

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.004

P 物质在 BMSCs 来源的成骨细胞与内皮细胞体外联合培养中的作用 *

李富航 靳宇飞 毕 龙 裴国献[△]

(第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察 P 物质(substance P, SP)在 BMSCs 来源的成骨细胞与内皮细胞体外联合培养中的作用,研究 P 物质作用于种子细胞的最适浓度指导组织工程骨修复骨缺损。**方法:**采用新生新西兰大白兔胎兔(雌雄不限)密度梯度离心法分离骨髓间充质干细胞行体外培养和连续传代,获得较纯的 BMSCs。取生长状态良好的第 3 代 BMSCs 行成骨诱导培养及成血管内皮细胞诱导培养并鉴定。将诱导 7 d 的两种细胞按 2:1 比例混合培养,待细胞传至 2 代加入不同浓度的 SP 作为实验组,以正常未加 SP 的细胞培养基为对照组。培养后 1、3、5、7 d 采用 CCK-8 法测定细胞增殖并绘制生长曲线,观察细胞生长数量,测定碱性磷酸酶活性及观察细胞周期分布。**结果:**浓度范围从 1×10^{-12} – 1×10^{-6} mol/L 的 SP 对联合共培养的成骨细胞增殖和活性都有促进作用,在浓度为 1×10^{-8} mol/L 对联合共培养的成骨细胞增殖和活性的作用功效最强。**结论:**在体外直接联合共培养的体系中,SP 对新种子细胞促进效果明显,其在 1×10^{-8} mol/L 对联合共培养的成骨细胞增殖和活性作用最强。

关键词:P 物质;BMSCs;成骨细胞;内皮细胞;共培养

中图分类号:R-33, R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)19-3615-04

Study of SP on Effect of Osteoblasts and Vascular Endothelial Cells from Rabbits BMSCs Co-cultured*

LI Fu-hang, JIN Yu-fei, BI Long, PEI Guo-xian[△]

(The Orthopedics Institute, Xijing Hospital, The fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of SP (Substance P) of osteoblasts and vascular endothelial cells from rabbits BMSCs co-cultured in vitro. To find the optimal concentration of SP on the new seed cells to guide bone defect repairing in tissue engineering of bone. **Methods:** The BMSCs were obtained from new-born rabbits by using gradient centrifuge method and cultured in vitro. The third generation of BMSCs were induced into osteoblasts and vascular endothelial cells. The osteoblasts and vascular endothelial cells, after being induced for 7 days in a ratio of 2 to 1, were directly co-cultured, the co-cultured osteoblasts and vascular endothelial cells in the second generation were used, and then SP with different concentrations was added (experimental group). While the second generation of co-cultured cells without SP was used as a control (control group). The function of SP was assessed by CCK-8 examination assay and the growth curve was drawn on 1,3,5,7 days, then counted the cells. Determined the ALP activity and examined the change of cell cycle distribution. **Results:** SP of 1×10^{-12} – 1×10^{-6} mol/L had enhancing effects on the proliferation and activity of co-culture osteoblasts, while the concentration of 1×10^{-8} mol/L had the strongest enhancing effects. **Conclusion:** In direct co-culture system in vitro, the effect of SP-promoting on the new seed cells was significant. SP can improve activity of co-cultured osteoblasts.

Key words: Substance P; BMSCs; Osteoblast; Endothelial cell; Co-cultured

Chinese Library Classification: R-33, R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3615-04

前言

近年在骨折愈合过程中神经系统作用的深入研究,其对骨代谢的影响尤为突出。感觉神经末梢可通过释放神经递质 SP、CGRP 等从而作用于成骨。而 P 物质因其良好的成骨作用而备受关注。P 物质(substance P, SP)是最早发现的神经肽,已经证实 SP 神经肽来源于感觉神经纤维,可作用于成骨细胞,且贯穿于骨折愈合的整个过程^[1]。SP 对血管的调节作用主要为内皮依赖

