

# 骨髓间充质干细胞成骨方向诱导过程中的基因表达\*\*\*

胡杨, 马莹, 何惠宇, 盛磊, 阿布力孜·阿布杜拉, 阿尔孜古丽

## Gene expression during induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts

Hu Yang, Ma Ying, He Hui-yu, Sheng Lei, Abulizi·Abudula, Aertziguli

### Abstract

**BACKGROUND:** At present, the gene expression mode of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiation into osteoblasts remains unclear.

**OBJECTIVE:** To observe gene expression of alkaline phosphatase, osteopontin, type I collagen, basic fibroblast growth factor and osteocalcin during BMSCs differentiation into osteoblasts, and to verify whether differentiation of BMSCs into osteoblasts is mature.

**METHODS:** The BMSCs were aspirated from the femoral bone of 2-month old New Zealand rabbits and cultured by all bone marrow adherence method, and induced to differentiate into osteoblasts in the medium supplemented with DMEM/F<sub>12</sub>, dexamethason  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L,  $\beta$ -glycerophosphate sodium 0.01 mol/L and vitamin C 0.05 g/L. The gene expression of alkaline phosphatase, osteopontin, type I collagen, basic fibroblast growth factor and osteocalcin in the first and second passages of BMSCs were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction. BMSCs surface antigen CD44 was identified.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Following induced culture in mineralized media, the first and second passages of BMSCs expressed alkaline phosphatase, osteopontin, type I collagen, basic fibroblast growth factor and osteocalcin gene in some phases. Positive rate of CD44 in the first passage of BMSCs was 44.4%. These indicate that rabbit BMSCs gradually differentiated into osteoblasts following *in vitro* mineralization. The first and second passages of BMSCs expressed alkaline phosphatase, osteopontin, type I collagen, basic fibroblast growth factor and osteocalcin in some phases. These cells have had the characteristics of osteoblasts and provided experimental evidences for revealing the mechanisms of gene expression of BMSCs differentiation into osteoblasts.

Hu Y, Ma Y, He HY, Sheng L, Abulizi·Abudula, Aertziguli. Gene expression during induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(49): 9131-9137. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 目前骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化演变中的基因表达模式尚不明确。

**目的:** 观察骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化过程中碱性磷酸酶、骨桥蛋白、I型胶原、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素基因的表达情况, 验证骨髓间充质干细胞是否向成骨细胞成熟分化。

**方法:** 抽取2月龄新西兰大白兔股骨骨髓, 全骨髓贴壁法培养获得骨髓间充质干细胞, 用矿化诱导培养基(DMEM/F<sub>12</sub>、地塞米松  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L、 $\beta$ -磷酸甘油钠 0.01 mol/L、维生素 C 0.05 g/L)进行成骨诱导培养, 用反转录-聚合酶链反应方法检测诱导培养后第一二代骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶、骨桥蛋白、I型胶原、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素基因的表达情况, 并对该骨髓间充质干细胞表面抗原 CD44 进行鉴定。

**结果与结论:** 经矿化诱导培养基诱导培养后, 第一二代骨髓间充质干细胞阶段性表达碱性磷酸酶、骨桥蛋白、I型胶原、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素基因; 第1代骨髓间充质干细胞抗原 CD44 阳性率达 44.4%。提示兔骨髓间充质干细胞在体外矿化诱导培养中逐渐向成骨细胞分化, 分别于诱导后第一二代细胞中阶段性顺序表达成骨细胞特异性基因碱性磷酸酶、骨桥蛋白、I型胶原、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素, 该细胞已具备成骨细胞特征, 为揭示骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化过程中基因表达机制提供了实验依据。

**关键词:** 成骨细胞; 基因表达; 骨髓间充质干细胞; 分离培养; 诱导分化

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.49.003

胡杨, 马莹, 何惠宇, 盛磊, 阿布力孜·阿布杜拉, 阿尔孜古丽. 骨髓间充质干细胞成骨方向诱导过程中的基因表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(49):9131-9137. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Prosthodontics, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Hu Yang★, Master, Physician, Department of Prosthodontics, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
joe98344@sina.cn

Correspondence to: He Hui-yu, Doctor, Associate professor, Associate chief physician, Department of Prosthodontics, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
joe98344@sina.cn

Supported by: the Key Scientific Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 200533118\*; the Scientific Research Key Program of Scientific Research Project of Higher Learning School of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. xjEDU2009122\*

Received: 2010-06-18  
Accepted: 2010-07-29

## 0 引言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一类来源于中胚层的未分化间充质干细胞, 在体内均具有多向分化潜能和较强的增殖能力<sup>[1-2]</sup>, 能够分化为成骨细胞、成软骨细胞、肌肉细胞、脂肪细胞和神经细胞等, 进行异体移植也不会出

现排斥反应<sup>[3]</sup>, 已广泛用于干细胞移植、组织工程、基因治疗等研究, 有着非常重要的理论意义和临床应用价值<sup>[4-8]</sup>。生理状态下, 哺乳动物的骨髓中约  $1 \times 10^6$  个骨髓有核细胞中仅有 2~5 个骨髓间充质干细胞<sup>[9]</sup>。因此, 本实验旨在探索简单的体外培养方法以大量扩增 BMSCs, 为组织工程骨提供适宜的种子细胞。实验通过改良的全骨髓贴壁培养法, 分离培养原代 BMSCs, 第2代以后的细胞用矿化诱导培养基进

