

干细胞研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000357

全反式视黄酸抑制大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化及其机制

舒秀兰, 刘祖银, 毕 杨, 陈 洁, 刘友学

(重庆医科大学附属儿童医院、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:探索全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, at-RA)对大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs)成骨分化的影响及其机制。**方法:**成骨诱导培养基诱导 rBMSCs, 加入不同浓度(0.1、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$) at-RA, 诱导第 7 天用组织化学染色法和检测试剂盒检测各组碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性, 第 21 天用茜素红染色后倒置显微镜观察并经提取法后检测钙盐沉积。于诱导第 7、14、21 天采用 real-time PCR 检测骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨桥素(osteopontin, OPN), 在上述时间点的基础上, 再增加第 1、3 天 2 个时间点检测 Runx2、Osterix 以及视黄酸受体 RARs(α 、 β) mRNA 表达。**结果:**rBMSCs 在成骨培养基诱导下经形态和茜素红染色观察证实能分化为成骨细胞, 加入 at-RA 后培养 7 d, ALP 活性较对照组增加($F=107.177, P=0.000$), 与对照组比较, at-RA 为 1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 2 组明显升高($P<0.05$)。然而经茜素红染色测定, ALP 升高组其钙盐沉积与对照组比较反而减少($F=57.554, P=0.000$)。选 at-RA 浓度 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 做 real-time PCR 检测, 与对照组相比在上述 3 个时间点 OCN($F=211.145, P=0.000$)、OPN($F=30.835, P=0.005$)表达均降低, Runx2($F=106.536, P=0.000$)、Osterix($F=452.546, P=0.000$)、RAR α ($F=253.159, P=0.000$)的表达在第 21 天均下降, 除 Osterix 表现为全程下调外, 其他 2 个基因也在多个时间点有统计学差异; 而 RAR β 表达则全程明显上升($F=2\ 294.377, P=0.000$)。**结论:**at-RA 抑制 rBMSCs 成骨分化, 其机制可能与 RAR α 的下调和 RAR β 的上调, 进而影响 Runx2、Osterix 的表达有关。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 全反式视黄酸; 调控

【中图分类号】R329.21; R331.22; R322.71; R977.21

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-02-20

All trans retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells

Shu Xiulan, Liu Zuyin, Bi Yang, Chen Jie, Liu Youxue

(Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorder, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effects of all trans retinoic acid(at-RA) on rat bone marrow mesenchymal stem cells(rBMSCs) osteogenic differentiation and mechanisms. **Methods:** The rBMSCs were isolated and induced to differentiate into osteoblast. At-RA at concentrations of 0.1, 1.0, 5.0 $\mu\text{mol/L}$ was added to the osteoblast induced medium. Morphology of the cultured cells was observed using inverted microscope respectively. On the 7th d, histochemical staining and alkaline phosphatase detection kit were used to test the alkaline phosphatase(ALP) activity. On the 21st d, alizarin red staining was employed to detect calcium salt deposition. During osteogenic induction, mRNA expressions of both osteocalcin(OCN) and osteopontin(OPN), biomarkers of osteoblast and related differentiation regulatory genes, i.e. Runx2, osterix of the osteogenesis regulation pathways and retinoic acid receptors(RARs, α , β) of the retinoic acid signaling pathways were measured using real-time PCR. **Results:** On the 7th d of differentiation, the activity of ALP of osteogenic induced rBMSCs with at-RA cells increased markedly compared with that without at-RA cells($F=107.177, P=0.000$). However, on the 21st d, the calcium salt deposition of at-RA treated rBMSCs significantly reduced compared with that of non-treated rBMSCs($F=57.554, P=0.000$). During osteogenic induction process, OCN, OPN, Runx2, Osterix and RAR α expressions of at-RA treated (5.0 $\mu\text{mol/L}$) rBMSCs decreased compared with those of non-treated rBMSCs(211.145, 0.000; 30.835, 0.005; 106.536, 0.000; 452.546, 0.000; 253.159, 0.000, respectively for F and P values) on the 21st d. Meanwhile, significantly increased RAR β expression was observed ($F=2\ 294.377, P=0.000$) during the whole differentiation process. **Conclusion:** at-RA can inhibit osteogenic differentiation of rBMSCs. The mechanism may be through up-regulating the expression of RAR β , down-regulating the expression of RAR α , and inhibiting the expressions of Runx2 and Osterix.

