·论著·

比较不同大鼠来源骨髓基质细胞对雌激素的反应性

郭晓霞 许晴 王芳 路欣

中图分类号：R318 文献标识码：A 文章编号：1006-7108(2009)11-0801-04

摘要：目的 探讨增龄和去卵巢大鼠骨髓基质细胞(BMSCs)对雌激素干预的反应。**方法** 取 3 月龄、9 月龄与去卵巢(卵巢切除 6 月后的 9 月龄)SD 雌性大鼠，全骨髓培养法分离培养 BMSCs，传代后给予 10 nM E_2 干预不同时间(3、7、11、15 d)。用油红 O 染色鉴定脂肪细胞，MTT 法检测细胞的增殖能力，采用磷酸苯二钠法检测碱性磷酸酶的活性。**结果** ①细胞的增殖能力随增龄和去卵巢依次递减，去卵巢组原代培养有细胞自发分化为脂肪细胞。②干预后细胞的增殖能力随时间延长逐渐增强，3 月龄组和去卵巢组与相应对照组比较有显著差异。E_2 增强各组碱性磷酸酶活性，对去卵巢组影响更显著。**结论** 大鼠 BMSCs 的增殖和分化能力随增龄和去卵巢下降，雌激素促进大鼠 BMSCs 的增殖和成骨分化，3 月龄组和去卵巢组细胞对雌激素更敏感。

关键词：雌激素；大鼠；骨髓基质细胞；增殖；分化

DOI：10.3969/j.issn.1006-7108.2009.11.003

Comparison the effects of estrogen on bone marrow stromal cells from different rats *GUO Xiaoxia, XU Qing, WANG Fang, et al. Department of Histology and Embryology, Capital Medical University, Beijing* 100069, China

Abstract: Objective The study was to explore the effects of estrogen on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) which came from different age healthy rats and ovariectomy rats. **Methods** Three months old, nine months old and ovariectomized (OVX) (nine months old, six months after ovariectomy) female Sprague-Dawley (SD) rats were used for the isolation of BMSCs by the method of the whole bone marrow culture. The passage BMSCs were treated with 10nM estradiol for 3 d, 7 d, 11 d, 15 d. The adipocytes were identified using the Oil Red O staining method. The proliferation of BMSCs was measured by MTT method, and the alkaline phosphatase activity was determined by disodium phenyl orthophosphate method. **Results** 1. The proliferation of BMSCs was declining with age and ovariectomy in turn. It was seen that a small number of cells had differentiated spontaneously into adipocytes in primary culture in OVX group. 2. After estradiol treatment, the capability of BMSCs proliferation was increasing with time, and there were significant differences when comparing those treated with non-treated cells in 3-month-old group and OVX group. Alkaline phosphatase activity was increased, and the effect of estradiol on OVX group was more evident than on the other groups. **Conclusion** The capacity of proliferation and osteogenic differentiation of rat BMSCs declines with age or ovariectomy. Estrogen promotes BMSCs proliferation and osteogenic differentiation, and the cells' responses to estrogen of 3-month-old group and OVX group are more sensitive than those of 9-month-old group.

Key words: Estrogen; Rat; Bone marrow stromal cell; Proliferation; Differentiation

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)具有自我复制和多向分化的能力，体外不同诱导条件下，能够向成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞等不同的细胞系分化[1]。目前认为体内成骨细胞多来源于 BMSC，雌激素是调节骨形成细胞的重要环境因素之一，并通过其受体发挥作用[2]。有研究提示绝经后骨质疏松症骨量的减少与 BMSC 成骨分化能

作者单位：100069 北京，首都医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室(郭晓霞、许晴、路欣)；首都医科大学宣武医院细胞治疗研究室(王芳)

通讯作者：郭晓霞，Email：gxxj@sohu.com

力降低,成脂分化能力增强,骨髓中脂肪组织增多有关[3]。本实验主要观察雌激素对体外培养正常增龄及去卵巢大鼠 BMSC 的增殖和成骨分化能力的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

