

•综述•

骨关节炎中软骨细胞铁死亡的研究进展

吴亚洲 赵海燕 王文己

摘要 细胞铁死亡以细胞铁代谢异常和细胞膜脂质过氧化为主要特征,细胞铁死亡在骨关节炎软骨退变中发挥重要作用,这一观点已在骨关节炎患者及骨关节炎动物模型中得到证实。对细胞铁死亡发生机制的研究发现,谷胱甘肽过氧化酶 4 在发挥核心调节作用的同时也被其他众多分子调控,此外,铁死亡抑制蛋白 1 可能存在与谷胱甘肽过氧化酶 4 相互平行且同等重要的调节作用。骨关节炎软骨细胞铁死亡的具体机制仍待进一步研究,其在疾病预防和治疗方面具有较大潜力。

关键词 铁死亡;骨关节炎;组织工程

DOI: 10.3969/j. issn. 1673-7083. 2023. 05. 006

骨关节炎(OA)的发病机制迄今未完全阐明,学者们一般认为,OA发病是机械负荷、炎症和代谢因素共同作用的复杂过程,其中关节软骨退变起决定性作用。铁死亡是一种新型程序性细胞死亡方式,其特点是铁依赖性及高水平的脂质过氧化发生,与已知的其他细胞死亡方式均不同。自铁死亡的概念被提出后,学者们已发现其参与了多种退行性疾病和癌症的发生发展。阐明OA发生发展过程中软骨细胞铁死亡的机制,对预防和治疗OA具有重要意义。

1 OA与铁死亡概述

OA是一种非炎症性慢性关节疾病,软骨退变在OA的发生发展中具有关键作用。软骨细胞是软骨中唯一的细胞类型,其对细胞外基质的产生和维持至关重要,当软骨细胞的合成能力被基质的降解能力压倒时,软骨内会发生稳态失衡,从而有助于OA的发生发展^[1]。

在OA病程中,软骨细胞受到机械性因素、局部炎症及全身代谢改变等多种因素作用而受损,并发生细胞死亡。既往的研究认为,坏死和凋亡是OA发生发展中软骨细胞死亡的主要方式,随着研究的深入,学者们发现自噬性细胞死亡、细胞焦亡和铁死亡等多种细胞死亡方式参与到OA的病理进展中^[2]。

2012年,铁死亡的概念被首次提出。铁死亡

是一种铁依赖性的脂质过氧化和活性氧过量产生所致的细胞死亡类型,其在形态学、生化和遗传学上均与其他的细胞死亡方式不同^[3]。学者们在透射电镜下观察发现,铁死亡会导致细胞线粒体变小,线粒体膜密度增高,线粒体嵴减少,而细胞核中的形态变化则不明显。在细胞成分方面,铁死亡表现为脂质过氧化增高,活性氧升高,同时也有一些特征性的基因改变^[4]。

2 相关研究

活性氧过量产生和脂质过氧化可以导致软骨细胞损伤,而铁死亡的特征是铁依赖性脂质过氧化物积累,这提示软骨细胞铁死亡可能参与OA的发生发展中^[5-6]。

2.1 临床研究

一些研究发现,OA患者存在软骨细胞的铁代谢失衡。Yazar等^[7]发现,OA患者炎症部位的关节液中铁离子(Fe^{3+})水平较健康受试者明显升高。有研究发现,OA患者关节液中 Fe^{3+} 水平与OA的严重程度呈正相关,OA损伤区软骨中亚铁离子(Fe^{2+})、 Fe^{3+} 和总铁含量均明显高于未损伤区,这提示OA进展过程中软骨处有铁元素积累^[8-9]。Nugzar等^[10]对膝关节骨关节炎(KOA)患者血清铁蛋白水平与软骨损伤程度进行评估,他们发现,血清铁蛋白水平随软骨损伤程度升高而增高,且与患者的年龄、性别、体质指数和C反应蛋白水平无关,提示铁蛋白可能参与症状性KOA患者软骨损伤的进展。Kennish等^[11]发现,OA患者中血清铁蛋白水平升高与影像学Kellgren-Lawrence分级的恶化程度呈正相关,尤其在男性患者中更明显。此外,

基金项目:国家自然科学基金(82060394)

作者单位:730000, 兰州大学第一临床医学院(吴亚洲);730000, 兰州大学第一医院骨科(吴亚洲、赵海燕、王文己)

