

狗骨髓基质细胞的体外诱导成骨潜能研究

尚显文¹, 刘日光¹, 尹培荣¹, 杨述华², 易诚青², 刘建湘²
(贵阳医学院附属医院骨科, 贵州 贵阳 550004)

摘要 目的: 观察狗骨髓基质细胞的生长特点及诱导条件下的成骨能力。方法: 采用成年狗双侧髂骨取材进行骨髓基质细胞培养, 应用四甲基偶氮唑蓝微量酶反应比色法观察细胞增殖; 以对硝基苯磷酸盐法及骨钙素含量测定法测定碱性磷酸酶活性及骨钙素含量; 用 Von Kossa 染色法观察矿化结节; 用间接免疫荧光染色法测定 I 型胶原。观察在培养液中添加地塞米松、维生素 C、 β -甘油磷酸钠条件下骨髓基质细胞生长及成骨分化情况。结果: 骨髓基质细胞呈成纤维样表现, 增殖力强。诱导条件下的细胞碱性磷酸酶活性及骨钙素含量明显增高, I 型胶原表达增多, 10~12 d 达到高峰, 并出现矿化结节。结论: 狗骨髓基质细胞在本实验条件下, 成骨能力肯定, 增殖能力强, 可作为骨组织工程的种子细胞。

关键词 骨髓细胞; 骨形成; 细胞培养

Osteogenic potentiality of cultured dogs marrow stromal cells under condition of bone induction SHANG Xiarwen^{*}, LIU Rìguang, YIN Peirong, YANG Shùhua, YI Chengqing, LIU Jianxiang.^{*} Department Of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guizhou Guiyang, 550004, China

Abstract Objective: To investigate the growth and osteogenic potentiality of cultured dog marrow stromal cells (MSCs). **Methods:** Marrow stromal cells were obtained from the dual ilium of adult dogs. The adhesive cells were preserved to passage culture. MSCs were cultured in a conditional medium in subculture including dexamethasone, vitamin C, and β -glycerophosphate. The proliferation was observed by MTT. The ALPase activity and BGP content were detected respectively through PNPP and radioimmunoassay. Von Kossa staining was used for the mineral nodule investigation. The collagen type I was observed by indirect immunofluorescent method. **Results:** The adhesive MSCs had strong capability of proliferation. The mineral nodules were observed on 12th to 14th days later under osteogenic condition. ALPase activity, BGP and collagen type I of MSCs increased significantly, and reached to a peak value on 10th to 12th days. **Conclusion:** The MSCs obtained in our experiment have a strong activity of proliferation and osteogenic potentiality. This study reveals that the MSCs can be used as the seed cells in the bone tissue engineering.

Key words Bone marrow cells; Osteogenesis; Cell culture

从人和动物骨髓和骨膜分离出来的骨髓基质细胞 (MSCs) 是一种间充质细胞, 具有多向分化潜能^[1]。分离的 MSCs 在体外培养, 其表型稳定, 经适当诱导可向成骨细胞、成软骨细胞分化的潜力不受影响, MSCs 的这种特性是骨组织工程或其他间充质来源的组织工程实施的理想的种子细胞。本实验通过对狗骨髓基质细胞的培养与诱导, 以期建立一种狗骨髓基质细胞定向诱导为成骨细胞的培养方法。

1 材料与方法

1.1 MSCs 的分离与培养 戊巴比妥 30 mg/kg 静脉麻醉下, 经常规消毒铺巾后, 用 16 号骨穿针穿刺狗 (12 月龄成年狗, 购自同济医学院实验动物中心) 髂前上棘下缘, 以含肝素 800 U/ml 的 DMEM 抽取骨髓, 用 4 号针头反复抽吸, 离心后吸取含 20% 胎牛血清 (FCS) 的 DMEM, 吹打细胞团成细胞悬液, 置 50 ml 的 2 个塑料培养瓶中, 于条件为 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱 (SABC) 培养。7 d 后换液, 倒置显微镜下观察细胞贴壁及生长情况。在原代细胞融合为单层后, 用 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco, PBS 配制) 消化并传代。实验用 MSCs 均不超过 4 代。

