

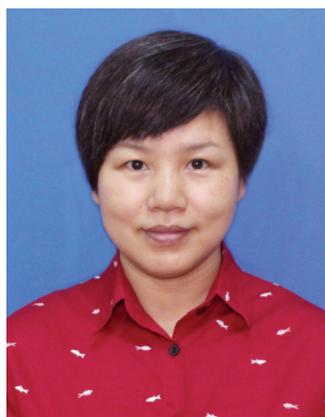
[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.06.002

· 专栏论著 ·

## 氧化应激对人成骨样细胞MG63活性的影响

付俊<sup>1</sup>, 范琳犀<sup>2</sup>, 姜宁<sup>2</sup>, 林海英<sup>2</sup>, 王琼<sup>2</sup>

1. 首都医科大学附属北京口腔医院, 北京(100050); 2. 西南医科大学医学基础研究中心/药学院, 四川 泸州(646000); 西南医科大学生理教研室, 四川 泸州(646000)



**【通讯作者简介】** 王琼,女,2010年毕业于中国医学科学院北京协和医学院,获医学博士学位。现任西南医科大学副研究员,西南医科大学药学院硕士研究生导师、湖南中医药大学药学院硕士研究生导师,澳门科技大学中医药学院兼职博士研究生导师,中欧科技合作联络点(健康领域)副主任;《中国实验动物学报》、《中国比较医学杂志》和《湖南中医药大学学报》编委,英国《Phytotherapy Research》审稿人。长期从事神经精神药理及实验方法学、航天医学的研究。多年来发表论文50余篇,其中SCI收录10余篇,获国家发明专利6项,获部级科技进步二等奖1项,国际大会一等奖1项,主编参编专著4部,培养硕士生8名,博士生3名。主持国家级、省部级项目十余项。为中国药理学会补益药药理专业委员会常务委员、北京药理学会神经精神药理专业委员会常务委员。

**【摘要】** **目的** 建立人成骨样细胞氧化应激模型,研究氧化应激对人成骨样细胞形态和增殖活力的影响。**方法** 用不同浓度黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶(xanthine/xanthine oxidase, X/XO)的酶促反应产生的超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)刺激人成骨样细胞MG63,建立成骨细胞内氧化应激模型,用X/XO加黄嘌呤氧化酶抑制剂羟嘌呤醇研究其对该氧化应激模型的逆转作用。运用氧化敏感性荧光探针2'7'-二氯荧光黄双乙酸盐结合流式细胞术检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,用倒置相差显微镜和MTT实验观察研究氧化应激对成骨细胞形态及增殖活力的影响。**结果** X/XO处理MG63细胞后,细胞形态发生明显破坏;在相同处理时间下,X/XO浓度越高,细胞内ROS荧光强度值越高,吸光光密度(optical density, OD)值越低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且X/XO加羟嘌呤醇联合处理组的细胞内ROS平均荧光强度较相同浓度X/XO单独处理组明显降低( $P < 0.05$ )。在相同X/XO处理浓度下,随着处理时间的延长,细胞内ROS平均荧光强度逐渐增强,OD值明显降低,120 min时细胞内ROS平均荧光强度比对照组增加了345%。24 h时OD值为相同时间对照组的22.9%。**结论** X/XO可导致人成骨样细胞氧化应激损伤,破坏人成骨样细胞的形态,抑制人成骨样细胞的增殖活力。X/XO抑制剂羟嘌呤醇可逆转X/XO引起的人成骨样细胞氧化损伤。

**【关键词】** 氧化应激; 人成骨样细胞MG63; 活性氧; 骨吸收

**【中图分类号】** R783 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)06-0347-07

**【引用著录格式】** 付俊,范琳犀,姜宁,等.氧化应激对人成骨样细胞MG63活性的影响[J].口腔疾病防治,2017,25(6):347-353.

**Effect of oxidative stress on the activity of human osteoblastic MG63 cells** FU Jun<sup>1</sup>, FAN Linxi<sup>2</sup>, JIANG Ning<sup>2</sup>,

**【收稿日期】** 2016-12-15; **【修回日期】** 2017-01-03

**【基金项目】** 四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合基金项目(14JC01323-LH50);四川省科技厅-泸州市-四川医科大学联合项目[2015LZCYD-S04(7/15)];国家重点研发计划政府间国家科技创新合作重点专项(2016YFE0131800)