新疆医科大学第一附属医院口腔修复科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

胡杨★, 男, 1983年生, 湖北省黄冈市人, 汉族, 2009年新疆医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事组织工程与口腔种植修复技术研究。  
joe98344@sina.cn

通讯作者: 何惠宇, 博士, 副教授, 副主任医师, 主任, 新疆医科大学第一附属医院口腔修复科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054  
joe98344@sina.cn

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2010)49-09131-07

收稿日期: 2010-06-18  
修回日期: 2010-07-29  
(20100305011/G·Q)

行诱导培养, 观察BMSCs向成骨细胞分化过程中细胞形态学变化, 检测成骨细胞标志性基因碱性磷酸酶、骨钙素、骨桥蛋白、I型胶原(Collagen-I)、碱性成纤维细胞生长因子的表达, 进行BMSCs抗原标志CD44阳性率的测定, 探究BMSCs向成骨细胞诱导分化的培养条件、细胞生长周期、成骨细胞特异性基因表达等情况。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞水平的观察学实验。

**时间及地点:** 于2008-01/2009-01在新疆医科大学地方病重点分子生物学实验室和新疆医科大学第一附属医院包虫病研究所细胞室完成。

**材料:** 2月龄新西兰大白兔, 体质量1.8~2.2 kg, 雌雄不限, 购于新疆医科大学第一附属医院医学研究中心实验动物科学部新西兰大白兔使用许可证编号: SYXK(新)2010-0002, 生产许可证号: SCXK(新)2003-0002。实验过程中对动物处置方法符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[10]</sup>。

**主要试剂及仪器:**

| 试剂及仪器   | 来源                     |
|---|------------------------|
| 胎牛血清、DMEM/F <sub>12</sub> 培养基                   | Gbico 公司, 美国           |
| β-甘油磷酸二钠  | Sigma 公司, 美国           |
| TRIzol® Reagent                                 | Invitrogen 公司, 美国      |
| Taq DNA Polymerase recombinant                  | Fermentas 公司, 立陶宛      |
| RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit      | Fermentas 公司, 立陶宛      |
| 10 mmol/L dNTP Mix                              | Roche, 美国              |
| Anti-Rabbit CD44 FITC - Mouse IgG1              | Antigenix 公司, 美国       |
| Steri-cycle CO <sub>2</sub> 恒温培养箱               | Thermo 公司, 美国          |
| IX71 倒置荧光显微镜                                    | OLYMPUS, 日本            |
| 垂直流超净工作台  | 上海智城分析仪器制造有限公司, 中国     |
| ABI Veriti 梯度聚合酶链反应仪                            | Gene 公司, 美国            |
| 凝胶成像仪   | BIO-RAD 公司, 美国         |
| Benchmark plus microplate spectrophotometer 酶标仪 | BIO-RAD 公司, 美国         |
| 流式细胞仪   | BECKMAN COULTER 公司, 美国 |

**方法:**

**BMSCs的分离与原代培养:** 取2月龄新西兰大白兔, 氯胺酮(50 mg/kg)与地西洋(50 mg/kg)

混合麻醉, 常规消毒, 自股骨远端进针, 用注射器(内含肝素200 U/mL)抽取骨髓6 mL。超净台内, 以10 mL培养液(内含体积分数为5%的FBS、DMEM/F<sub>12</sub>、维生素C 0.05 g/L、青霉素和链霉素各100 U/L)混匀, 吹打为细胞悬液后接种于细胞培养瓶内, CO<sub>2</sub> 孵箱中常规培养。培养后48 h, 96 h半量更换培养液, 以去除未贴壁的血细胞, 7 d后首次全量换液。以后每3 d换液1次待细胞长至80%~90%汇合时, 传代培养。

**BMSCs的诱导培养:** 第2代的BMSCs(接种细胞浓度为1×10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>)换以矿化诱导培养基进行诱导培养(体积分数5%的FBS、DMEM/F<sub>12</sub>、地塞米松 1×10<sup>-8</sup> mmol/L、β-磷酸甘油钠 0.01 mol/L、维生素C 0.05 g/L、青霉素和链霉素各100 U/L), 每3 d换液1次、待细胞约80%~90%汇合时, 传代培养。

**绘制BMSCs生长曲线:** 取生长良好的诱导后的第2代BMSCs, 制成单细胞悬液, 以1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>接种于24孔板, 每天各取3孔消化计数, 每孔计数3次, 计算均值, 连续7 d。以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴, 描绘生长曲线; 对照组为未诱导的第2代BMSCs, 处理方法同实验组。

**四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)检测BMSCs增殖活力:** 实验组取生长良好的诱导后的第2代BMSCs, 制成单细胞悬液, 以1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>接种于96孔板, 于接种后1, 2, 3, 4, 5, 6 d各取6个孔加20 μL MTT溶液, 4 h后小心吸出孔内液体, 每孔加入150 μL DMSO溶液, 振荡10 min后, 酶标仪于490 nm波长下检测各孔吸光度A值; 对照组为未诱导的第2代BMSCs, 处理方法同实验组。

**反转录-聚合酶链反应鉴定成骨细胞特异性基因:**

**引物设计:** 参照董世武等<sup>[11]</sup>的方法和Genebank中的序列, NCBI数据库中的Primer-BLAST Tool设计引物(上海生工公司合成)。

**碱性磷酸酶基因:** 正向引物: 5' -ACG TGG CTAAGAATG TCA TC -3', 反向引物: 5' -CTG GTA GGC GAT GTC CTT A -3'; 退火温度59 °C, 扩增目的片段为475 bp。

**骨钙素基因:** 正向引物: 5' CAT GAG AGC CCT CAC A 3', 反向引物: 5' -AGA GCG ACA CCC TAG AC- 3', 退火温度59 °C, 扩增片段为310 bp。

**I型胶原基因:** 正向引物: 5' -CCC AAC

CAA GGA TGC ACT AT-3', 反向引物: 5' -TGT TCT GAG AGG CGT GAT TG-3, 退火温度为52 °C, 扩增片段为259 bp。

