DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.009
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0669-04

论著

体外免活性骨组织对同种骨髓基质细胞粘附特性影响的实验研究

周红星,杨 柳,顾祖超,段小军,李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 研究兔活性骨组织在共培养条件下对同种骨髓基质细胞粘附特性的影响。方法 分别应用生理盐水和三蒸水浸泡新鲜兔骨碎粒5 h后与同种骨髓基质细胞共培养作为实验组;未进行共培养的骨髓基质细胞作为对照组。应用体视学计数法观察接种后0.5、1、2、4、8 h各时间点骨髓基质细胞贴壁情况,计量贴壁细胞数,计算出细胞贴壁率。结果 实验组的骨髓基质细胞贴壁率均显著高于对照组($P<0.01$),但三蒸水浸泡的兔活性骨组织共培养的同种骨髓基质细胞的贴壁率最高。结论 活性骨组织在体外具有调节和促进同种骨髓基质细胞粘附特性的作用,用三蒸水浸泡的活性骨组织的作用最强。

关键词:细胞粘附;活性骨组织;骨髓基质细胞;共培养
中图法分类号:R318.08;R322.71 文献标识码:A

Effects of living bone compounds co-cultured on the adhesion characteristics of bone marrow stromal cells

ZHOU Hong-xing, YANG Liu, GU Zu-chao, DUAN Xiao-jun, Li Qi-hong (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of rabbit living bone compounds on adhesion characteristics of homogeneous bone marrow stromal cell in a co-culture system. Methods In experimental group, rabbit fresh living bone compounds, immersed in 0.9% sodium chloride and distilled water for 5 hours, were used for co-culture with homogeneous bone marrow stromal cells. The un-cocultured rabbit bone marrow stromal cells served as the control. The attached cells were calculated by stereological method at hours of 0.5, 1, 2, 4 and 8 after seeding. Results The efficiency of attached cells was significantly higher in the experimental group than that in the control group ($P<0.01$); the efficiency of attached cells cocultured with the living bone compounds treated together with distilled water was the most significant. Conclusion Living bone compounds can have regulatory and accelerating effects on the adhesion characteristics of homogeneous bone marrow stromal cells *in vitro*. The effect of living bone compounds treated with distilled water on bone marrow stromal cells is the most significant. This experiment provides reference for the promotion of seeding cell adhesion on scaffold in the tissue engineering of bone.

Key words: cell adhesion; living bone compounds; bone marrow stromal cells; coculture

随着骨组织工程研究的快速发展,组织工程化活性骨已成为治疗骨缺损最有前程的组织工程成果之一[1]。但在体外构建活性骨的过程中种子细胞与支架材料的粘附仍不理想,从而限制了体外活性骨构建的质量。本实验旨在定量研究兔活性骨组织对同种骨髓基质细胞粘附特性的影响,探索一种调节和促进种子细胞与支架材料粘附的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

日本大耳白兔(第三军医大学实验动物中心提供);酶联免疫仪(HTS 7000, 美国);插入式细胞培养皿(Millipore公司, 美国);倒置显微镜(OLYMPUS-CK2型, 日本);淋巴细胞分离液(天津TBD公司);D-Hanks液、胎牛血清、DMEM/F12(Hyclone公司, 美国);地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素C、乙二胺四乙酸(EDTA)、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶、MTT(Sigma, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 骨髓基质细胞的分离与培养 参照文献[2,3],取3

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100);全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072)
作者简介:周红星(1967-),男,河南省南阳邓州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事骨组织工程中细胞与支架粘附的研究方面的研究。电话:(023)65317146
通信作者:杨 柳 电话:(023)65317146 E-mail:Jointsurgery@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-06-19;修回日期:2003-02-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

