

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research虾青素改善尿酸钠盐晶体诱导的痛风性软骨
细胞损伤的研究Study of astaxanthin improves gouty chondrocyte injury induced by sodium urate
crystals高秀林¹, 张丽卿², 陆伟锋¹(1. 山西医科大学 汾阳学院 临床医学系, 山西
汾阳 032200; 2. 山西省汾阳医院 风湿免疫科,
山西 汾阳 032200)GAO Xiu - lin¹, ZHANG Li - qing²,
LU Wei - feng¹(1. Department of Clinical Medicine,
Fenyang College, Shanxi Medical
University, Fenyang 032200, Shanxi
Province, China; 2. Department of
Rheumatology and Immunology,
Fenyang Hospital of Shanxi Province,
Fenyang 032200, Shanxi Province,
China)基金项目: 吕梁市重点研发计划基金资助项目
(2020SHFZ44)作者简介: 高秀林(1987 -), 女, 讲师, 主要从事
风湿性疾病临床诊治方面的工作

通信作者: 高秀林

MP: 13753350038

E - mail: aizhilin2024@163.com

摘要:目的 探讨虾青素(ASTA)对尿酸钠盐晶体(MSU)诱导的痛风性软骨细胞损伤的保护作用及其作用机制。方法 用尿酸钠盐建立痛风性细胞模型。将C-28I2细胞随机分为空白组(常规培养)、模型组(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU)、低剂量实验组(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASTA)、高剂量实验组(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU + 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASTA)、高剂量 + Vector组(转染Vector载体 + 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU + 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASTA)、高剂量 + NLRP3组(转染过表达NLRP3质粒 + 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU + 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASTA)。用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞的增殖情况,用蛋白质印迹法检测相关蛋白相对表达水平,用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测细胞羟脯氨酸(Hyp)、糖胺聚糖(GAG)水平。结果 空白组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组的细胞增殖率分别为(100.00 $\pm$ 5.40)%、(67.41 $\pm$ 4.52)%、(72.69 $\pm$ 5.05)%和(81.47 $\pm$ 7.73)%,模型组的上述指标与空白组比较,低剂量实验组、高剂量实验组的上述指标与模型组分别比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。空白组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、高剂量 + Vector组、高剂量 + NLRP3组的核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)蛋白相对表达水平分别为0.44 $\pm$ 0.04、0.86 $\pm$ 0.06、0.72 $\pm$ 0.10、0.52 $\pm$ 0.03、0.51 $\pm$ 0.03和1.13 $\pm$ 0.10,裂解的-胱天蛋白酶(CI-caspase-1)蛋白相对表达水平分别为0.33 $\pm$ 0.05、0.73 $\pm$ 0.08、0.61 $\pm$ 0.07、0.42 $\pm$ 0.04、0.39 $\pm$ 0.04和0.70 $\pm$ 0.06,成熟-白细胞介素(m-IL)-1 β 蛋白相对表达水平分别为0.26 $\pm$ 0.03、0.91 $\pm$ 0.05、0.70 $\pm$ 0.11、0.57 $\pm$ 0.08、0.58 $\pm$ 0.06和0.79 $\pm$ 0.08,Hyp水平分别为(1.95 $\pm$ 0.22)、(3.33 $\pm$ 0.25)、(2.53 $\pm$ 0.18)、(2.22 $\pm$ 0.21)、(2.24 $\pm$ 0.20)和(3.25 $\pm$ 0.38) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,GAG水平分别为(2.30 $\pm$ 0.20)、(3.71 $\pm$ 0.26)、(3.29 $\pm$ 0.33)、(2.90 $\pm$ 0.16)、(2.97 $\pm$ 0.24)和(3.50 $\pm$ 0.34) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。模型组的上述指标与空白组比较,低剂量实验组、高剂量实验组的上述指标分别与模型组比较,高剂量 + NLRP3组的上述指标与高剂量 + Vector组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 虾青素可调控NLRP3发挥抗炎作用,在MSU诱导的痛风性软骨损伤中具有保护作用。

