

β -TCP 作用 T 淋巴细胞后调控 BMSCs 成骨分化的研究

许敏^{1,2}, 吴婷婷^{1,2}, 何家才^{1,2}

摘要 目的 体外探究 β -TCP 对 T 淋巴细胞的免疫调节作用,并研究该免疫调节作用对小鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 成骨分化的影响。方法 将不同浓度 β -TCP 浸提液与 T 淋巴细胞培养,采用 CCK8 法和台盼蓝染色法进行细胞活性检测。流式细胞技术和细胞共聚焦法检测 β -TCP 浸提液与磁珠分选的 CD4⁺ T 细胞培养后 Th17 亚群分化。收取 β -TCP 浸提液与 T 淋巴细胞作用后的上清液,ELISA 法检测上清液中白介素 (IL)-17A 分泌量。将上清液再培养小鼠 BMSCs,qRT-PCR 法检测成骨分化相关基因碱性磷酸酶 (ALP) 和骨钙素 (OCN) 的表达,ALP 染色、茜素红染色法检测 BMSCs 的成骨分化的效果,Western blot 法检测 ALP 和 OCN 的蛋白表达水平。结果 6.25~50 mg/ml 的 β -TCP 浸提液可诱导 CD4⁺ T 淋巴细胞向 Th17 亚群分化,且当浸提液的浓度为 25 mg/ml 时,其诱导 Th17 亚群分化效果最好,同时该组上清液中 IL-17A 诱导小鼠 BMSCs 的成骨分化效果最明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 25 mg/ml 的 β -TCP 浸提液能够诱导 T 淋巴细胞向 Th17 亚群方向分化, Th17 细胞分泌 IL-17A 介导 BMSCs 的成骨分化,为进一步的体内实验奠定基础。

关键词 β -TCP;骨髓间充质干细胞;Th17;IL-17A;成骨分化
中图分类号 R 392;R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1168-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.003

免疫系统和骨骼系统紧密相关,免疫细胞直接或间接参与调控骨组织再生过程。T 淋巴细胞能够影响破骨细胞的增殖和分化。其中 Th17 细胞及其分泌的白介素 (interleukin, IL)-17A 在成骨与破骨平衡过程中的作用得到越来越多的研究。同时,研究^[1]报道免疫细胞可介导生物材料的骨免疫反应过程。 β -TCP 生物材料已被广泛研究应用于临床骨

再生。研究^[2]表明巨噬细胞参与 β -TCP 介导的成骨分化。目前还没有研究报道 T 淋巴细胞是否也参与了 β -TCP 介导的骨组织再生过程。因此,该研究以 β -TCP 材料对 T 淋巴细胞的免疫调节作用作为切入点,探讨其对 Th17 细胞亚群分化的影响,同时检测 Th17 细胞分泌的 IL-17A 对小鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨分化的调控作用,旨在为后期进一步的体内实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 4 周龄,体质量 (20 \pm 5) g,购自安徽医科大学实验动物中心。整个实验过程对动物的处置均符合医学伦理学标准。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM 培养基、RPMI 培养基、胰酶细胞消化液 (美国 Hyclone 公司);胎牛血清 (FBS) (美国 Corning 公司);Concanavalin A、PMA、茜素红染色剂 (美国 Sigma 公司);红细胞裂解液、钙离子霉素 (北京 Solarbio 公司);autoMACS (德国 Miltenyi Biotec 公司);二氧化碳孵箱 (美国 Thermo 公司);CCK8 试剂 (日本同仁公司);台盼蓝染色剂、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒 (上海碧云天公司);酶标仪 (美国 Bio-tek 公司);流式细胞检测仪 (美国 Beckman Coulter 公司);BFA (美国 Selleck 公司);倒置激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司);PCR 引物 (上海生工生物工程股份有限公司);实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Stratagene 公司);PVDF 膜 (美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 C57BL/6 小鼠 BMSCs 的分离与培养 健康 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,按照 Maniopoulos et al^[3]的方法,在无菌条件下去除表皮及肌肉等软组织,分离小鼠后肢股骨,剪去两端骨骺,采用注射器从骨髓腔两端将骨髓冲出,DMEM 完全培养基 (含 10% FBS) 制成细胞混悬液,接种至培养皿中,在

