

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001957

姜黄素调控脂多糖诱导成骨细胞线粒体功能改变及凋亡研究

李广悦,尹东青,徐 凌,丁慧芬,许 芸

(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:研究脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和姜黄素(curcumin, Cur)对成骨细胞线粒体功能活性改变及凋亡的影响。**方法:**体外培养小鼠原代成骨细胞,并将细胞分为 4 组:无任何处理的对照组(N 组);10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素预处理 2 h,使用正常培养基培养 24 h 组(Cur 组);用 1 mg/L LPS 处理 24 h 组(LPS 组);用 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素预处理 2 h,然后再用 1 mg/L LPS 处理成骨细胞 24 h 组(Cur +LPS 组)。利用线粒体荧光探针测量线粒体活性氧的产生,检测线粒体氧化呼吸链酶活性、线粒体膜电位、细胞内 ATP 的合成及细胞凋亡情况。**结果:**在经过 1 mg/L LPS 刺激后,小鼠成骨细胞线粒体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成成为对照组的 2.59 倍;与对照组相比,LPS 组氧化呼吸链酶 I 活性降低 21%,氧化呼吸链酶 III 活性降低 26%,氧化呼吸链酶 IV 活性降低 28%;线粒体细胞膜电位降低 32%,ATP 合成量为 $(0.79 \pm 0.06) \mu\text{mol/mg}$ 蛋白,细胞凋亡数目增加 3.2 倍;而 Cur+LPS 组较 LPS 组相比,小鼠成骨细胞内 ROS 水平降低 $(1.48 \pm 0.21 \text{ vs. } 2.59 \pm 0.32, P=0.003)$,氧化呼吸链酶 I 活性升高 $(0.98 \pm 0.02 \text{ vs. } 0.79 \pm 0.03, P=0.000)$,氧化呼吸链酶 III 活性升高 $(0.93 \pm 0.03 \text{ vs. } 0.74 \pm 0.03, P=0.004)$,氧化呼吸链酶 IV 活性升高 $(0.92 \pm 0.05 \text{ vs. } 0.72 \pm 0.02, P=0.009)$,线粒体膜电位增加 $(0.91 \pm 0.04 \text{ vs. } 0.68 \pm 0.04, P=0.002)$,ATP 合成量增加 $(1.53 \pm 0.05 \text{ vs. } 0.79 \pm 0.06, P=0.000)$,细胞凋亡数目减少 $(1.67 \pm 0.42 \text{ vs. } 5.33 \pm 0.80, P=0.002)$ 。**结论:**姜黄素预处理组的成骨细胞线粒体功能得以明显改善,并且细胞凋亡数目明显减少,为姜黄素可能被进一步应用于临床治疗慢性牙周炎提供一定的实验依据。

【关键词】脂多糖;姜黄素;成骨细胞;线粒体;活性氧;细胞凋亡**【中图分类号】**Q731; Q291**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-09-06

Effect of curcumin and lipopolysaccharide on mitochondrial function and cell apoptosis in osteoblasts

Li Guangyue, Yin Dongqing, Xu Ling, Ding Huifen, Xu Yun

(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 investigate the effect of lipopolysaccharide(LPS) and curcumin(Cur) on the changes in mitochondrial function and activity and cell apoptosis in osteoblasts. **Methods:** Primary mouse osteoblasts were cultured in vitro and then divided into control group(N group without any treatment), Cur group(pretreated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Cur for 2 hours and then cultured with normal medium for 24 hours), LPS group(treated with 1 mg/L LPS for 24 hours), and Cur+LPS group(pretreated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Cur for 2 hours and then treated with 1 mg/L LPS for 24 hours). A mitochondrial fluorescent probe was used to detect reactive oxygen species(ROS), and the activity of mitochondrial respiratory chain complex, mitochondrial membrane potential, synthesis of ATP in cells, and cell apoptosis were also measured. **Results:** After the stimulation with 1 mg/L LPS, ROS in the mitochondria was 2.59 times that in the control group. Compared with the control group, the LPS group had a 21% reduction in the activity of respiratory chain complex I, a 26% reduction in the activity of respiratory chain complex III, and a 28% reduction in the activity of respiratory chain complex IV, as well as a 32% reduction in mitochondrial membrane potential, an amount of ATP synthesis of $0.79 \pm 0.06 \mu\text{mol/mg}$ protein, and a 3.2-fold increase in the number of apoptotic cells. Compared with the LPS group, the Cur+LPS group had a significant reduction in ROS $(1.48 \pm 0.21 \text{ vs. } 2.59 \pm 0.32, P=0.003)$, significant increases in the activities of respiratory chain complex I

作者介绍:李广悦, Email: penny_1225@qq.com,

研究方向:口腔修复和骨代谢疾病。

通信作者:尹东青, Email: 392349622@qq.com。

基金项目:重庆市渝北区科技计划资助项目[编号:2016(社)08]。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190107.1745.004.html>

(2019-01-09)

