·论著·

GJIC 增强剂 PGE_2 对兔脂肪细胞向成骨细胞横向分化的影响

王吉博 彭浩 王凤宇 齐新文 王兆杰*
遵义医学院珠海校区手术学教研室,珠海 519041

中图分类号:R68 **文献标识码**:A **文章编号**:1006-7108(2014)09-1079-05

摘要:**目的** 探讨缝隙连接通讯增强剂前列腺素 E_2 对脂肪细胞向成骨细胞横向分化及细胞间缝隙连接通讯的影响。**方法** 选取 3 月龄新西兰大白兔腹股沟处脂肪组织,分离提取成熟脂肪细胞,使其去分化得到去分化脂肪细胞,取第三代去分化的脂肪细胞进行成骨诱导,加入 GJIC 增强剂 PGE_2 设为增强组,并设立对照组,MTT 法观察 PGE_2 对细胞倍增是否有影响,进行茜素红钙结节染色和 I 型胶原免疫组化染色对成骨细胞定性检测,Western blot 技术和划痕标记染料示踪法检测缝隙连接蛋白 43(Cx43)的表达。**结果** MTT 法检测结果显示 PGE_2 对细胞生长增殖无显著影响。茜素红染色显示均发现紫红色结节。免疫组化染色显示增强组 I 型胶原表达增强,SLDT 法显示增强组荧光染料扩散高于对照组,Western blot 技术检测结果显示增强组 Cx43 蛋白的表达增高。**结论** PGE_2 可以增强缝隙连接通讯以增强向成骨细胞分化的能力。

关键词:脂肪细胞;成骨细胞;去分化;缝隙连接通讯

The effect of GJIC stimulating agent PGE2 on the osteoblast transdifferentiation by adipocytes in rabbits

WANG Jibo, PENG Hao, WANG Fengyu, Qi Xinwen, WANG Zaojie
Operation Surgery Department, Zunyi Medical College Zhuhai Campus, Zhuhai 519041, China
Corresponding author: WANG Zhaojie, Email: zhaojiewang@163.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of gap junction strengthening agent PGE2 on the osteoblast transdifferentiation by adipocytes and the gap junction intercellular communication (GJIC). **Methods** Groin adipose tissue was taken from 3-month-old New Zealand white rabbits and the mature adipocytes were collected. The mature adipocytes were dedifferentiated and the dedifferentiated adipocytes were obtained. The 3rd generation of the dedifferentiated adipocytes were induced and differentiated into osteoblasts. PGE2 was additioned in the enhanced group. The control group was also established. The effect of PGE2 on osteoblast proliferation was detected using MTT assay. Osteoblast phenotype was examined using Alizarin red staining and collagen type I immunohistochemistry staining. The expression of Cx43 was measured using Western blotting and sorape-loading and dye transfet (SLDT) method. **Results** The results of MTT assay showed that PGE2 had no significant effect on cell proliferation. The results of Alizarin red staining showed that calcified nodules were purple stained in all groups. The results of collagen type I immunohistochemistry staining showed that the expression of collagen type I was stimulated in the enhanced group. The results of SLDT showed that the spread of fluorescent dye was more in the enhanced group than in the control group. The results of Western blotting showed that the expression of Cx43 was stimulated in the enhanced group. **Conclusion** PGE2 enhanced the capability of osteoblast transdifferentiation by enhancement of GJIC.

Key words: Adipocytes; Osteoblasts; Dedifferentiated; GJIC

骨质疏松症作为临床上的常见病多发病,主要是成骨细胞数量的减少为特征,同时发现骨组织中脂肪细胞数量增多,本现象的发生机制尚不明确。国内外研究多从骨髓间干细胞定向分化和调控角度考虑,较少从两种细胞的横向分化和细胞间信号传导调控角度考虑。因此,是否能够通过调控细胞间缝隙连接通讯(gap junction intracellular

基金项目:贵州省科技厅基金资助项目[黔科合 J 字(2007)2227 号];遵义医学院博士基金资助项目(遵医 F-129)

