

· 论 著 ·

高糖波动对 MG63 细胞株护骨素与 TRAIL 表达的影响

周 玮, 杜云翔, 王建国, 王加林

[摘要] **目的** 研究波动性葡萄糖和恒定高葡萄糖对 MG63 细胞株肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)、护骨素(osteoprotegerin, OPG)和其配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)表达的影响,探讨高糖波动在糖尿病性骨质疏松症发病中的作用。**方法** 体外培养的人成骨肉瘤 MG63 细胞株,随机分为正常对照组(NG 组,葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L);恒定高葡萄糖组(HG 组,葡萄糖浓度为 33.3 mmol/L);波动性葡萄糖组(FG 组,葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L 与葡萄糖浓度为 33.3 mmol/L 两种培养液,每 8 h 更换一次),共作用 24 h。四甲基偶氮唑蓝(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。RT-PCR 法检测 TRAIL、OPG、OPGL mRNA 的表达。**结果** ①高糖及高糖波动可抑制 MG63 细胞的增殖,与 HG 组相比,FG 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。FG 组作用更加明显($P < 0.05$)。③高糖作用下 MG63 细胞中 TRAIL 和 OPGL 基因表达增加,而 OPG 基因表达下降,FG 组较 HG 组上述作用更加明显($P < 0.05$)。**结论** 高糖波动可能导致成骨细胞中 TRAIL 和 OPGL 表达增多,OPG 的表达减少,抑制成骨细胞增殖,阻滞其细胞周期,诱导细胞凋亡,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] 高糖波动;MG63 细胞;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

[中图分类号] R574 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)02-0141-04

Effects of high glucose fluctuation on expressions of TRAIL and OPG in MG63 cells

ZHOU Wei, DU Yun-xiang, WANG Jian-guo, WANG Jia-lin. Department of Endocrinology, 82 Hospital of PLA, Huai'an, Jiangsu 223001, China

[Abstract] **Objective** To observe the regulative effects of glucose at different concentrations on the expressions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), osteoprotegerin (OPG), and the ligand of osteoprotegerin (OPGL) in osteosarcoma MG63 cells in order to study the role of high glucose fluctuation in pathogenesis of diabetic osteoporosis. **Methods** MG63 cells were randomly divided into the following medium containing 5.5 mmol/L glucose (Normal glucose group, NG group), 33.3 mmol/L glucose (High glucose group, HG group) and 5.5/33.3 mmol/L glucose (high glucose fluctuation of different amplitude 5.5/33.3 mmol/L group, FG group) and cultured in vitro for 24 h. The proliferation of MG63 cells was examined by MTT colorimetric analysis. The cell cycle and apoptotic rate of cells were determined by flow cytometry. The expressions of TRAIL, OPG and OPGL mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Both high glucose and high glucose fluctuation inhibited the proliferation of MG63 cells, and the effect of high glucose fluctuation was significantly higher than that in high glucose ($P < 0.05$). 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 of high glucose fluctuation was obviously stronger than that in high glucose ($P < 0.05$). The mRNA expressions of TRAIL and OPGL in MG63 cells significantly increased and the expression of OPG mRNA decreased under high glucose environment ($P < 0.05$). The mentioned effects were obviously power in FG group than that in HG group. **Conclusion** High glucose fluctuation could not only inhibit the proliferation, block cell cycle, induce apoptosis, and also lead to the increasing expressions of TRAIL and OPGL, but the decreasing expression of OPG in osteoblasts, which may be one of the key pathogenetic factors of diabetic osteoporosis.

[Key words] high glucose fluctuation; MG63 cell; tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

