

## · 基础研究 ·

## 梯度糖溶液对体外培养成骨细胞影响的实验研究

苏友新<sup>1</sup>, 陈智能<sup>1</sup>, 杨连梓<sup>2</sup>, 郑良朴<sup>3</sup>

(1. 福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350003; 2. 福建省第二人民医院; 3. 福建中医学院中心实验室)

**摘要** 目的: 探讨梯度高糖对体外培养成骨细胞(osteoblast, OB)的影响。方法: 采用胰蛋白酶 II 型胶原酶消化法从 1~2 日龄 SD 大鼠颅盖骨中分离出 OB, 倒置显微镜下及 HE 染色观察其形态, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALPase)染色法、钙化结节染色、Var Gieson 染色鉴定细胞后用不同浓度的糖溶液加入到成骨细胞培养体系中, 作用不同时间, 应用 MTT 比色法、ALPase 含量测定、矿化结节形成量等来检测其对成骨细胞增殖和成骨能力的影响。结果: 不同浓度的糖溶液在 OB 培养 48 h 时具有明显的促进增殖作用, 但  $> 15 \text{ mmol/L}$  的溶液在 72 h 时则呈抑制效应, 其中以  $\leq 15 \text{ mmol/L}$  的糖溶液在培养早期有显著促进作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而在培养较长时也无明显抑制效应;  $\geq 30 \text{ mmol/L}$  的糖溶液在 OB 培养 7 d 时显著抑制 ALPase 的分泌( $P < 0.05$ );  $\geq 10 \text{ mmol/L}$  的糖溶液在培养 18 d 时对矿化结节的形成也具有明显的延迟效应;  $< 10 \text{ mmol/L}$  的糖溶液对 OB 分泌 ALPase 及矿化结节形成无抑制作用。结论: 高糖可影响 OB 增殖、分化与矿化能力, OB 增殖耐受的糖浓度为  $\leq 15 \text{ mmol/L}$ , OB 分化与矿化过程耐受的糖浓度为  $< 10 \text{ mmol/L}$ 。

**关键词** 骨形成; 细胞培养; 血糖

**Effects of gradient glucose solution glucose on cultured osteoblasts in vitro** SU Youxin\*, CHEN Zhineng, YANG Lianzi, ZHENG Liangpu.\* Department of Traumatology and Orthopaedics, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fujian Fuzhou, 350003, China

**Abstract Objective:** To explore the effect of high gradient glucose on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells(OB) cultured in vitro. **Methods:** OB was isolated from the skull of 1~2 day newly born SD rats by means of Trypsin collagenase digestion, and the osteoblasts were identified by morphologic analysis, V-G collagen staining, ALPase staining, calcification nod staining etc. Different concentrations of glucose were added to the cultured OB. The effects of glucose on the proliferation and differentiation of osteoblasts was monitored by MTT analysis, ALPase activity analysis and formation of mineralized nodulus. **Results:** Different concentrations of glucose promoted the proliferation of osteoblastic cells for 48 hours culture, but inhibited for 72 hours when it was beyond  $15 \text{ mmol/L}$ . Among these different concentrations glucose, the glucose of less than  $15 \text{ mmol/L}$  could promote osteoblastic cells proliferation on the early period of cultivation ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) and has no suppression during a relative long time, and the glucose of more than  $30 \text{ mmol/L}$  inhibited the secretion of ALPase for 7 days( $P < 0.05$ ), and the glucose of beyond  $10 \text{ mmol/L}$  could delay formation of mineralized cell nodulus for 18 days, below  $10 \text{ mmol/L}$  glucoses did not inhibit the secretion of ALPase and formation of mineralized nodulus. **Conclusion:** High gradient glucose could influence on the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblastic cells. The tolerance concentrations of glucose were no more than  $15 \text{ mmol/L}$  on the proliferation of OB, and the differentiation and mineralization of OB were below  $10 \text{ mmol/L}$ .

