

胰高血糖素样肽-1 对 2 型糖尿病大鼠骨髓间充质干细胞成骨和成脂分化的影响

邓颖, 黎金凤, 陈志雄, 王晨秀, 胡雅琴, 黄水金, 刘精东, 程宗佑, 霍亚南

作者单位: 江西省人民医院、南昌大学附属人民医院内分泌科, 江西 南昌 330000

通信作者: 霍亚南, 女, 主任医师, 研究方向为内分泌代谢性骨病, E-mail: Hyn1397002@163.com

基金项目: 江西省卫生计生委科技计划项目(20165024)

摘要:目的 探讨胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)对2型糖尿病(T2DM)大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨和成脂分化的作用。方法 将20只SD大鼠按随机数字表法分为正常组及T2DM组,每组10只,高脂饲料喂养1个月联合链脲佐菌素(STZ)溶液注射制备T2DM模型大鼠,原代分离培养正常大鼠和T2DM大鼠BMSCs,并采用流式细胞术鉴定细胞。随后将正常大鼠BMSCs分为正常大鼠BMSCs(正常组),正常大鼠BMSCs+10 nmol/L GLP-1(正常组+10 nmol/L GLP-1),正常大鼠BMSCs+30 nmol/L GLP-1(正常组+30 nmol/L GLP-1)。T2DM模型大鼠BMSCs分为T2DM模型大鼠BMSCs(模型组),T2DM模型大鼠BMSCs+10nmol/L GLP-1(模型组+10 nmol/L GLP-1),T2DM模型大鼠BMSCs+30 nmol/L GLP-1(模型组+30 nmol/L GLP-1)。检测各组细胞的碱性磷酸酶(ALP)活性及成脂、成骨分化情况。**结果** 分离获得的大鼠BMSCs细胞呈纺锤形或长梭形,核内可见1~2个核仁。流式细胞术结果表明正常组大鼠及模型组大鼠的BMSCs均一性较好,纯度高。与正常组(2.81±0.04)比较,正常组+10 nmol GLP-1(4.92±0.07)及正常组+30 nmol GLP-1(6.76±0.02)的ALP活性升高,模型组(3.54±0.09)ALP活性降低;与模型组比较,模型组+10 nmol GLP-1(5.11±0.10)及模型组+30 nmol GLP-1(5.80±0.17)的ALP活性升高($F = 23.56, P = 0.000$)。与正常组(0.46±0.05)比较,正常组+10 nmol GLP-1(0.53±0.05)及正常组+30 nmol GLP-1(0.64±0.02)的OD值升高,模型组(0.09±0.01)OD值降低;与模型组比较,模型组+10 nmol GLP-1(0.16±0.03)及模型组+30 nmol GLP-1(0.33±0.03)的OD值升高($F = 18.39, P = 0.001$)。与正常组(0.29±0.05)比较,正常组+10 nmol GLP-1(0.16±0.05)及正常组+30 nmol GLP-1(0.09±0.02)的OD值降低,模型组(0.66±0.01)OD值升高;与模型组比较,模型组+10 nmol GLP-1(0.43±0.03)及模型组+30 nmol GLP-1(0.34±0.03)的OD值降低($F = 29.41, P = 0.000$)。**结论** GLP-1对T2DM大鼠BMSCs成骨分化具有促进作用,对成脂分化具有抑制作用。**关键词:**糖尿病,2型; 间质干细胞; 胰高血糖素样肽-1; 成骨分化; 成脂分化; 大鼠, Sprague-Dawley

Effect of glucagon-like peptide-1 on osteogenesis and adipogenesis differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from rats in type 2 diabetes mellitus

DENG Ying, LI Jinfeng, CHEN Zhixiong, WANG Chenxiu, HU Yaqin, HUANG Shuijin,

LIU Jingdong, CHENG Zongyou, HUO Yanan

Author Affiliation: Department of Endocrinology, Jiangxi Provincial People's Hospital Affiliated to Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330000, China

