

高糖高脂对人脐带间充质干细胞增殖及凋亡的影响*

徐薇¹, 于文龙¹, 高宏², 王丽², 刘相萍³, 王颜刚^{1,2}

Effects of high glucose and high lipid on proliferation and apoptosis of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Xu Wei¹, Yu Wen-long¹, Gao Hong², Wang Li², Liu Xiang-ping³, Wang Yan-gang^{1,2}

文章亮点:

糖尿病患者体内处于高糖高脂状态, 将抑制脐带间充质干细胞的生长。在间充质干细胞移植之前, 控制患者血糖血脂水平, 将更有利于干细胞在体内发挥作用。

Abstract

BACKGROUND: Several studies have confirmed that the curative effects of mesenchymal stem cell transplantation into diabetes patients *in vivo* are influenced by many factors, in which blood glucose and lipids play a key role.

OBJECTIVE: To simulate *in vivo* environment of high glucose and high lipid and further validate the effects of high glucose and high lipid on umbilical cord mesenchymal stem cells cultured *in vitro*.

METHODS: Human umbilical cord mesenchymal stem cells were cultured using cell culture medium containing different concentrations of glucose and palmitic acid. Then the cells were divided into seven groups: control, low glucose, low lipid, low glucose+low lipid, high glucose, high lipid, and high glucose+high lipid. After intervention for 48 hours, cell proliferation was measured by CCK-8 method and cell apoptosis was detected by Annexin-V/PI method.

RESULTS AND CONCLUSION: Under the condition of high glucose and high lipid, cell proliferation was significantly decreased ($P < 0.01$), while cell apoptosis was significantly increased ($P < 0.01$) after short-term culture compared with the control group. With increasing blood glucose and blood lipid concentration, cell proliferation was significantly inhibited, and cell apoptosis was significantly increased. In the low glucose + low lipid group and high lipid group, cell proliferation was inhibited (both $P < 0.05$) and cell apoptosis was increased (both $P < 0.01$). High glucose promoted the growth of human umbilical cord mesenchymal stem cells ($P < 0.01$). Results showed that diabetes patients exhibited a high glucose and high lipid *in vivo* environment, which inhibit the growth of human umbilical cord mesenchymal stem cells. Prior to transplantation of mesenchymal stem cells, control of patient's blood glucose and lipid level would benefit for the functioning of transplanted stem cells.

Xu W, Yu WL, Gao H, Wang L, Liu XP, Wang YG. Effects of high glucose and high lipid on proliferation and apoptosis of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(27): 5001-5005. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究证实, 间充质干细胞移植进入糖尿病患者体内后, 疗效受多种因素影响, 其中血糖、血脂起着关键作用。

目的: 模拟糖尿病患者体内高糖高脂环境, 进一步验证高糖高脂对体外培养脐带间充质干细胞的影响。

方法: 葡萄糖和软脂酸不同浓度分别体外干预人脐带间充质干细胞, 分为对照组、低糖组、低脂组、低糖低脂组、高糖组、高脂组及高糖高脂组。干预 48 h 后通过 CCK-8 方法酶标仪测定细胞增殖, Annexin-V/PI 方法流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

结果与结论: 在高糖高脂的条件下, 短期培养后细胞增殖及凋亡明显改变, 与对照组相比, 人脐带间充质干细胞增殖率明显减低($P < 0.01$)、凋亡率明显增高($P < 0.01$), 且随着血糖血脂浓度的增加, 人脐带间充质干细胞增殖率明显受到抑制, 凋亡率明显上升; 低糖低脂组和高脂组均抑制细胞增殖(均 $P < 0.05$), 促进细胞凋亡(均 $P < 0.01$), 高糖则促进人脐带间充质干细胞生长($P < 0.01$)。结果提示, 糖尿病患者体内处于高糖高脂状态, 将抑制脐带间充质干细胞的生长。在间充质干细胞移植之前, 控制患者血糖血脂水平, 将更有利于干细胞在体内发挥作用。

