网络出版时间:2018 - 4 - 27 9:39 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180426.1411.009.html

乙酰唑胺对 IL - 1β 诱导的大鼠关节软骨细胞凋亡的影响及机制研究

陈伟娜[1],李春梅[1],朱仲珍[1],蔡 莉[2],李 荣[1]

摘要 **目的** 探讨水通道蛋白 1(AQP1)抑制剂乙酰唑胺(AZ)对 IL-1β 诱导的大鼠关节软骨细胞凋亡的影响及机制。**方法** 分离培养大鼠关节软骨细胞主要采用胰酶 - 胶原酶法,IL-1β 诱导软骨细胞凋亡,AZ 体外处理 IL-1β 刺激的关节软骨细胞,MTT 法检测细胞增殖,hoechst 33258 染色、Annexin V-FITC/PI 双染和 rhodamine-123 染色检测细胞凋亡,Western blot 法检测 AQP1、Bcl-2、Bax、Caspase3、IκBα、p-IκBα、NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 的蛋白表达。**结果** AZ(12.5、25、50 μmol/L)剂量依赖性地提高 IL-1β 诱导的软骨细胞增殖;AZ 可以抑制 IL-1β 诱导的大鼠关节软骨细胞凋亡,表现为减少细胞凋亡形态学改变、降低软骨细胞凋亡率和提高软骨细胞线粒体膜电位;与正常组比较,IL-1β 组 AQP1 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达降低,Bax 和 Caspase3 蛋白表达升高,IκB 蛋白表达下降,p-IκBα 和 p-NF-κB p65 蛋白表达增加;与 IL-1β 组比较,AZ 抑制 AQP1 表达,提高 Bcl-2 表达,降低 Bax 和 Caspase3 表达,抑制 IκBα 的降解和磷酸化,并减少 p-NF-κB p65 蛋白表达。**结论** AZ 体外能抑制 IL-1β 诱导的关节软骨细胞凋亡。该项结果可能与下调 Caspase3 和 Bax(均为促凋亡基因)表达、上调 Bcl-2(抗凋亡基因)表达及抑制 NF-κB 炎症通路活化有关。

关键词 乙酰唑胺;水通道蛋白 1;类风湿性关节炎;关节软骨细胞;凋亡;NF-κB 通路

中图分类号 R 967

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2018)05 - 0700 - 07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.05.009

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种自身免疫性疾病,主要以慢性滑膜炎症、软骨和骨质破坏为特征。RA 关节软骨细胞功能异常,丧失了合成、修复软骨基质的能力而导致软骨损伤,软骨损伤与 RA 严重程度和预后密切相关,保护软骨功能可以有效降低 RA 致残率[1]。迄今为止,水通道蛋白(aquaporins,AQPs)已在哺乳动物中鉴定和克隆出 13 种 AQPs(AQP0 ~ 12)亚型,顾名思义,都是与水通透性相关的膜蛋白。研究[2-4]表明 AQP1 在 RA 疾病进展中发挥重要作用:AQP1 在 RA 患者滑膜和关节软骨组织中均表达升高,AQP1 能调节软骨细胞体积和基质合成,与 RA 软骨损伤、关节积

2018 - 02 - 06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81102273);高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号:gxyqZD2016045)

作者单位:安徽医科大学[1]药学院、[2]病理学教研室,合肥 230032

作者简介:陈伟娜,女,硕士研究生;

李 荣,男,副教授,研究生导师,责任作者,E-mail:aydlirong@163.com

hyperplasia (BPH) in rats by establishing a metabolic syndrome model in SD rats and to investigate the expression of Ⅱ type 5α-reductase (SRD5A2). ***Methods*** SD rats model of metabolic syndrome was established by high-fat and high-sugar feeding method; after treatment with metformin for 40 d, rats were sacrificed and prostatic tissue, fasting blood glucose (FBG), fasting blood insulin (FINS), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), body weight, prostate tissue weight and prostate index were obtained. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of SRD5A2 in prostate tissue. ***Results*** Metabolic syndrome was induced by high-fat diet successfully, significant increase in FINS and HOMA-IR ($P < 0.05$) were found in high-fat diet than normal diet, and prostatic hyperplasia occurred in this model, significant increase in weight, prostate weight and prostate index ($P < 0.05$) were found in this SD rats model. However, insulin sensitizer significantly improved insulin resistance, hyperplasia degree of prostate and high expression of SRD5A2 protein in high fat and sugar fed rats ($P < 0.05$) compared with that of the high-fat diet treatment rats. The expression of SRD5A2 in hyperplastic prostate tissue was increased, and was positively associated with the degree of hyperplasia of prostate. ***Conclusion*** Metabolic syndrome induced by high-fat and high-glucose feeding is an important influencing factor of benign prostatic hyperplasia in rats. Insulin sensitizer can treat benign prostatic hyperplasia caused by metabolic syndrome.

