

电穿孔介导白细胞介素-1受体阻滞剂抑制大鼠骨性关节炎实验

孙振, 尹合勇, 余晓明, 王玉, 彭江, 郭全义, 汪爱媛, 卢世璧
解放军总医院 骨科, 北京 100853

摘要: **目的** 探讨非病毒载体电穿孔 (electroporation, EP) 对大鼠早期骨性关节炎的基因治疗效果。**方法** 选用 8 周龄健康级雄性 SD 大鼠, 通过切断右膝前交叉韧带及切除内侧半月板前脚的方法建立早期骨性关节炎模型。选择白细胞介素-1受体阻滞剂 (interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra) 为目的基因。造模术后 1 周, 对患有早期骨性关节炎的膝关节进行治疗, 根据不同治疗方式将实验分为 4 组: 单纯骨性关节炎未治疗组 (OA 组, n=15)、骨性关节炎单纯目的基因治疗组 (NP 组, n=15)、骨性关节炎电穿孔目的基因治疗组 (EP 组, n=15) 和正常对照组 (n=15)。各组在治疗后 1 周、2 周、3 周、4 周处死大鼠, 抽取右膝关节液 20 μ l 用于 ELISA 检测, 分析其中 IL-1Ra 及白细胞介素-1 β (IL-1 β) 蛋白质含量, 游离右侧膝关节滑膜及软骨组织用于 PCR 检测, 分析其中 IL-1Ra 及 IL-1 β 基因表达情况; 在治疗后 4 周, 分离右膝股骨髁进行大体观察及病理学组织检查。**结果** 大体观察结果显示, OA 组与 NP 组股骨内侧髁负重区关节软骨大面积损伤, EP 组软骨表面完整光滑; 病理结果显示, OA 组及 NP 组中软骨严重破坏、细胞外基质大量丢失, EP 组软骨损伤仅局限在表层; PCR 结果显示, EP 组 IL-1Ra 基因的相对表达程度明显高于其他组 ($P < 0.01$), 4 周时是正常组的 4.29 倍, IL-1 β 基因表达水平在观察周期内与正常组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), ELISA 检测结果趋势与 PCR 一致。**结论** 电穿孔转染 IL-1Ra 能够抑制大鼠骨性关节炎的发展, 为骨性关节炎基因治疗的临床研究提供新手段。

关键词: 基因治疗; 骨性关节炎; 电穿孔; 白细胞介素-1受体阻滞剂; 大鼠

中图分类号: R 319 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2016)01-0074-05 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2016.01.019

网络出版时间: 2015-11-04 10:49 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20151104.1049.004.html>

Suppression of osteoarthritis in rats by electroporation mediated IL-1Ra

SUN Zhen, YIN Heyong, YU Xiaoming, WANG Yu, PENG Jiang, GUO Quanyi, WANG Aiyuan, LU Shibi

Department of Orthopaedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: PENG Jiang. Email: pengjiang301@126.com

Abstract: Objective To assess the electroporation (EP) as non-viral gene vectors for gene therapy of osteoarthritis (OA). **Methods** Healthy male SD rats aged 8 weeks were selected. OA model was induced by medial meniscus forefoot resection and anterior cruciate ligament transection in the right knee. EP with interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) was locally performed in the joints of rats at 1 week after induction of OA. According to the treatments, rats were randomly divided into four groups: non-treated arthritis as OA group (n=15); IL-1Ra plasmid treated arthritis without transfection performed as NP (naked plasmid) group (n=15); IL-1Ra plasmid treated arthritis and following electroporation as EP group (n=15); non-arthritic rats as normal group (n=15). Rats in different groups were sacrificed at 1-, 2-, 3-, 4-week after treatment, and isolated knee joints at 1 week post-treatment, IL-1Ra and IL-1 β mRNA levels in the tissue of cartilage and synovium were analyzed using real-time PCR, and the protein content in the synovial fluid were analyzed by ELISA. In addition, gross appearance examination and histological evaluations were performed and the pathology sections were stained with hematoxylin, eosin (H-E) and Toluidine blue at 4 weeks post-treatment. **Results** In OA and NP groups, cartilage in medial femoral condyle were largely damaged, in EP group, the cartilage surface was intact and smooth. Pathology results showed that cartilage in OA and NP groups were severely damaged, extracellular matrix loss considerably, while in EP group, the damage was limited in cartilage surface at 4 weeks. The IL-1Ra expression of EP was significantly higher than other groups ($P < 0.01$), and it was 4.29 times more than the normal group. Compared with normal group, IL-1 β gene expression in EP group showed no significant difference during observation period ($P > 0.05$). And the results of ELISA and PCR were accorded. **Conclusion** IL-1Ra transfected by electroporation can inhibit the development of osteoarthritis, which provides new tools for clinical study of gene therapy of osteoarthritis.