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30170945), 贵州省科学技术基金 (编号: 3049)

通讯作者: 刘日光 Tel: 0851-6855119-3379 E-mail: liuriguang5629519@tom.com

1.2 诱导 MSCs 向成骨细胞定向分化 传代后的基础培养液为含 10% FCS 的 DMEM, 条件培养液则另含地塞米松 10^{-8} mol/L, β 甘油磷酸钠 10 mmol/L 及抗坏血酸 50 μ g/ml。

1.3 MSCs 的碱性磷酸酶(ALP)活性检测 传代细胞按 2×10^5 个/孔密度接种于 24 孔板, 分别加入基础培养基与诱导条件培养基, 分别于 2、4、6、8、10、12、14 d 时收集细胞。参照文献[2]方法进行 ALP 活性检测, 按吸光度法换算出 ALP 含量。

1.4 MSCs 的骨钙素(BGP)含量测定 收集上述时间点的培养上清液, 置 -20°C 保存, 采用放射免疫法测定 BGP 含量, 方法按试剂盒(购自北京生物技术所)要求进行, 试剂批内变异系数 $< 5\%$, 批间变异系数 $< 10\%$ 。

1.5 四甲基偶氮唑蓝微量酶反应比色法 取传代细胞用 10% FCS 的 DMEM 释成 4×10^4 个/ml, 以每孔 200 μ l 加入 96 孔板, 分别加入基础培养基与诱导培养基。1~8 d 以 MTT 法测定细胞增殖, 绘制生长曲线, 并按文献[3]方法计算出倍增时间。

1.6 细胞外基质 I 型胶原检测 传代细胞于 6 孔板, 分别加入基础培养基与诱导培养基, 连续培养 7 d 进行细胞外基质 I 型胶原检测。采用间接免疫荧光法测定, 7 d 取出细胞爬片, 冷丙酮固定 10 min, 常规处理后滴加兔 I 型胶原抗体, -4°C 过夜, 再加二抗 FIT 羊抗兔 IgG(用 0.01% 伊文氏蓝溶液稀释), 在湿盒中, 保存 30 min, 50% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.7 钙结节染色 传代细胞于 6 孔板, 分别加入基础培养基与诱导培养基, 于 12 d 按文献方法[4]进行染色。

1.8 数据处理 采用 SPSS 10.0 软件包进行组间定量资料的 *t* 检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 MSCs 原代培养 原代培养 MSCs 至 7 d 换液时, 可见细胞贴壁生长, 圆而发亮, 开始有伸展突起。随着培养时间延长, 细胞呈三角形、梭形和多角形等

形态, 细胞数量增加并体积增大, 逐渐进入倍数增长期。换液后培养 3~5 d 时, 细胞胞浆丰满且与邻近细胞以突起相连, 此时细胞形态以梭形居多。再继续培养 3~4 d, 细胞已融合, 较密集铺满培养瓶底部。

2.2 MSCs 的传代培养 刚经传代的细胞为圆形, 折光好, 接种后很快贴壁, 伸展, 恢复原有的梭形样, 12 h 左右细胞基本完成贴壁, 呈均匀生长, 形态较为单一, 2~3 d 细胞完全融合铺满瓶底, 细胞排列仍有规则的方向性。

2.3 MSCs 的诱导培养 贴壁细胞加入诱导培养基后, 细胞生长相对减慢, 4~5 d 形成单层, 细胞为梭形和多角形, 随着培养时间的延长, 细胞呈多层生长, 没有接触性抑制, 细胞形态逐渐变为多角形和方形, 细胞外基质增多。

2.4 MSCs 和诱导 MSCs 的增殖分化情况

2.4.1 增殖生长曲线 传代后 MSCs 和诱导 MSCs 细胞在 1~2 d 内生长缓慢, 从第 3 天起快速增长, 于第 7 天达最高峰, MSCs 的增殖时间为 32.5 h, 诱导细胞的倍增时间为 31.8 h, 见图 1。