骨桥蛋白基因: 正向引物: 5' -CCG ACC AAG GAA CAA T-3', 反向引物: 5' -CTC TGA AGC ACC AGG ATA-3', 退火温度53 °C, 扩增片段581 bp。

碱性成纤维细胞生长因子基因: 正向引物: 5' -GCG ACC CAC ACA TCA AAT TA-3', 反向引物: 5' -TTT CAG TGC CAC ATA CCA GC-3', 退火温度52 °C, 扩增片段218 bp。

$\beta$ -actin基因: 正向引物: 5' -GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3', 反向引物: 5' -CTT CCT TAA TGT CAC GCA CGA TTT C-3', 扩增片段540 bp。

总RNA抽提及反转录-聚合酶链反应体系: 用TRIzol法提取原代及诱导后第1或2代BMSCs总RNA, 紫外分光光度计检测其浓度, 凝胶电泳显示RNA完整性。两步法反转录-聚合酶链反应进行分析, 第一链cDNA合成方法及条件, 请参看Fermentas公司生产的#K1621试剂盒说明书。

25  $\mu$ L的聚合酶链反应体系包括: 10 $\times$ Taq buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3.0  $\mu$ L, (10mmol/L) dNTP 2.0  $\mu$ L, Taq DNA Polymerase(1 U/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.5  $\mu$ L, 模板cDNA 1.0  $\mu$ L, 正向引物和反向引物(20  $\mu$ mol/L)各1.0  $\mu$ L, PCR仪设置为95 °C预变性3 min, 1个循环; 30个循环, 退火45 s(退火温度请参上), 72 °C延伸1 min; 72 °C, 7 min总延伸。在相同的聚合酶链反应条件下, 5个基因均分别设置 $\beta$ -actin引物反应作为内参。凝胶电泳鉴定后, 送PCR产物样品至上海生工进行DNA序列测定。

流式细胞术检测BMSCs表面标志CD44: 诱导培养至第2代的BMSCs, 2.5 g/L胰酶消化、离心, 调整细胞浓度为(1.0~2.0) $\times 10^9$  L<sup>-1</sup>, 按照说明书操作, 加入FITC标记兔抗鼠2抗, 避光标记15~20 min, 上流式细胞仪检测, 同时以未诱导培养的第2代BMSCs作为对照组。

主要观察指标: ①MTT法检测BMSCs增殖活力。②反转录-聚合酶链反应鉴定成骨细胞特异性基因。③流式细胞术检测BMSCs表面标志CD44。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估均为本文作者, 均经过正规培训, 未采用盲法评估。

统计学分析: 统计学处理者为马莹, 应用SPSS 15.0软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析或 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 兔BMSCs生长及形态观察 倒置显微镜下观察,

原代BMSCs体积较小, 胞质中见颗粒样物质, 细胞多呈梭形、三角形、多边形, 有长度和形态不一的突起。随着培养时间的延长, 细胞汇合成片, 可形成细胞集落, 集落中心细胞密集, 周围细胞呈放射状排列, 细胞之间无接触抑制现象, 集落间可出现重叠, 见图1。

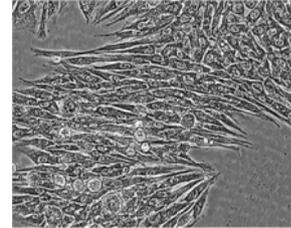


Figure 1 Primary culture of bone marrow mesenchymal stem cells ( $\times 20$ )  
图1 原代培养 BMSCs 的形态( $\times 20$ )

矿化诱导培养后BMSCs较原代细胞体积大, 三角形及不规则形细胞较多, 有短而薄的胞质突起, 细胞核圆形或椭圆形, 胞浆中有黑色颗粒; 传代后的BMSCs生长较为缓慢, 见图2。

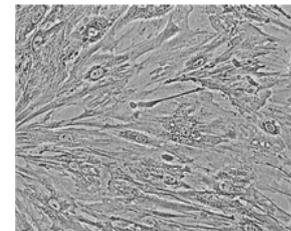


Figure 2 Induced bone marrow mesenchymal stem cells ( $\times 40$ )  
图2 诱导后 BMSCs 的形态( $\times 40$ )

