DOI:10.16016/j.2097-0927.202204215

高糖及巨噬细胞共培养对成骨细胞氧化应激及自噬的影响

何忻宜,明 叶,谭 浩,赵振兴,敬 劲,孟雪欢,李 想,郑雷蕾 401145 重庆,重庆医科大学附属口腔医院,口腔疾病与生物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

[摘要] **目的** 探讨在高糖环境下,与巨噬细胞 Raw264.7 共培养的成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激、自噬及细胞凋亡的变化。**方法** ①根据培养基的葡萄糖浓度将 Raw264.7 细胞分为 25、30、35 mmol/L 3 组,流式细胞术检测细胞 CD86 表达;RT-qPCR 检测 *IL*-6、*TNF*-α、*iNOS*、*NOX*2、*p*47*phox* 的 mRNA 表达水平,Western blot 检测 iNOS 的蛋白表达水平,DCFH-DA 探针检测 ROS 水平。②MC3T3-E1 细胞分为正常糖单独培养组(5.5 mmol/L 葡萄糖浓度,5.5-Mono 组)、高糖单独培养组(35 mmol/L 葡萄糖浓度,35-Mono 组)和高糖共培养组(与 Raw264.7 细胞共培养 24 h,35-Co 组)3 组,DCFH-DA 探针检测 MC3T3-E1 细胞 ROS 水平;透射电镜、Western blot 检测 MC3T3-E1 细胞自噬水平;流式细胞术检测 MC3T3-E1 细胞凋亡水平。**结果** 高糖下 Raw264.7 细胞表面标志 CD86 表达增加,与 25 mmol/L 组相比,35 mmol/L 组 *IL*-6、*TNF*-α、*iNOS* 的 mRNA 表达水平显著增加($P<0.05$),iNOS 蛋白表达水平显著增加($P<0.05$),ROS 水平增加,*NOX*2、*p*47*phox* 的 mRNA 表达水平显著增加($P<0.05$);与 5.5-Mono 组相比,35-Mono、35-Co 组 MC3T3-E1 细胞 ROS 均增加且 35-Co 组增加更明显,透射电镜显示 35-Co 组自噬溶酶体数量明显增加,35-Co 组 MC3T3-E1 细胞中 LC3-II 及 SQSTM1/p62 的蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),35-Co 组的 MC3T3-E1 细胞凋亡率较 35-Mono 组明显升高($P<0.05$)。**结论** 与高糖下 M1 向极化的 Raw264.7 细胞共培养会诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡,该作用可能与 MC3T3-E1 细胞胞内 ROS 增加和自噬过强有关。

[关键词] 高血糖;巨噬细胞极化;共培养;氧化应激;细胞自噬

[中图法分类号] R322.71; R329.25; R363.272 [文献标志码] A

Effects of hyperglycemia and macrophage co-culture on oxidative stress and autophagy in osteoblasts

HE Xinyi, MING Ye, TAN Hao, ZHAO Zhenxing, JING Jing, MENG Xuehuan, LI Xiang, ZHENG Leilei
Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Science, Chongqing Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401145, China

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effects of high glucose on oxidative stress, autophagy, and apoptosis in MC3T3-E1 cells co-cultured with Raw264.7 cells. **Methods** ①Raw264.7 cells were separated into 3 groups based on the glucose levels in the medium (25, 30, and 35 mmol/L). Flow cytometry was used to detect CD86 expression. RT-qPCR was employed to detect the mRNA expression levels of *IL*-6, *TNF*-α, *iNOS*, *NOX*2, and *p*47*phox* in Raw264.7 cells. Western blotting was used to detect the protein expression level of iNOS. The DCFH-DA probe was used to measure the level of reactive oxygen species (ROS) in Raw264.7 cells. ②MC3T3-E1 cells were divided into 3 groups: normal glucose group (5.5 mmol/L glucose, 5.5-Mono), high glucose mono-culture group (35 mmol/L glucose, 35-Mono) and high glucose co-culture group (co-cultured with Raw264.7 for 24 h, 35-Co). The ROS level of MC3T3-E1 cells were detected by

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470772);重庆英才计划创新领军人才(CQYC20210303384);重庆市自然科学基金项目(cstc2020jcyj-msxmX0307)

[通信作者] 郑雷蕾,E-mail:zhengleileicqmu@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

DCFH-DA probe. The autophagic level was assessed by transmission electron microscopy (TEM) and the expression of related proteins was detected with Western blotting. Flow cytometry was applied to determine the rate of apoptosis. **Results** Compared with the normal glucose group, the expression level of CD86 in Raw 264.7 cells was increased in other high glucose groups. Compared with the 25 mmol/L group, the mRNA levels of *IL*-6, *TNF*-α, *iNOS*, *NOX*2, and *p*47*phox* were increased ($P<0.05$), the protein level of iNOS was elevated ($P<0.05$) and the ROS level in the Raw264.7 cells was raised in the 35mmol/L group as well. Compared with the normal glucose group, the ROS level of MC3T3-E1 cells in the high glucose groups was increased, especially in high glucose co-culture group. The number of autophagolysosomes in the MC3T3-E1 cells were increased sharply in the high glucose co-culture group. The protein levels of LC3-II and SQSTM1/p62 in MC3T3-E1 cells were increased significantly in the high glucose co-culture group ($P<0.05$). The apoptotic rate of MC3T3-E1 cells was significantly higher in the high glucose co-culture group than the high glucose mono-culture group ($P<0.05$). **Conclusion** Co-culture with M1-polarized Raw264.7 cells under high glucose induces apoptosis in MC3T3-E1 cells, which may be related to the production of ROS and over-enhancement of autophagy in MC3T3-E1 cells.

[**Key words**] hyperglycemia; macrophage polarization; co-culture; oxidative stress; autophagy

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81470772), the Innovative Leading Talents of Chongqing Talent Program (CQYC20210303384), and the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0307). Corresponding author: ZHENG Leilei, E-mail: zhengleileicqmu@hospital.cqmu.edu.cn

