

骨髓间充质干细胞线粒体损伤影响其成骨分化的潜能

<https://doi.org/10.12307/2022.727>顾超^{1,2}, 陈维凯^{1,2}, 刘滔¹, 杨惠林^{1,2}, 何帆^{1,2}

投稿日期: 2021-11-04

采用日期: 2021-12-15

修回日期: 2021-12-31

在线日期: 2022-01-17

中图分类号:

R459.9; R318; R681

文章编号:

2095-4344(2022)31-04921-07

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△骨质疏松来源骨髓间充质干细胞存在高水平的氧化应激;
△骨质疏松来源骨髓间充质干细胞的线粒体功能受损, 线粒体抗氧化能力下降;
△线粒体损伤在干细胞的成骨分化过程中起重要作用。

假手术组大鼠

去卵巢组大鼠

3 个月提取

骨髓间充质干细胞

正常骨髓间充质干细胞

骨质疏松骨髓间充质干细胞

结论:

(1) 骨质疏松来源骨髓间充质干细胞内过多的活性氧导致其线粒体功能和抗氧化能力受损;
(2) 这种线粒体损伤可以影响干细胞的成骨分化潜能。

细胞内活性氧, 线粒体活性氧

线粒体膜电位, ATP 产生量

相关基因的 mRNA 和蛋白表达

茜素红染色

文题释义:

骨髓间充质干细胞: 是一种具有多种分化潜能的多能基质细胞, 尤其是其成骨分化潜能, 在骨形成和骨质疏松的发生发展中扮演着重要角色。由于氧化应激和代谢障碍等原因, 骨质疏松患者的骨髓间充质干细胞和健康人的骨髓间充质干细胞相比, 其成骨分化能力严重受损, 这也直接导致了骨形成的减少。

线粒体: 在干细胞的分化过程中, 能量代谢扮演着重要角色, 线粒体是公认的细胞内能量代谢中心, 健康的线粒体功能有助于维持骨髓间充质干细胞的多能性。线粒体对能量代谢的调控和细胞内氧化应激平衡的维持, 在骨髓间充质干细胞的成骨分化过程中至关重要。

摘要

背景: 骨质疏松症的发生与细胞抗氧化系统的损伤密切相关, 而线粒体是细胞内能量代谢和氧化应激发生的主要部位。线粒体的损伤对于骨髓间充质干细胞的成骨分化有何影响及其具体机制尚未明确, 有待进一步探索。

目的: 探讨高水平的氧化应激对线粒体功能及其抗氧化能力的影响, 以及线粒体损伤对于骨髓间充质干细胞成骨分化潜能的影响。

方法: 通过卵巢去势手术构建大鼠骨质疏松模型。从去卵巢组和假手术组雌性大鼠股骨中分离出骨髓间充质干细胞, 分别使用活性氧检测试剂盒以及MitoSOX Red荧光检测试剂盒测定骨髓间充质干细胞内和线粒体内的活性氧水平, 随后利用JC-1荧光探针检测细胞的线粒体膜电位水平, 使用ATP检测试剂盒检测细胞的ATP产量, 分析两者的线粒体功能变化, 使用qPCR和Western blot实验检测细胞内呼吸链关键基因以及抗氧化酶超氧化物歧化酶2的mRNA和蛋白的表达, 最后对两组骨髓间充质干细胞进行14 d的成骨诱导, 采用茜素红染色和qPCR分析成骨相关基因的表达。

结果与结论: ①去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞内存在着高水平的氧化应激, 同时线粒体内的超氧化物也维持着高水平; ②去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的线粒体膜电位和ATP含量都有明显下降, 线粒体功能受到损害; ③去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的呼吸链受损和超氧化物歧化酶2的表达下降; ④去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化潜能下降; ⑤结果表明, 骨质疏松来源骨髓间充质干细胞内的氧化应激水平升高, 线粒体功能受损, 最终导致成骨分化潜能下降。

关键词: 骨质疏松; 骨髓间充质干细胞; 氧化应激; 线粒体损伤; 成骨分化; 超氧化物歧化酶2

Mitochondrial dysfunction affects osteogenic differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells

Gu Chao^{1,2}, Chen Weikai^{1,2}, Liu Tao¹, Yang Huilin^{1,2}, He Fan^{1,2}

¹Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; ²Institute of Orthopedics, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China

Gu Chao, Master candidate, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; Institute of Orthopedics, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China

Corresponding author: He Fan, PhD, Researcher, Doctoral supervisor, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; Institute of Orthopedics, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: The occurrence of osteoporosis is closely related to the damage of cellular antioxidant system, and mitochondria is the main part of cellular energy metabolism and oxidative stress. The effect of mitochondrial injury on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and its specific mechanism remain to be explored.

¹ 苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006; ² 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215007

第一作者: 顾超, 男, 1994年生, 江苏省苏州市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事干细胞、组织工程和再生医学研究。

通讯作者: 何帆, 博士, 研究员, 博士生导师, 苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006; 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215007
<https://orcid.org/0000-0002-5532-9298> (顾超)

基金资助: 国家自然科学基金(31771063), 项目负责人: 何帆; 国家自然科学基金(82072476), 项目负责人: 刘滔; 江苏省自然科学基金(BK20191173), 项目负责人: 刘滔

引用本文: 顾超, 陈维凯, 刘滔, 杨惠林, 何帆. 骨髓间充质干细胞线粒体损伤影响其成骨分化的潜能 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(31):4921-4927.