* 通讯作者:王兆杰,Email:wjbsrh@163.com

communication, GJIC)来干预脂肪细胞向成骨细胞的横向分化,为骨量减少性疾病提供一种新的理论依据,以期达到治疗此骨量减少性疾病。

1 材料和方法

1.1 材料

2.3 ~ 2.5 kg 新西兰大白兔。前列腺素 E_2 (Prostaglandin E_2, PGE_2)(购自美国 Sigma-Aldrich 公司)。DMEM/F12 培养液(武汉博士德生物工程有限公司)等。

1.2 主要实验试剂配制

1.2.1 成骨诱导液配制

在新配制的基础培养基(含 10% FBS)中依次加入 100 mmol/L 的地塞米松、0.05 mmol/L 的 VitC、10 mmol/L 的 β-甘油磷酸钠,0.22 μm 微孔滤器过滤除菌后 4℃冰箱保存。

1.2.2 缝隙连接通讯增强剂的配置

将 150 mg PGE_2 溶于 27 ml 无水乙醇中,充分搅拌,加入 360 ml 成骨诱导液中,0.22 μm 微孔滤器过滤除菌后 4℃冰箱保存。

1.3 方法

1.3.1 提取成熟的脂肪细胞:

将 3 月龄新西兰大白兔空气栓塞法处死,置于无菌台上。取无菌培养皿一个,加入适量 PBS 液。在双腹股沟处取皮下脂肪组织约 2 g,置于此无菌培养皿中。在无菌条件下,去除表面的结缔组织。并剪成糊状,并移入 15 ml 离心管中,在离心管中滴入 0.1% I-型胶原酶 3 ml,并盖好瓶盖,置于 37℃水浴箱中进行消化,时间为 30 min,每 3 分钟进行一次震荡,加入含 1% FBS 体积分数的 DMEM 培养液 6 ml 终止消化,180 r/min 离心 10 min。收集上层液体,接种于 25 cm^2 培养瓶,采用天花板贴壁法培养成熟的脂肪细胞。

1.3.2 成熟脂肪细胞去分化:

10 天后继续在低氧低营养环境下培养,使其脱去脂滴,得到去分化脂肪细胞(Dedifferentiated adipocytes, DA),其后采用正常培养(10% FBS 的 DMEM 培养液),每 2 天更换一次培养液。待完全脱去脂滴呈长梭形,融合达 80% 时,进行传代。

1.3.3 分组并向成骨细胞诱导:

选取第三代的去分化脂肪细胞,随机分为增强组和对照组,增强组中加入含 PGE_2 的成骨诱导液,对照组加入成骨诱导液。培养过程中光镜下观察细胞形态变化。

1.3.4 MTT 法检测细胞毒性作用:

分组后的细胞按 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板内,向成骨细胞诱导后的第 2 日起,两组各取 6 个孔,检测各孔在 490 nm 下的吸光度(A)值,每天各取 6 孔进行检测,共检测 7 天,并绘制两组细胞的生长曲线。

1.3.5 茜素红染色:

取诱导后 14 d 的细胞,用无水乙醇进行固定,半小时后弃固定液,冲洗 3 遍后加入 0.1% 的茜素红 Tris-Hcl(PH 8.3)染色液染色半小时。

1.3.6 Ⅰ型胶原免疫细胞化学染色:

诱导 2 周后进行Ⅰ型胶原免疫细胞化学染色,吸去诱导液,用 PBS 冲洗 3 遍,每次冲洗 2 min,加入 4% 的多聚甲醛进行固定,固定 30 min,根据免疫组化试剂盒要求染色。

1.3.7 划痕标记染料示踪:

将 2 组细胞诱导 2 周后接种于 35 mm 直径培养皿中进行培养,显微镜下观察细胞汇合成均匀单层细胞后,PBS 冲洗 3 遍,加入荧光黄(Lucifer yellow, LY)溶液,用手术刀刀刃在培养皿中央作一直线划痕, 5 分钟后用 4% 多聚甲醛固定 3 min。用荧光倒置显微镜拍摄 LY 扩散情况,LY 扩散距离使用计算机图像进行测量。

