

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1621-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240616

小白菊内酯通过抑制 Piezo1 表达对机械牵张应力作用下软骨细胞凋亡的影响及其机制

马旋¹, 杨开祥², 邓海², 黄玉成¹

(1. 湖北省武汉市第四医院创伤骨科, 湖北 武汉 430030; 2. 湖北省武汉市第四医院关节外科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] **目的:** 探讨小白菊内酯 (PTL) 通过调控机械敏感性离子通道蛋白 1 (Piezo1) 表达对机械牵张应力作用下软骨细胞凋亡的影响, 并阐明其相关作用机制。**方法:** 按照拉伸性变量将软骨细胞分为 0%、5%、10%、15% 和 20% 拉伸组。另取软骨细胞, 分为对照组、20% 拉伸组、20% 拉伸 + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组、20% 拉伸 + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组和 20% 拉伸 + 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组。使用 Piezo1 短发夹 RNA (shRNA) 干扰慢病毒 (sh-Piezo1) 或 shRNA-NC 慢病毒感染软骨细胞, 将软骨细胞分为 sh-Piezo1 组和 sh-NC 组, 另设置空白对照组。另将软骨细胞分为 20% 拉伸组、20% 拉伸 + PTL 组、20% 拉伸 + sh-Piezo1 组和 20% 拉伸 + sh-Piezo1 + PTL 组。Hoechst 33258 荧光染色观察各组细胞核形态表现, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 分光光度法检测各组细胞中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-3 活性, CCK-8 法检测各组细胞增殖率, Fluo-4/AM 荧光探针法检测各组细胞中钙离子 (Ca^{2+}) 水平, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞中 Piezo1 mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组细胞中 Piezo1 蛋白表达水平。**结果:** Hoechst 33258 荧光染色观察, 随着拉伸量逐渐增加, 0%、5%、10%、15% 和 20% 拉伸组软骨细胞细胞核呈碎块状致密浓染的软骨细胞数量逐渐增加。流式细胞术检测, 与 0% 拉伸组比较, 5%、10%、15% 和 20% 拉伸组软骨细胞凋亡率均明显升高 ($P < 0.01$); 与对照组比较, 20% 拉伸组软骨细胞中细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与 20% 拉伸组比较, 20% 拉伸 + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组、20% 拉伸 + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组和 20% 拉伸 + 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组软骨细胞细胞凋亡率均明显降低 ($P < 0.05$); 与 20% 拉伸组比较, 20% 拉伸 + PTL 组和 20% 拉伸 + sh-Piezo1 组软骨细胞凋亡率均明显降低 ($P < 0.05$)。分光光度法检测, 与 0% 拉伸组表示, 5%、10%、15% 和 20% 拉伸组软骨细胞中 Caspase-3 活性均明显升高 ($P < 0.01$); 与对照组比较, 20% 拉伸组软骨细胞中 Caspase-3 活性明显升高 ($P < 0.05$); 与 20% 拉伸组比较, 20% 拉伸 + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组、20% 拉伸 + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组和 20% 拉伸 + 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组软骨细胞中 Caspase-3 活性均明显降低 ($P < 0.05$); 与 20% 拉伸组比较, 20% 拉伸 + PTL 组和 20% 拉伸 + sh-Piezo1 组软骨细胞中 Caspase-3 活性均明显降低 ($P < 0.05$)。CCK-8 法检测, 与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组比较, 40.00、80.00 和 160.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组软骨细胞增殖率均明显降低 ($P < 0.05$), 提示 20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 为最高无毒性作用浓度。Fluo-4/AM 荧光探针法检测, 与对照组比较, 20% 拉伸组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 20% 拉伸组比较, 20% 拉伸 + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组、20% 拉伸 + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组和 20% 拉伸 + 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与 20% 拉伸组比较, 20% 拉伸 + PTL 组和 20% 拉伸 + sh-Piezo1 组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平均明显降低 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 法检测, 与空白对照组和 sh-NC 组比较, sh-Piezo1 组软骨细胞中 Piezo1 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。Western blotting 法检测, 与对照组比较, 20% 拉伸组软骨细胞中 Piezo1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 20% 拉伸组比较, 20% 拉伸 + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组、20% 拉伸 + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组和 20% 拉伸 + 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 组软骨细胞中 Piezo1 蛋白表

[收稿日期] 2023-12-31

[基金项目] 湖北省卫健委青年人才项目 (WJ2021Q002)

[作者简介] 马旋 (1990—), 男, 湖北省武汉市人, 住院医师, 医学硕士, 主要从事骨创伤微创治疗基础方面的研究。

[通信作者] 黄玉成, 副主任医师 (E-mail: ehyc836@163.com)

达水平均明显降低 ($P<0.05$); 与空白对照组和 sh-NC 组比较, sh-Piezo1 组软骨细胞中 Piezo1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。 **结论:** PTL 可抑制高强度周期性机械牵张应力诱导的软骨细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制 Piezo1 介导 Ca^{2+} 内流引起的细胞凋亡有关。

[关键词] 小白菊内酯; 机械敏感离子通道蛋白1; 机械牵张应力; 软骨细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R681.3 [文献标志码] A

Effect of parthenolide on apoptosis of chondrocyte under mechanical stretch stress by inhibiting Piezo1 expression and its mechanism

MA Xuan¹, YANG Kaixiang², DENG Hai², HUANG Yucheng¹

(1. Department of Orthopedic Trauma, NO.4 Hospital, Wuhan City, Hubei Province, Wuhan 430030, China;

