

建立软骨细胞铁过载模型及损伤机制

何琪^{1,2}, 潘兆丰^{1,2}, 陈柏豪^{1,2}, 杨均政^{1,2}, 黎少聪^{1,2}, 曾嘉旭^{1,2}, 周驰^{2,3}, 王海彬^{2,3}

https://doi.org/10.12307/2023.590

投稿日期: 2022-08-02

采用日期: 2022-09-18

修回日期: 2022-12-08

在线日期: 2023-01-19

中图分类号:

R459.9; R318; R681

文章编号:

2095-4344(2023)32-05126-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 铁过载是膝关节炎发展的重要原因

①使用枸橼酸铁铵进行软骨细胞铁过载模型构建, 比较不同的浓度梯度及干预时间对造模的影响, 进一步精确了软骨细胞铁过载模型的造模方案。

② 500 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度枸橼酸铁铵与软骨细胞共培养 48 h 可成功建立软骨细胞铁过载模型。

④铁过载导致关节软骨自身修复难度进一步加大, 该研究为进一步分析铁过载对软骨细胞的损伤机制以及探索治疗铁过载性关节炎的有效治疗药物奠定基础。

③铁过载会破坏线粒体功能, 增加细胞内活性氧水平, 软骨细胞的功能活性受损, 分泌 II 型胶原、聚集蛋白聚糖等基质成分的能力下降。

文题释义:

铁过载: 是由于人体缺乏排出多余铁的有效途径, 衰老、基因突变、膳食铁摄入、慢性输血等诸多危险因素会导致机体进行性和病理性铁超负荷, 引起器官、细胞的广泛受损。

氧化应激: 是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态, 也是自由基在体内产生的一种负面作用, 被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。

摘要

背景: 目前尚不清楚过量的铁是如何参与关节炎发病的, 研究铁过载参与关节炎发展的潜在机制可以为关节炎的治疗提供新的方向。

目的: 通过枸橼酸铁铵和软骨细胞共培养构建软骨细胞的铁过载模型, 观察在铁过载环境下对软骨细胞存活、铁沉积、氧化应激以及线粒体损伤的影响。

方法: 采用酶消化法提取 C57BL/6J 小鼠膝关节软骨细胞, 加入不同浓度 (100, 250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol/L}$) 的枸橼酸铁铵干预软骨细胞, 分别培养 24, 48, 72 h, 建立铁过载软骨细胞模型, 采用 CCK-8 法分析细胞活力变化, 钙黄绿素 AM 法测定细胞内铁含量, 筛选出后续实验组所用枸橼酸铁铵浓度; 采用荧光探针 DCFH-DA 染色检测活性氧水平, 以 JC-1 为荧光探针检测线粒体膜电位变化, 并通过实时定量荧光 PCR 和 Western blot 检测 II 型胶原、基质金属蛋白酶 3 和 13 的表达水平。

结果与结论: 500 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度枸橼酸铁铵与软骨细胞共培养 48 h 可成功建立软骨细胞铁过载模型。枸橼酸铁铵能够诱导软骨细胞内铁过载, 且铁过载会破坏线粒体功能, 增加细胞内活性氧的水平, 软骨细胞的功能活性受损, 分泌 II 型胶原、聚集蛋白聚糖等基质成分的能力下降, 导致关节软骨自身修复难度进一步加大, 这为今后进一步研究铁过载对软骨细胞的损伤机制以及探索治疗铁过载性关节炎的有效治疗药物奠定基础。

关键词: 铁过载; 软骨细胞; 氧化应激; 线粒体功能

Establishment of chondrocyte model of iron overload and the mechanism of injury

He Qi^{1,2}, Pan Zhaofeng^{1,2}, Chen Baihao^{1,2}, Yang Junzheng^{1,2}, Li Shaocong^{1,2}, Zeng Jiaxu^{1,2}, Zhou Chi^{2,3}, Wang Haibin^{2,3}

¹First School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; ²Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; ³First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

He Qi, MD candidate, First School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Corresponding author: Wang Haibin, MD, Chief physician, Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Co-corresponding author: Zhou Chi, MD, Associate chief physician, Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

¹广州中医药大学第一临床医学院, 广东省广州市 510405; ²广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东省广州市 510405; ³广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405

第一作者: 何琪, 男, 1997 年生, 广东省揭阳市人, 汉族, 广州中医药大学在读博士, 主要从事关节炎和骨质疏松的基础研究。

通讯作者: 王海彬, 博士, 主任医师, 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东省广州市 510405; 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405

共同通讯作者: 周驰, 博士, 副主任医师, 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东省广州市 510405; 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405

https://orcid.org/0000-0003-2753-2536 (何琪)

基金资助: 国家自然科学基金资助项目 (82074462), 项目负责人: 王海彬; 广州中医药大学“双一流”与高水平大学学科协同创新团队项目 (2021xk53), 项目负责人: 王海彬

引用本文: 何琪, 潘兆丰, 陈柏豪, 杨均政, 黎少聪, 曾嘉旭, 周驰, 王海彬. 建立软骨细胞铁过载模型及损伤机制 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32):5126-5131.



Abstract

BACKGROUND: It is unclear how excessive iron is involved in the development of arthritis, and investigating the potential mechanisms by which iron overload is involved in the development of arthritis could provide new directions for the treatment of arthritis.

