



• 学术动态 •

Nav1.7 调节软骨细胞并作为骨关节炎的治疗靶点

摘要 骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是常见的关节疾病。目前还没有能够同时防止关节退化和减少疼痛的治疗方法。有证据表明软骨细胞中存在电压门控钠通道 (voltage gated sodium channels, VGSCs), 但它们在软骨细胞和 OA 中的表达和功能仍不清楚。该研究发现, Nav1.7 作为一个与 OA 相关的 VGSCs, 人 OA 软骨细胞以 $0.1 \sim 0.15$ 个/ μm^2 和 $350 \sim 525$ 个通道/细胞的密度表达功能性 Nav1.7。在通过基因操作抑制 Nav1.7 的一系列小鼠模型上发现, 表达在背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元中的 Nav1.7 参与疼痛的调控, 而表达在软骨细胞中的 Nav1.7 调节 OA 进程。使用选择性或临床常用的泛 Nav 通道阻断剂, 可显著改善结构性关节损伤, 并减轻 OA 疼痛。Nav1.7 阻断剂调节细胞内 Ca^{2+} 信号和软骨细胞的分泌组, 进而影响软骨细胞生物学和 OA 进程。该研究证实, Nav1.7 为一个新发现的、在软骨细胞表达的 OA 相关 VGSCs, 可作为具有双重靶点特性的用于治疗 OA 和镇痛的非阿片类镇痛药。

一、研究背景

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种进行性关节退化和严重致残的退行性疾病。目前尚不清楚其主要病因是否因软骨损伤, 但 OA 总是涉及软骨破坏和独特的、用于保障关节承压和弹性功能所必需的细胞外基质的损失。软骨细胞在 OA 过程中经历了一系列复杂的合成代谢和分解代谢变化。软骨细胞在这一级联反应中作为核心调节角色, 既是外部生物力学和生化刺激的靶点, 也是调节关节软骨退化的蛋白酶、细胞因子和多种介质的源泉。OA 的患病率和致残率高, 目前仍无有效的治疗手段, OA 的分子机制也尚不清楚。

OA 除了有关节软骨损失外, 还表现为显著的疼痛。支配关节组织 (包括滑膜和软骨下骨组织) 丰富的特化外周感觉神经元与 OA 疼痛有关。它们表达一系列特有的电压门控钠通道 (voltage gated sodium channels, VGSCs)。在背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中选择性地表达、在导致外周疼痛的动作电位的发起和传播中发挥作用的 Nav1.7、Nav1.8 和 Nav1.9 可作为疼痛治疗靶点。如调节 DRG 内 Nav1.8 的表达可减轻 OA 疼痛。Nav1.7 在疼痛信号传导中起关键作用, 功能获得性 Nav1.7 突变导致的严重疼痛以及功能丧失性 Nav1.7 突变导致疼痛不敏感, 进一步支持 Nav1.7 可作为疼痛治疗的靶点。Nav1.7 功能获得性突变可增加部分 OA 病人的疼痛。Nav1.7 基因全敲鼠和 DRG 特异性敲除鼠也支持 Nav1.7 在炎性疼痛中发挥作用。在碘乙酸钠

(monosodium iodoacetate, MIA) 诱导的 OA 模型中, 鞘内注射 Nav1.7 选择性拮抗剂 ProTx II 可减轻疼痛。

VGSCs 多在可兴奋性细胞中表达, 在非电兴奋性的细胞中, 如星形胶质细胞、小胶质细胞、巨噬细胞和癌细胞等也有表达。软骨是一种无血管和无神经的组织, OA 时血管和感觉神经生长至软骨中可能有助于诱发疼痛。尽管有证据表明 VGSCs 的异常激活参与了 OA 疼痛的发生, 但软骨细胞中 VGSCs 是否存在、其功能如何, 以及它们在 OA 进展和疼痛中的作用仍基本未知。对正常人和 OA 病人软骨进行 RNA-seq, 发现 OA 中 Nav1.7 的表达显著上调。与 DRG 内 Nav1.7 仅参与 OA 疼痛不同, 软骨细胞内 Nav1.7 参与调节软骨细胞生物学过程和 OA 进展以及阻断 Nav1.7 可保护关节炎恶化, 至少是部分通过调节细胞内 Ca^{2+} 信号和软骨细胞分泌来实现的。

