doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.006

高浓度葡萄糖通过 p38MAPK-TXNIP/TRX-ROS 通路抑制 MC3T3-E1 细胞成骨分化 *

吴 宁[1] 卢晓昭[2] 曹晓瑞[1] 于立峰[1] 陶惠人[1] 朱庆生[1△]

（1 第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032；2 中国人民解放军第三二三医院肾脏内科 陕西 西安 710054）

摘要 目的：研究高浓度葡萄糖抑制 MC3T3-E1 细胞成骨分化的机理。**方法：**建立 MC3T3-E1 细胞成骨分化诱导体系，观察不同浓度葡萄糖（5.5mM 和 22mM）对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的影响；用不同浓度的 p38 MAPK 抑制剂 Fr167653（0.1 μM、1.0 μM 和 10 μM）进行药物干预，观察 MC3T3-E1 细胞在 22mM 葡萄糖浓度下成骨分化的变化情况。通过钙含量检测、Real time PCR 检测相关分化的变化；用 Western Blot 方法检测 MC3T3-E1 细胞分化过程中 p38 MAPK 磷酸化状态、TXNIP 表达水平的变化；使用胰岛素二硫键还原法检测细胞内 TRX 活性水平；使用活性氧检测试剂盒检测细胞内自由氧生成水平。**结果：**体外诱导条件下，高浓度（22mM）葡萄糖通过升高 p38 MAPK 磷酸化水平，上调 TXNIP 表达水平，同时降低 TRX 活性，使细胞内自由氧生成增加，抑制 MC3T3-E1 细胞的成骨分化；Fr167653 通过抑制 p38 MAPK 磷酸化，下调 TXNIP 表达同时升高 TRX 活性，抑制细胞内自由氧生成，解除高浓度葡萄糖对细胞成骨分化的抑制作用。**结论：** 高浓度葡萄糖通过 p38 MAPK-TXNIP/TRX-ROS 信号通路抑制 MC3T3-E1 细胞成骨分化。

关键词：糖尿病性骨质疏松症；p38 MAPK；氧化应激；成骨细胞分化

中图分类号：Q591.9，R681 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2014）12-2224-06

High Glucose Suppresses Osteoblastic Differentiation of MC3T3-E1 Cells Via p38 MAPK-TXNIP/TRX-ROS Signal Pathway*

WU Ning[1], LU Xiao-zhao[2], CAO Xiao-rui[1], YU Li-feng[1], TAO Hui-ren[1], ZHU Qing-sheng[1△]

(1 Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Nephrology, the 323 Hospital of PLA, Xi"an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: Our study focus on the role of p38 MAPK and ROS in osteoblast differentiation of MC3T3-E1 cell under high concentration of glucose *in vitro*. **Methods:** MC3T3-E1 cells were divided into four groups: negtive control group(NC, MC3T3-E1 cells cultured in α-MEM medium), normal glucose and calcification induced control group(NIC, MC3T3-E1 cells cultured in calcification medium with 5.5mM glucose), high glucose group (HG, MC3T3-E1 cells cultured in calcification medium with 22mM glucose) and Fr167653 intervention group(Fr~, MC3T3-E1 cells cultured in calcification medium with 22mM glucose, in the presence of p38 MAPK inhibitor, Fr167653). The calcium deposition, alkaline phosphatase activity and the mRNA levels of osteoblast markers were tested to evaluate the osteoblast differentiation potency of MC3T3-E1 cells. P38 MAPK phosphorylation level and TXNIP protein expression level were detected by Western blot. Intracellular TRX activity was detected using the insulin disulfide reduction assay method. Intracellular ROS generation level was detected by Reactive Oxygen Species Assay Kit. **Results:** We showed in this report that 22mM glucose suppressed the osteoblast differentiation process of MC3T3-E1 cells, as indicated by the reduced calcium deposition, ALP activity and osteoblast markers. In the presence of Fr167653, the specific inhibitor of p38 MAPK, could significantly reverse the suppression effect of high glucose and the decrease of above-mentioned osteoblast differentiation markers. Furthermore, high glucose increased p38 MAPK phosphorylation level. The TXNIP expression level was up-regulated and the TRX activity was decreased, which further increased the intracellular ROS generation. Fr167653, which blocked the p38 MAPK phosphorylation, down-regulated the TXNIP expression, enhanced the TRX activity and reduced the ROS generation. **Conclusions:** These data suggest that high concentration of glucose had a deleterious effect on osteoblast differentiation of MC3T3-E1 cells probably via p38 MAPK-TXNIP/TRX-ROS signal pathway.

