

网络出版时间:2024-02-01 15:28:46 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1112.008

脂多糖干预后的不同滑膜细胞来源炎性外泌体 对软骨细胞的作用机制研究

周俊¹, 郭长青², 王庆甫¹

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.010

摘要 目的 观察脂多糖(LPS)诱导炎症后的不同滑膜细胞来源外泌体对软骨细胞的影响,探讨两种滑膜细胞外泌体在膝骨关节炎(KOA)疾病进展中引起软骨损伤的作用机制。方法 将两种滑膜细胞以1:4共培养并用LPS诱导炎症,提取上清液中外泌体,再分别提取正常及LPS诱导炎症后的两种滑膜细胞外泌体。将术中取得的人软骨组织分离培养成软骨细胞,分为五组:第Ⅰ组加入FLS外泌体;第Ⅱ组加入正常的FLS外泌体;第Ⅲ组加入两种滑膜细胞共培养后的外泌体;第Ⅳ组加入炎性的MLS外泌体;第Ⅴ组加入炎性的FLS外泌体。CCK-8检测各组软骨细胞活力。ELISA法检测各组软骨细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6水平。Western blot法检测各组软骨细胞中Toll样受体4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)、核因子 κ B抑制因子激酶(IkK)、核因子 κ B抑制蛋白(IkB)、金属肽酶含血小板反应蛋白基元5(ADAMTS5)的蛋白表达量。结果 CCK-8显示,与正常滑膜细胞来源外泌体相比,3组炎性外泌体均可使软骨细胞活力降低($P < 0.05$);ELISA检测显示Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组软骨细胞上清液中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平高于Ⅰ、Ⅱ组($P < 0.05$),Ⅲ组软骨细胞上清液中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平高于Ⅳ组而低于Ⅴ组($P < 0.05$)。Western blot显示Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组软骨细胞中TLR4、NF- κ B、IkK、IkB、ADAMTS5蛋白表达量高于Ⅰ、Ⅱ组($P < 0.05$),Ⅲ组软骨细胞中TLR4、NF- κ B、IkK、IkB、ADAMTS5蛋白表达量高于Ⅳ组而低于Ⅴ组($P < 0.05$)。结论 LPS诱导炎症后的两种滑膜细胞来源外泌体均可通过调控软骨TLRs/NF- κ B信号通路,引起软骨炎症。MLS外泌体致炎效果强于FLS外泌体,但两种共培养情况下的外泌体致炎效果弱于单纯MLS外泌体。

关键词 成纤维样滑膜细胞;巨噬样滑膜细胞;外泌体;TLRs/NF- κ B信号通路;膝骨关节炎;软骨细胞

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0243-06

2023-10-10 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81874475)

作者单位:¹ 北京中医药大学第三附属医院骨伤科,北京 100029

² 北京中医药大学针灸推拿学院,北京 100029

作者简介:周俊,男,博士研究生;

王庆甫,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: zj852333760@sina.com

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是由高龄、外伤、劳损、遗传、肥胖等因素引起的慢性无菌性炎症。基本的病理过程包括软骨降解和滑膜炎。滑膜炎可以出现于KOA病程的任意过程,且研究^[1]表明,滑膜炎常作为软骨炎症的前兆症状,并且与软骨退变、损伤、骨赘形成等临床症状多呈正相关^[2-3]。TLRs/NF- κ B信号通路介导的炎症反应与软骨细胞的坏死、凋亡关系密切^[4]。正常的膝关节滑膜组织由A型滑膜细胞(巨噬细胞样滑膜细胞, macrophage-like synoviocytes, MLS)、B型滑膜细胞(成纤维细胞样滑膜细胞, fibroblast-like synoviocytes, FLS)组成^[5]。外泌体(exosomes)是一种由细胞主动分泌到胞外的具有脂质双层膜结构的微小囊泡,其在细胞间信息交流、功能调控方面发挥巨大的作用^[6]。该研究拟通过离体实验观察炎症环境下不同滑膜细胞来源外泌体对于软骨细胞的影响,探讨不同细胞来源炎性外泌体干预软骨细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人成纤维样滑膜细胞系、巨噬样滑膜细胞系(上海ATCC细胞库);DMEM培养基、胎牛血清(美国Bio-Rad公司);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(美国Sigma公司);RYPsin 0.25%胰酶(美国Invitrogen公司);外泌体提取收集试剂盒(北京恩泽康泰公司);乌磷酸(美国Sigma公司);96孔细胞培养板(美国Corning公司);CCK-8试剂(南京诺唯赞公司);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 Elisa试剂盒(美国abcam公司);Toll样受体4(Toll-like receptor4, TLR4)、核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、核因子 κ B抑制因子激酶(inhibitor of kappa B kinase, IkK)、核因子 κ B抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, IkB)、金属肽酶含血小板反应蛋白基元5(a disintegrin and metallopro-

teinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5) 单克隆抗体(美国 abcam 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠抗体(美国 abcam 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 LPS 诱导滑膜细胞炎症 将冻存的两种滑膜细胞分别置于 37 ℃ 水浴箱中,不时摇动使其迅速融化后将细胞悬液转移至离心管中并利用离心机 1 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,加入适量含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素双抗的无外泌体 DMEM 培养基重悬后,分别转移至培养瓶中,置于 5% CO₂, 饱和湿度 90% 的 37 ℃ 恒温培养箱中培养。稳定传代至 3-4 代后,各取 2 瓶 FLS 和 MLS,加入新的含双抗无外泌体培养基后,在其中 1 瓶 FLS 及 MLS 中分别加入 5 μl LPS/PBS 溶液(1 μg/ml),另外两瓶滑膜细胞不做其余处理,干预 24 h 后收集两种细胞的上清液;将正常的 3-4 代 FLS 和 MLS 以 1:4 的比例接种于同一培养瓶中,加入含双抗无外泌体培养基,再加入 5 μl LPS/PBS 溶液(1 μg/ml)干预,模拟 KOA 环境,24 h 后收集细胞上清液,分别置于 -80 ℃ 冰箱中冻存,用于后续实验。

1.2.2 用尺寸排阻超滤法(SEC)提取细胞上清液中外泌体 将 Exosupur 柱固定在装置架上,使柱内温度与室温持平,打开柱子上下的封盖回收封柱液,将 15 ml 离心管置于柱子下方,从柱子顶部加入 PBS 进行冲洗,保持柱子湿润,冲洗完成后将细胞上清液从柱子顶部加入,收集底部流出液,前 1 500 μl 不用收集,之后收集的成分即为外泌体成分,将所得外泌体置于 -80 ℃ 下保存备用。

1.2.3 电镜观察两种细胞外泌体形态 将 10 μl 外泌体重悬液滴加在电镜的载样铜网上,室温下静置 5 min,用滤纸从侧方将多余的液体吸干,滴加 10 μl 4% 磷钨酸溶液于铜网上,室温负染 5 min。滤纸吸干负染液,白炽灯下烤干后,于透射电子显微镜下观察并在 80 kV 下成像。

1.2.4 软骨细胞提取与培养 软骨组织取自于北京中医药大学第三附属医院行全膝关节置换术的膝关节炎患者,患者对实验过程完全知情并签署知情同意书,收集术中取出的废弃软骨组织并立即送至实验室进行细胞提取。该研究已通过北京中医药大学第三附属医院伦理委员会审查(伦理号 BZYSY-2019KYKTPJ-26)。

将术中取得的软骨组织用含 1% 双抗的 PBS 漂洗 3 次,用眼科手术剪将附着软骨块的软组织剪除,再剪为 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的碎片,加入约 10