二、主要研究结果

1. OA 软骨细胞中 Nav1.7 表达升高

该研究首先用 RT-PCR 检测人软骨细胞中 VGSCs 的基因表达谱, 发现 *SCN2A*、*SCN3A*、*SCN4A*、*SCN8A*、*SCN9A* 和 *SCN11A* 在软骨细胞中有表达。通过对前期 RNA 测序数据集 (GSE168505) 的深入分析, 确认在软骨细胞中存在 6 个 VGSC 基因表达。与非 OA 软骨相比, OA 软骨中编码为 *SCN9A* 的 Nav1.7 mRNA 增加了 2.69 倍, 是唯一显著上调的 VGSC 的转录物。通过对人软骨细胞的细胞质和膜组分的分级分离和 Western blot 检测, 证实 Nav1.7 在软骨细胞中有膜定位。免疫组化显示, Nav1.7 在人和鼠



OA 软骨中的表达均增加。

2. OA 软骨细胞中 Nav1.7 电生理特性

来自 3 名 OA 病人的 77 个软骨细胞, 用 1 μM 的河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 处理, 阻断除了 Nav1.5、Nav1.8 和 Nav1.9 之外的所有 Nav 通道, 进而分离出 TTX 敏感型 (TTX-S) 电流。为证实 TTX-S 电流中包含 Nav1.7, 对 TTX-S 电流和 ProTx II 敏感 (ProTx II-S) 电流时程进行比较研究。在 TTX 处理的 4 个细胞中均有抑制作用; 在 ProTx II 处理的 5 个细胞也都有抑制作用。因 ProTx II 选择性地阻断 Nav1.7, 证明了 Nav1.7 的存在。

将 TTX-S 电流和 ProTx II-S 电流轨迹用峰值电流标准化后, 两者显示出相似的时程。与观察到的 TTX-S 和 ProTx II-S 电流时程相似性相一致, 它们的动力学参数无显著性差异, 支持 TTX-S 电流主要由 Nav1.7 产生的观点。通过分析失活时间常数、电流时峰值、总钠电流幅度和电流持续幅度等指标, 表明 Nav1.7 在 OA 软骨细胞钠电流中占比最大。

3. 软骨细胞中 Nav1.7 缺失可以保护 OA

在 DRG 神经元 (Nav1.7^{DRG}; Nav1.7 由 *Scn9a* 编码)、软骨细胞 (Nav1.7^{chondrocyte}) 以及两者均 (Nav1.7^{DRG;chondrocyte}) 条件性敲除 Nav1.7 的成年转基因鼠用他莫昔芬诱导后, 可以在 DRG 和软骨细胞中选择性敲除 Nav1.7。无论是手术 (内侧半月板失稳模型, DMM) 还是化学诱导 (MIA) 的 OA 模型鼠, 均表现出关节软骨的侵蚀或丢失以及 OA 相关疼痛。组织学分析显示, Nav1.7^{DRG} 和 Nav1.7^{chondrocyte} 鼠在 DMM 或 MIA 诱导的 OA 中均能显著减轻软骨丢失, 并降低 OARSI 评分。而 Nav1.7^{DRG;chondrocyte} 鼠在 DMM 模型中, 显著减少骨赘形成、缓解软骨下骨板的增厚 (硬化程度减轻), 并降低关节滑膜炎评分。Nav1.7^{DRG;chondrocyte} 鼠在 DMM 术后 3 个月内和 MIA 注射后 4 周内, 与 Nav1.7^{fllox} 鼠比较, 表现出更远的移动距离和显著降低的机械痛。膝关节的免疫组化研究显示, Nav1.7^{fllox} 对照鼠中与 OA 相关的合成代谢标志物 II 型胶原蛋白 (COL2) 减少、MMP13 增高、通过 ADAMTS5 切割产生的 Aggrecan 新表位的增加以及 COMP 片段的增加, 在手术或化学诱导的 Nav1.7^{DRG;chondrocyte} OA 鼠, 以上指标均得到改善。表明软骨细胞和 DRG 神经元表达 Nav1.7 同步参与调节 OA 进程和疼痛的调控。

为了区分软骨细胞和 DRG 神经元表达的 Nav1.7 对 OA 病程和疼痛的作用, 研究者用 DMM 法在 Nav1.7^{fllox}、Nav1.7^{chondrocyte} 和 Nav1.7^{DRG} 鼠建模。与 Nav1.7^{fllox} 鼠比较, Nav1.7^{chondrocyte} 鼠表现出软骨丢失减轻、骨赘形成减少、软骨下骨板的增厚降低和关

节滑膜炎评分减少; 也改善了运动和疼痛; 增高了 COL2、降低了 MMP13、Aggrecan 新表位水平以及 COMP 片段。与之形成对比的是, Nav1.7^{DRG} 鼠只表现出疼痛的缓解, 并无其他改善。表明 DRG 神经元中 Nav1.7 的敲除不参与软骨丢失的调控。总之, 软骨细胞表达的 Nav1.7 调节 OA 进展和相关疼痛, 而 DRG 神经元表达 Nav1.7 只对 OA 疼痛有贡献。