**【作者简介】** 付俊,主治医师,博士, Email: fujunhuaxi@sina.com

**【通信作者】** 王琼,副研究员,博士, Email: wqimlad@126.com

LIN Haiying<sup>2</sup>, WANG Qiong<sup>2</sup>. 1. Beijing stomatological hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Southwest Medical University, Preclinical Medicine Research Center / School of Pharmacy, Luzhou 646000, China; Southwest Medical University, Department of Physiology, Luzhou 646000, China

Corresponding author: WANG Qiong, Email: wqimplad@126.com, Tel: 0086-10-57099211

**【Abstract】 Objective** To investigate the morphology and proliferation viability in oxidative stress induced damage in human MG63 cells. **Methods** The MG63 cells were treated with superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) produced by different concentrations of xanthine/xanthine oxidase enzymatic reactions to establish the model of oxidative stress in MG63 cells, using the xanthine oxidase inhibitor oxypurinol to observe the reverse effect of oxypurinol on xanthine/xanthine oxidase induced damage in human MG63 cells. Using the flow cytometry, the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) induced by xanthine/xanthine oxidase induced cellular oxidative stress damage was evaluated by the oxidation-sensitive fluorescent probe, the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. Cellular viability and morphology was evaluated by the MTT assay and the phase contrast microscope. **Results** Xanthine/xanthine oxidase induced intracellular ROS production in a dose- and time- dependent manner ( $P < 0.05$ ). The cellular viability was reduced and cellular morphology was damaged, too ( $P < 0.05$ ). Xanthine/xanthine oxidase induced the damage of the cellular morphology. At the same processing time, the higher the xanthine/xanthine oxidase concentration, the higher intracellular ROS fluorescence intensity value, and the lower OD value, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The intracellular mean ROS fluorescence intensity in xanthine/xanthine oxidase + oxypurinol combined treatment group was significantly lower compared with the same concentration of xanthine/xanthine oxidase ( $P < 0.05$ ). At the same concentration of xanthine/xanthine oxidase, with the extension of treatment time, the intracellular mean ROS fluorescence intensity gradually increased, the OD value decreased, compared with the control group, the intracellular mean ROS fluorescence intensity of 120 min increased to 345% of the control, was the highest among the xanthine/xanthine oxidase groups. The OD value of 24 h was the 22.9% of the control group, was the lowest among the xanthine/xanthine oxidase groups, cell proliferation activity decreased more obvious. **Conclusions** Xanthine/xanthine oxidase could induce oxidative stress damaged the cellular morphology and reduced the cellular viability in MG63 cell lines. The oxypurinol (the inhibitor of xanthine oxidase) could reverse the oxidative stress injury induced by xanthine/xanthine oxidase in human osteoblastic cells.

**【Key words】** Oxidative stress; Human MG63 cell; Reactive oxygen species; bone resorption

氧化应激是由于内源性或外源性刺激使机体代谢异常而骤然产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),或机体抗氧化防御系统受损,氧自由基产生和清除的动态平衡遭到破坏,活性氧蓄积造成氧化损伤。目前的研究发现,慢性炎症性疾病和骨吸收相关疾病的发病机制与活性氧引起的氧化应激有关<sup>[1-4]</sup>。本实验通过用不同浓度黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶(xanthine/xanthine oxidase, X/XO)产生的超氧阴离子刺激MG63细胞,建立人成骨样细胞氧化应激模型,研究氧化应激对人成骨样细胞形态及增殖活力的影响,为进一步研究氧化应激在牙周炎、种植体周围炎等慢性骨吸收疾病的作用机理提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

骨肉瘤来源人成骨样细胞MG63(四川大学口腔生物医学工程教育部重点实验室提供),F12培

养基(Gibco,美国),新生小牛血清(哈利生物工程公司,成都),胰蛋白酶(Sigma,美国),细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染液(南京建成生物工程研究所,江苏),2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)(Sigma-Aldrich,美国),黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶(xanthine/xanthine oxidase, X/XO)(Sigma,美国),二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),羟嘌呤醇(Sigma,美国),四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)(Sigma,美国),二氧化碳恒温孵箱(SANYO,日本),Epics Elite Esp型流式细胞仪(Coulter,美国),倒置相差显微镜(Olympus,日本),HTS7000plus多孔板高效分析仪(PE,美国),细胞培养板(FALCON,美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人成骨样细胞MG63培养于含10%小牛血清、100 U/mL青霉素、100  $\mu$ g/mL硫酸链霉素的F12培养基的25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,置37  $^{\circ}$ C、5%

