论著

文章编号:1000-5404(2005)16-1652-04

# 体外成骨诱导增加人骨髓间充质干细胞刺激PBMCs增殖

代 飞[1],吴 军[2],许建中[1],王序全[1],尹芝华[1] (第三军医大学西南医院:[1]骨科,全军矫形外科中心,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市器官移植基础研究所,重庆 400038)

**提 要:目的** 初步观察人骨髓间充质干细胞(human bone marrow derived mesenchymal stem cell, hMSCs)及其成骨分化后代的免疫原性,为异基因hMSCs作为骨组织工程种子细胞研究提供理论基础。**方法** 应用Percoll密度梯度离心法从人骨髓中分离、培养细胞hMSCs;将第3代hMSCs及其体外诱导成骨3周的分化后代分别与人外周血单个核细胞(human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)混合培养,观察上述细胞对PBMC的刺激指数。**结果** Percoll(1.073 g/ml)分离培养的原代hMSCs为均匀一致的梭形,呈漩涡样排列。其在体外成骨诱导3周时Von-Kossa染色见细胞间质有大量的钙盐沉积,免疫细胞化学检测见到大多数细胞骨钙素表达阳性。混合细胞培养结果显示:不同细胞数量的hMSCs对PBMCs的刺激指数(stimulation index,SI)均小于2;而$1\times10^4$、$5\times10^3$、$10^3$的hMSCs-Osteo对PBMCs的刺激指数大于2。**结论** hMSCs的免疫原性较低,在体外不能刺激PBMCs增殖。但hMSCs的成骨分化后代的免疫原性增加,一定数量细胞在体外能够刺激PBMCs增殖,其在异基因宿主体内可能引起免疫排斥反应。本实验结果提示:异基因骨髓间充质干细胞要作为骨组织工程种子细胞,必须克服免疫方面的障碍。

**关键词**:人骨髓间充质干细胞;种子细胞;免疫原性

**中图法分类号**:R322.72;R329.2;R392.11 **文献标识码**:A

# Osteogenic inducement *in vitro* increases the proliferation of human peripheral blood mononuclear cell stimulated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells

DAI Fei[1], WU Jun[2], XU Jian-zhong[1], WANG Xu-quan[1], YIN Zhi-hua[1] ([1]Department of Orthopaedics, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate immunogenicity of human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hMCSs) and their offsprings after osteogenic induction *in vitro*. **Methods** hMSCs were isolated from bone marrow of the iliac crest of voluntary healthy adults by density gradient centrifugation of Percoll (1.073 g/ml), and cultured and carried out osteogenic induction *in vitro*. hMSCs of third passage and the hMSCs offsprings after osteogenic induction (hMSCs-Osteo) for 3 weeks were cocultured with human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). Then the stimulation index of hMSCs and hMSCs-Osteo were observed in this coculture system. **Results** The isolated cultured hMSCs were homogeneous spindle-like cells and had a circinate arrangement. hMSCs were induced into osteogenesis when they were cultured in osteogenic medium for three weeks demonstrated by calcium salts deposited in matrix, and osteocalcin were expressed in cytoplasm. hMSCs failed to elicit a proliferative response from allogeneic lymphocytes, but hMSCs-Osteo enhanced the proliferative response from allogeneic lymphocytes with the SI (stimulation index) over 2. **Conclusion** hMSCs show a lower immunogenic feature *in vitro*, but osteogenic inducement increases immunogenic feature of hMSCs, which indicate that allogeneic hMSCs would arose immune rejection in recipients when used as seeding cells of bone tissue engineering.

**Key words**: human bone marrow derived mesenchymal stem cells; seeding cells; immunogenicity

**基金项目**:国家自然科学青年基金资助项目(3030090),国家重点实验室开放课题(2003)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (3030090) and the Funds of Open Projects for the National Key Laboratories in China (2003)

**作者简介**:代 飞(1971-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事移植免疫及组织工程方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754000-73076

