论著

文章编号:1000-5404(2005)16-1644-04

微载体在培养人骨髓间充质干细胞成骨诱导中的作用

李 强,单建林,许建中,何清义,罗 飞,周 强,王序全,尹芝华 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨微载体在培养人骨髓间充质干细胞(hMSCs)成骨诱导中的作用,建立一种大量、快速获得骨组织工程种子细胞的方法。**方法** 将普通培养瓶培养的第3代hMSCs分别应用搅拌式生物反应器和微载体成骨诱导培养,分别于培养的第2、4、6、8、10、12、14天检测诱导细胞的碱性磷酸酶(ALP)活性,并与普通成骨诱导方法进行对比。观察细胞增殖情况,比较两种方法细胞增殖速度(细胞数/d)。**结果** 接种24 h后,88%的hMSCs细胞粘附于微载体并铺展,3 d后生长加速,约8~9 d后生长达最大值,最终细胞收获密度为接种时的16~22倍。细胞增殖速度约为普通培养法的3.2倍($P<0.05$)。诱导细胞的ALP的活性在第12天达最大值,且微载体成骨诱导培养的细胞ALP活性与普通培养法无显著差异($P>0.05$)。**结论** 应用微载体技术可成功地进行hMSCs的成骨诱导培养和快速扩增,能满足骨组织工程的需要。

关键词:微载体;人间充质干细胞;细胞培养;扩增

中图法分类号:R318;R322.71;R329.24 **文献标识码**:A

Effects of microcarrier in culturing human mesenchymal stem cells into osteoblasts *in vitro*

LI Qiang, SHAN Jian-lin, XU Jian-zhong, HE Qing-yi, LUO Fei, ZHOU Qiang, WANG Xu-quan, YIN Zhi-hua (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a method of acquiring seeding cells of bone tissue engineering quickly in large scale by comparing the effects of Cytodex3 microcarrier and common flask culture in culturing human mesenchymal stem cells (hMSCs) into osteoblasts. **Methods** hMSCs of the third generation were cultured under the condition of bone induction on microcarriers in spinner bioreactor or common flask culture. The cultivated cells were taken at day 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 respectively to measure the ALP activity. The growth condition of the hMHCs was monitored, and the cell growth curves were drawn. The cell proliferation rate of the two methods were compared. **Results** After the inoculation for 24 h, approximate 90% hMSCs attached to and spread on the microcarriers. In 3 days after inoculation, the cell proliferation sped up, and the cell density reached a peak at day 9. The final cell density was 16 – 22 times of that of primary inoculation. The activity of ALP was the highest at day 12 without significant difference between the two culture methods. **Conclusion** hMSCs can be induced into osteoblast and proliferate more quickly on the microcarriers, which can meet the requirement of bone tissue engineering.

Key words: microcarrier; human mesenchymal stem cells; cell culture; proliferation

利用组织工程骨修复大段骨缺损时,对种子细胞的需求量大,然而普通的平皿培养法难以满足要求,采用微载体技术在搅拌生物反应器内培养hMSCs,以探索一种大量、快速培养、扩增骨组织工程种子细胞的方法,以满足临床修复大段骨缺损时对种子细胞的需要。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

淋巴细胞分离液(华美生物工程公司),DMEM细胞培养基和优等胎牛血清(Hyclone公司),Cytodex3型微载体(Sigma公司),搅拌生物反应器,胰蛋白酶、EDTA(Sigma公司)。地塞米松(Sigma公司)、维生素C(Sigma公司),β甘油磷酸钠(Sigma

基金项目:国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003-AA205020),国家自然科学基金资助项目(30300357)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020) and the National Natural Science Foundation of China (30300357)

作者简介:李 强(1972-),男,安徽市徐州市人,博士研究生,主治医师,主要从事骨科临床与组织工程方面的研究。E-mail: lqlq101@126.com
通讯作者:许建中,电话:(023)68754164,E-mail: xjzslw@hotmail.com

