论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0776-04

压应力对组织工程骨内人骨髓基质细胞增殖能力影响的实验研究

刘 涌,周 强,曹炜鹏,郭 平,宋 磊,蒲小兵,郭从涛 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨压缩应变对组织工程骨内人骨髓基质细胞(human bone marrow stromal cells, hBMSCs)增殖的作用及适合强度范围。**方法** 双相接种法构建组织工程骨,对其施加频率为0.5 Hz,压缩幅度分别为2%、5%、10%、15%、20%的压应力刺激hBMSCs(2 h/d)。倒置显微镜观察细胞形态,扫描电镜观察培育的组织工程骨,常规病理切片和HE染色观察培育组织工程骨内细胞分布及生长情况。MTT法和流式细胞技术检测细胞增殖水平及生长周期。**结果** 压缩幅度为2%、5%、10%时压应力刺激可促进hBMSCs增殖;压缩幅度为15%、20%时压应力刺激抑制细胞增殖,其中以10%压缩幅度刺激细胞增殖效果最为显著,生长曲线比对照组明显前移,S期细胞百分比(27.45±0.25)%较对照组(19.15±0.26)%增高43.34%。**结论** 适当强度的压应力可促进hBMSCs的增殖,5%~10%的压缩幅度是促进hBMSCs增殖的适合强度。

关键词: 组织工程;生物反应器;骨髓基质细胞;压应力;增殖

中图法分类号: R318.08; R322.71; R329.28 **文献标识码:** A

Effect of compressive stress on proliferation of human bone marrow stromal cells in tissue engineering bone

LIU Yong, ZHOU Qiang, CAO Wei-peng, GUO Ping, SONG Lei, PU Xiao-bing, GUO Cong-tao (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of compressive stress on the proliferation of the human bone marrow stromal cells (hBMSCs) seeded on demineralized bone matrix (DBM) and its optimal range of intensity. **Methods** The tissue engineered bone was built with the method of double phase inoculation after the hBMSCs were isolated and cultured from fresh bone marrow sample of healthy individual and DBM was cut into a cube of 10 mm^3. Compressive stress with the power to make the cell body shrink by a ratio of 2%, 5%, 10%, 15% or 20% at 0.5 Hz, was applied to the hBMSCs for 2 h per day. The cells were harvested after the stimulus for 1, 3, 5, 7, 10 and 13 d respectively. Cell morphology was observed with inverted microscopy, and the ultrastructure of the tissue engineering bone with scanning electron microscopy. Proliferation and cell cycle was measured by MTT assay and flow cytometry respectively. **Results** Compressive stress promoted hBMSCs seeded on DBM to proliferate when the compression ratio was 2%, 5% or 10%; but restrain the cells to proliferate when the compression ratios were 15% and 20%. Among all of the compression ratio, 10% showed a most prominent effect on cell proliferation. It increased the percentage of cells at the S phase from (19.15±0.26)% (in control group) to (27.45±0.25)%. **Conclusion** Compressive stress promotes the hBMSCs to proliferate in a certain range of intensity, and the intensity with the power to shrink the cell body by 5% to 10% is an optimal range to apply.

Key words: tissue engineering bone; bioreactor; bone marrow stromal cells; compressive; stress proliferation

大量的临床实践证实了压应力可以调节骨的代谢,对骨的发育、改建、修复起着十分重要的作用[1]。许多研究也证实了流体剪切力、液压力等力学刺激在体外也可促进人骨髓基质细胞(human bone marrow stromal cells, hBMSCs)、软骨细胞等细胞增殖,对组织工程骨和软骨的构建有重要影响[2,3]。因此,作为体内最主要的力学刺激方式,压应力也必然对体外组织

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02Z4E3)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02Z4E3)

作者简介: 刘 涌,男,辽宁省沈阳市人,硕士研究生,主要从事骨组织工程方面的研究, E-mail:iamliuyong@sina.com.cn

通信作者: 周 强,电话:(023)68765283, E-mail: zqtlh@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2008-12-01;**修回日期:** 2009-02-09

