

基础研究

葡萄糖及 O-GlcNAc 糖基化对人骨髓间充质干细胞增殖、凋亡、衰老的影响

孙超¹, 王言¹, 邢辉¹, 尹晓红², 姚远¹, 刘欢¹, 周跃¹

(1 第三军医大学新桥医院骨科 400037 重庆市; 2 武汉大学中南医院循证与转化医学中心 430071 武汉市)

【摘要】目的:探讨微环境中不同浓度葡萄糖是否可通过蛋白质 O 位氮乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖基化修饰影响人骨髓间充质干细胞增殖、周期、凋亡及衰老。**方法:**构建常规浓度葡萄糖(A组)(5.5mmol/L)、高浓度葡萄糖(B组)(25mmol/L)微环境模型及常糖糖基化(C组)(常糖+Thiamet-G 1.0mmol/L)、高糖糖基化(D组)(高糖+Thiamet-G 1.0mmol/L)细胞模型。人骨髓间充质干细胞在各组中培养,于第3、5、7天用WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒测定各组细胞增殖情况;于第5天用流式细胞仪检测各组细胞周期和细胞凋亡情况;于第7天用细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测各组细胞衰老情况;于第5天用Real-time PCR、Western-bolt检测不同处理组Cyclin D1和caspase-3的表达水平。**结果:**第3、5、7天时细胞增殖结果显示,与A组相比,B组、C组和D组细胞增殖明显下降($P<0.05$)。细胞周期结果显示,B组、C组和D组相较于A组细胞周期G1期阻滞($P<0.05$)。细胞凋亡结果显示,与A组相比,B组、C组和D组凋亡明显增多($P<0.05$)。细胞衰老染色显示,与A组相比,B组、C组和D组细胞衰老明显增多($P<0.05$)。Real-time PCR结果显示,Cyclin D1的mRNA相对值A组、B组、C组和D组分别为 1.01 ± 0.31 、 0.31 ± 0.07 、 0.42 ± 0.1 、 0.18 ± 0.04 ,其他三组显著低于A组($P<0.05$);caspase-3的mRNA相对值A组、B组、C组和D组分别为 1.09 ± 0.82 、 5.73 ± 1.54 、 3.43 ± 0.59 、 6.82 ± 2.13 ,其他三组显著高于A组($P<0.05$)。Western-bolt结果显示,A组hMSCs内蛋白质O-GlcNAc糖基化水平高于B组;Cyclin D1的蛋白水平表达B组、C组和D组低于A组($P<0.05$),caspase-3的蛋白质水平表达B组、C组和D组高于A组($P<0.05$)。**结论:**微环境中高浓度葡萄糖和细胞蛋白质高水平O-GlcNAc糖基化修饰抑制人骨髓间充质干细胞增殖,阻滞细胞周期促进细胞凋亡及衰老。微环境中高浓度葡萄糖可诱导胞内蛋白质O-GlcNAc糖基化水平升高。微环境中高浓度葡萄糖诱导的蛋白质O-GlcNAc糖基化水平升高可能是其抑制增殖促进凋亡和衰老的机制之一。

【关键词】骨髓间充质干细胞;葡萄糖;糖基化;细胞增殖;细胞凋亡;细胞衰老

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.04.12

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2016)-04-0354-08

Effects of glucose on human bone marrow mesenchymal stem cell growth, apoptosis and senescence/SUN Chao, WANG Yan, XING Hui, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26 (4): 354-361

【Abstract】Objectives: To investigate the effect on cell growth, cycle, apoptosis and senescence of human bone marrow mesenchymal stem cells in high concentration of glucose microenvironment or with high level of O-GlcNAcylation cell models, and to explore the underlying molecular mechanism. **Methods:** The extent of growth of hMSCs previously cultured in normal concentration of glucose(group A)(1.0mg/ml), high concentration of glucose (group B)(4.5mg/ml), normal glucose with thiamet-G (group C)(1.0mmol/L) and high glucose with thiamet-G(group D)(1.0mmol/L) was evaluated by WST-1, flow cytometer, β -galactosidase staining to identify the role of glucose and O-GlcNAcylation in the regulation of proliferation, cell cycle, apoptosis and senescence in hMSCs. In addition, the expressions of Cyclin D1 and caspase-3 were detected by real-time RT-PCR and western blot. **Results:** In group B, group C and group D, hMSCs grew fewer than which in

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81271982、81472076);国家自然科学基金青年科学基金项目(81401801)

第一作者简介:男(1989-),医学硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(023)68774328 E-mail:sunchaodoctor@163.com

