

## • 基础研究 •

## 两种方法诱导骨髓基质细胞向成骨表型分化的比较

孙崇然 景猛 李长宇 安沂华 刘恩重\*

[摘要] 目的 探讨骨髓基质细胞分化为成骨表型的诱导条件。方法 体外扩增大鼠骨髓基质细胞,将第3代细胞分为A组(对照组)、B组(加入地塞米松、 $\beta$ -甘油磷酸钠、维生素C、1,25-二羟维生素D<sub>3</sub>的诱导组)和C组(在B组基础上加大鼠长骨骨折血肿浸出液诱导组),于诱导后第5、8、11天观察细胞形态变化,用免疫组织化学方法检测诱导细胞的成骨样细胞标志分子(碱性磷酸酶、I型胶原、骨钙素),并用 von Kossa 法检测培养物钙化情况。结果 诱导大鼠骨髓基质细胞经小分子诱导培养5 d后,部分发生形态学变化,碱性磷酸酶和I型胶原呈弱阳性表达,无钙质沉积;诱导8 d后,发生形态学变化的细胞增多,呈集落生长,碱性磷酸酶和I型胶原表达增强,钙质沉积仍不明显;11 d后,骨钙素开始表达,且出现钙质沉积。C组细胞表型变化与B组类似,但发生变化的细胞和钙质沉积的数量更多。结论 骨髓基质细胞在体外可以被小分子物质诱导为成骨表型;骨折血肿浸出液能够加强这一作用,可作为一种诱导成骨的添加成分。

[关键词] 骨髓基质细胞;诱导分化;骨折血肿浸出液;组织工程

Differentiation of rat bone marrow stromal cells into osteogenic phenotype: the comparison of two methods SUN Chong-ran, JING Meng, LI Chang-yu, et al. Beijing Neurosurgical Institute of Capital University of Medical Science, 100050 Beijing, China

[Abstract] **Objective** To explore environmental conditions under which bone marrow stromal cells could be induced into osteogenic phenotype. **Methods** Rat bone marrow stromal cells were isolated and proliferated in vitro, and the 3rd passage was divided into the group A (control group), group B (cells cultured in the medium containing dexamethasone,  $\beta$ -glycerol disodium phosphate salt hydrate, vitamin C and active form of vitamin D<sub>3</sub>), and group C (on the bases of group B, the cells were cultured additionally with fracture hematoma extract). On the post-induction day 5, 8, and 11, the morphological changes were observed and the osteogenic markers such as alkaline phosphatase (ALP), collagen type I (Col I) and osteocalcin (OCN) were assayed with immunohistochemical staining, the calcification was manifested with von Kossa staining. **Results** In the group A, no evident osteogenic effects had been observed. In the group B, on 5th day post-induction, some bone marrow stromal cells underwent a morphological change, and mild expression of ALP and Col I was observed but with no calcification effect. On 8th day post-induction, the ratio of morphologically changed cells increased, and the expression of ALP and Col I increased still with no evident calcification. On 11th day post-induction, anti-OCN staining was positive and the calcium nodes were showed by von Kossa staining. The phenotype changes in the group C were similar to group B, but were more evident. **Conclusion** Bone marrow stromal cells can be induced into osteogenic phenotype in vitro with small molecular inducers. Fracture hematoma extract can enhance this effect thus might be used as an additive in osteogenesis.

[Key words] bone marrow stromal cells; induced differentiation; fracture hematoma extraction; tissue engineering

中图分类号: Q253 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2005)12-0999-03

[本文著录格式] 孙崇然,景猛,李长宇,等.两种方法诱导骨髓基质细胞向成骨表型分化的比较[J].中国康复理论与实践,2005,11(12):999-1001.