通信作者:王文己 E-mail: ldyjzwwj@163.com

铁摄入量似乎也与 OA 的发生发展有关。一些学者发现,铁摄入量与 KOA 的进展呈“U”型相关,适当的铁摄入量可能有助于防止 OA 进展,而摄入过量或摄入不足均可增加 OA 进展的风险^[12-13]。

另一些研究发现,OA 患者存在软骨细胞氧化应激水平的增高。Grigolo 等^[14]用比色法评估 OA 患者与健康人关节滑膜细胞的过氧化程度,他们发现,OA 患者的滑膜细胞丙二醛(MDA)和 4-羟基壬烯酸(4-HNE)水平均高于健康人,且滑液中 4-HNE 也较健康人高。Shah 等^[15]使用免疫组化染色法检测 OA 患者关节炎症组织中的 MDA 和 4-HNE 水平,结果显示,与正常软骨切片相比,OA 患者切片的软骨表面呈弱免疫染色。Gavrilidis 等^[16]进行硫代巴比妥酸反应物质测定发现,OA 患者软骨中 MDA 水平高于健康人。Miao 等^[8]发现,OA 患者软骨中谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、谷胱甘肽(GSH)的水平及 GSH 与还原型谷胱甘肽(GSSG)的比值均降低。此外,作为铁死亡的特征性改变,在 OA 患者软骨细胞中通过透射电镜可观察到线粒体的形态学改变,这表明铁死亡与 OA 的发生发展密切相关^[17]。

2.2 动物实验研究

研究发现,OA 动物模型中存在铁代谢失衡和脂质过氧化现象,而铁螯合剂或抗氧化剂可以阻止 OA 发展。Lv 等^[18]报道,大鼠 OA 模型中可见关节滑液的 MDA 和 Fe^{2+} 水平均升高,软骨中 GPX4 表达降低。Miao 等^[8]制作 OA 小鼠模型开展研究,发现小鼠软骨细胞中 GPX4 和铁蛋白重链 1 的表达均减少,这与铁死亡的实验结果一致。他们进一步使用铁螯合剂或铁死亡特异性抑制剂 Ferrostatin-1 对 OA 模型小鼠进行关节腔内注射,结果显示,通过抑制软骨细胞铁死亡可以延缓小鼠 OA 的发展。他们也发现,于造模手术前 2 周在小鼠关节内注射腺相关病毒中克隆的 GPX4 短发夹 RNA 片段会加速 OA 进展。该研究结果表明,抗氧化系统活化下调与 OA 发展呈正相关。Yao 等^[19]的研究发现,OA 模型小鼠软骨细胞中 GPX4 表达下降,而在关节内注射细胞铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 可以逆转其软骨退变。Guo 等^[20]的研究发现,在小鼠关节内注射铁死亡特异性诱导剂 Erastin,可以诱导小鼠软骨中 II 型胶原(Col II)丢失,并显著增加细胞基质金属蛋白酶(MMP)-13 的水平。该研究结果表明,Erastin 可诱导软骨细胞

发生 OA 样改变,促进 OA 发展。

2.3 体外细胞研究

近年来大量体外细胞研究发现,OA 的软骨细胞中存在的铁代谢失衡与脂质过氧化有关。Jing 等^[5]的研究发现,白细胞介素(IL)-1 β 和肿瘤坏死因子- α 通过上调转铁蛋白受体(TFR)1和下调铁泵蛋白的表达能够破坏软骨细胞内的铁稳态,使用 IL-1 β 联合柠檬酸铁铵可以诱导软骨细胞 MMP-3、MMP-13 和血小板反应蛋白解整合素金属肽酶-5 的表达增强,而使用铁螯合剂或 N-乙酰-L-半胱氨酸则可逆转这一现象。Yao 等^[19]的研究发现,由 IL-1 β 或柠檬酸铁铵诱导的 OA 样软骨细胞内,活性氧和脂质过氧化水平均升高,而 GPX4 和 SLC7A11 的表达均降低。Mo 等^[21]的文献报道,经 IL-1 β 处理的小鼠成软骨细胞(ATDC5)内, Fe^{2+} 和 MDA 水平以及 TFR1 表达均增加,而 GSH、GPX4 和 SLC7A11 表达均降低。

由于 OA 发病机制中存在多种软骨细胞的死亡类型,因此可能无法将铁死亡与其他的细胞死亡方式完全分开,未来需要开展进一步的研究来揭示 OA 发病机制中不同软骨细胞死亡方式之间的相互作用^[22]。

