DOI:10.16016/j.2097-0927.202207184

雌马酚通过 PI3K/AKT 通路对高糖高脂环境下成骨细胞凋亡及增殖的影响

李 硕,倪向敏,徐 喆,朱文艺,梁馨予,王 建 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院营养科

[**摘要**] **目的** 探讨雌马酚(equol,Eq)对高糖高脂环境下成骨细胞增殖和凋亡的影响及其可能机制。**方法** 建立 ROS17/2.8 成骨细胞高糖高脂损伤模型,设立对照组(C 组)、模型组(M 组)、不同浓度梯度 Eq 干预组(Eq^{-7} 组:1×10^{-7} mol/L Eq,Eq^{-6} 组:1×10^{-6} mol/L Eq,Eq^{-5} 组:1×10^{-5} mol/L Eq)。药物处理 24 h 后,采用 CCK-8、HE 染色检测成骨细胞活性及形态结构变化,流式细胞术检测细胞凋亡及周期改变,Western blot 检测细胞 PI3K/AKT 通路磷酸化程度及相关蛋白表达变化,并联合 PI3K 抑制剂验证 PI3K/AKT 通路在其中的作用。**结果** 与 C 组比较,M 组成骨细胞存活率降低、细胞抑制率增加($P<0.05$),细胞形态结构明显损伤,细胞凋亡率增加($P<0.05$),细胞周期 G_1 期比例增加、S 期比例降低($P<0.05$),PI3K/AKT 通路磷酸化程度降低、Cyclin D1、Bcl-2 表达减少、Bax、cleaved caspase-3 表达增加($P<0.05$);与 M 组相比,各 Eq 干预组细胞存活率增加、细胞抑制率降低($P<0.05$),细胞形态结构损伤减轻,细胞凋亡减少($P<0.05$),细胞周期 G_1 期比例降低、S 期比例增加($P<0.05$),PI3K/AKT 通路磷酸化程度提高、Cyclin D1、Bcl-2 表达增加、Bax、cleaved caspase-3 表达减少($P<0.05$),且 Eq 的干预效应随着浓度升高而增强;联合 PI3K 抑制剂后,Eq 的上述效应显著降低。**结论** Eq 可通过激活 PI3K/AKT 通路减少高糖高脂环境下成骨细胞凋亡、促进成骨细胞增殖。

[**关键词**] 雌马酚;高糖高脂;成骨细胞;凋亡;增殖
[**中图法分类号**] R151.41; R322.71; R587.2 [**文献标志码**] A

Effects of equol on apoptosis and proliferation of osteoblast through PI3K/AKT pathway in high glucose and high fat environment

LI Shuo, NI Xiangmin, XU Zhe, ZHU Wenyi, LIANG Xinyu, WANG Jian Department of Nutrition, Second Affiliated Hospital, Army Medical University(Third Military Medical University),Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect and mechanism of equol(Eq) on the proliferation and apoptosis of osteoblasts in high-glucose and high-fat environment. **Methods** High-glucose and high-fat model of ROS17/2.8 osteoblasts was established, and cells were divided into the control group (C group) and the model group (M group), the Eq^{-7} group (1×10^{-7}mol/L Eq), the Eq^{-6} group(1×10^{-6}mol/L Eq) and the Eq^{-5} group(10^{-5}mol/L Eq). CCK-8 assay and HE staining was used to detect the viability and morphology of osteoblasts; Flow cytometry was used to test the apoptosis and cell cycle; Western blotting was used to detect the phosphorylation of PI3K/AKT signaling pathway and expression of associated proteins of osteoblasts. PI3K inhibitor was added to confirm the role of PI3K/AKT signaling pathway in the osteoprotective effect of Eq. **Results** Compared with the C group, the cell structure of the M group was significantly damaged, the cell survival rate, proportion of S phase of cell cycle, the degree of phosphorylation of PI3K/AKT pathway, the expression of Cyclin D1 and Bcl-2 in the M group decreased, while cell inhibition rate, cell apoptosis, proportion of G_1 phase of cell cycle, the expression of Bax and cleaved caspase-3 of the M group increased

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81973040);国家自然科学基金青年科学基金项目(81602855)
[**通信作者**] 王 建,E-mail: wj_xqhospital@163.com.

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/)

($P<0.05$); Compared with the M group, the Eq groups had increased cell survival rate, decreased cell inhibition rate, enhanced fraction of osteoblast in the S phase and decreased osteoblast apoptosis rate($P<0.05$). Eq treatment enhanced the phosphorylation of PI3K/AKT pathway of osteoblasts and increased expression level of Cyclin D1 and Bcl-2 protein and decreased expression of Bax and cleaved caspase-3 ($P<0.05$). The intervention effect of Eq enhanced with the increase of concentration of Eq. However, this regulatory effect of Eq almost disappeared after co-administration of PI3K inhibitor. **Conclusion** Eq can reduce the apoptosis and promote the proliferation of osteoblasts in the high-glucose and high-fat environment by activating the PI3K/AKT pathway.

[**Key words**] equol; high-glucose and high-fat; osteoblasts; apoptosis; proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81973040) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81602855). Corresponding author: WANG Jian, E-mail: wj_xqhospital@163.com.

2 型糖尿病(type 2 diabetes,T2DM)患者在糖尿病群体中占比超过 90%,患者因胰岛素抵抗或伴胰岛素分泌异常,糖脂代谢紊乱,易发生心血管、肝、肾、骨骼、神经等多系统并发症。糖尿病性骨质疏松症(diabetic osteoporosis,DOP)是 T2DM 患者骨骼系统常见并发症,发病率高达 37.8%[1],患者多呈现骨矿物质密度降低、骨脆性增加等特征。

