

· 论著 ·

四烯甲萘醌保护成骨细胞氧化损伤的作用研究

蒋益忠¹, 林丽娟², 辛海量², 金玉娥³, 蒋益萍², 薛黎明³ (1. 浙江省东阳市中医院, 浙江 东阳 322105; 2. 海军军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433; 3. 上海市疾病预防控制中心化学品毒性检定所, 上海 200336)

【摘要】 目的 考察四烯甲萘醌(MK₄)对成骨细胞氧化损伤的保护作用, 阐明MK₄防治骨质疏松作用机制。方法 采用过氧化氢(H₂O₂)刺激小鼠成骨细胞系(MC3T3-E1)氧化应激模型, 考察细胞活力、ALP活性和骨结节面积, DCFH-DA法检测活性氧(ROS)水平, JC-1检测线粒体膜电势, Annexin V-FITC/PI法检测细胞凋亡率, RT-PCR法考察氧化应激相关基因FoxO1、FoxO3、SOD、Bcl-2和bax等的mRNA表达。结果 10 μmol/L四烯甲萘醌能显著提高H₂O₂刺激的成骨细胞增殖、ALP活性、骨结节形成面积和增强细胞膜电势, 显著降低H₂O₂刺激的成骨细胞内丙二醛和活性氧水平, 同时显著降低成骨细胞凋亡率和细胞凋亡因子bax/Bcl-2的mRNA表达水平, 显著提高抗氧化酶SOD和转录因子FoxO1、FoxO3的mRNA表达。结论 四烯甲萘醌可通过调控FoxO通路保护成骨细胞氧化损伤和通过下调bax/Bcl-2比例, 降低成骨细胞凋亡。

【关键词】 四烯甲萘醌; 骨质疏松; 成骨细胞; 氧化损伤; FoxO通路

【中图分类号】 R15 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2020)06-0523-05

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202005047

Study on the protective effect of menatetrenone against the oxidative stress of osteoblasts

JIANG Yizhong¹, LIN Lijuan², XIN Hailiang², JIN Yu'e³, JIANG Yiping², XUE Liming³ (1. Dongyang Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhejiang, Dongyang 322105, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Institute of Chemical Toxicity, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, Chian)

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect of menatetrenone (MK₄) on the osteoblasts in oxidative stress, and to clarify the anti-osteoporosis mechanism of MK₄. **Methods** Mouse osteoblasts (MC3T3-E1) induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) was used. Cell viability, ALP activity and the area of bone nodule were observed. The level of ROS was detected by DCFH-DA, mitochondrial membrane potential by JC-1, apoptosis rate by annexin V-FITC/PI, and the expression of FoxO1, FoxO3, SOD, bcl-2 and bax by RT-PCR. **Results** Menatetrenone at 10 μmol/L significantly increased the proliferation of osteoblasts stimulated by H₂O₂, ALP activity, bone nodule formation area, cell membrane potential, the antioxidant SOD and transcription factors FoxO1 and FoxO3 mRNA expression. In the meantime, the elevated malondialdehyde and reactive oxygen species level in cells induced by H₂O₂, the apoptosis rate and the mRNA expression level of bax/Bcl-2 were significantly reduced. **Conclusion** menatetrenone can protect osteoblasts from oxidative damage by regulating FoxO pathway and reduce osteoblasts apoptosis by up regulating the proportion of Bcl-2/bax.

