

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240552

· 论 著 ·

低氧通过 HIF1 α /NIX 介导的线粒体自噬抑制软骨细胞焦亡

骆诗琪, 魏霞, 贾朗*

重庆医科大学附属第二医院康复科, 重庆 400010

[摘要] **目的** 观察低氧对 IL-1 β 诱导软骨细胞自噬及焦亡相关蛋白表达的影响, 并探讨其保护软骨的作用机制。**方法** 通过生物信息学方法分析骨关节炎患者软骨与正常软骨中 Bcl2/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 样蛋白 (BNIP3L/NIX) 的表达差异情况。提取 C57BL/6J 乳鼠膝关节原代软骨细胞, 将细胞分为对照组、IL-1 β 组、低氧组、IL-1 β +低氧组, 以 10 ng/mL IL-1 β 处理细胞 24 h 模拟骨关节炎样软骨细胞损伤, 低氧处理采用 1% O₂ 培养 24 h。采用蛋白质印迹法检测各组细胞中 II 型胶原蛋白 α 1 (COL2 α 1)、基质金属蛋白酶 13 (MMP13)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶 5 (ADAMTS5)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3)、消皮素 D 氨基末端结构域 (GSDMD-N)、含 CARD 结构的凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、IL-18、低氧诱导因子 1 α (HIF1 α)、NIX、Beclin1、微管相关蛋白轻链 3 (LC3)、p62 蛋白的表达。**结果** 生物信息学分析结果显示, 骨关节炎患者软骨细胞中 NIX 的表达比正常软骨降低。蛋白质印迹法验证结果显示, 与对照组比较, IL-1 β 组软骨细胞中 COL2 α 1、NIX 蛋白表达水平降低 (均 $P<0.05$), MMP13、ADAMTS5、NLRP3、GSDMD-N、ASC、IL-18、HIF1 α 蛋白表达水平增高 (均 $P<0.01$); 与 IL-1 β 组相比, IL-1 β +低氧组软骨细胞中 COL2 α 1、HIF1 α 、NIX、Beclin1 表达水平及 LC3 II / LC3 I 升高 (均 $P<0.01$), MMP13、ADAMTS5、NLRP3、GSDMD-N、ASC、IL-18、p62 表达水平降低 (均 $P<0.01$); 与对照组相比, 低氧组软骨细胞中 HIF1 α 、NIX、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3 II / LC3 I 增高 (均 $P<0.01$), p62、NLRP3、GSDMD-N、IL-18 蛋白表达水平降低 (均 $P<0.05$)。**结论** 低氧可能通过 HIF1 α /NIX 介导的线粒体自噬清除 NLRP3 炎症小体、抑制软骨细胞焦亡, 从而减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤。

[关键词] 低氧; 线粒体自噬; 骨关节炎; 软骨细胞; 焦亡

[引用本文] 骆诗琪, 魏霞, 贾朗. 低氧通过 HIF1 α /NIX 介导的线粒体自噬抑制软骨细胞焦亡 [J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(5): 594-601. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240552.

Hypoxia inhibits chondrocyte pyroptosis via HIF1 α /NIX-mediated mitochondrial autophagy

LUO Shiqi, WEI Xia, JIA Lang*

Department of Rehabilitation, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of hypoxia (HX) on autophagy and pyroptosis-related protein expression of interleukin (IL)-1 β -induced chondrocytes, and explore its mechanism of cartilage protection. **Methods** The expression of Bcl2/adenovirus E1B interacting protein 3-like (BNIP3L/NIX) in normal and osteoarthritis chondrocytes was analyzed by bioinformatics method. The primary chondrocytes from the knee joints of C57BL/6J neonatal mice were extracted and assigned to control group, IL-1 β group, HX group, or IL-1 β +HX group. The cells were treated with 10 ng/mL IL-1 β for 24 h to simulate osteoarthritis-like chondrocyte injury, and HX treatment was by incubation with 1% O₂ for 24 h. The expression levels of collagen type II α 1 (COL2 α 1), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5 (ADAMTS5), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3 (NLRP3), gasdermin D N-terminal domain (GSDMD-N), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), IL-18, hypoxia induced factor 1 α (HIF1 α), NIX, Beclin1, microtubule-associated protein-light chain 3 (LC3), and p62 proteins were detected by Western blotting

[收稿日期] 2024-08-07 **[接受日期]** 2024-12-16

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金 (81802234), 重庆市中青年医学高端人才项目, 重庆市科卫联合医学科研项目 (2024GDRC002), 重庆医科大学附属第二医院“宽仁英才”项目 (kryc-gg-2116). Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (81802234), Chongqing Young and Middle-Aged Medical High-End Talent Program, Medical Scientific Research Project of Chongqing Health Commission and Science and Technology Bureau (2024GDRC002), and “Kuanren Yingcai” Project of The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (kryc-gg-2116).