CO<sub>2</sub>孵箱中培养,3 d传代1次,待细胞生长至对数生长期进行实验。

1.2.2 染液配置 将2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)溶于二甲亚砜(DMSO),配成1 mmol/L储备液,-20℃避光冻存备用。

1.2.3 实验及分组 实验一:不同浓度X/XO处理MG63细胞相同时间(1 h)。实验分为5组:①空白对照组;②X/XO低浓度组,X为25 μmol/L,XO为25 U/L;③X/XO中浓度组,X为50 μmol/L,XO为50 U/L;④X/XO高浓度组,X为100 μmol/L,XO为100 U/L;⑤X/XO高浓度+羟嘌呤醇组,X为100 μmol/L,XO为100 U/L,羟嘌呤醇为50 mmol/L。X、XO、羟嘌呤醇的浓度根据预实验选择,每组设3个复管。

实验二:相同浓度X/XO(即X/XO中浓度)处理MG63细胞不同时间(0、15、30、60、120 min)。分为空白对照组,实验组(X/XO中浓度)。每组设3个复管。

实验三:不同浓度X/XO处理MG63细胞相同时间(24 h),药物浓度分组同实验一,每组设6个复孔。

实验四:相同浓度X/XO(即X/XO中浓度)处理MG63细胞不同时间(0、6、12、18、24 h),每组设6个复孔。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞内ROS的生成 0.25%胰酶消化MG63细胞,收集于离心管内,每组设3个复管。调节细胞密度为1 × 10<sup>5</sup>个/mL。加入DCFH-DA,使染液终浓度为10 μmol/L。在避光状态下孵育,每隔10 min振荡离心管,使荧光探针均匀装载进细胞内,30 min后离心弃染液,无血清F12洗3遍。用低血清细胞培养液重悬细胞,调节细胞密度为1 × 10<sup>5</sup>个/mL。细胞在避光状态下按实验一、实验二分组处理。用流式细胞仪在激发波长488 nm,发射波长530 nm条件下检测各组细胞中所产生的ROS荧光强度值,每个样品计数10<sup>4</sup>

个细胞。

1.2.5 MG63细胞形态结构的观察 将MG63细胞按1 × 10<sup>5</sup>个/mL接种于6孔培养板上,37℃、5% CO<sub>2</sub>孵育24 h。按实验三分组处理细胞24 h。在倒置相差显微镜下观察细胞形态,并拍照。

1.2.6 细胞增殖活力的检测 将MG63细胞按1 × 10<sup>5</sup>个/mL接种于96孔培养板上,37℃、5% CO<sub>2</sub>孵育24 h。按上述实验三和实验四分组处理细胞,干预结束后,每孔加MTT 20 μL(2 mg/mL)继续孵育4 h。吸弃培养液,每孔加入200 μL DMSO,振荡30 min,使用HTS 7000 Plus多孔板高效分析仪在检测波长570 nm下分别测量OD值。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件,对结果进行重复测量资料对称检验、单因素方差分析和组间 $q$ 检验、配对 $t$ 检验。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 流式细胞仪检测细胞内ROS的生成

实验一以不同浓度X/XO处理1 h后,MG63细胞内的平均荧光强度见表1。单因素方差分析结果显示,X/XO单独处理各组细胞的平均荧光强度比对照组明显升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。组间两两比较( $q$ 检验)发现,高浓度、中浓度和低浓度3组间的平均荧光强度值有显著差异,高浓度组较低浓度组细胞内荧光强度值高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。X/XO + 羟嘌呤醇联合处理细胞内平均荧光强度较相同浓度X/XO单独处理组明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果提示,X/XO刺激MG63细胞1 h后,细胞内ROS大量增加,高浓度处理组较低浓度处理组细胞ROS的产生更多,羟嘌呤醇抑制X/XO引起的细胞内ROS的增加。

表1 不同浓度X/XO处理MG63细胞1 h后细胞内ROS平均荧光强度值

Table 1 Mean fluorescence intensity of ROS in MG63 cells after treated different concentrations of X/XO for 1 h ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	ROS平均荧光强度	F值	P值	q值	P <sub>1</sub> 值	P <sub>2</sub> 值
对照组	0.662 ± 0.113					
低浓度组	1.113 ± 0.152			4.21	0.0223**	
中浓度组	2.156 ± 0.203	8.23	0.001*	5.79	0.0015**	
高浓度组	2.817 ± 0.172			6.34	0.0003**	
X/XO + 羟嘌呤醇	0.712 ± 0.120					0.0003#

