

甲基乙二醛通过 ROS - MCU 途径诱导成骨细胞凋亡的研究

金 杯 戴盼盼 孙 旺 顾卫燕 林海升 施更生

摘 要 目的 研究甲基乙二醛(methylglyoxal, MG)通过活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) - 线粒体钙单向转运蛋白(mitochondrial calcium uniporter, MCU)诱导成骨细胞凋亡的机制。方法 本研究将细胞随机分为4组,即对照组、MG组、N - 乙酰半胱氨酸(NAC)组和NAC + MG组。采用MG处理小鼠MC3T3 - E1成骨细胞系构建凋亡模型,MTT法检测细胞增殖活性,Annexin V - FITC/PI染色结合流式细胞仪以及TUNEL染色检测细胞凋亡,Western blot法检测MCU蛋白表达水平。结果 MG组较对照组显著抑制了成骨细胞增殖活性,同时增加了成骨细胞凋亡,而Western blot法检测结果显示MCU蛋白水平表达增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在加入抗氧化剂NAC干预后,NAC + MG组较MG组细胞增殖活性明显恢复,凋亡减少,MCU蛋白表达水平降低。结论 MG诱导成骨细胞凋亡,该作用可能通过调控ROS - MCU途径有关。

关键词 糖尿病牙周炎 甲基乙二醛 ROS MCU 细胞凋亡

中图分类号 R78

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.09.029

Effect of Methylglyoxal on the Apoptosis of Osteoblastic Cells by ROS - MCU Signaling Pathway. Jin Bei, Dai Panpan, Sun Wang, et al. Department of Stomatology, Taizhou Hospital, Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of methylglyoxal (MG) on osteoblast apoptosis through ROS - MCU signaling pathway. **Methods** Logarithmic growth phase MC3T3 - E1 were divided into 4 groups: control group, MG group, NAC group, NAC + MG group. Cell viability was evaluated by MTT assays. The apoptosis rate was analyzed by flow cytometry and TUNEL assays. The protein expression level of MCU was detected by western blotting. **Results** As compared with control group, MG decreased the number of viable cells. Flow cytometric analysis, TUNEL staining showed an increase in the incidence of apoptosis. What's more, MG increased the expression of MCU. As expected, NAC pretreatment greatly improved the viability of cells exposed to MG and attenuated MG - induced apoptosis. Furthermore, NAC treatment markedly decreased level of MCU. **Conclusion** MG induced osteoblast apoptosis, possibly by regulating ROS - MCU signaling pathway.

Key words Diabetic periodontitis; Methylglyoxal; ROS; MCU; Apoptosis

牙周炎作为国内外常见慢性口腔疾病,其全球成人发生率已达50%^[1]。目前,牙周炎与全身系统性疾病间的相互影响已经成为牙周医学的研究热点。其中,糖尿病作为严重影响人类健康的三大疾病之一,能增加牙周炎的易感性和严重性,影响疾病进程。牙槽骨破坏是牙周炎的重要病理特征,是造成牙齿松动和脱落的直接原因。研究揭示细胞凋亡在糖尿病性牙周炎中起着关键作用^[2]。成骨细胞是骨代谢的中枢细胞,能够抑制破骨细胞的形成,并分化为骨细胞形成骨网络结构来维持机械应力,其凋亡的发生贯

穿牙周炎的发生、发展,在牙周炎牙槽骨吸收中起着重要作用。甲基乙二醛(methylglyoxal, MG)是糖酵解过程中一种有毒代谢产物,研究发现牙周炎患者的龈沟液中MG水平较正常者高达15~20倍,与福赛类杆菌数量呈正比^[3]。此外,糖尿病患者血浆中MG浓度明显增高,其与糖尿病以及肾病、心血管病、白内障等多种糖尿病并发症密切相关。