3 铁死亡发生机制

铁死亡发生过程中有很多关键节点:第一,TFR1 可以控制 Fe^{2+} 进入细胞的速度和数量,从而避免细胞出现铁过载状态以及随后可能发生的脂质过氧化^[23]。第二,细胞膜上存在胱氨酸/谷氨酸转运蛋白 system Xc-,其与合成细胞内的重要抗氧化剂 GSH 和 GSSG 密切相关,抑制 system Xc- 的 SLC7A11 亚基会发生细胞铁死亡^[24]。第三,GPX4 可利用其催化活性将磷脂氢过氧化物还原为无毒的磷脂醇,以维持细胞膜的脂质双分子层稳态,从而抑制铁死亡^[25]。此外,铁死亡抑制蛋白(FSP)1 在细胞质和线粒体中均可抑制有毒的脂质过氧化物活性,从而避免细胞膜结构受损。以往的研究表明,GPX4 是铁死亡的关键调控因子,而最新研究表明,FSP1 和 GPX4 可协同作用,抑制细胞的磷脂过氧化和铁死亡^[26]。

3.1 GPX4 的核心调节作用

GPX4 是存在于细胞膜和多个有膜细胞器的抗氧化酶,被公认为铁死亡的中枢和最下游的调节因子。GPX4 在 OA 发病机制中具有双重作用,它既可以调节铁死亡或氧化应激过程,也可以通过

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/核因子- κ B(NF- κ B)信号转导通路调控细胞外基质的降解^[8]。

3.1.1 SLC7A11-GPX4 轴

SLC7A11-GPX4 轴是调控细胞铁死亡的经典信号通路。SLC7A11 是 system Xc- 蛋白的特有亚基,抑制 SLC7A11 可导致细胞内 GSH 耗竭和铁依赖性脂质过氧化发生。而抑癌基因 P53、核因子 E2 相关因子(Nrf)2 和缺氧诱导因子(HIF)都被证实是 SLC7A11 的上游调节因子,对 SLC7A11 的调节是抑制铁死亡治疗策略的核心^[25]。细胞铁死亡诱导剂 Erastin 就是通过抑制 system Xc- 蛋白发挥作用的。体外细胞实验研究显示,虾青素不但可以抑制 Erastin 诱导的软骨细胞铁死亡,还可以减轻细胞外基质降解,减轻炎症反应,从而减缓 OA 发展^[27]。此外,D-甘露糖通过抑制 HIF-2 α 对 SLC7A11 的抑制作用,可降低软骨细胞对铁死亡的敏感性,减轻 OA 进展^[28]。

3.1.2 Nrf2

Nrf2 一方面可直接上调 GPX4 表达,另一方面还能诱导还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、血红素氧合酶(HO)-1 等靶基因的表达,而 NADH、NADPH、HO-1 都是重要的细胞抗氧化酶,故 Nrf2 可通过多种途径抗氧化,发挥软骨保护作用^[29]。体外细胞实验显示,柚皮素可通过 Nrf2/HO-1 途径降低氧化应激反应,减轻铁过载对软骨细胞的损伤。而在 6 周龄雄性小鼠实验中,柚皮素可减轻 OA 小鼠的滑膜炎,减轻软骨损伤和软骨下骨增生^[30]。铁螯合剂可用于治疗铁过载相关疾病,有研究表明,铁螯合剂对 OA 中软骨细胞退化有较好的抑制作用,其通过激活 Nrf2 通路并促进 Nrf2 和 HO-1 向细胞核内转移发挥软骨保护作用^[20]。

3.1.3 热休克蛋白 A5 和辣椒素受体

在体外细胞实验中,软骨细胞的热休克蛋白(HSP)A5 可与 GPX4 蛋白直接结合并正向调节其表达,而葡萄球菌核酸酶样结构蛋白(SND)1 在 3' 端非翻译区(3'UTR)处与 HSPA5 结合,可使 HSPA5 mRNA 失稳,在 OA 大鼠模型中敲除 SND1 可上调大鼠软骨组织中 HSPA5 和 GPX4 表达,抑制软骨细胞的炎症损伤和铁死亡,减轻 OA 进展^[18]。

