

探讨趋化因子 5 白细胞介素-8 及一氧化氮在骨关节炎发病中的相关性研究^{*}

陈志林,袁太珍,廖建中,龚国龄,申 军(广东省深圳市龙岗区第二人民医院骨科 518000)

【摘要】 目的 探讨趋化因子 5(CCL5)、白细胞介素-8(IL-8)与一氧化氮(NO)在骨关节炎(OA)发病中的相关性,以了解 CCL5 在 OA 发生发展中的生物学作用。**方法** 应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 CCL5、IL-8 及硝酸还原法测定 NO 在关节滑液中的含量,分析 CCL5 与 IL-8、NO 在膝骨关节炎关节滑液中的相关性,研究对象包括膝关节炎(KOA)患者 56 例,健康者 25 例。**结果** 实验组与健康对照组 CCL5、IL-8 和 NO 3 个指标比较,差异有统计学意义($P<0.01$),KOA 患者中 CCL5、IL-8 和 NO 3 个指标的表达和健康者比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。CCL5、IL-8 和 NO 含量进行 Spearman 相关分析,相关系数 r 分别为 0.912、0.885($P<0.01$),均呈正相关。**结论** CCL5 可能是炎症因子 IL-8 和 NO 的趋化因子,其可促进 KOA 的局部非感染性炎症形成。

【关键词】 膝骨关节炎; 关节滑液; 趋化因子 5; 白细胞介素 8; 一氧化氮

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.12.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)12-1601-02

Explore the correlation and the lever of CCL5 IL-8 and NO in the pathogenesis of osteoarthritis^{*} CHEN Zhi-lin, YUAN Tai-zhen, LIAO Jian-zhong, GONG Guo-lin, SHEN Jun (the Department of Orthopedics, the Second, People's Hospital of Longgang, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

【Abstract】 Objective Discussion the correlation of osteoarthritis and the lever of CCL5, IL-8 and NO in the pathogenesis and understand the effects of OA CCL5 in pathogenesis. **Methods** The level of CCL5, IL-8 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, the NO level in synovial fluid were analyzed by nitrate reduction. The correlation of osteoarthritis and the lever of CCL5, IL-8 and NO in the pathogenesis were discussed in 56 patients with knee osteoarthritis (KOA), 25 cases of healthy subjects. **Results** The level of CCL5, IL-8 and NO in the experimental group was statistically significant, compared with the control group ($P<0.01$), Spearman correlation analysis was contented to CCL5, IL-8 and NO. The correlation coefficients was $r=0.912, 0.885$ ($P<0.01$), respectively, those were positively correlated. **Conclusion** CCL5 may be inflammatory cytokines IL-8 and NO chemokines, which promote local KOA formation of non infectious inflammation.

【Key words】 knee osteoarthritis; synovial fluid; chemokine ligand 5; interleukin 8; nitric oxide

骨性关节炎(OA)常见于老年化的退行性变、体质量增加或者长期负重导致慢性压缩磨损的非感染性炎症改变、创伤导致的损伤性病变等原因造成,初始仅可引起关节轻微疼痛,逐渐可发展成关节疼痛加重、晨僵及关节活动功能障碍的慢性关节性疾病。有报道显示趋化因子 5(CCL5)在非感染性炎症中的表达增高,其可能在非感染性炎症中趋化炎症因子的聚集^[1]。研究 CCL5 在膝骨关节炎(KOA)发病中的作用具有重要的意义。本组通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 KOA 患者关节滑液中 CCL5 和 IL-8 的表达量,通过相关回归曲线分析其相关性,以及了解其与骨关节炎发生发展中可能存在的关系。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有研究对象均为 2010 年 3 月至 2013 年 4 月深圳市龙岗区第二人民医院骨科骨关节炎患者。实验组膝关节炎 KOA 患者 56 例,女性 24 例,男性 32 例,平均年龄 76(51~81)岁。健康对照组为该院健康体检者 25 例,无 KOA 病史,双膝关节 X 线平片正常,行关节穿刺前与其签署知情同意书,女性 13 例,男性 12 例,平均年龄 42(23~50)岁。KOA 临床诊断参考 1986 年美国风湿协会所制定标准,X 线片诊断参考 Kellgren-Lawrence(K-L)分级标准。