Key words: Diabetic osteoporosis; P38 MAPK; Oxidate stress; Osteoblast differentiation

Chinese Library Classification(CLC): Q591.9，R681 Document code: A

Article ID: 1673-6273（2014）12-2224-06

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81070698）

作者简介：吴宁（1987-），男，博士研究生，主要研究方向：骨质疏松症。Email：wuningtwt@outlook.com

△通讯作者：朱庆生，Email：zhuqsfmmu@163.com

（收稿日期：2014-01-03 接受日期：2014-01-28）

前言

糖尿病患者常合并骨质减少、骨质疏松等骨骼系统疾病。临床实验[1,2]表明:1 型和 2 型糖尿病均会损伤新骨形成、骨骼微结构和骨骼质量,患者发生骨折风险增高。研究发现[3,4],糖尿病导致的骨骼系统代谢异常主要是骨形成缺陷,成骨细胞数量减少、类骨质形成不足和骨矿化速度减慢等,高血糖在这个过程中发挥重要作用。然而高血糖抑制成骨细胞分化的机理并不十分清楚。

p38 MAPK 是细胞内的一种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶,在外界刺激激活体内炎症反应、氧化应激等方面发挥重要作用[5]。高血糖在人体多个组织中激活 p38 MAPK 信号通路,导致糖尿病并发症的形成[6,7]。体外研究表明,高糖激活 MC3T3-E1 细胞 p38 MAPK 表达从而诱导细胞凋亡[8]。高血糖以及伴发的血脂异常是产生氧化应激的重要始动因素[9]。氧化应激能抑制成骨细胞分化及其矿化,促进成骨细胞凋亡,在骨质疏松发生和发展中起重要作用[10]。但是目前对于高血糖条件下成骨细胞分化研究中,p38 MAPK 信号通路与氧化应激的相互作用并不清楚。

本研究通过体外诱导 MC3T3-E1 细胞成骨分化模型,利用 p38 MAPK 抑制剂 Fr167653 探讨 p38 MAPK 与氧化应激在高糖条件下成骨细胞分化过程中的生物学效应。

1 材料与方法

1.1 细胞株

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞株,购自美国标准生物品种保藏中心(ATCC)。

1.2 实验试剂

β- 磷酸甘油(Sigma,美国),维生素 C(Sigma,美国),地塞米松(Sigma,美国),茜素红(Sigma,美国),α-MEM 细胞培养液(Gibco,美国),胎牛血清(Gibco,美国), 0.25%胰酶(Gibco,美国),Fr167653(藤泽药品工业株式会社,日本),蛋白酶抑制剂(Roche,美国),牛 TRX 还原酶(Sigma,美国),Trizol 试剂(Invitrogen,美国),M-MLV 反转录试剂盒(Thermo,美国),SYBR *Premix Ex Taq* 试剂盒(Takara,日本),磷酸化 p38 MAPK 抗体(CST,美国),p38 MAPK 抗体(CST,美国),TXNIP 抗体(Invitrogen,美国),IRDye 800CW 驴抗兔二抗(LI-COR Biosciences,美国),钙检测试剂盒(杰美基因,中国),活性氧检测试剂盒(碧云天生物技术研究所,中国),BCA 蛋白分析试剂盒(Pierce,美国)。

1.3 实验仪器

细胞培养箱(Thermo,美国),酶标读数仪(Tecan,瑞士),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国),电泳仪(Bio-Rad,美国),转移槽(Bio-Rad,美国),荧光酶标仪(Bio-Rad,美国),Odyssey 红外成像系统(LI-COR Biosciences,美国)。

1.4 Real time PCR 引物(表 1)

表 1 Real time PCR 引物

Table 1 Primers for Real time PCR

Primers	Primer sequences, 5'-3'
Runx2	Forward: GCTTGATGACTCTAAACCTA
	Reverse: AAAAAGGGCCCAGTTCTGAA
Osteorix	Forward: GAAGAAGCTCACTATGGCTC
	Reverse: GAAAAGCCAGTTGCAGACGA
ALP	Forward: GCCCTCTCCAAGACATATA
	Reverse: CCATGATCACGTCGATATCC
Osteocalcin	Forward: CAAGTCCCACACAGCAGCTT
	Reverse: AAAGCCGAGCTGCCAGAGTT
TXNIP	Forward: GAAGCTCCTCCCTGCTATATGGA
	Reverse: CCATGTCATCTAGCAGAGGAGTTGT
TRX	Forward: TTAACGAGGCTGGAAACA
	Reverse:AACGACATCGCTCATAGA
β -actin	Forward: ATATCGCTGCGCTGGTCGTC
	Reverse: AGGATGGCGTGAGGGAGAGC

1.5 方法步骤

1.5.1 钙化模型制备及分组用含 10%血清的 α-MEM 培养液在 37 ℃ 、5 % CO_2 的恒温培养箱中培养 MC3T3-E1 成骨细胞。细胞对数生长期时,0.25% 胰酶消化成细胞悬液。10^4/ml 细胞密度铺 24 孔细胞培养板, 细胞生长至 80%密度时更换钙化诱导培养液 (Calcificaton medium,CM)(含有 10 mM β- 磷酸甘油、50 mg/L 维生素 C 以及 10-8M 地塞米松的 α-MEM 培养液),记为第 0 天,连续培养 25 天后终止诱导。细胞每 2~3 天换液,换液时药物干预组加入不同浓度的 p38 MAPK 抑制剂Fr167653。细胞分组见表 2。