Keywords: gene therapy; osteoarthritis; electroporation; interleukin-1 receptor antagonist; rat

收稿日期: 2015-04-30

基金项目: 科技部 973 项目 (2014CB542201); 国家 863 计划项目 (2012AA020502); 北京市科技专项 (Z141107004414044)

Supported by National "973" Program for Basic Research of China(2014CB542201); "863" Program of China(2012AA020502); Key Program of Beijing Science and Technology Commission(Z141107004414044)

作者简介: 孙振, 男, 在读硕士。Email: sunzhen301@163.com

通信作者: 彭江, 男, 副研究员, 硕士生导师。Email: pengjiang301@126.com

骨性关节炎是骨科常见疾病,以关节软骨损伤伴软骨下骨改变为特点,目前仍无有效的治疗方法^[1]。基因技术的出现为其治疗提供了一条新的途径^[2]。已有学者通过动物实验,证实使用病毒载体基因治疗骨性关节炎的效果,并针对此方法开展了I期临床试验研究^[3-4]。但病毒载体存在引起机体免疫反应、血液系统肿瘤的风险,限制了其在临床的广泛开展^[5]。电穿孔作为一种非病毒的基因导入途径,通过高强度的脉冲电磁场作用,瞬间提高细胞膜的通透性,开放大分子通道,使细胞吸附周围介质中的外源分子(包括核酸、蛋白质),进而可以将基因导入组织内部^[6]。其安全性及转染效率已得到公认并已应用到类风湿关节炎的治疗研究中,但仍无关于骨性关节炎的实验研究报告^[7]。据此设计本实验,验证电穿孔介导白细胞介素-1受体阻滞剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra)基因对骨性关节炎的治疗效果。

材料和方法

1 骨性关节炎模型建立 8周龄雄性健康级SD大鼠60只,体质量220~250g,由本院实验动物中心提供。实验内容及小动物福利等要求已经解放军总医院医学伦理委员会审核批准。根据传统手术造模方式,建立早期骨性关节炎模型^[8]。具体方法:10%水合氯醛按3ml/kg剂量腹腔注射麻醉,仰卧位固定,右膝手术部位剃毛,常规碘伏消毒,右膝关节髌韧带平行位置行正中切口,沿髌韧带内侧缘切开关节囊及股四头肌肌腱,将髌骨向外脱位,暴露髌间隙,游离前交叉韧带和内侧半月板前韧带并予切断,分离内侧半月板前脚并予切除,术后0.9%氯化钠注射液冲洗,严密缝合关节囊及创口。术后大鼠自由活动,常规饲养1周后获得早期骨性关节炎模型。

2 试剂及器械 麻醉药物(10%水合氯醛),碘伏,100ml 0.9%氯化钠注射液,4%多聚甲醛溶液,磷酸盐缓冲液,TRIzol(TOYOBO公司,日本),mRNA反转录试剂盒(TOYOBO公司,日本),cDNA扩增试剂盒(TOYOBO公司,日本),IL-1Ra及IL-1 β 酶联免疫吸附实验试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。0.5ml注射器,手术刀,手术剪,眼科剪,手术镊,组织钳,止血钳,持针器,缝合针,医用慕丝线4-0/T,纱布,棉球,活体基因导入仪(上海塔瑞莎生物技术有限公司)。

