

瘦素在骨髓基质干细胞向成骨细胞分化早期的作用研究

陈翠珠 曲强

【摘要】 目的 研究小鼠骨髓基质干细胞体外增生及向成骨细胞定向分化早期瘦素(Leptin)的作用。**方法** 取雄性6周ICR小鼠股骨骨髓基质细胞进行原代和传代培养,在传代细胞培养时加入Leptin(实验组)或保持基础培养条件(对照组),分别检测两组的细胞增生情况。半定量RT-PCR方法检测成骨细胞相关基因Cbfa1和Cbfb等在两组细胞分化过程中的表达。**结果** 实验组在细胞培养24和48 h细胞数量明显少于对照组,显示时间与Leptin剂量依赖特性。Leptin在传代细胞培养中促进成骨细胞特异性转录因子Cbfa1和Cbfb的表达。**结论** Leptin抑制骨髓基质干细胞体外增生并促进早期成骨细胞相关基因的表达。

【关键词】 瘦素;骨髓干细胞;成骨细胞;细胞增生;细胞分化

Effect of leptin on proliferation and differentiation of mouse bone marrow-derived osteoblasts CHEN Cuizhu, QU Qiang. Medical Research Center, Peking Union Medical College Hospital, Beijing, 100032 China

【Abstract】 Objective To study the effect of leptin on bone marrow stem cell proliferation and osteoblast differentiation using a mouse bone marrow culture system. **Methods** Bone marrow cells were derived from 6-week old ICR mouse. Leptin was initiated in experimental group at the beginning of the cultures. Control group was treated with placebo. Cell number was counted after treatment. Semi-quantitative RT-PCR was used to evaluate the expression of Cbfa1 and Cbfb. **Results** Cell amount at 24 and 48 hours in experimental group was significantly less than that in control group in a dose-dependent manner. Leptin increased the expression of Cbfa1 and Cbfb in subcultures. **Conclusion** Leptin inhibits stromal cell proliferation and enhances the expression of early osteoblast differentiation-related markers.

【Key words】 Leptin; Bone marrow stem cell; Osteoblast; Cell proliferation; Cell differentiation

骨髓基质干细胞又称为间充质干细胞(Mesenchymal stromal cell, MSC);具有自我增生及多向分化潜能。MSC在适当诱导条件下可向成骨细胞,软骨细胞,脂肪细胞和肌细胞等多种细胞分化^[1]。瘦素(Leptin)是近年来发现的具有中枢调节和外周局部作用的重要细胞因子。Leptin基因缺失动物除表现为肥胖等其他表型外,在骨组织表现为骨量增加,而Leptin脑室应用后通过中枢下丘脑反射导致骨密度下降^[2]。但近来体外实验表明,Leptin促进hMS2-12人骨髓基质细胞系向成骨细胞分化^[3],在原代成骨细胞培养中,Leptin亦表现为直接刺激成骨细胞增殖、成熟和细胞外基质矿化^[4]。Leptin对MSC向成

骨细胞分化诱导的作用机制目前尚不清楚。

我们利用已建立的小鼠MSC体外培养模型^[5],在应用地塞米松(DEX)诱导成骨细胞分化的同时,研究Leptin对MSC增生能力及对成骨细胞特异性标记物I型胶原蛋白(COL1)、碱性磷酸酶(ALP)以及转录因子CBFA1、CBFB表达的作用。

材料和方法

1. 细胞培养

(1)原代细胞培养:取6周ICR雄性小鼠(北京大学医学实验动物科学部),颈椎脱位法处死后,于无菌条件下取出双侧股骨,去除股骨双侧干骺端,以25G针头用 α -MEM冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞于50 ml离心管中。1000 rpm离心10 min,弃上清,细胞重悬后计数有核细胞;并接种细胞于培养瓶或培养板中,加入条件培养液(α -MEM培养基,15%标准胎牛

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070367)

作者单位:100032 中国医学科学院北京协和医院中心实验室
中国医学科学院北京协和医院基本外科

血清, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 维生素 C, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青链霉素和 10^{-8} mol/L DEX)。5% 二氧化碳培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 隔日更换半量培养液。

(2) 传代细胞培养: 原代细胞培养 5 d 时, 吸出培养液; PBS 冲洗 2 次; 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化后, 1000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 加入适量 α -MEM 重悬细胞并计数, 种植于培养瓶或培养板中, 隔日半量换液。

2. 细胞增生检测

传代细胞按 10^4 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中, 实验组于传代培养中加入 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leptin, 每时间点设置 3 孔用于检测, 并平行设置未加 Leptin 对照组。采用 CellTiter96 试剂盒 (Promega) 方法, 于处理后 24 和 48 h 分别读取 490 nm 吸光度, 根据标准曲线计算各实验与对照组中每孔细胞数。

