

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002006

鸢尾素对静态和牵张力作用下 BMSCs 成骨向分化的研究

张泽玮, 李汶洋, 熊 均, 邱丽华

(重庆医科大学附属口腔医院颌面外科、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室、
重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室, 重庆 401147)

【摘 要】目的:在静态及牵张力作用下,研究鸢尾素(irisin)对大鼠骨髓间充质基质细胞(bone marrow mesenchymal stromal cells, BMSCs)成骨向分化的影响。**方法:**分离培养原代大鼠 BMSCs,应用四点弯曲加力系统建立体外细胞牵张模型。通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测在静态及牵张力作用下,不同浓度的鸢尾素对 BMSCs 成骨向分化的影响并筛选最适鸢尾素浓度。实验分组如下:A,对照组;B,鸢尾素组(100 ng/mL 鸢尾素);C,牵张力组(2 000 μE 牵张力);D,鸢尾素+牵张力组(100 ng/mL 鸢尾素+2 000 μE 牵张力)。细胞计数法检测各组细胞增殖情况,通过定量逆转录 PCR(qRT-PCR)及 Western blot 检测成骨相关 mRNA 及蛋白的表达,并检测 P38、ERK1/2 MAPK 通路表达。采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析。**结果:**ALP 活性检测结果显示,在静态及牵张力作用下,鸢尾素浓度为 100 ng/mL 时, BMSCs 的 ALP 活性显著升高($P<0.01$)。细胞增殖检测结果显示,与对照组相比,鸢尾素+牵张力组可促进 BMSCs 的增殖($P<0.05$)。qRT-PCR 结果显示,鸢尾素+牵张力可促进成骨标志物 Runx2、ALP、COL-I、OPN 表达的升高($P<0.05$)。Western blot 结果显示,鸢尾素+牵张力可促进 Runx2 蛋白表达的升高($P<0.05$)。此外,鸢尾素+牵张力联合作用促进 BMSCs 增殖与成骨向分化的机制可能与 P38、ERK1/2 MAPK 通路的激活有关。**结论:**鸢尾素对静态和体外牵张力作用下 BMSCs 增殖及成骨向分化具有促进作用,此效应可能通过 P38、ERK1/2 MAPK 通路发挥作用。

【关键词】鸢尾素;骨髓间充质基质细胞;机械牵张力**【中图分类号】**R782**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-10-16

Effect of irisin on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under static force and mechanical strain

Zhang Zewei, Li Wenyang, Xiong Jun, Qiu Lihua

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University; Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences; Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education)

【Abstract】Objective:To investigate the effect of irisin on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) under static force and mechanical strain. **Methods:**Primary rat BMSCs were isolated and cultured, and a four-point bending force system was used to establish an *in vitro* model of cell stretch. The activity of alkaline phosphatase (ALP) was measured to analyze the effect of irisin concentration on the osteogenic differentiation of BMSCs under static force and mechanical strain and screen out the optimal concentration of irisin. BMSCs were divided into control group, irisin group (100 ng/mL irisin), mechanical strain group (2 000 μE mechanical strain), and irisin+mechanical strain group (100 ng/mL irisin+2 000 μE mechanical strain). Cell counting was performed to observe cell proliferation, qRT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of

osteogenesis-related markers, and the expression of the P38 and ERK 1/2 MAPK pathways was measured. SPSS 20.0 software was used for statistical analysis. **Results:** The results of ALP activity showed that under static force and mechanical strain, BMSCs treated with 100 ng/mL irisin had a significant increase in ALP activity ($P<0.01$). Cell proliferation assay showed that compared with the control group, the irisin+mechanical strain group had a significantly higher level of proliferation of BMSCs ($P<0.05$). The results of qRT-PCR showed that irisin + mechanical strain significantly promoted the expression of osteogenesis-related markers including Runx2, ALP, COL-I, and

作者介绍:张泽玮, Email: 276257687@qq.com,

研究方向:骨再生。

通信作者:邱丽华, Email: gqyidi2001@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81600832);重庆市基础科学与前沿技术研究专项资助项目(编号:cstc2016jcy-jA0205);重庆市教委科学技术研究项目资助(编号:KJ1600231);重庆市社会民生科技创新专项资助项目(编号:cstc2016shmx00010);2016年重庆高校创新团队建设计划、重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室资助项目。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190321.1624.012.html
(2019-03-22)

OPN ($P < 0.05$), and Western blot showed that irisin+mechanical strain significantly promoted the protein expression of Runx2 ($P < 0.05$). In addition, irisin+mechanical strain promoted the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs, which might be associated with the activation of the P38 and ERK 1/2 MAPK pathways. **Conclusion:** Irisin can promote the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs under static force and mechanical strain, possibly via the P38 and ERK1/2 MAPK pathways.