OBJECTIVE: To investigate the effect of high level of oxidative stress on mitochondrial function and antioxidant capacity, and the effect of mitochondrial injury on the osteogenic differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: The rat model of osteoporosis was established by ovariectomy. Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from femurs of female rats in ovariectomized group and sham operation group. Reactive oxygen species detection kits and MitoSOX Red fluorescent probe were used to detect reactive oxygen species levels in bone marrow mesenchymal stem cells and mitochondria. Subsequently, JC-1 fluorescent probe was used to detect the mitochondrial membrane potential level of the two kinds of stem cells. ATP production was measured by the ATP detection kit. The changes of mitochondrial function were analyzed in both groups. qPCR and western blot assay were used to detect the mRNA and protein expression of key genes of respiratory chain and antioxidant enzyme superoxide dismutase 2 in two kinds of stem cells. Finally, the two groups of stem cells were subjected to osteogenic induction for 14 days. Alizarin red staining and qPCR were utilized to determine osteogenic related gene expression.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) There was high oxidative stress level in rat bone marrow mesenchymal stem cells of the ovariectomized group, and the superoxide in the mitochondria also maintained a high level. (2) The mitochondrial membrane potential and ATP content of rat bone marrow mesenchymal stem cells were decreased significantly, and the mitochondrial function was impaired in the ovariectomized group. (3) In the ovariectomized group, the respiratory chain was damaged and the expression of antioxidant enzyme superoxide dismutase 2 was decreased in rat bone marrow mesenchymal stem cells. (4) The osteogenic differentiation potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells was decreased in the ovariectomized group. (5) These findings confirm that the level of oxidative stress in bone marrow mesenchymal stem cells from osteoporosis is increased, and the mitochondrial function is impaired, which ultimately leads to the decrease of osteogenic differentiation potential of stem cells.

Key words: osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cells; oxidative stress; mitochondrial damage; osteogenic differentiation; superoxide dismutase 2

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 31771063 (to HF); National Natural Science Foundation of China, No. 82072476 (to LT); Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK20191173 (to LT)

How to cite this article: GU C, CHEN WK, LIU T, YANG HL, HE F. Mitochondrial dysfunction affects osteogenic differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(31):4921-4927.

0 引言 Introduction

骨质疏松症是一种常见的全身代谢性疾病，以骨量减少和骨组织微结构恶化为特征，易导致脆性和骨折风险的增加^[1-2]。年龄和以雌激素缺乏为主的内分泌或营养因素是骨质疏松性发病的主要危险因素。因此，绝经后妇女一直是骨质疏松性的高发人群^[3-4]。同时随着中国人口老龄化的加剧，骨质疏松症已成为中国面临的重要公共健康问题^[5]。

多项研究发现，在骨质疏松人群体内存在着高水平的氧化应激^[6-7]。相较于同龄健康人群，骨质疏松患者体内的活性氧自由基明显增多^[8]。而线粒体是细胞内氧化应激发生的主要场所，是活性氧自由基的主要来源，过多的活性氧自由基会损伤其功能^[9-10]，包括损伤线粒体内膜的呼吸链使得相关的抗氧化酶活性降低，促使线粒体DNA产生突变以及改变线粒体膜的通透性，使其膜电位水平下降^[11-12]。这些线粒体损伤对于细胞内的氧化还原平衡有着严重的破坏。

骨形成的重要条件之一是骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向的分化^[13-14]。在体外培养成骨细胞分化过程中伴随着能量代谢、细胞内ATP的合成和线粒体膜电位的变化^[15-16]。那么，这种高水平的氧化应激而导致的线粒体损伤，是否会对骨髓间充质干细胞的成骨分化能力有影响？具体作用机制是什么？有待进一步探索。该实验针对骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的线粒体功能和线粒体抗氧化能力进行研究，探索骨质疏松状态下骨髓间充质干细胞内线粒体功能和相关抗氧化酶发生的变化，以及这种变化对于其成骨分化能力的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物模型建立和细胞学体外观察，统计差异分析使用成组t检验比较。

1.2 时间及地点 实验于2020年9月至2021年8月在苏州大学骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 8周龄雌性SD大鼠10只，体质量(200.0±5.6)g，购自苏州大学动物中心，动物质量合格证号：

SYXK(苏)2017-0043，大鼠饲养于特定的无病原体环境中，22-24℃恒温，50%-60%湿度，12h光照/12h黑暗交替循环，自由获取所需饮食。所有动物手术和实验程序均在苏州大学伦理委员会的批准下进行(批准号为SUDA20211206A01)，同时严格遵守实验室动物护理和使用的指导方针。

1.3.2 实验试剂和仪器 胰酶、胎牛血清、PBS、 α -MEM培养基(Hyclone, 美国); 红细胞裂解液(碧云天, 中国); 抗坏血酸、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、茜素红、TRIzol(Sigma, 美国); 反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(Takara, 日本); JC-1、活性氧、ATP检测试剂盒(碧云天, 中国); MitoSOX RED检测试剂盒(Invitrogen, 美国); 酶标仪(Bio-Tek, 美国); 倒置荧光显微镜(Olympus, 日本); 流式细胞仪(Beckman Coulter, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物模型建立 8周龄雌性SD大鼠10只，随机分成假手术组和去卵巢组，每组5只。采用腹腔内注射3%戊巴比妥钠30mg/kg对大鼠进行麻醉，麻醉成功后在大鼠两侧腋窝水平处沿后正中线上作一长约1cm的纵形皮肤切口，钝性分离皮下组织、肌肉并充分暴露手术视野，可见粉红色桑葚样卵巢及淡红色输卵管。去卵巢组大鼠建立大鼠骨质疏松模型，即在距卵巢5mm处结扎输卵管及伴随血管，切除卵巢及周围脂肪组织，然后按相同的方法摘除对侧卵巢，在确保摘除双侧卵巢后，逐层缝合腹膜及皮肤，碘伏消毒并连续注射3d青霉素G(每只大鼠肌肉注射80000单位)。假手术组大鼠实施和去卵巢组大鼠相同的手术操作但是保留双侧卵巢。

