

## 链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化

胡苏<sup>1,2</sup>, 逢曙光<sup>2</sup>, 崔莹<sup>2</sup>, 于春晓<sup>1</sup>, 赵家军<sup>1</sup>, 管庆波<sup>1</sup>

(1. 山东大学附属省立医院内分泌科, 济南 250021; 2. 山东大学附属济南市中心医院内分泌科, 济南 250013)

**摘要:**目的 观察糖尿病大鼠模型骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外增殖、抗凋亡和成骨分化能力。方法 将40只6周龄雌性SD大鼠随机分为2组,每组20只,实验组腹腔注射链脲佐菌素,对照组注射等量的生理盐水。处理10周后,采用贴壁法获得2组大鼠的BMSCs。应用CCK-8检测第2代BMSCs增殖能力,0.3%过氧化氢和血清剥夺诱导的BMSCs凋亡;成骨诱导培养4周后,RT-PCR检测I型胶原蛋白(COL-I)、骨钙素(OCN)和核心结合蛋白因子-2(Runx-2)的mRNA表达水平;应用酶联免疫吸附法定量分析细胞碱性磷酸酶活性;茜素红染色及von Kossa染色分析矿化能力。结果 链脲佐菌素成功诱导制备糖尿病大鼠模型。与对照组比较,实验组BMSCs增殖和抗凋亡能力降低,细胞成骨相关基因表达下降,细胞碱性磷酸酶活性显著降低,细胞成骨分化能力减弱( $P < 0.01$ )。结论 糖尿病大鼠来源的BMSCs体外增殖、抗凋亡作用减弱,成骨分化能力显著下降。

**关键词:**糖尿病;骨质疏松症;骨髓间充质干细胞;骨形成;凋亡

中图分类号:R587.1

文献标志码:A

## Osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells from streptozotocin-induced diabetic rats

HU Su<sup>1,2</sup>, PANG Shu-guang<sup>2</sup>, CUI Ying<sup>2</sup>, YU Chun-xiao<sup>1</sup>, ZHAO Jia-jun<sup>1</sup>, GUAN Qing-bo<sup>1</sup>

(1. Department of Endocrinology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China;

2. Department of Endocrinology, Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250013, China)

**Abstract: Objective** To explore the proliferation, anti-apoptosis characteristics and osteogenic differentiation of BMSCs isolated from diabetic rats. **Methods** Forty 6-week female adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control group and experimental group, with 20 animals in each group. The rats in the experimental group were administrated with a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 65 mg/kg, dissolved in 5 mmol/L citrate buffer, pH 4.5) to induce diabetes mellitus. The control group was treated with the same dose of normal saline. After 10-week treatment, BMSCs were isolated from the two groups by using adherent method. The proliferation of second-passage BMSCs was evaluated by CCK-8 assay. The apoptosis induced by serum deprivation and 0.3% hydrogen peroxide was assessed by flow cytometry. After 4-week osteoinductive culture, the expressions of COL-I, OCN, and Runx-2 mRNA were detected by RT-PCR. Alkaline phosphatase (ALP) activity was determined in cell lysates using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Meanwhile, the capacities of mineralization of BMSCs were measured by VonKossa and alizarin red staining. **Results** Diabetic rat models were successfully induced by intraperitoneal injection of STZ. The proliferative and antiapoptotic abilities of BMSCs derived from diabetic rats were significantly decreased compared with those from normal rats ( $P < 0.01$ ). The mRNA expressions of COL-I, OCN and Runx-2 were down-regulated in experimental group. ALP activity in the experimental group was lower than that in the control

group. In addition, the ability of osteogenic differentiation decreased significantly. **Conclusion** BMSCs derived from diabetic rats show an impaired ability of proliferative, anti-apoptosis and osteogenic differentiation in vitro.