【Key words】irisin; bone marrow mesenchymal stem cell; mechanical strain

牵张成骨 (distraction osteogenesis, DO) 是通过切开后的骨断端施加一定大小的牵引力, 使骨折间隙内形成新骨从而达到延长或增宽骨骼, 进而矫正骨骼发育不足或修复骨缺损的一种内源性组织工程学技术。DO 具有三维方向软硬组织同时再生、微创、无须再次开辟术区等优势, 但是从开始牵张至骨成熟的周期长, 易出现成骨不良、牵张器移位、折裂等问题。这容易引起牵张区感染, 影响患者的美观、功能等^[1]。因此如何缩短 DO 周期, 提高骨再生的质量并减少 DO 的并发症, 是临床亟需解决的难题。

鸢尾素 (irisin) 是一种糖基化的分泌型蛋白^[2], 由 III 型纤连蛋白域蛋白 5 (fibronectin type III domain containing protein 5, FNDC5) 经蛋白水解酶作用后而形成。鸢尾素可作用于体内白色脂肪细胞, 诱导其转化为含量少、产热效率高的棕色脂肪细胞。Colaiaanni 等^[3-5]研究发现鸢尾素能促进干细胞成骨向分化, 促进成骨细胞及成骨前体细胞增殖及成骨的作用。虽然鸢尾素作为代谢性疾病防治的一个新靶点已经被广泛研究^[6-9], 但目前未见鸢尾素在牵张成骨中作用的研究报道。因此, 本实验建立了 DO 细胞模型, 研究鸢尾素对静态和牵张力作用下骨髓间充质基质细胞 (bone marrow mesenchymal stromal cells, BMSCs) 成骨向分化的作用及其可能机制。

1 材料及方法

1.1 实验动物

健康未生育 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 3~4 周龄, 体质量 90~110 g, 常规饲料饲养 (重庆医科大学动物实验中心提供)。

1.2 主要仪器及试剂

实验用品: 倒置相差显微镜 (Nikon, 日本)、高速低温离心机 (Eppendorf 公司, 德国)、低速台式离心机 (5810R, 德国)、Bio-Rad 定量 PCR 仪 CFX96 (BIO-RAD 公司, 美国)、酶联免疫检测仪 (Bio-Tek 公司, 美国)、四点弯曲加力装置 (四川大学与电子科技大学联合研制, 中国)、CO₂ 恒温孵箱 (Thermoforma 公司, 美国)、流式细胞仪 (BD 公司, 美国); irisin 重组蛋白: (peprotech, 美国, 货号: 0514593)、DMEM-F12 培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS) (Hyclone 公司, 美国)、胎牛血

清 (FBS) (Gibco 公司, 澳洲)、碱性磷酸酶试剂盒 (建成生物, 南京)、BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒 (碧云天生物, 上海)、Trizol reagent (Invitrogen 公司, 美国)、反转录反应试剂盒 GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega, 美国)。

1.3 大鼠 BMSCs 分离培养及鉴定

3~4 周龄 SD 大鼠 (雌雄不限) 10% 水合氯醛腹腔注射, 待麻醉后处死, 75% 乙醇浸泡消毒, 超净工作台解剖出胫骨和股骨。用含有 10% FBS、1% 双抗的完全培养基反复冲洗骨髓腔, 直至骨髓腔发白。将冲洗液制成单细胞悬液均匀接种于细胞培养瓶中, 置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱培养, 每 3 d 全换液。取生长状态良好的第 3 代 BMSCs, 流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD29、CD44、CD45 的表达率。