倍体积的 0.2% II 型胶原酶,使软骨碎片悬浮,放入 5% CO₂, 饱和湿度 90% 的 37 ℃ 恒温培养箱中过夜,用 70 μm 细胞过滤网过滤后,1 000 r/min 离心 5 min,获得软骨细胞。将细胞接种于培养瓶中,加入含双抗无外泌体培养基,置于培养箱中培养,选取第 3-4 代细胞用于后续实验。

1.2.5 炎性滑膜细胞外泌体干预软骨细胞 取 3-4 代软骨细胞,分别置于 5 个培养瓶中,并标记 I-V。在 5 组培养瓶中分别等量加入含双抗无外泌体培养基。将 1.2.2 中所得各组外泌体用生理盐水制备成混悬液(浓度为 1 × 10⁷/ml)。第 I、II 组软骨细胞中分别加入正常的 MLS 和 FLS 外泌体,第 III 组加入 2 种细胞共培养的炎性外泌体,第 IV、V 组加入分别加入炎性的 MLS 和 FLS 外泌体。各组干预 24 h 后,光镜下观察各组软骨细胞形态。分别收集各组软骨细胞及上清液并置于 -80 ℃ 冰箱中冻存,用于后续实验研究。

1.2.6 CCK-8 法检测各组软骨细胞活力 取 3-4 代软骨细胞,计数,用培养基使软骨细胞悬浮,调整细胞浓度 1 × 10⁵ 个/ml,接种于 96 孔板,各孔加 0.1 ml 细胞悬液,分为 5 组,分别加入对应的外泌体混悬液:第 I、II 组软骨细胞中分别加入正常的 MLS 和 FLS 外泌体,第 III 组加入两种细胞共培养的炎性外泌体,第 IV、V 组加入分别加入炎性的 MLS 和 FLS 外泌体。放入恒温培养箱中过夜,用倒置相差显微镜观察各组软骨细胞形态。向每组孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,放入恒温孵育箱中再次孵育 3 h 后使用酶联免疫检测仪在 450 nm 双波长处测得相应吸光度值(absorbance, A)。

1.2.7 ELISA 法检测各组软骨细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平 将各组软骨细胞上清液室温解冻摇匀后,ELISA 法检测其中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平,按照试剂盒操作步骤执行,每个指标设置 3 个复孔。

1.2.8 Western blot 法检测软骨细胞中 TLR4、NF-κB、IκK、IκB、ADAMTS5 蛋白的表达 收集各组软骨细胞,用 PBS 洗涤细胞沉淀 3 次,1 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清液后加入 0.2 ml 的蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂混合液;4 ℃ 低温离心机 12 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液置于新 EP 管中,标记分组。用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定,取适量蛋白进行电泳,电泳完成后进行电转,将目标蛋白转移至 PVDF 膜上,室温下将膜完全浸没在 3% BSA-TBST 中轻摇 30 min。用 3% BSA-TBST 稀释(1:

1 000)一抗,参照 TLR4、NF- κ B、IkK、IkB、ADAMTS5 及内参 β -actin 等抗体说明书进行一抗标记, TBST 清洗 4 次后,加入 3% BSA-TBST 稀释(1:1 000)后的二抗室温孵育 1 h,最后加入 ECL 试剂后显影。

1.3 统计学处理 计量资料符合正态分布检验和齐性检验,采用 t 检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若有一项不符合,则采用非参数统计中的多个独立样本秩和检验进行统计处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电镜下观察两种滑膜细胞外泌体形态 电镜下可见两种外泌体均为颗粒直径为 30 ~ 150 nm 范围内的圆形或椭圆形膜性微囊泡结构,内含有致密的云状物质,为外泌体内容物。

