

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.42.003

[http://www.crter.org]

黄长智, 杨效宁, 刘大诚, 孙一公, 戴醒明. 降钙素基因相关肽诱导藻酸钙凝胶复合脂肪干细胞的成骨细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(42):7356-7362.

## 降钙素基因相关肽诱导藻酸钙凝胶复合脂肪干细胞的成骨细胞分化\*

黄长智<sup>1</sup>, 杨效宁<sup>2</sup>, 刘大诚<sup>3</sup>, 孙一公<sup>2</sup>, 戴醒明<sup>2</sup> (<sup>1</sup>福建医科大学附属宁德市医院骨一科, 福建省宁德市 352100; <sup>2</sup>徐州医学院附属徐州市第一人民医院骨一科, 江苏省徐州市 221002; <sup>3</sup>徐州医学院研究生学院, 江苏省徐州市 221000)

### 文章亮点:

1 降钙素基因相关肽已被证实具有诱导成骨分化作用, 但是否对三维培养的脂肪干细胞具有相同作用国内外相关报道鲜见。实验利用藻酸钙凝胶三维培养方法来观察降钙素基因相关肽对兔脂肪干细胞向成骨细胞增殖、分化的影响。

2 实验虽在体外成功利用重组人降钙素基因相关肽诱导三维培养条件下的兔脂肪干细胞向成骨细胞分化, 但诱导后的成骨细胞在体内是否具有同样的生物学性能, 是否能够最终修复骨缺损, 还有待进一步开展其在修复骨缺损方面的动物实验研究。

### 关键词:

生物材料; 组织工程骨材料; 复合支架材料; 降钙素基因相关肽; 脂肪干细胞; 成骨分化; 藻酸钙凝胶; 三维培养

### 主题词:

生物相容性材料; 降钙素基因相关肽; 凝胶类; 干细胞

### 摘要

**背景:** 降钙素基因相关肽已被证实具有诱导成骨细胞分化作用, 但其是否可使三维培养下的脂肪干细胞向成骨细胞分化构建组织工程骨的相关报道少见。

**目的:** 探讨外源性降钙素基因相关肽诱导兔脂肪干细胞复合藻酸钙凝胶三维培养成骨分化的可行性。

**方法:** 取新西兰兔双侧腹股沟区皮下脂肪垫, I型胶原酶消化离心贴壁法分离培养脂肪干细胞, 取第3代与海藻酸钠混合制备凝胶, 于24孔板分组培养: 对照组加入含 $10^{-2}$  mol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、 $10^{-7}$  mol/L 地塞米松、50 mg/L 抗坏血酸、体积分数10%胎牛血清的DMEM/F-12骨诱导培养基, 实验组在此基础上再加入1.5  $\mu$ g/L降钙素基因相关肽进行诱导培养。于诱导不同时间点MTT法检测细胞增殖, RT-PCR法检测诱导细胞I型胶原和骨钙素mRNA的表达, 并检测碱性磷酸酶及钙离子浓度。

**结果与结论:** 兔脂肪干细胞的增殖曲线呈“S”型, 实验组诱导1, 3, 5, 7, 14, 21 d的A值高于对照组( $P < 0.05$ ); 诱导2周后两组细胞碱性磷酸酶、茜素红染色均阳性, 但实验组钙结节较对照组明显增多。实验组诱导7, 14 d的I型胶原和骨钙素mRNA表达均强于对照组。实验组诱导1, 2, 3, 4周的碱性磷酸酶活性及钙离子浓度均高于对照组( $P < 0.05$ )。结果表明降钙素基因相关肽能诱导复合藻酸钙凝胶的脂肪干细胞向成骨细胞分化。

## Calcitonin gene-related peptide induces the osteogenic differentiation of adipose derived stem cells combined with calcium alginate gel

Huang Chang-zhi<sup>1</sup>, Yang Xiao-ning<sup>2</sup>, Liu Da-cheng<sup>3</sup>, Sun Yi-gong<sup>2</sup>, Dai Xing-ming<sup>2</sup> (<sup>1</sup>First Department of Orthopedics, Ningde Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Ningde 352100, Fujian Province, China; <sup>2</sup>First Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Xuzhou, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China; <sup>3</sup>Graduate School, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Calcitonin gene-related peptide has been confirmed to induce osteogenic differentiation, but whether it can induce the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells under three-dimensional culture to construct tissue-engineered bone is rarely reported.

**OBJECTIVE:** To investigate the feasibility of exogenous calcitonin gene-related peptide to induce osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells combined with calcium alginate gel in three-dimensional condition.

