

[文章编号 1000-1182(2005)03-0240-04

# 骨髓间充质干细胞骨向诱导分化过程中破骨细胞分化因子和细胞间粘附分子-1的表达变化

王 军<sup>1</sup>, 赵志河<sup>1</sup>, 罗颂椒<sup>1</sup>, 樊瑜波<sup>2</sup>

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室; 2. 四川大学生物力学工程实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 观察破骨细胞分化因子(ODF)和细胞间粘附分子-1(ICAM-1)在不同分化状态成骨细胞的表达变化,探讨正畸牙移动过程中成骨细胞对破骨细胞分化成熟的诱导机制。方法 分离培养大鼠骨髓间充质干细胞,成骨定向诱导后获得不同分化状态的成骨细胞,RT-PCR检测不同分化状态下的成骨细胞ODF和ICAM-1的表达变化。结果 成骨细胞在分化成熟过程中,ICAM-1 mRNA表达水平逐渐升高;ODF mRNA则在诱导后6 d开始表达,并维持在一较稳定的水平。结论 不同分化状态的成骨细胞对破骨细胞诱导分化的能力有所差异,相对成熟的成骨细胞的诱导能力可能更强。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞; 破骨细胞分化因子; 细胞间粘附分子-1

[中图分类号] R 783.5 [文献标识码] A

**Expression of Osteoclast Differentiation Factor and Intercellular Adhesion Molecule-1 of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Enhanced with Osteogenic Differentiation** WANG Jun<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-He<sup>1</sup>, LUO Song-jiao<sup>1</sup>, FAN Yu-bo<sup>2</sup>. (1. Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory of Biomechanical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether the expression of osteoclast differentiation factor(ODF), intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) depended on the stage of osteoblastic differentiation from rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSC). **Methods** BMSC (4 passage) were selected for osteogenic differentiation by treated with osteogenic supplements(OS). Cells were harvested by day 0, 3, 6, 9, 12, 18 respectively after osteogenic inducement. In each experiment, control and OS-treated cells were processed in parallel. ODF and ICAM-1 mRNA were analyzed by semiquantitative RT-PCR assay. **Results** Expression of ODF was enhanced with osteogenic differentiation gradually. whereas, expression of ICAM-1 was activated at OS-treated day 6, then keeping at a stable level. **Conclusion** This study indicated that BMSC undergoing osteogenic inducement was an ideal model for studying the differentiation and maturation of osteoblasts. During the early stage of differentiation along osteoblasts from stem cells to osteocytes, BMSC or osteoprogenitor react somewhat differently from osteoblasts, suggesting the ability of osteoblasts to regulating differentiation and maturation of osteoclasts have been improved with osteogenic culture.

[Key words] rat bone marrow mesenchymal stem cells; osteoblasts; osteoclast differentiation factor; intercellular adhesion molecule-1

成骨细胞体外应力模型是研究正畸牙移动骨改建机制的有效手段,可排除体内众多因素的干扰,观察单一特定因素对单一类型细胞生物学特点的影响。成骨细胞来源于间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC),随着发育依次分化为骨祖细胞、成骨前体细胞、成骨细胞、骨细胞<sup>1</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)是一种具有多向分化潜能的干细胞,经定向诱导培养,可培养出不同分化状态的成骨细胞,是研究成骨细胞分化成熟过程

生物学行为的理想模型。

近年的研究认为<sup>2</sup>,成骨细胞在成骨和破骨过程均扮演着重要的角色,不仅是骨形成的效应细胞,而且在介导和调控破骨细胞分化和破骨细胞性骨吸收中也发挥重要作用。成骨细胞在分化成熟过程中,通过表达分泌一系列破骨细胞分化调控蛋白,如破骨细胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)和细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1),两者间接参与了破骨细胞分化成熟及功能的调节。ODF和ICAM-1的表达水平在一定程度上可反映成骨细胞调节破骨细胞分化成熟的能力。但关于成骨细胞的分化状态和其对破骨细胞分化的诱导功能之间的关系目前尚不清楚。本研究通过对BM-

