

双磷酸盐对高糖环境下 BMSCs 自噬相关因子 Beclin1 和 LC3 II 影响的研究*

刘艳¹, 胡赞¹, 张夏¹, 丁俐丹¹, 唐世俊¹, 杨兰², 陈杨³, 郑雷蕾^{1,4,5△}

1. 重庆医科大学附属口腔医院(重庆 401145); 2. 重庆市荣昌区人民医院 口腔科(重庆 402460);
3. 重庆市九龙坡区中医院 口腔科(重庆 400080); 4. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室(重庆 401145);
5. 重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室(重庆 401145)

【摘要】 目的 研究双磷酸盐对高糖环境下骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)自噬相关因子 Beclin1 和微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) II 的影响。方法 BMSCs 体外分离与培养,进行成骨、成软骨及成脂三向分化诱导与鉴定,配置含浓度梯度 10^{-6} ~ 10^{-9} mmol/L 双磷酸盐的高糖(30 mmol/L)培养基,采用 CCK-8 检测 BMSCs 的增殖活性后选定用于实验的双磷酸盐浓度为 10^{-9} mmol/L。另取 BMSCs 分为 3 组:正常对照组(D-葡萄糖 5.6 mmol/L),高糖组(D-葡萄糖 30 mmol/L),高糖(D-葡萄糖 30 mmol/L)+双磷酸盐(10^{-9} mmol/L)组。用 real time-PCR 检测 3 组细胞 LC3 和 Beclin1 的基因表达,Western blot 检测 3 组细胞 LC3 II 和 Beclin1 蛋白的表达水平,透射电镜观察自噬体。结果 鉴定结果显示所得 BMSCs 具有成骨、成软骨及成脂分化能力。高糖组 LC3 和 Beclin1 mRNA、LC3 II 和 Beclin1 蛋白的表达较正常对照组增高($P < 0.01$),而高糖组+双磷酸盐组较高糖组低($P < 0.05$);透射电镜显示高糖组细胞中自噬体数量最多,高糖+双磷酸盐组其次,正常对照组最少。结论 高糖环境下 BMSCs 自噬水平升高,而双磷酸盐能下调高糖环境下 BMSCs 自噬相关因子 Beclin1 和 LC3 II 的表达。

【关键词】 自噬 双磷酸盐 糖尿病性骨质疏松

Effects of Bisphosphonates on Beclin1 and LC3 II Induced by High-glucose in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells LIU Yan¹, HU Yun¹, ZHANG Xia¹, DING Li-dan¹, TANG Shi-jun¹, YANG Lan², CHEN Yang³, ZHENG Lei-lei^{1,4,5△}. 1. Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401145, China; 2. Department of Stomatology, Chongqing Rongchang District People's Hospital, Chongqing 402460, China; 3. Department of Stomatology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiulongpo District, Chongqing 400080, China; 4. Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Science, Chongqing 401145, China; 5. Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing 401145, China

△ Corresponding author, E-mail: zheng_lei_lei@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of bisphosphonates on autophagy induced by high-glucose in rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs were isolated and cultured *in vitro*, identified by undergoing osteogenic/chondrogenic/adipogenic differentiation, the concentration of bisphosphonates was determined by CCK-8 method. The cells were cultured in normal glucose (5.6 mmol/L D-glucose), high glucose (30 mmol/L D-glucose), and high glucose with bisphosphonates (30 mmol/L D-glucose + 10^{-9} mmol/L bisphosphonates). At 48 h, mRNA expression levels of autophagy related genes Beclin1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) were detected by real-time PCR, protein expression levels of Beclin1 and LC3 II were detected by Western blot, and the autophagy body was observed by transmission electron microscopy (TEM). **Results** The results showed that BMSCs had the ability of osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. Compared with the control group and high glucose with bisphosphonates group, the mRNA expressions of Beclin1 and LC3 and protein expressions of Beclin1 and LC3 II in the high glucose group were

* 国家自然科学基金(No. 81470772)、重庆市医学科研项目(No. 20141013, No. 2015HBRC009)、重庆市自然科学基金(No. cstc2015jcyjA10028, No. cstc2016jcyjA0238)、2016 年重庆高校创新团队建设计划资助(No. CXTDG201602006)和重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室资助

△ 通信作者, E-mail: zheng_lei_lei@163.com

increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). TEM showed that the number of autophagy body in high glucose group was higher than that in normal group and high glucose with bisphosphonates group. **Conclusion** Bisphosphonates may play a role of down-regulating the expression of Beclin1 and LC3 II induced by high-glucose in BMSCs.

