

矿化液和地塞米松增强大鼠原代骨髓基质细胞 NF- κ B 受体活化剂配体的表达

刘丽* 张晓聪 张烈焚 张李明

(浙江大学医学院附属口腔医院, 杭州 310006)

摘要 NF- κ B 受体活化剂配体(receptor activator for NF- κ B ligand, RANKL)是调节破骨细胞生成的重要因子, 它可在骨髓基质细胞中表达。矿化液(含 10^{-8} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/ml L-抗坏血酸)能够诱导骨髓基质细胞向成骨细胞分化, 为探讨矿化液及其主要成分地塞米松对大鼠原代骨髓基质细胞表达 RANKL 的影响, 采用矿化液培养原代大鼠骨髓基质细胞 48 h, 通过免疫荧光染色观察 RANKL 的表达变化。结果显示矿化液和地塞米松在短期内均能增强鼠骨髓基质细胞 RANKL 的表达, 提示地塞米松促进破骨细胞形成的分子机制可能与骨髓基质细胞 RANKL 表达的改变密切相关。

关键词 矿化液; 地塞米松; 骨髓基质细胞; NF- κ B 受体活化剂配体

NF- κ B 受体活化剂配体(receptor activator for NF- κ B ligand, RANKL)又称骨保护素配体(osteoprotegerin ligand, OPGL), 是一种调节骨代谢的重要因子, 主要表达在成骨细胞、骨髓基质细胞以及胸腺、淋巴结和脾组织中。研究证明, RANKL 能够促进破骨细胞的分化、成熟和活化^[1,2]。在巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)存在的前提下, RANKL 与破骨细胞前体上的肿瘤坏死因子超家族成员 RANK 膜蛋白结合, 促进破骨细胞的分化和成熟^[3]。体外培养已经证实, 成骨/基质细胞在破骨细胞分化中起重要作用, 矿化液(含 10^{-8} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/ml L-抗坏血酸)能够诱导大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞分化^[4,5]。矿化液中主要成分是地塞米松, 地塞米松长期使用能够促进破骨细胞的形成和骨质吸收。而矿化液、地塞米松和骨髓基质细胞表达 RANKL 的关系尚不明了。

本实验通过免疫荧光技术, 观察原代大鼠骨髓基质细胞经矿化液培养 48 h 后, 表达 RANKL 的变化, 从而明确矿化液和地塞米松对鼠骨髓基质细胞表达 RANKL 的作用, 进一步探讨矿化液和地塞米松对破骨细胞形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 α MEM 培养基(Gibco BRL), 清洁级

SD 大鼠(浙江大学医学院动物中心), 胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程公司), 山羊抗鼠 RANKL 多克隆抗体(Santa Cruz), 兔抗山羊 IgG-FITC (华美生物工程公司), 兔血清(北京中山), PI(Sigma), 地塞米松(dexamethasone, Sigma), β -甘油磷酸钠(Na- β -glycerophosphate, Sigma), L-抗坏血酸(L-ascorbic acid, Sigma), 矿化液(含 80% α MEM、20% 胎牛血清、 10^{-8} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/ml L-抗坏血酸)。

1.1.2 主要仪器 分光光度计(Bio-Rad), 恒温摇床(Forma), 细胞培养箱(Forma), 激光共聚焦显微镜(Leica TCS-SP)。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠骨髓基质细胞培养^[5] 颈椎脱臼法处死 2 只 120 g 左右雄性 SD 大鼠后, 无菌条件下取出大鼠股骨和胫骨, 剪去两端骨髓, 用针筒吸取含 20% 胎牛血清的 α MEM 培养基反复冲洗骨髓腔, 将细胞悬液吹打均匀, 接种于直径 60 mm 的塑料培养皿, 常规条件下培养。一般 7~9 天后细胞铺满底壁, 用反复传代法纯化鼠骨髓基质细胞, 细胞传至第三代时备用。

收稿日期: 2005-01-20 接受日期: 2005-08-08

国家自然科学基金资助项目(No.30271427)

*通讯作者: Tel: 0571-87217225, Fax: 0571-87217433, E-mail:

LL225@zju.edu.cn, YJING@mail.hz.zj.cn

1.2.2 Gomori钙钴法碱性磷酸酶染色 将无菌玻片放入培养皿，待第三代大鼠骨髓基质细胞接近汇合时取出，冷丙酮固定10 min。在含 β -甘油磷酸钠、巴比妥钠、 CaCl_2 、 MgSO_4 的温育液中温育5 h。分别在2%硝酸钴和1%硫化铵中浸泡3~5 min，苏木素复染，自然干燥后封固、摄片。