4. 抑制 Nav1.7 表达对 OA 有保护作用

在 WT 雄鼠 DMM 模型的术后 4 周开始, 隔天关节内注射载体 (对照) 或选择性 Nav1.7 阻断剂 PF-04856264, 持续 8 周。与对照组比较, PF-04856264 保护了关节软骨的结构并保持了软骨中蛋白聚糖的含量, 显著降低 OARSI 评分、骨赘形成和软骨下骨板厚度, 缓解了疼痛, 升高了 COL2, 但降低了 MMP13 和 Aggrecan 新表位水平。接受 PF-04856264 治疗的雌鼠与对照组相比, 表现出更少的关节软骨丢失、更低的 OARSI 评分以及疼痛的显著缓解。

在 MIA 模型中, 灌胃给予 PF-04856264 可以得到与关节局部给药类似的治疗效果, 虽没有明显的性别差异, 但能缓解 DMM 诱导的软骨丢失。

5. 卡马西平可缓解 OA 软骨丢失和疼痛

卡马西平是临床上使用的钠通道抑制剂, 能够作用于 Nav1.7, FDA 批准用于癫痫、双相情感障碍和神经病理性疼痛的治疗。MIA 鼠灌胃给予卡马西平, 在减轻软骨丢失、缓解疼痛、上调 COL2 和下调基质降解酶来保护软骨细胞中的促合成代谢和抗分解代谢效应, 与系统给予 PF-04856264 的疗效相似。在 DMM 鼠, 低剂量卡马西平显著减少术后 12 周的软骨损失, 但疼痛无显著改善; 中剂量和高剂量卡马西平具有更强的软骨损失保护、显著缓解疼痛。表明非特异性 VGSC 阻断剂 (如卡马西平), 可作为新型的 OA 疾病治疗药, 而不只是镇痛剂。

6. 阻断 Nav1.7 对软骨细胞生物学的调控

体外培养的软骨细胞, 由 IL-1 β 诱导的分解代谢基因包括 *MMP13*、*ADAMTS5*、*COX2* (*PTGS2*) 和 *NOS2* 的表达, 在给予 TTX 后受到抑制。用 ProTx II 和 PF-04856264 选择性抑制 Nav1.7 得到类似给予 TTX 的效果, 证明 Nav1.7 在抑制 IL-1 β 诱导的分解代谢中具有重要作用。同时给予 Nav1.7 阻断剂, 显著抑制了 TNF 和 poly (I:C) 诱导的软骨细胞分解代谢。TTX、ProTx II 或 PF-04856264 也显著诱导了合成代谢基因 (如 COL2 和 ACAN) 的表达。在分离的 Nav1.7^{chondrocyte} 鼠软骨细胞上证实, Nav1.7 敲除阻断了 IL-1 β 诱导的分解代谢。但在生理条件下, Nav1.7 敲除并未改变合成代谢。



对于原代培养的来自 6 名 OA 病人的软骨细胞, ProTx II 和 PF-04856264 处理都降低了 IL-1 β 诱导的 MMP13、ADAMTS5、COX2 和 NOS2 表达, 并升高 COL2 和 ACAN 的表达。OA 病人完整厚度的软骨组织体外培养实验, 在用 Nav1.7 阻断剂处理后的培养液上清中, 软骨分解代谢标志物 MMP13 显著降低, 而软骨基质成分润滑素 [蛋白聚糖 4 (PRG4)] 则高于对照组; 在炎症条件下培养时, Nav1.7 阻断剂也可降低分解代谢标志基因 MMP13 和 ADAMTS5 的表达, 而增加合成代谢标志基因 COL2 和 ACAN 的表达。

用 PF-04856264 或 ProTx II 处理软骨细胞后, 在收集的条件培养基中检测到了促进合成代谢标志物的表达, 并抑制了 IL-1 β 诱导的分解代谢分子的表达, 与直接用这些抑制剂处理软骨细胞的结果相似。表明条件培养基中的分泌因子介导了阻断 Nav1.7 对软骨细胞的生物学效应。

用串联质谱 (MS/MS) 分析与 UniProt 数据库进行对比, 分离并定性在条件培养基中介导 Nav1.7 调控软骨细胞合成代谢和分解代谢的分子。在 6 个符合标准的分子中, 研究者特别关注与软骨细胞生物学有关的 HSP70 (*HSPA1A* 和 *HSPA1B* 编码) 和 Midkine (*MDK* 编码)。用选择性 Nav1.7 阻断剂和泛 Nav 阻断剂 CBZ 处理后, 培养基中的 HSP70 和 Midkine 显著上调, 而细胞裂解液中的 HSP70 量保持不变。Midkine 在细胞裂解液中也上调, 表明 Nav1.7 阻断剂通过调节软骨细胞分泌来增加培养基中的 HSP70 和 Midkine。重组蛋白 HSP70 剂量依赖性增强软骨细胞的合成代谢, 而不影响分解代谢; 而重组蛋白 Midkine 剂量依赖性抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞分解代谢, 而不影响合成代谢。特异性抗体阻断条件培养基中的 HSP70 和 Midkine, 可消除条件培养基对软骨细胞的生物学效应。