表 2 细胞分组及培养条件

Table 2 Groups and culture medium

Groups	Culture medium
Negative control(NC)	5.5mM glucose + α-MEM medium
Normal glucose and calcification induced control(NIC)	5.5mM glucose + CM
High glucose(HG)	22mM glucose + CM
Fr167653 intervention(Fr~)	0.1 μM Fr167653+22mM glucose + CM
	1 μM Fr167653+22mM glucose + CM
	10 μM Fr167653+22mM glucose + CM

1.5.2 基质钙化形成检测 成骨诱导 25 天后, 使用茜素红染色法[11]定性分析各组细胞胞外基质钙化的形成情况。PBS 洗 3 次;90%酒精室温固定 1h,吸去酒精,PBS 洗 3 次;2% 茜素红溶液(pH4.2)染色 15 min 后 PBS 洗 3 次以去除非特异性染色。然

后进行组间比对并用照相机拍摄。

使用钙含量检测试剂盒定性分析成骨诱导 25 天后各组细胞基质外钙化情况。PBS 洗 3 次后，加入 0.6N HCl 脱钙 24h 后收集上清。按照试剂盒操作步骤，检测上清中钙离子含量。PBS 洗脱钙后各组细胞 3 次后，用 0.1 N NaOH/0.1% SDS 溶液溶解细胞并收集上清，使用 BCA 方法测定蛋白含量。用细胞蛋白含量进行标准化。

1.5.3 Real time PCR **检测相关基因的表达情况** 提取细胞总 RNA：弃去培养液，PBS 冲洗 2 次，6 孔板每孔加入 1 mL Trizol 试剂，反复吹打后移入 1.5 mL EP 管内，室温静置 5 min；静置后每孔加入 200 μL 氯仿，震荡 30sec；4 ℃，12 000 rpm 离心 10 min，小心吸取上层液体至新 1.5 mL EP 管内，加入等体积的异丙醇，4 ℃，12 000 rpm 离心 10 min，在管底可见白色沉淀物。弃上清后加入 1mL 75% 乙醇，4 ℃，12 000 rpm 离心 5 min； 弃去上清，EP 管倒置，待干燥后将 RNA 溶解于 20 μL DEPC 水中。紫外分光光度计 260 nm 波长进行定量。反转录：按照 Invitrogen 公司 M-MLV 反转录试剂盒说明进行，反应体系 20 μL，其中 5× RT buffer 4 μL，dNTP 混合液 2 μL，DTT 2 μL，M-MLV 逆转录酶 1 μL，随机引物(N) 5(1 μg/μL)1 μL，总 RNA 2 μg，DEPC 水补齐至 20 μL。混匀后低速 short 离心，37 ℃水浴 120 min，-20 ℃保存。Real time PCR：按照 Takara 公司 SYBR® Premix Ex Taq 试剂盒说明书进行操作。取反转录产物，用水 5 倍稀释后取 1 μL 为模板，配制 10 μL 实时定量 PCR 扩增反应体系，其中 SYBR Premix Ex Taq 5 μL，模板 1 μL，上、下游引物各 0.25 μL，双蒸水 3.5 μL。在 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪上完成相应的反应。反应条件为：95.0 ℃预变性 3 min，45 个循环(95.0 ℃ 5sec，60 ℃ 30sec)。使用管家基因 β-actin 作为内参，用 Excel 软件对 β-actin 和各样品 RNA 循环阈值(C_t)进行计算分析。应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法[12]处理数据，计算目的基因转录相对表达量。

1.5.4 **细胞内 TRX 活性检测** 用胰岛素二硫键还原分析法[13]检测诱导第 7 天各组细胞 TRX 活性。RIPA 裂解液裂解第 7 天各组细胞，收集裂解上清，BCA 法蛋白定量。每 100 μg 裂解细胞中，加入 40 μL 反应混合液(由 200 μL HEPES 液，40 μL EDTA，40 μL NADPH 和 500 μL 胰岛素配制)，加入 10 μL 牛 TRX 还原酶。37 ℃，孵育 15 分钟。加入 500 μL 反应终止液(含有 6M 盐酸，1 mM DTNB 的 Tris-HCl 溶液)，酶标仪 412 nm 波长进行定量。

1.5.5 **细胞内活性氧生成检测** 依试剂盒说明书步骤操作。取培养第 7 天各组细胞，PBS 冲洗 2 次，加入 DCFH-DA ，37 ℃孵育 20 分钟后用荧光酶标仪检测 488 nm 激发波长，525 nm 发射波长下的荧光强度。

