

FGF-2 对人骨髓间充质干细胞增殖和向成骨细胞分化的影响

唐文洁^{1,2} 李玛琳¹ 邱垂源² 陈琼玉² 李国辉² 李凌松³ 洪岸^{2*}

(¹ 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650031; ² 暨南大学生物工程研究所, 广州 510632;

³ 北京大学干细胞研究中心, 北京 100083)

摘要 探讨体外培养条件下, 成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)和地塞米松(Dex)对第7代人骨髓间充质干细胞(MSCs)增殖和向成骨细胞分化的作用以及两者联合使用的效应。MSCs经含FGF-2或/和Dex的培养液作用后, 于不同时间采用MTT法测定细胞增殖情况; 对硝基苯磷酸(pNPP)法测定碱性磷酸酶(ALP)活性; ELISA法测定骨钙蛋白(OC)含量; 茜素红S染色法对沉积的钙盐进行染色。发现: (1) FGF-2组细胞的生长速度为对照组的1.31倍, Dex/FGF-2组细胞的生长速度为FGF-2组的1.12倍。(2) Dex组的ALP活性、OC含量和细胞外基质钙盐沉积分别为对照组的17.0倍、2.12倍和10.56倍, 并能形成成熟的羟基磷灰石(HA)结晶和骨结节; FGF-2组的ALP活性比对照组降低了76.7%, 虽然OC含量、钙盐沉积增加, 但不能形成成熟的HA结晶和骨结节; FGF-2对Dex诱导的ALP活性增加和HA结晶形成有拮抗作用。由此证明: (1) FGF-2可促进MSCs的增殖, Dex对MSCs的增殖无明显作用; Dex能增强FGF-2对MSCs的促增殖效应。(2) Dex可使MSCs分化为成熟的成骨细胞, 是一个有效的成骨细胞分化诱导剂; FGF-2可使MSCs分化为未成熟的成骨细胞; FGF-2拮抗Dex诱导MSCs分化为成熟的成骨细胞。

关键词 间充质干细胞; 成纤维细胞生长因子-2; 地塞米松; 增殖; 成骨细胞

组织、器官的丧失或功能障碍是人类健康所面临的主要危害之一, 也是人类疾病和死亡的最主要原因。例如由创伤、手术、骨病变和先天性疾病等引起的骨组织缺损, 严重影响了病人的生活质量, 并给社会和家庭带来了巨大的经济负担^[1]。上世纪80年代兴起的骨组织工程学为骨缺损修复提供了一个全新的思路和方法。一般来说, 组织工程的3个核心因素是: 干细胞或前体细胞、合适的生物支架以及生长因子^[2]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多潜能成体干细胞, 在人体发生、发育过程中存在于许多种组织中。目前, 不仅可从成人的骨髓、外周血、脂肪、皮肤、骨膜、滑膜、骨骼肌等组织中分离得到MSCs, 而且也能从脐血、胎盘、脐带等组织中获得。在体外特定条件下, 骨髓来源的MSCs可以扩增并且可以分化为骨、软骨、骨髓基质、肌腱、韧带、脂肪等多种结缔组织细胞以及骨骼肌细胞、神经细胞和神经胶质细胞等^[3-6]。而且, 不论是自体的还是同种异源的骨髓MSCs一般都不会引起宿主的免疫

反应^[6,7]。因此, 骨髓MSCs可用于治疗一些机体无法自然修复的组织细胞损伤, 可以作为组织工程的种子细胞。

骨组织工程需要应用具有一定功能特性的终末细胞——成骨细胞来构建组织工程化人工骨, 但由于骨髓MSCs为间充质前体细胞, 在体外不会自发分化, 因此必须将MSCs加以诱导使其分化为成熟的成骨细胞。构建组织工程化人工骨的另一个前提条件是要有足够的种子细胞, 然而在体外往往难以获得大量的MSCs(每 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个骨髓单个核细胞中仅有1个MSC), 而且随着传代次数的增加, 其增殖、分化能力下降, 甚至消失^[8]。研究者试图使用各种生长因子和激素来解决上述问题。本实验选择了影响MSCs增殖和分化为成骨细胞的两个重要因子——成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)和地

