

雌激素对鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响

禹泽中^{2#}, 王志美^{1#}, 江 莎¹, 侯加法^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 玉溪农业职业技术学院, 玉溪 653100)

摘要: 本试验建立鸡胚骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外培养及其诱导成骨细胞方法, 以探讨雌激素对 BMSC 诱导的成骨细胞的影响。以全骨髓进行体外贴壁培养、传代, 取第 3 代细胞进行成骨细胞诱导培养, 用倒置显微镜观察其形态, MTT 法测定细胞增殖率, 流式细胞仪检测细胞周期率。通过碱性磷酸酶、Van-Gieson 及茜素红染色等方法进行成骨细胞鉴定。将诱导的成骨细胞分为 5 个试验组, 分别添加 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 和 10^{-11} mol · L⁻¹ 浓度的 17β -E₂ 于成骨细胞诱导培养基, 并设置对照组。用 MTT 法和 PNPP 法测定不同浓度 17β -E₂ 对诱导成骨细胞增殖和分化的影响, 判断其最有效浓度。并用该有效浓度作用于诱导培养的成骨细胞, 通过流式细胞术观察该浓度 17β -E₂ 对诱导的成骨细胞凋亡的影响。结果表明, 鸡胚全骨髓贴壁培养法可获得 BMSCs, 经典培养基诱导培养获得的细胞具有成骨细胞典型的生物学特征, 其 ALP、I 型胶原及钙化结节染色均为强阳性。 10^{-9} mol · L⁻¹ 17β -E₂ 可促进诱导的成骨细胞增殖、分化, 抑制其凋亡。经纯化处理的鸡 BMSCs 可诱导成骨细胞, 且雌激素可提高 BMSCs 诱导的成骨细胞功能。

关键词: BMSCs; 成骨细胞; 17β -E₂; 诱导; 增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: S831; S814.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)02-0197-10

Effect of 17β -E₂ on Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle of Osteoblasts Induced by BMSCs in Chicken Embryos

YU Ze-zhong^{2#}, WANG Zhi-mei^{1#}, JIANG Sha¹, HOU Jia-fa^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Yuxi Agriculture Vocation-Technical College, Yuxi 653100, China)

Abstract: To investigate the effect of 17β -E₂ on osteoblasts induced by chicken bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs), the method of *in vitro* culture of BMSCs and its inducement of osteoblasts were established in this experiment. Chicken BMSCs were purified with whole marrow adherent culture and subculture *in vitro*. The third generation of cells of BMSCs were selected for inducing osteoblastic culture. The growth and morphology, the cell proliferation rate and the cell cycle of osteoblasts induced-BMSCs were detected with inverted phase contrast microscope, methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) and flow cytometry, respectively. Induced-BMSCs osteoblasts were identified by alkaline phosphates (ALP), Van-Gieson staining and Alizarin red staining, respectively. The induced osteoblasts were divided into 5 experimental groups and cultured with osteogenic differentiated medium containing different 17β -E₂ concentrations of 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} mol · L⁻¹ for each group, respectively. Cells cultured without 17β -E₂ as a blank control

收稿日期: 2013-09-24

基金项目: 国家自然科学基金(31272618; 30972234; 30671546); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 禹泽中(1975-), 男, 云南弥渡人, 副教授, 主要从事临床兽医教学和科研工作, E-mail: 940906290@qq.com; 王志美(1985-), 女, 山东枣庄人, 硕士, 主要从事畜禽骨骼生物学研究, E-mail: 168shiying168@163.com。# 为并列第一作者

* 通信作者: 侯加法, 教授, 博士生导师, 主要从事畜禽骨骼生物学研究, E-mail: jfhou@njau.edu.cn

group. Effects of different concentrations of $17\beta\text{-E}_2$ on the proliferation and differentiation of induced-BMSCs osteoblasts were measured by MTT and PNPP for finding the most effective concentration. Then this effective concentration of $17\beta\text{-E}_2$ was used for culturing induced-BMSCs osteoblasts, and the percentages of apoptotic cells were measured by flow cytometry. The results showed that BMSCs could be purified with whole marrow adherent culture. Osteoblasts could be induced from purified BMSCs using classic differentiated medium and were typically characteristic of the osteoblastic biology. The induced-BMSCs osteoblasts' ALP, collagen type I and calcified nodules' staining were strongly positive compared with control group. $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $17\beta\text{-E}_2$ concentration represented the most action of promoting proliferation and differentiation and inhibiting apoptosis of induced-BMSCs osteoblasts among the other concentration groups. Thus, it is shown that osteoblasts can be induced from purified chicken BMSCs and estrogen can enhance the function of induced-BMSCs osteoblasts.

Key words: BMSCs; osteoblasts; $17\beta\text{-E}_2$; inducement; proliferation; apoptosis; cell cycle

骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是中胚层来源的干细胞,主要存在于全身结缔组织和器官间质中,以骨髓组织中含量最为丰富,具有自我更新和增殖能力,在适宜的微环境里具有多向分化潜能^[1]。在成年骨骼中, BMSCs 主要分化为成骨细胞和成脂细胞,成骨细胞由 BMSCs 通过骨原细胞、前成骨细胞分化而来,它可分泌骨的有机成分,并控制骨质的矿化过程,即骨形成。在骨骼生物学研究中,需要获取成骨细胞进行体外试验。成骨细胞的获取有多种方法,如直接从胚胎、幼年、成年动物或人骨组织培养,获取的成骨细胞纯,但量少;另一种是从间充质干细胞诱导培养,包括不同种属动物的骨髓间充质干细胞(BMSCs)^[2]、脂肪间充质干细胞^[3]、脐带间充质干细胞^[4]及羊膜间充质细胞^[5]、鸡精原干细胞^[6]。其中 BMSCs 具有易获得、易培养、获得的成骨样细胞量多而被广泛用于骨骼疾病的基础和临床应用研究。本试验从鸡胚 BMSCs 进行成骨细胞的诱导培养,建立一种鸡胚 BMSCs 简单易行的分离纯化、培养扩增的方法。