糖尿病病理状态下,体内活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)增加,抗氧化系统受抑制,氧化还原系统失衡形成氧化应激。线粒体不仅是细胞内ROS的主要来源,同时还是ROS攻击的主要靶点。线粒体功能障碍与牙周炎细胞凋亡密切相关,活性氧自由基导致的氧化应激状态下线粒体功能障碍诱导成骨细胞凋亡^[2]。而线粒体钙单向转运蛋白(mitochondrial calcium uniporter, MCU)作为线粒体Ca²⁺的

基金项目:浙江省台州市科技计划项目(XM20190604);恩泽医疗中心集团科研项目(18EZB11)

作者单位:317000 温州医科大学附属台州医院口腔科

通讯作者:施更生,电子邮箱:shigs@enzemed.com

关键调控者,与糖尿病的发生密切相关,并且可由 ROS 调控诱导细胞凋亡^[4]。目前,对于 ROS 以及 MCU 是否参与 MG 诱导成骨细胞凋亡的发生,并且在该过程中发挥怎样的作用未见相关报道。本研究拟构建 MG 诱导成骨细胞凋亡模型,观察 ROS - MCU 途径在其中作用,为糖尿病牙周炎的治疗奠定基础。

材料与与方法

1. 材料:α - MEM 细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),甲基乙二醛、3 - (4,5 - 二甲基噻唑 - 2) - 2,5 - 二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、N - 乙酰半胱氨酸(NAC)、Annexin V - FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、β - actin 一抗(美国 Sigma 公司),MCU 一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司),4',6 - 二脒基 - 2 - 苯基吲哚(DAPI)(美国 Invitrogen 公司),TUNEL 试剂盒(瑞士 Roche 公司),二抗(上海碧云天生物技术有限公司)。

2. 细胞培养:小鼠 MC3T3 - E1 细胞系购自美国 ATCC 细胞库,将细胞培养于含 10% 胎牛血清和 100U/ml 青霉素 G 和 100ng/ml 链霉素的 α - MEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱,待细胞长至 70% ~ 80% 融合时,用胰蛋白酶消化传代。

3. 细胞处理:对照组用 α - MEM 培养基培养;MG 组 MC3T3 - E1 细胞用半数抑制浓度的 MG 培养 24h;NAC 组 MC3T3 - E1 细胞用 2mmol/L NAC 培养 25h;NAC + MG 组 MC3T3 - E1 细胞用 2mmol/L NAC 预培养 1h,再加入半数抑制浓度的 MG 培养 24h。

4. 细胞存活率检测:采用 MTT 法进行检测。取对数生长期的 MC3T3 - E1 细胞,以 10⁵ 个/毫升的浓度接种于 96 孔板,培养 24h 后按不同分组处理后弃上清,换成无血清培养基,每孔加入 20μl 5mg/ml 的 MTT,37℃、5% CO₂ 培养箱避光培养 4h。小心吸弃孔内上清液,每孔加入 150μl DMSO,摇床上避光低速震荡 10min 使结晶完全溶解,酶标仪 490nm 检测吸光度值,实验重复 3 次。细胞存活率(%) = (各实验组吸光度值 - 调零孔吸光度值) / (对照组吸光度值 - 调零孔吸光度值) × 100%。

5. 细胞凋亡检测:采用 Annexin V - FITC/PI 双标记结合流式细胞仪以及 TUNEL 染色法进行检测。Annexin V - FITC/PI 法:将处理后的细胞消化收集,用预冷的结合缓冲液调整细胞密度至 10⁶ 个/毫升,室温避光加入 Annexin V - FITC,再加入 PI,孵育 10min 后流式细胞仪检测细胞凋亡。TUNEL 染色法

将细胞爬片用 4% 多聚甲醛室温固定 1h,再用通透液(体积分数 0.1% Triton X - 100 和质量分数 0.1% 柠檬酸钠配成)2 ~ 8℃ 通透 2min,PBS 清洗后 50μl 反应液 37℃ 避光孵育 1h,用含有 DAPI 的封片剂封片,正置荧光显微镜观察拍照,计数 300 个细胞计算凋亡率。

