

骨关节布鲁氏菌病的研究进展

梁 晨¹, 魏 伟², 梁秀文¹, 德恩金¹, 王立军¹

摘要:近年来布鲁氏菌病在一些国家和地区呈流行趋势,所致的骨与关节受损较为常见。其中骨关节受累最常见的3种形式是骶髂关节炎、脊椎炎和外周关节炎。骨损伤机制逐渐被阐明:TNF- α 和参与调节骨质代谢的核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)参与其中,并由单核巨噬细胞、中性粒细胞、CD4⁺ T 细胞和 B 细胞等炎性细胞介导。此外,布鲁氏菌可直接作用于骨细胞和打破骨重塑的稳态平衡。通过作用成骨细胞抑制骨基质沉积、改变细胞表型产生金属蛋白酶(MMPs)和分泌细胞因子,从而促进骨基质降解。布鲁氏菌还可通过诱导破骨细胞生成和增强破骨细胞活化,进而增加矿物质和有机骨基质吸收,加剧了骨损伤。关节组织的病理学实验发现滑膜组织除了诱导细胞分泌趋化因子的激活、生成炎性细胞因子和基质金属蛋白酶,布鲁氏菌感染也可抑制滑膜细胞凋亡。布鲁氏菌是一种细胞内细菌,在巨噬细胞的内质网中优先复制。近年来骨与关节布鲁氏菌病分子机制的研究揭示布鲁氏菌与人类免疫细胞及骨关节细胞之间的相互作用在骨与关节损伤中发挥了重要作用。

关键词:骨关节;布鲁氏菌病;B 细胞和 T 细胞;滑膜细胞;成骨细胞;破骨细胞

中图分类号:R378.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)12-1147-04

Research progress of osteoarticular involvement with brucellosis

LIANG Chen¹, WEI Wei², LIANG Xiu-wen¹, DE En-jin¹, WANG Li-jun¹

(1. Hulunbeier People's Hospital of, Hulunbuir 021008, China;

2. Hulunbeier Center for Disease Control and Prevention, Hulunbuir 021008, China)

Abstract: Osteoarticular brucellosis is the most common presentation of human disease in the world. There are three most common forms of osteoarticular involvement are peripheral arthritis, sacroiliitis, and spondylitis. *Brucella abortus* induces bone damage through diverse mechanisms in which TNF- α and RANKL modulator of bone homeostasis are involved. These processes are driven by inflammatory cells, like macrophages, neutrophils, Th17 CD4C T, and T cells. These bacteria inhibit bone matrix deposition by osteoblasts and modify the phenotype of those cells to produce matrix metalloproteinases (MMPs) and cytokine secretion, contributing to bone matrix degradation. Finally, the molecular mechanisms of osteoarticular brucellosis discovered that how the interaction between *B. abortus* and osteoarticular cells may play an important role in producing damage in joint and bone.

Keywords: osteoarticular; brucellosis; B and T cells; osteoblast; osteoclastogenesis; synoviocyte

Supported by the National Key Clinical Specialty Construction Project (No. 2011-470), the Inner Mongolia Autonomous Region Science and Technology Major Projects (No. 2060901), and the Hulunbuir Science and Technology Major Projects (No. 2014-812)

Liang Chen and Wei Wei contributed equally to the article.

Corresponding author: De en-jin, Email: hlbdesdej@163.com

国家临床重点专科建设项目(No.2011-470);2014 年内蒙古自治区科技重大专项(No.2060901)和 2014 年呼伦贝尔市科技重大项目(No.2014-812)联合资助。梁晨、魏伟同等贡献

通讯作者:德恩金,Email: hlbdesdej@163.com

作者单位:1.呼伦贝尔市人民医院,呼伦贝尔 021008;

2.呼伦贝尔市疾病预防控制中心,呼伦贝尔 021008

目前,布鲁氏菌感染导致的骨损伤机制尚不明确。骨损伤可能是细菌直接作用或者由炎症触发的先天免疫病理学过程。目前的研究发现布鲁氏菌不分泌蛋白酶、毒素或裂解酶,先天免疫应答可能是导致骨关节病变的主要原因。

