四川大学学报（医学版）
J Sichuan Univ (Med Sci Edi)　2016，47(5)：649－654

高糖环境下FGF-21对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响*

李　茜[1]，陈　程[1]，安振梅[2]，李雨珏[2]，张　玫[3]，何　訸[3]，李双庆[1△]

1.四川大学华西医院 全科医学科（成都 610041）；2.四川大学华西医院 内分泌科（成都 610041）；
3.四川大学华西医院 实验医学科（成都 610041）

【摘要】 目的　研究高糖环境下成纤维细胞生长因子21(FGF-21)对人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)骨向分化的作用及其机制。**方法**　取健康成人骨髓，分离培养hBMSCs，成骨、成脂诱导分化后，茜素红、油红O染色鉴定，流式细胞仪检测第3代细胞表面标志物CD105、CD90、CD73和CD44水平。将hBMSCs分为对照组〔以葡萄糖(Glu)浓度5.5 mmol/L模拟正常生理状态糖浓度〕，Glu A、B、C高糖浓度梯度组(Glu 16.5、25、40 mmol/ L)，FGF-21干预组(Glu 5.5 mmol/ L＋ FGF-21)，高糖环境FGF-21干预组(Glu B＋FGF-21)和Glu B＋FGF-21干预＋细胞丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 信号转导阻断剂(包括PD98059、SP600125、SB203580)组。成骨诱导第14天，检测碱性磷酸酶(ALP)活性；成骨诱导第21天，以RT-PCR检测骨向分化的相关因子*ALP*、骨钙素(*OCN*)、*Runx*2的mRNA水平，以Western blot检测MAPK通路中细胞外信号调节激酶(ERK1/ 2)、P38丝裂原活化蛋白激酶(P38)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)蛋白磷酸化水平。**结果**　①分离培养得到的hBMSCs成骨、成脂诱导后茜红素、油红O染色阳性，hBMSCs被成功地诱导向成骨细胞(OB)和脂肪细胞分化。流式细胞仪鉴定为hBMSCs。②与对照组相比，高糖组的骨向分化标志物*ALP*、*OCN*、*Runx*2的mRNA水平明显增加，MAPK通路中ERK、P38、JNK磷酸化水平表达增加。③与Glu B组相比，Glu B＋FGF-21组的*ALP*、*OCN*、*Runx*2的mRNA水平降低，ERK、P38和JNK的磷酸化水平降低。④与Glu B＋FGF-21组相比，Glu B＋FGF-21＋MAPK信号转导阻断剂组的*ALP*、*Runx*2的mRNA水平进一步降低，且相应的ERK、JNK和P38及其磷酸化水平进一步降低。**结论**　高糖能促进hBMSCs的骨向分化。高糖环境下FGF-21具有抑制hBMSCs的成骨分化或矿化作用。

【关键词】　成纤维细胞生长因子21　人骨髓间充质干细胞　成骨诱导　高糖环境　MAPK信号通路

Effects of FGF-21 on Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in High Glucose Environment

LI Xi[1], *CHEN Cheng*[1], *AN Zhen-mei*[2], *LI Yu-jue*[2], *ZHANG Mei*[3], *HE He*[3], *LI Shuang-qing*[1△]. 1. *Department of General Practice Medicine*, *West China Hospital*, *Sichuan University*, Chengdu 610041, China; 2. *Department of Endocrinology and Metabolism*, *West China Hospital*, *Sichuan University*, Chengdu 610041, China; 3. *Department of Laboratory Medicine*, *West China Hospital*, *Sichuan University*, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: hxjklsq@sina.com

【Abstract】 Objective　To determine the effect of fibroblast growth factor-21 (FGF-21) on the osteogenic differention of human bone mesenchymal stem cells (hBMSCs) exposed to a hyperglycemia condition *in vitro*. **Methods**　hBMSCs were isolated from adult bone marrows, and identified by Alizarin red and oil red O staining. The expressions of immunophenotype were analysed using flow cytometry (CD105, CD90, CD73, CD44). HBMSCs were divided into control group〔glucose (Glu) concentration of 5.5 mmol/L〕, Glu A, B, C groups (Glu 16.5, 25, 40 mmol/L), FGF-21 group (Glu 5.5mmol/ L＋ FGF-21), Glu B＋ FGF-21 group, and Glu B ＋FGF-21＋cell mitogen activated protein kinase (MAPK) blocker (PD98059, SP600125 ,and SB203580) groups. The effect of FGF-21 on the differentiation of hBMSCs was detected using indicators as follows: alkaline phosphatase (ALP) on day 14, mRNA expressions of *ALP*, osteocalcin (*OCN*) and *Runx*2, protein expressions and phosphorylation of extracellular signal regulated kinase (ERK), mitogen-activated protein kinase (P38) and c-Jun N-terminal kinases (JNK) on day 21. **Results**　①hBMSCs differentiated into osteoblast cells and lipocyte. The hBMSCs were identified by flow cytometry. ②Compared with control group, significant increases of *ALP* mRNA, *OCN* mRNA and *Runx*2 mRNA levels, as well as phosphorylation of ERK, P38 and JNK were observed in Glu A, B, C groups.