大豆异黄酮属于植物雌激素,可发挥抗动脉粥样硬化、改善胰岛素分泌障碍、抑制癌症发生、抗骨质疏松症等多种生物学效应[2]。雌马酚(equol,Eq)是大豆异黄酮在体内代谢的终产物之一,其生物学效应较大豆异黄酮更强。课题组前期研究发现 Eq 可促进成骨细胞增殖,改善患者绝经后骨质疏松症[3-4]。绝经后骨质疏松症以雌激素缺乏为主要发病机制,而 DOP 的发病涉及糖脂代谢毒性、细胞因子水平变化、氧化应激、炎症反应、糖尿病并发症等多种因素,其发病机制相较于绝经后骨质疏松症更为复杂[5]。迄今为止关于 Eq 对 DOP 的疗效及机制鲜有报道。本研究开展体外实验探讨 Eq 在高糖高脂环境下对成骨细胞增殖和凋亡的影响及机制,为 DOP 的预防和治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究主要使用的材料:ROS17/2.8 成骨细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司),S-雌马酚(上海大赛璐药物手性技术有限公司),高糖高脂试剂盒(西安鲲创科技发展有限公司),细胞周期与凋亡检测试剂盒(上海碧云天公司)、Annexin V-EGFP/PI 细胞凋亡检测试剂盒(武汉赛维尔公司),磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidyl inositol 3 kinase,PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B,AKT)及磷酸化 PI3K、AKT 多克隆抗体(p-PI3K,p-AKT)(美国 Proteintech 公司),细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl2-Associated X,Bax)、切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved caspase-3)多克隆抗体(上海 Abmart 公司),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)单克隆抗体(上海碧云天公司),LY294002(PI3K 抑制剂,上海碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ROS17/2.8 细胞在 DMEM 培养基(10%胎牛血清,1%青-链霉素)中培养。在细胞密度达 80%后,胰酶消化细胞然后离心、重悬、传代。在培养箱内(37 ℃,5% CO_2)传至第 3 代后收集对数期细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞分组及干预 采用 25 mmol/L 葡萄糖+250 μmol/L 棕榈酸钠模拟 T2DM 机体成骨细胞高糖高脂细胞微环境,S-Eq 粉剂溶于 DMSO 溶剂配制不同浓度梯度 Eq 母液。实验分组依次为对照组(C 组,5.5 mmol/L 葡萄糖)、模型组(M 组,25mmol/L 葡萄糖+250 μmol/L 棕榈酸钠)、Eq^{-7} 组(25 mmol/L 葡萄糖+250 μmol/L 棕榈酸钠,1×10^{-7} mol/L Eq)、Eq^{-6} 组(25 mmol/L 葡萄糖+250 μmol/L 棕榈酸钠,1×10^{-6}mol/L Eq)、Eq^{-5} 组(25 mmol/L 葡萄糖+250 μmol/L 棕榈酸钠,1×10^{-5}mol/L Eq),药物干预 24 h 后进行后续检测。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活力 细胞接种于 96 孔板(5×10^3/孔),待细胞贴壁后更换低血清 DMEM 培养基(5% FBS),按 1.2.2 所述进行分组干预,每组 6 个复孔,24 h 后 CCK-8 检测细胞活力,重复实验 3 次。细胞存活率=[(As−Ab)/(Ac−Ab)]×100%,细胞抑制率=[(Ac−As)/(Ac−Ab)]×100%。As:实验孔吸光度;Ac:对照孔吸光度;Ab:空白孔吸光度。

1.2.4 HE 染色观察细胞形态 细胞接种于 6 孔板(2×10^4/孔),制备细胞爬片,待细胞贴壁后更换低血

清 DMEM 培养基,分组干预 24 h 后取出爬片,HE 染色检测细胞形态变化。

1.2.5　流式细胞术检测细胞凋亡　　分组干预 24 h 后收集细胞,PBS 洗涤、重悬后依次加入 Loading Buffer、PI、Annexin V-FITC 染液,避光孵育 10 min 后流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.6　流式细胞术检测细胞周期　　分组干预 24 h 后收集细胞,经 PBS 洗涤、70%乙醇 4 ℃固定、PBS 重悬,依次加入 Loading Buffer、PI、RNase A 染液,37 ℃避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.7　Western blot 实验　　细胞经离心、裂解后获取蛋白上清,按照常规操作进行电泳、转膜、封闭,一抗 4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3×10 min 后二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3×10 min,ECL 显影液显影,以 GAPDH 为内参,Image J 软件计算各组蛋白相对表达量。

1.2.8　联合 PI3K 抑制剂　　细胞干预分组依次为 C 组(5.5 mmol/L 葡萄糖)、M 组(25 mmol/L 葡萄糖+250 μmol/L 棕榈酸钠)、Eq 组(25 mmol/L 葡萄糖+250 μmol/L 棕榈酸钠,1×10^{-5}mol/L Eq)、Eq+LY294002 组(Eq 组联合 LY294002),M+LY294002 组(M 组联合 LY294002),重复前述实验步骤。

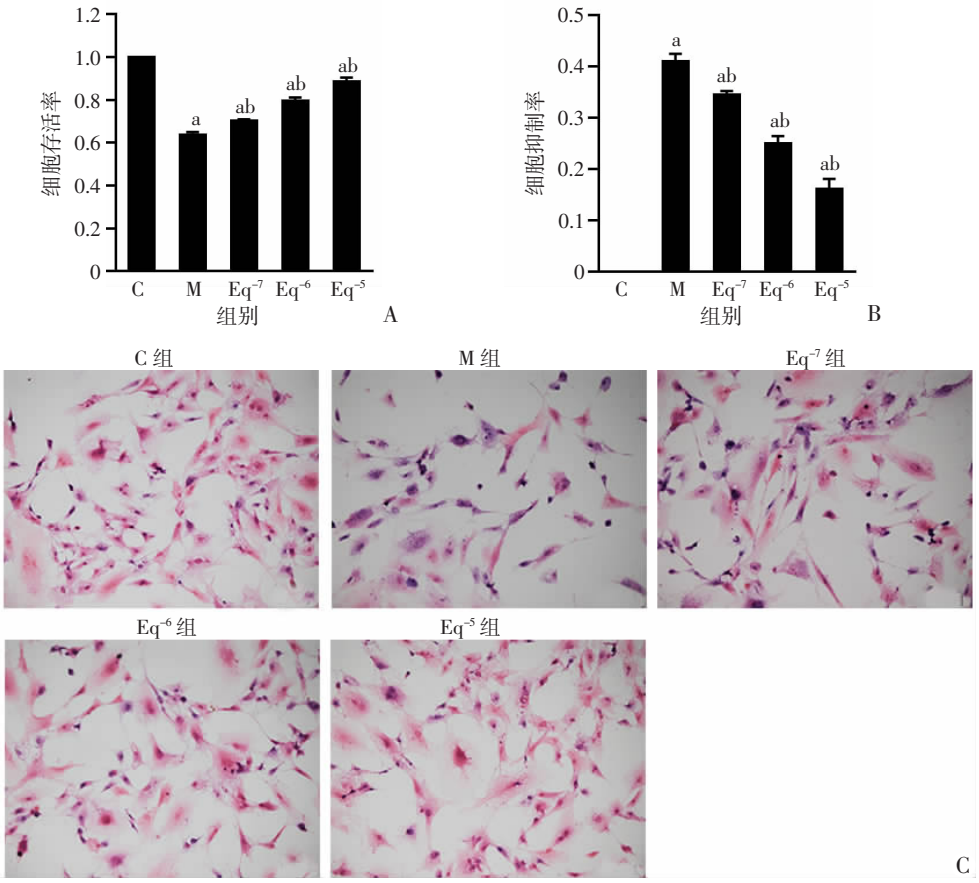
1.3　统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学检验。用 $\bar{x}\pm s$ 表示计量资料,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验。检验标准设定 $\alpha=0.05$,当 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

