

纸上说糖

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000696

氧化应激在高糖诱导成骨细胞凋亡中的作用

王小菊¹,冯正平¹,李济伶¹,陈力学²,汤为学²

(重庆医科大学附属第一医院 1. 内分泌科;2. 实验研究中心,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨氧化应激在高糖诱导成骨细胞凋亡中的作用。**方法:**体外培养的 MC3T3-E1 细胞,分为正常对照组、N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)组、11.0 mmol/L 高糖组、11.0 mmol/L 高糖+NAC 组、22.0 mmol/L 高糖组、22.0 mmol/L 高糖+NAC 组。应用 Annexin V-FITC/PI 处理不同组别细胞,流式细胞术检测细胞凋亡;Honchrest33258 染色观察细胞核形态;采用 MTT 法检测细胞增殖;采用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞活性氧类(reactive oxygen species, ROS)的生成。**结果:**①11.0 mmol/L 高糖组较正常对照组 MC3T3-E1 细胞凋亡率显著增加($P=0.004$);22.0 mmol/L 高糖组较正常对照组和 11.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞凋亡率明显增加($P=0.000$; $P=0.000$)。②11.0 mmol/L 高糖组较正常对照组 MC3T3-E1 细胞增殖轻微下降($P=0.305$);与正常对照组和 11.0 mmol/L 高糖组相比,22.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞增殖显著降低($P=0.001$; $P=0.009$)。③11.0 mmol/L 和 22.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞胞内 ROS 水平均明显增加($P=0.000$; $P=0.000$),但无明显浓度依赖性,抗氧化剂 NAC 可明显降低 ROS 水平,改善高糖所致的凋亡增加和增殖下降。**结论:**高糖可通过增加成骨细胞胞内 ROS 生成引起 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡增加、增殖下降。

【关键词】氧化应激;活性氧类;凋亡;增殖**【中图分类号】**R681**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-05-12

Function of oxidative stress in apoptosis of osteoblast induced by high glucose

Wang Xiaojun¹, Feng Zhengping¹, Li Jiling¹, Chen Lixue², Tang Weixue²

(1. Department of Endocrinology; 2. Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the function of oxidative stress in apoptosis and proliferation of MC3T3-E1 cells under high glucose. **Methods:** MC3T3-E1 cells cultured *in vitro* were divided into normal control group, N-acetyl-L-cysteine (NAC) group, 11.0 mmol/L high-glucose group, 11.0 mmol/L high-glucose+NAC group, 22.0 mmol/L high-glucose group and 22.0 mmol/L high-glucose+NAC group. Reactive oxygen species (ROS) production was measured with DCFH-DA fluorescent probe. Cell proliferation was measured by MTT analysis. Cells in different groups were stained with Annexin V-FITC/PI, then the apoptosis rates were detected by flow cytometry. Morphology of cell nucleus was observed with Honchrest33258. **Results:** ①Cell apoptosis of 11.0 mmol/L high-glucose increased dramatically compared with that of normal control group ($P=0.004$). Cell apoptosis in 22.0 mmol/L high-glucose group increased significantly compared with that of normal control group and 11.0 mmol/L high-glucose group ($P=0.000$; $P=0.000$). ②Proliferation in 11.0 mmol/L high-glucose slightly decreased compared with that of normal control group ($P=0.305$). Compared with that of normal control and 11.0 mmol/L high-glucose group, proliferation in 22.0 mmol/L high-glucose group decreased significantly ($P=0.001$; $P=0.009$). ③ROS production in osteoblasts remarkably increased under high glucose ($P=0.000$; $P=0.000$), but not in a dose-dependent manner. NAC, as an antioxidant, could reduce ROS production obviously and ameliorate cell apoptosis and proliferation abnormality caused by high glucose. **Conclusion:** High glucose can increase ROS production in osteoblasts and subsequently lead to the increase of apoptosis and decrease of proliferation.

