

年龄因素对大鼠骨髓间充质干细胞数量及组织中 BMP2 含量的影响

汤亭亭 岳冰 陆斌 郁朝锋 楼觉人 戴赅戎

摘要: **目的** 观察增龄对大鼠骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stromal cells, MSCs) 数量及组织中骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic proteins 2, BMP2) 含量的影响, 分析 MSCs 数量和 BMP2 含量变化与老年人骨量丢失及老年性骨质疏松症间的关系。 **方法** 取 3 种年龄层次的大鼠 (1 月龄、9 月龄、24 月龄), 抽取骨髓进行体外培养, 计算纤维细胞集落形成单位 (colony forming units fibroblastic, CFU-F) 的数量; 应用 ELISA 技术定量检测大鼠外周血以及股骨皮质骨中 BMP2 的含量。 **结果** MSCs 数量随增龄显著减少。1 月龄组皮质骨中以及血清中 BMP2 含量均明显高于其它两组, 9 月龄与 24 月龄大鼠间没有显著差异。 **结论** 骨髓中 MSCs 的数量随增龄而减少。外周血和皮质骨中 BMP2 的含量随增龄而减少。骨髓 MSCs 数量的减少及组织 BMP2 含量的降低可能是老年骨量丢失与老年性骨质疏松发病的重要原因。

关键词: 老年; 骨形态发生蛋白 2; 骨髓间充质干细胞

Influence of age on the amount of MSCs and values of BMP2 in serum and cortical bone in rats TANG Tingting, YUE Bing; LU Bin, et al. Shanghai Ninth Peoples' Hospital Affiliated to Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China.

Abstract: **Objective** To observe the differences of the number of MSCs and BMP2 value in Wistar rats of different ages (4-week-old, 9-month-old, and 24-month-old) and to analyze the relationship between those changes and bone loss and osteoporosis in elderly. **Methods** Primary MSCs were cultured in 10 nM dexamethasone media. On day 10, the number of CFU-F (fibroblast colony forming unit, CFU-F) and the ratio of ALP⁺/CFU-F were counted, the contents of BMP2 were assayed by ELISA. **Results** For a given number of marrow cells there are fewer stem cells with osteogenic potential in older animals than there are in younger animals. The number of CFU-F of the 4-week-old, 9-month-old, and 24-month-old groups were 33.67 ± 3.92 , 24.83 ± 3.54 and 18.17 ± 3.97 , respectively ($P < 0.05$), but colonies in these three groups all became alkaline phosphatase positive at the same rate (100%). The contents of BMP2, both in serum and cortical bone, were highest in the 4-week-old group and lower in the other two groups. (serum: 122pg/mg vs 96, 2 pg/mg and 92.7 pg/mg; cortical bone: 180pg/mg vs 122pg/mg and 106 pg/mg) **Conclusion** The defects in the number of MSCs and the content of BMP2 in tissues may underline the age-related decrease in bone formation.

Key words: Aged; Bone morphogenetic protein 2; Mesenchymal stromalcells

随年龄的增长和机体的衰老, MSCs 的数量以及与成骨有关的激素和生长因子如雌激素、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF-I)、

钙调节激素和转换生长因子- β (transforming growth factor, TGF/ β)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等在骨组织中的含量均出现减少^[1], 这些改变是造成老年性骨形成功能减退的重要原因。本研究比较了不同年龄大鼠骨髓中 MSCs 的数量, 并应用 ELISA 方法定量检测了它们外周血以及皮质骨中 BMP2 的含量, 为解释某些老年时期骨组织变化, 如老年性骨

基金项目: 上海市青年科技启明星 (99QB14021), 上海市科委重点项目 (024119016)

作者单位: 200011 上海, 上海第二医科大学附属第九人民医院骨科 (汤亭亭、岳冰、陆斌、郁朝锋、戴赅戎); 美国华盛顿大学医学院骨科实验室 (楼觉人)

通讯作者: 汤亭亭, Email: tingtingtang@hotmail.com

质疏松和其它一些骨量减少性疾病的发病机制提供依据,进而探讨治疗老年性骨骼问题的组织工程学方法。

1 材料和方法

1.1 试验动物的选择

SPF(无特定病原体动物)级雄性 Wistar 大鼠(中国科学院上海试验动物中心提供),大鼠按年龄分为幼年组(1月龄)、成年组(9月龄)和老年组(24月龄)。体重分别约为 250、450 和 650g,每组动物数为 6 只。

