

去卵巢对SD大鼠MSCs多向分化能力的影响

杨 丽¹ 王攀攀² 张荣华^{1*}

(¹暨南大学药学院, 广州 510632; ²暨南大学医学院, 广州 510632)

摘要 通过比较有、无诱导条件下正常与骨质疏松症(OP)大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)骨向、脂向及软骨向的分化情况, 观察去卵巢对SD大鼠MSCs多向分化能力的影响。实验分为四组: 正常组、正常诱导组、OP组、OP诱导组; 分别在有或无成骨、成脂、成软骨诱导条件下, 评价各组的分化情况。检测发现, 无诱导条件下, 正常大鼠MSCs骨向及软骨向分化的能力强于OP大鼠, 而OP大鼠MSCs的脂向分化能力强于正常大鼠; 诱导条件下, 正常大鼠MSCs对骨向及软骨向诱导剂的反应能力强于OP大鼠, 而OP大鼠MSCs对成脂诱导剂的反应能力强于正常大鼠。这些结果表明, 去卵巢后大鼠MSCs骨向分化能力及对成骨诱导剂的反应力下降, 脂向分化能力及对成脂诱导剂的反应力增强, 对软骨诱导剂的反应力下降。

关键词 骨髓间充质干细胞; 大鼠; 骨质疏松; 多向分化

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是在骨髓中发现的一种起源于中胚层、具有自我复制和多向分化潜能的非造血干细胞。本实验以双侧卵巢切除法复制骨质疏松症(osteoporosis, OP)大鼠模型, 通过比较正常和OP大鼠MSCs在有、无诱导条件下骨向、脂向及软骨向分化能力的差异, 观察去卵巢对SD大鼠MSCs多向分化能力的影响, 从MSCs角度诠释了患者罹患OP后机体内的病理学改变。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级(SPF)10月龄SD雌性大鼠(体重 (350 ± 10) g), 由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 合格证号: (川)2004-16scxk。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基(美国Gibco), 地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素C、胰岛素、吡哆美辛、IBMX(美国Sigma), TGF- β 1(澳大利亚Cell Science公司分装), 碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), 大鼠I型胶原ELISA试剂盒(美国ADL诊断实验室), 骨钙素放射免疫分析药盒(解放军总医院科技开发中心放免所), 甘油三酯测定试剂盒(浙江东瓯生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂配制方法 (1)成骨诱导液: 由含10%胎牛血清、 10^{-8} mol/L地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ mol/L维生素C的高糖DMEM无菌过滤配

制而成, 4 °C保存; (2)成脂诱导液: 由含10%胎牛血清、1 μ mol/L地塞米松、10 μ g/mL胰岛素、200 μ mol/L消炎痛、0.5 mmol/L IBMX的高糖DMEM无菌过滤配制而成, 4 °C保存; (3)成软骨诱导液: 由含2.5%胎牛血清、 10^{-7} mol/L地塞米松、37.5 μ g/mL维生素C、6.25 μ g/mL胰岛素、50 ng/mL TGF- β 1的低糖DMEM无菌过滤配制而成, 4 °C保存。

1.2.2 动物分组及模型复制 20只10月龄SD雌性大鼠随机分成模型组和假手术组, 每组10只, 模型组SD大鼠行双侧卵巢切除后再饲养3个月复制OP大鼠模型, 假手术组大鼠找到卵巢但不切除。手术3个月后采用双能X线骨密度仪检测大鼠骨密度, 显示OP组大鼠骨密度较正常组显著降低, 证明OP模型复制成功。

1.2.3 MSCs的分离、培养及传代 采用全骨髓贴壁法分离大鼠MSCs, 依据梭形细胞形态、细胞表达表面抗原CD29和CD44、不表达CD34和CD45以及细胞可以向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞分化的特性鉴定细胞。接种24 h后首次半量换液, 之后每3 d换液一次。待细胞达到80%~90%融合后, 以1:2比例传代。