1.4 牵张成骨体外细胞模型的建立

细胞加力板 (规格: 4 cm × 7.9 cm, 厚度为 1.15 mm) 由 75 cm² 斜颈细胞培养瓶 (No. 430720, corning) 底壁裁割而成。裁割后将四角打磨圆钝, 培养板行清洁, 泡酸, 紫外线正反面照射 30 min 后, 75% 酒精浸泡备用。取第 3 代 BMSCs 以 1×10^5 个/mL 密度铺细胞加力板, 四点弯曲加力装置施加张应力 60 min (图 1), 加力参数: (频率 0.5 Hz, 位移: 1 mm, 2 000 $\mu\epsilon$), 建立牵张成骨体外细胞模型^[10]。



图 1 四点弯曲细胞力学加载仪
(四川大学与电子科技大学联合研制)

1.5 不同浓度 irisin 对静态及牵张力作用下 BMSCs ALP 活性的影响

取第 3 代 BMSCs 细胞分为两大组, 一组细胞静态培养, 另一组细胞施加牵张力 (2 000 $\mu\epsilon$, 60 min)。分别以鸢尾素浓度为: 10、50、100、500、1 000 ng/mL 铺板。培养 7 d 后细胞收样进行 ALP 活性检测, 筛选出最适鸢尾素浓度。

1.6 鸢尾素和牵张力对 BMSCs 增殖的影响

按照筛选出的最适鸢尾素浓度, 取第 3 代 BMSCs 按 1×10^5 个/mL 密度铺板, 实验分组如下: A, 对照组 (PBS 处理);

B, 鸢尾素组; C, 牵张力组; D, 鸢尾素+牵张力组, 分别于培养 3、5、7 d 消化细胞, 重悬均匀后取 1 mL 行细胞计数, 检测 BMSCs 的增殖情况。

1.7 qRT-PCR 检测成骨相关标志物基因的表达

取第 3 代细胞按 1×10^5 个/mL 细胞密度铺板, 分组同上。4 组细胞成骨诱导后第 3、14 天收样。每例样品设 3 个平行复孔, 重复 3 次, 取均值, 收集数据, 测定各样品的 Ct 值, 计算目的基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。以 GAPDH 为内参照。相应引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 目的基因引物序列

名称	序列(5'到3'端)
Runx2 F	GGCTGTTGTGATGCGTATTC
Runx2 R	GCTCACGTCGCTCATCTTGC
ALP F	ACTGCTATTGTAGTGTCTGTGCTC
ALP R	ACCGTGTGCTAGCCTTCTGG
OPN F	CCGAGGTGATAGCTTGGCTTA
OPN R	GCTGGGCAACTGGGATGAC
COL-1 F	GAAGTCATAGGAGTCGAGGGACC
COL-1 R	CCATAGGACATCTGGAAGCAA
GAPDH F	GCAAGTTCAACGGCACAGTCA
GAPDH R	CCATTTGATGTTAGCGGGATCT

1.8 Western blot 法检测蛋白表达

1.8.1 Runx2 蛋白的表达 重悬第 3 代细胞 BMSCs, 按 1×10^5 个/mL 细胞密度铺板, 分组同上。Western blot 法检测成骨诱导 3 d 后 Runx2 蛋白的表达。光密度量化各组表达量。以 β -actin 作为对照校正各组光密度。

1.8.2 鸢尾素对 DO 细胞模型 P38、ERK1/2 MAPK 信号通路影响 Western blot 法检测鸢尾素+牵张力组在 5~30 min 内 P38、ERK1/2 MAPK 通路表达。光密度量化各组表达量。以 β -actin 作为对照校正各组光密度。

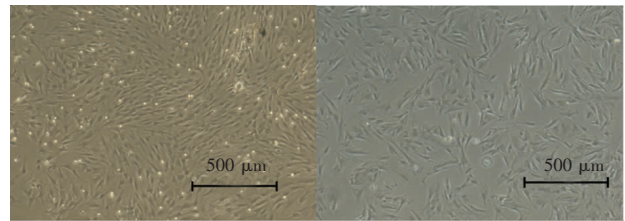
1.9 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件分析。实验结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计方法: 析因设计的方差分析、单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 原代培养, 流式细胞鉴定

