

· 基础研究 ·

# 成骨生长肽对大鼠骨髓基质细胞增殖和成骨分化的作用

肖毅, 王建国, 白增亮

(山东大学生命科学院发育免疫学实验室, 山东 济南 250100)

**【摘要】** 目的: 观察成骨生长肽诱导体外培养的大鼠骨髓基质细胞增殖及向成骨分化的作用。方法: 取 6 周龄 SD 大鼠, 贴壁法分离培养骨髓基质细胞, 在不同浓度成骨生长肽的诱导下, 观察细胞形态变化, 绘制骨髓基质细胞生长曲线, 碱性磷酸酶和钙结节组织化学染色。结果: 成骨生长肽对骨髓基质细胞增殖和成骨分化的作用呈剂量依赖性; 成骨生长肽浓度在  $10^{-10}$  及  $10^{-11}$  mol/L 时促进骨髓基质细胞增殖, 而在  $10^{-8}$  及  $10^{-9}$  mol/L 时对骨髓基质细胞的增殖略有抑制作用; 成骨生长肽浓度在  $10^{-10}$  及  $10^{-11}$  mol/L 时骨髓基质细胞碱性磷酸酶染色基本呈阴性, 与对照组相比差异无统计学意义, 而在  $10^{-8}$  及  $10^{-9}$  mol/L 浓度下可以显著提高骨髓基质细胞碱性磷酸酶染色的阳性率。结论: 成骨生长肽可以明显促进大鼠骨髓基质细胞增殖及向成骨细胞分化, 其促成骨活性具有显著的浓度依赖性。

**【关键词】** 成骨生长肽; 骨髓基质细胞; 细胞分化

**Effects of osteogenic growth peptide to the proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells** XIAO Yi, WANG Jian-guo, BAI Zeng-liang. *Developmental Immunology Lab, School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, Shandong, China*

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of osteogenic growth peptide (OGP) to the proliferation and differentiation of cultured bone marrow stromal cells (BMSCs) of rats. **Methods:** The SD rats (age 6 weeks) were sacrificed, and the bone marrow stromal cells as the adherent stromal cell population were separated from the bone marrow culture. The proliferation curves of bone marrow stromal cells which were conditioned cultured with four kind of different concentrations of osteogenic growth peptide were measured with the MTT method, and the osteogenesis markers including alkaline phosphatase and calcic deposition detected by histochemical staining. **Results:** Osteogenic growth peptide at the concentration of  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  mol/L promoted the proliferation of bone marrow stromal cells, while at the concentrations of  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  mol/L suppressed the proliferation of bone marrow stromal cells. However, osteogenic growth peptide at the concentration of  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  mol/L advanced the ratio of positive cells in alkaline phosphatase histochemical staining. **Conclusion:** Osteogenic growth peptide shows distinct effects on the proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells depending on its concentration. Osteogenic growth peptide at the concentration of  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  mol/L can promote bone marrow stromal cell differentiation to the osteogenic in vitro.

**Key words** Osteogenic growth peptide; Bone marrow stromal cells; Cell differentiation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(11):843-845 www.zggszz.com

1992 年, Bab 等<sup>[1]</sup>从愈合的骨髓组织中分离纯化了一种由 14 个氨基酸残基组成的多肽, 命名为成骨生长肽 (osteogenic growth peptide, OGP)。随后的研究表明成骨生长肽对多种细胞, 包括 MC3T3E1 成骨细胞、ROS17/2.8 成骨细胞、NIH3T3 成纤维细胞和鼠类颅盖骨成骨细胞等具有有丝分裂原活性, 提高多种成骨细胞系及原代成骨细胞的碱性磷酸酶活性, 促进基质矿化<sup>[1-2]</sup>。动物实验表明, 成骨生长肽可以明显促进骨质疏松大鼠骨量的增加<sup>[3]</sup>, 提高骨折动物模型的骨折

愈合速度<sup>[2,4]</sup>。静脉注射成骨生长肽的实验表明, 成骨生长肽还可以刺激骨髓造血细胞和外周血细胞数量的增加<sup>[5-7]</sup>, 提高骨髓移植小鼠的成活率<sup>[8]</sup>, 可能与成骨生长肽改善了造血微环境有关。成骨生长肽作为治疗骨质疏松、骨折不愈合及刺激造血的药物具有很好的研究价值和前景<sup>[9]</sup>。但目前关于成骨生长肽促进骨折愈合及刺激造血活性的细胞及分子机制仍不清楚。骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 是具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞, 可以分化为成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞等, 在骨髓造血微环境中扮演着关键的角色。本实验试图从骨髓基质细胞的角度研究成骨生长肽促进骨折愈合的细胞机制, 所获结果表明, 成骨生长肽对骨髓基质细胞具有有丝分裂原活性及促进骨髓基质细胞