【Key words】 menatetrenone; osteoporosis; osteoblasts; oxidative stress; FoxO pathway

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨微细结构破坏和骨量减少为特征的全身性骨代谢疾病, 可

导致骨脆性和骨折风险增加, 多见于老年人。衰老是致骨质疏松的一个重要因素, 随着机体的衰老, 骨骼中过多的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 抑制成骨细胞的增殖、分化和成熟, 抑制成骨细胞分泌骨基质及骨基质的矿化, 同时促进破骨细胞骨吸收, 导致骨质疏松的发生。2018年国家卫生健康委员会发布OP流行病学调查结果显示, 我国65岁以上人群OP患病率达32.0%, 其中, 男性为10.7%, 女性为51.6%^[1]。四烯甲萘醌 (menatetrenone, MK₄)

【基金项目】 上海市卫生和计划生育委员会面上项目 (201740068); 海军军医大学本科创新孵化基地项目 (PH2019102)

【作者简介】 蒋益忠, 本科, 主治医师, Email: msjyz@163.com

【通信作者】 蒋益萍, 实验师, 研究方向: 中药抗骨质疏松药理, Tel: (021)81871305, Email: msjyp@163.com; 薛黎明, 副主任技师, 研究方向: 骨质疏松症与组织蛋白酶K研究, Email: lm.xue@hotmail.com

在临床上常单独或协同用于防治老年性骨质疏松症,疗效显著^[2-3],是我国现版《原发性骨质疏松症诊疗指南》和《骨质疏松症中西医结合诊疗指南》的推荐药物^[1-2]。药理研究发现, MK₄ 能促进成骨增殖、分化和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性^[3-4]。MK₄ 能通过调节氧化应激相关基因和蛋白, 在成骨细胞骨形成中发挥保护作用^[5], 且能阻止成骨细胞凋亡^[6]。过氧化氢 (H₂O₂) 是 ROS 在体内存在的主要形式, 会穿透成骨细胞造成细胞损伤, 本研究拟探讨 MK₄ 对 H₂O₂ 刺激成骨细胞氧化损伤的保护作用和调控机制, 阐明 MK₄ 抗老年性骨质疏松的作用机制。

1 材料

成骨细胞系 MC3T3-E1 (中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心); 特级胎牛血清 (FBS)、DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、双抗 (青霉素和链霉素混合液) 和 PBS 缓冲液 (pH=7.2) 均购自美国 GIBCO 公司; 噻唑蓝 (MTT)、MK₄ (Sigma 公司)。过氧化氢 (H₂O₂, 比利时 Acros Organics 公司); 丙二醛 (MDA) 试剂盒、谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、JC-1 线粒体膜电势 (MMP) 试剂盒和活性氧 (ROS) 试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; BCA 蛋白检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、核酸提取试剂盒、反转录试剂盒和扩增试剂盒 (均为 Thermo Fisher 公司产品); 叉头框蛋白 (FoxO1 和 FoxO3)、β 细胞淋巴瘤/白血病基因 2 (Bcl2) 和凋亡基因 (Bax) 等引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测成骨细胞活力

复苏 MC3T3-E1 小鼠成骨细胞系, 置于 5 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱。以 2×10⁴/ml 浓度的成骨细胞接种于 96 孔培养板中培养 24 h 后, 分别采用 0、10、20、50 和 100 μmol/L (n=10) 的 H₂O₂ 处理, 培养 4、12、24 h 后, 采用碧云天 MTT 试剂盒测定细胞活力。

以 2×10⁴/ml 浓度的成骨细胞接种于 96 孔培养板中培养 24 h 后, 并按空白、氧化应激模型、药物剂量分组: ①对照组, ②选择合适浓度 H₂O₂ 组, ③H₂O₂+10 μmol/L MK₄ 组, ④H₂O₂+1 μmol/L MK₄ 组, ⑤H₂O₂+0.1 μmol/L MK₄ 组。加入药物培养 24 h, 采用 MTT 法检测细胞增殖活性。

2.2 成骨细胞 ALP 活性

以 2×10⁴/ml 浓度的成骨细胞接种于 96 孔培养板中培养 24 h, 按照方法“2.1”项下设置各实验组, 连续培养 6 d, 每 3 d 换液 1 次, 采用硝基苯酚磷酸二钠法检测 ALP 活性。给药 6 d 后, 弃培养液, PBS 洗 3 次, 依次加入 100 μl 二乙醇胺 (50 mmol/L), 50 μl 的对硝基苯酚磷酸二钠 (2.5 mmol/L), 在 37 °C 孵育 30 min, 再加入 50 μl 的 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液终止反应, 置 405nm 处, 测吸光度值 (A)。以不同浓度的对硝基苯酚溶液绘制标准曲线, ALP 活性由每孔释放的对硝基苯酚的 μmol 数表示。

