

肿瘤坏死因子样微弱凋亡诱导因子对骨关节炎软骨细胞作用实验研究*

陈 琼¹, 赵明才^{1,2△}, 蒋 萍³, 廖 涛¹, 蔚 芃³, 吴 青³, 蒋 红² (川北医学院: 1. 附属医院检验科; 2. 风湿免疫研究所; 3. 附属医院骨科, 四川南充 637000)

【摘要】 目的 研究肿瘤坏死因子样微弱凋亡诱导因子(TWEAK)对体外培养骨关节炎(OA)软骨细胞的作用, 同时探讨炎性细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)与 TWEAK 之间的关系。**方法** 体外培养 OA 患者原代软骨细胞, 分别用 TWEAK(75 ng/mL), TWEAK(75 ng/mL)和 IL-1 β (5 ng/mL), TWEAK(75 ng/mL)和 TNF- α (5 ng/mL)作用细胞 48 h, MTT 检测细胞因子对软骨细胞的增殖作用影响; ELISA 检测细胞培养上清液中 MMP-13、IL-6 和 Fas 的分泌表达。**结果** MTT 结果表明细胞因子刺激软骨细胞后对细胞增殖无明显影响。TWEAK 和 IL-1 β 组诱导 MMP-13 表达增加($P < 0.05$); TWEAK 和 IL-1 β 组, TWEAK 和 TNF- α 组均诱导 IL-6 表达增加($P < 0.05$)。3 组 Fas 分泌表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** IL-1 β 与 TWEAK, TNF- α 与 TWEAK 分别诱导 OA 软骨细胞 MMP-13 和 IL-6 表达增加, 可能参与关节软骨损伤和 OA 的病程发展。

【关键词】 骨关节炎; 肿瘤坏死因子样微弱凋亡诱导因子; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 16. 001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)16-2065-02

Discussion the role of TWEAK on the chondrocytes of Osteoarthritis* CHEN Qiong¹, ZHAO Ming-cai^{1,2△}, JIANG Ping³, LIAO Tao¹, WEI Peng³, WU Qing³, JIANG Hong² (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Institute of Rheumatology and Immunology; 3. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of TWEAK on the OA chondrocytes, and to discuss the relationship between IL-1 β and TWEAK, TNF- α and TWEAK. **Methods** Chondrocytes from OA patients were cultured in vitro, stimulated by TWEAK(75 ng/mL), TWEAK(75 ng/mL) with IL-1 β (5 ng/mL), TWEAK(75 ng/mL) with TNF- α (5 ng/mL) for 48 h. The cells proliferation rate was analyzed by MTT. ELISA was used to detect the concentration of MMP-13, IL-6 and Fas in supernatant. **Results** The chondrocytes proliferation was not influenced by these cytokines. The expression of MMP-13 could be induced by TWEAK with IL-1 β stimulation($P < 0.05$). IL-6 expression induced by TWEAK with IL-1 β or TWEAK with TNF- α were higher than the other groups ($P < 0.05$). There was no significance change in the expression of Fas. **Conclusion** TWEAK with IL-1 β , TWEAK with TNF- α could induce the OA chondrocytes to synthesize MMP-13 and IL-6, which might affect pathological process of OA.

【Key words】 osteoarthritis; TWEAK; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α

骨关节炎(OA)是最常见的慢性关节疾病, 据世界卫生组织(WHO)估计, OA 使 60 岁以上人群中至少 10% 的人丧失劳动力^[1]。OA 表现为进行性关节软骨破坏及骨赘形成, 并伴有不同程度的滑膜炎。关节软骨的退变可能与软骨细胞表型不稳定而形成的各种细胞反应模式有关, 这些反应模式包括细胞去分化, 释放基质降解酶、细胞肥大和细胞凋亡。肿瘤坏死因子样微弱凋亡诱导因子(TWEAK)是新近研究的细胞因子, Fn14 为 TWEAK 的特异性受体, 它们以受体和配体方式结合后具有多种生物学效应, 如诱导促炎症细胞因子释放, 调节免疫反应, 促进血管生成, 刺激凋亡发生和调节组织修复与重塑^[2]。本课题通过体外细胞实验, 研究 TWEAK 刺激 OA 患者软骨细胞对细胞增殖生长及相关炎症因子表达水平的影响, 探讨 TWEAK 在 OA 关节退行性改变和关节破坏中的作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 3~10 月 11 例川北医学院附属医院

骨科骨关节炎患者, 女 6 例, 男 5 例, 年龄 37~88 岁, 平均年龄 61 岁。所有患者临床特征和影像学改变均符合 1995 年美国 ACR 修订的 OA 诊断标准。

