

基础研究

二甲基乙二酰基甘氨酸对小鼠胚胎成骨细胞前体细胞增殖和分化的影响

周亮亮¹, 翁土军², 钱 隆², 聂振国², 何 莹², 张春丽², 王自强², 李 利²

(1 锦州医科大学研究生学院 121001 锦州市; 2 解放军总医院第一附属医院骨科 100048 北京市)

【摘要】目的:探讨低氧模拟剂二甲基乙二酰基甘氨酸(dimethyloxalylglycine, DMOG)对小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3-E1)的增殖、成骨分化及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。**方法:**将 MC3T3-E1 细胞接种到培养板 24h 后, 实验组培养基中分别加入 50 μ M (50 μ M 组)和 200 μ M (200 μ M 组)的 DMOG, 对照组加入完全培养液。分别于培养 1、3、5d 时采用 MTT 法检测 MC3T3-E1 细胞增殖情况, 5、10d 行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色及 ALP 活性检测成骨细胞分化, 21d 用茜素红染色检测 MC3T3-E1 细胞钙结节的形成并进行定量分析, 采用 ELISA 法检测 MC3T3-E1 培养 3d 情况时上清液中的 VEGF 蛋白含量, 并用实时荧光定量 PCR 法检测 MC3T3-E1 细胞 VEGF mRNA 的相对表达量。**结果:**培养 1d 时对照组、50 μ M 组和 200 μ M 组的 MC3T3-E1 的光密度(optical density, OD)值分别为 0.041 $\pm$ 0.009、0.074 $\pm$ 0.019、0.086 $\pm$ 0.044, 3d 时分别为 0.123 $\pm$ 0.027、0.148 $\pm$ 0.020、0.224 $\pm$ 0.061, 5d 时分别为 0.297 $\pm$ 0.044、0.325 $\pm$ 0.084、0.354 $\pm$ 0.038, 1d、3d 时 50 μ M 组和 200 μ M 组与同时点对照组比较均有显著性差异 ($P<0.05$), 3d 时 50 μ M 组与 200 μ M 组有显著性差异 ($P<0.05$)。培养 5d 和 10d 时对照组 ALP 染色颜色较深, 50 μ M 组颜色中等, 200 μ M 组颜色较浅; 5d 时对照组 ALP 活性为 1.943 $\pm$ 0.072, 50 μ M 组为 1.632 $\pm$ 0.051, 200 μ M 组为 1.319 $\pm$ 0.065; 10d 时对照组 ALP 活性为 3.734 $\pm$ 0.067, 50 μ M 组为 3.381 $\pm$ 0.070, 200 μ M 组为 2.831 $\pm$ 0.086。三组间同时点比较均有统计学差异 ($P<0.05$), 同组 10d 时与 5d 时比较均有统计学差异 ($P<0.05$)。茜素红染色 200 μ M 组可见少量红色结节, 50 μ M 组可见中等量红色结节, 对照组可见大量红色结节; 对照组茜素红含量(μ g/ml)为 56.178 $\pm$ 7.940, 50 μ M 组为 41.922 $\pm$ 2.438, 200 μ M 组为 31.929 $\pm$ 1.922, 三组间比较均有统计学差异 ($P<0.05$)。培养 3d 时对照组细胞培养上清液中 VEGF 蛋白含量 (ng/孔) 为 9.063 $\pm$ 0.603, 50 μ M 组为 12.123 $\pm$ 0.870, 200 μ M 组为 15.540 $\pm$ 0.581, 三组间比较均有统计学差异 ($P<0.05$); 50 μ M 组 VEGF mRNA 表达量为对照组的 1.792 $\pm$ 0.067, 200 μ M 组为对照组的 3.963 $\pm$ 0.092, 三组间比较均有统计学差异 ($P<0.05$)。**结论:**低氧模拟剂 DMOG 可促进 MC3T3-E1 细胞增殖和 VEGF 表达, 抑制其成骨分化。

【关键词】二甲基乙二酰基甘氨酸; 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞; 碱性磷酸酶; 血管内皮生长因子; 成骨分化

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.03.11

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-03-0262-08

Effects of dimethyloxalylglycine on proliferation and osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells/ZHOU Liangliang, WENG Tujun, QIAN Long, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(3): 262-269

【Abstract】 Objectives: To explore the effects of hypoxia mimic agent dimethyloxalylglycine(DMOG) on the proliferation, osteogenic differentiation and vascular endothelial growth factor(VEGF) expression of MC3T3-E1 cell. **Methods:** After MC3T3-E1 cells were seeded on plate for 24 hours, DMOG was added to the culture medium with concentrations of 50 μ M(50 μ M group) and 200 μ M(200 μ M group) respectively, while in the control group no DMOG was added. The proliferation of MC3T3-E1 cells was detected by MTT assay at the 1st, 3rd and 5th day of cells culture. The osteoblast differentiation was determined by alkaline phosphatase activity analysis and ALP staining at the 5th and 10th day. The formation of calcium nodules in MC3T3-E1 cells was detected by alizarin red staining and quantitative analysis at the 21st day. The level of VEGF in the su

