

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002809

SIRT3/MnSOD/ROS 参与调控脂肪源性干细胞成骨分化的机制研究

吕远航, 张廷蔚, 李广悦, 王 璐

(重庆医科大学附属口腔医院修复科、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室、重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室, 重庆 401147)

【摘要】目的:研究脂肪源性干细胞成骨分化过程中, SIRT3/MnSOD/ROS 信号通路的调控作用。**方法:**提取 SD 大鼠脂肪源性干细胞(adipose derived stem cell, ADSC)并通过细胞表面标志物(CD29、CD44、CD34、CD45)及成骨、成脂多向分化鉴定。体外诱导其成骨分化, 检测 SIRT3 表达情况; 利用慢病毒转染抑制 SIRT3 表达, 用茜素红染色检测 ADSC 成骨分化情况, qPCR 检测成骨相关基因 *Runx2*、*ALP*、*OCN* 的表达, 同时利用试剂盒检测锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)的活性及胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平。**结果:**ADSC 成骨分化过程中, 细胞内 SIRT3 mRNA 表达(7 d: 1.71 ± 0.03 , 15.21 ± 0.17 , $P=0.014$, $n=5$; 14 d: 1.44 ± 0.04 , 9.70 ± 0.18 , $P=0.002$, $n=5$)及蛋白质表达(7 d: 0.70 ± 0.01 , 2.99 ± 0.07 , $P=0.012$, $n=5$; 14 d: 1.00 ± 0.08 , 2.74 ± 0.50 , $P=0.009$, $n=5$)增加。转染 SIRT3 慢病毒可抑制 SIRT3 mRNA 表达(7 d: 1.02 ± 0.05 , 0.36 ± 0.01 , $P=0.011$, $n=5$; 14 d: 1.04 ± 0.08 , 0.30 ± 0.02 , $P=0.002$, $n=5$)及蛋白质表达(7 d: 0.88 ± 0.04 , 0.29 ± 0.01 , $P=0.034$, $n=5$; 14 d: 1.18 ± 0.03 , 0.43 ± 0.01 , $P=0.014$, $n=5$), 导致 ADSC 成骨分化能力降低, MnSOD 活性减弱(0.91 ± 0.13 , 0.29 ± 0.01 , $P=0.002$, $n=5$), 细胞内 ROS 水平升高(7 d: 1.00 ± 0.10 , 2.66 ± 0.32 , $P=0.013$, $n=5$; 14 d: 1.24 ± 0.10 , 2.59 ± 0.31 , $P=0.014$, $n=5$), 与成骨相关的相应靶基因 *Runx2*、*ALP*、*OCN* 表达下降(*Runx2*: 1.07 ± 0.02 , 0.19 ± 0.01 , $P=0.001$, $n=5$; *ALP*: 1.09 ± 0.02 , 0.53 ± 0.01 , $P=0.001$, $n=5$; *OCN*: 0.95 ± 0.02 , 0.33 ± 0.01 , $P=0.004$, $n=5$)。加入 NAC 预处理细胞, 可逆转敲减 SIRT3 对 ADSC 成骨分化的抑制作用(ROS: 2.63 ± 0.20 , 1.07 ± 0.19 , $P=0.010$, $n=5$)。**结论:**ADSC 成骨分化过程中, 线粒体内 SIRT3 表达增加。SIRT3 通过增强 MnSOD 的活性来降低胞内 ROS 水平, 从而介导 ADSC 成骨分化。

【关键词】脂肪源性干细胞; 成骨分化; SIRT3; 活性氧簇**【中图分类号】**Q254**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-11-17

Mechanism of SIRT3/MnSOD/ROS in mediating osteogenic differentiation of adipose derived stem cell in rats

Lü Yuanhang, Zhang Tingwei, Li Guangyue, Wang Lu

(Department of Prosthodontics, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education)

【Abstract】Objective: To study the regulatory effect of SIRT3/MnSOD/ROS signaling pathway on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells(ADSC). **Methods:** In this study, we first cultured ADSC isolated from rat inguinal fat pads, and ADSC were identified by surface markers(CD29, CD44, CD34, CD45) and they could be induced to osteogenic and adipogenic differentiation. During osteogenic differentiation induction *in vitro*, expressions of SIRT3 were studied by western blotting. We used Lenti-SIRT3shRNA transfection to knockdown SIRT3 within ADSC, osteogenic capacities were identified by ARS staining, osteogenic differentiation-related genes *Runx2*, *ALP*, *OCN* mRNA expressions were assessed by qPCR, and the activity of MnSOD and reactive oxygen species (ROS) levels within ADSC were tested using kits. **Results:** The expression of SIRT3 mRNA(7 d: 1.71 ± 0.03 , 15.21 ± 0.17 , $P=0.014$, $n=5$; 14 d: 1.44 ± 0.04 , 9.70 ± 0.18 , $P=0.002$, $n=5$) and protein(7 d: 0.70 ± 0.01 , 2.99 ± 0.07 , $P=0.012$, $n=5$; 14 d: 1.00 ± 0.08 , $2.74 \pm$

