

去卵巢骨质疏松山羊骨髓基质细胞成骨分化能力的研究

姜文雄 孟国林 刘建 袁志 杨鹏 李强 董青川

(第四军医大学西京医院骨科研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究在构建的去卵巢骨质疏松山羊动物模型中,骨髓基质细胞(MSCs)的生物学特性以及其成骨能力。方法:建立去卵巢骨质疏松山羊动物模型,使用全骨髓法获取去卵巢骨质疏松山羊(实验组)和正常山羊(对照组)MSCs,流式细胞仪检测实验组和对照组细胞周期及增殖指数(PI);地塞米松诱导 21d 时油红 O 染色,观察成脂分化比例;成骨诱导液诱导 14d,碱性磷酸酶(ALP)染色、检测 ALP 表达量。结果:对照组 PI 高于实验组;地塞米松诱导后实验组脂肪细胞比例明显高于对照组;成骨诱导第 7d,对照组 ALP 的表达量明显高于实验组。结论:去卵巢骨质疏松山羊的 MSCs 增殖和成骨分化能力都降低,可能与骨质疏松症的发病机理有关。

关键词:去卵巢骨质疏松山羊;骨髓基质细胞;成骨能力

中图分类号:R331.1 **文献标识码:**A

Study of osteogenic potential of ovariectomized goat MSCs

JIANG Wen-xiong, MENG Guo-lin, LIU Jian, YUAN Zhi, YANG Peng, LI Qiang, DONG Qing-chuan

(Institute of Orthopedics, Xi-jing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT Objective: To investigate the growth characteristic of ovariectomized osteoporotic goat bone marrow stromal stem cells and its osteogenic capability. **Method:** We established the animal model of osteoporosis by performing ovariectomy on the 2-year-old female goat. MSCs were isolated by all bone marrow culture method. Cell cycle and proliferation index were detected by flow cytometry of the 3rd passage MSCs of both two groups. The 2nd passage MSCs were induced by dexamethasone of 10^{-7} mol/L and osteogenic inducer for 21 days. The differentiation of adipocytes or osteoblasts were observed by oil red O and ALP staining. **Results:** PI of MSCs was lower in MSCs ovx group than in the MSCs control group. After 21 days of dexamethasone inducing, the ratio of the MSCs which displayed accumulation of lipid vacuoles were 76.6% in ovx group and 71.4% in control group. After 12 days of osteogenic inducing, the rates of ALP positive cells were 76.2% and 81.3% separately. **Conclusions:** The proliferation potential and osteogenic capacity of MSCs of ovariectomized osteoporotic goat were decreased, that may be the cellular mechanism of osteoporosis.

Key words: Ovariectomized osteoporotic goat; Bone marrow stromal stem cells; Osteogenic potential

前言

骨髓可以分为造血及基质两大系统。骨髓基质细胞也叫间充质干细胞,具有多向分化潜能,可同时向成骨细胞和脂肪细胞分化,也可以分化为软骨细胞、神经细胞、肌细胞。骨质疏松症骨量减少同时,通常伴有骨髓中脂肪组织增多,但是其具体机制尚未阐明。目前,对于骨髓基质细胞的研究多集中于人以及鼠、兔等动物实验,对于山羊,尤其是去卵巢山羊 MSCs 的研究报道很少。本研究旨在通过建立去卵巢骨质疏松山羊动物模型,研究其 MSCs 生长特性以及成骨能力,初步探讨骨质疏松症的细胞学机制。

1 实验材料

山羊(由第四军医大学实验动物中心提供),低糖 DMEM 培养液(Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物公司),地塞米松(sigma 公司),碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物公司)倒置相差显微镜(Olympus),酶联免疫检测仪(日立公司)流式细胞仪(BECKMAN-COULTER)。完全培养液:含胎牛血清体积比 10%,青霉素 100U/L,链霉素 100U/L 的 DMEM 培养液。

2 实验方法

2.1 建立去卵巢后骨质疏松山羊动物模型

成年雌性山羊十只,体重(45.03.4)Kg,年龄(24.34.9)月,由第四军医大学动物中心提供。手术切除双侧卵巢,术前行腰椎、跟骨骨密度检测,术后 6 月复查,证实骨质疏松模型成立。

2.2 MSCs 细胞原代培养

去势组山羊髂骨部剪毛、消毒,用灭菌骨髓穿刺针穿刺进入骨髓腔,在无菌条件下用预先吸有肝素抗凝液的注射器抽

作者简介:姜文雄,(1974-),男,硕士在读,

研究方向:骨关节损伤修复,骨质疏松

通讯作者:刘建,(1958-),男,教授,博士生导师,

主任医师,研究方向:骨关节损伤修复与骨移植,骨质疏松

E-mail: jiangwx@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2006-06-02 接受日期:2006-07-20)

