

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230516

· 论 著 ·

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

魏霞, 李东倩, 骆诗琪, 贾朗*

重庆医科大学附属第二医院康复科, 重庆 400010

[摘要] **目的** 探讨低强度脉冲聚焦超声 (FLIPUS) 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠膝关节软骨细胞损伤中炎症因子和细胞焦亡相关蛋白表达的影响及其保护软骨的作用机制。**方法** 提取 C57BL/6J 小鼠膝关节原代软骨细胞进行体外实验, 用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理软骨细胞 12 h 模拟骨关节炎样软骨细胞损伤。细胞分为对照组 (仅用含 10% FBS 的培养基培养, 不予任何处理)、LPS 组 (LPS 处理 12 h) 和 LPS+FLIPUS 组 (LPS 处理 12 h 后再用 FLIPUS 干预 20 min)。采用蛋白质印迹法检测各组软骨细胞中 II 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (COL2 $\alpha 1$)、炎症细胞因子 (IL-18 和 IL-1 β)、焦亡相关蛋白 [核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3)、cleaved caspase 1、消皮素 D N 端片段 (GSDMD-N)]、软骨基质降解因子 [基质金属蛋白酶 (MMP) 13、MMP3 和血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 (ADAMTS5)] 的表达。采用钙黄绿素乙酰氧基甲酯 (calcein AM) /PI 荧光染色和乳酸脱氢酶 (LDH) 释放实验检测细胞活性, 采用扫描电子显微镜观察细胞的形态变化, 采用 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-1 β 、IL-18 水平。**结果** 成功提取小鼠膝关节原代软骨细胞并模拟骨关节炎样软骨细胞损伤。与对照组相比, LPS 组小鼠膝关节软骨细胞中 COL2 $\alpha 1$ 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), MMP13、MMP3、ADAMTS5、NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase 1、IL-18 和 IL-1 β 蛋白表达增加 (均 $P < 0.01$), 细胞上清液中 IL-18、IL-1 β 水平升高和 LDH 释放增加 (均 $P < 0.01$), 细胞肿胀变形, 细胞膜上出现较多孔隙, 丧失完整性, 细胞死亡率增加 ($P < 0.01$)。与 LPS 组相比, LPS+FLIPUS 组小鼠膝关节软骨细胞中 COL2 $\alpha 1$ 蛋白表达上升 ($P < 0.01$), MMP13、MMP3、ADAMTS5、NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase 1、IL-18 和 IL-1 β 蛋白表达下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 细胞上清液中 IL-18、IL-1 β 水平下降和 LDH 释放减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 细胞肿胀程度减轻, 细胞膜上孔隙减少, 细胞死亡率下降 ($P < 0.05$)。**结论** FLIPUS 可能通过抑制炎症因子和细胞焦亡相关蛋白表达减轻 LPS 诱导的小鼠膝关节软骨细胞损伤

[关键词] 低强度脉冲聚焦超声; 骨关节炎; 炎症; 软骨细胞; 细胞焦亡

[引用本文] 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.

Effects of focused low-intensity pulsed ultrasound on inflammatory cytokines and pyroptosis-related proteins in mouse knee joint chondrocyte injury

WEI Xia, LI Dongqian, LUO Shiqi, JIA Lang*

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

[Abstract] **Objective** To explore the effects of focused low-intensity pulsed ultrasound (FLIPUS) on the expression of inflammatory cytokines and pyroptosis-related proteins in mouse knee joint chondrocyte injury induced by lipopolysaccharide (LPS) and the mechanism of chondroprotection. **Methods** Primary chondrocytes were isolated from knee cartilage of C57BL/6J mice and stimulated with LPS for 12 h to mimic osteoarthritic chondrocyte injury *in vitro*. The chondrocytes were

[收稿日期] 2023-09-11 [接受日期] 2023-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金 (81802234), 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2020jcyj-msxmX0134), 重庆医科大学未来医学青年创新团队发展支持计划项目 (W0196), 重庆医科大学附属第二医院“宽仁英才”项目 (kryc-gg-2116), 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). Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (81802234), General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0134), Support Program of Future Medical Youth Innovation Team Development of Chongqing Medical University (W0196), “Kuanren Yingcai” Project of The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (kryc-gg-2116), Chongqing Young and Middle-aged Medical High-end Talent Program, and Medical Scientific Research Project of Chongqing Health Commission and Science and Technology Bureau (2024GDRC002).

[作者简介] 魏霞, 硕士生. E-mail: 2021110392@stu.cqmu.edu.cn

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-63693075, E-mail: jialang@hospital.cqmu.edu.cn