2018-04-09 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81371114、81771117);安徽省自然科学基金 (编号:1408085MKL29);安徽省科技攻关项目 (编号:1604a0802082)

作者单位:¹ 安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

作者简介:许敏,女,硕士研究生;

何家才,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:hejiacai@163.com

37 °C、5 % CO₂ 条件下进行培养,原代细胞生长 7 d 后待细胞融合达 80% ~ 90% 时使用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 C57BL/6 小鼠脾淋巴细胞的分离与培养

小鼠脱颈处死,取右侧卧位,剪开表皮和皮下软组织,取出脾脏置于 70 μm 滤网上,加入适量红细胞裂解液研磨 3 ~ 5 min 后加入 4 倍体积 PBS 缓冲液终止,1 500 r/min 离心 5 min 弃上清液,RPMI 完全培养基(含 10% FBS)重悬,conA (5 μg/ml) 刺激活化 48 ~ 72 h。

1.2.3 梯度浓度 β-TCP 浸提液的制备 以 Ca(NO₃)₂·4H₂O 和 (NH₄)₂HPO₄ (均为上海国药集团) 为原始材料,采用化学沉淀法合成 β-TCP 粉末,方法如文献^[4]所述。β-TCP 粉剂加入不含血清 RPMI 培养基,充分混匀,37 °C 摇床孵育 24 h。1 500 r/min 离心 10 min,取上清液,0.22 mm 滤网过滤除菌。根据文献^[2]报道,将上清液依次对半稀释获得梯度浓度 β-TCP 浸提液(200、100、50、25、12.5、6.25 mg/ml)。4 °C 保存。

1.2.4 细胞活性检测 刺激活化 48 ~ 72 h 的 T 淋巴细胞 5 × 10³/孔接种于 96 孔板,每孔分别加入 100 μl β-TCP 浸提液(0 ~ 200 mg/ml)。每组做 3 个重复孔,培养 12、24、48、72 h,每孔分别加入 10 μl CCK8 buffer 37 °C 孵育 3 h,使用酶标仪在 450 nm 处读取吸光度值,所有定量检测重复测定 3 次。

1.2.5 Th17 亚群分化检测 autoMACS 直接法免疫磁珠分选出 CD4⁺ T 细胞,接种于预先包被 anti-CD3 (10 μg/ml) 4 °C 过夜的培养皿,同时加入 anti-CD28 (5 μg/ml) 和 IL-2 (20 μg/ml) 活化 48 ~ 72 h。

CD4⁺ T 细胞 2 × 10⁶ 每孔,每孔分别加入 2 ml β-TCP 浸提液(0 ~ 50 mg/ml),培养 4 d。加入 PMA、BFA 和钙离子霉素封闭 4 ~ 6 h 后,收集细胞进行流式细胞术或激光共聚焦检测,所有检测重复 3 次。

1.2.6 上清液中 IL-17A 分泌量检测 按 1.2.5 方法培养 4 d,收集孔内上清液,ELISA 法检测上清液中 IL-17A 的分泌量,每组做 3 个重复孔,酶标仪 450 nm 波长处检测,所有定量检测重复 3 次。

1.2.7 BMSCs 成骨分化检测 小鼠 BMSCs 3 × 10⁵ 每孔铺板,分别加入 β-TCP 浸提液对 T 淋巴细胞作用后的上清液和同浓度的单独的 β-TCP 浸提液,每 3 d 换液一次,在第 14 天和第 21 天采用 qRT-PCR 实验检测 ALP 和骨钙素(osteocalcin, OCN) 的基因表达水平,PCR 引物委托上海生工生物工程公司设