[收稿日期 2005-01-12; 修回日期 2005-03-02

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(10372066,10402027)

[作者简介]王 军(1974-),男,山西人,讲师,博士

[通讯作者]赵志河, Tel: 028-85503040

SC进行成骨诱导培养,观察其在成骨分化各阶段中ODF和ICAM-1的表达变化情况,为完善正畸牙周骨改建体外应力模型及改建机制的深入研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

6周龄SD雄性大鼠由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。-甘油磷酸盐(-glicerophosphate, -GP),地塞米松(dexamethasone sodium phosphate, Dex),抗坏血酸磷酸盐(L-ascorbic acid 2-phosphate, AsAp),六偶氮副品红等酶组化试剂均购自美国Sigma公司。TRIZOL Reagent (Invitrogen公司,美国); TaKaRa One Step RNA PCR Kit (大连宝生物工程有限公); ICAM-1和ODF上下游引物均由上海生物化工有限公司合成。

### 1.2 BMSC的分离培养及诱导分化

参照Friedenstein等<sup>3</sup>的方法,培养大鼠骨髓基质干细胞,当成簇细胞克隆融汇接近瓶底80%时进行第1次传代;细胞传至第4代时换用含有成骨细胞诱导剂的培养基(0.05 mmol/L AsAp、10 mmol/L -GP、 $10^{-8}$  mol/L Dex)培养。

### 1.3 BMSC成骨诱导培养后的鉴定

BMSC成骨诱导过程中定期收集细胞及培养液,制备细胞爬片,采用酶组化法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性进行成骨细胞鉴定。同时结合Von Kossa染色检测细胞外钙结节的沉积。

### 1.4 BMSC成骨诱导分化过程中ODF、ICAM-1的表达

1.4.1 提取细胞总RNA 按照TRIZOL试剂说明书提取细胞总RNA。

1.4.2 逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 引物设计见表1。参照One Step RNA PCR试剂盒提供的程序进行RT-PCR扩增。总反应体系为20  $\mu$ l,包括RNA模板1  $\mu$ g, 10  $\times$ Buffer 2  $\mu$ l, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP 0.8  $\mu$ l, RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) 0.4  $\mu$ l, TaqDNA聚合酶 0.7  $\mu$ l, AMV逆转录酶 0.7  $\mu$ l, 上下游引物各1  $\mu$ l; RNase Free d H<sub>2</sub>O 8  $\mu$ l。

阴性对照:以水或缓冲液代替模板DNA。

1.4.3 凝胶电泳及图像分析 PCR扩增产物在1.5%琼脂糖作凝胶电泳,凝胶扫描自动分析仪上对扩增带(ICAM-1、ODF、-actin分别为415 bp、354 bp、195 bp)进行灰度分析,测出扩增带曲线下面积的灰度值,分别记为A<sub>ICAM-1</sub>、A<sub>ODF</sub>、A<sub>-actin</sub>,目的条带与内参对照条带的比值A<sub>ICAM-1</sub>/A<sub>-actin</sub>和A<sub>ODF</sub>/A<sub>-actin</sub>表示ICAM-1、ODF mRNA相对含量。

表1 ICAM-1、ODF及内对照-actin引物设计

Tab 1 Sequences of ICAM-1, ODF and -actin optimal primers

引物	序列	长度(bp)
5-ICAM-1	5-acacagctctcagtagctg-3	415
3-ICAM-1	5-acttctcagtcacctccaactg-3	415
5-ODF	5-agactactaagagacgtggc-3	354
3-ODF	5-tgcaggttccagcgaatg-3	354
5--actin	5-gcaccacactttctacaatg-3	195
3--actin	5-ccatcacaatgccagtggtta-3	195

## 2 结果

### 2.1 BMSC形态学特征

原代培养第3天,培养液表面漂浮有大量圆形的红细胞及非贴壁的有核细胞,通过换液可逐渐将其清除。首次换液后,可见零星散在的贴壁生长细胞即BMSC,多呈纺锤型。BMSC呈克隆样增殖,7~10 d细胞汇合达90%,有接触抑制现象。原代BMSC增殖速度较慢,首次传代后细胞生长速度明显加快。BMSC诱导培养后细胞形态略有变化,从纺锤形变为以多角形为主。

