

2-APB 通过 PKC α /HIF-1 α 信号通路抑制 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡

欧阳紫微^{1,2}, 董雷², 王琰^{1,2}, 程远志^{1,2}, 朱仁弟^{1,2}, 周仁鹏^{1,2}, 赵英杰^{1,2}, 胡伟^{1,2}

摘要 目的 探讨 2-氨基乙氧基苯硼酸(2-APB)对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡的作用及其机制。方法 实验分为 Control 组、H₂O₂ 组、2-APB 组和 H₂O₂ + 2-APB 组。CCK-8 法检测各组细胞活力;显微镜下观察 2-APB 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞形态变化的影响;TUNEL 法和流式细胞术检测软骨细胞凋亡情况;流式细胞术检测脂质活性氧(ROS)水平;Western blot 法检测 2-APB 对 H₂O₂ 诱导的各组细胞中 Cleaved-PARP、p-PKC α 和 HIF-1 α 蛋白的表达情况;免疫荧光法检测 PKC α 抑制剂 BIM-1 对 H₂O₂ 诱导的各组细胞中 HIF-1 α 的荧光表达情况。结果 2-APB 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡具有抑制作用,且当 2-APB 浓度为 100 μ mol/L 时抑制效果最为显著($F = 235.80, P < 0.01$);2-APB 能够抑制 H₂O₂ 所致软骨细胞凋亡阳性率($F = 114.80, P < 0.01$)以及 ROS 的水平($F = 52.99, P < 0.01$),并且抑制 Cleaved-PARP($F = 10.10, P < 0.05$)、p-PKC α ($F = 24.56, P < 0.05$)和 HIF-1 α ($F = 6.85, P < 0.05$)蛋白的表达;PKC α 抑制剂 BIM-1 能够抑制 H₂O₂ 所致 HIF-1 α 荧光强度的增加。结论 2-APB 可以通

过抑制 PKC α /HIF-1 α 通路减少 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡,进而保护软骨细胞。

关键词 2-氨基乙氧基苯硼酸;软骨细胞;细胞凋亡;H₂O₂; PKC α /HIF-1 α 通路

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1150-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.007

细胞凋亡是一种高度调节的细胞死亡形式,正常生理状态下的细胞凋亡能够防止异常增殖的细胞对生物体产生负面影响,维持机体稳态^[1]。然而在病理状态下,异常凋亡与多种疾病的发生发展密切相关,包括自身免疫性疾病、退行性疾病和肿瘤等。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞类型,其过度凋亡是关节软骨损伤的始动因素,会引发多种软骨破坏相关疾病^[2]。因此,需要进一步探索调节软骨细胞凋亡的关键因素和机制。

细胞凋亡与活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过度累积密切相关,而过量的 ROS 可以诱导缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1 α) 在缺氧组织中广泛表达^[3]。最新研究^[4]表明, HIF-1 α 累积及细胞凋亡与软骨损伤密切相关。此外,蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) 是 HIF-1 α 活性的调节因子, p-PKC α 介导 HIF-1 α 转录发挥促凋亡作用^[5]。这提示 PKC α /HIF-1 α 信号通

2024-03-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82071591、82371575、82204405);安徽省自然科学基金(编号:2108085QH383)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²安徽医科大学第二附属医院药物临床试验研究中心,合肥 230601

作者简介:欧阳紫微,女,硕士研究生;

胡伟,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: huwei@ahmu.edu.cn

($P < 0.0001$), reduced NO secretion ($P < 0.001$), increased urea content ($P < 0.0001$), decreased M1-related inflammatory factor tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P < 0.001$) and decreased secretion of white blood cell interleukin(IL)-1 ($P < 0.001$); M2-related anti-inflammatory factor IL-10 secretion levels increased ($P < 0.01$), and IL-12 secretion increased ($P < 0.05$) Furthermore, co-culturing with frozen-thawed PRP significantly promoted cell migration and enhanced vascular formation efficiency, surpassing the effects of fresh PRP and being comparable to activated PRP ($P < 0.01$). Cell viability assays and CCK-8 proliferation experiments also showed a significant increase in the proliferation rates of L929 and HUVEC co-cultured with frozen-thawed PRP ($P < 0.01$). **Conclusion**

After being cryopreserved at -80°C , PRP has been proven to significantly enhance cell migration, differentiation and proliferation capabilities, while inhibiting the production of inflammatory factors and promoting M2 polarization of macrophages. Therefore, low-temperature cryopreservation can be considered as an effective method for PRP preservation.

