

基础研究

人骨髓间充质干细胞褪黑素受体的表达及其意义

李海波, 邱 勇, 李卫国, 孙光权, 黄爱兵, 邱旭升

(南京医科大学鼓楼临床医学院脊柱外科 210008 江苏省南京市)

【摘要】目的:检测体外培养的人骨髓间充质干细胞(bone mesenchymals stromal cells, BMSCs)褪黑素受体的表达,并探讨其意义。**方法:**10 例 12~18 岁志愿者,分别从髂前上棘处穿刺抽取 10ml 骨髓,肝素抗凝。采用密度梯度离心法分离 BMSCs,体外培养并传至 P3 代进行表型鉴定。抽提细胞总 RNA,采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测褪黑素受体 MT1、MT2 mRNA 的表达;同时应用免疫组化染色方法检测细胞 MT1、MT2 蛋白的表达。**结果:**分离的单个核细胞经培养至 P3 代,使用流式细胞仪进行细胞表型鉴定,体外培养细胞的表型与 BMSCs 的表面标志相符。细胞抽提总 RNA 以 MT1 和 MT2 两种受体的 RT-PCR 扩增产物电泳呈阳性条带;免疫组化结果显示细胞存在 MT1 和 MT2 蛋白的表达,主要分布在细胞膜和细胞浆,呈棕褐色阳性颗粒,而细胞核上未见阳性颗粒。**结论:**人 BMSCs 中存在褪黑素受体 MT1、MT2 的表达,它是褪黑素作用的靶细胞。这为进一步研究 BMSCs 褪黑素信号通路提供了实验基础。

【关键词】褪黑素;受体;骨髓间充质干细胞

中图分类号:R329.1, R682.3 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-09-707-05

Identification of melatonin receptor in human bone mesenchymals stromal cells and its significance/LI Haibo, QIU Yong, LI Weiguo, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(9):707-711

【Abstract】 Objective: To verify the expression of melatonin receptor in human bone mesenchymal stromal cells (BMSCs). **Method:** 10 volunteers aged 12-18 years were recruited in the study. The human bone marrow was obtained from anterior superior iliac spine, which was anticoagulated by heparin. The BMSCs were then isolated by density gradient centrifuge from the mononuclear cells, and cultivated in vitro. P3 cultures were analyzed by the flow cytometry to determine the surface antigens. The total RNA from BMSCs was collected and the mRNA of melatonin receptors (MT1, MT2) was detected by reverse transcript-polymerase chain reaction (RT-PCR). Immunohistochemistry was applied to identify and localize MT1 and MT2 proteins. **Result:** Mononuclear cells were cultivated and subcultivated to P3 culture in vitro, those cells were analyzed by the flow cytometry, and their phenotype matched to the mesenchymal cell markers. The electrophoretic results of RT-PCR products by MT1 and MT2 primer were all positive. The expression of MT1 and MT2 proteins in the cultured cells were demonstrated by immunohistochemistry, and these buffy positive granules primarily located in cell membrane and cytoplasm, rarely seen in nucleus. **Conclusion:** There exists melatonin receptors (MT1, MT2) gene in human BMSCs, which provides the foundation for study of melatonin signal pathway in BMSCs.

【Key words】 Melatonin; Receptor; Bone mesenchymals stromal cells

【Author's address】 Department of Spine Surgery, the Drum Tower Clinical Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing, 210008, China

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)是一种复杂的三维脊柱畸形,多发生于青春期女孩,其发病率大约为 2%~4%^[1]。目前 AIS 病因尚不清楚。褪黑素与特发性脊柱侧凸之间的关系是 AIS 病因学研究中的一个热点。有

研究发现^[2], AIS 患者成骨细胞中褪黑素信号转导通路存在异常,提示褪黑素信号通路异常可能是 AIS 发生的原因之一。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一种具有多向分化潜能的干细胞,可分化为成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞,对于骨软骨代谢和体脂代谢具有重要的生物学意义^[3]。人 BMSCs 是否存在褪黑素受体的表达目前国内尚无研究。本研究旨在明确人 BMSCs 是否为褪黑素

基金项目:江苏省国际合作项目(编号:BZ2007024)

第一作者简介:男(1984-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83304616-12102 E-mail:lihb1013@126.com

的靶细胞,为研究 AIS 患者 BMSCs 水平褪黑素信号通路提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 一般资料

