

论著·基础研究

锌对人骨髓间充质干细胞体外增殖和成脂分化的影响[▲]

朱晓宇 石 军

(上海交通大学附属第六人民医院血液科,上海市 200233,电子邮箱:homo1mono@163.com)

【摘要】 目的 探讨锌对人骨髓间充质干细胞(hBM-MSC)体外增殖和成脂分化的影响。方法 用密度梯度离心和贴壁培养的方法分离纯化hBM-MSC,对照组加入不含锌的低糖杜氏改良格耳(DMEM)完全培养基,其余5个锌处理组加入锌浓度分别为0.001 mmol/L、0.004 mmol/L、0.016 mmol/L、0.064 mmol/L、0.256 mmol/L的含锌低糖DMEM完全培养基,用细胞计数试验(CCK-8)法检测细胞活性以确定适宜hBM-MSC培养的锌浓度。用含有适宜浓度硫酸锌的成脂诱导培养基体外诱导hBM-MSC成脂分化,21 d后行油红O染色观察细胞内的脂滴,检测吸光度值评价成脂分化效率,并采用实时荧光定量PCR检测各组细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)、脂肪酸结合蛋白4(FABP4)、CCAAT增强子结合蛋白 α (C/EBP α) mRNA表达水平。结果 0.256 mmol/L锌处理组的细胞活性低于对照组($P < 0.05$),0.004 mmol/L锌处理组和0.016 mmol/L锌处理组的细胞活性均高于对照组($P < 0.05$),适宜hBM-MSC培养的锌浓度为0.001~0.064 mmol/L。0.001、0.004、0.016和0.064 mmol/L锌处理组油红O染色阳性的细胞数依次增多,各锌处理组细胞中的脂滴明显大于且多于对照组,成脂分化率以及PPAR- γ 、C/EBP α 、FABP4 mRNA表达水平均高于对照组(均 $P < 0.05$)。结论 一定浓度的锌能促进hBM-MSCs的增殖和成脂分化,这可能与锌作用于成脂基因有关。

【关键词】 人骨髓间充质干细胞;锌;增殖;成脂分化;成脂基因

【中图分类号】 R 329.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2018)08-0928-06

DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2018.08.18

Effect of zinc on proliferation and adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

ZHU Xiao-yu, SHI Jun

(Department of Hematology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of zinc on the proliferation and adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSC) *in vitro*. **Methods** hBM-MSCs were isolated by density gradient centrifugation and purified by adherent culture. The control group was given low-sugar Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) without zinc, while the five zinc groups were given low-sugar DMEM containing zinc of different concentrations (0, 0.001 mmol/L, 0.004 mmol/L, 0.016 mmol/L, 0.064 mmol/L and 0.256 mmol/L), then cell counting kit (CCK)-8 assay was used to evaluate cell viability to determine the appropriate concentrations for hBM-MSC culture. Adipogenic differentiation of hBM-MSCs *in vitro* was induced using adipogenic differentiation medium with zinc sulfate of appropriate concentrations. After 21 days, oil red O staining was conducted to observe intracellular lipid droplet, and the absorbance value was detected for evaluating the adipogenic differentiation rate. Quantitative real-time PCR was used to detect the expression levels of peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR- γ), fatty acid binding protein-4 (FABP4) and CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) mRNAs in each group. **Results** The cell viability in the 0.256 mmol/L zinc group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), and the cell viabilities in the 0.004 mmol/L and 0.016 mmol/L zinc groups were higher than that in the control group ($P < 0.05$), thus the appropriate concentrations for hBM-MSC culture were 0.001 - 0.064 mmol/L ($P < 0.05$). In the 0.001 mmol/L, 0.004 mmol/L, 0.016 mmol/L and 0.064 mmol/L zinc groups, the numbers of cells with positive oil red O staining increased in turn, the size and number of intracellular lipid droplet were significantly larger or more than those in the control group, and the adipogenic differentiation rate and the expression levels of PPAR- γ , C/EBP α and FABP4 mRNAs were higher compared to the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Zinc of a certain concentration can promote the proliferation and adipogenic differentiation of hBM-MSC, which is probably associated with the effect of zinc on the adipogenic genes.

