

文章编号:1004-7220(2011)02-0116-05

力学刺激和成骨化学诱导剂对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响

何学令^{a,b}, 姚晓玲^a, 冯贤^a, 邱飞远^a, 李凯^a, 吴江^a, 李良^a

(四川大学 a. 基础医学与法医学院, 生物医学工程研究室; b. 实验动物中心, 成都 610041)

摘要:目的 探讨力学刺激与成骨化学诱导剂对大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone mesenchymal stem cells, rBMSCs)碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I型胶原(collagen type I, COL I)和骨钙素(osteocalcin, OCN)基因表达与钙化结节形成的影响。**方法** 体外分离培养rBMSCs,分别在成骨诱导和非成骨诱导条件下应用双轴力学应变加载系统对rBMSCs施加周期性的机械张应变(应变2%,频率1 Hz,每次2 h,间隔2 h,每天加载3次)。力学刺激作用3 d和6 d,采用实时荧光定量RT-PCR检测ALP、COL I和OCN的mRNA表达,同时采用茜素红染色法观察钙化结节的形成情况。**结果** 力学刺激作用后,成骨诱导6 d组出现明显的钙化结节,其余各组均无明显钙化结节形成。与相应非诱导组比较,成骨诱导3 d组ALP、COL I和OCN的mRNA表达量分别增加0.6、3和11.8倍;成骨诱导6 d组ALP、COL I和OCN的mRNA表达量分别增加2.7、3.2和10倍。**结论** 成骨化学诱导剂和力学刺激均能促进rBMSCs的骨向分化,且二者之间具有协同作用。

关键词: 力学刺激; 双轴力学应变; 成骨细胞; 化学诱导剂; 大鼠骨髓间充质干细胞; 成骨分化

中图分类号: R3 文献标志码: A

Effects from mechanical stimulation and osteogenic chemical inductor on osteoblastic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells

HE Xue-ling^{a,b}, YAO Xiao-lin^a, FENG Xian^a, QIU Fei-yuan^a, LI Kai^a, WU Jiang^a, LI Liang^a (a. Institute of Biomedical Engineering, College of Preclinical Medicine and Forensic Medicine; b. Center of Experimental Animals, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the effect from mechanical stimulation and osteogenic chemical inductor on osteoblastic differentiation markers and formation of calcified nodules in rat bone mesenchymal stem cells (rBMSCs). **Method** The rBMSC were cultured in medium contained with or without osteogenic chemical inductor. The cyclic biaxial mechanical strain (2%), at a frequency of 1 Hz, was applied to the rBMSCs for periods of 2 hours each time, at intervals of 2 hours, 3 times every day, lasting 3 days and 6 days, respectively. The mRNA expression of alkaline phosphatase (ALP), collagen type I (COL I) and osteocalcin (OCN) were analyzed with real time fluorescent quantitation reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and formation of calcified nodules were detected with alizarin red staining method. **Results** The mRNA expression of ALP, COL I and OCN were significantly increased in induced group compared with that in the corresponding uninduced group and calcified nodule was observed in the osteogenic chemical inductor group after 6 days with mechanical stimulation. **Conclusions** Osteogenic chemical inductor and mechanical stimulation can promote the osteoblastic differentiation of rBMSCs.

Key words: Mechanical stimulation; Biaxial mechanical strain; Osteoblasts; Chemical inductor; Rat bone mesenchymal stem cells (rBMSCs); Osteoblastic differentiation

收稿日期:2011-02-27; 修回日期:2011-03-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770534, 10972149)。

