

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.012

CSE1L 在绝经后女性骨关节炎滑膜细胞中的作用探究 *

李楠 刘永明 韩赛平 王新利 董川 刘涛 文艳华 刘云燕 刘宇
陈孝强 马保安[△]

(第四军医大学唐都医院全军骨科中心暨全军骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨 CSE1L 在绝经后女性骨关节炎滑膜细胞中的表达及其作用和机制。**方法:**通过 RT-PCR、Western blot 以及免疫组化的实验方法检测和比较 CSE1L 在绝经后女性骨关节炎和创伤截肢患者关节滑膜细胞中的表达,不同浓度 TNF- α 或 TNF- α 抗体处理的关节炎滑膜细胞中 CSE1L 的表达;采用 siRNA 干预其骨关节炎滑膜细胞中 CSE1L 的表达后,通过 RT-PCR、ELISA 以及 Western blot 检测其 TNF- α 的表达和分泌情况。**结果:**RT-PCR 以及 Western blot 结果均提示绝经后女性骨关节炎滑膜细胞中 CSE1L 的表达较创伤截肢患者关节滑膜细胞显著增高 ($P<0.01$, $P<0.001$)。对 CSE1L 进行 siRNA 干预降低其表达水平后, CSE1L 表现出与 TNF- α 浓度呈正相关的变化趋势;此外,在对 CSE1L 进行敲减以降低其表达水平后,绝经后女性骨关节炎滑膜细胞中 TNF- α 的表达水平变化提示其受到 CSE1L 调节。**结论:**CSE1L 可能通过调节 TNF- α 的表达促进绝经后女性骨关节炎的发展。

关键词:CSE1L; 绝经; 骨性关节炎; 滑膜细胞; TNF- α

中图分类号:R-33; R684.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1865-05

A Study with Regard to How CSE1L Works in Osteoarthritis among Postmenopausal Women*

LI Nan, LIU Yong-ming, HAN Sai-ping, WANG Xin-li, DONG Chuan, LIU Tao, WEN Yan-hua, LIU Yun-yan, LIU Yu,
CHEN Xiao-qiang, MA Bao-an[△]

(Department of Orthopedic Surgery Center and Orthopedic Oncology Institute of PLA, Tangdu hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether the expression of CSE1L elevates in the synoviocytes among postmenopausal women with osteoarthritis(OA), after the positive result came out, to further preliminary look into the mechanism of how CSE1L works in the synoviocytes among postmenopausal women with OA. **Methods:** Investigate whether the expression of CSE1L elevates in the synoviocytes among postmenopausal women with OA by means of RT-PCR, western blot and immunohistochemistry, and then conduct quantitative and semi-quantitative analysis. After knocking down the expression of CSE1L with CSE1L specific siRNA, to investigate whether CSE1L shows a positive relationship with the severity of OA or not by means of western blot. Through the methods of RT-PCR, ELISA and western blot, the interaction between CSE1L and TNF- α was preliminarily illustrated, so the mechanism of how CSE1L works in the synoviocytes among postmenopausal women with OA was preliminarily showed up. **Results:** In the synoviocytes among postmenopausal women with OA, the results of both RT-PCR and western blot manifested that the expression of CSE1L elevated significantly ($P<0.01$, $P<0.001$). Moreover, after knocking down the expression of CSE1L with CSE1L specific siRNA, the expression level of CSE1L show a positive relationship with TNF- α concentration. In addition, after knocking down the expression of CSE1L with CSE1L specific siRNA, and the expression level of TNF- α came up to be regulated by CSE1L in the synoviocytes among postmenopausal women with OA. **Conclusions:** CSE1L promote OA development via interaction with TNF- α expressed by the synoviocytes among postmenopausal women with OA.

