

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2017.01.005

· 基础研究 ·

高糖对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

高海¹, 陈潇¹, 管东华¹, 张颖婕², 林常绿¹

1. 南方医科大学口腔医院·广东省口腔医院修复科, 广东 广州(510280); 2. 南方医科大学口腔医院·广东省口腔医院正畸科, 广东 广州(510280)

【摘要】 **目的** 探讨不同葡萄糖浓度培养环境对人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSC)增殖和成骨分化的影响。**方法** 用含不同葡萄糖浓度的基础培养基培养, 在1、4、7、10 d进行CCK-8细胞增殖检测; 用含不同葡萄糖浓度的成骨诱导分化培养基培养细胞7 d, 观察hBMSC分化情况; 实时荧光定量PCR法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OC)、I型胶原蛋白(collagen type I, Col-1)基因表达水平; 在7 d进行钙茜素红染色显示矿化结节形成。**结果** 10 mM葡萄糖有助于hBMSC细胞增殖, 高浓度葡萄糖(> 30 mM)能够抑制hBMSC增殖($P < 0.05$); 成骨诱导液能诱导hBMSC成骨分化, 但葡萄糖浓度升高会减少hBMSC的矿化结节形成、抑制成骨标志基因ALP、OC和Col-1表达($P < 0.05$)。**结论** 在高糖环境培养下, 抑制hBMSC增殖、下调成骨标志基因Col-1、ALP、OC的表达, 同时高糖可以减弱干细胞的成骨矿化能力, 间接影响骨形成和代谢。

【关键词】 糖尿病; 骨结合; 种植体; 成骨分化; 人骨髓间充质干细胞

【中图分类号】 R783.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)01-26-05

【引用著录格式】 高海, 陈潇, 管东华, 等. 高糖对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(1): 26-30.

Effects of high glucose on osteogenic differentiation of hBMSC GAO Hai¹, CHEN Xiao¹, GUAN Dong-hua¹, ZHANG Ying-jie², LIN Chang-lü. 1. Department of Prosthodontics, Stomatological Hospital of Southern Medical University & Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510000, China; 2. Department of Orthodontics, Stomatological Hospital of Southern Medical University & Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: GAO Hai, Email: drgaohai@aliyun.com, Tel: 0086-20-84427049

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of different glucose concentration on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSC) *in vivo*. **Methods** Cultured with basal medium containing different glucose concentrations, CCK-8 cell proliferation was detected at 1, 4, 7, 10 days. The osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells was observed at 7 d, which was induced by osteogenic differentiation medium with different concentration of glucose. The expressions of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC) and collagen type I (Col-1) gene were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Mineralized nodule formation was displayed by calcein staining on the seventh day. **Results** 10 mM glucose stimulated proliferation of hBMSC, while the higher (> 30 mM) inhibited the proliferation ($P < 0.05$); Osteogenic induction can induce osteogenic differentiation of hBMSC, but the increase of glucose concentration will decrease the formation of mineralized nodules of hBMSC, inhibit the expression of osteogenic marker genes ALP, OC and Col-1 ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Col-1, ALP and OC in osteoblast was down-regulated by high glucose, and the hBMSC proliferation was inhibited. At the same time, high glucose can reduce the osteogenic mineralization ability of stem cells and indirectly affect bone formation and metabolism.

【Key words】 Diabetes mellitus; Osteointegration; Dental implants; Osteogenic differentiation; hBMSC

【收稿日期】 2016-07-30; **【修回日期】** 2016-09-01

【基金项目】 广东省科技计划项目(2010B031600255)

