

高糖对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响

韦恩秀^{1,2}, 吴冲云¹, 朱玲¹, 李方晖³, 李星儿¹, 史新平¹, 刘承宜¹
(1.华南师范大学 体育科学学院激光运动医学实验室, 广东 广州 510006; 2.广西师范大学 体育学院, 广西 桂林 541004; 3.肇庆学院 体育与健康学院, 广东 肇庆 526061)

摘 要: 采用不同浓度葡萄糖对间充质干细胞(MSCs)增殖的影响来研究运动员补糖的 MSCs 效应, 分别用 5.0 和 22.5 mmol/L 葡萄糖预处理小鼠 MSCs 细胞株 C3H10T1/2 48 h 后, 换不同浓度葡萄糖(5.0~500.0 mmol/L)持续培养或 50.0~150.0 mmol/L 和 22.5 mmol/L 进行 12 h 交替培养, 甲基噻唑基四唑(MTT)法检测 24~192 h 的细胞增殖活性。结果发现: 1)22.5 和 50.0 mmol/L 葡萄糖组细胞的增殖活性最佳, 并称为正糖。浓度低于或高于正糖的葡萄糖称为低糖或高糖。2)22.5 mmol/L 正糖预处理后换不同糖浓度持续培养时, 和正糖相比, 高糖 100.0~300.0 mmol/L 具有短暂促增殖作用。3)高糖长期培养抑制细胞增殖。结果说明: 高糖对正糖预处理的 MSCs 具有短暂促增殖效应。

关 键 词: 运动生物化学; 间充质干细胞; 正糖; 高糖; 小鼠

中图分类号: G804.7 文献标志码: A 文章编号: 1006-7116(2015)06-0139-06

The effect of high glucose on the proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells of mice

WEI En-xiu^{1,2}, WU Chong-yun¹, ZHU Ling¹, LI Fang-hui³, LI Xing-er¹, SHI Xing-ping¹, LIU Cheng-yi¹
(1.Laboratory of Laser Sports Medicine, School of Physical Education and Sports Science, South China Normal University, Guangzhou 510006, China; 2. School of Physical Education, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 3.School of Physical Education and Health, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

Abstract: In order to study the mesenchymal stem cells (MSCs) effect of carbohydrate supplementation for athletes by studying the effect of glucose in different concentrations on the proliferation of MSCs, the authors pretreated cell lines C3H10T1/2 of MSCs of mice with 5.0 and 22.5 mmol/L glucose respectively for 48 h, then continuously cultured them with glucose in different concentrations (5.0~500.0 mmol/L) or alternatively cultured them with 50.0~150.0 mmol/L and 22.5 mmol/L glucose for 12 h, measured the proliferation activity of 24~192 h cells by means of methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide/thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay, and revealed the following findings: 1)the proliferation activity of the cells cultured with 22.5 and 50.0 mmol/L glucose was the best, and the glucose was called as normal glucose, while the glucose whose concentration was lower or higher than normal glucose was called as low glucose or high glucose; 2)when MSCs were pretreated with 22.5 mmol/L normal glucose and then continuously cultured with glucose in different concentrations, as compared with normal glucose, 100.0~300.0 mmol/L high glucose had a short-term proliferation promoting function; 3)longer-term high glucose culturing restrained cell proliferation. The said findings indicate that high glucose has a short-term proliferation promoting effect on MSCs pretreated with normal glucose.

Key words: sports biochemistry; mesenchymal stem cell; normal glucose; high glucose; mouse

收稿日期: 2015-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(60878061); 高等学校博士学科点专项科研基金(博导类)(20124407110013); 广东省科技计划项目(社会发展)(2012B031600004; 2014A020220015); 广东省高等学校青年创新人才项目(2014KQNCX225)。