作者介绍:舒秀兰, Email: 592306594@qq.com,

研究方向: 儿童保健。

通信作者:刘友学, Email: lyxliu@126.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000357.html>

expressions of Runx2 and Osterix.

【Key words】bone mesenchymal stem cells; osteogenesis; all-trans retinoic acid; regulation

骨质疏松症是一种因骨代谢失衡导致骨量减少、骨脆性增加的全身性骨骼疾病。目前人们通过补充钙、复合维生素 AD 等来预防骨质疏松症。国外一些学者通过人群调查研究发现,补充维生素 A 超过有效的参考摄入量时可能会增加患骨质疏松症的风险^[1-2]。美国一项历时 18 年的关于对 72 337 名绝经期妇女维生素 A 摄入量与髌部骨折的风险性研究显示,当妇女摄入维生素 A 超过 3 000 $\mu\text{g}/\text{d}$ 时,将会增加患髌部骨折的风险,但增加 β -胡萝卜素摄入量与骨折风险没有明显关系^[3]。医学上认为,骨质疏松是由成骨细胞的骨形成能力弱于破骨细胞的骨吸收能力所致。目前研究更多的是维生素 A 与骨吸收的关系,而维生素 A 与骨形成相关的研究较少^[2]。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是来源于骨髓基质中的一种多潜能分化的干细胞,在体外不同诱导环境下可以分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞及肌细胞等^[4]。目前已明确, BMSCs 是成骨细胞的来源之一,因此,明确维生素 A 对 BMSCs 成骨分化的影响及其相关分子机制对指导人群及临床正确补充维生素 A 具有潜在的意义。

视黄酸(retinoic acid, RA)是维生素 A 在体内发挥生物作用的主要调节者,其发挥生物学效应主要是通过通过与核受体(retinoic acid receptors, RARs)结合,再与目的基因启动子区域的特异性 RAR 效应元件(retinoic acid response elements, RAREs)结合,从而调控目的基因的表达^[5]。Lind 等^[6]最近研究发现,用 RA 干预 MC3T3-E1 细胞后,RA 可抑制 MC3T3-E1 细胞基质的矿化。但目前尚缺乏 RA 对 BMSCs 成骨分化影响的深入研究。本研究用 rBMSCs 作为研究对象,通过体外实验明确维生素 A 的活性代谢物 at-RA 对 rBMSCs 成骨分化的影响并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

细胞培养基 DMEM/F12 购自 Hyclone 公司, at-RA 购自 Sigma 公司,胎牛血清 FBS 购自 Gibco 公司,成骨分化培养基购自广州赛业公司,青链霉素混合液购自北京鼎国昌盛公司,胰蛋白酶消化液购自碧云天公司,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒购自南京建成生物研究所,碱性磷酸酶染色试剂购自 Sigma-Aldrich 公司。茜素红 S(Alizarin Red S)购自合肥博美生物科技有限责任公司,高纯度总 RNA

快速提取试剂盒(离心柱型)购自百泰克公司,反转录试剂盒、real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 rBMSCs 的分离培养

SD 大鼠购自第三军医大学大坪医院动物中心,在重庆医科大学附属儿童医院动物中心 SPF 级饲养。rBMSCs 分离培养参照江和碧等^[7]的实验方法。当细胞达到 90%融合度时即可消化传代,取第 4 代细胞进行成骨诱导分化。

1.3 实验分组

对照组(加成骨诱导液), 0.1、1.0、5.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ at-RA 处理组(成骨诱导液+相应浓度 at-RA)。细胞接种初始密度为 30%。

1.4 at-RA 对 rBMSCs 成骨分化的影响

1.4.1 ALP 染色鉴定及活性检测 成骨第 7 天时进行 ALP 定性染色:将少量 Fast Blue BB salt 粉末加入 ddH_2O 中,使其成为淡黄色即可;向上述液体中加 1/25 体积的 AS-MX 染料,配置成染液,除去 24 孔板中的培养基,每孔 250 μl 上述染液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min;显微镜下观察摄片。ALP 的定量检测:吸除 6 孔板内培养液, PBS 洗 2 遍,按 ALP 试剂盒操作表进行测定,用酶标仪测出各孔吸光度(absorbance, A)值,同时用 BCA 法测定各孔蛋白浓度,按照试剂盒说明书公式算出各孔每克蛋白中所含 ALP 的量,单位: U/gprot 。

