

在OA的发生、发展过程中NLRP3与自噬之间的关系



导 师：金群华教授
汇报人：徐 刚

1

研究背景

2

材料与amp;方法

3

技术路线

4

讨论



骨性关节炎 (OA)

❖ 骨性关节炎 (OA) 是老年人最常见的关节慢性退行性疾病，其主要特征为关节疼痛、功能下降、导致严重残疾，影响患者的生活质量。引起骨性关节炎的原因包括年龄、遗传、肥胖、外伤、生物力学等因素，导致关节软骨损伤、软骨下骨硬化、骨赘形成、滑膜炎。关节软骨退变被认为是OA发病的中心环节。维持软骨细胞稳态是保证软骨完整性和防止其退变的重要因素。关节软骨仅依赖于其固有的软骨细胞，维持细胞外基质平衡，在OA的进展中，细胞外基质分化和降解失衡导致关节软骨破坏，进一步发展为骨性关节炎。

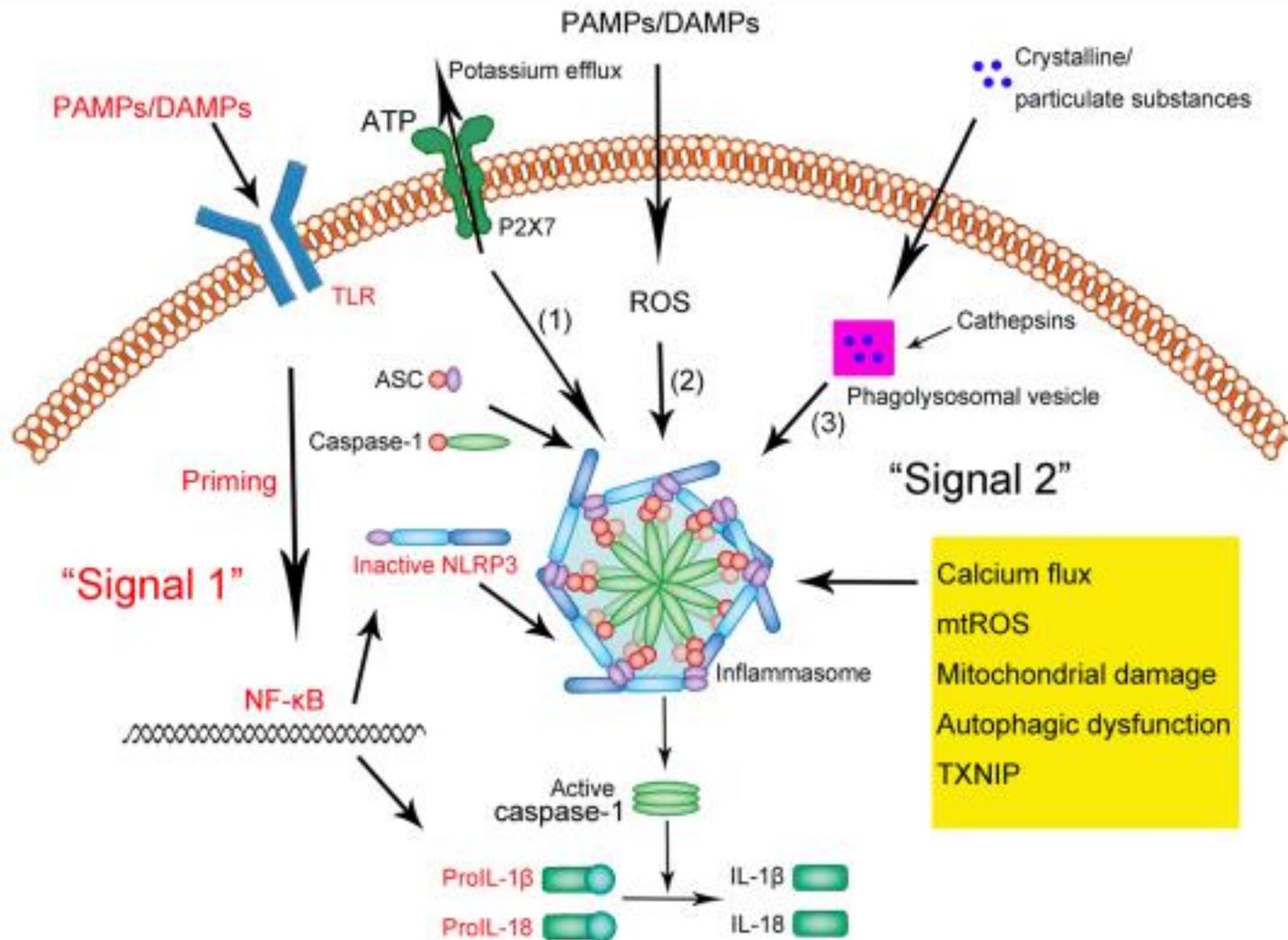
然而，骨关节炎的发病机制尚不明确，在临床治疗当中存在很大的异议。

- ❖ 炎性小体 (inflammasome) 也称炎症小体, 是由胞浆内模式识别受体 (PRRs) 参与组成的多蛋白复合物, 是天然免疫系统的重要组成部分。炎症小体能够识别病原相关分子模式 (PAMPs) 或者宿主来源的危险信号分子 (DAMPs), 结合并激活促炎症蛋白酶Caspase-1。活化的Caspase-1切割IL-1 β 和IL-18的前体, 产生相应的成熟细胞因子。炎症小体的活化还能够诱导细胞的炎症坏死 (pyroptosis)。目前已经确定多种炎症小体参与了针对多种病原体的宿主防御反应, 病原体也已经进化出多种相应的机制来抑制炎症小体的活化。

