基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0840-02

# 不同浓度葡萄糖对成骨细胞凋亡的影响

冯正平[1],邓华聪[1],杜 佳[2],陈丹燕[1],姜 蓉[2]
(1.重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016;2.重庆医科大学干细胞与组织工程实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察不同浓度葡萄糖对体外培养的 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡的影响。方法:不同浓度的葡萄糖、甘露醇分别刺激体外培养的 MC3T3-E1 成骨细胞 1、3、7、12 d,用流式细胞术检测成骨细胞的凋亡。结果:甘露醇组 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡较正常对照组有一定的增加,但无统计学差异($P>0.05$);而葡萄糖呈浓度、时间依赖性诱导 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡($P<0.05$,$P<0.01$)。结论:高糖状态下,MC3T3-E1 成骨细胞凋亡显著增加。

【关键词】葡萄糖;成骨细胞;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R581 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-11

# Influence of different glucose concentrations on the apoptosis of MC3T3-E1 osteoblast

*FENG Zheng-ping, et al*
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the influence of different glucose concentrations on the apoptosis of MC3T3-E1 osteoblast. *Methods*: Seven culture media of different glucose and mannitol concontrations, 5.5, 11.1, 22.2, 33.3 mmol/L were set up. MC3T3-E1 osteolblast was cultured in these media successively for 1, 3, 7, 12 d, and then the percentages of apoptotic cells were measured by flow cytometry. *Results*: High mannitol can slightly increase the apoptosis of MC3T3-E1 osteoblast, but there was no statistical significance ($P>0.05$). The inducing action of glucose to the apoptsis of MC3T3-E1 osteoblast was in concentration and time dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). *Conclusion*: Glucose of elevated concentration significantly promotes the apoptosis of MC3T3-E1 osteoblast.

【Key words】Glucose; Osteoblast; Apoptosis

骨质疏松症(Osteoporosis,OP)和糖尿病(Diabetes mellitus,DM)是两种常见的内分泌疾病,自 1948 年 Albright 首次提出糖尿病可致骨改变以来,越来越多的学者开始研究糖尿病骨改变及其机制,以防治糖尿病性骨质疏松症与骨折。既往的研究[1,2]已经观察到高糖对成骨细胞的一些影响,如细胞的活性受到抑制,细胞的矿化能力降低等,但糖尿病骨病发病机制较为复杂,具体的分子机制未完全明确。本研究观察不同葡萄糖浓度对成骨细胞凋亡的影响,进一步探讨糖尿病性骨病的发病机制,为其防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞株购自美国培养物保存中心(ATCC 号:CRL-1427),低糖型(D- 葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L) α-MEM 培养基由 GIBCO 公司生产,胎牛血清购自杭州四季青公司,Annexin V-FITC 试剂盒由 ABGA 公司生产。

### 1.2 细胞培养基的制备

按照 α-MEM 低糖型培养基说明书配制好基础培养基,并在培养基中加入不同剂量的葡萄糖、甘露醇,配制成葡萄糖、甘露醇浓度分别为 5.5、11.1、22.2、33.3 mmol/L 培养基。

### 1.3 成骨细胞培养

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞培养于含 10%胎牛血清的培养基中,置于 37℃、5%$CO_2$ 的细胞培养箱中培养,并分为以下 7 组:正常对照组:正常培养的成骨细胞(D- 葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L);甘露醇组 1:终浓度为 11.1 mmol/L 的甘露醇加入培养液中;甘露醇组 2:终浓度为 22.2 mmol/L 的甘露醇加入培养液中;甘露醇组 3:终浓度为 33.3 mmol/L 的甘露醇加入培养液中。高糖组 1:终浓度为 11.1 mmol/L 的 D- 葡萄糖加入培养液中;高糖组 2:终浓度为 22.2 mmol/L 的 D- 葡萄糖加入培养液中;高糖组 3:终浓度为 33.3 mmol/L 的 D- 葡萄糖加入培养液中。每组 3 复管。