雌激素是骨代谢重要的内分泌调节激素。研究发现雌激素水平降低是引起骨质疏松的重要原因之一。也有研究发现,人和动物患骨质疏松症时,其 BMSCs 的成骨能力降低,导致成骨细胞生成减少,脂肪细胞生成增多^[7],并证实雌激素可能具有调节 BMSCs 的增殖和分化,增强 BMSCs 的成骨分化能力^[8]。本试验在成功地从鸡胚获取 BMSCs 进行成骨细胞诱导培养的基础上,进行 $17\beta\text{-E}_2$ 对鸡胚 BMSCs 向成骨细胞分化的影响,为深入研究蛋鸡骨质

疏松症发病机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

15 日龄普通鸡胚(购自南京源创禽业), 37.0°C 自行孵化至 18 日龄。DMEM 培养基、 F_{12} 培养基和优级小牛血清(CS)购于 Gibco; L-谷氨酰胺、青霉素钠、硫酸链霉素、噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶、地塞米松、L-抗坏血酸和 β -甘油磷酸钠均购于 Sigma; BCIP/NBT 底物显色试剂盒购于北京天根生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 BMSCs 的分离培养

取 18 日龄鸡胚 20 枚,无菌条件下分离鸡胚双侧胫骨,剪除骨骺端。用 DMEM/ F_{12} 培养基冲出骨髓,充分分散细胞后,用完全培养基重悬细胞,接种于 50 mL 培养瓶中,置于 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 饱和湿度的培养箱中培养。第 2 天半量换液除去非贴壁细胞。首次换液后每 2 d 全量换液 1 次。待原代细胞融合率达 90% 时,吸弃培养液,用无菌 PBS 洗涤细胞,加入 0.25% 胰蛋白酶, 37°C 消化 $1.0\sim 2.0 \text{ min}$,显微镜下观察。当细胞变圆时加 DMEM/ F_{12} 培养基终止消化,去上清液,用完全培养基重悬细胞,以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 密度传代。

1.3 BMSCs 的定向诱导培养

将第 3 代的细胞分成试验组和对照组,对照组仍采用上述的培养液继续培养,试验组培养基更换为成骨诱导培养基(地塞米松 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 β -甘油磷酸钠 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、L-抗坏血酸 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),每 2~3 d 更换 1 次。用倒置相差显微

镜观察原代、传代及诱导细胞的生长、增殖情况及形态特征。

1.3.1 诱导的成骨细胞增殖测定^[9] 将诱导的成骨细胞以 4×10^3 个 \cdot mL⁻¹ 接种于 96 孔细胞板, 每组 8 个重复, 培养 24 h 后, 首次吸出培养液, 并用 PBS 冲洗, 更换无血清的 DMEM 培养液, 同时加入 MTT, 孵育 4 h 后, 加入 DMSO 终止反应后, 用酶标仪(波长 570 nm)测定其 OD 值。之后每 24 h 测定 1 次 OD 值。对照组(传代培养的 BMSCs)做同样的处理。

1.3.2 诱导的成骨细胞周期率测定 用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞, 显微镜下观察, 当细胞开始漂浮时, 立即用含 10% 小牛血清的培养液终止消化。然后进行如下操作: 在室温下, 以 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集细胞。用预冷 PBS 4 mL 重悬细胞 1 次, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 洗涤细胞。用灭菌去离子水稀释 $10 \times$ Binding Buffer 至 $1 \times$ Binding Buffer, 按每个标本 400 μ L 的 $1 \times$ Binding Buffer 的量配制, 置于冰上备用。每份标本($10^5 \sim 10^6$ 细胞)配制 Annexin V 标记液 100 μ L (10 μ L $10 \times$ Binding Buffer; 5 μ L Annexin V-FITC; 85 μ L distilled water)。以 $10^5 \sim 10^6$ 细胞 \cdot 100 μ L⁻¹ 的剂量用标记液轻轻重悬细胞, 在黑暗、室温下孵育 15 min, 然后再在每份标本中加入 10 μ L PI (DNA 染色剂)。每 100 μ L 孵育液中加入冷的 400 μ L $1 \times$ Binding Buffer 稀释, 15 min 内进行流式检测。检测后通过 BD 公司的 Cell Quest 软件进行分析处理, 给出细胞凋亡和周期结果。

1.3.3 诱导的成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 染色

取试验组细胞, 去除瓶内的培养基, PBS 液冲洗 2 遍, 95% 酒精固定 10 min 后倒掉, 在 3 mL 反应缓冲液中加入 150 μ L BCIP 和 150 μ L NBT, 混匀。将混合液加入培养瓶中, 室温下摇动孵育 30 min。同样处理对照组细胞。

1.3.4 诱导的成骨细胞钙化结节染色 取试验组细胞, 去除瓶内培养基, PBS 液冲洗 2 遍, 95% 酒精固定 10 min 后, 蒸馏水冲洗 3 次。0.1% 茜素红-Tris-Hcl (pH 8.3) 溶液加入培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min。同样处理对照组细胞。

1.3.5 诱导的成骨细胞 I 型胶原染色 (Van-Gieson 染色)^[10] 10% 中性甲醛固定培养于 6 孔板诱导成骨细胞, 蒸馏水冲洗, Weigert 苏木素染液染色 10 min, 自来水冲洗, 0.5% 盐酸乙醇分化, Van Gieson 染

色, 95% 乙醇分化脱水, 二甲苯透明, 显微镜下观察。

1.3.6 17β -E₂ 影响诱导的成骨细胞增殖率测定 (MTT 法) 称量 17β -E₂ 0.273 g, 充分溶解于 10 mL 的无水乙醇溶液, 作为 $10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 17β -E₂ 母液。依次梯度稀释为 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 和 $10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 设为 5 个试验组, 并设置对照组。MTT 法检测其细胞活性。收集纯化后第 2 代对数期细胞, 按 4×10^3 个 \cdot 孔⁻¹ 接种 96 孔板, 分别加入 200 μ L 的完全培养基, 37.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。将完全培养基分别换成不同浓度的 17β -E₂ 以及含 10% CS 的 DMEM/F₁₂ 培养液 (阴性对照组), 37.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 72 h。每组 10 个孔; 弃培养液, 每孔加入 200 μ L 不含血清的 DMEM/F₁₂ 培养液, 洗去悬浮的死细胞及杂质; 每孔加入 180 μ L 不含血清 DMEM/F₁₂ 培养液及 20 μ L MTT 溶液, 继续培养 4 h; 每孔加入 100 μ L DMSO, 置摇床低速振荡 10 min。紫外光 570 nm 检测各孔的吸光值; 同时设置调零孔 (无细胞孔添加培养基、MTT、DMSO), 对照孔 (无 17β -E₂。其余与各试验组条件一致)。

