

• 基础研究 •

过表达 Nampt 载体的构建及其对骨关节炎大鼠细胞因子的影响

厦门大学附属福州第二医院关节外科 (福州 350007) 康荣彬 吴 星 李炜明¹

【摘 要】 目的 探讨尼克酰胺磷酸核糖转移酶 (Nampt) 在骨关节炎中的作用机制。**方法** 构建 Nampt 过表达载体并转染到骨关节炎大鼠模型体内, 采用 Real-Time PCR 检测 Nampt 过表达效率, Western blot 检测细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、TGF- β 的表达。**结果** Nampt 过表达组的 mRNA 相对表达量显著高于空载组及对照组 ($P < 0.05$); Nampt 过表达组的 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的蛋白相对表达量显著高于空载组及对照组 ($P < 0.05$), TGF- β 的蛋白相对表达量要显著低于空载组和对照组 ($P < 0.05$)。**结论** Nampt 可能通过干预炎症细胞因子的表达来干涉骨关节炎的病程发展, 抑制 Nampt 活性可能成为治疗骨关节炎的一种新方法。

【关键词】 Nampt; 炎症因子; 骨关节炎

【中图分类号】 R36 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)01-0118-02

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 作为中老年人常见的疾病之一, 近年来患病人群呈现日益扩大的趋势, 由于其发病时产生剧烈疼痛及关节变形, 且目前临床治疗尚不能有效阻止疾病进程, 因此严重影响患者的日常生活^[1]。尼克酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotin-amide phosphoribosyltransferase, Nampt) 广泛表达于多个人类器官与组织, 尤其是在肝脏、肌肉、内脏脂肪组织中, 其参与调节多种细胞的增殖与凋亡^[2-3]。本研究通过构建 Nampt 基因过表达载体并将其转染到骨关节炎大鼠模型, 通过 Real-Time PCR 检测 Nampt 过表达效率, Western blot 方法检测骨关节炎大鼠受感染细胞中的细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、TGF- β 的表达水平, 研究过表达 Nampt 载体的构建及其对骨关节炎大鼠免疫细胞因子的影响。

1 材料与方法

1.1 材料: 选取 30 只雌雄不限的 Wistar 大鼠, 年龄 6 周, 体质量 (100 \pm 5) g, 来自成都达硕实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (川) 2013-005。lipofectamine TM2000 转染试剂盒、质粒纯化试剂盒 (上海玉博生物科技有限公司), pcDNA 3.1 (+) 真核表达载体、ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Invitrogen 公司), LB 培养基、DMEM 培养基、10% 胎牛血清 (FBS)、TRAP 活性染色试剂盒 (美国 sigma 公司), 显微摄影系统 (日本奥林巴斯有限公司), Western blot 相关试剂、Real-Time PCR 相关试剂和引物 (大连宝生物有限公司); Image pro Plus 6.0 图像分析系统 (美国 MEDIA CYBERNETICS 公司), 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法:

1.2.1 骨关节炎大鼠模型的构建: 用碘乙酸盐注入法构建大鼠骨关节炎模型, 以注射 4 周后破骨细胞活性增强、骨小梁局灶性断裂、塌陷和纤维化为造模成功。

1.2.2 Nampt 过表达载体的构建: PCR 扩增 Nampt (NM-005746.2), 以正常成骨细胞 cDNA 为模板, 基因扩增引物

序列正义链 5'-AAATCCAGAATCCTGCGCAGAGC-3', 反义链 5'-CGTAATTAGCCTCCTGAAAGCTTC-3'。扩增结束后的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 切下目的片段, 按照 DNA 胶回收试剂盒进行回收。采用 BamH I 和 EcoR I 37 °C 水浴双酶切回收后的 Nampt PCR 产物和 pcDNA3.1 (+) 1 h, 继续行 1% 琼脂糖凝胶电泳进行二次分离, 再次回收 Nampt DNA 并进行定量, -20 °C 保存备用。取酶切后的 Nampt 片段与 pcDNA3.1 (+) 载体进行连接, 反应体系为: 10 \times DNA 连接缓冲液 5 μ L, Nampt DNA 片段 20 μ L, pcDNA3.1 (+) 载体 10 μ L, 去离子水 4 μ L, T4 DNA 连接酶 3 μ L。置于 16 °C PCR 反应仪过夜。取连接产物与 100 μ L 感受态细胞进行孵育, 结束后取感受态细胞进行重悬并均匀涂抹于含有氨苄抗性的固体 LB 平板中 37 °C 培养过夜。挑取培养后的单克隆菌落, 接种于含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中, 过夜培养。收集菌液, 按照质粒提取试剂盒操作说明, 提取质粒并送上海生工测序做进一步鉴定。结果表明插入片段的序列大小、位点和方向与设计的片段完全一致, 说明成功构建了 pcDNA3.1 (+)-Nampt 过表达载体。将构建的 pcDNA3.1 (+)-Nampt 过表达载体进行包装、扩增后离心, 取上清液即为病毒液。

