

补骨合剂调节大鼠骨髓间充质细胞分化机制的研究

李楠¹, 王和鸣¹, 林旭², 郑良朴¹, 林一萍¹, 沈霖³, 苏友新¹, 陈伯仪¹

(1. 福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350003; 2. 福建医科大学; 3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院)

摘要 目的:应用体外培养骨髓间充质细胞,在细胞和分子水平观察补骨合剂对细胞分化的影响,探讨补骨合剂治疗骨质疏松症的机制。**方法:**分离 SD 大鼠骨髓间充质细胞,通过形态学、碱性磷酸酶、细胞内骨钙素、转化生长因子 β_1 基因表达等指标,对重组人骨形态发生蛋白 2(rhBMP₂)诱导下的骨髓间充质细胞向成骨细胞分化的程度进行探讨。**结果:**一定浓度的补骨合剂可促进分化中的骨髓间充质细胞分泌碱性磷酸酶和骨钙素,增强 rhBMP₂ 的活性,促进分化中的骨髓间充质细胞表达转化生长因子 β_1 ,补骨合剂的这种促进骨髓间充质细胞分化作用与密钙息基本相同。**结论:**补骨合剂不仅可以增强 rhBMP₂ 的活性,促进分化中的骨髓间充质细胞表达转化生长因子 β_1 ,大量分泌 I 型胶原,以利于钙盐沉积;还可以促进 rhBMP₂ 诱导的骨髓间充质细胞分泌碱性磷酸酶和骨钙素,促进骨髓间充质细胞向成骨细胞表型分化,从而促进钙、磷在骨表面沉积。

关键词 骨质疏松; 骨髓细胞; 成骨细胞; 转化生长因子 β

Study of differentiation of SD rat's marrow stromal cells with sthenia skeleton herbs mixture in vitro LI Nan, WANG He-ming, LIN Xu, ZHENG Liang-pu, LIN Yi-ping, SHEN Lin, SU You-zin, CHEN Bo-yi. Fujian Traditional Chinese Medicine University (Fujian Fuzhou, 350003, China)

Abstract Objective: To observe the influence of sthenia skeleton herbs mixture (SSHIM) on the differentiation of SD rat's marrow stromal cells culture in vitro and investigate the treatment mechanism of SSHIM on osteoporosis. **Methods:** Marrow stromal cells were separated from the SD rat. Differentiation of the marrow stromal cells to the osteoblasts induced by rhBMP₂ was observed with morphology, alkaline phosphatase specific activity, inner-cell osteocalcin, transforming growth factor β_1 gene expression, etc. **Results:** Sthenia skeleton herbs mixture could hasten the cell excreting alkaline phosphatase and osteocalcin, reinforce the activity of rhBMP₂ and facilitate the cell express transforming growth factor β_1 . These effects were the same as Miacalcic.

Conclusion: One of the principle of treatment on osteoporosis by sthenia skeleton herbs mixture is that it can reinforce the activity of rhBMP₂ and hasten the marrow stromal cell express β transforming growth factor I and to excreting collagen I. Thus, it is beneficial for the deposition of calcium salts. It can also hasten the induced marrow stromal cell by rhBMP₂ to excrete alkaline phosphatase and osteocalcin, which can accelerate the transforming of the cells into osteoblasts. Sequentially accelerate the deposition of calcium and phosphorus on the bone surface.

