

促炎脂肪因子 Chemerin 促进一氧化氮表达调节软骨细胞的增殖与代谢

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2976>

余成帅, 杜刚, 庞慎宁, 劳山

2095-4344.2976

投稿日期: 2019-12-19

送审日期: 2019-12-24

采用日期: 2020-02-12

在线日期: 2020-07-31

中图分类号:

R459.9; R318; R394.2

文章编号:

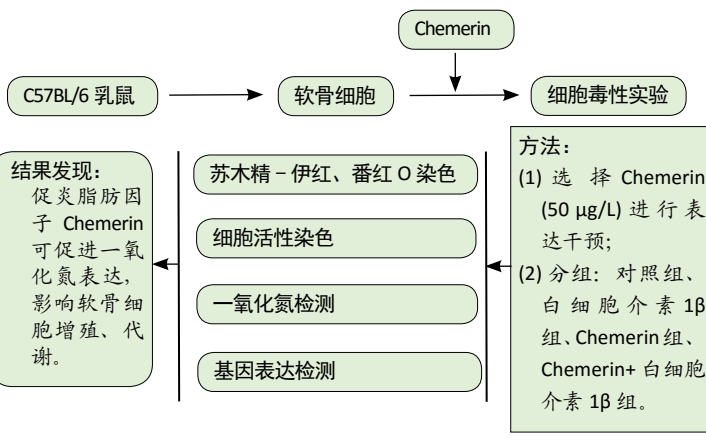
2095-4344(2021)02-00258-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点—

△生物力学负荷的单独作用不能解释超重者非负重关节骨关节炎风险的增加, 而一些脂肪因子被认为与骨关节炎的发生和发展有关;
△在体外明确了 Chemerin 影响软骨细胞增殖与代谢的可能性, 且这种可能性与促炎介质一氧化氮相关, 进一步加强了 Chemerin 与骨关节炎的联系。



文题释义:

软骨细胞: 软骨细胞和细胞外基质构成关节软骨, 软骨细胞分解与合成代谢间的不平衡决定了软骨的降解, 而软骨降解是骨关节炎的主要病理特征。因此软骨细胞损伤、凋亡致细胞外基质合成减少是骨关节炎的主要病理过程。

Chemerin: 是一种在脂肪组织、软骨组织、滑膜组织中广泛存在的脂肪因子, 其与肥胖、2型糖尿病、肝病、肾病、心血管疾病等代谢性疾病存在明显相关性, 近年来发现其与骨关节炎的发生发展可能存在紧密连接。

摘要

背景: 骨关节炎的关键病理特征体现为炎症致软骨的退变, 而软骨细胞是软骨中的唯一细胞, 其受损首当其冲。有研究表明Chemerin可刺激白细胞向炎症部位迁移, 增加软骨细胞的炎症信号, 提示Chemerin在关节炎中有所作用。前期课题组研究发现, 骨关节炎患者的血清中的Chemerin水平明显升高, 关节液中的Chemerin水平与以Kellgren-Lawrence分级为标准的骨关节炎严重程度相关, Chemerin在骨关节炎中可能作为炎症因子起重要作用。

目的: 探讨Chemerin对软骨细胞增殖、代谢的影响。

方法: 用II型胶原酶消化法分离新生乳鼠软骨细胞并培养, 建立细胞生长曲线, 用MTT法筛选对正常软骨细胞有毒性的Chemerin浓度范围。用白细胞介素1 β (10 μ g/L)构建骨关节炎的体外细胞模型。软骨细胞在药物存在下处理2 d后, 通过苏木精-伊红染色、番红O染色、二乙酸荧光素/碘化丙啶染色、观察细胞形态和增殖代谢; 另检测细胞一氧化氮分泌量分析诱导型一氧化氮合酶(一氧化氮合酶2)的表达; 同时使用荧光定量PCR检测软骨形成标志基因如蛋白聚糖、II型胶原a1, 分解代谢基因如基质金属蛋白酶13、一氧化氮合酶2基因的表达变化。

结果与结论: ①体外培养的软骨细胞活性、形态良好; ②Chemerin(50 μ g/L)及白细胞介素1 β (10 μ g/L)均可减少细胞外基质的合成, 促进细胞分泌一氧化氮和凋亡; ③荧光定量PCR结果进一步显示Chemerin和白细胞介素1 β 作用相似, 可下调软骨形成标志基因表达及上调软骨细胞分解代谢基因表达; ④结果表明, Chemerin作为一种促炎因子能促进软骨细胞一氧化氮高表达, 调节细胞代谢平衡, 促进细胞凋亡, 并与白细胞介素1 β 具有协同作用。

关键词: Chemerin; 软骨细胞; 细胞增殖; 细胞代谢; 一氧化氮

Chemerin, a pro-inflammatory adipokine, regulates chondrocyte proliferation and metabolism by increasing production of nitric oxide

Yu Chengshuai, Du Gang, Pang Shenning, Lao Shan

First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yu Chengshuai, Master candidate, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Lao Shan, MD, Chief physician, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

广西医科大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530021

第一作者: 余成帅, 男, 1993年生, 安徽省寿县人, 汉族, 广西医科大学在读硕士, 主要从事骨关节炎的防治研究。

通讯作者: 劳山, 博士, 主任医师, 广西医科大学第一附属医院骨关节外科, 广西壮族自治区南宁市 530021

<https://orcid.org/0000-0002-0862-207X> (余成帅)

基金资助: 国家自然科学基金(8156090038), 项目负责人: 劳山; 广西自然科学基金(2017GXNSFAA198159), 项目负责人: 劳山;

广西科技计划项目合同(桂科AB19110030), 项目负责人: 杜刚

引用本文: 余成帅, 杜刚, 庞慎宁, 劳山. 促炎脂肪因子 Chemerin 促进一氧化氮表达调节软骨细胞的增殖与代谢 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2):258-263.