健康 3 月龄雌性 SD 大鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。DMEM(Low Glucose,LG)培养液、胎牛血清(Gibcobrl 公司,美国)。成骨诱导培养液:含 10% 胎牛血清 DMEM(LG)培养液 + 50 μg/mL 维生素 C + 10 mmol/L β-甘油磷酸钠 + 10^{-8} mol/L 地塞米松 + 100 U/mL 青、链霉素。MTT(北京欣经科生物技术有限公司)。碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物制品公司)。LP 400 酶标仪(Pasteur 公司,法国)。

1.2 实验方法

1.2.1 去卵巢大鼠动物模型的建立:取 3 月龄 SD 大鼠,麻醉后无菌条件下行双侧卵巢切除术(ovariectomy, OVX)。术后在 24℃ ~ 28℃和通风良好的条件下饲养 6 个月,自由摄水摄食。

1.2.2 BMSC 的分离和体外培养:取 3 月龄、9 月龄与去卵巢大鼠,处死后无菌分离股骨、胫骨,刮除骨膜和软组织,切除股骨、胫骨两端的干骺端,用 DMEM(LG)全培养液(含 10% 胎牛血清,100 U/ml 青、链霉素)反复冲洗骨髓腔,吹散细胞,制成骨髓细胞悬液。采用全骨髓法分离培养 BMSC[4],将细胞分别接种于 60 cm^2 培养皿中,置 37℃,5% CO_2,95% 空气饱和湿度的孵箱中培养。48 h 后第一次换液,除去未贴壁细胞。以后,每隔 3 d 更换培养液,弃掉未贴壁的悬浮细胞。至细胞汇合成致密单层后进行传代。

1.2.3 实验分组:将第 2 代 BMSC 分为下列 6 组:(1)3 月龄组;(2)3 月龄组 + E_2(17-β estradiol);(3)9 月龄组;(4)9 月龄组 + E_2;(5)OVX 组;(6)OVX 组 + E_2。其中(1)(3)(5)组 BMSC 用 DMEM(LG)全培养液培养。(2)(4)(6)组在 DMEM(LG)全培养液中加入 10 nM E_2(根据本实验室前期实验观察不同浓度 E_2 对 BMSC 增殖的效果,选择 10 nM)。成骨诱导分化,分组与上同,用成骨诱导培养液代替 DMEM(LG)全培养液。

1.3 检测指标

1.3.1 原代培养的 BMSC 形态:在倒置相差显微镜下,分别观察各组原代培养的 BMSC 的形态 10 ~ 12 d。

1.3.2 油红 O 染色鉴定脂肪细胞:培养细胞用 PBS 漂洗 3 次,10% 中性甲醛固定 10 min,PBS 漂洗,油红 O 染液中浸染 20 min,PBS 漂洗后在倒置显微镜下观察。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖水平:将第 2 代生长良好的 BMSC,以 4×10^3 个/孔的细胞密度接种至 96 孔板,每组 5 孔,(2)(4)(6)组加入条件培养液,培养 3 d,7 d,11 d,15 d,分别检测细胞增殖水平。终止培养前加 MTT 20 μL,37℃孵育 4 h 后,弃上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,振荡 10 min 溶解沉淀,酶标仪测 490nm 吸光度(A)值。

1.3.4 细胞碱性磷酸酶(ALP)活性测定:取第 2 代 BMSC,按上法接种至 96 孔板,每组 5 孔,进行成骨诱导,于第 14 d 时终止培养。移去培养液,PBS 缓冲液洗涤 3 次,加入 0.2% triton-X-100 裂解液 100 μl,4℃冰箱过夜。次日将 6 组样本分别收集于 1.5 mL EP 管中,3000 r/min 离心 10 min,吸取 100 μl 细胞裂解上清液,按碱性磷酸酶试剂盒说明操作,酶标仪测 520 nm 测吸光度(A)值。