(0.98 ± 0.02 vs. 0.79 ± 0.03 , $P=0.000$), III (0.93 ± 0.03 vs. 0.74 ± 0.03 , $P=0.004$), and IV (0.92 ± 0.05 vs. 0.72 ± 0.02 , $P=0.009$), a significant increase in mitochondrial membrane potential (0.91 ± 0.04 vs. 0.68 ± 0.04 , $P=0.002$), a significant increase in ATP synthesis (1.53 ± 0.05 vs. 0.79 ± 0.06 , $P=0.000$), and a significant reduction in the number of apoptotic cells (1.67 ± 0.42 vs. 5.33 ± 0.80 , $P=0.002$). **Conclusion**: Osteoblasts pretreated with Cur had a significant improvement in mitochondrial function and a significant reduction in the number of apoptotic cells, which provide an experimental basis for the application of Cur in clinical treatment of periodontitis.

[Key words] lipopolysaccharide; curcumin; osteoblast; mitochondria; reactive oxygen species; cell apoptosis

细菌作为牙周炎发病的始动因子,在慢性牙周炎的发生发展中起着重要作用。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌外膜的主要结构成分,对牙周组织具有很高的毒性,被称为牙周炎症的主要病因之一^[1-2]。慢性牙周炎可致牙槽骨吸收、牙齿松动,而牙槽骨组织很难自身再生重建。成骨细胞是骨组织形成的重要参与者,既往研究发现 LPS 可以促进成骨细胞表达细胞核因子 κ B 活化因子配基、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎性细胞因子,从而促进破骨细胞的活化和分化^[3-4],刺激骨组织的吸收。另一方面, LPS 可以抑制成骨细胞的增殖、分化功能并促进细胞的凋亡,导致牙槽骨组织吸收后难以重新再生^[5]。

研究表明在慢性牙周炎患者的龈沟液内氧化应激标志物等活性明显升高,并持续存在^[6-7]。同时慢性牙周炎可能与糖尿病、肥胖、动脉粥样硬化疾病之间有着共同的病理因素,即出现线粒体功能失调,伴随氧化应激的存在^[8-9]。

线粒体是细胞内多种物质进行氧化呼吸的主要部位,可以为细胞的增殖分化、细胞外基质的分泌等功能活动提供能量;同时线粒体是细胞内新生氧簇产生的主要部位,也参与细胞凋亡的调节过程^[10-12]。但至今国内外尚未有关于 LPS 对成骨细胞线粒体的功能活性改变的研究报道。

姜黄素是从姜科姜黄属植物生姜、莪术、藏红花等的根茎中提取的一种天然的多酚类化合物。传统中医学认为姜黄素有抗炎、抗氧化、抗微生物的作用,对于治疗炎性疾病如关节炎、胃肠炎等具有良好的疗效^[13-14]。以往研究表明姜黄素可以抑制 LPS 对牙周组织内巨噬细胞的刺激,减少炎性细胞因子的分泌,进而缓解牙周炎症的进展^[15-16]。在实验性牙周炎大鼠模型牙周局部使用 2%姜黄素凝胶,可使牙

周炎大鼠的牙龈指数和牙周袋探诊深度得以明显好转^[17]。

为了探讨线粒体作为细胞内重要的细胞器,其参与调控 LPS 及姜黄素与慢性牙周病发生发展的可能机制,本实验体外培养小鼠成骨细胞,使用 1 mL/L LPS 处理成骨细胞 24 h,测定线粒体活性氧的产生,氧化呼吸链酶复合体活性,膜电位水平以及线粒体 ATP 的合成,并使用姜黄素预处理成骨细胞,再使用 LPS 刺激成骨细胞,以确定 LPS 及姜黄素对成骨细胞线粒体功能活性和细胞凋亡的影响,为姜黄素可能被进一步应用于临床治疗慢性牙周炎提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 小鼠成骨细胞体外培养,成骨细胞鉴定及细胞处理

取乳鼠(出生 3 d 以内的 C57 乳鼠,由重庆医科大学动物实验中心提供),断头处死后,无菌条件下分离取出头颅骨,用 Hank 液反复清洗去除软组织后,搔刮骨面,剪成 1 mm³ 大小,再用 Hank 液清洗 2 遍,将组织块移入盛有 0.2% II 型胶原酶(Sigma)及 0.05%胰蛋白酶(Invitrogen)的培养瓶中在 37 ℃、5%CO₂ 孵箱中静置消化 4 次,每次 15 min,不定时在倒置显微镜下观察。第 1 次消化液弃掉,滴管吹打组织块后,收集后 3 次的消化液,300 g 离心 5 min,弃除上清液,加入含 10%胎牛血清(Invitrogen)的完全培养液,将细胞按照相应的密度进行接种,培养于 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中。以后每 3 d 换 1 次液,至细胞铺满培养瓶底时,用 0.25%胰蛋白酶及 1% EDTA 消化传代^[18]。

