

· 基础研究 ·

大鼠骨髓基质干细胞的培养鉴定及向成骨细胞诱导分化的实验研究

程雷 聂林 谢青 汤继文

【摘要】 目的 研究体外培养大鼠骨髓基质干细胞的方法及其生长特点和成骨能力。**方法** 通过贴壁培养法和密度梯度离心法分离成年大鼠骨髓基质干细胞,应用含维生素 C、地塞米松、 β -甘油磷酸钠的诱导分化培养液定向诱导传代细胞向成骨细胞分化,检测碱性磷酸酶活性和细胞矿化作用。**结果** 原代培养基质干细胞首先形成细胞集落,14 d 时集落间接近融合;传代细胞体积变大,约 5~7 d 传代一次。诱导条件下,细胞碱性磷酸酶活性明显增高,并出现了矿化结节。**结论** 骨髓基质干细胞易于体外分离培养及扩增,成骨能力较强,可作为骨组织工程的种子细胞。

【关键词】 骨髓基质干细胞; 诱导分化; 成骨细胞; 大鼠

An experimental study of the cultivation, identification and differentiation induction of bone marrow stromal stem cells into osteoblasts CHENG Lei, NIE Lin, XIE Qing, TANG Ji-wen. Department of Orthopaedics, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China

【Abstract】 Objective To study the model of separation and culture and the growth characteristics and osteogenic capability of bone marrow stromal stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs were isolated from adult rats using gradient centrifugation and anchoring culture. The passage cells were induced to differentiate into osteoblasts by means of an differentiation induction medium containing dexamethasone, β -glycerophosphate and Vitamin C. Alkaline phosphatase (ALP) activity and the ability to form mineralized nodules were examined. **Results** Colonies of stromal stem cells were formed in the primary culture and contacted one another at the 14th day. In the passage culture, cells became bigger than those in the primary culture and could be subcultured one generation in 5~7 days. After the culture in the differentiation induction medium, the ALP activity was enhanced significantly and the mineralized nodules were formed. **Conclusion** BMSCs can be obtained easily and have strong proliferation ability and osteogenic capacity. This study suggests that BMSCs can become seeding-cells in bone tissue engineering.

【Key words】 Bone marrow stromal stem cells; Induction differentiation; Osteoblast; Rat

骨组织工程的关键是选择适宜的种子细胞,目前种子细胞的来源主要有骨膜、骨髓、骨及骨外组织。骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)^[1,2]是一类具有分化潜能的成体干细胞,在特定条件下还可横向分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞甚至肝细胞和神经细胞等多种类型的细胞。BMSCs取材方便,易于体外扩增,可进行自体移植而不存在组织配型和免疫排斥的问题,被认为是骨组织工程中最理想的种子细胞。本实验通过贴壁培养和密度梯度离心的方法分离 BMSCs,并用含地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 的诱导分化培养液做定向诱导培养,以探讨 BMSCs 的培养方法、生长规律及向成骨细胞分化的条件。

材料与方法

一、材料

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院骨创伤科(程雷、聂林、汤继文),药学部(谢青)

(一)实验动物

成年 Wistar 大鼠,雌雄不限,体重 140~170 g,由山东大学动物实验中心提供。

(二)试剂、药品

胎牛血清(杭州四季清生物技术有限公司),低糖 DMEM (Hyclone),淋巴细胞分离液(密度为 1.077 g/ml,上海试剂二厂产),胰蛋白酶(Gibico), β -甘油磷酸钠(Sigma),地塞米松,维生素 C, Triton X-100,碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

(三)培养液配制

1. 基础培养液:由含 15% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)低糖 DMEM 和 2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺配制。

2. 诱导分化培养液:基础培养液中加入 β -甘油磷酸钠、地塞米松及维生素 C,终浓度分别为 10 mmol/L、 10^{-8} mol/L、50 μ g/ml。

二、方法

(一) 骨髓基质干细胞的分离

健康成年 Wistar 大鼠, 麻醉后处死, 75% 酒精浸泡 15 min, 无菌条件下取股骨和胫骨, 除去骨表面附着的肌肉和骨膜, D-Hank's 液清洗干净。用剪刀将两端干骺端切除, 显露骨髓腔。用含 15% FBS 的低糖 DMEM 培养液冲洗骨髓腔, 以冲出骨髓。用 5 号针头的注射器反复冲打骨髓, 制成单细胞悬液。将骨髓细胞悬液沿管壁缓慢注入预先加有等体积淋巴细胞分离液的离心管中, 2 000 rpm 离心 25 min。小心吸取界面层细胞, 用 DMEM 洗 2 次。加入基础培养液, 血细胞计数板计数, 调整细胞浓度。