Key words metabolic syndrome; benign prostatic hyperplasia; metformin; SRD5A2

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

液、滑膜炎症和关节肿胀等密切相关，调控 AQP1 的表达和功能可能是 RA 的潜在治疗靶点。该研究使用炎症因子白介素(intertleukin，IL)-1β 诱导大鼠关节软骨细胞致其损伤作为软骨细胞凋亡的体外模型，观察 AQP1 抑制剂乙酰唑胺(acetazolamide，AZ)对 IL-1β 诱导的软骨细胞凋亡的影响，并从影响凋亡相关基因表达和 NF-κB 通路探讨其可能机制，为防治 RA 尤其是保护 RA 关节软骨提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Sprague-Dawley 大鼠(安徽医科大学实验动物中心)，清洁级，雄性，2～3 周龄，100～120 g。

1.2 药物与试剂 AZ、Ⅱ型胶原酶(美国 Sigma 公司)；IL-1β(美国 PeproTech 公司)；Rhodamine-123(北京索莱宝科技公司)；Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(上海贝博生物公司)；MTT、Hoechst 33258 染色液(上海碧云天生物技术研究所)；所有抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

1.3 软骨细胞的分离培养与鉴定 参考文献[5]方法，分离大鼠膝关节表面软骨，37 ℃下胰酶和 0.2% Ⅱ型胶原酶分别消化 30 min 和 3 h；200 目滤网过滤，1 500 r/min 离心 10 min，PBS 清洗，收集细胞；加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 吹打均匀后移入培养瓶，培养 48 h，换液，除去未贴壁细胞，当原代培养的细胞连成片时进行消化传代。本实验中所用细胞为传 1～3 代的关节软骨细胞，采用光镜下观察细胞形态、Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色和蛋白多糖甲苯胺蓝染色等进行软骨细胞的鉴定。

1.4 MTT 法检测细胞增殖 收集大鼠关节软骨细胞，制成单细胞悬液，接种于 96 孔板(密度 5×10^8/L)，分为 6 组：正常组，IL-1β 诱导组(终浓度 10 mg/L，浓度参考文献[6])，AZ 体外给药组(终浓度分别为 12.5、25、50、100 μmol/L)。每孔 100 μl，37 ℃、5% CO_2 培养 48 h 贴壁，弃去培养液。正常组不做处理，仅加入 DMEM 培养液培养 44 h，IL-1β 诱导组加入含 IL-1β 的 DMEM 培养液培养 44 h，各给药组加入含 IL-1β 和不同浓度 AZ 的 DMEM 培养液培养 44 h，每孔细胞均加入 10 μl MTT(5 g/L)继续孵育 4 h 后，再加入 150 μl DMSO 溶解细胞内结晶，室温振荡溶解，用酶标仪在 570 nm 测定吸光度值(即 A_{570}值)。

1.5 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡 将关节软骨细胞以 2×10^8/L 的细胞密度接种于 6 孔板(孔内预置无菌爬片)，分为正常组、IL-1β 诱导组和 3 组 AZ 给药组(12.5、25、50 μmol/L)，每孔 2 ml 细胞悬液，培养 48 h 后弃去培养液，IL-1β 组加入含 IL-1β 的培养基培养 24 h，各给药组加入含 10 mg/L IL-1β 和不同浓度 AZ 的培养液培养 24 h，PBS 洗涤，4% 多聚甲醛固定，0.1% TritonX 通透，滴加 Hoechst 33258 染液(10 mg/L)避光染色 30 min，荧光显微镜下观察拍照。

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 各组细胞经相应处理后，吸取上清液至离心管，贴壁细胞用胰酶消化后将细胞转入对应离心管，离心，收集细胞，PBS 洗涤，加入 400 μl Annexin V 结合液悬浮细胞，加入 5 μl Annexin V-FITC 染色液，4 ℃避光孵育 15 min，再加入 10 μl PI 染色液 4 ℃孵育 5 min，流式细胞仪检测，采用 WinMDI 软件进行分析。

1.7 Rhodamine-123 染色观察细胞凋亡 按前述方法进行细胞爬片和药物处理，PBS 洗涤，加入含 Rhodamine-123(终浓度 10 μmol/L)的 DMEM 培养液，37 ℃孵育 30 min，PBS 洗涤，4% 多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗涤，封片，荧光显微镜下观察拍照。选取 5 个不同的视野，用 ImageJ 图片分析软件对各视野平均荧光强度进行分析统计。

1.8 Western blot 检测相关蛋白 ① 各组细胞经相应处理后，加入 400 μl 含磷酸酶抑制剂及 PMSF 的裂解液，在冰上振动裂解约 20～30 min；② 裂解结束后，利用刮棒将细胞刮至一侧，将细胞碎片移至 1.5 ml 离心管中，先涡旋 10 次再 12 000 r/min 离心取上清液于新的 EP 管中；③ 取适量上清液加入蛋白上样缓冲液(4∶1)，摇匀，100 ℃煮沸 10 min，冷却待用；④ SDS-PAGE 电泳分离样品，转膜(PVDF 膜)，配置 5% 脱脂牛奶封闭 3 h，加入一抗孵育过夜(4 ℃)，二抗孵育 1 h；⑤ 使用 ECL 发光试剂盒在显影仪中显影，采用 ImageJ 图片分析软件对蛋白条带灰度值进行分析处理。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 One-Way ANOVA 检验，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞的鉴定 主要通过观察细胞形态变化、蛋白多糖及Ⅱ型胶原的表达，进行关节软骨细胞的鉴定。如图 1A 所示，传 1 代的细胞形态以梭形为主，细胞质丰富，细胞周围可见具有折光性的细胞外基质(extracellular matrix，ECM)。Ⅱ型胶原免疫

