

· 论 著 ·

高糖诱导内皮-脂肪细胞转分化的机制探讨

倪利华¹ 宋凯云¹ 朱冬冬² 王立婷¹ 张玉霞¹ 汪晓晨¹ 刘必成¹ 汤日宁^{1*}

1.东南大学附属中大医院,东南大学附属中大医院溧水分院肾内科,江苏 南京 210009

2.上海长征医院,上海 200000

中图分类号: R587.1;R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0611-06

摘要: **目的** 探讨高糖刺激内皮细胞(endothelial cells, ECs)是否可通过内皮-间充质细胞转分化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT),继而转分化为脂肪细胞(即内皮-脂肪细胞转分化),从而介导糖尿病(diabetes mellitus, DM)骨质疏松形成。**方法** (1)体内实验:建立DM大鼠模型,随机分为正常对照(control, CTL)组和DM组。双能X线和micro-CT检测骨代谢特征。骨组织HE染色检测骨髓脂肪组织含量。骨组织荧光和Western印迹检测骨髓EndMT相关标记物(内皮标记物CD31和间充质标记物FSP1);(2)体外实验:培养原代人主动脉内皮细胞,分为对照(normal glucose, NG)组和高糖(high glucose, HG)组。免疫荧光和Western印迹检测高糖对ECs EndMT相关标记物变化。继而使用脂肪培养基对高糖刺激后ECs进行1周诱导分化,Western印迹检测脂肪相关标记物(PPAR- γ)的水平,油红O染色检测脂滴形成情况。**结果** DM组大鼠较CTL组体重明显下降,血糖、血肌酐、尿素氮、24 h尿蛋白显著升高($P<0.05$);骨密度扫描和micro-CT结果显示,与CTL组相比,DM大鼠股骨和腰椎骨密度显著下降,松质骨变少(骨体积和骨小梁数目减少,骨小梁离散度增加)($P<0.05$)。皮质骨无明显改变($P>0.05$);骨组织Western印迹结果显示DM大鼠CD31表达减少,FSP1表达增加($P<0.05$);免疫荧光结果示DM组骨髓CD31和FSP1表达重叠;体外高糖干预ECs,Western印迹和免疫荧光结果显示HG组细胞CD31表达减少,FSP1表达增加($P<0.05$)。进一步诱导脂肪细胞分化一周,HG组PPAR- γ 表达水平显著升高($P<0.05$),油红O染色阳性。**结论** 高糖诱导ECs发生内皮-脂肪细胞转分化,从而参与了DM骨质疏松的发生。

关键词: 糖尿病;骨质疏松;高糖;内皮细胞;脂肪细胞

Mechanism of high-dose of glucose-induced endothelial-to-adipocyte transition

NI Lihua¹, SONG Kaiyun¹, ZHU Dongdong², WANG Liting¹, ZHANG Yuxia¹, WANG Xiaochen¹, LIU Bicheng¹, TANG Rining^{1*}

1.Department of Nephrology, Lishui Branch of Zhongda Hospital, Zhongda Hospital, Southeast University School of Medicine, Nanjing 210009

2.Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200000, China

* Corresponding author: TANG Rining, Email: tangrn77@163.com

Abstract: Objective To investigate whether high-dose of glucose induces endothelial-to-adipocyte transition via endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) in endothelial cells (ECs), and mediates osteoporosis in diabetes mellitus (DM). **Methods** (1) In vivo experiment: a DM rat model was established. Rats were randomly divided into control (CTL) group and DM group. Dual energy X-ray Absorptiometry and micro-CT were performed to detect the skeletal changes. HE staining of the bone was used to detect the bone marrow fat. Bone tissue immunofluorescence and Western blotting were used to determine the EndMT-related markers (ECs marker CD31 and mesenchymal marker FSP1). (2) In vitro experiment: primary human aortic ECs were cultured. The cells were divided into normal glucose (NG) group and high glucose (HG) group. Immunofluorescence and Western blotting were used to determine the changes of EndMT-related markers. And then these cells were transformed into adipogenic culture medium for 1 week. Western blotting and oil red O staining were performed to detect the adipocytes. **Results** Compared to those in the CTL group, the body weight decreased in DM group, while blood glucose, serum creatinine, urea nitrogen, and 24-hour