【Key words】oxidative stress; reactive oxygen species; apoptosis; proliferation

作者介绍:王小菊, Email:573879541@qq.com,

研究方向:糖尿病和骨质疏松的防治。

通信作者:冯正平, Email:fengzhengping@sina.com。

基金项目:国家临床重点专科建设项目资助项目(编号:2012);重庆

市卫生局科研基金资助项目(编号:12-02-041)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150709.1626.005.html>

(2015-07-09)

1948 年 Albright 首次提出糖尿病(diabetes mellitus, DM)可致骨改变,并提出糖尿病性骨质疏松的概念(diabetic osteoporosis, DOP)。目前认为 DOP 是 DM 的慢性并发症之一。DM 所导致骨代谢异常主要表现为骨形成缺陷、成骨细胞数量减少、类骨质形成不足等^[1],最终导致骨量减少、骨质量下降和骨折风险增加^[2]。我们^[3]的前期研究发现高糖可影响成骨细胞功能,但其具体分子机制仍未阐明。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一些反应性、短寿命的小分子,包括氧阴离子(O_2^-)、氧自由基(超氧自由基、羟自由基 OH^-)、过氧化物(H_2O_2)等,它具有双重作用,可氧化蛋白质、脂质和 DNA,导致细胞功能改变^[4],也可激活胞内多重适应性信号通路^[5]。本研究以 MC3T3-E1 成骨细胞为研究对象,探讨高糖环境下 ROS 生成及其对成骨细胞凋亡和增殖的影响,为 DOP 发病机制提供可能的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 α -MEM 培养基由美国 Hyclone 公司生产;胎牛血清购于德国 PAN 公司; N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)购于中国碧云天公司;DCFH-DA 探针试剂盒购于中国上海贝博公司。

1.1.2 细胞与分组 细胞 MC3T3-E1 购于美国 ATCC, MC3T3-E1 成骨细胞培养于含 10% FBS 和 1%青霉素/链霉素的 α -MEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO_2 细胞孵育箱中培养,待细胞生长至 90%时 0.25%胰酶常规传代培养。体外培养的 MC3T3-E1 成骨细胞分为正常对照组(正常培养, D-葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L, 培养 24 h)、高糖组和抗氧化剂组。根据糖尿病血糖升高特点,将高糖组分为 11.0 mmol/L 高糖组(11.0 mmol/L D-葡萄糖, 培养 24 h)和 22.0 mmol/L 高糖组(22.0 mmol/L D-葡萄糖, 培养 24 h)。抗氧化剂组包括 NAC 组(5.5 mmol/L D-葡萄糖和 2 mmol/L NAC 共培养 24 h)、11.0 mmol/L 高糖+NAC 组(11.0 mmol/L D-葡萄糖和 2 mmol/L NAC, 共培养 24 h)和 22.0 mmol/L 高糖+NAC 组(22.0 mmol/L D-葡萄糖和 2 mmol/L NAC, 共培养 24 h)。细胞生长至 80%即开始干预。

1.2 方法

1.2.1 MC3T3-E1 细胞内 ROS 水平检测 采用 DCFH-DA 探针试剂盒检测细胞内 ROS 水平。处理药物干预细胞 24 h, 装载 DCFH-DA 探针后,倒置显微镜下观察并分析荧光强度,流式细胞仪检测 ROS 阳性率。

1.2.2 MC3T3-E1 细胞凋亡检测 处理药物干预细胞 24 h

后, Honchest33258 染核,倒置荧光显微镜观察细胞核形态;搜集各处理组细胞沉淀,流式细胞仪检测并计算细胞凋亡率。

1.2.3 MC3T3-E1 细胞增殖检测 应用 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐)法检测。加入处理药物干预细胞 24 h 后,加入 MTT 溶液,置于 37 °C、5% CO_2 孵育箱中孵育 4 h。吸出孔内液体,加入 DMSO,避光振荡 10 min,酶标仪 570 nm 波长测定光密度值(A 值)。每组设 6 个复孔。

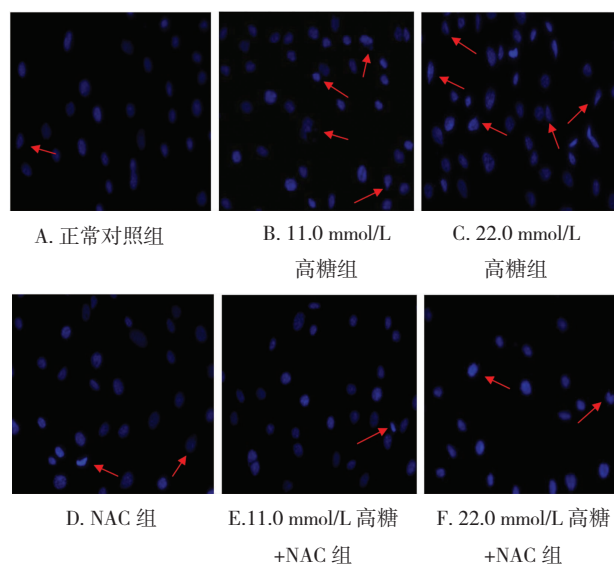
1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,所有计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示,组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法分析,所有实验重复 3 次。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 高糖对 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

