

网络出版时间:2025-11-13 11:07:53 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251202.1332.006

◇基础医学研究◇

乙酰唑胺抑制自噬对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、凋亡和炎症反应的影响

王梦晴,张曼玉,顾胜龙,黄艳,李荣

(安徽医科大学药学科学学院,炎症免疫性疾病安徽省实验室,合肥 230032)

摘要 目的 研究水通道蛋白1(AQP1)抑制剂乙酰唑胺(AZ)对类风湿关节炎(RA)成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖、凋亡和炎症反应的影响及其潜在机制。方法 使用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的 RA-FLS 作为体外 RA 模型。采用 MTT 法、IF 染色及 EdU 掺入实验研究 AZ 对 RA-FLS 增殖的影响。通过 Hoechst 染色、Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术及线粒体膜电位实验检测细胞凋亡情况。使用 ELISA 和实时定量 PCR 法检测促炎因子的水平。通过 IF 染色及 mCherry-GFP-LC3B 斑点实验评估细胞自噬水平。Western blot 检测与自噬、凋亡及增殖相关的蛋白表达。通过联合使用自噬激活剂雷帕霉素(RAPA)或自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA),探讨抑制自噬在 AZ 治疗 RA-FLS 中的作用。结果 AZ 剂量依赖性地抑制 RA-FLS 增殖,促进其凋亡,并减少促炎细胞因子的产生。AZ 抑制 RA-FLS 中的保护性细胞自噬,表现为 LC3B 水平降低($P < 0.05$)、p62 表达增加($P < 0.05$)、自噬流减少($P < 0.01$)。此外,AZ 的上述体外作用在 RAPA 诱导的自噬激活后被逆转,并在 3-MA 诱导的自噬抑制下得到增强。结论 AZ 通过抑制细胞保护性自噬改善 RA-FLS 的过度增殖、凋亡抵抗和异常炎症反应,揭示了自噬抑制在 AZ 抗 RA 疗效中的核心作用。

关键词 乙酰唑胺;类风湿关节炎;成纤维样滑膜细胞;细胞增殖;细胞凋亡;自噬

中图分类号 R 967

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)12-2187-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.12.001

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以滑膜增生、滑膜炎和关节损伤为特征的慢性自身免疫性疾病^[1]。RA 成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)呈现出过度增殖、凋亡抵抗和异常炎症反应的特点^[2]。滑膜中水通道蛋白1(aquaporin 1, AQP1)表达升高,并且密切参与 RA 发病过程^[3]。乙酰唑胺(acetazolamide, AZ)作为 AQP1 抑制剂,在 RA 实验动物中表现出抗风湿作用^[4],但 AZ 在调节 RA-FLS 致病性细胞行为中的作用尚不明确。自噬通过回收细胞组分,促进细胞存活,并帮助细胞抵御饥饿和炎症等应激因素^[5]。自噬水平升高通过增强凋亡抵抗,促进 RA-FLS 的过度增殖,而抑制自噬则能诱导 RA-FLS 凋亡,从而恢复增殖与凋亡的平衡^[6]。该研究探讨 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖、凋亡、炎症反应和自噬的影响,并通过

与自噬激活剂雷帕霉素(rapamycin, RAPA)和自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)联合处理,阐明抑制自噬在 AZ 对 RA-FLS 治疗效果中的关键作用,为 RA 治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 RA-FLS 购自美国 Cell Applications 公司。

1.1.2 主要试剂 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(货号:300-01A,美国 Pepro Tech 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(货号:086-150,加拿大 Wisent 公司);DMEM 高糖培养基(货号:SH30022.01,美国 Hyclone 公司);EdU 细胞增殖试剂盒(货号:C10310,广州锐博生物技术有限公司);AZ(货号:A194116,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-8 ELISA 试剂盒(货号:YX-E10083H、YX-E10140、YX-E10139,上海优选生物科技公司);RevertAid First Strand cDNA 合成试剂盒和 SYBR Green PCR 试剂盒(货号:K1622、4367659,美国 Thermo

2025-08-20 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81972040);安徽省高校协同创新项目(编号:GXXT-2022-063)

作者简介:王梦晴,女,硕士研究生;

李荣,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail: aydlirong@163.com

Fisher Scientific 公司); 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 和 Ad-mCherry-GFP-LC3B (货号: C2006、C3011, 上海碧云天生物科技有限公司); β -actin、LC3B、Bcl-2、c-myc、cyclin D1、p62、cleaved caspase 3 和 Bax 的抗体 (货号: ab8226、ab192890、ab182858、ab32072、ab16663、ab109012、ab2302、ab32503, 英国 Abcam 公司); IL-1 β 抗体 (货号: BS6067, 美国 Bio-world 公司); cleaved PARP、IL-6 和 IL-8 抗体 (货号: WL01932、WL02841、WL03074, 沈阳万类生物科技有限公司); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (货号: ZB-2301、ZB-2305, 北京中杉金桥生物技术有限公司); PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.1.3 主要仪器 超净工作台 (型号: NU 425 400s, 美国 Nuair 公司); CO₂ 细胞培养箱 (型号: Napco 6100, 美国杜邦公司); 蛋白显影仪 (型号: Chemi Doc, 美国 BIO-RAD 公司); 流式细胞仪 (型号: CytoFlex, 美国 Beckman Coulter 公司); CFX Connect 实时定量 PCR 仪 (型号: 1855202, 美国伯乐公司); 倒置荧光显微镜 (型号: Axio Observer 3, 德国蔡司集团); 酶标仪 (型号: MK3, 荷兰雷勃公司)。

1.2 细胞培养与药物治疗 将 RA-FLS 在 DMEM 培养基 (含 10% FBS 和 1% 青-链霉素溶液) 中进行培养。应用 Vimentin 免疫荧光染色来鉴定培养的细胞。将 AZ 溶解在 DMSO 中, 然后用 DMEM 培养基稀释到所需浓度。在 TNF- α (10 μ g/L) 存在的情况下, 用 AZ 单独或与 RAPA/3-MA 共同处理 RA-FLS, 再评估增殖、凋亡、炎症和自噬等相关指标。细胞分为对照组、TNF- α 诱导组、TNF- α + AZ (40、80 和 160 μ mol/L) 处理组; 在干预自噬实验中, 分为 TNF- α 诱导组、TNF- α + AZ (80 μ mol/L) 处理组、TNF- α + AZ (80 μ mol/L) + RAPA (20 nmol/L) 处理组、TNF- α + AZ (80 μ mol/L) + 3-MA (3 μ mol/L) 处理组。