**Key words:** Diabetes; Osteoporosis; Bone mesenchymal stem cells; Bone formation; Apoptosis

随着人口老龄化的进程,糖尿病在临床上越来越多见。糖尿病引起的代谢紊乱可直接对心、肾等多个器官造成损害,其中对骨代谢的影响近年受到重视<sup>[1]</sup>。然而,糖尿病继发性骨质疏松症的具体机制尚不清楚。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓中除造血干细胞以外的另一种重要的成体干细胞,参与构成造血微环境,BMSCs可以向成骨细胞定向分化,促进骨的形成,在维持骨量的相对稳定方面起着重要作用,其数量或活性的改变直接导致骨质疏松或骨硬化的发生<sup>[2]</sup>。近期研究发现,糖尿病患者骨髓造血干细胞有不同程度的损害<sup>[3]</sup>,而成骨细胞数量减少和功能降低与BMSCs成骨分化功能直接相关。因此,为了确定糖尿病体内环境对BMSCs成骨分化能力的影响,本研究通过观察糖尿病骨质疏松模型大鼠BMSCs的增殖、抗凋亡和成骨分化能力等生物学特性,分析糖尿病对骨代谢影响的细胞病理学机制,为了解糖尿病骨质疏松发病机制提供新的证据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 40只健康6周龄雄性Sprague-Dawley大鼠(清洁级),体质量190~245g,购自山东大学实验动物中心。

1.2 主要试剂及仪器设备 高糖DMEM(美国GIBCO公司),FBS(美国GIBCO公司), $\beta$ -甘油磷酸钠(美国Sigma公司),地塞米松(美国Sigma公司),抗坏血酸(美国Sigma公司),Annexin V/PI染色试剂盒(美国Invitrogen公司);CCK-8和ALP定量试剂盒购于碧云天生物试剂公司;荧光定量PCR试剂盒SYBR<sup>®</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup>(DRR420A,日本Takara公司)。细胞孵箱(德国Heraeus公司),流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);奥林巴斯倒置光学显微镜(日本Olympus公司);ABI 7500荧光PCR仪。

### 1.3 方法

1.3.1 糖尿病大鼠模型建立 将所选动物随机分为实验组(20只)和对照组(20只)。所有动物均在24~28℃、通风良好的相同条件下饲养,自由饮水,普通饲料喂养;实验组参照Manna等<sup>[4]</sup>报道的方法制作糖尿病大鼠模型,具体方法如下:将链脲佐菌素

(65 mg/kg,溶于5 mmol/L柠檬酸缓冲液,pH 4.5)一次性腹腔内注射。分别于链脲佐菌素处理后的第1、2和3周截尾取血,用罗氏试纸测禁食12 h后的血糖,选择3次血糖都高于11.1 mmol/L者纳入实验组<sup>[4]</sup>。实验组大鼠不用胰岛素控制血糖,并继续喂养10周。

1.3.2 大鼠BMSCs分离培养 将符合糖尿病特征的14只大鼠在链脲佐菌素处理后的第10周和20只正常SD大鼠分别在无菌条件下取其股骨,剪去长骨两端,1 mL注射器吸取完全培养基冲洗骨髓腔,收集骨髓混悬液,巴氏吸管反复吹打,接种于培养瓶,加入5 mL完全培养基(含L-谷氨酰胺的高糖DMEM补充15% FBS及50  $\mu$ g/mL青-链霉素双抗),培养条件为37℃、5% CO<sub>2</sub>,1 d后首次换液,以后每2天换液1次。待细胞生长、铺满瓶底约80%,0.25%胰蛋白酶-EDTA消化贴壁细胞,以1:3比例传代培养,取第2代细胞分别检测细胞增殖能力、凋亡率和矿化能力。

1.3.3 生长曲线测定 取生长良好的第2代BMSCs,消化收集并制成细胞悬液,将两组未分化的培养细胞消化、离心、重悬、计数后,按照细胞浓度 $1 \times 10^3$ 个/孔接种于96孔细胞培养板。分别于培养后第1、2、3、5、7、10、14天时CCK-8法测定细胞活力。具体操作如下:每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液,在细胞培养箱内继续孵育1 h,在450 nm测定吸光度,使用650 nm作为参考波长进行双波长测定。实验重复3次,绘制生长曲线。