作者介绍: 吕远航, Email: 276857417@qq.com,

研究方向: 口腔修复和骨代谢疾病研究。

通信作者: 李广悦, Email: guangyueli@hospital.cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金青年资助项目(编号: 81800938)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210513.1649.024.html>

(2021-05-15)

0.50 , $P=0.009$, $n=5$) increased during osteogenic differentiation of ADSC. Lenti-SIRT3 shRNA transfection could inhibit SIRT3 mRNA expression(7 d: 1.02 ± 0.05 , 0.36 ± 0.01 , $P=0.011$, $n=5$; 14 d: 1.04 ± 0.08 , 0.30 ± 0.02 , $P=0.002$, $n=5$) and protein expression(7 d: 0.88 ± 0.04 , 0.29 ± 0.01 , $P=0.034$, $n=5$; 14 d: 1.18 ± 0.03 , 0.43 ± 0.01 , $P=0.014$, $n=5$), with decreased MnSOD activ-

ities (0.91 ± 0.13 , 0.29 ± 0.01 , $P=0.002$, $n=5$) and increased ROS levels (7 d: 1.00 ± 0.10 , 2.66 ± 0.32 , $P=0.013$, $n=5$; 14 d: 1.24 ± 0.10 , 2.59 ± 0.31 , $P=0.014$, $n=5$). The expression of corresponding target genes *Runx2*, *ALP* and *OCN* related to osteogenesis decreased (*Runx2*: 1.07 ± 0.02 , 0.19 ± 0.01 , $P=0.001$, $n=5$; *ALP*: 1.09 ± 0.02 , 0.53 ± 0.01 , $P=0.001$, $n=5$; *OCN*: 0.95 ± 0.02 , 0.33 ± 0.01 , $P=0.004$, $n=5$). Inhibition of osteogenic differentiation, induced by knockdown of SIRT3, could be reversed by pretreatment of NAC (ROS: 2.63 ± 0.20 , 1.07 ± 0.19 , $P=0.010$, $n=5$). **Conclusion**: SIRT3 within mitochondria plays vital roles in promoting osteogenic differentiation of ADSC, by mediating enhancement of MnSOD activities and reduction of intracellular ROS levels.

[Key words] adipose derived stem cell; osteogenic differentiation; SIRT3; reactive oxygen species

骨组织由于再生能力有限,骨损伤修复因此成为目前临床医学、药学等领域研究的热点和难点。其中口腔领域最常见的骨缺损就是牙周病所导致的牙槽骨吸收。牙周病是由局部刺激因素引起的牙周支持组织慢性炎症,炎症可由牙龈向深层扩散到牙周膜、牙槽骨和牙骨质^[1]。世界卫生组织统计,全球牙周病的患病率高达 45%~50%,成为第六大人类最常见的疾病^[2]。对于牙周病的治疗,最期望取得的目标就是牙周组织再生。迄今为止牙周组织再生的治疗方法包括骨移植、异体材料、引导组织再生和各种基于生长因子的治疗方法^[3]。但是这些方法也无法恢复严重受损的牙周组织。目前基于细胞组织工程学 and 再生医学的牙周组织再生技术受到广泛关注,许多临床研究已经测试了各种干细胞产品的可行性、安全性和有效性,其中研究最多的干细胞之一就是脂肪源性干细胞(adipose derived stem cell, ADSC)^[4-5]。ADSC 是由脂肪组织分离培养的能够自我更新、高度增殖并可多向分化的成体干细胞,是骨组织工程中重要的种子细胞之一^[6-8]。因其来源丰富、易于获取、便于传代扩增等特点,ADSC 相对于骨髓间充质干细胞、脐带血干细胞等具有更大的应用潜能和优势^[9-11]。大量研究证实了 ADSC 在体内和体外的成骨分化能力^[12-14],其在促进口腔种植体骨整合、牙周组织重建及颅颌面骨缺损修复中有着广阔的应用前景。

线粒体作为细胞内进行氧化呼吸的主要场所,为细胞的多种代谢活动提供能量来源,同时也是活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产生的主要部位,可参与细胞内信号通路转导和细胞凋亡的调控^[15]。SIRT3 是一种存在于线粒体内的去乙酰化酶,可以介导线粒体内一系列蛋白去乙酰化,参与物质代谢、能量合成及细胞内信号转导^[16]。MnSOD 通常被认为是 SIRT3 去乙酰化的重要靶点。既往研究表

明 SIRT3 介导 MnSOD 等发生去乙酰化作用,可限制细胞内过多的 ROS 聚集,调节细胞内氧化应激的水平及相关细胞信号通路^[17]。SIRT3 对蛋白的去乙酰化修饰一直以来就是研究的热点,已有研究报道 SIRT3 可参与成骨细胞成骨分化的调控,但其对 ADSC 的成骨调控鲜有研究。

