DOI:10.16016/j.1000-5404.202009202

低强度脉冲聚焦超声通过上调 PGAM5 蛋白表达促进软骨细胞线粒体自噬

叶海霞,虞乐华,贾 朗 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院康复医学科

[摘要] **目的** 探讨低强度脉冲聚焦超声(focused low-intensity pulsed ultrasound,FLIPUS)对软骨细胞线粒体自噬活化的影响。**方法** 提取 C57BL/6J 乳鼠膝关节原代软骨细胞进行体外实验,IL-1β 处理细胞模拟骨关节炎样软骨细胞损伤并进行验证。细胞分为对照组、IL-1β 组和 IL-1β+FLIPUS 组。RT-PCR 检测各组 Col2α1 和 MMP13 mRNA 表达;Western blot 检测各组 Col2α1、MMP13、LC3B-Ⅱ、TOM20、TIM23、PGAM5、FUNDC1 及 p-FUNDC1(p-ser13)蛋白表达。**结果** 成功提取原代软骨细胞并模拟骨关节炎样软骨细胞损伤。与对照组比较,IL-1β 组 Col2α1 mRNA 和蛋白表达明显降低($P<0.01$),MMP13 mRNA 和蛋白表达明显增加($P<0.01$);与 IL-1β 组相比,IL-1β+FLIPUS 组 Col2α1 表达明显上升($P<0.05$),MMP13 表达明显下降($P<0.01$)。与对照组相比,IL-1β 组 LC3B-Ⅱ蛋白表达显著降低($P<0.05$);与 IL-1β 组相比,IL-1β+FLIPUS 组 LC3B-Ⅱ、PGAM5 蛋白表达显著上升($P<0.01$),TOM20、TIM23、p-ser13 蛋白表达则明显下降($P<0.05$)。**结论** FLIPUS 可能通过上调软骨细胞 PGAM5 蛋白表达,使 FUNDC1 第 13 位丝氨酸去磷酸化,活化线粒体自噬。

[关键词] 低强度脉冲聚焦超声;膝骨关节炎;线粒体自噬;PGAM5;FUNDC1
[中图法分类号] R322.71; R329.25; R454.3 [文献标志码] A

Focused low-intensity pulsed ultrasound promotes chondrocyte mitophagy *via* up-regulating PGAM5 protein

YE Haixia, YU Lehua, JIA Lang Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of focused low-intensity pulsed ultrasound (FLIPUS) on the activation of mitophagy in chondrocytes. Methods Chondrocytes were isolated from the knee articular cartilage of C57BL/6J suckling mice, and then primarily cultured. Then osteoarthritis-like chondrocyte injury was inflicted by IL-1β simulation in the chondrocytes and identified. The chondrocytes were divided into 3 groups, that is, control, IL-1β and IL-1β+FLIPUS group. The mRNA expression of Col2α1 and MMP13 was detected by quantitative real-time PCR, and the protein levels of Col2α1, MMP13, LC3B-Ⅱ, TOM20, TIM23, PGAM5, FUNDC1 and p-FUNDC1 (p-ser13) were detected by Western blotting. Results We cultured primary chondrocytes and established osteoarthritis-like chondrocyte injury model successfully. Compared with the control group, the mRNA and protein levels of Col2α1 were significantly decreased ($P<0.01$), while the levels of MMP13 were significantly increased ($P<0.01$) in the IL-1β group. The levels of Col2α1 were obviously enhanced ($P<0.05$), while those of MMP13 were reduced ($P<0.01$) in the IL-1β+FLIPUS group than the IL-1β group. Compared with the control group, the protein expression of LC3B-Ⅱ was remarkably reduced in the IL-1β group ($P<0.05$). The protein levels of LC3B-Ⅱ and PGAM5 were significantly increased ($P<0.01$), while those of TOM20, TIM23 and p-Ser13 were notably decreased ($P<0.05$) in the IL-1β+FLIPUS group than the IL-1β group. Conclusion FLIPUS may activate the mitophagy in chondrocytes though dephosphorylation of FUNDC1 Ser13 *via* up-regulating PGAM5 expression.

[**Key words**] focused low-intensity pulsed ultrasound; knee osteoarthritis; mitophagy; PGAM5; FUNDC1

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholar of China (81802234). Corresponding author: JIA Lang, E-mail: jialang@hospital.cqmu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81802234)
[通信作者] 贾 朗,E-mail:jialang@hospital.cqmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

软骨细胞过度凋亡是导致膝骨关节炎(knee osteoarthritis,KOA)发病的重要机制。有效地抗软骨细胞凋亡,维持软骨基质合成与降解达到动态平衡,是延缓关节软骨退变的重要手段之一。我们前期研究发现,低强度脉冲聚焦超声(focused low-intensity pulsed ultrasound,FLIPUS)可明显缓解 KOA 患者的关节疼痛,改善膝关节功能,提高患者的生活质量,且无不良反应[1-2]。体内实验表明,FLIPUS 可延缓 KOA 模型中新西兰兔软骨细胞凋亡,提高软骨基质内蛋白多糖和Ⅱ型胶原含量,改善软骨基质代谢紊乱[3]。同时,研究表明线粒体自噬活化能有效延缓软骨细胞凋亡,改善软骨基质代谢,对退变关节软骨具有保护作用[4-6]。进一步通过体外实验,我们发现 FLIPUS 干预软骨细胞后出现双层膜结构自噬体,提示 FLIPUS 促进软骨细胞线粒体自噬活化,其具体线粒体自噬活化分子机制仍不明确。因此,本研究拟用 FLIPUS 干预 IL-1β 处理的小鼠原代软骨细胞,检测线粒体自噬受体蛋白 FUNDC1、p-FUNDC1(p-ser13)、线粒体丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(PGAM5)、自噬相关基因 LC3 以及线粒体膜蛋白 TOM20、TIM23 蛋白表达水平,从体外细胞学层面初步探讨 FLIPUS 是否通过 PGAM5/FUNDC1 途径活化软骨细胞线粒体自噬,以达到抗软骨细胞凋亡的目的。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

