

本文引用:耿卢婧,孙智欣,李俞辰,等. 温度对过氧化氢抑制前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化的影响[J]. 新乡医学院学报,2024,41(2):109-114. DOI:10.7683/xyxyxb.2024.02.002.

【基础研究】

温度对过氧化氢抑制前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化的影响

耿卢婧, 孙智欣, 李俞辰, 张 瑜, 史培培

(新乡医学院生命科学技术学院,河南 新乡 453003)

摘要: 目的 探讨温度对过氧化氢(H_2O_2)抑制前成骨细胞增殖和成骨分化的影响。方法 取对数生长期 MC3T3-E1 细胞,随机分为 0、450、500、550、600、650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 干预组,分别给予 0、450、500、550、600、650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液干预 2 h。另取对数生长期 MC3T3-E1 细胞,随机分为对照组、模型组、低温组和高温组。对照组细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h;模型组细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h,并给予 H_2O_2 刺激 2 h;低温组细胞置于 32 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h,并给予 H_2O_2 刺激 2 h;高温组细胞置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h,并给予 H_2O_2 刺激 2 h。采用细胞计数试剂盒-8 检测各组细胞增殖能力,实时荧光定量聚合酶链反应法检测细胞中 Runx2 相关转录因子 2 (RUNX2)、骨桥蛋白(OPN)和骨钙素(OC)mRNA 表达水平,Western blot 法检测 MC3T3-E1 细胞中 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白表达水平。结果 0、450、500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 干预组细胞增殖率比较差异无统计学意义($P > 0.05$);550、600、650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 干预组细胞增殖率显著低于 0、450、500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 干预组,且随 H_2O_2 浓度增加细胞增殖率显著降低($P < 0.05$)。为保证后续实验有足够的细胞,选择 H_2O_2 的干预浓度为 550 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。模型组和低温组细胞增殖率显著低于对照组和高温组,低温组细胞增殖率显著低于模型组($P < 0.05$);对照组与高温组细胞增殖率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组和高温组细胞中 RUNX2 mRNA 相对表达量显著高于对照组和低温组,低温组细胞中 RUNX2 mRNA 相对表达量显著低于对照组($P < 0.05$);模型组与高温组细胞中 RUNX2 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组、低温组和高温组细胞中 OPN mRNA 相对表达量显著高于对照组,低温组和高温组细胞中 OPN mRNA 相对表达量显著高于模型组,低温组细胞中 OPN mRNA 相对表达量显著高于高温组($P < 0.05$)。模型组、低温组和高温组细胞中 OC mRNA 相对表达量显著高于对照组,低温组和高温组细胞中 OC mRNA 相对表达量显著高于模型组($P < 0.05$);低温组与高温组细胞中 OC mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组、低温组和高温组细胞中 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白相对表达量显著低于对照组($P < 0.05$)。低温组细胞中 RUNX2、OPN 蛋白相对表达量显著低于模型组和高温组,OC 蛋白相对表达量显著低于高温组($P < 0.05$);低温组与模型组细胞中 OC 蛋白相对表达量比差异无统计学意义($P > 0.05$)。高温组细胞中 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白相对表达量显著高于模型组($P < 0.05$)。结论 H_2O_2 可抑制 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化,低温可增强 H_2O_2 对 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化的抑制作用,高温可缓解 H_2O_2 对细胞增殖和成骨分化的抑制作用。RUNX2、OPN 和 OC 蛋白可能在温度调控细胞增殖和成骨分化的过程中发挥重要作用。

关键词: 孵育温度;氧化损伤;成骨细胞;MC3T3-E1 细胞;细胞增殖;成骨分化

中图分类号: R329.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2024)02-0109-06

Effect of temperature on the inhibitory effect induced by hydrogen peroxide on cell proliferation and osteogenic differentiation in preosteoblast MC3T3-E1 cells