第一作者简介: 男(1989-), 硕士研究生在读; 研究方向: 骨组织工程

电话: (010)66848830 E-mail: zhouliangliangjj@163.com

通讯作者: 李利 E-mail: lili304@126.com

pernatant of MC3T3-E1 cells was detected by ELISA method, and the gene expression of VEGF was also detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results:** At the 1st day of cells culture, the values of light density (optical density, OD) in the control group, the 50 μ M group and the 200 μ M group were 0.041 ± 0.009 , 0.074 ± 0.019 , and 0.086 ± 0.044 respectively. At the 3rd day, the values of OD in the control group, the 50 μ M group, and the 200 μ M group were 0.123 ± 0.027 , 0.148 ± 0.020 , 0.224 ± 0.061 respectively. At the 5th day, the values of OD in the control group, the 50 μ M group and the 200 μ M group were 0.297 ± 0.044 , 0.325 ± 0.084 , 0.354 ± 0.038 respectively. At the 1st day and the 3rd day, the DMOG results of the 50 μ M and 200 μ M group were significantly different from that of the control group ($P < 0.05$). At the 3rd day, the DMOG result of 50 μ M group was significantly different from that of 200 μ M group. ALP staining showed that the color was deeper in the control group, moderate in the 50 μ M group, and shallow in the 200 μ M group. At the 5th day, the alkaline phosphatase activity was 1.943 ± 0.072 in the control group, 1.632 ± 0.051 in the 50 μ M group, 1.319 ± 0.065 in the 200 μ M group. At the 10th day, the alkaline phosphatase activity was 3.734 ± 0.067 in the control group, 3.381 ± 0.070 in the 50 μ M group, 2.831 ± 0.086 in the 200 μ M group. Alkaline phosphatase activity was significantly different between each two groups ($P < 0.05$). Alizarin red staining and quantitative analysis showed a small amount of red nodules in the 200 μ M group, a moderate amount red nodules in the 50 μ M group, while a large number of red nodules in the control group. The alizarin red content was 56.178 ± 7.940 in the control group, 41.922 ± 2.438 in the 50 μ M group, 31.929 ± 1.922 in the 200 μ M group. There was significant difference of alizarin red content (μ g/ml) between each two groups ($P < 0.05$). The VEGF content in the supernatant was 9.063 ± 0.603 in the control group, 12.123 ± 0.870 in the 50 μ M group, 15.540 ± 0.581 in the 200 μ M group. There was significant difference of VEGF content between each two groups ($P < 0.05$). The VEGF gene expression level was 1.792 ± 0.067 in the 50 μ M group, 3.963 ± 0.092 in the 200 μ M group, and there was significant difference of VEGF gene expression level between each two groups ($P < 0.05$). **Conclusions:** Under normal oxygen condition, hypoxia mimicking agent DMOG significantly promotes proliferation and VEGF expression, while inhibites osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cell.

[Key words] Dimethyloxalylglycine; MC3T3-E1 cells; Alkaline phosphatase; Vascular endothelial growth factor; Osteogenic differentiation

[Author's address] Jinzhou Medical University Graduate School, Jinzhou, 121001, China

脊柱融合术中常用的植骨方法包括自体骨植骨、异体骨植骨、金属和复合材料融合器植骨。近 10 年研究的热点是复合材料型融合器植骨,它也是目前临床应用较多的植骨方法,其优势在于植入材料中含有骨诱导性因子。Meisel 等^[1]将重组人骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 附载于胶原海绵作为融合器的填充物应用于椎间融合术中,取得了较好的融合效果,但 BMP 存在价格昂贵等问题。近年来,在植骨材料中添加具有促成骨作用的活性物质成为研究的热点^[2]。有研究表明,低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 在耦联血管新生和骨生成中发挥关键作用^[3]。HIF-1 α 能够调控多种基因共同表达,在骨缺损部位诱导生理功能完整的新血管生成,为基质干细胞的成骨分化和成骨活动提供营养支持和代谢保证^[3,4]。二甲基乙二酰基甘氨酸 (dimethyloxalyl-glycine, DMOG) 是一种稳定 HIF-1 α 的低氧模拟剂^[5],通过抑制脯氨酸羟

化酶的活性,可使 HIF-1 α 在正常氧分压条件下不被降解,从而激活其下游基因如 VEGF 等的表达^[6]。研究发现 DMOG 通过促进成骨分化进而加快骨缺损愈合^[7]。有研究报道,支架材料复合低氧模拟剂如 DMOG 或去铁胺 (defetoxamine, DFO) 能促进间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的成骨分化及骨组织再生^[8,9]。成骨细胞是骨形成的主要效应细胞,但迄今为止 DMOG 对前成骨细胞的作用缺乏深入研究。本研究旨在探讨不同浓度 DMOG 对前成骨细胞系小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 (MC3T3-E1) 的细胞增殖、成骨分化及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的影响,为研制荷载 DMOG 的植骨材料奠定前期工作基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

MC3T3-E1 细胞 (解放军总医院第一附属医

院骨科研究所提供), DMOG (Gibco 公司), DMEM/HG 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司), 地塞米松、茜素红(Sigma 公司), 碱性磷酸酶(ALP) 显色试剂盒(碧云天公司), PCR 引物、PCR 试剂盒(南京康为世纪生物科技有限公司), 全光谱酶标仪、实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher 公司)。

1.2 细胞培养

MC3T3-E1 细胞基础培养液为含 10%胎牛血清和青链霉素各 100U/ml 的 DMEM/HG, 于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养, 48h 后全量换液。细胞融合到 75%~80%时, 用 0.25%胰酶进行消化, 约 2min 后加入含胎牛血清的培养基终止消化。离心重悬 MC3T3-E1 细胞, 调整细胞浓度接种至 96 孔板(2×10³ 个/孔)和 24 孔板(5×10⁴ 个/孔)。成骨分化诱导培养液为基础培养基中添加 1×10⁻⁸mol/L 地塞米松、50ng/ml 维生素 C、10mmol/L β-甘油磷酸钠。