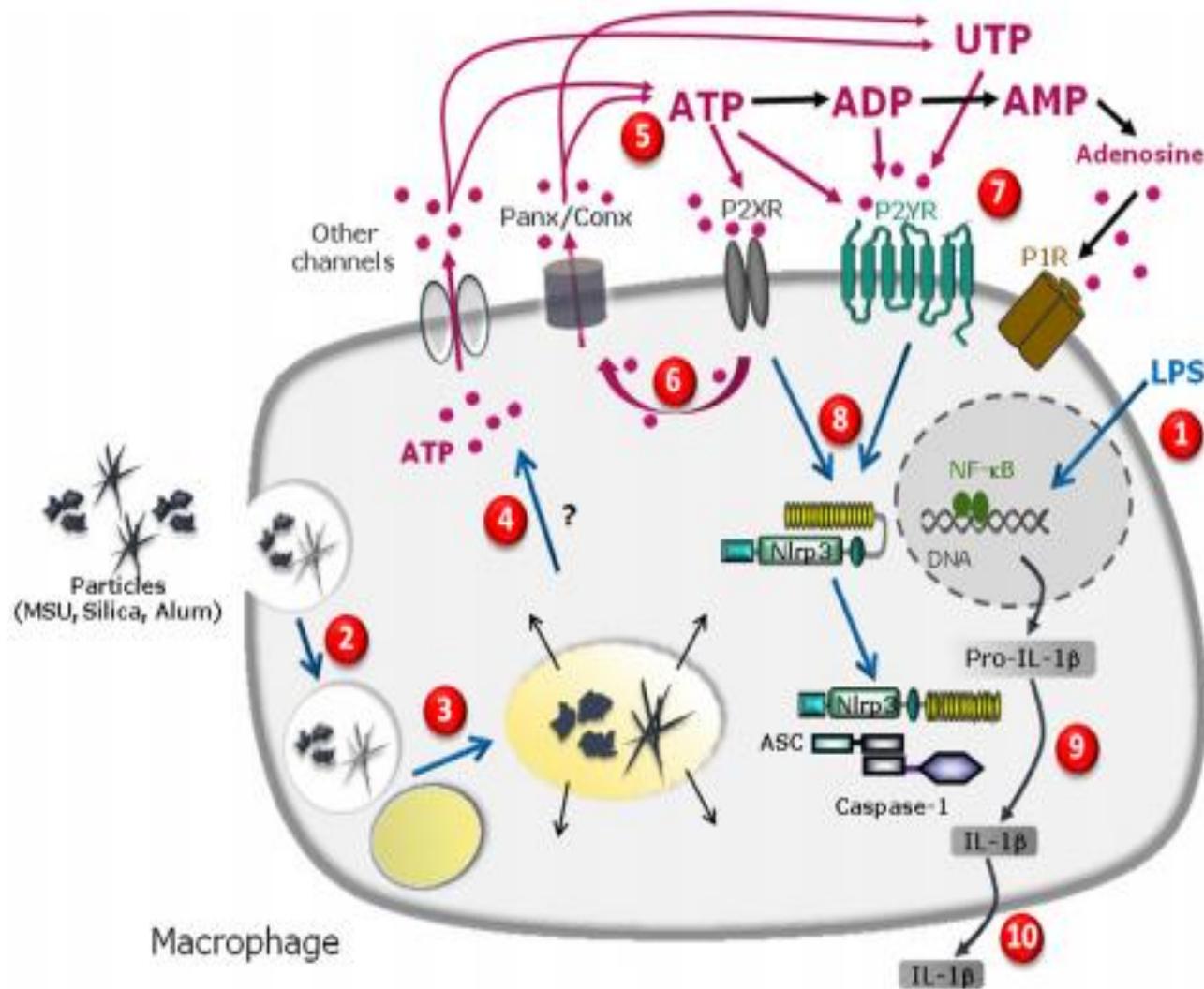
❖ 目前已发现的炎性小体主要有4种，即NLRP1炎性小体、NLRP3炎性小体、IPAF炎性小体和AIM2炎性小体。NLRP1炎性体被炭疽致死毒素激活，NLRP3炎性体被广泛的毒性刺激激活，IPAF易燃体由细菌鞭毛蛋白触发，AIM2炎性体是宿主防御某些细胞内细菌和DNA病毒的必要条件。已知发现的炎性小体一般均含有凋亡相关微粒蛋白（apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC）、caspase蛋白酶以及一种NOD样受体（NOD-like receptor, NLR）家族蛋白（如NLRP1）或HIN200家族蛋白（如AIM2）。