作者简介: 周 玮(1970-),女,江苏淮安人,硕士,副主任医师,从事内分泌专业临床工作

作者单位: 223001 江苏淮安,解放军 82 医院内分泌科

通讯作者: 王加林, E-mail: xiaowei_82yy@126.com

糖尿病易并发骨质疏松症已被公认,糖尿病对骨代谢的影响主要表现为骨吸收增加,骨形成减少与缓慢,使骨矿物质含量减少和骨质疏松^[1-2]。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL),护骨素(osteoprotegerin, OPG)及其配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)是新发现的肿瘤坏死因子超家族的成员^[3],既往研究发现,高糖环境可影响成骨细胞中上述因子的表达,从而推测高糖在成骨细胞对破骨细胞调节的环节上发挥着重要的作用,导致糖尿病性骨质疏松症的发生^[4-7]。但是高糖波动对上述因子的表达是否有影响及如何产生影响,目前未见报道。本文拟观察高糖及高糖波动环境下具有人成骨细胞表型特征的 MG63 细胞株中 TRAIL、OPG 及 OPGL 的表达,以探讨糖尿病性骨质疏松症的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料 MG63 细胞株由中南大学湘雅第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 Trizol 试剂盒购自 Gibco 公司;逆转录反应试剂盒购自 Promega 公司;PCR 扩增试剂盒和 DNA 梯度 Marker 购自 TaKaRa 公司;引物由北京三博远志公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 MG63 细胞株,根据实验要求接种于培养瓶(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℃,5% CO₂ 条件下培养,每 2 d 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 3 h,随机分为:①正常对照组(NG 组,含葡萄糖 5.5 mmol/L);②恒定高葡萄糖组(HG 组,含葡萄糖 33.3 mmol/L);③波动性葡萄糖组(FG 组,葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L 与 33.3 mmol/L 两种条件培养液,每 8 h 更换一次);NG 组和 HG 组同样每 8 h 更换培养液,共作用 24 h。

1.2.3 MTT 比色分析法 将细胞悬液(1×10⁴/ml)接种在 96 孔培养板,每孔 200 μl,每组设 6 个复孔。细胞生长 24 h 后,吸去上清液,每孔加入 1 mg/ml MTT 100 μl,37℃ 孵育 2 h,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 μl 二甲基亚砷,4℃ 冰箱内过夜,使细胞内结晶体完全溶解,于 DG3022 酶联免疫检测仪 570 nm 波长处测定各孔的吸光度,取平均值并计算其生长抑制率。

细胞生长抑制率(IR)=(1-实验组吸光度/对照组吸光度)×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 24 h 后收集细胞约 10⁶,PBS 洗涤两次后快速加入 1 ml 4℃ 预冷的流式细胞固定液(含 70% 无水酒精,1.5% 牛血清,28.5% PBS)制成细胞悬液。加入 PI 染液染色 4℃ 30 min。流式细胞术测定细胞 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 RT-PCR Trizol 抽提 MG63 细胞总 RNA,取 2 μg 总 RNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,再取 1 μl cDNA 行 PCR 扩增 OPG、OPGL、TRAIL 基因,以 β-actin 基因为内对照。OPG 上游引物:5'AGTGGGAG-CAGAAGACATTG 3',下游引物:5'ATTGGACCTGCT-TACCTATC 3',扩增长度为 268 bp;OPGL 上游引物:5'GCGTCGCCCTGTTCTTCTAT 3',下游引物:5'TTG-GTGCTTCCTCCTTTTCAT 3',扩增长度为 598 bp;TRAIL 上游引物:5'GGCATTTCATTCCTGAGCAAC-TT3',下游引物:5'GATCTCGTGATCTACCCACCTT3',扩增长度为 908 bp。反应体系为 25 μl,双蒸水 18 μl,缓冲液 2.5 μl,Taq 酶 0.5 μl,上游引物各 2 μl,下游引物各 2 μl,模板 1 μl。按要求常规扩增共 30 个循环,最后延伸 10 min。分别取 10 μl PCR 扩增产物于琼脂糖凝胶电泳并拍照,用凝胶成像分析系统行条带光密度定量检测,测值与 β-actin 光密度值比较,比值表示各指标的 mRNA 表达量。

1.3 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件包统计分析。检测数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,组间比较用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 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 NG 组相比,HG 组可明显抑制 MG63 细胞的增殖(*P* < 0.05),并在 FG 组达到最大效应(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞增殖的影响			
组别	<i>n</i>	A ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)	IR (%)
NG 组	6	0.306 ± 0.027	
HG 组	6	0.267 ± 0.031 ^a	12.75
FG 组	6	0.218 ± 0.034 ^{ab}	28.76

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

2.2 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。FG 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(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	G1 期细胞	S 期细胞	凋亡率
NG 组	3	38.33 \pm 3.51	53.09 \pm 8.13	2.89 \pm 0.37
HG 组	3	49.00 \pm 3.70 ^a	40.67 \pm 2.17 ^a	15.53 \pm 1.23 ^a
FG 组	3	61.97 \pm 3.82 ^{ab}	29.23 \pm 3.69 ^{ab}	26.16 \pm 1.35 ^{ab}