**METHODS:** Adipose-derived stem cells were gained by collagenase I digestion of the subcutaneous adipose tissue of both inguinal regions of New Zealand rabbits. Passage 3 cells were mixed with sodium alginate to prepare calcium alginate gel, and then the cells were assigned into two groups and cultured in 24-well plates. Adipose-derived stem cells in the control group were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's nutrient mixture F-12 supplemented with  $10^{-2}$  mol/L  $\beta$ -glycerophosphate sodium,  $10^{-7}$  mol/L dexamethasone,

黄长智★, 男, 1987年生, 福建省福安市人, 汉族, 2013年徐州医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事关节外科与骨组织工程学研究。

huangchangzhixz@sina.com

通讯作者: 杨效宁, 博士, 硕士生导师, 主任医师, 教授, 徐州医学院附属徐州市第一人民医院骨一科, 江苏省徐州市 221002  
yang2doc@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344 (2013)42-07356-07

收稿日期: 2013-04-15

修回日期: 2013-04-30

(201304062/GW - W)

Huang Chang-zhi★, Master, Physician, Department of Orthopedics, Ningde Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Ningde 352100, Fujian Province, China  
huangchangzhixz@sina.com

Corresponding author: Yang Xiao-ning, M.D., Master's supervisor, Professor, Chief physician, Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Xuzhou, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China  
yang2doc@163.com

Received: 2013-04-15

Accepted: 2013-04-30

50 mg/L ascorbic acid, 10% fetal bovine serum. While, adipose-derived stem cells in the experimental group were incubated with the same medium as above, but 1.5  $\mu\text{g/L}$  calcitonin gene-related peptide was added. The cells proliferation and the mRNA expressions of collagen I and osteocalcin were detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and reverse transcription-PCR respectively, and alkaline phosphatase and calcium concentration were detected at different induction time.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The cell proliferation curves were S shaped. The absorbance values of the experimental group were higher than those of the control group at 1, 3, 5, 7, 14, 21 days after osteogenic induction ( $P < 0.05$ ). Alkaline phosphatase and alizarin red staining of adipose-derived stem cells was all positive, but golden round nodes became more and bigger in the experimental group compared with the control group after 2 weeks. At 7 and 14 days, collagen I and osteocalcin mRNA expressions were higher in the experimental group than in the control group. Alkaline phosphatase activity and calcium concentration of the experimental group were higher than those of the control group at 1, 2, 3, 4 weeks after osteogenic induction ( $P < 0.05$ ). Results showed that the calcitonin gene-related peptide can induce the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells combined with calcium alginate gel.

**Subject headings:** biocompatible materials; calcitonin gene-related peptide; gels; stem cells

Huang CZ, Yang XN, Liu DC, Sun YG, Dai XM. Calcitonin gene-related peptide induces the osteogenic differentiation of adipose derived stem cells combined with calcium alginate gel. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(42):7356-7362.

## 0 引言 Introduction

降钙素基因相关肽作为最丰富的一种神经肽,目前国内外对其研究主要集中在神经系统和心血管系统上<sup>[1-3]</sup>,对骨缺损修复方面的研究很少,新近研究发现降钙素基因相关肽在骨修复及骨重建中发挥重要作用。Hukkanen等<sup>[4]</sup>研究发现在大鼠骨折处周围、骨外膜中降钙素基因相关肽阳性神经纤维发生起始退化而后迅速增殖;此后随着骨痂形成及骨改建的进展其分布和密度也发生变化。

Aoki等<sup>[5]</sup>研究也证实在大鼠骨折愈合过程中,纤维肉芽组织、骨膜及新生骨组织中均出现大量降钙素基因相关肽阳性神经纤维,并随着骨痂形成及骨改建其增生程度发生有序的增减。这些增生的感觉神经纤维能在局部释放出远高于血清水平的降钙素基因相关肽,参与正常骨愈合过程。Li等<sup>[6]</sup>也在胫骨骨折大鼠模型中发现骨折发生后可刺激损伤局部产生大量新生降钙素基因相关肽阳性神经纤维,这也许是骨折愈合和重塑的先决条件。Hayashi等<sup>[7]</sup>发现脊髓损伤合并骨折大鼠血清降钙素基因相关肽早期表达明显增高,伤后7 d达正常3倍以上,伤后3, 7 d与单纯骨折组比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。

Onuoha<sup>[8]</sup>利用ELISA法测定骨折患者24 h内血浆中降钙素基因相关肽水平的变化,发现患者血浆中降钙素基因相关肽水平较对照组明显升高。孙晓新等<sup>[9]</sup>通过动物实验观察到,骨折合并中枢神经损伤组在骨折愈合不同阶段,各种参与骨愈合的细胞其降钙素基因相关肽表达量明显高于单纯骨折组,且骨折端骨痂形成及改建均早于单纯骨折组。Ekelund等<sup>[10]</sup>通过对降钙素基因相关肽阳性神经纤维在异位骨化处的分布研究,发现该神经纤维的分布密度与局部骨形成量呈正相关。

人长骨骨干骨折不愈合处的降钙素基因相关肽阳性神经纤维稀疏或缺失;去除腓骨骨折大鼠骨膜的感觉神经终端降钙素基因相关肽阳性神经纤维,可导致骨折不愈合<sup>[11]</sup>。如切断大鼠坐骨神经,则胫骨骨折骨痂较正常大,但密度低且力学性能差,骨痂处无降钙素基因相关肽阳性神经纤维长入<sup>[12]</sup>。而在大鼠脊髓损伤模型观察到,胫骨骨折处早期形成大量的纤维骨痂和软骨骨痂,这一时期骨痂内降钙素基因相关肽呈强阳性表达;但骨折2周后骨痂内的降钙素基因相关肽明显减少,伴随纤维骨痂和软骨骨痂向骨性骨痂转化明显减慢<sup>[13]</sup>。