Abstract

BACKGROUND: The key pathological characteristics of osteoarthritis are manifested in the degeneration of the cartilage caused by inflammation, and chondrocytes are the only cells in cartilage tissues. Studies have shown that Chemerin can stimulate the migration of leukocytes to the inflammation site and increase the inflammation signal of chondrocytes, suggesting that Chemerin can play a role in arthritis. Our previous research indicated that the serum Chemerin level in patients with osteoarthritis was significantly increased, and the Chemerin level in the synovial fluid was related to the severity of osteoarthritis based on the Kellgren-Lawrence classification. Chemerin may be used as an inflammatory factor in osteoarthritis.

OBJECTIVE: To investigate the effect of Chemerin on the proliferation and metabolism of chondrocytes.

METHODS: The chondrocytes from neonatal mice were isolated by collagenase type II digestion, and then cultured. Cell growth curves were established and the range of concentrations of Chemerin that exhibited toxicity to normal chondrocytes was screened using an MTT assay. Subsequently, 10 $\mu\text{g/L}$ interleukin-1 β was used to stimulate the chondrocytes in order to establish an in vitro model of osteoarthritis induction. After the chondrocytes had been cultured in the presence of the drug for 2 days, cell morphology, proliferation and metabolism were evaluated by hematoxylin-eosin staining and diacetate fluorescein/propidium iodide staining. In addition, the expression of inducible nitric oxide polymerase was analyzed by measuring the secretion of nitric oxide. Furthermore, qRT-PCR was used to quantify mRNA expression of proteoglycan, type II collagen $\alpha 1$, matrix metalloproteinase-13 and nitric oxide synthase 2.

RESULTS AND CONCLUSION: The chondrocytes cultured in vitro exhibited healthy activity and morphology. Furthermore, chemerin (50 $\mu\text{g/L}$) and interleukin-1 β (10 $\mu\text{g/L}$) were able to reduce the synthesis of extracellular matrix, enhance the secretion of nitric oxide and increase chondrocyte apoptosis. More importantly, the qRT-PCR results indicated that Chemerin and interleukin-1 β caused similar effects, by which the expression of cartilage-specific genes was downregulated and catabolism-related genes upregulated. As a pro-inflammatory factor, Chemerin can increase the generation of nitric oxide in chondrocytes, regulate cell metabolism, stimulate cell apoptosis and act synergistically with interleukin-1 β .

Key words: Chemerin; chondrocyte; cell proliferation; cell metabolism; nitric oxide

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 8156090038 (to LS); the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 2017GXNSFAA198159 (to LS); the Scientific Research Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. AB19110030 (to DG)

How to cite this article: YU CS, DU G, PANG SN, LAO S. Chemerin, a pro-inflammatory adipokine, regulates chondrocyte proliferation and metabolism by increasing production of nitric oxide. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(2):258-263.

0 引言 Introduction

骨关节炎主要发生在中老年人中，发病率逐年上升，尤其是肥胖女性^[1]。它是一种退化性关节疾病，对受影响的个人、卫生保健系统和更广泛的社会经济成本造成巨大和日益加重的负担^[2-3]。既往研究表明肥胖、遗传、机械应力、炎症和环境等多种因素均可导致关节内结构紊乱，诱发骨关节炎发生。肥胖是骨关节炎的独立危险因素^[4]，迄今为止尚未完全了解肥胖如何导致骨关节炎。从历史上看，这种联系归因于体质量增加导致关节过度负荷，并且大多数人认为肥胖使局部负重关节软骨机械应力增加而导致骨关节炎发生^[5-6]。然而，肥胖与髌骨关节炎的发生并没有显著的相关性^[7]，而且非负重手指间关节骨关节炎的发生却随着体质量的增长也增长^[8]。另外动物实验中发现给予高脂饮食可加剧骨关节炎过程中滑膜炎的恶化^[9]。肥胖引起的骨关节炎的病因更为复杂，脂肪组织在这方面起着至关重要的作用，因为它们是细胞因子、趋化因子和代谢活性介质脂肪因子的主要来源^[10]。脂肪因子包括脂联素和瘦素，已被证明可以调节软骨的炎症免疫反应^[11-13]，这提示肥胖与骨关节炎的发生超越了生物力学的联系，骨关节炎的发生并不完全依赖于机械压力的增加。

Chemerin 是一种广泛分布于脂肪等组织中并具有内分泌活性的脂肪因子，其表达与肥胖、2 型糖尿病、心血管疾病等代谢性疾病有明显的相关性^[14-16]。此外，作者所在团队先前发现，骨关节炎患者血清中 Chemerin 水平显著升高，滑液中的量与基于 Kellgren-Lawrence(KL) 等级划分的骨关节炎严重程度有关^[17]。因此，作者从脂肪代谢的角度来推测 Chemerin 会增加骨关节炎的发生。据报道，一氧化氮(NO) 在膝关节中的过载是骨关节炎发生的重要因素，而且白细胞介素 1 β 诱导的骨关节炎可显著增加 NO 产生，并且这种效应可以被一氧化氮合酶抑制剂 L-NMMA 所调节^[18]。因此，作者大胆猜测 Chemerin 可使软骨细胞分泌更多的 NO，加剧了骨关节炎的发展。此次实验主要通过体外构建白细胞介素 1 β 介导的阳性对照骨关节炎细胞模型来探讨 Chemerin 产生的软骨退变效应，为骨关节炎的早期诊断及干预提供实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞干预实验。

1.2 时间及地点 于 2019 年 6 至 11 月在广西医科大学临床教学大楼再生医学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 广西医科大学实验动物中心供应的 6 只出生 1 周内的 C57BL/6 乳鼠(机构批准号: 201805008), 雌雄不限。