2.2 BMSCs生长曲线 第2天诱导培养的第2代BMSCs细胞数量少于第1天接种时的数量, 第2~4天为增殖活跃, 第5天达到最高峰, 第6~8天增殖减慢; 与未诱导的第2代BMSCs比较, 第1~8天其生长能力均有所降低, 见图3。

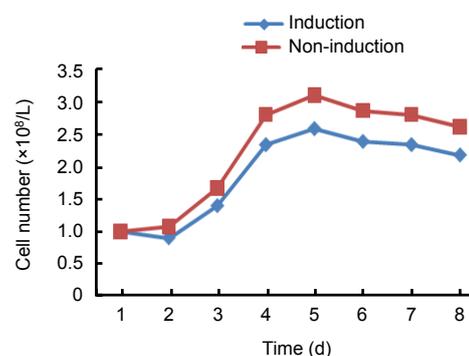
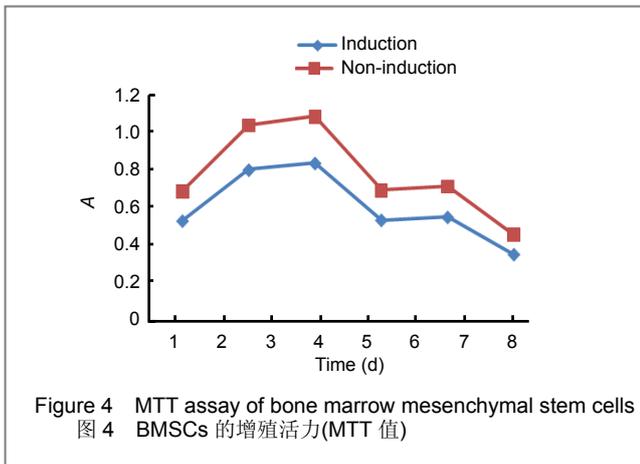


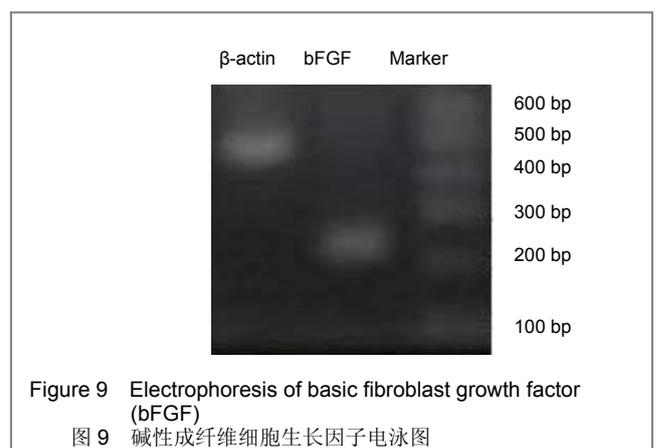
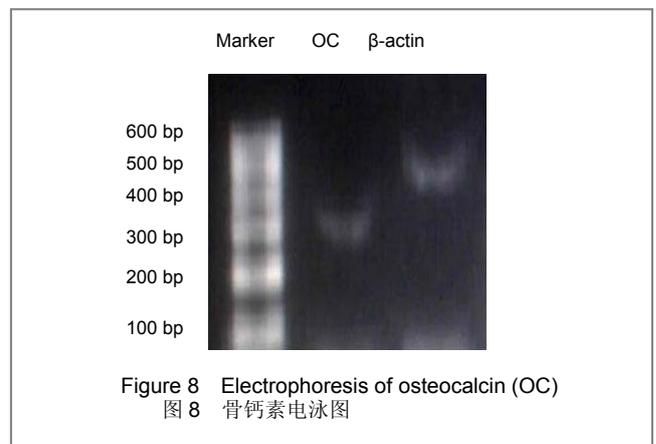
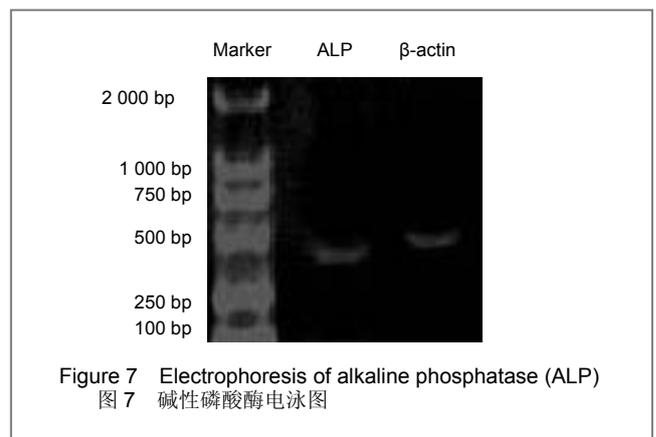
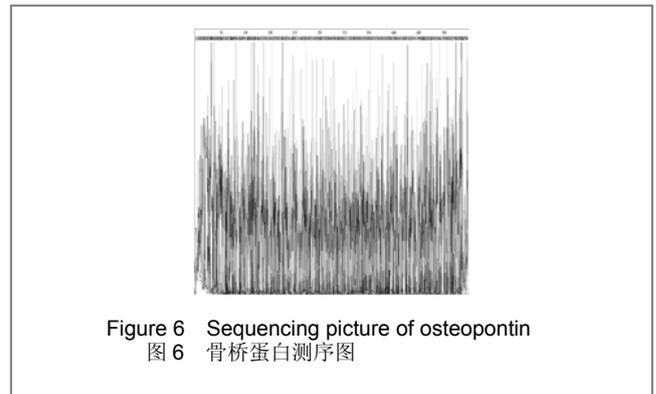
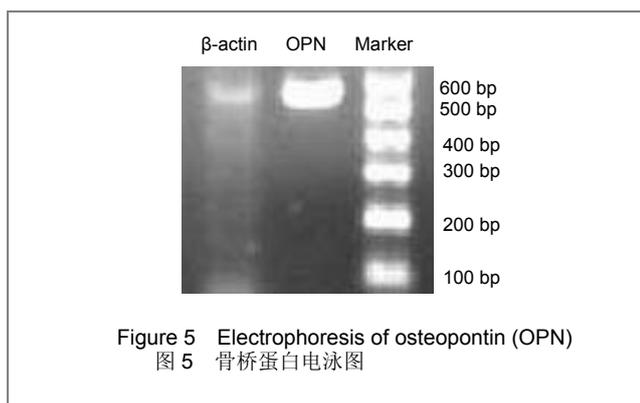
Figure 3 Growth curves of bone marrow mesenchymal stem cells  
图3 BMSCs 的生长曲线

