

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.13.012

文章编号: 1005-8982(2016)13-0063-05

论著

白细胞介素 -24 基因在膝关节骨性关节炎发病中的作用及意义

刘扬

(三峡大学第一临床医学院 骨外科,湖北 宜昌 443000)

摘要:目的 探讨白细胞介素 -24(IL-24)基因在膝关节骨性关节炎(KOA)疾病中的作用及意义,为 KOA 的早期诊断及基因治疗提供一定的科学依据。**方法** 选择该医院骨科原发性 KOA 的滑膜标本,提取总 RNA,用实时逆转录聚合酶链反应(Real-time RT-PCR)检测 KOA 滑膜组织中 IL-24 基因的表达。**结果** IL-24 基因表达在 KOA 滑膜组织中降低($P < 0.01$)。**结论** IL-24 在膝关节骨性关节炎滑膜中的表达降低,且与 KOA 病变关系密切,为将来诊断和基因治疗膝关节骨性关节炎疾病提供参考。

关键词: 膝关节骨性关节炎;IL-24;基因

中图分类号: R684.3

文献标识码: A

Expression of IL24 gene in knee osteoarthritis and its significance

Yang Liu

(Department of Bone Orthopedics, the First College of Clinical Medical Science,
China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443000, China)

Abstract: Objective To investigate expression and significance of IL24 gene in the knee osteoarthritis (KOA), and to provide scientific basis for early diagnosis and gene therapy for knee osteoarthritis. **Methods** Fresh synovial specimens were collected from orthopedic patients in our hospital. Trizol was used to extract total RNA. Expression of IL24 in knee osteoarthritis synovium was detected by RT-PCR. **Results** IL24 gene expression in knee KOA synovial tissue obviously decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** IL24 expression in the synovium of osteoarthritis knee joint obviously declines and is negatively correlated with the progress of KOA. Therefore, it can provide a reference for future diagnosis and gene therapy of knee osteoarthritis.

Keywords: knee osteoarthritis; IL24; gene

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是发生于老年人群中的一种慢性退行性关节疾病,使患者逐渐丧失关节功能^[1]。其主要特点是软骨下骨的改变、关节软骨的破坏、细胞外基质的减少及滑膜炎性的改变。其特征是骨赘的形成和软骨下骨的破坏^[2]。年龄、肥胖、外伤、性别等是引起 OA 的常见风险因素^[3]。在临床上最为常见的是膝关节骨性关节炎(knee os-

teoarthritis, KOA),其发病率最高,是一组病因不同,但是有相似的生物学、形态学和临床表现的疾病^[4]。KOA 主要损害关节软骨、半月板、软骨下骨及滑膜等关节组织,容易引起软骨代谢的变化。膝关节骨性关节炎是一种自身炎症反应,可以引起分解代谢和软骨细胞的凋亡,从而导致软骨的降解^[5-6]。研究表明, KOA 发生、发展的过程与多种细胞因子和生长因子

有关,如白细胞介素-1(Interleukin-1,IL-1)家族、转移生长因子、炎症因子等^[7]。白细胞介素是一种在细胞间发挥免疫调节作用的细胞因子,可以对免疫反应起刺激或者抑制作用,其主要由单核细胞、T淋巴细胞、巨噬细胞产生。IL-24 是一种抑制炎性白细胞介素,在骨性关节炎发病中起重要作用。IL-24 由外周血单核细胞、B 细胞、T 细胞等免疫细胞,以及黑色素细胞、皮肤角化细胞、结肠浆膜下肌成纤维细胞等^[8-9]非免疫细胞分泌。研究发现,IL-24 除具有抑制肿瘤作用,还参与银屑病、类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的免疫病理过程^[10-11]。总体来说,KOA 是多种细胞因子相互调节引起的复杂病理过程。目前,还没有 IL-24 与 KOA 的相关性及机制的系统性研究,本文通过 IL-24 基因在膝关节骨性关节炎发病中的作用研究,为 KOA 的发病机制研究和进一步的基因治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 KOA 组 选取 2010 年 1 月-2012 年 12 月在本院骨科就诊的膝关节骨性关节炎患者 42 例,男性 22 例,女性 20 例,平均年龄(61.00 ± 2.12)岁,取膝关节滑膜标本作为 KOA 组实验标本。

