

· 基础研究 ·

尼古丁对兔骨髓基质干细胞增殖及向软骨细胞方向分化的影响

应晓洲¹, 彭磊^{1,2}, 程少文¹, 陈庆玉¹, 张伟¹, 寇冬泉¹, 沈跃¹

(1. 温州医学院附属第二医院创伤骨科, 浙江 温州 325000; 2. 海南医学院附属医院创伤急救中心)

【摘要】 目的:探讨不同浓度尼古丁对单层培养的骨髓基质干细胞及向软骨方向分化的影响。**方法:**获取兔骨髓基质干细胞, 倒置显微镜下观察细胞形态。取第 3 代细胞, 加入不同浓度($0, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}$ M) 的尼古丁, 分别于 1、4、7、14 d 用 MTT 法检测其对骨髓基质干细胞增殖的影响。取第 3 代细胞进行诱导分化, 用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法检测 II 型胶原和蛋白聚糖的表达。**结果:**镜下见细胞形态由圆形向梭形转化; 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} M 尼古丁浓度能够促进骨髓基质干细胞的增殖, 1×10^{-5} M 尼古丁则会抑制骨髓基质干细胞的增殖活性。 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} M (特别是 1×10^{-6} M) 的尼古丁能够增加诱导后 II 型胶原的表达, 并随时间延长而增加。而 1×10^{-7} M 尼古丁在第 7 天时能促进诱导后蛋白聚糖的表达, 1×10^{-5} M 尼古丁则能抑制 II 型胶原及蛋白聚糖 mRNA 表达。**结论:**低浓度的尼古丁能够促进骨髓基质干细胞的增殖及向软骨细胞方向分化, 高浓度的尼古丁则对其有抑制作用, 由此推测在软骨组织工程中, 局部适时适量的应用尼古丁是一种能够促进骨髓基质干细胞向软骨细胞方向分化的有前景的治疗方法。

【关键词】 干细胞, 骨髓; 尼古丁; 胶原 II 型; 蛋白聚糖类; 软骨

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.11.015

Effects of nicotine on bone marrow stromal cells proliferation and differentiation of chondrocyte in vitro YING Xiaozhou, PENG Lei*, CHENG Shao-wen, CHEN Qing-yu, ZHANG Wei, KOU Dong-quan, SHEN Yue. * Department of Orthopaedics Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To examine the effects of various concentration of nicotine on bone marrow stromal cells (BMSCs) proliferation and differentiation of cartilaginous in vitro. **Methods:** BMSCs was obtained from femoral bone and tibia of New-Zealand albino rabbit. The cells of the 3rd generation were used in study. Different concentration of nicotine ($0, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}$ M) were added into BMSCs. BMSCs proliferation was analyzed by MTT assay at the 1, 4, 7, 14 days. The expression of collagen type II and aggrecan as the marker genes of cartilaginous differentiation from BMSCs were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** Microscope showed that BMSCs transformed from round to fusiform shape. The concentration of nicotine in $1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}$ M had a significant positive effect on cell proliferation and the expression of type II collagen in a time-dependent manner when supplemented in commonly used induction media ($P < 0.05$). Concentrations of nicotine in 1×10^{-7} can promote the expression of aggrecan at the 7th day after induction, and in 1×10^{-5} M may inhibit the expression of type II collagen and aggrecan. **Conclusion:** It was implied that local application of nicotine at an appropriate concentration may be a promising approach for enhancing cartilaginous differentiation capacity of BMSCs in cartilage tissue engineering.

KEYWORDS Stem cells, myeloid; Nicotine; Collagen type II; Proteoglycans; Cartilage

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(11):935-938 www.zggszz.com

骨髓基质干细胞是来源于骨髓基质的一种间充质细胞, 一方面能在保持自身生物特性前提下迅速自我更新; 另一方面, 它又具有多向分化潜能, 能分化为成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞等^[1-2]。目前, 自体骨髓基质干细胞移植已用于治疗骨关节炎及软骨修复^[3]。有报道指出, 吸烟与许多骨骼肌肉疾病相关, 如背部疾病、椎间盘退变、骨关节炎等^[4-5]。香烟烟雾中包含有 400 多种化学物质, 而尼古丁是

