

雌激素对正常及骨质疏松症大鼠骨髓基质细胞增殖分化的影响

郑碧琼 闫福华 骆凯 林敏魁 赵欣

摘要：目的 研究正常 SD 大鼠与骨质疏松症 SD 大鼠骨髓基质细胞(BMSCs)增殖分化的差异,以及雌激素对正常 SD 大鼠及骨质疏松症 SD 大鼠的 BMSCs 增殖分化的影响。方法 以雌性 SD 大鼠构建骨质疏松症模型,并通过生化和病理分析,确定骨质疏松症模型的建立。取骨质疏松症 SD 大鼠及正常 SD 大鼠的 BMSCs 进行研究,检测两者增殖分化的差异及其对雌激素的反应。结果 原代培养时,细胞集落样生长,集落大小不等,细胞形态长梭形。MTT 法检测增殖发现第 3 代假手术组(Sham 组)的 BMSCs 增殖缓慢,其碱性磷酸酶(ALP)合成量显著低于卵巢切除术组(OVX 组),对雌激素的反应亦不如 OVX 组明显。结论 两组细胞都具有成骨细胞特性,同是第 3 代 BMSCs,OVX 组比 Sham 组生长活跃,合成 ALP 的量也远多于 Sham 组,对雌激素的反应亦更为明显。

关键词：雌激素;骨质疏松症;骨髓基质细胞

Effects of estrogen treatment on the proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells from normal rats and osteoporosis rats ZHENG Biqiong, YAN Fuhua, LUO Kai, et al. College of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China

Abstract : Objective To investigate the proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells(BMSCs) from sham-operated rats and ovariectomized rats, and to evaluate the effects of 17 β -estradiol(E_2) treatment on the proliferation and differentiation of cells in the two groups. **Methods** Three-month-old female rats were randomly divided into two groups: sham-operated rats(the Sham) and ovariectomized rats(the OVX). Six weeks later, we gained the serum and one tibial bone of each of two groups to make sure that the models of osteoporosis were established. After collecting the BMSCs from two groups, culturing them *in vitro*, and treating some with E_2 , we evaluated the proliferation by MTT and the differentiation by comparing synthesized alkaline phosphatase(ALP).

Results The primary cells from two groups were always cultured to form colonies. And the cells shared the characteristic with osteoblast as they synthesized ALP. They appeared like shuttles. In the third passage, we found that the proliferation of the cells from the Sham was slow all the way. Our research results showed the synthesized ALP by the cells from the Sham was obviously less than that synthesized by the ones from the OVX. Just a small change occurred when the cells from the Sham were treated with E_2 . But in the other, the change was big.

Conclusions The cells from two group showed the characteristic of osteoblast. In the third passage, not only the cells from the OVX showed much greater growth potential and compounded much more ALP, but also E_2 could promote the proliferation and differentiation of the cells from the OVX much more.

Key words : Estrogen; Osteoporosis; Bone marrow stromal cells

绝经后骨质疏松症(PMOP)是临床上常见疾病之一,也是其他某些疾病,如骨折、牙周病发生的重要相关性因素。雌激素替代疗法已在世界范围内普遍应用,它具有增加患者骨密度、预防骨质疏松症和

改善更年期综合征等作用^[1]。目前有关骨质疏松症机体骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)的增殖分化能力与正常者相比是否存在差异,以及药物对两种细胞作用差异的研究尚较少。本实验拟建立雌性 SD 大鼠的骨质疏松症模型,观察正常及骨质疏松症 SD 大鼠 BMSCs 的增殖分化差异,同时观察雌激素对正常及骨质疏松症 SD 大鼠

BMSCs 增殖分化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

普通级 3 月龄健康雌性 SD 大鼠 20 只(福建医科大学动物实验中心提供),体重为(270±15)g,普通饮食;胎牛血清(FBS;Hyclone,USA),DMEM(Gibco,USA),雌激素、Triton X-100 和 MTT 粉(均购自 Sigma,USA),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)检测试剂盒(贝克曼公司,USA)。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松症动物模型的建立:将健康雌性 SD 大鼠 20 只随机分为两组:手术组(OVX 组)13 只,行卵巢切除术(ovariectomy,OVX 术),其中一只因麻醉过量致死;假手术组(Sham 组)7 只,即进入腹腔仅切除少量脂肪就缝合关闭皮肤。实验动物术后均可正常饮食与活动,生长状况良好。

术后 6 周测两组大鼠体重,跟底动脉取血,分离血清测定雌激素、钙、磷及血清碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)含量,取 OVX 组与 Sham 组 SD 大鼠的单侧股骨作病理切片并比较分析,以确认建立 SD 大鼠骨质疏松症模型。

