

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.001 [http://www.cjter.org/cjter-2012-qikanquanwen.html]
李福春, 马学玲, 屈艳萍, 谷贵山. 骨髓间充质干细胞成骨分化过程中瞬时性受体电位香草精受体5的表达[J].
中国组织工程研究, 2012, 16(45):8361-8366.

骨髓间充质干细胞成骨分化过程中瞬时性受体电位香草精受体5的表达*☆

李福春¹, 马学玲², 屈艳萍³, 谷贵山⁴

文章亮点: ①实验成功体外分离、传代培养大鼠骨髓间充质干细胞, 并应用成骨细胞诱导培养体系, 将培养成功的大鼠骨髓间充质干细胞诱导为成骨细胞, 所诱导的骨髓间充质干细胞来源的细胞具有显著的成骨细胞特征及特性。②大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中存在瞬时性受体电位香草精受体5钙离子通道, 此通道可能成为调节成骨细胞增殖和分化的候选通道。

关键词: 瞬时性受体电位通道; 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞; 大鼠; 分化; 离子通道; 钙离子; 免疫组织化学; 骨髓来源干细胞; 组织工程

缩略语: 瞬时性受体电位香草精受体5: transient receptor potential vanilloid receptor 5, TRPV5

摘要

背景: 目前, 钙离子通道的研究仅限于肾脏、小肠、光滑卵母细胞中瞬时性受体电位香草精受体5所表现出来的电生特性。

目的: 观察新型钙离子通道瞬时性受体电位香草精受体5在大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中的表达及意义。

方法: 分离、提取、培养大鼠骨髓间充质干细胞, 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 用免疫组织化学法检测大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化的成骨细胞中瞬时性受体电位香草精受体5的表达。

结果与结论: 实验成功将体外培养大鼠骨髓间充质干细胞诱导培养为成骨细胞。碱性磷酸酶染色和茜素红染色检测结果显示, 诱导分化的成骨细胞中胞浆中可见紫黑色和红色的矿化结节。免疫组织化学染色结果显示, 诱导的成骨细胞中瞬时性受体电位香草精受体5呈强阳性表达。结果证实, 大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中存在瞬时性受体电位香草精受体5钙离子通道, 此通道可能成为调节成骨细胞增殖和分化的候选通道。

Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 5 during osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

Li Fu-chun¹, Ma Xue-ling², Qu Yan-ping³, Gu Gui-shan⁴

Abstract

BACKGROUND: At present, the calcium ion channel research is confined in the electrophysiological properties demonstrated by transient receptor potential vanilla receptor 5 in the kidney, small intestine and smooth oocytes.

OBJECTIVE: To explore the expression and significance of new calcium ion channel transient receptor potential vanilla receptor 5 in rat bone marrow mesenchymal stem cells derived osteoblasts.

METHODS: The rat bone marrow mesenchymal stem cells were separated, extracted and cultivated, then the rat bone marrow mesenchymal stem cells were induced to differentiate into osteoblasts, the expression of transient receptor potential vanilla receptor 5 in osteoblasts derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells was detected by immunohistochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: The *in vitro* cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells were successfully induced to differentiate into osteoblasts. Alkaline phosphatase staining and alizarin red staining results showed that the purple-black and red mineralized nodules were visible in the cytoplasm of the osteoblasts derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells. Immunohistochemical staining results showed the strongly positive expression of transient receptor potential vanilla receptor 5 in bone marrow mesenchymal stem cells derived osteoblasts. Results confirm that transient receptor potential vanilla receptor 5 calcium ion channel exists in rat bone marrow mesenchymal stem cells derived osteoblasts, and the transient receptor potential vanilla receptor 5 calcium ion channel may be the candidate channel which can regulate the osteoblasts proliferation and differentiation.

Li FC, Ma XL, Qu YP, Gu GS. Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 5 during osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45):8361-8366.