其中最具有生理活性的物质之一。最近 Pereira 等^[6]研究发现, 尼古丁能够影响骨髓基质干细胞向成骨细胞方向分化。本实验采用不同浓度的尼古丁来研究其对骨髓基质干细胞向软骨细胞方向增殖分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验于 2010 年 9 月至 2011 年 2 月在温州医学院骨科实验室完成。2 周龄的 SPF 级新西兰大白兔 1 只, 雄性, 体重 1.5 kg, 由温州医学院动物实验中心提供。实验动物合格证号: SCXK(浙)

2006-0026。

1.2 实验试剂及仪器 尼古丁、DMEM 培养液、转化生长因子- β 3、MTT、二甲基亚砜、胰蛋白酶等细胞培养试剂(均为美国 Sigma 公司产品),地塞米松磷酸钠注射液 1 ml:5 mg(浙江仙琚制药股份有限公司,国药准字:H33620824),逆转录脱氧核糖核酸第一链合成试剂盒(批号:253082,加拿大 Fermentas 公司),SYBR Green I(日本 Takara 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),维生素 C(美国 Fluka 公司),重组人胰岛素、转铁蛋白(美国 BD Biosciences 公司),恒温气浴摇床,CO₂ 培养箱,Olympus 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),酶联免疫检测仪(ELX 800,美国 Bio-Tek 公司)。

1.3 兔骨髓基质干细胞的分离和培养 无菌操作下取出兔股骨和胫骨,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液反复冲洗骨髓,充分吹打成单细胞悬液,按照 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种在培养瓶内,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内进行培养。2 d 后首次换液,去掉未贴壁细胞,以后每隔 4 d 换液 1 次,当细胞接近 80% 融合时,0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,按 1:3 的比例进行传代。取第 3 代细胞进行实验。

1.4 实验分组及干预措施 取生长良好的第 3 代骨髓基质干细胞,以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于 24 孔培养板上,按不同尼古丁浓度分 4 组进行诱导。A 组:对照组,培养液为含软骨诱导液(1 mmol 丙酮酸钠,0.1 mmol/L 左旋维生素 C,0.1 nmol/L 地塞米松,10 ng/ml TGF- β 3,6.25 mg/ml 转铁蛋白,6.25 mg/ml 重组人胰岛素)及胎牛血清的 DMEM;B 组:在 A 组基础上加入 1×10^{-7} M 尼古丁;C 组:在 A 组基础上加入 1×10^{-6} M 尼古丁;D 组:在 A 组基础上加入 1×10^{-5} M 尼古丁。

1.5 观测指标及方法

1.5.1 形态学观察 倒置显微镜下观察细胞形态及生长变化。

1.5.2 骨髓基质干细胞增殖检测 采用 MTT 法(1、4、7、14 d)检测骨髓基质干细胞的增殖。用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养的骨髓基质干细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中。按尼古丁浓度(0 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} M)分为 4 组,其中 1×10^{-7} M 相当于慢性吸烟者中尼古丁的量^[7]。每组 10 个孔,分别于终止培养前 4 h 每孔加入 MTT 溶液 20 μ l(5 mg/ml),继续孵育 4 h 后,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。

1.5.3 RT-PCR 法检测诱导骨髓基质干细胞 II 型胶原和蛋白聚糖的表达 分别收集诱导后 7、14 d 的细胞,采用 Qiagen 公司逆转录试剂盒,按照其说明书上的指示和步骤利用 TRIZOL 来提取总的 RNA,进行逆转录合成 cDNA。兔关节软骨细胞中 II 型胶原和蛋白聚糖 cDNA 进行 PCR 扩增需要专门的引物。蛋白聚糖上下游引物:5'-GAGGTCGTGTGAAAGGTGT-3' 和 5'-CAGTCCATGGGGTAGGTGTG-3'。PCR 反应和循环条件:94 °C,30 s;53 °C,30 s;72 °C,30 s,共 30 个循环。II 型胶原上下游引物:5'-AACACTGCCAACGTCCAGAT-3' 和 5'-AGTGGATATGGCAGCAGCTC-3'。PCR 反应和循环条件:94 °C,30 s;54 °C,30 s;72 °C,30 s,共 30 个循环。GADPH 上下游引物:5'-GCCTGGTCACCAGGGCTGC-3' 和 5'-TGCTAAGCAGTTGTGTTGCA-3'。PCR 反应和循环条件:94 °C,30 s;57 °C,30 s;72 °C,30 s,共 30 个循环。PCR 产物采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,采用 SYBR Green 法来定量检测 II 型胶原和蛋白聚糖的 mRNA 表达水平。

