

2型糖尿病对大鼠颌骨骨髓间充质干细胞生物学特性的影响及其机制研究

李天琪^{1,2}, 孟祥博^{1,2}, 霍娜², 蔡川², 李帅臣^{1,2}, 周孙欣^{1,2}, 张彤²

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心口腔科, 北京 100853

摘要: **背景** 2型糖尿病患者骨代谢异常, 颌骨骨质和骨量都发生明显改变, 是牙周炎的全身促进因素之一。Wnt 信号通路可以促进干细胞矿化并修复骨组织缺损。然而 2 型糖尿病影响下 Wnt 信号通路是否参与了对颌骨骨髓间充质干细胞 (jaw bone marrow mesenchymal stem cells, JBMMSCs) 的成骨分化调控仍未可知。**目的** 研究 2 型糖尿病对大鼠 JBMMSCs 增殖及分化等生物学特性的影响, 并对其机制进行初步探索。**方法** 选取连续两周随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 的 13 周龄 GK 大鼠为 2 型糖尿病组, 相同周龄的 Wistar 大鼠作为对照组, 两组各 10 只; 无菌条件下采用骨髓冲洗法与骨片消化法相结合的方法分离培养两组 JBMMSCs 作为研究对象。CCK-8 法检测并比较两组细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞被诱导凋亡的能力。对 JBMMSCs 进行成骨、成脂诱导后, qRT-PCR 评估成骨、成脂及 Wnt 信号通路相关基因的表达改变, 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色检测成骨诱导后 ALP 的表达变化, 茜素红染色比较钙结节形成能力, 油红 O 染色检测成脂诱导后脂滴形成能力。**结果** 与对照组相比, 2 型糖尿病组 JBMMSCs 的增殖及克隆形成能力降低, 凋亡早期与晚期的细胞比例增加 ($P < 0.05$)。两组 JBMMSCs 成骨诱导后成骨相关基因 ALP、OCN 和 Runx2 mRNA 表达升高, 但 2 型糖尿病组低于对照组 ($P < 0.05$), 2 型糖尿病组钙结节形成能力和 ALP 染色面积及密度较对照组低 ($P < 0.05$)。成脂诱导后, 成脂相关基因的表达和脂滴的形成较对照组减少 ($P < 0.05$)。2 型糖尿病组 JBMMSCs 成骨诱导 7 d 后 Wnt 信号通路相关分子 Wnt4、Wnt5a、Wnt7b 的 mRNA 表达较对照组升高, β -catenin 的表达水平较对照组低。**结论** 2 型糖尿病影响大鼠颌骨骨髓间充质干细胞的增殖和克隆、抑制成骨及成脂分化能力, 其成骨能力的降低可能与 Wnt 信号通路相关。

关键词: 2 型糖尿病; 颌骨骨髓间充质干细胞; 成骨分化; Wnt 信号通路; GK 大鼠

中图分类号: R587.2

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2023)04-0372-09

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2023.04.010

引用本文: 李天琪, 孟祥博, 霍娜, 等. 2 型糖尿病对大鼠颌骨骨髓间充质干细胞生物学特性的影响及其机制研究 [J]. 解放军医学院学报, 2023, 44 (4): 372-379, 387.

Effect of type 2 diabetes mellitus on biological characteristics of jaw bone marrow mesenchymal stem cells in rats and its related mechanisms

LI Tianqi^{1,2}, MENG Xiangbo^{1,2}, HUO Na², CAI Chuan², LI Shuaichen^{1,2}, ZHOU Sunxin^{1,2}, ZHANG Tong²

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Stomatology, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: ZHANG Tong. Email: kqzhengji301@163.com

Abstract: **Background** Patients with type 2 diabetes have abnormal bone metabolism and marked alterations in both bone quality and bone mass of the jaw, which is one of the systemic contributors to periodontitis. Wnt signaling pathway can promote stem cells mineralization and repair bone tissue defects. However, it is still unknown whether the Wnt signaling pathway is involved in the regulation of osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in the jaws under the influence of type 2 diabetes. **Objective** To investigate the effects of type 2 diabetes on the proliferation and differentiation of jaw bone marrow mesenchymal stem cells (JBMMSCs) in rats and the possible mechanisms. **Methods** The 13-week-old GK rats with random blood glucose ≥ 16.7 mmol/L for two consecutive weeks were selected as the type 2 diabetes group, and Wistar rats of the same weeks of age served as the control group, with 10 rats in each group. Two groups of JBMMSCs were isolated and cultured as the research object by the combination of bone marrow flushing and bone slice digestion under sterile conditions. CCK-8 method was used to detect and analyze the cell's proliferative ability. The apoptosis ability of cells was assessed by flow cytometry. The expression of genes related to osteogenesis, adipogenesis and Wnt signaling pathway was assessed by qRT-PCR, alkaline phosphatase (ALP) expression was detected by alkaline phosphatase staining, and the difference in calcium nodule formation was compared by alizarin red staining. Oil Red O staining was used to detect lipid droplet formation differences after lipogenesis induction. **Results** Compared

收稿日期: 2022-10-11

基金项目: 军委后勤保障部保健专项课题 (19BJZ22); 军队医学科技青年培育项目 (21QNYPY104)

作者简介: 李天琪, 女, 在读硕士。研究方向: 口腔医学。Email: 619028753@qq.com

通信作者: 张彤, 女, 博士, 主任医师。Email: kqzhengji301@163.com

with the control group, the proliferation and clonogenic ability of JBMMSCs in the type 2 diabetes group decreased, and the proportion of cells of early and late apoptosis increased ($P < 0.05$). Osteogenesis-related genes ALP, OCN and Runx2 mRNA expression elevated in both groups after JBMMSCs osteogenic induction, but the expression in the type 2 diabetes group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), and calcium nodule forming ability and ALP staining area and density in the type 2 diabetes group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). After adipogenic induction, the expression level of adipogenesis-related genes and lipid droplet formation in the type 2 diabetes group reduced compared with the control group ($P < 0.05$). The mRNA expression levels of Wnt4, Wnt5a and Wnt7b related to the Wnt signal pathway in the type 2 diabetes group were higher than those in the control group at 7 days after JBMMSCs osteogenesis induction, while the expression level of β -catenin was lower than that in the control group. **Conclusion** Type 2 diabetes inhibits the proliferation, cloning, osteogenic and adipogenic differentiation of JBMMSCs, and the reduction of their osteogenic capacity may be related to the Wnt signaling pathway.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; jaw bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; Wnt signaling pathway; GK rat

Cited as: Li TQ, Meng XB, Huo N, et al. Effect of type 2 diabetes mellitus on biological characteristics of jaw bone marrow mesenchymal stem cells in rats and its related mechanisms [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2023, 44 (4): 372-379, 387.

