

糖浓度及BMP4对小鼠诱导型多能干细胞成骨作用的研究

邢舰誉^{1#} 张宇^{2#} 陈墨² 王屹博¹ 丁超¹ 史久慧^{1*} 刘忠华^{2*}

(¹哈尔滨医科大学附属第一医院, 哈尔滨 150006; ²东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)技术的建立为自体组织工程治疗带来了新的希望。鉴于糖尿病患者常伴有骨再生性障碍, 该研究比较了不同葡萄糖浓度下小鼠iPS细胞的成骨能力, 并探讨了骨形态蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)在该过程中的作用。实验结果显示: 成骨诱导21 d后, 低糖组茜素红阳性细胞比例和成骨基因*Runx2*、*Osteocalcin*的表达水平显著高于高糖组和自发分化组($P<0.05$); BMP4的添加提高了高糖组茜素红阳性细胞比例及*Osteocalcin*的表达水平($P<0.05$), 而对自发分化组细胞的成骨水平无影响。该结果表明: 低葡萄糖含量对小鼠iPS细胞的骨向分化有促进作用, 尽管BMP4可以提高高糖组小鼠iPS细胞的成骨能力, 但仅在成骨分化条件下发挥作用。

关键词 iPS细胞; 成骨分化; 葡萄糖浓度; BMP4

Effects of Glucose Level and BMP4 on Osteogenic Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells

Xing Jianyu^{1#}, Zhang Yu^{2#}, Chen Mo², Wang Yibo¹, Ding Chao¹, Shi Jiuhui^{1*}, Liu Zhonghua^{2*}

(¹The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150006, China;

²College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Induced pluripotent stem (iPS) cell technology casts a light on autologous cell/tissue transplantation. Considering that diabetes is combined with delayed bone regeneration, so in this study, we investigated osteogenic capability of mouse iPS cells in the media with different glucose levels and evaluated effect of BMP4 (bone morphogenetic protein 4) on the osteogenic capability of mouse iPS cells. The results showed that, after 21 days of osteogenic induction, low-glucose-level group had a higher percentage of alizarin red S-positive cells and elevated mRNA levels of osteogenic genes, *Runx2* and *Osteocalcin*, compared with those of the high-glucose-level group and spontaneous differentiation group ($P<0.05$); BMP4 treatment increased the percentage of alizarin red S-positive cells and expression level of *Osteocalcin* in high-glucose-level group ($P<0.05$), but had no effect in spontaneous differentiation group. The results indicated that low glucose level promoted osteogenetic differentiation of mouse iPS cells; Although BMP4 could enhance osteogenic ability in high-glucose-level group, it functioned specifically during osteogenesis.

Key words induced pluripotent stem cells; osteogenic differentiation; concentration of glucose; BMP4

收稿日期: 2013-12-13 接受日期: 2014-02-06

国家自然科学基金(批准号: 31301211)和哈尔滨医科大学心肌缺血省部共建教育部重点实验室开放课题基金(批准号: KF201317)资助的课题
#为共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0451-53639784, E-mail: tsjj926@163.com; Tel: 0451-55101729, E-mail: liu086@126.com

Received: December 13, 2013 Accepted: February 6, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31301211) and Open Project Program of Key Laboratory of Myocardial Ischemia of Harbin Medical University (Grant No.KF201317)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-451-53639784, E-mail: tsjj926@163.com; Tel: +86-451-55101729, E-mail: liu086@126.com

网络出版时间: 2014-04-30 17:56 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0417.html>

先天异常、外伤或疾病等原因引起的大范围骨缺损往往需要骨的重建。目前, 常规有效的方法均依赖于骨或其替代物的移植。然而, 糖尿病患者常常伴有钙磷代谢紊乱引起的继发性骨量减少、骨质疏松等糖尿病性骨病, 从而严重影响了移植物的骨结合能力及其功能^[1]。所以, 如何增加糖尿病患者的骨含量、改善糖尿病患者的骨质量是目前骨再生医学研究的热点。

随着组织工程和细胞工程技术的发展, 应用干细胞进行再生医学治疗的研究受到越来越多的关注。从骨髓、脐带分离的间充质干细胞具有较强的增殖分化能力、低免疫原性, 长期以来都是该领域的“明星细胞”。然而, 这类细胞来源有限, 成分复杂, 增殖分化能力容易受到年龄、身体状况等的影响, 这些大大限制了其临床应用^[2-5]。近年来, 诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)技术的建立和发展为干细胞治疗带来了新的曙光, 这项技术不仅使最初基于胚胎的“治疗性克隆”的设想在体细胞上得到了实现——摆脱了伦理学上的限制, 还避免了异体移植产生免疫排斥的风险。

胚胎发育过程中, 骨形态蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)家族成员在促进成骨方面发挥重要作用^[6-8]。目前, 国内外对BMPs的研究主要集中在它们如何提高成体干细胞和胚胎干细胞的成骨能力上。尽管有研究表明, iPS细胞在体内外均可以定向诱导分化为成骨细胞^[2], 但对其分化条件、分化效率的探讨及BMPs能否影响iPS细胞成骨能力的研究尚未见报道。据此, 本研究比较了不同葡萄糖浓度下小鼠iPS细胞的骨向分化能力, 并探讨了BMP4在该过程中的作用, 以期最终为提高糖尿病患者的成骨能力提供实验依据和理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠iPS细胞系(p14-2-2)由中国科学院动物所干细胞库惠赠。其诱导方法是将Yamanaka鼠源四因子(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)经逆转录病毒转染获得, 使用的源头细胞是小鼠胚胎成纤维细胞。

