

瘦素对绝经后骨质疏松病人骨髓间质干细胞定向分化后增殖的影响及相关机制研究

赵鹏¹, 李树锋²

(1. 焦作煤业(集团)有限责任公司中央医院, 河南 焦作 454000; 2. 山东省千佛山医院, 山东 济南 250014)

摘要: **目的** 探讨瘦素对绝经后骨质疏松病人骨髓间质干细胞(BMSCs)增殖分化的影响以及相关机制研究。 **方法** 留取20例因股骨颈骨折行股骨头置换股骨头, 分离获得骨髓间质干细胞, 利用成骨诱导培养液诱导培养, 检测 BMSCs 诱导前后细胞表面抗原表达, 将细胞分为5组: A组、B组、C组和D组分别加入 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的瘦素(leptin), 对照组不加入 leptin。MTT 法检测各组成骨样细胞增殖能力, 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中 *ALP*、*OCN*、*RANKL* 和 *OPN* 基因表达。 **结果** 相比于诱导前, 诱导后细胞表面 CD44 和 HLA-DR 表达量显著增加, 而 CD₉₀ 和 CD₁₀₅ 表达量下降 ($P < 0.05$); 与24 h时相比, A组、B组、C组、D组和对照组48、72、96 h时细胞增殖能力均增强 ($P < 0.05$); 与对照组相比, A组、B组和C组48、72、96 h时细胞增殖能力显著增强 ($P < 0.05$), 尤其是B组促增殖能力最强, 而D组各时点细胞增殖能力则降低 ($P < 0.05$); 与24 h时相比, A组、B组、C组、D组和对照组48、72、96 h时细胞中 *ALP*、*OCN* 和 *OPN* mRNA 相对表达量和 *OPN*/*RANKL* 比值均升高 ($P < 0.05$), 且呈现随时间推移逐渐升高趋势, 而 *RANKL* mRNA 相对表达量均降低 ($P < 0.05$), 且呈现随时间推移逐渐降低趋势; A组、B组、C组和D组组间相比, 48、72、96 h时细胞中 *ALP*、*OCN* 和 *OPN* mRNA 相对表达量和 *OPN*/*RANKL* 比值: B组 > C组 > A组 > D组, 而 *RANKL* mRNA 相对表达量: D组 > A组 > C组 > B组。 **结论** leptin 可促进绝经后骨质疏松病人 BMSCs 定向分化后成骨样细胞增殖分化, 且具有时间依赖性, 但存在最宜浓度。

关键词: 骨质疏松; 绝经后; 瘦素; 骨髓间质干细胞; 机制

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.06.020

Effect of leptin on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells after directional differentiation in postmenopausal osteoporosis patients and its related mechanism

ZHAO Peng¹, LI Shufeng²

(1. The Central Hospital of Jiaozuo Coal Group, Jiaozuo, Henan 454000, China;

2. Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Leptin on the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in postmenopausal osteoporosis patients and its related mechanism. **Methods** 20 cases of femoral heads were collected from patients with femoral neck fracture undergoing femoral head replacement. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated. The osteogenic induction medium was used to induce the culture. The cells were divided into five groups: group A, group B, group C and group D were given 10^{-10} , 10^{-9} and 10^{-8} $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ leptin respectively, while the control group was not given leptin. The proliferation of osteoblast-like cells were detected by MTT assay. The expressions of *ALP*, *OCN*, *RANKL* and *OPN* genes were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** Compared with before induction, the expression levels of CD44 and HLA-DR in cells after induction were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of CD90 and CD105 were decreased ($P < 0.05$). Compared with the 24 h, the cell proliferation ability at 48, 72 h and 96h in the group A, group B, group C, group D and control group were increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the proliferation abilities at 48, 72 h and 96 h in the group A, group B and group C were significantly increased ($P < 0.05$), especially, the proliferation ability in the group B was strongest, while the proliferation ability at different points were decreased ($P < 0.05$). Compared with 24 h, the relative expression levels of *ALP*, *OCN*, and *OPN* mRNA and the ratios of *OPN*/*RANKL* at 48, 72 h and 96 h in the group A, group B, group C, group D and control group were increased, and showed tendency to increase with time, while the relative expression levels of *RANKL* mRNA were decreased ($P < 0.05$), and showed tendency to decrease with time. Compared among group A, group B, group C, the relative expression levels of *ALP*, *OCN* and *OPN* mRNA and ratios of *OPN*/*RANKL* at 48, 72 h and 96h were: group B > group C > group A > group D, while the relative expression levels of *RANKL* mRNA: group D > group A > group C > group B. **Conclusion** Leptin could promote proliferation and differentiation of

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2014HM049)

osteoblast-like cells after directional differentiation of BMSCs in postmenopausal osteoporosis patients. This process might be achieved by adjusting the *OPN/RANKL* pathway, with time-dependent properties, and the optimum concentration.