1.4.2 茜素红染色及提取法测定每组钙盐沉积量 将第 4 代细胞种于 24 孔板, 24 h 后更换为成骨诱导液,以后每 3 d 换 1 次液,待诱导第 21 天时,取出, PBS 洗 3 次, 10% 甲醛固定 30 min,加入 0.4% 茜素红染液,出现红色物质堆积时弃去染液, ddH_2O 终止反应。染色后进行提取法半定量检测钙盐沉积量:加入 400 μl 冰乙酸/孔,在摇床上孵 30 min, 400 μl 刮下后将悬液移至 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,冰上 5 min, 14 000 r/min ,离心 15 min,取 400 μl 加入 150 μl 10% NH_4OH ,将 pH 调到 4.1~4.5 吸 150 μl 到 96 孔板中,紫外测 $A_{405\text{nm}}$ 。

1.4.3 Real-time PCR 检测 RA 信号通路和成骨细胞分化标志基因 将第 4 代细胞种于 6 孔板,取诱导后第 1、3、7、14、21 天培养的 BMSCs 提取总 RNA,以 TaKaRa 试剂盒反转录 cDNA 第 1 链。所有引物用 primer3.0 设计,北京华大基因公司合成。Runx2 上游: 5'-CCGGTCTCCTCCAGGAT-3',下游: 5'-GGGAGCTGCTGTGGCTTC-3'; Osterix 上游: 5'-GGGAAAA-GGAGGCACAAAGAA-3',下游: 5'-AGGAAATGAGTGGGG-AAAGGG-3'; OPN 上游: 5'-CTTTCACTCCAATCGTCCCTAC-3',下游: 5'-CTGCCCTTTCCGTTGTGTGTC-3'; OCN 上游: 5'-GGACCATCTTTCTGCTCACTCTG-3',下游: 5'-ACCTTATTG-CCCTCTGCTT-3'; RAR β 上游: 5'-ATTGCCGACAGATTA-CC-3',下游: 5'-AAAGCCAGCGTTGTGC-3'; RAR β 上游: 5'-AAAGCCCACCAGGAAACC-3',下游: 5'-CTTGGCGAATC-CACGAT-3'; GAPDH 上游: 5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAG-3',下游: 5'-CACAGGAGACAACCTGCTCC-3'。Real-time PCR 的反应体系包括:逆转录的 cDNA 模板链,引物, SYBR Premix Ex TaqTM II,去离子水,反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,退火 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$ 每上升 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光, 39 循环。实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS Statistics 17.0 软件进行数据分析。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 显示, ALP 活性、茜素红染色提取法各组比较用单因素方差分析, 两两比较用 Dunnett-*t* 检验 (检验水准: $\alpha=0.05$); real-time PCR 结果用重复测量方差分析, 各时间点两组间比较检验水准: OCN、OPN 基因 ($\alpha=0.0167$), Runx2、Osterix、RAR α 、RAR β 基因 ($\alpha=0.00833$)。

2 结 果

2.1 rBMSCs 成骨分化中 ALP 的变化

rBMSCs 在成骨诱导第 7 天, at-RA 组较对照组 ALP 活性明显升高 (图 1)。采用单因素方差分析定量检测 ALP 活性结果有统计学差异 ($F=107.200, P=0.000$); 进一步做 2 组间比较发现, 除 0.1 $\mu\text{mol/L}$ at-RA 组外 ($P_{\text{对照组 vs. } 0.1 \mu\text{mol/L at-RA}}=0.602$), 其他经 at-RA 处理后的 2 组 ALP 活性均高于对照组 ($P_{\text{对照组 vs. } 1.0 \mu\text{mol/L at-RA}}=0.000, P_{\text{对照组 vs. } 5.0 \mu\text{mol/L at-RA}}=0.000$) (表 1)。