取骨髓 5mL,完全培养液 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养。对照组处理相同。

2.3 换液、传代

细胞培养 4d 首次换液,去除未贴壁细胞,留下贴壁细胞继续培养,以后隔日换液,进一步去除未贴壁细胞。细胞长满瓶底后,用 0.25% 胰蛋白酶消化、悬浮细胞,镜下见大部分细胞胞质回缩、形态变圆后,含血清的 DMEM 培养液中中和消化,按 1:2 接种传代。

2.4 MTT 法测定两组细胞的生长曲线

取生长良好的两组第 2 代细胞,细胞长满瓶底后消化,调整细胞浓度为 2×10^4 /mL,接种于 96 孔培养板,隔日换液。每 24h 取出一板,每孔加入 MTT 溶液(5mg/mL)20 μ L,培养箱内培养 4 小时后,吸去上清液,每孔内加入 150 μ L DMSO,震荡 10 分钟,选择 490nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 A 值。以时间为横坐标,以 3 孔光吸收值的平均值为纵坐标,绘制生长曲线。

2.5 细胞增殖周期和增殖指数的检测

分别取实验组和对照组第 2 代 MSCs,以 1×10^4 接种于培养瓶,每组 3 瓶。细胞融合生长后,消化、固定细胞,碘化丙啶(50mg/L)作用 20 分钟,经流式细胞仪检测细胞周期变化。PI (S+G2/M 期细胞百分比)表示细胞增殖活性。

2.6 地塞米松诱导分化

分别取实验组和对照组第二代 MSCs,以密度 2×10^4 /L 接种预置盖玻片的 24 孔培养板,含地塞米松 1×10^{-7} mol/L 的完全培养液培养,隔日换液。

2.7 成骨诱导分化

分别取实验组和对照组第二代 MSCs,以密度 2×10^4 /L 接种预置盖玻片的 24 孔培养板。用成骨诱导液(含地塞米松 1×10^{-8} mol/L、维生素 C 50mg/L、 β -磷酸甘油钠 10mmol/L 的完全培养液)进行诱导,第 14d 行钙钴法碱性磷酸酶染色。染色完成后光镜检查,每张玻片随即抽取 10 个非重叠视野($\times 100$),计算碱性磷酸酶阳性细胞数的比例。另取两组第二代 MSCs,以密度 2×10^4 /L 接种 24 孔培养板,每组 6 孔。成骨诱导液诱导 14d,去上清,加入 Triton X-100,4℃过夜,按试剂说明步骤,最后在酶联免疫检测仪上 410nm 波长检测各孔吸光度 A 值,反映碱性磷酸酶活性。

3 结果和分析

3.1 原代细胞形态学观察

4d 后首次换液,倒置相差显微镜下观察,两组细胞形态相似,呈典型的成纤维细胞样外观,多呈集落生长。可见多角形、三角形、梭形细胞贴壁,有不规则突起,并可见较多的红细胞。随着换液次数的增加,细胞逐渐纯化。8-10d 后可见多个成纤维样细胞集落,出现较多的宽大扁平细胞,13-15d 后细胞密集生长,几乎长满瓶底,细胞间紧密贴附。(图 1,2)

3.2 细胞生长曲线

两组细胞生长曲线表明,两组细胞具有相似的 S 形生长曲线,对照组 MSCs 生长快于实验组。对照组 MSCs 接种后 3d

为生长潜伏期,此后进入对数生长期,13d 后细胞长满瓶底,进入平台期。实验组 MSCs 接种后有 5-6d 的生长潜伏期,7d 后进入对数生长期,15d 后细胞长满瓶底,进入平台期。(图 3)

3.3 细胞增殖周期和增殖指数。(表 1)

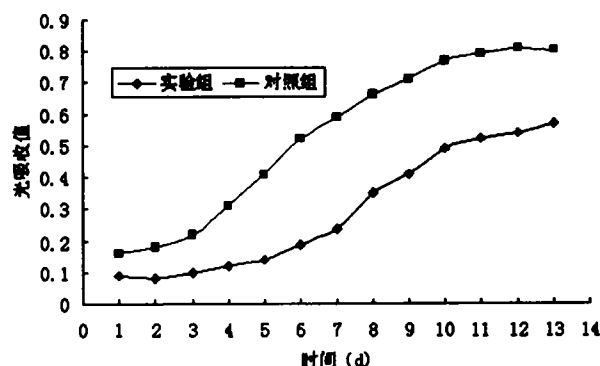


图 3 对照组和实验组第二代细胞生长曲线

Figure 3 growth curve of second passage of control and ovx group

表 1 骨髓基质细胞增殖周期分布和增殖指数($\bar{x} \pm s$, %, n=3)

