

半胱氨酸蛋白酶-1在NLRP3/Caspase-1通路下对颌骨成骨细胞焦亡作用机制

金红¹, 聂元文^{2*}

1. 牡丹江医学院 口腔医学院, 黑龙江 牡丹江 157001

2. 牡丹江医学院第二附属医院, 黑龙江 牡丹江 157001

摘要：目的：探析半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)在核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)/Caspase-1通路下对成骨细胞焦亡的影响机制。方法：于2024年1月-6月，用维甲酸复制颌骨骨质疏松大鼠动物模型，培养小鼠胚胎MC3T3-E1成骨细胞，分为观察1组（高葡萄糖处理）、观察2组（高葡萄糖处理+ caspx-1 siRNA）和对照组，对比乳酸脱氢酶（LDH）总量、成骨细胞焦亡情况及成骨细胞中NLRP3、caspase-1、白细胞介素-1 β （IL-1 β ）和IL-18的表达变化。结果：观察1组和2组细胞焦亡比例高于对照组，观察2组焦亡比例低于1组；观察1组和观察2组NLRP3、Caspase-1、IL-1 β ，IL-18与IL-18mRNA表达水平均显著高于对照组，观察1组以上指标均高于观察2组，但是两组NLRP3 mRNA、NLRP3蛋白相对表达水平无差异。结论：在体外培养的成骨细胞中，通过Caspase-1表达下调，可以抑制高糖引起的NLRP3炎症小体活性导致的IL-1 β ，IL-18上调，进而抑制成骨细胞焦亡。

关键词：颌骨成骨细胞；细胞焦亡；Caspase-1；NLRP3/Caspase-1通路；Caspase-1抑制剂

Mechanism of Pyroptosis of Cysteine Protease-1 on Jaw Osteoblasts under the NLRP 3 / Caspase-1 pathway

Jin Hong¹, Nie Yuanwen^{2*}

1. Mudanjiang Medical College, College of Stomatology, Mudanjiang, Heilongjiang 157001

2. Second Affiliated Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang 157001

Abstract： Objective: To explore the mechanism of the influence of cysteine protease-1 (Caspase-1) on osteoblast pyroptosis under the nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP 3) / Caspase-1 pathway. Methods: From January to June 2024, mouse embryonic MC3T3-E1 osteoblasts were divided into observation group 1 (high glucose treatment), observation group 2 (high glucose treatment + caspx-1 siRNA) and control group, comparing the total amount of lactate dehydrogenase (LDH), osteoblast pyroptosis, and NLRP 3, caspx-1, interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 in osteoblasts. Results: The proportion of pyroptosis in group 1 and 2 groups was higher than that in the control group, and the proportion of pyroptosis in group 2 was lower than that in group 1; IL-13, Caspase-1 and IL-1 β and IL-18 mRNA were significantly higher than that of the control group; observation group 1 was higher than that of group 2 groups, but the relative expression levels of NLRP3 mRNA and NLRP 3 protein in the two groups were not different. Conclusion: Caspase-1 expression could downregulate IL-1 β and IL-18 in osteoblasts.

Keywords： jaw osteoblasts; pyroptosis; Caspase-1; NLRP 3 / Caspase-1 pathway; caspase-1 inhibitor

口腔和颌面部缺陷对牙齿的保存以及假牙和种植体的成功有重大影响，骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是一种全身性骨病，可导致骨质流失、骨结构改变、骨脆性增加和骨折风险增加^[1]。在当前的研究中，炎症指标研究比较常见的是 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)，NLRP3 炎症体激活半胱氨酸天冬氨酸-1 (caspase-1)，后者在炎症级联中发挥重要作用^[2]。NLRP3 炎症体激活半胱氨酸天冬氨酸-1 (caspase-1)，从而引起级联炎症反应，而这一途径在焦亡死亡中起着重要作用。

一、材料与方法

(一) 材料

选取60只健康的SD大鼠（由西安医科大学实验动物中心提供），月龄5-6个月，体重190-260g，自由喂食和饮水（蒸馏水），恒温饲养（26℃）。

(二) 方法

1. 模型复制

将60只大鼠随机分为三组，分别为对照组20只和骨质疏松造模组（观察1组和观察2组各20只），用维甲酸（山东良福制药有限公司，国药准字H20083494，规格：10mg*20s）85mg/(kgd)喂养15天，从三组中各取10只标本处死，观察其重现性。