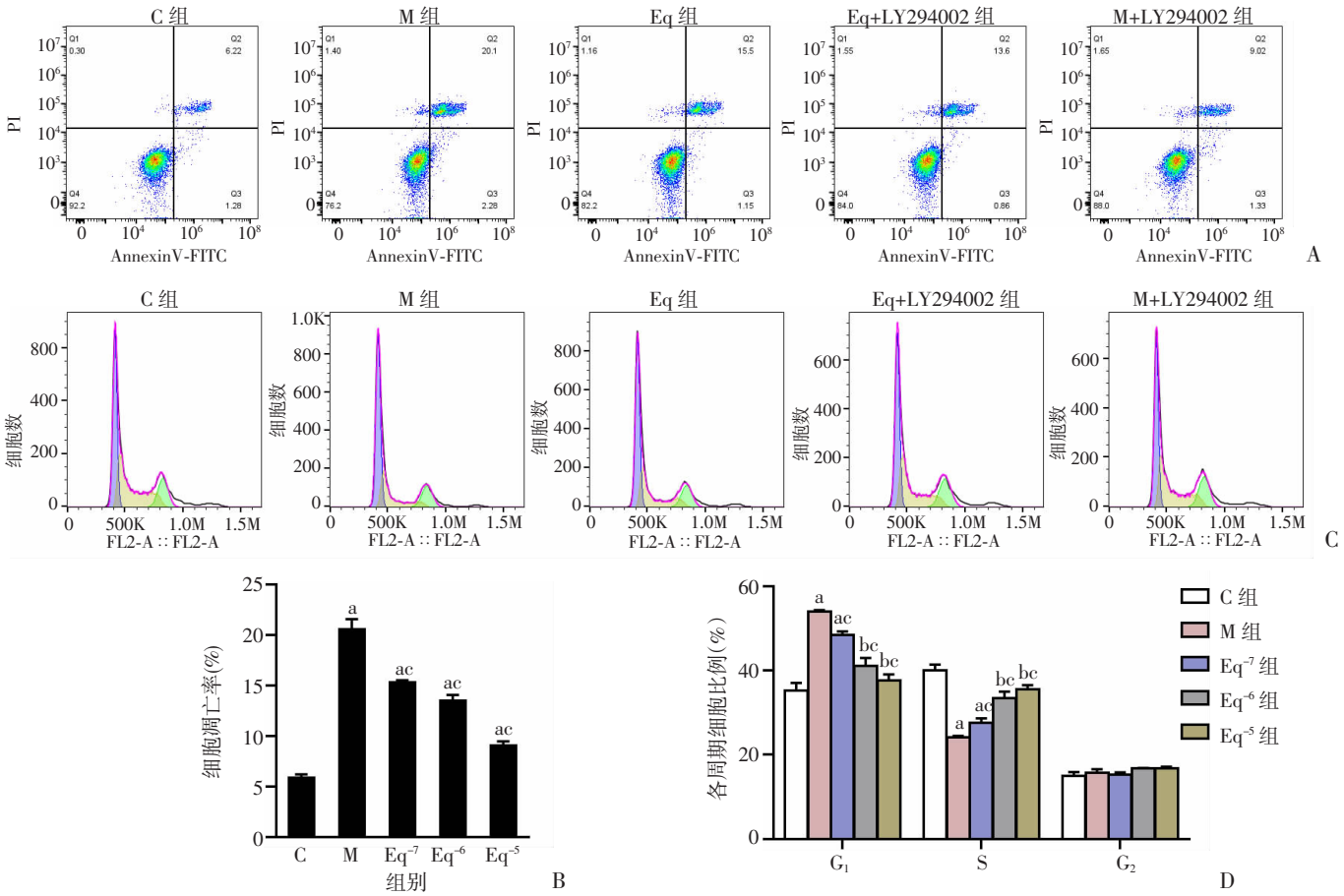
2.1　Eq 改善高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞活性及形态结构

CCK-8 结果显示,与 C 组比较,M 组细胞存活率降低、细胞抑制率增加($P<0.05$),细胞萎缩,细胞胞质和胞核浓缩,细胞凸起回缩或消失。与 M 组比较,各 Eq 干预组细胞存活率显著增加、细胞抑制率显著降低($P<0.05$),细胞形态结构损伤明显减轻,且 Eq 的干预效应随浓度升高而增强。见图 1。



A:CCK-8 检测高糖高脂环境下不同浓度 Eq 干预对 ROS17/2.8 细胞存活率的影响;B:CCK-8 检测高糖高脂环境下不同浓度 Eq 干预对 ROS17/2.8 细胞抑制率的影响　a:$P<0.001$,与 C 组比较;b:$P<0.001$,与 M 组比较;C:HE 染色检测高糖高脂环境下不同浓度 Eq 干预对 ROS17/2.8 细胞形态的影响(×200)