1.5.6 Western Blot **检测相关蛋白表达情况** 取各组细胞，PBS 洗 3 次，RIPA 裂解液冰上裂解 15min，4 ℃ 12 000 rpm 离心 5 min，收集上清；取 2 μL 用 BCA 法进行蛋白定量，其余裂解上清加入 6× 上样缓冲液，煮沸 5 min，-20 ℃保存。分别取 50 μg 各组蛋白样品进行蛋白 SDS-PAGE 电泳后电转至 PVDF 膜，用含 7.5% 的脱脂奶的 TBST 室温封闭 2h，p38 MAPK、磷酸化 p38 MAPK 以及 TXNIP 一抗杂交 PVDF 膜 4 ℃过夜，荧光二抗室温避光孵育 1 h，洗膜后用 Odyssey 红外成像系统扫膜。

1.5.7 **统计方法分析** 上述实验均进行 3 次重复，得出的实验数据使用 SPSS2.0 统计软件进行分析。数据以(mean± SD)表示，组间比较使用 bonferroni 法。$p < 0.05$ 认为有统计学差异。用 * 代表药物干预组和高糖诱导组之间的统计学比较；用 # 代表高糖诱导组和正常糖浓度诱导组之间的统计学比较。

2 结果

2.1 基质钙化检测

各组细胞连续诱导培养 25 天后，茜素红染色定性分析。结果如图 1 所示：阴性对照组组细胞钙化极少，正常诱导组较阴性对照组细胞钙化明显升高，MC3T3-E1 细胞进行成骨分化；高糖组细胞较正常诱导组明显降低，提示高糖条件 MC3T3-E1 细胞成骨分化受到抑制；加入不同浓度的 Fr167653 后，细胞钙化水平随药物浓度升高而增强，Fr167653 能减弱高糖条件对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的抑制作用。

细胞外基质钙含量检测结果如图 2 所示。正常诱导组细胞钙含量水平最高。阴性对照组细胞钙含量最低。高糖组钙含量较正常糖浓度诱导组低了 1.26 倍 (HG：122.33± 29.14 μg/mg 蛋白，NIC：276.00± 19.08 μg/mg 蛋白)，高糖组比阴性对照组钙含量高，但两组间无统计学差异。加入不同浓度的 Fr167653 后，细胞钙含量水平随药物浓度升高而升高(Fr0.1 组：152.33± 29.14 μg/mg；Fr1 组：183.33± 12.90 μg/mg；Fr10 组：206.67± 18.01 μg/mg)，呈浓度依赖性。

2.2 成骨相关基因表达变化

检测 MC3T3-E1 细胞诱导第 7 天的成骨相关基因表达情况，如图 3 所示：对细胞进行正常浓度葡萄糖(5.5 mM)的成骨诱导后，成骨标志分子 Runx2、Osteorix、Osteocalcin 和 ALP mRNA 表达水平均出现增高；用含高浓度葡萄糖(22 mM)诱导培养基培养后，Runx2、Osteorix、Osteocalcin 和 ALP mRNA 表达水平出现了下降，但仍较阴性对照组高；加入不同剂量 Fr167653 后，Runx2、Osteorix、Osteocalcin 和 ALP mRNA 分别出现了升高，且随着加入 Fr167653 浓度增大，mRNA 表达水平升高越强。表明高糖能够抑制成骨基因的表达，且这种抑制作用能被 p38 MAPK 抑制剂 Fr167653 解除。

2.3 p38 MAPK **磷酸化表达和** TXNIP **表达情况**

为了观察高糖条件下 MC3T3-E1 细胞分化过程中 p38 MAPK 磷酸化状态，分别收集第 0，3，7，10，15，20 天高糖培养组细胞，进行免疫印迹实验。结果如图 4(a)所示，在高糖培养过程中，p38 MAPK 磷酸化状态逐渐增强。

收集诱导第 7 天各组细胞，进行免疫印迹实验，检测 Fr167653 对于 p38 MAPK 磷酸化和 TXNIP 表达的影响。如图 4 (b) 所示，加入 Fr167653 后，p38MAPK 磷酸化表达水平和 TXNIP 表达随着药物浓度升高而下降，在 10 μM 浓度时下降至最低。

2.4 TXNIP **和** TRX mRNA **表达情况**

收集钙化诱导第 7 天 MC3T3-E1 细胞，提取 RNA，实时定量 PCR 检测 TXNIP 和 TRX mRNA 表达变化情况。如图 5 所示，高糖组 TXNIP mRNA 表达比正常诱导组明显高 ($P < 0.01$)，加入 p38 MAPK 抑制剂后，TXNIP mRNA 表达水平下