收稿日期: 2005-05-13 接受日期: 2005-06-21

国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(No.2001CB510106)

* 通讯作者。Tel: 020-85220220, Fax: 020-85226616, E-mail:

ojds@jnu.edu.cn

塞米松(Dex)作为主要研究因素,进一步深入研究它们对第7代人骨髓MSCs增殖和向成骨细胞分化的作用以及两者联合使用的效应。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨髓间充质干细胞(北京大学干细胞研究中心提供),重组人FGF-2(暨南大学生物工程研究所研发,蛋白质纯度 $\geq 95\%$,约 1.0×10^6 U/mg),MEM α 培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素、链霉素、两性霉素B、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶(Gibco BRL),Dex、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸、茜素红S、对硝基苯磷酸(pNPP)、考马斯亮蓝G-250(Sigma),二甲苯噻唑二苯基四唑溴盐(MD Bio),人骨钙蛋白ELISA试剂盒(DSL),其他试剂均为国产分析纯级别。

生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司, HFsafe-1200),倒置相差显微镜(Nikon, TS100),数码相机(Nikon, COOLPIX 4500),CO₂培养箱(Heraeus, BB16UV/BB5060UV),紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司, UV-7504),酶标板自动读数仪(上海雷勃分析仪器有限公司, Multiskan Mk3),一次性25 cm₂培养瓶、24孔培养板、96孔酶标板(Nunc),浓缩离心管(Sartorius, Vivaspin-2),超声匀浆器(Cole Parmer, CP50)。

1.2 方法

1.2.1 改良MTT法测定MSCs增殖情况 取培养于MEM α 生长培养液(含10% FBS、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素、0.25 μ g/ml两性霉素B和2 mmol/L L-谷氨酰胺)中的处于指数生长期的第7代人骨髓MSCs接种于24孔培养板,每孔 5×10^3 个细胞。将细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,待细胞充分贴壁(约12 h)后分四组换液(第1天),每组3复孔。1组(对照组)为生长培养液,2~4组为生长培养液分别含有 10^{-7} mol/L Dex、20 ng/ml FGF-2、20 ng/ml FGF-2和 10^{-7} mol/L Dex。分别于第2、第3、第5和第7天取出一块24孔培养板,应用改良MTT法^[9],于酶标仪570 nm波长下测定光吸收值(A),取两次数值的平均值代表每孔的A₅₇₀,反映各孔的细胞数。

1.2.2 测定碱性磷酸酶(ALP)活性和矿化结节染色

每孔 2×10^4 个第7代人骨髓MSCs接种于24孔培养板,于细胞汇合率为50~70%时(第1天),1组

(对照组)换为含10 mmol/L β -甘油磷酸钠、0.25 mmol/L抗坏血酸的生长培养液,2~4组分别在1组液体中添加Dex、FGF-2、Dex/FGF-2,浓度同前。每组3复孔,每3~4天换液。于第14天取出一块24孔培养板,PBS(pH 7.2)洗涤2~3次,每孔200 μ l 0.05% Triton X-100 4 $^{\circ}$ C过夜,于第2天收集细胞,超声破碎。用pNPP法^[10]测定样品的ALP活性,以A₄₀₅表示,同时用Brandford检测法^[11]测定样品的总蛋白浓度(mg/ml)对A₄₀₅值进行校正(A')。第21天,根据文献[12]的方法用茜素红S(pH 4.1)对细胞进行染色,倒置相差显微镜下观察并拍照。每孔随机取6点,用图像分析软件Simple PCI(Compix, Inc.)计算矿化率,矿化率=(染色阳性面积/总面积) $\times 100\%$,取均值进行统计分析。

1.2.3 测定骨钙蛋白(OC)含量 第7代人骨髓MSCs接种于12个25 cm²培养瓶,每瓶 2×10^5 个细胞,按方法1.2.2分4组换液。于第14天收集培养液,每样品经浓缩离心管浓缩10倍后,按说明书操作,测定样品中OC含量(ng/ml)。

1.2.4 统计分析 实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用两样本均数t检验(Student's t-test),应用SPSS 12.0统计软件进行处理。