注 \* $P < 0.05$ ,各组相比;\*\* $P_1 < 0.05$ ,组间两两比较;# $P_2 < 0.05$  vs 高浓度组。

实验二用 X/XO 中浓度处理 MG63 细胞 0 ~ 120 min, 随时间变化细胞内 ROS 的平均荧光强度的变化见表 2。单因素方差分析结果显示, 各处理组 MG63 细胞内平均荧光强度比对照组明显增强, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。组间两两比较发现, 对照组 0 ~ 120 min 内平均荧光强度未见明显差异 ( $P >$

0.05); 各实验组之间 ROS 荧光强度差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。随着处理时间的延长, 细胞内 ROS 平均荧光强度逐渐增强, 120 min 时细胞内 ROS 平均荧光强度比对照组增加了 345%, 为各组中最高。结果提示相同浓度 X/XO 处理 MG63 细胞时, 细胞内 ROS 的量从 0 ~ 120 min 逐渐增加。

表 2 X/XO 中浓度处理 MG63 细胞 0 ~ 120 min 后细胞内 ROS 平均荧光强度值  
Table 2 Mean fluorescence intensity of ROS in MG63 cells after exposure to 50  $\mu$ mol/L xanthine and 50 U/L XO during 0 ~ 120 min ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

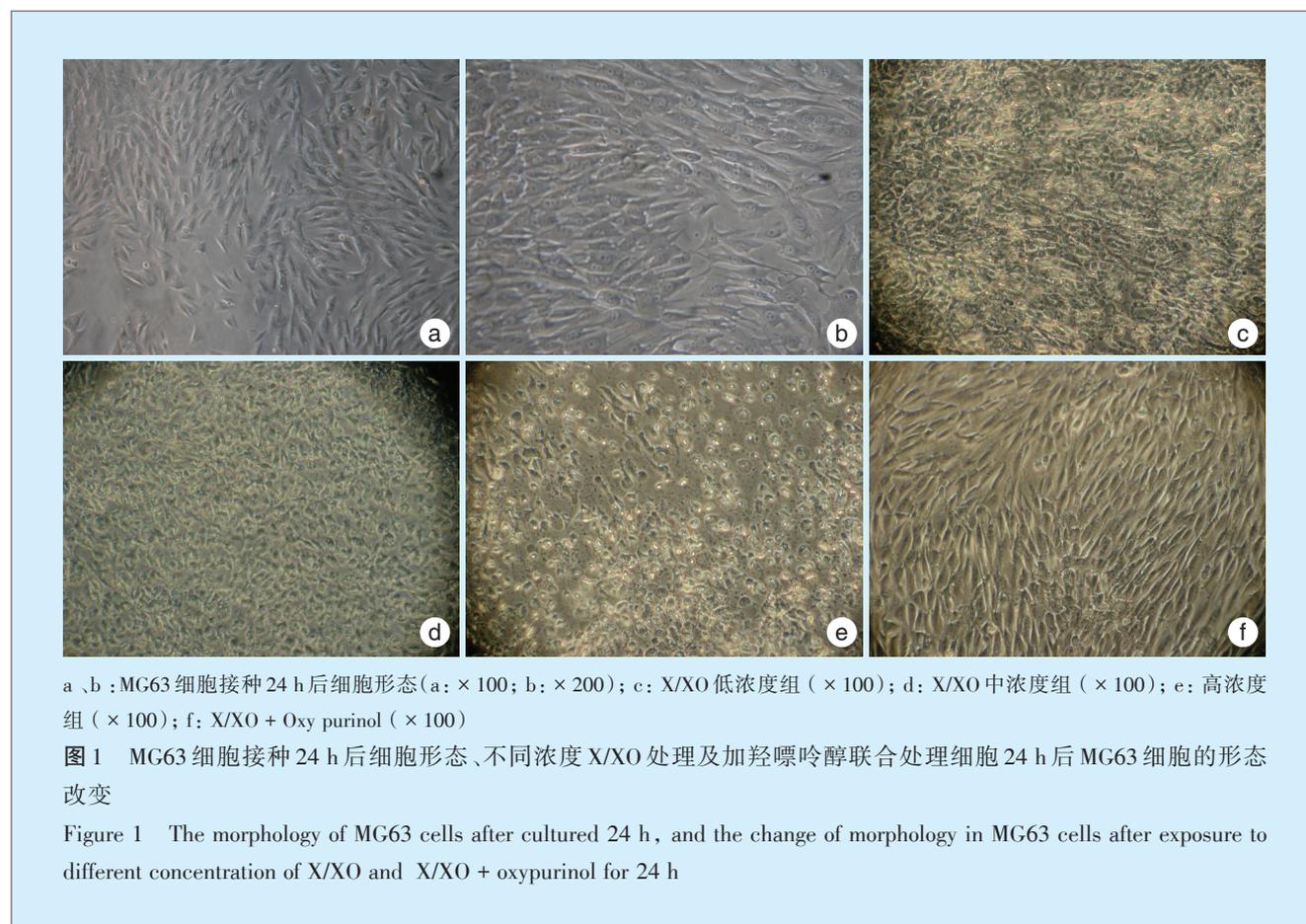
时间/min	对照组	实验组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>F</i> 值	<i>P</i> <sub>1</sub> 值	<i>q</i> 值	<i>P</i> <sub>2</sub> 值
0	0.638 ± 0.109	0.662 ± 0.113	2.91	0.13				
15	0.647 ± 0.124	1.326 ± 0.126	8.25	0.005 7 <sup>*</sup>			5.13	0.004 7 <sup>***</sup>
30	0.652 ± 0.129	1.825 ± 0.098	7.47	0.000 5 <sup>*</sup>	6.19	0.007 3 <sup>**</sup>	5.28	0.003 4 <sup>***</sup>
60	0.657 ± 0.114	2.156 ± 0.122	9.24	0.000 2 <sup>*</sup>			5.37	0.002 3 <sup>***</sup>
120	0.668 ± 0.126	2.287 ± 0.127	9.58	0.000 1 <sup>*</sup>			5.59	0.002 0 <sup>***</sup>