1.4 统计学处理

对各实验数据采用 SPSS 11.5 统计软件包进行单因素方差分析(ANOVA),$P < 0.05$ 代表有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养的 BMSC 形态学观察

接种后 48 h 内,培养皿中含有大量造血干细胞及悬浮细胞,无法观察到细胞贴壁情况。48 h 后全量换液,移去悬浮细胞。隔 3 d 再次全量换液,可见 3 月龄组贴壁细胞数比 9 月龄组多,细胞形态无明显差异,细胞散在或聚集生长,细胞呈长梭形,形态均一。而 OVX 组贴壁细胞数量最少,呈聚集生长。培养至第 8 d 时,可见 3 月龄组(图 1)和 9 月龄组细胞数量增多,细胞分布不很均匀,面积扩大。OVX 组的细胞数明显少于 3 月龄组和 9 月龄组,并且有细胞自发向脂肪细胞分化(图 2),油红 O 染色可见分化的脂肪细胞中红染的脂滴(图 3)。10 ~ 12 d 后,3 月龄组长满整个培养皿底,9 月龄组细胞基本汇合成单层,OVX 组细胞呈 50 ~ 60% 的汇合。

2.2 BMSC 增殖能力的比较

MTT 法检测显示细胞增殖速率随时间延长 3 月龄组逐渐高于 9 月龄组,3 月龄组与 9 月龄组明显

高于 OVX 组($P < 0.01$)(图 4) 加入 E_2 组细胞增殖速率逐渐高于相应对照组,3 月龄组在第 11 天与对照组有显著差异($P < 0.05$)(图 5),9 月龄组与相应对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)(图 6),OVX 组差异显著($P < 0.05$)(图 7)。

