

· 基础研究 ·

rhBMP-2 体外诱导骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨及 VEGF 表达的研究

李军, 王云, 鲍小明, 卫鹏斌, 张民
(山西医科大学第二医院, 山西 太原 030001)

【摘要】 目的: 观察骨形态发生蛋白-2 对骨质疏松时骨髓基质干细胞(BMSCs)体外成骨及成骨因子 VEGF 表达的影响, 为骨质疏松证的防治提供新的方法。方法: 将 20 只 6 月龄, 体重(300±20) g 雌性 SD 大鼠双侧卵巢切除, 术后 3 个月利用双能 X 线骨密度仪测量大鼠全身骨密度并与术前比较, 确保造模成功, 并运用全骨髓贴壁法培养骨质疏松大鼠 BMSCs, 倒置相差显微镜下观察 BMSCs 形态。随机把骨质疏松大鼠 BMSCs 第 2 代(p2)细胞分成实验组和对照组, 分别加入完全培养基(含 rhBMP-2)、成骨诱导液进行成骨诱导。2 周后茜素红染色法检测各组细胞钙结节的形成, 酶标仪测定碱性磷酸酶活性及 RT-PCR 法检测 VEGF 的表达量。结果: (1) 大鼠全身骨密度: 手术前后大鼠全身骨密度分别为(0.179±0.007), (0.158±0.006) g/cm², 差异有统计学意义($t=4.180, P<0.05$)。 (2) 茜素红染色: BMSCs(P2)成骨诱导 2 周后实验组染色效果明显强与对照组。 (3) 碱性磷酸酶活性: BMSCs(P2)成骨诱导 2 周后碱性磷酸酶活性实验组明显高于对照组, 分别为(15.62±1.27), (8.62±0.93) μg/prot, 差异有统计学意义($t=7.709, P<0.01$)。 (4) BMSCs(P2)成骨诱导 2 周后 VEGF 表达: 实验组明显高于对照组, 分别为 3.723±0.143, 0.950±0.072, 差异有统计学意义($t=29.462, P<0.01$)。结论: rhBMP-2 能提高去卵巢骨质疏松大鼠 BMSCs 的体外成骨能力, 可促进成骨因子 VEGF 的表达, 调控 VEGF 的表达可能是骨形态发生蛋白-2 参与骨代谢的机制之一。

【关键词】 重组人骨形态发生蛋白-2; 骨质疏松; 血管内皮因子; 骨髓基质干细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.05.013

Study on RhBMP-2 induced osteoporosis rat BMSCs in vitro osteogenesis and VEGF expression LI Jun, WANG Yun, BAO Xiao-ming, WEI Peng-bin, and ZHANG Min. Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

ABSTRACT Objective: To observe the impact of bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on bone marrow stromal cells (BMSCs) osteogenesis in vitro and vascular endothelial growth factors (VEGF) expression in bone osteoporotic to prevent and treat the osteoporosis. **Methods:** Twenty 6-month-old female SD rats weighted (300±20) g underwent bilateral ovariectomized. At 3 months after operation, dual-energy X-ray absorptiometry was used to measure bone mineral density of rats, the values were compared with preoperative to ensure the model successfully, and the osteoporosis rats' BMSCs were cultured by bone marrow adherent cultured and the BMSCs morphology was observed under a phase contrast microscope upside down. The osteoporosis rats' BMSCs at the 2nd generation(p2) were randomly divided into experimental and control groups and were added complete medium (containing rhBMP-2) and osteogenic induced liquid, respectively. Two weeks later, the formation of cell calcium nodules were detected by Alizarin red staining method, alkaline phosphatase activity was measured by enzyme standard instrument and the expression of VEGF was detected by RT-PCT method. **Results:** (1) Whole body bone mineral density of rats before and after operation were (0.179±0.007), (0.158±0.006) g/cm², there was statistically significant ($t=4.180, P<0.05$). (2) Alizarin red staining at 2 weeks after osteogenesis induced by BMSCs (P2) in the experimental group had more strong dyeing effect than the control group obviously. (3) Alkaline phosphatase activity at 2 weeks after osteogenesis induced by BMSCs (P2) of the experimental group (15.62±1.27) ug/gprot was significantly higher than that of the control group (8.62±0.93) ug/gprot, there was statistically significant ($t=7.709, P<0.01$). (4) The expression of VEGF at 2 weeks after osteogenesis induced by BMSCs (P2) of the experimental group 3.723±0.143 was significantly higher than that of the control group 0.950±0.072, there was statistically significant ($t=29.462, P<0.01$). **Conclusion:** RhBMP-2 can improve the in-vitro osteogenesis ability of ovary osteoporosis rat BMSCs, promote the VEGF expression of osteogenesis factor. Regulating the VEGF

