

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.013

BMP7 对小鼠诱导多能干细胞骨向分化作用的研究 *

任秋颖¹ 邢舰誉¹ 张宇² 王屹博¹ 丁超¹ 李妍² 史久慧^{1△} 刘忠华^{2△}

(1 哈尔滨医科大学附属口腔医院 黑龙江 哈尔滨 150006; 2 东北农业大学 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要 目的:探讨骨形态蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)超家族成员之一 BMP7 在小鼠诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cells,iPS)骨向分化过程中的作用。**方法:**本试验分成三组,分别是自发分化组,骨诱导组和添加 BMP7 的骨诱导组。每天观察各组细胞形态学特征及生长状况的差异,在诱导第 14 天通过茜素红染色检测基质矿化情况,判断 BMP7 在体外骨诱导条件下对小鼠 iPS 细胞骨向分化过程所发挥的作用。**结果:**完成了小鼠 iPS 细胞的培养鉴定,并诱导形成理想状态的拟胚体(Embryoid body,EB)用于分化接种。结果发现,添加 BMP7 的骨诱导组细胞的矿化结节阳性率明显增加。**结论:**BMP7 在诱导小鼠 iPS 细胞骨向分化过程中起促进作用,而对非骨向分化的细胞无成骨促进作用。

关键词:诱导多能干细胞;拟胚体;BMP7;骨向分化

中图分类号:R782.13 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)29-5651-04

The Effect of BMP7 on Osteogenetic Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells*

REN Qiu-ying¹, XING Jian-yu¹, ZHANG Yu², WANG Yi-bo¹, DING Chao¹, LI Yan², SHI Jiu-hui^{1△}, LIU Zhong-hua^{2△}

(1 Oral cavity hospital affiliated to harbin medical university, Harbin, Heilongjiang, 150006, China;

2 Northeast Agricultural university, Harbin, Heilongjiang, 150030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of BMP7, which is a member of bone morphogenetic protein (BMP), in the process of mouse induced pluripotent stem cells (iPS) osteogenetic differentiation. **Methods:** The study focuses on improving mouse iPS cells differentiating ability into osteoblast in the condition of physiological sugar. Three groups were setted in the study, Spontaneous differentiation group, bone induction group and BMP7 supplied bone induction group. The morphological characteristics and different growth status of the cells were observed under the inverted-microscope every day. The matrix mineralization were detected by alizarin red staining on the 14th day, so that the function of BMP7 in inducing mouse iPS cells into osteoblast in the condition of physiological sugar were reflected. **Results:** The amplification and identification of the mouse iPS were completed, and then the cells were induced into embryoid bodies (EB), and mineralized nodules were positive and the quantity of the mineralized nodules increased in BMP7 supplied physiological sugar group. **Conclusion:** BMP7 can promote osteoblast induction of mouse iPS cells.

Key words: Induced pluripotent stem cells; Embryoid bodies; BMP7; Osteogenetic differentiation

Chinese Library Classification: R782.13 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)29-5651-04

前言

骨内种植体的稳定性取决于植入部位骨的质和量,然而严重的骨缺损影响了种植义齿的成功率。因此修复种植体周围骨缺损,拓宽种植义齿适应范围,提高种植义齿的成功率,是当前研究的热点问题。自体干细胞移植技术在疾病治疗和损伤修复领域中具有潜在的应用价值,同时避免了免疫排斥反应。目前,通过体细胞核移植和诱导产生多能性干细胞这两项技术已能够获得自体来源的组织相容的多能干细胞,并且其体外定向诱导分化研究也取得了重大进展,特别是诱导型多能干细胞体系的建立,使其有可能取代胚胎干细胞和成体干细胞广泛应用于

