

熊翱,魏小雨,许建中,等. 碘乙酸单钠诱导 SD 大鼠膝关节炎后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 643-652.

Xiong A, Wei XY, Xu JZ, et al. Expression and significance of HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13 and NGF proteins after MIA-induced KOA in SD rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 643-652.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 05. 011

碘乙酸单钠诱导 SD 大鼠膝关节炎后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义

熊翱^{1,2},魏小雨¹,许建中²,罗飞^{1*}

(1. 陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院骨科,重庆 400038;
2. 郑州大学第一附属医院骨科,郑州 450042)

【摘要】 目的 探讨碘乙酸单钠(monosodium iodoacetate, MIA)诱导 SD 大鼠膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义。**方法** 采用 SD 大鼠(4 周龄,80 ~ 120 g)为研究对象,随机分为假手术(Sham)组和模型(KOA)组。第 0 天,大鼠用戊巴比妥钠麻醉,模型组经右膝关节腔下韧带向关节腔内注射含 2 mg MIA 生理盐水 50 μ L,Sham 组大鼠给予 50 μ L 灭菌生理盐水。SD 大鼠分别于第 0、3、7、10、14 天测量右膝关节直径和检测负重能力后,麻醉安乐死,切取软骨和分离滑膜组织。同时,原代培养假手术组和模型组滑膜组织,鉴定成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)的纯度和活性后,采用地塞米松处理 FLS。通过 Western Blot 检测缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)蛋白的表达。**结果** 与假手术组比较,大鼠膝关节腔被注入 MIA 3 d 后,HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达升高,呈不断增加趋势。大鼠膝关节腔横径,在 MIA 造模后第 7 天和第 14 天,显著大于假手术组。MIA 注入大鼠膝关节腔第 3 天起,大鼠右后肢的负重能力持续在 26% 以下,显著低于假手术组。采用 0.2% I 型胶原酶消化法,成功培养了 FLS 原代细胞。使用地塞米松对模型组大鼠体外 FLS 干预后,显著降低了促炎因子分泌、NGF 和 MMP-13 蛋白的表达。**结论** HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白在滑膜炎、软骨降解及基质破坏和关节疼痛等方面起着重要作用,既是关节疼痛管理、炎症反应调节和抑制软骨降解和基质破坏的重要靶点,也是开发新型 OA 镇痛药物的蛋白靶点。

【关键词】 骨关节炎;碘乙酸单钠;疼痛;骨桥蛋白;炎症因子;神经生长因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0643-10

Expression and significance of HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13, and NGF proteins after MIA-induced KOA in SD rats

XIONG Ao^{1,2}, WEI Xiaoyu¹, XU Jianzhong², LUO Fei^{1*}

(1. First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing 400038, China.
2. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450042)

Corresponding author: LUO Fei. E-mail: luofly1009@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13, and NGF proteins in SD rats with knee osteoarthritis KOA induced by monosodium

[基金项目] 陆军军医大学优秀人才库重点扶持对象(XZ-2019-505-021)。

Funded by Key Supporters of the Excellent Talent Pool of the Army Medical University (XZ-2019-505-021)

[作者简介] 熊翱(1995—),男,在读博士研究生,研究方向:骨科相关疾病的临床与基础,创伤基础与临床。Email:2528359578@qq.com

[通信作者] 罗飞(1976—),男,教授,博士,博士研究生导师,骨科主任,研究方向:骨科疾病,尤其擅长脊柱外科。

Email: luofly1009@hotmail.com

iodoacetate(MIA). **Methods** SD rats (4 weeks old, 80 ~ 120 g) were randomly divided into sham operation (Sham) and model (KOA) groups. On day 0, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital, and 50 μ L of normal saline containing 2 mg of MIA was injected into the joint cavity of the KOA group through the infrapatellar ligament of the right knee. In the sham group, 50 μ L sterile saline was injected into the knee joint cavity. SD rats were euthanized by overdosed anesthesia on days 0, 3, 7, 10, and 14 after measuring the diameter of the right knee joint and the weight-bearing capacity. Cartilage and synovial tissue were collected. Synovial tissues were primary cultured, and the purity and activity of fibroblast-like synoviocytes (FLSs) were assessed, and FLSs were treated with dexamethasone. Western Blot was used to detect HIF-1 α , osteopontin (OPN), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), and nerve growth factor (NGF) proteins. **Results** Compared with the Sham group, HIF-1 α , OPN, IL-1 β , and TNF- α expression was increased at 3 days after injection of MIA into the knee cavity and showed an increasing trend. The transverse diameter of the knee cavity in the MIA group was significantly larger than that in the Sham group on days 7 and 14 after palpation. On day 3 after injection of MIA into the knee cavity of rats, the weight bearing capacity of the right hind limb continued to be < 26%, which was significantly lower compared with the Sham group. Primary FLSs were successfully isolated by 0.2% type I collagenase digestion. After treatment of FLSs from KOA rats with dexamethasone, secretion of proinflammatory factors and expression of MMP-13 and NGF proteins were decreased significantly. **Conclusions** HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13, and NGF play major roles in cartilage and synovial inflammation, cartilage degradation, matrix destruction, and joint pain. They are important targets for joint pain management, regulation of inflammatory responses, and inhibition of cartilage degradation and matrix destruction, and the development of novel OA analgesics.

【**Keywords**】 osteoarthritis; monosodium iodoacetate; pain; osteopontin; proinflammatory factor; nerve growth factor
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是临床常见的中老年性关节退行性疾病,主要累及膝、髋、脊柱等负重关节^[1-2]。在全世界 65 岁以上的总人口中,有 50% 的老年人具有疼痛、僵硬和关节功能丧失等 OA 症状^[3-5]。关节疼痛是 OA 患者的主诉症状,在治疗上,采用非甾体抗炎药 (NSAIDs) 和皮质类固醇进行常规镇痛和抗炎。NSAIDs 的不良反应较多,可引起胃食管反流、胃溃疡及出血或穿孔、心血管不良反应^[6-7]。糖皮质激素虽对 OA 具有镇痛和抗炎作用,且临床疗效确切,但运用不当,会加剧关节软骨破坏,加重病情^[6-7]。由于这些镇痛药物的副作用大,迫切需要寻找副作用小的镇痛药物。目前,对 OA 疼痛的分子病理机制了解甚少,阻碍了 OA 相关疼痛抑制剂的开发研究。