2. Department of Articular Surgery, NO.4 Hospital, Wuhan City, Hubei Province, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of parthenolide (PTL) on the apoptosis of the chondrocytes under mechanical stretch stress by regulating the expression of piezo type mechanosensitive ion channel component 1 (Piezo1), and to clarify the related mechanism. **Methods:** The chondrocytes were divided into 0%, 5%, 10%, 15%, and 20% stretch groups according to the stretch variable. Additionally, the chondrocytes were divided into control group, 20% stretch group, 20% stretch+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, 20% stretch+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, and 20% stretch+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group. The Piezo1 short hairpin RNA (shRNA) interference lentivirus (sh-Piezo1) or shRNA-NC lentivirus were used to infect the chondrocytes, and the chondrocytes were divided into sh-Piezo1 group and sh-NC group, and also set up blank control group. The chondrocytes were also divided into 20% stretch group, 20% stretch+PTL group, 20% stretch+sh-Piezo1 group, and 20% stretch+sh-Piezo1+PTL group. Hoechst 33258 fluorescence staining was used to observe the morphology of the nuclear in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; spectrophotometry was used to detect the cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase)-3 activities in the cells in various groups; CCK-8 method was used to detect the proliferation rates of the cells in various groups; Fluo-4/AM fluorescent probe method was used to detect the calcium ion (Ca^{2+}) levels in the cells in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of Piezo1 mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of Piezo1 protein in the cells in various groups. **Results:** The Hoechst 33258 fluorescence staining results showed that as the increasing of stretch, the number of the chondrocytes with fragmented and densely stained nuclei in 0%, 5%, 10%, 15%, and 20% stretch groups were gradually increased. The flow cytometry results showed that compared with 0% stretch group, the apoptotic rates of the chondrocytes in 5%, 10%, 15%, and 20% stretch groups were significantly increased ($P<0.01$); compared with control group, the apoptotic rate of the chondrocytes in 20% stretch group was significantly increased ($P<0.05$); compared with 20% stretch group, the apoptotic rates of the chondrocytes in 20% stretch+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, 20% stretch+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, and 20% stretch+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group were significantly decreased ($P<0.05$); compared with 20% stretch group, the apoptotic rates of chondrocytes in 20% stretch+PTL group and 20% stretch+sh-Piezo1 group were significantly decreased ($P<0.05$). The spectrophotometry results showed that compared with 0% stretch group, the Caspase-3 activities in the chondrocytes in 5%, 10%, 15%, and 20% stretch groups were significantly increased ($P<0.01$); compared with control group, the Caspase-3 activity in the chondrocytes in 20% stretch group was

significantly increased ($P < 0.05$); compared with 20% stretch group, the Caspase-3 activities in the chondrocytes in 20% stretch+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, 20% stretch+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, and 20% stretch+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with 20% stretch group, the Caspase-3 activities in the chondrocytes in 20% stretch+PTL group and 20% stretch+sh-Piezo1 group were significantly decreased ($P < 0.05$). The CCK-8 method results showed that compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, the proliferation rates of the chondrocytes in 40.00, 80.00, and 160.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL groups were significantly decreased ($P < 0.05$), indicating that 20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL was the maximum non-toxic concentration. The Fluo-4/AM fluorescent probe method results showed that compared with control group, the Ca^{2+} level in the chondrocytes in 20% stretch group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with 20% stretch group, the Ca^{2+} levels in the chondrocytes in 20% stretch+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, 20% stretch+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, and 20% stretch+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with 20% stretch group, the Ca^{2+} levels in the chondrocytes in 20% stretch+PTL group and 20% stretch+sh-Piezo1 group were significantly decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with blank control group and sh-NC group, the expression level of Piezo1 mRNA in the chondrocytes in sh-Piezo1 group was significantly decreased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of Piezo1 protein in the chondrocytes in 20% stretch group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with 20% stretch group, the expression levels of Piezo1 protein in the chondrocytes in 20% stretch+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, 20% stretch+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group, and 20% stretch+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with blank control group and sh-NC group, the expression level of Piezo1 protein in the chondrocytes in sh-Piezo1 group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** PTL can inhibit the apoptosis of the chondrocyte induced by high-intensity cyclic mechanical stretch stress, and its mechanism may be related to inhibiting the Piezo1-mediated Ca^{2+} influx-induced apoptosis.

KEYWORDS Parthenolide; Piezo type mechanosensitive ion channel component 1; Mechanical stretch stress; Chondrocytes; Apoptosis

骨关节炎是一种非炎症性的退行性关节病, 患者行动过程中会引发关节疼痛和僵硬, 其生活质量受到严重影响^[1-2]。骨关节炎发病机制复杂, 机械负荷是其发展过程中的重要因素之一。适度机械负荷能促进软骨细胞生长发育, 增强细胞合成代谢。但过度机械负荷会导致软骨细胞凋亡, 进而引发软骨细胞丢失和骨关节炎发生^[3]。因此, 抑制过度机械负荷后软骨细胞的凋亡是防治骨关节炎的关键。机械敏感性离子通道蛋白 1 (piezo type mechanosensitive ion channel component 1, Piezo1) 是一种机械敏感性离子通道蛋白, 可感受细胞膜机械力的变化, 包括压缩、拉伸、重力和流体剪切等, 通过增强钙离子 (calcium ion, Ca^{2+}) 内流改变膜电位进而将胞外机械信号转化为胞内生物信号, 参与调节发育、肿瘤发生和骨重塑等多种细胞生命进程^[4-6]。然而, 过度的机械应力刺激可导致 Piezo1 高表达, 造成 Ca^{2+} 大量内流, 引起细胞凋亡。陈墨龙等^[7]发现: 过度机械牵拉应力通过激

活 Piezo1 和下游需钙蛋白酶 2 (calpain 2, CAPN2) /B 细胞淋巴瘤 2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2-associated X protein, BAX) /含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase)-3 通路诱导肌腱细胞凋亡。WANG 等^[8]发现: Piezo1 在小鼠骨关节炎模型和机械牵张应力作用下的人软骨细胞模型中高表达, 抑制其表达可降低 Ca^{2+} 水平并上调谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 表达, 从而减少小鼠骨关节炎程度和人软骨细胞凋亡水平。Piezo1 可能是治疗机械性骨关节炎的潜在靶点。小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 是一种倍半萜烯内酯类天然产物, 来源于艾菊和观光木等药用植物, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎和抗动脉粥样硬化等多种重要的药理活性, 临床上常用于治疗偏头痛、发热和类风湿性关节炎等^[9]。研究^[10-11]发现: PTL 可通过抗炎途径发挥改善膝骨关节炎模型动物关节损伤的作用。然而, PTL 与 Piezo1 的关系