[作者简介] 骆诗琪, 硕士生. E-mail: 2022110366@stu.cqmu.edu.cn

*通信作者 (Corresponding author). E-mail: jialang@hospital.cqmu.edu.cn

in each group. **Results** Bioinformatics analysis showed that the expression of NIX was lower in osteoarthritis chondrocytes than in normal chondrocytes. Western blotting showed that compared to the control group, the IL-1 β group showed significant decreases in COL2 α 1 and NIX protein expression (both $P<0.05$) and significant increases in MMP13, ADAMTS5, NLRP3, GSDMD-N, ASC, IL-18 and HIF1 α protein expression (all $P<0.01$). Compared to the IL-1 β group, the IL-1 β +HX group showed significant increases in COL2 α 1, HIF1 α , NIX, Beclin1, and LC3 II /LC3 I (all $P<0.01$) and significant decreases in MMP13, ADAMTS5, NLRP3, GSDMD-N, ASC, IL-18 and p62 (all $P<0.01$). Compared to the control group, the HX group exhibited significant increases in HIF1 α , NIX, Beclin1, and LC3 II /LC3 I (all $P<0.01$) and decreases in p62, NLRP3, GSDMD-N and IL-18 (all $P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia may eliminate NLRP3 inflammasome and inhibit chondrocyte pyroptosis through HIF1 α /NIX-mediated mitochondrial autophagy, thereby reducing IL-1 β -induced chondrocyte injury.

[**Key words**] hypoxia; mitochondrion; osteoarthritis; chondrocytes; pyroptosis

[**Citation**] LUO S, WEI X, JIA L. Hypoxia inhibits chondrocyte pyroptosis via HIF1 α /NIX-mediated mitochondrial autophagy[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(5): 594-601. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240552.

骨关节炎是中老年人群常见的退行性疾病,主要表现为逐渐加重的关节疼痛、畸形和运动功能障碍^[1-3]。我国骨关节炎患者人数已超1亿,骨关节炎发病率随着年龄增长而增加,预计到2044年中国骨关节炎的患病率和伤残调整生命年(disability-adjusted life years, DALY)将增加约1.5倍^[4]。骨关节炎目前尚无根治药物,极大地损害了患者生活质量,给患者家庭和社会带来沉重负担。

研究表明,细胞焦亡关键分子核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3, NLRP3)通过激活NLRP3炎症小体裂解消皮素D(gasdermin D, GSDMD),产生消皮素D氨基末端结构域(gasdermin D N-terminal domain, GSDMD-N),进而诱导细胞肿胀并导致细胞膜孔隙增多,触发焦亡;还可促进IL-1 β 、IL-18等促炎细胞因子的分泌,进一步加重软骨细胞损伤和骨关节炎进展^[5-8]。因此,清除NLRP3炎症小体、缓解软骨细胞焦亡可能是防治骨关节炎的一条途径,抑制炎症因子分泌及细胞焦亡相关蛋白表达可能是治疗骨关节炎潜在途径,值得深入研究。

Bcl2/腺病毒E1B相互作用蛋白3样蛋白(Bcl2/adenovirus E1B interacting protein 3-like, BNIP3L/NIX)是一种线粒体自噬蛋白,受缺氧诱导因子1 α (hypoxia induced factor 1 α , HIF1 α)调控并参与低氧引起的线粒体自噬。HIF1 α 调控NIX介导线粒体自噬在代谢紊乱、癌症和神经退行性疾病中发挥重要作用^[9]。本团队前期研究表明,线粒体自噬可保护软骨细胞,清除NLRP3炎症小体、抑制焦

亡对软骨细胞也具有保护作用^[10-11]。低氧诱导的线粒体自噬对骨关节炎软骨细胞焦亡的作用及机制尚不明确。HIF1 α 调控NIX介导的线粒体自噬是否通过清除NLRP3炎症小体、抑制软骨细胞焦亡保护软骨细胞,目前还未见研究报道。本研究采用IL-1 β 诱导的小鼠骨关节炎样软骨细胞损伤模型,探究低氧对线粒体自噬相关蛋白、炎症因子和焦亡相关蛋白表达的影响,揭示线粒体自噬保护软骨细胞的作用机制,为临床防治骨关节炎提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂 本研究经重庆医科大学附属第二医院实验动物伦理委员会审核批准(2024026)。SPF级C57BL/6J乳鼠(5~10日龄)购自重庆医科大学实验动物中心[实验动物生产许可证号为SCXK(渝)2022-0010,使用许可证号为SYXK(渝)2022-0016]。实验所用FBS和DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司;0.25%胰蛋白酶购自苏州新赛美生物科技有限公司;II型胶原酶购自德国BioFroxx公司;血小板反应蛋白解整合素金属肽酶5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5, ADAMTS5)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)、IL-18、Beclin1、p62抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;NLRP3、GSDMD抗体购自美国Affinity Biosciences公司;含CARD结构的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)抗体购自英国Abcam

公司; II型胶原蛋白 $\alpha 1$ (collagen type II $\alpha 1$, COL2 $\alpha 1$)和NIX抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;微管相关蛋白轻链3 (microtubule-associated protein-light chain 3, LC3) A/B抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;HIF1 α 抗体购自美国NOVUS公司;HRP标记的羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA强效细胞裂解液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、SDS上样缓冲液(5 $\times$)及无蛋白快速封闭液均购自上海雅酶生物医药科技有限公司。ECL发光液购自美国MedChemExpress公司,PVDF膜购自美国Millipore公司。

