

陶瓷化骨对成人骨髓基质干细胞分化的影响

谭勇海,姜苗苗,韩海霞,于海勇

(山东省文登整骨医院,山东 文登 264400)

摘要 目的:观察陶瓷化骨对成人骨髓基质干细胞生长和分化的影响。**方法:**体外分离培养成人骨髓基质干细胞,将第二代细胞以陶瓷化骨为载体进行培养,利用倒置显微镜、碱性磷酸酶细胞化学染色、碱性磷酸酶活性检测等条件,了解陶瓷化骨对成人骨髓基质干细胞生物学行为的影响。**结果:**体外连续培养 6 d,倒置显微镜下可见成人骨髓基质干细胞与陶瓷化骨相容性好,材料周边细胞生长密集,并有向陶瓷化骨趋化迁移现象,3 周后形成矿化结节。碱性磷酸酶染色呈阳性、碱性磷酸酶活性检测有明显的细胞分泌量。**结论:**体外培养条件下,陶瓷化骨可诱导成人骨髓基质干细胞向成骨和骨质细胞分化。

关键词 陶瓷化骨 骨髓基质干细胞 分化

The effect of ceramic bovine bone on growth and differentiation of adult human bone marrow stromal cells

TAN Yong-hai*, JIANG Miao-miao, HAN Hai-xia, YU Hai-yong. *Wendeng Orthopaedic Hospital, Wendeng 264400, Shandong, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of ceramic bovine bone (CBB) on growth and differentiation of adult human bone marrow stromal cells (hBMSCs) in vitro. **Methods:** The hBMSCs were cultured in vitro, the second generation of cells were cultured with CBB as the carrier, inverted microscope, alkaline phosphatase (AKP) staining, ALP activity detection conditions were used to investigate effect of CBB on hBMSCs biological behavior. **Results:** After continuous cultivation in vitro for 6 Days, hBMSCs and CBB showed good compatibility under inverted microscope, the cells were densely distributed around the material and showed CBB chemotactic migration, the formation of mineralized nodules. AKP staining showed positive and significant secretion was detected. **Conclusion:** CBB could induced hBMSCs to differentiated into osteoblasts and bone cells in vitro conditions.

Key words Ceramic bovine bon; Mesenchymal stem cells; Differentiation

骨髓基质干细胞是一种取材方便,具有类似胚胎细胞的多分化潜能的细胞,在适当的体外环境诱导下可以分化为骨、软骨、脂肪、肌肉、神经、肌腱及韧带等多种组织细胞^[1-7]。陶瓷化骨一般是由松质骨经煅烧而来,除了保留了原有自然骨的连续微孔大小和形状外,还具有人工合成材料难以相比的天然网孔结构,有利于细胞的植入与贴附,以及细胞营养成分的渗入和细胞代谢产物的排出,有利于传导成骨。本实验通过将成人骨髓基质干细胞分离培养后,再在陶瓷化骨在进行骨髓基质干细胞的成骨和骨质细胞分化培养。结果表明,成人骨髓基质干细胞在陶瓷化骨上生长活跃,并分泌大量胶原基质,为临床移植干细胞提供基础。现实验研究如下。

1 材料

冷冻离心机(Thermo 公司)、生物安全柜(青岛海尔)、PBS (BD Falcon)、DMEM (BD Falcon)、AMEM (BD Falcon)、培养瓶 (BD Falcon)、离心管 (BD Fal-

con)、无菌穿刺针(上海强智)、CO₂ 培养箱 (Thermo 公司)、ALP 试剂盒(上海沪宇生物科技有限公司)、倒置相差显微镜(日本奥林巴斯)、NaOH、氯仿甲醇、30% H₂O₂、CaCl₂、LiCl、程控箱式电炉 (SXL-1208 型,上海)、0.25% 胰蛋白酶 (BD Falcon)、扫描电镜 (XL30E 型,荷兰)。