---

* 国家自然科学基金青年项目(No. 81501800)、四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2014FZ0048)和四川省卫生厅项目(No. 171140062)资助

△ 通信作者，E-mail：hxjklsq@sina.com

③Compared with Glu B group, *ALP*, *OCN* and *Runx*2 mRNA levels, and phosphorylation of ERK, P38 and JNK were decreased in Glu B+FGF-21 group . ④Compared with Glu B+FGF-21 group, *ALP* and *Runx*2 mRNA levels, and phosphorylation of ERK, JNK and P38 were decreased in Glu B +FGF-21 +MAPK blocker groups. **Conclusion** High glucose could promote the biomineralization of hBMSCs. FGF-21 in high glucose environment could inhibit the osteogenic differentiation of hBMSCs.

【Key words】 FGF-21 Human bone mesenchymal stem cells Osteogenic differentiation High glucose MAPK signaling

糖尿病(DM)的发病率在世界范围内呈逐年上升的趋势,预计2035年中国糖尿病患者数达1.4亿,中国将成为全球糖尿病患者数最多的国家[1]。DM的急、慢性并发症严重危害患者的健康。骨质疏松(OP)是DM在骨骼系统出现的严重慢性并发症,并成为长期疼痛和功能障碍的主要原因,也是致残率最高的疾病。OP患者骨折风险增加,骨折不仅使国家和个人承担的医疗费用明显增加,且给家庭及社会带来严重危害[2],随着DM患者寿命和病程的延长,其OP的发病率也有上升趋势[3]。

人成纤维细胞生长因子21(FGF-21)具有多重内分泌功能,是治疗心血管疾病、肥胖和2型糖尿病等代谢性疾病的潜在新药。通过β-Kloth跨膜蛋白与FGF受体结合形成的FGF21受体复合物起作用[4]。在糖代谢中,FGF-21能增强脂肪细胞摄取葡萄糖能力、降低血糖及抑制胰高血糖素分泌,并保护胰岛β细胞存活,提高血清胰岛素水平、胰岛素敏感性和葡萄糖吸收率[5]。同时,WEI等[6]的研究显示,FGF-21转基因小鼠骨体积分数、骨小梁数、骨小梁厚度、骨矿物质密度减少,从而引起小鼠的骨量丢失。

人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)是一种具有多项分化潜能的干细胞,在一定的诱导条件下,能向成骨细胞(OB)、软骨细胞、神经细胞、脂肪细胞和心肌细胞等多向分化[7]。体外诱导hBMSCs向OB分化的具体机制中细胞丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路的研究较为深入,MAPKs家族中,主要有细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、P38丝裂原活化蛋白激酶(P38)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)参与间充质干细胞(MSCs)成骨分化调节[4-7]。在OB分化和成熟过程中,Runx2和骨钙素(OCN)是两个极为重要的转录因子[8]。Runx2和OCN参与了MAPK、骨形态发生蛋白2(BMP-2)、Wnt等多条信号转导途经;碱性磷酸酶(ALP)的活性可代表OB早期的分化水平,随着OB分化的发展ALP表达会逐渐增强,ALP活性的提高是骨髓间充质干细胞向OB分化的重要标志[9-10]。为进一步探讨FGF-21对高糖环境下hBMSCs的骨向分化的影响及其作用机制,我们进行了以下研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *人骨髓标本的获取* 本实验获得四川大学华西医院伦理委员会批准,用于分离hBMSCs的骨髓取自健康青年自愿者的髂骨,志愿者签署知情同意书。供体排除肿瘤、肝炎、结核、HIV感染等因素。通过骨髓穿刺取髂前上棘处骨髓15 mL并以肝素抗凝。