计,引物序列见表 1。第 21 天分别进行 ALP 染色和茜素红钙结节染色,同时 Western blot 法检测 ALP 和 OCN 的蛋白表达,所有测定重复 3 次。

1.2.8 IL-17A 中和实验 在 β-TCP 浸提液对 T 淋巴细胞作用后的上清液中加入 anti-IL-17A (10 μg/ml) 中和抗体,与小鼠 BMSCs 培养时加入,培养方法同 1.2.7。此后每 3 d 换液一次,在第 21 天通过 qRT-PCR 技术检测 β-actin、ALP 和 OCN 的基因表达水平,第 21 天分别进行 ALP 染色和茜素红钙结节染色,同时 Western blot 实验检测 ALP 和 OCN 蛋白表达水平。所有测定重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 One-Way ANOVA 和 Two-Way ANOVA 法进行方差分析,多个实验组与对照组的比较采用 Dunnett 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 PCR 引物列表

基因名称	引物序列 (5'-3')
β-actin	F: TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC
	R: TAA AACGCA GCTCAG TAACAGTCCG
ALP	F: CACGGCGTCCATGAGCAGAAC
	R: CAGGCACAGTGGTCAAGGTTGG
OCN	F: CTGACCTCACAGATGCCAAGCC
	R: CATACTGGTCTGATAGCTCGTCACAAG

2 结果

2.1 T 淋巴细胞活性检测 CCK8 检测结果显示,培养 72 h 内 0 ~ 50 mg/ml 的 β-TCP 材料浸提液促进 T 淋巴细胞缓慢生长,100 和 200 mg/ml 组明显抑制 T 淋巴细胞增殖;培养 72 h,台盼蓝染色结果显示,与 0 mg/ml 组比较,浓度为 100 和 200 mg/ml 的 β-TCP 材料浸提液组活细胞/死细胞比率接近零,细胞几乎全部死亡,具有明显细胞毒性,差异有统计学意义($F = 105.042, P < 0.05$),见图 1。

2.2 β-TCP 浸提液诱导 Th17 细胞分化 流式细胞术结果表明 0 ~ 50 mg/ml 的 β-TCP 浸提液能够诱导 Th17 亚群分化,具有浓度依赖性,浓度为 25 mg/ml 时诱导产生 Th17 细胞比例最高,差异有统计学意义($F = 134.76, P < 0.05$)。细胞激光共聚焦结果表明,25 mg/ml 组 IL-17A 荧光信号最强。ELISA 结果表明,β-TCP 浸提液浓度为 25 mg/ml 时上清液 IL-17A 分泌量最高,差异有统计学意义($F = 50.98, P < 0.05$),见图 2。

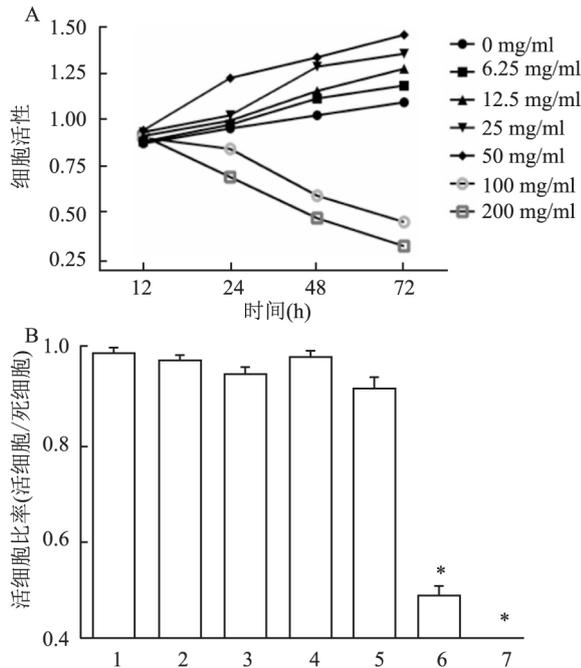


图1 β-TCP 浸提液对 T 淋巴细胞的细胞活性影响

A: CCK8 实验; B: 台盼蓝染色后活细胞/死细胞比率; 1: 0 mg/ml; 2: 6.25 mg/ml; 3: 12.5 mg/ml; 4: 25 mg/ml; 5: 50 mg/ml; 6: 100 mg/ml; 7: 200 mg/ml; 与 0 mg/ml 组比较: * P < 0.05