注 \*  $P < 0.05$ , vs 对照组; \*\*  $P_1 < 0.05$ , 实验组各组组长间相比; \*\*\*  $P_2 < 0.05$ , 实验组不同时间组两两比较。

## 2.2 光镜下 MG63 细胞的形态改变

倒置相差显微镜下可见, 接种的 MG63 细胞在培养 24 h 后活细胞贴壁生长, 呈梭形、三角形或多边形, 折光性强, 胞核呈满圆形, 位于中央 (图 1a, 1b)。X/XO 处理组 MG63 细胞形态发生明显改变,

细胞伪足回缩, 变圆, 细胞间隙增大, 并逐渐脱壁, 漂浮于培养基中。这些改变随处理浓度加大更加明显, X/XO + 羟嘌呤醇联合处理组细胞形态与对照组相比无明显改变 (图 1c ~ 1f)。



### 2.3 MG63 细胞增殖活力的改变

实验三以不同浓度 X/XO 处理细胞 24 h 后各组的 OD 值见表 3。单因素方差分析结果显示, X/XO 单独处理各组 OD 值比对照组明显降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。组间两两比较显示, 各处理组间 OD 值有明显差异, 高浓度组 OD 值比低浓度组 OD 值低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。X/XO + 羟嘌呤

联合处理细胞 OD 值较相同浓度 X/XO 单独处理组明显提高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。提示 X/XO 刺激 MG63 细胞 24 h 后, 细胞增殖活力明显降低, 高浓度组较低浓度组细胞增殖活力降低更明显, 50 mmol/L 羟嘌呤抑制了高浓度 X/XO 引起的 MG63 细胞毒性。

表 3 不同浓度 X/XO 处理 MG63 细胞 24 h 后 MTT 实验 OD 值

Table 3 OD value after exposure to different concentrations of X/XO for 24 h in MTT assay ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	OD 值	F 值	P 值	q 值	P <sub>1</sub> 值	P <sub>2</sub> 值
对照组	1.0832 ± 0.126					
低浓度组	0.5632 ± 0.052			5.77	0.0000**	
中浓度组	0.4280 ± 0.062	5.74	0.002*	5.97	0.0000**	
高浓度组	0.2064 ± 0.051			6.47	0.0000**	
X/XO + 羟嘌呤醇	0.9872 ± 0.116					0.0000*