高血糖是许多疾病的危险因素,包括缺血性心血管损伤[1]、肾脏疾病[2]和败血症[3],同时也被视为糖尿病患者骨改建不良的主要危险因素[4-5]。骨改建过程一般是指在力的作用下发生的一个成破骨动态循环过程,包括了骨吸收和骨形成,而成骨细胞和破骨细胞在其中发挥主要调节作用[6]。正常情况下,成骨与破骨的动态平衡是正畸治疗中牙齿发生移位的生理基础。在高糖环境下,巨噬细胞作为先天免疫细胞,首先被激活并到达骨改建区发挥免疫作用,分泌大量炎症因子[7-8]。根据活化状态、细胞表型及功能差异,巨噬细胞分为 M1 和 M2 型巨噬细胞,M1 型巨噬细胞在炎症早期浸润,其释放的炎性介质或细胞因子可发挥破骨细胞分化的第二信使作用;M2 型巨噬细胞则在减轻炎症、减弱抗原呈递、促进组织愈合等过程中发挥重要功能,同时释放如 BMP-2、TGF-β 和 IGF-1 等细胞因子促进骨髓间充质干细胞成骨分化[9-10]。在骨改建过程中,成骨细胞功能受到巨噬细胞的调控[11],当成骨细胞发生功能障碍时,将导致成破骨状态失衡,骨改建不良甚至失败[12]。氧化应激被认为是导致成骨细胞功能障碍的原因[13]。氧化应激是指因为活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的产生与清除之间失衡而导致细胞器、蛋白、脂质等受到氧化损伤[14]。ROS 是机体产生的诱导体内发生氧化应激的一组物质,主要包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基(·HO)[15],在决定细胞命运中发挥重要作用。目前对高糖环境下骨改建过程的研究较少,高糖环境对成骨细胞氧化应激的影响及巨噬细胞在其中发挥的作用仍不清楚。因此,本研究将采用 Transwell 细胞间接共培养技术探究高糖环境下巨噬细胞对成骨细胞氧化应激、自噬及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 和小鼠单核巨噬细胞系 Raw264.7 来源于美国 ATCC 公司;胎牛血清(FBS)购自阿根廷 Natcor 公司;Transwell 细胞小室购自美国 Millipore 公司;α-MEM 培养基购自美国 Gibco 公司;ROS 检测试剂盒和 ECL 化学发光法检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司;TRIzol Regent 购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司;LC3 Rabbit mAb 购自美国 Cell Signalin Technology 公司;SQSTM1/p62 Rabbit mAb 购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将前成骨细胞 MC3T3-E1 和小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7 分别置于含有 10%胎牛血清和 1%双抗的 α-MEM 培养基中,在 37 ℃、5%CO_2 的细胞培养箱中培养。当 MC3T3-E1 增殖到密度为 80%左右,用 0.25%胰酶消化 2 min 后终止消化,并吹打、离心后去除上清,用 3 mL α 完全培养基重悬沉淀并以

1∶3的比例进行传代培养,Raw264.7 吹打离心后去除上清,用 3 mL α 完全培养基重悬细胞并以 1∶3比例进行传代培养。

1.2.2　高糖对 Raw264.7 细胞 M1 表面抗原标志 CD86 表达的影响　　将 Raw264.7 细胞分别培养于含葡萄糖浓度为 25、30、35 mmol/L 的细胞培养基中培养 24 h,其中 5.5 mmol/L 作为阴性对照。24 h 后去除培养基并用 PBS 洗 2 次,用含 3%FBS 的 PBS 吹打并将细胞收集至 15 mL 离心管中,150×*g* 离心 5 min,收集细胞沉淀,去除上清并用 1 mL 含 3%FBS 的 PBS 重悬细胞并计数,取 1×10^6 个细胞于 1.5 mL EP 管中,以 500×*g* 离心 5 min,去除上清,每管加入 100 μL 含 3% FBS 和 1%抗 CD86-PE 的 PBS 重悬细胞,避光,4 ℃摇床孵育 30 min,每 5 min 重悬一次,孵育完成后 500×*g* 离心 5 min 去除上清,用含 3%FBS 的 PBS 清洗 3 次后并用筛网将细胞悬液过滤至流式细胞管,上机检测,结果用 FlowJo.v10 软件进行作图分析。

1.2.3　不同葡萄糖浓度对 Raw264.7 细胞 *TNF-α*、*IL-6*、*iNOS*、*NOX2*、*p47phox* mRNA 表达的 RT-qPCR 检测　　将 Raw264.7 细胞分别培养于含葡萄糖浓度为 25、30、35 mmol/L 的细胞培养基中培养 24 h。24 h 后采用 TRIzol 试剂提取各组细胞的 RNA,用 Promega 反转录试剂盒反转录 RNA 为 cDNA,以 *GAPDH* 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因表达水平。相关基因 *TNF-α*、*IL-6*、*iNOS*、*NOX2*、*p47phox* 的上下游引物序列来源于 NCBI,引物序列使用生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

1.2.4　不同葡萄糖浓度对 Raw264.7 细胞 iNOS 表达的蛋白检测　　去除培养基,将培养于 25、30、35 mmol/L 葡萄糖浓度的 Raw264.7 细胞用冰冷的 PBS 清洗 2 遍,用含有 PMSF 的 RIPA 裂解细胞,进行 BCA 蛋白定量检测并按 4∶1的比例加入 5× Loading Buffer 后 100 ℃煮沸 5 min。加入各组蛋白样品进行凝胶电泳,转膜,封闭,一抗 4 ℃孵育过夜,TBST 清洗 3 遍后二抗常温孵育 2 h,TBST 清洗 3 遍后采用 ECL 化学发光显影液进行显影,通过 Image J 软件进行目的蛋白半定量分析。

1.2.5　细胞 ROS 检测　　细胞 ROS 含量用 DCFH-DA 法测定,将 DCFH-DA 探针加入不含血清的培养基中,达到终浓度为 10 μmol/L,并以换液的方式加入至不同葡萄糖浓度培养的 Raw264.7(25、30、35 mmol/L 葡萄糖浓度)或 MC3T3-E1(5.5、35 mmol/L 葡萄糖浓度)细胞中,37℃细胞培养箱内孵育 30 min 后用不含血清的培养基清洗 3 次,每次 5 min。通过荧光显微镜记录荧光图片。

1.2.6　高糖共培养体系的建立　　采用 Transwell 间接共培养技术模拟细胞的旁分泌过程,即将两种细胞分别接种于上室和下室,细胞之间不直接接触,但仍可通过细胞分泌的细胞因子等物质进行信息交流。本实验将 Raw264.7 细胞置于 6 孔板中细胞上室,MC3T3-E1 细胞置于 6 孔板中细胞下室,采用含有 35 mmol/L 葡萄糖的培养基在 37 ℃、5%CO_2 的细胞培养箱中进行间接共培养(图 1),共培养 24 h 后进行后续实验,后续实验分为正常糖单独培养组(5.5-Mono 组)、高糖单独培养组(35-Mono 组)、高糖共培养组(35-Co 组)3 组。

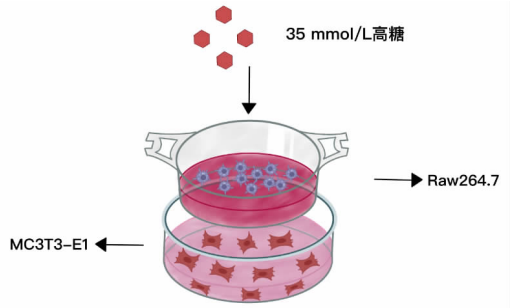


图 1　Transwell 间接共培养体系示意图

1.2.7　高糖共培养下 MC3T3-E1 细胞透射电镜检测　　去除 Transwell 细胞上室及 Raw264.7 细胞,将下室的 MC3T3-E1 细胞用 PBS 清洗后以 0.25%的胰酶消化 1 min 使细胞形成单个细胞后用 PBS 缓冲液以 120×*g* 离心 5 min,离心管底部形成松散团块,保留 1.5 mL 上清液,吸弃余下上清,重新将团块吹散后转移至 1.5 mL EP 管内并以 120×*g* 离心 10 min,EP 管底部形成细胞团块,吸弃上清并沿管壁缓慢加入戊二醛固定液,送电镜室观察。