2.3 成骨细胞骨结节面积

以 5×10⁴/ml 浓度的成骨细胞将 MC3T3-E1 细胞接种于 12 孔板内, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 12 h 后换骨结节诱导培养基 (0.1% 牛血清白蛋白、10 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 μg/ml 抗坏血酸以及 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基) 培养 24 h, 按照方法“2.1”项下设置各实验组, 每 3 d 换液 1 次, 连续培养 14 d, 采用 0.1% 茜素红-Tris-HCl 染液 (pH 8.3) 染色, 37 °C 下染色 30 min, 采用倒置相差显微镜 (Leica DMI 3000) 观察, 并随机拍照 10 张, 用 image-Pro Plus (IPP 6.0) 分析骨结节面积。

2.4 细胞线粒体膜电势、ROS 和氧化应激酶 MDA、GSH、SOD 测定

以 2×10⁵/ml 细胞浓度铺 6 孔板, 培养 24 h 后, 按照方法“2.1”项下设置各实验组, 干预 24 h 后, 用荧光酶标仪法分别测定 JC-1 单体和复合物的荧光, DCFH-DA 探针法测活性氧水平, ELISA 法测定 GSH、SOD 和 MDA 水平。

2.5 细胞凋亡检测

以 1×10⁶/ml 细胞浓度铺 6 孔板, 培养 12 h 后, 按照方法“2.1”项下设置各实验组, 干预 24 h 后, 依据 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书, 采用流式细胞仪法检测。

2.6 RT-PCR

以 1×10⁶/ml 细胞浓度铺 6 孔板, 培养 12 h 后, 按照方法“2.1”项下设置各实验组, 干预 24 h 后, 依据试剂盒说明书进行提取总 RNA 和反转录后, 分别对 GAPDH、SOD2、FoxO1、FoxO3、Bcl-2 和 bax 进行 RT-PCR 扩增, 引物序列见表 1, PCR 反应条件: 采用预变性 95 °C、10 min, 变性 95 °C、45 s, 退火 60 °C、45 s, 延伸 72 °C、50 s, 循环 40 次, 总反应体系为 10 μl。

2.7 统计学分析

每组实验重复 3 次。采用 SPSS 软件经 ANOVA

表1 小鼠引物序列

基因	上游引物	下游引物
SOD2	TCCCAGACCTGCCTTACGA	TCGGTGGCGTTGAGATTG
FoxO1	GTACGCCGACCTCATCACCAAG	GCACGCTCTTACCATCCACTC
FoxO3	TGCTAAGCAGGCCTCATCTCAA	AAGCTGTAAACGGATCACTGTC
Bcl-2	AGGAGCAGGTGCCTACAAGA	GCATTTTCCCACCACCTGTGC
bax	CATCCAGGATCGAGCAGA	GCCTTGAGCACCAGTTTG
GAPDH	TGAACGGGAAGCTAAGG	TCCACCACCCTGTTGCTGGA

方差分析检验, 差异有统计学意义($\alpha=0.05$), 再采用 Student's *t* test 检验进行两组比较, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 H₂O₂ 处理 MC3T3-E1 成骨细胞

MC3T3-E1 经 0~100 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 分别处理 4、12、24 h, 结果发现 0~100 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理 4 h 对细胞活力均无显著性影响 ($P>0.05$), 处理 12 h 后, 在 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 下的细胞活力显著降低, 分别降低 19.4% 和 33.4%。H₂O₂ 干预 24 h 后, 在 20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 均具有显著性差异, 分别降低 13.2%, 47.4% 和 57.9%(表 2)。故后续实验选择 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h。

