

高糖通过诱导铁死亡抑制骨髓基质细胞成骨分化

张希 邵高海*

(重庆医科大学附属永川医院, 重庆 402177)

摘要 该研究旨在探究高糖抑制骨髓基质细胞(bone marrow stroma cells, BMSCs)成骨分化的作用及其可能的机制。采用25.5 mmol/L的葡萄糖(HG)模拟高糖微环境, 通过碱性磷酸酶(ALP)染色及生化定量检测成骨分化水平, qRT-PCR检测成骨分化相关基因mRNA表达水平, CCK-8检测细胞增殖活性, 荧光探针H2DCFDA检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 脂质过氧化氢荧光探针Liperfluo检测脂质过氧化产物(lipid peroxidation products, LPO)水平, 流式细胞仪定量检测平均荧光强度, Western blot检测谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的表达水平, 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察线粒体超微结构。结果显示, 高糖(HG)显著抑制BMSCs成骨分化及细胞增殖活性, 导致细胞内ROS及LPO水平显著升高, 而铁死亡抑制剂可以恢复BMSCs成骨分化及细胞增殖活性, 降低ROS及LPO水平, 除此以外高糖(HG)导致BMSCs线粒体皱缩、体积变小、膜密度增高、嵴减少、细胞核形态变化不明显等铁死亡样改变。综上所述, 高糖通过诱导铁死亡从而抑制BMSCs成骨分化功能。

关键词 高糖; 铁死亡; 骨髓基质细胞; 成骨分化

High Glucose Inhibits Osteoblast Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells by Inducing Ferroptosis

ZHANG Xi, SHAO Gaohai*

(Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402177, China)

Abstract This study investigated the effect of high glucose on osteoblast differentiation of BMSCs (bone marrow stroma cells) and its possible mechanism. Using 25.5 mmol/L glucose (HG) to simulate high glucose microenvironment, the level of osteoblast differentiation was detected by ALP (alkaline phosphatase) staining and biochemical quantification. Cell proliferation activity was detected by CCK-8. ROS (reactive oxygen species) was detected by fluorescence probe H2DCFDA and Liperfluo probe was used to detect LPO (lipid peroxidation products), and the mean fluorescence intensity was quantitatively detected by flow cytometry. The expression level of GPX4 (glutathione peroxidase 4) was detected by Western blot. The ultrastructure of mitochondria was observed by TEM (transmission electron microscopy). These results showed that high glucose significantly inhibited osteoblast differentiation and cell proliferation activity of BMSCs, leading to a significant increase in intracellular ROS and LPO levels, while ferroptosis inhibitors could restore osteoblast differentiation and cell proliferation activity of BMSCs, and reduce ROS and LPO levels. In addition, high glucose resulted in mitochondrial shrinkage, smaller volume, in-

收稿日期: 2021-05-19 接受日期: 2021-06-25

重庆市科委技术创新与应用示范项目(批准号: cstc2018jcsx-msybX0132)和重庆医科大学附属永川医院院级项目(批准号: YJLC201719)资助的课题

*通讯作者: Tel: 13500303511, E-mail: shanggaohai567@163.com

Received: May 19, 2021 Accepted: June 25, 2021

This work was supported by the Technology Innovation and Application Demonstration Project of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No. cstc2018jcsx-msybX0132), and the Project of Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University (Grant No. YJLC201719)

*Corresponding author. Tel: +86-13500303511, E-mail: shanggaohai567@163.com

creased membrane density, reduced cristae and nucleus. In conclusion, high glucose inhibits osteoblast differentiation of BMSCs by inducing ferroptosis.

Keywords high glucose; ferroptosis; bone marrow stroma cells; osteoblast differentiation

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种进展缓慢伴有大量并发症的疾病,其特点是高水平的循环葡萄糖,导致大多数微血管和大血管并发症,包括神经病变、肾病及视网膜病变等^[1]。流行病学研究表明,2型糖尿病患者的骨质疏松性骨折发生率显著增加^[2],而进行胰岛素治疗的患者骨质疏松性骨折发生的风险进一步加剧^[3]。然而,2型糖尿病导致骨质疏松性骨折发病率增加的机制仍然不清楚^[4]。T2DM相关骨质疏松症(T2DM-related osteoporosis, T2DOP)的发病机制有待进一步阐明。最近有研究报道,2型糖尿病导致骨质疏松与慢性铁积累导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)升高密切相关^[5-7],氧化应激在T2DOP的发病机制中起重要作用^[8-9]。