Key words: CSE1L; Pausimenia; Osteoarthritis; Synoviocyte; TNF- α

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R684.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1865-05

前言

骨关节炎为最为常见的慢性退行性疾病之一,发病涉及全

身大小关节,如膝关节、踝关节、指间关节。而在所有骨关节炎病例中,膝关节所占比例最重,而其中又以绝经后女性发病率最高^[1],其病理改变涉及整个关节,包括关节软骨、周围韧带、

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81372297)

作者简介:李楠(1986-),男,博士研究生,主要研究方向:骨关节炎的发病机制研究,电话:18710873238, E-mail:958695747@qq.com

[△] 通讯作者:马保安, E-mail: gukamba@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-12-26 接受日期:2018-01-21)

关节囊软骨下骨、以及关节滑膜,最终导致关节功能丧失^[3]。骨关节炎的病因种类繁多,创伤、肥胖、老龄化以及遗传因素均参与其发生^[4]。然而,骨关节炎的确切发病机制至今尚未阐明。迄今为止,关于骨关节炎的发生机制研究多局限于针对软骨细胞,关于骨关节炎中滑膜细胞的研究则相对较少。受损的软骨细胞释放各种各样的蛋白水解酶引起滑膜炎^[5,6],而滑膜细胞释放的炎性分解产物又将进一步加重关节软骨细胞的病理改变^[7,8]。滑膜细胞对于骨关节炎的发生发展至关重要^[9]。

CSE1L(Chromosome Segregation 1-Like)位于人 20 号染色体长臂 13 区,其编码的蛋白产物 CSE1L 负责调节 importin- α 从细胞核中的运输,在胞质和胞核中都有表达^[10,11]。既往的研究显示 CSE1L 多表达于肿瘤疾病,与多种恶性肿瘤关系密切^[11]。此外,CSE1L 参与多种细胞代谢活动,包括细胞凋亡、胚胎发育、运输代谢产物、细胞亚单位组装,肿瘤的发生和转移^[12,13]。然而,至今没有 CSE1L 与骨关节炎关系的相关报道。为了探究 CSE1L 在骨关节炎滑膜炎中的作用,我们选择了最具代表性的炎性因子 TNF- α 作为观察对象^[14,15],现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本 本实验选取了 8 例标本,分为骨关节炎组和对照组。4 例骨关节炎样本来自唐都医院骨科骨关节炎行膝关节置换术患者^[16],标本来源均为绝经后女性患者;4 例对照组来自唐都医院骨科创伤截肢患者,所有标本的取得均经过患者本人知情同意并签署知情同意书,本研究中所有的实验均严格遵守赫尔辛基宣言^[17],并由本实验中心道德伦理委员会执行监督。

1.1.2 细胞培养和实验试剂 由标本分离而来的滑膜细胞遵照指导程序进行元代培养^[18]。首先,去除滑膜上脂肪组织并用 PBS 清洗三次;其次,将滑膜组织切碎至小块并与 I 型胶原酶充分混合,置于 37 °C 恒温箱中 6 小时;待充分消化后过滤悬液收获滑膜细胞,接种于 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中并加入双抗。本实验涉及到的抗体包括抗 CSE1L 抗体(BS1080)和 CSE1L 特异性 siRNA 来自上海生工公司,抗 TNF- α 抗体(10602-MM01-F)来自 Sino Biological 公司(中国),TNF- α ELISA 试剂盒(ab181412)和 β -actin(ab8227)均来自 Abcam(上海)公司,抗 TNF- α 抗体(410-MT)购于 R&D 公司(中国),其他试剂和仪器均由唐都医院骨肿瘤研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 实时定量 PCR 总 RNA 由 10 mg 滑膜组织或滑膜细胞中提取,选取裂解液购于 Thermo Fisher Scientific 公司(德国)。cDNA 的第一条链的合成来自 1 mg 总 RNA,采用 All-In-One 系统购于 Applied Biological Material 公司(加拿大)。基因表达量采用 Rotor-Gene Q 2 plex(德国 Qiagen 公司)系统定量检测。设计引物序列如下,CSE1L:Forward(5'→3'):CAGAACACGCTGACAAGTATCT,Reverse(5'→3'):AGCCCTGCGTCTAGTATCAATA;GAPDH:Forward(5'→3'):GGAAACACCGAGTCGGAATAC,Reverse(5'→3'):GCGGAAAACCTTGGAGGTAAT。

1.2.2 蛋白质免疫印记 收获的滑膜组织或细胞采用 RAPA 处理。所得溶解产物随后用 SDS-PAGE 电泳分离并转移至 PVDF 膜上,后者用 5%脱脂牛奶阻断后,加入特异性一抗并置