Table 1 Cell cycle and proliferation index of MSCs($\bar{x} \pm s$, %, n=3)

	G0/G1	S	G2/M	PI
实验组	53.0 $\pm$ 2.1	13.6 $\pm$ 2.2	33.7 $\pm$ 4.0	47.0 $\pm$ 2.1*
对照组	44.1 $\pm$ 4.2	28.1 $\pm$ 3.6	27.6 $\pm$ 1.6	56.4 $\pm$ 4.0

*P<0.05,实验组与对照组相比。

3.4 脂肪细胞油红 O 染色

第 2 代骨髓基质细胞经地塞米松诱导 21 天行油红 O 染色,镜下观察脂肪细胞为圆型或多边形,脂滴为橙红色,脂肪细胞中含大小不等的脂肪滴,细胞核被挤到细胞一侧。每张玻片随机抽取 6 个视野,高倍镜下统计每组各 4 张细胞爬片脂肪细胞分化比例,结果显示,去卵巢骨质疏松组 76.6% (63/82)MSCs 分化为脂肪细胞,对照组 65.6% (61/93)MSCs 分化为脂肪细胞,两者之间存在显著差异(P<0.01)。(图 4,5)

3.5 碱性磷酸酶染色以及活性检测

第 2 代骨髓基质细胞成骨诱导第 14d,取出细胞爬片,丙酮固定,按照说明步骤行碱性磷酸酶染色。镜下见部分细胞胞质内有棕黑色颗粒状沉淀,显示碱性磷酸酶染色强阳性。每张玻片随机抽取 6 个视野,高倍镜下统计每组各 4 张细胞爬片碱性磷酸酶染色阳性细胞率。结果显示,去卵巢骨质疏松组碱性磷酸酶染色阳性率为 71.4% (30/42),对照组为 81.3% (39/48),两者之间存在显著差异(P<0.01)。光吸收值(OD)值:实验组(0.1350,006, n=6);对照组(0.1520,004, n=6),两者之间有显著差异(P<0.01)。(图 6,7)

4 讨论

MSCs 分离方法通常分为密度梯度分离法和全骨髓贴壁法。骨髓中的造血干细胞能分泌生长因子以及促贴壁物质,促进骨髓基质细胞的贴壁和生长^[1],因此本研究采用全骨髓

法分离培养骨髓基质细胞,利用骨髓基质细胞贴壁生长的特性,通过更换培养液的方法,逐渐去除悬浮生长的造血细胞,从而获得了均一性较高的骨髓基质细胞。该方法操作简单,减少了离心、密度分离等步骤,从而减少污染机会以及对细胞的损害,因而成功率高,本实验10只动物的原代培养中有8只一次成功。该方法缺点是红细胞干扰原代细胞的观察。

骨质疏松等骨丢失性疾病在骨量减少的同时往往伴随骨髓内脂肪组织增加^[2]。实际上,所有导致骨丢失的条件如卵巢切除、制动、服用糖皮质激素等,均伴有髓内脂肪细胞的增加^[3]。成骨细胞和成脂细胞拥有一个共同的前体细胞源MSCs^[4]。MSCs向成骨与成脂细胞分化的平衡维系着髓内骨组织与脂肪组织量的平衡。一旦MSCs过多地向成脂细胞方向分化,则向成骨细胞分化的细胞数就相应减少,进而引起成骨缺陷。成骨与成脂平衡的调控机制十分复杂,有多条信号通路的参与。包括1、过氧化酶增殖体激活受体 α 通路;2、Wnt通路;3、RhoA通路;4、G蛋白偶联受体通路5、Notch/delta/Jagged通路等^[5]。

地塞米松在成骨、成脂的诱导分化中均起着重要作用,有人称之为骨髓基质细胞分化的启动因子^[6]。刘杰等^[7]实验结论:地塞米松可以从分子水平调控骨髓基质细胞分化,地塞米松浓度 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 时,诱导体外培养的骨髓基质细胞向脂肪细胞分化方向较强。脂肪细胞可以合成并储存甘油三酯,因此可以用油红O染色作为鉴定脂肪细胞的方法。碱性磷酸酶是诱导成骨后的关键性标志之一,并且是最早出现的成骨标志^[8]。定量检测碱性磷酸酶的活性可以衡量成骨细胞分化程度和成骨细胞的功能状态。

