

雌激素影响骨髓间充质干细胞 BMP-2 和 VEGF 表达的实验研究

黄海峰 孙立 田晓滨 张进

摘要 目的 研究大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨过程中雌激素对骨形态发生蛋白 2(BMP-2)和血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,以探讨雌激素可能的成骨机制。方法 对大鼠 BMSCs 进行分离培养,增殖到第 4 代后,实施成骨诱导 1 周后停止,通过碱性磷酸酶(ALP)染色方法,对成骨分化程度进行鉴定。使用雌激素对细胞进行作用,分别对细胞 BMP-2、VEGF、ALP 的表达情况进行测定。结果 在雌激素的作用下,BMP-2 mRNA、BMP-2、VEGF 蛋白和 ALP 蛋白表达均明显提高。结论 雌激素可能通过雌二醇的作用,促进 BMP-2 和 VEGF 蛋白的表达,使得骨的形成过程变得更为高效,因此可以判断这种物质具有骨诱导活性。

关键词 骨髓间充质干细胞;雌激素;骨形态发生蛋白 2;血管内皮生长因子

中图分类号 R 687

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1088-04

雌激素替代疗法是治疗绝经后的妇女骨质疏松症最有效的方法之一。除了雌激素能够抑制骨吸收,雌激素的受体能够有效促进骨基质蛋白的形成^[1],并对骨的形成有正面促进作用^[2]。骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)对于骨形成来说不可或缺,其功能在于诱导成骨的分化^[3]。而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在骨修复中对血管的产生十分重要。研究^[4]表明 VEGF 也会对成骨细胞所含有的 BMP-2 作用产生促进影响。骨修复时上述两种生长因子的表达上调,或许能够达到骨和血供重建的协同效应。而且骨髓间充质干细胞(bone marrow mes-

enchymal stem cells, BMSCs)中存在雌激素受体(ER)表达^[2],证明雌激素或许在细胞发挥生物学功能时发挥了一定的作用。雌激素作用后动物骨形成也会大幅提高^[5]。该研究拟探讨雌激素促进骨形成的生物学机制,为造福患者作出贡献。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,110~120 g,由贵阳医学院实验动物中心所提供。实验在《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]指导下进行。

1.2 药物和试剂 细胞完全培养液:20%胎牛血清、L-DMEM、100 U/ml 青链霉素。成骨诱导培养液^[7]:5%胎牛血清、L-DMEM、10 nmol/L 地塞米松、100 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/ml 抗坏血酸、100 U/ml 青链霉素。17 β -雌二醇,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒,大鼠 ALP、BMP-2、VEGF ELISA 试剂盒,PCR 试剂盒。

1.3 实验设计和分组

1.3.1 BMSCs 的分离培养和传代 取 2 只大鼠断颈处死后无菌操作分离取出股骨和胫骨,用 PBS 冲洗出骨髓,1 700 r/min 离心 5 min 后用 L-DMEM 重悬,再次 1 700 r/min 离心 5 min,去上清液,用细胞完全培养液重悬,用培养瓶盛装。然后放置到 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱里。2 d 后倒除一半的培养液,并倒入等量的新的培养液,以后每 3 d 换液 1 次,当原代细胞达到 80% 融合时用胰蛋白酶消化并吹打成单细胞悬液,按 1:2 传代培养。

1.3.2 BMSCs 成骨诱导分化 取一洁净的 6 孔培养板,并将完成灭菌的盖玻片盖上,接着按照 1×10⁵ 个/孔的标准,接种 4 代细胞进行培养。随机编为 A 组,分为对照 A 组和实验 A 组并持续观测,一旦细胞融合程度达到 70%,将成骨诱导培养液添加到实验 A 组里面,以 72 h 为周期更换培养液,持续诱导 1 周。对照 A 组中添加的培养液不含有成骨诱导剂,同样以 72 h 为周期更换培养液,持续诱导 1 周。