2 结果

2.1 FGF-2对第7代人骨髓MSCs增殖的影响

从表1可以看出,各时间点FGF-2组、Dex/FGF-2组的平均细胞数与对照组比较,有显著性差异($P < 0.01$);各时间点Dex/FGF-2组的平均细胞数与FGF-2组比较,也有显著性差异($P < 0.01$);各时间点Dex组的平均细胞数与对照组比较,没有显著性差异($P > 0.05$)。当细胞全汇合时(第7天),FGF-2组的平均细胞数为对照组的1.31倍,Dex/FGF-2组的平均细胞数为对照组的1.47倍,为FGF-2组的1.12倍。说明在最初低细胞密度(2.5×10^3 个/cm²)培养条件下,FGF-2(20 ng/ml)可以提高MSCs的生长速度,而单独应用Dex(10^{-7} mol/L)对MSCs的增殖无明显影响,联合应用FGF-2(20 ng/ml)和Dex(10^{-7} mol/L)表现出比单独应用FGF-2更强的促增殖能力。

2.2 人骨髓MSCs经各种成骨细胞诱导剂诱导第14天的ALP活性

根据表2,Dex组、Dex/FGF-2组细胞的ALP活性分别为对照组的17.0倍和3.15倍($P < 0.01$);FGF-2组细胞的ALP活性比对照组降低了76.7%($P < 0.01$);

表1 第7代人骨髓MSCs经 FGF-2 或 / 和 Dex 作用后各时间 MTT 法测定的 A_{570} ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | A_{570} | | | |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 第2天 | 第3天 | 第5天 | 第7天 |
| 对照 | 0.108 ± 0.0073 | 0.194 ± 0.0060 | 0.455 ± 0.0196 | 0.777 ± 0.0123 |
| Dex | 0.116 ± 0.0083 | 0.206 ± 0.0063 | 0.438 ± 0.0145 | 0.751 ± 0.0148 |
| FGF-2 | 0.140 ± 0.0065* | 0.322 ± 0.0149* | 0.572 ± 0.0110* | 1.017 ± 0.0233* |
| Dex/FGF-2 | 0.181 ± 0.0081** | 0.411 ± 0.0061** | 0.757 ± 0.0283** | 1.139 ± 0.0473** |

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 FGF-2 组比较, ** $P < 0.01$ ($\alpha = 0.01$, $n = 3$)。

表2 第7代人骨髓MSCs经 FGF-2 或 / 和 Dex 作用后第14天的 ALP 活性和 OC 含量、第21天的矿化率($\bar{x} \pm s$)

| 测定指标 | 处理因素 | | | |
|--------------|----------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| | 对照 | Dex | FGF-2 | Dex/FGF-2 |
| ALP 活性(A') | 0.262 ± 0.012 | 4.446 ± 0.106* | 0.061 ± 0.005* | 0.824 ± 0.051** Δ |
| OC 含量(ng/ml) | 19.333 ± 2.167 | 41.056 ± 1.110* | 60.944 ± 3.310** Δ | 58.389 ± 0.948** Δ |
| 矿化率(%) | 0.555 ± 0.075 | 5.861 ± 0.384* | 3.226 ± 0.425* | 2.177 ± 0.248** Δ |

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 Dex 组比较, $\Delta P < 0.01$ ($\alpha = 0.01$, $n = 3$)。

Dex/FGF-2 组细胞的 ALP 活性比 Dex 组降低了 81.5% ($P < 0.01$)。说明在诱导 MSCs 向成骨细胞分化过程中, Dex 可以提高 ALP 的活性, 而 FGF-2 降低 ALP 的活性(几乎不表达), 并使 Dex 的作用明显减弱。

2.3 人骨髓 MSCs 经各种成骨细胞诱导剂诱导后第 14 天的 OC 含量

根据表 2, Dex 组、FGF-2 组、Dex/FGF-2 组细胞培养液的 OC 含量分别为对照组的 2.12 倍、3.15 倍和 3.02 倍 ($P < 0.01$); FGF-2 组、Dex/FGF-2 组细胞培养液的 OC 含量分别为 Dex 组的 1.48 倍和 1.42 倍 ($P < 0.01$); Dex/FGF-2 组与 FGF-2 组细胞培养液的 OC 含量比较, 没有显著性差异 ($P > 0.05$)。说明在诱导人骨髓 MSCs 向成骨细胞分化过程中, Dex 和 FGF-2 都可以促进细胞分泌 OC, 且 FGF-2 的作用更强, 联合使用 Dex 与 FGF-2 并没有增强 FGF-2 的作用。