本研究采用碘乙酸单钠 (monosodium iodoacetate, MIA) 诱导 SD 大鼠膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA), 通过检测 MIA 注入膝关节腔后 0、3、7、10、14 d 的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 蛋白表达,同时,体外原代培养正常大鼠和 MIA 诱导 KOA 大鼠膝关节滑膜组织成纤维样滑

膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS), 采用地塞米松 (dexamethasone, DEX) 处理 FLS, 检测 IL-1 β 、TNF- α 、基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 和 NGF 蛋白表达变化。通过分析 MIA 使膝骨关节软骨、滑膜和体外 FLS 分泌和释放细胞因子和生长因子的变化情况,探讨其与 OA 关节疼痛的分子病理机制,为研究新型 OA 镇痛药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

50 只 4 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 80 ~ 120 g,购自陆军军医大学 (中国重庆) 大坪医院野战外科研究所实验动物中心【SCXK (军) 2017-0025】。实验前 1 周,于采光通风良好,温度 20 ~ 26 $^{\circ}$ C,相对湿度 42% ~ 62% 的室内适应环境,大鼠可以随意进食和饮水,按照 GB14925-2010 标准进行实验动物的环境控制。将动物饲养在陆军军医大学陆军特色医学中心的标准实验室【SYXK (军) 2017-0058】。本研究中使用的所有程序均严格按照美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南进行。所有动物程序均经陆军军医大学实验动物指南事务管理局批准 (AMUWEC20181430)。

1.1.2 主要试剂与仪器

MIA (Sigma 公司, 美国), 多克隆兔抗 HIF-1 α (Abcam 公司, 中国香港), 单克隆小鼠抗 OPN (Invitrogen Ltd, 美国), 鼠抗 IL-1 β 抗体 (Cell Signaling, 美国), 兔抗 TNF- α 抗体 (Cell Signaling, 美国), 单克隆兔抗 NGF (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 vimentin (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 PCNA (Abcam 公司, 中国香港), 单克隆小鼠抗 β -actin (Sigma 公司, 美国), 抗兔 IgG-HRP 抗体 (Sigma 公司, 美国), 抗鼠 IgG-HRP 抗体 (Sigma 公司, 美国), Western Blot 实验系统和试剂 (Bio-Rad 公司, 美国), Western Blot 底物发光试剂盒 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 KOA 模型制备和实验分组

将大鼠随机分为两组: 假手术 (Sham) 组 ($n = 25$)、模型 (KOA) 组 ($n = 25$)。模型组大鼠采用单次注入膝关节腔 MIA (2 mg/knee) 诱导 KOA 模型^[8-9]。主要步骤: 第 0 天, 大鼠用戊巴比妥钠麻醉, 模型组动物经右膝关节髌下韧带向关节腔内注射含 2 mg MIA 生理盐水 50 μ L, 假手术组大鼠给予 50 μ L 灭菌生理盐水。SD 大鼠分别于第 0 (注入 MIA 或生理盐水后 1 h 内)、3、7、10、14 天测量右膝关节直径和检测负重能力后, 麻醉安乐死, 切取软骨和分离滑膜组织存储于 -80°C 冰箱, 用于蛋白质表达检测。各组每个时间点 5 只 SD 大鼠。

1.2.2 检测负重能力

负重能力的变化, 是判定 OA 大鼠关节不适和疼痛的重要指标^[10]。在注射 MIA 后的第 0、3、7、10 和 14 天, 采用失能测试仪 (英国诺福克林顿仪器公司) 测量后爪重量分布, 评估 SD 大鼠右后肢的力量。分布在右后肢的重量百分比。使用下式计算: 负重率 (%) = (右后肢重量 / (左后肢重量 + 右后肢重量)) $\times 100\%$ 。

1.2.3 测量右后膝关节直径

关节直径的变化, 是衡量 OA 大鼠关节肿胀和关节不适的重要指标^[10-12], 大鼠膝关节腔被注入 MIA 后, 在第 0、3、7、10 和 14 天用游标卡尺测量右膝的横向直径。本研究获得的是膝盖弯曲 90° 时右膝之间的水平距离。每个膝关节测量 3 次并计算平均值^[8]。

1.2.4 滑膜组织的获取分离、滑膜细胞的原代培养及其纯度与增殖鉴定

研究表明, 滑膜细胞可以作为 OA 早期干预靶

点^[13], FLS 是滑膜组织的主要功能细胞^[9], 因此, 本研究按熊翱等^[9]和陈芳等^[14]已建立的实验方法加以完善进行滑膜细胞的原代培养, 通过分离注入 MIA 或生理盐水 14 d 后的 SD 大鼠滑膜组织进行原代 FLS 培养。主要步骤如下: SD 大鼠被麻醉后, 将其浸泡在 75% 乙醇中进行无菌处理 10 ~ 20 min, 在无菌条件下取 SD 大鼠膝关节。将盛有含双抗的 PBS 平皿置于超净工作台中, 分离滑膜组织。将分离的滑膜组织剪碎至 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 的块状, 移至 10 mL 无菌离心管, 短暂低速离心, 留取沉淀, 0.2% I 型胶原酶重悬滑膜组织, 转移至 25 cm^2 培养瓶, 用 0.2% I 型胶原酶定容至 2 ~ 3 mL, 轻轻晃动培养瓶, 使其底部滑膜组织均匀分布。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 消化滑膜组织 4 ~ 6 h。待滑膜组织变成棉絮状, 10% FBS 终止消化, 短暂低速离心, 弃上清, 加入完全培养基重悬洗涤 1 次后, 移至 25 cm^2 培养瓶中, 用完全培养基定容至 2 ~ 3 mL, 轻轻晃动培养瓶, 使滑膜组织在底部均匀分布。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养滑膜组织, 每天观察细胞游出情况。第 2 天可见梭形细胞游出, 2 ~ 3 d 换液 1 次。滑膜细胞的原代培养的纯度与增殖鉴定详见《脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析》^[9]。