基金项目: 山西省科技攻关项目(编号: 20100311098-2); 山西省留学人员科研资助项目(编号: 95)

Fund program: Scientific and Technological Projects in Shanxi(No. 20100311098-2)

通讯作者: 张民 E-mail: zhangminty@163.com

Corresponding author: ZHANG Min E-mail: zhangminty@163.com

expression may be one of the mechanisms of BMP-2 to participate in bone metabolism.

KEYWORDS Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2); Osteoporosis; Vascular endothelial growth factors (VEGF); Bone marrow stromal stem cells (BMSCs)

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(5):446-449 www.zggszz.com

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种由于骨形成和骨吸收失衡所致的全身性骨骼系统疾病,在绝经后妇女和老年人中的发病率较高。最新研究表明,骨髓基质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)生物学特性的改变在绝经后骨质疏松症的发病过程中起着重要的作用^[1]。骨形态发生蛋白-2是目前研究比较透彻的骨生长因子,其在诱导 BMSCs 成骨方面的能力得到国内外学者一致的认可。但对于骨形态发生蛋白-2在骨质疏松性 BMSCs 成骨过程中的作用及其机制,尚缺乏系统基础研究。因此,本实验通过观察 rhBMP-2 对去卵巢骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化及 VEGF 表达的影响,从而为 rhBMP-2 用于临床治疗骨质疏松症提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 6 月龄清洁级雌性 SD 大鼠(山西医科大学实验动物中心提供)20 只,体重约 300 g。

1.2 主要器材与材料

QDR 4500A 型 DEXA 骨密度仪(美国 HOLOG-IC 公司),倒置相差显微镜(Olympus),CO₂ 细胞孵箱(Heal Force),培养箱(德国 Heraeus 公司 BB5060),酶标仪(德国 Thermomk-3 型)。DMEM/F12 培养液(HyClone),胎牛血清(四季青),成骨诱导液(广州赛业),rhBMP-2(USCN life science inc.),茜素红染色剂(广州赛业),碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成)。Trizol(天根生化科技公司),PrimeScriptTM RT 试剂盒、SYBR[®] Premix ExTaqTM 试剂盒(Takara 公司),

1.3 干预措施

1.3.1 造模 在无菌条件下采用 10%水合氯醛对 6 月龄清洁级雌性 SD 大鼠进行腹腔麻醉。麻醉成功后在腰背部肋下约 1 cm、脊柱两侧约 1 cm 的交界处依次切开大鼠皮肤、皮下组织、肌肉以暴露腹腔,行双侧卵巢切除,术后饲养 3 个月,制造骨质疏松模型。行全身骨密度测定。

1.3.2 骨质疏松性 BMSCs 的体外分离培养^[2] 将测定完骨密度的大鼠颈椎脱臼处死,并将其放入 75%乙醇中浸泡 10 min,在无菌操作台下分离出双侧股骨,然后除去骨髓显露髓腔,并用含体积分数 15%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液反复冲洗髓腔,获取骨髓悬液。以 $1 \times 10^9/L$ 浓度将细胞接种至 25 cm² 培养瓶中,放入 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养

箱中进行培养。3 d 后首次半量换液,之后每 3 天全量换液 1 次,等待细胞融合到 80%~90%时,用 0.25%胰蛋白酶对细胞进行消化,并按 1:2 的比例进行传代培养。每天用倒置相差显微镜观察细胞的生长变化。取第 2 代(P2)细胞用于实验。

1.3.3 rhBMP-2 诱导骨质疏松性 BMSCs 成骨分化

将上述细胞随机分为实验组和对照组,分别加入含 100 ng/ml rhBMP-2 的完全培养基、成骨诱导液(含地塞米松 1×10^{-8} mol/L、维生素 C 50 mg/L、 β -磷酸甘油钠 10 mmol/L 的完全培养液)进行成骨诱导,每 2、3 天换 1 次液,2 周后进行钙结节染色、碱性磷酸酶活性测定、VEGF 的表达量测定。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 大鼠全身骨密度(BMD)测定 术后 3 个月将上述动物用 10%水合氯醛进行腹腔麻醉,置骨密度仪探头下,行全身骨密度测定。