作者简介: 韦恩秀(1986-), 女, 博士研究生, 研究方向: 激光运动医学。E-mail: 794929825@qq.com

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是属于中胚层的一类多能干细胞,主要存在于结缔组织和器官间质中,以骨髓组织含量最为丰富。骨髓 MSCs 具有强大的增殖能力和多向分化潜能,在适宜的体内或体外环境下不仅可分化为造血细胞,还具有分化为肌细胞、成骨细胞、软骨细胞等多种细胞的能力。研究表明,体育运动能提高 MSCs 增殖活性和迁移能力^[1]。同时, MSCs 参与了运动性骨骼肌损伤的修复过程^[2]。研究发现,运动性损伤后通过提高 MSCs 活性可抑制炎症反应^[3]、加速血管内皮细胞生长^[4-5]、促进骨骼肌卫星细胞增殖和分化^[6],进而有利于运动损伤的康复^[7-9]。然而, MSCs 增殖活性降低将导致肌肉损伤修复过程受到抑制^[6]。因此,研究 MSCs 增殖对于促进运动员骨骼肌损伤修复、提高运动员训练效果具有重要的现实意义。

既往研究发现,无论对于短时间大强度、间歇性运动还是对于耐力性运动而言,在运动前、中、后进行适度科学的补充葡萄糖,既能维持血糖的平衡、提高肌糖原的合成速率、降低运动后迅速上升的肌酸激酶(creatine kinase, CK)水平,同时也能抑制运动导致活动肌损伤后的炎症反应、促进损伤部位的骨骼肌再生,从而减轻运动性肌肉损伤,促进运动能力恢复^[10]。普遍认为,补糖量一般不超过 60 g/h 或 1 g/min^[11-12]。Depner 等^[13]研究了补充不同浓度葡萄糖对延迟性肌肉酸痛(delayed onset muscle soreness, DOMS)炎症过程的影响。他们发现,与补充低浓度葡萄糖相比,受试者运动过程中的补高浓度的葡萄糖组加重了运动 24 h 后肌肉的酸痛感,同时也增加炎症因子白介素(interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 的蛋白表达。Zehnder 等^[14]对运动后补糖对 DOMS 骨骼肌糖原重新合成和肌肉损伤恢复的影响的研究也发现,运动后补糖(>10 g/kg)导致 DOMS 骨骼肌的糖原在运动后 24 h 肌糖原合成进一步减少,运动后 DOMS 的骨骼肌损伤指标无机磷酸盐和无机磷酸盐/磷酸肌酸显著性增加,进而间接抑制肌肉再生。这些研究提示,运动补糖呈现出浓度依赖性特点。然而,这一特点是否与 MSCs 增殖活性有关尚不清楚。

本实验研究不同葡萄糖浓度对 MSCs 增殖的影响,从 MSCs 角度揭示运动员补糖的浓度依赖特点,为科学补糖提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

C3H10T1/2 细胞株是小鼠骨髓来源的 MSCs,购自中国科学院上海细胞库;特殊定制的无糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium,

DMEM)购自 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;甲基噻唑基四唑(the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)细胞计数试剂盒购自碧云天生物技术研究所;其它相关试剂都购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养及处理

1)常规培养。

将 C3H10T1/2 细胞接种于 22.5 mmol/L 的 D-葡萄糖、10%胎牛血清、100 μ g/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的增殖 DMEM 培养基中,置于体积分数为 5% 二氧化碳、饱和湿度、37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中培养。常规胰酶消化,细胞传代,隔天换液。

2)检测细胞增殖活性。

(1)不同糖浓度预处理后更换多个糖浓度培养细胞。

取对数生长期细胞,以 1 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中,分别用 D-葡萄糖浓度 5.0 和 22.5 mmol/L 的培养基培养,48 h 后开始计时,22.5 mmol/L 葡萄糖预处理组更换含不同浓度 D-葡萄糖(5.0、22.5、50、100、150、200、300、500 mmol/L)的培养基培养。5.0 mmol/L 葡萄糖预处理组更换含不同浓度 D-葡萄糖(5、22.5、50、100、150、200、250、300 mmol/L)的培养基培养。

细胞隔天换液,连续培养 6 d。用 MTT 法检测细胞的增殖活性,每日 1 次。方法如下:每孔加入 10 μ L 质量浓度为 5 g/L 的 MTT,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,吸出培养基,每孔加入二甲基亚砷(Dimethyl Sulphoxide, DMSO)150 μ L,于微量振荡器上轻轻震荡混匀 10 min,用酶标仪(BIORAD550 型,美国)测定 570 nm 处的光密度(optical density, $D(\lambda)$)值。