1.3 细胞活性测定 RA-FLS 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔板中。用 0、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320 和 640 μ mol/L 浓度的 AZ 处理, 再在有或无 TNF- α 刺激的情况下培养 48 h。随后, 在每个孔中加入 20 μ L MTT 溶液 (5 g/L), 继续在 37 $^{\circ}$ C 环境中孵育。4 h 后, 吸除培养基, 加入 DMSO (150 μ L/孔)。最后, 使用酶标仪检测 490 nm 处每个孔的吸光度值。

1.4 EdU 细胞增殖试验 根据实验分组, 处理 RA-FLS 48 h。在培养期结束前 2 h 向培养液中加入终

浓度为 10 μ mol/L 的 EdU。随后按照生产商的指南进行染色, 随机选取 5 个视野, 计算 EdU 阳性细胞的平均百分比来评估细胞增殖率。

1.5 Hoechst 染色试验 在 24 孔板的盖玻片上培养 RA-FLS。经过适当处理后, 细胞用 PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定, 并在避光条件下用 Hoechst 33342 (10 mg/L) 在黑暗中染色 30 min。使用荧光显微镜测定细胞凋亡核形态的百分比, 再进行统计分析。

1.6 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试验 将 RA-FLS 培养在 6 孔板中, 每孔 1×10^5 个细胞, 待其贴壁后进行药物处理, 后用不含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化, 收获细胞并将其悬浮在结合缓冲液中。在 400 μ L 细胞悬浮液中加入 5 μ L AnnexinV-FITC 混合染色, 在 2~8 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。孵育完毕后, 加入 5 μ L 的 PI 染色, 在避光室中孵育 5 min, 然后用流式细胞仪进行检测, 最后用 FlowJo 7.6 软件分析细胞凋亡百分比。

1.7 线粒体膜电位检测 将 RA-FLS 以每孔 1×10^4 个细胞密度接种于共聚焦小皿中, 待其贴壁后进行分组处理, 分为对照组、TNF- α 诱导组、TNF- α + AZ (40、80 和 160 μ mol/L) 处理组。药物处理结束后, 去掉培养基, 加入 PBS 清洗 2 次, 再加入 JC-1 染料, 完全混合后在 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。使用激光共聚焦显微镜观察细胞, 并拍摄代表性图像。

1.8 免疫荧光试验 在 24 孔板的盖玻片上培养 RA-FLS 并进行药物处理, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 再用 0.5% Triton X-100 进行通透处理。细胞用 5% 山羊血清封闭后, 与特异性一抗 (LC3B, 1:1 600; p62, 1:400; Ki67, 1:200) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用相应的荧光二抗 (TRITC 或 Alexa Fluor 488 标记, 1:1 000) 孵育 1 h 后, 用 DAPI 对细胞进行复染。最后, 使用荧光显微镜观察荧光信号, 并获取典型图像。

1.9 mCherry-GFP-LC3B 腺病毒转染 RA-FLS 以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于共聚焦培养皿中, 并引入 mCherry-GFP-LC3B 腺病毒, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。对细胞进行分组处理, 分为 TNF- α 诱导组和 TNF- α + AZ (160 μ mol/L) 处理组, 再培养 48 h。通过激光共聚焦显微镜获取细胞自噬的典型图像。自噬体用黄色斑点信号 (mCherry⁺ GFP⁺) 表示, 自溶酶体用红色斑点信号 (mCherry⁺ GFP⁻) 表示。通过量化黄色斑点和红色斑点的数量来确定自噬流强度。

1.10 实时定量 PCR 分析 使用 TRIzol 进行 RNA 提取,然后使用 RevertAid First Strand cDNA 合成试剂盒进行 DNA 合成。使用 SYBR Green PCR 试剂盒和 ABI Prism Sequence Detector 系统进行实时定量 PCR 分析,反应体系体积为 25 μ L,扩增 40 个循环。本研究使用的引物序列见表 1。使用 β -actin 作为内参,并采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算相对 mRNA 表达量。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')
IL-1 β	F: GCCAGTGAAATGATGGCTTATT R: AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG
IL-6	F: CACTGCTCTTTTGGAGTTTGAG R: GGACTTTTGTAATCATCTGCAC
IL-8	F: ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC R: AACCCTCTGCACCCAGTTTTC
β -actin	F: TTGCTGACAGGATGCAGAA R: ACCAATCCACACAGAGTACTT

1.11 ELISA 实验 在 TNF- α 刺激条件下,将细胞用 AZ 单独或与 RAPA/3-MA 联合处理。离心收集上清液,并按照厂家提供的操作规程,采用 ELISA 试剂盒测定促炎因子的浓度。

1.12 Western blot 实验 采用 RIPA 裂解液提取蛋白质,Bradford 法测定蛋白质含量。应用 SDS-PAGE 分离等量的蛋白质,将其转移到 PVDF 膜上并用 5% 脱脂牛奶封闭。使用特异性一抗 β -actin (1 : 5 000); LC3B、Bcl-2 和 Bax (1 : 2 000); p62 (1 : 10 000); c-myc、cleaved PARP、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 (1 : 1 000); cyclin D1 (1 : 200); cleaved caspase 3 (1 : 500),在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。将膜与相应的辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1 : 5 000) 在 37 $^{\circ}$ C 下孵

育 1 h。使用增强型化学发光试剂盒检测蛋白条带,并通过 ImageJ 软件进行定量分析,结果以 β -actin 为内参进行标准化处理。

1.13 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,并使用 GraphPad Prism 7.0 软件生成图表。组间比较采用单因素方差分析,若方差齐性则选用 Tukey's 检验进行事后检验,若方差不齐则选用 Tamhane's T2 检验。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