组织修复与再生研究领域^[1]。成体干细胞作为一种多能干细胞,对组织以及器官的修复与替代作用已逐步得到证实,其骨向分化也有较多研究,但对于诱导多能干细胞的骨向分化研究仍不多见。因此,本实验主要探究了诱导型多能干细胞体外骨向分化的能力,及 BMP7 在该过程中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠 iPS 细胞系、DMEM 低糖培养液、双抗青链霉素(II)、胎牛血清(FBS)、反转录试剂盒、茜素红 S、超净工作台、37℃ 培养箱、倒置显微镜(OLYMPUS 日本)、TI-S 倒置荧光显微镜、

* 基金项目:哈尔滨医科大学心肌缺血省部共建教育部重点实验室开放课题基金(KF201317)

作者简介:任秋颖(1987-),女,硕士,主要研究方向:小鼠 iPS 细胞骨向分化,E-mail:403829147@qq.com

△ 通讯作者:史久慧,E-mail:tsjj926@163.com; 刘忠华,E-mail:liu086@126.com

(收稿日期:2014-02-17 接受日期:2014-03-15)

心机(上海安亭科学仪器制造厂)、普通 PCR 仪(德国 Biometra Tpersonal)、凝胶成像系统(美国阿尔法)、水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 iPS 的培养及拟胚体(embryoid, EB)的形成 实验选取中国生命科学院提供的小鼠第 27 代 p14-2-2 iPS 细胞。iPS 细胞的培养需要丝裂霉素处理的小鼠胎儿成纤维细胞作为饲养层及 LN 培养液,传代至 34 代,细胞状态良好时备用。分化培养液中悬浮培养,诱导 EB 形成。诱导前利用明胶去除 iPS 中的饲养层细胞;将较纯净的悬液离心;用含有 15%FBS 的成纤维细胞培养液将细胞重悬,接种到培养皿内摇匀,37 °C 温箱孵育,3 天 EB 形成后即可进行接种。

1.2.2 iPS 细胞核型鉴定 每 1 mL 培养液中加入 0.5 μ L 秋水仙素处理 2-3 h;低渗液 37 °C 处理 15 min;加 1 mL 冷的固定液于低渗液中,室温静置 5 min 后离心;加入冷固定液 6 mL,冰上固定 20 min 离心,重复一次;加入 2 mL 冷固定液离心;加入 200 μ L 固定液滴片;吉姆萨染色 7 min,制成切片后镜下观察染色体状态,拍照记录。

1.2.3 iPS 表面标志的免疫荧光鉴定 免疫荧光检测小鼠 iPS 细胞表面特异抗原 Oct4、Sox2、Nannog、SSEA-1。首先配制清洗液、固定液、封闭液、透膜液;然后清洗细胞;4%多聚甲醛常温固定 30 min;清洗一遍,透膜液 37 °C 透膜 1 h;再次清洗,封闭液封闭 1 h;加相应一抗单克隆抗体 OCT4、SOX2、SSEA1、NANNOG;滴加清洗液于摇床上清洗 5 min,重复 3 次;滴加相应二抗。37 °C 避光孵育 1 h;再次摇床上清洗 5 min,重复 3 次;Hoeschst 染核 10 min,清洗 3 次,拍照记录。

1.2.4 诱导小鼠 iPS 细胞骨向分化研究中茜素红 s 染色 BMP7 诱导的成骨分化,实验分为自发分化组、骨诱导组和添加 BMP7 的骨诱导组,BMP7 浓度为 100 ng/ml,对照组为含有 15%FBS 的成纤维细胞培养液。用口吸管以每孔 7-8 个 EB 接种于 24 孔板,每组至少 3 个重复。

茜素红 S 染色:于诱导第 14 天进行,吸去诱导液 DPBS 洗 3 次;95%乙醇固定 10 min;1%茜素红 S 染色 30 min;DPBS 冲洗 3 次,拍照记录。