1.2.2 BMSCs 的体外培养:采用全骨髓法培养 BMSCs。无菌条件下取术后 6 周 SD 大鼠的单侧股骨、双侧胫骨,以肝素钠 DMEM 培养液(肝素钠 50 U/ml)冲洗髓腔,收集细胞,1500 r/min 离心 10 min,弃上清,DMEM 培养液(含青霉素 100 U/ml,链霉素 100 mg/L,17% FBS)重悬,3 瓶 25 ml 培养瓶分装,置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的二氧化碳孵箱中培养。3 d 后首次换液,之后每隔 3 d 换液 1 次。原代细胞培养待细胞集落处细胞密集,以 0.25% 胰酶加等量 0.1% EDTA 消化传代培养。

1.2.3 不同药物浓度作用下两组细胞增殖分化能力的比较:①药物配制:取 0.0272 g 17β-雌二醇(17β-estradiol, E₂)加入 4400 μl 酒精和 600 μl DMSO 的混合液中振荡使充分溶解,得到 0.02 mol/L 的浓缩液,称原液。大鼠循环中的雌激素浓度为 10⁻¹⁰ mol/L,与其结合受体的 K_d 值 0.6。故本实验使用雌激素浓度为 10⁻⁹ mol/L 和 10⁻¹¹ mol/L 的含血清培养液。②增殖分化能力比较:分别以 E₂ 浓度为 10⁻⁹ mol/L、10⁻¹¹ mol/L 的含血清培养液培养两组细胞即 OVX 组及 Sham 组 SD 大鼠的 BMSCs,两组细胞皆设立不含 E₂ 的对照组,共计 6 个实验组:Sham 组,Sham +

10⁻¹¹ mol/L E₂ 组,Sham + 10⁻⁹ mol/L E₂ 组,OVX 组,OVX + 10⁻¹¹ mol/L E₂ 组,OVX + 10⁻⁹ mol/L E₂ 组。

取生长良好的第 3 代 OVX 组及 Sham 组 SD 大鼠的 BMSCs 以 4×10⁴ 个/ml 的浓度,每孔 200 μl 接种于 96 孔板。6 个实验组每组接种 15 孔。

接种后 24 h,按以上分组情况换以相应培养液培养,此后每 2 天换液 1 次,每次换液 24 h 后即接种后第 2、4、6、8 天在 492 nm 波长下测各组 MTT 值,每组每次测 3 孔,取均值,检测细胞增殖情况。

细胞用药后第 5 天,吸弃培养液,PBS 冲洗 2 遍,加入 0.1% TritonX-100 细胞裂解液 150 μl,4℃ 冰箱过夜。吸取细胞裂解上清液,全自动生化分析仪测定 ALP,每组 3 孔,取均值。

2 结果

2.1 骨质疏松症模型的建立

术后 6 周 OVX 组 SD 大鼠体重明显大于 Sham 组。经方差齐性检验后,对 E₂、Ca 进行 t 检验,对体重、BGP、ALP、P 进行近似 t 检验,发现两组 SD 大鼠体重及血清中 E₂、BGP 含量有显著差别,而血清中 ALP、Ca、P 含量无统计学意义(表 1)。

表 1 术后 6 周两组 SD 大鼠的体重及血清中 E₂、BGP、ALP、Ca、P 含量($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | OVX 组(n) | Sham 组(n) | P 值 |
|------------------------|------------------|-----------------|-------|
| W(g) | 353.42(12)±17.87 | 315.14(7)±10.96 | <0.01 |
| E ₂ (pg/ml) | 22.19(9)±1.84 | 34.61(7)±7.48 | <0.01 |
| BGP(ng/ml) | 7.34(9)±1.47 | 4.84(7)±1.71 | <0.01 |
| ALP(U/L) | 170.20(5)±58.19 | 132.00(5)±47.82 | >0.05 |
| Ca(mmol/L) | 2.59(5)±0.22 | 2.62(5)±0.15 | >0.05 |
| P(mmol/L) | 2.40(5)±0.73 | 3.06(5)±0.67 | >0.05 |

骨组织切片(图 1) OVX 组骨小梁或纤细或断裂,排列稀疏,形态结构完整性差,骨髓腔连接成片。Sham 组骨小梁粗壮、饱满,形态结构完整,连接成网状,切片上髓腔孤立散在点状分布。

2.2 BMSCs 体外培养的观察

收集两组实验动物的细胞,离心后可发现 OVX 组所得细胞量明显少于 Sham 组。原代培养中发现 Sham 组细胞较 OVX 组细胞易于贴附,伸展较早,成纤维细胞集落形成比较早,比较密集,面积亦较大。但以 MTT 法观察第 3 代 Sham 组细胞增殖时却发现 Sham 组细胞增殖缓慢。

