

· 论 著 ·

GLP-1 对 GK 糖尿病大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化能力的影响

王春雷 朱紫薇 金晖*

东南大学附属中大医院内分泌科, 南京 210009

中图分类号: R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 03-0298-06

摘要: **目的** 观察胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 对 Goto-Kakizaki 鼠骨髓间充质干细胞 (Bone marrow stromal cell, BMSCs) 成骨分化能力的影响, 并探讨其可能作用机制。 **方法** 贴壁法取 8 周龄 GK 鼠 BMSCs, 逆转录 PCR 法验证 BMSCs 表达 GLP-1 受体, MTT 法筛选 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 的最佳刺激浓度, 选取该浓度干预 GK 鼠 BMSCs, 观察其成骨分化相关指标; 第 7 d、14 d 测定碱性磷酸酶活性, 第 14d 应用实时定量 PCR 检测 ALP、RUNX2、OCN、Smad1、 β -catenin、OPG 和 RANKL 的表达。 **结果** 1. GK 鼠 BMSCs 中存在 GLP-1 受体; 2. 20 nmol/L 的 GLP-1 对细胞刺激作用最佳; 3. 成骨诱导后 ALP 活性升高。成骨诱导 7 d, 诱导组和 GLP-1 干预组的 ALP 活性相对于对照组均明显升高 ($P < 0.05$); 成骨诱导 14 d, 诱导组和 GLP-1 干预组的 ALP 活性进一步升高 (与自身 7d 时相比, $P < 0.05$), 且均高于对照组 ($P < 0.05$); GLP-1 干预组 ALP 活性在第 7d 时稍高于诱导组 ($P > 0.05$), 第 14d 时明显高于诱导组 ($P < 0.05$); 4. 与正常成骨诱导组相比, GLP-1 干预组 ALP 和 RUNX2 表达量均明显增加 ($P < 0.05$), OCN 的表达量增加, 但无统计学意义。GLP-1 干预组表达 Smad1 减少 ($P > 0.05$), β -catenin 明显增多 ($P < 0.05$)。GLP-1 干预组表达 OPG 增加 ($P > 0.05$), RANKL 减少 ($P < 0.05$), OPG/RANKL 升高 ($P < 0.05$)。 **结论** 1. GK 鼠 BMSCs 上存在 GLP-1 受体; 2. GLP-1 可促进 GK 鼠 BMSCs 向成骨细胞分化, 并调节 Wnt 通路部分基因的表达及 OPG/RANK/RANKL 轴的动态平衡。

关键词: 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1); 骨向分化; 信号通路

Effect of GLP-1 on the osteogenic differentiation by bone mesenchymal stem cells in Goto-Kakizaki rats

WANG Chunlei, ZHU Ziwei, JIN Hui

Department of Endocrinology, The Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: JIN Hui, Email: jinhuison@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on the ability of osteoblast differentiation from bone marrow stromal cells (BMSCs), and the possible mechanism. **Methods** BMSCs was extracted from 8-week-old GK rats. Real-time RT-PCR was used to evaluate the expression level of GLP-1 receptor. MTT assay was used to assess the best concentration of stimulation of GLP-1. GLP-1 at this concentration was used to induce cell differentiation from BMSCs to osteoblasts. ALP staining was performed on the 7th and 14th day of osteoblasts induction. Real-time RT-PCR was used to evaluate the expression levels of ALP, RUNX2, OCN, Smad1, β -catenin, OPG, and RANKL on the 14th day. **Results** There were GLP-1 receptors in BMSCs. The best concentration of cell stimulation with GLP-1 was 20 nmol/L. ALP activity increased after osteogenic induction. After 7d osteogenic induction, ALP activity in induction group and GLP-1 intervention group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). After 14d osteogenic induction, ALP activity in induction group and GLP-1 intervention group was even much higher than that in the control group and that on 7d ($P < 0.05$). The activity of ALP in GLP-1 group was slightly higher than that in induction group on the 7th day, but significantly higher on the 14th day ($P < 0.05$). The expression levels of ALP and RUNX2 increased markedly in GLP-1 group ($P < 0.05$). Although the expression level of OCN increased, there was no statistical significance. The expression level of Smad1 reduced in GLP-1 group ($P < 0.05$). The expression level of β -catenin increased significantly ($P < 0.05$). After the intervention of GLP-1, the expression level of OPG increased ($P > 0.05$), the expression level of RANKL decreased ($P < 0.05$), and the expression level of OPG/RANKL increased ($P < 0.05$).