1.3.8 Western blot 技术检测 Cx43 蛋白的表达:

取诱导后的 2 组细胞,各取 3 ml 4℃预冷的 PBS 液加入 2 个培养瓶中,将培养瓶平放入摇箱中摇动 1 min,以充分洗涤细胞,弃去洗液。以同样的方法洗涤细胞 2 次,然后将培养瓶置于冰上。按 Western blot 试剂盒步骤进行操作,并进行曝光得到 X 光胶片。所得 X 光胶片用 Chemi Imager 5500 V2.0 软件扫描,通过 Fluor Chert2.0 软件进行定量分析,测得整合光密度值(mtegratcd density value, IDV)。

1.3.9 统计分析:

采用统计分析软件 SPSS 11.5 进行单因素方差分析,按 $\alpha = 0.05$ 检验水准, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,$P < 0.05$,有统计学意义。

2 结果

2.1 成熟脂肪细胞的去分化

成熟脂肪细胞于 24 h 开始贴壁生长,形状呈圆形空泡状,从 48 h 开始,圆形空泡状的脂肪细胞的胞质开始向周围伸展,第 4 天部分细胞胞质中的单个脂滴分裂成多个脂滴并向中央聚集,细胞形态逐渐由圆形变为椭圆形,在此环境下的第 10 天开始细胞逐渐伸展,形成不规则形状并且平铺于培养瓶底部,14 d 后梭形细胞逐渐增多,形态为成纤维细胞状细胞,并且贴服于培养瓶的底部,脂肪细胞完全去分化。

2.2 2 组细胞生长曲线及倍增时间

以每个时间点所测的 2 组各孔 A 值的算数平均值为纵坐标，以所测的时间为横坐标，用 EXCEL2003 软件绘制出散点折线图，可以发现随着时间的变化 A 值随之增加，1 ~ 2d2 组细胞为生长停滞期，指数生长期从第 3 天开始，均在第 6 天进入平台期生长期。曲线大致呈“S”形，2 组细胞生长的总体趋势变化不大（图 1）。经计算对照组细胞的倍增时间约为 60.96 h，增强组倍增时间约为 65.57 h，组间进行单因素方差分析 $P = 0.982$（$P > 0.05$），差异无显著性意义，结果表明缝隙连接通讯增强剂 PGE_2 对去分化脂肪细胞生长增殖无显著影响。

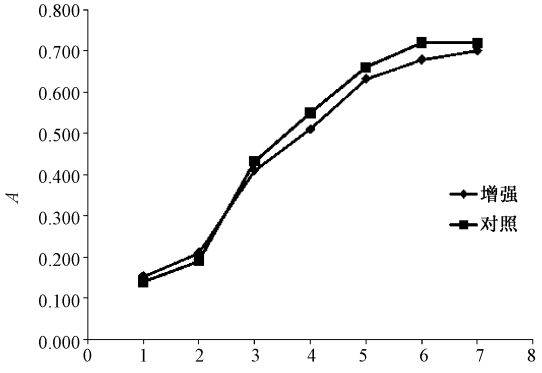

图 1　2 组 DA 的生长曲线

Fig. 1　The growth curves of DA in each group

2.3　茜素红钙结节染色

2 组细胞诱导 2 周后行茜素红染色，然后后镜下观察可见 2 组细胞均有被染成紫红色的钙结节。

2.4　SLDT 法检测 GJIC 的强弱

取诱导培养 2 周后的 2 组细胞，采用 SLDT 法进行检测，并在荧光显微镜下观察和测量 LY 扩散的层数，结果显示增强组为 9 ~ 10 层（图 2），对照组为 7 ~ 8 层（图 3）。

2.5　Ⅰ型胶原免疫细胞化学染色

取诱导培养 2 周后的 2 组细胞，行Ⅰ型胶原免疫细胞化学染色，染色后镜下观察发现组胞浆内均有棕黄色颗粒呈条索状或网状沉积（图 4、图 5），并对灰度值并进行统计学分析：增强组和对照组进行比较，P 值为 0.046 差异有统计学意义（$P < 0.05$）。说明增强组胞浆内有更多的Ⅰ型胶原产生（表 1）。

2.6　Western blot 技术检测 Cx43 蛋白的表达

2 组细胞诱导 2 周后用 Western blot 技术检测 Cx43 蛋白的表达，结果显示 Cx43 蛋白的相对分子量为 45×10^3，增强组的条带要强于对照组并且颜色较深（图 6），所得 X 光胶片用 ChemiImage5500 自动成像分析仪对 Cx43 电泳条带进行分析，测得整合光密度值（Integrated optical density，IOD），并做统计学分析，增强组和对照组比较 P 值分别是 0 差异有统计学意义（$P < 0.05$）（表 1）。