### 1.4 成骨细胞凋亡的检测

分别于第 1、3、7、12 d 收集细胞,采用 Beckeman Coulter EPICS-XL 型流式细胞仪检测成骨细胞凋亡率,具体操作按说明书。

作者介绍:冯正平(1967- ),男,博士,副教授,
研究方向:糖尿病性骨质疏松。
通讯作者:邓华聪,女,教授,E-mail:deng-huacong@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局自然科学基金资助课题(编号:2007-02-015)。

### 1.5 统计学分析

数据以表示，SPSS 11.0 统计软件包进行分析，统计采用方差分析，多组间比较行 $q$ 检验，以 $P \leqslant 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结 果

### 2.1 流式细胞仪检测成骨细胞凋亡情况

和正常对照组相比，甘露醇可轻度增加成骨细胞的凋亡，但无统计差异($P>0.05$，表 2)，而葡萄糖则呈浓度、时间依赖性的诱导成骨细胞凋亡($P<0.05$，$P<0.01$)，即随葡萄糖浓度增加，成骨细胞凋亡越明显；随诱导时间延长，细胞凋亡明显增加(表 1，图 1)

## 3 讨 论

骨组织的形成需在骨细胞的作用下，经历旧骨不断被吸收，新骨不断形成的骨重建过程。骨重建的基本细胞单位是成骨细胞、骨细胞和破骨细胞，其中成骨细胞是骨形成的重要细胞。成骨细胞在骨的形成中经历增殖、胞外基质成熟、基质矿化和细胞凋亡 4 个阶段。细胞凋亡是一个主动的、程序化的细胞固有的死亡过程，成骨细胞凋亡的速率对成骨细胞数量有重要影响，成骨细胞凋亡增加是低骨量的重要原因之一。

目前，糖尿病与骨质疏松症相关性的研究日益受到重视，大量的临床研究已提示[3-5]，糖尿病患者的骨量是明显降低的，骨折风险增加。糖尿病所致的骨代谢异常主要是骨形成的缺陷，表现为成骨细胞数目减少、类骨质形成不足等。在过去有关成骨细胞研究中，多数观察的是不同葡萄糖浓度对细胞增殖、分泌活性及矿化能力等方面的影响，程萌等[6]的研究提示，逐渐升高的葡萄糖浓度对 MG63 成骨细胞增殖呈现先促进后抑制的作用，细胞分泌骨钙素及矿化能力均呈不同程度下降。而高糖对成骨细胞凋亡影响的研究较少，糖尿病易引起骨量减少，有报道 1 型和 2 型糖尿病病人较同年龄、同性别健康人骨密度减少 10%左右，可能与其高血糖影响骨代谢相关。Qi 等[7]的研究认为高糖环境下，氧化应激增强，成骨细胞凋亡增加。Mani 等[8]进一步证实，糖基化终末产物可通过 MAPK 及胞质凋亡途径诱导成骨细胞凋亡，导致骨形成障碍。

**表 1 不同浓度葡萄糖作用下 MC3T3-E1 成骨细胞的凋亡率(%)**

| 组别 | 1 d | 3 d | 7 d | 12 d |
|---|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 1.6 ± 0.4 | 2.7 ± 0.8 | 3.1 ± 1.2 | 2.9 ± 0.9 |
| 高糖组 1 | 4.8 ± 1.2$^{\triangle}$ | 6.9 ± 2.7$^{\triangle}$ | 9.3 ± 2.7$^{\triangle\triangle}$ | 10.8 ± 3.5$^{\triangle\triangle}$ |
| 高糖组 2 | 5.9 ± 2.3$^{\triangle\triangle}$ | 8.4 ± 2.9$^{\triangle\triangle}$ | 11.6 ± 3.4$^{\triangle\triangle\ast}$ | 15.3 ± 4.1$^{\triangle\triangle\ast}$ |
| 高糖组 3 | 9.0 ± 2.7$^{\triangle\triangle\ast\blacktriangle}$ | 13.2 ± 4.0$^{\triangle\triangle\ast\ast\blacktriangle}$ | 15.1 ± 4.2$^{\triangle\triangle\ast\blacktriangle}$ | 20.5 ± 4.6$^{\triangle\triangle\ast\ast\blacktriangle}$ |