3. 成骨细胞分化相关基因表达的检测

细胞总 RNA 采用 Trizol (Promega) 一步法提取。取 2 μg 总 RNA 进行反转录; 反应体系含 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Oligo dT 2 μl , 10 mM dNTP 1.5 μl , 40 U/ μl IRNA 酶抑制剂 1 μl , 200 U/ μl M-MLV RT 酶 1 μl , 及反应缓冲液共 25 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。取 2.5 μl cDNA 作为模板于 25 μl 反应体系中进行 PCR。PCR 引物分别为: CBFA1 正链: ccaaatttgcttaaccagaatg, 反链: gaggtgtgtgttcaaacac; GAPDH 正链: caccatggaggcgggg, 反链: gacggacacattggggtag; CBFB 正链: aagta-cacgggttcagggacc, 反链: ctcaaggcctgtgtgctaa。PCR 反应为 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。35 个循环。循环反应完毕后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。产物取 8 μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化已锭染色, 利用凝胶成像系统 (Bio-Rad Gel Doc2000) 进行光密度扫描, 求取每一样品光密度与 GAPDH 光密度的比值。

4. 统计学处理

实验组与对照组每一时间点平行设置 3 个样本, 采集数据以均数 $\pm$ 标准差表示, ANOVA 方法检测组间均数差异, p 值小于 0.05 认为组间样本均数差异有显著性。

结 果

小鼠骨髓基质细胞在含有 DEX、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸及 10% 胎牛血清的条件培养基中 2 d 后细胞开始贴壁变形, 多呈梭形, 少数呈小圆形或三角形。原代培养 5 d 后进行传代, 传代的细胞约 2 h 后开始贴壁, 细胞形态较均一, 少数细胞呈多边形, 胞

核大而圆。原代及传代培养中均可见处于有丝分裂期细胞形态。传代细胞依次表达 COL1、ALP、骨钙素 (OCN) 等, 并于传代培养 2 周后出现细胞外基质矿化^[5]。

我们在细胞传代培养开始时于实验组培养基中分别加入 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leptin, 第 24、48 和 72 h 后进行细胞计数。与对照组比较, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leptin 实验组在第 24 和 48 h 细胞数量明显减少, 其中 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leptin 实验组减少更为显著, 呈现时间与剂量依赖效应。72 h 后 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leptin 组细胞数量仍明显少于对照组 (图 1)。

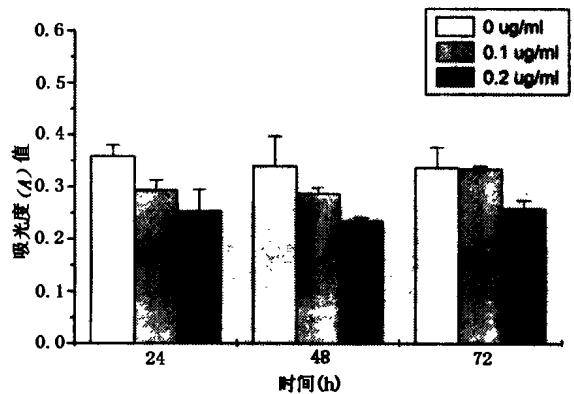


图 1 传代培养后第 24、48 和 72 h 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leptin 对细胞增生的影响

我们在细胞传代培养后第 5 天和第 10 天于 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leptin 实验组和对照组中分别提取总 RNA, 用 RT-PCR 方法扩增成骨细胞分化过程中特异性转录因子 CBFA1 和 CBFB, 以及成骨细胞特异性标记物 COL1 和 ALP, 并对其扩增产物进行半定量分析。我们发现在骨髓基质细胞传代培养后第 5 天和第 10 天时, 实验组 CBFA1 和 CBFB 的表达均高于对照组 (图 2), 而 COL1 和 ALP 表达在上述时间点与对照组无差异 (图 3)。

讨 论

Leptin 自 1994 年发现以来^[6], 被认为是具有中枢调节和外周局部作用的重要细胞因子。循环血中 Leptin 在成体主要来源于脂肪组织, 其作用是通过与广泛存在于多种组织细胞中的特异性受体 (OB-R) 结合而实现的。Leptin 的功能最初被证实是通过与中枢神经系统受体结合而产生限制食物摄入和增加能量代谢作用^[7]; 近来研究表明, Leptin 除与体重调节有关外, 还参与体内包括骨组织在内的多种组织代谢调节。Leptin 基因 (ob/ob) 或其受体基因 (db/db) 突变后, 动物除表现为肥胖等其他表型外, 在骨