1.2.4 MSCs分组 按MSCs来源及是否添加诱导条件分为以下四组: 正常组(正常大鼠MSCs未加诱

收稿日期: 2011-06-28 接受日期: 2011-10-19

国家自然科学基金(No.30772885)和国家中医药管理局中医药科学研究专项(No.04-05JL19)资助项目

*通讯作者。Tel: 020-85220023, E-mail: tzh@jnu.edu.cn

导条件), 正常诱导组(正常大鼠MSCs添加成骨、成脂、成软骨诱导液), OP组(OP大鼠MSCs未加诱导条件), OP诱导组(OP大鼠MSCs添加成骨、成脂、成软骨诱导液)。

1.2.5 骨向分化能力的比较 (1)碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP): 正常及OP大鼠P3代MSCs以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于预先置有小盖玻片的6孔板中, 共4组, 3个时间段(7, 14, 21 d), 每组3个复孔。按上述方法处理各组细胞, 每孔终体积2.5 mL。每3 d换液一次, 连续干预21 d。分别在第7, 14, 21 d将每孔进行ALP染色, 光镜下随机取10个非重叠视野, 高倍镜下记数ALP阳性细胞数和总细胞数, 计算ALP阳性染色率; (2)I型胶原(type I collagen, Col I): 正常及OP大鼠P3代MSCs以 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于24孔板, 共4组, 每组6个复孔。待细胞接种24 h后, 换入无血清培养基, 待细胞周期同步化24 h后正常组加入高糖完全培养液, 诱导组加入成骨诱导液, 每孔终体积2.5 mL。每3 d换液一次。分别取各组14 d细胞上清液, -20°C 保存, 样本收集齐后, 按大鼠Col I ELISA试剂盒操作说明进行检测; (3)骨钙素(bone gla protein, BGP): 按上述方法分别取各组诱导第7, 14, 21 d的细胞上清液, -20°C 保存, 样本收集齐后, 按BGP放射免疫分析药盒中说明书操作。

1.2.6 脂向分化能力的比较 (1)油红O染色: 正常及OP大鼠P3代MSCs以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于预先置有

小盖玻片的6孔板中, 共4组, 3个时间段(7, 14, 21 d), 每组3个复孔。待细胞接种24 h后, 换入无血清培养基, 待细胞周期同步化24 h后正常组加入高糖完全培养液, 诱导组加入脂向诱导液, 每孔终体积2.5 mL。每3 d换液一次, 连续干预21 d。分别在第7, 10, 14 d取出长有细胞的盖玻片, 按照油红O染色步骤进行染色; (2)甘油三酯(TG)测定: 按上述方法分别取各组第3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 d的细胞上清液, -20°C 保存, 样本收集齐后, 按TG试剂盒说明书操作。

1.2.7 软骨分化能力的比较 正常及OP大鼠P3代MSCs以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于预先置有小盖玻片的6孔板中, 共4组, 3个时间段(7, 14, 21 d), 每组3个复孔。待细胞接种24 h后, 换入无血清培养基, 待细胞周期同步化24 h后正常组加入高糖完全培养液, 诱导组加入软骨向诱导液, 每孔终体积2.5 mL。每3 d换液一次, 连续干预21 d。分别在第7, 10, 14 d取出长有细胞的盖玻片, 进行甲苯胺蓝染色。

1.2.8 统计学方法 本实验结果采用ANOVA法进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准取双侧 $\alpha=0.05$, 所用统计软件为SPSS13.0。

2 结果

2.1 骨向分化能力的比较

2.1.1 ALP染色 如表1和图1所示, 不同组间比

表1 不同诱导时间各组ALP阳性染色率的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the positive rate of ALP staining in each group at different induction time($n=6, \bar{x} \pm s$)