为了探讨 SIRT3 是否通过 MnSOD/ROS 信号通路参与 ADSC 成骨分化的相关调控;本实验通过提取并培养 SD 大鼠 ADSC,体外诱导其成骨分化,使用慢病毒 Lenti-SIRT3shRNA 转染敲减 SIRT3,检测 ADSC 成骨分化能力、MnSOD 活性及 ROS 水平改变,并使用抗氧化物 NAC 预处理 ADSC,以探讨 SIRT3/MnSOD/ROS 信号通路在大鼠 ADSC 成骨分化过程中的调控机制,为 SIRT3 作为调控靶点介导 ADSC 成骨分化提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 SD 大鼠 ADSC 提取、培养及鉴定

1.1.1 细胞培养 取 4 周龄雄性健康 SD 大鼠(由重庆医科大学动物实验中心提供),断头处死后,在无菌条件下取大鼠双侧腹股沟处脂肪组织, PBS 液漂洗 2 遍,剔除血管及其他组织后,剪碎至 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 大小,加入 3 倍体积 0.1% I 型胶原酶(Invitrogen 公司,美国), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中摇动消化 30 min,以 $1\text{ }200\text{g}$ 离心 10 min,弃去上清液,获得细胞沉淀,加入含体积分数 10% 胎牛血清的低糖 DMEM(Invitrogen 公司,美国)培养基重悬细胞沉淀,计数细胞,调节细胞密度以 $105\text{ 个}/\text{cm}^2$ 接种于培养皿中,置于饱和湿度、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育。48 h 首次换液,以后每 3 d 换液 1 次。直至贴壁细胞汇合达 80%~90%后,用胰蛋白酶消化,以 $8 \times 10^3\text{ 个}/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养皿中为 P1 代。传代至第 3 代备用。

1.1.2 细胞鉴定 表面抗原鉴定:按照大鼠脂肪干细胞检测试剂盒(赛业生物公司,美国)说明书上的步骤对第 3 代的 ADSC 进行表面抗原鉴定。其中,阳性细胞标记物包括 CD29

和 CD44; 阴性细胞表面标记物包括 CD34 和 CD45。成骨分化: 使用成骨诱导培养基 (细胞生长培养基+0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松+10 mmol/L β -甘油磷酸钠+10 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸) 对第 3 代 ADSC 进行成骨诱导分化。诱导分化 21 d, 用茜素红染色液 (碧云天公司, 中国) 进行检测, 显微镜下观察。成脂分化: 使用成品 SD 大鼠脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基 (赛业生物公司, 美国) 对第 3 代 ADSC 进行成脂诱导分化, 诱导分化 21 d, 用油红 O 染色液 (赛业生物公司, 美国) 进行检测, 显微镜下观察。

1.2 慢病毒 Lenti-SIRT3shRNA 的构建及 ADSC 的转染

体外进行 SIRT3 基因特异性靶序列的选择及模板链的合成; 构建 SIRT3-shRNA 重组质粒; 以 293T 细胞为包装细胞, 采用脂质体法进行转染, 进行慢病毒包装; 检测慢病毒滴度; 利用慢病毒 Lenti-SIRT3shRNA 感染大鼠 ADSC。

1.3 实时荧光定量 PCR

待 ADSC 在成骨诱导液中培养 3 d、7 d、14 d 时, 按照 Trizol RNA 提取试剂使用说明, 提取细胞总 RNA (所有操作均在冰上进行)。取总 RNA 1 μL , 在 20 μL 逆转录体系中合成 cDNA, 以 1 μL cDNA 为模板加入靶基因上下游引物, 在 20 μL 体系中进行实时定量 PCR 检测。根据 NCBI Genbank 中 *SIRT3*、*Runx2*、*ALP*、*OCN* 以及 β -actin 管家基因序列行引物设计。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

将不同组别 ADSC 加入蛋白裂解液及 PMSF, 冰上放置 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 1200 r/min 离心 20 min, 取上清。以 BSA 为标准, 用 Bradford 法对上清进行蛋白定量。取 20 μg 蛋白样品, 10% SDS-PAGE 电泳, 100 V 转移 1 h 至硝酸纤维素薄膜, 放入封闭液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。反复洗膜后, 将膜与碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 标记的抗 IgG 抗体孵育, 室温轻摇 1 h, 洗膜后, 用 Western blot 检测蛋白表达情况, 用图像分析测定各带吸光度值作定量分析来检测 SIRT3 (1:1 000, Cell Signaling, 美国), β -actin (1:3 000, Cell Signaling, 美国) 等蛋白表达量。

1.5 细胞内 MnSOD 活性的检测

利用黄嘌呤氧化酶检测法检测 MnSOD 活性。先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清, 按照每 500 万细胞加入 1 mL 提取液, 超声提取细胞裂解液上清。采用 MnSOD 检测试剂盒 (碧云天公司, 中国) 进行检测。

1.6 ROS 水平检测

将各组细胞收集于离心管内, 根据 MitoSOX 红色荧光测定试剂盒 (铭博生物公司, 中国) 说明书操作, 加入染料进行染色, 使用荧光分光光度计 (激发波长: 510 nm, 发射波长 580 nm) 检测各组荧光分光光度值。