divided into control group (only cultured in medium containing 10% FBS without any treatment), LPS group (LPS treatment for 12 h), and LPS+FLIPUS group (LPS treatment for 12 h followed by FLIPUS intervention for 20 min). The expression of collagen II $\alpha 1$ (COL2 $\alpha 1$), inflammatory cytokines (interleukin [IL]-18 and IL-1 β), pyroptosis-related proteins (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3 [NLRP3], cleaved cysteine aspartic acid specific protease 1 (caspase 1), and N-terminal fragment of gasdermin D [GSDMD-N]), and cartilage matrix degradation factors (matrix metalloproteinase [MMP] 13, MMP3, and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5 [ADAMTS5]) were detected by Western blotting. The viability of chondrocytes was detected by calcein acetoxymethyl ester/propidium iodide (calcein AM/PI) fluorescent staining and lactate dehydrogenase (LDH) release assay, the morphology of chondrocytes was observed by scanning electron microscopy, and the levels of IL-1 β and IL-18 in cell supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The primary chondrocytes were isolated from knee cartilage of the mice and osteoarthritic chondrocyte injury *in vitro* were successfully simulated. Compared with the control group, the expression of COL2 $\alpha 1$ was significantly decreased in the LPS group ($P < 0.01$), while the expression levels of MMP13, MMP3, ADAMTS5, NLRP3, GSDMD-N, cleaved caspase 1, IL-18, and IL-1 β were significantly increased (all $P < 0.01$); the levels of IL-18, IL-1 β , and LDH in the cell supernatant were significantly increased (all $P < 0.01$), with cell swelling and deformation, more pores on the membrane, loss of integrity, and increased cell mortality ($P < 0.01$). Compared with the LPS group, the expression of COL2 $\alpha 1$ was significantly increased in the knee chondrocytes of mice in the LPS+FLIPUS group ($P < 0.01$), while the expression levels of MMP13, MMP3, ADAMTS5, NLRP3, GSDMD-N, cleaved caspase 1, IL-18, and IL-1 β were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the levels of IL-18, IL-1 β , and LDH in the cell supernatant were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with relieved cell swelling and membrane pores and decreased cell mortality ($P < 0.05$). **Conclusion** FLIPUS may reduce chondrocytes injury induced by LPS in mice via inhibiting the expression of inflammatory cytokines and pyroptosis-related proteins.

[**Key words**] focused low-intensity pulsed ultrasound; osteoarthritis; inflammation; chondrocyte; pyroptosis

[**Citation**] 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.

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是以受累关节疼痛、肿胀或功能受限为主要表现的关节退行性疾病, 是导致关节疼痛和残疾的主要原因之一, 严重影响患者的生活质量^[1]。随着肥胖人数的增多及人口老龄化的加剧, OA 患病率逐渐升高, 在我国 40 岁以上的人群中 OA 发病率高达 30%, 造成巨大的社会经济负担^[2]。

软骨细胞在维持细胞外基质合成与降解的动态平衡、保证正常的软骨结构和功能中发挥着关键作用。在 OA 的发病过程中, 软骨细胞炎症反应及细胞凋亡的异常激活是造成软骨退行性的改变重要生物学因素。其中, IL-1 β 、IL-18 等炎症因子在软骨细胞外基质丢失、软骨退变、直接诱导软骨细胞凋亡等方面起重要作用^[3]。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) 所介导的炎症小体激活可以诱导细胞膜肿胀、细胞孔隙增多, 导致 IL-1 β 、IL-18 等促炎细胞因子分泌增多, 加重软骨细胞损伤, 加剧 OA 进展^[4]。进一步研究发现, 抑制 IL-1 β 、

IL-18 和细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、消皮素 D N 端片段 (N-terminal fragment of gasdermin D, GSDMD-N)、caspase 1 表达可减轻 OA 小鼠的软骨损伤^[5]。以上研究结果表明炎症反应、细胞焦亡与 OA 存在一定的因果关系, 抑制炎症因子分泌及细胞焦亡相关蛋白表达可能是治疗 OA 潜在的分子靶点, 值得深入研究。

低强度脉冲聚焦超声 (focused low-intensity pulsed ultrasound, FLIPUS) 是一种无创、安全的物理治疗方法, 可以有效缓解 OA 患者关节疼痛, 改善关节功能障碍和健康状况^[6]。体内实验表明, FLIPUS 通过缓解软骨细胞氧化应激、减轻软骨细胞损伤、抑制软骨细胞凋亡延缓软骨基质退变^[7]。然而, FLIPUS 对软骨细胞保护的分子机制还有待进一步深入研究。本研究通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 构建小鼠 OA 样软骨细胞损伤模型, 探究 FLIPUS 对炎症因子和细胞焦亡相关蛋白表达的影响, 揭示 FLIPUS 保护软骨细胞的作用机制, 以为临床防治 OA 提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物与主要试剂 SPF级C57BL/6J小鼠(8~10 d),由重庆医科大学实验动物中心提供,实验动物使用许可证号为SYXK(渝)2022-0016。本研究通过重庆医科大学动物伦理委员会审批。

FBS、DMEM/F12购于美国Gibco公司;胰蛋白酶、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购于上海碧云天生物技术股份有限公司;II型胶原酶购于德国BioFroxx公司;II型胶原蛋白 $\alpha 1$ (collagen II $\alpha 1$, COL2 $\alpha 1$)、血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5, ADAMTS5)抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)13、MMP3、IL-18、 β -肌动蛋白抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;NLRP3、IL-1 β 抗体购于英国Abcam公司;GSDMD-N抗体购于美国Affinity公司;cleaved caspase 1抗体购于美国Santa Cruz公司;小鼠IL-18、IL-1 β ELISA检测试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司;HRP标记的羊抗兔二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、RIPA强效细胞裂解液、SDS-PAGE上样缓冲液、无蛋白快速封闭液购于上海雅酶生物科技有限公司;ECL发光液购于美国MCE公司;PVDF膜购于美国Millipore公司。

1.2 小鼠膝关节原代软骨细胞的提取与培养 将小鼠浸泡于75%乙醇消毒5 min后,使用微型剪及眼科镊分离出小鼠膝关节;用含5%青霉素-链霉素的PBS浸泡10 min后,加入0.25%胰蛋白酶于37℃、5% CO₂ 孵箱中消化10 min,再进一步获取完整的膝关节软骨;加入0.1% II型胶原酶,于37℃、5% CO₂ 孵箱中消化过夜。第2天,将已消化好的软骨细胞悬液离心弃除上清液后,用完全培养基(10% FBS、90% DMEM/F12、1%青霉素-链霉素溶液)重悬细胞并接种于培养皿中,于37℃、5% CO₂ 孵箱中常规培养,以备后续实验。