铁死亡(ferroptosis)是一种铁依赖性的,区别于细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬的新型细胞程序性死亡方式^[10]。铁死亡的主要机制是细胞在二价铁或酯氧合酶的作用下,催化细胞膜上高表达的不饱和脂肪酸,发生脂质过氧化,导致脂质ROS及脂质过氧化物积累从而诱导细胞死亡^[11];此外,还表现为抗氧化体系(谷胱甘肽系统)的调控核心酶—谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的表达水平降低,其形态特征是线粒体收缩,体积变小,膜密度增高,嵴减少,细胞核形态变化不明显^[12]。同时,铁死亡不能被细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬的抑制剂所抑制,却可以被铁螯合剂、铁死亡抑制剂等所抑制^[13]。据报道铁死亡与多种疾病,如癌症、肾退化、脑出血和创伤性脑损伤有关^[14-16],由于铁死亡的激活可以导致肿瘤细胞的死亡,而铁死亡的抑制又可防止神经退行性疾病,因此铁死亡成为了近年的研究热点。而研究证实氧化应激在糖尿病骨质疏松症的发病机制中起着重要作用^[17],由此,我们推测在T2DOP发病过程中可能发生铁死亡,并进行了相关的研究以确定铁死亡的存在。

已经有研究发现,糖尿病微环境会影响骨髓基质细胞(bone marrow stroma cells, BMSCs)成骨分化,但具体机制需要进一步探索。因此本研究以BMSCs为研究对象,检测高糖微环境是否会导致BMSCs发生铁死亡,旨在为2型糖尿病合并骨质疏松症的临床

治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; CCK-8增殖试剂盒、Erastin购自上海 MedChemExpress公司; α -MEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司; 青-链霉素及胰酶购自美国HyClone公司; 荧光探针 liperfluo购自北京 Dojindo 生物技术有限公司; 荧光探针 H2DCA购自上海 MedChemExpress公司; QVD(Q-VD-oph)、Nec-1(necrostatin-1)、3-Ma(3-methyladenine)、葡萄糖(HG)、Fer-1(ferrostatin-1)均购自美国Sigma-Aldrich公司; GPX4抗体、GAPDH抗体购自英国Abcam公司。

1.2 原代骨髓基质细胞(BMSCs)提取及培养

利用乙醚麻醉C57/BL6小鼠[购于重庆医科大学动物实验中心,得到重庆医科大学医学伦理委员会审批,动物生产许可证号为SCXK(渝)2018-0003,使用许可证号为SYXK(渝)2018-0003],采用快速颈椎脱臼法处死,用灭菌的剪刀、镊子获得干净小鼠股骨和胫骨,尽量去除肌肉等,并将其置于含1%胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)、1%双抗(penicillin-streptomycin, PS)的 α -MEM培养液制成的冲洗液中,使其保持湿润,用1 mL无菌注射器快速猛烈冲洗股骨、胫骨、中骨髓腔3次以上获得原代骨髓基质细胞(bone marrow stroma cells, BMSCs)。培养3天后换液,细胞密度达80%~90%时用胰酶消化,离心(800 r/min, 8 min)后按照 2×10^5 个/孔的密度均匀铺于24板中,于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 ALP染色

将BMSCs按照 2×10^5 个/孔均匀铺于24板中,贴壁12 h后加入含不同药物的1 mL培养基,孵育(37 °C、5% CO₂) 3天后用PBS清洗2次,4%多聚甲醛固定10~15 min。然后按照BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒说明书配制染色液于避光环境下孵育(37 °C、5% CO₂) 显色15 min,染色达到要求后去除显色液并及时拍照保存。

1.4 ALP生化定量

在pH9.8的DEA(diethanolamine)缓冲液中, 37 °C条件下, 将每分钟水解para-nitrophenyl phosphate显色底物产生1 $\mu\text{mol/L}$ p-nitrophenol所需的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的量定义为一个酶活力单位。将BMSCs按照 2×10^5 个/孔均匀铺于24板中贴壁12 h后加入含不同药物的1 mL培养基, 孵育(37 °C、5% CO_2) 3天后根据试剂盒说明书每孔加入300 μL 裂解液, 超声破碎细胞, 4 °C、12 000 r/min离心5 min, 取上清液加入显色底物para-nitrophenyl phosphate, 37 °C孵育30 min, 加入终止液后测定样品在波长为405 nm处的吸光度(D)值。同时吸取上清液加入BCA工作液, 测定总蛋白浓度在波长为562 nm处的吸光度(D)值。以405 nm与562 nm处的吸光度值的比值作为样品的ALP生化定量。

1.5 CCK-8增殖检测

取对数生长期细胞, 将其消化制成单细胞悬液并计数, 按5 000个/孔的细胞密度接种于96孔板中, 边缘孔加PBS。细胞贴壁12 h后加入含不同药物的100 μL 的培养基, 于37 °C、5% CO_2 培养箱中培养48 h后, 吸弃原培养基, 改为无血清培养基, 每个孔加入10 μL CCK-8试剂, 置于37 °C培养箱中反应4 h, 使用微孔板读取器(Thermo, MA, USA)在波长为450 nm处检测每个孔中细胞的 D 值。相对细胞活性=(治疗组 D 值-空白组 D 值)/(对照组 D 值-空白组 D 值)。每个实验重复3次。

1.6 ROS检测

采用H2DCFDA荧光法测定ROS水平, 将BMSCs按照 2×10^5 个/孔均匀铺于24板, 贴壁12 h后加入含不同药物的培养基(1 mL), 孵育3天后用PBS清洗2次, 加入1 $\mu\text{mol/L}$ 的H2DCFDA染色液, 在37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育20-30 min, 荧光显微镜拍图并保存, 流式细胞术测定平均荧光强度。

