

地塞米松和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对体外人骨髓基质细胞成骨及成脂分化的影响

袁风红 程力 俞可佳 高恺言

摘要：目的 观察地塞米松(Dex)和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对骨髓基质细胞(MSCs)成骨及成脂分化的影响。方法 以离心法分离培养人MSCs,以 10^{-7} mol/L Dex和/或 10^{-8} mol/L $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 作为分化诱导剂对细胞进行干预,分别用细胞碱性磷酸酶(ALP)染液试剂盒及苏丹Ⅲ染液对成骨细胞和脂肪细胞进行组织化学染色,计数,使用RT-PCR技术在转录水平检测成骨细胞标记物骨桥蛋白(OPN)及脂肪细胞标记物过氧化酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ 2)mRNA的表达。结果 细胞染色结果表明各干预组ALP⁺细胞百分比均较对照组增加,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),苏丹Ⅲ⁺细胞百分比Dex组较对照组增多, D_3 组较对照组减少,差异有显著性($P < 0.05$),Dex + D_3 组较Dex组苏丹Ⅲ⁺细胞数明显减少,两者相比差异有显著性($P < 0.05$);OPN mRNA及PPAR γ 2 mRNA表达未在对照组测得,Dex诱导了OPN mRNA及PPAR γ 2 mRNA表达, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导OPN mRNA表达,并抑制Dex诱导的PPAR γ 2 mRNA的表达。结论 Dex促进MSCs的成骨分化及成脂分化, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 促进MSCs的成骨分化的同时抑制其成脂分化,与Dex合用抑制Dex成脂分化作用,强化了其成骨分化作用,反映了成骨细胞与脂肪细胞间存在的反变关系,表明两者来源于同一前体细胞的可能性。

关键词：地塞米松； $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ；人骨髓基质细胞；成骨分化；成脂分化

Effects of dexamethasone and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on osteogenic and adipocytic differentiation of human marrow stromal cells *in vitro* YUAN Fenghong, CHENG Li, YU Kejia, et al. Department of Rheumatology & Immunology First Wuxi People's Hospital, Jiangsu 214002, China

Abstract : **Objective** To observe the effects of dexamethasone (DEX) and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on osteogenic and adipocytic differentiation of human marrow stromal cells (MSCs) *in vitro*. **Methods** The primary human MSCs were isolated and cultured. DEX (10^{-7} mol/L) and/or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} mol/L) were added as differentiation inducers. The histochemical staining was performed with ALP staining to identify osteogenic cells and Sudan Ⅲ to identify adipocytic cells. The numbers of positive cells were counted. The expression of osteogenic marker osteopontin (OPN) and the adipocytic marker PPAR γ 2 mRNA was examined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The percentages of ALP-positive cells and Sudan Ⅲ-positive cells in cultures with DEX were significantly higher than that of control ($P < 0.05$). For those cultured with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, the percentage of ALP-positive cells was higher ($P < 0.05$), while that of Sudan Ⅲ-positive cells was lower than that of control ($P < 0.05$). The expression of OPN mRNA and PPAR γ 2 mRNA was induced by DEX and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promoted the expression of OPN mRNA but inhibited the stimulatory effect of DEX on PPAR γ 2 mRNA. **Conclusions** DEX induces human MSCs differentiation into osteoblasts and adipocytes and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induces human MSCs differentiation into osteoblasts but inhibit adipocytic differentiation. The inverse relationship between the differentiation of osteoblast and adipocyte in human MSCs suggesting the possibility of a common precursor of these two kinds of cells.

Key words : Dexamethasone ; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; Human marrow stromal cells ; Osteogenic differentiation ; Adipocytic differentiation

许多研究表明骨髓基质细胞(marrow stromal cells ,MSCs)属于间充质干细胞,具有多种分化潜能,许多研究已表明骨髓成骨细胞和脂肪细胞在分化上存在着反变关系^[1]。已有研究表明地塞米松和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对骨髓基质细胞的成骨及成脂分化具有调节作用,但研究结果结论不一。本实验旨在进一步阐明地塞米松及 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对人骨髓基质细胞成骨及成脂分化的影响以及两者间的相互关系,为两者合理的临床应用提供实验依据,更深入理解 MSCs 定向分化机制及骨质疏松发生机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