(二) 骨髓基质干细胞的原代和传代培养

将上述所得细胞悬液按 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml 密度接种于塑料培养皿, 置 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。于培养后的 48 h 和 96 h 更换培养液, 并用低糖 DMEM 冲洗 3 次, 以去除未贴壁的造血细胞, 以后每 3 d 换液一次, 进一步去除未贴壁的细胞, 待细胞汇合 80% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:2 传代培养。

(三) 骨髓基质干细胞的诱导分化培养

第 2 代 BMSCs 以 5×10^4 个/ml 的密度接种于 6 孔培养板和 96 孔培养板, 24 h 后吸去基础培养液。诱导分化培养组(实验组)加入诱导分化培养液, 基础培养组(对照组)加入等量基础培养液, 每 3 d 换液一次。

(四) 成骨细胞鉴定

1. 碱性磷酸酶活性测定: 在第 4, 8, 10, 12, 14 天时分别取一板在 96 孔培养板内接种的细胞, 洗净各孔内的培养液, PBS 洗 3 次, 每孔加入 100 μl 2% 的 TritonX-100, 4°C 过夜, 按试剂盒说明检测各孔的光吸光值(A), 计算对照组和实验组 A 的均值。

2. 细胞矿化作用的检测: 观察 6 孔培养板内细胞的形态, 并于 16 d 时洗净各孔内的培养液, PBS 洗 3 次; 每孔加入 1 ml 10% 的甲醛固定 30 min, 水洗; 饱和茜素红染色 30 min, 水洗。镜下观察细胞的形态和染色结果。

三、统计学分析

各组数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验进行统计学分析。

结 果

一、细胞的原代培养

接种 24 h 后, 出现贴壁细胞, 48 h 时贴壁细胞较多。经冲洗和换液, 去除悬浮细胞后, 贴壁细胞继续培养, 72 h 后细胞开始增殖, 呈集落样生长, 细胞呈多突、星形, 核呈椭圆形, 核仁多而明显, 有一些宽大扁平的细胞。至 14 d 时, 细胞密集在集落中心, 周围细胞呈旋涡状或放射状排列, 细胞之间无接触抑制现象,

故集落间出现重叠。

二、细胞的传代培养

原代培养的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打制成单细胞悬液, 传代培养。传代细胞在 24 h 内贴壁, 并很快铺展, 较原代细胞体积大, 呈不规则的多角形, 有短而薄的胞质突起, 细胞核椭圆形或圆形, 有多个核仁, 胞浆中有黑色颗粒。传代细胞增殖较快, 5 d 左右达 85% ~ 90% 融合, 此时若不传代, 细胞即密集重叠生长。

三、细胞的诱导分化培养

传代培养中加入诱导分化培养液后, 细胞继续生长, 9 d 后长满培养皿底, 并开始密集重叠生长, 无接触抑制。12 ~ 16 d 时细胞间出现了较多散在的致密圆形矿化结节, 并逐渐增大, 结节周围的细胞密度较高, 轮廓不清, 结节中心透光性差(图 1)。此时, 基础培养中作对照培养的细胞虽密集重叠生长, 但不形成矿化结节。

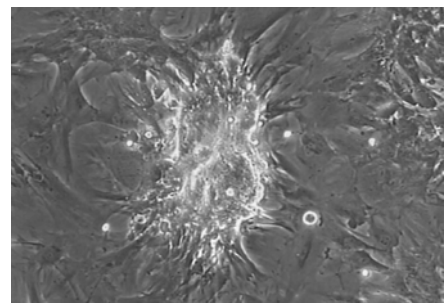


图 1 第 3 代 BMSCs 诱导后的矿化结节 ($\times 200$)

四、细胞碱性磷酸酶活性测定

诱导分化培养的细胞碱性磷酸酶的活性明显增高, 诱导后第 4 天碱性磷酸酶活性便明显高于对照组, 并随诱导时间的延长而增高(表 1)。

五、细胞矿化作用检测

实验组茜素红染色显示圆形矿化结节呈橘红色(图 2), 为茜素红与钙盐形成的橘红色复合物。对照组染色阴性, Van Kossa 染色可见黑色沉着物分布于细胞外基质中。

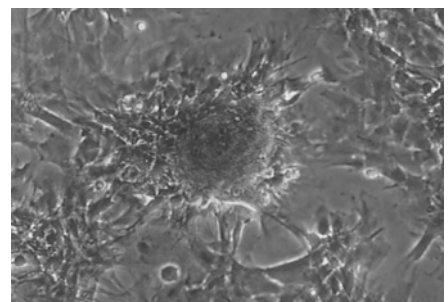


图 2 实验组的矿化结节(茜素红染色, $\times 200$)

表 1 2 组培养中代表细胞碱性磷酸酶活性的吸光值的测定 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	培养时间				
	4 d	8 d	10 d	12 d	14 d
对照组	0.184 $\pm$ 0.027	0.263 $\pm$ 0.034	0.322 $\pm$ 0.094	0.302 $\pm$ 0.109	0.401 $\pm$ 0.076
实验组	0.327 $\pm$ 0.037 *	0.583 $\pm$ 0.050 *	0.662 $\pm$ 0.089 *	0.686 $\pm$ 0.138 *	0.841 $\pm$ 0.026 *