1.3.3 ALP 染色 细胞完成 1 周的诱导后,把培养液全部吸除,使用 PBS 溶液进行冲洗 3 次后停止。

2016-04-14 接收

基金项目:国家自然科学基金地区基金(编号:81560356);贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金(编号:黔科合人字[2011]30 号);贵州省科技计划(编号:黔科合 SY 字[2015]3044);贵州省卫生厅科学技术基金(编号:gzwkj2013-1-150);贵州省人民医院青年基金(编号:GZSYQN[2015]05 号);贵州省卫生计生委科学技术项目(编号:gzwjkj2015-4-018)

作者单位:贵州省人民医院骨科,贵阳 550002

作者简介:黄海峰,男,硕士,住院医师;

田晓滨,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: txb6@vip.163.com

按 ALP 染色试剂盒操作进行染色, 标记, 镜下观察。

1.3.4 雌激素处理 使用胰蛋白酶对完成 1 周诱导的实验 A 组细胞进行消化。在 6 孔培养板中注入低糖培养液(成分为不包括血清的 L-DMEM), 接着按照 1×10^5 个/孔的标准接种细胞, 并随机编为 B 组, 分为对照 B 组和实验 B 组。1 d 后使用显微镜进行观察, 一旦培养板内壁上出现了细胞, 将 17β -雌二醇添加到实验 B 组里面, 确保培养液中雌激素浓度保持为 10 nmol/L ^[8]。经过 1 d 后收集上清液和细胞, 将细胞用超声波破碎仪破碎, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、ELISA 法分别检测每孔总的 BMP-2 和 VEGF、ALP 的浓度。

1.3.5 BMP-2 RT-PCR 电泳 提取细胞总 RNA 行逆转录后, 行 PCR(聚合酶链反应)。 β -actin 上游引物: $5' \text{-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'}$, 下游引物: $5' \text{-CCCATACCCACCATCACACC-3'}$; BMP-2 上游引物: $5' \text{-GTCCTCAGCGAGTTTGAGTTG-3'}$, 下游引物: $5' \text{-CAAAGCTCTCCCACTGACTTG-3'}$ 。反应条件: 在 94°C 条件下展开变性, 10 min 后取出。接着按照 94°C 、30 s, 55°C 、45 s 以及 72°C 、45 s 的条件进行处理, 经历 40 个循环, 在 72°C 环境下多反应 10 min。最后将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像系统检测并照相进行 DNA 的相对定量分析。

1.3.6 ELISA 法检测每孔总的 BMP-2 和 VEGF、ALP 的浓度 按试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用两独立样本 t 检验对多组数据进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 的形态学观察 完成 2 d 的分离细胞培养并更换 50% 的培养液后, 通过显微镜观察可知红细胞将培养瓶底完全覆盖, 难以找到 BMSCs 的存在。第 5 天全量换液后, 可以发现培养瓶壁上存在极少数的 BMSCs, 细胞形状主要为梭形、椭圆形或不规则型也有少量。细胞在折光性方面表现良好。经过第 2 次换液后, 细胞分化速度呈对数规律, 第 3 次换液后速度明显降低。第 8 天更换全部培养液后, 使用显微镜进行观察, 发现细胞大量分化, 且其排列如同漩涡。第 11 天更换全部培养液后, 细胞融合程度为 80% ~ 90%, 漩涡状排列形态更为明显, 分化后快速聚集成片。见图 1。

2.2 完成第 4 代细胞成骨诱导 1 周后进行 ALP 染色结果 完成成骨诱导后, 细胞染色结果显示, 细胞

核呈现出紫色, 大量的红棕色物质存在细胞质中, 充分说明 ALP 呈阳性。对照组 ALP 染色未见红棕色颗粒出现, 实验组 ALP 染色有较多的红棕色颗粒出现。见图 2。