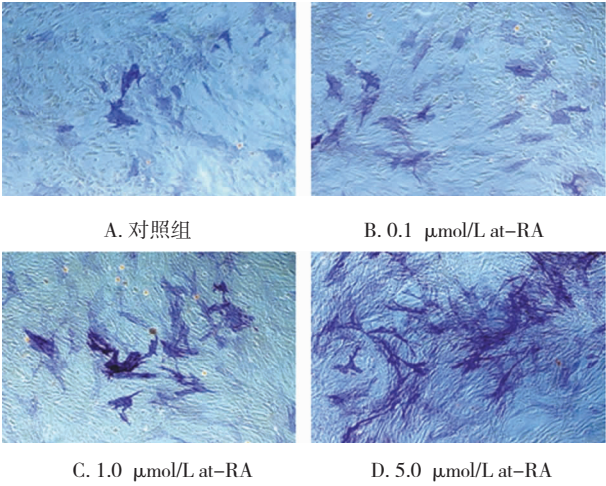


图 1 ALP 染色观察 (100 ×)
Fig.1 Observation of the staining of ALP (100 ×)

2.2 at-RA 抑制 rBMSCs 成骨诱导中钙盐形成

诱导第 21 天, 茜素红染色观察不同浓度 at-RA 组较对照组钙盐沉积明显减少, 且呈浓度依赖性, 尤其在 5.0 $\mu\text{mol/L}$ at-RA 组抑制最明显 (图 2)。进一步提取茜素红染色检测钙盐沉积量, 采用单因素方差分析 A 值有统计学差异 ($F=57.554, P=0.000$); 2 组间比较发现, 除 0.1 $\mu\text{mol/L}$ at-RA 组外 ($P_{\text{对照组 vs. } 0.1 \mu\text{mol/L at-RA}}=0.742$), 其他 2 组均低于对照组, 有统计学差异 ($P_{\text{对照组 vs. } 1.0 \mu\text{mol/L at-RA}}=0.002, P_{\text{对照组 vs. } 5.0 \mu\text{mol/L at-RA}}=0.000$) (表 1)。

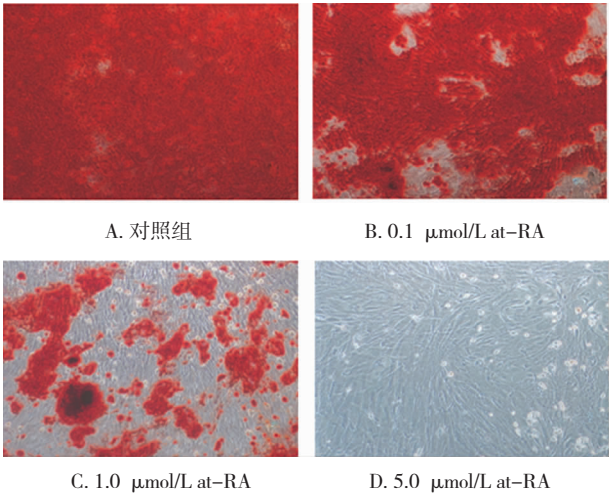


图 2 茜素红染色观察 (100 ×)
Fig.2 Observation of the Alizarin red staining of ALP (100 ×)

2.3 rBMSCs 成骨诱导中 at-RA 抑制骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨桥素 (osteopontin, OPN) 基因的表达

鉴于 at-RA 浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 对成骨分化的影响最明显, 因此选择用 5.0 $\mu\text{mol/L}$ at-RA 观察不同时间点 (7、14、21 d) 对 OCN、OPN 基因表达的影响。结果发现: OCN、OPN mRNA 水平在不同时间之间存在统计学差异 (F 值和 P 值分别为: 73.673、0.001, 39.994、0.000), 时间与组间存在交互作用

表 1 at-RA 对 rBMSCs 成骨分化中 ALP 和钙盐沉积的影响
Tab.1 Effects of at-RA on ALP activity and calcium salt deposition in rBMSCs

指标	对照组	at-RA 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)			<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
		0.1	1.0	5.0		
ALP (U/gprot)	5.262 70 ± 1.997 78	7.720 50 ± 0.628 49	13.391 00 ± 1.447 99	33.768 10 ± 7.893 02	107.177	0.000
钙盐沉积 (A 值)	2.597 50 ± 0.256 31	2.458 30 ± 0.284 46	1.759 70 ± 0.130 11	0.659 30 ± 0.004 62	57.554	0.000

