

高糖及高糖波动对 MG63 细胞株氧化应激的影响

周玮 万利 张勇 朱娟 苟明生 王加林

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)12-1048-04

摘要: **目的** 研究波动性葡萄糖和恒定高葡萄糖对 MG63 细胞增殖、细胞周期及氧化应激的影响,探讨波动性葡萄糖造成糖尿病性骨质疏松症可能的发病机制。**方法** 体外培养的人成骨肉瘤 MG63 细胞株,随机分为正常对照 NG 组(葡萄糖浓度为 5.5mmol/L),恒定高葡萄糖 HG 组(含葡萄糖 33.3mmol/L),波动性葡萄糖 FG 组(5.5/33.3mmol/L),共作用 24h。MTT 比色分析法测定细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率。取 MG63 细胞培养上清液,以黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性,以硫代巴比妥酸为底物检测丙二醛(MDA)含量。**结果** (1)高糖及高糖波动可抑制 MG63 细胞的增殖,与高糖组相比,高糖波动组的抑制效应更加明显。(2)高糖及高糖波动可阻滞 MG63 细胞周期,使 G1 期细胞比例增加,S 期比例减少,诱导细胞凋亡。高糖波动组作用更加明显。(3)高糖作用下 MG63 细胞 SOD 活性降低($P < 0.05$),MDA 水平升高($P < 0.05$),高糖波动组更加明显。**结论** 波动性葡萄糖可加重高糖环境下 MG63 细胞的氧化应激状态,抑制成骨细胞增殖,阻滞其细胞周期,诱导细胞凋亡。此可能是糖尿病性骨质疏松症的一个重要的发病机制。

关键词: 骨质疏松; 高糖波动; MG63 细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 凋亡; 氧化应激

Effects of high glucose and high glucose fluctuation on oxidative stress by MG63 cells ZHOU Wei, WAN Li, ZHANG Yong, et al. Department of Endocrinology, the 82nd Hospital of PLA, Huai'an 223001, China

Corresponding author: WANG Jialin, Email: 13861588239@139.com

Abstract: **Objective** To observe the effects of glucose and high glucose fluctuation on proliferation, cell cycle, apoptosis, and oxidative stress by MG63 cells, and to study the role of non-physiological concentration of glucose in the pathogenesis of diabetic osteoporosis. **Methods** MG63 cells were incubated for 24h in the presence of 5.5 mmol/L glucose (NG), 33.3mmol/L glucose (HG), and high glucose (5.5/33.3mmol/L) fluctuation (FG), respectively. The proliferation of MG63 cells was examined with MTT colorimetric analysis. The cell cycle and apoptotic rate of the cells were determined with flow cytometry. The activity of SOD in the supernatant was measured with xanthine oxidase method and the content of MDA was detected with thiobarbituric acid substrate. **Results** 1) Both high glucose and high glucose fluctuation inhibited MG63 cell proliferation, and the effect in high glucose fluctuation group was significantly higher than in high glucose group ($P < 0.05$). 2) Both high glucose and high glucose fluctuation blocked cell cycle, increased the percentage of G1 phase, decreased the percentage of S phase, and induced apoptosis. The effect in high glucose fluctuation group was obviously stronger than that in high glucose group ($P < 0.05$). 3) High glucose decreased the activity of SOD ($P < 0.05$) and increased the content of MDA ($P < 0.05$). Compared with those in HG group, the activity of SOD decreased and the content of MDA increased significantly in high glucose fluctuation group. **Conclusion** High glucose fluctuation not only inhibits the proliferation but also blocks cell cycle, induces apoptosis, and aggravates oxidative stress in MG63 cells, which may be one of the key pathogenic factors in diabetic osteoporosis.

作者单位: 223001 淮安,解放军第八二医院内分泌科

通讯作者: 王加林, Email: 13861588239@139.com

Key words: Osteoporosis; High glucose fluctuation; MG63 cell; Cell proliferation; Cell cycle; Apoptosis; Oxidative stress

高血糖是糖尿病的主要特征,糖尿病慢性并发症主要通过长期持续性高血糖和血糖波动^[1-3]两种方式实现,而其核心是氧化应激^[3,4]。研究表明,高糖波动可加重糖尿病患者血管内皮细胞的氧化应激反应,从而导致大血管并发症^[5,6]。糖尿病易并发骨质疏松症已为公认,既往研究表明,高浓度葡萄糖可通过抑制成骨细胞的增殖及影响其细胞周期参与骨质疏松症的发生^[7]。但高糖及高糖波动对成骨细胞的氧化应激是否有影响,目前未见报道。我们拟观察不同浓度葡萄糖及葡萄糖波动对 MG63 细胞株增殖、细胞周期及氧化应激表达的影响,进一步探讨糖尿病性骨质疏松症的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