1.1.2 对照组 选取 2010 年 1 月-2012 年 12 月在本院体检,未患过膝关节骨性关节炎、创伤性截肢的患者 32 例。其中男性 18 例,女性 14 例;平均年龄(51.00 ± 1.49)岁,取其膝关节滑膜组织来作为对照组的实验标本。

1.1.3 标本存放 KOA 组和对照组的实验标本取出后,直接置于无菌的装有液氮的冻存管中,30min 后存于 -80°C 冰箱冷冻保存中。

1.2 诊断及纳入标准

1.2.1 诊断标准 满足美国风湿协会的标准:患者具有膝关节疼痛,患膝 X 线检查可以发现骨赘;受累的膝关节晨僵 $<30\text{ cm}$;有骨擦声音,在近 1 个月内有膝关节疼痛。

1.2.2 纳入标准 筛选本院骨科年龄 >50 岁的原发性 KOA 患者,患者符合 Ahlback 膝关节骨性关节炎分级标准中关节间隙消失、轻度骨磨损、中度骨磨损(磨损 $0.5 \sim 1.0\text{ cm}$)的表现。

1.3 实验试剂

M-MLV 转移液(美国 Invitrogen 公司),dNTP 混合液(日本 TaKaRa 公司),RNase 合成酶抑制剂 In-

hibitor(美国 Promega 公司),TRIzol 提取液(美国 Invitrogen 公司),RQ1 无 RNase 活性的 DNA 酶(美国 Promega 公司),RNeasy 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司),SYBR Green I 嵌合荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)混合液(美国 Applied Biosystems 公司),ABI 荧光定量 PCR 仪专用 96 孔板(美国 Applied Biosystems 公司),ABI 荧光定量 PCR 仪专用封板膜(美国 Applied Biosystems 公司),引物(9N 逆转录引物 PCR 引物)(美国 Invitrogen 公司)。

1.4 实验仪器

小型台式高速离心机 5415D(德国 Eppendorf 公司),离心机 581 OR(德国 Eppendorf 公司),梯度 PCR(德国 Eppendorf 公司),多孔道 DNA 检测仪 PTC-225(美国 MJ 公司),凝胶成像系统 CBC/UVP I-DOOI(北京 CapitalBio 公司),分光光度计 ND-1000(美国 Nano Drop 公司),7900HT 实时定量 PCR(美国 Applied Biosystems),移液枪 P-2.5,P-20,P-200,P-1000(德国 Eppendorf 公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 RNA 的提取(Trizol 法) 用电子天平称 $0.3 \sim 0.5\text{ g}$ 取出的组织样本,使用液氮预冷的研钵来研磨,为使组织不融化,研磨过程中注意随时添加液氮;按组织:Trizol=100:1 的比例加入 Trizol,继续研磨组织使其至比较细的粉末,转入超净工作台,等融化后,把液体转移到体积为 1.5 ml 的离心管中,每管大约 1 ml ,室温下将其放置 $>15\text{ min}$;按照氯仿:Trizol=0.2:1.0 的比例加入氯仿,将其涡旋震荡 30 s 混匀,室温下放置 $2 \sim 3\text{ min}$,再在 4°C 、 15 000 r/min 离心 15 min ;将离心后得到的上清液转移到一个新 Eppendorf 管,按照异丙醇:Trizol=0.5:1.0 的比例加入异丙醇,混匀,在 -20°C 放置 $>10\text{ min}$, 4°C 、 15 000 r/min 离心 15 min ;将异丙醇弃掉,加入 1 ml 75%乙醇,用手指弹起沉淀块,颠倒几次, 4°C 、 7 500 r/min 离心 5 min ;将 75%乙醇弃掉,在超净台中自然干燥 $15 \sim 30\text{ min}$;视 RNA 沉淀大小加入一定体积的无核酸酶水, 65°C 助溶 $5 \sim 10\text{ min}$;置入 -20°C 冰箱冷冻保存,在 -80°C 长期冷冻保存。