SPF 级 C57BL/6J 乳鼠(5 d)购于重庆医科大学实验动物中心,并获得重庆医科大学伦理委员会批准(2018 年)。主要试剂:DMEM/F12 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(ExCell Bio)、胰蛋白酶(碧云天)、Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司)、CCK-8 溶液(MCE 公司)、甲苯胺蓝染液(塞维尔)、免疫组化试剂盒(中杉金桥)。Col2α1 抗体购于博士德公司;LC3 抗体购于 CST 公司;MMP13 抗体、β-actin、TOM20 抗体及 TIM23 抗体均购于 Proteintech 公司;PGAM5 抗体及 FUNDC1 抗体购于 Abcam 公司;Phospho-FUNDC1(Ser13)抗体由 Affinity 公司生产。RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及 TB Green 来自 TaKaRa 公司。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。BCA 蛋白浓度测定试剂盒及 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒等 Western blot 相关试剂均购于上海碧云天生物有限公司。

1.2 小鼠膝关节原代软骨细胞的分离培养

采用两步酶联合消化法提取乳鼠膝关节原代软骨细胞。用灭菌器械从小鼠中分离出膝关节,加入胰蛋白酶于 37 ℃、5%CO_2 孵箱中消化 10 min,体视显微镜下剔除邻近的肌肉、韧带和骨组织以获得膝关节软骨,加入 0.1%Ⅱ型胶原酶于 37 ℃、5%CO_2 孵箱中消化过夜。次日,将消化好的软骨细胞悬液离心后弃上清,用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞接种于培养瓶/皿中,于 37 ℃、5%CO_2 孵箱中常规培养,以后每 2 天换液 1 次。

1.3 原代软骨细胞的鉴定

1.3.1 甲苯胺蓝染色 原代软骨细胞(P0)长满 70%~80%时按 1∶3比例传代,接种于含细胞爬片的 6 孔板内,制作 P1 代细胞爬片,细胞孵箱培养 1~2 d,4%多聚甲醛室温固定 20 min,1%甲苯胺蓝染色液室温浸染 10 min,双蒸水冲洗至爬片背景干净,用注射器针头取出爬片,细胞面朝下置于载玻片上,中性树胶封片,拍照。

1.3.2 Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色 按上述方法制作细胞爬片,4%多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 浸洗 3 min×3 次,0.3% TritonX-100 室温通透 15 min,PBS 浸洗 3 min×3 次,正常山羊血清室温封闭 1 h,不洗,滴加兔抗鼠 Col2α1 抗体(1∶100)于 4 ℃冰箱孵育过夜。室温复温 30 min,PBS 洗 3 min×3 次,滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1∶500),室温孵育 1 h,PBS 洗 3 min×3 次,滴加 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,双蒸水冲洗爬片终止显色,苏木精复染,梯度酒精脱水,中性树胶封片,拍照。采用 Image J 软件分析平均光密度(average optical density, AOD)。

1.4 体外骨关节炎样软骨细胞损伤模型的构建及验证

采用 IL-1β 处理细胞模拟骨关节炎样软骨细胞损伤用于后续实验。首先用 CCK-8 法检测不同浓度 IL-1β 处理后软骨细胞的存活率,具体方法为将软骨细胞悬液以每孔 1×10^4/100 μL 接种于 96 孔板培养,细胞贴壁后,分别加入 0、5、10、15、20 ng/mL IL-1β 处理软骨细胞 24 h,加入 10 μL/孔 CCK-8 溶液于孵箱中孵育 1~2 h,酶标仪检测各组在 450 nm 波长处的光密度值[D(450)],实验重复 3 次。然后通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测相关因子表达,进一步验证 IL-1β 构建的软骨细胞损伤模型。

1.5 细胞分组及超声处理

原代软骨细胞分为 3 组,即对照组(Control 组)、IL-1β+假 FLIPUS 组(IL-1β 组)、IL-1β+FLIPUS 组。IL-1β 处理细胞 24 h 后,所有细胞置于低氧孵箱(含 1%O_2,5%CO_2 及 94%N_2 混合气体)中培养 24 h,低强度脉冲聚焦超声(CZG200 型,重庆海扶医疗科技有限公司,频率 0.6 MHz,声强 120 mW/cm^2,重复频率 300 Hz,治疗头焦平面距离 28 mm,脉冲宽度 200 μs,占空比 20%)处理细胞 20 min/d×3 d。FLIPUS 处理细胞时,探头上涂耦合剂,将其紧贴培养皿下方,用自制固定器保持探头稳定(图 1)。假 FLIPUS 处理时不开机。

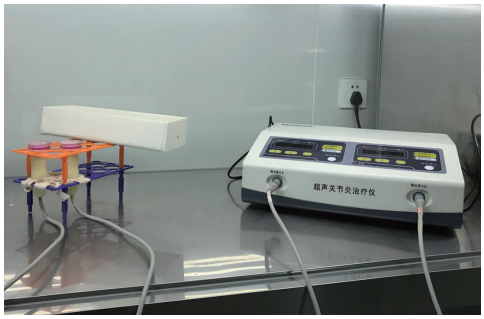


图 1 FLIPUS 处理软骨细胞装置图

1.6 实时荧光定量 PCR

按照使用说明书,从原代软骨细胞中提取总 RNA,并通过反转录合成 cDNA,用 TB Green RT-PCR 试剂盒配置 10 μL 反应体系进行定量 PCR 反应,即 TB Green 5 μL、上游引物 0.4 μL、下游引物 0.4 μL、cDNA 0.8 μL、DEPC 水 3.4 μL。每个样本均设置 3 个复孔,实验重复 3 次,mRNA 的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示,引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 的引物序列信息