第 106 代 MG63 细胞株由中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所惠赠;MEM 培养液购自 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;牛血清白蛋白购自 Gibco 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:将第 106 代 MG63 细胞株,根据实验要求接种于培养瓶或培养板(Nunc 公司)中,用含 100 ml/L 胎牛血清、50 mg/L 维生素 C 的无酚红 MEM 培养液,于 37℃,50 ml/L CO₂ 条件下培养,2d 换液 1 次。

1.2.2 干预试验:细胞达 50%~60% 汇片后换含 0.1% 牛血清白蛋白的无血清 MEM 培养液培养 3h 后,随机分为:①正常对照 NG 组(葡萄糖浓度为 5.5mmol/L);②恒定高葡萄糖 HG 组(含葡萄糖 33.3mmol/L);③波动性葡萄糖 FG 组(葡萄糖浓度为 5.5mmol/L 与葡萄糖浓度为 33.3mmol/L 两种条件培养液,每 8h 更换一次);NG 组和 FG 组同样每 8h 更换培养液,共作用 24h。

1.2.3 MTT 比色分析法:将细胞悬液(1×10^4 /ml),每孔 200 μ l,每组设 6 个复孔,接种在 96 孔培养板。细胞生长 24h 后,吸去上清液,每孔加入 1mg/ml MTT 100 μ l,37℃ 孵育 2h,细胞内出现深蓝色晶体后,终止培养,吸弃孔内上清液,每孔加入 100 μ l DMSO,4℃ 冰箱内过夜,使细胞内结晶体完全

溶解,直接于 DG3022 酶联免疫检测仪 570nm 波长处比色,测定各孔的光吸收值(A_{570} 值),以该组复孔的平均值作为该组细胞的 A_{570} 值,并计算其生长抑制率。细胞生长抑制率(IR) = $(1 - \text{实验组 } A_{570} \text{ 值} / \text{对照组 } A_{570} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞仪细胞周期及凋亡率检测:不同浓度葡萄糖的 MEM 培养液培养 24h 后,消化、收集细胞约 10^6 ,PBS 洗涤两次后快速加入 4℃ 1ml 预冷的流式细胞固定液(含 70% 无水酒精,1.5% 牛血清,28.5% PBS),吹打混匀制成细胞悬液。加入 PI 染液 4℃ 染色 30min。FCM 测定细胞 DNA 含量,专用软件进行细胞周期和凋亡分析。每组实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 细胞上清液 SOD 活性、MDA 含量测定:细胞在不同条件下培养 24h 后,取上清液 200 μ l。按 SOD 试剂盒说明操作,用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,550nm 处测定吸光度,计算 SOD 活性;按 MDA 试剂盒说明操作,以硫代巴比妥酸为底物检测 MDA 含量,532nm 处测定吸光度,计算 MDA 含量。每组实验重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学处理

用 SPSS13.0 软件包统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞形态的影响

倒置显微镜下可见,正常葡萄糖组 MG63 细胞呈梭形、多角形,贴壁生长,细胞边界不清,伪足伸出呈融合状态,部分区域出现重叠,细胞生长旺盛。稳定性高糖组细胞伪足明显回缩,细胞逐渐变圆,细胞间隙增大,脱壁。波动性高糖组细胞大部分呈脱壁状,圆形,悬浮于培养基中,可见崩解坏死的细胞(见图 1)。

2.2 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞增殖的影响

MTT 比色结果显示,高浓度葡萄糖可抑制 MG63 细胞的增殖。与正常葡萄糖组相比,稳定性高糖组可明显抑制 MG63 细胞的增殖($P < 0.05$),并在波动性高糖组达到最大效应($P < 0.05$)。见表 1。

