

徐昊. 雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用及机制探究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 824-830.

Xu H. Protective effect and associated mechanism of action of estrogen on oxidative stress injury of MC3T3-E1 osteoblasts in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 824-830.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.013

雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用及机制探究

徐昊*

(武汉市第四医院, 武汉 430000)

【摘要】 目的 探讨雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用及机制。方法 将体外培养 MC3T3-E1 细胞分为空白对照组、H₂O₂ 组(300 μmol/L)、H₂O₂+ 雌激素 0.1 μmol/L 组、H₂O₂+ 雌激素 1 μmol/L 组、H₂O₂+ 雌激素 10 μmol/L 组和 H₂O₂+ NAC 1 mmol/L 组,分别与相应浓度的药物进行孵育。CCK-8 检测各组细胞增殖活性,流式细胞仪检测细胞凋亡率和线粒体膜电位;试剂盒检测丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平;荧光探针法检测细胞活性氧(ROS)水平;Western Blot 检测 Smad5、Runx2、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较,H₂O₂ 组小鼠成骨细胞的增殖活性明显下降($P < 0.05$),细胞凋亡率和 JC-1 阳性细胞率明显升高($P < 0.05$),MDA 和 ROS 水平明显升高($P < 0.05$),SOD 活性明显下降($P < 0.05$),Smad5、Runx2 和 Bcl-2 蛋白表达明显下降($P < 0.05$),Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显升高($P < 0.05$);与 H₂O₂ 组比较,H₂O₂+ 雌激素 1 μmol/L 组、H₂O₂+ 雌激素 10 μmol/L 组和 H₂O₂+ NAC 1 mmol/L 组细胞的增殖活性明显升高($P < 0.05$),细胞凋亡率和 JC-1 阳性细胞率明显下降($P < 0.05$),MDA 和 ROS 水平明显下降($P < 0.05$),SOD 活性明显升高($P < 0.05$),Smad5、Runx2 和 Bcl-2 蛋白表达明显升高($P < 0.05$),Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显下降($P < 0.05$)。**结论** 雌激素可能通过激活 Smad5/Runx2 信号轴的表达,降低氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞的 ROS 水平,提高细胞的分化能力。

【关键词】 雌激素;成骨细胞;氧化应激

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0824-07

Protective effect and associated mechanism of action of estrogen on oxidative stress injury of MC3T3-E1 osteoblasts in mice

XU Hao*

(Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430000, China)

Corresponding author: XU Hao. E-mail: huangkanping@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the protective effect and associated mechanism of action of estrogen on oxidative stress injury of mouse MC3T3-E1 osteoblasts (OB). **Methods** MC3T3-E1 cells cultured *in vitro* were divided into a blank control group, H₂O₂ group (300 μmol/L), H₂O₂+ 0.1 μmol/L estrogen group, H₂O₂+ 1 μmol/L estrogen group, H₂O₂+ 10 μmol/L estrogen group, and H₂O₂+ 1 mmol/L NAC group, which were incubated with the corresponding concentrations of the drugs. The proliferative activities of cells in each group were determined by CCK-8. The apoptosis rate and

【基金项目】 湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2019F016)。

Funded by Scientific Research Project of Hubei Provincial Health Commission (WJ2019F016)。

【通信作者】 徐昊(1969—),男,副主任医师,本科,研究方向:骨外的研究。Email: huangkanping@163.com

mitochondrial membrane potential (MMP) were determined by flow cytometry. The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were determined using kits. The level of reactive oxygen species (ROS) was determined by a fluorescent probe method. The expression of Smad5, Runx2, Bax, Bcl-2, and cleaved Caspase-3 proteins was determined by western blotting. **Results** Compared with those in the blank control group, the proliferative activities of cells were significantly decreased ($P < 0.05$), apoptosis rate and positive rate of JC-1 cells were significantly increased ($P < 0.05$), levels of MDA and ROS were significantly increased ($P < 0.05$), SOD activity was significantly decreased ($P < 0.05$), expression of Smad5, Runx2, and Bcl-2 proteins was significantly decreased ($P < 0.05$), and expression of Bax and cleaved Caspase-3 proteins was significantly increased in the H_2O_2 group ($P < 0.05$). Compared with those in the H_2O_2 group, proliferative activities of cells were significantly increased ($P < 0.05$), apoptosis rate and positive rate of JC-1 cells were significantly decreased ($P < 0.05$), levels of MDA and ROS were significantly decreased ($P < 0.05$), SOD activity was significantly increased ($P < 0.05$), expression of Smad5, Runx2, and Bcl-2 proteins was significantly increased ($P < 0.05$), and expression of Bax and cleaved Caspase-3 proteins was significantly decreased in the $H_2O_2 + 1 \mu\text{mol/L}$ estrogen group, $H_2O_2 + 10 \mu\text{mol/L}$ estrogen group, and $H_2O_2 + 1 \text{mmol/L}$ NAC group ($P < 0.05$). **Conclusions** Estrogen may reduce the level of ROS in MC3T3-E1 cells damaged by oxidative stress and improve the differentiation ability of cells by activating the expression of the Smad5/Runx2 signal axis.