1.2.5 体外滑膜 FLS 的地塞米松处理

滑膜炎症是整个关节 OA 综合病理变化的主要事件^[13], 故本研究对体外 FLS 进行抑炎效果观察并探讨其与镇痛的关系。采用纯度超过 98% 的原代 SD 大鼠 KOA 滑膜 FLS, 将细胞数调整至每毫升 4×10^4 。再按每孔 0.2 mL 接种至腹腔小室 (Millicell® EZISLIDE), 培养 12 ~ 24 h。共分 3 组: MIA- 和 DEX-、MIA+ 和 DEX-、MIA+ 和 DEX+, 每组 5 孔, 使 DEX 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。在培养箱培养 24 h 后, 采用胰酶 (0.25%) 消化 FLS 2 ~ 5 min。终止消化采用 10% 胎牛血清, 收集细胞, 贮于 -80°C , 待用于蛋白质表达检测。

1.2.6 蛋白质印迹分析

根据文献报道的蛋白质印迹分析方法进行^[9], 主要步骤: 使用考马斯亮蓝法测定总蛋白浓度。然后, 通过十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 对总蛋白样品进行电泳分离, 并转移到硝酸纤维素 (nitrocellulose, NC) 膜上。然后, 将 NC 膜与下列一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜: ①多克

隆兔抗 HIF-1 α (1:1000); ②单克隆小鼠抗 OPN (1:1000); ③多克隆兔抗 IL-1 β (1:1000); ④多克隆兔抗 TNF- α (1:1000); ⑤多克隆兔抗 MMP-13 抗体 (1:1000); ⑥单克隆兔抗 NGF 抗体 (1:1000); ⑦单克隆小鼠抗 β -actin (1:10000)。最后,用 TPBS 清洗 NC 膜,并与相对应的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 结合的二抗一起孵育。使用底物发光试剂对 NC 膜进行可视化,并使用图像分析程序分析印迹图像。通过测量每个样品中的 β -actin 表达用以验证目的蛋白质含量的变化规律。

1.3 统计学分析

所有实验的数据采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有指标数据先进行正态分布评估,符合正态分布的数据,使用 t 检验来分析假手术组和模型

组之间差异的显著性。单因素方差分析 (ANOVA) 方法用于一个变量和多个条件数据处理。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