1.2.3 骨关节炎大鼠模型的分组及转染: 将造模成功的骨关节炎大鼠随机平均分为 3 组, Nampt 过表达组、空载组、对照组, 每组各 10 例。造模成功后的第 2 周采用关节腔内注射法将 pcDNA3.1 (+)-Nampt 过表达载体、pcDNA3.1 (+) 质粒及生理盐水注入到大鼠模型关节腔中, 每隔 10 天重复 1 次直至第 50 天。转染结束后 2 周, 取感染组织细胞, 提取蛋白后采用 Real-time PCR 检测 Nampt mRNA 的相对表达量, 具体步骤按照 Real-time PCR 检测试剂盒操作说明进行。

1.2.4 不同组大鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、TGF- β 蛋白表达量的检测: 转染结束后 2 周收集不同组感染组织细胞培养 48 h, 随后加入 150 μ L 细胞裂解液, 置于冰上裂解 30

基金项目: 福州市卫生健康科技计划项目 (2020-S-wt1)

1 通信作者

min, 将刮取下来的细胞碎片及裂解产物转移到 1.5 mL Eppendorf 管中。10 000 rpm、4 °C 离心 20 min 后吸取上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度并计算上样量。随后行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后将蛋白移至 PVDF 膜上, TBS-T 洗膜 3 次后用 5% 脱脂牛奶室温条件下封闭 1 h, 分别加入一抗后 4 °C 孵育过夜, TBST 反复漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗室温孵育 1 h, TBST 反复漂洗 3 次, 每次 10 min 后采用 ECL 化学发光法检测, 凝胶图像分析进行半定量分析。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差表示, 两组间的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组 Nampt mRNA 的相对表达水平: 过表达组

表 1 不同组 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、TGF- β 蛋白的相对表达量 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	IL-17	TNF- α	TGF- β
Nampt 过表达组	1.49±0.11*#	1.71±0.07*#	0.99±0.13	0.72±0.07*#	0.77±0.08*#
空载组	0.74±0.05	0.55±0.06	0.86±0.11	0.45±0.02	1.72±0.13
对照组	0.71±0.04	0.47±0.02	0.79±0.03	0.59±0.01	1.55±0.16

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与空载组比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

骨关节炎作为一种严重关节软骨退行性疾病, 给患者及患者家庭带来了极大的经济和心理负担。近年来的研究发现骨关节炎的病因主要与软骨代谢异常、酶的作用、化学成分改变及人体营养变化有关。Nampt 是 NAD 生物合成的限速酶, 在许多生物器官中都发挥着重要的作用, 有研究表明 OA 患者 Nampt 参与软骨基质降解, 并与 Kellgren-Lawrence 分级密切相关^[4]。Laiguillon 等^[5]在 OA 患者体内关节滑膜组织中发现了 Nampt 的高表达, 在体外 Nampt 可诱导多种软骨细胞、成骨细胞因子的表达。近年来的研究也都认为酶类对软骨细胞降解导致的骨关节炎至关重要, 这些细胞因子包括了金属蛋白酶组织抑制剂、白细胞介素、自由基、前列腺素 E₂、肿瘤坏死因子、I, III, X 型胶原等^[6]。

本研究通过构建 Nampt 过表达载体并转染到骨关节炎大鼠模型体内, 结果表明 Nampt 过表达载体能在骨关节炎大鼠模型体内高效表达, 通过对受感染细胞的炎症因子的蛋白表达检测发现, Nampt 过表达组的促炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的表达显著活跃, 抑制炎症细胞因子 TGF- β 显著降低。

总之, Nampt 可能通过干预炎症细胞因子的表达来干

Nampt 相对表达量 1.52 ± 0.09 , 空载组 Nampt 相对表达量 0.89 ± 0.05 , 对照组 Nampt 相对表达量 0.77 ± 0.04 。过表达组的 Nampt mRNA 相对表达量显著高于空载组及对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 不同组大鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、TGF- β 蛋白的相对表达量: Nampt 过表达组的 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的蛋白相对表达量要显著高于空载组和对照组 ($P < 0.05$), TGF- β 的蛋白相对表达量均要显著低于空载组和对照组 ($P < 0.05$), 空载组和对照组间在 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、TGF- β 蛋白的相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), IL-17 的蛋白相对表达量在 3 组之间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

涉骨关节炎的病程发展, 抑制 Nampt 活性可能成为治疗 OA 的一种新方法。

参考文献

- [1] 吕苏梅, 张瑞丽. 中老年膝骨关节炎的流行病学研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36 (16): 4133-4134.
- [2] 戴佳晟, 王彦泽, 刘鑫. 以 NAD⁺ 为靶点治疗衰老及其相关疾病研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34 (10): 762-770.
- [3] Ju H, Zhuang Z, Li H, et al. Regulation of the NAMPT-mediated NAD salvage pathway and its therapeutic implications in pancreatic cancer [J]. Cancer Lett, 2016, 379 (1): 1-11.
- [4] Duan Y, Hao D, Li M, et al. Increased synovial fluid visfatin is positively linked to cartilage degradation biomarkers in osteoarthritis [J]. Rheumatol Int, 2012, 32 (4): 985-990.
- [5] Laiguillon M C, Houard X, Bougault C, et al. Expression and function of visfatin (Nampt), an adipokine-enzyme involved in inflammatory pathways of osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16 (1): 38-44.
- [6] 朱夏媛, 孔芳, 朱艳辉, 等. 烟酰胺磷酸核糖转移酶及其与肿瘤关系研究进展 [J]. 北京医学, 2017, 39 (3): 291-293.