这些研究均表明降钙素基因相关肽及降钙素基因相关肽阳性神经纤维在骨形成、骨修复及骨重建中发挥着重要作用。体外实验也发现了成骨细胞表面降钙素基因相关肽受体的存在<sup>[14]</sup>,但是降钙素基因相关肽是否具有促使脂肪干细胞向成骨细胞定向分化的作用相关报道罕见。实验利用藻酸钙凝胶三维培养方法来观察降钙素基因相关肽对兔脂肪干细胞向成骨细胞增殖、分化的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 观察性实验。

**时间及地点:** 于2012年7月至2013年1月在徐州医学院附属医院中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 3月龄清洁级健康新西兰大白兔2只,雌雄不拘,体质量2.5-3.5 kg,由徐州医学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(苏)2005-0005。

实验过程中对动物的处置符合2006年中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》中的规定<sup>[15]</sup>。

## 降钙素基因相关肽诱导藻酸钙凝胶复合脂肪干细胞向成骨细胞分化实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F-12 培养基、胎牛血清	美国 Thermo 公司
$\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸、重组人降钙素基因相关肽、海藻酸钠	美国 Sigma 公司
胰蛋白酶、I 型胶原酶、MTT 细胞增殖及毒性检测试剂盒	碧云天生物技术研究所
Rabbit Anti-CD44/CD45	北京博奥森生物技术有限公司
FITC 标记山羊抗兔 IgG	北京中杉金桥生物技术有限公司
碱性磷酸酶检测试剂盒、碱性磷酸酶染色试剂盒、钙离子检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
总 RNA 提取试剂盒、RT 试剂盒、PCR 反应液	北京 Tian Gen 公司
超净工作台	苏州净化设备厂
倒置相差显微镜	日本 Olympus 公司
酶联免疫检测仪	日本东芝公司
荧光显微镜	日本 Nikon 公司
PCR 扩增仪	美国 MJ Research 公司
紫外凝胶成像系统	美国 Alpha Innotech 公司

### 实验方法:

**兔脂肪干细胞的分离培养<sup>[16-17]</sup>:** 取3月龄新西兰白兔, 以2 mL/kg的10%水合氯醛经耳缘静脉注射麻醉后, 备皮、消毒, 取下腹部正中切口至深筋膜, 向两侧的腹股沟区分离, 暴露双侧腹股沟脂肪垫, 并完整取出。置于直径10 cm培养皿中, 无菌条件下清除外包膜、明显的结缔组织和肉眼可见的小血管。尽可能去除包膜及结缔组织后用PBS清洗3-5次去除红细胞。眼科剪将组织剪成1.0-2.0 mm<sup>3</sup>组织块, 加入3-5倍体积0.1% I 型胶原酶, 37 °C水浴摇床上消化60 min后, 加入等体积含10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基终止消化, 200目尼龙网格滤网过滤, 离心半径为9 cm, 1 200 r/min离心5 min, 弃上清, 加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基重悬浮细胞, 将细胞收集调整细胞浓度为 $1 \times 10^9$  L<sup>-1</sup>接种至含基础培养基的25 cm<sup>2</sup>培养瓶中。置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度恒温培养箱进行单层细胞培养。

培养24 h后显微镜下轻轻晃动培养瓶, 见大部分细胞贴壁后, 首次换液去除未贴壁细胞。以后每3 d换液1次, 于倒置相差显微镜下观察细胞生长情况, 待细胞生长融合达80%-90%后进行纯化并首次传代。

### 兔脂肪干细胞的鉴定<sup>[18-19]</sup>:

**干细胞表面标记物检测:** 取第3代细胞以 $1 \times 10^9$  L<sup>-1</sup>浓度接种于预置盖玻片的6孔板, 每孔加入1.5 mL含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基, 37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度恒温培养箱培养至细胞达80%-90%融合。用预温的PBS洗3次, 每次5 min; 40 g/L多聚甲醛固定30 min; PBS洗3次, 每次5 min; 0.2% Triton X-100透化2-5 min; PBS洗3次, 每次5 min; 体积分数5%山羊封闭血清并室温孵育30 min, 弃封闭

液; 加入鼠抗兔CD44、CD45抗体反应液, 4 °C孵育过夜; 弃一抗, PBS洗3次, 每次5 min; 加入FITC荧光素标记的二抗37 °C避光孵育30 min; PBS洗3次, 每次5 min; 95%甘油封固, 荧光显微镜下观察染色情况。

**干细胞成骨诱导:** 取第3代细胞以 $1 \times 10^9$  L<sup>-1</sup>浓度接种于预置盖玻片的6孔板, 分为两组, 对照组加入含 $10^{-2}$  mol/L $\beta$ -甘油磷酸钠、 $10^{-7}$  mol/L地塞米松、50 mg/L抗坏血酸、体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F-12骨诱导培养基, 实验组在此基础上再加入1.5  $\mu$ g/L降钙素基因相关肽进行诱导培养。①碱性磷酸酶染色: 诱导2周后分别取出两组6孔板中盖玻片, 按照碱性磷酸酶染色试剂盒说明书进行操作。②茜素红染色: 诱导2周后分别取出两组6孔板中盖玻片, 用40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS漂洗后加入2%茜素红染色液1 mL, 室温孵育20 min, 倒置相差显微镜下观察并拍照。