制作成骨细胞爬片,将 5×10^5 个细胞接种于盖玻片上,待细胞在完全培养基中生长达到密度为 80%~90%时,将完全培养基换成骨分化诱导液,每 3 d 更换 1 次分化液,成骨分化 21 d 后使用 4% PFA 溶液固定细胞 20 min, PBS 冲洗 3 次,用含有 5%羊血清、0.1% Triton-X100 的封闭液进行封口 1 h,使用抗鼠骨钙素抗体(1:200),湿盒内 4 ℃孵育过夜。用 PBS 溶液漂洗细胞 3 次,每次 5 min,再加入抗兔荧光二抗(激发

波长:568 nm)室温孵育 1 h, PBS 溶液漂洗细胞 3 次, 用水溶性封片剂封片, 镜下观察并拍照。

选取 0、0.1、1、10 mg/L LPS 对成骨细胞进行处理, 细胞在相应浓度的培养基内培养 24 h 后, 进行细胞内 ATP 水平的检测。另将细胞分为 4 组: 无任何处理的对照组(N 组); 10 μ mol/L 姜黄素预处理 2 h, 使用正常培养基培养 24 h (Cur 组); 用 1 mg/L LPS 处理 24 h (LPS 组); 用 10 μ mol/L 姜黄素预处理 2 h, 然后再用 1 mg/L LPS 处理成骨细胞 24 h (Cur+LPS 组), 进行后续相应的检测。

1.2 小鼠成骨细胞线粒体活性氧的产生

根据线粒体荧光探针试剂盒 (Molecular probe, Invitrogen) 说明书操作, 将 2×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中, 根据上述的方式分为 4 组处理细胞, 弃去培养基加入荧光染料 MitoSox 并使其最终浓度为 5 μ mol/L, 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 用含有 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 HBSS (Invitrogen) 溶液洗后, 在 Gemini 荧光读板机 (Molecular Devices) 进行读数测定线粒体内活性氧的产生 (激发波长: 510 nm, 发射波长 580 nm)。阳性对照组加入试剂盒阳性对照试剂 37 $^{\circ}$ C 刺激 30 min 后按上述方法操作。

1.3 小鼠成骨细胞线粒体氧化呼吸链酶活性测定

为检测线粒体氧化呼吸酶复合体活性, 收集处理后的细胞进行线粒体制备^[19-20]。将 6 孔板内的小鼠成骨细胞收集起来, 离心, 重悬于 50 mL 的缓冲液内 (225 mmol/L D-Mannitol, 75 mmol/L Sucrose, 2 mmol/L K_2HPO_4 , 5 mmol/L HEPES, pH 7.2)。测定蛋白含量后, 调节蛋白至 1 mg/mL。按照相应方法^[20-21]分别测定线粒体复合酶 I、III 和 IV 的活性。

复合酶 I 活性的测定: 取线粒体蛋白 50 mg, 加入含有 2 mg 抗霉素 A (复合酶 III 抑制剂), 60 mmol/L CoQ10 (电子传递中间体) 的缓冲液 1 mL, 混匀后加入 0.13 mmol/L 底物 NADH 启动反应, 1 min 内测定 340 nm 处 NADH 吸收 (absorbance, A) 值的变化, 表示复合酶 I 的活性。空白管则加入 5 mmol/L rotenone 抑制复合酶 I 的活性。

复合酶 III 活性的测定: 将线粒体蛋白 50 加入含有 0.5 mmol/L EDTA, 35.7 mmol/L 氧化型细胞色素 C 的缓冲液 1 mL, 30 $^{\circ}$ C 温育 5 min, 加入终浓度为 100 mmol/L 新配制 ubiquinol-10 启动反应, 10 min 内测定 550 nm 处细胞色素 C 吸收值的变化, 表示复合酶 III 的活性。

复合酶 IV 活性的测定: 取线粒体蛋白 30 mg 和细胞色素 C 25 mL (2.7 mg/mL, $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}=10\sim20$), 测定 550 nm 处细胞色素吸收值 $A_{550\text{ nm}}$ 的变化, 表示复合酶 IV 的活性。

1.4 小鼠成骨细胞线粒体膜电位的测定

将 2×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中, 细胞培养处理 24 h 后, 弃去培养基加入荧光染料 Tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM) 并使其最终浓度为 300 nmol/L, 37 $^{\circ}$ C 放置 15 min, 用含有 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 HBSS (Invitrogen) 溶液洗后, 在 Gemini 荧光读板机进行读数测量线粒体的膜电位 (激发波长: 543 nm, 发射波长 580 nm)。

1.5 小鼠成骨细胞内 ATP 水平检测

根据荧光素酶催化荧光素产生荧光时需要 ATP 提供能量的原理来测定细胞内 ATP 水平。将处理好的细胞裂解样品加入到荧光素酶及荧光素反应体系中, 然后用液闪仪测定 CPM 值。检测前为了消除样品制备时由于蛋白量的差异而造成的误差, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 然后把 ATP 的浓度换算成 μ mol/mg 蛋白的形式。