1.3.7 17β -E₂ 影响诱导的成骨细胞 ALP 活性检测 (PNPP 法) 收集纯化后第 2 代对数期成骨细胞, 按 $4 \times 10^4 \cdot \text{L}^{-1}$ 接种 96 孔板, 分别加入 200 μ L 完全培养基, 37.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h; 将完全培养基分别换成上述不同浓度的 17β -E₂ 稀释液以及不含 17β -E₂ 的培养液培养 1、3、7 及 14 d, 每组 8 个重复; 吸弃培养液, 预热 PBS 冲洗悬浮的死细胞及杂质; 每孔加入 50 mmol \cdot L⁻¹ DEA (二乙醇胺, 含镁离子 20 mmol \cdot L⁻¹, pH=10.5) 100 μ L, 3 mmol \cdot L⁻¹ 的 PNPP (磷酸对硝基苯酯) 及缓冲液 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 加入 0.2 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠, 50 μ L \cdot 孔⁻¹, 终止反应, 酶标仪 405 nm 波长测其 OD 值。

1.3.8 适宜浓度 17β -E₂ 影响诱导的成骨细胞凋亡的测定 选择适宜浓度的 17β -E₂ 作用于诱导培养成骨细胞, 在平台期初期, 用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞, 收集洗涤细胞后, 用细胞流式仪测定成骨细胞凋亡。

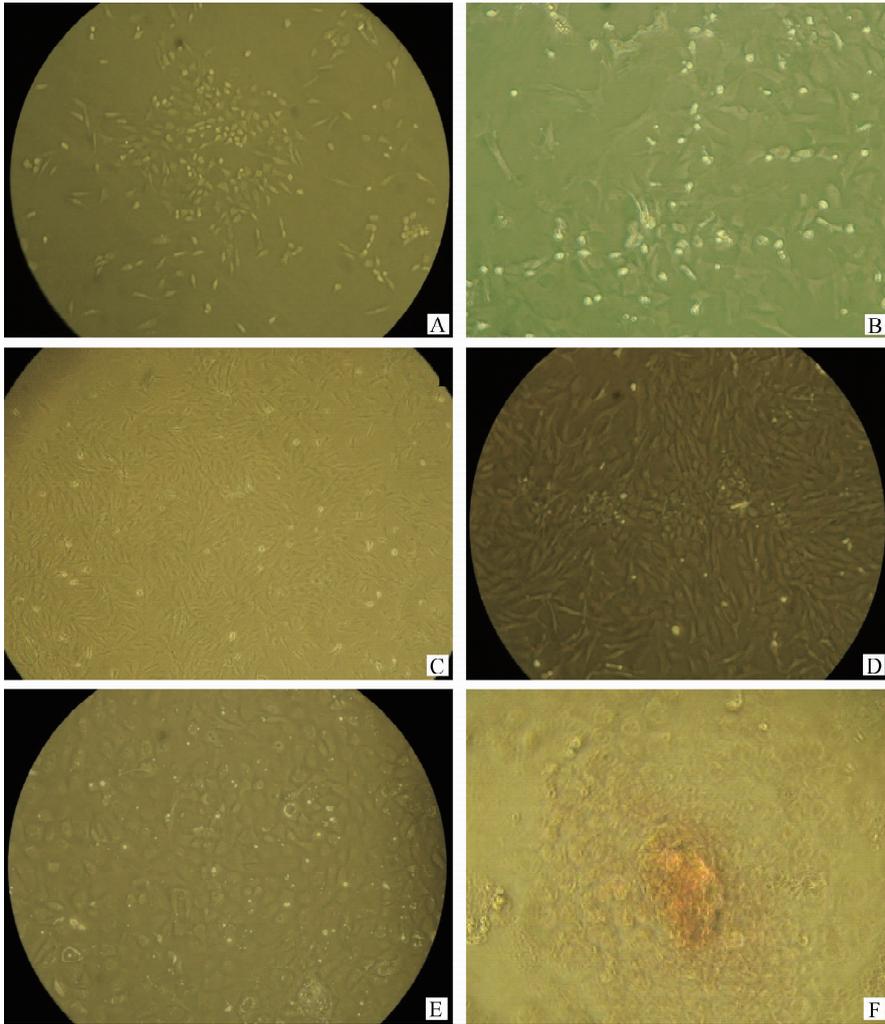
2 结果与分析

2.1 BMSCs 诱导的成骨细胞增殖与形态学变化

全骨髓法初接种的细胞密度大, 但血细胞所占比例多, 细胞呈圆形, 大多数悬浮。经不断换液, 骨

髓中外周血及造血干细胞等非贴壁细胞大部分被去除, BMSCs 即已经贴壁开始增殖(图 1 A), 生长良好。增殖速度快, 5 d 后多呈梭形或多角形(图 1 B)。传代后, 细胞 24 h 内完全贴壁, 形态与成纤维细胞相似, 成克隆性生长, 5 d 左右完全达到融合(图 1 C)。前 5 代的细胞生长迅速, 4~6 d 传代 1

次。但是, 加入成骨细胞诱导培养基后, 其细胞增殖速度减慢, 7 d 时细胞形态仍以梭形和多角形为主(图 1 D), 融合后多层生长, 不出现接触抑制, 继续培养 12 d 后细胞明显变为不规则形状(图 1 E), 细胞外基质分泌多, 在 21 d 后形成明显的钙化结节(图 1 F)。