1.2 主要试剂 TWEAK、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)购自 PEPROTECH 公司; MTT 购自武汉博士德公司, 胰蛋白酶-EDTA 和 H-DMEM 购自 Hyclone 公司; 胎牛血清购自浙江四季青生物公司; 基质金属酶-13(MMP-13)、IL-6、Fas ELISA 试剂盒购自 Ray Biotech 公司。

1.3 方法

1.3.1 软骨细胞的培养 留取患者关节置换术后的关节组织标本, 无菌条件下切取关节软骨层, 用含青链双抗(100 U/mL)的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍, 剪成 1~3 mm 的碎块, 加入等体积由 H-DMEM 配置的 0.2% II 型胶原酶在 37℃、5% CO₂ 培养箱静置消化 24 h, 用 200 目滤网收集软骨细胞, 使用含 20% FBS 的 H-DMEM 培养细胞。待细胞达到 90% 以上布满培养瓶时使用胰蛋白酶-EDTA 消化细胞, 以 1:2 进行传代培

* 基金项目: 国家自然科学基金(30972749); 四川省科技厅应用基础项目(2008JY0013)。△ 通讯作者, E-mail: aroge@sohu.com。

养。本实验均采用 2~3 代软骨细胞。

1.3.2 细胞因子刺激软骨细胞 软骨细胞以 1×10^4 /mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,24~48 h 后细胞贴壁,弃去培养液。使用含 10% FBS 的 DMEM 培养液配置终浓度为 TWEAK 75 ng/mL, TWEAK 75 ng/mL 和 IL-1 β 5 ng/mL, TWEAK 75 ng/mL 和 TNF- α 5 ng/mL 工作溶液,100 微升/孔加入 96 孔板中培养软骨细胞 48 h,含 10% FBS 的 H-DMEM 作为空白对照孔,每个刺激组设置 5 个复孔,48 h 后收集刺激细胞上清液于-20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.3.3 MTT 试验 向刺激后的软骨细胞培养孔中加入含有 10 μ L MTT 的 H-DMEM 培养液 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,加入 100 μ L Formazan 溶解液,室温振荡 10 min,酶标仪 570 nm 波长测定吸光度(OD)值。

1.3.4 ELISA 试验 严格按照试剂盒说明书操作步骤,复孔

检测刺激上清液中的 MMP-13、IL-6 和 Fas,酶标仪测定 OD 值,测定波长为 450 nm,制作标准曲线计算结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,多组均数比较采用 ANOVA 分析,组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞因子刺激软骨细胞后空白对照组 OD 值为(0.45 $\pm$ 0.15),TWEAK 刺激组为(0.53 $\pm$ 0.18),TWEAK 与 IL-1 β 共同刺激组为(0.58 $\pm$ 0.21),TWEAK 与 TNF- α 共同刺激组为(0.49 $\pm$ 0.12),统计分析显示组间差异无统计学意义($P > 0.05$),可能与软骨细胞增殖缓慢对细胞因子的刺激无明显反应有关。

2.2 细胞因子刺激软骨细胞后上清液中 MMP-13、IL-6 和 Fas 检测结果见表 1。

表 1 软骨细胞刺激上清液中 MMP-13、IL-6 和 Fas 表达水平($\bar{x} \pm s$,ng/mL)

组别	MMP-13	IL-6	Fas
空白对照组	1 866.80 $\pm$ 917.70	776.68 $\pm$ 261.88	135.50 $\pm$ 106.46
TWEAK 刺激组	4 260.86 $\pm$ 1 536.66	819.67 $\pm$ 246.15	228.00 $\pm$ 157.62
TWEAK+IL-1 β 共同刺激组	6 534.35 $\pm$ 1 311.84 ^a	974.45 $\pm$ 240.20 ^a	245.00 $\pm$ 137.33
TWEAK+TNF- α 共同刺激组	5 452.48 $\pm$ 1 424.56	936.70 $\pm$ 353.17 ^a	255.20 $\pm$ 181.15
F/P	1.88/0.16	2.64/0.06	0.88/0.47