收稿日期:2005-01-30;**修回日期**:2005-06-24

公司）。

1.2　方法

1.2.1　hMSCs 的分离与培养　　骨髓来源于健康志愿者，参照文献[1]，于髂后上棘穿刺，用内含肝素钠 200 U、生理盐水 20 ml 注射器抽取骨髓 15 ml，沿管壁缓慢注入 4 支含 5ml 淋巴细胞分离液的 10 ml 离心管，进行梯度离心（2 000 r/min × 20 min），仔细吸取中间交界面云絮状薄层加入 DMEM 培养基洗涤 1 次（1 500 r/min × 20 min），加入 DMEM 完全培养基（含 15% 胎牛血清、青霉素钠 100 U/ml、链霉素 100 U/ml），吹打计数，以 $1 \times 10^5/cm^2$ 的密度接种于 2 ~ 3 瓶 250 ml 玻璃培养瓶中。48 h 首次换液，以后第 3 天全量换液。孵育箱内培养条件：37 ℃，5% CO_2、饱和湿度。

1.2.2　hMSCs 传代培养　　待细胞长到瓶底 80% 面积时进行传代。吸取培养液，D-Hank 液洗涤 2 次，加入 0.25% 胰蛋白酶 5 ml，消化 3 ~ 5 min，加入 DMEM 完全培养基中止消化，轻柔吹打瓶底，细胞脱壁后吸入 50 ml 离心管，离心（1 500 r/min × 5 min）后弃去上清液，加入 DMEM 完全培养基，调整至适当体积后吹打记数，以 $1 \times 10^4/cm^2$ 的细胞密度传代培养，收集第 3 代细胞以 $1 \times 10^7/cm^2$ 待用。

1.2.3　hMSCs 普通诱导培养增殖测定　　将第 3 代 hMSCs 以 1×10^5/瓶的密度接种于第 1 组 8 个 25 ml 的普通培养瓶，以 5×10^4/ml/瓶的密度接种于第 2 组 3 个 25 ml 的普通培养瓶，加入诱导培养基（含 15% 胎牛血清的 DMEM 添加地塞米松 10^{-8} mol/L、维生素 C 50 μg/ml、β-甘油磷酸钠 10 mmol/L、青霉素钠 100 U/ml、链霉素 100 U/ml），37 ℃、5% CO_2 的空气、饱和湿度孵箱内孵育。每 24 小时收集 1 瓶细胞，记数，以时间为横坐标，细胞数为纵坐标，绘制生长曲线。应用公式：增殖速度 = 扩增倍数/培养时间，计算出细胞增殖速度。

1.2.4　hMSCs 普通诱导培养增殖测定及 ALP 检测　　第 1 组第 2、4、6、8 天的细胞浓度分别调整至 1×10^5/ml，第 2 组细胞分别于第 10、12、14 天收获并调整至 1×10^5/ml，取 1 ml，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，加入 2% Triton X-100 1 ml，4 ℃冰箱过夜粉碎，取 100 μl 接种于 96 孔板内，ALP 试剂盒作酶联免疫检测 520 nm 的 A 值，计算出 ALP 活性，以 U/L 表示，并绘制 ALP 活性曲线。ALP 试剂盒作酶联免疫检测 520 nm 的吸光度（A 值）。根据下列公式计算出 ALP 的活性。碱性磷酸酶（金氏单位/100 ml）= 测定管吸光值/标准管吸光值 × 0.005 × 100/0.005。

1.2.5　Cyterdex3 型微载体及反应器的预处理　　将 Cyterdex3 微载体 0.5 g 用 0.1 mol/磷酸盐缓冲溶液（PBS）100 ml（内加 2 滴吐温-80）浸泡过夜，再用 PBS 洗涤 2 次，高压灭菌 30 min，用 DMEM 培养基洗涤 2 次，浸泡于 DMEM 培养基中，置于 4 ℃冰箱中备用。将反应器瓶壁以 2.5% 的 poly-HEMA 无水酒精溶液被覆，以防止细胞及微载体粘连瓶壁，置净化台吹干，PBS 冲洗 3 次备用。