原代(P₀)BMSCs 镜下见: 细胞集落生长, 形态伸展呈典型的梭形铺满瓶壁(图 2A)。第 3 代(P₃)BMSCs 镜下见: 细胞呈梭形、菱形或多边形, 核大而饱满, 贴附于瓶壁, 部分细胞伸出圆钝的突起, 部分细胞聚集成灶(图 2B)。流式结果显示(图 3), 第 3 代 BMSCs 整合素家族成员 CD29 表达率 99.87%, 黏附分子 CD44 表达率 90.78%, 白细胞标志抗原 CD45 表达率 0.25%。此结果符合 BMSCs 的表面标志物特征。采用四点弯曲加力装置建立体外牵张成骨细胞模型(图 4)。



A. 原代(P₀)BMSCs

B. 第 3 代(P₃)BMSCs

图 2 SD 大鼠 BMSCs 镜下照片

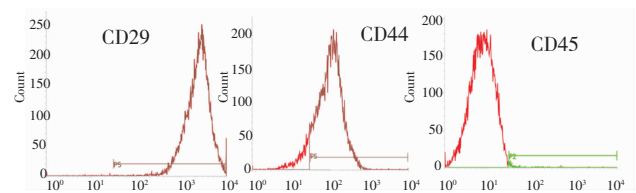


图 3 流式细胞鉴定结果

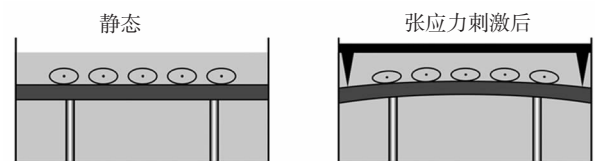
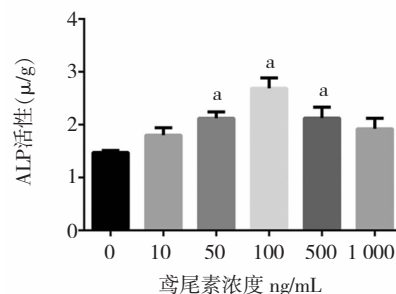


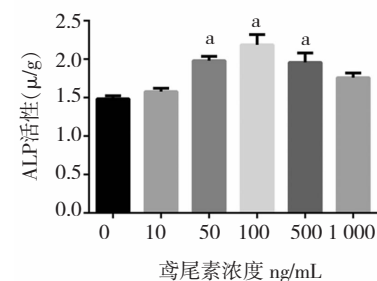
图 4 细胞受力变化示意图

2.2 不同浓度鸢尾素对静态、牵张力作用下 BMSCs ALP 活性的影响

在牵张力作用下, BMSCs 的 ALP 活性随鸢尾素的浓度改变而变化($F=18.841, P=0.000$), 当鸢尾素浓度为 100 ng/mL 时, ALP 活性较对照组显著升高($P=0.000$)。此外, 在静态状态下也观察到类似的结果($F=29.400, P=0.000$)(图 5)。以上结果提示, 当鸢尾素浓度为 100 ng/mL 时, BMSCs 的 ALP 活性最高。



A. 牵张力(2 000 $\mu\epsilon$)



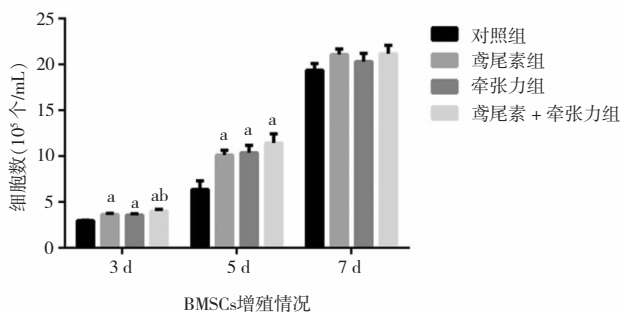
B. 静态

注: a, 与对照组比较, $P<0.05$

图 5 ALP 活性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 鸢尾素和牵张力对 BMSCs 增殖的影响

3 d 时,与对照组比较,鸢尾素组($P=0.001$)、牵张力组($P=0.001$)、鸢尾素+牵张力组($P=0.000$)均可明显促进 BMSCs 增殖。此外,与牵张力组比较,鸢尾素+牵张力组($P=0.024$)促进 BMSCs 增殖的作用更强;5 d 时也观察到类似效应;7 d 时,各组间未发现明显统计学差异。而进一步的析因方差分析结果显示,5 d 时,鸢尾素+牵张力对 BMSCs 的增殖作用表现出交互效应($F=7.868, P=0.023$)(图 6、表 2)。