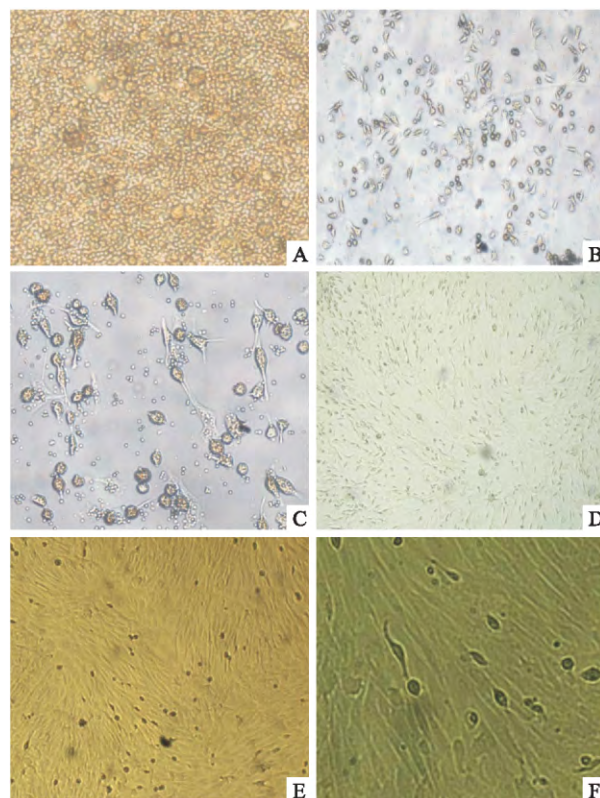


图 1 大鼠 BMSCs 的形态学观察

A: 48 h 行半量换液后 $\times 100$; B: 第 5 天全量换液后 $\times 40$; C: 第 5 天全量换液后 $\times 100$; D: 第 8 天全量换液后 $\times 40$; E: 第 11 天全量换液后 $\times 40$; F: 第 11 天全量换液后 $\times 100$

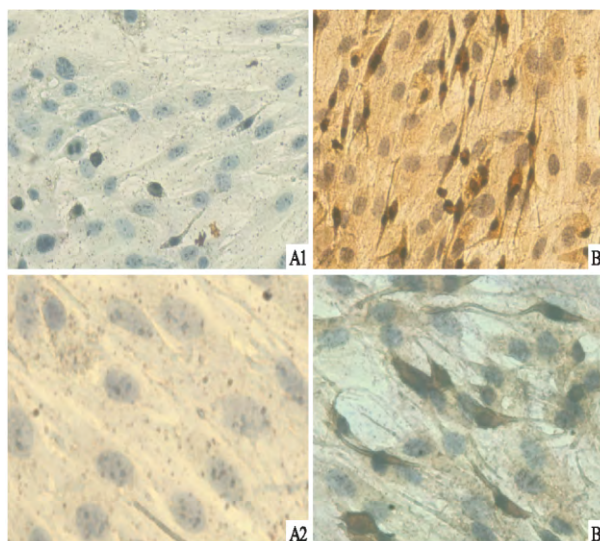


图 2 ALP 染色结果

A: 对照组; B: 实验组; 1: $\times 200$; 2: $\times 400$

2.3 BMP-2 mRNA 转录水平的变化 完成凝胶电泳后,使用紫外灯进行照射,测量结果显示大鼠 β -actin、BMP-2 分别为 207、475 bp。见图 3。使用凝胶成像系统针对大鼠 β -actin 与 BMP-2 DNA 目的条带进行积分光密度值的比值分析即相对定量分析。相对定量分析的目的基因为内参基因两者表达的比值。5 个样本量结果表明对照 B 组积分光密度比值(0.62 ± 0.13) 小于实验 B 组(0.95 ± 0.18), 差异有统计学意义($t = -3.19$, $P < 0.05$)。

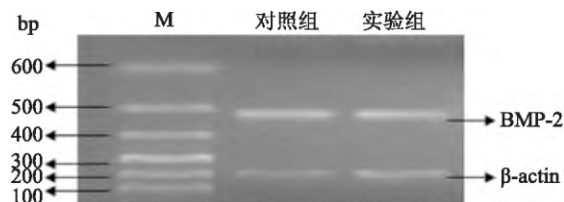


图3 BMP-2 mRNA 转录水平

M: Marker

2.4 BMP-2、VEGF 蛋白水平及 ALP 蛋白表达的变化 应用 ELISA 法测定 BMP-2、VEGF 蛋白、ALP 蛋白表达情况。本实验中 BMSCs 传代至 4 代后,对细胞均行随机分组行进一步检测。经雌激素处理后的细胞 BMP-2、VEGF、ALP 的表达都比对照组更高 ($P < 0.05$)。说明受到雌激素的刺激作用后,BMP-2、VEGF 蛋白和 ALP 蛋白的表达都出现了显著的提高。见图 4~6、表 1。