【通讯作者】 高海, 主任医师, 硕士, Email: drgaohai@aliyun.com

牙列缺损与牙列缺失是常见口腔疾病,随着口腔种植技术以及口腔生物材料的不断发展和改进,种植已经成为牙列缺损与缺失行之有效的修复手段。随着口腔种植的日益普及,糖尿病患者的种植失败率较正常缺牙患者明显偏高,在一定程度上限制了口腔种植修复治疗的实施^[1]。此外,糖尿病患者缺牙区可能伴有更严重的牙槽骨缺损和糖尿病性骨质疏松,良好的牙周环境也有助于糖尿病病情的控制^[2]。我国作为糖尿病高发国家^[3],提高糖尿病牙列缺损、牙列缺失患者的种植修复成功率、改进骨替代材料的相关研究,已成为目前口腔种植领域的研究热点^[4]。本研究通过细胞增殖检测、实时荧光定量PCR法(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)研究高糖对人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSC)成骨分化的影响,有助于进一步研究葡萄糖对hBMSC分化调控机制,为糖尿病患者种植体周围炎的预防和治疗提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

D-(+)-葡萄糖(Sigma, 美国), hBMSC (Cyagen Biosciences Inc, 美国)、hBMSC完全培养基(基础葡萄糖浓度约5.5 mM)、hBMSC成骨诱导分化培养基(含hBMSC成骨诱导分化基础培养基175 mL, hBMSC培养专用胎牛血清20 mL, 谷氨酰胺2 mL, 青霉素或链霉素2 mL, 抗坏血酸400 μ L, β -甘油磷酸钠2 mL, 地塞米松20 μ L)(Cyagen Biosciences Inc, 美国), 高速冷冻离心机(Hitachi, 日本), 酶标仪(Fluostar Optima, 美国), Nano Drop 2000分光光度计(Thermo, 美国), 倒置相差显微镜(Zeiss, 德国), StepOne型荧光定量PCR仪(ABI, 美国)。

1.2 实验分组

根据文献选取4种培养基糖浓度^[5-7], 模拟体外高糖培养环境: ①A组, 对照组, 用hBMSC完全培养基培养; ②B组, 为成骨诱导组, 用hBMSC成骨诱导分化培养基培养; ③C组, 用含10 mM葡萄糖的(只加葡萄糖诱导, 非成骨诱导培养基)完全培养基培养; ④D组, 用含30 mM葡萄糖的完全培养基培养; ⑤E组, 用含50 mM葡萄糖的完全培养基培养。

1.3 CCK-8检测细胞活力

细胞以 1×10^4 个/孔(100μ L/孔)接种于16个96孔板, 贴壁12 h后弃原培养基, 更换为配制不同糖

浓度(0 mM、10 mM、30 mM、50 mM)的hBMSC完全培养基培养细胞1、4、7、10 d。在1、4、7、10 d的同一时间点进行CCK-8检测: 向每个测试孔内加入CCK-8溶液10 μ L, 继续避光孵育3 h显色, 于450 nm处测量OD值。以各自0 mM培养的细胞作为对照, SigmaPlot 10.0软件绘制生长曲线图。每次实验重复5个平行副孔, 独立重复3次。

1.4 qRT-PCR检测葡萄糖对hBMSC成骨标志性基因表达的影响

将细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板, 贴壁后按照不同分组方案继续培养细胞1、4、7、10 d。冰上用Trizol法分别提取A、B、C、D组总RNA, 检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OC)、I型胶原蛋白(collagen type I, Col-1)基因表达水平(CCK-8检测细胞活力时, 发现E组细胞大量凋亡, 无研究意义, 在之后的基因检测和矿化结节实验时只选择了A、B、C、D组进行实验), 按照Takara RR047A试剂盒说明书进行操作。

根据公式: $-\Delta\Delta CT = (\text{对照组目标基因CT值} - \text{对照组内参基因CT值}) - (\text{待测样品CT值} - \text{待测样品内参基因CT值})$, 以3次独立实验测量结果的 $\Delta\Delta CT$ 值进行统计学检验, 用A组的 $\Delta\Delta CT$ 值标准化, 以 $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$ 表示相对变化倍数, SigmaPlot 6.0绘图。