1.5.2 cDNA 第一链的合成 取 $2\mu\text{g}$ RNA 置于反应管中,加入 Oligo dT $1\mu\text{l}$,再加入 2.5 mmol dNTP mix $4\mu\text{l}$,混匀,加 ddH_2O 至 $13\mu\text{l}$ 。在 60°C 条件下静置 10 min 后,放在冰上放置 $>1\text{ min}$ 。在反应管中加入 $5 \times$ 第一链缓冲液 $4\mu\text{l}$, 0.1 mol 二硫苏糖醇(DL-dithiothreito,DDT) $1\mu\text{l}$,RNase out ($40\text{ u}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$,

Superscript III RT 1 μ l, 震荡混匀后离心, 70 $^{\circ}$ C 条件下通过灭活逆转录酶, 合成 cDNA 第一链, 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。

1.5.3 实时逆转录聚合酶链反应 (real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, Real-time RT-PCR) ①逆转录反应体系和反应程序见表 1; ②逆转录终止反应程序: 在 70 $^{\circ}$ C 条件下加入 5 μ l 1.5 mol Na (OH) 来终止逆转录反应, 反应 10 min 后, 加入 1 μ l 10mol 乙酸以发生中和反应, 再加入无核酸酶水至 50 μ l, 在 4 $^{\circ}$ C 可以短期低温保存, 在 -80 $^{\circ}$ C 下能够长期低温保存。

1.5.4 Real time PCR 反应 ①Real time PCR 反应体系见表 2; ②Real time PCR 反应程序见表 3; ③Real time PCR 产物 1.5% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测见表 4。1.5% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测条件: 120V, 15 ~ 20 min。1.5% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测条件: 120 ~ 130V, 15 ~ 20 min。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 t 检验, 计数资料以率表示, 用 χ^2 检验, 用直线相关回归描述 IL-24 mRNA 的相对表达量与 KOA 病程的相关性, 用散点图描述两者的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般情况比较

KOA 组和对照组在性别、年龄方面比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

2.2 RT-PCR 检测不同组织中 IL-24 mRNA 表达的电泳图

人膝关节骨性关节炎滑膜组织与正常滑膜组织表达 IL-24 mRNA 的 Real-time RT-PCR 检测电泳图见图 1。

2.3 Real-time RT-PCR 分析

Real-time RT-PCR 反应结果表明, 两组 IL-24 基因表达比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 19.263, P = 0.000$), KOA 组较对照组 IL-24 基因表达降低。见图 2。

2.4 IL-24 mRNA 统计学分析

KOA 组 IL-24 mRNA 的表达值为 (0.051 ± 0.006), 对照组为 (0.940 ± 0.070), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 5.734, P = 0.001$), KOA 组低于对照组。

表 1 Real-time RT-PCR 逆转录反应体系及反应程序

成分	标准含量 / μ l
RNA 样品	2.0 ~ 2.5
9N 逆转录酶 (约 1 000 ng / μ l)	2.0
无核酸酶水使总体积达	11.5
65 $^{\circ}$ C 温育 5 min, 立即将微量离心管插入冰浴中 ≥ 2 min	
5 \times 第一链缓冲液	4.0
0.1 mol 二硫苏糖醇	2.0
dNTP 混合液	1.0
M-MLV 逆转录酶	1.0
重组 RNase 酶抑制剂	0.5
总体积	20.0
25 $^{\circ}$ C 温育 10 min, 37 $^{\circ}$ C 加热 1 h	

表 2 Real Time PCR 反应体系

成分	标准含量 / μ l
SYBR 荧光染料 PCR 混合体系 (2 \times)	10.0
cDNA 样品	1.0
上游引物 (10 μ mol)	0.5
下游引物 (10 μ mol)	0.5
无核酸酶水	8.0
总体积	20.0

表 3 Real Time PCR 反应程序

程序	温度 / $^{\circ}$ C	时间 / s	所需程序
Ampli Taq Gold R 酶激活	95	600	无
PCR 循环	变性	95	15
(40 周期)	退火和延伸	60	60
熔解曲线分析 (Temperature ramp 2%)	60 ~ 90		一个循环
			连续循环