(2)不同糖浓度交替 12 h 培养细胞。

取对数生长期细胞,以 1 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中,采用 22.5 mmol/L 的培养基培养 48 h 后开始计时,分别用不同葡萄糖浓度 12 h 交替培养,分组如下:A: N-N(22.5 mmol/L 持续培养);B: H50-H50(50 mmol/L 持续培养);C: H100-H100(100 mmol/L 持续培养);D: H150-H150(150 mmol/L 持续培养);E: H50-N(50 mmol/L 和 22.5 mmol/L 交替培养);F: H100-N(100 mmol/L 和 22.5 mmol/L 交替培养);G: H150-N(150 mmol/L 和 22.5 mmol/L 交替培养)。其中,A—D 为对照组,E—G 为观察组。各组细胞每隔 12 h 换液,连续培养 8 d。用 MTT 法检测细胞的增殖活性,每日 1 次。方法同上。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件分析数据。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用独立样本 T 检验,多组

间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为具有显著性统计差异, $P < 0.01$ 为具有非常显著性统计差异。

鉴于统计检验的局限性^[15], 本研究还按照定量差异的方法^[16]进行分析。对于任何两个数的绝对值的比值, 刘承宜等^[16]引入黄金分割常数 0.618 为底数计算其对数, 并将其定义为“定量差异”。通过与队列研究进行比较, 刘承宜等^[16]将定量差异小于或等于 0.27、大于 0.27 但小于或等于 0.47、大于 0.47 但小于或等于 0.80 和大于 0.80 分别定义为“完全没有定量差异”、“稍许定量差异”、“显著性定量差异”和“非常显著性定量差异”。根据文献研究总结, 细胞增殖的显著性差异要求定量差异大于 0.80。

2 结果及分析

2.1 C3H10T1/2 细胞增殖的正糖浓度

C3H10T1/2 细胞在用不同葡萄糖浓度培养之前, 分别用 22.5 mmol/L 葡萄糖(表 1 和 3)和 5 mmol/L(表 2)预处理 48 h。

从统计差异来看, 表 1 和 2 表明, 144 h 时增殖最佳的葡萄糖浓度分别为 22.5、50 mmol/L。表 3 观察的时间更长, 144、168 和 192 h 的情况类似, 增殖最佳的葡萄糖浓度只有 22.5 mmol/L。为了区别不同葡萄糖浓度的增殖效应, 本研究将维持细胞增殖的最佳浓度

的葡萄糖称为正糖, 低于或高于正糖浓度的葡萄糖称为低糖或高糖。按照这个定义, C3H10T1/2 细胞系用基础培养基进行体外培养时的正糖浓度是 22.5 mmol/L。

从定量差异来看, 表 1 表明, 只有 22.5 mmol/L 与 50.0 mmol/L 一直没有显著性差异。表 3 表明, 只有 N-N、H50-H50 和 H50-N 之间一直没有显著性差异。因此, 可以将统计差异定出的正糖概念拓展到 50 mmol/L。

2.2 细胞增殖的促进效应

从统计差异的角度, 相对于正糖(22.5 mmol/L), 高糖有复杂的促进增殖的效应。表 1 表明, 50、100 和 150 mmol/L 从 24 h 到 96 h 促进细胞增殖; 200 mmol/L 从 24 到 48 h 促进细胞增殖; 300 mmol/L 在 24 h 促进细胞增殖。表 2 表明, 100、150、200 和 250 mmol/L 在 24 h 促进细胞增殖。表 3 表明, H50-H50 和 H100-H100 在 24 h 促进细胞增殖; H50-N 在 48 和 72 h 促进细胞增殖; H100-N 和 H150-N 在 24 和 48 h 促进细胞增殖。从定量差异的角度, 相对于正糖(22.5 和 50.0 mmol/L), 高糖的促增殖效应非常简单。只有表 1 发现了高糖短暂促增殖效应。100 和 200 mmol/L 在 24 h 促进细胞增殖。150 mmol/L 在 24 和 48 h 都促进细胞增殖。

表 1 正糖预处理 48 h 后不同糖浓度不同时间 C3H10T1/2 细胞的增殖活性(光密度值)