GAPDH上游引物序列: 5'-GGTTGTCTCCTGC-GACTTCA-3'; GAPDH下游引物序列: 5'-TGGTC-CAGGGTTTCTTACTCC-3'。ALP上游引物序列: 5'-AACATCAGGGACATTGACGTG-3'; ALP下游引物序列: 5'-GTATCTCGGTTTGAAGCTCT-3'。Col-1上游引物序列: 5'-AGACATCCCACCAATCACCTG-3'; Col-1下游引物序列: 5'-CGTCATCGCACAAACACCTT-3'。OC上游引物序列: 5'-CAGGCGCTACCTGTAT-CAATG-3'; OC下游引物序列: 5'-GATGTGGT-CAGCCAACTCGT-3'。

1.5 茜素红染色检测矿化结节形成

将细胞以 5×10^4 个/孔接种于24孔板, 贴壁24 h后, A、B、C、D组按分组方案更换含不同葡萄糖浓度的培养基体外培养细胞, 每72 h换液。

在第7天, 对不同葡萄糖浓度下成骨诱导的hBMSC进行茜素红染色, 观察矿化结节形成。

1.6 统计学分析

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 19.0软件进行统计学分析。qRT-PCR以 $-\Delta\Delta CT$ 值进行检

验,指标比较采用单因素方差分析(OneWay-ANOVA),经正态性检验和Levene方差齐性检验,设定正态检验和方差齐性的检验显著性水准为 $P < 0.05$ 具有统计学意义。均数间用LSD- t 检验进行两两比较,方差不齐时用近似 F 检验Welch法进行均数间比较,Dunnett's法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

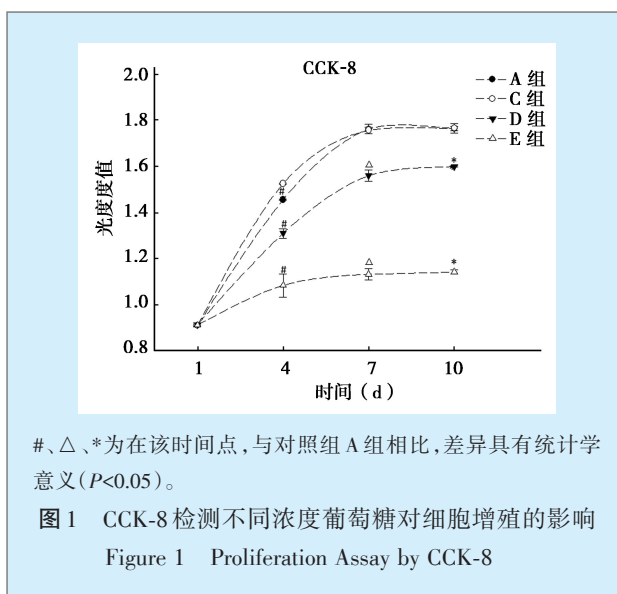
2 结果

2.1 CCK-8检测高糖培养对hBMSC增殖的影响

1、4、7、10 d,葡萄糖在一定浓度范围内,可促进hBMSC的增殖(图1)。接种后1 d,各组OD值差异无统计学意义($F = 0.31, P = 0.814$)。在第4天时,各组OD值总体差异有统计学意义($F = 155.88, P = 1.956$),10 mM葡萄糖浓度对细胞的增殖有明显的促进作用($P < 0.01$),而30 mM($P = 0.019$)和50 mM($P = 0.018$)葡萄糖对细胞生长具有抑制作用。第7、10天时,葡萄糖的促增殖作用减弱,与对照组相比,10 mM葡萄糖对细胞的增殖无明显作用($P = 0.897$),30 mM($P = 0.002$)和50 mM($P < 0.01$)葡萄糖对细胞增殖抑制明显。到第7天,可观察到E组细胞体积小且发生皱缩、细胞深染,培养基内漂浮细胞较多。

2.2 qRT-PCR检测ALP、Col-1和OC表达

第4天,各组ALP($F = 36.145, P < 0.05$)、Col-1($F = 21.953, P < 0.05$)、OC($F = 50.366, P < 0.05$)的总体表达差异具有统计学意义;第7天,各组ALP($F = 89.771, P < 0.05$)、Col-1($F = 53.048, P < 0.05$)、OC($F = 49.202, P < 0.05$)的总体表达差异具有统计学意义;第10天,各组ALP($F = 146.353, P < 0.05$)、Col-1($F = 33.338, P < 0.05$)、OC($F =$



