文章编号:1000-5404(2007)18-1783-04

论著

# 成骨生长肽对大鼠骨髓基质细胞增殖分化的影响

王 璐[1],徐 凌[1],梁 星[2],任乃华[1],付 钢[1],李苏伶[1],江晓峰[1] ([1]重庆医科大学附属口腔医院修复科,重庆 400015;[2]四川大学华西口腔医院修复科,成都 600041)

**提 要:目的** 研究成骨生长肽(osteogenic growth peptide, OGP)在体外对骨髓基质细胞增殖和成骨向分化的影响。**方法** 在体外培养的大鼠骨髓基质细胞中加入不同浓度的OGP($10^{-11}$~$10^{-7}$ mol/L),用MTT法检测细胞增殖,酶联免疫法检测细胞内碱性磷酸酶(ALP)的表达,RT-PCR法检测细胞内核心结合因子1(Cbfa1) mRNA的表达。**结果** OGP对骨髓基质细胞增殖有促进作用($P<0.05$),最大效应浓度为$10^{-9}$ mol/L;能增加细胞内ALP活性($P<0.05$),最大效应浓度为$10^{-8}$ mol/L;可诱导Cbfa1 mRNA的表达($P<0.05$)。**结论** OGP可促进骨髓基质细胞的增殖,并通过诱导其内Cbfa1 mRNA的表达促进其成骨向的分化。

**关键词:** 成骨生长肽;骨髓基质细胞;细胞增殖;碱性磷酸酶;核心结合因子1
**中图法分类号:** R322.71;R329.28;R341 **文献标识码:** A

# Osteoblastic growth peptide regulates proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells

WANG Lu[1], XU Ling[1], LIANG Xing[2], REN Nai-hua[1], FU Gang[1], LI Su-ling[1], JIANG Xiao-feng[1] ([1]Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400015; [2]Department of Prosthodontics, West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 600041, China)

**Abstract:** **Objective** To elucidate the effect of osteogenic growth peptide(OGP) on bone marrow stromal cells proliferation and differentiation *in vitro*. **Methods** Bone marrow stromal cells were cultured individually in medium contained various concentrations of OGP; and cell proliferation quantity, alkaline phosphatase activity and level of Cbfa1 mRNA were examined by means of MTT, enzyme-linked immunoreaction and reverse transfer polymerase chain reaction respectively. **Results** *In vitro*, the addition of OGP in cultures resulted in an increase of cell proliferation($P<0.05$), ALP activity($P<0.05$) and level of mRNA for Cbfa1($P<0.05$). All concentrations ($10^{-11}$ – $10^{-7}$ mol/L) of OGP were effective but the maximum response was obtained with $10^{-8}$ mol/L OGP. **Conclusion** Our results demonstrate that OGP stimulates proliferation and sequential differentiation of bone marrow stromal cells *in vitro*.

**Key words:** osteogenic growth peptide; bone marrow stromal cells; proliferation; alkaline phosphatase; Cbfa1

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)又称间充质干细胞(mesenchymal stem cells),具有自我增生及多向分化潜能,在适当诱导条件下可向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌细胞等多种细胞分化。成骨生长肽(osteogenic growth peptide,OGP)是新近发现的促进成骨作用的多肽类生长因子,已有的研究初步证实了其在加快骨折愈合,预防和治疗骨质疏松等方面具有良好的效果[1]。目前尚少见OGP对骨髓基质细胞作用的研究报道。因此,我们利用已建立的大鼠骨髓基质细胞体外培养模型,研究OGP对骨髓基质细胞的增殖能力及成骨细胞特异性标记物碱性磷酸酶(ALP)和转录因子Cbfa1表达的作用,旨在探讨OGP对其是否具有成骨向的诱导作用,为后续的进一步研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

α-MEM培养基(Gibco公司,美国);新生小牛血清(哈里生物,成都);OGP(Sigma公司,美国);MTT试剂(Gibco公司,美国);碱性磷酸酶检测试剂盒(柏定生物工程有限公司,北京);PCR标准DL 2000(天为时代有限公司,北京);SV Total RNA I-

