

SIRT1 在骨性关节炎滑膜中表达的相关研究

丁辉¹ 胡勇¹ 常俊² 张琪琪¹ 阙玉康¹ 许唐兵¹ 魏伟³

摘要 目的 探讨沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1) 在骨性关节炎 (OA) 正常滑膜组织及细胞中表达的差异性。方法 膝关节滑膜细胞培养传代, 甲苯胺蓝染色观察细胞形态, Western blot 法检测滑膜组织及细胞中 SIRT1 的表达情况; 免疫组织化学法对滑膜细胞检测 SIRT1 表达情况及表达部位。结果 甲苯胺蓝实验显示 OA 及正常滑膜细胞无明显形态学差异; 免疫细胞化学法显示 SIRT1 在滑膜细胞胞质中广泛表达, 染色强度 OA 组较正常组明显降低 ($t = 20.208$, $P < 0.01$); Western blot 法显示在滑膜细胞中 OA 组 SIRT1 表达明显低于正常对照组 ($t = 8.619$, $P < 0.01$); 在滑膜组织中 OA 组 SIRT1 的表达亦明显低于正常对照组 ($t = 7.664$, $P < 0.01$)。结论 SIRT1 与 OA 导致滑膜炎的发生发展密切相关, 为 SIRT1 可以作为 OA 治疗的靶点提供一个新的理论依据。

关键词 骨关节炎; 滑膜组织; 滑膜细胞; SIRT1

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0691-04

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是发病最高的关节疾病之一, 尤其以膝关节为主, 其病理特征主要表现为关节软骨的退行性病变, 但绝不仅仅局限于软骨, 关节的其他组成部分包括软骨下骨、滑膜、半月板和韧带共同参与其病理改变^[1], 各部分相互影响作用加速了关节的退变。多种信号传导通路参与 OA 发生发展进程, 其中核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 途径发挥着重要作用^[2]。沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (Sirtuin type 1, SIRT1) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 依赖的组蛋白脱乙酰酶, 作为 Sirtuins 家族成员之一, SIRT1 被认为与细胞的增殖、分化、衰老以及凋亡密切相关^[3]。有研究^[4]显示其可抑制 NF- κ B 途径的上游靶点从而

抑制下游多种促炎因子。该研究旨在探讨 SIRT1 在两者中的表达差异性, 为进一步研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2013 年 1 月~2014 年 6 月在安徽医科大学第一附属医院骨科二病区的住院患者。① OA 组: 因膝骨性关节炎行全膝关节置换术中所取标本共 20 例, 男 10 例, 女 10 例, 年龄 62~78 岁, 中位年龄 72.3 岁。纳入标准: 符合美国风湿病学会 2001 年推荐 OA 诊断标准^[5]; ② 正常对照组: 因急性外伤致下肢截肢或因胫骨平台骨折行开放复位内固定术中所取标本 10 例, 男 6 例, 女 4 例, 年龄 19~42 岁, 中位年龄 34.2 岁。纳入标准: 术后病理学诊断关节无病变。标本离体后无菌状态下放置于装有生理盐水的无菌标本盒中, 2 h 内送实验室处理。

1.2 试剂与仪器 Elivision 免疫组化两步法检测试剂盒 (福建迈新生物技术开发有限公司); Motic BA600 Mot-7.5 型自动显微镜 (厦门 Motic 公司); RIPA 组织裂解液和 SDS-PAGE 加样缓冲液 (北京碧云天生物技术研究); 兔抗 Anti-SIRT1 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司); 山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司); ECL 显影液 (美国 Thermo 公司)。

1.3 滑膜细胞的分离与培养 无菌条件下将标本剪成约 1~2 mm³ 小块, 用含青霉素和链霉素双抗的 PBS 漂洗 3 遍, 分离并弃除混杂其中的脂肪组织。将提纯过的滑膜组织一部分转移至细胞培养瓶中均匀平铺, 加入 1.5 ml 含 20% 胎牛血清的 DMEM, 置于二氧化碳培养箱 (37 °C、5% CO₂) 中, 每 2~3 d 换培养液, 1 周后培养瓶中贴壁细胞即为原代滑膜细胞。细胞接近汇合时胰酶消化, 1:2 传代培养, 传至第 3 代使用。