关键词: 虾青素;痛风性关节炎;软骨细胞损伤;核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3;凋亡

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.01.013

中图分类号:R28

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)01-0060-05

Abstract: Objective To investigate the protective effect of astaxanthin (ASTA) on gouty chondrocyte injury induced by monosodium urate crystal (MSU) and its mechanism. **Methods** The gout cell model by sodium urate crystals was established. C-28I2 cells were randomly

divided into blank group (conventional culture), model group ($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU), experimental - L group ($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU + $20 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ASTA), experimental - H group ($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU + $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASTA), experimental - H + Vector group (transfected with Vector + $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU + $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASTA), experimental - H + NLRP3 group (transfected with NLRP3 plasmid + $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MSU + $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASTA). Cell counting kit - 8 (CCK - 8) assay was used to detect the cell proliferation rate; Western blot assay was used to detect the expression of related proteins; the levels of Hyp and GAG were detected by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The cell proliferation rate of blank group, model group, experimental - L group and experimental - H group were $(100.00 \pm 5.40)\%$, $(67.41 \pm 4.52)\%$, $(72.69 \pm 5.05)\%$ and $(81.47 \pm 7.73)\%$, respectively. The above indicators showed statistically significant differences between the model group and the blank group, between the experimental - L, experimental - H groups and the model group (all $P < 0.05$). Nucleotide binding oligomeric domain - like receptor protein 3 (NLRP3) protein expression levels in blank group, model group, experimental - L group, experimental - H group, experimental - H + Vector group and experimental - H + NLRP3 group were 0.44 ± 0.04 , 0.86 ± 0.06 , 0.72 ± 0.10 , 0.52 ± 0.03 , 0.51 ± 0.03 and 1.13 ± 0.10 , respectively; the expression levels of cleaved Caspase - 1 (Cl - caspase - 1) protein were 0.33 ± 0.05 , 0.73 ± 0.08 , 0.61 ± 0.07 , 0.42 ± 0.04 , 0.39 ± 0.04 and 0.70 ± 0.06 , respectively; the mature interleukin (m - IL) - 1β protein expression levels were 0.26 ± 0.03 , 0.91 ± 0.05 , 0.70 ± 0.11 , 0.57 ± 0.08 , 0.58 ± 0.06 and 0.79 ± 0.08 , respectively; the Hyp levels were (1.95 ± 0.22) , (3.33 ± 0.25) , (2.53 ± 0.18) , (2.22 ± 0.21) , (2.24 ± 0.20) and $(3.25 \pm 0.38) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the GAG levels were (2.30 ± 0.20) , (3.71 ± 0.26) , (3.29 ± 0.33) , (2.90 ± 0.16) , (2.97 ± 0.24) and $(3.50 \pm 0.34) \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The above indicators showed statistically significant differences between the model group and the blank group, between the experimental - L, experimental - H groups and the model group, between the experimental - H + NLRP3 group and the experimental - H + Vector group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Astaxanthin can regulate NLRP3 to play an anti - inflammatory role and has a protective effect on MSU - induced gouty cartilage injury.

Key words: astaxanthin; gouty arthritis; chondrocyte injury; nucleotide - bound oligomerized domain - like receptor protein 3; apoptosis

痛风性关节炎是最常见的炎症性关节炎,根据2020年美国风湿病学会痛风管理指南,痛风性关节炎的影响因性别、种族或合并症的存在而不同,炎症反应的启动由尿酸钠盐晶体(monosodium urate crystals, MSU)的形成和沉积引起,可导致炎症介质的释放^[1]。虾青素(astaxanthin, ASTA)是一种天然类胡萝卜素,具有强大的抗炎作用^[2-3]。研究表明,ASTA在痛风性关节炎中也具有一定的治疗作用^[4]。本研究旨在通过体外构建痛风细胞模型,探索ASTA治疗痛风性关节炎的潜在机制,以期对相关研究提供参考。