2 结果

2.1 小鼠 iPS 细胞形态学及核型鉴定

小鼠 iPS 细胞以克隆团的形式生长、细胞间排列紧密,团块边界整齐清晰、与饲养层细胞相比体积略显微小、细胞生长速度较快、经过多次传代仍能保持良好的多能性。诱导形成的 EB 则是较大细胞团块,肉眼观为白色悬浮物,呈细小沙粒状,镜下可见细胞排列成密集的团块,形状近似圆形,边缘光滑圆润(如图 1A)。

光镜下观察,可见染色体形态、数目正常,未见明显的染色体缺陷(如图 1B)。

2.2 小鼠 iPS 细胞多能性免疫荧光鉴定

多能性基因免疫荧光鉴定结果显示,小鼠 iPS 细胞的 Oct-4、Sox-2、SSEA-1、Nannog 均阳性表达,FITC 标记,呈现绿色荧光,说明选用的 iPS 细胞具有良好的多能性(如图 2)。

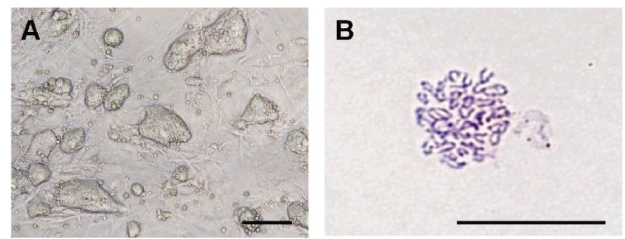


图 1 A 小鼠诱导多能干细胞形态(标尺=50 μ m)

Fig. 1 A The morphology of induced pluripotent stem cells(scale=50 μ m)

图 1 B 核型分析结果(标尺=50 μ m)

Fig. 1 B the result of Karyotype analysis(scale=200 μ m)

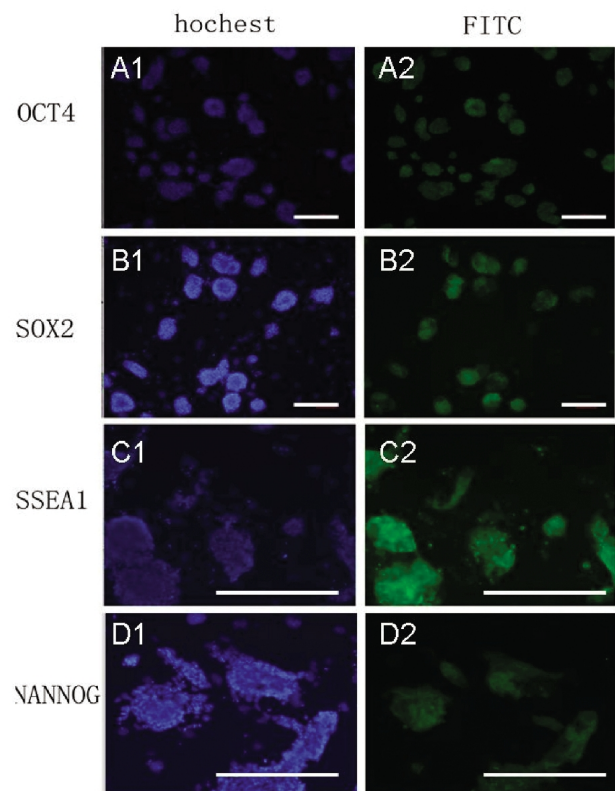


图 2 免疫荧光结果(标尺=200 μ m)

Fig. 2 The result of immunofourescence(scale=200 μ m)

2.3 小鼠 iPS 细胞骨向诱导分化研究

上述结果显示,所使用的小鼠 iPS 细胞具有多向分化潜能。接下来我们研究了该小鼠 iPS 细胞的体外成骨能力,及 BMP7 在该过程中的作用。

茜素红染色结果显示,自发分化组未见明显矿化,并且 BMP7 的添加并没有影响该条件下的茜素红染色结果(如图 3A-B)。而骨诱导组矿化结节数目相对较少,钙结节体积小,染色相对较浅(如图 3C)。添加 BMP7 的骨诱导组矿化明显,钙结节数量多,体积较大,染色深(如图 3D)。结果表明 BMP7 能促进 iPS 骨向分化,而对非骨向分化的细胞无成骨促进作用。