*通讯作者: 金晖, Email: jinhuison@126.com

Conclusion There were GLP-1 receptors in BMSCs of GK rats. GLP-1 can promote the osteoblast differentiation from BMSCs and regulate the expression of some genes in Wnt signal pathway and influence the dynamic balance in OPG/RANK/RANKL axial.

Key words: GLP-1; Osteogenic differentiation; Signal pathway

糖尿病是一种以慢性高血糖为特征的内分泌代谢综合征。糖尿病可并发多种并发症,心脑血管、肾、眼及神经系统病变已广为人们所知,糖尿病合并钙磷代谢紊乱和骨质疏松已渐为众多学者公认。GLP-1 具有葡萄糖浓度依赖性的促胰岛素分泌作用,并且通过抑制食欲等多种途径维持血糖的平稳^[1]。GLP-1 类似物和 GLP-1 受体激动剂作为新型糖尿病治疗药物具有降低血糖、促进胰岛 β 细胞再生、减轻体重及保护心血管等多重效应,有着广阔的临床应用前景。目前关于 GLP-1 与骨代谢的研究较少,临床上关于 GLP-1 对糖尿病患者骨代谢影响的回顾性研究尚无,但是 Monami 等^[2]就 DPP4 抑制剂与骨折二者关系进行 Meta 分析,认为 DPP4 抑制剂能降低 2 型糖尿病患者骨折发生的风险。本部分实验拟在体外诱导 GK 鼠 BMSCs 向成骨细胞分化的过程中加入 GLP-1 进行干预,观察 BMSCs 骨向分化能力是否增强,初探 GLP-1 对 BMSCs 的直接作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

GLP-1 (7-36) (美国 Sigma 公司); α -MEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (FBS) (美国 Hyclone 公司); 成骨分化诱导液 (美国 sigma 公司); RNA 提取试剂 Trizol (美国 Invitrogen); cDNA 第一链合成试剂盒 (立陶宛 Fermentas); $2 \times$ Taq PCR Mastermix (TIANGEN 产品); TritonX-400 (美国 sigma); 碱性磷酸酶染色试剂盒 (美国 sigma); 硝酸银 (美国 sigma); 番红 O (美国 sigma); MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒, 碱性磷酸酶 (ALP) 测定试剂盒, BCA 蛋白含量检测试剂盒均由南京凯基生物有限公司提供; DNA Marker (100bp、250bp、500bp、750bp、1000bp、2000bp) 均购自北京天为时代科技有限公司; 目的基因和内参照引物委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 主要仪器

二氧化碳恒温细胞培养箱 (美国 ThermoFisher 公司); qPCR 循环仪 (StepOnePlus 型, 美国 ABI 公司); 全自动酶标仪: MK3 型 (美国 ThermoFisher 公司); 流式细胞仪 (FACSCALIBUR, 美国 SD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 BMSCs 的制备: 选取 8 周龄的雄性 GK 大鼠, 留取股骨和胫骨骨髓, 制成单细胞悬液后转移至 15ml 离心管, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, α -MEM 完全培养基重悬后计数, 以 1×10^6 /L 的细胞浓度接种于 25 cm² 培养瓶中, 置入 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。待细胞长满瓶底后传代备用。