¹ 哈尔滨医科大学附属第一医院骨一科, 黑龙江省哈尔滨市 150001; ² 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001; ³ 黑龙江省医院门诊部, 黑龙江省哈尔滨市 150001; ⁴ 吉林大学第一临床医学院骨关节一科, 吉林省长春市 130021

李福春☆, 男, 1971年生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 朝鲜族, 2008年吉林大学第一临床医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事复杂创伤及骨肉瘤发病机制的研究。
lfcmxl@163.com

通讯作者: 谷贵山, 博士生导师, 教授, 吉林大学第一临床医学院骨关节一科, 吉林省长春市 130021
guguishan@sina.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2012)45-08361-06

收稿日期: 2012-08-09
修回日期: 2012-09-03
(2012062004/WJ C)

¹First Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China;
²Department of Neurology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China;
³Department of Out-patient, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China;
⁴First Department of Orthopedics, the First Clinical Medical College of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Li Fu-chun^{*}, Doctor, Attending physician, First Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
lfcmx1@163.com

Corresponding author: Gu Gui-shan, Doctoral supervisor, Professor, First Department of Orthopedics, the First Clinical Medical College of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
guguishan@sina.com

Supported by: Projects of Heilongjiang Health Department, No.2009-031*

Received: 2012-08-09
Accepted: 2012-09-03

0 引言

钙离子通道是一种存在于细胞膜上的与钙离子转运有关的特定蛋白质,钙通道通过蛋白构象的变化形成开放或关闭状态,从而控制钙离子的流动,来发挥钙离子对成骨细胞生物功能的调节作用。近年来,研究发现了多种钙离子跨膜转运通道,其中瞬时性受体电位通道超家族占有相当重要的地位,而瞬时性受体电位香草精受体5(transient receptor potential vanilloid receptor 5, TRPV5)是最具代表性的2个通道之一,属于TRP家族的1个亚型。目前,对这个钙离子通道的研究仅限于在肾脏、小肠、光滑卵母细胞中TRPV5所表现出的电生理特性^[1-6], TRPV5, 1, 25(OH)₂D₃, PTH, 饮食钙、雌激素和药物影响的调节在以往的研究中已经明确,最近研究热点集中在钙调节蛋白、S100A10-膜联蛋白-2复合物、80K-H等辅助蛋白的作用方面^[7-11]。而对其在骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中的表达及意义的研究罕见文献报道。

实验用密度梯度离心法将大鼠骨髓间充质干细胞从骨髓中成功分离并进行传代培养^[12-14],并将骨髓间充质干细胞诱导为成骨细胞,对骨髓间充质干细胞和成骨细胞鉴定结果符合各自的细胞特性。用免疫组织化学法检测了骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中TRPV5的表达情况,探讨TRPV5离子通道在骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中的表达及意义。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2010年1月至2011年11月在哈尔滨医科大学附属第一医院中心实验室完成。

材料: 健康出生后48 h的SD大鼠乳鼠5只,体质量平均约20 g,哈尔滨医科大学动物实验中心提供,动物许可证号:SYXK(黑)2006-032。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[15]。

骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化应用的

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养液	美国 Gibco 公司
胎牛血清	Hyclon 公司
胰蛋白酶,青霉素和链霉素, 二甲基亚砜(DMSO),二 甲基亚砜二苯基四唑溴盐 (MTT),维生素C,地塞米松, β-甘油磷酸钠	Sigma 公司
碱性磷酸酶免疫组织化学 试剂盒	南京建成公司
TRPV5 兔抗大鼠单克隆抗体 免疫组织化学 SP 试剂盒, DAB 显色试剂盒	Alomone Labs Ltd. Israel 福州迈新生物技术公司
倒置相差显微镜	Leica 公司
酶标仪	美国 ELx800 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司

实验方法:

大鼠乳鼠骨髓间充质干细胞的分离培养: 将乳鼠拉颈处死,体积分数75%乙醇中浸泡10 min,无菌条件下分离股骨,剪去骨骺端,用DMEM培养基冲洗骨髓腔数次,将细胞悬液移入刻度离心管,按1:1加入大鼠淋巴细胞分离液(percoll相对密度1.083),离心2 500×g,20 min,吸取中间薄膜层细胞,加DMEM培养基重悬细胞,计数并将细胞浓度调整为1×10⁹ L⁻¹,接种于50 mL培养瓶,每瓶含20 mL培养液(含青霉素100 U/mL、链霉素100 mg/L,体积分数10%胎牛血清,1%谷氨酰胺,普通低糖DMEM),37 ℃,体积分数5%CO₂湿化空气的孵箱中进行原代培养。每隔48 h半量换液,以后每隔3 d全量换液。换液时弃去未贴壁细胞,待贴壁细胞生长铺满瓶底后,进行传代培养。

骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化: 取第三、四代的大鼠骨髓间充质干细胞进行诱导分化。向在生长培养基中传代的大鼠骨髓间充质干细胞中加入10⁻⁸ mol/L地塞米松、质量浓度50 mg/L维生素C和10 mmol/L β-甘油磷酸钠等诱导剂诱导其向成骨细胞分化,分化过程中每隔两三天换液1次。待细胞彼此汇合、铺满整个培养瓶底后,按2×10⁸ L⁻¹细胞浓度进行传代。

成骨细胞鉴定:

生长情况和形态学观察: 每天观察诱导培养的第三代大鼠成骨细胞,MTT法观察其生长情况,绘制细胞生长曲线。到检测时间点前4 h加

质量浓度5 g/L MTT, 20 U/孔, 到检测时间点加DMSO(二甲基亚砜), 150 U/孔, 酶标仪检测。

成骨细胞碱性磷酸酶染色: 将无菌玻片放入第3代培养皿, 待细胞长至形成结节后取出。PBS冲洗。固定液固定10 min。蒸馏水冲洗数次, 晾干。滴加新鲜配制的底物液盖满样本部分, 加封口膜。孵育液中37 °C 15 min。蒸馏水冲洗数次。用苏木精复染10 min。蒸馏水洗数次, 晾干。

苏木精复染的成骨细胞碱性磷酸酶染色阳性者细胞浆中出现紫黑色颗粒, 其强度可按Kaplow记分法表示。0分: 细胞浆内无紫黑色; 1分: 弥散的紫黑色并偶见紫黑色颗粒; 2分: 弥散的紫黑色, 有中等量的紫黑色颗粒; 3分: 显著的紫黑色, 有较多的紫黑色颗粒; 4分: 显著的紫黑色并有粗大的紫黑色颗粒充满细胞浆。

矿化结节的茜素红染色: 在细胞矿化期, 细胞分泌的胶原纤维与钙盐亲和, 形成矿化结节, 该染色法是鉴别成骨细胞的特异性染色法。取连续培养20 d的细胞爬片, PBS洗3次, 体积分数95%乙醇固定10 min, 用饱和茜素红染色30 min, 然后水洗, 乙醇脱色, 二甲苯透明, 树胶封固。茜素红染色阳性结果为光学显微镜下观察镜下矿化结节呈现红色。

免疫组织化学染色检测骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中TRPV5的表达: 在第3代骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导过程中, 事先在24孔板中铺一无菌盖玻片, 将细胞接种在24孔板中, 至诱导成功成骨细胞后取出孔中的盖玻片, 进行TRPV5的免疫组织化学染色。用已知大鼠肾小管上皮细胞阳性标本做阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照。具体步骤: 倾去培养液, 预冷PBS漂洗2次, 5 s/次。-20 °C丙酮固定20 min; 室温晾干后-20 °C存放备用。每张切片加一滴3%过氧化酶阻断溶液, 室温下用孵育10 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性。PBS冲洗3次, 3 min/次。滴加适当稀释的一抗, 4 °C过夜。PBS冲洗3次, 每次3-5 min。除去PBS, 每张切片滴加生物素标记的二抗(山羊抗兔IgG), 室温下孵育10 min。PBS冲洗3次, 3 min/次。除去PBS, 每张切片滴加试剂链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液1滴, 室温下孵育10 min。PBS冲洗3次, 3 min/次。除去PBS, 每张切片加2滴新鲜配制的DAB溶液, 显微镜下观察3-10 min, 无论染色深浅, 同一抗体的所有切片染色时间均相同, 室温显色。自来水冲洗, 每张切片滴加苏木精染色1 min, 自来水下冲洗。每张切片滴加1% 盐酸乙醇, 流水返蓝。乙醇梯度脱水(体积分数70%乙醇1次, 95%乙醇2次, 100%乙醇4次)。二甲苯中性胶封固。以大鼠肾

