

# 锌离子浓度可影响兔骨髓间充质干细胞的增殖与成骨分化

赵桥<sup>1,2</sup>, 杨飞<sup>3</sup>, 张成栋<sup>2</sup>, 陈硕<sup>2</sup>, 孙泉<sup>2</sup>, 张波<sup>3</sup>, 肖东琴<sup>2</sup>, 刘康<sup>2</sup>, 冯刚<sup>1,2</sup>, 段可<sup>1</sup> (西南医科大学附属医院骨与关节科, 四川省骨科植入器械研发与应用技术工程实验室, 四川省泸州市 646000; <sup>2</sup>川北医学院第二临床医学院·南充市中心医院组织工程与干细胞研究所, 四川省南充市 637000; <sup>3</sup>南充市中心医院骨科, 四川省南充市 637000)

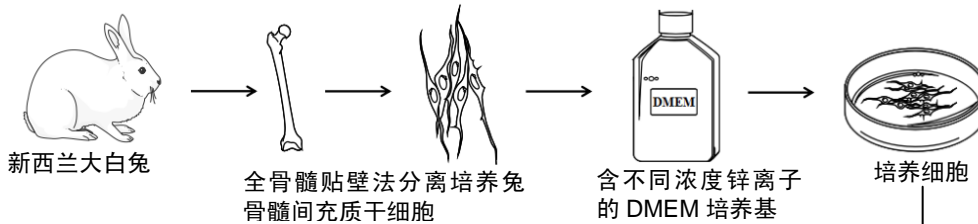
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2042

ORCID: 0000-0003-1353-2148(赵桥)

文章快速阅读:

文章特色—

- (1) 锌离子能刺激间充质干细胞增殖及成骨分化, 国内外许多专家学者在制作组织工程骨支架材料过程中, 通常添加锌离子或者锌涂层来促进骨修复;
- (2) 目前关于锌离子浓度的报道相对较少, 没有形成统一标准;
- (3) 该实验研究试图找出能够促进兔骨髓间充质干细胞增殖以及成骨分化的最适浓度, 有助于更好地发挥锌离子在成骨修复相关动物实验中的重要作用。



评价细胞增殖与成骨分化

结论:

- (1) 锌离子在一定浓度范围内, 能有效促进兔骨髓间充质干细胞的增殖与成骨分化;
- (2) 当浓度为  $10^{-7}$  mol/L 时, 其促增殖、成骨诱导及促矿化能力最强。

文题释义:

**骨髓间充质干细胞:** 间充质干细胞是一种多能干细胞, 最早于骨髓中发现, 后来陆续在外周血、脂肪等组织中被分离出来。相比于其他来源的干细胞, 骨髓间充质干细胞不仅具有自我更新及多向分化潜能, 还能分泌某些有助于血管生成的细胞因子; 在骨修复方面, 其能在促成骨的同时促进局部毛细血管的再生, 有较好的应用前景。

**成骨分化:** 人体内干细胞在生长增殖过程中, 受各种生物因素如细胞调控因子、激素水平以及细胞微环境中微量元素的影响, 可向不同组织分化。影响成骨分化的因素包括降钙素、锌离子、铜离子、钙离子、骨形态发生蛋白 2、生长分化因子 5 等, 因此量化每一个影响因素对于骨组织工程具有重要意义。

摘要

**背景:** 锌离子是人体所必需的金属微量元素, 在抑制破骨细胞活性和促进细胞成骨分化方面起着重要作用。然而, 不同浓度锌离子对兔骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响却鲜有研究。

**目的:** 评价不同浓度锌离子对兔骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化的影响, 探索最适宜的锌离子浓度。

**方法:** 从乳兔长骨骨髓内提取骨髓间充质干细胞培养并传代, 分为 6 组, 即  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mol/L 锌离子组以及空白对照组, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性并绘制生长曲线, 碱性磷酸酶试剂盒评价细胞的成骨分化能力, 活/死细胞染色表征细胞的生长活性, 茜素红染色观察细胞的矿化能力, 荧光定量 PCR 检测成骨相关基因的表达。

**结果与结论:** ①除  $10^{-4}$  mol/L 锌离子组之外, 随着时间延长, 各组细胞数量呈增长趋势, 且  $10^{-7}$  mol/L 锌离子组在培养 5 d 后细胞数量最多, 而  $10^{-4}$  mol/L 锌离子组细胞数量最少; ②细胞培养 14 d 后, 当锌离子浓度为  $10^{-7}$  mol/L 时, 碱性磷酸酶活性最高,  $10^{-4}$  mol/L 时碱性磷酸酶表达量最低; ③活/死细胞染色显示  $10^{-7}$  mol/L 锌离子组活细胞数量最多,  $10^{-4}$  mol/L 锌离子组则几乎全为死细胞; ④细胞培养 14 d 后, 当锌离子浓度为  $10^{-7}$  mol/L 时, 可观察到明显的钙结节形成, 且成骨相关基因表达水平最高; ⑤结果表明, 锌离子在一定浓度范围内, 能有效促进兔骨髓间充质干细胞的增殖与成骨分化, 且浓度为  $10^{-7}$  mol/L 时, 其促增殖、成骨诱导及促矿化能力最强。因此, 在培养基中添加适宜浓度锌离子, 有利于兔骨髓间充质干细胞的成骨分化。

关键词:

骨髓间充质干细胞; 锌离子; 细胞增殖; 成骨分化; 矿化能力

中图分类号: R459.9; R394.2; Q2-33

基金资助:

国家自然科学基金(81171472), 项目负责人: 冯刚; 四川省科技厅应用基础项目(2016JY0123), 项目负责人: 肖东琴; 四川省科技厅应用基础项目(2018JY0100), 项目负责人: 冯刚; 四川省卫计委科研项目(18PJ476), 项目负责人: 四川省教育厅科研项目(17ZA0178), 项目负责人: 肖东琴; 南充市市校合作科研专项资金(NSMC20170310, NSMC20170453, 18SXHZ0374, 18SXHZ0377, 18SXHZ0124), 项目负责人: 冯刚, 肖东琴, 张波, 刘康, 孙泉

赵桥, 男, 1993 年生, 西南医科大学在读硕士, 主要从事脊柱外科方面的研究。

通讯作者: 冯刚, 博士, 教授, 西南医科大学附属医院骨与关节科, 四川省骨科植入器械研发与应用技术工程实验室, 四川省泸州市 646000; 川北医学院第二临床医学院·南充市中心医院组织工程与干细胞研究所, 四川省南充市 637000

并列通讯作者: 段可, 博士, 副教授, 西南医科大学附属医院骨与关节科, 四川省骨科植入器械研发与应用技术工程实验室, 四川省泸州市 646000

文献标识码:A

投稿日期: 2019-05-08

送审日期: 2019-05-22

采用日期: 2019-08-07

在线日期: 2019-11-25

Zhao Qiao, Master candidate, Department of Orthopedics and Arthrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Laboratory of Research and Development and Application of Orthopedic Devices, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Second Clinical College of North Sichuan Medical College · Tissue Engineering and Stem Cell Research Institute of Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Feng Gang, MD, Professor, Department of Orthopedics and Arthrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Laboratory of Research and Development and Application of Orthopedic Devices, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Second Clinical College of North Sichuan Medical College · Tissue Engineering and Stem Cell Research Institute of Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

## Zinc ion concentration affects proliferation and osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

Zhao Qiao<sup>1,2</sup>, Yang Fei<sup>3</sup>, Zhang Chengdong<sup>2</sup>, Chen Shuo<sup>2</sup>, Sun Xiao<sup>2</sup>, Zhang Bo<sup>3</sup>, Xiao Dongqin<sup>2</sup>, Liu Kang<sup>2</sup>, Feng Gang<sup>1,2</sup>, Duan Ke<sup>1</sup> (1)Department of Orthopedics and Arthrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Laboratory of Research and Development and Application of Orthopedic Devices, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; (2)Second Clinical College of North Sichuan Medical College • Tissue Engineering and Stem Cell Research Institute of Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China; (3)Department of Orthopedics, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China)

Corresponding author:  
Duan Ke, MD, Associate professor, Department of Orthopedics and Arthrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Laboratory of Research and Development and Application of Orthopedic Devices, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Zinc ion is a necessary metal trace element in human body, which plays an important role in inhibiting osteoclast activity and promoting osteogenic differentiation. However, the effect of zinc ion at different concentrations on osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells has been rarely studied.

**OBJECTIVE:** To evaluate the effects of zinc ion at different concentrations on the proliferation and osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells for exploring the appropriate zinc ion concentration.

**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from the long bone marrow of rabbits and passaged. The cells were divided into six groups, including  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  and  $10^{-8}$  mol/L zinc ion groups, and blank control group. The cell proliferation activity was measured by Cell Counting Kit-8 and the growth curve was drawn. Alkaline Phosphatase Assay kit was used to evaluate the osteogenic differentiation ability of the cells, and the growth activity of the cells was shown by Live-Dead Cell Staining Kit. The mineralization ability of the cells was observed by alizarin red S staining. The expression of osteogenic genes was detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The number of cells in each group showed an increasing trend with the prolongation of time except for the  $10^{-4}$  mol/L zinc ion group. After 5 days of culture, the number of cells was highest in the  $10^{-7}$  mol/L zinc ion group, but lowest in the  $10^{-4}$  mol/L zinc ion group. Alkaline phosphatase activity was highest when zinc ion concentration was  $10^{-7}$  mol/L, but lowest at the  $10^{-4}$  mol/L zinc ion after cell culture for 14 days. The method of Live-Dead Cell Staining revealed the number of viable cells was highest in the  $10^{-7}$  mol/L zinc ion group. All cells were almost dead in the  $10^{-4}$  mol/L zinc ion group. Calcium nodule formation was visible, and the expression level of osteogenic genes was highest in the  $10^{-7}$  mol/L zinc ion group after 14 days of cell culture. These findings suggest that zinc ion can effectively promote the proliferation and osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells in a certain concentration range. The promoting effects of zinc ion on proliferation, osteogenic induction and mineralization are strongest. Therefore, the addition of a suitable concentration of zinc ions in the medium is beneficial for the osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells; zinc ion; cell proliferation; osteogenic differentiation; mineralization

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81171472 (to FG); the Applied Foundation Project of Science and Technology Department of Sichuan Province, No. 2016JY0123 (to XDQ), 2018JY0100 (to FG); the Scientific Research Project of Sichuan Health and Family Planning Commission, No. 18PJ476; the Scientific Research Project of Sichuan Provincial Department of Education, No. 17ZA0178 (to XDQ); the Nanchong City-School Cooperative Research Special Funds, No. NSMC20170310, NSMC20170453, 18SXHZ0374, 18SXHZ0377, 18SXHZ0124 (to FG, XDQ, ZB, LK, and SX).

