

PPAR δ 激动剂 GW501516 对大鼠骨髓基质干细胞分化的作用

陶晓燕, 潘天荣, 钟 兴, 杜益君, 王秀艳

摘要 目的 探讨过氧化物酶体增殖激活受体 δ (PPAR δ) 激动剂 GW501516 对大鼠骨髓基质干细胞 (BMSCs) 向成脂和成骨方向分化的作用。方法 全骨髓培养法培养大鼠原代 BMSCs 后采用差速贴壁法纯化, 流式细胞仪鉴定其细胞表面标志物, 实验分为 PPAR δ 激动剂组和对照组, 分别进行成骨和成脂方向诱导培养, 荧光定量 PCR 检测成骨细胞分化标志物 (碱性磷酸酶、骨钙素) 和脂肪细胞分化标志物 (脂肪酸结合蛋白 2、脂连素) mRNA 的表达, 油红 O 染色检测脂肪细胞分化, 茜素红染色检测成骨细胞矿化情况。结果 与对照组比较, PPAR δ 激动剂促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化标志物表达, 抑制向脂肪细胞方向分化标志物表达。茜素红染色显示 PPAR δ 激动剂组细胞矿化结节较对照组增加, 油红 O 染色显示 PPAR δ 激动剂组脂肪小滴明显减少。结论 PPAR δ 激动剂促进 BMSCs 向成骨方向分化, 抑制其向成脂方向分化。

关键词 骨质疏松; PPAR δ ; 骨髓基质干细胞; 细胞分化

中图分类号 R 589.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)07-0942-05

骨质疏松症可增加骨折风险, 增加致残率及死亡率, 目前已成为一个严重的公共健康问题^[1]。骨质疏松症主要是骨吸收增加和骨形成降低导致的骨量下降。骨吸收和骨形成主要涉及成骨细胞和破骨细胞的作用, 而骨髓间充质干细胞 (bone marrow stromal stem cells, BMSCs) 向成骨细胞和脂肪细胞方向的分化失调会导致骨质疏松的发生^[2]。研究^[3]显示过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR) γ 促进 BMSCs 向脂肪细胞系分化, 抑制其向成骨细胞系的分化。PPAR δ 与 PPAR γ 三维结构十分相似, 广泛表达于包括骨组织在内的多种组织中, 在脂肪细胞分化和能量代谢中具有重要作用。PPAR δ 激动剂

GW0742 和过表达 PPAR δ 能抑制 3T3-L1 前脂肪细胞向脂肪细胞的分化^[4], 但对 BMSCs 的分化作用的研究尚未见报道。该研究探讨 PPAR δ 激动剂 GW501516 对大鼠 BMSCs 向成脂和成骨方向分化的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 3 周龄雄性 SD 大鼠 (安徽医科大学实验动物中心); 低糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶、FBS (美国 Hyclone 公司); β -甘油磷酸钠、地塞米松、左旋抗坏血酸、吡哆美辛、异丁基黄嘌呤、胰岛素、青-链霉素、茜素红、油红 O、倒置相差显微镜、CO₂ 培养箱、高压灭菌器、流式细胞仪、恒温高速离心机、LightCycler[®] 480 System Real Time PCR 扩增仪、Real-time PCR 两步法试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); CD29、CD90、CD11b、CD45 抗体 (英国 Abcam 公司)。

1.2 BMSCs 的培养与鉴定

1.2.1 细胞培养 将大鼠麻醉后处死, 75% 酒精浸泡 10 min, 无菌条件下取两后肢长骨, 除去骨表面附着的软组织, 75% 酒精中浸泡 2 min, PBS 清洗干净, 将两端干骺端剪开, 显露骨髓腔, 用含 15% FBS 的低糖 DMEM 培养液冲洗骨髓腔, 以冲出骨髓, 用吸管反复轻柔吹打冲出的液体, 用筛网过滤后将滤出的液体按 10⁶ ~ 10⁷ 个/ml 密度接种于培养瓶中。24 h 后轻柔摇晃培养瓶, 倒出培养液, 用 PBS 轻柔冲洗 2 遍, 加入新的含 15% FBS 的培养液, 2 d 换 1 次液, 至细胞长满整瓶。