**复合载体的制备及实验分组:** 取第3代单层培养细胞 $1 \times 10^8$  L<sup>-1</sup>+2 mL 12 g/L海藻酸钠吹打均匀, 将混合液用吸管(50  $\mu$ L/粒), 约2 500细胞/粒, 滴于24孔板中, 每孔含1 mL  $10^2$  mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 每孔滴200  $\mu$ L, 12个复孔, 37 °C、10 min室温下成凝胶, 用PBS洗3次, 分为两组, 对照组加入含 $10^{-2}$  mol/L $\beta$ -甘油磷酸钠、 $10^{-7}$  mol/L地塞米松、50 mg/L抗坏血酸、体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F-12骨诱导培养基, 实验组在此基础上再加入1.5  $\mu$ g/L降钙素基因相关肽进行诱导培养。

**MTT法检测成骨诱导后脂肪干细胞的增殖活性:** 分别于培养1, 3, 5, 7, 14, 21 d后取出两组细胞, 每组6孔, 先用55 mmol/L柠檬酸钠溶解复合载体, 离心收集细胞至96孔板, 每孔加入200  $\mu$ L DMEM/F-12(含体积分数10%胎牛血清和双抗)培养液及20  $\mu$ L 5 g/L MTT溶液, 37 °C孵育4 h。吸弃上清液, 每孔加入150  $\mu$ L DMSO, 振荡10 min。选择490 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度(A值), 以6孔A值的均值为纵坐标, 以时间为横坐标绘制生长曲线。

**RT-PCR检测细胞 I 型胶原和骨钙素mRNA的表达:** 于成骨诱导7, 14 d终止培养, 先用55 mmol/L柠檬酸钠溶解复合载体, 离心收集细胞, 以Trizol试剂裂解细胞, 抽提细胞总RNA, 鉴定RNA纯度, 用RT试剂盒RNA反转录为cDNA。然后以cDNA的第一链作为模板进行PCR扩增。骨钙素上游引物: 5'-CAT GAG AGC CCT CAC A-3', 下游引物: 5'-AGA GCG ACA CCC TAG AC-3'; I 型胶原上游引物: 5'-GGC AAA CAT GGA AAC CG-3', 下游引物: 5'-TCA AGG AAG GGC AAA CG-3'。PCR条件: 94 °C预变性5 min, 随后94 °C变性30 s, 52 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共进行30个循环, 再72 °C延伸10 min。PCR产物经电泳、DNA吸光度扫描检测, 与 $\beta$ -actin内参条带的比值为mRNA表达水平参数。

**细胞碱性磷酸酶活性检测:** 分别于诱导1, 2, 3, 4周



时取出两组细胞, 每组4孔, 先用55 mmol/L柠檬酸钠溶解复合载体, 离心收集细胞至96孔板, 加入0.2 mL 1%的TritonX-100于4℃过夜, 然后按照碱性磷酸酶试剂盒说明书进行操作。碱性磷酸酶浓度以kat/L表示。

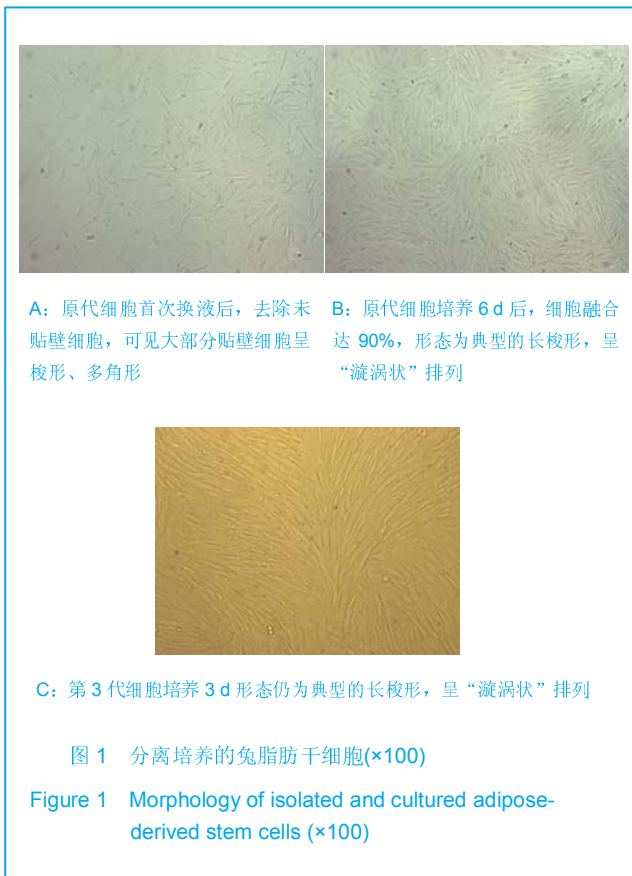
**钙离子浓度检测:** 分别于诱导1, 2, 3, 4周时取出各组细胞, 每组4孔, 先用55 mmol/L柠檬酸钠溶解复合载体, 离心收集细胞至96孔板, 加入0.2 mL 1%的TritonX-100于4℃过夜, 然后按照钙离子检测试剂盒说明书进行操作。钙离子浓度以mmol/L表示。