1.6 TUNEL 染色

根据原位检测细胞凋亡试剂盒的说明书操作, 待细胞进行相应的处理后, 弃去培养基, 用 PBS 溶液清洗细胞 2 次。加入 4% PFA 在室温固定细胞 1 h, 后用 PBS 清洗细胞 3 次。在冰上, 用含有 0.1% Triton-X100 的柠檬酸钠溶液通透细胞 2 min, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min。接下来加入 TUNEL 反应混合液 50 mL, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育 60 min 后用 PBS 清洗细胞 3 次。在激光共聚焦显微镜下观察, TUNEL 染色试剂 (激发波长: 510 nm, 发射波长 580 nm)。

每组细胞设置 3 个复孔。实验组与对照组细胞均在相同的设置条件下完成拍摄, 图片后期使用 NIH Image J 软件进行 TUNEL 阳性细胞计数分析。

1.7 Caspase-3 活性测定

按照 Roche 公司 Caspase-3 活性检测试剂盒说明书, 待细胞进行相应的处理后, 制备待检测样品。在试剂盒孔板每孔中加入 100 μ L 含有抗 Caspase-3 的铺板溶液, 置于 4 $^{\circ}$ C 过夜; 去除铺板溶液, 加入封闭液以避免非特异性的结合。在孔板内加入样品 (包括待测样品以及阳性对照样品), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 加入 200 μ L 孵育缓冲液, 清洗孔板 3 次, 每次 1 min; 每孔加入 100 μ L 反应底物溶液, 在荧光分光光度计内读数 T0 (荧光激发波长为 400 nm, 发射波长为 505 nm); 将孔板用薄膜严密封闭, 放置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 再次用荧光分光光度计在相同设置条件下读数 T1。结果计算: 对各孔的荧光值进行校正, 即用样品 (包括标准品) 的荧光值减去空白孔的荧光值, 计算各孔的荧光变化值 ($\Delta\text{FU}=\text{T0}-\text{T1}$); 按照标准品 (50、25、10、1、0.5 mmol/L) 的荧光变化值 ΔFU 作出标准曲线; 根据标准曲线以及各样品的荧光变化值, 计算相应样品中 Caspase-3 的活性; 计算公式为:

$$\text{Caspase 活性} = \Delta\text{FU} / (120 \text{ min} \times \text{标准曲线斜率})$$

1.8 数据统计与分析

采用 SPSS 16.0 (23.0) 统计分析软件进行处理, 所得数据以均数 $\pm$ 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 原代成骨细胞骨钙素免疫荧光染色

原代细胞在加入成骨诱导分化液, 培养 21 d 后细胞骨钙素免疫荧光染色, 约 95% 的细胞均为骨钙素阳性染色, 原代成骨细胞纯度较高 (图 1)。

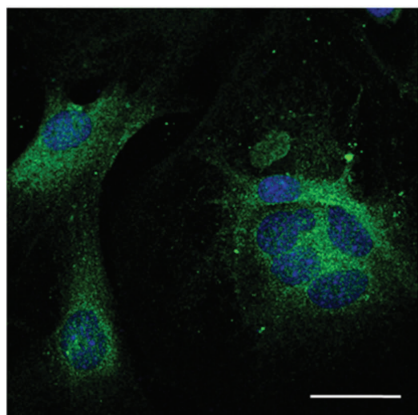
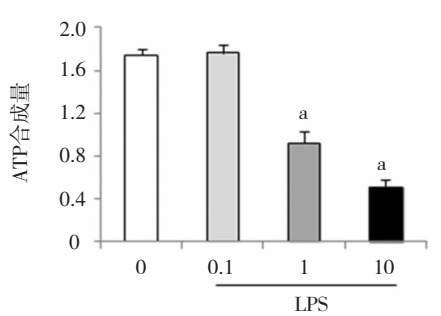


图1 成骨细胞骨钙素免疫荧光染色(标尺 30 μm)

2.2 LPS 抑制小鼠成骨细胞 ATP 合成

使用不同浓度的 LPS (0.1、1、10 mg/L) 刺激小鼠成骨细胞, 24 h 后检测 LPS 对细胞 ATP 合成的影响。方差分析 4 组 ATP 合成量水平的差异具有统计学意义 ($F=58.134, P=0.000$)。两两比较结果显示 0.1 mg/L 的 LPS 对成骨细胞 ATP 合成影响不大, 而 1 mg/L 和 10 mg/L 的 LPS 处理 24 h 后, 成骨细胞 ATP 合成受到明显抑制, 如图 2 所示。当使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞后, ATP 合成量较对照组明显降低 (0.93 ± 0.08 vs. $1.84 \pm 0.07, P=0.000, n=5$)。



a: 与 N 组比较, $P=0.000$

图2 LPS 对小鼠成骨细胞 ATP 合成的影响

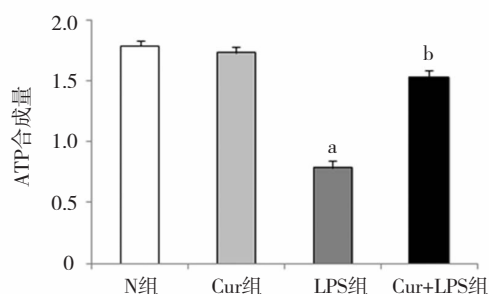
2.3 LPS 和姜黄素预处理后对成骨细胞 ATP 合成影响

使用 10 μmol/L 的姜黄素预处理小鼠成骨细胞 2 h 后, 再使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞, 24 h 后检测各组成骨细胞 ATP 合成情况。方差分析 4 组 ATP 合成量水平的差异具有统计学意义 ($F=77.224, P=0.000$)。两两比较结果显示 1 mg/L LPS 处理 24 h 后, 成骨细胞 ATP 合成受到明显抑制, 而 Cur+LPS 组小鼠成骨细胞 ATP 合成量较 LPS 组有了明显增加 (1.53 ± 0.05 vs. $0.97 \pm 0.06, P=0.000, n=5$), 如图 3 所示。