注 \* $P < 0.05$ , 各组相比; \*\* $P_1 < 0.05$ , 组间两两比较; # $P_2 < 0.05$  vs 高浓度组。

实验四用 X/XO 中浓度处理细胞时, 0 ~ 24 h 内每隔 6 h 的 OD 值见表 4。单因素方差分析结果显示: 各处理组 OD 值比相同时间对照组明显降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。对照组内各时间的 OD 值两两比较, 随着时间的延长, OD 值逐渐增大, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 处理组内各时间组

间两两比较发现, 随着处理时间的延长, OD 值明显降低, 各组间差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。处理 24 h 的 OD 值为相同时间对照组的 22.9%, 为各组中最低。结果提示 X/XO 中浓度处理细胞时, 细胞增殖活力从 0 ~ 24 h 逐渐降低, 对照组增殖活力随培养时间延长而逐渐增加。

表 4 X/XO 中浓度处理 MG63 细胞 0 ~ 24 h 后的 OD 值变化

Table 4 OD value in MTT assay after exposure to 50 μM xanthine and 50U/L XO during 0 ~ 24 h ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

时间 (h)	对照组	实验组	t 值	P 值	F 值	P <sub>1</sub> 值	q 值	P <sub>2</sub> 值
0	1.0801 ± 0.072	1.0763 ± 0.086	1.22	0.831 6				
6	1.1272 ± 0.068	0.9843 ± 0.059	3.66	0.015 5*			3.77	0.015 5***
12	1.1631 ± 0.1004	0.7831 ± 0.098	7.97	0.000 1*	5.87	0.0073**	6.07	0.000 1***
18	1.2246 ± 0.1137	0.5280 ± 0.062	9.62	0.000 0*			6.00	0.000 0***
24	1.4238 ± 0.1208	0.3257 ± 0.071	9.67	0.000 0*			6.10	0.000 0***

注 \* $P < 0.05$ , vs 对照组; \*\* $P_1 < 0.05$ , 实验组各组组间相比; \*\*\* $P_2 < 0.05$ , 实验组不同时间组两两比较。

### 3 讨论

氧化应激作为疾病的一个危险因素已越来越受到重视。对细胞施加一定的刺激因素使细胞内 ROS 大量产生, 建立细胞氧化应激模型是体外研究氧化应激损伤机制、筛选抗氧化药物的常用方法。ROS 在体外产生的方法包括酶促反应和非酶促反应, 其理论基础与机体内 ROS 的产生过程相同。最常用的方法包括一定浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 X/XO 的酶促反应产生大量活性氧刺激细胞产生氧化应激<sup>[5-8]</sup>。与 X/XO 相比, 过氧化氢虽价格便宜, 但因效价不稳定, 封闭不好及存放时间过长, 其浓度改变明显, 所以在应用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立氧化损伤模型时, 浓

度差异较大。而黄嘌呤氧化酶可催化次黄嘌呤氧化为黄嘌呤, 再氧化为尿酸, 以分子氧为电子受体, 使分子氧单电子还原生成 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>, 这也是细胞内源性 ROS 的生成途径之一<sup>[9]</sup>, 能更好的模拟出机体氧化应激状态。本研究利用 X/XO 造模, 建立成骨样细胞氧化应激模型, 在体外刺激 MG63 细胞产生氧化应激。2'7'-二氯荧光黄双乙酸盐是一种氧化敏感性荧光探针, 本身并不发出荧光。它能够穿过细胞膜进入细胞内, 被酯酶水解后生成 2'7'-DCFH。DCFH 被细胞内的活性氧化后转化为发出强烈荧光的 2'7'-二氯荧光素, 用流式细胞仪检测荧光强度可间接测得细胞内 ROS 生成的量, 即细