10 名 12~18 岁青少年志愿者,其中腰椎间盘突出症患者 2 例,L5 椎弓根峡部裂伴椎体滑脱 2 例,良性脊膜瘤 1 例;青少年特发性脊柱侧凸患者 5 例,年龄 12~16 岁,平均 14.6 岁,侧凸 Cobb 角 46°~80°,平均 55.6°。特发性脊柱侧凸的诊断基于站立全脊柱正侧位 X 线片及详细的临床检查,且均行全脊髓 MRI 检查,排除可能存在的中枢神经系统病变。

采用胚胎卵巢组织作为褪黑素受体表达阳性对照(胚胎卵巢组织取自流产胎儿)。

本课题获得医院伦理委员会批准通过,研究对象及其家长知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

低糖 DMEM 培养基(含青霉素、链霉素各 100IU/ml)、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(GIBCO 公司),人淋巴细胞分离液(Ficoll)(1.073×10³g/L,天津生物科技公司),荧光标记小鼠抗人抗体 CD45PerCP、CD90FITC、CD73PE、CD19PE、CD14-FITC、CD34PE、HLA-DRFITC(BD 公司)。褪黑素受体引物、 β -actin 引物由上海生物工程技术有限公司合成,总 RNA 抽提所用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司),逆转录酶(Invitrogen 公司),兔抗人 MT1 和 MT2 多克隆抗体(CHEMICON 公司),免疫组化试剂盒(福建迈新公司)。其他试剂为国产、分析纯级。FACS Calibur 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司),CK40 相差显微镜(Olympus 公司),Megafuge 1.0R 冷冻离心机(Heraeus 公司),PTC-200 型 PCR 仪(MJ 公司),紫外线电泳图像分析仪(UVP 公司)。Tisser-Tek DRS 染色机(美国 Sakura 公司),Olympus 光学显微镜。

1.3 BMSCs 的体外分离和培养

无菌条件下从髂前上棘取骨髓 8~10ml,肝素抗凝。将抗凝骨髓用 PBS 按 1:1 稀释,分装入 15ml 离心管中(离心管中已装入 Ficoll 分离液)。加入骨髓时,贴着管壁,操作轻柔,将骨髓加于分离液上(1:1)。20℃、2000r/min 离心 20min(brake 关闭)。离心完毕后,小心将白膜层吸至另一离心管中,PBS 洗涤 2 次,用全培养基(L-DMEM,10%

FBS)混悬细胞,接种于 25cm² 的培养瓶中。培养瓶置入 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。首次换液时间为 36~48h,以后每 3~5d 换液 1 次。待原代细胞达到 90%融合时,用 0.25%胰酶消化,按 1:2~1:3 比例传代,培养条件同原代。

1.4 BMSCs 的表型鉴定

待细胞培养至 P3 代 90%融合时,用 0.25% EDTA-胰蛋白酶消化,相差显微镜下计数板计数。取 1×10⁶ 个细胞在 FACS Calibur 型流式细胞仪行表型鉴定。选用荧光标记小鼠抗人抗体 CD90FITC、CD73PE、CD19PE、CD14FITC、CD34PE、HLA-DRFITC。

1.5 BMSCs 和卵巢组织总 RNA 的提取

取 5×10⁶ 个 P3 代细胞,加 1ml Trizol,吹打均匀,静置 5min(室温),加入 200 μ l 氯仿,剧烈振荡 15s,静置 3min,4℃ 12000r/min 离心 15min。取上层水相(约 600 μ l),加入异丙醇 500 μ l,混匀,静置 10min(室温),4℃ 12000r/min 离心 10min,弃上清。加入 75%酒精 1ml 震荡混匀,4℃、7000r/min 离心 5min,弃上清,重复 2 次。风干酒精,加入 DEPC 水充分溶解 RNA 沉淀。比色法测定样本 OD260/280 值,计算总 RNA 浓度,如此值在 1.8~2.0 之间,说明 RNA 抽提效果良好。取卵巢组织 50 μ g,加入 Trizol 试剂 1ml,彻底匀浆,静置 5min,其余步骤同前。