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

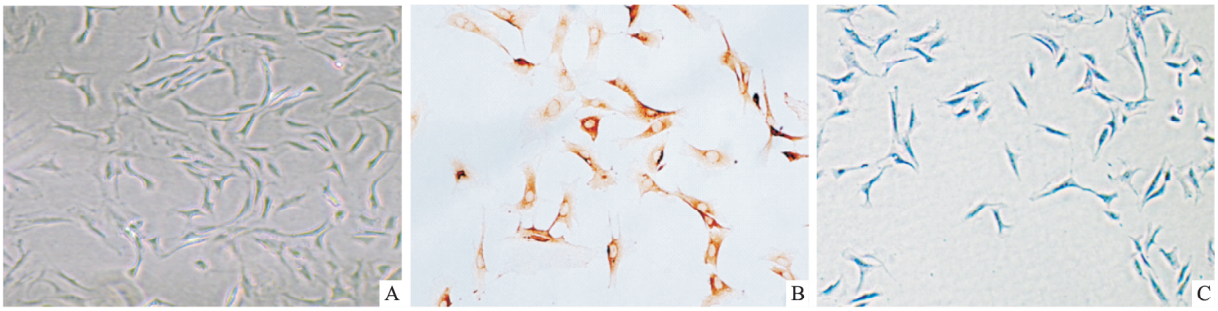

图1 大鼠关节软骨细胞的培养和鉴定 ×200

A: 传1代软骨细胞光镜观察; B: Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色鉴定; C: 甲苯胺蓝染色鉴定

细胞化学染色鉴定显示: 软骨细胞胞质被染成棕色，密集生长处染色较深，表明Ⅱ型胶原存在表达(图1B)。甲苯胺蓝染色结果显示: 细胞质被染成浅蓝色，胞核被染成深蓝色，有时可见双核，表明存在蛋白多糖的表达(图1C)。上述实验结果表明培养的细胞与关节软骨细胞特征一致。

2.2 AZ对IL-1β诱导的软骨细胞增殖的影响 MTT法检测AZ体外对IL-1β诱导的关节软骨细胞增殖的影响。如图2所示，IL-1β诱导组软骨细胞的增殖反应明显低于正常组($F=14.03$，$P<0.01$)，与IL-1β诱导组相比，AZ(12.5、25、50、100 μmol/L)体外给药能不同程度地提高IL-1β诱导的软骨细胞增殖反应，其中25、50和100 μmol/L差异有统计学意义，考虑到50 μmol/L AZ的作用优于100 μmol/L，且AZ在12.5～50 μmol/L表现出剂量依赖性($r=0.731$，$P<0.01$)，因此选择12.5、25和50 μmol/L 3个AZ浓度进行下一步研究。

2.3 Hoechst 33258染色观察AZ抑制IL-1β诱导的软骨细胞凋亡 Hoechst 33258作为一种特异性DNA染料，通过其染色荧光强度能反应细胞凋亡情况。如图3所示，正常组软骨细胞的细胞核多数呈现均匀的蓝色荧光; IL-1β诱导组软骨细胞可见较多的染色质固缩、聚集和核碎裂，呈现出典型凋亡形态学改变，表明IL-1β诱导组软骨细胞存在异常凋亡过程; AZ体外给药组仅有少量的软骨细胞出现凋亡形态学改变，提示AZ对IL-1β诱导的软骨细胞具有抗凋亡作用。

2.4 Annexin V-FITC/PI双染检测AZ抑制IL-1β诱导的软骨细胞凋亡 如图4所示，在双变量散点图上，$FITC^-/PI^+$(左上象限)表示死细胞，$FITC^+/PI^+$(右上象限)表示中晚期凋亡细胞，$FITC^-/PI^-$(左下象限)表示活细胞，$FITC^+/PI^-$(右下象限)表示早期凋亡细胞，右上和右下象限的细胞占全部细胞的比例代表细胞凋亡率(%)，定量分析结果表明，与正常组(9.20±0.94)%相比，IL-1β诱导组关

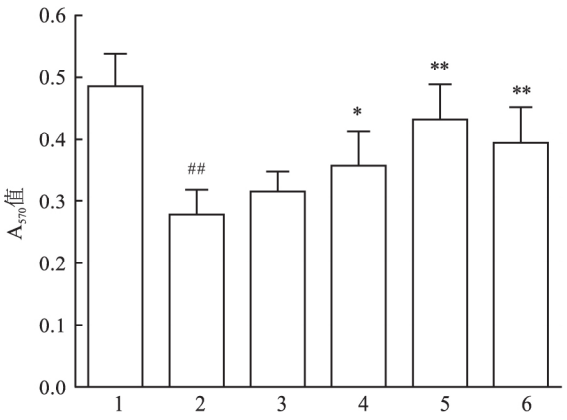

图2 AZ对IL-1β诱导的关节软骨细胞增殖的影响

1: 正常组; 2: IL-1β诱导组; 3: AZ 12.5 μmol/L; 4: AZ 25 μmol/L; 5: AZ 50 μmol/L; 6: AZ 100 μmol/L; 与正常组比较: $^{\#\#}P<0.01$; 与IL-1β诱导组比较: $^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