通讯作者:周跃 E-mail:happyzhou@vip.163.com

group A on the third, fifth and seventh day ($P<0.05$). Also in group B, group C and group D, the induced cell cycle was arrested at G1 phase in hMSCs on the fifth day ($P<0.05$). The rate of apoptosis of hMSCs in group B, group C and group D was higher than that in group A ($P<0.05$). After treatment, the dimension of hMSCs in group B, group C and group D was larger than that in group A culture ($P<0.05$), and the positive cells of SA- β -gal staining were also more than those in group A on the seventh day ($P<0.05$). The real-time PCR showed that the expression of Cyclin D1 in group A, B, C and D was 1.01 ± 0.31 , 0.31 ± 0.07 , 0.42 ± 0.1 , 0.18 ± 0.04 , and it decreased in group A on the fifth day ($P<0.05$). The expression of caspase-3 in group A, B, C and D was 1.09 ± 0.82 , 5.73 ± 1.54 , 3.43 ± 0.59 , 6.82 ± 2.13 , and it increased in group A on the fifth day ($P<0.05$). Compared with group A, the expression of Cyclin D1 decreased and the expression of caspase-3 increased when hMSCs were cultured in group B, group C and group D on the fifth day ($P<0.05$). **Conclusions:** Our findings demonstrate the effect of glucose concentration and O-GlcNAcylation on regulating the growth, cycle, apoptosis and senescence of hMSCs, which provide insight into the mechanism of how glucose concentration regulating hMSCs.

[Key words] Mesenchymal stem cells; Glucose; Cell growth; Cells apoptosis; Cell senescence

[Author's address] Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

间充质干细胞因其较强的增殖能力和潜在的分化多能性^[1-3]在再生医学领域有着广阔的发展前景。其可以从骨髓、脂肪及脐带血等多种组织中获得^[4-6],并且在合适的诱导条件下可分化为成骨细胞、成脂细胞和成软骨细胞^[7]。鉴于上述优点,间充质干细胞一直是组织工程再生医学等领域研究的热点之一,其中人骨髓间充质干细胞应用得最为广泛。然而体外培养中发现,人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)会出现增殖缓慢、过早凋亡衰老等问题,严重影响其作为种子细胞的应用,因此值得进一步研究和探索。

葡萄糖作为生命体的核心能量来源和重要代谢产物,体内外微环境中的葡萄糖浓度显著影响着细胞的增殖、凋亡、衰老和分化^[8-11]。培养基中的葡萄糖作为细胞代谢的重要能量来源和调控因素,对于干细胞的增殖、凋亡、衰老有着重要的影响。有研究报道高糖环境可以抑制干细胞增殖^[12],诱导凋亡^[13],促进衰老^[14],然而具体机制并不十分明确。O 位氮乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰形式,在众多生物学过程中扮演着重要角色^[15]。已在包括染色体结合蛋白、转录蛋白及核孔蛋白中发现了 O-GlcNAc 糖基化修饰^[11]。O-GlcNAc 糖基化参与了一系列重要的生物学过程,包括:基因表达、细胞生长与分化及炎症等^[16]。糖基化的糖基供体 UDP-GlcNAc 来自糖代谢的氨基己糖合成途径(HBP)^[17],因此微环境中葡萄糖浓度会影响蛋白质的糖基化水

平,可能通过 O-GlcNAc 糖基化修饰影响相关蛋白质活性进而影响细胞内的生物学过程,比如增殖、凋亡和衰老等^[18]。本研究拟通过观察微环境中葡萄糖浓度对 hBMSCs 增殖、周期、凋亡及衰老的影响,探讨微环境中不同浓度葡萄糖是否可通过蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰影响 hBMSCs 增殖、周期、凋亡及衰老,为组织工程再生医学中 hBMSCs 的培养和运用提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂及仪器

hBMSCs 购自赛业生物科技有限公司。Thiamet-G 购自 Cayman 公司,用助溶剂二甲基亚砜(DMSO)溶解后于-20℃保存待用。高糖 DMEM 培养基、低糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶(Trypsin)、新生小牛血清、青霉素/链霉素双抗溶液购自 Hyclone 公司。WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒和细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。细胞周期素 D1 (Cyclin D1)、caspase-3 引物由上海生工合成。Cyclin D1、caspase-3、O-GlcNAc 糖基化抗体(RL2)、和 GAPDH 购自赛默飞。美国 Costar 6 孔和 24 孔细胞培养板。美国 Thermo CO2 细胞培养箱和全波长多功能酶标仪。倒置显微镜(Olympus)。苏州苏洁洁净工作台。上海跃进隔水式电热恒温培养箱。

1.2 细胞分组及处理

对照组为常糖组(A组),实验组为高糖组(B组)、常糖糖基化组(C组)和高糖糖基化组(D组)。hBMSCs 培养于 A 组(低糖 DMEM 培养基,葡萄糖浓度 5.5mmol/L)、B 组(高糖 DMEM 培养基,葡萄糖浓度 25mmol/L)^[19,20] 和 C 组(低糖 DMEM 培养基,Thiamet-G 1.0mol/L)和 D 组(高糖 DMEM 培养基,Thiamet-G 1.0mol/L)^[21] 中,各组含 10%灭活新生小牛血清及 100 U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素,置于 37℃、5.0% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 水溶性四唑盐(WST)-1 法检测 hBMSCs 增殖