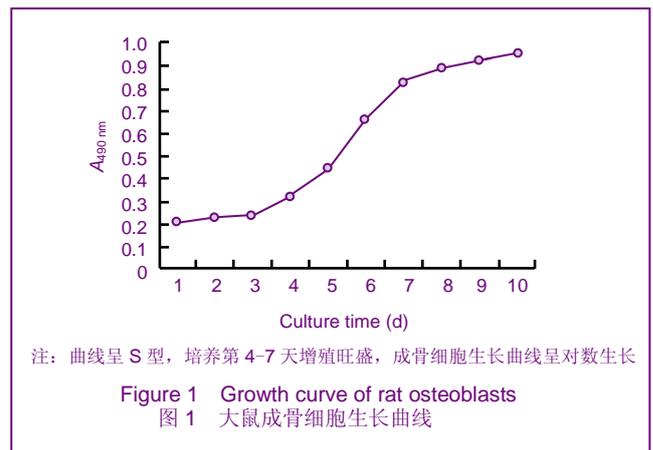
脏组织TRPV5的免疫组织化学检测结果作为阳性对照组。

用低倍镜和高倍镜观察切片, 以细胞胞浆内或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性, 将胞浆染色程度分为4级: 阴性(-), 基本不着色; 弱阳性(+), 着色淡; 阳性(++)色适中; 强阳性(+++), 着色深。

主要观察指标: 诱导的成骨细胞形态, 大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化的成骨细胞中TRPV5的表达。

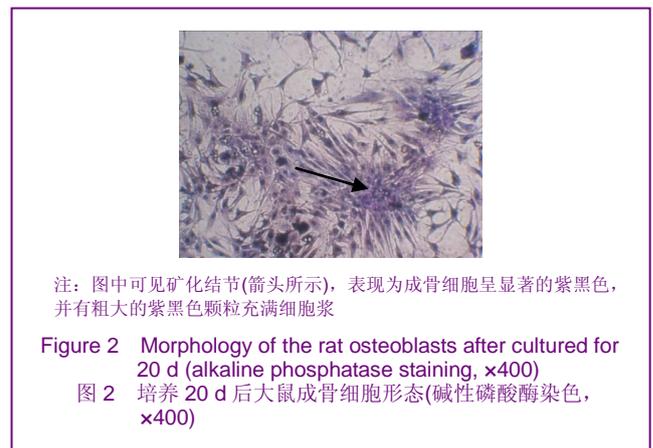
2 结果

2.1 诱导培养的大鼠成骨细胞的生长曲线 大鼠骨髓间充质干细胞初次加用成骨诱导剂后, 增殖速度明显变慢, 培养约15 d后才有明显改变。第3代成骨细胞生长曲线呈对数生长, 符合体外培养细胞生长的一般规律, 见图1。

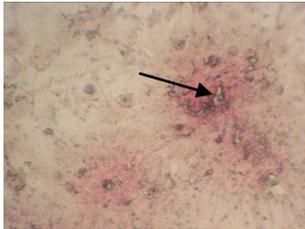


2.2 诱导培养的大鼠成骨细胞形态

碱性磷酸酶染色结果: 诱导培养的大鼠成骨细胞经碱性磷酸酶染色后, 可见碱性磷酸酶染色强阳性的矿化结节, 表现为细胞浆染为紫黑色, 并见大量紫黑色颗粒, 见图2。细胞培养传代3次, 约80%以上的细胞呈阳性。



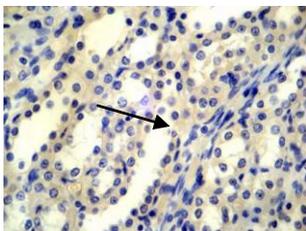
茜素红染色结果: 经茜素红染色后, 矿化结节呈红色。成骨细胞生长融合达单层, 继续培养增殖细胞会互相重叠成多层, 并聚集成簇, 形成多个散在的致密灶, 灶中央细胞逐渐萎缩变形, 被分泌的基质包埋, 进而钙盐沉积, 发生基质矿化, 形成不透明区, 经茜素红染色后显微镜下可见红色矿化结节, 见图3。



注: 成骨细胞聚集成簇, 形成多个散在的致密灶, 灶中央细胞逐渐萎缩变形, 发生基质矿化, 经茜素红染色后显微镜下可见红色矿化结节

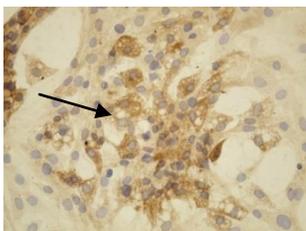
Figure 3 Morphology of the rat osteoblasts after cultured for 20 d (mineralized nodule staining, $\times 400$)
图3 培养 20 d 后大鼠成骨细胞形态(矿化结节染色, $\times 400$)

2.3 大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化的成骨细胞中 TRPV5 的表达 大鼠肾脏 TRPV5 阳性对照组可见细胞浆内充满棕黄色颗粒, 染色较深, 即为阳性表达, 见图4; 在诱导分化的成骨细胞中 TRPV5 表达呈强阳性, 细胞浆内棕黄色颗粒染色更深, 见图5。