2.3 BMSCs 增殖活力 诱导培养的第2代 BMSCs 以  $1 \times 10^8 L^{-1}$  接种于 96 孔板, 连续培养 6 d 可见细胞增殖趋势, 接种后第 1~3 天细胞增殖活跃, 第 4~6 天增殖有所降低; 与未诱导的第 2 代 BMSCs 比较, 其增殖活力均有所降低, 见图 4。



2.4 成骨细胞标志性基因在mRNA水平的表达 BMSCs 向成骨细胞分化过程中, 按照一定时间顺序表达基因骨桥蛋白和碱性磷酸酶、骨钙素、碱性成纤维细胞生长因子和 I 型胶原。第一二代原代细胞仅表达碱性磷酸酶和 I 型胶原, 诱导第 1 代 BMSCs 表达骨桥蛋白和碱性磷酸酶; 第 2 代细胞继续表达骨桥蛋白和碱性磷酸酶, 还表达骨钙素、碱性成纤维细胞生长因子和 I 型胶原。

骨桥蛋白基因聚合酶链反应产物片段长约 581 bp, 琼脂糖凝胶电泳显示目的片段大小与 Marker 一致。碱性磷酸酶基因片段约 475 bp, 与 Marker 一致。骨钙素基因片段约 310 bp, 与 Marker 一致。碱性成纤维细胞生长因子基因片段约 218 bp, 与 Marker 一致。I 型胶原基因片段约 259 bp, 与 Marker 一致。测序结果显示: 骨桥蛋白基因有 8 个碱基突变, 碱性成纤维细胞生长因子基因有 3 个碱基突变, 但均无移码突变。I 型胶原基因序列全部正确配对。电泳图和测序结果见图 5~12。



## 2.5 BMSCs 表面标志 CD44 实验组诱导培养的

BMSCs CD44阳性率为44.4%，对照组未诱导的BMSCs CD44阳性率为0.7%，见图13，14。

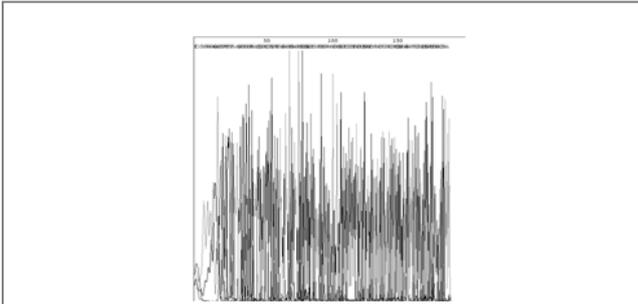


Figure 10 Sequencing spectrum of basic fibroblast growth factor  
图 10 碱性成纤维细胞生长因子测序图谱