1.2.2 细胞纯化 采用差速贴壁法纯化细胞。倒出培养液, 用 PBS 冲洗 2 遍, 加入 1 ml 胰酶消化至细胞变圆, 少许脱落, 加入含 15% FBS 的培养基, 轻轻吹打瓶壁, 吸出被吹打脱落的细胞混悬液, 加入新的培养瓶中, 水平放入培养箱中孵育 30 min 后, 再次拿出培养瓶, 轻轻直立培养瓶, 吸出培养液, 再次加入新的培养瓶中, 放入培养箱中培养, 直至长满瓶底 80% 左右, 再次进行相同的步骤进行差速贴壁, 反复共 3 次。采用流式细胞仪鉴定 BMSCs, 取第 3 代 BMSCs 进行下一步实验。

1.2.3 BMSCs 鉴定 第 3 代 BMSCs 经 PBS 清洗 3

2015-04-23 接收

基金项目: 安徽省年度重点科研项目 (编号: 12070403068); 安徽省自然科学基金 (编号: 1308085MH123)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院内分泌科, 合肥 230601

作者简介: 陶晓燕, 女, 硕士研究生;

潘天荣, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ptr1968@163.com

遍胰酶消化后,再用 1 ml PBS 重悬后转入 1.5 ml EP 管中,以 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,再次 1 ml PBS 重悬,细胞浓度为 1×10^6 个/ml,分别加入 CD29、CD90、CD11b、CD45 抗体,避光、4 °C、30 min 孵育后,再用 PBS 清洗 1 遍,0.3 ml PBS 再次重悬,上流式细胞仪检测。

1.3 试剂配制 成骨诱导液: 10% 胎牛血清 + 90% DMEM 培养基中加入 10 mmol/L β -甘油磷酸钠、 1×10^{-8} mol/L 地塞米松、50 mg/L 左旋抗坏血酸、1% 青-链霉素。

成脂诱导液: 10% 胎牛血清 + 90% DMEM 培养基中加入 1 μ mol/L 地塞米松、200 μ mol/L 吲哚美辛、0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤、10 μ mol/L 胰岛素、1% 青-链霉素。

GW501516 的配制: 使用 DMSO 溶解 GW501516, 配制浓度为 0.1 mmol/L, 避光常温保存备用。

油红 O 染液配制: 称取 0.5 g 油红 O 粉末溶于 100 ml 异丙醇中,使用前过滤,并按 3:2 比例使用蒸馏水稀释。

茜素红染液配制: 称取 0.1 g 茜素红粉末加入 100 ml 异丙醇中,调节 pH 值至 7.2,常温避光保存。

1.4 试验分组和诱导分化 第 3 代 BMSCs 接种至培养皿中,长满皿底 80% 以上时,随机分为 PPAR δ 激动剂组(GW501516) 10 瓶和对照组 10 瓶,弃去原培养液,PPAR δ 激动剂组 5 瓶加入 2 ml 的成骨诱导液,5 瓶加入 2 ml 的成脂诱导液,每个再分别加入 20 μ l 的 GW501516 配液,使得培养皿中 GW501516 最终浓度为 10 nmol/L; 对照组 5 瓶加入 2 ml 成骨诱导液,5 瓶加入 2 ml 成脂诱导液,另外每个培养皿中加入 20 μ l 的 DMSO 作为空白对照,2 d 更换成骨/成脂诱导液 1 次,并在换液时添加 GW501516 及空白对照,诱导培养 14 d 后进行下一步实验。

1.5 成骨及成脂细胞染色及观察

1.5.1 油红 O 观察成脂分化 成脂诱导细胞弃去培养皿中原培养液,使用 PBS 冲洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min 后弃去,加入油红 O 染液染色 30 min 后弃去,加入 60% 的异丙醇冲洗 5 s,随后立即弃去并用 PBS 缓慢冲洗 3 遍,显微镜下观察脂滴染色情况。

1.5.2 茜素红染色观察成骨分化 成骨诱导细胞弃去培养皿中原培养液,使用 PBS 冲洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 15 min 后弃去,加入茜素红染液 37 °C、30 min 弃去, PBS 冲洗 3 遍,显微镜下观察成骨矿化情况。

