

·论 著·

抑制 11 β -HSD1 对滑膜成纤维细胞炎症因子表达的影响

魏波,祝兆波,向旻,康银辉,林颢,曾荣

广东医学院附属医院骨科中心,广东 湛江 524001

摘要:目的 观察体外在 IL-1 β 诱导的炎症环境中,滑膜细胞中 I 型 11 β -羟基类固醇脱氢酶(11 β -HSD1)活性在受到干预时,细胞中炎症因子及 11 β -HSD1 表达受糖皮质激素的作用。方法 采用 SD 大鼠原代滑膜细胞为研究对象,以 IL-1 β 作为滑膜细胞炎症诱导因素。实验分为空白组;IL-1 β 组;IL-1 β +皮质酮组;IL-1 β +皮质酮+PF915275 组;观察各组 TNF- α 、IL-1 β 、11 β -HSD1 表达变化,并分析培养基中活性皮质醇的含量,分析各指标间是否存在的调节关系。结果 应用 IL-1 β 诱导后滑膜细胞 TNF- α 、IL-1 β 表达显著升高,活性皮质醇转化小与对照无差异,11 β -HSD1 表达明显高于对照;同时存在皮质酮时,TNF- α 、IL-1 β 表达受到明显抑制,炎症因子所诱发的 11 β -HSD1 的表达升高也受到抑制,明显低于对照组;PF915275 能够逆转皮质酮对炎症因子的表达抑制效应,表现为抑制后的 TNF- α 、IL-1 β 水平再度升高。11 β -HSD1 表达再度回升到单纯 IL-1 β 诱导时的水平。结论 前炎症因子可刺激滑膜细胞 11 β -HSD1 表达上调,与糖皮质激素共存时可有效增强 11 β -HSD1 转换活性,抑制炎症因子表达,同时下调炎症诱发的 11 β -HSD1 表达升高,这可能是滑膜细胞内存在维持自稳的反馈性调节机制。

关键词:滑膜成纤维细胞;炎症因子;I 型 11 β -羟基类固醇脱氢酶

中图分类号:R-33 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2015)10-1157-04 DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2015.10.01

Effect of inhibition of 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase on the expression of inflammatory cytokines in synovial cells

WEI Bo, ZHU Zhao-bo, XIANG Min, KANG Yin-hui, LIN Hao, ZENG Rong

Orthopaedic Centre of Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, P.R.China

Abstract: Objective To study the effects of glucocorticoid on the expression of inflammatory factors and 11 β -HSD1 in the synovial cells when the bioactivity of 11 β -HSD1 of the cells was impacted by IL-1 β . **Methods** Primary synovial cells from SD rat was obtained to induce synovial inflammation by using IL-1 β . The cells were divided into four groups: control group, IL-1 β group, IL-1 β +corticosterone group, and IL-1 β +corticosterone+PF915275 group. Expressions of TNF- α , IL-1 β , and 11 β -HSD1 in different mediums as well as the content of active cortisol were measured and the relationship among them were explored. **Results** The expression of the TNF- α , IL- β in synoviocytes increased significantly in IL-1 β group while the content of active cortisol in the medium showed no difference, compared with the control group. Expression of 11 β -HSD1 was significantly higher in IL- β group than that in the control group; Expressions of TNF- α , IL- β in IL-1 β +corticosterone group were inhibited. The increased expression of 11 β -HSD1 induced by inflammatory cytokines was also inhibited, significantly lower than that in the control group; The inhibited expressions of TNF- α , IL- β in IL-1 β +corticosterone+PF915275 group increased again for PF915275 reversed the inhibitory effect of corticosterone on expressions of inflammatory factors, the expression of 11 β -HSD1 also increased to the level of IL-1 β group. **Conclusion** Proinflammatory cytokines can increase the expression of 11 β -HSD1 in synovial cells, when co-existed with glucocorticoid it can enhance the 11 β -HSD1 bioactivity, suppress the expression of inflammatory cytokines and down regulate the expression of 11 β -HSD1 induced by proinflammatory factors. All above may be related to self feedback regulation mechanism to maintain the stability of the synoviocyte.