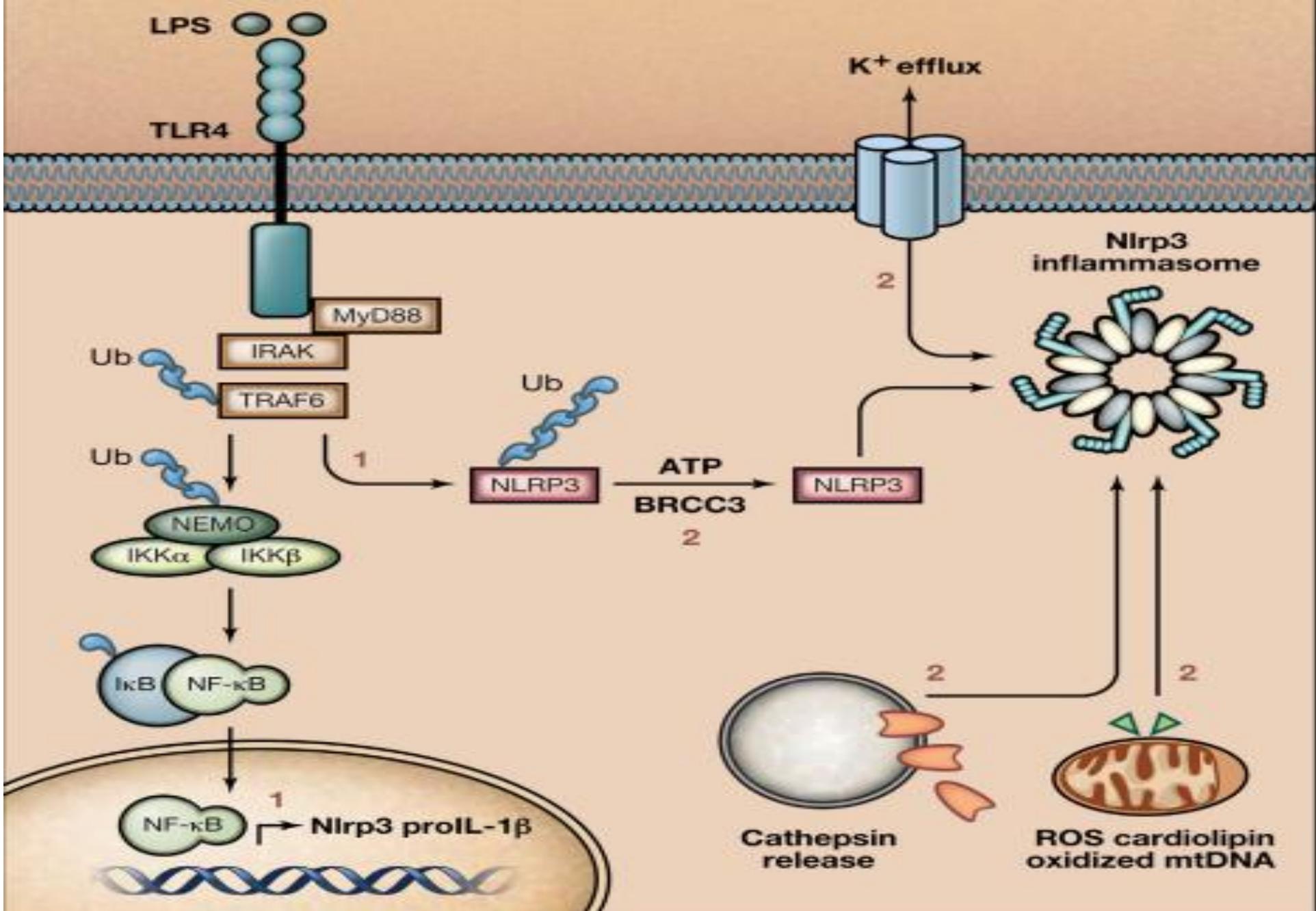
NLRP3炎性小体作为固有免疫的重要组分在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用。由于能被多种类型的病原体或危险信号所激活，NLRP3炎症小体在多种疾病过程中都发挥了关键作用，包括最初被确认的家族性周期性自身炎症反应，2型糖尿病、阿尔茨海默症和动脉粥样硬化症等。因此，作为炎症反应的核心，NLRP3炎症小体可能为各种炎症性疾病的治疗提供新的靶点。

炎症小体



炎症小体





Osteoarthritis and Cartilage



Review

NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis

M.J. McAllister, M. Chemaly, A.J. Eakin, D.S. Gibson*, V.E. McGilligan

Northern Ireland Centre for Stratified Medicine, Ulster University, Altnagelvin Hospital, Glenshane Road, Londonderry, United Kingdom