1.6 Real-time PCR 检测成脂及成骨分化指标

取上述诱导培养细胞弃去原培养液,使用 TRIzol 法提取总 RNA 后,荧光定量 PCR 法检测成脂分化指标[脂肪酸结合蛋白 2(adipocyte fatty acid binding protein 2, ap2)、脂连素]及成骨分化指标[碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素]的 mRNA 表达。

1.6.1 cDNA 第一链的合成 各样品总 RNA 分别各取 4 μ l,采用逆转录试剂盒进行逆转录,42 °C 孵育 30 min,加热至 95 °C 维持 30 min,得到 cDNA 溶液,置冰浴中待用。

1.6.2 PCR 的步骤 PCR 扩增 ap2、脂连素、ALP 及骨钙素,同时扩增 β -actin 内参,引物序列见表 1。反应体系: 共 20 μ l, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 使用量为 10 μ l,上下游引物各 0.4 μ l, cDNA 2 μ l,无 DNase 和 RNase 的水 7.2 μ l。反应条件: 95 °C 预变性 30 s,活化 Tag 酶; 94 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环结束。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)
ap2	F: GCGTGAATTCGATGAAATCA	114
	R: CCCGCCATCTAGGGTTATGA	
脂连素	F: GAGACGCAGGTGTCTCTG	123
	R: CCTACGCTGAATGCTGAG	
ALP	F: TCCGTGGGTCGGATTCT	171
	R: GCCGGCCCAAGAGAGAA	
骨钙素	F: GAGCTGCCCTGCACTGGGTG	157
	R: TGGCCCCAGACCTCTTCCCC	
β -actin	F: GTGTGATGGTGGGAATGGGTC	258
	R: AGGAAGAGGATGCCGGCAGTC	

1.6.3 PCR 产物分析 内参基因和目的基因熔解曲线尖峰在同一轴上,未见杂峰,说明引物与模板特异性结合,所测 CT 值有意义。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,所有符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 SD 大鼠 BMSCs 的分离、培养与鉴定

2.1.1 原代大鼠 BMSCs 分离与培养 接种 24 h 后弃去未贴壁细胞,可见少量贴壁细胞,细胞呈梭形或三角形,继续培养至长满培养瓶底 80%,培养至第 3 代细胞第 3 天,细胞数目明显增多,贴壁生长,大部

分呈长梭形,少部分呈三角形或不规则形,成瀑布或漩涡状排布。见图1。

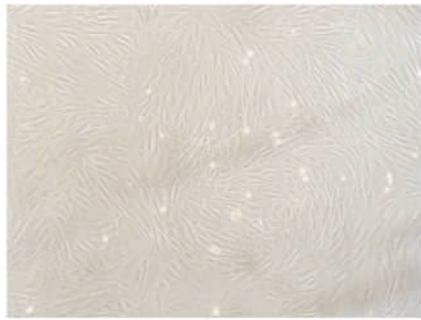


图1 原代大鼠 BMSCs 培养 ×100

2.1.2 BMSCs 表面抗原鉴定结果 采用流式细胞仪检测第3代的 BMSCs。结果显示细胞表面抗原 CD11b 表达率约为 7.51%, CD29 表达率约为 99.85%, CD45 表达率约为 7.14%, CD90 表达率约为 99.49%。细胞表面高表达 CD29、CD90,低表达 CD11b、CD45。见图2。

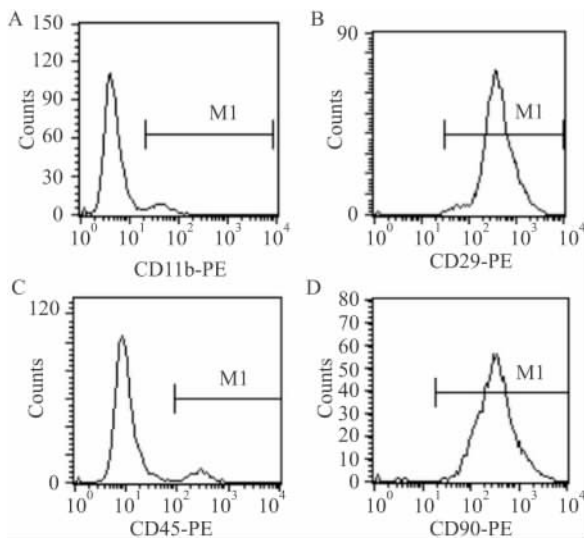


图2 大鼠 BMSCs 表面抗原鉴定
A: CD11b; B: CD29; C: CD45; D: CD90

2.2 茜素红及油红 O 染色结果 成骨诱导液诱导培养 14 d,茜素红染色后显微镜下观察细胞矿化结节,PPAR δ 激动剂组(图3B1)矿化结节数量较对照组(图3A1)明显增多;成脂诱导液诱导培养 14 d,油红 O 染色观察细胞内脂滴,PPAR δ 激动剂组(图3B2)脂滴数量较对照组(图3A2)明显减少。

