

脂多糖诱导成骨细胞中 CHI3L1 表达的分子机制研究*

高磊¹⁾ 蔡国平^{2)**}

(¹⁾清华大学生物科学与技术系, 北京 100084; ²⁾清华大学深圳研究生院生命学部, 深圳 518055)

摘要 慢性骨髓炎因其病程漫长、易出现并发症以及复发率高成为临床上棘手的难题, 其主要致病原因是金黄色葡萄球菌等革兰氏阴性菌感染。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁的重要成分, 用 LPS 在体外刺激骨组织相关细胞在一定程度上可以模拟骨髓炎患者的病理特征。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 等试验结果表明, 在骨髓炎患者的骨组织和 LPS 刺激的成骨细胞中, 几丁质酶家族成员 CHI3L1 的表达均有明显升高。核因子 κ B (NF- κ B) 荧光素酶报告载体检测结果显示, LPS 能诱导细胞的 NF- κ B 活化, NF- κ B 活化抑制剂 Bay11-7082 能抑制 LPS 诱导的 CHI3L1 表达升高。用抗肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的抗体预处理细胞, 或采用 siRNA 干扰的方法抑制 TNF- α 受体的表达, 都能明显抑制 LPS 诱导的 CHI3L1 表达上调。同时, NF- κ B 活化抑制剂 Bay11-7082 预处理细胞能抑制 LPS 对 TNF- α 表达的诱导作用。结果提示, LPS 通过激活 NF- κ B 诱导 TNF- α 分泌上调, 刺激 CHI3L1 表达。提出骨髓炎及脂多糖刺激条件下 CHI3L1 表达上调, 并在细胞水平上初步探讨了脂多糖诱导 CHI3L1 表达的分子机制。

关键词 骨髓炎, 脂多糖, CHI3L1, 成骨细胞

学科分类号 R3, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00634

骨髓炎是一种细菌感染骨髓、骨皮质和骨膜引起的炎症性疾病。其中慢性骨髓炎是骨科常见病, 其病程漫长, 易并发慢性窦道、骨缺损和病理性骨折, 而且清创手术失败率、复发率高, 是临床上较为棘手的难题。

CHI3L1 是哺乳动物几丁质酶基因家族成员^[1], 有证据表明分泌的 CHI3L1 蛋白参与细胞对不利刺激的保护性反应^[2]。CHI3L1 在正常的骨组织中有表达, 但在感染的骨组织中表达量是否有改变及其涉及的分子调控机制, 目前还不明确。

CHI3L1 在动脉粥样硬化、脑膜炎、哮喘等患者的血清或者组织中的浓度明显增加, 而这些疾病的病理过程都伴随着炎症反应的发生^[3~5]。骨髓炎的主要致病原因是细菌感染骨组织, 进而引发炎症反应。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为革兰氏阴性菌细胞壁的重要活性成分, 是导致感染和炎症的重要原因^[6, 7]。研究表明, 包括 LPS 在内的很多病原体活性成分通过与细胞表面的 TLR 结合, 激活核因子 κ B (NF- κ B), 引起广泛的免疫反应^[8]。另外, 感染发生后多种细胞因子表达迅速上调, 它们

参与介导了感染导致的发热、休克等多种病理反应^[9]。这些研究提示, LPS 很可能在受到感染的骨组织和相关细胞中诱导 CHI3L1 表达, 而 NF- κ B 和细胞因子则可能参与了这一诱导过程。

本研究发现, 在骨髓炎患者的骨组织和脂多糖刺激的成骨细胞中, CHI3L1 的表达均有明显升高, 并且进一步在细胞水平上初步探讨了脂多糖诱导 CHI3L1 表达的分子机制, 结果显示, NF- κ B 和抗肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 参与脂多糖诱导 CHI3L1 表达的过程, 为进一步研究 CHI3L1 在相关病理过程中的功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

dNTP 和 rTaqDNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;

* 清华大学深圳研究生院优秀学位论文培养基金资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0755-26036156, E-mail: gaolei1107@hotmail.com