## 0 引言 Introduction

骨骼中存在多种金属微量元素,它们在促进成骨相关细胞生长以及功能分化方面起着重要作用。研究表明,金属微量元素缺乏可能导致严重的骨关节功能障碍及相关疾病<sup>[1]</sup>。锌离子作为人体必需的微量元素,参与DNA和RNA的复制及蛋白合成,其缺失会降低骨密度,是维持骨代谢必不可少的微量元素<sup>[2]</sup>。近年来金属微量元素在骨组织修复中的作用越来越得到重视<sup>[3-4]</sup>。研究表明,含锌生物材料能促进细胞增殖和成骨分化<sup>[5-6]</sup>。然而,人体组织中锌离子浓度对干细胞生长与成骨分化的影响却鲜有研究。该实验旨在培养基中添加锌离子,探究锌离子浓度对兔骨髓间充质干细胞增殖与分化的影响,以确定最佳锌离子浓度,为支架材料中锌离子添加含量提供实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年1至5月在川北医学院第二临床医学院·南充市中心医院组织工程与干细胞研究所完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 1月龄新西兰大白兔6只,雌雄不限,体质量约0.5 kg,由川北医学院实验动物中心提供。

1.3.2 实验试剂与仪器 超净工作台(Airtech公司,美国);细胞培养箱(Thermo公司,美国);荧光倒置显微镜(Nikon公司,日本);0.25%胰蛋白酶(Sigma公司,美国);DMEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国);CCK-8试剂盒(凯基生物科技发展有限公司,中国);碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国);活细胞/死细胞染色试剂盒(上海贝博生物,中国);茜素红S染色液(北京索莱宝科技有限公司,中国);PCR引物(成都豪乙生物科技有限公司,中国);mRNA提取试剂盒(Sigma公司,美国);生物安全柜(Thermo公司,美国);酶标仪

(Thermo公司, 美国)等。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 兔骨髓间充质干细胞的提取和原代培养** 空气栓塞法处死乳兔, 浸入体积分数为75%乙醇中5 min, 然后完整取出肋骨、股骨及胫骨, 剃净肌肉, PBS(含5%双抗)冲洗3遍后移入超净工作台; 用20 mL注射器针头分别从骨两端沿长轴刺入, PBS(含1%双抗)反复冲洗骨髓腔, 依次处理所有长骨; 将骨髓腔冲洗液收集到50 mL离心管中, 2 000 r/min离心20 min, 去上清, 用20 mL DMEM(含1%双抗+体积分数为10%胎牛血清)轻柔吹打沉淀并将其移入细胞培养皿培养; 培养1 d后采用半量换液法, 即吸取出10 mL DMEM培养基, 再加入10 mL DMEM培养基, 其后每2 d换1次液, 共5 d, 可见兔原代骨髓间充质干细胞长满培养皿。

**1.4.2 骨髓间充质干细胞传代培养** 待兔原代骨髓间充质干细胞长满培养皿后, 吸弃旧培养基, 用PBS将培养皿中多余的组织及血细胞清洗干净, 加入1 mL胰蛋白酶, 轻晃培养皿, 消化20-30 s, 荧光倒置显微镜可见梭形细胞回缩变圆, 并有部分细胞漂浮, 立即加入5 mL DMEM培养基(含1%双抗+体积分数为10%胎牛血清)终止消化, 轻柔吹打使细胞重悬, 移入15 mL离心管, 2 000 r/min离心5 min, 计数。

#### 骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	新西兰大白兔骨髓组织
原代培养方法:	采用全骨髓贴壁培养法分离提取骨髓间充质干细胞
基础培养基:	DMEM basic(1x)培养基
添加材料:	体积分数为10%无菌胎牛血清、体积分数为1%的双抗(Penicillin-Streptomycin Solution)、不同浓度的锌离子( $0, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ mol/L)
原代培养时间:	原代培养采用半量换液法, 即培养1 d后吸取一半DMEM培养液, 再加入等量的DMEM培养液, 其后每2 d换1次液, 共5 d
细胞传代:	细胞融合至90%, 用胰酶(0.25% Trypsin-EDTA(1x))消化传至下1代, 按1:3传代, 约3 d传1代, 共传1代
细胞鉴定:	采用流式细胞仪鉴定
伦理学批准:	该实验经川北医学院伦理委员会批准

**1.4.3 CCK-8法检测细胞增殖** 将第2代兔骨髓间充质干细胞以 $1 \times 10^5$ /孔的密度加入96孔板, 将其分为空白组、 $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$  mol/L锌离子组共6组, 每组9个平行孔, 向每组孔板中加入相应浓度的锌离子, 培养24 h, 每组吸弃3个平行孔中的DMEM培养基(含1%双抗+体积分数为10%胎牛血清), 再加入含10% CCK-8试剂的DMEM培养基(含1%双抗+体积分数为10%胎牛血清)100  $\mu$ L, 培养2 h, 酶标仪测其在450 nm处波长的吸光度值。重复上述操作, 并依次检测培养第3天及第5天的吸光度值。

**1.4.4 碱性磷酸酶试剂盒检测成骨分化能力** 将第2代兔骨髓间充质干细胞加入48孔板中按上述方法分组, 每组设

置6个平行孔, 置于细胞培养箱中培养, 隔天换液, 培养7 d, 每组选择3个平行孔, 吸弃DMEM培养基(含1%双抗+体积分数为10%胎牛血清), PBS洗涤3次, 每孔加入100  $\mu$ L细胞裂解液常温下裂解40 min, 移液器吸出待测。每组取30  $\mu$ L样本依次加入50  $\mu$ L缓冲液及基质液, 充分混匀, 于37  $^{\circ}$ C水浴15 min, 加入150  $\mu$ L显色剂; 同时制作空白孔及标准孔, 酶标仪测其在520 nm处波长的吸光度值; 培养14 d后重复上述操作, 记录数据, 代入公式计算碱性磷酸酶活性, 并除以每孔蛋白浓度, 即可得到相应数值。