【Key words】 Autophagy Bisphosphonates Diabetic osteoporosis

糖尿病是一组以慢性血葡萄糖增高为特征、严重威胁人类健康的代谢性疾病。糖尿病性骨质疏松是在糖尿病的基础上并发的以单位体积骨量减少、骨脆性增加、骨折风险增高为特点的代谢性骨病,是糖尿病在骨骼系统的慢性并发症^[1-2]。临床研究发现双磷酸盐药物在治疗骨质疏松、增加骨质量和减少骨折方面具有显著疗效^[3-4],但对其作用机制尚无定论。自噬是细胞在进化的过程中形成的高度保守的自我保护机制,当细胞处于应激状态时起着维持内环境稳定和细胞活性的重要作用^[5]。自噬过程受一系列基因的调控,Beclin1 是自噬体形成过程中所必须的分子,调控自噬体的形成与成熟,微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)是目前研究细胞内自噬发生所使用的最广泛的分子标志物之一^[6]。LC3 参与了自噬体膜的形成,其蛋白包括两种可相互转化的形式,即 LC3 I 和 LC3 II。细胞内新合成的 LC3 蛋白经过加工,成为胞浆可溶形式的 LC3 I,后者经泛素化加工修饰,与自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合,成为膜结合形式的 LC3 II。因此,通过检测自噬相关因子 Beclin1 和 LC3 II 的表达,可以反映细胞内自噬水平发生的变化。自噬在骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖和成骨分化等生物学行为中的作用是近年关注的热点。因此,本研究拟分析双磷酸盐对高糖环境下 BMSCs 自噬作用的影响,为糖尿病骨病的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与主要试剂 4 周龄 SD 大鼠(购自重庆医科大学),雌雄不限,均按照重庆医科大学动物伦理委员会试验协议的要求处置。双磷酸盐药物(商品名福善美,杭州默沙东制药有限公司,中国),胎牛血清(FBS)(Natocor,阿根廷)、DMEM/F12(Hyclone,美国)、抗坏血酸(Sigma,美国)、 β -甘油磷酸钠、地塞米松、葡萄糖、兔抗大鼠 Beclin1 抗体,兔抗大鼠 LC3 II、LC3 I 抗体(Immunoway,美国)、辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔二抗(Signalway,美国)、Trizol Reagent(Invitrogen,美

国)、RT-PCR 试剂盒(Promega,美国)。

1.1.2 BMSCs 的体外培养 将 4 周龄 SD 大鼠脱颈处死,750 mL/L 乙醇中浸泡 3 min 后,于超净工作台内取出胫骨及股骨,去除附着的肌肉组织,暴露骨髓腔。10 mL 注射器吸取不含血清 4 °C 培养基进行反复冲洗骨髓腔。密度梯度离心(Percoll 分离液)法将 BMSCs 从骨髓血液中分离出来,贴壁培养 BMSCs。BMSCs 于 DMEM/F12 培养基中(含 D-葡萄糖 5.6 mmol/L 和体积分数 10% 的 FBS)、37 °C、体积分数 5% CO₂ 贴壁培养,以质量分数 0.25% 胰酶消化,1:3 传代,将第 3 代细胞作为实验细胞。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的成脂、成骨、成软骨诱导与鉴定
成骨诱导与鉴定:按 1×10^5 /孔接种 BMSCs 于 6 孔板中,细胞融合后(约 80% 左右)换成骨诱导液(DMEM/F12 培养基中含 10^{-7} mol/L 地塞米松、50 μ g/mL 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠以及 10% FBS),每 2 d 换液,培养 21 d 后进行常规茜素红染色。

成软骨诱导与鉴定:BMSCs 接种方式同前,更换成软骨诱导液,每 2 d 换液,14 d 后进行常规阿利新蓝染色。

成脂诱导与鉴定:BMSCs 接种方式同前,成脂诱导液培养,每 2 d 换液,14 d 后进行常规油红 O 染色。

1.2.2 CCK-8 法检测双磷酸盐对高糖环境下 BMSCs 增殖的影响 将第 3 代 BMSCs 以 5×10^3 /孔的密度植于 96 孔板,各孔加入含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液 100 μ L,以双磷酸盐浓度梯度 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ mmol/L 分别培养,并设对照组(不加双磷酸盐),每组 4 个复孔,于次日更换含药培养基,对照组更换高糖培养基(30 mmol/L),分别于加药后 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h 行 CCK-8 检测,每孔加入 10 μ L CCK-8 液,37 °C 继续孵育 3 h 后终止培养,在酶免疫检测仪器上进行各孔 450 nm 处吸光度值(A₄₅₀值)的测定,取各组平均值,以时间为横轴,光吸收值为纵轴进行生长曲线图的绘制,以反映不同组的细胞增殖情况。选择对细胞增殖活性影响最小的双磷酸盐浓度进行后续实验。

