

· 论 著 ·

硫酸钙对小鼠骨髓间充质干细胞分化和迁移的影响

刘佳¹ 周刚² 陈丹娜¹ 黄春霞^{1*}

1. 长沙医学院基础医学院, 湖南 长沙 410219

2. 中南大学生命科学院, 湖南 长沙 410013

中图分类号: R394.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 04-0421-05

摘要: **目的** 分析不同浓度的硫酸钙(calcium sulfate, CaSO_4)对小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化和迁移的影响,探讨 CaSO_4 促进骨修复的细胞机制。**方法** 分离小鼠骨髓 MSCs,绘制细胞生长曲线,评价不同浓度的 CaSO_4 对细胞生长的影响,用 qRT-PCR 方法评价 CaSO_4 作用后的成骨相关基因 Osterix 因子和骨钙素的表达,通过划痕实验和琼脂糖斑点实验,评估 CaSO_4 对 MSCs 迁移能力的影响。**结果** 中浓度(0.8 g/L)和低浓度(0.1 g/L)的 CaSO_4 对细胞生长无明显影响,高浓度(1.5 g/L)的 CaSO_4 抑制了细胞增殖;中浓度的 CaSO_4 在作用了 1~4 d 后,显著提高了 MSCs 成骨基因 Osterix 和骨钙素的表达,也明显促进了细胞迁移;高浓度(1.5 g/L)的 CaSO_4 反而抑制了 MSCs 分化和迁移。**结论** 一定浓度的 CaSO_4 能够诱导 MSCs 成骨分化,使 MSCs 细胞迁移能力增强;成骨细胞的出现可能是细胞迁移能力提高的原因之一。

关键词: 硫酸钙;间充质干细胞;迁移;骨再生

Effects of calcium sulfate on the differentiation and migration of mouse bone marrow mesenchymal stem cell

LIU Jia¹, ZHOU Gang², CHEN Danna², HUANG Chunxia^{1*}

1. Department of Basic Medicine, ChangSha Medical University, Changsha 410219

2. School of life sciences, Central South university, Changsha 410013, China

* Corresponding author: HUANG Chunxia, Email: joyandwork@ sina.com

Abstract: Objective To study the effects of different concentrations of calcium sulfate (CaSO_4) on the differentiation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) of mice, and to discuss the cellular mechanism of CaSO_4 in bone repair.

Methods Bone marrow MSCs were isolated from mice, and the cell growth curves were drawn to evaluate the effect of different concentrations of CaSO_4 on cell growth. After CaSO_4 treatment, the gene expression of osterix factor and osteocalcin was evaluated by qRT-PCR. The effect of CaSO_4 on the migration of MSCs was evaluated by wound healing assay and agarose spot experiment.

Results The medium concentration (0.8 g/L) and low concentration (0.1 g/L) of CaSO_4 had no significant effect on cell growth, while high concentration (1.5 g/L) inhibited cell proliferation. CaSO_4 of the medium concentration significantly promoted osteogene (osterix and osteocalcin) expression and cell migration after 1 to 4 days. In contrast, the high concentration (1.5 g/L) of CaSO_4 inhibited the differentiation and migration of MSCs. **Conclusion** At certain concentration, CaSO_4 induced MSCs osteogenesis differentiation, meanwhile, the migration ability of MSCs cells was enhanced. The appearance of osteoblasts may be one of the reason for the enhancement of cell migration.

Key words: calcium sulfate; mesenchymal stem cells; migration; bone regeneration

硫酸钙(calcium sulfate, CaSO_4)是使用历史悠久且简单的骨移植材料之一,已使用超过 100 年^[1],可应用于口腔外科^[2]、颌面外科^[3]、骨科手术^[4],效

果确定。科学界对于 CaSO_4 利于骨再生主要有几种解释, CaSO_4 等钙化合物材料在被植入后降解时,创造了富含钙的环境,其所诱导的生物反应与骨重塑过程中产生的生物反应相似^[5]。Walsh 等^[6]认为,在 CaSO_4 吸收过程中产生的 pH 值降低会导致相邻骨释放骨形态发生蛋白(BMPs)。此外也有课题组^[1]提出,在 CaSO_4 治疗的部位增加了血管生

基金项目: 国家自然科学基金(31501152); 湖南省卫生计生委科研计划课题(B2017042)