采用 WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测 hBMSCs 增殖状况^[22]。取对数期生长的 hBMSCs,以 5×10³ 细胞/孔的密度接种于 96 孔板,每孔 200μl,置于培养箱中培养 24h 后吸弃原液加处理。空白对照组为等体积内含 10%灭活新生小牛血清、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的低糖 DMEM 培养基,其他各组加入对应处理培养基。从加处理开始,分别于第 3、5、7 天时进行细胞增殖检测。检测时每孔加入 10μl WST-1 溶液于培养箱孵育 2h,然后用酶标仪 450nm 吸光度值检测。每组实验重复 6 次,计算细胞增殖比=每组平均吸光度值-空白对照组平均吸光度值/空白对照组平均吸光度值×100%。

1.4 流式细胞仪检测 hBMSCs 周期和凋亡

收集 A、B、C、D 组培养至第 5 天的细胞。2000r/min 离心 5min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两次;缓慢加入 70%乙醇,-20℃固定 20min 以上;2000r/min 离心 5min 去除乙醇,PBS 水化 15min;2000r/min 离心 5min 收集细胞,加入碘化丙啶(PI)染色,避光 30min 后流式细胞仪检测细胞周期;收集各组处理至第 5 天的细胞,采用 annexin V 和 PI 双染法检测细胞凋亡,按试剂盒说明书操作,PBS 洗涤细胞两次,离心后用 1μg/ml annexinV-异硫氰酸(PITC)和 PI 标记溶液重悬细胞,37℃避光孵育 15min,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。实验重复三次,采用 CellQuest 软件分析结果。

1.5 β-半乳糖苷酶染色法检测 hBMSCs 衰老

A、B、C、D 组于六孔板中培养细胞,于第 7 天吸除培养液,PBS 洗涤一次,加入 β-半乳糖苷酶染色固定液室温固定 15min。然后吸除固定液

PBS 洗涤 3 次,每孔加入 1ml β-半乳糖苷酶染色工作液,37℃孵育过夜,普通光学显微镜下观察计数。每组实验重复 3 次,计算细胞凋亡比=每组平均凋亡个数/该组细胞数量×100%。

1.6 Real-time PCR 检测 Cyclin D1 和 caspase-3 mRNA 表达

收集 A、B、C、D 组培养至第 5 天的细胞。常规 TRIZOL 法提取 hBMSCs RNA,参照反转录试剂盒(Prime Script™ reagent Kit TAKARA code NO R0037A)说明书进行 cDNA 的合成,Li-negene 9600 仪器进行 Real-time PCR 实验,引物序列见表 1。hBMSCs 中 Cyclin D1 和 caspase-3 的定量以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 算法得到各组中 Cyclin D1 和 caspase-3 的相对值,进行统计学分析。

1.7 蛋白质印迹法(Western blot)检测 hBMSCs 中 Cyclin D1 和 caspase-3 表达

收集各组处理至第 5 天的细胞。应用组织裂解液提取 hBMSCs 总蛋白。BCA 法测定提取液蛋白浓度。取总蛋白 20μg,经 10%SDS-PAGE 电泳分离后转移至硝酸纤维膜上,用 5%脱脂牛奶封闭 2h,I 抗 4℃孵育过夜(RL2,Thermo Fisher scientific;Cyclin D1,Thermo Fisher scientific;caspase-3 Thermo Fisher scientific;滴度为 1:1000),II 抗室温孵育 2h,显色拍照。

1.8 数据统计

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验中各组的数据采用完全随机设计资料单因素方差分析(One-way ANOVA)对比均数的差异,并用最小显著差法(LSD)进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,所有的实验重复至少三次。

2 结果

表 1 Cyclin D1 和 caspase-3 引物序列

Table 1 Primer Sequences of Cyclin D1, caspase-3 and GAPDH

基因 Gene	引物序列 Primer Sequences
Cyclin D1	上游引物 Forward primer GCTGCGAAGTGAAACCATC
	下游引物 Reverse primer CCTCCTTCTGCACACATTGAA
caspase-3	上游引物 Forward primer CATGGAAGCGAATCAATGGACT
	下游引物 Reverse primer CTGTACCAGACCGAGATGTCA
GADPH	上游引物 Forward primer TGTGGGCATCAATGGATTGG
	下游引物 Reverse primer ACACCATGTATTCCGGGTCAAT