1.2 试剂及仪器

低糖DMEM、高糖DMEM培养基购自Hyclone公司; 胎牛血清(FBS)、青霉素、链霉素、Tryple EXPRESS购自Gibco公司; 茜素红S、地塞米松、β-

甘油磷酸钠、抗坏血酸均购自Sigma公司; BMP4购自R&D公司; 一抗Oct4、Sox2、Nanog和SSEA1购自Millipore公司; 碱性磷酸酶染色试剂盒、H&E染色试剂盒购自碧云天股份有限公司。

12孔和24孔细胞培养板(Costar); 二氧化碳培养箱(Thermo-FORMA); 倒置显微镜(Olympas cx21); 石蜡切片机(Leica-RM2235); Real-time PCR仪(ABI 7500)。

1.3 小鼠iPS细胞培养

小鼠iPS细胞培养于LN培养液(LN培养液内含48% DMEM/F12培养基、48% Neurobasal培养基、1 000 U/mL白血病抑制因子(LIF)、0.5% N2、1% B27、0.5 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)中, 置于37 °C、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养, 丝裂霉素处理的小鼠胎儿成纤维细胞作为饲养层, Tryple EXPRESS消化传代。

1.4 小鼠iPS细胞鉴定

1.4.1 碱性磷酸酶染色 将6孔培养板中培养的小鼠iPS细胞弃去培养液, 加入4%多聚甲醛固定1 min, 清洗液清洗3次; 后将现配的碱性磷酸酶反应液加入, 避光室温孵育15 min, 清洗液清洗3次, 显微镜下观察拍照。

1.4.2 免疫荧光鉴定 除去细胞培养液, PBS(pH7.2)洗3次后加入4%多聚甲醛固定30 min; PBS洗3次, 37 °C透膜液透膜1 h; 清洗后, 室温下封闭液孵育1 h, 加相应的一抗Oct4、Sox2、SSEA1或Nanog, 4 °C孵育过夜; PBS洗3次后避光加入二抗, 37 °C避光孵育1 h; Hoechst33342染核15 min; 清洗3次, 加入防荧光淬灭剂, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.3 核型鉴定 培养皿中加入终浓度为0.4 g/mL的秋水仙素处理2 h; Tryple EXPRESS消化小鼠iPS细胞, 明胶贴壁去掉饲养层细胞后, 收集细胞于低渗液中, 37 °C下孵育15 min; 离心弃上清, 加入冷固定液冰上固定20 min; 重复上述步骤一次后离心; 加入200 μL冷固定液, 滴片; 吉姆萨染色5 min后镜检。

1.4.4 多能性基因表达检测 *GAPDH*为内参, 小鼠胚胎成纤维细胞为对照, PCR检测小鼠iPS细胞内源性多能性基因*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*c-Myc*、*FGF4*的表达。所用引物由华大基因合成, 序列如表1所示。

1.4.5 畸胎瘤组织切片鉴定 Tryple EXPRESS消化小鼠iPS细胞, 明胶贴壁去掉饲养层细胞后, 以1×10⁷密度注入6只6周龄裸鼠大腿内侧; 3周后处死, 取样固定, 按照标准的石蜡切片制作及苏木精-伊红

(H&E)染色步骤操作;封片后观察三胚层形成情况。

1.5 拟胚体(embryoid body, EB)的制备及EB骨向诱导分化

明胶贴壁去除iPS中的饲养层细胞;将较纯净的iPS细胞悬液离心;用成纤维细胞培养液(含有10% FBS、1%双抗、1%谷氨酰胺、1% NEAA(non-essential amino acids)的高糖DMEM培养液)将细胞重悬,接种到培养皿内摇匀,37 °C温箱孵育;3 d后EB形成。将EB机械吹打为小细胞团块后,以每孔(15~20)/孔EB的密度接种于铺有明胶的6孔板中,根据实验目的添加不同培养液培养21 d,隔天换液。

骨诱导培养液:含有10% FBS、1%双抗、50 mg/L 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、 1×10^{-8} mol/L 地塞米松的低糖或高糖DMEM;成纤维细胞培养液:含有10% FBS、1%双抗、1%谷氨酰胺、1% NEAA的高糖DMEM培养液。

实验分为自发分化组(成纤维细胞培养液)、高糖骨诱导组(高糖DMEM骨诱导培养液,其中D-Glucose含量为4 500 mg/L)和低糖骨诱导组(低糖DMEM骨诱导培养液,其中D-Glucose含量为1 100 mg/L)。另外,BMP4处理组的BMP4终浓度为100 ng/mL。

1.6 茜素红染色

分别于骨向诱导第7, 14, 21 d进行茜素红染色。95%乙醇室温固定10 min, PBS清洗3次,茜素红37 °C染色30 min, PBS清洗3次,倒置显微镜下观察拍照。

1.7 成骨基因表达检测

提取细胞的总RNA,具体过程参照Trizol Reagent说明书。反转录为cDNA后,按照TaKaRa SYBR PrimeScript™ Kit说明书建立反应体系。采用Real-time PCR检测成骨基因*Runx2*和*Osteocalcin*表达水平, *β -actin*为内参。所用引物由华大基因合成,引物序列为:*Osteocalcin-F*: TCT GAC AAA GCC TTC ATG TCC, *Osteocalcin-R*: AAA TAG TGA TAC CGT