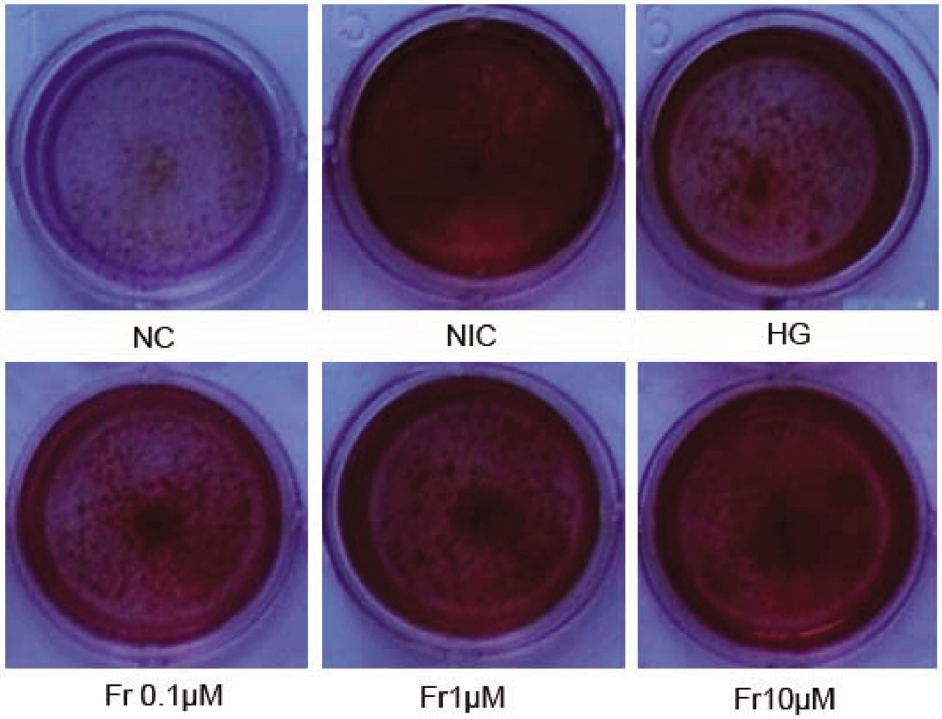

图 1 成骨诱导 25 天各组细胞茜素红染色

Fig.1 Alizarin Red S staining of each group after 25 days of culture

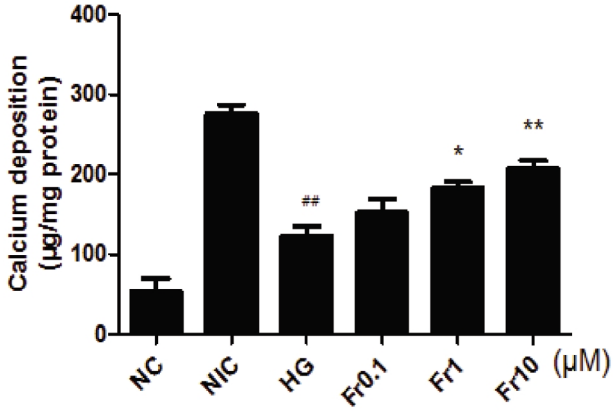

图 2 成骨诱导 25 天各组细胞胞外基质钙盐含量测定(#/* 表示 P<0.05; ##/ 表示 P<0.01)**

Fig.2 Extracellular calcium deposition of each group after 25 days of culture(#/* P< 0.05, ##/** P< 0.01)

降，出现浓度依赖特点。而高糖条件下诱导，MC3T3-E1 细胞 TRX mRNA 表达较 PC 组显著降低(P<0.01)，加入 Fr167653 后，TRX mRNA 表达升高。

2.5 TRX 活性检测

收集钙化诱导第 7 天 MC3T3-E1 细胞，进行 TRX 活性检测。如图 6 所示，高浓度葡萄糖抑制 TRX 活性，Fr167653 能够升高 TRX 活性。

2.6 胞内 ROS 水平变化

选取诱导诱导培养第 7 天的各组细胞进行 ROS 检测。如图 7 所示，在高糖诱导条件下，MC3T3-E1 细胞内 ROS 生成增加，高出正常诱导组 2 倍以上；加入 Fr167653 后，胞内 ROS 水平降低。Fr167653 能够减少高糖条件下 MC3T3-E1 成骨分化过程中 ROS 的生成。

3 讨论

本研究表明体外高浓度葡萄糖通过活化 p38 MAPK 信号通路，上调硫氧还原蛋白相互作用蛋白(thioredoxin interacting protein，TXNIP)mRNA 和蛋白水平表达，降低了硫氧还蛋白(thioredoxin，TRX) mRNA 和蛋白活性，导致细胞内 ROS 的失衡，从而抑制 MC3T3-E1 成骨细胞的分化。