工程骨的构建起到重要作用,但压应力对 hBMSCs 的作用目前尚不清楚。本实验旨在研究不同强度的压应力刺激对体外 hBMSCs 增殖的作用,以期找出促进 hBMSCs 增殖的适合压应力强度范围,为研制新型生物反应器、模拟仿生环境构建组织工程骨以及进一步研究压应力促进 hBMSCs 增殖的机制提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器

Percoll 分离液(Sigma 公司,美国),DMEM/F12 (1∶1)培养基(HyClone 公司,美国),优质胎牛血清(HyClone 公司,美国),四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司,美国),碘化丙啶(华美公司,北京),RNAseA(华美公司,北京),扫描电子显微镜观察(AMRAY-1000B,美国),相差显微镜(OLYMBUS-CKX41,日本),酶联反应检测仪(Model550 型,华东电子管厂),流式细胞仪(Becton Dickinson,美国),脱钙骨基质(demineralized bone matrix,DBM)(本科提供),压应力施加模拟机(本科设计、制作)。

1.2　方法

1.2.1　hBMSCs 的分离与培养　　无菌抽取 20 ~ 30 岁健康志愿者两侧髂骨骨髓 5 ~ 10 ml,肝素抗凝。用 1.073 g/ml Percoll 液梯度离心,以 $5 \times 10^5/cm^2$ 个细胞接种于培养瓶,加含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,置 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养。待原代细胞铺满瓶底 80%,以 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1∶3传代,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液继续培养。

1.2.2　DBM 的处理　　在超净工作台中无菌条件下将 DBM 放入 6 孔板中并剪成约 10 mm × 10 mm × 10 mm 大小方块,加入基础培养基浸泡并反复换液以中和其中的酸性物质,直到培养液不再变色为止。吸出培养液,将培养板放入取出水盆的 37 ℃ 孵箱中使 DBM 块中的水分缓慢蒸发干。

1.2.3　双相接种法构建组织工程骨[4]　　消化收集已经 80% 融合的第 3 代细胞,计数、离心、去上清备用。取 1 支 50 ml 灭菌离心管置于冰浴中,在无菌条件下加入 4 ml 5 g/L 胶原溶液、0.5 ml 10 倍浓度 DMEM/F12 溶液、0.5 ml 胎牛血清,混匀,将 pH 值调节到 7.4,制成胶原凝胶液。根据细胞数量取一定量已调制好的、尚未凝固的胶原凝胶液加入到 1 支盛有 hBMSCs 的离心管中,轻轻吹打混匀,制成密度为 $1 \times 10^7 ml^{-1}$ 凝胶-细胞悬液,立即用微量移液器滴加到 6 孔板中 DBM 块上,每块 300 μl。将 6 孔板放入 37 ℃、含 5% CO_2 的孵箱中孵育,15 min后将细胞-DBM 复合物块翻面,30 min 后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,每孔 8 ml,置于孵箱中培养。

1.2.4　压应力施加模拟机的设计与制作　　我们自行研制、设计的压应力施加模拟机包括 3 个部分:调控装置,动力装置,应力施加装置。调控装置为 1 台安装有调控程序的计算机。动力装置包括绕电线圈、变电器等。应力施加装置包括直线电机、力传感器、培养室 3 个部分。培养室通过连杆部分的往复运动对培养室内的组织工程骨施加压应力刺激。该仪器可对培育的组织工程骨施加行程为 0 ~ 48 mm 的压应力刺激,可调增量为 0.1 mm。也可施加大小为 0 ~ 98 N 的压应力刺激,可调增量为 0.02 N。施加压应力刺激时可通过计算机设定所需压缩的幅度或压应力值,同时也可设定压应力刺激的频率以及时间。