3 分组及处理 将造模成功后大鼠按照不同的治疗措施随机分为4组:单纯骨性关节炎组(OA

组, n=15), 不给予任何治疗;骨性关节炎单纯IL-1Ra基因治疗组(NP组, n=15), 向关节腔内部注射100 μ l溶有50 μ g IL-1Ra质粒的磷酸盐缓冲液;骨性关节炎电穿孔IL-1Ra基因治疗组(EP组, n=15), 在向关节腔内部注射100 μ l溶有50 μ g IL-1Ra质粒的磷酸盐缓冲液后, 立即在膝关节内外侧给予电穿孔处理, 电穿孔通过活体基因导入仪调整电磁场的脉宽至40ms来实现;正常对照组(n=15), 大鼠正常膝关节。治疗后1周、2周、3周、4周分别对大鼠膝关节进行取材, 自胫骨近端至股骨远端截取膝关节。

4 电穿孔方法 活体基因导入仪由脉冲发射器及电极两部分组成, 共同实现电穿孔。通过改变脉冲的脉宽值, 控制电穿孔过程中产生的电磁场强度, 进而调节细胞膜上微孔的开放个数及孔径大小, 调控基因进入细胞效率。使用电极将脉冲传输到所需电穿孔的靶器官, 实现对靶器官的基因导入。本实验调整脉宽至40ms, 将电极贴于大鼠膝关节内外侧, 进行目的基因的电穿孔。

5 关节液中IL-1Ra及IL-1 β 蛋白质含量测定 大鼠处死后, 立即使用0.5ml注射器自髌韧带内侧缘穿刺抽取20 μ l关节液, 使用磷酸盐缓冲液将抽取的20 μ l关节液稀释至1ml, 采用酶联免疫吸附(ELISA)方法对稀释后的关节液进行IL-1Ra及IL-1 β 蛋白质定量分析。使用武汉博士德公司提供的ELISA试剂盒, 操作参见说明书。

6 膝关节滑膜组织及软骨组织中IL-1Ra及IL-1 β 基因相对表达测定 切断髌韧带及内外侧副韧带, 充分打开关节腔, 游离收集滑膜组织, 切断后交叉韧带, 暴露股骨内外侧髌, 分离收集软骨组织。将收集的滑膜及软骨组织浸泡到液氮中减少RNA降解, 随后置于陶瓷研钵研碎。RNA提取、反转录cDNA操作参见参考文献[7], 引物序列: 大鼠GAPDH上游序列(5'~3') ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACG, 下游序列(5'~3') TTACTCCTTGGAGGCCATGTAG; IL-1Ra上游序列(5'~3') AGATGTGCCTGTCTCTGTGTC, 下游序列(5'~3') CCTGCTTTCTGTCTCTGCTC; IL-1 β 上游序列(5'~3') TTGTGGCTGTGGAGAAGCTG, 下游序列(5'~3') GCCGTCTTTCATACACAGG。

7 膝关节病理学组织染色 取材后的股骨髌进行大体观照相, 观察软骨损伤情况。大体观察后, 标本经4%多聚甲醛固定, 10%中性EDTA脱钙、脱水处理, 最后进行石蜡包埋切片, HE染色及甲苯胺蓝染色。

8 统计学分析 使用 SPSS17.0 统计学软件分析数据。组间使用 Tukey 检验进行统计学差异分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 IL-1Ra 在大鼠滑膜、软骨组织及关节液中含量

EP 组中 IL-1Ra 基因相对表达水平较其他各组明显上调 ($P < 0.01$), 并随实验时间延长呈下降趋势, 但在 4 周时仍高于正常组 ($P < 0.01$), 是正常组的 4.29 倍。1 周时, NP 组 IL-1Ra 表达水平高于 OA 组 ($P < 0.05$), 但其余时间节点二者差异无统计学意义, 表明单纯 IL-1Ra 质粒注射进入关节腔可以部分得到表达, 但很快被降解, 相比经电穿孔后, IL-1Ra 能够更高、更持久的表达 (图 1A)。关节液中 IL-1Ra 的蛋白含量变化趋势与滑膜、软骨组织中表达结果一致 (图 1B)。

