

## 基因与细胞治疗

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000154

## Dkk1对骨形态发生蛋白9诱导间充质干细胞成骨分化的影响

廖军义<sup>1</sup>,林良波<sup>1</sup>,周 年<sup>1</sup>,梁 熙<sup>1</sup>,胡 宁<sup>1</sup>,毕 杨<sup>2</sup>,黄 伟<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属儿童医院干细胞实验室,重庆 400014)

**【摘要】目的:**探讨经典 Wnt 信号通路胞外拮抗因子 Dkk1 对骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成骨分化的影响。**方法:**以 C3H10T1/2 为目的细胞,通过重组腺病毒介导 BMP9 过表达,联用重组腺病毒 Dkk1 抑制经典 Wnt 信号通路。检测各处理组碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性变化、钙盐沉积、骨钙素(osteocalcin, OC)、骨桥素(osteopontin, OPN)变化;体内异位成骨实验分析 Dkk1 对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化的影响。**结果:**BMP9 可诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化;Dkk1 显著降低 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 ALP 活性( $F=1\ 467.21, P=0.000$ )、钙盐沉积、OC( $F=32.95, P=0.000$ )和 OPN( $F=127.23, P=0.000$ )蛋白表达;异位成骨模型中 Dkk1 抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 成骨分化和骨块成熟。**结论:**Wnt 信号通路胞外拮抗因子 Dkk1 可降低 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 成骨分化, BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化可能需要经典的 Wnt 信号通路参与。

**【关键词】**骨形态发生蛋白 9;经典 Wnt 信号通路;Dkk1;间充质干细胞;骨向分化

**【中图分类号】**R329.2\*8

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2013-08-31

## Effects of Dkk1 on bone morphogenetic protein 9 induced mesenchymal stem cells osteogenic differentiation

Liao Junyi<sup>1</sup>, Lin Liangbo<sup>1</sup>, Zhou Nian<sup>1</sup>, Liang Xi<sup>1</sup>, Hu Ning<sup>1</sup>, Bi Yang<sup>2</sup>, Huang Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Stem Cells Laboratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of canonical Wnt signaling antagonist Dickkopf1 (Dkk1) on bone morphogenetic protein 9 (BMP9) induced C3H10T1/2 mesenchymal stem cells (MSCs) osteogenic differentiation. **Methods:** C3H10T1/2 cells were infected by recombinant adenovirus expressing green fluorescent protein (GFP), BMP9 and/or Dkk1. Early osteogenic marker, alkaline phosphatase (ALP) activity was detected by ALP activity assay and staining. Later osteogenic marker calcium deposition was determined by Alizarin Red S staining. Western blot was used to detect the middle osteogenic marker osteopontin (OPN) and osteocalcin (OC) at protein level. Ectopic bone formation assay was carried out to make sure the influence of Dkk1 on BMP9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stems cells in vivo. **Results:** Dkk1 effectively inhibited BMP9 induced ALP activity, calcium deposition, OPN and OC protein expression in C3H10T1/2 cells. Athymic nude mice subcutaneous injection C3H10T1/2 cells showed that Dkk1 inhibited BMP9 induced ectopic bone formation and calcification degree in vivo. **Conclusions:** Wnt signaling antagonist Dkk1 can dramatically inhibit BMP9 induced C3H10T1/2 cells osteogenic differentiation and BMP9 induced osteogenic differentiation may require functional canonical Wnt signaling.