1.1.2 *主要试剂及仪器* 特级胎牛血清、DMEM/F12培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)购于Hyclone公司。青-链霉素双抗(Solarbio公司)。淋巴细胞分离液(灏洋公司)。hBMSCs成骨诱导分化培养基、hBMSCs成脂诱导分化培养基、茜素红染液、油红O染液(赛业公司)。MAPK Family Antibody、Phospho-MAPK Family Antibody(CST公司),ALP试剂盒(Sigma公司)。

1.2 hBMSCs的分离、培养

以无菌PBS按2∶1比例稀释骨髓液混匀,贴壁加入到淋巴细胞分离液中;以密度梯度离心法分离出白膜层:2 000 r/min离心30 min,吸取白膜层并移入新的离心管,加入3倍体积PBS稀释、混匀,1 000 r/min离心10 min;吸弃上清,加PBS吹打重悬和洗涤细胞,以1 000 r/min离心5 min,收集细胞。吸弃上清液,加入含10%特级胎牛血清、1%双抗的DMEM/F12培养基,吹打重悬、混匀细胞后移至培养瓶,置入37 ℃、体积分数5%的CO_2孵箱中静置培养。48 h后首次半量换液,半量换液后72 h首次全量换液时以PBS洗涤培养瓶3次去除未贴壁的细胞,随后每3 d换液,视集落的生长状况决定首次传代时间,首次传代比例为1∶2,第1代细胞生长至90%底面积时以1∶3的比例传代。

1.3 hBMSCs的鉴定

1.3.1 *多向分化鉴定* 成骨分化使用成骨诱导培养基(hBMSCs成骨诱导分化基础培养基、hBMSCs

培养专用胎牛血清、地塞米松、双抗）每3 d换液一次，诱导 3 周后，洗涤、固定，以茜素红染色后镜下观察拍照；成脂分化使用成脂诱导培养基（hBMSCs 成脂诱导分化基础培养基 A、hBMSCs 成脂诱导分化基础培养基 B、hBMSCs 培养专用胎牛血清、谷氨酰胺、双抗、胰岛素、IBMX、罗格列酮、地塞米松），每 3 d换液，待细胞长满后换用成脂诱导 A 液，3 d 后换用 B 液，1 d 后再次换用 A 液作用 3 d，以此交替诱导 3 周后以 B 液诱导 7 d。洗涤、固定，用油红 O 染色后镜下观察拍照。

1.3.2 流式细胞技术检测　胰酶消化离心的第 3 代 hBMSCs，按国际细胞治疗协会提出的鉴定标准，阳性指标为 CD105、CD90、CD73 和 CD44，阴性指标为 CD45、CD34、CD19、CD11b 和 HLA-DR，实验结果用 BD FACS Diva 软件分析。

1.4　高糖及 FGF-21 对 hBMSCs 成骨分化的影响

1.4.1 hBMSCs 的成骨分化培养及分组　依据国内外文献、实际临床情况及实验结果[2,11-14]，选取葡萄糖（Glu）浓度 5.5 mmol/L 模拟正常生理状态糖浓度（作为对照），选取 Glu 16.5、25、40 mmol/L 为高糖梯度浓度（即为 Glu A、Glu B、Glu C）。取第 3 代细胞进行消化离心后以每孔 1×10^{5} 接种于培养板中，将细胞分 9 组：①对照组（Glu 5.5 mmol/L）；②～④组即为 Glu A～Glu C 组（Glu 16.5、25、40 mmol/ L）；⑤FGF-21 干预组（Glu 5.5 mmol/ L + FGF-21）；⑥高糖环境 FGF-21 干预组（Glu B+ FGF-21）；⑦、⑧、⑨ 高糖环境 FGF-21 干预 + MAPK 信号转导阻断剂〔包括 ERK 信号转导抑制剂 1（PD98059）、P38 信号转导抑制剂 2（SB203580）、JNK 信号转导抑制剂 3（SP600125）〕组，即为 Glu B+ FGF-21+ PD98059 组、Glu B+ FGF-21 + SB203580 组、Glu B + FGF-21 + SP600125 组。以上 9 组细胞均用成骨诱导培养基（同成骨分化鉴定培养基）培养，FGF-21 终质量为 0.2 μg/mL，PD98059 为 50 mmol/L，SP600125 为 10 μmol/L，SB203580 为 20 μmol/L。