作者简介:王 璐(1964-),男,重庆市人,副主任医师,副教授,主要从事口腔组织工程学及口腔材料学方面的研究。电话:(023)89038703,E-mail:xh1201@163.com
通讯作者:梁 星,E-mail:xingliangdent@vip.163.com
收稿日期:2006-09-26;修回日期:2007-05-12

solation System(Promega,美国);One Step RNA PCR Kit(TaKaRa,日本);HTS7000plus 多孔板高效分析仪(PE 公司,美国);PCR 扩增仪(MJ PTC-200 型,美国);电泳仪(Bio-Rad MINI SUB®CELL GT,美国);核酸凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)。

### 1.2 细胞来源和培养

取 6 周龄雄性 SD 大鼠(四川大学实验动物中心提供),颈椎脱位法处死后,于无菌条件下取出双侧股骨,去除股骨双侧干骺端,用针管吸取 5 ml 含血清的 α-MEM 培养基,冲出骨髓,悬浮细胞,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,α-MEM 洗涤 2 次,用含 10% 小牛血清的 α-MEM 培养基 5 ml 制成细胞悬液,按每瓶 $10^7$ 个细胞接种于 25 $cm^2$ 培养瓶中,置于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中静置培养。第 3 天换液,弃悬浮细胞。以后 4 d 换液 1 次。待细胞生长融合长满瓶底时,进行消化传代。

### 1.3 骨髓基质细胞的鉴定

取第 3 代细胞爬片,用 PBS 液清洗,95% 乙醇固定,采用免疫细胞化学的方法,行细胞 SH3 抗原检测。

### 1.4 细胞分组

将第 3 代传代细胞分为 6 组。空白对照组:仅加入含 10% 小牛血清的 α-MEM 培养基。实验组:含 10% 小牛血清的 α-MEM 培养基中加入不同浓度的 OGP,即 $10^{-11}$、$10^{-10}$、$10^{-9}$、$10^{-8}$、$10^{-7}$ mol/L OGP 组。所有实验中培养液每 3 天换 1 次。

### 1.5 细胞增殖的检测

采用 MTT 法。将传代细胞按每孔 $1\times10^4$/200 μl 接种于 96 孔细胞培养板中,按上述分组方案分为 6 组,每组设 5 个复孔。24 h 细胞贴壁后换液,分别加入相应药物,继续培养。在 1、2、3 d 3 个时间段,分别在所需检测的培养孔内每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl,37 ℃继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 200 μl 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值 $D(490)$。

### 1.6 细胞内 ALP 活性检测

将传代细胞按 $1\times10^5$/3 ml 细胞密度接种于培养瓶(25 ml),按上述分组方案分为 6 组,每组设 3 个复瓶。换液同前。在第 3、6、9 天 3 个时间段,分别收集细胞,按试剂使用说明,处理收集样品,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值,测定细胞内 ALP 酶活力。

### 1.7 细胞内 Cbfa1 mRNA 表达水平检测

采用逆转录 PCR 方法检测,将传代细胞按 $1\times10^6$/5 ml 接种于培养瓶(75 ml),按上述分组方案分为 6 组,每组设 3 个复瓶。换液同前。在第 10 天收集细胞。按照 SV Total RNA Isolation System 试剂盒使用说明提取总 mRNA。各取 5 μl 稀释 20 倍,于 Du70 紫外分光光度计下测量 $D(260)$、$D(280)$ 数值,保证 $D(280)/D(260)$ 在 1.8 ~ 2.0 之间。逆转录:按照 One Step RNA PCR Kit 试剂盒使用方法,进行扩增。PCR 反应温度 50 ℃ 30 min,94 ℃ 预变性 2 min,然后扩增。反应条件:变性 94 ℃ 30 s;53 ℃ 30 s;延伸 72 ℃ 1 min,共 35 个循环。最后 1 个循环 72 ℃ 延伸 10 min。引物由上海捷信思基因技术有限公司合成。引物序列:Cbfa1 上游:5′-TACGAAATGCCTCTGCTGTT-3′,下游:5′-TTCTGTCTGTGCCTTCTTGG-3′;β-actin 上游:5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAA-3′,下游:5′-CATCTCTTGCTCGAA-GTCCA-3′。