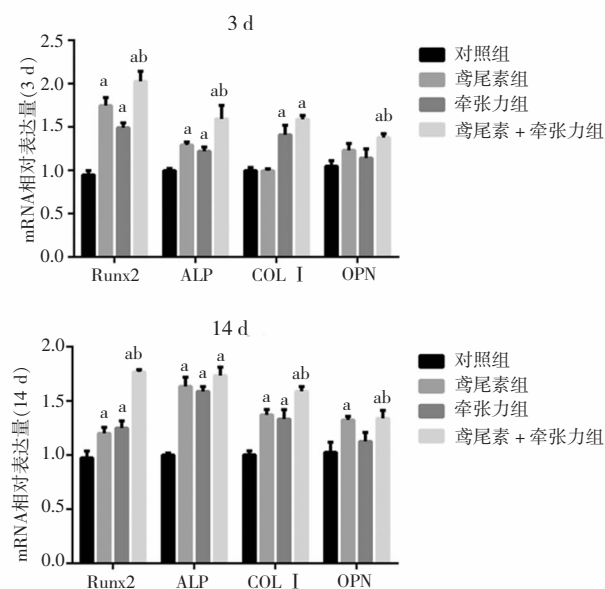
注:a,与对照组比较, $P<0.01$;b:与牵张力组比较, $P<0.05$

图 6 鸢尾素和牵张力对 BMSCs 增殖影响

2.4 qRT-PCR 结果

3 d 时,与对照组比较,鸢尾素+牵张力组 Runx2、ALP、COL-I、OPN 的 mRNA 表达均明显升高($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.002$)。此外,与牵张力组比较,鸢尾素+牵张力组 Runx2、ALP、COL-I、OPN 的 mRNA 表达也明显升高($P=0.000, P=0.002, P=0.021, P=0.014$)(图 7、表 3)。14 d 时,与对照组比较,鸢尾素+牵张力组 Runx2、ALP、COL-I、OPN 的 mRNA 表达均明显升高($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.002$)。而与牵张力组相比较,鸢尾素+牵张力组 Runx2、COL-I、OPN 的 mRNA 表达也明显升高($P=0.008, P=0.000, P=0.000$)。

$P=0.014$)。进一步的析因方差分析可知鸢尾素和牵张力联合作用可促进成骨标志物 Runx2、ALP、COL-I、OPN 的 mRNA 表达升高(图 7、表 4)。



注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与牵张力组相比, $P<0.05$

图 7 qRT-PCR 结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 Western blot 结果

2.5.1 RUNX2 蛋白表达情况 与对照组(1.000 ± 0.000)、牵张力组(1.700 ± 0.160)比较,鸢尾素+牵张力组(2.178 ± 0.206)可促进 Runx2 蛋白的表达($P=0.000, P=0.012$)。鸢尾素组 Runx2 蛋白表达为 1.903 ± 0.160 ,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.001$)。析因方差分析可知鸢尾素($F=61.44, P=0.000$)、牵张力($F=31.026, P=0.001$)可促进 Runx2 蛋白表达且鸢尾素+牵张力具有协同作用($F=5.829, P=0.042$)(图 8)。

表 2 BMSCs 增殖情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间	对照组	鸢尾素组	牵张力组	鸢尾素 + 牵张力组	F 值(A)	P 值(A)	F 值(B)	P 值(B)	F 值(AB)	P 值(AB)
3 d	2.960 ± 0.056	3.627 ± 0.132 ^a	3.580 ± 0.135 ^a	4.007 ± 0.193 ^{ab}	47.145	0.000	39.439	0.000	2.272	0.170
5 d	6.373 ± 0.919	10.113 ± 0.514 ^a	10.367 ± 0.802 ^a	11.433 ± 0.986 ^a	25.436	0.001	31.081	0.001	7.868	0.023
7 d	19.367 ± 0.723	21.067 ± 0.603	20.300 ± 0.900	21.167 ± 0.907	7.843	0.023	1.271	0.292	0.827	0.390

