

· 论 著 ·

葡萄糖对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响

邓丽萍*, 黄晓青, 乐有为, 龙爱梅, 罗明娟, 胡园园, 黄妙玲

摘要:目的 体外观察葡萄糖对间充质干细胞(BMSCs)向成骨细胞(OB)分化的影响,探讨其对骨代谢的作用机制。方法 从大鼠长骨骨髓分离获取间充质干细胞,在不同糖浓度(5.6mmol/l、25mmol/l、50mmol/l)干预下向成骨细胞诱导分化培养 21d,茜素红染色、光镜计数矿化率,realtime PCR 测定 OB 的标记物碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)及转录因子 Runx2 mRNA 表达,进行不同糖浓度组干预后的变化比较。结果 显示随着糖浓度升高,矿化率显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 5.6mmol/l 组比较,50mmol/l 组的 ALP、BGP 及 Runx2 mRNA 表达减少,分别为 73% ($P<0.05$)、69% ($P<0.05$) 及 70% ($P<0.05$)。25mmol/l 组的 ALP、BGP 及 Runx2 mRNA 表达下降也具有显著性($P<0.05$)。结论 高糖抑制 BMSCs 向 OB 分化,可能为糖尿病性骨质疏松形成的重要机制之一。

关键词: BMSCs; 葡萄糖; 成骨细胞; 分化。

中图分类号 R587.2 文献标识码 A 文章编号 1009-9727(2013)3-279-03

Effects of glucose on the differentiation of rat BMSC into osteoblastic lineages. DENG Li-ping HUANG Xiao-qing, Yue You-wei et al. (Department of Endocrinology Longgang Central Hospital, Shenzhen 518116, Guangdong P. R. China. Corresponding author: HUANG Xiao-qing E-mail: xy_yellow@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate the effects of glucose on the differentiation of rat bone-marrow stromal cells (BMSCs) (mesenchymal stem cell) into osteoblastic lineages in the presence of an osteogenic medium. Methods The calcium tubercle formation would be examined by staining of mineralized nodules with Alizarin red S. And the activity of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin and Runx2 between interblocks was examined by realtime PCR. Results Twenty-one days after induction the number of osteoblasts decreased in higher concentration glucose as detected by Alizarin red S, the mRNA expression of ALP, BGP and Runx2 decreased to 73% ($P<0.05$), 69% ($P<0.05$) and 70% ($P<0.05$), in 50mmol/l glucose than in 5.6mmol/l glucose. The differentiation of osteoblasts decreased in a dose-dependent manner with pioglitazone than without pioglitazone in triconcentration of glucose. Conclusions High concentration glucose inhibited the differentiation of BMSCs into osteoblasts, this observation provide a potential mechanisms of diabetes-induced osteoporosis.

Key words: BMSCs; Glucose; Osteoblast; Differentiation

骨髓间充质干细胞 (bonemarrowstromal cells, BMSCs) 是多能干细胞的一种,它具有多向分化潜能,主要存在于骨髓中。与非糖尿病患者相比,糖尿病患者发生骨质疏松的比例明显升高^[1]。有研究显示,血糖高会影响骨髓间充质干细胞的增殖和分化,导致骨量减少和骨质疏松症,目前其作用机制尚不清楚。本文从细胞水平观察葡萄糖对 BMSCs 向 OB 分化的影响,旨在探讨葡萄糖对 MSCs 向 OB 分化的影响及作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料 L-DMEM(GIBCO)、胰蛋白酶、胎牛血清(GIBCO)、B-磷酸甘油钠、地塞米松、茜素红、维生素 C、二甲基亚砷等 (SIGMA 公司)。基本培养基 (100u/ml 青霉素,10%FBS,100ug/ml 链霉素 L-DMEM)。骨诱导培养基 (基本培养基中加入 10mmol/LB-甘油

磷酸钠,0.1umol/l 地塞米松,50umol/l 维生素 C)。realtime PCR 试剂盒 (大连宝生物公司),雄性 Waster 大鼠 (120 克左右) 由同济医学院动物中心提供,引物序列由上海英骏 invitrogen 生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 分离和原代培养 在无菌环境中取出 Waster 大鼠股骨和胫骨中骨髓细胞,贴壁法分离并纯化其中的 BMSCs,接种于 50mL 含基本培养基的培养瓶中,置于饱和湿度,37℃,5% CO₂ 培养箱 24h 后首次换基本培养基,以后每 2d 换基本培养基一次。(换 4 次)