Key words platelet-rich plasma; cryopreservation; macrophage polarization; wound healing; angiogenesis

路可能在软骨细胞凋亡发挥重要作用。课题组前期研究^[6-7]显示 2-氨基乙氧基苯硼酸(2-aminoethoxy-diphenyl borate 2-APB)可以减轻关节软骨细胞凋亡和铁死亡,从而改善软骨损伤,但 2-APB 对软骨细胞凋亡的作用机制尚未完全阐明。因此,该研究旨在探讨 2-APB 通过 PKC α /HIF-1 α 信号通路对 H₂O₂ 诱导软骨细胞凋亡的作用和机制,为软骨细胞凋亡的防治提供新的靶点与策略。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞系 人软骨细胞系 C28/I2 由 ATCC 公司提供,培养在含 10% 胎牛血清以及 1% 青-链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM 培养基、胎牛血清(上海达希特尔生物科技有限公司,货号:2324181、2251344); CCK-8(北京兰杰柯科技有限公司,货号:BS350B); H₂O₂、2-APB(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号:7722-84-1、524-95-8); 青-链霉素混合液、胰蛋白酶、RIPA 裂解液、SDS-PAGE 上样缓冲液(上海碧云天生物科技有限公司,货号:C0222、C0201、P10013B、P0015A); β -actin 一抗(美国 Abcam 公司,货号 ab8226); PARP 一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:9532); PKC α 、p-PKC α (美国 Santa Cruz 公司,货号:sc8393、sc377565); HIF-1 α (美国 Abcam 公司,货号:ab51608); DAPI、ROS 检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,货号:C10061、S0033S); 流式分析仪、全波长全自动酶标仪、CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司,型号:CytoFLEX、800TS、371Steri-Cycle); 倒置显微镜(德国 Zeiss 公司,型号:AxioVert. A1)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞活力实验 将对数生长期的 C28/I2 细胞,接种至 96 孔板中,每组设置 6 个复孔,培养 24 h,用不同浓度 H₂O₂(0、50、100、200、400、500 μ mol/L)处理 24 h,每孔加入 100 μ l 新鲜的无血清培养基和 10 μ l CCK-8,37 °C 孵育 1 h,在酶标仪上测定各孔吸光度值,根据吸光度值确定 H₂O₂ 诱导软骨细胞的凋亡浓度。在 96 孔板中加入 H₂O₂ 和不同浓度 2-APB(0、50、100、200、300 μ mol/L)处理软骨细胞。吸尽孔内的旧培养基,每孔加入 100 μ l 新鲜的无血清培养基和 10 μ l CCK-8,37 °C 孵育 1 h。用全波长酶标仪选定波长 490 nm,在酶

标仪上测定各孔吸光度值。根据吸光度值计算出细胞活力,确定 2-APB 的最佳保护浓度。

1.2.2 实验分组 实验分为四组,分别为 Control 组、H₂O₂ 组、2-APB 组和 H₂O₂ + 2-APB 组,其中 Control 组仅加入完全培养基,H₂O₂ 组加入 H₂O₂,2-APB 组加入 2-APB,H₂O₂ + 2-APB 组加入 H₂O₂ 与 2-APB。

1.2.3 细胞形态观察 按实验分组处理细胞 24 h 后,在光学显微镜下观察其软骨细胞形态变化。

1.2.4 TUNEL 染色观察细胞凋亡 将对数生长期的 C28/I2 细胞,接种至 24 孔板中,制备细胞爬片,在 CO₂ 培养箱中培养至融合度 80% 左右,按照实验分组培养 24 h 后,按照试剂盒说明书操作,细胞用 PBS 洗涤后,4% 多聚甲醛固定 30 min,免疫染色强力通透液室温孵育 5 min,TUNEL 检测液 37 °C 孵育 60 min,PBS 洗涤 3 次,使用抗荧光淬灭剂进行封片,于荧光显微镜下观察。

1.2.5 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白的变化

将对数生长期的 C28/I2 细胞,接种至 6 孔板中培养至融合度 80% 左右,按实验分组处理细胞 24 h 后,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min 后,4 °C、13 200 r/min 离心 30 min,测定蛋白浓度,加入上样缓冲液后,将蛋白样品 100 °C 煮沸变性。Marker 和蛋白样品依次加入到每个梳孔内,10% SDS-PAGE 电泳后,200 mA 恒流转至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h,相应一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤 30 min,每 10 min 换液 1 次。使用 Tanon Imaging System 进行成像。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况

使用细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。C28/I2 细胞接种至 6 孔板中培养至融合度 80% 左右,按实验分组处理细胞 24 h 后,用胰蛋白酶常规消化并重新悬浮于 2.5 μ l Annexin V-FITC 的 PBS 中,在室温避光孵育 30 min;加入等体积 PBS,1 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗涤 2 次,再用 0.5 ml PBS 重悬,加入 2.5 μ l PI 溶液,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.7 细胞内 ROS 检测 C28/I2 细胞接种至 6 孔板中培养至融合度 80% 左右,按实验分组处理细胞 24 h 后,按照 1 : 1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA。用胰蛋白酶消化软骨细胞,并将细胞悬液在 4 °C 下以 1 500 r/min 离心 5 min。然后将收集的软骨细胞悬浮在稀释的 DCFH-DA 中,置于 37 °C 的细胞培养箱中 20 min,1 500 r/min 离心 5 min 后收集细