1.2.3 细胞处理、免疫荧光染色及激光共聚焦检测



图1 原代大鼠骨髓基质细胞倒置相差显微镜照片(40 \times)



图2 第三代大鼠骨髓基质细胞倒置相差显微镜照片(40 \times)

将接近汇合的第三代骨髓基质细胞消化传代，以 5×10^4 个/ cm^2 的密度接种于放有盖玻片的平皿中，将细胞分成两组。两组细胞传代24 h后分别换液，对照组用常规培养液培养，矿化液组用矿化液培养，细胞处理48 h后取出，进行免疫荧光染色，标本在激光共聚焦显微镜下观察、摄片。

1.2.4 统计方法 在激光共聚焦荧光显微镜下，随机选取矿化液组和对照组各10个视野，计算出每个视野荧光强度的平均值，采用独立样本的 t 检验比较两组荧光强度的差异。

1.2.5 地塞米松对鼠骨髓基质细胞系PA6表达RANKL的影响 将鼠骨髓基质细胞系PA6细胞以 5×10^4 个/ cm^2 密度接种于塑料培养瓶中，随机分成对照组和地塞米松培养组。对照组以含10%FBS的 α MEM培养基培养，地塞米松培养组在上述培养液中加 10^{-8} mol/L地塞米松。两组细胞处理72 h，制备细胞蛋白质样品并定量，SDS-PAGE电泳，蛋

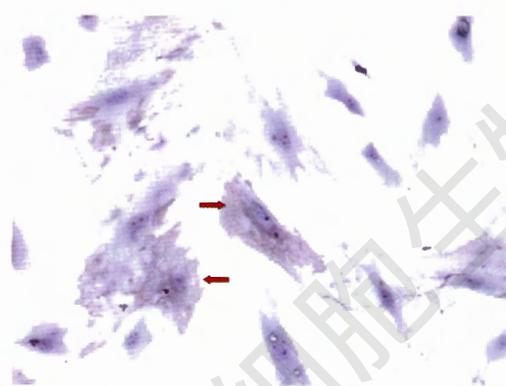


图3 原代大鼠骨髓基质细胞碱性磷酸酶染色(100 \times)

图中箭头所指为原代大鼠骨髓基质细胞中部分细胞胞质内有灰黑色颗粒。

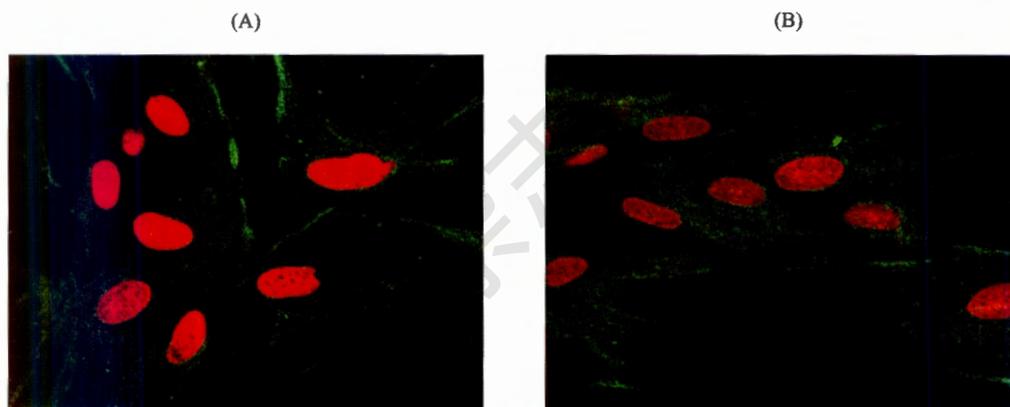


图4 激光共聚焦显微镜原代大鼠骨髓基质细胞观察(300 \times)

绿色染RANKL，红色染细胞核。A：常规培养48 h后的大鼠骨髓基质细胞；B：矿化液培养48 h后的大鼠骨髓基质细胞。

表 1 对照组和矿化液组荧光强度均值的统计量表

组别	样本数	平均值	标准差
对照组	10	35.26	9.43
矿化液组	10	59.73	19.00

$t=3.649$, $P<0.01$, 两组差异显著。

白质印迹转移, Western 印迹分析。

2 结果

2.1 原代大鼠骨髓基质细胞培养

原代鼠骨髓基质细胞生长缓慢, 细胞形态为纺锤形或成纤维样, 单核, 核圆形或卵圆形。原代培养第 9 天时, 细胞形态较均匀, 接近汇合, 部分区域呈集落样生长(图 1)。