时间/h	5 mmol/L	22.5 mmol/L	50 mmol/L	100 mmol/L	150 mmol/L	200 mmol/L	300 mmol/L	500 mmol/L
0	0.159±0.027	0.146±0.018	0.136±0.014	0.122±0.017	0.155±0.013	0.133±0.034	0.152±0.023	0.153±0.019
24	0.155±0.021 ²⁾	0.253±0.027	0.366±0.030 ²⁾	0.429±0.026²⁾	0.448±0.032²⁾	0.409±0.030²⁾	0.321±0.014 ²⁾	0.030±0.008²⁾
48	0.158±0.027²⁾	0.415±0.007	0.465±0.027 ¹⁾	0.565±0.043 ²⁾	0.637±0.046²⁾	0.603±0.040 ²⁾	0.438±0.012	0.038±0.006²⁾
72	0.346±0.067²⁾	0.631±0.056	0.720±0.024 ¹⁾	0.869±0.060 ²⁾	0.845±0.048 ²⁾	0.668±0.045	0.478±0.059 ²⁾	0.005±0.006²⁾
96	0.799±0.033²⁾	0.885±0.044	1.004±0.056 ²⁾	1.026±0.036 ²⁾	0.947±0.041 ¹⁾	0.845±0.039 ¹⁾	0.522±0.022²⁾	0.007±0.006²⁾
120	1.236±0.031 ²⁾	1.384±0.026	1.383±0.023	1.288±0.037 ²⁾	1.262±0.049 ²⁾	1.067±0.025 ²⁾	0.580±0.007²⁾	0.009±0.006²⁾
144	1.583±0.064 ²⁾	1.706±0.050	1.676±0.048	1.605±0.064 ²⁾	1.340±0.066 ²⁾	1.106±0.025 ²⁾	0.562±0.040²⁾	0.003±0.003²⁾

与 22.5 mmol/L 组比较, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 其中黑体表示定量差异大于 0.80

表 2 低糖预处理 48 h 后不同糖浓度不同时间 C3H10T1/2 细胞的增殖活性(光密度值)

时间/h	5 mmol/L	22.5 mmol/L	50 mmol/L	100 mmol/L	150 mmol/L	200 mmol/L	250 mmol/L	300 mmol/L
24	0.308±0.056 ²⁾	0.369±0.027	0.362±0.032	0.404±0.035 ¹⁾	0.431±0.047 ²⁾	0.434±0.038 ²⁾	0.404±0.028 ¹⁾	0.344±0.021
48	0.448±0.047 ¹⁾	0.501±0.039	0.485±0.054	0.497±0.037	0.457±0.021 ²⁾	0.461±0.018 ¹⁾	0.437±0.024 ²⁾	0.413±0.014 ²⁾
72	0.683±0.047 ²⁾	0.894±0.017	0.909±0.062	0.903±0.045	0.908±0.045	0.755±0.054 ²⁾	0.655±0.047 ²⁾	0.456±0.023²⁾
96	0.885±0.081 ²⁾	1.254±0.088	1.160±0.075	1.048±0.070 ²⁾	0.962±0.031 ²⁾	0.872±0.079 ²⁾	0.738±0.059²⁾	0.545±0.082²⁾
120	1.676±0.047 ²⁾	1.878±0.084	1.964±0.098	1.918±0.115	1.645±0.101 ²⁾	1.521±0.088 ²⁾	1.247±0.100²⁾	0.870±0.087²⁾
144	1.931±0.215 ²⁾	2.420±0.152	2.422±0.157	2.302±0.296 ²⁾	1.945±0.200 ²⁾	1.621±0.112²⁾	1.352±0.104²⁾	0.879±0.058²⁾

与 22.5 mmol/L 组比较, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 其中黑体表示定量差异大于 0.80

表 3 高糖和正糖交替培养时不同糖浓度不同时间 C3H10T1/2 细胞的增殖活性(光密度值)