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物大小/bp
Col2α1	上游 CATCCAGGGCTCCAATGATGTA 下游 ATGTCCATGGGTGCGATGTC	174
MMP13	上游 CTTCTTCTTGTTGAGCTGGACTC 下游 CTGTGGAGGTCACTGTAGACT	173
β-actin	上游 GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG 下游 ATGCCACAGGATTCCATACC	174

1.7 Western blot 检测

用裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,30 μg 的蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离,将蛋白电转移到 PVDF 膜中,用 5%的脱脂牛奶常温封闭 1~2 h,加入相应的一抗(1∶1 000 稀释)4 ℃孵育过夜,TBST 清洗 3 次后加入二抗(1∶5 000 稀释)室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,用 ECL 化学发光法显影,Image Lab 软件进行结果分析。以目标蛋白与 β-actin 灰度值的比值表示目标蛋白的相对含量。

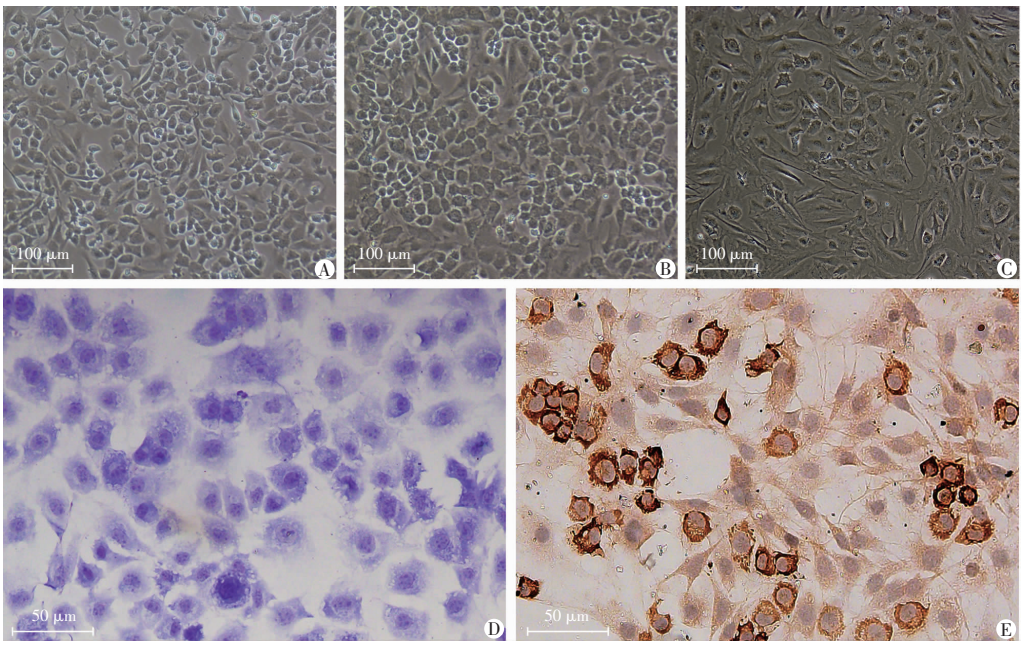
1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 进行统计学分析,正态分布资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验;非正态分布资料以中位数(四分位间距)表示,采用 Kruskal-Wallis H 检验。多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代软骨细胞形态观察及鉴定

原代软骨细胞于接种后 24 h 大部分贴壁,5~7 d 长满瓶底,呈多角形或不规则状,聚集生长的细胞呈现“铺路石”样外观(图 2A)。经传代培养后,第 1 代软骨细胞(P1)继续保持多角形形状及“铺路石”样外观(图 2B)。而到第 2 代软骨细胞(P2),部分细胞开始去分化,呈长梭形生长(图 2C)。因此,为保证实验结果的准确性,本研究只使用 P0 及 P1 代软骨细胞作为研究对象。



A:P0 代软骨细胞;B:P1 代软骨细胞;C:P2 代软骨细胞;D:软骨细胞甲苯胺蓝染色;E:软骨细胞Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色

图 2 原代软骨细胞形态学特征及鉴定

为鉴定软骨细胞,进行了甲苯胺蓝染色和Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色。软骨细胞经甲苯胺蓝染色,可见细胞被染为蓝紫色(图2D)。Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色,发现软骨细胞胞质大量阳性的棕黄色异染颗粒(图2E)。以上结果说明,小鼠膝关节原代软骨细胞提取成功。