1.3.2 逆转录 PCR (reverse transcription PCR) 检测 GK 大鼠 BMSCs 上 GLP-1 受体 (GLP-1 receptor, GLP-1R) 的表达: 取生长状态良好的 GK 大鼠的 P3 BMSCs, Trizol 法提取 RNA, 并通过 GeneQuant 将 RNA 的 Ratio 调节在 1.8-2.0 之间。取 2.0 μ l RNA 样品, 0.5 μ l RNA 酶抑制剂及 2.0 μ l 随机引物加入一无 RNA 酶的 200 μ l EP 管中, 用灭活 DEPC 水补足至 8 μ l, 小心混匀。65℃ 加热 5 min, 室温放置 10min, 短暂离心 5s 以将所有溶液收集到管底。按次序分别加入下列试剂: M-MuLV 5 $\times$ Buffer 5.0 μ l, dNTPs (2.5 mM) 2.5 μ l, RNA 酶抑制剂 (20 U $\cdot$ μ l⁻¹) 1.0 μ l, M-MuLV 逆转录酶 (200 U $\cdot$ μ l⁻¹) 1.0 μ l, DEPC 水 (补足至 25 μ l) 5.5 μ l, 小心混匀, 反应混合物于 42℃ 保温 60 min 后, 升温至 72℃ 加热 10 min 使逆转录酶灭活, DNA、RNA 杂合分子变性解离。立即转入冰浴中冷却 5 min, 然后短暂离心。反应产物立即扩增, 通过定时定量 PCR 检测 GLP-1 受体基因表达。

1.3.3 MTT 法检测 GLP-1 对 GK 大鼠 BMSCs 的细胞毒性作用: 将生长状态良好的 GK 大鼠 P2 BMSCs 接种于 96 孔培养板, 接种密度为 5×10^3 个/孔, 每孔 100 μ l α -MEM 完全培养基, 每板种植 50 孔, 共种植 3 板。待细胞融合 80% 以上时 (约 24 h 后), 予 0、1、10、20、50、100、1000 nmol/L 的 GLP-1 进行干预, 每个浓度 4 个复孔, 与之对应设置 4 平行对照孔。不同浓度 GLP-1 干预 24 h、48 h 和 72 h 后, 进行 MTT 检测, 选取合适浓度。

1.3.4 碱性磷酸酶 (ALP) 染色: 取生长状态良好的第 3 代 GK 大鼠 BMSCs, 按 2×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 先用 α -MEM 完全培养基培养至细胞融合 80% 以上时, 一板用成骨细胞诱导培养基诱导, 另一板用含有 20 nmol/L 的 GLP-1 的成骨诱导培养基换液

(根据之前 MTT 法检测 GLP-1 的细胞毒性结果), 每 3 天换液一次。第 14d 时进行 ALP 染色: 倒净各孔内培养液, PBS 液清洗 2 遍, 纸上拍干后加入固定剂(26% 柠檬酸盐液 + 66% 丙酮 + 37% 甲醛溶液, 4℃ 冰箱保存, 用前加热至 18℃ - 26℃) 1.5 ml/孔, 固定 30s 后倒净, 去离子水水洗拍干, 滴加染料(亚硝酸钠 0.5 ml + FRV-Alkaline 0.5 ml + ddH₂O 22.5 ml + Naphthol AS-BI 0.5 ml) 1.5 ml/孔, 避光 15 - 30 min, 再水洗、拍干, 苏木精 1ml/孔复染, 水洗拍干后镜下拍照。

1.3.5 骨矿结节 Vonkossa 染色: 种板、换液、干预均与碱性磷酸酶染色相同, 染色于成骨诱导第 28d 进行: 倒净各孔内培养液, PBS 液清洗 2 遍, 4% 多聚甲醛 1.5 ml/孔固定 15min, 倒净后双蒸水清洗 3 次, 拍干, 每孔加入 2 ml 的 5% 硝酸银溶液, 紫外线下照射 1 h(6 孔板揭去盖子), 水洗 3 次, 5% 硫代硫酸钠 1.5 ml/孔孵育 2 min, 双蒸水漂洗后 0.05% 中性红 1.5 ml/孔复染 3 min, 水洗后于倒置相差显微镜下拍照。

1.3.6 碱性磷酸酶活性测定: 将 GK 大鼠骨髓间充质干细胞接种至 6 孔板, 2×10^4 细胞/孔, 共接种 4 板, 先用 α -MEM 完全培养基培养至细胞融合 80% 以上时, 两板用成骨细胞诱导培养基诱导, 另两板用含有 20 nmol/L 的 GLP-1 的成骨诱导培养基换液(根据之前 MTT 法检测 GLP-1 的细胞毒性结果), 每 3 天换液一次, 分别在第 7 d 和第 14 d 行碱性磷酸酶活性测定。