2.1 葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 增殖的影响

收集 A、B、C、D 组培养至第 3、5、7 天时的细胞,采用 WST-1 法检测葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 增殖的影响见表 2。第 3、5、7 天时 B 组、C 组和 D 组的细胞增殖率显著低于 A 组 ($P<0.05$),D 组的细胞增殖率显著低于 C 组 ($P<0.05$)。D 组和 B 组的 hBMSCs 增殖无显著性差异

表 2 葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 2 Influence of glucose and O-GlcNAcylation on proliferation of hBMSCs

	3D	5D	7D
A组 Group A	6.41±1.09	15.33±3.34	47.57±5.75
B组 Group B	3.78±0.73 ^①	6.79±1.54 ^①	21.73±3.85 ^①
C组 Group C	4.33±0.92 ^①	10.93±1.59 ^①	34.01±1.03 ^①
D组 Group D	3.3±1.01 ^{①②}	5.82±1.33 ^{①②}	19.47±2.56 ^{①②}

注:①与 A 组比较, $P<0.05$; ②与 C 组比较, $P<0.05$

Note: ① Compared with group A, $P<0.05$; ② Compared with group C, $P<0.05$

($P>0.05$)。

2.2 葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 细胞周期的影响

细胞增殖抑制与细胞周期有关,采用流式细胞仪检测各组细胞周期分布情况(图 1)。结果显示:处理 5 天后,各组间差异有统计学意义($F=33.472, P<0.05$),其中 B 组、C 组和 D 组的 G1 期细胞比率显著高于常糖组($P<0.05$)(表 3)。D 组的 G1 期细胞比率与 B 组比差异无统计学意义($P=0.67$)。

2.3 葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 凋亡的影响

取右上限(凋亡晚期细胞)及右下限(早期凋亡细胞)2 个象限的细胞凋亡百分数之和作为细胞凋亡率(图 2)。流式结果显示:处理 5 天后,各组间差异有统计学意义($F=79.872, P<0.05$),其中 B 组、C 组和 D 组的凋亡率高于 A 组($P<0.05$)(表 3);D 组 hMSCs 凋亡率与 B 组差异无统计学意义($P=0.58$)。

2.4 葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 中 Cyclin D1 和 caspase-3 基因和蛋白表达的影响

A、B、C、D 组中细胞培养至第 5 天时,染色光

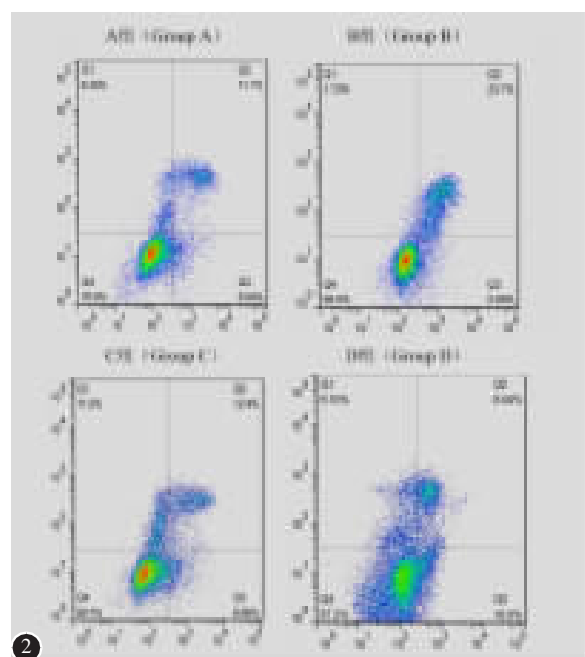
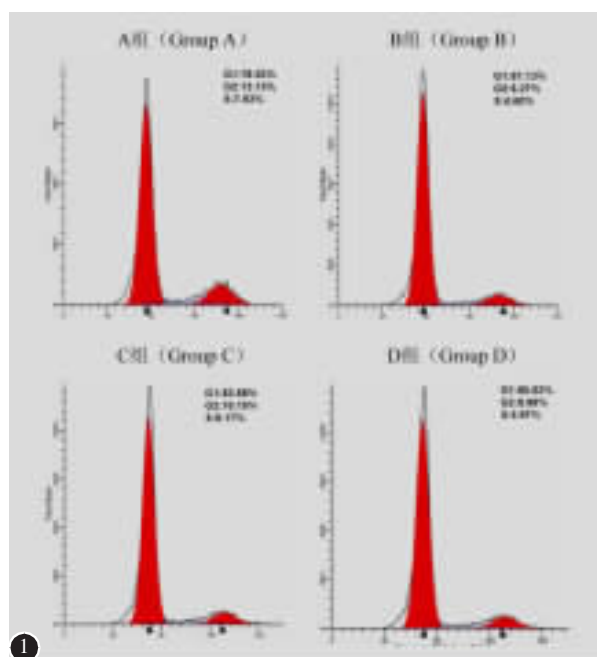