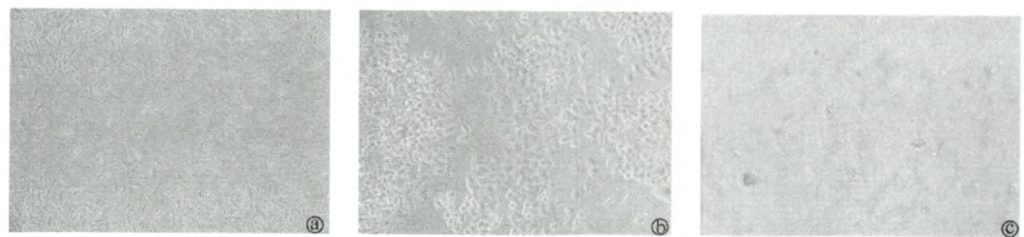


图 1 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞的形态的影响

注:a 正常葡萄糖组,b 稳定性高糖组,c 波动性高糖组

表 1 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	A ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)	IR (%)
NG 组	0.306 ± 0.027	
HG 组	0.267 ± 0.031 ^a	12.75
FG 组	0.218 ± 0.034 ^{ab}	28.76

注:^a $P < 0.05$,与 NG 组比较;^b $P < 0.05$,与 HG 组比较

2.3 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞周期的影响

高浓度葡萄糖可影响细胞周期,将细胞阻滞在 G1 期,且凋亡细胞增多,凋亡率增加。波动性高糖组细胞周期阻滞效应及诱导细胞凋亡作用更加明显($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞周期及凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	G1 期细胞 (%)	S 期细胞 (%)	凋亡率 (%)
NG 组	38.33 ± 3.51	53.09 ± 8.13	2.89 ± 0.37
HG 组	49.00 ± 3.70 ^a	40.67 ± 2.17 ^a	15.53 ± 1.23 ^a
FG 组	61.97 ± 3.82 ^{ab}	29.23 ± 3.69 ^{ab}	26.16 ± 1.35 ^{ab}

注:^a $P < 0.05$,与 NG 组比较;^b $P < 0.05$,与 HG 组比较

2.4 高糖及高糖波动对 MG63 细胞上清液 SOD 活性和 MDA 表达的影响

各组细胞培养 24h 后,与正常葡萄糖组相比,稳定性高糖组 SOD 活性降低,MDA 含量升高($P < 0.05$);波动性高糖组的 SOD 活性降低,MDA 含量升高更加明显。见表 3。

表 3 MG63 细胞培养上清液 SOD 活性和 MDA 含量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	SOD 活性 (U/ml)	MDA 含量 (nmol/ml)
NG 组	35.81 ± 4.85	0.55 ± 0.03
HG 组	20.15 ± 1.59 [*]	2.56 ± 0.09 [*]
FG 组	12.41 ± 1.32 ^{*△}	3.22 ± 0.12 ^{*△}

注:^{*} $P < 0.05$,与 NG 组比较[△] $P < 0.05$,与 HG 组比较

3 讨论

研究表明,糖尿病慢性并发症的发生发展不仅
万方数据

与整体血糖水平相关,而且与血糖的波动性密切相关^[1-3,8]。持续性高血糖引起糖尿病慢性并发症的机制主要有:多元醇途径,己糖胺途径,蛋白激酶 C (proteinkinaseC, PKC) 途径,晚期糖基化终末产物 (advancedglycationendproducts, AGE) 途径^[1-3] 等。Brownlee^[3] 进一步提出了糖尿病并发症的统一机制学说,其核心是由于高糖作用下线粒体呼吸链中氧自由基生成过多和(或)抗氧化防御系统受损导致氧化应激的结果。随着糖尿病病理生理机制的深入研究及多项大型临床观察的开展,学者们开始关注血糖波动对糖尿病慢性并发症的影响,发现 HbA1c 接近的患者,血糖波动较大者发生慢性并发症的风险大^[14,8],可能的机制是:血糖波动大者其氧化应激的相应产物浓度增加,氧化应激促进体内糖基化终末产物和脂氧化终末产物的大量生成和蓄积,增加了糖尿病慢性并发症的风险。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 是反映机体氧化应激状态的常用指标。SOD 是体内重要的氧自由基清除剂,能保护细胞免受损伤,其活力的高低间接反映机体清除氧自由基的能力,SOD 常被看做是机体抗氧化损伤防御体系中的第一道防线。MDA 作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,其含量变化间接反映了组织中氧自由基含量及细胞损伤的程度。