A. 鸡胚 BMSCs 细胞培养 72 h 后, 细胞贴壁 (100×); B. 鸡胚 BMSCs 细胞培养 5 d 后形态, 可见有多角形或梭型明显集落 (200×); C. 传代后的鸡胚 BMSCs 细胞培养 5 d 后形态, 成集落样, 类似成纤维细胞 (100×); D. 鸡胚 BMSCs 细胞经诱导培养 7 d 后, 细胞形态仍以梭形和多角形为主 (100×); E. 鸡胚 BMSCs 细胞诱导 12 d 后, 呈现不规则形状 (100×); F. 鸡胚 BMSCs 细胞经诱导培养 21 d 后, 出现钙化结节 (200×)

A. Chicken embryo BMSCs after cultured for 72 h, adherence to the wall (100×); B. The morphology of chicken embryo BMSCs after induce cultured for 5 d, show polyangular or spindle appearance (200×); C. The morphology of chicken embryo BMSCs after inducing cultured for 12 d, like fibroblasts, cell clusters can be watched (100×); D. The morphology of chicken embryo BMSCs after inducing cultured for 7 d, majority cell show polyangular or spindle appearance (100×); E. The morphology of chicken embryo BMSCs after inducing cultured for 12 d, irregular shapes of cells observed (100×); F. The morphology of chicken embryo BMSCs after cultured for 21 d, calcium nodules are formed (200×)

图 1 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞形态观察

Fig. 1 The morphology of osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs

2.2 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞生长曲线变化

鸡胚 BMSCs 生长良好, 且传代细胞的生长比

原代较快, 一般在接种 7~9 d 后即可铺满 96 孔板, 潜伏期为 24~36 h; 对数增殖期约为 3~4 d、7~8 d

后进入平台期,细胞增长逐渐缓慢,曲线呈现“S”型(图 2)。诱导的成骨细胞潜伏期增长,细胞增长缓慢,对数期不如 BMSCs 细胞明显,平台期时间后移(图 3)。

2.3 BMSCs 诱导的成骨细胞细胞周期检测结果

流式细胞仪检测结果表明,鸡胚诱导的成骨细

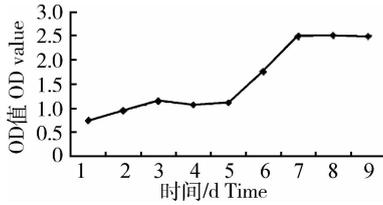


图 2 鸡胚 BMSCs 细胞生长曲线图,呈“S”型

Fig. 2 Growth curve, S-Shaped of chicken embryo BMSCs

表 1 鸡胚 BMSCs 及其定向诱导的成骨细胞细胞周期比较

组别 Group	G1 期细胞 Phase G1	S 期细胞 Phase S	G2 期细胞 Phase G2	G2/G1 G2/G1	凋亡 Apoptosis	% CV % CV
诱导组 Induced	56.92	2.01	41.07	2.00	1.94	24.68
对照组 Control	73.67	13.84	12.50	2.00	1.17	9.15

2.4 BMSCs 诱导的成骨细胞 ALP 染色检测结果

BCIP/NBT 底物显色检测发现,试验组细胞的胞质内外均可见紫色的细小颗粒,分布不均匀(图 6 A)。试验组细胞 ALP 检测呈强阳性,Image J 软件统计显示,阳性细胞纯率超过 90%,符合试验要求。对照组染色阴性(图 6 B)。

2.5 BMSCs 诱导的成骨细胞钙化结节观察结果

成骨细胞生长融合成单层,继续培养增殖细胞则相互重叠成多层,并聚集成簇,形成多个散在的致密灶,灶中央细胞逐渐萎缩变形,被分泌的基质包裹,进而钙盐沉积,发生基质矿化,形成不透明区。茜素红法染色显示,试验组细胞的胞质外可见广泛的大片红色结节,在细胞密集区反应强烈(图 7 A),结节的颜色深浅不一,体积相差较大,分布不均匀;而对照组染色阴性(图 7 B)。

2.6 BMSCs 诱导的成骨细胞 I 型胶原染色 (Van-Gieson 染色) 结果

培养 3、7、14、21 d 诱导的成骨细胞用 Van-Gieson 染液染色,胶原生成时,胞浆呈红色,红色越深,提示胶原越多。诱导的成骨细胞 3 d 时细胞胞浆基本不被红染(图 8 A),诱导培养到 7 d 可见胞浆被染

胞与 BMSCs 相比,S 期细胞数诱导组为 2.01%,对照组升高到 13.84%,G2 期细胞数诱导组达 41.07%,而对照组则降至 12.50%,提示鸡胚诱导的成骨细胞从 S 期到 G2 期发生了抑制,其具体数据见表 1,细胞周期图见图 4 和 5。

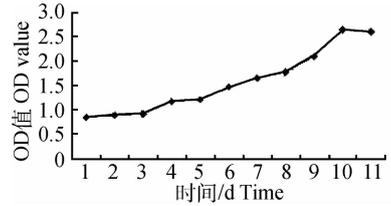


图 3 鸡胚 BMSCs 诱导成骨细胞生长曲线

Fig. 3 Growth curve of osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs

成淡粉红色(图 8 B),14 d 时,胞浆的红色进一步加深,21 d 时,胞浆红色更著。

2.7 $17\beta\text{-E}_2$ 对诱导的成骨细胞增殖的影响

雌激素对诱导的成骨细胞有一定的增殖作用,且增殖作用与浓度密切相关。本试验所采用的 $17\beta\text{-E}_2$ 浓度为 $10^{-11} \sim 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,随着浓度的上升,雌激素可促进成骨细胞的增殖,其中以 10^{-10} 、 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时尤为明显。雌激素促进成骨细胞的增殖也有一定的时间性, $17\beta\text{-E}_2$ 作用 2 d 后,试验组的 OD 值明显高于对照组 ($P < 0.05$,表 2)。

2.8 不同浓度 $17\beta\text{-E}_2$ 对诱导的成骨细胞 ALP 的影响

加入 $17\beta\text{-E}_2$ 的体外 BMSCs 成骨诱导培养的 3 d 左右,ALP 的表达开始上升,随后保持增长至 7 d 左右,但到 14 d 左右开始下降。其中以 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的试验组上升最明显(表 3)。