电泳和半定量分析:称取琼脂糖,与四溴乙烷(TBE)缓冲液配制 1.7% 凝胶,加入 1% 二溴乙烷(EB)2 μl。取扩增产物 8 μl 与 0.25% 溴酚蓝 2 μl 上样,80 V 电压下电泳 40 min。用凝胶成像系统进行凝胶摄像和图像分析。定量检测均重复 3 次,各产物的光密度值与其内参值之比即为其矫正值。

### 1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析,前先行方差齐性检验,方差齐时,Post Hoc 多重比较用 LSD 法;方差不齐时用 Tambance 法。

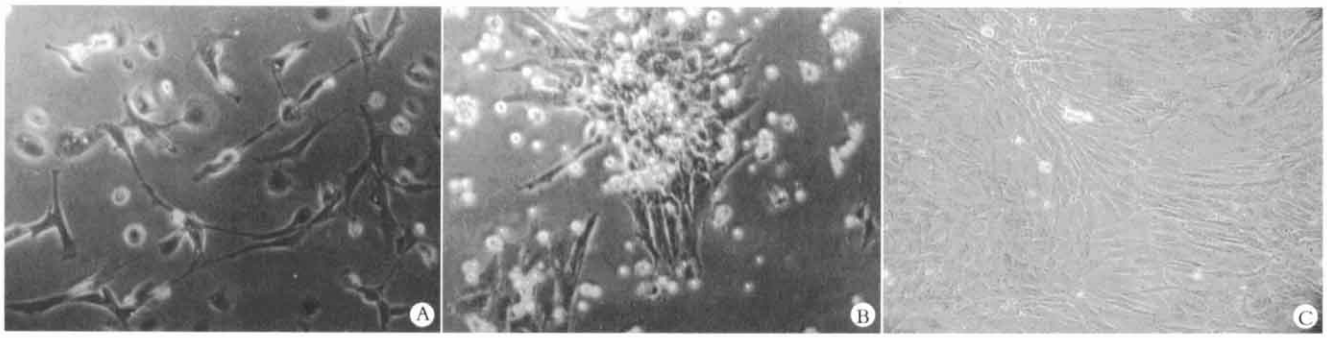
## 2 结果

### 2.1 骨髓基质细胞培养

骨髓基质细胞接种后 4 h 开始贴壁,24 ~ 72 h 可见贴壁细胞明显增大且分裂增殖,细胞呈三角形、多角形或梭形;3 d 后首次换液,贴壁细胞体积增大,呈集落生长;10 d 左右融合成片。多次传代的骨髓基质细胞呈有序的成纤维细胞样分布。见图 1。

### 2.2 骨髓基质细胞的鉴定

免疫细胞化学染色,细胞呈 SH3 抗体免疫反应阳性。见图 2。




A: 1 d(×200); B: 4 d(×200); C: 10 d(×100)

**图 1 倒置显微镜观察骨髓基质细胞传代培养结果**

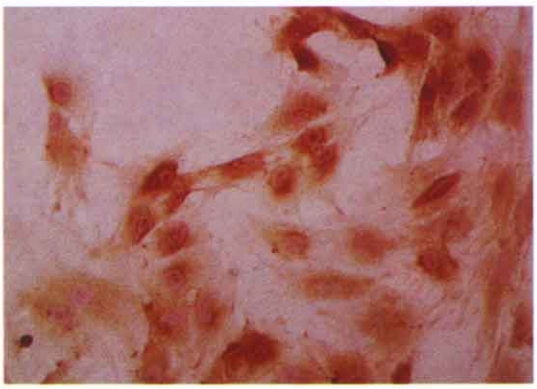


**图 2　免疫细胞化学染色观察骨髓基质细胞结果**　(SABC × 200)

### 2.3　OGP 对细胞增殖活性的影响

培养第 1、2、3 天，实验组与对照组相比，差异均有显著性意义($P<0.05$)，显示 OGP 作用后细胞增殖加速。实验组中，当 OGP 浓度为 $10^{-9}$ mol/L 时，促进细胞增殖的能力达到最大值，与其他实验组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，而其他实验组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