6. 蛋白表达检测:采用 Western blot 法检测。用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液充分裂解细胞,超声后高速离心机 4℃ 12000r/min 离心,上清液 - 80℃ 分装保存。采用 BCA 法测定蛋白浓度,并将各组蛋白浓度调至相同,加入上样缓冲液至蛋白终浓度为 1μg/μl,100℃ 煮沸 10min 使蛋白充分变性。配制 5% 浓缩胶以及 12% 分离胶,每孔上样 20μg 蛋白,SDS - PAGE 电泳分离后湿转法将蛋白电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,将膜分别转入含一抗的稀释液中(MCU 1:2000,β - actin 1:3000),4℃ 孵育过夜,洗膜后二抗室温孵育 1h,化学发光成像仪曝光,扫描图像并用 Image J 软件分析灰度。

7. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对结果进行单因素方差分析以及 LSD - t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. MG 对成骨细胞增殖活性的影响:与对照组比较,不同浓度的 MG(100、200、300、400、500、600、700、800、900μmol/L)处理 24h 后均能抑制成骨细胞增殖活性,并随着 MG 浓度增加抑制率升高,呈浓度依赖性。MTT 结果显示,600μmol/L 的 MG 处理细胞 24h 后细胞活性为 50.86%,达到半数抑制率,故后续实验采用该浓度作为给药条件(图 1)。