2.4 人骨髓 MSCs 经各种成骨细胞诱导剂诱导后第 21 天的矿化结节染色情况

第 7 代人骨髓 MSCs 经各种成骨细胞诱导剂诱导后第 21 天的矿化结节染色情况为: 对照组只有极少量红色的钙盐沉积(图 1- 对照组); Dex 组有许多红色的钙盐沉积, 钙盐颗粒颜色较深, 立体感较强, 均有较好的折光性, 说明是由成熟的羟基磷灰石(HA)结晶参与构成的骨结节(图 1-Dex 组); FGF-2 组也有较多的钙盐沉积, 但是钙盐颗粒较 Dex 组小, 颜色较浅, 立体感和折光性均较差, 疏松地结合于细胞外基质(轻轻摇动培养板, 颗粒颤动明显), 说明是一些无定形的颗粒而不是成熟的 HA 结晶(图 1-FGF-2 组); Dex/FGF-2 组钙盐颗粒的状态介于 Dex 组和

FGF-2 组之间(图 1-Dex/FGF-2 组)。用图像分析软件 Simple PCI 计算各组细胞的平均矿化率, 根据表 2, Dex 组、FGF-2 组、Dex/FGF-2 组细胞的矿化率分别为对照组的 10.56 倍、5.81 倍和 3.92 倍 ($P < 0.01$); Dex/FGF-2 组细胞的矿化率明显低于 Dex 组, 比 Dex 组减少了 62.9% ($P < 0.01$)。

综合分析, 在诱导人骨髓 MSCs 向成骨细胞分化过程中, Dex 和 FGF-2 都可以增加细胞外基质钙盐沉积, 但只有 Dex 能使 MSCs 形成成熟的 HA 结晶, 而 FGF-2 只能使 MSCs 形成一些无定形的颗粒, 联合应用 Dex 和 FGF-2, FGF-2 对 Dex 诱导的 HA 结晶形成有拮抗作用。

3 讨论

骨由胚胎时期的间充质发生, 骨形成有两种方式, 即膜内成骨和软骨内成骨。不论是那种方式, 骨组织形成的基本过程是一致的, 即先有间充质细胞的增殖和密集, 然后逐步分化为成骨细胞, 成骨细胞分泌类骨质, 并被包埋其中, 成为骨细胞, 继而类骨质钙化成骨基质, 于是形成骨组织。骨折修复过程同样也包括膜内成骨和软骨内成骨。可见成骨细胞在骨的发生、发育和修复中处于核心地位, 因而也是骨组织工程的关键细胞。成骨细胞的组织来源主要有骨髓、骨膜及颅顶骨、髂骨等的骨松质。其中, 骨髓来源的 MSCs 具有取材方便、创伤性较小的优势, 而且具有较强的增殖能力和多分化潜能, 因此骨髓 MSCs 成为最受重视的骨组织工程的种子细胞^[13]。