1.3.2 实验仪器与试剂 超净细胞操作台(苏洁净化, 苏州); ABI 7500 型定量 PCR 仪 (Applied Biosystems Inc., 美国); CO₂ 培养箱、MultiSkán 酶标仪、DMEM 培养基、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (Thermo Scientific, 美国); 荧光倒置显微镜 (Olympus, 日本); 重组鼠 Chemerin(R&D, 美国); 重组鼠白细胞介素 1 β (PeproTech, 美国); DMSO、MTT、二乙酸荧光素 (FDA) 染色、碘化丙啶 (PI) 染料 (Sigma, 美国); 0.25% 胰蛋白酶、II 型胶原酶、青霉素-链霉素混合液、细胞培养级 PBS 溶液、苏木精-伊红染色液、番红 O 染色液、细胞 RNA 快速提取试剂盒(索莱宝, 北京); 无支原体胎牛血清(四季青, 浙江); 总一氧化氮合酶抑制剂 L-NMMA(碧云天, 上海)。

1.4 实验方法

1.4.1 软骨细胞的分离培养 无菌下提取新生 C57BL/6 小鼠的膝关节软骨后放在在含有 II 型胶原酶 (2 g/L) 的 DMEM 中消化 4 h。消化结束后将细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入含体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基, 以适宜的细胞浓度接种于培养皿中, 置入恒温孵育箱中培养 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5%CO₂, 饱和湿度), 每 2 d 更换培养液 1 次, 倒置显微镜下观察细胞生长情况, 细胞铺满培养皿底达 80% 以上进行传代, 第二三代细胞用于以下实验。

1.4.2 细胞计数法描绘生长曲线 原代软骨细胞以 2×10^4 个/孔接种于 24 孔板, 连续培养 12 d, 每 2 d 用细胞计数板计数 1 次, 每时间点重复 3 次, 以时间为横坐标, 细胞数为纵坐标绘制软骨细胞生长曲线。

1.4.3 细胞毒性实验 取第 2 代生长良好的软骨细胞制成单细胞悬液, 并以 1×10^4 /孔的细胞浓度接种于 96 孔板中。培养 24 h,

细胞的提取和培养:

细胞来源:	出生 1 周内 C57BL/6 小鼠膝关节软骨
原代培养方法:	II 型胶原酶消化法
基础培养基:	H-DMEM 培养基: 体积分数为含 1% 链霉素、1% 青霉素、10% 胎牛血清
原代培养时间:	培养 24 h 后初次换液, 以后每 2 d 换 1 次液
细胞传代:	细胞融合大于 80% 时以 1 : 2 比例传代, 取第二三代用于实验
伦理学批准:	该实验经过广西医科大学动物实验伦理委员会批准

细胞贴壁后更换培养液为含有不同质量浓度 Chemerin 因子的培养基, 其质量浓度分别为 0, 1, 5, 10, 12.5, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 160, 200, 240, 320 $\mu\text{g/L}$ 继续培养。2 d 后, 应用 MTT 法检测 Chemerin 对关节软骨细胞的毒性, 分别向各培养孔加入 20 μL MTT 溶液 (终浓度 5 g/L), 继续培养 4 h 后小心吸去孔内培养液, 每孔加入 200 μL 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min, 使紫色结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度 (A) 值。实验重复 3 次。

MTT 分析表明, 在 Chemerin 50 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度下, 细胞增殖明显下降, 因此选择该质量浓度进行以下实验。细胞分成 4 组: 对照组 (Chemerin 0 $\mu\text{g/L}$)、Chemerin(50 $\mu\text{g/L}$) 组、白细胞介素 1 β (10 $\mu\text{g/L}$) 组、Chemerin(50 $\mu\text{g/L}$) + 白细胞介素 1 β (10 $\mu\text{g/L}$) 组。

1.4.4 苏木精 - 伊红染色、番红 O 染色 细胞以 4×10^4 / 孔种在 24 孔板内, 按上述分组后继续培养 2 d, 取出细胞爬片, PBS 轻洗 3 次后用体积分数 95% 乙醇固定 30 min。随后, 在 PBS 中重新洗涤细胞, 并进行苏木精 - 伊红和番红 O 染色。染毕后, 用双蒸馏水冲洗细胞并用中性胶密封。荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.4.5 细胞活性染色 细胞以 10×10^4 / 孔种在 6 孔板内, 同样分组后继续培养 2 d, 取出细胞爬片, PBS 洗 3 遍, 加入含 FDA 100 mg/L 和 PI 400 mg/L 的培养基孵育, 在避光黑暗中对细胞染色 5 min, 迅速 PBS 冲洗 3 遍, 倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.6 NO 浓度检测 除上述 4 组分组外, 还设定了另外 2 组: 对照 +L-NMMA(0.5 mmol/L) 组和 Chemerin (50 $\mu\text{g/L}$)+ L-NMMA (0.5 mmol/L) 组。6 组细胞同样以 10×10^4 / 孔种在 6 孔板内培养 2 d, 之后分别取其培养上清液按试剂盒步骤检测 NO 分泌量, 计算公式: $\Delta A = A_{\text{样本}} - A_{\text{对照}}$, NO 浓度 ($\mu\text{mol/L}$) = $(\Delta A + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} = 250 \times (\Delta A + 0.0103)$, $V_{\text{反应}}$ 为反应总体积, 0.2 mL; $V_{\text{样}}$ 为反应中样品体积, 0.1 mL; A 为吸光度值 (550 nm)。

1.4.7 RNA 提取及荧光定量 PCR 分析 荧光定量 PCR 分析软骨形成标志基因蛋白聚糖、II 型胶原 a1 以及分解代谢基因基质金属蛋白酶 13、一氧化氮合酶 2 的表达。表 1 中列出了荧光定量 PCR 所测基因的相应上下游引物碱基序列。同 1.4.6 中分组后处理培养 2 d, 按北京索莱宝科技有限公司提供的细胞 RNA 快速提取试剂盒完成 RNA 提取, 按赛默飞科技有限公司提供的反转录试剂盒合成 cDNA、荧光定量 PCR 试剂盒定量检测。引物序列见表 1。设 GAPDH 作为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析软骨细胞标记基因的表达。每种样本、每个基因实验检测重复 3 次减少操作误差。

