

间充质干细胞复合同种异体脱钙骨的形态学观察

刘晓静¹ 陈英¹ 袁林¹ 余磊¹ 袁非² 袁华¹ 第一军医大学¹ 解剖学教研室袁南方医院脊柱骨病外科袁广东广州 510515

摘要 目的 探讨以间充质干细胞MSC复合同种异体脱钙骨复合培养法构建组织工程化生物衍生骨的可行性方法 预先制备同种异体脱钙骨健康成人骨髓单核细胞分离液分离MSC充质干细胞基础培养基原代和传代培养到置显微镜下观察细胞生物学特性用 FITC 标记的抗 CD105 对第 3 代细胞进行流式细胞鉴定并与同种异体脱钙骨复合培养 1 周后行扫描电镜观察结果 原代及传代培养的 MSC 增殖迅速第 3 代 CD105 阳性细胞占 64.1%复合同种异体脱钙骨培养 1 周后细胞生长状态良好增殖迅速在材料表面形成细胞层结论 未诱导的 MSC 是骨组织工程适宜的种子细胞复合同种异体脱钙骨复合可作为骨组织工程的载体

关键词 间充质干细胞 脱钙骨 组织工程

中图分类号 R47;R831.11 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)01-0040-03

Morphological observation of mesenchymal stem cells cultured with allogenic decalcified bone matrix

LIU Xiao-jing¹, CHEN Ying¹, YUAN Lin¹, YU Lei¹, WANG Fei², LIAO Hua¹

Department of Anatomy¹, Department of Orthopedics and Spine Surgery, Nanfang Hospital², First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the feasibility of using decalcified bone matrix loaded with mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adult human bone marrow as scaffolds for bone tissue engineering. Methods Allogenic decalcified bone matrix was prepared. MSCs were isolated from adult human bone marrow with monocyte-separating medium and then cultured in basic medium of mesenchymal stem cells (MSC). The third generation of the cultured cells were identified by FITC-antiCD105, seeded onto allogenic decalcified bone matrix followed by observation under scanning electron microscope and inverted microscope a week later. Results Rapid proliferation of both primary and subcultured MSCs was observed, and CD105-positive cells reached 64.1% among the third generation of the cells. MSCs also grew well and proliferated rapidly after being cultured with decalcified bone matrix. Conclusion Naive MSCs are ideal seeding cells for bone tissue engineering, and the allogenic decalcified bone matrix loaded with MSCs may be used as a good scaffold.

Key words: mesenchymal stem cells; decalcified bone matrix; tissue engineering

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非生物材料水泥金属陶瓷等植入修复效果并不理想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多数学者采用成骨细胞¹⁻³和成骨分化的间充质干细胞⁴ mesenchymal stem cell, MSC⁵⁻⁶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 益冷冻 6 个月以上用 0.6 mol/L 盐酸在 2 益浸泡 12~24 h 蒸馏水反复冲洗后冷冻干燥 乙烷气体熏蒸灭菌 益保存备用

1.2 MSC 的分离与培养

将 1 ml 健康成人骨髓肝素化后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 g/ml 分离取白膜层分离的单核细胞按 2.0伊0⁷/ml 密度接种至 25 ml 培养瓶内加入含 10% 胎牛血清(美国 BioWhittaker 公司)的 MSCBM 培养基 7 益 5% CO₂ 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% 胰酶消化分离 (37 益 5 min) 按 1 颐比例传代接种培养 4 d 常规全量换液 d 后传代细胞长满瓶底

收稿日期 002-10-08

基金项目 广东省攻关课题 001A30202040 院

This study is a research project sponsored by Guangdong Provincial Science and Technology Committee (2001A302020401)

作者简介 刘晓静 1975- 女 袁河北张家口人 袁 1998 年毕业于南通医学院 现为第一军医大学在读硕士研究生 电话 20-61647752

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伊 10⁶/ml 的密度接种于脱钙骨,7 益尧% CO₂ 条件下培养,袁~6h 后换液去除未黏附细胞,袁~4d 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,遥取第 3 代 MSC,袁 0.25% 胰酶消化,袁离心重悬,袁调整细胞浓度至 10⁶/ml,袁与 FITC 标记的小鼠抗人 CD105,渊erotec 公司产品,冤 4 益尧孵育 30min,袁% 多聚甲醛固定,袁进行流式细胞仪分析,遥 MSC 与脱钙骨复合培养 1 周后,袁 2.5% 戊二醛固定,袁酮梯度脱水,袁酸异戊酯置换,袁干燥,渊金,袁扫描电镜观察。

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,袁显微镜下即可见有稀疏分布的单个细胞贴壁生长,袁细胞为长梭形,袁典型的成纤维细胞样外观,袁原代培养第 5 天可见散在分布的贴壁细胞数目增加,袁形成多个细胞克

隆,袁细胞形态同前,袁第 9 天细胞铺满培养瓶底面(图 1),遥传代培养细胞贴壁快,袁生长迅速,袁 d 长满培养瓶底面,遥细胞在 MSCBM 中传至第 8 代,形态无明显变化,袁细胞生长无接触抑制现象,袁长至 2~3 层。

2.2 免疫细胞化学检测

第 3 代 MSC,袁用 FITC 标记的 CD105 抗体进行流式细胞仪分析,袁结果显示 CD105⁺ 细胞占 64.1%(图 2),遥

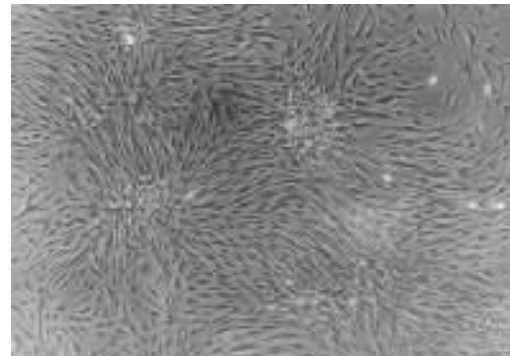


图 1 培养 7 d 的成人骨髓间充质干细胞,渊 00 冤
Fig.1 Mesenchymal stem cells from adult bone marrow cultured in vitro for 7 d (伊 00)