2 方法

2.1 hBMSCs 及血清的获得 无菌条件下取骨髓 30 mL,100 U·mL⁻¹肝素抗凝,200 g 离心 6 min,吸取中间富含核细胞的界面层至另一离心管,1000 g 离心 6 min,弃上清液;加入 DMEM 培养液(含体积分数为 10% 自体血清 + 8U·mL⁻¹ 强力霉素 + 3U·mL⁻¹ 肝素),于 37℃,体积分数为 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中原代培养,每 3 d 换液 1 次,8 d 后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养,以后每 3 d 传代 1 次。在第 2 代细胞后用 DMSO 进行冷冻保存,备用。无菌采集外周静脉血 200 mL,在超净工作台内分装,200 g 离心 20 min,

吸取上层血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中短时间内保存, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内长期保存。

2.2 陶瓷化骨的制备 取经股骨头置换术置换下的股骨头一个, 将股骨头切割成大小适当的几块。经以下步骤脱脂脱蛋白: ① $0.5\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{NaOH}$, 12 h; ② 1:1 氯仿甲醇, 1 h; ③ $30\%\text{ H}_2\text{O}_2$, 24 h; ④ $2\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{CaCl}_2$, 1 h; ⑤ $8\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{LiCl}$, 1 h; $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 恒温干燥。每个步骤之间均用三蒸水清洗 3 次。随后将标本置于箱式电炉中缓慢加温 $800\text{ }^{\circ}\text{C}$, 煅烧 3 h, 自然降温取出, 清洗, 切割成大小为 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 的形状, 环氧乙烷消毒备用^[5]。

2.3 细胞接种 取无菌细胞培养瓶 8 个, 在其中的 4 个培养瓶内放置消毒好的 BBC 颗粒 2~3 个, 另 4 个不放置消毒好的 BBC 颗粒。取 4 孔培养皿 1 个, 将消毒的盖玻片放入。将第 2 代成人骨髓基质干细胞接种到培养瓶和培养皿上。

2.4 各组细胞形态学观察 倒置相差显微镜下每日观察养瓶和培养皿中细胞形态和生长状态。培养 6 天后将含陶瓷化骨的培养瓶进行电镜扫描观察。

2.5 矿化结节观察 每天在倒置显微镜下观察细胞, 待盖玻片上出现肉眼可见的白色结节时, 细胞爬片行 AKP 染色。

2.6 碱性磷酸酶 (AKP) 细胞化学染色 将第 2 代细胞以 5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于预先放有盖玻片的培养皿中, 含 AMEM 的培养液每 4 天更换 1 次, 至细胞长满后取出盖玻片, Gomori 钴钙法 AKP 染色, 随机计数 5 张染片, 每张计数 300 个细胞, 计算 AKP 阳性细胞百分率作为成骨转化率。

2.7 成骨细胞 ALP 活性检测 细胞以 1×10^5 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种到 24 孔板, 每孔接种 1 mL, 隔天换液, 换液后第 2、4、6、8 天测定培养液中 ALP 含量。测定方法: 每孔各吸取 150 mL, 按试剂盒方法说明测定, 标准液吸 50 mL, 用培养基稀释到 150 mL, 测定 ALP 活性。

2.8 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计学软件对结果进行检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 hBMSCs 分离培养及增殖 刚接种的原代细胞由于与其它细胞互相混杂交难辨认。第 2 天首次换液, 未见贴壁生长的骨髓基质干细胞。第 4 天换液时可见骨髓基质干细胞迅速增殖, 呈克隆样生长。此时细胞形态渐为成纤维样的长梭形, 体积较大, 胞体透

亮, 折光性强, 胞核呈卵圆形。hBMSCs 贴壁后 2~4 天, 经多次换液及 PBS 洗涤后, 其它细胞逐渐被清除, 8 d 后细胞融合达 80%, 形态更趋一致。传代后的 hBMSCs 生长速度增快, 3 d 可铺满培养瓶底, 旋涡状分布直至融合(图 1)。