**通讯作者**:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail: Junwupro@public.cta.cq.cn

**收稿日期**:2005-01-30;**修回日期**:2005-06-24

人骨髓间充质干细胞(human bone marrow derived mesenchymal stem cell,hMSCs)由于具有多向分化潜能、在体外增殖能力较强、容易分离和培养等优点被认为是骨组织工程最佳的种子细胞之一。目前国内外应用自体hMSCs作为骨组织工程种子细胞修复骨缺损在动物实验中和临床上均取得了良好的效果[1]。但自体hMSCs移植,从分离到体外构建成组织工程骨至少需要3~4周,延误了临床上对骨缺损修复的时机,难以满足治疗的需要。那么,异基因骨髓间充质干细胞能否作为骨组织工程种子细胞的另一个来源呢?要回答这个问题,首先我们必须研究hMSCs及其诱导成骨后代的免疫原性,为异基因hMSCs作为骨组织工程种子细胞的研究提供理论基础。针对上述问题,本研究采用混合细胞培养方法,研究了第3代hMSCs及其成骨诱导21 d的hMSCs对同种异体外周血单个核细胞的刺激作用。现报告如下。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验材料

骨髓及外周血:健康成年自愿者捐献;培养基F12-DMEM及胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司;Percoll细胞分离液购自美国Pharmacia公司;Ficoll(1.077 g/ml)淋巴细胞分离液购自天津TBD公司;成骨诱导试剂:地塞米松、ASAP、β-GP,购自美国Sigma公司;Von-Kossa染色试剂:5%硝酸银、5%硫代硫酸钠为国产纯化试剂;鼠抗人骨钙素(Osteocalcin)单克隆抗体,购自美国Sigma公司;DAB显色试剂盒,购自晶美生物有限公司;$^3$H-TdR,购自中国同位素北京原子能研究所;其它常规试剂为国产分析纯或进口分装。

### 1.2　实验方法

1.2.1　hMSCs分离及培养　　参照Pittenger[2]介绍的Percoll密度梯度离心法及培养方法进行。

1.2.2　hMSCs体外成骨诱导　　取第3代hMSCs进行成骨诱导培养。成骨诱导培养基组成:F12-DMEM+地塞米松(终浓度:100 nmol/L)、ASAP(终浓度:0.05 mmol/L)、β-GP(终浓度:10 mmol/L)。取诱导3周的细胞进行成骨特异性标志检测。

1.2.3　Von-Kossa染色　　制备细胞爬片,取出后PBS浸洗2遍,丙酮固定;加5%的硝酸银,室温孵育30 min(紫外光下),蒸馏水冲洗;加5%硫代硫酸钠5 min,蒸馏水冲洗;中性红复染20 min,蒸馏水冲洗;常规脱水、封片。结果:钙染成黑色,细胞核成红色。

1.2.4　骨钙素免疫细胞化学检测　　将细胞培养在载玻片上,75%酒精固定30 min,PBS振洗2次;浸入0.75% $H_2O_2$-PBS中,37 ℃,30 min以阻断内源性过氧化物酶;PBS振洗2次,每次5min;滴加正常羊血清,湿盒内37 ℃,30 min以消除非特异性染色;弃羊血清,滴加鼠抗人骨钙素单抗(一抗,工作浓度:1∶500),湿盒内37 ℃,60 min;PBS振洗3次,每次5 min;滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG,湿盒内37 ℃,30 min;PBS振洗3次,每次5 min;DAB避光显色10 min;自来水振洗终止反应。细胞核复染:浸入苏木精2 min,水洗,浸入盐酸酒精溶液10 s,水洗反蓝5 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光学显微镜观察、照相。阳性为细胞中出现棕黄色着色。

1.2.5　人外周血单个核细胞(PBMCs)分离　　从健康成人(自愿者)抽取外周血20 ml,盛入含有3 000 U肝素的50 ml离心管中,加入20 ml PBS稀释,缓慢加入到分别装有20 ml Ficoll(1.077 g/ml)的两个50 ml离心管中,离心:1 500 r/min,20 ℃,20 min;收集分层界面上的单个核细胞,20 ml PBS稀释,离心:1 000 r/min,20 ℃,10 min,弃上清;最后用RPMI1640+10% NCS培养基重悬细胞,细胞计数备用。

1.2.6　hMSCs与体外成骨诱导的hMSCs(hMSCs-Osteo)体外刺激PBMCs增殖实验

1.2.6.1　反应细胞准备　　PBMCs用RPMI1640完全培养基调节细胞密度至$1\times10^5$/ml。

1.2.6.2　刺激细胞准备　　收集第3代hMSCs、诱导3周的hMSCs(hMSCs-Osteo)细胞,调节细胞浓度为$1\times10^6$/ml,加入丝裂霉素C至终浓度25 μg/ml,37 ℃、50% $CO_2$培养箱中孵育30 min,完全培养基洗涤3次以去除残余的丝裂霉素C。细胞用RPMI1640完全培养基重悬并进行细胞记数。