于 4 °C 环境下过夜。第二天,所得结果用 Western blot(GE Healthcare 公司)检测系统分析转膜。目标基因相对表达量用 Quantity One software(Bio-Rad 公司)计算分析各条带灰度值。

1.2.3 siRNA 干预及转染 CSE1L 特异性 siRNA 由脂质体 2000 转染进入骨关节炎滑膜细胞以干扰降低 CSE1L 在细胞水平上的表达。首先将滑膜细胞消化并接种于六孔板,待每个孔滑膜细胞分布至 50%左右(约 24 小时)后,用 CSE1L 特异性 siRNA 和非特异性 siRNA(阴性对照)进行干预,24 小时后干预完成可进行下一步实验。

1.2.4 免疫组织化学 首先将滑膜组织固定于盐酸福尔马林溶液 10 天后脱水并包埋于石蜡中,并将组织制成 6 μ m 的切片。在 4 °C 环境下用抗 CSE1L 抗体和纤溶酶原激活物抑制剂共同孵育过夜;对照组抗体用兔 IgGs,用本实验室生物素-链霉亲和素检测系统检测。然后将二氨基联苯胺和双氧水加入组织切片。最后将组织切片复染。

1.2.5 酶联免疫吸附试验 收集骨关节炎滑膜细胞培养液,3000 转/分 4 °C 离心 15 分钟,收集上清液并按照 ELISA 试剂盒规程进行实验。

1.3 统计学处理

数据使用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,分别采用了 Student-t 检验和 One-way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨关节炎的绝经后患者滑膜细胞 CSE1L 表达升高

RT-PCR 和 Western blot 结果均显示骨关节炎滑膜细胞 CSE1L 的表达量高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.001$);免疫组化结果与 RT-PCR 和 Western blot 结果一致,骨关节炎滑膜组织切片显示 CSE1L 主要存在于细胞核区域,见图 1。

2.2 CSE1L 表达量与 TNF- α 浓度呈正相关,并在 10 ng/mL 时达到峰值

研究表明 TNF- α 能够明显加重骨关节炎的严重程度,是骨关节炎发生发展过程中最重要的细胞因子之一^[19]。如图 2A 所示,骨关节炎滑膜细胞 CSE1L 的表达量与 TNF- α 浓度呈正相关,在 TNF- α 浓度为 10 ng/mL 时达到最大化。而如图 2B 所示,加入 TNF- α 抗体可以部分阻断 TNF- α 对 CSE1L 的刺激作用,提示在骨关节炎滑膜细胞中,CSE1L 的表达受 TNF- α 调节。

2.3 骨关节炎滑膜细胞中 TNF- α 的表达受 CSE1L 调节

RT-PCR 和 Western blot 结果显示在加入 CSE1L 特异性 siRNA 干预 24 小时后,骨关节炎滑膜细胞 TNF- α 的表达水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.0001$),见图 3A、3B。ELISA 结果显示骨关节炎滑膜细胞分泌的 TNF- α 同样受到 CSE1L 调节,CSE1L 特异性 siRNA 显著降低了骨关节炎滑膜细胞分泌表达 TNF- α (图 3C)($P < 0.05$)。

3 讨论

骨关节炎是一种长期慢性退行性关节疾病,最终可导致全关节功能障碍^[3]。迄今为止,仍然缺乏骨关节炎的有效治疗手段。在本研究中,我们首先证明了 CSE1L 在骨关节炎滑膜细胞中的异常高表达,继而我们证明了下调 CSE1L 可以有效降低骨关节炎滑膜细胞合成表达其代表性细胞因子--TNF- α 。