表 1　RT-qPCR 引物序列

基因	正义(5′→3′)	反义(3′→5′)
IL-6	CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGAC	AGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCTC
TNF-α	GCGACGTGGAACTGGCAGAAG	GCCACAAGCAGGAATGAGAAGAGG
iNOS	ACTCAGCCAAGCCCTCACCTAC	TCCAATCTCTGCCTATCCGTCTCG
NOX2	GAAGACAACTGGACAGGAACCTCAC	AAATCCCGACTCTGGCATTCACAC
p47phox	GCGAAGAAGCCTGAGACATACCTG	AACTCTTCTCGTAGTCAGCAATGGC
GAPDH	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

1.2.8　高糖共培养下 MC3T3-E1 细胞 LC3、SQSTM1/p62 的蛋白检测　去除 Transwell 细胞上室及 Raw264.7 细胞,将下室的 MC3T3-E1 细胞用冰冷的 PBS 清洗 2 遍,用含有 PMSF 的 RIPA 裂解细胞,进行 BCA 蛋白定量检测,并按 4∶1的比例加入 5×Loading Buffer 后 100 ℃煮沸 5 min。上样后进行凝胶电泳、转膜、封闭,一抗 4 ℃孵育过夜,TBST 清洗 3 遍后加二抗常温孵育 2 h,TBST 清洗 3 遍后采用 ECL 化学发光显影液进行显影,蛋白堆积量为加入自噬抑制剂 Bafilomycin A1 前后蛋白表达量的差值。通过 Image J 软件进行目的蛋白半定量分析。

1.2.9　流式细胞术检测高糖共培养下 MC3T3-E1 细胞凋亡　去除 Transwell 细胞上室,将下室的 MC3T3-E1 细胞用 PBS 清洗后以 0.25%的胰酶消化 1min 使细胞形成单个细胞后用 PBS 缓冲液以 150×*g* 离心 5 min,去除上清,重复 2 次后取至少 1×10^6 个细胞并用 400 μL PBS 重悬,加入荧光探针 Annexin V 和 PI 双重标记细胞,利用流式细胞仪快速检测细胞凋亡水平,结果用 FlowJo.v10 软件进行作图分析。

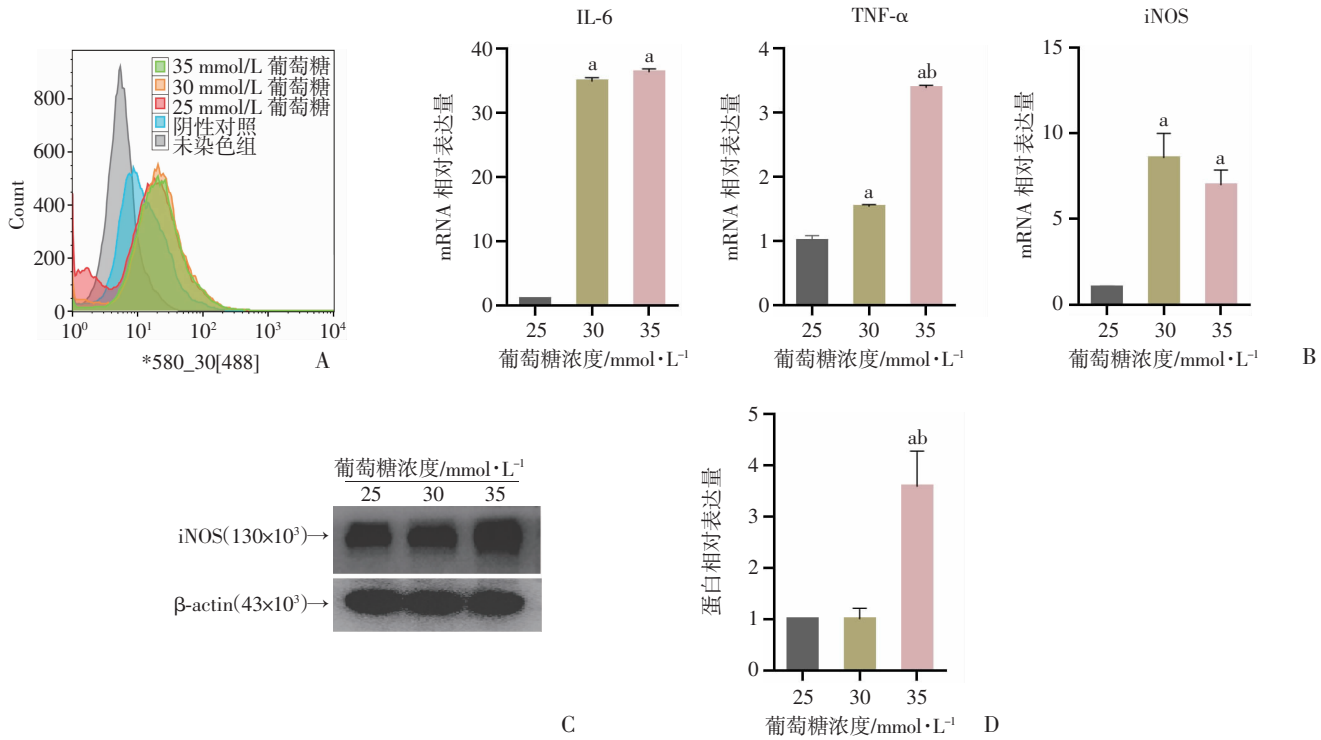
1.3　统计学分析

数据的统计均采用 3 组样本取平均值,RT-qPCR 数据用 BioRadCFXmanager 记录,Western blot 数据用 Bio-Rad, cat#12003154 记录,流式数据用 FlowJo.v10 记录,均采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　高糖促进 Raw264.7 细胞 M1 型极化

为探究高糖是否会激活 Raw264.7 细胞并导致其 M1 向极化,对 M1 型巨噬细胞表面标志抗原 CD86 进行流式细胞表面抗原检测,结果发现相比于正常糖浓度组,高糖环境下,CD86 阳性的 Raw264.7 细胞明显增加(图 2A),表明高糖促进 Raw264.7 细胞 M1 向极化。为进一步明确 M1 向极化的 Raw264.7 细胞在何种高糖浓度下产生最明显的促炎效应,采用 RT-qPCR 及 Western blot 技术检测促炎因子 *IL-6*、*TNF-α*、*iNOS* 基因及蛋白表达,RT-qPCR 结果显示 30、35 mmol/L 高糖浓度下 Raw264.7 细胞促炎因子的 mRNA 表达显著高于 25 mmol/L 组($P<0.05$,图 2B)。Western blot 结果显示 35 mmol/L 高糖浓度下 iNOS 蛋白表达显著高于 25 mmol/L 组及 30 mmol/L 组($P<0.05$,图 2C、D)。上述研究结果提示高糖促进 Raw264.7 细胞 M1 向极化,且 35 mmol/L 高糖浓度下 Raw264.7 产生促炎效应最明显。



a:$P<0.05$,与 25 mmol/L 组比较;b:$P<0.05$,与 30 mmol/L 组比较

A:流式细胞术检测各组细胞 CD86 表达　5.5 mmol/L 作为对照组;B:RT-qPCR 检测 M1 极化相关促炎因子基因表达;C:Western blot 检测 iNOS 蛋白表达;D:iNOS 蛋白表达半定量分析