MEM 粉剂、胰蛋白酶(Hyclone)、胎牛血清(杭州四季青)、淋巴细胞分离液(上海太阳)、地塞米松、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma)、细胞碱性磷酸酶染液试剂盒(南京建成)、M-MULV 逆转录酶(Promega)、TRIzol、Taq 酶、RNA 酶抑制剂、dNTP Set(Sangon)、DNA Marker DL 2000(Takara)。

1.2 骨髓基质细胞培养及观察

骨髓基质细胞培养,采用离心法进行培养。无菌条件下取无骨代谢疾病骨科手术患者股骨骨髓组织约 5 mL,加入淋巴细胞分离液进行分离(按 2:1),离心,吸取单个核细胞,洗涤 3 次,吹打制成单细胞悬液,接种于 100 mL 培养瓶,在 5% CO_2 、37℃ 饱和湿度条件下的恒温箱中孵化。所有实验采用传代细胞进行,传代细胞随机分为对照组(无干预)、Dex 组(10^{-7} mol/L Dex)、 D_3 组(10^{-8} mol/L $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)、Dex + D_3 组 [10^{-7} mol/L Dex 和 10^{-8} mol/L $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$]。利用倒置相差显微镜每日对生长情况和形态变化特点进行动态观察,选取视野照相。

1.3 细胞组织化学染色

在传代培养时 6 孔板内预先放置小盖玻片,细胞以 $1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种,10% FBS 完全培养基中培养 1 d 后分为 4 组,干预 4 d 后将血清浓度调整为 5% 以减慢细胞增殖,干预 12 d 后取出盖玻片进行染色。细胞 ALP 染色采用重氮盐法,脂滴染色采用苏丹 III 法。每张盖玻片随机选两个区分别计数 200 个细胞,计算阳性细胞百分比。每组设 3 个孔,重复 2 次。

1.4 RT-PCR 法检测细胞 OPN、PPAR γ 2 基因表达

1.4.1 TRIzol 法抽提培养细胞总 RNA,逆转录反应合成 cDNA

配制总体积 20 μL 的反应液:RNA 样品 1 μg , OligdT (50 $\mu\text{M}/\text{L}$) 0.8 μL , dNTPs (2 mM/L) 5 μL , $5 \times$ buffer 4 μL , RNase inhibitor (40 U/ μL) 0.5 μL , M-MULV 逆转录酶 (200 U/ μL) 0.5 μL , 37℃ 水浴 1 h,进行逆转录反应,97℃ 水浴 5 min,然后迅速置于冰上。

1.4.2 多聚酶链反应(PCR)扩增

PCR 引物设计:根据 Genbank 数据库中提供的人骨桥蛋白(OPN)、过氧化物酶体增殖活化受体 γ 2 (PPAR γ 2) β -actin 全长 cDNA 序列,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成三对引物,序列如下:
 β -actin 引物序列(预计扩增长度为 660 bp):上游 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3',下游:5'-CTAGAAGCATTTCGCGTGGACGATGGAGGG-3'。

OPN 引物序列(预计扩增长度为 330 bp):上游:5'-CTAGGCATCACCTGTGCCATACC-3',下游:5'-CTACTTAGACTACTTGACCACTGAC-3'。

PPAR γ 2 引物序列(预计扩增长度为 352 bp):上游:5'-GCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3',下游:5'-CTTGGACGTAGAGGTGGAATA-3'。

PCR 循环参数设置:OPN 94℃ 5 min \rightarrow (94℃ 45 s \rightarrow 57℃ 60 s \rightarrow 72℃ 90 s) 28 个循环 \rightarrow 72℃ 10 min \rightarrow 4℃ 保存。PPAR γ 2:94℃ 5 min \rightarrow (94℃ 35 s \rightarrow 57℃ 40 s \rightarrow 72℃ 90 s) 30 个循环 \rightarrow 72℃ 10 min \rightarrow 4℃ 保存。

1.5 统计学处理

实验数据以率表示,运用 Stata 7.0 统计软件包,两组计数资料间比较采用 χ^2 检验。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 倒置显微镜下细胞观察