表 2 at-RA 作用不同时间对 OCN、OPN 基因表达的影响
Tab.2 Effects of different at-RA action time points on gene expression of OCN and OPN during osteogenic differentiation of rBMSCs

诱导时间 (d)	OCN				OPN			
	对照组	at-RA 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	对照组	at-RA 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
7	0.003 1 ± 0.000 6	0.000 7 ± 0.000 06	7.172	0.002	0.004 9 ± 0.001 1	0.001 5 ± 0.000 0	5.464	0.032
14	0.004 2 ± 0.000 5	0.000 4 ± 0.000 00	14.507	0.000	0.001 8 ± 0.000 3	0.000 6 ± 0.000 1	5.865	0.004
21	0.033 6 ± 0.005 5	0.001 1 ± 0.000 02	10.266	0.009	0.002 5 ± 0.000 3	0.001 6 ± 0.000 5	3.165	0.034

注: at-RA 浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$; 2 组间比较检验水准 $\alpha=0.0167$

(分别为:73.698、0.001,19.654、0.001),不同组之间存在统计学差异(F 值和 P 值分别为:211.145、0.000,30.835、0.005);固定时间点后,at-RA 组较对照组 OCN、OPN 基因的表达受到不同程度的抑制,但统计分析仅在第 14 天时 OPN 基因表达受到抑制,OCN 基因表达则在 3 个时间点均受到明显抑制($P<0.0167$)(表 2)。

2.4 at-RA 抑制 Runx2、Osterix 基因的表达

在 5.0 $\mu\text{mol/L}$ at-RA 作用下,于成骨诱导不同时间点(1、3、7、14、21 d)检测成骨分化调控通路相关基因(Runx2、Osterix)的表达。结果发现:Runx2、Osterix 基因的表达在不同时间之间存在统计学差异(F 值和 P 值分别为:103.720、0.000,331.048、0.000),时间与组间存在交互作用(F 值和 P 值分别为:22.387、0.002,411.163、0.000),不同组之间也存在统计学差异(F 值和 P 值分别为:106.536、0.000,452.546、0.000)。固定时间点后,at-RA 组较对照组 Runx2、Osterix 基因的表达受到了不同程度的抑制,但统计分析仅在第 7、21 天时 Runx2 基因的表达受到明显抑制($P<0.00833$);Osterix 基因的表达除第 14 天外,其余各时间点都受到明显抑制($P<0.00833$)(表 3)。

2.5 at-RA 对 rBMSCs 成骨分化中 RARs 表达的影响

rBMSCs 成骨诱导分化在 5.0 $\mu\text{mol/L}$ at-RA 持续作用下培养 1、3、7、14、21 d 后检测 RAR α 、RAR β 基因表达情况。结果发现:RAR α 、RAR β 其 mRNA 水平在不同时间之间存在统计学差异(F 值和 P 值分别为:68.836、0.000,34.419、0.004),时间与组间存在交互作用(F 值和 P 值分别为:20.265、0.000,

33.814、0.004),不同组之间存在统计学差异(F 值和 P 值分别为:253.159、0.000,2294.377、0.000);固定时间因素后,各时间点 at-RA 组 RAR α 表达均低于对照组,但仅在第 21 天时有统计学差异($P<0.00833$);各时间点 at-RA 组 RAR β 基因表达均高于对照组($P<0.00833$)(表 4)。

3 讨论

骨质疏松症是一种常见的由骨代谢异常所致的全身性骨骼疾病。在细胞水平研究中,当前关于维生素 A 与骨代谢关系的研究更多的是证明 RA 可以促进破骨细胞生成,增加骨吸收^[2]。而关于 RA 成骨作用的研究却一直有争议,一些研究认为 at-RA 抑制小鼠胚胎间充质细胞成骨分化^[8],另一些研究则认为 at-RA 可促进前脂肪细胞 3T3-F442A 及间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化^[9-10]。体内成骨细胞来源已被证实是 BMSCs,因此研究 at-RA 对 BMSCs 成骨分化的调节机制具有潜在的应用价值。

本研究通过检测 OCN、OPN 基因的表达及钙盐沉积等相关成骨标志物表明:at-RA 可抑制 rBMSCs 成骨分化,其机制与 at-RA 降低成骨相关信号通路中 Runx2、Osterix 转录活性有关。Runx2 和 Osterix 是成骨相关通路的 2 个重要调节因子,Runx2 促进

