

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.006

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190529.1622.019.html(2019-05-31)

IL-1 $\beta$  和 IGF-1 在幼兔发育性髋脱位髋臼软骨细胞中的表达和作用\*张天久,俞松 $\Delta$ ,杨小红,吕欣,徐艳朋,罗宇  
(遵义医科大学附属医院小儿矫形外科,贵州遵义 563000)

**[摘要]** **目的** 探讨白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在发育性髋脱位(DDH)髋臼软骨细胞增殖和凋亡中的作用及意义。**方法** 选取 4 周龄实验幼兔 32 只,采用左侧后肢伸膝屈髋位管型石膏固定方法制作 DDH 动物模型,右侧后肢不做特殊处理作为对照侧,将幼兔平均分为 4 组(A、B、C、D 组),分别在石膏固定 8、12、16、20 周后处死,采用免疫组织化学法和 Western blot 法检测双侧髋臼外缘软骨块及细胞中 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 的表达情况和蛋白水平,结果进行统计学分析。**结果** IL-1 $\beta$  和 IGF-1 在双侧髋臼软骨细胞中均有不同程度的阳性表达;D 组实验侧髋臼软骨中 IL-1 $\beta$  的阳性率和蛋白水平最高,B、C、D 组实验侧和对照侧比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。C 组实验侧髋臼软骨中 IGF-1 的阳性率最高,B 组实验侧髋臼软骨中 IGF-1 的蛋白水平最高,B、C 组实验侧和对照侧比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** IL-1 $\beta$  与 IGF-1 在 DDH 髋臼软骨细胞中的表达异常,导致软骨细胞增殖和凋亡之间失衡,可能是 DDH 发生髋关节退行性变的原因之一。

**[关键词]** 白细胞介素-1 $\beta$ ;胰岛素样生长因子 I;发育性髋脱位;软骨细胞**[中图分类号]** R682.1+7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)14-2360-04Expression and role of IL-1 $\beta$  and IGF-1 in acetabular chondrocytes with developmental dislocation of the hip in immature rabbits\*ZHANG Tianjiu, YU Song $\Delta$ , YANG Xiaohong, LYU Xin, XU Yanpeng, LUO Yu  
(Department of Pediatric Orthopedics, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the role and significance of interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the proliferation and apoptosis of acetabular chondrocytes of developmental dislocation of the hip (DDH). **Methods** Thirty-two experimental rabbits aged 4 weeks old were selected, and the DDH animal model was made by plaster fixation in the knee extension and hip flexion position of the left hind limb. The right hind limb was not treated as a control side, and the rabbits were divided into four groups (group A, B, C and D) were sacrificed after 8, 12, 16 and 20 weeks of gypsum fixation. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect IL-1 $\beta$  and IGF-1 in bilateral acetabular rim cartilage blocks. The expression and protein levels were analyzed and the results were statistically analyzed. **Results** IL-1 $\beta$  and IGF-1 were positively expressed in bilateral acetabular chondrocytes. The positive rate and protein content of IL-1 $\beta$  in experimental acetabular chondrocytes in group D were the highest. Compared with the control side, the difference among group B, C and D was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The positive rate of IGF-1 in experimental acetabular cartilage in group C was the highest, while the protein content of that was the highest in group B. Compared with the control side, the difference between B and C was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The abnormal expression of IL-1 $\beta$  and IGF-1 leads to the imbalance between proliferation and apoptosis of acetabular chondrocytes in DDH, which may be one of the causes of hip degeneration resulted by DDH.

**[Key words]** interleukin-1beta; insulin-like growth factor I; developmental hip dislocation; chondrocytes

发育性髋关节脱位(developmental dislocation of the hip, DDH)是小儿骨科常见的骨关节畸形之一,致残率较高,治疗不及时或未经正确治疗,易较早出现

