

艾塞那肽通过 p38MAPK 通路对成骨细胞促增殖和抗凋亡的作用研究

陈泽群* 朱文雄 江铭 谢荏棠 张海滨
东莞市人民医院骨三科,广东 东莞 523000

中图分类号: R73-36+2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 06-0869-04

摘要: **目的** 探讨艾塞那肽通过 p38MAPK 通路对成骨细胞促增殖和抗凋亡的作用机制。**方法** 将小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 Subclone 14 分为对照组、艾塞那肽组、棕榈酸钠组、棕榈酸钠组+艾塞那肽组,分别使用相应试剂培养 48 h。通过 CCK-8 和流式细胞术检测细胞活力与凋亡。通过 Western blot 检测细胞中 P38MAPK、Cyclin D1、Caspase-3 的蛋白水平。**结果** 艾塞那肽对正常细胞活力无显著影响($P>0.05$),棕榈酸钠组的细胞活力显著低于对照组($P<0.01$),艾塞那肽+棕榈酸钠组的细胞活力显著高于棕榈酸钠组($P<0.01$);艾塞那肽对正常细胞凋亡无显著影响($P>0.05$),棕榈酸钠组的细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.01$),艾塞那肽+棕榈酸钠组的细胞凋亡率显著低于棕榈酸钠组($P<0.01$);艾塞那肽对正常细胞中 P38MAPK、Cyclin D1 和 Caspase-3 蛋白水平无明显影响($P>0.05$),棕榈酸钠组的 P38MAPK 和 Caspase-3 显著高于对照组而 Cyclin D1 显著低于对照组($P<0.01$),艾塞那肽+棕榈酸钠组的 P38MAPK 和 Caspase-3 显著低于棕榈酸钠组而 Cyclin D1 显著高于棕榈酸钠组($P<0.01$)。**结论** 艾塞那肽可以通过 p38MAPK 通路,减少 Caspase-3 蛋白并上调 Cyclin D1 蛋白的表达,抑制高脂环境下成骨细胞的凋亡并提高细胞活力。

关键词: 骨质疏松;成骨细胞;艾塞那肽;p38MAPK 通路

Study on the effects of exenatide on proliferation and anti-apoptosis of osteoblasts via p38MAPK pathway

CHEN Zequn*, ZHU Wenxiong, JIANG Ming, XIE Rentang, ZHANG Haibin
Department of Orthopaedics, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523000, China
* Corresponding author: CHEN Zequn, Email: 365896237@ qq.com

Abstract: Objective To explore the mechanism of action of exenatide on proliferation and anti-apoptosis of osteoblasts through p38MAPK pathway. **Methods** Mouse osteoblast MC3T3-E1 Subclone 14 was divided into control group, exenatide group, sodium palmitate group, sodium palmitate group and exenatide group, and cultured for 48 h with corresponding reagents. Cell viability and apoptosis were detected by CCK-8 and flow cytometry. Western blot was used to detect the protein levels of P38MAPK, Cyclin D1 and Caspase-3 in cells. **Results** Exenatide had no significant effect on normal cell viability ($P>0.05$). The cell viability of the sodium palmitate group was significantly lower than that of the control group ($P<0.01$). The cell viability of the exenatide + palmitate group was significantly higher than that of the sodium palmitate group ($P<0.01$). Exenatide had no significant effect on normal cell apoptosis ($P>0.05$). The apoptosis rate of the sodium palmitate group was significantly higher than that of the control group ($P<0.01$). The apoptosis rate of the exenatide + palmitate group was significantly lower than that of the sodium palmitate group ($P<0.01$). Exenatide had no significant effect on normal cells ($P>0.05$). P38MAPK and Caspase-3 in the sodium palmitate group were significantly higher than those in the control group, and Cyclin D1 was significantly lower than the control group ($P<0.01$). P38MAPK and Caspase-3 in the exenatide + palmitate group were significantly lower than those in the sodium palmitate group and Cyclin D1 was significantly higher than the sodium palmitate group ($P<0.01$). **Conclusion** Exenatide can reduce Caspase-3 protein and up-regulate the expression of Cyclin D1 protein through p38MAPK pathway, inhibit osteoblast apoptosis and increase cell viability in high-fat environment.

* 通信作者: 陈泽群, Email: 365896237@ qq.com

Key words: osteoporosis; osteoblasts; exenatide; p38MAPK pathway

骨质疏松症是以低骨量、骨组织退化以及微结构破坏为特征的一种疾病,在全球具有较高的发病率,现阶段治疗骨质疏松的药物以作用于破骨细胞为主,而作用于成骨细胞促进骨形成的药物较少^[1-2]。肥胖与骨质疏松和糖尿病的发生有着相关性,近期研究^[3]表明胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 的减少与骨质疏松有关,艾塞那肽(exenatide)作为一种 GLP-1 受体激动剂可用于治疗骨质疏松,但是关于其机制的研究不多^[4]。P38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)参与成骨细胞凋亡的启动、细胞周期的静止,诱导成骨细胞凋亡^[5]。本文将主要分析艾塞那肽通过激活 p38MAPK 通路对成骨细胞促增殖和抗凋亡的作用机制,为临床更好地治疗骨质疏松提供新的思路 and 依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料:小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 Subclone 14 购自 ATCC(美国);MEM 培养基以及胎牛血清购自 Gibco(美国);艾塞那肽购自礼来(美国);CCK-8 试剂盒和凋亡试剂盒购自 Dojindo(日本);流式细胞仪购自 BD 公司(美国);棕榈酸钠购自 Sigma(美国);P38MAPK、Cyclin D1、Caspase-3 一抗体和二抗均来自 Abcam 公司(美国);PVDF 膜(Bio-Rad,美国)。