1.2.3 实验细胞分组 第 3 代 BMSCs 生长至 70%~80% 融合后,胰酶消化,随机分 3 组:①正常对照组(D-葡萄糖 5.6 mmol/L);②高糖组(D-葡萄糖 30 mmol/L);③高糖(D-葡萄糖 30 mmol/L)+双磷酸盐组(根据 1.2.2 步骤选定 10^{-9} mmol/L)。细胞接种于 6 孔板中, 2×10^5 /孔,用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基培养 24 h 细胞贴壁后,再换用正常对照组、高糖组和高糖+双磷酸盐组培养基分别培养各组细胞,48 h 后收集细胞进行相关检测。

1.2.4 Real time-PCR 法检测 BMSCs 中 LC3、Beclin1 mRNA 表达 根据 NCBI 中大鼠 LC3、Beclin1 及 β -actin 基因序列设计引物序列,均由金斯瑞生物科技有限公司进行引物合成及质量检测。Beclin1 上游引物序列:5'-GGACAATTTGGCAGCATCAATA-3',下游引物序列:5'-CTGTCAGGGA CTCCAGATACGAG-3'(扩增产物长度 193 bp); LC3 上游引物序列:5'-GGTGATCATCGAGCGC TACA-3',下游引物序列:5'-TGAGGGGCAAGA TGGGTAGA-3'(扩增产物长度 569 bp);内参 β -actin 上游引物序列:5'-CCC GCGAGTACAACCT TCTTG-3',下游引物序列:5'-GTCATCCATGG CGAACTGGTG-3'(扩增产物长度 71 bp)。TRIzol 法提取细胞的总 RNA,紫外线分光光度计测定 RNA 浓度,各样本取总 RNA 2.5 μ g,按照 Promega 反转录试剂盒操作说明书进行反转录获得稳定 cDNA。以 cDNA 为模板,采用 SYBR Green 法实时荧光定量检测 PCR。实验重复 3 次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达量。

1.2.5 Western blot 法检测 BMSCs 中自噬标志物 LC3 和 Beclin1 蛋白表达 常规收集 3 组细胞, RIPA 裂解液提取细胞总蛋白后,BCA 法测定细胞总蛋白浓度。提取 20~40 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。孵育一抗,加入 LC3 II 和 LC3 I 抗体(均为 1:1 000),Beclin1 抗体(1:500),以及内参 β -actin 抗体(1:500) 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动孵育过夜。一抗孵育结束后, TBST 漂洗 3 次,二抗(1:1 000)室温孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次。辣根过氧化物酶标记 ECL 发光法显色、成像。全自动凝胶成像仪进行图像采集,采用 Quantity One 分析,以条带灰度与内参条带灰度的比值表示目的蛋白的相对表达量,再计算 LC3 II/LC3 I 的相对表达量的比值来评价 LC3 II 的表达水平。按相同实验条件重复 3 次。

1.2.6 透射电镜观察 BMSCs 中的自噬体 使用

4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 清洗各组细胞,收集细胞后立即用体积分数为 2% 戊二醛溶液 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h,1% 锇酸固定 1 h,体积分数 70%~100% 丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋,切片、染色,透射电镜下观察细胞。各组标本在相同放大倍数下随机观察 10 个细胞进行自噬体计数。

1.2.7 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的细胞形态

培养的第 3 代 BMSCs 细胞形态呈梭形,增殖旺盛,形态均匀良好,符合实验要求。见图 1。

2.2 BMSCs 成骨、成软骨及成脂分化能力的鉴定

BMSCs 在成骨诱导 21 d 后进行茜素红染色可见到明显的钙结节(图 2A);在成软骨诱导 14 d 后阿利新蓝染色可见到蓝色胞浆(图 2B);在成脂诱导 14 d 后油红 O 染色可见到红色脂滴(图 2C)。

