

· 基础研究 ·

缺氧对成人成骨细胞增殖及分化的影响

姚琦¹, 张元和², 姜华³, 王继芳¹

(1. 解放军总医院骨科, 北京 100853; 2. 锦州医学院附属一院骨科; 3. 解放军总医院口腔科)

【摘要】 目的:在缺氧条件下体外培养成人成骨细胞,探讨缺氧对成骨细胞增殖及分化的影响。方法:将手术中取得的成人髂骨骨块,使用酶消化法进行培养,当细胞传至第 2代时,建立成骨细胞缺氧模型,用 MTT法观察各组成骨细胞增殖活力的变化;用骨钙素放射免疫法分别检测各组骨钙素含量;用激光共聚焦显微镜对两组培养前 3 d细胞血管内皮生长因子(VEGF)光密度值作定量分析。结果:正常组细胞增殖活力较缺氧组强;缺氧组细胞 VEGF的光密度值及骨钙素含量均高于正常组。结论:缺氧抑制成骨细胞增殖,缺氧(1~3 d)诱导成人成骨细胞 VEGF的高表达并促进成骨细胞的分化。

【关键词】 缺氧; 成骨细胞; 增殖; 分化

Effects of hypoxia on osteoblast proliferation and differentiation YAO Qi^{*}, ZHANG Yuan-he, JIANG Hua, WANG Ji-fang^{*} Department of Orthopaedics, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects of hypoxia on osteoblasts proliferation and differentiation. **Methods:** Obtained osteoblasts from the adults iliac bone during operation were cultured by the method of enzyme digestion in vitro. Hypoxic model of osteoblast were established when cell subculturing into the second generation. The cell proliferation and osteocalcin (OCN) content were detected by MTT and radioimmunoassay, respectively. The VEGF optical density (O. D.) value of cells (which were cultured for the first three days) were rationally analyzed by laser confocal microscope. **Results:** The cell proliferation was inhibited in the hypoxic group when the cells were cultured for the first three days. The O. D. value of VEGF and OCN content of the hypoxic group were more than that of the normal group. **Conclusion:** Hypoxia can inhibit the osteoblasts proliferation. Hypoxia (1 - 3 days) can induce the high expression of VEGF and advance the osteoblasts differentiation.

Key words Hypoxia; Osteoblasts; Proliferation; Differentiation

股骨头缺血性坏死是由于不同的病因,破坏了股骨头的血液循环,造成局部血管破裂,触发炎症反应,包括坏死组织中释放酶、肾上腺素介导的血管收缩,导致损伤区的局部缺氧,最终导致股骨头塌陷,髋关节功能障碍。有研究表明血管内皮生长因子(VEGF)基因转染能促进股骨头缺血性坏死的修复^[1]。因此,本实验采用缺氧条件下培养成人成骨细胞,探讨缺氧对成骨细胞增殖及分化的影响,同时观察血管内皮生长因子(VEGF)在缺氧不同时间的表达,为探索骨缺血性坏死等疾病的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 DMEM培养基(Gibco, USA);胎牛血清(Sigma, USA);胰蛋白酶(Gibco, USA);型胶原酶(Sigma, USA);噻唑蓝(MTT, Sigma),二甲亚砜(DMSO),骨钙素(OCN)免疫组化试剂盒(德国 Santa Cruz公司);OCN放免试剂盒(中国原子能公司);倒置显微镜(日本 Olympus),酶标仪(Labsystems Multiskan MS, Version 5.0) YJ-14S超净工作台