1.2 生物信息学分析 从美国国立生物技术信息中心的基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中检索骨关节炎相关的芯片数据,下载GSE169077、GSE51588数据集,分别采用GPL96([HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array)和GPL13497平台。两组数据集均来源于智人,其中GSE169077的样本为60例软骨正常者的软骨及接受膝关节置换手术骨关节炎患者的骨关节炎软骨,采用5对配对的关节软骨RNA样本进行分析;GSE51588的样本为骨关节炎患者($n=20$)和非骨关节炎患者($n=5$)膝关节外侧和胫骨内侧平台软骨下骨中分离的总RNA。使用limma包进行去批次效应,并鉴定差异表达基因,将差异倍数 ≥ 1.5 或 ≤ -1.5 且 $P < 0.05$ 的基因视为差异表达基因,使用R语言中的ggplot2包进行可视化。

1.3 小鼠膝关节原代软骨细胞的提取与培养 小鼠经75%乙醇消毒后移入超净台,使用灭菌微型剪和眼科镊分离出膝关节,并将其浸泡在含有5%青霉素-链霉素的PBS溶液中。采用两步酶消化法提取软骨细胞。首先,将小鼠膝关节放入含有0.25%胰蛋白酶的溶液中消化10 min,以去除膝关节附近的肌肉、韧带和骨组织;然后将软骨组织置于含有0.1% II型胶原酶的溶液中,过夜消化。次日,以300 $\times g$ 离心5 min,弃去上清液,用完全培养基(含10% FBS、1%青霉素-链霉素的DMEM/F12)重悬细胞后接种于培养皿中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的孵箱中培养,以备后续实验使用。

1.4 小鼠膝关节原代软骨细胞的鉴定 将细胞接种于12孔板爬片上,当细胞生长到50%~60%融

合度时取出爬片,用PBS浸洗10 min $\times 3$ 次;使用4%多聚甲醛溶液常温固定30 min,用PBS浸洗10 min $\times 3$ 次;使用0.3% Triton X-100常温通透15 min,用PBS浸洗5 min $\times 3$ 次;加入山羊血清常温封闭30 min,加入COL2 $\alpha 1$ (稀释比例1:100)抗体于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。次日,用PBS浸洗10 min $\times 3$ 次,孵育山羊抗兔荧光二抗(稀释比例1:200)1 h,再用PBS浸洗10 min $\times 3$ 次,加入含DAPI的抗荧光淬灭剂后,于正置荧光显微镜下观察。

1.5 细胞骨关节样损伤模型建立及低氧干预 将小鼠软骨细胞在不同氧浓度(21%、5%、1% O_2)条件下培养24 h,并在低氧条件下(1% O_2)培养不同时间(6、12、24、48、72 h),采用蛋白质印迹法检测各条件下HIF1 α 蛋白表达,以确定后续实验条件。将细胞分为4组:对照组、IL-1 β 组、低氧组、IL-1 β +低氧组。将细胞接种于6 cm培养皿中,使用IL-1 β (10 ng/mL)干预模拟骨关节炎软骨细胞损伤,随后分别放入常氧孵箱和低氧孵箱(5% CO_2 +94% N_2 +1% O_2)37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。

1.6 软骨细胞中蛋白质表达的检测 使用预冷PBS清洗各组细胞3次,置于冰上,加入适量的裂解液(含1%蛋白酶和磷酸酶抑制剂),刮下细胞,随后使用细胞破碎超声仪进行冰浴超声裂解。使用4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机13 400 $\times g$ 离心15 min,取上清液提取总蛋白质,通过BCA法测定蛋白质浓度,并按比例加入5 $\times$ SDS上样缓冲液后100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸5 min使蛋白变性。取30 μg 蛋白进行SDS-PAGE,然后转移到PVDF膜上。使用5%脱脂牛奶或无蛋白快速封闭液封闭1 h后,将膜置于对应的一抗稀释液中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上孵育过夜。次日,用TBST洗膜10 min,重复3次;然后加入相应的二抗,在室温下孵育1 h;再用TBST洗膜10 min,重复3次。之后滴加ECL发光液,曝光显影。使用ImageJ软件进行灰度值分析,以目的蛋白与内参蛋白的光密度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.7 统计学处理 使用GraphPad Prism 9软件进行统计学分析。计量资料均符合正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较使用单因素方差分析(多重比较采用Tukey法)。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 小鼠原代软骨细胞鉴定和骨关节炎软骨细胞损伤模型验证 II 型胶原免疫荧光染色显示软骨细胞胞质呈阳性(图 1A),表明小鼠膝关节原代软骨细胞提取成功。用 10 ng/mL IL-1 β 处理小鼠原代软骨细胞 24 h,蛋白质印迹法检测结果