1.4.2 ALP 活性检测　取①～⑨组成骨诱导第 14 天的细胞，PBS 漂洗 2 次，加入 Trizol 进行细胞裂解，取上清液按 ALP 测定试剂盒说明书进行检测。

1.4.3 RT-PCR 检测骨向分化基因 *ALP*、*OCN*、*Runx2* 的表达水平　按 Trizol 试剂盒说明书的操作步骤提取贴壁培养的 hBMSCs 的总 RNA；按逆转录反应试剂盒说明书操作进行逆转录反应（37 ℃ 15 min，98 ℃ 5 min），反应产物进行 PCR 扩增；PCR 过程按试剂盒说明书操作在 ABI7300 荧光定量 PCR 仪上进行。*ALP* 上游引物：5′-CCAGCAGGTTTCTCTCTTGG-3′，下游引物：5′-CTGGGAGTCTCATCCTGAGC-3′；*Runx2* 上游引物：5′-CCGTGGCCTTCAAGGTTGT-3′，下游引物：5′-TTCATAACAGCGGAGGCAT-3′；*OCN* 上游引物：5′-CCCTTCTCAAGCACCAATGG-3′，下游引物：5′-AAGGGTGGGTAGTCATTTGC-3；*U6*（内参）上游引物：5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′，下游引物：5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′。基因引物设计及合成由 IDT 公司完成。PCR 反应条件：95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个 PCR 循环。获得 Ct 值后，目的基因的相对定量按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。每个样重复 3 个复孔，选择差异性＜0.5 的数据作为有效数据。

1.4.4 Western blot 检测 MAPK 通路中 ERK、P38、JNK 蛋白磷酸化水平　成骨诱导第 21 天，每组收集约 4×10^{5} 细胞，蛋白裂解液进行蛋白提取，按 Western blot 常规进行蛋白表达检测，其中相应Ⅰ抗（1∶5 000）于 4 ℃下孵育过夜。TBST 洗膜后连接辣根过氧化物酶标记的Ⅱ抗（1∶5 000）作为探针。目的蛋白特异条带化学发光法显影，经 GAPDH（1∶5 000）信号标准化，并通过 Image-Pro Plus 软件半定量分析，磷酸化与非磷酸化蛋白的比值代表蛋白磷酸化水平。

1.5　统计学方法

各实验重复 3 次，重复性好。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较用 t 检验，$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　hBMSCs 的培养与鉴定

2.1.1 hBMSCs 形态及成骨、成脂诱导分化的鉴定　骨髓分离培养所得的 hBMSCs 呈典型的长梭形（图 1A），细胞形态较好，经多次传代后形态保持稳定。经成骨、成脂诱导后分别用茜红素、油红 O 染色阳性，提示 hBMSCs 被成功地诱导向成骨细胞和脂肪细胞分化（图 1B、1C）。

2.1.2 hBMSCs 的流式鉴定　流式细胞仪检测示 hBMSCs 的阳性指标 CD90、CD44、CD73、CD105 均≥97%，阴性指标 CD45、CD34、CD11b、CD19、HLA-ADR 均≤0.5%，见图 2。

2.2　高糖及 FGF-21 对 ALP 活性的影响

成骨诱导 14 d 时 ALP 活性检测示：与对照组相比，Glu A、Glu B、Glu C 高糖组的 ALP 活性均增

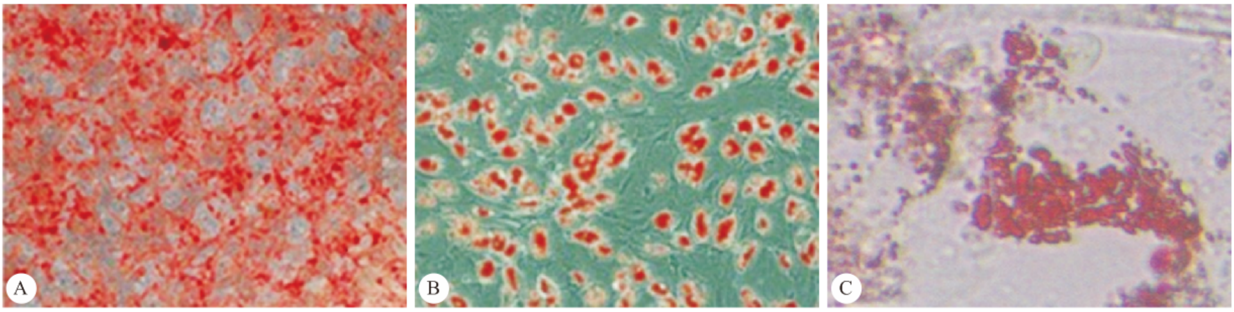

图 1 分离培养的 hBMSCs(A,×10);hBMSCs 成骨诱导 21 d 茜红素染色(B,×10);hBMSCs 成脂诱导 28 d 油红 O 染色(C,×10)