**主要观察指标:** ①应用免疫荧光染色法检测脂肪干细胞表面CD44、CD45的表达。②脂肪干细胞形态观察及增殖曲线。③应碱性磷酸酶、茜素红染色检测脂肪干细胞成骨诱导分化。④观察诱导后细胞骨钙素及I型胶原酶mRNA的表达。⑤成骨细胞碱性磷酸酶活性及钙离子浓度。

**统计学分析:** 由第一作者应用SPSS 16.0 统计软件包进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用配对样本t检验和单因素方差分析, 两两比较采用SNK检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

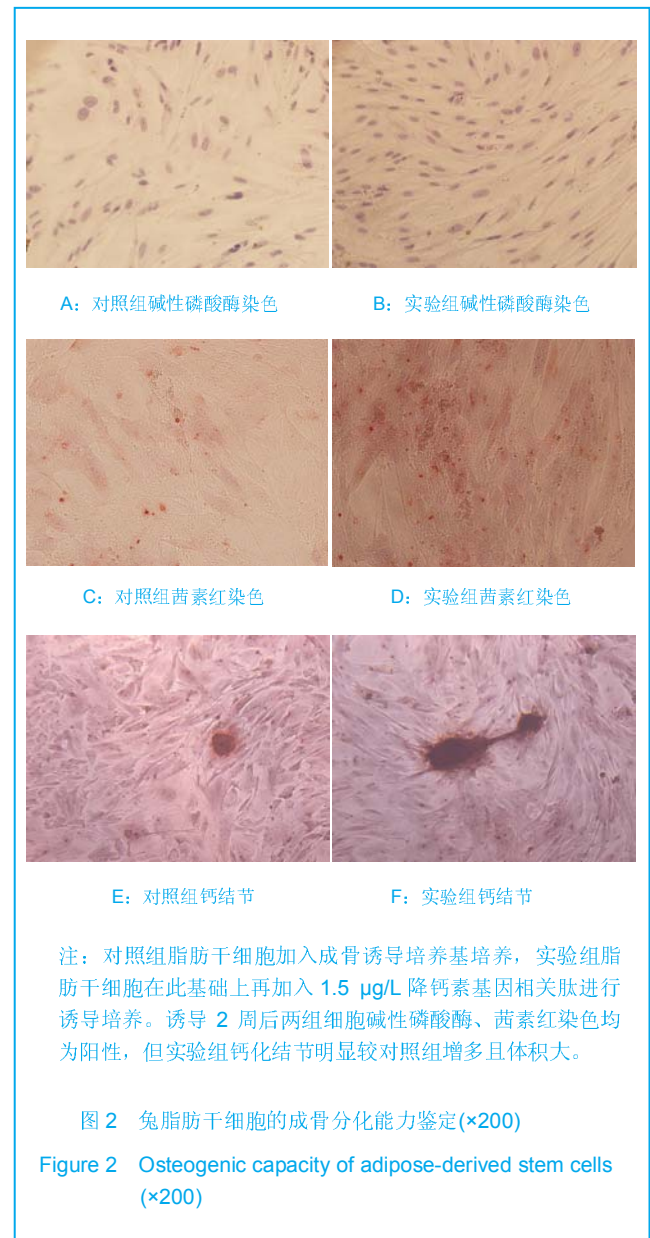
### 2.1 脂肪干细胞形态学观察 见图1。



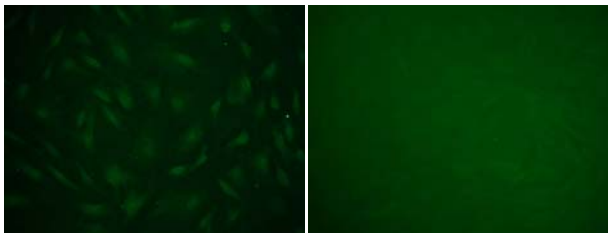
初分离的细胞形态呈小圆形, 培养24-48 h开始贴

壁, 未贴壁细胞为圆形或球形红细胞, 首次换液去除未贴壁细胞可见大部分贴壁细胞呈梭形、多角形, 见图1A。随培养时间的延长, 细胞数量增多, 形态为典型的长梭形, 呈集落式、团簇状生长; 5-7 d时细胞融合达80%-90%, 呈“漩涡状”排列, 见图1B。传代后细胞生长速度加快, 三四天可传代, 并能长期稳定培养, 见图1C。

**2.2 脂肪干细胞的成骨分化鉴定** 诱导2周后两组细胞碱性磷酸酶、茜素红染色均为阳性, 见图2, 但实验组钙化结节明显较对照组增多且体积大。



**2.3 脂肪干细胞的鉴定** 免疫荧光染色法检测脂肪干细胞表面分子结果显示, 细胞表面抗原CD44呈阳性, 见图3A, 表明这种细胞为间充质干细胞; 而表面抗原CD45呈阴性, 见图3B, 证明细胞并非来源于血液循环中的干细胞。

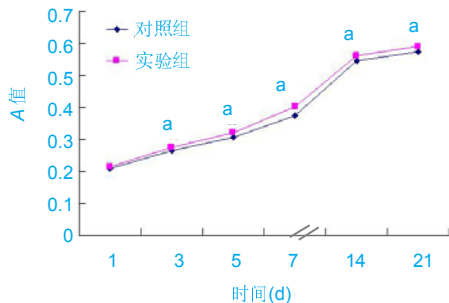


A: CD44 免疫荧光染色阳性, 表明这种细胞为间充质干细胞  
B: CD45 免疫荧光染色阴性, 证明所检测细胞并非来源于血液循环中的干细胞

图3 兔脂肪干细胞的表面标记物鉴定(×200)