在体给予 PF-04856264 缓解 DMM 鼠软骨丢失减少和 OA 疼痛, 但此保护作用几乎被联合应用 HSP70 抑制剂 VER155008 和 Midkine 抑制剂 iMDK 而消除。即使 VER155008 或 iMDK 单独应用也显著减低 PF-04856264 对 OA 的保护作用, 但不显著影响疼痛。总之, HSP70 和 Midkine 在抑制 Nav1.7 对 OA 的保护作用中发挥了重要作用。

与阻断 Nav1.7 上调人软骨细胞培养基中 HSP70 和 Midkine 一致, 基因敲除 Nav1.7 也可增加从 DMM 鼠分离的软骨细胞的 HSP70 和 Midkine 的分泌。与假手术小鼠比较, DMM 鼠血清 HSP70 和 Midkine 显著升高。临床上 OA 病人血清 HSP70

和 Midkine 显著高于健康者, 部分有症状膝 OA 病人的血清 HSP70 和 Midkine 含量与滑液内的含量呈相关。表明 Nav1.7 阻断至少部分是通过分别调控 HSP70 和 Midkine 的分泌, 来调节软骨细胞的合成代谢和分解代谢。

7. 阻断 Nav1.7 改变软骨细胞内 Ca^{2+} 信号

PF-04856264 可抑制 ATP 触发的人 OA 软骨细胞和人 C28I2 软骨细胞内 Na^+ 的增高。用 ProTx II 或 PF-04856264 抑制 Nav1.7 后, 两种细胞内均出现 Ca^{2+} 升高。C28I2 细胞用 Ca^{2+} 离子载体离子霉素和细胞通透性 Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA-AM 处理后, 有更多的 Ca^{2+} 信号参与了阻断 Nav1.7 对 HSP70 和 Midkine 分泌的调控。BAPTA-AM 处理减弱了软骨细胞中因阻断 Nav1.7 诱发的 HSP70 和 Midkine 的分泌增高。为研究 NCX 家族蛋白 (溶质载体家族 8 蛋白) 在阻断 Nav1.7 后软骨细胞内钙的调节作用, 在 ATP 刺激前使用 KB-R7943 来抑制 NCX。结果发现, KB-R7943 显著减少了 ATP 诱导的细胞内 Ca^{2+} 在最初 100 秒内的激增; 当 NCX 被 KB-R7943 阻断时, PF-04856264 对软骨细胞内钙水平的影响最小。表明 NCX 参与了阻断 Nav1.7 对细胞内 Ca^{2+} 信号的调控。而抑制 NCX 消除了阻断 Nav1.7 诱发的 HSP70 和 Midkine 的分泌增加。RT-PCR 检测到软骨细胞中明显表达 *NCX1* mRNA, 而 *NCX2* 和 *NCX3* 无法检测到。用 siRNA 敲减 *NCX1* 后, PF-04856264 介导的 Ca^{2+} 信号和 HSP70 以及 Midkine 的分泌几乎消失。总之, 软骨细胞内 Ca^{2+} 对于阻断 Nav1.7 后诱发的 HSP70 和 Midkine 的分泌增加至关重要, 而 *NCX1* 在调控钙信号和阻断 Nav1.7 导致的相关蛋白质分泌中起关键作用。

三、讨论

该研究证明了 Nav1.7 阻断剂通过调节软骨细胞分泌组来影响软骨细胞的合成代谢和分解代谢。Nav1.7 作为一个与 OA 相关的离子通道, 在疼痛和软骨稳态中具有双重作用: DRG 神经元表达 Nav1.7 参与疼痛调控, 而软骨细胞表达 Nav1.7 通过大力调控软骨细胞分泌组进而调节软骨细胞生物学、软骨丢失和 OA 疼痛。在软骨细胞内表达的 Nav1.7, 可作为 OA 治疗的新靶点, 提供了既具有疾病修饰作用又无成瘾性镇痛治疗新方案。

(Fu W, Vasylyev D, Bi Y, *et al.* Nav1.7 as a chondrocyte regulator and therapeutic target for osteoarthritis. *Nature*, 2024, 625(7995):557-565. 南通大学药学院, 戈家宜 译, 刘兴君 校)