表 4 Real time PCR 产物 1.5% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测

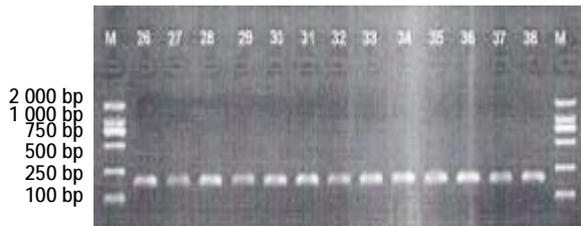
成分	标准含量 / μ l
实时荧光 PCR 产物	2 ~ 4
2 \times 上样缓冲液	4
无核酸酶水使总体积达	10

2.5 IL-24 mRNA 相对表达量与 KOA 病程的相关分析

随着病程的增加即关节磨损程度加重, IL-24 mRNA 相对表达量减少, 表明 IL-24 mRNA 的相对表达量与 KOA 病程呈负相关 ($r = -0.827, P = 0.000$)。见图 3。

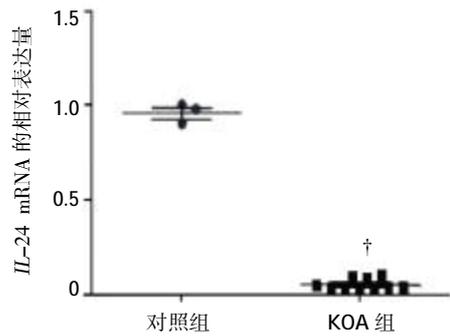
表 5 两组患者一般情况比较

组别	例数	男 / 女 / 例	平均年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)
KOA 组	42	22/20	61.00 ± 2.12
对照组	32	18/14	51.00 ± 1.49
t/χ^2 值		0.109	1.056
P 值		0.741	0.670



M: Maker; 26: H2; 27: H10; 28: H3; 29: H11; 30: H4; 31: H12; 32: H5; 33: GH1; 34: H7; 35: GH2; 36: H8; 37: GH3; 38: H9. H2, H3, H4, H5, H7, H8, H9, H10, H11, H12: KOA 组; GH1, GH2, GH3: 对照组

图 1 不同组织中 IL-24 mRNA 表达的电泳图



† 与对照组比较, $P=0.000$

图 2 两组 IL-24 mRNA 的相对表达量比较

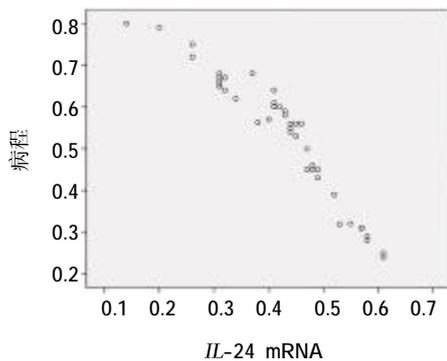


图 3 IL-24 mRNA 的相对表达量和 KOA 病程散点图

3 讨论

膝关节骨性关节炎又称增生性膝关节炎,是指膝关节由于外伤、慢性劳损及关节畸形等引起关节软骨变性、增生,从而导致肿胀、疼痛、伸屈受限等症状的退行性关节疾病。MURPHY 等^[2]研究表明,1/2

的成年人 85 岁之前患有症状的骨性关节炎。膝关节骨性关节炎易导致软骨代谢的变化,其变化开始于关节软骨结构的变化,滑膜的炎症参与该过程。滑膜炎是体内细胞因子合成释放综合作用的结果,进而影响到关节软骨的改变。滑膜炎是引起早期膝关节骨性关节炎临床症状的主要因素。任红革等^[3]通过查阅文献,总结出细胞因子在膝关节骨性关节炎发生、发展过程中发挥重要作用,部分细胞因子能促进骨性关节炎软骨降解、滑膜炎及软骨下骨的吸收,部分细胞因子也有抑制骨性关节炎病变发展的作用。与分解代谢有关的细胞因子主要有基质金属蛋白酶;与合成代谢有关的细胞因子主要有转化生长因子、骨形态发生蛋白、胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子和血管内皮细胞生长因子;在关节组织中发现的影响细胞功能的炎症因子包括白细胞介素、趋化因子和肿瘤坏死因子等。