1.4.2 μ CT分析 在摘除卵巢手术3个月后，使用Micro-CT(Skyscan1176, Kontich, 比利时)检测远端股骨的微观结构特征。骨骼以高分辨率(18 μ m)扫描，能量为65kV和385 μ A，利用NRecon v1.6和CTAn v1.13.8.1软件进行三维重建。选定股骨远端的松质骨作为感兴趣区域。采用骨密度、骨容积比2个指标评价骨微结构。

1.4.3 骨髓间充质干细胞的体外培养 假手术组和去卵巢组大鼠在3个月后实施安乐死并在无菌条件下取股骨，用

α -MEM 培养基冲洗骨髓腔，加红细胞裂解液充分裂解去除红细胞，从中分离骨髓间充质干细胞，然后将细胞接种于标准培养基（含体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗的 α -MEM 培养基）中，放置在二氧化碳培养箱（37 °C，体积分数为 5%CO₂）培养，每 3 d 换 1 次培养液，细胞融合至 70%–80% 用胰蛋白酶消化，按 1 : 3 比例进行传代。在以下实验中使用的所有细胞都是第 2 代骨髓间充质干细胞。

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	SD 大鼠双侧股骨骨髓
原代培养方法:	红细胞裂解液法
基础培养基:	α -MEM 培养基
添加材料:	体积分数为 10% 胎牛血清、1% 双抗（青、链霉素）
原代培养时间:	原代细胞第 4 天换液，之后 3 d 换液 1 次，培养约 2 周开始传代
细胞传代:	细胞融合至 70%–80% 用胰蛋白酶消化，按 1 : 3 比例进行传代，原代约 14 d 传 1 代，第 1 代约 10 d 传 1 代，共传 2 次，传到第 2 代使用
细胞鉴定:	通过光镜下的细胞形态以及成骨诱导分化水平可以判断是纯正的骨髓间充质干细胞
伦理学批准:	该实验经过苏州大学动物实验伦理委员会批准

1.4.4 成骨分化和茜素红染色 从两组大鼠中提取的第 2 代骨髓间充质干细胞以 $1 \times 10^4/cm^2$ 密度接种在 12 孔板中，待细胞生长至 60% 密度后，在成骨诱导培养基（ α -MEM 培养基、体积分数为 10% 胎牛血清、100 nmol/L 地塞米松、50 mg/L L-抗坏血酸、10 mmol/L β -磷酸甘油）中培养，成骨诱导培养基每 3 d 更换 1 次。成骨培养分化 14 d 用茜素红染色检测矿化水平。将细胞在 40 g/L 多聚甲醛（pH=7.4）中固定 30 min，随后在 0.1% 茜素红溶液（pH≈4.3）中室温孵育约 15 min，用 Olympus IX5 显微镜拍摄茜素红染色图片。在对茜素红染色进行定量分析时，每孔加入 200 μ L 5% 高氯酸溶液来溶解钙化层，用酶标仪测定每孔在 420 nm 波长处的吸光度值。

1.4.5 实时定量反转录-聚合酶链式反应（qRT-PCR）使用 Trizol 试剂提取第 2 代骨髓间充质干细胞内总 RNA，按反转录试剂盒说明制备同等浓度的 RNA 体系，再借助反转录仪经反转录得到 cDNA，根据 iTaq Universal SYBR Green Supermix 试剂操作指导，开展扩增测定。相关引物，见表 1。

表 1 | 基因引物序列

Table 1 | Primer sequences of each gene

基因	前引物 (5'-3')	后引物 (5'-3')
GAPDH	AGA CAG CCG CAT CTT CTT GT	TAC TCA GCA CCA GCA TCA CC
RUNX2	CCA ACT TCC TGT GCT CCG TG	GTG AAA CTC TTG CCT CGT CCG
SP7	CCC AAC TGT CAG GAG CTA GAG	GAT GTG GCG GCT GTG AAT
BGLAP	GAC CCT CTC TCT GCT CAC TCT	GAC CTT ACT GCC CTC CTG CTT G
超氧化物歧化酶 2	GGC CAA GGG AGA TGT TAC AA	GCT TGA TAG CCT CCA GCA AC
沉默信息调节因子 1	GAA AAT GCT GGC CTA ATA GAC TTG	TGG TAC AAA CAA GTA TTG ATT ACC G
COX-4	GTG CTG ATC TGG GAG AAG AGC TA	GGT TGA CCT TGA TGT CCA GCA T
ND-4	CCC TAC CCT CAA CAT GAT CC	GGA GCT TCT ACG TGG GCT TT
SDHA	TGG ACC TTG TCG TCT TTG G	TTT GCC TTA ATC GGA GGA AC
ATP5A	TCT CCA TGC CTA CAC TCG	CCA GGT CAA CAG ACG TGT CAG

1.4.6 线粒体膜电位检测（JC-1）采用 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒测定线粒体膜电位（ $\Delta\Psi_m$ ）。根据试剂盒使用说明，用 JC-1 工作液 37 °C 避光孵育待检测细胞 30 min，孵育结束后用缓冲液清洗 2 次，然后用流式细胞仪检测，在 488 nm 处激发 JC-1，用 580 nm 的长通滤波器检测，当线粒体膜电位水平高时，JC-1 聚集在线粒体基质中，形成聚合物（J-aggregates）。当线粒体膜电位水平低时，JC-1 为单体（monomer）。线粒体膜电位水平是根据聚合物（J-aggregates）的相对比例表示，使用 FlowJo 10.7 软件（TreeStar, San Carlos, CA, USA）进行分析。