及其对高强度的机械牵张应力作用下软骨细胞凋亡的影响尚未完全阐明。本研究探讨PTL对机械牵张应力作用下软骨细胞中Piezo1的调控作用及干扰Piezo1对细胞凋亡的影响,并阐明其相关作用机制,为骨关节炎的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 永生化人关节软骨细胞及其专用培养液购自上海康朗生物科技有限公司。4%多聚甲醛固定液、Hoechst 33258染色液、Caspase-3活性检测试剂盒和Ca²⁺荧光探针(Fluo-4/AM)购自上海碧云天生物技术有限公司,PTL购自美国MCE公司,CCK-8检测试剂盒和Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司,Piezo1抗体购自美国ThermoFisher Scientific公司,GAPDH抗体购自武汉爱博泰克生物技术有限公司,Piezo1引物、Piezo1短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)干扰慢病毒(sh-Piezo1,滴度:3.12×10⁸ TU·mL⁻¹)及其阴性对照慢病毒(shRNA-NC,滴度:1.36×10⁸ TU·mL⁻¹)由上海和元生物技术有限公司提供。张力系统(型号:Flexcell-5000)购自美国Flexcell公司,CO₂培养箱(型号:311)和化学发光成像系统(型号:CL750)购自美国ThermoFisher Scientific公司,倒置荧光显微镜(型号:CKX41)购自日本Olympus公司,流式细胞仪(型号:FACSCto II)购自美国BD公司,多功能酶标仪(型号:HH34000000)购自美国Perkinelmer公司。

1.2 细胞培养 永生化人关节软骨细胞采用专用培养液置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,待细胞密度生长至90%时,弃去培养基,加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗1次,加入1 mL胰蛋白酶室温消化2 min,待大部分细胞变圆脱落后,加入2 mL软骨细胞专用培养液终止消化,收集细胞离心后分瓶培养并用于后续实验。

1.3 慢病毒感染 收集对数生长期软骨细胞,以每孔1×10⁵个细胞的密度接种至6孔细胞培养板,置于培养箱中过夜。以病毒感染复数200加入64.1 mL sh-Piezo1或147.1 μL shRNA-NC慢病毒,将细胞分为sh-Piezo1组和sh-NC组,另设置空白对照组。同时,加入5 mg·L⁻¹ Polybrene促进病毒感染,8 h后更换新鲜培养液继续培养,72 h后收集细胞进行后续检测。

1.4 周期性机械牵张应力刺激细胞 取对数生长期软骨细胞,按照每孔1×10⁵个细胞的密度接种于6孔细胞培养板中,待细胞生长至约80%融合度时,采用Flexcell-5000张力系统对软骨细胞进行周期性机械拉伸^[4],以3 s受力和3 s放松为1个周期,进行机械拉伸,频率设置为0.5 Hz,拉伸性变量为5%~20%,拉伸36 h。

1.5 细胞分组和处理 按照拉伸性变量将软骨细胞分为0%、5%、10%、15%和20%拉伸组。另取软骨细胞,分为对照组、20%拉伸组、20%拉伸+5 μmol·L⁻¹ PTL组、20%拉伸+10 μmol·L⁻¹ PTL组和20%拉伸+20 μmol·L⁻¹ PTL组。其中对照组不作任何处理;20%拉伸组软骨细胞给予拉伸性变量为20%的周期性机械牵张应力刺激36 h;20%拉伸+5 μmol·L⁻¹ PTL组、20%拉伸+10 μmol·L⁻¹ PTL组和20%拉伸+20 μmol·L⁻¹ PTL组软骨细胞在20%拉伸的基础上分别给予5、10及20 μmol·L⁻¹ PTL处理。

另取软骨细胞,将其分为20%拉伸组、20%拉伸+PTL组、20%拉伸+sh-Piezo1组和20%拉伸+sh-Piezo1+PTL组。其中20%拉伸+PTL组软骨细胞进行拉伸性变量为20%的周期性机械牵张应力刺激36 h,同时给予20 μmol·L⁻¹ PTL;20%拉伸+sh-Piezo1组软骨细胞感染sh-Piezo1慢病毒后再进行拉伸性变量为20%的周期性机械牵张应力刺激36 h处理;20%拉伸+sh-Piezo1+PTL组软骨细胞感染sh-Piezo1慢病毒后再进行拉伸性变量为20%的周期性机械牵张应力刺激和20 μmol·L⁻¹ PTL干预36 h。

1.6 Hoechst 33258荧光染色观察各组细胞核形态表现 取对数生长期软骨细胞,以每孔3×10⁴个细胞的密度接种至6孔细胞培养板,置于培养箱中过夜,给予拉伸性变量为0%~20%的周期性机械牵张应力刺激36 h。取出培养板,经4%多聚甲醛固定液室温固定10 min, PBS缓冲液清洗3次,每孔加入500 μL Hoechst 33258染色液,室温避光孵育5 min, PBS缓冲液清洗3次,荧光显微镜观察细胞核形态表现。

1.7 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 收集各组细胞,加入400 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞,加入5 μL Annexin V-FITC染色液,轻轻吹打混匀,再加入10 μL PI染色液,轻轻吹打混匀,室温(20℃~25℃)避光孵育20 min,采用流式细胞

仪检测细胞凋亡率。细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.8 分光光度法检测各组细胞中Caspase-3活性

收集各组细胞, PBS缓冲液清洗1次, 加入100 μL裂解液于冰上裂解15 min, 4 °C、20 000 g离心10 min, 取上清, 参照Caspase-3活性检测试剂盒检测说明书操作, 同时设置标准品组。采用酶标仪检测波长405 nm处吸光度(A)值, 根据标准品A值和标准品浓度绘制标准曲线, 计算各组细胞中Caspase-3活性。Caspase-3活性=实验孔A值/对照孔A值。

1.9 CCK-8法检测各组细胞增殖率 收集对数生长期软骨细胞, 以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种至96孔细胞培养板中, 置于培养箱中过夜。给予0、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00和160.00 μmol·L⁻¹ PTL处理36 h, 并设置空白孔, 提前4 h取出培养板, 每孔加入10 μL CCK-8工作液, 37 °C孵育4 h, 采用多功能酶标仪检测波长450 nm处A值。细胞增殖率= [(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值)] ×100%。

1.10 Fluo-4/AM荧光探针法检测各组细胞中Ca²⁺水平 收集各组细胞, PBS缓冲液清洗3次, 加入500 μL 1 μmol·L⁻¹ Fluo-4/AM工作液, 37 °C避光孵育45 min, PBS缓冲液清洗3次, 流式细胞仪检测细胞中Fluo-4荧光强度, 以Fluo-4荧光强度代表细胞中Ca²⁺水平。