2.3 β-TCP 浸提液对 T 淋巴细胞作用后上清液调控 BMSCs 成骨分化 qRT-PCR 实验结果表明, 与阴性对照组比较, 培养第 14 天, 0 ~ 25 mg/ml 的上清液组 ALP 和 OCN 基因表达水平逐渐上升, 其中 25 mg/ml 组 ALP 和 OCN 基因的相对表达水平分别为 (3.07 ± 0.22) (F = 72.43, P < 0.05)、(3.52 ± 0.69) (F = 196.76, P < 0.05); 在第 21 天, 25 mg/ml 组的 ALP (F = 15.39, P < 0.05) 和 OCN (F = 495.34, P < 0.05) 基因表达上调明显, 差异有统计学意义。与同浓度的单独 β-TCP 浸提液组比较, 25 mg/ml 诱导 T 细胞后上清液组分别在 14 d 上调表达 ALP (F = 573.91, P < 0.05) 和 OCN (F = 1608.25, P < 0.05)、第 21 天上调表达 ALP (F = 436.73, P < 0.05) 和 OCN (F = 792.96, P < 0.05), 差异具有统计学意义, 表明 β-TCP 浸提液对 T 淋巴细胞作用后调控 BMSCs 成骨分化效果更佳。与此同时, 21 d 的 ALP 染色和茜素红钙结节染色结果也表明相同结果。第 21 天的 Western blot 实验结果显示, 阴性对照组 ALP 和 OCN 蛋白表达水平较低, 在 β-TCP 浸提液作用于 T 淋巴细胞后, 12.5 ~ 50 mg/ml 上清液组 ALP 和 OCN 蛋白表达水平随浓度增加而上升, 均在 25 mg/ml 时达到最大。见图 3。

2.4 IL-17A 中和实验降低 BMSCs 骨向分化 qRT-PCR 结果显示第 21 天, 与未中和上清液组比较, 12.5 ~ 50 mg/ml IL-17A 中和组 ALP 和 OCN 的基因表达水平下调, ALP 和 OCN 基因的相对表达量为 (1.803 ± 0.639) (F = 58.988, P < 0.05)、(1.617 ± 0.782) (F = 77.682, P < 0.05), 差异有统计学意义。第 21 天 ALP 染色、茜素红染色结果表明, 25 mg/ml 时, 与未中和上清液组和 β-TCP 浸提液组比较, IL-17A 中和组阳性染色减弱。Western blot 实验也表明, IL-17A 中和组 ALP 和 OCN 蛋白表达水平相对下降。见图 4。

3 讨论

β-TCP 是一种具有良好生物安全性和降解性能的骨替代生物材料, 被广泛用于临床骨缺损的再生修复治疗。2005 年, Zerbo et al^[5] 将 β-TCP 用于临床上颌窦底提升术, 由于植入材料后局部炎症反应和部分材料降解, 临床疗效不理想。与炎症反应和生物材料的降解吸收有关的 T 淋巴细胞在宿主与骨替代生物材料的相互作用中发挥着重要作用。因此, 研究骨替代材料对免疫细胞的调节作用, 有利于开发“智能”骨替代生物材料^[6], 创造促进成骨的免疫环境。本实验研究结果表明, 6.25 ~ 25 mg/ml 的 β-TCP 浸提液能够诱导产生 Th17 亚群, 具有浓度依赖性, 表明 β-TCP 浸提液对 T 淋巴细胞产生免疫调节作用, 诱导促进 Th17 细胞分化。