Key words: synovial fibroblasts; inflammatory factor; 11 β -HSD1

滑膜的炎性介入是加速软骨退变和诱发临床症状的重要因素之一,许多研究认为滑膜内衬细胞是原发性骨性关节炎的始发部位,在没有临床症状骨性关节炎患者,局部也常存在滑膜炎^[1-2]。滑膜成纤维细胞表达 11 β -HSD1,通过改变细胞内皮质激素的激活与失活平衡,发挥生物学作用^[3]。研究表明人骨关节炎滑膜成纤维细胞 11 β -HSD1 活性及 mRNA 水平表达

升高^[4];在胎膜组织、人脂肪组织中促炎性因子(IL-1 β 等)上调 11 β -HSD1 mRNA 的表达和酶的过程中,糖皮质激素与促炎症因子共同表现为协调诱导作用^[5]。

滑膜成纤维细胞在致炎因子与糖皮质激素共同作用下 11 β -HSD1 与炎症因子的表达关系有待于确定,本文应用 SD 大鼠关节滑膜细胞作为研究对象,观察在 IL-1 β 与皮质酮共同作用下滑膜细胞中炎症因

基金项目:广东省科技计划项目(No.2011B031800172);湛江市科技基金(No.20504zkkj20120006)

作者简介:魏波(1970—),男,博士,主任医师,研究方向:骨科退行性疾病。

子与11β-HSD1表达及活性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂及试剂盒 DMEM高糖培养基,胎牛血清,胰蛋白酶(GIBCO公司),去基因组及逆转录试剂盒,SYBR Premix Ex Tap II 试剂盒(TAKARA公司),PE标记CD90流式细胞术抗体,同型阴性PE标记IgG流式细胞术抗体(BIOLEGEND公司),山羊抗大鼠Vimentin IgG抗体,(武汉博士德公司),PF 915275试剂(TOCRIS公司),皮质酮试剂(SIGMA-ALDRICH公司),IL-1β试剂,ELISA试剂盒(R&D公司)。

1.2 SD大鼠滑膜成纤维细胞的分离培养与鉴定 取清洁级成年SD大鼠(广东医学院实验动物中心,SCXK(粤)2008-0008),断颈法处死,取膝关节滑膜组织,PBS洗涤后剪成2~3 mm²的组织块,入含15%胎牛血清和1%双抗的DMEM培养液中浸泡后移入培养瓶中,每瓶15~20块。将培养瓶倒置,加入约2 mL的培养液,5% CO₂ 37℃培养2~3h,组织块初步贴壁后反转培养瓶,隔两天换液,待组织块爬出细胞相互接触后即可传代。CD90流式细胞术及vimentin免疫细胞化学染色作细胞鉴定,取第三代细胞鉴定后用于实验。

1.3 实验分组 实验分为四组:空白组(A组); IL-1β组(B组); IL-1β+皮质酮组(C组); IL-1β+皮质酮+PF915275组(D组)。PF915275是特异性的11β-HSD1抑制剂。本实验过程同一操作者完成,实验各项指标均作三次以上重复。

1.4 细胞干预 各组细胞转代培养后按实验分组,含10%活性炭处理的无激素血清DMEM培养液,移入6孔培养板中,培养24h;空白组(A)继续用无激素血清培养液培养,实验各组10 ng/mL的IL-1β干预24h,B组继续用IL-1β无激素血清培养液换液,C组用IL-1β+10⁻⁶ mmol/L皮质酮,D组用IL-1β+10⁻⁶ mmol/L皮质酮+100nmol/L PF915275;作用后收集细胞用于实时荧光定量RT-PCR检测IL-1β,TNFα,11β-HSD1表达。

1.5 细胞培养液中皮质醇的含量检测 实验步骤按照试剂操作说明书进行。室温下将各组的培养液解冻后混匀,每组样品点入酶标板相邻的3个孔中,每孔50 μL。将不同浓度的标准品点入相邻的3个孔,3个孔做空白孔,不加入样品。除空白孔外,其他各孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体100 μL,用封板膜封板,37℃恒温摇床中孵育1h后弃去液体,洗涤。加入底物37℃避光孵育。加入终止液后立刻用酶标仪在450nm的波长下读出各孔的A值。CurveExpert1.3软件根据已知的样品浓度和A值,绘制出标准曲线和转换公式、计算出待测样品浓度。

1.6 数据的分析与处理 实验数据采用SPSS 21.0软

件进行分析与处理,所有数据采用均数±标准差表示,方差齐:组间比较用单因素的方差分析,组间差异采用两两比较SNK检验;方差不齐:经Brown-Forsythe修正后进行多组间比较,组间比较采用Dunnett's T3检验,P<0.05判定差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD大鼠滑膜成纤维细胞的鉴定 本实验所获取原代细胞应用vimentin染色及CD90流式细胞术鉴定,均证实细胞表型与滑膜成纤维细胞的表型一致,为均一的滑膜成纤维细胞。见图1~2。

