

• 论 著 •

## 胰岛素和阿仑膦酸钠对高糖环境下成骨样细胞 MC3T3-E1 增殖及凋亡的影响

赵春芝 李兴 娄方勇

中图分类号: R965 文献标识码: B 文章编号: 1006-7108(2010)08-0553-05

**摘要:** 目的 应用胰岛素(INSU)、阿仑膦酸钠(ALEN)干预体外高糖环境下培养的 MC3T3-E1,探讨胰岛素、阿仑膦酸钠对 MC3T3-E1 增殖及凋亡的影响。方法 用 DMEM 培养基培养 MC3T3-E1 细胞并以高糖( $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、INSU( $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、ALEN( $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )进行干预,按①对照组(NG);②高糖组(HG);③高糖+胰岛素组(HG+INSU);④高糖+阿仑膦酸钠组(HG+ALEN);⑤高糖+胰岛素+阿仑膦酸钠组(HG+INSU+ALEN)进行分组,抽取 24 h 样本,采用对 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶的嵌入法检测增殖率,应用流式细胞仪检测凋亡率。结果 胰岛素和阿仑膦酸钠均可促进 MC3T3-E1 细胞增殖,HG+INSU+ALEN 组促增殖作用最显著( $P < 0.05$ ),在高糖环境下成骨细胞的凋亡率对于单一加用胰岛素和阿仑膦酸钠均有降低,与对照组相比有显著差异( $P < 0.05$ ),但 HG+INSU+ALEN 组较其他组显著降低( $P < 0.01$ )。结论 INSU、ALEN 可以增加 MC3T3-E1 细胞数量,使其凋亡率降低,INSU、ALEN 对高糖环境下 MC3T3-E1 细胞具有保护作用。

**关键词:** MC3T3-E1 细胞; 胰岛素; 阿仑膦酸钠; 增殖; 凋亡

**Effects of insulin and alendronate on proliferation and apoptosis of MC3T3-E1 osteoblast in high concentration of glucose conditioned cultures** ZHAO Chunzhi, LI Xing, LOU Fangyong. Department of Geriatrics, The People's Hospital of Taizhou, Taizhou 225300, China

Corresponding author: LI Xing, Email: lixinglaoshi@yahoo.com.cn

**Abstract: Objective** To investigate the effects of insulin (INSU) and alendronate (ALEN) on the proliferation and apoptosis of MC3T3-E1 osteoblasts in high concentration of glucose conditioned cultures.

**Methods** MC3T3-E1 cells were cultured in the DMEM medium and added with high concentration of glucose ( $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), INSU ( $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and ALEN ( $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The cultures were divided into five groups: ① control group (NG), ② high concentration of glucose group (HG), ③ high concentration of glucose and insulin group (HG+INSU), ④ high concentration of glucose and alendronate group (HG+ALEN), and ⑤ high concentration of glucose, insulin, and alendronate group (HG+INSU+ALEN). Samples were extracted after 24 hours. Cell proliferation was measured using 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation assay and the rate of apoptosis was measured using flow cytometry. **Results** Both INSU and ALEN promoted the proliferation of MC3T3-E1 cells and the most significant increase was found in HG+INSU+ALEN group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate of osteoblasts in high concentration of glucose environment decreased after addition of INSU or ALEN comparing to NG ( $P < 0.05$ ). However, the apoptosis rate in HG+INSU+ALEN group significantly decreased comparing to other groups ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** INSU and ALEN promote the proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts, and reduce the apoptosis rate of these cells. INSU and ALEN have protective effects on MC3T3-E1 cells in high glucose environment.