组 Group	ALP阳性染色率 The positive rate of ALP staining		
	7天 7 d	14天 14 d	21天 21 d
Normal group	0.0178 $\pm$ 0.0013 ^{▲▲}	0.0516 $\pm$ 0.0107 ^{▲▲}	0.0684 $\pm$ 0.0126 ^{▲▲}
Normal induced group	0.1882 $\pm$ 0.0151	0.2890 $\pm$ 0.0176	0.4917 $\pm$ 0.0111
OP group	0.0154 $\pm$ 0.0085	0.0176 $\pm$ 0.0084 ^{▲▲}	0.0225 $\pm$ 0.0025 ^{▲▲}
OP induced group	0.1105 $\pm$ 0.0156 ^{▲▲}	0.2103 $\pm$ 0.0373 ^{▲▲}	0.3237 $\pm$ 0.0637 ^{▲▲}

与正常诱导组相比, ^{▲▲} $P<0.01$ 。

Compared with normal induced group, ^{▲▲} $P<0.01$.

较, 正常诱导组显著高于其它各组($P<0.01$), 而OP诱导组小于正常诱导组, 高于正常组和OP组($P<0.01$), 正常组和OP组之间比较无显著性差异($P>0.05$); 不同时间比较, 21 d的ALP阳性率显著高于7 d和14 d($P<0.01$), 7 d和14 d之间比较无显著性差异($P>0.05$)。

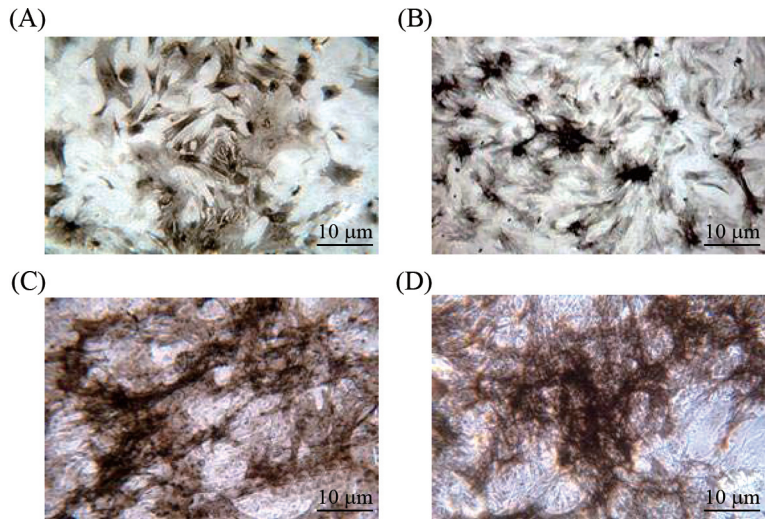
2.1.2 Col I 如表2所示, 正常诱导组Col I值显著高于其它各组($P<0.01$), 正常组Col I值显著高于OP

组和OP诱导组($P<0.01$), OP组和OP诱导组之间比较无显著性差异($P>0.05$)。

2.1.3 BGP 如表3所示, 正常诱导组BGP值显著高于其它各组($P<0.01$), 其它组之间比较无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 脂向分化能力的比较

2.2.1 脂肪细胞油红O染色 如图2和图3所示,



A: OP诱导组(14 d); B: OP诱导组(21 d); C: 正常诱导组(14 d); D: 正常诱导组(21 d)。
A: OP induced group (14 d); B: OP induced group (21 d); C: normal induced group (14 d); D: normal induced group (21 d).

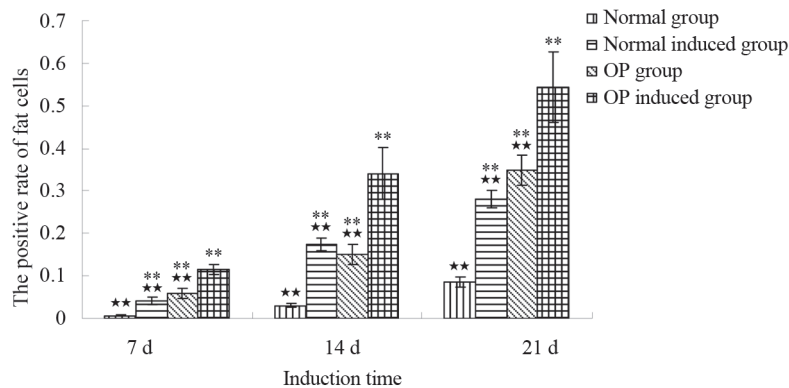
图1 ALP染色检测MSCs骨向分化能力
Fig.1 The osteogenic differentiation of MSCs identified by ALP staining

