

· 基础研究 ·

# 二氮嗪对软骨细胞氧化损伤的影响

彭磊<sup>1</sup>, 程少文<sup>1</sup>, 沈跃<sup>2</sup>, 应晓洲<sup>2</sup>, 赵志蓉<sup>2</sup>, 安涛<sup>2</sup>, 周英勇<sup>2</sup>, 程晓杰<sup>2</sup>, 陈庆玉<sup>2</sup>, 吕传柱<sup>3</sup>

(1. 海南医学院附属医院, 海南 海口 570100; 2. 温州医科大学, 浙江 温州 325000;

3. 海南医学院, 海南 海口 570100)

**摘要** 目的: 探讨二氮嗪对双氧水诱导的软骨细胞氧化损伤的影响。方法: 取 SD 乳鼠膝关节软骨细胞进行原代培养, 将对数生长期的软骨细胞分成 5 组, 分别为阴性对照组(A 组), 双氧水组(B 组),  $H_2O_2 + 0.1 \mu mol \cdot L^{-1}$  二氮嗪组(C 组),  $H_2O_2 + 1.0 \mu mol \cdot L^{-1}$  二氮嗪组(D 组),  $H_2O_2 + 10 \mu mol \cdot L^{-1}$  二氮嗪组(E 组); A 组细胞不做特殊处理, B 组用  $0.3 mmol \cdot L^{-1}$  双氧水在  $37^\circ C$  恒温箱内孵育 4 h, C、D、E、F 组预先分别用  $0.1 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ,  $1.0 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ,  $10 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ,  $100 \mu mol \cdot L^{-1}$  在  $37^\circ C$  的恒温箱孵育 30 分钟, PBS 洗涤细胞, 再用  $0.3 mmol \cdot L^{-1}$  双氧水在  $37^\circ C$  恒温箱内孵育 4 小时。分别检测 ABCDE 各组细胞的细胞活性, ROS 的量, 细胞凋亡情况。结果: ①MTT 法检测各组细胞活性, 细胞活性率从大至小依次为 D 组 > C 组 > E 组 > F 组 > B 组; ②用活性氧探针 DCFH-DA 检测各组细胞中的 ROS 的量, ROS 产量从多至少依次为 B 组 > E 组 > D 组 > C 组 > A 组; ③流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况, 各组细胞凋亡率由大至小依次为 B 组 > E 组 > D 组 > C 组。④Western bolt 检测各组软骨细胞中 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达, 各组软骨细胞中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量依次为 C 组 > D 组 > E 组 > A 组 > B 组。结论: 二氮嗪可降低双氧水诱导的软骨细胞的凋亡率, 同时也降低双氧水诱导的软骨细胞 ROS 的产生, 并诱导软骨细胞产生 HIF-1 $\alpha$  蛋白, 可能存在二氮嗪诱导 HIF-1 $\alpha$  的表达, 引起下游相关基因的转录, 总体提高软骨细胞对氧化损伤的耐受力, 阻碍自由基诱导的软骨细胞的凋亡。

**关键词** 二氮嗪 软骨细胞 活性氧 凋亡

**Diazoxide influence on cartilage cells from oxidative damage** Peng Lei\*, Cheng Saowen, Shen Yue, Ying Xiaozhou, Zhao Zhirong, An Tao, Zhou Yingyong, Cheng Xiaojie, Chen Qingyu, Lu Chuazhu. \* The affiliated hospital to Hainan medical college, Haikou, 570100, Hainan, China

**ABSTRACT** **Objective:** To investigate diazoxide infection in hydrogen peroxide induced cartilage cells. **Method:** We obtain the cartilage cells from the SD neonatal rat articular cartilages. The cartilage cells were divided into five groups, namely the control group (A), the hydrogen peroxide group (B),  $H_2O_2 + 0.1 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ group (C),  $H_2O_2 + 1.0 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ group (D),  $H_2O_2 + 10 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ group (E); group A had no special treatment, group B incubated with  $0.3 mmol/L$  hydrogen peroxide for 4 hours in  $37^\circ C$  incubator, the C, D, E group were preincubated with  $0.1 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ  $1.0 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ,  $10 \mu mol \cdot L^{-1}$  DZ in a  $37^\circ C$  incubator incubated 30 minutes, then incubated with  $0.3 mmol \cdot L^{-1}$  hydrogen peroxide solution in  $37^\circ C$  incubator. The amount of the ROS and the apoptosis rate of cells in each group were detected. **Results:** ①. Using the MTT assay, the order of the rate of cells activity: group A > group D > group C > group E > group B. ②. The ROS productions were detected by the DCFH-DA, the order of ROS production as follow: group B > group E > group D > group C > group A. ③. The apoptosis rates of cells were detected by Flow cytometer. The order of apoptosis rates of cartilage cells as follow: group B > group E > group D > group C group. ④. the expression of HIF-1 $\alpha$  in each chondrocytes group detected by western blot, as follow: group C > group D > group E > group A > group B. **Conclusion:** Diazoxide can reduce the apoptosis rates of hydrogen peroxide-induced chondrocytes, while also reducing the ROS production of the hydrogen peroxide-induced chondrocyte. It can be inferred that, diazoxide may reduce the apoptosis rates and mortality of chondrocyte by reducing the ROS production of chondrocyte and increasing the expression of HIF-1 $\alpha$  protein.

