

人骨髓基质干细胞体外诱导为成骨细胞的实验研究

★ 吴云刚 (浙江省温州医学院一附院骨伤科 温州 325000)

★ 张志平 (江西省南昌市第一医院骨科 南昌 330008)

摘要:目的:探讨体外培养的人骨髓基质干细胞(hBMSCs)诱导分化为成骨细胞的方法。方法:抽取骨髓,用梯度离心法分离单个核细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 普通培养基培养,传代后改用含 β -甘油磷酸钠、维生素 C 和地塞米松的条件培养基培养,用相差显微镜下观察细胞形态,钙钴法碱性磷酸酶染色, Von Kossa 法钙结节染色及细胞内 ALP 含量测定。结果:形态学观察、碱性磷酸酶染色、钙结节染色及细胞内 ALP 含量测定均表明, hBMSCs 经条件培养基培养后诱导的细胞具有成骨细胞的形态学及生物学特性。结论: hBMSCs 体外经含 β -甘油磷酸钠、维生素 C 和地塞米松的条件培养基培养可诱导为成骨细胞。

关键词:骨髓基质干细胞;成骨细胞;碱性磷酸酶

中图分类号: Q 813 **文献标识码:** A

Experiments on hBMSCs induced to differentiate into osteoblasts in vitro

WU Yun-gang¹, ZHANG Zhi-ping²

1. The First Affiliated Hospital of Wenzhou University, Wenzhou 325000

2. Nanchang First Hospital, Jiangxi Prounce, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To investigate hBMSCs can be induced to differentiate into osteoblasts in vitro. Methods: The hBMSCs were separated by gradient centrifugation on Percoll, cultured with ordinary culture medium and induced by conditional culture medium. The cells cultured with ordinary and conditional culture medium were examined by microscopy, ALP staining, Von-Kossa staining and ALP assay. Results: Microscopy, ALP staining, Von-Kossa staining and ALP assay all show that the cells cultured with conditional culture medium have the characteristics and the activity of the osteoblasts. Conclusion: hBMSCs can be induced to differentiate into osteoblasts in conditional culture medium in vitro.

Key words: Bone marrow stromal cell; Osteoblast; Alkaline phosphatase

骨髓基质干细胞具备多向分化的潜能,许多研究证明,骨髓基质干细胞具有向成骨细胞分化的能力,具有成骨潜能。本实验通过体外培养人骨髓基质干细胞(hBMSCs),加入含地塞米松、 β -磷酸甘油钠和维生素 C 的成骨条件培养液,诱导分化成骨细胞,并采用碱性磷酸酶染色(钙钴法)、钙结节染色(Von-Kossa 法)及细胞内 ALP 含量检测进行成骨细胞鉴定。

1 材料

1.1 主要仪器及试剂 二氧化碳培养箱、超净工作台、倒置显微镜;淋巴细胞分离液、DMEM、胰蛋白酶、胎牛血清、青霉素、链霉素、碱性磷酸酶试剂盒、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素 C。

1.2 骨髓标本取材 骨髓标本取自 6 位髌骨植骨或髌部骨折患者,平均年龄 36.5 岁(21~52 岁),取材部位为患者的髌前上棘或髌后上棘,取材前均向其说明并经本人同意志愿捐献。

2 方法

2.1 MSC 的分离和培养 注射器肝素化后抽取 4~5 mL 骨髓,置入装有 DMEM 培养液的 20 mL 无菌管中带至实验室。以 Percoll(1.073 g/mL)为分离介质,用梯度离心法分离单个核细胞。多次洗涤后重新悬浮于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,以 $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于 25 cm^2 的培养瓶中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,3~5 天后换液,去除未贴壁的细胞,每 3 天换液 1 次,每天观察细胞形态、贴壁及生长情况。待细胞融合达 80%~90%,用 0.25% 胰蛋白酶

消化、传代。

2.2 体外成骨的诱导 根据实验设计,当第 3 代的 hBMSCs 细胞贴壁生长达到 70%~80% 融合时,加入含地塞米松(5 nmol/L)、 β -磷酸甘油钠(10 mmol/L)和维生素 C (50 $\mu\text{mol/L}$)的 DMEM 成骨条件培养液,制成细胞悬液,按 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种 75 cm^2 的培养皿,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱培养。收集第 15 天的细胞培养上清,用于 ALP 的检测。每组设 8 孔,重复上述实验 4 次。

2.3 成骨细胞的鉴定 (1)碱性磷酸酶染色(钙钴法):取诱导培养 2 周后的细胞, PBS 冲洗后,丙酮固定 10 分钟后,蒸馏水冲洗。入孵育液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 小时,自来水冲洗后,在 2% 硝酸钴中浸透 5 分钟,蒸馏水洗数次,再在 1% 的硫化铵(现配)中浸 2~3 分钟,自来水冲洗,自然干燥后封固。正常对照组用未诱导的同组细胞。

(2)钙结节染色(Von-Kossa 法):细胞爬片用 PBS 冲 2 次,经冷丙酮固定 10 分钟后,蒸馏水冲洗,放入 2% 硝酸银内置暗处 1 小时,蒸馏水洗 3 次,5% 硫代硫酸钠还原 1 小时(硫代硫酸钠 5 g, 0.1 mol/L 氢氧化钠 0.2 mL,蒸馏水 100 mL);干燥,封片。

2.4 细胞内 ALP 含量检测 取生长状态良好的第 3 代细胞,按 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 2 个 24 孔板内,分别采用普通培养基和条件培养基诱导培养,2 周后各取 6 孔细胞用 0.1% TritonX-100 裂解后,收集裂解液按 ALP 检测试剂盒的说明进行 ALP 含量测定。