倒置显微镜下可见高糖组 MC3T3-E1 细胞核形态发生明显变化,表现为细胞核核质固缩、胞核呈不规则形,核仁边缘,呈颗粒状或新月形,核膜破裂,胞核碎裂成小颗粒状(图1)。与正常对照组相比,11.0 mmol/L 和 22.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞凋亡率由 $(3.46 \pm 0.09)\%$ 分别上升至 $(3.88 \pm 0.10)\%$ 和 $(5.55 \pm 0.24)\%$, 上升幅度分别为 12.14% 和 60.40% ($P=0.004$; $P=0.000$), 22.0 mmol/L 高糖组较 11.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞凋亡率增加 43.04% ($P=0.000$) (表 1, 图 2)。



红色箭头所示为凋亡细胞的细胞核

图 1 倒置荧光显微镜观察不同组别 MC3T3-E1 细胞核形态学变化 (200 $\times$)

Fig.1 ROS production in different groups under inverted fluorescence microscope(200 $\times$)

表 1 不同组别 MC3T3-E1 细胞凋亡率

Tab.1 Apoptosis rate of MC3T3-E1 cells in different groups

组别	凋亡率($\bar{x} \pm s, \%$)
正常对照组	3.46 $\pm$ 0.09
NAC组	3.15 $\pm$ 0.17 ^a
11.0 mmol/L 高糖组	3.88 $\pm$ 0.10 ^a
11.0 mmol/L 高糖+NAC 组	3.27 $\pm$ 0.16 ^b
22.0 mmol/L 高糖组	5.55 $\pm$ 0.24 ^{ab}
22.0 mmol/L 高糖+NAC 组	4.85 $\pm$ 0.02 ^c
F 值	134.036
P 值	0.000

注:与正常对照组相比,a, $P<0.05$;与 11.0 mmol/L 高糖组相比,b, $P<0.05$;与 22.0 mmol/L 高糖组相比,c, $P<0.01$

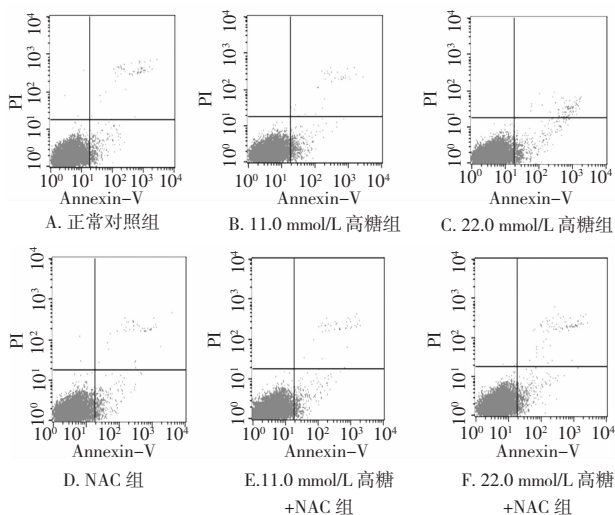


图 2 Annexin-FITC/PI 染色检测不同组别 MC3T3-E1 细胞的凋亡
Fig.2 Apoptosis of MC3T3-E1 cells in different groups
by Annexin-FITC/PI staining

2.2 高糖对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

与正常对照组相比,11.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞增殖下降 6.54%,但差异无统计学意义($P=0.305$)。22.0 mmol/L 高糖组较正常对照组和 11.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞增殖分别下降 24.17%和 18.86%($P=0.001$; $P=0.009$),差异有显著意义(表 2)。

表 2 不同组别 MC3T3-E1 细胞 A 值的比较

Tab.2 Comparison of A values at 570 nm in different groups

组别	A 值($\bar{x} \pm s$)
正常对照组	1.560 $\pm$ 0.152
NAC组	1.990 $\pm$ 0.082 ^a
11.0 mmol/L 高糖组	1.458 $\pm$ 0.129
11.0 mmol/L 高糖+NAC 组	1.693 $\pm$ 0.134 ^b
22.0 mmol/L 高糖组	1.183 $\pm$ 0.163 ^{ab}
22.0 mmol/L 高糖+NAC 组	1.404 $\pm$ 0.285 ^c
F 值	15.804
P 值	0.000