1.11 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组细胞中Piezo1 mRNA表达水平 收集各组细胞, 加入TRIzol裂解液, 于冰上提取总RNA。多功能酶标仪检测RNA浓度, 逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA并扩增。以β-actin为内参, 采用2^{-ΔΔCt}法计

算Piezo1 mRNA表达水平。引物序列: Piezo1 F 5'-ATCGCCATCATCTGGTTCCC-3', R 5'-TGG-TGAACAGCGGCTCATAG-3'; β-actin F 5'-GC-CGCCAGCTCACCAT-3', R 5'-TCGTCGCCC-ACATAGGAATC-3'。反应条件: 95 °C预变性5 min, 95 °C、10 s, 60 °C、30 s, 共40次循环。

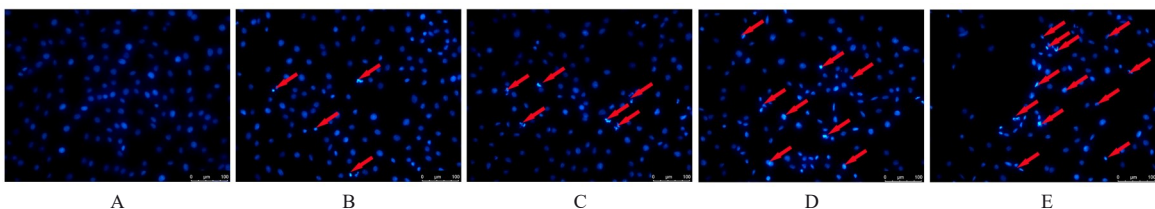
1.12 Western blotting法检测各组细胞中Piezo1蛋白表达水平

收集各组细胞, 加入RIPA裂解液, 冰上孵育30 min提取总蛋白, 4 °C、12 000 r·min⁻¹离心5 min收集上清, 金属浴煮沸10 min。采用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度, 每组细胞取30 μg蛋白上样、电泳和转膜处理后, 50 g·L⁻¹脱脂奶粉室温孵育1 h, 加入Piezo1抗体(1:1 000)和β-actin(1:10 000)抗体4 °C孵育过夜, TBST溶液清洗3次, 加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育1 h, 滴加显影液, 凝胶成像仪显影。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/β-actin蛋白条带灰度值。

1.13 统计学分析 使用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析。各组细胞凋亡率、细胞增殖率、细胞中Ca²⁺水平、Caspase-3活性和Piezo1 mRNA及蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组软骨细胞核形态表现 凋亡细胞的细胞核呈致密浓染或呈碎块状致密浓染, 荧光亮度增强。随着拉伸量逐渐增加, 0%、5%、10%、15%和20%拉伸组软骨细胞的细胞核呈碎块状致密浓染的软骨细胞数量逐渐增加。见图1。



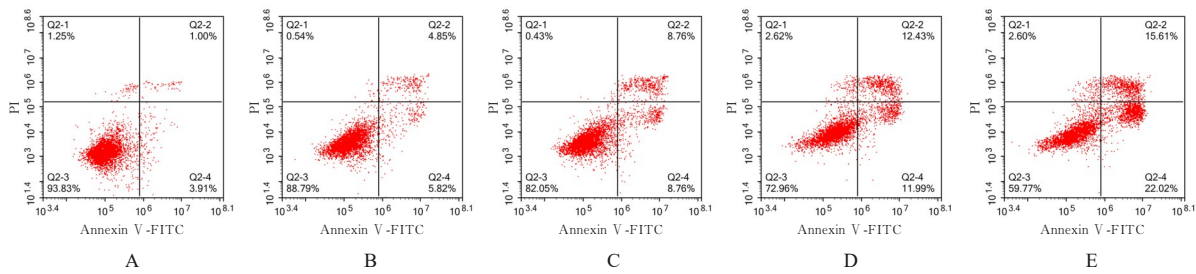
Red arrows showed apoptotic cells. A: 0% stretch group; B: 5% stretch group; C: 10% stretch group; D: 15% stretch group; E: 20% stretch group.

图1 Hoechst 33258染色观察软骨细胞核形态表现(×100)

Fig. 1 Morphology of nuclear in chondrocytes in various groups observed by Hoechst 33258 staining(×100)

2.2 各组软骨细胞凋亡率 与0%拉伸组比较, 5%、10%、15%和20%拉伸组软骨细胞凋亡率均明显升高 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 20%拉伸组软骨细胞中细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与20%拉伸组比较, 20%拉伸+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组、20%拉伸+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组和20%拉伸+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组软骨细胞细胞凋亡率均明显降

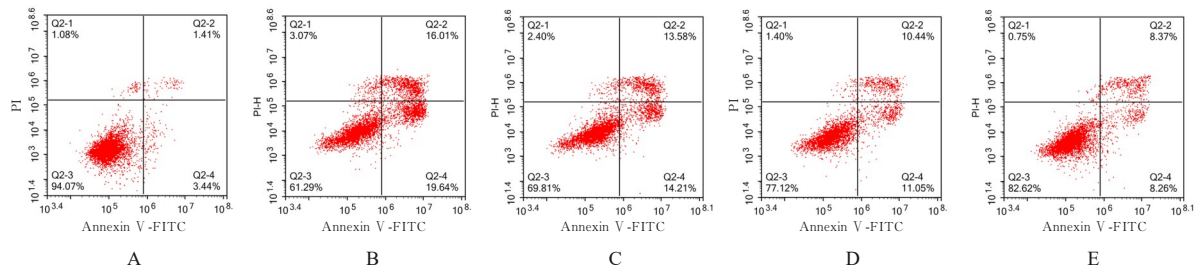
低 ($P < 0.05$)。与20%拉伸组 ($36.36\% \pm 2.61\%$) 比较, 20%拉伸+PTL组 ($18.80\% \pm 1.41\%$) 和20%拉伸+sh-Piezo1组 ($11.34\% \pm 2.49\%$) 软骨细胞凋亡率均明显降低 ($P < 0.05$); 与20%拉伸+sh-Piezo1组比较, 20%拉伸+sh-Piezo1+PTL组 ($11.86\% \pm 2.17\%$) 软骨细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图2~6。



A: 0% stretch group; B: 5% stretch group; C: 10% stretch group; D: 15% stretch group; E: 20% stretch group.