**【Key words】**bone morphogenetic protein 9; canonical Wnt signaling; dickkopf1; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能,能骨向分化并形成骨组织,是组织工程骨理想的种子细胞<sup>[1-2]</sup>。MSCs 成骨分化过程受多种信号通路调控<sup>[3]</sup>,而阐明信号因子之间的

相互作用及具体分子机制对组织工程骨的发展具有重要意义<sup>[4]</sup>。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族成员,已发现至少 15 种 BMPs,其成骨效应已得到广泛认可并已运用于临床<sup>[5-6]</sup>。骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)是目前发现成骨效应最强的 BMPs 之一<sup>[7]</sup>,其在体内

作者介绍:廖军义, Email: liaojunyi2011@126.com,

研究方向:组织工程骨与软骨。

通信作者:黄 伟, Email: huangwei68@263.net。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31070875)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000154.html>

外都能诱导 MSCs 成骨分化,且与其他信号通路发生复杂“串话”,如经典 Wnt 信号通路<sup>[8]</sup>。

经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是胚胎与器官发育的主要信号通路之一,可直接上调成骨关键因子 Runx2,促进成骨分化<sup>[9]</sup>。胞外拮抗因子 Dkk1(dickkopf1)是经典 Wnt 信号通路的重要调控因子<sup>[10]</sup>。已有转基因鼠模型证实,Dkk1 高表达可导致骨量减少和前肢缺损<sup>[11]</sup>。本课题前期研究已经证实,经典 Wnt 信号通路对 BMP9 诱导的成骨分化具有促进作用<sup>[12]</sup>。本研究探讨 Dkk1 对 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化的影响,有助于深入揭示 BMP9 与经典 Wnt 信号通路对成骨分化的相互作用及分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞与重组腺病毒 小鼠骨髓来源 MSCs 株 C3H10T1/2、表达 BMP9 的重组腺病毒 AdBMP9、表达 Dkk1 的重组腺病毒 AdDkk1、表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的对照组重组腺病毒 AdGFP、人胚肾 293 细胞均由美国芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠。实验动物购自重庆医科大学实验动物中心,选取 4~6 周龄雄性免疫缺陷小鼠,喂养于重庆医科大学无菌层流动物房,食物、水均消毒后自由进食。

1.1.2 试剂 DMEM 高糖培养基、优质胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶购自 Hyclone 公司。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色及定量试剂盒购自 BD 公司。细胞裂解液购自 Promega 公司;萘酚 AS-MX 碱性磷酸盐溶液、快速蓝重氮盐、茜素红 S、维生素 C、 $\beta$ -磷酸甘油购自 Sigma 公司。鼠多克隆抗体骨桥素(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OC)购自美国 Santa cruz 公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体购上海碧云天生物技术有限公司。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的扩增 将 HEK293 细胞在 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中培养,待细胞密度达 60%~70%时加入适量病毒进行感染。4~5 d 后,293 细胞病毒空泡化明显、变圆、脱落,约有 50%细胞漂浮时用-80℃/37℃反复冻融的方法裂解细胞并收集细胞裂解液上清,备用。

1.2.2 C3H10T1/2 细胞诱导分化 C3H10T1/2 细胞用完全培养基在 5%CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中培养。待生长至 80%融合时,将细胞植入培养板,接种密度约 30%,待细胞生长 24 h 后,分别加入适量重组腺病毒 AdGFP、AdBMP9、AdDkk1 和 AdBMP9+AdDkk1 诱导其分化,并设空白对照,感染率控制在 20%~30%。

1.2.3 ALP 染色 诱导分化 7 d 后,弃培养基,用 PBS 洗涤 2 次,加入萘酚 AS-MX 碱性磷酸盐溶液和快速重氮盐混合液

500  $\mu$ l/孔,避光 30 min;PBS 洗涤后镜下成像,阳性反应呈蓝紫色。

1.2.4 ALP 定量检测 C3H10T1/2 诱导分化 7 d 后,弃培养基,用 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 100  $\mu$ l 细胞裂解液裂解 5 min 后,13 000 r/min 离心 3 min,取 5  $\mu$ l 上清与 15  $\mu$ l Lupo buffer (1 ml 二乙醇胺、10 ml L-高精氨酸和 50  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, pH 9.8, 补加 ddH<sub>2</sub>O 至 100 ml)和 5  $\mu$ l ALP 底物混匀,避光静置 30 min,于酶标仪检测 562 nm 波长处吸光度(absorbance, A)值。并用 BCA 法检测细胞内总蛋白含量,校正 ALP 的定量结果。

