

· 基础研究 ·

MyD88 依赖途径在膝骨关节炎进程中的基因表达相关性研究

王欢¹, 王庆甫², 史榕苻¹, 张美丽¹, 杨帆¹, 刘思婷³, 樊小燕³, 郭玉茹³, 丁海涛¹, 唐学章¹

(1. 中日友好医院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029; 3. 北京中医药大学, 北京 100039)

【摘要】 目的:探讨 MyD88 依赖途径的相关基因 TLR4、NF- κ B 与 MyD88 在膝骨关节炎(osteoarthritis, OA)不同病程下大鼠滑膜组织的表达特点及相关性。方法:将 60 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组:空白组(N)、假手术组(F)和模型组[2 周组(2W)、4 周组(4W)、8 周组(8W)、12 周组(12W)],每组各 10 只。各模型组以 Hulth 法建立大鼠膝 OA 动物模型,空白组不予手术,假手术组仅打开关节腔。按上述设计时间收集样本,经总 RNA 的提取及反转录后,用 Real-time PCR 法对各组滑膜组织中 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的相对表达量进行检测,分析其相关性。结果:假手术组各基因的 mRNA 表达与空白组相比差异均无统计学意义($P>0.05$);而各模型组较空白组各基因表达增强($P<0.05$)。相关性分析显示:MyD88 与 TLR4 及 NF- κ B 的 mRNA 相关性系数分别为 0.91 和 0.86,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:MyD88 与 TLR4、NF- κ B 的表达均呈显著的正相关性,在通路上起重要的枢纽作用,可通过其表达预测通路上其他基因的表达情况,进一步明确膝 OA 病理机制。

【关键词】 膝骨关节炎; MyD88 依赖途径; 固有免疫; 滑膜炎

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2018.10.011

Correlation of genes expression on MyD 88 - dependent signaling pathway in progression of knee osteoarthritis

WANG Huan, WANG Qing-fu, SHI Rong-xing, ZHANG Mei-li, YANG Fan, LIU Si-ting, FAN Xiao-yan, GUO Yu-ru, DING Hai-tao, and TANG Xue-zhang*. *China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

ABSTRACT Objective: To investigate expression features and correlation of genes expression on MyD88-dependent signaling pathway in synovial membrane (SM) of progression of knee osteoarthritis (OA). **Methods:** Sixty Wistar rats were randomly divided into 6 groups, including blank group (N), false surgical group, model groups [2 weeks (2W), 4 weeks (4W), 8 weeks (8W) and 12 weeks (12W)], with 10 rats in each group. The models were established by using Hulth method. Control group was experienced no surgery, while false surgical group was only opened joint cavity and sutured. The SM samples was collected according to the time designed above. The relative expression quantity of MyD88, TLR4 and NF- κ B was detected by Real-time PCR after the extraction of the total RNA and reverse transcription. The correlation analysis was obtained by SPSS. **Results:** There was no significant difference in each gene mRNA expression between false surgical and blank group ($P>0.05$), while enhanced expression was found in the model groups ($P<0.05$). The correlation index among MyD88, TLR4 and NF- κ B was 0.91 and 0.86 respectively, and had significant difference among them. **Conclusion:** Positively relative among MyD88, TLR4 and NF- κ B played main role in TLR4/NF- κ B signal passway, and could predicate the expression of other genes in the passway. It also could further provide the basis for clarify the pathologic mechanism of knee OA.

KEYWORDS Knee osteoarthritis; MyD88-dependent pathway; Innate immunity; Synovitis

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(10):933-936 www.zggszz.com

膝骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种慢性膝关节退行性疾病,软骨细胞外基质的降解一直被认为是导致关节破坏的中心事件^[1]。而近年来,随着对滑

膜炎症作用和固有免疫反应在 OA 进程中作用机制的认识的深入,由 TLR4 介导的通过髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)途径激活核转录因子 NF- κ B 从而引发的滑膜炎炎症性应答反应的相关研究成为了进一步剖析膝 OA 病理机制的关键^[2]。对 MyD88 依赖途径在膝 OA 病理进展过程中的研究在调节滑膜炎症和关节结构完整性破坏中均有着重要的意义。本研究通过检测 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 在差异病程的滑膜组织中的 mRNA 变化

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81373662);北京中医药大学自主选题项目(编号:2015-JYB-XS202)