图 1 不同葡萄糖浓度和 O-GlcNAc 糖基化水平下第 5 天 hMSCs 各细胞周期所占比 图 2 不同葡萄糖浓度和 O-GlcNAc 糖基化水平下第 5 天 hMSCs 细胞凋亡数量

Figure 1 Comparison of cell cycle charts of 5-day hMSCs cultured under different concentrations of glucose and different levels of O-GlcNAcylation Figure 2 Comparison of cell apoptosis charts of 5-day hMSCs cultured under different concentrations of glucose and different levels of O-GlcNAcylation

镜下观察发现:各组均有不同程度的染色,表明均存在衰老(图 3)。计数后计算各组衰老比显示(表 3):各组间差异有统计学意义($F=95.933, P<0.05$),其中 B 组、C 组和 D 组的凋亡率高于 A 组($P<0.05$),而 D 组的凋亡率与 B 组无显著性差异($P=0.39$)。

2.5 Cyclin D1 和 caspase-3 在不同处理组的 hBMSCs 中的表达

通过 Real-time PCR 实验分析 Cyclin D1 和 Caspase-3 在不同处理组的 hBMSCs 中的表达变化(表 4)。发现 A、B、C、D 组中细胞培养至第 5 天时,各组间 Cyclin D1 表达水平差异有统计学意义($F=126.501, P<0.01$),各组间 caspase-3 表达水平差异有统计学意义($F=735.75, P<0.05$)。在 B 组、C 组和 D 组 hMSCs 中 Cyclin D1 水平明显低于 A 组($P<0.05$),而三组中的 caspase-3 水平明显高于 A 组($P<0.05$);caspase-3 mRNA 表达 D 组与 B 组比差异无统计学意义($P=0.51$)。

通过 Western-blot 检测高、低糖处理第 5 天时 hBMSCs 中 O-GlcNAc 糖基化水平的高低,结果显示 B 组的糖基化水平显著高于 A 组,说明高浓度葡萄糖可诱导 hBMSCs 胞内蛋白质 O-GlcNAc 糖基化(图 4a);通过 Westen-bolt 实验对比 Cyclin D1 和 caspase-3 在不同处理组 hMSCs 中的表达变化,发现二者的趋势与 PCR 结果一致(图 4b,表 5):各组间 Cyclin D1 表达水平差异有统计学意义($F=65.551, P<0.01$),其中 B 组、C 组和 D 组 hMSCs 中 Cyclin D1 水平明显低于 A 组($P<0.05$);各组间 caspase-3 表达水平差异有统计学意义($F=144.117, P<0.01$),其中 B 组、C 组和 D 组 hMSCs 中 caspase-3 水平明显高于 A 组($P<0.05$)。

3 讨论

体内外微环境的改变会影响干细胞增殖分化的能力,进而影响组织和器官的修复和再生,直接导致衰老和疾病的发生^[23]。hBMSCs 体外培养活性,及其增殖、凋亡、衰老与培养基中的成分有着紧密的联系。近些年研究发现:高糖环境可以抑制细胞增殖^[12],诱导凋亡^[13],促进衰老^[14],然而机制并不十分明确,有待于进一步研究。在本实验中,我们采用 WST-1、流式细胞仪对比了 A 组和 B 组对 hBMSCs 的影响,发现了体外培养微环境中高浓

度葡萄糖相较于常规浓度葡萄糖抑制 hBMSCs 增殖,促进其凋亡和衰老。在当前研究报道中高糖抑制 hBMSCs 增殖,促进其凋亡和衰老的机制有:高糖环境通过硫氧还原蛋白抑制硫氧还原蛋白系统的功能介导氧化应激,诱导细胞凋亡^[13,14];高糖环

表 3 葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 细胞周期、凋亡和衰老的影响 ($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 3 Influence of glucose and O-GlcNAcylation on cell cycle, apoptosis and senescence of hBMSCs

	G1 期 G1 phase	凋亡 apoptosis	衰老 senescence
A组 Group A	76.67±2.36	16.3±0.45	2.5±0.53
B组 Group B	87.29±3.29 ^①	29.33±1.69 ^①	10.2±2.22 ^①
C组 Group C	84.73±1.63 ^①	20.53±2.55 ^①	6.7±1.24 ^①
D组 Group D	86.17±2.57 ^①	30.07±1.34 ^①	11.7±1.57 ^①

注:①与 A 组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$

表 4 葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 中 Cyclin D1 和 caspase-3 mRNA 表达的影响

Table 4 Influence of glucose and O-GlcNAcylation on the expression of mRNA of Cyclin D1 and caspase-3 of hBMSCs