髋关节退行性变和骨关节炎(osteoarthritis, OA)。研究发现,正常软骨组织中软骨细胞的增殖与凋亡及细胞外基质的降解与合成之间处于一种动态平衡,当这

种平衡被打破后即可发生关节退行性变,目前 DDH 发生髋关节退行性变的机制仍不清楚,可能与髋臼软骨细胞增殖和凋亡异常密切相关<sup>[1-2]</sup>。白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 在关节软骨细胞的增殖、发育、成熟和凋亡过程中起重要作用,且两者在软骨细胞中的作用是相互拮抗的<sup>[3-4]</sup>。本实验通过制作幼兔 DDH 动物模型,检测不同时期髋臼软骨细胞中 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 的表达情况,探讨 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 在 DDH 髋臼软骨细胞增殖和凋亡中的作用和意义,为儿童 DDH 退行性髋关节炎的预防和治疗提供参考,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 兔抗 IL-1 $\beta$  多克隆抗体(bs-0812R,北京博奥森生物技术有限公司);兔抗 IGF-1 多克隆抗体(bs-0014R,北京博奥森生物技术有限公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L,ZB-2301,北京中杉金桥生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(CW0125,北京康为世纪生物科技有限公司);鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(TA-08,北京中杉金桥生物技术有限公司,浓度 1/3 000);蛋白垂直电泳仪(DYY-6C,北京市六一仪器厂);超高灵敏度化学发光成像系统[Chemi Doc<sup>TM</sup> XRS+,伯乐生命医学产品(上海)有限公司]。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组及模型制作** 4 周龄实验幼兔 40 只,雌雄不限,平均体质量(0.45 $\pm$ 0.06)kg;采用硫喷妥钠肌肉注射麻醉,左侧后肢伸膝屈髋位管型石膏固定,右侧后肢不做特殊处理作为对照侧。实验 8 周后摄髋关节正位片了解造模情况,根据实验侧 Shenton 线不连续、髋臼指数增大和股骨头位于 Perkin 方格外侧象限判定为 DDH 造模成功<sup>[5]</sup>,造模不成功影响实验进程需积极补充造模。选取造模成功的幼兔继续进行实验,分为 A、B、C、D 4 组,每组 8 只,分别在石膏固定 8、12、16、20 周后,采用空气栓塞法处死,在无菌条件下解剖双髋,将双侧髋臼边缘软骨块分为两部分,一部分迅速放入-80 $^{\circ}$ C 液氮保存,一部分放

入 10% 中性甲醛液固定。

**1.2.2 免疫组织化学染色检测 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 的表达情况** 用 10% 中性甲醛液固定标本,然后行脱钙、脱水、石蜡包埋、3~4  $\mu$ m 切片,常规脱蜡水化后,进行抗原修复,滴加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消除组织内源性过氧化物酶的活性,切片封闭后,逐步滴加 IL-1 $\beta$  一抗(1:200)或 IGF-1 一抗(1:400)、4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,室温下孵育 45 min,滴加山羊抗兔 IgG(H+L)二抗工作液和 DAB 显色剂工作液,苏木素复染,脱水、透明、封片,镜下观察染色切片,软骨细胞的细胞质或细胞核被染成黄色或棕黄色为阳性,阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,并用目镜网格测微尺随机选择 6 个视野( $\times$ 400)进行观察,记录阳性细胞数量。阳性率用细胞分数来表示,即 6 个视野内阳性软骨细胞数占软骨细胞总数的比值 $\times$ 100%。

**1.2.3 Western blot 法检测 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 的蛋白水平** 取出用液氮保存的标本,取 0.2 g 组织放入研钵中充分研磨,加入 500  $\mu$ L 的细胞裂解液研磨至匀浆无明显颗粒,高速离心 15 min,BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,取上清液移至新的 EP 管,提取等量蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜封闭,加入 IL-1 $\beta$  或 IGF-1 一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 摇床过夜,37 $^{\circ}$ C 水浴复温后加二抗(1:1 000),孵育后漂洗显色,用 GAPDH 做内参重复上述步骤,用 Quantity One 软件扫描各条带灰度值后进行定量分析(目的蛋白相对水平计算公式:目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,比较采用  $t$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 幼兔 DDH 造模情况** 幼兔在造模过程中肢体活动受限,进食减少,部分幼兔死亡,无关节感染及骨折并发症发生,但经过积极补充造模,未影响实验正常进行。实验过程中共造模成功 32 只,分成 4 组,每组 8 只。