1.3 MC3T3-E1 细胞活性分析

接种至 96 孔板(2×10³ 个/孔)的 MC3T3-E1 细胞培养 24h 后对照组换不含 DMOG 的基础培养液, 50μM 组采用含 50μM DMOG 的基础培养液干预, 200μM 组采用含 200μM DMOG 的基础培养液干预, 干预时间为 1d、3d、5d, 每 48h 全量换液。在指定的时间点各组细胞每孔加 5mg/ml 的 MTT 试剂 20μl, 放置 37℃、5%CO₂ 的培养箱中孵育 4h, 弃上清液, 每孔加 200μl 的二甲基亚砷(DMSO), 避光放置摇床上摇 10min, 酶标仪检测波长在 490nm 下的 OD 值。

1.4 MC3T3-E1 细胞成骨分化检测

接种至 24 孔板(5×10⁴ 个/孔)的 MC3T3-E1 细胞培养 24h 后对照组换不含 DMOG 的成骨分化诱导培养液, 50μM 组采用含 50μM DMOG 的成骨分化诱导培养液干预, 200μM 组采用含 200μM DMOG 的成骨分化诱导培养液干预。持续干预 5d、10d 后弃上清液, 每孔加 500μl 的 4%多聚甲醛固定液固定 15min, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗 3 次, 每孔加入 300μl 按 ALP 染色试剂盒说明书配置的试剂置于 37℃环境避光孵育 20h, 弃上清液终止反应, 双蒸水洗 2 次, 干燥, 扫描拍照及倒置显微镜下放大拍照。ALP 活性测定的细胞培养及 DMOG 处理方法同 ALP 染色, 细胞诱导培养 5d、10d 后弃上清液,

每孔加入 200μl 细胞裂解液(20mM Tris (pH 值 7.5), 150mM NaCl, 1% Triton X-100), 移液枪吹打 10s 后 12000g 离心 5min, 取上清, 于 96 孔板中设置空白对照、标准品、样品孔, 其中样品取 50μl, 37℃孵育 20min 后每孔取 100μl 终止液终止反应, 在 405nm 条件下测定吸光度, 按标准品结果得出标准曲线并计算各样品 ALP 活性。37℃条件下, 每分钟水解显色底物产生 1μM 对硝基苯酚所需 ALP 的量定义为一个活力单位。

1.5 MC3T3-E1 细胞成骨矿化检测

接种至 24 孔板(5×10⁴ 个/孔)的 MC3T3-E1 细胞培养 24h 后对照组换不含 DMOG 的成骨分化诱导培养液, 50μM 组采用含 50μM DMOG 的成骨分化诱导培养液干预, 200μM 组采用含 200μM DMOG 的成骨分化诱导培养液干预, 持续干预 21d, 每 48h 全量换液。培养 21d 后弃上清液, PBS 洗 2 遍, 95%的乙醇固定 15min, PBS 洗 3 遍后每孔加入 200μl 含 2%无水乙醇的 1%茜素红染色工作液, 室温染色 15min, 弃上清并用双蒸水洗 5 次, 每次 3min。干燥, 将染色的孔板扫描拍照, 同时在显微镜下拍照。再向每孔加 1ml 茜素红溶解液(0.5N HCl, 5%SDS), 摇床上室温溶解 30min。取 200μl 溶解的染料溶液在 415nm 波长处测定吸光值, 同时设立标准曲线。按曲线方程计算各样本浓度。

1.6 MC3T3-E1 细胞分泌 VEGF 蛋白含量的检测

接种至 24 孔板(5×10⁴ 个/孔)的 MC3T3-E1 细胞 24h 后对照组换不含 DMOG 的基础培养液, 50μM 组采用含 50μM DMOG 的基础培养液干预, 200μM 组采用含 200μM DMOG 的基础培养液干预, 干预 3d 后取细胞上清液, 3000r/min 离心 10min 去除颗粒和聚合物。设立标准孔和样本孔, 标准孔各加不同浓度的标准液 50μl(0、15、30、60、120、240pg/ml); 样本孔先加待测样本 10μl, 再加样本稀释液 40μl, 空白孔不加; 除空白孔外, 每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100μl, 用封板膜封住反应孔, 37℃水浴锅温育 60min; 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗 5 次; 每孔加入底物 A、B 各 50μl, 37℃避光孵育 15min; 每孔加入终止液 50μl, 在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值; 绘制标准曲线, 按曲线方程计算

各样本浓度值。

1.7 VEGF 基因表达的检测

接种至 24 孔板 (5×10^4 个/孔) 的 MC3T3-E1 细胞培养 24h 后对照组换不含 DMOG 的基础培养液, $50\mu\text{M}$ 组采用含 $50\mu\text{M}$ DMOG 的基础培养液干预, $200\mu\text{M}$ 组采用含 $200\mu\text{M}$ DMOG 的基础培养液干预, 干预 3d 后, 弃上清, PBS 洗 2 遍, 加入 TRIzol 试剂裂解细胞, 试剂盒提取细胞总 RNA。用紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度。取各组样品总 RNA 行逆转录合成 cDNA, 用实时荧光定量 PCR 仪 (QuanStudio5) 进行 PCR 荧光定量。PCR 反应体系为 $25\mu\text{l}$, 反应条件和步骤: (1) 预变性: 50°C 、2min, 95°C 、10min; (2) 变性和退火: 95°C 、15s, 57°C 、1min, 循环 40 次; (3) 溶解曲线分析: 95°C 、15s, 57°C 、1min, 95°C 、15s, 60°C 、15s。用于标准化的内参基因为 GAPDH。通过 ABI 公司自带的 Quant Studio Design & Analysis 分析软件计算得出基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