注:与正常对照组相比,a, $P<0.01$;与 11.0 mmol/L 高糖组相比,b, $P<0.05$,与 22.0 mmol/L 高糖组相比,c, $P<0.05$

2.3 高糖对 MC3T3-E1 细胞 ROS 生成的影响

倒置荧光显微镜下可见高糖组 MC3T3-E1 细胞荧光强度较正常对照组明显增加(图 3),荧光波峰右移(图 4),应用抗氧化剂 NAC 后,荧光明显减弱,荧光波峰向左回移(图 3、图 4)。11.0 mmol/L 高糖组和 22.0 mmol/L 高糖组 ROS 生成率较正常对照组分别上升 35.14%和 40.13%($P=0.001$; $P=0.000$)(表 3,图 4),22.0 mmol/L 高糖组较 11.0 mmol/L 高糖组 ROS 生成率上升 3.69%($P=0.522$)。应用抗氧化剂 NAC 后,11.0 mmol/L 高糖和 22.0 mmol/L 高糖组 ROS 生成率分别下降 27.85%和 23.99%($P=0.000$; $P=0.001$)(表 3,图 4)。

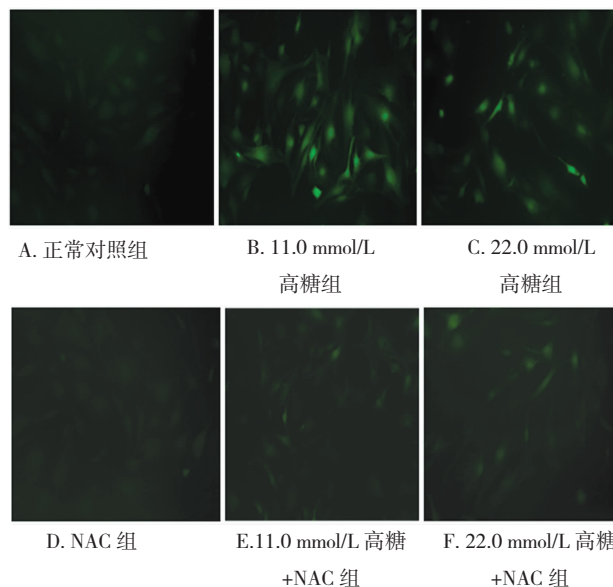


图 3 倒置荧光显微镜观察不同组别 MC3T3-E1 细胞
ROS 的生成 (200 $\times$)

Fig.3 ROS production in MC3T3-E1 cells in different groups
under inverted fluorescence microscope(200 $\times$)

表 3 不同组别 MC3T3-E1 细胞 ROS 生成率

Tab.3 ROS production rate of MC3T3-E1 cells
in different groups

组别	ROS生成率($\bar{x} \pm s, \%$)
正常对照组	9.22 $\pm$ 0.52
NAC组	8.53 $\pm$ 0.07
11.0 mmol/L 高糖组	12.46 $\pm$ 0.87 ^a
11.0 mmol/L 高糖+NAC 组	8.99 $\pm$ 0.75 ^b
22.0 mmol/L 高糖组	12.92 $\pm$ 1.03 ^a
22.0 mmol/L 高糖+NAC 组	9.82 $\pm$ 1.33 ^c
F 值	14.611
P 值	0.000

注:与正常对照组相比,a, $P<0.01$;与 11.0 mmol/L 高糖组相比,b, $P<0.01$;与 22.0 mmol/L 高糖组相比,c, $P<0.01$