### 2.2 BMSC来源成骨细胞的鉴定

酶组化染色显示成骨诱导培养第3天即可见约30%细胞ALP表达阳性,随培养时间延长,细胞ALP表达阳性率及强度逐渐上升,第9天约96%细胞表达呈强阳性。Von Kossa染色显示,在成骨诱导培养第3天即可见少量晶状物沉积在细胞基质,为黑色颗粒状,随培养时间延长钙结节形成越来越多,散在的点状开始融合成块状,第15天矿化物几乎覆盖了整个细胞层。

### 2.3 BMSC成骨分化过程中ICAM-1、ODF的表达变化

BMSC在成骨诱导剂的刺激下向成骨细胞分化,ICAM-1 mRNA表达水平逐渐升高(图1,2);ODF mRNA则在诱导后6 d开始表达,并维持在一较稳定的水平(图3,4)。



图1 BMSC成骨诱导分化过程ICAM-1 mRNA表达的电泳图

Fig 1 Expression of ICAM-1 mRNA in response to osteogenic supplement

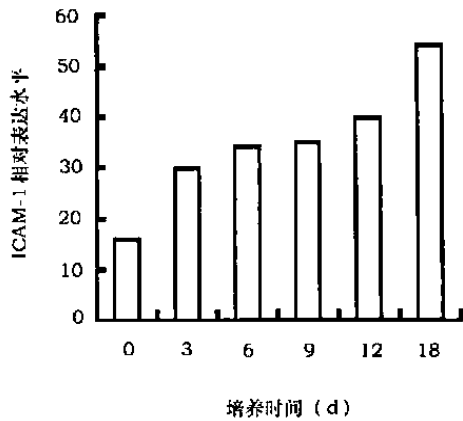


图2 BMSC 成骨诱导分化过程 ICAM-1 mRNA 的表达变化

Fig 2 Expression of ICAM-1 mRNA in response to osteogenic supplement



图3 BMSC 成骨诱导分化过程 ODF mRNA 表达的电泳图

Fig 3 Expression of ODF mRNA in response to osteogenic supplement

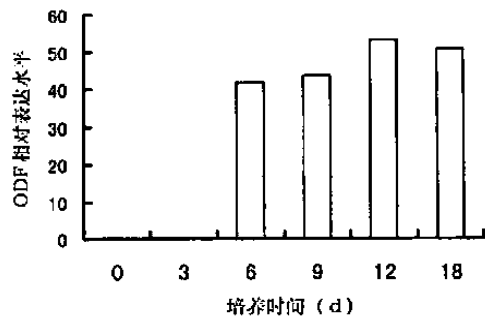


图4 BMSC 成骨诱导分化过程 ODF mRNA 的表达变化

Fig 4 Expression of ODF mRNA in response to osteogenic supplement

### 3 讨论

#### 3.1 BMSC 在正畸治疗相关组织改建研究中的应用

成骨细胞、软骨细胞、成肌细胞是正畸牙移动和功能矫形发生的细胞学基础。现已证实,成骨细胞、软骨细胞、成肌细胞有着共同的前体——间充质干细胞(MSC)。当前的研究主要集中于骨髓中的 MSC (BMSC), MSC 具有增殖和多向分化潜能的特点<sup>4</sup>, 目前被认为是生成组织工程化肌腱、血管、骨等组织最有前途的种子细胞,有希望用于组织的再生、修复。MSC 体外培养时,在特定诱导剂的刺激下碱性磷酸酶活性的一过性增强和羟基磷灰石在胞外基质上的沉积均表明 MSC 在体外培养条件下能够诱导分化为成骨细胞<sup>5</sup>。大鼠颅骨缺损模型研究亦证明<sup>6</sup>,用<sup>3</sup>H 胸腺嘧啶核苷局部标记硬脑膜和覆盖缺损颅骨的皮