表2 各组Col I的表达量的比较(μg/mL, $\bar{x}\pm s$)		
Table 2 Comparison of Col I in each group(μg/mL, $\bar{x}\pm s$)		
组别	样本数	I型胶原表达量
Group	<i>n</i>	Col I
Normal group	6	1.355 6±0.074 0 ^{▲▲}
Normal induced group	6	1.712 3±0.103 0 ^{**}
OP group	6	0.938 3±0.038 5 ^{***▲▲}
OP induced group	6	0.925 2±0.048 ^{***▲▲}

与正常组相比, ^{**}*P*<0.01; 其他三组与正常诱导组相比; ^{▲▲}*P*<0.01。
Compared with normal group, ^{**}*P*<0.01; compared with normal induced group, ^{▲▲}*P*<0.01.

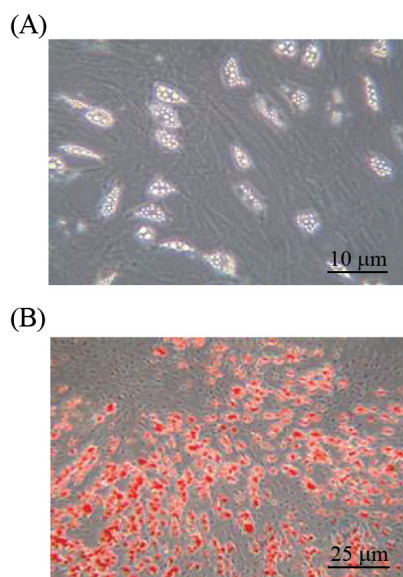
表3 各组BGP的表达量的比较(ng/mL, $\bar{x}\pm s$)		
Table 3 Comparison of BGP in each group(ng/mL, $\bar{x}\pm s$)		
组别	样本数	骨钙素表达量
Group	<i>n</i>	BGP
Normal group	6	2.422 3±0.299 6 ^{▲▲}
Normal induced group	6	4.167 7±0.466 9
OP group	6	1.401 0±0.441 7 ^{▲▲}
OP induced group	6	2.505 7±0.559 7 ^{▲▲}

与正常诱导组相比, ^{▲▲}*P*<0.01。
Compared with normal group with normal induced group, ^{▲▲}*P*<0.01.



与正常组相比, ^{**}*P*<0.01; 与OP诱导组相比, ^{▲▲}*P*<0.01。
Compared with normal group, ^{**}*P*<0.01; compared with OP induced group, ^{▲▲}*P*<0.01.

图2 不同诱导时间各组脂肪细胞染色阳性率
Fig.2 The positive rate of adipocytes in each group at different induction time



A: 脂肪细胞; B: 脂肪细胞油红O染色。

A: adipocytes; B: adipocytes stained by Oil red.

图3 脂肪细胞

Fig. 3 Adipocytes

不同组间比较, 正常组脂肪细胞阳性率明显低于其它各组($P<0.01$), 而OP诱导组显著高于其它各组($P<0.01$), 正常诱导组和OP组之间无显著性差异($P>0.05$); 不同时间之间比较均有显著性差异($P<0.01$)。

2.2.2 细胞上清液中TG含量 如图4所示, 不同组间比较显示, OP诱导组的TG表达量低于其它各组($P<0.01$), 其它组之间比较无显著性差异($P>0.05$); 不同时间比较, 各时间段TG无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 软骨向分化能力的比较