**Key words** Osteogenesis; Cell culture; Blood glucose

长期高血糖状态是导致糖尿病性骨质疏松(diabetic osteoporosis, DOP)的主要危险因素之一<sup>[1]</sup>。

对于 DOP 的发病机制国内外研究主要集中在高血糖状态下的机体糖基化反应及其产物的影响方

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目(编号: 2001J062)

通讯作者: 苏友新 Tel: 0594-83570513 E-mail: syx777@tom.com

面<sup>[2]</sup>,而对于高血糖直接对骨骼细胞谱系的影响,国外报道不同<sup>[3,4]</sup>。本研究拟通过观察不同浓度糖溶液条件下成骨细胞增殖、分化及矿化能力的变化,以揭示高血糖对骨代谢的影响,为进一步探讨 DOP 的发病机制及其防治策略打下研究基础。

1 材料与方法

1.1 试剂 四甲基偶氮唑盐(MTT)购自Sigma公司;新生牛血清(NCS)、α-MEM 培养基、青链霉素溶液均购自Hyclone(USA)公司;分析纯葡萄糖购自上海化学试剂公司;ALP 试剂盒购自南京建成生物有限公司。

1.2 仪器 荧光倒置显微镜(IX70,日本Olympus),CO<sub>2</sub> 培养箱(GBB16,德国Hearas),酶标仪(ELX808,美国BioTek),紫外分光光度计(DU650,德国Beckman)。

1.3 梯度糖培养液的配制 分别配制成含10% NCS及糖5、10、15、30、60 mmol/L的α-MEM 溶液,经0.22 μm的滤膜过滤除菌,4℃保存备用。

1.4 成骨细胞的分离、培养与鉴定 ①实验动物:1~2日龄SD乳鼠5只,购于福建医科大学实验动物中心。②颅骨成骨细胞的分离、培养:取2只1~2日龄SD乳鼠颅盖骨,先以0.25%胰酶溶液预消化,再用0.1% II型胶原酶溶液振荡消化,制成细胞悬液,接种于培养瓶置37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24 h换液1次,以后每2~3 d换液1次,细胞汇合后进行消化传代。③细胞爬片的制备:将消化下的细胞悬液接种于含有已消毒玻璃片的6孔培养板,待细胞汇合后取出,PBS液洗涤,固定液固定,-20℃储存备用。④成骨细胞的鉴定:倒置显微镜下及HE染色观察细胞的形态与生长情况;组织化学对细胞爬片分别进行V-G胶原染色、ALPase染色、矿化结节茜素红染色。

1.5 MTT 比色法测定 OB 增殖功能 取5~8代成骨细胞,2×10<sup>4</sup>/ml的细胞密度接种于96孔培养板经同步化后,分别加入不含糖(对照组)及含糖5、10、15、30、60 mmol/L的10% NCS α-MEM 培养液,0.1 ml/孔,培养48、72 h。培养结束前4 h弃去原培养液,用PBS液洗3次,分别加入用PBS液配制的5 mg/ml MTT,20 μl/孔,结束后弃去培养上清液,加入DMSO,100 μl/孔振荡15 min,待紫色结晶完全溶解,在酶标仪上以波长490 nm测定各孔的OD值。

1.6 OB分泌ALPase的测定 分组同上,于24孔培养板培养7 d后取培养上清液50 μl,采用磷酸苯

二钠盐为底物,经520 nm波长比色,测OD值,换算成ALPase活性(金氏单位/100 ml)。

1.7 OB矿化功能的测定 分组同上,同步化后换入含50 μg/ml维生素C、10 mmol/L β-甘油磷酸钠的不含糖及含糖5、10、15、30、60 mmol/L的10% NCS α-MEM 培养液,隔天换液。培养18 d后将培养基吸出,用PBS洗板3次,95%乙醇固定10 min,0.1%茜素红溶液染色30 min,蒸馏水洗,镜下计数矿化结节数。