《中国组织工程研究》 *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*



NOD2、NLRP3在石膏关节制动法建立兔膝骨性关节炎模型
关节软骨中的表达

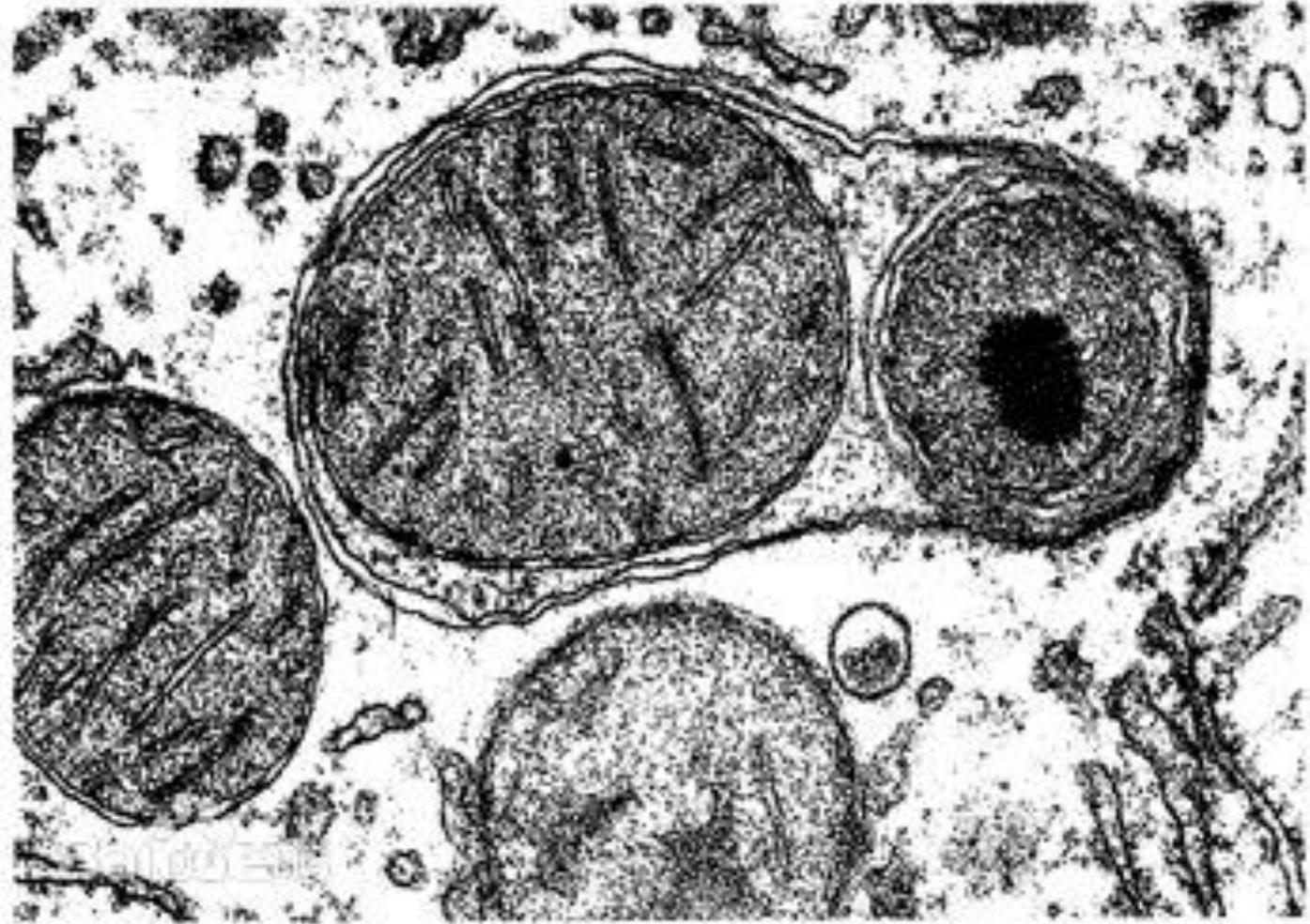
· 研究原著 ·



自噬 (autophagy)

❖ **自噬**是指从粗面内质网的无核糖体附着区脱落的双层膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、**蛋白质**等成分形成自噬体 (autophagosome)，并与溶酶体融合形成自噬溶酶体，降解其所包裹的内容物，以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。

自噬体 (autophagy)





自噬溶酶体(autolysosome)

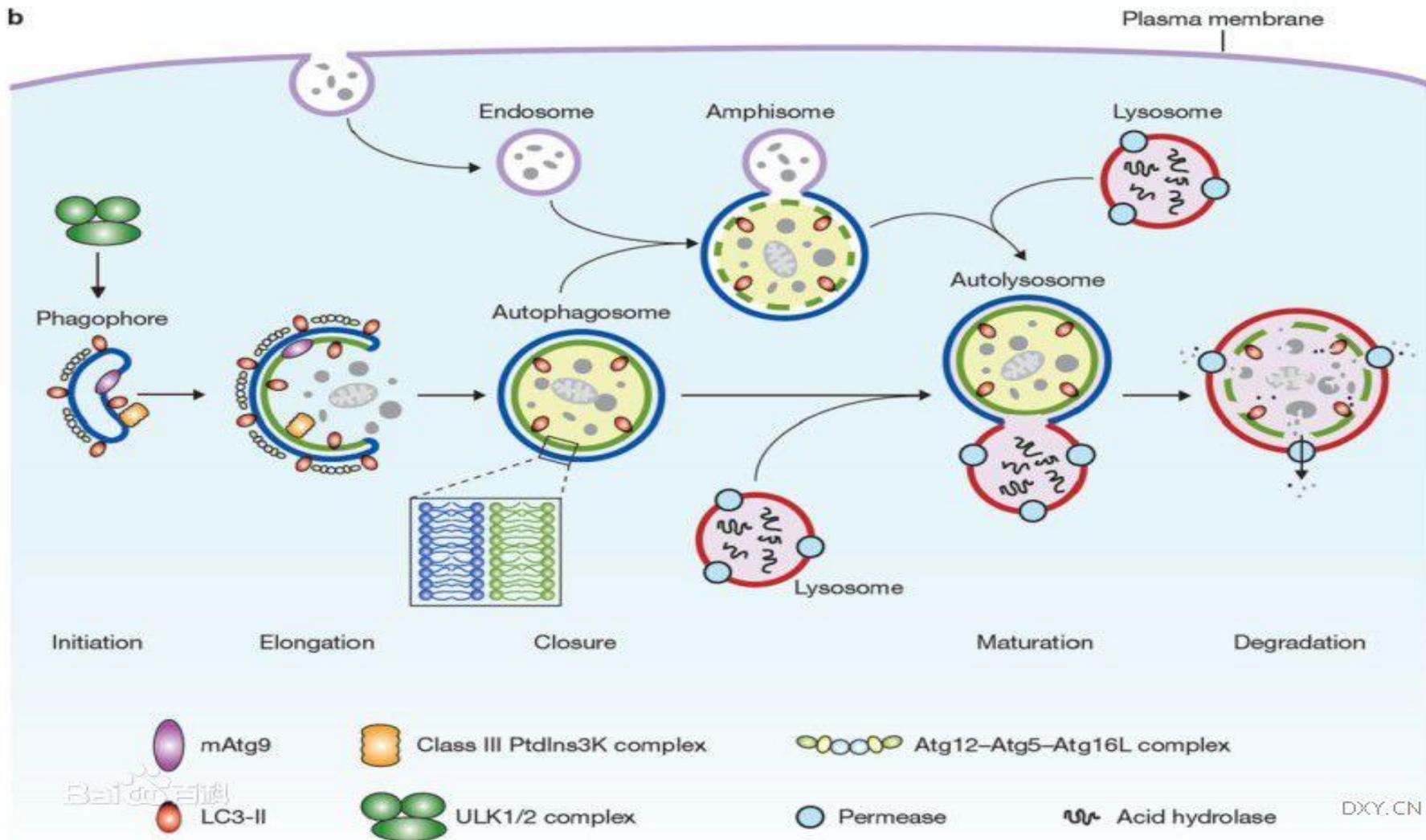
❖ **自噬溶酶体 (autolysosome)** 当自噬体与溶酶体融合后，形成自噬溶酶体。自噬性溶酶体是一种自体吞噬泡，作用底物是内源性的，即细胞内的蜕变、破损的某些细胞器或局部细胞质。这种溶酶体广泛存在于正常的细胞内，在细胞内起“清道夫”作用，作为细胞内细胞器和其它结构自然减员和更新的正常途径。在组织细胞受到各种理化因素伤害时，自噬性溶酶体大量增加，因此对细胞的损伤起一种保护作用。自噬性溶酶体的作用底物是内源性的，即来自细胞内的衰老和崩解的细胞器或局部细胞质等。它们由单层膜包围，内部常含有尚未分解的内质网、线粒体和高尔基复合体或脂类、糖原等。



自噬溶酶体(autolysosome)

