

地塞米松对骨髓基质干细胞体外增殖的影响

曲强 郭伟 张柳 陈翠珠

摘要：目的 观察地塞米松对小鼠骨髓基质干细胞体外增殖的作用。方法 取雄性 6 周龄 ICR 小鼠股骨骨髓基质细胞进行体外培养，在细胞培养不同时间点加入 10^{-8} mol/L 地塞米松(实验组)或保持基础培养条件(对照组)，用 CellTiter 方法分别检测两组的细胞增殖情况，并予比较。结果 在细胞培养不同阶段开始应用地塞米松的实验组中，细胞增殖能力较对照组降低，随着培养时间延长实验组细胞数量明显少于对照组。实验组中细胞形态较对照组更趋成熟。结论 地塞米松在促进骨髓干细胞定向分化早期抑制骨髓基质干细胞体外增殖。

关键词：骨髓基质干细胞；成骨细胞；地塞米松；细胞增生；细胞分化

Effect of dexamethasone on the proliferation of bone marrow stem cells in vitro QU Qiang ,GUO Wei , ZHANG Liu ,et al . Department of General Surgery ,Beijing Union Medical College Hospital ,Beijing 100032 ,China

Abstract : Objective To study the mechanism of stem cells proliferation using dexamethasone-induced mouse bone marrow culture system. **Methods** Bone marrow cells were derived from 6-week-old ICR mice. Dexamethasone was initiated in experimental group at different time in the cultures. The control group was treated with placebo. Cell number was counted and compared between the two groups by CellTiter kit. **Results** The number of cells in the experimental group was significantly less than that in the control group at every time points. Much more cell differentiation was observed in the experimental groups. **Conclusion** Dexamethasone inhibits stromal cell proliferation while stimulates osteoblast differentiation.

Key words : Bone marrow stem cell ; Osteoblast ; Dexamethasone ; Cell proliferation ; Cell differentiation

骨髓基质干细胞(bone marrow stem cell , BMSC)为多分化潜能细胞。研究表明，BMSC 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]。地塞米松(dexamethasone , DEX)在体外诱导 BMSC 向成骨细胞分化过程中起着重要作用^[2]，但其作用机制尚未阐明。

我们以往研究应用 DEX 体外诱导小鼠 BMSC，细胞经诱导后递次表达成骨细胞特异性标志物如 I 型胶原蛋白、碱性磷酸酶和骨钙素等，细胞外基质最终发生矿化，表明细胞具有成熟成骨细胞特征^[3]。本研究重点探讨 DEX 在促进成骨细胞分化早期对 BMSC 增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

6 周龄 ICR 雄性小鼠(北京大学医学实验动物科学部)经颈椎脱位法处死后，于无菌条件下取出双侧股骨，去除股骨双侧干骺端，以 α -MEM 冲洗骨髓腔，收集骨髓细胞，以 Ficoll 液离心，收集并计数有核细胞，然后接种细胞于培养瓶中，加入条件培养液(α -MEM 培养基，15% 标准胎牛血清，50 μ g/mL 维生素 C，10 mmol/L β -甘油磷酸钠，和 100 U/mL 青链霉素)。置入 5% 二氧化碳培养箱 37℃ 培养，隔日更换半量培养液。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 r/min 离心 10 min，弃上清，加入适量 α -MEM 重悬细胞并计数，按 10^3 个细胞/孔传代接种于 96 孔培养板中，隔日半量换液。

1.2 细胞增殖检测

传代细胞按 10^3 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中，实验组于传代培养后第 0、2、4 d 起分别加入

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30440077)

作者单位：100032 北京，中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院基本外科(曲强)；华北煤炭医学院附属医院骨科(郭伟、张柳)；中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院中心实验室(陈翠珠)

通讯作者：曲强，Email：qiangqu800@sina.com.cn

10^{-8} mol/L DEX ,每时间点设置 4 孔培养细胞用于检测 ,并平行设置未加 DEX 对照组。每间隔 2 d 采用 CellTiter 96 试剂盒 (Promega) 方法 ,分别读取各孔在 490 nm 下吸光度 ,根据标准曲线计算实验组与对照组中每孔细胞数。