众所周知, BMSCs 是来源于骨髓的多能间充质干细胞, 具有营养、抗炎作用和免疫调节、促进组织再生和抗凋亡等特性^[7]。研究^[8]显示, HIF-1α 介导的 BMSCs 在修复大鼠颅骨标准骨缺损中取得理想效果。然而 Nauta et al^[9] 将 BMSCs 作为种子细胞, 以羟基磷灰石磷酸钙作为支架材料体内成骨失败。因此, 一定浓度的炎症细胞因子对于骨替代生物材料启动和促进 BMSCs 成骨分化是必需的。

IL-17A 是 Th17 细胞分泌的主要炎症细胞因子。有研究^[10]表明, 正畸诱导的牙髓炎症微环境中的 IL-17A 提高牙髓干细胞的自我更新和分化, 也有学者称 IL-17A 能够促进人间充质干细胞的增殖分化能力^[11]。本研究显示, β-TCP 材料浸提液对 T 淋巴细胞免疫调节作用后的上清液中 IL-17A 浓度与小鼠 BMSCs 的成骨分化效果相关。上清液中的 IL-17A 调控小鼠 BMSCs 的成骨分化, 刺激 BMSCs 释放成骨相关因子, ALP 和 OCN 均呈现高水平上调, 且能够持续高水平表达。其中, ALP 是成骨分化的早