【Key words】 Human bone marrow mesenchymal stem cell, Zinc, Proliferation, Adipogenic differentiation, Adipogenic gene

[▲]基金项目:国家自然科学基金(81570135)

作者简介:朱晓宇(1990~),男,硕士,住院医师,研究方向:造血干细胞移植与骨髓微环境。

通信作者:石军(1967~),女,博士,主任医师,教授,研究方向:造血干细胞移植与骨髓微环境,电子邮箱:junshi@shtu.edu.cn。

成人骨髓含有内皮样细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、骨细胞、脂肪细胞、间充质干细胞等多种细胞,其中以脂肪细胞的含量最为丰富,可占据骨髓腔容积的50%以上,老年时其可占据90%以上的骨髓腔容积^[1]。作为骨髓微环境的重要组分,骨髓脂肪细胞不仅占据非造血的骨髓腔空间,还具有多方面的生理功能^[2],并在多种疾病的病理过程中扮演重要角色^[3-4],可能与白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征等血液系统疾病的发病、预后有密切关系^[5-6]。

目前,对人体内骨髓脂肪细胞的研究存在许多困难,如从人体获取的骨髓液中脂肪细胞含量少、成熟脂肪细胞体外存活时间短等,因而主要采用将骨髓间充质干细胞诱导分化为脂肪细胞的方法进行体外研究。但在常用的二维培养系统中,骨髓间充质干细胞的成脂分化率较低,导致成脂体系中混杂着较多未分化的骨髓间充质干细胞,这对进一步的实验研究造成较大的干扰。因此,通过优化培养条件促进骨髓间充质干细胞体外增殖和提高成脂分化的效率具有重要意义。

锌是人体的一种必需微量元素,有研究表明锌具有胰岛素样作用,可作用于与葡萄糖摄取相关的胰岛素受体和胞内磷脂酰肌醇激酶,促进葡萄糖的转运和利用及TG的合成和聚积^[7]。这提示锌可能有利于间充质干细胞成脂分化过程中细胞对葡萄糖的转运和利用及脂质的合成和聚积,从而促进其成脂分化。本研究采用密度梯度离心法分离人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cell, hBM-MSC)并进行体外扩增培养,分析锌对hBM-MSC增殖、成脂分化的影响,并检测相关成脂基因氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR- γ)、脂肪酸结合蛋白4(fatty acid binding protein 4, FABP4)、CCAAT增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding protein α , C/EBP α)的表达水平,探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 人外周血单个核细胞分离液购自挪威 Axis-Shield 公司(生产批号:1114740),七水硫酸锌购自国药集团化学试剂有限公司(生产批号:10024028),低糖杜氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)购自美国 HyClone 公司(生产批号:11885084),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰酶购自美国 Gibco 公司(生产批号:10100147、25300054),胰岛素、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、吡啶美辛购自美国

Sigma-Aldrich 公司(生产批号:I9278、D4902、I7018、I7378),细胞计数试验(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司(生产批号:CK04),油红O染色液、0.4%台盼蓝染液购自北京索莱宝科技有限公司(生产批号:G1260、C0040),TRIzol[®]试剂购自美国 Invitrogen 公司(生产批号:15596018),RNA反转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒购自大连 TaKaRa 公司(生产批号:RR037A、RR420A)。PCR引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。NanoDrop 2000超微量分光光度计、Sorvall Legend[™] XTR 120VAC型冷冻微量离心机、Multiskan[™] FC型酶标仪、Forma CO₂培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司,7500实时荧光定量PCR系统、Veriti[™] 96孔PCR热循环仪购自美国 Applied Biosystems 公司,Cellometer Mini自动细胞计数仪购自美国 Nexcelom 公司,精密天平购自德国 Sartorius 公司(型号:BSA124S),荧光倒置及正置显微镜(型号:CKX41)、显微镜 CCD 成像系统(型号:DP22)购自日本 Olympus 公司。