Fund program: Provided by National Natural Science Foundation (No. 81373662)

通讯作者:唐学章 E-mail: tangxuezhang@126.com

Corresponding author: TANG Xue-zhang E-mail: tangxuezhang@126.com

规律,分析它们在膝 OA 进程中的相关性。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康雄性 8 周龄 Wistar 大鼠 60 只[SCXK(京)2016-0001],体重(200±20)g,由北京中医药大学附属第一临床医学院实验动物中心通过维通利华实验动物技术有限公司购买,微生物学检测合格,SPF 级清洁饲养。

1.2 实验试剂

mRNA 提取试剂盒 (Qiagen, 德国),ReverTra Ace qPCR RT Kit(TOYOBO, 日本),SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa, 日本),TLR4、MyD88 和 NF-κB 引物(百诺威生物科技有限公司,中国)。

1.3 实验仪器与设备

PCR 仪 (PTC-225 Peltier Thermal cycle,MJ Research Inc.), 荧光定量 PCR 仪 (CFX-96,BIO-RAD),漩涡混匀器(Vortex5, 齐林贝尔),冷冻高速离心机 (5804R,Eppendorf), 高速离心机 (keyWrice-DTM C3i multifunction,Thermo), 紫外分光光度计 (Biophotometerplus,Eppendorf), 超低温冰箱 (Forma700 series,Thermo)。

1.4 分组与样本收集方法

将 60 只大鼠编号后输入 SPSS 统计软件随机抽取排列分为 6 组:空白组(N),假手术组(F),模型组[2 周组(2W)、4 周组(4W)、8 周组(8W)和 12 周组(12W)],每组 10 只。

1.5 造模方法

模型组以经典 Hulth 法建立大鼠膝 OA 动物模型^[3],10%水合氯醛腹腔注射麻醉,髌旁内侧入路,屈曲膝关节以眼科剪切断前后交叉韧带及内侧韧带,髌骨复位后冲洗创口并逐层缝合关节腔。空白组不予手术,假手术组仅打开关节腔,生理盐水冲洗后缝合。术后 3 d 每日大鼠臀大肌肌注 10 万 U/kg 青霉素以预防感染。手术全程于冰上操作,样本用液氮运输,置于-80℃超低温冰箱中贮存备用。

1.6 检测项目与方法

1.6.1 总 RNA 提取及反转录 按 mRNA 提取试剂盒说明书逐步提取总 RNA,加入适量体积的 DEPC-Water 至完全溶解,紫外分光光度计进行分析检测及浓度测定,合格后进行反转录(reverse transcription,RT)反应。按反转录试剂盒说明书操作后,将配置好的各组反应液置于 PCR 仪中 RT 获得 cDNA,低温贮存以用于后续实验。

1.6.2 Real-Time PCR 反应 取出试剂、引物、模板,在室温下解冻,涡旋震荡离心管确保均质化,短暂离心收集溶液于管底。在配制反应混合液前,准备

合适浓度的样品。根据下表配制相应数量的反应混合液 SYBGreen mix10.0、Primer F(10 μM)0.4、Primer R(10μM) 0.4、ddH2O8.2 (单位为 μl),混合除样本外的所有样品。涡旋震荡混匀,平均分装到每个反应孔中,最后加入模板。引物设计序列如表 1 所示。在 PCR 体系中依次加入 1 体积 RT 产物,每个样本设 3 个复孔。用荧光定量专用八排管封口膜覆盖 96 孔 PCR 板,瞬时离心混匀后,收集反应液于管底。将八排管放入荧光定量 PCR 仪内,设定反应条件后启动程序进行荧光定量 PCR 反应(表 1)。荧光定量反应结束后,取出 96 孔板或八排管,收集包括扩增曲线、融解曲线与相应 Ct 值等荧光定量数据进行分析。具体观察项目为:(1)不同 OA 进程中的 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达。(2)MyD88 与 TLR4、NF-κB mRNA 表达的相关性。