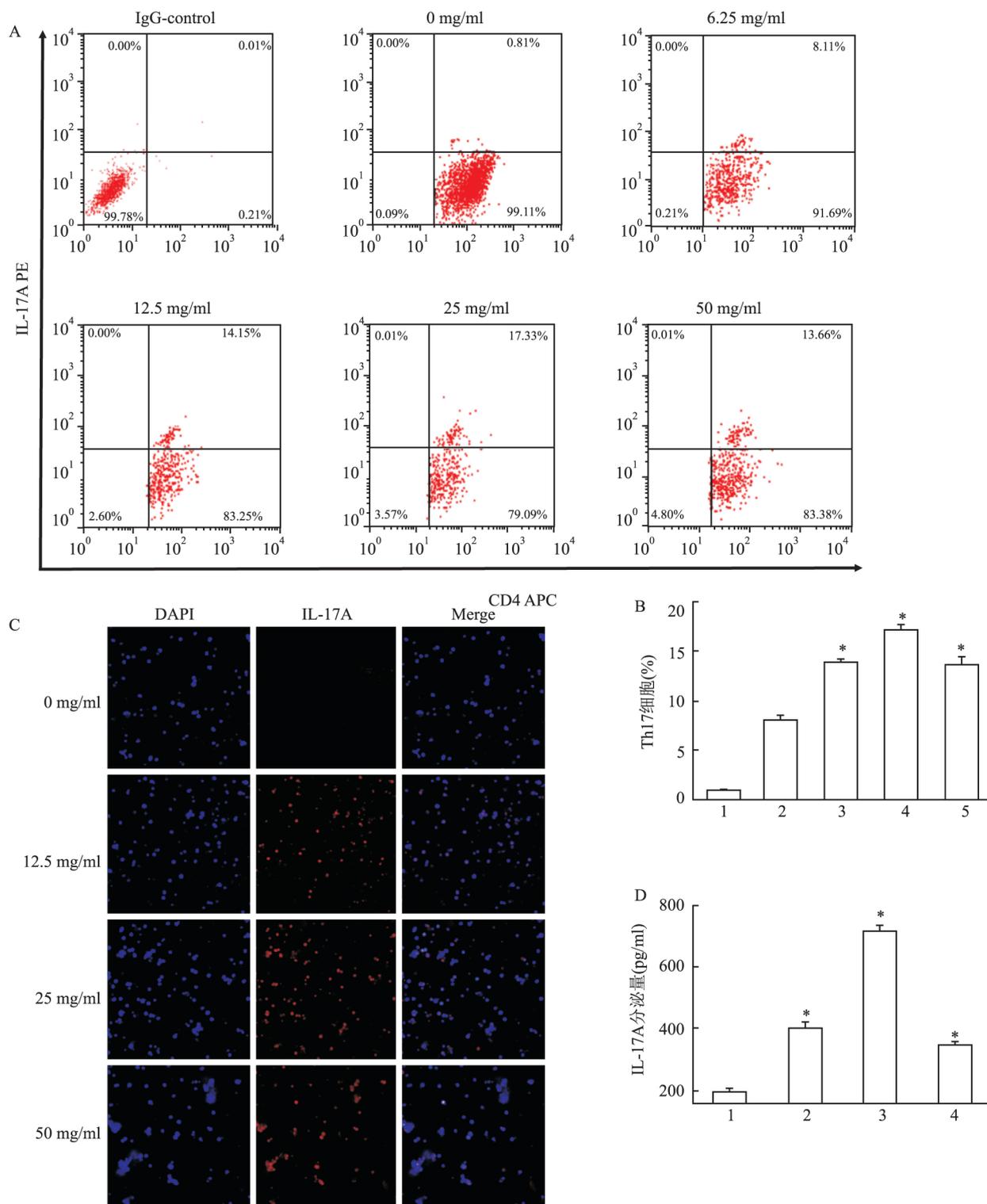


图2 β -TCP材料浸提液对T淋巴细胞的亚群分化作用

A:流式细胞技术检测细胞表面标志物 CD4 和 IL-17A 阳性表达情况;B:流式结果统计分析;1:0 mg/ml;2: 6.25 mg/ml; 3: 12.5 mg/ml; 4: 25 mg/ml; 5:50 mg/ml;C:细胞共聚焦检测细胞表面标志物 CD4 和 IL-17A 阳性表达情况 $\times 60$;D:ELISA 法检测共培养上清液中 IL-17A 分泌量;IgG - control: IL-17A 抗体同源对照;1: 0 mg/ml;2:12.5 mg/ml;3:25 mg/ml;4:50 mg/ml;与 0 mg/ml 比较: * $P < 0.05$