2.3 不同浓度双磷酸盐对高糖环境下 BMSCs 增殖能力的影响

与对照组相比,因双磷酸盐药物对细胞的毒性作用,故加药组细胞增殖活性相对较弱,双磷酸盐浓度梯度范围为 10^{-6} ~ 10^{-9} mmol/L 时,随着药物浓度的降低,细胞增殖逐渐增加且呈时间依赖性,因 10^{-9} mmol/L 药物浓度对细胞增殖活性影响最小,与其他加药组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),故将此浓度作为后续实验组药物浓度(图 3)。确定 10^{-9} mmol/L 浓度药物后,发现此浓度在 48 h 时开始与其他加药组之间的差异有统计学意义,此时药物对细胞毒性作用时间最短,细胞活性最好,适用于后期的检测,故选择此时间节点行后续实验。

2.4 双磷酸盐对高糖环境下 BMSCs 自噬相关因子 LC3 和 Beclin1 的影响

与正常对照组相比,高糖组培养 48 h 后 LC3 和 Beclin1 mRNA 表达增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);高糖+双磷酸盐组与高糖组相比,LC3 和 Beclin1 mRNA 表达量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 4)。LC3 II 蛋白表达水平(LC3 II/LC3 I)和 Beclin1 蛋白变化的趋势与 mRNA 一致(图 5)。

2.5 透射电子显微镜结果

透射电镜结果(图 6)示:自噬溶酶体为单层膜结构,含有降解不同阶段的胞浆成分,降解物质电解密度会增加,形成黑色颗粒状或不定形的聚集。与正常对照组相比,高糖组细胞自噬体形成的数量明

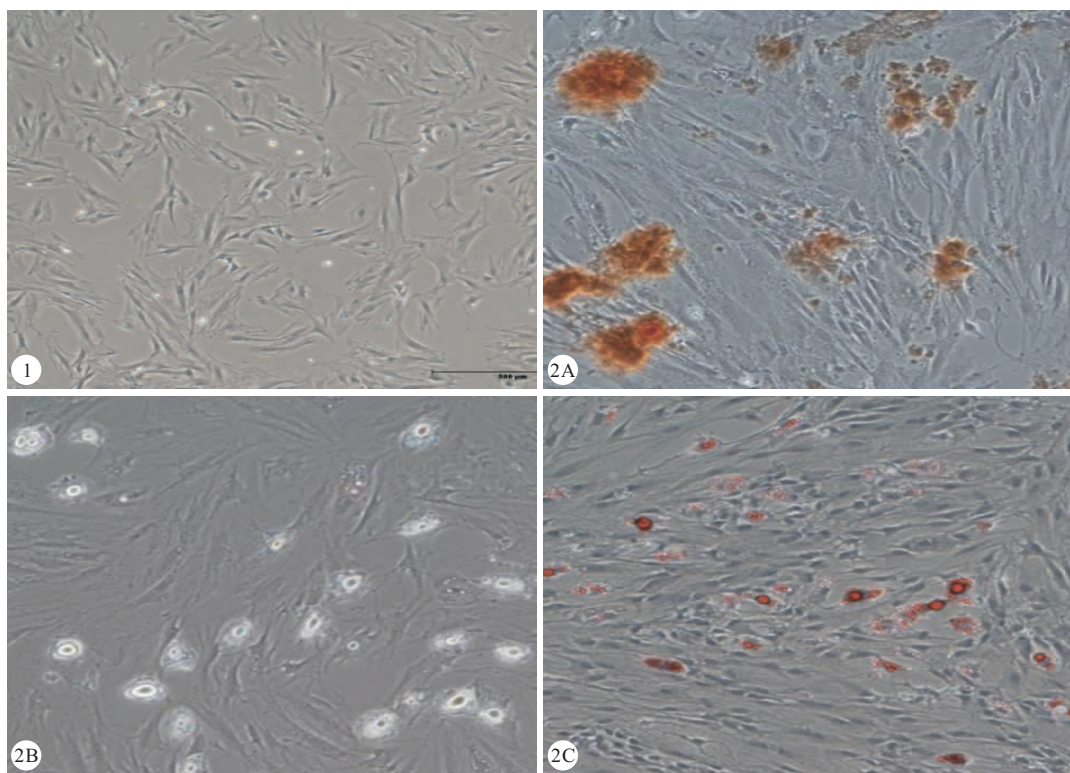


图 1 第 3 代 BMSCs. ×40

图 2 BMSCs 成骨诱导 21 d(A, 茜素红染色 ×100), 成软骨诱导 14 d(B, 阿利新蓝染色 ×100) 及成脂诱导 14 d(C, 油红 O 染色 ×100)