或非依赖性的舒张反应^[2]。本实验研究最新种子细胞在于保证足够量的接种细胞数量,与此同时维持细胞增殖活性且可以预防细胞衰老。文献报道证实成骨细胞与血管内皮细胞体外联合共培养作为最新的种子细胞^[3-5],其在促进成骨细胞的增殖同时又有助于组织工程骨的血管化再生过程,故而有助于增强组织工程骨对于骨缺损的修复^[6]。因此,我们对 SP 作用于体外联合培养的 BMSCs 来源的成骨细胞与内皮细胞进行了最适浓度以及后期的分子水平影响的研究,以发现其在新种子细胞中的促

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272011)

作者简介:李富航(1986.9-),男,硕士研究生,主要研究方向:骨组织工程学, E-mail: angelalfh1@126.com

△ 通讯作者:裴国献,电话:029-84773524, E-mail: nfperry@163.com

(收稿日期:2014-01-21 接受日期:2014-02-20)

成骨作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物与试剂 初生 24 h 新西兰大白兔胎兔 10 只(第四军医大学实验动物中心提供),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(BD, 美国), CCK-8 (南京建成), M199(GIBCO, 美国); SP、一抗内皮Ⅷ因子、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素 C(Sigma, 美国); VEGF、bFGF(R&D, 美国), 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性定量检测试剂盒(Genmed, 上海)。

1.1.2 实验仪器 透射电镜 JEM-1230(Hitachi, 日本), 流式细胞仪 BD FACS Aria(Bection Dickinson, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 分离培养 将出生 24 h 以内的新西兰大白兔胎兔 10 只处死酒精浸泡消毒, 无菌超净台下取双侧四肢长骨, 剪断骨髓暴露骨髓腔。用包含双抗(青、链霉素)的 DM-F12 培养液反复冲洗骨髓腔, 冲洗出骨髓悬液。细胞悬液在半径 12 cm, 800 r/min 离心 8 min, 倒掉上清加入 DM-F12, 吸打混匀, 分装入培养瓶中然后放入 37 °C 孵箱孵育培养。

1.2.2 BMSCs 诱导培养 待 BMSCs 细胞纯化至第 3 代, 将其加入含 10% FBS、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、 1×10^{-8} mol/L 地塞米松、50 mg/L 维生素 C 的成骨分化培养基, 成骨诱导培养; 加入含 10% FBS、10 μ g/L VEGF、2 μ g/L bFGF 的内皮分化培养基, 成血管内皮细胞诱导培养。

1.2.3 两种诱导细胞共培养及 P 物质刺激 将分化培养 7 d 的两种细胞以 2:1^[7-9]比例接种于同一培养板中共培养, 待细胞铺满胰酶消化传代, 加入含有 1×10^{-12} - 1×10^{-6} mol/L^[10,11]不同浓度的 SP 作为实验组, 以正常未加 SP 的 DM-F12 培养基作为对照组。

1.3 实验检测项目

1.3.1 成骨分化 ALP 染色(钙钴法) 取诱导培养 7 d 的成骨细胞进行玻片爬片, 行常规 ALP 染色(钙钴法), 光镜下可见黑色沉淀表示酶活性, 以 BMSCs 作对照组。

1.3.2 内皮细胞免疫组化 取诱导培养 14 d 的血管内皮细胞行玻片爬片, 倒置显微镜下观察细胞形态以及内皮细胞免疫组化化学Ⅷ因子染色, 一抗工作浓度为 1:200。

透射电镜: 诱导分化 14 d 内皮细胞消化离心, 常规制作细胞铜网透射电镜下观察。

1.3.3 磷酸酶(ALP)活性 以 1×10^4 孔接种于 96 孔板, 培养 24 h, 然后更换为含有不同浓度 SP 培养基, 每浓度 6 个平行孔。分别于接种后第 1、3、5、7 d 进行, 吸尽 96 孔培养板内的培养基, PBS 冲洗 3 次, 进行常规 ALP 活性检测, 使用酶联免疫仪于波长 410 nm 下读取光密度(OD)值。

1.3.4 CCK-8 细胞增殖以及生长曲线 细胞处理以及检测时间同 ALP, 常规 CCK-8 增殖检测。酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

1.3.5 流式细胞周期检测 传代细胞培养至铺满瓶底 80%, 加入不同浓度 SP 培养 24 h, 消化, 洗涤, 常规流式细胞周期检测, 用 BD FACS Aria 型流式细胞仪测定 DNA 含量, ModFit LT 软件分析细胞周期分布情况。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析, 数据 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析(ANOVA)统计, 组内两两比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 形态观察

