

文章编号:1004-7220(2014)03-0276-05

TNF- α 、IL-1 β 通过 PKA 通路诱导成纤维样滑膜细胞中力生长因子表达

黄杨河, 罗自维, 李海滨, 吴双迟, 吕永钢, 刘万钱, 钟莉, 杨力
(重庆大学 生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 国家“111 计划”基地, 重庆 400044)

摘要: **目的** 探讨炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 对力生长因子 (mechano growth factor, MGF) 表达的影响。**方法** 实验组细胞用浓度为 25、50、100 ng/mL 的 TNF- α 、IL-6 或者是 2.5、5.0、10 ng/mL 的 IL-1 β 处理 12 h, 抑制剂组在因子处理前用 1.0 mmol KT5720 预处理 1 h, 然后添加炎症因子刺激 12 h, 对照组细胞保持与实验组培养条件一致的情况下不添加因子刺激。因子刺激后, 用定量 PCR 方法检测细胞中 MGF 表达量。**结果** 25 ng/mL TNF- α 和 10 ng/mL IL-1 β 因子刺激滑膜成纤维细胞诱导 MGF 表达显著增加 ($P < 0.05$)。IL-6 对 MGF 表达无影响。1.0 mmol PKA 通路抑制剂 KT5720 处理显著降低 TNF- α 和 IL-1 β 诱导的 MGF 表达 ($P < 0.05$)。**结论** 炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 在浓度分别为 25 和 10 ng/mL 时能显著诱导滑膜成纤维细胞中 MGF 表达, 其表达是通过 PKA 通路介导的。本研究对于促进 MGF 用于改善膝关节相关组织修复中的应力刺激不足有一定的现实意义。

关键词: 力生长因子; 成纤维样滑膜细胞; 应力刺激

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

TNF- α , IL-1 β induce mechano growth factor expression in human fibroblast-like synoviocytes through the PKA pathway

HUANG Yang-he, LUO Zi-wei, LI Hai-bin, WU Shuang-chi, LÜ Yong-gang, LIU Wan-qian, ZHONG Li, YANG-Li (Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, "111" Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract; Objective To investigate the effects of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 on expression of mechano growth factor (MGF). **Methods** In the experimental group, TNF- α and IL-6 at concentration of 25, 50, 100 ng/mL, or IL-1 β at concentration of 2.5, 5.0, 10 ng/mL were applied to fibroblast-like synoviocytes (FLSs) for 12 hours. The inhibitor groups were pretreated with PKA pathway inhibitor KT5720 at concentration of 1.0 mmol for 1 hour. The control group remained under the same culture condition as the experimental group, but without any growth factor. Real-time PCR was used to measure the gene expression of MGF. **Results** Treated with TNF- α at concentration of 25 ng/mL and IL-1 β at concentration of 10 ng/mL, the MGF expression in FLSs was significantly increased ($P < 0.05$). IL-6 had no effect on MGF expression. A specific inhibitor of cAMP-dependent protein kinase, at concentration of 1.0 mmol significantly decreased the activation of MGF synthesis by TNF- α and IL-1 β in FLSs ($P < 0.05$). **Conclusions** TNF- α at concentration of 25 ng/mL and IL-1 β at concentration of 10 ng/mL significantly induce the MGF expression in FLSs, which activate MGF synthesis via the PKA pathway. This study is of significance in improving the application of MGF used in tissue repair area to make up the insufficient stress stimulation.

Key words: Mechano growth factor (MGF); Fibroblast-like synoviocytes (FLSs); Stress stimulation

收稿日期:2013-02-27; 修回日期:2013-03-28

基金项目:高等学校学科创新引智计划(国家“111 计划”)(B06023), 国家自然科学基金资助项目(11032012,31270990), 新世纪优秀人才支持计划(NCET-10-0879), 重庆大学大型仪器设备开放基金。