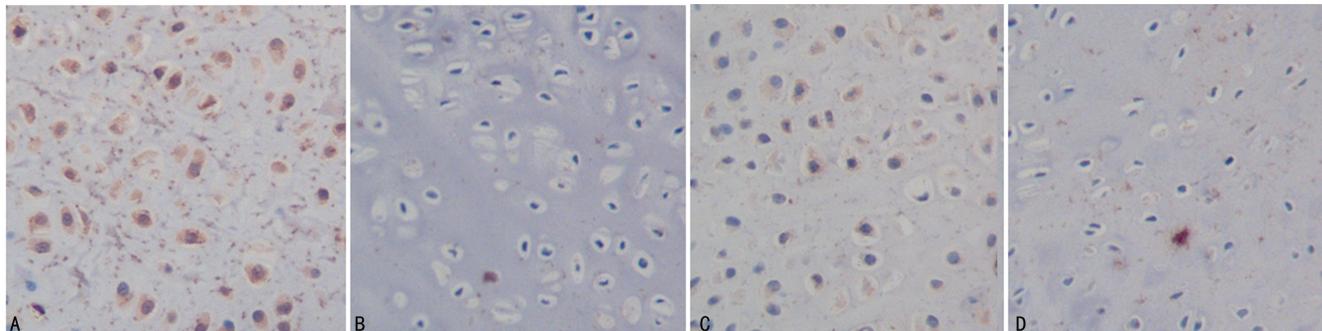


图 1 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 在髋臼软骨中表达(免疫组织化学, $\times$ 400)

**2.2 免疫组织化学法检测 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 在髌臼软骨细胞中的表达** IL-1 $\beta$  和 IGF-1 在每组实验侧和对照侧的髌臼软骨细胞中均有不同程度的表达,软骨细胞细胞质被染成黄色或棕黄色。IL-1 $\beta$  在 4 组中实验侧髌臼软骨中阳性率逐渐增高,B、C 和 D 组实验侧和对照侧比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。IGF-1 在 C 组实验侧髌臼软骨细胞中的阳性率最高,B、C 组实验侧和对照侧比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1,表 1、2。

表 1 各组髌臼软骨细胞中 IL-1 $\beta$  阳性率的变化情况( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	实验侧	对照侧	<i>t</i>	<i>P</i>
A 组	13.18 $\pm$ 2.06	13.02 $\pm$ 2.12	0.148	>0.05
B 组	18.88 $\pm$ 3.07	13.44 $\pm$ 2.02	4.187	<0.05
C 组	25.04 $\pm$ 4.11	14.09 $\pm$ 2.67	6.322	<0.05
D 组	29.38 $\pm$ 3.74	14.85 $\pm$ 3.09	8.463	<0.05

表 2 各组髌臼软骨细胞中 IGF-1 阳性率的变化情况( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	实验侧	对照侧	<i>t</i>	<i>P</i>
A 组	25.45 $\pm$ 5.59	23.66 $\pm$ 3.76	0.750	>0.05
B 组	29.98 $\pm$ 3.36	24.64 $\pm$ 4.60	2.652	<0.05
C 组	30.59 $\pm$ 2.80	25.35 $\pm$ 3.86	3.110	<0.05
D 组	23.53 $\pm$ 3.66	24.26 $\pm$ 2.63	0.463	>0.05

**2.3 Western blot 法检测 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 在髌臼软骨细胞中的表达水平** IL-1 $\beta$  在实验侧髌臼软骨细胞中的表达水平逐渐增加,在 D 组中的水平最高,B、C、D 组实验侧和对照侧比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。IGF-1 在 B 组实验侧髌臼软骨细胞中的表达水平最高,B、C 组实验侧和对照侧比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2,表 3、4。

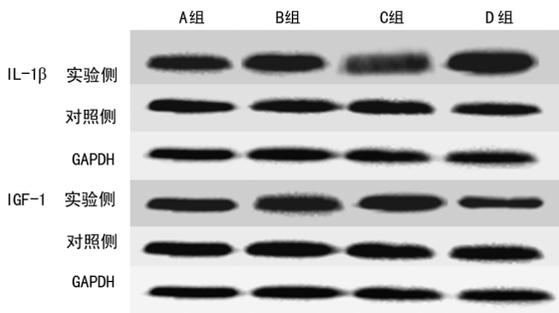


图 2 各组髌臼软骨细胞中 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 蛋白水平 Western blot

表 3 各组髌臼软骨细胞中 IL-1 $\beta$  的蛋白水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	实验侧	对照侧	<i>t</i>	<i>P</i>
A 组	0.532 $\pm$ 0.163	0.491 $\pm$ 0.122	0.569	>0.05
B 组	0.725 $\pm$ 0.174	0.509 $\pm$ 0.171	2.504	<0.05
C 组	0.832 $\pm$ 0.204	0.512 $\pm$ 0.179	3.335	<0.05
D 组	0.906 $\pm$ 0.303	0.608 $\pm$ 0.168	2.433	<0.05

表 4 各组髌臼软骨细胞中 IGF-1 的蛋白水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	实验侧	对照侧	<i>t</i>	<i>P</i>
A 组	1.358 $\pm$ 0.139	1.287 $\pm$ 0.215	0.784	>0.05
B 组	1.506 $\pm$ 0.305	1.085 $\pm$ 0.208	3.225	<0.05
C 组	1.488 $\pm$ 0.269	0.954 $\pm$ 0.195	4.546	<0.05
D 组	0.939 $\pm$ 0.235	0.948 $\pm$ 0.185	0.085	>0.05