1.7 LPO检测

采用脂质过氧化氢探针的衍生物Liperfluo检测脂质过氧化产物(lipid peroxidation products, LPO), Liperfluo是一种Spy-LHP(一种脂质过氧化氢探针)的常见衍生物, 可用于活细胞中脂质过氧化产物(LPO)的荧光成像或流式分析。将BMSCs按照 2×10^5 个/孔均匀铺于24板中贴壁12 h后加入含不同药物的1 mL培养基, 孵育3天后用PBS清洗2次, 加入10 $\mu\text{mol/L}$ 的Liperfluo工作染色液, 在37 °C、5% CO_2 培养箱孵育30 min, 荧光显微镜拍图并保存, 流式细胞术测定平均荧光强度。

1.8 蛋白印迹

将BMSCs按照 2×10^5 个/孔均匀铺于24板中, 待其贴壁12 h后加入含不同药物的1 mL培养基, 孵育(37 °C、5% CO_2) 3天后用PBS清洗2遍, 使用加入了蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解细胞, 从而获得蛋白质裂解物。然后使用BCA试剂盒对裂解液中的50 μg 蛋白质进行定量, 并将其在10% SDS-PAGE上分离并电转移至PVDF膜。免疫印迹是通过使用1:1 000稀释度的多克隆抗GPX4抗体, 通过化学发光显影印迹。

1.9 透射电子显微镜观察

将BMSCs按照 5×10^5 个/孔接种于6孔板, 贴壁12 h后加入含不同药物的3 mL培养基, 孵育3天后用PBS清洗2次, 用0.25%胰蛋白酶收集和1%钨酸(Sigma-Aldrich)固定4 h后送样检查。将切片置于透射电镜下观察细胞线粒体超微结构。

1.10 qRT-PCR

Trizol法提取细胞总RNA, 通过反转录得到cDNA, cDNA反应液进行5倍稀释后, 作为qRT-PCR反应的模板。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析, 以GAPDH的表达水平作为标准。各基因引物序列见表1。

表1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of each gene

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>GAPDH</i>	Forward: GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT Reverse: GCC TTC TCC ATG GTG GTG GTG AA
<i>ALP</i>	Forward: ACA CCA ATG TAG CCA AGA ATG TCA Reverse: GAT TCG GGC AGC GGT TAC T
<i>Runx2</i>	Forward: CCG TGG CCT TCA AGG TTG T Reverse: TTC ATA ACA GCG GAG GCA
<i>OSX</i>	Forward: CCC TTC TCA AGC ACC ATT GG Reverse: AAG GGT GGG TAG TCA TTT GCA TA
<i>OCN</i>	Forward: GAC AGG CGA ACA AGG TGA CAG AG Reverse: CAG GAG AAC CAG GAG AAC CAG GAG

1.11 统计分析

每组实验均独立重复3次, 定量数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用单因素方差分析比较多组间差异, t 检验比较两组间差异。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制铁死亡恢复HG抑制的BMSCs成骨分化

采用 25.5 mmol/L 葡萄糖 (HG) 处理骨髓基质细胞 (BMSCs) 模拟 2 型糖尿病高糖微环境^[18], 对照细胞使用 5.5 mmol/L 葡萄糖 (HG)。ALP 是成骨分化的早期标志物, ALP 染色 (图 1A) 及生化定量 (图 2B) 检测结果表明, HG 显著抑制 BMSCs 的成骨分化。为了确定 HG 引起的 BMSCs 成骨分化降低是否由铁死亡导致, 分别选用凋亡抑制剂 Q-VD-o-ph (QVD)、坏死抑制 necrostatin-1 (Nec-1)、自噬抑制剂 3-methyladenine (3-Ma) 处理细胞, 结果发现其均不能恢复 HG 对 BMSCs 成骨分化的抑制作用。然而, 使用铁死亡抑制剂 Fer-1 (ferrostatin-1) 处理细胞, 结果显示, Fer-1 可以显著恢复 HG 对 BMSCs 成骨分化的抑制作用, 这提示 HG 对 BMSCs 成骨分化的抑制作用可能是铁死亡导致的。