1.3.4 Annexin V/PI染色法检测细胞凋亡率 将实验组和对照组来源的BMSCs分别分为3个亚组,血清组、血清剥夺组和0.3%过氧化氢组,处理24 h后检测凋亡率。检测方法如下:各组细胞经相应处理后,加入0.25%不含EDTA的胰蛋白酶0.8 mL消化,约2 min后于倒置显微镜下见细胞稍收缩、间隙增大,加入2 mL 10%胎牛血清混匀以中和胰蛋白酶的活性,用吸管轻轻吹打细胞,吸回到15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入细胞缓冲液(Buffer A)100  $\mu$ L(1 mL Buffer A + 4 mL双蒸水),立即加入5  $\mu$ L Annexin V和1  $\mu$ L PI(100 ng/mL),避光下37℃孵育15 min,再加入Buffer A 400  $\mu$ L,制成 $10^6$ 个/mL细胞悬液。

1.3.5 ALP活性测定 经成骨诱导培养后第0、14和28天收集两组细胞,制成 $2.5 \times 10^6$ 个/mL细胞悬

液,以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 600  $\mu$ L 0.1% Triton X-100 细胞裂解液,4  $^{\circ}$ C 冰箱中放置 12 h,吸管反复吹打裂解液,倒置相差显微镜下观察 BMSCs 结构全部破坏后,按 ELISA 试剂盒说明书检测细胞中 ALP 活性。

1.3.6 RT-PCR 检测 COL-I、Runx-2 和 OCN 的 mRNA 表达水平 成骨诱导培养 4 周后,取两组细胞 PBS 液冲洗,Trizol 细胞裂解液抽提总 mRNA,使用特异性引物将 mRNA 反转录为 cDNA(引物序列见表 1),然后以 Sybr Green 染料作为荧光标记物,按 PCR 试剂盒说明书在冰上配制 PCR 反应液,适当混匀后在 LightCycler 荧光实时定量 PCR 仪上进行 PCR 反应(ABI PRISM 7500),反应程序如下:95  $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 34 s(2  $^{\circ}$ C/s),45 个循环 $\rightarrow$ 95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 60 s,95  $^{\circ}$ C 15 s。以正常培养细胞制作外在标准曲线,反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线,以目的基因与  $\beta$ -actin 基因表达水平进行相对定量分析。

表 1 RT-PCR 引物序列

| 目的基因           | 序列(5'-3')  | 产物长度(bp) | 基因编号        |
|----------------|--|----------|-------------|
| Runx-2         | R:CCGAGATGGACTGCTGAACCTG<br>F:CAGCCGAGGCAAGGGACTT  | 137      | NM_053470   |
| COL-I          | R:TCCTGCCGATGTCGCTAT<br>F:AGATTGGGATGGAGGGAGTT     | 383      | NM_053304.1 |
| OCN            | R:AGCGACTCTGAGTCTGACAAA<br>F:AACGGTGGTGCCATAGATGCG | 221      | NM_013414.1 |
| $\beta$ -actin | R:CCTGTACGCCAACACAGTGC<br>F:ATACTCCTGCTTGCTGATCC   | 308      | NM_017008   |

1.3.7 von Kossa 染色法和茜素红染色评价细胞矿化能力 将 BMSCs 以  $1.5 \times 10^6$  个/孔接种于 6 孔板,并加入成骨诱导液(50  $\mu$ g/mL 抗坏血酸,10 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油,10 nmol/L 地塞米松),成骨诱导培养 28 d 后分别比较实验组和对照组细胞成骨分化能力。von Kossa 染色法具体如下:PBS 磷酸缓冲液冲洗培养细胞 2 次,甲醛磷酸缓冲液室温下固定 10 min,流水冲洗;加入 2% 硝酸银溶液,强光照射 20 min,再次流水冲洗;加入 5% 五水硫代硫酸钠溶液,放置 3 min 后,再次流水冲洗。光镜镜检、计数各组矿化阳性细胞数目。茜素红染色如下:用 10% 的中性甲醛在室温固定细胞 10 min。吸弃固定液,在 6 孔板中每孔加入 800  $\mu$ L 1% 茜素红的染色工作液,于室温染色 10 min,吸弃染色液,PBS 漂洗 15 min,37  $^{\circ}$ C 温箱中过夜烘干。光镜镜检、计数各组矿化阳性细胞。所有图片均通过奥林巴斯倒置光学显微镜拍摄