1.8 统计学分析

运用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活性

见表 2。培养 1d 时, $50\mu\text{M}$ 和 $200\mu\text{M}$ 组的 MC3T3-E1 细胞增殖均多于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), $50\mu\text{M}$ 与 $200\mu\text{M}$ 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 3d 时 $200\mu\text{M}$ 组的 MC3T3-E1 细胞增殖显著多于其余各组 ($P < 0.05$)。培养 5d 时各组 MC3T3-E1 细胞增殖均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.2 成骨分化

成骨诱导培养 5d、10d 时。ALP 染色可见对照组颜色较深, $50\mu\text{M}$ 组颜色中等, $200\mu\text{M}$ 组颜色较浅; 10d 时染色较 5d 时更深, 且 $200\mu\text{M}$ 组较 $50\mu\text{M}$ 组染色颜色更浅; 显微镜下三组均可见较多细胞 (图 1~3)。三组各时间点的 ALP 活性见表 3, 同时点三组间的 ALP 活性均有显著性差异, $200\mu\text{M}$ 组和 $50\mu\text{M}$ 组低于对照组, $200\mu\text{M}$ 组低于 $50\mu\text{M}$ 组 ($P < 0.05$)。

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequence

		引物 Primer	
血管内皮生长因子 m-VEGF	上游	Forward	GGGATGAAAGGCTTCACTG
	下游	Reverse	AGGAATGGGTTTGTCTGT
标准化内参 m-GAPDH	上游	Forward	AAGGAGTAAGAAACCCTGGAC
	下游	Reverse	TCTGGGATGGAAATGTGTAG

表 2 不同时间点 MC3T3-E1 的 OD 值

Table 2 OD values of MC3T3-E1 at different time points

	对照组 Control group	$50\mu\text{M}$ 组 $50\mu\text{M}$ group	$200\mu\text{M}$ 组 $200\mu\text{M}$ group
1d	0.041 $\pm$ 0.009	0.074 $\pm$ 0.019 ^①	0.086 $\pm$ 0.044 ^①
3d	0.123 $\pm$ 0.027	0.148 $\pm$ 0.020 ^①	0.224 $\pm$ 0.061 ^{①②}
5d	0.297 $\pm$ 0.044	0.325 $\pm$ 0.084	0.354 $\pm$ 0.038

注: ①与对照组比较 $P < 0.05$; ②与 $50\mu\text{M}$ 组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.05$; ②Compared with $200\mu\text{M}$ group, $P < 0.05$

2.3 细胞成骨矿化

成骨诱导培养 21d 后茜素红染色对照组可见大量红色结节, $50\mu\text{M}$ 组可见中等量红色结节, $200\mu\text{M}$ 仅见少量红色结节 (图 4、5)。定量分析对照组茜素红含量 ($\mu\text{g/ml}$) 为 56.178 ± 7.940 , $50\mu\text{M}$ 组为 41.922 ± 2.438 , $200\mu\text{M}$ 组为 31.929 ± 1.922 , 三组间比较异均有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.4 VEGF 蛋白和 mRNA 表达情况

基础培养液培养细胞 3d 各组上清液中的 VEGF 蛋白和 mRNA 相对表达量见表 4。三组细胞分泌的 VEGF 蛋白和 mRNA 相对表达量均有统计学差异 ($P < 0.05$), $50\mu\text{M}$ 组高于对照组, $200\mu\text{M}$ 组高于 $50\mu\text{M}$ 组。

3 讨论

脊柱融合术是一种临床常见手术, 用于治疗因退行性改变、外伤等原因引起的脊柱不稳、椎体滑脱以及脊柱畸形、肿瘤等疾病, 通过使局部上、下节段形成骨性融合来重建脊柱力学稳定性。仅美国, 每年就有超过 25 万例患者行脊柱融合手术, 由于植骨材料不同等因素融合失败率在 5%~35%^[10]。自体骨移植是植骨融合术的金标准, 但它也有不足^[11]: 骨来源有限, 取骨手术带来的二次伤害及并发症, 获取的骨形态、数量等不能满足治疗要求。相对自体骨, 异体骨来源更丰富, 但异体骨可引起免疫排斥反应和一些疾病的传播等问题。