图 2　Raw264.7 细胞 CD86 流式细胞检测,*IL-6*、*TNF-α* 和 *iNOS* 的 RT-qPCR 及 iNOS 的 Western blot 检测　($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.2　高糖促进 Raw264.7 细胞产生氧化应激

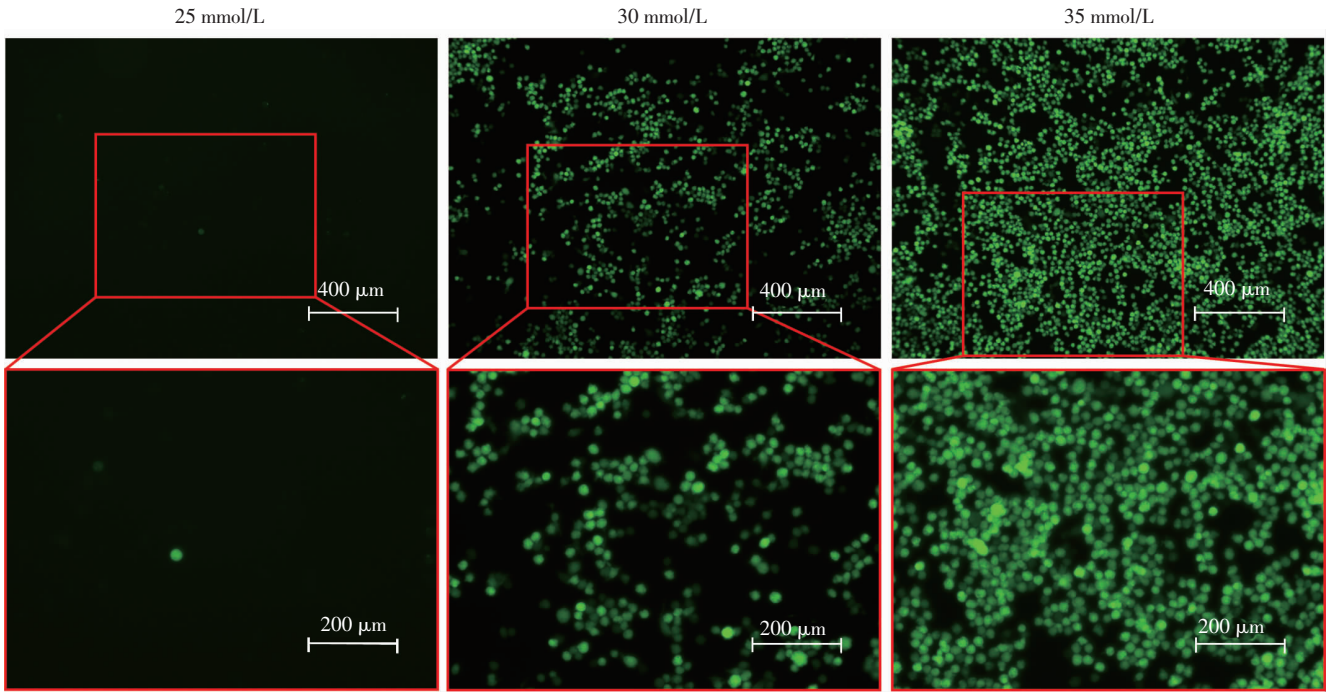
为探究不同葡萄糖浓度对 Raw264.7 细胞 ROS 产生、氧化应激相关基因表达的影响,采用 DCFH-DA 探针检测胞内 ROS 水平,并采用 RT-qPCR 对相关基因进行检测。DCFH-DA 探针的荧光结果显示,高糖环境促进 Raw264.7 胞内 ROS 产生,且呈浓度依赖性,在 35 mmol/L 高糖浓度下 ROS 产生最多(图 3A)。RT-qPCR 结果显示,高糖环境下 Raw264.7 细胞氧化应激相关基因表达明显增加,且在 35 mmol/L 高糖环境下增加最明显(图 3B),差异有统计学意义($P<0.05$),表明 35 mmol/L 高糖环境显著促进 Raw264.7 细胞氧化应激。

2.3　高糖共培养条件下 MC3T3-E1 胞内 ROS 增加

为探究各组 MC3T3-E1 细胞氧化应激水平,采用 DCFH-DA 探针检测 MC3T3-E1 细胞胞内 ROS。荧光结果显示,与正常糖浓度相比,在 35 mmol/L 高糖环境下,MC3T3-E1 细胞产生较多 ROS,且与 Raw264.7 细胞共培养下 MC3T3-E1 细胞产生 ROS 更多,荧光最强(图 4),提示高糖共培养刺激 MC3T3-E1 细胞产生氧化应激。

2.4　透射电镜结果

为进一步探究高糖共培养环境下 MC3T3-E1 细胞及细胞器形态学改变,本研究采用透射电镜观察高糖单独培养或与 Raw264.7 细胞高糖间接共培养中 MC3T3-E1 细胞及其细胞器形态。结果显示,35-Mono 组的 MC3T3-E1 胞内出现线粒体肿胀,线粒体部分溶解的现象,35-Co 组的 MC3T3-E1 胞内线粒体未见明显肿胀,但可见较多自噬溶酶体形成(图 5)。



A:荧光显微镜检测不同糖浓度下 Raw264.7 细胞 ROS 水平;B:RT-qPCR 检测 *NOX2*、*p47phox* 基因表达($n=3$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与 25 mmol/L 组比较