目前全世界约 4.6 亿人患糖尿病, 其中 90% 以上是以胰岛素抵抗和胰岛功能障碍为主要发病机制的 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)^[1]。研究显示 2 型糖尿病患者颌骨骨质更疏松, 骨小梁间隙更大^[2]。颌骨骨髓间充质干细胞 (jaw bone marrow mesenchymal stem cells, JBMMSCs) 是源于颌骨骨髓的一类具有高度自我更新和多向分化潜能的成体干细胞, 具有成骨、成脂、成软骨等多向分化能力, 是骨组织修复与再生的基础^[3]。但 2 型糖尿病对 JBMMSCs 成骨分化能力的影响及其机制尚不清楚。本课题拟探讨 2 型糖尿病状态下颌骨组织来源骨髓间充质干细胞的生物学变化及成骨分化中 Wnt 信号通路相关分子的变化规律, 为进一步研究通过调控 Wnt 信号通路恢复 2 型糖尿病环境下 JBMMSCs 成骨能力提供基础。

材料与方 法

1 实验动物 10 只 12 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0006]; 10 只 12 周龄 SPF 级雄性 GK 大鼠购于常州卡文斯实验动物有限公司 [动物生产许可证号: (SCXK(苏)2021-0013)]。本课题已通过解放军总医院实验动物伦理委员会审查 (批准号: 2022-X18-20)。

2 材料、试剂与仪器 血糖仪 (罗氏-活力型); 45% 高脂饲料 (无锡帆泊生物技术有限公司, 中国); α -MEM 培养基 (Gibco, 美国); 胎牛血清 (BI, 以色列); 1% 青霉素-链霉素、0.25% 胰蛋白酶-EDTA、PBS (中科迈晨, 中国); II 型胶原酶 (Sigma, 美国); 成骨诱导试剂盒 (赛业, 中国); 成脂诱导试剂盒 (Gibco, 美国); CCK-8 试剂盒 (东仁, 日本); Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒 (Sino Biological, 中国); RNA 提取试剂盒

(天根生化科技, 中国); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo Fisher, 美国); 逆转录试剂盒 (Takara, 日本); 4% 多聚甲醛、油红 O 染色试剂盒、0.2% 茜素红染色液 (索莱宝, 中国); BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒、结晶紫染色液 (碧云天, 中国); 细胞培养箱 (Thermo, 美国); 流式细胞仪 (BD Celesta, 美国); 酶标仪、实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)。

3 2 型糖尿病大鼠模型的构建 GK 大鼠是目前常用的非肥胖自发性 2 型糖尿病模型, 其高血糖是由胰岛素分泌受损和胰岛素抵抗引起的, 与人类 2 型糖尿病进展极为相似^[4]。GK 大鼠以 45% 高脂饲料喂养, 12~13 周龄时每周固定时间测量血糖和体质量, 以 GK 大鼠连续两次随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为建模成功标准^[5]。相同周龄的 Wistar 大鼠作为对照, 以普通饲料喂养, 每周相同时间测量血糖和体质量。本实验选取 10 只建模成功的 GK 大鼠作为 2 型糖尿病组, 10 只 Wistar 大鼠为对照组。

4 JBMMSCs 的分离与培养 选取建模成功的 10 只 13 周龄 GK 大鼠及 10 只 13 周龄 Wistar 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉 (2 mL/kg), 颈椎脱臼处死, 75% 乙醇浸泡 30 min 后转移至超净台。无菌条件下解剖下颌骨, 去除下颌骨上附着的皮肤、肌肉、全部牙齿; 使用咬骨钳去除两端后暴露骨髓腔, 用含有 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的 α -MEM 完全培养基反复冲洗骨髓腔, 收集颌骨骨髓冲洗液至 15 mL 离心管中, 800 r/min 离心 3 min, 去上清, 1 mL 完全培养基重悬。将细胞悬液转移至含有 9 mL 完全培养基的 10 cm 皿中, 放置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。冲洗后的下颌骨用咬骨钳分割成 1~3 mm³ 骨片并将其转移至 15 mL 离心管中, 加入 0.1% II 型胶原酶 3 mL,

置于 200 r/min 摇床上; 37℃、200 r/min 条件下消化 90 min; 800 r/min 离心 3 min, 去上清, 3 mL 完全培养基重悬, 将骨片转移至含有颌骨骨髓冲洗液的培养皿中, 放置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养。接种 72 h 后半换液, 以后每 2 d 换液 1 次。倒置相差显微镜下观察颌骨骨髓间充质干细胞形态及生长特点, 细胞汇合度达到 80%~90% 时按 1:2 的比例传代, 第 2 次传代时去除骨片, 取第 3~5 代细胞进行实验。

5 CCK-8 检测细胞增殖能力 取生长状态良好的各组第 3 代 JBMMSCs, 以 2000/孔接种到 96 孔板中, 连续培养 8 d, 每 3 d 换液 1 次; 于接种后 1~8 d 每天检测细胞的增殖活力, 吸弃原有培养基, 每孔加入 90 μL 的完全培养基和 10 μL 的 CCK-8 试剂, 37℃ 培养 4 h, 酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值并绘制细胞增殖曲线。

6 JBMMSCs 克隆形成率检测 取生长状态良好的各组第 3 代 JBMMSCs, 以 1000/皿接种到直径为 10 cm 的培养皿中, 在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 连续培养 15 d 后进行结晶紫染色。PBS 清洗 3 遍, 甲醇固定 5 min, 结晶紫染色 5 min, PBS 清洗多次至无多余染液, 室温下晾干并拍照观察。

7 细胞凋亡检测 收集各组第 3 代 JBMMSCs, 用 4℃ 预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 离心后去上清用 Binding Buffer 重悬细胞至 5 × 10⁶/mL, 将细胞悬液转移至流式管中, 每管 100 μL。Wistar 组和 GK 组每组 4 管: 一管为阴性对照组, 一管加入 5 μL Annexin V-PE, 一管加入 5 μL 7-AAD, 一管加入 5 μL Annexin V-PE 和 5 μL 7-AAD; 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min 后加入 400 μL Binding Buffer 终止反应, 上机检测。在细胞凋亡早期, 磷脂酰丝氨酸暴露于细胞表面, 但细胞膜不具有通透性, 因此 Annexin V 可以与细胞结合, 但细胞拒染 7-AAD, 因此早期凋亡细胞为 Annexin V 阳性、7-AAD 阴性。在凋亡晚期, 7-AAD 可以通过细胞膜进入细胞与 DNA 结合, 同时 Annexin V 进入细胞与磷脂酰丝氨酸结合, 因此凋亡晚期的细胞表现为 Annexin V 和 7-AAD 双阳性。