Key words Osteoporosis; Bone marrow cells; Osteoblasts; Transforming growth factor beta

骨质疏松症是骨伤科临床常见病、多发病。随着老龄社会的到来,其发病率呈明显上升趋势。目前对该症的治疗仍缺乏理想药物。随着临床研究和

实验研究的逐步深入,中医的“肾主骨”理论和“补肾壮骨”治疗原则,以及中医药治疗骨质疏松症的临床效果均引起了广泛关注。近 10 年来,随着分子生物学的不断发展,人们对骨质疏松症也有了进一步的认识。骨髓间充质细胞(marrow stromal cells, MSC)的分化及其调控在骨质疏松发生的病理机制、预防和治疗中起着重要作用。但迄今为止,影响 MSC 分

基金项目:福建省卫生厅资助项目(2002-201)

通讯作者:李楠 Tel: 0591-3570823 E-mail: ALEXLEE@HOT-MAIL.COM

化的因素仍不明确。本研究将通过碱性磷酸酶 (ALP) 比活性、细胞内骨钙素检测及 RT-PCR 法观察补骨合剂对重组人骨形态发生蛋白 2 (rhBMP₂) 诱导下的 MSC 表达转化生长因子 β₁ (TGFβ₁) mRNA 的影响, 探讨补骨合剂 (sthenia skeleton herbs mixture, SSHM) 在 MSC 分化过程中的作用。

1 实验方法与步骤

1.1 取材 1 月龄 SD 大鼠的股骨和胫骨, 切去骺软骨, 暴露骨髓腔, 注射器吸取含 15% 新生牛血清 (Newborn Calf Serum, NCS, 美国 Hyclone 公司) 的 α-MEM (美国 Hyclone 公司) 反复冲洗、离心, 制成细胞悬液, 调整有核细胞数为 2 × 10⁵/ml 接种于 250 ml 培养瓶中, 置二氧化碳培养箱中培养。至细胞融合成单层, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。取二代细胞, 调整细胞浓度为 5 × 10⁵/ml, 进行实验。

1.2 条件培养液 15% NCS 的 α-MEM 培养液 100 ml 中加入 rhBMP₂ (美国 R&D 公司) 200 ng/ml、β 甘油磷酸钠 (美国 Sigma 公司) 10 mmol/L, 4 °C 保存。

1.3 ALP 染色 Gomori 钙钴法、矿化结节染色 von Kossa 改良法^[1] 以 2 ml/孔接种于 6 孔培养板, 第 2 天换液时每孔加入条件培养液, 同时分别加入补骨合剂 100 μg/ml, 密钙息 50 mU/ml。6 d 后进行 ALP 染色, 28 d 后进行矿化结节染色。100 倍倒置显微镜下随机选取视野进行照像。

1.4 ALP 比活性测定 以 1 ml/孔接种于 24 孔培养板, 第 2 天换条件培养液, 同时分别加入: 补骨合剂 5、10、50、100、500 μg/ml, 密钙息 10、50、100 mU/ml。6 d 后按 ALP 试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 说明书进行测定。

1.5 细胞内骨钙素 (BGP) 含量测定 以 2 ml/瓶接种于 25 ml 培养瓶, 第 2 天换条件培养液, 同时加入: 对照组培养液中仅加入含血清培养基, 诱导组中加入条件培养基, 补骨合剂组分别为 5、10、50、100、500 μg/ml, 密钙息组分别为 10、50、100 mU/ml。18 d 后按 BGP 试剂盒 (中国原子能科学研究院) 说明书进行测定。

1.6 补骨合剂促进 rhBMP₂ 诱导 MSC 表达 TGFβ₁ mRNA 的测定 以 5 ml/瓶接种于 50 ml 培养瓶, 第 2 天换液时将细胞分为 4 组: 对照组仅加培养液; 诱导组加条件培养液, 补骨合剂组分为 5、10、50、100、500 μg/ml 组; 密钙息组分为 50、100、200 mU/ml。3 d 后一步法提取总 RNA, 进行 RT-PCR。其中 TGFβ₁: 504CCACCTGCAAGACCATCGAC,

841TGCTTCCCGAATGTCTGACG;