GENG Lujing, SUN Zhixin, LI Yuchen, ZHANG Yu, SHI Peipei

(College of Life Sciences and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of temperature on cell proliferation and osteogenic differentiation inhibition of preosteoblast induced by hydrogen peroxide(H_2O_2). **Methods** The MC3T3-E1 cells in the logarithmic phase were randomly divided into 0, 450, 500, 550, 600, 650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 intervention groups and incubated with 0, 450, 500, 550, 600, 650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 for 2 h, respectively. Other MC3T3-E1 cells in the logarithmic phase were selected and randomly divided into the control group, model group, low-temperature group, and high-temperature group. Cells in the control group were cul-

DOI:10.7683/xyxyxb.2024.02.002

收稿日期:2022-11-22

基金项目:新乡医学院(国家级)大学生创新创业训练计划项目(编号:202110472017);2022年度河南省重点研发与推广专项(科技攻关)资助项目(编号:222102310517);新乡医学院人才(博士)支持计划资助项目(编号:XYBSKYZZ202144)。

作者简介:耿卢婧(1987-),女,河北灵寿人,博士,讲师,研究方向:细胞生物学。

通信作者:史培培(1981-),女,河南南乐人,硕士,讲师,研究方向:分子生物学;E-mail:052131@xxmu.edu.cn。

tured in an incubator with 5% CO₂ for 24 h at 37 °C; cells in the model group were incubated with H₂O₂ for 2 h and cultured in an incubator with 5% CO₂ for 24 h at 37 °C; cells in the low-temperature group were incubated with H₂O₂ for 2 h and cultured in an incubator with 5% CO₂ for 24 h at 32 °C; cells in the high-temperature group were incubated with H₂O₂ for 2 h and cultured in an incubator with 5% CO₂ for 24 h at 40 °C. The cell proliferation in all groups was detected by cell counting kit-8. The expression levels of Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin (OPN) and osteocalcin (OC) mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; and the expression levels of RUNX2, OPN and OC protein were detected by Western blot. **Results** There was no statistically significant difference in cell proliferation among the 0, 450 and 500 μmol · L⁻¹ H₂O₂ intervention groups ($P > 0.05$); the cell proliferation rate in the 550, 600 and 650 μmol · L⁻¹ H₂O₂ intervention groups was significantly lower than that in the 0, 450 and 500 μmol · L⁻¹ H₂O₂ intervention groups, showing a significant decrease in cell proliferation with the increase of H₂O₂ concentrations ($P < 0.05$). In order to ensure that there were enough cells to perform the following experiments, 550 μmol · L⁻¹ H₂O₂ was chosen. The cell proliferation rate in the model group and the low-temperature group was significantly lower than that in the control group and high-temperature group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the cell proliferation rate between the control group and high-temperature group ($P > 0.05$). The relative expression of RUNX2 mRNA in the model group and high-temperature group were significantly higher than that in the control group and low-temperature group ($P < 0.05$); the relative expression of RUNX2 mRNA in the low-temperature group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the relative expression of RUNX2 mRNA between the model group and high-temperature group ($P > 0.05$). The relative expression of OPN mRNA in the model group, low-temperature group and high-temperature group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); the relative expression of OPN mRNA in the low-temperature group and high-temperature group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$); the relative expression of OPN mRNA in the low-temperature group was significantly higher than that in the high-temperature group ($P < 0.05$). The relative expression of OC mRNA in the model group, low-temperature group and high-temperature group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); the relative expression of OC mRNA in the low-temperature group and high-temperature group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the relative expression of OC mRNA between the low-temperature group and high-temperature group ($P > 0.05$). The relative expressions of RUNX2, OPN and OC protein in the model group, low-temperature group and high-temperature group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$); the relative expressions of RUNX2 and OPN protein in the low-temperature group were significantly lower than those in the model group and high-temperature group ($P < 0.05$); the relative expression of OC protein was significantly lower than that in the high-temperature group ($P < 0.05$); and there was no significant difference in the relative expression of OC protein between the low-temperature group and model group ($P > 0.05$); the relative expressions of RUNX2, OPN and OC protein in the high-temperature group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The inhibitory effects of H₂O₂ on cell proliferation and osteogenic differentiation are observed in MC3T3-E1 cells; low-temperature incubation can enhance the inhibition of H₂O₂ on cell proliferation and osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells, while high-temperature incubation can relieve its inhibitory effect on cell proliferation and osteogenic differentiation. RUNX2, OPN and OC protein might play an important role in cell proliferation and osteogenic differentiation mediated by temperature.