1.2 骨髓基质干细胞的分离和培养

动物麻醉后处死,75%酒精浸泡 5 min,无菌条件下取出股骨,除去骨表面附着的软组织。用咬骨钳将两端干骺端切除,显露骨髓腔。用 10ml 含 100U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、10%胎牛血清的 α-MEM 培养液彻底冲洗骨髓腔,使骨髓细胞充分分散,制成单细胞悬液,用淋巴细胞密度梯度分离液(1.077 ± 0.001 g/cm³, ficoll-paque plus, Amersham)室温离心(1500g, 30min, 分离单个核细胞接种于 6 孔板中,每孔 4 × 10⁶ 个单个核细胞。接种后置 37℃、5%CO₂ 孵化箱内培养,第 2 天改换含 100nM 地塞米松、10mMβ-甘油磷酸钠、50μg/ml 维生素 C 的 OS 液(ossteogenic solution)继续培养,至第 10d 进行 ALP 染色并计数。

1.3 ALP 染色及 CFU-F/ALP⁺计数

含有 50 个以上细胞的集落被计数为一个 CFU-F^[2],CFU-F 中至少有一个细胞 ALP 染色阳性则视为 CFU-F/ALP⁺^[3]。原代细胞在 OS 液中培养 10d 进行 ALP 染色(虹桥医用试剂研究所),此时集落数目较为稳定而且还没有汇合,计算平均每孔 CFU-F 和 ALP⁺/CFU-F 的数量。ALP 染色步骤为:吸去培养液,PBS 冲洗 1 次;固定液 4℃ 固定 20s,PBS 冲洗 3 次;底物溶于二甲基甲酰胺中,加入缓冲液中,将固紫 B 加入缓冲液中,配成混合液;取 2 ml 混合液加入至 100 mm 培养皿中,37℃,2h,流水冲洗,显微镜下计数。

1.4 ELISA 样品的制备

皮质骨 BMP2 的收集。使用过量麻醉药处死动物,收集股骨干,去除骨髓、骨膜和骨髓使之清洁,冻干。液氮速冻处理后,将骨干机械研磨成为 0.5 ~ 1.0 mm³ 大小的骨颗粒。称取 150 mg(干重)的骨颗粒,0.6M HCL 中脱钙 48h,室温下用 PBS

(30 ml/g) 冲洗脱钙骨颗粒 10~20 min,将骨颗粒放入 3 ml 蛋白抽提液中在 4℃ 下持续搅拌 16h。蛋白抽提液成分包括:4mol/L 盐酸胍/50mol Tris pH7.4、蛋白酶抑制剂(protease inhibitor cocktail, Sigma)。将抽提物离心(40,000 × g, 30 min, 4℃),提取上清,对水透析(Mr=3500)48h 或等沉淀析出后,用 2mol/L 盐酸胍溶液溶解透析产物,冷冻保存。

外周血上清液的采集。手术暴露股静脉后用 5 ml 注射器采血,每份血 3 ml,采血后立即于室温下以 3,000 × g, 5 min 离心,吸取上清,冷冻保存备用。

1.5 ELISA 定量检测 BMP2

实验操作严格按照 BMP2 Immunoassay 试剂盒(Quantikine, catalog number DBP200, R&D 公司)的操作程序进行:首先将标准品进行溶解并倍比稀释;在已用抗 BMP2 单抗包被的微孔板内加 RD1~19 检测稀释液 100μL,再分别加入标准品、样品(用 30 倍体积的 RD5P 稀释样品,使盐酸胍浓度为 0.067mol)各 50 μl,每个标准品、样品设两个重复孔;用不含标准品及样品的测定稀释液 RD1~19 作为零对照(两个重复孔)。室温下静置 2 h,洗涤 3 次。然后,加 200 μl 的酶标抗体(偶联辣根过氧化物酶的抗 BMP2 单克隆抗体),室温下静置 2h,洗涤 3 次。再加 200 μl 的底物溶液(过氧化氢和四甲基联苯胺),室温下避光静置 30 min 后加入 50 μl 2mol H₂SO₄ 终止反应,30 min 内用酶标仪(Bio-Tek, EL311, USA)测光密度 OD 值(测定波长 450 nm)。求出标准曲线,计算出样品含量。试剂盒的最低检测质量浓度约为 11 pg/ml。

1.6 统计学方法

采用 SAS 软件进行统计学分析,计算结果以均数 ± 标准差形式表示,方差齐性检验后进行组间比较的 SNK(Student-Newman-Keuls)检验,P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 CFU-F 及 ALP⁺/CFU-F 计数

一个 CFU-F 由一个 MSC 增殖形成,故 CFU-F 的数量可以代表骨髓中 MSCs 的数量。体外培养 10 d 时,每 5 × 10⁶ 个有核细胞 4 月龄大鼠 CFU 数量为 33.67 ± 3.92,9 月龄大鼠为 24.83 ± 3.54,24 月龄大鼠为 18.17 ± 3.97,差异有显著性(P < 0.05)。