OBJECTIVE: To establish an iron overload model of chondrocytes by co-culture of ferric ammonium citrate and chondrocytes, and to observe the effects of iron overload on chondrocyte survival, iron deposition, oxidative stress, and mitochondrial damage.

METHODS: The chondrocytes of C57BL/6J mouse knee joint were extracted by enzyme digestion and cultured with ferric ammonium citrate (100, 250, 500, 1 000 and 2 000 $\mu\text{mol/L}$) chondrocytes for 24, 48 and 72 hours to establish chondrocyte models of iron overload. Cell viability was measured by cell counting kit-8. Content of iron was determined by Calcein-AM, and ferric ammonium citrate concentration was screened for subsequent experiments. Then, the level of reactive oxygen species was detected by fluorescence probe DCFH-DA and the change of mitochondrial membrane potential was detected by JC-1. Real-time quantitative PCR and western blot assays were used to detect the expression levels of type II collagen, matrix metalloproteinases 3 and 13.

RESULTS AND CONCLUSION: The iron overload model could be successfully established in chondrocytes co-cultured with ferric ammonium citrate at the concentration of 500 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ for 48 hours. Ferric ammonium citrate could induce iron overload in chondrocytes, and iron overload subsequently destroy mitochondrial function, increase the level of intracellular reactive oxygen species, impair the functional activity of chondrocytes, and decrease the cell ability to secrete type II collagen and aggrecan, which further increases the difficulty of articular cartilage self-repair. It lays a foundation for further research on the mechanism of chondrocyte injury caused by iron overload and the exploration of effective therapeutic drugs for the treatment of iron overload-induced arthritis.

Key words: iron overload; chondrocyte; oxidative stress; mitochondrial function

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 82074462 (to WHB); "Double First-class" and High-level Collaborative Innovation Team Project of Guangzhou University of Chinese Medicine, No. 2021xk53 (to WHB)

How to cite this article: HE Q, PAN ZF, CHEN BH, YANG JZ, LI SC, ZENG JX, ZHOU C, WANG HB. Establishment of chondrocyte model of iron overload and the mechanism of injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2023;27(32):5126-5131.

0 引言 Introduction

膝关节关节炎是一类多发于中老年人的关节退行性疾病^[1], 随着年龄的上升以及肥胖等因素, 其发病也逐年上升^[2]。最新流行性病学调查显示 70 岁以上老年群体的膝关节关节炎发病率高达 40%, 给家庭和社会带来了极大的经济负担^[3-4]。膝关节关节炎在病理性改变上, 以渐进性的关节软骨损伤、软骨下骨病变、滑膜炎、骨赘形成等为主^[5]。在临床上则主要表现为关节活动受限、红肿发热、刺痛或酸痛不适, 活动后加剧等; 严重者甚至出现关节畸形^[6]。目前大多学者针对关节炎的基础研究主要集中在干细胞、细胞因子等方面, 而临床研究主要集中在关节软骨手术修补或生物制剂治疗, 疗效离预期仍有差距。尽管靶向生物制剂治疗取得了一定进展, 但由于治疗效果有限原因, 在膝关节关节炎中仍未得到深入应用。因此需要继续深入探索关节炎的发病机制, 从而带来新的更高效治疗策略。

膝关节关节炎的典型特征是滑膜组织炎症和关节软骨的进行性丧失。软骨细胞是软骨中唯一负责产生细胞外软骨基质(包括 II 型胶原蛋白和蛋白聚糖)的细胞类型, 它们在维持软骨功能方面发挥重要作用^[7]。膝关节关节炎的发病机制目前尚不清楚, 既往研究表明炎症是加重关节炎进展的重要诱因之一^[8], 白细胞介素 1 β 是主要促炎因子, 抑制软骨细胞外基质的合成^[9]。越来越多研究发现膝关节关节炎的疾病进展与机体中铁过载有关, 而且促炎细胞因子在铁过载诱导关节炎进展中可能参与了铁稳态的调控, 为此研究者们积极探讨铁在关节炎发病机制中的潜在作用^[10]。关节滑膜和软骨中大量的铁沉积是铁代谢异常疾病的常见并发症, 同时也是膝关节关节炎发展的重要病理过程^[11], 如常见的遗传性血色病是一种以慢性全身性铁过载发展的疾病, 由 HFE 基因突变引起, 其特征是许多组织(包括骨骼、肝脏、心脏、肾脏和大脑)的全身铁超负荷。据统计患有血色病的患者发生骨关节炎的概率高达 56%^[12]。为了进一步探究铁超负荷是否与骨关节炎的发病率相关, CAMACHO 等^[13]在 HFE 基因敲除的动物模型上做了进一步验证, 发现部分半月板切除术引起动物模型关节不稳定后, 患有血色病的小鼠会比野生型小鼠发生更严重的膝关节关节炎。