Fig 1 Isolated and cultured hBMSCs (A,×10); hBMSCs osteogenesis induced 21 d, Alizarin red staining (B,×10); hBMSCs adipogenic and chondrogenic induced 28 d, Red Oil O staining (C,×10)

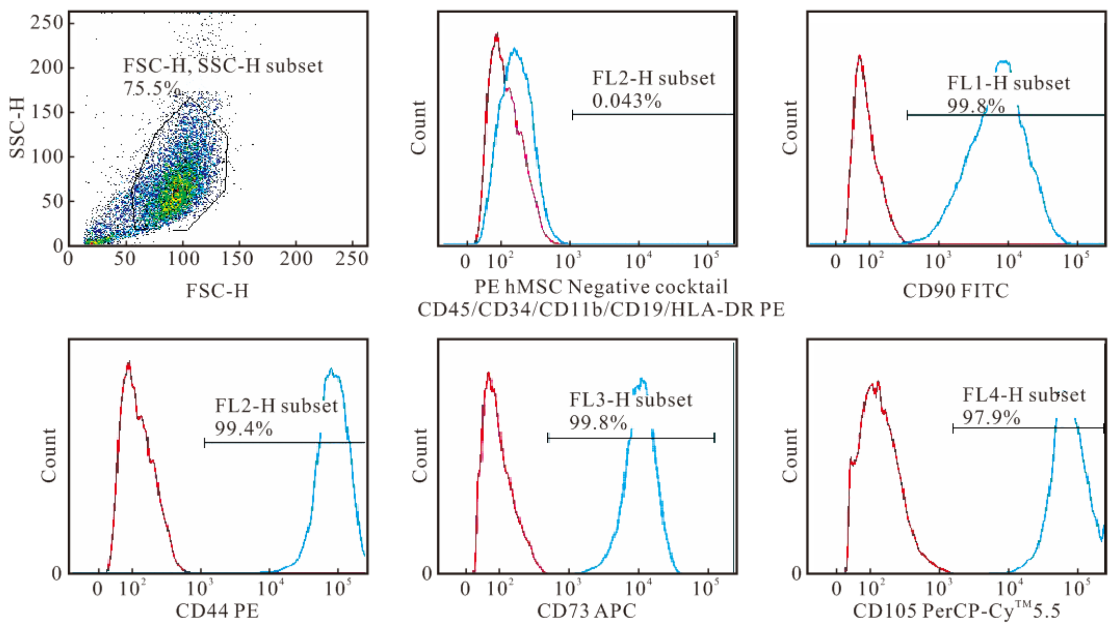

图 2 流式细胞仪鉴定 hBMSCs

Fig 2 Identification of hBMSCs by flow cytometry

加,但差异均无统计学意义;FGF-21 对正常生理状态糖浓度下 ALP 活性无影响($P>0.05$);而 FGF-21 和 MAPK 信号转导阻断剂在高糖浓度下可使 ALP 活性降低,其中 Glu B+FGF-21 组和 Glu B+FGF-21+PD98059 组 ALP 活性降低与 Glu B 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 Glu B+FGF-21 + SP600125 组 、Glu B + FGF-21+SB203580 组与 Glu B+FGF-21 组比较,差异无统计学意义,见图 3。

2.3 高糖及 FGF-21 对 hBMSCs 骨向分化相关基因表达的影响

在成骨诱导 21 d 时,RT-PCR 检测 *ALP*、*OCN* 和 *Runx2* 的 mRNA 水平示:与对照组相比,Glu A、Glu B、Glu C高糖组均促进 *ALP*、*OCN*、*Runx2* 的