基金项目: 国家自然科学基金(31571186, 81770735, 81470997);江苏省卫生计生委科教强卫重点医学人才资助(ZDRCA2016079);江苏省临床医学科技专项(BL2014080)

* 通信作者: 汤日宁, Email: tangrn77@163.com

proteinuria increased (all $P < 0.05$). Bone mineral density of the femur and lumbar vertebrae decreased in DM rats compared to that in CTL group. Bone volume/tissue volume and the number of trabecular number decreased, and the trabecular separation increased in DM group ($P < 0.05$). There was no significant change in cortical bone ($P > 0.05$). The expression of CD31 decreased and the expression of FSP1 increased in DM rats compared to those in CTL group ($P < 0.05$). Bone tissue fluorescence showed overlapping expression of CD31 and FSP1 in bone marrow of DM group in vitro. ECs were stimulated by high-dose of glucose. Western blotting and fluorescence result showed a decrease in CD31 and an increase in FSP1 ($P < 0.05$). After further induction of adipocyte differentiation for one week, the expression level of PPAR- γ increased significantly ($P < 0.05$) and oil red O staining was positive in HG group. **Conclusion** High-dose of glucose induces endothelial-to-adipocyte transition in ECs, and is involved in DM-related osteoporosis.

Key words: diabetes; osteoporosis; high glucose; endothelial cells; adipocytes

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是全身系统性疾病,据国际糖尿病联盟统计,2014年全球糖尿病患者已达3.8亿,其中80%在发展中国家,中国位列第一^[1]。骨质疏松症是DM的常见并发症,表现为骨量减少,骨折风险增加,影响骨的修复和再生^[2]。流行病学研究发现,DM患者骨折风险较非糖尿病人群显著增加,尤其1型糖尿病患者髌骨骨折风险是正常人群的10倍^[3-4]。因此,深入探讨DM骨质疏松的发生机制,对于积极防治DM骨折等并发症具有十分重要的意义。越来越多证据表明骨髓脂肪组织在DM骨质疏松发生发展中起着关键作用^[5-7]。最新研究发现,一定条件下内皮细胞(endothelial cells, ECs)可发生内皮-间充质转分化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT),可进一步分化为脂肪细胞,即内皮-脂肪细胞转分化^[8]。本课题前期研究发现,高糖能诱导内皮细胞发生EndMT^[9-11]。因此,本研究拟通过动物和细胞实验,探讨高糖能否刺激ECs发生EndMT并进一步转化为脂肪细胞,参与DM骨质疏松的形成和发展。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞及材料

1.1.1 动物:8周龄SPF级SD雄性大鼠,体重180~220 g,购于上海莱斯科公司。

1.1.2 细胞:原代人主动脉ECs(美国ScienCell公司)。

1.1.3 材料:内皮细胞培养基(美国ScienCell公司);诱导成脂细胞培养基(美国ScienCell公司);葡萄糖(美国sigma公司);油红O工作液(中国武汉塞维尔生物公司);CD31抗体(sc-376764,美国Santa Cruz公司);FSP1抗体(ab-197896,美国Abcam公司);PPAR- γ 抗体(ab-209350,美国Abcam公司);光学显微镜、激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司);micro-CT(德国Bruker公司);双能

X线骨密度检测仪(美国HOLOGIC公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备:SD大鼠适应性喂养1周,禁食12 h,链脲佐菌素58 mg/kg一次性腹腔注射制备DM模型,72 h后尾静脉采血测定血糖,血糖 >16.7 mmol/L为造模成功。随机分为2组:对照组(control, CTL)和糖尿病组(DM),各10只。继续喂养24周后处死大鼠,留取血尿、骨骼样本。

1.2.2 细胞培养和分组:ECs置于含10% FBS和1%青链霉素的内皮细胞培养基中,于37℃,5% CO₂细胞培养箱中培养。选择第2~5代细胞进行实验。使用高糖(high glucose, HG, 30 mmol/L)或正常糖(normal glucose, NG, 5.5 mmol/L)干预ECs 48 h,继而更换培养基为诱导成脂分化培养基培养1周。