经多次传代, 传至第三代时, 混杂的细胞明显减少, 细胞类型趋向一致, 细胞增殖活跃(图 2)。

2.2 Gomori 钙钴法碱性磷酸酶染色

用 Gomori 钙钴法将第三代大鼠骨髓基质细胞进行碱性磷酸酶染色, 显示大部分细胞呈阴性, 小部分细胞胞质内有灰黑色颗粒(图 3)。

2.3 免疫荧光染色及激光共聚焦检测

第三代骨髓基质细胞常规培养 48 h 后, 免疫荧光染色发现 RANKL 在细胞浆和细胞膜上都有表达(图 4A)。而用矿化液培养 48 h 后, RANKL 表达较对照组明显增强(图 4B)。

2.4 统计

对照组和矿化液组荧光强度的均值采用独立样本的 t 检验, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 骨髓基质细胞的特性

骨髓基质细胞为骨组织微环境中较原始的未分化细胞, 具有较强的增殖能力和分化潜能。在适当条件下, 骨髓基质细胞可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞等^[6]。分离骨髓基质细胞的常用方法有的贴壁培养法和密度梯度离心法。本实验采用贴壁培养法分离出的细胞, 胞体较小, 呈纺锤形或成纤维样, 单核, 核卵圆形, 有集落样生长趋势, 传三代后细胞增殖活跃。碱性磷酸酶是成熟成骨细胞的标志, 传代后的细胞经碱性磷酸酶染色, 大部分细胞呈阴性, 有小部分细胞呈弱阳性, 说明原代骨髓基质细胞中这部分细胞具有成骨细胞表型, 经适当诱导后能分化为成骨细胞。本实验

结果均符合骨髓基质细胞的特性。

用贴壁培养法获得的原代大鼠骨髓基质细胞, 刚开始细胞较混杂, 有骨髓基质细胞、造血干细胞等, 经反复换液和传代, 逐步换去不贴壁的细胞以及部分上皮细胞, 到第三、四代的骨髓基质细胞, 细胞已基本上得到纯化, 同时其增殖能力和对外界因子的敏感度也达到较好的状态。随着传代数的增多, 细胞将逐渐走向衰弱。为了尽量减少影响实验的外界因素, 增强实验的可靠性, 本实验统一使用了第三代骨髓基质细胞。

3.2 矿化液的成分和作用

矿化液中主要成分是地塞米松、L- 抗坏血酸和 β - 甘油磷酸钠。研究证实, 器官和组织培养中, 骨样细胞外基质的形成和矿化需要 L- 抗坏血酸和 β - 甘油磷酸钠。 β - 甘油磷酸钠作为一种有机磷酸, 提供磷酸根离子; L- 抗坏血酸是体外胶原和骨形成的需要, 抗坏血酸还可以调节 ATP 酶形成、碱性磷酸酶活性和蛋白质合成; 地塞米松能够诱导骨髓基质细胞向成骨细胞分化和骨基质的矿化。

矿化液作用于原代骨髓基质细胞后, 细胞的碱性磷酸酶表达逐渐增强并向成骨细胞分化, 作用较长时间后可形成矿化结节。前成骨细胞在向成骨细胞分化的过程中, 既有形成骨质的功能, 又能促进破骨细胞的形成。Atkin 等^[7]研究了不同成熟程度的人成骨细胞在地塞米松作用下, 前成骨细胞标志 STRO-1、成熟成骨细胞标志碱性磷酸酶以及和破骨细胞形成密切相关的 RANKL 和骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 四者的表达情况, 结果显示, 地塞米松能促进碱性磷酸酶阳性细胞的增殖, 使成骨细胞分化成熟; 地塞米松对成骨细胞 RANKL mRNA 表达无影响, 但能降低成骨细胞 OPG mRNA 的表达; RANKL mRNA 在成熟成骨细胞中表达较低, 而在未成熟成骨细胞中表达水平较高。