1.7 统计学处理

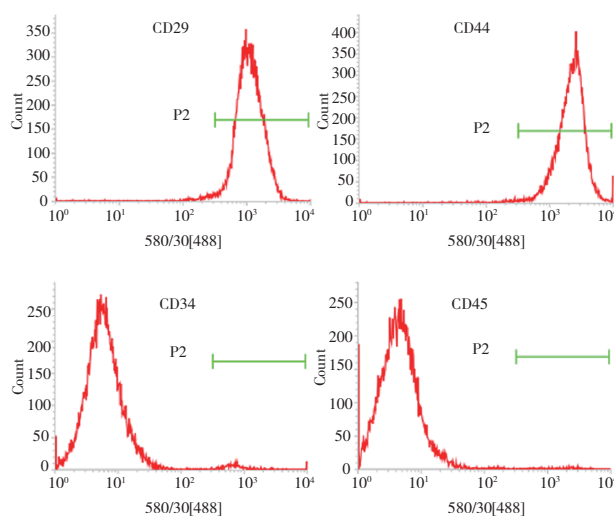
采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行处理。所得数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据采用单因素方差分析。检验水

准 $\alpha=0.05$ 。

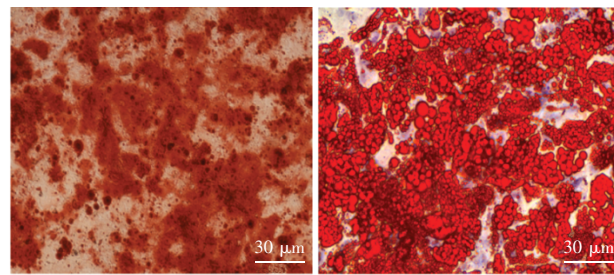
2 结果

2.1 大鼠原代 ADSC 细胞鉴定

将提取的大鼠原代细胞进行细胞染色及流式细胞检测, 所提取的原代细胞 98% 以上表面分子标记 CD29(+)、CD44(+), CD34(-)、CD45(-) (图 1A); 并对提取的大鼠原代 ADSC 进行成骨及成脂分化诱导, 成骨诱导 21 d 茜素红染色 (图 1B) 显示, 体外诱导细胞可形成大量钙结节; 同时成脂诱导 21 d 后对细胞进行油红 O 染色 (图 1C), 可以见到原代 ADSC 成脂诱导后可形成明显脂滴, 本部分实验证实所提取的 SD 大鼠 ADSC 细胞纯度较高, 且具有多向分化能力, 可用于进一步实验。



A. ADSC 表面分子标记流式检测



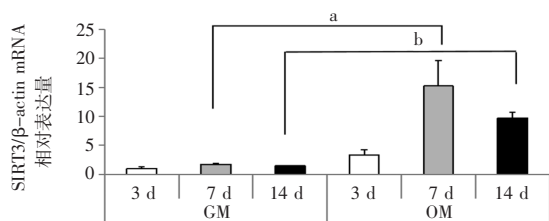
B. ADSC 成骨诱导分化 21 d 后, 茜素红染色
C. ADSC 成脂诱导分化 21 d 后, 油红 O 染色

图 1 原代大鼠 ADSC 细胞鉴定

2.2 ADSC 成骨诱导分化, SIRT3 表达升高

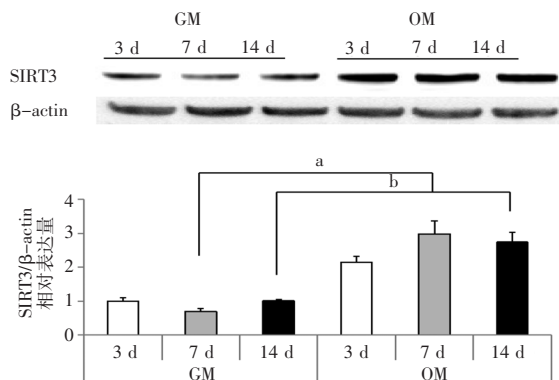
将传至第 3 代的 ADSC 加入成骨诱导分化液, 诱导 ADSC 成骨分化, 在加入诱导液的第 3、7、14 天, 使用 qPCR 检测诱导组及对照组 SIRT3 mRNA 表达情况, 以 β -actin 为参照。在诱导第 3 天, 检测 SIRT3 mRNA 的表达, 与未加成骨诱导分化液的对照组相比, SIRT3 mRNA 的表达有所升高, 而在诱导

分化第 7 天和第 14 天(图 2A),进行成骨诱导分化组(OM组)的 SIRT3 表达较对照组(GM 组)明显升高(7 d: 1.71 ± 0.03 , 15.21 ± 0.17 , $P=0.014$, $n=5$; 14 d: 1.44 ± 0.04 , 9.70 ± 0.18 , $P=0.002$, $n=5$)。同时在 ADSC 成骨分化的第 3、7、14 天,利用 Western blot 检测 SIRT3 蛋白表达(图 2B),以 β -actin 为参照。OM 组 SIRT3 蛋白表达较对照组(GM 组)明显升高(7 d: 0.70 ± 0.01 , 2.99 ± 0.07 , $P=0.012$, $n=5$; 14 d: 1.00 ± 0.08 , 2.74 ± 0.50 , $P=0.009$, $n=5$)。



