

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0656-04

促矿化液对大鼠成骨细胞增殖分化的影响

杨晓喻¹, 刘长虹¹, 梁星², 孙俊²

(1.广东省口腔医院·南方医科大学附属口腔医院 种植中心, 广东 广州 510280;

2.四川大学华西口腔医院 修复科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 比较大鼠成骨细胞在矿化条件与非矿化条件下增殖和分化的过程, 评价促矿化液对其生理功能的影响, 明确促矿化液加入细胞培养环境的适宜时间。方法 取SD大鼠头盖骨做成骨细胞原代培养, 将增殖稳定后的第4代细胞分别在矿化条件和非矿化条件下培养, 检测其形态、碱性磷酸酶活性、细胞周期等。结果 大鼠成骨细胞增殖基本稳定后促矿化液组与无促矿化液组细胞分裂增殖指数相似, 但前者碱性磷酸酶活性明显较高且持久。结论 成骨细胞增殖基本稳定后加入促矿化液对细胞增殖无影响, 但可明显促进细胞矿化功能, 是加入促矿化液诱导细胞矿化功能的较好时机。

[关键词] 成骨细胞; 促矿化液; 增殖; 分化

[中图分类号] R318 **[文献标识码]** A

Effects of mineralization liquid on rat's osteoblast proliferation and differentiation YANG Xiao-yu¹, LIU Chang-hong¹, LIANG Xing², SUN Jun². (1. Center of Oral Implantology, Guangdong Provincial Stomatological Hospital, South University of Medical Sciences, Guangzhou 510280, China; 2. Dept. of Prosthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To compare the rat osteoblast proliferation and differentiation in the mineralization condition and non-mineralization condition, and to prove the feasible time of adding the mineralization liquid to the cell surroundings. **Methods** SD rat's calvarial osteoblast was primary cultured and passaged to the 4th generation. After proliferation stabilized, the 4th generation rat's osteoblast was cultured in the mineralization condition and non-mineralization condition. The cellular modality was observed by inverted microscopy analyzing system. Proliferation was described by MTT chromatometry and growth curve. Expression of alkaline phosphatase(ALP) was proved by alkaline phosphatase staining, mineralized nodus alizarin red staining and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The cell apoptosis and proliferation were examined by flow cytometry. **Results** The proliferation of osteoblast went to the flat stage about in the 8th day. After in the mineralization condition 3 weeks, a number of mineralized nodus formed. After the osteoblast proliferation almost stabilized, the mineralization group and the non-mineralization group had the similar proliferation index(PI), but in the mineralization group, the expression of alkaline phosphatase of the osteoblast was more and kept longer than the last group. **Conclusion** After the osteoblast proliferation almost stabilized, adding the mineralization liquid would not influence the proliferation, but accelerate the osteoblast alkaline phosphatase expression and mineralized nodus amount. It proved that the feasible time to add the mineralization liquid was after the cell proliferation almost stabilized.

[Key words] osteoblasts; mineralization liquid; proliferation; differentiation

成骨细胞作为骨组织工程的种子细胞是口腔组织工程学研究的重点之一。特别是原代培养的动物

成骨细胞由于不涉及医德问题, 又具有与体内正常成骨细胞相似的生长特性在口腔基础研究中已广泛应用。Schecroun等^[1]和杨志明等^[2]均通过实验证明成骨细胞在体外具有较好的增殖和钙化作用。本研究通过实验进一步探明原代培养的大鼠成骨细胞充分增殖分化的培养条件, 为口腔生物工程细胞培养提供有效的数据。

[收稿日期] 2008-03-05; [修回日期] 2008-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30500569); 广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2006110和A2007098)