2.2 抑制铁死亡恢复HG抑制的BMSCs成骨分化标志基因的表达

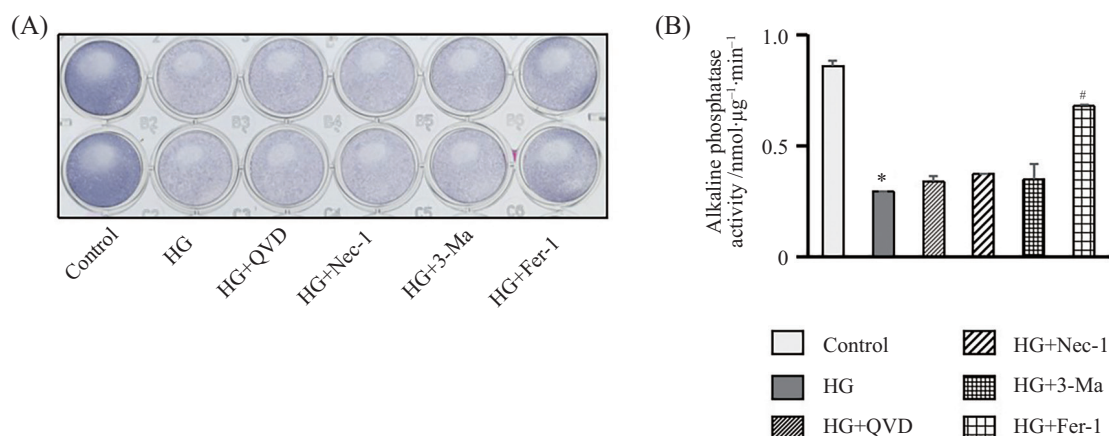
同时, 我们进一步检测了铁死亡抑制剂 Fer-1、凋亡抑制剂 QVD、坏死抑制剂 Nec-1、自噬抑制剂 3-Ma 处理细胞对成骨分化标志基因 *ALP*、*OSX*、*Runx2*、*OCN* 表达的影响, 图 2 结果显示, 凋亡抑制剂 QVD、坏死抑制剂 Nec-1、自噬抑制剂 3-Ma 均不能恢复 HG 对 BMSCs 成骨分化基因的抑制作用。然而, 铁死亡抑制剂 Fer-1 处理细胞可以显著恢复 HG 对 BMSCs 成骨分化基因的抑制作用, 这再次证明 HG 对 BMSCs 成骨分化的抑制作用是铁死亡导致的。

2.3 抑制铁死亡恢复HG抑制的BMSCs增殖活性

为了进一步探究 HG 对 BMSCs 增殖活性的影响, 通过 CCK-8 检测到 HG 处理细胞 48 h 后可显著降低 BMSCs 的增殖活性, 而加入凋亡抑制剂 QVD、坏死抑制剂 Nec-1、自噬抑制剂 3-Ma 处理细胞后细胞增殖活性没有显著改善, 然而使用铁死亡抑制剂 Fer-1 后恢复了细胞增殖活性, 阻止了 HG 诱导 BMSCs 死亡 (图 3)。