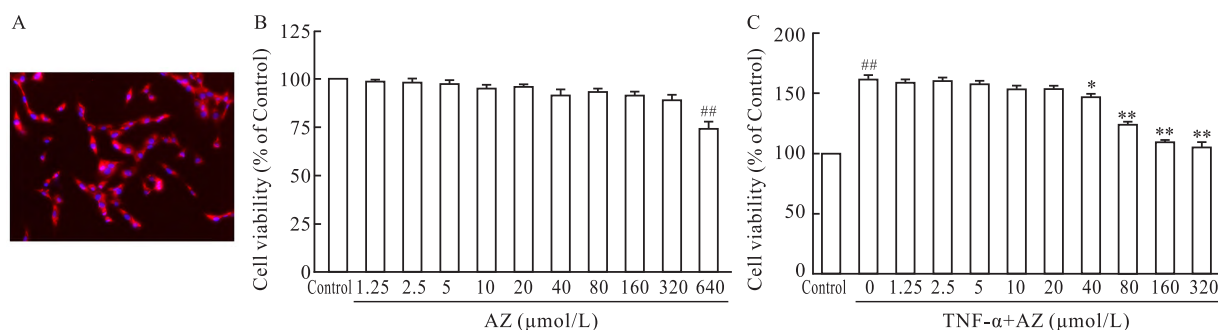
2 结果

2.1 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 活性的影响

免疫荧光染色检测到 Vimentin 阳性表达,结合细胞形态学特征,确认培养细胞属于 FLS 内膜亚群,见图 1A。MTT 检测结果表明,640 μ mol/L AZ 处理 RA-FLS 48 h 后,对其活性影响大 ($P < 0.01$),见图 1B。TNF- α 诱导组的细胞存活率高于未处理的对照组 ($P < 0.01$)。与 TNF- α 诱导组比较,用 20 μ mol/L 及以下浓度的 AZ 处理 TNF- α 诱导的 RA-FLS 时,差异无统计学意义;但用 40、80、160、320 μ mol/L 的 AZ 处理 48 h 后,细胞活性下降 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$),见图 1C,这表明 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 的活性呈浓度依赖性抑制。因此,选择用 40、80 和 160 μ mol/L AZ 处理 48 h 进行后续细胞实验。

2.2 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖的影响

AZ 在 40、80 和 160 μ mol/L 浓度下,浓度依赖性抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$),见图 2A。此外,EdU 实验结果表明,与对照组比较,TNF- α 诱导组中 EdU 阳性细胞百分比大幅上升,但在 AZ 处理 48 h 后,这种上升趋势明显

图 1 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 活性的影响Fig.1 The effects of AZ on the viability of TNF- α -induced RA-FLS

A: FLS identification by Vimentin expression using immunofluorescence staining ($\times 200$); B: AZ's effects on the viability of RA-FLS were assessed by MTT assay; C: AZ's effects on the viability of TNF- α -induced RA-FLS were assessed by MTT assay; ## $P < 0.01$ vs Control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TNF- α -induced group.

逆转,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 2B、2C。此外,IF 实验显示,AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中 Ki67 的表达也有类似的抑制作用,见图 2D。Western blot 检测结果进一步表明,与 TNF- α 诱导组比较,AZ 处理组能有效降低 c-myc 和 cyclin D1 的蛋白表达,其中 AZ (80、160 $\mu\text{mol/L}$) 差异有统计学

意义(均 $P < 0.01$),见图 2E、2F。

2.3 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 凋亡的影响

Hoechst 33342 染色结果显示,对照组和 TNF- α 诱导组的细胞核均表现出一致且规则的染色。而 AZ (40、80 和 160 $\mu\text{mol/L}$) 处理组则增加了具有凋亡核形态的细胞比例,表现为核碎裂和染色质凝聚($P <$