1.2 细胞分离和培养 本研究所用的hBM-MSC分离自具有正常骨髓象的患者骨髓液标本,共10例,年龄30~60岁,均符合医学伦理要求。取骨髓液2ml,肝素抗凝后用人外周血单个核细胞分离液分离单个核细胞。计数细胞,用含10%FBS的低糖DMEM培养液(含100 IU/ml青霉素、100 IU/ml链霉素)将浓度调至 1×10^4 个/ml后接种在培养瓶中,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱培养。72h后弃去悬浮细胞,继续培养,每隔2~3d换液1次,待细胞融合后用胰酶消化,进行常规传代培养1~2次后即可获得hBM-MSC。

1.3 hBM-MSC生长曲线测定 将hBM-MSC以 6.4×10^3 个/孔接种于96孔细胞培养板,分成9组,每组5孔,向每孔加入低糖DMEM完全培养基,在37℃、5%CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱内培养。每3d换液1次。每天取1组细胞,吸去低糖DMEM完全培养基,用 $1 \times$ PBS洗3次,向每孔加100 μ l含10%体积分数CCK-8的低糖DMEM,在37℃、5%CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱内孵育4h。在酶标仪上450nm波长处测定各孔吸光度值(A值),连续检测9d,根据每天的测定结果绘制细胞生长曲线。实验重复3次,分别采用3个骨髓标本来源的细胞。

1.4 hBM-MSC的活性检测 将hBM-MSC以 6.4×10^3 个/孔接种于96孔细胞培养板,分成6组,每组5孔,对照组加入不含锌的低糖DMEM完全培养基,其余5个锌处理组加入锌浓度分别为0.001 mmol/L、0.004 mmol/L、0.016 mmol/L、0.064 mmol/L、0.256 mmol/L的含锌低

糖 DMEM 完全培养基, 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱内培养。根据细胞生长曲线, 在细胞增殖速度最快的时间点检测细胞活性。吸去低糖 DMEM 完全培养基, 用 1 × PBS 洗 3 次, 向每孔加 100 μl 含 10% 体积分数 CCK-8 的低糖 DMEM 培养基, 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱内孵育 4 h。在酶标仪上 450 nm 波长处测定各孔 A 值, 计算细胞活性, 细胞活性 (%) = 锌处理组 A 值/对照组 A 值 × 100%。实验重复 3 次, 分别采用 3 个骨髓标本来源的细胞。

1.5 成脂诱导培养基的配制 (1) 成脂诱导培养基 A 液的配制: 室温解冻后, 将 500 μl IBMX 储存液、50 μl 地塞米松储存液、500 μl 胰岛素储存液、50 μl 吡啶美辛储存液和 5 ml FBS 加入 43.9 ml 低糖 DMEM 中, 轻晃以确保混合均匀, 用 0.22 μm 过滤器过滤后置于 4℃ 冰箱保存备用。(2) 成脂诱导培养基 B 液的配制: 室温解冻后, 将 500 μl 胰岛素储存液和 5 ml FBS 加入 44.5 ml 低糖 DMEM 中, 轻晃以确保混合均匀, 用 0.22 μm 过滤器过滤后置于 4℃ 冰箱保存备用。(3) 含锌的成脂诱导培养基: 用精密天平称取 0.037 g 七水硫酸锌分别溶解于 50 ml 上述成脂诱导培养基 A 液、B 液中, 配制成锌浓度为 2.56 mmol/L 的成脂诱导培养基, 再稀释(稀释液为不含锌的成脂诱导培养基 A、B 液)成锌浓度分别为 0.001 mmol/L、0.004 mmol/L、0.016 mmol/L、0.064 mmol/L 的成脂诱导培养基 A 液、B 液, 轻晃以确保混合均匀, 用 0.22 μm 过滤器过滤后置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.6 hBM-MSC 诱导成脂分化 将 hBM-MSC 以 2 × 10⁴ 个/cm² 的密度接种于 24 孔细胞培养板, 每孔加入低糖 DMEM 完全培养基 2 ml, 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱内培养, 每 3 d 换液 1 次。单层生长的细胞完全融合后再继续培养 3 ~ 4 d 达到接触抑制。将细胞分为 5 组, 其中 4 个实验组分别用含锌浓度为 0.001 mmol/L、0.004 mmol/L、0.016 mmol/L、0.064 mmol/L 的成脂诱导培养基 A 液培养, 3 d 后分别换成含锌浓度为 0.001 mmol/L、0.004 mmol/L、0.016 mmol/L、0.064 mmol/L 的成脂诱导培养基 B 液继续培养 1 d, 此过程为 1 个循环的诱导, 培养 3 个循环后继续用含锌的成脂诱导培养基 B 液维持培养至 21 d, 期间每 3 d 换液 1 次。对照组用不含锌的成脂诱导培养基 A 液及 B 液进行相同的成脂诱导。