时间/h	N-N	H50-H50	H100- H100	H150- H150	H50-N	H100-N	H150-N
24	0.125±0.033	0.135±0.033	0.143±0.034	0.129±0.033	0.139±0.038	0.157±0.040 ¹⁾	0.167±0.015 ²⁾³⁾
48	0.177±0.016	0.232±0.029 ²⁾	0.217±0.023 ²⁾	0.192±0.014	0.222±0.026 ²⁾	0.203±0.018 ¹⁾	0.203±0.024 ¹⁾
72	0.277±0.060	0.294±0.052	0.277±0.048	0.247±0.021	0.331±0.045 ¹⁾	0.293±0.020	0.275±0.028
96	0.504±0.050	0.440±0.086 ¹⁾	0.334±0.042 ²⁾	0.314±0.063 ²⁾	0.485±0.058	0.456±0.066 ⁴⁾	0.353±0.045 ²⁾
120	0.632±0.089	0.498±0.125 ¹⁾	0.333±0.061 ²⁾	0.357±0.052 ²⁾	0.474±0.156 ²⁾	0.405±0.075 ²⁾	0.406±0.172 ²⁾
144	1.173±0.269	0.887±0.199 ²⁾	0.671±0.144 ²⁾	0.481±0.118 ²⁾	0.947±0.208 ²⁾	0.840±0.186 ²⁾³⁾	0.627±0.110 ²⁾
168	1.364±0.131	1.150±0.209 ²⁾	0.819±0.165 ²⁾	0.713±0.120 ²⁾	1.298±0.157	1.075±0.184 ²⁾⁴⁾	0.887±0.162 ²⁾³⁾
192	1.826±0.236	1.514±0.150 ²⁾	1.052±0.168 ²⁾	0.972±0.147 ²⁾	1.585±0.237 ²⁾	1.455±0.188 ²⁾⁴⁾	1.369±0.223 ²⁾⁴⁾

与 N-N 组比较, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 其中黑体表示定量差异大于 0.80; 和相同浓度的持续性高糖组比较, 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$.

2.3 细胞增殖的抑制效应

从统计差异的角度, 相对于正糖(22.5 mmol/L), 低糖都是抑制效应; 除了 50 mmol/L 以外, 高糖较长时间的作用都是抑制效应。

从定量差异的角度, 相对于正糖(22.5 和 50.0 mmol/L), 总的趋势与统计差异一样, 但抑制增殖的范围比统计差异要小得多。低糖对正糖预处理的抑制只能持续到 72 h(见表 1), 对低糖预处理则没有发现抑制效应(见表 2)。500 mmol/L 高糖的抑制效应与统计差异一致(表 1)。其它高糖的抑制效应与统计差异的结果相差较大。

3 讨论

3.1 葡萄糖浓度对 MSCs 增殖功能的影响

细胞种类不同、培养方式不同, 或研究的生理功能不同, 维持该功能最佳状态的细胞培养条件也有异, 不能一概而论。然而, 当前细胞实验中, 却存在着依实验目的不同而实验前培养条件不统一的隐性弊端。

培养细胞的葡萄糖浓度的混乱来源于对细胞功能定义的混乱。李方晖等^[17]首次引入功能内稳态(function-specific homeostasis, FSH)^[18-19]理论来探讨葡萄糖对细胞体外培养的影响。FSH 是维持功能充分稳定发挥的负反馈机制。处于 FSH 的功能称为“正则功能”, 远离 FSH 的功能称为“失调功能”。正则功能当然优于“失调功能”, 换句话说, 正则功能是局部最优的。随着葡萄糖浓度的增加, 成肌细胞增殖逐渐增加, 然后逐渐下降^[17]。细胞增殖的峰值标志细胞处于增殖内稳态(proliferation-specific homeostasis, PISH), 相应的葡萄糖和 PISH 分别称为正糖和正糖 PISH。浓度低于或高于正糖的葡萄糖称为低糖或高糖, 会打破正糖 PISH, 导致增殖功能下降。李方晖等^[17]发现, 维持 C2C12 成肌细胞正则增殖的正糖浓度为 22.5 mmol/L。本研究按照统计差异发现的正糖为 22.5 mmol/L, 按照定量差异发现的正糖为 22.5 和 50.0 mmol/L。表 2 表明, 22.5 和 50.0 mmol/L 不但没有定量差异, 而且连统计差