AGA TGC G; *Runx2-F*: CCT GAA CTC TGC ACC AAG TC, *Runx2-R*: GAG GTG GCA GTG TCA TCA TC; *β -actin-F*: GAC GGC CAG GTC ATC ACT ATT G, *β -actin-R*: CCA CAG GAT TCC ATA CCC AAG A。

1.8 数据统计

采用SPSS软件包(10.0.1)进行数据处理,显著性分析采用Student's *t*检验, $P < 0.05$ 认为存在显著差异, $P < 0.01$ 认为存在极显著差异。

2 结果

2.1 小鼠iPS细胞形态学观察及核型鉴定

小鼠iPS细胞呈集落状生长,形成的克隆呈岛状或鸟巢状,边界清晰,表面光滑,细胞之间界限不明显,如图1A实线箭头所示。小鼠iPS细胞碱性磷酸酶染色为阳性(图1B实线箭头),而作为对照的饲养层细胞为阴性(图1B虚线箭头)。小鼠iPS细胞经过多次传代后进行核型分析,光镜下观察结果显示,其染色体的数目、形态并未发生异常和改变(图2)。

2.2 小鼠iPS细胞多能性基因的表达分析

免疫荧光结果显示,小鼠iPS细胞的*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*SSEA1*均呈阳性表达(图3A~图3H)。而饲养层细胞中上述多能性基因的表达呈阴性。接下来我们又检测了小鼠iPS细胞内源性多能基因的表达情况,并以小鼠胚胎成纤维细胞作为阴性对照。结果如图3I所示,小鼠iPS细胞的内源性基因*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*c-Myc*、*Fgf4*均被激活,而小鼠胚胎成纤维细胞中上述基因的表达呈阴性。

2.3 小鼠iPS细胞的分化能力检测

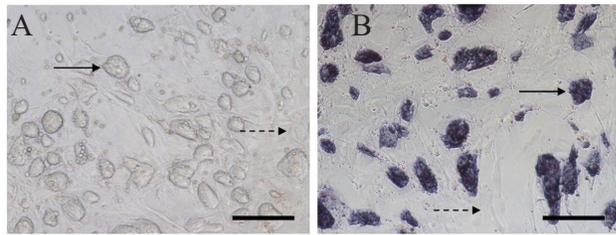
将小鼠iPS细胞悬浮培养3 d后可见拟胚体形成,镜下观察拟胚体呈半透明的圆球状(图4D),可见该细胞具有良好的体外分化能力。

将小鼠iPS细胞注入裸鼠皮下组织,3周后可见畸胎瘤形成。图4A~4C为畸胎瘤石蜡切片经苏木精-

表1 引物序列表

Table 1 Primer list

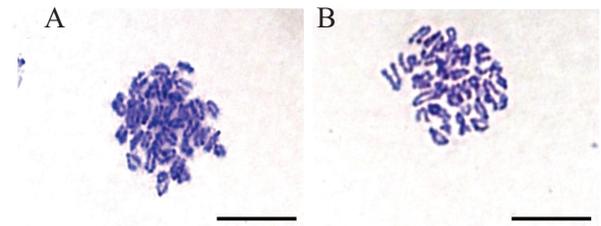
基因名称 Gene name	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>Nanog</i>	CAG GTG TTT GAG GGT AGC TC	CGG TTC ATC ATG GTA CAG TC
<i>Fgf4</i>	CGT GGT GAG CAT CTT CGG AGT GG	CCT TCT TGG TCC GCC CGT TCT TA
<i>Oct4</i>	TCT TTC CAC CAG GCC CCC GGC TC	TGC GGG CGG ACA TGG GGA GAT CC
<i>Sox2</i>	TAG AGC TAG ACT CCG GGC GAT GA	TTG CCT TAA ACA AGA CCA CGAA AA
<i>c-Myc</i>	TGA CCT AAC TCG AGG AGG AGC TGG AAT C	AAG TTT GAG GCA GTT AAA ATT ATG GCT GAA GC
<i>GAPDH</i>	CCG CAT CTT CTT GTG CAG TG	CTG TGG TCA TGA GCC CTT CC



A: 小鼠iPS细胞; B: 小鼠iPS细胞碱性磷酸酶染色。标尺=200 μm。
A: the morphology of mouse iPS; B: alkaline phosphatase staining of mouse iPS. Scale bar=200 μm.