2.4 小鼠成骨细胞线粒体 ROS 的产生

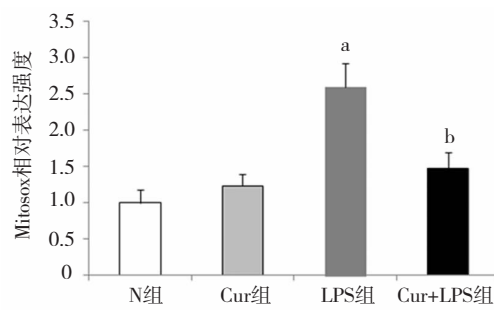
当分别使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞, 和 10 μmol/L 姜黄素预处理小鼠成骨细胞 2 h 后, 再使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞, 24 h 后检测各组成骨细胞线粒体 ROS 合成。方差分析 4 组 ROS 产生量的差异具有统计学意义 ($F=9.760$,

$P=0.001$)。两两比较结果显示 1 mg/L LPS 处理 24 h 后, 成骨细胞 ROS 水平明显增加, 而 Cur+LPS 组中, 小鼠成骨细胞 ROS 水平较单纯 LPS 处理组明显降低 (1.48 ± 0.21 vs. $2.59 \pm 0.32, P=0.003, n=5$), 如图 4 所示。



a: 与 N 组比较, $P=0.000$; b: 与 LPS 组比较, $P=0.000$

图3 小鼠成骨细胞 ATP 合成

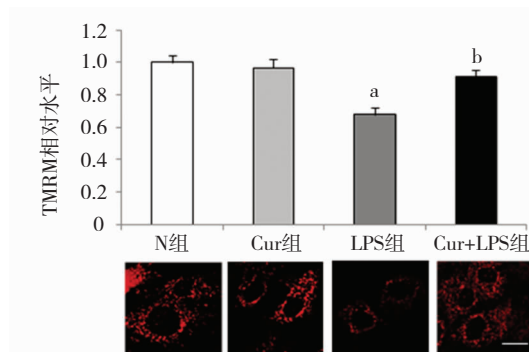


a: 与 N 组比较, $P=0.000$; b: 与 LPS 组比较, $P=0.003$

图4 小鼠成骨细胞 ROS 水平

2.5 小鼠成骨细胞线粒体膜电位水平

当分别使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞, 和 10 μmol/L 姜黄素预处理小鼠成骨细胞 2 h 后, 再使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞, 24 h 后检测成骨细胞线粒体膜电位水平。方差分析 4 组 TMRM 强度的差异具有统计学意义 ($F=9.865, P=0.001$)。两两比较结果显示 1 mg/L LPS 处理 24 h 后, 成骨细胞膜电位明显降低, 而 Cur+LPS 组小鼠成骨细胞线粒体膜电位较单纯 LPS 组有所升高 (0.91 ± 0.04 vs. $0.68 \pm 0.04, P=0.002, n=5$), 如图 5 所示。

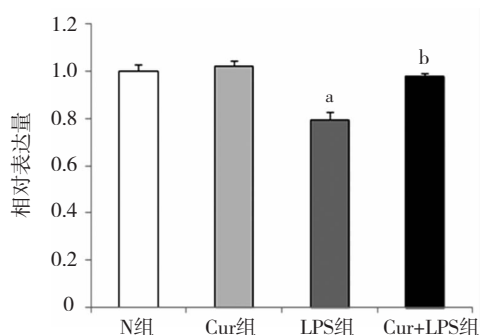


a: 与 N 组比较, $P=0.000$; b: 与 LPS 组比较, $P=0.002$ (标尺 10 μm)