注: 细胞浆内充满棕黄色颗粒(箭头所示为 TRPV5 阳性表达细胞), 染色深

Figure 4 Staining results of transient receptor potential vanilloid receptor 5 in the kidney of positive control group (immunohistochemical staining, $\times 400$)
图4 大鼠肾脏阳性对照组 TRPV5 染色结果(免疫组织化学染色, $\times 400$)



注: 成骨细胞中棕黄色颗粒染色很深, TRPV5 阳性表达细胞表达呈强阳性(箭头所示)

Figure 5 Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 5 in the osteoblasts derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells (immunohistochemical staining, $\times 400$)
图5 大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中 TRPV5 的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

3 讨论

骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能。骨髓分为造血和间充质两大系统, 骨髓间充质系统能对造血系统提供支持作用, 影响造血干细胞生存、生长和分化^[16-20]。有实验证实, 在非诱导条件下的骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能^[21]。Digirolamo 等^[22]报道, 体外培养的骨髓间充质干细胞具有自动分化为成骨细胞并分泌矿物质的能力。同年, Aubin 等^[23]用地塞米松作用于骨髓间充质干细胞时发现: 地塞米松可升高细胞各种成骨标记物的表达, 但并非必需, 这说明存在两种类型的骨祖细胞: 一种不需要外源性诱导物如糖皮质激素、骨形态发生蛋白的作用就能自动分化成骨, 称为定向性骨祖细胞, 所以骨髓间充质干细胞具有自动成骨分化的能力。另一种为诱导性骨祖细胞, 其不能自发形成骨组织, 必须在诱导物的作用下才能成骨。这解释了为什么骨髓间充质干细胞中部分细胞在没有成骨诱导因素的前提下自动分化为成骨细胞, 而加入诱导因素可增加成骨细胞数量的原因。Pittenger 等^[24]认为确定某细胞为骨髓间充质干细胞必须具有以下特性: ①骨髓来源。②体外培养贴附于培养皿上形态呈成纤维样集落形成单位。③能够自主增殖至少可以分化为3种以上间充质细胞系。因此, 在进行关于骨髓间充质干细胞的研究和相关评价时, 必须考虑到以上差异因素。实验采用细胞骨髓来源、细胞生长特性、细胞形态、向成骨细胞诱导等手段对骨髓间充质干细胞鉴定, 结果显示: 所分离传代的细胞各项指标均符合骨髓间充质干细胞细胞特性及特征。

成熟的成骨细胞分化体系。近来, 国内外学者研究出了很多诱导骨髓间充质细胞成骨分化的体外培养体系, 可以归纳为主要利用化学、生物、物理3种因素进行诱导。实验采用化学常规成骨诱导剂: 向培养体系中加入 10^{-8} mol/L 地塞米松、质量浓度 50 mg/L 维生素 C 和 10 mmol/L β -甘油磷酸钠进行成骨诱导。培养 15 d 后骨髓间充质干细胞产生矿盐逐渐沉积而形成矿化结节, 其碱性磷酸酶和茜素红染色均为强阳性。一般认为碱性磷酸酶是成熟成骨细胞的标志酶之一^[25], 在体外矿化中起着关键性的作用, 即如果没有碱性磷酸酶活力, 矿化就不会发生, 其主要机理是碱性磷酸酶能够水解有机磷酸化合物, 使局部 PO_4^{4-} 浓度升高, 并可破坏钙化抑制剂, 从而启动矿化^[26]。目前普遍认为碱性磷酸酶的活性和矿化结节的检测是鉴定成骨细胞的主要方法。实验中大鼠骨髓间充

质干细胞经加入成骨诱导剂培养后, 细胞碱性磷酸酶染色呈强阳性, 显示了成骨细胞的典型特征, 证明该成骨诱导培养体系可以刺激骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化和增殖。诱导剂中地塞米松可抑制骨髓间充质干细胞增殖, 但是在早期地塞米松可以促进间充质(碱性磷酸酶、骨涎蛋白和骨桥蛋白)合成, 后期可以促进钙化, 是骨髓间充质干细胞体外成骨的必需成分。 β -甘油磷酸钠在地塞米松存在的条件下可以提供磷离子作为碱性磷酸酶作用的底物, 诱导和激活碱性磷酸酶, 促进有机磷向无机磷转化, 加速钙盐的沉着。维生素C是细胞合成胶原的必需物质。上述2种化学药物一般联合使用, 以便发挥它们的协同效应。实验观察到第4-7天完全贴壁的大鼠成骨细胞进入活跃增殖阶段, 生长增殖为连续的单层后, 增生速度减慢, 转而细胞呈多层生长, 在局部聚集成灶, 分泌骨基质并最终矿化成矿化结节。矿化结节茜素红染色呈强阳性, 表明培养的细胞具有钙质分泌的能力。