异也不存在, 这个结果支持定量差异的正糖定义。文献上经常采用 25 mmol/L 葡萄糖作为对照组, 也支持定量差异的正糖定义。如下讨论将采用定量差异来展开。

正糖对正则增殖的维持还体现在 48 h 的预处理上。表 1 与表 2 比较表明, 预处理 48 h 后更换高糖培养时, 低糖预处理的高糖无法促增殖, 但正糖预处理的高糖可以; 低糖预处理的高糖抑制效应强于正糖预处理; 低糖预处理增强了对低糖的适应能力, 但降低了对高糖抑制增殖的抵抗能力。这说明, 低糖预处理细胞本身所具备的增殖能力下降, 提示低糖降低了 C3H10T1/2 细胞系的增殖能力。

3.2 短暂高糖对 C3H10T1/2 细胞系的增殖促进

本研究首次发现短暂高糖具有促进 MSCs 增殖的作用。有研究提出持续性“高糖”和间歇性“高糖”(Intermittent high glucose, IHG)对原代人肾小管上皮细胞和肾皮质成纤维细胞^[20]、大鼠肾小球系膜细胞^[21]、大鼠主动脉血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)^[22]、人视网膜内皮细胞(human retinal endothelial cells, hRECs)^[21]等具有促增殖作用, 而且间歇性“高糖”的上述作用比持续性“高糖”更为显著。值得指出的是, 这些文献中所谓的“高糖”实际上属于本研究发现的正糖范围, 而对照组则属于本研究发现的低糖范围。因此, 这些所谓“高糖”促进增殖效应实际上属于 3.1 节讨论的正糖相对于低糖的促增殖效应。

短暂高糖促增殖效应只对正糖预处理成立, 对低糖预处理或交替培养不成立。细胞 PISH 不但抵抗外界干扰, 而且抑制其它信号通路的激活, 维持 PISH 特异的正则通路的充分激活^[19]。维持正则增殖的正则通路不是唯一的, 它们彼此成为冗余通路。一条正则通路的充分激活维持一级正则增殖。 N 条冗余通路的充分激活可以通过形成协同作用将一级正则增殖升级为 N 级正则增殖。正糖预处理可以维持一条正则通路的充分激活, 但低糖预处理的正则通路不能充分激活, 交替处理也会降低正则通路的激活程度。我们的实验

提示,只有在一条正则通路充分激活的前提下,高糖才可以促进冗余通路的激活,从而通过与已经充分激活的正则通路的协同作用将正则增殖升级。当然,详细的机制有待进一步实验的研究。本研究提示,运动员要获得高糖对 MSCs 的短暂促增殖效应,补糖前血糖必须处于 MSCs 功能最佳的范围。

研究发现, MSCs 参与了运动性骨骼肌损伤的修复过程^[2]。MSCs 能够转化成免疫细胞^[23],运动性损伤后通过提高 MSCs 活性可抑制炎症反应^[3],促进骨骼肌卫星细胞增殖和分化^[6],进而有利于运动损伤的康复^[7-9]。另一方面的研究发现,无论对于短时间高强度、间歇性运动还是耐力性运动而言,在运动前、中、后进行适度科学的补充碳水化合物,既能维持血糖的平衡、提高肌糖原的合成速率、降低运动后迅速上升的 CK 水平^[24],同时也能抑制运动导致活动肌损伤后的炎症反应、促进损伤部位的骨骼肌再生,从而减轻运动性肌肉损伤^[10]。然而,这一过程是否由 MSCs 介导未见报道。本研究的结果从细胞模型上发现短暂高糖具有促进 MSCs 增殖的作用,推测适度科学补糖可能是通过促进体内 MSCs 的增殖来抑制炎症反应、促进骨骼肌细胞的增殖和分化,从而促进运动损伤的康复。

