-5/TonEBP 的经典通路发挥作用<sup>[14]</sup>不同,高渗状态抑制 ADAMTS-4 启动子的活性并不是通过该通路来实现的,这个过程中可能存在其他未知的调控机制。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Colombini A, Lombardi G, Corsi M M, Banfi G. Pathophysiology of the human intervertebral disc [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40: 837-842.

[2] Song R H, Tortorella M D, Malfait A M, Alston J T, Yang Z, Arner E C, et al. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5 [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56: 575-585.

[3] Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, Caterson B. The regulation of the ADAMTS-4 and ADAMTS-5 aggrecanases in osteoarthritis; a review [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2008, 26: 139-145.

[4] Risbud M V, Guttapalli A, Stokes D G, Hawkins D, Danielson K G, Schaer T P, et al. Nucleus pulposus cells express HIF-1 alpha under normoxic culture conditions; a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98:

152-159.

[5] Wasserman W W, Sandelin A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 276-287.

[6] Tian Y, Yuan W, Fujita N, Wang J, Wang H, Shapiro I M, et al. Inflammatory cytokines associated with degenerative disc disease control aggrecanase-1 (ADAMTS-4) expression in nucleus pulposus cells through MAPK and NF- $\kappa$ B [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182: 2310-2321.

[7] Ranger A M, Gerstenfeld L C, Wang J, Kon T, Bae H, Gravalles E M, et al. The transcription factor NFATp is a repressor of chondrogenesis [J]. *J Exp Med*, 2000, 191: 9-21.

[8] Nishigaki F, Sakuma S, Ogawa T, Miyata S, Ohkubo T, Goto T. FK506 induces chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic carcinoma cells, ATDC5 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 437: 123-128.

[9] Thirunavukkarasu K, Pei Y, Moore T L, Wang H, Yu X P, Geiser A G, et al. Regulation of the human ADAMTS-4 promoter by transcription factors and cytokines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345: 197-204.

[10] Flanagan W M, Corthésy B, Bram R J, Crabtree G R. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A [J]. *Nature*, 1991, 352: 803-807.

[11] Tomita M, Reinhold M I, Molkenin J D, Naski M C. Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 42214-42218.

[12] Hiyama A, Gajghate S, Sakai D, Mochida J, Shapiro I M, Risbud M V. Activation of TonEBP by calcium controls  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferase-I expression, a key regulator of glycosaminoglycan synthesis in cells of the intervertebral disc [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 9824-9834.

[13] Tsai T T, Danielson K G, Guttapalli A, Oguz E, Albert T J, Shapiro I M, et al. TonEBP/OREBP is a regulator of nucleus pulposus cell function and survival in the intervertebral disc [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 25416-25424.

[14] Cheung C Y, Ko B C. NFAT5 in cellular adaptation to hypertonic stress-regulations and functional significance [J]. *J Mol Signal*, 2013, 8: 5.