二甲双胍通过上调BMP-2/IGF-1表达调控糖尿病大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的机制研究

王 瑒,郭 莉,柯瑞琼,刘登科,吴 丹
(赣南医科大学第一附属医院内分泌科,江西 赣州 341000)

摘 要:目的:探讨不同剂量二甲双胍对糖尿病大鼠骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)体外成骨分化的影响及其分子机制。**方法:**采用链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ)(40 mg/kg)诱导构建糖尿病雄性Wistar大鼠模型,分离并培养其BMSCs,取第3代细胞进行实验。将细胞随机分为3组:对照组(不加二甲双胍)、低剂量组(10 μmol/L二甲双胍)和高剂量组(100 μmol/L二甲双胍),均在成骨诱导液条件下培养。分别于诱导分化第7天、第14天检测细胞碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,ALP)活性,进行茜素红染色观察钙化结节形成,并采用蛋白免疫印迹法检测成骨相关蛋白骨形态发生蛋白2(Bone morphogenetic protein-2,BMP-2)和胰岛素样生长因子1(Insulin-like growth factor-1,IGF-1)的表达水平。**结果:**诱导分化第7天和第14天,与对照组比较,低、高剂量组ALP活性升高以及钙化结节形成增加,且高剂量组高于低剂量组。与对照组比较,低、高剂量组BMP-2和IGF-1蛋白表达升高($P<0.05$);且高剂量组BMP-2、IGF-1蛋白表达水平高于低剂量组($P<0.05$)。**结论:**二甲双胍可剂量依赖性增强糖尿病大鼠BMSCs的成骨分化能力,其机制可能与上调BMP-2和IGF-1蛋白表达有关。

关键词:二甲双胍;糖尿病;骨髓间充质干细胞;成骨分化
中图分类号:R587.1 **文献标志码:**A **文章编号:**2097-7174(2026)09-0795-05
DOI:10.3969/j.issn.2097-7174.2026.09.001

Study on the mechanism of metformin regulating osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in diabetic rats by up-regulating BMP-2/IGF-1 expression

WANG Yang, GUO Li, KE Ruiqiong, LIU Dengke, WU Dan
(Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract: Objective: To investigate the effects of different concentrations of metformin on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in diabetic rats *in vitro* and its molecular mechanism. **Methods:** Diabetic male Wistar rat models were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 40 mg/kg). BMSCs were isolated, cultured, and the third-generation cells were used for the experiments. The cells were randomly divided into three groups: control group (without metformin), low-dose group (10 μmol/L metformin), and high-dose group (100 μmol/L metformin). All groups were cultured in osteogenic induction medium. The alkaline phosphatase (ALP) activity of the cells was detected on the 7th and 14th days of induction differentiation, and alizarin red staining was used to observe the formation of calcified nodules. The expression levels of osteogenic-related proteins bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) were also detected by protein immunoblotting. **Results:** On the 7th and 14th days of induction differentiation, compared with the control group, the ALP activity and the formation of calcified nodules increased in the low-dose and high-dose metformin groups, and the high-dose group was superior to the low-dose group. Compared with the control group, both low-dose and high-dose groups showed increased protein expression

基金项目:江西省卫生健康委员会科技计划项目(202210952)
作者简介:王瑒,女,硕士,副主任医师,研究方向:骨代谢疾病基础与临床。E-mail:55521360@qq.com
通信作者:郭莉,女,硕士,副主任医师,研究方向:骨质疏松和骨代谢疾病。E-mail:727608895@qq.com

levels of BMP-2 and IGF-1($P<0.05$), with the high-dose group exhibiting higher protein expression levels of BMP-2 and IGF-1 than the low-dose group($P<0.05$). **Conclusion**: Metformin can dose-dependably enhance the osteogenic differentiation ability of BMSCs in diabetic rats, and the mechanism may be related to the upregulation of BMP-2 and IGF-1 protein expressions.

Key words: Metformin; Diabetes mellitus; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation

随着生活方式的改变以及人口老龄化的加剧，糖尿病的发病率逐年上升，对多系统功能造成显著影响[1]。近年来研究发现，高糖环境下骨髓间充质干细胞（Bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）的成骨分化能力显著下降，表现为碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase，ALP）活性降低、成骨相关基因如Ⅰ型胶原（Collagen type Ⅰ，COL-1）和骨钙素（Osteocalcin，OCN）表达下降，细胞矿化能力减弱[2]。二甲双胍是经典的一线降糖药物，不仅能够改善胰岛素抵抗，还具有抗炎、抗氧化及代谢调节作用[3]，其对BMSCs成骨分化的促进作用备受关注[4]。有研究[5]表明，二甲双胍可以提高ALP活性，促进成骨相关基因的表达，增强矿化能力。然而，其具体的分子作用机制尚未明确。骨形态发生蛋白（Bone morphogenetic proteins，BMPs）家族中的BMP-2在成骨分化中具有重要调节作用，可通过调控SMAD信号通路促进骨基质形成[6]。此外，胰岛素样生长因子1（Insulin-like growth factor-1，IGF-1）不仅促进骨细胞分化和矿化，还通过抑制胶原酶活性减少骨基质的降解[7]。但高糖环境下诱导的氧化应激和晚期糖基化终末产物积累，导致BMSCs成骨分化能力显著下降，BMP-2和IGF-1的表达及信号转导均受到抑制[8]，而二甲双胍是否通过这些信号通路和因子调控成骨分化尚不清楚。因此，本研究以糖尿病大鼠为模型，分离培养其BMSCs，探讨二甲双胍对糖尿病大鼠BMSCs成骨分化的影响及BMP-2/IGF-1介导的分子机制，为糖尿病合并骨质疏松症的临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物 仪器：超低温冷冻离心机（Eppendorf 5424R）、倒置显微镜（Olympus CKX53）、酶标仪（Thermo Fisher Multiskan FC）、全自动PCR仪（ABI 7500）、电泳系统（Bio-Rad）、化学发光成像系统（ChemiDoc MP）。

试剂：二甲双胍购自Sigma-Aldrich公司，处理浓度为10 μmol/L和100 μmol/L。ALP检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号：A059-1-1）。成骨细胞矿化结节染色试剂盒（茜素红S法，Beyotime公司，货号：C0148S）。氯化十六烷吡啶（Cetylpyridinium chloride，CPC）洗脱液（Sigma-Aldrich公司，货号：C0732）。Western blot相关试剂（RIPA裂解液、BCA蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE胶试剂等）购自Beyotime公司。BMP-2抗体、IGF-1抗体及内参GAPDH抗体（Cell Signaling Technology公司，货号分别为：HYP86447、104116-T08、2118）。二抗山羊抗小鼠IgG（美国Bioss公司，货号：bs-0296G）。α-MEM培养基、胎牛血清（Fetal bovine serum，FBS）、胰酶（货号：25300054）购自Gibco公司。

1.2 实验细胞获取 实验动物与模型构建：健康雄性Wistar大鼠6只，8 w龄，体质量（204.79±9.21）g，购自江苏华创信诺医药科技有限公司，给予高脂高糖饲料喂养4 w后腹腔注射40 mg/kg链脲佐菌素（Streptozocin，STZ）构建糖尿病大鼠模型，注射STZ后72 h开始检测大鼠空腹血糖，间隔24 h复测1次，连续2次空腹血糖≥11.1 mmol/L者判定建模成功[9]。采用全骨髓贴壁法分离与培养BMSCs[10]：在无菌环境中，选取建模合格的大鼠，分离其双侧股骨和胫骨，剔除附着的软组织并剪破骨末端，使骨髓腔充分暴露，采用含10% FBS的α-MEM完全培养液，多次冲洗骨髓腔收集骨髓细胞悬液。将收集到的悬液，以1 000 r/min离心5 min，丢弃上清液后，α-MEM完全培养液重悬沉淀细胞，随后接种至T25培养瓶。将培养瓶置于37 ℃、5% CO_2培养箱内进行培养。24 h后更换培养液以移除未贴壁的细胞。之后每2～3 d更换1次培养液，其间通过倒置相差显微镜观察细胞增殖情况及生长状态。当细胞融合率达到80%～90%时实施传代操作，最终选取第3代细胞用于后续相关实验。

1.3 实验分组与处理 将第3代生长状态良好的BMSCs，按1×10^4/孔接种至铺有盖玻片的6孔板，待细胞长满孔底的80%～90%，弃去原有培养基，所有组别均加入成骨诱导液（含有10 mmol/L β-磷酸甘油钠、100 nmol/L地塞米松、50 μg/mL维生素C、10% FBS的α-MEM培养基）培养，并随机分为对照组、低剂量组和高剂量组3组（每组3～6孔）。分组

处理如下[4,11]:对照组:成骨诱导液中另外加入与处理组等体积的PBS;低剂量组:成骨诱导液中另外加入10 μmol/L二甲双胍;高剂量组:成骨诱导液中另外加入100 μmol/L二甲双胍。于诱导分化的第7天与第14天,分别收集细胞样本及对应的培养上清液用于后续实验。实验独立重复3次。