1.2.6　hMSCs 的微载体成骨诱导培养增殖测定　　参照文献[2]将微载体 0.5 g 和 1×10^7 个 hMSCs 加入搅拌反应器中，添加诱导培养液（含 15% 胎牛血清的 DMEM 添加地塞米松 10^{-8} mol/L、维生素 C 50 μg/ml、β-甘油磷酸钠 10 mmol/L、青霉素钠 100 U/ml、链霉素 100 U/ml）至 50 ml。反应器安放于普通孵箱内，借细导线与孵箱外电源相连。每间隔 30 min 搅拌 2 min，搅拌速度为 40 r/min，6 h 后持续转动，次日添加培养基至 100 ml。隔日半量换液，定期以相差显微镜观察细胞在微载体上的生长状况。在培养的 1、3、5、7、9、11、13 d，在旋转搅拌状态下取样少许，在倒置相差显微镜下观察细胞在微载体上的生长状况，并摄像。同法在培养的 1、3、5、7、9、11、13 d，在旋转搅拌状态下取样 1 ml，静置片刻，待微载体沉淀后，吸尽培养基，加入 0.25% 的胰酶 2 ml，5 min 后加入含血清培养基中止消化，吹打使细胞从微载体脱落，静置 1 min 后，微载体自然沉降，吸取上清液离心，在血球记数板上计数细胞，应用公式：增殖速度 = 扩增倍数/培养时间，计算出微载体培养 hMSCs 的细胞增殖速度。

1.2.7　hMSCs 微载体成骨诱导培养培养的 ALP 检测　　分别于微载体培养的第 2、4、6、8、10、12、14 天取样消化收集细胞，调整细胞浓度至 1×10^5/ml，同普通成骨培养法检测 ALP 活性。

1.3　统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

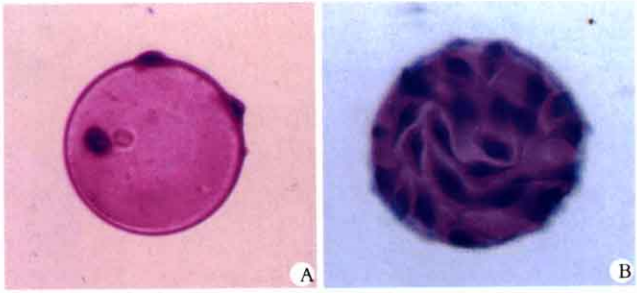
2　结果

2.1　细胞在 Cytodex3 型微载体表面粘附生长情况

接种 6 h 后约 66% 的细胞粘附于微载体表面，多数呈半球形，少数已铺展，12 h 后约 80% 的细胞粘附于微载体表面，多数铺展。24 h 后约 88% 细胞粘附于微载体表面，细胞在微载体上铺展的形态为不规则扁平形，少数为长梭形。接种后的第 3 天开始生长加速，细胞形态多数为梭形，至第 8 ~ 9 天约 72% 微载体表面长满细胞。

2.2　hMSCs 普通成骨与诱导成骨培养的增殖情况

hMSCs 普通成骨诱导培养至第 6 ~ 7 天长满单层，细胞呈多角形和梭形，而微载体培养的 hMSCs 在接种 6 h 后，约 67% 细胞粘附于微载体表面，多数呈半球形（图 1A）。12 h 约 86.8% 的细胞粘附于微载体表面，多数铺展。24 h 后约 89.9% 的细胞粘附于微载体表面，细胞在微载体上铺展的形态为不规则扁平形，少数为长梭形，接种后的第 3 天后生长开始加速，至第 10 ~ 11 天细胞达最高密度，为接种密度的 16 ~ 22 倍（图 1B），细胞形态多数为不规则多边形，此期间为对数生长期，此后细胞变化不明显。通过应用扩增倍数/培养时间的方法计算微载体培养法与普通法 hMSCs 的增殖速度，见微载体培养法的约为普通培养法的 3.2 倍，两者之间存在非常显著性差异（$P < 0.01$）。两种培养方法各时间点的 hMSCs 增殖速度见表 1。