1.4.2 骨质疏松大鼠 BMSCs 的形态学观察 培养 24 h 细胞贴壁后,将装有骨质疏松大鼠 BMSCs 的培养瓶放置倒置相差显微镜下进行观察、拍照。钙结节染色:把 BMSCs(P2)滴加在盖玻片上,接种到 6 孔板里,成骨诱导 2 周后,取出细胞爬片,2 ml 的 4%中性甲醛固定 30 min,茜素红染色 4 min,去除染色液,观察钙结节形成。

1.4.3 BMSCs(P2)成骨诱导碱性磷酸酶(ALP)活性^[3] BMSCs(P2)成骨诱导 2 周后,倒掉培养液,并用 PBS 冲洗 2 次,之后加入细胞裂解液,按试剂说明步骤操作,BCA 法测量样品中的蛋白含量,并在酶标检测仪上 480 nm 波长检测各孔吸光度 OD 值,最后计算各组细胞碱性磷酸酶的表达量。

1.4.4 RT-PCR 检测各组细胞 VEGF 表达量 诱导 2 周后取各组细胞,倒掉诱导液,PBS 冲洗 2 次,加入 1 ml Trizol 充分溶解,并导入标记好的 EP 管中。使用 PrimeScriptTM RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA;使用 SYBR[®] Premix ExTaqTM 试剂盒将反转录的 cDNA 进行目的基因扩增;基因序列如下:VEGF 上游 GCC CTG AGT CAA GAG GAC AG,下游 CAG GCT CCT GAT TCT TCC AG;18s 上游 CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA,下游 GCT GGA ATT ACC GAG GCT。反应条件:95 °C 预变形 5 min,进入循环:95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。通过计算得到 Ct 值,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达量。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件, 所得计量数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两独立样本比较采用 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠全身骨密度(BMD)的测定结果

6 月龄雌性 SD 大鼠的 BMD 值和去势后 3 个月的 BMD 值分别是 (0.179 ± 0.007) g/cm² 和 (0.158 ± 0.006) g/cm²。手术后 BMD 比手术前显著降低, 差异有统计学意义($t=4.180, P<0.05$), 表明 SD 大鼠处于骨质疏松状态。

2.2 细胞形态学观察

刚接种时, 细胞悬液中含有大量红细胞溶血和油脂, 所以很难观察到细胞。等到全量换液, 并用 PBS 洗涤 2 次后, 可以看到典型的细胞克隆样生长。经传代培养后, 可以清晰观察到细胞形态。第 2 代骨髓基质干细胞大部分成梭形, 类似成纤维细胞, 少部分成多角形, 细胞增生旺盛。采用全骨髓贴壁培养法, 可以去除原代细胞中混杂着的其他来源细胞(如血液源性细胞)。连续传代培养法可以使骨髓基质干细胞进行纯化。其原理是: 骨髓基质干细胞具备良好的贴壁生长能力, 而其他混杂细胞贴壁能力较弱, 在传代培养过程中可以逐步去除。笔者选用第 2 代细胞作为实验用细胞(图 1)。成骨诱导 14 d 后, 用茜素红对两组细胞进行染色, 其中实验组细胞染色后出现大量钙化结节, 而对对照组细胞染色后仅出现少量钙化结节(图 2)。



图 1 第 2 代骨髓基质干细胞大部分成梭形, 类似成纤维细胞, 少部分成多角形, 细胞增生旺盛(电镜×100)

Fig.1 Most of 2P bone marrow stromal cells were spindle-shaped, similar to fibroblasts, a small part of them were polygon, cell proliferation was exuberant (electron microscopy×100)

2.3 BMSCs 的 ALP 表达量变化

成骨诱导 2 周后实验组细胞的 ALP 表达量明显高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$, 表 1)。表

