

## 间充质干细胞复合同种异体脱钙骨的形态学观察

对由创伤、肿瘤、感染等引起的骨缺损,传统治疗采用生物材料(自体骨、同种异体骨、异种骨等)或非生物材料(骨水泥、金属、陶瓷等)植入,但修复效果并不理想。自组织工程技术成为骨缺损修复的新手段之后,种子细胞和生物材料成为组织工程研究的核心。理想的种子细胞应具有取材方便、增殖分化能力强的特点,现多数学者采用成骨细胞[1][2][3]和成骨分化的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)[4][5][6],前者取材不便、机体损伤大;后者在体外诱导成骨分化后移植,细胞增殖能力显著下降。我们将未经诱导的MSC与具有骨诱导和传导活性的同种异体脱钙骨复合培养,观察细胞在材料表面的生长增殖情况。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 同种异体脱钙骨的制备

取青壮年新鲜尸体骨,无菌条件下去除骨膜,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻6个月以上,用  $0.6\text{ mol/L}$  盐酸在  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  浸泡  $12\sim 24\text{ h}$ ,蒸馏水反复冲洗后,冷冻干燥,环氧乙烷气体熏蒸灭菌,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 1.2 MSC的分离与培养

将  $1\text{ ml}$  健康成人骨髓肝素化后,用间充质干细胞基础培养基(BioWhittaker公司产品)稀释2.5倍,单核细胞分离液(密度  $1.077\text{ g/ml}$ )分离,取白膜层,将分离的单核细胞按  $2.0\times 10^7/\text{ml}$  密度接种至  $25\text{ ml}$  培养瓶内。加入含10%胎牛血清(美国BioWhittaker公司)的MSCBM培养基,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 条件下培养。48 h后第1次换液,去除未贴壁细胞,以后每3~4天全量换液。接种后9 d细胞长满瓶底,用0.25%胰酶(Sigma公司产品)消化分离( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3~5 min),按1:3比例传代接种培养,3~4 d常规全量换液,7 d后传代细胞长满瓶底。

#### 1.3 细胞与生物衍生骨复合培养

取同种异体脱钙骨用Hanks液冲洗3次,培养基浸泡24 h,将第3代MSC用0.25%胰酶消化,以  $2.0\times 10^6/\text{ml}$  的密度接种于脱钙骨,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 条件下培养,4~6 h后换液去除未黏附细胞,3~4 d常规换液。

#### 1.4 细胞形态学和免疫组织化学观察

倒置显微镜观察细胞形态。取第3代MSC,0.25%胰酶消化,离心重悬,调整细胞浓度至  $10^6/\text{ml}$ ,与FITC标记的小鼠抗人CD105(Serotec公司产品)  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育30 min,4%多聚甲醛固定,进行流式细胞仪分析。MSC与脱钙骨复合培养1周后,0.25%戊二醛固定,丙酮梯度脱水,乙酸异戊酯置换,干燥喷金,扫描电镜观察。

### 2 结 果

#### 2.1 倒置显微镜观察

骨髓MSC原代接种培养后2~3 d,显微镜下即可见有稀疏分布的单个细胞贴壁生长,细胞为长梭形,呈典型的成纤维细胞样外观,原代培养第5天可见散在分布的贴壁细胞数目增加,形成多个细胞克隆,细胞形态同

前，第9天细胞铺满培养瓶底面(图 1)。传代培养细胞贴壁快，生长迅速，7 d长满培养瓶底面。细胞在MSCBM中传至第8代形态无明显变化，且细胞生长无接触抑制现象，可长至2~3层。

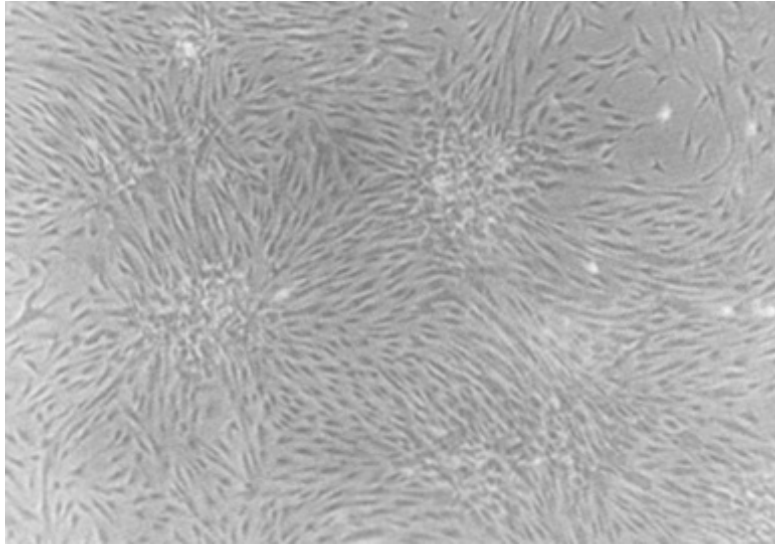


图1 培养7 d的成人骨髓间充质干细胞(×100)