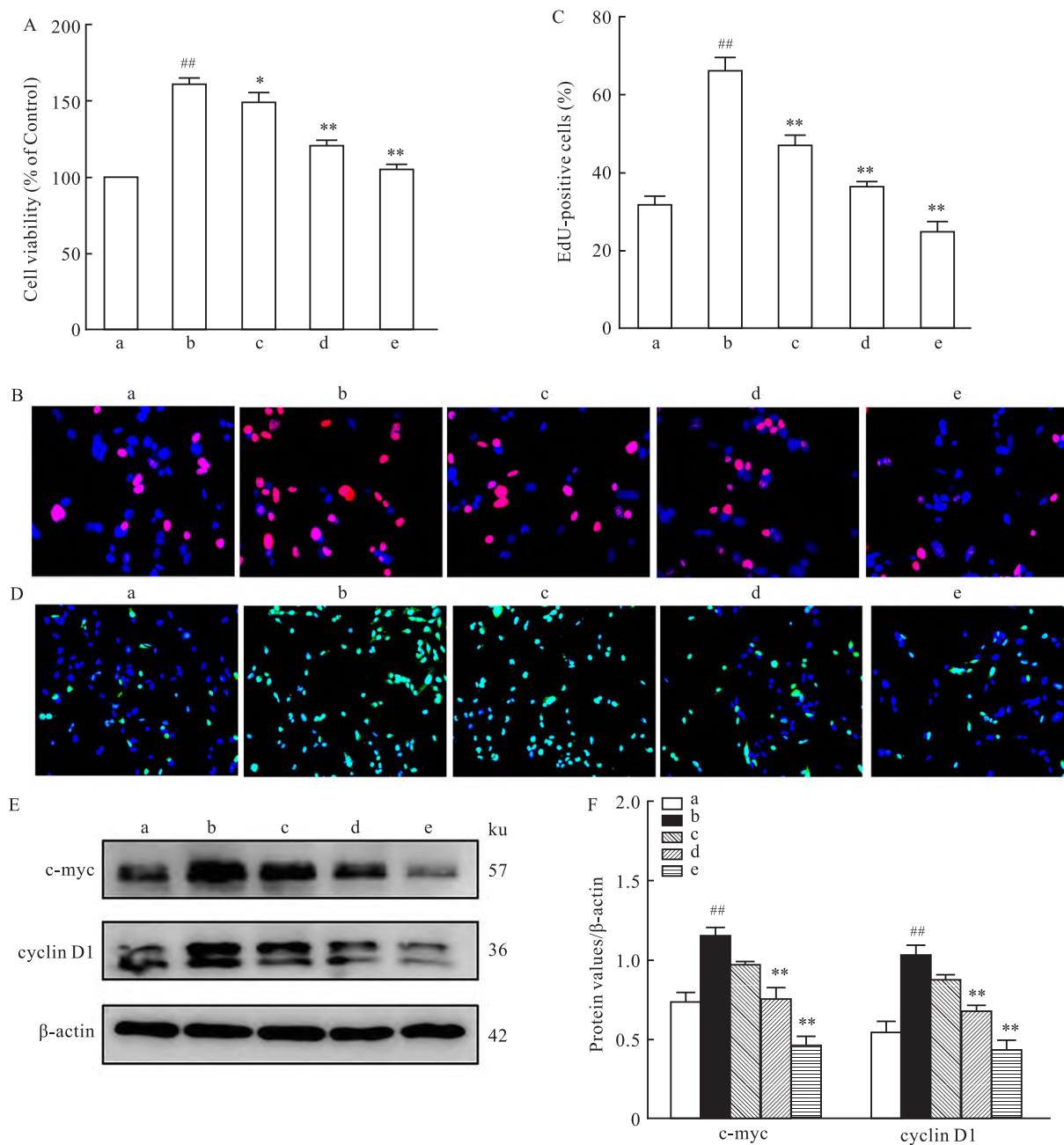


图2 AZ抑制TNF- α 诱导的RA-FLS增殖

Fig. 2 AZ hindered the proliferation of TNF- α -induced RA-FLS

A: MTT assay was used for the detection of cell proliferation; B, C: Typical images of the EdU incorporation assay ($\times 200$) and quantification of the EdU-positive cells (%); D: Typical images of Ki67 immunofluorescence staining ($\times 100$); E, F: Western blot analysis and quantification of c-myc and cyclin D1 expression levels; a: Control group; b: TNF- α -induced group; c: TNF- α + AZ (40 $\mu\text{mol/L}$) group; d: TNF- α + AZ (80 $\mu\text{mol/L}$) group; e: TNF- α + AZ (160 $\mu\text{mol/L}$) group; ^{##} $P < 0.01$ vs Control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs TNF- α -induced group.

0.05、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$), 见图 3A、3B。通过 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术分析显示, AZ(40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 处理组提高了 TNF- α 诱导的 RA-FLS 的细胞凋亡率($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$), 见图 3C、3D。此外, 随着 AZ 剂量的增加, 线粒体膜电位逐渐降低, JC-1 染色由红色荧光转变为绿色荧

光, 见图 3E。Western blot 结果显示, 与 TNF- α 诱导组比较, AZ 处理组中 Bax 水平上升, Bcl-2 水平下降, Bax/Bcl-2 比值升高, 并且 cleaved caspase 3 和 cleaved PARP 的蛋白水平上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 3F–3H。

2.4 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中促炎细胞因

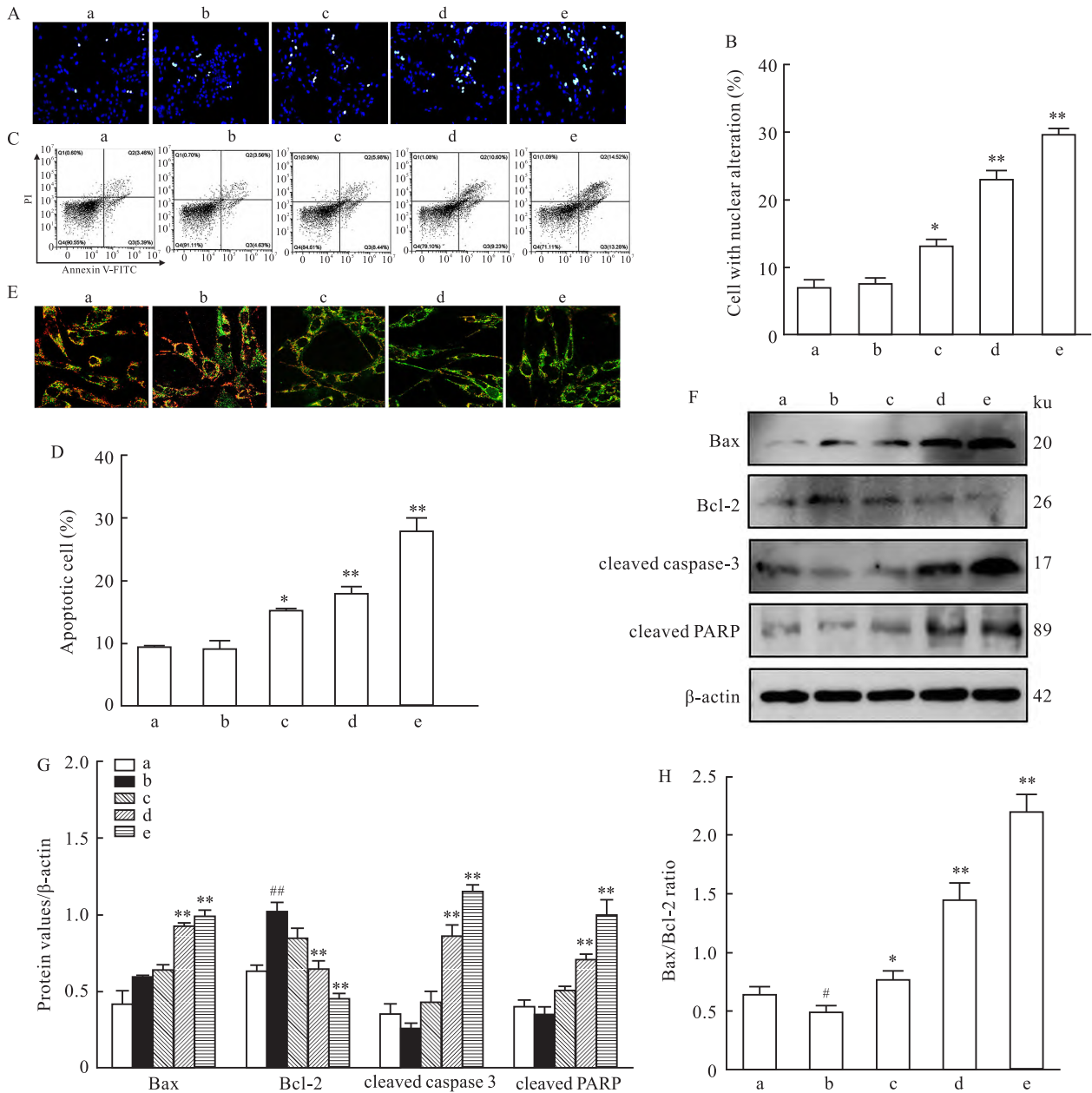


图 3 AZ 促进 TNF- α 诱导的 RA-FLS 凋亡

Fig. 3 AZ promoted the apoptosis of TNF- α -induced RA-FLS

A, B: Typical photos of Hoechst 33342 staining from various groups ($\times 100$) and the statistical results of the percentage of cells showing nuclear abnormalities (%); C, D: Flow cytometry analysis of Annexin V-FITC/PI-stained cells and the statistical results of the percentage of apoptosis (%); E: Typical photos of RA-FLS stained with JC-1 from various groups ($\times 200$); F, G: Western blot assay and quantitation of Bcl-2, Bax, cleaved caspase 3 and cleaved PARP; H: Bax/Bcl-2 expression ratios; a: Control group; b: TNF- α -induced group; c: TNF- α + AZ (40 $\mu\text{mol/L}$) group; d: TNF- α + AZ (80 $\mu\text{mol/L}$) group; e: TNF- α + AZ (160 $\mu\text{mol/L}$) group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TNF- α -induced group.