8 成骨诱导、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 及茜素红染色 取生长状态良好的各组第 3 代 JBMMSCs 以 1 × 10⁵/孔接种于六孔板中, 细胞汇合度达 70% 时更换为成骨诱导液, 每 3~4 d 换液。成骨诱导培养 7 d 后按照 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒的说明书进行 ALP 染色实验。

成骨诱导分化 21 d 时进行茜素红染色实验, 吸去六孔板中的液体, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min 后吸去固定液, PBS 清洗 3 次, 每孔加入 2 mL 茜素红工作液, 室温染色 5 min, 吸去多余染色液, PBS 清洗多次至无多余染液, 显微镜下观察钙结节数量。

9 成脂诱导及油红 O 染色 将各组第 3 代 JBMMSCs 以 1 × 10⁵/孔接种于六孔板中, 细胞汇合度达 70% 时更换为成脂诱导液, 每 3~4 d 换液。成脂诱导 14 d 时按照油红 O 染色试剂盒说明书的步骤进行油红 O 染色, 并在显微镜下观察脂滴数量。

10 qRT-PCR 检测成骨、成脂及 Wnt 信号通路相关基因的 mRNA 表达 将各组第 3 代 JBMMSCs 以 1 × 10⁵/孔接种于六孔板, 细胞汇合至 70% 时更换为成骨或成脂诱导液, 每 3~4 d 换液 1 次, 连续培养 7 d 后使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 使用酶标仪测定 RNA 浓度, 以 500 ng RNA 为模板, 按照逆转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa) 的说明书合成 cDNA。采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测试剂盒检测成骨相关基因 ALP、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、Runx 相关转录因子 2 (runx-related transcription factor-2, Runx2)、成脂相关基因脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase, LPL)、过氧化物酶体增殖物激

表 1 相关基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences of related genes

基因	序列 (5'-3')
GAPDH	F: ACCCAGAAGACTGTGGATGG R: CACATTGGGGGTAGGAACAC
ALP	F: CACGTTGACTGTGGTTACTGCTGA R: CCTTGAACCAGGCCCGTTG
OCN	F: GGTGGTGAATAGACTCCGGC R: GCAACACATGCCCTAAACGG
Runx2	F: GCACCCAGCCATAATAGA R: TTGGAGCAAGGAGAACC
LPL	F: GGAGTTTGCTCCAGAGTTT R: AAGGTTTTGCTGCTGTGGTTG
PPAR γ	F: ACCGCCAGGCTTGCTGAAC R: TGGAGCACCTTGCGAACACG
β -catenin	F: AAGTCTTGCTATTACGACA R: ACAGCACCTTCAGCACTCT
Wnt4	F: TCAGTTGGCCACGACTAAAGGAG R: AGTCTGGACTTGCTCCAGGTACAC
Wnt5a	F: GCGGGACTTTCTCAAGGACA R: CGGCTGCCTATTTGCATCAC
Wnt7b	F: CTGGGAGCCAACATCATCTG R: TGCCCAAAGACGGTCTTCTC

活受体 (peroxisome proliferators-activated receptor- γ , PPAR γ) 及 Wnt 信号通路相关基因的 mRNA 表达水平; 相关引物均由上海生工合成, 引物序列见表 1。

11 统计学分析 使用 Graphpad Prism 9.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组采用正态性检验, 两组间样本均数比较采用 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 2 型糖尿病大鼠模型构建情况 2 型糖尿病组大鼠随机血糖为 (24.63 ± 5.123) mmol/L, 对照组随机血糖为 (9.220 ± 0.957) mmol/L ($P < 0.001$), 2 型糖尿病组体质量为 (360.5 ± 18.65) g, 对照组体质量为 (598.4 ± 35.88) g ($P < 0.001$)。2 型糖尿病组大鼠随机血糖 > 16.7 mmol/L, 体质量显著低于对照组, 毛色发黄, 毛发脏乱, 并存在多饮多食