3 讨论

随着种植学的发展,人们对种植体成功率的要求不断提高,但由于患者缺牙部位颌骨缺损,对种植义齿修复有一定局

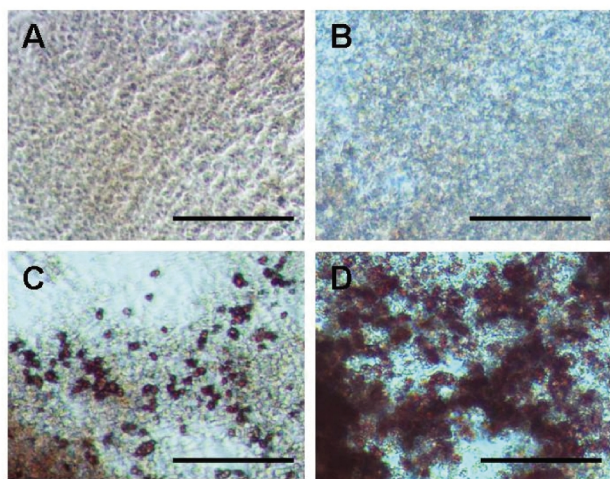


图3 茜素红染色结果(标尺=50 μm)

Fig. 3 The result of alizarin red staining(scale=50 μm)

限性。目前常用的骨移植方法都有其局限性,仍需寻找理想的骨缺损修复方法。

目前 iPS 的发现在干细胞领域还是口腔领域都引起了极大的轰动。在颌骨生长发育过程中,有多种生长因子共同参与复杂的调控,如 MPs、TGF-β、FGF 等,其中 BMPs 可以诱导多种干细胞、成骨前体细胞向成骨细胞分化。以细胞为基础的组织再生疗法是一个很有前途的疗法。研究表明 BMSC、ESC,以及 iPS 细胞都具有多向分化潜力。然而前两者均存在明显弊端,当 BMSC 用作自体移植时,具有抗炎特性,然而中年捐赠者增殖能力有限^[2-4];虽然 ESC 是多能干细胞,具有高度分化和增殖潜力,但它是同种异体物质,可能导致免疫抑制。而 iPS 细胞 iPS 细胞能够表达大多数干细胞标记物^[5],并能够避免了上述争议,并兼具它们的优势。因此本实验选取小鼠 iPS 细胞作为研究对象,探讨 BMP 在诱导小鼠 iPS 细胞骨向分化过程中的地位,为今后解决种植体周围骨缺损问题奠定实验基础。

3.1 小鼠诱导多能干细胞(iPS)的鉴定

研究发现 iPS 在分化过程中多能性基因的表答仍能维持较高水平^[6],在分子水平上以 ES 细胞表达的特异性标志物为参照。鉴定 iPS 细胞的方法多种多样,常用的方法有 PCR、免疫荧光、核型分析等。采用 PCR 法主要对 OCT4、SOX2、SSEA1、NANOG 等多能性基因进行检测^[7,8];免疫荧光主要对表面标志物进行鉴定;而核型分析是由于外源基因的导入,对细胞的核型情况会产生一定的影响,导致核突变的几率较高,一旦植入体内可能会导致组织癌变,需要将此类细胞予以剔除,因此核型分析具有重要意义。对 iPS 细胞发育潜能的鉴定则是通过将获得的 iPS 细胞注入到裸鼠皮下可以产生三胚层细胞的畸胎瘤,说明 iPS 的发育潜能和 esc 基本相似。本实验主要采用免疫荧光和核型分析的方法对小鼠的 iPS 进行鉴定。