正常和OP大鼠在无诱导情况下, 均不向软骨方向分化, 在加入软骨诱导剂后, 正常老龄大鼠第7 d进行甲苯胺蓝染色即呈阳性, 而且染色深度及面积随着诱导时间的增加而增加, 细胞仍呈极性生长, 细胞呈梭形、圆形和多角形; OP大鼠在进行软骨诱导后, 细胞呈散在生长, 形态大部分呈圆形和多角形, 甲苯胺蓝染色着色较浅, 细胞状态较差(图5)。

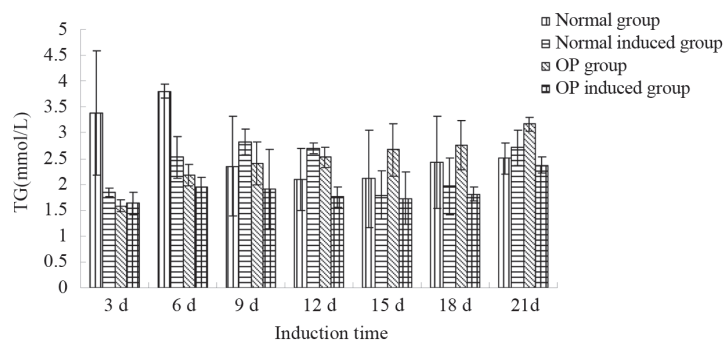


图4 不同诱导时间各组TG的表达量

Fig.4 The expression of TG in each group at different induction time

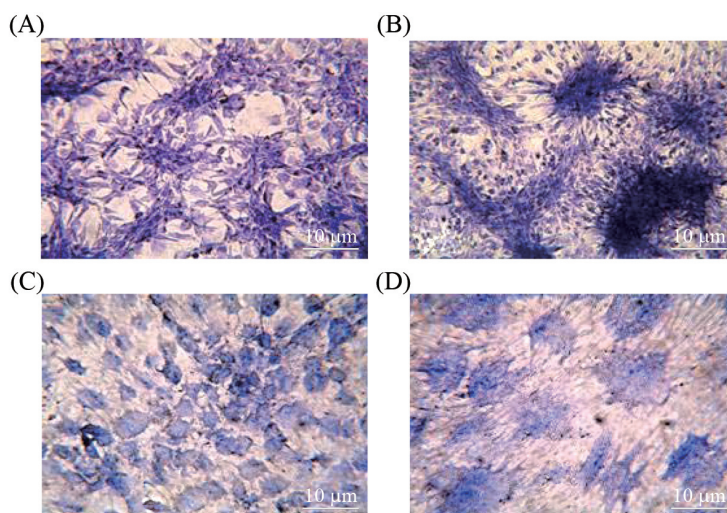


图5 软骨诱导各组甲苯胺蓝染色

Fig. 5 The chondrocyte differentiation of MSCs identified by toluidine blue staining

3 讨论

MSCs在向成骨细胞(osteoblast, OB)分化过程中的不同阶段会陆续表达各种骨特征性标志蛋白,如ALP和Col I在OB分化早期表达高,发生矿化后有所降低;骨桥蛋白是最早合成的基质蛋白,随后是骨涎蛋白,最后BGP和细胞外基质钙化同时出现。正因为上述这些基质蛋白的协同作用^[1],才保证了细胞外基质的正常成熟,一旦基质成熟,OB被包埋其中而形成骨组织。因此,本实验选用ALP、Col I、BGP和钙化结节这几个特异性指标来鉴定和评价MSCs骨向分化能力。