2.9 最适浓度 $17\beta\text{-E}_2$ 对诱导的成骨细胞凋亡的影响

根据上述试验结果,认为本试验 $17\beta\text{-E}_2 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 值为最适宜浓度。 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} 17\beta\text{-E}_2$ 作用于诱导培养的成骨细胞,10~12 d 时流式细胞术检测结果表明,试验组凋亡的细胞为 35.30%(图

表 2 不同浓度的 17 β -E₂ 对诱导的成骨细胞增殖的影响 (n=8)Table 2 Effects of different 17 β -E₂ concentrations on proliferation of osteoblasts induced by BMSCs (n=8)

组别/(mol · L ⁻¹) Group	成骨细胞增殖 OD 值 OD values for osteoblast proliferation						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
0(对照组)	0.22±0.004	0.22±0.003	0.43±0.006	0.68±0.020	0.85±0.013	1.22±0.034	1.09±0.021
10 ⁻¹¹	0.20±0.009	0.43±0.004	0.41±0.005	0.73±0.014*	0.89±0.015*	1.23±0.006*	1.12±0.027*
10 ⁻¹⁰	0.22±0.003	0.44±0.003	0.71±0.014*	0.69±0.010	0.81±0.012	1.02±0.061	1.08±0.023
10 ⁻⁹	0.20±0.011	0.42±0.004	0.65±0.022*	0.85±0.012	0.86±0.009	0.98±0.177	1.05±0.046
10 ⁻⁸	0.24±0.012	0.40±0.006*	0.74±0.041**	0.82±0.015	0.82±0.035	1.04±0.037	1.05±0.028
10 ⁻⁷	0.22±0.005	0.41±0.006	0.62±0.011*	0.84±0.044	0.83±0.051	1.12±0.022	1.06±0.015

与对照组相比,*.差异显著($P<0.05$);**.差异极显著($P<0.01$).下同

*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ compared with control. The same as below

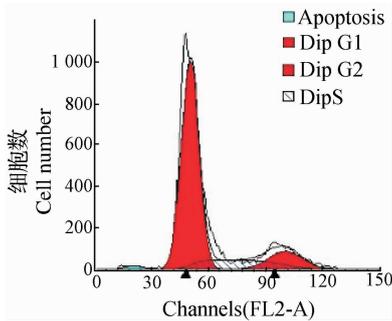


图 4 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞周期

Fig. 4 The cell cycle of osteoblasts induced by chicken BMSCs

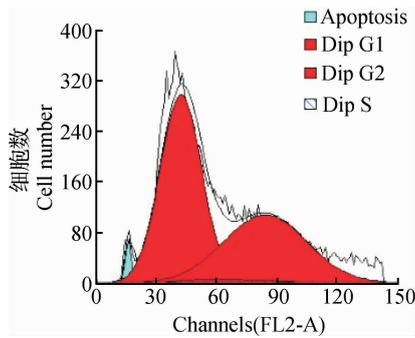
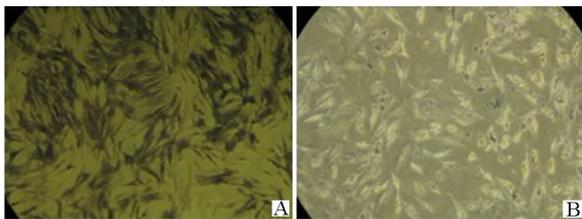


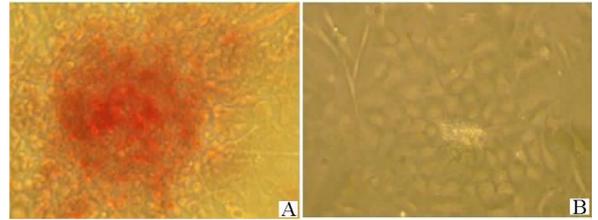
图 5 鸡胚 BMSCs 细胞周期图

Fig. 5 The cell cycle of chicken BMSCs



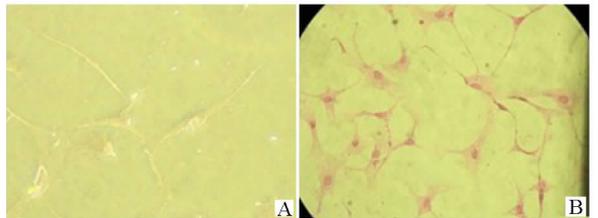
A. 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞 ALP 染色; B. 鸡胚 BMSCs ALP 染色

A. Cytochemical staining of ALP for osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs; B. Cytochemical staining of ALP for BMSCs

图 6 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞和 BMSCs ALP 染色 200 \times
Fig. 6 Cytochemical staining of ALP for osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs and BMSCs 200 \times 

A. 鸡胚诱导的成骨细胞钙化结节染色呈阳性; B. 鸡胚 BMSCs 细胞钙化结节染色呈阴性

A. Alizarin red staining for osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs showed strong positive; B. Alizarin red staining for BMSCs showed negative

图 7 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞和 BMSCs 细胞钙化结节染色 200 \times Fig. 7 Alizarin red staining for mineralization node of osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs and BMSCs 200 \times 

A. 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞培养 3 d 后的 Van-Gieson 染色; B. 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞培养 7 d 后的 Van-Gieson 染色

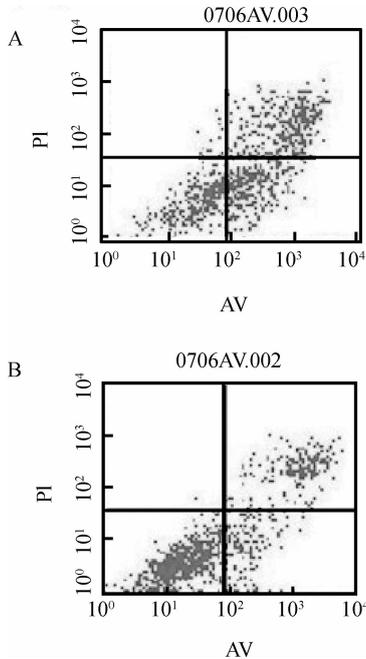
A. Van-Gieson stain for osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs 3 d after cultured; B. Van-Gieson stain for osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs 7 d after cultured