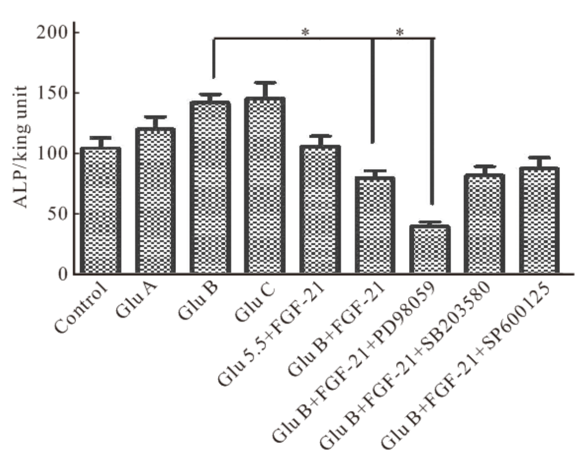

图 3 hBMSCs 进行成骨诱导 14 d 时检测内 ALP 活性

Fig 3 ALP activity of hBMSCs on day 14 of chondrogenic inducing

* $P<0.05$

mRNA 的表达（附表），促进作用随着 Glu 浓度梯度的递增而增加（$P<0.05$）。FGF-21 下调正常生理状态糖浓度及高糖下 *ALP* 和 *Runx*2 的 mRNA 水平（P 均<0.05），对正常生理状态糖浓度 *OCN* mRNA 也有下调作用（$P<0.05$）；加入 P38、ERK 信号转导抑制剂均进一步抑制 *ALP*、*OCN* 和 *Runx*2 的 mRNA 水平，加入 JNK 信号转导抑制剂组抑制 *ALP*、*Runx*2 的 mRNA 水平，对 *OCN* 的 mRNA 无抑制；其中 P38 信号转导抑制剂组对 *ALP*、*OCN* 和 *Runx*2 的 mRNA 抑制均有统计学意义（P 均<0.05）。

附表　各组细胞骨诱导 21 d 时 RT-CR 检测 *ALP*、*OCN*、*Runx*2 的 mRNA 表达

Table　Expressions of *ALP*, *OCN*, and *Runx*2 mRNA on day 21 of osteogenic differentiation

Group	*ALP*	*OCN*	*Runx*2
Control	1.000±0.041	1.000±0.132	1.000±0.143
Glu A	1.677±0.168*	1.168±0.103	1.567±0.170*
Glu B	2.266±0.217*,☆	1.348±0.074*,☆	2.256±0.152*,☆
Glu C	2.510±0.390*,☆	1.499±0.129*,☆	2.370±0.097*
Glu 5.5+FGF-21	0.637±0.043*	0.540±0.040*	0.675±0.052*
Glu B+FGF-21	0.639±0.036#	1.158±0.052	0.695±0.042#
Glu B+FGF-21+PD98059	0.525±0.036#	1.024±0.110	0.343±0.020#
Glu B+FGF-21+SP600125	0.383±0.032#	1.267±0.210	0.358±0.014#
Glu B+FGF-21+SB203580	0.345±0.017#,△	0.762±0.066△	0.422±0.039#,△

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. Glu B group; △$P<0.05$, vs. Glu B+FGF-21 group; ☆ $P<0.05$, vs. former group

2.4　高糖及 FGF-21 对 MAPK 通路中 ERK、P38、JNK 蛋白表达及磷酸化水平的影响

Western blot 检测（图 4）显示：Glu A、Glu B、Glu C 高糖组 ERK、JNK 及其磷酸化水平均增加，并随 Glu 浓度增加而增高；P38 磷酸化水平随葡萄糖浓度增加而变化不明显。Glu B+FGF-21 干预组对 ERK、JNK、P38 的磷酸化均起抑制作用，其磷酸化条带 p-ERK、p-JNK 和 p-P38 均减弱。

与 Glu B+FGF-21 干预相比，加入 ERK 信号转导抑制剂组 p-JNK 水平均进一步降低，加入 P38 信号转到抑制剂组 p-P38 水平无明显变化。

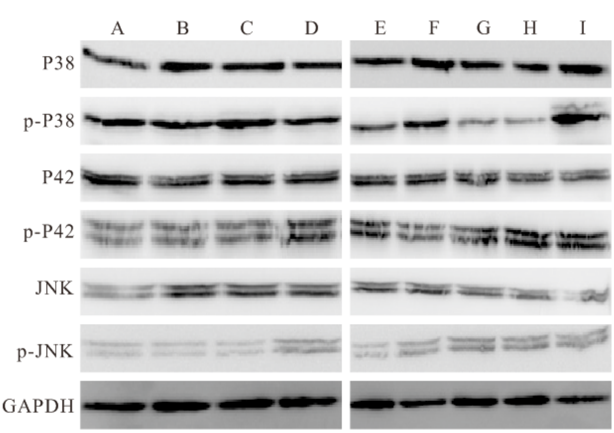

图 4　hBMSCs 骨诱导 21 d Western blot 检测 ERK（P42）、JNK、P38 蛋白表达及其磷酸化水平

Fig 4　Expressions and phosphorylation of ERK(P42), P38, and JNK on day 21 of osteogenic differentiantion