1.3 小鼠OA样软骨细胞损伤模型建立及FLIPUS干预 将细胞分为3组:对照组、LPS组、LPS+FLIPUS组。将原代软骨细胞接种于6孔板或3.5 cm培养皿,用LPS(1 μ g/mL)处理12 h体外模拟

OA样软骨细胞损伤^[8]。使用FLIPUS干预细胞20 min,FLIPUS干预时探头上涂耦合剂,将其紧贴培养皿下方。所采用的超声治疗仪(CZG200型)购于重庆海扶医疗科技股份有限公司,频率0.6 MHz,声强120 mW/cm²,治疗头焦平面距离28 mm,脉冲宽度200 μ s,占空比20%。对照组细胞用仅含10% FBS的培养基培养,不予任何处理。

1.4 LDH释放实验 将细胞接种于12孔板,分组处理细胞,取各组细胞上清液120 μ L加入96孔板,再按照试剂盒使用说明书配置工作液,每孔加入60 μ L工作液,室温避光孵育30 min后采用酶标仪(美国Bio-Rad公司)检测490 nm波长处各组上清液的光密度值。

1.5 免疫细胞荧光染色 将细胞接种于放置爬片的6孔板中,细胞生长到60%~70%时取出爬片;使用4%多聚甲醛溶液常温固定30 min, PBS浸洗5 min、3次;0.1% Triton X-100常温通透20 min, PBS浸洗5 min、3次,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℃冰箱孵育过夜。第2天,用PBS浸洗5 min、3次,孵育山羊抗小鼠荧光二抗(稀释比例1:500)1 h, PBS浸洗5 min、3次,滴加含DAPI的抗荧光淬灭剂后,于荧光显微镜下观察。

1.6 扫描电子显微镜观察分析 如前所述制作细胞爬片后, PBS清洗3次,使用3%戊二醛溶液常温固定30 min后,将样本送至重庆医科大学电子显微镜扫描室进行观察分析。

1.7 蛋白质印迹法检测蛋白的表达 用预冷的PBS清洗各组细胞3次,加入适当体积的裂解液(含1%蛋白酶及磷酸酶抑制剂)于冰上提取总蛋白,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,按比例加入上样缓冲液,煮沸变性。取20 μ g的蛋白经不同浓度的SDS-PAGE凝胶分离后,转移到PVDF膜上,经无蛋白快速封闭液室温封闭30 min后,将膜放置于相应的一抗中,于4℃摇床孵育过夜。第2天, TBST漂洗10 min、3次;加入相应的二抗室温孵育1 h, TBST漂洗10 min、3次,滴加ECL发光液进行曝光显影,用ImageJ软件分析并计算,以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.8 ELISA法检测细胞上清液中IL-18、IL-1 β 的水平 将细胞接种于6孔板,分组处理细胞,取各

组细胞上清液, 4 °C 1 500×g 离心 10 min, 取上清。按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测细胞上清液中 IL-18、IL-1β 水平。采用酶标仪检测 450 nm 波长处各组细胞上清液的光密度值。

1.9 钙黄绿素乙酰氧基甲酯 (calcein acetoxymethyl ester, calcein AM) /PI 荧光染色 将细胞接种于 24 孔板, 分组处理细胞, 吸除培养基, 每孔加入 100 μL calcein AM/PI 检测工作液, 37 °C 避光孵育 30 min 后, 吸除培养基, PBS 洗涤 3 次, 加入培养基于倒置荧光显微镜下观察。

1.10 统计学处理 应用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 并运用 Tukey

法多重检验进行两两比较。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 小鼠膝关节软骨细胞的形态学观察及鉴定 由图 1A 可见, 小鼠膝关节软骨细胞接种于培养皿后, 贴壁生长, 约 2~3 d 长满皿底, 形状呈不规则圆形或多边形; 经传代培养后, 第 1 代软骨细胞生长良好, 仍保持不规则圆形; 第 2 代软骨细胞逐渐衰老, 生长减缓, 外观呈长梭形。

免疫细胞荧光染色结果显示, 与原代和第 1 代软骨细胞相比, 第 2 代软骨细胞 COL2α1 表达减少、表型逐渐丢失 (图 1B)。因此, 为了保证实验的准确性, 后续实验选用原代或第 1 代软骨细胞。