❖ 正常细胞中的自噬性溶酶体在消化、分解、自然更替一些细胞内的结构上起着重要作用。当细胞受到药物作用、射线照射和机械损伤时，其数量明显地增多。在病变的细胞中也常可见到自噬性溶酶体。溶酶体的作用还包括对细胞内物质的消化，溶酶体能消化分解经胞吞作用摄入细胞内的各种物质和细胞内衰亡或损伤的各种细胞器等。吞噬性溶酶体内的各种大分子在水解酶的作用下，可被分解为简单物质。例如，能将蛋白质分解为二肽或游离氨基酸；把核酸分解为核苷和磷酸；使碳水化合物分解为寡糖类或单糖；将中性脂肪分解为甘油和脂肪酸等。这些被分解而生成的可溶性小分子物质，能透过溶酶体体膜进入细胞质基质，重新参与细胞的物质代谢，一些未被完全消化的物质残留下来，形成残余小体。

自噬示意图





自噬溶酶体(autolysosome)

- ❖ 在骨生长和**骨重建**过程中，溶酶体对骨质的更新起着重要作用。破骨细胞的溶酶体酶能释放到细胞外，分解和消除陈旧的骨基质，这是骨质更新的一个重要步骤。溶酶体酶释放的具体过程可能是：细胞内的环化酶活性发生改变后，随着cAMP的增加，蛋白质激酶被活化而引起微管及其周围的蛋白质的磷酸化，其结果微管发生聚集，致使溶酶体向细胞膜方向移动，并与细胞膜相互融合，然后溶酶体内的水解酶被排出细胞外，以分解和消除陈旧的骨质。



NIH Public Access

Author Manuscript

Dev Cell. Author manuscript; available in PMC 2012 November 15.

Published in final edited form as:

Dev Cell. 2011 November 15; 21(5): 966–974. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.016.

Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption

Carl J. DeSelm^{1,†}, Brian C. Miller^{1,†}, Wei Zou¹, Wandy L. Beatty², Helena van Meel⁴, Yoshifumi Takahata¹, Judith Klumperman⁴, Sharon A. Tooze⁵, Steven L. Teitelbaum^{1,3,*}, and Herbert W. Virgin^{1,2,3,*}



LETTER

doi:10.1038/nature16063

FGF signalling regulates bone growth through autophagy

Laura Cinque^{1,2*}, Alison Forrester^{1,2,3*}, Rosa Bartolomeo^{1,2}, Maria Svelto^{1,2,3}, Rossella Venditti¹, Sandro Montefusco¹, Elena Polishchuk¹, Edoardo Nusco¹, Antonio Rossi⁴, Diego L. Medina¹, Roman Polishchuk¹, Maria Antonietta De Matteis¹ & Carmine Settembre^{1,2,3}



自噬 (autophagy) 与OA

❖ 关节软骨是一种无血管的、无神经的、粘弹性的结缔组织，其营养和氧气通过滑膜和软骨下骨的扩散提供，软骨细胞主要负责细胞外基质 (ECM) 的合成和分化；因此，保持软骨细胞在健康状态是维持整个软骨完整性的的重要因素。自噬已被认为是各种应激反应中重要的细胞存活机制。自噬不仅可调节软骨细胞生命周期的最后阶段，也可调节软骨细胞进入成熟过程的速率，自噬在正常成人关节软骨中是细胞稳态的重要机制。OA软骨细胞中相关蛋白LC3和Beclin-

1mRNA表达增加，老鼠膝关节老化与自噬和软骨细胞减少以及细胞凋亡增加有关。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路是调节许多重要的细胞变化过程如细胞蛋白合成、转录、生长、生存、运动、增殖等的一种苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶。