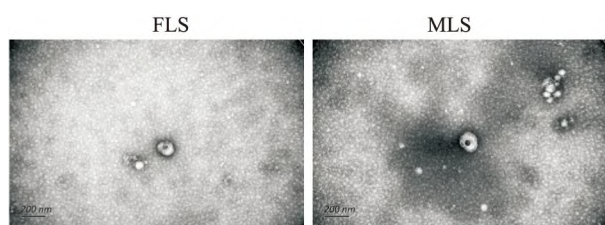


图1 电镜下观察两种滑膜细胞外泌体形态 $\times 500$

2.2 各组软骨细胞的生长形态 显微镜下观察正

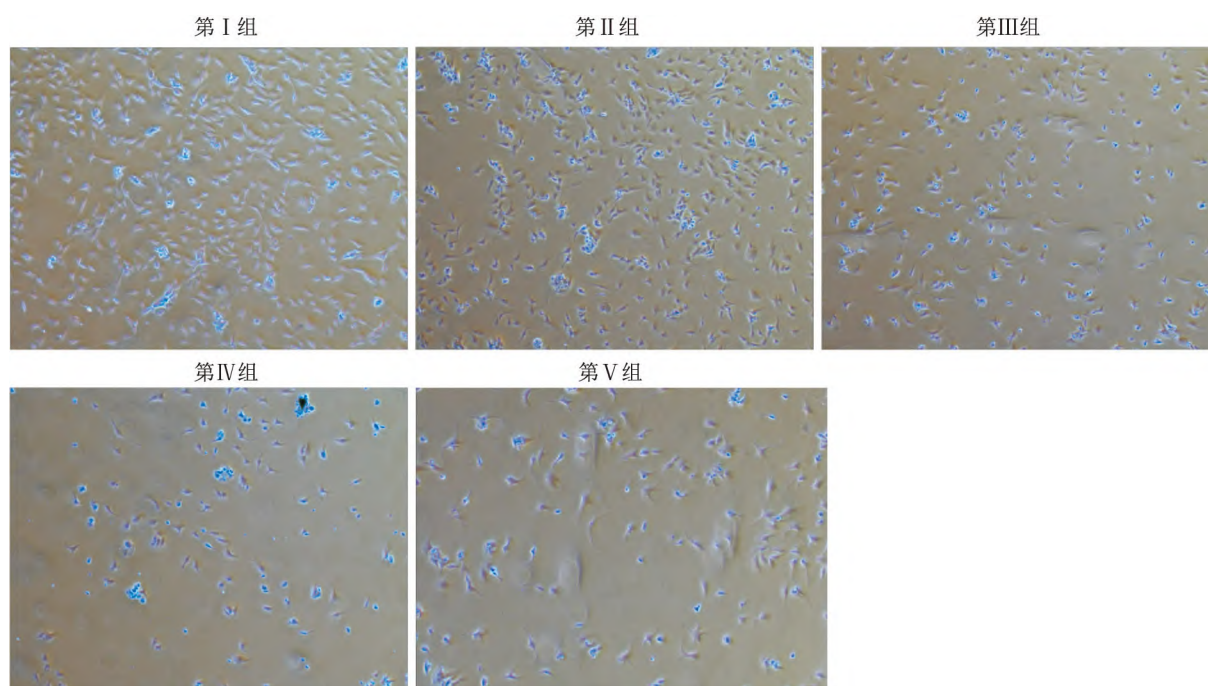


图2 各组软骨细胞生长形态 $\times 10$

常外泌体干预的两组软骨细胞多为圆形、椭圆形及短梭形,贴壁生长,与未经干预的正常软骨细胞形态基本相似;炎性外泌体干预的三组软骨细胞形态出现不规则型,有较多的悬浮坏死细胞,细胞密度低于另外两组。见图 2。

2.3 各组软骨细胞 A 值 Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组软骨细胞活力低于 I、Ⅱ组($P < 0.05$)。I、Ⅱ组细胞活力几乎没有差异。Ⅳ组细胞活力最低,Ⅲ组细胞活力高于Ⅳ组但低于Ⅴ组($P < 0.05$)。见表 1。