1.2.5 茜素红 S 染色检测钙盐沉积 加入病毒 1 d 后,在 24 孔板中加入终浓度为 50  $\mu$ g/ml 的维生素 C 和 10 mmol/L 的  $\beta$ -磷酸甘油的钙盐培养基培养 14 d 后进行茜素红 S 染色:吸弃孔内培养基,用 PBS 洗涤 3 次,洗净;每孔加入 200  $\mu$ l 2.5%的戊二醛固定 10 min,弃去戊二醛,PBS 洗涤 3 次,洗净;每孔加入 250  $\mu$ l 2%的茜素红 S,37℃孵育 30 min,出现红色沉淀即将染液弃去;PBS 洗涤净后镜下观察和成像保存。

1.2.6 Western blot 诱导 9 d 后,用细胞裂解液裂解细胞并提取细胞总蛋白。用 BCA 法测定总蛋白浓度,然后经 SDS-PAGE 蛋白电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭、4℃敷育一抗过夜、洗膜、室温敷二抗 2 h 等过程后,化学发光并保存图像,用 Quantity one 软件进行光密度分析,目的蛋白光密度/内参蛋白光密度得到相对的蛋白表达量。

1.2.7 动物实验和组织染色 C3H10T1/2 细胞接种于直径 100 mm 的培养皿中,接种密度为 30%左右,待细胞贴壁后分别加入适量 AdGFP、AdBMP9、AdDkk1 和 AdBMP9+AdDkk1 诱导细胞分化,继续培养 24 h,弃去细胞培养皿中的培养基,用胰酶 2 ml 消化细胞,8 ml 含 10%血清的 DMEM 中和,吸管吹打成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 3 min,弃去上清,用含 100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 PBS 100  $\mu$ l 重悬后注射于裸鼠背部皮下,每周观察裸鼠皮下成骨包块的大小。细胞接种 5 周后,断颈处死裸鼠,取皮下包块观察其大小。用福尔马林固定包块,经脱钙、石蜡包埋切片后,行 HE、Masson Tricrome 染色,成像并保存。

### 1.3 统计分析

运用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计分析采用单因素方差分析,组间两两间比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 Dkk1 降低 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 ALP 活性

ALP 是早期成骨分化的标志。ALP 染色显示 BMP9 诱导后的 C3H10T1/2 蓝染细胞数明显增多,而 Dkk1 与 BMP9 共同作用组蓝染细胞明显减少(图 1)。ALP 活性定量检测结果:GFP 组=(7 343.35 $\pm$ 325.22) nmol/(min $\cdot$ mg),BMP9 组=(167 832.25 $\pm$ 6 712.80) nmol/(min $\cdot$ mg),BMP9+Dkk1 组=(41 135.33 $\pm$ 995.8) nmol/(min $\cdot$ mg),Dkk1 组=(10 101.59 $\pm$ 855.30) nmol/(min $\cdot$ mg)。总体结果行方差分析提示各组间均数差异具有统计学意义( $F=1 467.22, P=0.000$ )。进一步行

LSD-*t* 组间两两比较: BMP9 组与对照组相比 C3H10T1/2 细胞 ALP 活性增高 ( $P=0.000$ ); 当 Dkk1 与 BMP9 联合作用于 C3H10T1/2 细胞时, BMP9+Dkk1 组 ALP 活性较 BMP9 组降低 ( $P=0.000$ )。此实验结果提示 Dkk1 对 BMP9 诱导的早期成骨分化具有抑制作用。

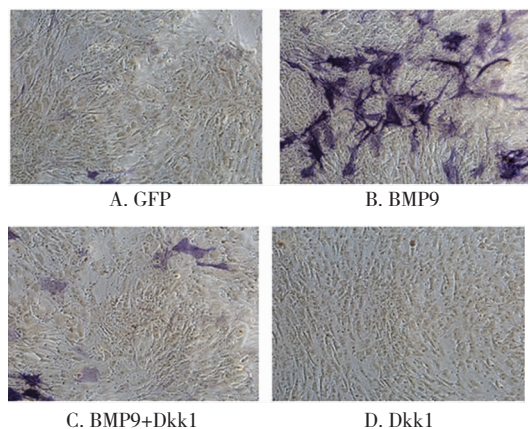


图 1 不同处理组 ALP 染色情况 (100 ×)