FGF-2 是成纤维细胞因子家族的一员。实验显

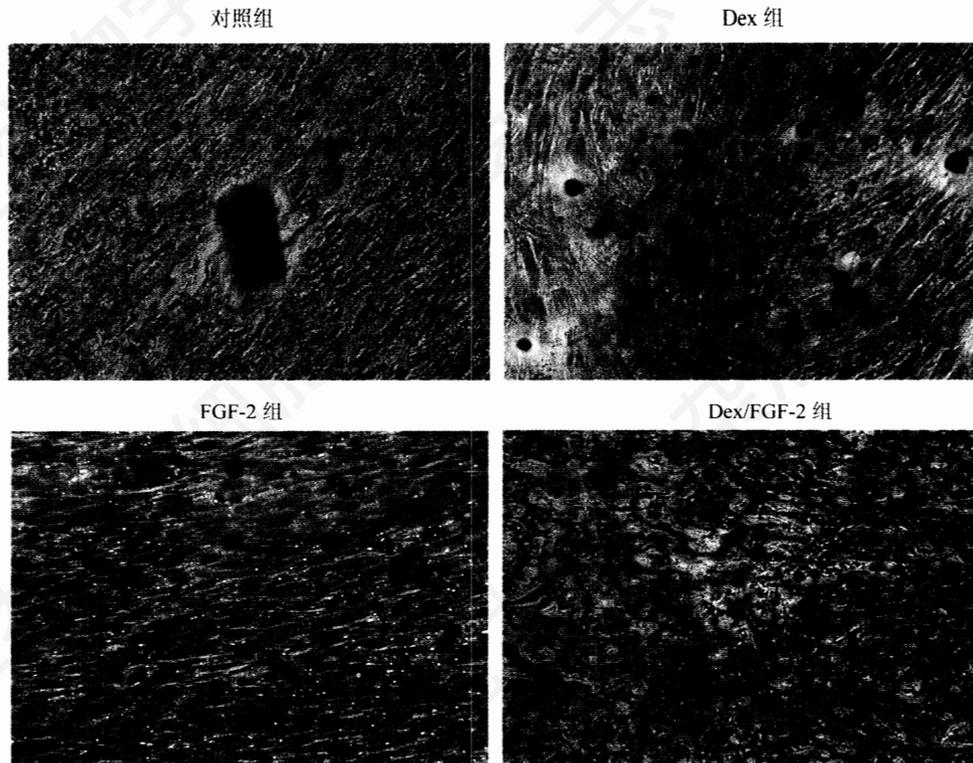


图1 第7代人骨髓 MSCs 经 FGF-2 或 / 和 Dex 诱导后第 21 天的矿化结节茜素红 S 染色(200 ×)

示, FGF-2 是一个有效的促细胞分裂剂, 可增加人骨髓 MSCs 的体外增殖能力, 获得更多的细胞数量, 这种作用在低细胞密度时更明显。另外, FGF-2 也可维持 MSCs 的体外多分化潜能^[14-17]。体外研究发现, 联合应用 1 ng/ml rhFGF-2 (Austral Biologicals 公司) 和 10^{-8} mol/L Dex, 表现出比单用 FGF-2 更好的促第 1 代人骨髓 MSCs 增殖的作用^[15]。本实验显示, 起始低细胞密度(2 500 个/cm²)培养, 大约在 0.1~80 ng/ml 浓度范围内, FGF-2 可以提高第 7 代人骨髓 MSCs 的生长速度, 且呈剂量依赖性(结果中未标明), 联合应用 20 ng/ml FGF-2 和 10^{-7} mol/L Dex 也能出现协同效应。

在生长培养液中添加一定浓度范围的 Dex、 β -甘油磷酸钠和抗坏血酸(成骨添加剂, OS)可以使人骨髓 MSCs 分化为成骨细胞^[18,19]。Dex 是一个人工合成的糖皮质激素, 可有效地调节细胞生长和分化^[20], 并可以促进人骨髓 MSCs 体外分化为成骨细胞^[21], 可以用作一个阳性对照品来研究其他生长因子或激素等对 MSCs 向成骨细胞分化的影响^[12]。 β -甘油磷酸钠能为 MSCs 提供磷酸根成分, 促进生理性钙盐沉积, 促进钙化。抗坏血酸为 MSCs 合成 I 型胶原所必需, 而 I 型胶原是钙盐沉积和细胞附着的支