材料与方法

1 材料

细胞 人正常软骨细胞 C - 28I2,购自美国 ATCC 公司。

药品与试剂 ASTA,规格:每支 100 mg,纯度:90%,批号:240310,上海源叶生物公司生产;MSU,规

格:每瓶 5 g,上海爱必信生物科技有限公司生产。杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle media, DMEM),购自北京百奥创新科技有限公司;Lipofectamine 3000 转染试剂、细胞计数试剂盒 - 8 (cell counting kit - 8, CCK - 8)试剂盒,均购自南京沃博生物科技有限公司;逆转录试剂盒、TRIzol 试剂、增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)化学发光检测试剂盒,均购自上海爱必信生物科技有限公司;原位末端转移酶标记法(TdT mediated dUDP nick end labeling, Tunel)凋亡试剂盒,购自北京索莱宝科技公司;羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)、糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG),均购自南京建成生物有限公司;核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide - bound oligomerized domain - like receptor protein 3, NLRP3)、裂解的 - 胱天蛋白酶(Cleaved Caspase - 1, Cl - Caspase - 1)、高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein B1, HMGB1)、前体 - 白细胞介素(precursor interleukin, pro - IL) - 1β 、成熟(mature,

m-IL-1 β 一抗,均购自美国CST公司。质粒和引物,均由上海吉玛生物公司提供。

仪器 MA-6000实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪,苏州雅睿生物公司产品;Thermo Varioskan LUX多功能酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司产品;ZLDF-KY1荧光显微镜,上海奋业光电仪器设备有限公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[5]

用DMEM培养基对C-28I2细胞进行培养,培养基中含有100 U $\cdot$ mL⁻¹青霉素、100 mg $\cdot$ mL⁻¹链霉素和10%胎牛血清,并在培养箱中培养。细胞融合至85%~90%时进行消化传代。

2.2 模型构建^[6]

取MSU 20 mg置于烧杯中,并加入DMEM培养基9 mL和吐温1 mL,搅拌至完全溶解配制为2 mg $\cdot$ mL⁻¹的MSU母液,灭菌后保存。取C-28I2细胞,用含有200 μ g $\cdot$ mL⁻¹ MSU的培养基处理细胞构建痛风性损伤模型。

2.3 分组与处置方法

将C-28I2细胞随机分为空白组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、高剂量+Vector组、高剂量+NLRP3组。空白组细胞常规培养,其余组均按照“2.2”中方法建模,低剂量实验组、高剂量实验组细胞分别用MSU和20、40 μ mol $\cdot$ L⁻¹的ASTA共同处理24 h,高剂量+Vector组细胞先用Lipofectamine 3000转染试剂将Vector质粒转染至细胞48 h后再用MSU和40 μ mol $\cdot$ L⁻¹ ASTA处理细胞24 h,高剂量+NLRP3组将过表达NLRP3质粒转染至细胞48 h后再用MSU和40 μ mol $\cdot$ L⁻¹ ASTA处理细胞24 h。

2.4 CCK-8实验检测细胞增殖情况^[7]

将C-28I2细胞接种在96孔中(每孔接种7 000个细胞),培养24 h后,进行分组药物处理,结束后取CCK-8试剂10 μ L加入小孔中,在37 $^{\circ}$ C下培养120 min,用酶标仪器检测光密度值,并计算细胞增殖率。

2.5 RT-qPCR实验检测细胞相关基因mRNA相对表达水平^[7]

收集分组处理之后的各组C-28I2细胞,用TRIzol法提取总RNA,用逆转录试剂盒对其进行逆转录,之后配制体系进行PCR扩增,得到Ct值,以 β -actin为内参,用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行计算mRNA相对表达水平。

2.6 蛋白质印迹法检测相关蛋白相对表达水平^[8]