图 1 原代培养 8 d 的正常 3 月大鼠 BMSC

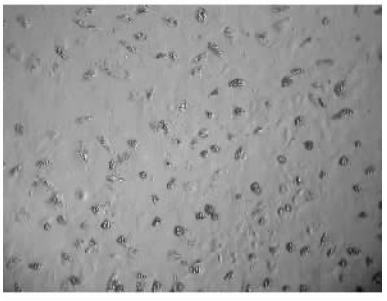

图 2 原代培养 8 d 的去卵巢大鼠的 BMSC

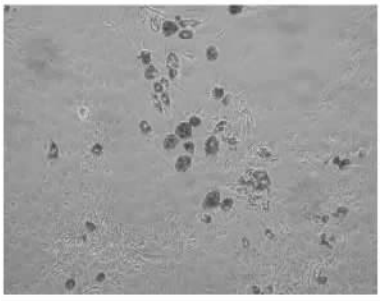

图 3 油红 O 染色显示去卵巢组 BMSC 分化的脂肪细胞

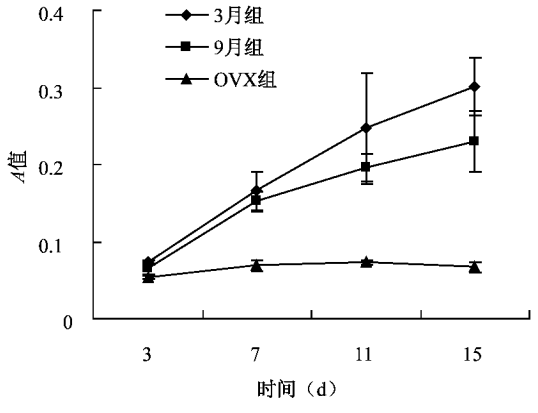

图 4 3 月龄、9 月龄和 OVX 组 BMSC 增殖能力的比较

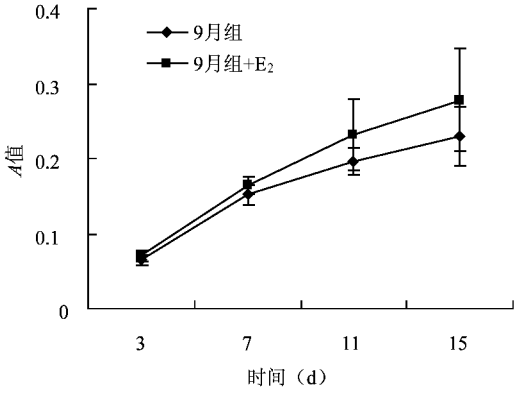

图 6 雌激素对 9 月龄组 BMSC 增殖能力的影响

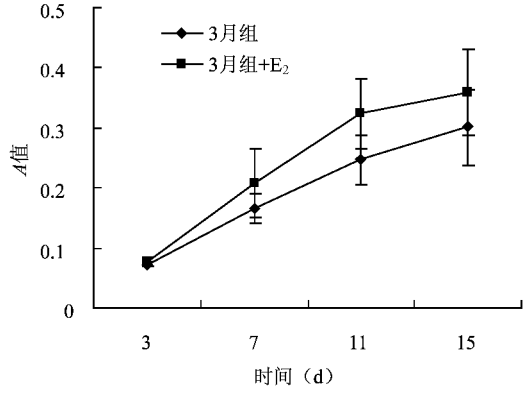

图 5 雌激素对 3 月龄组 BMSC 增殖能力的影响

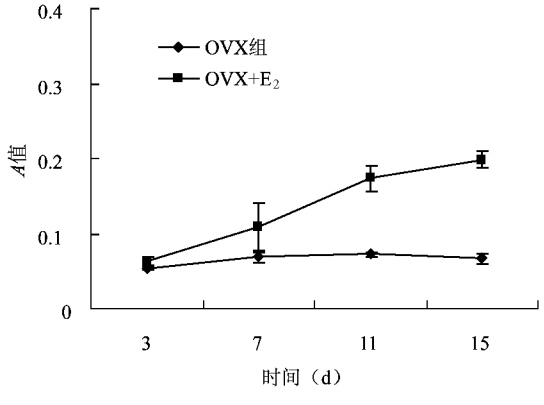

图 7 雌激素对 OVX 组 BMSC 增殖能力的影响

2.3 雌激素对 BMSC 成骨诱导 ALP 活性的影响

各组 BMSC 成骨诱导培养至第 14 天,测 ALP 活性,结果显示雌激素增强 3 月龄组、9 月龄组 BMSC 的 ALP 活性($P < 0.05$),对 OVX 组 ALP 活性影响更为显著($P < 0.01$)(图 8)。

3 讨论

为了观察雌激素对不同条件大鼠 BMSC 增殖和成骨分化能力的影响,我们分别取正常 3 月龄、9 月龄与去卵巢大鼠骨髓细胞,采用全骨髓培养法分离培养 BMSC。该方法操作简单易行,通过传代,可以

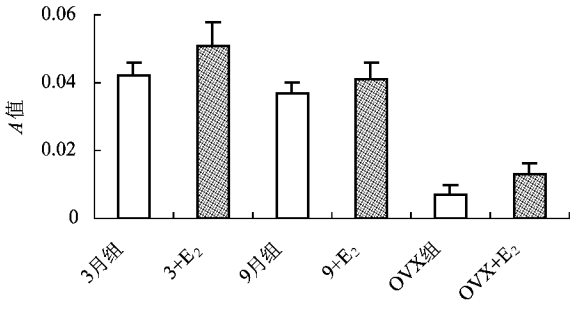

图 8 BMSC 成骨诱导 14 d ALP 活性的比较

获得相对纯化的 BMSC。

本实验比较了 3 月龄、9 月龄和去卵巢大鼠 BMSC 的增殖能力，MTT 法检测结果显示 3 月龄组和 9 月龄组的 BMSC 的增殖能力具有时间依赖性，3 月龄组随时间延长逐渐高于 9 月龄组，并在第 15 天左右显示出明显差异；OVX 组 BMSC 的增殖能力明显低于前两组。这一结果说明大鼠 BMSC 的增殖能力随增龄而降低；雌激素缺乏使大鼠的 BMSC 的增殖能力明显下降。这可能与老年动物骨髓中的基质细胞集落形成单位数目减少有关[5]。