Abstract: Objective To explore effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on osteogenesis and adipogenesis differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into two groups: normal group and T2DM group according to the random number table method. T2DM rats was established by high-fat diet feeding for 1 month combined with streptozotocin (STZ) injection. BMSCs of normal rats and T2DM rats were isolated and cultured in primary generation, and BMSCs were identified by flow cytometry. Normal rats BMSCs were divided into normal rats BMSCs (normal group), normal rats BMSCs+10 nmol/L GLP-1 (normal group+10 nmol/L GLP-1), normal rats BMSCs+30 nmol/L GLP-1 (normal group+30 nmol/L GLP-1). BMSCs of T2DM rats were divided into BMSCs of T2DM rats (model group), BMSCs+10 nmol/L GLP-1 (model group + 10 nmol/L GLP-1) and BMSCs + 30 nmol/L GLP-1 (model group + 30 nmol/L GLP-1) in T2DM model rats. After glucagon-like peptide-1 (GLP-1) was added to BMSCs of normal rats and model rats, Alkaline phosphatase (ALP) activity, differentiation of BMSCs after induction in each group was detected. **Results** The isolated BMSCs cells were spindle-shaped or spindle-shaped with 1-2 nucleoli in the nucleus. The results of flow cytometry showed the BMSCs of normal group and model group had good homogeneity and high purity. Compared with normal group (2.81±0.04), the activity of ALP was in-

creased in normal group+10 nmol/L GLP-1(4.92±0.07) and normal group+30 nmol/L GLP-1(6.76±0.02), the activity of ALP was decreased in model group(3.54±0.09). Compared with model group, the activity of ALP was increased in normal group+10 nmol/L GLP-1(5.11±0.10) and normal group+30 nmol/L GLP-1(5.80±0.17) ($F=23.56, P=0.000$). Compared with normal group(0.46±0.05), OD value was increased in normal group+10 nmol/L GLP-1(0.53±0.05) and normal group+30 nmol/L GLP-1(0.64±0.02), OD value was decreased in model group(0.09±0.01). Compared with model group, OD value was increased in normal group+10 nmol/L GLP-1(0.16±0.03) and normal group+30 nmol/L GLP-1(0.33±0.03) ($F=18.39, P=0.001$). Compared with normal group(0.29±0.05), OD value was decreased in normal group+10 nmol/L GLP-1(0.16±0.05) and normal group+30 nmol/L GLP-1(0.09±0.02), OD value was increased in model group(0.66±0.01). Compared with model group, OD value was decreased in normal group+10 nmol/L GLP-1(0.43±0.03) and normal group+30 nmol/L GLP-1(0.34±0.03) ($F=29.41, P=0.000$). **Conclusion** GLP-1 could promote the osteogenic differentiation of BMSCs and inhibit the adipogenic differentiation of BMSCs in rats with T2DM.

Key words: Diabetes mellitus, type 2; Mesenchymal stem cells; Glucagon-like peptide-1; Osteogenesis differentiation; Adipogenesis differentiation; Rats, Sprague-Dawley