用细胞裂解液裂解各组细胞提取总蛋白,检测浓度后进行电泳分离,然后转至聚偏氟乙烯膜上,脱脂奶粉室温封闭,将膜与一抗试剂(NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、HMGB1、MMP3一抗稀释比均为1:1 000)在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,然后滴加二抗室温下孵育60 min,ECL显色后成像,用Image J软件对蛋白进行量化分析。

2.7 Tunel实验检测细胞凋亡率^[9]

收集软骨细胞,分组处理后多聚甲醛进行固定,用通透液室温孵育后,用Tunel缓冲液孵育,然后4',6-联脒-2'-苯基吡啶进行核染后用荧光显微镜观察。

2.8 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测细胞Hyp、GAG水平^[10]

细胞根据“2.2”中分组药物处理后,离心收集上清液,然后严格根据试剂盒操作步骤检测细胞上清液中Hyp、GAG含量。

3 统计学处理

用SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较用独立 t 检验,多组间比较用单因素方差分析。

结 果

1 ASTA对MSU诱导的C-28I2增殖率的影响

将C-28I2细胞随机分为空白组(常规培养)、模型组(200 μ g $\cdot$ mL⁻¹ MSU)、低剂量实验组(200 μ g $\cdot$ mL⁻¹ MSU+20 μ mol $\cdot$ L⁻¹ ASTA)、高剂量实验组(200 μ g $\cdot$ mL⁻¹ MSU+40 μ mol $\cdot$ L⁻¹ ASTA)、高剂量+Vector组(转染Vector载体+200 μ g $\cdot$ mL⁻¹ MSU+40 μ mol $\cdot$ L⁻¹ ASTA)、高剂量+NLRP3组(转染过表达NLRP3质粒+200 μ g $\cdot$ mL⁻¹ MSU+40 μ mol $\cdot$ L⁻¹ ASTA)。

空白组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组细胞增殖率分别为(100.00 $\pm$ 5.40)%、(67.41 $\pm$ 4.52)%、(72.69 $\pm$ 5.05)%和(81.47 $\pm$ 7.73)%。模型组与空白组比较,细胞增殖率显著降低($P<0.05$);低剂量实验组和高剂量实验组与模型组比较,细胞增殖率均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2 ASTA对MSU诱导的C-28I2中NLRP3炎症小体表达的影响

模型组与空白组比较,NLRP3 mRNA和蛋白相对表达水平均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);低、高剂量实验组与模型组比较,

NLRP3 mRNA 和蛋白相对表达水平均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);高剂量实验组与低剂量实验组间比较,NLRP3 mRNA 和蛋白相对表达水平均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

3 ASTA 介导 NLRP3 抑制 MSU 诱导的炎症反应

模型组的 NLRP3、Caspase - 1、IL - 1 β 、HMGB1 mRNA和蛋白相对表达水平与空白组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);低剂量实验组、高剂量实验组、高剂量 + Vector 组的 NLRP3、

Cl - Caspase - 1、IL - 1 β 、HMGB1 mRNA 和蛋白相对表达水平与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);高剂量实验组、高剂量 + Vector 组的 NLRP3、Cl - Caspase - 1、IL - 1 β 、HMGB1 mRNA 和蛋白相对表达水平与低剂量实验组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);高剂量 + NLRP3 组的 NLRP3、Cl - Caspase - 1、IL - 1 β 、HMGB1 mRNA 和蛋白相对表达水平与高剂量 + Vector 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 2。

4 ASTA 介导 NLRP3 对 MSU 诱导的 C - 28I2 凋亡的影响

空白组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、高剂量 + Vector 组和高剂量 + NLRP3 组的细胞凋亡率分别为 (3.98 $\pm$ 0.67)%、(23.76 $\pm$ 2.55)%、(16.12 $\pm$ 1.39)%、(9.19 $\pm$ 0.61)%、(9.09 $\pm$ 1.09)%和(17.50 $\pm$ 1.48)%。模型组的细胞凋亡率与空白组比较,低剂量实验组和高剂量实验组的细胞凋亡率与模型组比较,高剂量 + NLRP3 组的细胞凋亡率与高剂量 + Vector 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