* 通信作者: 黄春霞, Email: joyandwork@ sina.com

成。目前, CaSO_4 成骨效应的细胞机制和分子机制仍不十分清楚。

前期, 笔者将间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 接种在脱蛋白骨支架上, 对大鼠的临界大小骨缺损模型进行修补^[7]。笔者注意到, 当没有接种 MSCs 的脱蛋白骨支架作为对照组植入到骨缺损时, 组织学切片可以观察到丰富的宿主细胞进入支架。脱蛋白骨中起主要作用的成分是钙。因此, 本研究的目的是利用体外细胞培养的方式, 探讨 CaSO_4 对 MSCs 成骨分化和迁移能力的直接作用, 推测其中的联系, 探索构建临床实用的无细胞骨移植简易支架的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: SPF 级 KM 小鼠, 雌性, 6~8 周, 体重 (28 ± 2) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 长沙医学院科研中心标准动物室饲养。

1.1.2 实验仪器: 显微镜 (奥林巴斯公司); qRT-PCR 分析 (Thermo Fisher 公司) 在湘雅医学院生命科学院进行。

1.1.3 实验试剂: TRIzol (Invitrogen 公司); 高效反转录试剂盒和 Taqman 探针 (Applied Biosystems 公司); CaSO_4 粉末、明胶 (Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 含 CaSO_4 明胶预先包被细胞培养板: CaSO_4 按照 0.1、0.8、1.5 g/L 浓度溶于 0.1% 明胶/PBS 中, 设为高、中、低浓度组, 经 70 μm 孔径的滤器过滤, 包被培养板的孔。不含 CaSO_4 的 0.1% 明胶/PBS 溶液包被培养板为对照组。经过处理的培养皿在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 MSCs 的分离和培养: 小鼠实验严格遵守长沙医学院动物实验的伦理条例进行。将小鼠麻醉后, 以快速颈椎脱臼法处死, 取出胫骨和股骨。剪去两侧关节头, 用培养基将细胞冲出, 用 DMEM (含 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺和双抗) 对细胞进行培养。3 d 后, 更换培养基, 去掉未贴壁的细胞。当附着的细胞汇合到 80% 时, 经胰蛋白酶消化后传代, 2~4 代细胞被用于后续实验。

1.2.3 细胞生长曲线: 取对数生长期的细胞进行酶消化后, 以 $6 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞密度接种于已经包被有高、中、低浓度 CaSO_4 /明胶的 24 孔板和对照组 24 孔板, 均置 6 个平行孔培养细胞。用台盼蓝拒染法, 每天计存活细胞数, 共计 10 d, 据所获平均拒染活细

胞数绘制细胞生长曲线。

1.2.4 qRT-PCR 分析: MSCs 在含有高、中、低浓度 CaSO_4 环境中培养 1、4、7、10 d 后收集细胞, 用 TRIzol 法制备总 RNA, 用分光光度法进行 RNA 定量分析。按照高效反转录试剂盒说明书, 对纯化的 RNA 进行反转录后, 每个 RT-PCR 扩增体系使用 50 ng 的 cDNA, 每个样品重复 2 次。使用 Osterix 因子和骨钙素 (Osteocalcin) 作为探针、GAPDH 作为内参对基因表达进行定量分析。相对定量数据 fold induction 以标准化单位表示。

1.2.5 刮痕合拢实验分析细胞迁移: 按照参考文献 [8] 进行。在明胶/ CaSO_4 包被的 12 孔板中接种 1 mL 密度为 $6 \times 10^4/\text{mL}$ MSCs, 培养至细胞汇合。然后, 融合的细胞被最小平头 tip 头 (0.1~10 μL) 刮出痕迹, 用培养基轻柔清洗, 祛除脱落的细胞。继续培养 48 h, 用奥林巴斯显微镜拍摄细胞迁移后, 利用 ImageJ 软件分析划痕合拢程度。实验重复 4 次。