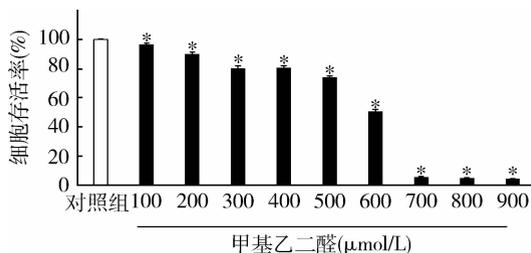


图 1 不同浓度 MG 对成骨细胞增殖的影响
与对照组比较,* P < 0.05

2. MG 对成骨细胞凋亡的影响:流式细胞术结果显示,用半数抑制浓度 MG 处理的成骨细胞总凋亡率为 39.02%,与对照组比较,差异有统计学意义(P < 0.05,图 2A、图 2B),提示 MG 诱导成骨细胞凋亡。

此外,在同样的处理条件下 TUNEL 染色结果显示,与对照组比较, MG 处理组染色阳性率为 32.48% ($P <$

0.05,图 2C、图 2D),显著多于对照组,这进一步验证了 MG 处理后 MC3T3 - E1 细胞的死亡类型以凋亡为主。

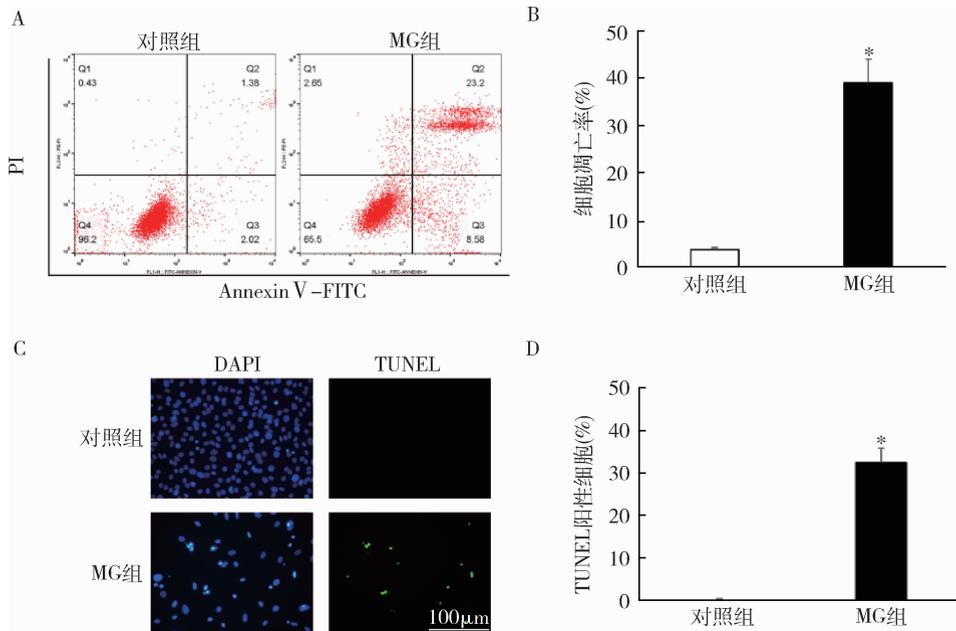


图 2 MG 对成骨细胞凋亡的影响

A、B. 流式细胞术,左上象限为坏死细胞,左下象限为正常细胞,右上象限为晚期凋亡细胞,右下象限为早期凋亡细胞;
C、D. TUNEL 染色 ($\times 200$);与对照组比较, * $P < 0.05$

3. MG 对 MCU 蛋白表达的影响:与对照组比较, 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 MG 处理 MC3T3 - E1 细胞 24h 后 MCU 蛋白表达明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

生物所引起的慢性感染性疾病,可导致牙周袋形成、进行性附着丧失和牙槽骨吸收,最后可致牙松动甚至脱落,是中国成人失牙的首位因素。目前,牙周炎与全身系统性疾病间的相互影响已经成为牙周医学的研究热点。其中,糖尿病作为严重影响人类健康的三大疾病之一,与牙周炎存在双向关系,两者发病存在共同危险因素且互为高危因素。据统计,全球已有 4.25 亿成年人患有糖尿病,而糖尿病患者得牙周炎概率高于正常者约 20%,并且牙周组织破坏更显著以及疾病发展更迅速^[5]。糖尿病病理条件下,牙周基质产生细胞如成纤维细胞以及成骨细胞凋亡增加,进一步限制了牙周软组织和骨组织的愈合,而牙槽骨破坏是牙周炎的重要病理特征,是造成牙齿松动和脱落的直接原因^[2, 6]。因此,深入研究糖尿病牙周炎中成骨细胞凋亡机制,为减少牙槽骨吸收提供理论依据,具有积极的临床意义。

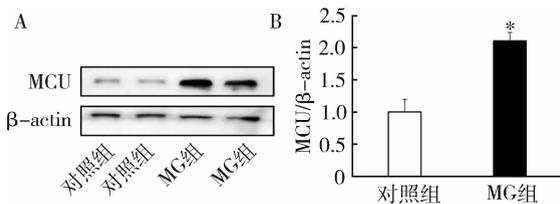


图 3 MG 对 MCU 蛋白表达的影响

A. Western blot 法检测 MCU 蛋白表达变化;B. MCU 蛋白与 β - actin 比较;与对照组比较, * $P < 0.05$

4. ROS 在 MG 诱导成骨细胞凋亡中的作用: TUNEL 结果证实, NAC 预处理后细胞阳性染色率较 MG 组显著减少,细胞凋亡减少。此外, Western blot 法检测结果表明,与 MG 组比较, NAC 处理后 MCU 蛋白表达水平减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

讨 论

牙周炎是发生在牙支持组织的由牙菌斑中的微

MG 属于 α - 酮基醛类,由糖酵解的中间产物丙糖磷酸化裂解生成,或由丙酮和氨基丙酮代谢生成,是一种有毒的代谢产物。糖尿病高糖环境下,细胞和血浆中 MG 升高并长期处于较高状态。已有研究证实 MG 能直接或者间接通过糖基化反应作用于细胞,

