

体外培养成骨细胞研究新进展

Development of osteoblast culture in vitro

李楠 王和鸣

LI Nan, WANG Heming

【关键词】 成骨细胞; 细胞, 培养的 【Key words】 Osteoblasts; Cells, Cultured

成骨细胞是骨形成细胞,对骨组织的生长发育、骨代谢平衡、骨量维持和损伤修复起关键作用。一旦成骨细胞生成不足或功能降低,不能及时补充由于破骨细胞活动所导致的骨吸收、骨量丢失,将直接导致骨形成减少。随着细胞培养技术的发展,人们已经从许多动物的颅骨、骨髓基质和骨膜中成功分离培养出了具有典型成骨细胞特征的细胞株,研究表明培养后的成骨细胞在体内仍具有良好的成骨能力,在不同环境下可以形成骨组织。将分离培养的成骨细胞大量增殖后回植于体内,具有取材方便,成骨能力好等优点,且不需考虑免疫反应和传播疾病的危险。

1 成骨细胞的演变阶段

成骨细胞在骨形成过程中可划分为分化期、增殖期、矿化期和休止期四个阶段,但这四个阶段之间并没有明确的界限,很多因素可调节这几个阶段从而调控骨形成。在分化早期碱性磷酸酶的表达是成骨细胞分化的主要特征之一,增殖下调可提前诱导 ALP mRNA 表达。而 ALP 的高峰表达发生在增殖期,为矿化期磷酸盐的聚集提供有利条件。增殖期成骨细胞在有丝分裂原作用下复制 DNA 和细胞分裂,最新进展表明通过抑制与细胞周期调节相关的基因会导致增殖的停止,目前已发现的与增殖激活有关的基因有 c-Myc、c-Fos、c-Jun 等^[1,2],它们作为即刻早期表达基因在细胞的增殖分化中发挥着重要的作用,可将来源于细胞膜受体的促有丝分裂信号和生长发育信号传入胞浆和细胞核,通过释放局部骨生长因子特异性的增加有丝分裂原活化蛋白激酶酪氨酸磷酸化作用和活性以促进成骨细胞增殖;c-Fos、c-Jun 基因表达在增殖晚期明显下调,同时伴随成骨细胞增殖减慢。此期同时还能表达的基因有胰岛素样生长因子、血小板衍生生长因子、成骨细胞特异性转录因子、转化生长因子、型胶原等。在细胞增殖后期,编码细胞外基质成熟的蛋白的基因开始表达,型胶原的合成在细胞增殖期占主导地位,并与细胞的进一步分化有着很大的关系。骨桥蛋白的 mRNA 在成骨细胞分化的早期即开始表达,并在细胞增殖期和矿化期呈现出两个合成高峰。前者被认为可能和介导成骨细胞与胶原的粘附有关,促进成骨样细胞贴附于细胞外基质;而后者则因其存在着

潜在的钙结合位点而被认为在基质矿化中起着调节机体生长的作用。在成骨细胞进入矿化期,细胞内的 ALP 活性下降,而与细胞外基质中羟磷灰石沉积相关的基因表达达到高峰,如骨桥蛋白、骨钙素、骨唾液酸蛋白基因。骨钙素是维生素 K 依赖、维生素 D 诱导的钙连接基质蛋白,骨钙素 mRNA 的转录和蛋白合成是成骨细胞进入矿化期的主要指征之一,是成骨细胞成熟的标志。

2 成骨细胞的增殖和分化的调节

成骨细胞的产生、发展的各个阶段均需借助于精细的调控,以最终完成正常的骨形成,ALP、型胶原和骨钙素等的表达不仅代表了成骨细胞演化的不同阶段,而且对成骨细胞的表型发育起着一定的诱导作用。已知许多全身和局部调节因子如 PTH、性激素、IGF、TGF- β 、PDGF、IL-1 等都对成骨细胞发挥作用并影响成骨细胞发展的各个阶段,调节成骨细胞功能,新近发现的还有:

2.1 血管内皮生长因子(VEGF) 血管的侵入是骨形成的必要条件,而 VEGF 的失活会使血管的生成减少,因此血管内皮细胞分泌的血管生成因子 VEGF 可能在成骨细胞的分化和增殖中起着重要作用。Martine 等^[3]在 IGF 促成骨细胞分化实验中发现有 VEGF-A 高表达,加入 PTH 相关肽抑制成骨细胞分化则导致 VEGF-A 减少。因此在软骨质内骨形成和骨折愈合过程中 VEGF 在血管发生和骨形成间的作用值得进一步探讨。

2.2 溶血磷脂酸(LPA) 是磷脂代谢的中间产物,细胞促有丝分裂剂,可以促进体外培养成骨细胞 DNA 合成和增殖,Andrew 等^[4]认为 LPA 作用于成骨细胞 LPA 受体 LPA-1/edg-2/vzg-1,在细胞分裂剂活化蛋白激酶的磷酸化作用下,可在短时间内刺激成骨细胞有丝分裂原活化蛋白激酶的磷酸化,从而促进成骨细胞增殖。

2.3 成骨细胞因子 45(OF45) Donna 等^[5]在小鼠骨髓细胞编码细胞外基质成熟的蛋白 DNA 中发现骨细胞所独有的 DNA 片段,根据其 DNA 编码命名为 OF45(Osteoblast factor of 45 kDa),发现在成骨细胞矿化的早期能检测到 OF45 表达,在骨组织中 OF 的表达可促进基质成熟和提高细胞的矿化能力。认为 OF45 控制着成骨细胞的矿化能力,OF45 的表达可作为成骨细胞矿化期的一个重要指征。

2.4 成骨生长肽(OGP) 在生理状态下,大量存在于人和哺

乳动物的血清中,是新近被发现的具有促进成骨和刺激造血的多肽类生长因子,愈合的骨髓组织能产生促进成骨细胞增殖的活性因子,对细胞的增殖和 ALP 活性的表达,呈现低浓度时抑制而高浓度时促进。在骨丢失的预防以及骨质疏松症的治疗方面有很大的潜力^[6]。

2.5 核心结合因子-1(CBF-1) 是骨形成的关键基因,决定着成骨细胞的发生与分化,它在维持正常的骨骼生长发育中起着重要作用^[7]。人们应用靶基因阻断或定点突变技术,成功地制造出 CBF-1 基因缺失或突变的小鼠,并对其胚胎骨骼的发育过程进行了研究。结果发现 CBF-1 基因缺失的纯合子出生后因没有肋骨导致呼吸困难而很快死亡。X 线显示完全没有骨化组织的成骨细胞形成,因此整个成骨过程均被终止^[8]。Ducy 等最近利用只在出生后分化的成骨细胞中过度表达 CBF-1 DNA 结合区的转基因小鼠,证明 CBF-1 除调节成骨细胞分化外,还调节已分化成骨细胞的功能和其它生长因子的基因表达,从而控制出生后骨骼形成和发育的生理过程^[9]。CBF-1 可能不仅扮演了促使成骨细胞分化的“总开关”角色,也可能是成骨细胞激发破骨细胞形成的关键因子。因此对于 CBF-1 的深入研究可能有助于揭示间充质细胞向成骨细胞转化的主要机制。

体外培养的成骨样细胞来源于组织内的前成骨细胞,具有分裂增殖能力;在体内成骨细胞本身是不分裂的,其数量的增加完全依赖于其前身细胞的不断增殖、分化。目前大多数学者认为细胞因子促增殖机制主要是通过成骨细胞膜上的特异性受体促使有丝分裂信号向胞内传递,促进 DNA 的合成和细胞的分裂增殖:与其相应受体结合活化膜内磷脂酶 C,刺激脂酶磷脂产生三磷酸肌醇(IP3)和甘油二酯(DAG)。IP3 主要对内质网起作用,DAG 则可激活蛋白激酶 C(PKC)使细胞内相关蛋白磷酸化或分解成乙酰甘油和花生烯酸,从而刺激细胞从 G0/G1 期进入 S 期。通过内源性细胞内底物的自动磷酸化而调节酶的活性。膜上受体酪氨酸激酶活化刺激受体上部分酪氨酸磷酸化,使酪氨酸转移酶活性增强,从而促进细胞分裂增殖。