糖尿病是一种由遗传和环境因素共同作用引起的糖代谢紊乱的内分泌综合征^[1-3]。糖尿病可有多种并发症,肾、神经、心血管、眼等器官的病变已广为人知,而糖尿病合并骨质疏松的发生率也明显增加^[2,4-5]。1/2以上的糖尿病病人骨密度降低,1/3病人被诊断为骨质疏松^[2,4-5]。因此探讨糖尿病合并骨质疏松的发病机制及治疗手段意义重大。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)是一种主要由肠道L细胞产生的肽类激素,具有保护胰岛β细胞功能,对糖尿病小鼠具有保护作用,也对骨质疏松大鼠具有改善作用,从而提示GLP-1可能对糖尿病合并骨质疏松大鼠具有保护作用^[6-7]。因此本研究于2018年8—12月将通过原代培养正常大鼠和2型糖尿病(T2DM)大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs),并利用GLP-1干预BMSCs,探讨GLP-1对糖尿病大鼠BMSCs成骨及成脂的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 20只(200±20)g、4周龄清洁级的雄性SD大鼠,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002,本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 实验试剂与仪器 DMEM高糖培养基(gibco公司);胰蛋白酶-乙二胺四乙酸消化液(Solarbio公司);青链霉素混合液(100×)(Solarbio);成骨诱导液(RASMx-03021-175, cyagen);成脂诱导A液(RASMx-03031-175, cyagen);成脂诱导B液(RASMx-03032-175, cyagen);利拉鲁肽注射液(诺和力公司);茜素红染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);GLP-1(7-36)购于美国sigma公司,磷酸缓冲盐溶液(PBS)溶解制成所需浓度。光学相差显微镜(日本OLYMPUS公司);荧光显微镜(日本OLYMPUS公司);流式细胞仪(美国BD公司);Odyssey红外荧光成像系统(美国LI-COR公司)。

1.3 T2DM大鼠模型复制 将20只SD大鼠按随机数字表法分为正常组及T2DM组,每组10只,正常组大鼠喂以普通饲料;T2DM组大鼠喂以高脂饲料(其中含70%碳水化合物、20%蔗糖,10%猪油),每周测定大鼠的体质量、饮水量和进食量。于第4周末大鼠禁食14 h后,腹腔注射25 mg/kg链脲佐菌素(STZ)溶液(STZ溶于0.1 mol/L, pH4.5的柠檬酸缓冲液,配制为1%的溶液),3 d后测量随机血糖,血糖低于16.7 mmol/mL的再次注射STZ溶液加强模型,随机血糖连续2周均高于16.7 mmol/mL且出现糖尿病症状的大鼠进行后续实验。

1.4 BMSCs的分离及培养 将SD大鼠缺氧处死,75%乙醇浸泡15~20 min,无菌条件下取下胫骨和肱骨,将其两端干骺端切除,显露骨髓腔,用10%完全培养基彻底冲洗骨髓腔,并使骨髓细胞充分分散制成单细胞悬液,离心,弃去上清液,加入DMEM+20%胎牛血清(FBS)+双抗培养液重悬,分别均匀的铺在培养板中,并做好标记,标明代数,置于37℃,5%二氧化碳培养箱中继续培养,3 d换1次液。当细胞的融合度达到90%以上时,弃去培养液,PBS洗2次,加入胰蛋白酶消化2~3 min,加入含10%FBS的完全培养基,将细胞吹打下来并吸取到10 mL离心管中,离心,弃上清,注意不要碰到管口,并接种到新的培养瓶中,置于37℃,5%二氧化碳培养箱中继续培养。

1.5 BMSCs的鉴定 胰蛋白酶将融合度达到80%~90%的第3代BMSCs消化下来并制成单细胞悬液,将细胞浓度调整为 1×10^6 /mL,分于3个已做标记的微型离心管(EP管)中,分别加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CD29、CD34、CD44、CD45单克隆抗体,室温避光孵育30 min,PBS洗涤没有结合的抗体,最后加入PBS重悬细胞,于流式细胞仪上检测上述标志物的含量。

1.6 BMSCs 分组 正常大鼠 BMSCs (正常组), 正常大鼠 BMSCs+10 nmol/L GLP-1 (正常组+10 nmol/L GLP-1), 正常大鼠 BMSCs+30 nmol/L GLP-1 (正常组+30 nmol/L GLP-1)。T2DM 模型大鼠 BMSCs (模型组), T2DM 模型大鼠 BMSCs+10 nmol/L GLP-1 (模型组+10 nmol/L GLP-1), T2DM 模型大鼠 BMSCs+30 nmol/L GLP-1 (模型组+30 nmol/L GLP-1)。