注:A,鸢尾素因素;B:牵张力因素;AB:鸢尾素因素 + 牵张力因素;a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与牵张力组比较, $P<0.05$

表 3 3 d mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

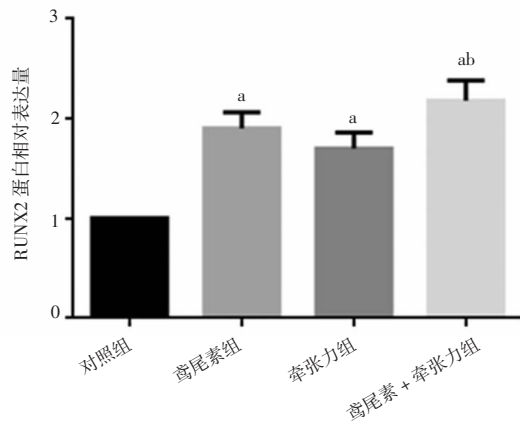
指标	对照组	鸢尾素组	牵张力组	鸢尾素 + 牵张力组	F 值(A)	P 值(A)	F 值(B)	P 值(B)	F 值(AB)	P 值(AB)
Runx2	0.947 ± 0.050	1.748 ± 0.091 ^a	1.491 ± 0.056 ^a	2.027 ± 0.115 ^{ab}	197.939	0.000	75.076	0.000	7.784	0.024
ALP	0.997 ± 0.025	1.290 ± 0.036 ^a	1.219 ± 0.049 ^a	1.593 ± 0.155 ^{ab}	47.034	0.000	29.155	0.001	0.681	0.433
Col I	0.997 ± 0.035	0.996 ± 0.021	1.410 ± 0.110 ^a	1.588 ± 0.045 ^a	5.936	0.041	192.220	0.000	6.071	0.039
OPN	1.047 ± 0.064	1.231 ± 0.079	1.140 ± 0.106	1.377 ± 0.045 ^{ab}	22.533	0.001	7.311	0.027	0.352	0.569

注:A,鸢尾素因素;B:牵张力因素;AB:鸢尾素因素 + 牵张力因素;a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与牵张力组比较, $P<0.05$

表 4 14 d mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

指标	对照组	鸢尾素组	牵张力组	鸢尾素 + 牵张力组	F 值 (A)	P 值 (A)	F 值 (B)	P 值 (B)	F 值 (AB)	P 值 (AB)
Runx2	0.974 ± 0.064	1.201 ± 0.055 ^a	1.250 ± 0.067 ^a	1.767 ± 0.023 ^{ab}	138.721	0.000	177.074	0.000	20.942	0.002
ALP	1.000 ± 0.020	1.635 ± 0.084 ^a	1.587 ± 0.045 ^a	1.735 ± 0.077 ^a	118.960	0.000	91.567	0.000	45.995	0.000
Col I	1.003 ± 0.035	1.371 ± 0.050 ^a	1.332 ± 0.088 ^a	1.590 ± 0.043 ^{ab}	88.867	0.000	67.952	0.000	2.730	0.002
OPN	1.027 ± 0.093	1.324 ± 0.033 ^a	1.125 ± 0.084	1.339 ± 0.074 ^{ab}	35.287	0.000	1.733	0.224	0.952	0.358

注:A, 鸢尾素因素; B, 牵张力因素; AB: 鸢尾素因素 + 牵张力因素; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与牵张力组比较, $P < 0.05$