2.2 构建体外骨关节炎样软骨细胞损伤模型

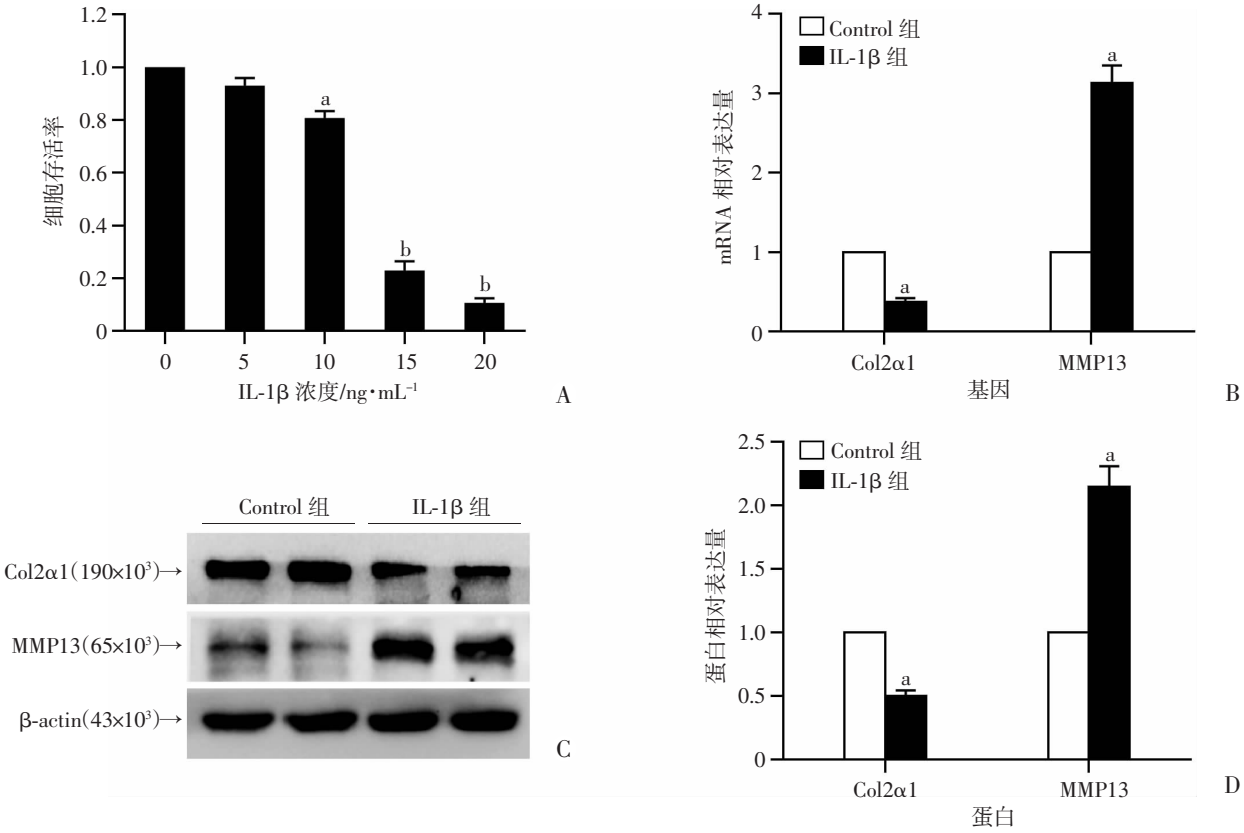
经不同浓度IL-1β处理24 h后,CCK-8结果显示,随着IL-1β浓度增高,软骨细胞存活率逐渐下降,10 ng/mL时,软骨细胞存活率约为80%(图3A,$P<0.05$),而从15 ng/mL开始,软骨细胞存活率呈现"断崖式"下降(图3A,$P<0.01$)。因此,本研究选取10 ng/mL IL-1β处理软骨细胞用于后续实验。进一步通过RT-PCR和Western blot检测显示,经10 ng/mL IL-1β处理后,软骨细胞Col2α1 mRNA和蛋白表达水平均明显低于对照组($P<0.01$),而MMP13的表达则明显高于对照组($P<0.01$,图3B~D)。表明通过10 ng/mL IL-1β处理软骨细胞,成功模拟了体外骨关节炎样软骨细胞损伤。

2.3 FLIPUS干预对Col2α1及MMP13表达的影响

RT-PCR及Western blot结果显示,与对照组相比,IL-1β组Col2α1在mRNA和蛋白表达水平均明显降低,MMP13表达水平则明显升高($P<0.01$,图3B~D,图4)。而IL-1β+FLIPUS组Col2α1 mRNA($P<0.01$,图4A)和蛋白($P<0.05$,图4C、D)表达水平均明显高于IL-1β组,MMP13表达水平明显低于IL-1β组($P<0.01$,图4B~D)。Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色结果也显示,IL-1β组Col2α1阳性表达明显低于对照组($P<0.01$,图5),而IL-1β+FLIPUS组Col2α1阳性表达明显高于IL-1β组($P<0.05$,图5)。