5 ASTA 介导 NLRP3 对蛋白聚糖降解的影响

模型组与空白组比较,细胞 Hyp 和 GAG 水平均显著升高(均 $P < 0.05$);低剂量实验组、高剂量实验组与模型组比较,细胞 Hyp 和 GAG 水平均显著降低(均 $P < 0.05$);高剂量 + NLRP3 组与高剂量 + Vector

表 1 各组核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1 Comparison of nucleotide - bound oligomerized domain - like receptor protein 3 (NLRP3) expression in each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Group	Dose	NLRP3 mRNA	NLRP3 protein
Blank	-	1.00 $\pm$ 0.14	0.43 $\pm$ 0.04
Model	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.31 $\pm$ 0.24 *	0.85 $\pm$ 0.07 *
Experimental - L	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.96 $\pm$ 0.15 #	0.75 $\pm$ 0.05 #
Experimental - H	40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.52 $\pm$ 0.07 # Δ	0.54 $\pm$ 0.06 # Δ

Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, $\Delta P < 0.05$; Blank group: Routine culture; Model group: Sodium urate treated cells; Experimental - L group: Sodium urate salt and 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ astaxanthin treated cells; Experimental - H group: Sodium urate salt and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ astaxanthin treated cells.

表 2 各组 NLRP3 炎症小体相关炎症因子表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Comparison of NLRP3 inflammatom - related inflammatory factors in each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Group	mRNA			
	NLRP3	Caspase - 1	IL - 1 β	HMGB1
Blank	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.11
Model	2.28 $\pm$ 0.16 *	2.03 $\pm$ 0.14 *	1.71 $\pm$ 0.17 *	2.65 $\pm$ 0.19 *
Experimental - L	1.96 $\pm$ 0.11 #	1.65 $\pm$ 0.11 #	1.54 $\pm$ 0.15 #	2.25 $\pm$ 0.19 #
Experimental - H	1.44 $\pm$ 0.16 # Δ	1.37 $\pm$ 0.08 # Δ	1.34 $\pm$ 0.07 # Δ	1.68 $\pm$ 0.18 # Δ
Experimental - H + Vector	1.43 $\pm$ 0.13 # Δ	1.41 $\pm$ 0.15 # Δ	1.31 $\pm$ 0.14 # Δ	1.67 $\pm$ 0.08 # Δ
Experimental - H + NLRP3	5.31 $\pm$ 0.22 Δ	1.98 $\pm$ 0.16 Δ	1.66 $\pm$ 0.19 Δ	2.48 $\pm$ 0.22 Δ

Group	Protein				
	NLRP3	Cl - Caspase - 1	pro - IL - 1 β	m - IL - 1 β	HMGB1
Blank	0.44 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.06
Model	0.86 $\pm$ 0.06 *	0.73 $\pm$ 0.08 *	0.69 $\pm$ 0.08 *	0.91 $\pm$ 0.05 *	1.07 $\pm$ 0.10 *
Experimental - L	0.72 $\pm$ 0.10 #	0.61 $\pm$ 0.07 #	0.59 $\pm$ 0.06 #	0.70 $\pm$ 0.11 #	0.79 $\pm$ 0.08 #
Experimental - H	0.52 $\pm$ 0.03 # Δ	0.42 $\pm$ 0.04 # Δ	0.35 $\pm$ 0.03 # Δ	0.57 $\pm$ 0.08 # Δ	0.62 $\pm$ 0.04 # Δ
Experimental - H + Vector	0.51 $\pm$ 0.03 # Δ	0.39 $\pm$ 0.04 # Δ	0.32 $\pm$ 0.05 # Δ	0.58 $\pm$ 0.06 # Δ	0.61 $\pm$ 0.04 # Δ
Experimental - H + NLRP3	1.13 $\pm$ 0.10 Δ	0.70 $\pm$ 0.06 Δ	0.64 $\pm$ 0.05 Δ	0.79 $\pm$ 0.08 Δ	0.94 $\pm$ 0.07 Δ