表1 各组软骨细胞 A 值($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	干预方式	A 值
I	正常 A 细胞外泌体	1.97 ± 0.35
II	正常 B 细胞外泌体	1.95 ± 0.32
III	炎性 AB 细胞共培养外泌体	$0.85 \pm 0.12^{* \# \Delta}$
IV	炎性 A 细胞外泌体	$0.63 \pm 0.09^{*}$
V	炎性 B 细胞外泌体	$1.02 \pm 0.19^{*}$

与 I、Ⅱ组比较: $^{*} P < 0.05$; 与Ⅳ组比较: $^{*} P < 0.05$; 与Ⅴ组比较: $^{\Delta} P < 0.05$

2.4 各组软骨细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 I、Ⅱ两组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平没有差异; Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平高于 I、Ⅱ两组($P < 0.05$); Ⅲ组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平高于Ⅳ组($P < 0.05$),但低于Ⅴ组($P < 0.05$)。见表 2。

2.5 各组软骨细胞中 TLR4、NF- κ B、IkK、IkB、

表2 Elisa 法检测各组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平($n=5$, ng/L, $\bar{x} \pm s$)

分组	TNF- α	IL-1 β	IL-6
I	52.11 $\pm$ 2.73	51.33 $\pm$ 1.72	50.34 $\pm$ 2.21
II	51.47 $\pm$ 2.14	52.21 $\pm$ 2.05	51.22 $\pm$ 2.17
III	87.36 $\pm$ 3.19 * Δ	89.44 $\pm$ 3.59 * Δ	85.23 $\pm$ 3.33 * Δ
IV	84.13 $\pm$ 2.94 *	86.14 $\pm$ 3.21 *	81.14 $\pm$ 2.39 *
V	91.22 $\pm$ 3.09 *	93.35 $\pm$ 3.13 *	95.45 $\pm$ 3.04 *

与 I、II 组比较: * $P < 0.05$; 与 IV 组比较: # $P < 0.05$; 与 V 组比较: $\Delta P < 0.05$

ADAMTS5 的表达量 I、II 两组软骨细胞 TLR4、NF- κ B、I κ K、I κ B、ADAMTS5 的蛋白表达量没有差异; III、IV、V 组软骨细胞 TLR4、NF- κ B、I κ K、I κ B、ADAMTS5 的蛋白表达量高于 I、II 两组 ($P < 0.05$); III 组软骨细胞 TLR4、NF- κ B、I κ K、I κ B、ADAMTS5 的蛋白表达量高于 IV 组 ($P < 0.05$), 但低于 V 组 ($P < 0.05$)。见图 3、表 3。

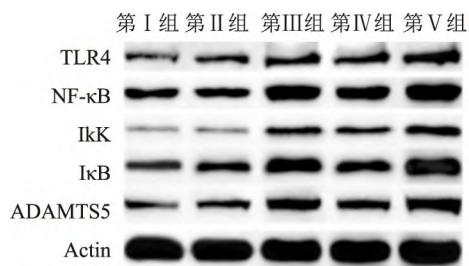


图3 Western blot 检测各组软骨细胞 TLRs/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达印迹图

3 讨论

KOA 是一种以滑膜炎症、软骨退变为主要病理变化的退行性疾病^[6-10]。滑膜炎症导致滑膜细胞释放的炎症因子和基质蛋白酶是诱发软骨炎症、加重软骨损伤的重要因素^[11]。人体膝关节滑膜组织主要由 MLS 和 FLS 两种细胞组成。MLS 是来源于骨髓的巨噬细胞通过循环系统迁徙至滑膜下层, 约占滑膜细胞总数的约 20%, 它可以吞噬关节腔内碎