基金项目: 山东省博士后基金 (编号: 11200004040740)

通讯作者: 白增亮 Tel: 0531-88362332 E-mail: zengliangbai@mail.sdu.edu.cn

成骨分化的作用。

**1 材料与方**

**1.1 试剂与仪器** 成骨生长肽购自上海益众生物技术有限公司,纯度在 97%以上。L-DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、细胞培养瓶等细胞培养耗材购自济南爱博公司,二氧化碳培养箱、倒置相差显微镜为尼康公司产品。

**1.2 实验动物及分组** 雌性 6 周龄 SD 大鼠 4 只(山东大学实验动物中心提供)。以下各组中所用的骨髓基质细胞均来自同一来源。实验分 5 组: ①对照组为正常培养的骨髓基质细胞;② $10^{-11}$  mol/L 浓度 OGP 诱导培养的骨髓基质细胞;③ $10^{-10}$  mol/L 浓度 OGP 诱导培养的骨髓基质细胞;④ $10^{-9}$  mol/L 浓度 OGP 诱导培养的骨髓基质细胞;⑤ $10^{-8}$  mol/L 浓度 OGP 诱导培养的骨髓基质细胞。骨髓基质细胞的培养条件除 OGP 不同外均完全相同,均为 90%L-DMEM 培养基+10%胎牛血清+100 U/ml 青霉素+100 U/ml 链霉素的完全培养基。

**1.3 BMSCs 的分离、原代和传代培养及形态观察** 拉颈脱臼处死 4 只雌性 6 周龄 SD 大鼠,浸入 75%乙醇 5 min,无菌操作取出股骨、胫骨,两端剪开,用无菌 1 ml 注射器吸入完全培养基,反复冲洗股骨、胫骨的骨髓腔数次,收集冲洗液。完全培养基为 90%L-DMEM 培养基+10%胎牛血清+100 U/ml 青霉素+100 U/ml 链霉素。用完全培养基调整细胞密度为  $1 \times 10^7$ /ml,接种于培养瓶中,置于 37℃、5%的 CO<sub>2</sub> 浓度及饱和湿度的培养箱内,静置 72 h 后更换培养液,弃掉未贴壁细胞,以后每 3 d 换液 1 次,细胞长到 80%融合时用 0.25%的胰蛋白酶消化传代,以  $2 \times 10^4$ /ml 的细胞密度传代。

**1.4 观察项目及方法**

**1.4.1 细胞增殖率检测** 噻唑蓝比色法(MTT 法)按实验分组检测对照组和诱导组的细胞增殖率。取生长良好的第 3 代骨髓基质细胞,以  $2 \times 10^4$ /ml 的细胞密度接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100  $\mu$ l,待细胞贴壁(4 h)后吸弃培养基,按实验分组分别加入不同的培养基 100  $\mu$ l,各组培养基均为每 3 d 换液 1 次。于第 1 至 12 天,每天 MTT 法检测对照组和诱导组的细胞存活数。MTT 法具体步骤:在所需检测的培养孔内每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) 10  $\mu$ l,37℃、5%的 CO<sub>2</sub> 浓度及饱和湿度的培养箱内继续孵育 4 h 后,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 200  $\mu$ l 二甲基亚砜(DMSO),酶联免疫检测仪检测

各孔 490 nm 吸光度(A)。

**1.4.2 细胞碱性磷酸酶染色鉴定成骨细胞** 取生长良好的第 3 代骨髓基质细胞, $2 \times 10^4$ /ml 的细胞密度接种于 96 孔培养板,每孔 100  $\mu$ l,待细胞贴壁(24 h)后吸弃培养基,按实验分组分别加入不同的培养基 100  $\mu$ l,各组培养基均为每 3 d 换液 1 次。于第 1 天至第 12 天,每天对各组骨髓基质细胞进行碱性磷酸酶染色。碱性磷酸酶染色的具体步骤:骨髓基质细胞用 PBS 洗涤 2 次,100  $\mu$ l 95%乙醇固定 10 min,蒸馏水洗涤 3 次,BCIP/NBT 显色剂 50  $\mu$ l 显色 10 min,蒸馏水洗涤 3 次,显微镜下观察并随机选取 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,计算碱性磷酸酶染色的阳性率。

**1.4.3 Von Kossa 法检测钙结节** 取生长良好的第 3 代骨髓基质细胞, $2 \times 10^4$ /ml 的细胞密度接种于 96 孔培养板,每孔 100  $\mu$ l,待细胞贴壁(24 h)后吸弃培养基,按实验分组分别加入不同的培养基 100  $\mu$ l,各组培养基均为每 3 d 换液 1 次。于第 1 天至第 12 天,每天 Von Kossa 法检测钙盐沉积。Von Kossa 法检测钙盐沉积的具体步骤:PBS 冲洗骨髓基质细胞 1 次,以 4%甲醛固定 5 min 后蒸馏水冲洗 2 次,2%硝酸银日光灯下染色 80 min,蒸馏水冲洗 2 次,每次 3 min,以 5%硫代硫酸钠处理 2 min,蒸馏水冲洗 2 次,然后在倒置显微镜下观察钙结节的形成。