2.3 Real-time PCR 结果分析 与对照组比较,PPAR δ 激动剂组 ALP(2.596 ± 0.588) 和骨钙素

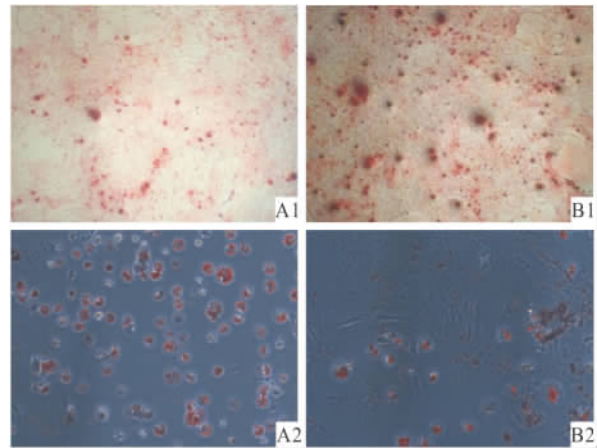


图3 两组矿化结节及脂滴形成情况 ×100

A: 对照组; B: PPAR δ 激动剂组; 1: 茜素红染色; 2: 油红 O 染色

mRNA(2.891 ± 0.368) 的表达显著升高 (P < 0.01), ap2(0.567 ± 0.038) 和脂连素(0.616 ± 0.075) mRNA 表达显著下降 (P < 0.05)。见图4。

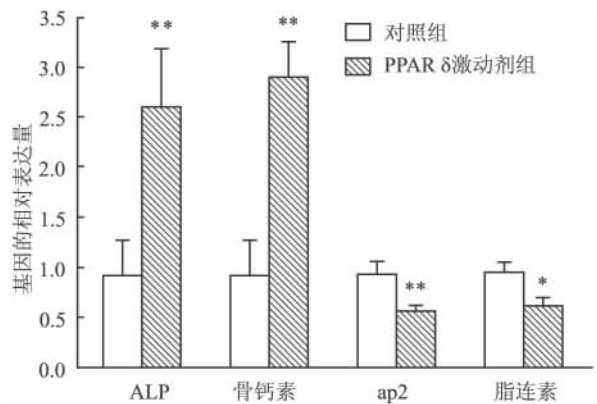


图4 成骨及成脂分化标志物 mRNA 相对表达量
与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

3 讨论

PPAR δ 属于核受体超家族,能介导亲脂性小分子化合物,如类固醇、视黄酸 X、胆汁酸等调节 DNA 转录。目前已合成了多种 PPAR δ 的人工配体,其中 2003 年葛兰素史克发现的 PPAR δ 特异性选择性激动剂 GW501516 引发了对该受体的关注,人们逐渐认识到 PPAR δ 在参与能量和脂质代谢上的作用。在小鼠的脂肪组织中转基因表达 PPAR δ 可阻止小鼠因高脂饮食而导致的肥胖^[5];相反,PPAR δ 缺陷的小鼠则显示能量解偶联的下降,易发生肥胖,血脂水平增高。以上研究提示 PPAR δ 可能在能量代谢及脂代谢中起着一定的作用,但目前其在骨代

谢方面的研究较少。

BMSCs 是近年来研究的热点,在体内外不同条件下能够诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞以及骨骼肌细胞等,也可以分化成破骨支持细胞,对破骨细胞活动发出信号指示,从而调节骨代谢平衡^[6-7]。脂肪细胞分化与骨代谢密切相关,主要因为成骨细胞和脂肪细胞共同来源于 BMSCs^[8]。动物研究^[9]显示,通过去势手术人为造成绝经后骨质疏松模型的大鼠,其体内 BMSCs 向脂肪细胞分化的能力增强,而向成骨细胞分化的能力减弱,由此推断, BMSCs 向成骨及成脂方向分化趋势的改变可能是造成骨质疏松的重要因素之一。因此,本研究选择 BMSCs 作为研究对象。

