DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2017.08.014

医学生物物理

骨髓间充质干细胞成骨分化过程中碱性磷酸酶基因表达含量的变化

洪亮[1],焦根龙[2]
1.广州增城区新塘医院骨科,广东 广州 511340;2.暨南大学附属第一医院骨科东区,广东 广州 510630

【摘 要】**目的:**提取鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)进行成骨诱导并对BMSCs成骨分化过程中碱性磷酸酶(ALP)的表达量进行定量监测,揭示BMSCs在成骨分化过程中活性的变化。 **方法:**采用全骨髓贴壁法提取鼠BMSCs,培育、扩增至第3代时,以地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素C为主要成分配制诱导培养基进行成骨诱导3周。在成骨诱导过程中,通过实时荧光定量(qRT-PCR)探针法对目标细胞的ALP表达量进行实时监测。 **结果:**成骨诱导BMSCs,经显微镜观察、ALP染色、矿化结节染色等检测方法证实诱导成功。qRT-PCR实时检测的ALP表达量在1周后快速上升并维持1周的高值,2周后快速下降至初始值。 **结论:**采用全骨髓贴壁法提取、培养的BMSCs,利用经典的成骨诱导方法可分化为成骨细胞。成骨分化过程中,目标细胞的成骨活性1周后开始快速增强,并可在高水平维持1周,2周后活性开始下降。

【关键词】骨髓间充质干细胞;成骨分化;碱性磷酸酶;基因表达;实时荧光定量聚合酶链反应
【中图分类号】R329 【文献标志码】A 【文章编号】1005-202X(2017)08-0825-04

Changes of alkaline phosphatase gene expression level in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

HONG Liang[1], JIAO Genlong[2]
1. Department of Orthopedics, Xintang Hospital of Zengcheng District, Guangzhou 511340, China; 2. Department of Orthopedics (Eastern), the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China

Abstract: Objective To investigate the changes of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) activity during osteogenic differentiation by performing osteogenic induction for the extracted rat BMSCs and quantitatively monitoring the alkaline phosphatase (ALP) expression level during osteogenic differentiation of BMSCs. **Methods** BMSCs extracted with full-adherent method were cultivated until cells spread to the third generation. The prepared induction medium with the main components of dexamethasone, beta glycerophosphate, vitamin C was used for 3 weeks of osteogenic induction. During osteogenic induction, the ALP expression level of target cells was monitored in real-time with quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) probe method. **Results** The osteogenic induction of BMSCs was confirmed by microscopy, ALP staining, staining of mineralized nodules and so on. The ALP expression level detected with qRT-PCR in real-time increased rapidly after 1 week and maintained high level for 1 week, but decreased rapidly to initial value after 2 weeks. **Conclusion** BMSCs extracted and cultured with full-adherent method were differentiated into osteoblasts by classical osteogenic induction. During osteogenic differentiation, the osteogenic activity of target cells increases rapidly after 1 week, and maintains high level for 1 week, but declines after 2 weeks.
Keywords: bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; alkaline phosphatase; gene expression; quantitative real-time polymerase chain reaction

前 言

骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells,BMSCs)是一类具有多向分化潜能的细胞,可向多种方向分化。采用全骨髓贴壁法可以有效获得数量充足、生长状态良好并具有分化潜能的间充质干细胞[1]。BMSCs的分化特性稳定,是一种理想的种子细胞[2-4]。在骨组织修复研究中,成骨分化后的种子细胞与支架材料的有效结合,构成具有生物活性的复合体是取代自体骨移植的关键步骤。在成骨分化过程中,了解成骨细胞从展现活力到逐渐衰老、消失的变化规律具有非常重要的现实意义,有助于解决种子细胞与支架材料结合的时机问题。本实验利用全骨髓贴壁法

【收稿日期】2017-04-16
【基金项目】广东省医学科研基金(20161028182842;A2017475)
【作者简介】洪亮,硕士,主治医师,主要研究方向:骨组织工程、脊柱外科,E-mail:13565409@qq.com