1.6 统计学方法 各项实验都进行了至少 3 次的独立重复试验。所有数据应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,各组实验资料统计量以均数 \pm 标准差表示,重复测量资料的方差分析比较不同时间点不同组间的指标变化趋势,与对照组的比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察 刚接种的骨髓细胞呈圆形,大小不一,无法辨认细胞核。48 h 首次半量换液去除大量红细胞,并能观察到细胞开始贴壁,贴壁细胞以多角形为主,但仍有部分圆形细胞悬浮生长。5~7 d 后细胞大体呈长梭形、纺锤形,胞体丰满,生长良好。待 14 d 左右细胞爬满瓶底。

2.2 MTT 比色试验 通过对单层培养的骨髓基质干细胞进行 MTT 比色分析,发现 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} M 尼古丁浓度能够促进骨髓基质干细胞增殖,并随时间延长而增加,在 14 d 时达到高峰。同时,与对照组比较,在 1×10^{-5} M 尼古丁浓度刺激下各个时间点的骨髓基质干细胞增殖均受到抑制,见表 1。

2.3 II 型胶原及蛋白聚糖 mRNA 表达的检测 RT-PCR 用来检测骨髓基质干细胞经诱导后在 7、14 d 的 II 型胶原和蛋白聚糖的表达情况。II 型胶原及蛋白聚糖 mRNA 表达情况见图 1, II 型胶原的相对表达量见表 2。 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} M 的尼古丁(特别是 1×10^{-6} M)能够增加 II 型胶原的表达,并且在第 14 天较第 7 天增加更明显。而在更高的尼古丁浓度 ($1 \times$

表 1 不同浓度尼古丁诱导 BMSCs MTT OD 值 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of OD value of BMSCs in different concentration of nicotine after induction ($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	1 d	4 d	7 d	14 d
对照组	10	0.220±0.021	0.350±0.026	0.600±0.034	0.890±0.027
1×10 ⁻⁷ M 尼古丁组	10	0.230±0.020	0.420±0.016*	0.670±0.031*	1.030±0.059**
1×10 ⁻⁶ M 尼古丁组	10	0.220±0.018	0.570±0.019**	0.740±0.029**	1.110±0.018**
1×10 ⁻⁵ M 尼古丁组	10	0.180±0.021	0.260±0.026*	0.440±0.022**	0.530±0.012**

注:4 组不同时间点重复测量方差分析结果, $F=69.293, P<0.05$; 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: The results of analysis of variance of repeated measure for 4 groups at different time, $F=69.293, P<0.05$; compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表 2 RT-PCR 检测 BMSCs 在不同浓度尼古丁诱导下 7 d 和 14 d 后 II 型胶原和蛋白聚糖的 mRNA 相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 mRNA expression of type II collagen and aggrecan of BMSCs induced by different concentrations of nicotine at 7th and 14th days using RT-PCR method ($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	II 型胶原的 mRNA 相对表达量		蛋白聚糖的 mRNA 相对表达量	
		7 d	14 d	7 d	14 d
对照组	6	0.760±0.032	1.150±0.033	0.740±0.019	1.110±0.008
1×10 ⁻⁷ M 尼古丁组	6	1.000±0.042**	1.100±0.022	0.900±0.063*	1.090±0.001
1×10 ⁻⁶ M 尼古丁组	6	1.790±0.077**	1.950±0.044**	0.760±0.010	0.960±0.015
1×10 ⁻⁵ M 尼古丁组	6	0.800±0.007*	1.020±0.029**	0.730±0.008	0.710±0.014**

注:4 组 II 型胶原的 mRNA 相对表达量不同时间点重复测量方差分析结果, $F=97.4, P<0.05$; 4 组蛋白聚糖的 mRNA 相对表达量不同时间点重复测量方差分析结果, $F=48.86, P<0.05$; 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: The results of repeated measures analysis of variance of type II collagen for 4 groups at different time, $F=97.4, P<0.05$; results of repeated measures analysis of variance of aggrecan for 4 groups at different time, $F=48.86, P<0.05$; compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