下组织细胞,结果发现参与缺损修复的成骨细胞来自于 MSC。在含有肿瘤转化生长因子或地塞米松的无血清培养液中,采用离心沉淀式培养法,细胞由梭形变为肥大软骨细胞形状,胞外基质中蛋白聚糖丰富,表明 MSC 可向软骨细胞分化<sup>7</sup>。此外,除成骨细胞和软骨细胞外, MSC 还可以分化为成肌细胞、脂肪细胞、神经细胞及星形胶质细胞等,同时支持造血细胞增殖和分化。此外,最近的研究显示,间充质干细胞与牙周膜细胞关系密切, Kramer 等<sup>8</sup> 对间充质干细胞和牙周膜细胞进行共同培养,结果发现牙周膜细胞可以诱导间充质干细胞骨钙素、骨桥素表达增强,骨涎蛋白表达降低,呈现典型的牙周膜细胞的特点,提示间充质干细胞很可能是牙周膜细胞的前体细胞,并且在牙周组织修复和再生中有良好的临床应用前景。Alhadlaq 等<sup>9</sup> 采用组织工程的手段也初步证实了 MSC 在髌突软骨修复方面应用的可能性。

#### 3.2 BMSC 的成骨分化潜能

骨髓的成骨能力早在 20 世纪 70 年代年就已经得到初步证实,其成骨能力来源于其中的基质细胞<sup>10</sup>。骨髓基质细胞中仅有小部分可自发分化为成骨细胞的骨祖细胞, Friendstein 称之为定向成骨前体细胞 (determined osteogenic precursor cells, DOPC), 其余大部分细胞在体外的分化依赖于适当的培养条件,一旦诱导刺激消失,这种分化便停止, Friendstein 把这种成骨前体细胞叫做诱导成骨前体细胞 (inducible osteogenic precursor cells, IOPC), IOPC 是成骨诱导发生的细胞基础。ALP 表达及钙结节的形成是检测成骨细胞分化的重要指标。ALP 是成骨细胞分化的早期标志,是成熟成骨细胞的标志性酶之一<sup>11</sup>。高活性 ALP 是骨钙素 (osteocalcin, OC) 表达和钙结节形成的基础。目前普遍认为 ALP 在体外钙化中起着关键性作用,其主要机制在于 ALP 能够水解有机磷酸酶,使局部  $PO_4^{+}$  浓度升高,并可破坏钙化抑制剂,从而启动钙化<sup>12</sup>。本研究酶组化及 Von Kossa 染色结果亦显示, BMSC 成骨诱导培养的细胞具有典型的成骨细胞特点和良好的体外成骨功能,诱导培养后的 BMSC 具有典型的成骨细胞生物学特性,是体外培养成骨细胞的一种有效的生物学模型。

#### 3.3 成骨细胞是破骨细胞分化成熟的重要调控因素

破骨细胞与成骨细胞的组织来源不同,破骨细胞来源于骨髓或造血组织的单核细胞,与巨噬细胞有共同的前体,在特定条件下融合成多核细胞。研究表明<sup>13</sup>,牙周膜内的破骨细胞来源于相邻的牙槽骨骨髓,但其分化成熟主要发生在牙周组织局部。破骨前体细胞分化要在特定的微环境中完成,研究表明多种细胞因子和激素可能参与调节破骨细胞的分化成熟。

其中成骨细胞或基质细胞表达分泌的 ODF 可能是介导多种刺激因子诱导破骨细胞生成及功能信号传导的最终因子<sup>14</sup>,参与破骨细胞形成的全部过程,包括分化、融合、激活及生存<sup>15</sup>。此外,Tanaka 等研究显示,并非全部的成骨细胞或基质细胞可表达分泌 ODF,而 ICAM-1 的表达是介导此过程的重要因子。成骨细胞膜表面的 ICAM-1 不仅起到与周围细胞粘附的作用,更重要的是转导活化信号,ICAM-1 与其配体所介导的粘附作用可能是破骨细胞成熟的必要条件。ODF 和 ICAM-1 的表达水平在一定程度上可反映成骨细胞促进破骨细胞分化成熟的能力。本研究结果显示,在成骨细胞分化成熟过程中,ODF 和 ICAM-1 的表达均上升,表明成骨细胞分化成熟的同时对破骨前体细胞分化的诱导功能有所提高,提示在建立破骨细胞培养模型时必须考虑用于诱导的成骨细胞的分化状态,以期获得最佳效果。此外控制成骨细胞的分化状态也是控制破骨细胞培养模型标准化和一致性的良好途径。本研究结果亦显示成骨细胞在分化成熟过程,ICAM-1 的表达早于 ODF,可能是由于 ICAM-1 是 ODF 表达的一个关键性调控环节,与 Tanaka 等的研究类似。但本研究的结果仅在总体上说明成骨细胞 ICAM-1、ODF 的表达变化,至于是单个成骨细胞 ICAM-1 和 ODF 基因表达强度发生变化,还是成骨细胞内 ICAM-1、ODF 阳性表达亚群细胞数量发生变化尚有待证实。