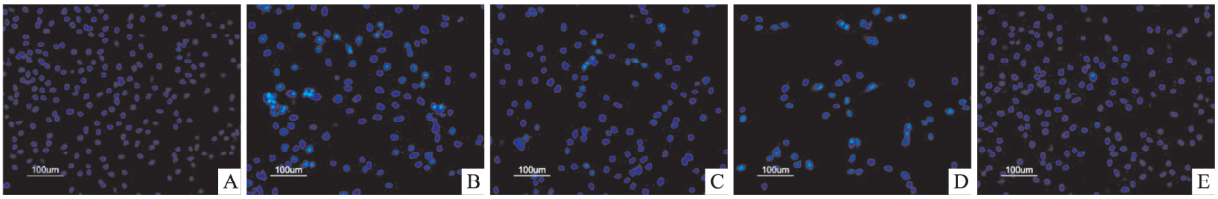

图3 Hoechst 33258染色观察AZ抑制IL-1β诱导的关节软骨细胞凋亡 ×100

A: 正常组; B: IL-1β诱导组; C: AZ 12.5 μmol/L; D: AZ 25 μmol/L; E: AZ 50 μmol/L

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

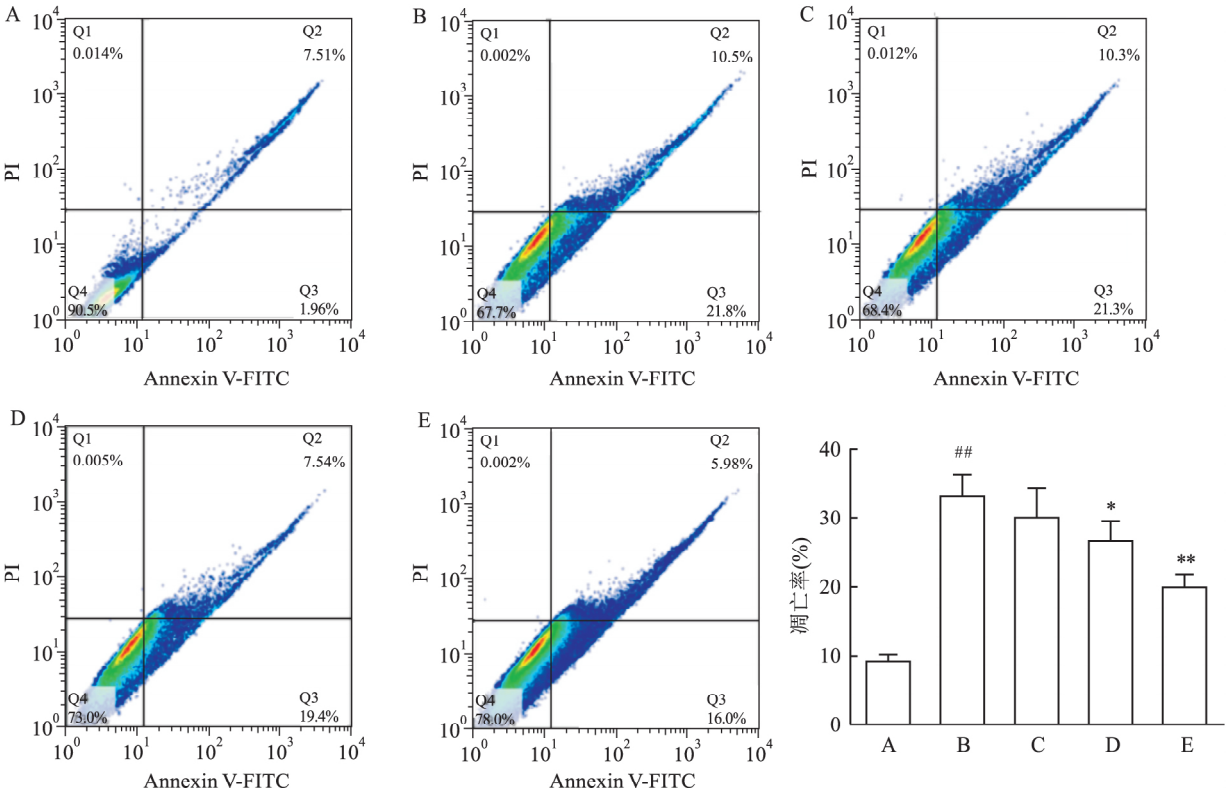

图4 Annexin-V FITC/PI 双染检测 AZ 抑制 IL-1β 诱导的关节软骨细胞凋亡

A: **正常组**; B: IL-1β **诱导组**; C: AZ 12.5 μmol/L; D: AZ 25 μmol/L; E: AZ 50 μmol/L; **与正常组比较**: $^{\#\#}P<0.01$; **与** IL-1β **诱导组比较**: $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

节软骨细胞的凋亡率(33.18±3.06)% **明显增高**($F=34.19$, $P<0.01$), AZ(12.5、25、50 μmol/L) **能剂量依赖性地降低** IL-1β **诱导的软骨细胞凋亡率**($r=-0.855$, $P<0.01$), **其中** AZ(25、50 μmol/L) **的差异有统计学意义**。