图2 流式细胞术检测周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞凋亡率

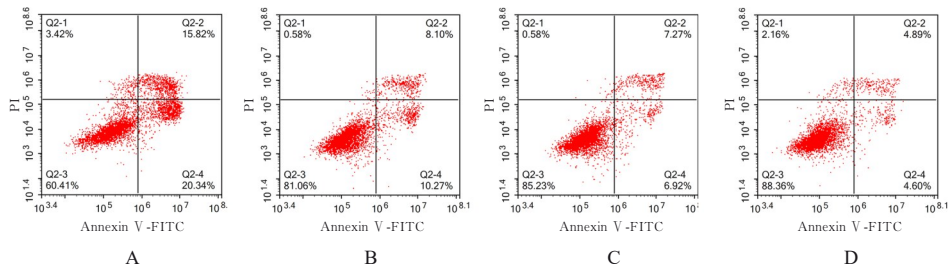
Fig. 2 Apoptotic rates of chondrocytes in various groups after treated with cyclic mechanical distraction stress detected by flow cytometry



A: Control group; B: 20% stretch group; C: 20% stretch+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group; D: 20% stretch+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group; E: 20% stretch+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group.

图3 流式细胞术检测 PTL 联合周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞凋亡率

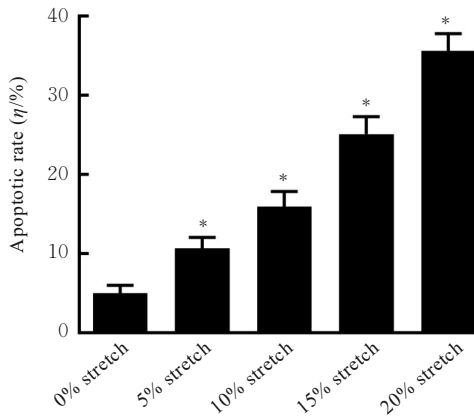
Fig. 3 Apoptotic rates of chondrocytes in various groups after treated with PTL combined with cyclic mechanical distraction stress detected by flow cytometry



A: 20% stretch group; B: 20% stretch+PTL group; C: 20% stretch+sh-Piezo1 group; D: 20% stretch+sh-Piezo1+PTL group.

图4 流式细胞术检测慢病毒感染后各组软骨细胞凋亡率

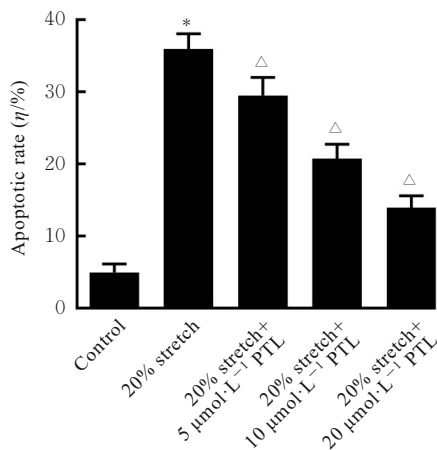
Fig. 4 Apoptotic rates of chondrocytes in various groups after infection of lentivirus detected by flow cytometry



* $P < 0.01$ compared with 0% stretch group.

图5 周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞凋亡率

Fig. 5 Apoptotic rates of chondrocytes in various groups after treated with cyclic mechanical distraction stress



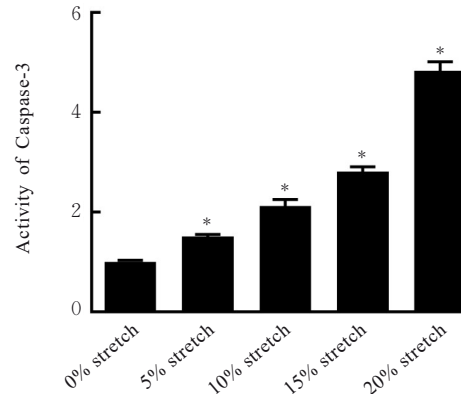
* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with 20% stretch group.

图6 PTL联合周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞凋亡率

Fig. 6 Apoptotic rates of chondrocytes in various groups after treated with PTL combined with cyclic mechanical distraction stress

2.3 各组软骨细胞中 Caspase-3 活性 与0%拉伸组比较, 5%、10%、15%和20%拉伸组软骨细胞中 Caspase-3 活性均明显升高 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 20%拉伸组软骨细胞中 Caspase-3 活性明显升高 ($P < 0.05$); 与20%拉伸组比较, 20%拉伸+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组、20%拉伸+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组和20%拉伸+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组软骨细胞中 Caspase-3 活性均明显降低 ($P < 0.05$)。与20%拉伸组比较, 20%拉伸+PTL组和20%拉伸+

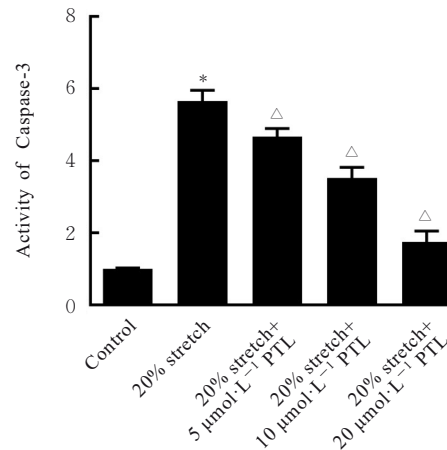
sh-Piezo1组软骨细胞中 Caspase-3 活性均明显降低 ($P < 0.05$), 20%拉伸+sh-Piezo1+PTL组软骨细胞中 Caspase-3 活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与20%拉伸+sh-Piezo1组比较, 20%拉伸+sh-Piezo1+PTL组软骨细胞中 Caspase-3 活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图7~9。



* $P < 0.01$ compared with 0% stretch group.