成骨细胞不仅决定成骨,同时也调节破骨细胞性骨吸收,是骨代谢的主要功能细胞。IL-1、TNF、IGF 和 TNF- α 等引起破骨作用增加的细胞因子,都具有刺激成骨细胞分泌前列腺素 E₂、IL-6 等细胞因子的作用。而成骨细胞产生的 IL-6 可直接作用于破骨细胞前体及破骨细胞,以增加破骨细胞的数量,增强破骨作用。破骨细胞的分化发育及其骨吸收功能,不仅需要骨吸收刺激因素的存在,而且需要与成骨细胞的直接接触和相互作用才能够完成。破骨细胞分化因子(ODF)与破骨细胞生成抑制因子(OCIF)的发现,揭示了成骨细胞介导破骨细胞骨吸收的分子基础,以及破骨细胞分化与功能调节最新机制。ODF 是各种骨吸收刺激因子与破骨细胞之间的重要偶联因子^[10],而 OCIF 具有对破骨细胞分化与功能的特殊拮抗作用^[11],两者构成一种骨吸收代谢的正负调节体系。进一步研究成骨细胞 ODF 与 OCIF 产生的调节规律,及其与成骨细胞骨形成功能之间的关系,将有助于我们认识骨吸收与骨形成的偶联与平衡问题;而对于 ODF 与 OCIF 的应用研究,将有可能为钙磷代谢紊乱、骨质疏松等代谢性骨

病的诊断与治疗提供新的有效手段。另外,ODF 与 OCIF 的发现,还揭示了骨细胞与免疫细胞之间的密切关系,对于研究骨代谢与免疫系统的调节作用,以及免疫制剂对骨代谢的影响,都开辟了新的途径,具有重要的理论意义和应用前景。

3 中药对成骨细胞活性的影响

随着现代分子生物学实验技术与方法的不断改进和发展,国内一些学者们已开始尝试从分子生物学水平探讨中药影响骨改建的作用机制。目前对体外培养成骨细胞的研究主要集中在活血祛瘀和补肾壮骨这两类骨科常用中药方面。

俞文华等^[12]认为由首乌、苁蓉等组成的具有补肾益精、延缓衰老的固真方可促进 ROS17/2.8 细胞 DNA 和 ALP 的合成,促进 UMR106 细胞中与增殖相关的原癌基因 c-Fos mRNA 表达和骨钙素基因 mRNA 表达。提高大鼠成骨样细胞甲状旁腺素受体的结合率,增进 PTH 刺激后细胞内钙的释出。胡光亮等^[13]认为由淫羊藿、杜仲等组成的用于治疗骨质疏松症的补肾密骨液以剂量依赖方式促进成骨样细胞的增殖,同时可抑制体外培养颅骨的骨吸收。李芳芳等^[14]观察到淫羊藿可促进成骨细胞的增殖,但对成骨细胞 ALP 活性无影响。王拥军等^[15]提取黄芪的主要活性成分黄芪多糖进行定性定量分析,认为在短期内促进成骨细胞增殖和增强 ALP 活性,对自然衰老成骨细胞的增殖能力也有一定恢复作用,而长期高浓度则抑制成骨细胞增殖,降低其活性。

高晓燕等^[16]观察到牛膝的醇提液及其石油醚和乙酸乙酯萃取的混合物对细胞具有较强的促进增殖作用,因而认为牛膝中含有直接刺激成骨细胞增殖的成分。丁寅等^[17]发现丹参可增强分化晚期的 MC3T3-E1 细胞内 ALPase 活性,而在分化早期则表现为抑制作用,对各生长分化期的细胞内 DNA 合成均无影响。认为不同分化阶段的成骨细胞具有不同的生物学特性,这可能是导致丹参对不同分化阶段的细胞产生相反作用的主要原因。丹参促进新骨生成的作用机制可能是增强了成骨细胞本身的功能与活性。