~4月龄的健康日本大耳白兔，无菌条件下作股骨髁上骨髓腔穿刺，抽吸双侧股骨骨髓共4 ml，加入到含有等量体积淋巴细胞分离液的离心管中，以2 000 r/min离心20 min，吸取中间乳白色膜状层，漂洗，加入基础培养液，吹打，制成单细胞悬液，红细胞计数板计数，以3×10^5/cm^2接种50 ml培养瓶，48 h首次半量换液，弃去部分悬浮细胞，以后每2~3 d根据培养液颜色全量换液。待细胞长至瓶底90%面积时，用0.25%的胰蛋白酶消化传代，接种密度为1×10^4/cm^2。

1.2.2 新鲜兔骨碎粒的制备及用生理盐水和三蒸水处理的方法 通过耳缘静脉注射空气的方法处死3月龄日本大耳白兔，75%酒精消毒后无菌条件下取其四肢骨，Hank's液洗涤后用剪刀剪成3 mm×3 mm×3 mm大小的骨碎粒，称取两份，每份湿重100 g，分别放入盛有100 ml生理盐水和盛有100 ml三蒸水的烧杯中浸泡5 h，然后将其分别均分后置入6孔培养板中加入含10%胎牛血清的培养基备用。

1.2.3 实验分组 分别与生理盐水和三蒸水浸泡的兔骨碎粒进行共培养的同种骨髓基质细胞作为实验组，未进行共培养的兔骨髓基质细胞作为对照组。

1.2.4 共培养方法 当传2代细胞长满90%瓶底时倒去培养瓶内的培养基，加入0.25%胰蛋白酶(含0.01%EDTA)1 ml漂洗后迅速倒掉，再加入同样的消化液2 ml置于37 ℃、5%CO_2及饱和湿度条件下孵育5 min，倒置显微镜下见有大量的细胞变形且脱离瓶壁，此时加入含10%胎牛血清的培养基终止消化，小心吹打制成单细胞悬液，1 000 r/min离心5 min，弃上清；制成1×10^4个细胞/200 μl的单细胞悬液，接种插入式细胞培养皿(直径10 mm，底部微孔直径0.4 μm)，每孔接种200 μl；把接种细胞的插入式细胞培养皿置入含有碎骨粒的6孔培养皿中进行共培养。

1.2.5 观察与检测

1.2.5.1 倒置显微镜观察 倒置显微镜下观察原代与传代培养的兔骨髓基质细胞的形态。

1.2.5.2 生长曲线的测定 MTT法测兔传3代骨髓基质细胞的生长曲线：当传2代细胞长满90%瓶底时，消化细胞并制成0.2×10^4个细胞/200 μl，接种10块96孔培养板，每板接种6孔并同时设空白对照；每天取1块培养板，在接种细胞孔和空白对照孔内加入20 μl MTT(5 mg/ml)溶液，置入37 ℃、5% CO_2及饱和湿度条件下孵育4 h后取出，弃除培养基，每孔内加入二甲亚砜150 μl轻摇10 min，使结晶完全溶解，酶联免疫仪上(492 nm)测每孔的吸光度(A_{492})，连续测10 d，以时间为横坐标、A_{492}值为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.5.3 兔骨髓基质细胞粘附特性的检测 体视学计数法计算细胞贴壁率：设0.5、1、2、4、8 h共5个时相点，每个时相点设6孔。分别于相应时间点取出插入式细胞培养板，置入含0.1 mol/L PBS液的6孔培养板中清洗3次，4%多聚甲醛固定。显微镜下采用体视学计数的方法，计算孔内粘附细胞数目。每组计数5个区域，计算出平均值，并用%表示贴壁率。