Fig.1 ALP staining for ALP activity in different treatment groups (100 ×)

## 2.2 Dkk1 抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积

钙盐沉积是晚期成骨分化的检测指标。C3H10T1/2 经诱导分化 14 d 后, 通过茜素红 S 染色反应钙盐沉积; BMP9 处理组能明显促进细胞内钙盐沉积, 而 Dkk1 与 BMP9 协同处理组钙盐沉积明显减少 (图 2)。此实验结果提示 Dkk1 对 BMP9 诱导的晚期成骨分化具有抑制作用。

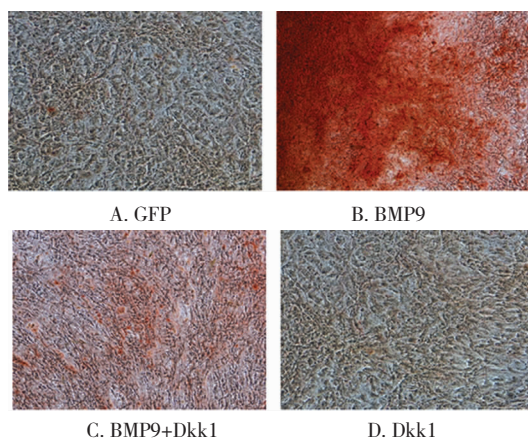


图 2 不同处理组茜素红染色情况 (100 ×)

Fig.2 Alizarin Red S staining for calcium deposition in different treatment groups (100 ×)

## 2.3 Dkk1 抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞骨标志物 OC、OPN 的表达

OC 和 OPN 是成骨分化的标志物。C3H10T1/2 经诱导分化 9 d 后, Western blot 检测 OC 和 OPN 的表达 (图 3)。用 Quantity One 软件行光密度分析, 目的蛋白光密度/内参蛋白光密度得到 OC 和 OPN 蛋白相对表达量 (表 1), OC 和 OPN

蛋白相对表达量总体结果行单因素方差分析各间组均数差异具有统计学意义 (OC:  $F=32.95$ ,  $P=0.000$ ; OPN:  $F=127.23$ ,  $P=0.000$ )。进一步行 LSD-*t* 检验, 与 GFP 组相比 BMP9 组 OC ( $P=0.000$ ) 和 OPN ( $P=0.000$ ) 的表达明显增高, 而 Dkk1 与 BMP9 共同感染组 OC ( $P=0.000$ ) 和 OPN ( $P=0.000$ ) 的表达较 BMP9 组降低 (表 1)。此实验结果从蛋白水平证实 Dkk1 抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 成骨分化。

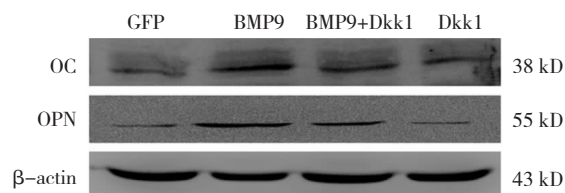


图 3 不同处理组 OC、OPN 蛋白表达情况

Fig.3 Western blot for OC and OPN protein expression in different treatment groups

表 1 不同处理组 OC 和 OPN 蛋白的相对表达量

Tab.1 Relative expression of OC and OPN protein in different treatment groups

| 组别       | GFP         | BMP9                     | BMP9+Dkk1                | Dkk1                     |
|----------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| OC 相对表达  | 0.49 ± 0.01 | 0.80 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.54 ± 0.04 <sup>b</sup> | 0.56 ± 0.05 <sup>b</sup> |
| OPN 相对表达 | 0.25 ± 0.03 | 0.82 ± 0.03 <sup>a</sup> | 0.53 ± 0.04 <sup>b</sup> | 0.28 ± 0.05 <sup>b</sup> |