1.7 油红 O 染色 hBM-MSC 诱导成脂 21 d 后用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS, pH7.4) 洗涤两次, 然后用 4% 中性福尔马林固定 30 min, 0.5% 油红 O 贮存液 (溶于异丙醇) 用水按 3 : 2 稀释, 0.45 μm 滤膜过

滤, 固定后的细胞用此稀释液室温孵育 30 min 后, 蒸馏水漂洗细胞 3 次, 在倒置显微镜下拍照。随后加入异丙醇, 10 min 后于酶标仪 492 nm 处读取的 A 值。成脂效率 (%) = 锌处理组 A 值/对照组 A 值 × 100%。

1.8 成脂基因 mRNA 表达水平检测 收集诱导成脂 21 d 的 hBM-MSC, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 测定总 RNA 浓度, A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8 ~ 2.0 之间。应用反转录试剂盒合成 cDNA, 按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书方法配制 20 μl PCR 反应体系, 采用实时荧光定量 PCR 法检测成脂相关基因 mRNA 相对表达量。实时荧光定量 PCR 引物见表 1。PCR 扩增条件为: 95℃ 10 min, 然后 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 共 40 个循环。实验重复 3 次, 每组 3 个复孔, 分别计算同一样品 3 个复孔的 Ct 值, 以 β-肌动蛋白 (β-actin) 作为内参照, 根据 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列

| 基因 | 引物序列(5'-3') | NCBI 序列号 |
|----------------|--------------------------------|-------------|
| PPAR γ | 上游: GATACACTGTCTGCAACATATCACAA | NM_015869.4 |
| | 下游: CCACGGAGCTGATCCCAA | |
| FABP4 | 上游: GCTTTGCCACCAGGAAAGTG | NM_001442.2 |
| | 下游: ATGGACGCATCCACCACCA | |
| C/EBP α | 上游: AAGAAGTCGGTGGACAAGAACAG | NM_004364.4 |
| | 下游: TCGGCACCGCATGT | |
| β -actin | 上游: GGGACCTGACTGACTACCTC | NM_001101.3 |
| | 下游: TCATACTCCTGCTTGCTGAT | |

2 结果

2.1 hBM-MSC 的生长形态学观察 hBM-MSC 在接种后数小时内开始贴壁, 24 h 后基本全部贴壁, 细胞呈长梭形或长多边形, 形成若干个集落, 见图 1 A; 随后细胞迅速扩增, 集落呈放射状向周围扩散, 相邻集落开始接触、融合; 接种后第 7 天细胞可融合至 80% ~ 90%, 排列成旋涡状生长, 见图 1B。

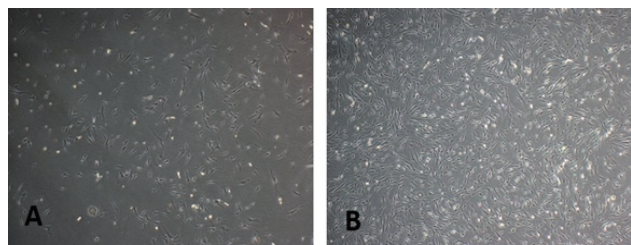


图 1 hBM-MSC 的生长形态学观察 (×40)