接种后 24 h 骨髓间充质干细胞, 可见少部分 BMSCs 自单个核细胞贴壁伸展为梭形, 大部分尚未贴壁伸展, (图 1a)。

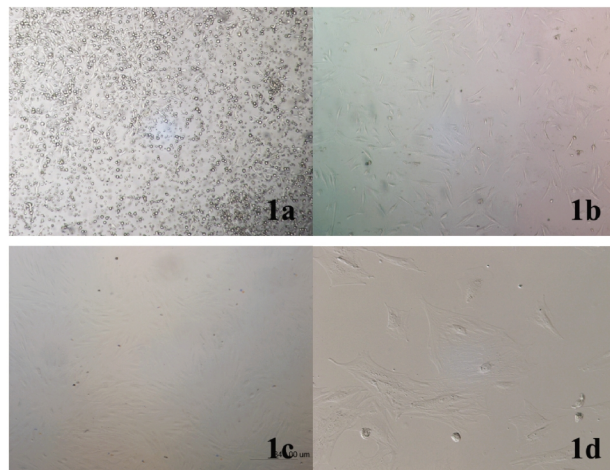


图 1 1a 骨髓干细胞、1b 成骨细胞、1c 内皮细胞($\times 40$), 1d 共培养细胞($\times 100$)

Fig. 1 1a BMSCs, 1b osteoblast, 1c endothelial cell($\times 40$), 1d co-cultured cells($\times 100$)

2.2 诱导的成骨细胞形态观察及鉴定

成骨分化 7 d, 细胞渐大, 呈多角型分化形状不规则, 有多处突起, 细胞有集落趋化趋势(图 1b)。BMSCs 成骨诱导 7 d, ALP 染色示分化成骨细胞胞浆蓝染, 而胞核红染(图 2a)。

2.3 诱导的内皮细胞形态学及鉴定

内皮细胞分化 14 d 后, 诱导细胞表现为典型的“铺路石”样形态(图 1c)。Ⅷ因子免疫组化染色阳性, 细胞质呈棕色(图 2b)。透射电镜可观察到内皮细胞典型特征棒状 WP 小体(图 2c)。

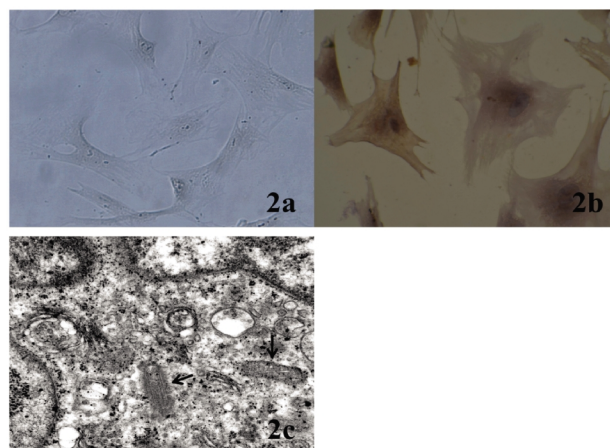


图 2 2a 成骨细胞 ALP 染色, 2b 内皮细胞Ⅷ因子免疫组化染色($\times 100$), 2c 内皮细胞透射电镜($\times 80w$)

Fig. 2 2a ALP dyeing of osteoblast, 2b endothelial cells Ⅷ factor immunohistochemical staining($\times 100$), 2c TEM of endothelial cells($\times 80w$)

2.4 共培养细胞形态学

倒置显微镜下观察可见两种细胞在共培养初期保持各自细胞形态生长良好,伴随着时间越长,共培养 7 d 时分化成骨细胞与内皮细胞失去自身细胞形态,均梭形生长(图 1d)。

2.5 ALP 活性

ALP 活性检测各浓度组较对照组均有显著增加($P<0.05$),且随着时间增长吸光值增加,而在 P 物质在 1×10^{-8} mol/L 组作用效果最显著($P<0.05$),均具有统计学差异(表 1)。

表 1 不同浓度 P 物质作用共培养的 BMSCs 来源成骨与内皮细胞 ALP 活性吸光度(A)值的比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$) 与对照组比较, $P^a<0.05$, $P^b<0.01$; 组间比较, $P^c<0.05$