培育BMSCs，扩增至第3代时实施经典的化学诱导成骨分化方案，利用显微镜观察、ALP染色、矿化结节染色对诱导细胞进行鉴定，在诱导过程中利用qRT-PCR实时检测成骨细胞最显著的标志基因ALP的表达量，以此来研究成骨诱导细胞的活性变化规律。

1 材料与方法

1.1 BMSCs的培养、成骨诱导

选取4周龄雄性SD大鼠8只，取股骨、胫骨骨髓混悬液，接种于培养瓶内，置于37 ℃、5 mL/dL CO_2饱和湿度培养箱中，以DMEM/F12培养基进行培养，3 d换液1次。当瓶底细胞贴壁约90%时，用0.25%胰蛋白酶消化，1:2传代培养。传至第3代时更换诱导培养基（DMEM/F12培养基+10^{-8} mmol/L地塞米松+10 mmol/L β-甘油磷酸钠+50 μg/mL维生素C）行成骨诱导培养，共3周。

1.2 细胞检测指标

1.2.1 形态学观察 倒置像差显微镜下观察BMSCs的形态变化。

1.2.2 ALP染色 第21天时，冷纯丙酮固定10 min。蒸馏水冲洗、沥干。加入孵育液（5 mL 3%甘油磷酸钠；1 mL 2% $MgSO_4$；5 mL 2%巴比妥钠；10 mL 2% $CaCl_2$；蒸馏水10 mL），4 h后取出培养瓶蒸馏水冲洗。加入2%硝酸钴5 min。蒸馏水冲洗。加入1%硫化铵2 min。PBS冲洗、干燥，显微镜下观察、照片。

1.2.3 矿化结节染色（茜素红法） 第21天时，95%乙醇固定10 min，蒸馏水冲洗。0.1%茜素红-Tris-HCl（pH 8.3），培养箱中30 min。蒸馏水冲洗、干燥，显微镜下观察、拍照。

1.3 实时荧光定量（qRT-PCR）探针法

成骨诱导的3周里，每3 d检测2个标记基因：内参β-actin和ALP。

总RNA的提取按照试剂盒说明书操作。琼脂糖电泳测定结果。反转录反应根据试剂盒的RT反应液配制。条件：37 ℃，15 min（反转录反应）；85 ℃，5 s（反转录酶的失活时间）。引物的序列摘自美国NCBI基因库。引物及探针设计、PCR步骤委托美国Invitrogen公司中国分公司上海英骏生物技术有限公司。ALP基因序列：上游引物5'GGGAAGATGTGGCGGTCTTTG3'，下游引物5'CAGGCACAGTGGTCAAGGTTG3'，探针序列5'CCTATGGCTCACCTGCTTCACGGCG3'，大小130 bp；内参β-actin基因序列：上游引物5'TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTAT3'，下游引物5'ACTCATCGTACTCCTGCTTGCT3'，探针序列5'CCTCACTGTCCACCTTCCAGCAGATGT3'，大小82 bp。

2 结 果

2.1 光镜下BMSCs的第3代细胞及成骨诱导细胞的形态学观察

BMSCs的P3代细胞呈梭形纺锤状，形态均一，折光性好。细胞融合后呈典型的极性，漩涡状生长，见图1。

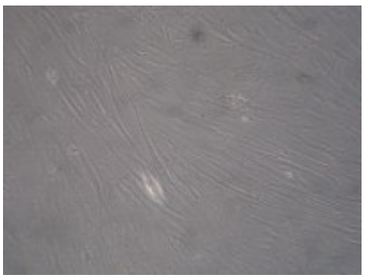

图1 BMSCs第3代细胞(×300)

Fig.1 Third generation cells of bone marrow mesenchymal stem cells (×300)