(苏州净化设备厂);激光共聚焦显微镜(德国 Leica公司)等。

1.2 成骨细胞的分离培养^[2] 将手术中取得的成人髂骨骨块,除去肌肉、骨膜, Hanks液冲洗,洗去骨髓细胞,直至松质骨接近透明为止。将髂骨块剪成 1 mm³大小,加入 0.2%胶原酶和 0.25%胰蛋白酶混合液搅拌消化约 0.5 h,离心 5 min,去上清,沉淀的骨粒继续消化 1 h,吸取上层细胞悬液离心 5 min,去上清,沉淀的细胞中加入 DMEM 培养液,吹打成细胞悬液并以 1 × 10⁵/ml 植入 25 cm²培养瓶中。加培养液(15%胎牛血清的 DMEM 培养液) CO₂ 孵箱中 37 培养。48 h 更换培养液 1 次。待原代细胞接近汇合时,用 0.25%胰蛋白酶 - 0.02% EDTA (1:1)混合液消化,以 5 × 10⁴/cm² 个细胞的密度接种于培养瓶,进行传代培养。

1.3 缺氧装置的构建 以橡皮塞密封培养瓶口,在橡皮塞上插入 2 个 7 号针头分别作为进气、排气孔,高纯氮气通过装有蒸馏水的已经高压灭菌处理的大烧瓶过滤后,经胶皮管与进气孔针头相连接,以 1 L/min 的流量持续充入 5 min,从出气孔抽气进行血气分析,使培养瓶达到相对缺氧状态。分为实验组(缺氧组)和对照组(正常组),实验组为在缺氧条件下培

养,对照组为在正常氧条件下培养。

1.4 成骨细胞的鉴定 通过倒置显微镜观察,对成骨细胞进行形态学鉴定,通过 ALP改良钙 钴法染色和 OCN免疫组化染色检测,对成骨细胞进行生化指标鉴定。

1.5 成骨细胞增殖情况检测 缺氧方案取 2代细胞,分别设正常氧组(A组)和缺氧 24、48、72 h(分别为 B、C、D)组作为实验对象,加入 0.25%胰酶消化收集细胞,1 000 r/min,离心 5 min, PBS洗沉淀 1次,加适量培养基,计数,以 5×10^4 /ml的密度,每孔 100 μ l,接种于 96孔培养板内,共接种 6组 36孔,每组 6孔平行,其中选 6孔,只加入等量培养基,而不加细胞,做空白对照,放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养 24 h,吸出 A、B、C、D培养基,用 PBS洗 1次,每孔加 10 μ l MTT,继续培养 2 h,吸弃孔内培养上清,每孔加入 1 ml DMSO-乙醇溶液 100 μ l(包括空白对照孔),震荡,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪上选择 570 nm波长测定每孔的光密度值(OD值)。

1.6 OCN含量测定 将成骨细胞分别传代培养 1、2、3 d,每天分别取正常氧组和缺氧组培养液 3瓶,每瓶 200 μ l,取无细胞的培养液作为空白组,冷冻干燥后按照 OCN放免试剂盒的步骤进行,得到两组细胞 OCN的含量。

1.7 VEGF表达的测定 分别在传代培养的 1、2、3 d,取出两组培养瓶中的盖玻片,4%多聚甲醛固定后加 抗(小鼠抗人 VEGF单克隆抗体,1:75 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育,加羊抗小鼠 抗,37 $^{\circ}$ C 孵育,罗丹明标记,激光共聚焦显微镜扫描,用 Leica图像处理系统进行成骨细胞 VEGF的光密度值的定量

分析。

1.8 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所得数据采用 SPSS 10.0统计软件进行 *t*检验和 *F*检验。

2 结果

2.1 成骨细胞鉴定 成骨细胞呈贴壁形生长,形态为梭形或多角形。ALP改良钙 钴法染色阳性细胞的胞质中有黑色颗粒,有些融合成块状(图 1)。OCN免疫组化染色结果:成骨细胞的胞浆染成棕色,胞核为蓝色(图 2)。

2.2 MTT比色法测定成骨细胞增殖功能 A、B、C、D组的 OD值分别为(0.256 5、0.147 5、0.064 3、0.045 5)。各组与正常组(A组)比较差异有统计学意义($P < 0.01$),D组与 B组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。可见 A组细胞的增殖活力最强,B、C、D组细胞的增殖活力随缺氧时间延长而逐渐减弱。