图1 小鼠iPS细胞形态及碱性磷酸酶染色

Fig.1 The morphology and alkaline phosphatase staining of mouse iPS cells

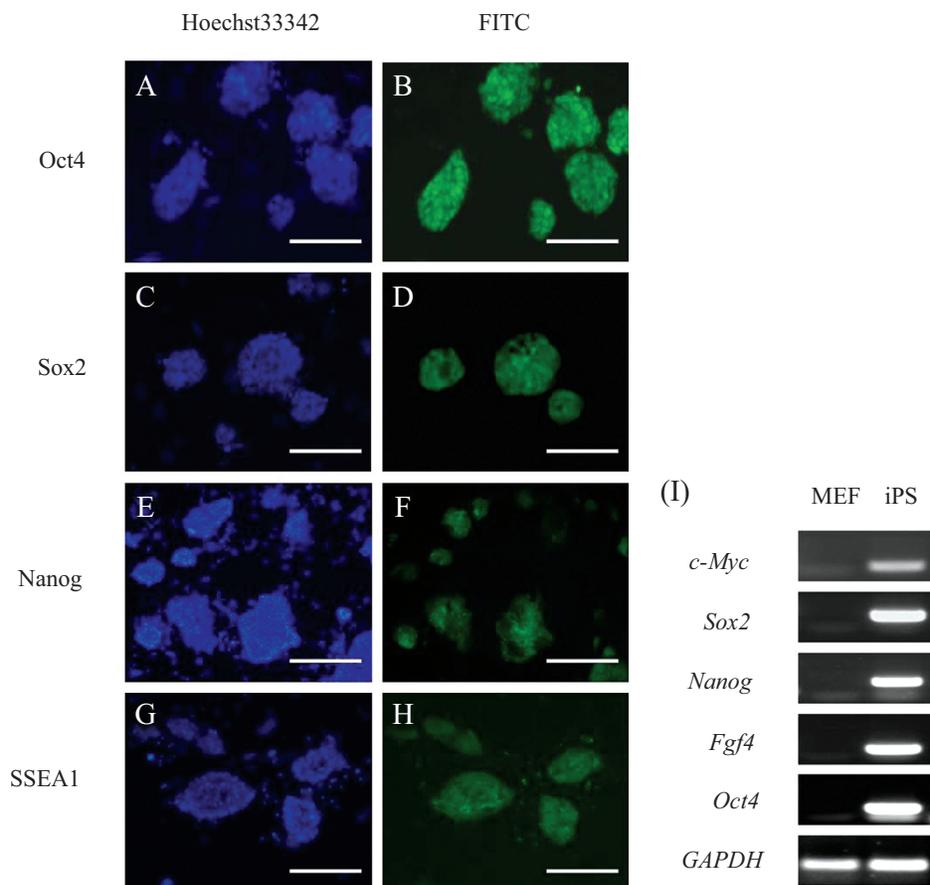


A: 第28代细胞的核型, 2n=40; B: 第46代细胞的核型, 2n=40。标尺=20 μm。

A: P=28, 2n=40; B: P=46, 2n=40. Scale bar=20 μm.

图2 小鼠iPS细胞的核型分析

Fig.2 Karyotype analysis of mouse iPS cells



A、C、E、G: hoechst33342染色; B、D、F、H: FITC标记的免疫荧光。其中A、B为Oct4; C、D为Sox2; E、F为Nanog; G、H为SSEA1; I: 内源性多能性基因mRNA表达检测。标尺=100 μm。

A,C,E,G: hoechst33342 staining; B,D,F,H: immunofluorescence assay for FITC-labeled antibody. A,B: Oct4; C,D: Sox2; E,F: Nanog; G,H: SSEA1; I: the mRNA levels of endogenous pluripotency markers of mouse iPS cells. Scale bar=100 μm.

图3 小鼠iPS细胞多能性基因的表达检测

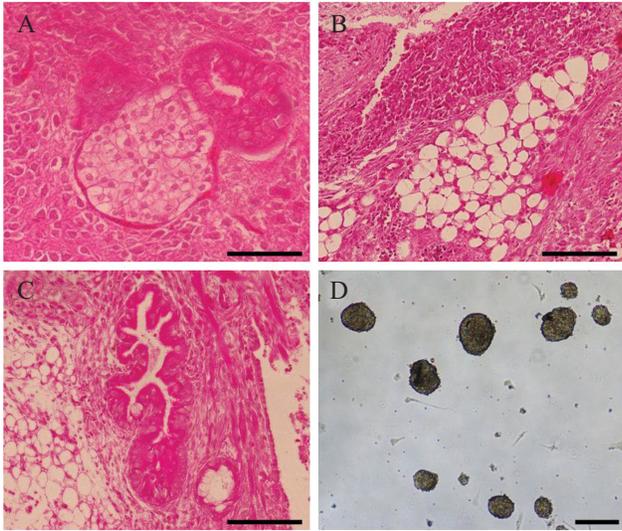
Fig.3 The expression of pluripotent-specific genes of mouse iPS cells

伊红(H&E)染色后镜检得到的代表性图片, 可见瘤体具有丰富的组织形态, 拥有三胚层来源的典型结构, 包括神经组织(外胚层, 图4A)、脂肪组织(中胚层, 图4B)及分泌腺体样组织(内胚层, 图4C)。结果显示