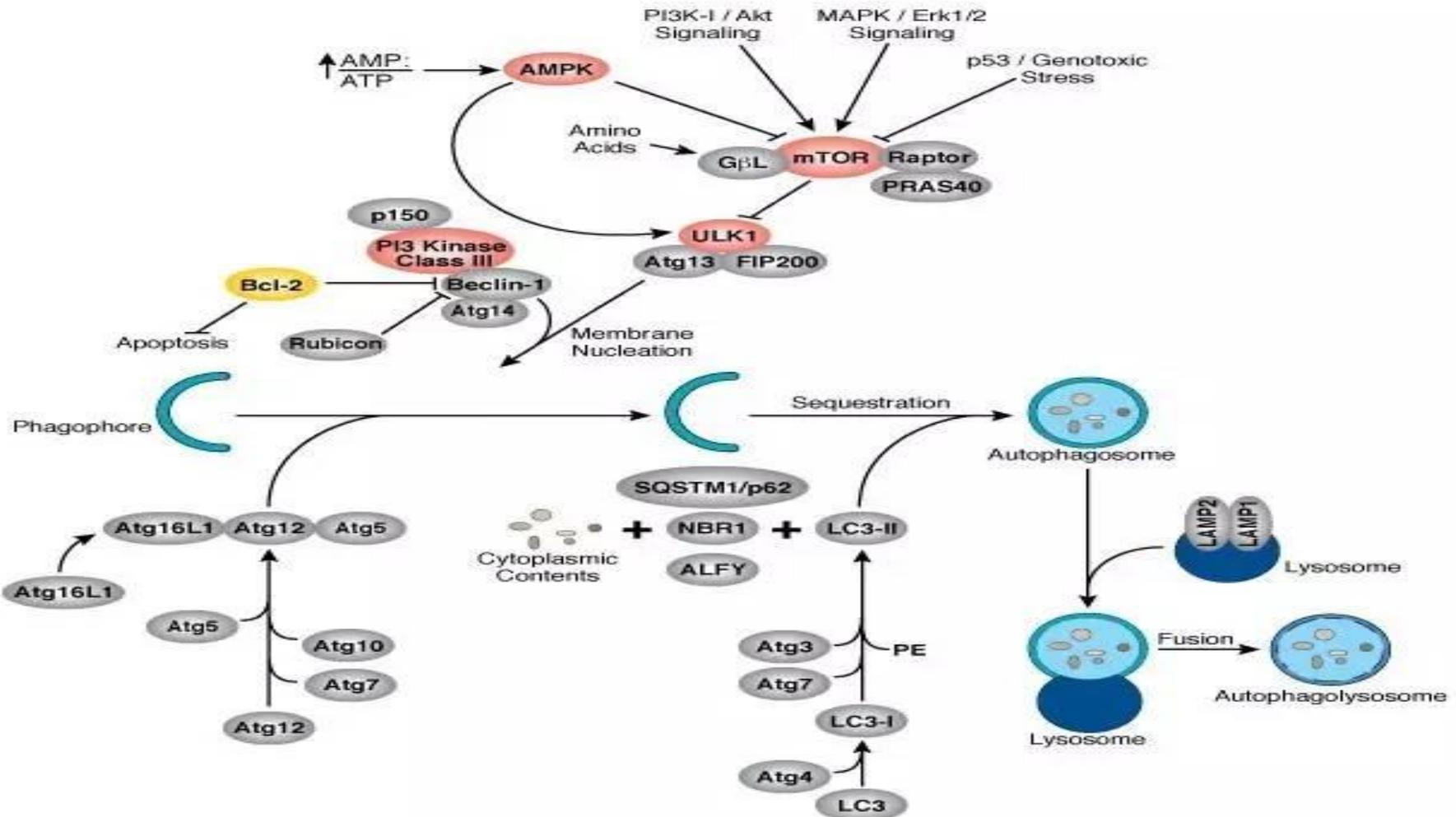


自噬（autophagy）与OA

❖ mTOR在人、小鼠、狗OA中表达，在mTOR敲除小鼠的软骨细胞中，自噬信号传导增加，关节软骨退化、细胞凋亡和滑膜纤维化显著减少。此外，自噬通过调节细胞凋亡和活性氧（ROS）调节OA样基因表达的变化。ULK1为自噬上游的诱导因子、Beclin1为自噬调节因子，LC3为自噬体形成标志，ATG5是自噬溶酶体形成的标志。自噬与多种疾病相关，其也贯穿于整个骨关节系统生长发育及生理病理过程，这为研究OA的研究提供了新的思路。研究认为，自噬主要双重作用于细胞活性及细胞功能从而对软骨细胞起保护作用，阻止软骨细胞的OA变性。

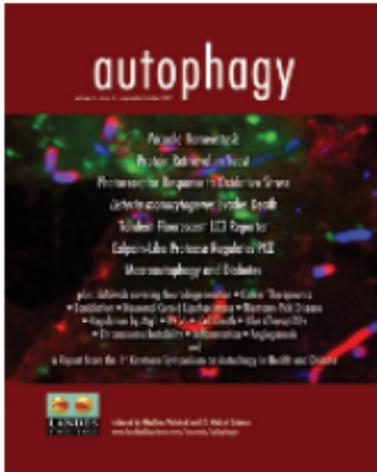
mTOR 激酶是自体吞噬诱导过程中关键的分子，激活 mTOR 的通路如 Akt 和 MAPK 信号通路抑制自体吞噬，负调控 mTOR 的通路如 AMPK 和 p53 信号通路促进自体吞噬。

Autophagy Signaling





❖ 近期研究证明自噬参与了破骨细胞骨吸收过程。自噬的作用调节了NLRP3细胞的清除，从而控制了人巨噬细胞的IL-1 β 分泌和炎症活性，在衰老过程中，自噬效应随衰老的下降可能增加NLRP3的存在。研究显示，肌肉干细胞通过维持细胞器和蛋白内稳态来保存肌力，这是一种重要的调控机制。静息状态的肌肉干细胞持续进行着基础自噬，这种活动会在衰老过程中减弱。在老化的卫星细胞或者基因受损的年轻细胞中，自噬能力的减弱导致了细胞内有毒物质的积累，从而使细胞进入衰老状态。也有研究表明FGF信号通路通过自噬调节了软骨细胞II型胶原蛋白的分泌，进而影响了骨的发育。但是，自噬在OA发病机制中的作用仍不清楚。



Autophagy

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/kaup20>

Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3

Shunsuke Kimura, Takeshi Noda & Tamotsu Yoshimori

Published online: 25 May 2007.