关键词: 高糖; 高脂; 间充质干细胞; 增殖; 凋亡; 干细胞

徐薇, 于文龙, 高宏, 王丽, 刘相萍, 王颜刚. 高糖高脂对人脐带间充质干细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(27):5001-5005. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Endocrinology, ²Stem Cell Center, ³Central Laboratory, Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Xu Wei★, Studying for master's degree, Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
xuweiqd1985@126.com

Corresponding author: Wang Yan-gang, M.D., Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Endocrinology, Stem Cell Center, Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
wangyg1966@yahoo.com.cn

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.27.012

Received: 2012-02-27
Accepted: 2012-05-05

青岛大学医学院附属医院, ¹ 内分泌科, ² 干细胞中心, ³ 中心实验室, 山东省青岛市 266003

徐薇★, 女, 1985年生, 山东省青岛市人, 汉族, 青岛大学医学院附属医院内分泌科在读硕士, 主要从事干细胞治疗 1 型糖尿病的研究。xuweiqd1985@126.com

通讯作者: 王颜刚, 博士, 主任医师, 博士生导师, 青岛大学医学院附属医院内分泌科, 山东省青岛市 266003 wangyg1966@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)27-05001-05

收稿日期: 2012-02-27
修回日期: 2012-05-05 (20120227023/W · S)

0 引言

间充质干细胞来源于发育早期的中胚层和外胚层。因其具有自我复制、多向分化潜能和免疫调控等特点而日益受到人们的关注。如间充质干细胞在体内或体外特定的诱导条件下, 可分化为脂肪、肌肉、神经、肝、胰岛细胞等多种组织细胞^[1-5], 因而在组织损伤修复方面具有广阔的前景。人脐带间充质干细胞具有取材方便、易于获得、不存在伦理问题、体外基因稳定、易于扩增、免疫原性低、异体移植不需要配型等诸多优点, 应用前景更为广泛^[6]。糖尿病患者特别是 2 型糖尿病患者, 体内往往同时处于高糖高脂状态。本实验旨在研究高糖高脂对人脐带间充质干细胞的影响, 从而进一步指导临床治疗糖尿病。

1 材料和方法

设计: 以细胞为对象的实验研究。

时间及地点: 于 2011-09/12 在青岛大学医学院附属医院中美干细胞中心及中心实验室完成。

材料: 根据培养液中加入葡萄糖和软脂酸浓度不同, 随机将细胞分为 7 组分别培养: ① 对照组: 5.6 mmol/L 葡萄糖-DMEM。② 低糖组: 11.1 mmol/L 葡萄糖-DMEM。③ 低脂组: 150 μmol/L 软脂酸。④ 低糖加低脂混合组(低混组): 11.1 mmol/L 葡萄糖-DMEM+150 μmol/L 软脂酸。⑤ 高糖组: 25 mmol/L 葡萄糖-DMEM。⑥ 高脂组: 250 μmol/L 软脂酸。⑦ 高糖加中脂混合组(高混组): 25 mmol/L 葡萄糖-DMEM+250 μmol/L 软脂酸。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
软脂酸、葡萄糖	美国 Sigma 公司
CCK-8 细胞增殖试剂盒	日本同仁
Annexin V/PI 凋亡试剂盒	美国 BD 公司
酶标仪	美国 Thermo
流式细胞仪	美国 BECKMAN
CO ₂ 培养箱	Forma 公司
倒置荧光显微镜	Olympus

实验方法:

人脐带间充质干细胞的制备、表型鉴定及培养: 人脐带间充质干细胞由青岛大学医学院附属医院中美干细胞中心提供。细胞经需氧菌、厌氧菌及支原体等微生物检测及流式细胞仪检测, 流式细胞仪检测间充质干细胞表型, 即 CD34、CD45、HLA-DR、CD90 和 CD105。按 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于 25 cm² 培养瓶中, 置于 37 °C、体积分数 0.05% 的 CO₂ 培养箱中, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的低糖 DMEM/进行培养。两三天细胞密度可达 80%~90%, 用 0.5 g/L 胰酶消化, 按 1:2 的比例传代, 继续扩增培养。