图7 周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞中 Caspase-3 活性

Fig. 7 Activities of in Caspase-3 in chondrocytes in various groups after treated with cyclic mechanical distraction stress

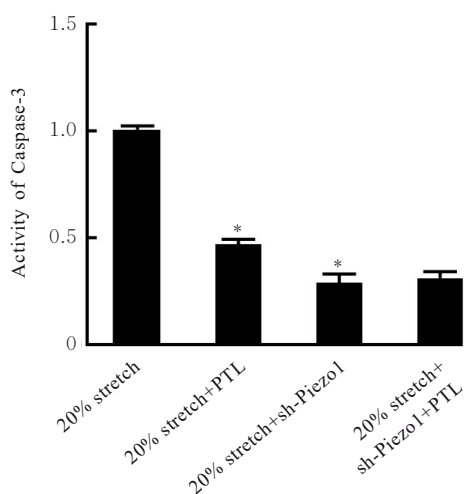


* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with 20% stretch group.

图8 PTL联合周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞中 Caspase-3 活性

Fig. 8 Activities of Caspase-3 in chondrocytes in various groups after treated with PTL combined with cyclic mechanical distraction stress

2.4 各组软骨细胞增殖率 与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组比较, 1.25、2.50、5.00、10.00和20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



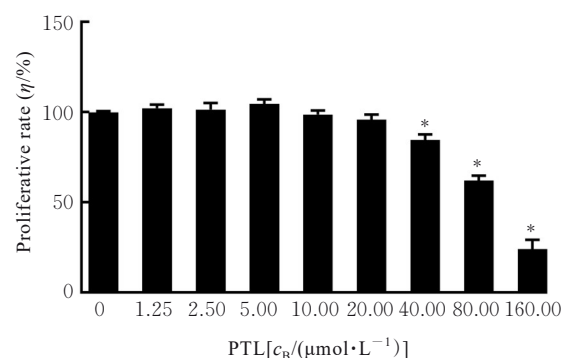
* $P < 0.05$ compared with 20% stretch group.

图9 慢病毒感染后各组软骨细胞中Caspase-3活性

Fig. 9 Activities of Caspase-3 in chondrocytes in various groups after infection of lentivirus

PTL组软骨细胞增殖率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 40.00、80.00和160.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组软骨细胞增殖率均明显降低 ($P < 0.05$), 提示20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL为最高无毒性作用浓度。见图10。

2.5 各组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平 与对照组比较, 20%拉伸组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平升高 ($P < 0.05$); 与20%拉伸组比较, 20%拉伸+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组、

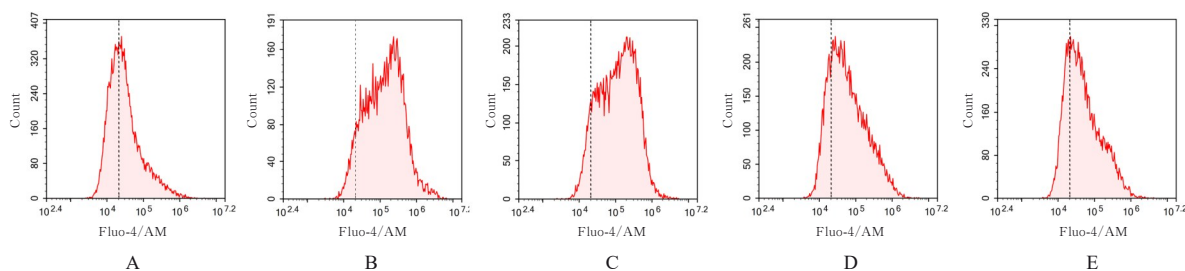


* $P < 0.05$ compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group.

图10 PTL联合周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞增殖率

Fig. 10 Proliferation rates of chondrocytes in various groups after treated with PTL combined with cyclic mechanical distraction stress

20%拉伸+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组和20%拉伸+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与20%拉伸组比较, 20%拉伸+PTL组和20%拉伸+sh-Piezo1组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平均明显降低 ($P < 0.05$), 20%拉伸+sh-Piezo1+PTL组软骨细胞中Caspase-3活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与20%拉伸+sh-Piezo1组比较, 20%拉伸+sh-Piezo1+PTL组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图11~14。



A: Control group; B: 20% stretch group; C: 20% stretch+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group; D: 20% stretch+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group; E: 20% stretch+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL group.

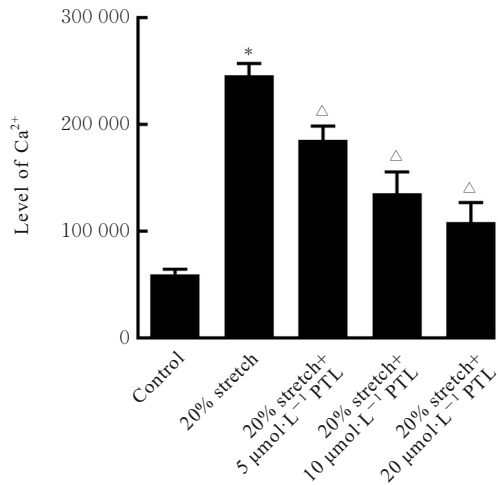
图11 Fluo-4/AM荧光探针法检测PTL联合周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞中 Ca^{2+} 水平

Fig. 11 Levels of Ca^{2+} in chondrocytes in various groups after treated with PTL combined with cyclic mechanical distraction stress detected by Fluo-4/AM fluorescence probe method

2.6 各组细胞中Piezo1 mRNA表达水平 与空白对照组 (0.99 ± 0.03) 和 sh-NC组 (0.95 ± 0.05) 比较, sh-Piezo1组软骨细胞中Piezo1 mRNA表达水平 (0.20 ± 0.08) 明显降低 ($P < 0.05$)。

2.7 各组软骨细胞中Piezo1蛋白表达水平 与对照组比较, 20%拉伸组软骨细胞中Piezo1蛋白表

达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与20%拉伸组比较, 20%拉伸+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组、20%拉伸+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组和20%拉伸+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL组软骨细胞中Piezo1蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与空白对照组 (0.43 ± 0.05) 和 sh-NC组 (0.42 ± 0.06) 比较, sh-Piezo1组软骨



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with 20% stretch group.