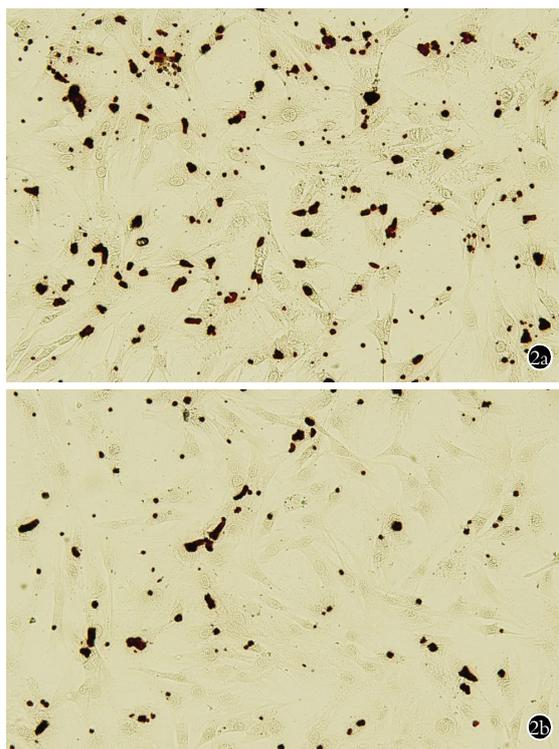


图 2 成骨诱导 14 d 后骨髓基质干细胞 2a. 实验组细胞染色后出现大量钙化结节(钙结节茜素红染色×100) 2b. 对照组细胞染色后仅出现少量钙化结节(钙结节茜素红染色×100)

Fig.2 Bone marrow stromal cells by osteogenesis induced for 14 days 2a. In the experimental group a lot of cell calcium nodules appeared after Alizarin staining (×100) 2b. In the control group a few of cell calcium nodules appeared after Alizarin staining (×100)

明 rhBMP-2 具有很好的体外诱导骨质疏松大鼠 BMSCs 向成骨细胞分化的能力。

2.4 成骨标志因子 VEGF mRNA 相对表达量

两组成骨标志因子 VEGF mRNA 相对表达量, 实验组结果明显高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$)(表 1)

表 1 BMSCs(P2)成骨诱导 2 周后实验组和对照组的 ALP 含量和 VEGFmRNA 相对表达量($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 ALP content and relative expression of VEGF mRNA at 2 weeks after osteogenesis induced by BMSCs (P2) in the experimental group and the control group($\bar{x}\pm s$)			
组别	孔数	ALP 含量 ($\mu\text{g}/\text{prot}$)	VEGFmRNA 相对表达量
实验组	6	15.62±1.27	3.723±0.143
对照组	6	8.62±0.93	0.950±0.072
<i>t</i> 值	-	7.709	29.462
<i>P</i> 值	-	0.002	0.001

3 讨论

骨质疏松症是以骨量减少、骨微结构退变、骨脆

性增加为主要特征的全身性骨骼疾病^[4]。骨折是骨质疏松的主要并发症,常见的骨折部位有椎体、髌部等。近些年研究表明,绝经后骨质疏松症的发生发展伴随着 BMSCs 生物学特性的变化^[5]。

骨髓基质干细胞是一种可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等的成体干细胞^[6]。正常情况下骨髓基质干细胞的成骨分化和成脂分化之间存在着一种平衡关系,而骨质疏松的发生正是由于这种平衡的分化状态发生了改变^[7]。Kretlow 等^[8]发现去卵巢大鼠 BMSCs 的成骨能力明显降低,而成脂能力显著增强。因此,如何增强骨髓基质干细胞的成骨分化能力,减弱骨髓基质干细胞成脂分化能力,可以成为防治骨质疏松的一个重要靶点。

骨形态发生蛋白-2(BMP-2)是一种很强的骨成长因子,其具有强大的诱导 BMSCs 成骨的能力。本实验主要是通过观察两组实验细胞钙化结节,碱性磷酸酶和 VEGF 的表达量的差异,从而揭示骨形态发生蛋白-2 对骨质疏松性 BMSCs 的成骨诱导能力和可能的作用机制。

钙化结节是鉴定 BMSCs 向成骨细胞分化的重要标志之一。它是由成骨细胞分泌的胶原在细胞外基质中结合钙盐而生成^[9]。本实验分别对诱导 14 d 的两组细胞进行茜素红染色。结果发现,实验组细胞染色结果呈强阳性,而对照组细胞染色则呈弱阳性;因此表明 rhBMP-2 具有强大的促进体外骨质疏松大鼠 BMSCs 向成骨分化的能力。