1.2.5　实验分组　　将构建的组织工程骨分为对照组和实验组(压缩幅度 2%、5%、10%、15%、20% 压应力刺激组)。对照组的组织工程骨块静置培养,不施加压应力刺激。无菌条件下将各实验组的组织工程骨块置入已灭菌的培养室内,并加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液 4 ml,将应力施加装置放入孵箱内,启动装置,分别对其施加压缩幅度分别为 2%、5%、10%、15%、20% 的压应力刺激,2 h/d,共处理 13 d,施加刺激完成后,无菌条件下将组织工程骨块重新置回孔板内培养。

1.3　检测指标

1.3.1　倒置显微镜观察　　培养过程中,分别在不同时相点用倒置相差显微镜观察细胞增殖和基质分泌情况。

1.3.2　扫描电镜观察　　取不同压应力作用下培育 1 周的各组组织工程骨骨块,PBS 液漂洗 3 次,3% 戊二醛溶液固定48 h,酒精系列脱水,真空干燥,表面喷金,扫描电镜观察组织工程骨内细胞的增殖、分布情况。

1.3.3　组织切片观察　　取各组培育 1 周的组织工程骨骨块,PBS 漂洗 3 次,4 ℃、4% 多聚甲醛固定 48 h 后常规病理切片,HE 染色,倒置显微镜下观察细胞、基质在支架中的分布情况。

1.3.4　MTT 法检测细胞活性及生长曲线　　分别于构建组织工程骨培育的第 1、3、5、7、10、13 天时,在无菌条件下取待测组织工程骨块,并将其置入一新 6 孔板内,磷酸盐缓冲液冲洗 2 遍,加入 6 ml MTT(0.5 g/L)溶液,在孵箱内 37 ℃孵育 4 h,吸出 MTT 溶液,加入 5 ml 含 0.01 mol/L 盐酸的盐酸异丙醇溶液洗脱,吸取 150 μl 洗脱液加入 96 孔板内,并置入酶联反应测试仪内,选择 490 nm 波长,每板设一不含细胞的调零孔,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光密度值[D(490)]。以时间为横轴,D(490)值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.3.5　流式细胞仪检测细胞周期　　消化收集已培育 5 d 的各组组织工程骨块上的 hBMSCs,PBS 洗涤 2 次,迅速注入预冷的 75% 乙醇,振荡、混匀,以 1×10^5 个细胞密度悬浮固定细胞,4 ℃,30 min,弃去固定液,用预冷的 PBS 漂洗离心,37 ℃以 200 μl 浓度为 1 mg/ml 的 RNase 处理 30 min,离心,过 40 目尼龙网,调整细胞数为 1×10^6/L,加入 10 mg/ml 的碘化丙啶 0.5 ml,4 ℃避光染色 30 min,流式细胞仪 488 nm 波长检测,获得 DNA 含量分布组方图和细胞凋亡比例。以增殖指数(proliferation index,PI)分析压应力对 hBMSCs 分裂增殖水平的影响。$PI = [(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)] \times 100\%$。

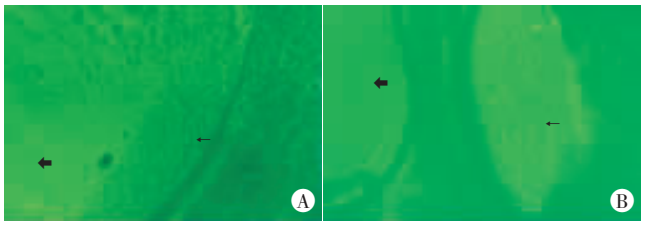
1.4　统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。各频率组间数据采用 Tukey 法进行多重比较。

2　结果

2.1　形态学结果

倒置显微镜下见细胞较均匀地分布于支架孔隙中,约 4 h 后细胞开始“发芽”形成突起,8 h 后细胞伸展良好,凝胶收缩出现裂隙,10 d 时,胶原基质中可见大量具有一定折光性的细胞(图 1)。其中压幅为 10%、频率为 0.5 Hz 的压应力刺激组细胞在凝胶内分布更均匀,密度更高。



A:压幅10%组　支架孔隙见大量有一定折光性的细胞(⬆),呈纤维状;基质中央孔隙可见(↑);B:对照组　支架孔隙中也可见折光性的细胞(⬆)及基质中央孔隙(↑),但细胞密度较低