Key words: Osteoporosis; Postmenopausal; Leptin; Mesenchymal stem cells; Mechanism

绝经后骨质疏松作为绝经后女性常见骨科疾病,常由于绝经而导致骨量减少、骨组织结构改变,使骨脆性增加、强度降低,增加了骨折风险,严重影响绝经后女性健康^[1]。目前,绝经后骨质疏松发生机制尚未完全清楚,瘦素(leptin)是由脂肪组织分泌的一种蛋白类激素,在糖脂代谢中发挥重要作用,而且与动脉粥样硬化的发生关系密切^[2],有研究^[3]指出,leptin在骨代谢中发挥多种作用,与成骨细胞增殖、分化、凋亡、矿化等过程密切相关。动物实验^[4]表明,leptin可刺激去卵巢大鼠骨髓基质细胞向成骨分化。本研究拟通过培养绝经后骨质疏松病人骨髓间质干细胞(BMSCs),利用leptin进行体外刺激,探讨其对BMSCs增殖分化的影响,并探讨可能的机制,以期临床防治提供基础资料。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例来源 选取2014年3月—2014年9月因股骨颈骨折在焦作煤业(集团)有限责任公司中央医院行股骨头置换的绝经后骨质疏松女性。纳入标准:(1)年龄60岁以上;(2)绝经后女性;(3)因股骨颈骨折而行股骨头置换;(4)所有病人均利用双能X线吸收仪测定股骨近端(股骨颈、大转子、Ward三角区)骨矿物质密度(BMD)T值,T值均 $< -2.5SD$ 。排除标准:(1)肝肾等重要脏器严重功能障碍者;(2)患有影响骨代谢性疾病者;(3)患有内分泌系统疾病者;(4)近30 d内服用影响骨代谢药物者。最终纳入20例病人,年龄62~85岁,平均年龄 (67.7 ± 9.8) 岁。本研究获焦作煤业(集团)有限责任公司中央医院伦理委员会批准,病人或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.1.2 试剂和设备 人瘦素购自上海拜力生物科技有限公司,DMEM/F12培养液和太牛血清均购自美国Gibco公司,抗坏血酸、地塞米松、 β -磷酸甘油均购自美国Sigma公司,免疫荧光标记的羊抗兔单克隆抗体CD44-FITC、CD90-FITC、CD105-PE和HLA-DR-FITC均购自美国BD公司,MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自上海居里生物科技有限公司,Trizol总RNA提取试剂盒购自美国Invitrogen公司,逆转录及PCR试剂盒均购自大连宝生物公司,碱性磷酸(ALP)、骨钙蛋白(OCN)、核因子- κB 受体活化因子配体(ANKL)、骨桥蛋白(OPN)及内参引

物序列均由上海生工公司设计合成,倒置相差显微镜购自日本Olympus公司,FACSCalibur流式细胞仪购自美国BD公司,680型酶标仪购自美国Bio-rad公司,荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs分离和培养 取行股骨头置换术后股骨头,在无菌流层条件下用电锯将股骨头切开,对切面用无菌生理盐水反复冲洗,利用密度梯度离心法将冲出的骨髓物质进行分离,获得BMSCs,置于含15%胎牛血清的低糖DMEM培养基中,于37℃、5% CO₂恒温培养箱中进行原代培养,待细胞融合度达到80%以上时,进行传代培养。

1.2.2 诱导BMSCs向成骨样细胞分化培养 取传第3代培养的BMSCs细胞,融合至50%时,换成成骨诱导培养液(含10%胎牛血清的DMEM培养液、抗坏血酸50 mg·L⁻¹、地塞米松10 nmol·L⁻¹、 β -磷酸甘油10 mmol·L⁻¹)培养,持续诱导培养5~7 d后,用倒置显微镜观察可见原代骨样细胞。