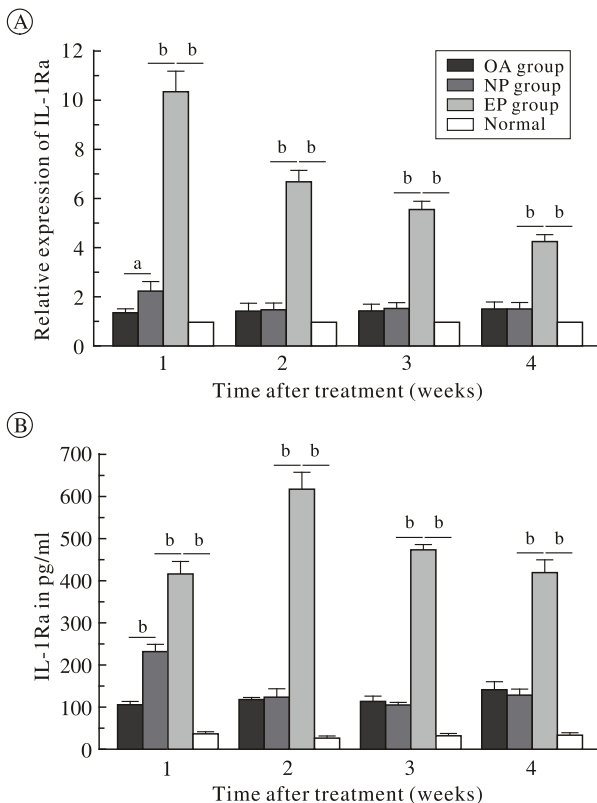


图 1 4周内各组大鼠 IL-1Ra 基因相对表达情况及蛋白质含量
A: 滑膜及软骨组织中基因相对表达情况; B: 关节液中蛋白质含量, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$

Fig.1 IL-1Ra relative expression and protein content in each group in 4 weeks

A: gene relative expression in synovium and cartilage; B: protein content in synovial fluid. $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$

2 IL-1 β 在大鼠滑膜、软骨组织及关节液中含量

OA 组与 NP 组 IL-1 β 表达水平呈上升趋势, 并在每个时间节点均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。

1 周时, NP 组 IL-1 β 相对表达水平低于 OA 组 ($P < 0.05$), 其他时间节点二者无统计学差异 ($P > 0.05$)。EP 组与正常对照组在观察周期内的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2A)。关节液中 IL-1 β 的蛋白含量变化趋势与滑膜、软骨组织中基因表达结果一致 (图 2B)。

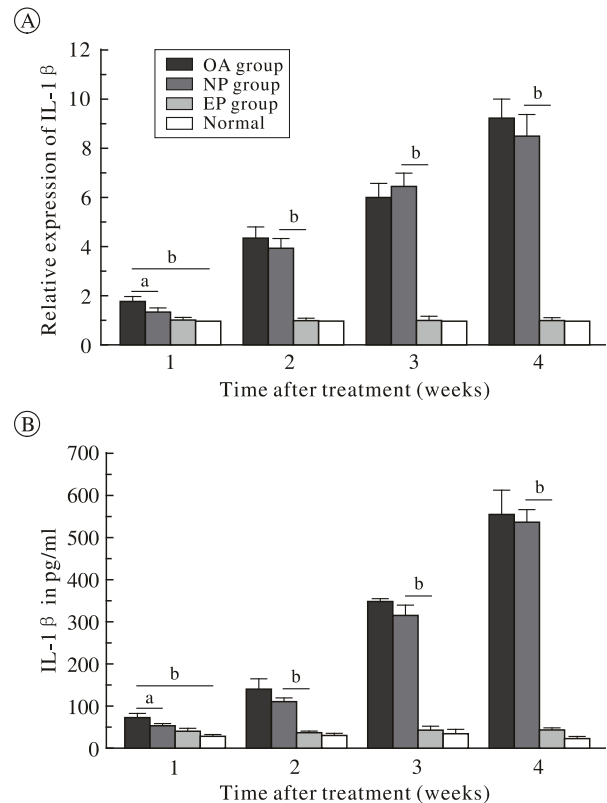


图 2 4周内各组大鼠 IL-1 β 基因相对表达情况及蛋白质含量
A: 滑膜及软骨组织中基因相对表达情况; B: 关节液中蛋白质含量, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$