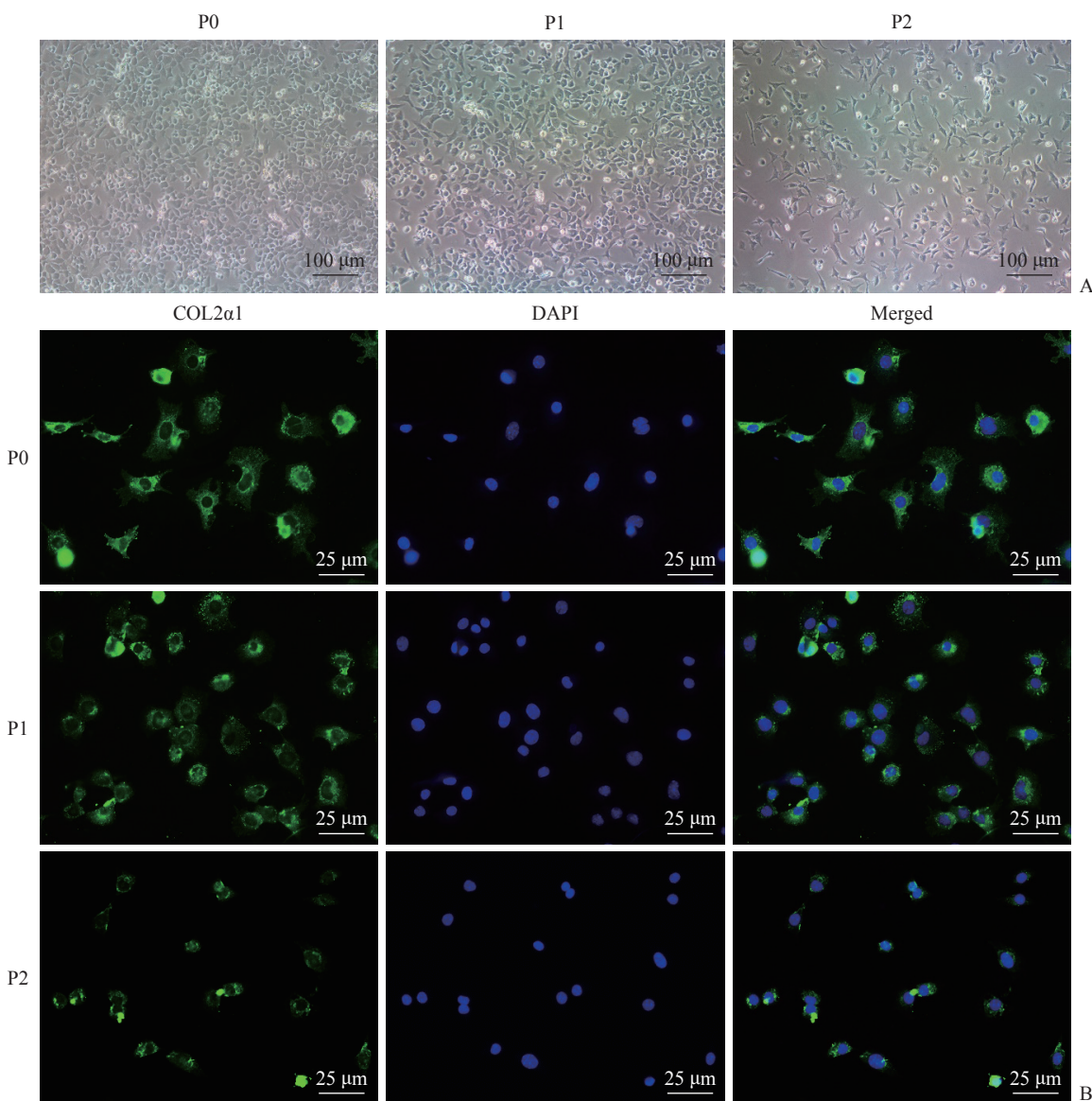


图 1 小鼠膝关节软骨细胞形态学观察 (A) 及鉴定 (B)

Fig 1 Morphological observation (A) and identification (B) of mouse knee joint chondrocytes

P0: Primary culture cells; P1: First-passage cells; P2: Second-passage cells. COL2α1: Collagen II α1; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

2.2 FLIPUS 对 LPS 诱导的小鼠膝关节软骨细胞损伤的影响 蛋白质印迹法分析结果显示,与对照组相比,LPS 组小鼠膝关节软骨细胞中 MMP13、MMP3 和 ADAMTS5 蛋白的表达增加(均 $P < 0.01$)、COL2 α 1 蛋白表达受到抑制 ($P < 0.01$),表明 LPS 成功诱导了体外 OA 样软骨细胞损伤。与 LPS 组

相比,LPS+FLIPUS 组小鼠膝关节软骨细胞中 MMP13、MMP3 和 ADAMTS5 蛋白的表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)、COL2 α 1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$),表明 FLIPUS 能减轻 LPS 诱导的小鼠膝关节软骨细胞损伤。见图 2、表 1。

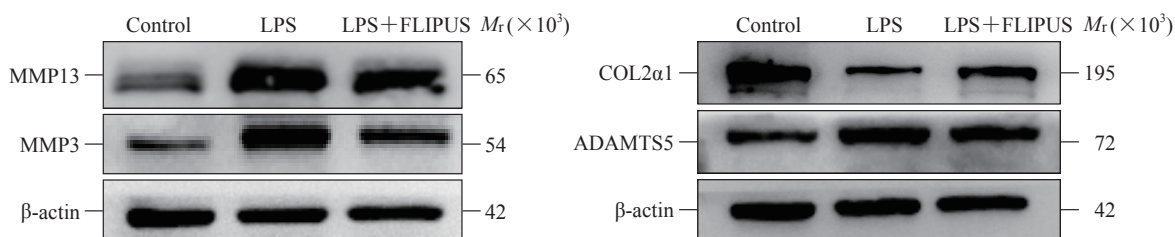


图 2 蛋白质印迹法检测各组小鼠膝关节软骨细胞中 MMP13、MMP3、ADAMTS5、COL2 α 1 蛋白的表达

Fig 2 Expression of MMP13, MMP3, ADAMTS5 and COL2 α 1 in mouse knee joint chondrocytes in each group detected by Western blotting

MMP: Matrix metalloproteinase; ADAMTS5: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5; COL2 α 1: Collagen II α 1; LPS: Lipopolysaccharide; FLIPUS: Focused low-intensity pulsed ultrasound.