骨质疏松是糖尿病常见的并发症之一^[2,10-13],表现为成骨细胞与破骨细胞分化及功能失衡,进而导致全身骨量减少、易于发生骨折,其发病机制较为复杂。近年来,骨质疏松与氧化应激的相关性受到了广泛关注,但多限于血液中氧化应激水平与骨质疏松的关系研究^[11-13],反映的是全身氧化应激状态,有关骨组织、成骨细胞中的氧化应激水平与骨质疏松的关系则较少报道。糖尿病可提高机体氧化应激水平^[14],但高糖及高糖波动对成骨细胞如何影响,目前更少见报道。

MG63 细胞株是当前已公认的永生化成骨样细胞系中的一种,具有成骨细胞的大部分特征,广泛应用于基础研究及药效观察等^[13]。我们应用 MTT 比色分析法和流式细胞术分别观察了葡萄糖及葡萄糖波动对具有成骨细胞表型特征的 MG63 细胞增殖和细胞周期表达的影响,发现高糖能降低 MG63 细胞的增殖能力,将细胞阻滞在 G1 期,并诱导细胞凋亡。而葡萄糖波动对细胞的增殖抑制和细胞周期的阻滞及细胞凋亡的诱导作用更加明显。

慢性高糖状态下,细胞可以通过改变某些代谢状态或者进行调节性反馈来部分拮抗葡萄糖毒性作用,有学者称其为“高血糖记忆效应”,而葡萄糖浓度剧烈波动时,该适应性调节作用减弱,葡萄糖毒性增强。波动性高血糖可能更能促进多元醇通路、己糖胺通路、PKC 及 AGE 的活性,也更能使氧化应激放大^[14]。我们观察了高糖及波动性高糖对 MG63 细胞 SOD 和 MDA 表达的影响,发现:高糖可使体外培养的 MG63 细胞上清液中 SOD 活性表达下降,MDA 含量增高;波动性高糖降低 SOD 活性及增高 MDA 含量的效应更加明显。故推测,高糖波动可能通过诱导成骨细胞的氧化应激反应,进而导致其增殖减少、细胞周期改变及细胞凋亡,此可能是糖尿病性骨质疏松症的发病机制之一。

【参 考 文 献】

- [1] Al-Dorzi HM, Tamim HM, Arabi YM. Glycaemic fluctuation predicts mortality in critically ill patients. *Anaesth Intensive Care*, 2010, 38(4):695-702.
- [2] Yamagishi SI. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets*, 2011 Oct 21 [Epub ahead of print].
- [3] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001, 414 (6865):813-820.
- [4] Yan M, Mehta JL, Zhang W, et al. LOX-1, Oxidative Stress and Inflammation: A Novel Mechanism for Diabetic Cardiovascular Complications. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, 25 (5):451-459.
- [5] Ye XY, Tu Q, Tong Z, et al. Effects of glucose concentration fluctuation on function of cultured bovine arterial endothelial cells. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2010, 38(3):264-267.
- [6] Azuma K, Kawamori R, Toyofuku Y, et al. Repetitive fluctuations in blood glucose enhance monocyte adhesion to the endothelium of rat thoracic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(10):2275-2280.
- [7] 周玮,张南雁,姬秋和. 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞株骨素及其配体 mRNA 表达的影响. *医学临床研究*, 2005, 22 (12):1651-1653.
- [8] The Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*, 1995, 44(8):968-983.
- [9] Michele M, Riccardo CB, Giacomo Z, et al. Fasting plasma glucose variability predicts 10-year survival of type 2 diabetes patients: The verona diabetes study. *Diabetes Care*, 2000, 23 (1):45-50.
- [10] Saito, Mitsuru. Poor bone quality in diabetes and arteriosclerosis. *Clinical calcium*, 2009, 19(9):1257-1268.
- [11] Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of Oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone*, 2009, 45(Suppl 1):S35-S38.
- [12] Manolagas SC. From Estrogen-Centric to Aging and Oxidative Stress: A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 2010, 31(3):266-300.
- [13] Manolagas SC, Almeida M. Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21(11):2605-2614.
- [14] Bai XC, Lu D, Liu AL, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kB ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem*, 2005, 280(17):17497-17506.

(收稿日期: 2011-08-05)

高糖及高糖波动对MG63细胞株氧化应激的影响

作者: [周玮](#), [万利](#), [张勇](#), [朱娟](#), [荀明生](#), [王加林](#)
作者单位: [解放军第八二医院内分泌科](#), [淮安, 223001](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2011, 17 (12)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201112004.aspx