碱性磷酸酶活性(金氏单位/100 mL)=(测定孔吸光度值-空白孔吸光度值)/(标准孔吸光度值-空白孔吸光度值) $\times$ 酚标准品浓度 $\times 100$  mL。

**1.4.5 活/死细胞染色检测细胞活力** 将第2代兔骨髓间充质干细胞加入6孔板中按上述方法分组, 置于细胞培养箱中培养, 隔天换液, 培养7 d, 吸弃培养基, 胰酶消化重悬, 细胞计数, 控制细胞浓度在 $1 \times 10^6$  L $^{-1}$ 左右, PBS清洗3次, 用200  $\mu$ L染色工作液将细胞重悬, 4  $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 荧光显微镜下使用(490 $\pm$ 10) nm激发滤片观察, 可见黄绿色荧光的活细胞及红色荧光的死细胞。

**1.4.6 茜素红染色检测钙结节** 将第2代兔骨髓间充质干细胞加入6孔板中按上述方法分组, 置于细胞培养箱中培养, 隔天换液, 换液时每孔加入2 mL含有相应锌离子的DMEM培养基, 当细胞铺满孔板80%左右, 加入1 mL含锌离子培养基及1 mL成骨诱导液。培养14 d, 吸弃培养基, PBS洗涤3次, 加入体积分数为10%甲醛缓冲液固定10 min, 吸弃固定液后再次用PBS洗涤细胞, 加入茜素红染色液染色5 min, 吸弃染色液, PBS洗涤, 镜下观察可见钙沉积阳性的细胞为桔红色。

**1.4.7 荧光定量PCR检测相关成骨基因表达** 将第2代兔骨髓间充质干细胞以 $1 \times 10^5$ /孔加入12孔板并按上述方法分组, 每组设置6个平行孔, 隔天换液; 换液时每孔加入2 mL含有相应锌离子的DMEM培养基, 当细胞铺满孔板80%左右, 加入1 mL含锌离子培养基及1 mL成骨诱导液。培养14 d, 用Trizol法提取RNA, 反转录成cDNA, 行qPCR扩增分析, 以GAPDH为内参; 设计引物序列: ALP上游引物序列: 5'-GTT CAG TGC GGT TCC AGA CAA-3', 下游引物序列: 5'-CTG CAA GGA CAT CGC TTA TCA-3'; OCN上游引物序列: 5'-TGA TGC AAG CCT GAC CTC C-3', 下游引物序列: 5'-CCA TAG CCC ACG GCC AAA A-3'; OPN上游引物序列: 5'-TGG CTT TCA ATG GAC TTA CTC G-3', 下游引物序列: 5'-CAG CTT TAC CAC AAA CAC CCG-3'; OXS上游引物序列: 5'-GCA AGG TGT ACG GCA AGG-3', 下游引物序列: 5'-CAG AGC AGG CAG GTG AAT T-3', 结果以相对GAPDH的表达量表示。

**1.5 主要观察指标** ①兔骨髓间充质干细胞生长情况; ②锌离子浓度对兔骨髓间充质干细胞增殖的影响; ③锌离子浓度对兔骨髓间充质干细胞成骨及矿化的影响。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 16.0软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 兔骨髓间充质干细胞的形态** 培养的兔骨髓间充质干细胞多呈长梭形, 也可见三角形、多角形等形态, 折光性强, 漩涡状平行排布, 原代中可见较多血细胞及其他组织, 清洗传代后, 细胞形态未见明显差别, 见图1。

**2.2 各组细胞增殖能力** 除 $10^{-4}$  mol/L锌离子组外, 各组骨髓间充质干细胞随培养时间的延长而逐渐增多。第1天,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mol/L锌离子组及空白组之间差异无显著性意义( $P > 0.1$ ),  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  mol/L锌离子组细胞数量低于其他各组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 第3天,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mol/L锌离子组与空白组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 第5天, 各组间两两比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ), 其中 $10^{-7}$  mol/L锌离子组细胞数量最多,  $10^{-6}$  mol/L锌离子组次之, 其后依次为 $10^{-8}$  mol/L锌离子组、空白组、 $10^{-5}$  mol/L锌离子组、 $10^{-4}$  mol/L锌离子组; 由此, 当锌离子浓度为 $10^{-7}$  mol/L时, 培养基内骨髓间充质干细胞的数量最多, 而当其浓度为 $10^{-4}$  mol/L时, 培养基内骨髓间充质干细胞的数量最少, 见图2。

**2.3 各组细胞成骨分化能力** 除 $10^{-4}$  mol/L锌离子组外, 其余各组第14天的碱性磷酸酶活性均高于第7天。培养7 d, 各组间差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ),  $10^{-7}$  mol/L锌离子组碱性磷酸酶活性最高,  $10^{-6}$  mol/L锌离子组次之, 其后依次为 $10^{-8}$  mol/L锌离子组、 $10^{-5}$  mol/L锌离子组、空白组、 $10^{-4}$  mol/L锌离子组。培养14 d,  $10^{-7}$  mol/L锌离子组碱性磷酸酶活性仍为最高, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。由此, 当锌离子浓度为 $10^{-7}$  mol/L时, 骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶活性最高, 见图3。