2.4 ROS 对 MC3T3-E1 细胞凋亡和增殖的影响

应用 NAC 后,高糖组凋亡细胞核明显减少(图 1),11.0

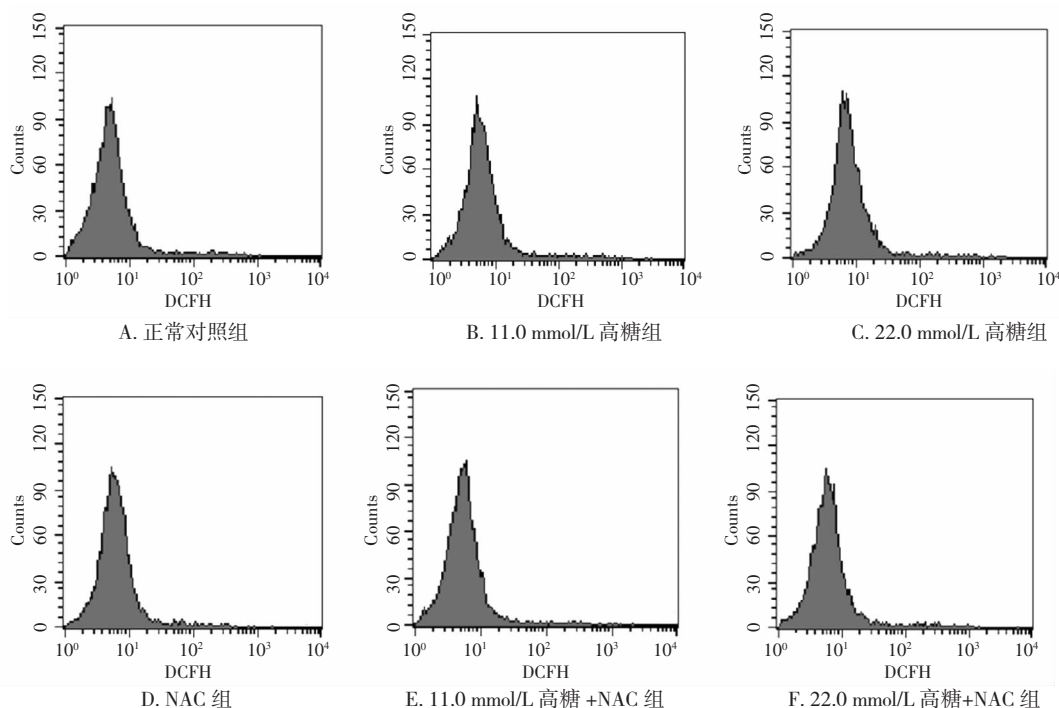


图 4 流式细胞仪检测不同组别 MC3T3-E1 细胞 ROS 生成

Fig.4 ROS production of MC3T3-E1 cells in different groups measured by flow cytometry

mmol/L 高糖组和 22.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞凋亡率分别下降 15.72% 和 12.61% ($P=0.000$; $P=0.000$) (表 1, 图 2), 增殖能力分别上升 16.12% 和 18.68% ($P=0.023$; $P=0.032$) (表 2)。

3 讨论

骨系细胞中, 成骨细胞和破骨细胞在维持骨正常代谢方面发挥重要作用^[6], 高糖环境下则以成骨细胞功能改变最为显著^[2]。因此本研究以常用的成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞为研究对象, 根据糖尿病患者血糖升高的特点, 最大程度模拟体内环境, 以 α -MEM 为基础培养基, 设定高糖培养基分别为 11.0 mmol/L 和 22.0 mmol/L, 观察高糖对成骨细胞功能的影响及其机制。本研究发现高糖组成骨细胞形态明显改变, 胞核核质固缩、胞核不规则, 染色质边集, 核膜破裂, 胞核碎裂成小颗粒状, 符合细胞凋亡, 且细胞凋亡率随葡萄糖浓度增加而增加, 并与高糖所致高渗透压无关^[7-8]。另一项 Zhen 等^[9]的研究发现 11.0 mmol/L 高糖环境下成骨细胞凋亡率轻微下降, 随葡萄糖浓度上升成骨细胞凋亡率明显增加。本研究还发现, 11.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞

增殖下降, 但较正常对照组无统计学差异, 随葡萄糖浓度升高至 22.0 mmol/L, 细胞增殖明显下降, 这与国内外部分研究一致^[10-12]。但也有学者提出不同意见。他们认为高糖对成骨细胞增殖的影响呈先促进后抑制效应^[9,13]。这种差异可能与成骨细胞的选择和培养时间不同有关。