1.4 BMSCs成骨分化能力检测

1.4.1 碱性磷酸酶活性检测与染色 在诱导分化第7天、第14天分别执行ALP染色。细胞样本先后经过PBS清洗和多聚甲醛固定处理。染色步骤遵循南京建成生物工程研究所生产的碱性磷酸酶显色试剂盒说明,孵育30 min后,通过显微镜拍摄获取图像结果。于酶标仪520 nm波长处测定(Optical density,OD),根据标准曲线计算ALP活性。

1.4.2 茜素红染色 细胞成骨诱导分化至第7天、第14天时,吸去培养基,PBS轻柔清洗细胞3次。每孔加入4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS再次清洗3次。加入0.2%茜素红S染色液,均匀覆盖细胞,室温避光孵育30 min,用PBS轻柔洗去未结合染料,在显微镜下观察并拍照。

为量化钙化结节,加入CPC洗脱液洗脱染料后取上清液,取200 μL上清液转移至96孔板,于562 nm波长下采用酶标仪测定其OD值,以OD值表示钙化结节形成量。每组设3个复孔,实验独立重复3次。

1.5 Western blot检测蛋白表达水平

于诱导分化第14天,收集各组BMSCs,PBS清洗2次。每孔加入含1% PMSF的RIPA裂解液100 μL,冰上裂解30 min,4 ℃、12 000 r/min离心15 min,取上清。BCA定量调整蛋白浓度一致,加入缓冲液后沸水浴变性。取20 μg蛋白样品进行SDS-PAGE电泳(5%浓缩胶,10%分离胶),浓缩胶恒压90 V电泳约30 min,分离胶恒压120 V电泳约60 min。采用湿转法,恒流300 mA、4 ℃转膜90 min,将蛋白转移至PVDF膜。转膜后,5%脱脂奶粉(溶于TBST)室温封闭2 h。分别加入一抗:兔抗大鼠BMP-2抗体(1∶500)、兔抗大鼠IGF-1抗体(1∶500)、兔抗大鼠GAPDH抗体(1∶10 000),4 ℃孵育过夜。次日,TBST洗膜3次,每次10 min。加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1∶5 000),室温孵育1 h。TBST洗膜3次,每次10 min。滴加ECL化学发光液,在化学发光成像系统中显影,采集图像。使用Image J软件分析各条带灰度值,以目的蛋白灰度值与对应内参GAPDH灰度值的比值表示相对表达水平。实验独立重复3次。

1.6 统计学处理

使用SPSS 22.0软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料采用$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用LSD-t检验进行事后两两比较。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 诱导分化第7天、14天时ALP活性

与对照组相比,低、高剂量组在诱导分化第7天和第14天的ALP活性均升高,差异有统计学意义(P<0.05);且高剂量组ALP活性高于同时间点低剂量组,差异有统计学意义(P<0.05)。各组ALP活性随时间延长均有所增加。见图1和表1。

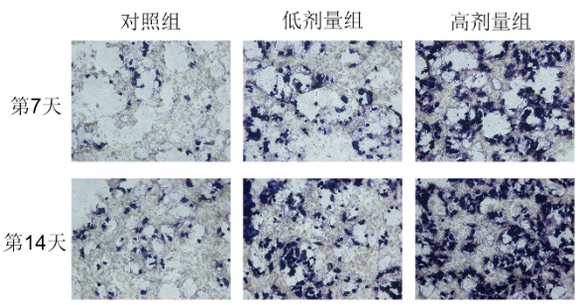


图1 各组BMSCs ALP活性(200×)

表1 各组BMSCs ALP活性比较(U/mg,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	BMSCs ALP活性	
		第7天	第14天
对照组	3	6.90±0.52	7.50±0.68
低剂量组	3	12.56±1.02①	15.68±1.15①
高剂量组	3	18.35±1.26①②	22.47±1.38①②
F		42.581	38.653
P		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,①P<0.05;与低剂量组比较,②P<0.05。

2.2 钙化结节形成情况

茜素红染色结果显示,与对照组相比,低、高剂量组在诱导分化第7天和第14天的钙化结节形成量均增加,差异有统计学意义(P<0.05);高剂量组钙化结节形成量高于同时间点低剂量组,差异有统计学意义(P<0.05)。见图2和表2。

2.3 BMP-2和IGF-1蛋白的表达

Western blot结果显示,与对照组比较,低、高剂量组BMP-2、IGF-1蛋白表达升高(P<0.05);与低剂量组比较,高剂量组BMP-2、IGF-1蛋白表达更高(P<0.05)。见图3。