1.2.3 骨组织HE染色、免疫荧光:分离各组大鼠左侧股骨,于4%多聚甲醛中固定48 h、10% EDTA脱钙、常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,贴附于载玻片上,HE染色,在普通光学显微镜下观察脂肪细胞(空泡结构)的数量;将3 μ m股骨石蜡切片脱蜡、水化、抗normal glucose,原修复,内源性过氧化物酶阻断剂(福州迈新)阻断,加入相应一抗,4℃过夜。次日加入相应荧光二抗(避光,室温孵育2 h),DAPI染细胞核5 min。激光共聚焦显微镜下观察各蛋白的表达。

1.2.4 Western印迹检测:取骨骼及细胞组织,加适量裂解液匀浆,离心取上清液,提取蛋白,BCA检测蛋白浓度。取20 μ g蛋白变性后SDS-PAGE凝胶电泳,湿法转入PVDF膜,5% BSA封闭1 h后加入相应一抗,4℃过夜。次日洗膜后加入相应二抗,室温孵育1 h,洗膜,ECL化学发光法曝光。

1.2.5 油红O染色:4%多聚甲醛固定细胞20 min,水洗后加入油红O工作液5 min,水洗后苏木素染细胞核1 min,水洗后尽快光镜下观察,拍照。

1.2.6 双能 X 线检测: 双能 X 线骨密度检测各组大鼠腰椎和股骨的骨密度。使用双能 X 线骨密度仪(检测地址为南京中大医院影像科)进行骨扫描,计算机自动分析骨密度。

1.2.7 micro-CT 检测: 使用 micro-CT 对大鼠股骨进行扫描(检测地址为南京医科大学江苏省医药动物实验基地)。扫描结束后将原始扫描图像导入 microCT 系统自带的 NRecon 重建软件中,对重建图像进行分析,使用 CtAnalyser(SkyScan 软件)分析骨相关参数。

1.3 统计学分析

数据均采用 SPSS 21.0 软件分析处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用单因素方差分析, $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、生化参数等变化

DM 组与 CTL 组相比,血糖、肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白升高,体重降低, P 值均 < 0.05 ; 两组大鼠血钙和血磷未见明显变化 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠的一般资料

Table 1 The general parameters of rats in each group

组别	体重/g	血糖 (mmol/L)	尿素氮 (mmol/L)	肌酐 (μ mol/L)	钙 (mmol/L)	磷 (mmol/L)	尿蛋白 (mg/24 h)
对照组 ($n=10$)	385 $\pm$ 9.04	6.37 $\pm$ 1.04	5.41 $\pm$ 1.07	20.45 $\pm$ 3.78	2.58 $\pm$ 0.20	2.55 $\pm$ 0.14	5.25 $\pm$ 1.09
糖尿病组 ($n=10$)	239 $\pm$ 10.43 *	22.67 $\pm$ 4.79 *	66.03 $\pm$ 7.43 *	189.42 $\pm$ 12.65 *	2.44 $\pm$ 0.36	2.59 $\pm$ 0.26	115.62 $\pm$ 10.14 *

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠骨骼参数变化

双能 X 线骨密度检测示,DM 组大鼠腰椎和股骨骨密度均低于 CTL 组 ($P < 0.05$)。见表 2。股骨 micro-CT 扫描示,DM 组远端股骨骨体积分数和骨小梁数目减少,骨小梁离散度增加 ($P < 0.05$); 股骨干皮质骨厚度、皮质骨面积无明显改变 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 各组大鼠的骨密度检测 (g/cm^2)

Table 2 Bone mineral density tests of rats in each group (g/cm^2)

组别	股骨骨密度	腰椎骨密度
对照组 ($n=8$)	0.278 $\pm$ 0.024	0.351 $\pm$ 0.035
糖尿病组 ($n=6$)	0.230 $\pm$ 0.026 *	0.270 $\pm$ 0.042 *

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠的 micro-CT 检测

Table 3 Micro-CT analysis of rats in each group

组别	远端股骨				股骨干	
	骨体积分数/%	骨小梁厚度/mm	骨小梁数量/(1/mm)	骨小梁离散度/mm	皮质骨厚度/mm	皮质骨面积/ mm^2
对照组 ($n=4$)	43.417 $\pm$ 2.248	0.197 $\pm$ 0.020	2.357 $\pm$ 0.257	0.212 $\pm$ 0.041	0.831 $\pm$ 0.052	8.572 $\pm$ 1.613
糖尿病组 ($n=6$)	23.859 $\pm$ 4.510 *	0.170 $\pm$ 0.012	1.226 $\pm$ 0.375 *	0.558 $\pm$ 0.179 *	0.846 $\pm$ 0.057	8.934 $\pm$ 0.877