**Key words** Diazoxide; Chondrocytes; Reactive oxygen species; Apoptosis

软骨细胞的氧化损伤是许多疾病的发生发展的

重要原因之一, 因为氧化损伤会导致软骨细胞形态和功能改变, 细胞骨架变形, 分泌的胞外基质减少, 胞内的金属蛋白酶增加, 可降解胞外基质, 过多氧自由基的产生破坏胞外胶原, 导致胶原断裂, 诱导细胞凋亡, 软骨细胞的凋亡及其分泌功能下降是骨性关节炎发

基金项目: 海南省医学科研重点课题(琼卫 2012ZD-08); 海南省医学科研课题(琼卫 2013 资助-039 号)

通讯作者: 吕传柱 E-mail: luchuanzhu@emss.cn

生发展的重要原因之一<sup>[1]</sup>。Grishko 等<sup>[2]</sup>报道,骨关节炎患者的软骨细胞比正常软骨细胞产生更多的活性氧及活性氮,这些活性物质可导致软骨细胞线粒体 DNA 的损伤及线粒体 DNA 修复能力的下降,软骨细胞活性和凋亡指数增加。有研究表明,二氮嗪(diazoxide, DZ)可轻度提高线粒体中活性氧的产生,活性氧的生理信号可诱导细胞内线粒体产生更多的非偶联蛋白,这些非偶联蛋白的增加可提高细胞对病理性活性氧的耐受性,从而对抗细胞的氧化损伤<sup>[3]</sup>。此外, DZ 是一种线粒体 ATP 敏感性钾通道开放剂,可开放线粒体膜上的钾通道,导致钾内流,线粒体膜去极化,钙离子内流减少,线粒体钙超载减轻,从而使得胞内病理性活性氧生成减少,提高细胞的存活率<sup>[4]</sup>。本研究旨在研究 DZ 对氧化损伤的软骨细胞的影响,探索 DZ 对抗软骨细胞氧化损伤的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 24 h 内 SD 大鼠的乳鼠 5 只,由广东省动物实验中心提供。实验动物合格证号: SCXK(粤)2008-0002。

**1.2 实验试剂与仪器** DMEM 培养液、胎牛血清、胰酶、Ⅱ型胶原酶、透明质酸酶、PBS、凋亡试剂盒、活性氧检测试剂盒、CO<sub>2</sub> 培养箱、Olympus 倒置显微镜、流式细胞仪、荧光显微镜。

**1.3 软骨细胞的分离与培养** 无菌操作下取出乳鼠的关节软骨,并切成小块,用 PBS 洗 2 次,透明质酸酶消化 10 min,胰酶在 37 ℃ 下消化 30 min,Ⅱ型胶原酶在 37 ℃ 下消化 2 h,吸取上清液,2100 r 离心 8 min,弃上清,加入 DMEM 10 mL,混匀,600 r 离心 1 min,吸取上清液,2100 r 离心 10 min,弃上清,加入培养液,混匀,接种在培养瓶内,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内进行培养,5 d 后首次换液,去掉未贴壁的细胞,以后每隔 3 d 换 1 次液,当细胞铺满瓶底时,0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,按 1:3 的比例进行传代。取第 3 代细胞进行实验。

**1.4 实验分组与干预** 取生长良好的第 3 代软骨细胞,以  $1 \times 10^6 \cdot \text{cm}^{-2}$  的密度接种于 6 孔培养板上,分 3 组,正常细胞组,无血清的培养基孵育 4.5 h;双氧水组,无血清的培养基孵育 30 min,双氧水孵育 4 h;双氧水 + DZ 组, DZ 孵育 30 min,双氧水孵育 4 h。