β-actin: 185GAG-GCATCCTGACCCCTGAAG,

459CATCACAATGCCAGTGGTACG。

总反应体积 50 μl, 55 °C 30 min, 94 °C 3 min, 94 °C 30 秒、50 °C 30 秒、72 °C 30 秒, 共 30 个循环, 72 °C 7 min, 4 °C 保存, 2% 琼脂糖凝胶电泳, BIO-RAD 凝胶成像系统观察结果。应用 BIO-RAD 公司 Quantitation 软件 Quantity one 比较基因 TGF-β₁、β-actin 的相对表达量。

2 结果

2.1 ALP 染色 Gomori 钙钴法观察 rhBMP₂ 诱导的 F₂MSC 中成片状的 ALP 染色呈灰黑色颗粒或块状沉淀阳性着色 (图 1), 补骨合剂组的 F₂MSC 中成片状的 ALP 染色呈强阳性着色 (图 2), 密钙息组的 F₂MSC 中成片状的 ALP 呈阳性着色 (图 3)。

2.2 矿化结节染色 von Kossa 改良法观察 rhBMP₂ 诱导下的 F₂MSC 细胞浆中散在的矿化结节呈黑色颗粒样沉着 (图 4)。

2.3 ALP 比活性测定结果 补骨合剂、密钙息各浓度组 ALP 比活性均高于对照组。补骨合剂组 ALP 比活性随着药物浓度增加而升高, 至 100 μg/ml 时达到最大效应 (P < 0.05); 而密钙息组 50 mU/ml 时 ALP 比活性最高。其中补骨合剂 100、500 μg/ml 组、密钙息 50 mU/ml 组与对照组相比具有显著的差异 (P < 0.05), 见表 1。

表 1 不同浓度药液对 MSC ALP 比活性的影响

Tab.1 Results of ALP activity in different concentration groups

组别	药物浓度	n	ALP 比活性 (U/ng, $\bar{x} \pm s$)
对照组	0	3	0.7619 ± 0.1486
(μg/ml)			
补骨合剂组	5	3	0.7633 ± 0.2103
(μg/ml)	10	3	0.7637 ± 0.0191
	50	3	1.0002 ± 0.0826
	100	3	1.1126 ± 0.0295 *
	500	3	1.1013 ± 0.0535 *
密钙息组	10	3	0.8787 ± 0.1045
(mU/ml)	50	3	1.1232 ± 0.0186 *
	100	3	0.9573 ± 0.0664

注: 与对照组比较, * P < 0.05。

2.4 细胞内骨钙素 (BGP) 含量测定结果 诱导组、补骨合剂组和密钙息组细胞内 BGP 含量与对照组相比均具有非常显著差异 (P < 0.01)。补骨合剂 10、50、100、500 μg/ml 组、密钙息 50、100 mU/ml 组与诱导组相比具有非常显著差异 (P < 0.01)。其中