#、Δ、*为在该时间点,与对照组A组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

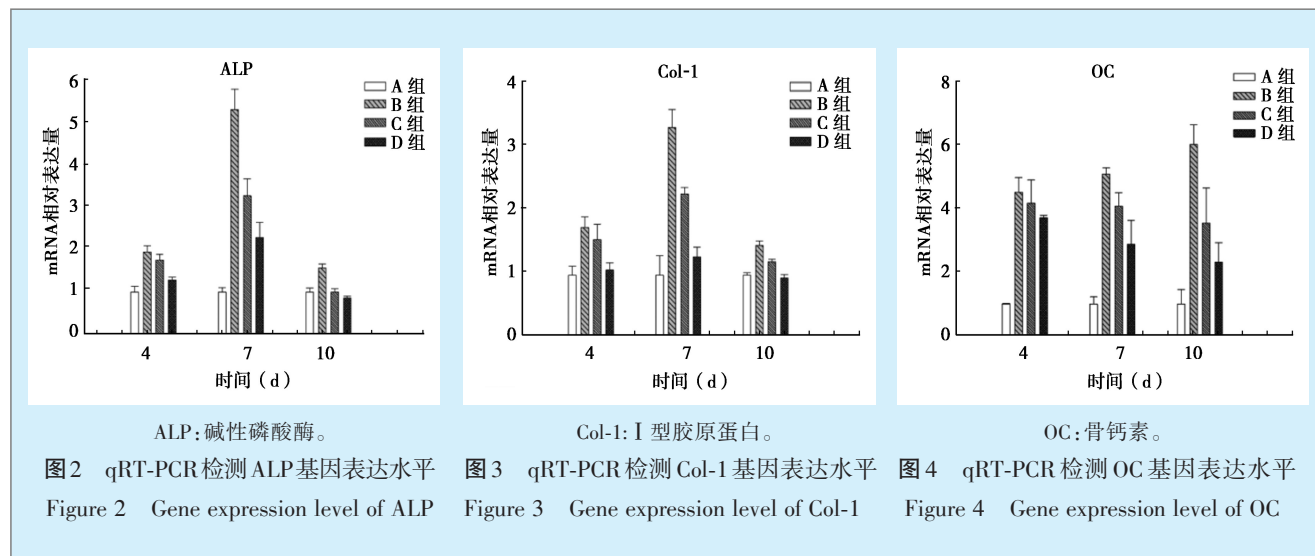
图1 CCK-8检测不同浓度葡萄糖对细胞增殖的影响
Figure 1 Proliferation Assay by CCK-8

29.997, $P < 0.05$)的总体表达差异具有统计学意义(图2~4)。

与对照组(A组)相比,成骨诱导液能明显诱导成骨标志性基因表达,在第7天,B组ALP、Col-1、OC的表达变化是A组的5.28、3.30和5.07倍($P < 0.01$);而高糖对诱导后hBMSC成骨分化标志性基因的表达具有明显的抑制作用。在第4、7、10天,10 mM、30 mM葡萄糖能够明显抑制ALP的诱导表达($P < 0.05$),第7天和第10天时,10 mM、30 mM葡萄糖能显著抑制ALP、Col-1和OC的表达($P < 0.05$)。