A：6 h；B：12 d

图 1　微载体成骨诱导培养 hMSCs（甲基紫染色 × 100）

Fig 1　hMSCs induced into osteoblasts with microcarrier（Methylviolet staining × 100）

表1 微载体培养法与普通法成骨培养 hMSCs 的增殖速度($\bar{x}\pm s$, 扩增倍数/培养时间)

Tab 1 Proliferative speed of hMSCs induced into ostoblasts by microcarrier and common flask culture ($\bar{x}\pm s$, proliferative power/culture time)

Group	Culture time (t/d)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Common flask culture	0.47±0.03	0.49±0.04	0.48±0.03	0.49±0.05	0.52±0.04	0.52±0.04	0.42±0.03	0.50±0.05	0.53±0.03	0.55±0.05	0.55±0.04	0.43±0.04	0.50±0.04
Microcarrier	1.45±0.11	1.60±0.10	1.59±0.12	1.67±0.13	1.69±0.10	1.72±0.14	1.55±0.10	1.59±0.11	1.68±0.10	1.71±0.13	1.76±0.15	1.41±0.11	1.66±0.12

$P<0.01$ in comparison of commonflask culture and microcarrier

2.3 hMSCs 普通成骨与诱导成骨培养的 ALP 的活性

hMSCs 普通成骨培养的 ALP 的活性从第 4 天逐渐增高,在约 12 d 活性达最大值,为(12.3±2.5) U/100 ml,微载体诱导成骨培养的 ALP 活性从第 4 天开始逐渐增高,第 12 天活性达最大值(13.2±2.1) U/100 ml。比较两种培养方法 hMSCs 的 ALP 活性无显著性差异($P>0.05$)。两种方法的 ALP 活性见表 2。

表2 微载体培养法与普通法成骨培养 hMSCs 的 ALP 活性最大值($\bar{x}\pm s$, U/100 ml)

Tab 2 The peak of active ALP in the hMSCs by microcarrier and common flask culture($\bar{x}\pm s$, U/100 ml)

Group	Culture time (t/d)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Common flask culture	11.1±0.8	10.6±0.7	11.8±0.9	12.2±1.0	10.5±0.7	11.3±1.0	12.8±1.1	13.3±0.9	9.6±0.6	11.5±1.1	10.2±0.8	12.1±0.7	11.9±0.9
Microcarrier	12.5±0.9	12.0±0.8	13.9±1.0	10.3±0.6	11.2±0.8	15.0±0.7	12.5±0.9	12.9±1.2	12.6±0.8	14.9±1.1	10.6±0.7	12.0±1.0	13.1±0.8

3 讨论

各种原因造成的骨缺损特别是大段骨缺损,仍是困扰临床医生的难题,近年来组织工程学的发展为骨缺损的治疗提供了新的治疗手段。理想的骨缺损修复材料应当同时具备骨生成性、骨诱导性和骨传导性,骨生成性是指修复材料中含有能够成骨的细胞,即种子细胞。种子细胞的选择与培养是骨组织工程中的根本环节,骨膜中成骨细胞因为来源有限和供区损伤等原因不是理想的种子细胞。Friedenstein 等[3]首先发现并证实骨髓中除了包含造血干细胞外,还存在一类可以向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等分化的细胞,即骨髓间充质干细胞(MSCs)。研究证明骨髓间充质干细胞,不仅具有强大的增殖潜能和良好的成骨细胞分化潜能,且来源方便,可以通过穿刺抽取自体骨髓分离获得,避免了免疫排斥问题,能够满足自体组织工程骨构建的需要。因此,MSCs 作为骨组织的种子细胞备受关注。