**表 1　实验组和对照组骨髓基质细胞吸光度值($\bar{x}\pm s, n=5$)**

| 组别 | 1 d | 2 d | 3 d |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.48 ± 0.03 | 0.67 ± 0.03 | 0.87 ± 0.04 |
| 实验组 OGP 浓度(mol/L) | | | |
| $10^{-11}$ | 0.59 ± 0.05$^{ab}$ | 0.72 ± 0.05$^{ab}$ | 1.02 ± 0.03$^{ab}$ |
| $10^{-10}$ | 0.64 ± 0.04$^{ab}$ | 0.79 ± 0.06$^{ab}$ | 1.07 ± 0.07$^{ab}$ |
| $10^{-9}$ | 0.72 ± 0.04$^{a}$ | 0.87 ± 0.07$^{a}$ | 1.25 ± 0.09$^{a}$ |
| $10^{-8}$ | 0.60 ± 0.02$^{ab}$ | 0.73 ± 0.04$^{ab}$ | 1.09 ± 0.05$^{ab}$ |
| $10^{-7}$ | 0.61 ± 0.05$^{ab}$ | 0.72 ± 0.05$^{ab}$ | 1.03 ± 0.14$^{ab}$ |

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 OGP 浓度为 $10^{-9}$ mol/L 组比较

### 2.4　成骨生长肽对细胞的 ALP 活性的影响

实验组在培养第 3、6、9 天，ALP 活性高于对照组($P<0.05$)。当 OGP 浓度为 $10^{-8}$ mol/L 时，增加细胞内 ALP 活性作用最为明显，ALP 活性表达达到最大值，且与其他实验组相比，差异均有统计学意义($P<0.05$)，而其他实验组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

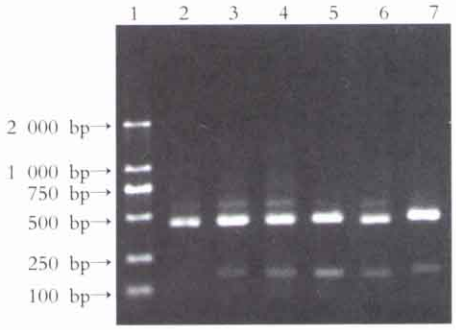
**表 2　实验组和对照组骨髓基质细胞 ALP 活性测定结果($n=3, \bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 3 d | 6 d | 9 d |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.283 ± 0.038 | 0.403 ± 0.020 | 0.575 ± 0.056 |
| 实验组 OGP 浓度(mol/L) | | | |
| $10^{-11}$ | 0.428 ± 0.012$^{ab}$ | 0.673 ± 0.042$^{ab}$ | 0.861 ± 0.069$^{ab}$ |
| $10^{-10}$ | 0.447 ± 0.049$^{ab}$ | 0.692 ± 0.068$^{ab}$ | 0.903 ± 0.064$^{ab}$ |
| $10^{-9}$ | 0.546 ± 0.060$^{ab}$ | 0.789 ± 0.049$^{ab}$ | 0.958 ± 0.069$^{ab}$ |
| $10^{-8}$ | 0.622 ± 0.056$^{a}$ | 0.892 ± 0.076$^{a}$ | 1.246 ± 0.113$^{a}$ |
| $10^{-7}$ | 0.464 ± 0.042$^{ab}$ | 0.675 ± 0.049$^{ab}$ | 0.918 ± 0.072$^{ab}$ |

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 OGP 浓度为 $10^{-8}$ mol/L 组比较