两组 ALP 染色阳性 CFU-F 的比例均为 100%，没有显著差异。

2.2 BMP2 含量定量检测

股骨皮质和血清中 BMP2 的含量在 1 月龄与 9 月龄，以及 1 月龄与 24 月龄大鼠间存在显著差异 (P 均小于 0.05)。

1 月龄组皮质骨 BMP2 含量明显高于其它两组，达到 180pg/mg 皮质骨。9 月龄与 24 月龄大鼠间没有显著差异 ($P > 0.05$)，含量分别为 122pg/mg 皮质骨、106pg/mg 皮质骨。

1 月龄组血清 BMP2 含量明显高于其它两组，达到 122pg/ml。9 月龄与 24 月龄大鼠间没有显著差异 ($P > 0.05$)，含量分别为 96.2 pg/ml、92.7 pg/ml。

3 讨论

骨形成与重建过程包括骨髓成骨前体细胞的募集、增殖、及最终分化为具有活性的成骨细胞，这些过程受到促骨激素及细胞因子的高度调控。所以，随增龄出现的 MSCs 数量和功能的改变，以及有关激素和细胞因子表达的下降可能是导致老年性骨形成功能减退的重要原因。

关于增龄对 MSCs 影响的研究很多，但结果并不一致。有观点认为人体 MSCs 的数量随增龄而减少，但也有研究认为人体 MSCs 数量并不随增龄改变。对啮齿类动物的认识较为一致，即 MSCs 的数量随增龄而减少，但也有增加或不变报道。本研究发现大鼠 MSCs 的数量随增龄而减少，与此结果相似，Dodson 等发现每 3×10^6 个骨髓单核细胞中，55 天龄 SD 大鼠 MSCs 数量为 3.6 ± 2.3523 个，而 18~22 月龄大鼠仅 0.45 ± 0.6863 个^[4]。试验间 MSCs 数量的差别可能和动物种系，细胞接种密度或评定标准的不同有关。试验结果同时表明，ALP⁺/CFU-F 的比例在各年龄组间没有显著差别，几乎所有 CFU-F 都为 ALP 阳性，说明 MSCs 的成骨分化能力不随增龄而下降，这与 Bergman 等^[3] 的试验结果一致。此外，MSCs 数量的下降也和细胞本身寿命的减短有关，Stenderup^[5] 发现虽然短期内老年人 MSCs 增殖能力的下降并不明显，但长期体外培养时，老年人 MSCs 仅能成倍扩增 24 ± 11 代，而青年人 MSCs 能够扩增 41 ± 10 代。MSCs 数量的缺乏使骨折局部不能募集足够量的种子细胞，影响骨折修复，但我们可以通过 MSCs 的体外分离、扩

增，有效地解决种子细胞来源的问题。

存在于骨组织中的生长因子可能来自血循环或由骨组织中多种细胞所合成。随年龄的增长，骨组织中成骨刺激因子，如雌激素、BMPs、TGF- β 、IGFs、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 及血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等都减少了^[1]，此外，细胞对 PTH (parathyroid hormone, PTH)、IGF-I、TGF- β 、PDGF 的反应活性也降低了^[6]。这些骨组织微环境的改变很大程度上解释了成骨祖细胞的数量及功能随增龄下降的原因。

BMP-2 主要存在于皮质骨中，是一种具有修复和调节作用的生长因子，机体的成骨细胞、破骨细胞和间充质的干细胞均可分泌 BMP2，它们具有强大的骨、软骨诱导活性，可以有效地促进骨折愈合和骨缺损的修复，在自体骨移植的吸收替代过程中也发挥着重要作用，一直是研究的热点。但目前有关 BMP2 随增龄发生变化的研究，特别是定量的研究还未见到，因此有必要通过定量的方法观察 BMP2 随增龄出现的变化，阐明 BMP2 含量变化与老年性骨形成功能障碍间的关系。

本研究通过比较不同年龄的大鼠股骨干中 BMP2 的含量，发现幼年皮质骨中 BMP2 含量显著高于其它两组，与此结果相似，Yazaki 等人^[7] 用免疫组化法测定大鼠胫骨骨髓细胞 BMP2 的表达时，发现 BMP2 在骨髓细胞中有随年龄增长而表达逐渐下降的趋势，RNA 斑点杂交法^[8] 和 RT-PCR 半定量法^[9] 的检测都得到类似结果。Meyer 等^[10] 还发现老年大鼠股骨骨折局部 BMP2 的表达量显著低于幼年大鼠，而其它与骨折修复有关的因子如 TGF β 、BMP4、BMP7、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等的表达均没有降低，部分解释了老年大鼠骨折愈合缓慢的原因，更说明了 BMP2 在骨折修复过程中的重要作用。