1.2.2 传代培养 (定向诱导 MSCs 成骨分化并加入干预剂) 取骨髓细胞第 2 代细胞,以 104/孔密度分别接种于有盖玻片的 6 孔板中 (细胞将行茜素红染色) 及未置盖玻片的 6 孔板中 (细胞将提取 RNA 行

作者单位 深圳市龙岗中心医院 内分泌科 广东 深圳 518116

作者简介 邓丽萍 (1980-) 女 汉族 硕士 主治医师 研究方向 糖尿病与骨代谢。

* 通讯作者 E-mail: xy_yellow@yahoo.com.cn

realtime PCR)。细胞生长至 90%汇合时换成骨诱导培养基,根据糖浓度分为三组 5.6mmol/L 组、25mmol/L 组、50mmol/L 组。重复该实验三次。

1.3 观察指标

1.3.1 成骨相关基因 BGP、ALP 与 Runx2 mRNA 表达 各组经 3 周诱导分化培养后,用 Trizol 溶液按一步法分别提取总 RNA,按试剂盒说明将 mRNA 逆转录成 cDNA 分子,应用 SYBR Green 荧光染料技术进行实时定量 PCR 反应分析 BGP、ALP 与 Runx2 的表达,以每个反应管内荧光强度达到系统认可的有目的 DNA 合成时的循环数作为 CT 值,每个基因的相对含量以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示。然后计算各组目的基因 Ct 值和相应 GAPDH Ct 值的差值(ΔCt),计算公式:待测样品相对值 = $2^{-(\Delta Ct \beta - \text{actin} - \Delta Ct \text{待测样品})}$ 。

GBP 正义链 5'-CAGGAGGGCAGTAAGGTGGTG-3' 反义链 5'-GGCGTCCTGGAAGCCAATGTG-3' ALP 正义链 5'-TATGGCTCACCTGCTTCACGG-3', 反义链: 5'-GCTGTCCATTGTGGGCTCTTG-3' Runx2 正义链 5'-CCATAACGGTCTTCACAAATCCTC-3' 反义链 5'-ACTTGGTGCTGAGTTCAGGGAG-3' GAPDH 内参正义链 5'-GATGGTGAAGGTGGTGTG-3' 反义链 5'-GAGGTCAATGAAGGGGTGCG-3'

1.3.2 矿化率 各组诱导干预培养 21d 后,将盖玻片放置在 10%中性甲醛中固定 10min,蒸馏水冲洗 3 次后即用 0.1%茜素红-Tris-HCL 染液 37℃下染色 30 分钟(PH8.3),然后蒸馏水冲洗,将盖玻片干燥,光镜下观察计数。

1.3.3 统计学处理 结果应用 SPSS-13.0 统计软件包进行数据分析,以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较应用方差分析。

2 结果

2.1 糖对矿化率的影响比较 盖玻片上红色矿化结节为阳性结果。图 1。随糖浓度增加,矿化率下降。5.6mmol/L 组、25mmol/L 组与 50mmol/L 组的矿化率分别为 28.19%、22.03%与 12.62%。组间比较差异具有显著性($P<0.05$)。

2.2 糖对成骨相关基因 ALP、BGP 与 Runx2 mRNA 表达的影响比较 结果显示:与 5.6mmol/L 组相比,25mmol/L 组的 ALP、BGP 及 Runx2 mRNA 的表达分别减少至 79% (0.078 ± 0.006 vs 0.098 ± 0.007) ($P<0.05$)、88% (0.099 ± 0.009 vs 0.112 ± 0.005) ($P<0.05$) 及 85% (0.099 ± 0.006 vs 0.117 ± 0.008) ($P<0.05$) 50mmol/L 组分别减少至 73% (0.072 ± 0.004 vs 0.098 ± 0.007)

($P<0.05$)、69% (0.078 ± 0.006 vs 0.112 ± 0.005) ($P<0.05$) 及 70% (0.082 ± 0.007 vs 0.117 ± 0.008) ($P<0.05$)。见图 2。