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

3 讨 论

OA 关节软骨毁损中最为基本的因素是细胞外基质合成与分解途径的失衡。受累关节细胞因子网络被异常激活,分解型细胞因子如 IL-1、TNF- α 表达增多,在软骨降解过程中发挥重要作用。IL-1 β 和 TNF- α 等细胞因子与细胞膜相关受体结合后,通过共同的信号途径介导基质金属酶(MMPs)的产生,导致细胞外基质平衡失调,加速关节基质降解,软骨细胞凋亡^[3]。OA 的滑膜细胞和软骨细胞中均有 TWEAK、IL-1 β 和 TNF- α 的表达并介导炎症反应。研究认为 IL-1 β 和 TNF- α 对 TWEAK 具有协同作用^[4],它们之间可能通过相同的信号通路加速 OA 疾病进程。研究认为 TWEAK/Fn14 通过多种机制参与关节组织病理过程,其机制可能是 TWEAK 诱导人软骨细胞 MMPs 产生,以及 TWEAK 通过抑制祖细胞的成软骨作用,从而抑制关节修复^[5]。OA 的病理基础是关节软骨基质降解,进而引起关节软骨的进行性破坏。MMPs 可降解软骨细胞外基质中的 II 型胶原、弹力纤维和蛋白聚糖等,使关节软骨肿胀,抗外力作用下降,最终导致关节软骨进行性破坏。MMP-13 主要由软骨细胞分泌,关节炎发生时受关节中细胞因子和生长因子诱导表达增加,特异降解 II 型胶原,参与软骨组织骨胶原和基质降解^[6]。IL-6 在软骨退变中起着双重的调节作用,既能促进可溶性 TNF 受体生成,下调炎症反应,又能提高免疫细胞的功能和炎症反应,促使 IL-1 释放。TWEAK 作用 OA 和类风湿关节炎(RA)滑膜细胞和软骨细胞后,MMP-3、MMP-9 表达增加。IL-1 β 刺激软骨细胞后,软骨细胞 MMP-3、9 和 13 mRNA 的表达明显升高。TNF- α 刺激 RA 滑膜成纤维细胞后,TWEAK 能够抑制细胞因子 IL-6、IL-8 产生,表明 TWEAK 促细胞因子表达与相关促炎症环境有关,当 TNF- α 刺激 RA 滑膜细胞后 TWEAK 的作用可能是网络抑制效应^[7]。本实验中 TWEAK 单独作用软骨细胞后刺激了

MMP-13 和 IL-6 的生成增加。TWEAK 在 IL-1 β 的共同作用下 MMP-13 表达量与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。TWEAK 在 TNF- α 的共同作用下 MMP-13 和 IL-6 表达增加,与空白对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。细胞凋亡在 OA 的病理过程中的起着重要作用。TWEAK 通过 TNF- α -TNFR1 信号通路,刺激 RIP1-FADD-caspase-8 复合物合成而激发凋亡^[8]。Fas 是介导 OA 软骨细胞凋亡的重要途径之一。Fas 诱导 Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD),caspase 8 和 caspase 10 表达。同时 Fas 参与了 TWEAK/Fn14 的炎症信号通路,Fas 激活 NF- κ B、MAPK3/ERK1 和 MAPK8/JNK^[9],NF- κ B 的活化抑制 IL-1 β 和 TNF- α 的凋亡活性^[10]。Fas 表达于培养的软骨细胞膜表面,并且其表达水平受细胞密度调节,本实验结果表明 OA 软骨细胞本身分泌表达 Fas,受到细胞因子刺激后其表达增加,但结果并没有统计学意义($P > 0.05$),可能与体外试验中作用浓度及时间相关,需做进一步研究。有研究表明,TWEAK 具有促细胞增殖活性,促进组织修复^[11]。本试验中 OA 软骨细胞经细胞因子作用后细胞增殖较空白对照组有所增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$),可能与体外传代培养过程中脱离炎症环境,相关配体丢失有关。

在本试验中 TWEAK 对 OA 软骨细胞的促凋亡、促增殖作用不明显,可能与其作用的相互抑制有关。TWEAK 刺激炎症因子 MMP-13 和 IL-6 的表达增加,TWEAK 与 IL-1 β 或 TNF- α 共同作用后促炎作用增强,表明其可能通过共同的信号通路参与 OA 的疾病进程。进一步探讨 TWEAK 在 OA 发病机制中的作用,对该病临床治疗具有重要意义。

参考文献

[1] Rubin RJ,Dietrich KA,Hawk AD. Clinical and economic impact of implementing a comprehensive(下转第 2068 页)

2.3 染色体异常与 SCE 间的关系 石油作业环境使 SCE 增加,进而可能使染色体稳定性下降,染色体异常率增加。结果见表 2。

3 讨 论

习惯性流产是妇产科常见的疾病之一,而染色体异常是导致流产的重要原因。本研究表明,石油作业人员染色体畸变率高于健康对照组($P < 0.05$)。大量研究表明染色体异常可作为辐射损伤的敏感指标之一^[5]。本文研究结果说明,染色体数目和结构异常,包括结构易位、倒位均可导致习惯性流产。因此,对于石油作业习惯性流产夫妇,应采用细胞遗传学技术^[6],及时、准确地检测出异常染色体携带者和患者,避免生育染色体异常患儿。