1.4.7 线粒体 ATP 水平检测 根据制造商说明，使用增强型 ATP 检测试剂盒测定 ATP 水平。将细胞悬液在 4 °C 12 000 \times g 离心 5 min，收集上清液，每 20 μ L 上清液加入 100 μ L 的 ATP 检测工作液，一起放入黑色不透光 96 孔板，使用 Centro LB 960（Berthold Technologies, Germany）进行分析。根据说明绘制标准曲线，计算每孔的 ATP 水平，然后用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度，对每孔的 ATP 水平进行标化。

1.4.8 细胞内活性氧水平检测 使用活性氧检测试剂盒测定细胞内活性氧水平。首先，用 0.25% 胰酶-EDTA 消化细胞，得到细胞悬液，然后在细胞悬液中加入 10 μ mol/L DCFH-DA 试剂，37 °C 孵育 10 min，使用流式细胞仪计数 10 000 个细胞进行活性氧水平检测，波长 488 nm/530 nm，FlowJo 10.7 软件进行分析。

1.4.9 线粒体特异性活性氧检测 采用特异性的线粒体荧光探针 MitoSOX™ Red (Molecular Probes™, Invitrogen) 来检测线粒体内的活性氧水平。首先，用 0.25% 胰酶-EDTA 消化细胞，随后加入 5 μ mol/L MitoSOX™ Red 37 °C 避光孵育 10 min，使用流式细胞仪计数 10 000 个细胞进行活性氧水平检测，FlowJo 10.7 软件进行分析。

1.4.10 蛋白印迹实验 首先，使用 RIPA 裂解液从骨髓间充质干细胞中提取蛋白，然后在 4 °C，12 000 \times g 条件下离心 30 min 得到上清液，使用 BCA 检测试剂盒测量样品的蛋白浓度，10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量的蛋白，然后选用硝酸纤维素膜进行转膜，封闭液封闭 30 min 后使用沉默信息调节因子 1，超氧化物歧化酶 2，ND-4，SDHA，COX-4，ATP5A 和 TUBLIN 一抗（表 2）孵育过夜，第 2 天二抗孵育 1 h 后曝光，用 ImageJ 软件（National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）进行定量分析。

表 2 | 蛋白抗体信息

Table 2 | Protein antibody information

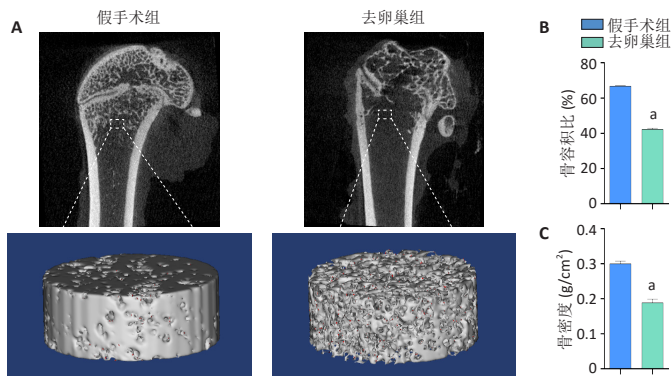
蛋白	货号 / 厂商	使用比例
沉默信息调节因子 1	A17307/abclonal	1 : 2 000
超氧化物歧化酶 2	A19576/abclonal	1 : 5 000
COX-4	ab202554/abcam	1 : 2 000
ND-4	Ab219822/abcam	1 : 2 000
SDHA	ab137040/abcam	1 : 5 000
ATP5A	ab176569/abcam	1 : 5 000
TUBLIN	AT819-1/BEYOTIME	1 : 5 000

1.5 主要观察指标 ① μ CT 分析骨密度及骨容积比参数；② 各组细胞线粒体膜电位和 ATP 产生水平；③ 各组细胞矿化能力和成骨基因的表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 进行统计分析, 各项数据以均值 ± 标准误表示。统计差异分析使用成组 *t* 检验, $P < 0.01$ 为各组间差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过苏州大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 骨质疏松模型建立 术后 3 个月, 使用 Micro-CT 扫描和 3D 重建观察去卵巢组和假手术组大鼠的骨组织形态结构。重建结果显示去卵巢组大鼠骨量明显下降, 骨小梁数目明显降低, 见图 1A。去卵巢组的骨密度、骨容积比都低于假手术组, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 1B, C, 说明去卵巢组大鼠已患骨质疏松。



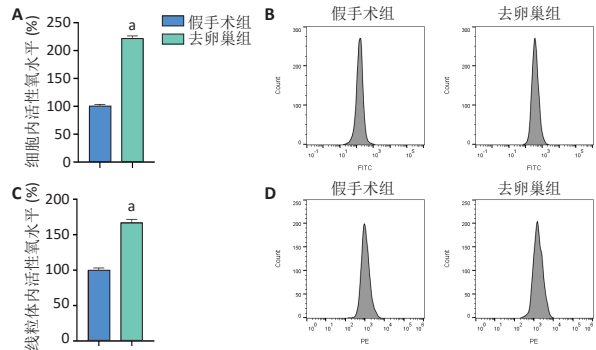
图注: 去卵巢组大鼠股骨骨密度下降和骨质破坏严重。图 A 为股骨 CT 扫描以及三维重建图; B 为骨容积比, 相比于假手术组, 去卵巢组的骨容积比下降约 37%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), C 为骨密度, 相比于假手术组, 去卵巢组的骨密度下降约 37%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)