诱导第5天时，细胞体积开始增大，形似立方形、三角形等，旋涡状分布不规则，高倍镜下见胞浆内含颗粒样物质；第14天时，细胞呈层叠密集生长，形态多样，可见到结节状结构，高倍镜下见胞浆内的颗粒样物质浓度增高；第21天时，细胞更加密集，出现细胞团聚，高倍镜下见局部有红褐色的细胞外基质沉积，见图2。

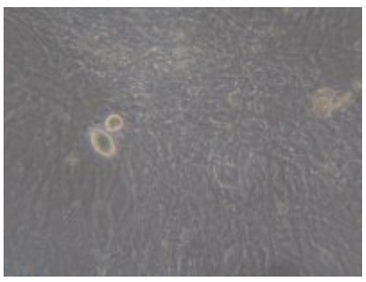

图2 成骨诱导细胞(×300)

Fig.2 Osteogenic induction cells (×300)

2.2 ALP染色结果

镜下见大量棕黑色或黑色颗粒，呈现强阳性（>90%，图3）。

2.3 矿化结节染色（茜素红法）结果

镜下可见细胞呈橘红色，胞质内钙结节部位颜色分明（图4）。

2.4 RNA电泳结果RNA

电泳凝胶结果，紫光下显示清晰的3条亮带（5S、18S、28S），见图5，证明所提取的样本为RNA物质。

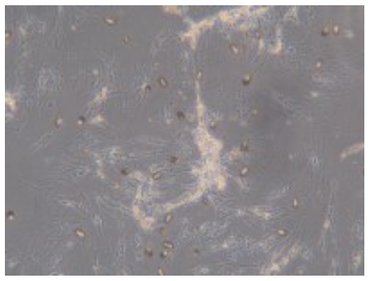

图3 成骨诱导细胞ALP染色(×150)
Fig.3 Alkaline phosphatase (ALP) staining of osteogenic induction cells (×150)

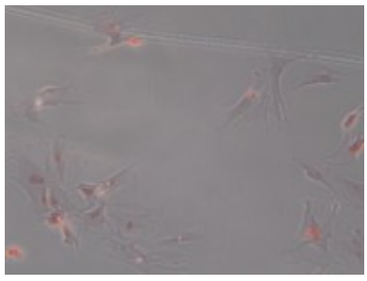

图4 矿化结节染色(茜素红法)(×300)
Fig.4 Staining of mineralized nodules (alizarin red method) (×300)

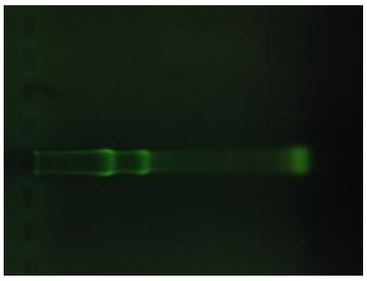

图5 RNA凝胶电泳
Fig.5 RNA gel electrophoresis

2.5 qRT-PCR结果分析

ALP含量早期维持在较低水平,在1周后快速上升并维持1周的高值,2周后快速下降至初始值(图6)。

3 讨 论

大量研究表明SD大鼠BMSCs在特定条件下体外可向成骨、软骨、脂肪细胞等分化[5-6]。Muraglia等[7]研究表明BMSCs中60%~80%具有成骨和软骨分化潜能,实际上所有的繁殖都显示出成骨分化潜能,进一步的繁殖会逐步失去脂肪、软骨分化的潜