获得,图像分析软件采用 Image-Pro Plus 5.1 软件包。

1.4 统计学处理 所有数据来源于 3 次独立的重复实验,数据统计使用 SAS 5.1 软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析比较组间各时间点的差异, $t$  检验比较同一时间点上两组间的差异, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 糖尿病模型建立 实验组 2 只大鼠死亡,对照组处理前血糖为(3.9  $\pm$  0.6) mmol/L,注射生理盐水后血糖为(4.5  $\pm$  0.8) mmol/L,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验组在链脲佐菌素处理前血糖为(4.2  $\pm$  0.5) mmol/L,2 周后血糖为(11.5  $\pm$  2.5) mmol/L,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。实验组 18 只存活的大鼠中 14 只 3 次血糖均高于 11.1 mmol/L,符合实验要求。

2.2 细胞形态学观察及细胞鉴定 原代 BMSCs 经完全培养基培养 1 d 后贴壁,呈圆形或多角形,集落形成能力低于对照组;经传代后 BMSCs 细胞数量明显增多,呈漩涡状排列;7 d 后细胞 90% 以上汇合,细胞边界不清,汇合成片,呈纺锤形,见图 1。对第 2 代 BMSCs 的表面抗原进行流式细胞术的检测,发现 CD45 阳性率为 0.1%,而 CD90 阳性率为 98%,符合实验要求。

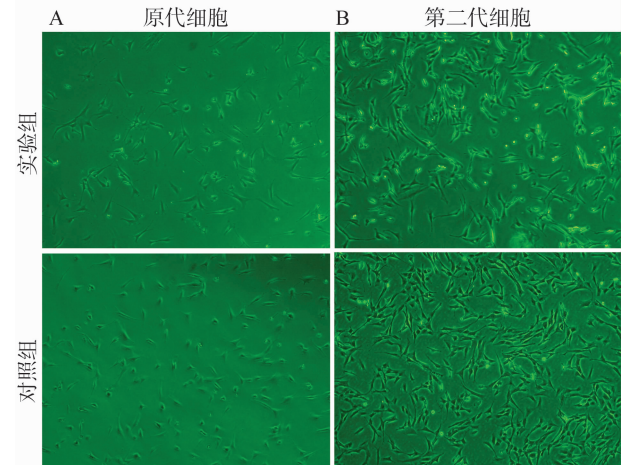


图 1 实验组和对照组 BMSCs 形态学观察 ( $\times 50$ )  
A: 实验组来源的原代 BMSCs 形成的细胞集落较正常小; B: 经传代后实验组的细胞呈扁平和不规则形态,并且一部分细胞变圆、脱落。

Fig. 1 The morphologic observation of BMSCs isolated from experimental and control groups ( $\times 50$ )  
A: In the experimental group, the colony units were much smaller than their control counterparts; B: After they were subcultured to the second passage, diabetic BMSCs showed irregular and flat shape and a part of them turned into round shape and began to shed off.

2.3 BMSCs 的细胞增殖能力 取第2代细胞测定增殖能力,两组 BMSCs 数量均随培养时间延长而增加,传代后的 BMSCs 潜伏期为 1~2 d,指数生长期为 3~5 d,7 d 后进入平台期,10 d 后增长速度逐渐缓慢。2~3 d 对照组 BMSCs 增殖能力强于实验组,但差异无统计学意义;5~10 d 对照组 BMSCs 增殖能力明显强于实验组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

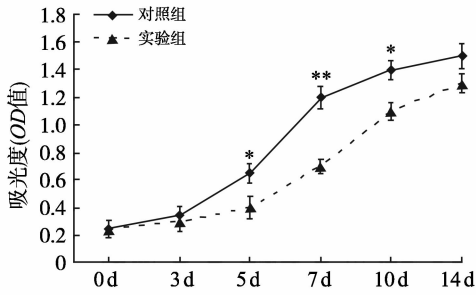


图2 CCK-8 测定第2代 BMSCs 增殖能力。在第5、7、10天,实验组细胞增殖能力明显低于对照组。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs 对照组。  
Fig. 2 BMSCs proliferation was determined by CCK-8. On days 5, 7 and 10, the proliferative ability of BMSCs in experimental group decreased significantly as compared with the control group.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs the control group.