图12 PTL联合周期性机械牵张应力作用后各组软骨细胞中Ca²⁺水平

Fig. 12 Levels of Ca²⁺ in chondrocytes in various groups after treated with PTL combined with cyclic mechanical distraction stress

细胞中Piezo1蛋白表达水平(0.07±0.03)明显降低($P < 0.05$),提示软骨细胞中Piezo1基因表达被成功干扰。见图15和16。

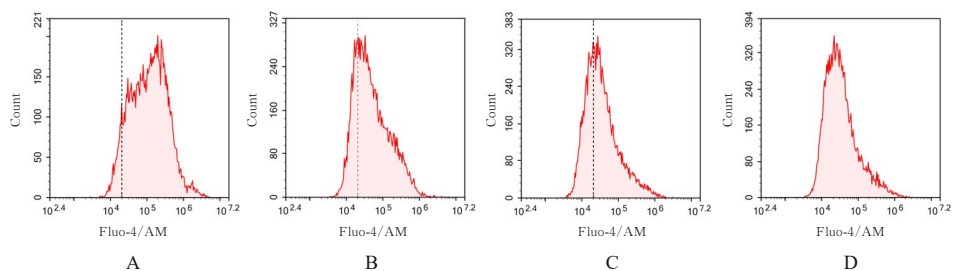
3 讨论

研究^[12]显示:机械负荷过高诱导的软骨细胞凋亡是诱发骨关节炎的因素之一,长期从事体力劳动人群、肥胖人群及运动员关节长期受到过度负荷,更易导致关节炎。CHANG等^[13]发现:过度的机械负荷会通过DAN结构域BMP拮抗剂家族成员1(DAN domain BMP antagonist family member 1, gremlin-1)/核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)途径促进小鼠骨关节炎发展。ZHAO等^[14]

发现:机械超负荷诱导的微小RNA(microRNAs, miR)-325-3p表达水平降低可促进软骨细胞衰老,加剧小关节退变。伍伟挺等^[15]发现:高负荷周期性机械应力可能通过激活内质网应激通路加速软骨细胞凋亡,促进软骨细胞炎症反应。本研究结果显示:在体外培养的软骨细胞中,周期性机械牵张应力可明显诱导软骨细胞凋亡,并上调Piezo1表达。PTL和干扰Piezo1基因表达均可抑制周期性机械牵张应力诱导的软骨细胞凋亡,同时抑制Ca²⁺内流,提示PTL在周期性机械牵张应力介导的软骨细胞凋亡的作用和机制,可能为骨关节炎临床治疗提供新方向。

Piezo1是机械敏感离子通道蛋白,其参与肿瘤细胞、肌腱细胞和软骨细胞等多种细胞机械负荷诱导的凋亡进程^[7, 16-17]。Piezo1在软骨细胞中稳定表达,不仅可以通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)的经典MAPK信号通路参与细胞凋亡过程,还可介导机械刺激下Ca²⁺内流,维持细胞内游离Ca²⁺和结合钙动态平衡^[18]。过度机械负荷可激活Piezo1介导细胞内Ca²⁺超载,导致线粒体呼吸功能障碍及内质网应激,从而启动Caspase级联反应,进而诱导细胞凋亡^[19-20]。因此,下调Piezo1表达可能抑制胞内Ca²⁺超载增强软骨细胞机械负载的抵抗阈值,促进细胞活性,从而改善骨关节炎。本研究结果显示:干扰Piezo1基因表达可抑制周期性机械牵张应力诱导的软骨细胞凋亡,并降低细胞内Ca²⁺水平,提示Piezo1激活介导Ca²⁺超载是周期性机械牵张应力诱导软骨细胞凋亡的关键因素。

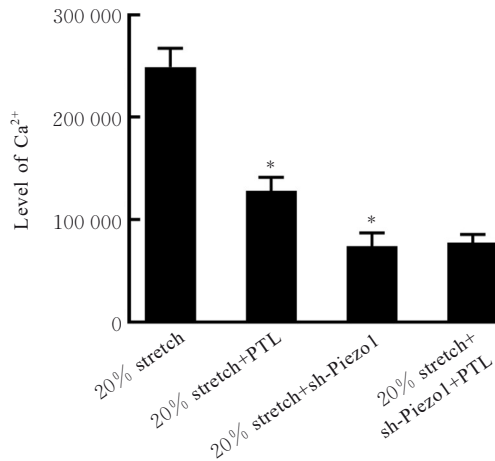
PTL来源于药草短舌匹菊的倍半萜内酯,具有抗炎、抗病毒和抗肿瘤等药理作用。朱芳晓等^[21]



A:20% stretch group;B:20% stretch+PTL group;C:20% stretch+sh-Piezo1 group;D:20% stretch+sh-Piezo1+PTL group.

图13 Fluo-4/AM荧光探针法检测慢病毒感染后各组软骨细胞中Ca²⁺水平

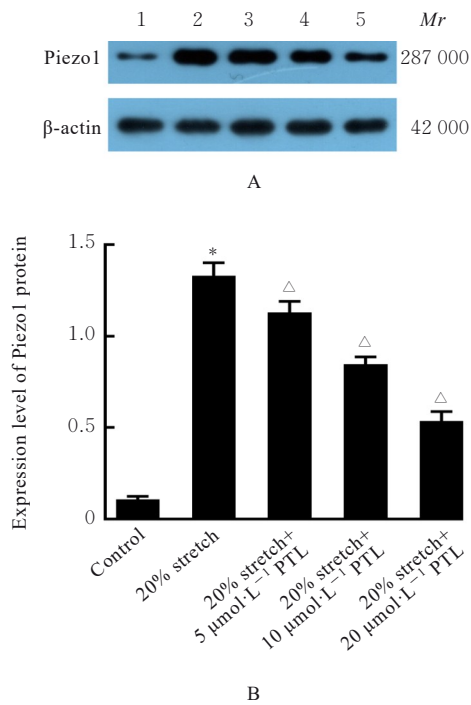
Fig. 13 Levels of Ca²⁺ in chondrocytes in various groups after infection of lentivirus detected by Fluo-4/AM fluorescence probe method



* $P < 0.05$ compared with 20% stretch group.

图14 慢病毒感染后各组软骨细胞中Ca²⁺水平

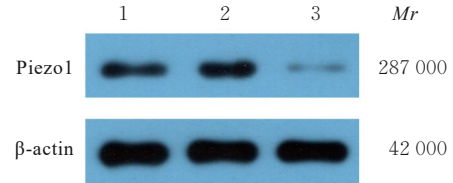
Fig. 14 Levels of Ca²⁺ in chondrocytes in various groups after infection of lentivirus



Lane 1: Control group; Lane 2: 20% stretch group; Lane 3: 20% stretch+5 μmol·L⁻¹ PTL group; Lane 4: 20% stretch+10 μmol·L⁻¹ PTL group; Lane 5: 20% stretch+20 μmol·L⁻¹ PTL group. * $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with 20% stretch group.