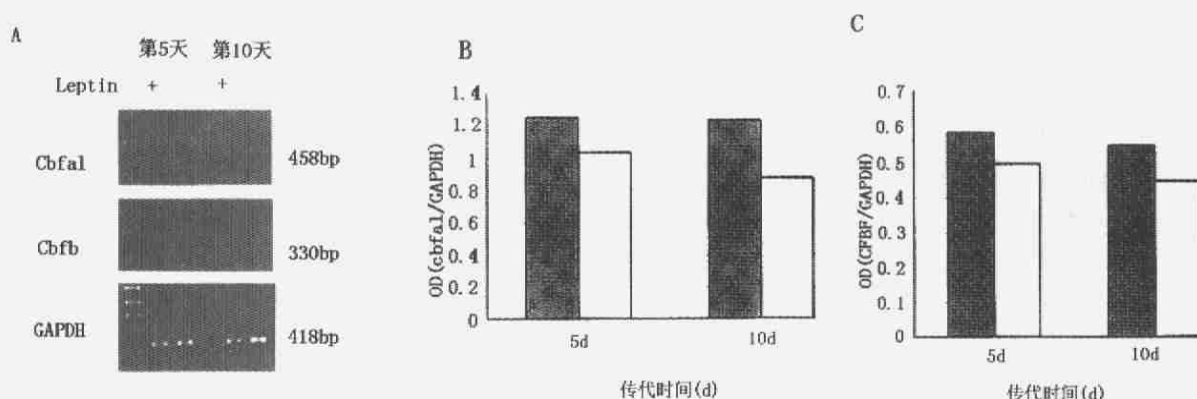


图2 传代培养后第5 d和10 d 0 µg/ml(白色)或0.1 µg/ml(灰色)Leptin对成骨细胞特异性转录因子Cbfa1和Cbfb表达的影响。

A: Cbfa1和Cbfb RT-PCR后电泳图; B: Cbfa1/GAPDH半定量分析; C: Cbfb/GAPDH半定量分析

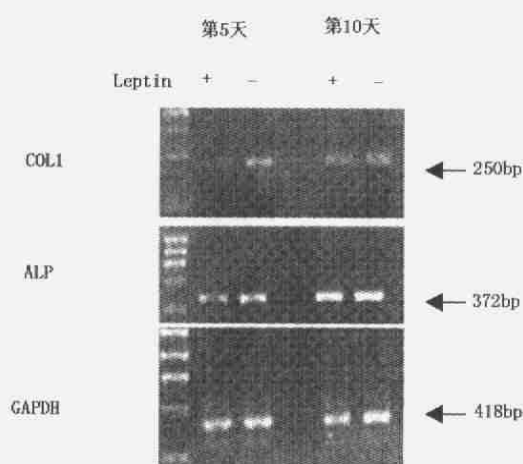


图3 传代培养后第5 d和第10 d 0 µg/ml或0.1 µg/ml Leptin对成骨细胞特异性标志物COL1和ALP表达的影响

组织表现为骨量增加和成骨细胞功能增强,而脑室内局部应用Leptin则导致骨密度下降,证明Leptin有中枢性抑制骨形成作用^[2]。Elefteriou等^[8]更进一步证实提高外周血清Leptin水平,可以减少骨量,提示Leptin外周作用与中枢作用一致。但是,与上述证据相反,许多学者亦证明Leptin可直接刺激成骨细胞增殖、成熟和细胞外基质矿化。首先,Reseland等^[9]发现人成骨细胞中存在Leptin及Leptin受体表达,提示Leptin可直接作用于成骨细胞。其次,在人原代成骨细胞或骨髓基质细胞系hMS2-12培养中,应用Leptin均可促进向成骨细胞分化^[3]。再次,Leptin基因敲除小鼠(ob/ob)应用Leptin后,表现为骨量和骨密度增加,肢体增长^[10]。同样,Matkovic等^[11]应用DEXA骨密度仪测量发现青春少女血清Leptin水平与骨密度呈正相关。总之,Leptin对成骨细胞作用机制及与骨形成的关系尚无定论。

在我们所建立的小鼠MSC体外培养模型中,

MSC经DEX诱导可分化为成熟成骨细胞,终期细胞外基质矿化形成骨样结构。本实验MSC传代培养早期加入Leptin后,细胞增殖受到明显抑制,实验组未发现明显细胞凋亡,提示MSC进入定向分化阶段。Leptin抑制细胞增殖作用发生于传代培养72 h之内,与地塞米松单独诱导细胞分化有叠加效应。