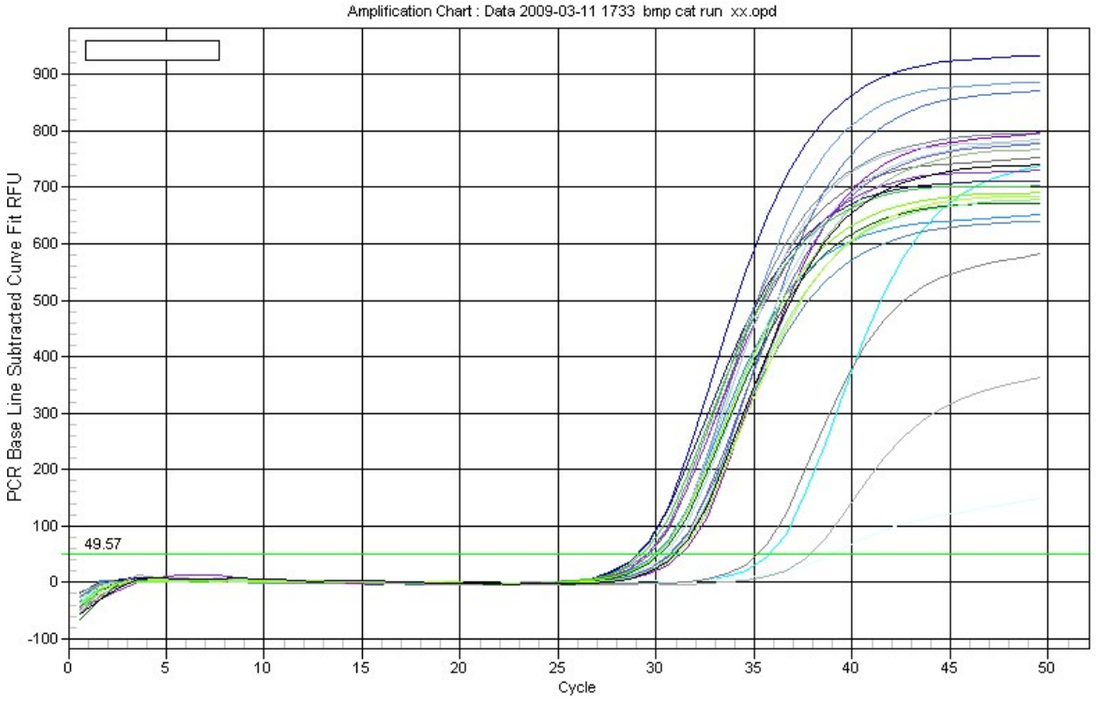

图6 ALP基因扩增曲线图
Fig.6 ALP gene amplification curve

能。大量实验表明,BMSCs经成骨诱导后再复合适当的支架材料,能够异位成骨、修复骨缺损,并且不存在组织配型、免疫排斥问题,是目前最具有应用前景的种子细胞[8]。在经典的化学诱导成骨分化方案中,使用特定的诱导培养基,经诱导培养的干细胞在3周后可以成功地转化为成骨细胞[9-11]。这种培养基

里包括地塞米松、β-磷酸甘油钠和维生素C。地塞米松可促进成骨细胞分化成熟，提高ALP活性，调节成骨细胞分泌胰岛素样生长因子，促进细胞外基质胶原合成；抗坏血酸的主要作用与细胞间质的合成有关，对成骨细胞分化的促进作用，主要是通过增加胶原的累积，然后增加ALP在成骨细胞中的表达[12-13]；β-磷酸甘油钠为成骨细胞提供磷酸离子，促进生理性钙盐的沉积和钙化，是发生矿化结节的必要条件。干细胞在经过多次传代，会出现老化和突变。Bruder等[14]评价传代15代过程中hMSC的生长、成骨分化情况，尽管成骨分化潜能并未受到影响，但反映增殖潜能的细胞标记物减少了。BMSCs成骨分化后转变为成熟细胞，失去传代特性，其活性将随细胞的衰老很快消失，故了解成骨细胞活性变化规律，有助于提高成骨细胞的使用效率。