2.4 BMSCs 的细胞凋亡率 正常培养条件下,对照组和实验组的细胞凋亡率均较低( $< 3\%$ ),两组无统计学差异。用0.3%过氧化氢和血清剥夺模拟体内氧化应激损伤,诱导细胞凋亡,在血清剥夺24 h后,对照组细胞的凋亡率为( $9.0 \pm 3.0$ )%,实验组为( $16.0 \pm 3.5$ )%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在0.3%过氧化氢处理24 h后,对照组的凋亡率为( $15.0 \pm 4.0$ )%,实验组为( $26.0 \pm 5.5$ )%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图3。

2.5 成骨基因表达和 ALP 活性 经成骨诱导培养28 d后,实验组 BMSCs 的 COL-I、OCN 和 Runx-2 的表达量只有正常组的 35.0%、22.0% 和 58.0%,与对照组之间存在统计学差异,见图4A;在成骨诱导前(第0 d),ALP 活性在实验组与对照组之间无统计学差异,但是经成骨诱导培养后第14天和28天,ALP 活性分别只有对照组的 50.0% 和 30.0%,见图4B。

2.6 BMSCs 矿化能力 对照组和实验组 BMSCs 经成骨诱导培养14 d后,细胞呈集落状生长, von Kossa 染色呈团状并向四周放射,形成钙结节,经茜素红染色后放射状团样中心呈橘红色,但是两组之间的钙结节均较少且差异不明显;在成骨诱导培养

28 d后观察到大片矿化结节,但实验组钙结节较对照组分布稀疏,镜下计数并进行半定量分析发现差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图5。