血糖升高是糖尿病的最主要特征，高血糖导致骨骼代谢紊乱，损害骨重建[14]。本研究通过 β- 磷酸甘油、维生素 C 和地塞米松这一经典的成骨细胞诱导体系，研究不同浓度葡萄糖对 MC3T3-E1 细胞成骨分化能力影响。定性和定量结果均表明 22 μM 葡萄糖抑制了细胞成骨分化能力，同时降低了成骨标志分子 mRNA 的表达；使用 p38 MAPK 抑制剂 Fr167653 后，MC3T3-E1 细胞成骨分化能力增强，成骨标志分子 mRNA 表达升高，高糖对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的抑制作用被解除。

糖尿病患者体内存在有不同程度的慢性炎症反应[15]。p38 MAPK 是介导炎症反应重要的分子。高浓度葡萄糖使机体的渗透压改变，导致 p38 MAPK 活化，降低了成骨细胞 I 型胶原的表达 [16]。此外，高糖对 MC3T3-E1 细胞的凋亡作用与 p38 MAPK 信号通路活化相关[8]。本研究中，检测高糖条件下不同时间点 p38 MAPK 磷酸化状态表明高浓度葡萄糖能够活化 p38 MAPK，与文献报导一致。

线粒体是细胞产生活性氧的重要来源。氧气通过氧化呼吸链产生 ROS；ROS 通过谷胱甘肽氧化酶系统和硫氧还蛋白系统分解为水，维持正常活性氧浓度[17]。当体内活性氧生成速度超过清除速度时，就会导致氧化应激的发生。TRX 是一个分子量为 12 KDa 的蛋白，能通过巯基结构中具有还原能力的二硫键清除活性氧(reactive oxygen species，ROS)。TXNIP 是细胞内

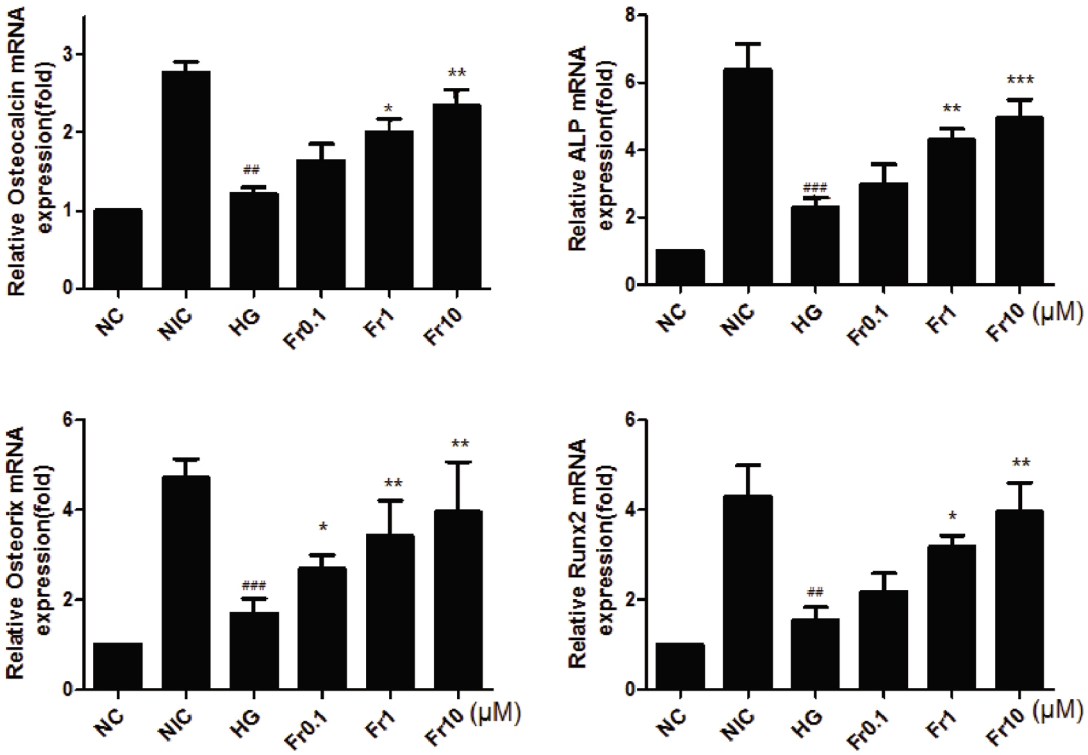

图 3 成骨诱导 7 天的各组细胞成骨标志基因表达水平(#/* 表示 P＜0.05;##/** 表示 P＜0.01)

Fig.3 The relative mRNA expressions of osteoblast markers(#/* P＜0.05,##/** P＜0.01)