胞悬液,在不含血清的 DMEM 中洗涤 3 次。在流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

1.2.8 免疫荧光染色 C28/I2 细胞接种于放有玻璃爬片的 24 孔板中,培养箱中培养 24 h 后进行细胞加药处理,分组为 Control 组、H₂O₂ 组和 H₂O₂ + BIM-1 组。处理完成后,使用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.2% Triton X-100 室温通透 10 min,1% BSA 室温封闭 1 h,按照 1:500 比例稀释 HIF-1 α 一抗于 4℃ 孵育过夜,荧光二抗室温孵育 1 h,DAPI 染核 5 min,使用抗荧光淬灭封片液封片,在显微镜下观察目的蛋白荧光强度,并保存图像。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异比较行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APB 处理对 H₂O₂ 诱导软骨细胞活性的影响

采用 CCK-8 法检测不同剂量的 H₂O₂ 对正常软骨细胞的活性的影响。用不同浓度 H₂O₂ 处理正常软骨细胞 24 h 后,结果显示,当 H₂O₂ 的浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时可以明显降低软骨细胞的活力 ($F = 406.20, P < 0.01$)。因此,本实验选择 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 来诱导软骨细胞损伤。联合 H₂O₂ (400 $\mu\text{mol/L}$) 和不同浓度 2-APB (0、50、100、200、300 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 24 h 后,结果显示,与 H₂O₂ 组比较 2-APB 处理后,细胞活力有所恢复,且当 2-APB 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时保护效果显著 ($F = 235.80, P$

< 0.01)。因此,选择 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-APB 作为后续实验研究的有效使用浓度。见图 1A。

2.2 2-APB 对 H₂O₂ 诱导软骨细胞形态的影响

采用光学显微镜观察 2-APB 对 H₂O₂ 诱导软骨细胞形态的影响。Control 组软骨细胞贴壁情况较好,形态正常,细胞间紧密排列;H₂O₂ 组软骨细胞贴壁能力变弱,细胞皱缩,发生死亡;与 H₂O₂ 组比较,H₂O₂ + 2-APB 组可以明显改善 H₂O₂ 导致的软骨细胞形态的改变。见图 1B。

2.3 2-APB 对 H₂O₂ 诱导软骨细胞凋亡的影响

2.3.1 TUNEL 染色 TUNEL 染色结果显示,与 Control 组比较,H₂O₂ 组软骨细胞发生明显的细胞凋亡,而与 H₂O₂ 组比较,H₂O₂ + 2-APB 组可以显著的减轻 H₂O₂ 的诱导软骨细胞凋亡。见图 2A。

2.3.2 2-APB 对 H₂O₂ 诱导软骨细胞凋亡相关蛋白 Cleaved-PARP 的表达 采用 Western blot 法检测软骨细胞凋亡蛋白的表达水平。与 Control 组比较,H₂O₂ 组 Cleaved-PARP 的含量明显上升 ($P < 0.01$),而 2-APB 可以明显改善软骨细胞的凋亡蛋白水平上升的情况 ($F = 10.10, P < 0.05$)。结果表明,2-APB 能抑制 H₂O₂ 诱导 Cleaved-PARP 凋亡蛋白的表达,进而起到抑制软骨细胞凋亡的作用。见图 2B。

2.3.3 流式分析 2-APB 对 H₂O₂ 诱导软骨细胞凋亡的影响 采用流式细胞术分析 2-APB 对 H₂O₂ 诱导软骨细胞凋亡的影响。与 Control 组比较,H₂O₂ 组软骨细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$),而 2-APB 可以明显降低软骨细胞的凋亡阳性率 ($F = 114.80, P < 0.01$)。见图 2C。