【Keywords】 estrogen; osteoblast; oxidative stress

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是临床常见的一种女性年龄相关的系统性骨骼退行性疾病, 早期无明显症状, 随病情发展可表现为骨痛、驼背、局部压痛等症状, 是引起老年女性骨折最常见的原因, 发病率可达 10%~20%^[1-2]。既往研究认为, PMOP 主要由于雌激素缺乏引起^[3]; 然而近年来研究显示^[4], 氧化应激是 PMOP 的重要发病机制, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 增加可以诱导成骨细胞 (osteoblast, OB) 的氧化应激损伤, 影响骨重建, 降低骨密度, 增加骨折的风险。OB 是骨形成的主要功能细胞, 来源于骨、骨膜、骨髓及骨外组织, 可以合成并分泌多种生物活性物质, 参与调节骨的形成和重建^[5]。研究显示, 随着绝经期妇女年龄的增加, 机体的抗氧化系统功能也会降低, 导致细胞内的 ROS 累积, 可损伤成骨细胞功能, 影响骨的形成^[6]。雌激素是生物体重要的内源性激素, 可以调节成骨细胞和破骨细胞间的平衡, 对于骨的形成和骨量维持具有重要作用^[7]。近年来研究显示, 雌激素可以通过弱化活性氧作用, 增加抗氧化酶的表达, 调节破骨细胞和成骨细胞的活性, 维持骨吸收和转换的平衡, 但其具体的作用和机制尚不清楚^[8-9]。因此, 本研究探讨了雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用, 并进一步阐明了其对 MC3T3-E1 细胞分化能力的影响及机制, 旨在为雌激素在 PMOP 治疗中的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

MC3T3-E1 细胞由中国科学院上海生命科学研究院提供。

1.1.2 主要试剂与仪器

β -雌二醇 (批号 190409) 购自上海广锐生物科技有限公司; α -MEM 培养基 (批号 190615)、10% 胎牛血清 (批号 190407)、CCK-8 检测试剂盒 (批号 190712) 购自上海经科化学科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 190916) 和 ROS 荧光探针购自北京绿源伯德生物科技有限公司; JC-1 荧光探针购自 Molecular Probes 公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) (批号 190410) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) (批号 190326) 购自南京建成生物科技有限公司; 兔抗鼠 Smad5、Runx2、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、 β -actin 单克隆抗体和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔 IgG 均购于美国 CST 公司。

流式细胞仪 (FACScan) 购自美国 FranklinLakes 公司; 多功能酶标检测仪 (iMark680) 购自 Bio-Rad 公司; 荧光显微镜 (ix71) 购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 MC3T3-E1 细胞氧化应激损伤模型的建立

将 MC3T3-E1 细胞培养于质量分数为 10% 热灭活胎牛血清的 α -MEM 培养液, 置于 37°C、5% CO_2

培养箱中贴壁培养,每周换 2 次培养液。将贴壁培养至对数生长期的细胞分为空白对照组、 H_2O_2 组 ($300 \mu\text{mol/L}$)、 H_2O_2 + 雌激素 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 组、 H_2O_2 + 雌激素 $1 \mu\text{mol/L}$ 组、 H_2O_2 + 雌激素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组和 H_2O_2 + NAC 1 mmol/L 组。除空白对照组加入 α -MEM 培养液外,其他各组细胞均加入含 H_2O_2 (终浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$) 的培养液孵育 3 h,诱导氧化应激损伤。处理后,采用无血清培养液洗 2 遍,除空白对照组和 H_2O_2 组加入 α -MEM 培养液外,其他各组细胞均加入含相应浓度药物的培养液继续孵育,培养 24 h 过夜,用于检测细胞的生物学特征。