注: A 为细胞接种后第 6 天; B 为细胞接种后第 7 天

2.2 hBM-MSC 的生长曲线 hBM-MSC 接种后第1天处于贴壁过程,生长相对停滞;从第2天起细胞开始缓慢增长,处于生长潜伏期;从第5天起细胞增殖速度显著加快,细胞倍增时间明显缩短,至第6天细胞增殖速度达到高峰,处于指数增长期;从第7天起细胞增殖速度又开始减慢,逐渐达到平台期。见图2。

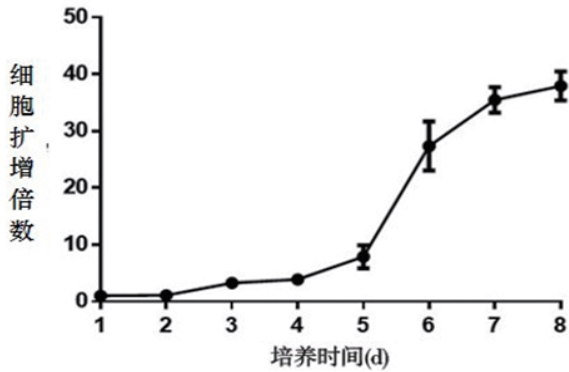


图2 hBM-MSC 的生长曲线

2.3 6组 hBM-MSC 活性比较 与对照组比较,0.004 mmol/L 锌处理组和 0.016 mmol/L 锌处理组的细胞活性升高 ($P < 0.05$),而 0.256 mmol/L 锌处理组的细胞活性降低 ($P < 0.05$);0.001 mmol/L 锌处理组和 0.064 mmol/L 锌处理组的细胞活性与对照组比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表2。

表2 6组 hBM-MSC 活性比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | hBM-MSC 活性 |
|-------------------|---|-----------------|
| 对照组 | 5 | 100.00 |
| 0.001 mmol/L 锌处理组 | 5 | 104.46 ± 12.51 |
| 0.004 mmol/L 锌处理组 | 5 | 130.88 ± 17.08* |
| 0.016 mmol/L 锌处理组 | 5 | 148.06 ± 22.94* |
| 0.064 mmol/L 锌处理组 | 5 | 121.35 ± 14.99 |
| 0.256 mmol/L 锌处理组 | 5 | 39.03 ± 8.94* |
| F 值 | | 19.661 |
| P 值 | | <0.001 |

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

表4 5组 hBM-MSC 成脂基因相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | PPAR- γ | C/EBP α | FABP4 |
|-------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 | 3 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 0.001 mmol/L 锌处理组 | 3 | 116.67 ± 6.87** | 112.61 ± 5.59** | 115.30 ± 5.51** |
| 0.004 mmol/L 锌处理组 | 3 | 118.35 ± 5.65** | 123.19 ± 6.84** | 156.68 ± 7.66** |
| 0.016 mmol/L 锌处理组 | 3 | 134.19 ± 10.23* | 138.70 ± 3.00* | 173.51 ± 5.93* |
| 0.064 mmol/L 锌处理组 | 3 | 145.43 ± 7.98* | 166.52 ± 6.91* | 180.47 ± 14.73* |
| F 值 | | 16.411 | 63.227 | 52.759 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 0.016 mmol/L 和 0.064 mmol/L 锌处理组比较, # $P < 0.05$ 。

2.4 5组 hBM-MSC 成脂效率比较 随着锌浓度的增加,锌处理组油红 O 染色阳性的细胞数也增多,细胞中的脂滴明显大于且多于对照组,见图3。定量分析结果显示,各浓度锌处理组细胞的成脂分化率均高于对照组(均 $P < 0.05$),0.064 mmol/L 锌处理组的成脂分化率最高 ($P < 0.05$),见表3。

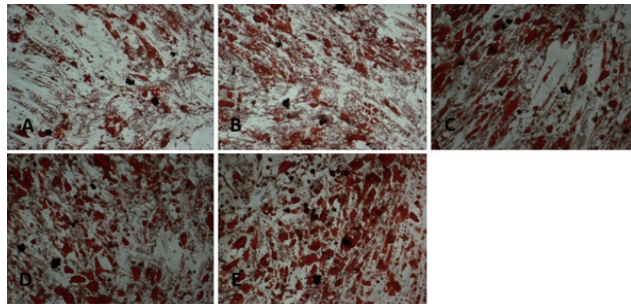


图3 各组 hBM-MSC 成脂化情况(油红 O 染色, ×200)