表 1 | 基因引物序列

Table 1 | Primer sequences for each gene analyzed by qRT-PCR

名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
GAPDH	AAG CCC ATC ACC ATC TTC CAG GAG	ATG AGC CCT TCC ACA ATG CCA AAG
蛋白聚糖 II 型胶原 a1	CAC CGC CAT TGC CTC TGT TCC CTT CCT GAG CCG TGC ATG TTA GAG	CCA GCC AGC ATA GCA CTT GTC C TGC CGC TGG TGT CCT ATC TCG
基质金属蛋白酶 13	ACC TAG AAG GAG GCA GCA GAG AAC	AGC CAC AGC AGG ACC GGA AG
一氧化氮合酶 2	GCC GAG TGC AAG CAT GGA GAG	GGC TGT GAG GTG AGG TTG AAG AAG
β -actin	5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3'	5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'

1.5 主要观察指标 ①软骨细胞毒性分析; ②软骨细胞活性染色结果; ③软骨细胞苏木精 - 伊红、番红 O 染色结果; ④软骨细胞 NO 分泌结果; ⑤软骨细胞代谢相关基因表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量数据, 采用单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 时差异有显著性意义。

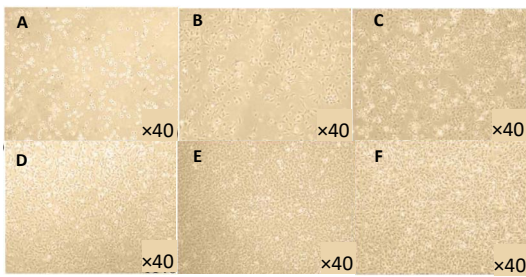
2 结果 Results

2.1 原代软骨细胞的观察 软骨细胞观察结果见图 1。通过 II 型胶原酶消化法所得软骨细胞, 最初接种时均呈现出小圆形透亮状, 漂浮于培养基中。接种后大部分细胞可在 24 h 内完成贴壁, 少部分可有伸展, 此时细胞体积尚较小, 呈扁圆形、三角形, 均匀散在生长 (图 1A)。继续培养至 2, 4, 6, 8, 10 d 时可见细胞数逐渐增多、体积渐大, 细胞形态多样化呈类圆形、多角形、星形等, 越到后期细胞铺满培养皿底长成类经典的“铺路石”状外观 (图 1B-F)。

2.2 细胞生长曲线及细胞毒性实验 图 2A 示细胞生长曲线结果, 0-2 d 原代软骨细胞增殖较缓, 2-8 d 快速增殖, 8-10 d 未见明显增殖, 10 d 以后细胞出现负增长。图 2B 示 Chemerin 对软骨细胞的毒性作用, Chemerin 处理小鼠膝关节软骨细胞在较低质量浓度时并不能明显抑制软骨细胞生长, 当 Chemerin 增加到质量浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 时开始出现对正常软骨细胞较明显的毒性作用。

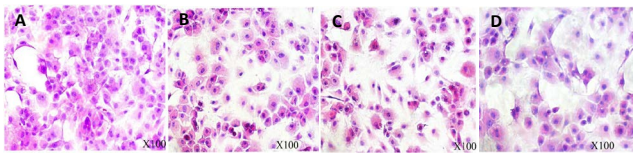
2.3 苏木精 - 伊红染色结果 见图 3。各组软骨细胞形态未见明显的特殊差异。典型的软骨细胞仍以扁圆形、多角形, 砖块状为主; 细胞核呈紫蓝色, 可见明显的双核仁、多核仁形态, 细胞质红染, 胞浆及细胞周围有紫红或红色异染样区出现。在药物存在的情况下, 细胞增殖减慢, 这一观察结果与毒性实验的结果一致。

2.4 番红 O 染色结果 见图 4。番红 O 染色通过阳性染色区来分析软骨细胞外基质糖胺聚糖的分泌减少。对照组培养 2 d 后, 糖胺聚糖在细胞周围分布均匀呈强染区, 在同一时期, 3 个实验组的糖胺聚糖染色区均减弱。还发现 Chemerin (50 $\mu\text{g/L}$) + 白细胞介素 1 β (10 $\mu\text{g/L}$) 组糖胺聚糖合成染色减弱最明显, 而 Chemerin 和白细胞介素 1 β 组之间差异无显著性意义。说明 Chemerin 可有类似于白细胞介素 1 β 抑制软骨细



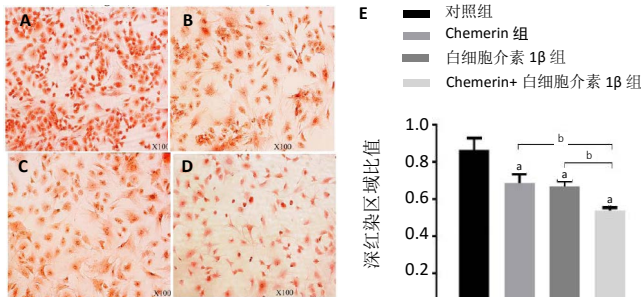
图注：图 A 为原代软骨细胞接种后 24 h，大部分细胞贴壁生长，体积小，以扁圆形、三角形等为主；B 为培养 2 d 时，细胞数较前增多不明显，细胞体积增大；C 为培养 4 d，见细胞数明显增多；D、E 为分别培养 6 d 和 8 d，细胞数量进一步增多，此时细胞多似类圆形、多角形、星形，细胞体积增大、胞浆逐渐丰富、胞核清晰；F 为培养 10 d，细胞已基本铺满皿底，类似“铺路石”样，但较第 8 天时细胞数未见明显增殖
图 1 | 倒置显微镜下软骨细胞观察结果 (x40)