5 结论

本研究结果表明,采用全骨髓贴壁法可以获得去卵巢骨质疏松山羊MSCs,并且体外扩增生长良好,可以用于相关研

究。在地塞米松浓度 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 诱导下,去卵巢骨质疏松组MSCs向脂肪细胞分化比例明显高于对照组,在成骨诱导液诱导下,去卵巢骨质疏松组MSCs碱性磷酸酶表达量明显低于对照组,由此,可以得出结论:去卵巢骨质疏松山羊MSCs成脂分化能力增强,成骨分化能力减弱;并且其成骨能力减弱。因此,MSCs细胞分化方向改变,致成骨细胞生成减少,脂肪细胞生成增多可能是骨质疏松症的原因之一。

参考文献

- [1] Robey PG. Collagenase - treated trabecular bone fragments: a reproducible source in the osteoblastic lineage[J]. Calcif Tissue Int, 1995,56:11 - 12
- [2] Nuttall ME, Gimble JM. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? [J]Bone. 2000,27(2):177 - 184
- [3] Martin RB, Chow BD, Lucas PA. Bone marrow fat content in relation to bone remodeling and serum chemistry in intact and ovariectomized dogs[J]. Calcif Tissue Int, 1990,46:189 - 194
- [4] Owen A. What is early intervention? Br J Psychiatry. 2003,183(2):562
- [5] Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2004,4:290 - 294
- [6] Horwitz EM, Prockop DJ. Clinical response to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta [J]. Blood, 2001,97(5):1227 - 1231
- [7] 刘杰,孙正义,曹蕾.地塞米松对骨髓基质干细胞生物学行为的影响[J].中华骨科杂志,2003,23(11):691 - 693
- [8] Sammons J, Ahmed N. The role of BMP - 6, IL - 6, and BMP - 4 in mesenchymal stem cell - dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3)[J]. Stem Cells, 2004,13(3):273

(图1,图2,图4-图7请见封3)

(上接第26页)

参考文献

- [1] Emmerson BT. Chronic lead nephropathy[J]. Kidney Int. 1973 Jul;4(1):1 - 5
- [2] Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel[J]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jul;2(7):550 - 556
- [3] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, et al. X - linked IAP is a direct inhibitor of cell - death proteases[J]. Nature. 1997 Jul 17;388(6639):300 - 304
- [4] Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, et al. X - linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase - 3 and - 7 in distinct modes[J]. J Biol Chem. 2001 Jul 20;276(29):27058 - 27063
- [5] Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, et al. Structural basis of caspase - 7 inhibition by XIAP[J]. Cell. 2001 Mar 9;104(5):769 - 780
- [6] Sun C, Cai M, Gunasekera AH, et al. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor - of - apoptosis protein XIAP[J]. Nature. 1999 Oct 21;401(6755):818 - 822
- [7] 蒋云生,夏运成,罗季安,等.碘化钾抗铅性肾细胞损害的机制探讨[J].中华劳动卫生职业病,1997,15(3):169 - 170
- [8] Nolan CV, Shaikh ZA. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. Toxicology[J]. 1992,73(2):127 - 146