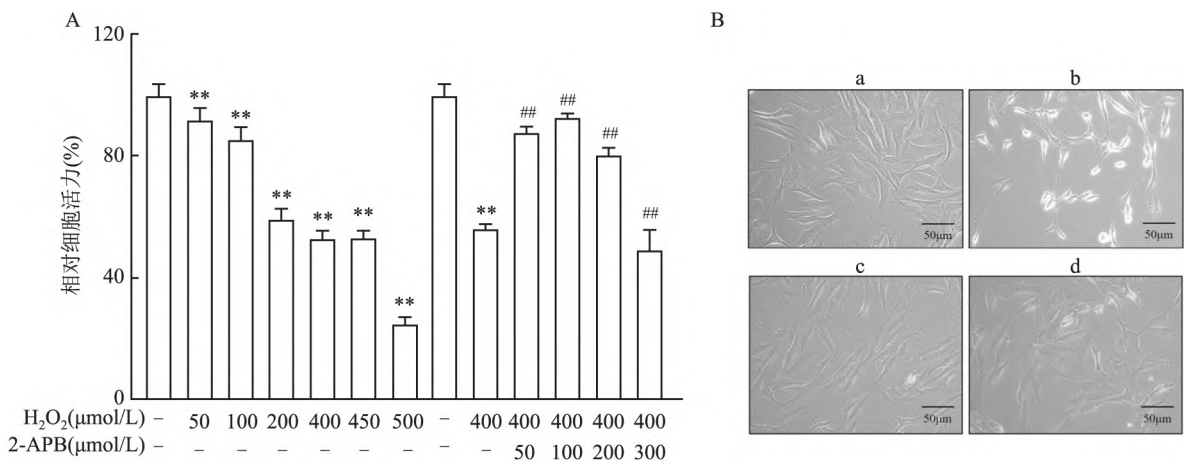


图 1 2-APB 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞细胞活力和细胞形态的影响

A: CCK-8 法检测 2-APB 对 H₂O₂ 诱导 C28/I2 细胞活力的影响; B: 光学显微镜下 C28/I2 细胞形态的变化 $\times 200$; a: Control 组; b: H₂O₂ 组; c: 2-APB 组; d: H₂O₂ + 2-APB 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 H₂O₂ 组比较: ## $P < 0.01$