1.8 统计学处理 所得计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 11.0进行统计分析,多组之间比较先采用F检验而后进行q检验,以P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 原代及传代OB形态学观察 培养第1天可见细胞数量较多悬浮在培养液中,呈圆形,核大而圆位于胞体的一端;24 h后细胞全部贴壁,胞体展开呈三角形、多角形、棱形等,核呈卵圆形;对数生长期细胞分裂相多见,有较多的突起互相连接;细胞汇合时呈铺石状,并可重叠生长。符合OB的形态学特征。

2.2 OB染色鉴定 V-G胶原染色可见红色的胶原、蓝色的胞核、黄色的胞质;ALPase染色可见胞内的ALPase黑色团块,ALPase测定培养液有较高的ALPase活性;矿化结节茜素红染色可见矿化结节形成。符合OB的功能学特征。

2.3 梯度葡萄糖α-MEM培养液对OB增殖功能的影响 见表1。

表1 不同浓度糖培养液对OB增殖功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 1 The effect of different concentration of glucose on the proliferation of osteoblastic cells (OB) cultured in vitro( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Groups	48 h	72 h
Concentration of glucose(mmol/L)		
5	0.389 0±0.016 4**	0.549 3±0.017 1
10	0.388 4±0.019 5*	0.526 5±0.011 4
15	0.380 1±0.012 9△*	0.447 9±0.011 8
30	0.345 8±0.014 6△△	0.336 8±0.011 0**△△△△
60	0.337 0±0.010 5△△	0.276 3±0.007 7**△△△△
Control group	0.329 3±0.013 7△△	0.528 8±0.015 2

Note: Compared with control group, \*\*P<0.01, \*P<0.05; compared with 5 mmol/L group, △△P<0.01, △P<0.05; compared with 10 mmol/L group, △△P<0.01, △P<0.05

表1显示:不同浓度的糖溶液在OB培养48 h和72 h时对其增殖效应具有显著性差异(F=2.163, P<0.05和F=10.484, P<0.01)。在培养

48 h 时, 与 5 mmol/L 相比较, 15、30、60 mmol/L 及正常对照组均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 与 10 mmol/L 相比较, 30、60 mmol/L 及正常对照组均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。在培养 72 h 时, 与 5 mmol/L 或 10 mmol/L 相比较, 30、60 mmol/L 及正常对照组均有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

#### 2.4 梯度糖 $\alpha$ -MEM 培养液对 OB 分泌 ALPase 的影响 见表 2。

表 2 不同浓度的糖溶液对 OB 分泌 ALPase 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 2 The effect of different concentration glucose on the secretion of ALPase of osteoblastic cells (OB) cultured in vitro ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Groups	OD value (king unit/100 ml)
Concentration (mmol/L)	
5	2.626 9 $\pm$ 0.062 8 <sup>**</sup>
10	2.140 5 $\pm$ 0.050 7 <sup>△</sup>
15	1.950 9 $\pm$ 0.015 6 <sup>△</sup>
30	1.711 0 $\pm$ 0.072 9 <sup>**△</sup>
60	1.300 6 $\pm$ 0.085 4 <sup>**△△</sup>
Control group	2.438 2 $\pm$ 0.237 0

Note: Compared with control group, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; compared with 5 mmol/L group, <sup>△△</sup> $P < 0.01$ , <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; compared with 10 mmol/L group, <sup>△△</sup> $P < 0.01$ , <sup>△</sup> $P < 0.05$

表 2 显示: 不同浓度的糖溶液在 OB 培养 7 d 时对其分泌 ALPase 作用具有显著性差异 ( $F = 9.486, P < 0.01$ )。与 5 mmol/L 相比较, 10、15、30、60 mmol/L 组均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 与 10 mmol/L 相比较, 30、60 mmol/L 及正常对照组均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.5 梯度糖 $\alpha$ -MEM 培养液对 OB 矿化功能的影响

经过 18 d 的培养, 对照组及 5 mmol/L 糖溶液组可形成圆形矿化结节, 呈橘红色, 边界清晰。而大于等于 10 mmol/L 浓度的糖培养液均不能按时形成矿化结节。