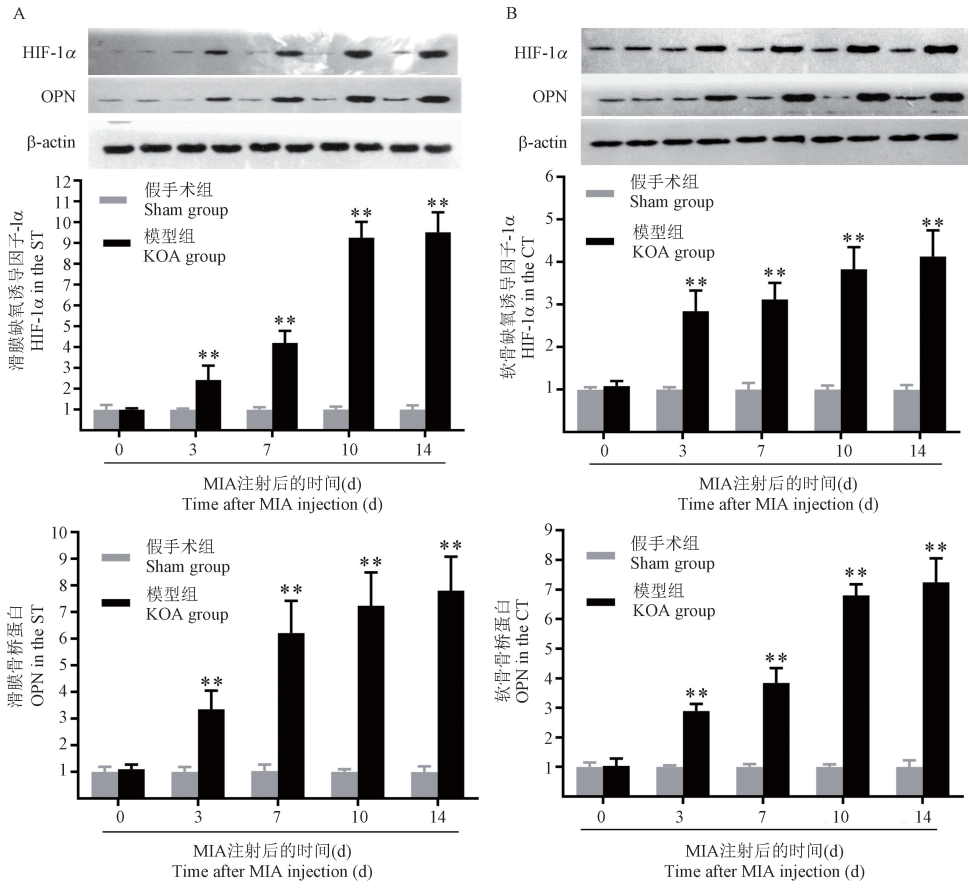
2 结果

2.1 MIA 注入大鼠膝关节, HIF-1 α 和 OPN 蛋白表达变化

与假手术组比,大鼠膝关节腔被注入 MIA 3 d 后软骨细胞和滑膜组织 HIF-1 α 和 OPN 蛋白含量呈不断增加的趋势 (图 1)。

2.2 MIA 注入大鼠膝关节, IL-1 β 和 TNF- α 蛋白质表达变化

与假手术组比较, MIA 注入关节腔第 3 天起, 软骨细胞和滑膜组织 IL-1 β 和 TNF- α 呈现高表达 (见图 2A, 2B)。

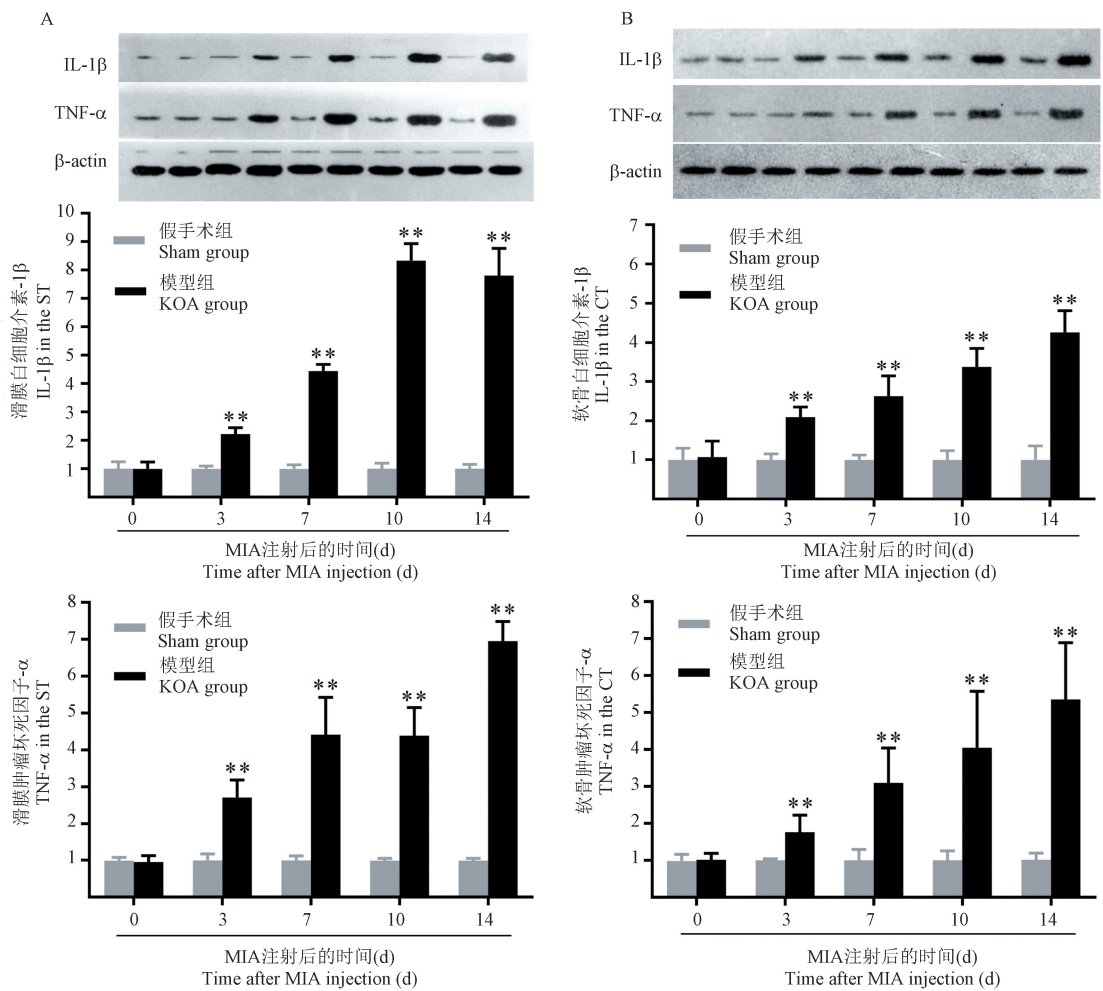


注:A;SD 大鼠膝关节滑膜组织中 HIF- α 和 OPN 蛋白表达的 Western Blot;B;SD 大鼠膝关节软骨组织中 HIF-1 α 和 OPN 的蛋白表达的 Western Blot;检测指标的积分光密度值经过内参指标校正后,假手术组归一;与假手术组相比, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 MIA 对大鼠膝关节中 HIF-1 α 和 OPN 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot assay of the protein expression of HIF-1 α and OPN in the synovial tissue of SD rat knee joints. B. Western Blot assay of the protein expression of HIF-1 α and OPN in SD rat knee cartilage tissue. The integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index, normalized by sham. Compared with sham group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of MIA on HIF-1 α and OPN in rat knee joints($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注:A;SD 大鼠关节滑膜组织中 IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达的 Western Blot;B;SD 大鼠膝关节软骨组织 IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达的 Western Blot;检测指标的积分光密度值经过内参指标校正后,假手术组归一。

图 2 MIA 对大鼠膝关节中 IL-1β 和 TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot analysis of the protein expression of IL-1β and TNF-α in the synovial tissue of SD rat knee joint. B. Western Blot analysis of the protein expression of IL-1β and TNF-α in SD rat knee cartilage tissue. The integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index, normalized by sham.

Figure 2 Effect of MIA on IL-1β and TNF-α in rat knee joint($\bar{x} \pm s, n = 5$)

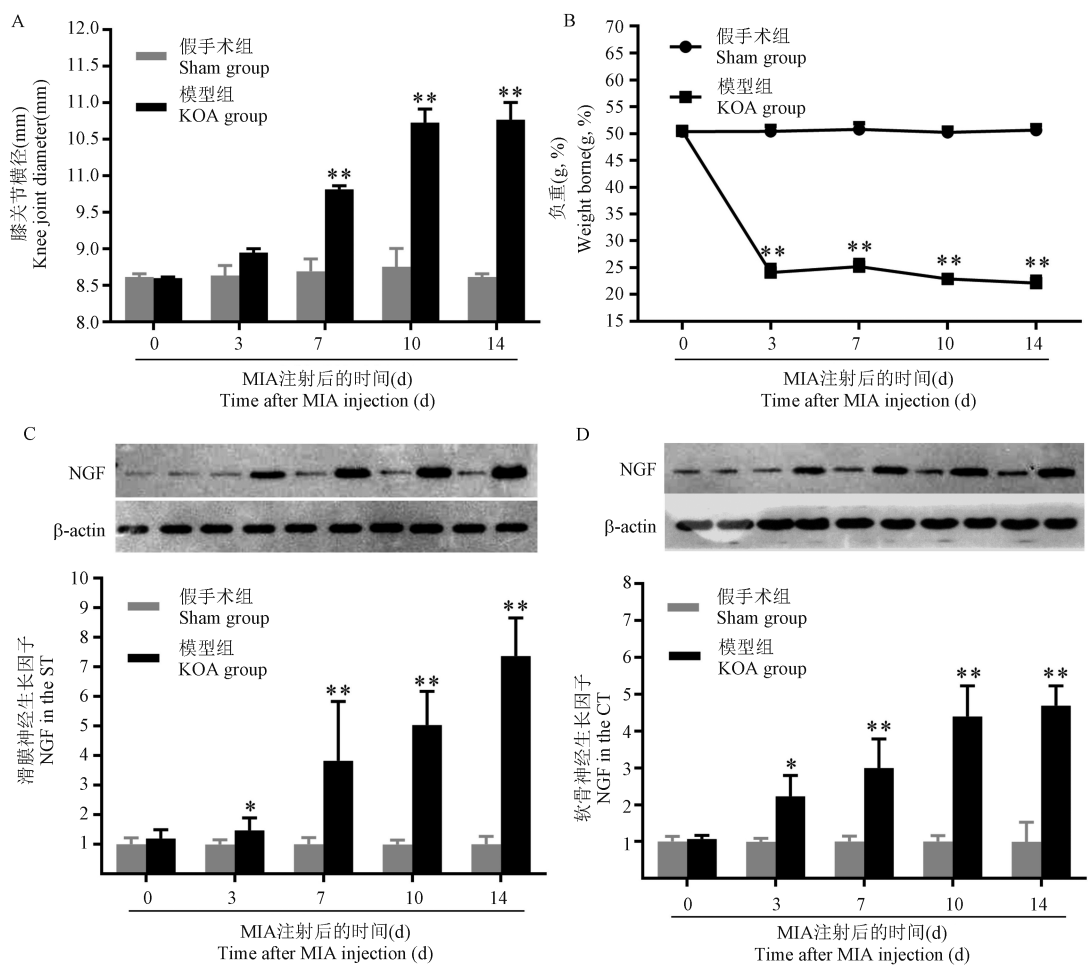
2.3 MIA 对大鼠右后膝关节横径和右后肢负重的影响及 NGF 在膝关节滑膜和软骨中的表达