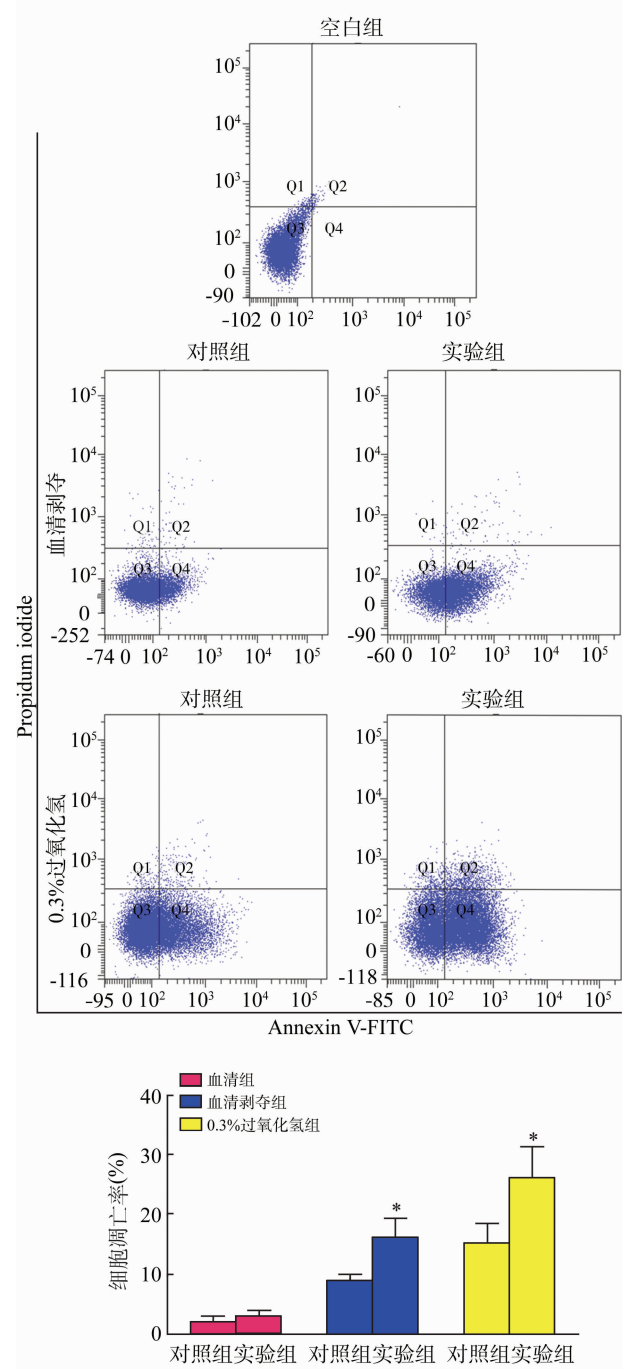


图3 流式细胞分析仪检测凋亡率(Annexin V/PI法)  
A: 流式细胞仪检测典型图片; B: 细胞分别在正常血清、血清剥夺和0.3%过氧化氢条件下培养,比较两组细胞凋亡率。 $*P < 0.05$  vs 对照组。  
Fig. 3 Apoptotic cells were determined by using flow cytometer analysis (Annexin V/PI staining)  
A: Typical pictures output by a flow cytometer; B: Comparison of apoptotic incidence between the experimental group and the control group under serum supplementation, serum deprivation and 0.3% hydrogen peroxide conditions.  $*P < 0.05$  vs the control group.

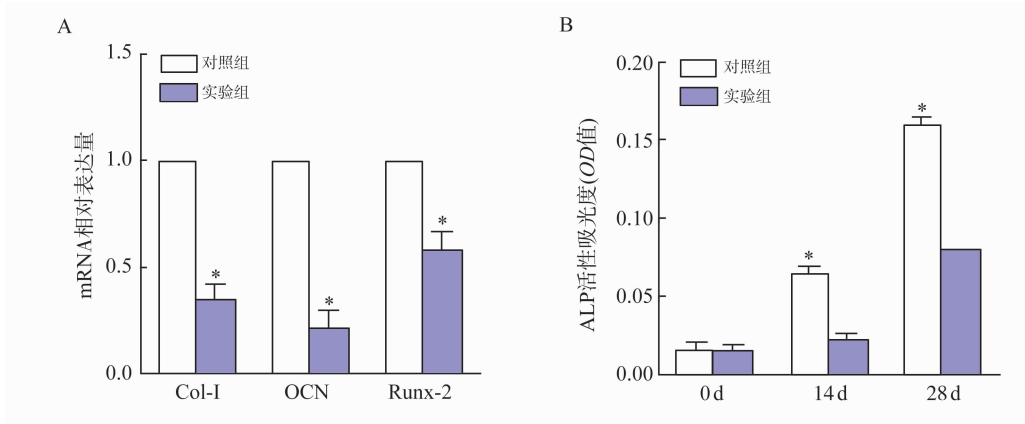


图4 ELISA 法检测碱性磷酸酶活性和 RT-PCR 分析 COL-1、OCN、Runx-2 mRNA 表达量  
A: 成骨诱导 28 d 后, 实验组的成骨相关基因 COL-1、OCN 和 Runx-2 表达明显低于对照组;  
B: 成骨诱导培养 14、28 d 后, 实验组 ALP 活性低于对照组。\* $P < 0.05$  vs 对照组。

Fig. 4 ALP activity detected by ELISA and the mRNA levels of COL-1, OCN and Runx-2 analyzed by RT-PCR

A: After 28-day osteoinductive culture, the expressions of COL-1, OCN and Runx-2 mRNA in the experimental group were significantly lower than those in the control group; B: After osteoinductive culture for 14 and 28 days, ALP activity in experimental group was significantly lower than that in control group. \* $P < 0.05$  vs the control group.