### 1.5 观测指标和方法

**1.5.1 形态学观察** 倒置显微镜下观察细胞的生长

和形态。

**1.5.2 软骨细胞的鉴定** 阿利新蓝染色在倒置显微镜下观察。

**1.5.3 细胞活性检测** 取对数生长期的软骨细胞(第 3 代软骨细胞),以 0.25% 胰酶消化,计数,接种于 96 孔培养板内,使每孔细胞密度为  $1 \times 10^4$  个,每组设 1 个平行孔并设不含细胞的空白对照,37 ℃ 培养 24 h,细胞贴壁后,分为 6 组,分别为阴性对照组(A),双氧水组(B),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 组(C),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 组(D),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 组(E),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 组(F),CDEF 五组分别用 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 预处理 30 min 后,BCDEF 组分别加入 0.3 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,吸掉上清液,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含 MTT 试剂的培养基,继续培养 4 h,然后在 595 nm 的波长下检测。

**1.5.4 凋亡的检测** 分别收集 ABCDE 五组软骨细胞。悬浮细胞离心(2 000 r 离心 5 min)收集;贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集(注:胰酶消化时间不易过长,否则容易引起假阳性);用 PBS 洗涤细胞二次(2 000 r 离心 5 min)收集  $1 \sim 5 \times 10^5$  细胞;加入 500  $\mu\text{L}$  的 Binding Buffer 悬浮细胞;加入 1  $\mu\text{L}$  Annexin V-PE 混匀;室温、避光、反应 5 ~ 15 min;在 1 h 内,进行流式细胞仪的观察和检测。用流式细胞仪检测,激发波长 Ex = 488 nm;发射波长 Em = 578 nm。

**1.5.5 活性氧的检测** 去除 6 孔板内 CDE 三组的细胞培养液,并设立阴性对照 A 和阳性对照 B,分别加入等体积的浓度为 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DCFH-DA 探针,能充分盖住细胞为宜,37 ℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。在荧光显微镜上检测,488 nm 激发波长,525 nm 发射波长。

**1.5.6 Western bolt 检测** 各组软骨细胞中 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达 将培养的第 3 代软骨细胞于 6 孔板中,随机取 5 孔,标记 ABCDE 组分别做不同处理,处理后将细胞重悬至细胞裂解液中,于低温离心,10 000 r 离心 8 min,取上清液备用。100 mL  $\cdot \text{L}^{-1}$  聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,将蛋白转移至 NC 膜,并置于含 5% 脱脂乳的二羟单基氨单烷吐温-20 封闭缓冲液中封闭后,加入相应 HIF-1 $\alpha$  抗体(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜。加入相应二抗,37 ℃ 孵育 1 h,化学发光法曝光

后观察,  $\beta$  肌动蛋白为内参, 采用 Bio-image 软件采集信号和灰度扫描。

**1.6 统计学方法** 各项实验都进行了至少 3 次的独立重复试验。所有数据应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 各组实验资料统计量以均数  $\pm$  标准差表示, 重复测量资料的方差分析比较不同组间的指标变化趋势, 两两比较采用  $q$  检验, 流式细胞仪检测细胞凋亡的实验数据采用秩和检验, 两两比较采用  $q$  检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 倒置显微镜观察** 将原代软骨细胞传代 3 次, 传至第 3 代, 第 3 代软骨细胞形态功能稳定, 细胞呈多角形, 可稳定分泌 II 型胶原和糖胺聚糖(图 1)。正常原代软骨细胞 48 h 后完全贴壁, 细胞大部分呈多角形, 圆形, 椭圆形外观, 约 5 d 后长满瓶底, 疏密不一, 有些地方可见大量基质包绕结节样细胞群落。传代后一般 24 h 即可完全贴壁, 第 2 代软骨细胞 3 d 即可长满瓶底, 以多角形多见, 随着细胞的传代次数增加, 细胞的分泌和增殖能力下降, 传代周期延长。