通信作者:杨力, 教授, E-mail: yanglibme@cqu.edu.cn; 吕永钢, 教授, E-mail: yglv@cqu.edu.cn。

在骨骼肌和肝脏中主要表达的胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 的全长基因含 6 个外显子, 转录翻译生成 IGF-1^[1]。但当其受到刺激时可在外显子 4 到 6 间产生两种不同剪接变体形式, IGF-1 Ea 或 IGF-1 Ec (啮齿动物中称为 IGF-1 Eb), 后者 c 端包含有外显子 4、6 以及二者间插入的长度为 49 bp 的外显子 5 的部分序列 (啮齿动物中为 52 bp)。与 IGF-1Ea 相比, 该剪接形式产生了开放阅读框的改变。这种剪接变体在啮齿动物中称为 IGF-1Eb, 在人当中称为 IGF-1Ec, 并且在肝脏和肌肉中都能检测到这种形式的变体。IGF-1Ec 在响应肌肉损伤和机械刺激时显著增加, 这引起了肌肉领域专家的兴趣^[2-3], 在肌肉经历 2.5 h 高强度拉伸运动后, 骨骼肌中 IGF-1Ec 的水平上升了 4~8 倍^[4], 故 IGF-1Ec 也称为力生长因子 (mechano growth factor, MGF)。

目前尚不清楚诱导 MGF 合成的机制。机械载荷^[5-6]和骨骼肌匀浆液^[7]均能诱导成肌细胞 MGF 的表达。机械拉伸也能刺激肌腱细胞中 MGF 的合成^[8]。IGF-1 的经典诱导激素生长激素激活成肌细胞系 C2C12 中 MGF 的合成^[9]。培养液的过热和酸化等细胞应激因子也能刺激初级成肌细胞和分化的多核肌管细胞表达 MGF^[10]。然而胞内激活 MGF 表达的信号转导通路鲜有报道。Kravchenko 等^[11]报道了胞内第 2 信使 cAMP 在大鼠和人的成肌细胞和肌管细胞中诱导 MGF 的合成, cAMP 的诱导作用与蛋白激酶 A (PKA) 通路相关, 但与 Epac 蛋白无关。较早前有文献报道 TNF 和 IL-1 提高了人成纤维细胞中 cAMP 水平。在组织损伤后, 组织内 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平显著增高^[12]。本研究认为, 组织损伤后的炎症响应能激活 MGF 的表达, 而且可能是通过 PKA 通路实现的; 因此, 本研究采用炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 刺激正常的人成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLSs), 并采用 PKA 通路的抑制剂 KT5720 预处理细胞, 然后用炎症因子刺激细胞, 用实时定量 PCR 方法检测 MGF mRNA 水平, 以探讨炎症因子与 MGF 表达的关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM (Gibco BRL 公司, 美国); 优质胎牛血清

(天津 TBD 生物有限公司); 青霉素和链霉素 (华北制药公司); 胰蛋白酶 (Gibco BRL 公司, 美国); DM-SO (Sigma 公司, 美国); RNA 提取试剂盒 (百泰克, 中国); 反转录试剂盒 (Thermoscientific 公司, 美国); CO₂ 恒温培养箱 (Bio-Rad, 美国); TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 (Peprotech 公司, 美国); SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 美国)。

1.2 细胞培养

滑膜组织来源于重庆医科大学附属第一医院及西南医院因外伤行下肢截肢治疗患者的正常膝关节。组织获取经医院伦理委员会批准, 患者签署知情同意书。FLSs 的获取方法参考文献^[13]。在无菌条件下, 取出截肢病患正常的滑膜组织 ($n = 4$), 用含 1 500 U 双抗的 10 mmol/L PBS 多次冲洗, 冲洗后在含 300 U 双抗的 PBS 中以解剖剪剔除组织多余的脂肪和结缔组织, 然后用眼科剪将滑膜组织剪成 2 mm \times 2 mm \times 2 mm 大小的组织块, 随后将滑膜组织块以适当的间距放入 25 mm² 培养瓶中, 并加入含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、4 mmol/L L-谷氨酸、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液。静置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的孵箱中培养, 每 3 d 更换 1 次培养液。待组织块周围长满细胞, 将组织块以相同方法移入新的培养瓶中继续培养, 原培养瓶中的细胞让其继续生长, 当原代培养的细胞长至 90% 融合时, 以 0.25% 的胰蛋白酶消化进行原代培养。取 4~7 代稳定的传代细胞用于实验。多余细胞用 DMSO 冻存, 置于液氮中保存备用。