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

讨 论

骨组织工程的种子细胞要满足以下要求:①易于分离培养,体外扩增较快;②有成骨潜能;③取材方便,对机体损伤小;④稳定性好,连续传代仍能保持成骨潜能。骨髓的成骨能力来源于骨髓基质细胞中的成纤维细胞集落形成单位(BMSCs),它具有多向分化的潜能,可分化成骨系细胞、脂肪细胞、成纤维细胞和网状细胞。在诱导因子的作用下可使其向成骨细胞系分化的数量增加 11。由于 BMSCs 易于获取,可诱导分化多种细胞,并且易于被外源基因转染并稳定地表达,被认为是组织工程细胞替代治疗中的最佳选择。

BMSCs 在骨髓中的丰度不高,约占有核细胞的 0.001% ~ 0.010%,因此如何进行分离纯化和体外扩增就显得尤为重要。目前用于分离纯化 BMSCs 的方法主要有 4 种,即全骨髓贴壁培养法^[3]、密度梯度离心法^[4]、流式细胞仪^[5]和免疫磁珠法。由于目前尚未发现 BMSCs 特异性很强的表面标志分子,因此很难应用流式细胞仪和免疫磁珠法对其进行准确的分选;密度梯度离心法是根据骨髓中各种细胞的比重不同而分离 BMSCs;而贴壁筛选法则是利用 BMSCs 有较强的粘附贴壁能力对其分离。本实验同时采用了密度梯度离心和贴壁培养 2 种方法,首先用淋巴细胞分离液将大部分的造血细胞分离出去,再通过贴壁培养换液去除悬浮生长的造血细胞,培养 48 h 后全量换液,便可获得贴壁生长的 BMSCs,随着传代次数的增加,细胞得以进一步纯化。用这种方法分离的 BMSCs 中,虽然仍混杂着少量其他类型的细胞,如脂肪细胞、成纤维细胞,但其数量很少,而且随着传代和诱导分化的进行会越来越

少。Maniopoulos 等^[6]首次报道鼠骨髓基质细胞在体外培养能形成钙化的骨样组织向成骨细胞的诱导分化。McQuillan 等^[7]报道,β-甘油磷酸钠可以为骨细胞分化和增殖提供磷原子,能增加碱性磷酸酶在成骨细胞中的表达,从而促进生理性钙盐的沉积,促进钙化。β-甘油磷酸钠可诱导 BMSCs 向成骨细胞方向分化,为分化中的成骨细胞的成骨活动提供磷酸根,促进生理性钙盐沉积;地塞米松能提高碱性磷酸酶活性,诱导细胞表达骨钙素,增加 I 型胶原和骨桥素信使核糖核酸的合成,诱导 BMSCs 向成骨细胞转化;维生素 C 促

进体外培养细胞合成胶原,并调节碱性磷酸酶活性。Otsuka 等^[8]证实,维生素 C 能通过诱导成骨细胞特异性分化蛋白基因的表达来诱导碱性磷酸酶活性的增加,促进 ST2 细胞(一种鼠的骨髓 MSCs)向成骨细胞的转化。同时证实维生素 C 能增加钙盐的沉积和促进钙化骨结节的形成。

参考相关的文献报道,我们联合应用这三种物质,经多次实验,摸索出了诱导 BMSCs 向成骨细胞分化的最适浓度。

种子细胞的选择与培养是骨组织工程中的基本环节,目前用于骨组织工程的种子细胞多取自骨外膜或骨组织,但存在取材困难,获得的细胞数量也有有限的缺点,因而其应用受到一定的限制。BMSCs 取材方便,易于体外扩增,在一定条件下,可以定向诱导分化为成骨细胞。本实验结果也证明,大鼠的 BMSCs 在体外培养中增殖能力强,并可诱导分化为成骨细胞,在骨组织工程中有良好的应用前景,也为骨缺损和骨折不愈合患者提供了新的治疗和康复手段。

参 考 文 献

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276: 71-74.
- Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen osteochondrogenesis. *J Cell Physiol*, 2001, 187: 345-355.
- Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2000, 275: 9645-9652.
- Ghilson R, McCulloch CA, Zohar R. Stromal mesenchymal progenitor cells. *Leuk Lymphoma*, 1999, 32: 211-221.
- Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*, 1998, 254: 317.
- McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS2). *Bone*, 1995, 16: 415-426.
- Otsuka E, Yamaguchi A, Shigehisa H, et al. Characterizations of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. *Am J Physiol*, 1999, 277: 132-138.

(修回日期:2004-12-20)

(本文编辑:郭正成)