除了遗传和代谢功能障碍, 临床研究表明与年龄相关的退行性骨关节炎和创伤性关节炎的关节中也观察到滑液中铁浓度升高和大量铁晶体沉积^[14]。铁过载在老年人的组织中很常见, 多项针对老年人膝关节关节炎的独立临床研究发现, 血清铁蛋白水平高的人患膝关节关节炎的风险将较正常患者增加 4 倍, 并且血清铁蛋白水平与膝关节影像学检查严重程度呈正相关^[15-16]。综上, 过量的铁可能是促进膝关节关节炎发生的另一种危险因素, 其机制或许和软骨细胞的损伤程度相关, 但具体的发病机制目前尚不明确。既往大量研究证实铁代谢紊乱会引起各类组织器官病变, 而对关节炎发生发展中软骨细胞的铁代谢研究相对较少^[17]。该研究在体外培养小鼠原代软骨细胞, 并用枸橼酸铁铵建立软骨细胞铁过载模型, 以观察铁过载对软骨细胞活力、功能及活性氧水平及线粒体的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验, 所有数据比较采用单因素方差分析, 对于两组之间样本比较采用 *t* 检验, 对于多组样本之间比较采用 Turkey 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 3-6 月在广州中医药大学岭南医学研究中心中医骨伤科学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选择出生一两天的 C57BL/6J 小鼠乳鼠 10 只, 仅用于提取小鼠软骨细胞, 购置于广州中医药大学实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK(粤)2018-0034。

实验方案经广州中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 TCMF1-2021029。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 实验试剂与仪器 白细胞介素 1 β 购自美国 PeproTech 公司; 枸橼酸铁铵购自美国 Sigma 公司; DMEM/F12 培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司; 甲苯胺蓝染色试剂购自 Solarbio 公司; CCK-8 试剂购自 Biosharp 公司; TRizol 试剂

购自美国 Invitrogen 公司；反转录试剂盒、SYBR green qPCR 试剂盒均购自中国艾科瑞生物公司；RIPA 试剂、凝胶制备试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Calcein-AM、JC-1 和活性氧检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司；II 型胶原抗体 (货号: ab62352)、基质金属蛋白酶 13 抗体 (货号: ab52947)、基质金属蛋白酶 3 抗体 (货号: ab80588)、GAPDH 抗体 (货号: ab8245)、羊抗兔 / 鼠二抗 (货号: ab6721) 均购自北京博奥森生物技术有限公司；CFX96 实时荧光定量 PCR 仪、ChemiDoc MP 成像仪购自美国 Bio-Rad 公司；BD FACSCelesta 流式细胞仪购自美国 BD 公司；Multiskan Go 酶标仪购自美国 Thermo 公司；Leica DMI3000 B 倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 原代软骨细胞分离培养与鉴定 原代软骨细胞分离自 C57BL/6J 小鼠，取出生一两天的 C57BL/6J 小鼠乳鼠，无菌环境下用手术器械取适量软骨组织，加入 0.25% 胰酶置于 37 °C 摇床 90 r/min 消化 30 min，300×g 离心 15 min，倒掉胰酶，用含 2% 双抗的 PBS 清洗 2 遍，使用含 0.05% II 型胶原酶的 DMEM/F12 培养基 37 °C 摇床消化，60 r/min 放置八九个小时，待管底基本不见关节软骨后，吹打混匀，用 70 或 100 μm 的细胞筛过滤上清，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，再用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬沉淀，接种至 T25 培养瓶，37 °C 恒温、体积分数为 5%CO₂ 饱和湿度培养箱内培养，待细胞达到 90% 密度后再用胰酶消化传代。取第 1 代软骨细胞进行鉴定，将其以 1×10⁵ 密度接种于 24 孔板上，待细胞培养 48 h 后，吸去培养基，PBS 清洗 2 次后使用甲苯胺蓝染色液染色 5 min，PBS 清洗 2 次后镜检。以下实验均使用第 1 代软骨细胞。

1.4.2 实验分组与软骨细胞关节炎铁过载模型建立 ①空白对照组：在细胞培养过程中仅给予含有体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基处理；②阳性对照组：在细胞培养过程中给予含有体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基和 10 μg/L 白细胞介素 1β 处理；③铁过载组：细胞培养过程中给予含有体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基和 100, 250, 500, 1 000, 2 000 μmol/L 枸橼酸铁铵处理。

1.4.3 CCK-8 法检测软骨细胞活力 取第 1 代软骨细胞，将其以 5×10³ 密度接种于 96 孔板上，待细胞培养 24 h 后，按照实验分组换液并添加相应培养基，细胞在培养箱中分别培养 24, 48, 72 h，每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL，避免在孔中生成气泡，然后置于细胞培养箱中避光孵育 2 h，再通过酶标仪测定 490 nm 波长吸光度值，重复实验 3 次，以确定枸橼酸铁铵的实验浓度及培育时间。

1.4.4 细胞内的铁含量检测 为检测细胞内铁含量，通过 Calcein-AM 标记各组细胞，用荧光显微镜观察荧光强度。取第 1 代软骨细胞，以每孔 1×10⁵ 细胞的密度种入 24 孔板中，待细胞培养 24 h 后，按照实验分组换液并加入相应培养基，培养 48 h 后弃去培养基，加入 0.5 μmol/L 用 PBS 稀释的 Calcein-AM，在细胞培养箱中干预 30 min 后，PBS 清洗 3 次，洗去过多的

Calcein-AM，然后置于荧光显微镜下观察拍照，激发波长 488 nm、发射波长 525 nm。不稳定铁池水平与平均荧光强度呈反比，荧光淬灭率越高，表明进入细胞内的铁越高。

