

二氮嗪对氧化损伤状态下软骨细胞增殖和凋亡的影响机制研究^Δ

蒋翠云^{1*},任少琳¹,张纯萍¹,程少文^{2#}(1.海南医学院第一附属医院药学部,海口 570102;2.海南医学院第一附属医院创伤医学中心,海口 570102)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1890-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.04

摘要 目的:基于内质网应激(ERS)途径探讨二氮嗪对氧化损伤状态下软骨细胞增殖和凋亡的影响机制。方法:取SD小鼠膝关节软骨细胞进行原代培养,取第3代软骨细胞随机分为对照组、损伤模型组和二氮嗪组。对照组细胞不作处理;损伤模型组细胞以300 μmol/L过氧化氢(H₂O₂)在37℃孵育8h;二氮嗪组细胞先以300 μmol/L二氮嗪在37℃预处理0.5h后,再以300 μmol/L H₂O₂同法孵育8h。采用CCK-8法检测细胞的增殖活力,采用流式细胞术检测细胞的凋亡率,采用Western blotting法检测细胞中ERS相关蛋白[胱天蛋白酶3(Caspase-3)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、增强子结合蛋白环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CHOP)]的表达情况。结果:与对照组比较,损伤模型组细胞增殖活力显著降低,凋亡率显著升高($P<0.05$);Caspase-3、Bax、CHOP蛋白表达量均显著升高($P<0.05$)。与损伤模型组比较,二氮嗪组软骨细胞增殖活力显著升高,凋亡率显著降低($P<0.05$);上述相关蛋白表达量均显著降低($P<0.05$)。结论:二氮嗪可能通过抑制ERS途径,提高软骨细胞在氧化损伤状态下的增殖活力,并抑制细胞凋亡。

关键词 二氮嗪;氧化损伤;软骨细胞;增殖活力;凋亡;内质网应激途径;机制

Study on the Effect Mechanism of Diazoxide on the Proliferation and Apoptosis of Chondrocytes with Oxidative Injury

JIANG Cuiyun¹, REN Shaolin¹, ZHANG Chunping¹, CHENG Shaowen² (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China; 2. Traumatic Medical Center, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effect mechanism of diazoxide on the proliferation and apoptosis of chondrocytes with oxidative injury based on endoplasmic reticulum stress (ERS) pathway. METHODS: SD mice were selected for primary culture of articular chondrocytes. The 3rd generation chondrocytes were randomly divided into control group, injury model group and diazoxide group. Control group didn't receive any treatment. The injury model group was incubated with 300 μmol/L hydrogen peroxide (H₂O₂) at 37℃ for 8 h. Diazoxide group was pretreated with 300 μmol/L diazoxide at 37℃ for 0.5 h, and then incubated with 300 μmol/L H₂O₂ for 8 h. The proliferation of chondrocytes was detected by CCK-8 assay. The apoptosis rate of chondrocytes was detected by flow cytometry. The expression of ERS-related proteins [Caspase-3, Bcl-2-associated X (Bax), C/EBP homologous protein (CHOP)] were detected by Western blotting assay. RESULTS: Compared with control group, the proliferation activity of chondrocytes in injury model group was significantly decreased, while apoptosis rate was increased significantly ($P<0.05$); the protein expression of Caspase-3, Bax and CHOP were increased significantly ($P<0.05$). Compared with injury model group, the proliferation activity of chondrocytes in diazoxide group was increased significantly, while the apoptosis rate was decreased significantly ($P<0.05$); the expression of above related proteins were decreased significantly ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Diazoxide can improve the proliferation activity of chondrocytes with oxidative injury and inhibit their apoptosis by inhibiting ERS pathway.

KEYWORDS Diazoxide; Oxidative injury; Chondrocytes; Proliferation activity; Apoptosis; Endoplasmic reticulum stress pathway; Mechanism

关节软骨是保障关节运动的最主要结构,软骨细胞位于软骨组织表层,可随着关节内微环境的变化而相应地合成和分泌基质与纤维^[1]。有研究发现,在关节软骨

退变的过程中,软骨细胞的增殖活力减弱、凋亡增多^[2]。软骨细胞的凋亡途径主要包括线粒体途径、内质网应激(ERS)途径等^[3]。有研究证实,抑制ERS途径可减少软骨基质中聚蛋白多糖酶和Ⅱ型胶原蛋白(Coll-Ⅱ)的表达,使软骨细胞增殖活力增强、凋亡减少^[4]。因此,抑制ERS途径可使软骨细胞恢复正常的增殖和凋亡状态,保护软骨细胞,减少关节软骨缺失,对防治骨关节炎(OA)等关节软骨退行性疾病有重要意义。二氮嗪是一种钾