注:a, 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与牵张力组比较, $P < 0.05$

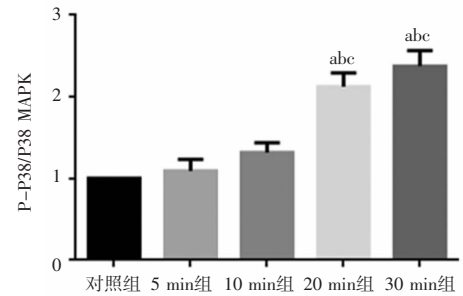
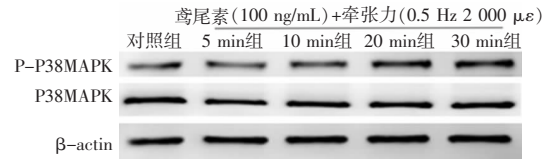
图 8 Runx2 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5.2 P38/ERK MAPK 信号通路 在鸢尾素+牵张力联合作用下 BMSCs 在 5~30 min 内磷酸化 P38 呈现逐渐升高趋势, 峰值出现在 30 min, 但总 P38 量未改变。磷酸化 ERK1/2 呈先升高后降低的趋势, 峰值出现在 20 min, 总 ERK1/2 量未改变。差异具有统计学意义(图 9, 表 5)。结果提示:P38/ERK MAPK 通路可能在鸢尾素+牵张力联合作用促进 BMSCs 成骨向分化过程中起重要作用。

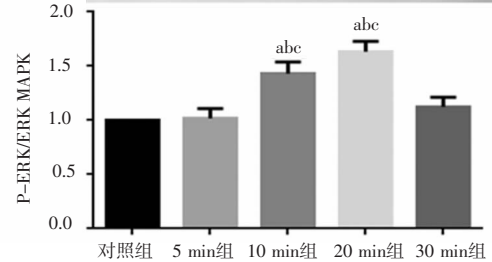
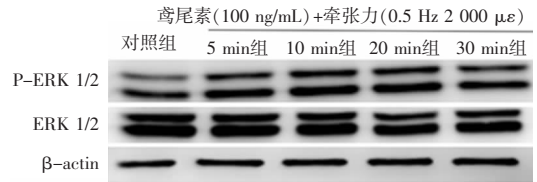
表 5 P38/ERK MAPK 通路表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	P-P38/P38	P-ERK/ERK
对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
5 min 组	1.092 ± 0.145	1.019 ± 0.897
10 min 组	1.320 ± 0.118	1.430 ± 0.108 ^{abc}
20 min 组	2.125 ± 0.169 ^{abc}	1.632 ± 0.097 ^{abc}
30 min 组	2.375 ± 0.192 ^{abc}	1.123 ± 0.092
F 值	58.530	31.000
P 值	0.000	0.000

注:a, 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 5 min 组比较, $P < 0.01$; P-P38/P38 c: 与 10 min 组比较, $P < 0.01$; P-ERK/ERK c: 与 30 min 组比较, $P < 0.01$



注:a, 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 5 min 组比较, $P < 0.01$; P-P38/P38 c: 与 10 min 组比较, $P < 0.01$; P-ERK/ERK c: 与 30 min 组比较, $P < 0.01$



注:a, 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 5 min 组比较, $P < 0.01$; P-P38/P38 c: 与 10 min 组比较, $P < 0.01$; P-ERK/ERK c: 与 30 min 组比较, $P < 0.01$

图 9 P38/ERK MAPK 通路表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

本实验应用四点弯曲加力装置给予 BMSCs 短暂力学刺激(2 000 $\mu\epsilon$, 60 min)来模拟临床单次牵张效应。四点弯曲加力装置是一款经典的力学加载装置^[11]。Han^[10]和 Qi^[12]等研究发现使用此装置对细胞

施加的周期性张应力(2 000 $\mu\epsilon$)更接近体内正常生理牵张成骨状态,过小的力学刺激细胞反应较弱,过大的力学刺激易引起细胞凋亡,同时还发现了适宜的力学刺激可以促进 BMSCs 成骨向分化。

鸢尾素通过骨骼肌与脂肪组织、肝脏、大脑及其他外周组织相联系而发挥关键作用^[13]。最新研究表明,运动是骨骼肌分泌鸢尾素的第一诱发因素,骨骼肌分泌 PGC-1 α 下降可导致 FNDC5 和鸢尾素表达下降,三者蛋白表达量的减少抑制了白色脂肪组织的棕色化,间接引发肌肉萎缩^[14-15]。前期研究结果提示在体内运动、骨骼肌、鸢尾素三者的关系非常密切^[16-17]。本实验结果提示静态、牵张力作用下,100 ng/mL 的鸢尾素可能为作用 BMSCs 的最适浓度。