1 骨与免疫系统的相互作用

人体骨骼可运输、存储钙以及由血液细胞和免疫细胞分化出造血干细胞。虽然骨代谢并不活跃但是一个动态过程。骨由细胞和细胞外基质组成, 钙羟基磷灰石沉积而成, 从而赋予骨的刚性和强度。骨组织有3个不同类型的细胞: 成骨细胞或骨形成细胞, 破骨细胞或骨吸收细胞和骨细胞。三者功能紧密相连, 成骨细胞嵌入矿化骨基质终末分化成骨细胞。骨重塑是由成骨细胞和破骨细胞相互协调骨的形成和降解从而维持人体骨质代谢平衡。成骨细胞通过分泌RANKL调节破骨细胞的分化, 而骨细胞是Wnt拮抗剂硬化蛋白的来源, 通过Wnt信号通路调控硬化蛋白活性而改变成骨细胞的活性, 同时分泌RANKL来调节破骨细胞活性^[1]。

近几年的研究集中在骨与免疫细胞之间相互重叠调控机制的作用方面。来源于同种髓样前体细胞的成骨细胞可生成巨噬细胞和髓样树突状细胞。此外, 成骨细胞调控血液和免疫细胞分化的造血干细胞龛。而且许多免疫细胞的可溶性介质如细胞因子和生长因子, 调节成骨细胞和破骨细胞的活性^[2]。

在生理条件下, 破骨细胞形成需要巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和κB受体活化因子配体(RANKL)的参与。它们作用于单核巨噬细胞系细胞, 诱导其融合形成多核细胞后主动吸收。在骨环境中M-CSF由成骨细胞和骨髓基质细胞产生, 诱导破骨细胞的前体细胞增殖、分化成熟破骨细胞及存活。M-CSF诱导RANKL的受体表达RANK即单核破骨细胞前体, 与成骨细胞和基质细胞的膜结合RANKL(破骨细胞分化因子)相互作用启动破骨细胞分化^[1-2]。RANKL是一种Ⅱ型跨膜蛋白, 它能与RANK相互作用同时拮抗骨髓基质细胞和成骨细胞产生的可溶性诱饵受体OPG。除了M-CSF和RANKL还有其他一些细胞因子和生长因子, 在异常生理条件下替代两者并诱导破骨细胞形成^[3]。骨髓源性和循环破骨细胞前体在M-CSF和RANKL的替代物如TNF-α、B淋巴细胞活化因子(BAFF)、神经生长因子, 胰岛素样生长因子(IGF)-I和II、TGF-β、IL-6、IL-11、IL-8等或者M-CSF的替代品如血管内皮生长因子, 胎盘生长因子、FLT-3配体和肝细胞生长因子分化成破骨细胞^[3]。IL-1, IL-7, IL-17和IL-23也参与其中, 通过间接诱导破骨细胞形成而促进其他细胞释放RANKL。目前已证实Th17细胞自身产生RANKL。IL-17加剧局部炎症、增加炎症细胞因子的产生, 进一步促进RANKL的表达和活性^[1-2, 4]。这些分子也参与到免疫系统的

调节中, 表明一些免疫细胞与骨细胞之间的交叉作用。另一方面, RANKL也参与了免疫调节。生理性骨吸收过程中的非常规传导通路机制不明, 但极有可能是病理性骨吸收伴随炎性骨损害时细胞内高浓度的细胞因子和生长因子诱导下完成。

成骨细胞是特殊分化的间充质细胞, 负责骨基质的沉积和破骨细胞的调节, 它在创建和维持骨骼结构中起着非常重要的作用。成骨细胞表达甲状腺激素受体并与激素结合增加血清钙离子水平, 激活破骨细胞活性。与成骨细胞的前体和基质细胞一起, 成骨细胞作用于破骨细胞的2个关键因子: RANKL和OPG。