Key words: incubation temperature; oxidative damage; preosteoblast; MC3T3-E1 cell; cell proliferation; osteogenic differentiation

随着人口老龄化的持续加速,骨质疏松症已成为公共卫生健康的热点问题之一。老年骨质疏松症诱发的脆性骨折1 a内病死率高达14%^[1]。研究表明,在骨质疏松症发病过程中,氧化应激^[2]、肠道微生物^[3-4]、自噬^[5-6]、铁代谢^[7]、细胞衰老^[8]等均发挥重要作用,而氧化应激是导致骨质疏松症中成骨细胞和破骨细胞功能失衡的关键因素之一^[9]。此外,随着年龄的增加,机体的体温调节能力自然衰退^[10]。温度不仅可以调节机体的免疫能力^[11],改变肠道微生物的功能^[12],还会增加机体患癌风险,影响癌症的免疫治疗效果^[13],甚至影响生物体的寿命^[14]。然而,目前温度与骨质疏松的关系尚不清楚。基于此,本研究选用小鼠胚胎成骨细胞前体细

胞 MC3T3-E1 为研究对象,观察温度对过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 诱导的氧化损伤抑制前成骨细胞增殖和成骨分化的影响,旨在揭示温度对骨重建的影响,为骨质疏松症的治疗提供实验基础和新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器

小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 由河南省温度应激分子基础与疾病防治创新团队赠予并保存。MEM α 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 × 青霉素-链霉素溶液、2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶购自武汉普诺赛生命科技有限公司,细胞计数试

剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司, H_2O_2 溶液购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, RNAiso Plus、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自宝日生物技术(北京)有限公司, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 凝胶快速制备试剂盒、三色预染蛋白 Marker 购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 和骨钙素 (osteocalcin, OC) 一抗和二抗均购自英国 Abcam 公司; NanoDrop 2000 微量分光光度计购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 电泳仪和电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司, 7500 荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, Amersham Imager 600 化学发光仪购自美国 GE 公司。

1.2 细胞培养及分组处理

将 MC3T3-E1 细胞接种于含体积分数 20% FBS、体积分数 1% $100 \times$ 青霉素-链霉素溶液的 MEM α 培养液中, 置于 37 °C、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养, 待细胞生长至汇合度为 80% ~ 90% 时进行传代。传代时, 先去除所有培养液, 然后加入 1 mL 胰蛋白酶 ($2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 消化细胞, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞; 取对数生长期 MC3T3-E1 细胞, 以每孔 1×10^4 接种于 96 孔板, 随机分为 0、450、500、550、600、650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ 干预组, 分别给予 0、450、500、550、600、650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ 溶液干预 2 h。依据参考文献 [15-17] 和预实验结果, 选择 32 °C、37 °C、40 °C 温度作为实验温度条件。取对数生长期 MC3T3-E1 细胞, 以每孔 3×10^5 接种于 6 孔板, 随机分为对照组、模型组、低温组和高温组。对照组细胞置于 37 °C、含体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h; 模型组细胞置于 37 °C、含体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h, 并给予 H_2O_2 刺激 2 h; 低温组细胞置于 32 °C、含体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h, 并给予 H_2O_2 刺激 2 h; 高温组细胞置于 40 °C、含体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h, 并予 H_2O_2 刺激 2 h。

1.3 CCK-8 法检测 MC3T3-E1 细胞增殖能力

取 0、450、500、550、600、650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ 干预组细胞, 以及对照组、模型组、低温组和高温组细胞, 滴加新鲜含体积分数 10% CCK-8 工作液的完全培养液, 继续在 37 °C、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养 1 h; 然后, 使用酶标仪检测各孔在 450 nm

处的光密度值 (optical density, OD)。计算细胞增殖率, 细胞增殖率 = $(OD_{\text{处理组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次, 取均值。