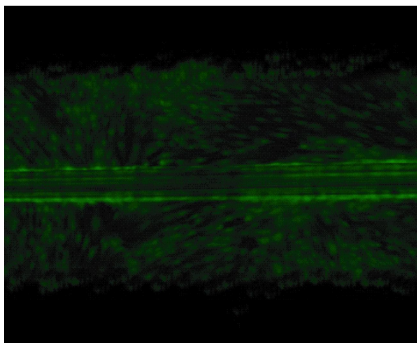

图 2　SLDT 法检测增强组荧光黄扩散距离 ×100

Fig. 2　The distance of resorcinolphthalein diffusion using SLDT method in the enhancement group, ×100

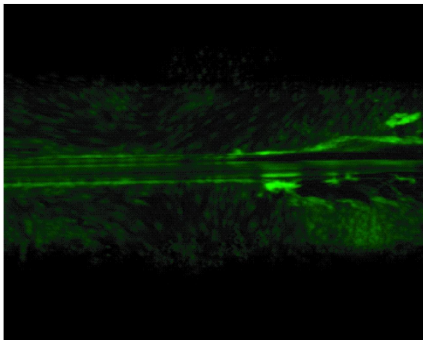

图 3　SLDT 法检测对照组荧光黄扩散距离 ×100

Fig. 3　The distance of resorcinolphthalein diffusion using SLDT method in the control group, ×100

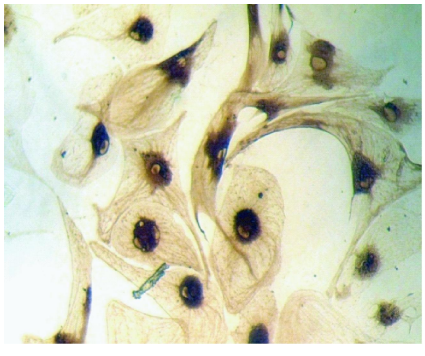

图 4　增强组 DA 诱导 14 天 I 型胶原免疫组化染色镜下观察 ×100

Fig. 4　Collagen type I immunohistochemical staining of DA in the enhancement group treated on inducing day 14, ×100

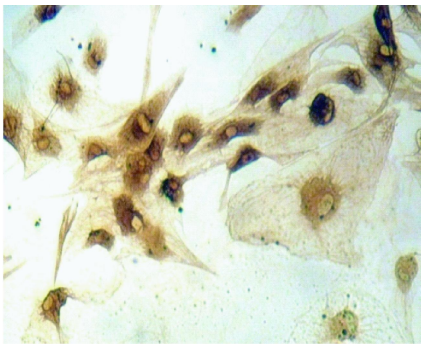

图 5 对照组 DA 诱导 14 天 I 型胶原免疫组化染色镜下观察 ×100

Fig. 5 Collagen type I immunohistochemical staining of DA in the control group treated on inducing day 14, ×100

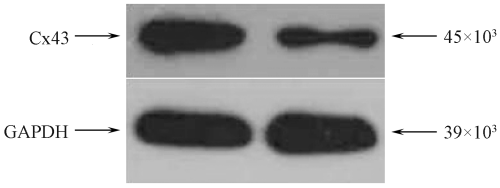

图 6 Western blot 技术检测 Cx43 蛋白的表达

Fig. 6 The expression of Cx43 detected using Western blotting

表 1 不同组别 I 型胶原免疫细胞化学染色灰度值评分($n=8$, $\bar{x}\pm s$, $P<0.05$)、Cx43 表达水平(IOD 值, $n=6$, $\bar{x}\pm s$, $P<0.05$)

Table 1 The gray value score of the immunocytochemical staining of collagen type I($n=8$, $\bar{x}\pm s$, $P<0.05$), The expression level of Cx43(IOD, $n=6$, $\bar{x}\pm s$, $P<0.05$)