ALP阳性率结果显示,不同组间比较,正常诱导组显著高于其它各组($P<0.01$),而OP诱导组小于正常诱导组,高于正常组和OP组($P<0.01$),说明在成骨诱导剂的作用下,正常和OP大鼠MSCs的ALP阳性表达率均增加,但是正常诱导组ALP高于OP诱导组,提示正常大鼠MSCs对成骨诱导剂的反应性强于OP组。正常组和OP组之间比较无显著性差异($P>0.05$),这可能是由增龄导致大鼠的MSCs骨向分化能力降低所致。不同诱导时间比较,21 d的ALP阳性率显著高于7 d和14 d($P<0.01$),7 d和14 d之间比较无显著性差异($P>0.05$),说明随着诱导时间的增加,ALP的阳性表达率逐渐增加,成骨比例也逐渐增加。各组Col I结果显示,正常诱导组Col I值显著高于其它各组($P<0.01$),正常组Col I值显著高于OP组和OP诱导组($P<0.01$),OP组和OP诱导组之间比较无显著性差异($P>0.05$),说明正常组促Col I分泌的能力强于OP组,这与Rodriguez等^[2]的研究一致。此外,正常组促Col I分泌的能力还强于OP诱导组,这可能是由于OP大鼠MSCs内促胶原合成的基因减少所致。各组21 d的BGP结果显示,正常诱导组BGP值显著高于其它各组($P<0.01$),其它组之间比较无显著性差异($P>0.05$),说明OP大鼠MSCs在成骨诱导剂的作用下,BGP表达增加不明显;而在无诱导条件下,两组的BGP表达无差异,说明增龄和去卵巢均导致大鼠的MSCs骨向分化能力降低且降低程度相当。总之,无成骨诱导条件下,正常和OP大鼠MSCs的ALP、BGP表达量无明显差异,正常组Col I分泌量高于OP组;加入成骨诱导剂后,OP大鼠MSCs的ALP、Col I和BGP的增加量低于正常大鼠。

随着年龄的增长,骨组织不断丢失,骨髓中黄骨髓大量增加、骨髓腔扩大、脂肪组织增加。骨髓

前体细胞分化为OB和脂肪细胞的比例受干扰而发生偏差,造成OB数量减少、脂肪细胞数量增多。本实验在分离正常和OP大鼠骨髓,用培养基冲洗骨髓腔时,冲出的液体均可见大量的油脂浮于表面,OP大鼠尤甚于正常大鼠,说明增龄和造模均导致大鼠骨髓腔内脂肪组织增多,这可能是由于骨髓中前体成骨细胞减少、脂肪祖细胞增多所造成的^[3]。

陈槐卿等^[4]发现,大鼠MSCs随月龄增长成骨能力降低、成脂肪能力增强。12月龄大鼠MSCs在脂肪诱导中更早出现脂滴,而且可被诱导成脂肪细胞的数目要多于3月龄MSCs,诱导成富含脂滴的细胞的形态与3月龄MSCs也不尽相同,提示年龄的老化使MSCs更易向成脂肪细胞分化。本实验发现,正常组MSCs也有少量的脂肪细胞分化,这与上述研究一致。不过正常组的脂肪细胞阳性率明显低于其它各组($P<0.01$),在脂向分化诱导剂的作用下,正常诱导组脂肪细胞阳性率与OP组无诱导情况下的脂肪细胞阳性率无差异,说明OP大鼠MSCs具有很强的自然分化为脂肪细胞的能力,这与Nishikawa等^[5]的研究结果一致。而OP诱导组脂肪细胞阳性率显著高于其它各组($P<0.01$),可见脂向分化诱导剂能刺激OP大鼠MSCs进一步脂向分化。不同时间之间的脂肪细胞阳性率比较有显著性差异($P<0.01$),说明随着诱导时间的增加,各组脂肪细胞的数目也有所增加,且脂肪细胞的分化率与时间成正比。此外,本实验取诱导过程中各组细胞上清液进行TG含量检测,结果显示OP诱导组的TG表达量低于其它各组($P<0.01$),其它组之间比较无显著性差异($P>0.05$),与OP诱导组的脂肪细胞数不成正比,这可能是由于脂肪细胞内外的TG量形成了一个动态平衡,在脂肪细胞分化过程中,细胞内TG大量分泌,但并不一定释放到胞外,因此本实验需进一步检测各组细胞内的TG含量,才能更真实地反应脂肪细胞的TG分泌情况。