屑、异物并释放 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等细胞因子。FLS 占滑膜细胞总数的约 80%, 它具有分泌透明质酸, 合成胶原蛋白及分泌产生基质蛋白酶的功 能^[12]。外泌体携带有来自细胞的蛋白、脂质及核酸等物质。在细胞间信息交流和细胞功能调控方面发挥着重要作用^[13]。不同细胞来源的外泌体具备不同的特点和功能。观察不同滑膜细胞来源的外泌体在炎症过程中的特点和功能差异, 有助于进一步研究 KOA 的病理过程 and 治疗方法。TLRs/NF- κ B 信号通路可以调节膝关节滑膜及软骨细胞产生免疫和炎症反应。一般状态下, NF- κ B 与 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)结合成二聚体结构而处于活性抑制状态。在 KOA 中, 由于软骨损伤或退化产生体内损伤相关分子模式(DAMPs)和炎症因子, Toll 样受体是一类重要的模式识别受体(如 TLR2、TLR4 等), 其可通过识别 DAMPs 而激活, 并使得 I κ K 活化, 该激酶可以激活 I κ B, 使其从二聚体上解离, 激活 NF- κ B 信号通路。产生 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等下游因子, 引起滑膜和软骨炎症, 同时产生 MMP-13 和 ADAMTs 等可以使软骨外基质降解, 导致软骨细胞坏死^[14]。

本研究中三组炎性外泌体干预后的软骨细胞均出现了细胞变形, 悬浮, 坏死的情况。说明炎性滑膜细胞外泌体可以影响软骨细胞活力。用 CCK-8 法观察各组软骨细胞活力, 三组炎性外泌体干预组的软骨细胞活力比正常外泌体干预后的软骨细胞差, 两种滑膜细胞共培养后的炎性外泌体干预后的软骨细胞活力高于炎性 FLS 外泌体而低于炎性 MLS 外泌体。ELISA 法和 Western blot 法检测结果亦显示三组炎性外泌体组均可激活软骨细胞中 TLRs/NF- κ B 信号通路并产生炎症因子, 其中两种滑膜细胞共培养后的炎性外泌体致炎效果强于 FLS 外泌体而弱于 MLS 外泌体。在 KOA 中两种滑膜细胞均会产生炎症因子, 其中 FLS 还会一些抗炎因子如前列腺素和血管内皮生长因子等, 同时巨噬细胞可以根据微环境的变化由具有促炎作用的 M1 型转化为具有

表3 各组软骨细胞中相关蛋白表达量与 actin 比值

分组	TLR4/actin	NF- κ B/actin	I κ K/actin	I κ B/actin	ADAMTS5/actin
I	0.53 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.04
II	0.56 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.02
III	0.77 $\pm$ 0.12 * Δ	0.86 $\pm$ 0.11 * Δ	0.76 $\pm$ 0.07 * Δ	0.81 $\pm$ 0.11 * Δ	0.81 $\pm$ 0.08 * Δ
IV	0.72 $\pm$ 0.04 *	0.83 $\pm$ 0.12 *	0.71 $\pm$ 0.13 *	0.77 $\pm$ 0.14 *	0.71 $\pm$ 0.12 *
V	0.96 $\pm$ 0.23 *	1.05 $\pm$ 0.34 *	0.89 $\pm$ 0.21 *	1.03 $\pm$ 0.25 *	0.98 $\pm$ 0.21 *

与 I、II 组比较: * $P < 0.05$; 与 IV 组比较: # $P < 0.05$; 与 V 组比较: $\Delta P < 0.05$

生抗炎和组织修复作用的 M2 型^[15]。有研究^[16-17]通过成纤维细胞与巨噬细胞体外共培养,显示巨噬细胞的促炎因子释放得到抑制,这可能是由于成纤维细胞体表的 CD14⁺ 蛋白的中和作用导致的。在本实验中,两种细胞共培养后 MLS 外泌体的致炎作用得到一定抑制,可能由于 FLS 外泌体对于 MLS 的炎症因子释放和 M1、M2 两种亚型的转变有一定的调控作用,有待进一步的实验验证。总之在 KOA 的炎症过程,两种细胞之间既可以相互促进炎症释放,又可互相抑制其致炎作用,处于促炎与抗炎的动态平衡中,而外泌体在两种细胞的信息交流中发挥了重要作用。