图5 小鼠成骨细胞线粒体膜电位

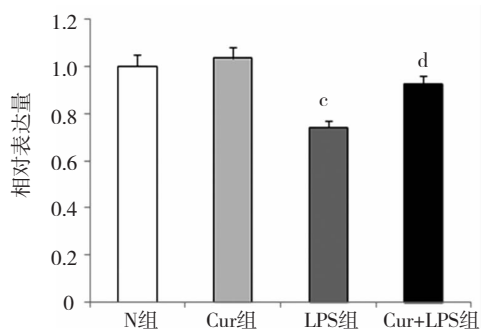
2.6 小鼠成骨细胞线粒体氧化呼吸链复合酶活性

当分别使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞,和 10 μ mol/L 姜黄素预处理小鼠成骨细胞 2 h 后,再使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞,24 h 后检测 LPS 对细胞线粒体氧化呼吸链复合酶活性。方差分析 4 组氧化呼吸链复合酶表达水平的差异具有统计学意义(氧化呼吸链复合酶 I : $F=16.784, P=0.000$;氧化呼吸链复合酶 III : $F=11.057, P=0.000$;氧化呼吸链复合酶 IV : $F=12.779, P=0.000$)。两两比较结果显示 1 mg/L LPS 处理 24 h 后,成骨细胞线粒体氧化呼吸链复合酶 I、III、IV 活性明显降低,而 Cur+LPS 组中,小鼠成骨细胞线粒体氧化呼吸链复合酶 I、III、IV 活性较单纯 LPS 组有所升高,结果分别为氧化呼吸链复合酶 I (0.98 ± 0.02 vs. $0.79 \pm 0.03, P=0.000$),氧化呼吸链复合酶 III (0.93 ± 0.03 vs. $0.74 \pm 0.03, P=0.004$),氧化呼吸链复合酶 IV (0.92 ± 0.05 vs. $0.72 \pm 0.03, P=0.009$),如图 6 所示。



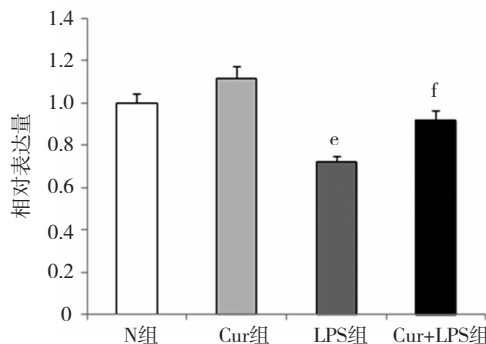
a: 与 N 组比较, $P=0.000$; b: 与 LPS 组比较, $P=0.000$

A. 氧化呼吸链复合酶 I 相对表达量



c: 与 N 组比较, $P=0.000$; d: 与 LPS 组比较, $P=0.004$

B. 氧化呼吸链复合酶 III 相对表达量



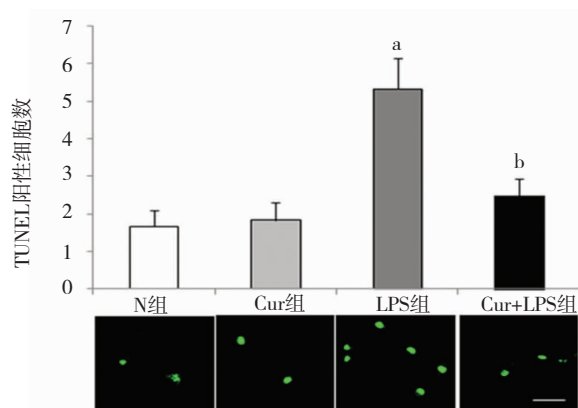
e: 与 N 组比较, $P=0.001$; f: 与 LPS 组比较, $P=0.009$

C. 氧化呼吸链复合酶 IV 相对表达量

图 6 小鼠成骨细胞线粒体氧化呼吸链复合酶 I、III、IV 活性

2.7 小鼠成骨细胞凋亡情况

当分别使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞,和 10 μ mol/L 姜黄素预处理小鼠成骨细胞 2 h 后,再使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞,24 h 后检测 LPS 对成骨细胞凋亡的影响。方差分析 4 组 TUNEL 阳性细胞数的差异有统计学意义 ($F=9.429, P=0.000$)。两两比较结果显示 1 mg/L LPS 处理 24 h 后,成骨细胞凋亡数目明显增加,而 Cur+LPS 组小鼠成骨细胞凋亡数目较单纯 LPS 组明显减少 (2.50 ± 0.43 vs. $5.33 \pm 0.80, P=0.002$),如图 7 所示。

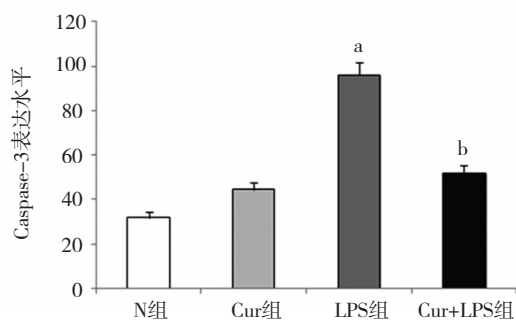


a: 与 N 组比较, $P=0.000$; b: 与 LPS 组比较, $P=0.002$ (标尺 30 μ m)

