

· 基础研究 ·

TLR4/NF-κB 通路参与大鼠膝骨关节炎滑膜早期病变的研究

王学宗^{1,2}, 丁道芳², 薛艳¹, 顾新丰¹, 庞坚², 张旻², 郑显新¹, 曹月龙^{1,2}, 詹红生^{1,2}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 201203; 2. 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海 201203)

【摘要】 目的:探讨 TLR4/NF-κB 通路在大鼠膝骨关节炎(OA)滑膜早期病变的表达情况。方法:将 8 周龄体重为 (200±20) g 的 18 只雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为模型组和对照组,每组 9 只。模型组按照改良 Hulth 法构建膝 OA 模型,对照组不做手术。分别于术后 4、21 d 提取滑膜组织和血清,采用 PCR 法检测 CD14、TLR-4、IL-1β、TNF-α、MMP-13、ADAMTS-4 表达;采用 Western-blot 法检测 NF-κB p65 蛋白表达;采用 Elisa 法检测血清中透明质酸(HA)及Ⅲ型前胶原氨基端(PⅢNP)浓度。结果:术后 4、21 d 时模型组 CD14、ADAMTS-4 及 NF-κB p65 表达均较对照组升高,术后 21 d 时模型组 TLR-4、IL-1β、TNF-α 及 MMP-13 表达较对照组升高(P<0.01)。模型组术后 4 d 时血清 PⅢNP 和 HA 浓度高于对照组,术后 21 d 时两组比较差异无统计学意义。结论:NF-κB 通路可通过 CD14/TLR-4 早期激活进而触发滑膜分泌炎症因子 IL-1β、TNF-α、MMP-13、ADAMTS-4、PⅢNP 和 HA 增加介导膝 OA 发生。

【关键词】 骨关节炎,膝; 滑膜; 大鼠

中图分类号:R686.7

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2019.01.015

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Role of TLR4/NF-κB pathway for early change of synovial membrane in knee osteoarthritis rats WANG Xue-zong, DING Dao-fang, XUE Yan, GU Xin-feng, PANG Jian, ZHANG Min, ZHENG Yu-xin*, CAO Yue-long, and ZHAN Hong-sheng. *Shi's Center of Orthopaedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

ABSTRACT Objective: To study role of TLR4/NF-κB pathway for early change of synovial membrane in knee osteoarthritis rats. **Methods:** Eighteen male SD rats weighted (200±20) g were randomly divided into 2 groups, namely control and model group, and 9 in each group. Knee OA model group was established by using modified Hulth method in model group. Control group was not treated. Synovial tissue and serum was extracted at 4 and 21 d after operation. Expression of CD14, TLR4, IL-1β, TNF-α, ADAMTS-4, MMP-13 were detected by real-time PCR respectively. NF-κB p65 protein was detected by Western-blot; serum concentrations of haluronic acid (HA), N-propeptide of type III procollagen (PⅢNP) was detected by Elisa. **Results:** Expression of CD14, ADAMTS-4, and NF-κB p65 in model group were higher than that of control group at 4 and 21 days after operation, while expression of TLR4, IL-1β, TNF-α and MMP-13 were higher than that of control group at 21 days after operation (P<0.01). Concentration of PⅢNP and HA in model group were higher than that of control group at 4 days after operation, while there was no significant difference at 21 days after operation. **Conclusion:** NF-κB pathway could mediate occurrence of KOA by early activating and triggering synovial increasingly secreting inflammatory secretion CD14, TLR4, IL-1β, TNF-α, ADAMTS-4, MMP-13, PⅢNP and HA.

KEYWORDS Osteoarthritis, knee; Synovial membrane; Rats

骨关节炎(osteoarthritis, OA)发病特点以关节软骨改变为主,进而导致关节软骨脱落、软骨下骨破

坏、滑膜炎及骨赘形成的整个关节病变^[1]。膝 OA 患者滑膜中都有局部的或散在的炎症反应,以紧邻关节软骨的滑膜最为显著。OA 滑膜可作为膝关节置换的危险因素(经 15 年随访),甚至为独立的危险因素^[2]。有人甚至提出滑膜炎先于关节软骨的破坏,作为 OA 进展的前驱^[3]。有研究^[4]认为 toll-4 受体(toll-like receptor, TLR4)作为先天免疫模式识别,通过 NF-κB 信号通路介导炎症细胞因子表达,在调控 OA 滑膜炎发病中起着重要作用。通过 CD14

基金项目:国家自然科学基金(编号:81503598;81503592;81674003;81774340);上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(编号:ZY3-LCPT-2-1005)

Fund program:Supported by National Natural Science Foundation (No. 81503598;81503592;81674003;81774340).

