

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00460

# 犬膝关节急性炎症期细胞因子的表达

## Cytokine expression in acute inflamed knee joint of Beagle dog

陈前波, 陈巍, 李振杰, 何星颖, 袁红斌\*

第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003

[关键词] 炎症; 膝关节炎; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 白细胞介素

[中图分类号] R 684.3 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2010)04-0460-02

炎性细胞因子在神经病理性疼痛的发生机制中具有重要作用<sup>[1]</sup>。我们的前期研究证实成人膝关节滑膜组织中存在  $\mu$  阿片受体,且在慢性炎症期间表达上调,局部外源性阿片类药物的应用能够缓解慢性炎症的疼痛<sup>[2]</sup>;后续研究发现犬急性膝关节炎炎症期滑膜组织  $\mu$  阿片受体同样表达上调<sup>[3]</sup>。因此,本研究在前期实验的基础上进一步观察膝关节腔内注射金黄色葡萄球菌诱发的急性犬膝关节炎模型中血清和膝关节滑膜组织中炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ )的表达,观察炎性因子可能的致痛作用,为后续镇痛研究奠定基础。

### 1 材料和方法

1.1 主要材料 ELISA 试剂盒,包括酶标板、二抗、Biotin、HRP、TMB、终止液等,购自美国 R&D 公司。金黄色葡萄球菌悬液自行制备;将金黄色葡萄球菌临床分离株溶于生理盐水,由麦氏比浊仪比浊后制成密度相当于  $1 \times 10^8$ /ml 的悬液,密闭于试管中。

1.2 动物分组及处理 16 只健康 Beagle 犬,体质量 10~12 kg,雌雄不限,购自上海虹筠犬类养殖场。随机分为急性感染性炎症组( $n=8$ )和正常对照组( $n=8$ )。正常对照组不作处理;急性感染性炎症组犬于麻醉后双侧后肢膝关节腔内注射金黄色葡萄球菌悬液 1 ml,建立急性感染性炎症动物模型,正常饲养。24 h 后取股静脉血液 2 ml 及双侧后肢膝关节腔内滑膜组织,离体后迅速将滑膜组织标本置液氮中保存

备用检测。急性感染性炎症组关节腔液进行培养,若培养出金黄色葡萄球菌,说明急性感染性炎症模型制备成功,否则该数据予以剔除。所有操作过程均为无菌操作。

1.3 血清和膝关节滑膜组织炎症因子表达的测定 采用双抗体夹心 ELISA 法测定标本中各种细胞因子浓度,提前 15 min 配制工作液,加入 100  $\mu$ l 标准品、100  $\mu$ l 标本于相应反应孔中,混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 90 min,洗涤液反复洗涤 5 次。每孔加入 100  $\mu$ l  $1 \times$  Biotin,洗涤液反复洗涤 5 次。每孔加入 100  $\mu$ l TMB 显色液,混匀,37 $^{\circ}$ C 暗处温育(15 $\pm$ 10) min。每孔加入 100  $\mu$ l 终止液,混匀,30 min 内在 450 nm 处读取 D 值。以 D 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线。根据样品的 D 值可在标准曲线上查出其浓度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件,行非配对成组资料方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 血清炎症因子的表达水平 结果(表 1)表明:与正常对照组相比,膝关节炎急性感染组 24 h 血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度明显升高( $P < 0.01$ ),而 IL-6、IL-10 浓度无统计学差异。

2.2 膝关节滑膜组织炎症因子的表达 结果(表 1)表明:与正常对照组相比,膝关节炎急性感染组 24 h 滑膜组织的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  浓度明显升高( $P < 0.01$ ),而 IL-10 浓度无统计学差异。

表 1 血清炎症因子表达水平的比较

[ $n=8, \rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

组别	血清				滑膜组织			
	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$
正常对照	166.73 $\pm$ 8.12	240.02 $\pm$ 37.74	169.21 $\pm$ 30.71	159 $\pm$ 21.38	118.18 $\pm$ 19.67	123.77 $\pm$ 19.48	323.14 $\pm$ 46.06	166.92 $\pm$ 14.05
炎症模型	269.66 $\pm$ 36.66**	222.96 $\pm$ 50.32	171.36 $\pm$ 36.70	277.54 $\pm$ 27.20**	315.88 $\pm$ 97.42**	232.34 $\pm$ 31.93**	291.18 $\pm$ 51.90	334.83 $\pm$ 50.70**

\*\*  $P < 0.01$  与正常对照组比较

[收稿日期] 2010-02-08

[接受日期] 2010-03-29

[基金项目] 军队“十一五”计划面上项目(06MB223)。Supported by the Military “11<sup>th</sup> Five-Year” Plan (06MB223)。

[作者简介] 陈前波, 硕士生。E-mail: qianbo1984chen@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81885822, E-mail: yuan\_hongb@sina.com

### 3 讨论

急性炎症状态下,炎症局部组织产生大量炎性细胞因子,并伴随相关止痛物质的释放,诱发疼痛超敏状态<sup>[4]</sup>。细胞因子和多肽生长因子在关节软骨和滑膜正常结构和功能维持方面起着重要作用,也在关节炎的病理过程中对关节软骨和关节滑膜产生一定的破坏作用。

IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  是重要的促进炎症反应的细胞因子,而 IL-10 具有抑制炎症反应的作用。IL-1 为炎症起始因子之一,包括 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ,在刺激条件下,IL-1 $\beta$  mRNA 水平要高于 IL-1 $\alpha$ 。因此,本研究测定膝关节急性炎症期犬模型 24 h 血清和滑膜组织 IL-1 $\beta$  浓度。IL-6 可由淋巴样和非淋巴样细胞产生,其合成及分泌受到 IL-1、TNF- $\alpha$  的调节,是炎症起始阶段的重要始动因子,可诱导多种细胞合成和分泌多种急性期蛋白。IL-6 通过增强中性粒细胞的功能和延长中性粒细胞功能性生命期限而发挥其炎症促进作用<sup>[5]</sup>。TNF- $\alpha$  主要由单核细胞和巨噬细胞产生,能够促进中性粒细胞黏附到内皮细胞上,从而刺激机体局部炎症反应<sup>[6]</sup>。TNF- $\alpha$  在炎症时升高,与 IL-6 协同,共同促进炎症反应,其作用与组织中浓度有关:低水平 TNF- $\alpha$  在组织修复、炎症应答中起作用,对机体有利;高浓度 TNF- $\alpha$  则会引起炎症损害。过高浓度的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 可诱发全身性炎症反应综合征。本研究中测定膝关节急性炎症期犬模型中 24 h 血清及滑膜组织的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  浓度发现均升高,且滑膜组织中的浓度较血清高。

IL-10 可能通过降低抗原递呈细胞 MHC II 类抗原表达,或诱导抗原递呈细胞产生其他细胞因子,改变细胞内信号转导通路,从而选择性抑制某些细胞因子 mRNA 转录,抑制 TNF 等多种细胞因子合成。IL-10 通过促进单核细胞表达 IL-1 受体抑制炎症反应<sup>[7]</sup>。本研究发现 IL-10 在膝关节急性炎症期犬模型中 24 h 血清以及滑膜组织中的浓度降低,可能由于在急性炎症早期其抑制作用受到其他炎症因子的抑制作用。

脊髓小胶质细胞激活引起神经病理性疼痛的发生可能是由于脊髓胶质细胞的激活及随后胶质细胞释放的前炎症细胞因子引起的<sup>[8]</sup>。外周神经损伤后脊髓小胶质细胞变得非常活跃并且开始表达很多受体<sup>[9]</sup>,抑制这些受体表达可以减轻神经病理性疼痛<sup>[10]</sup>;被激活的小胶质细胞还可释放前炎症细胞因子,如 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,在膝关节急性感染期模型中滑膜组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  浓度较正常组明显升高,提示炎症因子可能参与了关节炎急性期关节痛的发生,但仍需进一步实验证明。

综上所述,在犬膝关节急性炎症模型早期,细胞因子间相互作用影响炎症的发生、发展,为临床治疗此类疾病寻找

新的治疗靶点提供了新线索。

### [参考文献]

- [1] Summer G J, Romero-Sandoval E A, Bogen O, Dina O A, Khasar S G, Levine J D. Proinflammatory cytokines mediating burn-injury pain[J]. *Pain*, 2008, 135(1-2): 98-107.
- [2] Yuan H B, He X Y, Xu H T, Zhu Q F, Wang Y H, Shi X Y. Expression of mu-opioid receptors in human chronic inflamed knee joint synovium tissue[J]. *J Med Coll PLA*, 2006, 21: 397-400.
- [3] 袁红斌,蒋京京,刘虎,田谋利,何星颖,宋哲明. 犬急性膝关节炎炎症期滑膜组织  $\mu$ -阿片受体的表达[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 77-79.  
Yuan H B, Jiang J J, Liu H, Tian M L, He X Y, Song Z M. Expression of  $\mu$ -opioid receptor in synovium tissue in acute inflamed knee joint of dogs[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 77-79.
- [4] Loria M P, Dambra P, Moretti B, Patella V, Capuzzimati L, Cavallo E, et al. Role of cytokines in gonarthrosis and knee prosthesis aseptic loosening[J]. *J Orthop Sci*, 2004, 9: 274-279.
- [5] Steensberg A, Fischer C P, Keller C, Møller K, Pedersen B K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285: E433-E437.
- [6] Bombini G, Canetti C, Rocha F A, Cunha F Q. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 496(1-3): 197-204.
- [7] Smeets R L, van de Loo F A, Joosten L A, Arntz O J, Bennink M B, Loesberg W A, et al. Effectiveness of the soluble form of the interleukin-1 receptor accessory protein as an inhibitor of interleukin-1 in collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48: 2949-2958.
- [8] Verge G M, Milligan E D, Maier S F, Watkins L R, Naeve G S, Foster A C. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20: 1150-1160.
- [9] Tanga F Y, Raghavendra V, DeLeo J A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain[J]. *Neurochem Int*, 2004, 45(2-3): 397-407.
- [10] Abbadi C, Lindia J A, Cumiskey A M, Peterson L B, Mudgett J S, Bayne E K, et al. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7947-7952.
- [11] Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system[J]. *J Biochem*, 2001, 130: 169-175.

[本文编辑] 贾泽军