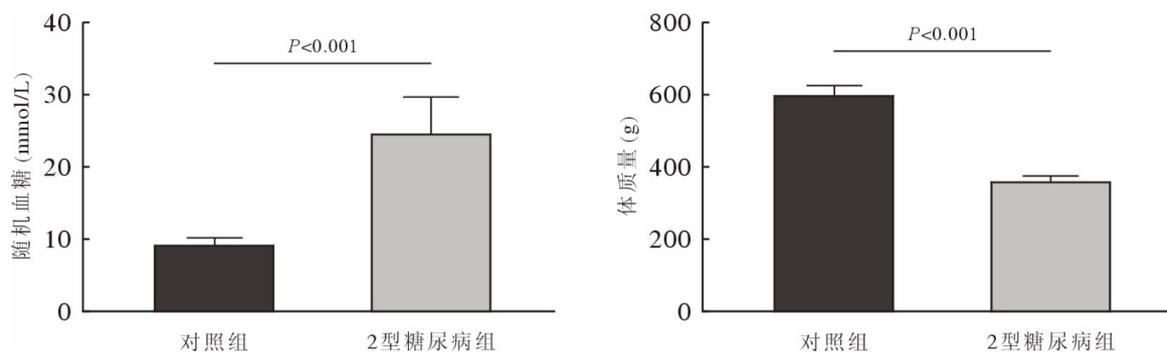


图 1 对照组和 2 型糖尿病组随机血糖和体质量

Fig.1 Randomized blood glucose and weight in control and T2DM groups

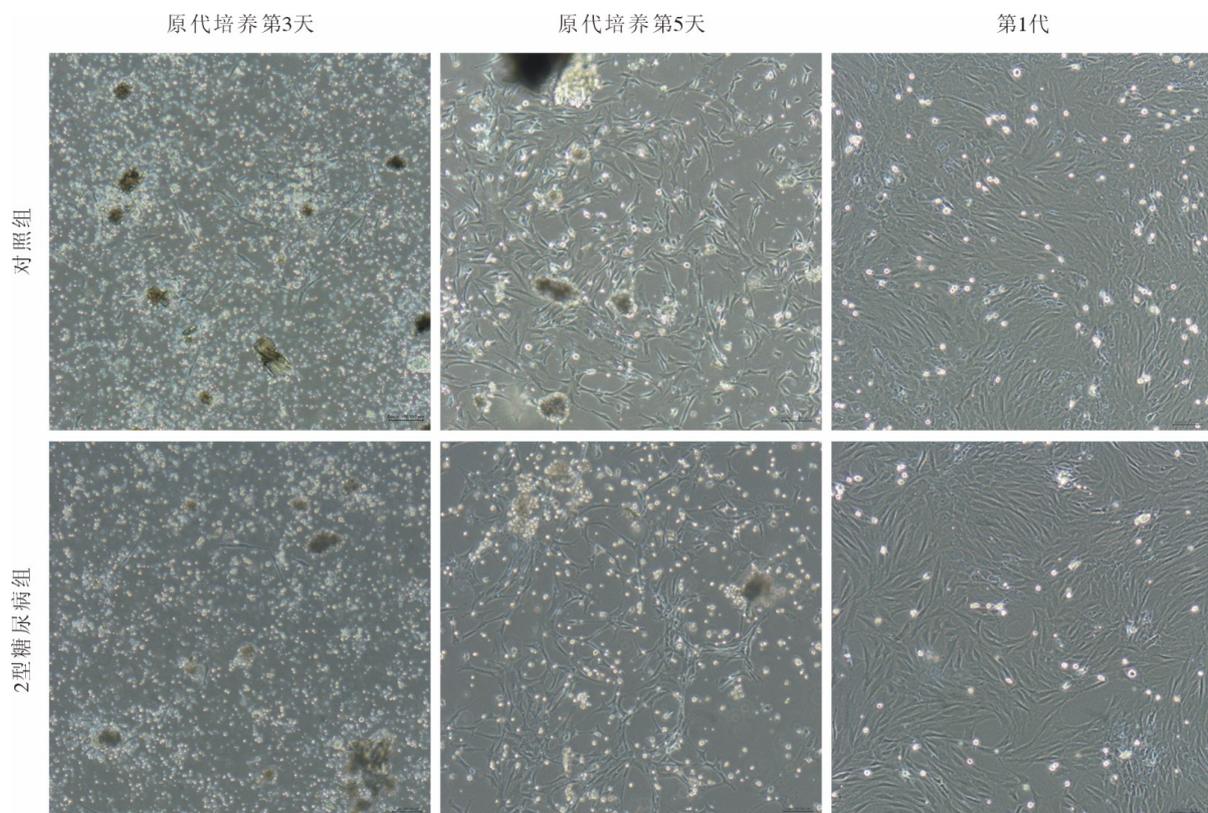


图 2 对照组和 2 型糖尿病组 JBMMSCs 镜下形态观察

A: 原代培养第 3 天; B: 原代培养第 5 天; C: 第 1 代 (标尺=100 μ m)

Fig.2 Morphological observation of JBMMSCs in control and T2DM groups (bar=100 μ m)

A: P0 passage on day3; B: P0 passage on day5; C: P1 passage

多尿的表现,符合2型糖尿病的特征(图1)。

2 大鼠 JBMMSCs 细胞形态 对照组和2型糖尿病组 JBMMSCs 分离培养3 d后,镜下可见少量贴壁生长的长梭形或三角形细胞,以及大量圆形、较亮的血细胞;随着换液次数的增加,血细胞数量逐渐减少,JBMMSCs 不断分裂增殖,数量增加,7 d左右汇合度可达80%,按1:2的比例进行传代,细胞纯化后增殖速度变快,3 d后汇合度可达80%~90%。显微镜下观察可见对照组和2型糖尿病组第1代 JBMMSCs 均呈长梭形,细胞形态无显著差异(图2)。

3 两组 JBMMSCs 活力及克隆能力比较 CCK-8 法检测对照组和2型糖尿病组 JBMMSCs 连续培养1~8 d的增殖数量变化,两组 JBMMSCs 均呈现出稳定的体外扩增能力,细胞生长曲线均类似“S”形,但2型糖尿病组细胞生长较对照组平缓。第1、2天两组细胞的增殖能力无显著差异,2 d后两组细胞均进入快速生长期,但对对照组细胞增殖速度更快,450 nm处的OD值明显大于2型糖

尿病组;6 d后两组细胞的生长速度明显放缓,但对对照组的细胞数量仍多于2型糖尿病组(图3A)。两组 JBMMSCs 以较低密度接种至直径10 cm的培养皿中,常规培养15 d后镜下可见克隆形成,散在分布。0.2%结晶紫溶液染色后,克隆呈蓝色,对照组的克隆数显著多于2型糖尿病组(图3B),说明2型糖尿病显著抑制 JBMMSCs 的克隆形成能力。流式检测结果显示,对照组凋亡早期细胞占比1.37%,凋亡晚期6.73%,2型糖尿病组凋亡早期细胞占比3.11%,凋亡晚期10.6%(图3C);对照组凋亡细胞比例明显低于2型糖尿病组。

4 两组大鼠 JBMMSCs 成骨及成脂分化能力比较 qRT-PCR 显示,成骨诱导7 d后对照组和2型糖尿病组 JBMMSCs 成骨相关基因 ALP、OCN、Runx2 的表达均升高($P < 0.05$);2型糖尿病组细胞成骨诱导后成骨相关基因的 mRNA 水平低于对照组($P < 0.05$)(图4A)。成骨诱导7 d后对 ALP 染色实验结果显示2型糖尿病组蓝紫色染色颗粒分布较稀疏,蓝染面积及密度低于对照组(图4B)。