胞氧化应激的程度。

成骨细胞是参与骨改建的重要细胞,成骨细胞的功能状态是影响牙周组织健康的重要因素。Mody等<sup>[10]</sup>研究发现,氧化应激抑制骨髓基质细胞系和成骨细胞前体细胞系的分化。氧化应激抑制这些细胞系的矿化作用。Rao等<sup>[11]</sup>通过对33名绝经后妇女的临床横断面研究发现,血浆抗氧化剂(维生素E、 $\beta$ 胡萝卜素、类胡萝卜素和番茄红素等)浓度高的受试者血浆脂质过氧化程度低,骨吸收程度也低。本课题组研究金属铬离子对成骨细胞活性影响时发现, $\text{Cr}^{6+}$ 对人成骨样细胞MG63具有明显的细胞毒性,其毒性机制与刺激细胞内ROS生成,引起成骨样细胞氧化应激有关<sup>[12-13]</sup>。但氧化应激如何参与骨吸收过程,具体机制尚不清楚。因此在体外建立成骨细胞氧化应激模型,研究氧化应激对成骨细胞活性的影响很有必要。本研究发现,用X/XO建立的氧化应激模型,在用X/XO处理相同时间后,随着X/XO浓度的增加,成骨样细胞内ROS平均荧光强度增高,即细胞内产生更多的ROS,同时,用相同浓度的X/XO处理细胞,随着处理时间的增加,成骨样细胞内ROS平均荧光强度增高,且前30 min增加迅速,后30 min增加速度减慢,说明X/XO引起了成骨样细胞氧化损伤,且这种损伤与其浓度和作用时间有关。

牙周炎是牙周病原菌与宿主之间复杂的相互作用而形成的慢性感染性疾病。宿主防御机制在抵抗致病微生物入侵时,中性多形核白细胞是首要的防御细胞。在牙周炎症时,牙周上皮及其下方结缔组织中中性多形核白细胞大量浸润,并逐渐渗透至龈沟液中,中性多形核白细胞通过呼吸爆发产生大量ROS以清除细菌、真菌、病毒等异物;而ROS的不断增加,超出了机体抗氧化防御系统的清除能力,减弱了机体正常的防卫机能,导致机体氧化与抗氧化能力失衡,随之氧化应激发生。Sheikhi等<sup>[14]</sup>在体外应用福赛类杆菌刺激细胞,检测了细胞内ROS的生成以及脂质过氧化程度,发现福赛类杆菌刺激产生呼吸爆发,生成大量ROS,抗氧化维生素可以剂量依赖性抑制ROS的产生和脂质损害。Brock等<sup>[15]</sup>通过临床研究牙周健康者和牙周炎患者龈沟液、唾液、外周血浆、血清的总抗氧化能力的差异发现:牙周炎患者的龈沟液总抗氧化能力显著低于健康人群。本实验利用X/XO刺激人成骨样细胞,也检测出人成骨样细胞产生了大量的ROS,与以上研究报道一致。

除了病原体的刺激外,学者们也开始关注各种修复材料对牙周健康的影响与氧化应激之间的关系。Spagnuolo等<sup>[16]</sup>研究光固化型牙科粘接材料发现,固化后的残余单体在体外明显抑制了上皮细胞ECV304的增殖活性,细胞内ROS的量明显增加,与细胞增殖活性呈负相关。Walther等<sup>[17]</sup>的研究发现,两种树脂单体HEMA和TEGDMA在体外抑制了鼠牙槽上皮细胞L2、人牙周韧带细胞A549和人成纤维样细胞11Lu的增殖活性,抗氧化维生素可以拮抗树脂单体引发的细胞毒性。Hajime等<sup>[18]</sup>研究发现,树脂增强型玻璃离子材料(RMGI)对猫牙髓细胞有明显的细胞毒性,抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸可以抑制材料的细胞毒性,增加成牙本质细胞相关基因和蛋白表达,恢复牙髓细胞的矿化能力。这种作用与NAC增加细胞内的谷胱甘肽水平,减少细胞内ROS的生成有关。说明修复材料对牙周健康的影响与氧化应激关系密切,抗氧化治疗可以有效对抗修复材料引起的牙周疾病。本文应用X/XO的抑制剂羟嘌呤醇,发现它可以有效逆转X/XO对人成骨样细胞的氧化损伤,从侧面印证了氧化应激对牙周健康的影响。

ROS聚集或增加可破坏蛋白质、脂质等,导致细胞形态功能的改变<sup>[19-21]</sup>。ROS所致的氧化应激与影响成骨细胞的自噬、凋亡、增殖与分化有关<sup>[22]</sup>。本研究发现,加入X/XO后,MG63细胞伪足回缩,变圆,细胞间隙增大,并逐渐脱壁,这种形态上的变化是细胞氧化损伤的标志之一。且随着X/XO浓度的增加、处理时间的增加,细胞增殖活力越低,而加入X/XO抑制剂羟嘌呤醇能保护细胞形态和增殖能力不受破坏,说明人成骨样细胞的这种形态和增殖能力损伤与ROS的增加有关。