2.2 各组培养液中皮质醇含量测定 B组与A组比较培养基中的皮质醇含量无差异(P>0.05);C组加入底物皮质酮后皮质醇的含量较对照组A显著增加(t=7.82,P<0.05),D组以PF915275抑制11β-HSD1活性,皮质醇的生成量明显较C组明显减少(t=6.484,P<0.05),与对照组比较差异无统计学意义(P>0.05)。提示炎症因子作用后的滑膜成纤维细胞,具备皮质酮的脱氢激活作用,该作用可被11β-HSD1抑制剂有效阻断。见表1。

2.3 11β-HSD1表达分析 IL-1β诱导滑膜成纤维细胞上调11β-HSD1mRNA表达(B组),与对照组(A组)相比具有统计学差异(t=10.15,P<0.05)。共同应用皮质酮后(C组)11β-HSD1mRNA的表达下降,较B组呈现明显的统计学差异(t=5.52,P<0.05),提示正常情况下,受炎症因子作用,皮质酮能够通过正常转换发挥生物学作用,使11β-HSD1表达下降。应用11β-HSD1抑制剂PF915275作用后,表现为11β-HSD1表达较以C组出现明显升高,表达被逆转,回到与B组相当或升高的水平(t=5.91,P<0.05),提示11β-HSD1的表达可能与细胞内转化后活性皮质醇的效应有关。IL-1β与皮质酮共同作用对11β-HSD1表达呈抑制效应。见表1。

表1 各组11β-HSD1 mRNA相对表达量及培养液中皮质醇含量测定(±s)

Table 1 The relative expression of 11β-HSD1 mRNA and cortisol levels in different groups(±s)		
组别Group	11β-HSD1 mRNA	皮质醇含量Cortisol levels(ng/mL)
A	1.00±0.03	0.19±0.02
B	1.83±0.12	0.57±0.02
C	1.04±0.18	0.19±0.01
D	1.67±0.04	0.60±0.01

2.4 11β-HSD1活性抑制对IL-1β诱导滑膜细胞炎症因子表达的作用 实验中各组细胞以10 ng/mL的IL-1β干预24h后细胞中的IL-1β、TNF-α mRNA表

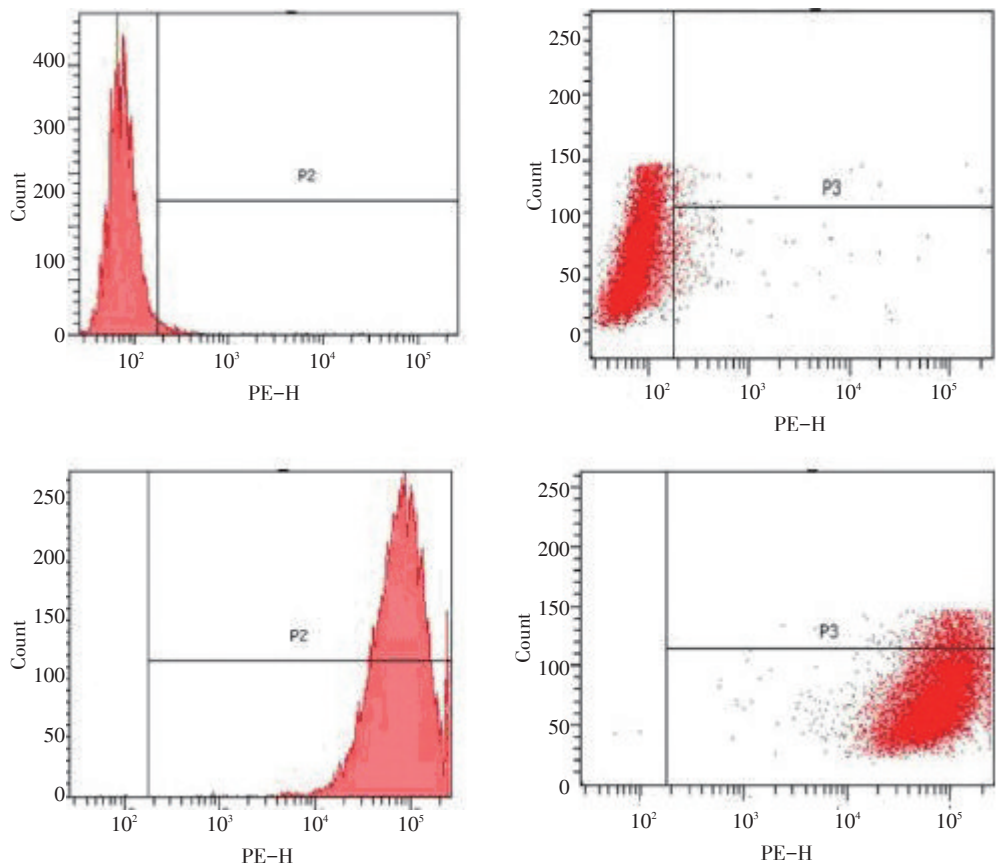
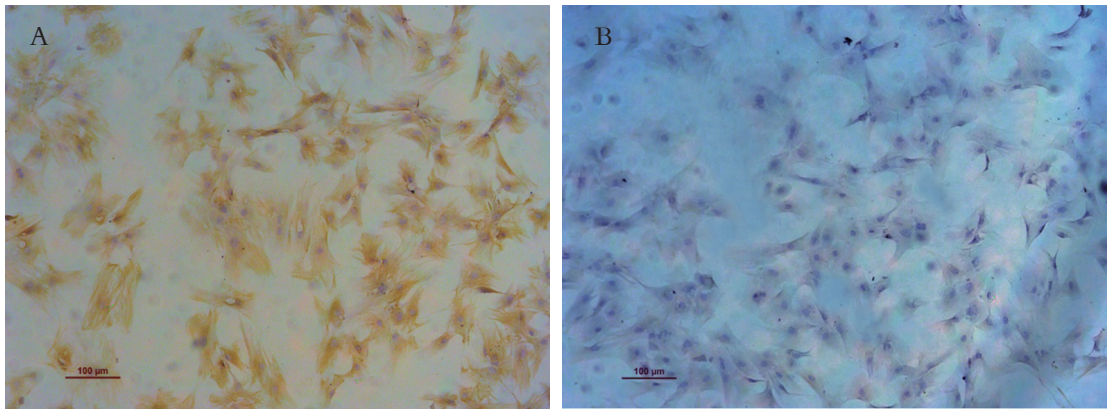