表 3 at-RA 作用不同时间对 Runx2、osterix 的影响

Tab.3 Effects of different at-RA action time points on gene expression of Runx2 and osterix during osteogenic differentiation of rBMSCs

诱导时间 (d)	Runx2				Osterix			
	对照组	at-RA组	t 值	P 值	对照组	at-RA组	t 值	P 值
1	0.007 8 $\pm$ 0.000 7	0.007 2 $\pm$ 0.002 5	0.422	0.694	0.001 1 $\pm$ 0.000 1	0.000 7 $\pm$ 0.000 0	13.413	0.000
3	0.007 7 $\pm$ 0.001 3	0.007 9 $\pm$ 0.000 3	-0.165	0.887	0.003 5 $\pm$ 0.000 4	0.001 8 $\pm$ 0.000 1	7.193	0.002
7	0.016 4 $\pm$ 0.002 7	0.005 7 $\pm$ 0.001 1	6.367	0.003	0.002 3 $\pm$ 0.000 2	0.000 1 $\pm$ 0.000 0	20.865	0.002
14	0.020 4 $\pm$ 0.003 5	0.016 5 $\pm$ 0.001 3	1.778	0.150	0.005 6 $\pm$ 0.001 0	0.000 1 $\pm$ 0.000 0	9.712	0.010
21	0.049 9 $\pm$ 0.005 2	0.022 9 $\pm$ 0.004 4	6.827	0.002	0.014 3 $\pm$ 0.000 7	0.000 1 $\pm$ 0.000 0	34.015	0.000

注:at-RA 浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$;2 组间比较检验水准 $\alpha=0.00833$

表 4 at-RA 作用不同时间对 RAR α 、RAR β 的影响

Tab.4 Effects of different at-RA action time points on gene expression of RAR α and RAR β during osteogenic differentiation of rBMSCs

诱导时间 (d)	RAR α				RAR β			
	对照组	at-RA组	t 值	P 值	对照组	at-RA组	t 值	P 值
1	0.028 3 $\pm$ 0.003 2	0.017 0 $\pm$ 0.003 8	3.916	0.017	0.000 1 $\pm$ 0.000 0	0.013 5 $\pm$ 0.002 3	-10.109	0.001
3	0.025 7 $\pm$ 0.005 5	0.018 4 $\pm$ 0.007 8	1.323	0.256	0.000 2 $\pm$ 0.000 1	0.027 6 $\pm$ 0.004 3	-11.172	0.008
7	0.017 2 $\pm$ 0.003 7	0.006 8 $\pm$ 0.000 8	4.800	0.034	0.000 2 $\pm$ 0.000 1	0.008 3 $\pm$ 0.000 9	-16.167	0.000
14	0.038 1 $\pm$ 0.005 0	0.025 9 $\pm$ 0.006 9	2.490	0.067	0.000 5 $\pm$ 0.000 1	0.055 3 $\pm$ 0.006 5	-14.559	0.005
21	0.086 1 $\pm$ 0.065 0	0.032 3 $\pm$ 0.001 6	13.833	0.003	0.000 3 $\pm$ 0.000 1	0.069 0 $\pm$ 0.013 7	-8.689	0.001

注:at-RA 浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$;2 组间比较检验水准 $\alpha=0.00833$

间充质干细胞向前体成骨细胞分化,Osterix是前体成骨细胞分化为成骨细胞的主要调节因子^[11]。OCN、OPN 是成骨细胞分化时分泌的一种非胶原蛋白,可以维持骨的正常矿化,是成骨细胞的特异性产物^[12]。钙盐沉积是体外鉴定成骨细胞最客观的证据。本实验研究发现,在成骨诱导 7 d 以后,at-RA 组与对照组相比,Runx2、Osterix、OCN 和 OPN 基因的表达均有明显降低,且在第 21 天时,钙盐沉积量明显减少。提示:持续高浓度 at-RA 可通过抑制成骨通路相关基因 Runx2、Osterix 的表达,进而影响成骨分化标志物 OCN、OPN 的表达,最终抑制钙盐形成。Lind 等^[6]用 400 nmol/L RA 干预小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1 细胞,发现 RA 组干预的细胞较对照组相比,Runx2、Osterix、OCN 和 OPN 基因的表达均有明显降低,钙盐沉积也明显减少,其结果与本研究结果一致。但 Skillington 等^[9]发现 1 μ mol/L RA 可以促进骨形态发生蛋白 2 诱导 3T3-F442A 成骨分化。黄帆^[10]等发现用一定浓度的 at-RA 可加强骨形态发生蛋白 9 诱导的 C3H10T1/2 的成骨分化。出现此不同是否由所用干细胞种类及干细胞所处阶段和合用的成骨诱导因子不同导致,需进一步研究证实。