1.3 因子处理

将生长于 75 cm² 培养瓶中的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 2×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板中, 置于培养箱内培养 48~72 h。待细胞贴壁生长至 80% 融合后, 换成 FBS 体积分数为 2% 的 DMEM 培养液继续培养 12 h, 使各组细胞状态达到同步。然后在 FBS 体积分数为 1% 的培养液中分别加入 TNF- α 、IL-6 (25、50、100 ng/mL), IL-1 β (2.5、5、10 ng/mL) 处理细胞, 12 h 后用 RNA 提取试剂盒裂液裂解细胞并提取 RNA。或者用 PKA 通路抑制剂 KT5720 1.0 mmol 预处理 1 h, 然后加入因子刺激 12 h, 提取细胞总 RNA。

1.4 细胞总 RNA 提取, 反转录及荧光定量分析

使用百泰克公司高纯总 RNA 快速提取试剂盒

(离心柱型)进行RNA提取,提取步骤根据试剂盒说明书进行。不同实验条件下的细胞总RNA按照微量分光光度计测定的统一量(500 ng),使用 Thermo Scientific 公司 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 在 42 °C 下反转录 60 min。反转录结束后,以相应量的 cDNA 为模板进行 GAPDH 和 MGF 基因的定量 PCR 反应。每个反应进行 3 个技术重复。不同实验条件实验重复 3 次以上。GAPDH 和 MGF 基因的引物序列由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物序列见表 1。每个反应加入 1 μ L cDNA 作为模板进行定量 PCR 扩增,扩增条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s 共 40 个循环,在循环完成后进行 65 ~ 95 °C 的溶解曲线分析,以确定产物的特异性。

表 1 qPCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences for qPCR

基因	引物序列
GAPDH	上游: GAAGGTGAAGGTCGGACTC
	下游: GAAGATGCTGATGGGATTTTC
MGF ^[4]	上游: CGAAGTCTCAGAGAAGGAAAGG
	下游: ACAGGTAACCTCGTCAGAGC

1.5 统计学分析

实验结果以均数 \pm 标准差表示,采用 Origin Pro 8.0 统计分析软件的单因素方差过程分析数据,检测各组之间是否存在差异, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 TNF- α 、IL-1 β 诱导 FLSs 中 MGF 表达

分别用 25、50、100 ng/mL 浓度的 TNF- α 和 2.5、5、10 ng/mL 的 IL-1 β 处理 FLSs,以未处理组作为对照。12 h 后收集细胞 RNA 进行反转录,用定量 PCR 方法检测 MGF mRNA 水平,结果如图 1、2 所示。TNF- α 处理 12 h 后, MGF 的表达较对照组分别显著增加 (2.46 ± 0.66)、(2.20 ± 0.47)、(2.86 ± 0.67) 倍 ($n = 3, P < 0.05$), 因子处理组间没有显著差异。IL-1 β 处理 12 h 后, MGF 表达量分别为对照组 (0.91 ± 0.26)、(1.67 ± 0.77)、(2.68 ± 0.51) 倍 ($P < 0.05$), 当浓度达到 10 ng/mL 时, MGF 的表达量才显著增加 2.68 倍 ($n = 4, P < 0.05$)。

2.2 IL-6 因子处理对 FLSs 中 MGF 表达无影响

分别用 25、50、100 ng/mL 的 IL-6 因子处理 FLSs,以无因子处理组作为对照组,于 12 h 后提取细胞 RNA 并反转录,定量 PCR 法检测 MGF 表达,实验结果如图 3 所示。