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460339)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0898-66733262。E-mail:459171669@qq.com

通信作者:主治医师,硕士。研究方向:外科学。电话:0898-66733262。E-mail:chengshaowen1@123.com

离子通道激活剂,具有松弛血管平滑肌、降低血压、抑制胰岛素分泌的作用,临床上主要用于高血压危象急救及低血糖症等的治疗^[1]。有研究表明,二氮嗪可通过抑制ERS途径来促进骨骼肌成肌细胞的增殖并抑制其凋亡^[2]。但目前尚未见二氮嗪对氧化损伤状态下软骨细胞增殖活力及凋亡的影响机制研究。因此,本研究从ERS途径探讨二氮嗪对氧化损伤状态下软骨细胞增殖活力及凋亡影响的作用机制,旨在为该药防治关节软骨退行性病变的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BSA124S/BSA124S-CW型分析天平(苏州金钻称重设备系统开发有限公司);64R型低温高速离心机(北京时代北利离心机有限公司);FYL-YS-50L型恒温培养箱(美国Godinier公司);ELx800NB型酶标仪(美国BioTek公司);Attune NxT型流式细胞仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);DYCZ-24F型电泳仪(绍兴上虞艾科仪器设备有限公司);ChemiDocXRS+型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

二氮嗪(批号:022K1516,纯度:98%)、30%过氧化氢(H₂O₂)溶液均购自美国Sigma公司;胰酶(济南维尔康生化制药有限公司);II型胶原酶(美国Worthington公司);DMEM培养基(美国Hyclone公司);CCK-8检测试剂盒(上海锐赛生物技术有限公司);Binding buffer溶液(北京拜尔迪生物技术有限公司);Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒(上海继锦化学科技有限公司);BCA蛋白定量检测试剂盒(武汉华瑞康生物科技有限公司);细胞裂解液(北京华夏远洋科技有限公司);兔抗人胱天蛋白酶3(Caspase-3)单克隆抗体(上海沪宇生物科技有限公司);兔抗人Bcl-2相关X蛋白(Bax)单克隆抗体(上海麦仓生物医药科技有限公司);兔抗人增强子结合蛋白环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CHOP)单克隆抗体(上海美恩生物技术有限公司);兔抗人甘油三磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(武汉艾美捷科技有限公司);过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(杭州昊鑫生物科技股份有限公司);ECL电化学发光试剂盒(上海炎熙生物科技有限公司);pH 7.5磷酸盐缓冲液(PBS,上海田源生物技术有限公司);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级SD小鼠3只,雌性,1周龄,体质量为(20±2)g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006。

2 方法

2.1 小鼠软骨细胞的分离与培养

取3只小鼠,对其膝关节作无菌处理后摘取膝关节软骨,用眼科剪剪成絮状,PBS冲洗,胰酶消化0.5 h,II型胶原酶消化2 h。取上清液,以2 000 r/min离心5 min,

吸弃上清液,加入DMEM培养基10 mL重悬细胞后,按 1×10^6 个/皿接种于培养皿。将培养皿置于37℃、5%CO₂恒温箱内孵育,每72 h换液1次,当细胞生长密度达95%以上时进行消化、传代,取第3代细胞进行后续试验。

2.2 分组与给药

参考文献[6]的给药剂量和作用时间进行分组、给药。取第3代软骨细胞,随机分为对照组、损伤模型组和二氮嗪组,按 1×10^6 个/cm²的密度接种于6孔细胞培养板上。对照组细胞不作处理;损伤模型组细胞加入300 μmol/L的H₂O₂溶液100 μL后,在37℃、5%CO₂恒温箱内孵育8 h;二氮嗪组细胞加入300 μmol/L的二氮嗪溶液(以0.4%二甲基亚砷溶液为溶剂配制)100 μL,在37℃、5%CO₂恒温箱内孵育0.5 h进行预处理后,再加入300 μmol/L H₂O₂溶液100 μL,与损伤模型组同法孵育8 h。

2.3 软骨细胞增殖活力检测

采用CCK-8法检测。取第3代软骨细胞,按“2.2”项下方法分组、给药并孵育完毕后,吸弃上清液,每孔加入10% CCK-8溶液100 μL,于37℃、5%CO₂恒温箱孵育4 h,采用酶标仪于450 nm波长下测定光密度(OD值)。试验重复3次后取均值。按公式计算细胞增殖活力:细胞增殖活力=(损伤模型组或二氮嗪组平均OD值/对照组平均OD值)×100%。