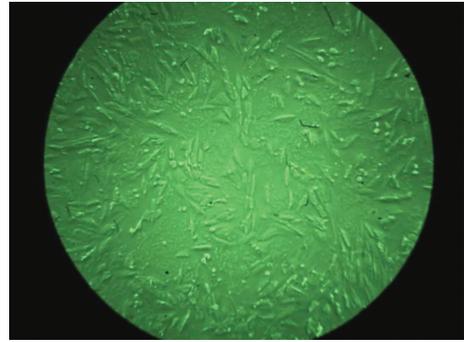


图 1 培养 7 d 的成人骨髓基质干细胞倒置显微镜图 $\times 100$

3.2 陶瓷化骨的观察 煅烧形成的陶瓷化骨保持了原骨组织的多孔网状结构, 骨组织支架的三维多孔结构存在, 较骨组织色白, 质脆(图 2)。



图 2 陶瓷化骨

3.3 倒置显微镜观察 细胞接种与陶瓷化骨联合培养 40 h 后, 可见陶瓷化骨周边细胞增多, 并附着在陶瓷化骨上且不易脱落, 细胞由接种时的圆形变为长梭或多角形, 并伸出长的突起(图 3)。只接种细胞的培养瓶内只见到细胞生长, 没观察到伸出长的突起。

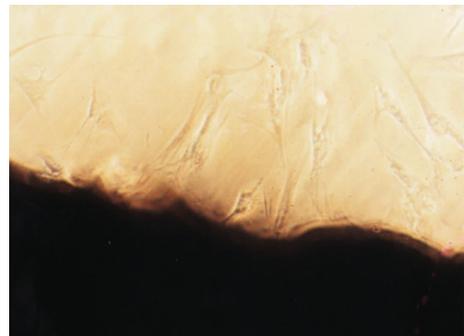


图 3 培养 40 h 后骨髓基质干细胞在陶瓷化骨上生长倒置显微镜图 $\times 100$

3.4 扫描电镜下观察 陶瓷化骨与细胞联合培养 3 d 后, 可见细胞附着生长, 但分布不均, 贴近培养瓶

底部一侧细胞较多。细胞沿微孔生长,伸出较多的树枝状突起,其边角开始伸展而未见边角翘起和反褶。细胞呈多角形、矮柱形及长梭形,部分可见细胞遮盖微孔间隙。培养 6 d 后部分区域可见多角、星形细胞连接成单层可见重叠生长,附着与载体孔壁相互连接,细胞间通过伪足接触融合,互相形成网状,可见细胞间有部分重叠生长,并分泌大量条索状胶原纤维并向孔内生长。

3.5 矿化结节 接种培养 3 周后细胞聚集成多个散在的结节,结节中间细胞由梭形变为矮柱状,排列紧密,逐渐形成多层结构。结节中心部逐渐变浓,直至不透光而成黑色(图 5)。