正常和OP大鼠在无诱导情况下,均不向软骨方向分化,在加入软骨诱导剂后,正常大鼠第7 d进行甲苯胺蓝染色即呈阳性,而且染色深度及面积随着诱导时间的延长而增加,细胞仍呈极性生长,细胞呈梭形、圆形和多角形;OP大鼠在进行软骨诱导后,细胞呈散在生长,形态大部分呈圆形和多角形,甲苯胺蓝染色着色较浅,细胞状态较差,说明OP大鼠对软骨诱导剂的反应能力低于正常组。

从上述结果可以看出, 无诱导条件下, 正常大鼠MSCs骨向及软骨向分化能力强于OP大鼠, 而OP大鼠MSCs脂向分化能力强于正常大鼠; 诱导条件下, 正常大鼠MSCs对骨向及软骨向诱导剂反应能力强于OP大鼠, 而OP大鼠MSCs对成脂诱导剂反应能力强于正常大鼠。可见, OP的产生可能与MSCs骨向、软骨向分化能力减弱、脂向分化能力增强有密切的关系。因此, 对MSCs多向分化能力的深入研究, 可能为OP等骨性疾病的预防与治疗提供了新思路, 即: 是否可通过增加MSCs骨向和软骨向分化抑制MSCs脂向分化, 从而减缓骨量的减少, 对OP等骨性疾病达到防治的作用, 这一思路还有待于对MSCs的分化特性及调控机制的进一步深入探索。

参考文献 (References)

- 1 廖二元, 谭利华. 代谢性骨病学(第一版). 北京: 人民卫生出版社, 2003, 1-78.
- 2 Rodriguez, Hess R. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donor. *J Cell Biochem* 2005; 94(1): 50-7.
- 3 Rodríguez JP, Astudillo P, Ríos S, Pino AM. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008; 3(3): 208-18.
- 4 陈槐卿, 药容, 韩君, 邓力, 李良. 增龄对大鼠骨髓基质细胞分化的影响. *中国医学科学院学报* 2003; 25(3): 244-9.
- 5 Nishikawa K, Nakashima T, Takeda S, Isogai M, Hamada M, Kimura A, *et al.* Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. *Clin Invest* 2010; 120(10): 3455-65.

The Effect of Ovariectomy on the Ability of Multidirectional Differentiation of MSCs from SD Rats

Yang Li¹, Wang Panpan², Zhang Ronghua^{1*}

(¹College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²College of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract To investigate the effects of ovariectomy on the ability of multidirectional differentiation into osteoblast, adipocyte and chondrocyte of Sprague-Dawley (SD) rats' mesenchymal stem cells (MSCs) was compared by the differential condition of the MSCs derived from the osteoporosis (OP) rats and normal rats with and without induced conditions. The experiment was divided into four groups: normal group, normal induced group, OP group, and OP induced group. The ability of multidirectional differentiation was detected after treated with or without osteoblast-induced, adipocyte-induced or chondrocyte-induced conditions, respectively. The results demonstrated that the ability of osteogenic and chondral differentiation of MSCs from normal rats was stronger than that from OP rats without the induced conditions, but the ability of adipose differentiation was lower. With the induced conditions, the reaction to osteoblast-induced and chondrocyte-induced agent of MSCs from normal rats was stronger than that from OP rats, but the reaction to adipocyte-induced agent was lower. In conclusion, compared with MSCs from normal rats, the ability of osteogenic differentiation and the reaction to osteoblast-induced agent of MSCs from OP rats decreased, the ability of differentiation into adipocyte and reaction to chondrocyte-induced agent of MSCs from OP rats increased, and the reaction to chondrocyte-induced agent decreased.

Key words mesenchymal stem cells; rats; osteoporosis; multidirectional differentiation

Received: June 28, 2011 Accepted: October 19, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30772885) and the Special Scientific Research of State Administration of Traditional Chinese Medicine (No.04-05JL19)

*Corresponding author. Tel: 86-20-85220023, E-mail: tzh@jnu.edu.cn