ROS 在骨质疏松的发生、发展中具有重要作用^[14-16], 当细胞内 ROS 聚集、增加, 最终可影响成骨细胞功能^[17-20]。本研究发现 11.0 mmol/L 和 22.0 mmol/L 高糖组 MC3T3-E1 细胞胞内 ROS 生成明显增加, 但无明显浓度依赖性, 这与 Zhen 等^[9]的研究结果不同。他们发现 11.0 mmol/L 高糖组成骨细胞胞内 ROS 生成轻微下降, 但无统计学意义, 随着葡萄糖浓度升高至 22.0 mmol/L 和 44.0 mmol/L, 成骨细胞胞内 ROS 生成呈浓度依赖性增加。这种差异可能与培养时间、培养条件和细胞选择不同密切相关。应用抗氧化剂 NAC 后, 发现 NAC 可显著拮抗 ROS 生成、改善由高糖所致的 MC3T3-E1 细胞凋亡增加和增殖下降。Zhen 等^[9]发现二甲双胍可作为抗氧化剂明显降低高糖引起的 ROS 生成增加, 从而改善成骨细胞增殖、降低凋亡。以上研究结果提示 ROS 生成

增加所致的氧化应激可诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡增加和增殖下降,这与郭宝磊等^[21]的研究结论一致。ROS 作为胞内信号分子可激活胞内多重信号通路,其影响成骨细胞的功能的下游分子机制有待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明高糖可通过增加 MC3T3-E1 细胞胞内 ROS 生成诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡、降低增殖,所以氧化应激可能在糖尿病性骨代谢异常中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, et al. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(9): 1317-1328.
- [2] Hamann C, Kirschner S, Günther KP, et al. Bone, sweet bone: osteoporotic fractures in diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(5): 297-305.
- [3] 王小菊, 冯正平, 邓华聪, 等. 活化蛋白 1 在高糖诱导 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡中的作用[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2014, 7(3): 258-262.
- [4] Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy[J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(9): 422-427.
- [5] Li M, Zhao L, Liu J, et al. Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009, 292(8): 1107-1113.
- [6] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance[J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1501-1504.
- [7] Feng Z, Deng H, Du J, et al. Lentiviral-mediated RNAi targeting p38MAPK ameliorates high glucose-induced apoptosis in osteoblast MC3T3-E1 cell line[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2011, 49(2): 94-104.
- [8] 冯正平, 邓华聪, 杜佳, 等. 不同浓度葡萄糖对成骨细胞凋亡的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(6): 840-842.
- [9] Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function[J]. *J Diabetes Complications*, 2010, 24(5): 334-344.
- [10] Shao X, Cao X, Song G, et al. Metformin Rescues the MG63 Osteoblasts against the effect of High Glucose on Proliferation[J]. *J Diabetes Res*, 2014(2014): 453940.
- [11] Ma P, Gu B, Xiong W, et al. Glimepiride promotes osteogenic differentiation in rat osteoblasts via the PI3K/Akt/eNOS pathway in a high glucose microenvironment[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112243.
- [12] 董永辉, 徐飞, 郭风劲, 等. 高糖对原代成骨细胞增殖分化的影响[J]. *中华老年医学杂志*, 2014, 33(6): 665-667.
- [13] 程萌, 陈德才, 卢春燕. 不同浓度葡萄糖对成人骨肉瘤细胞株 MG63 活性的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2008, 39(2): 239-242.
- [14] Feng YL, Tang X. Effect of glucocorticoid-induced oxidative stress on the expression of Cbfa1[J]. *Chem Biol Interact*, 2014(207): 26-31.
- [15] Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, et al. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress[J]. *Bone*, 2007, 40(5): 1408-1414.
- [16] Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, et al. Oxidative stress in bone remodelling and disease[J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(10): 468-477.
- [17] Liang D, Xiang L, Yang M, et al. ZnT7 can protect MC3T3-E1 cells from oxidative stress-induced apoptosis via PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1126-1135.
- [18] Zhang JK, Yang L, Meng GL, et al. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 689(1-3): 31-37.
- [19] Liang D, Yang M, Guo B, et al. Zinc inhibits H₂O₂-induced MC3T3-E1 cells apoptosis via MAPK and PI3K/AKT pathways[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 148(3): 420-429.
- [20] Yin H, Shi ZG, Yu YS, et al. Protection against osteoporosis by statins is linked to a reduction of oxidative stress and restoration of nitric oxide formation in aged and ovariectomized rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2-3): 200-206.
- [21] 郭宝磊, 杨茂伟, 梁单, 等. 高糖通过提高 ROS 水平和钙超载诱导小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(2): 292-297.

(责任编辑:唐秋姗)