1.2.6.3　实验步骤　　①于96孔培养板中加入反应细胞,$10^5$/孔;②每孔中分别加入$1\times10^5$、$5\times10^4$、$1\times10^4$、$5\times10^3$、$1\times10^3$的刺激细胞。每实验组、实验对照组($10^5$ PBMCs)和空白对照(RPMI1640完全培养基)组均设立3个复孔;③37 ℃、50% $CO_2$培养箱中培养4 d,培养结束前18 h,向每孔中加入$3.7\times10^4$ Bq $^3$H-TdR;④结束培养时,用自动细胞收集器将细胞收集到玻璃纤维滤纸上,生理盐水反复冲洗10次,80 ℃烘干;⑤将干燥的滤纸装入闪烁瓶,加入闪烁液,用闪烁仪测定其cpm值。计算刺激指数。刺激指数(SI)=cpm(实验组-空白对照组)/cpm(实验对照组-空白对照组)。

### 1.3　统计学处理

数据均用$\bar{x}\pm s$表示。

## 2　结果

### 2.1　hMSCs分离、培养及体外诱导成骨情况

Percoll(1.073 g/ml)分离培养的原代hMSCs为均匀一致的梭形,呈漩涡样排列(图1)。第1~6代细胞的细胞形态及生长速度无明显改变;第7~8代细胞,细胞生长速度逐渐变慢(传代时间越来越长),但细胞形态无明显改变;第9代部分细胞由梭形变为平坦、宽大,细胞质疏松,可见空泡,增殖缓慢;此后细胞越长越慢,并有部分细胞脱落死亡,几乎不能再继续传代。hMSCs在成骨诱导过程中,前2周细胞形态和生长速度无明显改变,但在诱导10 d可以见到细胞聚集成团现象;2周后细胞逐渐变大、变短,多角形细胞增多,细胞基质增多;到3周时大多数细胞为多角形且聚集成团,有大量的细胞基质。此时Von-Kossa染色见细胞间质有大量的钙盐沉积(图2);免疫细胞化学检测见到大多数细胞骨钙素表达阳性,骨钙素表达在细胞浆中(图3)。