修补颅骨缺损的人工材料存在组织相容性差、不能随个体生长而生长等缺点。组织工程学方法有望构建出一种同宿主整合良好并可以随个体生长的修补颅骨缺损的材料<sup>[1]</sup>。

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)是一种骨组织工程学常用的种子细胞,但将其诱导为成骨样细胞表型的方法尚不完善,存在诱导效率低、钙

质沉积量不足等缺陷。目前的诱导方法主要是利用小分子诱导物<sup>[2]</sup>,而临床观察证实,骨折处的血肿浸出液有助于促进骨折的愈合<sup>[3]</sup>。我们推测,骨折血肿浸出液的这种效应可能是在细胞水平上发挥作用的。

为验证这种推测,我们对两种不同诱导方法进行比较,优化 BMSC 的诱导方法,为采用组织工程学方法修复颅骨缺损奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 新生 Wistar 大鼠(1~2周,体重30g左右,雌雄不限),由哈尔滨医科大学第一临床医学院实验动物中心提供。

1.2 细胞分离 引颈法处死新生大鼠,75%酒精消毒

作者单位:1. 100050 北京市,首都医科大学附属北京市神经外科研究所神经干细胞室(孙崇然、安沂华);2. 150001 黑龙江哈尔滨市,哈尔滨医科大学第一临床医学院神经外科(景猛、李长宇、刘恩重)。作者简介:孙崇然(1978-),男,山东淄博人,博士研究生,主要研究方向:神经系统的损伤修复。\* 通讯作者:刘恩重。

3 min,游离动物后肢,分离股骨和胫骨,剪除一端骨髓,用 1 ml 注射器从另一侧刺入骨髓腔,用磷酸缓冲液(PBS)将骨髓腔内容物冲出,重复冲洗 2 次。将骨髓腔内容物用滴管反复吹打,1000 rpm/min 离心 10 min 2 次,弃去上清,将细胞接种于含 20 %胎牛血清(Gibco)的 DMEM 培养液(Gibco),37℃、5 %CO<sub>2</sub> 培养。24 h 后换培养液,以后隔日换液。

1.3 骨折血肿浸出液制备 取 280 g 雄性 Wistar 大鼠 1 只,10 %水合氯醛腹腔麻醉后折断其一侧的肱骨和股骨中段,饲养 1 周后,以过量水合氯醛腹腔麻醉处死,分离骨折线两侧约 8 mm 的含血肿软组织,匀浆后 1000 rpm/min 离心 5 min,弃去沉淀,将上清液过滤后备用。

1.4 细胞诱导分化 待培养细胞 80 %汇合后,以 0.25 %胰蛋白酶(Sigma 公司产品)消化传代。将第 3 代细胞分为 3 组:①A 组:为对照组,加含 10 %胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养;②B 组:加成骨诱导培养液(含 10 %胎牛血清 DMEM 培养液中加入 1,25-二羟维生素 D<sub>3</sub> 10<sup>-8</sup> mol/L、地塞米松 5 nmol/L、甘油磷酸钠 10 mmol/L、维生素 C 50 μmol/L)培养;③C 组:在 B 组的基础上,加入骨折血肿浸出液(体积比 = 1:600)培养。

取诱导后第 5、8、11 天的爬片细胞做免疫组织化学染色和 von Kossa 染色。

1.5 免疫组织化学染色 标本用 4 %多聚甲醛固定,0.3 %双氧水—甲醇溶液孵育 30 min(除去内源性过氧化物酶),用山羊血清封闭 20 min,然后分别用不同稀释度的 1 抗:1:100 抗碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP) 1:100 抗 I 型胶原(collagen type I,Col I)和 1:100 抗骨钙素(osteocalcin,OCN),室温孵育 2.5 h,漂洗后先后用生物素化 2 抗和链霉素亲和素-生物素-辣根过氧化物酶室温孵育各 0.5 h,漂洗后用 DAB 法显色。

1.6 von Kossa 染色 4 %多聚甲醛固定标本,5 %硫代硫酸钠孵育 30 min,1 %硝酸银溶液紫外线下染色 30 min,继续用 5 %硫代硫酸钠孵育 2 min,1 %中性红复染 10 min,蒸馏水漂洗后观察。