**2.4 活/死细胞染色检测细胞活力**  $10^{-7}$  mol/L锌离子组大片绿色视野, 表明活细胞最多,  $10^{-6}$  mol/L锌离子组次之, 其后依次为 $10^{-8}$  mol/L锌离子组、空白组,  $10^{-5}$  mol/L锌离子组活细胞较少, 并且可见较多死细胞, 而 $10^{-4}$  mol/L锌离子组活细胞几乎不可见。由此, 当锌离子浓度为 $10^{-7}$  mol/L时细胞活力最强, 当锌离子浓度为 $10^{-4}$  mol/L时有明显细胞毒性, 见图4。

**2.5 茜素红染色检测钙结节**  $10^{-7}$  mol/L锌离子组可见桔色细胞最多, 表明该组钙结节沉积最多,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$  mol/L锌离子组钙结节沉积依次减少,  $10^{-4}$  mol/L锌离子组几乎为死细胞, 染色效果不佳, 空白组可见少量桔红色钙沉积。由此, 当锌离子浓度为 $10^{-7}$  mol/L时, 钙结节沉积最多, 见图5。

**2.6 荧光定量PCR检测相关成骨基因表达**  $10^{-7}$  mol/L锌离子组细胞的ALP、OCN、OPN、OSX基因表达水平均为最高, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 其他各组基因表达水平由高至低大致为 $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$  mol/L锌离子组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),  $10^{-4}$  mol/L锌离子组几乎无法检测到相关基因表达; 由此, 当锌离子浓度为 $10^{-7}$  mol/L时, 骨髓间充质干细胞的相关成骨基因表达水平最高, 见图6。

## 3 讨论 Discussion

锌是生物生长发育必不可少的金属元素, 85%都存在

于肌肉和骨骼当中, 它们在DNA合成、RNA转录、酶活性调节、核酸超分子化等过程中发挥着极其重要的生物作用<sup>[7-9]</sup>。在骨代谢中, 锌能抑制破骨细胞活性, 这可能与抑制破骨细胞分化过程中RANKL及RANK信号通路以及抑制NFATc1的激活有关<sup>[10]</sup>; 同时, 锌可以通过促进细胞增殖、分化、成骨基因表达等途径增强细胞成骨能力<sup>[11]</sup>。因此, 锌离子成为许多生物骨支架的添加因子之一<sup>[12-14]</sup>。

然而, 细胞对环境中锌离子的反应具有剂量依赖性<sup>[15]</sup>, 锌离子浓度过高会引起细胞凋亡、局部炎症等<sup>[16-17]</sup>, 浓度过低则可通过线粒体介导途径诱导成骨细胞凋亡, 同样不利于细胞增殖<sup>[18-19]</sup>; 同时, 低浓度的锌离子还能抑制瘦素的产生从而引起肥胖及骨髓脂肪化<sup>[20-21]</sup>。因此, 探究出既能促进骨髓间充质干细胞成骨分化, 又能抑制骨吸收和骨髓脂肪化的适宜锌离子浓度尤为重要。

目前, 研究锌离子对骨髓间充质干细胞成骨分化影响的相关报道较少, 主要探索的是其浓度与人骨髓间充质干细胞增殖与成脂分化之间的作用。朱晓宇等<sup>[22]</sup>研究发现锌离子浓度在 $10^{-6}$  mol/L到 $10^{-5}$  mol/L之间, 最有利于人骨髓间充质干细胞的增殖与成脂分化; 毕晓云等<sup>[23]</sup>则发现其浓度为 $10^{-5}$  mol/L能够明显提高人骨髓间充质干细胞的贴壁与增殖能力, 并认为可在人无血清培养基中添加锌离子作为必要成分。组织工程骨的研究多以动物实验为基础, 植入的材料在体外进行生物学性能检测后, 再植入兔或鼠体内验证其可行性, 相比于鼠类, 体型较大的新西兰大白兔近年来越来越受到实验人员的青睐, 故研究锌离子对兔骨髓间充质干细胞成骨分化的影响有其重要性和必要性, 能为相关后续动物体内实验奠定基础。

CCK-8试剂盒可通过检测细胞线粒体活性来反映细胞增殖和生存能力, 在该研究中, 细胞数量随着时间的增长而增多, 且在锌离子浓度为 $10^{-6}$  mol/L到 $10^{-8}$  mol/L时, 细胞数量高于空白组, 当锌离子浓度为 $10^{-7}$  mol/L时, 细胞长势最好; 活/死细胞染色利用不同荧光染色剂分别进入活/死细胞内部发出不同颜色的荧光来区分细胞生存状态, 锌离子浓度为 $10^{-6}$  mol/L到 $10^{-8}$  mol/L时, 其活细胞率及细胞密度均高于空白组,  $10^{-7}$  mol/L组最高; 两种检测方法皆能证明锌离子在细胞增殖方面发挥的重要作用, 并进一步提示其浓度为 $10^{-7}$  mol/L时, 促细胞增殖能力最强。