注：与正常对照组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与高糖组 1 比较，$^{\ast}P<0.05$，$^{\ast\ast}P<0.01$；与高糖组 2 比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$

**表 2 不同浓度甘露醇作用下 MC3T3-E1 成骨细胞的凋亡率(%)**

| 组别 | 1 d | 3 d | 7 d | 12 d |
|---|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 1.6 ± 0.4 | 2.7 ± 0.8 | 3.1 ± 1.2 | 2.9 ± 0.9 |
| 甘露醇组 1 | 1.4 ± 0.3 | 3.1 ± 0.9 | 3.9 ± 1.0 | 3.3 ± 1.2 |
| 甘露醇组 2 | 1.8 ± 0.5 | 3.6 ± 1.1 | 3.8 ± 1.3 | 4.0 ± 1.1 |
| 甘露醇组 3 | 2.5 ± 0.7 | 4.2 ± 1.3 | 4.6 ± 1.7 | 4.4 ± 1.4 |

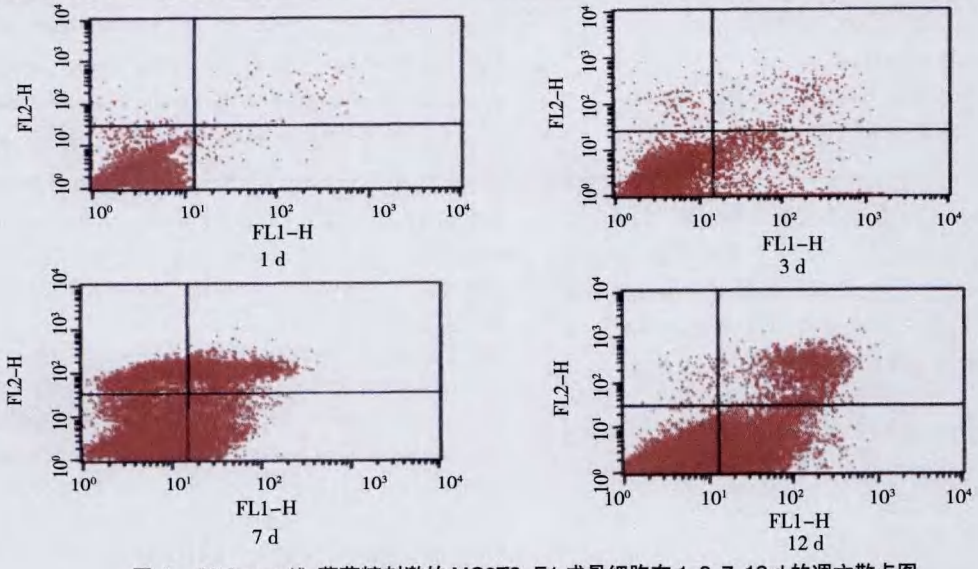



**图 1 22.2 mmol/L 葡萄糖刺激的 MC3T3-E1 成骨细胞在 1、3、7、12 d 的凋亡散点图**

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0842-03

# 银杏叶提取物对早期糖尿病肾病患者 IL-6、TNF-a 的影响

毛春谱,李小毅,张红梅,蔡文婷
(苏州大学附属无锡市第四人民医院内分泌科,无锡 214062)

【摘 要】目的:探讨银杏叶提取物(Extract of gingko biloba,EGB)对早期糖尿病肾病(Diabetic nephropathy,DN)患者血清细胞因子的影响。方法:将 39 例早期 DN 患者随机分为对照组(19 例)和治疗组(20 例),对照组为常规西药治疗,治疗组在此基础上加用 EGB。6 个月后,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定两组患者治疗前后血清白细胞介素 -6(Interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子 -α(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)表达水平,同时观察尿微量白蛋白排泄率、空腹血糖、血肌酐、尿素氮、血脂等指标的变化。结果:与治疗前比较,两组患者治疗后血清 IL-6、TNF-α 水平均下降($P<0.05$),治疗组较对照组下降更为明显($P<0.01$)。经 q 检验显示,治疗组与对照组治疗后同期比较,下降更为明显($P<0.01$)。结论:银杏叶提取物可能通过减低血清 IL-6、TNF-α 的表达,抑制炎症反应,起到对 DN 的保护作用。