1.2.2 CCK-8 实验检测细胞的增殖

取贴壁培养 24 h 至对数生长期的细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,以 $3 \times 10^4 \text{ mL}$ 密度接种至 96 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养箱中贴壁培养 24 h 后,分组与相应药物孵育,分别于 24、48、72 h 的细胞,弃培养液,每孔分别加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,继续培养 4 h,采用酶标仪检测 570 nm 波长的吸光度值。

1.2.3 试剂盒检测细胞的 MDA 和 SOD 水平

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,吸去培养基,PBS 洗 3 次后采用 IP 细胞裂解工作液裂解细胞,离心 ($10\ 000 \text{ rpm}$, 10 min),取上清,硫代巴比妥酸法检测 MDA;黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 水平。

1.2.4 荧光探针法检测细胞的 ROS 水平

用无血清的 α -MEM 培养液稀释 DCFH-DA (终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$),装载探针。取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,吸去培养基,加入 DCFH-DA 培养基重悬细胞,孵育 20 min 后,采用无血清细胞培养液洗去未进入细胞内的 DCFH-DA,荧光酶标仪检测 ROS 水平。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞的凋亡

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,离心 (1000 rpm , 5 min),弃上清,依次加入 $5 \mu\text{L}$ 的 AnnexinV-FITC 和 propidium iodide 进行染色,室温避光孵育 30 min,经 70 目的细胞筛过滤后,采用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,2.5% 胰酶消化,离心 (1000 rpm , 10 min),加入 1 mmol/L 的 JC-1 染色工作溶液 1 mL , 37°C 孵育 30 min,JC-1 缓冲液洗 3 次后,倒置荧光显微镜下分析荧光强度,流式细胞仪分析 JC-1 阳性率。

1.2.7 Western Blot 检测细胞分化和凋亡相关蛋白

表达

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,细胞裂解液提取总蛋白后经 BCA 法进行蛋白定量,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,室温封闭 2 h,加入一抗 (Smad5、Runx2、Bcl-2、Bax 和 Cleaved Caspase-3,稀释比例均为 $1:1000$) 4°C 孵育过夜,以 β -actin 作为内参,洗膜加 HRP 标记的二抗 (稀释比例为 $1:5000$) 室温孵育 2 h,电化学发光显影,分析对比条带强弱。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对所得数据进行分析,满足正态分布计量资料均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析比较组间差异性,若组间比较有差异,采用 SNK-*q* 比较两组间差异性,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 雌激素对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

表 1 结果显示,与空白对照组比较, H_2O_2 组细胞在不同时间点的增殖活性明显下降 ($P < 0.05$);与 H_2O_2 组比较, H_2O_2 + 雌激素 $1 \mu\text{mol/L}$ 组、 H_2O_2 + 雌激素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组和 H_2O_2 + NAC 1 mmol/L 组细胞在不同时间点的增殖活性明显升高 ($P < 0.05$)。

2.2 雌激素对 MC3T3-E1 细胞凋亡水平的影响

流式细胞仪检测结果显示 (图 1),与空白对照组比较, H_2O_2 组细胞的凋亡率明显升高 [$(11.74 \pm 2.18) \text{ vs } (4.85 \pm 0.53)$, $P < 0.05$];与 H_2O_2 组比较, H_2O_2 + 雌激素 $1 \mu\text{mol/L}$ 组、 H_2O_2 + 雌激素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组和 H_2O_2 + NAC 1 mmol/L 组细胞的凋亡率明显下降 [(8.86 ± 0.95) 、 (6.71 ± 0.72) 、 $(6.53 \pm 0.65) \text{ vs } (11.74 \pm 2.18)$, $P < 0.05$]。

2.3 雌激素对 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位的影响

流式细胞仪检测结果显示 (图 2),与空白对照组比较, H_2O_2 组细胞的 JC-1 阳性细胞率明显增加 [$(9.70 \pm 1.53) \text{ vs } (3.85 \pm 0.42)$, $P < 0.05$];与 H_2O_2 组比较, H_2O_2 + 雌激素 $1 \mu\text{mol/L}$ 组、 H_2O_2 + 雌激素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组和 H_2O_2 + NAC 1 mmol/L 组 JC-1 阳性细胞率明显下降 [(7.82 ± 0.93) 、 (5.61 ± 0.65) 、 $(5.54 \pm 0.62) \text{ vs } (9.70 \pm 1.53)$, $P < 0.05$]。