收稿日期: 2008-09-14, 接受日期: 2008-10-13

TRIzol, 第一链 cDNA 合成试剂盒和转染试剂 Lipofectamine 2000 均购自 Invitrogen 公司; pGL3 载体和荧光素酶活性检测试剂盒均购自 Promega 公司; α -MEM 培养基和胎牛血清 (FBS) 均购自 Hyclone 公司; TNF- α 购自 Peprotech 公司; 抗 CHI3L1 抗体、抗 TNF- α 抗体、抗 IL-6 抗体以及检测 TNF- α 和 IL-6 的 ELISA 试剂盒均购自 R&D 公司; 辣根过氧化物酶标记的兔抗绵羊二抗和 Western blot 化学发光检测试剂盒均购自 KPL 公司; 抗 β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司; LPS 和 Bay11-7082 购自 Sigma 公司; siRNA 由上海吉玛生物技术公司合成; 引物合成和 PCR 产物测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. 成骨细胞 MC3T3-E1 和单核 / 巨噬样细胞 RAW264.7 (均购自中国医学科学院细胞中心) 培养在 α -MEM (含 10% FBS) 培养基中. 在 37℃、含 5% CO₂ 的孵箱中培养. 当细胞生长达到

90% 汇合时, 用胰酶消化, 1:3 分瓶.

1.2.2 荧光实时定量 PCR 检测骨髓炎组织中 CHI3L1 表达变化. 取骨髓炎患者的感染骨组织在液氮中充分研磨后, 加入 Trizol 抽提 RNA. 用第一链 cDNA 合成试剂盒进行反转录获得 cDNA 模板. 使用 Stratagene 公司的 Real-time PCR 试剂盒进行反应. 反应条件为: 94℃ 5 min 预变性; 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 20 s, 扩增 40 个循环.

1.2.3 RT-PCR 分析.

TRIzol 法提取细胞总 RNA, 用第一链 cDNA 合成试剂盒进行反转录获得 cDNA 模板. 做 RT-PCR 检测基因表达. 以 GAPDH 为内参, 用表 1 中所列引物进行 PCR 反应.

PCR 反应条件为: 94℃ 4 min 预变性; 94℃ 45 s, 57℃ 45 s, 72℃ 1 min, 扩增 30 个循环; 72℃ 延伸 15 min. PCR 产物经测序证明序列正确.

Table 1 Oligo-deoxyribonucleotide primers sequences used in RT-PCR

Forward(5'~3')	Reverse(5'~3')	Gene
ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	GAPDH
CCGTTCTCTGCGTTCTTAT	ACTGGTTGCCCTTGGTAG	CHI3L1
CCGATGGGTTGTACCTTGTC	GGGCTGGGTAGAGAATGGAT	TNF- α
CTGGTGACAACCACGGCCTTCCCTA	ATGCTTAGGCATAACGCACTAGGTT	IL-6

1.2.4 Western blot. 收集细胞培养液上清, 加入 3 倍体积的冷乙醇, 置于 -20℃ 30 min 后, 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min, 小心吸出上清. 加入去离子水溶解沉淀, 用 BCA 法进行蛋白质定量. 每条泳道取 50 μ g 蛋白质加入等体积的 5 $\times$ 上样缓冲液, 煮沸后进行电泳分离. 69 V 0.5 h 将蛋白质转移到 PVDF 膜上. 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗, 4℃ 过夜. 然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温 2 h. 最后加入 KPL 公司的发光底物, 反应 2 min, 于暗室中进行曝光、显影和定影.