CCK-8 检测细胞增殖: 选用第 4 代培养的人脐带间充质干细胞, 以每孔 100 μL 培养基(细胞浓度为 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) 接种于 96 孔板, 每组设复孔 6 个。培养 24 h 后, 换液, 加入各组相应的培养基。继续培养 48 h 后, 显微镜下观察、拍照。吸出培养基, 每孔加入 100 μL CCK-8, 培养 72 h 后, 490 nm 酶标仪测定吸光度(A)。

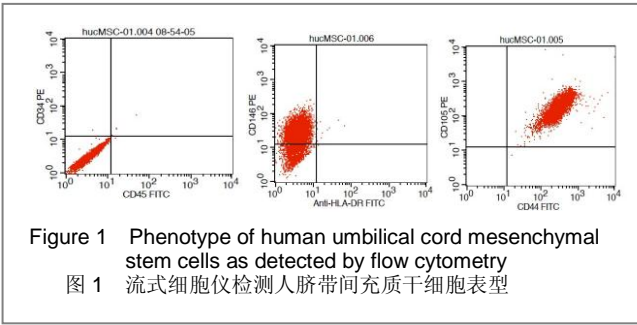
Annexin-V/PI 法检测细胞凋亡率: 细胞培养、分组、干预同上, 选第 4 代培养的人脐带间充质干细胞, 以每孔 1.5 mL 培养基(细胞浓度为 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) 接种于 6 孔板。培养 24 h 后, 换液, 加入各组相应的培养基。继续培养 48 h 后, 0.5 g/L 胰酶消化离心(1 000 r/min, 3 min), 收集细胞, PBS 重悬。按照美国 BD 公司 Annexin-V/PI 凋亡试剂盒说明书进行具体实验操作, 并进行数据的收集、整理。

主要观察指标: ① 人脐带间充质干细胞表型特征。② 高糖高脂干预 48 h 后人脐带间充质干细胞的形态。③ 人脐带间充质干细胞增殖及凋亡。

统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。组间比较采用 *t* 检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 人脐带间充质干细胞表型特征 人脐带间充质干细胞均经过微生物检测及流式细胞仪检测, 微生物检测结果均为阴性, 细胞表型符合间充质干细胞的表型特征, 即 CD34(-), CD45(-), HLA-DR(-), CD90(+), CD105(+).