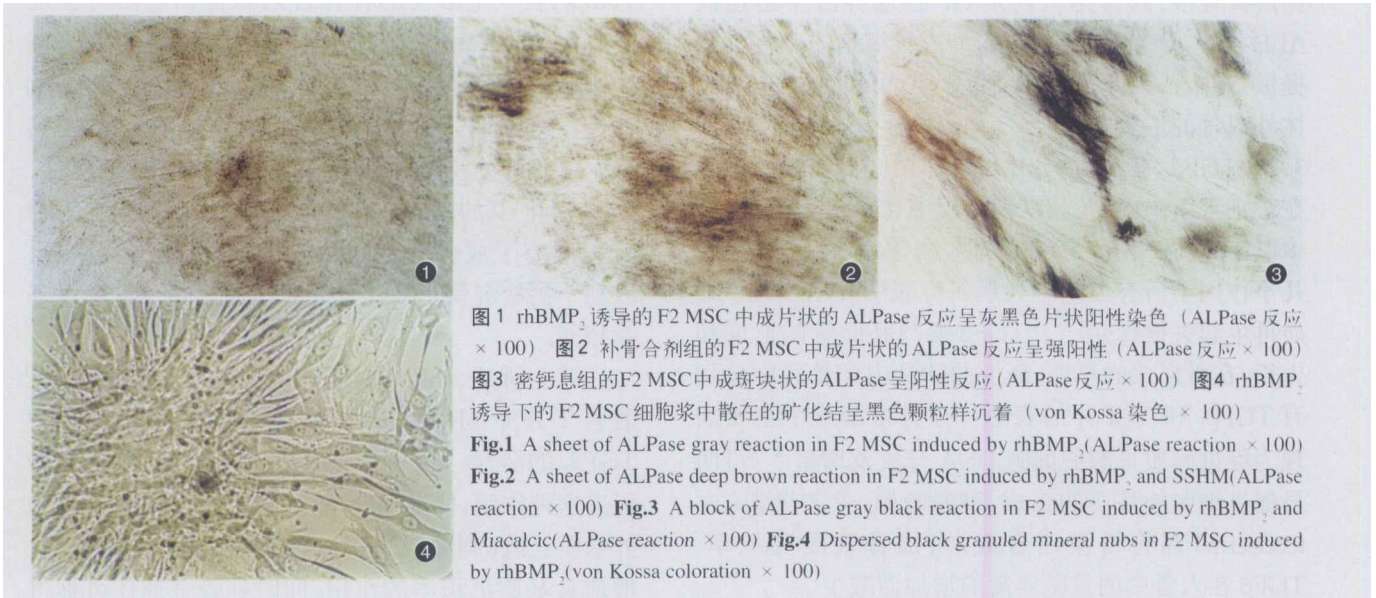


图1 rhBMP₂ 诱导的 F2 MSC 中成片状的 ALPase 反应呈灰黑色片状阳性染色 (ALPase 反应 × 100) 图2 补骨合剂组的 F2 MSC 中成片状的 ALPase 反应呈强阳性 (ALPase 反应 × 100) 图3 密钙息组的 F2 MSC 中成斑块状的 ALPase 呈阳性反应 (ALPase 反应 × 100) 图4 rhBMP₂ 诱导下的 F2 MSC 细胞浆中散在的矿化结呈黑色颗粒样沉着 (von Kossa 染色 × 100)
 Fig.1 A sheet of ALPase gray reaction in F2 MSC induced by rhBMP₂ (ALPase reaction × 100) Fig.2 A sheet of ALPase deep brown reaction in F2 MSC induced by rhBMP₂ and SSHM (ALPase reaction × 100) Fig.3 A block of ALPase gray black reaction in F2 MSC induced by rhBMP₂ and Miacalcin (ALPase reaction × 100) Fig.4 Dispersed black granulated mineral nubs in F2 MSC induced by rhBMP₂ (von Kossa coloration × 100)

100 μg/ml 补骨合剂组、50 mU/ml 密钙息组分别达到本组的最大效应,见表 2。

表 2 不同浓度药液对 MSC 内 BGP 含量的影响

Tab.2 Results of BGP in different concentration groups

组别	药物浓度	n	BGP(ng/10 ⁶ , $\bar{x} \pm s$)
对照组	0	3	2.2759 ± 0.3433
(μg/ml)			
诱导组	0	6	3.3242 ± 0.2103 *
(μg/ml)			
补骨合剂组	5	6	3.3484 ± 0.3964 *
(μg/ml)	10	6	3.9392 ± 0.2115 * #
	50	6	4.1474 ± 0.2210 * #
	100	6	5.4644 ± 0.4522 * #
	500	6	4.3847 ± 0.6825 * #
密钙息组	10	6	3.4356 ± 0.1658 *
(mU/ml)	50	6	5.3434 ± 0.3436 * #
	100	6	4.0651 ± 0.2761 * #