1.4.5 细胞内的活性氧水平检测 荧光探针 DCFH-DA 可以进行细胞内活性氧水平检测。取第 1 代软骨细胞，以每孔 3×10⁵ 细胞的密度种入 6 孔板中，待细胞培养 24 h 后，按照实验分组换液并加入相应培养基，培养 48 h 后用无血清的 DMEM/F12 清洗 2 次，然后加入 10 μmol/L DMEM/F12 稀释的 DCFH-DA 避光孵育 20 min，再用无血清培养基清洗 2 次，加入无血清培养基置于荧光显微镜下观察。由于 DCFH-DA 自身并无荧光，且可以自由穿过细胞膜，可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH，而 DCFH 不能通透细胞膜，从而使探针很容易被装载到细胞内，细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF，检测 DCF 的荧光强度就可以知道细胞内活性氧的水平。为了量化细胞内活性氧水平，收集细胞并使用 FACSCelesta 流式细胞仪评估平均荧光强度。

1.4.6 细胞线粒体膜电位检测 JC-1 荧光探针是一种广泛用于检测线粒体膜电位的理想荧光探针。取第 1 代软骨细胞，以每孔 3×10⁵ 细胞的密度种入 6 孔板中，待细胞培养 24 h 后，按照实验分组换液并加入相应培养基，培养 48 h 后弃去 6 孔板内的培养基，用无血清培养基洗涤 2 次，每孔加入 1 mL JC-1 染色工作液，充分混匀后置于细胞培养箱中 37 °C 孵育 20 min，孵育结束后，吸除上清，用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次，加入 2 mL 无血清细胞培养基，荧光显微镜观察。当线粒体膜电位较高时，JC-1 可以产生红色荧光，在线粒体膜电位较低时，JC-1 呈现绿色荧光，这样就可以非常方便地通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。

1.4.7 实时定量荧光 PCR 取第 1 代软骨细胞，以每孔 5×10⁵ 细胞的密度种入 6 孔板中，待细胞培养 24 h 后，按照实验分组换液并加入相应培养基，培养 48 h 后 PBS 清洗 1 次，随后加入 Trizol 试剂提取细胞总 RNA，使用 NanoDrop2000 对提取的 RNA 进行定量分析，然后用反转录试剂盒反转录 RNA 以获得 cDNA。以 cDNA 为模板，使用 SYBR Green 法、CFX96 (Bio-Rad)qPCR 仪检测目标基因表达量，采用 2^{-ΔΔCt} 法进行定量分析。18 s 作为内参对照，每个样品至少重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列
Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列 Forward (5'-3')	引物序列 Reverse (5'-3')
II 型胶原	ATT CCT GGA GCC AAA GGA TCT GCT	TGA AGC CAG CAA TAC CAG GTT CAC
基质金属蛋白酶 13	GCT GGA CTC CCT GTT G	TCG GAG CCT GTC AAC T
基质金属蛋白酶 3	ATG CCC ACT TTG ATG ATG ATG AAC	CCA CGC CTG AAG GAA GAG ATG
18s	TGG TTG CAA AGC TGA AAC TTA AAG	AGT CAA ATT AAG CCG CAG GC

1.4.8 Western blot 取第 1 代软骨细胞，以每孔 5×10⁵ 细胞的密度种入 6 孔板中，待细胞培养 24 h 后，按照实验分组换液并加入相应培养基，培养 48 h 后 PBS 清洗细胞 1 次，随后加入 RIPA 裂解缓冲液提取细胞总蛋白，使用 Bio-Rad 电泳系统进行 SDS-PAGE 凝胶的配置、蛋白样本的上

样(上样量为 20 μg)和凝胶电泳,接着依次采用硝酸纤维素膜(德国 GE 品牌, Lot#A19478273)、5% 脱脂牛奶进行蛋白印迹的转膜与封闭,随后 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境过夜孵育 II 型胶原、基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13 和 β -actin 蛋白抗体,第 2 天用 TBST 冲洗硝酸纤维素膜,其中条带 II 型胶原、基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13 与山羊抗兔二抗(1 : 1 000)孵育 2 h,条带 β -actin 与山羊抗小鼠二抗(1 : 1 000)孵育 2 h,使用 ECL 显影后放入 Bio-Rad 凝胶成像系统进行成像,并使用 ImageJ 软件进行条带定量,使用内参 β -actin 的结果进行参照,分析数据。

1.5 主要观察指标 ①软骨细胞造模后 24, 48, 72 h 后细胞活力; ②软骨细胞造模 48 h 后细胞内钙黄绿素平均荧光强度; ③软骨细胞造模 48 h 后细胞内活性氧水平; ④软骨细胞造模 48 h 后细胞内线粒体膜电位; ⑤实时荧光定量 PCR 和 Western blot 观察软骨细胞造模 48 h 后细胞外基质相关基因和蛋白表达。

1.6 统计学分析 所有数据采用 SPSS 19.0 统计学软件处理,测定数值均使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,均值比较采用单因素方差分析,对于两组之间样本比较采用 t 检验,对于多组样本之间比较采用 Turkey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过广州中医药大学第一附属医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 软骨细胞鉴定结果 甲苯胺蓝染色可见软骨细胞内细胞核呈紫蓝色,见图 1。