[作者简介] 杨晓喻(1974-), 女, 四川人, 副主任医师, 博士

[通讯作者] 梁星, Tel: 028-85501450

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

SD大鼠(四川大学华西实验动物中心)。F12培养基、MTT试剂(Gibco公司,美国),促矿化液(β -甘油磷酸钠为 1×10^{-2} mol/L,维生素C为50 mg/mL,地塞米松为 1×10^{-7} mol/L)(Sigma公司,美国), 柏定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(柏定生物工程有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 成骨细胞原代培养、传代及形态学观察 将1周龄乳鼠浸泡于无水乙醇,无菌条件下分离头部组织,取头盖骨。清洗,剪碎,均匀置于培养瓶底,组织块原代培养。待细胞增殖贴壁融合成单层后去除组织块,0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,分瓶传代。倒置相差显微镜观察细胞生长情况。

1.2.2 成骨细胞矿化性能检测 将第4代成骨细胞接种爬片,第3天加入促矿化液。7 d后采用偶氮偶联法作细胞碱性磷酸酶染色:用PBS漂洗5 min,冷丙酮固定10 min,在孵育液37℃孵育50 min, PBS洗5 min(3次),2%甲基绿复染细胞核10 min, PBS洗5 min(3次),晾干,透明,封片,光镜观察。

将第4代成骨细胞接种爬片,用含促矿化液的F12培养基培养4周,在倒置相差显微镜下见白色结节,茜素红染色,光镜观察。

1.2.3 成骨细胞增殖特性检测 将每毫升 1×10^4 个,2 mL,第4代成骨细胞接种于24孔板,共接种40孔。每天取4孔,收集细胞计数,取其均值。记录10 d,绘制生长曲线。另外,将每毫升 1×10^4 个,200 μ L,第4代成骨细胞接种于96孔板孔内,共接种40孔。每天取4孔作MTT检测,取其均值。记录10 d,描记MTT增殖曲线。SPSS 10.0统计软件对2曲线进行直线回归与相关分析。

1.2.4 成骨细胞ALP活性检测 实验分非矿化组(F12培养基)与矿化组(F12培养基加促矿化液),每组按照细胞培养天数从1到10分为10小组,每小组有培养皿3个。将每毫升 1×10^5 个、4 mL第4代大鼠成骨细胞接种于培养皿内(直径90 mm),矿化组在培养的第3天加入促矿化液。每天收集相应的培养细胞,ELISA检测其ALP活性,考马斯亮兰法测定总蛋白含量。将ALP活性除以细胞总蛋白即为单位蛋白含量的相对ALP活性。相同培养皿的均值为该小组当天ALP单位活性。

1.2.5 成骨细胞细胞周期检测 将每毫升 1×10^5 个,8 mL成骨细胞接种于培养皿(直径90 mm),共6个培养皿,分2组。第3天在其中1组加入促矿化液。接

种后第7天分别收集2组细胞。流式细胞仪检测细胞周期、DNA含量,计算细胞分裂增殖指数。

2 结果

2.1 原代培养的大鼠成骨细胞形态

大鼠成骨细胞原代培养第5天可见,细胞从组织块中游离出,呈成纤维细胞型贴壁生长,外观呈梭形、三角形、多角形和鳞片形,胞核呈满圆形,位于中央(图1)。原代培养2周可见,细胞融合成片,细胞分界模糊,胞体增大,形态为短梭形和不规则多角形,中央可见正在进行分裂的成骨细胞(图2)。原代培养3周见细胞重叠生长(图3)。原代培养4周见细胞向中央聚集形成钙化结节(图4)。



图1 大鼠成骨细胞原代培养第5天的形态 倒置相差显微镜 $\times 200$

Fig 1 The rat osteoblast was primary cultured for 5 days inverted phase contrast microscope $\times 200$



图2 大鼠成骨细胞原代培养2周后的形态 倒置相差显微镜 $\times 100$

Fig 2 The rat osteoblast was primary cultured for 2 weeks inverted phase contrast microscope $\times 100$