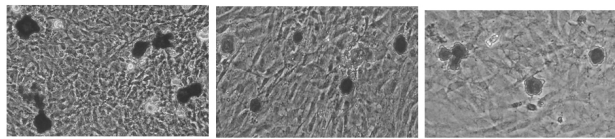
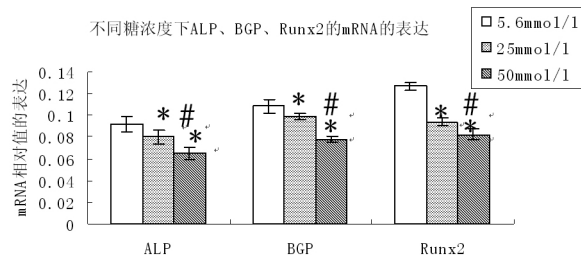


图 1 显微镜 ×200, 各组 21d 后茜素红染色结果比较: I 5.6mmol/L 糖浓度; II 25mmol/L 糖浓度; III 50mmol/L 糖浓度。结果显示 随糖浓度升高 形成的红色结节数目显著减少($P<0.05$)。
Fig 1 inverted phase contrast microscope X 200 bone formation induced by 21 days after staining with alizarin red red calcium nodule formation comparison: I 5.6mmol/L II 25mmol/L sugar sugar concentration; concentration; III 50mmol/L sugar concentration. The results show that: with the sugar concentration, forming a red nodule number decreased significantly ($P<0.05$).



Different concentrations of glucose the mRNA expression Of ALP, BGP and Runx2

图 2 * $P<0.05$ 表示 25mmol/L 糖浓度组和 50mmol/L 糖浓度组与 5.6mmol/L 糖浓度组相比,差异具有显著性。# $P<0.05$ 表示 50mmol/L 糖浓度组与 25mmol/L 糖浓度组相比,差异具有显著性。
* $P<0.05$ 25mmol/L sugar concentration and 50mmol/L concentration and 5.6mmol/L concentration compared to the group the difference was significant # $P<0.05$ 50mmol/L sugar concentration and 25mmol/L concentration compared to the group the difference was significant.

3 讨论

研究表明, BMSCs 是在特定转录因子的调控下向不同的方向分化,如过氧化物酶体增殖子活化受体 2 (Peroxisomeproliferator-activated receptor 2, PPAR2) 决定向脂肪细胞系的分化,而 Runx2 决定向成骨细胞(osteoblast, OB)系分化。脂肪细胞和 OB 均来源于 BMSCs,在一定条件下两者可相互转化^[2]。OB 分化过程分为 3 个阶段:第一阶段细胞增殖、第二阶段骨基质成熟、第三阶段骨基质矿化阶段^[3]。而在第一阶段细胞增殖阶段,细胞合成的大量胶原为第二阶段骨基质成熟与第三阶段骨基质矿化提供基质网架。在骨基质成熟期阶段,基质成熟时 ALP 的活性最高。在骨基质矿化阶段, BGP 基质的表达明显增加。在骨基质矿化

阶段中。Runx2 具有核心作用,因 Runx2 能激活与启动 MSCs 向 OB 系分化并能调节 OB 的成熟,因此 Runx2 作为 OB 特异性转录因子和 OB 分化的关键因子。ALP、BGP 及矿化结节的形成是 OB 的表型特征,Runx2 是 OB 特异性转录因子,这为我们进行细胞鉴定提供了依据。

本文选用三种不同的糖浓度(5.6mmol/l、25mmol/l、50mmol/l),分别代表正常糖浓度、高糖浓度及严重高血糖浓度。相关实验结果显示,随着实验组糖浓度的逐渐升高,OB 标记物 BGP、ALP 及 OB 特异性转录因子 Runx2 的 mRNA 表达均降低,即高血糖抑制 BMSCs 向 OB 分化,这与 Stolzing 等人的结果^[4]相一致。Stolzing 等发现高浓度糖可导致 BMSCs 的过早衰老、凋亡及死亡,抑制增殖。长期高血糖,导致过多的糖基化终末产物的形成。糖基化终末产物可影响蛋白质的理化性质,引起成骨作用降低,同时其还可刺激破骨细胞骨吸收因子 IL26、TNF2 α 的形成,导致骨吸收增加,引起骨量丢失^[5]。高血糖严重损伤了细胞对胰岛素样生长因子 -I (Insulin-like Growth Factor-I, IGF-I) 的应答性^[6,7],胰岛素样生长因子 -I 能明显增加前成骨细胞的形成、并能刺激 OB 的分化、增加骨胶原的合成和基质的沉积、诱导 OB 增殖。通过目前这些相关研究可以推测,机体高血糖状态可通过促进细胞内氧自由基的释放并激活线粒体的程序性凋亡,促使细胞 DNA 合成水平的下降,诱导细胞凋亡明显增加、增殖减少使后期参与分化的细胞减少,使