表 1 各组小鼠膝关节软骨细胞中 MMP13、MMP3、ADAMTS5、COL2 α 1 蛋白表达水平的比较

Tab 1 Comparison of expression levels of MMP13, MMP3, ADAMTS5 and COL2 α 1 in mouse knee joint chondrocytes in each group

Group	$n=3, \bar{x} \pm s$			
	MMP13	MMP3	ADAMTS5	COL2 α 1
Control	0.10 \pm 0.01	0.14 \pm 0.03	0.64 \pm 0.06	1.18 \pm 0.13
LPS	0.97 \pm 0.12**	1.08 \pm 0.05**	1.09 \pm 0.17**	0.52 \pm 0.06**
LPS+FLIPUS	0.58 \pm 0.08** $\Delta\Delta$	0.69 \pm 0.03** $\Delta\Delta$	0.73 \pm 0.10 Δ	0.86 \pm 0.08** $\Delta\Delta$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs LPS group. MMP: Matrix metalloproteinase; ADAMTS5: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5; COL2 α 1: Collagen II α 1; LPS: Lipopolysaccharide; FLIPUS: Focused low-intensity pulsed ultrasound.

2.3 FLIPUS 可改善 LPS 诱导的小鼠膝关节软骨细胞活性受损 通过 calcein AM/PI 荧光染色及 LDH 释放实验观察小鼠膝关节软骨细胞活性变化,calcein AM 被活细胞中的内源性酯酶水解,生成不能通透细胞膜的钙黄绿素,发绿色荧光;细胞膜完整性被破坏的死细胞可以被 PI 染色,发红色荧光,并且释放 LDH。与对照组相比,LPS 组小鼠膝关节组软骨细胞 PI 阳性率升高 ($P < 0.01$),且细胞上清液中 LDH 释放增加 ($P < 0.01$);与 LPS 组相比,LPS+FLIPUS 组小鼠膝关节软骨细胞 PI 阳性率下降 ($P < 0.05$)、LDH 释放减少 ($P < 0.05$)。结果提示 FLIPUS 能增加小鼠膝关节软骨细胞活性、减少软骨细胞死亡。见表 2、图 3。

表 2 各组小鼠膝关节软骨细胞 PI 阳性率及 LDH 释放率比较

Tab 2 PI positive rates and LDH release rates of mouse knee joint chondrocytes in each group

Group	$\%, n=3, \bar{x} \pm s$	
	PI positive rate	LDH release rate
Control	3.02 \pm 1.15	9.80 \pm 0.79
LPS	24.02 \pm 5.31**	23.26 \pm 2.51**
LPS+FLIPUS	14.34 \pm 2.62* Δ	15.09 \pm 2.85 Δ

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs LPS group. PI: Propidium iodide; LDH: Lactate dehydrogenase; LPS: Lipopolysaccharide; FLIPUS: Focused low-intensity pulsed ultrasound.

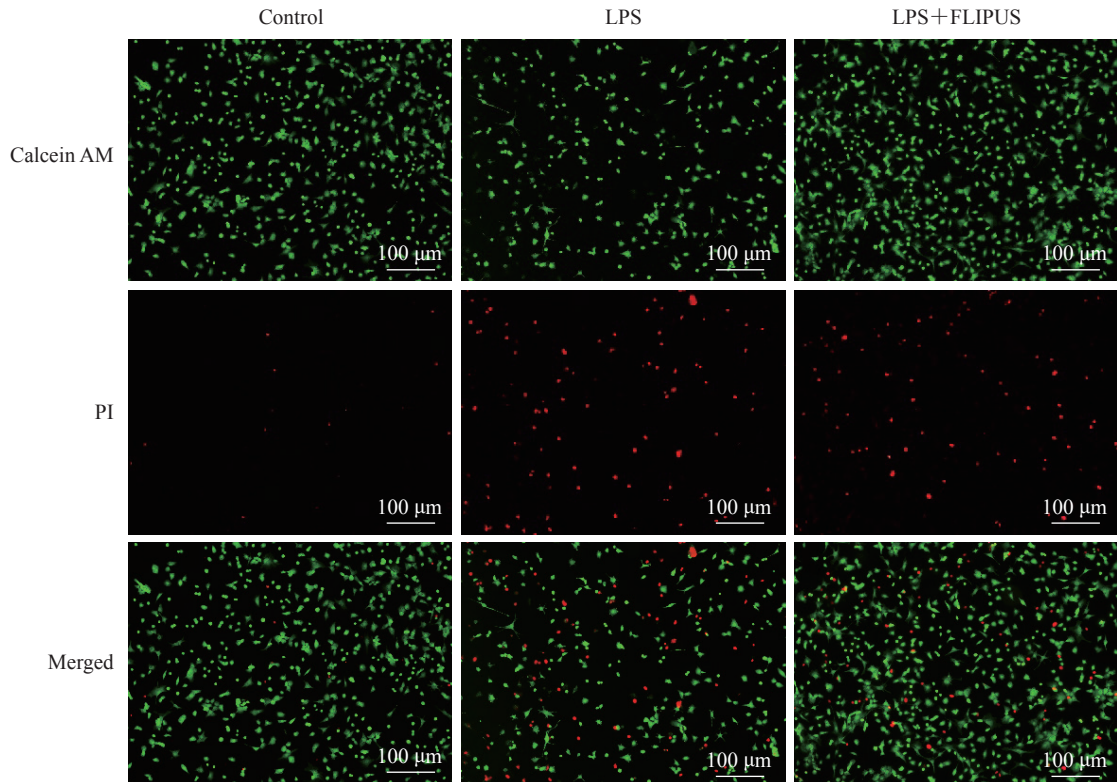


图3 各组小鼠膝关节软骨细胞 calcein AM/PI 荧光染色

Fig 3 Calcein AM/PI fluorescent staining of mouse knee joint chondrocytes in each group

AM: Acetoxymethyl ester; PI: Propidium iodide; LDH: Lactate dehydrogenase; LPS: Lipopolysaccharide; FLIPUS: Focused low-intensity pulsed ultrasound.