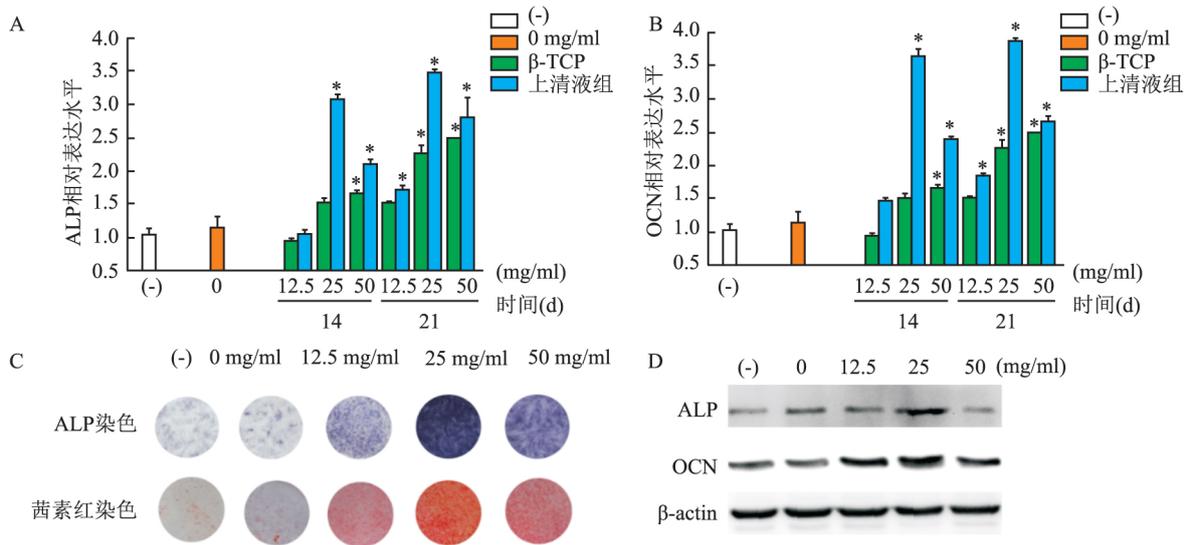


图3 β-TCP 浸提液与 T 淋巴细胞作用后上清液对小鼠 BMSCs 成骨分化的影响

A、B:qRT-PCR 技术检测 ALP 和 OCN 基因的表达;C:ALP 染色和茜素红染色;D:Western blot 法检测 ALP、OCN 蛋白表达;(-):阴性对照组;与阴性对照组比较:* P < 0.05

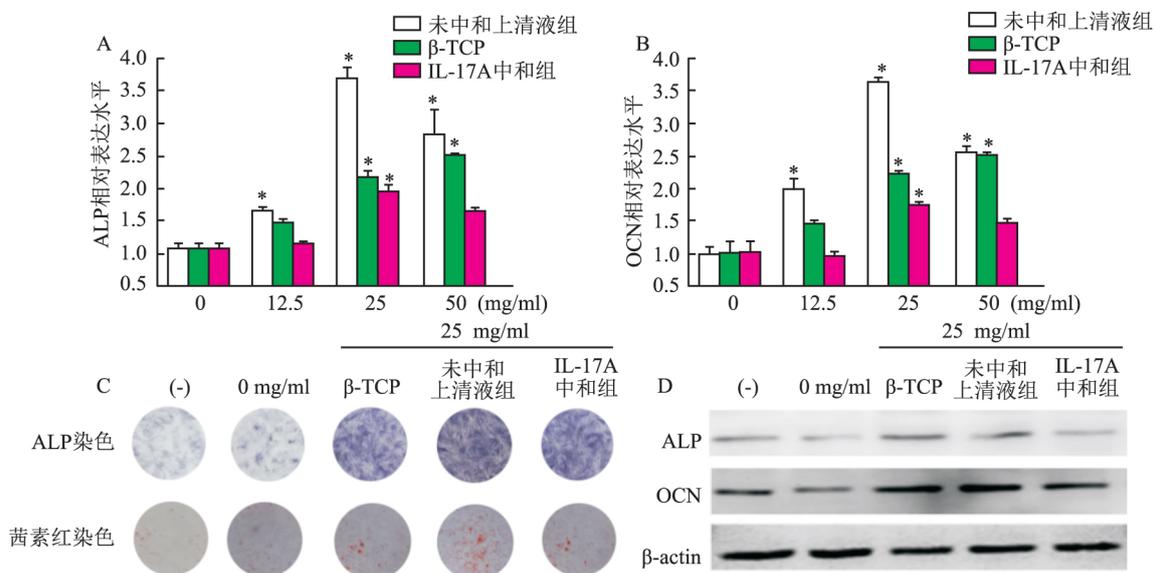


图4 IL-17A 中和实验对小鼠 BMSCs 成骨分化能力的影响

A、B:qRT-PCR 法检测 ALP、OCN 基因表达;C:ALP 和茜素红染色;D:Western blot 法检测 ALP、OCN 蛋白表达;(-):阴性对照组;与阴性对照组比较:* P < 0.05

期标志物,是骨矿化过程中发挥重要作用的酶^[12]。OCN 是成骨分化的关键基因。β-TCP 作为公认的能够促进成骨分化的骨替代材料,已被证明具有明显的促进 BMSCs 成骨分化的能力。本研究为排除 β-TCP 浸提液本身对成骨过程的影响,实验中设置了同等浓度的 β-TCP 浸提液组和 β-TCP 浸提液作用于 T 淋巴细胞后的上清液组。通过图 3 的诱导实

验及图 4 的抗体中和实验 均说明了 β-TCP 浸提液作用于 T 淋巴细胞后可增强 β-TCP 成骨诱导效果。同时 IL-17A 抗体中和实验后的小鼠 BMSCs 的成骨分化能力明显下降,表明 IL-17A 在提高小鼠 BMSCs 成骨分化能力中发挥着重要作用。