2.4 抑制铁死亡降低HG导致的BMSCs细胞内ROS和LPO升高

铁死亡是由于铁代谢紊乱从而引起的以活性

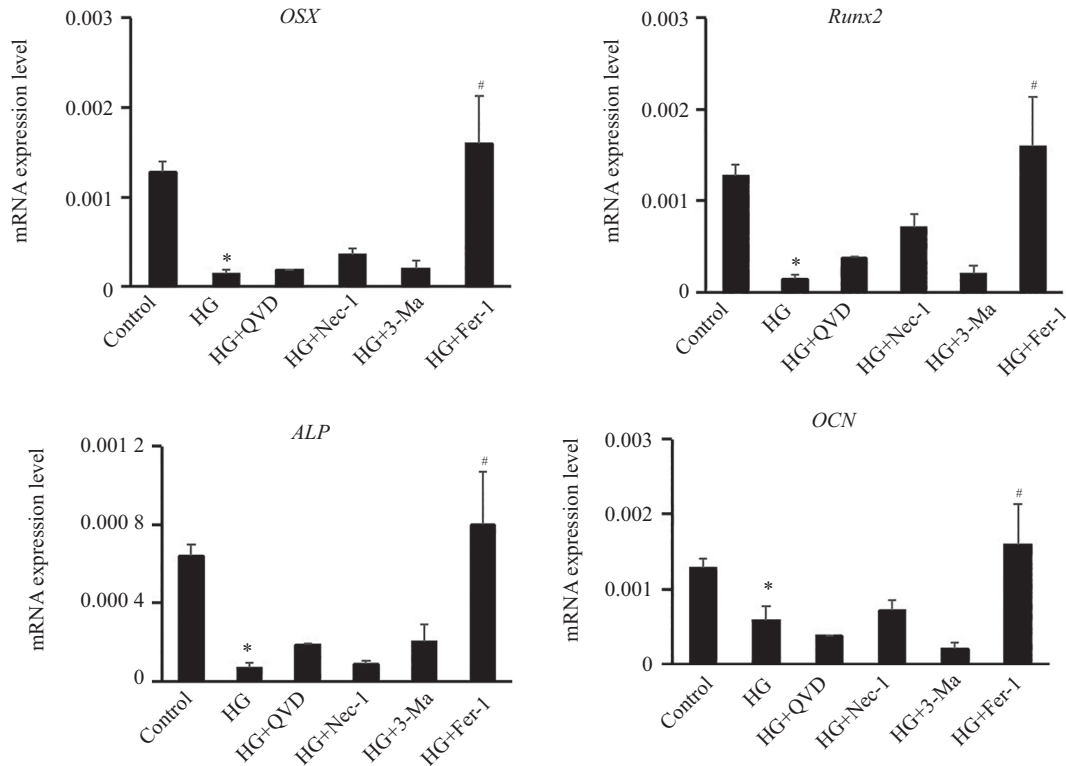


A: ALP染色检测HG对BMSCs成骨分化的作用。B: ALP生化定量检测。Control为DMSO对照组(<0.1%), HG为高糖组(high glucose, HG, 25.5 mmol/L), HG+QVD为高糖同时加凋亡抑制剂组(Q-VD-o-ph, QVD, 10 μmol/L), HG+Nec-1为高糖同时加坏死抑制剂组(necrostatin-1, Nec-1, 50 μmol/L), HG+3-Ma为高糖同时加自噬抑制剂组(3-methyladenine, 3-Ma, 1 mmol/L), HG+Fer-1为高糖同时加铁死亡抑制剂组(ferrostatin-1, Fer-1, 5 μmol/L)。* $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与HG组相比。

A: ALP staining was used to detect the effect of HG on osteoblast differentiation of BMSCs. B: quantitative detection of ALP biochemical activity. Control group (DMSO<0.1%); HG group (high glucose, HG, 25.5 mmol/L); HG+QVD group (Q-VD-o-ph, QVD, 10 μmol/L); HG+Nec-1 group (necrostatin-1, Nec-1, 50 μmol/L); HG+3-Ma group (3-methyladenine, 3-Ma, 1 mmol/L) and HG+Fer-1 group (ferrostatin-1, Fer-1, 5 μmol/L). * $P<0.05$ vs Control group; # $P<0.05$ vs HG group.

图1 抑制铁死亡恢复HG抑制的BMSCs成骨分化能力

Fig.1 Inhibition of ferroptosis restores osteoblast differentiation of BMSCs inhibited by HG

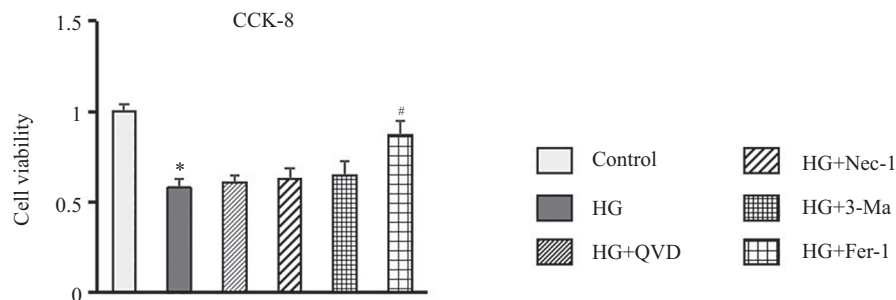


q-RT-PCR检测HG、QVD、Nec-1、3-Ma、Fer-1对BMSCs成骨分化标志基因 ALP 、 OSX 、 $Runx2$ 、 OCN 表达的影响。Control为DMSO对照组(<0.1%), HG为高糖组(high glucose, HG, 25.5 mmol/L), HG+QVD为高糖同时加凋亡抑制剂组(Q-VD-oph, QVD, 10 μ mol/L), HG+Nec-1为高糖同时加坏死抑制剂组(necrostatin-1, Nec-1, 50 μ mol/L), HG+3-Ma为高糖同时加自噬抑制剂组(3-methyladenine, 3-Ma, 1 mmol/L), HG+Fer-1为高糖同时加铁死亡抑制剂组(ferrostatin-1, Fer-1, 5 μ mol/L)。* P <0.05, 与Control组相比; # P <0.05, 与HG组相比。

The effects of HG, QVD, Nec-1, 3-Ma, Fer-1 on the expression of BMSCs osteoblast differentiation marker genes ALP , OSX , $Runx2$, OCN were detected by q-RT-PCR. Control group (DMSO<0.1%), HG group (high glucose, HG, 25.5 mmol/L), HG+QVD was the high glucose group combined with apoptosis inhibitor (Q-VD-oph, QVD, 10 μ mol/L), and HG+Nec-1 was the high glucose group combined with necrosis inhibitor (necrostatin-1, Nec-1, 50 μ mol/L), HG+ 3-MA was the hyperglycemic group combined with autophagy inhibitor (3-methyl adenine, 3-MA, 1 mmol/L). HG+ Fer-1 was the hyperglycemic group combined with ferroptosis inhibitor (Fer-1, 5 μ mol/L). * P <0.05 vs Control group; # P <0.05 vs HG group.