2.4 FLIPUS 对 LPS 诱导的小鼠膝关节软骨细胞肿胀变形及膜穿孔等焦亡表征的影响 扫描电子显微镜观察结果 (图 4) 显示, 对照组小鼠膝关节软骨细胞呈圆形, 细胞膜完整光滑; LPS 组小鼠膝关节软骨

细胞肿胀变形, 边界不规则, 细胞膜上出现较多孔隙和气泡; LPS+FLIPUS 组小鼠膝关节软骨细胞形态改善, 肿胀程度减轻, 细胞膜上孔隙及气泡减少。

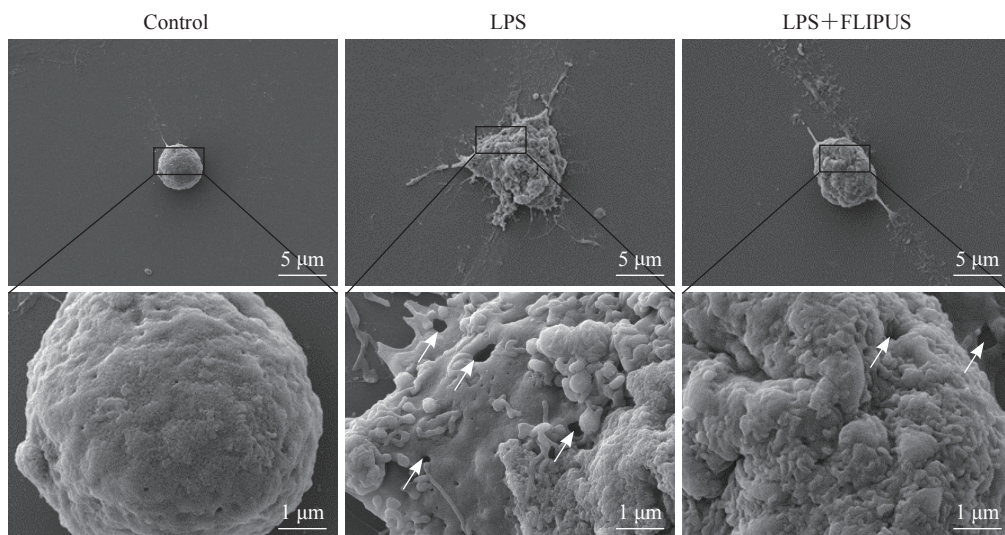


图4 SEM 观察各组小鼠膝关节软骨细胞形态的变化

Fig 4 Morphological changes in mouse knee joint chondrocytes in each group detected by SEM

White arrows indicate cell membrane pores. SEM: Scanning electron microscopy; LPS: Lipopolysaccharide; FLIPUS: Focused low-intensity pulsed ultrasound.

2.5 FLIPUS对炎症因子和焦亡相关蛋白表达的影响 蛋白质印迹法分析结果(图5、表3)显示,与对照组相比,LPS组小鼠膝关节软骨细胞中NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase 1、IL-1 β 、IL-18蛋白的表达水平升高(均 $P<0.01$);与LPS组相比,LPS+FLIPUS组小鼠膝关节软骨细胞中NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase 1、IL-1 β 、

IL-18蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。ELISA检测结果(表4)显示,与对照组相比,LPS组小鼠膝关节软骨细胞上清液中IL-1 β 、IL-18水平升高(均 $P<0.01$);与LPS组相比,FLIPUS+LPS组小鼠膝关节软骨细胞上清液中IL-1 β 、IL-18水平降低(均 $P<0.01$)。

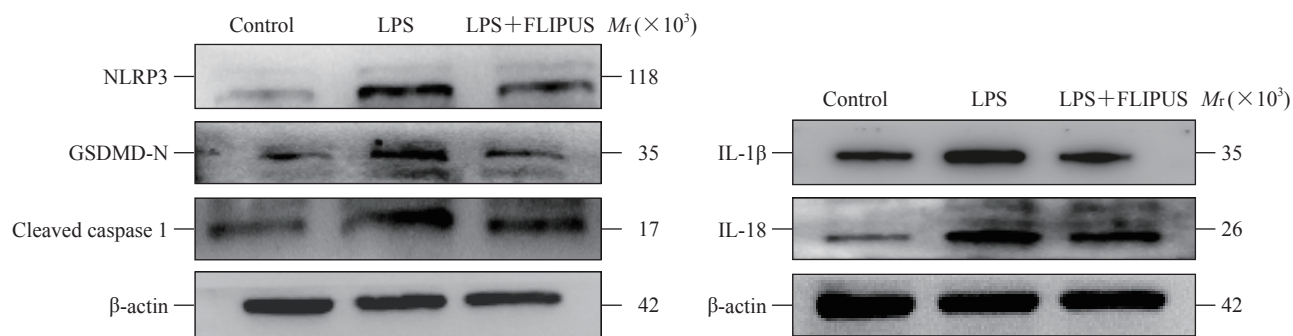


图5 蛋白质印迹法检测各组小鼠膝关节软骨细胞中NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase 1、IL-1 β 和IL-18蛋白的表达

Fig 5 Expression of NLRP3, GSDMD-N, cleaved caspase 1, IL-1 β and IL-18 in mouse knee joint chondrocytes in each group detected by Western blotting

NLRP3: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3; GSDMD-N: N-terminal fragment of gasdermin D; caspase 1: Cysteine aspartic acid specific protease 1; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; FLIPUS: Focused low-intensity pulsed ultrasound.