**Key words:** MC3T3-E1 cells; Insulin; Alendronate; Proliferation; Apoptosis

作者单位: 225300 泰州,江苏省泰州市人民医院老年科(赵春芝);山西医科大学第二医院内分泌科(李兴);江苏省泰州市人民医院骨科(娄方勇)

通讯作者: 李兴, Email: lixinglaoshi@yahoo.com.cn

随着人类生活水平的逐步提高,糖尿病的发病率呈逐年上升趋势,而糖尿病骨质疏松并发症也日趋显著。糖尿病性骨质疏松症(diabetic osteoporosis, DOP)已成为继发性骨质疏松的研究热

点,DOP是由于糖尿病患者胰岛素绝对或相对缺乏,引起机体糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱,钙、磷、镁等元素代谢障碍而导致骨量减少和骨的微细结构破坏,继而导致生物力学性能降低,骨脆性增加,容易发生骨折的一种全身代谢性疾病。成骨细胞是骨形成、骨骼发育与生长的主要细胞,成骨细胞的增殖与凋亡对维持骨的转换平衡起着重要作用。骨质疏松症的发生主要与成骨细胞骨形成功能衰退和破骨细胞骨吸收功能增强有关,因而在细胞水平上观察药物对骨细胞的影响是评价防治骨质疏松症药物药效的方法之一。

阿仑膦酸钠是第三代双膦酸盐类药物,多用于增龄或绝经后骨质疏松症的治疗。胰岛素是治疗糖尿病的经典药物,可促进成骨细胞增殖和分化。此实验通过上述两种药物干预高糖环境下体外培养的成骨细胞,在细胞水平上探讨其对成骨细胞的影响,指导糖尿病骨质疏松的治疗。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验的细胞:**MC3T3-E1 细胞,购于浙江大学医学部。

**1.2.2 试剂和药品:**细胞培养液 DMEM/F12 (Hyclone),胎牛血清(四季清公司),重组人胰岛素(吉林通化东宝药业股份有限公司馈赠),阿仑膦酸钠(石家庄制药集团华盛制药有限公司馈赠),5-溴-2-脱氧尿嘧啶(5-bromo-2'-deoxyuridine; BrdU),细胞增殖检测试剂盒购于 Roche (Nutley, NJ, USA),BD pharmingen Annexin V-FITC PI 凋亡试剂盒(USA),胰酶(大连生物有限公司进口分装),DMSO (sigma BRL, USA),主要仪器:生物洁净工作台(BCM-1000),恒温生化箱(303As-2),细胞培养箱(Heraeus, BB5060),倒置相差显微镜(XSZ-D<sub>2</sub>),流式细胞仪(USA B-D 公司,型号 FACS Calibur),高速冷冻离心机,图象摄影成像系统(020-507010, LEICA BioiMED)。

### 1.2 方法

**1.2.1 含血清细胞培养:**将 MC3T3-E1 细胞以  $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$  接种于以 DMEM 为完全培养基(10% 胎牛血清、100 U  $\cdot \text{ml}^{-1}$  青霉素和 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  链霉素)的培养瓶中,置于 37℃,饱和湿度 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养,24 h 首次换液,以后每 2 天换液 1 次,5~6 天细胞基本融合传代,更换无血清培养。

**1.2.2 无血清细胞培养:**24 孔板( $9 \times 10^3$  细胞数/

孔),96 孔板( $1.5 \times 10^3$  细胞数/孔),每组 3 孔,DMEM 完全培养液,24 h 首次换液,以后每 2 天换液 1 次,细胞融合近 80% 改为高糖环境下培养(设置对照),按照胰岛素和阿仑膦酸钠干预的不同而分为如下各组:①对照组(NG);②高糖组(HG);③高糖+胰岛素组(HG+INSU);④高糖+阿仑膦酸钠组(HG+ALEN);⑤高糖+胰岛素+阿仑膦酸钠组(HG+INSU+ALEN)。干预 24 h 后采用 BrdU 试剂盒对细胞进行增殖检测,用流式细胞仪测定凋亡。

**1.2.3 细胞增殖的检测:**采用 BrdU 试剂盒,在细胞增殖的过程中,BrdU 可以取代胸腺嘧啶镶嵌到细胞 DNA 中,成骨细胞种植在 96 孔板中,待长至 80%~90% 融合时无血清培养 24 h,然后分别用 HG、HG+INSU、HG+ALEN、HG+INSU+ALEN 处理细胞 24 h,BrdU 标记增殖细胞 4 h,然后固定细胞,按照试剂盒使用说明检测。在显微镜下随机计数 10 个高倍视野中细胞总数 BrdU 阳性细胞数,计算标记百分数绘制直方图。