图15 各组软骨细胞中Piezo1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 15 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of Piezo1 protein in chondrocytes in various groups after treated with PTL combined with cyclic mechanical distraction stress



Lane 1: Blank control group; Lane 2: Sh-NC group; Lane 3: Sh-Piezo1 group.

图16 Western blotting法检测各组软骨细胞中Piezo1蛋白表达电泳图

Fig. 16 Electrophoregram of expressions of Piezo1 protein in chondrocytes in various groups detected by Western blotting method

发现: PTL可减轻兔骨关节炎症状,可能是通过抑制血清和关节腔肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)和白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)等炎症因子分泌实现的。LIU等^[10]发现: Piezo1可抑制促炎细胞因子的产生,并对胶原诱导的大鼠关节炎的进展表现出保护作用。然而,高强度的机械牵张应力被认为是导致骨关节炎的重要外界致病因素,但PTL对高强度的机械牵张应力作用下软骨细胞凋亡的影响尚未完全阐明。本研究结果显示: PTL可以有效抑制周期性机械牵张应力诱导的软骨细胞凋亡,并下调细胞中Piezo1表达,同时降低软骨细胞中Ca²⁺水平和Caspase-3活性,而在Piezo1基因沉默的软骨细胞中加入PTL干预后,并未进一步抑制周期性机械牵张应力诱导的软骨细胞凋亡,提示PTL通过调控Piezo1表达,发挥抑制周期性机械牵张应力诱导软骨细胞凋亡的作用。

综上所述,周期性机械牵张应力可通过调控Piezo1介导Ca²⁺超载促进软骨细胞凋亡,PTL可通过下调Piezo1表达降低细胞中Ca²⁺水平,进而抑制软骨细胞凋亡。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

马旋参与研究选题、数据收集整理和论文撰写,杨开祥参与实验操作,邓海参与数据统计学分析,黄玉成参与论文审校和指导。

[参考文献]

[1] EMAMI A, NAMDARI H, PARVIZPOUR F, et al. Challenges in osteoarthritis treatment [J]. Tissue Cell,

- 2023, 80: 101992.
- [2] YUE L D, BERMAN J. What is osteoarthritis? [J]. *JAMA*, 2022, 327(13): 1300.
- [3] FANG T S, ZHOU X H, JIN M C, et al. Molecular mechanisms of mechanical load-induced osteoarthritis[J]. *Int Orthop*, 2021, 45(5): 1125-1136.
- [4] LAI A, COX C D, CHANDRA SEKAR N, et al. Mechanosensing by Piezo1 and its implications for physiology and various pathologies[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2022, 97(2): 604-614.
- [5] LIU Y L, TIAN H T, HU Y X, et al. Mechanosensitive Piezo1 is crucial for periosteal stem cell-mediated fracture healing[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(10): 3961-3980.
- [6] CAI G H, LU Y H, ZHONG W J, et al. Piezo1-mediated M2 macrophage mechanotransduction enhances bone formation through secretion and activation of transforming growth factor- β 1[J]. *Cell Prolif*, 2023, 56(9): e13440.
- [7] 陈墨龙, 陈万, 唐康来. 过度机械拉伸应力通过Piezo1介导肌腱细胞凋亡的作用及机制研究[J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(10): 1040-1049.
- [8] WANG S Y, LI W W, ZHANG P F, et al. Mechanical overloading induces GPX4-regulated chondrocyte ferroptosis in osteoarthritis via Piezo1 channel facilitated calcium influx[J]. *J Adv Res*, 2022, 41: 63-75.
- [9] ZHU S P, SUN P, BENNETT S, et al. The therapeutic effect and mechanism of parthenolide in skeletal disease, cancers, and cytokine storm[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1111218.
- [10] LIU Q, ZHAO J, TAN R, et al. Parthenolide inhibits pro-inflammatory cytokine production and exhibits protective effects on progression of collagen-induced arthritis in a rat model[J]. *Scand J Rheumatol*, 2015, 44(3): 182-191.
- [11] WILLIAMS B, LEES F, TSANGARI H, et al. Assessing the effects of parthenolide on inflammation, bone loss, and glial cells within a collagen antibody-induced arthritis mouse model[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 6245798.
- [12] DELL' ISOLA A, ALLAN R, SMITH S L, et al. Identification of clinical phenotypes in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2016, 17(1): 425.
- [13] CHANG S H, MORI D, KOBAYASHI H, et al. Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1-NF- κ B pathway [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1442.
- [14] ZHAO J Y, LI C J, QIN T, et al. Mechanical overloading-induced miR-325-3p reduction promoted chondrocyte senescence and exacerbated facet joint degeneration[J]. *Arthritis Res Ther*, 2023, 25(1): 54.
- [15] 伍伟挺, 黎润光, 曹生鲁, 等. 过度周期性机械应力刺激可引起软骨细胞炎症反应及凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(29): 4608-4613.
- [16] YU J L, LIAO H Y. Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (Piezo1) in human cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111692.
- [17] GAO W, HASAN H, ANDERSON D E, et al. The role of mechanically-activated ion channels Piezo1, Piezo2, and TRPV4 in chondrocyte mechanotransduction and mechano-therapeutics for osteoarthritis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 885224.
- [18] 闫亮, 姜金, 万浪, 等. Piezo机械敏感性离子通道研究现状及其在骨与关节组织的研究进展[J]. *中国医学物理学杂志*, 2018, 35(8): 962-967.
- [19] TIWARY S, NANDWANI A, KHAN R, et al. GRP75 mediates endoplasmic reticulum-mitochondria coupling during palmitate-induced pancreatic β -cell apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(6): 101368.
- [20] LI Y, LI H Y, SHAO J, et al. GRP75 modulates endoplasmic reticulum-mitochondria coupling and accelerates Ca^{2+} -dependent endothelial cell apoptosis in diabetic retinopathy[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12): 1778.
- [21] 朱芳晓, 莫汉有, 陈建, 等. 小白菊内酯不同给药途径对兔膝关节关节炎的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(10): 1254-1257.