离心法培养的原代细胞接种约 4 h 开始贴壁,呈圆形未分化状态,4 d 左右细胞大部分贴壁,并开始向外周伸出突触,向饱满梭形转变,表面颗粒较少,开始分裂、增殖(图 1)。随着培养时间延长,约 1 周后细胞体积增大,形状向多样性发展,呈现三角形、星形、较长梭形及不规则形,并且表面颗粒状分泌物增多(图 2,3),11 d 后细胞形状随培养时间延长进一步向长梭形发展,细胞增殖加快,但排列仍不规则(图 4),14 d 后细胞逐渐汇合,呈细长梭形,沿一定方向排列(图 5)。胰蛋白酶消化传代时细胞逐渐回缩成圆形(图 6)。传代细胞 6 h 左右大部分贴壁,干预组细胞形态发生了变化,部分转变为多角形,而对照组细胞多为成纤维样。



图 1 细胞培养 4 d 后向饱满梭形转变 100 ×

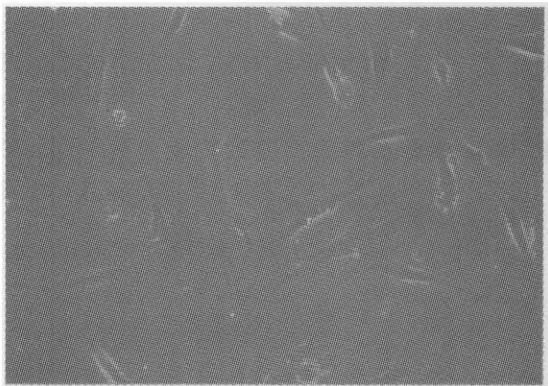


图 2 细胞培养 1 周后体积增大形态多样化 100 ×

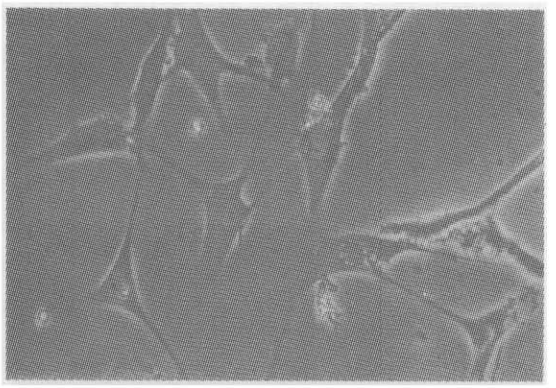


图 3 细胞呈三角形、星形、不规则形、长梭形 200 ×

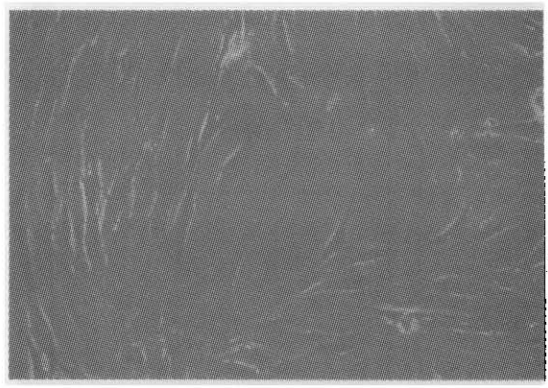


图 4 11 d 后向长梭形发展,排列不规则 100 ×

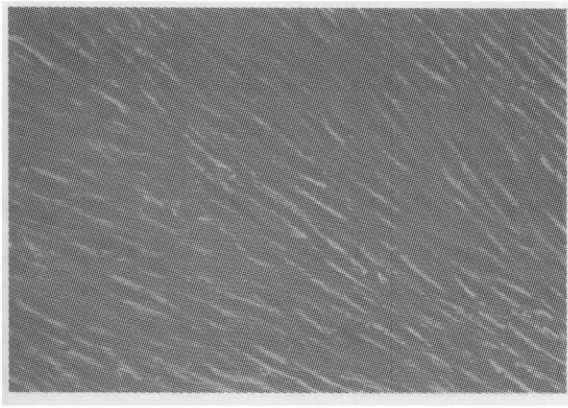


图 5 14 d 后细胞汇合成片,并沿一定方向排列 100 ×

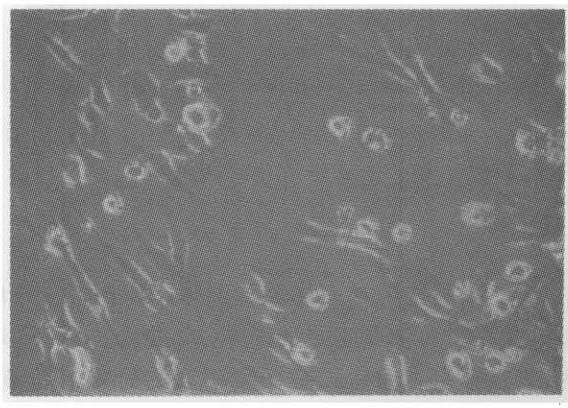


图 6 细胞培养消化时细胞回缩成圆形 100 ×

2.2 细胞组织化学染色