1.2.6 琼脂糖斑法分析细胞迁移: 按照参考文献 [9] 进行。低熔点琼脂糖溶于 PBS, 制成 1% 琼脂糖溶液, 然后高温。为制备琼脂糖斑点, 在 1.5 mL 的 Eppendorf 试管中加入 100 μL 融化的 1% 琼脂糖溶液, 再混合 100 μL PBS 或 0.2、1.6、3 g/L 的 CaSO_4 溶液, 实验组终浓度为 0.1、0.8、1.5 g/L。细胞培养 6 孔板上点两个 2 μL 的斑点, 一个含 CaSO_4 , 一个则不含, 4 $^{\circ}\text{C}$ 凝固 10 min。MSCs 进行胰蛋白酶消化后, 取 6×10^5 个细胞均匀接种在含有斑点的培养皿中。细胞培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定, 在显微镜下拍照, 利用 ImageJ 软件分析斑点区被侵袭的程度。实验重复 2 次。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 10.0 软件进行计量资料统计, 多组比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CaSO_4 对 MSCs 生长曲线的影响

以活细胞数均值绘制的生长曲线显示, 各组均在第 6~7 天进入平台期, CaSO_4 中、低浓度组细胞生长曲线和对照组相似, MSCs 增殖未受到 CaSO_4 影响。反倒是高浓度 CaSO_4 组细胞生长受抑制, 3~10 d 活细胞远低于其他组, 生长曲线平缓, 见图 1。

2.2 CaSO_4 对成骨基因表达的影响

在不同 CaSO_4 浓度作用于细胞 1、4、7、10 d 后, 笔者通过定量 RT-PCR 测定了各组 Osterix 因子和骨钙素表达。如图 2 A、图 2B 所示, 中浓度 0.8 g/L

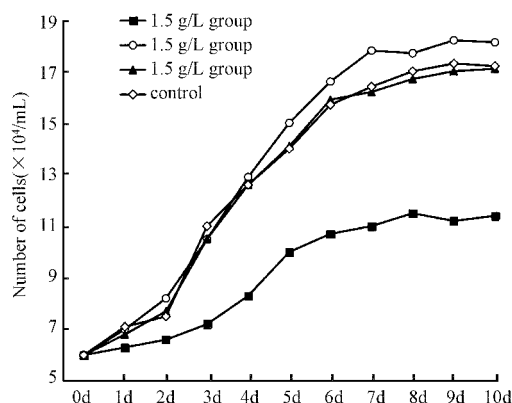


图1 不同浓度 CaSO_4 对细胞生长的影响

Fig.1 Effect of CaSO_4 at different concentrations on cell growth

的 CaSO_4 在 1 d 内降低了 Osterix 的表达,而骨钙素的表达量在 1~4 d 内均略降低, Osterix 因子和骨钙素的 mRNA 的表达从第 4~10 天逐渐增加。这些结果表明, CaSO_4 对 MSCs 分化成骨细胞产生了双重作用。1~4 d 内, CaSO_4 对成骨基因的表达有轻度的抑制作用,第 4 天是个分水岭,4 d 后渐进性上调 Osterix 因子和骨钙素等成骨基因的表达。而高浓度 1.5 g/L 的 CaSO_4 自始至终都在降低 Osterix 和骨钙素的表达,提示高浓度的 CaSO_4 抑制 MSCs 分化成骨细胞。低浓度 0.1 g/L 的 CaSO_4 对成骨基因的表达影响不明显。

2.3 CaSO_4 诱导 MSCs 迁移

为了评估 MSCs 的迁移,笔者使用刮痕合拢实验来检验在不同 CaSO_4 浓度的影响下,令细胞迁移 48 h 后的情况。笔者观察到 CaSO_4 对 MSCs 迁移的影响与浓度密切相关。与对照组相比,0.8 g/L 浓度下的细胞迁移最活跃(图 3B),迁移后合拢面积达到了 $(81.1 \pm 3.5)\%$ 。而暴露于剂量高达 1.5 g/L 的

高浓度组细胞迁移幅度小,合拢面积为 $(24.6 \pm 5.1)\%$,细胞本身的生长增殖状态也较差,细胞稀疏而且胞质中颗粒多(图 3A)。低浓度组细胞的合拢面积为 $(49.8 \pm 4.4)\%$,迁移程度比对照组 $[(36.2 \pm 2.6)\%]$ 稍大(图 3C、图 3D)。