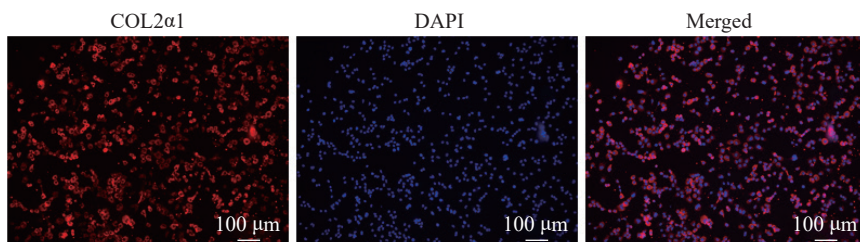


图 1 小鼠膝关节原代软骨细胞鉴定 (A) 和骨关节炎软骨细胞损伤模型验证 (B)

Fig 1 Identification of primary chondrocytes (A) and establishment of osteoarthritis chondrocyte injury model (B)
COL2 α 1: Collagen type II α 1; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; IL-1 β : Interleukin-1 β ; ADAMTS5: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5; MMP13: Matrix metalloproteinase 13; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.2 NIX 在正常软骨与骨关节炎软骨中的差异表达 生物信息学分析结果(图 2A、2B)显示,骨关节炎患者软骨中 NIX 的表达降低。蛋白质印

(图 1B) 显示,与对照组相比,IL-1 β 组 MMP13 和 ADAMTS5 的表达水平增高 (8.62 ± 0.30 vs 0.90 ± 0.07 、 1.72 ± 0.09 vs 1.11 ± 0.04 , 均 $P < 0.01$), COL2 α 1 表达减少 (0.69 ± 0.03 vs 1.02 ± 0.09 , $P < 0.01$),表明 IL-1 β 成功诱导了体外骨关节炎样软骨细胞损伤。

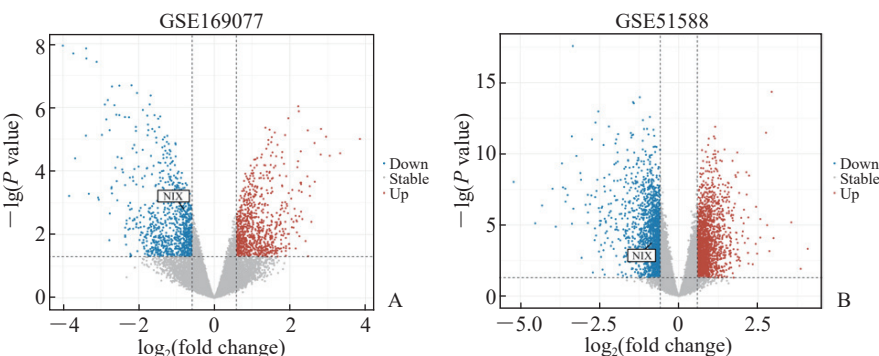
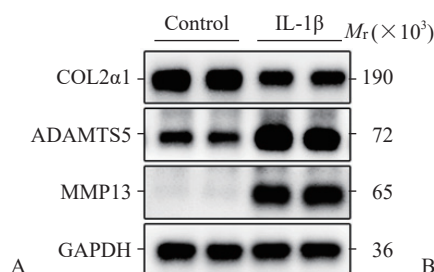


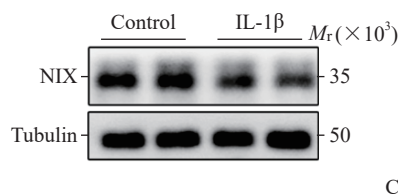
图 2 生物信息学分析 (A、B) 和蛋白质印迹法 (C) 评估骨关节炎软骨中 NIX 的表达水平

Fig 2 Expression levels of NIX in osteoarthritis evaluated by bioinformatics analysis (A, B) and Western blotting (C)

NIX: Bcl2/adenovirus E1B interacting protein 3-like; IL-1 β : Interleukin-1 β .

2.3 小鼠软骨细胞中 HIF1 α 表达水平随氧浓度和培养时间的变化 蛋白质印迹法检测结果(图 3)显示,将小鼠软骨细胞在不同氧浓度(21%、5%、1% O $_2$) 条件下培养 24 h, HIF1 α 蛋白表达随着氧水平的降低而增加 (1.00 ± 0.04 、 3.11 ± 0.15 、 4.76 ± 0.03 , 组间两两比较均 $P < 0.01$); 将小鼠软骨细胞在低氧条件下 (1% O $_2$) 培养 6、12、24、48、72 h 时, HIF1 α 蛋白表达水平分别为 2.96 ± 0.13 、 3.93 ± 0.36 、 5.32 ± 0.47 、 3.70 ± 0.17 、 2.60 ± 0.45 , 在培养 24 h

迹法检测结果(图 2C) 显示,与正常软骨细胞相比,骨关节炎软骨细胞中 NIX 表达降低 (0.76 ± 0.16 vs 1.04 ± 0.05 , $P < 0.05$)。



时达到峰值(与其他时间点比较均 $P < 0.01$)。因此,后续实验中以 1% O $_2$ 作用 24 h 作为培养条件。

2.4 低氧减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤 蛋白质印迹法检测结果(图 4) 显示,与 IL-1 β 组相比, IL-1 β + 低氧组小鼠软骨细胞 MMP13 和 ADAMTS5 的表达减少、COL2 α 1 表达增多(均 $P < 0.01$),表明低氧可以减轻 IL-1 β 诱导的损伤因子增加和 II 型胶原丢失。