2.3 茜素红染色显示矿化结节形成

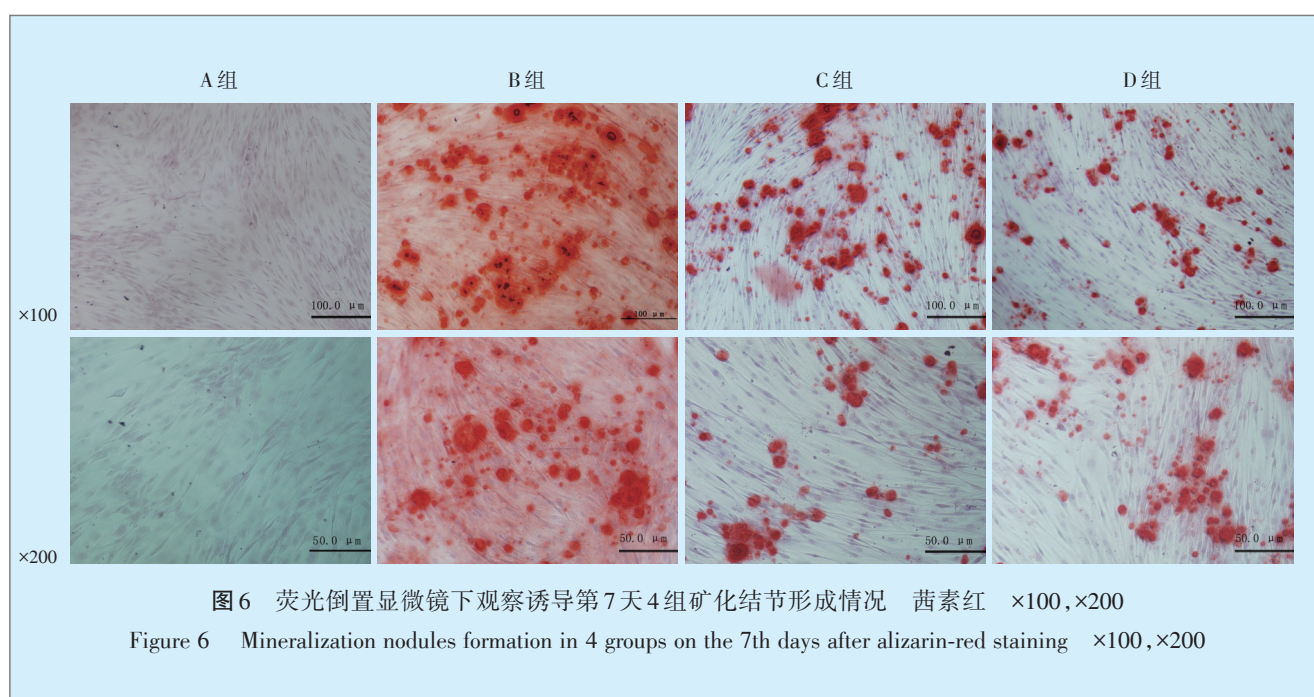
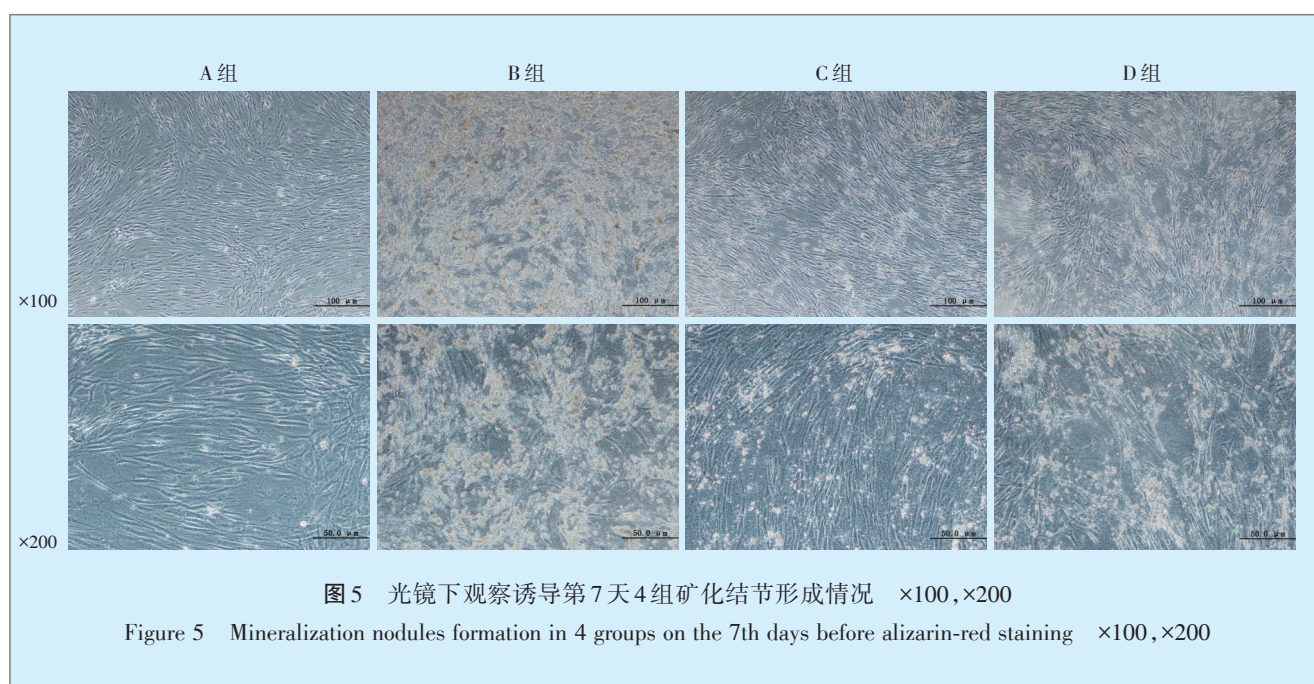
经过7 d培养,hBMSC呈梭形,排列呈旋涡状(图5)。hBMSC经成骨诱导后,茜素红染色有大量的红色钙结节形成(图6)。随着糖浓度的升高,细胞密度降低,矿化减弱。



