

# 地塞米松在人骨髓基质细胞诱导成骨细胞中的作用

高晓增 张柳 李任增 高建清

**摘要:**目的 通过对人骨髓基质细胞体外培养及检测,研究地塞米松在骨髓基质细胞体外增生并向成骨细胞定向分化过程中的应用。方法 骨折内固定术扩髓前收集髓腔内骨髓进行原代和传代培养,传代后改用条件培养基(含地塞米松)和基础培养基(不含地塞米松)分别进行培养,应用组织化学及 von Kossa 方法检测细胞碱性磷酸酶和细胞外基质矿化程度;半定量 RT-PCR 方法检测 Cbfa1 mRNA 和 Osterix mRNA 在细胞培养过程中不同时间点的表达。并观测地塞米松对上述成骨细胞相关基因表达的影响。结果 条件培养基组细胞 Cbfa1 mRNA 和 Osterix mRNA 的表达峰值高于基础培养基组细胞,并且峰值出现的时间提前。结论 地塞米松通过促进 Cbfa1 mRNA 和 Osterix mRNA 的表达而促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化。

**关键词:** 骨髓基质细胞;成骨细胞;地塞米松;Cbfa1;Osterix

**Effects of dexamethasone on osteoblast induced by human bone marrow stromal cells** GAO Xiaozeng, ZHANG Liu, LI Renzeng, et al. Department of Orthopaedic North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of dexamethasone(DEX) on the differentiation of osteoblast induced by human bone marrow stromal cells. **Methods** Human bone marrow cells were obtained from the cavum ossis of patients undergoing corrective surgery after traumatic fracture and cultured *in vitro*. Cells were cultured in condition medium( with DEX ) and standard medium( without DEX ) during subculturing. Alkaline phosphatase staining and von Kossa staining were used to assess osteoblast differentiation. Semi-quantitative RT-PCR was used to evaluate the expression of Cbfa1 mRNA and Osterix mRNA at different time. **Results** The maximum expression of Cbfa1 mRNA and Osterix mRNA in condition medium were higher and presented earlier than that in standard medium. **Conclusions** Dexamethasone promotes the differentiation of osteoblast induced by human bone marrow stromal cells by enhancing the expression of Cbfa1 mRNA and Osterix mRNA.

**Key words:** Bone marrow stromal cells; Osteoblast; Dexamethasone; Cbfa1; Osterix

骨髓基质细胞(Bone Marrow Stromal Cells, BMSC)具有向多个细胞谱系分化的能力,在一定条件下可以向骨、软骨、脂肪等方向分化<sup>[1-3]</sup>。地塞米松(dexamethasone, DEX)作为体外骨髓基质细胞诱导分化的必要辅剂,可以促进成骨细胞的分化和调控多种成骨细胞相关标志性蛋白的表达。本试验通过体外培养人骨髓基质细胞并定向向成骨细胞诱导分化,研究 DEX 在骨髓基质细胞向成骨细胞诱导分化过程中对成骨细胞特异性转录因子 Cbfa1、Osterix 表达的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

**1.1.1 原代培养:**将所得的成人骨髓 3~5 ml,于 800 r/min 离心 10 min,去除上层脂肪,用 22 G 针头吹打成单细胞悬液,采用全骨髓培养法以  $1 \times 10^6$  / cm<sup>2</sup> 种植于 25 ml 培养瓶内,培养瓶内含 5 ml 培养液(含青、链霉素各 100 U/ml,体积分数 10% 的胎牛血清,10 mmol/L 的  $\beta$ -GP,50 mg/L 的 VitC),置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的湿化气孵箱中行原代培养,48 h 后半量换液,以后隔日换液。

**1.1.2 传代培养:**原代培养至 7、8 d,细胞接近融合,行无血清的 DMEM 洗涤细胞,0.25% 的胰酶消化

细胞,细胞脱壁后用完全培养液终止消化,收集细胞悬液,1000 rmp离心10 min,弃上清,加入完全培养基重悬,计数后以  $1 \times 10^4/cm^2$  种植于 35Φ 平皿;传代后分为两组:一组在完全培养基内加入 DEX ( $10^{-8}$  mol/L)为实验组,另一组继续应用完全培养基为对照组。两组持续培养,常规换液。