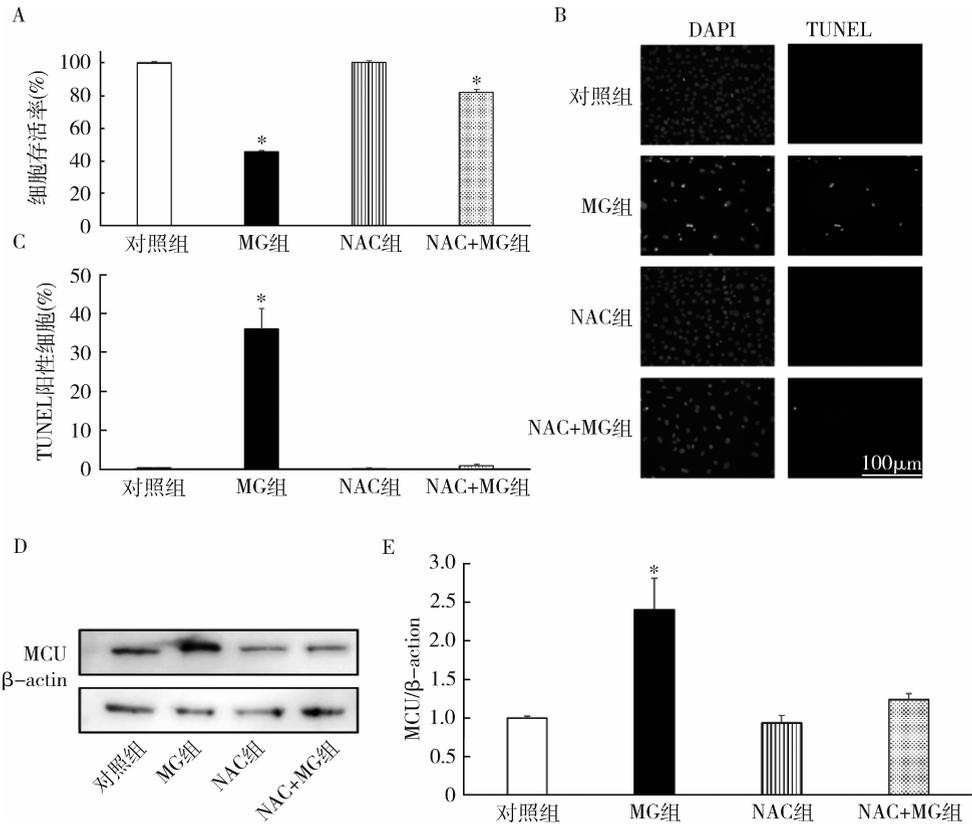


图4 ROS在MG诱导成骨细胞凋亡中的作用

A. MTT 检测细胞存活率; B、C. TUNEL 染色 (×200); D、E. Western blot 法检测 MCU 蛋白表达变化; E. MCU 蛋白与 β-actin 比较; 与对照组比较, * P < 0.05

诱导细胞应激反应,损伤胰岛细胞降低其降糖作用,与糖尿病的进程及各项并发症息息相关。此外, Kashket 等^[3]研究发现 MG 是牙周炎重要致病菌福赛类杆菌的产物,其浓度在牙周炎患者龈沟液中明显高于正常者。Settem 等^[7]研究证实 MG 能诱发牙周组织的炎症反应。Retamal 等^[8]研究发现 MG 能够诱导牙龈成纤维细胞凋亡。牙周炎患者龈沟液中 MG 的浓度可高达 23mmol/L,本研究采用的半数抑制浓度 600μmol/L 远低于该生理浓度,根据 MTT 结果以及流式细胞术、TUNEL 凋亡染色证实,该浓度能够诱导成骨细胞凋亡,符合既往研究结果。

近年来,ROS 与糖尿病牙周炎的关系已成为研究热点。ROS 是指含氧自由基,主要是线粒体呼吸链电子传递时产生,同时,细胞本身具有复杂的抗氧化防御系统与之抗衡,当这种平衡失调 ROS 水平升高时,氧化应激形成。研究证实,糖尿病牙周炎患者牙周组织中 ROS 水平增加,并且与牙周炎附着丧失的严重程度呈正相关^[9]。NAC 作为经典的抗氧化剂,能够清除细胞中的活性氧,其可以明显缓解 MG