注: A、B、C、D、E 分别为对照组、0.001 mmol/L 锌处理组、0.004 mmol/L 锌处理组、0.016 mmol/L 锌处理组、0.064 mmol/L 锌处理组

表3 5组 hBM-MSC 成脂效率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | hBM-MSC 成脂率 |
|-------------------|---|-----------------|
| 对照组 | 3 | 100.00 |
| 0.001 mmol/L 锌处理组 | 3 | 150.60 ± 1.46** |
| 0.004 mmol/L 锌处理组 | 3 | 201.60 ± 3.46** |
| 0.016 mmol/L 锌处理组 | 3 | 209.85 ± 3.46** |
| 0.064 mmol/L 锌处理组 | 3 | 227.03 ± 8.79* |
| F 值 | | 185.380 |
| P 值 | | <0.001 |

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 0.064 mmol/L 锌处理组比较, # $P < 0.05$ 。

2.5 5组 hBM-MSC 成脂基因 mRNA 相对表达水平比较 0.001、0.004、0.016 和 0.064 mmol/L 锌处理组 hBM-MSC 成脂基因 PPAR- γ 、C/EBP α 和 FABP4 的 mRNA 表达水平均高于对照组(均 $P < 0.05$),0.016 mmol/L 和 0.064 mmol/L 锌处理组的表达水平高于其他浓度锌处理组 ($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

脂肪细胞是成人骨髓中含量最多的细胞组分,具有多方面的病理生理功能。骨髓脂肪细胞参与机体的脂肪代谢和能量储存,并能通过分泌瘦素、脂联素等脂肪细胞因子调节周围细胞的增殖、分化、凋亡等生理活动^[2]。此外,骨髓脂肪细胞也参与骨代谢:在高齢或骨质疏松、骨坏死等病理状态下,骨髓间充质干细胞向脂肪细胞的分化增强,导致脂肪细胞增多,骨量减少^[8];此外,脂肪细胞在造血过程中作为支持细胞促进造血细胞的成熟发育^[3]。但也有学者发现骨髓脂肪细胞对造血起负性调节作用,抑制骨髓脂肪细胞的生成有助于促进临床骨髓移植患者造血功能的恢复^[4]。我们在前期研究中发现骨髓脂肪细胞可能在急性髓系白血病的化疗抵抗中发挥重要作用,与急性髓系白血病的预后相关^[5-6]。

目前骨髓脂肪细胞的形态、表型和功能特征并未完全明确^[9]。此外,骨髓脂肪细胞与白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征等血液系统疾病的发病、预后等关系也需要更多的研究加以明确。目前骨髓脂肪细胞体外研究的障碍在于难以从体内获取足量的骨髓脂肪细胞。现主要用密度梯度离心法获取骨髓液中的漂浮脂肪细胞并用天花板培养法在体外纯化分离培养^[10],但所获取的细胞数量非常有限,而且无法在体外长期培养,因此难以利用体内原位的骨髓脂肪细胞进行体外实验研究。由于骨髓脂肪细胞主要来源于间充质干细胞,目前常用的方法是用密度梯度离心法从体内获取骨髓间充质干细胞,通过体外培养、扩增后诱导分化为脂肪细胞再用于实验研究。但在常用的二维培养系统(细胞培养板、培养皿)中,骨髓间充质干细胞的成脂率较低,成脂体系中混杂着大量未分化的间充质干细胞,对进一步的实验存在较大的干扰。因此,提高骨髓间充质干细胞体外成脂分化率非常重要。

在前脂肪细胞转化为成熟脂肪细胞的过程中,伴随着许多基因(脂肪酸合成酶、磷酸甘油脱氢酶、乙酰辅酶A羧化酶、脂肪酸结合蛋白、葡萄糖转运体4、胰岛素受体等)的表达上调,促进葡萄糖的转运和利用及TG的合成和聚积^[11]。此前有学者发现锌具有胰岛素样作用,可作用于胰岛素受体和胞内磷脂酰肌醇激酶,影响葡萄糖转运蛋白4摄取葡萄糖^[7]。锌还能抑制脂肪细胞释放游离脂肪酸,并影响磷酸二酯酶的激活^[12]。故此我们推测锌可能有利于间充质干细胞成脂分化过程中细胞对葡萄糖的转运和利用及脂质的合成和聚积,从