$$骨髓基质细胞的贴壁率(\%)=\frac{贴壁细胞数}{接种细胞数}\times 100\%$$

1.3 统计学处理

应用SPSS 10.0统计软件对数据进行multivariate分析。

2 结果

2.1 兔骨髓基质细胞的形态学特性

兔骨髓基质细胞原代培养时细胞贴壁较慢，一般48 h后从骨髓中分离提取的单个核细胞开始贴壁伸展变形，单个排列，呈纺锤状、短棒状；以后逐渐伸展呈成纤维细胞样外观。培养至第7天时，可见细胞集落形成，细胞围绕中心呈旋涡状排列，见图1；当培养至第14天时，细胞已大部融合，长满瓶底，细胞呈长梭形(成纤维细胞样外观)，有的细胞呈交叉重叠生长，见图2；传代细胞贴壁较快，接种细胞后30 min细胞开始变形贴壁，细胞伸展较快呈成纤维细胞样外观，细胞增殖快，按1×10^4/cm^2的密度接种50 ml培养瓶，4~5 d可以长满瓶底，见图3。MTT法测传3代细胞的生长曲线，见图4。这种细胞在有地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素C存在的条件下继续培养可出现钙结节，见图5。且骨钙素免疫组化染色呈阳性反应，见图6。说明这种细胞具有干细胞特性。且与多数学者描述的骨髓基质细胞原代及传代培养的生长特征一致[4,5]。骨髓基质细胞的成骨诱导将在另文说明。

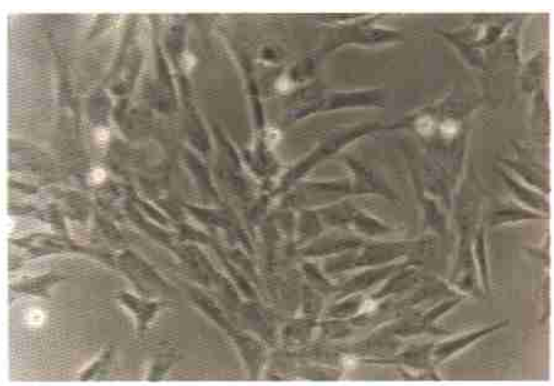


图1 原代培养第7天，倒置显微镜下可见细胞岛形成，细胞围绕中心呈旋涡状排列 (×100)

Fig 1 Formation of cell islets at the 7th day after primary culture, vortical arrangement of cells around the center under an inverted microscope (×100)



图2 原代培养第14天，倒置显微镜下见细胞融合，交叉重叠生长，成纤维细胞样外观 (×100)

Fig 2 Cell fusion, crossing and overlapping growth with fibroblast-like appearance at the 14th day after primary culture under an inverted microscope (×100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 3　传一代培养第 5 天, 倒置显微镜下见细胞呈成纤维细胞样外观并融合　(× 100)

Fig 3　Cells with fibroblast appearance and confluence at the 5th day after culture of 1 passage under an inverted microscope　(× 100)

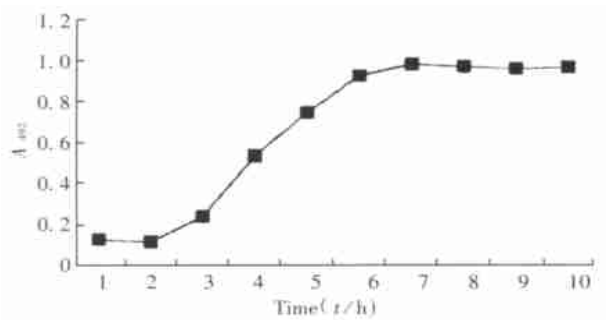


图 4　MTT法测传三代兔骨髓基质细胞的生长曲线

Fig 4　The growth curve of the rabbit bone marrow stromal cells after culture of 3 passages by MTT method

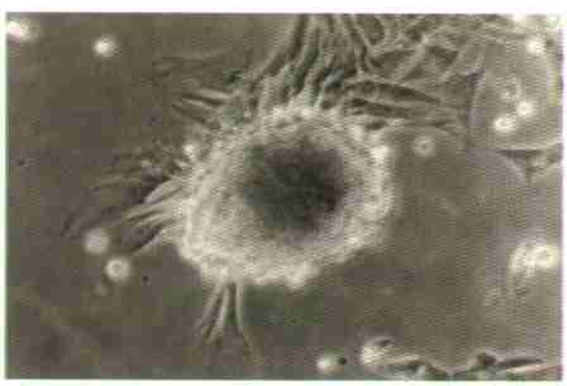


图 5　成骨诱导 10 d 的骨髓基质细胞倒置显微镜下见形成细胞岛, 岛中央细胞坏死、钙化, 细胞被 ECM 包埋, 透光性下降　(× 100)