注:a,与 GM 组比较, $P=0.014$;b:与 GM 组比较, $P=0.002$

A. SIRT3 mRNA 表达情况



注:a,与 GM 组比较, $P=0.012$;b:与 GM 组比较, $P=0.014$

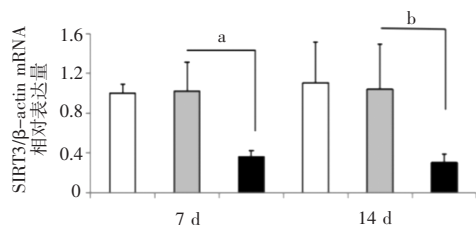
B. SIRT3 蛋白表达情况

图 2 ADSC 成骨诱导分化,胞内 SIRT3 表达升高

2.3 ADSC 转染慢病毒敲减 SIRT3 后,成骨能力明显减弱

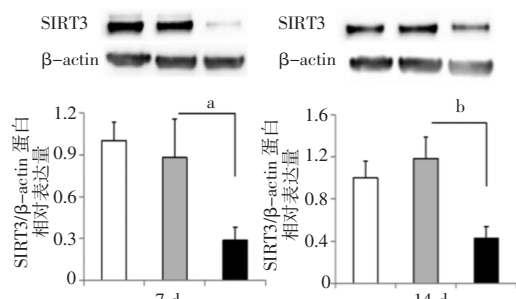
使用 SIRT3 慢病毒对 ADSC 进行转染后,将其分为对照组、空载体组、SIRT3 慢病毒处理组,利用 qPCR 和 Western blot 检测 SIRT3 在细胞内的表达情况,以 β -actin 为参照。在成骨诱导 7 d 和 14 d 对细胞内 SIRT3 mRNA 进行检测, qPCR 检测结果(图 3A)显示:加入 SIRT3 慢病毒处理组的 SIRT3 基因表达较空载体组明显降低(7 d: 1.02 ± 0.05 , 0.36 ± 0.01 , $P=0.011$, $n=5$; 14 d: 1.04 ± 0.08 , 0.30 ± 0.02 , $P=0.02$, $n=5$),且该组 SIRT3 蛋白表达量(图 3B)较空载体组明显降低(7 d: 0.88 ± 0.04 , 0.29 ± 0.01 , $P=0.034$, $n=5$; 14 d: 1.18 ± 0.03 , 0.43 ± 0.01 , $P=0.014$, $n=5$)。这一结果表明 SIRT3 慢病毒处理转染成功,可抑制 SIRT3 表达。成骨诱导 14 d,利用 qPCR 检测成骨关键基因 *Runx2*、*ALP* 和 *OCN* 的 mRNA 相对表达,以 β -actin 为参照,结果(图 3C)显示:慢病毒处理组的成骨关键基因 mRNA 相对表达较空载体组均明显降低(*Runx2*:

1.07 ± 0.02 , 0.19 ± 0.01 , $P=0.001$, $n=5$; *ALP*: 1.09 ± 0.002 , 0.53 ± 0.01 , $P=0.001$, $n=5$; *OCN*: 0.95 ± 0.02 , 0.33 ± 0.01 , $P=0.004$, $n=5$)。成骨诱导 21 d 时,茜素红染色结果(图 3D)显示:SIRT3 慢病毒处理组较对照组相比染色较浅,细胞外钙化结节明显减少。结果表明 SIRT3 表达降低会导致 ADSC 成骨分化能力减弱,即 SIRT3 可参与调控 ADSC 成骨分化。