本实验对原代骨髓基质细胞经矿化液处理两天后, 免疫荧光染色发现对照组和矿化液组 RANKL 在细胞浆和细胞膜上都有表达, 而矿化液组荧光强度较对照组明显增强, 经独立样本的 t 检验, 差异有显著性, 说明矿化液能够增强原代骨髓基质细胞 RANKL 的表达。

有关矿化液中的不同成分单独对基质细胞 RANKL 表达的影响国内外研究较少。Otsuka 等^[8]用鼠骨髓细胞和 ST2 骨髓基质细胞共培养体系培养 TRAP 阳性破骨样细胞, 研究发现抗坏血酸能显著

增加ST2细胞的RANKL mRNA水平,而mRNA的半衰期则不受影响。同时,实验结果显示,在所研究的共培养体系中,抗坏血酸可能是通过诱导RANKL的合成以促进TRAP阳性的破骨样细胞形成。

糖皮质激素的长期使用会导致骨代谢失调和骨质疏松,其具体的分子机制是目前研究的热点,但是目前激素直接对骨髓基质细胞RANKL表达的影响研究较少。本实验直接以地塞米松处理PA6骨髓基质细胞三天,结果显示(数据未列入实验结果中),与对照组相比,地塞米松组骨髓基质细胞RANKL的表达增强。因此推测,糖皮质激素导致的骨质吸收的分子机制中,RANKL分子也参与重要作用。但是,地塞米松如何上调骨髓基质细胞RANKL的表达,其中的具体调节机制有待深入研究。

正常的骨髓基质细胞是一种比较原始的细胞,具有较强的增殖能力和较高的多分化潜能,本实验结果显示矿化液和地塞米松增强骨髓基质细胞

RANKL表达,提示地塞米松引起的破骨细胞形成和骨质吸收与骨髓基质细胞中RANKL的变化密切相关。而L-抗坏血酸和 β -甘油磷酸钠对骨髓基质细胞RANKL表达的作用以及地塞米松和两者的作用关系,尚待进一步研究证实。

本实验在浙江大学医学院生物电磁实验室完成,衷心感谢孙文均副研究员等老师的悉心指导和各位研究生同学的热心帮助。

参考文献 (References)

- [1] Hofbauer LC *et al.* *J Bone Miner Res*, 2000, **15**: 2
- [2] Lacey DL *et al.* *Cell*, 1998, **93**: 165
- [3] Yasuda H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 3597
- [4] Maniopoulos C *et al.* *Cell Tissue Res*, 1988, **254**: 317
- [5] Peter SJ *et al.* *J Cell Biochem*, 1998, **71**: 55
- [6] Prockop DJ. *Science*, 1997, **276**: 71
- [7] Atkins GJ *et al.* *J Bone Miner Res*, 2003, **18**: 1088
- [8] Otsuka E *et al.* *Endocrinology*, 2000, **141**: 3006

Mineralizing Solution and Dexamethasone Enhance Receptor Activator for NF- κ B Ligand Expression in Rat Bone Marrow Stromal Cells

Li Liu*, Xiao-Cong Zhang, Lie-Fen Zhang, Li-Ming Zhang

(The Affiliated Stomatology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

Abstract Receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL) was one of crucial factors regulating osteoclastic differentiation and activation, which express on bone marrow stromal cells (BMSCs). BMSCs cultivated with mineralizing solution (α MEM medium supplemented with 20%FBS, 10^{-8} mol/L dexamethasone, 10 mmol/L Na- β -glycerophosphate, 50 μ g/ml L-ascorbic acid) can be induced to differentiation into osteoblasts. Dexamethasone was the major component of mineralizing solution. To investigate the effect of mineralizing solution and dexamethasone on RANKL expression, RANKL expressed on rat BMSCs cultivated with mineralizing solution for 48 h was detected by immunofluorescence staining and that expressed on the stromal MC3T3-G2/PA6 cell line cultivated with dexamethasone for 72 h was detected by Western blot. The results showed that mineralizing solution and dexamethasone enhanced RANKL expressed on murine BMSCs in short period. It was suggested that the mechanism of dexamethasone-reduced osteoclast formation may be indirectly related to RANKL change in BMSCs.

Key words mineralizing solution; dexamethasone; bone marrow stromal cells; receptor activator for NF- κ B ligand

Received: January 20, 2005 Accepted: August 8, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30271427)

*Corresponding author. Tel: 86-571-87217225, Fax: 86-571-87217433, E-mail: LL225@zju.edu.cn, YJING@mail.hz.zj.cn