组别	灰度值	Cx43 表达水平
增强组	115.804 ± 8.476 *	54826.69 ± 1909.12 *
对照组	125.497 ± 9.230	48519.19 ± 1678.5

注: * 表示与对照组相比较, $P<0.05$

3 讨论

骨质疏松症作为临床上的常见病多发病,主要是成骨细胞数量的减少为特征,同时发现骨组织中脂肪细胞数量增多,两者存在一种此消彼长的现象,此种现象的发生机制尚不明确。国内外研究多从骨髓间干细胞定向分化和调控角度考虑,较少从两种细胞的横向分化和细胞间信号传导调控角度考虑。成骨细胞和脂肪细胞间的横向分化已经得到证实[1]。

GJIC 广泛存在于人体的各个系统中,目前研究比较多并取得一定进展的有神经系统和心血管等系统,成骨细胞和脂肪细胞间也存在广泛的缝隙连接,缝隙连接介导的缝隙连接通讯对两种细胞的代谢、生长、增殖及分化中起到非常重要的作用,两种细胞存在相同的表型,是否可以增强缝隙连接通讯以此影响脂肪细胞向成骨细胞的转换,为治疗骨量性疾病提供理论依据。

3.1 缝隙连接通讯在横向分化中的作用

通过对缝隙连接通讯的不断研究,发现前列腺素 E_2(PGE_2)[16]、胰岛素样生长因子 Ⅰ(IGF-Ⅰ)、甲状旁腺素(PTH)等对缝隙连接通讯有增强作用。

GJIC 的组成单位为缝隙连接蛋白(Cx),通过调控 Cx 的生成、Cx 的转运、及连接子的偶联情况可以调节缝隙连接的数量,从而调控 GJIC。

GJIC 在维持细胞间信息的传递,调节细胞增殖、分化及维持组织内环境的稳态等过程中起着十分重要的作用[3,4],有研究表明[5-7]成骨细胞和骨细胞中主要表达 Cx43[2],McLachlan E[10]的研究表明 Cx43 与骨骼的正常发育密切相关,Cx 介导的 GJIC 在骨骼发育、塑形中扮演尤为重要的角色[8]。可通过调节成骨细胞的增殖、分化及存活等生物学过程而影响骨骼的发育、塑形[9]。

本实验选用 Western blot 技术检测成骨细胞中 Cx43 蛋白的表达,发现增强组 Cx43 的量明显多于对照组的量,这说明 PGE_2 对 GJIC 具有调控作用,通过改变 Cx 的生成和转运使其在细胞与细胞之间产生了更多的缝隙连接结构的。直观的 SLDT 法检测缝隙连接通讯功能,发现单位时间内增强组 LY 的的扩散细胞层数明显多于对照组,说明细胞与细胞之间产生更多的缝隙连接结构的基础上,可以使单位时间细胞与细胞之间的信息交换量明显增加。

3.2 去分化脂肪细胞向成骨细胞横向分化

成熟的脂肪细胞在缺氧缺营养的培养条件下能够去分化为成纤维样细胞,这种细胞在成骨诱导环境下具有分化为成骨细胞[11]的能力。因此选用 3 月龄新西兰大白兔,提取成熟脂肪细胞。

成熟脂肪细胞采用天花板贴壁法在缺氧缺营养环境下进行培养,镜下观察到成熟的脂肪细胞第 4 天开始逐渐脱去脂滴,10 d 左右去分化成功得到高纯度去分化脂肪细胞,随后进行分组诱导。

通过 MTT 法检测发现 PGE_2 药物对去分化脂肪细胞向成骨诱导过程中对细胞增殖无显著影响。

钙结节为成骨细胞进入成熟期的标志[12-15],成骨细胞的成熟在骨形成的过程至关重要。本实验中 2 组细胞于诱导 2 周后行茜素红钙结节染色,均有

钙结节被染成了紫红色,说明在成骨诱导脂肪细胞成功分化为成骨细胞,并能聚集钙离子,促进细胞外基质矿化,使成骨细胞进入了成熟期。

I 型胶原是成骨细胞分化过程中的早期标志之一,在骨发育中 I 型胶原起重要作用,I 型胶原缺失会造成成骨细胞发育停滞。本实验结果显示增强组胞浆内 I 型胶原含量多于对照组,这说明增强 GJIC 可以产生更多的 I 型胶原,加快骨基质重建进程。