Table 1 Compared with the ALP absorbance(A) of different concentrations of SP on osteoblasts and vascular endothelial cells from rabbits BMSCs co-cultured($\bar{x} \pm s$, $n=6$). Compared with the control group, $P^a<0.05$, $P^b<0.01$; compared between the two groups, $P^c<0.05$

Time(d)	SP Group(mol/L)				
	1×10^{-6}	1×10^{-8}	1×10^{-10}	1×10^{-12}	0
1	0.322 ± 0.035^a	0.332 ± 0.041	0.318 ± 0.012	0.313 ± 0.036	0.295 ± 0.031
3	0.657 ± 0.053^a	0.733 ± 0.051^{bc}	0.653 ± 0.043^a	0.637 ± 0.022	0.588 ± 0.055
5	0.965 ± 0.105^a	1.125 ± 0.059^{bc}	0.917 ± 0.099^a	0.842 ± 0.034	0.807 ± 0.028
7	1.085 ± 0.092^{bc}	1.280 ± 0.158^{bc}	1.060 ± 0.100^a	1.032 ± 0.025^a	0.907 ± 0.061

2.6 CCK-8 细胞增殖与活性

不同浓度组的表达随着时间推移都有增加,且均有明显增

加($P<0.05$ 或 <0.01)而 P 物质在 1×10^{-8} mol/L 组作用效果最显著($P<0.01$),均具有统计学差异(图 3、表 2)。

表 2 不同浓度 P 物质作用共培养的 BMSCs 来源成骨与内皮细胞 CCK-8 活性吸光度(A)值的比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$) 与对照组比较, $P^a<0.05$, $P^b<0.01$; 组间比较, $P^c<0.05$

Table 2 Compared with the CCK-8 absorbance(A) of different concentrations of SP on osteoblasts and vascular endothelial cells from rabbits BMSCs co-cultured($\bar{x} \pm s$, $n=6$). Compared with the control group, $P^a<0.05$, $P^b<0.01$; compared between the two groups, $P^c<0.05$

Time(d)	SP Group(mol/L)				
	1×10^{-6}	1×10^{-8}	1×10^{-10}	1×10^{-12}	0
1	0.325 ± 0.08^a	0.331 ± 0.013^{ac}	0.315 ± 0.012^a	0.310 ± 0.010	0.297 ± 0.012
3	0.708 ± 0.010^b	0.748 ± 0.043^{bc}	0.682 ± 0.030^b	0.652 ± 0.019^b	0.543 ± 0.014
5	1.110 ± 0.059^b	1.211 ± 0.059^{bc}	1.003 ± 0.076^a	0.986 ± 0.016^b	0.864 ± 0.020
7	1.745 ± 0.094^b	1.921 ± 0.065^{bc}	1.712 ± 0.035^{bc}	1.588 ± 0.052^b	1.233 ± 0.029

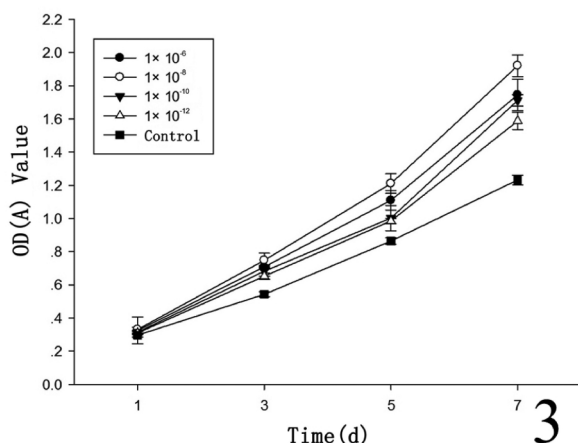


图 3 共培养细胞 1、3、5、7 d CCK-8 生长曲线

Fig. 3 The 1,3,5,7 d CCK-8 growth curve of co-cultured cells

2.7 流式细胞周期检测

不同浓度的 SP 干预共培养细胞 24 h 后,对其细胞周期的影响均有增加,在浓度为 1×10^{-8} mol/L 对联合共培养细胞的周期影响最大,共培养细胞 S 期增加或者促进 ($P<0.01$),G1 及 G2/M 期有所缩短($P<0.05$)。见表 3。