前期体外研究揭示^[3],从运动后的小鼠中提取高表达鸢尾素的成肌细胞,将其与成骨细胞共培养,发现鸢尾素能直接作用于成骨细胞,促进其分化。Qiao 等^[18]研究也发现,鸢尾素不仅能够上调成骨细胞的骨诱导转录因子(Runx2、Osterix/sp7)以及成骨细胞组织特异性分化标志物(ALP、I 型胶原、OCN、OPN)的表达,还能增加成骨细胞 ALP 的活性和钙盐的沉积,提示鸢尾素能促进成骨细胞的增殖、分化和矿化。本实验的结果与前期研究基本一致,提示在牵张力作用下,鸢尾素能够促进 BMSCs 增殖和成骨向分化,此效应可能通过激活 P38、ERK 1/2 MAPK 通路来发挥作用。

众所周知,功能锻炼可以加快骨折愈合的速度。然而在临床上,DO 患者通常受制于牵张区域内新骨形成的速度和质量,不可能早期进行功能锻炼,进而骨折愈合速度慢,治疗周期时间长,随之而来的并发症也较多。因此,如果能在 DO 患者中应用鸢尾素来模拟功能锻炼的骨合成代谢作用,对于缩短 DO 的治疗周期,减少 DO 的并发症具有重要的临床意义。

综上所述,本研究证实了鸢尾素可促进静态和牵张力作用下 BMSCs 增殖及成骨向分化。这为临床探索使用鸢尾素来提高成骨效果,缩短牵张成骨治疗周期提供了理论依据,但此结果仍需进一步体内实验来支持。

参 考 文 献

- [1] Vega LG, Bilbao A. Alveolar distraction osteogenesis for dental implant preparation: an update[J]. Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America, 2010, 22(3): 369-385.
- [2] Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. Nature, 2012, 481(7382): 463-468.

- [3] Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, et al. irisin enhances osteoblast differentiation in vitro[J]. International Journal of Endocrinology, 2014, 2014: 902186.
- [4] Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(39): 12157-12162.
- [5] Colaianni G, Grano M. Role of irisin on the bone-muscle functional unit[J]. Bonekey Reports, 2015, 4: 765.
- [6] Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, et al. Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity — correlation with body mass index[J]. Peptides, 2013, 39: 125-130.
- [7] Polyzos SA, Anastasilakis AD, Efstathiadou ZA, et al. irisin in metabolic diseases[J]. Endocrine, 2018, 59(2): 260-274.
- [8] Gouveia MC, Vella JP, Cafeo FR, et al. Association between irisin and major chronic diseases: a review[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2016, 20(19): 4072-4077.
- [9] Mahgoub MO, D'Souza C, Al Darmaki R, et al. An update on the role of irisin in the regulation of endocrine and metabolic functions[J]. Peptides, 2018, 104: 15-23.
- [10] Han LC, Qi MC, Li JH, et al. Response of bone marrow mesenchymal stem cells to mechanical stretch and gene expression of transforming growth factor- β and insulin-like growth factor- II under mechanical strain[J]. West China Journal of Stomatology, 2009, 27(4): 381-385.
- [11] Bottlang M, Simnacher M, Claes L, et al. A cell strain system for small homogeneous strain applications[J]. Biomedizinische Technik Biomedical Engineering, 1997, 42(11): 305-309.
- [12] Qi MC, Hu J, Han LC, et al. Mechanical strain induces osteogenic differentiation: Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells[J]. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2008, 37(5): 453-458.
- [13] Kim HJ, So B, Choi M, et al. Resistance exercise training increases the expression of irisin concomitant with improvement of muscle function in aging mice and humans[J]. Experimental Gerontology, 2015, 70: 11-17.
- [14] Sanchez-Delgado G, Martinez-Tellez B, Olza J, et al. Role of exercise in the activation of brown adipose tissue[J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2015, 67(1): 21-32.
- [15] Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise[J]. Metabolism: Clinical and Experimental, 2012, 61(12): 1725-1738.
- [16] Colaianni G, Cinti S, Colucci S, et al. irisin and musculoskeletal health[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2017, 1402(1): 5-9.
- [17] Colaianni G, Mongelli T, Cuscito C, et al. irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 2811.
- [18] Qiao X, Nie Y, Ma Y, et al. irisin promotes osteoblast proliferation and differentiation via activating the MAP kinase signaling pathways[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 18732.

(责任编辑:唐秋姗)