ALP:碱性磷酸酶。
图2 qRT-PCR检测ALP基因表达水平
Figure 2 Gene expression level of ALP

Col-1:I型胶原蛋白。
图3 qRT-PCR检测Col-1基因表达水平
Figure 3 Gene expression level of Col-1

OC:骨钙素。
图4 qRT-PCR检测OC基因表达水平
Figure 4 Gene expression level of OC



3 讨论

随着生活水平的提高,糖尿病发病率也急剧升高。2010年,在年龄≥20岁的中国人群中,糖尿病和糖尿病前期患病率分别高达9.7%和15.5%^[8]。大量临床研究表明^[9],高血糖是导致包括种植体周围炎在内的种植手术并发症的主要危险因素之一。糖尿病对种植体骨结合的影响主要包括:引起牙龈上皮细胞炎症因子分泌^[10]、减少胶原纤维形成、骨愈合能力下降、易感染以及胶原酶活性增强等,

导致骨质破坏,影响骨质沉积、改建和矿化^[11-12]。目前研究已经证实,高糖环境下成骨细胞的粘附和矿化能力减弱,被认为是糖尿病导致骨质下降的原因,但其机制尚不清楚。在长期高血糖状态下,机体或细胞内氧自由基的消长失衡,细胞线粒体内处于氧化应激状态,生成的过氧化物和超氧自由基激活通路,形成糖基化终产物,如蛋白质氧化修饰产物滞留,最终发生糖尿病微血管病变和糖尿病性骨质疏松等。

种植体周围的成骨过程是一个复杂的程序性反应,生长因子通过趋化作用使间充质干细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等,一起向创伤区迁移分化,启动愈合和骨改建过程^[13]。成骨发生的关键是骨髓间充质细胞向骨形成转变。成骨细胞的分化过程可分为增殖、细胞外基质沉积、基质成熟与矿化及凋亡,多因素调节这几个阶段^[14]。骨形态发生蛋白-2是促进骨形成和诱导成骨细胞分化最重要的细胞外信号分子之一,ALP、Col-1、OC是成骨分化的标志性基因。目前已证实,在持续高血糖的状态下大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞、分泌胰岛素的细胞分化受到抑制^[15]。本研究结果提示,中低浓度葡萄糖(10 mM)在短期内能够促进细胞增殖,高糖(30 mM、50 mM)在早期即对细胞增殖具有抑制作用,本研究的实验结果与王俊成等^[16]的研究不完全一致。10 mM、30 mM、50 mM葡萄糖能明显下调骨髓间充质干细胞的成骨分化标志基因表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。同时,高糖能干扰成骨诱导培养下骨髓间充质干细胞矿化结节的形成。有研究认为高葡萄糖浓度培养hBMSC,可能会影响间充质干细胞的增殖、迁移、分化和凋亡^[17-18],同时改变细胞的成骨分化能力,导致矿化基因表达降低和矿化结节形成减少^[19]。具体机制可能涉及到一氧化氮-环磷酸鸟苷、MAPK、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin、Notch等经典信号转导通路激活改变^[20-22],至于引起何种信号转导通路蛋白及效应蛋白的时空表达改变,仍需要进一步探讨。