1.2.3 BMSCs诱导前后细胞表面抗原检测 分别于诱导前后取BMSCs,用含0.125%胰酶和0.05%乙二胺四乙酸的消化液消化后,用含1%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液对细胞密度调整至 5×10^9 L⁻¹,分别将免疫荧光标记的羊抗兔单克隆抗体CD44-FITC、CD90-FITC、CD105-PE和HLA-DR-FITC加入,4℃下避光孵育25 min,FITC或PE标记的鼠免疫球蛋白G(IgG)作为阴性对照组,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,利用流式细胞仪进行检测,利用重复检测6次,利用CELL Quest软件对细胞表面抗原表达情况进行分析。

1.2.4 细胞分组及处理 诱导培养9~10 d时,将细胞分为5组:A组:加入10 μ g·L⁻¹浓度的leptin;B组:加入 1×10^2 μ g·L⁻¹浓度的leptin;C组:加入 1×10^3 μ g·L⁻¹浓度的leptin;D组:加入 1×10^4 μ g·L⁻¹浓度的leptin;对照组:不加入leptin。继续培养,待细胞大部分贴壁生长时,完成后续实验操作。

1.2.5 MTT法检测各组成骨样细胞增殖能力 取各组大部分贴壁生长的细胞,接种于96孔板中,调整细胞密度为 5×10^4 个/孔,分别于接种24、48、72、96 h时,往每孔加入浓度为5 g·L⁻¹的MTT工作液10 μ L,孵育5 h,弃上清,每孔加入二甲亚砜0.12

mL,震荡 10 min,充分结晶后,上酶标仪于 490 nm 处测定各孔吸光度值(*A* 值),重复检测 3 次,取均值。

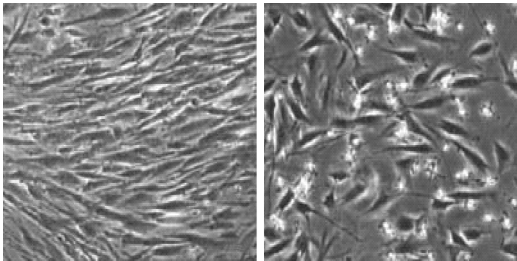
1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中 *ALP*、*OCN*、*RANKL* 和 *OPN* 基因表达 取各组传代培养的成骨样细胞,加入细胞裂解液裂解,用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒对细胞中总 RNA 进行提取,用紫外分光光度计对总 RNA 纯度进行检测,取 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ 作为合格样品。用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为模板单链 cDNA,以 cDNA 为模板,用 PCR 试剂盒进行 PCR,各引物及内参序列见表 1。PCR 反应条件:92 ℃ 1 min,92 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,74 ℃ 30 s,连续进行 40 次循环,每个样品均设 3 个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对各组细胞中 *ALP*、*OCN*、*RANKL* 和 *OPN* 基因相对表达量进行分析。基因引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列	
基因	序列(5' -3')
<i>ALP</i>	上游:CCACGTCCTTCACATTGCTG
	下游:GCAGTGAAGGCTTCTTGTC
<i>OCN</i>	上游:GACTGTGACGAGTTGGCTGA
	下游:CTGGAGAGGAGCAGAACTGG
<i>RANKL</i>	上游:AGCCTTTCAAGGGCCCGTGC
	下游:GGGCCACATCGAGCCACGAA
<i>OPN</i>	上游:TTGCAGTGATTTGCTTTTGC
	下游:GCCACAGCATCTGGGTATTT

1.3 统计学方法 利用 SPSS 21.0 统计分析软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,BMSCs 诱导前后细胞表面抗原表达变化比较采用配对 *t* 检验,不同时点资料比较采用重复测量资料的方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察结果 原代 BMSCs 呈圆形,培养 3 d 时可见细胞呈长梭形或多角形,集落状生长,7 d 后,细胞逐渐形成扁平单层细胞并呈极性排列,呈簇状生长,并随细胞密度增加,胞体变细长(图 1A),原代 BMSCs 生长较为缓慢,约需 14 d 细胞融合度才可达到 80% 左右;传代培养第 3 代时,加入成骨细胞诱导 5 ~ 7 d 后,部分细胞体积增大,胞质丰富,呈鳞片状,胞核较大且位于一侧,多伪足,呈成骨样细胞形态(图 1B)。