注:a,与空载体组比较, $P=0.011$;b:与空载体组比较, $P=0.002$

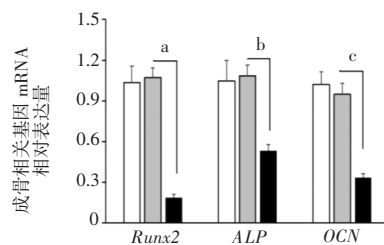
A. SIRT3 mRNA 表达情况



注:a,与空载体组比较, $P=0.034$;b:与空载体组比较, $P=0.014$

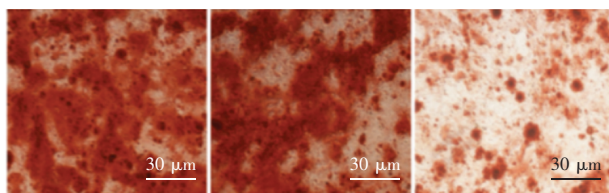
B. SIRT3 蛋白表达情况

□ 对照组
■ 空载体组
■ SIRT3慢病毒处理组



注:a,与空载体组比较, $P=0.001$;b:与空载体组比较, $P=0.001$;c:与空载体组比较, $P=0.004$

C. 成骨关键基因 mRNA 的相对表达

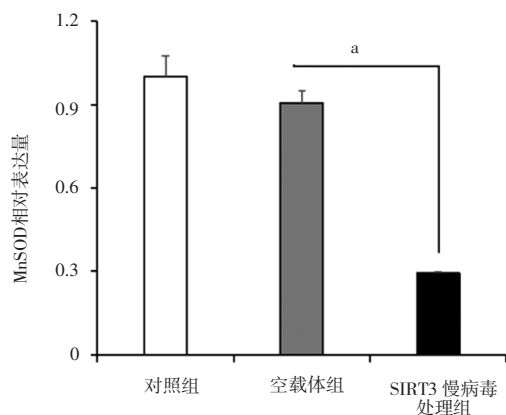


D. ADSC 成骨诱导分化 21 d,茜素红染色结果

图 3 ADSC 转染 Lenti-SIRT3shRNA 后, SIRT3 的表达及成骨分化情况

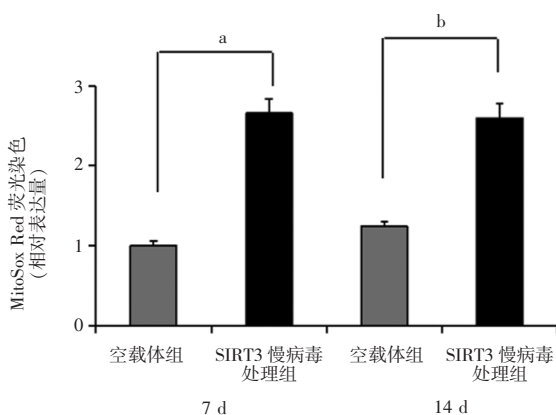
2.4 ADSC 转染慢病毒敲减 SIRT3 后, MnSOD 活性降低, ROS 水平升高

使用 SIRT3 慢病毒对 ADSC 进行转染后, 将其分为对照组、空载体组、SIRT3 慢病毒处理组, 在 ADSC 成骨诱导 14 d 后, 利用黄嘌呤氧化酶检测法检测细胞内 MnSOD 的活性, 结果(图 4A)显示: 与空载体组相比, SIRT3 慢病毒处理转染组中, 抑制 SIRT3 表达可使细胞内 MnSOD 活性明显降低($0.91 \pm 0.13, 0.29 \pm 0.01, P=0.002, n=5$)。而 ADSC 成骨诱导分化 7 d 和 14 d 时, 利用 MitoSox Red 试剂盒检测各组细胞内荧光表达量相对强度, 结果(图 4B)显示: 与空载体组相比, SIRT3 慢病毒处理组细胞内 ROS 的含量明显升高(7 d: $1.00 \pm 0.10, 2.66 \pm 0.32, P=0.013, n=5$; 14 d: $1.24 \pm 0.10, 2.59 \pm 0.31, P=0.014, n=5$)。



注: a, 与空载体组比较, $P=0.002$

A. 细胞内 MnSOD 的活性



注: a, 与空载体组比较, $P=0.013$; b, 与空载体组比较, $P=0.014$

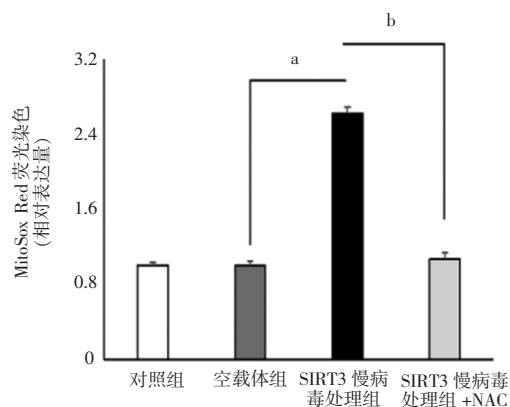
B. 细胞内 ROS 水平

图 4 ADSC 转染 SIRT3 慢病毒处理后, MnSOD 活性及 ROS 水平检测结果

2.5 加入 NAC 预处理细胞, 可逆转 SIRT3 敲减所致的成骨抑制

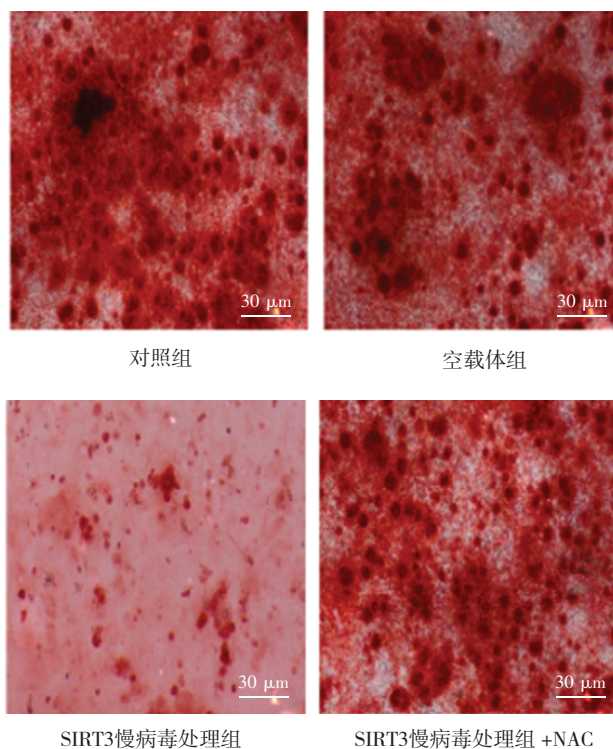
SIRT3 慢病毒处理组中 ROS 在胞内堆积, 故在本部分实验中增加 SIRT3 慢病毒处理+NAC 组, 以期研究 MnSOD/ROS