转录因子Cbfa1和Cbfb均是成骨细胞分化和完成其骨形成功能过程中的不可缺少的关键因子,Cbfa1与Cbfb结合共同启动包括COL1、ALP和OSN等在内的多种成骨细胞相关基因转录,实现成骨细胞生物学功能。实验组转录因子Cbfa1和Cbfb在传代培养第5天和第10天表达高于对照组,进一步表明MSC开始向成骨细胞分化,而Leptin促进了成骨细胞分化关键因子的表达。成熟成骨细胞特异性标志物COL1和ALP的表达并未因Leptin的加入而升高,一方面说明Leptin并未加速成骨细胞的成熟进程,另一方面,我们尚不清楚在MSC分化途径中,是否存在特异的Leptin作用时段。Gordeladze等^[4]发现内源性Leptin主要表达于基质细胞和成骨细胞成熟晚期,提示Leptin作用存在时序性。

参 考 文 献

- 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284:143-147.
- 2 Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 2000, 100:197-207.
- 3 Thomas T, Gori F, Khosla S, et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 1999 140:1630-1638.
- 4 Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, et al. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineraliza-

tion: impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem*, 2002, 85: 825-836.

- 5 Qu Q, Pera-Heape M, Kapanen A, et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*, 1998, 22: 201-209.
- 6 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. 1994 Position cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.
- 7 Couce ME, Burguera B, Parisi JE, et al. Localization of the leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology*, 1997, 66: 145-150.
- 8 Eleftheriou F, Takeda S, Ebihara K, et al. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 3258-3263.

- 9 Reseland JE, Syversen U, Bakke I, et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1426-1433.
- 10 Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, et al. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept*, 2000, 92 (1-3): 73-78.
- 11 Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82: 3239-3245.

(收稿日期: 2004-03-18)

(上接第 250 页)

因子, 限制骨代谢。瘦素对机体骨骼的影响是这两种效应的综合, 在正常机体, 瘦素的外周作用与中枢效应维持较好的平衡。尽管目前对瘦素在骨代谢中的作用已经有一定了解, 但还处于表面的观察阶段, 尤其对瘦素在骨骼的直接作用和如何通过中枢影响骨代谢, 还有许多关键问题尚不明瞭, 需要进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, et al. Plasma leptin concentrations are associated with bone mineral density and the presence of vertebral fractures in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2001, 55 (3): 341-347.
- 2 Pasco JA, Henry MJ, Kotowicz MA, et al. Serum leptin levels are associated with bone mass in nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 1884-1887.
- 3 Blain H, Vuillemin A, Guillemin F, et al. Serum leptin level is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87 (3): 1030-1035.
- 4 Ricci TA, Heymsfield SB, Pierson RN Jr, et al. Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73 (2): 347-352.
- 5 Kaufman BA, Warren MP, Dominguez JE, et al. Bone density and amenorrhea in ballet dancers are related to a decreased resting metabolic rate and lower leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87 (6): 2777-2783.
- 6 Martina H, Claudia M, Ina G, et al. Changes in bone turnover in patients with anorexia nervosa during eleven weeks of inpatient dietary treatment. *Clinical Chemistry*, 2002, 48 (5): 754-760.
- 7 Thomas T, Burguera B, Melton LJ, et al. Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat

mass and bone mineral density in men versus women. *Bone*, 2001, 29 (2): 114-120.

- 8 Martini G, Valenti R, Giovani S, et al. Influence of insulin-like growth factor-1 and leptin on bone mass in healthy postmenopausal women. *Bone*, 2001, 28 (1): 113-117.
- 9 Ormarsdottir S, Ljunggren O, Mallmin H, et al. Inverse relationship between circulating levels of leptin and bone mineral density in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16 (2): 1409-1414.
- 10 Reseland JE, Syversen U, Bakke I, et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res*, 2001, 16 (8): 1426-1433.
- 11 Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, et al. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem*, 2002, 85 (4): 825-836.
- 12 Kume K, Satomura K, Nishisho S, et al. Potential role of leptin in endochondral ossification. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50: 159-169.
- 13 Cornish J, Callon KE, Bava U, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinology*, 2002, 175: 405-415.
- 14 Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology*, 2001, 142 (8): 3546-3553.
- 15 Takeda S, Karsenty G. Central control of bone formation. *J Bone Miner Metab*, 2001, 19 (3): 195-198.
- 16 Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 2000, 100: 197-207.
- 17 Goldstone AP, Howard JK, Lord GM, et al. Leptin prevents the fall in plasma osteocalcin during starvation in male mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295 (2): 475-481.
- 18 Baldock PA, Sainsbury A, Couzens M, et al. Hypothalamic Y2 receptors regulate bone formation. *J Clin Invest*, 2002, 109 (7): 915-921.

(收稿日期: 2003-04-10)