表3 各组小鼠膝关节软骨细胞中NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase 1、IL-1 β 和IL-18蛋白表达水平的比较

Tab 3 Comparison of expression levels of NLRP3, GSDMD-N, cleaved caspase 1, IL-1 β and IL-18 in mouse knee joint chondrocytes in each group

Group	NLRP3	GSDMD-N	Cleaved caspase 1	IL-1 β	IL-18
Control	0.79 \pm 0.14	0.41 \pm 0.10	0.62 \pm 0.03	0.34 \pm 0.04	0.72 \pm 0.11
LPS	1.13 \pm 0.19**	0.86 \pm 0.12**	1.14 \pm 0.12**	0.75 \pm 0.09**	1.58 \pm 0.25**
LPS+FLIPUS	0.77 \pm 0.07 $\Delta\Delta$	0.57 \pm 0.08 Δ	0.83 \pm 0.15 Δ	0.52 \pm 0.12 Δ	1.06 \pm 0.15 Δ

** $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs LPS group. NLRP3: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3; GSDMD-N: N-terminal fragment of gasdermin D; caspase 1: Cysteine aspartic acid specific protease 1; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; FLIPUS: Focused low-intensity pulsed ultrasound.

表4 各组小鼠膝关节软骨细胞上清液中炎症因子IL-1 β 、IL-18水平比较

Tab 4 Comparison of levels of inflammatory factors IL-1 β and IL-18 in supernatants of mouse knee joint chondrocytes in each group

Group	IL-1 β	IL-18
Control	43.30 \pm 7.04	17.14 \pm 5.98
LPS	92.11 \pm 6.52**	76.77 \pm 7.07**
LPS+FLIPUS	69.13 \pm 9.23** $\Delta\Delta$	52.41 \pm 8.18** $\Delta\Delta$

** $P<0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs LPS group. IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; FLIPUS: Focused low-intensity pulsed ultrasound.

3 讨论

OA由多种因素引起,是以关节软骨纤维化、破裂、软骨下骨损伤及继发性骨赘形成为特点的退行性疾病,证据表明炎症因子IL-1 β 和IL-18可介导软骨细胞损伤、软骨基质降解并刺激关节周围神经导致关节疼痛^[9-10]。同时,MMP3和MMP13可协同裂解胶原分子中三维螺旋结构,高效地降解II型胶原,继而破坏软骨的拱形纤维结构^[11-12]。ADAMTS5主要对软骨基质中的蛋白多糖进行降解,能加速OA病情进展^[13]。因此,抑制炎症反应

是治疗 OA 的重要策略之一。

细胞焦亡是一种促炎程序性细胞死亡,形态学特征表现为焦亡细胞质膜上形成直径为 10~15 nm 的孔隙,细胞肿胀并出现破裂。细胞焦亡的生化特征包括炎症小体形成、相关 caspase 和消皮素激活及大量促炎症因子(IL-1 β 、IL-18)释放^[14]。相关研究表明,细胞焦亡途径中的炎症小体、caspase 蛋白、IL-1 β 和 IL-18 与 OA 发生、发展有着密切关系^[4]。其中,NLRP3 炎症小体是近年来细胞焦亡途径的研究热点,各种致病因素激活模式识别受体 NLRP3, NLRP3 发生寡聚化并募集 caspase 1 前体蛋白(pro-caspase 1)形成 NLRP3 炎症小体,将 pro-caspase 1 加工为有活性的 cleaved caspase 1。cleaved caspase 1 裂解消皮素 D 并释放其 N 端结构域,该结构域可与细胞膜结合并使其穿孔,介导细胞内容物的释放,造成细胞损伤。同时,cleaved caspase 1 促进 IL-1 β 和 IL-18 的成熟与分泌,导致滑膜炎症和软骨退变^[15-16]。既往研究表明,在小鼠 OA 模型及 OA 患者中软骨细胞焦亡水平上升^[5]。新型脂肪细胞因子 meteorin-like 及鸢尾素(irisin)通过 NLRP3 信号通路抑制软骨细胞焦亡,减轻软骨损伤,缓解 OA 进展,提示通过 NLRP3 信号通路调控细胞焦亡可能是 OA 治疗的新途径、新方法^[17-18]。

超声作为一种物理因子,具有无创、不良反应小、性价比高等特点,在临床上广泛应用于治疗肌肉骨骼及神经系统疾病^[18-20]。既往研究发现,传统非聚焦超声主要利用其温热效应增加毛细血管通透性,达到改善组织循环、促进炎症物质代谢等作用^[21]。与传统非聚焦超声相比,FLIPUS 采用低频率(0.6 MHz)以聚焦的方式将超声能量投射至关节深处的软骨组织,主要通过机械效应在 OA 中发挥治疗作用。软骨对机械负荷刺激极其敏感,生理性机械负荷可以降低软骨细胞的炎症反应,增加软骨细胞代谢活性,促进细胞外基质合成^[22]。本课题组前期研究也发现,FLIPUS 通过机械效应改善新西兰兔膝关节炎症模型的炎症微环境,促进炎症介质前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 及一氧化氮(nitric oxide, NO)代谢,保护退变的关节软骨^[7]。FLIPUS 保护关节软骨的潜在作用机制还有待进一步研究。

本研究结果显示,LPS 造成小鼠膝关节软

骨细胞炎症性损伤后,细胞软骨基质降解因子 ADAMTS5、MMP3、MMP13 表达上升。同时,细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase 1 及炎症因子 IL-1 β 、IL-18 表达升高,细胞上清液中 IL-1 β 、IL-18 水平上升,而细胞中 COL2 α 1 表达下降,软骨细胞活性下降,死亡率增加。扫描电子显微镜观察到 LPS 刺激后软骨细胞肿胀变形,细胞膜穿孔,完整性丧失,出现明显的焦亡形态学改变。以上结果表明 LPS 可诱导软骨细胞焦亡,导致炎症因子释放增加,加重软骨细胞损伤。