综上所述 β-TCP 浸提液通过对 T 淋巴细胞的免疫调节作用,促进 Th17 亚群分化,呈浓度依赖性;

Th17 细胞分泌 IL-17A 介导小鼠 BMSCs 的成骨分化,为将来体内实验奠定基础。但目前为止,β-TCP 材料诱导 T 淋巴细胞 Th17 细胞方向分化的具体分子作用机制尚不明确,且在体内 β-TCP 诱导成骨的机制是否依赖于对 T 细胞的调控,仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology[J]. Periodontol Res 2005 40(4):287-93.
- [2] Chen Z, Wu C, Gu W, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by β-tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway[J]. Biomaterials 2014 35(5):1507-18.
- [3] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher A H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats [J]. Cell Tissue Res 1988, 254(2):317-30.
- [4] Ni S, Chang J, Chou L, et al. Comparison of osteoblast-like cell responses to calcium silicate and tricalcium phosphate ceramics *in vitro* [J]. Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007 80(1):174-83.
- [5] Zerbo I R, Bronckers A L, de Lange G, et al. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous β-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation[J]. Biomaterials 2005 26(12):1445-51.
- [6] Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, et al. Immune responses to implants—a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials[J]. Biomaterials 2011 32(28):6692-709.
- [7] Murphy M B, Moncivais K, Caplan A I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine [J]. Exp Mol Med 2013 94:45-54.
- [8] 朱艳秋,王默涵,周咏,等. HIF-1α 介导 BMSCs 复合 PLGA 修复大鼠颅骨标准骨缺损的研究[J]. 安徽医科大学学报 2017, 52(9):1261-5.
- [9] Nauta A J, Fibbe W E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells[J]. Blood 2007 110(10):3499-506.
- [10] Yu W, Zhang Y, Jiang C, et al. Orthodontic treatment mediates dental pulp microenvironment via IL17A [J]. Arch Oral Bio 2016, 66(8):22-9.
- [11] Huang H, Kim H J, Chang E J, et al. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling [J]. Cell Death Differ 2009, 16(10):1332-43.
- [12] Ohara N, Hayashi Y, Yamada S, et al. Early gene expression analyzed by cDNA microarray and RT-PCR in osteoblasts cultured with water-soluble and low molecular chitooligosaccharide [J]. Biomaterials 2004 25(10):1749-54.

Study on osteogenic differentiation of BMSCs induced by T-lymphocytes treated with β-TCP

Xu Min^{1,2}, Wu Tingting^{1,2}, He Jiakai^{1,2}

(¹Stomatologic College of Anhui Medical University Hefei 230032; ²The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effect of β-TCP on T lymphocytes, and to study the role of this effect in the process of osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*. **Methods** T lymphocytes were treated with gradient concentration of β-TCP extracts, then cell viability assay was detected by CCK8 and trypan blue staining. Flow cytometry and cell confocal method were used to define the effect of the most suitable concentration of β-TCP extract on the differentiation of Th17 subgroups of CD4⁺ T cells separated by magnetic microbeads. The secretion of IL-17A in the supernatant was detected by ELISA. The expression of the osteogenic differentiation related markers including alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) were detected by Real time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot, and ALP staining and alizarin red staining were used to detect the effect of β-TCP extracts on murine BMSCs osteogenesis. **Results** 25 mg/ml β-TCP extraction could induce T-lymphocytes' differentiation into Th17 subgroups, and the secretion of IL-17A in the supernatant had the best effect on the osteogenic differentiation of BMSCs, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** 25 mg/ml β-TCP extraction could induce T lymphocytes to differentiate into Th17 subsets, and Th17 cells and its immunomodulatory effect could mediate the osteogenic differentiation of BMSCs, which lays the foundation for further experiments *in vivo*.

Key words β-TCP; bone marrow mesenchymal stem cells; Th17; IL-17A; osteogenic differentiation