图 7 小鼠成骨细胞凋亡情况

2.8 小鼠成骨细胞内 Caspase-3 活性

当分别使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞,和 10 μ mol/L 姜黄素预处理小鼠成骨细胞 2 h 后,再使用 1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞,24 h 后检测 LPS 对成骨细胞内 Caspase-3 活性的影响。方差分析 4 组 TMRM 强度的差异有统计学意义 ($F=50.555, P=0.000$)。两两比较结果显示 1 mg/L LPS 处理 24 h 后,成骨细胞内 Caspase-3 活性明显增加,而 Cur+LPS 组小鼠成骨细胞内 Caspase-3 活性较单纯 LPS 组明显减少 (51.84 ± 3.71 vs. $95.94 \pm 5.60, P=0.000, n=5$),如图 8 所示。



a: 与 N 组比较, $P=0.000$; b: 与 LPS 组比较, $P=0.000$

图 8 小鼠成骨细胞内 Caspase-3 活性

3 讨论

LPS 作为 G-菌的主要致病因子,是引发机体炎

症的重要物质。线粒体作为细胞里的重要细胞器,它在细胞的能量代谢、氧自由基的形成和细胞凋亡中起关键作用^[10-12]。本实验发现,1 mg/L LPS 刺激小鼠成骨细胞后可使成骨细胞线粒体功能活性受到抑制,且细胞凋亡数目明显增加。与既往研究发现 LPS 可通过激活 JNK 通路诱导成骨细胞凋亡抑制成骨细胞分化^[5]的结果相似。

细胞凋亡是生物体细胞为维持体内环境的稳定,在基因控制下所产生的自主死亡过程。此过程可受到细胞内多种基因蛋白以及细胞外凋亡因子的调控。现在普遍认为细胞凋亡主要涉及两大凋亡信号转导通路,其一是外源性凋亡途径,主要是依赖死亡受体所形成的复合物,直接活化 Caspase 通路导致细胞凋亡,故该通路也被称为死亡受体介导途径;而另一途径为内源性凋亡通路,由线粒体所介导激活 Caspase 相关蛋白,发生级联放大反应,从而导致细胞内相应底物被降解,致使细胞死亡^[20]。活化的 Caspase-3 是凋亡过程的主要执行者,其由 2 个大亚基(17 kD)和 2 个小亚基(12 kD)组成,可裂解相应的胞浆、胞核底物,最终导致细胞凋亡^[23]。本实验结果显示 1 mg/L LPS 处理使得 TUNEL 阳性细胞数目增多,细胞内 Caspase-3 活性也明显升高,两者结果一致,提示 1 mg/L LPS 处理可刺激小鼠成骨细胞凋亡;而姜黄素的预处理,可明显抑制由 LPS 所致的细胞凋亡。

活性氧是含氧的自由基,是细胞氧化磷酸化过程中氧的代谢副产物,是一类有高度化学反应活性的含氧基团^[12]。在正常情况下,机体内 ROS 的产生和清除处于动态平衡状态,适量的 ROS 可以参与机体免疫和信号的传导^[24-25]。而当机体受到某些应激,会使 ROS 的产生急剧增加,当 ROS 清除体系的能力不足时,造成体内 ROS 蓄积,ROS 易与生物大分子发生反应,可直接损害或通过一系列过氧化链式反应导致细胞结构的破坏,影响机体正常细胞和组织,从而引起多种疾病的发生^[26]。本实验利用线粒体内荧光探针 MitoSox 来测量成骨细胞内 ROS 产生,发现在 1 mg/L LPS 处理细胞 24 h 后,ROS 水平较对照组明显升高,而 ROS 的增加可能会进一步导致线粒体的损伤^[27]。姜黄素来源于姜科植物姜黄的根茎,是一种具有免疫调节、抗炎、抗氧化活性的传统中药,主要通过调节免疫因子、炎症因子、具有氧化活性的酶等及其相关信号通路的传导而发挥效应^[28]。

10 μ mol/L 姜黄素预处理可以在一定程度上抑制 LPS 刺激所致的成骨细胞内 ROS 过量形成,从而避免了细胞损伤的发生,使成骨细胞凋亡数目减少,而由 ROS 所参与介导的细胞信号通路等具体分子机制还需进一步研究。

由于线粒体内膜上氧化呼吸链的存在,可使内膜两侧质子不均匀分布而产生质子梯度,形成线粒体膜内负外正的电位差。线粒体膜电位是维护线粒体内外物质平衡,保持线粒体功能正常活动所必需的。亲脂性阳离子染料 TMRM 可以通过线粒体膜结构进入线粒体内,并且 TMRM 进入量与线粒体膜电位呈正比。同时,300 nmol/L TMRM 相对毒性更小,不会影响线粒体代谢,与线粒体膜电位高度相关,适合用于做线粒体膜电位的定量分析^[29]。1 mg/L LPS 处理 24 h 后,小鼠成骨细胞线粒体膜电位明显下降,这可能是由于 LPS 的刺激所致成骨细胞内 ROS 平衡状态的破坏,从而影响线粒体正常的功能活性。而姜黄素预处理可明显抑制由 LPS 所致的线粒体膜电位的改变,维持相对正常水平的线粒体膜电位对细胞功能活性及凋亡有着重要意义。