1.7 统计学处理 每低倍视野下钙结节的计数用( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间均值比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 大鼠 BMSC 的分离、培养 新鲜取材的全骨髓细胞呈圆形,大小不均。培养数小时后,培养瓶底出现少量贴壁细胞;24 h 后,贴壁细胞呈梭形,换培养液继续培养,梭形细胞在数量上占据优势。至第 5~7 天,梭形细胞约 80 %汇合(见封 3 图 1.1),传代培养。

2.2 诱导分化后的细胞形态学改变 A 组细胞在观

察时间内保持 BMSC 的形态特征。B 组细胞 5 d 后,集落边缘的细胞发生形态变化,细胞体积变小,形态短粗或为多角形;第 8 天,约 80 %的培养细胞变为多角形,并形成少量结节样结构(见封 3 图 1.2);第 11 天,几乎所有细胞发生形态学变化,结节样结构更多。C 组细胞形态变化与 B 组相似,但发生形态学改变的细胞比例更高。不同诱导时间各组钙质结节形成的数量见表 1。

表 1 不同诱导时间各组钙质结节形成的数量

(个/低倍视野)(n=5)

组别	诱导前	第 5 天	第 8 天	第 11 天
A 组	0	0	0	0
B 组	0	0	2 ± 2	5 ± 3
C 组	0	0	8 ± 6 <sup>a</sup>	12 ± 7 <sup>a</sup>

注:a:与 B 组比较, *P* < 0.05。

2.3 诱导分化后成骨标志物的表达 A 组细胞在各个观察点免疫组化染色均为阴性。B 组细胞 5 d 后发生形态变化的细胞 ALP、Col I 呈弱阳性,染色阳性的部位位于胞浆(见封 3 图 1.3),未见抗 OCN 染色;8 d 后表达 ALP、Col I 的细胞增至约 80 %,免疫组化染色亦更深;11 d 后,可见部分细胞抗 OCN 染色阳性,OCN 多表达于胞核周围的胞浆,且阳性细胞呈集落样分布(见封 3 图 1.4)。C 组细胞成骨性诱导的蛋白表达状况与 B 组相似,但阳性细胞的比例更高。

2.4 钙质沉积情况 第 5 天,各组细胞均未形成结节样结构,von Kossa 染色也无阳性发现。第 8 天和第 11 天时,A 组仍然没有形成结节样结构,B 组和 C 组形成结节样结构的部位 von Kossa 染色显示黑色的钙质沉积(见封 3 图 1.5)。

## 3 讨论

组织工程学的发展为颅骨缺损的修复开辟了一条新的途径,可以解决其他修补材料组织相容性差、不能随个体生长的缺陷。但到目前为止,组织工程骨强度并不尽如人意。为解决这个问题,细胞的分化比例和数量非常重要。因此有必要研究种子细胞诱导的方法。

3.1 BMSCs 的成骨改变 BMSC 是来源于骨髓、具有多向分化潜能的细胞,能够向成骨细胞、成纤维细胞、网状细胞、脂肪细胞和内皮细胞等分化<sup>[4]</sup>。评价 BMSCs 诱导后的成骨活性可以通过成骨细胞的标志分子和功能学两种途径。

ALP 是一种与成骨作用有关的细胞内酶,其表达强度可以表示 BMSC 向成骨细胞分化趋势的强弱,但不具有特异性。成骨细胞仅表达 Col I,并且 Col I 的合成在细胞增殖期占主导地位。OCN 是由成骨细胞表达的一种基质蛋白,具有调节基质钙化的作用。

OCN mRNA 的转录和蛋白合成标志着成骨细胞进入矿化期<sup>[5]</sup>。

钙结节形成成为成骨细胞特有,并且是成骨细胞有功能的表现。von Kossa 法是染色矿化结节的经典方法,其原理是利用硝酸银与钙盐的复分解反应形成可被还原的银盐,在强光或紫外光下生成金属银。

3.2 小分子诱导物的作用 虽然在没有诱导物的条件下,BMSCs 也会自发向成骨表型分化,但这种效应并不明显<sup>[6]</sup>,而且本实验对照组诱导后的 11 d 内,并没有观察到这种变化。