Figure 3 Identification of surface markers of adipose-derived stem cells (×200)

**2.4 MTT法检测成骨诱导后三维培养脂肪干细胞的增殖活性** 两组细胞随着培养时间延长A值均升高, 但实验组与对照组相比除第1天外, 在各时间点的A值比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ), 同时实验组在不同诱导时相的变化趋势有统计学意义( $P < 0.05$ ), 表明降钙素基因相关肽对脂肪干细胞的成骨分化有促进作用, 结果见图4。



与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

注: 脂肪干细胞与海藻酸钠复合后, 对照组脂肪干细胞加入成骨诱导培养基培养, 实验组脂肪干细胞在此基础上再加入 1.5 μg/L 降钙素基因相关肽进行诱导培养。实验组 3-21 d 的 A 值高于对照组, 表明降钙素基因相关肽可促进脂肪干细胞向成骨细胞分化。

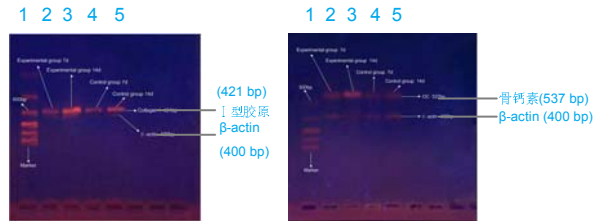
图4 不同方法诱导后兔脂肪干细胞的增殖情况

Figure 4 The cell proliferation of two groups

**2.5 RT-PCR检测成骨诱导后三维培养脂肪干细胞 I 型胶原和骨钙素mRNA的表达** 成骨诱导7, 14 d实验组 I 型胶原 mRNA和骨钙素 mRNA的表达均强于对照组, 见图5。

**2.6 成骨诱导后三维培养脂肪干细胞碱性磷酸酶活性的测定** 各个时间点实验组的碱性磷酸酶活性均高于

对照组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。两组碱性磷酸酶活性的变化趋势也不同, 实验组的变化幅度更大, 两组第2周后碱性磷酸酶活性达峰值, 此后逐步下降, 见表1。



A: I 型胶原 mRNA 表达

B: 骨钙素 mRNA 表达

1: Marker, 2: 实验组 7 d, 3: 实验组 14 d; 4: 对照组 7 d, 5: 对照组 14 d。

注: 脂肪干细胞与海藻酸钠复合后, 对照组脂肪干细胞加入成骨诱导培养基培养, 实验组脂肪干细胞在此基础上再加入 1.5 μg/L 降钙素基因相关肽进行诱导培养。成骨诱导 7, 14 d 实验组 I 型胶原和骨钙素 mRNA 的表达均强于对照组, 表明降钙素基因相关肽可促进脂肪干细胞向成骨细胞分化。

图5 RT-PCR 检测成骨诱导后三维培养脂肪干细胞 I 型胶原和骨钙素 mRNA 的表达

Figure 5 Reserve transcriptase-PCR results of collagen I and osteocalcin mRNA between the two groups

表1 成骨诱导后三维培养脂肪干细胞的碱性磷酸酶活性  
Table 1 Alkaline phosphatase expression in both groups after induction ( $\bar{x} \pm s$ , King unit/L)

诱导时间	实验组	对照组
第1周	8.141±0.780 <sup>a</sup>	3.614±0.239
第2周	16.916±1.333 <sup>a</sup>	5.865±0.840
第3周	10.666±3.879 <sup>a</sup>	4.406±1.373
第4周	8.790±1.170 <sup>a</sup>	3.876±0.557

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 实验组组内不同时间两两比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

注: 脂肪干细胞与海藻酸钠复合后, 对照组脂肪干细胞加入成骨诱导培养基培养, 实验组脂肪干细胞在此基础上再加入 1.5 μg/L 降钙素基因相关肽进行诱导培养。结果表明降钙素基因相关肽可促进脂肪干细胞向成骨细胞分化。

**2.7 成骨诱导后三维培养脂肪干细胞钙离子浓度的测定** 各个时间点实验组钙离子浓度均高于对照组( $P < 0.05$ )。两组钙离子浓度的变化趋势也不同, 1, 2周两组变化趋势相似, 3, 4周实验组变化幅度明显高于对照组, 见表2。

表2 成骨诱导后三维培养脂肪干细胞的钙离子浓度

Table 2 Calcium concentration of two groups after induction ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , mmol/L)

诱导时间	实验组	对照组
第1周	1.188 3±0.136 5 <sup>a</sup>	0.543 1±0.147 2
第2周	1.881 4±0.087 0 <sup>a</sup>	1.136 7±0.060 2
第3周	3.287 8±0.235 4 <sup>a</sup>	1.574 0±0.091 9
第4周	5.544 9±0.508 8 <sup>a</sup>	2.608 6±0.097 6

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 实验组组内不同时间两两比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