线粒体的氧化呼吸链位于线粒体内膜上,有 4 个分子量很大的跨膜蛋白复合体(线粒体呼吸链膜蛋白复合体 I、II、III 和 IV)、介于 I/II 与 III 之间的泛醌以及介于 III 与 IV 之间的细胞色素 C 共同组成。在线粒体呼吸链的电子传递过程中,电子的化学位能被复合体 I、III、IV 所利用,将基质中的质子泵到膜间隙中,从而将能量储存在线粒体内膜两侧的质子电化学势梯度中,最后质子通过 ATPase 回到基质中,其电化学势能被用来合成 ATP 分子。本实验通过经典方法^[20-21]测量了小鼠成骨细胞线粒体氧化呼吸链酶复合体 I、III 和 IV 的活性,以及细胞内 ATP 合成情况。经过 24 h 1 mg/L LPS 处理,3 种酶复合体的活性均明显下降,受到不同程度的抑制。故线粒体的氧化呼吸功能在一定程度上受到 LPS 刺激的限制,ATP 合成水平的下降也导致细胞内供能不足,从而引起细胞凋亡数目增加。而姜黄素预处理可明显拮抗 LPS 对线粒体氧化呼吸链酶活性的抑制,对线粒体发挥正常的氧化呼吸功能及 ATP 合成起到了一定的促进作用。本研究从线粒体相关角度出发,探讨了姜黄素的使用可改善 LPS 诱导成骨细胞所产生的氧化应激及对细胞功能活性的抑制作用,能抑制 LPS 刺激引起的成骨细胞凋亡,进而增加成

骨细胞的功能活性及数目,减少骨破坏的发生,为姜黄素可能被进一步应用于临床治疗慢性牙周炎提供一定的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11 (3): 234–250.
- [2] Smith M, Seymour GJ, Cullinan MP. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis[J]. *Periodontol* 2000, 2010, 53: 45–54.
- [3] Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, et al. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervations[J]. *J Clin Periodontol*, 2004, 31 (8): 596–603.
- [4] Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, et al. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease[J]. *Periodontol* 2000, 2007, 43: 65–84.
- [5] Guo C, Yuan L, Wang JG, et al. Lipopolysaccharide (LPS) induces the apoptosis and inhibits osteoblast differentiation through JNK pathway in MC3T3-E1 cells[J]. *Inflammation*, 2014, 37 (2): 621–631.
- [6] Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease?[J]. *J Periodontol*, 2014, 85 (10): 1432–1441.
- [7] Nibali L, Donos N. Periodontitis and redox status: a review[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19 (15): 2687–2697.
- [8] Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction?[J]. *Periodontol* 2000, 2014, 64 (1): 139–153.
- [9] Masi S, Salpea KD, Li K, et al. Oxidative stress, chronic inflammation, and telomere length in patients with periodontitis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50 (6): 730–735.
- [10] Lane N. Mitochondrial disease: powerhouse of disease[J]. *Nature*, 2006, 440 (7084): 600–602.
- [11] Li G, Wang M, Hao L, et al. Angiotensin II induces mitochondrial dysfunction and promotes apoptosis via JNK signalling pathway in primary mouse calvaria osteoblast[J]. *Arch Oral Biol*, 2014, 59 (5): 513–523.
- [12] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain[J]. *J Neurochem*, 2002, 80 (5): 780–787.
- [13] Kant V, Gopal A, Pathak NN, et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20 (2): 322–330.
- [14] Huang G, Xu Z, Huang Y, et al. Curcumin protects against collagen-induced arthritis via suppression of BAFF production[J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33 (3): 550–557.
- [15] Chen D, Nie M, Fan MW, et al. Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Pharmacology*, 2008, 82 (4): 264–269.
- [16] Gu Y, Lee HM, Napolitano N, et al. 4-methoxycarbonyl curcumin: a unique inhibitor of both inflammatory mediators and periodontal inflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 329740.
- [17] Hosadurga RR, Rao SN, Jose J, et al. Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis[J]. *Pharmacognosy Res*, 2014, 6 (4): 326–333.
- [18] Guo L, Wang M, Zhang ZY, et al. Angiotensin II induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts through ERK1/2 pathway via AT1 receptor[J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56 (3): 205–211.
- [19] Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, et al. Biochemical assays of respiratory chain complex activity[J]. *Methods Cell Biol*, 2007, 80: 93–119.
- [20] Chambers JW, LoGrasso PV. Mitochondrial c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling initiates physiological changes resulting in amplification of reactive oxygen species generation[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (18): 16052–16062.
- [21] Tieu K, Perier C, Caspersen C, et al. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112 (6): 892–901.
- [22] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35 (4): 495–516.
- [23] Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5 (6): a008672.
- [24] Williams MS, Kwon J. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37 (8): 1144–1151.
- [25] Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79 (4): 829–843.
- [26] Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa[J]. *Fertil Steril*, 2000, 74 (6): 1200–1207.
- [27] Zemke D, Smith JL, Reeves MJ, et al. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview[J]. *Neurotoxicology*, 2004, 25 (6): 895–904.
- [28] Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin[J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12 (3): 332–347.
- [29] Iijima T. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death[J]. *Neurosci Res*, 2006, 55 (3): 234–243.

(责任编辑: 张辉洁)