Fig 1 Image of the third generation of BMSCs. ×40

Fig 2 BMSCs osteogenesis induced at the 21st day (A, Alizarin red staining ×100), chondrogenic induced at the 14th day (B, Alcian blue staining ×100) and adipogenic induced at the 14th day (C, Red Oil O staining ×100)

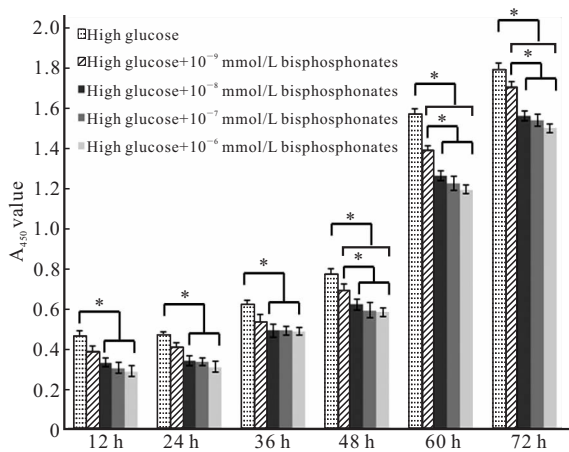


图 3 高糖环境下不同双磷酸盐浓度的细胞增殖活性

Fig 3 Cell viability of BMSCs assessed by CCK-8 assay in high glucose with different concentrations of bisphosphonates medium

* P<0.05

显著增多且可见大量空泡状结构;与高糖组相比,高糖+双磷酸盐组细胞自噬体形成数量明显减少。

3 讨论

糖尿病患者长期高血糖、存在微血管并发症等

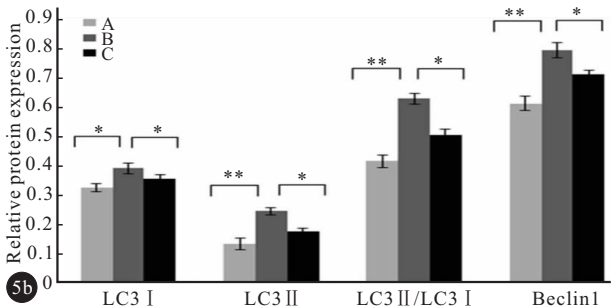
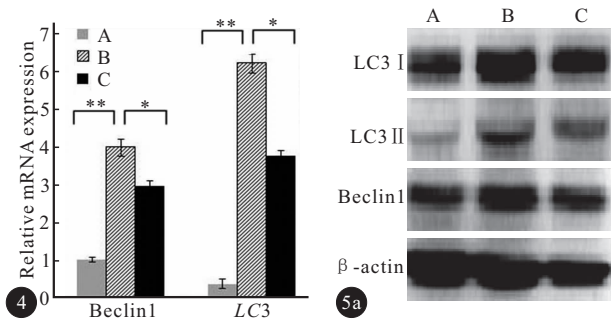


图 4 LC3 和 Beclin1 的 mRNA 表达

图 5 LC3 和 Beclin1 的蛋白表达

Fig 4 Expressions of LC3 and Beclin1 mRNAs

Fig 5

Expressions of LC3 and Beclin1 proteins

A: Normal glucose group; B: High glucose group; C: High glucose + 10⁻⁹ mmol/L bisphosphonates group; 5a: Electrophoregram; 5b: Chart. * P<0.05; ** P<0.01