3.2 MK₄ 对 H₂O₂ 损伤成骨细胞增殖、ALP 活性和骨结节形成的影响

MC3T3-E1 经 20 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理 24 h 后, 结果显示, 显著抑制了成骨细胞的细胞活力 ($P<0.05$), ALP 活性 ($P<0.05$) 和骨结节形成面积 ($P<$

0.05), 与空白组比较, 分别降低 13%、16% 和 85%, 见表 3 和图 1。与模型组比较, MK₄ 在 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 可促进 H₂O₂ 损伤成骨细胞增殖 ($P<0.05$)。同样, MK₄ 在 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 能显著改善 ALP 活性 ($P<0.05$) 和提高骨结节形成面积 ($P<0.05$), 分别增加 50.7% 和 44.5% (表 3 和图 1)。

3.3 MK₄ 对 H₂O₂ 损伤成骨细胞线粒体膜电势、活性氧和抗氧化酶的影响

MC3T3-E1 成骨细胞经 20 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理 24 h 后, 结果发现显著降低成骨细胞膜电势和增高活性氧含量 ($P<0.05$)。与模型组比较, MK₄ 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 可促进 H₂O₂ 损伤成骨细胞膜电势升高和降低活性氧含量 ($P<0.05$)。与空白组比较, 20 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 能显著降低 FoxO1, FoxO3 和 SOD2 的 mRNA 表达 ($P<0.05$)。与 H₂O₂ 组比较, 给予 10 $\mu\text{mol/L}$ MK₄ 后, FoxO1, FoxO3 和 SOD2 的 mRNA 表达均显著增高 ($P<0.01$)。

3.4 MK₄ 对 H₂O₂ 损伤成骨细胞凋亡的影响

在通道 1 和通道 2 观察单个细胞分布区域, 选

表2 H₂O₂ 处理的时间与浓度对成骨细胞活力的影响

处理时间(<i>t</i> /h)	对照组	H ₂ O ₂ 浓度($\mu\text{mol/L}$)			
		10	20	50	100
4	0.22±0.04	0.23±0.03	0.22±0.04	0.21±0.05	0.20±0.04
12	0.31±0.05	0.33±0.04	0.30±0.04	0.27±0.02*	0.22±0.03*
24	0.38±0.03	0.39±0.03	0.34±0.02*	0.20±0.03**	0.16±0.04**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

表3 MK₄ 对 H₂O₂ 损伤成骨细胞的影响

组别	MTT(%对照)	ALP(%对照)	MPP(%对照)	活性氧(%对照)	MDA($\mu\text{mol/g}$)	细胞凋亡率(%)
对照组	1.00±0.01*	1.00±0.02*	1.00±0.02*	1.00±0.01*	27.2±4.3**	2.3±0.3*
H ₂ O ₂ 组	0.87±0.02	0.84±0.03	0.78±0.05	1.13±0.02	51.0±3.7	7.3±0.3
H ₂ O ₂ +MK ₄ (10 $\mu\text{mol/L}$)组	1.03±0.04*	0.99±0.03*	1.05±0.07*	1.02±0.02*	27.3±3.1**	1.8±0.2*
H ₂ O ₂ +MK ₄ (1 $\mu\text{mol/L}$)组	0.96±0.03	0.87±0.04	0.88±0.21	1.06±0.05	44.8±2.0	2.9±0.3*
H ₂ O ₂ +MK ₄ (0.1 $\mu\text{mol/L}$)组	0.85±0.03	0.80±0.03	0.82±0.09	1.09±0.05	51.6±0.3	5.7±0.4

