DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.005
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0509-04

论著

人间充质干细胞体外成骨诱导培养及其生物学特性变化

杨 柳[1],段小军[1],戴 刚[2],唐康来[1],谭祖键[1],周 强[1],李起鸿[1] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[2]北京军区总医院骨科,北京 100700)

提 要:目的 确定人间充质干细胞(MSC_S)体外扩增培养、向成骨细胞表型转化的方法,了解其生物学特性变化。方法 分离人骨髓细胞,按不同种植密度、首次换液时间进行原代培养,对传代培养细胞用化学药物或生长因子进行成骨诱导培养,并检测成骨细胞表型、生长曲线、贴壁率。结果 人MSC_S原代培养种植细胞密度为$1\times10^5\sim3\times10^5/cm^2$,48 h后半量换液,以后每3 d全量换液的方法较合理。经化学药物(如地塞米松、β-甘油磷酸、维生素C)或生长因子(rh-BMP_2、BMP_5)作用后,MSC_S表达碱性磷酸酶、Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原和骨钙素,细胞增殖速度减慢,贴壁率略降低。未诱导MSC_S形成细胞团后,可自动分化表达碱性磷酸酶活性。结论 合理的人MSC_S培养方法及可靠的诱导条件,可为体外构建组织工程化骨提供自体种子细胞。

关键词:间充质干细胞;细胞培养;成骨细胞;组织工程
中图法分类号:R322.71;R329.2 文献标识码:A

Induce differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts and their biological characteristics *in vitro*

YANG Liu, DUAN Xiao-jun, DAI Gang, TANG Kang-lai, TAN Zu-jian, ZHOU Qiang, LI Qi-hong (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a method of inducing human mesenchymal stem cells(MSC_S) *in vitro* differentiate into osteoblasts, and investigate biological characteristics of the differentiated cells. Methods The mononuclear cells fraction of the marrow was enriched by using density centrifuge and then cultured in different conditions. The passaged cells were cultured to differentiation with aid of some chemical drugs or special growth factors. Then morphology, phenotypes, growth curves, adhesive rate of the differentiated cells were studied. Results Though our study, the most optimal culture condition for MSC_S was $(10\sim30)\times10^4/cm^2$ in primary cell density, changing half of medium after 48 h and all every 3 d. With some chemicals (Dexamethasone, β-Glycerphosphoric sodium, Vitamin C) or growth factors (rh-BMP2, BMP_5), MSC_S showed the expressions of alkaline phosphatase, collagen Ⅰ, and collagen Ⅲ. Osteocalcin and localized regions of mineralization were found too in the cells. Conclusion Under certain culture condition and inducement of some chemicals or growth factors, human MSC_S are able to differentiate into osteoblasts, which provides autogenous seeding cells for *in vitro* construction of tissue engineered bone.

Key words: mesenchymal stem cells; cell culture; osteoblasts; tissue engineering

间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSC_S)存在于人类、鸟类、啮齿类等生物的骨髓中,它具有向骨、软骨、脂肪、肌肉及肌腱等组织分化的潜能[1]。既往研究发现MSC_S具有增殖较快,体外培养、体内植入均具有较强的成骨能力,而成为目前骨组织工程中重要的种子细胞[2]。本实验旨在确定简单易行的人MSC_S体外培养,及向成骨细胞表型转化的方法,并了解其诱导前后的生物学特性变化,从而为体外构建组织工程化骨提供自体种子细胞,为临床应用该技术创造条件。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39980100);全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072);重庆市科技攻关基金资助重点项目(2000-08-55)
作者简介:杨 柳(1963-),男,山西省稷山县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事关节外科临床研究、骨与软骨组织工程学基础研究,已发表相关论文9篇。电话:(023)65317146,E-mail:jointsurgery@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

1 材料与方法

1.1 材料

淋巴细胞分离液(华美生物工程公司),DMEM培养基、RPMI1640培养基、优等胎牛血清(Hyclone公司,美国),地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素C、胰蛋白酶、EDTA(Sigma公司,美国),rh-BMP_2(百灵克公司),兔抗人Ⅰ型胶原抗体、兔抗人Ⅲ型胶原抗体、DAB显色试剂盒(博士德公司),兔抗人骨钙素抗体(东亚公司),二步法免疫组化检测试剂盒(中山公司),四甲基偶氮唑蓝MTT、二甲基亚砜(Amresco公司,美国),酶联免疫检测仪(DG3022A型,华东电子管厂)。

1.2 方法

1.2.1 人MSC_S的原代培养 参照文献[3],无菌条件下,从健康40岁男性志愿者髂后上棘处用骨穿针穿刺,用内含1 ml肝素钠生理盐水(1 200 U/ml)的20 ml注射器抽出骨髓9 ml,去针头后注入含10 ml DMEM培养基的培养瓶中,混匀后带入实验室。将细胞悬液沿管壁缓慢加入含20 ml淋巴细胞分离液的离心管中,进行梯度离心(2 000 r/min×20 min),然后缓慢吸取中间交界面细胞悬液至另一离心管,用15 ml DMEM培养基洗涤1次(1 500 r/min×5 min),加入DMEM完全培养基(含10%