Figure 1 | Observation of chondrocytes using an inverted microscope (x40)



图注：图 A-D 分别为对照组、Chemerin 组、白细胞介素 1β 组、Chemerin+ 白细胞介素 1β 组。与对照组相比，各实验组细胞生长缓慢，有抑制软骨细胞增殖的趋势
图 3 | 苏木精-伊红染色观察不同干预条件处理 2 d 后软骨细胞形态 (x100)

Figure 3 | Morphology of chondrocytes after 2 days of culture under different intervention conditions (hematoxylin-eosin staining, x100)



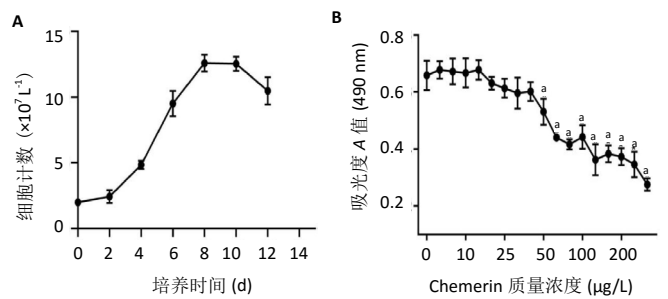
图注：图 A-D 分别为对照组、Chemerin 组、白细胞介素 1β 组、Chemerin+ 白细胞介素 1β 组，为糖胺聚糖分泌的定性评价 (x100)，图 A 深染区最明显，图 B、C 染色稍次之，图 D 深染区最浅；E 为染色强度的相对定量比较，与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；两两比较，^b $P < 0.05$

图 4 | 番红 O 染色观察不同干预条件处理 2 d 后细胞外基质糖胺聚糖的分泌
Figure 4 | Secretion of glycosaminoglycans from extracellular matrix after 2 days of culture under different intervention conditions (safranin-O staining)

胞外基质糖胺聚糖的分泌，具有破坏体外二维培养软骨细胞结构的作用。

2.5 细胞活性染色 FDA/PI 荧光染色结果见图 5，对照组具有绿色荧光的活细胞数明显多于其他各组，而其他 3 个实验组有较多的红色荧光死亡细胞。Chemerin (50 μg/L) 组和白细胞介素 1β (10 μg/L) 组活细胞数间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，Chemerin+ 白细胞介素 1β 联合存在时可使死亡细胞数量显著增加 ($P < 0.05$)。结果表明，与对照组相比，Chemerin 和白细胞介素 1β 对软骨细胞的存活有抑制效应，不利于软骨细胞的生长。

2.6 NO 的浓度结果 见图 6，NO 在体内或水溶液中极易氧化成 NO^2 ，在酸性条件下， NO^2 与重氮盐磺酰胺生成重氮化合物，进一步与奈基乙烯基二胺偶合，产物在 550 nm 处有特征性吸收峰，测定其 A 值，可以计算 NO 浓度。体外药物刺激 2 d 后，软骨细胞中 NO 的生成量较对照组增加，而当 Chemerin 和白细胞介素 1β 共存时，NO 的生成明显增加 (图 6A)。这些结果与既往的研究一致，白细胞介素 1β 可以促进 NO 的分泌，



图注：图 A 为培养原代小鼠关节软骨细胞生长曲线，0-2 d 为缓慢增长期，2-8 d 为快速增长期，8-10 d 为平台期，10-12 d 为负增长期；B 为经过不同质量浓度 Chemerin 刺激正常软骨细胞 2 d 后对其毒性的分析，与对照组 (Chemerin 0 μg/L) 比较，^a $P < 0.05$

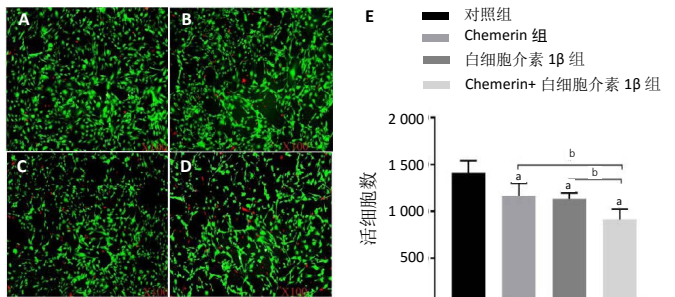
图 2 | 细胞生长曲线及细胞毒性结果

Figure 2 | Cell growth curve and cytotoxicity test

也表明 Chemerin 具有类似的作用。当在 Chemerin 中加入 L-NMMA 后，NO 的分泌明显减少 (图 6B)。换句话说，L-NMMA 成功地抑制了由诱导型一氧化氮合酶合成的 NO，表明 Chemerin 通过促进软骨细胞中诱导型一氧化氮合酶表达而增加 NO 产生进而影响软骨细胞存活的这一过程可被 L-NMMA 所阻断。

图 5 | FDA/PI 染色观察不同干预条件处理 2 d 后软骨细胞活性

Figure 5 | FDA/PI detection of living and dead chondrocytes after 2 days of culture under different intervention conditions