2.4 雌激素对 MC3T3-E1 细胞氧化应激水平的影响

表 2 结果显示,与空白对照组比较, H_2O_2 组

MDA 和 ROS 水平明显升高 ($P < 0.05$), SOD 活性明显下降 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组比较, $H_2O_2 +$ 雌激素 $1 \mu\text{mol/L}$ 组、 $H_2O_2 +$ 雌激素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组和 $H_2O_2 +$ NAC 1 mmol/L 组 MDA 和 ROS 水平明显下降 ($P < 0.05$), SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$)。

2.5 雌激素对 MC3T3-E1 细胞 Smad5、Runx2、Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 表达的影响

图 3、表 3 结果显示, 与空白对照组比较, H_2O_2

组细胞 Smad5、Runx2 和 Bcl-2 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$), Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组比较, $H_2O_2 +$ 雌激素 $1 \mu\text{mol/L}$ 组、 $H_2O_2 +$ 雌激素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组和 $H_2O_2 +$ NAC 1 mmol/L 组细胞 Smad5、Runx2 和 Bcl-2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$)。

表 1 雌激素对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of estrogen on proliferation of MC3T3-E1 cells ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	24 h	48 h	72 h
空白对照组 Blank control group	0.685 ± 0.024	0.804 ± 0.023	0.975 ± 0.028
H_2O_2 组 H_2O_2 group	0.324 ± 0.018 *	0.381 ± 0.021 *	0.448 ± 0.024 *
$H_2O_2 +$ 雌激素 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 组 $H_2O_2 +$ estrogen $0.1 \mu\text{mol/L}$ group	0.331 ± 0.026 *	0.388 ± 0.020 *	0.452 ± 0.022 *
$H_2O_2 +$ 雌激素 $1 \mu\text{mol/L}$ 组 $H_2O_2 +$ estrogen $1 \mu\text{mol/L}$ group	0.427 ± 0.021 **	0.483 ± 0.025 **	0.576 ± 0.021 **
$H_2O_2 +$ 雌激素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组 $H_2O_2 +$ estrogen $10 \mu\text{mol/L}$ group	0.514 ± 0.023 **	0.587 ± 0.026 **	0.671 ± 0.027 **
$H_2O_2 +$ NAC 1 mmol/L 组 $H_2O_2 +$ NAC 1 mmol/L group	0.520 ± 0.025 **	0.591 ± 0.026 **	0.674 ± 0.028 **
<i>F</i>	96.752	117.341	104.593
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组相比, # $P < 0.05$ 。(下表同)

Note. Compared with blank control group, * $P < 0.05$. Compared with H_2O_2 group, # $P < 0.05$. (The same in the following tables)