### [参考文献]

- 1] Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, et al. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens J. Bone, 1997, 21(3): 225-235.
- 2] Lundberg P, Lie A, Bjurholm A, et al. Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts J. Bone, 2000, 27(6): 803-810.
- 3] Friedenstein AJ, Latzinik NV, Grskaya YF, et al. Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells J. Bone Miner, 1992, 18(3): 199-213.
- 4] Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, et al. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow J. Artif Organs, 2004, 28(1): 33-39.
- 5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells J. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- 6] Wang J. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells J. Calcif Tissue Int, 1999, 65(6): 486.
- 7] Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system *in vitro* J. Cell Dev Biol Anim, 2002, 38(8): 457-466.
- 8] Kramer PR, Nares S, Kramer SF, et al. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament *in vitro* J. J Dent Res, 2004, 83(1): 27-34.
- 9] Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells J. J Dent Res, 2003, 82(12): 951-956.
- 10] Amsel S, Dell ES. Bone formation by hemopoietic tissue: Separation of preosteoblast from hemopoietic stem cell function in the rat J. Blood, 1972, 39(2): 267-273.
- 11] Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stromal J. Lab Invest, 1999, 79(4): 449-457.
- 12] Collignon H, Davicco M, Barlet JP. Isolation of cells from ovine fetal long bone and characterization of their osteoblastic activities during *in vitro* mineralization J. Arch Physiol Biochem, 1997, 105(2): 158-166.
- 13] Rody WJ Jr, King G, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement J. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2001, 120(5): 477-489.
- 14] Wong BR, Rho J, Arron J, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells J. J Biol Chem, 1997, 272(40): 25190-25194.
- 15] Yashuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function J. Bone, 1999, 25(1): 109-113.

(本文编辑 汤亚玲)

### 2005 年中日口腔医学大会通知

2005 年中日口腔医学大会将于 2005 年 11 月 11~13 日在上海光大会展中心国际大酒店举行,会议由中华口腔医学会、日本齿科医学会主办,上海口腔医学会、上海第二医科大学口腔医学院、同济大学口腔医学院承办。本次大会是继在北京召开的中日医学大会和中日口腔医学大会之后,由中华口腔医学会与日本齿医学会共同举办的又一次中日双方在口腔医学领域的盛会。本次大会邀请了中日双方口腔医学著名学者和专家作精彩的大会报告,并对各学科最新的进展作精湛的专题报告和近 200 篇墙报展示,为与会者提供极好的学习和交流机会。上海口腔医学年会将同时召开。

参会事项 1. 希望参会、有论文者,请于 2005 年 7 月 31 日前将中文、英文摘要和中文全文寄往 2005 年中日口腔医学大会会务组,注明详细的通讯和联系方式。无论文发表者,请于 7 月 31 日前将详细的通讯和联系方式寄往 2005 年中日口腔医学大会会务组。2. 联系方式:上海市制造局路 639 号,上海第二医科大学口腔医学院中日口腔医学大会会务组, Tel: 021-53590947, Fax: 021-53591154, 邮编: 200011。3. 中日口腔医学大会会务组将根据参会者信息,在 9 月底前发出第二轮通知,告之详细参会事项。

2005 年中日口腔医学大会组委会