BMSCs 向 OB 分化减少,从而使 OB 的数量减少。

因此,控制血糖至理想水平,减少高糖毒性,有利于糖尿病患者减少骨量丢失,减少骨质疏松的发生。

参考文献:

- [1] Ren Hong, He Hongzhe, Zhao Rui et al. Diabetic osteoporosis in patients with silent killer[J]. Diabetes new world, 2005, 06: 24225. (任洪, 何红哲, 赵芮, 等. 糖尿病骨质疏松患者的无声杀手[J]. 糖尿病新世界, 2005, 06: 24225.)
- [2] Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE et al. Playing with bone and fat[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(2): 251-66.
- [3] Lian JB and Stein GS. 1992. Transcriptional control of vitamin D-regulated proteins[J]. J Cell Biochem, 49: 37-45.
- [4] Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells [J]. Rejuvenation research, 2006, 9(1): 31-35.
- [5] Yamamoto M. et al. Diabetes mellitus and osteoporosis. Predictive candidate markers for fracture risk in diabetic patients [J]. Clin Calcium. 2012 Sep; 22(9): 1359-65. doi: 10.1007/s12013-012-0365-1.
- [6] Gopalakrishnan V, Vignesh RC, Arunakaran J et al. Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages[J]. Biochem Cell Biol. 2006 Feb; 84(1): 93-101.
- [7] Cheng H, Zhang YC, Wolfe S et al. Combinatorial treatment of bone marrow stem cells and stromal cell-derived factor 1 improves glycemia and insulin production in diabetic mice [J]. Mol Cell Endocrinol. 2011 Oct 15; 345 (1-2): 88-96. doi: 10.1016/j.mce.2011.07.024. Epub 2011 Jul 27.

收稿日期: 2012-12-06 编辑: 崔宜庆

(上接第 272 页)

版) 2009, 29(8): 1085-1103.)

- [4] Pao W, Cai B, Yang YX et al. Relationship between ERK1/2 signal transduction pathway and estrogen receptor and progesterone receptor in endometrial carcinoma[J]. J Shanghai Jiaotong University (Med Sci), 2009, 29(1): 5-8. (In Chinese) (鲍伟, 蔡斌, 杨懿霞, 等. 子宫内膜癌中 ERK1/2 信号转导通路与雌、孕激素受体的相关性 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2009, 29(1): 5-8.)
- [5] Wei SQ, Sui LH, Wei LH. Progress in research on protein kinase pathway in gynecological tumor mitogen-activated [J]. J Internat Obstetrics Gynecol, 2004, 31(1): 51-53. (In Chinese) (韦淑琴, 隋丽华, 魏丽惠. 丝裂原活化蛋白激酶通路在妇科肿瘤中的研究进展 [J]. 国外医学妇产科学分册, 2004, 31(1): 51-53.)
- [6] Liu G, Yu WW. EBV, Ki67, ERK1 expression in breast cancer and their correlation [J]. Pract Clin Med, 2008, 9 (3): 129-133. (In Chinese) (刘刚, 俞微微. EBV、Ki67、ERK1 在乳腺癌中的表达及其相关性

[J]. 实用临床医学, 2008, 9(3): 129-133)

- [7] Maemura K, Shiraishi N, Sakagami K et al. Proliferative effects of gamma aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation [J]. Gastroenterol Hepatol, 2009, 24: 688-696.
- [8] Zha Y, Gajewski TF. An adenoviral vector encoding dominant negative Cbl lowers the threshold for T cell activation in post-thymic T cells[J]. Cell Immunol, 2007, 247: 95-102.
- [9] Katsuji Yoshioka. Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades[J]. J Biochem, 2004, 135(6): 657-661.
- [10] Zhang WJ, Li RS. Mitogen Activated Protein Kinase Pathway and its Research Progress [J]. Med Review, 2007, 13 (9): 663-665. (In Chinese) (张文军, 李荣山. p38 丝裂原活化蛋白激酶通路及其研究进展 [J]. 医学综述, 2007, 13(9): 663-665.)

收稿日期: 2012-12-18 编辑: 吴中菲