1.4 实时荧光定量 PCR 法检测 MC3T3-E1 细胞中 RUNX2、OPN 和 OC mRNA 表达水平

取对照组、模型组、低温组和高温组细胞, 使用 RNAiso Plus 提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, 进行荧光定量 PCR 检测。根据不同目的基因的 mRNA 序列, 设计荧光定量 PCR 引物: β -actin 上游引物序列为 5'-TATGCTCTCCCTCAGCCATCC-3', β -actin 下游引物序列为 5'-GTCACGCACGATTTCCCTCTCAG-3'; RUNX2 上游引物序列为 5'-GATGATGACACTGCCACCTCTGAC-3', RUNX2 下游引物序列为 5'-TGAGGGATGAAATGCTTGGGACTG-3'; OPN 上游引物序列为 5'-ATGGACGACGATGATGACG-ATATG-3', OPN 下游引物序列为 5'-ATGGACGACGATGATGACGATATG-3'; OC 上游引物序列为 5'-CAAGCAGGAGGGCAATAAGGTAGT-3', OC 下游引物序列为 5'-CGGTCTTCAAGCCATACTGGTCTG-3'。反应体系为: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) ($2 \times$) $10.0 \mu\text{L}$, 上游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.8 \mu\text{L}$, 下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.8 \mu\text{L}$, ROX Reference Dye II ($50 \times$) $0.4 \mu\text{L}$, 灭菌水 $6.0 \mu\text{L}$ 。反应条件为: 第 1 阶段, 95 °C 30 s; 第 2 阶段 95 °C 5 s, 60 °C 31 s, 重复 40 个循环; 第 3 阶段, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 RUNX2、OPN、OC mRNA 相对表达量。实验重复 3 次, 取均值。

1.5 Western blot 法检测 MC3T3-E1 细胞中 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白表达

取对照组、模型组、低温组和高温组细胞, 加入 $80 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液, 置于冰上裂解 30 min; $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $10\ 000 \times g$ 离心 10 min, 收集细胞裂解液上清液; 使用二辛可酸蛋白浓度测定试剂盒测定上清液蛋白浓度后, 调整不同样品的蛋白浓度一致, 按比例加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 15 min, 冷却至室温后 $10\ 000 \times g$ 离心 5 min, 取上清液; 使用 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (12.5%) 配制凝胶进行电泳, 上样量为每孔 20 ng 蛋白, 电泳条件为 80 mV 30 min, 然后调整电压为 120 mV 继续电泳 90 min。电泳结束后, 将样品转移至 $0.45 \mu\text{m}$ 聚偏氟乙烯膜上; 然后, 用脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h 后, 滴加 GAPDH 小鼠源一抗、RUNX2 兔源一抗、OPN 兔源一抗、OC 兔源一抗 (滴度均为 1 : 1 000), 摇床孵育过

夜;洗膜3次后,添加对应种属来源的羊抗鼠二抗或羊抗兔二抗(滴度均为1:1 000),室温摇床孵育50 min。使用增强化学发光试剂盒进行显影,Amersham Imager 600 化学发光仪采集蛋白条带照片;使用ImageJ软件分析目的蛋白条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量,以GAPDH为内参,以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值比值表示目的蛋白相对表达量。实验重复3次,取均值。

1.6 统计学处理

应用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,多重比较采用Turkey's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度H₂O₂诱导MC3T3-E1细胞增殖率比较

0、450、500、550、600、650 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 干预组细胞增殖率分别为(100.00 ± 6.49)%、(95.10 ± 5.69)%、(88.50 ± 4.46)%、(76.00 ± 2.02)%、(51.20 ± 6.87)%、(39.50 ± 4.46)%。0、450、500 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 干预组细胞增殖率比较差异无统计学意义($P > 0.05$);550、600、650 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 干预组细胞增殖率显著低于0、450、500 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 干预组,且随H₂O₂浓度增加细胞增殖率显著降低($P < 0.05$)。为保证后续实验有足够的细胞,选择550 μmol · L⁻¹为H₂O₂干预浓度。