本研究结果提示 PPAR δ 激动剂 GW501516 能够显著增加矿化结节数量,减少脂肪细胞分化及脂滴数。体外研究^[4]显示 PPAR α/δ 激动剂(苯扎贝特)刺激啮齿类成骨细胞分化和矿化结节的形成,主要通过 PPAR δ 途径发挥作用^[10]。Scholtysek et al^[11]也使用 PPAR δ 激动剂 GW501516,发现 PPAR δ 选择性特异性激动剂能够促进去卵巢小鼠骨量的增加,体外实验提示能促进原代成骨细胞矿化结节的形成,本研究结果与之类似,进一步证实 PPAR δ 激动剂能促进骨的合成代谢。

BMSCs 向成骨细胞或脂肪细胞分化是一个伴随多种转录因子及特异性基因表达的过程。ALP 的表达是检测成骨细胞在早期分化活动标志之一,能够反映细胞的成骨分化能力^[12];骨钙素是骨基质矿化的必需物质,反映新形成的成骨细胞的活动状态^[13]。本研究结果显示 PPAR δ 激动剂 GW501516 促进 BMSCs 成骨分化标志物 ALP 和骨钙素的表达,与 Zhong et al^[14] 研究结果类似。Zhong et al 研究提示 PPAR α/δ 激动剂(苯扎贝特)主要通过 PPAR δ 途径促进成骨细胞分化标志物的表达。脂肪细胞分化方面,脂联素和 ap2 是脂肪细胞分化后期表达的特异性基因。本研究结果还显示 PPAR δ 激动剂 GW501516 抑制成脂分化标志物 ap2 及脂连素表达。

综上所述,本研究结果提示 PPAR δ 激动剂能够促进 BMSCs 向成骨方向分化,抑制其向脂肪细胞方向分化,因此,PPAR δ 在骨合成代谢中起着重要的作用,可为临床骨质疏松症的治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] Salari Sharif P, Abdollahi M, Larijani B. Current, new and future treatments of osteoporosis [J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(3): 289-300.
- [2] Mukherjee A, Rotwein P. Selective signaling by Akt1 controls osteoblast differentiation and osteoblast-mediated osteoblast development [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(2): 490-500.
- [3] Lecka-Czernik B, Suva L J. Resolving the two "Bony" faces of PPAR- γ [J]. *PPAR Res*, 2006, 2006: 27489.
- [4] Still K, Grabowski P, Mackie I, et al. The peroxisome proliferator activator receptor α/δ agonists linoleic acid and bezafibrate upregulate osteoblast differentiation and induce periosteal bone formation *in vivo* [J]. *Calcif Tissue Int*, 2008, 83(4): 285-92.
- [5] Wang Y X, Lee C H, Tjep S, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity [J]. *Cell*, 2003, 113(2): 159-70.
- [6] Kim R H, Mehrazarin S, Kang M K. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for oral and systemic disease [J]. *Dent Clin North Am*, 2012, 56(3): 651-75.
- [7] Nicolaidou V, Wong M M, Redpath A N, et al. Monocytes induce STAT3 activation in human mesenchymal stem cells to promote osteoblast formation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39871.
- [8] Lorincz C, Reimer R A, Boyd S K, et al. High-fat, sucrose diet impairs geometrical and mechanical properties of cortical bone in mice [J]. *Br J Nutr*, 2010, 103(9): 1302-8.
- [9] 李冬菊, 李良, 吴江. 去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞体外成脂分化能力的研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2007, 24(3): 641-5.
- [10] Zhong X, Xiu L L, Wei G H, et al. Bezafibrate enhances proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells *via* AMPK and eNOS activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(5): 591-600.
- [11] Scholtysek C, Katzenbeisser J, Fu H, et al. PPAR β/δ governs Wnt signaling and bone turnover [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5): 608-13.
- [12] Shen Z J, Kim S K, Jun D Y, et al. Antisense targeting of TGF- β 1 augments BMP-induced upregulation of osteopontin, type I collagen and Cbfa1 in human Saos-2 cells [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(7): 1415-25.
- [13] 赵煜, 李冰雁, 杜莉, 等. 磁性附着体模拟静磁场对成骨细胞分化功能的影响 [J]. *中华口腔医学研究杂志*, 2011, 5(2): 151-5.
- [14] Zhong X, Xiu L L, Wei G H, et al. Bezafibrate enhances proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells *via* AMPK and eNOS activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(5): 591-600.