2.2 高糖高脂干预48 h后人脐带间充质干细胞的形态 在高糖高脂的条件下, 人脐带间充质干细胞明显变形, 且凋亡增多。



2.3 高糖高脂对人脐带间充质干细胞增殖及凋亡影响

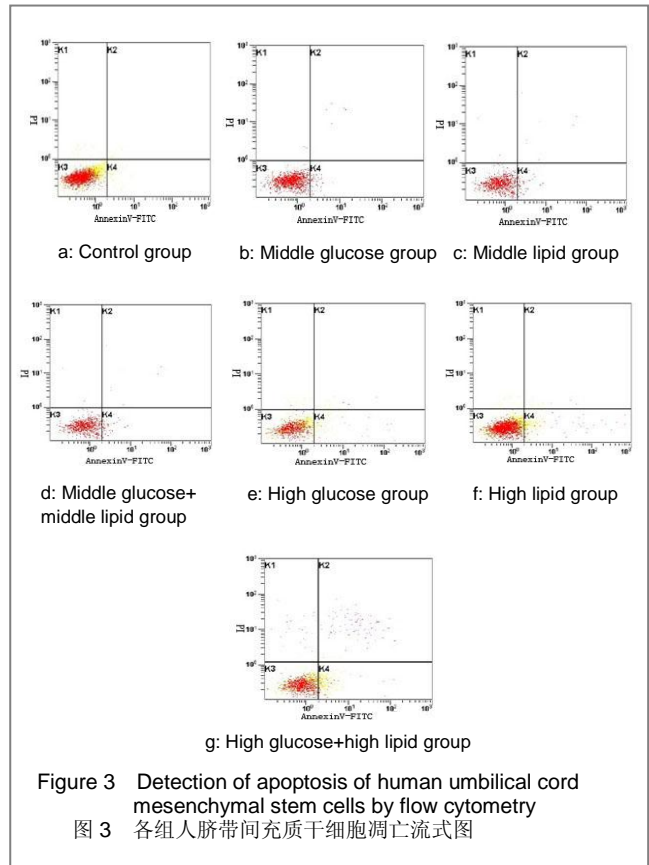
的结果 在高糖高脂的条件下, 短期培养后细胞增殖及凋亡明显改变, 与对照组相比, 人脐带间充质干细胞增殖率明显减低($P < 0.01$)、凋亡率明显增高($P < 0.01$), 且随着血糖血脂浓度的增加, 增殖吸光度由 1.17 ± 0.03 降为 1.13 ± 0.02 ($P < 0.05$), 凋亡率由 $(2.6 \pm 0.5)\%$ 增为 $(18.3 \pm 2.2)\%$ ($P < 0.01$)。与对照组相比, 低糖低脂组和高脂组均抑制细胞增殖(均 $P < 0.05$), 促进细胞凋亡(均 $P < 0.01$), 高糖则促进人脐带间充质干细胞生长($P < 0.01$), 低糖及低脂组与对照组相比虽有差异, 但差异无显著性意义(均 $P > 0.05$)。见表1。

表1 高糖高脂对脐带间充质干细胞增殖及凋亡影响的指标
Table 1 Effects of high glucose high lipid on proliferation and apoptosis of umbilical cord mesenchymal stem cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Absorbance	Apoptosis (%)
Control	1.25 ± 0.03	2.2 ± 0.6
Low glucose	1.28 ± 0.04	2.4 ± 0.5
Low lipid	1.22 ± 0.04	3.9 ± 0.7^a
Low glucose+low lipid	1.17 ± 0.03^a	6.7 ± 0.9^b
High glucose	1.35 ± 0.04^{bc}	2.6 ± 0.5
High lipid	1.18 ± 0.04^a	7.2 ± 0.8^{bd}
High glucose+high lipid	1.13 ± 0.02^{be}	18.3 ± 2.2^{bf}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. control group; ^c $P < 0.05$, low glucose group; ^d $P < 0.01$, vs. low lipid group; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$, vs. low glucose+low lipid group

人脐带间充质干细胞凋亡流式图见图3。



3 讨论

高糖高脂在细胞微环境中影响细胞生长、增殖及凋亡。在人脐带间充质干细胞体外培养时, 对高糖高脂条件下人脐带间充质干细胞的增殖和凋亡进行测定。结果表明, 高糖高脂可以使人脐带间充质干细胞增殖减少而凋亡增多。虽然在单独高糖环境中可以促进人脐带间充质干细胞的增殖, 但对细胞结构、形态、功能的影响以及长期的作用效果需要进一步的探讨研究。