碱性磷酸酶是细胞成骨分化及含锌离子金属酶的标志<sup>[24]</sup>, OCN在正常骨组织中含量较高, 是骨形成过程中的负性调节因子<sup>[25]</sup>, OPN可由多种骨相关细胞合成和分泌, 在骨基质的矿化和吸收过程中发挥着重要作用<sup>[26]</sup>, OSX可在成骨细胞中表达, 是一种具有锌指结构的转录因子<sup>[27]</sup>, 茜素红可沉积矿物并将其染色。因此, 可利用它们进行成骨相关基因水平的检测, 研究锌离子对兔骨髓间充质干细胞的成骨分化及促矿化作用。结果显示, 除 $10^{-4}$  mol/L锌离子组外, 各组碱性磷酸酶表达呈时间依赖性, 当锌离子浓度在 $10^{-6}$  mol/L到 $10^{-8}$  mol/L之间时, 细胞碱性磷酸酶表达量增加, 钙沉积增多, 成骨基因的表达水平也相应增高, 表明在培养基中适当添加锌离子能发挥促细胞成骨分化及促矿化作用; 当锌离子浓度为 $10^{-7}$  mol/L时, 碱性磷酸酶表

达活性、钙沉积及成骨基因的表达水平均高于其他各组，提示在该浓度下，其骨诱导能力及促矿化能力最强。

当锌离子浓度为 $10^{-4}$  mol/L时，细胞增殖与碱性磷酸酶活性的纵向数据皆没有显著性意义( $P > 0.05$ )，考虑为细胞在该浓度下直接死亡，未发生贴壁及生长，细胞活力检测同时印证了该观点，这也与BRAUER等<sup>[28]</sup>的研究结果相同，锌离子浓度高于 $10^{-4}$  mol/L时，具有明显的细胞毒性，导致细胞无法继续生长。锌离子浓度为 $10^{-5}$  mol/L时，其活细胞数量低于空白组，碱性磷酸酶活性却较空白组高，可能是由于该浓度下兔骨髓间充质干细胞被锌离子诱导分化，但细胞基数较低，因此二者比值相对性增大，从而表现出低促细胞增殖而高成骨诱导。

综上，该研究发现锌离子在一定浓度范围内，能有效促进兔骨髓间充质干细胞的增殖与分化，且浓度为 $10^{-7}$  mol/L时，其促增殖、成骨诱导及矿化能力最强。因此，在培养基中添加适宜浓度锌离子，有利于兔骨髓间充质干细胞的成骨分化。在后续的实验，还将继续探讨支架材料中锌离子浓度释放对兔骨髓间充质干细胞成骨分化的影响，从而为构建促骨分化的支架材料提供实验参考。

**作者贡献:** 实验设计为冯刚、段可；实验实施为赵桥、杨飞、陈硕、孙泉；实验评估为刘康、张波、肖东琴、张成栋；资料收集为赵桥。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金(81171472)”“四川省科技厅应用基础项目(2016JY0123, 2018JY0100)”“四川省卫计委科研项目(18PJ476)”“四川省教育厅科研项目(17ZA0178)”“南充市市校合作科研专项资金(NSMC20170310, NSMC20170453, 18SXHZ0374, 18SXHZ0377, 18SXHZ0124)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经川北医学院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