该细胞具有良好的体内分化能力。

2.4 葡萄糖含量对小鼠iPS细胞成骨分化的影响

钙沉积水平是衡量细胞骨向分化程度的一个经典指标。自发分化组、高糖骨诱导组和低糖骨诱

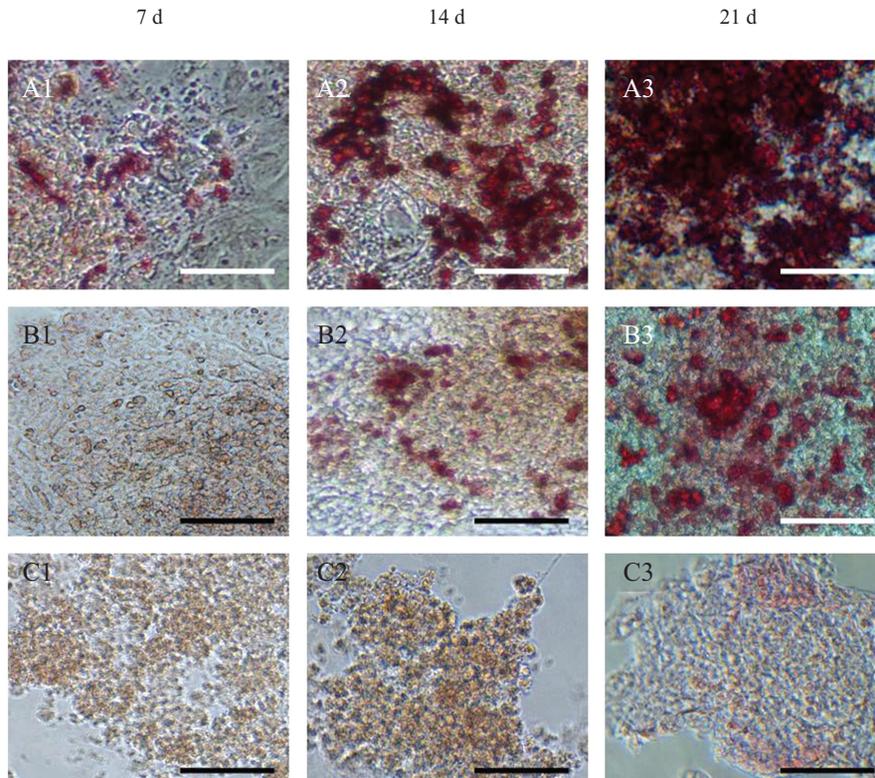


A~C: 小鼠畸胎瘤石蜡切片经H&E染色后进行组织学检测。A: 神经组织; B: 脂肪组织; C: 分泌腺体样组织; D: 拟胚体。标尺=50 μm。

A~C: paraffin section of teratoma derived from mouse iPS cells stained with hematoxylin and eosin. A: neural tissue; B: adipose tissue; C: gland-like tissue; D: embryoid bodies. Scale bar=50 μm.

图4 小鼠iPS细胞分化能力检测

Fig.4 Differentiation ability of mouse iPS cells



A1~A3: 低糖组; B1~B3: 高糖组; C1~C3: 自发分化组(对照组)。A1、B1、C1: 分化7 d; A2、B2、C2: 分化14 d; A3、B3、C3: 分化21 d。标尺=50 μm。

A1~A3: low glucose group; B1~B3: high glucose group; C1~C3: spontaneous differentiation group (control group). A1,B1,C1: 7 days after differentiation; A2,B2,C2: 14 days after differentiation; A3,B3,C3: 21 days after differentiation. Scale bar=50 μm.

图5 高葡萄糖水平抑制小鼠iPS细胞的成骨分化

Fig.5 The effect of high glucose level on mouse iPS cells osteogenic differentiation

导组的细胞分别经过7, 14, 21 d培养后, 进行茜素红染色观察其钙沉积情况。如图5所示, 随着诱导时间的延长, 高糖组和低糖组的红色钙结节数量明显增多, 且高糖组的钙结节数低于同时期的低糖组(图5A1~图5A3、图5B1~图5B3), 而自发分化组在整个培养期间均未见明显的钙结节产生(图5C1~图5C3)。应用Image-J软件对随机视野中茜素红着色面积(百分比)进行分析, 结果显示, 诱导分化的14, 21 d, 高糖组的茜素红着色面积显著低于低糖组($P < 0.05$)(表2)。该结果提示, 培养液中的高葡萄糖含量降低了骨向分化细胞的钙沉积水平。

*Runx2*和*Osteocalcin*是成骨分化时期表达的两个重要基因^[9]。骨诱导21 d, 采用Real-time PCR法检测三组中*Runx2*和*Osteocalcin*的表达水平(图6)。结果显示, 高糖组*Runx2*和*Osteocalcin*的表达水平显著低于低糖组。

上述结果表明, 在适当的培养条件下, 小鼠iPS细胞可以进行定向成骨分化, 而培养基中的高葡萄糖

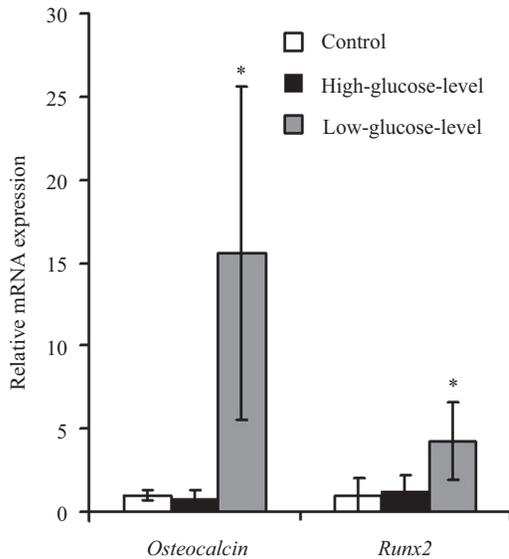
表2 Image-J软件分析茜素红染色面积(%)

Table 2 Image-J software analysis of the percentage of alizarin red positive cells (%)

分组	7天	14天	21天
Group	7 d	14 d	21 d
Low-glucose-level	4.33±1.53 ^b	25.33±2.31 ^c	69±8 ^c
High-glucose-level	1.67±2.08 ^{ab}	9.33±4.51 ^b	33.67±11.72 ^b
Control	0 ^a	1.67±1.53 ^a	1±1 ^a

同列数据上标不含有相同字母者表示差异显著($P<0.05$)。mean±S.D., $n=4$ 。

The value in the same column with different superscripts represented a significant difference ($P<0.05$). mean±S.D., $n=4$.