图1　培育10 d组织工程骨的形态学观察　(倒置显微镜×100)

扫描电镜观察发现10%压缩幅度的压应力刺激作用下培育的组织工程骨(图2A)孔隙表面覆盖大量的细胞,方向一致,分布均匀,细胞密度明显高于对照组(图2B)。而20%压缩幅度的压应力刺激作用下培育的组织工程骨(图2C)孔隙内部仅可见少量的细胞生长,分布较均匀,排列不齐,形态不规则,细胞密度明显低于对照组。

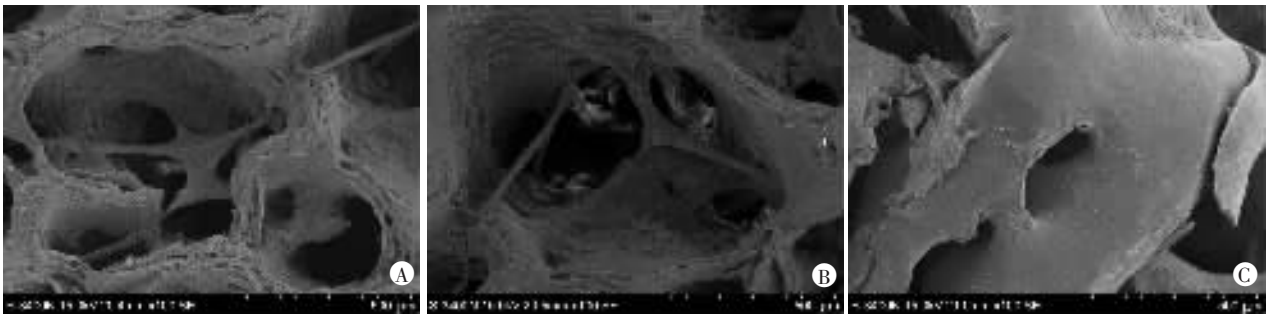
组织切片观察可见10%压缩幅度的压应力刺激作用下培育的组织工程骨(图3A)支架中细胞数量明显多于对照组(图3B),细胞分布更均匀,基质分泌较多。而20%压缩幅度的压应力刺激作用下培育的组织工程骨(图3C)支架材料中仅可见少量的细胞生长,基质分泌少,细胞密度明显低于对照组。

2.2　MTT检测及生长曲线

MTT检测数值见表1,绘制成生长曲线。经统计学分析,各实验组均与对照组有明显差异($P<0.05$),其中压幅分别为2%、5%、10%的实验组均可促进细胞增殖,尤其以压幅为10%组最明显,细胞生长曲线明显前移,生长高峰期延长,峰值升高;而压幅为15%、20%的实验组则抑制细胞增殖,细胞生长曲线后移,生长高峰期缩短,峰值降低。