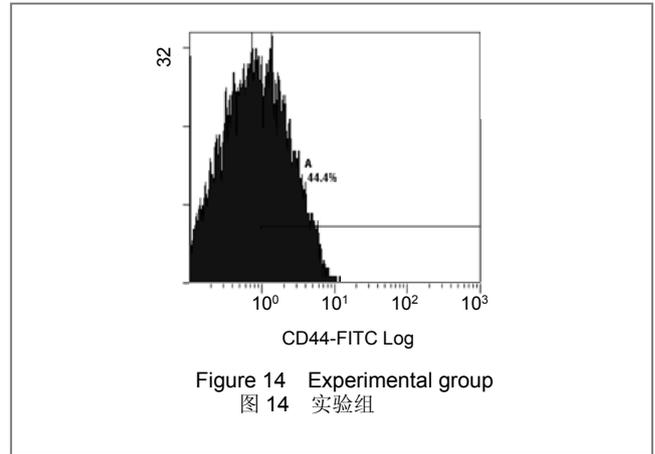


Figure 14 Experimental group  
图 14 实验组

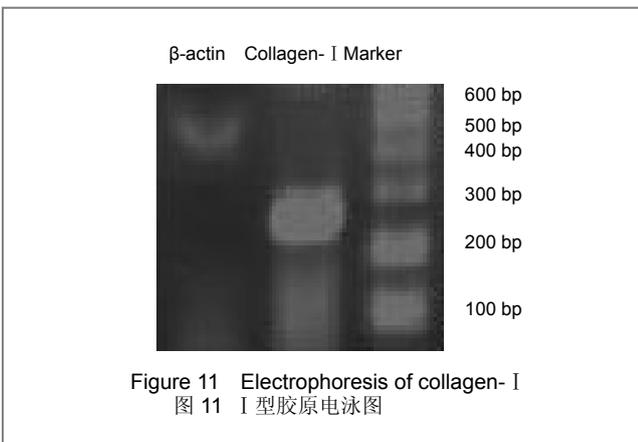


Figure 11 Electrophoresis of collagen- I  
图 11 I型胶原电泳图

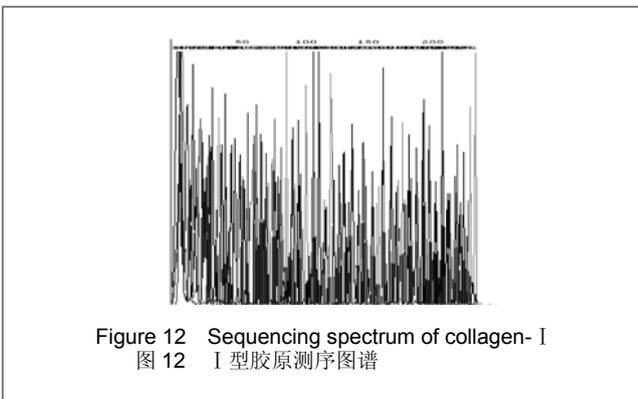


Figure 12 Sequencing spectrum of collagen- I  
图 12 I型胶原测序图谱

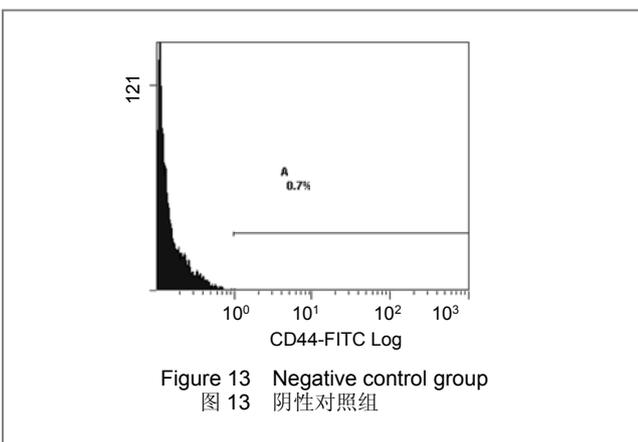


Figure 13 Negative control group  
图 13 阴性对照组

### 3 讨论

骨髓中骨髓间充质干细胞含量很低，并且随年龄的增加而减少，功能下降<sup>[12-13]</sup>；实验研究需要大量的BMSCs，其体外分离培养、纯化、扩增方法是研究重点之一。目前，分离培养方法主要有以下4种方法：①贴壁法。②密度梯度离心法。③流式细胞仪法。④免疫磁珠法。以上4种方法均有其不足之处，密度梯度离心法中不同密度的分离液对BMSCs纯度的影响较大，获得的BMSCs纯度不高；流式细胞仪法和免疫磁珠法是近年来新颖的分离培养方法<sup>[14]</sup>，可获得较高纯度的BMSCs，但其需要特殊的实验仪器，实验条件要求高，需要BMSCs量大，由于目前尚未发现BMSCs特异性的表面标志，因此很难用流式细胞仪法和免疫磁珠法对其进行准确的分选，其应用受到一定的限制<sup>[15]</sup>。

目前，比较常用的方法是贴壁法和密度梯度离心法<sup>[16]</sup>。马力等<sup>[17]</sup>对Percoll密度梯度和全骨髓贴壁法做了比较，结果表明全骨髓贴壁法操作简单，分离过程短，BMSCs在离体后很少有分离所造成的损伤。Vaquero等<sup>[18]</sup>在实验中证明贴壁培养法筛选出的MSCs活性高，而且骨髓中的造血干细胞能分泌生长因子和促贴壁物质，可促进MSCs贴壁生长。因此，本实验采用全骨髓贴壁培养法从兔骨髓中诱导培养BMSCs，据BMSCs在血清培养基中贴壁生长的特性，通过2次半量换液和1次全换液逐渐去除不贴壁的造血系细胞，尽量减小对细胞的损伤，达到纯化、扩增BMSCs的目的；此法操作简易，无需特殊仪器，可避免密度梯度离心法中不同密度的分离液对BMSCs纯度的影响，分离到的细胞分化潜能较好，是比较理想的分离纯化BMSCs的方法。

本实验通过绘制 BMSCs生长曲线，MTT法检测BMSCs增殖活力，比较成骨诱导第2代的BMSCs与未诱导BMSCs的增殖能力和生长能力。实验结果表明，与未诱导的BMSCs比较，成骨诱导后的BMSCs增殖能力有所降低，但其生长和增殖能力仍然较强，4 d左右即

可传代, 可以提供足够数量的种子细胞。其增殖能力的降低可能与传代次数的增加有关, 未诱导的BMSCs多为第2代, 细胞较年轻, 诱导后的BMSCs大都传了4代, 增殖能力不如未诱导的BMSCs。

目前认为骨组织是由成骨细胞合成、分泌骨基质, 骨基质钙化形成。成骨细胞增殖分化过程中分泌骨基质, 其生长过程可分为: 细胞增殖期(0~4 d), 基质成熟期(3~14 d), 矿化期(13~15 d); 分化过程包括多潜能干细胞定向分化为前成骨细胞、幼稚的成骨细胞、成熟的成骨细胞<sup>[19]</sup>。本实验中发现, 兔BMSCs成骨诱导培养中第3~5天为细胞增殖期, 第5~14天为基质成熟期, 第14~20天为矿化期; 第1~3天细胞增殖能力最强, 其后逐渐减弱。成骨细胞分别在细胞增殖期、基质成熟期、矿化期阶段性优势表达碱性磷酸酶、骨钙素、骨桥蛋白、I型胶原等细胞外基质蛋白, 观察这些标志性基因mRNA水平的表达可以在一定程度上了解BMSCs向成骨细胞分化成熟的阶段; 目前研究表明I型胶原、骨桥蛋白和碱性磷酸酶在成骨方向分化中早期分泌, 骨钙素是骨质钙化、矿化必需的因子, 成骨细胞分化终末阶段的标志, 在经过1周的培养后, 这些基因的表达水平通常会增高<sup>[20-22]</sup>。