1.4 甲苯胺蓝染色法观察细胞形态及免疫组织化学检测滑膜细胞 SIRT1 表达及分布特点

1.4.1 甲苯胺蓝染色及免疫组化 滑膜细胞接种至已放入无菌盖玻片的 6 孔板内, 置于二氧化碳培养箱过夜, 弃培养基, 干燥。甲苯胺蓝染色步骤为: 0.1% 甲苯胺蓝液浸染 10 min, PBS 漂洗 3 遍, 各级

2015-01-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81173075)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院关节与骨肿瘤科, 合肥 230022

²安徽医科大学第四附属医院骨科, 合肥 230032

³安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032

作者简介: 丁辉, 男, 硕士研究生;

胡勇, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hy_in163@163.com;

魏伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

乙醇溶液脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察;免疫组化步骤为:4%多聚甲醛固定30 min,滴加0.5% Triton X-100 通透30 min,3%内源性过氧化物阻滞剂 H₂O₂ 一抗(稀释浓度1:250)4℃冰箱过夜,滴加生物素标记的二抗,DAB显色,苏木精复染,各级乙醇溶液脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察。

1.4.2 甲苯胺蓝染色及免疫组化结果判断 均采用 Motic BA600MOT-7.5 型自动显微镜对各组结果扫描拍照,甲苯胺蓝染色每张图片选取5个随机视野(×400),胞质呈淡蓝色作为阳性标记;免疫组化使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对各组图片结果进行积分光密度检测分析,每张图片选取5个随机视野(×400),选取胞质呈棕黄色细胞作为阳性结果标记,以此为参照自动扫描所有视野的阳性结果,再从选定图片中随机选取视野(×1000)重复对照。以参数平均积分光密度代表蛋白颗粒密度。

1.5 Western blot 法检测滑膜组织及细胞中 SIRT1 表达 提取组织蛋白时,冰浴条件下0.05 g 滑膜组织加入499 μl RIPA 组织裂解液和1 μl 苯甲磺酰氟中研磨裂解30 min,裂解液移至1.5 ml EP 管中;提取细胞蛋白时,弃培养基后每瓶细胞加入297 μl RIPA 组织裂解液和3 μl 苯甲磺酰氟冰上裂解30 min,刮棒刮取细胞后将细胞及裂解液移至1.5 ml EP 管中。将EP管14 000 r/min 离心15 min 后取上清液,按4:1加入SDS上样缓冲液,煮沸15 min,冷却后用10% SDS-PAGE 凝胶电泳2 h,电转使蛋白质转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶37℃封闭2 h,加入兔抗 SIRT1 一抗(1:5 000)及鼠抗 β-actin 一抗(1:500)4℃孵育过夜,山羊抗兔标记二抗(1:30 000)、山羊抗鼠标记二抗(1:30 000)常温孵育2 h,TBS漂洗3遍及PBS漂洗1遍后加ECL液显影,扫描仪中成像。Image J 软件进行分析各组条带计算灰度值。以 β-actin 蛋白灰度值作为内参,二者比值即为灰度值比值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据分析结果用柱状图表示,采用 *t* 检验比较组间差异。

2 结果

2.1 甲苯胺蓝染色结果 滑膜细胞大部分呈梭形,两极胞突细长,末端多与临近细胞相连,交织成网状,网间可见少部分小星型或多边形细胞。正常组与 OA 组滑膜细胞无明显形态学差异,见图 1、2。