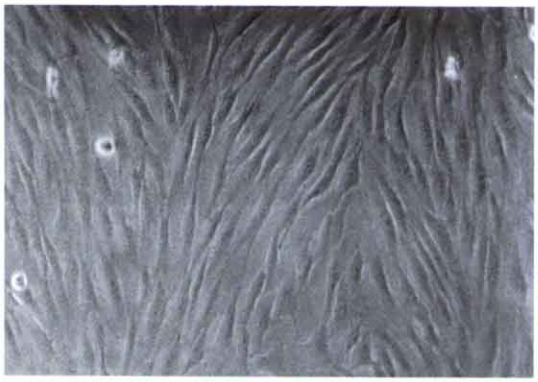


**图1 原代 hMSCs 呈纺锤形并漩涡状排列** （LM×100）

**Fig 1 Primary hMSCs were homogeneous spindle-like cells in a circinate arrangement** （LM×100）

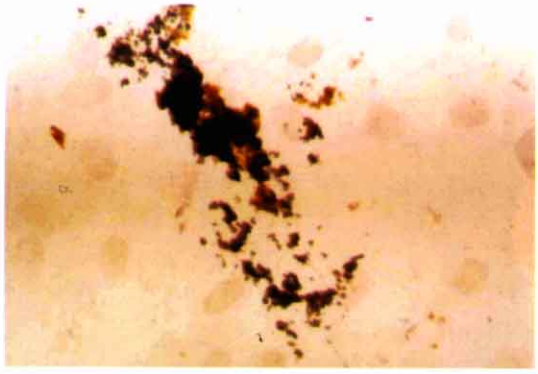


**图2 Von-Kossa 染色显示:hMSCs-Osteo 细胞间质中有大量钙盐沉积** （LM×200）

**Fig 2 A great deal of calcium salts deposited in matrix of hMSCs-Osteo stained by Von-Kossa method** （LM×200）



**图3 免疫细胞化学检测见到大多数 hMSCs-Osteo 骨钙素表达阳性** （DAB×200）

**Fig 3 Most hMSCs-Osteo expressing osteocalcin detected by immunocytochemistry** （DAB×200）

### 2.2 hMSCs 及 hMSCs-Osteo 体外刺激人外周血单个核细胞(PBMCs)增殖实验结果

为检测 hMSCs 及 hMSCs-Osteo 的免疫原性,我们将不同数量的上述两种细胞分别与 PBMCs 混合培养,观察其刺激 PBMCs 增殖的能力。PBMCs 是一个混合细胞群体,包含抗原提呈细胞(APCs)和 T 淋巴细胞,外来抗原可刺激其增殖,上述实验可在体外反映 hMSCs 及 hMSCs-Osteo 的免疫原性。实验结果表明:不同细胞数量的 hMSCs 的刺激指数(stimulation index, SI)均小于 2;而 $1\times10^4$、$5\times10^3$、$10^3$ 的 hMSCs-Osteo 的刺激指数大于 2,见表 1。这提示:与 hMSCs 的免疫原性较低,在体外不能刺激 PBMCs 增殖;而 hMSCs 的成骨分化后代 hMSCs-Osteo 的免疫原性增加,一定数量细胞在体外能够刺激 PBMCs 增殖。

**表1 hMSCs、hMSCs-Osteo 体外对 PBMCs 的刺激作用**

**Tab 1 SI of hMSCs and hMSCs-Osteo when cocultured with human peripheral blood mononuclear cells**

| | CPM($n=3$, $\bar{x}\pm s$) | SI |
|---|---|---|
| Number of allogeneic hMSCs added | | |
| 100 000 | 1 909.33±154.04 | 0.91 |
| 50 000 | 2 159±339.22 | 1.06 |
| 10 000 | 1 869.67±135.77 | 0.89 |
| 5 000 | 2 555.67±303.75 | 1.29 |
| 1 000 | 3 171.33±201.62 | 1.64 |
| Number of allogeneic hMSCs-Osteo added | | |
| 100 000 | 2 777±591.27 | 1.41 |
| 50 000 | 3 411.67±530.10 | 1.78 |
| 10 000 | 4 016±1212.36 | 2.13 |
| 5 000 | 4 035.67±766.54 | 2.14 |
| 1 000 | 5 114±820.78 | 2.77 |

## 3 讨论

种子细胞是组织工程的关键因素之一。目前应用自体 hMSCs 作为骨组织工程种子细胞构建的组织工程骨修复骨缺损在动物实验中和临床上均取得了良好的效果。但 hMSCs 在骨髓中含量很少,仅占成年骨髓单个核细胞的 0.001%～0.01%,并随着年龄的增长减少[3];现有方法体外迅速扩增困难。因此,自体骨髓间充质干细胞的应用会受来源和数量限制,难以满足临床治疗的需要。异基因骨髓间充质干细胞来源及数量不受限制,能否作为骨组织工程种子细胞的另一个来源呢? 要回答这个问题,首先我们应当研究 hMSCs 及其诱导成骨后代的免疫原性,探讨其异基因移植时是否引起免疫排斥反应。研究表明:骨髓间充质干细胞表达 MHC-Ⅰ类分子,不表达 MHC-Ⅱ类分子,不表达 B7-1、B7-2 和 CD40、CD40L[4]。小剂量 hMSCs 可以刺激 T 淋巴细胞增生;大剂量 hMSCs 则抑制 ConA 刺激的 T 淋巴细胞增生以及异基因混合淋巴细胞反应[5]。Aggarwal 等[6,7]的研究发现:hMSCs 强烈抑制 DC1 和分泌 TNF-α,减少 Th1 和 NK 细胞分泌 INF-γ;增加成熟 DC2 分泌 IL-10,增加 Th2 分泌 IL-4,增加