综上所述,在 KOA 疾病进展过程中,两种滑膜细胞来源外泌体均可通过调控软骨 TLRs/NF- κ B 信号通路,促进软骨细胞外基质降解,加重软骨退变。两种细胞通过其外泌体进行细胞间信号交流,既可以相互促进又会抑制致炎效果。本实验为 KOA 的机制研究和临床用药开发提供了新的途径和思路。

参考文献

- [1] Primorac D, Molnar V, Rod E, et al. Knee osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(8):854.
- [2] Sharma L. Osteoarthritis of the knee[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(1): 51-9.
- [3] Zhang Z, Huang C, Jiang Q, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of osteoarthritis in China (2019 edition) [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(19): 1213.
- [4] 吴文哲, 付长秀, 黄李晨露, 等. 外泌体通过 NF- κ B 信号通路调节骨关节炎的炎症反应[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(22): 2689-94, 2699.
- [5] 叶小康, 白自然, 金敏丽, 等. 滑膜细胞在骨关节炎中的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2021, 48(11): 1282-9.
- [6] Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential[J]. *Cell Biosci*, 2019, 9(1): 19.
- [7] Huskisson E C. Modern management of mild-to-moderate joint pain due to osteoarthritis: a holistic approach[J]. *J Int Med Res*, 2010, 38(4): 1175-212.
- [8] Cross M, Emma S, Damian H, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(7): 1323-30.
- [9] Pas H I, Marinus W, Hidde J H, et al. Stem cell injections in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature[J]. *Br J Sports Med*, 2017, 51(15): 1125-33.
- [10] Miller R E, Scanzello C R, Malfait A M. An emerging role for Toll-like receptors at the neuroimmune interface in osteoarthritis[J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(5): 583-94.
- [11] 颜春鲁, 安方玉, 汪永锋, 等. 右归丸对膝骨关节炎模型鼠软骨组织凋亡和基质降解调控基因表达的影响[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2020, 13(1): 41-8.
- [12] 易南星, 梁倩倩, 张伟强, 等. 骨性关节炎相关滑膜炎研究进展[J]. *昆明医科大学学报*, 2019, 40(3): 136-9.
- [13] 李双双, 杜春阳, 袁媛, 等. 不同细胞来源的外泌体的特点和功能[J]. *国际药学研究杂志*, 2019, 46(6): 411-7.
- [14] 吴剑, 张栢, 陈沼飞, 等. AGEs 调节 NF- κ B 通路对软骨细胞炎症因子 IL-1 β 的影响[J]. *四川医学*, 2021, 42(11): 1077-81.
- [15] Jakubczik C, Gautier E L, Gibbins S L, et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes[J]. *Immunity*, 2013, 39(3): 599-610.
- [16] Chomarat P, Rissoan M C, Pin J J, et al. Contribution of IL-1, CD14, and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions [J]. *J Immunol*, 1995, 155(7): 3645-52.
- [17] Liu B, Zhang M, Zhao J, et al. Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 5009-14.

Study on the mechanism of action of different synovial cell-derived inflammatory exosomes on chondrocytes after lipopolysaccharide intervention

Zhou Jun¹, Guo Changqing², Wang Qingfu¹

(¹Dept of Orthopedics and Traumatology, The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; ²College of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029)

Abstract Objective To observe the effect of different synovial cell secretions on chondrocytes after LPS-induced inflammation, and to explore the mechanism of two synovial cell secretions causing cartilage damage in the progression of KOA disease. **Methods** Two kinds of synovial cells were co-cultured at 1 : 4 and LPS-induced inflamma-