图 3　Raw264.7 细胞 ROS 检测及 *NOX2*、*p47phox* 的 RT-qPCR 检测

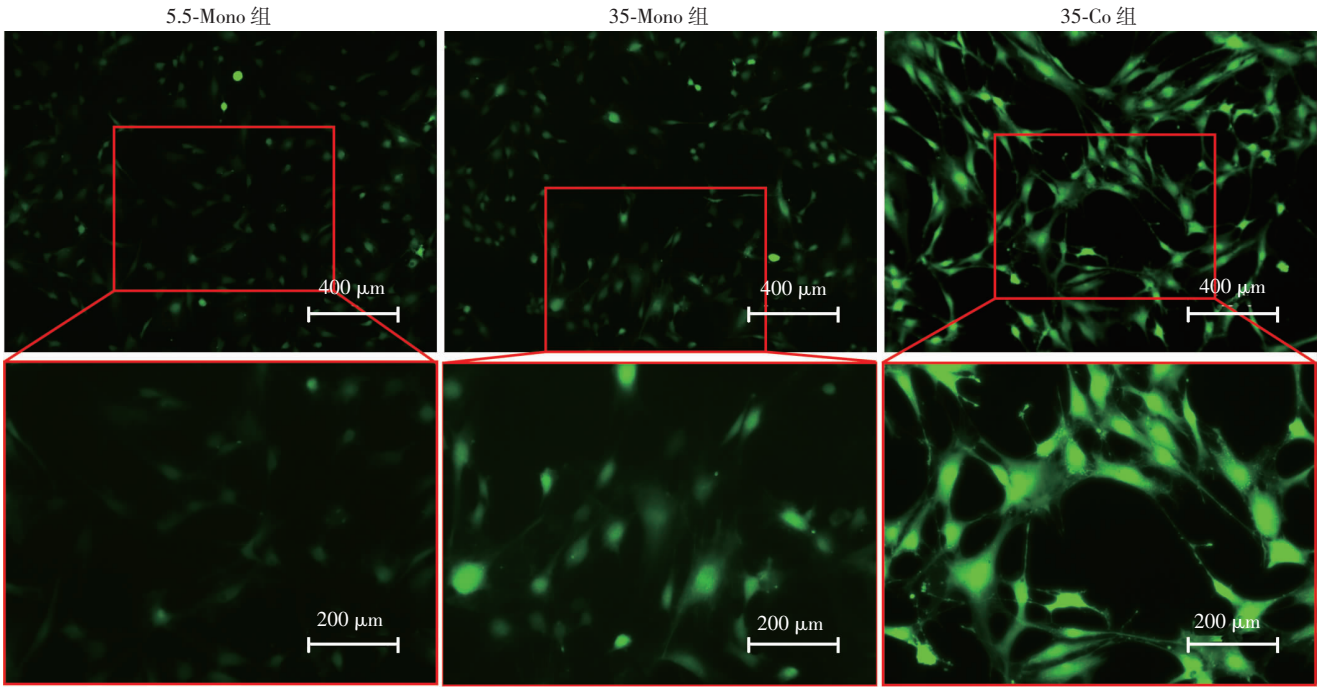
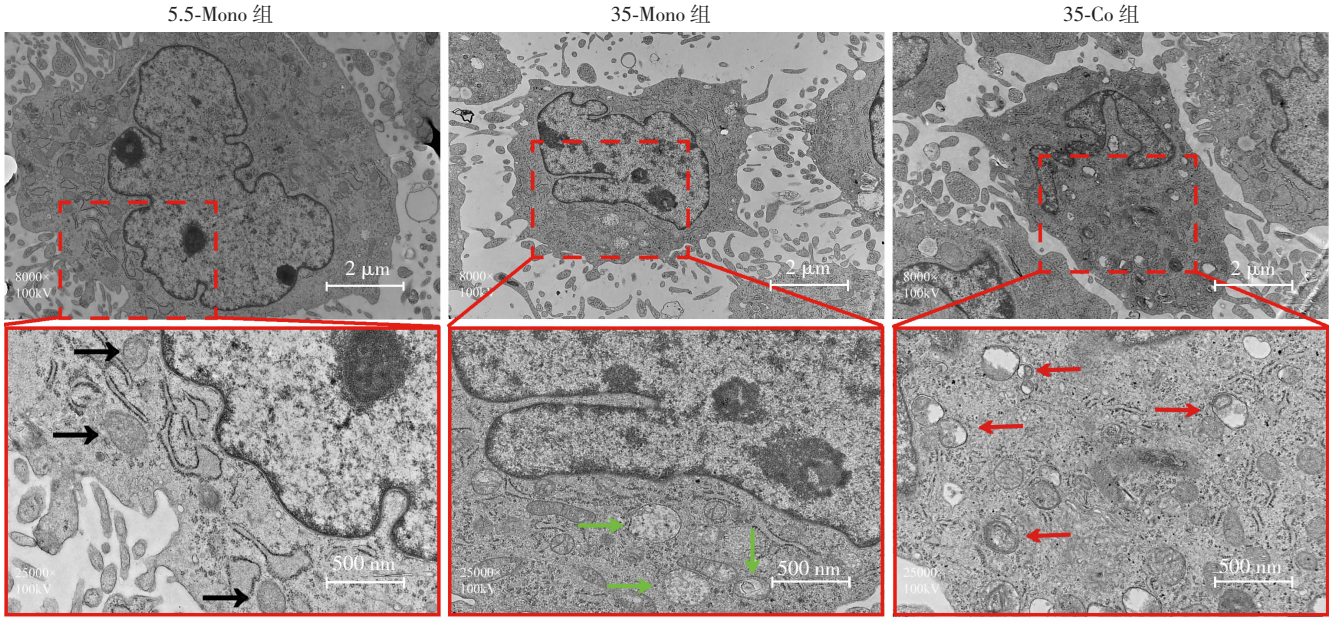