1.7 BMSCs 成骨诱导 取生长状态良好的 BMSCs, 按 1×10^4 个/孔接种至铺有盖玻片 6 孔板, 按照“1.6”分组加入相应浓度药物和成骨诱导液, 3 d 换 1 次液, 连续培养 21 d 后做碱性磷酸酶 (ALP) 检测和茜素红染色。

1.8 BMSCs 成脂诱导 取生长状态良好的 BMSCs, 按 1×10^4 个/孔接种至铺有盖玻片 6 孔板, 按照“1.6”分组加入相应浓度药物共同培养, 成脂诱导液 A 液培养 3 d 换成脂诱导液 B 液诱导 1 d, 连续培养 14 d 后做油红染色。

1.9 ALP 活性检测 在诱导第 21 天时候, 收集 BMSCs, 并用不含酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 并用 BCA 蛋白试剂盒进行定量, 最后根据 ALP 酶活性试剂盒测定 ALP 活性。

1.10 茜素红染色 在诱导第 21 天时候, 去除培养基, PBS 洗涤细胞玻片, 70% 乙醇室温固定细胞, 茜素红染色液覆盖样本, 37 °C 避光孵育 60 min; 双蒸水冲洗玻片 3~5 min; 荧光倒置显微镜下观察并拍照后加入 10% 氯化十六烷基吡啶, 室温 30 min, 将氯化十六烷基吡啶析出; 从每个培养皿取出 100 μ L 溶液加入 96 孔板, 选择 560 nm 波长进行光密度 (OD) 值测定, 通过样本总蛋白量对各组 OD 值进行标化。

1.11 油红染色 在诱导第 14 天, 去除培养基, 加入 4% 组织细胞固定液固定 15 min; 60% 异丙醇充分浸润, 油红染液染色 8 min, 60% 异丙醇快速分化, 苏木素染色 2 min, 去除染色液, 水洗, 荧光倒置显微镜下观察, 镜检结束后加入 100% 异丙醇, 室温放置孵育 30 min, 选择 520 nm 波长进行 OD 值测定。

1.2 统计学方法 所有数据均用 SPSS 17.0 软件统计分析。观测资料均为计量资料, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 多组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的鉴定 分离获得的正常组大鼠 BMSCs 细胞呈纺锤形或长梭形, 核内可见 1~2 个核仁。同时采用流式细胞术检测 BMSCs 表面标志物, 结果正常组及模型组大鼠的 BMSCs 表面标志物 CD29、CD44 阳性率均高于 97%, CD34、CD45 阳性率均低

于 5%, 从而说明本实验获得的 BMSCs 均一性较好, 纯度高, 能够用于后续实验。见图 1。

2.2 ALP 活性检测 与正常组 (2.81 ± 0.04) 比较, 正常组+10 nmol GLP-1 (4.92 ± 0.07) 及正常组+30 nmol GLP-1 (6.76 ± 0.02) 的 ALP 活性升高, 模型组 (3.54 ± 0.09) ALP 活性降低; 与模型组比较, 模型组+10 nmol GLP-1 (5.11 ± 0.10) 及模型组+30 nmol GLP-1 (5.80 ± 0.17) 的 ALP 活性升高 ($F = 23.56, P = 0.000$)。说明随着 GLP-1 浓度升高, 正常组及模型组成骨分化越多。

2.3 茜素红染色结果 与正常组 (0.46 ± 0.05) 比较, 正常组+10 nmol GLP-1 (0.53 ± 0.05) 及正常组+30 nmol GLP-1 (0.64 ± 0.02) 的 OD 值升高, 模型组 (0.09 ± 0.01) OD 值降低; 与模型组比较, 模型组+10 nmol GLP-1 (0.16 ± 0.03) 及模型组+30 nmol GLP-1 (0.33 ± 0.03) 的 OD 值升高 ($F = 18.39, P = 0.001$)。说明随着 GLP-1 浓度升高, 正常组及模型组成骨分化越多。见图 2。