2.2 对照组、模型组、低温组和高温组细胞增殖率比较

对照组、模型组、低温组和高温组细胞增殖率分别为(100.0 ± 1.73)%、(77.7 ± 2.28)%、(54.3 ± 1.99)%、(96.2 ± 4.56)%。模型组和低温组细胞增殖率显著低于对照组和高温组,低温组细胞增殖率显著低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组与高温组细胞增殖率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 对照组、模型组、低温组和高温组细胞中RUNX2、OPN和OC mRNA相对表达量比较

模型组和高温组细胞中RUNX2 mRNA相对表达量显著高于对照组和低温组,低温组细胞中RUNX2 mRNA相对表达量显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组和高温组细胞中RUNX2 mRNA相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组、低温组和高温组细胞中OPN mRNA相对表达量显著高于对照组,低温组和高温

组细胞中OPN mRNA相对表达量显著高于模型组,低温组细胞中OPN mRNA相对表达量显著高于高温组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组、低温组和高温组细胞中OC mRNA相对表达量显著高于对照组,低温组和高温组细胞中OC mRNA相对表达量显著高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);低温组与高温组细胞中OC mRNA相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表1。

表1 对照组、模型组、低温组和高温组细胞中RUNX2、OPN和OC mRNA相对表达量比较

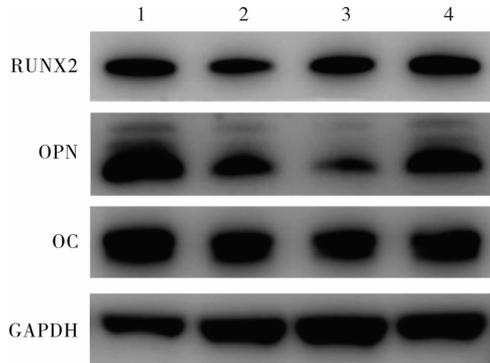
Tab.1 Comparison of relative expression levels of RUNX2, OPN and OC mRNA in the cells among the control group, model group, low-temperature group and high-temperature group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	RUNX2 mRNA	OPN mRNA	OC mRNA
对照组	3	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.01
模型组	3	1.67 ± 0.06 ^a	1.18 ± 0.10 ^a	2.19 ± 0.13 ^a
低温组	3	0.59 ± 0.01 ^{ab}	1.36 ± 0.04 ^{ab}	1.88 ± 0.04 ^{ab}
高温组	3	1.66 ± 0.04 ^{ac}	1.82 ± 0.02 ^{abc}	1.88 ± 0.03 ^{ab}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$;与低温组比较^c $P < 0.05$ 。

2.4 对照组、模型组、低温组和高温组细胞中RUNX2、OPN和OC蛋白相对表达量比较

模型组、低温组和高温组细胞中RUNX2、OPN和OC蛋白相对表达量显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。低温组细胞中RUNX2、OPN蛋白相对表达量显著低于模型组和高温组,OC蛋白相对表达量显著低于高温组,差异有统计学意义($P < 0.05$);低温组与模型组细胞中OC蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。高温组细胞中RUNX2、OPN和OC蛋白相对表达量显著高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图1和表2。



1:对照组;2:模型组;3:低温组;4:高温组。

图1 对照组、模型组、低温组和高温组细胞中RUNX2、OPN和OC蛋白表达

Fig.1 Expressions of RUNX2,OPN,and OC protein in cells in the control group,model group,low-temperature group, and high-temperature group

表2 对照组、模型组、低温组和高温组细胞中 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白相对表达量比较

Tab.2 Comparison of relative expression levels of RUNX2, OPN, and OC protein in cells among the control group, model group, low-temperature group, and high-temperature group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RUNX2 蛋白	OPN 蛋白	OC 蛋白
对照组	3	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05
模型组	3	0.69 ± 0.03 ^a	0.46 ± 0.03 ^a	0.66 ± 0.04 ^a
低温组	3	0.59 ± 0.02 ^{ab}	0.32 ± 0.02 ^{ab}	0.65 ± 0.03 ^a
高温组	3	0.87 ± 0.04 ^{abc}	0.62 ± 0.03 ^{abc}	0.81 ± 0.04 ^{abc}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$;与低温组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