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

2.3 高糖及高糖波动对 MG63 细胞 OPG、OPGL、TRAIL mRNA 表达的影响 高糖作用下 MG63 细胞中 TRAIL 和 OPGL 基因表达增加,而 OPG 基因表达下降 ($P < 0.05$),FG 组较 HG 组上述作用更加明显 ($P < 0.05$),见表 3。

3 讨 论

糖尿病易并发骨质疏松症已被公认,糖尿病对骨代谢的影响主要表现为骨吸收增加,骨形成减少与缓慢,骨吸收过程大于骨形成过程,使骨矿物质含量减少和骨质疏松。动物实验表明,在糖尿病大鼠病程早期即表现为成骨细胞数下降、破骨细胞数上升,说明骨形成减少,骨吸收相对大于骨形成^[1-2,4],其发病机制较为复杂。既往研究发现,发病与胰岛素或胰岛素样生长因子-1 缺乏、持续高糖状态、高级糖基化终末产物增多及糖尿病并发症等有关。但其确切的细胞机制尚未阐明。

TRAIL 是新发现的肿瘤坏死因子超家族的凋亡分子,可与多种受体结合,发挥诱导或抗凋亡作用。TRAIL 有 5 个受体:死亡受体(DR4, DR5)、诱骗受体(DcR1, DcR2)和分泌型受体 OPG。TRAIL 与 DR4、DR5 相互作用,可诱导许多组织来源的肿瘤细胞株迅速凋亡。OPG 是一个分泌型受体,通过结合 OPGL,抑制破骨细胞生成、活化,减少骨吸收,发挥骨保护作用^[8-13]。OPG 还能通过与 TRAIL 的竞争

性结合,抑制 TRAIL 和死亡受体结合,来抑制 TRAIL 诱导细胞凋亡的作用。反之,TRAIL 结合 OPG^[9-10],可间接解除 OPG 对 OPGL 的结合,抑制它的骨保护作用,OPG 和 TRAIL 是相互制约的。

MG63 细胞株是当前公认的永生化成骨样细胞系中的一种,具有成骨细胞的特征,广泛应用于基础研究及药效观察等^[11]。本研究从基因水平观察了高糖及高糖波动对 MG63 细胞株中 OPG、OPGL 表达的影响。发现高糖能使 MG63 细胞中 OPGL mRNA 表达增加,同时能抑制 OPG mRNA 的表达,使细胞内 OPG/OPGL 比率降低,波动性高糖效应更加明显。提示高糖及高糖波动可能通过对成骨细胞中 OPG/OPGL 比率的影响,导致骨质疏松。本研究从基因的角度,还观察了葡萄糖对 MG63 细胞株 TRAIL 表达的影响。发现高糖及高糖波动均可使 TRAIL mRNA 表达增多。由于 TRAIL 是与细胞凋亡有关的细胞因子,提示高浓度的葡萄糖可能通过 TRAIL 以自分泌或旁分泌的形式介导成骨细胞的凋亡,导致骨形成减少、骨质疏松发生。另一方面,高糖环境下 TRAIL 表达的增多,还可竞争性结合 OPG,阻断后者对 OPGL 的结合,促进了破骨细胞数目的增多及分化成熟。本研究还应用 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 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。因葡萄糖波动对细胞的增殖抑制和细胞周期的阻滞及凋亡的诱导作用更加明显,故推测血糖波动可能是通过成骨细胞内 TRAIL、OPG 及 OPGL 表达的改变,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。因此推测对于临床糖尿病患者,可采用连续血糖监测并通过强化治疗或联合治疗精细调节患者血糖的措施,避免血糖控制的大幅波动,以有效预防和控制骨质疏松症。

【参考文献】

[1] 廖二元,超楚生,伍汉文. 内分泌学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1818-1819.