2.5 Rhodamine-123 染色检测 AZ 抑制 IL-1β 诱导的软骨细胞凋亡 线粒体能够在细胞凋亡过程中起枢纽作用, 其膜电位的下降是凋亡级联反应中最早期事件。Rhodamine-123 作为亲脂性阳离子荧光染料在结合到线粒体基质后, 其荧光的变化说明线粒体内膜电负性的相应改变。如图5所示, 正常组软骨细胞线粒体染色分布均匀, 荧光强度强; IL-1β 诱导组软骨细胞线粒体对 Rhodamine-123 的摄取能力降低, 荧光强度弱; 半定量分析结果表明, 与 IL-1β 诱导组相比, 不同剂量 AZ 处理组软骨细胞的荧光强度有不同程度的提高($F=37.41$, $P<0.01$), 其中 AZ(25、50 μmol/L) 差异有统计学意义。

2.6 AZ 对 IL-1β 诱导的软骨细胞中 AQP1 和凋亡相关基因蛋白表达的影响 Western blot 法检测 AQP1、Bax、Bcl-2 和 Caspase3 蛋白表达并进行统计学分析(图6)。IL-1β 组软骨细胞中 AQP1 蛋白表达增高, AZ 体外给药可以抑制 AQP1 蛋白表达($F=11.99$, $P<0.01$); 同时, 与正常组比较, IL-1β 组的 Bcl-2 蛋白表达显著下降($F=30.10$, $P<0.01$), 而 Bax 和 Caspase3 蛋白表达明显升高($F=50.13$、167.88, $P<0.01$), 与 IL-1β 组比较, AZ 体外能够提高 Bcl-2 蛋白表达, 并且降低 Bax 和 Caspase3 蛋白表达, 这可能与 AZ 抑制 IL-1β 诱导的软骨细胞凋亡的作用密切相关。

2.7 AZ 对 IL-1β 诱导的软骨细胞中 NF-κB 信号通路的影响 Western blot 法检测 NF-κB 信号通路相关蛋白表达并进行统计学分析(图7)。与正常组比较, IL-1β 组 IκB 蛋白表达下降($F=172.03$, $P<0.01$), 而 p-IκBα 和 p-NF-κB p65 蛋白表达增加($F=56.19$、61.84, $P<0.01$), 与 IL-1β 组比较, AZ 体外可以有效抑制 IκBα 的降解和磷酸化, 并显著减少 p-NF-κB p65 蛋白表达, 而各组细胞中 NF-κB p65 的蛋白表达水平无明显改变($F=0.49$, $P>0.01$), 表明 AZ 体外给药降低 IL-1β 诱导的关节软骨细胞凋亡可能通过抑制 NF-κB 信号通路的活化实现。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

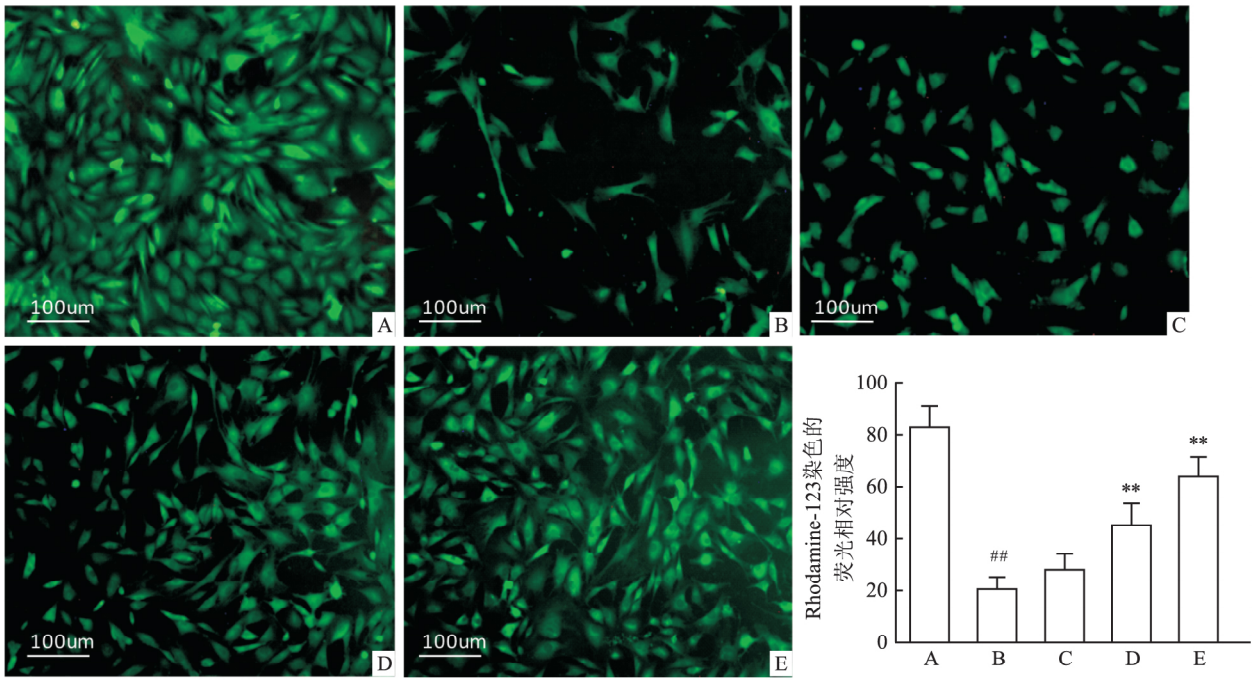

图5 Rhodamine-123 染色检测 AZ 抑制 IL-1β 诱导的关节软骨细胞凋亡 ×100

A: **正常组**; B: IL-1β **诱导组**; C: AZ 12.5 μmol/L; D: AZ 25 μmol/L; E: AZ 50 μmol/L; **与正常组比较:** $^{\#\#}P<0.01$; **与** IL-1β **诱导组比较:** $^{**}P<0.01$