2.2 软骨细胞活力的变化 培养 24 h 时,阳性对照组相比空白对照组差异无显著性意义;加入不同浓度的枸橼酸铁铵后,细胞活力较空白对照组略有降低,其中 100 和 250 $\mu\text{mol/L}$ 组与空白对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$),而 500, 1 000 和 2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组与空白对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。培养 48 h 时,加入不同浓度的枸橼酸铁铵后,细胞活力较空白对照组降低,其中 250, 500, 1 000 和 2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组与空白对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$),500, 1 000 和 2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组与阳性对照组相比差异也有显著性意义($P < 0.05$)。培养 72 h 时,各浓度枸橼酸铁铵组与空白对照组相比,细胞活力均明显下降,差异有显著性意义($P < 0.05$),1 000, 2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组与阳性对照组相比差异也有显著性意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 软骨细胞内铁含量的变化 为了评估软骨细胞内的不稳定铁池,用枸橼酸铁铵预处理原代小鼠软骨细胞,荧光染料钙黄绿素用于评估软骨细胞中亚铁吸收过程。如图 3 所示,不同浓度枸橼酸铁铵预处理后荧光强度较空白对照组显著降低,表明软骨细胞中铁浓度升高。

以荧光强度相对最低即不稳定铁池相对水平最高、细胞相对活力小于空白对照组和阳性对照组,大于 50% 为原则,选取干预 48 h,枸橼酸铁铵浓度为 500, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 为后续实验的铁过载组,细胞活力分别是 73% 和 68%。

2.4 软骨细胞内活性氧水平的变化 为了更好地了解铁过载是否能够促进软骨细胞活性氧的产生,根据 2.3 结果,用 500, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 枸橼酸铁铵处理软骨细胞 48 h,并与 DCFH-DA 孵育以评估活性氧水平。流式细胞术分析表明,枸橼酸铁铵以剂量依赖的方式促进活性氧的产生,见图 4,且与白细胞介素 1 β 处理的炎症环境下相比,枸橼酸铁铵处理增加软骨细胞内活性氧累积程度更大。

2.5 软骨细胞内线粒体膜电位的变化 线粒体膜电位的崩溃代表线粒体功能障碍,因此通过检测线粒体膜电位的水平来检测线粒体的功能。如图 5 所示,枸橼酸铁铵处理后显著增加了 JC-1 单体的绿色荧光强度,且以剂量依赖方式增加荧光强度,表明铁过载对线粒体功能有不利影响,导致线粒体膜电位降低。图 5B 示,与单纯炎症环境相比,铁过载加剧了对软骨细胞线粒体功能障碍的不利影响。

2.6 铁过载增加软骨细胞外基质降解 为了评估铁流入对软骨细胞的不利影响,用不同浓度枸橼酸铁铵处理软骨细胞。如图 6 所示,PCR 检测白细胞介素 1 β 处理 48 h 后观察到基质金属蛋白酶 3 和 13 的过量产生,II 型胶原明显减少。在枸橼酸铁铵处理 48 h 后观察到基质金属蛋白酶 3 和 13 较空白对照组显著过量产生,II 型胶原与空白对照组相比显著减少。如图 7 所示,Western blot 也观察到类似的结果。1 000 $\mu\text{mol/L}$ 枸橼酸铁铵处理较使用白细胞介素 1 β 的传统造模方法可以进一步促进基质降解酶产生,并减少 II 型胶原蛋白的表达。

3 讨论 Discussion

软骨细胞和其合成分泌的细胞外基质组成了关节软骨,包裹软骨细胞的基质起着润滑软骨及为关节提供机械支撑的作用^[18-19]。尽管软骨细胞仅占软骨总体积的很小一部分,但它在维持基质完整性方面起着重要作用^[20]。大量研究证实软骨细胞过度凋亡是软骨退变的重要原因^[21-22],因此寻找减少和控制软骨细胞损伤的有效手段对于探索膝骨关节炎新的治疗靶点至关重要。

铁是机体必需的微量元素之一,它除了是构成血红素必不可少的成分外,还参与细胞的增殖和分化,并通过调控氧化-还原反应参与机体的能量代谢等多种重要生理过程^[23-25]。而当体内铁过载时,将会引起器官、细胞的广泛受损,因此如何维持铁稳态对正常细胞的发展是至关重要的。目前,氧化应激和线粒体功能障碍被证明是膝骨关节炎发展的重要因素^[26-28],当发生铁过载时可促进机体内的脂质过氧化物的堆积,导致细胞发生膜脂过氧化、线粒体功能障碍、核酸和蛋白损伤,最终损伤细胞的结构和功能^[28-31]。铁代谢和活性氧形成的主要场所位于线粒体中,铁通过参与线粒体氧化呼吸链,从而促进活性氧的产生^[32]。活性氧水平的增加可能会损害线粒体和其他结构,导致细胞死亡。受损的线粒体反过来又会产生过量的活性氧,导致胶原蛋白生成减少和基质降解酶分泌增加^[33]。最近的临床研究发现铁过载与膝骨关节炎的发病率和进展之间存在密切联系^[34]。综上,这些可能是铁过载导致软骨细胞损伤的重要机制。然而,迄今