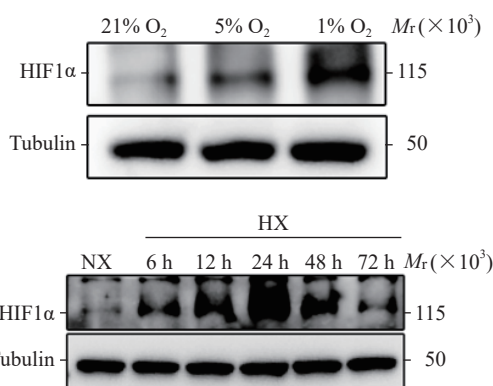


图3 蛋白质印迹法检测小鼠软骨细胞中 HIF1 α 表达水平随氧浓度和培养时间的变化

Fig 3 Changes of HIF1 α in chondrocytes with oxygen level and time detected by Western blotting

HIF1 α : Hypoxia induced factor 1 α ; NX: Normoxia; HX: Hypoxia.

2.5 低氧下调软骨细胞炎症细胞因子和焦亡相关蛋白表达 蛋白质印迹法检测结果(图5)显示,与对照组相比,IL-1 β 组小鼠软骨细胞 NLRP3、GSDMD-N、ASC、IL-18 蛋白表达水平升高(均 $P < 0.01$);与 IL-1 β 组相比,IL-1 β +低氧组小鼠软骨细胞 NLRP3、GSDMD-N、ASC、IL-18 蛋白表达水平降低(均 $P < 0.01$)。

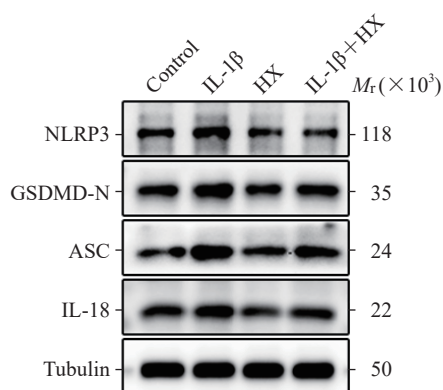


图5 蛋白质印迹法检测各组软骨细胞 NLRP3、GSDMD-N、ASC 和 IL-18 蛋白表达水平

Fig 5 Expression of NLRP3, GSDMD-N, ASC and IL-18 proteins in chondrocytes of each group detected by Western blotting

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. NLRP3: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3; GSDMD-N: Gasdermin D N-terminal domain; ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; IL: Interleukin; HX: Hypoxia.

2.6 低氧诱导 HIF1 α /NIX 表达增高促进线粒体自噬 蛋白质印迹法检测结果(图6)显示,与 IL-1 β 组相比,IL-1 β +低氧组小鼠软骨细胞 HIF1 α 、NIX、Beclin1 的表达水平及 LC3 II /LC3 I

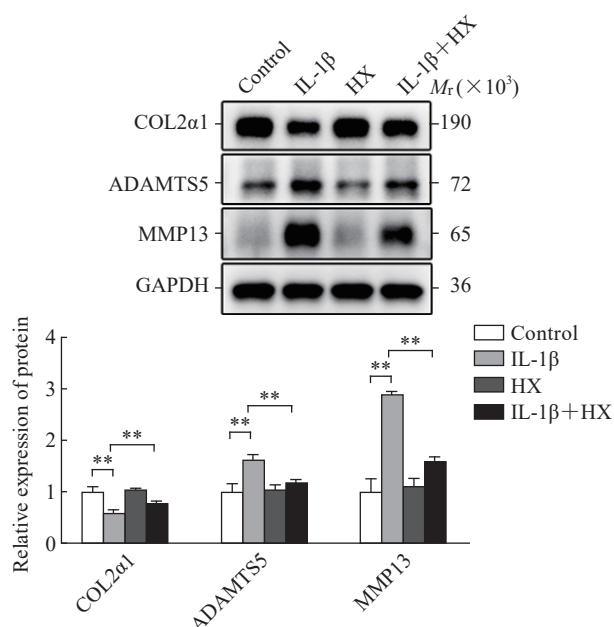
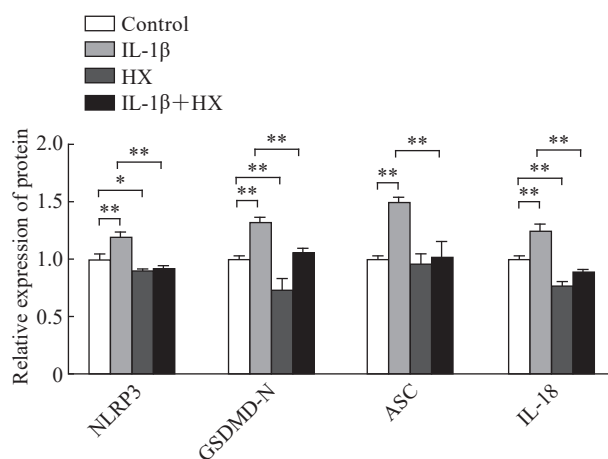