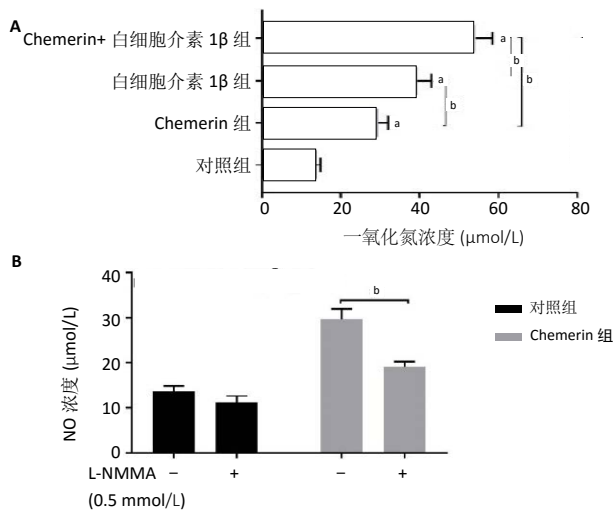


图注：图 A-D 分别为对照组、Chemerin 组、白细胞介素 1β 组、Chemerin+ 白细胞介素 1β 组软骨细胞活性的定性评价 (x100)，对照组活细胞数较其余 3 组明显较多且死细胞少，其他 3 组活细胞减少、死细胞明显增多，且在 Chemerin+ 白细胞介素 1β 协同同时作用更明显。E 为活细胞的相对定量比较，与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；两两比较，^b $P < 0.05$

图 5 | FDA/PI 染色观察不同干预条件处理 2 d 后软骨细胞活性
Figure 5 | FDA/PI detection of living and dead chondrocytes after 2 days of culture under different intervention conditions

分泌，也表明 Chemerin 具有类似的作用。当在 Chemerin 中加入 L-NMMA 后，NO 的分泌明显减少 (图 6B)。换句话说，L-NMMA 成功地抑制了由诱导型一氧化氮合酶合成的 NO，表明 Chemerin 通过促进软骨细胞中诱导型一氧化氮合酶表达而增加 NO 产生进而影响软骨细胞存活的这一过程可被 L-NMMA 所阻断。

2.7 软骨细胞代谢基因分析 基因的相对表达量见图 7。在培养 2 d 后，通过对软骨细胞蛋白聚糖 (一种主要由糖胺聚糖组成的蛋白多糖)、II 型胶原 a1、基质金属蛋白酶 13 和一氧化氮合酶 2 基因表达的相对定量检测，进一步研究 Chemerin 对软骨细胞细胞外基质合成和降解的影响。如图 7A 所示，与对照组相比，3 个药物实验组细胞中蛋白聚糖和 II 型胶原 a1 类软骨形成标记基因的相对表达水平均降低，而与细胞外基质降解密切相关的基因一氧化氮合酶 2 和基质金属蛋白酶 13 的表达水平显著增加。此外，实验结果表明 Chemerin 的作用可能不像白细胞介素 1β 那样强大，但两者之间的协同



图注：图 A 示含有不同处理条件的细胞组均较对照组明显促进 NO 的分泌；B 表示 Chemerin 组 NO 累积量在有 L-NMMA 存在时表达明显减少。与对照组比较，^a*P* < 0.05；两两比较，^b*P* < 0.05

图 6 | 不同干预条件处理 2 d 后细胞培养上清液中 NO 的累积浓度
Figure 6 | Cumulative concentration of nitric oxide in cell culture supernatant after 2 days of culture under different intervention conditions

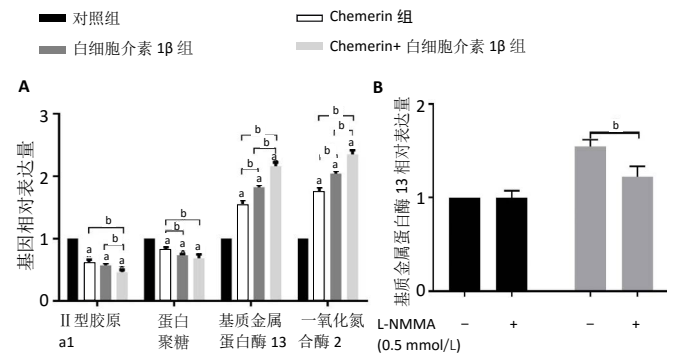
作用在基因水平上也是显而易见的。在 Chemerin 组中加入 L-NMMA 后，基质金属蛋白酶 13 的相对表达也明显降低 (图 7B)，与图 6B 的结果一致，这也反过来证明 NO 能促进基质金属蛋白酶 13 基因的表达。

3 讨论 Discussion

此次研究借鉴经典方法分离和培养小鼠膝关节软骨细胞^[19]，结果表明，所得软骨细胞具有经典形态和良好活性。此外，作者还在此次实验环境下摸索出软骨细胞生长曲线，这为后续实验提供了一个稳定可靠的软骨细胞来源。

近 10 年来有研究表明，Chemerin 是一种具有趋化活性的脂肪因子，肥胖患者中 Chemerin 系统水平较高^[20]，不仅在类风湿关节炎患者血清中 Chemerin 浓度升高^[21]，而且在膝关节滑液和血清中也升高，其浓度与疾病的严重程度显著相关^[17, 22-23]。此外，EISINGER 等^[24]、BERG 等^[25]报道 Chemerin 可以刺激白细胞进入关节组织，增加关节软骨细胞的炎症信号，这无疑加剧了骨关节炎的进展。

因此，作者认为 Chemerin 在全身和局部组织中的水平在骨关节炎的发病机制中起着重要的作用。关节软骨是骨关节炎的靶组织，关节软骨退化是骨关节炎的主要病理特征^[26-27]，软骨细胞作为软骨中的唯一细胞合成和分泌细胞外基质是维持软骨稳定性的关键，软骨细胞凋亡则是骨关节炎发病的重要因素^[28-29]。于是，作者在体外研究 Chemerin 对软骨细胞增殖和代谢的影响，并成功地重建了白细胞介素 1β 诱导的软骨细胞炎症反应^[30]。在此次研究中，细胞毒性结果表明 Chemerin 在较高质量浓度 (50 μg/L) 抑制了软骨细胞增殖，但质量浓度较低时则未出现抑制。作者猜想一方面 Chemerin 累积的毒性作用可能在低质量浓度下是不够的，另一方面表明 Chemerin 可能在疾病的不同阶段具有不同效果。苏木精-伊红染色显示，不同实验组细胞形态无明显差异，