图2 抑制铁死亡恢复HG抑制的BMSCs成骨分化标志基因

Fig.2 Inhibition of ferroptosis restores HG-inhibited osteoblast differentiation marker genes

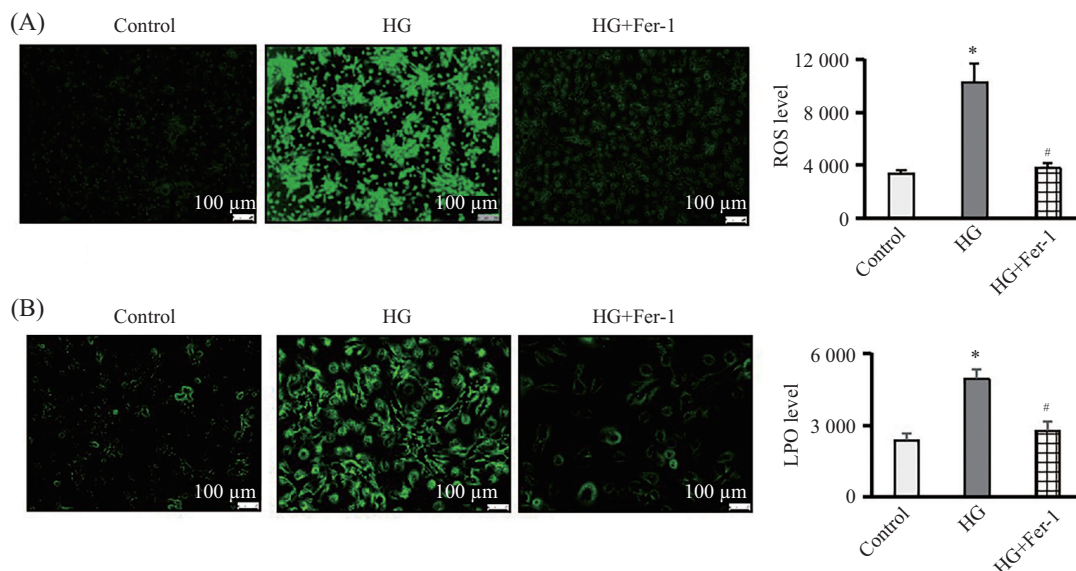


CCK-8检测HG、QVD、Nec-1、3-Ma、Fer-1对BMSCs细胞活性的影响。Control为DMSO对照组(<0.1%), HG为高糖组(high glucose, HG, 25.5 mmol/L), HG+QVD为高糖同时加凋亡抑制剂组(Q-VD-oph, QVD, 10 μ mol/L), HG+Nec-1为高糖同时加坏死抑制剂组(necrostatin-1, Nec-1, 50 μ mol/L), HG+3-Ma为高糖同时加自噬抑制剂组(3-methyladenine, 3-Ma, 1 mmol/L)。HG+Fer-1为高糖同时加铁死亡抑制剂组(ferrostatin-1, Fer-1, 5 μ mol/L)。* P <0.05, 与Control组相比; # P <0.05, 与HG组相比。

The effects of HG, QVD, Nec-1, 3-Ma and Fer-1 on the activity of BMSCs cells were detected by CCK-8. Control group (DMSO<0.1%); HG group (high glucose, HG, 25.5 mmol/L); HG+QVD group (Q-VD-oph, QVD, 10 μ mol/L); HG+Nec-1 group (necrostatin-1, Nec-1, 50 μ mol/L); HG+3-Ma group (3-methyladenine, 3-Ma, 1 mmol/L) and HG+Fer-1 group (ferrostatin-1, Fer-1, 5 μ mol/L). * P <0.05 vs Control group; # P <0.05 vs HG group.

图3 抑制铁死亡恢复HG抑制的BMSCs细胞活性

Fig.3 Inhibition of ferroptosis restored the activity of HG-inhibited in BMSCs



A、B: 荧光探针H2DCFDA和Liperfluor检测HG对BMSCs活性氧ROS和脂质过氧化物LPO的影响, 荧光显微镜拍照(左), 流式细胞仪定量检测ROS及LPO的荧光强度(右)。* $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与HG组相比。

A,B: the effects of HG on BMSCs reactive oxygen ROS and lipid peroxide LPO were detected by fluorescence probe H2DCA and Liperfluor. Fluorescence microscope was taken (left), and fluorescence intensities of ROS and LPO were quantitatively detected by flow cytometry (right). * $P<0.05$ vs Control group; # $P<0.05$ vs HG group.

图4 抑制铁死亡恢复HG导致的BMSCs细胞内ROS和LPO升高

Fig.4 Inhibition of ferroptosis restored the increase of ROS and LPO induced by HG in BMSCs

氧(ROS)和脂质过氧化产物(LPO)积累为特征的一种可调控细胞死亡方式。ROS及LPO被认为是铁死亡的执行者。通过荧光探针H2DCFDA和Liperfluor检测HG对BMSCs活性氧ROS和脂质过氧化物LPO的影响, 并通过流式细胞仪对荧光强度进行定量检测。结果显示, HG显著增加了细胞内的ROS(图4A)及LPO(图4B)的积累, 而加入铁死亡抑制剂Fer-1后, ROS及LPO恢复至正常水平。

2.5 抑制铁死亡恢复HG导致的BMSCs细胞内GPX4降低

GPX4是铁死亡过程中的标志物, 是细胞内唯一一个用于脂质体过氧化物还原的酶。Western blot检测HG对BMSCs细胞中铁死亡相关蛋白GPX4表达的影响, 图5结果显示, HG显著降低GPX4蛋白的表达, 而加入铁死亡抑制剂Fer-1后GPX4表达升高。以上结果证明, HG诱导BMSCs发生铁死亡从而抑制成骨分化。