骨质疏松主要是由于骨量丢失增加与骨细胞生成减少所致,过量自由基导致的氧化应激是骨质疏松症发生和进展的主要因素之一。 H_2O_2 常用于模拟自由基引起的细胞氧化损伤模型,包括骨质疏松模型^[9]。本研究结果显示,模型组细胞增殖率显著低于对照组,RUNX2、OPN 和 OC mRNA 相对表达量显著高于对照组,RUNX2、OPN 和 OC 蛋白相对表达量显著低于对照组;说明, H_2O_2 可抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和 RUNX2、OPN 和 OC 的蛋白翻译,从而抑制成骨分化,导致骨质疏松。与文献报道 H_2O_2 抑制间充质干细胞^[18]、成骨细胞^[19] 和血管平滑肌细胞^[20] 成骨分化的作用一致。

温度是生物体不可避免的应激因子之一,适度应激可为机体抵御不良因素的损伤建立保护机制^[21]。此外,温度可以通过积极的基因调控策略对机体产生影响,而不仅仅是被动的热力学效应。有研究报道,36 °C 或 15 °C 的低温能够激活人源细胞和线虫体内的蛋白酶体,降解无用蛋白质,从而使人源细胞和线虫的寿命显著延长;但线虫在 4 °C 孵育 12 h 并没有延长寿命的效果^[14]。正确认识环境温度对机体的影响,有助于更好地进行健康管理,甚至可能有助于发现退行性骨病的治疗新方法和新思路。冷休克蛋白和热休克蛋白分别是哺乳动物体内受到低温或高温刺激后产生的特征性的蛋白。冷休克蛋白普遍具有 RNA 结合能力,可稳定 mRNA,促进蛋白翻译^[22]。热休克蛋白具有分子伴侣活性,可以维持蛋白稳态从而使细胞在应激条件下存活^[23]。有研究报道,热休克蛋白 70 经 39 ~ 42.5 °C 刺激后高表达可能抑制破骨细胞增殖^[24]。本研究结果显示,低温组细胞增殖率显著低于模型组,高温组与对照组细胞增殖率比较差异无统计学意义;说明,32 °C 低温处理可促进 H_2O_2 对 MC3T3-E1 细胞增殖抑制作用;而 40 °C 高温处理对于 H_2O_2 导致的 MC3T3-E1 细胞增殖率下降具有较好的缓解作用。

RUNX2 是转录因子 runx 家族成员,可调控成骨细胞的基因表达,对成骨细胞分化和骨骼形态发生至关重要。OPN 是成骨细胞分化成熟的标志。OC 在调节骨钙代谢中起到重要作用。RUNX2、OPN、OC 蛋白均是研究骨分化、骨代谢的重要标志物。本研究结果显示,与对照组相比,模型组、低温组和高温组细胞中 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白的相对表达量显著减少;与模型组相比,低温组 RUNX2、OPN 蛋白的相对表达量均显著下降,OC 蛋白的相对表达量无显著变化;高温组细胞 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白的相对表达量显著高于模型组。这说明,低温处理对 H_2O_2 引起的 MC3T3-E1 细胞的成骨分化抑制具有增强作用,而高温处理可有效缓解 H_2O_2 造成的成骨分化抑制,推测其机制可能是低温抑制了 RUNX2、OPN 蛋白的表达,而高温促进了 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白的表达。低温组中 OC 蛋白表达量的变化不同于 RUNX2 和 OPN,可能是由于基因对不同刺激的敏感度不同造成的,需要进一步的实验验证。