**1.2.4 细胞凋亡的检测:**对数生长期的 MC3T3-E1 细胞以  $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  密度接种于 6 孔板,每孔 3 ml,用含 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h 换无血清 DMEM 再培养 24 h,开始加药干预,设置对照组(无血清 DMEM 培养)5 组细胞培养 24 h 后,0.25% 胰酶消化离心,PBS 液清洗,离心,弃去培养液。用孵育缓冲液重悬细胞,避光送山西医科大学流式细胞仪(购于美国 BD 公司,型号 FACS Calibar, cell Quest 软件分析)进行检测,流式细胞仪激发光波长用 488 nm,用一光波长为 515 nm 的滤器检测 FITC 荧光,另一波长大于 560 nm 的滤器检测 PI。在流式细胞仪的直方图上,以对数方式获取 10 000 个细胞,阳性细胞用百分比方式计算, $M_1$  为凋亡率。

### 1.3 统计学处理

全部资料采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,采用随机区组设计分析进行统计学处理, $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 成骨细胞增殖能力测定结果

胰岛素和阿仑膦酸钠对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) 见图 1。结果用实验组与对照组吸收度的百分比值来表达,各组结果显示:HG 组、HG+INSU 组、HG+ALEN 组、HG+INSU+ALEN 组与对照组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ),其中 HG 组成骨细胞增殖率较 NG 组下降,干预组上升,再对

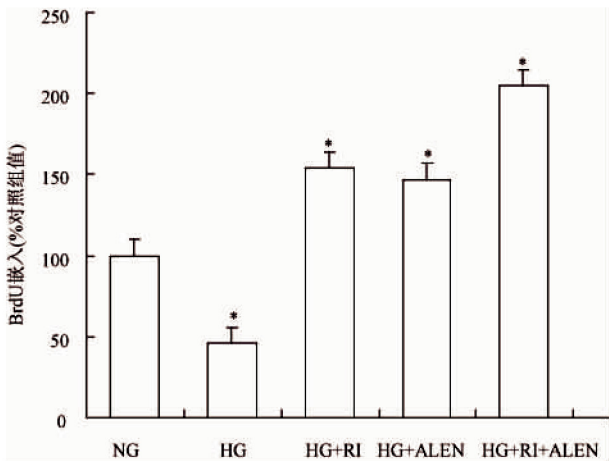


图 1 胰岛素和阿仑膦酸钠对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响  
 $n = 5$ , 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

各组之间两两比较, HG + INSU + ALEN 组较 HG 组、HG + INSU 组、HG + ALEN 组上升最显著 ( $P < 0.05$ ), 而 HG + INSU 组与 HG + ALEN 组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

2.2 成骨细胞的凋亡检测结果

流式细胞仪检测结果显示: 各组均呈现不同程度的凋亡率, 干预后均使凋亡率降低, 在高糖环境下单一加用胰岛素和阿仑膦酸钠均有降低, 与对照组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 但 HG + INSU + ALEN 组较其他组显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2。胰岛素和阿仑膦酸钠对 MC3T3-E1 细胞凋亡影响的叠加图见图 3。