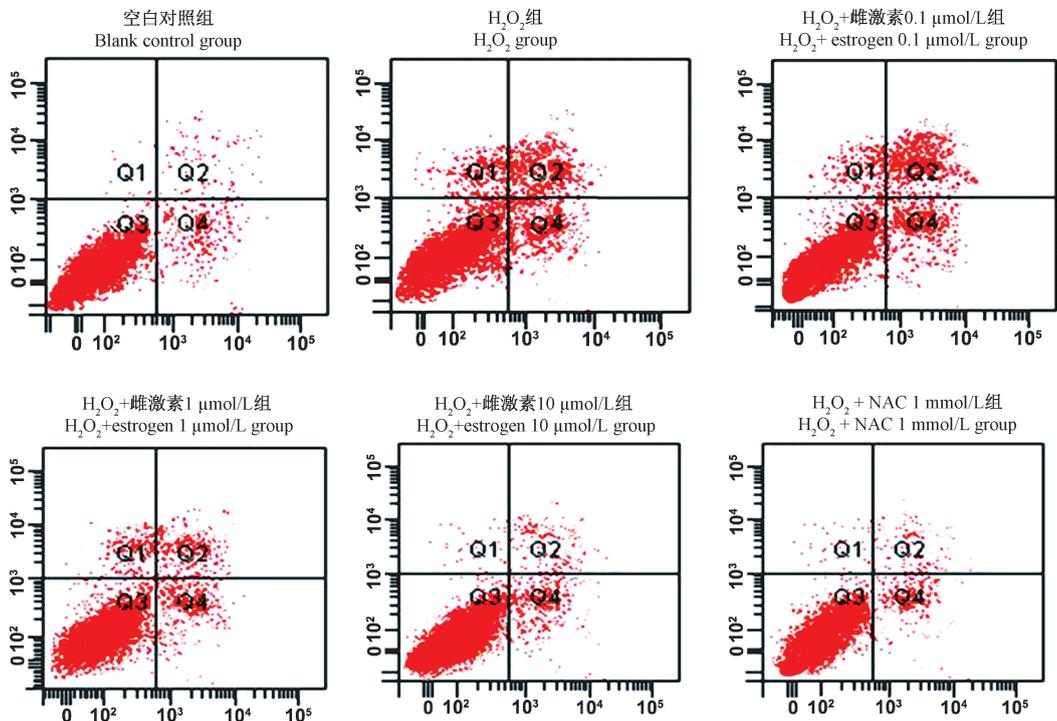


图 1 雌激素对 MC3T3-E1 细胞凋亡水平的影响

Figure 1 Effect of estrogen on apoptosis of MC3T3-E1 cells

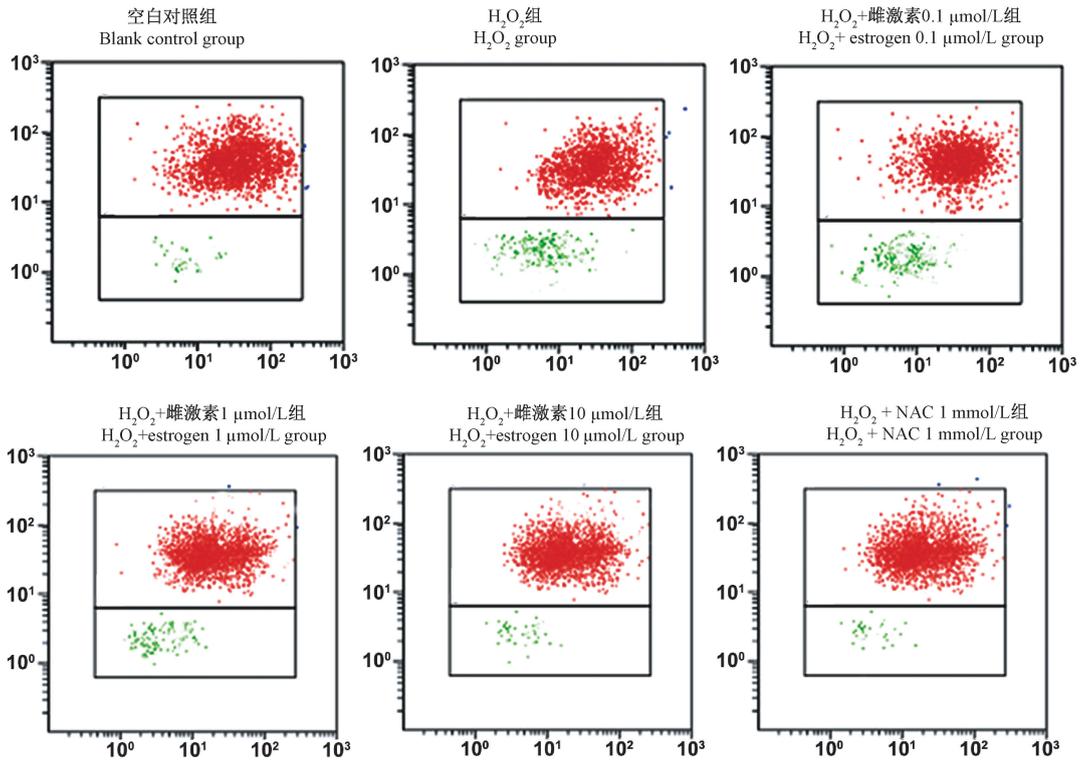


图 2 雌激素对 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位的影响

Figure 2 Effect of estrogen on mitochondrial membrane potential of MC3T3-E1 cells