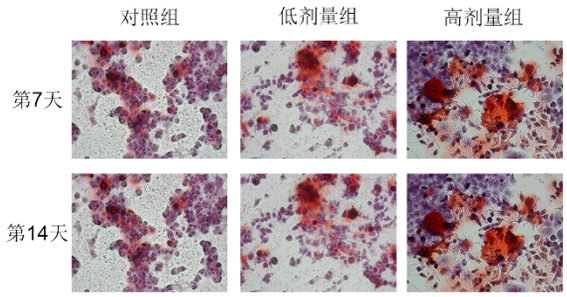
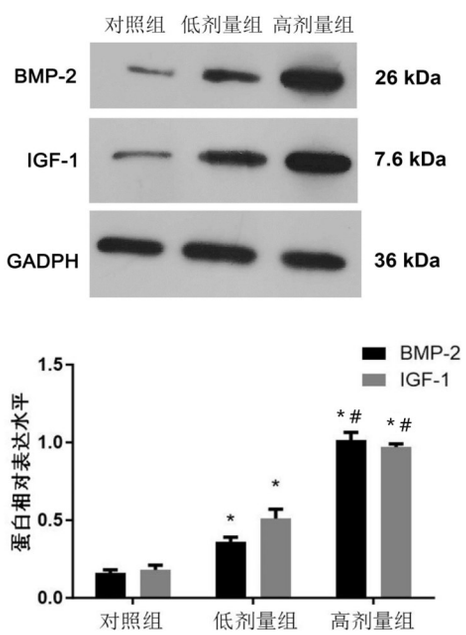


图2 各组BMSCs茜素红染色(200×)

表2 各组BMSCs钙化结节形成量($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BMSCs钙化结节形成量(OD值)	
		第7天	第14天
对照组	3	0.23±0.02	0.35±0.03
低剂量组	3	0.45±0.04①	0.62±0.05①
高剂量组	3	0.68±0.05①②	0.95±0.07①②
F		51.263	45.895
P		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,①P<0.05;与低剂量组比较,②P<0.05。



与对照组比较,*P<0.05;与低剂量组比较,#P<0.05。

图3 BMSCs细胞BMP-2、IGF-1蛋白表达

3 讨论

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病,可引发多种并发症,也会影响骨代谢[12]。BMSCs具有多向分化潜能,定向诱导其向成骨细胞分化对于研究骨质疏松症等疾病的发病机制以及骨组织工程的应用具有极其重要的理论和实践意义。既往研究[13-14]已表明二甲双胍在正常代谢背景下具有促成骨作用,本研究表明,二甲双胍能够增强糖尿病大鼠来源BMSCs的成骨分化能力,表现为ALP活性升高及矿化结节形成增加,而且这种促成骨作用具有剂量依赖性,高剂量组(100 μmol/L)作用强于低剂量组(10 μmol/L)。

BMP-2是成骨分化的核心诱导因子,可直接结合细胞膜上的丝氨酸/苏氨酸激酶受体,激活SMAD1/5/8信号通路,促进成骨基质蛋白的合成与分泌,进而推动BMSCs向成骨细胞分化[15-16];既往研究显示,在BMSCs分化为成骨细胞的过程中,上调的BMP-2能促进BMSCs的成骨分化[17]。吴铭等[18]研究显示,BMP-2还可以促进基质矿化和矿化结节形成,这与本研究中矿化结节增加的结果一致。IGF-1则可通过激活磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路,促进成骨细胞的增殖与矿化,同时抑制骨基质的降解,维持骨代谢平衡。同时有研究[19]表明,二甲双胍治疗可以提高糖尿病合并骨质疏松症患者血清中IGF-1水平,改善机体骨代谢。但在糖尿病高糖环境中,氧化应激和炎症反应增强,可能抑制BMP-2和IGF-1的表达及信号转导,导致BMSCs成骨分化障碍。本研究证实,二甲双胍能通过上调BMP-2和IGF-1蛋白的表达,促进糖尿病大鼠来源BMSCs的成骨分化,提示二甲双胍可能可以通过直接或间接机制拮抗高糖环境对这2个因子的抑制作用,增强BMSCs的成骨分化能力,为二甲双胍在糖尿病合并骨质疏松症治疗中的应用提供了新的细胞学依据。

综上所述,二甲双胍可剂量依赖性增强糖尿病大鼠BMSCs的成骨分化能力,其机制可能与上调BMP-2和IGF-1蛋白表达有关。然而本研究也存在一定局限性:(1)本研究仅检测了BMP-2和IGF-1两个关键蛋白,未系统考察下游信号通路的活化状态,也未涉及更广泛的成骨相关信号网络及表观遗传调控机制;(2)本研究为体外细胞实验,二甲双胍在体内复杂微环境中的实际作用效果及安全性尚需通过动物体内实验进一步验证。

所有作者均声明不存在利益冲突关系。

参考文献:

[1] 程妍,张守伟,李宜国. 基于OPG/RANKL信号通路探讨黄精多糖对糖尿病大鼠骨质疏松骨代谢的影响[J]. 中国老年学杂志,2023,43(16):4029-4033.