由此可见,补肾壮骨类中药可以促进体外培养成骨细胞的增殖,目前已被大多数国内学者们所认可,然而有关于作用机制方面的研究尚缺乏一定的深度。活血化瘀类中药的促增殖作用不同的学者有不同的观点,其确切的影响还需进一步的观察。

4 体外培养成骨细胞研究中必须注意的几个问题

然而,许多学者在研究中也观察到相同的实验干涉因素往往也会导致相反的实验结果。比如在鼠骨肉瘤 ROS17/2.8 细胞系培养中,BMP-7 抑制细胞增殖,而在人成骨细胞培养中,BMP-7 刺激细胞增殖。有人认为转化生长因子(TGF- β)可以刺激成骨细胞增殖,但对分化没有作用^[18]:能增加其 DNA 的合成,而对 ALP 活性无影响。在有血清培养的条件下,低剂量的 TGF- β 增加 DNA 和胶原的合成,抑制 ALP 活性,并引起细胞形态学上明显变化,高剂量的 TGF- β 抑制胶原合成,对 DNA 合成没有作用;在无血清的培养条件下,TGF- β 对 ALP 表现为双相作用,高剂量抑制但低剂量增强 ALP 的活性,并且对胶原合成只有轻度的刺激作用。而 Tsuchida 等^[19]认为 TGF- β 对成骨细胞增殖无作用但刺激其分化:对来源于正常人肋骨的成骨细胞研究发现,

TGF- β 不影响其细胞增殖,但刺激其蛋白合成和增强 ALP 的活性;Hefferan 等^[20]进一步证实了除上述作用外,还发现 TGF- β 能增加来源于正常人肋骨的成骨细胞型胶原表达。Kumar 等^[21]对 ROS17/2.8 研究发现,TGF- β 降低其细胞增殖率,增加了胶原的产生和 ALP 活性,Kaji 等^[22]证实 TGF- β 提高编码纤维结合素、型前胶原、骨桥蛋白、ALP 和骨连接素的基因转录水平。

导致这些不同实验结果的因素归纳起来包括:细胞模型不同,目前用于此研究的细胞模型分为四类:一是原代分离培养的成骨样细胞群,该细胞群离体时间短,生物学特性及成骨能力与体内相比具有很好的相似性;二是从正常组织中克隆传代的成骨样细胞株,它具有成骨细胞固有的生物学特性,细胞成分单一,与体内成骨存在一定差异;三是从肿瘤细胞中克隆传代筛选建立的成骨样细胞株,该细胞株增殖速度快,具有致瘤性,与体内成骨有较大差异;四是利用转基因技术建立的永生细胞株,该细胞多为非二倍体细胞,与体内成骨细胞生物学特性和成骨能力差异很大。这些来源不同的成骨细胞,具有共同的表型结构及相似的生物学特性,但对外界的刺激反应性仍不尽相同。因此,在体外实验中应注意不同来源细胞对同一刺激物产生结果可能存在一定差异性。同一类型的细胞由于细胞来源、种属、取材部位及所选动物的发育阶段不同,其结果也可能不一致。培养条件不同,包括有细胞分离传代的方法、细胞接种的密度大小、培养基的不同选择、培养液中有无血清和其他相关因子存在等因素均可影响实验结果。干扰因素的剂量、处理时间、方式的不同对成骨细胞的作用机制不同,其实验结果也可能不一致。

参考文献

- Mitsikostas DD, Sanchez RM. Receptor systems mediating c-fos expression with in trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, 35(1): 20-35.
- Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, et al. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *PNAS*, 2000, 97(14): 29-34.
- Martine M, Deckers L, Marcel K, et al. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 2000, 141(5): 67-74.
- Andrew G, Tatjana B, Dorit N, et al. Lysophosphatidic acid is an osteoblast mitogen whose proliferative actions involve gi proteins and protein kinase C, but not P42/44 mitogen-activated protein Kinases. *Endocrinology*, 2001, 142(3): 98-106.
- Donna N, Petersen GT, Tkalcovic AL, et al. Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. *J Biol Chem*, 2000, 275(46): 172-180.