### 2.5　OGP 对 Cbfa1 mRNA 表达的影响

$10^{-11}$、$10^{-10}$、$10^{-9}$、$10^{-8}$、$10^{-7}$ mol/L OGP 组在骨髓基质细胞处理后 10 d 时，Cbfa1 产物光密度与其内参值的比值分别为(0.25 ± 0.02)、(0.54 ± 0.03)、(0.36 ± 0.02)、(0.21 ± 0.02)、(0.28 ± 0.03)，对照组为(0.04 ± 0.01)。实验组的 Cbfa1 mRNA 水平高于对照组($P<0.05$)，且 OGP 浓度为 $10^{-8}$ mol/L 促进表达作用最明显，与其他实验组相比，差异均有统计学意义($P<0.05$)，而其他实验组之间无统计学差异($P>0.05$)。见图 3。




1：DNA 标准(DL 2000)；2：对照组；3：$10^{-7}$ mol/L OGP；4：$10^{-8}$ mol/L OGP；5：$10^{-9}$ mol/L OGP；6：$10^{-10}$ mol/L；7：$10^{-11}$ mol/L OGP

**图 3　Cbfa1 与 β-actin mRNA RT-PCR 产物电泳图**

## 3　讨论

牙种植修复现在已成为失牙修复的选择之一。然而，牙缺失后因多种原因造成牙槽骨大量的吸收，剩余的牙槽嵴难以达到种植体稳固和修复美观的要求，限制了种植修复的适用范围。随着骨组织工程学的发展，已经为这类问题的解决提供了很好的方法，其中骨髓来源的骨髓基质细胞作为理想的种子细胞，展现了良好的应用前景。因此，选择合适的生长因子在体外促进其增殖和成骨向的分化，为组织工程化骨组织的构建提供充足的细胞来源，有着重要的意义。目前国内外学者对多种生长因子，如骨形成蛋白、血小板衍生生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子等，作了大量研究，也取得了一定的进展，但是这些生长因子在免疫原性、临床使用成本等方面存在着各自的不足，难以在临床上推广使用。

1992 年，Bab 等[2]首先报道了愈合的骨髓组织能产生促进全身性成骨活动的活性因子，通过进一步分离、纯化，得到 1 个由 14 个氨基酸组成的多肽，命名为成骨生长肽。随后的研究表明其氨基酸序列在啮齿类和人类完全一致，大多数动物具有同源性，这种进化上的保守性暗示了 OGP 具有潜在的生物学价值和医学价值。作为 14 个氨基酸组成的 OGP，其相对分子质量仅为 $1.5\times10^3$，免疫原性远低于其他相对分子质量在 $20\times10^3$ 以上的生长因子，而且制作工艺简单，临床使用成本低，是一种极具有临床应用前景的生长因子。

目前的研究表明 OGP 对成骨细胞的增殖具有促进作用，而且能够明显增强细胞 ALP、Ⅰ型胶原蛋白和骨钙素的合成及分泌[3]。

我们综合文献发现骨髓损伤后早期修复时有一短暂成骨相的存在，因此我们进行本实验，以了解 OGP 是否对骨髓基质细胞存在成骨诱导作用。本实验通过 MTT 法检测细胞增殖活性。MTT 法检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉积在细胞中，而死细胞无此功能，在一定细胞数范围内，MTT 结晶物形成的量与细胞数成正比。研究表明实验组中骨髓基质细胞增殖数量明显高于对照组，其最佳促进骨髓基质细胞增殖的 OGP 浓度为 $10^{-9}$mol/L。这与 Gabarin 等[4]报道的 OGP 对成骨细胞有促有丝分裂活性的研究结果相符。但是，最佳作用浓度与促进成骨细胞增殖活性的最佳作用浓度 $10^{-11}$ mol/L 不同，这可能与细胞来源有关。作为一种有丝分裂原，OGP 可对多种组织细胞具有相应的增殖活性，其作用的有无及大小决定于不同组织细胞的细胞膜上有无 OGP 的相关受体以及该受体的数量。目前国内外研究尚少涉及其受体的研究，因此只能在此作出推测，还需进一步的研究证实。