Fig.2 IL-1 β relative expression and protein content in each group in 4 weeks

A: gene relative expression in synovium and cartilage; B: protein content in synovial fluid. $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$

3 股骨内侧髌大体观察 4 周大体观察结果显示, 正常关节软骨表面光滑且连续。OA 组和 NP 组股骨内侧髌负重区软骨破坏严重, 整个负重区软骨丢失, 严重部位软骨下骨裸露。EP 组软骨表面光滑、亮泽, 肉眼未见损伤 (图 3)。

4 病理学 HE 染色分析 4 周时, 正常软骨分层明显, 各层软骨细胞排列整齐, 基质分布均匀, 软骨表面光滑。OA 组与 NP 组软骨完全破坏, 裂隙深达软骨下骨, 软骨细胞排列紊乱, 局部出现细胞簇, 软骨下骨板上移。EP 组裂隙局限在软骨表层, 其余未见异常 (图 4)。

5 病理学甲苯胺蓝染色分析 4 周时, 正常组软骨细胞外基质甲苯胺蓝染色均一, 无局部染色丢

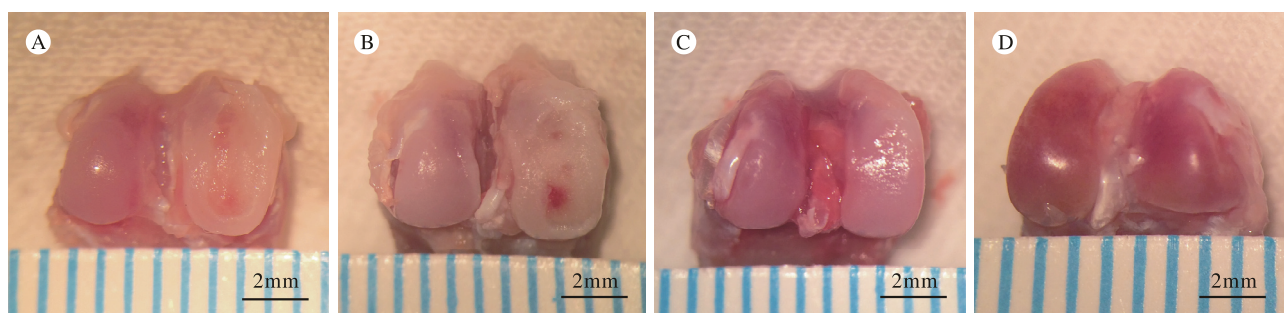


图 3 4周时大鼠股骨内侧髌大体形态 A:OA组; B:NP组; C:EP组; D:正常对照组

Fig.3 Gross appearance results at the fourth week A:OA group; B:NP group; C:EP group; D: Normal group