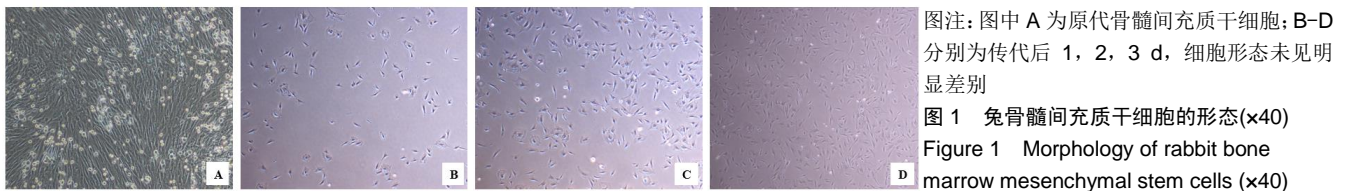
**生物统计学声明:** 文章统计学方法经西南医科大学附属医院统计学专家核通过。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] AASETH J, BOIVIN G, ANDERSEN O. Osteoporosis and trace elements--an overview. *J Trace Elem Med Biol*. 2012;26(2-3):149-152.
- [2] PEREZ RA, SEO SJ, WON JE, et al. Therapeutically relevant aspects in bone repair and regeneration. *Mater Today*. 2015;18(10):573-589.
- [3] JEFFERIES SR. Bioactive and biomimetic restorative materials: a comprehensive review. Part I. *J Esthet Restor Dent*. 2014;26(1):14-26.
- [4] JEFFERIES S. Bioactive and biomimetic restorative materials: a comprehensive review. Part II. *J Esthet Restor Dent*. 2014;26(1):27-39.
- [5] CHEN J, ZHANG X, CAI H, et al. Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc oxide/carboxylated graphene oxide nanocomposites: Preparation and in vitro evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;147:397-407.
- [6] AN S, GONG Q, HUANG Y. Promotive Effect of Zinc Ions on the Vitality, Migration, and Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. *Biol Trace Elem Res*. 2017;175(1):112-121.
- [7] TANG Y, CHAPPELL HF, DOVE MT, et al. Zinc incorporation into hydroxylapatite. *Biomaterials*. 2009;30(15):2864-2872.
- [8] STORRIE H, STUPP SI. Cellular response to zinc-containing organoapatite: an in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. *Biomaterials*. 2005;26(27):5492-5499.
- [9] SANNA A, FIRINU D, ZAVATTARI P, et al. Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2018;10(1):E68.
- [10] PARK KH, PARK B, YOON DS, et al. Zinc inhibits osteoclast differentiation by suppression of  $Ca^{2+}$ -Calcineurin-NFATc1 signaling pathway. *Cell Commun Signal*. 2013;11:74.
- [11] PARK KH, CHOI Y, YOON DS, et al. Zinc Promotes Osteoblast Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells Via Activation of the cAMP-PKA-CREB Signaling Pathway. *Stem Cells Dev*. 2018;27(16):1125-1135.
- [12] XIAO DQ, YANG F, ZHAO Q, et al. Fabrication of a Cu/Zn co-incorporated calcium phosphate scaffold-derived GDF-5 sustained release system with enhanced angiogenesis and osteogenesis properties. *RSC Advances*. 2018;8(2):29526.
- [13] PINA S, CANADAS RF, JIMÉNEZ G, et al. Biofunctional Ionic-Doped Calcium Phosphates: Silk Fibroin Composites for Bone Tissue Engineering Scaffolding. *Cells Tissues Organs*. 2017;204(3-4):150-163.
- [14] RAZ M, MOZTARZADEH F, KORDESTANI SS. Sol-gel Based Fabrication and Properties of Mg-Zn Doped Bioactive Glass/Gelatin Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Silicon*. 2018;10(2):667-674.
- [15] LIU YJ, SU WT, CHEN PH. Magnesium and zinc borate enhance osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro. *J Biomater Appl*. 2018;32(6):765-774.
- [16] LIANG D, YANG M, GUO B, et al. Zinc inhibits H(2)O(2)-induced MC3T3-E1 cells apoptosis via MAPK and PI3K/AKT pathways. *Biol Trace Elem Res*. 2012;148(3):420-429.
- [17] HU JY, ZHANG DL, LIU XL, et al. Pathological concentration of zinc dramatically accelerates abnormal aggregation of full-length human Tau and thereby significantly increases Tau toxicity in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(2):414-427.
- [18] SUH KS, LEE YS, SEO SH, et al. Effect of zinc oxide nanoparticles on the function of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biol Trace Elem Res*. 2013;155(2):287-294.
- [19] SHEARER ER, BOWEN PK, HE W, et al. In Vitro Cytotoxicity, Adhesion, and Proliferation of Human Vascular Cells Exposed to Zinc. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(4):634-642.
- [20] LIU MJ, BAO S, BOLIN ER, et al. Zinc deficiency augments leptin production and exacerbates macrophage infiltration into adipose tissue in mice fed a high-fat diet. *J Nutr*. 2013;143(7):1036-1045.
- [21] BALTACI AK, MOGULKOC R. Leptin, NPY, Melatonin and Zinc Levels in Experimental Hypothyroidism and Hyperthyroidism: The Relation to Zinc. *Biochem Genet*. 2017;55(3):223-233.
- [22] 朱晓宇,石军.锌对人骨髓间充质干细胞体外增殖和成脂分化的影响[J].广西医学,2018,40(8):928-933.
- [23] 毕晓云,黄舒,郭杰,等.锌离子促进人骨髓间充质干细胞增殖并增强其纤黏连蛋白表达的实验研究[J].组织工程与重建外科,2013,9(2):81-84.
- [24] JAFARY F, HANACHI P, GORJIPOUR K. Osteoblast Differentiation on Collagen Scaffold with Immobilized Alkaline Phosphatase. *Int J Organ Transplant Med*. 2017;8(4):195-202.
- [25] UDEBOR SE, ADISA AO, ORLOWSKA A, et al. Osteocalcin, Azan and Toluidine blue staining in fibrous dysplasia and ossifying fibroma of the jaws. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018;54(4):693-697.
- [26] DE FUSCO C, MESSINA A, MONDA V, et al. Osteopontin: Relation between Adipose Tissue and Bone Homeostasis. *Stem Cells Int*. 2017;2017:4045238.
- [27] CHOI YH, HAN Y, JIN SW, et al. Pseudoshikonin I enhances osteoblast differentiation by stimulating Runx2 and Osterix. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):748-757.
- [28] BRAUER DS, GENTLEMAN E, FARRAR DF, et al. Benefits and drawbacks of zinc in glass ionomer bone cements. *Biomed Mater*. 2011;6(4):045007.



图注: 图中 A 为原代骨髓间充质干细胞; B-D 分别为传代后 1, 2, 3 d, 细胞形态未见明显差别  
图 1 兔骨髓间充质干细胞的形态(x40)  
Figure 1 Morphology of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (x40)

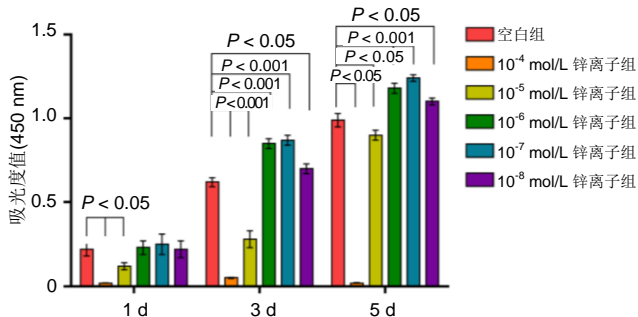


图 2 各组骨髓间充质干细胞的增殖条形图  
Figure 2 Proliferation bar chart of bone marrow mesenchymal stem cells in each group