1.3 统计学方法

实验组与对照组每一时间点平行设置 4 个培养孔 ,根据吸光度计算各孔细胞数。结果以均数 \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。

2 结果

原代培养中贴壁细胞多呈梭形 ,少数呈小圆形或三角形。原代培养 5 d 后进行传代 ,传代细胞中贴壁细胞形态较均一 ,呈多边形 ,胞核大而圆。在各实验组中 ,多数细胞在加入 DEX 后逐渐呈均一多边形形态 ,细胞大而舒展 ,随着培养时间推移 ,细胞呈叠形多层排列 ,细胞外基质明显增多 ,并逐渐形成多小结样结构。对照组中细胞形态欠均一 ,可见梭形、小圆形形态 ,少数细胞呈多边形 ,细胞外基质明显少于实验组 ,罕见小结样结构。形态学观察与我们以往诱导骨髓基质干细胞分化为成骨细胞结果一致^[4]。

我们在细胞传代培养后第 0、2、4 d 时分别于实验组培养基中分别加入 10^{-8} mol/L DEX ,对照组细胞中加入等量的 PBS ,以 2 d 为间隔进行细胞计数。对照组细胞数量在传代培养 10 d 内增长 25 倍 ,显示在体外环境中骨髓基质干细胞保持持续分裂增殖能力。实验组细胞数量亦有增长 ,但在各计数时间点细胞数量均少于对照组。传代培养后即刻加入 DEX ,继续培养第 4、6、8、10 和 12 d 时实验组细胞数量分别较相应时间点对照组下降 53%、22%、26%、26% 和 32% ,其中第 10 和 12 d 两组细胞数量差异显著 ($P < 0.01$,图 1A)。传代培养第 2 d 时加入 DEX 后 ,第 4、6、8、10 和 12 d 时实验组细胞数量分别较相应时间点对照组下降 39%、25%、12%、12% 和 34% ($P < 0.01$,图 1B)。第 4 d 时加入 DEX 后 ,第 6、8、10 和 12 d 时实验组细胞数量分别较相应时间点对照组下降 19%、19%、18% ($P < 0.01$) 和 28% ($P < 0.01$,图 1C)。