TLR4 mAb 对人正常肝内胆管上皮细胞 LPS - TLR4 - NF - κB 通路的影响

刘 辉 余宏铸 韩 珑 王正林

摘要 目的 对脂多糖 (LPS) 及 Toll 样受体 4 单克隆抗体 (TLR4 mAb) 作用于体外培养的人肝内胆管细胞 (HiBEC) 后其 TLR4 mRNA 和核转录因子-κB (NF-κB) mRNA 的表达情况进行了研究。方法 体外培养 HiBEC 采用 RT-PCR 法检测经 LPS 和不同浓度的 TLR4 mAb 作用后 HiBEC 细胞株中 TLR4 mRNA 和 NF-κB mRNA 的表达情况。结果 LPS 可以上调 HiBEC 中 TLR4 mRNA 和 NF-κB mRNA 的表达 ($P < 0.05$); 而 LPS 作用于 TLR4 mAb 处理后的 HiBEC 中其 TLR4 mRNA 和 NF-κB mRNA 的表达下调; 高质量浓度 TLR4 mAb 使 NF-κB mRNA 的表达下调更明显 ($P < 0.05$)。结论 LPS 能上调 HiBEC 中 TLR4 mRNA 和 NF-κB mRNA 的表达; 而 TLR4 mAb 则能拮抗 LPS 对 HiBEC 的刺激作用, 下调

TLR4 mRNA 和 NF-κB mRNA 的表达。

关键词 脂多糖; Toll 样受体 4 单克隆抗体; Toll 样受体 4; 核转录因子-κB

中图分类号 R 349.54

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2015) 07 - 0946 - 04

肝内胆管细胞癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是一类来源于肝内二级胆管以上的胆管上皮细胞恶性肿瘤^[1], 在原发性肝癌中占第二位, 约为 5% ~ 30%, 仅次于肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)。台湾超过 70% 的 ICC 患者合并肝内胆管结石, 日本 6% ~ 8% 的 ICC 患者手术切除标本中发现了肝内胆管结石。研究^[2]显示, 肝内胆管结石患者中有 3% ~ 10% 的患者最终会发生 ICC, 肝内胆管结石是 ICC 的危险因素之一。关于脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) -Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) -核转录因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 经典炎症通路在人肝内胆管细胞 (human intrahepatic biliary epithelial cell, HiBEC) 中的作用研

2015 - 04 - 23 接收

基金项目: 2013 年安徽省年度重点科研项目 (编号: 1301043034)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肝胆外科, 合肥 230022

作者简介: 刘 辉, 男, 硕士研究生;

余宏铸, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hong-zhu.620929@aliyun.com

The effect of PPAR δ agonist-GW501516 on the differentiation of rats bone marrow stromal stem cells

Tao Xiaoyan, Pan Tianrong, Zhong Xing, et al

(Dept of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of peroxisome proliferators-activated receptor δ (PPAR δ) agonist GW501516 on the adipogenic and osteogenic differentiation of rats bone marrow stromal stem cells (BMSCs).

Methods Rat BMSCs were cultured using whole marrow adhesion method. The biomarkers on the cell membrane were identified using flow cytometry. BMSCs were randomly divided into PPAR δ agonist group and control group. The expression of osteoblast differentiation markers (alkaline phosphatase, osteocalcin) and adipocyte differentiation markers (ap2, fat vitronectin) were detected using Real-time PCR after osteogenic and adipogenic induced culture. Mineralized nodules and lipid droplets were detected using alizarin red and oil red O staining. **Results**

Compared with the control group, cells in PPAR δ agonist group had more expression of osteoblast differentiation markers and less expression of adipocyte differentiation markers. There were more mineralized nodules and fewer lipid droplets in the PPAR δ agonist group. **Conclusion** PPAR δ agonist can promote osteogenic differentiation of BMSCs, and inhibit their differentiation into adipocytes direction.

Key words osteoporosis; PPAR δ; bone marrow stem cells; cell differentiation