本研究结果显示,mRNA 的表达量变化和蛋白质并不完全一致, H_2O_2 可抑制 RUNX2、OPN 和 OC 蛋白相对表达量,但 RUNX2、OPN 和 OC mRNA 相对表达量并未受到 H_2O_2 的抑制,其相对表达量显著增加;与对照组相比,高温组同样出现 RUNX2、OPN 和 OC 的基因表达量增加、蛋白表达量减少的现象;低温组细胞中 RUNX2 mRNA 表达量和蛋白显著下降,OPN 和 OC 呈现基因表达量增加、蛋白表达量减少;与模型组相比,低温组 OPN mRNA 表达量上调,RUNX2、OC mRNA 表达量和 RUNX2、OPN、OC 的蛋白表达量均显著下降;高温组细胞中 OPN mRNA 表达量显著高于模型组,OC 的基因表达量显著低于模型组,RUNX2、OPN 和 OC 蛋白表达量高模型组。出现这一现象,可能是因为 mRNA 浓度只能部分解释蛋白质浓度的变化,复杂而多样的调控机制导致转录组和翻译组之间定量关系的差异^[25]。此外,本研究中仅检测了蛋白质和 mRNA 的相对表达量,并不能用来直接比较蛋白质和 mRNA 水平^[26]。在特定稳态条件下,影响蛋白质表达水平的翻译和蛋白质降解的基因特异性调控仍需要进一步的研究。