2.2 成骨细胞的矿化性能

成骨细胞碱性磷酸酶胞浆呈深红色阳性染色。矿化结节茜素红染色呈深红色阳性染色,结节周围细胞向中心聚集(图5)。

2.3 成骨细胞的增殖活性

大鼠成骨细胞生长曲线见图6,大鼠成骨细胞

MTT增殖曲线见图7,由曲线可以看出大鼠成骨细胞生长潜伏期约为1~2 d, 2~8 d进入对数增殖期, 8~10 d进入平台期。由直线回归与相关分析可知,大鼠成骨细胞生长曲线与MTT增殖曲线相关系数为 $r=0.913$, $P<0.05$ 。故可以认为该生长曲线与其MTT增殖曲线呈强正相关关系,说明2种曲线对大鼠成骨细胞生长情况的表达一致。



图3 大鼠成骨细胞原代培养3周的形态 倒置相差显微镜 ×100

Fig 3 The rat osteoblast was primary cultured for 3 weeks in inverted phase contrast microscope ×100

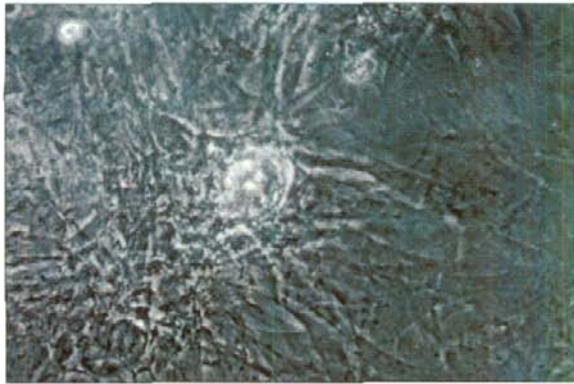
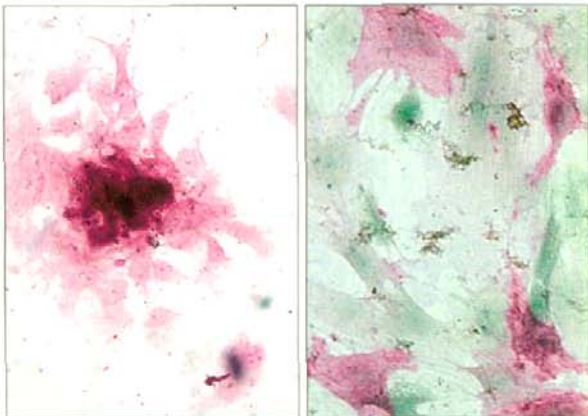


图4 大鼠成骨细胞原代培养4周的形态 倒置相差显微镜 ×100

Fig 4 The rat osteoblast was primary cultured for 4 weeks in inverted phase contrast microscope ×100