2.4 软骨细胞凋亡率检测

采用流式细胞术检测。取第3代软骨细胞,按“2.2”项下方法分组、给药并孵育完毕后,以2 000 r/min离心5 min,弃上清,胰酶消化细胞。收集贴壁软骨细胞,加入Binding buffer溶液500 μL重悬细胞,然后加入Annexin V-PE试剂1 μL,混匀,于25℃下避光反应10 min,在1 h内采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。试验重复3次后取均值。

2.5 软骨细胞中Caspase-3、Bax、CHOP蛋白表达量检测

采用Western blotting法检测。取第3代软骨细胞,按“2.2”项下方法分组、给药并孵育完毕后,加细胞裂解液,匀浆,12 000 r/min离心8 min;取上清液,以BCA试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白上样,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜;将膜在5%脱脂奶粉常温封闭2 h,分别加入Caspase-3单克隆抗体(1:200)、Bax单克隆抗体(1:100)、CHOP单克隆抗体(1:300)后,均与内参GAPDH单克隆抗体(1:100)混合,4℃下孵育过夜;PBS冲洗膜,加入二抗(1:500),37℃孵育1 h;PBS冲洗,ECL显色、显影。采用凝胶成像仪扫描,以Image Quant TL软件分析各目标蛋白条带的灰度值与内参蛋白条带灰度值之比(即相对灰度值),用来表示目标蛋白表达量。试验重复3次后取均值。

2.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资

料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组软骨细胞增殖活力比较

与对照组比较,损伤模型组软骨细胞增殖活力显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与损伤模型组比较,二氮嗪组软骨细胞增殖活力显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表1。

表1 各组软骨细胞的增殖活力和凋亡率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Proliferation activity and apoptotic rate of chondrocyte in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

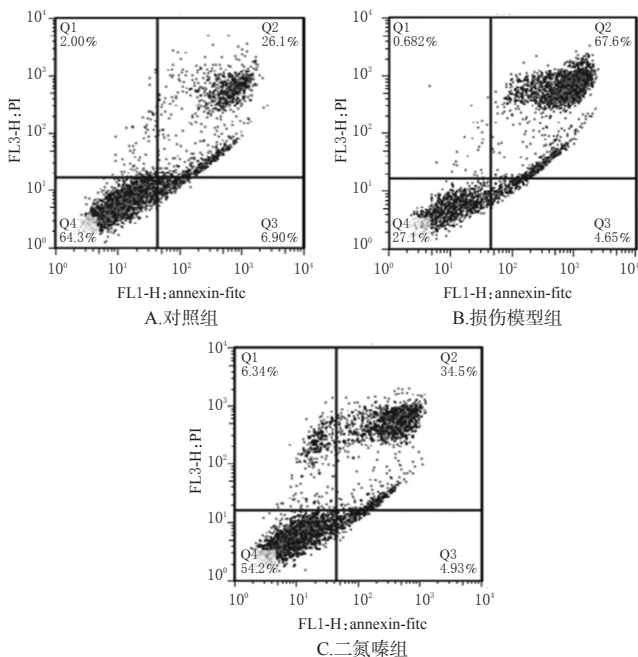
组别	增殖活力, %	凋亡率, %
对照组	100	32.45 ± 1.67
损伤模型组	41.29 ± 3.02*	75.68 ± 2.05*
二氮嗪组	67.35 ± 2.68 [#]	46.59 ± 2.25 [#]

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与损伤模型组比较, [#] $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. injury model group, [#] $P < 0.05$

3.2 各组软骨细胞凋亡率比较

与对照组比较,损伤模型组软骨细胞凋亡率显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与损伤模型组比较,二氮嗪组软骨细胞凋亡率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见图1、表1。



注:左下象限(Q4)为正常细胞;左上象限(Q1)为死亡细胞;右下象限(Q3)为早期凋亡细胞;右上象限(Q2)为晚期凋亡细胞

Note: the left lower quadrant (Q4) is normal cells; the left upper quadrant (Q1) is dead cells; the right lower quadrant (Q3) is early apoptotic cells; the right upper quadrant (Q2) is late apoptotic cells

图1 各组软骨细胞凋亡率流式细胞图

Fig 1 Flow cytograms of apoptotic rate of chondrocyte in each group

3.3 各组软骨细胞中 Caspase-3、Bax、CHOP 的蛋白表达量比较

与对照组比较,损伤模型组软骨细胞中 Caspase-3、Bax、CHOP 蛋白表达量均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与损伤模型组比较,二氮嗪组软骨细胞中上述蛋白表达量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图2、表2。