1.6 引物设计与 RT-PCR

见表 1。采用两步法进行 RT-PCR:(1)逆转录过程,使用逆转录酶进行逆转录反应(按 Invitrogen 公司说明书操作);(2)聚合酶链式反应(PCR)过程,反应总体系为 25 μ l,体系成分为 10 $\times$ buffer 2.5 μ l,25mM Mg²⁺ 1.5 μ l,2.5mM dNTP 2 μ l,上游引物 1 μ l,下游引物 1 μ l,cDNA 模板(MT1、MT2、 β -actin)各 2 μ l,Taq 酶 0.2 μ l,DEPC 预处理水 14.8 μ l。将反应管置于 PCR 扩增仪中,95℃预变性 5min,94℃变性 45s,55℃退火 45s,72℃延伸

表 1 MT1、MT2 与内参照 β -actin 引物序列

	引物序列	片段长度
MT1	上游引物 5'-GGTGCTGATGTCGATA-3'	368bp
	下游引物 5'-AGAAGATGACTATGATCATG-3'	
MT2	上游引物 5'-CTCCCTATCGCTGTCGTGTC-3'	224bp
	下游引物 5'-ATCTGGGA GCCATTCTTG-3'	
β -actin	上游引物 5'-GGCATCCTCACCCTGAAGTA-3'	200bp
	下游引物 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'	

1min, 循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 10min。每个标本的 RT-PCR 过程均重复 2 次, 以预防假阳性的发生。设置阳性对照(卵巢)^[4]和阴性对照(双蒸水)。

1.7 RT-PCR 反应产物琼脂糖凝胶电泳

在含有 0.5% 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上加入扩增产物 (MT1、MT2 为 7.5μl, β-actin 为 5μl) 及 1μl 溴酚兰缓冲液, 电压 120V, 电泳 15min。使用紫外线电泳图像分析仪观察扩增条带。Marker 的分子量依次为 2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp。取 2μl 扩增所得阳性产物的 cDNA 作为模板, 以各自的反应体系再进行扩增, 将扩增产物送上海生物工程技术有限公司测序。

1.8 免疫组化染色

取 P3 代细胞进行细胞爬片, 待贴壁细胞达到 60%~70% 融合时, 取出盖玻片, PBS 洗两遍; 丙酮固定 30min, PBS 洗净; 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 (室温下 10min), PBS 洗净; 10% 山羊血清封闭 (室温下 10min), 甩去血清 (不洗); 加一抗 4℃ 过夜, PBS 洗 3 遍; 加二抗 37℃ 30min, PBS 洗 3 遍; DAB 显色, 镜下观察, 自来水中止; 苏木素复染, 自来水洗; 迅速过盐酸酒精溶液, 自来水

洗; 风干, 中性树脂封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。光学显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 BMSCs 体外培养结果

10 例 BMSCs 传代培养均获得成功。培养 36~48h, 视野可见多个散在的集落样细胞克隆 (图 1, 后插页 VII)。培养 7~10d, 细胞达到 90% 融合, 可传至 P1 代。以后每 3~4d 传代一次, 随着传代代数增加, 细胞形态趋于一致, 呈均一长梭形, 向心性生长。经 10d 左右, P3 代细胞达到 90% 融合 (图 2, 后插页 VII)。

2.2 P3 代 BMSCs 表型鉴定结果

体外培养的 P3 代细胞表面 BMSCs 阴性标志 CD19PE、CD14FITC、CD34PE、HLA-DRFITC 的检测率均基本低于 5%; 而阳性标志 CD90FITC 和 CD73PE 检测率均达到 95% 左右。检测结果与文献报道一致^[5], 证明所培养细胞是 BMSCs, 且纯度达到 95% 左右 (图 3)。