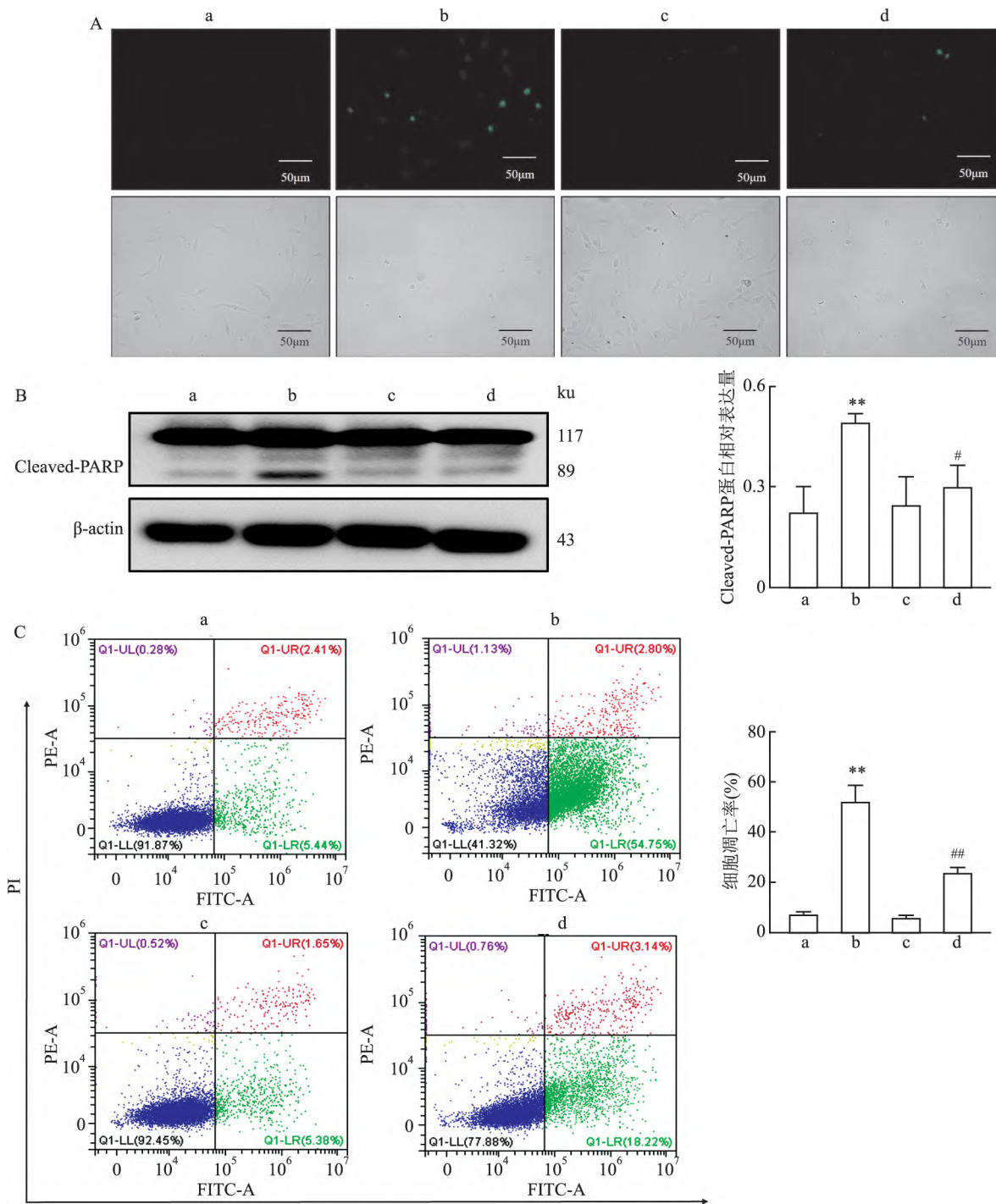


图2 2-APB对H₂O₂诱导的软骨细胞凋亡的影响

A: TUNEL染色检测软骨细胞凋亡×200 图A上为TUNEL染色图片,图A下为同一视野下的光学显微镜下的图片; B: Western blot法检测Cleaved-PARP蛋白在软骨细胞中的表达; C: 流式细胞术检测软骨细胞凋亡; a: Control组; b: H₂O₂组; c: 2-APB组; d: H₂O₂+2-APB组; 与Control组比较: ***P*<0.01; 与H₂O₂组比较: #*P*<0.05, ##*P*<0.01

2.4 2-APB对H₂O₂诱导软骨细胞ROS的影响
 采用流式分析,2-APB对H₂O₂诱导软骨细胞ROS的影响。与Control组比较,H₂O₂组软骨细胞ROS明显升高(*P*<0.01),而2-APB可以明显降低软骨细胞的ROS含量(*F*=52.99,*P*<0.01)。见图3。

2.5 2-APB通过PKCα/HIF-1α信号通路调控H₂O₂诱导软骨细胞凋亡 通过Western blot法检测2-APB对p-PKCα、HIF-1α蛋白表达的影响。与Control组比较,H₂O₂组p-PKCα(*P*<0.01)、HIF-1α(*P*<0.05)蛋白的表达升高,而2-APB可以

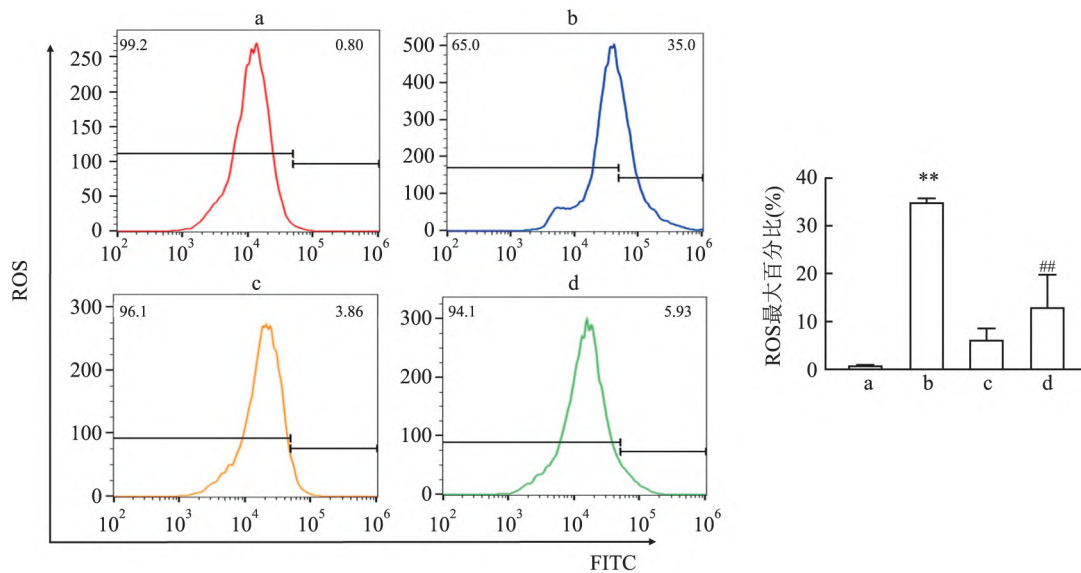


图3 流式细胞术检测细胞脂质 ROS 的产生

a: Control 组; b: H₂O₂ 组; c: 2-APB 组; d: H₂O₂ + 2-APB 组; 与 Control 组比较: ** *P* < 0.01; 与 H₂O₂ 组比较: ## *P* < 0.01

降低 p-PKCα (*F* = 24.56, *P* < 0.05)、HIF-1α 蛋白表达 (*F* = 6.85, *P* < 0.05), 见图 4A。为了进一步验证 PKCα 与 HIF-1α 的关系, 本实验使用免疫荧光检测发现 PKCα 抑制剂 BIM-1 (1 μmol/L) 可以抑制 H₂O₂ 诱导的软骨细胞 HIF-1α 荧光强度的表达, 见图 4B。结果提示, 2-APB 可能通过 PKCα/HIF-1α 信号通路调控 H₂O₂ 诱导软骨细胞凋亡。