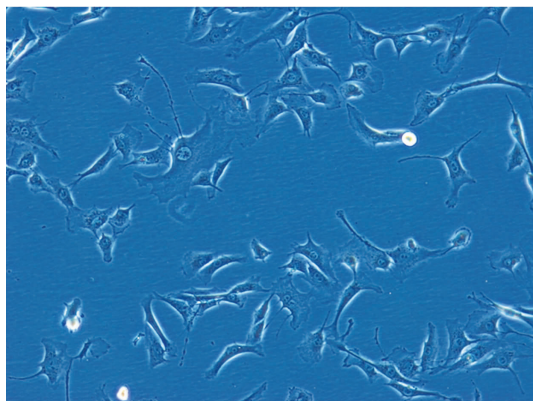


图 1 F3 代的软骨细胞组织细胞学倒置显微镜片 ( $\times 100$ )

**2.2 软骨细胞的鉴定** 软骨细胞的鉴定可通过取材部位、细胞形态和阿利新蓝染色三方面来进行表型的鉴定。原代软骨细胞的取材是来源 SD 乳鼠关节软骨组织; 且镜下观所培养的细胞的形态以多角形为主, 符合软骨细胞的表型; 软骨细胞能分泌糖胺聚糖等特异性的物质, 在阿利新蓝染料下可染成蓝色。图 2 中细胞被染成浅蓝色, 细胞核被染成蓝色, 细胞质被染成浅蓝色, 证明此细胞具有分泌糖胺聚糖的能力, 结合该细胞的取材部位和细胞形态, 即可鉴定实验所提取的细胞是软骨细胞。实验还发现, 用 DZ 预处理过的软骨细胞在双氧水的作用下, 其阿利新蓝染色深度比未用 DZ 处理的软骨细胞更深(图 3、图 4), 可间接

反映, DZ 对抗氧化损伤的作用, 可保护软骨细胞分泌糖胺聚糖。

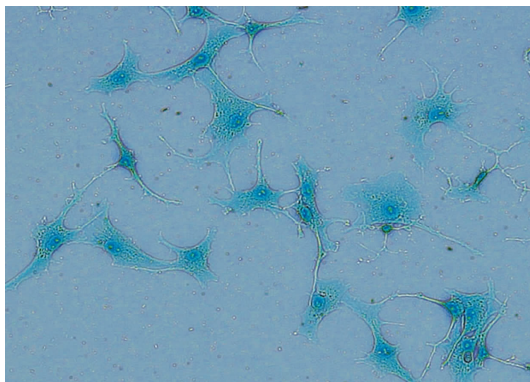


图 2 F3 代软骨细胞组织细胞学光镜片 (阿利新蓝染色  $\times 100$ )

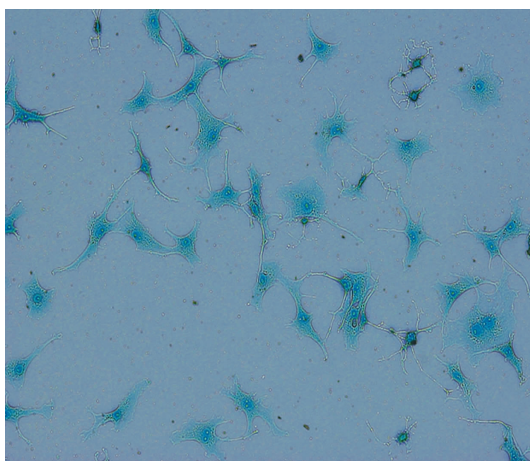


图 3 C 组组织细胞学光镜片 (阿利新蓝染色  $\times 50$ )

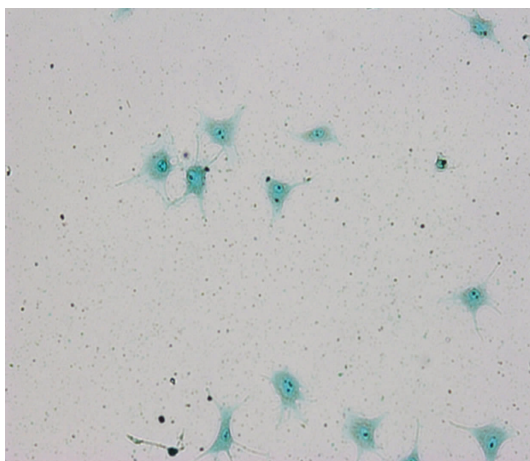


图 4 B 组组织细胞学光镜片 (阿利新蓝染色  $\times 50$ )

**2.3 DZ 预处理过氧化氢诱导的软骨细胞活性检测结果** 不同浓度 DZ 预处理对过氧化氢诱导的软骨细胞活性检测结果见表 1,  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 组和  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 组预处理可对抗过氧化氢诱导的软骨细胞的损伤, 而  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 组抗氧化损伤的能力不是很明显, 可能是由于 DZ 浓度过高产生细胞毒性作用, 过度开放了软骨细胞线粒