A. 原代 BMSCs B. 成骨样细胞
图 1 原代 BMSCs 及定向分化成骨细胞培养观察
(倒置显微镜 × 100)

2.2 BMSCs 诱导前后细胞表面抗原表达变化 流式细胞仪检测结果显示,相比于诱导前,诱导后细胞表面 CD44 和 HLA-DR 表达量显著增加,而 CD90 和 CD105 表达量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 BMSCs 诱导前后细胞表面抗原表达变化/(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)				
时间	CD44	CD90	CD105	HLA-DR
诱导前	8.07 ± 1.14	94.34 ± 2.98	88.24 ± 4.76	2.97 ± 0.48
诱导后	33.52 ± 2.68	9.21 ± 1.05	41.35 ± 3.58	14.35 ± 1.17
<i>t</i> 值	29.208	66.208	21.661	27.994
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 各组成骨样细胞增殖能力比较 MTT 实验显示,与 24 h 时相比,A 组、B 组、C 组、D 组和对照组 48、72、96 h 时细胞增殖能力均增强($P < 0.05$);与对照组相比,A 组、B 组和 C 组 48、72、96 h 时细胞增殖能力显著增强($P < 0.05$),尤其是 B 组促增殖能力最强,而 D 组各时点细胞增殖能力则降低($P < 0.05$),见表 3 和图 2。

表 3 不同时点各组成骨样细胞增殖能力/(<i>A</i> 值, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)				
组别	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0.22 ± 0.07	0.31 ± 0.06 ^a	0.37 ± 0.12 ^a	0.46 ± 0.13 ^a
A 组	0.21 ± 0.06	0.38 ± 0.08 ^{abcde}	0.44 ± 0.11 ^{abcde}	0.58 ± 0.12 ^{abcde}
B 组	0.19 ± 0.05	0.56 ± 0.10 ^{abcd}	0.65 ± 0.09 ^{abc}	0.83 ± 0.11 ^{abc}
C 组	0.20 ± 0.07	0.45 ± 0.07 ^{abc}	0.51 ± 0.08 ^{abc}	0.66 ± 0.09 ^{abc}
D 组	0.18 ± 0.06	0.24 ± 0.06 ^{ab}	0.30 ± 0.10 ^{ab}	0.39 ± 0.08 ^{ab}
组间 <i>F</i> 值, <i>P</i> 值	196.284,0.000			
时间 <i>F</i> 值, <i>P</i> 值	42.671,0.000			
交互 <i>F</i> 值, <i>P</i> 值	19.275,0.000			
时间校正系数 <i>HF</i>	0.429			

注:与同组 24 h 时相比,^a $P < 0.05$;与同时点对照组相比,^b $P < 0.05$;与同时点 D 组相比,^c $P < 0.05$;与同时点 C 组相比,^d $P < 0.05$;与同时点 B 组相比,^e $P < 0.05$ 。

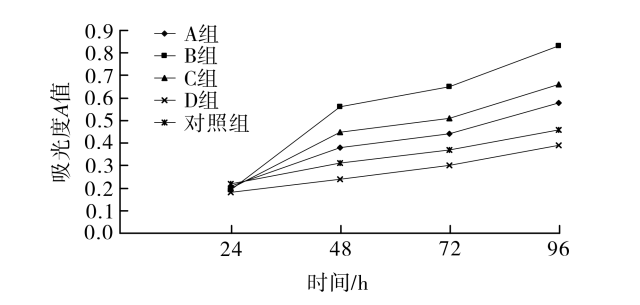


图2 各组成骨样细胞增殖能力比较

2.4 各组细胞中不同时点 *ALP*、*OCN*、*RANKL* 和 *OPN* 基因表达比较 与 24 h 时相比,A 组、B 组、C 组、D 组和对照组 48、72、96 h 时细胞中 *ALP*、*OCN* 和 *OPN* 相对表达量和 *OPN*/*RANKL* 比值均升高