	Cyclin D1	Caspase-3
A组 Group A	1.01±0.31	1.09±0.82
B组 Group B	0.31±0.07 ^①	5.73±1.54 ^①
C组 Group C	0.42±0.1 ^①	3.43±0.59 ^①
D组 Group D	0.18±0.04 ^①	6.82±2.13 ^①

注:①与 A 组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$

表 5 葡萄糖和 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 中 Cyclin D1 和 caspase-3 蛋白表达的影响

Table 5 Influence of glucose and O-GlcNAcylation on the expression of protein of Cyclin D1 and caspase-3 of hBMSCs

	Cyclin D1	Caspase-3
A组(Group A)	1.00±0.12	1.00±0.18
B组(Group B)	0.44±0.07 ^①	3.18±0.11 ^①
C组(Group C)	0.26±0.05 ^①	3.19±0.33 ^①
D组(Group D)	0.17±0.34 ^①	3.55±0.41 ^①

注:①与 A 组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$

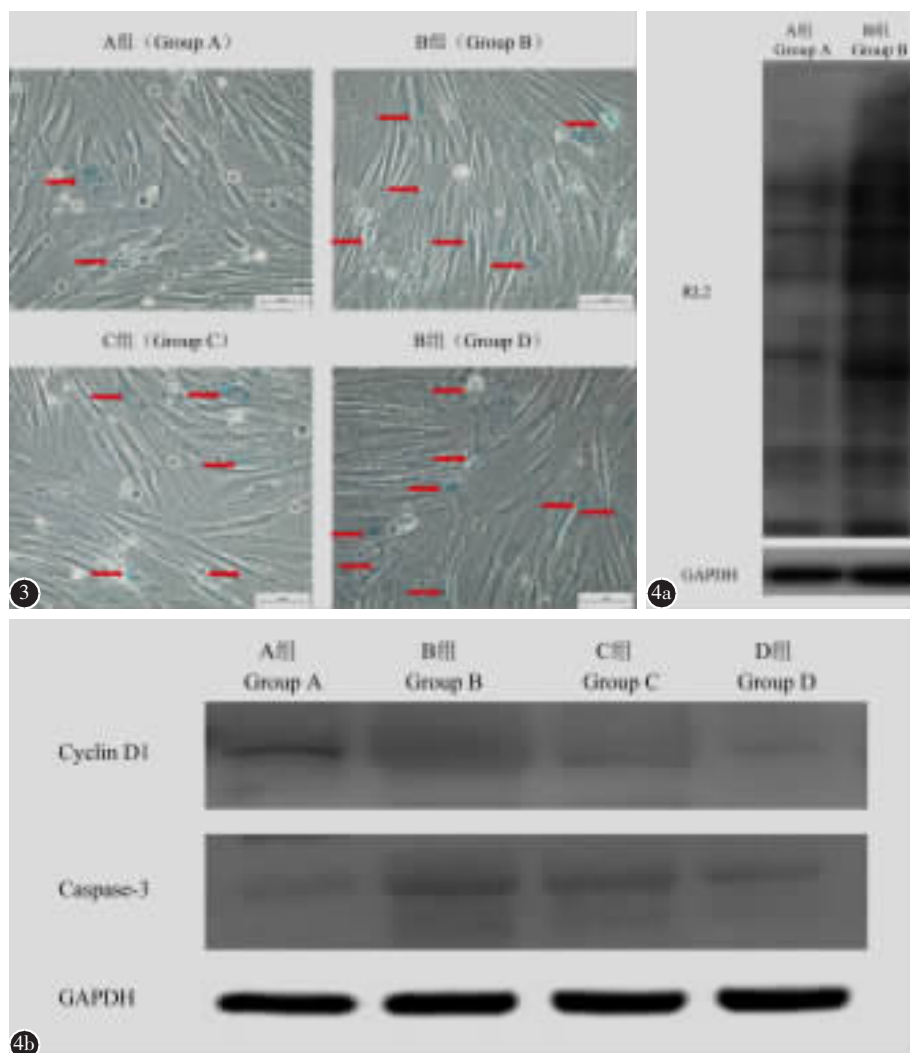


图 3 β -半乳糖苷酶染色法检测细胞衰老, 标红色箭头的为衰老细胞 ($\times 200$) **图 4 a** Western-bolt 比较 A 组和 B 组 hBMSCs 中蛋白质 O-GlcNAc 糖基化水平, 内参为 GAPDH **b** Western-bolt 比较不同处理组 hBMSCs 中 Cyclin D1 和 caspase-3 表达水平, 内参为 GAPDH

Figure 3 β -galactosidase staining analysis of each group after 5-day induction. The specimen sections were stained with β -galactosidase. Cells with red arrow were senescent ($\times 200$) **Figure 4 a** The expressions of O-GlcNAcylation of protein in A and B glucose were determined by Western blot with GAPDH as a loading control **b** The expression of Cyclin D1 and Caspase-3 in each group was determined by Western blot with GAPDH as a loading control