参考文献

- [1] Renvert S, Quirynen M. Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review[J]. Clin Oral Implants Res, 2015, 26(11): 15-44.
- [2] Demmer RT, Jacobs DR Jr, Singh R, et al. Periodontal bacteria and prediabetes prevalence in origins: the oral infections, glucose intolerance, and insulin resistance study [J]. J Dent Res, 2015, 94(9): 201-211.
- [3] 魏晓,欧三桃. 综合防治,延缓进展——2014年版《中国糖尿病肾病防治专家共识》解读[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(1): 1-3.
- [4] Marchand F, Raskin A, Dionnes-Hornes A, et al. Dental implants and diabetes: conditions for success [J]. Diabetes Metab, 2012, 38(1): 14-19.
- [5] 燕洁静,王海燕,王雨生,等. 低氧和高糖促进体外培养的人骨髓间充质干细胞的增殖和迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(5): 639-643.
- [6] Ying X, Chen X, Liu H, et al. Silibinin alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells via antioxidant effect and PI3K/Akt signaling [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 765: 394-401.
- [7] Portela JM, Tavares RS, Mota PC, et al. High glucose concentrations per se do not adversely affect human sperm function in vitro [J]. Reproduction, 2015, 150(1): 77-84.
- [8] Yang SH, Dou KF, Song WJ. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Engl J Med, 2010, 362(25): 2425-2426.
- [9] Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, et al. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects [J]. J Clin Periodontol, 2006, 33(12): 929-935.
- [10] 杨熙,罗世高,轩东英,等. 高糖状态对脂多糖诱导人牙龈上皮细胞表达炎症因子的影响[J]. 广东牙病防治, 2015, 23(7): 341-345.
- [11] Kotsovilis S, Karoussis IK, Fourmousis I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients [J]. Clin Oral Implants Res, 2006, 17(5): 587-599.
- [12] Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system [J]. Nature, 2000, 408(6812): 535-536.
- [13] 邹璇,王兴,刘洪臣. 间充质干细胞成骨成脂分化在糖尿病骨质疏松中的作用[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2016, 17(3): 180-183.
- [15] 吴立萍,李蒙,李瑞玉,等. 骨髓间充质干细胞及与胰岛细胞共移植治疗糖尿病[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(31): 5711-5716.
- [16] 王俊成. miR-467f对高糖环境下小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的调节机制研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2013.
- [17] 毕逸海. 高热量摄入对大鼠骨髓间充质干细胞定向分化能力影响的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [18] Zhang B, Liu N, Shi H, et al. High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3beta [J]. J Bone Miner Metab, 2016, 34(2): 140-150.
- [19] Ma XY, Feng YF, Ma ZS, et al. The promotion of osteointegration under diabetic conditions using chitosan/hydroxyapatite composite coating on porous titanium surfaces [J]. Biomaterials, 2014, 35(26): 7259-7270.
- [20] Li X, Ma XY, Feng YF, et al. Osseointegration of chitosan coated porous titanium alloy implant by reactive oxygen species-mediated activation of the PI3K/AKT pathway under diabetic conditions [J]. Biomaterials, 2015, 36: 44-54.
- [21] Dai Z, Li Y, Quarles LD, et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation [J]. Phytomedicine, 2007, 14(12): 806-814.
- [22] 柳逸博,王佐林. 浓缩生长因子与1,25二羟维生素D3对骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化的影响[J]. 口腔颌面外科杂志, 2016, 26(1): 13-18.

(编辑 张琳,徐平平)