对于部分1型糖尿病患者和大部分2型糖尿病患者, 在高血糖的同时, 常伴有高脂血症。大量研究表明, 长期慢性高血糖和高血脂状态对胰岛 β 细胞的分泌功能有显著的损害作用。即所称的“糖毒性”和“脂毒性”^[7]。另外高糖高脂血症对糖尿病动脉粥样硬化血管并发症的发生发展一定起重要的作用^[8]。Heng、Choi等^[9-10]学者的研究结果提示内皮细胞在高糖和高脂条件下培养容易引起细胞损伤。因而在治疗高血糖的同时应积极治疗脂代谢紊乱, 对防止胰岛干细胞凋亡、保护胰岛 β 细胞功能也有重要意义。糖尿病患者的高脂血症主要存在高饱和脂肪酸的升高以及多不饱和脂肪酸下降。软脂酸是血中最主要的饱和脂肪酸。基础和临床研究均证实2型糖尿病时软脂酸增高, 体外培养血管内皮细胞发现将其暴露于高浓度软脂酸后, 活性氧产生增多, 发现软脂酸能刺激甘油二酯的从头合成途径, 激活蛋白激酶^[11], 进而对细胞造成损伤。研究表明软脂酸诱导胰岛 β 细胞凋亡和坏死, 且这种诱导作用呈剂量依赖性^[12]。Prentki等^[13]证实在胰岛 β 细胞, 血糖和脂代谢途径交汇于甘油/自由脂肪酸循环, 葡萄糖和脂肪酸来源的底物, 3-磷酸甘油和脂肪酸酰基辅酶A启动这一过程, 这与 β 细胞生存/凋亡和生长/增殖有关的信号密切相关。Berne等^[14]体外研究显示, β 细胞能将过多的葡萄糖和游离脂肪酸转化为三酰甘油储存, 且高糖和高脂对 β 细胞内三酰甘油堆积有明显的协同作用^[15]。生理情况下, β 细胞内三酰甘油的合成可减弱游离脂肪酸的毒性作用, 但长期三酰甘油堆积, 该作用不足或消失, 不仅造成 β 细胞凋亡, 而且影响胰岛素分泌功能^[16]。

本实验模拟糖尿病状态时的体内环境, 将人脐带间充质干细胞在葡萄糖与软脂酸混合的条件下培养, 观察高糖高脂对人脐带间充质干细胞增殖和凋亡的影响。结果表明, 在高糖高脂的条件下, 短期培养后细胞增殖及凋亡明显改变, 人脐带间充质干细胞增殖率减低($P < 0.01$)、凋亡率增高($P < 0.01$), 且随着血糖血脂浓度的增加, 增殖

及凋亡改变更明显(分别 $P < 0.01$, $P < 0.05$)。提示高糖高脂可以使人脐带间充质干细胞发生损伤和凋亡。国外学者研究结果也证实, 高糖高脂环境下间充质干细胞凋亡增加, 流式细胞仪检测间充质干细胞凋亡率较正常组显著增高^[17], Gopalakrishnan等^[18]研究表明, 高糖能抑制间充质干细胞的增殖和功能, 胰岛素和雌激素能减弱这种抑制作用^[19], 提示糖尿病内环境可能影响移植干细胞的存活率。文献表明, 高糖高脂主要通过合成N-脂酰鞘氨醇^[20], 激活线粒体释放细胞色素C^[21], 凋亡蛋白Bad、Bid、Bax过表达等机制诱导细胞凋亡^[22-23]。

全面深入地研究高糖、高脂状态下人脐带间充质干细胞的变化, 将有助于为糖尿病患者干细胞移植在体内保持最大量活性的人脐带间充质干细胞, 为更好的治疗糖尿病提供指导。对于糖尿病患者, 糖毒性和脂毒性二者相互作用, 共同引起了心脏、视网膜、肾脏等很多脏器的损伤。本实验结果提示, 对于糖尿病患者, 在间充质干细胞移植之前, 控制患者糖脂水平, 将更有利于干细胞在体内发挥作用, 同时也会减缓很多糖脂毒性对各种器官造成的损伤。另外, 高糖高脂对人脐带间充质干细胞的长期作用及形态、结构、功能的改变, 以及患者的高糖高脂状态对于自身体内的一些干细胞, 如胰岛干细胞、骨髓间充质干细胞等的影响, 尚需要进一步的研究。