图 4 荧光显微镜检测各组 MC3T3-E1 细胞 ROS 水平



黑色箭头示正常线粒体;绿色箭头示肿胀线粒体;红色箭头示自噬溶酶体

图 5 透射电镜观察与 Raw264.7 细胞高糖共培养下 MC3T3-E1 细胞线粒体及自噬溶酶体的形态

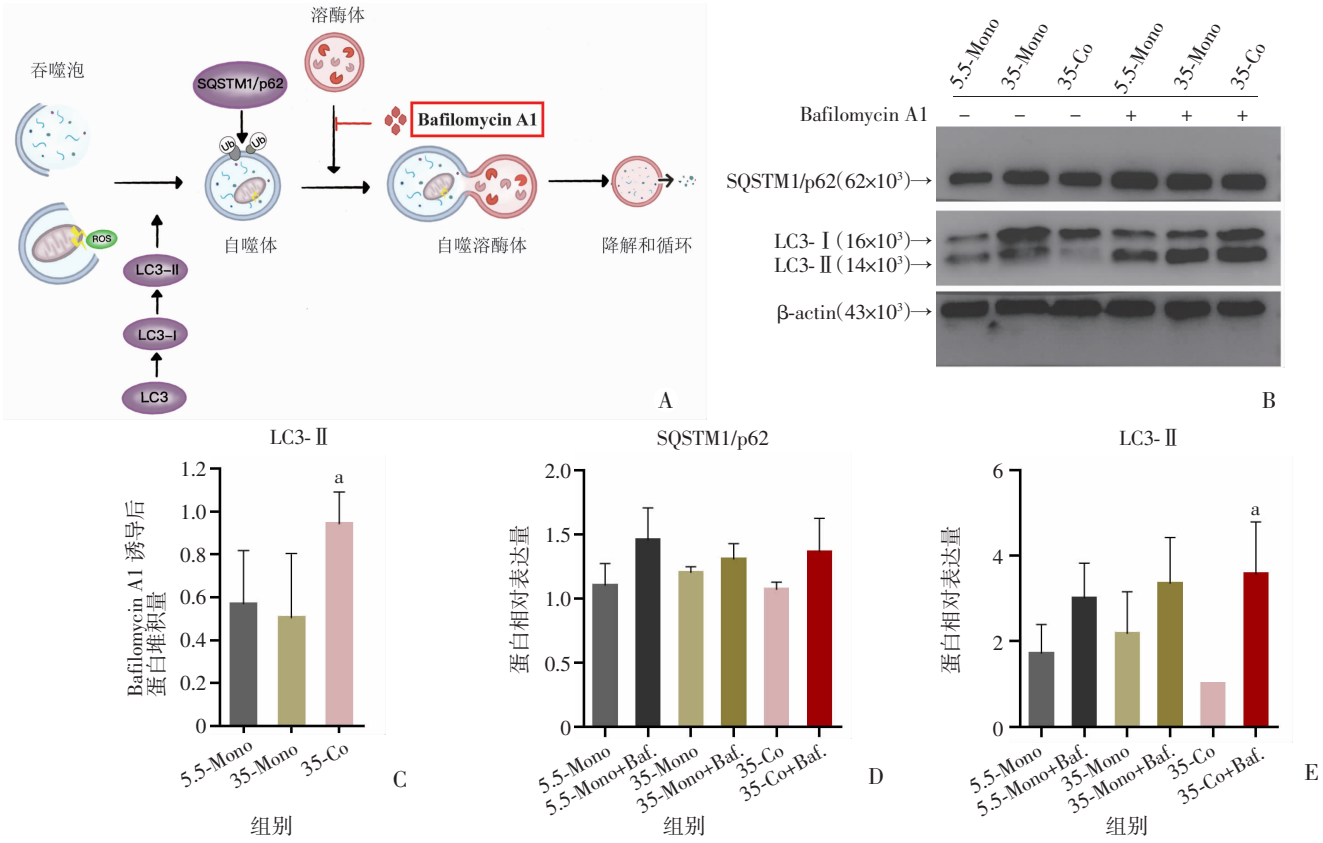
2.5 高糖共培养促进 MC3T3-E1 细胞自噬相关蛋白表达

为探究在高糖环境下,与 Raw264.7 细胞共培养的 MC3T3-E1 胞内自噬流是否有改变,采用自噬抑制剂 Bafilomycin A1 分别将 3 组 MC3T3-E1 细胞的自噬流阻断,LC3 合成后在羧基末端迅速裂解产生 LC3-Ⅰ,在自噬过程中 LC3-Ⅰ被脂质化为 LC3-Ⅱ,从而将 LC3 与自噬小泡结合,与 SQSTM1/p62 一起形成自噬体,而 Bafilomycin A1 阻断后自噬体无法与溶酶体融合降解(图 6A),进而 LC3-Ⅱ及 SQSTM1/p62 等自噬相关蛋白会堆积,根据阻断后 LC3-Ⅱ及 SQSTM1/p62 堆积的多少可以判断自噬流的强弱。根据 Western blot 检测 MC3T3-E1 细胞自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ及 SQSTM1/p62 表达的结果显示,在未加入 Bafilomycin A1 的 3 组中,35-Co 组 MC3T3-E1 细胞的 LC3-Ⅱ最少,但加入 Bafilomycin A1 将自噬流阻断后,可以发现 35-Co 组

MC3T3-E1 细胞的 LC3-Ⅱ堆积最为明显,即加入自噬抑制剂 Bafilomycin A1 前后 LC3-Ⅱ蛋白表达量的差值最大,自噬流明显强于单独培养组(图 6B、C),且差异有统计学意义($P<0.05$)。

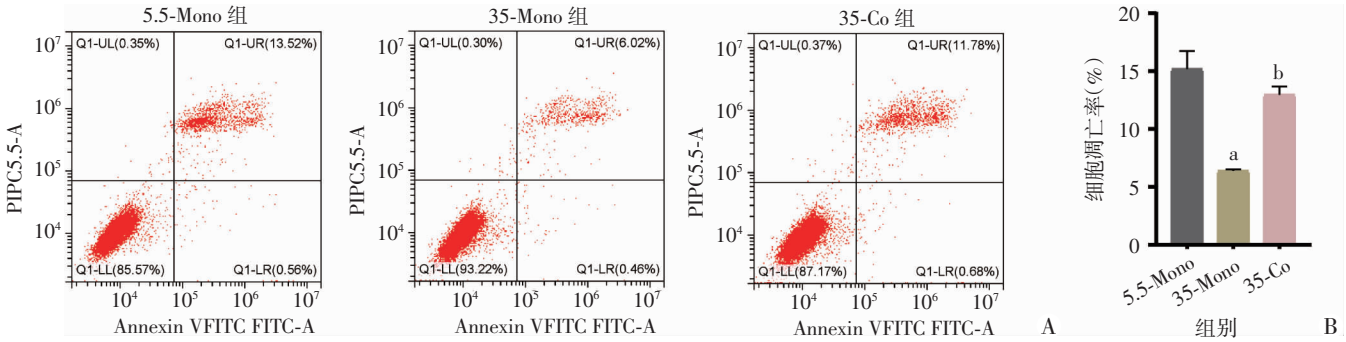
2.6　高糖共培养条件减少 MC3T3-E1 细胞凋亡

为了探讨在高糖环境下,与 Raw264.7 细胞共培养的 MC3T3-E1 细胞 ROS 及自噬的增加是否影响其凋亡,通过流式细胞仪分析 3 组 MC3T3-E1 细胞的凋亡率。结果显示,在 35 mmol/L 高糖环境下,与 Raw264.7 共培养的 MC3T3-E1 细胞(35-Co 组)的凋亡率较高糖单独培养(35-Mono 组)明显增加($P<0.05$,图 7),表明高糖共培养促进 MC3T3-E1 细胞凋亡。



A:自噬过程示意图;B:Western blot 检测各组相关蛋白表达;C:经 Bafilomycin A1 阻断前后各组 LC3-Ⅱ蛋白堆积量差值半定量分析　a:$P<0.05$,与 35-Mono 组比较;D:各组 SQSTM1/p62 蛋白半定量分析;E:各组 LC3-Ⅱ蛋白半定量分析　a:$P<0.05$,与 35-Co 组比较

图 6　与 Raw264.7 细胞高糖共培养对 MC3T3-E1 细胞 LC3-Ⅱ及 SQSTM1/p62 蛋白表达的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:流式细胞术检测 MC3T3-E1 细胞凋亡;B:各组 MC3T3-E1 细胞凋亡率　a:$P<0.05$,与 5.5-Mono 组比较;b:$P<0.05$,与 35-Mono 组比较