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与H₂O₂组比较。

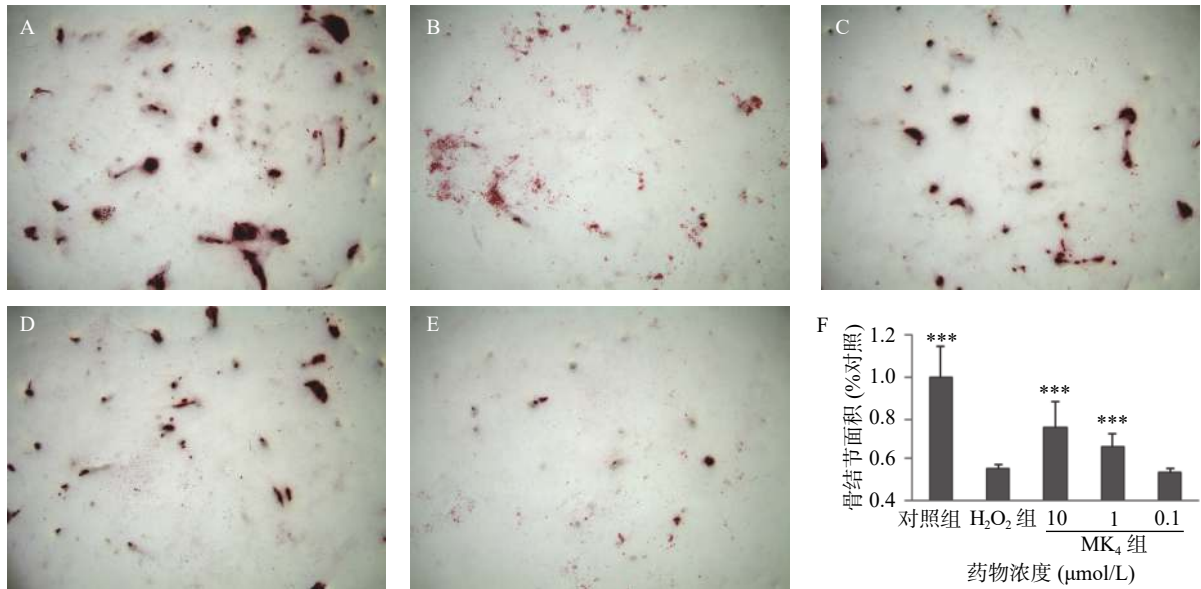


图1 MK₄对H₂O₂损伤成骨细胞骨结节的影响(×200)