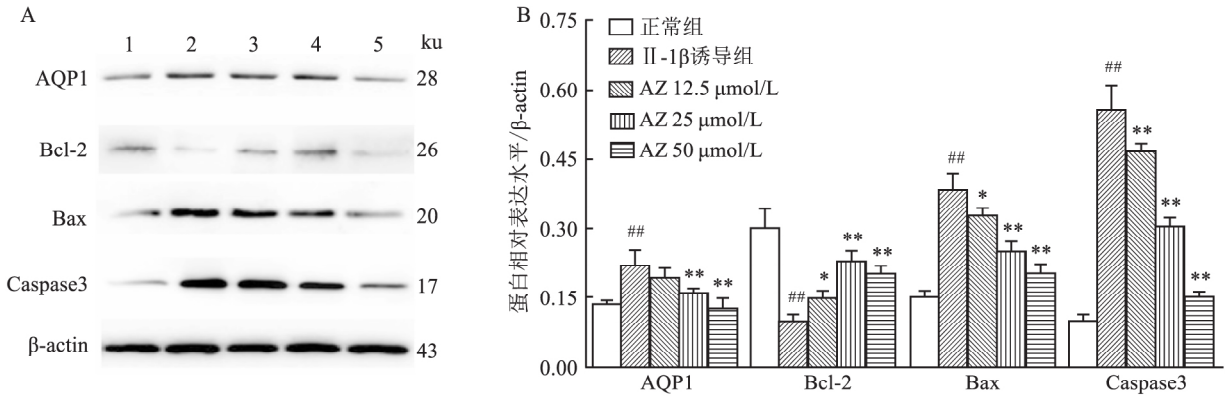

图6 AZ 对 IL-1β 诱导的软骨细胞中 AQP1 和凋亡相关基因蛋白表达的影响

A: **各组细胞中** AQP1、Bcl-2、Bax **和** Caspase3 **蛋白表达的典型条带图**; B: **蛋白表达的半定量分析统计图**; 1: **正常组**; 2: IL-1β **诱导组**; 3: AZ 12.5 μmol/L; 4: AZ 25 μmol/L; 5: AZ 50 μmol/L; **与正常组比较:** $^{\#\#}P<0.01$; **与** IL-1β **诱导组比较:** $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

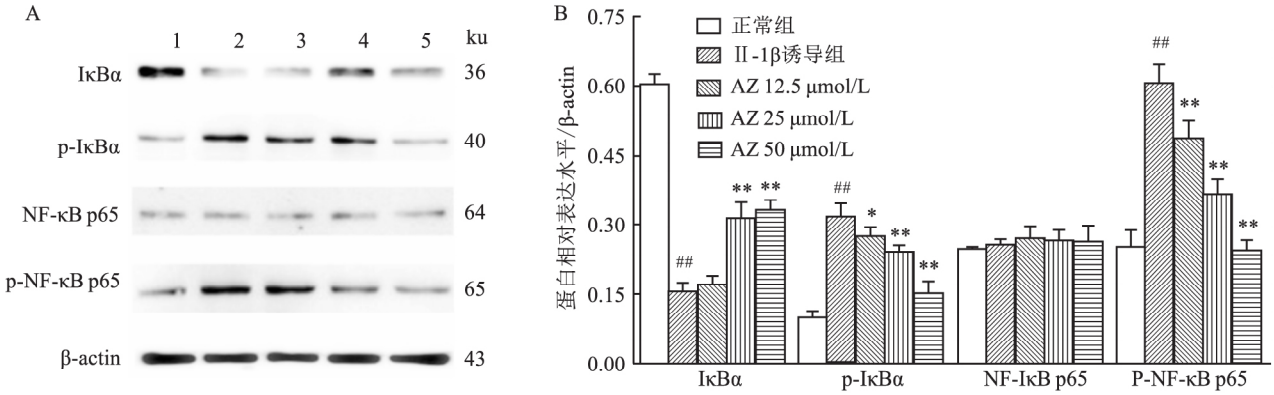

图7 AZ 对 IL-1β 诱导的软骨细胞中 NF-κB 信号通路的影响

A: **各组细胞中** IκBα、p-IκBα、NF-κB p65 **和** p-NF-κB p65 **蛋白表达典型条带图**; B: **蛋白表达的半定量分析统计图**; 1: **正常组**; 2: IL-1β **诱导组**; 3: AZ 12.5 μmol/L; 4: AZ 25 μmol/L; 5: AZ 50 μmol/L; **与正常组比较:** $^{\#\#}P<0.01$; **与** IL-1β **诱导组比较:** $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