【关键词】银杏叶提取物;糖尿病肾病;白细胞介素 -6;肿瘤坏死因子 -α
【中国图书分类法分类号】R587.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-03

# Extract of gingko biloba on IL-6, TNF-a in patients with early diabetic nephropathy

*MAO Chun-pu, et al*
(*Department of Endocrinology, the Fourth Affiliated Hospital, Suzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of extract of gingko biloba (EGB) on inflammatory cytokines in patients with early diabetic nephropathy (DN). *Methods*: Thirty-nine patients with early DN were randomly assigned into the control group ($n$=19) treated by irbesartan alone and the treated group ($n$=20) treated by EGB combined with irbesartan for 6 months. Serum interleukin-6

作者介绍:毛春谱(1976-),男,主治医师,硕士,研究方向:糖尿病肾病的防治。
通讯作者:李小毅,女,副教授,E-mail:lixiaoyi9915@126.com。
基金项目:无锡市社会发展指导性计划项目(编号:CSZ00833)。

为明确高浓度葡萄糖是否影响成骨细胞功能,本研究应用流式细胞仪检测细胞凋亡,观察不同浓度葡萄糖对 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡影响,并用与高糖水平具有相同渗透压的甘露醇作对照培养,结果表明,高浓度的甘露醇可增加 MC3T3-E1 成骨细胞的凋亡,但和正常对照组相比,无显著统计差异($P>0.05$)。而葡萄糖则随着浓度的升高,其诱导 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡的作用越明显;同时随着培养时间的延长,MC3T3-E1 成骨细胞凋亡也是显著增加的($P<0.01$,$P<0.05$)。说明葡萄糖是直接作用于成骨细胞而非通过渗透压所致,这和 Balint 等[9]的研究一致。

总之,本研究表明,高浓度的葡萄糖可诱导成骨细胞凋亡,且呈浓度、时间依赖性,证实了高糖环境对成骨细胞功能的毒性作用,为临床工作中严格控制血糖,防止骨质疏松症的发生发展提供了理论依据。

## 参 考 文 献

[1] Locatto ME, Abranzon H, Caferra D, et al.Growth and development of bone mass in untreated alloxan diabetic rats[J].Bone Miner, 1993, 23(2): 129-144.

[2] Anegla M, Inzerillo E.Osteoporosis and diabetes mellitus[J].J Endocrine and Metabolic Disorders, 2004, 5(2): 261-268.

[3] 廖国荣,罗迎春.105 例 2 型糖尿病患者骨密度分析[J].中国骨质疏松杂志,2003,9(3):247-250.

[4] Krakauer J C, McKenna M J, Buderer N F, et al.Bone loss and bone turnover in diabetes[J].Diabetes, 1995, 44(7): 775-782.

[5] Shyng Y C, Devlin H, Sloan P.The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat[J].Int J Oral Maxillofac Surg, 2001, 30(1): 70-74.

[6] 程 荫,陈德才,卢春燕.不同浓度葡萄糖对人成骨肉瘤细胞株 MG63 活性的影响[J].四川大学学报(医学版),2008,39(2):239-242.

[7] Qi J S, Li Yn, Zhang B S, et al.Peroxynitrite mediates high glucose-induced osteoblast apoptosis[J].J Endocrinol Invest, 2008, 31(4): 314-320.

[8] Mani A, Zoubin A, Coy B, et al.Advance glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP Kinase and cytosolis apotosic pathways[J].Bone, 2007, 40(4): 345-353.

[9] Balint E, Szabo P, Mashall C F, et al.Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization[J]. Bone, 2001, 28(1): 21-28.

(责任编辑:关蕴良)