在职业人群遗传毒理学效应的监护方法中,SCE 检测是评价环境中的诱变物质引起的 DNA 损伤与修复效应的一种敏感方法^[7-8]。SCE 形成与 DNA 的稳定性有关。SCE 发生率随 DNA 损伤积累及修复能力降低而增加。本文结果显示,各实验组 SCE 发生率明显高于健康对照组,表明石油作业环境中含有的化学物质增加了 DNA 的损伤水平和 SCE 发生率,由此产生明显的细胞毒理效应。各工龄组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。受损伤的 DNA 是不稳定的,虽然其可依靠自身的修复能力复原,但并非都能修复成正常结构^[9-10],此时易致染色体畸变。本实验结果表明实验组的 SCE 发生率随染色体畸变率的增高而增加,两者间存在着密切相关性。

对于在有害因子环境中作业的女性,在妊娠前应进行 SCE 检测,明确其染色体稳定性,再决定是否妊娠,这对提高生育质量有一定的价值。因此,加强对石油作业人员的劳动卫生监护和定期健康检查是非常重要的。

参考文献

- [1] 王培林. 遗传病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:965.
- [2] 慕明涛,霍满鹏,刘俊俊,等. 染色体技术诊断遗传性疾病病因的应用[J]. 中国妇幼保健,2009,24(11):1524-1526.
- [3] 余元勋,马旭,余国斌. 中国遗传咨询[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,2003:419-420.
- [4] 刘权章. 人类染色体方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1992:316-320.
- [5] 孙秀兰,刘伟,杨如景. 放射医学与防护[M]. 济南:济南出版社,2001:99-111.
- [6] 喜焱,代军,郭少铃. 不良生育和习惯性流产夫妇淋巴细胞染色体研究[J]. 中国优生与遗传杂志,1999,7(2):50.
- [7] 赵福林,金汉杰,李晓堂,等. 环氧丙烷作业工人白细胞中 DNA 加合物的检测[J]. 卫生毒理学杂志,2003,17(2):117-118.
- [8] 孙丽丽,张方清. 破乳剂对工人健康影响的流行病学调查[J]. 中国工业医学杂志,2004,17(4):257-259.
- [9] 朱健生,李启发,陈永桂,等. 安徽地区 87 例先天愚型的染色体分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2003,20(1):88.
- [10] 罗雪莹,王占平. 反复自然流产患者妊娠组织中 Survivin 和 PCNA 的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健,2010,25(1):107-108.

(收稿日期:2012-12-19 修回日期:2013-04-19)

(上接第 2066 页)

- diabetes management program in managed care[J]. J Clin Endocrinol Metab,1998,83(8):2635-2642.
- [2] Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery,biology and therapeutic targeting[J]. Nat Rev Drug Discov,2008,7(5):411-425.
- [3] Haas S, Straub RH. Disruption of rhythms of molecular clocks in primary synovial fibroblasts of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis,role of IL-1 β /TNF. [J]. Arthritis Res Ther,2012,14(3):122-125.
- [4] 夏丽萍,肖卫国,李俊松,等. TWEAK 诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞合成 MMP-3 的实验研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2009,25(1):46-48.
- [5] Perper SJ, Browning B, Burkly LC, et al. TWEAK is a novel arthritogenic mediator[J]. J Immunol,2006,177(4):2610-2620.
- [6] Lim H, Park H, Kim HP. Effects of flavonoids on matrix metalloproteinase-13 expression of interleukin-1 β -treated articular chondrocytes and their cellular mechanisms: inhibition of c-Fos/AP-1 and JAK/STAT signaling pathways [J]. J Pharmacol Sci,2011,116(2):221-231.
- [7] Yamana J, Morand EF, Manabu T, et al. Inhibition of TNF-

induced IL-6 by the TWEAK-Fn14 interaction in rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes[J]. Cell Immunol,2012,272(2):293-298.

- [8] Ikner A, Ashkenazi A. TWEAK induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIP1), Fas-associated death domain (FADD), and caspase-8[J]. J Biol Chem,2011,286(24):21546-21554.
- [9] Dharmapatni AA, Smith MD, Crotti TN, et al. TWEAK and Fn14 expression in the pathogenesis of joint inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther,2011,13(2):R51.
- [10] Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, et al. TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation[J]. Biol Chem,2003,278(38):36005-36012.
- [11] Chen HN, Wang DJ, Ren MY, et al. TWEAK/Fn14 promotes the proliferation and collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts via the NF- κ B pathway[J]. Mol Biol Rep,2012,39(8):8231-8241.

(收稿日期:2012-12-26 修回日期:2013-04-10)