表 3 BMSCs 来源的成骨细胞与血管内皮细胞共培养细胞周期测定。

与对照组比较, $P^a<0.05$, $P^b<0.01$; 组间比较, $P^c<0.05$

Table 3 Determination of cell cycle of osteoblasts and vascular endothelial cells from rabbits BMSCs co-cultured. Compared with the control group, $P^a<0.05$, $P^b<0.01$; compared between the two groups, $P^c<0.05$

SP(mol/L)	G ₁	G ₂ /M	S	S+ G ₂ /M
Control	87.42 ± 2.06	8.06 ± 1.99	4.52 ± 0.64	12.59 ± 2.06
10^{-6}	83.57 ± 1.52^a	9.28 ± 1.56	7.14 ± 1.47^a	16.43 ± 1.52^a
10^{-8}	78.26 ± 1.82^{bc}	10.55 ± 1.81^a	11.52 ± 2.49^{bc}	22.08 ± 1.77^{bc}
10^{-10}	85.93 ± 1.09	9.45 ± 1.09^c	4.62 ± 0.74	14.07 ± 1.09
10^{-12}	85.97 ± 1.09	7.38 ± 1.35	6.65 ± 1.85^{ac}	14.03 ± 1.09

3 讨论

文献报道 SP 与骨代谢联系紧密。在骨折愈合过程中,发现 SP 样神经纤维与毛细血管一同出现在新生骨组织的周围,SP 主要通过与其受体 -Neurokinin-1 受体(NK1 受体)结合发挥调节作用^[12,13]。SP 主要通过内皮细胞发挥作用,Onuoha^[14]认为 SP 能刺激内皮素细胞,动脉平滑肌细胞,皮肤成纤维细胞的增殖,而且能够促进毛细血管的生长^[15]。如能将 SP 作用于其共培养细胞,使其既能有效作用于成骨细胞促进其细胞增殖、同时

作用于内皮细胞加速组织工程骨的血管化再生过程,将进一步增强组织工程骨的骨缺损修复。本实验旨在观察 SP 作用于共培养细胞的成骨效果,探讨 SP 最适浓度。

从本实验 CCK-8 曲线图可以直观的看出 SP 各浓度组对共培养细胞均具有促进作用且随着时间的推移作用效果呈现增长,而 1×10^{-8} mol/L 浓度的细胞增殖效果最明显。ALP 活性吸光度结果提示 3 d 以后 SP 作用效果明显,低浓度组 1×10^{-12} mol/L 作用效果不明显,而 1×10^{-8} - 1×10^{-6} mol/L 作用效果明显,说明在 ALP 活性作用可以看出其对细胞分泌物的影响存在浓度依赖以及时间依赖。在细胞周期测定中各实验组相对于对照组 G_1 期均有所缩短, $G_2/M+S$ 期均有所增加。在 1×10^{-8} mol/L 浓度组作用效果最明显,表明 SP 作用于共培养细胞可改变细胞周期,促进细胞增殖活跃。结果表明浓度范围从 1×10^{-12} - 1×10^{-6} mol/L 的 SP 对联合共培养细胞的 CCK8 和 ALP 以及细胞周期均较单纯的共培养时增强。表明其对成骨细胞的增殖和活性有促进作用,且浓度为 1×10^{-8} mol/L ($P < 0.01$) 对联合共培养的成骨细胞增殖和活性的促进作用最强。

究其原因:① SP 可直接作用于成骨细胞,与成骨细胞 SP 受体结合,并进一步激活细胞内部第二信使 Ca^{2+} ,继而作用于成骨细胞的增殖^[14]。② SP 可促进内皮细胞的增殖从而间接作用于成骨细胞来促进成骨细胞的增殖与活性。SP 参与调控内皮的静脉张力,其作用过程可能是最先激活内皮细胞 IP 系统,从而通过释放细胞内储存的 Ca^{2+} 以及连锁的胞膜 Ca^{2+} 通道开放而增高胞浆游离 Ca^{2+} ,从而发挥其调节作用^[16,17]。P 物质可促进内皮细胞分泌细胞介质,表达骨形态发生蛋白、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)以及四环素等,对 OB 具有与 TGF- β 相似的调节作用,VEC 能够合成和分泌 VEGF,因此能明显提高 OB 的 ALP 活性水平^[18-20]。本实验通过三种检测确定 SP 对共培养细胞的最适浓度以及作用效果,指导后期的具体作用机制的研究。因而其详尽的作用机制较为复杂,有待进一步深入的研究其具体的分子作用机制。总之,其可以作用于新的种子细胞促进其成骨与血管化再生过程,进而通过组织工程骨应用于临床。