1.2 细胞生物学特性检测

1.2.1 碱性磷酸酶检测:传代细胞分别于传代后 7、14、21、28、35 d 用 ALP 试剂盒检测两组细胞的 ALP 活性,光镜下观察。

1.2.2 细胞形成钙结节能力的检测:传代细胞分别于传代后 7、14、21、28、35 d 用 von Kossa 法进行钙染色,直视与光镜下观察。

1.3 成骨细胞分化相关基因表达的检测

细胞总 RNA 于传代后 7、14、21、28、35 d 采用 Trizo( Promega )一步法分别提取两组细胞总 RNA,将 RNA 的浓度调至  $1 \mu g/\mu l$  备用。取  $2 \mu l$  总 RNA 进行反转录,反应体系含  $5 \times RT$  buffer  $5 \mu l$ ,  $200 U/\mu l$  的 M-MLVRTM 酶  $1 \mu l$ , RNasin  $1 \mu l$ ,  $0.5 \mu g/\mu l$  的 Oligo( dT )  $1 \mu l$ ,  $10 \text{ nmol/L}$  的 dNTPs  $2 \mu l$ , 加入去 DEPC 水补至  $25 \mu l$ 。充分混匀,  $37^\circ C$  反应 60 min。  $-20^\circ C$  保存。取  $2.5 \mu l$  cDNA 作为模板于  $25 \mu l$  反应体系中行 PCR, 所用引物见表 1。

PCR 反应先于扩增仪中  $95^\circ C$  3 min。再进行 30 个循环 ( $94^\circ C$  30 s,  $56^\circ C$  30 s,  $72^\circ C$  60 s),最后  $72^\circ C$  延

长 10 min  $4^\circ C$  保存。用 2% 琼脂糖凝胶,取反应产物  $8 \mu l$  电泳,溴化乙锭染色。利用凝胶成像系统( Bio-Rad Gel Doc 2000 )中扫描,分析各目的基因条带的光密度值,并求出与内参基因 GAPDH 的比值。

表 1 PCR 引物序列

目的基因	上游引物	下游引物	产物大小 ( bp )
Cbfa1	5'-cagttccaagcatttcaccc-3'	5'-tcaatatggtcgccaacag-3'	443
OSX	5'-gcagctagaaggagtggtg-3'	5'-gcaggcaggtgaacttcttc-3'	359
GAPDH	5'-agccgcactctcttttgcgtc-3'	5'-tcataattggcagggttttct-3'	816

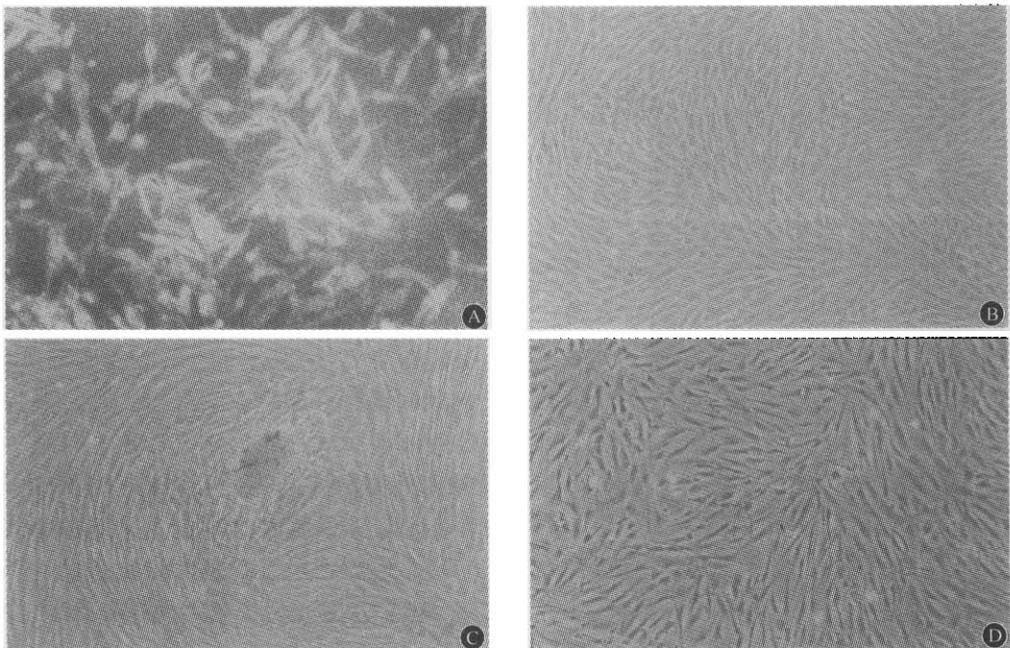
1.4 统计学处理

所有数据输入 Excel 表,采用 SPSS10.0 对结果进行 t 检验,结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

2 结果

2.1 细胞培养结果

倒置相差显微镜观察原代细胞,1 d 后可见有变形贴壁的细胞,多为梭形,细胞周围可有镂空的透光区(图 1A)。以后细胞呈克隆样生长,胞核明显卵圆形,核仁多,胞质丰富清晰。7~8 d 细胞接近融合,不贴壁细胞随换液弃去。传代后实验组细胞随时间延长,可发生重叠生长,没有接触抑制现象(图 1B)。随胶原的堆积及钙的沉积逐渐形成小结样结构(图 1C)。而对照组细胞则随时间延长出现接触抑制的现象,细胞体积逐渐增大,会出现一些退行性改变。很少形成小结样结构(图 1D)。