1.3.7 Real-Time PCR 检测成骨细胞相关特异性基因表达: 取体外扩增的第 2 代 GK 大鼠 BMSCs, 以每瓶 2×10^4 的浓度接种于 6 孔板, 共接种 2 板, 先用 α -MEM 完全培养基培养至细胞融合 80% 以上时, 一板用成骨细胞诱导培养基诱导, 另一板用含有 20 nmol/L 的 GLP-1 的成骨诱导培养基换液(根据之前 MTT 法检测 GLP-1 的细胞毒性结果), 每 3 天换液一次, 于第 14 d Trizol 法提取 RNA, 行 RNA 浓度、纯度测定, 逆转录合成 cDNA: 25 μ l 反应体系包括: 样品 RNA 2.0 μ l, RNA 酶抑制剂 0.5 μ l, 随机引物 2.0 μ l, M-MuLV 5 $\times$ Buffer 5.0 μ l, dNTPs (2.5 mM) 2.5 μ l, RNA 酶抑制剂 (20 U $\cdot$ μ l⁻¹) 1.0 μ l, M-MuLV 逆转录酶 (200 U $\cdot$ μ l⁻¹) 1.0 μ l, DEPC 水补足至 25 μ l, 42℃ 保温 60 min 后, 升温至 72℃ 加热 10 min 使逆转录酶灭活, DNA、RNA 杂合分子变性解离。立即转入冰浴中冷却 5 min, 然后短暂离心。PCR: 各取 2 μ l 逆转录产物进行 PCR 扩增, 20 μ l 反应体系,

其中 SYBR Green Mix 10 μ l, 上下游引物各 0.6 μ l, dd H₂O 6.8 μ l。94℃ 预变性 2 min, 然后 94℃ 变性 45 s, 56℃ 或 57℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s 进行 40 个循环扩增, 再以 72℃ 延伸 7 min。

ALP 上游引物: 5'-AGGCAGGATTGACCACGG-3'; 下游引物: 5'-TGTAGTTCTGCTCATGGA-3'。PCR 产物 440bp。

RUNX2 上游引物: 5'-CGCACGACAACCGCACCAT-3'; 下游引物: 5'-CAGCACGGAGCACAGGAAGTT-3'。PCR 产物 92bp。

OCN 上游引物: 5'-GGTGCAAAGCCCA GCGACTCT-3'; 下游引物: 5'-GGAAGCCAATGTG GTCCGCTA-3'。PCR 产物 199bp。

GLP-1R 上游引物: 5'-GTGATAGCCAAGCTGAAGGC-3'; 下游引物: 5'-GTCCCTCTGGATGT TCAAGC-3'。PCR 产物 300bp。

Smad1 上游引物: 5'-CTTTTCAGATGCCAGCCGAC-3'; 下游引物: 5'-TCTGCTCCCCAGC CCTTC-3'。PCR 产物 224bp。

β -catenin 上游引物: 5'-AGCAGTTCGTG GAGGGCGT-3'; 下游引物: 5'-CATTCCTGGAGTGG AGCAACTCT-3'。PCR 产物 273bp。

OPG 上游引物: 5'-TCCTGGCACCTACCTAATACAGCA-3'; 下游引物: 5'-CTACACTCTC GGCATTCACTTTGG-3'。PCR 产物 117bp。

RANKL 上游引物: 5'-AGCCTTTCAGGG GCCGTGC-3'; 下游引物: 5'-GGGCCACATCGAG CCACGAA-3'。PCR 产物 104bp。

β -actin 上游引物: 5'-CTACAATGAGCT GCGTGTGG-3'; 下游引物: 5'-TAGCTCTTCTCCAG GGAGGA-3'。PCR 产物 221bp。

每个样本检测均重复 3 次, 反应以 β -actin 为内对照, 采用比较循环阈值法 (2- $\Delta\Delta$ Ct) 来分析样本中的 ALP、RUNX2、OCN、Smad1、 β -catenin、OPG 和 RANKL 的相对含量。