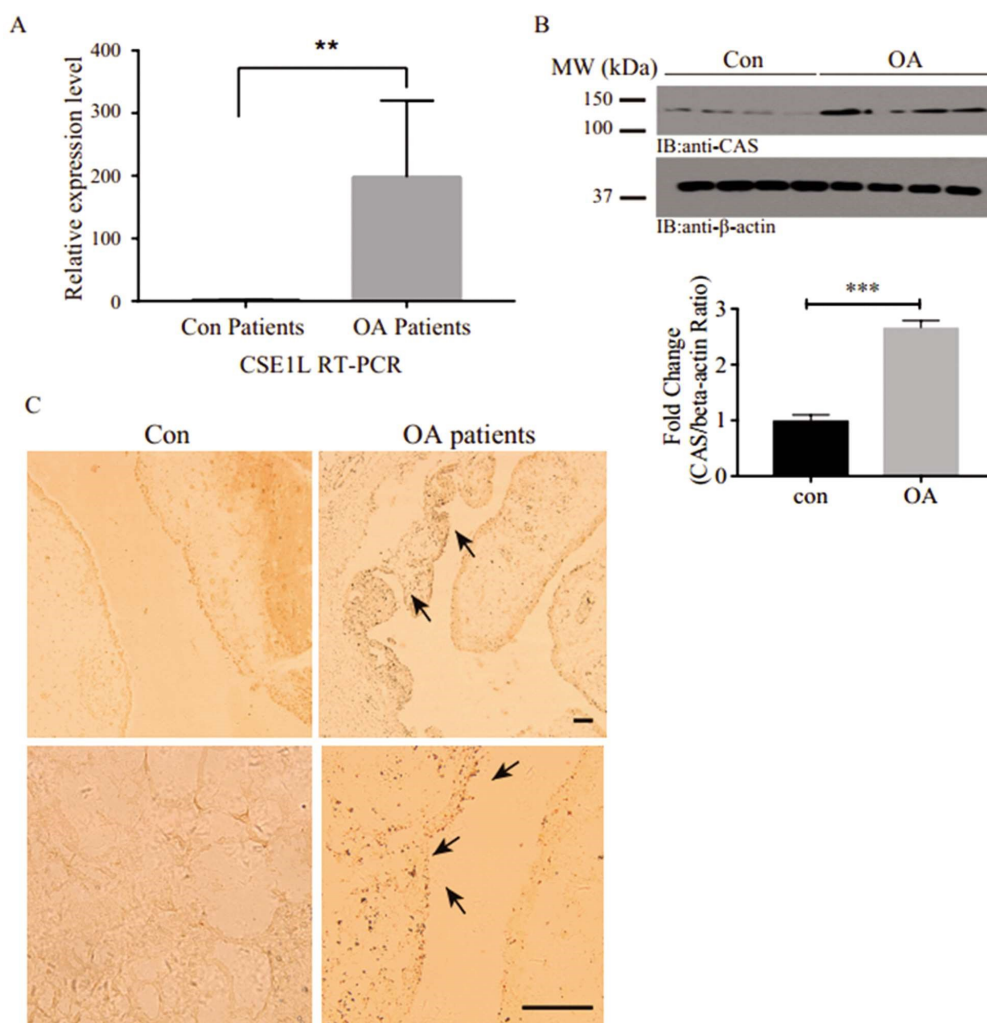


图1 骨关节炎的绝经后患者滑膜细胞 CSE1L 表达升高

Fig.1 CSE1L elevated in the synoviocytes in postmenopausal women with OA

Note: (A) The RT-PCR result of CSE1L expression among OA patients and control patients(** $P<0.01$);(B) The western blot result of CSE1L expression among OA patients and control patients(*** $P<0.001$); (C) The immunohistochemistry result of CSE1L among OA patients and control patients (magnification times: $10\times$, $10\times$, $40\times$)

CSE1L 在细胞代谢中的作用十分复杂,然而过去的研究大多关注的是 CSE1L 与肿瘤疾病之间的联系^[1]。迄今为止,鲜有关于 CSE1L 与炎症性疾病比如骨关节炎之间关系的研究报道。通过前期的基因芯片测序工作,我们发现了骨关节炎的可疑致病基因 CSE1L,在后续的研究中,我们直接选择了探究骨关节炎重要炎症因子 TNF- α 与 CSE1L 的相互作用来观察 CSE1L 对这一疾病的影响。结果显示骨关节炎滑膜细胞 CSE1L 的表达量高于对照组,且骨关节炎滑膜细胞 CSE1L 主要表达于细胞核。此外,骨关节炎滑膜细胞 CSE1L 的表达量与 TNF- α 浓度呈正相关,在 TNF- α 浓度为 10 ng/mL 时达到最大化,继续增加 TNF- α 浓度,CSE1L 的表达量反而下降。这是因为在 TNF- α 浓度大于 10 ng/mL 时,滑膜细胞凋亡数量明显增加,趋于凋亡的骨关节炎滑膜细胞在受到高浓度 TNF- α 的刺激后没有能力继续合成表达 CSE1L。而加入 TNF- α 抗体可以部分阻断 TNF- α 对 CSE1L 的刺激作用,也证明了在骨关节炎滑膜细胞中,CSE1L 的表达量受到 TNF- α 的调节,而阻断 TNF- α 的刺激,可以相应降低 CSE1L 的表达。在加入 CSE1L 特异性 SiRNA 干预 24 小时后,TNF- α 的表达水平降低,