注: a, 与对照组相比差异具有统计学意义; b, 与 BMP9 组相比差异具有统计学意义

## 2.4 Dkk1 抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞裸鼠体内异位成骨

将不同处理组的 C3H10T1/2 细胞重悬后接种于裸鼠双腿背侧皮下, 5 周后取出包块, 并行 HE、Masson Tricrome 染色。HE 染色可观察骨块骨小梁的形成情况, Masson Tricrome 染色可以使骨组织胶原蓝染。大体结果显示: BMP9 组形成明显包块, 质地偏硬; BMP9+Dkk1 包块明显小于 BMP9 组, 质地偏软; GFP 与 Dkk1 单独作用组无明显包块形成 (图 4)。组织染色结果显示: BMP9 组骨小梁形成较丰富, 基质较成熟; 而 BMP9+Dkk1 组骨小梁形成较 BMP9 组明显减少, 基质蓝染较 BMP9 组明显减少 (图 5)。这表明经典 Wnt 信号通路胞外拮抗因子 Dkk1 可抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 裸鼠皮下异位成骨, 骨块大小和成熟度均降低。

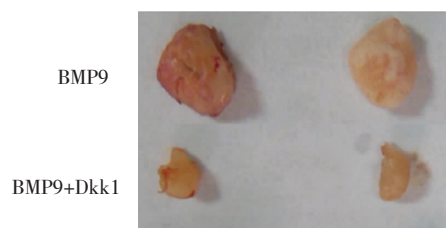


图 4 不同处理组异位成骨包块大体形态

Fig.4 Gross morphology of ectopic mass in different treatment groups

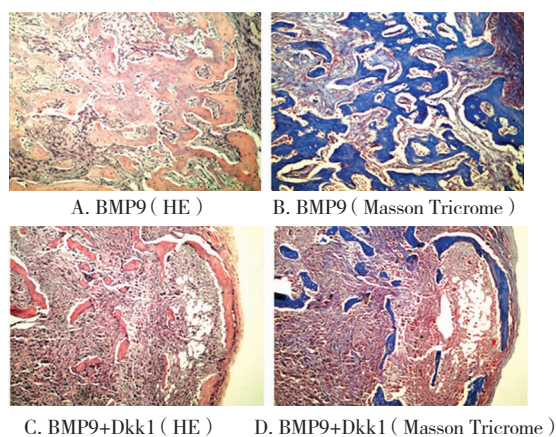


图 5 不同处理组异位成骨包块 HE、Masson Tricrome 染色情况 (100 ×)

Fig.5 HE and Masson Tricrome staining of ectopic mass in different treatment groups (100 ×)

### 3 讨 论

骨再生和骨修复是目前组织工程骨的研究热点。MSCs 具有骨向分化潜能,且具有来源充足、取材简便等优点,是理想的种子细胞。BMP9 作为 BMPs 家族成员之一,已发现其具有诱导 MSCs 成骨分化的能力,且其成骨效应优于其他 BMPs 家族成员如 BMP2、BMP6、BMP7 等<sup>[8,13]</sup>。已有学者发现 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化与 Smads、p38 和 ERK1/2 信号通路及其他生长因子相关<sup>[14-16]</sup>。经典的 Wnt 信号通路在骨形成过程中同样起到非常重要的作用<sup>[17]</sup>, Wnt3a 与细胞膜上的 Frizzled 和 LRP5/6 受体结合,激活下游的  $\beta$ -catenin,促进成骨分化<sup>[18]</sup>。目前研究发现 BMP 信号通路与经典 Wnt 信号通路存在复杂的“串话”<sup>[19-21]</sup>。本课题组的前期研究也证实 Wnt/ $\beta$ -catenin 能够有效协同 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化,但具体的分子机制不清楚。