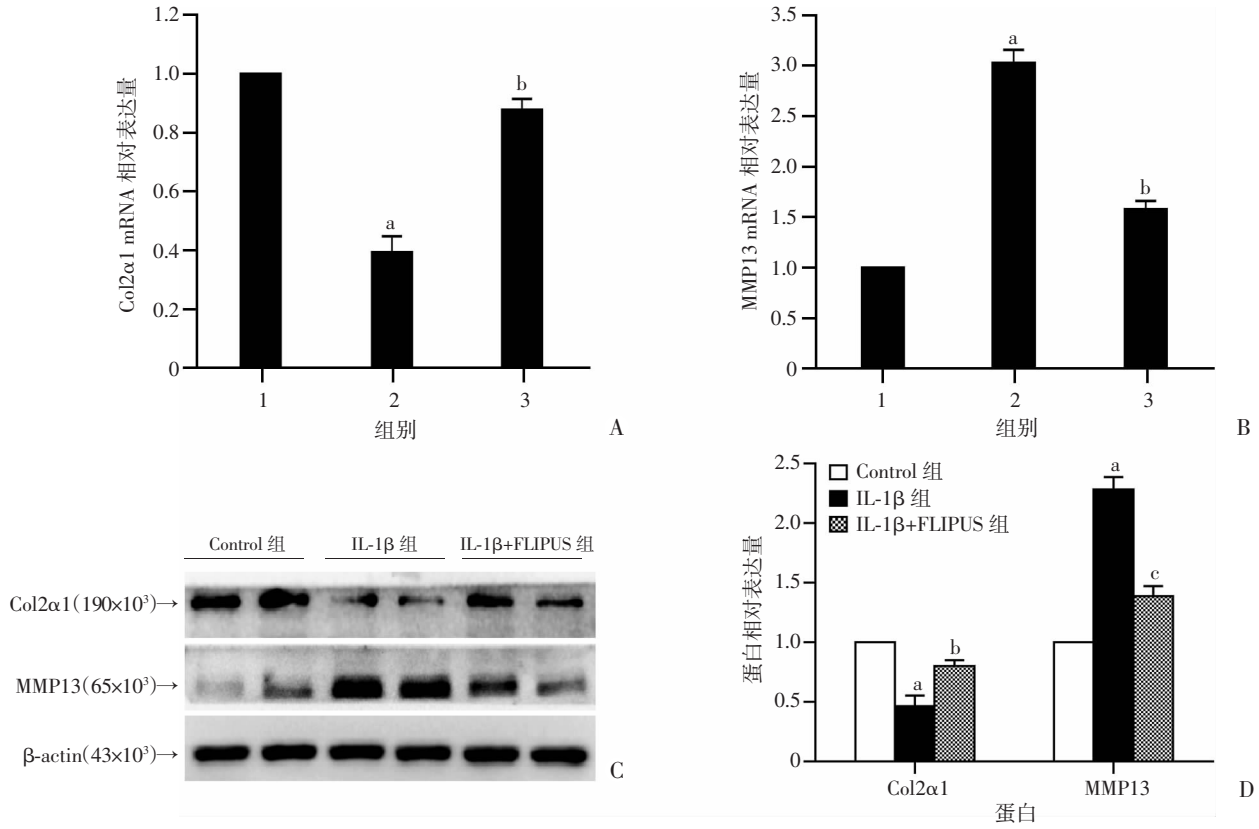
2.4 FLIPUS对线粒体自噬活化的影响

与对照组比较,IL-1β组LC3B-Ⅱ蛋白表达水平明显降低($P<0.05$,图6A、B);而与IL-1β组比较,IL-1β+FLIPUS组LC3B-Ⅱ表达水平则明显增高($P<0.01$,图6A、B);TOM20($P<0.01$)及TIM23($P<0.05$)蛋白表达水平均显著降低(图6A、C、D)。



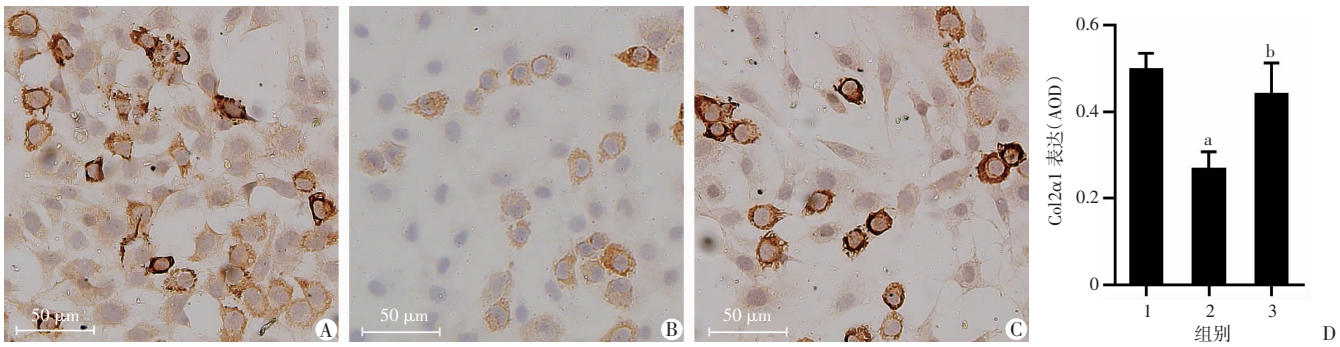
A:CCK-8实验检测不同浓度IL-1β处理24 h后软骨细胞的存活率 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与0 ng/mL IL-1β比较;B:RT-PCR检测软骨细胞Col2α1和MMP13 mRNA的表达 a:$P<0.01$,与Control组比较;C、D:Western blot检测软骨细胞Col2α1和MMP13蛋白表达及半定量分析 a:$P<0.01$,与Control组比较

图3 体外骨关节炎样软骨细胞损伤模型的构建及验证



A、B: RT-PCR 检测各组 Col2α1、MMP13 的 mRNA 表达　1:Control 组;2:IL-1β 组;3:IL-1β+FLIPUS 组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 IL-1β 组比较;C、D:Western blot 检测各组软骨细胞 Col2α1 和 MMP13 蛋白表达及半定量分析　a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 IL-1β 组比较