2.2 免疫组化法检测结果 在正常组及 OA 组滑

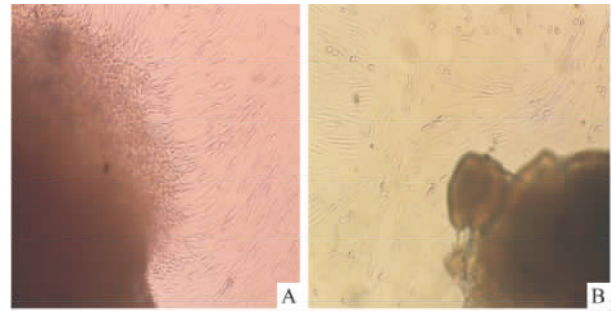


图1 滑膜细胞原代细胞培养 ×400
A: OA 组; B: 正常组

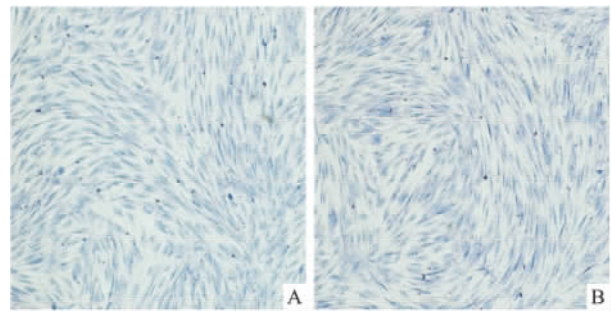


图2 滑膜细胞甲苯胺蓝染色 ×400
A: OA 组; B: 正常组

膜细胞中,胞质广泛呈棕黄色,细胞核及细胞膜未见明显黄染,OA 组染色强度较正常组明显降低,两者比较差异有统计学意义($t=20.208, P<0.01$),见图 3。

2.3 Western blot 法检测结果 OA 患者滑膜组织及细胞中 SIRT1 表达低于正常组,正常组与 OA 组灰度值经统计学分析比较,差异有统计学意义。部分滑膜组织正常组及 OA 组显影结果及柱状图见图 4($t=7.664, P<0.01$) 滑膜细胞正常组及 OA 组显影结果及柱状图见图 5($t=8.619, P<0.01$)。

3 讨论

以往认为 OA 的主要特征是关节软骨变性,并在软骨下方及关节周围有新骨形成。随着对 OA 研究的不断深入,滑膜病变对 OA 病程的影响开始越来越受到重视,现已通过基因芯片法证实滑膜对 OA 病程的发展起到关键性作用^[6]。细胞凋亡是 OA 发生发展过程中不可忽视的一个重要因素^[7]。软骨凋亡退变导致基质破坏,释放的降解片段被滑膜细胞中巨噬样细胞吞噬,引起滑膜发生炎症反应,而炎症滑膜细胞分泌白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子-α(tumour necrosis factor-α, TNF-α)等炎