对成骨细胞活性的抑制,而其单独处理对细胞并无影响。此外,糖尿病患者血清 ROS 增加,自身抗氧化能力下降也间接增加活性氧水平和活性氧对牙周组织的损害,而牙周基础治疗在改善牙周炎症的同时伴随着血清 ROS 的降低。线粒体作为细胞内 ROS 的主要来源,也是 ROS 攻击的主要靶点^[10]。

Sun 等^[2]研究发现,线粒体 ROS 增加、功能障碍和线粒体生理失衡是导致糖尿病牙周炎加重的发病机制。线粒体钙单向转运蛋白位于线粒体内膜,可顺电化学梯度摄入 Ca²⁺,将 Ca²⁺从胞质转运到线粒体基质并控制转运速率, Ca²⁺通过 MCU 进入线粒体,激活线粒体内脱氢酶和 ATP 合成酶,从而调节氧化磷酸化。已有研究证实,在构建 H₂O₂ 氧化应激损伤模型中,MCU 通过 Ca²⁺ 超载机制,诱导 HeLa 细胞、小脑神经元细胞凋亡,而使用 MCU 阻断剂改善了 NSC34 细胞系的氧化应激损伤,这说明 ROS 可能通过 MCU 诱导细胞凋亡^[11,12]。此外,MCU 与 2 型糖尿病胰岛素抵抗以及糖尿病小鼠心脏功能密切相关^[13,14]。Liu 等^[15]研究发现,MCU 介导体外高糖诱

导的人神经母细胞瘤细胞的凋亡,并且与 ROS 相关。而 MCU 是否介导糖尿病牙周炎中成骨细胞凋亡目前未见相关研究。本研究中, MG 在诱导成骨细胞凋亡的同时伴随着 MCU 蛋白表达的显著增加,说明 MCU 在该过程中发挥了重要作用。为了进一步探讨 ROS 与 MCU 的相关性以及成骨细胞凋亡中的作用,本实验采用经典抗氧化剂 NAC 进行干预,其能有效清除细胞内 ROS,如图 4 所示, MTT 以及 TUNEL 染色结果显示 NAC 不仅有效地缓解了 MG 对成骨细胞增殖活性的抑制,同时减少了细胞凋亡,此外,同样的处理条件下 MCU 蛋白表达水平下降,而 NAC 单独处理并没有影响,这说明 MG 很可能是通过上调 ROS 水平,经 MCU 调控诱导成骨细胞凋亡。

综上所述,本研究认为 MG 能够诱导成骨细胞凋亡,其作用机制可能是通过激活 ROS - MCU 途径来实现的,这将为进一步探索以 MCU 为靶点防治糖尿病性牙周炎牙槽骨吸收提供分子生物学依据。

参考文献

- Sanders AE, Sofer T, Wong Q, *et al.* Chronic periodontitis genome - wide association study in the Hispanic community health study/study of Latinos[J]. *J Dent Res*, 2017, 96(1): 64 - 72
- Sun X, Mao Y, Dai P, *et al.* Mitochondrial dysfunction is involved in the aggravation of periodontitis by diabetes[J]. *J Clin Periodontol*, 2017, 44(5): 463 - 471
- Kashket S, Maiden MF, Haffajee AD, *et al.* Accumulation of methylglyoxal in the gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patients [J]. *J Clin Periodontol*, 2003, 30(4): 364 - 367
- Seidlmayer LK, Juettner VV, Kettlewell S, *et al.* Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia - reperfusion: contributions of Ca^{2+} , ROS, pH, and inorganic polyphosphate[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106(2): 237 - 248
- Graves DT, Ding Z, Yang Y. The impact of diabetes on periodontal