参考文献(References)

- [1] Mori T, Ogata T, Okumura H, et al. Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1999, 262(2): 418-422
- [2] Shah A R, Shah S R, Oh S, et al. Migration of co-cultured endothelial cells and osteoblasts in composite hydroxyapatite/poly(lactic acid) scaffolds[J]. Annals of biomedical engineering, 2011, 39(10): 2501-2509
- [3] Sun H, Qu Z, Guo Y, et al. In vitro and in vivo effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on poly(lactide-glycolic acid) (PLGA) scaffolds[J]. Biomed Eng Online, 2007, 6: 41-41
- [4] Saleh F A, Whyte M, Ashton P, et al. Regulation of mesenchymal stem cell activity by endothelial cells [J]. Stem Cells and Development, 2010, 20(3): 391-403
- [5] Santos M I, Unger R E, Sousa R A, et al. Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone starch scaffold and the in vitro development of vascularization [J]. Biomaterials, 2009, 30(26): 4407-4415
- [6] Trejo C G, Lozano D, Manzano M, et al. The osteoinductive properties of mesoporous silicate coated with osteostatin in a rabbit femur cavity defect model[J]. Biomaterials, 2010, 31(33): 8564-8573
- [7] Bo Y, Yan L, Gang Z, et al. Effect of calcitonin gene related peptide on osteoblast differentiation in an osteoblast and endothelial cell co-culture system[J]. Cell Biology International, 2012, 36(10): 909-915
- [8] Grellier M, Ferreira Tojais N, Bourget C, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells [J]. Journal of cellular biochemistry, 2009, 106(3): 390-398
- [9] Thébaud N B, Siadous R, Bareille R, et al. Whatever their differentiation status, human progenitor derived or mature endothelial cells induce osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2012, 6(10): e51-e60
- [10] Shih C, Bernard G W. Neurogenic substance P stimulates osteogenesis in vitro[J]. Peptides, 1997, 18(2): 323-326
- [11] Goto T, Nakao K, Gunjigake K K, et al. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors[J]. Neuropeptides, 2007, 41(1): 25-31
- [12] Adamus M A, Dabrowski Z J. Effect of the neuropeptide substance P on the rat bone marrow derived osteogenic cells in vitro[J]. Journal of cellular biochemistry, 2001, 81(3): 499-506
- [13] Azuma H, Kido J, Ikeda D, et al. Substance P enhances the inhibition of osteoblastic cell differentiation induced by lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis[J]. Journal of periodontology, 2004, 75(7): 974-981
- [14] Onuoha G N. Circulating sensory peptide levels within 24 h of human bone fracture[J]. Peptides, 2001, 22(7): 1107-1110
- [15] Gallicchio M, Rosa A C, Benetti E, et al. Substance P induced cyclooxygenase 2 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. British journal of pharmacology, 2006, 147(6): 681-689
- [16] Sollini M, Frieden M, Bény J L. Charybdotoxin sensitive small conductance KCa channel activated by bradykinin and substance P in endothelial cells[J]. British journal of pharmacology, 2002, 136(8): 1201-1209
- [17] Lerner U H. Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation [J]. Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 2002, 2(5): 440-447
- [18] Shaik-Dasthagirisahab Y B, Varvara G, Murmura G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation [J]. International journal of immunopathology and pharmacology, 2012, 26(2): 327-335
- [19] Mapp P I, McWilliams D F, Turley M J, et al. A role for the sensory neuropeptide calcitonin gene related peptide in endothelial cell proliferation in vivo [J]. British journal of pharmacology, 2012, 166(4): 1261-1271
- [20] Castellani M L, Galzio R J, Felaco P, et al. VEGF, substance P and stress, new aspects: a revisited study [J]. Journal of biological regulators and homeostatic agents, 2010, 24(3): 229-229