体膜上钾通道,引起线粒体的损伤,产生细胞毒作用。 各组在酶标仪上读出各组的 OD 值见表 1。

表 1 不同浓度 DZ 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的鼠关节软骨细胞活性影响

	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组	F 值	P 值
细胞数	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>		
OD	0.42 ± 0.038	0.63 ± 0.046	0.72 ± 0.032	0.49 ± 0.028	0.48 ± 0.017	91.431	0

不同浓度 DZ 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的鼠关节软骨细胞活性影响。各组数据采用方差分析比较,结果如表所示,差异有统计学意义。采用 *q* 检验进行两两比较,结果显示 C 组(*q* = 1.710, *P* = 0.021)和 D 组(*q* = 2.433, *P* = 0.009)差异较显著;E 组(*q* = 0.322, *p* = 0.059)和 F 组(*q* = 0.310, *P* = 0.06)差异无统计学意义

**2.4 DZ 对软骨细胞凋亡的影响** 不同浓度的 DZ 预处理软骨细胞 30 min,0.25 μmol · L<sup>-1</sup> 双氧水处理 4 h,流式细胞仪检测软骨细胞的凋亡率见图 5,实验发现:0.1 μmol · L<sup>-1</sup> DZ 组和 1 μmol · L<sup>-1</sup> DZ 组可对抗软骨细胞早期凋亡,而 10 μmol · L<sup>-1</sup> DZ 组对软骨细胞的凋亡无明显的保护作用。

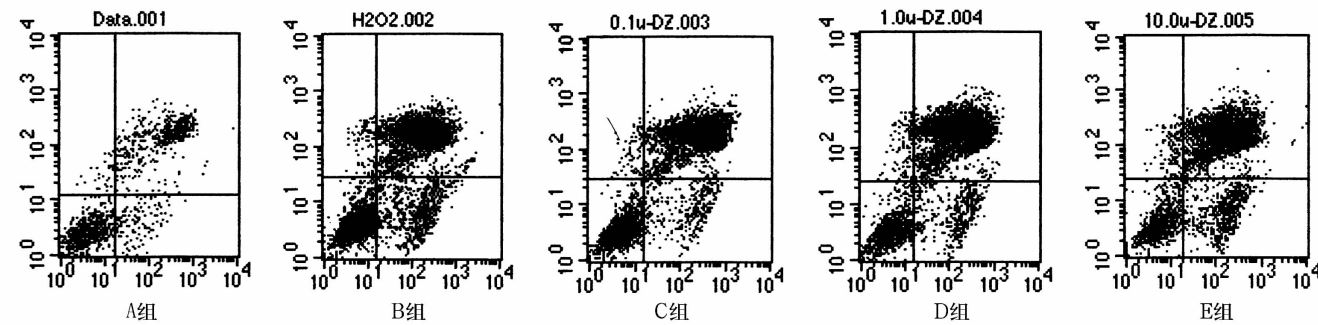


图 5 各组鼠关节软骨细胞凋亡分布

流式细胞仪检测,左下象限为正常细胞,右下象限为早期凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡,左上象限为死亡细胞

表 2 流式细胞仪检测各组软骨细胞凋亡率(中值 M ± 四分位间距 Q)

分组	正常细胞(%)	凋亡细胞(%)	死亡细胞(%)
A 组	21.050 ± 1.940	12.710 ± 1.080	65.930 ± 4.380
B 组	27.080 ± 0.770	7.170 ± 0.330	65.620 ± 1.280
C 组	20.740 ± 1.820	9.130 ± 0.880	69.650 ± 1.860
D 组	17.80 ± 1.410	11.930 ± 2.210	70.680 ± 2.450
H 值	16.143	16.146	13.011
P 值	0.001	0.001	0.005

不同浓度的 DZ 预处理软骨细胞 30 min,0.25 μmol · L<sup>-1</sup> 双氧水处理 4 h,流式细胞仪检测软骨细胞的凋亡率及死亡率。各组数据采用秩和检验比较,结果如表 2 所示,差异有统计学意义。通过将原始数据转换为秩,进行 *q* 检验两两比较的结果显示,B 组(*q* = 12.265, *P* = 0.000)和 C 组(*q* = 7.610, *P* = 0.003)差异显著,D 组(*q* = 0.213, *P* = 0.08)差异无统计学意义