1.2.5 报告基因转染. 构建 NF- κ B 报告载体, 将含有 4 个串联的 NF- κ B 结合序列的片段插入 pGL3 (pGL3-NF- κ B). 用 Omega 公司的质粒中提试剂盒纯化报告载体. 细胞转染采用 Lipofectamine 2000 转染试剂. 24 孔板每孔转染 300 ng 报告载体, 同时转染 30 ng pRL-TK 质粒. 转染 12 h 后加入 LPS 刺激细胞 8 h, 吸弃培养液, 用冰冷的 PBS 洗涤细胞 1 次, 然后加入裂解缓冲液, 轻柔振荡 15 min,

离心收集上清. 把 20 μ l 裂解上清液加入 100 μ l 反应缓冲液中, 用加样器轻柔吹打数次. 然后在酶标仪上读取 pGL3-NF- κ B 载体产生的荧光强度值. 加入 100 μ l 终止反应液, 轻柔震荡混匀. 再用酶标仪读取 pRL-TK 载体产生的荧光强度值, 并用第二个荧光强度值对第一个值进行校正.

1.2.6 siRNA 转染. 用针对 C/EBP β 和 TNF- α 受体 1 的特异性 siRNA 转染细胞抑制相关基因表达. 具体如下: 针对 C/EBP β 的 siRNA (5' GUGGCCAACUUCUACUACGdTdT 3' 和 5' CGUAGUAGAAGUUGGCCACdTdT 3') 和阴性对照 siRNA (5' AUCCGCGCGAUAGUACGUAdTdT 3' 和 5' UACGUACUAUCGCGCGGAUdTdT 3'); 针对 TNF- α 受体 1 的 siRNA (5' GUGGCCAACUUCUACUACGdTdT 3' 和 5' CGUAGUAGAAGUUGGCCACdTdT 3') 和阴性对照 siRNA (5' AUCCGCGCGAUAGUACGUAdTdT 3'; 5' UACGUACUAUCGCGCGGAUdTdT 3'). 2 μ l Lipofectamine 2000 与

200 μl 无血清培养基混匀为 A 液, 室温孵育 5 min. 2 μl siRNAs (储存浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$) 加入 200 μl 无血清培养基中为 B 液. A 液与 B 液混匀, 室温孵育 20 min, 加入培养板中, 使 siRNA 终浓度为 33 nmol/L. 转染 24 h 后再加入 LPS 刺激细胞.

1.2.7 ELISA 检测 TNF- α 和 IL-6 分泌量的变化. 收集细胞培养基上清. 用捕获抗体包被 ELISA 板, 每孔中加 100 μl , 然后放入封闭的湿盒中, 室温过夜. 用含 0.05% Tween20 的 PBS 洗板 4 次. 每孔加入 300 μl 封闭液, 1%BSA 室温封闭 2 h. 洗板 4 次. 每孔加入 100 μl 培养液上清, 室温孵育 2 h. 洗板 4 次. 把检测抗体加入 ELISA 板, 每孔中加 100 μl , 室温 2 h. 洗板 4 次. 然后加入生物素标记的过氧化物酶稀释液室温 30 min. 洗板 4 次. 最后每孔加入 100 μl 反应底物. 在暗盒中反应显色 15~20 min. 用 1 mol/L 硫酸终止反应, 立即在酶标仪上读取 A_{450} 值. 每组试验均设 3 个平行.

1.2.8 统计分析. 全部结果用($\bar{x} \pm s$)表示, 对实验结果进行 t 检验, $P < 0.05$ 认为存在显著性差异.

2 结 果

2.1 在骨髓炎组织中 CHI3L1 表达明显升高

取骨髓炎患者(7 人)的感染骨组织, 在液氮中充分研磨, 加入 Trizol 抽提 RNA. 反转录后进行实时定量 PCR. 结果显示, 虽然不同病人的感染组织中 CHI3L1 表达差异较大(相对表达量依次为 2.37, 2.81, 2.14, 1.72, 1.84, 2.59, 2.78), 但是与正常人的骨组织相比, 感染骨组织中 CHI3L1 表达明显增加(与对照相比, $P < 0.05$), 结果见表 2.

Table 2 Real-time PCR analysis of CHI3L1 expression levels in osteomyelitis patients

	Control	Osteomyelitis patients
CHI3L1 expression level	1.00 ± 0.29	2.32 ± 0.45

The expression level of control was designated as 1. Data were reported as $\bar{x} \pm s$.