1.1.2 细胞分组与培养:MC3T3-E1 Subclone 14 细胞系在含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中培养,培养条件为 37 ℃,5% 的 CO₂。实验分为对照组、艾塞那肽组、棕榈酸钠组、棕榈酸钠组+艾塞那肽组。棕榈酸钠组培养液棕榈酸钠终浓度为 500 μmol/L,艾塞那肽组培养中艾塞那肽终浓度为 100 nmol/L。共同培养 48 h。

1.2 方法

1.2.1 检测细胞活力:CCK-8 法被应用于测定细胞活力。将细胞接种于 96 孔板,加入 10 μL CCK-8 试剂并在 37 ℃,5% 的 CO₂ 中培养 4 h。使用酶标仪(ELX 800, Bio-Teck, USA)测量每个孔在 450 nm 处的吸光度(OD)。

1.2.2 检测细胞凋亡:流式细胞术用于检测细胞凋亡情况,细胞洗涤、重悬后分别按照试剂盒说明书加入试剂,通过流式细胞术检测凋亡率。

1.2.3 Western blot 检测:使用 Western Blot 检测细胞中 P38MAPK、Cyclin D1、Caspase-3 蛋白水平。在液氮的保护下裂解细胞,在 12 000 r/min,4 ℃ 下离心 15 min 收集上清液,使用 BCA 方法确定蛋白质浓度。使用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶用于电泳,电泳后使用 PVDF 膜转膜并在室温下用 5% 无脂牛奶封闭 2 h。加入一抗室温震荡 2 h,后在 4 ℃ 孵育过夜,加入二抗。使用 GAPDH 作为内参。

1.3 统计学处理

实验数据均以平均值±标准偏差(SD)表示。统计分析使用 SPSS 19 软件(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)。进行单因素方差分析(ANOVA)以评估实验组之间的差异。 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 艾塞那肽对细胞活力的影响

艾塞那肽对正常细胞活力无显著影响($P>0.05$),棕榈酸钠组的细胞活力显著低于对照组($P<0.01$),艾塞那肽+棕榈酸钠组的细胞活力显著高于棕榈酸钠组($P<0.01$),见表 1。

表 1 艾塞那肽对细胞活力的影响

Table 1 Effects of exenatide on cell viability

组别	OD(24 h)	OD(48 h)
对照组	1.63±0.15	2.25±0.17
艾塞那肽组	1.70±0.17	2.33±0.20
棕榈酸钠组	1.16±0.11**	1.30±0.13**
艾塞那肽+棕榈酸钠组	1.45±0.14##	1.96±0.16##

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与棕榈酸钠组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.2 艾塞那肽对细胞凋亡的影响

艾塞那肽对正常细胞凋亡无显著影响($P>0.05$),棕榈酸钠组的细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.01$),艾塞那肽+棕榈酸钠组的细胞凋亡率显著低于棕榈酸钠组($P<0.01$),见表 2 和图 1。

表 2 艾塞那肽对细胞凋亡的影响

Table 2 Effects of exenatide on apoptosis

组别	凋亡率/%	凋亡率(48 h)
对照组	1.6±0.1	1.9±0.1
艾塞那肽组	1.9±0.1	2.5±0.1
棕榈酸钠组	12.4±0.2**	15.6±0.2**
艾塞那肽+棕榈酸钠组	5.7±0.1##	7.0±0.2##

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与棕榈酸钠组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

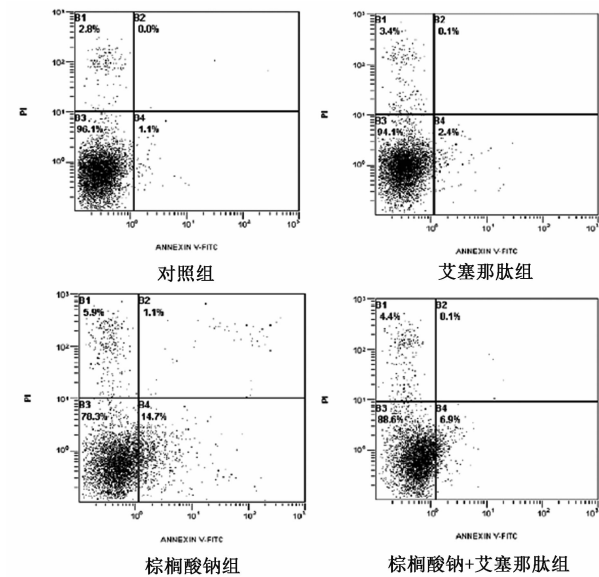


图 1 流式细胞术检测 48 h 时各组细胞凋亡
Fig.1 Flow cytometry was used to detect the apoptosis of each group at 48 h