表 2 雌激素对 MC3T3-E1 细胞氧化应激水平的影响 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of estrogen on oxidative stress in MC3T3-E1 cells ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	ROS (%)
空白对照组 Blank control group	3.45 ± 0.34	27.80 ± 2.13	9.75 ± 0.78
H ₂ O ₂ 组 H ₂ O ₂ group	6.78 ± 0.68 *	20.36 ± 2.07 *	14.48 ± 1.24 *
H ₂ O ₂ + 雌激素 0.1 μmol/L 组 H ₂ O ₂ + estrogen 0.1 μmol/L group	6.51 ± 0.66 *	21.07 ± 2.20 *	13.42 ± 1.25 *
H ₂ O ₂ + 雌激素 1 μmol/L 组 H ₂ O ₂ + estrogen 1 μmol/L group	5.32 ± 0.51 *#	23.65 ± 2.24 *#	12.56 ± 1.21 *#
H ₂ O ₂ + 雌激素 10 μmol/L 组 H ₂ O ₂ + estrogen 10 μmol/L group	4.76 ± 0.43 *#	25.71 ± 2.15 *#	10.61 ± 1.06 *#
H ₂ O ₂ + NAC 1 mmol/L 组 H ₂ O ₂ + NAC 1 mmol/L group	4.51 ± 0.45 *#	25.89 ± 2.21 *#	10.74 ± 1.02 *#
<i>F</i>	87.451	26.143	52.695
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 3 MC3T3-E1 细胞 Smad5、Runx2、Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 表达 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)Table 3 Expression of Smad5, Runx2, bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 in MC3T3-E1 cells ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	Smad5	Runx2	Bcl-2	Bax	cleaved Caspase-3
空白对照组 Blank control group	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.02
H ₂ O ₂ 组 H ₂ O ₂ group	0.18 ± 0.02 *	0.21 ± 0.02 *	0.22 ± 0.02 *	0.48 ± 0.04 *	0.45 ± 0.03 *
H ₂ O ₂ + 雌激素 0.1 μmol/L 组 H ₂ O ₂ + estrogen 0.1 μmol/L group	0.18 ± 0.02 *	0.22 ± 0.02 *	0.23 ± 0.03 *	0.47 ± 0.04 *	0.44 ± 0.04 *
H ₂ O ₂ + 雌激素 1 μmol/L 组 H ₂ O ₂ + estrogen 1 μmol/L group	0.20 ± 0.02 *#	0.25 ± 0.02 *#	0.27 ± 0.03#	0.41 ± 0.04 *#	0.39 ± 0.03 *#
H ₂ O ₂ + 雌激素 10 μmol/L 组 H ₂ O ₂ + estrogen 10 μmol/L group	0.22 ± 0.03 *#	0.27 ± 0.03 *#	0.30 ± 0.03 *#	0.34 ± 0.03 *#	0.33 ± 0.03 *#
H ₂ O ₂ + NAC 1 mmol/L 组 H ₂ O ₂ + NAC 1 mmol/L group	0.22 ± 0.02 *#	0.27 ± 0.02 *#	0.30 ± 0.02 *#	0.33 ± 0.03 *#	0.33 ± 0.02 *#
<i>F</i>	77.961	63.285	17.632	95.240	89.437
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

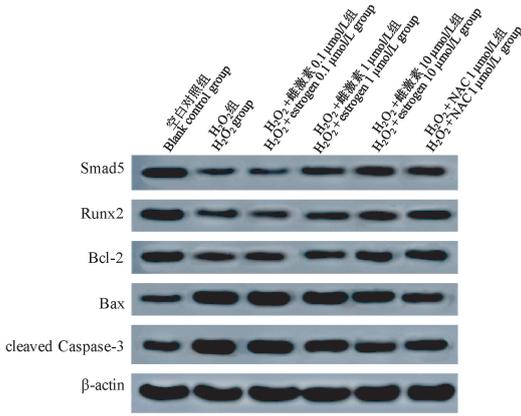


图 3 MC3T3-E1 细胞 Smad5、Runx2、Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 表达

Figure 3 Expression of Smad5, Runx2, bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 in MC3T3-E1 cells

3 讨论

氧化应激是指细胞内氧自由基尤其是 ROS 的产生与抗氧化能力失衡的一种状态,可以引起多组织细胞的氧化损伤^[10]。已有多项研究显示^[11-12],氧化应激是导致 PMOP 发生的主要原因之一,细胞内过多的 ROS 可以诱导成骨细胞和骨细胞的凋亡,影响骨形成和吸收过程的平衡。雌激素是机体重要的内分泌激素,具有广泛的生物学作用,可以调节骨的形成和吸收,目前已逐步应用于 PMOP 患者的替代治疗^[13]。既往研究显示^[14],雌激素可以增加细胞内抗氧化酶的表达,清除细胞内过多的 ROS,调节破骨细胞骨吸收和成骨细胞骨形成的平衡,但作用机制尚不清楚。因此,本研究建立了体外成骨细胞氧化应激损伤模型,来分析雌激素成骨细胞氧化应激损伤的作用。 H_2O_2 是一种常见的活性氧自由基,可以穿透细胞膜,诱导细胞的氧化应激损伤,与 PMOP 的发生发展密切相关^[15]。因此,本研究采用 H_2O_2 诱导 MC3T3-E1 细胞的氧化应激损伤,来分析雌激素的作用。本研究中, H_2O_2 诱导 MC3T3-E1 细胞的增殖活性明显下降,细胞凋亡率明显升高,经浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 及以上的雌激素作用后,MC3T3-E1 细胞的增殖活性明显增加,凋亡率明显下降。周雪娟等^[16]的研究显示,雌二醇可以上调成骨细胞内抗氧化酶的表达,减轻骨质疏松大鼠的氧化应激损伤,提示雌激素可以促进氧化应激损伤成骨细胞的增殖,抑制其凋亡,其具体的作用机制有待于进一步深入研究。