子产生的影响 ELISA 数据显示,与对照组比较, TNF- α 诱导组中促炎细胞因子的水平增加 ($P < 0.01$)。然而,与 TNF- α 诱导组比较, AZ 以浓度依赖的方式逆转促炎细胞因子的升高,见图 4A。与 ELISA 结果一致,实时定量 PCR 结果证实, AZ 能够不同程度地降低 TNF- α 刺激组中的 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 mRNA 水平,见图 4B。

2.5 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中的细胞保护性自噬的影响 采用 IF 实验(图 5A、5B)和 Western blot 实验(图 5C、5D)检测自噬标志物 LC3B 和 p62 的表达。与 TNF- α 诱导组比较, AZ 处理组显示 LC3B 的水平降低, p62 的水平升高。在 TNF- α 诱导组中,感染 mCherry-GFP-LC3B 的 RA-FLS 中呈现大量黄色斑点,而 AZ 处理后,黄色荧光呈弥漫状分布于 RA-FLS 细胞质中,见图 5E。通过比较 TNF- α 诱导组和 AZ (160 $\mu\text{mol/L}$) 组的黄色斑点和红色斑点,发现 AZ 处理后 RA-FLS 中自噬通量下降 ($P < 0.01$),见图 5F。

2.6 干预自噬影响 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖、凋亡和炎症反应的治疗作用 MTT 实验(图 6A)和 EdU 实验(图 6B、6C)结果表明,与 AZ 组比

较, RAPA (20 nmol/L) 逆转 AZ (80 $\mu\text{mol/L}$) 对 RA-FLS 增殖的抑制作用 ($P < 0.01$),而在 MTT 实验中联合使用 3-MA (3 $\mu\text{mol/L}$) 会增强这种抑制作用 ($P < 0.05$)。Hoechst 33342 染色(图 6D、6E)和 Annexin V-FITC/PI 染色的流式细胞术分析(图 6F、6G)结果表明,与 TNF- α 诱导组比较, RAPA 联合治疗减少了 AZ 诱导的细胞凋亡 ($P < 0.01$),而联合使用 3-MA 加强了 AZ 的促凋亡作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。ELISA 结果显示,与 AZ 处理组比较,联合处理 RAPA 提高 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 水平(均 $P < 0.01$),而联合给药 3-MA 则效果相反,其降低了 IL-1 β 和 IL-8 的水平(均 $P < 0.05$),但对 IL-6 的降低则差异无统计学意义,见图 6H。Western blot 进一步证实了自噬干预对 AZ 在 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中增殖与凋亡作用的影响,见图 6I、6J。

3 讨论

RA 是一种慢性炎症性自身免疫性疾病,以滑膜炎、关节损伤和关节功能障碍为特征。有研究^[3]表明, RA 滑膜组织中 AQP1 表达升高,并与滑膜积液、关节肿胀及炎症程度相关,表明 AQP1 在

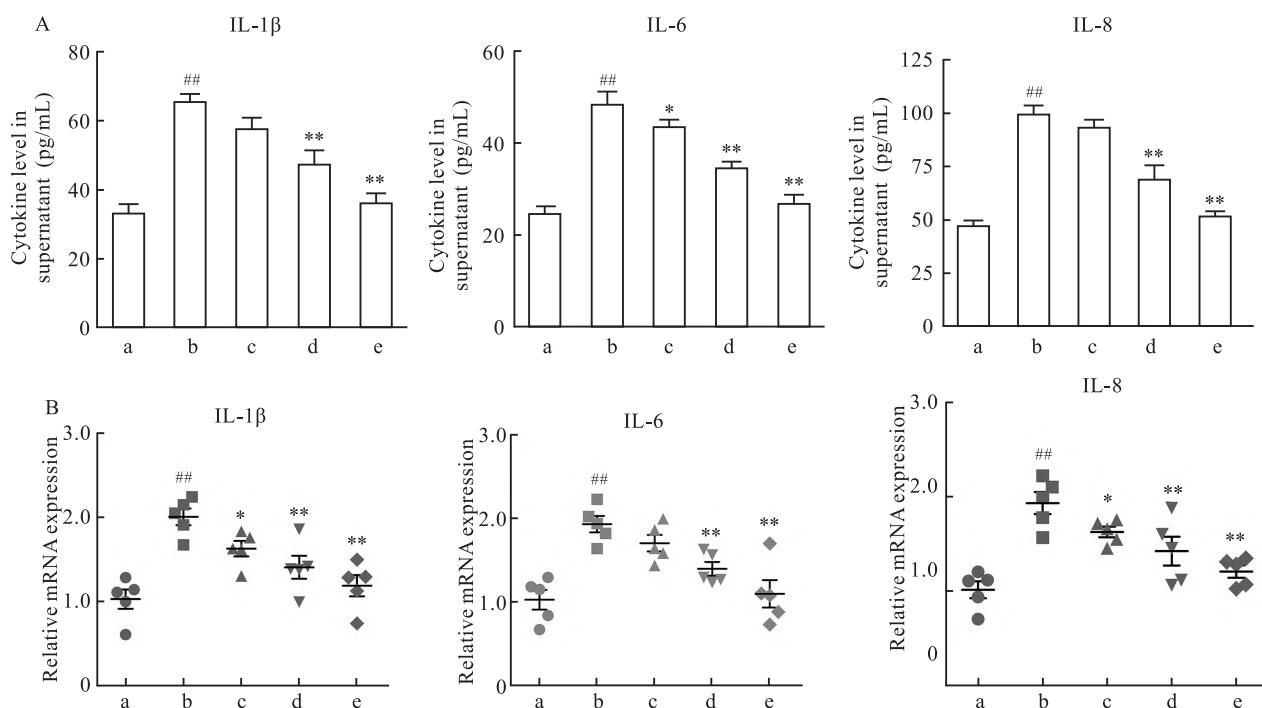
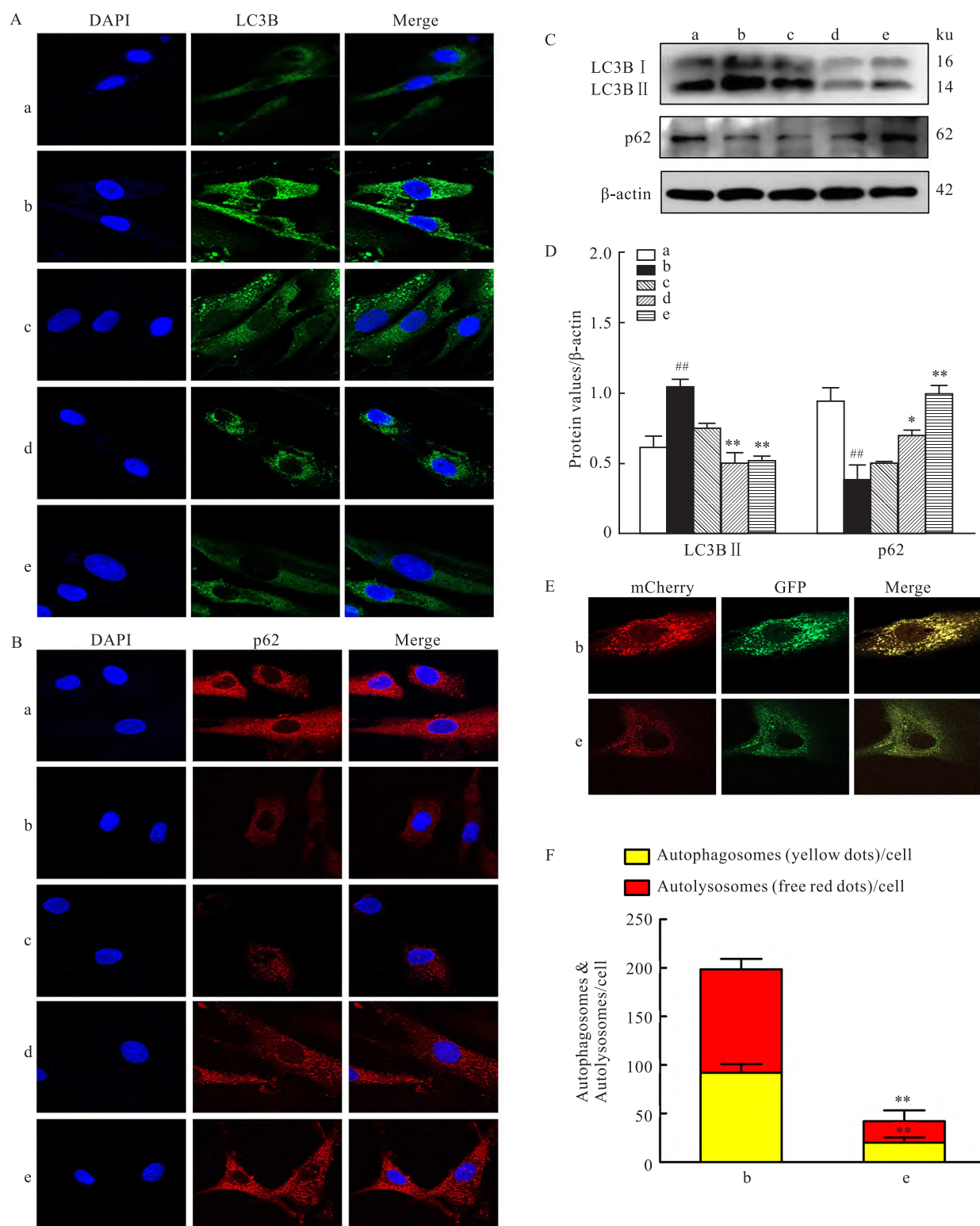