Figure 1 | Observation of micro-architectural properties of the rat distal femur

2.2 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞内活性氧水平有明显升高 与假手术组大鼠骨髓间充质干细胞相比, 来源于去卵巢组大鼠的骨髓间充质干细胞内活性氧水平显著增高, 说明细胞内存在着高水平的氧化应激, 见图 2A, B。针对线粒体内的活性氧, 采用 MITOSOX RED 这一特异性荧光探针, 结果显示去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞线粒体内活性氧水平也有明显升高, 证明去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞线粒体内存在着过多的未能被清除的活性氧, 见图 2C, D。

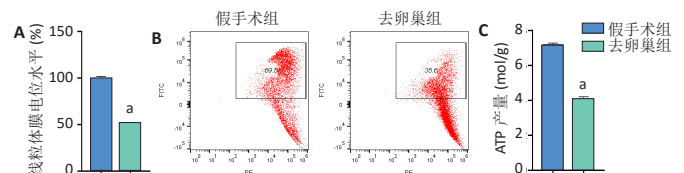
2.3 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的线粒体功能受损明显 通过 JC-1 染色, 使用流式细胞仪分析比较两种来源骨髓间充质干细胞内的线粒体膜电位水平, 可见去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的线粒体膜电位下降明显, 证明过多的活性氧对线粒体膜的通透性有伤害, 见图 3A, B。同时, 检测两种来源骨髓间充质干细胞 ATP 含量, 结果发现相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的 ATP 含量显著下调, 见图 3C。

2.4 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中呼吸链复合体上关键基因的表达下降 对于呼吸链复合体 I, II, IV, V, 分别选取了其关键基因 ND-4, SDHA, COX-4 和 ATP5A, 对其进行 mRNA 和蛋白水平的双重检测。在去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中, 这 4 个关键基因的 mRNA 都有不同程度的低表达, 见图 4A; 同样, 这 4 个关键基因的蛋白水平也有不同程度的低表达, 见图 4B, C。



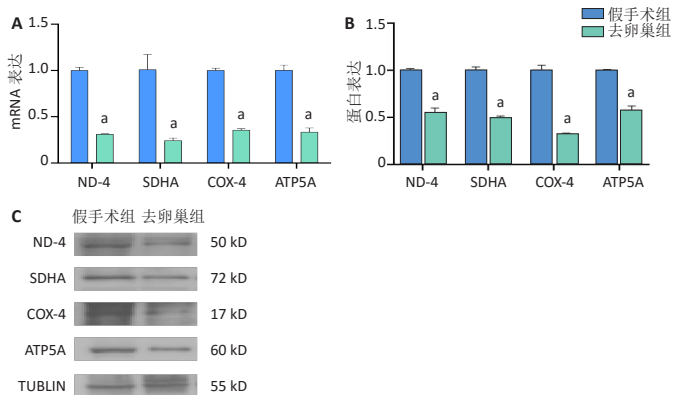
图注: 图 A, B 为细胞内活性氧水平定量, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞内活性氧水平提升了 2.22 倍, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); C, D 为线粒体内活性氧水平定量, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞线粒体内活性氧水平提升了 1.67 倍, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)

Figure 2 | Comparison of oxidative stress levels in rat bone marrow mesenchymal stem cells of both groups



图注: 相较于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的线粒体膜电位丢失, ATP 产量减少, 线粒体功能受到损害。图 A 为线粒体膜电位水平定量, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞线粒体内膜电位水平下降近 50%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); B 为流式细胞仪所呈现的聚合物 (J-aggregates) 比例图像; C 为 ATP 产量定量, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的 ATP 产量减少了 43%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)

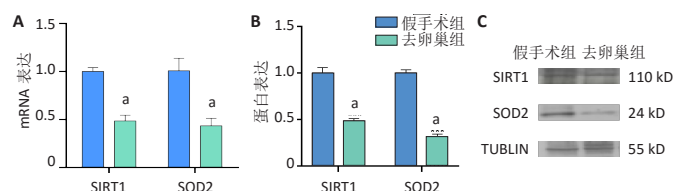
Figure 3 | Comparison of mitochondrial function in rat bone marrow mesenchymal stem cells of both groups



图注: 相较于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的 ND-4, SDHA, COX-4 和 ATP5A 基因表达都有不同程度的下调, 说明呼吸链受到损伤。图 A 为 ND-4, SDHA, COX-4 和 ATP5A 基因的 mRNA 表达, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞此 4 个基因的 mRNA 表达分别下降了约 69%, 76%, 64% 和 66%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); B 为 ND-4, SDHA, COX-4 和 ATP5A 的蛋白表达定量, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞此 4 个基因的蛋白表达分别下降了约 46%, 51%, 68% 和 43%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); C 为 ND-4, SDHA, COX-4 和 ATP5A 的蛋白印迹实验结果

Figure 4 | Expression comparison of the key gene of respiratory chain in rat bone marrow mesenchymal stem cells of both groups

2.5 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞线粒体内抗氧化酶的表达下降 选取线粒体内重要的抗氧化酶超氧化物歧化酶 2 及其上游调控因子沉默信息调节因子 1, 对两者进行 mRNA 水平和蛋白水平的双重检测。在去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中沉默信息调节因子 1 的 mRNA 表达下降, 同时其下游的抗氧化酶超氧化物歧化酶 2 的 mRNA 表达也下降, 见图 5A。同样, 沉默信息调节因子 1 和超氧化物歧化酶 2 两者在去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中的蛋白水平都有所下降, 见图 5B, C。