架; 抗坏血酸还调节 MSCs 的 ALP 活性和蛋白质合成^[13]。本实验应用添加 OS 的生长培养液作为阳性对照组(Dex 组)。我们在早期实验中发现, 在 Dex 诱导人骨髓 MSCs 向成骨细胞分化的第 14 天左右, 成骨细胞已处于钙化期, 既有较高的 ALP 活性, 又有一定程度的 OC 分泌; 而第 21 天左右, 矿化结节成熟, 但此时 ALP 活性已有所降低。因此, 实验中采用测定诱导第 14 天各组细胞的 ALP 活性和 OC 含量, 作为成骨细胞的鉴定指标和功能状态的评价指标; 应用茜素红 S 对诱导第 21 天各组 MSCs 的细胞外基质的矿化结节进行染色, 倒置相差显微镜下观察并计算矿化率, 判断矿化结节的成熟度。进而探讨 FGF-2 以及联合应用 FGF-2 和 Dex 对 MSCs 向成骨细胞分化的影响。实验结果表明, Dex 和 FGF-2 都可以增加 OC 分泌和细胞外基质钙盐沉积, 但只有 Dex 能增加 ALP 活性和使矿化结节在分化末期成熟。说明 ALP 活性和 / 或 OC 分泌的增加都可促使人骨髓 MSCs 向成骨细胞分化, 而高活性的 ALP 在矿化结节成熟过程中具有主要作用。如果仅有较高的 OC 分泌而无 ALP 活性, MSCs 的细胞外基质中只有无定形的钙盐沉积, 不能形成成熟的 HA 结晶和骨结节, 成骨细胞只能处于未成熟的前体细胞状

态。Chaudhary 等^[12]的研究也表明, FGF-2 降低 ALP 活性, 刺激人骨髓 MSCs 细胞外基质无定形的钙盐沉积, 但不能形成成熟的 HA 结晶。另外, 他们证明 FGF-2 能拮抗 BMP-7 诱导的 ALP 活性增加和 HA 形成, 而我们的结果显示, FGF-2 对 Dex 诱导的 ALP 活性增加和 HA 形成同样有拮抗作用。

增殖和分化是细胞生活周期中两个最基本的, 又是“矛盾”的过程。为了获得新的细胞表型, 未分化的人骨髓 MSCs 必须经过增殖和分化的改变。促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径可能是一个调节人骨髓 MSCs 增殖和分化的有效信号转导通路。细胞外信号调节激酶(ERK)是第一个被发现的 MAPK 家族的成员, 可由某些细胞因子通过 Ras 依赖的信号转导通路而激活。细胞的分化需要 ERK 持续的激活, 而短暂激活 ERK 导致细胞增殖^[20]。Dex 和 FGF-2 都可通过激活 MEK(MAPK / ERKK)使 ERK1 和 ERK2 磷酸化而具有活性, 但 Dex 单独存在并不能刺激人骨髓 MSCs 分裂^[20,22]。FGF-2 和 Dex 都可激活 ERK, 因此联合应用表现出比单独应用 FGF-2 更强的促 MSCs 增殖能力。Dex 可以持续激活 ERK^[20], 可能通过进一步激活 Runt 相关转录因子 2(Runx2)和 Osterix 转录因子(Osx)而使人骨髓 MSCs 分化为成熟的成骨细胞^[23,24]。在 MSCs 分化的末期, FGF-2 只能使成骨细胞处于未成熟的前体细胞状态, 这可能是由于 FGF-2 使 Runx2 过度表达, 反而不能使成骨细胞进一步分化成熟^[22]。Dex 和 FGF-2 虽然作用于同一信号转导通路, 但它们可能通过不同的转录因子(蛋白质-蛋白质)间或蛋白质-DNA 间的相互作用, 而使不同基因具有不同的表达活性和表达时

间。这些问题值得我们进一步研究。

总之, 在人骨髓 MSCs 体外增殖过程中, 起始低细胞密度培养, 早期、联合使用适当浓度的 FGF-2 和 Dex, 可以获得更多的人骨髓 MSCs; 在人骨髓 MSCs 向成骨细胞分化过程中, 早期可联合使用适当浓度的 FGF-2 和 Dex, 然后应及时去除 FGF-2, 以免影响成骨细胞分化成熟。

参考文献 (References)