2.5 统计学处理 各数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

用 SPSS10.0 进行统计分析。

3 结果

3.1 原代细胞培养 细胞接种后 72 小时内,培养物中以造血细胞成分居多,随着培养时间延长,造血细胞逐渐碎裂坏死,并随着换液而清除。细胞悬液中少数较大的单个核细胞于接种后 24 小时开始贴壁,由圆形变为短梭形。48 小时后,贴壁细胞增多,开始分裂增殖,细胞呈成纤维细胞外观。5~7 天,由于换液培养瓶中造血细胞成分已基本消失,贴壁细胞体积增大,多为梭形,有些则为三角形、多角形或不规则形,此时已经有细胞集落形成(见图 1)。9~10 天集落数目增加,并见集落体积增大。14 天细胞基本融合成层,细胞形态的多样性更加明显,有梭形、多角形、三角形、类圆形,以梭形居多(见图 2)。

3.2 成骨细胞鉴定 (1)碱性磷酸酶染色:细胞呈强阳性反应,细胞质中出现黑色、灰褐色颗粒状或片状沉淀(见图 3)。

(2)钙结节染色:细胞呈集落生长后开始形成钙结节,细胞间出现的致密的、圆形不透光团块呈现片状的棕染,着色区域范围广、面积大(见图 4)。

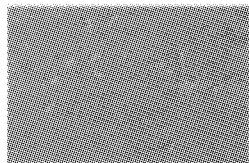


图 1 原代 hBMSCs 第 3 天($\times 20$)

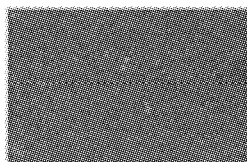


图 2 原代 hBMSCs 第 15 天($\times 10$)

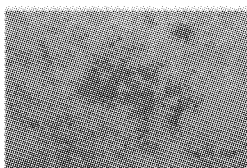


图 3 碱性磷酸酶染色($\times 100$)

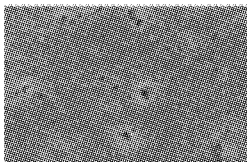


图 4 钙结节染色($\times 10$)

3.3 细胞内 ALP 含量检测 见表 1。

表 1 条件培养基组与
普通培养基组细胞内 ALP 含量测定的比较

分组	孔数	细胞内 ALP/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$
条件培养基组	36	$1.62 \pm 0.22^*$
普通培养基组	36	$0.34 \pm 0.12^*$

注:与普通培养基组比, $*P < 0.05$ 。

表 1 表明条件培养基组细胞内 ALP 含量明显高于普通培养基组细胞内 ALP 含量,骨髓基质干细胞经条件培养基培养后诱导成成骨细胞,与上述形态学观察结果一致。

4 讨论

4.1 骨髓基质干细胞 Friedenstein^[1]描述了一群来自骨髓的纤维样细胞,称为成纤维样细胞集落形成单位。成人骨髓中主要含造血系细胞和骨髓基质细胞成分,骨髓基质细胞(BMSCs)是骨髓腔中为造血干细胞提供结构和功能支持的结缔组织,由基质细胞和细胞间基质构成。骨髓基质细胞表现多系分化能力,可以形成多种定向分化潜能的祖细胞,包括成纤维细胞、成骨细胞、脂肪细胞等,所以又被称为间充质干细胞(MSCs)。实验研究证实,hBMSCs 的成骨能力并不因年龄的增加而降低^[2]。

4.2 BMSCs 体外诱导成骨 BMSCs 为条件成骨细胞,许多研究表明^[3~4],地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 是 BMSCs 向成骨细胞分化和体外成骨的必要条件,是最常用的成骨诱导剂。地塞米松可以促使 BMSCs 向成骨细胞分化,提高 ALP 的活性,调节成骨细胞分泌胰岛素样生长因子,促进细胞外基质胶原合成,具体作用机制目前仍不清楚。但高浓度地塞米松却抑制 BMSCs 增殖,并可诱导其向脂肪细胞分化。一般认为培养基中地塞米松浓度取 $10 \sim 8 \text{ mg/L}$ 为宜。维生素 C 的作用是促进培养的细胞合成胶原,形成钙化,并能调节 ATP、ALP 活性和非胶原基质蛋白的合成^[3]。Allampall 等^[5]也证实维生素 C 具有调控碱性磷酸酶活性和蛋白合成的作用。 β -甘油磷酸钠能提供磷酸离子作为 ALP 作用的底物,诱导和激活 ALP,产生大量磷酸离子,促进有机磷向无机磷转化,加速钙盐沉着,而且可破坏钙化抑制剂,从而启动钙化,是 BMSCs 发生矿化结节的沉积必要条件^[4]。维生素 C、 β -甘油磷酸钠、地塞米松对 BMSCs 分化为成骨细胞是十分必要的。

本实验进一步证实,采用加入地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 的培养基诱导分化的细胞具有典型的成骨细胞形态特征和生物学特征。本实验体外诱导的细胞,在倒置显微镜下观察,呈梭形或多角形,具有多个突起,呈克隆簇样生长,具有典型的成骨细胞形态特征。

参考文献

- [1]Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method[J]. Exp Hematol, 1974, 2: 83~92
- [2]Leskela HV, Risteli J, Niskanen S, et al. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(4): 1 008~1 013
- [3]刘延青, 姜思权. 骨髓基质中的骨源性干细胞[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20: 114~116
- [4]Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part 2: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblast differentiation[J]. Biomaterials, 2000, 21: 1 095~1 102
- [5]Allampall K. Effect of ascorbic acid and growth factors on collagen metabolism of flexor vetinaculum cells from individuals with and without carpal tunnel syndrome[J]. J Occup Environ Med, 2000, 42(3): 251~255

(收稿日期:2006-07-29)