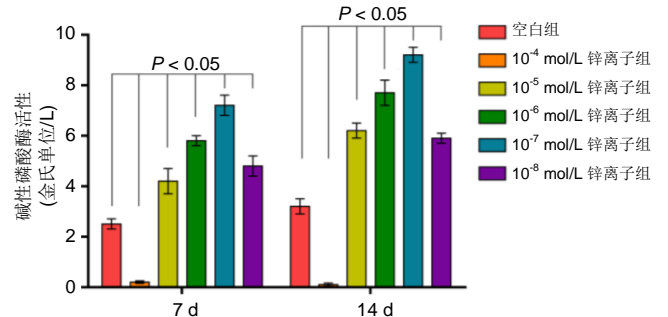
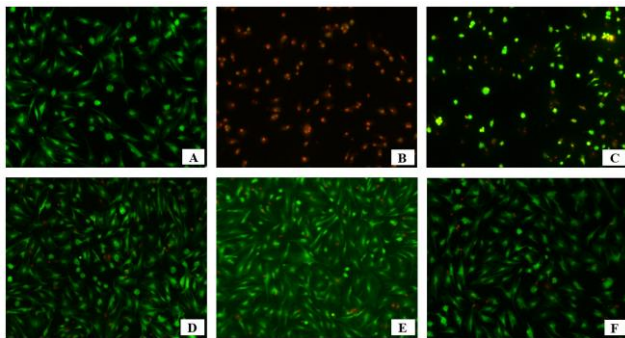
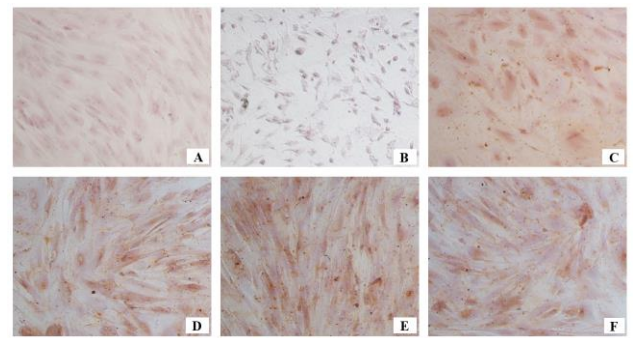


图 3 各组骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶活性条形图  
Figure 3 Alkaline phosphatase activity bar chart of bone marrow mesenchymal stem cells in each group



图注: 图中 A-F 分别为空白组、 $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mol/L 锌离子组, 其中  $10^{-7}$  mol/L 锌离子组活细胞最多,  $10^{-4}$  mol/L 锌离子组活细胞几乎不可见

图 4 各组骨髓间充质干细胞的活/死细胞染色荧光图(x40)  
Figure 4 Live-Dead Cell Staining Fluorescence map of bone marrow mesenchymal stem cells in each group (x40)



图注: 图中 A-F 分别为空白组、 $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mol/L 锌离子组, 其中  $10^{-7}$  mol/L 锌离子组钙结节沉积最多,  $10^{-4}$  mol/L 锌离子组几乎为死细胞, 染色效果不佳

图 5 各组骨髓间充质干细胞茜素红染色(x100)  
Figure 5 Alizarin red S staining of bone marrow mesenchymal stem cells in each group (x100)

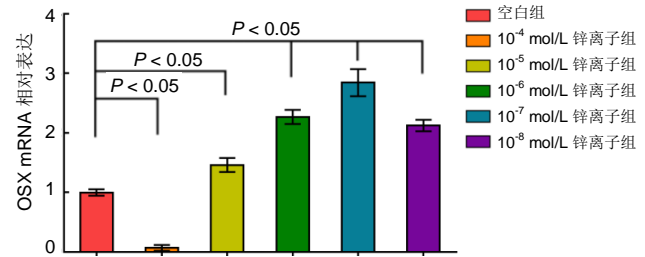
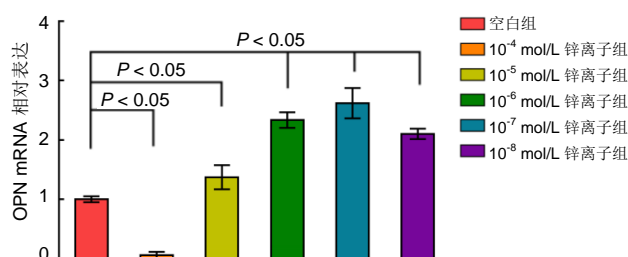
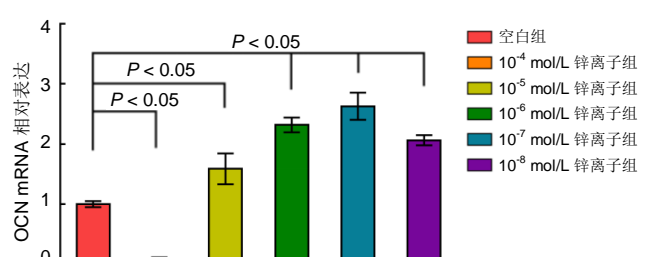
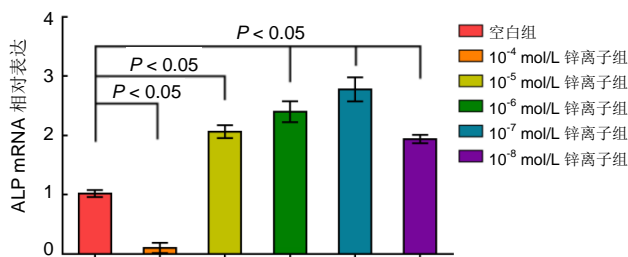


图 6 荧光定量 PCR 检测各组细胞成骨相关基因表达水平  
Figure 6 Quantitative fluorescence polymerase chain reaction detection of osteogenic gene expression levels in each group