A, B, C, D, E, F, G, H, I: Control, Glu A, Glu B, Glu C, FGF-21+Glu 5.5, Glu B+FGF-21, Glu B+FGF-21+PD98059, Glu B+FGF-21+SB203580 and Glu B+FGF-21+SP600125, respectively

3　讨论

3.1　高糖对 hBMSCs 成骨分化的影响

本研究结果显示，高糖环境下（Glu 16.5、25、40 mmol/L），骨诱导 14 d 时，ALP 活性均增加，提示高糖对 hBMSCs 成骨分化过程中 ALP 活性有促进作用；持续骨诱导 21 d，RT- PCR 显示高糖对骨向分化基因 *ALP*、*OCN*、*Runx*2 的 mRNA 水平有促进作用。说明细胞外高糖可能作为一种内源性因素促进 hBMSCs 向成骨分化的生物矿化过程。这与 LI 等[11]的实验结果一致。但文献[12]研究发现高糖对 hBMSCs 诱导分化为成骨细胞具有抑制作用。在不同的研究中，高糖对矿化过程的相反作用可能是因为细胞来源的异质性，实验条件或实验用的葡萄糖浓度不同等原因造成。糖尿病是复杂的全身系统性疾病，体外模拟糖尿病高糖是否能完全代表机体的糖尿病发病状态还未知。

3.2　FGF-21 对 hBMSCs 成骨分化的影响

研究发现，FGF-21 可引起骨量丢失：FGF-21 转基因小鼠长骨生长受限，而 *FGF*-21 基因敲除小鼠可对抗该作用，表明 FGF-21 可抑制长骨的生长[13]。在体外 FGF-21 能促进 MSCs 成脂分化，抑制成骨分化，并可抑制小鼠 MSCs 成骨分化[6,13]。本研究结果显示，高糖浓度环境中 FGF-21 的干预明显抑制了 hBMSCs 的 ALP 活性，*OCN*、*Runx*2 的 mRNA 水平均降低，说明 FGF-21 抑制 hBMSCs 成骨分化或矿化，提示 FGF-21 可能作为 DM 合并 OP 高风险人群的“生物标志物”，为进一步探索 FGF-21 对 hBMSCs 骨向分化影响的机制，避免 OP 的发

生并降低 DM 患者的骨折风险提供科学依据。

3.3 MAPKs 通路抑制剂对 hBMSCs 成骨分化的影响

体外诱导 hBMSCs 向 OB 分化的具体机制中 MAPKs 通路的研究较为深入,MAPKs 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化能力,所有真核细胞从基因表达、有丝分裂和新陈代谢,到细胞自主活动、增殖、凋亡,甚至是分化,均有 MAPKs 通路的参与。在哺乳动物细胞中已鉴定了 4 条 MAPK 信号通路:ERK1/2、P38、JNK 和 ERK5,其中 ERK、P38 和 JNK 参与了 MSCs 成骨分化的调节[14-15]。ERK 通路在参与 MSCs 成骨分化的过程中有促进 MSCs 增殖与促进成骨分化的作用,且 ERK 通路的活化与 OB 的分化程度呈正相关。活化 P38 通路促进 MSCs 成骨分化,抑制 MSCs 成脂分化。JNK 参与了 MSCs 的分化与凋亡过程,抑制 JNK 信号通路延缓或阻滞细胞凋亡[16-19]。本实验中高糖环境下加入 ERK、JNK、P38 信号传导抑制剂,hBMSCs 骨向分化标志物 mRNA 水平减低;相应的 ERK、JNK 及其磷酸化表达水平进一步降低,说明 FGF-21 抑制 hBMSCs 成骨分化可能与 MAPK 通路中的 ERK、JNK 通路受抑制有关。这与 MAPK 激活转录因子后转入核内,ERK、JNK 通路激活在参与 MSCs 成骨分化的过程中有促进 MSCs 增殖与促进成骨分化的作用相关[18-23]。

综上所述,本研究通过全骨髓培养法,成功分离培养得到 hBMSCs,其具有成骨、成脂分化功能。高糖能促进 hBMSCs 的成骨分化,FGF-21 具有抑制 hBMSCs 骨向分化作用,高糖环境下此抑制作用增强,FGF-21 抑制 hBMSCs 的成骨分化或矿化可能和 MAPK 通路有关,需要进一步研究探察。

参 考 文 献

[1] 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版). 中国糖尿病杂志, 2014,22(8):2-42.