CSE1L 能够调节骨关节炎滑膜细胞 TNF- α 的表达水平。骨关节炎滑膜细胞分泌至细胞外的 TNF- α 同样受到 CSE1L 调节,CSE1L 的表达在受到特异性 siRNA 抑制后,骨关节炎滑膜细胞分泌表达 TNF- α 也随之减少,说明 CSE1L 的表达不仅受到 TNF- α 调节,而 TNF- α 的表达同样会受到 CSE1L 的影响。

结合文献,我们认为上述现象出现的原因可以通过 CSE1L 对 importin- α 的运输作用的影响来解释^[1]。CSE1L 的表达受到抑制,导致 importin- α 的细胞核运输作用受抑,而 TNF- α 激活的下游产物进入细胞核发挥转录调节作用需要 importin- α 的载体功能^[20,21]。CSE1L 主要集中在骨关节炎滑膜细胞的细胞核区域,说明了在此区域也应同时存在较高浓度的 importin- α 发挥作用,而 importin- α 需要 CSE1L 将其从细胞核运回细胞质从而开始下一轮对 TNF- α 下游产物的运输功能。在骨关节炎中,哪一种或者几种细胞因子主要通过 CSE1L 和 importin- α 发挥作用,至今未见报道。而 importin- α 有八种亚型^[22,23],具体是哪种亚型发挥作用,也需要更进一步研究。但也正是因为 CSE1L 的非特异性运输功能,让直接阻断 CSE1L 从而阻断其所有下游的反应通路成为一种可能的治疗思路。