通讯作者:郑显新 E-mail:sg_zyx1728@126.com

Corresponding author:ZHENG Yu-xin E-mail:sg_zyx1728@126.com

TLR2/4 途径可以增加早期 OA 患者成纤维样滑膜组织对 TLR 的敏感性^[5],但还没有详细研究关节滑膜在膝 OA 早期的病变。本研究旨在探讨 TLR4/NF-κB 信号通路在膝 OA 滑膜早期病变中发病机制,为预防和治疗 OA 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

实验仪器:电子天平(Labpro,上海良平电子天平仪器厂);分光光度(SYNERGY4,日本日立);Bio-rad 酶标仪(美国 BioTek);普通 PCR 仪(Biometra 公司);Stepone plus 定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);Nanodrop 仪(Thermo Scientific 公司);离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);蛋白电泳仪,蛋白转膜仪及化学发光扫描仪(Bio-Rad 公司)。

主要试剂:30%聚丙烯(国药集团);甘氨酸,Tris,SDS,BSA(Amresco 公司);化学发光试剂及 PVDF 膜(美国 Millipore 公司);Trizol 试剂(Invitrogen 公司,Cat. No 15596-026);逆转录试剂盒及定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);透明质酸(Haluronic acid,HA;上海润裕生物科技有限公司);Ⅲ型前胶原氨基端肽(N-terminal procollagen Ⅲ propeptide,PⅢNP)试剂盒(美国 Cloud-Clone Corp)。

1.2 实验动物与方法

1.2.1 实验动物 选取 SPF 级 8 周龄雄性 SD 大鼠 18 只,体重(200±20)g,购自上海中医药大学实验动物中心,适应性饲养 1 周,观察无异常者入组。

1.2.2 造模与分组 采用随机数字表法分为模型组和对照组,每组 9 只,分笼饲养。模型组采用改良 Hulth 等^[6]法造模,将动物麻醉后仰卧于手术台上,无菌条件下取右膝关节内侧纵切口长约 2 cm,显露膝关节,然后切断前交叉韧带及内侧副韧带。对照组:标记后不做处理。

1.3 干预措施

术后肌肉注射青霉素每只 2.0×10⁵ U 预防感染。大鼠用 4%水合氯醛麻醉后分别于术后 4、21 d 处死,采取腹动脉血装入抗凝管(抗凝管中有枸橼酸钠),滑膜标本及时投入液氮冷冻后,-80℃冰箱保存。

1.4 检测项目与方法

1.4.1 Real-time PCR 法检测滑膜免疫和炎症因子 mRNA 表达 样本解冻,组织匀浆器研磨于 PBS 中快速洗涤 2 遍后转入组织匀浆器研磨。用 Trizol 提取滑膜组织总 RNA,检测其纯度及完整性后将 RNA 逆转录合成 cDNA。采 Primers Express software(Bio Tools Incorporated,Edmonton,AB,Canada)设计 CD14、TLR4、IL-1β、TNF-α、ADAMTS-4、MMP-13 引物序列(表 1),以 GAPDH 引物作为内参照,反应时具体

温度条件根据每个引物不同而设定。

1.4.2 Western-blot 法检测 NF-κB p65 蛋白 将少

表 1 荧光定量逆转录多聚酶链反应引物序列
Tab.1 Primer sequences for RT-PCR

Gene name	mRNA sequences(5' - 3')
CD14-F	CCCAAGCACACTCACTCAAC
CD14-R	CGCTAAAACCTGGAGGGTCC
TNF-α-F	CGTCGTAGCAAACCACCAAG
TNF-α-R	GAGGCTGACTTTCTCTGGT
TLR4-F	AGGACTGGGTGAGAAACGAG
TLR4-R	ACACCAACGGCTCTGGATAA
ADAMTS4-F	TCATGAACTGGCCATGTCT
ADAMTS4-R	GTCAGTGATGAATCGGGCAC
IL-1β-F	GGGATGATGACGACCTGCTA
IL-1β-R	TGTCGTTGCTTGTCTCTCT
MMP13-F	CCTAAGCACCCAAAACACC
MMP13-R	GGGAAGTTCTGGCCAAAAGG
GAPDH-F	TTCAACGGCACAGTCAAGG
GAPDH-R	CTCAGCACCAGCATCACC