A. 对照组; B. H₂O₂组; C-E. H₂O₂+10、1、0.1 μmol/L MK₄组; F. 骨结节面积

****P*<0.001, 与H₂O₂组比较。

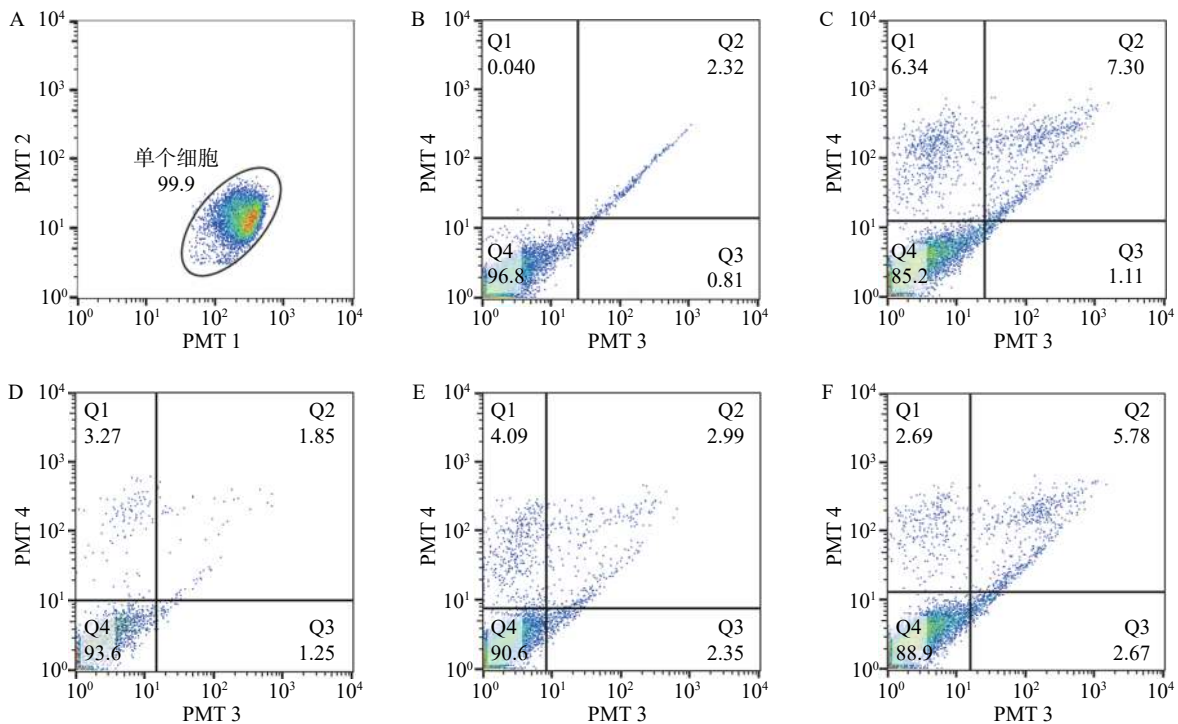


图2 MK₄对H₂O₂损伤成骨细胞凋亡的影响

A. 对照组单个细胞选择范围; B. 对照组; C. H₂O₂组; D-F. H₂O₂+10、1、0.1 μmol/L MK₄组

定 99.9% 的细胞区域用于后续分析,在通道 3 和通道 4 观察凋亡细胞分布, Q4 为正常细胞, Q1 为坏死细胞; Q2 为晚期凋亡细胞, Q3 为早期凋亡细胞。与对照组比较, 20 μmol/L H₂O₂ 处理 24 h 后, 细胞的凋亡率显著增高 (*P*<0.05)。经 0.1 ~ 10 μmol/L 浓度 MK₄ 干预 24 h 后发现, 1 ~ 10 μmol/L 浓度 MK₄ 能显著降低细胞凋亡率 (*P*<0.05), 与对

照组相近, 见表 3 和图 2。与空白组比较, 20 μmol/L H₂O₂ 能显著降低 Bcl-2 的 mRNA 表达 (*P*<0.001), bax 表达无显著差异, 给予 10 μmol/L MK₄ 后, Bcl-2 和 bax 的 mRNA 表达均显著增高 (*P*<0.01), 见图 3。H₂O₂ 组的 bax/Bcl-2 比值为对照组的 22.5 倍, 而 MK₄ 处理后降低至对照组的 7.6 倍。

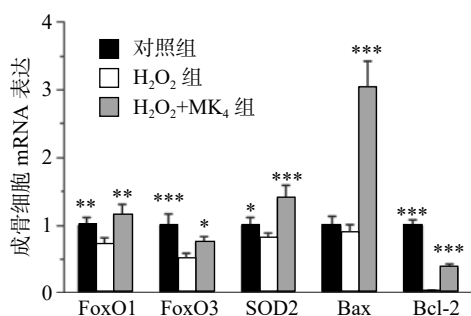


图3 MK₄对H₂O₂损伤成骨细胞氧化和凋亡相关mRNA表达的影响

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 与H₂O₂组比较。

4 结论与讨论

骨代谢中,机体通过调节 FoxOs 转录因子的活性,产生抗氧化物酶,对抗氧化应激对骨骼的损伤,包括 FoxO1、FoxO3、FoxO4 和 FoxO6 等,其中, FoxO1 和 FoxO3 是调节成骨细胞氧化还原平衡和成骨功能的主要分子^[7]。活性氧可激活 FoxO1 的转录,调节线粒体抗氧化酶 Mn-SOD 的活性^[8]。随着活性氧的升高, FoxO3 下调,成骨细胞分化受损,抑制骨形成作用^[9]。本研究发现, MK₄ 对 H₂O₂ 引起的氧化应激具有显著的改善作用,降低活性氧和脂质氧化产物 MDA 水平,上调转录因子 FoxO1、FoxO3 和抗氧化酶 SOD 的 mRNA 表达。