在分离 BMSC 的过程中我们发现，OVX 组培养皿中漂浮大量脂肪颗粒，说明 OVX 大鼠骨髓中脂肪细胞增多，在原代培养中可见 OVX 组 BMSC 有少数细胞自发向脂肪细胞分化。提示雌激素缺乏使得 BMSC 更易向成脂肪细胞分化。ALP 是一种细胞内磷酸单酯酶，定量检测其活性是评价成骨细胞功能及分化的重要指标。研究发现 BMSC 在成骨诱导后，ALP 是最早出现的成骨性标志，并且有时间依赖性，随着诱导时间延长表达量增加[6]。本实验检测了各组 BMSC 进行成骨诱导 14 天 ALP 的活性，结果显示 3 月龄组较 9 月龄组高，说明大鼠 BMSC 的成骨分化能力随增龄而降低。OVX 组 BMSC 的成骨能力明显降低，与前述雌激素缺乏时 BMSC 成脂肪细胞能力增强一致。Kajkenova 等[7]发现快速衰老模型小鼠(SAMP-6)不仅骨髓细胞的成骨生成能力下降，表现为骨生成速率下降和骨密度下降，而且骨髓中脂肪细胞的克隆形成单位和已分化成熟的脂肪细胞都增加。Benayahu 等[8]和 Rodriguez 等[9]的实验结果也说明了雌激素缺乏将导致 BMSC 更多地分化为成脂肪细胞。之后，Okazaki 等[10]经体外实验证实雌激素促进 BMSC 向成骨细胞分化，抑制其向成脂肪细胞分化。Sethi 等[11]研究认为成骨细胞分化和成脂肪细胞分化有共同的球形转录模式，多种基因阻遏在干细胞早期分化中是一种普遍现象，定向细胞在特异性细胞程序激活前，有可能进行转分化。

我们在实验中观察了各组 BMSC 对雌激素的反应，有趣的是尽管雌激素对各组 BMSC 的增殖及成骨细胞分化均有促进作用，但反应程度并不完全相同。OVX 大鼠 BMSC 对雌激素的反应似乎比 3 月龄组和 9 月龄组更强，3 月龄组又强于 9 月龄组。这种现象是否与 BMSC 的雌激素受体的数量或受体与雌激素的亲和力有关，有待于进一步研究。

【 参 考 文 献 】

[1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[2] Wang Q, Yu JH, Zhai HH, et al. Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells. Biochem and Biophys Res Commun, 2006, 347(1): 117-123.

[3] Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(3): 290-294.

[4] 曹谊林. 组织工程学理论与实践. 上海：上海科学技术出版社, 2004: 162.

[5] Kotev-Emeth S, Savion N, Pri-chen S, et al. Effect of maturation on the osteogenic response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor. Bone, 2000, 27(6): 777-783.

[6] Sammons J, Ahmed N, El-Sheemy M, et al. The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D (3). Stem Cells Dev, 2004, 13(3): 273-280.

[7] Kajkenova O, Lecka-Czernik B, Gubrij I, et al. Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia. J Bone Miner Res, 1997, 12(11): 1772-1779.

[8] 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(3): 407-415.

[9] Rodriguez JP, Montecinos L, Rois S, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. J Cell Biochem, 2000, 79(4): 557-565.

[10] 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) alpha or beta. Endocrinology, 2002, 143(6): 2349-2356.

[11] Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. J Lipid Res, 2007, 48(6): 1253-1262.

(收稿日期：2009-06-24)