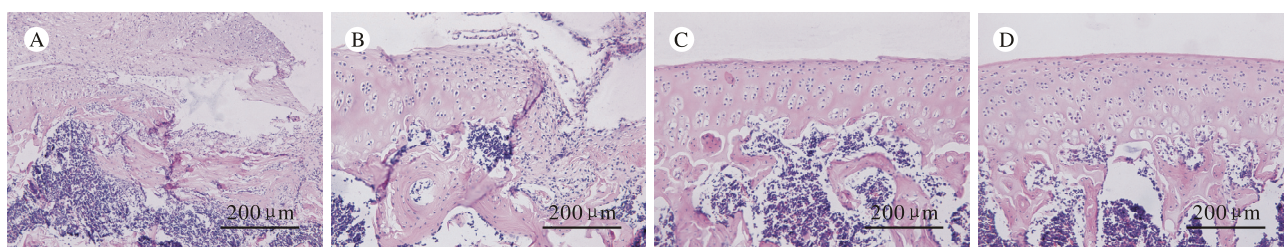


图 4 4周时大鼠股骨内侧髌病理切片HE染色结果 A:OA组; B:NP组; C:EP组; D:正常对照组

Fig.4 HE staining results at the fourth week A:OA group; B:NP group; C:EP group; D: Normal group

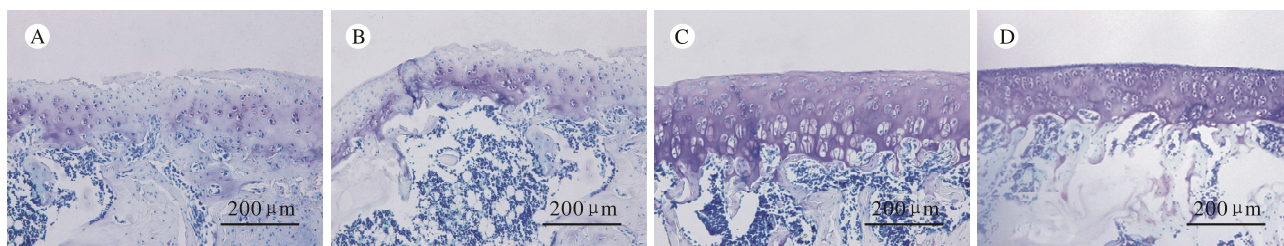


图 5 4周时大鼠股骨内侧髌病理切片甲苯胺蓝染色结果 A:OA组; B:NP组; C:EP组; D:正常对照组

Fig.5 Toluidine blue staining results at the fourth week A: OA group; B: NP group; C: EP group; D: Normal group

失现象。OA组与NP组细胞外基质染色广泛丢失，仅深层软骨区域有少量保存。EP组软骨表层细胞外基质染色轻微丢失，其他各层软骨区域染色同正常组(图5)。

讨论

骨性关节炎是多因子、多细胞参与的复杂过程，无有效治愈方法^[8-10]。基因治疗提供了新的治疗可能性。首先，挑选目的基因。IL-1及IL-1Ra在调控炎症反应中起关键作用^[2]。体内外实验证实了IL-1Ra对骨性关节炎的治疗效果，既能够明显抑制IL-1引起的兔膝关节骨性关节炎^[11]，又可以保护马关节软骨^[12]。所以，本实验选择IL-1Ra作为目的基因，验证电穿孔对骨性关节炎的基因治疗效果。其次，载体的选择决定基因转染的效率及最终治疗效果。病毒载体由于其较高的转染效率已经应用到很多疾病的基因治疗研究当中，并且开展了大量临床实验研究，但其潜在的传染性、

免疫原性、致癌作用及其他不能预测的风险限制了其在临床进一步开展^[13-17]。根据细胞膜正常生理功能—电特性，电穿孔通过物理方式—过性地可逆地改变细胞膜的通透性，产生大量微孔，将DNA、RNA等大分子吸附到细胞内，完成基因的转染^[18-19]。

本实验中，经电穿孔治疗4周后，在软骨及滑膜组织中IL-1Ra基因表达程度是正常组的4.29倍，在关节液中IL-1Ra蛋白质含量是正常组的12.09倍，表明转染后IL-1Ra基因可获得高效、长期的表达，表达的蛋白质可在关节液内以较高的浓度保存，该蛋白与IL-1受体特异性结合，阻止IL-1与其受体的匹配，从而阻断了IL-1介导的炎症通路，减轻关节炎炎症反应。比较治疗4周后的关节软骨形态，结果证实经电穿孔治疗后，阻止了由于关节炎的加重引起的软骨损伤(软骨结构破坏、细胞外基质丢失、软骨下骨板重塑)。而向骨性关节炎的膝关节腔内单纯添加IL-1Ra基因的