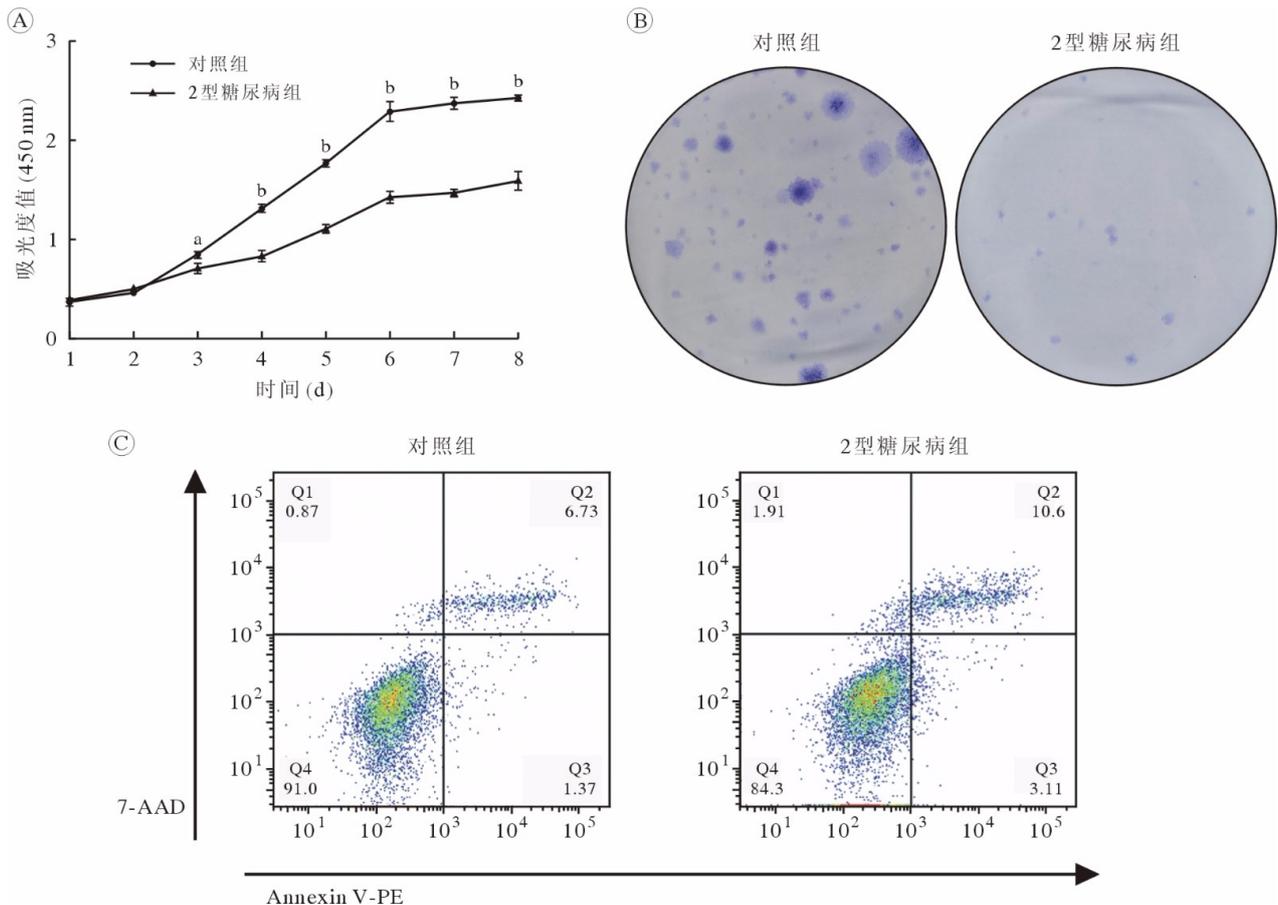


图3 2型糖尿病对 JBMMSCs 增殖、克隆及凋亡的影响

A: CCK-8 法检测细胞的增殖能力; B: 细胞克隆形成能力; C: 细胞凋亡检测 ($^a P < 0.05$, $^b P < 0.001$, vs 2型糖尿病组)

Fig.3 Effect of type 2 diabetes on the proliferation, clone formation and apoptosis ability of JBMMSCs

A: Proliferation ability by CCK-8; B: Clone-forming ability; C: Detection of apoptosis ($^a P < 0.05$, $^b P < 0.001$, vs T2DM group)

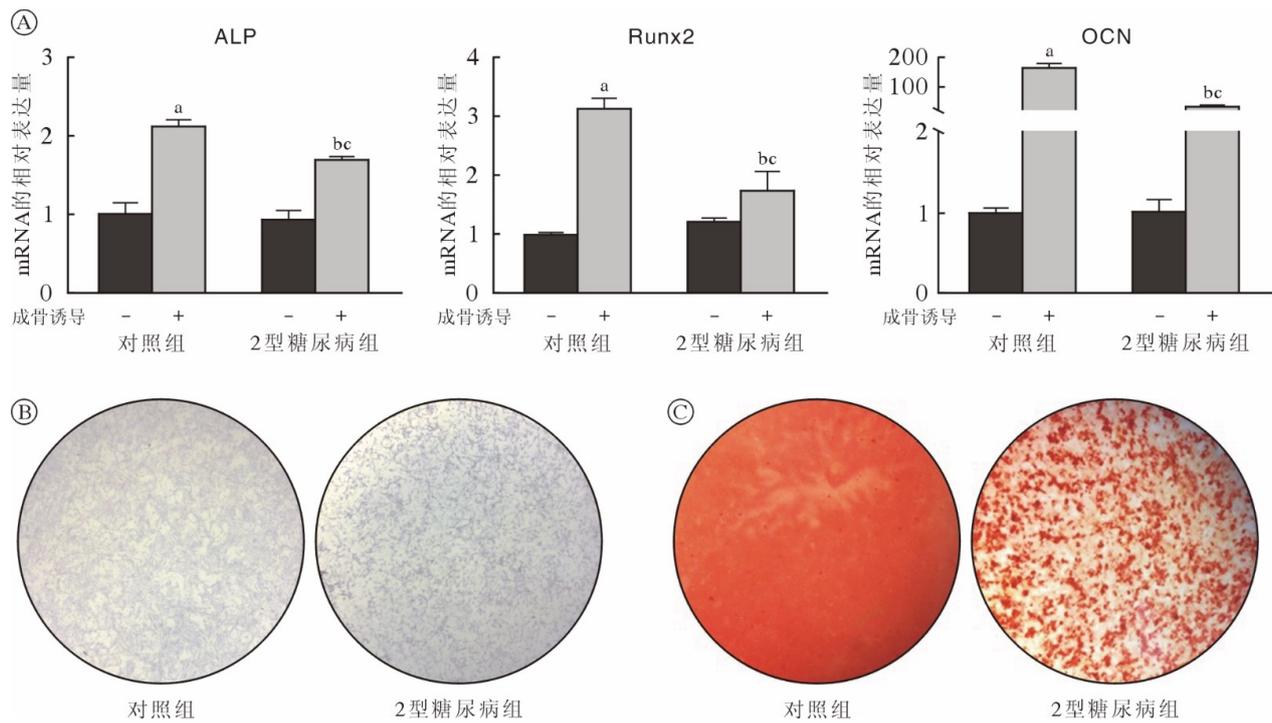


图 4 两组 JBMMSCs 成骨分化能力比较

A: qRT-PCR 检测正常培养和成骨诱导 7 d 后对照组和 2 型糖尿病组中成骨相关基因的 mRNA 表达水平的变化 (^a $P < 0.05$, vs 对照组-未成骨诱导; ^b $P < 0.05$, vs 对照组-成骨诱导; ^c $P < 0.05$, vs 2 型糖尿病组-未成骨诱导); B: ALP 染色; C: 茜素红染色

Fig.4 Comparison of osteogenic differentiation ability of JBMMSCs between the two groups

A: Changes in mRNA expression levels of osteogenesis-related genes in the control group and the T2DM group after 7 days of normal culture and osteogenesis induction by qRT-PCR (^a $P < 0.05$, vs control-NC group; ^b $P < 0.05$, vs control-OS group; ^c $P < 0.05$, vs T2DM-NC group); B: ALP staining; C: Alizarin red staining