Cl - caspase - 1; Cleaved Caspase - 1; pro - IL; Precursor interleukin; m - IL; Mature interleukin; HMGB1; High mobility group protein B1; Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, $\Delta P < 0.05$; Compared with experimental - H + Vector group, $\Delta P < 0.05$; Experimental - H + Vector group: After transfection with Vector, the cells were treated with sodium urate and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ astaxanthin; Experimental - H + NLRP3 group: After transfection with NLRP3, the cells were treated with sodium urate and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ astaxanthin.

表3 各组细胞 Hyp 和 GAG 水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of Hyp and GAG levels in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Hyp ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	GAG ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Blank	1.95 $\pm$ 0.22	2.30 $\pm$ 0.20
Model	3.33 $\pm$ 0.25 [*]	3.71 $\pm$ 0.26 [*]
Experimental - L	2.53 $\pm$ 0.18 [#]	3.29 $\pm$ 0.33 [#]
Experimental - H	2.22 $\pm$ 0.21 ^{#Δ}	2.90 $\pm$ 0.16 ^{#Δ}
Experimental - H + Vector	2.24 $\pm$ 0.20 ^{#Δ}	2.97 $\pm$ 0.24 ^{#Δ}
Experimental - H + NLRP3	3.25 $\pm$ 0.38 [▲]	3.50 $\pm$ 0.34 [▲]

Dose and *n* refer to table 2; Hyp: Hydroxyproline; GAG: Glycosaminoglycan; Compared with blank group, ^{*}*P* < 0.05; Compared with model group, [#]*P* < 0.05; Compared with experimental - L group, ^Δ*P* < 0.05; Compared with experimental - H + Vector group, [▲]*P* < 0.05.

组比较, 细胞 Hyp 和 GAG 水平均显著升高(均 *P* < 0.05), 见表3。

讨 论

研究表明, MSU 的沉积与软骨病变之间存在很强的相关性^[6]。ASTA 已被证实多种炎症性疾病均具有显著的治疗效果^[3, 11], 这提示 ASTA 在痛风性关节炎的治疗中也具有较大潜力, 然而目前 ASTA 在痛风性关节炎中的研究仍然十分有限。在本研究中观察到 ASTA 可提高 MSU 刺激的软骨细胞增殖率, 这提示 ASTA 可以改善 MSU 刺激的软骨损伤。

NLRP3 炎症小体一旦被激活, 可上调多种促炎细胞因子和趋化因子(如 IL-1 β)的合成和成熟, 导致对抗环境或宿主来源抗原的炎症^[12]。因此, 阻断 NLRP3 炎症小体相关炎症信号的激活是治疗痛风性关节炎的重要机制。本研究发现, ASTA 可显著抑制 MSU 诱导的软骨细胞中 NLRP3 的表达。研究表明, NLRP3 炎症小体激活后, Caspase-1 被活化, Caspase-1 一旦被激活, 可将 pro-IL-1 β 裂解为 m-IL-1 β , m-IL-1 β 再从细胞中释放出, 然后聚集更多的炎性细胞, 进一步扩大炎症反应, 此外当受到炎性损害时, 表达在真核细胞核中的非组蛋白 HMGB1 会从细胞核中排出诱发炎症^[13]。在本研究中, 经 ASTA 处理后, 可以显著抑制 MSU 诱导后细胞中 Caspase-1、HMGB1 及 m-IL-1 β 的表达, 并抑制软骨细胞凋亡, 此外, NLRP3 过表达后削弱了 ASTA 对 Caspase-1、HMGB1、IL-1 β 表达及细胞凋亡的抑制作用, 这进一步说明了 ASTA 可通过抑制 NLRP3 炎症小体在 MSU 诱导的软骨细胞炎症反应中发挥保护作用。