图注：图 A 示，与对照组相比含有不同处理条件的细胞组蛋白聚糖、II 型胶原 a1 表达均会下调，基质金属蛋白酶 13、一氧化氮合酶 2 则表达上调。图 B 表示，Chemerin 组基质金属蛋白酶 13 表达量在有 L-NMMA 存在时明显降低。与对照组比较，^a*P* < 0.05；两两比较，^b*P* < 0.05

图 7 | 荧光定量 PCR 检测不同干预条件处理 2 d 后软骨细胞蛋白聚糖、II 型胶原 a1、基质金属蛋白酶 13、一氧化氮合酶 2 基因相对表达量
Figure 7 | qRT-PCR detection of the relative expression of proteoglycan, type II collagen α1, matrix metalloprotease-13 and nitric oxide synthase 2 in chondrocytes after 2 days of culture under different intervention conditions

早期软骨细胞的变性可能比变形更明显；番红 O 染色显示，Chemerin 能抑制细胞外基质的合成分泌；而 FDA/PI 染色显示 Chemerin 能显著促进软骨细胞的凋亡。Chemerin 与白细胞介素 1β 联合作用对细胞外基质降解作用最强，对细胞凋亡的影响最为明显，这些结果提示 Chemerin 可引起软骨细胞功能障碍，破坏软骨的稳定性。

关节软骨基质的主要成分是糖胺聚糖和 II 型胶原，二者对于软骨的稳定性是至关重要的^[31]。基质金属蛋白酶在细胞基质代谢中起重要作用，包括骨关节炎软骨细胞基质的代谢和降解^[32]。基质金属蛋白酶能特异裂解胶原网络并暴露最初嵌入在细胞外基质中的软骨细胞，使软骨细胞受到多种有害因素的直接攻击，最终导致细胞凋亡。据 RUAN 等^[33]报道，系统水平中的基质金属蛋白酶 13 在膝关节骨关节炎中起作用，并可受炎症因子调节。基质金属蛋白酶 13 是以降解 II 型胶原为代表的基质金属蛋白酶家族成员之一，在正常组织中不表达，但在骨关节炎软骨细胞中高表达^[34]。在此次研究中，荧光定量 PCR 结果证实蛋白聚糖和 II 型胶原 a1 类软骨标记基因的表达水平被 Chemerin 和白细胞介素 1β 下调，而基质金属蛋白酶 13 基因表达上调，进一步佐证了番红 O 和 FDA/PI 染色的结果。因此，荧光定量 PCR 结果进一步证明 Chemerin 在基因水平上抑制软骨细胞的代谢。

在骨关节炎的发病过程中，多种细胞因子异常表达，导致软骨细胞代谢和功能紊乱。目前导致软骨结构改变及其功能障碍的潜在分子机制仍不明确^[35]。在骨关节炎中，白细胞介素 1β 可通过 NO、活性氧、MAPK、核因子 κB 等途径诱导细胞损伤和死亡^[18, 36-38]。此外，一些研究发现 NO 在关节疾病中负载过多，NO 主要来源于骨关节炎的软骨细胞分泌，通过诱导软骨细胞凋亡、基质金属蛋白酶合成和促炎细胞因子表达，参与软骨细胞的病理改变^[39]。在促炎和 / 或免疫刺激条件下，诱导型一氧化氮合酶可在多种细胞类型中被诱导产生少量 NO，并可持续较长时间^[40]。SOROKIN^[41]发现 NO 起作用也与其他细胞因子密切相关，关节中 NO 的产生往往

需要其他细胞因子刺激。此文中一氧化氮合酶 2 基因的高表达 (图 7A), 以及应用 L-NMMA 后 NO 分泌减少 (图 6B) 和基质金属蛋白酶 13 表达降低 (图 7B), 初步证明了 Chemerin 能在基因水平上促进一氧化氮合酶 2 的高表达, 产生大量的 NO, 从而提高基质金属蛋白酶 13 的活性。

此次研究验证了白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞炎症模型能否成功建立; 同时采用推荐剂量为 50 $\mu\text{g/L}$ 的 Chemerin 不仅影响正常软骨细胞的增殖和代谢, 而且能加重其炎症反应。综上所述 Chemerin 是一种促炎因子, 它能增加软骨细胞中 NO 的生成, 调节细胞代谢, 诱导细胞凋亡, 并与白细胞介素 1 β 协同作用, 可以诱导或加剧骨关节炎的发展。Chemerin 可能在肥胖引起的骨关节炎中起重要作用, 可以作为反映疾病严重程度的一种新颖而可靠的生物标志物, 并可有助于临床上对肥胖患者早期骨关节炎的监控及干预。未来需要进一步讨论脂质代谢紊乱、轻度炎症和脂肪因子对关节组织的影响, 并将其与骨关节炎相关联。

作者贡献: 实验设计为杜刚, 实验实施为余成帅, 实验评估为劳山, 资料收集为庞慎宁。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(8156090038)、广西自然科学基金(2017GXNSFAA198159)、广西科技计划项目合同(桂科 AB19110030)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经广西医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 201805008。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过广西医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] HUNTER DJ, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393:1745-1759.

[2] YOUM J, CHAN V, BELKORA J, et al. Impact of socioeconomic factors on informed decision making and treatment choice in patients with hip and knee OA. *J Arthroplasty*. 2015;30:171-175.

[3] HUNTER DJ, SCHOFIELD D, CALLANDER E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(7):437-441.

[4] WANG T, HE C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;44:38-50.

[5] THIJSSSEN E, VAN CAAM A, VAN DER KRAAN PM. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(4):588-600.

[6] FRANCISCO V, PÉREZ T, PINO J, et al. Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. *J Orthop Res*. 2018;36(2):594-604.

[7] SINGER SP, DAMMERER D, KRISMER M, et al. Maximum lifetime body mass index is the appropriate predictor of knee and hip osteoarthritis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2018;138(1):99-103.