图 8 鸡胚 BMSCs 诱导的成骨细胞 Van-Gieson 染色 100 \times
Fig. 8 Van-Gieson stain for osteoblasts induced by chicken embryo BMSCs 100 \times

9A), 对照组为 64.89% (图 9B), 且早、晚期凋亡比例均有显著的下降, 提示 10⁻⁹ mol · L⁻¹ 17 β -E₂ 可对抗凋亡, 且差异显著 ($P<0.05$, 表 4)。

表 3 不同浓度的雌激素对诱导的成骨细胞 ALP 活性的影响 ($n=8$)Table 3 The effects of different $17\beta\text{-E}_2$ concentrations on ALP activity of osteoblasts induced by BMSCs ($n=8$)

组别/(mol · L ⁻¹)Group	诱导的成骨细胞 ALP 活性 ALP activity of induced osteoblasts			
	1 d	3 d	7 d	14 d
0(对照组)	0.16±0.004	0.33±0.01	0.54±0.048	0.09±0.002
10 ⁻¹¹	0.16±0.008	0.31±0.013	0.52±0.026	0.09±0.001
10 ⁻¹⁰	0.16±0.004	0.34±0.025	0.66±0.028*	0.09±0.002
10 ⁻⁹	0.19±0.003	0.41±0.048*	0.73±0.036**	0.09±0.002
10 ⁻⁸	0.13±0.011	0.40±0.03*	0.52±0.028	0.09±0.001
10 ⁻⁷	0.15±0.004	0.24±0.018	0.58±0.027	0.09±0.001

A. 10⁻⁹ mol · L⁻¹ 17β-E₂ 组, 诱导的成骨细胞凋亡散点图; B. 对照组成骨细胞凋亡散点图A. Scatterplot of apoptosis for osteoblasts induced by BMSCs with 10⁻⁹ mol · L⁻¹ 17β-E₂; B. Scatterplot of apoptosis for the control osteoblasts图 9 10⁻⁹ mol · L⁻¹ 17β-E₂ 作用于 BMSCs 诱导成骨细胞与对照组成骨细胞凋亡散点图Fig. 9 Scatterplot of apoptosis for osteoblasts induced by BMSCs with 10⁻⁹ mol · L⁻¹ 17β-E₂ and control osteoblasts

3 讨论

3.1 BMSCs 细胞的分离培养与纯化

MSC 最初由 A. J. Friedenstein^[11] 发现, 研究表明, BMSCs 易于获取, 保持高度未分化状态, 在一定的条件下, 可诱导分化为成骨细胞、软骨细胞等, 表现出多向分化潜能。但是, BMSCs 含量稀少, 仅占

表 4 17β-E₂ 试验组与对照组细胞凋亡率对比Table 4 Comparison of cell apoptosis rates with 17β-E₂ and control groups

区域 Area	意义 Meaning	17β-E ₂	对照 Control	%
下左 LL	阴性对照的正常细胞	64.15	33.44	
上左 UL	碎片及损伤细胞	0.55	1.67	
上右 UR	晚期凋亡及死亡细胞	20.27	34.75	
下右 LR	早期凋亡细胞	15.03	30.14	
凋亡总计		35.30	64.89	

单核细胞的 10⁻⁶ ~ 10⁻⁵^[12]。目前分离纯化 BMSCs 的方法: 全骨髓贴壁培养法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法和免疫磁珠法。流式细胞仪分离法与免疫磁珠法操作繁琐, 费用昂贵, 并且对细胞活性影响较大^[13]。本试验采用全骨髓贴壁培养法, 将 BMSCs 直接加入培养瓶中, 而未先进行分离。由于 BMSCs 贴壁生长, 而造血细胞悬浮生长, 尽管有较多造血细胞沉淀于细胞培养瓶底部, 但早期连续换液后, 能基本除去未贴壁细胞。该培养方法省略了 BMSCs 分离步骤, 减少了污染机会和细胞丢失。

3.2 条件培养基对 BMSCs 向成骨细胞转化的影响

BMSCs 只有在条件培养基中才能大量向成骨细胞转化, 形成骨组织。具有成骨诱导作用的有: 骨形态发生蛋白 (Bonemorphogenetic protein, BMP)、碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子 B (Transforming growth factor beta, TGF-B)、胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF)、地塞米松 (Dexamethasone, Dex)、维生素 C、B-甘油磷酸钠、瘦素 (Leptin)、骨生长肽 (Osteogenic growth peptide, OGP)、雌激素 (17beta-estradiol)、1,25 (OH)₂ D 和

甲状旁腺激素(Parathyroid hormone, PTH)^[14]。其中生长因子和地塞米松(Dexamethasone, Dex)、维生素 C、B-甘油磷酸钠研究较多。 β -甘油磷酸钠可为骨细胞分化和增殖提供磷原子,能增加 ALP 在成骨细胞中的表达,从而促进生理性钙盐的沉积和钙化。 β -甘油磷酸钠可诱导 BMSCs 向成骨细胞方向分化,为分化中的成骨细胞的成骨活动提供磷酸根,促进生理性钙盐沉积^[15];M. J. Coelho 等^[14]认为骨髓间充质干细胞只有在 β -甘油磷酸钠存在的情况下才可发生矿化结节的沉积。维生素 C 可促进体外培养细胞合成胶原,形成钙化并调节 ALP 活性^[15]。地塞米松是一种糖皮质类固醇,可提高碱性磷酸酶合成,增加细胞骨钙素的表达,诱导 BMSCs 向成骨细胞分化^[16],骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化对地塞米松具有浓度依赖性,低浓度促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,高浓度使其向脂肪细胞分化^[17],研究表明 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时促进成骨分化作用最为明显。本试验观察到 BMSCs 在高分化时,它的增殖减慢,这可能与地塞米松对细胞的增殖抑制有关。

$1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 是维生素 D 活性代谢产物,其作用通过维生素 D 受体介导,诱导其向成骨细胞分化且能抑制成骨细胞凋亡,促进骨髓间充质干细胞成骨标记物 I 胶原蛋白、骨桥蛋白及其碱性磷酸酶的分泌^[18]。