Fig.1 Mesenchymal stem cells from adult bone marrow cultured in vitro for 7 d (×100)

## 2.2 免疫细胞化学检测

第3代MSC，用FITC标记的CD105抗体进行流式细胞仪分析，结果示CD105<sup>+</sup>细胞占64.1%(图2)。

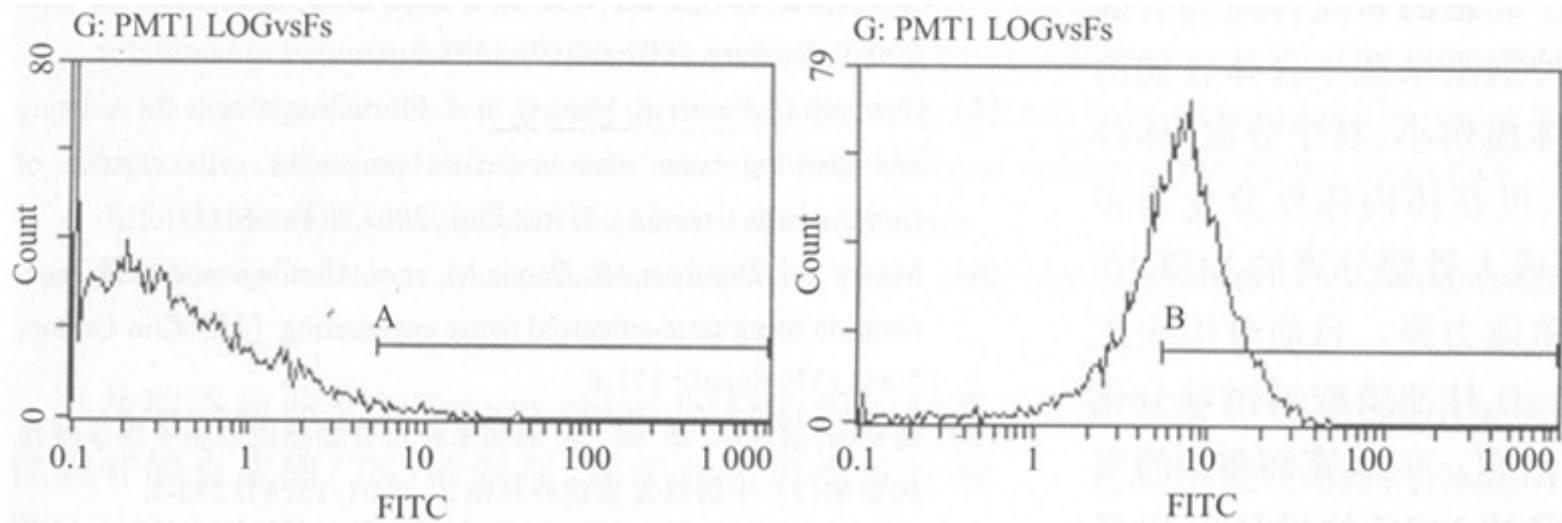


图2 第3代细胞 FITC-抗CD105 流式细胞检测结果

Fig.2 The third generation of the MSCs identified by FITC-antiCD105

A: Control; B: The third generation of the MSCs

## 2.3 扫描电镜观察

脱钙骨结构疏松，孔隙大且互相交通，呈多孔网状结构(图3)。MSC接种于脱钙骨培养1周后，可见少数细胞变圆，为处于分裂期细胞，多数细胞呈长梭形，随材料表面特征成一定方向排列。在平坦表面，细胞生长致密，形成完整细胞层。在空隙部位，细胞向孔内生长，细胞及突起交错呈网状覆盖孔隙表面(图4)。细胞表面微绒毛丰富，有多个细长突起，细胞突起交互连接呈网状(图5)。

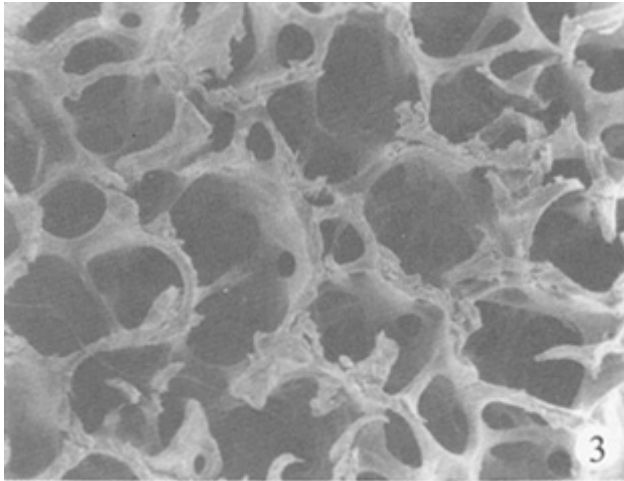


图3 同种异体脱钙骨( $\times 20$ )  
Fig.3 Allogenic decalcified bone matrix ( $\times 20$ )