在本实验中发现, 原代BMSCs仅表达碱性磷酸酶和I型胶原, 经诱导培养后继续表达碱性磷酸酶, 还表达成骨细胞特异性基因骨桥蛋白、I型胶原、骨钙素和碱性成纤维细胞生长因子。诱导培养中第1代BMSCs表达骨桥蛋白和碱性磷酸酶, 表明正处于基质成熟期, 第2代BMSCs继续表达骨桥蛋白和碱性磷酸酶, 还表达骨钙素、碱性成纤维细胞生长因子和I型胶原。

现阶段研究表明, 成骨细胞也可以合成和分泌碱性成纤维细胞生长因子, Liu等<sup>[23]</sup>发现成纤维样细胞和成骨细胞分泌碱性成纤维细胞生长因子。本实验检测出原代BMSCs不表达碱性成纤维细胞生长因子mRNA, BMSCs经诱导培养后表达, 与Liu等<sup>[23]</sup>的研究结果一致。

值得注意的是, I型胶原在原代BMSCs中表达, 诱导培养第1代时没有表达, 在第2代时再次表达, 现阶段研究表明I型胶原多在成骨分化中早期分泌, 本实验中发现I型胶原基因在BMSCs基质成熟期也会表达。

骨钙素作为成骨细胞分化终末阶段的标志, 其表达可说明BMSCs处于成骨细胞方向分化的晚期, 该细胞分化成熟, 可作为成熟的种子细胞构建组织工程骨。

在BMSCs成骨方向诱导培养中, 碱性磷酸酶、骨桥蛋白、I型胶原、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素基因阶段性表达, 说明BMSCs正处于基质成熟期向矿化期过渡的阶段, 可在一定程度上了解BMSCs向成骨细胞分化演变中的基因表达模式, 本实验证明矿化诱导培养的BMSCs已成功向成骨细胞分化, 具备一定的成

骨功能。

目前认为BMSCs具有多种抗原标志及非单一性的特点, 且目前尚未发现其特有抗原标志<sup>[24]</sup>。BMSCs与造血干细胞共同存在于骨髓中, 但BMSCs不表达造血干细胞表面抗原, 如造血干细胞标志抗原CD34、白细胞标志抗原CD45等, 而表达CD29, CD44, CD90, CD105和CD166等一些黏附分子、生长因子受体与整合素家族成员, 其中CD44被认为是BMSCs的重要标志抗原。本实验通过流式细胞术筛选BMSCs特异性抗原CD44, 实验组阳性率为44.4%, 阴性对照组的阳性率为0.7%。该试验结果证明阴性对照组未诱导的细胞中骨髓间充质干细胞含量较少, 随着换液、传代次数的逐渐增加, 造血系细胞等混杂细胞被逐渐清除, 实验组成骨诱导培养的骨髓间充质干细胞不断增殖, 其CD44阳性率有所增高, 该结果表明本实验中分离培养的BMSCs纯度较高, 确是从骨髓间充质干细胞诱导分化而来。

本实验中发现成骨细胞特异性基因碱性磷酸酶、骨桥蛋白、I型胶原、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素阶段性顺序表达, 诱导培养的BMSCs已完成成骨细胞方向的分化, 实验结果表明BMSCs初步具备分泌成骨细胞外基质蛋白的能力, 具备一定的成骨功能; 诱导培养后BMSCs特异性抗原CD44的阳性率有所增加, 表明BMSCs具备干细胞的特征; 该BMSCs既具有骨髓间充质干细胞增殖能力较强的特点, 又具有一定的成骨能力, 可作为组织工程骨的理想种子细胞。

#### 4 参考文献

- [1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-49.
- [2] Clavin NW, Fernandez J, Schonmeyer BH, et al. Fractionated doses of ionizing radiation confer protection to mesenchymal stem cell pluripotency. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(3):739-748.
- [3] Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng*. 2007;13(1):111.
- [4] Chen BL, Chen DP, Zhang ZJ, et al. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi*. 2009;25(2):241-247. 陈柏龄, 陈东平, 张志坚, 等. Ang-1基因修饰的骨髓间质干细胞移植治疗脑梗死的实验研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(2):241-247.
- [5] Li YH, Wu ZZ, Wu WK, et al. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi*. 2009;25(8):1548-1553. 李映红, 吴正治, 吴伟康, 等. 天然脑活素定向诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化的实验研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(8):1548-1553.
- [6] Wang G, Lv TD, Ma J, et al. *Zhongguo Shiyanzhenduanxue*. 2008; 12(3):12-15. 王刚, 吕同德, 马静, 等. 大鼠骨髓MSCs表面分子检测及诱导分化研究[J]. *中国实验诊断学*, 2008, 12(3):12-15.
- [7] Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, et al. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2006;26(13):3377-3389.
- [8] Thirion C, Lochmüller H, Ruzsics Z, et al. Adenovirus vectors based on human adenovirus type 19a have high potential for human muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2006;17(2):193-205.
- [9] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(6):507-520.
- [10] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 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. 2006-09-30.