图 1　Eq 改善高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞活性及形态结构　($n=6,\bar{x}\pm s$)



A:流式细胞术检测高糖高脂环境下不同浓度 Eq 干预对 ROS17/2.8 细胞凋亡的影响;B:高糖高脂环境下不同浓度 Eq 干预后 ROS17/2.8 细胞凋亡比例;C:流式细胞术检测高糖高脂环境下不同浓度 Eq 干预对 ROS17/2.8 细胞周期的影响; D:高糖高脂环境下不同浓度 Eq 干预后 ROS17/2.8 细胞各周期比例 a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与 C 组比较;c:$P<0.001$,与 M 组比较

图 2 Eq 对高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞凋亡及周期的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.2 Eq 减少高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞凋亡、加快细胞周期

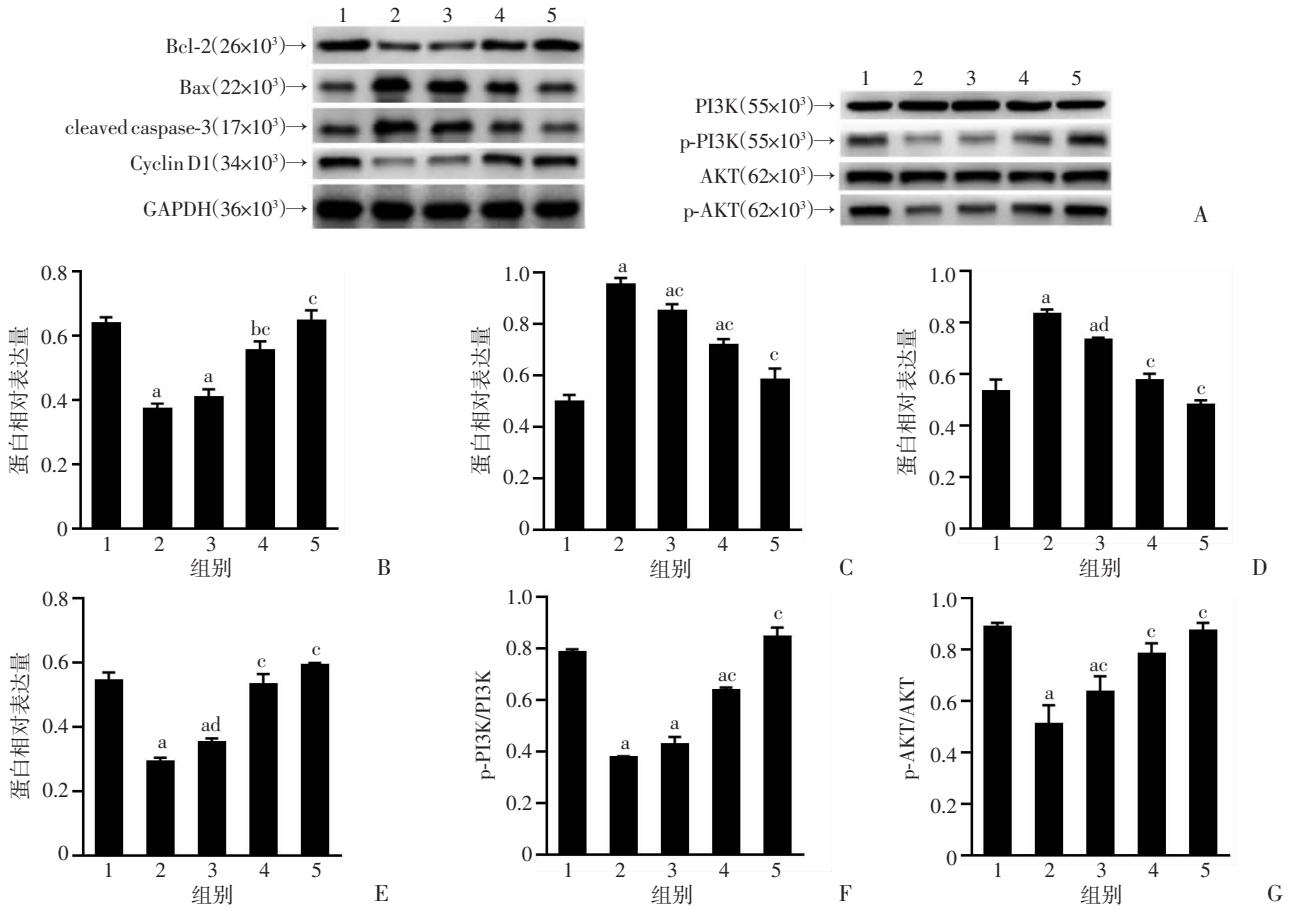
流式细胞术结果显示,M 组细胞凋亡率为(20.53±1.02)%,细胞周期 G_1 期比例为(53.90±4.36)%,均显著高于 C 组($P<0.05$),细胞周期 S 期比例为(24.2±0.26)%,显著低于 C 组($P<0.05$)。与 M 组相比,各 Eq 组细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),细胞周期 G_1 期比例减少、S 期比例增加($P<0.05$),且 Eq 对细胞周期、细胞凋亡的调控效应随着浓度升高而增强,在 S-Eq 浓度达到 10^{-5}mol/L 时,细胞凋亡率降至(9.03±0.44)%,细胞周期 G_1 期降至(37.63±1.45)%,S 期比例升至(35.53±1.00)%。见图 2。

2.3 Eq 调节高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞相关蛋白的表达

Western blot 结果显示,与 C 组比较,M 组 ROS17/2.8 成骨细胞 PI3K、AKT 磷酸化程度显著下调($P<0.05$),Bax、cleaved caspase-3 表达增加($P<0.05$),Bcl-2、Cyclin D1 表达减少($P<0.05$)。与 M 组比较,Eq 干预可上调 PI3K、AKT 磷酸化程度($P<0.05$),抑制 Bax、cleaved caspase-3 表达、促进 Bcl-2、Cyclin D1 表达($P<0.05$),且 Eq 对上述蛋白表达的调控效应随着浓度升高而增强。见图 3。