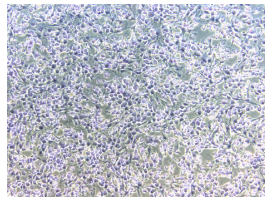
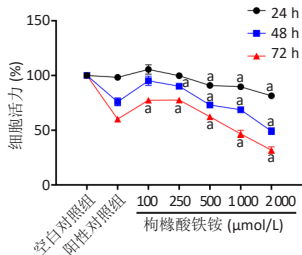
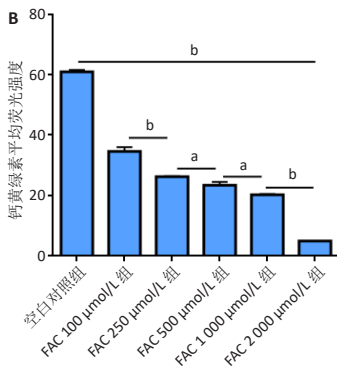
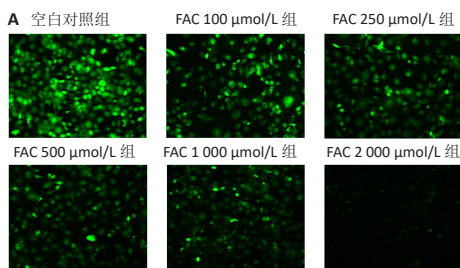


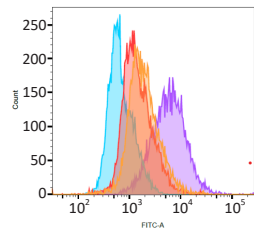
图1 | 软骨细胞甲苯胺蓝染色 (×100)
Figure 1 | Toluidine blue staining of chondrocytes (×100)



图注: 与空白对照组相比, ^a*P* < 0.05(*n*=3)
图2 | 不同浓度枸橼酸铁铵干预不同时间后对软骨细胞活力的影响
Figure 2 | Effects of different concentrations of ferric ammonium citrate on chondrocyte viability after different time of intervention.



图注: 图A可见钙黄绿素标记的软骨细胞内不稳定铁池的荧光图 (×100); B为荧光定量分析。^a*P* < 0.01, ^b*P* < 0.0001(*n*=3)
图3 | 不同浓度枸橼酸铁铵(FAC)干预后对软骨细胞内钙黄绿素平均荧光强度的影响
Figure 3 | Effects of different concentrations of ferric ammonium citrate on average fluorescence intensity of calcein in chondrocytes

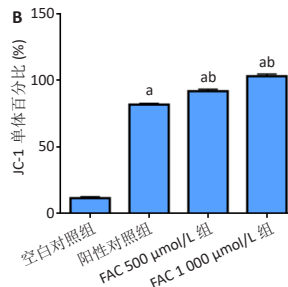
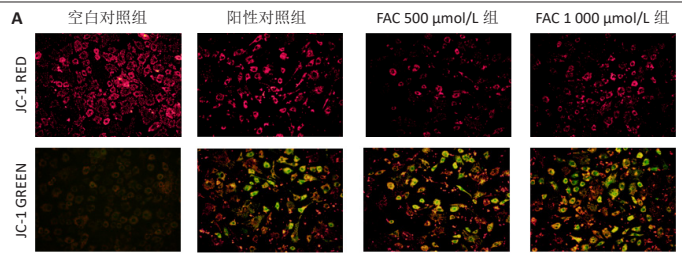


组别	Mean:ROS
空白对照组	821
阳性对照组	1903
FAC 500 μmol/L 组	2522
FAC 1000 μmol/L 组	8047

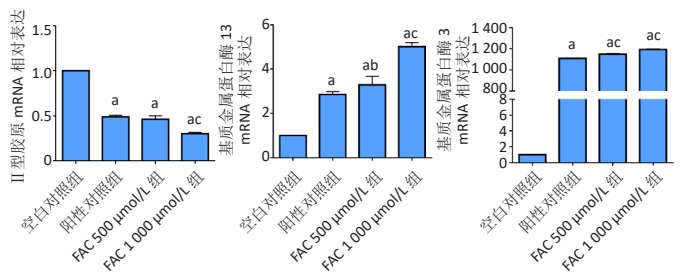
图注: FAC为枸橼酸铁铵
图4 | 软骨细胞铁过载模型活性氧(ROS)生成明显增加
Figure 4 | Reactive oxygen species level is significantly increased in the chondrocyte model of iron overload

为止没有证据清楚表明铁在膝骨关节炎发病机制中的作用, 铁参与膝骨关节炎的发生和进展的机制仍然未知。因此构建铁过载环境下诱导软骨细胞损伤和死亡的模型是深入了解膝骨关节炎病理生理机制的重要步骤。在该研究中, 选择枸橼酸铁铵构建软骨细胞的铁过载模型, 软骨细胞用不同浓度(100, 250, 500, 1 000, 2 000 μmol/L)的枸橼酸铁铵分别培养24, 48, 72 h, 以探索建立软骨细胞铁过载模型的条件。

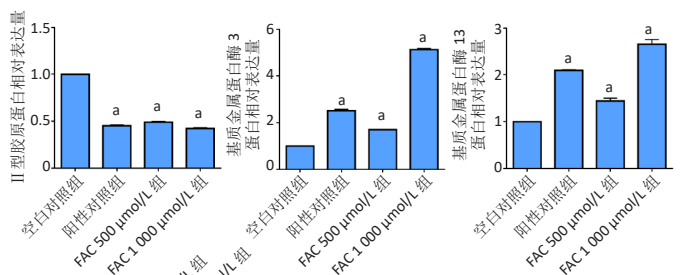
通过钙黄绿素实验发现, 枸橼酸铁铵可以诱导软骨细胞内铁含量的升高, 且随着枸橼酸铁铵浓度升高能够促进铁内