Dkk1 是经典 Wnt 信号通路的抑制因子,可与 Wnt 信号通路受体 LRP5/6 结合从而抑制 Wnt3a 发挥作用,Dkk1 与 Wnt3a 一起调节经典 Wnt 信号通路下游  $\beta$ -catenin 活化及经典 Wnt 信号通路的功能<sup>[22]</sup>。同时,Dkk1 在经典 Wnt 信号通路介导的骨形成和骨代谢过程中发挥了重要的作用,被视为骨相关疾病如骨质疏松、骨修复的治疗靶点<sup>[23]</sup>。本实验证实了经典 Wnt 信号通路抑制因子 Dkk1 能够抑制 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化,为进一步探讨经典 Wnt 信号通路与 BMP9 信号通路之间的“串话”及相互联系提供了重要的研究靶点。

BMP9 能够诱导 MSCs 早期及晚期成骨分化,并且裸鼠皮下注射转染 BMP9 的 MSCs 皮下成骨效应优于 BMP2、BMP6、BMP7 等<sup>[8]</sup>。本研究通过检测早期

成骨指标 ALP 活性,晚期成骨分化指标钙盐沉积,及成骨标志物 OC 和 OPN 蛋白水平的表达,证实了 Dkk1 可抑制 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化。裸鼠皮下注射成骨实验进一步印证了 Dkk1 对 BMP9 诱导的 MSCs 体内成骨分化的抑制作用。Li 等<sup>[11]</sup>证实 Dkk1 通过抑制经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路使破骨细胞基质形成和矿化减少,同时过表达 Dkk1 的转基因鼠骨形成和骨量明显减少;Ke 等<sup>[23]</sup>发现在动物模型中中和 Dkk1 可以促进骨形成和骨修复;Heiland 等<sup>[24]</sup>研究发现炎症可以通过激活 Dkk1 的表达进而促进骨丢失,而中和 Dkk1 可以减少炎症导致的骨丢失;Guo 等<sup>[25]</sup>发现运用 Dkk1 抑制 Wnt3a 信号通路后,可以抑制 PTH 诱导的骨形成。这些研究都表明 Dkk1 能够抑制经典 Wnt 信号通路,进一步影响骨形成和代谢。本课题组体内外实验结果均表明 BMP9 能够诱导 MSCs 早期、晚期成骨分化,而 Dkk1 对这一过程具有抑制作用,从而推测经典 Wnt 信号通路在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化过程中发挥了重要的协同作用。

阐明 BMP9 信号与经典 Wnt 信号通路之间的关系对骨形成和骨再生具有重要的意义。本实验证实了经典 Wnt 信号通路抑制因子 Dkk1 对 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化的抑制作用,为深入探讨经典 Wnt 信号通路对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化的分子机制研究提供了新的研究靶点,研究 Dkk1 与 BMP9 发生作用的关键节点分子是下一步的重点研究方向。

### 参 考 文 献

- [1] Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(7): 1608-1619.
- [2] Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches[J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 20: 121-133.
- [3] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(10): 1226-1238.
- [4] Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development[J]. *Dev Cell*, 2002, 2(4): 389-406.
- [5] Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications[J]. *ANZ J Surg*, 2007, 77(8): 626-631.
- [6] Ronga M, Fagetti A, Canton G, et al. Clinical applications of growth factors in bone injuries: Experience with BMPs[J]. *Injury*, 2013, 44(s1): S34-S39.
- [7] Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(17): 1312-1320.
- [8] Lamplot JD, Qin J, Nan G, et al. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis[J]. *Am J Stem Cells*, 2013, 2(1): 1-21.