**2.5 各组软骨细胞中的活性氧的检测** 软骨细胞经双氧水处理后,软骨细胞内的活性氧水平显著升高,而经 DZ 预处理过的软骨细胞,再次接受双氧水处理后,活性氧的水平较低,甚至比正常软骨细胞的活性氧低,间接反映 DZ 具有保护软骨细胞对抗氧化损伤的能力(图 6)。

实验结果表明 C 组和 D 组有明显的对抗氧化损伤的能力,而 E 组对抗氧化损伤的能力效果不明显。实验表明适宜浓度的 DZ 可以降低软骨细胞中活性氧的水平,但 DZ 浓度增大不一定会增强其的抗氧化损

伤的能力,反而增强其对细胞的毒性,实验还发现,DZ 浓度超过 10 μmol · L<sup>-1</sup> 时会增加其对软骨细胞的毒性(表 1),加速软骨细胞的死亡。

**2.6 各组软骨细胞中 HIF-1α 蛋白表达的比较** 如图所示,与 A 组比较,B 组 HIF - α 蛋白表达明显下降(*q* = 13.653, *P* < 0.05),与 B 组比较,不同浓度 DZ 预处理的软骨细胞组中 HIF - α 蛋白表达明显上升(*P* < 0.05),差异有统计学意义。其中尤以 C 组(*q* = 2.075, *P* = 0.010)和 D 组(*q* = 1.878, *P* = 0.019)差异显著。



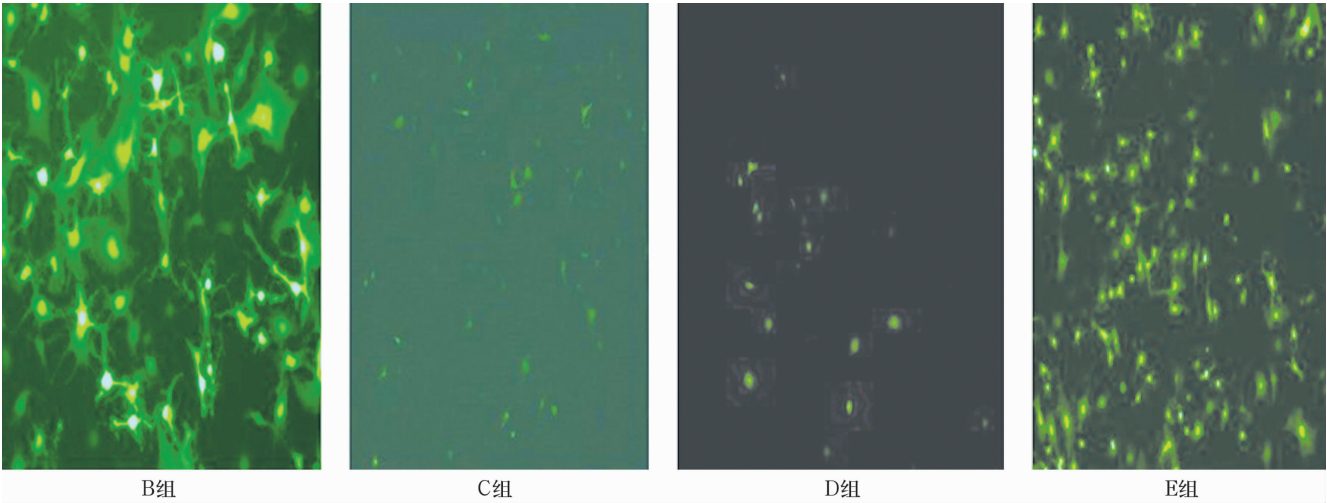


图 6 鼠关节软骨细胞学荧光显微镜片 (DCF 荧光染色 ×50)

不同浓度的 DZ 预处理软骨细胞 30 min,然后 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  双氧水处理 4 h,检测活性氧如图 6 所示,绿色荧光强度反应活性氧产生的量(×50)。由图可见,D 组和 C 组产生的荧光强度明显比 B 组弱



图 7 鼠关节软骨细胞 HIF- $\alpha$  蛋白的表达

Western bolt 检测不同浓度的 DZ 预处理软骨细胞 HIF- $\alpha$  蛋白表达的影响:各组数据采用方差分析比较, $F = 294.08, P < 0.0001$ ,差异有统计学意义。采用  $q$  检验进行两两比较结果显示,C 组( $q = 2.075, P = 0.010$ )和 D 组( $q = 1.878, P = 0.019$ )差异显著