1.3.8 统计学方法: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPASS18.0 统计软件分析数据, ALP 活性指标采用两因素方差分析进行显著性检验, 其余指标采用单因素方差分析进行检验, 组间比较采用 S-N-K 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GK 鼠 BMSCs 上 GLP-1 受体的表达

凝胶图谱扫描显示在 Marker 300bp 处有一高亮

条带, 先前查阅文献提示 GLP-1R 大小为 300bp, 证明 GK 鼠 BMSCs 存在 GLP-1 受体(见图 1)。

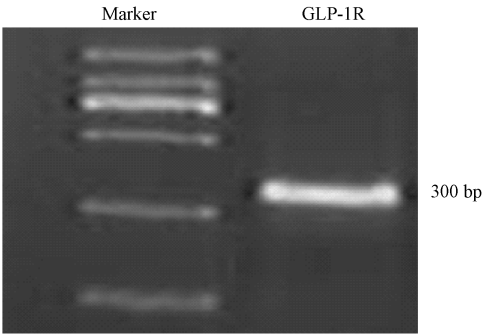


图 1 逆转录 PCR 检测 GK 鼠 BMSCs 上 GLP-1R 的表达

Fig. 1 mRNA expression of GLP-1 receptor in GK rat BMSCs detected by RT-PCR.

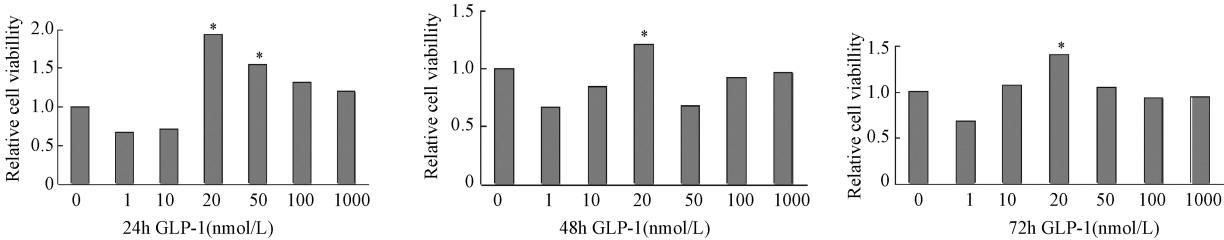


图 2 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 活力的影响

Fig. 2 Effect of various concentrations of GLP-1 on viability of GK rat BMSCs.

* $P < 0.05$ compared with 0 nmol/L group.

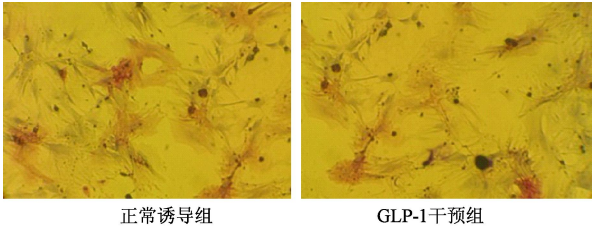


图 3 GK 大鼠对照组与 GLP-1 干预组 BMSCs 成骨诱导 ALP 染色(×100)

Fig. 3 Alkaline phosphatase staining of osteoblastic induction in control group and GLP-1 group (×100)

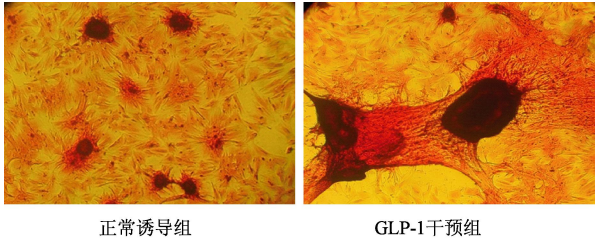


图 4 GK 大鼠对照组与 GLP-1 干预组 BMSCs 成骨诱导 Vonkossa 染色(×100)

Fig. 4 Von Kossa staining of osteoblastic induction in control group and GLP-1 group (×100)