- 李群,王智兴,朱雅萍.成骨生长肽对新生大鼠颅盖骨成骨细胞样细胞影响的生长分析. *上海实验动物科学*, 2000, 20(2): 227-229.
- David J, Rebecca R, Xuhao Yang, et al. The osteoblast-specific transcription factor cbfal contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 163-172.
- G Xiao, D Jiang, Thomas M, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor Cbfal. *J Biol Chem*, 2000, 275(6): 453-459.
- Tamara A, Lisa C, Patricia D, et al. TGF- β -induced repression of CBF 1 by Smad3 decreases cbf 1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J*, 2001, 20(9): 254-272.
- Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 2000, 141(9): 478-484.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor and osteoprotegerin: a mechanism by which/inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998, 139: 329-337.
- 俞文华, 刘晓军, 陆通, 等. 中药固真方对成骨样细胞 UMR106 增殖分化的影响. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(3): 400-402.
- 胡光亮, 杜靖远, 王洪, 等. 补肾密骨液对骨代谢影响的体外实验研究. *中国骨伤*, 2000, 13(2): 83-85.
- 李芳芳, 宋士军, 李建平, 等. 淫羊藿对成骨细胞增殖分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 1999, 5(2): 70.
- 王拥军, 宋莉君, 孙爱贞, 等. 黄芪多糖的提取及对体外培养成骨细胞成骨能力的影响. *中国中医骨伤科杂志*, 1999, 7(6): 1-4.
- 高晓燕, 王大为, 李发美, 等. 牛膝提取物对成骨样细胞增殖的作用. *沈阳药科大学学报*, 2000, 17(3): 210-212.
- 丁寅, 相马俊一, 山本照子, 等. 丹参对克隆化成骨细胞株 MC3T3-E1 细胞影响的实验研究. *第四军医大学学报*, 1996, 17(4): 261-263.
- Kassem M, Kveiborg M, Eriksen EF. Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol. *Eur J Clin Invest*, 2000, 30(5): 429-437.
- Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto, et al. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF- β family. *J Biol Chem*, 2000, 275(52): 88-96.
- Hefferan TE, Reinholz GG, Rickard DJ, et al. Overexpression of a nuclear protein, TIEG, mimics transforming growth factor- β action in human osteoblast cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(27): 255-259.
- Kumar A, Novoselov V, Anthony J, et al. Nodal signaling uses activin and transforming growth factor- β receptor-regulated smads. *J Biol Chem*, 2000, 276(1): 56-61.
- Kaji T, Yamada A, Miyajima S, et al. Cell density-dependent regulation of proteoglycan synthesis by transforming growth factor- β 1 in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 63-70.

(收稿:2001-07-24 编辑:李为农)

· 读者 作者 编者 ·

关于一稿两投和一稿两用等现象的处理声明

文稿的一稿两投、一稿两用、抄袭、假署名、弄虚作假等现象属于科技领域的不正之风,我刊历来对此加以谴责和制止。为防止类似现象的发生,我刊一直严把投稿时的审核关,要求每篇文章必须经作者单位主管学术的机构审核,附单位推荐信(并注明资料属实、无一稿两投等事项)。希望引起广大作者的重视。为维护我刊的声誉和广大读者的利益,凡核实属于一稿两投和一稿两用等现象者,我刊将择期在杂志上提出批评,刊出其作者姓名和单位,并对该文的第一作者所撰写的一切文稿 2 年内拒绝在本刊发表,同时通知相关杂志。欢迎广大读者监督。

本刊编辑部