一些学者发现,OA 铁死亡软骨细胞中(尤其是损伤区域)积累了铁死亡标志物^[31]。他们对人 OA 软骨细胞进行单细胞 RNA 测序分析,发现铁

死亡的软骨细胞群中存在优先表达的铁死亡特征基因,并筛选出辣椒素受体(TRPV1)作为体外和体内抗铁死亡的靶点。TRPV1 通过上调 GPX4 的表达避免发生铁死亡现象,这在小鼠肠道缺血再灌注损伤的研究中已被证实^[32],而在新的研究中发现,软骨细胞中也存在 TRPV1 被激活后 GPX4 表达上调的情况,这避免了软骨细胞铁死亡发生。上述推理在原代软骨细胞、人 OA 软骨外植体和内侧半月板失稳术诱导的 OA 小鼠模型中均得到验证。综上,TRPV1 具有明显的抗铁死亡作用,这提示其有可能成为 OA 治疗的调控靶点^[33]。

3.2 FSP1 的潜在调控作用

通常,当脂质过氧化的产生超过细胞抗氧化系统的缓冲能力时,细胞铁死亡会被触发^[34]。既往的研究认为,GPX4 是细胞铁死亡的主要调节因子,敲除 GPX4 基因可引起活性氧自由基在细胞膜上的积累,诱发细胞铁死亡。2019 年的一项研究证明,FSP1-辅酶 Q10(CoQ10)-NAD(P)H 通路作为独立的平行系统存在,其与 GPX4 和 GSH 协同能够抑制磷脂过氧化和铁死亡发生^[35]。学者们发现,FSP1 是非线粒体辅酶 Q 抗氧化系统的关键组成部分,该系统与典型的基于 GSH 的 GPX4 途径呈平行作用^[26]。FSP1 定位于细胞膜,作为一种 NAD(P)H 依赖的氧化还原酶,能够还原 CoQ10,捕获脂质过氧化自由基,从而抑制脂质过氧化和铁死亡。这些研究结果提示,可以探究 OA 软骨细胞发生的铁死亡是否存在 FSP1-CoQ10 轴的作用,是否可以利用抑制 FSP1 来降低软骨细胞对铁死亡的敏感性,从而干预 OA 进展^[36]。

4 结语

OA 软骨细胞铁死亡的研究主要集中于 GPX4 的核心调节作用,而 FSP1 途径可能与 GPX4 途径同等重要,对此还需开展进一步研究。目前,探索 OA 软骨细胞铁死亡的研究主要集中于分子机制和信号转导通路方面,未来需要在基因转录和表达层面探究 OA 软骨细胞铁死亡的具体发生机制,为临床治疗指明更准确的方向。

参考文献

- [1] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] Yang J, Hu S, Bian Y, et al. Targeting cell death: pyroptosis, ferroptosis, apoptosis and necroptosis in osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 9: 789948.