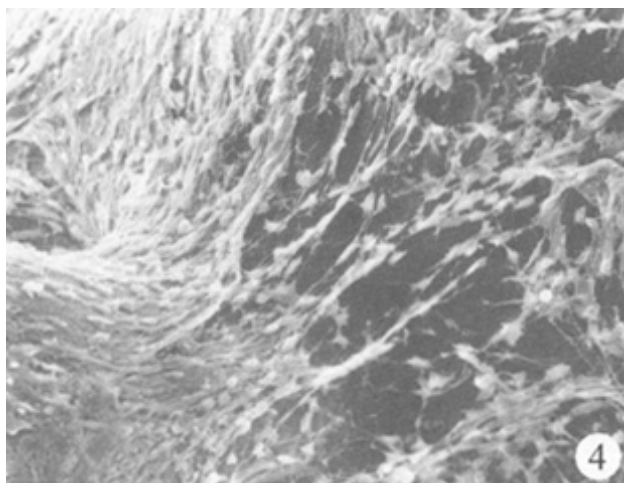


图4 间充质干细胞复合同种异体脱钙骨培养1周( $\times 200$ )  
Fig.4 MSCs seeded on allogenic decalcified matrix for 1 week( $\times 200$ )

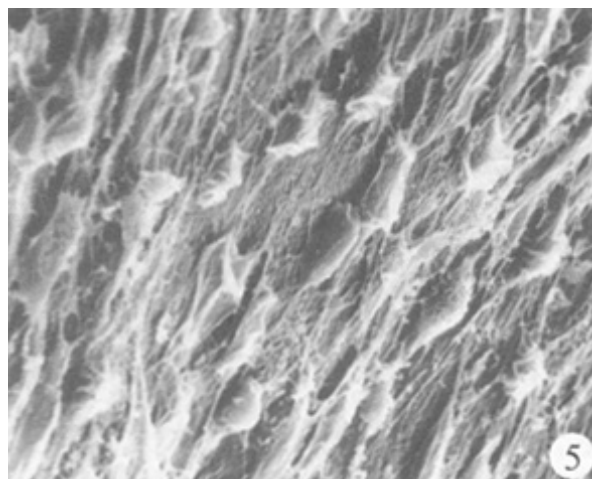


图5 间充质干细胞复合同种异体脱钙骨培养1周( $\times 1\ 000$ )  
Fig.5 MSCs seeded on allogenic decalcified matrix for 1 week( $\times 1\ 000$ )

骨髓细胞分为造血细胞和间质细胞，其中造血干细胞为悬浮生长细胞，MSC为贴壁细胞，在MSC增殖分化过程中表面标志不断变化。CD105是MSC保持未分化状态时较为特异性的表面标志[10]。本实验从骨髓中分离贴壁生长的MSC，以FITC-抗CD105进行流式细胞仪分析鉴定。第3代可得到MSC占64.1%的贴壁细胞，因此用单核细胞分离液从骨髓中分离贴壁生长的MSC法是一种经济、简单、有效的分离方法。本实验中分离所得的MSC在基础培养基中扩增迅速，具有很强的增殖能力，直至第8代仍保持未分化状态，为体外操作提供了充足的时间。

利用组织工程的方法修复骨缺损成为创伤修复研究的热点，理想的骨组织工程种子细胞应具有以下特点：①取材方便，对机体损伤小；②体外培养增殖能力强；③能特异性向成骨方向分化；④植入体内能保持成骨活性。既往实验研究中多数作者选用成骨细胞为种子细胞，其来源有三种，骨组织、骨膜、骨髓。由于数量有限，取材不便，采用自体成骨细胞对机体损伤大等原因，在实际应用中有一定的局限性。随着干细胞研究的进展，组织工程种子细胞的研究转向具有多向分化潜能的成体干细胞，特别是来源于自体骨髓的MSC。MSC取材方便，对机体损伤小、易于分离、体外培养扩增迅速、无免疫原性、可在体内体外分化为多种细胞类型。本实验从健康成人骨髓分离的MSC在基础培养基中扩增迅速，增殖能力强。目前骨组织工程研究中，多以地塞米松、 $\beta$ 甘油磷酸钠诱导分化为成骨细胞的MSC为种子细胞。但魏宽海等[7]的实验发现地塞米松对体外培养的MSC的增殖有明显的抑制作用，大大降低了其增殖能力，而MSC体内分化研究发现将其注入早期囊胚，几乎可以分化形成所有的体细胞类型[8]。傅文玉等[9]的实验证明，将MSC注射到裸鼠皮下，可分化为骨、软骨组织，可见MSC体外扩增后移植入体内无需特殊条件仍然可以向成骨方向分化，具有成骨能力。虽然MSC是一种幼稚细胞，生命周期长，但不具有恶性肿瘤的无限增殖能力[9]，体内移植较为安全。因此，自体未经诱导分化的MSC是骨组织工程较为理想的种子细胞。