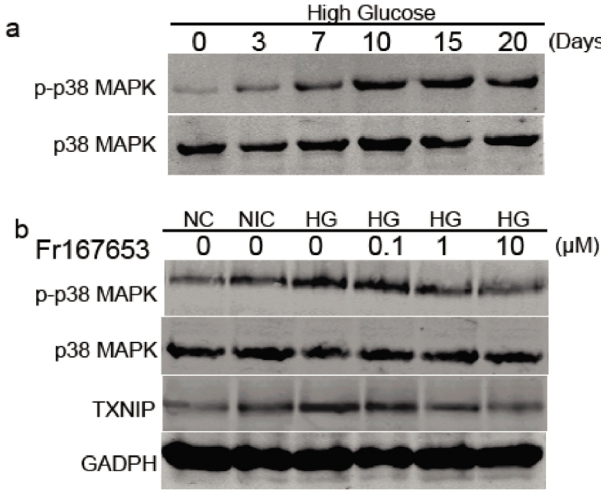

图 4 p38 MAPK 和 TXNIP 蛋白表达

(a)高糖组不同时间点 p38 MAPK 磷酸化水平;(b)各组细胞诱导培养 7 天 p38 MAPK 磷酸化和 TXNIP 蛋白表达。

Fig.4 The levels of p38 MAPK phosphorylation and TXNIP expression

(a) p38 MAPK phosphorylation at different time points in MC3T3-E1 cells of high glucose group. (b) p38 MAPK phosphorylation and TXNIP expression of each group after 7 days of culture.

源性的 TRX 抑制剂，通过结合 TRX 的半胱氨酸残基使 TRX 失去抗氧化能力[18]。人体通过一系列复杂的分子调控网络调节 TRX 和 TXNIP 的活性,以维持正常的 ROS 浓度。在肾小球系膜细胞、远端小管细胞和血管平滑肌细胞中，高糖能升高 TXNIP 的表达 [19,20]。在体外培养的肾脏细胞中，高糖诱导的 TXNIP 损伤 TRX 的还原反应能力造成[21]。本研究结果表明,高浓度葡萄糖激活 p38 MAPK 磷酸化同时，细胞 TXNIP mRNA

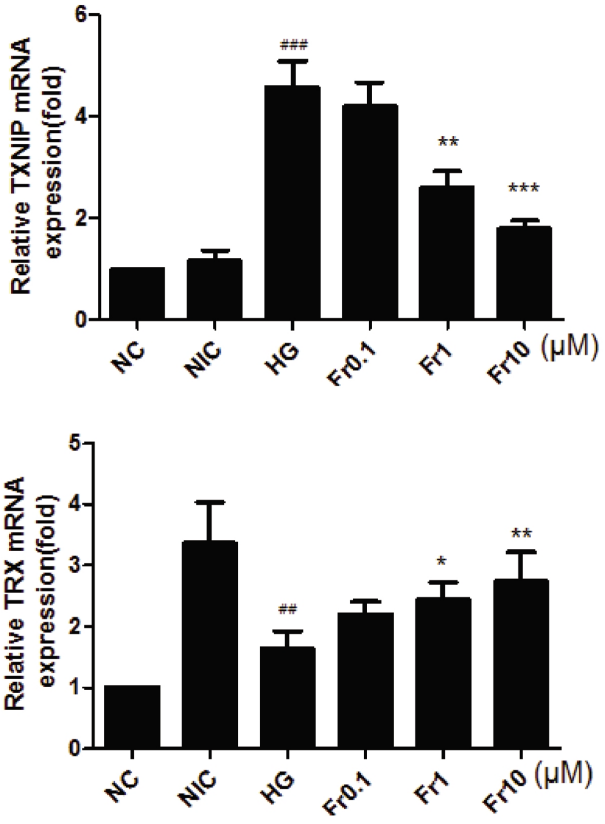

图 5 成骨诱导第 7 天,各组细胞 TXNIP、TRX mRNA 表达(#/* 表示 P＜0.05;##/** 表示 P＜0.01)

Fig.5 The relative mRNA expression of TXNIP and TRX of each group after 7 days of cultures(#/*P＜0.05,##/**P＜0.01)

和蛋白表达水平均升高；使用 Fr167653 进行干预后,p38

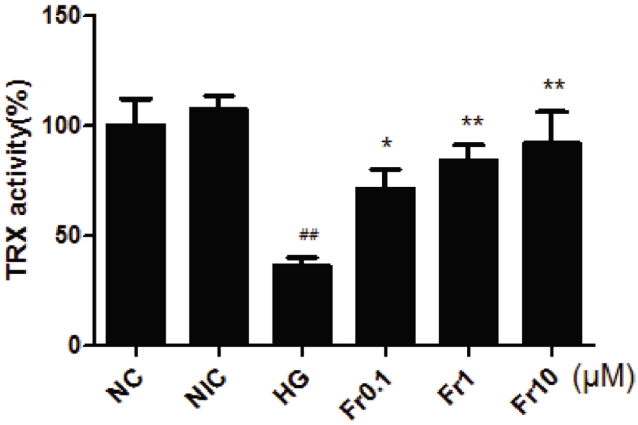

图 6 成骨诱导第 7 天,各组细胞 TRX 活性检测(#/* 表示 P＜0.05;##/** 表示 P＜0.01)