($P < 0.05$),且呈现随时间推移逐渐升高趋势,而 *RANKL* 相对表达量均降低($P < 0.05$),且呈现随时间推移逐渐降低趋势;与对照组相比,A 组、B 组和 C 组 48、72、96 h 时细胞中 *ALP*、*OCN* 和 *OPN* 相对表达量和 *OPN*/*RANKL* 比值均升高($P < 0.05$),而 *RANKL* mRNA 则降低($P < 0.05$),D 组 48、72、96 h 时细胞中 *ALP*、*OCN* 和 *OPN* 相对表达量和 *OPN*/*RANKL* 比值均降低($P < 0.05$),而 *RANKL* 相对表达量则升高($P < 0.05$);A 组、B 组、C 组和 D 组组间相比,48、72、96 h 时细胞中 *ALP*、*OCN* 和 *OPN* 相对表达量和 *OPN*/*RANKL* 比值:B 组 > C 组 > A 组 > D 组,而 *RANKL* 相对表达量:D 组 > A 组 > C 组 > B 组,见表 4。

表4 各组细胞中不同时点 *ALP*、*OCN*、*RANKL* 和 *OPN* 基因表达比较/ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	<i>ALP</i>	<i>OCN</i>	<i>RANKL</i>	<i>OPN</i>	<i>OPN</i> / <i>RANKL</i>
对照组					
24 h	0.29 ± 0.08	0.31 ± 0.09	1.72 ± 0.10	0.49 ± 0.09	0.28 ± 0.05
48 h	0.39 ± 0.10 ^a	0.43 ± 0.11 ^a	1.62 ± 0.10 ^a	0.65 ± 0.09 ^a	0.40 ± 0.09 ^a
72 h	0.47 ± 0.12 ^a	0.48 ± 0.08 ^a	1.58 ± 0.09 ^a	0.69 ± 0.08 ^a	0.44 ± 0.11 ^a
96 h	0.56 ± 0.09 ^a	0.57 ± 0.13 ^a	1.51 ± 0.11 ^a	0.74 ± 0.11 ^a	0.49 ± 0.10 ^a
A 组					
24 h	0.28 ± 0.06	0.33 ± 0.08	1.72 ± 0.09	0.51 ± 0.12	0.30 ± 0.07
48 h	0.42 ± 0.08 ^{abcde}	0.46 ± 0.07 ^{abcde}	1.54 ± 0.10 ^{abcde}	0.69 ± 0.10 ^{abcde}	0.44 ± 0.06 ^{abcde}
72 h	0.47 ± 0.10 ^{abcde}	0.51 ± 0.11 ^{abcde}	1.59 ± 0.11 ^{abcde}	0.76 ± 0.12 ^{abcde}	0.48 ± 0.11 ^{abcde}
96 h	0.53 ± 0.07 ^{abcde}	0.60 ± 0.09 ^{abcde}	1.50 ± 0.08 ^{abcde}	0.80 ± 0.11 ^{abcde}	0.53 ± 0.09 ^{abcde}
B 组					
24 h	0.29 ± 0.07	0.34 ± 0.09	1.71 ± 0.08	0.52 ± 0.13	0.30 ± 0.06
48 h	0.51 ± 0.09 ^{abcd}	0.54 ± 0.08 ^{abcd}	1.49 ± 0.09 ^{abcd}	0.84 ± 0.08 ^{abcd}	0.56 ± 0.08 ^{abcd}
72 h	0.64 ± 0.13 ^{abcd}	0.58 ± 0.09 ^{abcd}	1.43 ± 0.10 ^{abcd}	0.88 ± 0.14 ^{abcd}	0.62 ± 0.09 ^{abcd}
96 h	0.72 ± 0.08 ^{abcd}	0.71 ± 0.12 ^{abcd}	1.37 ± 0.08 ^{abcd}	0.93 ± 0.10 ^{abcd}	0.68 ± 0.10 ^{abcd}
C 组					
24 h	0.27 ± 0.05	0.32 ± 0.07	1.73 ± 0.11	0.50 ± 0.10	0.29 ± 0.05
48 h	0.46 ± 0.11 ^{abc}	0.50 ± 0.13 ^{abc}	1.58 ± 0.09 ^{abc}	0.79 ± 0.07 ^{abc}	0.50 ± 0.09 ^{abc}
72 h	0.52 ± 0.12 ^{abc}	0.54 ± 0.12 ^{abc}	1.48 ± 0.09 ^{abc}	0.81 ± 0.11 ^{abc}	0.55 ± 0.10 ^{abc}
96 h	0.61 ± 0.10 ^{abc}	0.66 ± 0.13 ^{abc}	1.42 ± 0.07 ^{abc}	0.85 ± 0.13 ^{abc}	0.60 ± 0.07 ^{abc}
D 组					
24 h	0.30 ± 0.06	0.33 ± 0.07	1.71 ± 0.09	0.51 ± 0.11	0.30 ± 0.06
48 h	0.36 ± 0.07 ^{ab}	0.40 ± 0.06 ^{ab}	1.67 ± 0.12 ^{ab}	0.60 ± 0.08 ^{ab}	0.36 ± 0.11 ^{ab}
72 h	0.43 ± 0.09 ^{ab}	0.45 ± 0.11 ^{ab}	1.63 ± 0.10 ^{ab}	0.64 ± 0.09 ^{ab}	0.39 ± 0.12 ^{ab}
96 h	0.51 ± 0.11 ^{ab}	0.52 ± 0.12 ^{ab}	1.56 ± 0.11 ^{ab}	0.67 ± 0.07 ^{ab}	0.43 ± 0.08 ^{ab}
组间 <i>F</i> 值, <i>P</i> 值	115.178,0.000	92.752,0.000	134.183,0.000	81.384,0.000	98.178,0.000
时间 <i>F</i> 值, <i>P</i> 值	508.373,0.000	386.154,0.000	608.390,0.000	443.818,0.000	367.195,0.000
交互 <i>F</i> 值, <i>P</i> 值	30.226,0.000	18.396,0.000	24.172,0.000	16.261,0.000	15.682,0.000
时间校正系数 <i>HF</i>	0.417	0.505	0.396	0.472	0.534