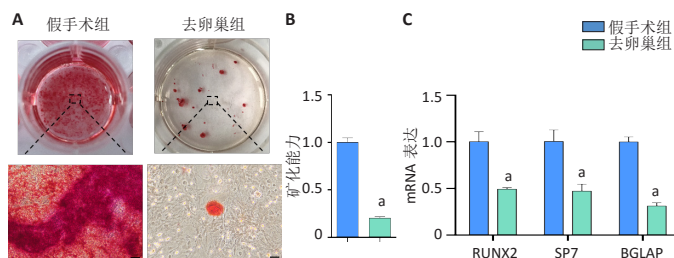


图注: 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中 SIRT1 和 SOD2 的表达都有不同程度的下调, 说明抗氧化系统受到损伤。图 A 为 SIRT1 和 SOD2 的 mRNA 表达, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞内 SIRT1、SOD2 mRNA 表达分别下降了约 51%, 57%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); B 为 SIRT1 和 SOD2 的蛋白表达定量, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中 SIRT1 和 SOD2 蛋白表达分别下降了大约 52% 和 69%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); C 为 SIRT1 和 SOD2 的蛋白印迹实验结果

图 5 | 两组大鼠骨髓间充质干细胞内调控因子沉默信息调节因子 1(SIRT1) 和抗氧化酶超氧化物歧化酶 2(SOD2) 表达的比较

Figure 5 | Expression comparison of silent information regulator 1 and superoxide dismutase 2 in rat bone marrow mesenchymal stem cells of both groups

2.6 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化潜能下降 成骨诱导 14 d, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的钙结节明显减少, 见图 6A。茜素红定量分析结果与上述一致, 见图 6B。成骨相关基因检测显示, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中 RUNX2, SP7, BGLAP 的 mRNA 表达量低于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 见图 6C。



图注: 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的成骨能力受损。图 A, B 为茜素红染色 (标尺 = 100 μm) 及定量分析结果, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的钙结节数量下降了约 80%; C 为 RT-PCR 检测成骨相关基因 RUNX2, SP7 和 BGLAP 的 mRNA 表达, 相比于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞 RUNX2, SP7 和 BGLAP 的 mRNA 表达分别下降了约 51%, 53%, 69%, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)

图 6 | 两组大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化潜能比较

Figure 6 | Comparison of osteogenic differentiation potential in rat bone marrow mesenchymal stem cells of both groups

3 讨论 Discussion

此次研究中, 先建立假手术组和去卵巢组大鼠模型, 随后提取假手术组和去卵巢组大鼠骨髓腔内的细胞并进行贴壁培养, 因为在细胞传代时, 骨髓间充质干细胞更容易被胰酶消化, 利用这一特征从而分离并纯化得到骨髓间充质干细胞。利用活性氧检测试剂盒对假手术组和去卵巢组的骨髓间充质干细胞进行细胞内的活性氧水平检测, 发现去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的活性氧水平明显高于假手术组大鼠骨髓间充质干细胞, 这证明了去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞内的确存在着高水平的氧化应激。另外有研究表明, 除了活性氧, 活性氮在细胞内的氧化应激中也发挥重要作用, 其作为一种强大的氧化剂, 通过与超氧化物反应形成过氧亚硝酸盐, 对细胞内相关代谢酶产生损伤^[17]。

近年来研究表明, 骨质疏松的发生与氧化应激关系密切, 这可能与骨细胞线粒体内氧化还原稳态相关^[18-20]。体内自由基的含量决定着氧化应激水平的高低。活性氧主要产生于线粒体, 正常状态下, 活性氧可被过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等抗氧化酶分解, 从而保持着动态平衡。相关文献报道, 与对照组相比, 绝经后骨质疏松患者血清/血浆中的过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性有明显下降^[21-22]。在氧化应激条件下, 线粒体内过量的活性氧则会攻击线粒体, 从而导致线粒体 DNA 的突变, 损伤呼吸链使相关酶活性降低, 损伤线粒体内膜的通透性使其膜电位水平下降, 破坏氧化还原平衡^[23-25]。对此, 选取了 MitoSOX Red 这一新型的线粒体荧光探针, 它可特异性靶向线粒体从而针对线粒体内的超氧化物进行检测^[26-27]。与作者预想的一样, 相较于假手术组, 去卵巢组骨髓间充质干细胞中线粒体活性氧水平有着明显的提升, 这证明去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的线粒体内存在过多未被清除的活性氧。那么, 这些多余的活性氧是否对线粒体的功能产生影响呢? 为此, 作者首先选择了 JC-1 这一阳离子染料, 它可以在线粒体内聚集, 当线粒体膜电位正常时, 它通过线粒体膜极性进入线粒体基质内, 形成发射红色荧光的聚合物 (J-aggregates); 相反, 当线粒体跨膜电位去极化时, 它则表现为绿色荧光的单聚体^[28-29]。对假手术组和去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞进行 JC-1 流式检测发现, 去卵巢组的聚合物 (J-aggregates) 比例下降, 说明过量的活性氧攻击了线粒体内膜, 使其膜电位水平下降。在骨髓间充质干细胞的成骨分化过程中, 是由信号通路、转录因子和表观遗传机制多种因素共同参与的, 其中能量代谢扮演着重要角色。线粒体是公认的细胞内能量代谢的中心^[10]。因此, 针对线粒体合成 ATP 为细胞供能这一重要的生物学功能, 使用了增强型 ATP 检测试剂盒^[30-31], 分别对假手术组和去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞进行检测, 发现去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的 ATP 产量有明显下降。膜电位水平和 ATP 产量的下降, 证明去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞的线粒体功能严重受损。在年龄引起的骨质疏松症中, 根据 LV