2.2 LPS 诱导成骨细胞 CHI3L1 表达

RT-PCR 检测结果显示, 10 mg/L LPS 刺激成骨细胞 MC3T3-E1, 6 h 后 CHI3L1 mRNA 表达水平明显升高, 一直持续到 12 h 没有下降趋势(图 1a). 但是在单核/巨噬样细胞 RAW264.7 中, 受到刺激 12 h 后, 该基因的表达仍没有明显变化

(图 1b). 如图 1c 所示, Western blot 分析在蛋白质水平上验证了 LPS 对 CHI3L1 表达的诱导作用.

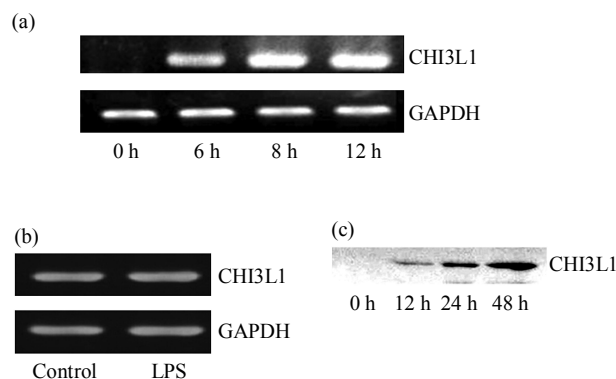


Fig. 1 Expression changes of CHI3L1 in MC3T3-E1 and RAW264.7 cells after LPS stimulation

(a) LPS-stimulated MC3T3-E1 cells. (b) LPS-stimulated RAW264.7 cells. GAPDH is used as an internal control. (c) Analysis of expression of CHI3L1 after LPS treatment by Western blot.

2.3 NF- κ B 介导 LPS 对 CHI3L1 表达的诱导作用

运用 NF- κ B 萤光素酶报告载体检测 NF- κ B 活化程度, 结果显示, LPS 能诱导转染报告载体的成骨细胞中萤光素酶活性明显增强, 与对照组有显著差异($P < 0.05$), 而且呈 LPS 剂量依赖性, 说明 LPS 激活了 NF κ B 信号通路(表 3).

Table 3 Activities of luciferase reporter gene in MC3T3-E1 cells transfected with pGL3-NF- κ B and pRL-TK plasmids

	Control (PBS)	LPS (1 mg/L)	LPS (10 mg/L)
Relative fluorescence intensity	1.00 ± 0.21	10.70 ± 2.91	16.80 ± 3.54

The activity of control was normalized to 1. Data were reported as $\bar{x} \pm s$. $P < 0.05$ vs control.

Bay11-7082 能够抑制 NF- κ B 的降解, 从而抑制 NF- κ B 的活化. 采用 RT-PCR 和 Western blot 分析 CHI3L1 表达发现: 在 Bay11-7082 预处理的细胞中, LPS 对 CHI3L1 表达的诱导作用受到明显抑制(图 2a, c). 表明 NF- κ B 在 LPS 诱导 CHI3L1 表达的过程中是必需的. 抑制 LPS 下游信号通路的另一个重要转录因子 C/EBP β 表达, 对 CHI3L1 的表达则没有明显影响(图 2b, c), 表明 C/EBP β 不参与 LPS 诱导 CHI3L1 表达的过程.