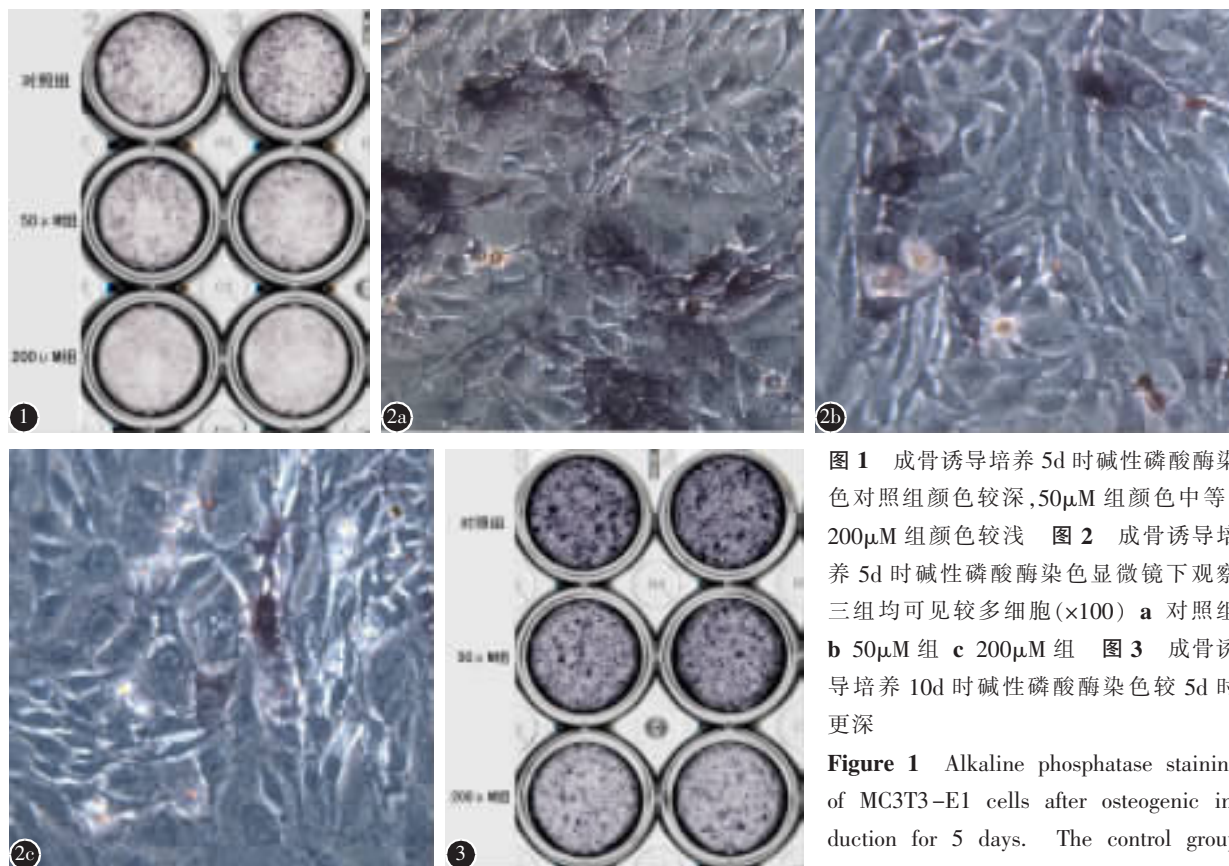


图 1 成骨诱导培养 5d 时碱性磷酸酶染色对照组颜色较深, 50 μ M 组颜色中等, 200 μ M 组颜色较浅 图 2 成骨诱导培养 5d 时碱性磷酸酶染色显微镜下观察三组均可见较多细胞($\times 100$) a 对照组 b 50 μ M 组 c 200 μ M 组 图 3 成骨诱导培养 10d 时碱性磷酸酶染色较 5d 时更深

Figure 1 Alkaline phosphatase staining of MC3T3-E1 cells after osteogenic induction for 5 days. The control group had a darker color, the group of 50 μ M

had a moderate color, and the group of 200 μ M had a lighter color Figure 2 Alkaline phosphatase staining of MC3T3-E1 cells after osteogenic induction for 5 days. Observed under microscope, many cells can be seen in all three groups ($\times 100$) a control group b 50 μ M group c 200 μ M group Figure 3 Alkaline phosphatase staining of MC3T3-E1 cells after osteogenic induction for 10 days was deeper than that at 5 days

表 3 培养 5d 和 10d 时碱性磷酸酶活性
Table 3 Alkaline phosphatase activity at different time points

	对照组 Control group	50 μ M 组 50 μ M group	200 μ M 组 200 μ M group
5d	1.943 $\pm$ 0.072	1.632 $\pm$ 0.051 ^①	1.319 $\pm$ 0.065 ^{①②}
10d	3.734 $\pm$ 0.067	3.381 $\pm$ 0.070 ^①	2.831 $\pm$ 0.086 ^{①②}

注: ①与对照组比较 $P < 0.05$; ②与 50 μ M 组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.05$; ②Compared with 50 μ M group, $P < 0.05$

金属融合器在 20 世纪 80 年代末期开始代替自体骨, 但因其无骨诱导性常常出现不融合导致融合器下沉。因此, 人们一直在研究并改进能促进脊柱融合的复合植骨材料。在支架材料中荷载生物活性因子是骨组织工程的研究热点。在众多的成骨诱导因子中, 成骨活性蛋白 BMP2 成骨能力强, 被美国 FDA 批准用于腰椎前路融合手术, 临床效果显著, 能极大地促进融合率, 但 BMP2 费用昂贵,

存在异位成骨、潜在肿瘤风险等一系列问题^[12]。DMOG 作为酮戊二酸类似物, 是一种无细胞毒性的小分子化合物, 能竞争 2-酮戊二酸从而抑制脯氨酸羟化酶^[13], 进一步抑制 HIF-1 α 的羟化, 减少 HIF-1 α 在常氧条件下的降解, 从而促进 HIF-1 α 下游基因的合成和表达。