$P<0.05$, 与低糖组比较。

$P<0.05$ vs low-glucose-level group.

图6 骨分化基因的mRNA表达水平检测

Fig.6 The mRNA level of osteogenic gene

糖含量抑制了细胞的骨向分化能力。

2.5 BMP4对小鼠iPS细胞成骨分化的影响

有研究表明, BMP4能够促进骨髓间充质干细胞的骨向分化, 为了研究BMP4对小鼠iPS细胞成骨的影响, 我们比较了BMP4处理组与非处理组的成骨效率。结果显示, 骨诱导第7 d, BMP4处理的高糖组出现了较多的钙结节, 此时其他三组尚未出现明显

钙化(图7A1、图7B1、图7C1、图7D1); 骨诱导第14 d和21 d, 高糖组和BMP4处理的高糖组均有明显的钙沉积, 且BMP4处理的高糖组的钙结节数量多于高糖组(图7A2~图7A3、图7B2~图7B3); 在整个培养期间, 自发分化组均未见明显钙沉积, 且BMP4的加入对其茜素红染色结果没有影响(图7C2~图7C3、图7D2~图7D3)。应用Image-J软件分析茜素红染色面积, 结果如表3所示, BMP4处理的高糖组在第14, 21d的茜素红染色面积显著高于高糖组($P<0.05$), 其面积百分比约为后者的2倍。

骨诱导21 d后, 我们检测了成骨基因的表达水平。结果显示, BMP4处理组的*Osteocalcin*的mRNA表达量显著高于高糖组($P<0.05$), 而对照组(即自发分化组)和经BMP4处理的对照组中, *Runx2*和*Osteocalcin*的表达水平无显著性差异(图8)。

上述结果表明, BMP4可以提高高糖培养环境下的小鼠iPS细胞的成骨效率, 而对非骨向分化的细胞无成骨促进作用。

3 讨论

尽管骨组织有一定的再生能力, 但若缺损严重仍然不能满足组织修复的需求。干细胞一方面通过细胞分裂维持自我更新, 另一方面可以分化为特定的细胞类型。干细胞的上述特性使其在再生医学

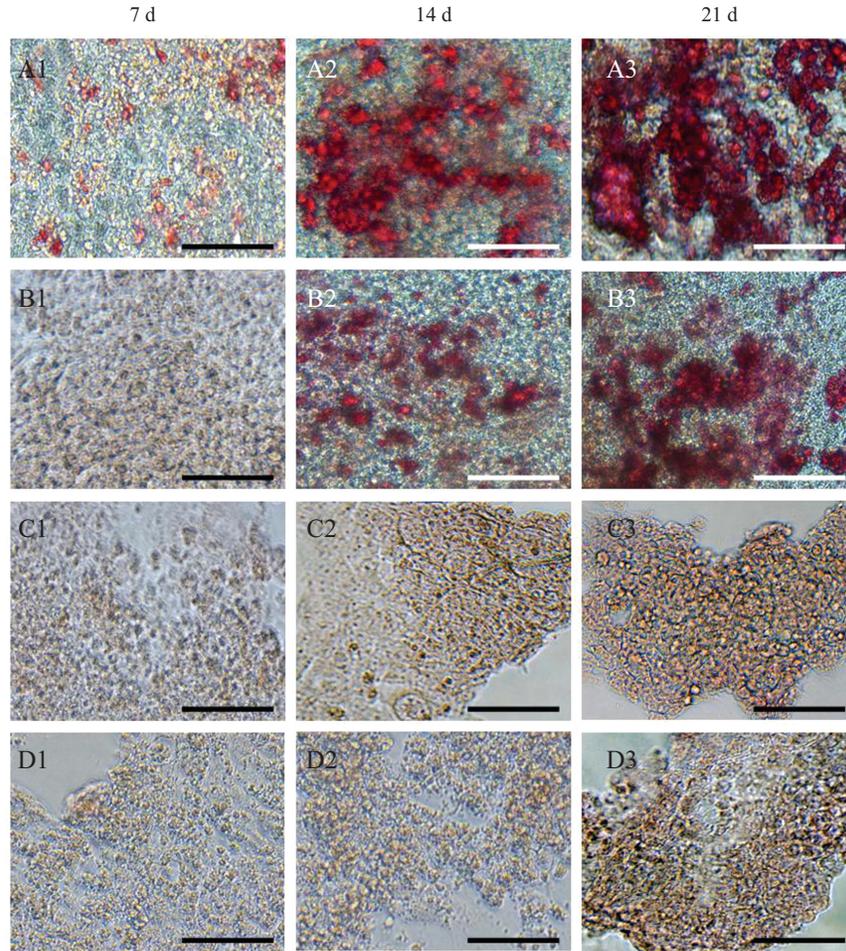
表3 Image-J软件分析茜素红染色面积(%)

Table 3 Image-J software analysis of the percentage of alizarin red positive cells (%)

分组	7天	14天	21天
Group	7 d	14 d	21 d
High-glucose-level+BMP4	6±3.61 ^{ab}	37.33±8.74 ^c	64±7.94 ^c
High-glucose-level	2.33±0.58 ^b	17.67±4.04 ^b	32±7 ^b
Control+BMP4	1.33±0.58 ^{ab}	1±1.73 ^a	1.67±0.58 ^a
Control	0.33±0.58 ^a	1±1 ^a	1±1.73 ^a

同列数据上标不含有相同字母者表示差异显著($P<0.05$)。mean±S.D., $n=4$ 。

The value in the same column with different superscripts represent a significant difference ($P<0.05$). mean±S.D., $n=4$.