图4 AZ减少TNF- α 诱导的RA-FLS中促炎细胞因子的产生

Fig. 4 AZ reduced pro-inflammatory cytokine production in TNF- α -induced RA-FLS

A: IL-1 β , IL-6 and IL-8 levels in the cellular supernatant, detected by ELISA assay; B: IL-1 β , IL-6 and IL-8 mRNA levels among various cell groups, detected by quantitative real-time PCR; a: Control group; b: TNF- α -induced group; c: TNF- α + AZ (40 $\mu\text{mol/L}$) group; d: TNF- α + AZ (80 $\mu\text{mol/L}$) group; e: TNF- α + AZ (160 $\mu\text{mol/L}$) group; ^{##} $P < 0.01$ vs Control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs TNF- α -induced group.

图5 AZ抑制TNF- α 诱导的RA-FLS中的细胞保护性自噬Fig.5 AZ inhibited the cytoprotective autophagy in TNF- α -induced RA-FLS

A, B: LC3B and p62 expression were measured by IF assay ($\times 200$); C, D: Western blot assay and quantification of the protein level of LC3B and p62; E: Representative photos of autophagy flux detected by mCherry-GFP-LC3B puncta assay ($\times 800$); F: The quantitative analysis of the numbers of yellow and red puncta; a: Control group; b: TNF- α -induced group; c: TNF- α + AZ (40 $\mu\text{mol/L}$) group; d: TNF- α + AZ (80 $\mu\text{mol/L}$) group; e: TNF- α + AZ (160 $\mu\text{mol/L}$) group; # $P < 0.01$ vs Control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TNF- α -induced group.