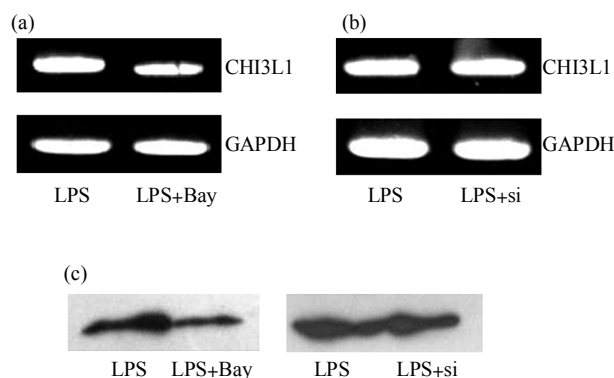


Fig. 2 Effect of inhibition of NF- κ B activation and C/EBP β expression on the LPS-induced CHI3L1 expression

(a) Cells were pretreated with 20 mg/L Bay11-7082 (Bay). RT-PCR was performed to evaluate mRNA expression. (b) Cells were transfected with siRNA for C/EBP β (si). RT-PCR was performed to evaluate mRNA expression. (c) Western blot was performed to confirm the results of RT-PCR.

2.4 TNF- α 对 LPS 诱导的 CHI3L1 表达是必需的

为了确定 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子在 LPS 诱导 CHI3L1 表达过程中的作用, 检测了 LPS 刺激 MC3T3-E1 细胞后, TNF- α 和 IL-6 的表达量. RT-PCR 结果显示: 细胞受到 LPS 刺激 1.5 h 后即可见 TNF- α 和 IL-6 表达升高, 且早于 CHI3L1 表达升高出现的时间(图 3a), 另外, ELISA 试验也显

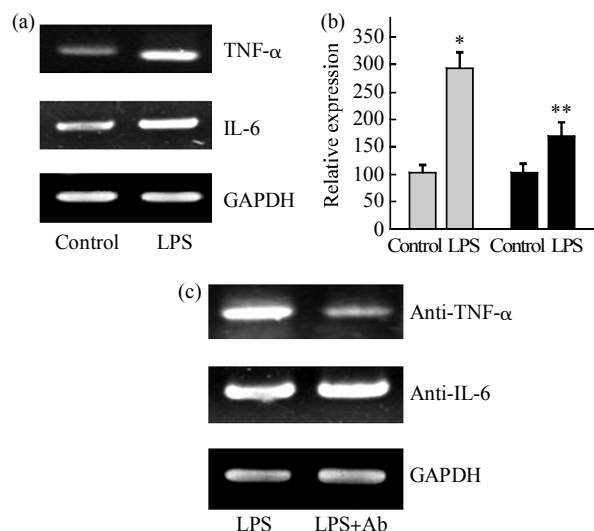


Fig. 3 Roles of TNF- α and IL-6 in the LPS-induced CHI3L1 expression

(a) MC3T3-E1 cells were treated with LPS for 1.5 h, then RT-PCR analysis was performed to examine the expression levels of TNF- α and IL-6. (b) ELISA was performed to evaluate the production of TNF- α and IL-6. * P < 0.01, ** P < 0.05 vs control. (c) Pre-incubation of antibodies (Ab) resulted in decrease of CHI3L1 expression. □: TNF- α ; ■: IL-6.

示两种细胞因子的表达分泌量增加(图 3b). 因此 TNF- α 和 IL-6 可能参与 LPS 诱导 CHI3L1 表达的过程. 用抗 TNF- α 的抗体预处理细胞, 能明显抑制 LPS 的诱导作用. 但是, 用抗 IL-6 的抗体预处理细胞, 则没有明显效果(图 3c).

为了进一步验证 LPS 通过 TNF- α 诱导 CHI3L1 表达, 采用 siRNA 干扰的方法抑制 TNF- α 受体 1 (TNFR1) 的表达, 结果显示, 转染了 siRNA 后, TNFR1 表达水平明显下降(图 4a), LPS 处理细胞后 CHI3L1 的表达上调也受到明显抑制(图 4b, c). 直接用 TNF- α 刺激细胞也会引起 CHI3L1 表达上调(图 4d). 这些结果表明: LPS 刺激细胞后, 通过诱导 TNF- α 表达提高 CHI3L1 的表达.