图1 CD90流式细胞学鉴定结果
Fig.1 CD90 flow cytometry cell identification



注:A 阳性 B 阴性对照 Note: A Positive; B: negative control

图2 Vimentin染色(×100)
Fig.2 Cell identification by Vimentin staining (×100)

达结果分析见表2。在受到IL-1 β 作用后,B组细胞的炎症因子表达 mRNA 水平较对照组显著升高($t=39.71, 5.71, P<0.05$);IL-1 β 与皮质酮共同作用于实验细胞(C组),各组的炎症因子表达量 mRNA 显著下降($t=31.78, 4.75, P<0.05$),如同时应用 PF915275 作用(D组),则炎症因子表达量较C组明显回升($t=9.09, 5.95, P<0.05$)。表明 11 β -HSD1 对皮质酮的激活转化作用,是滑膜成纤维细胞抗炎的关键之一。

表2 各组 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的相对表达量($\bar{x}\pm s$)
Table 2 The relative expression of IL-1 β , TNF- α mRNA in different groups($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	IL-1 β mRNA	TNF α mRNA
A	1.03 \pm 0.32	1.01 \pm 0.13
B	22.40 \pm 0.79	1.99 \pm 0.27
C	4.98 \pm 0.17	0.97 \pm 0.03
D	10.28 \pm 0.10	1.87 \pm 0.06

3 讨论

滑膜成纤维细胞为主要的功能细胞,表达11 β -HSD1^[5],本文主要研究对象为单一的滑膜成纤维细胞^[6]。CD90是滑膜成纤维细胞表达的特异性表面标志物,而vimentin是来源于中胚层分化的细胞的特异性表达蛋白,本实验所获取的滑膜成纤维细胞经流式细胞术CD90表面抗体鉴定证实传至第三代后为表型均一的成纤维样滑膜细胞,vimentin免疫细胞化学染色呈高表达,与文献报道相符^[7]。实验表明传第七代以后滑膜成纤维细胞增殖活力明显减弱,故取3~6代纯度较高、活力较好的细胞用于实验。滑膜细胞受IL-1 β 诱导后表现为IL-1 β 、TNF- α 等表达明显增加的炎症状态,本研究利用这种较理想的状态作为体外研究的模型。

11 β -HSD属于糖皮质激素的受体前调节酶,通过其还原氧化调节组织局部活性糖皮质激素的浓度^[8]。未经氧化的糖皮质激素(如可的松、11-脱氢皮质酮等)不能发挥任何的生物学效应,经11 β -HSD1转换是它们活化的唯一方式^[9]。研究报道许多关节炎患者的持续炎症状态是由于局部的异常激素代谢所导致的^[10]。滑膜炎的存在是OA软骨损伤及OA慢性持续化的重要原因,探讨滑膜细胞致炎细胞因子的分泌与调节机制,与糖皮质激素的细胞水平的调节关系具有重要的临床意义。