境通过产生的糖基化终末产物诱导 hBMSCs 凋亡并抑制其增殖^[24]等。但明确的机制还有待进一步研究。

O-GlcNAc 糖基化广泛存在于各种细胞中, 对细胞活动的正常进行有着重要的作用。其参与了细胞信号转导、配受体相互作用、转录调控和细胞应答等多种过程^[25]。环境中葡萄糖进入细胞后, 可部分进入 HBP 合成 UDP-GlcNAc^[26], 而 UDP-GlcNAc 是糖基化转移酶的底物, UDP-GlcNAc 增多可以促进细胞内蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修

饰。目前已发现在细胞培养、动物模型及糖尿病患者中高血糖可导致 UDP-GlcNAc 水平提高^[27,28]。因此, 本研究假设葡萄糖经由 HBP 调控细胞内蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰, 影响蛋白质的结构和功能, 进而影响细胞的增殖、凋亡和衰老, 可能是高糖环境影响 hBMSCs 的机制之一。本实验进一步分析高糖环境是否诱导蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰, 及 O-GlcNAc 糖基化对 hBMSCs 增殖、凋亡与衰老的影响。首先采用 Western-blot 检测 A 组和 B 组 hBMSCs 内蛋白质 O-GlcNAc 糖基化

修饰水平,发现微环境高浓度葡萄糖可诱导蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰水平升高。采用糖基化水解酶抑制剂 Thiamet-G 构建常糖糖基化细胞模型和高糖糖基化细胞模型。通过 WST-1、流式细胞仪检测结果显示:C 组相较于 A 组抑制增殖,促进凋亡和衰老,表明 hMSCs 内蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰水平升高可以抑制其增殖、促进其凋亡和衰老;而 B 组和 D 组在 hMSCs 增殖、凋亡和衰老上无显著性差异。上述结果说明微环境中高浓度葡萄糖可诱导 hBMSCs 胞内蛋白质 O-GlcNAc 糖基化水平升高,进而影响 hBMSCs 的增殖、凋亡、衰老。

Cyclin D1 是细胞周期的正调节因子,在 G1/S 期转换中起重要作用,其表达可以促进 G1/S 期转换,促进细胞增殖^[29]。天冬氨酸蛋白酶家族被认为是凋亡的重要发起者和执行者,其中作为核心成员的 caspase-3 是直接作用于细胞引发凋亡的关键终端因子^[30]。采用 RT-PCR 和 Western-blot 检测不同处理组中的 Cyclin D1 和 caspase-3 的基因和蛋白表达水平。结果显示:B 组、C 组和 D 组 Cyclin D1 mRNA 表达和蛋白表达水平均低于 A 组,说明其 G1/S 期转换受抑制,结果与流式细胞仪检测三组 G1 期阻滞结果一致,证实其抑制细胞增殖;而 B 组、C 组和 D 组 caspase-3 mRNA 表达和蛋白表达水平均高于 A 组,说明其促进 hBMSCs 凋亡。结果中 B 组和 D 组无显著性差异。上述结果从基因和蛋白水平证实了高浓度葡萄糖可通过蛋白质 O-GlcNAc 糖基化抑制 hBMSCs 增殖并促进其凋亡。

O-GlcNAc 糖基化参与细胞生命活动多是通过与其他一些蛋白质翻译后修饰相互作用而进行的^[31]。而在与其相互作用的多种蛋白质翻译后修饰中,磷酸化研究的最多,二者以竞争性抑制、异位交替修饰、邻位交替修饰或协同修饰的方式相互作用^[32]。二者相互依赖影响形成了一种平衡,协同完成各种复杂生命活动,若平衡被打破就会出现异常生命活动或者疾病^[33]。另外 O-GlcNAc 糖基化还与泛素化和乙酰化存在着相互作用^[34]。有研究报导磷酸化修饰可增强蛋白激酶 C(PKC)的活性,O-GlcNAc 糖基化则抑制其活性,二者成竞争性关系^[35],且 PKC 广泛作用于细胞内多种生命过程,因此诸如 PKC 这样的蛋白在糖基化与磷酸化、乙酰化等相互作用的情况必会对其他诸如细

胞增殖、凋亡、衰老和分化等生命活动产生影响。因此,O-GlcNAc 糖基化在葡萄糖对 hBMSCs 增殖、凋亡和衰老的影响过程中修饰了哪些蛋白质,并且在这些蛋白质上是否与磷酸化、乙酰化或者泛素化存在着相互作用,还有待进一步研究。