图 4　FLIPUS 对 OA 软骨细胞 Col2α1 及 MMP13 表达的影响

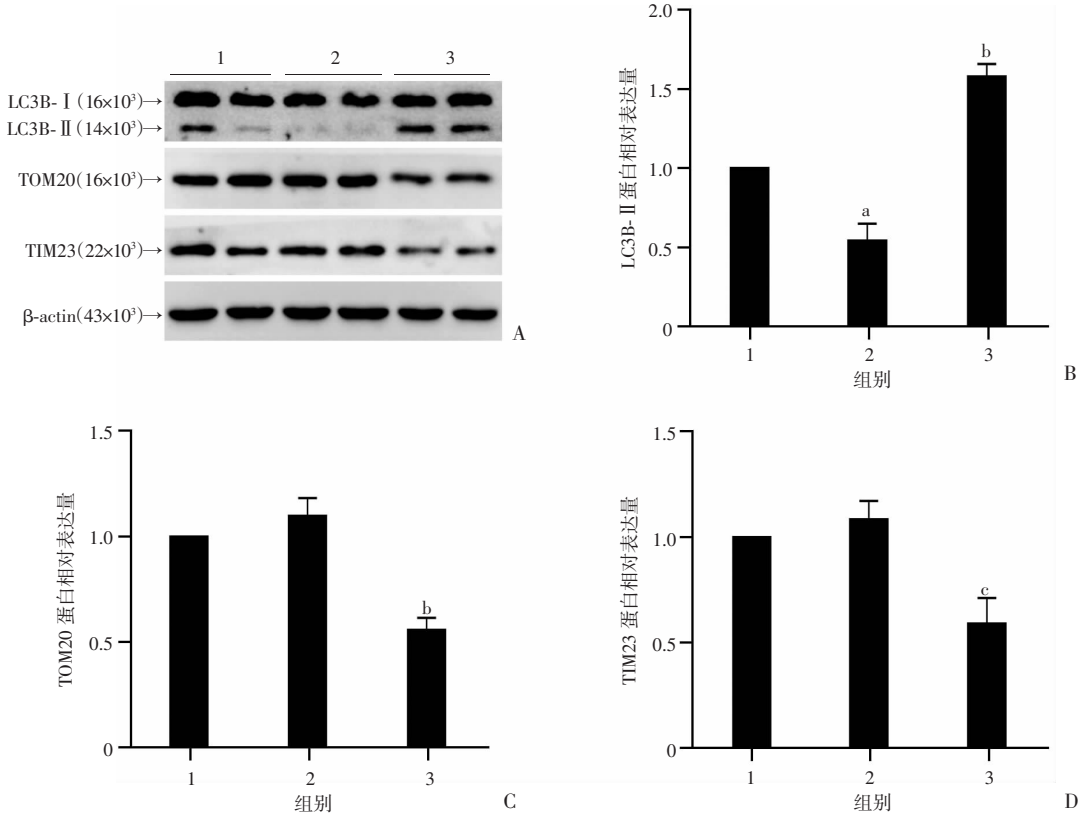


A:Control 组;B:IL-1β 组;C:IL-1β+FLIPUS 组;D:各组 Col2α1 相对表达情况　1:Control 组;2:IL-1β 组;3:IL-1β+FLIPUS 组;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 IL-1β 组比较

图 5　免疫细胞化学染色观察各组软骨细胞中 Col2α1 的表达

2.5　FLIPUS 干预对 PGAM5 蛋白表达及 FUNDC1 Ser13 去磷酸化的影响

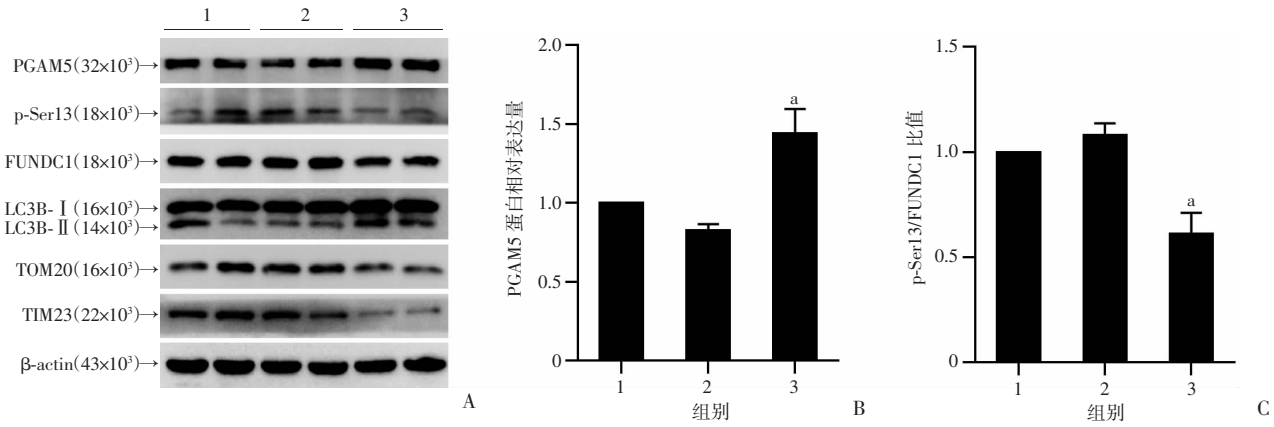
IL-1β+FLIPUS 组 LC3B-Ⅱ蛋白表达水平明显高于 IL-1β 组,线粒体膜蛋白 TOM20 及 TIM23 表达则明显低于 IL-1β 组(图 6、7A)。同时,与 IL-1β 组比较,IL-1β+FLIPUS 组 PGAM5 蛋白表达明显升高(图 7A、B,$P<0.01$),FUNDC1 Ser13 磷酸化水平(p-ser13/FUNDC1 比值)则明显降低(图 7A、C,$P<0.01$)。



1:Control 组;2:IL-1β 组;3:IL-1β+FLIPUS 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 IL-1β 组比较

A:Western blot 检测各组软骨细胞 LC3、TOM20 及 TIM23 蛋白表达;B:LC3B-Ⅱ蛋白表达的半定量分析;C:TOM20 蛋白表达的半定量分析;D:TIM23 蛋白表达的半定量分析

图 6 FLIPUS 对 OA 软骨细胞线粒体自噬的影响



1:Control 组;2:IL-1β 组;3:IL-1β+FLIPUS 组;a:$P<0.01$,与 IL-1β 组比较

A:Western blot 检测各组软骨细胞 PGAM5、FUNDC1、p-Ser13、LC3、TOM20 及 TIM23 的蛋白表达;B:PGAM5 蛋白表达的半定量分析;C:p-Ser13 与 FUNDC1 灰度值的比值