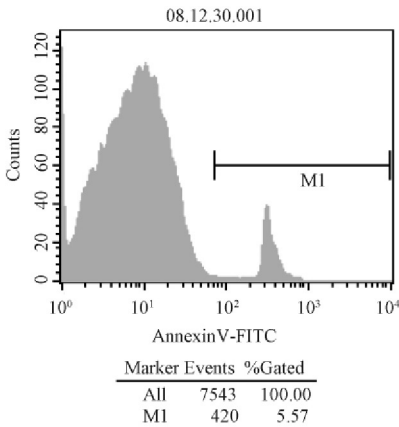


图 2A NG 组凋亡直方图

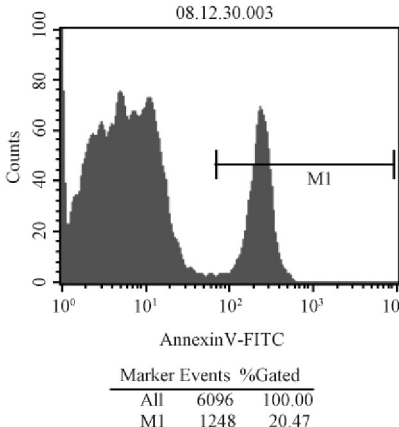


图 2B HG 组凋亡直方图

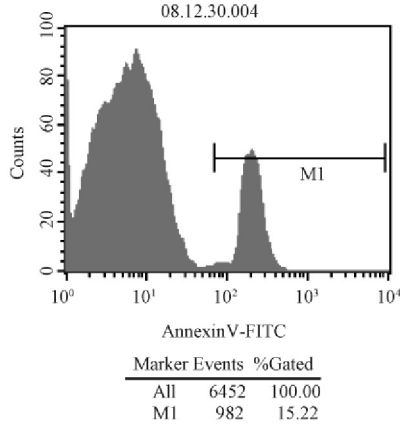


图 2C HG + INSU 组凋亡直方图

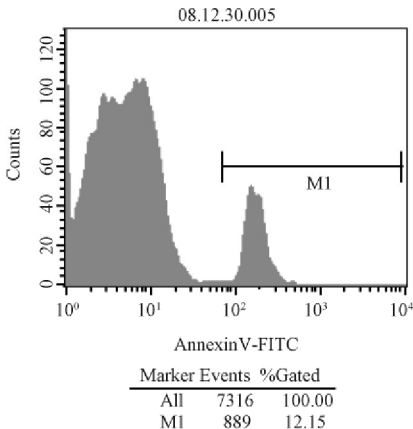


图 2D HG + ALEN 组凋亡直方图

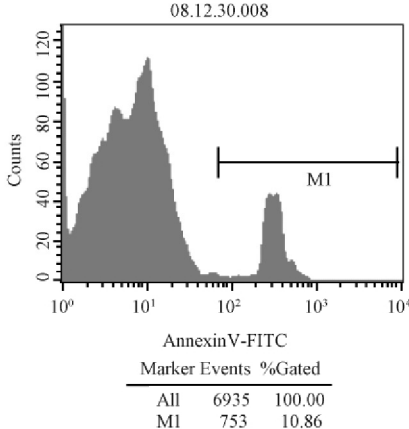


图 2E HG + INSU + ALEN 组凋亡直方图

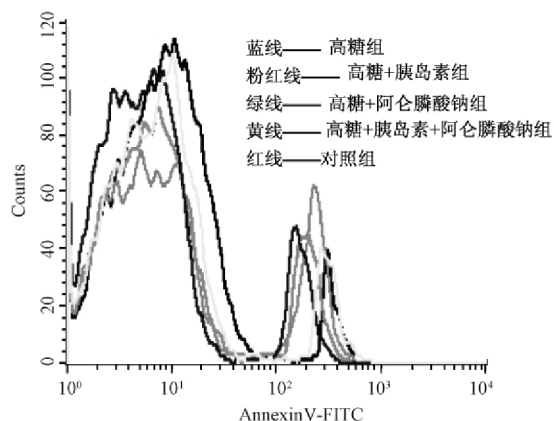


图3 胰岛素和阿仑膦酸钠对 MC3T3-E1 细胞凋亡影响的叠加图

### 3 讨论

成骨细胞是骨形成、骨骼生长和发育的重要细胞,它能向其周围组织产生胶原纤维和非胶原蛋白,生成类骨质和促进类骨质矿化,形成的新骨质修补破骨细胞骨吸收形成的骨陷窝。成骨细胞功能减退导致新骨形成量减少,对骨吸收陷窝的修复能力减弱,造成骨小梁变细、薄弱、穿孔,皮质骨呈多空性改变。因此,促进成骨细胞形成是防治骨质疏松症的主要切入点。高糖培养基直接用于病理来源的成骨细胞原代培养时,不仅抑制了成骨细胞分化及矿化而且抑制了其增殖<sup>[1]</sup>。高血糖可以抑制成骨细胞分化转录基因的表达,最终促进其凋亡<sup>[2]</sup>。糖代谢异常状态下成骨细胞的功能下降和数量不足,引起骨形成减少并且变慢,骨吸收超过骨形成,导致骨量减少,是骨质疏松发生发展的重要原因。本研究发现,高糖可抑制成骨细胞增殖促进其凋亡,经胰岛素和阿仑膦酸钠干预后增殖率上升,凋亡率下降,证实了胰岛素和阿仑膦酸钠对高糖环境下 MC3T3-E1 细胞具有保护作用。

本实验选用的 MC3T3-E1 小鼠成骨样细胞是公认的近十种永久性成骨样细胞系,具备成骨样细胞的大部分功能,可用于基础研究和观察等。本研究参考国内文献确定胰岛素药物干预剂量<sup>[3]</sup>,阿仑膦酸钠作用于成骨细胞的文献较多,其剂量从  $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  mol · L<sup>-1</sup> 不等,但  $10^{-7}$  mol · L<sup>-1</sup> 剂量对成骨细胞有增殖作用<sup>[4]</sup>,本实验结果与之相符。