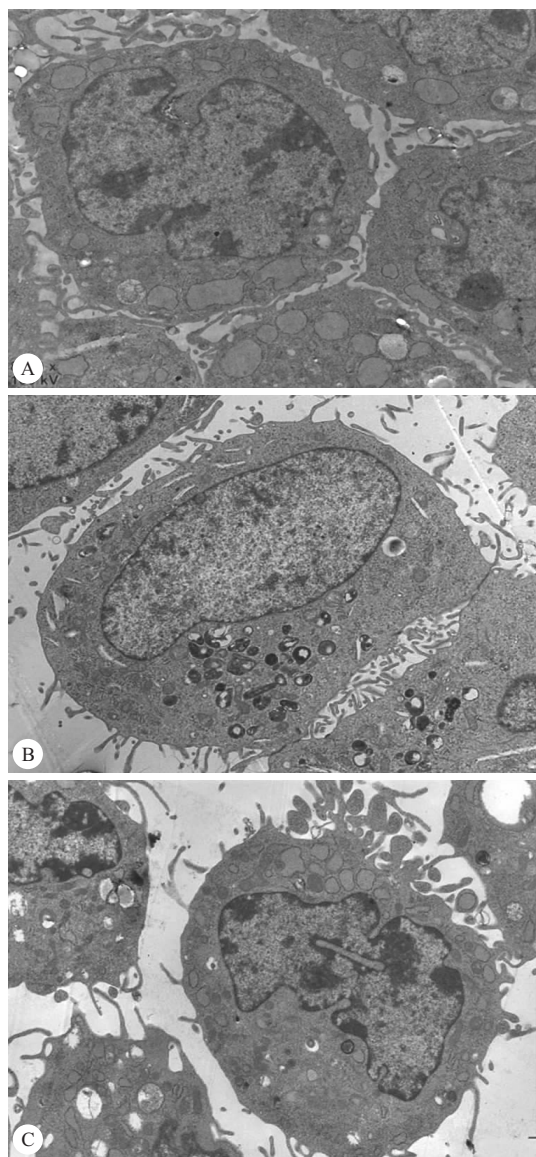


图 6 各组细胞自噬体形成情况

Fig 6 Transmission electron microscopy showed that the number of autophagy body in each group

A: Normal glucose group ($\times 8\ 000$); B: High glucose group ($\times 6\ 000$); C: High glucose with bisphosphonates group ($\times 8\ 000$)

因素影响骨密度而容易发生骨质疏松症。研究发现糖尿病大鼠在骨量和骨密度方面都低于正常大鼠^[7]。而高血糖环境通过渗透性利尿,使钙磷排泄增加,或调控体内激素分泌和氧化应激等方式,使成骨细胞的骨形成功能与破骨细胞的骨吸收功能的平衡被打破,是糖尿病性骨病发病的可能机制^[8]。研究发现,在一定的糖浓度范围内,随着糖浓度的升高,可一定程度促进颌骨骨髓间充质干细胞的增殖活性,然而糖浓度升高对成骨分化却呈抑制效应^[9],可能是通过调节 Runt 相关转录因子 2 (Runt-

related transcription factor 2, Runx2) 对磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinases, PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (protein kinase B, PKB, Akt)/糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β)/ β -catenin 信号通路实现^[10]。

在对糖尿病性骨质疏松发病机制的深入研究中,自噬吸引了众多研究学者的广泛关注。自噬与细胞增殖和凋亡等发生过程及稳态维持有密切关系,是生命进化过程中的高度保守的细胞行为之一,其主要参与细胞内大分子物质循环和再利用、受损细胞器清除降解等过程,在维持细胞内环境的自我稳态及促进细胞生存方面发挥着重要作用。自噬现象贯穿于骨组织及各类骨细胞发育成熟全过程,在骨类疾病中也能发现自噬现象。而通过调节自噬影响并改变骨组织的稳态结构,改善骨类疾病病程,也已成为目前的研究热点^[11]。最近, WANG 等^[12]报道高糖可通过活性氧 (reactive oxygen species, ROS)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (protein kinase B, PKB, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号轴诱导 MC3T3-E1 成骨细胞自噬和凋亡,降低细胞增殖; XUE 等^[13]报道了利用地塞米松诱导软骨细胞的衰老的同时激活软骨细胞中的自噬活性,提出自噬在这过程中对细胞的衰老可能具有代偿性保护作用。王超炜等^[14]报道了自噬与骨代谢疾病密切相关,自噬参与的骨代谢失衡也是各种骨疾病的根源。然而,自噬在糖尿病性骨质疏松的发生发展中的重要作用仍需进一步的研究,基于此,本研究以 BMSCs 为实验对象,在体外培养予以高糖刺激模拟糖尿病状态,通过 real time-PCR、Western blot 及透射电镜检测观察到高糖组 BMSCs 中的自噬相关因子 Beclin1 和 LC3 II 表达增加,细胞的自噬体产生增多,表明高糖环境可以促进骨髓间充质干细胞自噬功能增强,提示糖尿病性骨质疏松可能与骨髓间充质干细胞的自噬失衡相关。