通讯作者:李良,教授, Tel:(028)85502314; E-mail:lilianghx@163.com。

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一类具有多向分化潜能的原始干细胞, 具有自我复制和多向分化能力, 将这种干细胞施以合适的化学诱导物, 便可向一定的目的细胞分化^[1]。研究发现, 成骨化学诱导剂作用一定时间后, BMSCs 出现成骨细胞相关表型, 并向成骨细胞定向分化^[2]。BMSCs 也是对机械应力最敏感细胞之一, 应力刺激 BMSCs 骨向分化是牵张成骨以及骨折愈合过程中新骨生成的关键细胞学基础^[3,4]。本课题组前期研究发现, 在力学刺激下, BMSCs 能够合成、分泌表达成骨细胞特异性的蛋白和细胞外基质成分, 包括早期出现的骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、ALP、I 型胶原等, 以及较晚出现的骨钙素 (osteocalcin, OCN) 等^[5]。但是有关力学应变和成骨化学诱导剂共同作用对 BMSCs 的影响研究较少。因此, 在前期研究基础上, 本研究应用双轴力学应变加载装置对成骨诱导剂诱导的大鼠骨髓间充质干细胞 (rat bone mesenchymal stem cells, rBMSCs) 施加周期性机械张力刺激, 并检测力学刺激后 ALP、COL I 和 OCN 的基因表达和钙化结节形成, 以期探索成骨化学诱导因素和力学刺激在 rBMSCs 向成骨细胞转化过程的相互作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

健康 Sprague-Dawley 新生大鼠 (1 周龄), 雌雄不拘, 由四川大学实验动物中心提供。DMEM-LG 培养基、胎牛血清 (FBS)、纤维连结蛋白 (fibronectin, FN)、TRIzol/TMRNA Isolation Reagent 均购于 Gibco 公司; Percoll 分离液 (中科院); qRT-PCR 试剂盒、IQSYBR Green supermix 购于 TOYOBO 公司; 引物设计与合成由宝信生物工程有限公司完成。CO₂ 细胞孵箱 (SANYO); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad)。双轴力学应变加载装置由四川大学基础医学与法医学院生物医学工程研究室研制。

DMEM 完全培养液: DMEM-LG + 20% FBS + 青霉素 100 U/mL + 链霉素 100 μg/mL。成骨诱导培养液: DMEM 完全培养液 + 0.1 μmol/L 地塞米松 + 50 μmol/L 维生素 C + 10 mmol/L β-甘油磷酸钠。

1.2 方法

1.2.1 骨髓间充质干细胞的体外培养 采用常规

密度梯度离心法分离大鼠骨髓间充质干细胞^[6]。所获细胞用血细胞计数板计数, 以 4×10^6 /mL 密度接种于培养瓶, 2 mL/瓶, 加入 DMEM-LG 完全培养液, 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养。第 5 d 首次更换培养液, 以后每 3 d 换液 1 次, 直至细胞长成融合状态时进行细胞传代。取 3~4 代细胞用于实验。

1.2.2 实验分组

(1) 成骨诱导 3 d 组: 成骨诱导培养液培养 rBMSCs, 同时加载力学应变 3 d。

(2) 成骨诱导 6 d 组: 成骨诱导培养液培养 rBMSCs, 同时加载力学应变 6 d。

(3) 非成骨诱导 3 d 组: DMEM-LG 完全培养液培养 rBMSCs, 同时加载力学应变 3 d。

(4) 非成骨诱导 6 d 组: DMEM-LG 完全培养液培养 rBMSCs, 同时加载力学应变 6 d。

1.2.3 周期性双轴力学应变加载 采用双轴力学应变加载装置对 rBMSCs 进行力学刺激 (见图 1)。力学应变培养小室预先用 10 μg/mL FN 溶液涂层, 取第 3~4 代 rBMSCs 以 1×10^5 /mL 密度接种于已

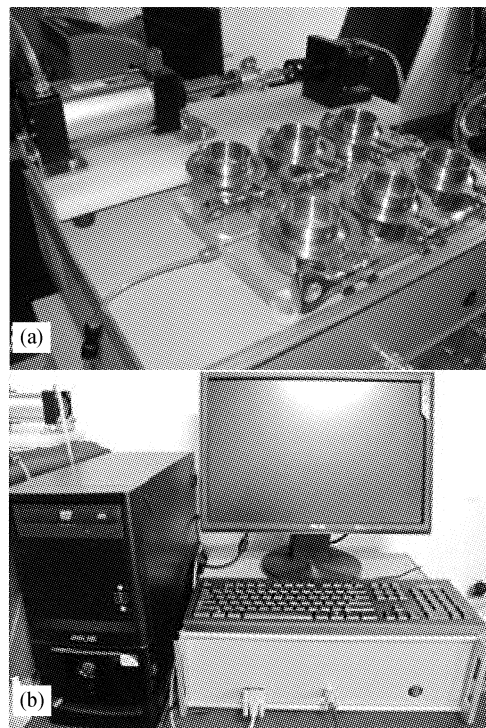


图 1 双轴力学应变装置 (a) 培养小室和空气抽吸系统, (b) 驱动与控制系统

Fig.1 The biaxial mechanical strain system
(a) Culture chamber and the air suction system,
(b) Drive and control system