### 3 讨论

OB 是体内骨形成的主要细胞, 糖尿病时 OB 功能的减退是糖尿病性骨质疏松症发病的重要机制之一。体外培养 OB 的生物学性状类似于体内成骨细胞的表型, 体内组织液中的糖浓度相当于体外培养体系中培养基的糖终浓度。但究竟 OB 在体外培养过程中细胞各种功能可以耐受的糖浓度为多少? 什

么样的糖浓度不影响 OB 生物学效应的发挥? 糖尿病患者的血糖该控制在什么范围才不影响 OB 的功能, 即不影响骨质量, 以往的研究并未见报道。我们的研究发现: 只有  $\leq 15$  mmol/L 的糖溶液在培养早期有显著促进增殖作用, 而在培养较长时也无明显抑制效应。分化和矿化功能是 OB 的重要特性, ALPase 是一种较为肯定的 OB 分化的早期指标, 是衡量多种细胞向 OB 方向分化的一个重要标志; 矿化是细胞进一步分化成熟的功能表现。在我们的研究中, 小于 10 mmol/L 的糖溶液对 OB 分泌 ALPase 及矿化结节形成均无抑制作用。研究结果表明 OB 增殖耐受的糖浓度为  $\leq 15$  mmol/L, OB 分化与矿化功能耐受的糖浓度为  $< 10$  mmol/L。从 OB 的整体效应而言, 小于 10 mmol/L 浓度的糖溶液即本研究中的 5 mmol/L 不仅对 OB 增殖和分化能力, 而且对其矿化成骨能力都无抑制影响, 这提示在临床上应尽量将糖尿病患者的血糖水平控制在 10.0 mmol/L 以下 (接近于 5 mmol/L), 才有可能控制或延缓糖尿病骨骼并发症的发生。

已有研究证实: 高浓度的葡萄糖对细胞膜的通透性<sup>[5]</sup>、信号传导方面<sup>[6]</sup>具有重要影响; 同时, 高糖本身引起细胞产生细胞因子的改变<sup>[7]</sup>在糖尿病发病及其并发症中也有重要影响, 并且高糖还存在诱导或加速细胞凋亡<sup>[8]</sup>以及胀亡等。这是否在高糖培养的骨系细胞变化及 DOP 发病中也呈同样机制, 有待于进一步进行研究。

#### 参考文献

- 1 苏友新, 钱松涛, 董忠, 等. 强骨宝治疗糖尿病性骨质疏松症 40 例临床观察. 福建中医学院学报, 2001, 11(3): 23-25.
- 2 Mendez JD. Advanced glycosylation end products and chronic complications of diabetes mellitus. Gac Med Mex, 2003, 139(1): 49-55.
- 3 Balint E, Szabo P, Marshal F, et al. Glucose induced inhibition of in vitro bone mineralization. Bone, 2001, 28(1): 21-28.
- 4 Terada M, Inaba M, Yano Y, et al. Growth inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. Bone, 1998, 22(1): 17-23.
- 5 闫振成, 贾昆霞, 张建国, 等. 高糖对培养肾小球内皮细胞细胞膜流动性影响的研究. 第三军医大学学报, 2001, 23(6): 723-725.
- 6 闫振成, 张建国, 李开龙, 等. 高糖对血管紧张素 II 促系膜细胞增殖作用的影响及其机制. 重庆医学, 2002, 31(2): 89-90.
- 7 张嘉, 黄庆玲, 张家庆. 高糖对混合培养的血管内皮及平滑肌细胞产生 TGF $\beta_1$  的影响. 第二军医大学学报, 2001, 22(3): 278-280.
- 8 黄雌友, 文格波, 曹仁贤, 等. 葡萄糖诱导人血管内皮细胞凋亡及其对 bax 和 bcl 2 表达的影响. 中国糖尿病杂志, 2003, 11(1): 37-41.

(收稿日期: 2004-10-20 本文编辑: 李为农)