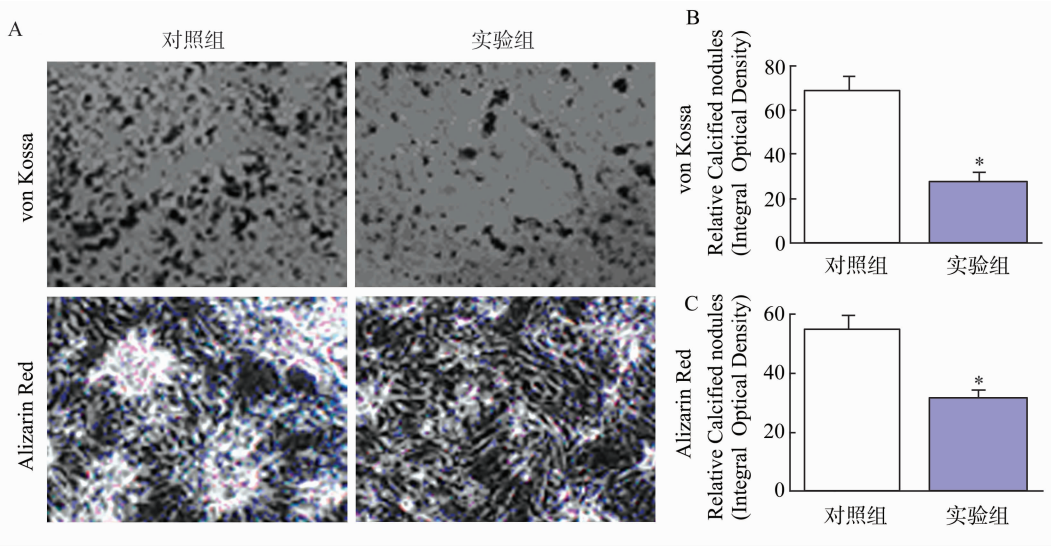


图5 两组大鼠 BMSCs 经成骨分化后染色结果 ( $\times 50$ )

A: 成骨诱导 4 周后, vonKossa 染色和茜素红染色检测矿化结节; B、C: 分别为钙染色阳性细胞数占总细胞数的相对比率, 结果显示实验组矿化结节数量显著下降。\* $P < 0.05$  vs 对照组。

Fig. 5 Mineralized nodules developed from BMSCs in the experimental and control groups ( $\times 50$ )

A: Mineralized nodules were stained by vonKossa staining and Alizarin red staining 4 weeks after osteoinductive culture; B and C: The number of mineralized nodules was expressed as the proportion of calcified nodules-positive cells. The number of calcified nodules significantly decreased in the experimental group. \* $P < 0.05$  vs the control group.

### 3 讨论

糖尿病患者常常伴有骨量下降和骨微结构改变, 1 型和 2 型糖尿病患者的骨折风险均明显增加<sup>[5]</sup>。由于 2 型糖尿病自身发病机制的复杂性和差异性, 其骨量表现为减少、正常甚至增加<sup>[6]</sup>, 然而在 1 型糖尿病中常常伴有普遍且严重的骨量下降<sup>[7]</sup>。目前认为与糖尿病继发性骨质疏松症有关

的因素主要有以下几个方面: 高血糖可引起渗透性利尿, 使钙和磷排泄增加<sup>[8]</sup>; 在高糖环境下, 糖基化终末产物生成增加, 抑制了成骨细胞分化, 导致成骨细胞数量减少和活性降低<sup>[9]</sup>; 糖尿病导致性激素水平异常<sup>[10]</sup>。虽然糖尿病引起内环境改变和激素分泌的异常, 直接影响了骨代谢, 但是糖尿病继发性骨质疏松的具体机制仍未阐明。一般而言, 大剂量链脲佐菌素导致胰岛  $\beta$  细胞坏死, 3 ~ 7 d 后出现持续的高血糖, 28 ~ 42 d 后出现明显的肝肾功能损害,

42~56 d 后出现明显的骨质疏松<sup>[11]</sup>,因此该研究中,选择在模型建立 10 周后提取原代 BMSCs,进一步研究糖尿病来源 BMSCs 的增殖和分化特点,推断糖尿病性骨质疏松的发病机制。

本研究发现,在细胞培养第 5~10 天,实验组 BMSCs 增殖能力显著低于对照组,与金培峰等<sup>[12]</sup>发现糖尿病导致 BMSCs 增殖能力减弱的研究结果一致。然而后期两组细胞之间差异并不明显,这可能与后期细胞密度较高、增殖受到限制有关。