等^[32]研究证实,老年小鼠骨髓间充质干细胞内冗余的活性氧,同样导致了线粒体功能的受损,包括线粒体超微结构异常和氧化磷酸化产能不足。这与该研究结果是相似的。

由于线粒体是通过呼吸链产生 ATP 为细胞供能,呼吸链也是氧化磷酸化和线粒体中一些重要的抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶的重要影响因素^[33]。针对呼吸链复合体 I, II, IV, V, 分别选取了其关键基因 ND-4, SDHA, COX-4 和 ATP5A^[34-35], 对其进行 mRNA 水平和蛋白水平的双重验证,发现在去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中这些关键基因都有明显下调,证明过多的活性氧确实对线粒体的呼吸链产生了损伤,而受损的呼吸链则会对相关抗氧化酶产生影响。相对线粒体而言,超氧化物歧化酶 2 作为线粒体中一种重要的抗氧化酶,其活性中心是锰,可以催化超氧化物自由基分解为氧和过氧化氢^[36-37],因此,它在线粒体的氧化还原稳态的调节中有着至关重要的作用。同样对超氧化物歧化酶 2 的 mRNA 和蛋白水平的表达进行检测,发现在去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中超氧化物歧化酶 2 的表达水平有明显下降,代表了线粒体清除活性氧能力的减弱,这证明线粒体抗氧化功能和呼吸链的损伤有着重大的关联。超氧化物歧化酶 2 表达的下调或许与沉默信息调节因子 1 对超氧化物歧化酶 2 的调控有关。对沉默信息调节因子 1 的 mRNA 和蛋白水平进行检测,发现在去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞内其表达是下调的,这与课题组先前的研究结果相符合^[38]。另外,GAO 等^[39]研究表明,沉默信息调节因子家族的另一位成员沉默信息调节因子 3 也与超氧化物歧化酶 2 密切相关,其可以通过去乙酰化作用来增强超氧化物歧化酶 2 的活性,从而对抗过多的活性氧。沉默信息调节因子 3 通过对线粒体稳态的调节可以促进干细胞的成骨分化。因此,去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞中高水平的氧化应激、受损的线粒体功能、呼吸链关键基因的损伤和抗氧化酶表达的下降,这些可能是导致去卵巢组大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力下降的重要原因。

当然该实验还有很多不足之处:①对于成骨能力的评价缺乏蛋白层面的解释;②对于线粒体损伤,如 MitoDNA 的检测、线粒体形态结构损伤的观察等,有待进一步研究;③对于成骨分化能力缺乏相关病理检测,在后续实验中还将进行体内层面的补充说明。

结论:线粒体作为细胞内能量代谢的主要场所,参与骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的过程。此次研究证实,在骨质疏松情况下,骨髓间充质干细胞内高水平的氧化应激,使得线粒体正常生物功能受到损伤,包括通过氧化磷酸化产生 ATP 和清除自由基的能力,最终导致干细胞成骨分化潜能下降。作者认为,这种由线粒体损伤引起的能量代谢障碍和抗氧化系统的损伤,在骨质疏松症的发生中起着重要作用。或许以线粒体为靶点对骨质疏松进行有效防治是未来临床研究中的一个新方向。

致谢:感谢苏州大学骨科研究所提供实验设备。

作者贡献:顾超负责细胞培养、指标检测、论文撰写,顾超、陈维凯、刘滔负责实验数据分析处理,顾超、何帆、杨惠林负责数据和文章的校对,顾超、陈维凯、何帆负责实验设计。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》;文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重;文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] LANGDAHL BL. Overview of treatment approaches to osteoporosis. *Br J Pharmacol.* 2021;178(9):1891-1906.
- [2] ANAM AK, INSOGNA K. Update on Osteoporosis Screening and Management. *Med Clin North Am.* 2021;105(6):1117-1134.
- [3] RACHNER TD, KHOSLA S, HOFBAUER LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet.* 2011;377(9773):1276-1287.
- [4] SALARI N, GHASEMI H, MOHAMMADI L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2021;16(1):609.
- [5] CHENG X, ZHAO K, ZHA X, et al. Opportunistic Screening Using Low-Dose CT and the Prevalence of Osteoporosis in China: A Nationwide, Multicenter Study. *J Bone Miner Res.* 2021;36(3):427-435.
- [6] LEE NK, CHOI YG, BAIK JY, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood.* 2005;106(3):852-859.
- [7] HO PJ, YEN ML, TANG BC, et al. H2O2 accumulation mediates differentiation capacity alteration, but not proliferative decline, in senescent human fetal mesenchymal stem cells. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(15):1895-1905.
- [8] ZHANG YB, ZHONG ZM, HOU G, et al. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *J Surg Res.* 2011;169(1):e37-42.
- [9] KALYANARAMAN B. Teaching the basics of repurposing mitochondria-targeted drugs: From Parkinson's disease to cancer and back to Parkinson's disease. *Redox Biol.* 2020;36:101665.
- [10] MENDIVIL-PEREZ M, SOTO-MERCADO V, GUERRA-LIBRERO A, et al. Melatonin enhances neural stem cell differentiation and engraftment by increasing mitochondrial function. *J Pineal Res.* 2017;63(2). doi: 10.1111/jpi.12415.
- [11] KUNG HC, LIN KJ, KUNG CT, et al. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroprotection of Polyphenols with Respect to Resveratrol in Parkinson's Disease. *Biomedicines.* 2021;9(8):918.
- [12] SHARES BH, BUSCH M, WHITE N, et al. Active mitochondria support osteogenic differentiation by stimulating β -catenin acetylation. *J Biol Chem.* 2018;293(41):16019-16027.
- [13] GRAYSON WL, ZHAO F, BUNNELL B, et al. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(3):948-953.
- [14] WANG C, MENG H, WANG X, et al. Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis. *Med Sci Monit.* 2016;22:226-233.