与假手术组比较,大鼠右后膝关节,在 MIA 造模后的第 3 天开始肿胀,第 7 天后,肿胀明显。因此,导致膝关节横径,在 MIA 造模后的第 7 天、第 10 天和第 14 天显著高于假手术组(图 3A)。MIA 注入大鼠膝骨关节第 3 天起,大鼠右后肢的负重量持续在 26% 以下,显著低于假手术组(图 3B)。通过负重能力和膝关节横径的检测评估,表明 MIA 注入大鼠膝骨关节第 3 天起,大鼠膝关节不适和疼痛明显。检测了 NGF 的蛋白质水平,发现与假手术组比较, MIA 注入大鼠膝骨关节第 3 天起,滑膜(图 3C)和软

骨(图 3D)组织的 NGF 蛋白表达增加。滑膜和软骨 NGF 增加,与疼痛关系密切^[13]。

2.4 SD 大鼠滑膜细胞的原代培养及其 FLS 的纯度和增殖功能

分离的 SD 大鼠滑膜组织培养至第 6 天,原代细胞的融合度达 70% ~ 80%,细胞贴壁生长,但在观察视野中,仍有极少的圆形、椭圆形细胞(图 4A)。细胞传代至第 3 代(第 12 ~ 14 天),细胞形态基本上为梭形,核位于中央,细胞生长良好(图 4B)。细胞在第 8 代增长缓慢,而且细胞形态改变,梭形较少,多为近似椭圆形,细胞间隙增大,细胞有空泡坏死老化(图 4C)。免疫荧光化学观察到:第 3



注:A:用游标卡尺测量右膝关节的横向直径;B:MIA 注射后大鼠右后肢负重比的变化;C:Western Blot 分析 SD 大鼠膝关节滑膜组织中 NGF 的蛋白表达;D:Western Blot 分析 NGF 在 SD 大鼠膝关节软骨组织中的蛋白表达;检测指标的积分光密度值经过内参指标校正后,假手术组归一;与假手术组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 3 MIA 对大鼠膝关节横向直径、后肢负重能力和 NGF 的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. The transverse diameter of the right knee joint was measured with a vernier caliper. B. Changes in the weight-bearing ratio of left and right hindlimbs of rats after MIA injection. C. Western Blot assay to analyze the protein expression of NGF in the synovial tissue of SD rat knee joints. D. Western Blot assay to analyze the protein expression of NGF in SD rat knee cartilage tissue. The integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index, normalized by sham. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

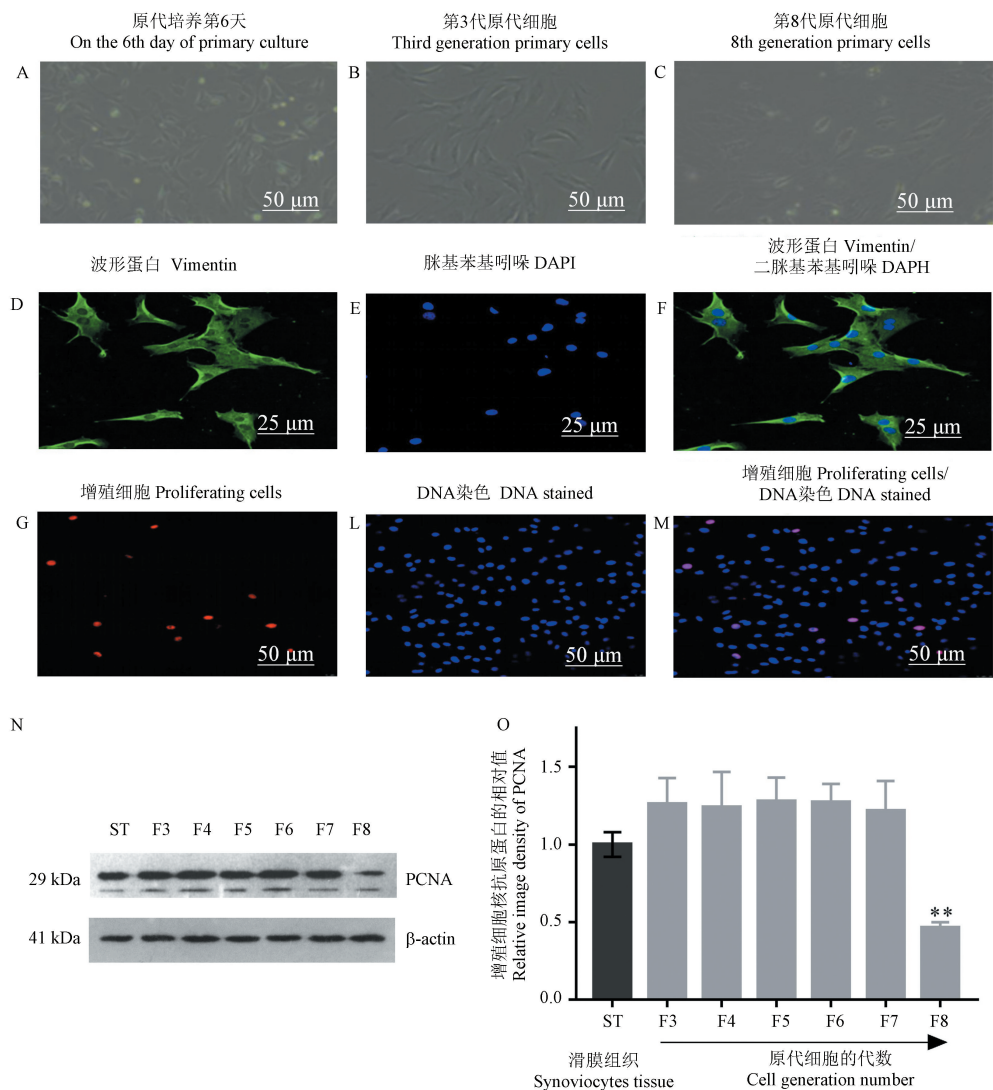
Figure 3 Effects of MIA on the transverse diameter of the knee joint, weight-bearing capacity of hind limbs and NGF in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