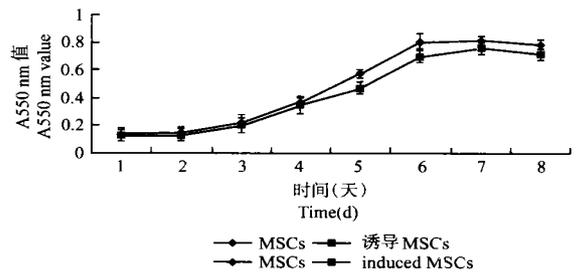


图 1 MSCs 和诱导 MSCs 的增殖生长曲线 Fig. 1 Growth curve of MSCs and induced MSCs

2.4.2 MSCs 和诱导 MSCs 的 ALP 活性与 BGP 含量 由表 1-2 可见经诱导 4 d 后的 MSCs 的 ALP 活性与 BGP 含量明显增高, 差异有显著性意义, 随着培养时间延长, ALP 与 BGP 增加更为明显, 至 12 d 达高峰, 14 d 后略下降, 但仍有统计学差异。

表 1 MSCs 和诱导 MSCs 的 ALP 酶活性的比较(单位: U/ml)

Tab. 1 Comparison of ALPase activity between MSCs and induced MSCs(U/ml)

groups	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
MSCs	11.16 ± 0.91	13.46 ± 0.65	15.10 ± 0.90	16.09 ± 0.70	18.07 ± 0.45	18.42 ± 0.41	18.12 ± 0.41
induced MSCs	11.55 ± 0.52	18.23 ± 0.41*	24.28 ± 1.34**	30.10 ± 0.90*	32.92 ± 0.99**	34.84 ± 1.07*	34.19 ± 1.19**

注: $n = 6, t_2 = -0.91, t_4 = -15.18, t_6 = -13.93, t_8 = -31.84, t_{10} = -33.42, t_{12} = -35.11, t_{14} = -31.23$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Notes: $n = 6, t_2 = -0.91, t_4 = -15.18, t_6 = -13.93, t_8 = -31.84, t_{10} = -33.42, t_{12} = -35.11, t_{14} = -31.23$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 2 MSCs 和诱导 MSCs 的 BGP 含量的比较(单位: $\mu\text{g/L}$)Tab. 2 Comparison of BGP content between MSCs and induced MSCs($\mu\text{g/L}$)

groups	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
MSCs	1.64 \pm 0.13	1.66 \pm 0.16	1.74 \pm 0.11	1.87 \pm 0.18	1.87 \pm 0.08	1.91 \pm 0.09	1.94 \pm 0.07
induced MSCs	1.67 \pm 0.16	3.60 \pm 0.46*	4.18 \pm 0.38*	7.64 \pm 0.81*	8.35 \pm 0.89*	9.50 \pm 0.49*	9.29 \pm 0.61*

注: $n=6$, $t_2=-0.36$, $t_4=-9.73$, $t_6=-18.78$, $t_8=-17.14$, $t_{10}=-17.73$, $t_{12}=-37.33$, $t_{14}=-26.37$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Notes: $n=6$, $t_2=-0.36$, $t_4=-9.73$, $t_6=-18.78$, $t_8=-17.14$, $t_{10}=-17.73$, $t_{12}=-37.33$, $t_{14}=-26.37$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.4.3 钙结节与细胞外基质 I 型胶原检测结果

经诱导的骨髓基质细胞 7 d 后, 大多数细胞 I 型胶原呈阳性荧光反应; 14 d 钙结节染色可见有大量阳性细胞。

3 讨论

本实验采用全骨髓贴壁分离筛选法, 初始培养时以造血细胞成分居多, 随着培养时间的延长, 这些细胞逐渐坏死碎裂或被换液而清除, 原代培养早期贴壁细胞中可见到一些圆形和扇形的细胞, 在原代培养末期这些细胞基本消失, 获得均一性较好的 MSCs。Cheng 等^[5]认为这些圆形或扇形的细胞可能是混杂的单核细胞及破骨前体细胞, 由于这些细胞在生长时需要 1-25-(OH)₂VitD₃ 或集落刺激因子的作用, 因此在培养过程中逐步消失。但本实验过程中, 在早期培养 7 d 时贴壁的 MSCs 尚不多, 这比鼠和兔类骨髓基质细胞培养所报道的贴壁时间要慢, 可能与本实验所选的狗均为成年狗, 其骨髓中所含的 MSCs 相对较少, 以及狗骨髓中红细胞占据了 MSCs 的贴壁空间有关。