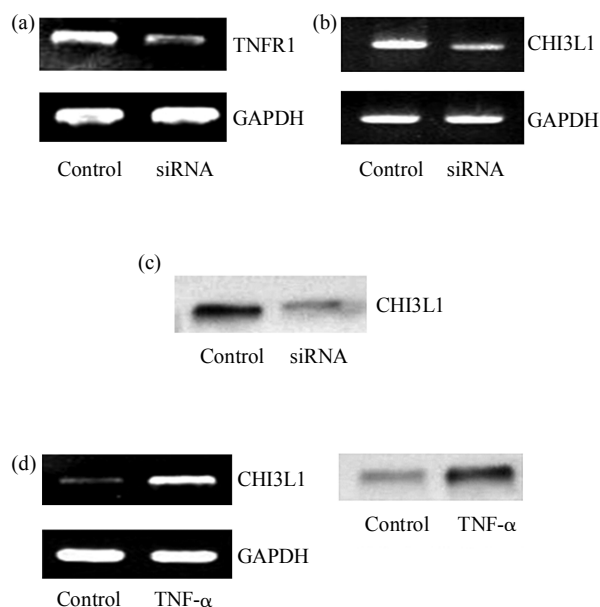


Fig. 4 Effect of TNFR1 silencing on CHI3L1 expression

(a) Expression of TNFR1 after transfection of siRNA. (b) Expression of CHI3L1 mRNA after transfection of siRNA. (c) Expression of CHI3L1 protein after transfection of siRNA. (d) TNF- α induced CHI3L1 expression at both mRNA and protein levels.

2.5 LPS 通过 NF- κ B 诱导 TNF- α 表达

上述结果已经证明, NF- κ B 活化和 TNF- α 表达对 LPS 引起的 CHI3L1 表达上调都是必需的, 为了验证二者之间有无直接联系, 用 NF- κ B 活化抑制剂 Bay11-7082 预处理细胞, 然后检测 LPS 对 TNF- α 表达的诱导作用是否受到影响. 结果显示, Bay11-7082 预处理细胞明显抑制了 LPS 对 TNF- α 表达的诱导作用(图 5), 说明 LPS 通过激活 NF- κ B 诱导 TNF- α 表达.

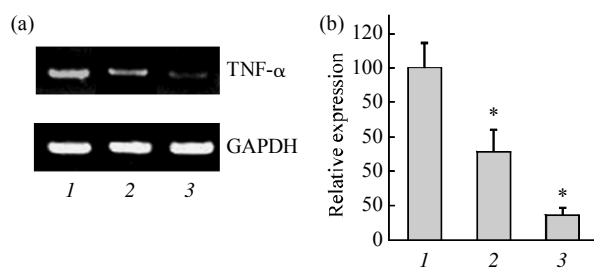


Fig. 5 Effect of inhibition of NF- κ B activation on TNF- α expression induced by LPS

(a) mRNA expression was assessed by RT-PCR. (b) Protein expression was detected by ELISA. * $P < 0.01$ vs LPS. 1: LPS; 2: LPS + Bay (20 mg/L); 3: LPS + Bay (20 mg/L).

3 讨 论

CHI3L1 属于哺乳动物几丁质酶家族, 该基因的 cDNA 编码长为 383 个氨基酸的蛋白质. CHI3L1 的三级结构是由 $\alpha 8/\beta 8$ 的桶状折叠构成, 在蛋白质的 C 端有一个沟形结构是直接和几丁质结合的部位. 临床研究表明, CHI3L1 主要表达于人体细胞外基质重构和炎症反应等病理条件下, 如动脉粥样硬化、重型骨关节炎、肝纤维化、脑膜炎等. 体外实验证明, TNF- α 能够诱导软骨细胞表达 CHI3L1^[10]. 提示炎症因子是诱导 CHI3L1 表达的重要因素.