近年来,随着骨组织工程技术的日趋成熟,利用 MSCs 作为骨组织的种子细胞的实验研究已在大型哺乳动物骨缺损修复中取得了满意的效果[4,5],然而在利用组织工程骨修复管状负重骨的段型骨缺损的实验研究中,由于对种子细胞如 hMSCs 的需求量较大,普通培养法难以在短时间内扩增出所需的 hMSCs。因此,如何能在尽量短的时间内扩增出所需的种子细胞是真正实现临床组织工程骨替代自体骨移植修复大段骨缺损的关键。hMSCs 由于具有较为明显的成骨潜能,且来源方便,可以通过穿刺抽取自体骨髓分离获得,用其作为种子细胞避免了免疫排斥,可满足组织工程骨的构建[6]。然而,由于骨髓中的 hMSCs 含量极低,约占骨髓有核细胞的 0.001% ~0.01%,为了满足大段骨缺损修复的需要,必须在体外进行大量扩增,但普通的平皿培养法不仅难以在短时间内扩增出所需的 hMSCs,而且需经多次消化传代,操作繁杂,易污染。

应用微载体培养 hMSCs 克服了上述普通培养法的不足,使 hMSCs 成骨诱导培养效率大大增加,本研究应用微载体技术成骨诱导 hMSCs,结果显示 hMSCs 能够在微载体上迅速粘附、铺展,当 hMSCs 在微载体表面长满时,其细胞密度可达到接种时的 16 ~22 倍,微载体成骨诱导 hMSCs 的速度是普通培养法的 3.2 倍左右。且有研究报道,在利用微载体培养细胞时,还有利于保护细胞的表型,从而提高种子细胞的质量[7]。

碱性磷酸酶(ALP)是成骨细胞的早期标志酶,在成骨过程中水解磷酸酯,为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸,有利于成骨,表明成骨分化的开始。是反映成骨细胞在体外分化为成熟骨细胞及基质钙化的重要指标之一[8]。本研究观察到 Cytodex3 型微载体培养的 hMSCs 的形态呈不规则多边形,微载体成骨诱导培养的 hMSCs 的 ALP 活性虽较普通培养法略有增高,但二者之间无统计学差异,说明微载体培养法不仅能较明显地促进 hMSCs 的增殖,而且对 hMSCs 诱导分化也无明显抑制。此外,若采用三维旋转生物反应器或灌

注生物反应器，微载体成骨诱导培养的 hMSCs 的成骨表型还可望有更好的表达。

应用 Cytodex3 型微载体培养 hMSCs 存在的不足之处：①细胞增殖的速度与理论值还存在一定的差距。从理论上讲，100 ml 的搅拌生物反应器内加入 0.5 g Cytodex3 型微载体，由于培养面积为 100 ml 普通培养面积的 60 倍，因此，微载体法培养的细胞数量也应为普通培养的 60 倍，其原因一方面是因为搅拌式生物反应器的剪切力对细胞的不利影响，另一方面可能是高密度的细胞凋亡限制细胞进一步增殖。因为当细胞增殖达一定密度时存在营养不足，代谢产物如氨、乳酸的累积限制了细胞的进一步增殖[9]。②Cytodex3 型微载体无法降解，限制了其临床应用，若能用可降解的材料制备微载体，不仅可增加细胞的粘附，而且具有更大的临床应用潜能。

参考文献：

[1] Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, *et al*. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57 - 66.

[2] Nilsson K. Microcarrier cell culture[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1988, 6(9): 403 - 439.

[3] Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. Cell Tissue Kinet, 1987, 20(3): 263 - 272.

[4] 王学明，裴国献. 组织工程骨血管化的监测[J]. 中华创伤骨科杂志，2004，6(7)：822 - 824.

[5] 戚　超，黄富国，罗静聪，等. 体外构建与体内构建组织工程骨的血管化研究[J]. 中华创伤骨科杂志，2004，6(7)：748 - 751.

[6] 朱　瀛，许建中. 不同年龄供体间充质干细胞在骨组织工程中的应用[J]. 中国临床康复，2004，8(2)：328 - 329.