3 讨论

关节软骨是一种高度特化的组织, 软骨细胞是软骨组织中唯一的细胞类型, 负责关节软骨细胞外基质的合成和基本结构的维持, 软骨细胞功能受损将导致关节软骨破坏^[8]。细胞凋亡是程序性细胞死亡的一种形式, 可有序有效地去除受损细胞, 涉及发育、稳态和衰老^[9]。细胞凋亡对细胞和组织稳态以及器官发育至关重要, 其失调与多种疾病有关, 包括发育缺陷、自身免疫性疾病、肿瘤和退行性疾病^[10]。研究^[11-12]显示, 软骨损伤程度与软骨细胞凋亡之间存在明确的相关性, 在骨关节炎的早期阶段, 细胞凋亡保护软骨细胞免受机械应激和炎症。随着疾病的进展, 软骨细胞过度凋亡会破坏软骨组织正常结构。此外, 类风湿性关节炎中软骨细胞凋亡与遗传和环境等因素密切相关, 抑制细胞凋亡可以减少软骨损伤并改善疾病状态, 然而目前尚无有效的治疗方法可以逆转关节软骨损伤^[7]。因此抑制

软骨细胞凋亡是预防和控制关节软骨损伤的关键策略。目前, 药物治疗主要用于改善疾病的症状。例如, 非甾体抗炎药可以减轻疼痛, 但对氧化应激、线粒体功能障碍和软骨细胞凋亡无显著影响^[13]。因此, 将软骨细胞凋亡作为调节软骨变性的有效靶标, 可以为药物治疗提供多种潜在靶点, 以保护损伤的关节软骨。

2-APB 在研究中通常用作调节钙信号传导的工具, 抑制细胞内钙离子水平的增加, 调节和降低 ROS 表达, 提供细胞保护作用^[14]。在课题组先前的研究中, 2-APB 通过阻断瞬时受体电位通道 7 (transient receptor potential melastatin 7, TRPM7), 抑制印度刺楸信号通路活化, 从而减轻佐剂诱导型关节炎大鼠膝关节软骨细胞凋亡和软骨损伤^[7]。并且 2-APB 也可以通过阻断 TRPM7-PKCα-NOX4 信号轴活化, 减轻类风湿关节炎关节软骨细胞铁死亡^[6]。本研究也证明了 2-APB 对软骨细胞凋亡的保护作用, H₂O₂ 可以抑制软骨细胞活性, 并诱导软骨细胞发生凋亡, 而 2-APB 可以发挥抑制 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡的作用。

HIF-1α 是诱导缺氧基因和修复细胞氧环境的核心调节因子, 在细胞凋亡过程中具有关键功能。最新研究^[4]显示, HIF-1α 表达增加是关节软骨变性的的重要因素, 其可能的机制是 HIF-1α 通过从血管中释放促凋亡因子, 促进软骨细胞的凋亡, 从而诱导软