**1.5 统计学处理** 应用 Minitab 统计分析工具,采用单因素 5 水平设计定量资料的 F 检验比较各组间细胞增殖率的差异及碱性磷酸酶染色阳性率的差异,两两比较采用 LSD 方法。

**2 结果**

**2.1 细胞形态观察** 原代骨髓细胞在接种 24 h 后开始有圆形细胞贴壁,72 h 后贴壁的细胞开始有胞浆突起,呈短棒状。第 1 次换液后培养瓶中大量的悬浮细胞被去除,3 次换液后悬浮细胞基本被完全去除,贴壁的细胞大部分为梭形和多角形,少量细胞呈椭圆形。随着培养时间的延长,细胞逐渐变长,呈长梭形。原代细胞大多数呈梭形、三角形,并可见散在分布的细胞集落形成,集落中心细胞致密,集落边缘细胞呈放射状向外分布。原代培养 12 d 左右后,细胞生长至 80%~90%融合。传代后细胞单层贴壁生长,细胞生长至 80%~90%融合后大多数细胞呈长梭形平行分布,并可见少量的圆形细胞散在其间。此种方法分离的骨髓基质细胞可以稳定传代 15 代以

表 1 实验组与对照组骨髓基质细胞增殖率的差异分析

Tab.1 The difference of the proliferation rate of BMSCs grown in the experiment and control groups

| 分组                     | 细胞增殖率 |             |              |              |              |              |
|------------------------|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                        | 培养时间  | 1 d         | 6 d          | 8 d          | 10 d         | 12 d         |
| 对照组                    |       | 0.308±0.013 | 0.644±0.029  | 0.818±0.023  | 0.862±0.038  | 0.848±0.037  |
| $10^{-11}$ mol/L OGP 组 |       | 0.306±0.011 | 0.710±0.044* | 0.880±0.033* | 0.970±0.039* | 0.958±0.038* |
| $10^{-10}$ mol/L OGP 组 |       | 0.306±0.011 | 0.692±0.043  | 0.868±0.035* | 0.942±0.042* | 0.934±0.039* |
| $10^{-9}$ mol/L OGP 组  |       | 0.306±0.018 | 0.630±0.027  | 0.802±0.031  | 0.816±0.037  | 0.790±0.036* |
| $10^{-8}$ mol/L OGP 组  |       | 0.304±0.018 | 0.593±0.028* | 0.776±0.033* | 0.810±0.032* | 0.776±0.034* |
| F 值                    |       | 0.94        | 8.53         | 15.70        | 18.38        | 22.18        |
| P 值                    |       | 0.46        | 0.000        | 0.000        | 0.000        | 0.000        |

注:与对照组相比,\*P<0.05

Note:Compared with control group,\*P<0.05

上,随着传代次数的增多,细胞形态开始变宽大,细胞的增殖速度也有所下降,细胞内颗粒状物质增多。

**2.2 细胞增殖率的检测** 如表 1 所示,成骨生长肽对骨髓基质细胞增殖的作用具有浓度依赖性,在  $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$  mol/L 浓度时促进骨髓基质细胞增殖; $10^{-9}$  mol/L 浓度时对骨髓基质细胞的增殖无影响; $10^{-8}$  mol/L 浓度时对骨髓基质细胞的增殖有抑制作用。

**2.3 细胞碱性磷酸酶染色** 如表 2 所示, $10^{-11}$ 、 $10^{-10}$  mol/L 浓度 OGP 诱导组的碱性磷酸酶染色阳性率都很低,与对照组相比差异无统计学意义,而  $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$  mol/L 浓度 OGP 诱导组碱性磷酸酶染色阳性率与对照组相比有明显提高。碱性磷酸酶染色的结果表明,OGP 在  $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$  mol/L 浓度下可以明显诱导骨髓基质细胞向成骨细胞分化。

表 2 实验组与对照组细胞碱性磷酸酶染色阳性率的差异

Tab.2 The difference of the ratio of the positive cells in alkaline phosphatase histochemical staining of BMSCs grown in the experiment and control groups

| 分组                     | 碱性磷酸酶染色阳性率  |
|------------------------|-------------|
| 对照组                    | 24.00±5.57  |
| $10^{-11}$ mol/L OGP 组 | 26.00±6.08  |
| $10^{-10}$ mol/L OGP 组 | 26.60±6.47  |
| $10^{-9}$ mol/L OGP 组  | 42.60±6.36* |
| $10^{-8}$ mol/L OGP 组  | 40.00±5.96* |
| F 值                    | 10.42       |
| P 值                    | 0.000       |