有研究报道, DMOG 能促进骨髓间充质干细胞成骨分化, 作用效果从 100 μ M~1000 μ M 呈现剂量依赖的方式增加^[14,15]。本研究采用 200 μ M 浓度的 DMOG 处理细胞, 同时设 50 μ M 的 DMOG 组观察更低浓度 DMOG 对 MC3T3-E1 的生物学效应。DMOG 作为一种几乎无细胞毒性的小分子化学物质, 有望添加到植骨材料中促进骨再生。有研究报道在介孔生物活性玻璃支架中置入缓释稳定 HIF-1 α 的小分子化合物 DMOG, 能够显著增加人骨髓间充质干细胞的成骨分化和促血管生成能力^[9]。另有报道, 在硫酸钙支架材料的制备过程中

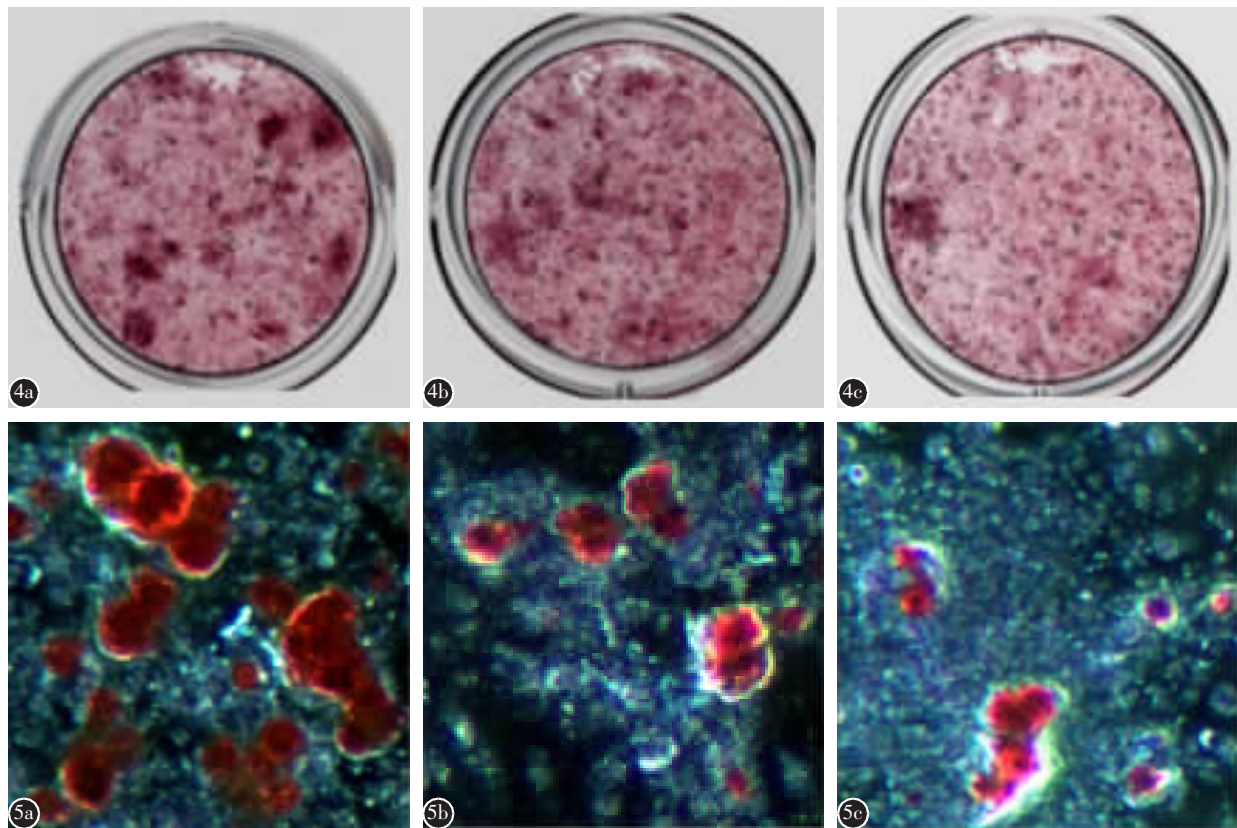


图 4 MC3T3-E1 细胞成骨诱导 21d 后茜素红染色 a 对照组可见大量红色结节 b 50 μM 组可见中等量红色结节 c 200 μM 组仅见少量红色结节 图 5 茜素红染色后显微镜下观察情况 a 对照组 b 50 μM 组 c 200 μM 组 (×40)

Figure 4 Alizarin red staining of MC3T3-E1 cells after osteogenic induction for 21 days **a** A large number of red nodules were seen in control group **b** Moderate red nodules were seen in 50 μM group **c** Small amount of red nodules were seen in 200 μM group **Figure 5** Alizarin red staining of MC3T3-E1 cells after osteogenic induction for 21 days under microscopic **a** represents the control group **b** represents the 50 μM group **c** represents the 200 μM group (×40)

表 4 培养 3d 时培养基上清液中 VEGF 蛋白含量和细胞 mRNA 的相对表达量

Table 3 The content of VEGF protein in the culture supernatant and the relative expression of cellular mRNA at 3 days

	蛋白 Protein	mRNA
对照组 Control group	9.063±0.603	1
50 μM 组 50 μM group	12.123±0.870 ^①	1.792±0.067 ^①
200 μM 组 200 μM group	15.540±0.581 ^{①②}	3.963±0.092 ^{①②}