3 讨论

骨髓基质干细胞具有不断自我增殖和在特定条件下定向分化的特性。DEX 作为合成的可溶性糖

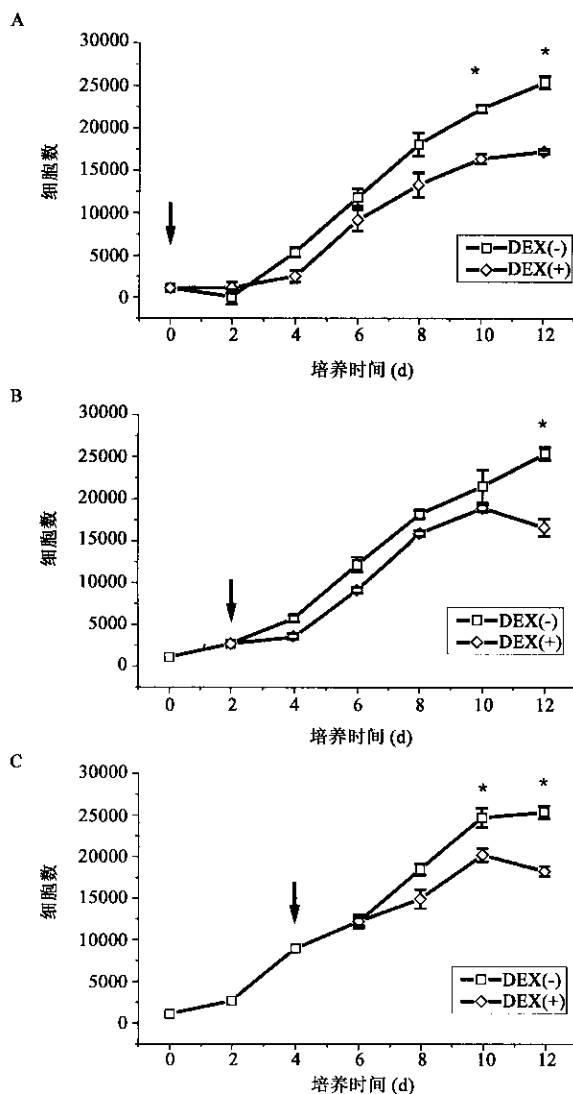


图 1 骨髓基质细胞体外培养中 DEX(+) 或 DEX(-) 细胞增殖变化。↓ 显示加入 DEX 时间

皮质激素是体外诱导成骨细胞生长和分化的重要因子。DEX 是绝大部分种属骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中所必需的^[5] ,其基本作用是在转录水平促进各种成熟成骨细胞标志物的表达 ,促进 ALP 活性 ,并促进骨结节的形成。在我们的细胞培养体系中 ,传代培养后第 0、2、4 d 分别加入 DEX ,从形态学、组织化学染色、基因表达和细胞外基质染色等多方面观察表明 ,BMSC 经 DEX 诱导均可定向分化为成熟成骨细胞。与实验组比较 ,对照组细胞大部分仍保持未分化状态。

本研究重点就加入 DEX 后 BMSC 的细胞增殖能力进行比较。实验表明 ,在无 DEX 处理的对照组中细胞保持持续增殖能力。而实验组在 BMSC 增生过程中 3 个时间点分别加入 DEX 后 ,细胞增殖水平较对照组均有下降 ,显示 DEX 在开始诱导 BMSC 向

成熟成骨细胞分化后 ,抑制了 BMSC 的增殖 ,而成熟成骨细胞不再增殖。同时 ,在传代培养第 0、2、4 d 分别加入 DEX 后 ,实验组细胞增殖能力下降趋势一致 ,这一方面显示非经诱导的对照组中 BMSC 仍保持着持续增殖的潜能 ,另一方面也证明了 DEX 抑制 BMSC 增殖是诱导其定向分化过程早期的重要组成机制。

糖皮质激素对于细胞增殖的作用途径尚不完全清楚。研究表明 ,DEX 可以通过调节与增殖激活相关的原癌基因如 c-jun 等抑制细胞内 DNA 复制^[6]。DEX 还可通过启动甲状旁腺激素(PTH)信号传导系统^[7]和放大并增强细胞对骨形态蛋白(BMP)的反应^[8]发挥作用。DEX 与细胞增殖后期同时表达的其他细胞生长因子如表皮生长因子(FGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、转化生长因子 β (TGF β)等的相互关系尚不明了。我们曾观察到瘦素(Leptin)抑制 BMSC 增殖作用亦发生于传代培养 72 h 之内 ,与 DEX 单独诱导细胞分化有叠加效应^[9]。

【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] Owen M , Friendenstein AJ. Stromal stem cells : marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp , 1988 , 136 :42-60.

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

[4] 曲强 , 万新海 , 陈翠珠. 转录因子 cbfa1 在骨髓干细胞向成骨细胞分化过程中的表达. 中华实验外科杂志 , 2003 , 20(3) :62-63.

[5] 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.

[6] Kasperk C , Schneider U , Sommer F , et al. Differential effects of glucocorticoids on human osteoblastic cell metabolism *in vitro*. Calcif Tissue Int , 1995 , 57 :120-126.

[7] Suarez F , Silve C. Effect of parathyroid hormone on arachidonic acid metabolism in mouse osteoblasts : Permissive action of dexamethasone. Endocrinology , 1992 , 130 :592-598.

[8] Boden S , McCuaig K , Hair G , et al. Differential effects and glucocorticoid potentiation of bone morphogenetic protein action during rat osteoblast differentiation *in vitro*. Endocrinology , 1996 , 137 :3401-3407.

[9] 陈翠珠 , 曲强. 瘦素在骨髓基质干细胞向成骨细胞分化早期的作用研究. 中国骨质疏松杂志 , 2004 , 10 :158-161.

(收稿日期 :2006-03-20)