3 讨 论

**3.1 氧自由基对软骨细胞的影响** 近年来的研究表明,骨关节炎的发生、发展与氧自由基代谢有一定关系<sup>[5]</sup>。自由基是具有很强反应活性的基团,可增加氨基酸、多肽和蛋白质对蛋白水解酶的敏感性,促进其降解,使细胞膜发生脂质过氧化,是许多疾病发生的基础。氧自由基包括超氧化物阴离子自由基、单线态氧、羟自由基等。若细胞产生过多的自由基则会对细胞生物膜、蛋白质和核酸等的损伤,引起软骨细胞的形态、生长状态和功能改变,从而使得软骨基质合成减少,甚至软骨细胞死亡。最后慢慢演变为骨关节炎。

**3.2 DZ 对软骨细胞氧自由基的影响** 近来研究表明,DZ 可抑制 MPP + 诱导中脑神经元活性氧的过量产生,同时稳定神经元线粒体膜电位和阻止线粒体细胞色素 C 释放,从而保护中脑神经元细胞<sup>[6]</sup>。DZ 是线粒体钾通道(mito-KATP)激活剂,而 mito-KATP 是一个八聚体,由两部分组成,一部分是内向整流 K 通道由四个亚基组成活性氧,另一部分是磺酰胺类受体由四个亚基组成<sup>[4]</sup>。激活 mito-KATP,可稳定线粒体

膜电位,降低细胞钙超载,促进线粒体氧化磷酸化<sup>[7]</sup>。Minners 等<sup>[3]</sup>报道激活 mito-KATP,可轻度的抑制呼吸链,导致生理性活性氧增加,激发线粒体活性氧信号通路,使得线粒体形态和功能发生改变,上调线粒体膜上非偶联蛋白数量,以抵抗病理性活性氧的氧化损伤和缺氧损伤,提高细胞抗氧化损伤的能力。Kukreja 等<sup>[8]</sup>报道开放线粒体钾通道可促使细胞中生理性活性氧的增加,生理性活性氧可作为细胞第二信使激活一系列的蛋白激酶,从而对抗细胞氧化损伤,稳定细胞功能,提高细胞生存率。本实验证明 DZ 可降低软骨细胞内病理性活性氧的产生,图 6 可见双氧水组软骨细胞中病理性活性氧最多,细胞形态改变,实验中细胞存活率最低,而 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 1.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DZ 预处理组中软骨细胞病理性活性氧较少,大部分软骨细胞在双氧水处理下仍保持原有形态,细胞存活率高。由此可见,DZ 可对抗软骨细胞的氧化损伤,提高细胞耐受抗氧化能力,可能的机制之一是 DZ 开放软骨细胞的 mito-KATP,促细胞产生生理性活性氧,激活活性氧信号通路,从而提高细胞抗氧化能力,提高细胞存活率。

**3.3 二氮嗪对软骨细胞功能的影响** 正常软骨细胞可分泌糖胺聚糖(GAG)和Ⅱ型胶原,GAG 是软骨组织中胞外基质的重要组成部分之一,骨性关节炎患者中,软骨组织中 GAG 减少,且软骨细胞分泌 GAG 能力下降<sup>[1]</sup>。实验发现,DZ 预处理双氧水诱导的软骨细胞产生的 GAG 的含量比单纯的双氧水诱导的软骨细胞 GAG 含量多(图 3、图 4),间接反映,DZ 对软骨