3.3 长期高糖对 C3H10T1/2 细胞系的增殖抑制

尽管短时间的高糖可以促进细胞的增殖,然而,一旦高糖培养时间延长,可能会对细胞产生“糖毒性”作用,炎症因子分泌和活性氧(Reactive oxygen species, ROS)生成大量增加^[25],从而抑制细胞增殖。Zhang 等^[25]用 30 mmol/L 的高糖培养基培养血管内皮祖细胞 9 d,培养第 3 天能显著促进该细胞增殖,第 7 天和第 9 天其细胞增殖则受到显著抑制。Zhang 等^[26]研究表明,较之 5.0 mmol/L 对照组,高糖 16.5 mmol/L 培养 72 h 后开始显著抑制大鼠 MSCs 的增殖。Cramer 等^[27]研究发现,长时间的持续性高糖培养可以改变 MSCs 的再生潜能。和前人的研究结果一致,本研究发现无论是持续性高糖培养还是间歇性高糖培养,一旦作用时间延长,都具有抑制 MSCs 增殖的作用。并且葡萄糖浓度越高,出现增殖抑制的时间越早。用正糖培养细胞 48 h 后,更换不同葡萄糖浓度培养,300 mmol/L 高糖分别在第 4 天开始显著抑制细胞增殖。用 5 mmol/L 低糖预处理细胞 48 h 后,更换不同葡萄糖浓度培养,得到和正糖预处理类似的结果,但高糖出现抑制增殖的时间提前了。

文献研究普遍认为,运动补糖的量一般不超过 60 g/h 或 1 g/min^[11-12]。如果补糖不当容易出现高血糖^[10],补糖过量反而会加重运动性骨骼肌损伤^[13, 28-29]。Miles 等^[29]发现,与 6 g/kg 的低糖相比,运动后即刻补 104 g/(kg·d)的高糖导致血清中介导炎症的肿瘤坏死因子-

α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β /6 及 C 反应蛋白水平都显著增加。此外,补糖过量也会引起骨骼肌 CK 和疼痛感明显增加^[13],骨骼肌的 ROS 大量产生^[28]和肌糖原再合成受到抑制^[14]。这些介导炎症的细胞因子同样也可以抑制成肌细胞活性,导致运动性损伤修复延迟。研究发现,长时间的高糖培养抑制 MSCs 增殖活性和再生潜能^[26-27]。MSCs 增殖活性降低将导致肌肉损伤修复过程受到抑制^[6]。本研究的细胞模型结果表明,无论是持续性高糖培养还是间歇性高糖培养,一旦作用时间延长,都具有抑制 MSCs 增殖的作用,推测补糖过量导致的运动性骨骼肌损伤加重、损伤修复延迟和过度炎症反应与 MSCs 增殖活性下降有关。因此,基于 MSCs 角度说明,运动员补充糖饮料需要控制补充的浓度和剂量。

本研究沿用实验室既往应用 FSH 理论确立细胞最佳培养条件的实验方法,证实小鼠 C3H10T1/2 细胞系体外培养时的正糖浓度为 22.5 和 50.0 mmol/L;短暂高糖具有短暂促进细胞增殖的作用,当高糖持续作用较长时间时,对细胞的增殖不利。

本研究提示,运动员要获得高糖对 MSCs 的短暂促增殖效应,补糖前血糖必须处于 MSCs 功能最佳的范围,而且补糖时间不宜过长。当然,本研究的结果仅局限于细胞模型,下一步我们将采用人体实验来直接研究补糖和运动的量效关系以及对 MSCs 增殖活性的影响,从 MSCs 的角度为提高运动成绩、促进运动性损伤恢复开辟新的思路。

参考文献:

- [1] Schmidt A, Bierwirth S, Weber S, et al. Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells[J]. *Br J Sports Med*, 2009, 43(3): 195-198.
- [2] Ramirez M, Lucia A, Gomez-Gallego F, et al. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury[J]. *Br J Sports Med*, 2006, 40(8): 719-722.
- [3] Zou K, De Lisio M, Huntsman H D, et al. Laminin-111 improves skeletal muscle stem cell quantity and function following eccentric exercise[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(9): 1013-1022.
- [4] Huntsman H D, Zachwieja N, Zou K, et al. Mesenchymal stem cells contribute to vascular growth in skeletal muscle in response to eccentric exercise[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(1): H72-H81.
- [5] Molina E J, Palma J, Gupta D, et al. Improvement in