白细胞介素含促炎症白细胞介素和抑制白细胞介素两类,其在膝关节骨性关节炎中发挥重要作用。促炎症白细胞介素主要有 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-5、IL-6、IL-8、IL-17、IL-18 等,抑制炎症白细胞介素主要有 IL-4、IL-10、IL-13、IL-24 等。研究表明,IL-24 同肿瘤的抑制、炎症的抑制、损失的修复作用密切相关^[14-15]。IL-24 对肿瘤的抑制作用比较广泛,能够抑制肺癌、鼻咽癌、宫颈癌等癌细胞的生长^[16]。大量对其机制的研究表明,主要从 PKR 途径、抑制肿瘤血管的生成、抑制肿瘤细胞的侵袭,以及 IL-24 的免疫调节作用来发挥作用。同时 DOMINIK 等^[17]经免疫组织化学法、迁移分析等研究发现,IL-24 在损伤修复过程中,在皮肤角化细胞中表达升高,并抑制由 TGF- α 引起的促炎症作用。在本研究中通过 Real-time RT-PCR 检测发现,IL-24 基因在膝关节骨性关节炎滑膜中表达显著降低,考虑原因为 IL-24 的低表达作用能很好地促进 TGF- α 引起的促炎症反应以及关节软骨的降解作用,从而引起人发生膝关节骨性关节炎。

通过 IL-24 基因在膝关节骨性关节炎发病中的作用研究,笔者发现,IL-24 基因在膝关节骨性关节炎滑膜中表达显著降低,IL-24 与 KOA 的发生、发展过程密切相关。同时对 IL-24 基因的表达水平研究,能够帮助早期诊断膝关节骨性关节炎,并且对 IL-24 基因进一步深入研究可以为将来膝关节骨性关节炎的诊断和基因治疗提供参考。

参 考 文 献:

- [1] FORESTIER R, FRANCON A, BRIOLE V, et al. Prevalence of generalized osteoarthritis in a population with knee osteoarthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2011, 78(3): 275-278.
- [2] BLAGOJEVIC M, JINKS C, JEFFERY A, et al. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18: 24-33.
- [3] LOESER R F. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis[J]. *Clin Geriatr Med*, 2010, 26: 371-386.
- [4] MIYAZAKI T, WADA M, KAWAHARA H, et al. Dynamic load at baseline can predict radiographic disease progression in medial compartment knee osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(7): 617-622.
- [5] GOLDRING M B, OTERO M. Inflammation in osteoarthritis[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2011, 23(5): 471-478.
- [6] ABRAMSON S B. Inflammation in osteoarthritis [J]. *The Journal of Rheumatology*, 2004, 70: 70-76.
- [7] 帅明. 白细胞介素 -1 β 、HIF-1 α 和 VEGF 在兔骨性关节炎模型的滑膜中的表达[D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [8] ANDOH A, SHIOYA M, NISHIDA A, et al. Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease[J]. *J Immunol*, 2009, 183: 687-695.
- [9] KUN S, WOLK K, WITTE E, et al. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs[J]. *Exp Dermatol*, 2006, 15: 991-1004.
- [10] MIAO H, PENG L. IL-24 Transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22 and IL-24 in the epidermis[J]. *J Immunol*, 2010, 184: 1793-1798.
- [11] WU B, HUANG C H, MIDORI K M. IL-24 modulates IFN- γ expression in patients with tuberculosis[J]. *Immunol Lett*, 2008, 117(1): 57-62.
- [12] MURPHY L, SCHWARTZ T A, HELMICK C G, et al. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 59: 1207-1213.
- [13] 任红革, 崔逢德. 细胞因子在骨性关节炎中的表达与应用 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(52): 9828-9835.
- [14] CHOI Y M, ROH M S, HONG Y S, et al. Interleukin-24 is correlated with differentiation and lymph node numbers in rectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(9): 1167-1173.
- [15] ANDOH A, SHIOYA M, NISHIDA A, et al. Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 Cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease[J]. *J Immunol*, 2009, 183: 687-695.
- [16] FISHER P B. Is mda-7/IL-24 a magic bullet for cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(22): 10128-10138.
- [17] DOMINIK R H, BAO N, JIAN F, et al. Rho-dependent CCL20 induced by dynamic compression of human chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(9): 2735-2742.

(童颖丹 编辑)