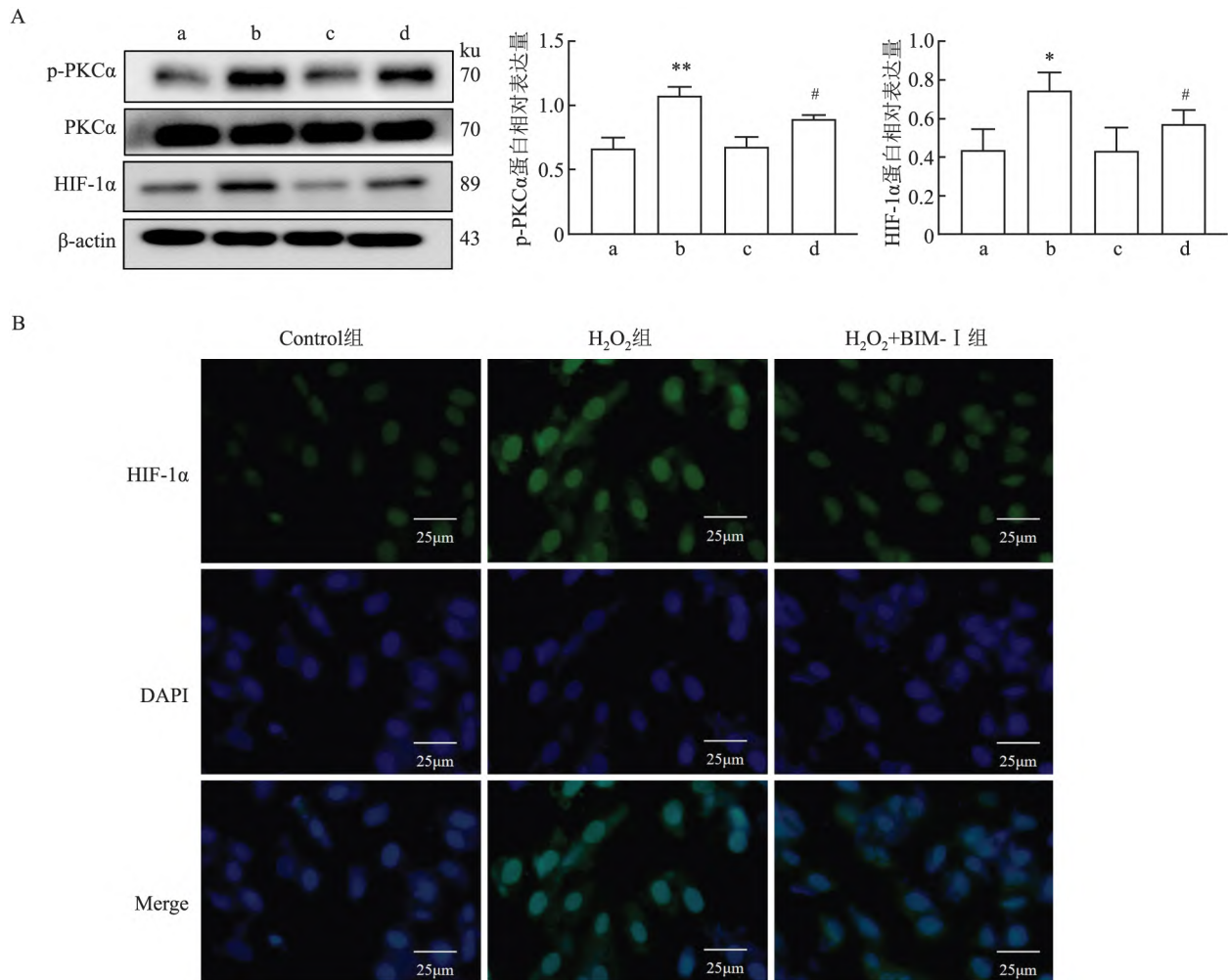


图4 2-APB对H₂O₂诱导的软骨细胞p-PKCα和HIF-1α蛋白表达的影响(n=3)

A: Western blot法检测软骨细胞p-PKCα蛋白和HIF-1α蛋白的表达; B: 免疫荧光法检测BIM-I对HIF-α荧光强度的表达情况(×400); a: Control组; b: H₂O₂组; c: 2-APB组; d: H₂O₂+2-APB组; 与Control组比较: *P<0.05, **P<0.01; 与H₂O₂组比较: #P<0.05

骨破坏。研究^[15]显示,PKC家族在HIF-1α活化中具有重要作用,其中PKCα活化介导HIF-1α的转录调控在心肌细胞中发生促凋亡事件,但在软骨细胞凋亡中的作用未见文献报道。本研究进一步发现H₂O₂可以诱导软骨细胞ROS水平的增加以及刺激p-PKCα和HIF-1α的表达增加,而2-APB可以显著的逆转H₂O₂诱导的ROS水平增加及抑制p-PKCα和HIF-1α的活化,此外,使用PKCα抑制剂BIM-I可以抑制HIF-1α的荧光表达。

综上所述,这些发现表明2-APB显著的抑制H₂O₂诱导的软骨细胞凋亡,并且PKCα/HIF-1α途径可能作为治疗软骨细胞凋亡的潜在治疗靶点。但本研究仅局限在细胞水平,尚需在动物实验进一步验证以上结论。

参考文献

- [1] Bock F J, Riley J S. When cell death goes wrong: Inflammatory outcomes of failed apoptosis and mitotic cell death [J]. Cell Death Differ 2023 30(2): 293-303.
- [2] Liu N N, Huang Y P, Shao Y B, et al. The regulatory role and mechanism of lncTUG1 on cartilage apoptosis and inflammation in osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther 2023 25(1): 106.
- [3] Zhang Y, Tang Y, Tang X, et al. Paclitaxel induces the apoptosis of prostate cancer cells via ROS-Mediated HIF-1α expression [J]. Molecules 2022 27(21): 7183.
- [4] Zhang J, Hu Y, Wang Z, et al. Hypoxia-inducible factor expression is related to apoptosis and cartilage degradation in temporomandibular joint osteoarthritis [J]. BMC Musculoskelet Disord 2022 23(1): 583.
- [5] Zara S, Macchi V, De Caro R, et al. pPKCα mediated-HIF-1α activation related to the morphological modifications occurring in neonatal myocardial tissue in response to severe and mild hyperoxia