骨髓基质细胞具有多种分化潜能，寻找调控其向成骨细胞分化的因子一直是骨生物学领域的研究热点。最近这一领域取得了突破性的进展，证实了 Cbfa1 基因是骨形成的关键基因。Cbfa1 是重要的成骨细胞成熟的启动子，它能调节Ⅰ型胶原、骨钙素、骨桥蛋白及骨连结蛋白等基因在成骨细胞中的表达，进而促进成骨细胞的分化、成熟[5]。Ducy 等[6]研究表明，Cbfa1 的表达能诱导多潜能间充质干细胞 C3H10T1/2 向成骨细胞表型分化，并激活下游一系列成骨基因的转录。本实验通过 RT-PCR 检测 OGP 作用的骨髓基质细胞是否有 Cbfa1 mRNA 的表达来证实 OGP 对其向成骨细胞分化的诱导作用。研究表明，OGP 作用的骨髓基质细胞在培养第 10 天时，可以检测到 Cbfa1 mRNA 的表达，这说明了 OGP 能通过诱导 Cbfa1 mRNA 的表达，诱导其向成骨细胞分化的作用。这与本实验结果显示的 OGP 能促进 ALP 的表达活性的结果相符合。检测时间点上存在着差异，是因为本实验采用的 RT-PCR 是对 mRNA 半定量的检测，这种检测需要 mRNA 累及到一定数量才能检测出，相比免疫组化的方法，灵敏度较差，因而第 10 天时才能检测出。结合形态学上的表现，骨髓基质细胞在体外培养中存在向成骨细胞的自然分化，但比例不到 10%，仍需 BMP 等相关生长因子的诱导。该实验用 OGP 作为诱导因子，能明显促进其向成骨细胞的分化，由图 1C 可见诱导后的细胞大部分具有成骨细胞的形态，表现为成纤维细胞样形态。同时也发现当培养基中 OGP 浓度为 $10^{-8}$mol/L 时诱导作用最为明显，这种诱导作用呈一定剂量的依赖性，说明了细胞对 OGP 存在自身的调控，这也为 OGP 临床使用的安全性提供了保证。

对于 OGP 调控骨髓基质细胞 Cbfa1 表达的原因，可以从对 Cbfa1 表达调控的传导通路来解释。目前已发现多条传导通路参与调控：①Ras/Raf/MEK/MAPK 通路；②cAMP 通路；③自身调控途径[7]。其中 Ras/Raf/MEK/MAPK 通路已经证实不但与细胞分化的调控及转录因子的激活密切相关，同时也在细胞增殖中起重要作用。MAPK 家族在调节膜受体和基因表达谱变化之间的关系发挥着关键作用，参与调节成骨细胞的增殖和间充质干细胞向成骨细胞系的分化功能[8]。MAPK 磷酸化后被激活，转运至细胞核，作用于特定转录因子，尚可调节胰岛素样生长因子的表达。OGP 作为一种有丝分裂原，其可能就是通过该条途径发挥其促进细胞增殖同时也诱导或增强细胞成骨向分化的作用，但这一推论仍需进一步的后续实验证明。

**参考文献：**


[1] 马 芸，邱明才. 成骨生长肽[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册，2004，24(3)：242－245.

[2] Bab I, Gazit D, Chorev M, *et al*. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity [J]. EMBO J, 1992, 11(5): 1867－1873.

[3] 徐 凌，梁 星，黄 姣，等. 成骨生长肽对大鼠颅盖骨成骨细胞样细胞增殖和分化的影响[J]. 四川大学学报：医学版，2006，37(3)：445－448.

[4] Gabarin N, Gavish H, Muhlrad A, *et al*. Mitogenic G(i) protein-MAP kinase signaling cascade in MC3T3-E1 osteogenic cells: activation by C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)] and attenuation of activation by cAMP [J]. J Cell Biochem, 2001, 81(4): 594－603.

[5] Gao Y H, Shinki T, Yuasa T, *et al*. The potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor(ODF) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 252(3): 697－702.

[6] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, *et al*. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development[J]. Genes Dev, 1999, 13(8): 1025－1036.

[7] Xiao G, Jiang D, Thomas P, *et al*. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(6): 4453－4459.

[8] Tintut Y, Parhami F, Le V, *et al*. Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. Ubiquitin/proteasome-dependent regulation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(41): 28875－28879.


（编辑 栾 嘉）