表 3 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞 OPG、OPGL 及 TRAIL mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OPG	OPGL	TRAIL	OPG/OPGL
NG 组	5	0.961 \pm 0.027	0.109 \pm 0.034	0.739 \pm 0.023	8.785 \pm 0.561
HG 组	5	0.929 \pm 0.019 ^a	0.181 \pm 0.022 ^a	0.884 \pm 0.035 ^a	5.107 \pm 0.441 ^a
FG 组	5	0.904 \pm 0.075 ^{ab}	0.222 \pm 0.020 ^{ab}	0.905 \pm 0.041 ^{ab}	4.085 \pm 0.417 ^{ab}

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

- [2] Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: possible cellular and molecular mechanisms [J]. World J Diabetes, 2011, 2(3): 41-48.
- [3] Sanchez-Niño MD, Benito-Martin A, Goncalves S, et al. TNF superfamily: s growing saga of kidney injury modulators [J]. Mediators Inflamm, 2010, 2010: 182958.
- [4] van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus [J]. Mediators Inflamm, 2010, 2010: 792393.
- [5] Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, et al. Rank, rankl and osteoprotegerin in bone biology and disease [J]. Curr Rev Musculoskelet Med, 2009, 2(1): 56-64.
- [6] 周 玮,姬秋和,张南雁,等. 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞株护骨素、护骨素配体及其相关因子表达的影响 [J]. 医学研究生学报, 2007, 20(2): 146-149.
- [7] Matsuda T, Almasan A, Tomita M, et al. Resistance to Apo2 ligand (apo2L)/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis and constitutive expression of apo2L/trail in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines [J]. J Virol, 2005, 79(3): 1367-1378.
- [8] Narducci P, Bortol R, Bareggi R, et al. Clathrin-dependent endocytosis of membrane-bound RANKL in differentiated osteoclasts [J]. Eur J Histochem, 2010, 54(1): e6.
- [9] Bell NH. Rank ligand and the regulation of skeletal remodeling [J]. J Clin Invest, 2003, 111(8): 1120-1122.
- [10] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(1): 2-12.
- [11] Bai XC, Lu D, Liu AL, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast [J]. J Biol Chem, 2005, 280(17): 17497-17506.
- [12] Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(Suppl 1): S1.
- [13] 罗助荣. 骨保护素系统与动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 东南国防医药, 2010, 12(6): 523-525.

(收稿日期: 2011-09-26; 修回日期: 2011-12-14)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

· 短 篇 ·

中青年非酒精性脂肪肝与代谢综合征的关系

王 颖, 钟 勇, 史兆荣, 游云鹏, 郑大东

[关键词] 非酒精性脂肪肝; 代谢综合征; 血脂异常

[中图分类号] R589 [文献标志码] B

[文章编号] 1672-271X(2012)02-0144-02

随着生活水平的提高和工作环境的改变, 中青年肥胖、高血压、高血脂和高血糖发病率明显增加, 且常伴有脂肪肝的发生, 使心血管疾病发病和死亡危险大大增加^[1]。本文对 2008 至 2010 年我院体检中心 450 例中青年的体检资料进行分析, 探讨非酒精性脂肪肝的发病情况及相关因素。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本组 450 例, 男 306 例, 女 144 例; 年龄 28~59 岁, 平均 42.6 岁。根据有无发生非酒精性脂肪肝, 将其分为两组: 脂肪肝组 47 例(排除病毒性、药物性、自身免疫性肝炎以及饮酒折合摄入酒精量每周 > 40 g 的对象), 无脂肪肝组 403 例。

1.2 方法

1.2.1 人体测量学指标 测定身高、体重、腰围、血压等

(按国际标准进行)。

1.2.2 诊断 高血压: 收缩压/舒张压(SBP/DBP) \geq 140/90 mmHg 及(或)已确认为高血压并予以治疗者。代谢综合征与非酒精性脂肪肝诊断参照相关标准^[2-3]予以判定, 排除继发性高血压、慢性肝肾疾病、自身免疫病等。

1.2.3 生化指标 应用日立 7600-020 型自动生化分析仪。空腹静脉采血测定空腹血糖(FPG)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件加以分析, 计量资料用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述, 采用独立样本 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组一般情况比较 两组年龄及男女构成差异无统计学意义($P > 0.05$), 有可比性。脂肪肝组腰围及体重指数均明显高于无脂肪肝组($P < 0.05$), 高血压的发生率(46.8%)也明显高于无脂肪肝组(19.9%)($P < 0.01$)。

2.2 两组生化指标比较 脂肪肝组 FPG、LDL-C、TG 水平与血脂异常率均明显高于无脂肪肝组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但 TC 及 HDL-C 比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

(下转第 175 页)

基金项目: 南京军区南京总医院面上课题资助项目 (2009M003)

作者单位: 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院干部保健科