为了证实 CaSO_4 对 MSCs 迁移的影响,继续进行了琼脂糖斑点试验。在 CaSO_4 中浓度时,观察到细胞迁移程度更大,侵袭面积更大 $[(91.4 \pm 6.1)\%]$; CaSO_4 高浓度时, MSCs 的迁移幅度小,侵袭面积 $[(18.8 \pm 10.4)\%]$ 甚至远不及对照组 $[(50.5 \pm 8.0)\%]$ 和低浓度组 $[(59.7 \pm 9.4)\%]$ 。这些结果表明,体外 CaSO_4 诱导的 MSCs 迁移与浓度依赖性相关,0.8 g/L 可以有效的促进迁移。

3 讨论

复杂化的社会生活带来了多样化的危险,也带了医疗新挑战,例如高速交通工具事故可能带来的多发性复杂骨损伤。骨损伤发生后,成骨诱导开始启动。成骨诱导是指内源或者外源的多能干细胞(主要是 MSCs)受到外在因素的调节,分化形成成骨细胞等骨祖细胞的过程,是细胞水平和分子水平的多阶段级联反应,包括细胞的趋化移动以及几轮的细胞增殖和分化。在重塑骨过程中,骨基质中常有大量的信号分子,这些可溶性信号形成的化学梯度创造了一个成骨诱导的微环境,促进骨祖细胞迁移进入骨再生区域。有研究^[10]表明, BMP-2、BMP-4、PDGF 及 TGF- β 等因子对 MSCs 迁移有促进作用。而 BMP 靶基因包括成骨细胞的转录因子如 Osterix、Runx2^[11]、Dlx3/5 和 Smad 蛋白家族^[12],均对成骨细胞的分化和迁移至关重要^[13],也和骨质疏松症等疾病的发生发展密切相关。MSCs 迁移是个复杂的多因素调控过程,对迁移有促进作用的因子

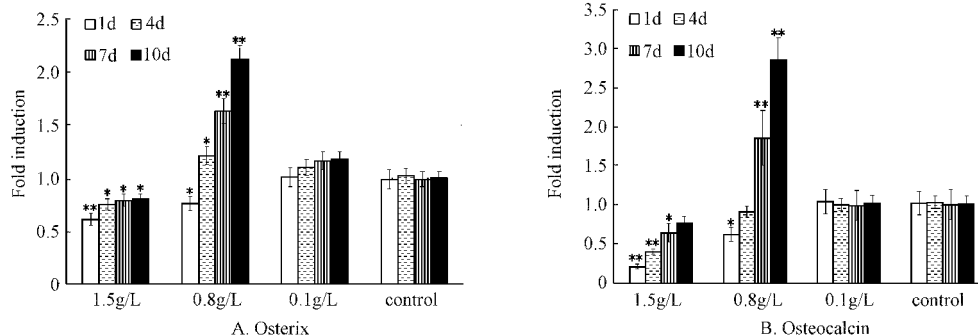


图2 不同浓度 CaSO_4 对 Osterix 因子和骨钙素表达的影响(与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Effects of CaSO_4 at different concentrations on Osterix factor and osteocalcin expression (compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

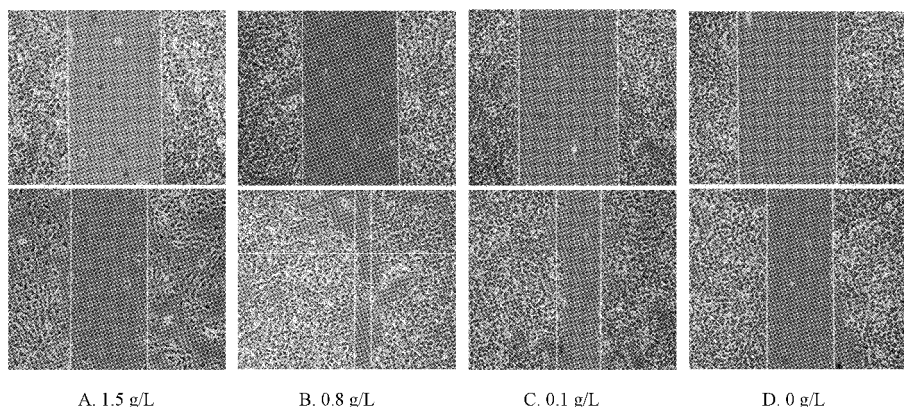


图 3 刮痕合拢实验检测 CaSO_4 对 MSCs 的迁移能力的影响 (每组上图为迁移前, 下图为迁移后)