2.3 OCN含量的检测 见表 1,缺氧对成骨细胞 OCN含量的影响,在传代培养的前 3 d,缺氧组的 OCN含量均高于正常氧组,在传代培养的第 1、3天, $P < 0.05$,和传代培养的第 2 d, $P < 0.01$ 。

2.4 成骨细胞 VEGF表达的检测(见表 2) 由表 2和图 3、4可见:在传代培养的前 3 d,激光共聚焦显微镜下可检测到的 VEGF的光密度值(VEGF的光密度值与 VEGF表达的含量成正比),缺氧组大于正常组($P < 0.01$)差异有显著性统计学意义。

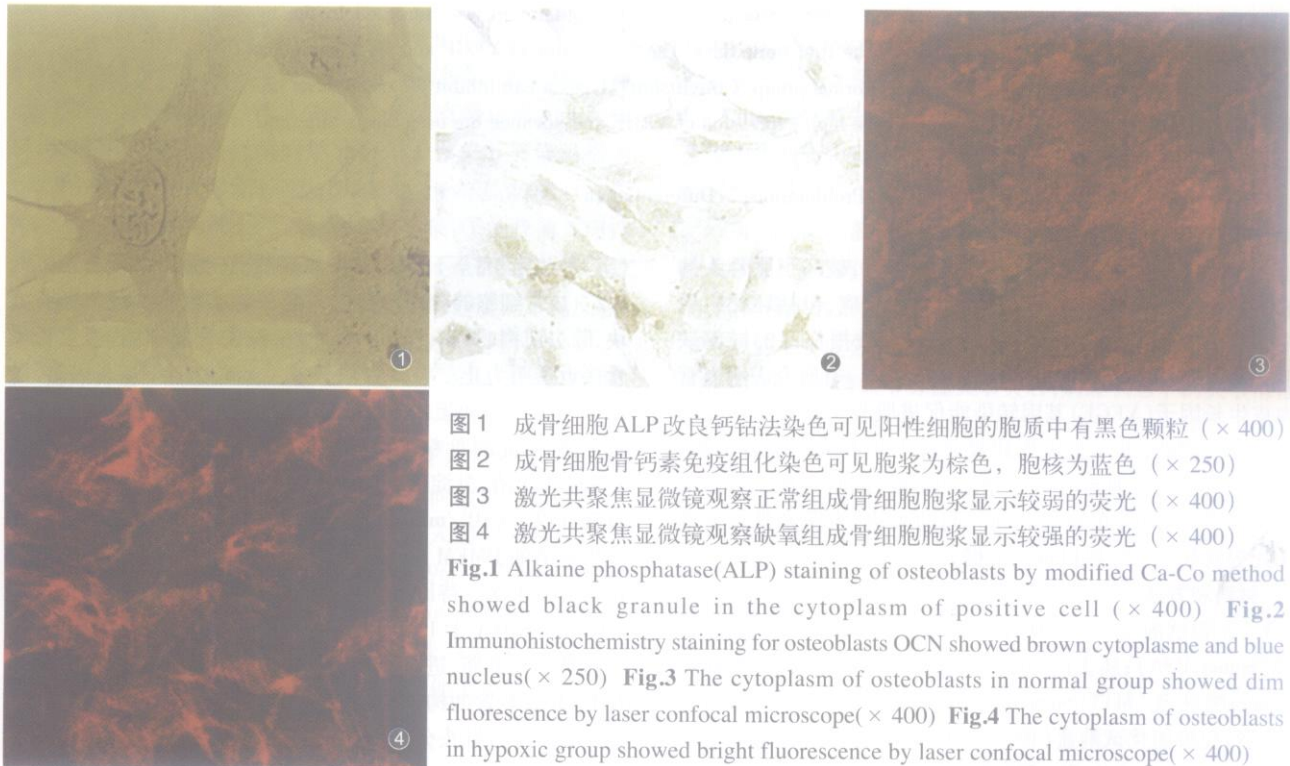


图 1 成骨细胞 ALP 改良钙钴法染色可见阳性细胞的胞质中有黑色颗粒($\times 400$)
 图 2 成骨细胞骨钙素免疫组化染色可见胞浆为棕色,胞核为蓝色($\times 250$)
 图 3 激光共聚焦显微镜观察正常组成骨细胞胞浆显示较弱的荧光($\times 400$)
 图 4 激光共聚焦显微镜观察缺氧组成骨细胞胞浆显示较强的荧光($\times 400$)
 Fig.1 Alkaine phosphatase(ALP) staining of osteoblasts by modified Ca-Co method showed black granule in the cytoplasm of positive cell($\times 400$) Fig.2 Immunohistochemistry staining for osteoblasts OCN showed brown cytoplasm and blue nucleus($\times 250$) Fig.3 The cytoplasm of osteoblasts in normal group showed dim fluorescence by laser confocal microscope($\times 400$) Fig.4 The cytoplasm of osteoblasts in hypoxic group showed bright fluorescence by laser confocal microscope($\times 400$)

表 1 两组成骨细胞 OCN含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The comparison of OCN content of osteoblast between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

Days	Normal group	Hypoxic group	t	P
1	1.51 ±0.34	3.02 ±0.13	- 6.74	0.021
2	3.31 ±0.30	5.69 ±0.45	- 10.31	0.009*
3	5.17 ±0.13 [#]	9.36 ±1.26 [#]	- 5.28	0.034