图 7 FLIPUS 对线粒体自噬通路 PGAM5-FUNDC1 的影响

3 讨论

KOA 是一种以关节软骨变性破坏、骨质增生及滑膜炎症为特征的慢性关节疾病。软骨细胞作为关节软骨内唯一细胞,具有数量少、分布稀疏等特点。保持软骨细胞有效的数量和质量,维持软骨基质合成与降解达到动态平衡,是延缓关节软骨退变的重要因素。超声波作为一种物理因子,与药物及手术治疗相比,具有

无创、副作用小等优点,早在1952年即应用于OA的治疗[7]。尽管有荟萃分析认为超声治疗可以缓解KOA疼痛,改善膝关节功能[8],然而传统的超声治疗疗效备受质疑[9-10]。国际骨关节炎研究学会(OARSI)发布的2014版指南也将治疗超声判定为疗效"不确定"[11]。因此需要从超声波的生物学效应和物理参数作进一步的研究,以寻求KOA治疗的有效方法。

传统非聚焦超声采用频率为1~1.5 MHz、声强为1~2.5 W/cm^2,以连续能量输出方式,作用于关节周围肌肉、关节囊等软组织[9-10, 12-13],利用超声的温热效应,达到缓解软组织痉挛、消除软组织肿胀、改善组织循环、促进炎症物质代谢等作用[9-10]。传统非聚焦超声虽然取得一定的疗效,然而病变的原发病灶关节软骨未得到有效的治疗,这可能是导致临床疗效不确定的原因之一[2]。从皮肤到关节软骨解剖层次复杂,超声波需要通过皮肤、皮下组织、浅筋膜、深筋膜、肌肉、关节囊、韧带等组织才能达到关节软骨,加之超声波在穿过各层解剖结构时会发生不同程度的衰减,很难达到软骨表面。同时,皮肤对温度刺激非常敏感,不能单纯通过提高超声功率达到治疗目的。因此需要从超声波的物理学特性和生物学效应选择适当的超声参数和方法对病变的关节软骨部位进行治疗。

前期研究发现,经频率为0.6 MHz超声刺激后,新西兰兔软骨全层缺损组织中蛋白多糖和Ⅱ型胶原等含量显著升高,明显优于1.0 MHz和1.5 MHz超声刺激[3]。周崑等[14]进一步研究表明,0.6 MHz聚焦超声可通过机械作用,促进葡萄糖等小分子物质向KOA模型的新西兰兔膝关节软骨内渗透,改善软骨营养。此外,根据ATKINS等[15]报道,多普勒成像模式下(3 MHz,290 mW/cm^2)作用10 min,软组织升温仅0.21 ℃。加之本研究采用脉冲输出方式,其温热效应可以忽略不计。因此,我们筛选出FLIPUS的最佳治疗参数(频率0.6 MHz,声强120 mW/cm^2,重复频率300 Hz,治疗头焦平面距离28 mm,脉冲宽度200 μs,占空比20%),能有效作用于关节软骨,从而达到最佳的治疗作用[3]。

最近,多个研究发现低强度脉冲超声可上调细胞自噬水平,对细胞起到保护作用[16-18]。通过电镜观察,我们也发现经FLIPUS干预后,软骨细胞内出现双层膜结构自噬体,提示FLIPUS能活化软骨细胞线粒体自噬。线粒体自噬活化是一个细胞分解代谢的过程,典型表现为细胞内出现双层膜结构自噬体吞噬线粒体,是唯一确定的线粒体更新机制。软骨细胞处于低氧微环境[19],低氧刺激下,通过多条信号通路实现线粒体自噬活化,特异性降解受损线粒体,减少促凋亡因子释放,防止软骨细胞进一步损伤,发挥抗细胞凋亡作用[20-21]。线粒体自噬活化途径中,线粒体自噬受体蛋白FUNDC1第13位丝氨酸(Ser13)去磷酸化,在促进线粒体自噬活化中起到关键作用[22],而其上游PGAM5是促进Ser13去磷酸化的关键蛋白磷酸酶[23]。因此,探明FLIPUS对PGAM5的调控作用,则可能初步阐明FLIPUS活化线粒体自噬的分子机制。通过本研究,我们发现FLIPUS可上调软骨细胞PGAM5蛋白表达,使FUNDC1第13位丝氨酸去磷酸化,增强其与LC3相互作用,促进LC3-Ⅰ转化为LC3-Ⅱ。为进一步说明线粒体自噬的发生及自噬流的畅通,本研究同时检测了线粒体膜蛋白TOM20及TIM23的表达量,当线粒体自噬流畅通时,受损线粒体通过溶酶体降解,TOM20及TIM23蛋白表达量会相应降低[22-23]。本研究发现FLIPUS在上调LC3-Ⅱ表达的同时,下调TOM20及TIM23蛋白表达水平,表明FLIPUS可活化软骨细胞线粒体自噬。

本研究还存在以下不足之处:①本研究只进行了体外培养细胞上的现象观察,FLIPUS通过PGAM5/FUNDC1途径活化线粒体自噬,抗软骨细胞凋亡的体内效应,将在下一步动物实验中进行证实;②本研究未讨论FLIPUS对PGAM5磷酸酶活性的影响,今后将进一步完善该部分内容。

综上所述,FLIPUS通过上调软骨细胞PGAM5蛋白表达,使FUNDC1第13位丝氨酸去磷酸化,活化线粒体自噬,发挥抗软骨细胞凋亡的作用。

参考文献:

[1] JIA L, WANG Y, CHEN J Y, *et al*. Efficacy of focused low-intensity pulsed ultrasound therapy for the management of knee osteoarthritis: a randomized, double blind, placebo-controlled trial[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35453. DOI: 10.1038/srep35453.