本研究中,MC3T3-E1 细胞经 H_2O_2 诱导后,细

胞内 Smad5 和 Runx2 蛋白表达明显下降,经浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 及以上的雌激素作用后,细胞内 Smad5 和 Runx2 蛋白表达明显升高。已有研究显示^[17-18],Smad5/Runx2 信号轴在成骨细胞的分化中具有重要的调节作用,细胞外信号分子磷酸化 Smad5 后,可以与 Smad4 结合形成复合物并进入细胞核,与 Runx2 相互作用,调节成骨细胞的分化。王慧等^[19]的研究显示,雌激素可以通过多种信号通路调节成骨细胞 Runx2 的表达,提示雌激素可能通过调节 Smad5/Runx2 信号轴的表达,提高成骨细胞的分化能力。本研究中,MC3T3-E1 细胞经 H_2O_2 诱导后,细胞内 MDA 和 ROS 水平明显升高,SOD 活性明显下降,经浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 及以上的雌激素作用后,细胞内 MDA 和 ROS 水平明显下降,SOD 活性明显升高,提示雌激素可以提高细胞内抗氧化酶的表达,降低 ROS 水平,改善细胞的氧化应激状态。

本研究中,MC3T3-E1 细胞经 H_2O_2 诱导后,JC-1 阳性细胞率明显升高,经浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 及以上的雌激素作用后,细胞 JC-1 阳性细胞率明显下降。JC-1 是实验中常用的一种检测线粒体膜电位的荧光探针,在线粒体膜电位降低时,JC-1 为单体出现绿色荧光^[20],提示雌激素可以升高氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞的线粒体膜电位。线粒体是细胞内能量代谢的中心,线粒体膜内外的电位差变化可以影响细胞内的能量代谢,影响细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学过程^[21],提示雌激素可能通过恢复线粒体膜电位,促进 H_2O_2 诱导 MC3T3-E1 细胞的增殖,抑制其凋亡。本研究中, H_2O_2 可以诱导 MC3T3-E1 细胞 Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达上调,Bcl-2 蛋白的表达下调,经浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 及以上的雌激素作用后,Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达下调,Bcl-2 蛋白的表达上调。Bcl-2 和 Bax 为一组调控线粒体凋亡途径的蛋白,cleaved Caspase-3 为细胞内凋亡的执行蛋白,可以降解细胞内多种重要蛋白,诱导细胞凋亡^[22],提示雌激素可以恢复线粒体膜电位,上调氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞 Bcl-2/Bax 的表达,抑制细胞凋亡。

综上所述,雌激素可以调节 Smad5/Runx2 信号轴的表达,促进 H_2O_2 致氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞的增殖和分化,降低细胞的氧化应激水平,抑制其凋亡,有望应用于临床治疗。但本研究尚处于初步探索阶段,其雌激素保护 H_2O_2 致氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞的具体机制尚需进一步验证。

参 考 文 献(References)