表 1 Real-time PCR 目的基因引物序列
Tab.1 Purpose gene sequence primers in Real-time PCR

| 基因名称 | | 引物序列 | 长度 |
|-------|------|-------------------------|-------|
| TLR4 | 正义引物 | TGAGCTACAACCCACTGAAGA | 21 bp |
| | 反义引物 | TGCCTTGTGTTC AATTGACTCA | 20 bp |
| MyD88 | 正义引物 | CTCGAAGTTTGTGGCTGCC | 20 bp |
| | 反义引物 | TCGATCCGGTCCATCAGTTC | 20 bp |
| NF-κB | 正义引物 | TCTTGGACTACGCGCTTACG | 20 bp |
| | 反义引物 | CACAGTCCCGCTTCTCTCC | 20 bp |
| GAPDH | 正义引物 | GTGCTCAGTATGTCTGGAGTC | 20 bp |
| | 反义引物 | TTGATGACAATCTTGTATGGA | 20 bp |

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,组间数据的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),连续正态数据线性相关系数的比较采用 Pearson 相关性分析,相关性系数用 *r* 表示。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达检测

假手术组各基因的 mRNA 表达与空白组相比差异均无统计学意义(*P*>0.05),排除了手术操作因素对实验结果的影响,符合造模要求。而模型组各基因表达与空白组比较,差异有统计学意义(*P*<0.05);而且 3 个目的基因的 mRNA 表达趋势基本相似,在 4 周时达峰值(表 2)。

2.2 MyD88 与 TLR4、NF-κB mRNA 表达的相关性分析

通过对上述实验数据的系统分析,MyD88 与 TLR4 的 mRNA 相对表达量的相关系数为 0.91,显

表 2 各组 TLR4、MyD88、NF-κB 的 mRNA 相对表达量
Tab.2 Relative mRNA expression of TLR4, MyD88, NF-κB

| 组别 | 鼠数 | TLR4 | MyD88 | NF-κB |
|-------|----|----------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白组 | 10 | 0.10±1.02 | 0.54±0.21 | 0.51±0.04 |
| 假手术组 | 10 | 0.26±0.49* | 0.47±0.07 [△] | 0.53±0.07 [▲] |
| 2 周组 | 10 | 3.36±0.12** | 1.15±0.12 ^{△△} | 1.11±0.07 ^{▲▲} |
| 4 周组 | 10 | 5.67±0.04*** | 2.56±0.06 ^{△△△} | 1.68±0.06 ^{▲▲▲} |
| 8 周组 | 10 | 3.17±0.00**** | 1.28±0.16 ^{△△△△} | 1.40±0.09 ^{▲▲▲▲} |
| 12 周组 | 10 | 0.67±1.02***** | 1.06±0.09 ^{△△△△△} | 1.40±0.08 ^{▲▲▲▲▲} |
| F 值 | - | 38.56 | 100.04 | 147.54 |
| P 值 | - | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

注:TLR4 表达量与空白组比较, * $t=-0.33, P=0.75$; ** $t=-6.44, P=0.00$; *** $t=-10.98, P=0.00$; **** $t=-6.05, P=0.00$; ***** $t=-1.13, P=0.28$ 。MyD88 各组与空白组比较, [△] $t=0.64, P=0.53$; ^{△△} $t=-5.76, P=0.00$; ^{△△△} $t=-18.95, P=0.00$; ^{△△△△} $t=-6.97, P=0.00$; ^{△△△△△} $t=-4.92, P=0.00$ 。NF-κB 各组与空白组比较, [▲] $t=-0.32, P=0.76$; ^{▲▲} $t=-10.5, P=0.00$; ^{▲▲▲} $t=-20.56, P=0.00$; ^{▲▲▲▲} $t=-15.68, P=0.00$; ^{▲▲▲▲▲} $t=-15.68, P=0.00$

Note: Compared with blank group in TLR4, * $t=-0.33, P=0.75$; ** $t=-6.44, P=0.00$; *** $t=-10.98, P=0.00$; **** $t=-6.05, P=0.00$; ***** $t=-1.13, P=0.28$. Compared with blank group in MyD88, [△] $t=0.64, P=0.53$; ^{△△} $t=-5.76, P=0.00$; ^{△△△} $t=-18.95, P=0.00$; ^{△△△△} $t=-6.97, P=0.00$; ^{△△△△△} $t=-4.92, P=0.00$. Compare with blank group in NF-κB, [▲] $t=-0.32, P=0.76$; ^{▲▲} $t=-10.5, P=0.00$; ^{▲▲▲} $t=-20.56, P=0.00$; ^{▲▲▲▲} $t=-15.68, P=0.00$; ^{▲▲▲▲▲} $t=-15.68, P=0.00$