HMGB1 基因敲除通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路 减轻脓毒症小鼠急性肺损伤

张志斌,李瑞彤,郑卫伟,林雪容,牛宁宁,王 慧,苑 萌,韩树池,薛乾隆

摘要 目的 研究高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 基因敲除减轻脓毒症小鼠急性肺损伤及抑制 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子- κ B (NF- κ B) 通路的作用。**方法** 野生型 (WT) 小鼠分为 WT-Sham 组和 WT-模型组, HMGB1 基因敲除 (KO) 小鼠分为 KO-Sham 组和 KO-模型组。WT-模型组和 KO-模型组采用盲肠结扎穿孔术制备脓毒症 ALI 模型, WT-Sham 组和 KO-Sham 组进行假手术操作。造模后 24 h, 检测动脉血氧分压 (PaO₂), 计算氧合指数 (OI), 检测肺组织病理改变, 计算肺损伤评分, 检测血清及肺组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、活性氧簇 (ROS)、丙二醛

(MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的浓度, 肺组织中 HMGB1、TLR4、核 NF- κ B 的表达。**结果** WT-模型组的 PaO₂、OI、血清及肺组织 SOD 的浓度低于 WT-Sham 组, 肺损伤评分、血清及肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ROS、MDA 的浓度、肺组织中 HMGB1、TLR4、核 NF- κ B 的表达水平高于 WT-Sham 组 ($P < 0.05$); KO-模型组肺组织中不表达 HMGB1, PaO₂、OI、血清及肺组织 SOD 的浓度高于 WT-模型组, 肺损伤评分、血清及肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ROS、MDA 的浓度、肺组织中 TLR4、核 NF- κ B 的表达水平低于 WT-模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 敲除 HMGB1 减轻脓毒症小鼠 ALI, 相关的分子机制可能是抑制 TLR4/NF- κ B 通路介导的炎症反应和氧化应激反应。

关键词 脓毒症; 急性肺损伤; 高迁移率族蛋白 B1; Toll 样受体 4; 核因子- κ B

中图分类号 R 631

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0248-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.011

2023-11-12 接收

基金项目: 2023 年度河北省卫生健康委科研基金项目 (编号: 20231452)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院急诊科, 张家口 075000

作者简介: 张志斌, 男, 主治医师;

薛乾隆, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: 4641614@qq.

com

tion. The supernatant and exocrine were extracted, and then the normal and LPS-induced inflammation were extracted. The human cartilage tissue obtained during the operation was isolated and cultured into chondrocytes, which were divided into five groups: the first group was added with FLS secretion, the second group was added with normal FLS secretion, the third group was added with secretion after co-culture of two kinds of synovial cells, the fourth group was added with inflammatory MLS secretion, and the fifth group was added with inflammatory FLS secretion. CCK-8 was used to detect the viability of chondrocytes in each group. TNF- α , IL-1 β , IL-6 level in the supernatant of chondrocytes in each group was detected by ELISA. The protein expression of TLR4, NF- κ B, IkK, IkB, ADAMTS5 in chondrocytes of each group was detected by Western blot method. **Results** CCK-8 showed that the activity of chondrocytes in the three groups of inflammatory secretions decreased compared with the secretions from normal synovial cells ($P < 0.05$); ELISA showed TNF- α , IL-1 β , IL-6 level in the supernatant of group III, IV and V was higher than that of group I and II ($P < 0.05$), TNF- α , IL-1 β , IL-6 level in group III was higher than that in group IV but lower than that in group V ($P < 0.05$). Western blot showed the protein expression of TLR4, NF- κ B, IkK, IkB, ADAMTS5 in chondrocytes of group III, IV and V was higher than that in group I and II ($P < 0.05$), the protein expression of TLR4, NF- κ B, IkK, IkB, ADAMTS5 in group III was higher than that in group IV but lower than that in group V ($P < 0.05$). **Conclusion** Two kinds of synovial cell-derived secretions after LPS-induced inflammation can regulate cartilage TLRs/NF- κ B signal pathway, causing cartilage inflammation. The inflammatory effect of MLS secretion is stronger than that of FLS secretion, but the inflammatory effect of MLS secretion under two co-cultures is weaker than that of MLS secretion alone.

Key words fibroblast-like synoviocytes; macrophage-like synoviocytes; exosomes; TLRs/NF- κ B signal pathway; knee osteoarthritis; chondrocytes