软骨细胞作为关节软骨中的唯一细胞类型,维持软骨组织乃至关节的内环境稳定。RA 患者关节软骨细胞存在过度凋亡,引发关节软骨 ECM 迅速而广泛的损失,抑制软骨细胞凋亡有望成为 RA 治疗的新方法[7-9]。在 RA 患者滑液和血清中 IL-1β 是最重要的促炎细胞因子,其通过参与抑制Ⅱ型胶原、蛋白多糖的合成以及诱导软骨细胞的凋亡、刺激基质金属蛋白酶的产生从而导致软骨 ECM 降解诱发关节软骨损伤。现今,IL-1β 诱导建立关节软骨细胞的凋亡模型已被广泛应用[6,10]。所以本研究以 IL-1β 诱导分离培养的大鼠关节软骨细胞使其凋亡,观察 AZ 体外对 IL-1β 诱导的关节软骨细胞凋亡的影响,并探讨其可能机制。

大量研究表明,碳酸苷酶抑制剂 AZ 可以显著降低 AQP1 介导的水通透性[11],并能够直接抑制 AQP1 的表达进而发挥抑制肿瘤转移和血管生成的能力[12],故 AZ 可以作为合适的 AQP1 抑制剂,与既往报道一致;本研究显示 AZ 体外给药能够有效抑制 IL-1β 诱导组软骨细胞中 AQP1 蛋白表达。参考既往文献中 AZ 的体外给药剂量,本研究采用 MTT 法观察了 AZ(12.5、25、50、100 μmol/L)对 IL-1β 诱导的软骨细胞增殖的影响,结果显示 AZ 在 12.5 ~ 50 μmol/L 浓度范围内能剂量依赖性地提高 IL-1β 诱导的软骨细胞增殖反应。Hoechst 33258 染色结果表明,IL-1β 组软骨细胞呈现出典型的凋亡形态学改变如染色质固缩和核碎裂,而 AZ 组多数细胞呈现均匀蓝色荧光,凋亡细胞数相对减少。Annexin-V FITC/PI 双染法结果表明,与正常组相比,IL-1β 诱导组的细胞凋亡率显著增高,AZ 体外给药可以剂量依赖性地降低 IL-1β 诱导的软骨细胞凋亡率。Rhodamine-123 染色结果表明,IL-1β 诱导组软骨细胞的荧光强度弱,不同剂量 AZ 处理组软骨细胞的荧光强度有不同程度的提高。上述结果提示 IL-1β 诱导的关节软骨细胞存在明显的细胞凋亡过程,AZ 体外能够有效抑制其过度凋亡。

细胞凋亡是一种为维持内环境稳定的细胞自主性死亡,多种癌基因和抑癌基因都参与了对凋亡的调控。Bcl-2 基因家族中的 Bcl-2 和 Bax 是细胞凋亡的重要调节因子,Bax 介导线粒体细胞色素 C 的释放促进细胞凋亡,而 Bcl-2 与促凋亡蛋白形成异源二聚物抑制细胞凋亡[13]。作为级联反应中的关键蛋白酶,Caspase3 调控各条凋亡通路,是凋亡的最终执行者,抑制 Caspase3 活性或功能可减少细胞凋亡[14]。文献[7,15]报道指出 RA 软骨组织中 Bcl-2 蛋白表达降低,Caspase3 蛋白表达升高,与 RA 关节软骨细胞的异常凋亡过程密切相关。在本研究中,IL-1β 诱导组中 Bcl-2(抗凋亡基因)蛋白表达显著下调,而 Bax 和 Caspase3(促凋亡基因)蛋白表达明显升高,AZ 体外可以上调 Bcl-2 表达、下调 Bax 和 Caspase3 表达,表明 AZ 能够通过调控凋亡相关基因的表达进而发挥其抗凋亡作用。

NF-κB 信号通路异常活化在 RA 的发生和发展过程中发挥重要作用,参与 RA 滑膜炎症和关节软骨损伤[16]。在静息状态时,胞质中的 NF-κB p65 与 IκB 结合形成无活性的二聚体;在应激状态时,IκB 磷酸化并迅速降解,NF-κB p65 与 IκB 分离,活化的 NF-κB p65 进入细胞核,导致众多促炎介质的产生。与既往文献[10]报道一致,IL-1β 诱导组软骨细胞存在 NF-κB 信号通路的过度活化,表现为 IκB 蛋白表达下降,而 p-IκBα 和 p-NF-κB p65 蛋白表达增加。余涵 等[17]报道 AZ 体内给药可以抑制慢性癫痫大鼠海马组织中 NF-κB 信号通路的活化,与之相似,在本研究中,AZ 体外给药可以提高 IκB 蛋白的表达水平,降低 p-IκBα 和 p-NF-κB p65 的蛋白表达水平,提示 AZ 可以抑制 IL-1β 诱导的关节软骨细胞 NF-κB 信号通路活化,可能与其抗凋亡作用密切相关。

参考文献

[1] Aletaha D, Funovits J, Smolen J S. Physical disability in rheumatoid arthritis is associated with cartilage damage rather than bone destruction[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(5): 733-9.

[2] Mobasheri A, Marples D. Expression of the AQP-1 water channel in normalhuman tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286(3): C529-37.