[2] STROTMEYER ES, CAULEY JA. Diabetes mellitus, bone mineral density, and fracture risk. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes,2007,14(6):429-435.

[3] KABACK LA, SOUNG DO Y, NAIK A, *et al*. Osterix/Sp7 regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. J Cell Physiol,2008,214(1):173-182.

[4] KAMIMURA N, NISHIMAKI K, OHSAWA I, *et al*. Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. Obesity,2011,19(7):1396-1403.

[5] FLIER JS. Hormone resistance in diabetes and obesity: insulin, leptin, and FGF21. Yale J Biol Med,2012,85(3): 405-414.

[6] WEI W, DUTCHAK PA, WANG X, *et al*. Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ. Proc Natl Acad Sci,2012,109(8):3143-3148.

[7] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science,1999,284(5411):143-147.

[8] KARNER E, UNGER C, CERNY R, *et al*. Differentiation of human embryonic stem cells into osteogenic or hematopoietic lineages: a dose-dependent effect of osterix over-expression. J Cell Physiol,2009,218(2):323-333.

[9] JI Z, CHENG Y, YUAN P, *et al*. Panax notoginseng stimulates alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2015,51(9):1-8.

[10] WU J, XU S, QIU Z, *et al*. Comparison of human mesenchymal stem cells proliferation and differentiation on poly (methyl methacrylate) bone cements with and without mineralized collagen incorporation. J Biomater Appl,2016,30 (6):722-731.

[11] LI YM, SCHILLING T, BENISCH P, *et al*. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363 (1):209-215.

[12] KHARITONENKOV A, WROBLEWSKI VJ, KOESTER A, *et al*. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. Endocrinology,2007,148(2): 774-781.

[13] DICEMBRINI I, MANNUCCI E, ROTELLA CM. Bone: incretin hormones perceiver or receiver? Exp Diabetes Res, 2012(2012):519784[2015-12-02]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761607. doi: 10.1155/2012/519784.

[14] KIM HK, KIM MG, LEEM KH. Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis. Molecules,2013,18(12):15474-15489.

[15] PLOTNIKOV A, ZEHORAI E, PROCACCIA S, *et al*. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. Biochim Biophys Acta, 2011,1813(9):1619-1633.

[16] LIANG X, SO YH, CUI J, *et al*. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells. J Radiat Res,2011,52(3):380-386.

[17] FU L, TANG T, MIAO Y, *et al*. Stimulation of osteogenic differentiation and inhibition of adipogenic differentiation in bone marrow stromal cells by alendronate via ERK and JNK activation. Bone,2008,43(1):40-47.

[18] YI C, LIU D, FONG CC, *et al*. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. Acs Nano,2010,4(11):6439-6448.

[19] GAUNDAR SS, BRADSTOCK KF, BENDALL LJ. p38MAPK inhibitors attenuate cytokine production by bone marrow stromal cells and reduce stroma-mediated proliferation of acute lymphoblastic leukemia cells. Cell Cycle,2009,8(18):2977-2985.

[20] ARAFAT A, KACZMAREK P, SKRZYPSKI M, *et al*. Glucagon increases circulating fibroblast growth factor 21 independently of endogenous insulin levels: a novel mechanism of glucagon-stimulated lipolysis? Diabetologia, 2013,56(3):588-597.

[21] JIN P, ZHANG X, WU Y, *et al*. Streptozotocin-induced diabetic rat-derived bone marrow mesenchymal stem cells have impaired abilities in proliferation, paracrine, antiapoptosis, and myogenic differentiation. Transplant Proc,2010,42(7):2745-2752.

[22] GORMAN E, CHUDYK AM, MADDEN KM, *et al*. Bone health and type 2 diabetes mellitus: a systematic review. Physiotherapy Canada,2011,63(1):8-20.

[23] XIA J, ZHONG Y, HUANG G, *et al*. The relationship between insulin resistance and osteoporosis in elderly male type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. Ann Endocrinol (Paris),2012,73(6):546-551.

(2015-10-11 收稿,2016-03-05 修回)

编辑 沈 进