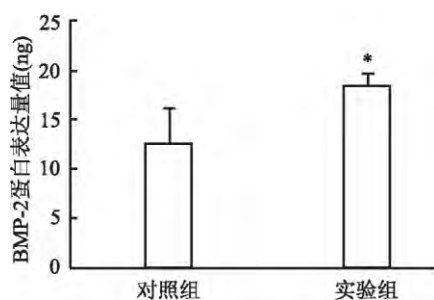


图4 B组 BMP-2 蛋白表达情况

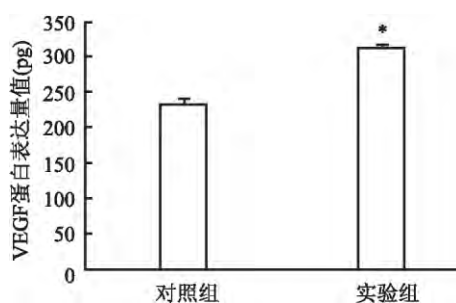
与对照组比较: * $P < 0.05$ 

图5 B组 VEGF 蛋白表达情况

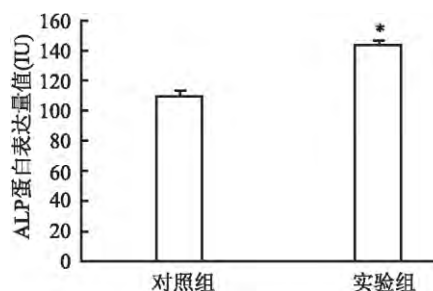
与对照组比较: * $P < 0.05$ 

图6 B组 ALP 蛋白表达情况

与对照组比较: * $P < 0.05$ 表1 BMP-2、VEGF、ALP 检测情况($n=5$ $\bar{x} \pm s$)

蛋白	对照 B 组	实验 B 组	t 值
BMP-2(ng)	12.21 ± 3.39	$18.13 \pm 1.34^*$	-3.97
VEGF(pg)	231.20 ± 9.76	$311.85 \pm 5.04^*$	-16.42
ALP(IU)	109.47 ± 3.23	$143.42 \pm 3.55^*$	-15.81

与对照 B 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

本研究采用的大鼠,体重不超过 110~120 g,鼠龄不超过 6~8 周龄^[9]。大鼠重量的把握十分关键。如果重量不够的话,BMSCs 数量比较少,反之如果重量太大,干细胞的活性降低,存活率低且实现效果不够明显^[10]。培养及传代至 4 代后,BMSCs 的纯度有了显著的提升。由于这种细胞的鉴定难度复杂性较高^[11]。本实验主要从形态学上判断,实验主要采取外形鉴定的方法进行判断,细胞形状呈扁平状或长梭形,所有细胞构成旋涡状^[9]。取第 4 代生长良好的 BMSCs 进行成骨诱导 1 周。ALP 染色结果证明,BMSCs 经过成骨诱导后出现 ALP 表达,进一步表明 BMSCs 向成骨方向分化。使用雌激素施加一定的刺激作用,在刺激之前,考虑到血清所包含的物质过于复杂,首先将细胞转移到低糖培养基中进行处理,24 h 后停止,在最大程度上消除血清的影响,接着施加雌激素刺激,对细胞进行 24 h 的作用^[8]。运用 RT-PCR 半定量法和 ELISA 法检测 BMP-2 mRNA、BMP-2、VEGF 蛋白和 ALP 蛋白的表达。检测结果表明,这些物质的表达均有所提高。本研究充分说明雌激素能够通过某种未知的作用促进成骨基因 BMP-2 以及 ALP 蛋白的表达,而且对于 VEGF 的表达具有正向刺激作用,从而加速局部血管的生成。本实验中通过检测显示雌激素作用于细胞后 ALP 的表达明显上调,而 ALP 为成骨细胞表达的重要物质之一,进一步从侧面反应了雌激素对细胞成骨作用存在促进作用。