文献报道,11 β -HSD1基因敲除会使关节炎的动物炎症加重^[11],说明11 β -HSD1对控制关节炎的严重程度具有积极的作用。但其具体机制尚不明了,有研究发现地塞米松能够通过GR作用于11 β -HSD1基因的启动子区而调控11 β -HSD1表达。IL-1 β 和TNF α 能够诱导许多基质细胞的11 β -HSD1相关基因和蛋白表达上调^[12]。本研究也证实了正常的滑膜成纤维细胞经IL-1 β 诱导后,相对于正常的滑膜细胞11 β -HSD1基因呈现出高表达。Li等报道IL-1 β 等炎性介质可以和糖皮质激素一起协同诱导羊膜成纤维细胞的mRNA和11 β -HSD1的表达上调^[5],但是滑膜成纤维细胞内是否也存在这种协同作用尚不清楚。分析本文结果发现,应用IL-1 β 与皮质酮共同作用于滑膜成纤维细胞时,活性的皮质醇含量明显增加,11 β -HSD1的表达明显下降,同时炎症因子的表达也表现为同样的下降趋势,说明正常的滑膜细胞具备良好的皮质酮活性转换功能,所产生的活性皮质醇产生良好的抑制滑膜细胞炎症的生物学作用。当用PF915275抑制11 β -HSD1转换活性时,这种抑制作用发生了改变,表现为诱导所产生的炎症因子表达明显回升,

11 β -HSD1表达明显回升,提示细胞内的皮质醇的活性转换是调节11 β -HSD1表达的重要环节之一。提示IL-1 β 与皮质酮共同作用于滑膜细胞可有效抑制炎症因子的表达,11 β -HSD1是参与调节的重要环节。相对于皮质醇含量的增加,IL-1 β 与皮质酮共同作用时11 β -HSD1表达下降,表明这种调节模式可能存在反馈机制,但滑膜细胞中未观察到与羊膜细胞中类似的协同作用。

参考文献

- [1] Magliano M. Obesity and arthritis. *Menopause International*[J]. 2008;14:149-154.
- [2] Atukorala I, Kwok CK, Guermazi A, et al. Synovitis in knee osteoarthritis: a precursor of disease? [J]*Ann Rheum Dis*.,2015;74:59.
- [3] Moravec M, Svec J, Ergang P, et al. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is deregulated in colon carcinoma. *Histol Histopathol*[J]. 2014 ;29(4):489-96. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mandys%20V%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24189979
- [4] Hardy R, Rabbitt EH, Filer A, et al. Local and systemic glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* [J]. 2008;67:1204-1210.
- [5] Jun YJ, Park SJ, Kim TH, et al. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 in patients with chronic rhinosinusitis and their possible contribution to local glucocorticoid activation in sinus mucosa [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014 ,134(4):926-934.
- [6] Nanus DE, Filer AD, Yeo L, et al. Differential glucocorticoid metabolism in patients with persistent versus resolving inflammatory arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015,14(17)121.
- [7] Lehmann J, Jüngel A, Lehmann I, et al. Grafting of fibroblasts isolated from the synovial membrane of rheumatoid arthritis (RA) patients induces chronic arthritis in scid mice—a novel model for studying the arthritogenic role of rat fibroblasts in vivo. *Journal of autoimmunity*[J]. 2000;15:301-313.
- [8] Hardy RS, Raza K, Cooper MS. Glucocorticoid metabolism in rheumatoid arthritis[J].*Ann N Y Acad Sci*,2014 :1318:18-26.
- [9] Chapman KE1, Coutinho AE, Zhang Z, et al. Changing glucocorticoid action: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation[J].*J Steroid Biochem Mol Biol*,2013,137:82-92.
- [10] Coutinho AE, Gray M, Brownstein DG, et al. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1, but not type 2, deficiency worsens acute inflammation and experimental arthritis in mice[J].*Endocrinology*,2012 ,153(1):234-40.
- [11] 林振和. 核因子- κ b 信号转导途径的调节研究进展.国外医学免疫学分册[J]. 2004,27(4):234-238.
- [12] Ahasan MM1, Hardy R, Jones C, et al. Inflammatory regulation of glucocorticoid metabolism in mesenchymal stromal cells[J].*Arthritis Rheum*, 2012 ,64(7):2404-13.

收稿日期:2015-06-15 编辑:谢永慧