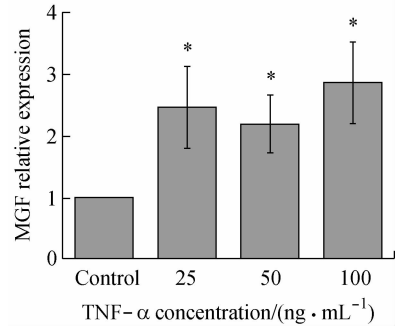


图 1 TNF- α 诱导 FLSs 中 MGF 表达 (* $P < 0.05$)

Fig. 1 TNF- α induces MGF expression in FLSs

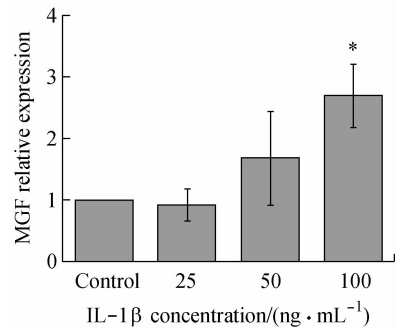


图 2 IL-1 β 诱导 FLSs 中 MGF 表达 (* $P < 0.05$)

Fig. 2 IL-1 β induces MGF expression in FLSs

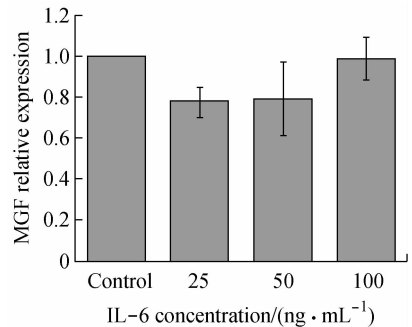


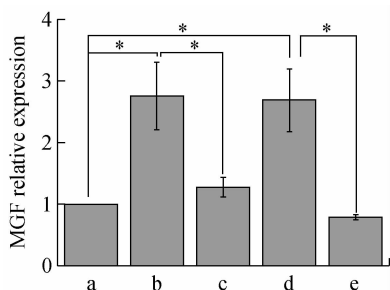
图 3 IL-6 对 FLSs 中 MGF 表达无影响

Fig. 3 IL-6 had no effect on MGF expression in FLSs

因子处理后 FLSs 中 MGF 的水平分别为对照组的 (0.78 ± 0.07)、(0.79 ± 0.18)、(0.99 ± 0.10) 倍, 各组之间均无统计学差异, 表明 IL-6 因子处理对 FLSs 中 MGF 的表达没有影响。

2.3 抑制 PKA 通路抑制 TNF- α 、IL-1 β 诱导的 MGF 表达

实验分为无因子处理对照组、TNF- α 100 ng/mL 组、TNF- α + KT5720 组 (1.0 mmol KT5720 预处理 1 h, 1.0 mmol KT5720 + TNF- α 100 ng/mL 处理 12 h)、IL-1 β 10 ng/mL 组、IL-1 β + KT5720 组 (1.0 mmol KT5720 预处理 1 h, 1.0 mmol KT5720 + IL-1 β 10 ng/mL 处理 12 h)。提取各实验组细胞 RNA, 反转录, 定量 PCR 法测定 MGF 表达, 实验结果如图 4 所示。各处理组 MGF 表达量与对照组的比值为 2.75 ± 0.55 、 1.27 ± 0.15 、 2.68 ± 0.51 、 0.78 ± 0.03 。从实验结果可以看出, PKA 通路特异性抑制剂 KT5720 预处理显著降低了 TNF- α 、IL-1 β 诱导的 MGF 表达 ($n=3, P < 0.05$)。



a: 对照组, b: TNF- α 100 ng/mL 组, c: TNF- α + KT5720 组;
d: IL-1 β 10 ng/mL 组, e: IL-1 β + KT5720 组

图 4 PKA 通路抑制剂对 TNF- α 、IL-1 β 诱导的 MGF 表达的影响

Fig. 4 Effects of protein kinase A inhibitor on TNF- α 、IL-1 β induced stimulation of MGF expression