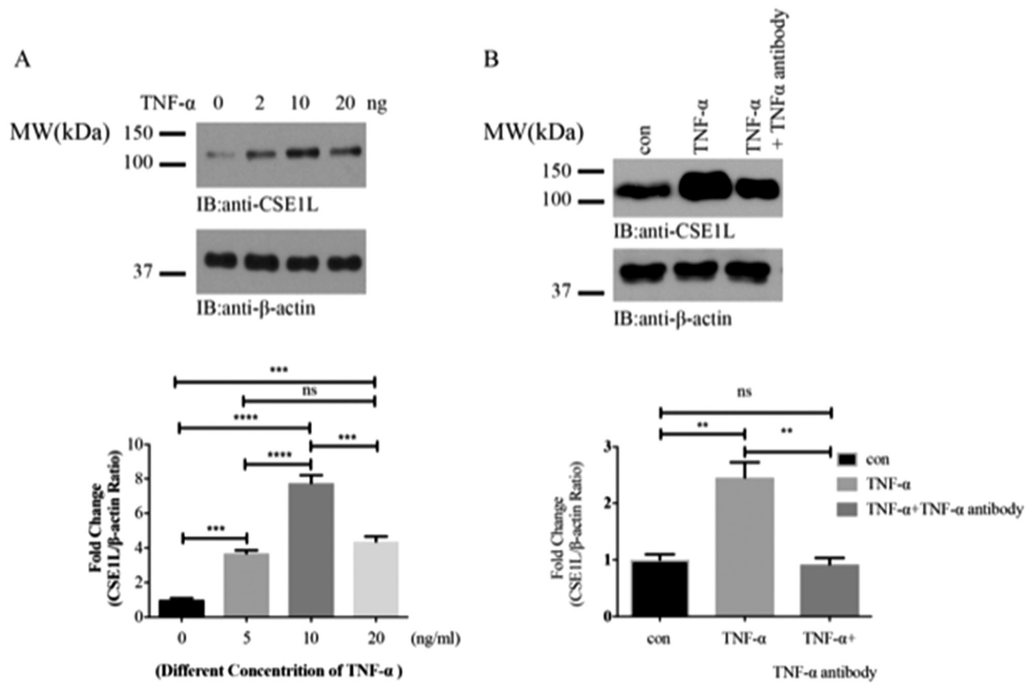


图 2 CSE1L 表达量与骨关节炎严重程度呈正相关

Fig.2 CSE1L expression was positively related with the severity degree of OA

Note: (A) The western blot result of CSE1L expression after treatment of different concentration of CSE1L specific siRNA (**P<0.001, ****P<0.01, ns, no significance);(B) The western blot result of CSE1L after treatment of TNF-α and TNF-α+ TNF-α-antibody (**P<0.01, ns, no significance)

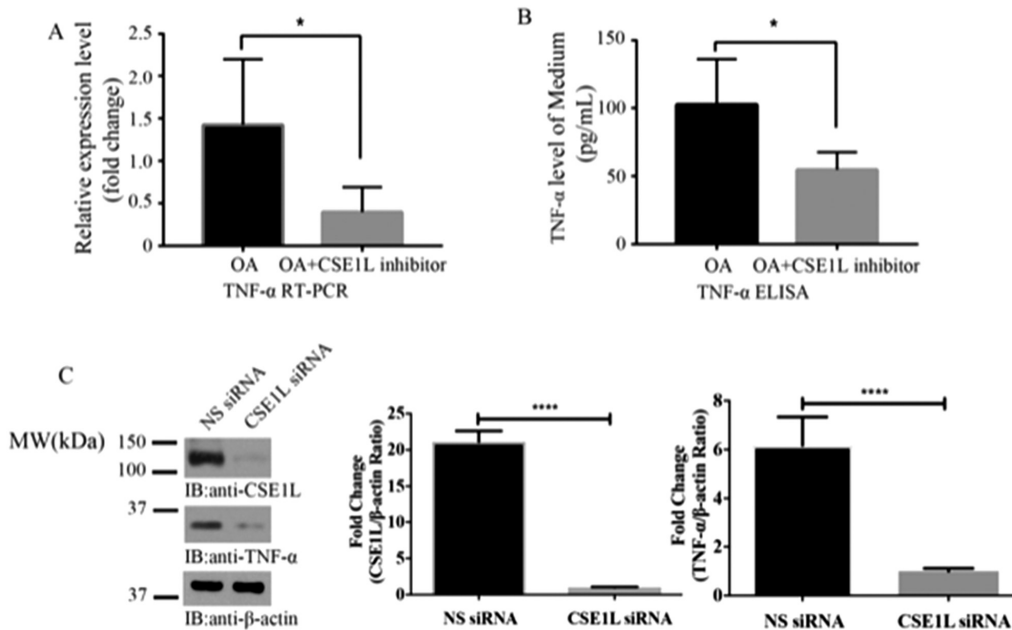


图 3 骨关节炎滑膜细胞中 TNF-α 的表达受 CSE1L 调节

Fig.3 TNF-α expression was related by CSE1L

Note: (A) The RT-PCR result of TNF-α expression after intervention of CSE1L specific siRNA(*P<0.05); (B) The western blot result of CSE1L and TNF-α expression after treatment of CSE1L specific siRNA (**P<0.001, ****P<0.0001); (C) The ELISA result of TNF-α expression after treatment of CSE1L specific siRNA(*P<0.05)

目前,临床针对骨关节炎的药物治疗作用十分有限^[24]。本研究结果显示体外用 SiRNA 干扰 CSE1L 对骨关节炎滑膜细胞炎症的抑制作用,这也为我们更好的治疗绝经后女性骨关节炎提供了新的思路,因为 CSE1L 广泛参与的转绿因子的运输作用,针对 CSE1L 进行基因治疗,从上游的水平阻断其运输各

种炎症因子至细胞核内,进而从源头阻断或抑制骨关节炎的炎症反应发生与发展。在下一阶段的实验中,我们将把研究的重点放在如何将 CSE1L 靶向治疗转化成为切实可行的治疗方法上。

参考文献(References)

