

大鼠骨髓基质细胞体外成脂、成骨分化的研究

张维成 陈志信 王和平 刘林

摘要: **目的** 观察体外定向诱导大鼠骨髓基质细胞分化为脂肪细胞和成骨细胞。**方法** 全骨髓法分离大鼠骨髓基质细胞,传3代后分别在成脂、成骨诱导条件下继续培养,油红O染色、碱性磷酸酶染色和 Von Kossa 染色判定其分化结果。**结果** 传3代大鼠骨髓基质细胞成脂诱导21 d后,分化为脂肪细胞的阳性率为 $(83.6 \pm 2.8)\%$,成骨诱导12 d后碱性磷酸酶染色阳性率达 $(87.6 \pm 2.8)\%$,连续诱导35 d可见矿化结节形成。**结论** 随着诱导条件的不同,大鼠骨髓基质细胞在体外可定向分化为脂肪细胞或成骨细胞。

关键词: 骨髓基质细胞;分化;脂肪细胞;成骨细胞

Bone marrow stromal cells differentiate into adipocytes and osteoblasts ZHANG Weicheng, CHEN Zhixin, WANG Heping, et al. Department of Orthopaedics, The People's Hospital of Gansu Province, The Third Teaching Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the differentiation from bone marrow stromal cells to adipocytes and osteoblasts. **Methods** Bone marrow stromal cells were isolated from both femora in Wistar rats using all-bone marrow culture method. The cells were subcultured, collected after passage 3, and induced to adipocytes or osteoblasts by adipogenic inducer or osteogenic inducer. The differentiation of adipocytes or osteoblasts from bone marrow stromal cells was observed by oil red O, alkaline phosphatase and Von Kossa staining. **Results** After 21 days of adipocyte inducing, about $(83.6 \pm 2.8)\%$ of the cells displayed accumulation of lipid vacuoles. The rate of alkaline phosphatase positive cells reached $(87.6 \pm 2.8)\%$ after 12 days of osteoblast inducing. When cultured up to 35 days, there was calcium deposition in the nodules. **Conclusions** Under appropriate conditions, bone marrow stromal cells can be induced to differentiate along the adipocytic or osteoblastic pathways.

Key words: Bone marrow stromal cells; Differentiation; Adipocytes; Osteoblasts

骨质疏松患者骨量减少与髓腔内脂肪增多总是相伴出现,这一现象已为大家所公认。骨髓基质细胞具有多向分化潜能,可在不同的生物环境和细胞因子的作用下向相应的方向转化,是否可以通过抑制骨髓基质细胞向脂肪细胞的化,从而有效地促进骨形成,是为治疗骨质疏松症提供了新的思路。本实验采用细胞培养技术,观察不同诱导条件下大鼠骨髓基质细胞向成脂和成骨方向分化的过程,以期将骨髓基质细胞应用于骨质疏松的治疗提供理论依据,并希望所建立的实验方法能为将来进一步的临床和科研工作建立稳定的细胞模型。

1 材料和方法

作者单位:730000 兰州医学院第三临床医学院(甘肃省人民医院)骨科

通讯作者:陈志信, Email: xuechen@public.lz.gs.cn

1.1 材料

1.1.1 实验动物: Wistar 大鼠,雌性,6周龄(合格证书:医动字第14-006号,兰州医学院实验动物中心提供)。

1.1.2 主要试剂及仪器设备: DMEM 培养基(GIBCO),胎牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司),胰蛋白酶(AMRESCO),3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素、吡啶美辛、地塞米松、维生素C、 β -甘油磷酸钠(SIGMA);倒置相差显微镜(OLYMPUS),照相机(CANON),超净工作台,二氧化碳孵箱,离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

1.2.1.1 原代细胞培养: 颈椎脱位处死大鼠,无菌条件下取出双侧股骨,用DMEM培养液冲洗髓腔,冲出的骨髓细胞用含10%胎牛血清、青链霉素各100 U/ml的DMEM培养液制成骨髓细胞悬液,以 2×10^5

/cm²的密度种植于培养瓶内,置37℃、5% CO₂、95%湿度的孵箱中培养。3 d后首次换液,以后每隔3~5 d换液一次。

1.2.1.2 传代细胞培养:原代细胞培养12~16 d融合,用0.25%的胰蛋白酶消化细胞,吹打悬浮细胞,过滤成单细胞悬液,以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度传代培养,用传3代细胞进行以下实验。