注:与对照组比较, * P < 0.01; 与诱导组比较, * # P < 0.01。

2.5 补骨合剂促进 rhBMP₂ 诱导 MSC 表达 TGFβ₁ mRNA 的测定结果 诱导组 TGFβ₁ mRNA 的表达高于对照组,而补骨合剂、密钙息各组 TGFβ₁ mRNA 的表达均高于诱导组。补骨合剂组在低浓度范畴内随剂量的增高而表达逐渐增强,至 50 μg/ml 时达到最大效应,继续提高浓度则 TGFβ₁ mRNA 表现呈下降趋势;100 mU/ml 密钙息组达到本组的最大效应,见表 3。

3 讨论

3.1 MSC 向成骨细胞分化条件 MSC 在体外成骨的条件与其他来源的成骨细胞相比有其特殊性。由

于骨髓间充质干细胞可以向成骨细胞、成纤维细胞、成软骨细胞和脂肪细胞等多个方向分化,故间充质细胞中只有一部分是能自发分化为成骨细胞系的骨祖细胞,其在体外的分化很大程度上依赖于培养条件。故摸索 MSC 最佳体外培养条件使 MSC 多量、稳定地向成骨细胞系分化,对骨组织的形成具有重要意义。培养条件包括培养液的选择、培养时间及影响细胞分化、增殖物质的加入。常规 MSC 的培养采用能使细胞生长速度较快、易于贴壁的 α-MEM 培养液,24 h 贴壁改为在培养液中加入不同浓度的 rhBMP₂ 和 10 mmol/L β-GP,结果显示细胞形态的变化、培养所需时间等与其他文献报道的结果相近。其中条件培养液中加入 rhBMP₂ 可增加细胞内 ALP

表 3 不同处理组 MSC 内 TGFβ₁ mRNA 的相对表达量

Tab.3 Comparison of expressed quantity of TGFβ₁ mRNA among different concentration groups

组别	浓度	TGFβ ₁ mRNA
对照组	0	0.0750
(μg/ml)		
诱导组	0	0.2053
(μg/ml)		
补骨合剂组	5	0.6408
(μg/ml)	10	0.8995
	50	2.9746
	100	1.7230
	500	0.3748
密钙息组	50	0.7218
(mU/ml)	100	2.6922
	200	0.4005

的活性,骨钙素和胶原蛋白的含量、 β -GP 能为细胞提供磷酸根,其作用机制是 GP 在培养液中迅速被 ALP 水解,产生大量磷酸根,为成骨细胞的矿化沉积提供条件^[2],因此 rhBMP₂ 和 β -GP 可作为促进 MSC 体外成骨的主要成分。

3.2 TGF β ₁ 在 MSC 分化中的作用 TGF β ₁ 广泛存在于正常组织中,尤其以骨组织中含量最为丰富,其中以 TGF β ₁ 为主。TGF β 的生物学活性十分广泛,几乎作用于所有细胞。大量研究表明 TGF β 对于骨质再生起关键作用^[3]。TGF β 参与胚胎骨的形成和生长,在骨形成的早期,新生的软骨内和骨膜中分别有 TGF β ₁ 和 TGF β ₂ 的表达。在骨系细胞中主要表现为促进间质来源的细胞 DNA 合成及增殖^[4],可明显促进细胞外基质的合成,刺激胶原、骨连接素 (osteonectin) 和骨桥蛋白合成,增加骨基质沉积率。TGF β 在人骨中的量随年龄的增加而减少。

3.3 补骨合剂促进 rhBMP₂ 诱导 MSC 分化的作用

ALP 比活性测定结果显示:100、500 μ g/ml 补骨合剂、50 mU/ml 密钙息与对照组相比具有显著差异,提示补骨合剂与密钙息均可促进分化中的 MSC 分泌 ALP;同时细胞内骨钙素含量测定显示:补骨合剂与密钙息同样能够非常显著地促进细胞分泌骨钙素。通过对 MSC 形态学观察、ALP 比活性测定和 BGP 含量测定,均可以说明经传代培养的细胞已经具有与成骨细胞相似的形态及生长特点,并且在分化过程中,补骨合剂具有与密钙息相同的作用,即促进 MSC 分泌 ALP 和骨钙素,促进 MSC 向成骨细胞分化。但补骨合剂的作用机制是通过增强 rhBMP₂ 活性还是直接作用于靶细胞需要进一步的观察。