图4 蛋白质印迹法检测各组软骨细胞 COL2 α 1、ADAMTS5、MMP13 蛋白的表达

Fig 4 Expression of COL2 α 1, ADAMTS5, and MMP13 proteins in chondrocytes of each group detected by Western blotting

** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. COL2 α 1: Collagen type II α 1; MMP13: Matrix metalloproteinase 13; ADAMTS5: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5; IL-1 β : Interleukin-1 β ; HX: Hypoxia; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



均增高(均 $P < 0.01$), p62 表达水平降低($P < 0.01$),表明低氧环境诱导了 HIF1 α 和 NIX 蛋白高表达,促进了线粒体自噬。

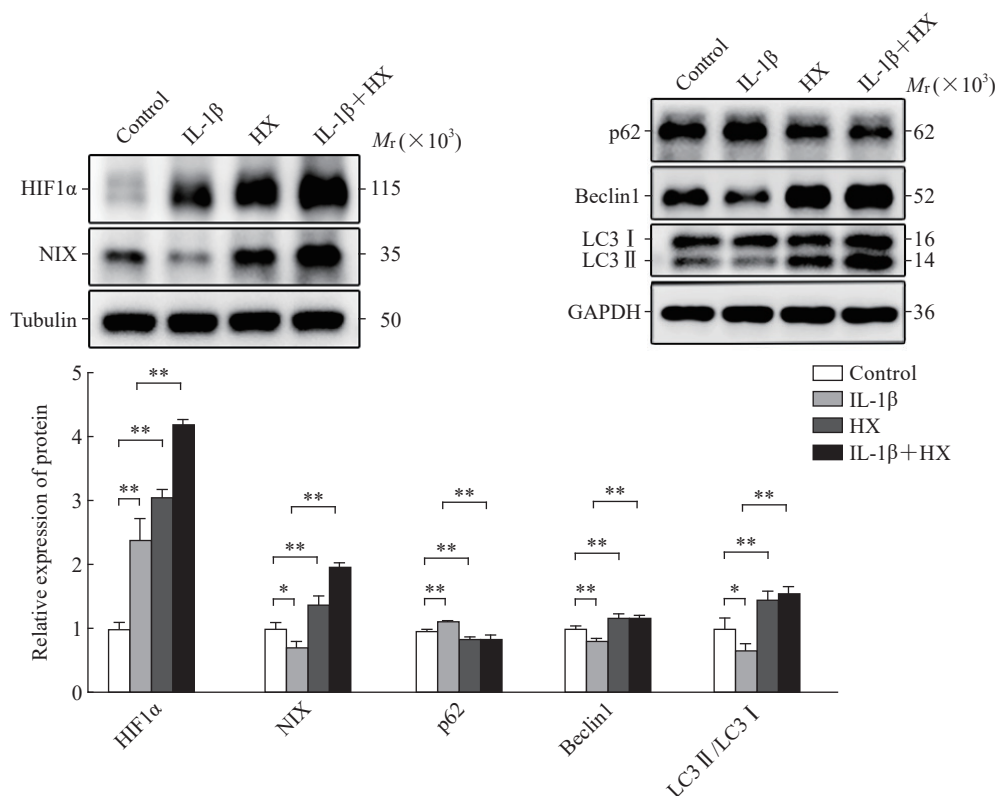


图6 蛋白质印迹法检测各组软骨细胞 HIF1α、NIX、p62、Beclin1、LC3 蛋白表达水平

Fig 6 Expression of HIF1α, NIX, p62, Beclin 1, and LC3 proteins in chondrocytes of each group detected by Western blotting

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. HIF1α: Hypoxia inducible factor 1α; NIX: Bcl2/adenovirus E1B interacting protein 3-like; LC3: Microtubule-associated protein-light chain 3; IL-1β: Interleukin-1β; HX: Hypoxia; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

3 讨论

骨关节炎主要病理特征包括关节软骨纤维化、断裂、溃疡,软骨下骨增厚和硬化、囊性变及继发性滑膜炎等。防止软骨变性、软骨下骨重塑异常、缓解炎症是骨关节炎防治的重要途径。细胞焦亡是一种促炎程序性细胞死亡,其生化特征是 NLRP3 炎症小体形成、相关 caspase 蛋白和消皮素激活及大量促炎因子(如 IL-1β、IL-18)释放^[12]。NLRP3 炎症小体激活并在关节内大量积聚是导致骨关节炎一系列病理生理改变(包括氧化应激、软骨基质丢失等)的重要触发因素,最终引起软骨变性破坏、软骨下骨重塑异常、关节炎症、关节疼痛、运动功能障碍等。抑制并清除 NLRP3 炎症小体,进而抑制细胞焦亡,是预防和治疗骨关节炎的重要策略^[13]。