Fig 5　Formation of cell islets of BMCs induced at the 10th day, cellular necrosis and calcification at the center of the islet, cells surrounded by the extracellular matrix with low transparency under an inverted microscope　(× 100)



图 6　成骨诱导 10 d 的骨髓基质细胞, 骨钙素免疫组化染色呈强阳性反应　(ABC× 100)

Fig 6　BMCs induced at the 7th day, strongly positive by osteocalcin immunohistochemical staining　(ABC× 100)

2.2　不同共培养方法对兔骨髓基质细胞粘附特性的影响

研究结果显示, 与用生理盐水浸泡的兔骨碎粒共培养的同种骨髓基质细胞贴壁率显著高于对照组($P<0.01$), 而与用三蒸水浸泡的兔骨碎粒共培养的骨髓基质细胞的贴壁率最高, 对照组的兔骨髓基质细胞的贴壁率最低, 见表 1。

表 1　不同方法共培养、不同时间兔骨髓基质细胞的贴壁率定量观测($n=3$, %, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Quantitative observation of the attachment efficiency of rabbit bone marrow stromal cells by different co-culture methods at different time points($n=3$, %, $\bar{x}\pm s$)

	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
Bone tissue immesed					
in distilled water	5.73±0.29*	13.02±0.54*#	32.4±0.51*#	51.62±0.54*#	73.43±0.61*#
in saline	5.61±0.34*	11.55±0.49*	30.25±0.39*	48.17±0.43*	70.55±0.45*
Control	5.02±0.27	9.27±0.45	25.57±0.41	45.83±0.29	67.54±0.46

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* bone tissue immersed in saline

3　讨论

种子细胞与支架材料的粘附直接影响体外活性骨构建的质量。无论是在体外还是在体内, 最先直接与组织细胞接触并发生作用的是材料的表面, 因此细胞黏附到材料表面相当重要, 且粘附特性的差异也将会影响细胞的增殖、分化等一系列反应[6]。因此探索提高种子细胞粘附率的方法是目前骨组织工程研究中迫切需要解决的问题。

种子细胞在材料表面的粘附是细胞膜上的整合素受体与吸附于材料上的粘附蛋白发生作用的结果。几

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

种骨基质蛋白如:纤维连接素、层粘连蛋白、玻璃体结合蛋白、Ⅰ型胶原、骨钙素、骨桥蛋白、骨连接素、碱性成纤维细胞生长因子等都已被证明具有促细胞粘附的作用,这些蛋白中均含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列(RGD)。这一序列被称作粘附序列,当它被细胞膜表面的整合素受体特异识别后激活细胞内的细胞骨架蛋白、蛋白酶、蛋白激酶、磷酸酶和信号传导系统,促使细胞发生一系列的生理生化反应,铺展而粘附于材料上[7]。目前对种子细胞粘附特性影响的研究大都集中在两个方向:不同化学成分的支架材料对细胞粘附特性产生的影响;支架材料不同表面形态、粗糙度对种子细胞粘附行为产生的影响以及一些蛋白质和多肽因子对种子细胞粘附特性的影响,这些方法均欠理想。