2. 分组和用药

在对数发育阶段之前，在6孔培养皿中每孔接种 2×10^5 个细胞，或在96孔培养皿中每孔接种 2×10^4 个细胞，分组处理，直到细胞达到6孔培养皿的75%至80%。观察组1在含最终葡萄糖浓度为45mmol/l的 α -MEM培养基中培养24小时。用含45mmol/l葡萄糖的 α -MEM培养基对观察2组的siRNA转录细胞进行培养，观察siRNA转录细胞的情况。对照组用普通 α -MEM培养基培养24小时。

3. 成骨细胞焦亡检测

Hoechst33342用PI和细胞染色缓冲液按1:1:20稀释成工作液，采用PBS冲洗6孔板中的细胞，每孔加入1ml，将其置于4℃避光环境下保存30min，用PBS冲洗3次，用热释荧光显微镜下观察成骨细胞。

4. 成骨细胞LDH活性检测

在96孔板中加入60 μ lLDH试剂，在2000rpm转速下避光30分钟，离心5分钟，然后在96孔板中加入150 μ L上清液，用酶标准品在490nm处测量吸光度，用LDH试液调零，计算LDH活性。

5. 用RT-PCR法测定成骨细胞中NLRP3、casses-1、IL-1B、IL-18mRNA的表达情况。

6. 检测成骨细胞中NLRP3、caspase1、IL-1 β 和IL-18的表达情况

从6孔板中取出所有细胞并压碎，在12000xg、4℃下离心10分钟，收集清液待用。用BCA法测量蛋白质含量，用多种细胞培养系统在细胞水平上观察单个细胞的生长情况，检测细胞类型。细胞用5%脱脂溶液密封1h，加入双对试剂，室温培养2h，采用ECL染色后进行 β -肌动蛋白基因的相对吸收率观察，采用ImageJ图像分析系统进行计算。

(三) 统计学方法

采用SPSS25.0软件分析数据，计量数据采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，行t检验，组间数据用LSD-t检验，P<0.05表示有统计学意义。

二、结果

(一) 成骨细胞焦亡比较

观察1组和2组细胞焦亡比例高于对照组（P<0.05），观察

2组焦亡比例低于1组（P<0.05），见表1。

表1 成骨细胞焦亡比例比较 $(\bar{x} \pm s, \%)$

组别	孔数	焦亡比例
观察1组	12	72.39 \pm 7.65
观察2组	12	19.49 \pm 3.56
对照组	12	5.89 \pm 1.43

(二) LDH活性比较

观察1组和2组LDH活性高于对照组（t=7.126、2.667，P=<0.001，0.014），观察2组低于1组（t=4.782，P<0.001），三组差异有统计学意义（P<0.001）。见表2。

表2 表1三组MC3T3-E1成骨LDH活性比较 $(\bar{x} \pm s, U.L^{-1})$

组别	孔数	焦亡比例
观察1组	12	363.97 \pm 58.96
观察2组	12	262.89 \pm 43.42
对照组	12	217.48 \pm 39.93

(三) NLRP3、Caspase-1与促炎因子的比较

观察1组和2组NLRP3、Caspase-1与促炎因子表达水平高于对照组（P均<0.05），观察1组以上指标高于2组（P<0.05），两组NLRP3mRNA水平无统计学意义（P>0.05），见表3。

表3 NLRP3、Caspase-1与促炎因子比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	孔数	NLRP3	Caspase-1	IL-1 β	IL-18
观察1组	12	0.783 \pm 0.196	0.928 \pm 0.232	1.861 \pm 0.249	1.442 \pm 0.217
观察2组	12	0.771 \pm 0.145	0.445 \pm 0.114	0.567 \pm 0.146	0.523 \pm 0.143
对照组	12	0.251 \pm 0.087	0.305 \pm 0.096	0.407 \pm 0.138	0.365 \pm 0.166

注：①为NLRP3、②为Caspase-1、③为IL-1 β 、④为IL-18

三、讨论

骨关节炎是一种复杂疾病，治疗需明确其发病机制以进行靶向治疗^[3]。在以往的相关研究中，NLRP3的表达在股骨骨质流失的小鼠模型中明显增加，尤其是在成骨细胞中，胞浆 β -连环蛋白水平和碱性磷酸酶的活性明显降低^[4]。骨质疏松症的特点是成骨细胞功能失调、氧化应激以及高血糖和胰岛素缺乏导致的炎症反应增强。NLRP3炎性小体在许多关节疾病中发挥着重要作用。最近的研究表明，NLRP1和NLRP3在成纤维样滑膜细胞炎症和凋亡中发挥重要作用，提示NLRP1和NLRP3在OA的进展中起着重要作用^[5]。NLRP3是OA发病机制的分子信号，雌激素和姜黄素通过抑制NLRP3等可以降低炎症因子的水平，延缓OA的进展。Gasdermin D是Gasdermin家族的成员，被caspase-1裂解后，导致细胞被裂解并释放到细胞外^[6]。Gasdermin D在caspel-one中被分解，释放N末端域，在膜上形成用于释放IL-1 β 和IL-18等基质的孔^[7]。