1.2 实验标本 实验组患者行关节腔注射治疗前留取,2 组

研究对象均为 2 mL 生理盐水关节腔冲洗后抽出。2 组标本均进行 1 500 r/min 离心 10 min 后取上清液,置于-20℃冰箱保存备用。

1.3 仪器与试剂 -20℃普通冰箱,电热恒温水浴箱(深圳爱特),全自动酶标仪(Bio-Tec)。Chemokine(C-C motif) ligand 5(CCL5) ELISA Kit(货号:10900-H14H,公司:Sino Biological Inc); Interleukin-8(aa 1-77) Protein Datasheet (IL-8) ELISA Kit(货号:10098-H01H1,公司:Sino Biological Inc);一氧化氮 Griess Reagent 法检测试剂盒(NO)(货号:S0021,公司:碧云天)。

1.4 方法

1.4.1 ELISA 检测 CCL5 和 IL-8 在关节液中的表达水平 96 孔板第 1 排的 8 个孔作为标准孔,按浓度为 1、5、10、20、30、40、50 μL 滴入各标准孔,按 50 微升/孔稀释,第 1 排的最后 1 个孔滴入超纯水作为空白对照,利用标准孔数据在 Excel 下建立标准曲线。将制备的关节液恢复常温后各样品 50 μL 加入其余样品孔,在 37℃的恒温箱中反应 90 min;预先制备的 0.01 M PBS 洗板 3 次,滤纸印干;加入 1 抗(CCL5、IL-8)100 μL,37℃恒温箱中反应 60 min;0.01 M PBS 再次洗板 3 次,每次浸泡 4 min,滤纸印干;加入酶标液 100 μL,37℃恒温箱中反应 30 min;0.01 M PBS 洗板 4 次,每次浸泡 3 min,滤纸印干;

^{*} 基金项目:广东省深圳市科技计划(201203336)。

作者简介:陈志林,男,本科,副主任医师,主要从事骨外科研究。△ 通讯作者,E-mail:13510074826@139.com。

加入底物 TMB 90 μL ,置恒温箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 在暗处反应 11 min;每孔加入 1 滴终止液混匀,当蓝色转为黄色时上机检测;DG5033A 酶标仪设定 450 nm 处测定吸光值。

1.4.2 关节滑液中 NO 的检测 取出标准品(1 M NaNO_2)和样品(关节液)放置至室温;将标准品按以下浓度加入标准孔:0、1、2、5、10、20、30、40、50、60、80、100 μM ,并稀释至 50 微升/孔。在剩余的样品孔中加入 50 微升/孔的关节液样品;取出 Griess Reagent I、II 放置至室温,按 50 微升/孔在各孔中加入 Griess Reagent I,按 50 微升/孔在各孔中加入 Griess Reagent II;通过酶标仪测出各标准品及样品孔的吸光度,通过标准品的吸光度绘制出标准曲线,并通过标准曲线及样品孔的吸光度计算各样品的 NO 浓度。

1.5 统计学处理 本实验数据均为计量数据,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用经 SPSS 17.0 统计学软件分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。其中 3 个指标的实验组与健康对照组组间比较应用单因素方差分析;CCL5 与 IL-8 及 CCL5 与 NO 进行 Spearman 相关分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 实验组与健康对照组 CCL5、IL-8 及 NO 含量比较 实验组与健康对照组 CCL5、IL-8 和 NO 3 个指标比较,差异有统计学意义($P<0.01$),表示 CCL5、IL-8 和 NO 3 个指标在骨关节炎关节滑液中表达与健康者比较显著增高。见表 1。

表 1 2 组研究对象关节滑液中 CCL5、IL-8 及 NO 检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CCL5(pg/mL)	IL-8(pg/mL)	NO($\mu\text{mol/L}$)
实验组	56	1 782.41 $\pm$ 430.12*	1 089.71 $\pm$ 396.21*	11.12 $\pm$ 4.89*
对照组	25	372.31 $\pm$ 140.50	413.43 $\pm$ 136.11	3.43 $\pm$ 1.45

注:与对照组比较,* $P<0.01$ 。

2.2 CCL5 与 IL-8、NO 的相关性分析 CCL5 与 IL-8 水平作 Spearman 相关分析,相关系数 $r=0.912(P<0.01)$,两者呈正相关。CCL5 与 NO 水平作 Spearman 相关分析,相关系数 $r=0.885(P<0.01)$,两者仍呈正相关。

3 讨 论

KOA 的发病与关节滑液中炎性因子的形成与聚集密切相关,有实验研究表明在胚胎时,其间充质干细胞定向发育为软骨与成骨的过程中,一定浓度的趋化因子黏附于上述过程的环境中,可表现出聚集炎性因子、趋化炎性改变^[2]。但是 KOA 关节滑液中的炎性改变是否与 CCL5 的炎性趋化有关,定量检测 KOA 患者关节滑液中 CCL5 的含量是否可以作为 KOA 的诊断指标,至今为止尚未有报道表明。