3 讨论

MGF 是 IGF-1 的一个剪接变体, 该因子在机体组织受到应力刺激之后产生。研究发现, MGF 的主要功能是激活肌肉卫星细胞的活化, 促进肌肉肥大以及对神经元的保护作用, 同时还能弱化心肌梗塞改善心脏功能^[14-16]。IGF-1 Ea 和 MGF 在肌肉肥大和再生方面具有不同的生理作用。MGF 可以激活成肌细胞的增殖, 但是抑制其向肌管分化并融合, 而 IGF-1Ea 却能激活其向肌管分化融合过程^[14]。因此, MGF 在用于改善老年人和患有某种肌营养不良疾病患者或者是运动员肌肉活动能力方面具有广泛的运用前景^[17-18]。MGF 的功能与组织工程中生长因子的要求相符, 提示 MGF 在组织工程领域也可

有广泛的用途。然而有关 MGF 表达调控的机理研究匮乏。Kravchenko 等^[11] 报道了胞内第 2 信使 cAMP 在大鼠和人的成肌细胞和肌管细胞中能诱导 MGF 的合成; 他们在研究 cAMP 的可能下游靶标中发现, PKA 的特异性抑制剂降低了 db-cAMP 诱导的 MGF 表达, 然而超极化激活环腺苷酸门控阳离子通道和环化腺苷酸门控阳离子通道的阻断剂却没有相似的作用, 激活 Epac 蛋白也没有出现类似的结果, 说明 cAMP 激活 MGF 表达是通过 PKA 通路介导的。本研究发现, 前炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 能够诱导 FLSs 中 MGF 的表达, 并且抑制 PKA 通路也能抑制 MGF 的表达。前炎症因子对 MGF 的诱导有一定的剂量阈值, TNF- α 为 25 ng/mL、IL-1 β 为 10 ng/mL 才能对 MGF 的诱导表达起显著作用。IL-6 对 MGF 的表达无影响。本实验使用 PKA 通路抑制剂 KT5720 也得到了与 Kravchenko 等^[11] 一致的结果, 表明 TNF- α 、IL-1 β 对 MGF 的诱导作用也是通过 PKA 通路介导的。正常的膝关节中, FLSs 给膝关节和毗连软骨提供了关节腔和各种血浆蛋白质等营养物质以及润滑剂, 如透明质酸等^[19]。林福春等^[20] 用基因表达谱方法分析发现, 应力刺激和力生长因子 E 肽作用对成骨细胞的基因表达产生类似的调控效应。MGF 作为一个局部作用因子, 目前没有证据证明其进入了血液循环系统^[21-22], 它通过自分泌产生, 从而对周围的组织产生生理影响^[11]。应力刺激不足是损伤组织难以愈合和愈合迟缓的重要原因, 设想利用细胞在力学过载下高表达的 MGF 去刺激细胞, 则损伤组织细胞在应力不足的条件下仍感受到力学过载信号而加速修复, 故 FLSs 中 MGF 表达的增高或者是外源性 MGF 注射可能对膝关节软骨以及韧带组织的损伤有一定的修复作用。炎症是十分常见而又重要的基本病理过程, 体表的外伤感染和各器官的大部分常见病和多发病都属于炎症性疾病。组织损伤通常伴随着炎症响应^[12], 组织损伤之后炎症因子表达的上调对组织的愈合过程其重要作用。本研究表明, 炎症响应与 MGF 表达之间存在一定的联系, 研究炎症因子与 MGF 表达的相互作用有助于促进 MGF 用于组织修复。本研究也存在一定的局限性, 炎症响应刺激产生 MGF, 那么 MGF 的产生是否是机体缓解炎症的一种机制还有待进一步研究。同时, 力学加载对 FLSs 中 MGF 表达的影响

以及 MGF 在组织修复领域的作用机理还有待深入的探讨。

参考文献:

- [1] Musaro A, McCullagh K, Paul A, *et al.* Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle [J]. *Nat Genet*, 2001, 27(2): 195-200.
- [2] Yang S, Alnaqeeb M, Simpson H, *et al.* Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 1996, 17(4): 487-495.
- [3] McKoy G, Ashley W, Mander J, *et al.* Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation [J]. *J Physiol*, 1999, 516(2): 583-592.
- [4] Hameed M, Orrell RW, Cobbold M, *et al.* Expression of IGF-1 splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise [J]. *J Physiol*, 2003, 547(Pt 1): 247-254.
- [5] Cheema U, Brown R, Mudera V, *et al.* Mechanical signals and IGF-1 gene splicing in vitro in relation to development of skeletal muscle [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202(1): 67-75.
- [6] Li Y, Zhao Z, Song J, *et al.* Cyclic force upregulates mechano-growth factor and elevates cell proliferation in 3D cultured skeletal myoblasts [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 490(2): 171-176.
- [7] Kravchenko IV, Furalyov VA, Khotchenkov VP, *et al.* A study of the induction of mechano growth factor expression in an in vitro system [J]. *Dokl Biochem Biophys*, 2007, 417(1): 337-340.
- [8] Olesen JL, Heinemeier KM, Haddad F, *et al.* Expression of insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, and collagen mRNA in mechanically loaded plantaris tendon [J]. *J Appl Physiol*, 2006, 101(1): 183-188.
- [9] Imanaka M, Iida K, Murawaki A, *et al.* Growth hormone stimulates mechano growth factor expression and activates myoblast transformation in C2C12 cells [J]. *Kobe J Med Sci*, 2008, 54(1): E46-54.
- [10] Kravchenko IV, Furalyov VA, Popov VO. Hyperthermia and acidification stimulate mechano-growth factor synthesis in murine myoblasts and myotubes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(2): 271-274.
- [11] Kravchenko IV, Furalyov VA, Lisitsina ES, *et al.* Stimulation of mechano-growth factor expression by second messengers [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 507(2): 323-331.
- [12] Tang Z, Yang L, Wang Y, *et al.* Contributions of different intraarticular tissues to the acute phase elevation of synovial fluid MMP-2 following rat ACL rupture [J]. *J Orthop Res*, 2009, 27(2): 243-248.
- [13] Wang P, Yang L, You X, *et al.* Mechanical stretch regulates the expression of matrix metalloproteinase in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Connect Tissue Res*, 2009, 50(2): 98-109.
- [14] Yang SY, Goldspink G. Different roles of the IGF-1 Ec peptide (MGF) and mature IGF-1 in myoblast proliferation and differentiation [J]. *FEBS Lett*, 2002, 522(1-3): 156-160.
- [15] Shioura KM, Los T, Geenen DL, *et al.* The unique E-domain of an IGF-1 isoform expressed in muscle preserves cardiac function and prevents apoptosis following myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2006, 114(18): 232-232.
- [16] Riddoch-Contreras J, Yang SY, Dick JRT, *et al.* Mechano-growth factor, an IGF-1 splice variant, rescues motoneurons and improves muscle function in SOD1 (G93A) mice [J]. *Exp Neurol*, 2009, 215(2): 281-289.
- [17] Goldspink G. Loss of muscle strength during aging studied at the gene level [J]. *Rejuvenation Res*, 2007, 10(3): 397-405.
- [18] Goldspink G, Wessner B, Bachl N. Growth factors, muscle function and doping [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(3): 352-357.
- [19] Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, *et al.* Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(6): 223.
- [20] 林福春, 张兵兵, 辛娟, 等. 力生长因子 E 肽与应力刺激对成骨细胞基因表达的影响 [J]. *医用生物力学*, 2012, 27(1): 65-71.
- [21] Lin FC, Zhang BB, Xin J, *et al.* Effect of MGF-Ct24E and mechanical stimulation on gene expression of osteoblasts [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(1): 65-71.
- [22] Goldspink G. Cloning of local growth factors involved in the determination of muscle mass [J]. *Br J Sports Med*, 2000, 34(3): 159-160.
- [23] Goldspink C, Yang SY, Skarli M, *et al.* Local growth regulation is associated with an isoform of IGF-1 that is expressed in normal muscles but not in dystrophic mdx or dydy mouse muscles when subjected to stretch [J]. *J Physiol Lond*, 1996, 495P: P162-163.