同种异体脱钙骨是临床常用的骨缺损填充材料，但作为骨组织工程种子细胞的载体仍处于探索阶段，其天然网状孔隙未受破坏，仍保留原有的骨小梁、小梁间隙及骨内管腔系统，骨支架的三维结构依然存在，这种天然结构有利于种子细胞粘附、生长并为细胞外基质分泌提供充分的空间及表面积[11]，本实验中材料结构扫描电镜观察与此一致；将MSC悬液接种于脱钙骨，1周后细胞在材料表面形成致密细胞层，细胞突起交错，表面微绒毛丰富示细胞生长状态良好，部分细胞呈圆形处于分裂期，说明细胞在材料表面增殖活跃。同种异体脱钙骨对细胞生长不仅无抑制作用，而且具有良好的细胞黏附特性和组织相容性；且同种异体脱钙骨具有骨诱导性和骨传导性[12]，复合未经诱导的MSC利于其向成骨方向分化，因此同种异体脱钙骨复合MSC用于骨缺损修复具有可行性。

#### 参考文献：

- [1] Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4315-23.
- [2] Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, et al. How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(16): 3319-28.
- [3] Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, et al. Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants[J]. *Cell Tissue Organ*, 2002, 170(4): 214-27.
- [4] Chen F, Mao T, Tao K, et al. Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2002, 60(10): 1155-9.
- [5] Gurevich O, Vexler A, Marx G, et al. Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue[J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(4): 661-72.
- [6] Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, et al. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering[J]. *Clin Orthop*, 2000, (379 Suppl): 171-8.

[7] 魏宽海, 裴国献, 郑磊, 等. 地塞米松对骨髓基质细胞生物学特性的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(4): 232-4.

Wei KH, Pei GX, Zheng L, et al. The effect of dexamethasone on biological characteristics of bone marrow stromal cells[J]. Chin J Reparat Reconstruct Surg, 2001, 15(4): 232-4.

[8] Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-9.

[9] 傅文玉, 路艳蒙, 朴英杰. 人骨髓间充质干细胞的分化与端粒酶活性[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(11): 801-4.

Fu WY, Lu YM, Piao YJ. Differentiation and telomerase activity of human mesenchymal stem cells[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(11): 801-4.

[10] Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(1): 134-9.

[11] Lin F, Liao CJ, Chen KS, et al. Preparation of a biphasic porous bioceramic by heating bovine cancellous bone with Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O addition[J]. Biomaterials, 1999, 20: 475-84

[12] 孔明学. 脱钙骨基质诱导成骨活性的因素分析[J]. 国外医学·外科学分册, 2001, 28(5): 286-8.

#### 参考文献:

[1] Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2002, 23(22): 4315-23.

[2] Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, et al. How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials[J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3319-28.

[3] Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, et al. Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants[J]. Cell Tissue Organ, 2002, 170(4): 214-27.

[4] Chen F, Mao T, Tao K, et al. Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2002, 60(10): 1155-9.

[5] Gurevich O, Vexler A, Marx G, et al. Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue[J]. Tissue Eng, 2002, 8(4): 661-72.

[6] Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, et al. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering[J]. Clin Orthop, 2000, (379 Suppl): 171-8.

[7] 魏宽海, 裴国献, 郑磊, 等. 地塞米松对骨髓基质细胞生物学特性的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(4): 232-4.

Wei KH, Pei GX, Zheng L, et al. The effect of dexamethasone on biological characteristics of bone marrow stromal cells[J]. Chin J Reparat Reconstruct Surg, 2001, 15(4): 232-4.

[8] Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-9.

[9] 傅文玉, 路艳蒙, 朴英杰. 人骨髓间充质干细胞的分化与端粒酶活性[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(11): 801-4.

Fu WY, Lu YM, Piao YJ. Differentiation and telomerase activity of human mesenchymal stem cells[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(11): 801-4.

[10] Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(1): 134-9.

[11] Lin F, Liao CJ, Chen KS, et al. Preparation of a biphasic porous bioceramic by heating bovine cancellous bone with  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  addition[J]. Biomaterials, 1999, 20: 475-84

[12] 孔明学. 脱钙骨基质诱导成骨活性的因素分析[J]. 国外医学·外科学分册, 2001, 28(5): 286-8.

---

[回结果列表](#)