注:与同组 24 h 时相比,^a $P < 0.05$;与同时点对照组相比,^b $P < 0.05$;与同时点 D 组相比,^c $P < 0.05$;与同时点 C 组相比,^d $P < 0.05$;与同时点 B 组相比,^e $P < 0.05$ 。

3 讨论

leptin 是由脂肪细胞产生的一种内分泌激素,在骨形成和骨代谢过程中发挥重要作用^[5]。Scheller 等^[6]利用腺病毒转染的方式使 leptin 在 BMSCs 中过表达,发现 leptin 可促进 BMSCs 向成骨细胞分化,骨钙素和 ALP 含量显著增加。Khanmohammadi 等^[7]研究发现 leptin 对人 BMSCs 的 ALP 和骨钙素的表达具有上调作用。leptin 促进 BMSCs 向成骨分化的具体机制可能与 BMSCs 在成骨分化过程中 leptin 受体表达有关^[8],亦可能是外源性 leptin 与 leptin 受体结合而激活成骨相关信号通路(如 JAK-STAT 信号通路)有关^[9]。同时,研究证实^[10],leptin 对 BMSCs 的增殖作用无明显影响,但对成骨细胞有明显促增殖作用,提示 leptin 促细胞增殖作用可能与细胞类型有关。体外实验^[11]表明,从骨质疏松病人骨髓源中获得 BMSCs,经体外培养、扩增后可达到组织工程骨所需的 $10^6 \sim 10^7$ 细胞数量级,且可诱导分化为成骨细胞。提示 BMSCs 作为一种重要的成体干细胞,其本身特性并不受骨质疏松的影响。Zheng 等^[12]利用重组腺病毒将 leptin 基因转染骨质疏松大鼠 BMSCs 发现,leptin 过表达不影响骨质疏松的 BMSCs 的生存能力,但可增强成骨分化及骨样结构的形成。陈志强等^[13]通过对行股骨头置换的绝经后骨质疏松妇女和无骨质疏松妇女股骨头中 BMSCs 培养发现,leptin 受体存在于成骨细胞中,定向分化的 BMSCs 经 leptin 刺激可促成骨。本研究从因股骨颈骨折而行股骨头置换的绝经后骨质疏松女性股骨头中获取 BMSCs,培养后参考文献[14]的方法诱导其向成骨样细胞分化,倒置显微镜观察显示,经诱导后 BMSCs 呈现成骨样细胞形态,流式细胞仪检测结果进一步显示,相比于诱导前,诱导后细胞表面成骨细胞特征性抗原 CD44 和 HLA-DR 表达量显著增加,而 BMSCs 特征性抗原 CD90 和 CD105 表达量下降,进一步证实经诱导 BMSCs 发生了成骨样细胞转化。