而促进细胞成脂分化。

本研究结果显示,除0.256 mmol/L锌处理组的细胞活性降低外,锌在0.001~0.064 mmol/L浓度范围内有利于hBM-MSC的存活,且与对照组比较,0.004 mmol/L锌处理组和0.016 mmol/L锌处理组的细胞活性升高($P < 0.05$),提示0.004、0.016 mmol/L锌浓度可以促进细胞增殖。在成脂诱导培养基中添加适宜浓度的锌能使更多的细胞发生成脂分化,细胞中的脂滴也更大、更多,定量分析结果显示,各浓度锌处理组细胞的成脂分化率均高于对照组($P < 0.05$)。这均表明适宜浓度的锌能有效促进hBM-MSC的增殖和成脂分化。

锌是人体的必需微量元素,具有多种调节功能,参与胰岛素的合成、分泌、信号转导等生理过程^[13]。在1型和2型糖尿病动物模型中,锌能提高糖类和脂类的代谢水平,降低血糖水平,表现出高效的抗糖尿病作用。在分离培养的细胞中,锌能促进葡萄糖的转运、糖原和脂质的合成,抑制糖原异生和脂肪分解^[14]。然而,锌胰岛素样作用的分子机制还未完全阐明。有学者发现,磷脂酰基醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路的激活是锌胰岛素样作用的潜在分子机制^[13]。锌能作用于与葡萄糖摄取相关的胰岛素受体,诱导磷脂酰基醇3-激酶/蛋白激酶B的磷酸化,激活胰岛素信号级联反应,将葡萄糖转运蛋白从胞质液转移到细胞膜上,促进细胞对葡萄糖的摄取,并刺激葡萄糖代谢为二氧化碳、脂肪酸甘油酯和甘油酯甘油^[13]。该磷酸化作用能被细胞松弛素和渥曼青霉素抑制,从而减弱锌诱导的葡萄糖转运^[7,13]。此外,锌还能在缺乏葡萄糖的情况下抑制 β 肾上腺素能药物羟苄羟麻黄碱激活的脂肪分解作用^[20]。锌对葡萄糖氧化和脂肪分解的作用能被细胞外的过氧化氢酶抑制,提示这些效应是过氧化氢生成的结果^[15]。因此,锌对脂肪细胞的胰岛素样作用不仅是由锌对细胞内代谢的直接作用引起,还与过氧化氢生成的间接作用相关。因此,我们推测锌促进hBM-MSC成脂分化的作用与锌促进细胞葡萄糖的摄取和转运、脂质的合成及抑制脂肪分解、游离脂肪酸释放等效应有关。本研究结果显示,0.001、0.004、0.016和0.064 mmol/L锌处理组hBM-MSC成脂基因 $PPAR\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 和 $FABP4$ 的mRNA表达水平均高于对照组($P < 0.05$),即锌处理的hBM-MSC成脂分化相关基因 $PPAR-\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 和 $FABP4$ 的表达也明显增强,这提示锌可能通过作用于这些成脂基因发挥其促进细胞成脂分化的作用,但这一推论有待于后续实验加以验证。

我们所使用的锌属于无机化合物,价格便宜,而且

具有操作简便、使用安全、作用周期长的优点,因此更易于广泛应用。随着细胞三维培养的兴起和发展,目前可以将锌整合到生物学材料如生物活性陶瓷中制成缓释系统,在细胞培养和分化的过程中使锌自动、持续地释放到培养液中,维持培养液中稳定有效的锌浓度,大大简化了实验操作程序,而且可以适用于细胞分化的体内研究和临床应用,具有良好的应用前景。

综上所述,作为成脂诱导培养基的成分,锌在一定浓度范围内能显著促进 hBM-MSC 的成脂分化。但锌作为成脂诱导培养基的刺激因素对骨髓间充质干细胞的作用研究还处于初步阶段,需要更多的实验来验证这一结论。锌促进骨髓间充质干细胞成脂分化的具体机制也仍需深入研究加以阐明。此外,锌处理的间充质干细胞分化的脂肪细胞是否在形态、表型、功能特征上的变化也不清楚,需进一步研究探明。

参 考 文 献

[1] Gimble JM, Robinson CE, Wu X, et al. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update [J]. *Bone*, 1996, 19(5): 421-428.