RT-PCR 结果显示:rhBMP₂ 能诱导 MSC 表达 TGF β ₁,且一定浓度的补骨合剂和密钙息均可促进由 rhBMP₂ 诱导的这种作用,其中 50 μ g/ml 补骨合剂和 100 mU/ml 密钙息均达本组最大效应,且 50 μ g/ml 补骨合剂的 TGF β ₁ 表达量略高于 100 mU/ml 密钙息。由此可见,补骨合剂可以增强 rhBMP₂ 的活性,促进分化中的 MSC 表达 TGF β ₁,从而使分化的 MSC 具有了成骨细胞的功能,大量分泌 I 型胶原,以利于钙盐沉积。补骨合剂的这种作用与密钙息基本相同。

综上所述, rhBMP₂ 能够最大限度的诱导 MSC 表达 TGF β ₁ mRNA,从而能够有效的提高 MSC 中 TGF β ₁ 的活性。50 μ g/ml 的补骨合剂可以最有效的促进这种作用,使 TGF β ₁ 能够有效地发挥促进细胞外基质合成,刺激胶原、骨连接素和骨桥蛋白合成,增加骨基质沉积率的作用,同时补骨合剂还可促进分化中的 MSC 分泌 ALP 和骨钙素,从而加速 MSC 向成骨细胞分化。补骨合剂的这种促进 MSC 分化作用与密钙息作用原理基本相同。然而 rhBMP₂ 在正常人体内的产生机制还不明确,可以通过 PCR 等方法进一步扩增其片段,探讨其在体内的产生机制。

参考文献

- 1 王洪复. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术. 上海:科学技术出版社,2001. 61-62.
- 2 Locklin RM, Willianson MC, Beresford JN, et al. In vitro effects of growth factors and dexamethasone on rat marrow stromal cells. Clin Orthop, 2001, 313:27.
- 3 Urist MR, Delange RJ, Finerman GAM. Bone cell differentiation and growth factors. Science, 1983, 220:680.
- 4 Trippel SB, Courss RD, Einborn TA, et al. Growth factors as therapeutic agents. J Bone Joint Surg (Am), 2002, 78(8):1272.

(收稿日期:2003-11-19 本文编辑:王宏)

2005 年征订启事

《中国骨伤》杂志是中国中西医结合学会和中国中医研究院主办的国家级专业性学术期刊,是中国期刊方阵双奖期刊。本刊坚持中西医并重原则,突出中西医结合特色,执行理论与实践、普及与提高相结合的方针。主要报道中医、西医和中西医结合在骨伤科领域的科研成果、理论探讨和临床诊疗经验,反映我国骨伤科在医疗、科研工作中的新进展,以促进国内外骨伤科的学术交流。

本刊主要设有专家述评、临床研究、实验研究、骨伤论坛(学术探讨)、影像分析、诊治失误、经验交流、文献综述、手法介绍、学习园地、科研思路与方法、临床病例报告、国内外骨伤科医学动态以及医学书刊评价等栏目。

本刊为月刊,每月 25 日出版,期刊内页采用 80 g 铜版纸,国际通用 16 开大版本,64 页。价格不变,单价 8.80 元,全年价 105.60 元。国内外公开发售,全国各地邮局订阅,邮发代号:82-393。如错过征订机会,本刊编辑部亦可代办补订(请直接汇款至编辑部),国内订户我们将负责免费邮寄。

编辑部地址:北京东直门内南小街甲 16 号《中国骨伤》杂志编辑部,100700 电话:(010)64014411-2693 传真:(010)84036581

http://www.corthoptrauma.com E-mail:zggszz@sina.com