左:碱性磷酸酶染色 ×400;右:茜素红染色 ×200

图5 大鼠成骨细胞矿化能力表现

Fig 5 The mineralization of rat osteoblast

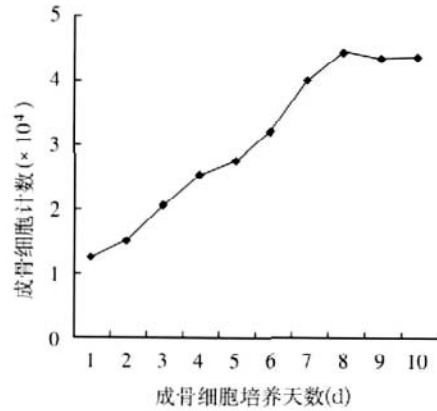


图6 大鼠成骨细胞生长曲线

Fig 6 The rat osteoblast growth curve

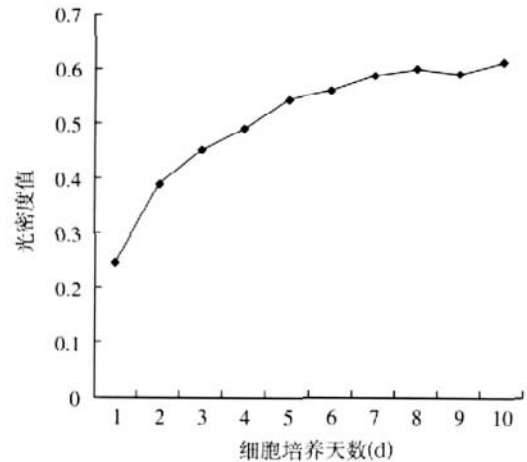


图7 大鼠成骨细胞MTT增殖曲线

Fig 7 The rat osteoblast MTT curve

2.4 成骨细胞的碱性磷酸酶活性

成骨细胞ALP单位活性随时间变化曲线如图8所示,2组在未加入促矿化液前,ALP单位活性表达无明显差异。系列1代表非矿化组培养的成骨细胞。它在第5天出现ALP单位活性的一个高峰,此后ALP单位活性下降并保持在一个较低的相对稳定水平。系列2代表矿化组培养的成骨细胞。在促矿化液加入的第3天ALP单位活性明显升高,形成峰值,此后下降并保持在一个较高的相对稳定水平。

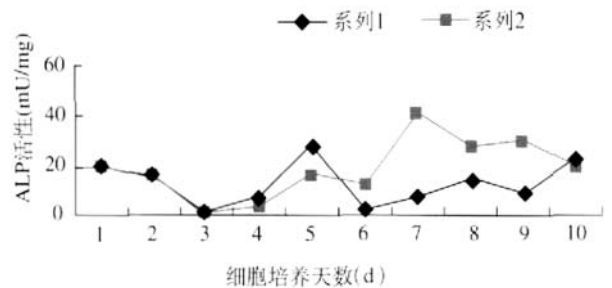


图8 大鼠成骨细胞ALP单位活性随时间变化曲线

Fig 8 The rat osteoblast ALP activity curve

2.5 成骨细胞的流式细胞仪检测

促矿化液对大鼠成骨细胞的细胞周期影响的结

果见表1。由表1可见第7天时2组细胞周期及分裂增殖指数值相似,说明进入一定时期后加入促矿化液对成骨细胞的分裂和增殖影响不大。

表1 促矿化液对大鼠成骨细胞周期的影响

Tab 1 The influence of mineralization liquid on the rat's osteoblast cell cycle

分组	DNA合成前期 (G ₁ %)	DNA合成期 (G ₂ %)	有丝分裂期 (S%)	细胞分裂增殖指数
非矿化组	79.7	10.8	9.5	20.3
矿化组	76.5	10.8	12.7	23.5

3 讨论

3.1 成骨细胞性能

综合镜下观察、细胞生长曲线计数和MTT记录收集的大鼠成骨细胞增殖情况分析:该细胞的生长潜伏期约为1~2 d,2~8 d进入对数增殖期,增殖旺盛,8~10 d进入平台期。提示应用该细胞进行实验通常应该在细胞接种后的第2~8天。平台期时,细胞逐渐衰老或者增殖受到明显抑制,不宜进行干扰因素的研究。在增殖的过程中,成骨细胞特有的矿化功能也逐渐表现。加促矿化液培养1周后,成骨细胞碱性磷酸酶染色阳性。同时观察到大鼠成骨细胞复层生长,为钙盐沉积提供三维空间。加促矿化液培养4周后,细胞向多个中心集结,形成矿化结节,茜素红染色阳性,说明加入促矿化液后该细胞从各方面都表现出良好的矿化功能。

3.2 体外培养细胞的ALP单位活性随时间变化规律

学者们对于ALP在钙化中的关键作用已达成共识,ALP的表达高峰发生在基质成熟期^[3-7]。第1阶段是接种细胞从附着到基质逐渐成熟表达功能为主的阶段,因此单位蛋白的ALP单位活性逐渐升高形成峰值。第2阶段的单位蛋白的ALP单位活性下降是由于细胞不断增殖,新分裂的细胞基质尚未成熟,ALP表达低下,同时第1阶段中活跃的ALP通过水解有机磷酸,使局部PO₄³⁻浓度快速升高,环境中过高的PO₄³⁻对ALP逆向抑制,导致单位蛋白内ALP单位活性下降。第3阶段为平台期,当细胞增殖至一个相对稳定的数量,局部PO₄³⁻浓度相对稳定时,成骨细胞生存环境趋于一种饱和性稳定,单位蛋白ALP单位活性就在高于细胞接种时活性的基础上达到一个相对的平衡。