A: 相差显微镜显示原代初期细胞多为梭形,周围有镂空区;B: 传代后试验组细胞增殖旺盛,无接触抑制现象; C: 试验组细胞钙化小结的形成;D: 对照组传代后细胞有接触抑制,无钙化小结

图 1 骨髓基质细胞向成骨细胞转化过程中的表现

## 2.2 细胞生物学检测

试验组细胞 ALP 活性在检测的各个时间点都强于对照组细胞,且强阳性结果出现早,持续时间长。实验组细胞在传代后 2 周可有钙结节形成, von Kossa 染色显示为不透光的黑色块状物,而对照组则无此结节出现。在随后的检测中试验组细胞的钙结节逐渐增多,对照组也可出现极少数的结节。

## 2.3 骨髓细胞骨形成相关基因的表达变化

RT-PCR 半定量分析表明 DEX 加入促进了 cbfal、OSX mRNA 的表达,在各时间点的表达都强于对照组细胞(图 2、3),PCR 结果分析见表 2、3。

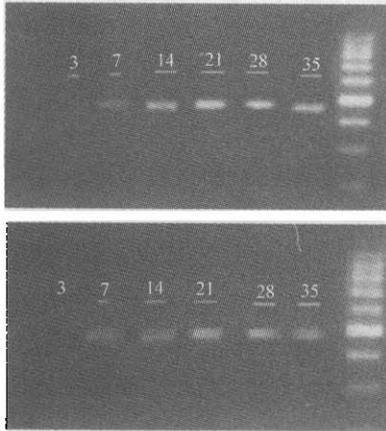


图 2 RT-PCR 检测 Cbfa1 mRNA(443bp)的表达结果

A: 对照组各时间点的表达情况; B: 试验组各时间点的表达情况

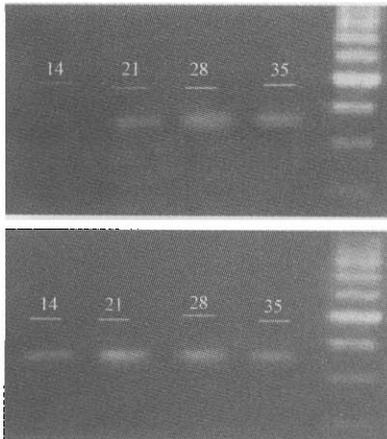


图 3 RT-PCR 检测 OSX mRNA(539 bp)的表达结果

A: 对照组各时间点的表达情况; B: 试验组各时间点的表达情况

表 2 各时间点 Cbfa1 mRNA 表达情况

组别	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
对照组 (n=4)	—	0.99±0.03	1.45±0.10	1.05±0.04	1.00±0.01
试验组 (n=4)	—	1.12±0.04	2.76±0.14	1.88±0.08	1.55±0.07
t 值	—	3.946	14.304	15.451	12.697
P 值	—	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

注 第 7 天均为基础培养基,未作分析

表 3 各时间点 OSX mRNA 表达情况

组别	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
对照组 (n=4)	—	—	0.84±0.09	1.07±0.13	0.58±0.02
试验组 (n=4)	—	0.78±0.06	1.74±0.08	1.20±0.09	1.07±0.04
t 值	—	—	13.169	1.643	17.612
P 值	—	—	<0.01	>0.05	<0.01