靶向 NLRP3 炎症小体的传统策略是通过抑制软骨 NLRP3 蛋白表达降低炎症小体活性。近年来,靶向软骨 NLRP3 蛋白治疗骨关节炎的基础及

临床研究不断取得新进展。研究发现,淫羊藿苷可抑制软骨 NLRP3 蛋白,治疗骨关节炎^[14];新型靶向软骨 NLRP3 蛋白的抑制剂 holomycin 可减轻关节炎炎症和软骨退变^[15];NLRP3 抑制剂 CY-9 可维持软骨细胞外基质稳态,并可通过抑制 NLRP3 炎症小体活性减轻细胞焦亡,延缓骨关节炎进展^[16];右美托咪定可通过抑制软骨 NLRP3 蛋白改善骨关节炎大鼠疼痛症状及软骨破坏^[17];二甲双胍可通过抑制软骨 NLRP3 蛋白延缓骨关节炎软骨退变,减轻软骨细胞焦亡^[18];NLRP3 抑制剂 MCC950 可防止骨关节炎小鼠模型中的软骨降解^[19];靶向抑制软骨 NLRP3 蛋白药物 inzmolide 也已处于 I 期临床试验^[20]。这提示 NLRP3 炎症小体是探索骨关节炎防治方法的重要靶点。传统靶向 NLRP3 炎症小体的策略是通过关节腔注射或全身用药途径抑制软骨 NLRP3 蛋白,以降低 NLRP3 炎症小体的活性,由于软骨缺乏血液供应,传统策略药物利用率低且有关节感染风险^[21]。清除 NLRP3 炎症小体在炎症相关退行性疾病中发挥积极治疗作用^[22],其可能

也是骨关节炎防治的一条重要措施。

NIX 作为线粒体自噬受体分子参与低氧诱导下线粒体自噬活化,通过直接募集自噬体包裹、清除线粒体。研究表明,骨关节炎中存在线粒体自噬缺陷,线粒体自噬缺陷导致清除 NLRP3 炎症小体能力减弱,加速骨关节炎的发展进程^[23]。本研究通过生物信息学分析以及蛋白质印迹法检测发现,骨关节炎样软骨细胞中 NIX 表达下降,提示骨关节炎样软骨细胞线粒体自噬缺陷与 NIX 低表达密切相关。本研究结果表明,IL-1 β 造成小鼠软骨细胞骨关节炎样损伤,细胞软骨基质降解因子 MMP13、ADAMTS5 表达上升;线粒体自噬相关蛋白 NIX、Beclin1 表达及 LC3 II /LC3 I 降低,而 p62 表达升高;细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD-N、ASC 及炎症因子 IL-18 表达升高。以上这些结果提示 IL-1 β 可抑制软骨细胞自噬,增加 NLRP3 炎症小体,促进软骨细胞焦亡,导致炎症因子释放,从而加重软骨损伤。

本团队前期研究表明,线粒体自噬活化对软骨细胞具有保护作用^[10-11],其机制尚不明确。线粒体自噬受体分子 NIX 在线粒体自噬活化中发挥重要作用^[24]。本研究结果提示,骨关节炎软骨细胞中 NIX 表达下调,线粒体自噬功能障碍, NLRP3 的表达增高,焦亡相关蛋白及炎症因子的表达上调。低氧通过上调 HIF1 α 表达促进 NIX 和 Beclin1 表达,增高 LC3 II /LC3 I,降低 p62 蛋白表达,活化线粒体自噬,加速清除 NLRP3 炎症小体,抑制焦亡相关蛋白 GSDMD-N、ASC 及炎症因子 IL-18 表达,从而延缓 II 型胶原丢失。以上结果表明,低氧通过 HIF1 α /NIX 促进线粒体自噬,清除 NLRP3 炎症小体,抑制软骨细胞焦亡,减轻 IL-1 β 诱导的炎症反应,发挥了保护软骨细胞的作用。

本研究存在以下不足之处:(1)线粒体自噬涉及众多受体分子,本研究只验证了低氧对受体蛋白 NIX 的影响,还需要验证低氧对其他受体分子的调控作用;(2)本研究仅观察了低氧对细胞炎症因子水平、线粒体自噬及细胞焦亡的影响,没有通过沉默、过表达关键靶蛋白或采取特异性通路阻断剂进一步验证低氧促进线粒体自噬、清除 NLRP3 炎症小体的分子机制;(3)本研究结果提示低氧促进 NIX 介导的软骨细胞线粒体自噬,加速清除 NLRP3 炎症小体,但未验证 NIX 升高是否会直接

导致 NLRP3 表达下降,在下一步研究中将采用免疫共沉淀等方法验证 NIX 和 NLRP3 之间是否有直接作用。

综上所述,低氧通过上调软骨细胞 HIF1 α /NIX 蛋白表达活化线粒体自噬,清除 NLRP3 炎症小体,抑制细胞焦亡,从而减轻 IL-1 β 诱导的小鼠膝关节软骨细胞损伤。

[参 考 文 献]