许多小分子物质可以通过不同的途径促进 BMSCs 自发向成骨表型分化。地塞米松可促进 BMSCs 向成骨细胞分化,早期以促进基质合成为主,后期以促进钙化为主<sup>[2]</sup>。但是,地塞米松在促进成骨的同时,能激活 BMSCs 表面的糖皮质激素受体,使其向脂肪细胞分化。1,25-二羟维生素 D<sub>3</sub> 在促进 BMSCs 向成骨细胞分化的同时,可抑制其向脂肪细胞分化<sup>[7]</sup>,而且还可以在无地塞米松、雌二醇、维生素 C 的情况下诱导 BMSCs 向成骨细胞转化,并能增加 ALP 的活性。维生素 C 可促进体外培养细胞合成胶原,形成钙化,亦能调节 ATP 及 ALP 的活性,并影响其合成<sup>[8]</sup>。β-甘油磷酸钠可提供磷离子作为 ALP 的底物,从而加速结节钙化。

3.3 骨折血肿浸出液的作用 骨折周围的血肿浸出液含有多种生长因子,可以促进成骨细胞的增殖<sup>[9]</sup>和骨折处的血管与神经再生<sup>[10,112]</sup>,但并不能加快成骨表型的表达<sup>[12]</sup>。本实验中,C 组在早期发生形态学及生化改变的细胞比例高于 B 组,且这样的细胞聚集在一起,形成集落,因而推测骨折血肿浸出液促进成骨的作用是通过选择性刺激具有成骨表型的细胞的增殖。

总之,本实验结果显示,骨折血肿浸出液有可能作为一种添加成分加入到种子细胞中用以加强细胞的成骨作用。

## [参考文献]

- [1] Charles A, Vacanti MD, Lawrence J, et al. An overview of tissue engineered bone [J]. Clin Orthop, 1999, 367: 375—381.
- [2] Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV, et al. Expression of bone matrix during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells [J]. J Cell Biochem, 1996, 61 (2): 182—193.
- [3] 郭运通,冯金顺,李淑芬.人工血肿疗法治疗骨折延迟愈合临床体会 [J]. 中医正骨, 2000, 10: 43.
- [4] Oreffo RO, Triffitt JT. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthoedics [J]. Bone, 1999, 25: 5—9.
- [5] 孙崇然.颅骨缺损的组织工程学修复研究进展 [J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2002, 2: 183—186.
- [6] Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(1): 160—165.
- [7] Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, et al. Extracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$  (0))-sensing receptor in a murine bone marrow-derived stromal cell line (ST2): potential mediator of the actions of  $\text{Ca}^{2+}$  (0) on the function of ST2 cells [J]. Endocrinology, 1998, 139(8): 3561.
- [8] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH, et al. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats [J]. Tissue Res, 1998, 254: 317.
- [9] Grundnes O, Reikeras O. The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats [J]. Acta Orthop Scand, 1993, 64(1): 47—49.
- [10] Street J, Winter D, Wang JH, et al. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? [J]. Clin Orthop, 2000, 378: 224—237.
- [11] Li J, Ahmad T, Spetea M, et al. Bone reinnervation after fracture: a study in the rat [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16 (8): 1505—1510.
- [12] Tachibana T, Matsubara T, Mizuno K, et al. Enhancement of new bone formation by hematoma at fracture site [J]. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1991, 65(5): 349—358.

(收稿日期: 2005-08-15)



图1.1 BMSC原代培养, 大部分细胞呈梭型 ( $\times 100$ )

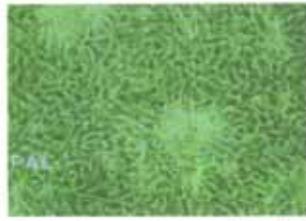


图1.2 第3组培养第8天, 少量结节样结构形成 ( $\times 100$ )



图1.3 第2组第5天后, ALP染色, ALP均匀表达于胞浆 ( $\times 400$ )



图1.4 第2组第11天后, 骨钙素染色, 骨钙素表达于细胞核周围的胎聚 ( $\times 100$ )