1.2.2 培养细胞的诱导分化

传3代骨髓基质细胞分对照组和实验组,对照组培养液同原代培养液;成脂诱导组培养液为对照组培养液+0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤+10 μg/ml 胰岛素+100 μg/ml 吡啶美辛+ 10^{-6} mol/L 地塞米松;成骨诱导组培养液为对照组培养液+50 μg/ml 维生素 C+10 mmol/L β-甘油磷酸钠+ 10^{-8} mol/L 地塞米松。

1.2.3 细胞形态观察

倒置相差显微镜下逐日观察细胞增殖与分化的情况。

1.2.4 脂肪细胞鉴定

成脂诱导组细胞以 1×10^4 /孔种于24孔培养板中并进行爬片,诱导21 d后行脂肪细胞油红O染色,染色完成后光镜观察,每张玻片随机数取10个非重叠视野($\times 100$),计算脂肪细胞占总细胞数的比例。

1.2.5 碱性磷酸酶染色及细胞钙化检测

成骨诱导组细胞以 1×10^4 /孔种于24孔培养板中并进行爬片,第12天取细胞做碱性磷酸酶的改良Gomori氏钙钴法染色,染色完成后光镜观察,每张玻片随机数取10个非重叠视野($\times 100$),计算碱性磷酸酶阳性细胞占总细胞数的比例。于第35天取细胞做Von Kossa染色。

2 结果

2.1 细胞形态观察

原代接种后最初72 h内培养物中以造血细胞成分居多,随培养时间的延长,这些细胞逐渐坏死或随换液而移去。接种后24 h有少量细胞贴壁,48 h后贴壁细胞明显增多,并开始分裂增殖,72 h后部分区域形成集落。细胞呈多角形、纺锤形、短梭形,胞核质分界清楚,胞体有不规则突起。12~14 d后集落迅速增多,逐渐长大融合成片,细胞形态为长梭形及多边形,无接触抑制现象发生。传代细胞分组培养后增殖速度均明显减慢,传代后2 h开始贴壁,8 h后基本贴壁。贴壁细胞多呈长梭形及大多角形,一

周左右达到融合生长(图1)。

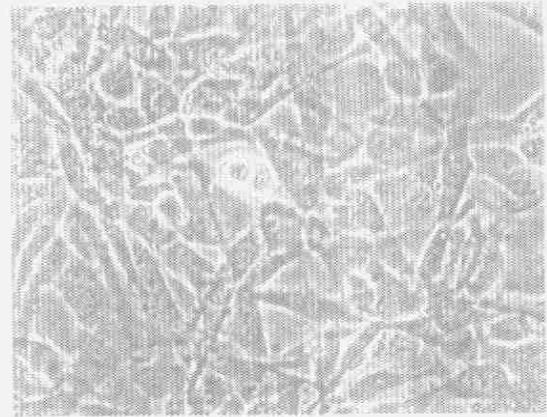


图1 第3代骨髓基质细胞培养1周后融合(相差镜 $\times 100$)

骨髓基质细胞成脂诱导48 h后细胞中有小脂滴出现,主要集中于细胞核周围,小脂滴逐渐聚集成大的脂泡,细胞逐渐增大,由原来的梭形变为圆形或多角形。

骨髓基质细胞成骨诱导15 d后细胞相互接触连成一片,培养20 d后细胞聚积成多个散在的细胞结节,结节中间的细胞由梭形变为矮柱状、锥体形、立方或扁平不规则形,细胞排列紧密,逐渐形成多层结构,并产生分泌颗粒将结节包埋。随培养时间的延长结节逐渐增大,中心部逐渐变浓,直至不透光而成黑色。

2.2 脂肪细胞油红O染色

传3代骨髓基质细胞成脂诱导第21天行油红O染色,镜下观察脂肪细胞为圆形或多边形,脂滴为橙红色,胞核为蓝色,脂肪细胞中含大小不等的脂肪滴,细胞核被脂滴挤于细胞一侧(图2)。每张玻片随机数取10个视野计算结果显示,实验组脂肪细胞为 $(83.6 \pm 2.8)\%$,对照组为 $(6.5 \pm 2.9)\%$ 。

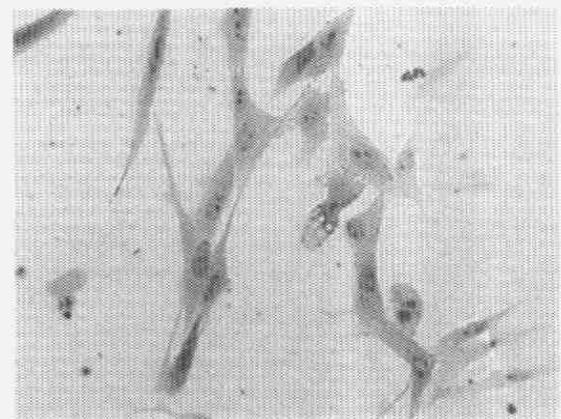


图2 骨髓基质细胞成脂诱导3周(油红O染色 $\times 40$)