著性概率为 0.00; MyD88 与 NF-κB 的 mRNA 相对表达量的相关系数为 0.86, 显著性概率为 0.00, 表明了 MyD88 与 TLR4、NF-κB 之间显著性关系的存在, 并且呈较强的正相关性, 其相关性散点图更直观地说明了这一点(图 1-2)。

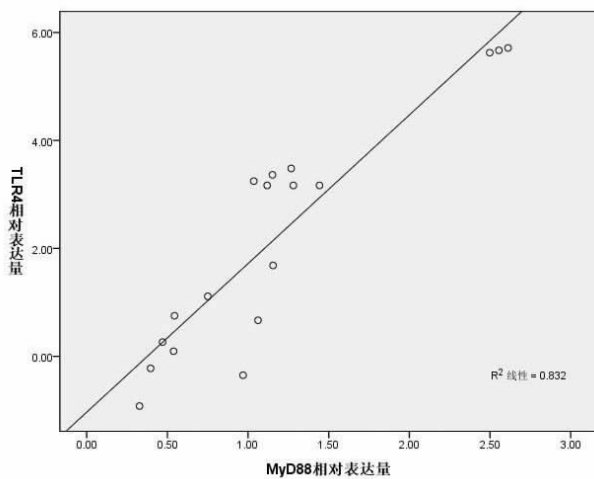


图 1 MyD88 与 TLR4 的相关性散点图
Fig.1 Correlation scatter plot of MyD88 and TLR4

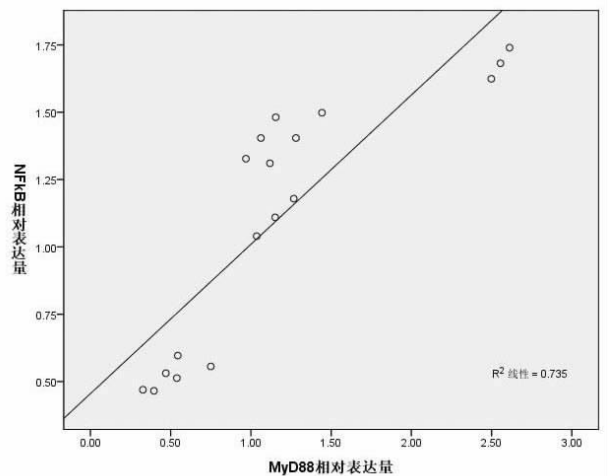


图 2 MyD88 与 NF-κB 的相关性散点图
Fig.2 Correlation scatter plot of MyD88 and NF-κB

3 讨论

3.1 MyD88 依赖途径在膝 OA 滑膜中的意义

膝 OA 是当今社会危害公众健康的一大疾病, 以滑膜和软骨等关节结构的破坏为主要病理特征。国内外研究显示, 过度增殖的滑膜细胞启动一系列免疫反应和炎症反应, 是导致软骨降解、关节退变和加速膝 OA 病情进展的重要环节, 其病理进程涉及多种组织细胞、信号转导通路和细胞因子的参与。

MyD88 是一种分子质量为 34kDa 的胞质可溶性蛋白, 是 TLR4/NF-κB 信号通路中的关键接头分子^[4-5]。目前, 尚未有 MyD88 依赖途径上重要元件 (TLR4、NF-κB) 在膝 OA 不同病理进程滑膜中表达关系的相关报道, 本研究在一定程度上弥补了这项空白。

本研究发现 MyD88 依赖途径的相关基因均广泛参与着膝 OA 病程中的各个阶段^[6-7]。实验结果显示: (1) 各基因在 OA 病程进展中的表达变化反映了机体对刺激的保护和代偿过程: 从 2 周至 4 周迅速上调的表达量展示了一个随病程进展, 信号通路迅速被激活, mRNA 迅速合成, 为形成靶蛋白做准备的 mRNA 积蓄的过程。4 周后, 膝 OA 逐渐由急性期进入了较稳定的代偿期, 机体本身也启动了相应的保

护模式,mRNA 合成逐渐减慢;至 12 周时,重度膝 OA 的滑膜细胞发生凋亡、变性和坏死,炎症反应消退,使目的基因的表达也相应的减少。(2) 根据 MyD88 与 TLR4、NF-κB 在 OA 病程进展中表达趋势的相似,初步反映了它们之间的相关性,之后的相关性分析明确了这一结论。