- [11] Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, et al. Zuzhi Gongcheng. 2005;19(9):746-750.  
董世武, 应大君, 段小军, 等. 核心结合因子A1对骨髓间充质干细胞成骨细胞标志基因表达的影响[J]. 组织工程, 2005, 19(9):746-750.
- [12] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284(5411): 143-147.
- [13] Stolzing A, Scutt A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. Aging Cell. 2006;5(3):213-224.
- [14] Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, et al. Mesenchymal stem cells. Arch Med Res. 2003;34(6): 565-571.
- [15] Qiu LY, Wang JF. Shengwu Gongcheng Xuebao. 2003;19(2): 136. 邱丽燕, 王金福. 骨髓间充质干细胞的研究进展[J]. 生物工程学报, 2003, 19(2):136.
- [16] Tropel P, Noél D, Platet N, et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res. 2004;295(2): 395.
- [17] Ma L, Liu DJ, Li DT, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(38):7401-7406.  
马力, 刘大军, 李德天, 等. 不同分离方法及培养条件对兔骨髓间充质干细胞生长增殖及生物学特性的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(38):7401-7406.
- [18] Vaquero J, Zurita M, Oya S, et al. Cell therapy using bonemarrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration. Neurosci Lett. 2006;398(1-2): 129-134.
- [19] Cotter EJ, Ip HS, Powderly WG, et al. Mechanism of HIV protein induced modulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. BMC Musculoskelet Disord. 2008;13:9-33.
- [20] Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. Acta Biochimica Polonica. 2003;50(4):1019-1038.
- [21] Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, et al. Transforming growth factor-beta1 to the bone. Endocr Rev. 2005;26(6):743-774.
- [22] Osyczka AM, Leboy PS. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. Endocrinology. 2005; 146(8):3428-3437.
- [23] Liu RK, Zhang QF, Ma XQ, et al. Temporospatial expression of bFGF and IGF-I in growing goats with cranial suture distraction osteogenesis. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2008;39(4): 605-608.
- [24] Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells. Regen Med. 2006;1(4): 497.

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 新疆维吾尔自治区科技攻关项目, 项目名称: 组织工程骨用于即刻牙种植骨结合的实验研究, 项目编号: 200533118; 新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目, 项目名称: bFGF 基因转染的骨髓间充质干细胞复合异种煅烧骨修复颌骨缺损的实验研究, 项目编号: xj EDU2009122.

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** 课题创新之处在于骨髓间充质干细胞经矿化诱导培养基诱导培养后, 第一二代骨髓间充质干细胞阶段性表达碱性磷酸酶、骨桥蛋白、collagen- I、碱性成纤维

细胞生长因子和骨钙素基因; 第 1 代骨髓间充质干细胞抗原 CD44 阳性率达 44.4%。提示兔骨髓间充质干细胞在体外矿化诱导培养中逐渐向成骨细胞分化, 分别于诱导后第一二代细胞中阶段性顺序表达成骨细胞特异性基因碱性磷酸酶、骨桥蛋白、collagen- I、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素, 该细胞已具备成骨细胞特征。

**课题评估的“金标准”:** 关于成骨细胞的鉴定缺乏金标准, 多根据细胞表面免疫标志进行鉴定, 考虑到经费等客观因素, 采用相对经济适用的鉴定方法, 成骨细胞特异外基质蛋白碱性磷酸酶、骨桥蛋白、collagen- I、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素 mRNA 水平的表达来判定成骨细胞的分化状态, 是否具备成骨细胞的基本功能。

**设计或课题的偏倚与不足:** 最好采用

Western-blot 的方法检测成骨细胞特异外基质蛋白碱性磷酸酶、骨桥蛋白、collagen- I、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素蛋白水平的表达, 因为蛋白在 mRNA 水平的表达后, 还需剪切、修饰等包装, 才能形成功能蛋白, 所以还需进一步检测。

**提供临床借鉴的价值:** 通过成骨细胞特异性基因碱性磷酸酶、骨桥蛋白、collagen- I、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素在 mRNA 水平的表达, 可以在一定程度上证明骨髓间充质干细胞正在向成骨细胞分化, 初步具备分泌成骨细胞基质蛋白碱性磷酸酶、骨桥蛋白、collagen- I、碱性成纤维细胞生长因子和骨钙素的功能, 该方法可作为骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化、鉴定的简便方法之一。



CRTER 杂志关注“2011-2013 年国家自然科学基金干细胞项目”:

本刊学术部<sup>①</sup>

- IL-24 基因修饰的间充质干细胞双靶向抗肺癌的实验研究
- BMP-4 活化的脂肪源干细胞治疗重型再生障碍性贫血的实验研究
- 松针有效部位对猪骨髓间充质干细胞生长机制的研究
- PTO 诱导肿瘤干细胞凋亡的分子机制
- 果蝇肠干细胞的维持和定向分化的分子机理
- 脂代谢关键基因 fas 在果蝇生殖干细胞命运决定中的作用
- 以 IPS 作为供体细胞进行核移植后表观遗传学研究
- 基于诱导多能干细胞技术的 I 型神经纤维瘤疾病模型研究
- 肾透明细胞癌干细胞表面分子标志的鉴定
- 应用表面模式化方法研究表皮干细胞过移动力学及其分子机制
- Calcineurin/NFAT 信号通路在小鼠胚胎干细胞中的功能研究
- 间充质干细胞与免疫系统的相互作用: 基础及应用研究
- 三磷酸肌醇受体(IP3Rs)在胚胎干细胞分化命运决定中的作用和调控机制
- 纺锤体基质蛋白质在胚胎干细胞维持和分化中的功能
- 干细胞编程与重编程过程中组蛋白变体 H2A.Z 和 H3.3 表观遗传调控的分子机制
- 蛋白质精氨酸甲基转移酶 SKB1 调控拟南芥根尖干细胞维持和分化的分子机制
- 利用独特的细胞共培养体系分离刺激哺乳动物器官鹿茸完全再生生物物质的研究
- 转染 Ang1 及 VEGF 双质粒的胎盘来源间充质干细胞对新生小鼠 BPD 模型干预研究
- 癌基因 p28GANK 对肝细胞和肝癌前体细胞功能的调节及其对肝癌发生机制的影响