注:与对照组相比,\* $P<0.05$

Note: Compared with control group, \* $P<0.05$

**2.4 钙结节染色** 实验组与对照组在 15 d 内均未观察到有钙结节的生成。

### 3 讨论

OGP 是组蛋白 H4 mRNA 第 85 位 AUG 密码子起始翻译产物,结构高度保守<sup>[10]</sup>。OGP 普遍存在于哺乳动物血清中<sup>[1]</sup>,骨折及大量失血均可造成血清 OGP 浓度的迅速升高,提示 OGP 可能具有非常重要的生理学功能。已有研究表明,OGP 具有促进骨折愈合、刺激造血的活性,但对其细胞机制的了解还知之甚少。骨髓基质细胞是成骨祖细胞的主要来源,在骨折愈合的过程中起着重要的作用。骨髓基质细胞也是骨髓造血微环境的重要组成部分,对骨髓造血的调控起着重要作用。因此,推测骨髓基质细胞可能是 OGP 的效应细胞,OGP 的促成骨作用和刺激造血的作用可能与骨髓基质细胞有关。碱性磷酸酶被认为是成骨细胞分化和功能的标志,是骨形成所必需的酶,在体外钙化中起着关键性的作用。碱性磷酸酶活性高低一定程度上可以反映出细胞的成骨分化程度。本实验通过全骨髓贴壁筛选的方法能够分离到可以稳定传代、相对均质的骨髓基质细胞。其第 3 代细胞的碱性磷酸酶染色基本呈阴性。因此,本实验以碱性磷酸酶和钙结节的组织化学染色作为骨髓基质细胞向成骨分化的标志。实验结果表明,OGP 在低浓

度( $10^{-11}$ 、 $10^{-10}$  mol/L)下对骨髓基质细胞具有有丝分裂原活性,高浓度下( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$  mol/L)诱导骨髓基质细胞成骨分化。钙结节染色阴性可能是因为诱导时间不足,也可能是因为培养液中缺乏  $\beta$ -甘油磷酸钠。因此,骨髓基质细胞在 OGP 促进骨折愈合中起着重要的作用,进一步研究 OGP 作用于骨髓基质细胞的分子机制及信号转导途径具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Bab IA, Dan Gazit, Chorev M, et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide(OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. EMBO J, 1992, 11: 1867-1873.
- [2] Yankel G, Ralph M, Eran R, et al. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. Bone, 2004, 35: 65-73.
- [3] 施德源, 俞超, 陈统一, 等. 成骨生长肽促进大鼠骨量增加的作用. 上海医科大学学报, 1999, 26: 187-190.
- [4] Sun YQ, Ashhurst DE. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing in rabbits. Cell Biol Int, 1998, 22: 313-319.
- [5] Brager MA, Patterson MJ, Connolly JF, et al. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. J Orthop Res, 2000, 18: 133-139.
- [6] Fazzi R, Testi R, Trasciatti S, et al. Bone and bone marrow interactions: haematological activity of osteoblastic growth peptide (OGP) derived carboxy-terminal pentapeptide. Mobilizing properties on white blood cells and peripheral blood stem cells in mice. Leuk Res, 2002, 26: 19-27.
- [7] Fazzi R, Galimberti S, Testi R, et al. Bone and bone marrow interactions: hematological activity of osteoblastic growth peptide (OGP) derived carboxy terminal pentapeptide II Action on human hematopoietic stem cells. Leuk Res, 2002, 26: 839-848.
- [8] Chen HH, Shi DY, Shao YC, et al. Effect of synthetic osteogenic growth peptide on hematopoiesis in normal mice and assay of its hematological activity in vitro. Chinese Pharmacological Bulletin, 2003, 19: 89-92.
- [9] Gurevitch O, Shavin S, Muhrad A, et al. Osteogenic growth peptide increases blood and bone marrow cellularity and enhances engraftment of bone marrow transplants in mice. Blood, 1996, 88 (12): 4719-4724.
- [10] Bab I, Chorev M. Osteogenic growth peptide: from concept to drug design. Biopolymers, 2002, 66: 33-48.
- [11] Mark FP, Alastair MM, Stephen CB, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284: 143-147.
- [12] Itai B, Elisheva S, Hanna G, et al. Biosynthesis of osteogenic growth peptide via alternative translational initiation at AUG85 of Histone H4 mRNA. J Biol Chem, 1999, 274: 14474-14481.
- [13] Greenberg Z, Chorev M, Muhrad A, et al. Structural and functional characterization of osteogenic growth peptide from human serum: identity with rat and mouse homologs. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(8): 2330-2335.

(收稿日期: 2008-04-16 本文编辑: 连智华)