10⁻⁵ M), II 型胶原的表达量下降。蛋白聚糖的相对表达量见表 2: 在第 7 天时 1×10⁻⁷ M 尼古丁浓度能够促进蛋白聚糖的表达, 1×10⁻⁶、1×10⁻⁵ M 组与对照组比较差异无统计学意义; 而在第 14 天时, 1×10⁻⁵ M

培养时间延长增加更明显。而 1×10⁻⁷ M 尼古丁在第 7 天时则能促进 BMSCs 向软骨细胞方向诱导后蛋白聚糖的表达。1×10⁻⁵ M 尼古丁则会抑制 BMSCs 的增殖活性, 并抑制诱导后 II 型胶原及蛋白聚糖 mRNA 表达。由此得出尼古丁对 BMSCs 的增殖结果与 Pereira 等^[6]的结果是相似的, 发现尼古丁对 BMSCs 增殖起促进作用, 直到尼古丁浓度达 0.2 mg/ml, 而更高浓度的尼古丁则对其增殖起抑制作用。Schraufstatter 等^[8]则报道高浓度的尼古丁(1×10⁻⁵ M)会导致人间充质干细胞的凋亡, 而 1×10⁻⁷、1×10⁻⁶ M 的尼古丁则对细胞活性没有影响。上述实验结果说明低浓度的尼古丁对 BMSCs 的增殖是有好处的, 而高浓度尼古丁则可能会产生细胞毒作用。

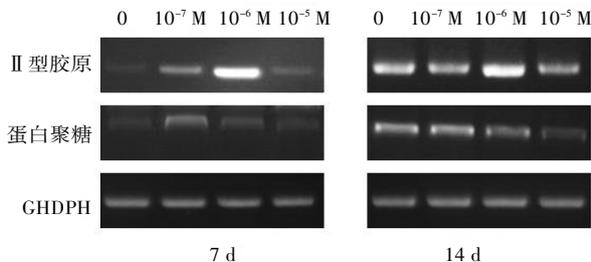


图 1 不同浓度尼古丁在 7、14 d 时对骨髓基质干细胞向软骨细胞方向诱导后 II 型胶原及蛋白聚糖 mRNA 表达凝胶电泳图

Fig.1 The electropherogram of expression of collagen type II and aggrecan as the marker genes of cartilaginous differentiation from BMSCs induced by different concentrations of nicotine at the 7th and 14th days

的尼古丁对蛋白聚糖的表达却呈抑制作用。

3 讨论

3.1 尼古丁对 BMSCs 增殖的影响 软骨的生长和修复是一个极其复杂的过程, 需要多种因素的参与。BMSCs 在关节软骨缺损内能向软骨细胞定向分化并形成软骨组织, 本实验通过检测不同浓度尼古丁对 BMSCs 向软骨细胞方向增殖分化的影响, 来研究尼古丁与 BMSCs 的关系。经分析发现 1×10⁻⁷、1×10⁻⁶ M (特别是 1×10⁻⁶ M) 的尼古丁能够促进 BMSCs 的体外增殖并能增加诱导后 II 型胶原的表达量, 且随着

3.2 尼古丁诱导 BMSCs 向软骨细胞方向分化的作用 软骨细胞外基质是软骨细胞发挥生理作用的场所, 是软骨细胞汲取营养及传递信号的载体, 细胞外基质的代谢平衡维持着软骨组织的正常功能。胶原是细胞外基质的重要组成部分, II 型胶原是关节软骨内的主要胶原成分。II 型胶原和蛋白聚糖是检测 BMSCs 向软骨细胞分化最主要的指标^[9-11]。II 型胶原和蛋白多糖质和量的改变是关节软骨丧失其正常生物力学特性的直接原因^[12]。之前 Gullahorn 等^[13]研究了尼古丁对人关节软骨细胞分化的影响, 发现 2.5、12.5、25 ng/ml 的尼古丁能够促进 II 型胶原的表达, 而更高浓度的尼古丁则抑制 II 型胶原的表达。然而

Kawakita 等^[14]则发现尼古丁能够通过烟碱乙酰胆碱受体(nAChR)抑制人生长盘软骨细胞的基质合成,抑制其肥大分化,导致骨骼生长延迟。上述两种关于尼古丁对软骨细胞分化截然不同的结果可能与实验中软骨细胞的来源不同,生长盘软骨细胞是软骨内骨化的重要组成部分,可能对尼古丁的刺激更加敏感。