### 3 讨论

DDH 是一种儿童早期出现的髌关节发育异常性疾病,可能会随着生长发育好转或加重,若伴有不同程度的髌臼发育不良,易早期发生髌关节退行性变。软骨细胞是关节软骨中的惟一细胞类型,维持着软骨细胞和细胞外基质的动态平衡,儿童髌臼软骨细胞还有软骨内化骨,促进髌臼生长发育的作用。研究发现髌臼软骨细胞的增殖与凋亡活性异常在 DDH 的发展过程中有着重要意义<sup>[1]</sup>,但具体机制仍不清楚。损伤性细胞因子 IL-1 $\beta$  和合成性细胞因子 IGF-1 是软骨细胞在增殖和凋亡过程中重要的细胞因子,对 DDH 髌臼软骨细胞的增殖和凋亡也可能有着重要的调控作用。

IL-1 $\beta$  是一种主要的关节软骨退变代谢调节因子,与软骨破裂、基质降解密切相关,可诱导软骨细胞变性和衰老,对软骨细胞凋亡起到重要的调控作用,是 OA 的主要病因之一<sup>[6-7]</sup>。IL-1 分为 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  两种类型,正常软骨细胞可产生少量的 IL-1 $\beta$ ,当其损伤后可大量合成和分泌大量的 IL-1 $\beta$ ,并刺激细胞膜上 IL-1 $\beta$  受体表达增高,IL-1 $\beta$  与受体结合后将病变的信息传送到细胞内,从而影响了软骨细胞的正常代谢活动,刺激软骨细胞分泌基质金属蛋白酶,加速软骨基质中蛋白多糖及胶原蛋白的降解,抑制蛋白多糖和胶原蛋白的合成,促进软骨细胞凋亡的发生<sup>[8-9]</sup>。将 IL-1 $\beta$  加入到培养的软骨细胞中,诱发型一氧化氮合酶(iNOS)水平显著增高,一氧化氮合成、释放增加,诱发关节软骨细胞凋亡<sup>[10]</sup>;实验表明 OA 患者的关节软骨中 IL-1 $\beta$  有较高水平的表达<sup>[11]</sup>。在本实验幼兔 DDH 动物模型中,免疫组织化学法和 Western blot 法检测结果均提示实验侧髌臼软骨中 IL-1 $\beta$  的水平高于对照组,且随着脱位时间的延长,差异越显著,这可能与 DDH 自然病程密切相关,即当髌臼和股骨头失去正常的解剖对位关系和生物力学刺激后,可导致了髌臼软骨的损伤和退行性变,诱发和加速髌臼软骨细胞的凋亡。本研究提示 IL-1 $\beta$  可能是促进 DDH 髌臼软骨细胞凋亡的原因之一。

IGF-1 是一种具有胰岛素样合成代谢作用和促生长作用的多肽生长因子,促进软骨细胞的增殖、表型的维持和软骨细胞外基质的合成,抑制各种原因诱导的软骨细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。IGF-1 在青春期前可通过刺激软骨细胞的增殖和塑形使骨骼呈线性生长,在成人

通过刺激软骨细胞合成基质蛋白,抑制软骨细胞的衰老和凋亡;IGF-1 同样也能抑制 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞凋亡和对抗 IL-1 $\beta$  引起的炎性介质 MMP-13<sup>[13-14]</sup>, IGF-1 还可联合透明质酸促进大鼠股骨关节软骨缺损的修复,延缓周围软骨的退变<sup>[15]</sup>。本实验 B、C 组中实验侧髌白软骨细胞中 IGF-1 表达和蛋白水平都较高,可使髌白软骨细胞保持着较高的增殖活性,抑制 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞凋亡,尚能维持髌白软骨细胞增殖和凋亡之间的动态平衡,但随着 DDH 自然病程的延长,髌白软骨细胞的增殖能力逐渐减弱,即发生髌白软骨不可逆性的损伤,这和 DDH 自然病程基本一致,但具体机制仍需要进一步研究。IL-1 $\beta$  和 IGF-1 在 DDH 早、中期髌白软骨中都有较高的表达,但后期 IGF-1 的表达减弱,提示 DDH 髌白软骨细胞在早、中期表现出较强的增殖活性与异常增高的凋亡率,后期增殖活性明显减弱,这与部分文献报道基本一致<sup>[1-2]</sup>, IL-1 $\beta$  与 IGF-1 在 DDH 髌白软骨细胞中的表达异常,导致增殖活性和凋亡率之间失衡,可能是 DDH 发生髌关节退行性变的原因之一。