2.6 HG导致BMSCs线粒体铁死亡样改变

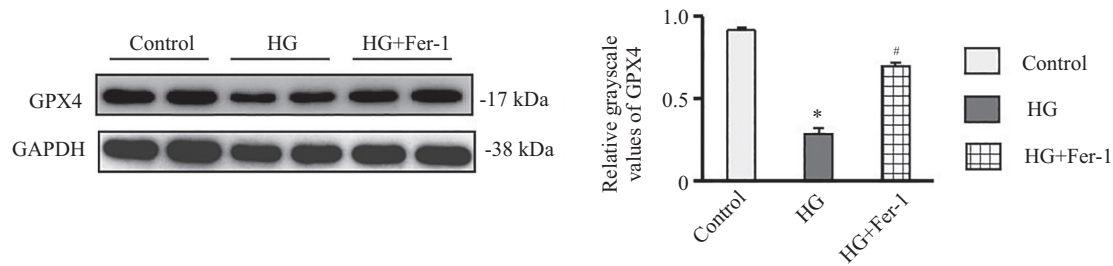
线粒体的改变被认为是铁死亡的一个主要形态学特征, 因此, 通过透射电子显微镜观察HG及Erastin处理BMSCs后线粒体超微结构的变化, 以铁死亡诱导剂Erastin作为阳性对照, 结果(图6)发现, 线

粒体萎缩, 体积变小, 双层膜密度增高, 细胞核形态正常, 但缺乏染色质凝集。综上所述, 铁死亡为HG抑制BMSCs成骨分化的机制之一, 而抑制高糖导致的铁死亡可能为临床治疗2型糖尿病合并骨质疏松症提供新的理论依据。

3 讨论

关于T2DOP的研究越来越多, 但具体的机制仍需要进一步探索^[19]。本研究的目的是探讨糖尿病合并骨质疏松症的发病机制, 这需要一个模拟糖尿病病理过程的模型。因此, 我们采用HG(25.5 mmol/L)处理BMSCs, 旨在体外模拟糖尿病微环境。结果表明, HG在体外显著抑制BMSCs成骨分化和细胞增殖活性, 其机制是HG诱导BMSCs发生铁死亡。

MA等^[20]研究发现, 铁过载和氧化应激是T2DOP发病机制中的重要因素。最近发现依赖于铁的程序性细胞死亡被称为铁死亡, 其特征是细胞内铁和脂质ROS的积累, 自2012年首次报道以来, 铁死亡引起了研究者的极大兴趣^[11]。在本研究中, 我们发现HG对BMSCs成骨分化及增殖活性的抑制作用可以被铁死亡抑制剂Fer-1逆转, 但不能被调亡抑制剂QVD、坏死抑制剂Nec-1、自噬抑制剂3-Ma所恢

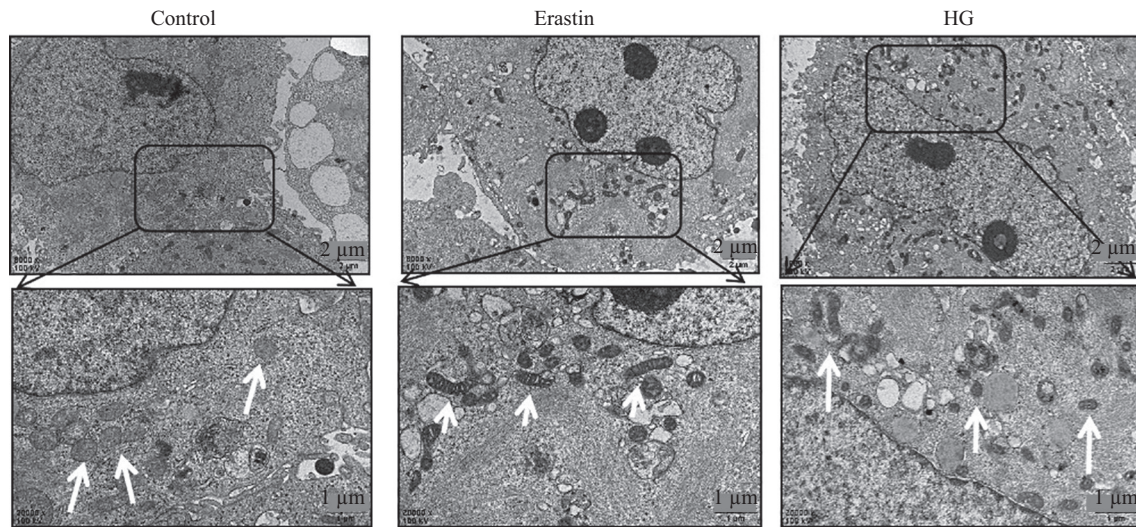


Western blot检测HG及Fer-1对GPX4蛋白表达的影响。* $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与HG组相比。

The effects of HG and Fer-1 on GPX4 protein expression were detected by Western blot. * $P<0.05$ vs Control group; # $P<0.05$ vs HG group.