量组织加液氮研磨至粉末状,再加裂解液 500 μl,抽提蛋白并测浓度,-80℃保存。制胶后取蛋白标本,加上样缓冲液,100℃变性 5 min。采用 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶恒压 60~80 V,分离胶恒压 80~100 V。剥胶,采用 Bio-Rad Mini 湿式转移电泳槽恒流 200 mA,转膜结束,以 5%脱脂牛奶封闭,37℃中封闭 2 h 后,分别加入上述指标稀释浓度按不同比例和一抗,4℃孵育过夜。转膜缓冲液(TBST)后加二抗。ECL 显影洗片,凝胶图像处理系统分析各组表达灰度值。

1.4.3 Elisa 法检测血清 PⅢNP 及 HA 取出血样,解冻复温后分装用于 PⅢNP (ng/ml)及 HA (ng/ml)检测,按样品处理,标准品(样品)稀释与加样,孵育,洗涤;加酶标抗体,孵育,洗涤;加底物显色,孵育;加终止液,测定步骤进行,力求各个步骤操作的标准化的。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析,定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)或四分位间距(中位数)表示。相应时间点两组比较采用两独立样本均数的 t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 滑膜 CD14、TLR4 mRNA 的表达

术后 4、21 d 时,模型组 CD14 表达较对照组升高(P<0.01),术后 21 d 时模型组 TLR4 表达显著增加。见表 2。

2.2 滑膜 NF-κB p65 蛋白的表达

术后 4、21 d 时对照组 NF-κB p65 蛋白表达分

表 2 滑膜免疫因素术后 4 d 和 21 d 的基因表达 ($\bar{x}\pm s$)
Tab.2 mRNA expression of synovial immune factors at 4 and 21 days after operation ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数 (只)	CD14		TLR4	
		术后 4 d	术后 21 d	术后 4 d	术后 21 d
模型组	9	1.156±0.020	3.525±0.160	0.892±0.110	3.016±0.220
对照组	9	1.000±0.020	1.001±0.060	1.001±0.060	1.002±0.080
<i>t</i> 值	-	-8.840	-26.073	1.446	-15.120
<i>P</i> 值	-	0.001	0.000	0.222	0.000

别为 0.356±0.030 和 0.139±0.010, 模型组分别为 0.639±0.070 和 0.425±0.000, 模型组较对照组升高 ($P<0.01$), 表 3。

表 3 术后 4 d 和 21 d 滑膜 NF-κB p65 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$)
Tab.4 Expression of synovial NF-κB p65 protein at 4 and 21 days after operation ($\bar{x}\pm s$)

项目	鼠数(只)	术后 4 d	术后 21 d
对照组	9	0.356±0.030	0.139±0.010
模型组	9	0.639±0.070	0.425±0.000
<i>t</i> 值	-	6.858	-47.872
<i>P</i> 值	-	0.002	0.000

2.3 滑膜炎症因子的表达

术后 4、21 d 时模型组 ADAMTS-4 表达较对照组升高 ($P<0.01$)。术后 21 d 时模型组 IL-1β、TNF-α 及 MMP13 表达较对照组显著增加 ($P<0.01$), 见表 4。

表 4 滑膜炎性因子在 4 d 和 21 d 的基因表达 ($\bar{x}\pm s$)
Tab.4 mRNA expression of synovial inflammatory factors at 4 and 21 days ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	IL-1β		TNF-α		ADAMTS-4		MMP-13	
		术后 4 d	术后 21 d	术后 4 d	术后 21 d	术后 4 d	术后 21 d	术后 4 d	术后 21 d
模型组	9	0.964±0.030	2.065±0.110	0.868±0.110	2.930±0.080	1.147±0.420	2.349±0.090	0.909±0.510	5.560±0.490
对照组	9	1.001±0.050	1.002±0.080	1.001±0.040	1.001±0.050	1.001±0.050	1.001±0.050	1.001±0.510	1.000±0.030
<i>t</i> 值	-	0.998	-13.347	1.915	-34.691	-11.376	-22.699	2.207	-15.951
<i>P</i> 值	-	0.375	0.000	0.128	0.000	0.000	0.000	0.092	0.000