diseases[J]. *Periodontol* 2000, 2020, 82(1): 214 - 224

- Xiao W, Wang Y, Pacios S, *et al.* Cellular and molecular aspects of bone remodeling[J]. *Front Oral Biol*, 2016, 18: 9 - 16
- Settem RP, Honma K, Shankar M, *et al.* Tannerella forsythia - produced methylglyoxal causes accumulation of advanced glycation end-products to trigger cytokine secretion in human monocytes[J]. *Mol Oral Microbiol*, 2018, 33(4): 292 - 299
- Retamal IN, Hernández R, González - Rivas C, *et al.* Methylglyoxal and methylglyoxal - modified collagen as inducers of cellular injury in gingival connective tissue cells[J]. *J Periodontol Res*, 2016, 51(6): 812 - 821
- Tamaki N, Hayashida H, Fukui M, *et al.* Oxidative stress and antibody levels to periodontal bacteria in adults: the Nagasaki Islands study[J]. *Oral Dis*, 2014, 20(3): e49 - 56
- Patil VS, Patil VP, Gokhale N, *et al.* Chronic periodontitis in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress as a common factor in periodontal tissue injury[J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10(4): BC12 - BC16
- Liao Y, Hao Y, Chen H, *et al.* Mitochondrial calcium uniporter protein MCU is involved in oxidative stress - induced cell death[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(6): 434 - 42
- Liu X, Xu S, Wang P, *et al.* Transient mitochondrial permeability transition mediates excitotoxicity in glutamate - sensitive NSC34D motor neuron - like cells[J]. *Exp Neurol*, 2015, 271: 122 - 130
- Wang CH, Wei YH. Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca^{2+} homeostasis in the pathophysiology of insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 70
- Suarez J, Cividini F, Scott BT, *et al.* Restoring mitochondrial calcium uniporter expression in diabetic mouse heart improves mitochondrial calcium handling and cardiac function[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(21): 8182 - 8195
- Liu ZJ, Zhao W, Lei HY, *et al.* High glucose enhances bupivacaine - induced neurotoxicity via MCU - mediated oxidative stress in SH - SY5Y cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 18: 7192798

(收稿日期: 2018 - 03 - 14)

(修回日期: 2020 - 03 - 17)

(上接第 127 页)

- Liedl B, Goeschen K, Durner L. Current treatment of pelvic organ prolapse correlated with chronic pelvic pain, bladder and bowel dysfunction[J]. *Curr Opin Urol*, 2017, 27(3): 274 - 281
- Schmitt JJ, Singh R, Weaver AL, *et al.* Prospective outcomes of a pelvic floor rehabilitation program including vaginal electrogalvanic stimulation for urinary, defecatory, and pelvic pain symptoms[J]. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*, 2017, 23(2): 108 - 113
- Sangsawang B, Sangsawang N. Stress urinary incontinence in pregnant women: a review of prevalence, pathophysiology, and treatment[J]. *Int Urogynecol J*, 2013, 24(6): 901 - 912
- Hill A, Alappattu M. Quality - of - life outcomes following surface electromyography biofeedback as an adjunct to pelvic floor muscle training for urinary incontinence: a case report[J]. *J Womens Health*

Phys Therap, 2017, 41(2): 73 - 82

- Murray AS. Pelvic floor muscle training versus no treatment, or inactive control treatments, for urinary incontinence in women[J]. *Res Nurs Health*, 2019, 42(3): 234 - 235
- Kahyaoglu Sut H, Balkanli Kaplan P. Effect of pelvic floor muscle exercise on pelvic floor muscle activity and voiding functions during pregnancy and the postpartum period[J]. *Neurourol Urodyn*, 2016, 35(3): 417 - 422
- 马玲, 李花, 穆兰芳, 等. 电刺激生物反馈、阴道锥联合盆底肌锻炼治疗产后盆底功能障碍的前瞻性队列研究[J]. *现代妇产科进展*, 2017, 26(12): 928 - 930

(收稿日期: 2020 - 03 - 12)

(修回日期: 2020 - 03 - 15)