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠骨髓脂肪组织变化

骨组织 HE 染色时骨髓空泡结构示脂肪细胞。

如图 1 所示,DM 组大鼠骨髓腔内充满脂肪细胞,其脂肪组织含量较 CTL 组显著增多 ($P < 0.05$)。

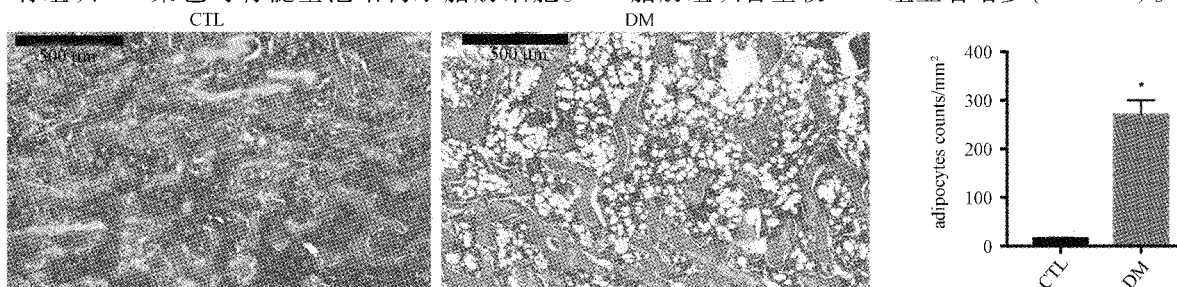


图 1 各组大鼠胫骨 HE 染色及脂肪含量分析 (HE 染色的骨髓空泡结构为脂肪细胞)

Fig.1 HE staining of the tibias and quantification of the bone fat (bone marrow vacuoles with H&E stain indicated adipocytes)

2.4 各组大鼠骨髓 ECs EndMT 的影响

以内皮标记物 CD31 和间充质标志物 FSP1 作为检测 EndMT 的指标。Western 印迹示,与 CTL 组

相比,DM 组 CD31 表达减少,FSP1 表达增多 ($P > 0.05$);骨组织荧光结果示,DM 组骨髓 CD31 和 FSP1 存在表达重叠。见图 2。

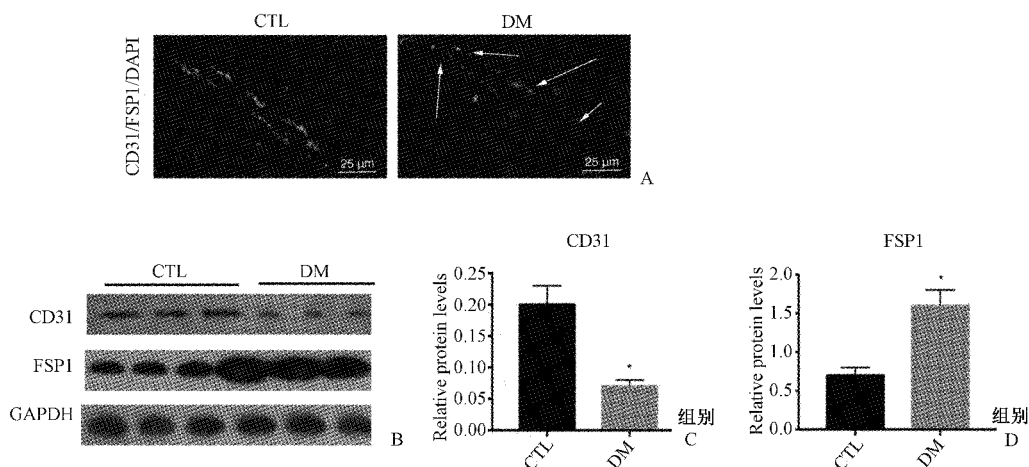


图2 各组大鼠骨髓 CD31 和 FSP1 的表达情况 A:大鼠骨组织共聚焦显微镜检测免疫荧光,白色箭示骨髓 CD31 和 FSP1 存在共表达情况;B~D:CD31 和 FSP1 蛋白的表达(Western 印迹)。

Fig.2 The protein expression of bone marrow CD31 and FSP1 of rats in each group. A: Immunofluorescence was detected by confocal microscopy in rat bone tissues. White arrow showed co-expression of CD31 and FSP1 in bone marrow. B-D: The protein expression of CD31 and FSP1 (Western blotting).