Fig.3 Effects of CaSO_4 on the migration capacity of MSCs detected by wound healing assay (The images above are before the migration, and the images below are after the migration)

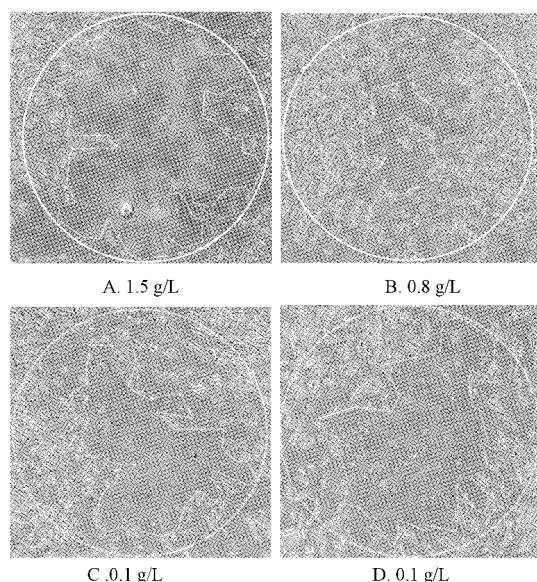


图 4 斑点实验检测 CaSO_4 对 MSCs 的迁移能力的影响

Fig.4 Effects of CaSO_4 on the migration capacity of MSCs detected by agarose spot experiment

还不止这些, 钙可能也是一个因素。

在前期实验中, 笔者将脱蛋白骨植入后, 其中释放的钙可能成为基质趋化因子, 引起 MSCs 定向迁移, 因此才能在没有附着细胞的脱蛋白骨支架上看到实验动物自身少量细胞迁移进去的现象^[7]。因此, 假设 CaSO_4 可以作为一个引导信号, 诱导正在成骨分化的细胞移动。 CaSO_4 是微溶的, 即使到饱和溶液, 其离子浓度也不大, 容易因吸收而变化。为此, 此次实验利用明胶作为钙结合剂, 提供一个钙持续释放的稳定环境。

实验中, 笔者首先评估了 CaSO_4 对 MSCs 增殖和分化的影响。中低浓度的 CaSO_4 对 MSCs 增殖没

有明显的影响, 但是中浓度的 CaSO_4 对 MSCs 分化产生了两相效应, 开始时短暂抑制分化, CaSO_4 在 1 d 内降低了 Osterix 的表达, 而骨钙素的表达量在 1~4 d 内均轻度降低; 随后是成骨基因表达的逐步增加, 经过 4~10 d 的培养后 Osterix 和骨钙素均增加, 提示 CaSO_4 促进了 MSCs 成骨分化。之后的细胞迁移实验表明 CaSO_4 有能力激发 MSCs 迁移, 而且 CaSO_4 浓度为 0.8 g/L 时效果最佳。另外笔者还观察到, 高浓度的 CaSO_4 干扰了 MSCs 迁移。这和另外一个现象相印证, 在受伤或炎症部位的细胞外液中含有高浓度的钙, 不利于成骨分化和迁移, 反而容易引起细胞凋亡^[14]。

本研究结果表明, 中浓度的 CaSO_4 可以诱导 MSCs 成骨相关基因表达, 可能促进干细胞的成骨分化, 同时促进细胞迁移, 强化祖细胞的招募, 有利于完成对骨损伤区的修复。 CaSO_4 支架有望成为无细胞的骨修复简易支架。而未开启成骨分化的 MSCs 的迁移显著低于分化细胞, 可能因为对趋化因子的反应较低。 Gonzalez 课题组的研究^[15] 也表明, 在以钙为主的生物材料或培养基中存在额外的钙离子, 会使 MSCs 增强成骨基因表达和成骨细胞分化, 与本研究结果一致。

【参 考 文 献】

- [1] Strocchi R, Orsini G, Iezzi G, et al. Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits [J]. J Oral Implantol, 2002, 28(6):273-278.
- [2] Kutkut A, Andreana S. Medical-grade calcium sulfate hemihydrate in clinical implant dentistry: a review [J]. J Long Term Eff Med Implants, 2010, 20(4):295-301.