综上,本实验通过构建常糖、高糖微环境模型和常糖糖基化和高糖糖基化细胞模型,通过 WST-1、流式细胞仪、 β -半乳糖苷酶衰老染色、对比了糖浓度和 O-GlcNAc 对 hMSCs 增殖、周期、凋亡和衰老的影响,并通过 RT-PCR 和 Western-blot 分析不同处理组 Cyclin D1 和 caspase-3 的表达水平,发现微环境中高浓度葡萄糖可通过诱导 hBMSCs 蛋白质高 O-GlcNAc 糖基化修饰,进而抑制 hBMSCs 增殖、促进其凋亡和衰老。为后续的干细胞培养和组织工程研究提供了基础和依据。

4 参考文献

1. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging[J]. *Exp Hematol*, 2004, 32(5): 414-425.
2. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4): 568-584.
3. Jorgensen C, Gordeladze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(5): 406-410.
4. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow[J]. *Blood*, 2001, 98(8): 2396-2402.
5. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. *Br J Haematol*, 2000, 109(1): 235-242.
6. Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential[J]. *J Exp Med*, 2004, 200(2): 123-135.
7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
8. Hsieh TJ, Fustier P, Zhang SL, et al. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(10): 4338-4349.
9. Li YM, Schilling T, Benisch P, et al. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation [J].

- Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(1): 209–215.
10. Horie N, Moriya T, Mitome M, et al. Lowered glucose suppressed the proliferation and increased the differentiation of murine neural stem cells in vitro[J]. FEBS Lett, 2004, 571(1–3): 237–242.
 11. Wells L, Vosseller K, Hart G. A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance[J]. Cell Mol Life Sci, 2003, 60(2): 222–228.
 12. Strotmeyer ES, Cauley JA, Orchard TJ, et al. Middle-aged premenopausal women with type 1 diabetes have lower bone mineral density and calcaneal quantitative ultrasound than nondiabetic women[J]. Diabetes Care, 2006, 29(2): 306–311.
 13. Minn AH, Hafele C, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces β -cell apoptosis [J]. Endocrinology, 2005, 146(5): 2397–2405.
 14. Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells[J]. Rejuvenation Res, 2006, 9(1): 31–35.
 15. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(7): 448–462.
 16. Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling [J]. Science, 1995, 268(5208): 221–225.
 17. Kreppel LK, Hart GW. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase: role of the tetratricopeptide repeats[J]. J Biol Chem, 1999, 274(45): 32015–32022.
 18. Slawson C, Copeland R, Hart GW. O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer [J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(10): 547–555.
 19. Zhao K, Hao H, Liu J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose-induced β -cell injury through modulation of autophagy [J]. Cell Death Dis, 2015, 6(9): e1885.
 20. Dhanasekaran M, Indumathi S, Rajkumar J, et al. Effect of high glucose on extensive culturing of mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat, omentum fat and bone marrow[J]. Cell Biochem Funct, 2013, 31(1): 20–29.
 21. Andres-Bergos J, Tardio L, Larranaga-Vera A, et al. The increase in O-linked N-acetylglucosamine protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo[J]. J Biol Chem, 2012, 287(40): 33615–33628.
 22. Weng M, Zhang M, Qin Y, et al. Targeting gallbladder carcinoma: bone marrow-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of myxoma virus [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(12): 2350–2356.
 23. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells[J]. Bone, 2003, 33(6): 919–926.
 24. Kume S, Kato S, Yamagishi S, et al. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(9): 1647–1658.
 25. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, et al. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease[J]. Annu Rev Biochem, 2011, 80: 825.
 26. Mengin-Lecreulx D, van Heijenoort J. Identification of the glmU gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase in Escherichia coli [J]. J Bacteriol, 1993, 175(19): 6150–6157.
 27. Yki-Jarvinen H, Virkamaki A, Daniels MC, et al. Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetylglucosamine in skeletal muscle proteins in vivo[J]. Metabolism, 1998, 47(4): 449–455.
 28. Federici M, Menghini R, Mauriello A, et al. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells[J]. Circulation, 2002, 106(4): 466–472.
 29. Johnson D, Walker C. Cyclins and cell cycle checkpoints[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999, 39(1): 295–312.
 30. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(4): 821–846.
 31. Slawson C, Hart GW. O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology[J]. Nature Reviews Cancer, 2011, 11(9): 678–684.
 32. Zeidan Q, Hart GW. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways[J]. J Cell Sci, 2010, 123(1): 13–22.
 33. Gong CX, Liu F, Iqbal K. O-GlcNAc cycling modulates neurodegeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(43): 17319–17320.
 34. Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, et al. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination [J]. Nature, 2011, 480(7378): 557–560.
 35. Robles-Flores M, Melendez L, Garcia W, et al. Posttranslational modifications on protein kinase c isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(5): 695–712.
- (收稿日期: 2015-11-10 修回日期: 2016-03-05)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)