在 SIRT3 介导 ADSC 成骨分化中的作用。在成骨分化 14 d 利用 MitoSox Red 试剂盒检测细胞内 ROS 水平, 结果(图 5A)显示: 通过与空载体组相比, 抑制 SIRT3 表达可使细胞内 ROS 水平明显升高($1.00 \pm 0.13, 2.63 \pm 0.20, P=0.010, n=5$)。而加入 NAC 预处理细胞后, ROS 水平明显降低($2.63 \pm 0.20, 1.07 \pm 0.19, P=0.010, n=5$)。在 ADSC 成骨诱导分化 21 d, 使用茜素红进行染色, 显微镜下观察染色结果(图 5B)显示: SIRT3 慢病毒处理组与对照组相比, 胞外钙结节减少, 成骨分化能力明显减弱; 而使用 NAC 预处理后, SIRT3 慢病毒处理+NAC 组, 茜素红染色较深, 细胞外有明显的钙化结节, 成骨分化能力明显增强。



注: a, 与空载体组比较, $P=0.010$; b, 与空载体组比较, $P=0.010$

A. 细胞内 ROS 水平



B. 各组细胞茜素红染色结果

图 5 加入 NAC 预处理剂后, 各组细胞 ROS 水平及成骨分化情况

3 讨论

既往研究表明,SIRT3 能使许多调节线粒体生物发生及 ROS 生成、清除和代谢相关的蛋白去乙酰化^[14]。本研究评估了 SIRT3 在 ADSC 成骨分化中的作用。既往研究结果发现在 ADSC 成骨分化过程中,SIRT3 表达增加,敲减 SIRT3 可以明显抑制 ADSC 成骨分化。因此推测 SIRT3 在成骨分化过程中发挥至关重要的作用。SIRT3 主要存在于线粒体中,SIRT3 作为线粒体去乙酰化酶的重要作用早已被充分证明^[15]。线粒体是细胞内多数代谢活动及能量产生的场所,也是内源性 ROS 产生的主要场所。维持线粒体功能和生物合成的稳态对成骨分化至关重要^[18]。而成骨分化又是一个消耗能量的过程,在此过程中线粒体的生物合成及氧化供能会大大增加,其代谢副产物 ROS 的量也会相应增加。但是在成骨分化过程中只观察到线粒体生物合成和氧化代谢增强,ROS 的水平却意外降低。因此推测细胞可能是通过某种机制来降低 ROS 水平,以防止过量的 ROS 对细胞造成损伤。既往研究表明,超氧化物歧化酶 MnSOD 存在于线粒体中,可以催化活性氧自由基歧化为氧和过氧化氢,防止细胞组织受到氧化应激损伤^[19]。MnSOD 是 SIRT3 的重要靶点之一,因此推测 SIRT3/MnSOD/ROS 这一信号通路可在 ADSC 成骨分化过程中发挥重要调控作用。

SIRT3 可能影响 ROS 稳态,这是维持线粒体功能和生物发生的关键。MnSOD 是介导 SIRT3 对 ROS 状态影响的重要传感器。之前已经报道了 SIRT3 对毛细血管内皮细胞和肝细胞中 MnSOD 的去乙酰化作用^[20]。SIRT3 能够通过去乙酰化 2 个赖氨酸残基(Lys53 和 Lys89)来激活 ROS 的主要解毒剂 MnSOD,从而保护细胞免受氧化应激。这些结果与上述推测相一致。除此之外,SIRT3 还可直接调节 ROS 的产生。SIRT3 能够与线粒体电子传递链的几个组成部分相互作用并使其去乙酰化,其中包括复合体 I 和复合体 III,它们负责了线粒体内大约 90% 的 ROS 生成^[21]。SIRT3 通过发挥去乙酰化作用来影响线粒体电子传递的功能,从而降低 ROS 的生成。

本研究发现敲减 SIRT3 可降低细胞内 MnSOD 活性,增加细胞内 ROS 水平,并减弱 ADSC 的成骨分化能力。通过增加抗氧化剂 NAC 预处理的方式减少 ROS 的堆积,可以逆转 SIRT3 敲减对成骨分化的抑制作用,表明成骨分化降低与 ROS 的堆积相关。