注:缺氧组与正常组比, $P < 0.05$, * $P < 0.01$; 培养第 3 天与第 1 天比较, [#] $P < 0.01$

Note: Hypoxic group vs normal group, $P < 0.05$, * $P < 0.01$; the third day after cultures vs the first day, [#] $P < 0.01$

表 2 两组成骨细胞 VEGF含量表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The comparison of the expression of VEGF OD value in osteoblast between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

Days	Normal group	Hypoxic group	t	P
1	69.86 ±6.84	88.28 ±3.04	- 7.61	3.29 ×10 ⁻⁵ *
2	73.81 ±3.85	95.89 ±3.06	- 22.35	3.04 ×10 ⁻⁹ *
3	76.19 ±1.39**	105.19 ±2.59 [#]	- 42.75	1.04 ×10 ⁻¹¹ *

注:缺氧组与正常组比, * $P < 0.01$; 第 3 天与第 1 天相比较, [#] $P < 0.01$, ** $P > 0.05$

Notes: Hypoxic group vs normal group, * $P < 0.01$; the group of the third day vs the first day, [#] $P < 0.01$, ** $P > 0.05$

3 讨论

由于股骨头缺血性坏死导致局部血管被破坏,细胞能量和营养需求量增高,从而诱导产生多种细胞因子,参与血管再生,进而骨组织进行修复重建。目前,在基础及临床研究中,利用各种生长因子促进骨修复重建已取得较好的效果,这些细胞因子包括三类:促进成骨细胞增殖的细胞因子,包括成纤维细胞生长因子、转化生长因子- β 、胰岛素样生长因子、血小板源性生长因子、肿瘤坏死因子等;具有骨诱导活性的骨形态发生蛋白;血管生长因子如 VEGF 血管生成素、成纤维细胞生长因子、前列腺素 E₂ 等^[3]。这些因子具有控制人成骨细胞聚集、增殖和分化的作用。而 VEGF 是目前所知惟一特异作用于血管内皮细胞的细胞因子,可以刺激前体血管内皮细胞和骨细胞分化、增殖,加快骨形成和重新塑形^[4,5], VEGF 在其中发挥中心调控因子的作用。

成骨细胞体外培养在骨代谢的研究中非常重要,不仅可为筛选骨代谢相关药物提供细胞模型,而且是研究骨代谢机制的重要手段之一。近年来开始培养人成骨细胞,主要来源于新生儿颅骨^[6]和成人松质骨^[2]。这些细胞所处的分化时期不同,性质不完全相同。本实验中,我们直接取材成人髂骨松质骨,用胰蛋白酶多次消化的方法体外培养人成骨细胞,获得细胞的数量较多,形态正常,生长稳定,有成骨细胞特征,测定缺氧对其增殖和分化的影响,所得结果可能更接近临床。