3.6 AKP 染色 经 AKP 染色及 HE 复染后,阳性细胞可见灰黑以至深黑色沉淀(图 6),阴性细胞为均一的红色。

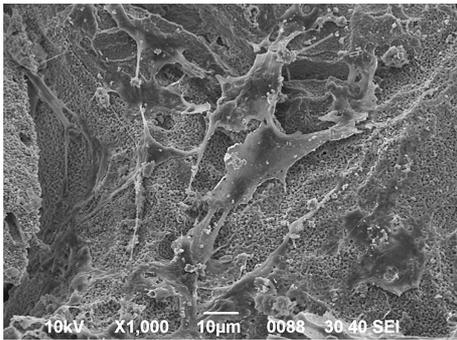


图 4 培养 6 d 的骨髓基质干细胞在陶瓷化骨上生长扫描电镜图 ×1000

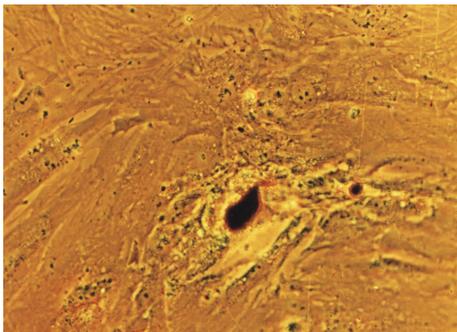


图 5 骨髓基质干细胞培养 3 周后形成的矿化结节倒置显微镜图 ×100

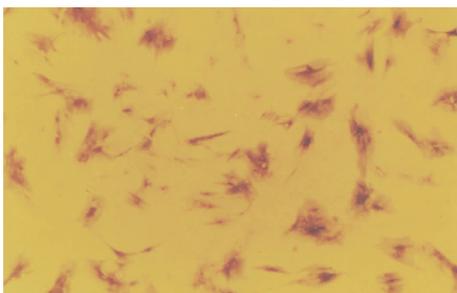


图 6 成骨细胞 AKP 染色(黑色)图

3.7 ALP 活性检测 各组 ALP 活性检测结果分别为:第 2 天(1.4 ± 0.39) $U \cdot mL^{-1}$ 、第 4 天(1.5 ± 0.19) $U \cdot mL^{-1}$ 、第 6 天(2.1 ± 0.14) $U \cdot mL^{-1}$ 、第 8 天(3.3 ± 0.16) $U \cdot mL^{-1}$,经重复测量方差分析,第 2、4、6 及第 8 天陶瓷化骨 ALP 分泌量($F = 21.591, P = 0.023$)均有显著性差异。

4 讨论

陶瓷化骨成分为精细结晶状态 HA,与正常骨组织成分相似。陶瓷化骨具有原骨的骨小梁、小梁间隙及骨内管腔系统,保留了自然骨的连续多孔结构。陶瓷化骨解决了化学合成人工骨的孔隙率、孔隙连通、孔径大小等方面的制作难题。陶瓷化骨具有良好的生物相容性、骨传导性、机械承载能力、细胞易于贴附和可控制降解速度等特性。同时,其在韧性、功能适应性、理化性能、体内降解等方面也优于人工陶瓷材料^[6-8]。陶瓷化骨作为骨组织工程的支架材料,其来源丰富,制作要求低、难度小、费用低,基本符合骨组织支架材料的要求。为了进一步提高和改善陶瓷化骨的生物活性,可将生陶瓷化骨与生物活性因子或药物复合,形成多种生物活性陶瓷基复合材料,进一步模拟骨正常结构及生理功能,是生物活性人工骨的研究方向,目前已有关于陶瓷化骨与水凝胶、骨形态发生蛋白、胶原等复合研究的报道^[9-11]。

本实验使用陶瓷化骨培养成人骨髓基质干细胞符合骨组织工程的基本要求,即将体外培养的高浓度组织细胞,吸附扩增于一种生物相容性良好并可被人体逐步降解吸收的生物材料上,形成细胞—生物材料复合物。然后将此细胞—生物材料复合体植入机体组织的病损部位。生物支架材料在集体组织病变部位逐步降解吸收,但细胞继续增殖分化并分泌基质,形成新的具有与自身功能和形态相应的组织和器官,为临床应用打下基础。

5 参考文献

- [1] Kim SW, Lee IK, Yun KI, et al. Adult stem cells derived from human maxillary sinus membrane and their osteogenic differentiation[J]. Maxillofac Implants. 2008,24(6):991.
- [2] Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord[J]. Cell Biol Int. 2008,32(7):724.
- [3] Lange C, Schroeder J, Stute N, et al. High-potential human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev,2005,14(1):

70 - 80.

[4] Gribben JG. Stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 15 (1 Suppl): 53 - 58.

[5] 姜红江. 陶瓷化骨的改性及生物活性人工骨构建的研究[D]. 天津: 天津大学, 2009.