2.3 RT-PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳结果

细胞抽提的总 RNA 经比色法测定

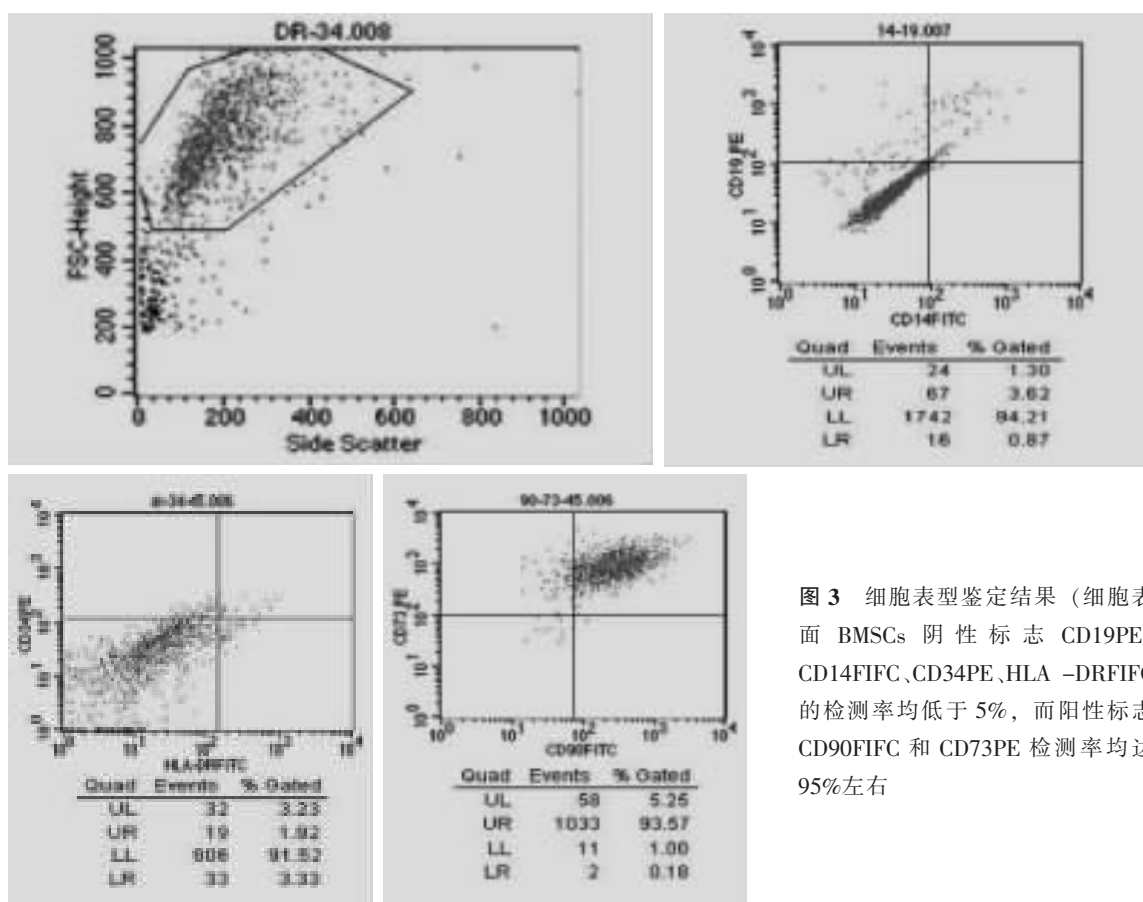


图 3 细胞表型鉴定结果 (细胞表面 BMSCs 阴性标志 CD19PE、CD14FITC、CD34PE、HLA-DRFITC 的检测率均低于 5%, 而阳性标志 CD90FITC 和 CD73PE 检测率均达 95% 左右)

OD260/280 值均在 1.8~2.0 之间,说明 RNA 抽提效果良好。所有以 MT1、MT2 为引物的 BMSCs RT-PCR 产物中,均可见大小分别为 400bp 和 200bp 左右的条带,阳性对照胚胎卵巢 RT-PCR 产物也可见 400bp 和 200bp 左右的条带;阴性对照组未扩增出阳性条带(图 4)。显示人 BMSCs MT1、MT2 的 RT-PCR 产物序列与基因库(GeneBank)中 MT1、MT2 的 cDNA 序列相吻合。

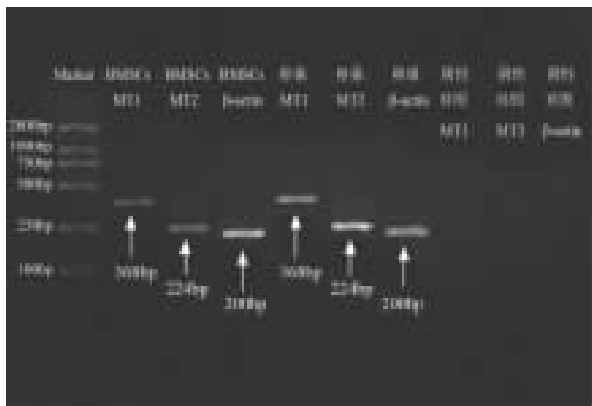


图 4 人 BMSCs MT1、MT2 mRNA RT-PCR 产物电泳可见大小分别为 400bp 和 200bp 左右的条带,阳性对照胚胎卵巢 RT-PCR 产物也可见 400bp 和 200bp 左右的电泳条带,而阴性对照组未见阳性条带