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与 50 μM 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with 50 μM group, $P<0.05$

加入 DMOG 和组蛋白乙酰酶抑制剂丁酸盐,能显著促进成骨细胞的分化和促血管反应,加快大鼠颅骨缺损愈合^[6]。但是,迄今为止 DMOG 对成骨细胞的作用还鲜有研究报道。MC3T3-E1 作为前

成骨细胞系,是研究成骨细胞功能的常用细胞模型。本研究利用 MC3T3-E1 观察 DMOG 对成骨细胞增殖、分化、矿化等的影响。结果表明,DMOG 能显著促进 MC3T3-E1 的细胞增殖,这与此前报道^[17,18]的低氧及低氧模拟剂促进骨髓间充质干细胞增殖的结果一致。Wang 等^[19]的研究也表明低氧环境培养能促进 MC3T3-E1 的细胞增殖。ALP 作为一个反映成骨细胞分化水平的重要指标,ALP 染色越深表明成骨细胞分化越强^[20]。本研究通过 ALP 染色和活性测定发现 50 μM、200 μM 浓度的 DMOG 均能抑制 MC3T3-E1 成骨分化,而且随着 DMOG 浓度的增加对 MC3T3-E1 成骨分化的抑制作用也更加明显。既往研究表明,DMOG 对不同发育阶段的细胞在成骨分化方面可能有不一样的作用。Liu 等^[21]报道在低氧环境下转移相关基因 1 (metastasis-associated gene 1, MTA1) 受 HIF-1α 的调节而抑制 MC3T3-E1 成骨分化;Irwin 等^[22]报

道 5mM 浓度的 DMOG 处理 24h 后换液继续成骨诱导培养, MC3T3-E1 成骨分化作用显著抑制。本研究结果也支持 DMOG 抑制 MC3T3-E1 的成骨分化, 这与之前报道的低氧或低氧模拟剂促进间充质干细胞成骨分化的结果相反。对于 DMOG 促进骨髓和脂肪间充质干细胞的成骨分化作用而抑制 MC3T3-E1 成骨分化, 我们推测是细胞类型不同及发育阶段差异导致对 DMOG 有不同的生物学效应, 即 DMOG 对不同细胞类型及细胞不同窗口期的成骨分化作用不同。为了观察 DMOG 对 MC3T3-E1 细胞矿化的影响, 我们通过茜素红染色来检测成骨诱导 21d 后细胞矿化结节的形成并进行定量分析, 发现 50 μ M、200 μ M 的 DMOG 均能抑制 MC3T3-E1 细胞钙结节的形成, 而且随着 DMOG 的浓度增加对 MC3T3-E1 细胞钙结节形成的抑制作用也更加明显。DMOG 促进间充质干细胞的骨向分化而抑制成骨细胞 ALP 表达的分子机制目前还缺乏相关研究, 这可能是不同细胞类型中 DMOG 作用效果具有特异性。

DMOG 通过抑制 HIF-1 α 的降解稳定细胞中 HIF-1 α 的水平, 可促进下游基因 VEGF 的合成和表达。本研究结果显示, 50 μ M 和 200 μ M 的 DMOG 均能促进 MC3T3-E1 细胞分泌 VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 的表达, 而且随着 DMOG 的浓度的增加对 MC3T3-E1 细胞分泌 VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 的表达作用也更加明显。VEGF 在骨的形成和修复过程中起着重要的调节作用, 通过促进血管内皮细胞的形成加快骨缺损区域的血管再生和局部骨再生^[23, 24]。因此, 附载 DMOG 的植骨材料可通过促进血管形成偶联增强骨形成。

本研究结果表明, DMOG 能够促进成骨细胞系 MC3T3-E1 的增殖并促进 VEGF mRNA 的表达和蛋白分泌, 抑制 MC3T3-E1 的成骨分化和矿化。但附载 DMOG 的植骨材料是否能促进脊柱融合还需要更多的实验研究。

4 参考文献

1. Meisel HJ, Schnöring M, Hohaus C, et al. Posterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2[J]. *Eur Spine J*, 2008, 17(12): 1735-1744.
2. Balmayor ER. Targeted delivery as key for the success of small osteoinductive molecules[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 94: 13-27.
3. Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(6): 1616-1626.
4. Wan C, Gilbert SR, Wang Y, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(2): 686-691.
5. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(12): 5447-5454.
6. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-1alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation[J]. *Science*, 2001, 292(5516): 468-472.
7. Ding H, Gao YS, Wang Y, et al. Dimethyloxaloylglycine increases the bone healing capacity of adipose-derived stem cells by promoting osteogenic differentiation and angiogenic potential[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(9): 990-1000.
8. Yao Q, Liu Y, Tao J, et al. Hypoxia-mimicking nanofibrous scaffolds promote endogenous bone regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(47): 32450-32459.
9. Wu C, Zhou Y, Chang J, et al. Delivery of dimethyloxaloylglycine in mesoporous bioactive glass scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis of human bone marrow stromal cells[J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(11): 9159-9168.
10. Evans NR, Davies EM, Dare CJ, et al. Tissue engineering strategies in spinal arthrodesis: the clinical imperative and challenges to clinical translation[J]. *Regen Med*, 2013, 8(1): 49-64.
11. Sasso RC, Williams JJ, Dimasi N, et al. Postoperative drains at the donor sites of iliac-crest bone grafts: a prospective, randomized study of morbidity at the donor site in patients who had a traumatic injury of the spine [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1998, 80(5): 631-635.
12. Kon E, Roffi A, Filardo G, et al. Scaffold-based cartilage treatments: with or without cells? a systematic review of pre-clinical and clinical evidence[J]. *Arthroscopy*, 2015, 31(4): 767-775.
13. Liu X, Tu Y, Zhang L, et al. Prolyl hydroxylase inhibitors protect from the bone loss in ovariectomy rats by increasing bone vascularity[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 69(1): 141-149.
14. Ding H, Chen S, Song WQ, et al. Dimethyloxaloylglycine improves angiogenic activity of bone marrow stromal cells in the tissue-engineered bone[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(7): 746-756.
15. Zhang L, Jiang G, Zhao X, et al. Dimethyloxaloylglycine promotes bone marrow mesenchymal stem cell osteogenesis via Rho/ROCK signaling[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(4): 1391-1403.
16. Woo KM, Jung HM, Oh JH, et al. Synergistic effects of