碱性磷酸酶(ALP)是骨髓基质干细胞向成骨细胞分化过程中合成、分泌的一种成骨特异性细胞内酶。作为衡量多种细胞向成骨细胞分化程度和成骨细胞功能状态的一个重要指标^[10],定量检测细胞内碱性磷酸酶的活性被广泛应用在骨代谢的研究中。研究表明,与正常女性相比绝经后骨质疏松女性患者的 BMSCs 经成骨诱导后 ALP 表达量会明显降低。本实验结果表明:成骨诱导后实验组 ALP 的表达量明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 rhBMP-2 可以促进骨质疏松性 BMSCs 向成骨细胞分化,并使 ALP 的表达量增高。

血管内皮生长因子既是一种主要的血管形成因子,又是一种重要的骨生长因子。作为一种不可或缺的骨生长因子,它在成骨细胞、破骨细胞的增殖、分化及功能活性方面发挥着重要的作用,对骨质疏松的发生发展有着重大的影响。Pufe 等^[11]发现去卵巢的小猪腰椎中 VEGF 浓度较对照组明显下降,当给体外培养的成骨细胞中加入雌激素后 VEGF 水平明显增高,提示 VEGF 水平下降可能是绝经后骨矿密度减少的原因之一。本研究实验组中 VEGF mRNA

的表达量较对照组明显增高,表明重组人骨形态发生蛋白-2 促进骨质疏松(ovariectomied osteoporosis, ovx)大鼠 BMSCs 向成骨细胞分化可能与其提高成骨因子 VEGF 的表达有关。

综上,骨形态发生蛋白-2 可以提高骨质疏松大鼠 BMSCs 向成骨细胞分化,并促进成骨因子 VEGF 的表达,调控 VEGF 的表达可能是骨形态发生蛋白-2 参与骨代谢的机制之一。

参考文献

- [1] Coipeau P, Rosset P, Langonne A, et al. Impaired differentiation potential of human trabecular bone mesenchymal stromal cells from elderly patients[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(5): 584-594.
- [2] Yue B, Lu B, Dai KR, et al. BMP-2 gene therapy on the repair of bone defects of aged rats[J]. *Calcif Tissue Int*, 2005, 77(6): 395-403.
- [3] 汤小康,程婉. 骨细胞分离培养及其与成骨细胞鉴别计较的实验[J]. *中国骨伤*, 2013, 26(3): 227-231.
Tang XK, Cheng W. Bone cell and osteoblast differentiation cultivation object of the experiment[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2013, 26(3): 227-231. Chinese with abstract in English.
- [4] Johnson ML, Lara N, Kamel MA. How genomics has informed our understanding of the pathogenesis of osteoporosis[J]. *Genome Med*, 2009, 1(9): 84.
- [5] 王强,赵兵,李超,等. 干细胞移植治疗骨质疏松[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2012, 5(3): 225-229.
Wang Q, Zhang B, Li C, et al. Stem cell transplantation in the treatment of osteoporosis[J]. *Zhonghua Gu Zhi Shu Song He Gu Kuang Yan Ji Bing Za Zhi*, 2012, 5(3): 225-229. Chinese.
- [6] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(3): 180-192.
- [7] Li D, Li L, Wu J. Adipogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells derived from ovariectomized rats[J]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 2007, 24(3): 641-645.
- [8] Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells[J]. *BMC Cell Biol*, 2008, 9: 60.
- [9] 蔡鹏,朱绍兴,苏一鸣,等. 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞及其诱导分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(36): 7073-7077
Cai P, Zhu SX, Su YM, et al. Isolation and culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced to differentiate whole bone marrow adherence method[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2009, 13(36): 7073-7077. Chinese.
- [10] See EY, Toh SL, Goh JC. Multilineage potential of bone-marrow-derived mesenchymal stem cell cell sheets; implications for tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(4): 1421-1431.
- [11] Pufe T, Claassen H, Scholz-Ahrens KE, et al. Influence of estradiol on vascular endothelial growth factor expression in bone: a study in Göttingen miniature pigs and human osteoblasts[J]. *Calcif Tissue Int*, 2007, 80(3): 184-191.

(收稿日期:2014-03-20 本文编辑:王玉蔓)