本研究发现 FLIPUS 能有效下调 LPS 处理后软骨细胞中软骨基质降解因子 ADAMTS5、MMP13、MMP3 蛋白表达,抑制焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase 1 及炎症因子 IL-1 β 、IL-18 表达,降低细胞上清液中 IL-1 β 、IL-18 水平。同时,FLIPUS 上调细胞中 COL2 α 1 表达,增加软骨细胞活性,降低软骨细胞死亡率。扫描电子显微观察到 FLIPUS 可减轻软骨细胞肿胀并减少细胞膜孔隙形成,一定程度上逆转 LPS 诱导的软骨细胞焦亡形态学变化。以上结果表明,FLIPUS 可能通过抑制焦亡相关蛋白及炎症因子表达,减轻 LPS 诱导的炎症反应、II 型胶原降解和软骨细胞损伤,保护软骨。

本研究有以下不足之处:(1) OA 发病机制复杂,涉及众多的分子机制及信号通路,本研究仅从 FLIPUS 对炎症因子和焦亡相关蛋白入手探讨其作用机制,还需进一步探究 FLIPUS 是否有其他保护机制;(2) 本研究只进行了体外细胞实验,FLIPUS 抗炎和抗细胞焦亡的体内效应还有待进一步证实;(3) 本研究仅观察了 FLIPUS 对细胞炎症因子水平及细胞焦亡相关蛋白的影响,没有沉默、过表达关键靶蛋白或采取特异性通路阻断剂进一步验证 FLIPUS 抗炎和抗细胞焦亡的分子机制。在下一步研究中,我们将通过转染病毒的方式干预 NLRP3 表达,更加深入地探讨 FLIPUS 抑制软骨细胞焦亡、降低炎症因子表达的机制。

综上所述,FLIPUS 通过抑制炎症因子和细胞焦亡相关蛋白表达减轻 LPS 诱导的小鼠膝关节软骨细胞损伤。

[参 考 文 献]

[1] 谢天顺,邱萍,朱锦宇. 2019 版 OARSI《膝、髌和多

- 关节骨关节炎非手术治疗指南》膝关节骨关节炎部分更新内容的解读[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2020, 13(9): 705-708. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9958.2020.09.01.
- [2] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南(2021年版)[J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(18): 1291-1314. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20210624-00424.
- [3] 邓丽, 文振华, 田锋, 等. 艾拉莫德通过TLR4/NF- κ B通路抑制骨关节炎软骨细胞模型凋亡及炎症反应[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(3): 316-321. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.03.012.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] JIA L, LI D, WEI X, et al. Efficacy and safety of focused low-intensity pulsed ultrasound versus pulsed shortwave diathermy on knee osteoarthritis: a randomized comparative trial[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 12792. DOI: 10.1038/s41598-022-17291-z.
- [7] JIA L, CHEN J, WANG Y, et al. Focused low-intensity pulsed ultrasound affects extracellular matrix degradation via decreasing chondrocyte apoptosis and inflammatory mediators in a surgically induced osteoarthritic rabbit model[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2016, 42(1): 208-219. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.08.010.
- [8] GUO Q, ZHANG M, DONG Y, et al. Isobavachalcone ameliorates the progression of osteoarthritis by suppressing NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 119: 110102. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110102.
- [9] LIEBERTHAL J, SAMBAMURTHY N, SCANZELLO C R. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(11): 1825-1834. DOI: 10.1016/j.joca.2015.08.015.
- [10] KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1): 33-42. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.196.
- [11] ZHANG Y, LI S, JIN P, et al. Dual functions of microRNA-17 in maintaining cartilage homeostasis and protection against osteoarthritis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2447. DOI: 10.1038/s41467-022-30119-8.
- [12] WANG T, HE C. Pro-inflammatory cytokines: the link between obesity and osteoarthritis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 44: 38-50. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2018.10.002.
- [13] ZHOU H, SHEN X, YAN C, et al. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis of the knee in mice model by interacting with METTL3 to reduce m6A of NLRP3 in macrophage[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 322. DOI: 10.1186/s13287-022-03005-9.
- [14] CHANG X, KANG Y, YANG Y, et al. Pyroptosis: a novel intervention target in the progression of osteoarthritis[J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 3859-3871. DOI: 10.2147/JIR.S368501.
- [15] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127. DOI: 10.1038/s41423-021-00740-6.
- [16] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 128. DOI: 10.1038/s41392-021-00507-5.
- [17] LIU J, JIA S, YANG Y, et al. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114118. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114118.
- [18] JIA S, YANG Y, BAI Y, et al. Mechanical stimulation protects against chondrocyte pyroptosis through irisin-induced suppression of PI3K/Akt/NF- κ B signal pathway in osteoarthritis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 797855. DOI: 10.3389/fcell.2022.797855.
- [19] LIAO Q, LI B J, LI Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes osteoarthritic cartilage regeneration by BMSC-derived exosomes via modulating the NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107824. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107824.
- [20] SONG W S, SUNG C Y, KE C H, et al. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of transcranial ultrasound stimulation on Parkinson's disease[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2022, 48(2): 265-274. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2021.10.001.
- [21] CAKIR S, HEPGULER S, OZTURK C, et al. Efficacy of therapeutic ultrasound for the management of knee osteoarthritis: a randomized, controlled, and double-blind study[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2014, 93(5): 405-412. DOI: 10.1097/PHM.0000000000000033.
- [22] SANCHEZ-ADAMS J, LEDDY H A, MCNULTY A L, et al. The mechanobiology of articular cartilage: bearing the burden of osteoarthritis[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2014, 16(10): 451. DOI: 10.1007/s11926-014-0451-6.