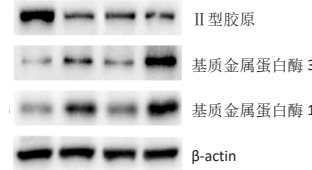
图注: 图A可见JC-1检测线粒体膜电位的荧光图 (×100); B为JC-1单体的荧光定量分析。FAC: 枸橼酸铁铵。与空白对照组比较, ^a*P* < 0.001, 与阳性对照组比较, ^b*P* < 0.001(*n*=3)
图5 | 软骨细胞内线粒体膜电位的变化
Figure 5 | Changes in mitochondrial membrane potential in chondrocytes



图注: 与空白对照组比较, ^a*P* < 0.001, 与阳性对照组比较, ^b*P* < 0.05, ^c*P* < 0.0001(*n*=3)。FAC: 枸橼酸铁铵
图6 | 铁过载增加软骨细胞外基质降解酶相关基因表达
Figure 6 | Iron overload increases the expression of genes associated with extracellular matrix degradation enzymes in chondrocytes



图注: 与空白对照组比较, ^a*P* < 0.0001。
FAC: 枸橼酸铁铵
图7 | 铁过载增加软骨细胞外基质降解酶相关蛋白表达
Figure 7 | Iron overload increases the expression of proteins associated with extracellular matrix degradation enzymes in chondrocytes



流并加重软骨细胞发生铁过载的状态。进一步观察表明随着枸橼酸铁铵浓度增加, Calcein的平均荧光强度逐渐减弱, 表明在共培养阶段的枸橼酸铁铵浓度越高, 其细胞内铁沉积越明显, 这与ZHANG等^[35]的结果一致, 其发现铁可能通过影响铁调节蛋白参与了铁稳态的调节。但是当枸橼酸铁铵浓度达到2 000 μmol/L时Calcein的平均荧光强度过于低下, 说明此时细胞内铁含量达到很高水平, 结合该浓度下软骨细胞活力指标, 作者认为该浓度下的枸橼酸铁铵对软骨细胞造成了不可逆的损伤, 不适宜做后续实验模型。

促炎细胞因子如白细胞介素 1β 和肿瘤坏死因子 α 是膝骨关节炎炎症的主要成分,在膝骨关节炎原发性软骨损伤中起关键作用^[36],常用于体外构建软骨细胞关节炎模型。随着铁过载作为膝骨关节炎的致病条件越来越受到人们关注,因此建立铁过载的体外细胞模型变得非常重要。该研究显示当枸橼酸铁铵浓度超过 $500 \mu\text{mol/L}$ 时软骨细胞活力开始逐渐下降,这表明当枸橼酸铁铵大于该浓度时软骨细胞对其较为敏感,可作为构建铁过载细胞模型的浓度选择。同时过量的铁也促进了软骨细胞的基质降解酶基质金属蛋白酶 3 和 13 的表达并抑制了胶原蛋白的合成。

然而,软骨细胞中的铁是如何促进关节软骨细胞的病理转变仍然未知。在体内过量的铁会发生芬顿(Fenton)反应从而产生过量活性氧,活性氧诱发的氧化应激反应是机体内自由基产生的一种负面效应,会对软骨细胞的正常新陈代谢行为造成不利影响,导致软骨细胞发生功能障碍和变性进而导致细胞凋亡和老化^[37]。这与作者的研究结果相符,随着铁浓度的增高,细胞内铁含量增加导致细胞内活性氧水平明显升高,与 KUANG 等^[38]发现过量的游离铁可作为催化剂产生大量活性氧并导致脂质过氧化物的累积相符。与此同时形成恶性循环,线粒体膜电位下降,线粒体受损,而损坏的线粒体又释放更多的活性氧,最终导致软骨细胞死亡。

综上所述,该研究首先通过观察不同浓度的枸橼酸铁铵对软骨细胞内铁含量水平及细胞生长情况的影响,并以此为基础进一步探究不同浓度的铁是否影响软骨细胞活性氧水平和线粒体膜电位,成功建立软骨细胞铁过载模型,为今后进一步研究铁过载对软骨细胞的损伤机制以及探索治疗铁过载性关节炎的有效治疗药物奠定基础。除此之外,该研究还在体外证明了铁对软骨细胞的损伤机制可能与活性氧的累积造成线粒体损伤相关,不过未来仍需要深入研究铁过载导致软骨细胞死亡的确切机制及对其进行干预,这有可能成为保护软骨细胞的重要环节,也为解决铁过载所致的膝骨关节炎提供了一个新的切入点。

作者贡献: 何琪负责实验实施、论文撰写,潘兆丰负责实验数据分析处理,陈柏豪和黎少聪负责细胞培养、指标检测,杨均政和曾嘉旭负责数据和文章的校对,王海彬和周驰负责实验设计。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] BIJLSMA JW, BERENBAUM F, LAFEBER FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011;377(9783):2115-2126.
- [2] HUNTER DJ, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393(10182):1745-1759.
- [3] WENHAM CY, CONAGHAN PG. New horizons in osteoarthritis. *Age Ageing*. 2013;42(3):272-278.