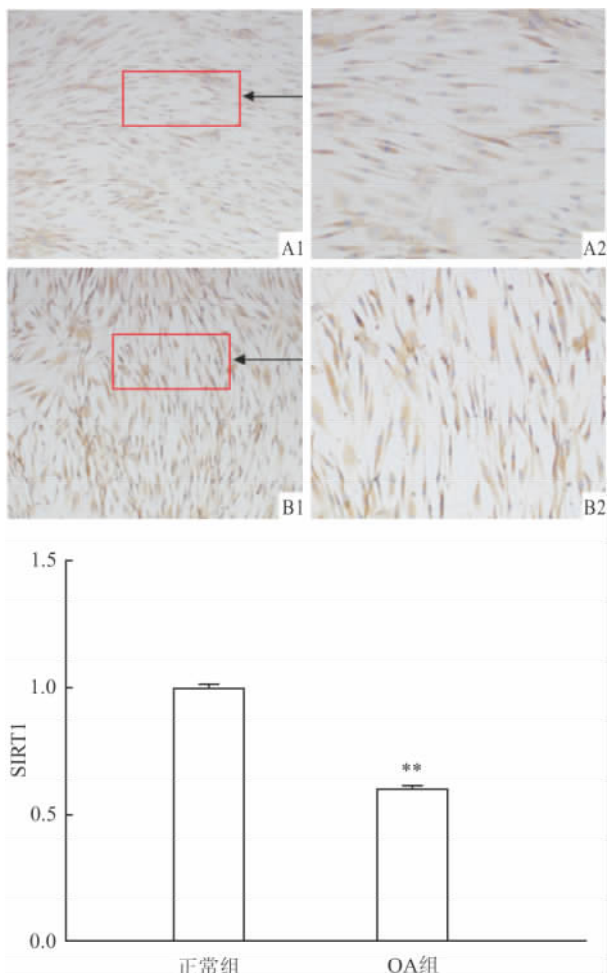


图3 SIRT1在滑膜细胞中表达及分布

A: OA组 B: 正常组; 1: Elivision × 400 2: Elivision × 1 000; 与正常组比较: ** P < 0.01

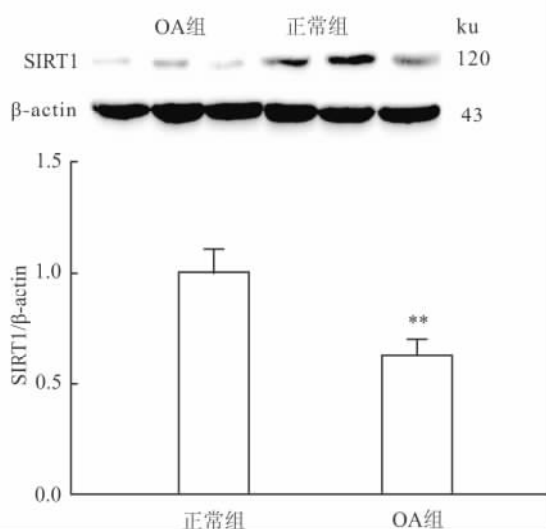


图4 Western blot法检测SIRT1在滑膜组织中的表达

与正常组比较: ** P < 0.01

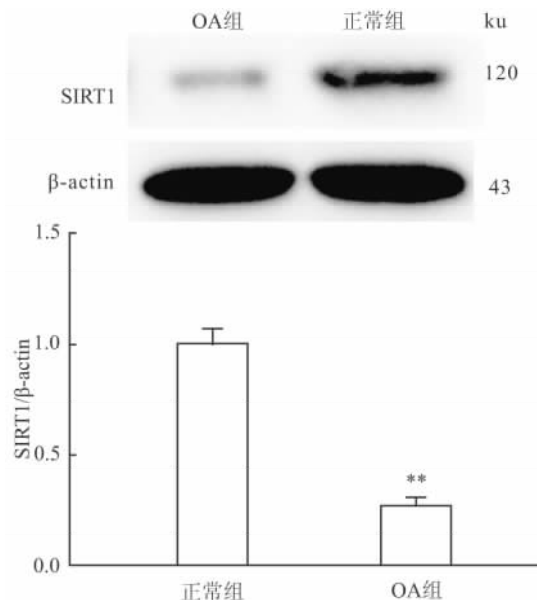


图5 Western blot法检测SIRT1在滑膜细胞中的表达
与正常组比较: ** P < 0.01

性介质及胶原酶等蛋白水解酶^[8-9]。其中 IL-1β 可上调基质金属蛋白酶基因 mRNA 表达,增强软骨基质破坏降解,还可诱导产生一氧化氮,抑制蛋白聚糖及 II 型胶原合成,诱导软骨细胞凋亡; IL-6 不仅通过自分泌形式影响软骨和滑膜细胞的正常增殖,还可协同 IL-1 阻碍成纤维细胞胶原合成,抑制软骨细胞的合成修复; TNF-α 通过增加基质金属蛋白酶活性抑制软骨基质中糖蛋白和胶原合成,加速软骨基质分解,是软骨基质降解的重要介质^[10-12]; 胶原酶则直接破坏溶解软骨基质导致其分解。上述机制形成软骨-滑膜的恶性循环,加速 OA 病情的发展。

SIRT1 在人体中绝大部分细胞中都有表达,近年来成为肿瘤、衰老、炎症及心血管系统等研究领域的热点。其中,SIRT1 使促凋亡因子 P53 蛋白第 373、320 以及 382 位赖氨酸残基去乙酰化,抑制 P53 与靶 DNA 顺式元件结合,抑制 P53 促凋亡活性,从而抑制细胞凋亡^[13]。同时 Yeung et al^[14] 指出,SIRT1 是 NF-κB 的 p65 亚单位的直接靶点,通过抑制 p65 亚单位的 Lys310 位点,不影响其他赖氨酸位点,使其发生去乙酰化,降低 NF-κB 蛋白的转录活性,从而抑制对下游基因的转录功能,进一步抑制其对下游因子包括 IL-1、TNF-α、IL-8、IL-6 等炎症介质的转录水平,改善炎症症状。而滑膜炎炎症介质转录水平的降低不仅改善滑膜炎的自身症状,同时打破软骨-滑膜的恶性循环过程,减少软骨细胞的凋亡及基质的破坏降解,使之成为良性循环,延缓 OA 病