2.3 碱性磷酸酶染色及细胞钙化的检测

传3代骨髓基质细胞成骨诱导第12天行碱性磷酸酶染色,镜下见大部分细胞胞质内有棕黑色至黑色颗粒状或片块状沉淀,细胞聚集处呈深黑色,示碱性磷酸酶染色强阳性(图3)。随机数取10个视野计算结果显示,实验组碱性磷酸酶染色阳性率达 $(87.6 \pm 2.8)\%$,而对照组仅为 $(25.5 \pm 2.7)\%$ 。第35天行钙染色,镜下及大体观察染色情况,见实验组有大片的黑色无结构银染颗粒沉积区,大小、形态各异,细胞结构已不清晰(图4);对照组中这种区域相对较少。



图3 骨髓基质细胞成骨诱导12 d(ALP 钙钴法染色 $\times 40$)

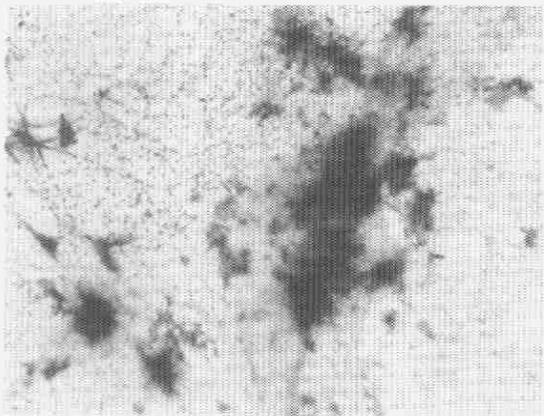


图4 骨髓基质细胞成骨诱导35 d(Von Kossa 染色 $\times 40$)

3 讨论

骨髓可分为造血及基质两大系统,骨髓的成骨能力来源于基质系统。骨髓基质细胞也叫间充质干细胞^[1],是近年来发现的一种易于扩增、具有多种分化潜能的细胞,造血干细胞能分泌生长因子及促贴壁物质,促进骨髓基质细胞的贴壁和生长^[2]。因此本实验在参照了Pereira等^[3]的骨髓基质细胞分离方法的基础上,采用国内常用的全骨髓法分离培养骨

髓基质细胞,通过更换培养液的方式去除悬浮生长的造血细胞。虽然单核细胞和破骨前体细胞可能在最初的贴壁细胞中混杂,但因这些细胞的生长需要 $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}_3$ 或集落刺激因子,所以它们一般在原代培养末期就基本消失了,即使有少量留存也会经传代而去除^[4],因此可获得均一性较高的骨髓基质细胞。我们培养的原代细胞贴壁生长10~14 d便可融合成片,细胞主要为长梭形。

骨髓基质细胞在适当的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^[5]。在细胞传代培养中,我们用地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素和吡啶美辛诱导骨髓基质细胞实现了向脂肪细胞的定向分化。地塞米松能激活骨髓基质细胞表面的糖皮质激素受体,使其向脂肪细胞分化^[6]。在脂肪细胞的分化调控中,核激素受体家族成员PPAR γ 2、转录因子家族成员C/EBP以及脂肪决定-分化因子1(ADD1-SREBP)起决定性作用^[7]。3-异丁基-1-甲基黄嘌呤是磷酸二酯酶的特异性抑制剂,通过抑制cAMP的降解而提高细胞内cAMP的水平。cAMP是一种重要的脂肪诱导剂^[8],它通过激活cAMP反应元件结合蛋白(CREB)来调控C/EBP α 和C/EBP β 的表达,促进脂肪细胞的产生。胰岛素与IGF-1受体结合,通过激活AK1、Ras、ERK1/ERK2等信号传导途径,以及降低核蛋白磷酸酶PP2A的活性来调节CREB的磷酸化和转录活性^[9]。吡啶美辛通过激活PPAR γ 促进脂肪细胞的生成^[10]。诱导后细胞由原来的梭形变为圆形或多角形,胞内有脂滴出现并逐渐聚集成大脂泡,表现出与脂肪细胞相似的生长特点,细胞内甘油三酯含量明显增加,具有与脂肪细胞相似的功能,证明采用此种方法体外培养的骨髓基质细胞有明确的成脂肪能力。脂肪细胞的特点是能够合成并储存甘油三酯,因此本实验以检测甘油三酯的油红O染色作为鉴定脂肪细胞的主要方法;同时我们用地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素C诱导骨髓基质细胞实现了向成骨细胞的定向分化。地塞米松可促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化,其促进骨形成的作用机制可能是地塞米松能增加增殖因子受体,从而促进骨细胞的增殖^[11]。 β -甘油磷酸钠可提供磷离子作为碱性磷酸酶的底物,从而加速结节钙化。Coelho等^[12]认为只有 β -甘油磷酸钠存在时骨髓基质细胞才发生矿化结节的沉积。维生素C是胶原中脯氨酸和赖氨酸末端羟基化的共同影响因子,也可单独促进鼠骨髓基质细胞向成骨细胞转化^[13]。维生素C能通过诱导成骨