2.5 体外高糖干预对 ECs EndMT 的影响

NG (5.5 mmol/L) 和 HG (30 mmol/L) 分别干预 ECs 48 h。Western 印迹示,与 NG 组相比,HG 组 CD31 蛋白表达减少,FSP1 蛋白表达增加 ($P < 0.05$);激光共聚焦显微镜结果示,HG 组细胞 CD31 表达减少,并获得性表达 FSP1。见图 3。

2.6 体外高糖干预可促进 ECs 进一步分化为脂肪细胞

ECs 分别给予 NG 或 HG 干预 48 h,继而使用脂肪细胞培养基诱导分化 1 周。Western 印迹结果示,HG 组脂肪细胞标志物 PPAR- γ 蛋白表达显著高于 NG 组 ($P < 0.05$),油红 O 染色阳性,见图 4。

3 讨论

研究发现,异常升高的血糖水平是 DM 骨质疏松发生的独立危险因素,降低血糖治疗能显著改善患者骨代谢情况^[12]。DM 往往伴随一定程度的骨质疏松,制约患者的生活质量,但是潜在机制仍不十分清楚。

既往人们普遍认为,DM 骨质疏松与高糖、氧化应激、晚期糖基化产物形成、炎症因子释放等有关^[6]。近年来研究表明,骨髓脂肪组织参与了 DM 骨质疏松的形成和发展^[5-7]。异常增多的骨髓脂肪细胞能引起骨质疏松,可能与以下 3 个方面有

关^[13]:(1)骨髓脂肪细胞能分泌一些细胞因子,影响成骨细胞和破骨细胞功能;(2)骨髓脂肪细胞和成骨细胞均主要来源于骨髓间充质干细胞,脂肪细胞的增多必然导致骨髓成骨细胞合成减少;(3)脂肪因子(如瘦素、脂联素等)通过交感神经系统调控骨的形成。研究证实^[14-15],减少骨髓脂肪组织合成的靶向治疗能促进骨形成。本研究发现,相较于 CTL 组,DM 组大鼠存在明显的骨质疏松,并伴随骨髓脂肪细胞显著增多。故探讨异常增多的骨髓脂肪细胞来源成为深入理解 DM 骨质疏松机制的关键。

目前,关于骨髓脂肪组织来源的研究主要集中在骨髓间充质干细胞^[16]。随着研究的深入,人们逐渐发现内皮细胞一定条件下也能转化为脂肪细胞,成为骨髓脂肪细胞的重要来源^[8]。2010 年,Medici 等^[8]使用 BMP-2 和 BMP-4 干预脐静脉内皮细胞 48 h,内皮细胞发生 EndMT,且获得间充质干细胞特性,继而在脂肪诱导环境下表达脂肪细胞表型。这提示 ECs 可能通过 EndMT 形成脂肪细胞,直接参与了骨质疏松的过程。其后 Horwitz 等^[17]也指出 ALK2 能刺激 ECs 发生 EndMT,可进一步诱导形成软骨和成骨细胞,参与骨再生和重建。Lin 等^[18]发现 BMP4 能促进内皮-成骨细胞转分化,参与前列腺癌骨转移。笔者前期研究^[9]发现,高糖可诱导 ECs 发生 EndMT,表现为内皮细胞标志物 CD31 表达减