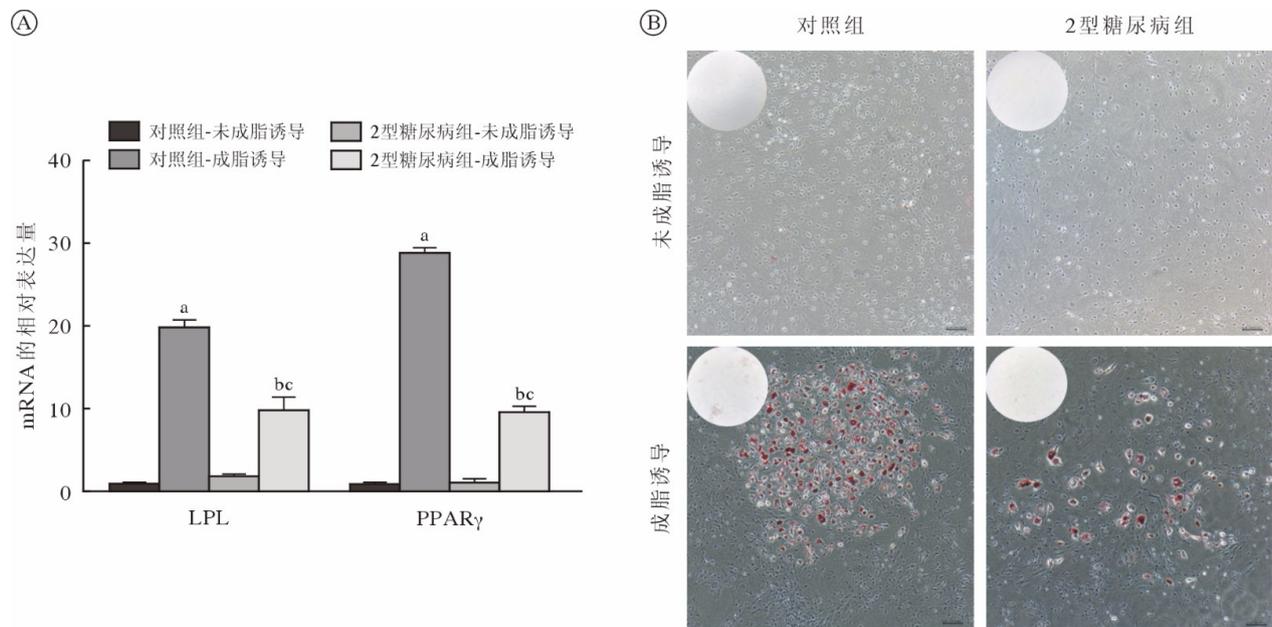


图 5 两组 JBMMSCs 成脂分化能力比较

A: qRT-PCR 检测正常培养和成脂诱导 7 d 后对照组和 2 型糖尿病组中成骨相关基因的 mRNA 表达水平的变化 (^a $P < 0.05$, vs 对照组-未成脂诱导; ^b $P < 0.05$, vs 对照组-成脂诱导; ^c $P < 0.05$, vs 2 型糖尿病组-未成脂诱导); B: 油红 O 染色 (标尺=100 μ m)

Fig.5 Comparison of adipogenic differentiation ability of JBMMSCs between the two groups

A: Changes in mRNA expression levels of adipogenesis-related genes in the control group and the T2DM group after 7 days of normal culture and adipogenic differentiation induction by qRT-PCR (^a $P < 0.05$, vs control-NC group; ^b $P < 0.05$, vs control-AD group; ^c $P < 0.05$, vs T2DM-NC group); B: Oil Red O staining (bar=100 μ m)

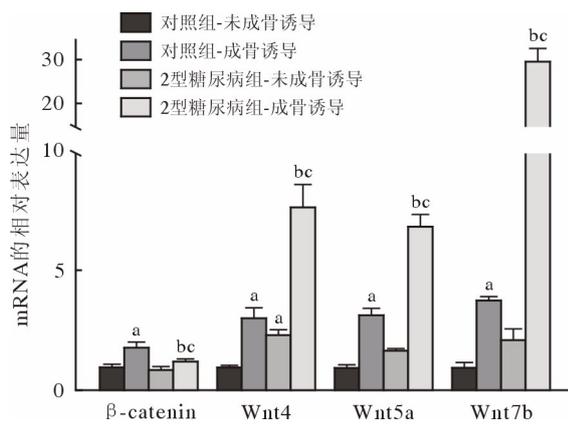


图6 Wnt信号通路相关分子mRNA水平在两组JBMMSCs成骨诱导过程中的变化 (* $P < 0.05$, vs 对照组-未成骨诱导; ^b $P < 0.05$, vs 对照组-成骨诱导; ^c $P < 0.05$, vs 2型糖尿病组-未成骨诱导)

Fig.6 Changes in mRNA levels of Wnt signaling pathway-related molecules during osteogenesis induction (* $P < 0.05$, vs control-NC group; ^b $P < 0.05$, vs control-OS group; ^c $P < 0.05$, vs T2DM-NC group)

茜素红染色结果显示对照组钙结节颗粒数量及红染面积明显多于2型糖尿病组(图4C)。成脂诱导7d后对照组和2型糖尿病组JBMMSCs成脂相关基因LPL及PPAR γ 的表达均升高($P < 0.05$); 2型糖尿病组细胞成脂诱导后成脂相关基因的mRNA水平低于对照组($P < 0.05$)(图5A)。油红O染色结果显示对照组脂滴数量多于2型糖尿病组(图5B)。

5 2型糖尿病抑制JBMMSCs成骨能力的机制研究 成骨诱导7d后对照组及2型糖尿病组Wnt信号通路中的相关分子 β -catenin、Wnt4、Wnt5a、Wnt7b的mRNA表达水平均显著高于常规培养。然而成骨诱导7d后2型糖尿病组JBMMSCs成骨诱导后Wnt4、Wnt5a、Wnt7b的mRNA表达较对照组增高, β -catenin的表达较对照组低(图6)。本部分结果提示Wnt信号通路促进了JBMMSCs的成骨分化,并且在2型糖尿病抑制JBMMSCs成骨分化能力的过程中发挥了作用。然而成骨诱导7d后, β -catenin、Wnt4、Wnt5a、Wnt7b在2型糖尿病组与对照组中的变化趋势并不相同,提示Wnt信号通路中不同分子在2型糖尿病对大鼠JBMMSCs成骨能力的影响过程中发挥了不同作用。

讨论

糖尿病既可以促进牙周病发展,又可以影响种植牙的骨结合、引发种植体周围炎;糖尿病患者种植体周围骨吸收量增加,术后稳定性差^[6-7]。有学者通过体外构建高糖微环境来模拟2型糖尿

病,将大鼠JBMMSCs在高糖培养基中诱导成骨培养7d后,细胞中ALP和Runx2蛋白的表达较低糖培养基低^[8]。但体外的高糖环境无法完全模拟2型糖尿病患者颌骨中的环境。因此,本实验选取与人类2型糖尿病发生发展过程相似的GK大鼠作为2型糖尿病组,选取相同周龄的Wistar大鼠作为对照^[9]。