Bcl-2 蛋白可减少氧化应激水平,而 bax 基因可与 Bcl-2 形成异源二聚体,抑制 Bcl-2 的作用,进而诱导细胞凋亡。MK₄ 可上调 Bcl-2/bax 比值,抑制了成骨细胞凋亡^[10]。本研究发现, H₂O₂ 能显著提高成骨细胞凋亡率,同时增加 bax 的表达,降低 Bcl-2 蛋白表达。MK₄ 处理组对成骨细胞凋亡的拮抗作用明显,随着剂量浓度增加而增加。MK₄ 在氧化应激状态下,可显著上调 Bcl-2,下调 bax 的基因表达, bax/Bcl-2 比值显著降低,抑制了成骨细胞凋亡。

FoxOs 激活促进 Bcl-2 相关凋亡调节蛋白 (Bim) 转录, Bim 是线粒体凋亡通路的核心调控者,引起成骨细胞线粒体膜电位降低^[10]。线粒体跨膜电位降低说明线粒体膜通透性转运孔 (MPTP) 过度开放。若 MPTP 过度开放,易引起呼吸链解偶联,线粒体基质渗透压增高,使得促凋亡活性物质从线粒

体释放入细胞基质,导致细胞凋亡。MK₄ 显著改善了 H₂O₂ 刺激的成骨细胞线粒体膜电势降低,表明 MK₄ 对 H₂O₂ 刺激成骨细胞的氧化损伤具有保护作用。

综上所述, MK₄ 能显著抑制 H₂O₂ 刺激的成骨细胞氧化损伤,机制与 FoxO 转录因子相关。同时, MK₄ 对 H₂O₂ 引起的成骨细胞凋亡具有拮抗作用,其机制为上调 Bcl-2 和下调 bax 的基因表达。

【参考文献】

- [1] 中国中西医结合学会骨伤科专业委员会. 骨质疏松症中西医结合诊疗指南[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(45): 3524-3533.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2011)[J]. 中国全科医学, 2011, 4(1): 2-17.
- [3] AKBARI S, RASOULI-GHAHROUDI A A. Vitamin K and bone metabolism: a review of the latest evidence in preclinical studies[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 4629383.
- [4] WU W J, GAO H Y, JIN J S, et al. A comparative study of menaquinone-7 isolated from Cheonggukjang with vitamin K₁ and menaquinone-4 on osteoblastic cells differentiation and mineralization[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 131: 110540.
- [5] MUSZYŃSKA M, AMBROŹEWICZ E, GĘGOTEK A, et al. Protective effects of vitamin K compounds on the proteomic profile of osteoblasts under oxidative stress conditions[J]. Molecules, 2020, 25(8): E1990.
- [6] URAYAMA S, KAWAKAMI A, NAKASHIMA T, et al. Effect of vitamin K2 on osteoblast apoptosis: vitamin K2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblasts induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine[J]. J Lab Clin Med, 2000, 136(3): 181-193.
- [7] SALIH D A, BRUNET A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(2): 126-136.
- [8] SIQUEIRA M F, FLOWERS S, BHATTACHARYA R, et al. FOXO1 modulates osteoblast differentiation[J]. Bone, 2011, 48(5): 1043-1051.
- [9] GÓMEZ-PUERTO M C, VERHAGEN L P, BRAAT A K, et al. Activation of autophagy by FoxO3 regulates redox homeostasis during osteogenic differentiation[J]. Autophagy, 2016, 12(10): 1804-1816.
- [10] 李成, 梁庆威, 周志成, 等. Bim在激素诱导成骨细胞凋亡中的表达及意义[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(10): 921-925, 929.

【收稿日期】 2020-05-18 【修回日期】 2020-07-13

【本文编辑】 李睿琴