3.3 促矿化液对成骨细胞功能和增殖的影响

虽然成骨细胞有矿化、成骨功能,但在体外条件下往往需要给予一定的诱导条件才能促使其更好的行使这一功能。但是,增殖态和功能态是细胞的2种对立态,若细胞某一态表现明显,则另一态表

现低下^[4-7]。由于ALP单位活性的测试要求有足够的细胞量,同时成骨细胞行使功能形成矿化结节也需要一定量的细胞,所以本研究在细胞接种后用普通的F12培养基培养到第3天(对数增殖期),待细胞增殖到一定的量时才加入促矿化液。结果显示促矿化液组与无促矿化液组细胞分裂增殖指数相似,但前者ALP单位活性明显较高且持久。ALP单位活性与钙化紧密相关,一般来说单位蛋白量内ALP单位活性越大,细胞钙化成骨能力越强,因此此时加入促矿化液对成骨细胞功能有明显的促进作用。

本实验促矿化液是β-甘油磷酸钠1×10⁻² mol/L,维生素C 50 mg/mL,地塞米松1×10⁻⁷ mol/L。地塞米松作为皮质激素虽抑制细胞增殖,但能提高ALP单位活性,促使细胞分泌更多的基质,直接促进矿化成骨,另外,它还能调节成骨样细胞合成胰岛素样的生长因子,间接促进成骨。维生素C能加强成骨细胞合成胶原纤维的能力,促进胶原纤维羟基化,为钙盐沉积提供更多的位点。β-甘油磷酸钠中的PO₄³⁻作为ALP底物,对ALP有诱导和激活的作用,并参与钙盐的形成和沉积。

[参考文献]

- [1] Schecroun N, Delloye C. Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells: Comparative study and characterization[J]. Bone, 2003, 32(3): 252-260.
- [2] 杨志明, 余希杰, 解慧琪, 等. 不同来源成骨细胞生物学特性的比较研究[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(1): 10-13.
YANG Zhi-ming, YU Xi-jie, XIE Hui-qi, et al. Comparative study on biological characteristics of osteoblasts with different sources[J]. Chin J Traumatol, 2001, 17(1): 10-13.
- [3] 唐昭, 陈治清. 大鼠成骨细胞体外培养的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1997, 15(1): 70-72.
TANG Zhao, CHEN Zhi-qing. A research on rat osteoblasts culture *in vitro*[J]. West China J Stomatol, 1997, 15(1): 70-72.
- [4] 吴云刚, 张志平. 人骨髓基质干细胞体外诱导为成骨细胞的实验研究[J]. 江西医学院学报, 2007, 19(1): 74-75.
WU Yun-gang, ZHANG Zhi-ping. Experiments on hBMSCs induced to differentiate into osteoblasts *in vitro*[J]. J Jiangxi University Traditional Chinese Medicine, 2007, 19(1): 74-75.
- [5] 胡静, 郑洪新. 改良成骨细胞体外培养和鉴定方法[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(1): 77-78.
HU Jing, ZHENG Hong-xin. Improved culture and behavior of osteoblasts *in vitro*[J]. Chin J Gerontol, 2006, 26(1): 77-78.
- [6] Song SJ, Jeon O, Yang HS, et al. Effects of culture conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells [J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(7): 1113-1119.
- [7] Beloti MM, Martins W Jr, Xavier SP, et al. *In vitro* osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone[J]. Clin Oral Implants Res, 2008, 19(1): 48-54.