双磷酸盐是人工合成的一类焦磷酸盐类似物,它对钙和骨骼矿物质具有极强的亲和性,可以抑制羟磷灰石结晶及其总体物质的形成、生长和溶解^[15],作为新型骨吸收抑制剂,双磷酸盐药物在治疗骨质疏松、增加骨质量和减少骨折发生率等方面卓有成效。本研究用双磷酸盐对高糖处理的细胞进行干预,结果发现双磷酸盐有效降低了高糖环境下的 BMSCs 自噬体数量及相关基因 Beclin1 和自噬标志性分子 LC3 II 的表达水平,提示双磷酸盐对高

糖诱导的骨髓间充质干细胞自噬表达具有明显的抑制作用,其可能机制是抑制其细胞内的自噬活性。

文中要补充说明的是, SDS-PAGE 电泳中, LC3 I 的表观分子质量是 18 kDa, LC3 II 的表观分子质量是 16 kDa, 尽管 PE 偶联形式的 LC3 II 的分子质量较 LC3 I 大, 但是其有强疏水性, 因此在 SDS-PAGE 中电泳迁移率反而比 LC3 I (非 PE 偶联的 LC3) 大, 故可以通过计算 LC3 II / I 的比值来评价 LC3 II 的水平, 并推测自噬囊泡数量的多少^[16]。LC3 I 和 LC3 II 都是相同的 LC3 基因编码, 故在 real time-PCR 检测中不区分两种形式, 仅显示 LC3 基因的结果。

综上所述, 本研究证实了 BMSCs 在高糖环境下自噬活性会增强, 而双磷酸盐对高糖诱导的 BMSCs 自噬的表达有抑制作用, 这提示自噬在高糖诱导的细胞损伤中有重要作用, 也提示双磷酸盐对自噬活性的影响在糖尿病性骨质疏松有研究价值, 然而这只是一个简单的探索, 其具体分子机制还有待确定, 需要进行更多的基础研究进行深入的探究。

参 考 文 献

[1] 李晓宇, 冯正平. 糖尿病性骨质疏松发病机制的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 580-583.

[2] SEALAND R, RAZAVI C, ADLER RA. Diabetes mellitus and osteoporosis. *Curr Diab Rep*, 2013, 13(3): 411-418.

[3] EASTELL R, WALSH JS, WATTS NB, *et al.* Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Bone*, 2011, 49(1): 82-88.

[4] TELLA SH, GALLAGHER JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 142: 155-170 [2018-01-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176761/PMC4187361>. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.09.008.

[5] PARZYCH KR, KLIONSKY DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460-473.

[6] GLICK D, BARTH S, MACLEOD KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 2010, 221(1): 3-12.

[7] 杨 兰, 郑雷蕾, 陈 杨, 等. 基于 micro-CT 的 2 型糖尿病大鼠骨骼特点的研究. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(5): 727-731.

[8] HAMANN C, KIRSCHNER S, GUNTHER KP, *et al.* Bone, sweet bone-osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(5): 297-305.

[9] 陈 杨, 胡 赟, 杨 兰, 等. 不同糖浓度对颌骨骨髓间充质干细胞成骨分化的影响. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(5): 679-684.

[10] CHEN Y, HU Y, YANG L, *et al.* Runx2 alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation via PI3K/AKT/GSK3beta/beta-catenin pathway. *Cell Biol Int*, 2017, 41(8): 822-832.

[11] 杨 戈, 林达生, 练克俭. 自噬与骨组织细胞及骨类疾病. *国际骨科学杂志*, 2014, 35(3): 181-183.

[12] WANG X, FENG Z, LI J, *et al.* High glucose induces autophagy of MC3T3-E1 cells via ROS-AKT-mTOR axis. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 429: 62-72 [2018-01-16]. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.03.036>.

[13] XUE E, ZHANG Y, SONG B, *et al.* Effect of autophagy induced by dexamethasone on senescence in chondrocytes. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3037-3044.

[14] 王超炜, 周 益, 王慧明. 骨相关细胞的自噬及其在口腔种植中的作用. *口腔医学*, 2016, 36(5): 458-461.

[15] SAHNI M, GUENTHER HL, FLEISCH H, *et al.* Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest*, 1993, 91(5): 2004-2011.

[16] 朱 琪, 林 芳. 自噬的分子标志物. *药学报*, 2016, 51(1): 33-38.

(2018-03-24 收稿, 2018-05-27 修回)

编辑 吕 熙