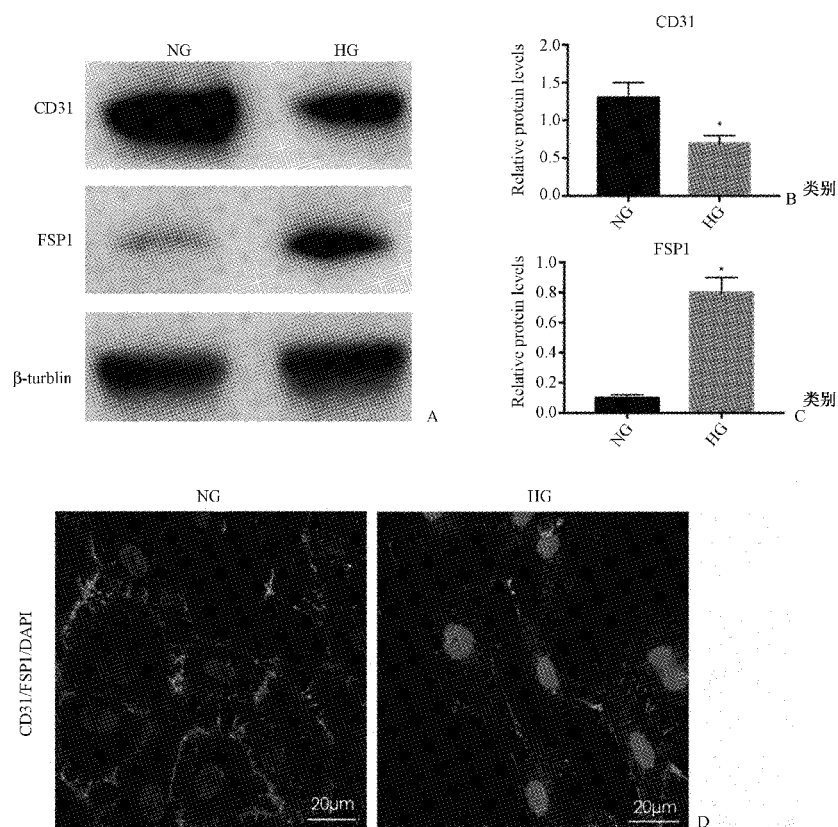


图3 高糖干预 ECs 的 CD31、FSP1 蛋白表达变化 A~C: CD31 和 FSP1 蛋白的表达 (Western 印迹); D: 细胞共聚焦免疫荧光双染 (1000 倍)

Fig.3 The protein expression of CD31 and FSP1 in cultured ECs after high glucose stimulation. A-C: CD31 and FSP1 protein expression (Western blotting); D: immunofluorescence double staining observed with confocal scanning microscope (1000 times).

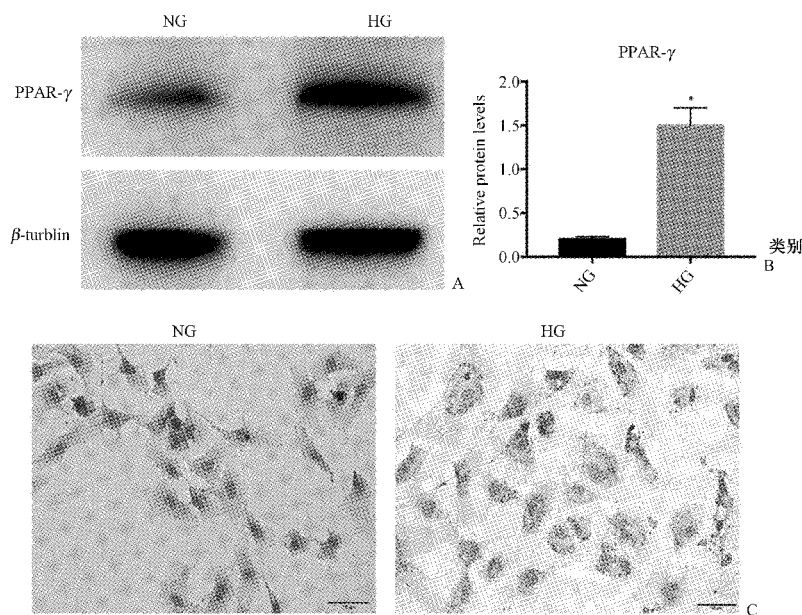


图4 经脂肪细胞培养基培养1周后 ECs 向脂肪细胞转分化 A、B: PPAR-γ 蛋白的表达 (Western 印迹); C: 细胞油红 O 染色 (200 倍)

Fig.4 The ECs were transformed into adipocytes after cultured in adipogenic medium for one week. A, B: Expression of PPAR-γ protein (Western blotting); C: Oil red O staining (200 times).