对于骨质疏松症的绝经妇女患者而言,雌激素是一种效果比较理想的治疗方法,其能够抑制患者骨量的降低,避免骨头过脆后经常发生骨折的情况^[2]。研究^[2]结果表明,BMSCs中存在ER的表达。本研究结果并结合相关文献可以得出,雌激素能够有效促进成骨细胞中BMP-2和VEGF蛋白量的提高,或许是因为其能够和BMSCs中的ER结合在一起而造成的。很多研究^[12]早已证明,BMP-2能够使成骨细胞所包含的VEGF的表达变得更加活跃。研究^[4]显示,VEGF能够促进成骨细胞里BMP-2的表达。以上结论似乎显示了这两种物质的作用能够彼此促进。那么在修复骨损伤时,两者或许也能够促进彼此作用的发挥。综上所述,本研究为更加深入地揭示雌激素成骨机制提供新的途径。

参考文献

- [1] Liao M H , Tai Y T , Cherg Y G , et al. Genistein induces oestrogen receptor- α gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/NF- κ B/activator protein-1 and promotes cell mineralisation [J]. *Br J Nutr* ,2014 ,111(1) : 55 - 63.
- [2] Calis M , Demirtas T T , Atila P , et al. Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: *in vivo* bone tissue-engineering study [J]. *Plast Reconstr Surg* 2014 ,133(4) : 499-510.
- [3] Heggebö J , Haasters F , Polzer H , et al. Aged human mesenchymal stem cells: the duration of bone morphogenetic protein-2 stimulation determines induction or inhibition of osteogenic differentiation [J]. *Orthop Rev (Pavia)* 2014 6(2) : 5242.
- [4] Ramazanoglu M , Lutz R , Rusche P , et al. Bone response to bio-mimetic implants delivering BMP-2 and VEGF: an immunohistochemical study [J]. *J Craniomaxillofac Surg* 2013 41(8) : 826 - 35.
- [5] Windahl S H , Börjesson A E , Farman H H , et al. Estrogen receptor- α in osteocytes is important for trabecular bone formation in male mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ,110(6) : 2294 - 9.
- [6] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见[S]. 2006.
- [7] 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 - 5.
- [8] Zhou S , Turgeman G , Harris S E , et al. Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells [J]. *Mol Endocrinol* ,2003 ,17(1) : 56 - 66.
- [9] 王佳南,张晓刚,汤为学,等. 大鼠骨髓间充质干细胞的原代培养条件 [J]. *中国组织工程研究与临床康复* ,2009 ,13(14) : 2741 - 5.
- [10] 杨光,范东艳,陈强,等. 贴壁法培养不同龄小鼠骨髓间充质干细胞的生物学特点 [J]. *中国实验诊断学* ,2007 ,11(1) : 13 - 5.
- [11] de Girolamo L , Lucarelli E , Alessandri G , et al. Mesenchymal stem/stromal cells: a new “cells as drugs” paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy [J]. *Curr Pharm Des* ,2013 ,19(13) : 2459 - 73.
- [12] Hussein K A , Choksi K , Akeel S , et al. Bone morphogenetic protein 2: a potential new player in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res* ,2014 ,125: 79 - 88.

Experimental study of BMP-2 and VEGF's expression in estrogen on bone marrow mesenchymal stem cells

Huang Haifeng , Sun Li , Tian Xiaobin , et al

(*Dept of Orthopedics , Guizhou Province People's Hospital , Guiyang 550002*)

Abstract Objective To study the possible osteogenesis mechanism of estrogen by its effect of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) and vascular endothelial growth factor(VEGF) expression on rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) during osteogenic differentiation. **Methods** The rat bone marrow mesenchymal stem cells were isolated , cultured and proliferated to the fourth generation. After one week osteoblastic induction , the level of osteogenic differentiation was identified by alkaline phosphatase (ALP) staining method. The expressions of BMP-2 , VEGF and ALP were measured by the action of estrogen on cells. **Results** Estrogen could promote the expression of BMP-2 mRNA , BMP-2 , VEGF and ALP. **Conclusion** Estrogen may promote the expression of BMP-2 and VEGF protein through the action of estradiol so as to make the bone formation process more efficient. So this substance can be considered osteoinductively active.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; estrogen; bone morphogenetic protein-2; vascular endothelial growth factor