焦亡是一种典型的依赖于caspase-1的途径，通过激活NLRP3等炎性囊泡，而NLRP3激活caspate前体（procas-

partate)，从而产生了 caspartate 生物活性^[8]。Caspartate-1 介导的 IL-1 β 在细胞内发生穿孔，并经胞内剪切释放至胞外，导致炎症反应加剧。本研究发现，高糖刺激可诱导破骨细胞焦亡，NLRP3，caspase1-1,IL-1 β ，IL-18mrna 及相关蛋白表达均明显升高，提示高糖可诱导破骨细胞焦亡，并通过 caspase-1 途径释放促炎因子。

IL-1 β 和 IL-18 可诱导炎症反应，破骨细胞的激活主要是通过 IL-1 β 上调核因子- κ B 配体受体活化因子、巨噬细胞集落刺激因子等信号通路，以及下调成骨细胞雄激素蛋白完成该过程。IL-1 β 可能与成骨细胞分化的炎症因子 TNF- α 有关，TNF- α

可抑制 IL-1 β 并下调 TNF- α 的表达，从而抑制成骨细胞的功能^[9]。IL-18 在成骨细胞中起着调节成骨的作用，对 T 细胞和单核细胞 / 巨噬细胞有明显的抑制作用，还能激活 TNF- α 增强破骨细胞的功能^[10]。

综上所述，Casperone 可抑制 Casperone 下调 NLRP3/casperone 信号通路，避免 IL-1 β 和 IL-18 升高，缓解成骨细胞的焦亡。然而，本研究也存在样本不足、在 Ac-YVAD-CMK 浓度和处理时间对 NLRP3/casperone 信号通路的影响内容上未做深化等，在后续的研究中还需进一步探索，进而保障研究结果的科学性与准确性。

参考文献

[1] 蔡猛, 张永宁. 三七总皂苷调控 TLR4/NLRP3/Caspase-1 信号通路对骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡的影响 [J]. 中医药信息, 2023, 40(2):11-17.

[2] 杨洋, 梅胜, 辛龙. 桂枝附子汤调控 TXNIP/NLRP3/caspase-1 通路抑制软骨细胞焦亡的机制研究 [J]. 现代实用医学, 2021, 33(6):709-712F0002.

[3] 乜茹, 刘川川, 李文登, 等. 小鼠肝多房棘球绦感染模型中细胞焦亡 NLRP3/Caspase-1 通路的初步研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2023, 30(06):666-673.

[4] 刘艳阳, 郭雅碧, 翟宏宇, 等. 电针调节 NLRP3/Caspase-1 通路对帕金森病大鼠多巴胺能神经元焦亡的影响 [J]. 针刺研究, 2022, 47(11):983-992.

[5] 宋纯东, 宋丹, 贾评评, 等. 雷公藤多苷通过 NLRP3/caspase-1/GSDMD 细胞焦亡通路对糖尿病肾病大鼠肾损伤的影响 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(10):2639-2645.

[6] 谢小芳, 赵展庆, 符妹垂. 丁香苷调节 NLRP3/Caspase-1 信号通路对脓毒症肺损伤大鼠细胞焦亡的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(19):1744-1751.

[7] 王建坤. PDZK1_CFTR 调控 NLRP3-焦亡途径对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖和分化的影响 [J]. 福建医药杂志, 2024, 46(5):52-56.

[8] 于涛, 王海. 基于 Caspase-1 研究 NLRP3/Caspase-1 通路对成骨细胞焦亡作用机制 [J]. 外科研究与新技术, 2023, 12(3):163-167.

[9] 郭亚净, 任静, 刘寒, 等. Caspase-1 介导的细胞焦亡对脑出血大鼠神经损伤的影响 [J]. 中国病理生理杂志. 2021, (8).

[10] 宁璞, 柯蕊, 和平, 等. 苦柯胺 B 调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路减轻脂多糖诱导的巨噬细胞炎症 [J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(7):1009-1016.