代滑膜细胞形态规则,呈梭形,其细胞核位于细胞中央,其形状为卵圆形;FLS 标志蛋白波形蛋白(Vimentin)的阳性染色率超过 98%(图 4D ~ 4F),提示培养的原代滑膜细胞为 FLS。EdU 增殖实验显示第 7 代 FLS 细胞仍有增殖能力(图 4G ~ 4M)。第 3 ~ 8 代 FLS 的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)蛋白的 Western Blot 表明,第 4 ~ 7 代 FLS 的 PCNA 蛋白表达与第 3 代差异不显著(图 4N,4O)。同时第 8 代 PCNA 蛋白表达降低

且与第 3 代 PCNA 蛋白的表达存在显著差异(图 4N,4O)。以上表明:第 3 代到第 7 代原代培养的 FLS 可以用作后续实验材料。

2.5 地塞米松抑制 OA 大鼠体外 FLS 的炎性反应

与假手术组比较,MIA 注入关节腔诱导 KOA 模型后,原代培养的 FLS 促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 、NGF 和 MMP-13 蛋白表达上调。使用地塞米松对 KOA 大鼠体外 FLS 干预后,降低促炎因子的分泌、NGF 和 MMP-13 蛋白的表达(图 5)。



注:A:滑膜细胞培养第6天第1次传代前;B:滑膜细胞培养至第3代;C:滑膜细胞培养至第8代;D~F:滑膜细胞培养至第3代进行波形蛋白荧光化学鉴定;G~M:第7代滑膜细胞EdU增殖实验;N:滑膜组织和原代培养成纤维样滑膜细胞(第3~8代)的增殖细胞核抗原蛋白Western Blot结果;O:滑膜组织和各代细胞中增殖细胞核抗原蛋白的相对含量;组间单因素方差分析, $F_{(6,28)}=45.936, P<0.001$,与第3代细胞相比,只有第8代细胞的增殖细胞核抗原蛋白表达明显下调。

图4 OA大鼠膝关节FLS的原代培养、纯度和增殖

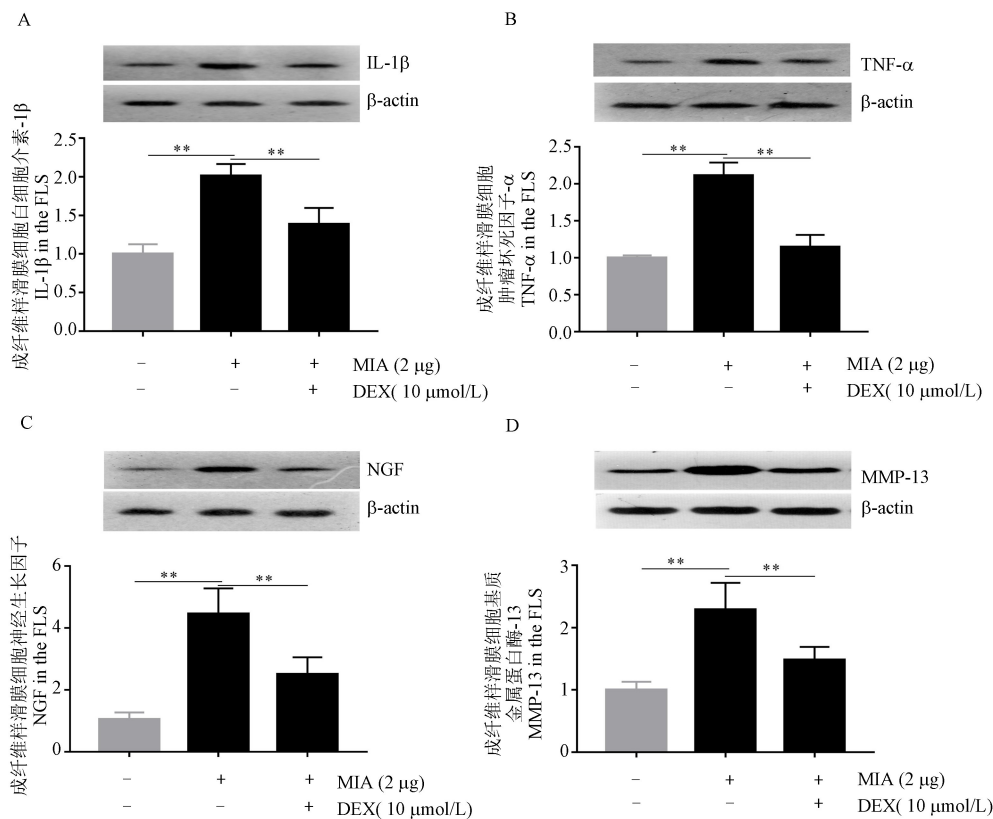
Note. A. Before the first passage on the 6th day of synovial cell cultur. B. Synovial cells cultured to the third generation. C. Synovial cells cultured to the 8th generation. D ~ F. Synovial cells were cultured to the third generation for vimentin fluorescence chemical identification. G ~ M. Seventh generation synovial cell EdU proliferation experiment. N. Western Blot results of PCNA protein of ST and primary cultured FLS (3rd ~ 8th generation). O. The relative content of PCNA protein in ST and cells of each generation. Single factor analysis of variance between groups, $F_{(6,28)}=45.936, P<0.001$. Compared with the third generation cells, only the eighth generation cells had significantly decreased PCNA protein expression.