2.2.1 细胞碱性磷酸酶(ALP)染色

光镜下可见 ALP⁺ 细胞胞浆中有大小不等的深棕红色颗粒,即 ALP 所在部位,证实为成骨细胞(图 7)。Dex 组、D₃ 组及 Dex + D₃ 组 ALP⁺ 细胞数较对照组增加,与对照组相比有显著差异($P < 0.05$)。D₃ 组 ALP⁺ 细胞数较 Dex 组增加,与 Dex 组相比有显著差异($P < 0.05$)。两者联合用药 ALP⁺ 细胞数与单独用药组相比较没有差异($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 干预 12 d 后 ALP⁺ 细胞率和苏丹Ⅲ⁺ 细胞率

组别	对照组 (n = 12)	Dex 组 (n = 12)	D ₃ 组 (n = 12)	Dex + D ₃ 组 (n = 12)
ALP ⁺ 细胞率(%)	32.5 ± 4.87	69.08 ± 8.81	87.00 ± 6.13	81.92 ± 5.75
苏丹Ⅲ ⁺ 细胞率(%)	9.58 ± 2.11	23.17 ± 2.87	2.92 ± 1.49	10.04 ± 2.38

2.2.2 胞浆脂滴染色

光镜下可见细胞核染成淡蓝色,苏丹Ⅲ⁺ 细胞胞浆中有大小不等的桔红色颗粒,即为脂肪滴,证实为脂肪细胞(图 8)。Dex 组苏丹Ⅲ⁺ 细胞率较对照组明显增加,D₃ 组较对照组减少,与对照组相比均

有显著性差异 ($P < 0.05$)。Dex + D₃ 组较 Dex 组脂肪细胞数减少, 两组相比较有显著性差异 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.3 细胞 OPN、PPAR γ 2 基因转录