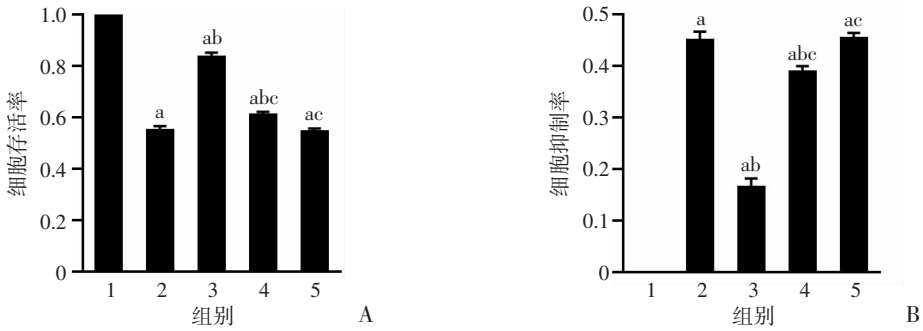
2.4 LY294002 显著降低 Eq 对高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞活性的影响

与 M 组比较,Eq 组细胞存活率显著增加、细胞抑制率显著降低($P<0.05$),分别为(83.53±1.69)%、(16.47±1.69)%。与 Eq 组比较,Eq+LY294002 组细胞存活率显著降低、细胞抑制率显著增加($P<0.05$),分别为(61.12±1.05)%、(38.89±1.05)%。见图 4。



A:Western blot 检测高糖高脂环境下不同浓度 Eq 干预对 ROS17/2.8 细胞蛋白表达的影响;B~G:Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、Cyclin D1、p-PI3K、p-AKT 的蛋白相对表达量;1:C 组;2:M 组;3:Eq^{-7} 组;4:Eq^{-6} 组;5:Eq^{-5} 组;a:$P<0.001$,b:$P<0.05$,与 C 组比较;c:$P<0.001$,d:$P<0.01$,与 M 组比较

图 3 Eq 对高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞相关蛋白表达的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

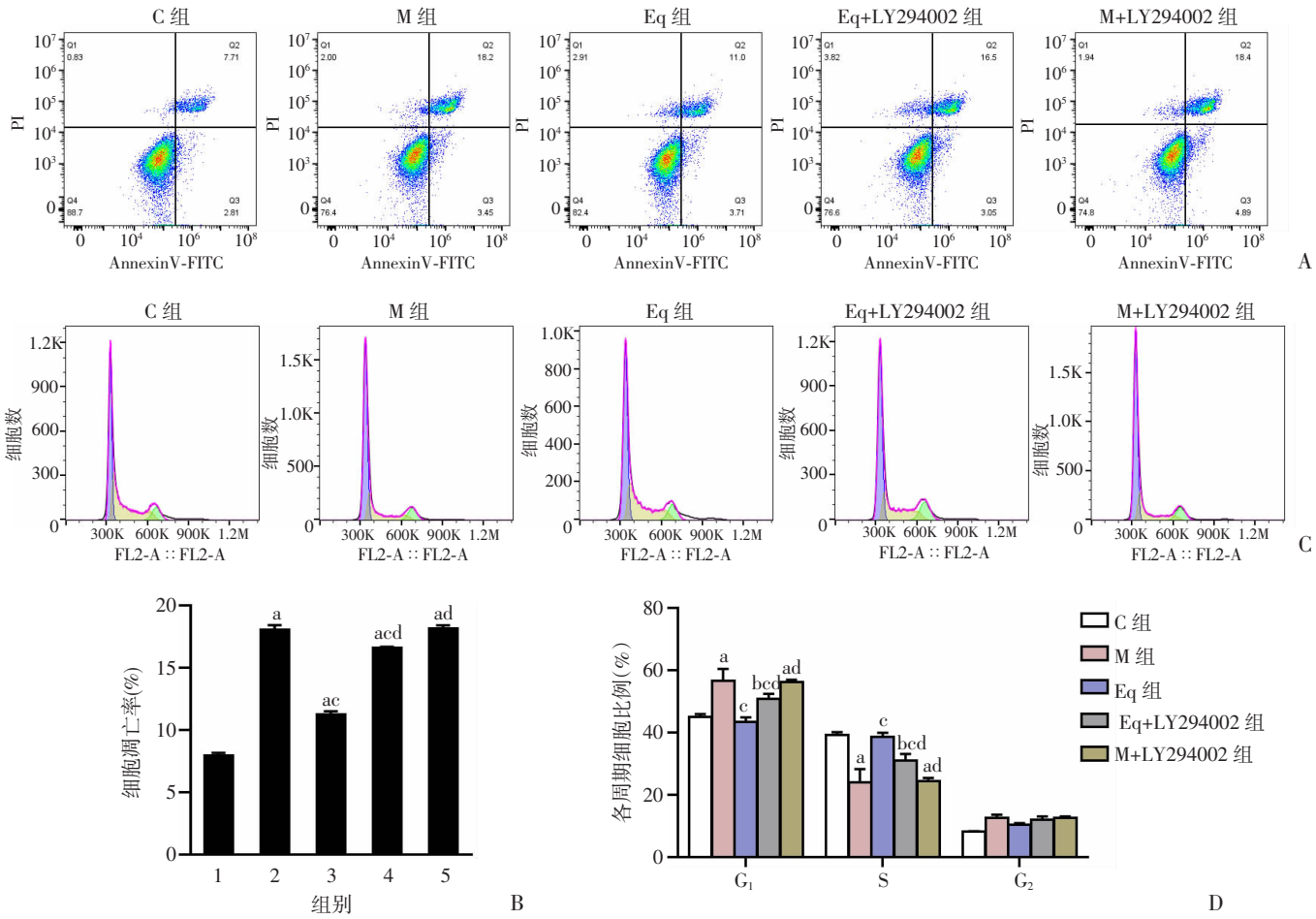


A:CCK-8 检测高糖高脂环境下 Eq 联合 LY294002 干预对 ROS17/2.8 细胞存活率的影响,B:CCK-8 检测高糖高脂环境下 Eq 联合 LY294002 干预对 ROS17/2.8 细胞抑制率的影响 1:C 组;2:M 组;3:Eq 组;4:Eq+LY294002 组;5:M+LY294002 组;a:$P<0.001$,与 C 组比较;b:$P<0.001$,与 M 组比较;c:$P<0.001$,与 Eq 组比较