4 结论

H_2O_2 可抑制 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化,低温可促进 H_2O_2 对 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化的抑制作用,高温则可缓解 H_2O_2 对 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化的抑制作用。RUNX2、OPN 和 OC 蛋白可能在温度调控成骨分化的过程中有重要作用,然而其具体的信号通路还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] CUI Z, FENG H, MENG X, *et al.* Age-specific 1-year mortality rates after hip fracture based on the populations in mainland China between the years 2000 and 2018: a systematic analysis [J]. *Arch Osteoporos*, 2019, 14(1): 55.
- [2] KHOSLA S, FARR J N, TCHKONIA T, *et al.* The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(5): 263-275.
- [3] LI R, BOER C G, OEI L, *et al.* The gut microbiome: a new frontier in musculoskeletal research [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2021, 19(3): 347-357.
- [4] 孙钰, 杨利学, 王官林, 等. 从肠道微生态探讨“肝-肠相通”理论在骨质疏松症防治中的应用 [J]. *中医学报*, 2022, 37(6): 1148-1152.
- SUN Y, YANG L X, WANG G L, *et al.* Exploring application of "Liver-Intestine Connectivity" theory in prevention and treatment of osteoporosis from perspective of intestinal microecology [J]. *Acta Chin Med*, 2022, 37(6): 1148-1152.
- [5] LI X, XU J, DAI B, *et al.* Targeting autophagy in osteoporosis: from pathophysiology to potential therapy [J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 62: 101098.
- [6] 祝震亚, 童蕾, 陆燕群. miR-181a 调控 PINK1/Parkin 通路对骨质疏松大鼠破骨细胞线粒体自噬的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(6): 569-578.
- ZHU Z Y, TONG L, LU Y Q. Effect of miR-181a regulating PINK1/Parkin pathway on mitochondrial autophagy of osteoclasts in osteoporotic rats [J]. *Med J Chin PLA*, 2022, 47(6): 569-578.
- [7] MA H, WANG X, ZHANG W, *et al.* Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9067610.
- [8] 曹娟, 李玲玲, 姚瑶, 等. 氧化应激相关细胞衰老指标与骨关节炎的相关性探讨 [J]. *中华全科医学*, 2023, 21(3): 396-400.
- CAO J, LI L L, YAO Y, *et al.* Correlation between oxidative stress related cell senescence indicators and osteoarthritis [J]. *Chin J Gen Pract*, 2023, 21(3): 396-400.
- [9] KIMBALL J S, JOHNSON J P, CARLSON D A. Oxidative stress and osteoporosis [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2021, 103(15): 1451-1461.
- [10] 谢英毫. 高温环境下人体年龄对热生理与行为能力的影响 [D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- XIE Y H. Effect of human age on thermophysiological response and behavior ability in a high temperature environment [D]. Suzhou: Soochow University, 2021.
- [11] WANG H, ÜLGEN M, TRAJKOVSKI M. Importance of temperature on immuno-metabolic regulation and cancer progression [J]. *FEBS J*, 2022, Epub ahead of print.
- [12] HUUS K E, LEY R E. Blowing hot and cold: body temperature and the microbiome [J]. *mSystems*, 2021, 6(5): e0070721.
- [13] HYLANDER B L, GORDON C J, REPASKY E A. Manipulation of ambient housing temperature to study the impact of chronic stress on immunity and cancer in mice [J]. *J Immunol*, 2019, 202(3): 631-636.
- [14] LEE H J, ALIRZAYEVA H, KOYUNCU S, *et al.* Cold temperature extends longevity and prevents disease-related protein aggregation through PA28 γ -induced proteasomes [J]. *Nat Aging*, 2023, 3(5): 546-566.
- [15] 中国研究型医院学会神经再生与修复专业委员会心脏重症脑保护学组, 中国研究型医院学会神经再生与修复专业委员会神经重症护理与康复学组. 亚低温脑保护中国专家共识 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(4): 385-391.
- CEREBRAL PROTECTION IN CARDIAC INTENSIVE CARE GROUP, NEURAL REGENERATION AND REPAIR COMMITTEE, CHINESE RESEARCH HOSPITAL ASSOCIATION, NEURAL INTENSIVE NURSING AND REHABILITATION GROUP, NEURAL REGENERATION AND REPAIR COMMITTEE, CHINESE RESEARCH HOSPITAL ASSOCIATION. Chinese consensus for mild hypothermia brain protection [J]. *Chin Crit Care Med*, 2020, 32(4): 385-391.
- [16] YUAN X, ZHANG J, MA T T, *et al.* Expression regulation of cold-inducible protein RBM3 by FAK/Src signaling for neuroprotection against rotenone under mild hypothermia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 240-247.
- [17] LI S, CHIEN S, BRÄNEMARK P I. Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts [J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(6): 891-899.
- [18] YANG Y, SUN Y, MAO W W, *et al.* Oxidative stress induces downregulation of TP53INP2 and suppresses osteogenic differentiation of BMSCs during osteoporosis through the autophagy degradation pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 166: 226-237.
- [19] 阮建伟. 抑制 microRNA-29a 促使 Gab1 蛋白上调保护 OB-6 人成骨细胞免受 H₂O₂ 破坏的机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- RUAN J W. MicroRNA-29a inhibition induces Gab1 upregulation to protect OB-6 human osteoblasts from hydrogen peroxide [D]. Suzhou: Soochow University, 2018.
- [20] 卢茜. 硒对 H₂O₂ 诱导血管平滑肌细胞向成骨细胞分化作用的影响及机理 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- LU Q. Effect of selenium on H₂O₂-induced osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells and the related mechanisms [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2011.
- [21] 黄灿华. 应激医学与人类健康 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(1): 1-4.
- HUANG C H. Stress medicine and human health [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2021, 52(1): 1-4.
- [22] PREUBNER M, SMITH H L, HUGHES D, *et al.* ASO targeting RBM3 temperature-controlled poison exon splicing prevents neurodegeneration in vivo [J]. *EMBO Mol Med*, 2023, 15(5): e17157.
- [23] FU R, HUANG Z, LI H, *et al.* A hemidesmosome-to-cytoplasm translocation of small heat shock proteins provides immediate protection against heat stress [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(8): 108410.
- [24] 杨彤涛, 甘璐, 周勇. 热作用下成骨细胞 HSP70 mRNA 的表达变化及其对破骨细胞增殖的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(19): 3639-3642.
- YANG T T, GAN L, ZHOU Y. Effect of thermal stimulation on expression of HSP70 mRNA in osteoblasts & its medium's effect on proliferation of osteoclasts in mice [J]. *Progr Mod Biomed*, 2010, 10(19): 3639-3642.
- [25] ZENG H, HUANG J, REN J, *et al.* Spatially resolved single-cell translomics at molecular resolution [J]. *Science*, 2023, 380(6652): eadd3067.
- [26] DE SOUSA ABREU R, PENALVA L O, MARCOTTE E M, *et al.* Global signatures of protein and mRNA expression levels [J]. *Mol Biosyst*, 2009, 5(12): 1512-1526.