图 7　高糖共培养对 MC3T3-E1 凋亡的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

3.1 高糖与骨改建

糖尿病是一种代谢紊乱,常伴随炎症状态的增加。活性氧的产生和晚期糖基化终产物的积累,会增加骨折风险,干扰骨改建,损害骨折愈合[4],但糖尿病骨改建不良的具体机制仍有待进一步阐明。巨噬细胞作为天然免疫细胞,是最先抵达并作用于牙移动区域的细胞之一[11]。根据其活化状态、细胞表型及功能差异,巨噬细胞分为 M1 和 M2 型巨噬细胞。研究表明,M1 型巨噬细胞分泌炎症介质和细胞因子介导炎症反应的发生,主要供能方式为糖酵解[16],但糖酵解效率难以满足炎性反应的高 ATP 需求,细胞代谢方式由糖酵解转变为氧化磷酸化,M2 型巨噬细胞逐渐代替 M1 型巨噬细胞,炎症将逐步趋于缓和甚至自限[17-18]。但在高糖环境下,过量的葡萄糖导致线粒体电子传递功能被破坏,巨噬细胞无法完成从 M1 到 M2 型的转换,炎症失去自限性,促炎因子、趋化因子和受体被大量表达,进而导致糖尿病患者体内长期处于高氧化应激和炎症状态[19]。有研究表明,高糖还伴随着巨噬细胞胞浆 NADPH 氧化酶(NOX)的异常激活,加剧 ROS 的产生和线粒体功能障碍[20-21]。NOX 是一种多亚基酶复合体,是体内氧化应激的关键酶,也是巨噬细胞中 ROS 的主要来源之一[22]。NOX 蛋白存在于胞膜上,本身几乎没有催化活性,其需要与多种调节亚基(p40phox、p47phox、p66phox 等)结合形成复合物而发挥催化作用,在血红素等辅基的协助下将电子从基质转移至氧分子,形成 ROS。本研究证实高糖促进 Raw264.7 细胞 M1 向极化,且随着培养环境中葡萄糖的浓度逐渐升高,Raw264.7 细胞的 M1 型促炎效应及氧化应激更明显。

在机体的骨组织不断形成或修复过程中,成骨细胞分泌骨基质,矿化形成新骨,而来自单核造血细胞的巨噬细胞则对成骨细胞的功能起调控作用[23-24],这两种细胞类型是骨改建的主要参与者,骨改建也是一个持续影响我们骨骼健康的过程[25]。成骨细胞来源于骨髓间充质干细胞,在骨重塑中发挥重要作用,但在高糖环境下其功能发生显著改变。研究表明,高糖会导致 MC3T3-E1 细胞 ROS 产生增加,成骨能力减弱[26]。大量体内实验也表明,糖尿病大鼠骨缺损处的骨愈合速度及质量均较正常组差[27]。WHO 在 2006 年发布的糖尿病指南中明确指出,随机血糖≥7.0 mmol/L 以及餐后 2 h 血糖≥11.1 mmol/L 可诊断为糖尿病,该指南在一项对 38 个前瞻性研究进行的 Meta 分析中,证实未达到糖尿病标准的高血糖会增加患心血管疾病的风险,并提到空腹血糖 5.5 mmol/L 可能为一个阈值,多项研究也表明空腹血糖>5.5 mmol/L 时,心血管疾病发生风险将成倍增加[28]。因此,许多研究都将 5.5 mmol/L 作为正常血糖浓度,本研究也不例外。本研究通过 Transwell 间接共培养模型,模拟体内环境中的细胞旁分泌交流,结果证实高糖促进 MC3T3-E1 细胞产生 ROS,而 Raw264.7 细胞在高糖环境下持续的氧化应激和炎症介质等的分泌对 MC3T3-E1 细胞产生不利影响。VOLPE 等[15]表明,高糖通过直接作用于细胞表面的 Toll 样受体导致成骨细胞胞内 ROS 产生增加,而 ROS 可以通过激活细胞内质网应激的 PERK 通路或破坏自噬与凋亡的平衡而导致细胞凋亡。

3.2 氧化应激,自噬与凋亡

ROS 的来源分为外源性和内源性,外源性来源于辐射、药物等刺激,而内源性来源于线粒体、内质网、过氧化物酶、NADPH 氧化酶体等,在大部分细胞中,线粒体氧化呼吸链中的复合体 I 和复合体 III 是产生 ROS 的主要部位[29]。在高糖环境下,过量的葡萄糖导致大量电子供体进入线粒体氧化呼吸链,导致电子泄露和大量 ROS 产生,随之线粒体电子传递功能被破坏。ROS 的产生和损伤线粒体表面发出的“吃我”的信号均会激活细胞自噬,从而在一定程度上缓解细胞受到氧化应激的压力,但当这个压力持续时间过长或超过阈值时,细胞自噬也无法挽救细胞死亡的命运[15]。由于自噬是一个动态变化过程,也被称作自噬流,可以通过检测自噬关键蛋白 LC3-Ⅱ和 SQSTM1/p62 来反映自噬的强弱,但单独检测某一时间点的自噬相关蛋白结果并不准确,使用自噬阻断剂 Bafilomycin A1 可以在自噬体与溶酶体融合阶段进行阻断,从而更准确的观察自噬流过程中 LC3-Ⅱ和 SQSTM1/p62 蛋白的堆积量,反映自噬流的强弱。本研究结果发现 35 mmol/L 高糖环境下,与 Raw264.7 细胞共培养的 MC3T3-E1 细胞自噬被大量激活。通常在同一细胞中,自噬先于凋亡发生,这是因为压力通常会首先刺激自噬反应,尤其是在压力水平不致命的情况下。当压力超过临界持续时间或强度阈值时,凋亡和非凋亡致死程序被激活[30]。文献表明,自噬小体的形成,有助于激活 caspase-8,从而激活凋亡的 caspase 级联过程[31],此外自噬也可能通过消耗细胞死亡途径的内源性抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins,IAPs),破坏凋亡与凋亡抑制蛋白之间的平衡来刺激细胞凋亡[32]。我们的结果表明相比于 35-Mono 组,35-Co 组 MC3T3-E1 细胞凋亡率明显上升,提示我们过强的 ROS 和自噬导致

了细胞死亡的发生。

综上,本研究发现与 Raw264.7 细胞在高糖环境下共培养会诱导 MC3T3-E1 细胞产生凋亡,而该凋亡的发生可能与高糖环境下 Raw264.7 细胞持续氧化应激和促炎因子分泌而导致 MC3T3-E1 胞内产生大量 ROS 和过度自噬有关,然而上述结论仍需通过体内实验进一步验证。本研究有助于诠释高糖环境下正畸骨改建失败的生物学基础,高糖环境对成骨细胞氧化应激和自噬的影响及巨噬细胞在其中发挥的作用,力求探索保护成骨细胞正常生理功能的关键靶点,为临床制定针对性预防和治疗策略提供新的思路和理论依据。

参考文献:

[1] TAN Y, ZHANG Z G, ZHENG C, *et al*. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(9): 585-607. DOI: 10.1038/s41569-020-0339-2.