图 4 联合 LY294002 后 Eq 对高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞活性的影响 ($n=6,\bar{x}\pm s$)

2.5 LY294002 显著降低 Eq 对高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞凋亡和周期的影响

流式细胞术结果显示,Eq 组细胞凋亡率(11.13±2.30)%、细胞周期 G_1 期比例(41.3±1.51)%,均显著低于 M 组($P<0.05$),细胞周期 S 期比例为(38.57±1.35)%,显著高于 M 组($P<0.05$)。与 Eq 组相比,Eq+LY294002 组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),达(16.57±2.31)%,细胞周期 G_1 期比例显著增加($P<0.05$)、S 期比例明显降低($P<0.05$),分别为(50.80±1.57)%、(30.93±2.20)%。见图 5。



A:高糖高脂环境下 Eq 联合 LY294002 干预对 ROS17/2.8 细胞凋亡的影响;B:高糖高脂环境下 Eq 联合 LY294002 干预后 ROS17/2.8 细胞凋亡率;C:高糖高脂环境下 Eq 联合 LY294002 干预对 ROS17/2.8 细胞周期的影响;D:高糖高脂环境下 Eq 联合 LY294002 干预后 ROS17/2.8 细胞各周期比例 1:C 组;2:M 组;3:Eq 组;4:Eq+LY294002 组;5:M+LY294002 组;a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与 C 组比;c:$P<0.001$,与 M 组比较;d:$P<0.001$,与 Eq 组比较

图 5 联合 LY294002 后 Eq 对高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞凋亡和周期的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.6 LY294002 显著降低 Eq 对高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞相关蛋白表达的调控作用

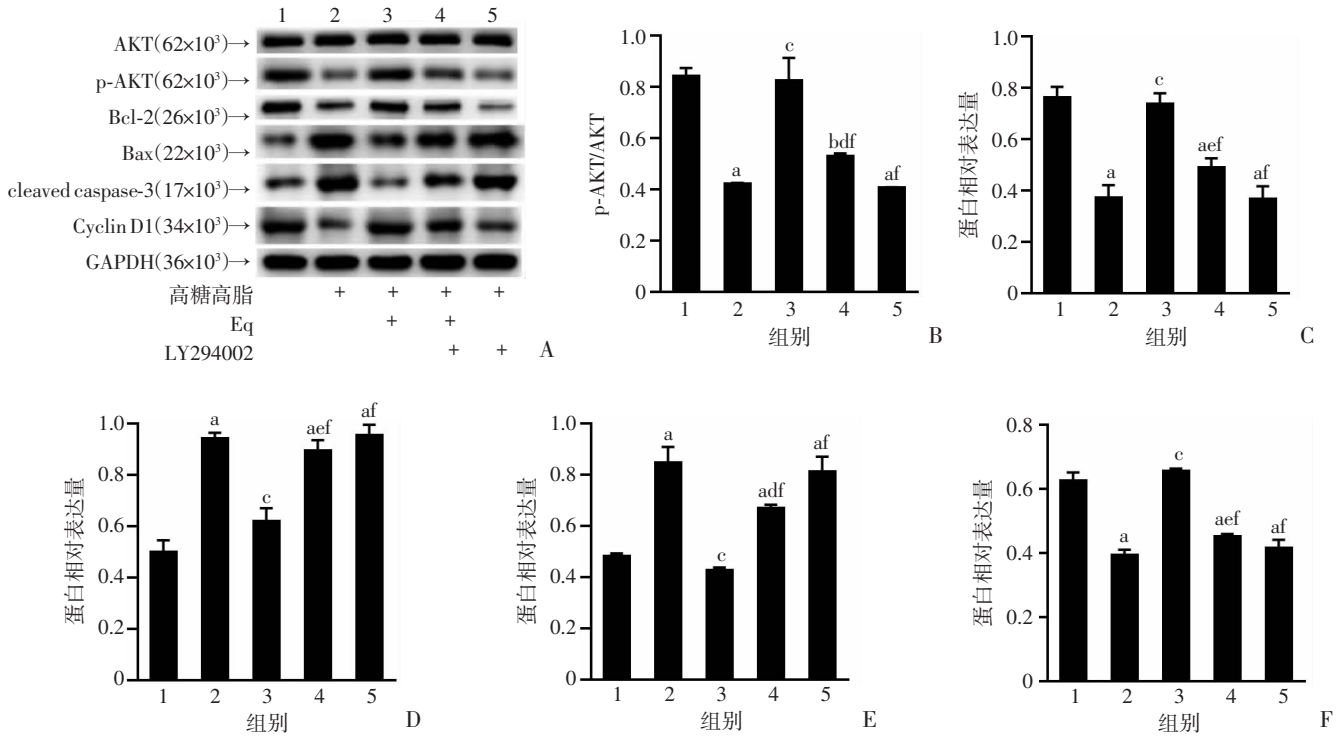
Western blot 结果显示,与 M 组比较,Eq 干预可显著上调 AKT 磷酸化程度,促进 Bcl-2、Cyclin D1 蛋白表达、抑制 Bax、cleaved caspase-3 表达($P<0.05$)。与 Eq 组比较,Eq+LY294002 组 AKT 磷酸化程度受到显著抑制,Bcl-2、Cyclin D1 蛋白表达显著下调,Bax、cleaved caspase-3 表达显著上调($P<0.05$)。见图 6。

3 讨论

Eq 是植物雌激素大豆异黄酮的体内代谢产物,与大豆异黄酮相比,Eq 的结构更稳定、生物学效应更强。研究表明大豆异黄酮对人体的健康效应与机体能否将大豆异黄酮代谢为 Eq 密切相关[6],能将大豆异黄酮代谢为 Eq 者可通过摄入大豆异黄酮获得更大的健康益处。自 Eq 被首次分离提取后,应用于多种疾病的预防和治疗研究[7-8]。但目前关于 Eq 对 DOP 是否具有改善作用及机制鲜有研究报道。本研究探讨 Eq 对高糖高脂环境下成骨细胞增殖、凋亡的影响及其机制。