[3] Mobasheri A, Moskaluk C A, Marples D, et al. Expression of aquaporin 1 (AQP1) in human synovitis[J]. Ann Anat, 2010, 192(2): 116-21.

[4] Trujillo E, Gonzalez T, Marin R, et al. Human articular chondrocytes, synoviocytes and synovial microvessels express aquaporin water channels; upregulation of AQP1 in rheumatoid arthritis[J]. Histol Histopathol, 2004, 19(2): 435-44.

[5] 丁 婧,李 荣,胡向阳,等. 环巴胺对佐剂性关节炎大鼠关节软骨细胞增殖凋亡的影响及其抗凋亡机制[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(4): 446-51.

[6] Zhang C, Yu L, Zhou Y, et al. Chitosan oligosaccharides inhibit IL-1beta-induced chondrocyte apoptosis *via* the P38 MAPK signaling pathway[J]. Glycoconj J, 2016, 33(5): 735-44.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[7] Kim H A,Song Y W. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum,1999,42(7):1528 - 37.
[8] Yatsugi N,Tsukazaki T,Osaki M,et al. Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc [J]. J Orthop Sci,2000,5(2):150 - 6.
[9] Malemud C J. Chondrocyte apoptosis in rheumatoid arthritis: is preventive therapy possible [J]. Immunotherapy (Los Angel),2015,1(1):102.
[10] Zhang G,Sun Y,Wang Y,et al. MiR-502-5p inhibits IL-1beta-induced chondrocyte injury by targeting TRAF2 [J]. Cell Immunol,2016,302:50 - 7.
[11] Gao J,Wang X,Chang Y,et al. Acetazolamide inhibits osmotic water permeability by interaction with aquaporin-1 [J]. Anal Biochem,2006,350(2):165 - 70.
[12] Zhang J,An Y,Gao J,et al. Aquaporin-1 translocation and degradation mediates the water transportation mechanism of acetazolamide [J]. PLoS One,2012,7(9):e45976.
[13] Eichhorn J M,Alford S E,Sakurikar N,et al. Molecular analysis of functional redundancy among anti-apoptotic Bcl-2 proteins and its role in cancer cell survival [J]. Exp Cell Res,2014,322(2):415 - 24.
[14] Porter A G,Janicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. Cell Death Differ,1999,6(2):99 - 104.
[15] Campo G M,Avenoso A,Campo S,et al. Chondroitin-4-sulphate inhibits NF-κB translocation and caspase activation in collagen-induced arthritis in mice [J]. Osteoarthritis Cartilage,2008,16(12):1474 - 83.
[16] van Loo G,Beyaert R. Negative regulation of NF-kappaB and its involvement in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther,2011,13(3):221.
[17] 余 涵,陈 丽,马 猛,等. 乙酰唑胺对慢性癫痫大鼠海马 NF-κB p65、IL-1β、IL-6 及 TNF-α 表达的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志,2015,32(8):730 - 3.

Effect of acetazolamide on IL-1β-induced apoptosis in rat articular chondrocytes and its mechanism

Chen Weina, Li Chunmei, Zhu Zhongzhen, et al
(*School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To investigate the effects and mechanisms of acetazolamide (AZ), an aquaporin 1 (AQP1) inhibitor, on IL-1β-induced apoptosis in rat articular chondrocytes. ***Methods*** Articular chondrocytes were isolated and cultured by trypsin and collagenase digestion method. IL-1β was used to induce chondrocytes apoptosis *in vitro*. Different doses of AZ were added to IL-1β-treated chondrocytes. The cell proliferation was detected by MTT assay. The cell apoptosis was evaluated by hoechst 33258 staining, flow cytometry analysis and rhodamine-123 staining. Protein levels of AQP1, Bcl-2, Bax, Caspase3, NF-κB p65, p-NF-κB p65, IκBα and p-IκBα were assayed by Western blot. ***Results*** AZ (12.5, 25, 50 μmol/L) increased the proliferation of IL-1β-induced chondrocytes with a dose-dependent manner. AZ could inhibit the IL-1β-induced rat articular chondrocyte apoptosis, manifested by reducing apoptosis morphological changes, decreasing the rate of chondrocyte apoptosis and increasing mitochondrial membrane potential. Compared with normal group, increased AQP1 protein level, reduced Bcl-2 protein level and increased protein levels of Bax and Caspase3 were observed in IL-1β-induced group. In addition, IκB expression in IL-1β-induced group was lower than normal group, whereas p-IκBα and p-NF-κB p65 protein levels of IL-1β-induced group were higher than normal group. Compared with IL-1β-induced group, AZ decreased AQP1 expression, increased Bcl-2 expression and down-regulated the expressions of Bax and Caspase3. Moreover, AZ inhibited the degradation and phosphorylation of IκBα and reduced p-NF-κB p65 protein level. ***Conclusion*** AQP1 inhibition by AZ can decrease chondrocytes apoptosis induced by IL-1β, which might be related to up-regulating Bax and Caspase3 (all pro-apoptotic genes), down-regulating Bcl-2 (anti-apoptotic gene), and inhibiting the activation of NF-κB inflammatory pathway.

Key words acetazolamide; aquaporin 1; rheumatoid arthritis; articular chondrocytes; apoptosis; NF-κB pathway

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net