2.2.1 细胞增殖能力比较:MTT 法观察 Sham 组与 OVX 组细胞增殖差异时,我们发现在最初 4 d Sham 组细胞的增殖速率略高于 OVX 组细胞,但不明显。此后 Sham 组细胞进入增殖几乎停滞的阶段,而

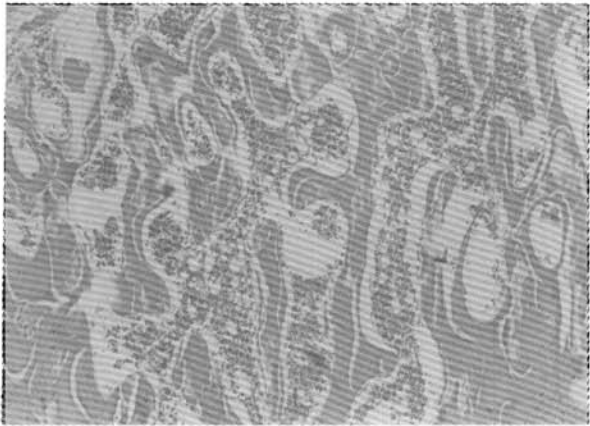


图 1a OVX 组骨组织切片 HE 染色(× 100)

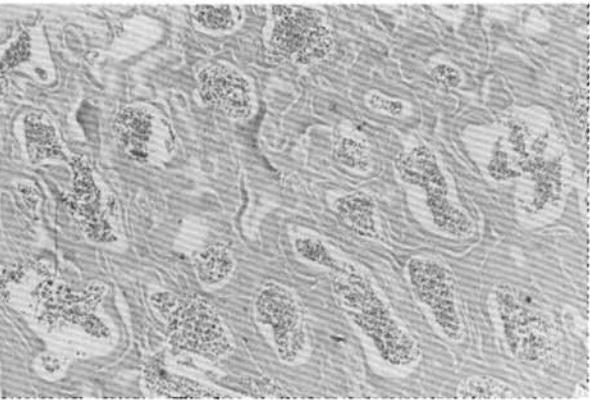


图 1b Sham 组骨组织切片 HE 染色(× 100)

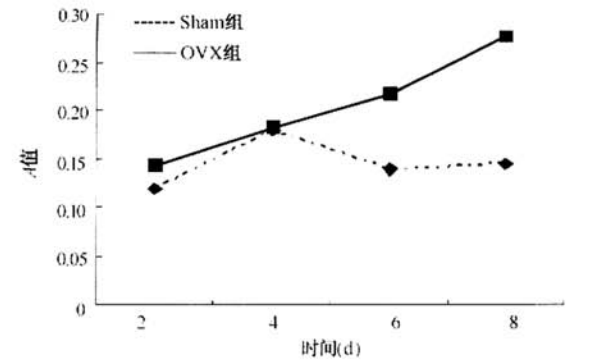


图 2 Sham 组与 OVX 组第 3 代 BMSCs 增殖能力的比较

OVX 组细胞依然增殖旺盛(图 2)。

Sham 组第 3 代 BMSCs 无论是否加用雌激素皆增殖缓慢,用药组细胞量略高于未用药组,但差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 3)。OVX 组第 3 代 BMSCs 在前期无论是否加用雌激素增殖皆不显著,用药组的细胞量略高于未用药组,但接种后第 2、4、6 天并无统计学意义。接种 6 d 后细胞增殖加快,第 8 天 $OVX + 10^{-9}$ mol/L E_2 组的细胞量与另两组有统

计学差异($P < 0.01$),而 $OVX + 10^{-11}$ mol/L E_2 组的细胞量与未用药的对照组无统计学意义($P > 0.05$) (图 4)。