3.1 Eq 对高糖高脂环境下成骨细胞的保护作用

糖脂代谢紊乱是 T2DM 患者最显著临床特征,主要表现为高糖高脂血症[9]。本研究采用葡萄糖联合棕榈酸钠模拟 T2DM 患者机体成骨细胞高糖高脂微环境[10]。CCK-8 结果显示,在高糖高脂(25 mmol/L 葡萄糖+250 umol/L 棕榈酸钠)环境下成骨细胞存活率显著降低、细胞抑制率显著增加。结合 HE 染色发现,高脂高糖环境导致成骨细胞形态结构明显损伤,而在给予不同浓度梯度 Eq 干预后,可显著提高成骨细胞存活率、改善成骨细胞形态结构,且呈浓度梯度趋势。此外,流式细胞术检测结果显示高糖高脂环境下成骨



A:Western blot 检测高糖高脂环境下 Eq 联合 LY294002 干预对 ROS17/2.8 细胞蛋白表达的影响;B~F:p-AKT、Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、CyclinD1 的蛋白相对表达量 1:C 组;2:M 组;3:Eq 组;4:Eq+LY294002 组;5:M+LY294002 组;a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与 C 组比较;c:$P<0.001$,d:$P<0.01$,e:$P<0.05$,与 M 组比较;f:$P<0.001$,与 Eq 组比较

图 6 联合 LY294002 后 Eq 对高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞相关蛋白表达的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

细胞凋亡率增高,细胞周期 G_1 期比例增加、S 期比例降低。细胞周期主要由 G_1/S 期、G_2/M 期、纺锤体装配 3 个检测点进行调节,细胞周期进展的关键在于 G_1/S 期的过渡[11]。高脂高糖环境下成骨细胞的细胞周期阻滞于 G_1 期,提示成骨细胞的增殖分裂能力降低,而 Eq 干预不仅降低了成骨细胞凋亡率,还能加快 G_1/S 期进展,促进成骨细胞分裂增殖,且 Eq 的干预效应随浓度升高而增强。

3.2 PI3K/AKT 通路与成骨细胞的增殖、凋亡

PI3K/AKT 通路是调节骨骼生长发育的关键通路,在成骨细胞增殖、凋亡等生理过程中发挥重要作用。PI3K/AKT 通路由 PI3K、中间效应因子、AKT 构成,在受体酪氨酸激酶激活后,PI3K 将磷脂酰肌醇-二磷酸磷酸化,导致磷脂酰肌醇-三磷酸积累并激活 AKT,调控下游 Cyclin D1、胰岛素样生长因子 1、Runt 相关转录因子 2、Bax、Bcl-2 等多种蛋白表达,进而调节成骨细胞的增殖、分化和凋亡过程[12]。而 T2DM 可降低成骨细胞 PI3K 和 AKT 的磷酸化程度、抑制 PI3K/AKT 通路效应,是 DOP 发生发展的重要促进因素[13]。Cyclin D1 是调控细胞周期 G_1 期的关键蛋白,能够推动细胞周期由 G_1 期向 S 期转换,在整个细胞周期进展及细胞增殖中发挥关键作用。文献[14]指出,在 PI3K/AKT 通路受抑制后,GSK-3β 等磷酸化程度升高,Cyclin D1 蛋白经泛素蛋白酶体降解增多,细胞增殖分裂受抑制。Bcl-2 基因家族属于原癌基因家族,在调控线粒体途径介导的细胞凋亡中发挥重要作用,该基因家族表达的 Bcl-2 属于抗凋亡蛋白,可通过蛋白的跨膜锚定区锚定于线粒体外膜,抑制线粒体细胞色素 C 的释放及 caspase-3 的活化,减少线粒体介导的细胞凋亡。Bax 功能与 Bcl-2 相反,是 Bcl-2 家族最重要的促凋亡因子,可与 Bcl-2 构成异源二聚体,改变线粒体膜通透性、激活 caspase-3,导致细胞凋亡增加。相关研究发现 PI3K/AKT 通路抑制可导致成骨细胞 Bcl-2/Bax 比例降低,cleaved caspase-3 表达增多,导致细胞凋亡[15]。

3.3 Eq 激活 PI3K/AKT 通路、调控下游靶蛋白表达

Western blot 结果显示,高糖高脂环境下成骨细胞 PI3K 及 AKT 磷酸化程度显著降低,与王昆[16]研究结果一致。另外本次研究发现,高糖高脂环境下成骨细胞 Cyclin D1、Bcl-2 表达显著降低、Bax 和 cleaved

caspase-3 表达显著升高,而 Eq 干预能够激活 PI3K/AKT 通路、提高 Cyclin D1、Bcl-2 表达水平、下调 Bax、cleaved caspase-3 表达水平,减轻高糖高脂诱发的成骨细胞凋亡、推动细胞周期进展,并且随着 Eq 浓度升高,其干预效应增强。综合上述结果,本研究推测 Eq 可能通过调节 PI3K/AKT 通路进而调控 Cyclin D1、Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 等下游分子表达,发挥成骨细胞保护效应。为进一步验证 PI3K/AKT 通路的作用,本研究联合应用 PI3K 抑制剂,结果显示在联合应用 PI3K 抑制剂后,Eq 抑制高脂高糖环境下成骨细胞凋亡、促进细胞增殖的效应显著降低,对 Cyclin D1、Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 等蛋白的调控能力显著减弱,提示 Eq 主要通过 PI3K/AKT 通路对高糖高脂环境下成骨细胞发挥保护效应。另外,在应用 LY294002 后,本研究发现 M+LY294002 组 ROS17/2.8 细胞的细胞活性、细胞凋亡和周期、细胞蛋白表达等指标虽然略高于或低于 M 组,但两组各指标尚无统计学差异,分析原因可能如下:①根据 2.3 结果,ROS17/2.8 细胞的 PI3K/AKT 通路在高糖高脂环境下已被显著抑制,在此情况下联合应用 LY294002 效应不显著,因而未出现叠加效应;②根据 2.1 结果,高糖高脂环境下 ROS17/2.8 细胞形态显著改变、活性极大降低,导致细胞对 LY294002 反应不明显、LY294002 效应不显著。

本研究首次探讨了 Eq 对高糖高脂环境下成骨细胞增殖、凋亡的影响及机制,为 Eq 的健康效应研究及 DOP 的防治工作提供了实验依据。

参考文献:

[1] SI Y H, WANG C Y, GUO Y, *et al*. Prevalence of oste oporosis in patients with type 2 diabetes mellitus in the Chinese mainland: a systematic review and meta-analysis[J]. Iran J Public Health, 2019, 48(7): 1203-1214.