注: 脂肪干细胞与海藻酸钠复合后, 对照组脂肪干细胞加入成骨诱导培养基培养, 实验组脂肪干细胞在此基础上再加入 1.5  $\mu\text{g/L}$  降钙素基因相关肽进行诱导培养。结果表明降钙素基因相关肽可促进脂肪干细胞向成骨细胞分化。

### 3 讨论 Discussion

各种因素如感染、创伤、肿瘤等所造成的骨缺损修复治疗一直是骨科界的难题之一。随着组织工程技术的兴起和迅猛发展为骨缺损修复重建带来了新的治疗途径。组织工程骨、转基因工程骨等修复骨缺损研究也取得了一定进展<sup>[20-23]</sup>。脂肪干细胞是近年来发现的一种成体干细胞, 因具有来源丰富、取材方便、对机体损伤小、增殖快、多向分化潜能及安全性高等优点, 故迅速成为组织工程学、再生医学等领域的研究热点<sup>[24]</sup>。组织工程技术主要包括种子细胞、生物活性因子和载体材料。脂肪干细胞作为新型的种子细胞目前已成为骨、软骨组织工程研究的焦点。而作为载体支架的藻酸钙凝胶具有三位立体结构、良好的生物相容性、可降解性、亲水性, 还具有良好的细胞吸附性和可塑性, 有利于营养物质的扩散和细胞之间的联系<sup>[25]</sup>, 已被美国FDA批准广泛应用于药物剂型研制、食品工业、伤口敷料及骨及软骨组织工程。

降钙素基因相关肽作为最丰富的一种神经肽, 是1983年Rosenfeld等<sup>[26]</sup>应用DNA重组和分子生物学技术研究发现的一种生物活性多肽。1984年Morris等<sup>[27]</sup>第1次在人甲状腺髓样癌组织中提取出降钙素基因相关肽, 从而证实了此肽存在于人体中。目前已知人、大鼠、小鼠、兔等脊髓动物体内均含有降钙素基因相关肽<sup>[28]</sup>。降钙素基因相关肽是一类多功能的激素多肽, 分为降钙素基因相关肽1、降钙素基因相关肽2两种亚型, 是目前已知作用最强的血管扩张物质<sup>[28]</sup>, 因其广泛的生物学效应逐渐受到重视。降钙素基因相关肽在骨形成过程中发挥重要作用, 可以促进骨形成、抑制骨吸收<sup>[29-30]</sup>。多年来的研究证明, 与骨组织代谢直接相关的骨髓基质细胞、

成骨细胞、骨髓巨噬细胞、破骨细胞4种细胞表面均存在降钙素基因相关肽受体<sup>[29]</sup>。Jimenez-Andrade等<sup>[31]</sup>采用RT-PCR方法发现成骨细胞表面有降钙素基因相关肽受体的mRNA表达, 进而证实了成骨细胞降钙素基因相关肽受体的存在。研究发现, 降钙素基因相关肽对成骨细胞的 $\text{Ca}^{2+}$ 、cAMP、PCK、IGF等细胞生长因子的调控, 是发挥其对成骨细胞调控的重要作用途径<sup>[32]</sup>。

实验利用降钙素基因相关肽促进藻酸钙凝胶三维培养条件下的脂肪干细胞向成骨细胞分化, 在诱导2周后两组细胞的碱性磷酸酶、钙化结节染色均阳性, 通过对诱导1, 2, 3, 4周的碱性磷酸酶浓度和钙离子浓度变化进行分析发现, 碱性磷酸酶1, 2周递增, 此后逐步下降; 而钙离子1-4周成递增趋势; 且降钙素基因相关肽诱导组均显著高于对照组。与对照组相比, 实验组钙化结节数量多、体积大。实验组诱导7, 14 d成骨细胞标志性蛋白I型胶原和骨钙素mRNA表达的RT-PCR检测结果均强于对照组, 由此证明实现了脂肪干细胞向成骨细胞的诱导分化, 同时也说明降钙素基因相关肽具有促进脂肪干细胞向成骨细胞分化的作用。

总之, 实验虽在体外成功利用重组人降钙素基因相关肽诱导三维培养条件下的兔脂肪干细胞向成骨细胞分化, 但诱导后的成骨细胞在体内是否具有同样的生物学性能, 是否能够最终修复骨缺损, 还有待进一步开展其在修复骨缺损方面的动物实验研究。

**致谢:** 感谢导师杨效宁教授的悉心指导, 感谢徐州医学院附院血液科及中心实验室全体老师的无私帮助, 感谢徐州医学院附院曾令宇博士提供的技术性帮助。

**作者贡献:** 由黄长智、杨效宁进行实验设计, 实验实施为黄长智、刘大诚, 全部作者参与实验结果的评估, 资料收集及成文均为黄长智, 杨效宁审校, 黄长智、杨效宁对文章负责。

**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:** 实验过程中对动物的处置符合相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 降钙素基因相关肽作为最丰富的一种神经肽, 是1983年Rosenfeld等应用DNA重组和分子生物学技术研究发现的一种生物活性多肽。1984年Morris等第1次在人甲状腺髓样癌组织中提取出降钙素基因相关肽, 从而证实了此肽存在于人体中。目前已知人、大鼠、小鼠、兔等脊髓动物体内均含有降钙素基因相关肽。降钙素基因相关肽是一类多功能的激素多肽, 分为降钙素基因相关肽1、降钙素基因相关肽2两种亚型, 是目前已知作用最强的血管扩张物质, 因其广泛的生物学效应逐渐受到重视。降钙素基因相关肽在骨形成过程中发挥重要作用, 可以促进骨形成、抑制骨吸收<sup>[29-30]</sup>。多年来的研究证明, 与骨组织代谢直接相关的骨髓基质细胞、成骨细胞、骨髓巨噬细胞、破骨细胞4种细胞表面均存在降钙素基因相关肽受体。