3.2 小鼠 iPS 细胞骨向分化

本实验探讨小鼠 iPS 细胞骨向分化能力。但人和小鼠 iPS 细胞还存在差异,很多相关数据还不能通用^[9,10]。廉等人发现人 iPS 细胞表型和分化潜能与 BMSC 类似,但 iPS 细胞衍生的细胞与间充质干细胞存在一定差异,因其强大的生存能力及促进新生血管和骨骼肌细胞分化的能力,比骨髓间充质干细胞的作

用更加强大,为 iPS 组织细胞工程的应用提供令人信服的论据。未来值得探究的目标是:如何将小鼠为实验基础的相关研究数据应用于推动人类 iPS 细胞表型和分化潜能方面的研究。

本实验体外研究结果证实:小鼠 iPS 细胞具有骨向分化的潜能,可以作为成骨细胞的一个潜在来源,BMP7 在诱导小鼠 iPS 成骨过程中起到促进骨形成的作用。有研究表明,以细胞为基础的组织工程骨的形成,在体外确定其分化潜能是十分必要的^[11,12]。尽管如此,未来仍需深入研究。首先,除了确定其体外成骨分化外,还必须支持体内成骨^[13,14];其次,由 iPS 细胞衍生的成骨细胞在体内成骨还受植入区支架材料的影响,理想的支架支持细胞在体内终末分化^[15,16];最后,由细胞工程产生的成骨细胞源能否应用于临床还有待进一步研究。确定诱导骨稳定的理想细胞选择标记至关重要^[17]。

3.3 小鼠 iPS 细胞诱导成骨过程中相关检测指标

本实验中诱导第 14 天,茜素红染色结果显示:添加 BMP7 的骨诱导组较单纯骨诱导组矿化结节数量多,体积大,染色较深;而对照组未见明显矿化,说明无明显成骨分化迹象。证实了矿化的存在。与 Kim HS 和 Balint E 等人的相关研究^[19,20]结论一致。

参考文献(References)

- [1] 汤翠菊,田有勇,张颖冬.诱导多能干细胞研究现状及发展前景[J]. 医学综述, 2011, 17(17): 2564-2568
Tang Cui-ju, Tian You-yong, Zhang Ying-dong. The progress and prospect of induced pluripotent stem cells medical recapitulate [J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(17): 2564-2568
- [2] Lian Q, Zhang Y, Zhang J, et al. Functional Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells Attenuate Limb Ischemia in Mice[J]. Circulation, 2010, 121(9): 1113-1123
- [3] Noh HBHJA, Lee WJ, Kwack KB, et al. The molecular signature of in vitro senescence in human mesenchymal stem cells [J]. Genes & Genomics, 2010, 32(1): 87-93
- [4] Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. Experimental Cell Research[J]. Exp Cell Res, 2008, 314(9): 1937-1944
- [5] Satoru Y, Miyuki Y, Hideyuki M, et al. Generation of stratified squamous epithelial progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells[J]. Plosone, 2011, 6(12): e28856
- [6] 杜丽丽,林戈,卢光琇.人诱导多能干细胞与人胚胎干细胞分化过程中 Oct4/Nanog 基因表达的比较 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(1): 1-4
Du Li-li, Lin Ge, Lu Guang-xiu. Comparison of human induced pluripotent stem cells and Oct4/Nanog gene expression in human embryonic stem cell differentiation [J]. progress in modern biomedicine, 2011, 11(1): 1-4
- [7] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676
- [8] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induced pluripotent stem cells from human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 11-15
- [9] Grinnemo KH, Kumagai-Braesch M, Masson-Broberg A, et al. Human

- embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings[J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13(5): 712-724
- [10] Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, et al. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 2005, 112(9 Suppl):I166-172
- [11] Muller A, Mehrkens A, Schafer DJ, et al. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue [J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 3 (19): 127-135
- [12] Tremoleda J, Forsyth NR, Khan NS, et al. Bone tissue formation from human embryonic stem cells in vivo[J]. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10 (1): 119-132
- [13] Muller A, Mehrkens A, Schafer DJ, et al. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue [J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 3 (19): 127-135
- [14] Tremoleda J, Forsyth NR, Khan NS, et al. Bone tissue formation from human embryonic stem cells in vivo[J]. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10 (1): 119-132
- [15] Naujoks C, Langenbach F, Berr K, Depprich R, et al. Biocompatibility of Osteogenic Predifferentiated Human Cord Blood Stem Cells with Biomaterials and the Influence of the Biomaterial on the Process of Differentiation[J]. *J Biomater Appl*, 2011, 25(5): 497-512
- [16] Smith LA, Liu X, Hu J, et al. The Enhancement of human embryonic stem cell osteogenic differentiation with nano-fibrous scaffolding[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(21): 5526-5535
- [17] Peltari K, Wixmerten A, Martin I. Do we really need cartilage tissue engineering [J]. *Swiss Med Wkly*, 2009, 139(41-42): 602-609
- [18] 成德, 雷蕾, 卢智娟, 等. 诱导多能干细胞(iPS)的诱导培养与鉴定[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(4): 421-430
- Cheng De, Lei Lei, Lu Zhi-juan, et al. the induction of cultivation and identification of induced pluripotent stem cells [J]. *Journal of biological engineering*, 2010, 26(4): 421-430
- [19] Kim HS, Park JW, Yeo SI, et al. Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells in vitro [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006, 74(1): 41-47
- [20] Balint E, Szabo P, Marshall CF, et al. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization[J]. *Bone*, 2001, 28(1): 21-28

(上接第 5639 页)

- [11] 顾玉东, 王澍寰, 侍德. 手外科手术学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2010: 204-204
- Gu Yu-dong, Wang Shu-huan, Shi De. *Operative Hand Surgery*[M]. Shanghai: Fudan University Press, 2010: 204-204
- [12] 沈华, 沈尊理, 张兆峰, 等. 指蹼穿支蒂逆行掌背皮瓣修复手指创面[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2011, 22(10): 588-590
- Shen Hua, Shen Zun-li, Zhang Zhao-feng, et al. Application of reverse dorsal metacarpal flap based on webspace perforator for the coverage of finger defects[J]. *Chinese Journal of Aesthetic and Plastic Surgery*, 2011, 22(10): 588-590
- [13] Yang JW, Kim JS, Lee DC, et al. The radial artery superficial palmar branch flap: a modified free thenar flap with constant innervations[J]. *J Reconstr Microsurg*, 2010, 26(8): 529-538
- [14] Aydin H U, Mengi A S. Recurrent interdigital pilonidal sinus treated with dorsal metacarpal artery perforator flap [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010, 63(12): e832-e834
- [15] Vollala VR, Nagabhooshana S, Bhat SM, et al. Rare anatomical variant: arterial circle in palm and at the base of the thumb [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2008, 49(4): 585-587
- [16] Ramf rez AR, Gonzalez SM. Arteries of the thumb: description of anatomical variations and review of the literature [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2012, 129(3): 468e-476e
- [17] Jakubietz G, Kloss D F, Gruenert J G, et al. The ageing hand. A study to evaluate the chronological ageing process of the hand[J]. *Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2008, 61(6): 681-686
- [18] Saxena A, Agarwal KK, Ray B, et al. A rare finding of the superficial palmar arch-developmental and clinical significance [J]. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(4): 704-708
- [19] Feigl GC, Petrac M, Pixner T, et al. The superficial palmar arch and median artery as an example of misleading results due to a small number of investigated specimens or the use of different classifications[J]. *Ann Anat*, 2012, 194(4): 389-395
- [20] Loukas M, Tubbs S, Louis RG, et al. Princeps pollicis artery arising from the superficial palmar arch [J]. *Singapore Med J*, 2009, 50(11): e391-e392