[7] Malda J, van Blitterswijk C A, Grojec M, *et al*. Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation [J]. Tissue Eng, 2003, 9(5): 939 - 948.

[8] Aubin J E, Liu F, Malaval L, *et al*. Osteoblast and chondroblast differentiation[J]. Bone, 1995, 17(2 Suppl): 77S - 83S.

[9] Butler M. Growth limitations in high density microcarrier cultures[J]. Dev Biol Stand, 1985, 60: 269 - 280.

（编辑　王　红）

（上接 1643 页）

讨论

肿瘤早期准确的定性、定位诊断是成功治疗的关键，卫生保健工作的重要内容之一是筛查肿瘤，也是早期发现肿瘤的主要途径。测定血清肿瘤标志物虽然是筛查肿瘤的有效方法之一，但大多缺乏组织器官特异性，部分标志物敏感性不够高，阳性者仍需依靠影像学进行准确定位，故具有一定的局限性。目前，常规影像学（CT、MRI 及超声）仍主要侧重于评判组织器官的形态结构变化，较难以探测肿瘤早期改变。正电子发射体层显像（positron emission tomography，PET）是一种分子影像学技术，能够从糖、脂、蛋白质代谢及受体、抗原与基因表达等分子水平探测和显示肿瘤生物学特性变化[1]，能在肿瘤的功能、代谢改变等早期阶段发现异常，有可能比临床更早发现病变，从而使肿瘤的早期诊断和治愈成为可能。其中^{18}F-FDG PET 在临床肿瘤学中得到了较为广泛的应用[2]，并在健康体检发现早期肿瘤方面初步显示出独特的价值[3-6]。本例甲状腺微小癌首先被^{18}FDG PET/CT 定性和准确定位，与手术病理结果吻合，手术发现的炎性淋巴结在显像中并未出现假阳性。PET/CT 融合图像既含有反映病变组织代谢功能信息，又能精确显示病变组织的详细解剖毗邻关系，这一新型医学影像学技术必将在早期发现肿瘤，提高临床肿瘤学诊断、治疗技术水平方面发挥巨大的促进作用[6]。鉴于 PET/CT 费用较为昂贵，目前尚不适用于一般人群筛查肿瘤，但对肿瘤高危人群的筛查具有更高的价格/效益比。此外，结合血清肿瘤标志物检查，有助于减少^{18}F-FDG 显像可能出现的假阳性与假阴性[5]。

关键词：甲状腺癌；体层摄影术，发射型计算机；体层摄影术，X 线计算机；脱氧葡萄糖

中图法分类号：R736.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Stahl A, Wieder H, Piert M, *et al*. Positron emission tomography as a tool for translational research in oncology[J]. Mol Imaging Biol, 2004, 6(4): 214 - 224.

[2] Talbot J N, Petegnief Y, Kerrou K, *et al*. Positron emission tomography with [^{18}F]-FDG in oncology [J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2003, 504(1-3): 129 - 138.

[3] Kao C H, Kwan A S, Kwan J K, *et al*. The role of ^{18}F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in cancer screening - a preliminary report[J]. Oncol Rep, 2001, 8(5): 1145 - 1148.

[4] Chen Y K, Kao C H, Liao A C, *et al*. Colorectal cancer screening in asymptomatic adults: the role of FDG PET scan[J]. Anticancer Res, 2003, 23(5b): 4357 - 4361.

[5] Shen Y Y, Su C T, Chen G J, *et al*. The value of ^{18}F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography with the additional help of tumor markers in cancer screening[J]. Neoplasma, 2003, 50(3): 217 - 221.

[6] Israel O, Mor M, Gaitini D, *et al*. Combined functional and structural evaluation of cancer patients with a hybrid camera-based PET/CT system using ^{18}F-FDG[J]. J Nucl Med, 2002, 43(9): 1129 - 1136.

（编辑　陈聪连）