本研究显示,与 24 h 时相比,A 组、B 组、C 组、D 组和对照组 48、72、96 h 时细胞增殖能力均增强($P < 0.05$);与对照组相比,A 组、B 组和 C 组 48、72、96 h 时细胞增殖能力显著增强($P < 0.05$),尤其是 B 组促增殖能力最强,而 D 组各时点细胞增殖能力则降低($P < 0.05$),说明 leptin 可刺激成骨样细胞增殖,但有时间和剂量依赖性,过量的 leptin 则会抑制成骨样细胞增殖。ALP 是细胞分化成熟和成骨能力的重要标志物^[15],OCN 是骨形成过程重要指标^[16],本研究显示,与 24 h 时相比,A 组、B 组、C

组、D 组和对照组 48、72、96 h 时细胞中 ALP、OCN mRNA 相对表达量均升高($P < 0.05$),且呈现随时间推移逐渐升高趋势,A 组、B 组、C 组和 D 组组间相比,48、72、96 h 时细胞中 ALP、OCN 相对表达量:B 组 > C 组 > A 组 > D 组,说明随着时间推移,各组成骨能力均增强,但 leptin 剂量会影响成骨过程,存在最宜浓度,浓度过高则抑制成骨过程。近年来,OPN/RANKL 系统在骨代谢中的作用越来越受到临床重视,OPN 是一种诱饵受体,高表达于成骨的成骨细胞中,可竞争性的与 RANKL 结合,而抑制破骨细胞表面 RANK 与 RANKL 的结合,从而抑制破骨细胞的成熟和分化^[17-18],OPN/RANKL 被认为是骨形成和骨吸收动态平衡的标准^[19],本研究显示,各组随时间延续,OPN 表达量增加而 RANKL 表达量减少,OPN/RANKL 的比值增加,这表面 leptin 可能通过调节 OPN/RANKL 通路而发挥促成骨样细胞大量增殖,促骨形成,但本研究亦发现,leptin 在调节 OPN/RANKL 通路时有最佳适应浓度,浓度过高或过低均不能发挥最大的调节作用。

综上所述,leptin 可促进绝经后骨质疏松病人 BMSCs 定向分化后成骨样细胞增殖分化,该过程可能通过调节 OPN/RANKL 通路而实现,且具有时间依赖性,存在最宜浓度,但限于本研究是体外实验,下一步将通过动物实验进一步探讨 leptin 在机体内对骨代谢是否存在安全剂量,以期对女性绝经后骨质疏松综合防治提供线索。

参考文献

- [1] THULKAR J, SINGH S, SHARMA S, et al. Preventable risk factors for osteoporosis in postmenopausal women: Systematic review and meta-analysis [J]. J Midlife Health, 2016, 7(3): 108-113.
- [2] WASIM M, AWAN FR, NAJAM SS, et al. Role of leptin deficiency, inefficiency, and leptin receptors in obesity [J]. Biochem Genet, 2016, 54(5): 565-572.
- [3] CHEN XX, YANG T. Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases [J]. J Bone Miner Metab, 2015, 33(5): 474-485.
- [4] 江俊, 骆凯. 瘦素对绝经后骨质疏松大鼠骨髓基质细胞生物学活性影响的实验研究 [J]. 福建医药杂志, 2016, 38(2): 79-81.
- [5] SCOTECCE M, CONDE J, LOPEZ V, et al. Leptin in joint and bone diseases: new insights [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(27): 3416-3425.
- [6] SCHELLER EL, SONG J, DISHOWITZ MI, et al. Leptin functions peripherally to regulate differentiation of mesenchymal progenitor cells [J]. Stem Cells, 2010, 28(6): 1071-1080.
- [7] KHANMOHAMMADI M, KHANJANI S, EDALATKHAH H, et al. Modified protocol for improvement of differentiation potential of menstrual blood-derived stem cells into adipogenic lineage [J]. Cell Prolif, 2014, 47(6): 615-623.