骨组织和相关细胞都可能受到细菌感染, 诱发骨髓炎、骨炎等疾病. 慢性骨髓炎是骨科常见病, 因其病程漫长、复发率高, 所以目前是临床上较为棘手的一个难题. 慢性骨髓炎的主要致病菌是金黄色葡萄球菌等革兰氏阴性菌^[11, 12]. LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁的重要成分, 是导致感染和骨组织破坏的重要原因. 用 LPS 在体外刺激骨组织相关细胞, 在一定程度上可以模拟骨髓炎患者的病理特征. 本文提出, CHI3L1 在骨髓炎患者的感染骨组织和 LPS 处理的成骨细胞中表达均有升高, 但是在单核/巨噬样细胞中 LPS 并不诱导 CHI3L1 表达升高, 提示 CHI3L1 有可能参与骨组织感染的病理进程, 而且成骨细胞很可能是骨髓炎病理过程中 CHI3L1 表达升高的细胞来源.

NF- κ B 和 C/EBP β 是 LPS 激活的信号通路下游重要的转录因子, 是参与炎症反应的重要基因^[13, 14]. 为了进一步阐明 LPS 诱导 CHI3L1 表达的机制, 检测了这两个转录因子是否参与介导了该诱导过程. 结果显示, LPS 对 NF- κ B 有明显的激活作用, 抑制 NF- κ B 活化会强烈抑制 LPS 对 CHI3L1 的诱导

作用, 而抑制 C/EBP β 表达并不会影响 LPS 的诱导作用, 表明转录因子 NF- κ B 的活化在 LPS 诱导 CHI3L1 表达的过程中起重要作用.

多种细胞因子也会介导感染导致的病理反应. 已知多种细胞受到 LPS 刺激后都会表达 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 等细胞因子, 这些细胞因子单独或与 LPS 一起调节下游基因表达, 在 LPS 发挥生物学活性和功能的过程中起重要作用. 有研究报道, 在小鼠的骨髓炎造模之后, TNF- α 、IL-1、IL-6 等细胞因子表达在极早期即发生明显上调^[15]. 本研究的结果也显示, LPS 刺激成骨细胞后, TNF- α 和 IL-6 表达上调出现早于 CHI3L1, 提示这些细胞因子可能参与了感染和 LPS 诱导 CHI3L1 表达的过程. 用抗 TNF- α 抗体预处理细胞和对 TNFR1 进行基因沉默, 结果显示这两种方法可以使 LPS 处理细胞后 CHI3L1 的表达上调受到明显抑制. 本研究还发现直接用 TNF- α 处理细胞也能刺激 CHI3L1 表达. 上述结果证实 LPS 通过 TNF- α 介导 CHI3L1 表达. 用 NF- κ B 活化抑制剂 Bay11-7082 处理细胞会抑制 LPS 诱导的 TNF- α 表达上调, 说明 NF- κ B 的激活是 TNF- α 上调的上游事件. 基于以上实验结果, 提出 LPS 诱导 CHI3L1 表达的可能的分子机制: LPS 首先激活 NF- κ B, NF- κ B 的激活诱导 TNF- α 分泌上调, 最后由 TNF- α 采用自分泌或者旁分泌的方式刺激 CHI3L1 表达.

综上所述, 本研究首次发现, CHI3L1 在骨髓炎患者的感染骨组织和 LPS 处理的成骨细胞中表达均有升高, 提示 CHI3L1 有可能参与骨组织感染的病理进程, 并初步阐明了 LPS 诱导成骨细胞表达 CHI3L1 的信号通路, 为进一步阐明该基因的生物学特性和功能奠定了良好的基础, 也为了解骨髓炎等相关疾病的发病机理提供了重要的资料.