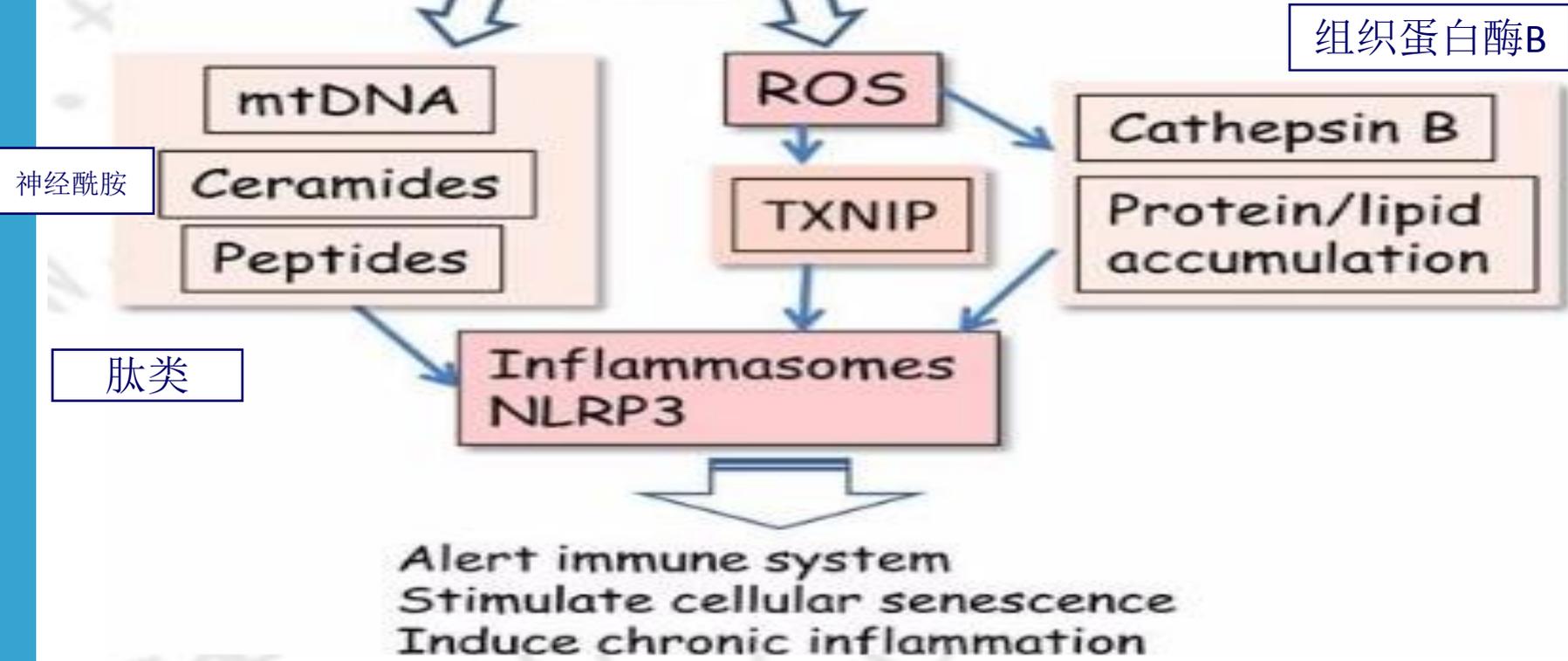
ARTICLE

doi:10.1038/nature16187

Autophagy maintains stemness by preventing senescence

Laura García-Prat¹, Marta Martínez-Vicente^{2*}, Eusebio Perdiguero¹, Laura Ortet¹, Javier Rodríguez-Ubreva³, Elena Rebollo⁴, Vanessa Ruiz-Bonilla¹, Susana Gutarra¹, Esteban Ballestar³, Antonio L. Serrano¹, Marco Sandri^{5,6*} & Pura Muñoz-Cánoves^{1,7}

自噬与炎症体





Apoptosis inducers

- ROS
- NO
- Cytokines (IL-1, TNF- α , TRAIL, Fas ligand)
- Mechanical stress

Synovial fluids

cartilage

chondrocyte

ER stress
Autophagy

Caspase-3 and -8
DNA fragmentation

Cartilage degeneration

MMPs, ADAMTS \uparrow
Aggrecan, Type II collagen \downarrow

apoptosis

\uparrow : increase / activation
 \downarrow : decrease / inhibition



❖ 线粒体功能障碍和氧化应激可以促进和加重炎症反应。NLRP3是细胞应激信号的主要免疫感受器，在衰老过程中，线粒体的自噬清除率下降、功能障碍引起慢性氧化应激，线粒体是生成ROS的主要场所。先天性免疫系统的激活和慢性炎症的存在是衰老的共同标志。炎症体活性与年龄相关性疾病有关，NLRP3介导阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、糖尿病、痛风、高尿酸血症，也可参与感染性疾病的发生、发展。有效的自噬活动可以防止炎症体的激活和诱导炎症反应。有证据表明，NLRP3免疫球蛋白参与OA的发病机制，通过激活Toll样受体和NF- κ B信号通路导致软骨降解和滑膜失活。



软骨细胞细胞质内有大量的粗面内质网和发达的高尔基复合及少量的线粒体。关节软骨本身缺乏血液和氧气供应，软骨细胞长期处于低氧环境，是一种缺氧环境，其能量代谢主要靠糖酵解途径，与线粒体关系似乎不大。因此在OA关节软骨退变过程中NLRP3与自噬之间的关系有待进一步验证。本课题设计动物和细胞模型进一步研究在OA发生、发展过程中NLRP3与自噬之间的关系。

- ❖ 1、C57BL/6j小鼠（雌雄不限）30只。
- ❖ 2、骨关节炎组标本：收集2018年8月-2018年10月期间就诊于宁夏医科大学总医院骨三科，诊断为原发性膝关节骨关节炎并内翻屈曲畸形，并于我科行人工全膝关节置换术的患者所捐赠的内侧胫骨平台软骨。诊断标准采用美国风湿学会制定的骨关节炎诊断标准。共纳入了5例OA患者软骨标本。
- ❖ 3、实验方法：蕃红O染色、mankin评分、透射电镜、免疫组化、免疫荧光。

骨性关节炎组织病理学分级评分Mankin表(总分14分):

I.结构	积分	II.细胞	积分
正常	0	正常	0
表面不规则	1	弥漫性细胞过多	1
血管翳和表面不规则	2	局部细胞增多	2
血管翳和表面不规则	3	细胞过少	3
到过渡带的裂隙	4		
到放射带的裂隙	5		
到钙化带的裂隙	6		