体外研究报道,ALN 对成骨细胞的增殖具有促进作用<sup>[5]</sup>。本研究结果显示:单用胰岛素和阿仑膦酸钠均能明显增加小鼠成骨样细胞的数量,联用上述两种药物

该作用则更为显著。因此,成骨细胞数量的增加可能与胰岛素和阿仑膦酸钠的促增殖作用有关。

在临床上,糖尿病高血糖会导致骨量减少和骨质疏松的产生,但具体机制不明确。糖尿病可从许多方面影响骨代谢,如胰岛素缺乏、高血糖、糖基化终末产物积累、微血管病变等<sup>[6]</sup>。其中胰岛素缺乏与 1 型糖尿病合并骨质疏松关系更为密切。近年来的研究显示,胰岛素缺乏、胰岛素样生长因子减少、炎症因子白介素、肿瘤坏死因子等引起成骨细胞活性降低及数目减少,导致骨形成障碍是其中重要的机制<sup>[7]</sup>。胰岛素、胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子可阻止成骨细胞凋亡,而白介素-1、肿瘤坏死因子则可促进成骨细胞凋亡<sup>[8]</sup>。国内亦有研究,在对 2 型糖尿病大鼠胫骨牵引成骨过程中发现,骨组织的再生与修复能力明显降低,成骨细胞的增殖也明显降低<sup>[9]</sup>。

细胞的凋亡是一个主动的、程序化的细胞固有的死亡过程,受细胞内特定因子及多种因子的调控。1 型糖尿病模型鼠在持续高血糖 (30nM) 作用 21 天出现了骨丢失,而高血糖正是直接原因<sup>[10]</sup>。1 型糖尿病的胰岛素缺乏状态,以及诱发机体的炎症状态都增强了成骨细胞前凋亡基因的表达<sup>[11]</sup>。在本实验中高糖组则模拟了持续高糖的状态,结果显示高糖对成骨细胞有促凋亡作用,对照组成骨细胞的凋亡率为 5.57%,高糖环境下的凋亡率是 20.47%,而加用胰岛素或阿仑膦酸钠凋亡率明显降低,提示胰岛素和阿仑膦酸钠对高糖诱导的成骨细胞凋亡有明显的抑制作用。至于抗凋亡的具体机制是与成骨细胞合成碱性磷酸酶的能力有关还是抑制了抗凋亡蛋白的表达,抑或是存在其他机制,有待进一步研究。胰岛素是治疗糖尿病最经典药物,本研究从细胞水平上证实了其对高糖环境下成骨细胞的抗凋亡作用,特别是与阿仑膦酸钠联用其效果更明显,提示胰岛素和阿仑膦酸钠均有抑制成骨细胞凋亡、促进增殖的作用。