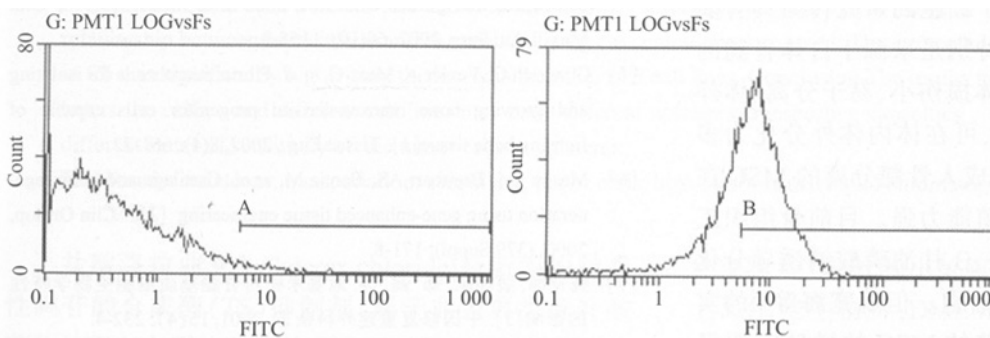


图 2 第 3 代细胞 FITC- 抗 CD105 流式细胞检测结果
Fig.2 The third generation of the MSCs identified by FITC-antiCD105
A:Control;B:The third generation of the MSCs

2.3 扫描电镜观察

脱钙骨结构疏松,袁孔隙大且互相交通,袁呈多孔网状结构(图 3),遥 MSC 接种于脱钙骨培养 1 周后,袁可见少数细胞变圆,袁处于分裂期细胞,袁多数细胞呈长梭形,袁随材料表面特征成一定方向排列,遥在平坦表面,袁细胞

生长致密,袁形成完整细胞层,遥在空隙部位,袁细胞向孔内生长,袁细胞及突起交错呈网状覆盖孔隙表面,渊 4 冤,遥细胞表面微绒毛丰富,袁有多个细长突起,袁细胞突起交互连接呈网状,渊 5 冤。

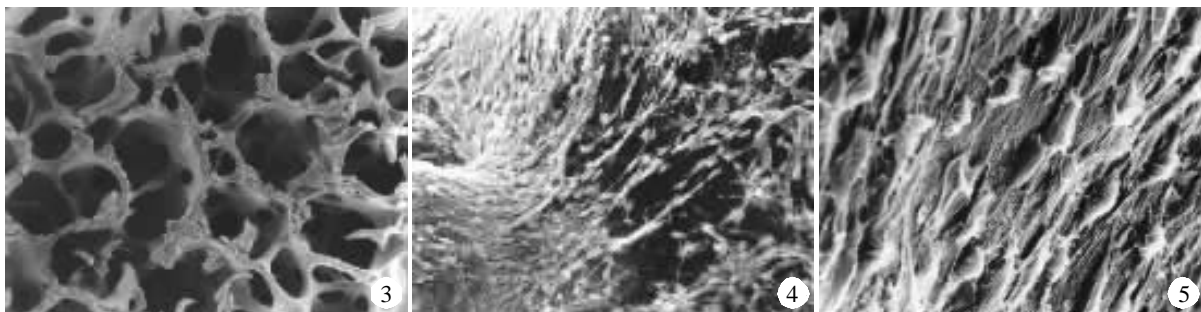


图 3 同种异体脱钙骨,渊 0 冤 Fig.3 Allogenic decalcified bone matrix (伊 0)

图 4 间充质干细胞复合同种异体脱钙骨培养 1 周,渊 00 冤

Fig.4 MSCs seeded on allogenic decalcified matrix for 1 week,渊 00 冤

图 5 间充质干细胞复合同种异体脱钙骨培养 1 周,渊 000 冤

Fig.5 MSCs seeded on allogenic decalcified matrix for 1 week,渊 000 冤

3 讨论

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。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。甚至第 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：取材方便、对机体损伤小、体外培养增殖能力强、能特异性向成骨方向分化、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、骨髓、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，多以经地塞米松、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。傅文玉等的实验证明，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。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。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。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. *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4315-23.
- 2 Wiedmann AI, Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, et al. How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials. *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. *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 mouse model. *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. *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. *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. *中国修复重建外科杂志*, 2001, 15(2): 32-4.
- 8 Wei KH, Pei GX, Zheng L, et al. The effect of dexamethasone on biological characteristics of bone marrow stromal cells. *Chin J Repar Reconstr Surg*, 2001, 15(4): 232-4.
- 9 Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-9.
- 10 傅文玉, 路艳蒙, 朴英杰. 人骨髓间质干细胞的分化与端粒酶活性. *第一军医大学学报*, 2001, 21(1): 801-4.
- 11 Fu WY, Lu YM, Piao YJ. Differentiation and telomerase activity of human mesenchymal stem cells. *First Mil Med Univ*, 2001, 21(11): 801-4.
- 12 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). *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265(1): 134-9.
- 13 Lin F, Liao CJ, Chen KS, et al. Preparation of a biphasic porous bioceramic by heating bovine cancellous bone with Na₂P₂O₇·6H₂O addition. *Biomaterials*, 1999, 20: 475-84.
- 14 孔明学. 脱钙骨基质诱导成骨活性的因素分析. *国外医学(外科科学分册)*, 2001, 28(2): 286-8.