非感染性炎性是 KOA 局部内环境的主要特征,在 KOA 的发展过程中早期病理改变主要表现为关节软骨浅表区的非感染炎性改变,并逐渐发展为胶原破坏、缺失,软骨细胞凋亡,并最终出现软骨层中断,该病理生理过程的蛋白分子机制尚未完全阐明^[3]。然而另一方面的实验证明在早期红斑狼疮细胞(非感染性炎性)的研究中,应用 CCL5 受体竞争性抑制剂干预红斑狼疮细胞病程进展,发现红斑狼疮的非感染性炎性范围逐步缩小,炎性因子浓度逐渐下降^[4]。本实验研究显示 CCL5、IL-8 及 NO 在实验组的表达均较健康对照组高,由此可见 CCL5、IL-8 及 NO 均为骨关节炎的炎性因子之一,与其他报道结果基本相符^[5]。本组结果表明 CCL5 在骨关节炎患者的关节滑液中表达量是健康者的 4~5 倍,而 IL-8 和 NO 的表达量是 2~3 倍,由此更加证实了 CCL5 可能是炎性因子 IL-8 和 NO 的趋化因子。

NO 因浓度不同而具有不同的生物学作用,低浓度时具有扩血管、促炎性的作用,高浓度时具有促细胞凋亡的作用。近几年大量的实验提示 NO 与 KOA 有密切的关系,其中早期 KOA 时,低浓度 NO 可促使 KOA 非感染性炎性改变;晚期 KOA 时,高浓度 NO 可导致软骨细胞凋亡,表明 NO 和 KOA 密切相关^[6-7]。IL-8 是由 Th1 细胞分泌的趋化性细胞因子,有大量相关报道其为 KOA 的炎性相关因子之一^[8-9]。本研究显示 CCL5 与 NO、IL-8 均呈正相关关系,表明 CCL5 可促进 KOA 的局部非感染性炎性形成。

综上所述,CCL5 可能是炎性因子 IL-8 和 NO 的趋化因子,其可促进 KOA 的局部非感染性炎性形成。探讨 CCL5 受体抑制剂对 KOA 细胞或者 KOA 动物实验的治疗作用,可为 KOA 的治疗提供新的靶向治疗方向;然而通过研究 CCL5 在 KOA 各级临床阶段的分组变化,可进一步掌握各级临床阶段中 CCL5 的实验数据,为将来临床 CCL5 靶向治疗提供可靠的依据。

参考文献

[1] Di Prisco S, Merega E, Milanese M, et al. CCL5-glutamate interaction in central nervous system; Early and acute pre-synaptic defects in EAE mice[J]. Neuropharmacology, 2013, 16(75): 337-346.

[2] Vincent HK, Percival SS, Conrad BP, et al. Hyaluronic Acid (HA) viscosupplementation on synovial fluid inflammation in knee osteoarthritis; A Pilot Study[J]. Open Orthop J, 2013, 20(7): 378-384.

[3] Messier SP, Mihalko SL, Legault C, et al. Effects of intensive diet and exercise on knee joint loads, inflammation, and clinical outcomes among overweight and obese adults with knee osteoarthritis; the IDEA randomized clinical trial[J]. JAMA, 2013, 310(12): 1263-1273.

[4] Hrycek E, Franek AB, Aszczak E, et al. Serum levels of selected chemokines in systemic lupus erythematosus patients[J]. Rheumatol Int, 2013, 33(9): 2423-2437.

[5] Pierzchala AW, Kusz DJ, Hajduk G. CXCL8 and CCL5 expression in synovial fluid and blood serum in patients with osteoarthritis of the knee[J]. Arch Immunol Ther Exp(Warsz), 2011, 59(2): 151-155.

[6] Mansouri FE, Chabane N, Zayed N, et al. Contribution of H3K4 methylation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human osteoarthritis chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(1): 168-179.

[7] 林睿, 高灿, 胡永挑, 等. NO、TNF- α 在骨性关节炎病程中的作用[J]. 放射免疫学, 2011, 24(3): 351-352.

[8] Chauffier K, Laiguillon MC, Bougault C, et al. Induction of the chemokine IL-8/Kc by the articular cartilage; possible influence on osteoarthritis[J]. Joint Bone Spine, 2012, 79(6): 604-609.

[9] Raap T, Jüsten HP, Miller LE, et al. Neurotransmitter modulation of interleukin 6(IL-6) and IL-8 secretion of synovial fibroblasts in patients with rheumatoid arthritis compared to osteoarthritis[J]. J Rheumatol, 2000, 27(11): 2558-2565.