少,间充质标志物 FSP1 表达增加。本研究发现,DM 组大鼠较 CTL 组骨髓 CD31 蛋白表达减少,FSP1 蛋白表达增加($P<0.05$);骨组织荧光可见 DM 组骨髓 CD31 和 FSP1 表达重叠,这些均提示 DM 大鼠骨髓 EndMT 的发生;进一步体外高糖干预 ECs 48 h,与 NG 组相比,HG 组 CD31 蛋白表达减少,FSP1 蛋白表达增加($P<0.05$);对高糖刺激的 ECs 诱导成脂分化 1 周发现,HG 组细胞脂肪细胞标志物 PPAR- γ 蛋白表达增加($P<0.05$),油红 O 染色阳性,以上提示发生 EndMT 的 ECs 能够进一步分化为脂肪细胞(内皮-脂肪细胞转分化),促进脂肪样细胞在骨髓堆积,介导 DM 骨质疏松。

总而言之,本研究结果证实,高糖可诱导 ECs 发生 EndMT,可进一步诱导分化为脂肪细胞(内皮-脂肪细胞转分化),参与 DM 骨质疏松的发生和发展。

【参 考 文 献】

- [1] Guariguata L,Whiting DR,Hambleton I,et al.Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. Diabetes Res Clin Pract,2014, 103(2):137-149.
- [2] Kurra S,Fink DA,Siris ES.Osteoporosis-associated fracture and diabetes[J]. Endocrinol Metab Clin North Am,2014,43(1):233-243.
- [3] Vestergaard P.Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes-a meta-analysis [J]. Osteoporos Int,2007, 18(4):427-444.
- [4] Cortet B, Lucas S, Legroux-Gerot I, et al. Bone disorders associated with diabetes mellitus and its treatments[J]. Joint Bone Spine,2018 Aug 8;doi: 10.1016/j.jbspin.2018.08.002.
- [5] Kim TY, Schafer AL. Diabetes and bone marrow adiposity[J]. Curr Osteoporos Rep, 2016,14(6):337-344.
- [6] Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017,13(4):208-219.
- [7] 倪利华,刘必成,汤日宁.慢性肾脏病骨密度下降研究进展 [J].中华医学杂志,2018, 98(4):317-320.
- [8] Medici D. Endothelial-mesenchymal transition in regenerative medicine[J]. Stem Cells Int,2016,2016:6962801.
- [9] Zhu DD,Tang RN,Lv LL, et al.Interleukin-1 β mediates high glucose induced phenotypic transition in human aortic endothelial cells[J].Cardiovasc Diabetol, 2016,15:42.
- [10] 汤日宁,朱冬冬,韩雨晨,等.厄贝沙坦对糖尿病大鼠心肌内皮细胞转分化的作用[J].中华肾脏病杂志,2015,31(5):351-358.
- [11] 汤日宁,伍敏,刘宏,等.高糖诱导人主动脉内皮细胞-软骨转分化[J].中华肾脏病杂志,2013,29(3):183-188.
- [12] Lecka-Czernik B. Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology[J]. Diabetologia,2017,60(7):1163-1169.
- [13] Kawai M,de Paula FJ,Rosen CJ.New insights into osteoporosis: the bone-fat connection [J]. J Intern Med, 2012, 272(4):317-329.
- [14] Lecka-Czernik B, Baroi S, Stechschulte LA, et al. Marrow fat-a new target to treat bone diseases [J]. Curr Osteoporos Rep, 2018,16(2):123-129.
- [15] 颜春鲁,李盛华,郭爱军,等.藤黄健骨胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度和骨代谢的影响[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(8):914-917.
- [16] Hardouin P,Rharass T,Lucas S.Bone marrow adipose tissue: To be or not to be a typical adipose tissue? [J].Front Endocrinol, 2016,7:85.
- [17] Horwitz EM. Building bone from blood vessels [J]. Nat Med, 2010, 16(12):1373-1374.
- [18] Lin SC, Lee YC, Yu G, et al. Endothelial-to-osteoblast conversion generates osteoblastic metastasis of prostate cancer[J]. Dev Cell, 2017,41(5):467-480.

(收稿日期:2018-11-21;修回日期:2018-11-30)