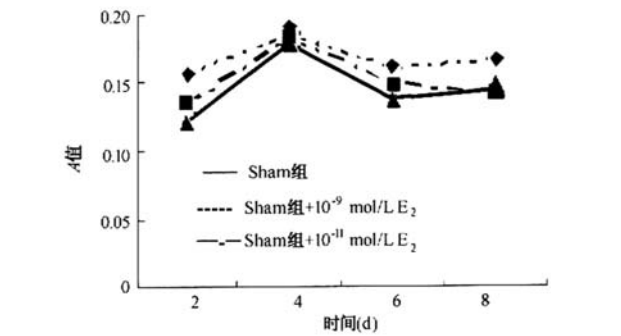


图 3 雌激素对 Sham 组第 3 代 BMSCs 增殖的影响

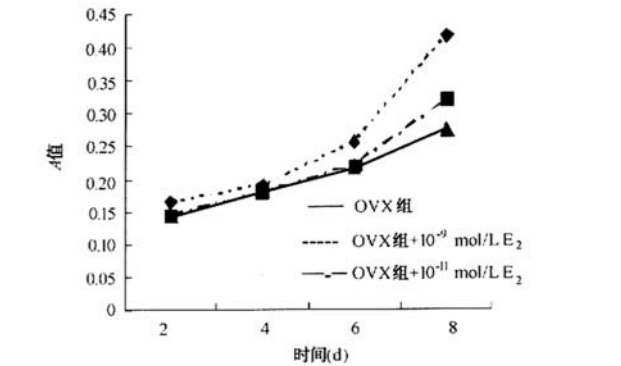


图 4 雌激素对 OVX 组第 3 代 BMSCs 增殖的影响

2.2.2 细胞分化比较:对各组 ALP 的检测结果(表 2)进行析因分析。分析表明 Sham 组 ALP 合成显著低于 OVX 组($P < 0.01$)。雌激素对细胞 ALP 合成有影响:未用药的 OVX 组及 Sham 组细胞 ALP 合成量都低于用药者($P < 0.01$);OVX 组用药细胞之间 ALP 合成量无显著性差异($P > 0.05$),Sham 组用药细胞之间 ALP 合成量有差异,但不显著($P < 0.05$)。

表 2 雌激素浓度(U/L)

| 组别 | 雌激素(E ₂) | | |
|------|------------------------|-------------------------|------------|
| | 10 ⁻⁹ mol/L | 10 ⁻¹¹ mol/L | 0 mol/L |
| Sham | 6, 5, 5 | 4, 5, 4 | 2, 2, 2 |
| OVX | 28, 26, 29 | 26, 27, 27 | 12, 10, 11 |

3 讨论

骨质疏松症是以骨量减少、骨组织显微结构退化为特征,以致脆性增高及骨折危险性增加的一种全身性骨病。正常情况下机体骨组织处于不断进行骨吸收与骨形成的动态平衡中。雌激素是女性体

内的一种重要激素,具有调节成骨细胞和破骨细胞的骨形成和骨吸收作用,雌激素缺乏将破坏骨吸收与骨形成之间的平衡,导致骨质疏松症的发生^[2]。

目前研究骨代谢状况的方法包括组织学、影像学 and 生化技术。组织学方法可用于确诊和鉴别诊断。生化指标检测具有简便、快速、无创伤的特点,在疗效观察、预防性诊断方面独具优势^[3],其中常用的骨形成指标包括骨钙素及碱性磷酸酶含量。

骨钙素是由成骨细胞和成牙骨质细胞合成的特殊骨蛋白。血中骨钙素浓度和羧化程度可以反映骨中骨钙素的状态^[4]。女性绝经后雌激素水平下降,骨转换加快,可导致 BGP 升高^[5]。本实验中 OVX 组 SD 大鼠的 E₂ 含量显著低于 Sham 组, BGP 含量高于 Sham 组,可以知道 OVX 组 SD 大鼠的骨转换率高于 Sham 组。ALP 是以往常用的骨形成指标,但本实验检测的结果为两组 SD 大鼠血清中 ALP 含量无统计学差异,其原因有待进一步探讨。股骨组织切片显示 OVX 组骨小梁或纤细或断裂,骨髓腔连接成片。Sham 组骨小梁粗壮、饱满,骨髓腔孤立散在分布。说明 SD 大鼠的骨质疏松症模型已成功建立。

骨髓中的 BMSCs 在维持骨量、骨强度及骨结构的完整性方面发挥重要作用。BMSCs 可分化为成骨细胞及成脂肪细胞。一般认为各种原因(增龄、雌激素缺乏等)引起的骨质疏松症,与骨髓中的脂肪细胞增多有关^[6-8]。

Benayahu 等^[7]的研究表明雌激素缺乏将导致 BMSCs 更多地分化为成脂肪细胞。Okazaki 等^[1]的体外实验发现 BMP-2 可促进 BMSCs 同时向成骨细胞、成脂细胞分化,而雌激素促进其向成骨细胞分化,抑制向成脂细胞分化。本次实验的结果表明了雌激素具有很强的促 BMSCs 向成骨细胞分化的作用,这在 OVX 组表现得尤为明显。