- [3] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [4] Chen X, Comish PB, Tang D, et al. Characteristics and biomarkers of ferroptosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 637162.
- [5] 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]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(12): 5671-5680.
- [6] 黎森, 何琪, 曾嘉旭, 等. 骨科相关疾病发生发展中的铁超载 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(17): 2723-2728.
- [7] Yazar M, Sarban S, Kocyigit A, et al. Synovial fluid and plasma selenium, copper, zinc, and iron concentrations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2005, 106(2): 123-132.
- [8] Miao Y, Chen Y, Xue F, et al. Contribution of ferroptosis and GPX4's dual functions to osteoarthritis progression[J]. *EBioMedicine*, 2022, 76: 103847.
- [9] Burton LH, Radakovich LB, Marolf AJ, et al. Systemic iron overload exacerbates osteoarthritis in the strain 13 guinea pig[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(9): 1265-1275.
- [10] Nugzar O, Zandman-Goddard G, Oz H, et al. The role of ferritin and adiponectin as predictors of cartilage damage assessed by arthroscopy in patients with symptomatic knee osteoarthritis[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2018, 32(5): 662-668.
- [11] 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[J]. *BMC Musculoskel Dis*, 2014, 15: 8.
- [12] Wu L, Si H, Zeng Y, et al. Association between iron intake and progression of knee osteoarthritis[J]. *Nutrients*, 2022, 14(8): 1674.
- [13] Sun K, Guo Z, Hou L, et al. Iron homeostasis in arthropathies: from pathogenesis to therapeutic potential[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 72: 101481.
- [14] Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, et al. Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis[J]. *J Rheumatol*, 2003, 30(2): 345-347.
- [15] Shah R, Raska K Jr, Tiku ML. The presence of molecular markers of in vivo lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2005, 52(9): 2799-2807.
- [16] Gavrilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, et al. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2013, 65(2): 378-387.
- [17] Liu X, Wang T, Wang W, et al. Emerging potential therapeutic targets of ferroptosis in skeletal diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3112388.
- [18] Lv M, Cai Y, Hou W, et al. The RNA-binding protein SND1 promotes the degradation of GPX4 by destabilizing the HSPA5 mRNA and suppressing HSPA5 expression, promoting ferroptosis in osteoarthritis chondrocytes[J]. *Inflamm Res*, 2022, 71(4): 461-472.
- [19] Yao X, Sun K, Yu S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis[J]. *J Orthop Translat*, 2020, 27: 33-43.
- [20] Guo Z, Lin J, Sun K, et al. Deferoxamine alleviates osteoarthritis by inhibiting chondrocyte ferroptosis and activating the Nrf2 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 791376.
- [21] Mo Z, Xu P, Li H. Stigmasterol alleviates interleukin-1 β -induced chondrocyte injury by down-regulating sterol regulatory element binding transcription factor 2 to regulate ferroptosis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 9332-9340.
- [22] Zhang S, Xu J, Si H, et al. The role played by ferroptosis in osteoarthritis: evidence based on iron dyshomeostasis and lipid peroxidation[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(9): 1668.
- [23] Radakovich LB, Burton LH, Culver LA, et al. Systemic iron reduction via an iron deficient diet decreases the severity of knee cartilage lesions in the Dunkin-Hartley guinea pig model of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(11): 1482-1494.
- [24] Peng CY, Hu L, Wu ZJ, et al. Effects of moxibustion on p53, SLC7A11, and GPX4 expression in synovial tissues of rats with adjuvant arthritis[J]. *Zhen ci yan jiu*, 2022, 47(1): 21-26.
- [25] Luo H, Zhang R. Icaritin enhances cell survival in lipopolysaccharide-induced synoviocytes by suppressing ferroptosis via the Xc-/GPX4 axis[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(1): 72.
- [26] Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 688-692.
- [27] Wang X, Liu Z, Peng P, et al. Astaxanthin attenuates osteoarthritis progression via inhibiting ferroptosis and regulating mitochondrial function in chondrocytes[J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 366: 110148.
- [28] Zhou X, Zheng Y, Sun W, et al. D-mannose alleviates osteoarthritis progression by inhibiting chondrocyte ferroptosis in a HIF-2 α -dependent manner[J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(11): e13134.
- [29] Sanada Y, Tan SJO, Adachi N, et al. Pharmacological targeting of heme oxygenase-1 in osteoarthritis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(3): 419.
- [30] Pan Z, He Q, Zeng J, et al. Naringenin protects against iron overload-induced osteoarthritis by suppressing oxidative stress[J]. *Phytomedicine*, 2022, 105: 154330.
- [31] Chang S, Tang M, Zhang B, et al. Ferroptosis in inflammatory arthritis: a promising future[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 955069.
- [32] Deng F, Zhao BC, Yang X, et al. The gut microbiota metabolite capsate promotes Gpx4 expression by activating TRPV1 to inhibit intestinal ischemia reperfusion-induced ferroptosis[J]. *Gut microbes*, 2021, 13(1): 1-21.
- [33] Lv Z, Han J, Li J, et al. Single cell RNA-seq analysis identifies ferroptotic chondrocyte cluster and reveals TRPV1 as an anti-ferroptotic target in osteoarthritis[J]. *EBioMedicine*, 2022, 84: 104258.

- [34] Stockwell BR, Jiang X, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis[J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(6): 478-490.
- [35] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor[J]. Nature, 2019, 575(7784): 693-698.

- [36] 陆会平, 党裔武, 陈罡. 铁死亡抑制蛋白 1 在人类疾病中的作用机制研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(7): 731-736.

(收稿时间: 2023-05-31)

(本文编辑: 杨晓娟)

• 敬告读者 •

为了更好地服务读者和作者,提高稿件的处理速度和效率,缩短文章发表周期,本刊现已采用远程采编系统。进入官方网站(<http://gjgkx.paperopen.com>),点击左上侧“作者投稿”栏,登记作者信息,注册成功后即可在线投稿。或可直接将稿件以附件形式发送至官方邮箱(intjorthop@163.com)。请作者以实名、常用电子邮箱和移动电话登记,以便于后续与您联系。

《国际骨科学杂志》编辑部