2.4 免疫组化结果

免疫组织化学染色结果显示,人 BMSCs 存在褪黑素受体 MT1、MT2 蛋白,主要分布在细胞膜和细胞浆,呈棕褐色阳性颗粒,细胞核极少见阳性颗粒(图 5a、5b,后插页 VII);空白对照未见阳性颗粒(图 5c、5d,后插页 VII)。

3 讨论

3.1 褪黑素受体的分布和生理特点

褪黑素(Melatonin)为吲哚类激素,主要由松果体分泌,与其受体结合后发挥作用。褪黑素受体既存在于细胞膜也存在于细胞核内,一般认为褪黑素主要通过膜受体引起生物学效应。褪黑素膜受体分为 MT1、MT2、MT3 三种亚型,其中在人类只存在 MT1、MT2 两种亚型,其 DNA 序列已经清楚^[6]。研究证实,人体内许多组织器官都有褪黑素受体的表达。赵瑛等^[7]应用放射性配体结合法证实中期引产胎儿 16 个脑区以及脊髓都存在褪黑素受体。刘志民等^[8]应用放射性配体结合法首次证实人胚胎 16 个外周组织(心、肝、脾、肺、肾、胃、

小肠、大肠、甲状腺、胸腺、肾上腺、卵巢、子宫、睾丸、前列腺和膀胱组织)中均存在褪黑素的特异性结合位点,其中胸腺和脾脏的结合容量最高。吴亮等^[9]应用 RT-PCR 的方法检测出人脊椎骨中存在 MT1、MT2 两种褪黑素受体 mRNA 的表达,证明人脊椎骨是褪黑素作用的靶器官。可见,褪黑素作用具有广泛性,人体多种组织器官都是褪黑素的靶器官。

3.2 褪黑素及其受体与特发性脊柱侧凸的关系

目前 AIS 的病因尚不清楚。褪黑素与特发性脊柱侧凸之间的关系是 AIS 病因学研究的一个热点。松果体切除的动物模型,特别是小鸡模型,可以导致脊柱侧凸的发生。由于松果体分泌的主要激素是褪黑素,这使得人们将血清褪黑素水平低下与脊柱侧凸的发生联系起来。Machida 等^[9]通过切除小鸡松果体建立脊柱侧凸模型,发现切除松果体的小鸡脊柱侧凸发生率达 100%,且发生脊柱侧凸的鸡其褪黑素水平明显比未发生脊柱侧凸的鸡低,而术后补充褪黑素可明显降低脊柱侧凸的发生率。因此他们认为褪黑素的缺乏可能是导致脊柱侧凸发病的原因。Wang 等^[10]比较了切除松果体建立的小鸡脊柱侧凸和 AIS 的形态学特征,发现两者的侧凸类型、累及节段、椎体旋转、单弯和双弯的比例均很相似,认为小鸡发生脊柱侧凸的原因可能与 AIS 的发病原因相似,均为褪黑素缺乏造成。但后续的研究表明^[11],AIS 患者血清褪黑素水平并不比正常人低。最近,Moreau 等^[12]研究发现,AIS 患者成骨细胞中褪黑素信号转导通路存在异常,提示褪黑素信号通路异常可能是 AIS 发生的原因。邱旭升等^[12]通过研究亦发现 AIS 患者成骨细胞中褪黑素信号转导通路存在异常。

3.3 BMSCs 与特发性脊柱侧凸

BMSCs 是一种具有多向分化潜能的干细胞,可分化为成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞,对于骨软骨代谢和体脂代谢具有重要的生物学意义^[3]。众多学者发现 AIS 患儿存在身材瘦高、四肢纤细修长以及全身性骨密度减低的现象。Cheung 等^[13]对中国香港地区 598 例 AIS 患儿的大体形态学资料分析后发现,在青春发育前期,AIS 女性患儿的身高要矮于对照组。一旦青春发育启动(相当于实足年龄 12~15 岁),其矫正身高、臂长、矫正坐高均显著高于对照组。Ylikoski^[14]通过对 1500 例芬兰 AIS 女孩的研究发现,她们的矫正身长要