在细胞增殖方面,Modrowski 等^[9]对 OVX 组、OVX + E₂ 组及 Sham 组大鼠术后 1、3、6 个月的成骨细胞增殖率进行比较发现 OVX 组细胞的增殖率高于 Sham 组及 OVX + E₂ 组。陈世璋等^[10]的相关研究表明,骨质疏松症患者牙槽骨细胞生长较快,可多次传代,生长活跃,而正常人的牙槽骨细胞传到第 8 代就开始老化,生长速度减慢。我们的实验结果亦说明骨质疏松症大鼠 BMSCs 的增殖更较假手术组活跃。

有研究认为雌激素可促进破骨细胞凋亡^[11,12],延缓成骨细胞凋亡^[13],雌激素减少将引起骨细胞大量凋亡^[14],但雌激素不促进正常机体成骨细胞的增殖^[15,16]。本实验结果发现,雌激素对骨质疏松症大

鼠 BMSCs 的促增殖更明显,而假手术组 BMSCs 的用药组与对照组增殖无明显差异。

什么改变了成骨细胞的增殖分化能力? Yokose 等^[2]的实验认为应是 OVX 术大鼠的血清中除胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、IL-1、IL-6 之外的系统生长因子促进成骨细胞的增殖。

结合以往研究可以认为,雌激素缺乏导致破骨细胞生长活跃,成骨细胞代偿性增殖加快,这种增殖加快是由血清内所含因子如某种有丝致裂原的增加,及成骨细胞本身的变化如细胞上某种受体的增加引起,这使体外同样培养条件下 OVX 组细胞生长更比 Sham 组细胞活跃。但尚需要进一步的实验才能证实。

在体内这一变化可以因雌激素的运用而纠正,那么在体外呢?雌激素的长期作用是否将纠正骨质疏松症大鼠 BMSCs 的增殖速率,或者对其可传代次数及传代细胞的形态维持有所影响?雌激素长期作用于体外的 Sham 组 BMSCs 时,它的作用又将怎样?雌激素在体外引起 BMSCs 变化,或者不引起与体内同样变化的原因都值得进一步研究。

【参考文献】

- [1] Okazaki R, Inoue D, Shibata M, et al. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) α or β . *Endocrinology*, 2002, 143: 2349-2356.
- [2] Yokose S, Ishizuya T, Ikeda T, et al. An estrogen deficiency caused by ovariectomy increases plasma levels of systemic factors that stimulate proliferation and differentiation of osteoblasts in rats. *Endocrinology*, 1996, 137: 469-478.
- [3] Riis BJ. Biochemical markers of bone turnover in diagnosis and assessment of therapy. *Am J Med*, 1991, 91: 64S-68S.
- [4] Price PA, Williamson MK, Lothringer JW. Origin of the Vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem*, 1981, 256: 12760-12766.
- [5] Wan D, Yin T, Wang W, et al. The changes of serum bone Gla protein in postmenopausal women-A study of the mechanism of osteoporosis. *Chin J Orthop*, 1993, 13: 294-299 (in Chinese).
- [6] Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, et al. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology*, 2001, 2: 165-171.
- [7] Benayahu D, Shur I, Ben-Eliyahu S. Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J Cell Biochem*, 2000, 79: 407-415.
- [8] Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, et al. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res*, 2001, 19: 117-125.

(上接第 25 页)

- [9] Modrowski D , Miravet L , Feuga M , et al. Increased proliferation of osteoblast precursor cells in estrogen-deficient rats. *Am J Physiol* , 1993 , 264 : 190-196.
- [10] Chen S , Huang J , Sun M , et al. Biological characteristics of cell lines derived from human dental alveolus. *Chin J Osteoporos* , 2004 , 10 : 474-476 (in Chinese).
- [11] Kameda T , Mano H , Yuasa T , et al. Estrogen Inhibits Bone Resorption by Directly Inducing Apoptosis of the Bone-resorbing Osteoclasts. *J Exp Med* , 1997 , 186 : 489-495.
- [12] Hughes DE , Dai A , Tiffée JC , et al , Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* , 1996 , 2 : 1132-1136.
- [13] Cooper LF , Tiffée JC , Griffin JP , et al. Estrogen-induced resistance to osteoblast apoptosis is associated with increased hsp27 expression. *J Cell Physiol* , 2000 , 185 : 401-407.
- [14] Tomkinson A , Gevers EF , Wit JM , et al. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* , 1998 , 13 : 1234-1250.
- [15] Robinson JA , Harris SA , Lawrence Riggs B , et al. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology* , 1997 , 138 : 2919-2927.
- [16] Keeting PE , Scott RE , Colvard DS , et al. Lack of a direct effect of estrogen on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* , 1991 , 6 : 297-304.

(收稿日期 : 2005-12-31)