[2] 贾朗, 谭波涛, 陈锦云. 低强度脉冲聚焦超声治疗膝骨关节炎的安全性和有效性[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(5): 633-638. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.05.011.
JIA L, TAN B T, CHEN J Y. Safety and efficacy of focused low-intensity pulsed ultrasound therapy for the treatment of knee osteoarthritis[J]. J Shanghai Jiaotong Univ(Med Sci), 2020, 40(5): 633-638. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.05.011.

[3] JIA L, CHEN J Y, WANG Y, *et al*. Focused low-intensity pulsed ultrasound affects extracellular matrix degradation *via*

decreasing chondrocyte apoptosis and inflammatory mediators in a surgically induced osteoarthritic rabbit model[J]. Ultrasound Med Biol, 2016, 42(1): 208-219. DOI:10.1016/j.ultrasmedbio.2015.08.010.

[4] WANG S, DENG Z, MA Y, *et al*. The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14): 2675-2691. DOI:10.7150/ijbs.46627.

[5] LÓPEZ DE FIGUEROA P, LOTZ M K, BLANCO F J, *et al*. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(4): 966-976. DOI:10.1002/art.39025.

[6] ROCKEL J S, KAPOOR M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(9): 517-531. DOI:10.1038/nrrheum.2016.92.

[7] LINDAHL O. Clinical effect of ultrasonic waves in chondromalacic and osteoarthritic changes in the knee[J]. Rheumatism, 1952, 8(2): 36-37.

[8] LOYOLA-SÁNCHEZ A, RICHARDSON J, MACINTYRE N J. Efficacy of ultrasound therapy for the management of knee osteoarthritis: a systematic review with meta-analysis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(9): 1117-1126. DOI:10.1016/j.joca.2010.06.010.

[9] ULUS Y, TANDER B, AKYOL Y, *et al*. Therapeutic ultrasound versus sham ultrasound for the management of patients with knee osteoarthritis: a randomized double-blind controlled clinical study[J]. Int J Rheum Dis, 2012, 15(2): 197-206. DOI:10.1111/j.1756-185x.2012.01709.x.

[10] CAKIR S, HEPGULER S, OZTURK C, *et al*. Efficacy of therapeutic ultrasound for the management of knee osteoarthritis[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2014, 93(5): 405-412. DOI:10.1097/phm.0000000000000033.

[11] MCALINDON T E, BANNURU R R, SULLIVAN M C, *et al*. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis[J]. Osteoarthr Cartil, 2014, 22(3): 363-388. DOI:10.1016/j.joca.2014.01.003.

[12] OZGÖNENEL L, AYTEKIN E, DURMUŞOGLU G. A double-blind trial of clinical effects of therapeutic ultrasound in knee osteoarthritis[J]. Ultrasound Med Biol, 2009, 35(1): 44-49. DOI:10.1016/j.ultrasmedbio.2008.07.009.

[13] HUANG M H, LIN Y S, LEE C L, *et al*. Use of ultrasound to increase effectiveness of isokinetic exercise for knee osteoarthritis[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2005, 86(8): 1545-1551. DOI:10.1016/j.apmr.2005.02.007.

[14] 周崑, 周伟, 陈文直, 等. 低强度脉冲超声对美蓝渗入正常兔膝关节软骨的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(2): 121-124.
ZHOU K, ZHOU W, CHEN W Z, *et al*. Low intensity pulsed ultrasound for promoting penetration of methylene blue into knee cartilage of normal rabbit[J]. J Chongqing Med Univ, 2012, 37(2): 121-124.

[15] ATKINS T J, DUCK F A. Heating caused by selected pulsed Doppler and physiotherapy ultrasound beams measured using thermal test objects[J]. Eur J Ultrasound, 2003, 16(3): 243-252. DOI:10.1016/s0929-8266(02)00079-4.

[16] PANDIT R, LEINENGA G, GÖTZ J. Repeated ultrasound treatment of tau transgenic mice clears neuronal tau by autophagy and improves behavioral functions[J]. Theranostics, 2019, 9(13): 3754-3767. DOI:10.7150/thno.34388.

[17] ZHANG B, CHEN H G, OUYANG J J, *et al*. SQSTM1-dependent autophagic degradation of PKM2 inhibits the production of mature IL1B/IL-1β and contributes to LIPUS-mediated anti-inflammatory effect[J]. Autophagy, 2020, 16(7): 1262-1278. DOI:10.1080/15548627.2019.1664705.

[18] ZHOU H Y, LI Q, WANG J X, *et al*. Low-intensity pulsed ultrasound repair in mandibular condylar cartilage injury rabbit model[J]. Arch Oral Biol, 2019, 104: 60-66. DOI:10.1016/j.archoralbio.2019.05.018.

[19] MILNER P I, FAIRFAX T P A, BROWNING J A, *et al*. The effect of O2 tension on pH homeostasis in equine articular chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(11): 3523-3532. DOI:10.1002/art.22209.

[20] ZHANG F J, LUO W, LEI G H. Role of HIF-1α and HIF-2α in osteoarthritis[J]. Joint Bone Spine, 2015, 82(3): 144-147. DOI:10.1016/j.jbspin.2014.10.003.

[21] HU S, ZHANG C, NI L, *et al*. Stabilization of HIF-1α alleviates osteoarthritis *via* enhancing mitophagy[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(6): 481. DOI:10.1038/s41419-020-2680-0.

[22] LIU L, FENG D, CHEN G, *et al*. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells[J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(2): 177-185. DOI:10.1038/ncb2422.

[23] CHEN G, HAN Z, FENG D, *et al*. A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy[J]. Mol Cell, 2014, 54(3): 362-377. DOI:10.1016/j.molcel.2014.02.034.

(**收稿**:2020-09-23;**修回**:2020-11-05)

(编辑 张 维)