[8] REYES C, LEYLAND KM, PEAT G, et al. Association between overweight and obesity and risk of clinically diagnosed knee, hip, and hand osteoarthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(8):1869-1875.

[9] LARRAÑAGA-VERA A, LAMUEDRA A, PÉREZ-BAOS S, et al. Increased synovial lipodystrophy induced by high fat diet aggravates synovitis in experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):264.

[10] XIE C, CHEN Q. Adipokines: New Therapeutic Target for Osteoarthritis? *Curr Rheumatol Rep*. 2019;21(12):71.

[11] CHEN X, LU J, BAO J, et al. Adiponectin: a biomarker for rheumatoid arthritis?. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(1):83-89.

[12] RUSCITTI P, DI BENEDETTO P, BERARDICURTI O, et al. Adipocytokines in rheumatoid arthritis: the hidden link between inflammation and cardiometabolic comorbidities. *J Immunol Res*. 2018;2018:8410182.

[13] YAN M, ZHANG J, YANG H, et al. The role of leptin in osteoarthritis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(14):e0257.

[14] STOJEK M. The role of chemerin in human disease. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71:110-117.

[15] 宫计划, 徐昭. 2 型糖尿病患者血清脂肪细胞因子 Chemerin 表达水平及临床价值 [J]. *中国医学创新*. 2018;15(27):22-25.

[16] KAUR J, MATTU HS, CHATHA K, et al. Chemerin in human cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*. 2018;110:1-6.

[17] HUANG K, DU G, LI L, et al. Association of chemerin levels in synovial fluid with the severity of knee osteoarthritis. *Biomarkers*. 2012;17(1):16-20.

[18] CIPOLLETTA C, JOUZEAU JY, GEGOUT-POTTIE P, et al. Modulation of IL-1-induced cartilage injury by NO synthase inhibitors: a comparative study with rat chondrocytes and cartilage entities. *Br J Pharmacol*. 1998;124(8):1719-1727.

[19] JONASON JH, HOAK D, O'KEEFE RJ. Primary murine growth plate and articular chondrocyte isolation and cell culture. *Methods Mol Biol*. 2015;1226:11-18.

[20] BUECHLER C, FEDER S, HABERL EM, et al. Chemerin Isoforms and Activity in Obesity. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1128.

[21] MAKRIKAKIS K, FRAGIADAKI K, SMITH J, et al. Interrelated reduction of chemerin and plasminogen activator inhibitor-1 serum levels in rheumatoid arthritis after interleukin-6 receptor blockade. *Clin Rheumatol*. 2015;34(3):419-427.

[22] 段国庆, 任春风. 血清 chemerin 含量与膝骨关节炎严重程度的相关性 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*. 2015;9(1):63-66.

[23] ZHAO L, YAMAGUCHI Y, GE X, et al. Chemerin 156F, generated by chymase cleavage of prochemerin, is elevated in joint fluids of arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):132.

[24] EISINGER K, BAUER S, SCHÄFFLER A, et al. Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(1):90-96.

[25] BERG V, SVEINBJÖRNSSON B, BENDIKSEN S, et al. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin(21-157). *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):R228.

[26] MAN GS, MOLOGHIANU G. Osteoarthritis pathogenesis- a complex process that involves the entire joint. *J Med Life*. 2014;7(1):37-41.

[27] GUILAK F, NIMS RJ, DICKS A, et al. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol*. 2018;71-72:40-50.

[28] DERFOUL A, MIYOSHI AD, FREEMAN DE, et al. Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(6):646-655.

[29] GROGAN SP, CHEN X, SOVANI S, et al. Influence of cartilage extracellular matrix molecules on cell phenotype and neocartilage formation. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(1-2):264-274.

[30] YAN H, SU YX, LIN XY. In vitro culture and identification of IL-1 β induced degeneration of cartilage cells in New Zealand white rabbits knee joint. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2014;34(1):81-86.

[31] HALONEN KS, MONONEN ME, JURVELIN JS, et al. Importance of depth-wise distribution of collagen and proteoglycans in articular cartilage--a 3D finite element study of stresses and strains in human knee joint. *J Biomech*. 2013;46(6):1184-1192.

[32] CHUBINSKAYA S, KUETTNER KE, COLE AA. Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Lab Invest*. 1999;79(12):1669-1677.

[33] RUAN G, XU J, WANG K, et al. Associations between knee structural measures, circulating inflammatory factors and MMP13 in patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(8):1063-1069.

[34] LI Z, LIU B, ZHAO D, et al. Protective effects of Nebivolol against interleukin-1 β (IL-1 β)-induced type II collagen destruction mediated by matrix metalloproteinase-13 (MMP-13). *Cell Stress Chaperones*. 2017;22(6): 767-774.

[35] CHARLIER E, RELIC B, DEROYER C, et al. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2146.

[36] CHELESCHI S, FIORAVANTI A, DE PALMA A, et al. Methylsulfonylmethane and mobile prevent negative effect of IL-1 β in human chondrocyte cultures via NF- κ B signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2018;65:129-139.

[37] KALUNIAN KC. Current advances in therapies for osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(3):246-250.

[38] JENEI-LANZL Z, MEURER A, ZAUCKE F. Interleukin-1 β signaling in osteoarthritis- chondrocytes in focus. *Cell Signal*. 2019;53:212-223.

[39] SANTORO A, CONDE J, SCOTECE M, et al. Choosing the right chondrocyte cell line: Focus on nitric oxide. *J Orthop Res*. 2015;33(12):1784-1788.

[40] LEONIDOU A, LEPETSOS P, MINTZAS M, et al. Inducible nitric oxide synthase as a target for osteoarthritis treatment. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(4):299-318.

[41] SOROKIN A. Nitric oxide synthase and cyclooxygenase pathways: a complex interplay in cellular signaling. *Curr Med Chem*. 2016;23(24):2559-2578.