治疗方式, 仅在 1 周时观察到目的基因表达上调, 但 4 周时的关节软骨严重破坏, 表明该方法仅能起到轻微、短暂的效果, 不能抑制骨性关节炎的发展过程。

参考文献

- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. Osteoarthritis : a disease of the joint as an organ [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64 (6): 1697-1707.
- Pelletier JP, Faure MP, DiBattista JA, et al. Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-1, and oncogene proteins in experimental osteoarthritis. An immunohistochemical study [J]. *Am J Pathol*, 1993, 142 (1): 95-105.
- Chen B, Qin J, Wang H, et al. Effects of adenovirus-mediated bFGF, IL-1Ra and IGF-1 gene transfer on human osteoarthritic chondrocytes and osteoarthritis in rabbits [J]. *Exp Mol Med*, 2010, 42 (10): 684-695.
- Ha CW, Noh MJ, Choi KB, et al. Initial phase I safety of retrovirally transduced human chondrocytes expressing transforming growth factor-beta-1 in degenerative arthritis patients [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14 (2): 247-256.
- Zhang F, Yao Y, Su K, et al. Co-transduction of lentiviral and adenoviral vectors for co-delivery of growth factor and shRNA genes in mesenchymal stem cells-based chondrogenic system [J/OL]. [http : //dx.doi.org/10.1002/term.1656](http://dx.doi.org/10.1002/term.1656).
- 熊兰, 孙才新, 廖瑞金, 等. 细胞膜电穿孔的机理及应用前景的初步探讨 [J]. *重庆大学学报 : 自然科学版*, 2000, 23 (4): 76-79.
- Sukedai M, Ariyoshi W, Okinaga T, et al. Inhibition of adjuvant arthritis in rats by electroporation with interleukin-1 receptor antagonist [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31 (11): 839-846.
- Hussain H, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, et al. A fruitful decade from 2005 to 2014 for anthraquinone patents [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 25 (9): 1053-1064.
- 张江林. 关节炎最新诊断标准解读 [J]. *军医进修学院学报*, 2012, 33 (6): 553-555.
- 廖伟雄, 李众利, 王杰, 等. 骨性关节炎患者血清和关节滑液中 BMP-7 的检测及临床意义 [J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34 (3): 273-275.
- Zhang P, Zhong ZH, Yu HT, et al. Exogenous expression of IL-1Ra and TGF-β 1 promotes in vivo repair in experimental rabbit osteoarthritis [J/OL]. [http : //www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03009742.2015.1009942](http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03009742.2015.1009942).
- Watson RS, Broome TA, Levings PP, et al. scAAV-mediated gene transfer of interleukin-1-receptor antagonist to synovium and articular cartilage in large mammalian joints [J]. *Gene Ther*, 2013, 20 (6): 670-677.
- Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62 (1): 12-27.
- Heckl D, Schwarzer A, Haemmerle RA, et al. Lentiviral vector induced insertional haploinsufficiency of Ebf1 causes murine leukemia [J]. *Mol Ther*, 2012, 20 (6): 1187-1195.
- Simon RH, Engelhardt JF, Yang Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates : toxicity study [J]. *Hum Gene Ther*, 1993, 4 (6): 771-780.
- Deng WT, Dyka FM, Dinculescu A, et al. Stability and Safety of an AAV Vector for Treating RPGR-ORF15 X-Linked Retinitis Pigmentosa [J/OL]. [http : //online.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2015.035](http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2015.035).
- Goodrich LR, Grieger JC, Phillips JN, et al. scAAVIL-1ra dosing trial in a large animal model and validation of long-term expression with repeat administration for osteoarthritis therapy [J]. *Gene Ther*, 2015, 22 (7): 536-545.
- Mir LM. Electroporation-based gene therapy : recent evolution in the mechanism description and technology developments [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1121 : 3-23.
- Gehl J. Electroporation : theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research [J]. *Acta Physiol Scand*, 2003, 177 (4): 437-447.