本实验制作的幼兔 DDH 动物模型可模拟人类 DDH 的自然病程和髌关节的病理生理变化过程,若早期对 DDH 进行干预和治疗,恢复髌关节的解剖关系及相应的生物力学环境,可能会改变这一自然病程,延缓退行性髌关节炎的发生。若本课题组在治疗 DDH 时再采用其他方式进行干预,调控髌白软骨中 IL-1 $\beta$  和 IGF-1 的生物学活性,维持髌白软骨细胞增殖和凋亡活性的动态平衡,或许在一定程度上能延缓或减少髌关节退行性变的发生,而这需要进一步的实验研究。

## 参考文献

- [1] 王彭,宁波,裴新红,等.大鼠髌脱位在退变过程中软骨细胞增殖与凋亡的变化及意义[J].中华小儿外科杂志,2013,34(12):938-943.
- [2] WEI Y S,LI D H,LIU W L,et al. Altered chondrocyte apoptosis status in developmental hip dysplasia in rabbits [J]. *Balkan Med J*,2016,33(6):639-644.
- [3] 张保龙,邵增务.胰岛素样生长因子 1 和白介素 1 受体拮抗剂在骨性关节炎中的作用及研究进展[J].实用医学杂志,2009,25(8):1335-1337.
- [4] SCHMIDT T A,GASTELUM N S,HAN E H,et al. Differential regulation of proteoglycan 4 metabolism in cartilage by IL-1 $\alpha$ ,IGF-I,and TGF- $\beta$ 1[J]. *Osteoarthritis? Cartilage*,2008,16(1):90-97.
- [5] 王炳海,韦宜山,丁良甲,等.发育性髋关节脱位早期髌白软骨细胞凋亡的实验研究[J].中国矫形外科杂志,2013,21(17):1755-1760.
- [6] 苏晓恩,孔志强,朱娟,等.膝关节骨关节炎软骨中 YKL-40、IL-1 $\beta$  的表达及相关性探讨[J].重庆医学,2017,46(4):480-482.
- [7] ELSAID K A,UBHE A,SHAMAN Z,et al. Intra-articular interleukin-1 receptor antagonist (IL1-ra) microspheres for posttraumatic osteoarthritis:in vitro biological activity and in vivo disease modifying effect[J].*J Exp Orthop*,2016,3(1):18.
- [8] NASI S,EA H K,SO A,et al. Revisiting the role of interleukin-1 pathway in osteoarthritis:interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$ , and NLRP3 inflammasome are not involved in the pathological features of the murine meniscectomy model of osteoarthritis[J].*Front Pharmacol*,2017,8:282.
- [9] 熊寿良,徐宏光,王强,等.白细胞介素 1 $\beta$  诱导软骨细胞中雷帕霉素靶蛋白信号通路[J].中华医学杂志,2017,97(7):540-544.
- [10] BWALYA E C,KIM S,FANG J,et al. Pentosan polysulfate inhibits IL-1 $\beta$ -induced iNOS, c-Jun and HIF-1 $\alpha$  upregulation in canine articular chondrocytes[J].*PLoS One*,2017,12(5):e0177144.
- [11] 尹万乐,马利阁,尤笑迎,等.膝骨性关节炎患者关节滑液白细胞介素-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$  的表达及意义[J].中华实验外科杂志,2017,34(9):1593-1595.
- [12] 李宁,刘鸣,刘宏建,等.节律基因 BMAL1 调控人软骨细胞胰岛素样生长因子 1 信号传导[J].中华实验外科杂志,2018,35(2):292-296.
- [13] WEI F Y,LEE J K,WEI L,et al. Correlation of insulin-like growth factor 1 and osteoarthritic cartilage degradation;a spontaneous osteoarthritis in guinea-pig[J].*Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2017,21(20):4493-4500.
- [14] 彭程,肖涛,罗远明,等.IGF-1 对 IL-1 诱导的兔关节软骨细胞 NO 和 PGE2 影响[J].中南大学学报(医学版),2008,33(3):197-203.
- [15] PETERSE E F,CLEVEN A H,DE J Y,et al. No preclinical rationale for IGF1R directed therapy in chondrosarcoma of bone[J].*BMC Cancer*,2016,16:475.

(收稿日期:2019-01-14 修回日期:2019-04-06)