- [1] HULSHOF C T J, PEGA F, NEUPANE S, et al. The effect of occupational exposure to ergonomic risk factors on osteoarthritis of hip or knee and selected other musculoskeletal diseases: a systematic review and meta-analysis from the WHO/ILO Joint Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury[J]. *Environ Int*, 2021, 150: 106349. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106349.
- [2] ALLEN K D, THOMA L M, GOLIGHTLY Y M. Epidemiology of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(2): 184-195. DOI: 10.1016/j.joca.2021.04.020.
- [3] USENBO A, KRAMER V, YOUNG T, et al. Prevalence of arthritis in Africa: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0133858. DOI: 10.1371/journal.pone.0133858.
- [4] CHEN H, ZHANG L, SHI X, et al. Evaluation of osteoarthritis disease burden in China during 1990-2019 and forecasting its trend over the future 25 years[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2024, 76(7): 1006-1017. DOI: 10.1002/acr.25322.
- [5] HE W T, WAN H, HU L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion[J]. *Cell Res*, 2015, 25(12): 1285-1298. DOI: 10.1038/cr.2015.139.
- [6] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316. DOI: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207.
- [7] AN S, HU H, LI Y, et al. Pyroptosis plays a role in osteoarthritis[J]. *Aging Dis*, 2020, 11(5): 1146-1157. DOI: 10.14336/AD.2019.1127.
- [8] ZHAO L R, XING R L, WANG P M, et al. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP-induced pyroptosis in knee osteoarthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5463-5469. DOI: 10.3892/mmr.2018.8520.
- [9] WU H, CHEN Q. Hypoxia activation of mitophagy and its role in disease pathogenesis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(12): 1032-1046. DOI: 10.1089/ars.2014.6204.

- [10] 魏霞,李东倩,骆诗琪,等.低强度脉冲聚焦超声对小鼠膝关节软骨细胞损伤中炎症因子和焦亡蛋白的影响[J].海军军医大学学报,2024,45(3):268-276. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230516.
WEI X, LI D, LUO S, et al. Effects of focused low-intensity pulsed ultrasound on inflammatory cytokines and pyroptosis-related proteins in mouse knee joint chondrocyte injury[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(3): 268-276. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230516.
- [11] 叶海霞,虞乐华,贾朗.低强度脉冲聚焦超声通过上调PGAM5蛋白表达促进软骨细胞线粒体自噬[J].第三军医大学学报,2021,43(5):403-410. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202009202.
- [12] LI Z, HUANG Z, ZHANG H, et al. Moderate-intensity exercise alleviates pyroptosis by promoting autophagy in osteoarthritis via the P2X7/AMPK/mTOR axis[J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 346. DOI: 10.1038/s41420-021-00746-z.
- [13] MCALLISTER M J, CHEMALY M, EAKIN A J, et al. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2018, 26(5): 612-619. DOI: 10.1016/j.joca.2018.02.901.
- [14] ZU Y, MU Y, LI Q, et al. Icaritin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis[J]. J Orthop Surg Res, 2019, 14(1): 307. DOI: 10.1186/s13018-019-1307-6.
- [15] PAN D, YIN P, LI L, et al. Holomycin, a novel NLRP3 inhibitor, attenuates cartilage degeneration and inflammation in osteoarthritis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 657: 59-68. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.03.053.
- [16] ZHANG Y, LIN Z, CHEN D, et al. CY-09 attenuates the progression of osteoarthritis via inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 553: 119-125. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.03.055.
- [17] CHENG F, YAN F F, LIU Y P, et al. Dexmedetomidine inhibits the NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome to attenuate papain-induced osteoarthritis in rats[J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 649-659. DOI: 10.1080/13880209.2019.1651874.
- [18] YAN J, DING D, FENG G, et al. Metformin reduces chondrocyte pyroptosis in an osteoarthritis mouse model by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(3): 222. DOI: 10.3892/etm.2022.11146.
- [19] NI B, PEI W, QU Y, et al. MCC950, the NLRP3 inhibitor, protects against cartilage degradation in a mouse model of osteoarthritis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 4139048. DOI: 10.1155/2021/4139048.
- [20] CHEN X, ZHANG P, ZHANG Y, et al. The research progression of direct NLRP3 inhibitors to treat inflammatory disorders[J]. Cell Immunol, 2024, 397/398: 104810. DOI: 10.1016/j.cellimm.2024.104810.
- [21] MURAKAMI T, NAKAMINAMI Y, TAKAHATA Y, et al. Activation and function of NLRP3 inflammasome in bone and joint-related diseases[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5365. DOI: 10.3390/ijms23105365.
- [22] HU Y, JIANG Y, LI S, et al. The gasdermin D N-terminal fragment acts as a negative feedback system to inhibit inflammasome-mediated activation of caspase-1/11 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(45): e2210809119. DOI: 10.1073/pnas.2210809119.
- [23] LI W, ZHONG Y, LIN Z, et al. Forsythoside A mitigates osteoarthritis and inhibits chondrocyte senescence by promoting mitophagy and suppressing NLRP3 inflammasome via the Nrf2 pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 135: 156052. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.156052.
- [24] YE H, LI D, WEI X, et al. Focused low-intensity pulsed ultrasound alleviates osteoarthritis via restoring impaired FUNDC1-mediated mitophagy[J]. iScience, 2023, 26(10): 107772. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107772.

[本文编辑] 尹 茶