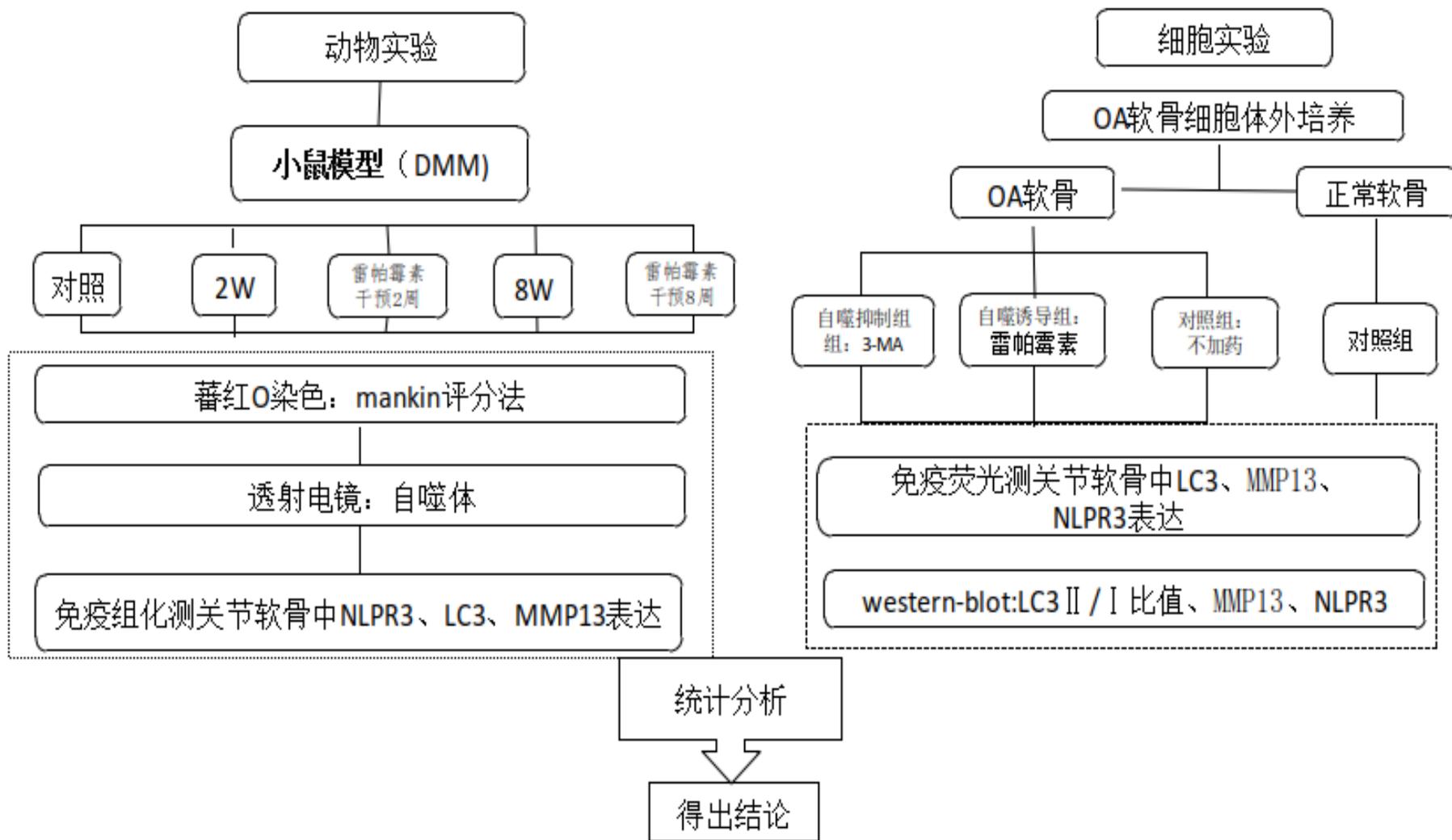
III.基质染色(异染性)	积分	IV.潮线完整性	积分
正常	0	完整	0
轻度减少	1	被血管破坏	1
中度减少	2		
重度减少	3		
未着色	4		

表 2 免疫组织化学表达含量评分标准

Table 2 Immunohistochemistry scoring

指标分类	计分
阳性细胞百分比	
无阳性细胞	0
≤25%	1
26%-50%	2
51%-75%	3
> 75%	4
染色细胞强度	
阴性	0
淡黄色	1
棕黄色	2
棕褐色	3

技术路线图





Mouse Models of Osteoarthritis: Surgical Model of Posttraumatic Osteoarthritis Induced by Destabilization of the Medial Meniscus

Kirsty L. Culley, Cecilia L. Dragomir, Jun Chang, Elisabeth B. Wondimu, Jonathan Coico, Darren A. Plumb, Miguel Otero, and Mary B. Goldring

Abstract

The surgical model of destabilization of the medial meniscus (DMM) has become a gold standard for studying the onset and progression of posttraumatic osteoarthritis (OA). The DMM model mimics clinical meniscal injury, a known predisposing factor for the development of human OA, and permits the study of structural and biological changes over the course of the disease. In addition, when applied to genetically modified or engineered mouse models, this surgical procedure permits dissection of the relative contribution of a given gene to OA initiation and/or progression. This chapter describes the requirements for the surgical induction of OA in mouse models, and provides guidelines and tools for the subsequent histological, immunohistochemical, and molecular analyses. Methods for the assessment of the contributions of selected genes in genetically modified strains are also provided.

动物DMM造模创伤小，病变主要集中在胫骨内侧平台和股骨内侧髁，与人类多发的前内侧骨关节炎相近。DMM模型病变在4周内由轻度至中度，术后8周由中度到重度。手术模型由于自发模型，发病更快、变异性降低和对遗传背景的依赖性小。与外固定模型比，更接近生物力学因素导致的OA。



Displayed by FoxitReader ActiveX For Evaluation Only.

Copyright (c) 2006-2009 Foxit Corporation

Established in 1871

SMW

Swiss Medical Weekly
Formerly: Schweizerische Medizinische Wochenschrift

The European Journal of Medical Sciences

Review article | Published 19 July 2012, doi:10.4414/smw.2012.13583

Cite this as: Swiss Med Wkly. 2012;142:w13583

Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis

Christian Egloff, Thomas Hügle, Victor Valderrabano

Orthopaedic Department, University Hospital, University of Basel, Switzerland

- ❖ 在衰老相关性疾病中，线粒体功能减低导致自噬水平下降，ROS增加激活炎症体引起一系列病理变化，年龄是OA的一种危险因素，软骨细胞的凋亡与自噬水平降低有关，OA是有多种因素导致的慢性退行性疾病，研究中发现与生物力学关系密切，因此在关节不稳OA模型中
- ❖ 1、探究NLRP3与自噬之间的关系？
- ❖ 2、自噬对OA软骨细胞中NLRP3的影响？
- ❖ 3、激活自噬能否增加软骨细胞中的II型胶原？

Thank You !



望各位老师和师兄对本课题设计提出宝贵的意见和建议！