细胞的分泌功能有一定保护作用。

**3.4 DZ 对软骨细胞凋亡的影响** 软骨细胞的凋亡是引起关节软骨退化的重要原因之一,而软骨细胞的凋亡主要包括线粒体途径,死亡受体途径和内质网应激反应性凋亡途径。其中在线粒体途径中,由于线粒体代谢功能紊乱,释放细胞色素 C 和促凋亡因子,激活细胞凋亡酶信号通路,诱导软骨细胞凋亡,促进关节软骨的退化,逐渐发展为骨关节炎<sup>[9]</sup>。邵素霞等<sup>[9]</sup>研究发现 DZ 可以降低双氧水诱导的骨骼肌成肌细胞的凋亡率,并且可以促进骨骼肌成肌细胞的增殖。Chio 等<sup>[10]</sup>研究表明 DZ 可以对抗双氧水所引起的成骨细胞凋亡,提高成骨细胞的存活率。在本实验过程中我们证明了 DZ 可以降低双氧水诱导的软骨细胞的凋亡率,提高细胞的抗氧化损伤的能力。双氧水组凋亡率为  $12.710 \pm 1.080\%$ ,  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DZ 组早期凋亡率为  $7.170 \pm 0.330\%$  (表 2),可见 DZ 预处理双氧水诱导的软骨细胞,可降低软骨细胞的凋亡率,提升软骨细胞抗氧化损伤能力。可能存在的机制之一是 DZ 激活 mito-KATP,激活活性氧信号通路,稳定线粒体膜电位,使得线粒体细胞色素 c 和凋亡诱导因子释放减少,降低细胞凋亡率。Patel 等<sup>[11]</sup>研究表明 DZ 可以使缺血再灌注的 PC12 细胞释放的细胞色素 C 和 AIF 减少,从而减少激活 caspase-3,减少细胞的凋亡。HIF-1 $\alpha$  是缺血缺氧条件下广泛存在人体组织的一种转录因子,通过  $\alpha$  亚基促进下游相关基因的转录和表达,使这些基因参与无氧代谢、红细胞生成、血管形成等低氧应答反应<sup>[12]</sup>。本实验发现  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DZ 组所诱导的 HIF-1 $\alpha$  蛋白比对照组明显上升(图 7),可能存在 DZ 诱导 HIF-1 $\alpha$  的表达,引起下游相关基因的转录,总体提高软骨细胞对氧化损伤的耐受力,阻碍自由基诱导的软骨细胞的凋亡。

综上所述,DZ 可通过降低软骨细胞线粒体内的病理性活性氧的增加,稳定线粒体膜电位,提高软骨细胞抗氧化损伤的能力,降低软骨细胞的凋亡率。而骨性关节炎患者的软骨细胞内病理性活性氧产生过度,导致线粒体膜通透性转换孔开放,细胞色素 C 和凋亡诱导因子的释放,诱发软骨细胞的凋亡。此外,骨性关节炎软骨细胞功能下降,细胞外基质分泌减少及破坏,而 DZ 可阻断氧自由基过度产生,阻止软骨细胞凋亡及功能下降,预防关节炎发生。

## 4 参考文献

- [1] Sutipornpalangkul W, Morales NP, Harnroongroj T. Free radicals in primary knee osteoarthritis[J]. J Med Assoc Thai, 2009, 92(6): 268 - 274.
- [2] Grishko VI, Ho R, Wilson GL, et al. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(1): 107 - 113.
- [3] Minners J, Locerdal, Yellon OM, et al. Diazoxide-induced respiratory inhibition—a putative mitochondrial K ATP channel independent mechanism of pharmacological preconditioning[J]. Mol and Cell Biochemistry, 2007, 294(9): 11.
- [4] McCully JD, Wakiyama H, Cowan DB, et al. Diazoxide amelioration of myocardial injury and mitochondrial damage during cardiac surgery[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 74(7): 2138 - 2145.
- [5] Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010, 24(8): 15 - 26.
- [6] Xie J, Duan L, Qian X, et al. K-ATP Channel Openers Protect Mesencephalic Neurons Against MPP<sup>+</sup>-Induced Cytotoxicity Via Inhibition of ROS Production[J]. J Neurosci. 2010, 88(2): 428 - 437.
- [7] Virgili N, Espinosa-Parrilla JF, Mancera P, et al. Oral administration of the KATP channel opener diazoxide ameliorates disease progression in a murine model of multiple sclerosis[J]. J Neuroinflammation, 2011, 8(2): 149.
- [8] Kukreja RC. Mechanism of reactive oxygen species generation after opening of mitochondrial KATP channels[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(5): 2041 - 2043.
- [9] Shao SX, Zhang L, Chen HX, et al. Diazoxide pretreatment enhances L6 skeletal myoblast survival and inhibits apoptosis induced by hydrogen peroxide[J]. Anat Rec (Hoboken), 2012, 295(4): 632 - 640.
- [10] Choi EM, Kim GH, Lee YS. Diazoxide protects against hydrogen peroxide-induced toxicity in the osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 624(1 - 3): 45 - 50.
- [11] Zhang H, Zhao D, Wang Z, et al. Diazoxide preconditioning alleviates caspase-dependent and caspase-independent apoptosis induced by anoxia-reoxygenation of PC12 cells[J]. J Biochem, 2010, 148(4): 413 - 421.
- [12] Patel NS, Muneer A, Blick C, et al. Targeting vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2009, 30(6): 292 - 299.