TRPV5是瞬时性受体电位通道家族最具代表性的2个通道之一。近年来, 研究发现了多种钙离子跨膜转运通道, 其中瞬时性受体电位通道超家族占有相当重要的地位, 而TRPV5是最具代表性的两个通道之一, 属于瞬时性受体电位通道家族的一个亚型。目前, 对这个钙离子通道的研究仅限于在肾脏、小肠、光滑卵母细胞中TRPV5所表现出的电生理特性。

大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中TRPV5表达为强阳性。实验用免疫组织化学法检测了大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中TRPV5的表达情况。研究发现, 大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中TRPV5表达为强阳性。因此可以证明大鼠成骨细胞中存在TRPV5钙离子通道。

骨髓间充质干细胞向成骨分化的过程中有钙离子及钙离子通道共同参与其中。目前研究表明, 在骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的过程中, 骨髓间充质干细胞必须吸收钙离子, 这说明在由骨髓间充质干细胞向成骨分化的过程中有钙离子及钙离子通道共同参与其中。Zahanich等^[27]在研究VOCCs通道在人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中的作用时发现, 在成骨分化过程中, L型钙通道阻断剂-硝苯地平不影响人间充质干细胞碱性磷酸酶的活性、钙和磷酸盐的蓄积, 因而提示, 人间充质干细胞成骨分化不需要L型钙通道功能。Zahanich等^[27]认为: 在大多数人间充质干细胞, 钙离子通过质膜进入是通过其他通道调节的, 而不是VOCCs, 阻断L型钙通道不影响人间充质干细胞早期成骨分化。

TRPV5钙离子通道有可能成为调节成骨细胞增殖、

分化的候选通道。根据实验的研究结果: 在大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中, 有TRPV5钙离子通道蛋白表达, 说明TRPV5通道参与成骨细胞内钙离子变化, 而钙离子作为细胞内的第二信使, 在信号传导中具有极其重要的作用, 成为各条信号传导途径的枢纽, 钙离子能够直接或间接地影响细胞的某些DNA复制和RNA表达功能, 从而完成生物信号的跨膜信息传递, 将细胞受到的外部刺激传递到细胞内部, 不同的转录因子被激活, 达到调节细胞的生长、分化和功能活性的目的。而钙离子进入细胞的中间环节就是钙离子通道, 也就是说钙离子通过钙离子通道进入细胞而发挥作用, 钙离子通道是一种存在于细胞膜上的与钙离子转运有关的特定蛋白质, 钙通道通过蛋白构象的变化形成开放或关闭状态, 从而控制钙离子的流动, 来发挥钙离子对成骨细胞生物功能的调节作用。因此, 钙离子通道的存在对于成骨细胞的进一步分化、代谢、凋亡起重要作用。近来已经证明, TRPV5是促进跨细胞钙离子转运的3步过程中的一部分。钙离子通过TRPV5进入细胞后, 钙离子结合到钙结合蛋白D28K上和(或)钙结合蛋白D9K上弥散到基底外侧膜; 然后, 钙离子经NCX1和ATP依赖性膜 Ca^{2+} -ATPase 1b排出。故实验推测: TRPV5钙离子通道有可能成为调节成骨细胞增殖、分化的候选通道, 而TRPV5钙离子通道在成骨细胞中的作用还需要进一步深入研究。

综上所述, 实验成功体外分离、传代培养大鼠骨髓间充质干细胞, 并应用成骨细胞诱导培养体系, 将培养成功的大鼠骨髓间充质干细胞诱导为成骨细胞, 所诱导的骨髓间充质干细胞来源的细胞具有显著的成骨细胞特征及特性。

4 参考文献

- [1] Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, et al. Molecular identification of the apical Ca^{2+} channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia. *J Biol Chem.* 1999;274(13):8375-8378.
- [2] Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, et al. The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;261(2):488-492.
- [3] Nilius B, Vennekens R, Prenen J, et al. The single pore residue Asp542 determines Ca^{2+} permeation and Mg^{2+} block of the epithelial Ca^{2+} channel. *J Biol Chem.* 2001;276(2):1020-1025.
- [4] Nilius B, Prenen J, Hoenderop JG, et al. Fast and slow inactivation kinetics of the Ca^{2+} channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30852-30858.