[2] Butturini AM, Dorey FJ, Lange BJ, et al. Obesity and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(15): 2063-2069.

[3] Wang C, Meng H, Wang X, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in osteoblasts and adipocytes and its role in treatment of osteoporosis [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 226-233.

[4] Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment [J]. *Nature*, 2009, 460(7252): 259-263.

[5] 王慧, 刘四红, 翟元梅, 等. 二甲双胍通过调节成脂影响脂肪细胞对白血病细胞作用 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(2): 340-344.

[6] 刘四红, 王慧, 翟元梅, 等. 3T3-L1 细胞与人骨髓间充质干细胞体外成脂及脂肪细胞功能的比较研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(06): 1729-1733.

[7] Tang X, Shay NF. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes [J]. *J Nutr*, 2001, 131(5): 1414-1420.

[8] Valenti MT, Dalle Carbonare L, Mottes M. Osteogenic differentiation in healthy and pathological conditions [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 18(1): pii: E41.

[9] Hardouin P, Pansini V, Cortet B. Bone marrow fat [J]. *Joint Bone Spine*, 2014, 81(4): 313-319.

[10] Poloni A, Maurizi G, Serrani F, et al. Molecular and functional characterization of human bone marrow adipocytes [J]. *Exp Hematol*, 2013, 41(6): 558-566. e2.

[11] Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, et al. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(10): 6823-6826.

[12] Yoshikawa Y, Ueda E, Kojima Y, et al. The action mechanism of zinc(II) complexes with insulinomimetic activity in rat adipocytes [J]. *Life Sci*, 2004, 75(6): 741-751.

[13] Basuki W, Hiromura M, Sakurai H. Insulinomimetic Zn complex (Zn(opt)2) enhances insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Inorg Biochem*, 2007, 101(4): 692-699.

[14] Vardatsikos G, Pandey NR, Srivastava AK. Insulinomimetic and anti-diabetic effects of zinc [J]. *J Inorg Biochem*, 2013, 120: 8-17.

[15] May JM, Contoreggi CS. The mechanism of the insulin-like effects of ionic zinc [J]. *J Biol Chem*, 1982, 257(8): 4362-4368.

(收稿日期: 2018-01-21 修回日期: 2018-03-28)

● 医学科研论文讨论部分的写作内容及注意事项

我们在审稿工作中,常发现有的作者在撰写论文的讨论部分时,只将前文的资料简单罗列,甚至文不对题,妄加评论或下结论。现将论文中需要讨论的内容及写作上的注意点介绍如下,供大家参考。

讨论的内容:(1)针对研究目的,对自己的研究结果进行说明和解释,重点说明该项研究的创造性、先进性及其在实践中的意义;(2)与国内外相关研究的结果进行比较,分析其异同点及可能的原因,对自己和他人的研究结果和结论进行客观公正的评价,提出自己的观点和建议;(3)对本研究的缺陷及局限性进行实事求是的评价、分析和解释,说明相互矛盾的结果和结论,如有意外发现,也请予以说明;(4)通过评价、分析和解释,揭示本研究的所有结论;(5)提出有待进一步研究的问题。

写作上要注意:(1)讨论必须详尽确切,有据有证;(2)以结果为依据,与前人的结果和论点作比较,对结果作合理的解释和恰当的评价,必须具有说服力,论证要符合逻辑;(3)详略得当,突出新发现、新发明,阐述自己的见解;(4)实事求是,掌握分寸;(5)避免面面俱到,罗列文献;(6)切忌报喜不报忧;(7)层次要清楚。