细胞特异性分化蛋白基因的表达,来诱导碱性磷酸酶活性的增加,同时增加钙盐的沉积和促进钙化结节的形成。诱导后细胞由梭形向多角形、锥形、立方形转化,能多层重叠生长,不出现接触抑制现象,具有与成骨细胞相似的形态和生长特点;同时表现出较强的碱性磷酸酶活性,具有与成骨细胞相似的功能,证明采用此种方法体外培养的骨髓基质细胞有明确的成骨能力。碱性磷酸酶是骨形成所必需的酶,在体外钙化中起着关键性的作用,可表达于成熟期的成骨祖细胞和前成骨细胞,并且随着成骨细胞的成熟其表达进一步增强,即使在骨细胞的形成期碱性磷酸酶的表达依然很强^[14],因此它的活性和矿化结节的检测是鉴定成骨细胞的主要方法。

骨质疏松症是以骨量减少、骨微观结构退化为特征,致使脆性增加易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。随着年龄的增加,骨髓中的脂肪细胞逐渐增多,甚至四肢长骨中90%骨髓腔中充满脂肪细胞。增龄、去卵巢及其他原因造成的骨质疏松都存在骨量减少和骨髓脂肪增加,在各种类型的骨质疏松症患者中发现骨髓中的脂肪细胞与松质骨的骨量成反比^[15]。由于骨量减少与髓腔内脂肪增多总是相伴出现,且人们发现骨髓基质细胞中含有可以同时向这两个方向分化的干细胞,有一套复杂的机制调控骨髓基质细胞的分化方向。本实验也证实成骨细胞与脂肪细胞均可由骨髓基质细胞分化而来,由此推断,可以通过抑制骨髓基质细胞向脂肪细胞的分化并促进其分化为更多的成骨细胞,从而有效地促进骨形成,达到治疗骨质疏松的目的。这为治疗骨质疏松的研究提供了新的思路,利用体外定向诱导骨髓基质细胞分化为脂肪细胞或成骨细胞的模型有助于将来进一步的临床和科研工作。

【参 考 文 献】

[1] Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 655-663.

[2] Robey PG. Collagenase-treated trabecular bone fragments: a repro-

ducible source of cells in the osteoblastic lineage. *Calcif Tissue Int*, 1995, 56: S11-12.

[3] Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 1142-1147.

[4] Cheng SL, Yang JW, Rifas L, et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 1994, 134: 277-286.

[5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.

[6] Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, et al. Extracellular calcium ($Ca^{2+}(o)$)-sensing receptor in a murine bone marrow-derived stromal cell line (ST2): potential mediator of the actions of $Ca^{2+}(o)$ on the function of ST2 cells. *Endocrinology*, 1998, 139: 3561-3568.

[7] Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 2000, 14: 1293-1307.

[8] Tang QQ, Jiang MS, Lane MD. Repressive effect of Sp1 on the C/EBPalpha gene promoter: role in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 4855-4865.

[9] Klemm DJ, Roesler WJ, Boras T, et al. Insulin stimulates cAMP-response element binding protein activity in HepG2 and 3T3-L1 cell lines. *J Biol Chem*, 1998, 273: 917-923.

[10] Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, 1997, 272: 3406-3410.

[11] Varga F, Luegmayer E, Fratzl-Zelman N, et al. Tri-iodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3-E1, by promoting apoptosis. *J Endocrinol*, 1999, 160: 57-65.

[12] Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 2000, 21: 1095-102.

[13] Otsuka E, Yamaguchi A, Hirose S, et al. Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. *Am J Physiol*, 1999, 277: C132-138.

[14] Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*, 1998, 22: 201-209.

[15] Ahdjoudj S, Lasmoles F, Oyajobi BO, et al. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. *J Cell Biochem*, 2001, 81: 23-38.

(收稿日期:2004-09-28)