表 5 术后 4 d 和 21 d 血清 PⅢNP 和 HA 浓度比较 ($\bar{x}\pm s$, ng/ml)
Tab.5 Comparison of concentration of serum PⅢNP and HA at 4 and 21 days after operation ($\bar{x}\pm s$, ng/ml)

组别	鼠数(只)	PⅢNP		HA	
		术后 4 d	术后 21 d	术后 4 d	术后 21 d
模型组	9	146.463±0.440	93.105±1.670	0.048±0.000	0.049±0.000
对照组	9	112.746±3.390	60.504±11.380	0.047±0.000	0.048±0.000
<i>t</i> 值	-	-13.940	-4.008	-10.118	-4.055
<i>P</i> 值	-	0.020	0.057	0.057	0.152

2.4 外周血 PⅢNP 及 HA 的浓度

术后 4、21 d 时对照组血清 PⅢNP 浓度分别为 (112.746±3.390) ng/ml 和 (60.504±11.380) ng/ml, 模型组分别为 (146.463±0.440) ng/ml 和 (93.105±1.670) ng/ml。术后 4 d 模型组 PⅢNP 浓度高于对照组 ($P<0.05$), 术后 21 d 时两组比较差异无统计学意义。对照组术后 4、21 d 血清 HA 浓度分别为 (0.047±0.000) ng/ml 和 (0.048±0.000) ng/ml, 模型组分别为 (0.048±0.000) ng/ml 和 (0.049±0.000) ng/ml; 模型组 HA 浓度高于对照组, 但两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果见表 5。

3 讨论

3.1 损伤诱导膝 OA 免疫因素 CD14 和 TLR4 变化

CD14(mCD14 和 sCD14)的化学结构为糖蛋白, 其生物学功能主要是识别、结合脂多糖 (LPS) 或 LPS/脂多糖结合蛋白 (LBP) 三体复合物并活化 TLR 信号传导, TLR4 可以识别多种类型的病原体相关分子模式 (PAMPs) 或损伤相关分子模式 (DAMPs), 其传导可以通过激活白介素受体相关激酶-1 (IRAK-1) 和肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (TRAF-6) 诱导 NF-κB 激活而引起因子的瀑布反应^[7]。研究显示膝 OA 模型中滑膜 CD14 mRNA 在术后 4 d 及 21 d 时含量显著增加, TLR4 mRNA 在 21 d 时含量增加。表明组织损伤时, CD14 存在的条件下, 进一步明确 TLR4 可以激活 DAMPs^[3,8], 非 TLR4 基因在 OA 滑膜组织表达逐渐抑制^[4,9]。同时, 也说明只有损伤到一定阶段, 才能启动 TLR4 通路。因此, 随着 CD14 和 TLR4 的相继活化, OA 病程的进展, 机体(滑膜)的免

疫系统处于自我防御的激活状态。

3.2 膝 OA 相关的滑膜炎因子及 NF- κ B 变化特点

本文研究结果发现模型组 NF- κ B p65 的蛋白显著高于对照组, 术后 4 d 及 21 d 含量均有不同程度的增加, 表明 NF- κ B 通路早期可以被激活。这些指标进一步展示了先天免疫在膝 OA 早期的特点, 阐释 Robinson 等^[8]认为先天免疫激活 NF- κ B 通路后触发 OA 的机制, 更通过 TLR4 途径说明 OA 作为低炎症性疾病。NF- κ B p65 蛋白早期大量表达, 但与 TLR4 及炎症因子等非同步表达, 其机制有待进一步的研究。滑膜炎症可作为膝 OA 的危险因素, 常伴有 IL-1 β mRNA、TNF- α 等炎症因子^[4]。本研究的炎症因子多与既往研究相似, 但 MMP-13 在造模后 3 周滑膜时才高表达, 与既往软骨中早期高表达有别, 这可能与其在滑膜含量较少有关。因此, 损伤激活 NF- κ B 通路, 引发了下游炎症因子如 IL-1 β 、TNF- α 等表达增加。