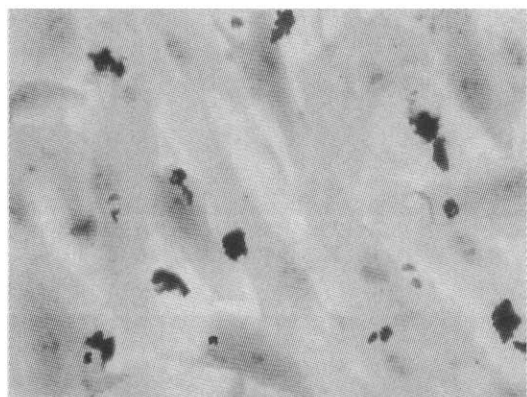


图 7 细胞碱性磷酸酶染色
胞浆内 ALP 染成深棕红色 200 \times

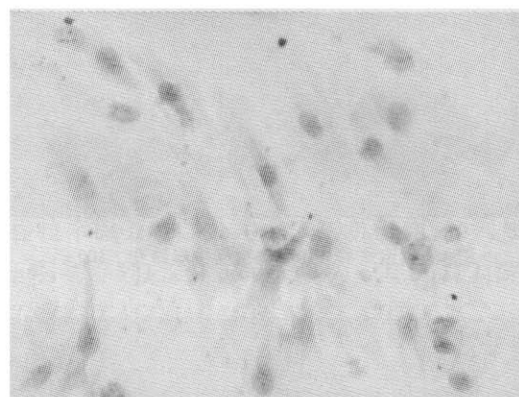


图 8 胞浆脂滴染色
胞浆内脂滴染成桔红色 200 \times

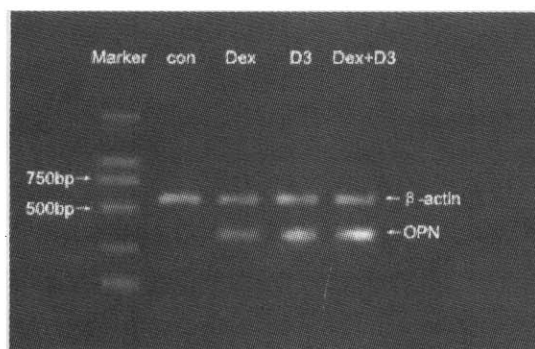


图 9 OPN mRNA 表达

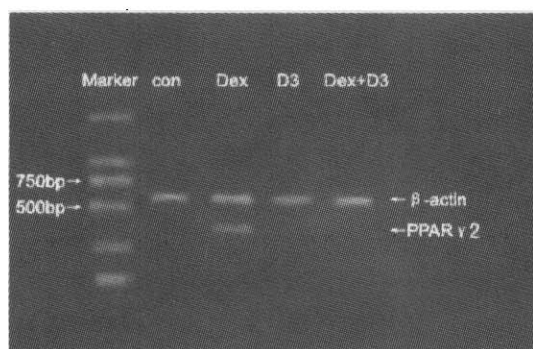


图 10 PPAR γ 2 mRNA 表达

3 讨论

骨髓基质细胞是多相细胞群体, 具有多种分化潜能, 其存在为骨重建的过程提供了潜在的支持, 近年来已被作为骨前体细胞来源而成为研究的热点。研究已证实 MSCs 对外源性条件非常敏感, 其中以生物因素的作用最为显著和直接, 类固醇激素在决定基质细胞的分化方向上起着重要作用。

3.1 地塞米松对骨髓基质细胞分化的影响

在人体, 长期超生理剂量的糖皮质激素对骨骼产生不利影响, 成为目前引起骨质疏松的主要原因之一。体内研究结果表明, 导致上述结果的原因主要是过量的糖皮质激素对成骨细胞系的增殖和/或分化的负面影响。但体外多数研究结果表明糖皮质激素促进 MSCs 成骨分化^[2,3]。本研究结果也显示 Dex 使 ALP 阳性细胞数增加, 同时成骨细胞标记物

RT-PCR 结果显示, Dex 组、D₃ 组及 Dex + D₃ 组均有 OPN mRNA 表达 (图 9); Dex 诱导了人 MSCs 的早期脂肪细胞标记物 PPAR γ 2 的表达, 对照组、D₃ 组及 Dex + D₃ 组未测得 PPAR γ 2 mRNA 表达 (图 10)。

OPN mRNA 的表达也明显增加。另外, 许多研究结果也显示 Dex 促进了脂前体细胞的成脂分化, 其成脂作用随 Dex 浓度增加而增强^[4], 本实验结果证实了这一结论, Dex 诱导后脂肪细胞数增多, 而且促进 PPAR γ 2 mRNA 表达。因此, 超生理剂量高浓度的糖皮质激素导致脂肪数目增加, 可能在糖皮质激素引起骨质疏松的发病机制中起一定作用。

3.2 1,25(OH)₂D₃ 对骨髓基质细胞分化的影响

骨髓基质细胞中存在 1,25(OH)₂D₃ 受体基因, 1,25(OH)₂D₃ 对 MSCs 分化具有调控作用。本研究结果表明 1,25(OH)₂D₃ 对骨髓基质前体细胞的成骨分化有促进作用。这与 Kelly 等^[5]研究结果一致, 认为 1,25(OH)₂D₃ 促进人 MSCs 的成骨分化。但 Atmani 等^[6,7]研究结果表明 1,25(OH)₂D₃ 抑制大鼠 MSCs 的成骨分化。另外, 还有研究认为 1,25(OH)₂D₃ 对 MSCs 成骨分化的影响取决于细胞