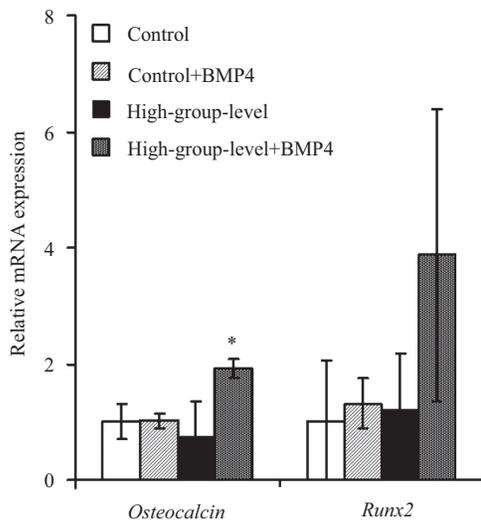


A1~A3: 高糖组+BMP4; B1~B3: 高糖组; C1~C3: 对照组+BMP4; D1~D3: 对照组。A1、B1、C1、D1: 分化7 d; A2、B2、C2、D2: 分化14 d; A3、B3、C3、D3: 分化21 d。标尺=50 μm。

A1~A3: high glucose+BMP4 group; B1~B3: high glucose group; C1~C3: control+BMP4 group; D1~D3: control group. A1,B1,C1,D1: 7 days after differentiation; A2,B2,C2,D2: 14 days after differentiation; A3,B3,C3,D3: 21 days after differentiation. Scale bar=50 μm.

图7 BMP4提高了小鼠iPS细胞的成骨效率

Fig.7 The effect of BMP4 on mouse iPS cells osteogenic differentiation



$P < 0.05$, 与高糖组比较。

$P < 0.05$ vs high-glucose-level group.

图8 骨分化基因的mRNA表达水平检测

Fig.8 The mRNA level of osteogenic gene

领域拥有广阔的应用前景。iPS细胞的出现更是引起了再生医学界的广泛关注: 首先将体细胞重编程为iPS细胞, 再将定向诱导的分化细胞用于细胞移植治疗, 可以避免免疫排斥的风险和伦理学上的争议。目前, 关于iPS细胞用于骨修复的研究仅限于探索阶段^[10], 对其定向诱导体系的优化和评价是亚临床研究的重要环节。于是, 本研究比较了不同葡萄糖浓度下小鼠iPS细胞的骨向分化能力, 并探讨了BMP4在该过程中的作用。

iPS细胞的鉴定包括较多环节, 如多能性基因的表达、核型分析、体外体内的分化能力等^[11-13]。其中, iPS细胞内源性多能性基因的激活是其重编程的重要指标, 基因的选择以ES细胞的特异性标志为参照^[14]。本实验采用RT-PCR法, 检测了小鼠iPS细胞内源性基因*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*c-Myc*、*Fgf4*的表

达情况, 结果显示其表达均为阳性, 可见所使用的细胞具有较好的多能性。外源基因的导入及细胞的快速增殖有可能增加细胞染色体畸变的概率, 而染色体畸变会提高细胞癌变的风险, 因此核型分析对于判定“健康细胞”具有重要意义。此外, iPS细胞定向诱导分化的前提是其本身具有分化能力, 所以我们检测了该细胞体外、内的分化情况, 结果发现该细胞自发分化能力较强, 皮下注射2周就可见明显的畸胎瘤形成, 3周的组织切片显示瘤体具有丰富的组织形态, 均匀分布三胚层来源的组织结构。

Kim等^[15]的研究显示, 牙周韧带细胞在低糖葡萄糖培养基(100 mg/L葡萄糖)和高葡萄糖培养基(4500 mg/L葡萄糖)中具有不同的增殖、分化效率, 高葡萄糖含量抑制了牙周韧带细胞的增殖和分化。本研究发现, iPS细胞成骨诱导期间, 高糖组的钙结节数明显少于低糖组, 这与Balint等^[16]在MC3T3细胞上得出的结论一致, 他们认为高糖浓度抑制了钙质在新生结节上的沉积。*Runx2*和*Osteocalcin*是成骨分化过程中的两个重要的基因: *Runx2*被认为是骨分化的启动因子, 比ALP出现的更早, 并且小鼠iPS细胞过表达该基因后, 其成骨能力得到提高; *Osteocalcin*是骨分化成熟的标志性分子^[17-18]。我们检测了骨诱导21 d后上述基因的表达水平, 结果显示, 低糖组*Runx2*和*Osteocalcin*的表达量均高于高糖组, 尤其是*Osteocalcin*。该结果与Gopalakrishnan等^[19]在骨髓间充质干细胞上得出的结论相似, 他们认为葡萄糖以浓度依赖的方式抑制了成骨前体细胞的增殖和分化。然而, 高糖组细胞经BMP4处理后, 细胞的钙化程度和成骨基因表达水平均得到提高, 尽管*Runx2*在两组间不存在显著差异, 但这或许是由于较大的标准差引起的。本实验还发现, BMP4的添加并没有引起自发分化组细胞成骨效率的改变, 可见, 尽管BMP4可以提高iPS细胞的成骨能力, 但仅在细胞骨向分化时发挥作用。