3.2 MyD88 与 TLR4、NF-κB 在膝 OA 进程中的相关性研究

实验结果显示,在膝 OA 的进展过程中,MyD88 与 TLR4 和 NF-κB 的相对表达量均呈较强的正相关关系,这与它们在相关通路上的转接过程有关。当机体受到刺激后,PAMPs 和 DAMPs 被 TLR4 感知和识别,刺激肌动蛋白重排,之前稳定的非活性的存在于细胞骨架中的 MyD88 随之释放,被 TLR4 胞内信号区募集入胞质,作为启动下游信号转导的靶分子^[8]。MyD88 诱导下游信号转导过程中处于中枢地位的转录因子 NF-κB 活化而转位进核,与相应靶基因中的启动子或增强子的 κB 位点结合,诱导靶基因的转录,启动免疫反应,导致如肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、一氧化氮(NO)等炎性介质的释放,产生各种特异性的生物学效应^[9],诱发或加重膝 OA 的进程^[10]。MyD88 与 TLR4 和 NF-κB 构成了一个联系紧密的相互作用网^[11],MyD88 及其依赖途径相关基因功能任意一方的缺陷均可导致信号传导的中断。某些研究试图通过抑制 MyD88 依赖途径的上游 TLR4、中游 MyD88 和下游 NF-κB 的表达,进而借助整个级联反应来减轻膝 OA 的关节破坏症状^[12]。

3.3 本研究意义及展望

因此,对 MyD88 依赖途径相关基因的调控是干预膝 OA 滑膜炎的重要靶点,以后的治疗可通过干扰该通路上的某个环节,利用其相关性进行诊断和治疗。本研究通过 RT-PCR 技术对膝 OA 病程各阶段滑膜组织的 TLR4、MyD88 和 NF-κB 的 mRNA 相对表达量进行系统检测和相关性分析,探讨 MyD88 依赖途径在膝 OA 滑膜炎中的调控机制,为进一步阐明膝 OA 发病机制的内在效应网络关系、探寻各阶段药物作用靶点提供数据支持,也为膝 OA 的预防和治疗开拓新的思路^[13]。

参考文献

- [1] Kim HA,Cho ML,Choi HY,et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*,2006,54(7):2152-2163.
- [2] Ko W,Sohn JH,Jang JH,et al. Inhibitory effects of alternaramide on inflammatory mediator expression through TLR4-MyD88-mediated inhibition of NF-κB and MAPK pathway signaling in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 and BV2 cells[J]. *Chem Biol Interact*,2016,244:16.
- [3] Rogart JN,Barrach HJ,Chichester CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhaq model of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,1999,7(6):539-547.
- [4] Ngo VN,Young RM,Schmitz R,et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma[J]. *Nature*,2011,470(7332):115-119.
- [5] Hosoi T,Yokoyama S,Matsuo S,et al. Myeloid differentiation factor 88(MyD88)-deficiency increases risk of diabetes in mice[J]. *PLoS One*,2010,5(9):e12537.
- [6] Michaud JP,Richard KL,Rivest S. MyD88-adaptor protein acts as a preventive mechanism for memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*,2011,6(1):5.
- [7] Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors[J]. *Yonsei Med J*,2011,52(3):379-392.
- [8] Wenzel J,Held C,Palmisano R,et al. Measurement of TLR-induced macrophage spreading by automated image analysis: Differential role of Myd88 and MAPK in early and late responses[J]. *Front Physiol*,2011,2:71.
- [9] Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors[J]. *Yonsei Med J*,2011,52(3):379-392.
- [10] Willcocks S,Offord V,Seyfert HM,et al. Species-specific PAMP recognition by TLR2 and evidence for species-restricted interaction with Dectin-1[J]. *J Leukoc Biol*,2013,94(3):449-458.
- [11] 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.
- [12] Saklatvala J. Inflammatory signaling in cartilage: MAPK and NF-κB pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis[J]. *Curr Drug Targets*,2007,8(2):305-313.
- [13] 王庆甫,马玉峰,殷岳杉. 重新认识膝骨性关节炎的诊断和治疗[J]. *中国骨伤*,2016,29(9):779-781.
WANG QF,MA YF,YIN YS. Recognition 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.

(收稿日期:2018-03-25 本文编辑:李宜)