- [15] KOMAROVA SV, ATAULLAKHANOV FI, GLOBUS RK. Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(4): C1220-1229.
- [16] CHA Y, HAN MJ, CHA HJ, et al. Metabolic control of primed human pluripotent stem cell fate and function by the miR-200c-SIRT2 axis. *Nat Cell Biol.* 2017;19(5):445-456.
- [17] DI MEO S, REED TT, VENDITTI P, et al. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:1245049.
- [18] WANG FS, WU RW, CHEN YS, et al. Biophysical Modulation of the Mitochondrial Metabolism and Redox in Bone Homeostasis and Osteoporosis: How Biophysics Converts into Bioenergetics. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(9):1394.
- [19] YANG S, FESKANICH D, WILLET WC, et al. Association between global biomarkers of oxidative stress and hip fracture in postmenopausal women: a prospective study. *J Bone Miner Res.* 2014;29(12): 2577-2583.
- [20] LANGDAHL JH, FREDERIKSEN AL, HANSEN SJ, et al. Mitochondrial Point Mutation m.3243A>G Associates With Lower Bone Mineral Density, Thinner Cortices, and Reduced Bone Strength: A Case-Control Study. *J Bone Miner Res.* 2017;32(10):2041-2048.
- [21] OZGOCMEN S, KAYA H, FADILIOGLU E, et al. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem.* 2007;295(1-2):45-52.
- [22] ZINNUROGLU M, DINCEL AS, KOSOVA F, et al. Prospective evaluation of free radicals and antioxidant activity following 6-month risedronate treatment in patients with postmenopausal osteoporosis. *Rheumatol Int.* 2012;32(4):875-880.
- [23] TANG X, MA S, LI Y, et al. Evaluating the Activity of Sodium Butyrate to Prevent Osteoporosis in Rats by Promoting Osteal GSK-3 β /Nrf2 Signaling and Mitochondrial Function. *J Agric Food Chem.* 2020;68(24): 6588-6603.
- [24] KOBAYASHI K, NOJIRI H, SAITA Y, et al. Mitochondrial superoxide in osteocytes perturbs canalicular networks in the setting of age-related osteoporosis. *Sci Rep.* 2015;5:9148.
- [25] CHEN CT, SHIH YR, KUO TK, et al. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(4):960-968.
- [26] DICKIE LJ, AZIZ AM, SAVIC S, et al. Involvement of X-box binding protein 1 and reactive oxygen species pathways in the pathogenesis of tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(12):2035-2043.
- [27] ANDRÉ L, GOUZI F, THIREAU J, et al. Carbon monoxide exposure enhances arrhythmia after cardiac stress: involvement of oxidative stress. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(6):1235-1246.
- [28] SATO T, SAITO T, SAEGUSA N, et al. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation.* 2005;111(2): 198-203.
- [29] ZHANG F, CUI J, LIU X, et al. Correction to: Roles of microRNA-34a targeting SIRT1 in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1):331.
- [30] LI HJ, SUN XM, LI ZK, et al. LncRNA UCA1 Promotes Mitochondrial Function of Bladder Cancer via the MiR-195/ARL2 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(6):2548-2561.
- [31] ZHOU J, ZHANG F, MENG H, et al. Introducing extra NADPH consumption ability significantly increases the photosynthetic efficiency and biomass production of cyanobacteria. *Metab Eng.* 2016;38: 217-227.
- [32] LV YJ, YANG Y, SUI BD, et al. Resveratrol counteracts bone loss via mitofilin-mediated osteogenic improvement of mesenchymal stem cells in senescence-accelerated mice. *Theranostics.* 2018;8(9): 2387-2406.
- [33] EBERT R, ULMER M, ZECK S, et al. Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells.* 2006;24(5):1226-1235.
- [34] NDI M, MARIN-BUERA L, SALVATORI R, et al. Biogenesis of the bc(1) Complex of the Mitochondrial Respiratory Chain. *J Mol Biol.* 2018; 430(21):3892-3905.
- [35] GELDON S, FERNÁNDEZ-VIZARRA E, TOKATLIDIS K. Redox-Mediated Regulation of Mitochondrial Biogenesis, Dynamics, and Respiratory Chain Assembly in Yeast and Human Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9: 720656.
- [36] HE J, LIU X, SU C, et al. Inhibition of Mitochondrial Oxidative Damage Improves Reendothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells via SIRT3 (Sirtuin 3)-Enhanced SOD2 (Superoxide Dismutase 2) Deacetylation in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019; 39(8):1682-1698.
- [37] TSAI YT, YEH HY, CHAO CT, et al. Superoxide Dismutase 2 (SOD2) in Vascular Calcification: A Focus on Vascular Smooth Muscle Cells, Calcification Pathogenesis, and Therapeutic Strategies. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:6675548.
- [38] CHEN W, CHEN X, CHEN AC, et al. Melatonin restores the osteoporosis-impaired osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells by preserving SIRT1-mediated intracellular antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 2020;146:92-106.
- [39] GAO J, FENG Z, WANG X, et al. SIRT3/SOD2 maintains osteoblast differentiation and bone formation by regulating mitochondrial stress. *Cell Death Differ.* 2018;25(2):229-240.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)