颌骨骨髓间充质干细胞是一种具有较强增殖能力和多向分化潜能的成体干细胞,病理因素、理化因素及生物因素均可影响其生物学特性^[10]。本实验成功分离培养了来源于大鼠的JBMMSCs,并对其增殖、分化等生物学性能进行了分析与比较。体外培养条件下对照组与2型糖尿病组JBMMSCs贴壁生长,并呈长梭形的成纤维细胞样形态,无显著差异。CCK-8法检测细胞的增殖能力,与对照组相比,2型糖尿病组JBMMSCs的细胞增殖较缓慢,克隆形成能力较低。流式细胞术检测结果显示,2型糖尿病促进细胞的凋亡,处于凋亡期的细胞比例高于对照组。同时,2型糖尿病可抑制细胞的成骨与成脂分化能力。JBMMSCs成骨诱导及成脂诱导7d后2型糖尿病组成骨、成脂相关基因的mRNA表达均低于对照组,ALP染色结节的数量也显著降低,产生的脂滴数量也显著少于对照组。研究表明,与正常来源JBMMSCs相比,糖尿病来源的JBMMSCs增殖及成骨分化能力显著减弱,这与本实验的研究结果一致^[11]。

目前关于2型糖尿病对颌骨骨髓间充质干细胞成骨分化影响机制的研究较少。2型糖尿病猪拔牙后牙槽窝的生长分化因子11(growth differentiation factor 11, GDF11)的mRNA和蛋白表达水平显著高于对照组,降低GDF11的表达可提高2型糖尿病来源的JBMMSCs成骨能力,促进2型糖尿病条件下拔牙窝的愈合^[12]。种植失败糖尿病患者牙槽骨骨髓间充质干细胞的黏附、迁移和成骨分化能力显著低于种植成功糖尿病患者和正常患者,整合素亚单位 α 10(ITGA10)的表达也低于种植成功糖尿病患者和正常患者;ITGA10基因敲除可显著降低JBMMSCs的黏附和迁移能力,并通过干扰FAK/PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin通路抑制其成骨分化潜能^[13]。陆玖青等^[11]研究发现2型糖尿病大鼠来源的JBMMSCs中NF- κ B p65核蛋白的mRNA及蛋白表达增加,并推测NF- κ B可能参与2型糖尿病抑制JBMMSCs成骨分化能力的过程。抑制miR-203-3p的表达可上调BMP/Smad信号通路,促进体外高糖环境下JBMMSCs的成骨分化^[8]。

糖尿病组 JBMMSCs 的胰岛素样生长因子结合蛋白 2 的 mRNA 表达和蛋白翻译水平显著高于非糖尿病组^[14]。

Wnt 信号通路是调控干细胞增殖和多向分化的关键途径,与骨髓间充质干细胞骨向分化关系密切^[15]。根据是否依赖 β -catenin 可分为经典通路与非经典通路;非经典 Wnt 信号通路主要分为 Wnt/ Ca^{2+} 和 Wnt/平面细胞极性信号通路^[16]。目前的研究表明糖尿病性骨质疏松症与 Wnt/ β -catenin 信号通路关系密切,2 型糖尿病患者血清中骨转换标志物及 β -catenin 含量显著低于对照组^[17]。Gassel 等^[18]的研究结果显示,患有夏科氏关节病的 2 型糖尿病患者下肢骨组织中 Wnt3a、Wnt5a 的 mRNA 表达水平低于正常组。经典 Wnt 信号通路激活后,细胞质中的 β -catenin 含量升高并向细胞核中迁移,激活靶基因进而引起下游的一系列反应^[19]。Wnt4、Wnt5a、Wnt7b 是非经典 Wnt 信号通路的启动子,但也可以通过经典 Wnt 信号通路发挥作用^[20-22]。在本实验中 2 型糖尿病组 JBMMSCs 成骨诱导后 Wnt 信号通路相关分子 Wnt4、Wnt5a、Wnt7b 的 mRNA 表达水平较对照组升高, β -catenin 的 mRNA 表达水平较对照组降低,说明 2 型糖尿病影响下经典及非经典 Wnt 信号通路可能均参与了对颌骨骨髓间充质干细胞成骨分化的调控过程,并且 Wnt4、Wnt5a、Wnt7b 可能通过非经典 Wnt 信号通路发挥作用。但 Wnt 信号通路调节网络结构复杂,其调控具体机制还需进一步研究。

综上所述,2 型糖尿病会影响颌骨骨髓间充质干细胞的增殖、克隆及分化能力。2 型糖尿病影响下 JBMMSCs 的增殖、克隆、成骨及成脂分化能力均降低,成骨分化过程中 Wnt 信号通路相关分子的表达也有所改变。但若明确 2 型糖尿病通过 Wnt 信号通路对 JBMMSCs 具体调控机制,还需进一步实验研究。

作者贡献 李天琪:细胞及分子生物学实验,文章撰写;孟祥博:动物实验;霍娜:课题设计与指导;蔡川:文章修改,文章审阅和校正;李帅臣:文献收集和整理;周孙欣:统计分析;张彤:写作指导,修订,终审论文。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: 619028753@qq.com。

参考文献

- 1 宋亚男,金昕晔,张颖,等.基于集成学习的2型糖尿病患者降糖用药方案智能分类探讨[J].解放军医学院学报,2019,40(8):719-724.
- 2 Rodic T, Wölfel EM, Milovanovic P, et al. Bone quality analysis of jaw bones in individuals with type 2 diabetes mellitus-post mortem anatomical and microstructural evaluation [J]. *Clin Oral Investig*, 2021, 25(7): 4377-4400.
- 3 Son C, Choi MS, Park JC. Different responsiveness of alveolar bone and long bone to epithelial-mesenchymal interaction-related factor [J]. *JBMR Plus*, 2020, 4(8): e10382.
- 4 Guest PC. Characterization of the goto-kakizaki (GK) rat model of type 2 diabetes [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 203-211.
- 5 林心君,王麒又,辛金钟,等.高成模率和高稳定性的糖尿病大鼠模型制备:高脂高糖膳食+STZ体重联合体表面积法构建糖尿病大鼠模型[J].*中国老年学杂志*,2013,33(9):2051-2054.
- 6 Al Zahrani S, Al Mutairi AA. Stability and bone loss around submerged and non-submerged implants in diabetic and non-diabetic patients: a 7-year follow-up [J]. *Braz Oral Res*, 2018, 32: e57.
- 7 Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis and diabetes [J]. *Br Dent J*, 2019, 227(7): 577-584.
- 8 Tang YY, Zheng LL, Zhou J, et al. miR-203-3p participates in the suppression of diabetes-associated osteogenesis in the jaw bone through targeting Smad1 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1595-1607.
- 9 Fajardo RJ, Karim L, Calley VI, et al. A review of rodent models of type 2 diabetic skeletal fragility [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(5): 1025-1040.
- 10 李天琪,孟祥博,时权,等.颌骨骨髓间充质干细胞生物学特性及其影响因素的研究进展[J].*中华口腔医学杂志*,2022,57(1):107-112.
- 11 陆玖青,吕佳姝,谢亚佳,等.糖尿病大鼠颌骨结构及颌骨骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J].*口腔颌面外科杂志*,2020,30(3):144-149.
- 12 Wang SY, Wang L, Shi SJ, et al. Inhibition of GDF11 could promote bone healing in the tooth extraction socket and facilitate mesenchymal stem cell osteogenic differentiation in T2DM pigs [J]. *J Periodontol*, 2020, 91(12): 1645-1652.
- 13 Liang C, Liu X, Liu CY, et al. Integrin α 10 regulates adhesion, migration, and osteogenic differentiation of alveolar bone marrow mesenchymal stem cells in type 2 diabetic patients who underwent dental implant surgery [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 13252-13268.
- 14 王一博,梁超,李钧.IGFBP2在2型糖尿病患者牙槽突骨髓间充质干细胞中的表达[J].*北京口腔医学*,2022,30(4):264-268.
- 15 Thomas S, Jaganathan BG. Signaling network regulating osteogenesis in mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Commun Signal*, 2022, 16(1): 47-61.
- 16 Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(14): 4042-4045.
- 17 Gaudio A, Privitera F, Battaglia K, et al. Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(10): 3744-3750.