Figure 4 Primary culture, purity and proliferation of knee joint FLS of OA rats

3 讨论

在本研究中,SD大鼠膝关节腔注入2 mg MIA后,破坏了软骨细胞的有氧糖酵解能量代谢,造成炎症和软骨损伤^[10,15],导致HIF-1α蛋白质表达上调,进而促进OPN升高。OPN是骨关节炎标志

物^[15-16],OPN蛋白的表达升高激活了滑膜组织和软骨细胞的促炎因子IL-1β和TNF-α^[17],使其分泌和释放增加。显著增加的IL-1β和TNF-α,致使NGF蛋白质表达上调。在这些细胞因子的共同作用下,诱导了SD大鼠的疼痛反应。表现为SD大鼠被注入MIA后,从第3天起,膝关节肿胀,负重率降低至



注:A:SD大鼠关节滑膜FLS中IL-1 β 蛋白表达;B:SD大鼠关节滑膜FLS中TNF- α 蛋白表达;C:SD大鼠关节滑膜FLS中NGF蛋白表达;D:SD大鼠关节滑膜FLS中MMP-13蛋白表达。

图5 Western Blot检测体外FLS细胞经过DEX干预后促炎因子、MMP-13和NGF蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Note. A. IL-1 β protein expression in joint synovial FLS of SD rats. B. TNF- α protein expression in the synovial FLS of SD rats. C. NGF protein expression in the synovial FLS of SD rats. D. MMP-13 protein expression in the synovial FLS of SD rats.

Figure 5 Western Blot was used to detect the expression of proinflammatory factors, MMP-13 and NGF protein in FLS cells after DEX intervention($\bar{x} \pm s, n = 5$)

26%以下。滑膜炎被^{认为是}OA早期最重要的特征^[13],为此,本研究不但检测了MIA诱导的KOA大鼠膝关节患处软骨和滑膜组织促炎因子的表达,也检测了MIA诱导的KOA大鼠膝关节患处滑膜组织体外原代培养的FLS中的促炎因子、MMP-13和NGF的蛋白表达。结果显示:IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13和NGF的蛋白表达异常增高,经DEX治疗后,显著下调。

通过行为测试(也称为失能实验),观察大鼠肢体的负重能力的变化被广泛认为是衡量MIA大鼠痛苦行为的有效方法,因为啮齿类动物感到疼痛时后肢承受的重量较少^[10]。对MIA诱导的OA大鼠进行14 d的失能实验,观察到MIA注射大鼠膝关节第3天后,负重能力下降,关节肿胀,关节横径增加,关节不适和疼痛。MIA诱导的实验性OA早期以巨噬细胞浸润和滑膜炎为特征;MIA诱导的OA,进一步发展则发生严重的软骨破坏和丢失直至软骨

下骨重建,使疼痛明显且持久。

OA是一种以软骨破坏和滑膜炎为特征的全关节退行性疾病^[13,18]。骨质破坏是以软骨降解为先兆,以OPN为标志^[12]。OPN既是一种细胞外多功能基质糖蛋白^[12],又是一种潜在的炎性细胞因子,在OA关节软骨、滑液及滑膜组织中的表达水平增高,并且与OA的严重程度呈正相关^[12,15]。OA关节软骨和滑膜糖酵解障碍,缺氧引起OPN蛋白质表达上调和炎症因子释放^[16]。OPN可以激活多种促炎因子(如IL-1 β 和TNF- α)和趋化因子的表达,OPN对滑膜炎的放大和维持具有重要意义^[19]。促炎性IL-1 β 和TNF- α 可以刺激NGF释放,而NGF又可以调节TNF- α 的释放^[13]。OA患者关节中OPN、IL-1 β 、TNF- α 和NGF通过分子级联,相互作用,使其蛋白表达上调,再通过一定的分子病理机制,导致关节患处促炎因子聚集,关节肿胀、不适,上调的NGF增加关节患处的痛觉神经敏感性,患处

关节疼痛,使关节失能(肢体负重能力下降)。

OPN 可促进 OA 软骨细胞增殖,但这在一定程度上是代偿性增殖。其增殖程度与 OA 软骨退变、软骨细胞衰老呈正相关^[16]。国内学者利用 OPN shRNA 干预 OA 的软骨细胞增殖,有一定治疗作用^[15]。促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 是引起关节炎症性疼痛的主要原因。IL-1 β 可刺激 COX-2、iNOS 等产生,进一步激活炎症途径,诱导炎症性疼痛^[10],降低肢体负重能力。利用合欢提取液^[10]、木香根提取物^[20]和穿心莲提取物^[21]对 MIA 诱导的 OA 有一定的镇痛抗炎作用,而且提高了大鼠负重能力,这可能与抑制炎症反应有关。据报道,NGF 通过增加伤害感受器敏感性和促进感觉神经生长,加强疼痛^[13],使关节失能。目前,已有多种人源化 NGF 单克隆抗体在进行临床试验,用于治疗骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 疼痛及神经病理性疼痛等慢性疼痛^[22]。但 NGF 单克隆抗体 (例如: fulranumab、tanezumab 等),因其存在致患者关节损伤的潜在风险而被暂停研究。

滑膜 NGF 增加是膝关节 OA 的一个特征^[15],本研究对 KOA 大鼠滑膜原代培养的体外 FLS 进行分子蛋白检测,其结果提示 NGF 表达显著升高,而且与其关联的 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-13 蛋白分子也升高明显^[22],说明 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 在 OA 的分子病理和疼痛发生中发挥着重要作用。这些 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-13 蛋白在滑膜产生,并通过滑液扩散到软骨中,这是导致软骨细胞凋亡的原因之一^[23-25]。IL-1 β 和 TNF- α 启动软骨降解,MMP-13 直接降解软骨基质。IL-1 β 和 TNF- α 直接刺激 FLS 释放 NGF,进而 NGF 诱导感觉神经生长和增加痛觉敏感性^[13],导致疼痛相关行为病理改变。经过 DEX 抑炎处理,使 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 的蛋白表达负增长,证明抑炎对降低 OA 关节感觉神经生长速度和神经敏感性是有效的。这也说明 FLS 是一个研究痛觉的靶点。