显著高于 11~15 岁健康女孩的平均身长。其中 11~13 岁身高甚至无需矫正都要高于同年龄对照组。Cheng 等^[15]研究了 81 例 12~14 岁的 AIS 女性患者的骨密度,并与 220 名健康对照者进行对比,其身高、体重及月经初潮年龄无显著性差异的情况下,AIS 组有 68% 存在明显的骨密度减低,且这种低骨量与患者年龄、AIS 的弯曲程度及弯曲类型无关。其后作者^[16]对 28 例 11~20 岁(平均 14 岁)的 AIS 患者术前测定骨密度,术中取髂嵴及棘突的骨标本进行组织形态学分析,发现 AIS 患者骨密度较同年龄组正常人明显降低,其中 53.6% 的患者可诊断为骨质疏松。研究还发现,AIS 的成骨细胞和破骨细胞数量明显减少,骨碱性磷酸酶降低。因此,作者认为骨量减低是 AIS 的原发改变,可能与其发病相关。由上述可以推断 AIS 患者可能存在以软骨内化骨增强为特征的骨纵向生长发育的活跃,骨代谢以及体脂代谢异常。而作为成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞的上游细胞,BMSCs 是否在 AIS 的发生发展中起到一定的作用呢?既然已有学者发现 AIS 患者成骨细胞中褪黑素信号转导通路存在异常,那么 AIS 患者 BMSCs 中是否有类似现象?设计本实验旨在明确人 BMSCs 中是否存在褪黑素受体的表达,为进一步研究特发性脊柱侧凸患者 BMSCs 水平褪黑素信号通路做准备。

3.4 本实验的研究情况及意义

本实验利用 RT-PCR 和免疫组织化学方法检测出体外培养的人 BMSCs 确有褪黑素受体 MT1、MT2 的表达,证实人 BMSCs 是褪黑素的靶细胞,为研究特发性脊柱侧凸患者 BMSCs 水平褪黑素信号通路提供了实验基础。

4 参考文献

- 邱勇,朱丽华,宋知非,等.脊柱侧凸病因学的临床分类研究[J].中华骨科杂志,2000,20(5):265-268.
- Moreau A,Wang DS,Forget S,et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis [J].Spine,2004,29(16):1772-1781.
- Pittenger MF,Mackay AM,Jaiswal SC,et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J].Science,1999,284(5411):143-147.
- 吴亮,邱勇,李雷.人脊椎骨中褪黑素受体 mRNA 的表达及其意义[J].中国脊柱脊髓杂志,2005,15(4):232-234.
- Dominici M,Le Blanc K,Mueller I,et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells:the international society for cellular therapy position statement [J].Cytotherapy,2006,8(4):315-317.
- Kokkola T,Laitinen JT.Melatonin receptor genes[J].Ann Med,1998,30(1):88-94.
- 赵瑛,邵福源,何淑芬,等.人胚胎中枢神经系统褪黑素受体的鉴定及生物学特性[J].第二军医大学学报,2001,22(1):12-14.
- 刘志民,邹俊杰,沈玉美,等.人胚胎外周组织褪黑素受体的鉴定[J].第二军医大学学报,2001,22(1):8-11.
- Machida M,Dubousset J,Imamura Y, et al. An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis [J].Spine,1993,18(2):1609-1615.
- Wang X,Jiang H,Raso J,et al.Characterization of the scoliosis that develops after pinealectomy in the chicken and comparison with adolescent idiopathic scoliosis in humans[J].Spine,1997,22(22):2626-2635.
- Hilibrand AS,Blakemore LC,Loder RT, et al. The role of melatonin in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis[J].Spine,1996,21(10):1140-1146.
- 邱旭升,邱勇,陈晖,等.青少年特发性脊柱侧凸患者褪黑素信号传导通路的初步研究[J].中国脊柱脊髓杂志,2007,17(3):201-204.
- Cheung CSK,Lee WTK,Tse YK,et al.Abnormal peri-pubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis:a study of 598 patients[J].Spine,2003,28(18):2152-2157.
- Ylikoski M. Height of girls with adolescent idiopathic scoliosis[J].Eur Spine J,2003,12(3):288-291.
- Cheng JC,Guo X. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis:a primary problem or secondary to the spinal deformity [J]?Spine,1997,22(15):1716-1721.
- Cheng JC,Tang SP,Guo X,et al.Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis histomorphometric study [J].Spine,2001,26(3):E19-23.

(收稿日期:2008-04-18 修回日期:2008-07-21)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)