尽管骨骼对感染有抵抗力, 但是布鲁氏菌对骨关节部位有一定的趋向性。本综述回顾目前对布鲁氏菌、骨细胞和免疫细胞之间的相互作用的研究。

1.1 布鲁氏菌和成骨细胞 研究发现感染布鲁氏菌的小鼠和人类成骨细胞是导致骨髓炎的决定因素^[2-3]。布鲁氏菌直接作用于成骨细胞并在细胞内复制, 促使成骨细胞的代谢发生改变。布鲁氏菌抑制成骨细胞分化和功能, 导致骨损失。感染诱导成骨细胞凋亡, 并抑制细胞的矿物质和有机基质沉积, 通过p38和ERK1/2 MAPK途径激活诱导RANKL表达^[1, 4-5]。布鲁氏菌感染巨噬细胞后分泌TNF-α诱导成骨细胞凋亡和抑制基质沉积。此外, 感染还引起趋化因子和基质金属蛋白酶(MMPs)的分泌。骨和关节损伤可能是由MMPs活性增高引起的炎症反应的结果。在这些病理过程中MMPs的主要来源是炎性浸润细胞。体外研究表明, 感染布鲁氏菌的单核细胞和中性粒细胞分泌MMP-9和促炎细胞因子^[3, 6]。成骨细胞也被证实可产生几种基质金属蛋白酶, 其中MMP-2因其降低存在于骨骼I型胶原蛋白和软骨中II型胶原蛋白而极其重要^[4]。从受感染的上清液培养的成骨细胞中检测到成骨细胞诱导GM-CSF分泌作为主要介质调节MMP-2生成增加^[5, 7]。在髌前滑囊炎患者的关节液中也发现MMPs活性明显增强^[8]。研究发现在布鲁氏菌病性骨关节炎的关节滑液中都存在白细胞浸润(单核细胞和中性粒细胞)^[4-6], 感染成骨细胞诱导IL-8和MCP-1的分泌。总之, 布鲁氏菌可直接或间接调节成骨细胞功能增加骨吸收。

1.2 布鲁氏菌和骨细胞 骨细胞由成骨细胞终末分化形成后嵌入矿化骨基质中。骨细胞不但数量众多, 成人骨骼中95%为骨细胞, 主要负责调节骨重塑过程中成骨细胞和破骨细胞的分化和活性^[8]。骨细胞在骨组织形成一个广泛的、多功能合胞体。它

们在基质中分布赋予骨细胞感应骨所受到的压力并做出相应调整。骨细胞感应机械负荷后发送信号(RANKL, NO 和 IGF-1)至成骨细胞和破骨细胞并调节其活性^[2-3,7-8]。

体外研究显示布鲁氏菌可侵入小鼠骨细胞诱导分泌 MMP-2、RANKL 和炎性细胞因子。这种炎症反应通过 RANKL 和 TNF- α 诱导骨髓源性单核细胞进行破骨细胞生成^[7-9]。骨细胞包埋在细胞间质腔隙中通过骨小管维持骨稳态。缝隙连接蛋白 43(Cx-43)在骨组织中是主要的间隙连接蛋白,它有利于细胞间信号的交流、保持骨细胞活性^[9]。而布鲁氏菌抑制 Cx-43 表达,加剧细胞凋亡^[10]。此外,整合素不仅影响细胞增殖和分化,可以把细胞骨架至细胞外基质联系起来,拆开骨细胞从周围的细胞外基质,从而诱导骨细胞凋亡。当骨细胞与布鲁氏菌感染的上清液里作用时,Cx43 的表达被抑制。同时,多种整合素的表达也受到影响,诱导骨细胞凋亡^[9,11]。鉴于骨细胞直接参与骨重塑,布鲁氏菌感染可影响骨细胞活性直接导致骨损伤。

1.3 布鲁氏菌与成纤维样滑膜细胞 成纤维细胞样滑膜细胞是一种间充质细胞,表现出成纤维细胞的许多特性。这些细胞已被公认为感染性或者非感染性关节损伤中枢介质^[5,12]。布鲁氏菌感染的滑膜细胞分泌 MMP-2、促炎细胞因子、RANKL,趋化因子可加速单核细胞和中性粒细胞迁移、介导滑膜的活化^[4,11-12]。Horowitz MC 等研究已经表明类风湿性关节炎和骨关节感染性疾病中 RANKL 参与骨质破坏^[13]。滑膜感染已被证明,也是通过 RANKL 传导通路结合破骨细胞形成抑制因子(OPG)诱导破骨细胞生成。

布鲁氏菌还能在巨噬细胞内生存,已经证实布鲁氏菌主要靶向感染人类滑膜细胞并复制^[14],还能感染其它细胞包括成骨细胞、星形胶质细胞、肝细胞和肝星状细胞。与成骨细胞不同的是感染并不直接诱导滑膜细胞凋亡,通过布鲁氏菌感染的巨噬细胞和单核细胞作用诱导凋亡,这种抑制作用是由于上调抗凋亡因子如 CIAP-2、clusterin、livin 和 P21/CIP/CDNK1A 以及减少促凋亡蛋白如 p-p53(S15) 和(TNF) RI/TNFRSF1A 的表达^[7,9,14]。

2 免疫细胞和骨关节布鲁氏菌病

2.1 骨关节布鲁氏菌病中巨噬细胞和布鲁氏菌的相互作用 感染布鲁氏菌后,巨噬细胞在未分化鼠骨髓细胞释放炎性因子,诱导生成破骨细胞^[9,12-13]。在一些慢性炎症性骨病如风湿性关节炎,炎性细胞