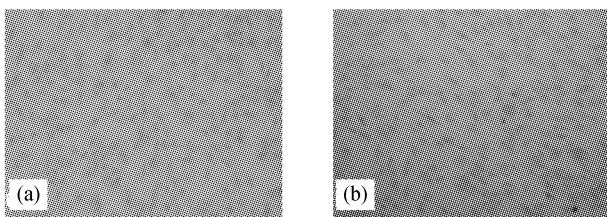
处理的双轴力学应变培养小室,每个培养小室接种1 mL,加入DMEM-LG完全培养液。待细胞生长至70%~80%融合状态时,弃去原培养液,分别在成骨诱导组加入成骨诱导培养液,非成骨诱导组加入DMEM-LG完全培养液。选取2%应变,1 Hz频率对rBMSCs进行力学应变加载。每天加载3次,每次2 h,间隔2 h。

1.3 检测指标

1.3.1 钙化结节 分别在加力3 d和6 d后,采用茜素红对各组进行钙化结节染色,观察rBMSCs成骨分化效应。

1.3.2 ALP、COL I 和 OCN mRNA 表达 力学刺激结束后,用预冷的PBS清洗细胞2次,每个培养小室加1 mL Trizol提取细胞总RNA,取细胞总RNA 2 μ L,加入0.1% DEPC水98 μ L,分别于紫外分光光度计260 nm和280 nm处读取A值, A_{260}/A_{280} 值为1.8~2.0之间方可使用。并用ReverTra Ace qPCR RT试剂盒将所提取的mRNA逆转录为cDNA。取逆转录产物进行实时荧光定量RT-PCR;引物标记采用荧光染料SYBR qPCR Mix。所用引物如下:

COL I 上游引物为5'-CGAGTATGGAAGCGA-AGG-3',



下游引物为5'-GCAGTGATAGGTGATGTTCT-3';
OCN 上游引物为5'-GCAGTAAGGTGGTGAA-TAGA-3',

下游引物为5'-AACGGTGGTGCCATAGAT-3';
ALP 上游引物为5'-GTGGAAGGAGGCAGGA-TT-3',

下游引物为5'-TCAGCAGTAACCACAGTCA-3';
GAPDH 上游引物为5'-TGGGTGTGAACCAC-GAGAA-3',

下游引物为5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'。

各rBMSCs组的COL I、OCN和ALP的RT-PCR产物分别与相应GAPDH的产物比较,其比值为相应参数mRNA的相对表达量。

1.3 统计学处理

所有检测均重复测定3次,所有参数用SPSS 10.0软件中ANOVA做统计学处理,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 力学应变和成骨诱导剂对各组细胞钙化结节形成的影响

成骨诱导6 d组出现明显的钙化结节,其余各组未见明显钙化结节形成(见图2)。

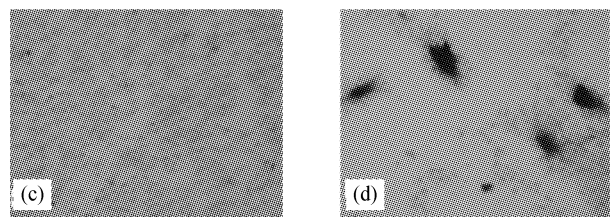


图2 力学应变和成骨诱导剂对各组细胞钙化结节形成的影响(40 \times) (a)非诱导3 d组,(b)非诱导6 d组,(c)诱导3 d组,(d)诱导6 d组
Fig.2 The effects of mechanical strain and chemical inductor on calcified nodules (a)Uninduced-3d group, (b) Uninduced-6d group, (c) Induced-3d group, (d) Induced-6d group

2.2 ALP mRNA 表达

力学应变作用3 d和6 d,非诱导组之间ALP mRNA表达量无明显差异($P > 0.05$);而成骨诱导6 d组ALP mRNA表达量比成骨诱导3 d组增加了2.1倍;与相应非诱导组比较,成骨诱导组ALP mRNA表达量分别增加了0.6倍与2.7倍,差异有显著性($P < 0.05$)(见图3)。