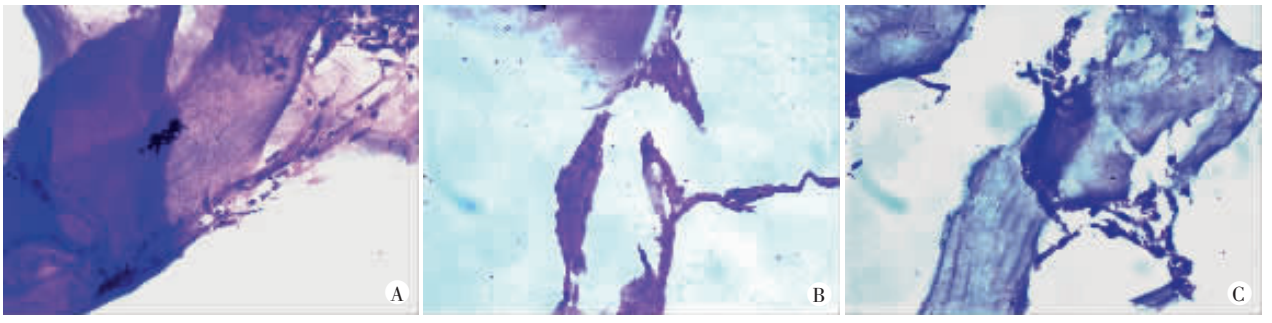
2.3　细胞周期检测

压应力刺激强度不同,细胞周期改变不一,压幅2%、5%、10%组刺激作用后S期细胞百分比提高($P<0.05$),其中压幅10%组S期细胞百分比(27.45±0.25)%较对照组(19.15±0.26)%增高43.34%,高于其他两组。而压幅为15%、20%的实验组S期细胞百分比降低($P<0.05$),这种改变与MTT法测定的结果相吻合。见表2。



A:压幅10%组;B:对照组;C:压幅20%组

图2　培育组织工程骨的扫描电镜观察



A:压幅10%组;B:对照组;C:压幅20%组

图3　培育组织工程骨的组织切片观察　(HE×400)

表1　不同培养时间组织工程骨内hMSC增殖活性的MTT检测结果[$D(490)$,$n=4$,$\bar{x}\pm s$]

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	13 d
对照组	0.093±0.022	0.192±0.036	0.487±0.128	0.516±0.035	0.526±0.072	0.495±0.088
压幅2%组	0.096±0.037	0.201±0.077	0.486±0.092	0.635±0.093[a]	0.608±0.121[a]	0.573±0.111[a]
压幅5%组	0.087±0.029	0.195±0.051	0.568±0.085[a]	0.836±0.090[a]	1.004±0.214[a]	0.915±0.132[a]
压幅10%组	0.095±0.026	0.214±0.063[a]	0.572±0.194[a]	0.944±0.101[a]	1.184±0.122[a]	0.935±0.159[a]
压幅15%组	0.124±0.045	0.187±0.046	0.462±0.076	0.454±0.084[a]	0.441±0.149[a]	0.320±0.067[a]
压幅20%组	0.087±0.027	0.145±0.056[a]	0.392±0.053[a]	0.400±0.066[a]	0.385±0.084[a]	0.274±0.079[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

表 2　流式细胞仪检测细胞周期分布和 PI 值（$n=4$，%，$\bar{x}\pm s$）

组别	G_0+G_1	S	G_2+M	PI 值
对照组	74.34 ± 0.25	19.15 ± 0.26	6.51 ± 0.32	25.66
压幅 2% 组	69.07 ± 0.26[a]	26.09 ± 0.30[a]	4.84 ± 0.28[a]	30.93
压幅 5% 组	65.94 ± 0.30[a]	26.58 ± 0.45[a]	7.48 ± 0.50[a]	34.06
压幅 10% 组	64.57 ± 0.45[a]	27.45 ± 0.25[a]	7.98 ± 0.63[a]	35.43
压幅 15% 组	78.31 ± 0.72[a]	16.44 ± 0.60[a]	5.25 ± 0.45[a]	21.69
压幅 20% 组	82.43 ± 0.32[a]	14.57 ± 0.55[a]	3.4 ± 0.54[a]	17.07

a：$P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

骨组织工程是利用工程学原理和细胞生物学技术在体外构建组织工程骨，成为骨移植的新来源，有望解决临床修复大范围骨缺损的难题。但在体外构建的组织工程骨由于缺少与体内环境相似的仿生构建环境，很难达到临床骨缺损修复的要求，因此组织工程骨体外构建的仿生环境一直是骨组织工程追求的目标，而力学刺激正是构建骨组织工程仿生环境的必备条件之一。各种生物反应器的应用使体外构建一个仿生力学环境成为可能。具有多向分化潜能的 hBMSCs 是当前骨组织工程最重要的种子细胞，担负着增殖、分化成骨和分泌基质的作用[5]。因此研究力学刺激对 hBMSCs 的作用有重要意义。