- [1] Dionello CF, S -Caputo D, Pereira HV, et al. Effects of whole body vibration exercises on bone mineral density of women with postmenopausal osteoporosis without medications: Novel findings and literature review [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2016, 16(3): 193-203.
- [2] 潘心瑶, 谢欣薇, 周琦, 等. 绝经后骨质疏松症中医药研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(9): 1140-1147.
Pan XY, Xie XW, Zhou Q, et al. Advances in traditional Chinese medicine research on postmenopausal osteoporosis [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2019, 39(9): 1140-1147.
- [3] Naylor KE, Bradburn M, Paggiosi MA, et al. Effects of discontinuing oral bisphosphonate treatments for postmenopausal osteoporosis on bone turnover markers and bone density [J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29(6): 1407-1417.
- [4] 孙振双, 耿元卿, 张丽君, 等. 氧化应激介导绝经后骨质疏松发病机制的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(8): 1063-1067.
Sun ZS, Geng YQ, Zhang LY, et al. Research progress on the pathogenesis of oxidative stress mediated osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2016, 22(8): 1063-1067.
- [5] Balani DH, Ono N, Kronenberg HM. Parathyroid hormone regulates fates of murine osteoblast precursors *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9): 3327-3338.
- [6] Wolski H, Drews K, Bogacz A, et al. The RANKL/RANK/OPG signal trail: significance of genetic polymorphisms in the etiology of postmenopausal osteoporosis [J]. *Ginekol Pol*, 2016, 87(5): 347-352.
- [7] Lin PI, Tai YT, Chan WP, et al. Estrogen/ER α signaling axis participates in osteoblast maturation via upregulating chromosomal and mitochondrial complex gene expressions [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1): 1169-1186.
- [8] Siqueira R, Colombo R, Conzatti A, et al. Effects of ovariectomy on antioxidant defence systems in the right ventricle of female rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(3): 295-303.
- [9] Besse PA, L veill  M, Oropeza D, et al. Estrogen signals through peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α to reduce oxidative damage associated with diet-induced fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 243-256.
- [10] Guzik, Tomasz TJ, Touyz RM. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension [J]. *Hypertension*, 2017, 70(4): 660-667.
- [11] Yao H, Yao Z, Zhang S, et al. Upregulation of SIRT1 inhibits H₂O₂-induced osteoblast apoptosis via FoxO1/ β -catenin pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6681-6690.
- [12] Li DY, Yu JC, Xiao L, et al. Autophagy attenuates the oxidative stress-induced apoptosis of Mc3T3-E1 osteoblasts [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(24): 5548-5556.
- [13] Prior JC, Seifert-Klauss VR, Giustini D, et al. Estrogen-progestin therapy causes a greater increase in spinal bone mineral density than estrogen therapy - a systematic review and meta-analysis of controlled trials with direct randomization [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2017, 17(3): 146-154.
- [14] 费蓓蓓, 王啸, 张弘, 等. 雌激素对铁蓄积小鼠骨代谢的影响及机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(6): 917-920.
Fei BB, Wang X, Zhang X, et al. Effects of estrogen on bone metabolism of mice with iron accumulation [J]. *Chin J Exp Surg*, 2017, 34(6): 917-920.
- [15] Ghorabi MT, Aliaghaei A, Sadeghi Y, et al. Evidence supporting neuroprotective effect of adipose derived stem cells on PC12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂ [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2017, 63(3): 1-6.
- [16] 周雪娟, 夏颖, 赵岩岩, 等. 雌二醇显著上调骨质疏松大鼠成骨细胞内抗氧化酶的表达 [J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(4): 402-408.
Zhou XJ, Xia Y, Zhao YY, et al. Estradiol significantly increases the expression of antioxidant enzymes in osteoporotic rats and osteoblasts *in vitro* [J]. *J South Med Univ*, 2018, 38(4): 402-408.
- [17] Yan J, Guo D, Yang S, et al. Inhibition of miR-222-3p activity promoted osteogenic differentiation of hBMSCs by regulating Smad5-RUNX2 signal axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(3): 498-503.
- [18] 程旭锋, 张新峰, 刘琦, 等. 附子-白术“药对”对成骨细胞 BMP-2/Smads/Runx2 通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1): 78-81.
Cheng XF, Zhang XF, Liu Q, et al. Effects of Fuzi-Baizhu couplet medicines on the osteoblast BMP-2/Smads/Runx2 pathway [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(1): 78-81.
- [19] 王慧, 孙惠强. 成骨细胞中雌激素与 Runx2 相互作用机制的研究与趋势 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(2): 331-336.
Wang H, Sun HQ. Mechanism underlying interaction between estrogen and runt-related transcription factor 2 in osteoblasts [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2013, 17(2): 331-336.
- [20] Hu CH, Zhuang XJ, Wei YM, et al. Comparison of mitochondrial function in boar and bull spermatozoa throughout cryopreservation based on JC-1 staining [J]. *Cryo Letters*, 2017, 38(1): 75-79.
- [21] Mora AL, Bueno M, Rojas M. Mitochondria in the spotlight of aging and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(2): 405-414.
- [22] Al-Qathama A, Gibbons S, Prieto JM. Differential modulation of Bax/Bcl-2 ratio and onset of caspase-3/7 activation induced by derivatives of Justicidin B in human melanoma cells A375 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95999-96012.