[1] Blaney, DE, AP van Caam, PM van der Kraan. Osteoarthritis year in

- review 2016: biology [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25 (2): 175-180
- [2] Felson, DT, HG Schaible, Pain in osteoarthritis [M]. 2009, Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell.308
- [3] Flemming, DJ, CN Gustas-French. Rapidly Progressive Osteoarthritis: a Review of the Clinical and Radiologic Presentation [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(7): 42
- [4] Aupiais, C, Ilharreborde B, Doit C, et al. Aetiology of arthritis in hospitalised children: an observational study [J]. *Arch Dis Child*, 2015, 100(8): 742-747
- [5] Scanzello, CR, SR Goldring. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis[J]. *Bone*, 2012, 51(2): 249-257
- [6] Sun, AR, Friis T1, Sekar S, et al. Is Synovial Macrophage Activation the Inflammatory Link Between Obesity and Osteoarthritis? [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2016, 18(9): 57
- [7] Scotece, M, A Mobasheri. Leptin in osteoarthritis: Focus on articular cartilage and chondrocytes[J]. *Life Sci*, 2015, 140: 75-78
- [8] Speziali, A, Delcogliano M, Tei M, et al. Chondropenia: current concept review[J]. *Musculoskelet Surg*, 2015, 99(3): 189-200
- [9] Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, et al. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in primary knee osteoarthritis[J]. *J Med Assoc Thai*, 2015, 98 Suppl 1: S91-97
- [10] Jiang, MC. CAS (CSE1L) signaling pathway in tumor progression and its potential as a biomarker and target for targeted therapy[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 13077-13090
- [11] Tai CJ, Hsu CH, Shen SC, et al. Cellular apoptosis susceptibility (CSE1L/CAS) protein in cancer metastasis and chemotherapeutic drug-induced apoptosis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 110
- [12] Liao, CF, Lin SH, Chen HC, et al. CSE1L, a novel microvesicle membrane protein, mediates Ras-triggered microvesicle generation and metastasis of tumor cells[J]. *Mol Med*, 2012, 18: 1269-1280
- [13] Bera, TK, Bera J, Brinkmann U, et al. Cse1l is essential for early embryonic growth and development [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21 (20): 7020-7024
- [14] Kellesarian SV, Al-Kheraif AA, Vohra F, et al. Cytokine profile in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders: A systematic review[J]. *Cytokine*, 2016, 77: 98-106
- [15] Roy K, RK Kanwar, JR Kanwar. Molecular targets in arthritis and recent trends in nanotherapy[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 5407-5420
- [16] Altman, R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association [M]. *Arthritis Rheum*, 1986, 29(8): 1039-1049
- [17] General Assembly of the World Medical Association, World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects [M]. *JAMA*, 2013, 310 (20): 2191-2194
- [18] Haerdi-Landerer, MC, A Steiner, MM Suter. Primary bovine synovio-cyte cultures: a useful tool for in vitro drug testing? [J]. *Vet J*, 2011, 188(1): 58-63
- [19] Zhao, YP, Liu B, Tian QY, et al. Progranulin protects against osteoarthritis through interacting with TNF-alpha and beta-Catenin signalling[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(12): 2244-2253
- [20] Limagne E, Lançon A, Delmas D, et al. Resveratrol Interferes with IL1-beta-Induced Pro-Inflammatory Paracrine Interaction between Primary Chondrocytes and Macrophages [J]. *Nutrients*, 2016, 8 (5) [Epub ahead of print]
- [21] Liu-Bryan R, R Terkeltaub. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(1): 35-44
- [22] Wirthmueller L, Roth C, Fabro G, et al. Probing formation of cargo/importin-alpha transport complexes in plant cells using a pathogen effector[J]. *Plant J*, 2015, 81(1): 40-52
- [23] Miyamoto Y, K Yamada, Y Yoneda. Importin alpha: a key molecule in nuclear transport and non-transport functions[J]. *J Biochem*, 2016, 160(2): 69-75
- [24] Newberry SJ, FitzGerald J, SooHoo NF, et al. Treatment of Osteoarthritis of the Knee: An Update Review [J]. *AHRQ Comparative Effectiveness Reviews*. 2017, Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US).