因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 以及 RANKL,已被证明在疾病发展过程中起了决定性作用^[13]。Prideaux M 等报到 TNF- α 通过独立 RANKL 机制刺激破骨细胞生成^[14]。巨噬细胞感染布鲁氏菌诱导分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6,但不分泌 RANKL。其中起诱导作用的是布鲁杆菌脂蛋白而不是脂多糖(LPS)。脂化型外膜蛋白 19(L-OPM19)能够促进炎症反应导致细胞凋亡、破骨细胞分化^[15]。

TNF- α 是一种有效的,在病理条件下激活成熟破骨细胞的主要促炎细胞因子^[11-12,15]。Alotaibi MK 等利用 tnfr1p55 基因敲除小鼠发现,TNF- α 信号通路通过 TNFR1 在布鲁氏菌及其脂蛋白的协同作用下使巨噬细胞诱导破骨细胞形成。在人类应用细胞因子中和抗体也确定了 TNF- α 在布鲁氏菌诱导破骨细胞生成起主要作用^[16]。布鲁氏菌感染后成骨细胞和滑膜细胞分泌 MCP-1,单核细胞向感染灶移动,这种恶性循环加剧了骨损伤。

2.2 T 细胞在布鲁氏菌诱导骨损伤中的作用 T 细胞与破骨细胞的相互作用在感染性和非感染性骨病中发挥关键作用^[6-17]。病理条件下如雌激素缺乏和炎症时促使 RANKL、TNF- α 和 IL-17 的分泌增加,活化的 T 细胞打破骨稳态失衡,引起骨破坏^[18-19]。虽然这些细胞因子可诱导破骨细胞的分化,但大多数 T 细胞中的细胞因子如 IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 作用为抑制破骨细胞的分化^[20]。许多研究证实骨关节病的标志性病理改变是 T 细胞浸润,但是 T 细胞是如何增强破骨细胞的骨吸收机制不明。体外实验表明,小鼠纯化的 T 细胞受到布鲁氏菌感染巨噬细胞所在炎性环境的影响,T 细胞可促进破骨细胞的生成^[20]。IL-17 通过诱导破骨细胞前体产生的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 间接刺激破骨细胞形成。众所周知,布鲁氏菌感染激活免疫系统,有利于 T 细胞朝向 Th1 细胞的分化。

2.3 布鲁氏菌活化 B 细胞对破骨细胞生成的影响

B 细胞的主要功能是产生抗感染病原体的抗微生物免疫球蛋白。B 细胞还能分泌细胞因子,调节免疫应答。活化的 B 细胞寿命较长,布鲁氏菌感染可激活 B 细胞。同时,B 细胞作为布鲁氏菌的载体细胞长期存在。B 细胞与骨细胞关系紧密,骨关节布鲁氏菌病导致感染的骨与关节细胞发现有 B 细胞浸润,鉴于此认为 B 细胞可能与慢性感染有关^[18,21]。在对人类慢性布鲁氏杆菌病变骨关节的组织学研究发现炎性反应导致的不同程度的骨质破坏和淋巴细胞浸润^[15]。体外研究小鼠脾脏中提纯的 B 细胞中研究表明,布鲁氏菌感染诱导 MMP-9,

RANKL 和炎性细胞因子的表达。除了炎性细胞因子和 RANKL 诱导破骨细胞的分化, B 细胞诱导 OPG 拮抗破骨细胞的分化表明 RANKL 是参与破骨细胞分化诱导骨吸收的主要分子^[9,21]。

3 展望

骨关节布鲁氏菌病发病率约 2%~65%, 受累关节严重可影响生活质量, 给社会造成了巨大的经济负担^[22]。本文从分子和细胞水平探讨布鲁氏菌导致骨流失的致病机制的研究进展, 介绍炎性因子在布鲁氏菌所致骨与关节损伤中发挥了决定性的作用。在某些骨细胞中感染可抑制细胞凋亡或者死亡, 它们可能作为布鲁氏菌的载体导致病程进展向着慢性演变, 这也为未来锁定这种细胞类型作为治疗靶向指明了方向, 同样也为我们寻找新的治疗方案从而更有效地降低骨损伤另辟新径。

参考文献:

- [1] Scian R, Barrionuevo P, Rodriguez AM, et al. *Brucella abortus* invasion of synoviocytes inhibits apoptosis and induces bone resorption through RANKL expression[J]. *Infect Immun*, 2013, 81(6):1940-1951. DOI: 10.1128/IAI.01366-12
- [2] Giambartolomei GH, Arriola Benitez PC, Delpino MV. *Brucella* and osteoarticular cell activation: partners in crime[J]. *Front Microbiol*, 2017, 20(8):256. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00256
- [3] Scian R, Barrionuevo P, Fossati CA, et al. *Brucella abortus* invasion of osteoblasts inhibits bone formation[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(7):2333-2345. DOI: 10.1128/IAI.00208-12
- [4] Giambartolomei GH, Scian R, Acosta-Rodríguez E, et al. *Brucella abortus*-infected macrophages modulate T lymphocytes to promote osteoclastogenesis via IL-17[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(3):887-896. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.05.029
- [5] Chakraborty S, Kloos B, Harre U, et al. *Pasteurella multocida* toxin triggers RANKL-independent osteoclastogenesis[J]. *Front Immunol*, 2017, 27(8):185. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00185
- [6] Souza PP, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss[J]. *Immunol Invest*, 2013, 42(7):555-622. DOI: 10.3109/08820139.2013.822766
- [7] Prideaux M, Staines KA, Jones ER, et al. MMP and TIMP temporal gene expression during osteocytogenesis[J]. *Gene Expr Patterns*, 2015, 18(1/2):29-36. DOI: 10.1016/j.gep.2015.04.004
- [8] Liu KG, He QH, Tan JW, et al. Expression of TNF- α , VEGF, and MMP-3 mRNAs in synovial tissues and their roles in fibroblast-mediated osteogenesis in ankylosing spondylitis[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2):6852-6858. DOI: 10.4238/2015.June.18.28
- [9] Goenka R, Parent MA, Elzer PH. B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*[J]. *J Infect Dis*, 2011, 203(8):1136-1146. DOI: 10.1093/infdis/jiq171
- [10] Garcia Samartino C, Delpino MV, Pott Godoy C, et al. *Brucella abortus* induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(3):1323-1338. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090503
- [11] Goenka R, Guirnalda PD, Black SJ, et al. B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*[J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(1):91-98. DOI: 10.1093/infdis/jis310
- [12] Ikeda K, Takeshita S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis[J]. *J Biochem*, 2016, 159(1):1-8. DOI: 10.1093/jb/mvv112
- [13] Horowitz MC, Fretz JA, Lorenzo JA. How B cells influence bone biology in health and disease[J]. *Bone*, 2010, 47(3):472-479. DOI: 10.1016/j.bone.2010.06.011
- [14] Prideaux M, Findlay DM, Atkins GJ. Osteocytes: the master cells in bone remodelling[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 28:24-30. DOI: 10.1016/j.coph.2016.02.003
- [15] Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation[J]. *J Dent Res*, 2010, 89(4):331-343. DOI: 10.1177/0022034510363963
- [16] Alotaibi MK, Kitase Y, Shuler CF. Smad2 overexpression induces alveolar bone loss and up regulates TNF- α , and RANKL [J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 71:38-45. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.06.023
- [17] D'Amelio P, Grimaldi A, Bernabei P, et al. Immune system and bone metabolism: Does thymectomy influence postmenopausal bone loss in humans[J]. *Bone*, 2006, 39(3):658-665. DOI: 10.1016/j.bone.2006.03.009
- [18] Scian R, Barrionuevo P, Fossati CA, et al. *Brucella abortus* invasion of osteoblasts Inhibits bone formation[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(7):2333-2345. DOI: 10.1128/IAI.00208-12
- [19] Sabokbar A, Mahoney DJ, Hemingway F, et al. Non-canonical (RANKL-Independent) pathways of osteoclast differentiation and their role in musculoskeletal diseases[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016, 51(1):16-26. DOI: 10.1007/s12016-015-8523-6
- [20] Komori T. Cell death in chondrocytes, osteoblasts, and osteocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): E2045. DOI: 10.3390/ijms17122045
- [21] Scian R, Barrionuevo P, Giambartolomei GH, et al. Potential role of fibroblast-like synoviocytes in joint damage induced by *Brucella abortus* infection through production and induction of matrix metalloproteinases[J]. *Infect Immun*, 2011, 79(9):3619-3632. DOI: 10.1128/IAI.05408-11
- [22] Franco MP, Mulder M, Gilman RH. Human brucellosis[J]. *Lancet Infect Dis* 2007, 7(12): 775-786.