综上所述, 本研究以具有良好的多能性及分化能力的小鼠iPS细胞为对象, 比较了不同葡萄糖含量对该细胞成骨效率的影响, 并探讨了BMP4在该过程中的作用。实验证实, 在适当的诱导条件下, 小鼠iPS细胞可以进行成骨分化, 并且低葡萄糖含量、BMP4处理均可提高该细胞的成骨效率。然而该结论与体内试验的一致性及相关的作用机制还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 吕 娇, 刘洪臣. 糖尿病对种植体骨影响结合的研究进展. 中华老年口腔医学杂志(Lü Jiao, Liu Hongchen. Research progress of effects on diabetes mellitus patients' osseointegration around implants. Chinese Journal of Geriatric Dentistry) 2008; 6(2): 123-6.
- 2 Bilousova G, Hyunjun D, Eennis R, King KB, Langhe SD, Chick WS, *et al.* Osteoblasts derived from induced pluripotent stem cells from calcified structures in scaffolds both *in vitro* and *in vivo*. Stem Cells 2011; 29(2): 206-16.
- 3 Hayashi T, Misawa H, Nakahara H, Noguchi H, Yoshida A, Kobayashi N, *et al.* Transplantation of osteogenically differentiation mouse iPS cells for bone repair. Cell Transplant 2012; 21: 591-600.
- 4 Wen Y, Wang F, Xu X, Zhang WC, Li YH, Pei XT, *et al.* Application of induced pluripotent stem cells in generation of a tissue-engineered tooth-like structure. Tissue Eng Part A 2012; 18(15/16): 1677-85.
- 5 Duan XJ, Tu QS, Zhang J, Ye JH, Sommer C, Mostoslavsky G. Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. J Cell Physiol 2010; 226: 150-7.
- 6 Rivera JC, Strohbach CA, Wenke JC, Rthbone CR. Beyond osteogenesis: An *in vitro* comparison of the potentials of six bone morphogenetic proteins. Front Pharmacol 2013; 4(125): 1-7.
- 7 Jiang X, Chen J, Chen C, Zhang X, Zhang Z. The ectopic study of tissue-engineered bone with hBMP-4 gene modified bone marrow stromal cells in rabbits. Chin Med J (Engl) 2005; 118(4): 281-8.
- 8 Mckay WF, Peck SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2. Int Orthop 2007; 31: 729-34.
- 9 Okamoto H, Matsumi Y, Takuko K, Ryoke K, Ryoke K, Shiota G. Involvement of microRNAs in regulation of osteoblastic differentiation in mouse induced pluripotent stem cells. PLoS One 2012; 7(8): e43800.
- 10 de Peppo GM, Marcos-Campos I, Kahler DJ, Alsalman D, Shang L, Vunjak-Novakovic G, *et al.* Engineering bone tissue substitutes from human induced pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110(21): 8680-5.
- 11 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent cells from mouse embryonic and adult human fibroblasts cultures by defined factors. Cell 2006; 126(4): 663-76.
- 12 Takahashi K, Yamanaka S, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, *et al.* Induction of pluripotent cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131(5): 11-5.
- 13 Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2009; 6(1): 1-9.
- 14 成 德, 雷 蕾, 卢智娟, 李 珍, 王华岩. 诱导多能干细胞(iPS)的诱导培养与鉴定. 生物工程学报(Cheng De, Lei Lei, Lu Zhi-juan, Li Zhen, Wang Huayan. Induction and characterization of induced pluripotent stem (iPS) cells, a review. Chinese Journal of Biological Engineering) 2010; 26(4): 421-30.
- 15 Kim HS, Park JW, Yeo SI, Choi BJ, Suh JY. Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells *in vitro*. Diabetes Res Clin Pract 2006; 74(1): 41-7.

- 16 Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM. Glucose-induced inhibition of *in vitro* bone mineralization. *Bone* 2001; 28(1): 21-8.
- 17 叶立伟, 武睿, 段亮, 张昀源, 杨霞, 陈娴, 等. 过表达S100A6对BMP9诱导的小鼠间充质干细胞C3H10T1/2成骨分化的影响. 中国细胞生物学学报(Ye Liwei, Wu Rui, Duan Liang, Zhang Yunyuan, Yang Xia, Chen Xian, *et al.* Effect of overexpressed S100A6 on osteogenic differentiation of BMP9 induced mesenchymal stem cell C3H10T1/2. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(8): 1087-93.
- 18 Tashiro E, Inamura M, Kawabata K, Sakurai F, Yamanishi K, Hayakawa T, *et al.* Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem cells* 2009; 27: 1802-11.
- 19 Gopalakrishnan V, Vignesh RC, Arunakaran J, Aruldas MM, Srinivasan. Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages. *Biochem Cell Biol* 2006; 84(1): 93-101.