[2] KIMY T, CHUNG H J, PARK B R, *et al*. Risk of cardiovascular disease and chronic kidney disease according to 2017 blood pressure categories in diabetes mellitus[J]. Hypertension, 2020, 76(3): 766-775. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15320.

[3] COLEJ B, FLOREZ J C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications[J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(7): 377-390. DOI: 10.1038/s41581-020-0278-5.

[4] KHOSLA S, SAMAKKARNTHAI P, MONROED G, *et al*. Update on the pathogenesis and treatment of skeletal fragility in type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(11): 685-697. DOI: 10.1038/s41574-021-00555-5.

[5] CHEN Y, HU Y, YANG L, *et al*. Runx2 alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation via PI3K/AKT/GSK3β/β-catenin pathway[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(8): 822-832. DOI: 10.1002/cbin.10779.

[6] VELLETRI T, HUANG Y, WANG Y, *et al*. Loss of p53 in mesenchymal stem cells promotes alteration of bone remodeling through negative regulation of osteoprotegerin[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(1): 156-169. DOI: 10.1038/s41418-020-0590-4.

[7] MUÑOZ J, AKHAVAN N S, MULLINS A P, *et al*. Macrophage polarization and osteoporosis: a review[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 2999. DOI: 10.3390/nu12102999.

[8] ZHANG B, YANG Y, YI J R, *et al*. Hyperglycemia modulates M1/M2 macrophage polarization via reactive oxygen species overproduction in ligature-induced periodontitis[J]. J Periodontal Res, 2021, 56(5): 991-1005. DOI: 10.1111/jre.12912.

[9] CHEN K X, JIAO Y R, LIU L, *et al*. Communications between bone marrow macrophages and bone cells in bone remodeling[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 598263. DOI: 10.3389/fcell.2020.598263.

[10] RIOS-ARCE N D, DAGENAIS A, FEENSTRA D, *et al*. Loss of interleukin-10 exacerbates early type-1 diabetes-induced bone loss[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(3): 2350-2365. DOI: 10.1002/jcp.29141.

[11] SHEN X, SHEN X, LI B, *et al*. Abnormal macrophage polarization impedes the healing of diabetes-associated tooth sockets[J]. Bone, 2021, 143: 115618. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115618.

[12] YE W B, WANG J Z, LIN D S, *et al*. The immunomodulatory role of irisin on osteogenesis via AMPK-mediated macrophage polarization[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 146: 25-35. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.028.

[13] LIU M L, WU X, CUI Y L, *et al*. Mitophagy and apoptosis mediated by ROS participate in AlCl 3-induced MC3T3-E1 cell dysfunction[J]. Food Chem Toxicol, 2021, 155: 112388. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112388.

[14] YING S Q, TAN M M, FENG G, *et al*. Low-intensity pulsed ultrasound regulates alveolar bone homeostasis in experimental periodontitis by diminishing oxidative stress[J]. Theranostics, 2020, 10(21): 9789-9807. DOI: 10.7150/thno.42508.

[15] VOLPE C M O, VILLAR-DELFINO P H, DOS ANJOS P M F, *et al*. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 119. DOI: 10.1038/s41419-017-0135-z.

[16] YAMAUCHI T, MAKINODAN M, TORITSUKA M, *et al*. Tumor necrosis factor-α expression aberration of M1/M2 macrophages in adult h igh-functioning autism spectrum disorder[J]. Autism Res, 2021, 14(11): 2330-2341. DOI: 10.1002/aur.2585.

[17] KIMS J, CHANG H J, VOLIN M V, *et al*. Macrophages are the primary effector cells in IL-7-induced arthritis[J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(7): 728-740. DOI: 10.1038/s41423-019-0235-z.

[18] LI X W, GAO F J, ZHU W H, *et al*. Pristane promotes anaerobic glycolysis to facilitate proinflammatory activation of macrophages and development of arthritis[J]. Exp Cell Res, 2021, 398(1): 112404. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112404.

[19] LIECHTY C, HU J Y, ZHANG L P, *et al*. Role of microRNA-21 and its underlying mechanisms in inflammatory responses in diabetic wounds[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3328. DOI: 10.3390/ijms21093328.

[20] HEGYI B, BORST J M, BAILEY L R J, *et al*. Hyperglycemia regulates cardiac K+ channels via O-GlcNAc-CaMKII and NOX2-ROS-PKC pathways[J]. Basic Res Cardiol,

2020, 115(6): 71. DOI: 10.1007/s00395-020-00834-8.

[21] LU S, LIAO Z D, LU X Y, *et al*. Hyperglycemia acutely increases cytosolic reactive oxygen species via O-linked GlcNAcylation and CaMKII activation in mouse ventricular myocytes[J]. Circ Res, 2020, 126(10): e80-e96. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316288.

[22] DRUMMOND G R, SELEMIDIS S, GRIENDLING K K, *et al*. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(6): 453-471. DOI: 10.1038/nrd3403.

[23] TSUKASAKI M, TAKAYANAGI H. Osteoimmunology: evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(10): 626-642. DOI: 10.1038/s41577-019-0178-8.

[24] XIANG G, LIU K Y, WANG T J, *et al*. *In situ* regulation of macrophage polarization to enhance osseointegration under diabetic conditions using injectable silk/sitagliptin gel scaffolds[J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 8(3): 2002328. DOI: 10.1002/advs.202002328.

[25] BORCIANI G, MONTALBANO G, BALDINI N, *et al*. Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating *in vitro* bone remodeling in regenerative approaches[J]. Acta Biomater, 2020, 108: 22-45. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.03.043.

[26] WANG N N, XU P C, WU R J, *et al*. Timosaponin BII improved osteoporosis caused by hyperglycemia through promoting autophagy of osteoblasts via suppressing the mTOR/NFκB signaling pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 171: 112-123. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.014.

[27] ZHENG L F, SHEN X M, YE J J, *et al*. Metformin alleviates hyperglycemia-induced apoptosis and differentiation suppression in osteoblasts through inhibiting the TLR4 signaling pathway[J]. Life Sci, 2019, 216: 29-38. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.11.008.

[28] BORGNAKKE W S. IDF Diabetes Atlas: diabetes and oral health—A two-way relationship of clinical importance[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107839. DOI: 10.1016/j.diabres.2019.107839.

[29] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(7): 363-383. DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3.

[30] MARIÑO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H, *et al*. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(2): 81-94. DOI: 10.1038/nrm3735.

[31] YOUNG M M, TAKAHASHI Y, KHAN O, *et al*. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(15): 12455-12468. DOI: 10.1074/jbc.M111.309104.

[32] NEZIS I P, SHRAVAGE B V, SAGONA A P, *et al*. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis[J]. J Cell Biol, 2010, 190(4): 523-531. DOI: 10.1083/jcb.201002035.

(**收稿**:2022-04-29;**修回**:2022-06-08)

(编辑 栾 嘉)