从第 3 代细胞形态学以及诱导分化后的成骨活性看,间接证明所培养的细胞就是成骨细胞。ALP 强阳性表达是 BMSCs 向成骨细胞分化的重要标志^[19]。茜素红可与钙离子结合形成复合物,在成骨细胞基质矿化期,形成钙化结节,使茜素红染色阳性^[20]。在细胞周期中,DNA 含量是恒定的参量,随细胞增殖周期各时相不同而发生变化,通过流式细胞技术检测细胞周期分析显示 73.67% 的细胞处于 DNA 合成前期 G₀/G₁ 期,说明大量细胞处于休眠期,仅少数细胞处于细胞分裂期。提示分离培养的细胞是属于原始状态的一种干细胞。诱导的成骨细胞 S 期(DNA 合成期)增加到 13.84%,说明诱导的细胞增殖能力变强。BMSCs 细胞和诱导的成骨细胞生长曲线无显著性差异,提示培养的细胞经过传代诱导,其生长特性未改变,自我更新能力随着代数的增加有所增强。细胞周期在一定程度上可反映细胞的增殖状态,S 期细胞比例越高,则细胞分裂活力强,处于增殖旺盛的细胞比例越高^[21]。试验结果表

明,诱导组 S 期细胞低于对照组,说明培养基中某种成分可能抑制了成骨细胞分裂增加,延长成骨细胞周期的进程。这也与细胞增殖率的结果相吻合,诱导的成骨细胞潜伏期增长,细胞增殖缓慢,对数期不如 BMSCs 细胞明显,平台期时间后移。但是鉴于 BMSCs 体内成骨环境及调节机制的复杂性,迄今为止,还未形成一套标准的 BMSCs 体外提取和培养诱导的方法。

3.3 雌激素对 BMSCs 成骨分化作用

雌激素对 BMSCs 成骨分化作用的研究由于细胞来源、生长发育成熟等方面的差异,其结果不一致,尚有争议。袁成良等^[22]研究表明雌二醇可抑制骨髓基质细胞向成骨细胞分化,而陈翠平等^[23]研究表明, $17\beta\text{-E}_2$ 可增强 BMSCs 体外诱导成骨分化。 $17\beta\text{-E}_2$ 对 BMSCs 成骨分化促进作用的机制可能表现在 2 个方面:(1)雌激素的直接刺激效应:雌激素对骨细胞及其他细胞的作用通过受体 α 、 β 调节。雌激素与 BMSCs 内受体结合发挥促增殖作用,增加 MSCs 的数量。而 BMSCs 的成骨分化能力很大程度上与细胞的数量相关。(2)雌激素的间接效应:雌激素作用发挥诱导或促进 BMSCs 成骨分化作用的细胞因子。本试验中,当 $17\beta\text{-E}_2$ 浓度为 10^{-10} 、 10^{-9} 和 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可促进诱导的成骨细胞增殖,其中又以 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度促进作用更明显, $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时不能促进增殖。药物作用 24 h 时,试验组与对照组比较无显著差异,但随着时间的推移,有明显的增殖作用,说明 $17\beta\text{-E}_2$ 作用时间越长,其增殖作用越明显,但当 $17\beta\text{-E}_2$ 浓度大于 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,OD 值并不出现持续的增高,可能是高浓度的 $17\beta\text{-E}_2$ 对成骨细胞有一定的毒害作用。由此推出, $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $17\beta\text{-E}_2$ 可能是促进鸡胚 BMSCs 诱导成骨细胞的最佳生理浓度。ALP 是成骨细胞成熟的早期标志之一^[24],可作为观察成骨分化的早期指标。本试验使用 10^{-10} 、 10^{-9} 及 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $17\beta\text{-E}_2$ 时,体外 BMSCs 成骨诱导培养 3 d 左右其 ALP 明显上升,随后保持较稳定增长至第 7 天,到第 14 天开始明显下降。 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $17\beta\text{-E}_2$ 对 ALP 的促进作用不明显。L. R. Chaudhary 等^[25]认为,雌激素对成骨细胞 ALP 活性无作用,但陈翠平等^[23]研究证明,雌激素可促进诱导的成骨细胞分泌 ALP,与本试验结果基本一致。

细胞凋亡(Apoptosis)或细胞程序性死亡(Pro-

grammed cell death, PCD)是指在一定的条件下,细胞遵循固定的程序,自己结束生命的过程。Annexin V/PI 双染色法可很好地区分早期凋亡、晚期凋亡及坏死细胞,是目前判断细胞凋亡的常用方法^[26]。本研究试验组与对照组细胞凋亡比较,试验组晚期凋亡细胞降低,证明雌激素不仅具有抗凋亡作用,且主要在抗晚期凋亡。研究表明,雌激素可通过多种途径来抑制细胞的凋亡^[27-29],但雌激素抗凋亡作用的剂量和时间依赖性还有待进一步研究。

3.4 雌激素、BMSCs 与骨质疏松

骨组织通过破骨细胞的骨吸收和成骨细胞的骨形成不断进行骨重建过程^[30]。雌激素是骨代谢调节的重要激素之一,参与机体骨骼生理和病理的相关过程,雌激素水平下降时,骨骼对钙的结合能力下降,破骨细胞的吸收作用增强,导致骨质疏松。产蛋前期蛋鸡,在性成熟前形成与禽类产蛋功能密切相关的髓质骨。髓质骨是产蛋鸡的钙库,为蛋壳形成时钙的主要来源^[31-32]。雌激素对蛋鸡骨骼的生长发育、成熟以及骨量的维持有重要的调节作用^[33],可直接间接地对破骨细胞和成骨细胞活性发挥调节作用,以维持骨重建的平衡,雌激素能介导成骨细胞性骨形成,促进成骨细胞增殖、分化、成熟,改善骨代谢^[34],本试验的目的在于研究外源性 17β -雌二醇对 BMSCs 细胞诱导的成骨细胞的影响,为探索髓质骨形成及其蛋鸡骨质疏松症发病机理提供理论基础。

4 结 论

综上所述,鸡胚的 BMSCs 体外培养增殖能力强,添加条件诱导培养基可诱导其向成骨细胞分化,经体外诱导和分化的成骨细胞生长良好,表现出与典型的成骨细胞相似的形态和生物学特征。不同浓度的雌激素可促进 BMSCs 诱导的成骨细胞分化增殖,促进其分泌 ALP,其中 10^{-9} mol · L⁻¹ 的 17β -E₂ 促进作用尤为突出。

参考文献:

[1] 赵大成,汪玉良,党跃修,等.大鼠骨髓间充质干细胞的体外成骨诱导[J].中国组织工程研究,2012,16(14):2491-2495.