本实验获得狗骨髓基质细胞在体外培养条件下增殖能力强, 在体外培养其形态特征和报道相似^[6], 经诱导完全具有成骨细胞的生物学特性。魏海宽等^[7]的报道指出: 地塞米松浓度增大, 促进 MSCs 成骨分化的同时, 可抑制基质细胞的增殖。但本实验使用的地塞米松浓度对 MSCs 增殖没有明显的影响,

ALP 活性检测发现诱导因素能显著增加 ALP 的活性, 并且 ALP 随着诱导时间的延长而增高。BGP 检测也同样发现诱导因素可显著增加 MSCs 的 BGP 分泌, 其时效关系同 ALP 活性检测结果相一致。骨髓基质细胞必须在地塞米松和甘油磷酸钠的条件培养基中才能形成钙化, 这是由于地塞米松不仅能促进成骨细胞分化成熟, 诱导成骨, 而且具有调节成骨样细胞合成胰岛素样生长因子和促进胶原合成的作用, 刺激 ALP 的活性; β -甘油磷酸钠提供磷酸根离子作为 ALP 作用的底物, 诱导和激活 ALP, 促进有机磷向无机磷的转化, 加速钙盐沉着。

参考文献

- Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Sci, 1998, 10(Suppl): 63-67.
- 李德华, 刘宝林, 黄啸原, 等. 体外培养成骨细胞中碱性磷酸酶活性的检测方法. 实用口腔医学杂志, 1997, 13(1): 21-23.
- 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 136-137.
- Bodine PV, Green J, Harris HA, et al. Function properties of a conditionally phenotypic, estrogen responsive, human osteoblast cell line. J Cell Biochem, 1997, 65(3): 368-387.
- Cheng SL, Yang JW, Rifas L, et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. Endocrinology, 1994, 134(1): 277-286.
- 金丹, 裴国献, 王前, 等. 骨髓基质细胞体外培养成骨发生潜能及条件研究. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(6): 565-568.
- 魏海宽, 裴国献, 郑磊. 地塞米松对体外培养的骨髓基质细胞成骨特性的影响. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(4): 232-236.

(收稿日期: 2004-10-29 本文编辑: 连智华)

2005 年骨折微创治疗与生物学固定技术学习班

由《中华创伤骨科杂志》编辑部和山东省医学会骨科学分会主办, 青岛市骨伤科医院承办的“2005 年骨折微创治疗与生物学固定技术学习班”, 定于 2005 年 8 月 19~22 日在青岛举行。研讨会将邀请上海第九人民医院戴克戎院士, 北京积水潭医院荣国威教授、王满宜教授, 南方医科大学南方医院裴国献教授, 山东大学齐鲁医院陈允震教授, 山东省医院骨科周东升教授等创伤骨科专家就骨折的解剖、生物力学、影像学及 CT/MRI 诊断、分类、急救处理、内固定及外固定治疗、手术入路等进行专题演讲。

本项目为国家级继续教育项目, 记国家 I 类学分 10 分。欢迎报名参加! 会务费: 780 元/人; 食宿费: 每天 100 元。报名地址: ①广州市南方医科大学南方医院《中华创伤骨科杂志》编辑部张宁编辑收 510515, 电话为 020-61641748, E-mail: zhangn-79@yahoo.com.cn。②山东省青岛市骨伤科医院科教信息科丁梅老师收, 266021, 电话为 0532-3615013。报到地点: 青岛市市南区彰化路 4 号邮电部疗养院。