近年来，许多研究发现适当的流体剪切力、张应力均可促进 hBMSCs 的增殖及分化，并认为应变的幅度对细胞作用有很强的影响[2,3]。同时有研究发现压应力刺激可促进软骨细胞增殖及基质分泌[6]。因此我们推测压应力也能促进 hBMSCs 的增殖及成骨分化，然而压应力刺激的强度不同，是否会对细胞增殖及细胞周期产生不同的影响？在组织工程骨的构建中我们应该选择怎样的合适强度范围？选择适当的参数对促进 hBMSCs 的体外扩增及新型生物反应器的研制有重要意义。

我们通过自制的压应力施加模拟机结合胶原凝胶双相接种技术，实现对 hBMSCs 施加压应力刺激，参考 Campbell 等[7]的报道及相关文献，将压应力刺激的压缩强度分为 2%、5%、10%、15%、20%，研究不同强度压应力刺激对 hBMSCs 体外增殖的作用，以期找出促进 hBMSCs 增殖的适合强度。

本实验结果表明压应力刺激强度的不同，对 hBMSCs 增殖的作用也不同，说明 hBMSCs 对压应力的感受可能存在一定的“域值”，超过这一“域值”则抑制细胞增殖，损伤细胞，这也与其他对流体剪切应力、液压力等力学刺激的研究结果相似[8-10]。通过本实验，我们认为 5% ~10% 压缩幅度的压应力是促进 hBMSCs 增殖的最适强度范围。虽然在正常生理情况下 hBMSCs 很难受到接近 10% 的压缩形变，但作为一个体外实验的模型，本研究结果确立 hBMSCs 在适当范围的压应力的作用下增殖加速，而此项结果与临床上施加动态负荷有助于骨的修复及生长是相互吻合的。同时本研究的结果也表明压缩幅度超过 15% 则对细胞的增殖产生抑制。究其原因可能是因为过大压缩幅度的压应力促进了细胞的凋亡所致。

本实验利用动态压应力刺激来进行组织工程骨的培养，明确压应力压缩强度对 hBMSCs 增殖的影响，以及它们之间的量-效关系，为研制新型生物反应器，模拟仿生环境构建组织工程骨以及进一步研究压应力促进 hBMSCs 增殖的机制提供了重要实验依据。

参考文献：

[1] Sandino C, Planell J A, Lacroix D. A finite element study of mechanical stimuli in scaffolds for bone tissue engineering[J]. J Biomech, 2008, 41(5): 1005 - 1014.

[2] Song G, Ju Y, Soyama H, *et al*. Regulation of cyclic longitudinal mechanical stretch on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Mol Cell Biomech, 2007, 4(4): 201 - 210.

[3] Stiehler M, Bunger C, Baatrup A, *et al*. Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 89(1): 96 - 107.

[4] 吕仁发，周　强，许建中，等. 双相接种法体外构建组织工程骨[J]. 第三军医大学学报，2005，27(16)：1656 - 1659.

[5] 步雪峰，严玉兰，张志坚，等. 骨髓单个核细胞构建细胞化生物组织工程血管支架的研究[J]. 实用临床医药杂志，2008，12(3)：18 - 23.

[6] Knight M M, Toyoda T, Lee D A, *et al*. Mechanical compression and hydrostatic pressure induce reversible changes in actin cytoskeletal organisation in chondrocytes in agarose[J]. J Biomech, 2006, 39(8): 1547 - 1551.

[7] Campbell J J, Lee D A, Bader D L. Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells[J]. Biorheology, 2006, 43(3 - 4): 455 - 470.

[8] Zhao F, Chella R, Ma T. Effects of shear stress on 3-D human mesenchymal stem cell construct development in a perfusion bioreactor system: Experiments and hydrodynamic modeling[J]. Biotechnol Bioeng, 2007, 96(3): 584 - 595.

[9] Sim W Y, Park S W, Park S H, *et al*. A pneumatic micro cell chip for the differentiation of human mesenchymal stem cells under mechanical stimulation[J]. Lab Chip, 2007, 7(12): 1775 - 1782.

[10] Orr D E, Burg K J. Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications[J]. Ann Biomed Eng, 2008, 36(7): 1228 - 1241.

（编辑　吴培红）