图5 抑制铁死亡恢复HG导致的BMSCs细胞内GPX4降低

Fig.5 Inhibition of ferroptosis restored hyperglycemic GPX4 reduction in BMSCs



TEM检测HG对BMSCs线粒体的影响, 以铁死亡诱导剂Erastin作为阳性对照。白色箭头为线粒体, 黑框表示放大区域。

The effect of HG on BMSCs mitochondria was detected by TEM. The ferroptosis inducer Erastin was the positive control. The white arrow represented the mitochondria, and the black box represented the amplification region.

图6 HG导致BMSCs线粒体铁死亡样改变

Fig.6 HG induced ferroptosis-like changes in BMSCs mitochondria

复。TEM观察发现, HG增加线粒体膜的密度和减少线粒体内膜嵴, 这种形态学变化与阳性对照铁死亡诱导剂Erastin的作用是一致的。HG还增加细胞内ROS的表达量, 促进脂质氧化物LPO的积累, 降低细胞内铁死亡相关蛋白GPX4的表达水平。总的来说, 这些结果表明HG在BMSCs中诱导了铁死亡。但HG引起铁积累进一步导致ROS增加诱发铁死亡的机制还需进一步阐明。研究人员发现, T2DM中铁过载是由成骨细胞中二价金属转运蛋白1(recombinant divalent metal transporter 1, DMT1)的过度表达引起的, 并且在T2DOP的发病机制中起重要作用^[8-9]。除此以外, 有研究表明, HG通过抑制Nrf2/HO-1信号通路以促进T2DOP细胞内铁过载和脂质过氧化来抑制成骨^[18]。而Nrf2/HO-1轴在调节细胞内铁代谢以

及调节铁死亡过程中至关重要^[21]。因此, Nrf2/HO-1信号通路可能是HG诱发铁死亡的机制, 值得进一步探索。

总之, 本研究证明HG导致BMSCs成骨分化及增殖活性降低的机制是通过诱发ROS及LPO积累而导致细胞铁死亡的, 虽然HG导致BMSCs铁死亡的机制需要进一步的探讨, 但本研究为T2DOP的发病机制提供了一个新的证据。

参考文献 (References)

- [1] RATHMANN W, KOSTEV K. Fracture risk in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a retrospective database analysis in primary care [J]. J Diabetes Complications, 2015, 29(6): 766-70.
- [2] VESTERGAARD P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes-a meta-

- analysis [J]. *Osteoporos Int*, 2007, 18(4): 427-44.
- [3] NAPOLI N, STROTMEYER E S, ENSRUD K E, et al. Fracture risk in diabetic elderly men: the MrOS study [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(10): 2057-65.
- [4] ASOKAN A G, JAGANATHAN J, PHILIP R, et al. Evaluation of bone mineral density among type 2 diabetes mellitus patients in South Karnataka [J]. *J Nat Sci Biol Med*, 2017, 8(1): 94-8.
- [5] ZHANG Q, ZHAO L, SHEN Y, et al. Curculigoside protects against excess-iron-induced bone loss by attenuating akt-foxo1-dependent oxidative damage to mice and osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, doi: 10.1155/2019/9281481.
- [6] TSAY J, YANG Z, ROSS F P, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress [J]. *Blood*, 2010, 116(14): 2582-9.
- [7] JING X, DU T, CHEN K, et al. Icariin protects against iron overload-induced bone loss via suppressing oxidative stress [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10123-37.
- [8] ZHANG W L, MENG H Z, YANG M W. Regulation of DMT1 on bone microstructure in type 2 diabetes [J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12(5): 441-9.
- [9] LIU F, ZHANG W L, MENG H Z, et al. Regulation of DMT1 on autophagy and apoptosis in osteoblast [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(3): 275-83.
- [10] YEE P P, WEI Y, KIM S Y, et al. Neutrophil-induced ferroptosis promotes tumor necrosis in glioblastoma progression [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5424.
- [11] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-72.
- [12] PARK E, CHUNG S W. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 822.
- [13] LIN X, PING J, WEN Y, et al. The mechanism of ferroptosis and applications in tumor treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.01061.
- [14] SHAN X, LI S, SUN B, et al. Ferroptosis-driven nanotherapeutics for cancer treatment [J]. *J Control Release*, 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.01.008.
- [15] FRIEDMANN ANGELI J P, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180-91.
- [16] LI Q, HAN X, LAN X, et al. Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(7): e90777.
- [17] NAPOLI N, CHANDRAN M, PIERROZ D D, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(4): 208-19.
- [18] 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, doi: 10.1155/2020/9067610.
- [19] KLEINERT M, CLEMMENSEN C, HOFMANN S M, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(3): 140-62.
- [20] LIANG D, XIANG L, YANG M, et al. ZnT7 can protect MC3T3-E1 cells from oxidative stress-induced apoptosis via PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1126-35.
- [21] LA ROSA P, PETRILLO S, TURCHI R, et al. The Nrf2 induction prevents ferroptosis in Friedreich's Ataxia [J]. *Redox Biol*, 2021, doi: 10.1016/j.redox.2020.101791.