研究表明, II 型胶原蛋白可以通过调节 MSU 和炎症细胞募集促进痛风性关节炎, 其中胶原蛋白主要

是由 Hyp 组成^[14]。研究证实, 减少 GAG 的释放可缓解痛风^[15]。本研究中观察到 ASTA, 可以显著降低 MSU 诱导的 Hyp 和 GAG 水平的升高, 同时上调 NLRP3 的表达削弱了 ASTA 对 Hyp、GAG 水平的影响, 这提示 ASTA 可以通过调节 NLRP3 的表达抑制蛋白多糖的降解缓解软骨损伤。

本研究提示: ASTA 可通过抑制 NLRP3 炎症小体的表达抑制炎症反应, 缓解 MSU 诱导的痛风性关节炎细胞损伤。

参考文献:

- [1] FITZGERALD J D, DALBETH N, MIKULS T, *et al.* 2020 American college of rheumatology guideline for the management of gout[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(6): 879—895.
- [2] 张驰昊, 高冬梅, 郑迪, 等. 虾青素通过 ROS/NLRP3 炎症小体信号通路减轻碘海醇诱导的 HK-2 损伤[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(15): 3726—3731.
- [3] 张田, 陈世杰, 柴智, 等. 虾青素和氨基葡萄糖对大鼠慢性骨关节炎干预作用的研究[J]. *营养学报*, 2018, 40(6): 587—593.
- [4] PENG Y J, LU J W, LIU F C, *et al.* Astaxanthin attenuates joint inflammation induced by monosodium urate crystals[J]. *FASEB J*, 2020, 34(8): 11215—11226.
- [5] 王婵, 王晶, 何学智, 等. 长非编码 RNA SNAI3-AS1 调控人软骨细胞 C28/I2 增殖能力及退变的机制研究[J]. *现代生物医学进展*, 2023, 23(14): 2601—2608.
- [6] 肖璐. Sox8 下调介导尿酸钠盐晶体诱导的软骨自噬性损伤[D]. 广东广州: 南方医科大学, 2023.
- [7] 刘平举, 唐魁韩, 孙立, 等. 龙胆苦苷对骨性关节炎软骨细胞外基质的影响[J]. *世界中医药*, 2024, 19(7): 957—961.
- [8] 孙鹏, 张国华, 陈超斌, 等. 长链非编码 RNA KCNK15-AS1 靶向微 RNA-140-5p 对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡及炎症因子表达的影响[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2024, 17(5): 459—466.
- [9] 陈晓超, 马田成, 邹继伟, 等. 长链非编码 RNA MIR155HG 对 IL-1 β 诱导的骨关节炎软骨细胞炎症损伤的调控作用[J]. *河北医药*, 2024, 46(7): 971—976.
- [10] 黄月琪, 邹文进. 多西环素对 TGF- β 1 诱导的人角膜基质细胞纤维化的抑制作用[J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(3): 430—435.
- [11] 阿布都扎依尔·买买提, 马吾浪·乌布利艾拉, 阿衣吐拉. 虾青素对颈动脉粥样硬化大鼠脂代谢和氧化应激及炎症反应的影响与作用机制[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2023, 25(8): 866—869.
- [12] 王书惠, 高丹, 王栋, 等. 上中下通用痛风方对痛风性关节炎大鼠 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路的影响[J]. *中医药信息*, 2024, 41(5): 19—23.
- [13] 齐鑫, 张晓刚, 于海洋, 等. HMGB1 在调节骨关节炎软骨细胞功能中的作用机制[J]. *协和医学杂志*, 2024, 15(1): 141—146.
- [14] XU H, ZHANG B, CHEN Y, *et al.* Type II collagen facilitates gouty arthritis by regulating MSU crystallisation and inflammatory cell recruitment[J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(3): 416—427.
- [15] CAO Y. Icaritin alleviates MSU-induced rat GA models through NF- κ B/NALP3 pathway[J]. *Cell Biochem Funct*, 2021, 39(3): 357—366. (收稿日期 2024-08-01; 本文编辑 孟海峰)