插入式细胞培养皿底面是一个微孔直径0.4 μm的薄膜,只许营养物质自由通过,而细胞则不能通过,从骨基质中溢出的因子能作用于细胞,这样就达到共培养的目的。

正常骨组织本身含有多种细胞,将单一细胞分离提纯后可能会因失去正常的细胞间作用而影响其粘附与增殖等生物学特性,因此我们设想应用同种活骨组织与骨髓基质细胞共培养的方法来提高其粘附性。结果发现,经过与用生理盐水浸泡的兔活骨组织共培养的同种骨髓基质细胞的贴壁率显著高于对照组($P<0.01$),而与用三蒸水浸泡的兔活性骨组织共培养的同种骨髓基质细胞的贴壁率最高。这种现象的机制目前还不清楚。可能是因为骨基质中的促细胞粘附因子优先作用于自身基质中的细胞,从骨基质中逸出的促细胞粘附因子或含粘附序列的肽段较少,而经过三蒸水浸泡的活性骨组织,其自身细胞处于低渗状态中,细胞因水肿变性而失活,至于用三蒸水浸泡活骨组织后,活骨组织中的细胞失活达到何种程度,我们将继续深入研究。经过这种方法处理的活性骨组织中有活性的细胞数量减少,因而从骨基质中逸出的促细胞粘附因子或含粘附序列的肽段较多。它们作用于骨髓基质细胞,更多的与骨髓基质细胞膜表面的β1整合素受体结合[8],激活细胞内的细胞骨架蛋白、蛋白酶、蛋白激酶、磷酸酶和信号传导系统,促使细胞发生一系列的生理生化反应;从而提高骨髓基质细胞的粘附能力,使其贴壁率增高。目前国内外学者们已把骨髓基质细胞作为骨组织工程中的种子细胞[9],因此本实验可能为解决骨组织工程中种子细胞与支架材料粘附的问题建立一个技术平台。但这还需要在以后的工作中进一步研究。

参考文献:

[1] Khan S N, Bostrom M P, Lane J M. Bone growth factors[J]. Orthop Clin North AM, 2000, 31(3): 375-388.

[2] Howlett C R, Cave J, Williamson M, *et al*. Mineralization in *in vitro* cultures of rabbit marrow stromal cells[J]. Clin Orthop, 1986, (213): 251-263.

[3] 段小军, 杨 柳, 石宗利, 等. 新型组织工程化人工骨的体外初步构建[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 553-555.

[4] Maniatopoulous C, Sodaek J, Melcher A H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats[J]. Cell Tissue Res, 1988, 254(2): 317-330.

[5] Locklin R M, Williamson M C, Beresford J N, *et al*. *In vitro* effects of growth factors and dexamethasone on rat marrow stromal cells[J]. Clin Orthop, 1995, 313(4): 27-35.

[6] Ikada Y. Surface modification of polymers for medical application[J]. Biomaterials, 1994, 15(10): 725-736.

[7] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials[J]. Biomaterials, 2000, 21(7): 667-681.

[8] 郑 磊, 王 前, 魏宽海 等. 碱性成纤维细胞生长因子对成骨细胞粘附特性影响的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(5): 305-307.

[9] Deschamps A A, Claase M B, Sleijster W J, *et al*. Design of segmented poly(ether ester) materials and structures for the tissue engineering of bone [J]. J Control Release, 2002, 78(1-3): 175-186.

(编辑 张 宁)

(上接668页)

性增殖性单发或多发性结节病变,未侵及粘膜而区别于癌肿;③侵及周围粘膜时表现为糜烂,多发性溃疡及巨大皱壁;④PMLGT的溃疡表现为地图状、树枝状。(4)活检取材要多方位并在同一部位重复取样直到粘膜下。(5)经常规检查仍诊断不明应尽早剖腹探查。(6)对怀疑本病但光镜检查不能确诊者,应行免疫组化及电镜检查以与未分化癌、假性淋巴瘤、溃疡及炎症相区别。

2.3 PMLGT的治疗

尽管对PMLGT的治疗意见尚不一致,但目前学术界仍推崇手术治疗为首选[4],术后辅以化疗或放疗的综合性治疗。

关键词:胃肠道;恶性淋巴瘤
中图法分类号:R730.264;R735 文献标识码:B

参考文献:

[1] 丁 缤. 撩开误诊的面纱[M]. 北京:长征出版社, 1999. 135.

[2] Dawson I P M, Comes J S, Morson B C. Primary malignant lymphoid tumors of the intestinal tract[J]. Br J Surg, 1961, 49: 80.

[3] 张雅洁, 孙 渝, 绵贯勤. 胃肠道原发B细胞性淋巴瘤的病理学特征及播散机制[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2001, 8(1): 3-6.

[4] 傅诚强. 原发性肠道恶性淋巴瘤[J]. 国外医学外科学分册, 1995, 22(6): 338-340.

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net