2.4 Vonkossa 染色测定 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 成骨分化的影响

GK 大鼠对照组与 GLP-1 干预组 BMSCs 经成骨诱导培养液培养 28 d, 细胞形态由梭形改变为多角形, 细胞间质内含较多矿盐沉积, 并可见矿化沉积形成的钙化结节。对照组矿化结节明显小于 GLP-1 干预组(见图 4)。

2.5 碱性磷酸酶活性测定 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs

2.2 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 的毒性作用

GK 鼠 BMSCs 成骨诱导过程中, 加入浓度梯度的 GLP-1 (0、1、10、20、50、100、1000 nmol/L), 分别作用 24、48、72 h, GLP-1 浓度为 1 nmol/L 时始终对细胞有毒性作用, 10、50、100、1000 nmol/L 在不同时间段对细胞毒性作用不同, 唯有 20 nmol/L 的 GLP-1 一直对 BMSCs 刺激效果最佳, 因此选用 20 nmol/L 的 GLP-1 进行实验(见图 2)。

2.3 碱性磷酸酶染色(ALP 染色)测定 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 成骨分化的影响

GK 大鼠对照组与 GLP-1 干预组 BMSCs 经成骨诱导培养液培养 14 d, 碱性磷酸酶染色可见细胞膜及胞浆内颗粒均呈阳性反应, 染色呈蓝黑色颗粒。两组阳性率未见明显差异(见图 3)。

成骨分化的影响

成骨诱导 7 d, 诱导组和 GLP-1 干预组的 ALP 活性相对于对照组都明显升高 ($P < 0.05$); 成骨诱导 14 d, 诱导组和 GLP-1 干预组的 ALP 活性进一步升高(与自身 7 d 时相比, $P < 0.05$), 且均高于对照组 ($P < 0.05$); GLP-1 干预组 ALP 活性在第 7 d 时稍高于诱导组 ($P > 0.05$), 第 14 d 时则明显高于诱导组 ($P < 0.05$)(见表 1)。

表 1 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 成骨分化 ALP 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of GLP-1 on ALP activity in GK rat BMSCs.

组别	n	ALP 活性(U/gprot)	
		7d	14d
对照组	4	7. 9463 ± 3. 1944	11. 9315 ± 3. 4968
诱导组	4	16. 4483 ± 4. 075 *	26. 0933 ± 2. 8486 [△]
GLP-1 组	4	18. 0018 ± 2. 1533 *	32. 2710 ± 3. 1006 ^{#△}

* $P < 0.05$ 与各自对照组相比; # $P < 0.05$ 与同时时间诱导组相比; $\Delta P < 0.05$ 与各自 7d 相比
* $P < 0.05$, compared with each control group; # $P < 0.05$ compared with induction group at the same time; $\Delta P < 0.05$ compared with each 7d group

2.6 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 成骨分化指标 mRNA 的影响

GLP-1 (20 nmol/L) 干预 GK 鼠 BMSCs 成骨分化 14 d, ALP 和 RUNX 2 表达较正常成骨诱导组明显增加($P < 0.05$), OCN 的表达增加, 但无统计学意义。Smad1 的表达减少($P > 0.05$), β -catenin 表达明显增多($P < 0.05$)。OPG 增加($P > 0.05$), RANKL 减少($P < 0.05$), OPG/RANKL 升高($P < 0.05$)(见表 2-4)。

表 2 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 成骨分化指标 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of GLP-1 on the osteoblastic differentiation marker mRNA in GK rat BMSCs.

分组	n	2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}		
		ALP	OCN	RUNX2
正常诱导组	3	0. 6274 ± 0. 0735	0. 6937 ± 0. 0927	0. 5274 ± 0. 0635
GLP-1 干预组	3	0. 8263 ± 0. 0093 *	0. 8163 ± 0. 0642	0. 7354 ± 0. 0527 *
		$P = 0. 0216$	$P = 0. 0663$	$P = 0. 0060$
		$t = 4. 6500$	$t = 1. 8831$	$t = 4. 3658$

* $P < 0.05$ 与各自对照组相比
* $P < 0.05$ compared with control group

表 3 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 成骨分化指标 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of GLP-1 on the osteoblastic differentiation marker mRNA in GK rat BMSCs.