at-RA 在体内是依靠其核受体 RARs(α 、 β 、 γ)发挥作用的。Jacobson 等^[13]发现,RAR α 激动剂可降低人类骨肉瘤 MG-63 细胞中骨保护素的表达。Zhang 等^[14]发现,将过表达 RAR α 和骨形态发生蛋白 9 的间充质祖细胞移植入无胸腺的小鼠后,可显著增加小梁骨及类骨质的形成。目前关于何种受体参与 BMSCs 成骨分化尚未见有报道。本实验研究发现,加入 at-RA 后 rBMSCs 成骨分化时其核受体 RAR β 基因表达明显升高,RAR α 基因表达有所降低,提示 at-RA 调节成骨分化可能通过下调 RAR α 、上调 RAR β 实现。

ALP 是成骨细胞质膜上的一种糖蛋白,是被大家公认的成骨标志物之一。本研究发现,at-RA 能增强 ALP 活性。ALP 作为非特异性成骨分化指标,在成脂分化^[15]、成软骨分化^[16]时也有较高水平的表达,甚至用 ALP 染色显示未诱导分化的 rBMSCs 也呈强阳性(结果未列出),因此本研究中 ALP 的来源需进一步研究证实。

本实验证实:持续高浓度的 at-RA 可抑制 rBMSCs 成骨分化,下一步将致力于寻找对成骨分化无抑制作用的安全 at-RA 浓度,并通过体内实验及人

群调查验证,为指导人群及临床正确掌握维生素 A 的补充量奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] 窦清慧,魏 丽.维生素 A 与骨质疏松症[J].中国骨质疏松杂志,2008,14(2):134-137.
- [2] Conaway HH, Henning P, Lerner UH, et al. Vitamin A metabolism, action, and role in skeletal homeostasis[J]. *Endocr Rev*, 2013, 34(6): 766-797.
- [3] Feskanich D, Singh V, Willett WC, et al. Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women[J]. *JAMA*, 2002, 287(1): 47-54.
- [4] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2739-2749.
- [5] Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signalling during development[J]. *Development*, 2012, 139(5): 843-858.
- [6] Lind T, Sundqvist A, Hu L, et al. Vitamin A is a negative regulator of osteoblast mineralization[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82388.
- [7] 江和碧,卓本慧,代 英,等. bFGF 促进大鼠骨髓间充质干细胞向神经元转化及机制[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 98-101.
- [8] Chen M, Huang HZ, Wang M, et al. Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of mouse embryonic palate mesenchymal cells[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2010, 88(11): 965-970.
- [9] Skillington J, Choy L, Derynck R, et al. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes[J]. *J Cell Biol*, 2002, 159(1): 135-146.
- [10] 黄 帆,刘映孜,杨秋珺,等. 全反式维甲酸增强骨形态发生蛋白诱导间充质干细胞成骨分化作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(4): 328-331.
- [11] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel Zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [12] Hu Y, Tang XX, He HY. Gene expression during induced differentiation of sheep bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 6527-6534.
- [13] Jacobson A, Johansson S, Branting M, et al. Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322(1): 162-167.
- [14] Zhang W, Deng ZL, Chen L, et al. Retinoic acids potentiate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11917.
- [15] Ali AT, Penny CB, Paiker JE, et al. The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 cells and human preadipocytes[J]. *Anal Biochem*, 2006, 354(2): 247-254.
- [16] Meretoja VV, Fischer M, Zellner J, et al. Effect of parathyroid hormone-related protein in an in vitro hypertrophy model for mesenchymal stem[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(17): 4266-4273.

(责任编辑:冉明会)