糖尿病导致体内的氧自由基水平上升,加重细胞的氧化应激损伤<sup>[13]</sup>,而血清剥夺<sup>[14]</sup>和过氧化氢<sup>[15]</sup>是诱导氧化应激损伤的常用方法,因此,为进一步观察细胞对氧化应激损害抵抗能力,分别应用以上两种方法处理细胞后检测凋亡率。结果显示,在血清剥夺和 0.3% 过氧化氢诱导下,实验组 BMSCs 的抗凋亡能力明显下降。该研究结果提示,糖尿病导致的骨质疏松不仅与体内异常分泌的激素相关,而且与 BMSCs 抗氧化应激损伤能力下降有关。

COL-I 是成骨细胞合成的主要细胞外基质;OCN 的主要功能是维持骨的正常矿化速率,促进骨组织矿物质沉积和正常钙化过程。Runx-2 是间充质干细胞向成骨细胞分化的特异性转录调节因子,它能调节成骨细胞增殖和分化。因此,COL-I、OCN 和 Runx-2 是反映成骨活性的三个关键基因<sup>[16-17]</sup>。本研究发现,经成骨诱导培养 28 d 后,实验组和对照组 BMSCs 的成骨相关基因表达增高,但是实验组 BMSCs 的成骨相关基因表达水平较对照组低,矿化能力也显著低于对照组。李良等<sup>[16]</sup>也发现,去卵巢骨质疏松模型 BMSCs 的成骨能力显著下降。以上研究结果提示,骨质疏松的发生发展与 BMSCs 成骨分化能力不足相关。

#### 参考文献:

[1] Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis[J]. *Osteoporos Int*, 2007, 18(4):427-444.

[2] Gimble J M, Nuttall M E. The relationship between adipose tissue and bone metabolism[J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(12):874-879.

[3] Fadini G P, Albiero M, Vigili de Kreutzenberg S, et al. Diabetes impairs stem cell and proangiogenic cell mobilization in humans[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(4):943-949.

[4] Manna P, Jain S K. Decreased hepatic phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) levels and impaired glu-

cose homeostasis in type 1 and type 2 diabetic rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(6):1363-1370.

[5] Hofbauer L C, Brueck C C, Singh S K, et al. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(9):1317-1328.

[6] Rakel A, Sheehy O, Rahme E, et al. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes[J]. *Diabetes Metab*, 2008, 34(3):193-205.

[7] Anafroglu I, Nar-Demirer A, Bascil-Tutuncu N, et al. Prevalence of osteoporosis and factors affecting bone mineral density among postmenopausal Turkish women with type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Complications*, 2009, 23(1):12-17.

[8] McNair P, Madsbad S, Christensen M S, et al. Bone mineral loss in insulin-treated diabetes mellitus: studies on pathogenesis[J]. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1979, 90(3):463-472.

[9] Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, et al. Advanced glycation endproducts stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(3):439-446.

[10] Kanabrocki E L, Hermida R C, Wright M, et al. Circadian variation of serum leptin in healthy and diabetic men[J]. *Chronobiol Int*, 2001, 18(2):273-283.

[11] Horcajada-Molteni M N, Chanteranne B, Lebecque P, et al. Amylin and bone metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(5):958-965.

[12] 金培峰,张浩,郑亮承,等.糖尿病大鼠来源骨髓间充质干细胞体外培养观察及其生物学特性[J].*温州医学院学报*, 2010, 40(1):1-5.

[13] Saito M. Diabetes mellitus and osteoporosis. Bone quality in diabetes[J]. *Clin Calcium*, 2012, 22(9):1323-1332.

[14] Charles I, Khalyfa A, Kumar D M, et al. Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(4):1330-1338.

[15] 孙慧环,刘福强,龚蕾,等.骨髓间充质干细胞对 INS-1 细胞凋亡的影响[J].*山东大学学报:医学版*, 2011, 49(5):6-10.

[16] 李良,李冬菊,吴江,等.骨髓间充质干细胞在去卵巢大鼠骨质疏松发病机理中潜在的作用[J].*生物医学工程学杂志*, 2006, 23(1):129-135.

[17] Abdallah B M, Kassem M. New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis[J]. *Bone*, 2012, 50(2):540-545.