2.4 油红染色结果 与正常组 (0.29 ± 0.05) 比较, 正常组+10 nmol GLP-1 (0.16 ± 0.05) 及正常组+30 nmol GLP-1 (0.09 ± 0.02) 的 OD 值降低, 模型组 (0.66 ± 0.01) OD 值升高; 与模型组比较, 模型组+10 nmol GLP-1 (0.43 ± 0.03) 及模型组+30 nmol GLP-1 (0.34 ± 0.03) 的 OD 值降低 ($F = 29.41, P = 0.000$)。说明随着 GLP-1 浓度升高, 可以抑制正常组及模型组的成脂分化。见图 3。

3 讨论

糖尿病合并骨质疏松作为糖尿病并发症在近年已逐渐得到专家学者认可, 其是一种全身性、代谢性、退行性的骨科疾病, 是糖尿病在骨骼系统中的主要并发症^[5]。病人单位体积的骨量减少, 骨强度降低, 骨组织微结构改变是糖尿病骨质疏松病人主要特征, 超过 50% 的糖尿病病人患有骨质疏松。研究显示不管是 1 型糖尿病 (T1DM) 还是 T2DM 病人都较正常人群发生髌部骨折的风险高^[5, 8-9]。因此探讨糖尿病合并骨质疏松的发病机制具有重要意义。

BMSCs 是一种于 1976 年发现, 1991 年正式命名的间充质干细胞。BMSCs 来源于中胚层, 能够从脐带、骨髓、羊水等多种组织中获得, 并能够在诱导剂的诱导下定向分化为软骨细胞、成骨细胞、神经细胞、心肌细胞、内皮细胞等, 进而修复受损的细胞^[10-12]。BMSCs 由于易分离、易培养, 低免疫原性、易转染外源基因及自我更新能力较强, 因此被广泛的应用于骨退行性疾病, 神经退行性疾病, 血管病

性疾病等疾病的治疗中^[10-12]。因此本研究首先探讨正常大鼠及T2DM大鼠中BMSCs的成骨及成脂分化的影响。原代培养获得的BMSCs经过流式细胞术鉴定发现正常组大鼠及模型组大鼠的BMSCs表面标志物CD29、CD44阳性率均高于97%，CD34、CD45阳性率均低于5%，从而说明本实验获得的BMSCs均一性较好，纯度高，能够用于后续实验。ALP是BMSCs向成骨细胞分化的早期标志物之一，在成骨诱导的第3天就开始表达，是骨钙素及钙结节形成的前提。本研究ALP检测结果发现模型组BMSCs中ALP活性低于正常组BMSCs，另外茜素红染色结果表明模型组BMSCs较正常组BMSCs成骨分化减少，油红染色结果表明模型组BMSCs较正常组BMSCs成脂分化增加，从而说明糖尿病对BMSCs的成骨分化具有抑制作用，对BMSCs的成脂分化具有促进作用。

GLP-1是一种主要由肠道L细胞产生的肠促胰岛素，具有保护胰岛β细胞，促进细胞增殖，抑制细胞凋亡的作用^[6,13-14]。GLP-1受体是G蛋白偶联受体B家族的一员，能够广泛地表达于人及鼠类的胰脏、心脏、肺、脑、胃等组织^[6,13-14]。GLP-1通过结合于GLP-1受体，使自身的G蛋白α亚基与β、γ亚基解离，进而介导细胞内不同信号通路，发挥不同的生理作用^[6,13-14]。研究已经显示BMSCs表面能够表达GLP-1受体，GLP-1能够显著的促进BMSCs增殖，抑制BMSCs凋亡^[15-17]。另外还有研究显示GLP-1类似物噁液素-4(Exendin-4)能够促进BMSCs向成骨细胞分化，同时还有改善大鼠骨质疏松作用^[7,18-19]。进而提示GLP-1对骨的保护作用。因此本研究将不同浓度的GLP-1加入到正常组大鼠及T2DM大鼠的BMSCs，结果发现GLP-1不论是对正常大鼠的BMSCs还是T2DM大鼠的BMSCs均具有成骨分化的促进作用，而对成脂分化具有抑制作用。