2.3 COL I mRNA 表达

力学应变作用3 d,成骨诱导组COL I mRNA表

达量比非诱导组增加了3倍;力学应变作用6 d,成骨诱导组COL I mRNA表达量比非诱导组增加了3.2倍,差异均有显著性($P < 0.05$)。与相应力学应变作用3 d比较,非诱导6 d组和成骨诱导6 d组COL I mRNA表达量分别增加了0.9倍,而成骨诱导3 d组COL I mRNA表达量比非诱导6 d组增高0.5倍。

2.4 OCN mRNA 表达

力学应变作用3 d和6 d,成骨诱导组OCN mR-

NA 表达量与相应非诱导组比较分别增加 11.8 倍和 10 倍,差异有显著性($P < 0.05$);与相应力学应变作用 3 d 比较,非诱导 6 d 组和成骨诱导 6 d 组 OCN mRNA 表达量分别增加 2 倍和 0.61 倍,而成骨诱导 3 d 组 OCN mRNA 表达量比非诱导 6 d 组增高 5 倍(见图 3)。

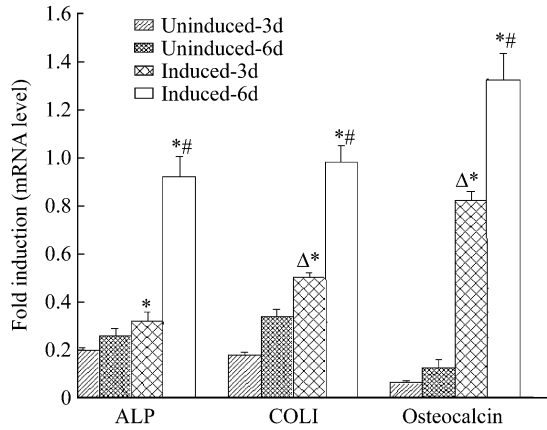


图 3 力学应变作用后各组 rBMSCs 的 ALP、COL I、OCN mRNA 表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 mRNA expression of ALP, COL I, OCN in all groups after mechanical strain ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

体外实验验证在单纯诱导剂作用下和单纯在力学因素的影响下, MSCs 均可出现骨向分化。但成骨诱导剂和力学刺激共同作用对 MSCs 影响,目前报道较少。

近年来,许多文献报道了机械应力对体外培养 MSCs 向成骨细胞分化的影响,但由于采用的力学加载装置及所选用的细胞种类不同而结果不一致^[3, 7-10]。Koike 等^[7]用 Flexercell 双轴应力系统对干细胞系 ST2 细胞施加 0.8% ~ 15% 张应变,结果显示较低张应变(0.8% ~ 5%)能够更有效地促进成骨分化。Jagodzinski 等^[8]对人 MSCs 施加 2% 和 8% 的循环张应变,均能促进 BMSC 向成骨方向分化。本课题组前期实验结果也发现,力学刺激对 rBMSCs 骨向分化能力明显强于静态培养的 rBMSCs 骨向分化能力。本实验中,对 rBMSCs 施加应变幅度为 2%,频率为 1 Hz 的力学应变,每次 2 h,间隔 2 h,每天 3 次,持续 3 d 和 6 d。结果发现,力学应变作用

后,成骨诱导 6 d 组出现明显的钙化结节,其余各组均无明显钙化结节形成。而 Simmons 等^[9]报道,对人 BMSCs,施加大小 3%,频率 0.25 Hz 的力学应变,持续加力 16 d 后才出现较为明显的钙化结节;同时,本实验中成骨诱导 3 d 组的 OCN、COL I mRNA 表达量明显高于非诱导 6 d 组,说明在成骨诱导剂和力学应变共同作用下,可加速促进 rBMSCs 向成骨细胞分化。