- hemodynamic performance, exercise capacity, inflammatory profile, and left ventricular reverse remodeling after intracoronary delivery of mesenchymal stem cells in an experimental model of pressure overload hypertrophy[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135(2): 292-299, 299.e1.
- [6] Zou K, Huntsman H D, Carmen V M, et al. Mesenchymal stem cells augment the adaptive response to eccentric exercise[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2015, 47(2): 315-325.
- [7] 杨波, 梁静群, 刘涛, 等. 干细胞参与运动损伤的组织修复[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011(10): 1867-1870.
- [8] Dave L Y, Nyland J, McKee P B, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the sports knee: where are we in 2011[J]. *Sports Health*, 2012, 4(3): 252-257.
- [9] Valero M C, Huntsman H D, Liu J, et al. Eccentric exercise facilitates mesenchymal stem cell appearance in skeletal muscle[J]. *PLOS ONE*, 2012, 7(1): e29760.
- [10] 冯炜权, 谢敏豪, 王香生, 等. 运动生物化学研究进展[M]. 北京: 北京体育大学出版社, 2006: 671-724.
- [11] 陈吉棣. 营养与体能和健康的研究进展[J]. *现代康复*, 1998, 18(3): 65-70.
- [12] Coyle E F. Carbohydrate feeding during exercise[J]. *Int J Sports Med*, 1992, 13(Suppl 1): S126-S128.
- [13] Depner C M, Kirwan R D, Frederickson S J, et al. Enhanced inflammation with high carbohydrate intake during recovery from eccentric exercise[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2010, 109(6): 1067-1076.
- [14] Zehnder M, Muelli M, Buchli R, et al. Further glycogen decrease during early recovery after eccentric exercise despite a high carbohydrate intake[J]. *Eur J Nutr*, 2004, 43(3): 148-159.
- [15] Leek J T, Peng R D. Statistics: P values are just the tip of the iceberg[J]. *Nature*, 2015, 520(7549): 612.
- [16] 刘承宜, 李涛. 我国大学生行为表型组学研究[J]. *体育学刊*, 2015, 22(S1): 126-128.
- [17] 李方晖, 刘承宜, 杨海平, 等. 高糖诱导成肌细胞应激的低强度单色光调节的实验研究[J]. *体育科学*, 2012, 32(8): 40-48, 54.
- [18] Liu TCY, Liu Y Y, Wei E X, et al. Photobiomodulation on Stress[J]. *Int J Photoenergy*, 2012, 2012: 628649.
- [19] Liu TCY, Wu D F, Zhu L, et al. Micro-environment dependent photobiomodulation on function-specific signal transduction pathways[J]. *Int J Photoenergy*, 2014, 2014: 904304.
- [20] Jones S C, Saunders H J, Qi W, et al. Intermittent high glucose enhances cell growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells [J]. *Diabetologia*, 1999, 42(9): 1113-1119.
- [21] Sun J, Xu Y, Deng H, et al. Involvement of osteopontin upregulation on mesangial cells growth and collagen synthesis induced by intermittent high glucose [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(6): 1210-1221.
- [22] Sun J, Xu Y, Dai Z, et al. Intermittent high glucose enhances proliferation of vascular smooth muscle cells by upregulating osteopontin[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 313(1-2): 64-69.
- [23] Vacca P, Montaldo E, Vitale C, et al. MSC and innate immune cell interactions: A lesson from human decidua[J]. *Immunol Lett*, 2015, pii: S0165-2478(15)00074-7.
- [24] Samadi A, Gaeini A A, Kordi M R, et al. Effect of various ratios of carbohydrate-protein supplementation on resistance exercise-induced muscle damage[J]. *J Sports Med Phys Fitness*, 2012, 52(2): 151-157.
- [25] Zhang W, Wang X H, Chen S F, et al. Biphasic response of endothelial progenitor cell proliferation induced by high glucose and its relationship with reactive oxygen species[J]. *J Endocrinol*, 2008, 197(3): 463-470.
- [26] Zhang B, Liu N, Shi H, et al. High glucose micro-environments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3beta[J]. *J Bone Miner Metab*, 2015 Apr 4. [Epub ahead of print].
- [27] Cramer C, Freisinger E, Jones R K, et al. Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(12): 1875-1884.
- [28] Close G L, Ashton T, Cable T, et al. Effects of dietary carbohydrate on delayed onset muscle soreness and reactive oxygen species after contraction induced muscle damage[J]. *Br J Sports Med*, 2005, 39(12): 948-953.
- [29] Miles M P, Pearson S D, Andring J M, et al. Effect of carbohydrate intake during recovery from eccentric exercise on interleukin-6 and muscle-damage markers[J]. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2007, 17(6): 507-520.