参 考 文 献

- 1 Hakala B E, White C, Recklies A D. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem*, 1993, **268**(34): 25803~25810
- 2 Ling H, Recklies A D. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor α . *Biochem J*, 2004, **380**(3): 651~659
- 3 Østergaard C, Johansen J S, Benfield T, *et al.* YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, **9**(3): 598~604
- 4 Boot R G, van Achterberg T A, van Aken B E, *et al.* Strong induction of members of chitinase family proteins in atherosclerosis.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, **19** (3): 687~694
- 5 Chupp G L, Lee C G, Jarjour N, *et al.* A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med*, 2007, **357**(20): 2016~2027
 - 6 Hausmann E, Raisz L G, Miller W A. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science*, 1970, **168**(933): 861~864
 - 7 Chiang C Y, Kyritsis G, Graves D T, *et al.* Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1999, **67** (8): 4231~4236
 - 8 Caamaño J, Hunter C A. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev*, 2002, **15**(3): 414~429
 - 9 Tam V K, Schotland S, Green J. Inflammatory cytokines (IL-1 α , TNF- α) and LPS modulate the Ca²⁺ signaling pathway in osteoblasts. *Am J Physiol*, 1998, **274** (6 Pt 1): C1686~1698
 - 10 Recklies A D, Ling H, White C, *et al.* Inflammatory cytokines induce production of CHI3L1 by articular chondrocytes. *J Biol Chem*, 2005, **280**(50): 41213~41221
 - 11 Lew D P, Waldvogel F A. Osteomyelitis. *N Engl J Med*, 1997, **336** (14): 999~1007
 - 12 Cunningham R, Cockayne A, Humphreys H. Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. *J Med Microbiol*, 1996, **44**(3): 157~164
 - 13 Papin S, Cazeneuve C, Duquesnoy P, *et al.* The tumor necrosis factor alpha-dependent activation of the human mediterranean fever (MEFV) promoter is mediated by a synergistic interaction between C/EBP beta and NF kappaB p65. *J Biol Chem*, 2003, **278** (49): 48839~48847
 - 14 Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, *et al.* Transcriptional roles of CCAAT/enhancer binding protein-beta, nuclear factor-kappaB, and C-promoter binding factor 1 in interleukin (IL)-1beta-induced IL-6 synthesis by human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Biol Chem*, 1998, **273**(13): 7620~7627
 - 15 Yoshii T, Magara S, Miyai D, *et al.* Local levels of interleukin-1beta, -4, -6 and tumor necrosis factor alpha in an experimental model of murine osteomyelitis due to *staphylococcus aureus*. *Cytokine*, 2002, **21**(2): 59~65

The Molecular Mechanism of LPS-induced CHI3L1 Expression*

GAO Lei¹⁾, CAI Guo-Ping^{2)**}

¹⁾Department of Biological Sciences and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾Life Science Division, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)

Abstract Treatment of chronic osteomyelitis has become a difficult problem in clinical medicine due to its extended pathological process, high occurrence of complication and recurrence of disease. The major pathogenesis mechanism is Gram-negative bacteria infection, such as staphylococci. LPS is an important substance found in the cell wall of Gram-negative bacteria and administration of LPS to skeleton relevant cells *in vitro* could simulate the pathological characteristics of osteomyelitis patients. The results of quantitative real-time PCR and Western blot showed that CHI3L1 was up-regulated obviously in the infected bone tissues of osteomyelitis patients and LPS-stimulated osteoblasts. Analysis of the luciferase activity of NF- κ B reporter gene vector revealed that LPS could activate NF- κ B. Bay11-7082, an inhibitor of NF- κ B activation, suppressed the elevation of CHI3L1 expression induced by LPS. Pre-incubation of osteoblasts with anti-TNF- α antibody or silencing TNF- α receptor expression by siRNA inhibited the induction effect of LPS on CHI3L1. Inhibition of NF- κ B activation also prevented up-regulation of TNF- α induced by LPS. In conclusion, LPS stimulated TNF- α expression through activating NF- κ B, then TNF- α induced CHI3L1 expression. It was demonstrated for the first time that CHI3L1 expression is promoted in osteomyelitis and LPS-treated osteoblasts and investigates the molecular mechanism of LPS-induced CHI3L1 expression in osteoblasts.

Key words osteomyelitis, LPS, CHI3L1, osteoblast

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00634

*This work was supported by a grant from The Fund for Fostering Excellent Degree Thesis in Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University.

**Corresponding author.

Tel: 86-755-26036156, E-mail: gaolei1107@hotmail.com

Received: September 14, 2008 Accepted: October 13, 2008