关于血清 BMP 含量与老年性骨质疏松的明确关系还不明了，比较明确的是 Paget's 病，Urist 等^[11] 现 Paget's 病人血清中 BMPs 的含量高达 250 $\mu\text{g/ml}$ 。本研究结果表明，血清 BMP2 含量与骨组织中 BMP2 的含量一样，随着年龄的增长呈下降趋势。Urist^[11] 用放免法检测血清中的 BMPs 发现，生长快的儿童 BMPs 的含量为 20~70 $\mu\text{g/ml}$ ，已停止生长的成人 16 $\mu\text{g/ml}$ 。张美荣等^[12] 通过半定量 ELISA 法测定男性血清 BMPs 发现，20 岁以下年龄

- tor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 1996, 11: 1241-1248.
- [15] Andevyver C, Wylin T, Cassiman JJ, et al. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 241-247.
- [16] Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 1283-1288.

(收稿日期: 2005-01-18)

(上接第 158 页)

组血清 BMPs 平均 OD 值为 0.23 ± 0.01 , 明显高于 50 岁以上年龄组的 OD 值 0.19 ± 0.01 。可以推测, 血清 BMP2 含量的降低与老年骨形成能力的改变间存在一定的联系。

BMP2 在老年性骨骼疾病治疗中的作用已经得到充分肯定。BMP2 能刺激老龄鼠体内成骨细胞活性, 加快骨形成, 提高骨质量, 从而促进骨质疏松后骨折缺损的愈合^[13], 而且, 不同年龄机体对 BMP2 的反应能力没有显著差异^[14]。但 BMP2 的生产成本昂贵、植入体内后会很快降解、需要重复用药等都严重阻碍了它向临床发展的可能性。我们可以将经过分离、培养、扩增、hBMP2 基因修饰的骨髓基质干细胞和一定载体复合在体外构建人工骨, 从细胞、生长因子及支架等各方面最大程度地满足老年骨骼的成骨需要, Turgemani 等^[15]应用一个骨质疏松病人的 MSCs, 经 hBMP2 基因修饰后成功地修复了大鼠桡骨骨缺损, 这是一个很好的提示, 组织工程和基因工程方法有可能为与老年性成骨功能减退有关的骨科疾病的治疗带来突破性进展。

【参 考 文 献】

- [1] Canalis E, Pash J, Varghese S. Skeletal growth factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Express*, 1993, 3: 155-166.
- [2] Nishida S, Endo N, Yamagiwa H. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab*, 1999, 17 (3): 171-177.
- [3] Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ. Age-related changes in osteogenic Stemcells in mice. *J Bone Miner Res*, 1996, 11: 568-577.
- [4] Dodson SA, Bernard GW, Kenney EB. *In vitro* comparison of aged and young osteogenic and hemopoietic bone marrow stem cells and their derivative colonies. *J Periodontol*, 1996, 67 (3): 184-196.
- [5] Stenderup K, Justesen J, Clausen C. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 2003, 33: 919-926.
- [6] Kotev-Emeth S, Savion N, Pti-chen S. Effect of maturation on the osteogenic response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor. *Bone*, 2000, 27 (6): 777-783.
- [7] Yazaki Y, Matsunaga S, Onishi T. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins and the receptors in epiphyseal growth plate. *ANTICANCER Res*, 1998, 18 (4A): 2339-2344.
- [8] 张勇, 吴兴裕, 陈苏民. 老年性骨质疏松患者松质骨中骨形成蛋白-2 及骨形成蛋白-7 基因表达. *中国临床康复*, 2002, 7: 989-990.
- [9] 刘铭, 朱振安, 王克敏. 增龄对大鼠股骨上端 BMP-2 基因表达的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2003, 9: 311-313.
- [10] Meyer RA, Meyer MH, Phieffer LS. Delayed union of femoral fractures in older rats: decreased gene expression. *BMC Muscul Oskelet Disord*, 2001, 2 (1): 2.
- [11] Urist MR, Hudak RT. Radioimmunoassay of bone morphogenetic protein in serum: a tissue-specific parameter of bone metabolism. *Proc Soc Exp Biolmed*, 1984, 176: 427-475.
- [12] 张美荣, 余家阔, 曲绵域. 不同年龄组正常人血清 hBMP 含量的测定及临床意义. *中国运动医学杂志*, 1998, 2: 172-174.
- [13] 徐栋梁, 李佛保, 黄芝胜. 骨形态形成蛋白对老龄性骨质疏松后骨缺损愈合的成骨促进作用. *中山医科大学学报*, 1997, 18 (增刊): 65-68.
- [14] Matsumoto A, Yamaji K, Kawanami M, et al. Effect of aging on bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 combined with fibrous collagen membranes at subperiosteal sites. *J Periodontal Res*, 2001, 36 (3): 175-182.
- [15] Turgeman G, Pittman DD, Muller R. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med*, 2001, 3: 240-251.

(收稿日期: 2004-09-17)