- [4] LEE AS, ELLMAN MB, YAN D, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*. 2013;527(2):440-447.
- [5] 张荣, 张向东, 赵明宇. 膝骨关节炎发病机制及治疗进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2019,8(5):68-72.
- [6] 中华中医药学会骨伤科分会膝痹病(膝骨关节炎)临床诊疗指南制定工作组. 中医骨伤科临床诊疗指南·膝痹病(膝骨关节炎) [J]. 康复学报, 2019, 29(3):1-7.
- [7] GLYN-JONES S, PALMER AJ, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015;386(9991):376-387.
- [8] GOLDRING MB, OTERO M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):471-478.
- [9] GOLDRING MB, FUKUO K, BIRKHEAD JR, et al. Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem*. 1994;54(1):85-99.
- [10] JING X, DU T, LI T, et al. The detrimental effect of iron on OA chondrocytes: Importance of pro-inflammatory cytokines induced iron influx and oxidative stress. *J Cell Mol Med*. 2021;25(12):5671-5680.
- [11] ROOSEDAAL G, TEKOPPEL JM, VIANEN ME, et al. Articular cartilage is more susceptible to blood induced damage at young than at old age. *J Rheumatol*. 2000;27(7):1740-1744.
- [12] CARROLL GJ, SHARMA G, UPADHYAY A, et al. Ferritin concentrations in synovial fluid are higher in osteoarthritis patients with HFE gene mutations (C282Y or H63D). *Scand J Rheumatol*. 2010;39(5):413-420.
- [13] CAMACHO A, SIMÃO M, EA HK, et al. Iron overload in a murine model of hereditary hemochromatosis is associated with accelerated progression of osteoarthritis under mechanical stress. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(3):494-502.
- [14] HOOVELD MJ, ROOSEDAAL G, VIANEN ME, et al. Immature articular cartilage is more susceptible to blood-induced damage than mature articular cartilage: an in vivo animal study. *Arthritis Rheum*. 2003;48(2):396-403.
- [15] KENNISH L, ATTUR M, OH C, et al. Age-dependent ferritin elevations and HFE C282Y mutation as risk factors for symptomatic knee osteoarthritis in males: a longitudinal cohort study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:8.
- [16] CARROLL GJ. Primary osteoarthritis in the ankle joint is associated with finger metacarpophalangeal osteoarthritis and the H63D mutation in the HFE gene: evidence for a hemochromatosis-like polyarticular osteoarthritis phenotype. *J Clin Rheumatol*. 2006;12(3):109-113.
- [17] 郭州, 彭雅文, 孙凯, 等. 铁代谢及其与骨关节炎关系的研究进展 [J]. 骨科, 2020,11(5):457-462.
- [18] MUSUMECI G, CASTROGIOVANNI P, TROVATO FM, et al. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):20560-20575.
- [19] THOMAS RS, CLARKE AR, DUANCE VC, et al. Effects of Wnt3A and mechanical load on cartilage chondrocyte homeostasis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(6):R203.
- [20] RAHMATI M, NALESSO G, MOBASHERI A, et al. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing Res Rev*. 2017;40:20-30.
- [21] SHEN S, WU Y, CHEN J, et al. CircSERPINE2 protects against osteoarthritis by targeting miR-1271 and ETS-related gene. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(6):826-836.
- [22] TAKÁCS-BUIA L, IORDACHEL C, EFIMOV N, et al. Pathogenesis of osteoarthritis: chondrocyte replicative senescence or apoptosis? *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(6):356-362.
- [23] ANDREWS NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999;341(26):1986-1995.
- [24] ONG-AJYOOTH L, MALASIT P, ONG-AJYOOTH S, et al. Renal function in adult beta-thalassemia/Hb E disease. *Nephron*. 1998;78(2):156-161.
- [25] CRICHTON RR, WARD RJ. Iron species in iron homeostasis and toxicity. *Analyst*. 1995;120(3):693-697.
- [26] SUANTAWEE T, TANTAVISUT S, ADISAKWATTANA S, et al. Oxidative stress, vitamin e, and antioxidant capacity in knee osteoarthritis. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(9):1855-1859.
- [27] ZHANG W, SUN G, AITKEN D, et al. Lysophosphatidylcholines to phosphatidylcholines ratio predicts advanced knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(9):1566-1574.
- [28] LOESER RF, COLLINS JA, DIEKMAN BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(7):412-420.
- [29] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*. 2016;23(3):369-379.
- [30] DE VALK B, MARX JJ. Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Arch Intern Med*. 1999;159(14):1542-1548.
- [31] TOYOKUNI S, OKADA S, HAMAZAKI S, et al. Combined histochemical and biochemical analysis of sex hormone dependence of ferric nitrilotriacetate-induced renal lipid peroxidation in ddY mice. *Cancer Res*. 1990;50(17):5574-5580.
- [32] BRESGEN N, ECKL PM. Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. *Biomolecules*. 2015;5(2):808-847.
- [33] BLANCO FJ, REGO I, RUIZ-ROMERO C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(3):161-169.
- [34] VAN VULPEN LF, SCHUTGENS RE, COELEVELD K, et al. IL-1 β , in contrast to TNF α , is pivotal in blood-induced cartilage damage and is a potential target for therapy. *Blood*. 2015;126(19):2239-2246.
- [35] ZHANG DL, GHOSH MC, ROUAULT TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol*. 2014;5:124.
- [36] WANG T, HE C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;44:38-50.
- [37] BOLDUC JA, COLLINS JA, LOESER RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2019;132:73-82.
- [38] KUANG F, LIU J, TANG D, et al. Oxidative Damage and Antioxidant Defense in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:586578.