4 参考文献

- [1] Wu H, Deng Y, Yan Y, et al. Adipose differentiation and adipose tissue engineering of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using pluronic F-127 hydrogel in vitro. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2011;28(6):1148-11453.
- [2] Ghaedi M, Soleimani M, Shabani I, et al. Hepatic differentiation from human mesenchymal stem cells on a novel nanofiber scaffold. *Cell Mol Biol Lett*. 2012;17(1):89-106.
- [3] Ma K, Fox L, Shi G, et al. Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurol Res*. 2011;33(10):1083-93.
- [4] Thanabalasundaram G, Arumalla N, Tailor HD, Khan WS. Regulation of differentiation of mesenchymal stem cells into musculoskeletal cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7(2):95-102.
- [5] Wang J, Gao Y, Lu Y, et al. Differentiation of PDX1 gene-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells into insulin-producing cells in vitro. *J Mol Med*. 2011;28(6):1019-1024.
- [6] Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev*. 2011;7(1):195-207.
- [7] Kim JW, Yoon KH. Glucolipotoxicity in Pancreatic β -Cells. *Diabetes Metab J*. 2011 Oct;35(5):444-450.

- [8] S`antl Letonja M, Letonja M, Ikolajevic-Staräevic JN, et al. Association of manganese superoxide dismutase and glutathione S-transferases genotypes with carotid atherosclerosis in patients with diabetes mellitus type 2. *Int Angiol.* 2012;31(1):33-41.
- [9] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Toxicity features of high glucose on endothelial cell cycle and protection by Dan Gua-Fang in ECV-304 in high glucose medium. *Chin J Integr Med.* 2012 Feb 9.
- [10] Choi DH, Lee YJ, Oh HC, et al. Improved Endothelial Dysfunction by *Cynanchum wilfordii* in Apolipoprotein E(-/-) Mice Fed a High Fat/Cholesterol Diet. *J Med Food.* 2012; 15(2):169-179.
- [11] Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000; 49(11):1939-1945.
- [12] Jiang YZ, Xue YM, Deng Y, et al. *Di Yi Jun Yi Daxue Xue Bao.* 2003;23(5):449-451.
姜一真, 薛耀明, 邓燕, 等. 软脂酸对体外原代培养大鼠胰岛细胞凋亡作用的实验研究[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(5):449-451.
- [13] Prentki M, Madiraju SR. Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet β -cell function in health, obesity and diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Nov 15.
- [14] Berne C. The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids. *Biochem J.* 1975;152(3):667-673.
- [15] Briaud I, Harmon JS, Kelpel CL, et al. Lipotoxicity of the pancreatic β -cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes.* 2001; 50(2):315-321.
- [16] Kelpel CL, Johnson LM, Poitout V. Increasing triglyceride synthesis inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat islets of langerhans: a study using adenoviral expression of dia-cylglycerol acyltransferase. *Endocrinology.* 2002, 143(9):3326-3332.
- [17] Cramer C, Freisinger E, Jones RK, et al. Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010;19(12): 1875-1884.
- [18] Gopalakrishnan V, Vignesh RC, Arunakaran J, et al. Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages. *Biochem Cell Biol.* 2006;84(1):93-101.
- [19] Price S A, Gardiner N, Duran-Jimenez B, et al. Thioredoxin interacting protein is increased in sensory neurons in experimental diabetes. *Brain Res.* 2006;1116(1):206-214.
- [20] Maedler K, Spinass GA, Dyntar D, et al. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes.* 2001;50(1):69-76.
- [21] Massimo F, Marta H, Lucia P, et al. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of langerhans. *Diabetes.* 2001;50(6):1290-1301.
- [22] Niquet J, Wastedain CG. Bim, Bad, and Bax: a deadly combination in epileptic seizures. *J Clin Invest.* 2004;113(7): 960-962.
- [23] Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, et al. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2002;22(9):3003-3013.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 第六作者负责实验设计, 第一、二、四作者负责实验实施, 第三、五作者负责评估。采用盲法评估, 作者均经过相关专业培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 未涉及与相关伦理道德冲突的内容。

文章概要:

文章要点: 进一步验证高糖高脂对体外培养脐带间充质干细胞的影响。

关键信息: 糖尿病患者体内处于高糖高脂状态, 将抑制脐带间充质干细胞的生长。

研究的创新之处: 模拟 2 型糖尿病患者体内高糖高脂环境, 体外证实高糖高脂对脐带间充质干细胞的抑制作用。