[2] 雷栓虎,岳海源,汪静,等.骨髓间充质干细胞诱导分化成骨方法的研究与进展[J].中国组织工程研究,2013,17(6):1101-1106.

[3] 郭常敏,王达利,魏在荣,等.人脂肪间充质干细胞体

外培养鉴定与诱导分化的初步研究[J].遵义医学院学报,2013,(1):32-36.

- [4] 张帆.淫羊藿苷诱导人脐带间充质干细胞分化为成骨细胞的试验研究[D].郑州:郑州大学,2011.
- [5] TAKASHIMA S, ISE H, ZHAO P, et al. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions[J]. *Cell Struct Funct*, 2004, 29(3):73-84.
- [6] 李碧春,魏彩霞,余飞,等.鸡精原干细胞定向诱导分化特性的研究[J].畜牧兽医学报,2008,39(10):1336-1342.
- [7] LI Z W, PIAO C D, SUN H H, et al. Asiatic acid inhibits adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. *Cell Biochem Biophys*, Published Online; 2013, Aug. 10. DOI 10.1007/s12013-013-9725-2.
- [8] SCUTT A, BERTRAM P, BRÄUTIGAM M. The role of glucocorticoids and prostaglandin E₂ in the recruitment of bone marrow mesenchymal cells to the osteoblastic lineage; positive and negative effects[J]. *Calcif Tissue Int*, 1996, 59(3):154-162.
- [9] PANJA A. A novel method for the establishment of a pure population of nontransformed human intestinal primary epithelial cell (HIPEC) lines in long term culture [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(9):1473-1475.
- [10] 郑集义. Van Gieson 染色液的配制及染色体会 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2005, 20(4):496
- [11] FRIEDENSTEIN A J. Precursor cells of mechanocytes [J]. *Int Rev Cytol*, 1976, 47:327-359.
- [12] BARRY F P, MRUPHY J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4):568-584.
- [13] SUGIOKA T, OCHI M, YASUNAGA Y, et al. Accumulation of magnetically labeled rat mesenchymal stem cells using an external magnetic force, and their potential for bone regeneration [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 85(3): 597-604.
- [14] COELHO M J, FERNANDES M H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(11):1095-1102.
- [15] MANIATOPOULOS C, SODEK J, MELCHER A H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats [J]. *Cell Tissue Res*, 1988, 254(2):317-330.
- [16] MARIE P J, FROMIGUE O. Osteogenic differentia-

- tion of human marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Regen Med*, 2006, 1(4): 539-548.
- [17] JAISWAL N, HAYNESWORTH S E, CAPLA N A I, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*[J]. *J Cell Biochem*, 1997, 64(2): 295-312.
- [18] VAN LEEUWEN J P, VAN DRIEL M, VAN DEN BEMD G J, et al. Vitamin D control of osteoblast functions and bone extracellular matrix mineralization [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2011, 11(1-3): 199-226.
- [19] SU L C, JOSEPH W, LEONARD R, et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*; induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone [J]. *Endocrinology*, 1994, 134: 277-286.
- [20] ABDALLAH B M, JENSEN C H, GUTIERREZ G, et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/ Pref-1[J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(5): 841-852.
- [21] 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学[M]. 第2版. 北京: 北京师范大学出版社, 1998.
- [22] 袁成良, 金小岚, 侯建红, 等. 雌二醇对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(13): 1155-1158.
- [23] 陈翠平, 罗新. 17 β -雌二醇对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 13(5): 334-338.
- [24] 王洪复. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 60-63.
- [25] CHAUDHARY L R, SPELSBERG T C, RIGGS B L. Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-21 beta and tumor necrosis factor-alpha; lack of regulation by 17 beta-estradiol[J]. *Endocrinology*, 1992, 130: 25-82.
- [26] 何雯, 张蓓, 刘无逸. 四种细胞凋亡检测方法的比较[J]. 中外医疗, 2007, 26(24): 122.
- [27] CHEN J R, PLOTKIN L I, AGUIRRE J I, et al. Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus Pro-Apoptotic effects of estrogens[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 4632-4638.
- [28] CHANDAR N, LOGAN D, SZAJKOVICS A, et al. Gene expression changes accompanying p53 activity during estrogen treatment of osteoblasts [J]. *Life Sci*, 2004, 75: 2045-2055.
- [29] TAKANO H, AIZAWA T, IRIE T, et al. Normal bone growth requires optimal estrogen levels; negative effects of both high and low dose estrogen on the number of growth plate chondrocytes[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2008, 214(3): 269-280.
- [30] WHITEHEAD C C. Overview of bone biology in the egg-laying hen[J]. *Poult Sci*, 2006, 83(2): 193-199.
- [31] KIM W K, DONALSON L M, BLOOMFIELD S A. Molt performance and bone density of cortical, medullary, and cancellous bone in laying hens during feed restriction or alfalfa-based feed molt[J]. *Poult Sci*, 2007, 86(9): 1821-1830.
- [32] WEBSTER A B. Welfare implications of avian osteoporosis[J]. *Poult Sci*, 2004, 83(2): 184-192.
- [33] CHEN X X, DENG Y F, ZHOU Z L, et al. 17(-estradiol combined with testosterone promotes chicken osteoblast proliferation and differentiation by accelerating the cell cycle and inhibiting apoptosis *in vitro* [J]. *Vet Res Commun*, 2010, 34: 143-152.
- [34] 陈秀霞, 邓益锋, 周振雷, 等. 17 β -雌二醇对青年期 ISA 蛋鸡骨代谢的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(42): 8251-8254.

(编辑 程金华)