[2] 罗文豪，冯乐，黄海霞，等. 高糖微环境下糖原合酶激酶3β抑制剂Tideglusib干预大鼠骨髓间充质干细胞的增殖及成骨分化[J]. 中国组织工程研究，2023，27(19)：2968-2974.

[3] Maruthur N M，Tseng E，Hutfless S，et al. Diabetes medications as monotherapy or metformin-based combination therapy for type 2 diabetes：a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Intern Med，2016，164(11)：740-751.

[4] 吴世卫，陈瑜，马晓军，等. 二甲双胍调控糖尿病大鼠骨髓间充质干细胞的增殖和分化[J]. 基因组学与应用生物学，2020，39(2)：909-913.

[5] 王娟，赵玉霞，茹雅维，等. 二甲双胍对Ⅰ型成骨不全小鼠间充质干细胞成骨分化的影响及疗效探讨[J]. 天津医药，2023，51(8)：830-834.

[6] Derynck R，Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling [J]. Nature，2003，425(6958)：577-584.

[7] García-Arnés J A，García-Casares N. Doping and sports endocrinology：growth hormone，IGF-1，insulin，and erythropoietin [J]. Rev Clínica Española Engl Ed，2023，223(3)：181-187.

[8] 魏泽宁，张凤成，李传洁，等. 糖尿病大鼠Nfic与成骨相关基因表达的研究[J]. 中华老年口腔医学杂志，2016，14(2)：72-76.

[9] 谢振杰，卢燕雪，袁晓诗，等. 二甲双胍对微弧氧化羟基磷灰石涂层金属钛表面的糖尿病大鼠BMSCs细胞增殖和成骨分化的影响及机制研究[J]. 西部医学，2024，36(8)：1107-1114.

[10] Dong K，Zhou W J，Liu Z H. Metformin enhances the osteogenic activity of rat bone marrow mesenchymal stem cells by inhibiting oxidative stress induced by diabetes mellitus：an *in vitro* and *in vivo* study [J]. J Periodontal Implant Sci，2023，53(1)：54-68.

[11] 董凯. 二甲双胍通过NRF2-GPX7通路抑制氧化应激促进T2DM大鼠BMMSCs成骨分化的研究[D]. 济南：山东大学，2023.

[12] Vaz de Castro P A S，Bitencourt L，de Oliveira Campos J L，et al. Nephrogenic diabetes insipidus：a comprehensive overview[J]. J Pediatr Endocrinol Metab，2022，35(4)：421-434.

[13] 孔令俊，李想，邓叶龙，等. 二甲双胍调控成骨细胞相关信号通路作用机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志，2024，30(8)：1244-1248.

[14] 卢柳金，叶婷婷，郭柳青，等. 不同浓度二甲双胍对大鼠离体成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 广西医学，2023，45(23)：2848-2854.

[15] Zhang J M，Yu R Q，Wu F Z，et al. BMP-2 alleviates heart failure with type 2 diabetes mellitus and doxorubicin-induced AC16 cell injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. Exp Ther Med，2021，22(2)：897.

[16] Sun X，Ma Z，Zhao X，et al. Three-dimensional bioprinting of multicell-laden scaffolds containing bone morphogenic protein-4 for promoting M2 macrophage polarization and accelerating bone defect repair in diabetes mellitus[J]. Bioact Mater，2021，6(3)：757-769.

[17] 王瑒，李正，王小娜，等. 雷奈酸锶通过上调骨形态发生蛋白2的表达促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞[J]. 中国病理生理杂志，2012，28(3)：404-408.

[18] 吴铭，张岩. 调控骨髓间充质干细胞成骨分化的Wnt/β-catenin信号通路及相关因素[J]. 中国组织工程研究，2021，25(1)：116-122.

[19] Li Q，Xu K，Li J，et al. Metabolic small molecules materialized hydrogel promotes diabetic bone regeneration through osteoimmunological remodeling [J]. Biomaterials，2026，325：123597.

（收稿：2025-12-11）（修回：2026-03-10）

（责任编辑：刘仰斌）