分组	n	2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}	
		β -catenin	Smad1
正常诱导组	3	0. 8263 ± 0. 0424	0. 8193 ± 0. 0362
GLP-1 干预组	3	1. 1791 ± 0. 0073 *	0. 7911 ± 0. 0074
		$P = 0. 0024$	$P = 0. 1970$
		$t = 14. 2030$	$t = 0. 9540$

* $P < 0.05$ 与各自对照组相比
* $P < 0.05$ compared with control group

表 4 GLP-1 对 GK 鼠 BMSCs 成骨分化指标 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of GLP-1 on the osteoblastic differentiation marker mRNA in GK rat BMSCs.

分组	n	2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}		
		OPG	RANKL	OPG/RANKL
正常诱导组	3	0. 7293 ± 0. 0082	0. 5873 ± 0. 0073	1. 1473 ± 0. 0072
GLP-1 干预组	3	0. 8098 ± 0. 0625	0. 4283 ± 0. 0625 *	1. 9607 ± 0. 0589 *
		$P = 0. 0787$	$P = 0. 0242$	$P = 0. 0008$
		$t = 2. 2119$	$t = 4. 3765$	$t = 23. 7426$

* $P < 0.05$ 与各自对照组相比
* $P < 0.05$ compared with control group

3 讨论

糖尿病性骨质疏松(Diabetic osteoporosis, DO)作为糖尿病新型并发症近年来正日益受到医学界的重视,它是指糖尿病并发单位体积内骨量减少、骨组织微结构改变、骨强度减低、脆性增加等易发生骨折的一种全身性、代谢性骨病^[3]。研究显示,约 1/2-2/3 的糖尿病患者伴有骨密度(Bone mineral density, BMD)降低,有将近 1/3 患者可诊断为骨质疏松^[4]。1 型糖尿病患者已明确伴随有 BMD 下降,其髋部骨折风险是正常人的 6.9 倍,2 型糖尿病患者尽管 BMD 增加,但其髋部骨折风险相对正常人仍然升高 1.9 倍^[5]。随着糖尿病患病率不断上升,糖尿病性骨质疏松已成为糖尿病患者生存质量下降的主要原因之一,因此,研究糖尿病性骨质疏松的具体发病机制意义重大,可为糖尿病患者及早防治骨质疏松提供恰当的治疗依据。本研究从细胞层面研究 GLP-1 干预细胞效果及其可能作用机制。GLP-1R 由 463 个氨基酸组成,隶属于 G 蛋白偶联受体 B 家族中的胰高血糖素受体亚家族,广泛存在于人类和啮齿类动物的中枢神经系统、心血管、胰腺 β 细胞、胃肠道等组织中。GLP-1 通过与 GLP-1R 结合发挥不同生理作用^[6]。研究证实大鼠骨髓间充质干细胞和未成熟的成骨细胞上存在 GLP-1R^[7],但成熟的成骨细胞上尚未发现 GLP-1R^[8],体外实验也未发现它对成熟成骨细胞存在任何影响^[9]。GLP-1R 亦表达于人骨髓间充质干细胞,其可促进骨髓间充质干细胞的增殖,并阻止其向脂肪细胞分化^[10]。不同的动物实验证实了 GLP-1 在体水平可促进骨形成,抑制骨吸收^[7,9],这无疑为我们的细胞实验提供了研究依据,我们在实验中检测到 GK 鼠 BMSCs 表面确实表达 GLP-1R,以 20nmol/L GLP-1 体外干预 GK 鼠 BMSCs 向成骨细胞分化,GLP-1 干预组 ALP 活性