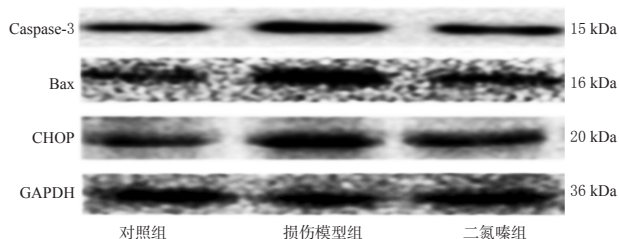


图2 各组软骨细胞中 Caspase-3、Bax、CHOP 蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of protein expression of Caspase-3, Bax and CHOP in chondrocyte in each group

表2 各组软骨细胞中 Caspase-3、Bax、CHOP 蛋白表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Protein expression of Caspase-3, Bax and CHOP in chondrocyte in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Caspase-3	Bax	CHOP
对照组	1.03 ± 0.03	1.05 ± 0.02	1.04 ± 0.02
损伤模型组	2.41 ± 0.23*	1.82 ± 0.19*	2.62 ± 0.22*
二氮嗪组	1.50 ± 0.16 [#]	1.44 ± 0.09 [#]	1.73 ± 0.18 [#]

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与损伤模型组比较, [#] $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. injury model group, [#] $P < 0.05$

4 讨论

OA 是以关节基质破坏及关节软骨细胞减少为主要病理特点的退行性关节疾病,而关节软骨是由致密结缔组织的胶原纤维构成的透明软骨,软骨细胞是关节软骨中的唯一细胞成分,存在于无血管、神经或淋巴管分布的特殊微环境中,其既能合成蛋白多糖、Coll- II 等基质大分子物质,又能降解衰老退变的软骨基质,还参与维持软骨组织平衡^[7]。有研究发现,软骨细胞发生氧化损伤后较正常软骨细胞在体外的增殖活力明显减弱、凋亡明显增多^[8]。有研究显示, H_2O_2 可诱导骨骼肌成肌细胞凋亡,可作为氧化损伤造模试剂^[9]。本研究通过 H_2O_2 诱导软骨细胞发生氧化损伤后发现,在氧化损伤状态下的软骨细胞增殖活力显著下降,凋亡率显著升高。

软骨细胞大量凋亡主要表现为内质网、高尔基体、溶酶体的增加以及自噬性空泡形成^[10]。内质网是一种具有分泌功能的细胞器,也是蛋白质合成和细胞内信号转导的重要场所,在 ERS 过程中发挥着重要作用^[11]。

ERS包括缺糖损伤、未折叠蛋白增加、钙离子流失及自由基释放过多等,这些刺激因素均可导致内质网腔内钙离子平衡紊乱、未折叠蛋白聚集等,进而激活内质网超负荷反应,使细胞增殖活性减弱、凋亡增强,造成关节软骨大量缺失,最终导致关节软骨退行性病变^[12]。Caspase-3、Bax、CHOP为ERS途径相关蛋白。Caspase-3是细胞凋亡过程中的关键分子,在某些细胞凋亡末期的细胞裂解及凋亡小体形成过程中扮演重要角色,可激活下游的细胞凋亡蛋白酶^[13]。Bax是重要的促细胞凋亡基因之一,其编码产物可通过与B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)家族中的凋亡抑制基因Bcl-2、Bcl-xL的表达产物结合,替换Bcl-xL/Bax、Bcl-2/Bax二聚体中的Bax,而达到促进细胞凋亡的目的^[14]。CHOP基因受蛋白激酶R样内质网激酶等通路调控,是ERS诱导软骨细胞凋亡的重要因素^[15]。本研究通过Western blotting法检测发现,损伤模型组软骨细胞中Caspase-3、Bax、CHOP蛋白表达量均较对照组显著升高,表明软骨细胞发生氧化损伤后其ERS作用增强,导致上述蛋白表达上调。

有研究显示,二氮嗪可通过抑制死亡受体和线粒体途径改善抗谷氨酸盐、 β -淀粉样蛋白等诱导的神经细胞损伤^[16-17];其可通过阻碍ERS途径抑制H₂O₂诱导的骨骼肌成肌细胞凋亡^[5]。本研究结果显示,二氮嗪组软骨细胞增殖活力较损伤模型组显著升高,凋亡率则显著降低,表明二氮嗪可有效抑制氧化损伤诱导的软骨细胞凋亡,提高软骨细胞增殖活力。Western blotting检测结果显示,二氮嗪组软骨细胞中Caspase-3、Bax、CHOP蛋白表达量均较损伤模型组显著降低,提示二氮嗪可通过下调软骨细胞中的上述蛋白来抑制ERS,恢复内质网功能,稳定细胞内环境,避免氧化损伤诱导的软骨细胞活力下降及过度凋亡,从而预防关节软骨退行性病变的发生。这与已有研究结果相符。