2.3 艾塞那肽对 P38MAPK、Cyclin D1、Caspase-3 的影响

艾塞那肽对正常细胞中 P38MAPK、Cyclin D1 和 Caspase-3 蛋白水平无明显影响 ($P>0.05$), 棕榈酸钠组的 P38MAPK 和 Caspase-3 显著高于对照组而 Cyclin D1 显著低于对照组 ($P<0.01$), 艾塞那肽+棕榈酸钠组的 P38MAPK 和 Caspase-3 显著低于棕榈酸钠组而 Cyclin D1 显著高于棕榈酸钠组 ($P<0.01$), 见表 3。

表 3 艾塞那肽对 P38MAPK、Cyclin D1、Caspase-3 的影响
Table 3 Effects of exenatide on P38MAPK、Cyclin D1、Caspase-3 expression

组别	P38MAPK	Cyclin D1	Caspase-3
对照组	1.14±0.09	2.21±0.12	1.45±0.11
艾塞那肽组	1.05±0.10	2.24±0.11	1.37±0.12
棕榈酸钠组	3.13±0.13	0.78±0.08	4.36±0.23
艾塞那肽+棕榈酸钠组	1.93±0.14	1.47±0.13	2.76±0.16

注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与棕榈酸钠组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3 讨论

糖尿病患者患有骨折和骨质疏松症的风险高, 骨质疏松症最近被认为是一种高脂性的疾病, 研究^[6]发现骨丢失通常伴随着上调脂肪形成, 糖尿病、肥胖和骨质疏松具有密切的关系。GLP-1 肠降血糖素激素主要由肠内 L-细胞和一些脑神经元中

的胰高血糖素原基因编码, 在集体中 GLP-1 会被酶二肽基肽酶-4 (DPP-4) 快速降解。GLP-1 在血糖控制和胰岛细胞增殖中起着至关重要的作用, 艾塞那肽已经是一种被广泛使用的治疗糖尿病的药物, 而近年来的研究发现艾塞那肽作为一种 GLP-1 激动剂, 也具有调节脂肪形成和骨生成的作用^[7]。

为分析艾塞那肽对骨质疏松的作用, 本研究使用棕榈酸钠建立高脂模型, 研究结果显示棕榈酸钠可显著的抑制成骨细胞的细胞活力, 抑制细胞增殖, 并促进细胞凋亡。而艾塞那肽可显著恢复棕榈酸钠组的细胞活力, 抑制成骨细胞的凋亡。国内最新研究^[4]显示艾塞那肽可以保护高脂环境下成骨细胞的生长并抑制凋亡。李军等^[8]的研究也发现 GLP-1 类似物利拉鲁肽也可以保护高糖环境下的成骨细胞增殖和分化。国外也有研究^[9]显示 GLP-1 可抑制脂肪细胞分化并促进成骨细胞的生长和分化。这提示艾塞那肽可能通过促进成骨细胞增殖和抑制凋亡治疗骨质疏松。

为进一步分析艾塞那肽对保护高脂环境下成骨细胞生长的机制, 笔者分析了其对 p38MAPK 通路的影响。p38MAPK 属于 MAPK 亚类, 可通过调节增殖、凋亡相关基因参与多种肿瘤的发生和发展, 在不同细胞中 p38MAPK 的作用可能不同^[10]。研究^[11]显示高糖可通过上调 p38MAPK 通路的表达诱导成骨细胞的凋亡, 而抑制 p38MAPK 的磷酸化可保护成骨细胞, 促进其增殖, 抑制其凋亡。本次研究结果显示艾塞那肽对正常细胞无明显影响, 棕榈酸钠组的 P38MAPK 和 Caspase-3 显著高于对照组而 Cyclin D1 显著低于对照组, 艾塞那肽+棕榈酸钠组的 P38MAPK 和 Caspase-3 显著低于棕榈酸钠组而 Cyclin D1 显著高于棕榈酸钠组。Marie 等^[12]的研究显示艾塞那肽可显著提高小鼠的骨量。成骨细胞 p38MAPK 的过度磷酸化引起成骨细胞的凋亡^[13]。黄超等^[14]研究发现艾塞那肽会通过 p38MAPK 通路调节细胞的增殖和凋亡。过往有研究^[15]发现 GLP-1 类似物可通过抑制 p38MAPK 通路减轻炎性损伤。曾海龙等^[16]的研究也显示 GLP-1 可以抑制 p38MAPK 通路抗凋亡。这说明艾塞那肽可以通过抑制 p38MAPK 通路提高高脂环境下成骨细胞活力, 抑制凋亡。

综上所述, 艾塞那肽可以通过 p38MAPK 通路, 减少 Caspase-3 蛋白并上调 Cyclin D1 蛋白的表达, 抑制高脂环境下成骨细胞的凋亡并提高细胞活力。

(下转第 880 页)