3.3 尼古丁影响 BMSCs 增殖及分化的机制 本实验结果与 Gullahorn 等^[13]的结果比较相似,低浓度的尼古丁能够促进 II 型胶原及蛋白聚糖的表达。但尼古丁是通过何种机制起作用呢?许多研究证实胆碱能系统包括乙酰转移酶,乙酰胆碱酯酶和乙酰胆碱受体分子不仅在神经细胞上表达,在非神经细胞上也大量表达,如上皮细胞、内皮细胞、造血祖细胞、成骨细胞、间充质干细胞等^[15-17]。而尼古丁,作为烟碱乙酰胆碱受体激动剂,也许在 BMSCs 增殖及向软骨细胞分化过程中发挥重要作用。Kalamida 等^[18]发现乙酰胆碱受体作为非典型 $\alpha 7$ 受体的均聚物,对钙离子内流提供了门控通道。同时, Schraufstatter 等^[8]也证实尼古丁能够促进钙离子内流,导致细胞内钙离子增加。由此,可推测,尼古丁与胆碱能受体结合,激活钙离子通道,导致细胞内钙离子增加,或许与尼古丁促进 BMSCs 增殖及向软骨细胞方向分化有关。进一步的实验需研究尼古丁促进 BMSCs 向软骨细胞方向分化的分子机制。因为本实验的结果是建立在单层培养体系中,体外三维培养体系中结果是不是也这样,需进一步研究。

本实验研究发现低浓度(1×10^{-7} 、 1×10^{-6} M)的尼古丁能够促进兔子 BMSCs 的增殖及向软骨细胞方向分化,而高浓度的尼古丁(1×10^{-5} M)则对其起抑制作用。由此,可推测在软骨组织工程中,局部适时适量的应用尼古丁是一种能够促进 BMSCs 向软骨细胞方向分化的有前景的治疗方法。

参考文献

[1] Abdallah BM, Kassem M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives[J]. J Cell Physiol, 2009, 218: 9-12.
 [2] Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering[J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5: 32-45.
 [3] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg Am, 1994, 76: 579-592.
 [4] Fogelholm RR, Alho AV. Smoking and intervertebral disc degener-

ation[J]. Med Hypotheses, 2001, 56: 537-539.
 [5] Kaila-Kangas L, Leino-Arjas P, Riihimäki H, et al. Smoking and overweight as predictors of hospitalization for back disorders [J]. Spine, 2003, 28: 1860-1868.
 [6] Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, et al. Effect of nicotine in matrix mineralization by human bone marrow and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants[J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 88(1): 84-93.
 [7] Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine[J]. Pharmacol Rev, 2005, 57(1): 79-115.
 [8] Schraufstatter IU, DiScipio RG, Khaldoyanidi SK. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells [J]. J Stem Cells, 2009, 4(4): 203-215.
 [9] Vasan NS, Lash JW. Monomeric and aggregate proteoglycans in the chondrogenic differentiation of embryonic chick limb buds[J]. J Embryol Exp Morphol, 1979, 49: 47-59.
 [10] Solchaga LA, Penick K, Goldberg VM, et al. Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16 (3): 1009-1019.
 [11] Wu SC, Chang JK, Wang CK, et al. Enhancement of chondrogenesis of human adipose derived stem cells in a hyaluronan-enriched microenvironment[J]. Biomaterials, 2010, 31(4): 631-640.
 [12] Henrotin Y, Addison S, Kraus V, et al. Type II collagen markers in osteoarthritis; what do they indicate[J]. Curr Opin Rheumatol, 2007, 19(5): 444-450.
 [13] Gullahorn L, Lippiello L, Karpman R. Smoking and osteoarthritis: differential effect of nicotine on human chondrocyte glycosaminoglycan and collagen synthesis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13: 942-943.
 [14] Kawakita A, Sato K, Makino H, et al. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor[J]. Plos One, 2008, 3(12): 39-45.
 [15] Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(1): 103-112.
 [16] Rothem DE, Rothem L, Soudry M, et al. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells[J]. J Bone Miner Metab, 2009, 27(5): 555-561.
 [17] Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106(2): 186-192.
 [18] Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, et al. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity[J]. FEBS J, 2007, 274(15): 3799-3845.

(收稿日期: 2011-05-30 本文编辑: 连智华)