综上所述，T2DM大鼠BMSCs较正常大鼠BMSCs的成骨转化作用减少，成脂作用增加。GLP-1的加入能显著的促进T2DM大鼠BMSCs及正常大鼠BMSCs的成骨作用，减少成脂作用，从而说明GLP-1对T2DM大鼠BMSCs的成骨分化具有促进作用，对成脂分化具有抑制作用。

(本文图1~3见插图9-2)

参考文献

[1] CHO J, D'ANTUONO M, GLICKSMAN M, et al. A review of clinical trials: mesenchymal stem cell transplant therapy in type 1 and

- type 2 diabetes mellitus[J]. *Am J Stem Cells*, 2018, 7(4): 82-93.
- [2] LI Y, LIU B, LI Y, et al. Epicardial fat tissue in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 3.
- [3] BELLOU V, BELBASIS L, TZOULAKI I, et al. Risk factors for type 2 diabetes mellitus: an exposure-wide umbrella review of meta-analyses [J/CD]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e194127, DOI: 10.1371/journal.pone.0194127.
- [4] AHF E, EAH I, EMA AS, et al. Review on bone disease (osteoporosis) in diabetes mellitus[J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2017, 47(1): 35-46.
- [5] 张磊, 谷燕, 董砚虎. 糖尿病骨质疏松的细胞及分子机制研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2013, 19(11): 1190-1194.
- [6] 闵媛婷, 盛德乔. GLP-1与2型糖尿病的研究进展[J]. *生命的化学*, 2015, 35(6): 751-756.
- [7] 王一然, 翟骁, 王奇金. GLP-1及其类似物对减缓骨质疏松作用的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(6): 752-756.
- [8] 罗巧彦, 徐勇. 糖尿病与骨质疏松的研究进展[J]. *大连医科大学学报*, 2014, 36(2): 190-194.
- [9] TAN SY, MEI WJ, SIM YJ, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: a review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(1): 364-372.
- [10] WANG C, WANG Y, MENG HY, et al. Application of bone marrow mesenchymal stem cells to the treatment of osteonecrosis of the femoral head[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3): 3127-3135.
- [11] KOKABU S, LOWERY JW, JIMI E. Cell fate and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 3753581. DOI: 10.1155/2016/3753581.
- [12] PAL B, DAS B. In vitro culture of naive human bone marrow mesenchymal stem cells: a stemness based approach [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 69.
- [13] 李承业, 黄文龙, 钱海. 胰岛素和GLP-1类似物长效化策略研究的最新进展[J]. *中国药科大学学报*, 2018, 49(6): 660-670.
- [14] 杨懿, 高新, 宋海峰. GLP-1受体激动剂的临床研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(19): 2203-2208.
- [15] HUSSEIN NI, EBRAHIM N, MOHAMMED OM, et al. Combination of obestatin and bone marrow mesenchymal stem cells prevents aggravation of endocrine pancreatic damage in type II diabetic rats[J]. *Int J Stem Cells*, 2017, 10(2): 129-143.
- [16] MENG J, MA X, WANG N, et al. Activation of GLP-1 receptor promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through beta-catenin[J]. *Stem Cell Rep*, 2016, 6(4): 579-591.
- [17] 张勤凤, 朱剑, 徐宽枫, 等. 腺病毒介导胰高血糖素样肽-1受体在小鼠骨髓间充质干细胞表达的体外研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(3): 310-314.
- [18] 周诗萌, 王宁, 孟静茹, 等. 胰高血糖素样肽-1及其类似物EX-4促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖与成骨分化[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015, 20(2): 121-127.
- [19] 赵燕, 王艳, 张燕, 等. GLP-1对2型糖尿病大鼠血清OPG、RANKL及骨密度的影响研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(6): 700-705.

(收稿日期: 2019-05-08, 修回日期: 2019-07-30)