ALP是反应骨组织中分解代谢水平的一种标志酶，在钙化中起着关键作用。钙离子在ALP作用下沉积于胶原上，完成基质矿化过程[15]，骨组织是通过骨基质钙化而形成，而骨基质由成骨细胞合成、分泌；在基质开始钙化时，成骨细胞的ALP活性最高，在钙化接近结束时活性则最低，其活力在一定程度上反映成骨细胞的分化程度和功能状态[16]。ALP染色法是一种定性的检测方法，为揭示诱导过程中成骨活性的变化规律，只有定性结果显然是不够的。qRT-PCR是目前量化表达基因水平最准确的方法之一，广泛应用于基因RNA水平的检测[17-18]。运用此定量技术对成骨诱导过程中ALP的表达进行实时监测，可以更准确地了解成骨细胞的活性变化规律，对指导成骨细胞应用具有重要意义。BMSCs经过成骨诱导1周后与支架材料复合，具备良好的实用性和可操作性。

【参考文献】

[1] 黄伟, 谢琪璇, 秦俊文, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞多潜能性的鉴定[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2011, 32(2): 136-140.
HUANG W, XIE Q X, QIN J W, et al. The identification of multipotential in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Journal of Jinan University: Medicine Edition, 2011, 32(2): 136-140.

[2] BIRMINGHAM E, NIEBUR G L, MCHUGH P E, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche[J]. Eur Cell Mater, 2012, 23: 13-27.

[3] LIU A R, LIU L, CHEN S, et al. Activation of canonical wntpathway promotes differentiation of mouse bone marrow-derived MSCs into type Ⅱ alveolar epithelial cells, confers resistance to oxidative stress, and promotes their migration to injured lung tissue *in vitro*[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(6): 1270-1283.

[4] DU M Q, HUANG Y Q, LU N S, et al. Characterization and differentiation into adipocytes and myocytes of porcine bone marrow mesenchymal stem cells[J]. J Integr Agr, 2014, 13(4): 837-848.

[5] VIDAL M A, KILROY G E, LOPEZ M J, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Vet Surg, 2007, 36(7): 613-622.

[6] COELHO M J, FERNANDE M H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part Ⅱ: effect of ascorbic acid, β-glycrophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation[J]. Biomaterials, 2000, 21(11): 1095-1102.

[7] MURAGLIA A, CANCEDDA R, QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model[J]. Cell Sci, 2000, 113: 1161-1166.

[8] DAHIR G A, CUI Q, ANDERSON P, et al. Pluripotential mesenchymal cells repopulate bone marrow and retain osteogenic properties[J]. Clin Orthop, 2000, 379(S): 134-145.

[9] RYAN M P, WILLIAM R, HUCKLE S, et al. Effect of dexamethason withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. Cell Biochem, 2003, 90: 13-22.

[10] GOODWIN H S, BICKNESS A R. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of none, fat and neural markers[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2001, 7(11): 581-588.

[11] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[12] CHENG S L, YANG J W, RIFAS L, et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone[J]. Endocrinology, 1994, 134 (1): 277-286.

[13] SCUTT A, BERTRAM P, BRAUTIGAM 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.

[14] BRUDER S P, JAISWAL N, HAYNESWORTH S E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation[J]. Cell Biochem, 1997, 64: 278-294.

[15] JAISWAL S E, CAPLAN A I. Osteogenic differentation of purified culture expanded human mensenchymal stem cells *in vitro*[J]. Cell Biochem, 1997, 64(2): 295.

[16] ALBORZI A, MAC K, GLACKIN C A, et al. Endochondral and intramembranous fetal bone development: osteoblastic cell proliferation and expression of alkaline phosphatase, mtwist, and histone H4[J]. Craniofac Gent Dev Biol, 1996, 6(2): 94.

[17] BUDHIA S, HARING L F, MCCONNELL I, et al. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR[J]. Immunol Methods, 2006, 309(1/2): 160-172.

[18] SINGH R, RECINOS R F, AGRESTI M, et al. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: an improvement in detecting mRNA levels in mouse cranial tissue[J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(7): 2227-2234.

（编辑：黄开颜）