- gene in hibernating mammals [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (20): 7599.
- 7 Horii Y, Shiina T, Shimizu Y. The mechanism enabling hibernation in mammals [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1081: 45-60.
- 8 Zhong P, Huang H. Recent progress in the research of cold-inducible RNA-binding protein [J]. *Future Sci OA*, 2017, 3 (4): FSO246.
- 9 Chen KH, Murao A, Arif A, et al. Inhibition of efferocytosis by extracellular C1RP-induced neutrophil extracellular traps [J]. *J Immunol*, 2021, 206 (4): 797-806.
- 10 Zhong P, Peng JY, Yuan MJ, et al. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in inflammatory diseases: molecular insights of its associated signalling pathways [J]. *Scand J Immunol*, 2021, 93 (1): e12949.
- 11 Aziz M, Brenner M, Wang P. Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106 (1): 133-146.
- 12 Takizawa S, Murao A, Ochani M, et al. Frontline Science: Extracellular CIRP generates a proinflammatory Ly6G + CD11bhi subset of low-density neutrophils in sepsis [J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 109 (6): 1019-1032.
- 13 Ode Y, Aziz M, Wang P. CIRP increases ICAM-1 + phenotype of neutrophils exhibiting elevated iNOS and NETs in sepsis [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103 (4): 693-707.
- 14 Chen KH, Cagliani J, Aziz M, et al. Extracellular CIRP activates STING to exacerbate hemorrhagic shock [J]. *JCI Insight*, 2021, 6 (14): e143715.
- 15 Sendler M, van den Brandt C, Glaubit J, et al. NLRP3 inflammasome regulates development of systemic inflammatory response and compensatory anti-inflammatory response syndromes in mice with acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158 (1): 253-269.
- 16 Xu QS, Wang MF, Guo HY, et al. Emodin alleviates severe acute pancreatitis-associated acute lung injury by inhibiting the cold-inducible RNA-binding protein (CIRP)-mediated activation of the NLRP3/IL-1 β /CXCL1 signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 655372.
- 17 牛世英, 丛昌盛, 孙美丽, 等. 冷诱导RNA结合蛋白在放射性肺损伤模型中的表达变化 [J]. *中国辐射卫生*, 2022, 31 (1): 33-38.
- 18 Shimizu J, Murao A, Nofi C, et al. Extracellular CIRP promotes GPX4-mediated ferroptosis in Sepsis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 903859.
- 19 Kulkarni HS, Lee JS, Bastarache JA, et al. Update on the features and measurements of experimental acute lung injury in animals: an official American thoracic society workshop report [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66 (2): e1-e14.
- 20 Li L, Sun RF, Miao Y, et al. PD-1/PD-L1 expression and interaction by automated quantitative immunofluorescent analysis show adverse prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma having T-cell infiltration: a study from the International DLBCL Consortium Program [J]. *Mod Pathol*, 2019, 32 (6): 741-754.
- 21 Dogan S, Vasudevaraja V, Xu B, et al. DNA methylation-based classification of sinonasal undifferentiated carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2019, 32 (10): 1447-1459.
- 22 陈祝桂, 彭志勇, 张智豪, 等. 不同浓度脂多糖对脓毒症急性肺损伤肺上皮细胞坏死性凋亡和线粒体自噬的影响 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2020, 34 (4): 330-333.
- 23 Logan SM, Storey KB. Cold-inducible RNA-binding protein Cirp, but not Rbm3, may regulate transcript processing and protection in tissues of the hibernating ground squirrel [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2020, 25 (6): 857-868.
- 24 Fujita T, Liu Y, Higashitsuji H, et al. Involvement of TRPV3 and TRPM8 ion channel proteins in induction of mammalian cold-inducible proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495 (1): 935-940.
- 25 Yang J, Wu HQ, Xie WY, et al. Cold-inducible RNA-binding protein mediates airway inflammation and mucus hypersecretion through a post-transcriptional regulatory mechanism under cold stress [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 78: 335-348.
- 26 Denning NL, Aziz M, Murao A, et al. Extracellular CIRP as an endogenous TREM-1 ligand to fuel inflammation in sepsis [J]. *JCI Insight*, 2020, 5 (5): e134172.
- 27 Tan CY, Gurien SD, Royster W, et al. Extracellular CIRP induces inflammation in alveolar type II cells via TREM-1 [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 579157.
- 28 Rosenthal LM, Leithner C, Tong G, et al. RBM3 and CIRP expressions in targeted temperature management treated cardiac arrest patients—a prospective single center study [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (12): e0226005.

(责任编辑: 孟晓彤)

(上接第 379 页)

- 18 Gassel LC, Schneider S, Banke IJ, et al. Dysregulation of Wnt signaling in bone of type 2 diabetes mellitus and diabetic Charcot arthropathy [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2022, 23 (1): 365.
- 19 张丽君, 王可, 王艺璇, 等. 模拟失重条件下Wnt/ β -catenin信号通路调节成骨细胞功能的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2019, 40 (3): 290-292.
- 20 Nie XB, Wei XY, Ma H, et al. The complex role of Wnt ligands in type 2 diabetes mellitus and related complications [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (14): 6479-6495.
- 21 Li X, Li ZH, Wang JR, et al. Wnt4 signaling mediates protective effects of melatonin on new bone formation in an inflammatory environment [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (9): 10126-10139.
- 22 Fu YJ, Ma D, Fan FY, et al. Noncanonical Wnt5a signaling suppresses hippo/TAZ-mediated osteogenesis partly through the canonical Wnt pathway in SCAPs [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 469-483.

(责任编辑: 施晓亚)