综上所述,OA 的细胞因子 (HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF),在滑膜炎症、软骨降解及基质破坏和关节疼痛等方面起着重要作用,将其作为靶点,采取干预剂或 shRNA 或相应抗体用于关节疼痛的管理、炎症反应调节和抑制软骨降解和基质破坏等,这也许是今后的研究方向。

参 考 文 献 (References)

[1] Chen D, Shen J, Zhao W, et al. Osteoarthritis: toward a

comprehensive understanding of pathological mechanism [J]. Bone Res, 2017, 5: 16044.

[2] Lu K, Ma F, Yi D, et al. Molecular signaling in temporomandibular joint osteoarthritis [J]. J Orthop Translat, 2022, 32: 21-27.

[3] 张晋宁, 杨天翔, 张博文, 等. 转化生长因子- β 信号转导通路与骨关节炎 [J]. 国际骨科学杂志, 2021, 42(2): 97-101. Zhang JN, Yang TX, Zhang BW, et al. Transforming growth factor- β signal transduction pathway and osteoarthritis [J]. Int J Orthop, 2021, 42(2): 97-101.

[4] Duan D, Derynck R. Transforming growth factor- β (TGF- β)-induced up-regulation of TGF- β receptors at the cell surface amplifies the TGF- β response [J]. J Biol Chem, 2019, 294(21): 8490-8504.

[5] 乔虎军, 王国祥, 郝鑫. 转化生长因子 β /Smad 信号通路和骨关节炎研究进展 [J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(2): 143-151.

Qiao HJ, Wang GX, Hao X. Research progress of transforming growth factor β /Smad signaling pathway and osteoarthritis [J]. Chin J Sports Med, 2019, 38(2): 143-151.

[6] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心 (湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南 (2021 年版) [J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(18): 1291-1314.

The Joint Surgery Branch of the Chinese Orthopaedic Association, The Subspecialty Group of Osteoarthritis, Chinese Association of Orthopaedic Surgeons, The National Clinical Research Center for Geriatric Disorders (Xiangya Hospital), et al. Chinese guideline for diagnosis and treatment of osteoarthritis (2021 edition) [J]. Chin J Orthop, 2021, 41(18): 1291-1314.

[7] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南 (2018 年版) [J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(12): 705-715. Joint Surgery Group of Orthopaedic Branch of Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of osteoarthritis (2018 edition) [J]. Chin J Orthop, 2018, 38(12): 705-715.

[8] Zhang L, Zhang L, Huang Z, et al. Increased HIF-1 α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis via fibroblast-like synoviocyte pyroptosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 6326517.

[9] 熊翱, 熊仁平, 彭艳, 等. 脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 436-446.

Xiong A, Xiong RP, Peng Y, et al. Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 436-446.

[10] Lee D, Ju MK, Kim H. *Commiphora* extract mixture ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1477.

[11] Chien, Huang SK, Lee CJ, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of zerumbone against mono-iodoacetate-

- induced arthritis [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2): 249.
- [12] Gao S, Li K, Zeng K, et al. Elevated osteopontin level of synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis patients [J]. Osteoarthr Cartil, 2009, 18(1): 82–87.
- [13] Liao L, Zhang S, Zhao L, et al. Acute synovitis after trauma precedes and is associated with osteoarthritis onset and progression [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(6): 970–980.
- [14] 陈芳, 刘琴, 王丽平, 等. 改良组织块法分离培养兔成纤维样滑膜细胞 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4): 75–78, 85.
- Chen F, Liu Q, Wang LP, et al. Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes using an improved explant culture method [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(4): 75–78, 85.
- [15] Huang J, Zhao L, Chen D. Growth factor signalling in osteoarthritis [J]. Growth Factors, 2018, 36(5–6): 187–195.
- [16] 姜未, 林博文, 张轩, 等. 骨桥蛋白可促进骨关节炎软骨细胞增殖 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(24): 3773–3777.
- Jiang W, Lin BW, Zhang X, et al. Osteopontin promotes chondrocyte proliferation in osteoarthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2017, 21(24): 3773–3777.
- [17] Gross TS, King KA, Rabaia NA, et al. Upregulation of osteopontin by osteocytes deprived of mechanical loading or oxygen [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(2): 250–256.
- [18] 杨威, 郭斯印, 易志勇, 等. 膝关节关节炎病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 139–143.
- Yang W, Guo SY, Yi ZY, et al. Research progress on animal models of a combination of diseases and syndromes of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 139–143.
- [19] Xu G, Nie H, Li N, et al. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(4): 1060–1067.
- [20] Lee D, Baek CY, Hwang JH, et al. *Andrographis paniculata* extract relieves pain and inflammation in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis and acetic acid-induced writhing in animal models [J]. Processes, 2020, 8(7): 873.
- [21] Jo HG, Lee GY, Baek CY, et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Aucklandia lappa* root extracts on acetic acid-induced writhing in mice and monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. Plants (Basel), 2020, 10(1): 42.
- [22] 张常建, 陈秀秀, 周丽君. 抗体治疗疼痛的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(2): 130–133.
- Zhang J, Chen YY, Zhou LJ. Research progress of antibody therapy for pain [J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(2): 130–133.
- [23] 赵军, 褚亚君, 梁晋裕, 等. 跑台运动对糖尿病大鼠学习记忆及海马炎症因子和 NGF 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 65–71.
- Zhao J, Chu YJ, Liang JY, et al. Effects of treadmill exercise on learning, memory, inflammation, and NGF expression in the hippocampus of diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 65–71.
- [24] Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(6): 1237–1247.
- [25] 孙尚, 邹达, 赵振达, 等. 基于大鼠 OVX 模型研究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 16–22.
- Sun S, Zou D, Zhao ZD, et al. Degeneration of chondrocytes in cartilage endplate due to estrogen deficiency based on rat OVX model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 16–22.

[收稿日期] 2022-09-19