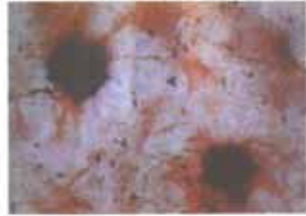


图1.5 第3组培养第11天, 图示两个矿化结节 ( $\times 100$ )

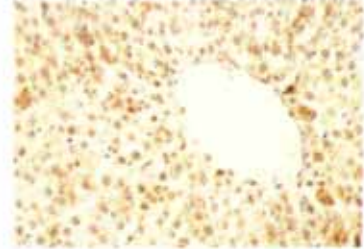


图2.1 Lpl在胞膜/胞浆内的阳性细胞

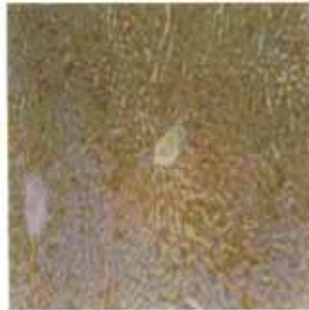


图2.2 Akt在胞膜/胞浆内的阳性细胞

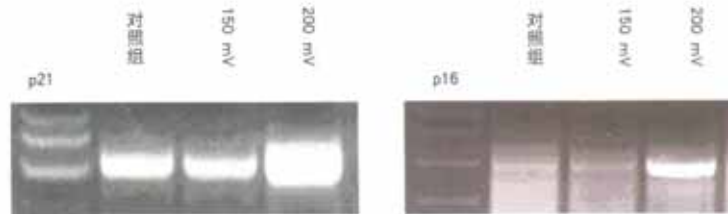
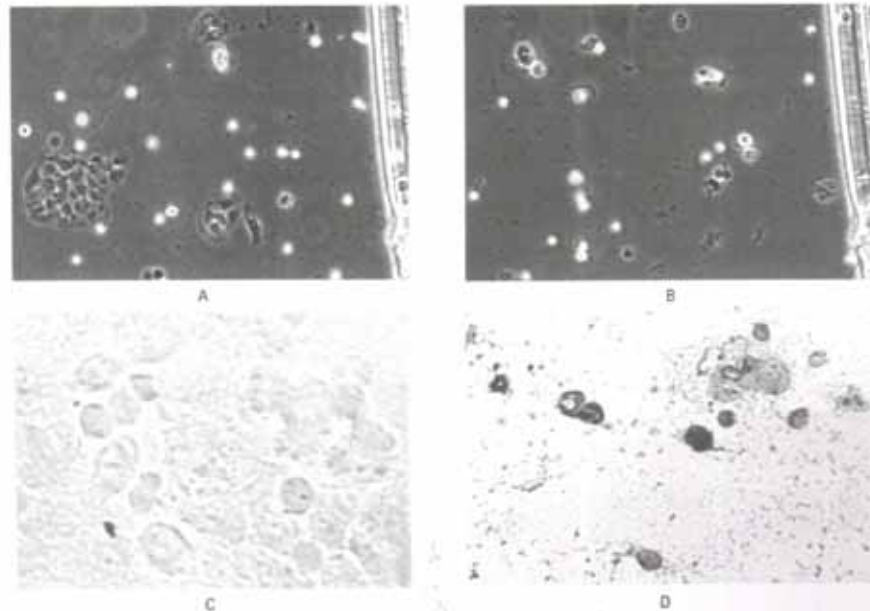


图3.2 直流小电场对于乳腺癌细胞p21、p16基因mRNA表达的诱导作用 (p21、p16基因mRNA表达明显升高)



A、B为电场前后同一视野下癌细胞脱落情况。C、D为未加电场组与电场组细胞TUNEL染色结果比较, 电场作用后凋亡细胞明显增多。

图3.1 直流小电场对于乳腺癌细胞的作用

图1.1—图1.5 正文见P1000

图2.1—图2.2 正文见P1003

图3.1—图3.2 正文见P1006