Fig.6 The TRX activity of each group after 7 days of cultures(#/*P＜0.05, ##/**P＜0.01)

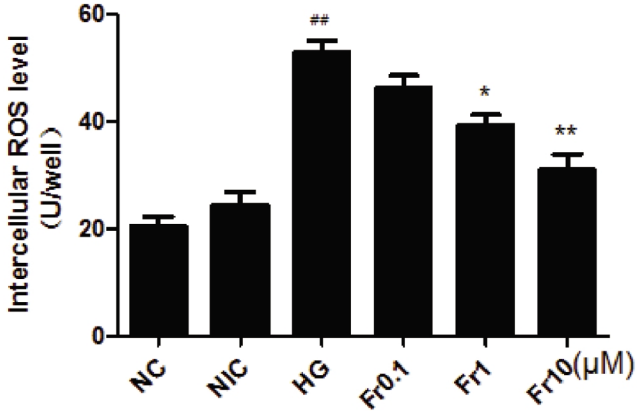

图 7 成骨诱导第 7 天,各组细胞胞内 ROS 生成检测(#/* 表示 P＜0.05; ##/** 表示 P＜0.01)

Fig.7 Intracellular ROS generation level of each group after 7 days of culture(#/*P＜0.05,##/** P＜0.01)

MAPK 磷酸化水平、TXNIP mRNA 和蛋白表达水平呈现浓度依赖性降低。TRX mRNA 表达和活性测定结果显示,高浓度葡萄糖下调 TRX 的表达与活性, 最终使胞内 ROS 水平升高,相反 Fr167653 上调 TRX 的表达与活性,降低胞内 ROS 的含量。

在糖尿病性骨质疏松形成和发展过程中, 伴随着炎症反应、氧化应激以及其他的病理因素。本试验在细胞水平阐明了高浓度葡萄糖通过 p38 MAPK-TXNIP/TRX-ROS 信号通路抑制 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化,有助于我们进一步探索糖尿病性骨质疏松症的发病机制和靶向性治疗,具有重要的临床意义。

参 考 文 献(References)

[1] Yaturu S. Diabetes and skeletal health [J]. J Diabetes, 2009, 1(4): 246-254

[2] Issa C, Zantout M S, Azar S T. Osteoporosis in men with diabetes mellitus[J]. J Osteoporos, 2011, 2011: 651867

[3] Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function [J]. J Diabetes Complications, 2010, 24(5): 334-344

[4] de Paula F J, Horowitz M C, Rosen C J. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2010, 26(8): 622-630

[5] Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2007,1773 (8): 1358-1375

[6] Du Y, Tang J, Li G, et al. Effects of p38 MAPK inhibition on early stages of diabetic retinopathy and sensory nerve function [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(4): 2158-2164

[7] Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, et al. Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways[J]. J Clin Invest, 1999, 103(2): 185-195

[8] Feng Z, Deng H, Du J, et al. Lentiviral-mediated RNAi targeting p38MAPK ameliorates high glucose-induced apoptosis in osteoblast MC3T3-E1 cell line[J]. Indian J Exp Biol, 2011, 49(2): 94-104

[9] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature, 2001, 414(6865): 813-820

[10] Cervellati C, Bonaccorsi G, Cremonini E, et al. Bone mass density selectively correlates with serum markers of oxidative damage in post-menopausal women [J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51 (2): 333-338

[11] Stanford C M, Jacobson P A, Eanes E D, et al. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP)[J]. J Biol Chem, 1995, 270(16): 9420-9428

[12] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108

[13] Holmgren A, Bjornstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase [J]. Methods Enzymol, 1995, 252: 199-208

[14] Balint E, Szabo P, Marshall C F, et al. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization[J]. Bone, 2001, 28(1): 21-28

[15] Classen J B. Review of evidence that epidemics of type 1 diabetes and type 2 diabetes/metabolic syndrome are polar opposite responses to iatrogenic inflammation [J]. Curr Diabetes Rev, 2012, 8 (6): 413-418

[16] Zayzafoon M, Botolin S, Mccabe L R. P38 and activating transcription factor-2 involvement in osteoblast osmotic response to elevated extracellular glucose[J]. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37212-37218

[17] Sedeek M, Montezano A C, Hebert R L, et al. Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes--potential targets for novel therapies[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2012, 5(4): 509-518

[18] Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(1): 120-124

[19] Qi W, Chen X, Gilbert R E, et al. High glucose-induced thioredoxin-interacting protein in renal proximal tubule cells is independent of transforming growth factor-beta1 [J]. Am J Pathol, 2007, 171 (3): 744-754

[20] Schulze P C, Yoshioka J, Takahashi T, et al. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (29): 30369-30374

[21] Advani A, Gilbert R E, Thai K, et al. Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(4): 730-741