脊柱手术围手术期抗凝治疗的研究进展

Research progress of perioperative antithrombotic therapies in spine surgery

张子凡¹, 沈兴利¹, 孙柏峰², 简美诚¹, 刘 洋²

(1 海军军医大学基础医学院 200433 上海市; 2 海军军医大学附属长征医院骨科医院脊柱一科 200003 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.03.12

中图分类号: R619 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-03-0269-06

静脉血栓栓塞(venous thromboembolism, VTE)通常包括深静脉血栓形成(deep vein thrombosis, DVT)、肺栓塞(pulmonary embolism, PE),是脊柱外科手术比较常见的并发症^[1],会显著影响患者的生活质量,严重者甚至导致死亡^[2]。Sebastian 等^[3]在样本数量为 43777 例的回顾性分析中指出,行胸腰椎手术的患者 30d 内 PE 和 DVT 的发生率分别为 0.5%和 0.7%,而行椎体次全切除手术的患者发生 VTE 风险更高。因此,合理进行抗凝治疗是必要的。根据原理不同,抗凝治疗通常可以分为物理抗凝治疗、化学抗凝治疗两种方法^[4],而临床上也常进行物理、化学抗凝联合治疗^[5]。但如何平衡疗效和风险,选择合适的方案仍存争议。例如相比物理抗凝治疗,化学抗凝治疗疗效更好,但其与

硬膜外血肿等并发症的发生密切相关^[6],有些并发症甚至会严重影响患者的神经系统^[7]。笔者围绕脊柱手术围手术期抗凝治疗的研究进展综述如下。

1 抗凝治疗方法简介

1.1 物理抗凝治疗

物理抗凝治疗一般应用充气或外力等机械原理,模仿人体下肢的肌肉收缩挤压静脉,从而加速血液回流和减少血液淤积,进而降低 VTE 发生的概率。一般包括梯度压力弹力袜(compressive stocking, CS)、间歇充气加压装置(intermittent pneumatic compression devices, IPCD)、脚脉冲设备(foot impulse devices, FIDs)等。

1.1.1 物理抗凝治疗的有效性 物理抗凝治疗相对普遍,3 篇指南类文章^[5,8,9]均推荐应用。另有 13 篇文献^[10-22]对其有效性也持肯定态度,提出不同意见的有 1 篇^[23]。

在 2009 年的北美脊柱协会(North American Spine Society, NASS)临床循证指南^[9]中,推荐择期脊柱手术患者使用下肢机械压缩装置来降低栓塞的风险,推荐程度为

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号:81572096; 81772392)

第一作者简介:男(1997-),在读本科生,研究方向:脊柱骨科

电话:(021)81870958 E-mail:jueargus9427@smmu.edu.cn

通讯作者:刘洋 E-mail:liuyangspine@smmu.edu.cn

- dimethylglycine and butyrate incorporated into α -calcium sulfate on bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2015, 39: 1-14.
17. Min Z, Shichang Z, Chen X, et al. 3D-printed dimethylglycine delivery scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis[J]. *Biomater Sci*, 2015, 3(8): 1236-1244.
18. 张磊, 龚跃昆, 赵学凌, 等. 低氧与低氧模拟剂对 BMSCs 成骨分化影响的对比研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30(7): 903-908.
19. Wang L, Wu B, Zhang Y, et al. Hypoxia promotes the proliferation of MC3T3-E1 cells via the hypoxia-inducible factor-1 α signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5267-5273.
20. Kyeyune-Nyombi E, Lau KH, Baylink DJ, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates both alkaline phosphatase gene transcription and mRNA stability in human bone cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 291(2): 316-325.
21. Liu T, Zou W, Shi G, et al. Hypoxia-induced MTA1 pro-

- mot MC3T3 osteoblast growth but suppresses MC3T3 osteoblast differentiation[J]. *Eur J Med Res*, 2015, 20(1): 1-7.
22. Irwin R, LaPres JJ, Kinser S, et al. Prolyl-hydroxylase inhibition and HIF activation in osteoblasts promotes an adipocytic phenotype[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100(3): 762-772.
23. Yuan J, Cui L, Zhang WJ, et al. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate [J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (6): 1005-1013.
24. Liu G, Zhao L, Zhang W, et al. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(6): 2367-2376.

(收稿日期:2017-10-09 末次修回日期:2018-01-22)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)