- [5] Nilius B, Weidema F, Prenen J, et al. The carboxyl terminus of the epithelial Ca(2+) channel ECaC1 is involved in Ca(2+)-dependent inactivation. *Pflugers Arch.* 2003;445(5): 584-588.
- [6] Vennekens R, Hoenderop JG, Prenen J, et al. Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J Biol Chem.* 2000;275(6):3963-3969.
- [7] Niemeyer BA, Bergs C, Wissenbach U, et al. Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6): 3600-3605.
- [8] Lambers TT, Weidema AF, Nilius B, et al. Regulation of the mouse epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 by the Ca(2+)-sensor calmodulin. *J Biol Chem.* 2004;279(28): 28855-28861.
- [9] van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D, et al. Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* 2003;22(7):1478-1487.
- [10] Menaa C, Devlin RD, Reddy SV, et al. Annexin II increases osteoclast formation by stimulating the proliferation of osteoclast precursors in human marrow cultures. *J Clin Invest.* 1999;103(11):1605-1613.
- [11] Gkika D, Mahieu F, Nilius B, et al. 80K-H as a new Ca²⁺ sensor regulating the activity of the epithelial Ca²⁺ channel transient receptor potential cation channel V5 (TRPV5). *J Biol Chem.* 2004;279(25):26351-26357.
- [12] Mu XH, Zhao ZY, Xu L, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(27):4955-4958. 穆晓红,赵子义,徐林,等.密度梯度离心法体外培养骨髓间充质干细胞的分化能力[J].中国组织工程研究与临床康复,2011, 15(27): 4955-4958.
- [13] Xu CF, Hu DH, Zhao ZT, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6):1002-1005. 徐成峰,胡大海,赵周婷,等.兔骨髓间充质干细胞体外分离培养及多向诱导分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(6): 1002-1005.
- [14] Yu LF, Kong LB, Zhu QS. *Disi Junyidaxue Xuebao.* 2009;30(23): 2816-2819. 于利峰,孔令攀,朱庆生.骨髓间充质干细胞建立的成骨细胞培养模型的研究[J].第四军医大学学报,2009,30(23):2816-2819.
- [15] 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.
- [16] Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, et al. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2002;2(2):195-209.
- [17] Fisher M, Hyzy S, Gulberg RE, et al. Regeneration of bone marrow after tibial ablation in immunocompromised rats is age dependent. *Bone.* 2010;46(2):396-340.
- [18] Zhao DC, Wang YL, Dang YX, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14):2491-2495. 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.
- [19] Liu W, Liu M, Zhu JS, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14):2515-2519. 刘伟,刘萌,祝劲松,等.人骨髓间充质干细胞的体外培养、鉴定及成骨分化[J].中国组织工程研究,2012,16(14):2515-2519.
- [20] Li S, Guo YW, Fang DJ. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14):2477-2480. 李松,郭延伟,房殿吉.兔下颌骨来源骨髓间充质干细胞的体外培养及生物学特性[J].中国组织工程研究,2012,16(14):2477-2480.
- [21] Negishi Y, Kudo A, Obinata A, et al. Multipotency of a bone marrow stromal cell line, TBR31-2, established from ts-SV40 T antigen gene transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268(2):450-455.
- [22] Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 1999;107(2):275-281.
- [23] Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 1999;72(3): 396-410.
- [24] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-147.
- [25] Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol.* 2001;187(3):345-355.
- [26] Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(355 Suppl):S73-81.
- [27] Zahanich I, Graf EM, Heubach JF, et al. Molecular and functional expression of voltage-operated calcium channels during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.* 2005;20(9):1637-1646.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 黑龙江省卫生厅课题(2009-031)。

作者贡献: 第一作者负责课题设计,完成论文写作。第二、四作者负责免疫组织化学实验操作。第三作者负责细胞培养实验操作。通讯作者为课题指导者。

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。

伦理要求: 实验已经获得哈尔滨医科大学动物伦理委员会批准。

文章概要: TRPV5 钙离子通道有可能成为调节成骨细胞增殖、分化的候选通道。大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞中 TRPV5 表达为强阳性。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。