3.3 膝 OA 相关的滑膜增生特点

PⅢNP 和 HA 可反应膝关节滑膜增生^[5,10]。增生是滑膜细胞重要的炎症反应。本研究发现模型组 PⅢNP 的浓度早期明显升高, 笔者推测创伤后滑膜病变加速。造模后, 随着时间的延长, PⅢNP 的浓度逐渐减少, 可能滑膜成纤维化减弱。HA 浓度的变化与 PⅢNP 相似, 表明损伤诱导膝 OA 滑膜早期增生明显。因此, 膝 OA 早期滑膜相关的炎症特点为炎症因子表达和滑膜增生呈一定相关性, 滑膜增生早于炎症分泌。

3.4 对急性膝 OA 相关滑膜炎症临床治疗的意义

临床上老年人产生滑膜炎多继发于膝 OA, 主要因为软骨退变与骨质增生产生的机械性、生物性刺激滑膜产生炎症, 分泌和吸收液体失调, 形成积液的一种关节病变。防治 OA, 既往的研究一直围绕着软骨和软骨下骨的形态和功能变化开展, 很少重视滑膜因素, 常忽视炎症因子导致关节结构损伤产生临床症状。本研究为损伤诱导先天免疫启动, 触发滑膜改变为源头, 滑膜产生的 IL-1 β 及 TNF- α 等炎症介质很可能就是导致滑膜炎慢性化、持续化的重要因素, 进而诱导膝 OA 发生, 为早期抑制滑膜 TLR4/NF- κ B 通路治疗 OA 提供新视角, 并可作为膝 OA 严重程度的客观评价, 也为滑膜炎颗粒等活血利水中药治疗膝关节滑膜炎的良好效果提供证据^[11-12]。同时, 需关注膝 OA 病理过程涉及众多因素、滑膜或为局部因素^[13]或伴随现象^[3], 其在疾病不同

阶段独立作用的详细机制及在此作用基础上的关联性还有待进一步深入研究。

综上所述, NF- κ B 通路可通过 CD14/TLR4 早期激活免疫因素进而触发滑膜分泌炎症因子 (IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13、ADAMTS-4), 滑膜增生 (PⅢNP 和 HA) 增加并介导膝 OA 发生, 即在膝损伤早期, 滑膜炎症急性阶段或者滑膜炎早期, 炎症因子表达和滑膜增生增多, 滑膜炎症可诱导膝 OA。

参考文献

- [1] 王庆甫, 马玉峰, 殷岳杉. 重新认识膝骨性关节炎的诊断和防治 [J]. 中国骨伤, 2016, 29(9): 779-781.
WANG QF, MA YF, YIN YB. A new understanding of the diagnosis and treatment of knee osteoarthritis [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2016, 29(9): 779-781. Chinese with abstract in English.
- [2] Nielsen FK, Egund N, Jorgensen A, et al. Risk factors for joint replacement in knee osteoarthritis; a 15-year follow-up study [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2017, 18(1): 510.
- [3] Zeng C, Li YS, Lei GH. Synovitis in knee osteoarthritis; a precursor or a concomitant feature [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(10): e58.
- [4] Wang H, Wang Q, Yang M, et al. Histomorphology and innate immunity during the progression of osteoarthritis; Does synovitis affect cartilage degradation [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2): 1342-1358.
- [5] Nair A, Kanda V, Bush-Joseph C, et al. Synovial fluid from patients with early osteoarthritis modulates fibroblast-like synoviocyte responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 ligands via soluble CD14 [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(7): 2268-2277.
- [6] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report [J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(5): 522-530.
- [7] Ghosh S, Dass JF. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: a brief review [J]. Gene, 2016, 584(1): 97-109.
- [8] Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(10): 580-592.
- [9] 陈树清, 孙保国, 周厚明, 等. 活血利水中药联合复方南星止痛膏治疗慢性膝关节滑膜炎的病例对照研究 [J]. 中国骨伤, 2012, 25(4): 283-286.
CHEN SQ, SUN BG, ZHOU HM, et al. Combined use of Compound Nanxing Pain Paste with blood-promoting and diuretic Chinese herbal medicines in treatment of chronic knee synovitis [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(4): 283-286. Chinese with abstract in English.
- [10] de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, Yusuf E, et al. Association of pain in knee osteoarthritis with distinct patterns of synovitis [J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(3): 733-740.

(收稿日期: 2018-10-30 本文编辑: 李宜)