注 第 7 天、14 天对照组 OSX 未测到表达

## 3 讨论

骨髓基质细胞(bone marrow stromal stem cell, BMSC)是一种条件成骨细胞,在一定理化条件诱导下可以向成骨细胞(osteoblast, OB)转化,地塞米松(dexamethsone, DEX)、 $\beta$ -甘油磷酸钠、维生素 C 则是这一过程中必须的辅基<sup>[4,5]</sup>,DEX 可以促进 BMSC 向成骨细胞分化,并刺激碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素、I 型胶原等的表达。ALP 是骨形成过程中必须的酶,ALP 的表达情况代表着骨形成的状况,标志着成骨细胞分化的开始<sup>[6]</sup>,并与成骨细胞的分化成熟呈正相关。随着成骨细胞的成熟,细胞外基质分泌的增加,钙盐不断的沉积于细胞外基质,则可形成钙化小结,这是成骨细胞的另一种特征性标志。Ducy 等<sup>[7]</sup>的研究表明,核心结合因子 al(core binding factor alpha 1, Cbfa1)是调节成骨细胞分化和功能行使的中心因子,也是成骨细胞分化最早、最特异的标志。Cbfa1 属于 RUNT 结构域基因家族,通过 RUNT 结构域选择性结合把基因,调节着成骨细胞转录的起始,并通过结合成骨细胞表达的特异性标志物的启动子调节这些成骨标志物的表达。Cbfa1 的突变或缺失将导致骨骼发育不良或停止,人的 Cbfa1 自然变异表现为颅骨锁骨发育不良,被称为颅骨锁骨发育不良综合症(cleidocranial dysplasia, CCD)。Osterix(OSX)<sup>[8]</sup>则是最近才发现的一个调控成骨细胞分化和骨形成的特异性转录因子,它与 Cbfa1 处于同一个转录途径,位于 Cbfa1 的下游,其表达需要 Cbfa1 的存在。OSX 的突变或缺失同样会造成骨骼发育不良或停止。本研究采用体外试验的方法,探讨了 DEX 在骨髓质细胞向成骨细胞转化过程中的作用,结果表明,DEX 所诱导转化的试验组细胞在形态和生物学特性上都较对照组更具有成骨细胞的特征,其 ALP 的活性和形成钙结节的能力都强于对照组细胞。这表明 BMSC 在体外适合的条件下可以向成骨细胞诱导转化,所得到的成骨细胞可以进行分化并可检测到特异性的标志物的表达。说明 DEX 的加入使得 BMSC 向成骨细胞转化的过程加速,并促进了成骨细胞的分化。同时本试验采用 RT-PCR 技术从

mRNA的水平检测发现 Cbfa1 与 OSX 在两组细胞中均有表达,但表达情况却有很大不同:试验组细胞的 Cbfa1 mRNA 的水平在检测的各时间点都高于对照组细胞,两组间差异有显著性;试验组细胞的 OSX mRNA 的表达以及到达峰值的时间均提前于对照组细胞。这说明试验组所诱导的成骨细胞其分化要早于对照组,分化的程度也较对照组高。表明 DEX ( $10^{-8}$  mol/L) 的加入提高了各时间点 Cbfa1 mRNA 的表达水平,使 OSX mRNA 的表达及达峰时间提前,而 Cbfa1 的表达标志着成骨细胞分化的开始,其表达的水平与成骨细胞分化的水平呈正相关<sup>[9]</sup>。结合同一时间点对细胞进行的生物学特性的检测结果说明,DEX ( $10^{-8}$  mol/L) 的加入促进了骨髓基质细胞向成骨细胞的转化,并促进了成骨细胞的分化。

本试验结果表明,利用成人骨髓进行体外培养能够在较短时间内获得大量较高纯度的自体成骨细胞,且周期短、重复性好,可作为骨组织工程学中种子细胞的重要来源。DEX 促进了骨髓基质细胞向成骨细胞的转化,并促进了成骨细胞的分化,它的这一作用正是通过上调 Cbfa1 mRNA 和 OSX mRNA 的表达而实现的。但成骨细胞分化是一个复杂的过程,是不同途径、不同因子共同作用的结果,其具体的过程仍有待我们继续探索。

## 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Morrison SJ ,Shan NM ,Anderson DJ . Regulatory mechanisms in stem cell biology . Cell ,1997 ,88 :287-298 .
- [ 2 ] Aubin JE . Bone stem cells . Cell Biochem Suppl ,1998 ,30-31 :73-82 .
- [ 3 ] Friedenstein A ,Chalilakhyan RK ,Gerassimov UV . Bone marrow osteogenic stem cells : *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers . Cell Tissue Kinet ,1987 ,20 :263-272 .
- [ 4 ] Neelam J ,Stephen E ,Haynes W ,et al . Bruderosteogenic differentiation of purified culture expanded human mesenchymal stem cells *in vitro* . Cellular Biochem ,1997 ,7 :265-279 .
- [ 5 ] Bruder SP ,Jaiswal N ,Haynesworth SE ,et al . Growth kinetics self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation . J Cell Biolchem ,1997 ,64 :278-294 .
- [ 6 ] Herbertson A ,Aubin JE . Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell culture . Bone ,1997 ,21 :491-500 .
- [ 7 ] Ducy P ,Zhang R ,Geoffroy V ,et al . OSF2/Cbfa1 : a transcriptional activator of osteoblast differentiation . Cell ,1997 ,89 :747-754 .
- [ 8 ] Nakashima K ,Xin Z ,Kunkel G ,et al . The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation . Cell ,2002 ,108 :17-29 .
- [ 9 ] Viereck V ,Siggelkow H ,Tauber S ,et al . Differential regulation of Cbfa/Runx2 and Osteocalcin gene expression by Vitamin-D<sub>3</sub> , dexamethasone and local growth factors in primary human osteoblasts . J Cell Biochem ,2002 ,86 :348-256 .

( 收稿日期 :2004-12-01 )