- [J]. *Eur J Histochem* 2012, 56(1): e2.
- [6] Zhou R, Chen Y, Li S, et al. TRPM7 channel inhibition attenuates rheumatoid arthritis articular chondrocyte ferroptosis by suppression of the PKC α -NOX4 axis [J]. *Redox Biol* 2022, 55: 102411.
- [7] Ma G, Yang Y, Chen Y, et al. Blockade of TRPM7 alleviates chondrocyte apoptosis and articular cartilage damage in the adjuvant arthritis rat model through regulation of the indian hedgehog signaling pathway [J]. *Front Pharmacol* 2021, 12: 655551.
- [8] Ouyang Z, Dong L, Yao F, et al. Cartilage-related collagens in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: From pathogenesis to therapeutics [J]. *Int J Mol Sci* 2023, 24(12): 9841.
- [9] Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)* 2016, 8(4): 603–19.
- [10] Kulbay M, Paimboeuf A, Ozdemir D, et al. Review of cancer cell resistance mechanisms to apoptosis and actual targeted therapies [J]. *J Cell Biochem* 2022, 123(11): 1736–61.
- [11] Wang B, Wang J, Jiang Y, Yao Z, Li L, et al. Aucubin protects chondrocytes against IL-1 β -induced apoptosis *in vitro* and inhibits osteoarthritis in mice model [J]. *Drug Des Devel Ther* 2019, 13: 3529–38.
- [12] Cui T, Lan Y, Lu Y, et al. Isoorientin ameliorates H₂O₂-induced apoptosis and oxidative stress in chondrocytes by regulating MAPK and PI3K/Akt pathways [J]. *Aging (Albany NY)* 2023, 15(11): 4861–74.
- [13] Slowik E, J Stankoska K, Bui N, et al. The calcium channel modulator 2-APB hydrolyzes in physiological buffers and acts as an effective radical scavenger and inhibitor of the NADPH oxidase 2 [J]. *Redox Biol* 2023, 61: 102654.
- [14] Rosalez M, N Estevez-Fregoso E, Alatorre A, et al. 2-Aminoethyldiphenyl Borinate: A multitarget compound with potential as a drug precursor [J]. *Curr Mol Pharmacol* 2020, 13(1): 57–75.
- [15] Xia J, Ozaki I, Matsuhashi S, et al. Mechanisms of PKC-Mediated enhancement of HIF-1 α activity and its inhibition by vitamin K2 in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci* 2019, 20(5): 1022.

2-APB inhibits H₂O₂-induced chondrocyte apoptosis through PKC α /HIF-1 α signaling pathway

Ouyang Ziwei^{1,2}, Dong Lei², Wang Yan^{1,2}, Cheng Yuanzhi^{1,2}, Zhu Rendu^{1,2}, Zhou Renpeng^{1,2}, Zhao Yingjie^{1,2}, Hu Wei^{1,2}

(¹ School of Pharmacy Anhui Medical University Hefei 230032; ² Dept of Clinical Pharmacology, The Second Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the effect of 2-aminoethoxy-diphenyl borate (2-APB) on H₂O₂-induced chondrocyte apoptosis and its mechanism. **Methods** The experiment was divided into control group, H₂O₂ group, 2-APB group and H₂O₂ + 2-APB group. CCK-8 method was used to detect the cell viability of each group; The effect of 2-APB on the morphological changes of chondrocytes induced by H₂O₂ was observed under microscopy; TUNEL method and flow cytometry were used to detect chondrocyte apoptosis; Flow cytometry was used to detect Lipid reactive oxygen species (ROS); Western blot was used to detect the protein expressions of Cleaved-PARP, p-PKC α and HIF-1 α in H₂O₂-induced cells by 2-APB; Immunofluorescence was used to detect the fluorescent expression of HIF-1 α in cells induced by H₂O₂ by PKC α inhibitor BIM-1. **Results** 2-APB inhibited H₂O₂-induced apoptosis in chondrocytes and the inhibitory effect was the most significant when the concentration of 2-APB was 100 μ mol/L ($F = 235.80$, $P < 0.01$); 2-APB could inhibit the positive rate of H₂O₂-induced apoptosis of chondrocytes ($F = 114.80$, $P < 0.01$) and the level of ROS ($F = 52.99$, $P < 0.01$), and inhibited the expression of Cleaved-PARP ($F = 10.10$, $P < 0.05$), p-PKC α ($F = 24.56$, $P < 0.05$) and HIF-1 α proteins ($F = 6.85$, $P < 0.05$). The PKC α inhibitor BIM-1 could inhibit the increase in HIF-1 α fluorescence intensity caused by H₂O₂. **Conclusion** 2-APB can inhibit chondrocytes apoptosis induced by H₂O₂ through the PKC α /HIF-1 α pathway and thus protect chondrocytes.

Key words 2-aminoethoxy-diphenyl borate; chondrocytes; apoptosis; H₂O₂; PKC α /HIF-1 α signaling pathway