[2] 李硕, 王建. 大豆异黄酮临床应用的研究进展[J]. 大豆科学, 2020, 39(4): 633-640.
LI S, WANG J. Research progress on the clinical application of soybean isoflavones[J]. Soybean Sci, 2020, 39(4): 633-640.

[3] WANG J, XU J, WANG B, *et al*. Equol promotes rat osteoblast proliferation and differentiation through activating estrogen receptor[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3): 5055-5063. DOI: 10.4238/2014.July.4.21.

[4] 吴彬, 张勇, 陈明亮, 等. 雌马酚对去卵巢后大鼠骨质疏松症的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(3): 256-260. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201409076.
WU B, ZHANG Y, CHEN M L, *et al*. Equol improves osteoporosis in ovarietomized rats[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(3): 256-260. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201409076.

[5] 王盼, 吴科锋, 崔燎. 不同阶段 2 型糖尿病诱发骨质疏松症的致病机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(4): 619-624.
WANG P, WU K F, CUI L. Research progress on the pathogenesis type 2 diabetes-induced osteoporosis of different stages[J]. Chin J Osteoporos, 2020, 26(4): 619-624.

[6] MAGEE P J. Is equol production beneficial to health?[J]. Proc Nutr Soc, 2011, 70(1): 10-18. DOI: 10.1017/S0029665110003940.

[7] 任梓溢, 韦震, 姜宁, 等. 雌马酚对慢性睡眠干扰所致小鼠抑郁样行为的改善作用[J]. 大豆科学, 2022,41(3): 323-329.
REN Z Y, WEI Z, JIANG N, *et al*. Protective effects of equol on depression-like behavior of mice induced by chronic sleep deprivation[J]. Soybean Sci, 2022,41(3): 323-329.

[8] SEKIKAWA A, IHARA M, LOPEZ O, *et al*. Effect of S-equol and soy isoflavones on heart and brain[J]. Curr Cardiol Rev, 2019, 15(2): 114-135. DOI: 10.2174/1573403X15666181205104717.

[9] 中华医学会内分泌学分会脂代谢学组. 中国 2 型糖尿病合并血脂异常防治专家共识(2017 年修订版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017(11): 925-936.
Lipid Metabolism Group of Chinese Society of Endocrinology. Expert consensus on prevention and treatment of type 2 diabetes complicated with dyslipidemia in China (revised edition 2017)[J]. Chin J Endocrinol Metab, 2017(11): 925-936.

[10] 吴娟, 邱绮虹, 杨骥锋, 等. 高糖高脂抑制成骨细胞增殖及促进凋亡[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2018, 16(2): 65-70. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2973.2018.02.001.
WU J, QIU Q H, YANG J F, *et al*. High glucose and free fatty acid inhibit proliferation and induce apoptosis in osteoblast[J]. Chin J Geriatr Dent, 2018, 16(2): 65-70. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2973.2018.02.001.

[11] 柯芷茵, 梁爱玲, 刘勇军. 细胞周期检测点激酶与肺癌耐药研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2021, 24(4): 265-270.
KE Z Y, LIANG A L, LIU Y J. Cell cycle checkpoint kinase and drug resistance of lung cancer[J]. Chin J Lung Cancer, 2021, 24(4): 265-270.

[12] 梁宁, 何斌, 张奇文, 等. 调控干细胞成骨分化的 PI3K/Akt 信号通路及相关因素[J]. 现代医学, 2022, 50(1): 126-130.

LIANG N, HE B, ZHANG Q W, *et al*. Stem cell development into osteoblasts is regulated by the PI3K/Akt signaling pathway and other factors. [J]. Mod Med J, 2022, 50(1): 126-130.

[13] 张莹, 周艳红, 李江雁, 等. 基于 PI3K/Akt 通路研究利拉鲁肽对 2 型糖尿病骨质疏松大鼠的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(7): 985-989.
ZHANG Y, ZHOU Y H, LI J Y, *et al*. Effect of liraglutide on type 2 diabetic osteoporosis rats based on the study of PI3K/Akt pathway[J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(7): 985-989.

[14] 袁玥. SHP2 通过 PI3K/AKT/GSK3β 信号通路调节 Cyclin D1 的稳定性来促进乳腺癌细胞的增殖[D]. 天津: 天津医科大学, 2020.
YUAN Y. SHP2 promotes proliferation of breast cancer cells through regulating cyclin D1 stability *via* the PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2020.

[15] 张丰姣, 毛雨, 何丽, 等. 二甲双胍调控 PI3K/Akt/mTOR 通路减轻糖皮质激素诱导的成骨细胞凋亡[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(9): 1323-1328.
ZHANG F J, MAO Y, HE L, *et al*. Metformin attenuates glucocorticoid-induced osteoblast apoptosis by regulating PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(9): 1323-1328.

[16] 王昆. 柚皮苷通过抑制由 PI3K-Akt-mTOR 通路介导的自噬改善高糖/高脂应激造成的内皮细胞功能失常[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
WANG K. Naringin inhibits autophagy mediated by PI3K-Akt-mTOR pathway to ameliorate endothelial cell dysfunction induced by high glucose/high fat stress[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.

(**收稿**:2022-07-28;**修回**:2022-11-19)

(编辑 邓强庭)