双膦酸盐抑制骨吸收的作用机理是通过选择性吸附在骨基质表面,被破骨细胞摄入后通过多种途径抑制破骨细胞介导的骨吸收,成骨细胞是负责骨形成的细胞,该药物作用于成骨细胞通过调节细胞因子的释放,抑制其分泌破骨细胞刺激因子或促使其释放破骨细胞抑制因子,间接抑制骨吸收,进而减少成骨细胞蛋白质的合成<sup>[12]</sup>。胰岛素影响骨代谢的机制为:胰岛素具有抑制腺苷酸环化酶活性和环磷酸腺苷 (cAMP) 合成的作用,后者具有促进骨吸

收作用<sup>[13]</sup>。胰岛素可兴奋 25-羟化酶,协同甲状旁腺激素调节  $\alpha_2$  羟化酶活性,抑制腺苷酸环化酶和环磷酸腺苷(cAMP)合成的作用,抑制高血糖对骨髓源基质细胞衍生的成骨细胞分化和增殖的毒性作用<sup>[14]</sup>。成骨细胞表面存在胰岛素受体,胰岛素能直接刺激成骨细胞,促进成骨细胞内氨基酸蓄积、骨胶原合成,分泌骨基质<sup>[15]</sup>。

综上所述:胰岛素和阿仑膦酸钠能促进成骨细胞增殖,对高糖环境中成骨细胞有保护作用,增加了细胞量,减少了凋亡,提示胰岛素和阿仑膦酸钠均可防治骨质疏松。在应用胰岛素治疗糖尿病的同时,联合阿仑膦酸钠治疗骨质疏松,疗效会更理想。

#### 【参 考 文 献】

- [1] 吴璇,刘洪臣,鄂玲玲. 建模时间及糖浓度对糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞培养的影响. 中华老年口腔医学杂志, 2008, 6 (1):48-51.
- [2] Kumeda Y. Bone metabolic abnormality in diabetes: especially about osteoblast dysfunction. Clin Calcium, 2006, 16 (8):1277-1285.
- [3] 马艳芬,李万根,陈澍. 胰岛素和胰岛素样生长因子对人成骨样细胞 MG63 骨钙素基因表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 2007, 6 (13):398-401.
- [4] 吴宗键,王继芳,卢世璧,等. 阿仑膦酸钠对人成骨细胞增殖的影响. 中国矫形外科杂志, 2002, 9 (5):464-466.
- [5] Im GI, Qureshi SA, Kenney J, et al. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. Biomaterials, 2004, 25 (18):4105-4115.
- [6] Wada S. Therapeutic approaches for diabetic osteopathy. Clin Calcium, 2006, 16 (8):1297-1304.
- [7] Liu R, Bal H S, Desta T, et al. Diabetes Enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. J Dent Res, 2006, 85 (6):510-514.
- [8] He HB, Liu RK, Desta T, et al. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. Endocrinology, 2004, 145 (1):447-452.
- [9] LIU Zhendong, ZHANG Chaoyue, ZHAN Ruisen, et al. Effect of type II diabetes mellitus on reformation and repairment of bone. China Journal of Modern Medicine, 2004, 14 (13):71-73 (in Chinese).
- [10] Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. J Cell Biochem, 2006, 99 (2):411-424.
- [11] Liu R, Bal HS, Desta T, et al. Diabetes Enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. J Dent Res, 2006, 85 (6):510-514.
- [12] 董启榕,陈向阳. 骨性关节炎软骨下骨力学性能变化的实验研究. 中华创伤杂志, 2007, 23 (5):386-389.
- [13] 覃美琳. 糖尿病合并骨质疏松的研究进展. 实用糖尿病杂志, 2008, 1 (4):3-5.
- [14] Gopalakrishnan V, Vigneau RC, Arunakaran J, et al. Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages. Biochem Cell Biol, 2006, 84 (1):93-101.
- [15] 陈晓红,侯建明. 2 型糖尿病性骨质疏松研究进展. 青岛医药卫生, 2008, 40 (3):201-204.

(收稿日期: 2010-04-23)