综上所述,二氮嗪可能通过抑制ERS途径,提高软骨细胞在氧化损伤状态下的增殖活力,并抑制软骨细胞凋亡,这可为防治关节软骨退行性病变提供新的治疗思路与方向,具有重要的临床意义。但二氮嗪是否通过其他机制对氧化损伤状态下的软骨细胞的增殖及凋亡产生影响尚不清楚,仍需进一步研究。

参考文献

[1] 刘兴振,范洁,李甲,等.骨关节炎关节软骨自然退变过程中Dvl2及 β -catenin表达变化[J].中国现代应用药学,2016,33(11):1355-1358.

[2] 史继德,冯海军,耿喜林,等. α -倒捻子素调节骨关节炎软骨细胞的增殖和凋亡[J].中成药,2018,40(1):8-13.

[3] 窦天旭,李旭.MAPK信号通路与骨关节炎[J].解剖科学进展,2017,23(6):649-652.

[4] 刘晓虎,杨坤,张平平,等.软骨细胞凋亡与内质网应激[J].中国组织工程研究,2015,19(33):5364-5370.

[5] 何平平,张鸿,韩冬,等.二氮嗪预处理对大鼠脑缺血/再

灌注损伤后血脑屏障的保护作用研究[J].中国医师杂志,2016,18(9):1309-1312.

[6] 顾运涛,陈克伟,卞阳阳,等.二氮嗪通过抑制内质网应激作用降低软骨细胞凋亡的研究[J].中华全科医学,2018,20(3):138-145.

[7] LI C, CAI H, MENG Q, et al. IL-1 β mediating high mobility group box protein-1 expression in condylar chondrocyte during temporomandibular joint inflammation[J]. *J Oral Pathol Med*, 2016, 45(7):539-545.

[8] WANG X, GUO Y, WANG C, et al. MicroRNA-142-3p inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting HMGB1[J]. *Inflammation*, 2016, 39(5):1718-1728.

[9] SHAO SX, ZHANG L, CHEN HX. Diazoxide pretreatment enhances L6 skeletal myoblast survival and inhibits apoptosis induced by hydrogen peroxide[J]. *Anat Rec: Hoboken*, 2012, 295(4):632-640.

[10] YAN S, WANG M, ZHAO J, et al. MicroRNA-34a affects chondrocyte apoptosis and proliferation by targeting the SIRT1/p53 signaling pathway during the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(1):201-209.

[11] YU Y, SUN G, LUO Y, et al. Cardioprotective effects of notoginsenoside R1 against ischemia/reperfusion injuries by regulating oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-related signaling pathways[J]. *Sci Rep*, 2016. DOI: 10.1038/srep21730.

[12] WAN S, JIANG L. Endoplasmic reticulum(ER) stress and the unfolded protein response(UPR) in plants[J]. *Protoplasma*, 2016, 253(3):753-764.

[13] LIU C, VOJNOVIC D, KOICHEVAR IE, et al. UV-A irradiation activates Nrf2-regulated antioxidant defense and induces p53/caspase3-dependent apoptosis in corneal endothelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(4):2319-2327.

[14] SAMIK C, MINAKSHI M, SHRAVANTI M, et al. Restoration of p53/miR-34a regulatory axis decreases survival advantage and ensures Bax-dependent apoptosis of non-small cell lung carcinoma cells[J]. *Febs Letters*, 2016, 588(4):549-559.

[15] AYAUB EA, KOLB PS, MOHAMMED-ALI Z, et al. GRP78 and CHOP modulate macrophage apoptosis and the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *J Pathol*, 2016, 239(4):411-425.

[16] 李红波,林诗炜,姚江凌,等.二氮嗪对低氧环境下骨髓间充质干细胞增殖活力及凋亡的影响[J].中国组织工程研究,2018,22(9):1332-1337.

[17] 雷小峰,雷立健,张志清,等.ATP敏感性钾通道开放剂二氮嗪对海马神经元氧糖剥夺损伤的保护作用及其分子机制[J].中华神经医学杂志,2016,15(5):445-450.

(收稿日期:2019-03-06 修回日期:2019-05-30)

(编辑:段思怡)