(下转第 438 页)

- γ and $\text{TNF-}\alpha$ [J]. *Nat Med*, 2012, 17(12): 1594-1601.
- [17] 陈犹白, 陈聪慧, 韩岩, 等. 脂肪干细胞成骨分化的研究进展 [J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2016, 11(2): 126-134.
- [18] Agas L, Marchetti M, Capitani. The dual face of parathyroid hormone and prostaglandins in the osteoimmune system [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(10): E1185-E1194.
- [19] Raisz LG. Potential Impact of Selective Cyclooxygenase-2 inhibitors on bone metabolism in health and disease [J]. *Am J Med*, 2001, 110(3): 43-45.
- [20] Zhou Y, Boudreau DM, Freedman AN. Trends in the use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the general U. S. population [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Safety*, 2014, 23(1): 43-50.
- [21] Chen Q, Shou P, Zheng C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts [J]? *Cell Death Different*, 2016, 23(7): 1128-1139.
- [22] He G, Shi Y, Lim J, et al. Differential involvement of Wnt signaling in Bmp regulation of cancellous versus periosteal bone growth [J]. *Bone Res*, 2017, 5: 17016.
- [23] Strini T, Tilburg J, Westerhoff H, et al. Identification of Three Early Phases of Cell-Fate Determination during Osteogenic and Adipogenic Differentiation by Transcription Factor Dynamics [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 8(4): 947-960.
- [24] Xu X, Zheng L, Yuan Q, et al. Transforming growth factor-beta in stem cells and tissue homeostasis [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 2.
- [25] 熊燕琴, 周筠, 雷涛. 骨代谢信号通路的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(2): 200-204.
- [26] Liu H, Li W, Liu Y, et al. Co-administration of aspirin and allogeneic adipose-derived stromal cells attenuates bone loss in ovariectomized rats through the anti-inflammatory and chemotactic abilities of aspirin [J]. *Stem Cell Res Therap*, 2015, 6: 200.
- [27] Su YF, Yang SH, Lee YH, et al. Aspirin-induced inhibition of adipogenesis was p53-dependent and associated with inactivation of pentose phosphate pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014 (738): 101-110.
- [28] Zhan Y, He Z, Liu X, et al. Aspirin-induced attenuation of adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells is accompanied by the disturbed epigenetic modification [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 98: 29-42.
- (收稿日期: 2018-09-26; 修回日期: 2018-11-29)

(上接第 424 页)

- [3] Cho BC, Park JW, Baik BS, et al. Clinical application of injectable calcium sulfate on early bony consolidation in distraction osteogenesis for the treatment of craniofacial microsomia [J]. *J Craniofac Surg*, 2002, 13(3): 465-475.
- [4] Kelly CM, Wilkins RM. Treatment of benign bone lesions with an injectable calcium sulfate-based bone graft substitute [J]. *Orthopedics*, 2004, 27(Suppl 1): s131-s135.
- [5] Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics [J]. *Int J Nanomed*, 2006, 1(3): 317-332.
- [6] Walsh WR, Morberg P, Yu Y, et al. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 406: 228-236.
- [7] Jia L, Peng Z, Yu L, et al. Repair of bone defects in rat radii with a composite of allogeneic adipose-derived stem cells and heterogeneous deproteinized bone [J]. *Stem Cell Res Therap*, 2018, 9(1): 79.
- [8] Gamell C, Osses N, Bartrons R, et al. BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121 (Pt 23): 3960-3970.
- [9] Ahmed M, Basheer HA, Ayuso JM, et al. Agarose spot as a comparative method for in situ analysis of simultaneous chemotactic responses to multiple chemokines [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1075.
- [10] Gamell C, Susperregui AG, Bernard O, et al. The p38/MK2/Hsp25 pathway is required for BMP-2-induced cell migration [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16477.
- [11] 陈伟健, 晋大祥, 谢炜星, 等. Runx2 基因参与骨代谢相关通路的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(4): 556-560.
- [12] 陈伟健, 谢炜星, 温龙飞, 等. Smad 与骨质疏松症 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(8): 1100-1104.
- [13] Ulsamer A, Ortuño MJ, Ruizet S, et al. BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(7): 3816-3826.
- [14] Olszak IT, Poznansky MC, Evans RH, et al. Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(9): 1299-1305.
- [15] Gonzalez-Vazquez A, Planell JA, Engel E. Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(6): 2824-2833.
- (收稿日期: 2018-05-01; 修回日期: 2018-07-04)