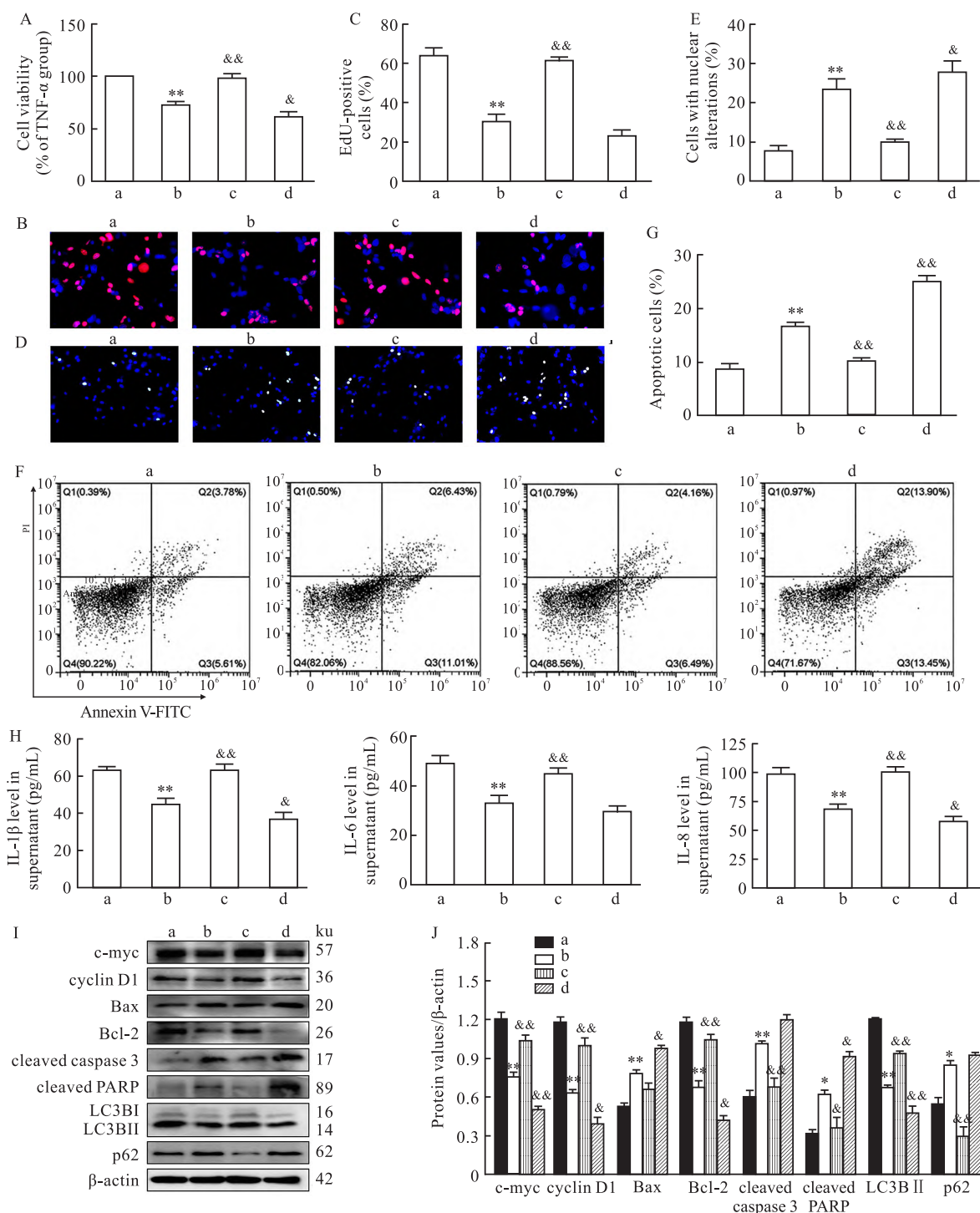


图6 干预自噬影响了AZ对TNF-α诱导的RA-FLS增殖、凋亡和炎症反应的治疗作用

Fig.6 Intervening autophagy influenced AZ's therapeutic effects on the proliferation, apoptosis, and inflammatory response of TNF-α-induced RA-FLS

A: MTT assay was used for the detection of the cell viability of RA-FLS; B, C: Typical photos of EdU incorporation assay (×200) from various groups, along with the statistical data of the percentage of EdU-positive cells (%); D, E: Representative photos of Hoechst 33342 staining from various groups (×100) and the statistical data of the percentage of cells with nuclear changes (%); F, G: Flow cytometry assay of Annexin V-FITC/PI-stained cells and the statistical results of apoptosis rate (%); H: ELISA assay was used for the detection of IL-1β, IL-6 and IL-8 levels in the cellular supernatant; I, J: Western blot assay and the statistical data for c-myc, cyclin D1, Bax, Bcl-2, cleaved caspase 3, cleaved PARP, LC3B and p62; a: TNF-α-induced group; b: TNF-α + AZ (80 μmol/L) group; c: TNF-α + AZ (80 μmol/L) + RAPA (20 nmol/L) group; d: TNF-α + AZ (80 μmol/L) + 3-MA (3 μmol/L) group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TNF-α-induced group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs TNF-α + AZ (80 μmol/L) group.

RA 病理进程中扮演重要角色,并可能是潜在的 RA 治疗靶点。AQP1 抑制剂 AZ 可减轻关节炎模型大鼠的疾病严重程度^[4]。然而,AZ 对 RA-FLS 异常细胞行为的潜在调控作用及机制尚不明确。本研究首次揭示了 AZ 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 的细胞增殖、凋亡抵抗和炎症反应的抑制作用,并进一步揭示了 AZ 抑制 RA-FLS 保护性自噬的作用机制。

FLS 在 RA 发病过程中发挥重要作用,研究其生物学特性对于阐明 RA 的发病机制以及开发新型 RA 治疗药物至关重要。滑膜增生是 RA 的关键病理表现,主要源于 RA-FLS 的类肿瘤性过度增殖及凋亡抵抗^[7-8]。因此,抑制 RA-FLS 过度增殖并促进其凋亡具有潜在的 RA 治疗作用。研究表明,AQP1 可促进癌细胞周期进程与增殖^[9],而 AZ 在多种癌细胞中已被证实具有抑制增殖和促进凋亡的作用^[10]。本研究中,相较于 TNF- α 诱导组,AZ 处理组中 Ki67 阳性细胞的百分比明显下降,EdU 阳性细胞的数量明显减少。同时,Annexin V-FITC/PI 双染流式实验显示,AZ 能够提高 TNF- α 诱导的 RA-FLS 的细胞凋亡率。这些结果表明 AZ 能够有效抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 过度增殖,并减少其抗凋亡能力。

滑膜炎是 RA 的核心病理基础。RA 发展过程中,持续激活的 RA-FLS 会大量产生促炎细胞因子,诱导 RA-FLS 的迁移或侵袭,加剧滑膜及全身炎症,并导致骨和软骨损伤^[11]。因此,抑制促炎细胞因子产生是缓解 RA 的有效策略之一。AZ 已被证实在多种疾病中具有抗炎作用^[12-13],本研究中 AZ 有效抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中促炎细胞因子的产生,表明其具有显著的抗炎作用,为 AZ 治疗 RA 的抗炎疗效提供了直接证据。

自噬是维持细胞内稳态的关键机制之一,其功能失调与 RA 等自身免疫性疾病的发病密切相关^[14]。RA 滑膜组织中的自噬水平高于骨关节炎患者,高水平的自噬通过缓解内质网应激促进 RA-FLS 的存活、增殖及凋亡抵抗。RA 滑膜内衬层细胞自噬的增加与 RA-FLS 的抗凋亡能力呈正相关,而抑制自噬可提高 RA-FLS 的凋亡率。由此可见,自噬是促进 RA-FLS 过度增殖和凋亡抵抗的重要机制^[15]。TNF- α 是 RA 患者滑液和血清中的重要炎症因子,其水平与疾病的严重程度呈正相关。研究^[16]表明,TNF- α 能够诱导 RA-FLS 发生自噬,促进错误折叠蛋白和受损细胞器的清除,从而减少凋亡并促进细胞存活。本研究使用 TNF- α 诱导的 RA-FLS 作为细胞模型,首次证实 AZ 能够抑制 RA-FLS