本实验证实成熟的脂肪细胞能够去分化并且得到了去分化脂肪细胞,去分化脂肪细胞在成骨诱导环境下能够横向分化为成骨细胞,并能使之进入成熟期,参与成骨过程。增强 GJIC 能够产生更多的成骨细胞分化过程中的早期标志物 I 型胶原,使之继续发育并进入成熟期。

综上所述,缝隙连接通讯增强剂 PGE_2 通过调控 Cx 的生成、Cx 的转运、及连接子的偶联,增加了缝隙连接结构的形成,从而增加了缝隙连接的数量,因此使得细胞与细胞间的信息传递增加,进而加快了去分化脂肪细胞向成骨细胞横向分化的速度,分化成了更多的成骨细胞并加快了成骨细胞的成熟和骨质重建。说明影响缝隙连接通讯能够影响脂肪细胞向成骨细胞分化。

【 参 考 文 献 】

[1] Wang ZJ, An RZ, Zang C, et al. Reasearch of transdifferentiation between osteoblasts and adipocytes in rabbits [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2012, 29(1): 21-23.

[2] Zheng CY, Li XD, Du SX. The role of connexin43 in bone development and shaping. International Journal of Orthopaedics, 2009, 30(2): 134-136.

[3] Collignon H, Davicco MJ, Barlet JP. lsolation of cells from oxine fetal long bone and characterization of their osteoblastic activities during in vitro mineralization. Arch Physiol Biochem, 1997, 105(2): 158-166.

[4] Gramsch B, Gabriel HD, wiemann M, et al. Enhancement of connexin43 expression increases pmlifemtion and differentiation of an osteoblastke cell line[J]. Exp Cell Res, 2001, 264(2): 397-407.

[5] Liu Manli, Zhang Zhihong, Wang Zongren, et al. TGF-β1 in rat testicular Leydig cells mediated by connexin 43 gap junctional intercellular communication function [J]. National Journal of Andrology, 2012, 18(2): 99-104.

[6] Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, et al. Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. J Clin Invest. 1993, 91(5): 1888-96.

[7] Donahue HJ. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. Bone. 2000, 26(5): 417-22.

[8] Koval M, Harley JE, Hick E, et al. Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells[J]. Cell Biol, 1997, 137(4): 847-57.

[9] Matsuo K. Cross-talk among bone cells. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009, 18(4): 292-7.

[10] Li Z, Zhou Z, Saunders MM, et al. Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(4): C1248-55.

[11] Kang Pengde, Pei Fuxing, Yang Jing, et al. Transdifferentiation of bone marrow adipocytes into osteoblasts [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(1): 17-22.

[12] Van RL, Bayliss CE, Roncari DA. Cytological and Enzymological Characterization of adult human adipocyte precursors in Culture [J]. J Clin Invest, 1976, 58(3): 699-704.

[13] Li Dawei, Qin Linlin. Isoflavones Genistein on medicines in primary cultured rat osteoblast proliferation, differentiation, calcium content and Mineralization. Chinese Journal of osteoporosis, 2002, 8(4): 307-310. 34.

[14] Liu Zhonghou. Osteoporosis study. Bei Jing: Science Press, 1998, 87-90.

[15] Errico JA, Macneil RL, Takata T, et al. Expression of bone associated marker by tooth root lining cells in situ and vitro. Bone, 1997, 20 (2): 117-126.

[16] Civitelli R, Ziambaras K, Warlow PM, et al. Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells[J]. Cell Biochem, 1998, 68(1): 8-21.

(收稿日期: 2014-03-25)

GJIC 增强剂 PGE2对兔脂肪细胞向成骨细胞横向分化的影响

万方数据 WANFANG DATA 文献链接

作者： 王吉博， 彭浩， 王凤宇， 齐新文， 王兆杰， WANG Jibo， PENG Hao， WANG Fengyu， Qi Xinwen， WANG Zaojie

作者单位： 遵义医学院珠海校区手术学教研室,珠海,519041

刊名： 中国骨质疏松杂志 ISTIC

英文刊名： Chinese Journal of Osteoporosis

年，卷(期)： 2014(9)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201409011.aspx