## 基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000080

## 人脐血清对人脐带血间充质干细胞生物学特征与衰老的影响

王 爽, 范振海, 刘祖林, 王钰莹, 方 宁, 喻皇飞, 刘金伟, 余丽梅

(遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 遵义 563003)

**【摘要】目的:**探讨人脐血清(human umbilical cord blood serum, CBS)对体外培养人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)基本生物学特征的影响。**方法:**密度梯度离心分离脐带血单个核细胞, 以含 3% CBS 加 7% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(CBS 组)或 10% FBS(FBS 组)的完全培养基培养 hUCB-MSCs, 流式细胞术检测细胞表面分子与细胞周期, 显微镜下测定细胞表面积和表达  $\beta$ -半乳糖苷酶细胞百分率, MTT 法检测光密度值、绘制生长曲线。**结果:** CBS 组和 FBS 组均表达 CD44、CD105、CD90、CD73, 不表达 CD45、CD34、CD11b、CD19 和人白细胞 DR 抗原(human leukocyte antigen DR, HLA-DR), 但与 FBS 组比较, CBS 组表达 CD90 细胞百分率更低, G0/G1 期细胞比例较少, 细胞增殖指数较高( $P < 0.05$ )且细胞表面积也明显更小( $P < 0.05$ )。CBS 组生长曲线较 FBS 组左移, 峰值更高, 细胞倍增时间 48.37 h, FBS 组则为 54.43 h。FBS 组  $\beta$ -gal 染色阳性细胞百分率明显高于 CBS 组( $P < 0.05$ )。**结论:**部分 CBS 合用 FBS 培养 hUCB-MSCs 能更好地促进细胞增殖, 并更好地保持 hUCB-MSCs 的基本生物学特征和延缓细胞的衰老。

**【关键词】**人脐血清; 脐带血间充质干细胞; 生物学特征; 衰老**【中图分类号】**Q813.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-04-02**作者简介:**王 爽, Email: wangshuang116@163.com,

研究方向: 干细胞生物学与衰老。

**通信作者:**余丽梅, Email: ylm720@sina.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号: 30860388)、遵义市重大科技项目培养与科技人才培养计划资助项目[编号: 遵科培(2009)02 号]。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000080.html>

- [9] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(39): 33132-33140.
- [10] Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells[J]. *Nature*, 1999, 398(6726): 422-426.
- [11] Li J, Sarosi I, Cattle RC, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia[J]. *Bone*, 2006, 39(4): 754-766.
- [12] 张 晓, 徐道晶, 黄 伟, 等. Wnt3a 协同 BMP9 调控间充质干细胞成骨分化及机制研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(7): 565-568.
- [13] Xiang L, Liang C, Zhen-Yong K, et al. BMP9-induced osteogenic differentiation and bone formation of muscle-derived stem cells[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 610952.
- [14] Xu DJ, Zhao YZ, Wang J, et al. Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells[J]. *BMB Rep*, 2012, 45(4): 247-252.
- [15] Li RD, Deng ZL, Hu N, et al. Biphasic effects of TGF beta1 on BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *BMB Rep*, 2012, 45(9): 509-514.
- [16] Huang E, Zhu G, Jiang W, et al. Growth hormone synergizes with BMP9 in osteogenic differentiation by activating the JAK/STAT/IGF1 pathway in murine multilineage cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(7): 1566-1575.
- [17] Liu G, Vijayakumar S, Grumolato L, et al. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(1): 67-75.

- [18] Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/beta-catenin Signaling in the treatment of osteoporosis[J]. *Calcif Tissue Int*, 2013, 93(2): 121-132.
- [19] Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokines phingosine-1-phosphate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20764-20769.
- [20] Zhou S, Mizuno S, Glowacki J. Wnt pathway regulation by demineralized bone is approximated by both BMP-2 and TGF-beta1 signaling[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(4): 554-560.
- [21] Zhang R, Oyajobi BO, Harris SE, et al. Wnt/beta-catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts[J]. *Bone*, 2013, 52(1): 145-156.
- [22] Yamamoto H, Sakane H, Michiue T, et al. Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(1): 37-48.
- [23] Ke HZ, Richards WG, Li X, et al. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases[J]. *Endocr Rev*, 2012, 33(5): 747-783.
- [24] Heiland GR, Zwerina K, Baum W, et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(12): 2152-2159.
- [25] Guo J, Liu M, Yang D, et al. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation[J]. *Cell Metab*, 2010, 11(2): 161-171.

(责任编辑: 冉明会)