细胞的功能是指细胞在分化的基础上完成特定功能活动,如分泌、传导、吞噬等。成骨细胞主要完成成骨活动,一般认为 AKP 是成骨细胞分泌的早期标志,OCN 是成骨细胞分化成熟的标志。Midy 等的研究显示,在成骨细胞培养液中加入

外源性 VEGF 能使碱性磷酸酶的活性及 cAMP 浓度提高 4 倍^[7]。通过预实验证明缺氧组的成骨细胞从传代培养的第 3 天后,活细胞数逐渐减少,说明缺氧 3 d 后,细胞活性逐渐降低。因此,为了保证在检测其他指标时,细胞活性处于良好状态,本实验均采用传代培养的前 3 d 实验数据进行统计学分析。本实验使用 MTT 法结果表明缺氧抑制成骨细胞增殖;使用 OCN 放射免疫法定量分析了 OCN 的含量,结果表明缺氧组与对照组的 OCN 含量均增高,而且缺氧组的 OCN 含量均高于对照组;本研究通过激光共聚焦显微镜以及 Leica 数据处理系统,对细胞 VEGF 的表达进行定量分析,结果表明缺氧组的成骨细胞 VEGF 的表达均高于对照组,而且在缺氧的前 3 d,随缺氧时间延长,VEGF 的表达逐渐增高,而对照组 VEGF 的表达无明显改变,进一步说明缺氧能诱导成骨细胞 VEGF 的表达,可以推断:缺氧通过诱导成骨细胞 VEGF 的表达,加强局部血管形成,从而促进成骨细胞的分化,加速骨形成,完成骨创伤的自身修复。有研究表明 VEGF 可能通过以下途径在骨形成与代谢中发挥作用^[8]:通过促血管生成参与骨发育形成;作为旁分泌因子或直接参与骨形成与代谢;通过促内皮细胞增殖参与骨愈合和骨代谢。

本实验通过在缺氧条件下体外培养成人成骨细胞,成功地证实了缺氧抑制成骨细胞增殖,同时可以诱导 VEGF 的表达,从而促进成骨细胞的分化,可以推测成骨细胞存在一种氧感受机制,氧张力减低可调节 VEGF 的基因表达以及成骨细胞的增殖与分化。提示在体内缺氧条件下利用 VEGF 的血管生成作用治疗骨缺血性坏死、骨折不愈合及延迟愈合、骨缺损等方面具有广阔应用前景。

参考文献

- 杨操,杨述华,杜靖远,等. 血管内皮生长因子基因转染促进股骨头坏死的修复. 临床骨科杂志, 2004, 7(1): 90-93.
- 张兴凯,杨庆铭,邓廉夫,等. 成人成骨细胞体外培养. 中华外科杂志, 2000, 38(1): 51-53.
- Mont MA, Jones LC, Einhorn T, et al. Osteonecrosis of the femoral head: Potential treatment with growth and differentiation factors. Clin Orthop, 1998, 355 (suppl): 314-335.
- Holmes SB, Lloyd T, Coghlan KM, et al. Distraction osteogenesis of the mandible in the previously irradiated patient. Oral Maxillofac Surg, 2002, 60: 305-309.
- Mayer-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. Bone, 2002, 30: 472-477.
- De Pollak C, Anaud E, Renier D, et al. Age-related changes in bone formation, osteoblastic cell proliferation and differentiation during post-natal osteogenesis in human calvaria. J Cell Biochem, 1997, 64: 128-139.
- Midy V, Plouet J. Vascuotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation of cultured osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199: 380-386.
- Burkhardt B, Kettner G, Bohm W, et al. Changes in trabecular bone: hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia primary osteoporosis and old age. Plast Reconstr Surg, 1983, 72: 572-675.

(收稿日期: 2006-02-10 本文编辑: 李为农)