情的发展。

以往的 OA 研究重点集中于软骨组织及细胞,有研究^[15]证实 OA 软骨细胞与正常软骨细胞对比 SIRT1 表达量明显减少,而细胞凋亡率显著增加。本研究显示,在 OA 引起的滑膜炎组织及细胞中, SIRT1 表达量与正常滑膜组织对比显著降低,且 SIRT1 广泛平均分布于滑膜细胞胞质中,细胞核及细胞膜未见明显表达,而炎症介质在胞质中被转录表达,由此推断 SIRT1 在胞质中抑制炎症介质的产生,改善自身的炎症状况,减少炎症介质在关节液中含量,延缓软骨细胞的凋亡及基质的破坏分解。其表达量减少对 IL-6、TNF- α 等炎症介质抑制降低,通过特异性增加 SIRT1 可能有效的控制 OA 病情的发展。

参考文献

[1] Abramson S B, Attur M, Yazici Y. Prospects for disease modification in osteoarthritis [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006, 2(6): 304 - 12.

[2] Berenbaum F. Signaling transduction: target in osteoarthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2004, 16(5): 616 - 22.

[3] Dirks A J, Leeuwenburgh C. Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction [J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17(8): 501 - 8.

[4] Xie J, Zhang X, Zhang L. Negative regulation of inflammation by SIRT1 [J]. *Pharmacol Res*, 2013, 67(1): 60 - 7.

[5] 陈百成, 张静. 骨关节炎 [M]. 北京: 北京卫生出版社, 2004: 18.

[6] 朱锦宇, 史曼, 张伟等. 基因芯片法筛选膝骨关节炎滑膜相关差异表达基因 [J]. *国际骨科学杂志*, 2010, 31(6): 384 - 6.

[7] Kim H A, Blanco F J. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage [J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(2): 333 - 45.

[8] 孙正明, 凌鸣, 刘森, 等. 大骨节病和骨性关节炎患者滑膜白介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 的比较 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(1): 5 - 8.

[9] Fernandes J C, Martel-Pelletier J, Pelletier J P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology [J]. *Biorheology*, 2002, 39(1-2): 237 - 46.

[10] Kreydiyyeh S I, Abou-Chahine C, Hilal-Dandan R. Interleukin-1 beta inhibits Na⁺-K⁺ ATPase activity and protein expression in cardiac myocytes [J]. *Cytokine*, 2004, 26(1): 1 - 8.

[11] Grabowski P S, Macpherson H, Ralston S H. Nitric oxide production in cells derived from the human joint [J]. *Br J Rheumatol*, 1996, 35(3): 207 - 12.

[12] Stefanovic-Racic M, Morales T I, Taskiran D, et al. The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures [J]. *J Immunol*, 1996, 156(3): 1213 - 20.

[13] Luo J, Nikolaev A Y, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress [J]. *Cell*, 2001, 107(2): 137 - 48.

[14] Yeung F, Hoberg J E, Ramsey C S, et al. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase [J]. *Embo J*, 2004, 23(12): 2369 - 80.

[15] Kim H J, Braun H J, Dragoo J L. The effect of resveratrol on normal and osteoarthritic chondrocyte metabolism [J]. *Bone Joint Res*, 2014, 3(3): 51 - 9.

The research of SIRT1 expression in osteoarthritis synovial membrane

Ding Hui¹, Hu Yong¹, Chang Jun², et al

(¹Dept of Joint and Bone Tumors, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Orthopedics, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of silent information regulator factor 2 related enzyme 1 (SIRT1) in osteoarthritis (OA) synovial membrane tissue and cells. **Methods** Knee joint synovial membrane cells were cultured, and the synovial membrane cells morphology was detected by toluidine blue staining. The expression of SIRT1 protein in osteoarthritis synovial membrane tissue and cells was detected by Western blot. The expression and distribution of SIRT1 protein was also detected by immunohistochemistry. **Results** Toluidine blue assay showed that OA and normal synovial cells had no obvious morphological difference; Immunohistochemistry showed that SIRT1 was widely expressed in synovial cells, the staining intensity of OA group was significantly decreased compared with normal group ($t = 20.208, P < 0.01$); Western blot showed that the expression of SIRT1 in synovial cells in OA group was significantly lower than that in normal control group ($t = 8.619, P < 0.01$); The expression of SIRT1 in synovium of OA group was obviously lower than that in the normal group ($t = 7.664, P < 0.01$). **Conclusion** The low expression of SIRT1 may play an essential role in OA progression, and the research provides a new theoretical basis for SIRT1 as therapeutic target in OA treatment.

Key words osteoarthritis; synovial tissues; synovial cells; SIRT1