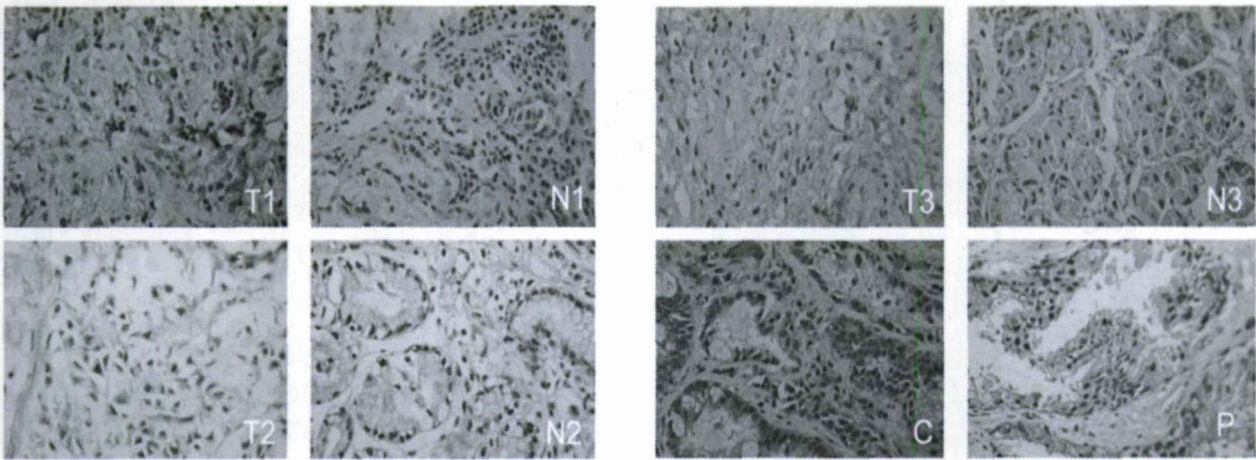
雌激素受体β在胃腺癌中表达的研究

王 梅¹ 潘吉勇² 范姝君³ 安利佳¹

(1 大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系 大连市 116024 2 大连市肿瘤医院腹部外科 大连市 116033
3 大连医科大学中日临床病理中心 大连市 116027)

图1 胃腺癌和癌旁非癌组织雌激素受体β免疫组织化学染色(SP×400)

Fig.1 Immunohistochemical staining of estrogen receptor β in primary gastric adenocarcinoma and corresponding non-cancerous samples(SP×400). Compared with non-cancer tissues (N1, N2, N3), the intensity of ERβ immunoreactivity showed decreased (T1, T2) and undetectable in matched tumors (T3) respectively. Prostate tissue (P) treated in the same way was used as ERβ positive control; C: Control normal gastric mucosa.



*注: 与非癌组织(N1, N2, N3)比较, 癌组织显示较弱的免疫染色信号(T1, T2)和阴性染色(T3); P:前列腺组织 ERβ 阳性对照; C: 正常胃粘膜对照。
(正文请见27页)

去卵巢骨质疏松山羊骨髓基质细胞成骨分化能力的研究

姜文雄 孟国林 刘 建 袁 志 杨 鹏 李 强 董青川

(第四军医大学西京医院骨科研究所 陕西 西安 71003)

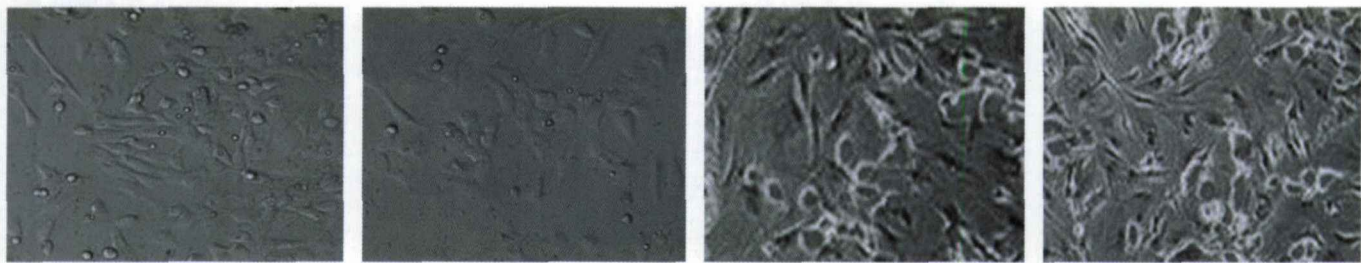


图1: 原代培养的对照组MSCs (×100) 图 2: 原代培养的实验组 MSCs (×100) 图 4: 对照组油红 O 染色 (×100) 图 5: 实验组油红 O 染色 (×100)
Figure1: primary cultured MSCs of control group (×100) Figure2: primary cultured MSCs of ovx group (×100) Figure4: oil red staining of control group (×100) Figure5: oil red staining of ovx group (×100)

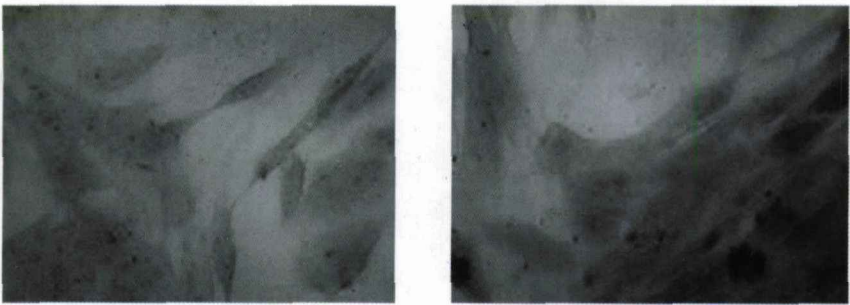


图 6: 对照组 ALP 染色 (×400) 图7: 实验组ALP染色 (×400)
Figure6: ALP staining of control group (×400) Figure7: ALP staining of control ovx (×400)