MSCs 向成骨细胞分化过程中能够合成、分泌表达成骨特异性的蛋白和细胞外基质成分,其中,ALP、COL I 和 OCN 是 MSCs 成骨分化过程中极为重要的分化产物。碱性磷酸酶是成骨细胞的一种细胞表面标志性酶,被普遍认为是成骨细胞分化和功能的标志,能够反映成骨细胞合成 I 型胶原、形成骨基质的能力。有学者发现 MSCs 成骨诱导后,ALP 是最早出现的成骨性标志物,并随着成骨分化程度的增加表达增强^[11]。本实验中,力学应变作用 3 d 和 6 d,非诱导组之间 ALP mRNA 表达量无明显差异($P > 0.05$),而成骨诱导 6 d 组 ALP mRNA 表达量比成骨诱导 3 d 组显著增强;与相应非诱导组比较,成骨诱导组 ALP mRNA 表达量明显增强。

I 型胶原是体外培养成骨细胞所分泌的特异性胶原蛋白,所形成的网状结构也是成骨细胞矿化功能实现的前提^[12]。本实验结果发现,与非诱导组比较,力学应变作用 3 d 和 6 d,成骨诱导组 COL I mRNA 表达量均有显著增加($P < 0.05$)。与力学应变作用 3 d 比较,非诱导 6 d 组和成骨诱导 6 d 组 COL I mRNA 表达量均明显增强($P < 0.05$);同时,与非诱导 6 d 组比较,成骨诱导 3 d 组 COL I mRNA 表达量明显增强($P < 0.05$)。

OCN 是成骨细胞合成分泌的一种非胶原蛋白,是反映成骨细胞分化成熟的指标,能准确表示成骨细胞的活性,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的正常钙化过程^[12]。本实验结果发现,力学应变作用 3 d 和 6 d,成骨诱导组 OCN mRNA 表达量与相应非诱导组比较,均显著增加($P < 0.05$);同时,与力学应变作用 3 d 比较,非诱导 6 d 组和成骨诱导 6 d 组 OCN mRNA 表达量均明显增强($P < 0.05$)。与非诱导 6 d 组比较,成骨诱导 3 d 组 COL I mRNA 表达量明显增强($P < 0.05$)。本实验结果还发现,非诱导组 OCN mRNA 表

达量较低,其原因可能是由于 OCN 是成骨细胞分化成熟的指标,出现时间较晚,因此,单独力学应变在短时间内可能不会诱导 rBMSCs 为成熟的成骨细胞。而成骨诱导剂与力学应变共同作用会在短时间内诱导 rBMSCs 为成熟的成骨细胞,这也应证了本实验中钙化结节形成结果。

实验结果提示,成骨诱导剂对力学刺激 MSCs 向成骨细胞分化具有促进作用。

参考文献:

- [1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893):41-49.
- [2] 李冬菊,葛冬霞,吴文超,等. 去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2005,36(3):318-321.
- [3] Qi MC, Hu J, Zou SJ, *et al.* Mechanical strain induces osteogenic differentiation: Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2008, 37(5):453-458.
- [4] 江凌勇,赵志河,王军,等. 张应力对成骨分化骨髓间充质干细胞 ODF mRNA 表达的影响[J]. *医用生物力学*,2010,25(6):428-432.
Jiang LY, Zhao ZH, Wang J, *et al.* Effects of mechanical tensile stress on the expression of ODF mRNA in osteoblasts differentiated from rBMSCs in vitro [J]. *J Med Bio-*
- mech*, 2010,25(6):428-432.
- [5] 井燕,李良,李毅,等. 力学应变对大鼠骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化能力的影响[J]. *生物医学工程学杂志*,2006,23(3):542-545.
- [6] 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]. *生物医学工程杂志*, 2006; 23(1):129-135.
- [7] Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, *et al.* Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2[J]. *J Bone Miner Metabo*, 2005, 23(3):219-225.
- [8] Jagodzinski M, Drescher M, Zeichen J, *et al.* Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells[J]. *Eur Cell Mater*, 2004,16(7):35-41.
- [9] Simmons CA, Mattis S, Thornton AJ, *et al.* Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway [J]. *J Biomech*, 2003, 36(8):1087-1096.
- [10] Mizuno M, Kuboki Y. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen[J]. *J Biochem*, 2001,129(1):133-138.
- [11] Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength[J]. *Osteoporosis*, 2006,17(3):319-336.
- [12] 徐青,田小秀. 成骨细胞分化产物以其生化标准研究进展[J]. *临床荟萃*, 2003,18(1):55.