中的保护性自噬,表现为 LC3B 水平降低、p62 水平升高以及自噬流减少。为进一步明确自噬抑制在介导 AZ 疗效中的作用,本研究使用自噬激活剂 RAPA 或自噬抑制剂 3-MA 与 AZ 进行联合处理。实验结果表明,RAPA 联合处理逆转了 AZ 的治疗效果,而 3-MA 的加入则协同增强其作用。这些发现进一步支持自噬抑制在介导 AZ 抗类风湿特性中的关键作用。

综上所述,本研究首次证明 AZ 通过抑制细胞保护性自噬,抑制 RA-FLS 的过度增殖、凋亡抵抗和异常炎症反应。本研究结果揭示了 AZ 抗 RA 的新作用机制,并强调了 AZ 介导的 AQP1 抑制在 RA 治疗中的应用潜力。

参考文献

- [1] Gravalles E M, Firestein G S. Rheumatoid arthritis - common origins, divergent mechanisms[J]. N Engl J Med, 2023, 388(6): 529-42. doi: 10.1056/NEJMr2103726.
- [2] Tsaltan V, Firestein G S. Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Pharmacol, 2022, 67: 102304. doi: 10.1016/j.coph.2022.102304.
- [3] Mobasher A, Moskaluk C A, Marples D, et al. Expression of aquaporin 1 (AQP1) in human synovitis[J]. Ann Anat, 2010, 192(2): 116-21. doi: 10.1016/j.aanat.2010.01.001.
- [4] Mu Y R, Cai L, Zhou M Y, et al. Acetazolamide ameliorates the severity of collagen-induced arthritis in rats; involvement of inducing synovial apoptosis and inhibiting Wnt/ β -catenin pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 90: 107214. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107214.
- [5] Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective[J]. Cell, 2019, 176(1-2): 11-42. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.048.
- [6] Karami J, Masoumi M, Khorramdelazad H, et al. Role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: latest evidence and therapeutic approaches[J]. Life Sci, 2020, 254: 117734. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117734.
- [7] Rivellese F, Pitzalis C. Cellular and molecular diversity in rheumatoid arthritis[J]. Semin Immunol, 2021, 58: 101519. doi: 10.1016/j.smim.2021.101519.
- [8] Zhang Q, Liu J, Zhang M, et al. Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis[J]. Biomolecules, 2019, 9(12): 795. doi: 10.3390/biom9120795.
- [9] Wei X, Dong J. Aquaporin 1 promotes the proliferation and migration of lung cancer cell *in vitro*[J]. Oncol Rep, 2015, 34(3): 1440-8. doi: 10.3892/or.2015.4107.
- [10] Bayat Mokhtari R, Baluch N, Ka Hon Tsui M, et al. Acetazolamide potentiates the anti-tumor potential of HDACi, MS-275, in

- neuroblastoma[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 156. doi: 10.1186/s12885-017-3126-7.
- [11] Zhang S, Zhao J, Ma W. Circ-Sirt1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Autoimmunity*, 2021, 54(8): 514-25. doi: 10.1080/08916934.2021.1969550.
- [12] Abdel Hamed E F, Taha A A, Abdel Ghany S M, et al. Acetazolamide loaded-silver nanoparticles: a potential treatment for murine trichinellosis[J]. *J Helminthol*, 2023, 97: e86. doi: 10.1017/S0022149X23000731.
- [13] 陈伟娜, 李春梅, 朱仲珍, 等. 乙酰唑胺对 IL-1 β 诱导的大鼠关节软骨细胞凋亡的影响及机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5): 700-6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.009.
- [13] Chen W N, Li C M, Zhu Z Z, et al. Effect of acetazolamide on IL-1 β -induced apoptosis in rat articular chondrocytes and its mechanism[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2018, 53(5): 700-6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.009.
- [14] Ding J T, Hong F F, Yang S L. Roles of autophagy in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2022, 40(11): 2179-87. doi: 10.55563/clinexp Rheumatol/exg1ic.
- [15] He S D, Huang S G, Zhu H J, et al. Oridonin suppresses autophagy and survival in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 146-51. doi: 10.1080/13880209.2020.1711783.
- [16] Wang Y, Gao W. Effects of TNF- α on autophagy of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and regulation of the NF- κ B signaling pathway[J]. *Immunobiology*, 2021, 226(2): 152059. doi: 10.1016/j.imbio.2021.152059.

Effects of acetazolamide on the proliferation, apoptosis, and inflammatory response of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by inhibiting autophagy

Wang Mengqing, Zhang Manyu, Gu Shenglong, Huang Yan, Li Rong
(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Inflammation and Immune Mediated Diseases Laboratory of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract *Objective* To study the effects and potential mechanisms of the aquaporin 1 (AQP1) inhibitor acetazolamide (AZ) on the proliferation, apoptosis, and inflammatory response of rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS). *Methods* TNF- α -induced RA-FLS was served as *in vitro* RA model. MTT assay, IF staining, and EdU incorporation assay were applied to study AZ's effects on RA-FLS proliferation. Hoechst staining, flow cytometry analysis of Annexin V-FITC/PI-stained cells, and mitochondrial membrane potential detection experiments were used to detect cell apoptosis. ELISA and quantitative real-time PCR methods were used to measure pro-inflammatory cytokine production. Cell autophagy was evaluated using IF staining and mCherry-GFP-LC3B puncta assay. Western blot was performed to detect the levels of autophagy, apoptosis, and proliferation-related proteins. Moreover, the role of autophagy inhibition in AZ's effects on RA-FLS was examined by co-treating with the autophagy activator rapamycin (RAPA) or the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA). *Results* AZ dose-dependently inhibited cell proliferation, promoted apoptosis, and reduced the production of pro-inflammatory cytokines in RA-FLS. Furthermore, AZ suppressed cytoprotective autophagy in these cells, as evidenced by decreased LC3B levels ($P < 0.05$), increased p62 expression ($P < 0.05$), and reduced autophagic flux ($P < 0.01$). Particularly, AZ's beneficial effects were reversed by RAPA-induced autophagy activation and enhanced by 3-MA-induced autophagy inhibition. *Conclusion* This study provides the first evidence that AZ hinders cytoprotective autophagy, thereby alleviating the hyperproliferation, apoptosis resistance, and aberrant inflammatory response of RA-FLS, revealing the core role of autophagy inhibition in AZ's anti-RA effects.

Key words acetazolamide; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; cell proliferation; cell apoptosis; autophagy

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81972040); Collaborative Innovation Project of Anhui Province Universities (No. GXXT-2022-063)

Corresponding author Li Rong, E-mail: aydlirong@163.com