Treg 细胞比例等;MSCs 的免疫抑制作用还和其分泌 PGE2 和 TGF-β1 有关。Niemeyer 等[8]将 hMSCs 及成骨诱导 0、8、16、24 d 的 hMSCs 与同种异体单个核细胞共培养,发现 hMSCs 与其成骨诱导后代均不能刺激同种异体淋巴细胞增殖,且均不表达 MHC Ⅱ类分子、B7-1、B7-2、CD40、CD40L,阳性表达 MHC Ⅰ类分子。hMSCs 及其成骨、成软骨、成脂肪分化后的 hMSCs 均不能刺激同种异体淋巴细胞增殖;尤其是成骨分化后代具有更强的免疫抑制作用,这种作用在加入 INF-γ 后增强。这提示:hMSCs 在 HLA 不匹配的个体之间可以相互移植并不引起免疫排斥反应,同种异体 hMSCs 很有希望成为骨组织工程种子细胞的另一个来源[9]。但上述报道尚有争论。

虽然 hMSCs 显示出很低的免疫原性,但当其作为组织工程骨的种子细胞异基因移植时,有较多报道其并不能很好的成骨并会引起免疫排斥反应。本实验也表明:虽然 hMSCs 在体外不能刺激人外周血单个核细胞(PBMCs)增殖(刺激指数小于 2),免疫原性较低;但成骨诱导 3 周的 hMSCs-Osteo 作用于 PBMCs 的刺激指数增高,一定数量的 hMSCs-Osteo 可以刺激 PBMCs 增殖(刺激指数大于 2)。这证明 hMSCs 成骨诱导分化后代的免疫原性增高,其在异基因宿主体内可能引起免疫排斥反应。本实验结果提示:异基因骨髓间充质干细胞要作为骨组织工程种子细胞,必须克服免疫方面的障碍。在今后的工作中,对于骨组织工程中影响种子细胞广泛应用的免疫学障碍问题可能成为关注的焦点,克服免疫学障碍的研究可能会成为热点。建立种子细胞库、适当应用免疫抑制剂、诱导特异性免疫耐受或对种子细胞进行基因修饰可能是解决免疫学障碍的有效途径。

## 参考文献:


[1] Simonsen J L, Rosada C, Serakinci N, *et al*. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells[J]. Nature Biotechnol, 2002, 20(6): 592-596.

[2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[3] Bradley J A, Bolton E M, Pedersen R A. Stem cell medicine encounters the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(11): 859-871.

[4] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, *et al*. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*[J]. Exp Hematol, 2002, 30(1): 42-48.

[5] Le Blanc K. Mesenchymal stem cells. Basic science and future clinical use[J]. Lakartidningen, 2002, 99(12): 1318-1321, 1324.

[6] Aggarwal S, Pittenger M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood, 2005, 105(4): 1815-1822.

[7] Maccario R, Podesta M, Moretta A, *et al*. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of $CD4^+$ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype[J]. Haematologica, 2005, 90(4): 516-525.

[8] Niemeyer P, Seckinger A, Simank H G, *et al*. Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an *in vitro* study[J]. Orthopade, 2004, 33(12): 1346-1353.

[9] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, *et al*. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells[J]. Exp Hematol, 2003, 31(10): 890-896.


(编辑　王　红)

(上接 1651 页)

### 3　疫情处理

对患者进行隔离治疗,环境进行终末消毒,消除潜在的致病隐患,对易感接触者进行检疫,加强健康教育,进行应急接种。

### 4　讨论

对本次麻疹暴发疫情的调查处理与学校紧密配合,按照《学校卫生工作条例》,及时采取了紧急综合预防措施,在短期内控制了疫情,保护了广大师生的健康。

从这次暴发疫情来看,首例患者卫生常识和传染病防治意识落后[1],学校医生对其未及时进行隔离治疗是引起暴发的主要原因。其他学生虽有免疫史,但因接种时间较长,保护力下降或消失,一旦受到病毒感染,较易发生麻疹[2]。另外也暴露出疫苗接种质量不高,相关地方部门不够重视等一些不足,有待改进[3,4]。

关键词:麻疹;暴发调查
中图法分类号:R511.1　　文献标识码:B

### 参考文献:


[1] 张震巍,陈飞虎. 浅议增强传染病防治意识与知识的必要性[J]. 中国卫生事业管理,2003,19(9):569-570.

[2] 王余琼. 儿童计划免疫对麻疹疾病的控制[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2004,25(4):419-420.

[3] 雷新军. 关于乡镇预防体制改革的探讨[J]. 湖北预防医学杂志,2004,15(2):71-72.

[4] 郭万申,范军星,刁琳琪,等. 河南省麻疹监测项目进展及监测质量分析[J]. 郑州大学学报(医学版),2003,38(3):423-424.


(编辑　张大春)