的成熟程度 ,其对前体细胞的成骨分化表现为抑制作用 ,而对成熟细胞起促进作用。针对上述矛盾结果 ,一些学者提出可能与物种来源不同有关 ,有待进一步探讨。

1,25(OH)₂D₃对 MCSc 成脂分化的研究报道较少 ,本研究表明 1,25(OH)₂D₃对人 MSCs 的成脂分化表现为抑制作用 ,这与 Kelly 等^[5]的研究结果一致 ,但与 Atmani 等^[6,7]的研究结果相反 ,后者认为 1,25(OH)₂D₃促进 MSCs 成脂分化。对这种分歧的产生的原因有着不同的解释 ,Kelly 等^[8]认为该分歧可能与骨髓来源的位点有关。但是 Atmani 等^[6,7]后来的研究否定了上述来源位点不同的解释 ,并提出了可能与动物性别有关的观点 ,认为就雄性鼠而言 ,1,25(OH)₂D₃表现为促进其 MSCs 成脂分化 ,而对雌性鼠则表现为抑制其 MSCs 成脂分化。本实验采用的为男性骨髓基质细胞 ,表现为 1,25(OH)₂D₃对 MSCs 成脂的抑制 ,与上述性别不同的观点相矛盾。因此 ,1,25(OH)₂D₃对 MCSc 成脂分化的研究尚有待进一步深入。

3.3 骨髓基质细胞成脂及成骨分化的关系

体外许多研究也已表明骨髓成骨细胞和脂肪细胞在分化上存在着反变关系 ,脂肪细胞标志物表达增加往往伴随着成骨标志物表达减少 ,脂肪细胞能被诱导表达成骨细胞标记 ,成骨细胞能表现脂肪表型 ,从而表明了两者来源于同一前体细胞的可能性。我们的研究结果也证实了这一观点 ,1,25(OH)₂D₃在抑制 MCSc 成脂分化的同时促进了其成骨分化 ,1,25(OH)₂D₃与 Dex 合用抑制了后者的成脂作用 ,脂肪细胞数目减少 ,同时增强了其成骨作用 ,成骨细胞数目增多 ,支持两者来源于同一前体细胞的观点。但成骨细胞和脂肪细胞两者间是如何进行相互调控的分子机制目前尚不清楚 ,一些研究认为脂肪细胞分泌的瘦素和多不饱和脂肪酸可能参与其调控 ,人 MSCs 表达瘦素受体 ,其激活时增加成骨细胞分化而

抑制脂肪细胞分化^[8] ;成熟脂肪细胞分泌的多不饱和脂肪酸对共同培养的原代成骨样细胞的增殖具有抑制作用^[9]。那么对两者间相互调控的分子机制的深入研究将有助于我们对骨质疏松发生机制的理解 ,这将为骨病的治疗开辟新的领域。

【 参 考 文 献 】

- [1] 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.
- [2] Ogston N , Harrison AJ , Cheung HE , et al. Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics. Steroids , 2002 , 67 : 895-906.
- [3] Walsh S , Jordan GR , Jefferiss c , et al. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors *in vitro* : relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. Rheumatology , 2001 , 40 : 74-83.
- [4] 刘杰 , 孙正义 , 曹蕾 . 地塞米松对骨髓基质干细胞生物学特性的影响. 中华骨科杂志 , 2003 , 11 : 691-693.
- [5] Kelly A , Gimble J. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. Endocrinology , 1998 , 139 : 2622-2628.
- [6] Atmani H , Audrain C , Mercier L , et al. Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. J Cell Biochem , 2002 , 85 : 640-650.
- [7] Atmani H , Chappard D , Michel F. Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures : Effects of dexamethasone and calcitriol. Journal of Cellular Biochemistry , 2003 , 89 : 364-372.
- [8] 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.
- [9] Maurin A , Chavassieux PM , Vericel E , et al. Role of polyunsaturated fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic proliferation. Bone , 2002 , 31 : 260-266.

(收稿日期 : 2006-03-14)