综上所述,本实验采用X/XO的酶促反应在体外刺激MG63细胞成功建立了人成骨样细胞氧化应激模型,模型细胞内ROS大量产生,破坏人成骨样细胞形态,抑制人成骨样细胞增殖活力,而X/XO的抑制剂能有效逆转这种氧化损伤。该研究为牙周炎、种植体周围炎等慢性骨吸收相关疾病的研究和防治奠定了基础,但其具体机制还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Zhang G, Skorokhod OA, Khoo SK, et al. Plasma advanced oxidative protein products are associated with anti-oxidative stress pathway genes and malaria in a longitudinal cohort[J]. *Malar J*, 2014, 13(1): 1-10.

- [2] Akanbi OM. Effect of age on prevalence of malaria and oxidative stress in children[J]. *Br Microbiol Res J*, 2015, 8(1): 379-385.
- [3] Muniz FWMG, Nogueira SB, Rösing CK, et al. The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: A systematic review[J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(9): 1203-1214.
- [4] Tomofuji T, Ekuni D, Morita M. Studies on periodontal disease [M]. New York: Springer New York, 2014: 147-156.
- [5] Ghorbanihaghjo A, Argani H, Rashtchizadeh N, et al. The effect of tuberculosis on serum receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and total antioxidant capacity[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2015, 30(4): 1-5.
- [6] Qu M, Nan X, Gao Z, et al. Protective effects of lycopene against methylmercury - induced neurotoxicity in cultured rat cerebellar granule neurons[J]. *Brain Res*, 2013, 1540(17): 92-102.
- [7] Parahuleva MS, Jung J, Burgazli M, et al. Vitamin C suppresses lipopolysaccharide - induced procoagulant response of human monocyte - derived macrophages[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(10): 2174-2182.
- [8] Boudiaf K, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, et al. Thymoquinone strongly inhibits fMLF-induced neutrophil functions and exhibits anti-inflammatory properties in vivo[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 15(104): 62-73.
- [9] 景亚武, 易静, 高飞, 等. 活性氧: 从毒性分子到信号分子——活性氧与细胞的增殖、分化和凋亡及其信号转导途径[J]. *中国细胞生物学学报*, 2003, 25(4): 197-202.
- [10] Mody N, Parhami F, Sarafian TA, et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(4): 509-519.
- [11] Rao LG, Mackinnon ES, Josse RG, et al. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women[J]. *Osteoporos Int*, 2007, 18(1): 109-115.
- [12] 付俊, 张理红, 田艾, 等. 铬离子对成人成骨样细胞 MG63 增殖活性的影响及拮抗研究[J]. *广东牙病防治*, 2014, 22(8): 400-405.
- [13] Fu J, Liang X, Chen Y, et al. Oxidative stress as a component of chromium-induced cytotoxicity in rat calvarial osteoblasts[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2008, 24(3): 201-212.
- [14] Sheikhi M, Bouhafs RK, Hammarström KJ, et al. Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from *Fusobacterium* - stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis [J]. *Oral Dis*, 2001, 7(1): 41-46.
- [15] Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, et al. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health[J]. *J Clin Periodontol*, 2004, 31(7): 515-521.
- [16] Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S. Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights [J]. *Clin Oral Invest*, 2004, 8: 81-85.
- [17] Walther UI, Siagian II, Walther SC, et al. Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines [J]. *Arch. Oral Biol*, 2004, 49(2): 125-131.
- [18] Hajime M, Masahiro Y, Fuminori I, et al. Amino acid derivative-mediated detoxification and functionalization of dual cure dental restorative material for dental pulp cell mineralization[J]. *Biomater*, 2010, 31(28): 7213-7225.
- [19] Akhtar MJ, Ahamed M, Alhadlaq HA, et al. Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in ROS associated degenerative disorders[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1861(4): 802-813.
- [20] Okamoto T, Taguchi M, Osaki T, et al. Phosphate enhances reactive oxygen species production and suppresses osteoblastic differentiation[J]. *J Bone Miner Metab*, 2014, 32(4): 393-399.
- [21] Savion N, Izigov N, Morein M, et al. S-Allylmercapto-N-acetylcysteine (ASSNAC) protects cultured nerve cells from oxidative stress and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 583(10): 108-113.
- [22] 王小菊, 冯正平. 氧化应激对成骨细胞功能的影响[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2015, 8(2): 168-173.

(编辑 罗燕鸿, 曾曙光)