本研究发现 ADSC 成骨诱导过程中 SIRT3 高表达,可通过增加 MnSOD 活性来降低胞内 ROS 水平,从而促进 ADSC 成骨分化。SIRT3 作为线粒体内重要的去乙酰化酶,存在多个下游调控因子,既往研究发现 PGC-1 α 及 FOXO3 转录因子也是 SIRT3 去乙酰化的重要靶点。PGC-1 α 作为线粒体生物合成和功能的主要调节者,可以对不同的代谢应激作出反应,以保证线粒体的数目和代谢能力达到组织所需的能量要求。FOXO3 属于 FOXO 家族,其作为重要的转录因子,可调节多种基因的转录和表达。研究发现 SIRT3 介导 FOXO3 去乙酰化,调控一系列 FOXO3 下游基因的表达,对线粒体的功能活动、线粒体融合/分裂及线粒体自噬等方面起重要调节作用^[22]。因此关于 SIRT3 对于 PGC-1 α 和 FOXO3 的去乙酰化调控,以及这一过程对 ADSC 成骨分化的影响还有待进一步研究。

既往研究表明,ADSC 作为牙周组织再生治疗研究最多的干细胞之一,其成骨分化功能在牙周组织再生中发挥重要作用,尤其是在牙骨质再生方面相对于其他干细胞表现得更加优异^[4]。另有研究发现,ADSC 在牙周非手术治疗中发挥重要作用,其可作为牙周基础治疗的辅助疗法,提高对牙周组织再生的治疗效果^[5]。本研究探讨了 SIRT3/MnSOD/ROS 信号通路在大鼠 ADSC 成骨分化过程中的调控机制,为 ADSC 进一步运用到牙周组织再生治疗提供了一定的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17038.
- [2] Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors[J]. J Dent Res,

- 2017,96(4):380-387.
- [3] Vaquette C, Pilipchuk SP, Bartold PM, et al. Tissue engineered constructs for periodontal regeneration; current status and future perspectives[J]. Adv Healthc Mater, 2018, 7(21): e1800457.
- [4] Derkus B, Emregul K, Emregul E. A new approach in stem cell research exosomes: their mechanism of action via cellular pathways[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(5): 466-475.
- [5] Du J, Shan Z, Ma P, et al. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for periodontal regeneration[J]. J Dent Res, 2014, 93(2): 183-188.
- [6] Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells; a review[J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(4): 1111-1126.
- [7] Nordberg RC, Lobo EG. Our fat future: translating adipose stem cell therapy[J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4(9): 974-979.
- [8] Zhou LN, Wang JC, Zilundu PLM, et al. A comparison of the use of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells for peripheral nerve regeneration *in vitro* and *in vivo*[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 153.
- [9] Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G, et al. Methods of isolation, characterization and expansion of human adipose-derived stem cells (ASCs): an overview[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): 1897.
- [10] Griffin MF, Ibrahim A, Seifalian AM, et al. Argon plasma modification promotes adipose derived stem cells osteogenic and chondrogenic differentiation on nanocomposite polyurethane scaffolds; implications for skeletal tissue engineering[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 105: 110085.
- [11] Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma: the keys to functional periodontal tissue engineering[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(5): 400-406.
- [12] Xie Q, Wang Z, Zhou HF, et al. The role of miR-135-modified adipose-derived mesenchymal stem cells in bone regeneration[J]. Bio-materials, 2016, 75: 279-294.
- [13] Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era[J]. Lancet, 2018, 391(10139): 2560-2574.
- [14] Tang BL. Sirt1 and the mitochondria[J]. Mol Cells, 2016, 39(2): 87-95.
- [15] Gao J, Feng ZH, Wang XQ, et al. SIRT3/SOD2 maintains osteoblast differentiation and bone formation by regulating mitochondrial stress[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(2): 229-240.
- [16] Ding Y, Yang HM, Wang YC, et al. Sirtuin 3 is required for osteogenic differentiation through maintenance of PGC-1 α -SOD2-mediated regulation of mitochondrial function[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(2): 254-264.
- [17] Kim H, Lee YD, Kim HJ, et al. SOD2 and Sirt3 control osteoclastogenesis by regulating mitochondrial ROS[J]. J Bone Miner Res, 2017, 32(2): 397-406.
- [18] Huh JE, Shin JH, Jang ES, et al. Sirtuin 3 (SIRT3) maintains bone homeostasis by regulating AMPK-PGC-1 β axis in mice[J]. Sci Rep, 2016, 6: 22511.
- [19] Olsen RK, Cornelius N, Gregersen N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism[J]. J Inher Metab Dis, 2015, 38(4): 703-719.
- [20] Gao J, Zheng Z, Gu Q, et al. Deacetylation of MnSOD by PARP-regulated SIRT3 protects retinal capillary endothelial cells from hyperglycemia-induced damage[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(3): 425-431.
- [21] Pi HF, Xu SC, Reiter RJ, et al. SIRT3-SOD2-mROS-dependent autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin[J]. Autophagy, 2015, 11(7): 1037-1051.
- [22] Wang Q, Li L, Li CY, et al. SIRT3 protects cells from hypoxia via PGC-1 α - and MnSOD-dependent pathways[J]. Neuroscience, 2015, 286: 109-121.

(责任编辑:唐秋姗)