- [1] Chapekar MS. *J Biomed Mater Res*, 2000, **53**: 617
- [2] Rose FR et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292**: 1
- [3] Reyes M et al. *Blood*, 2001, **98**: 2615
- [4] Caplan AI et al. *Trends Mol Med*, 2001, **7**: 259
- [5] Dennis JE et al. *Stem Cells*, 2002, **20**: 205
- [6] Barry FP et al. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**: 568
- [7] Baksh D et al. *J Cell Mol Med*, 2004, **8**: 301
- [8] Zimmermann S et al. *Leukemia*, 2003, **17**: 1146
- [9] Denizot F et al. *J Immunol Methods*, 1986, **89**: 271
- [10] 李德华等. *实用口腔医学杂志*, 1997, **13**: 21
- [11] 汪家政等. *蛋白质技术手册*, 北京: 科学出版社, 2000, 42
- [12] Chaudhary LR et al. *Bone*, 2004, **34**: 402
- [13] 杨志明. *组织工程基础与临床*, 成都: 四川科技出版社, 2000, 124
- [14] Martin I et al. *Endocrinology*, 1997, **138**: 4456
- [15] Muraglia A et al. *Bone*, 1998, **22**: 131S
- [16] Banfi A et al. *Exp Hematol*, 2000, **28**: 707
- [17] Bianchi G et al. *Exp Cell Res*, 2003, **287**: 98
- [18] Jaiswal N et al. *J Cell Biochem*, 1997, **64**: 295
- [19] Pittenger MF et al. *Science*, 1999, **284**: 143
- [20] Jaiswal RK et al. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 9645
- [21] Cheng SL et al. *Endocrinology*, 1994, **134**: 277
- [22] Nakashima K et al. *Trends Genet*, 2003, **19**: 458
- [23] Franceschi RT et al. *J Cell Biochem*, 2003, **88**: 446
- [24] Nakashima K et al. *Cell*, 2002, **108**: 17

Effects of FGF-2 on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of the Adult Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow

Wen-Jie Tang^{1,2}, Ma-Lin Li¹, Chui-Yuan Qiu², Qiong-Yu Chen², Guo-Hui Li, Ling-Song Li³, An Hong^{2*}

¹Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming 650031, China;

²Bioengineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China;

³The Centre of Stem Cell Research, University of Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract To study the effects of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and/or dexamethasone (Dex) on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) from passage 7 (P7) *in vitro*. Following the treatment with different mediums containing FGF-2 and/or Dex *in vitro*, the proliferation

of human bone marrow MSCs (from P7) was evaluated via MTT assay; for osteogenic differentiation, the alkaline phosphatase (ALP) activity was determined by biochemical colorimetric assay with *p*NPP, and the contents of osteocalcin (OC) was detected by ELISA assay at different times, and then the assay of extracellular matrix mineralization was based on the detection of calcium mineral deposition using alizarin red S staining. When MSCs of P7 were cultured at low-cell-density *in vitro*, the growth rate of MSCs was 1.31-fold higher in the cultures treated with FGF-2 as compared to that of control at confluence. The growth rate of MSCs in the cultures treated with Dex/FGF-2 increased 1.47-fold or 1.12-fold respectively compared to that of control or FGF-2 treated cultures. The growth rate of MSCs did not alter obviously in the cultures treated with Dex alone. Under osteogenic differentiation culture conditions, the treatment with Dex increased the ALP activity (17.0-fold), and OC contents (2.12-fold) of MSCs. Alizarin red S staining of cells indicated that Dex enhanced calcium mineral deposition in extracellular matrix (10.56-fold) and could mature mineral deposition into hydroxyapatite (HA) crystal and bone-like nodules. FGF-2 treatment decreased ALP activity (76.7%), increased OC contents and calcium mineral deposition of MSCs. In the treatment of FGF-2 alone, the MSCs formed amorphous calcium mineral deposition and failed to mature into HA crystal and bone-like nodules. Thus, FGF-2 antagonized the induction of Dex on the ALP and HA crystal formation of MSCs. Results suggest that FGF-2 increases the proliferation potential of MSCs while Dex alone has not this effect. The combination of FGF-2 and Dex increases the proliferation potential at a level much higher than the FGF-2 alone. Dex can introduce MSCs into mature osteoblast as a potent osteogenic inducer. FGF-2 can also stimulates the osteogenic differentiation of MSCs, but the differentiated cells remain in immature state. FGF-2 antagonists the effect of inducing mature osteocytes by Dex.

Key words mesenchymal stem cells; fibroblast growth factor-2; dexamethasone; proliferation; osteoblast

Received: May 13, 2005 Accepted: June 21, 2005

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2001CB510106)

*Corresponding author. Tel: 86-20-85220220, Fax: 86-20-85226616, E-mail: ojs@jnu.edu.cn