显著增高,表达 ALP、OCN 和 RUNX 2 等成骨细胞特异性基因均增加,初步证实了 GLP-1 可增强 GK 鼠 BMSCs 成骨分化能力。

结合其他研究者的动物实验和我们的细胞实验结果,我们不难得出 GLP-1 可促进骨形成这一结论,但 GLP 通过何种机制影响 BMSCs 向成骨分化仍然有待进一步深入研究。BMSCs 成骨分化过程受到多种细胞信号传导通路的调控,包括 Wnt/ β -catenin 信号途径、BMPs 信号途径等^[11]。Wnt/ β -catenin 信号通路对于正常骨骼的发生起着决定性作用,位于 Ihh 和 Osx 的下游的 β -catenin 可促进成骨细胞的成熟,因此 β -catenin 功能的缺失将会影响成骨细胞的增殖、分化与成熟^[12]。骨形态发生蛋白 (BMP-2) 属于 TGF- β 超家族成员,不仅可以促进成骨细胞及其前体细胞的增殖,而且能够促进成骨细胞的分化,在其下游信号传导过程中 Smads 是最重要的信号传导介质,Smad1 作为 Smads 的一种,可诱导 C2C12 细胞碱性磷酸酶 ALP 活化并增加骨钙蛋白的产生^[13]。研究表明,成骨细胞和基质细胞可以表达 RANKL,在巨噬细胞 M-CSF 存在的情况下,破骨细胞前体细胞表达的 RANK 可以和成骨细胞、基质细胞表达的 RANKL 配体相互作用结合,诱导破骨细胞前体细胞分化成破骨细胞,成熟的破骨细胞也可以表达 RANK,成骨细胞和基质细胞亦可以通过 RANKL 调节破骨细胞骨吸收的活性^[14]。OPG 是一种可溶性的 RANKL 受体,与 RANKL 结合可竞争性抑制 RANKL 与 RANK 的结合,进而抑制破骨细胞的分化^[15]。OPG/RANK/RANKL 这个调节轴是影响破骨细胞分化、发育、调节其功能唯一、最终的途径^[16]。OPG/RANKL 比值决定了破骨细胞分化、成熟及功能。本研究中, GLP-1 干预组表达 Smad1 变化不大, β -catenin 和 OPG/RANKL 比值均明显升高,表明 GLP-1 可能在 BMSCs 成骨分化过程中通过上调 Wnt 通路中 β -catenin 促进其向成骨细胞分化,另一方面 GLP-1 通过提高 OPG/RANKL 比值间接抑制破骨细胞功能,使得成骨细胞功能强于破骨细胞,也就是说, GLP-1 可部分逆转高糖环境造成 BMSCs 的骨向分化能力减弱。

【参 考 文 献】

[1] Svec F. Incretin physiology and its role in type 2 diabetes mellitus. J Am Osteopath Assoc, 2010,110(7 Suppl 7):eS20-24.
[2] Monami M, Dicembrini I, Antenore A, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of

randomized clinical trials. Diabetes Care, 2011, 34(11):2474-2476.
[3] 潘琦,郭立新. 糖尿病与骨质疏松. 中国实用内科杂志, 2009, 29(10):968-970.
Qi Pan, Lixin Guo. Diabetes and Osteoporosis. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2009, 29(10):968-970 (in Chinese).
[4] Strotmeyer ES, Cauley JA. Diabetes mellitus, bone mineral density, and fracture risk. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2007, 14(6):429-435.
[5] Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. Osteoporos Int, 2007, 18(4):427-44.
[6] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology, 2007, 132(6):2131-2157.
[7] Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, et al. Effect of GLP-1 Treatment on Bone Turnover in Normal, Type 2 Diabetic, and Insulin-Resistant States. Calcif Tissue Int, 2009, 84(6):453-461.
[8] Bollag Pd, Zhong Q, Phillips P, et al. Osteoblast-derived cells express functional glucose-dependent insulinotropic peptide receptors. Endocrinology, 2000, 141(3):1228-1235.
[9] Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. Endocrinology, 2008, (149):574-579.
[10] Sanz C, Vázquez P, Blázquez C, et al. Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 298(3):634-643.
[11] Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. Hormones (Athens), 2007, 6(4):279-294.
[12] Day TF, Yang Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(Suppl 1):19-24.
[13] Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, et al. Smad1 and Smad5 act downstream of intracellular signalling of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238:574-580.
[14] Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, et al. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoporosis tegerino osteoclast to genesis inhibitory factor. Eur J Biochem, 1998, 254:685-691.
[15] Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 256(3):449-455.
[16] Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoporosis tegerin Paracrine Regulators of Bone Metabolism and Vascular Function. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(4):5492-5531.

(收稿日期: 2014-06-11)