**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。

#### 4 参考文献 References

- [1] Shinbara H, Okubo M, Kimura K, et al. Participation of calcitonin gene related peptide release -d via axon reflex in the local increase in muscle blood flow following manual acupuncture. *Acupunct Med.* 2013;31(1):81-87.
- [2] 窦常胜,叶彩宏,张士发,等.先天性心脏病合并肺动脉高压患儿血浆内皮素、降钙素基因相关肽的临床研究[J]. *临床儿科杂志*, 2010, 28(7):621-623.
- [3] Porseva VV, Strelkov AA, Shikin VV, et al. Age-related changes in sensory neurons containin-g calcitonin gene-related peptide under conditions of afferentation deficit in rats. *Ontogenez.* 2012;43(6):405-412.
- [4] Hukkanen M, Kontinen YT, Santavirta S, et al. Rapid proliferation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves during healing of rat tibial fracture suggests neural involvement in bone growth and remodelling. *Neuroscience.* 1993;54(4):969-979.
- [5] Aoki M, Tamai K, Saotome K. Substance P-and calcitonin gene-related peptide-immunofluorescent nerves in the repair of experimental bone defects. *Int Orthopaeds.* 2004;18(5):317-324.
- [6] Li J, Kreicbergs A, Bergstrom J, et al. Site-specific CGRP innervation coincides with bone formation during fracture healing and modeling: A study in rat angulated tibia. *J Orthop Res.* 2007;25(9):1204-1212.
- [7] Hayashi Y, Ohtori S, Yamashita M, et al. Direct single injection of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor does not affect calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons innervating punctured discs in rats. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009;34(26):2843-2847.
- [8] Onuoha GN. Circulating sensory peptide levels within 24h of human bone fracture. *Peptides.* 2011;22(7):1107-1110.
- [9] 孙晓新,张柳,刘志奎,等.骨折愈合过程中降钙素基因相关肽表达与脑损伤的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(2):263-267.
- [10] Ekelund A, Ahmed M, Bjurholm A, et al. Neuropeptides in heterotopic bone induced by bone matrix in immunosuppressed rats. *Clin Orthop Relat Res.* 1997; 13(345):229-238.
- [11] 张远金,周赤兵,段军,等.降钙素基因相关肽神经生长因子与失神经支配兔骨折愈合[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(41):7675-7677.
- [12] 李志宏,周振华,谢菊英,等.坐骨神经和股神经离断后肢固定对大鼠降钙素基因相关肽水平及骨密度的影响[J]. *中国康复医学*, 2009, 24(12):1112-1115.
- [13] 姚建华,时述山,李亚非,等.脊髓损伤大鼠胫骨骨痂中降钙素基因相关肽的改变[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 17(4):342-343.
- [14] Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *J Cell Biochem.* 2008;104(3):920-933.
- [15] 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.
- [16] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-4295.
- [17] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.
- [18] Pilchard HL, Richerd WM, Klitzman B, et al. Adult adipose-derived stem cells attachment to biomaterials. *Biomaterials.* 2007;28(6):936-946.
- [19] Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie.* 2005; 87(1):125-128.
- [20] Yu H, VandeVord PJ, Mao L, et al. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials.* 2009;30(4):508-517.
- [21] 卢向东,郭庆华,刘强. 转基因干细胞构建组织工程骨的初步实验研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2010, 33(2):143-147.
- [22] 闫峰,杨卫良,杨威. 生物材料修复股骨缺损及其性能评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(16):2963-2966.
- [23] 张建新,徐展望,常峰. 组织工程化人工骨修复骨缺损的实验研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(16):1258-1261.
- [24] Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med.* 2011; 11(57):160-170.
- [25] 张东,杨克,马忠石,等.藻酸盐三维细胞培养在骨组织工程中应用的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2007, 23(6):62-66.
- [26] Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature.* 1983;304(5922):129-135.
- [27] Morris HR, Panico M, Etienne T, et al. Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature.* 1984;308(5961):746-748.
- [28] Barwell J, Wheatley M, Conner AC, et al. The activation of the CGRP receptor. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(1):180-184.
- [29] Wang L, Shi X, Zhao R, et al. Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone.* 2010;46(5):1369-1379.
- [30] Huebner AK, Keller J, Catala-Lehnen P, et al. The role of calcitonin and alpha-calcitonin gene-related peptide in bone formation. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):210-217.
- [31] Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, et al. A phenotypically restricted set of primary afferent nerve fibers innervate the bone versus skin: therapeutic opportunity for treating skeletal pain. *Bone.* 2010;46(2):306-313.
- [32] Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone.* 2008;43(5):813-818.