[6] Artzi Z, Nem Covsky CE, Dayan D. Bovine-HA spongiosa blocks and immediate implant placement in sinus augmentation procedures [J]. Clin Oral Implants Res, 2002, 13: 420.

[7] 郑启新, 刘苏南. 煅烧牛松质骨的制备、理化性能及生物相容性研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2005, 22(1): 95.

[8] Werber KD, Brauer RB, Weiss W, et al. Osseous integration of bovine hydro-xyapatite ceramic in metaphyseal bone defects of the distal radius [J]. Hand Surg [Am], 2000, 25: 833 - 836.

[9] 何大为, 金岩, 骆凯, 等. 陶瓷化骨-水凝胶与骨髓基质细胞自体皮下成骨实验 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(2): 116 - 120.

[10] 李跃峰, 王万春, 雷青, 等. 牛骨形态发生蛋白复合煅烧骨与同种异体骨治疗兔骨缺损的实验研究 [J]. 中国医师杂志, 2004, 6(3): 364 - 366.

[11] 顾为望, 许永华, 曹宏卿, 等. 胶原涂层煅烧骨-成骨细胞复合物的体内成骨作用 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 518 - 520.

(2011-10-15 收稿 2012-02-02 修回)

· 通 知 ·

全国水针刀三氧消融术尸体解剖研修班及 中华筋骨三针法学习班通知

水针刀三氧消融术及筋骨针法是由中国骨伤微创水针刀学术委员会会长、张仲景国医学院教授、广东省中医院主任导师吴汉卿教授在水针刀疗法的基础上, 结合三氧治疗仪所研发的新技术, 研制发明的多用系列筋骨针具已获国家专利, 并创立了十大筋骨针法(已编入骨伤教材), 出版了《中华筋骨三针疗法》。该项技术的培训班已举办 180 余期, 来自国内包括台湾、香港等地区及国外(马来西亚、新加坡、韩国)的万余名医生学习、掌握了该技术。为满足广大医师要求, 现继续举办以下研修、学习班:

水针刀三氧消融术及尸体解剖研修班: 由吴汉卿教授主要传授: 水针刀新针法治疗骨伤颈肩腰腿痛病、水针刀三氧消融术。应用水针刀法结合新鲜尸体详细讲解三针法安全入路法、配合独特松解液及椎间孔扩张术、侧隐窝分离术。新颖的三针法理论、独特的十大针法, 结合尸体刀法入路、水针刀挂图, 有专科医院手术病人治疗, 同时讲解影像诊断, 保证每位学员能够独立操作。临床上可治疗腰椎间盘突出症, 对颈肩腰腿痛患者具有较好的疗效。

中华筋骨三针法学习班: 中华筋骨三针法是吴汉卿教授在水针刀针法九针疗法基础上, 根据人体生物力学, 提出了人体软组织立体三角平衡学说, 创立了平衡三针法。该班传授筋骨三针法原理、三针定位法、十大针法技巧。该法主要治疗: 颈椎病、颈 1 横突综合症、颈 7 棘突综合症、肩关节周围炎、肌筋膜炎、腰椎间盘突出症、股骨头坏死症、膝关节骨关节炎、神经痛、类风湿性关节炎、脊柱相关病等。

脊柱九病区药磁线植入技术: 传授独特的脊背九大诊疗区, 临床应用水针刀分离、磁线留置并配合整脊手法, 快速治疗脊柱相关病, 如颈源性心脏病、颈性咽炎、面瘫、三叉神经痛、癫痫、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等。

其他: 参加学习班者将授予国家级中医药 I 类继续教育学分(项目编号: 390206006)

开学时间: 2012 年 3 月 1 日开课, 以后每月 1 日开课, 需提前 2 日报到

报到地址: 河南省南阳市仲景路与天山路口(水针刀专科医院)

邮政编码: 473000 **联系电话:** 0377 - 63282507, 13721820657 **联系人:** 黄建

网址: www. shuizhendao. com **邮箱:** shuizhendao@ 163. com