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

胎牛血清、青霉素钠 100 U/ml、链霉素 100 U/ml)，吹打计数。①分别以 1× 10^6/ cm^2、3× 10^5/ cm^2、1× 10^5/ cm^2、3× 10^4/ cm^2、1× 10^4/ cm^2 的密度接种于 30 cm^2 玻璃培养瓶(5 组，4 瓶/ 组)，48 h 首次半量换液，以后每 3 d 全量换液；②以 1× 10^5/ cm^2 接种于 30 cm^2 玻璃培养瓶(4 组，4 瓶/ 组)，首次半量换液时间分别为 1、2、4、6 d，以后每 3 d 全量换液；首次换出液加 3 ml DMEM 完全培养基置于另外培养瓶中培养。孵箱内培养条件：37 ℃、5% CO_2 的空气、饱和湿度。

1.2.2 人 MSC_S 的传代培养 待细胞长至瓶底 90% 面积时，进行消化传代。吸出培养液，D-Hank 液洗涤 2 次，加入 3 ml 0.25% 胰蛋白酶+0.01% EDTA，消化 3～5 min，加入 3 ml 含血清培养液，离心后去上清液，加入 DMEM 完全培养基吹打计数，以 1× 10^4/ cm^2 的密度传代培养。

1.2.3 人 MSC_S 向成骨细胞表型诱导培养 将第 3 代细胞以 5× 10^3/ cm^2 的密度接种至 4 个 24 孔板和 8 个培养瓶中(均内含预处理的小玻片)，48 h 后全量换液，分为 4 组进行下面实验。①化学药物的作用：用含地塞米松(10^{-8} mol/ L)、β-甘油磷酸钠(10 mmol/ L)、维生素 C(50 mg/ L)的 RPMI1640 完全培养液，每 2～3d 换液。②rh-BMP_2 的作用：用含 rh-BMP_2(100 ng/ L)的 RPMI1640 完全培养液，每 2～3 d 换液。③天然 BMP_S 的作用：参照文献[4]，将提取的牛 BMP_S 初提物 2 mg 研成粉状，置于 100 ml RPMI1640 培养液中，磁力搅拌 8 h，过滤除菌，将此溶液用 RPMI1640 稀释 5 倍后，配成含 10% 胎牛血清的培养液。用此培养液每 2～3d 换液。④空白对照：用 RPMI1640 完全培养液，每 2～3 d 换液。

1.2.4 人 MSC_S 诱导前后的检测 ①倒置显微镜观察。②HE 染色：95% 酒精固定 15 min，常规染色封片。③细胞碱性磷酸酶(ALP)染色：95% 酒精固定 15 min，采用钙钴法(Gomori 法)染色，阳性细胞呈棕色。④Ⅰ型、Ⅲ型胶原、骨钙素的免疫组化染色：4% 多聚甲醛固定 30 min，按二步法试剂盒说明书操作，阳性细胞的胞质呈棕色。⑤钙结节的染色：取出培养瓶中小玻片用 4% 多聚甲醛固定 15 min，采用 Von Kossa 法染色，阳性部位呈黑色。

1.2.5 诱导培养对生长曲线、贴壁率的影响 将第 3 代细胞以 5× 10^3/ cm^2 的密度接种后，分为试验组和对照组。试验组用条件培养液(含 RPMI1640 完全培养基、地塞米松 10^{-8} mol/ L、β-甘油磷酸钠 10 mmol/ L、维生素 C50 mg/ L)，对照组继续用 DMEM 完全培养基。细胞长满瓶底后消化，进行下面实验：①分别调整细胞密度为 2× 10^4/ ml，接种 9 块 96 孔培养板，2 组/ 板，6 孔/ 组，150 μl/ 孔。每 3d 换液，试验组用条件培养液，对照组用 DMEM 完全培养基。参照文献[5]，每 24 h 取出 1 板，用 MTT 比色实验测生长曲线。以时间为横坐标，6 孔吸光度的平均值为纵坐标，绘制生长曲线。②取底面积 12 cm^2 的培养瓶，试验组与对照组各 12 个，接种细胞 4× 10^5/ 瓶。每 2h 取出 1 瓶，吸出培养液，胰酶消化，计数贴壁细胞，计算每个时间点的贴壁率(贴壁率= 已贴壁细胞总数/接种细胞数× 100%)。以时间为横坐标，贴壁率为纵坐标，绘制曲线。

1.2.6 统计学方法 应用 SPSS 医用统计软件包，采用独立样本 t 检验。进行数据统计学处理。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察

原代培养：24 h 有个别细胞贴壁，稍微变形，48 h 有极少数细胞贴壁呈成纤维样细胞改变，主要为长条索状，少数为多角形，以后细胞呈克隆样生长。血细胞因不贴壁而随换液逐渐清除。传代培养：2 h 细胞开始贴壁变形，呈条索状，24 h 完成贴壁，7～8 d 长满瓶底，可收获 1.5× 10^6/ 30 cm^2，若继续培养则某些局部细胞可复层生长成团。原代培养时间：接种密度 1× 10^6/ cm^2 组为 13.0±0.8 d，3× 10^5/ cm^2 组为 12.7±0.9 d，1× 10^5/ cm^2 组为 13.2±0.5 d。3× 10^4/ cm^2 组 28 d 时仍不能传代，1× 10^4/ cm^2 组仅有 1 瓶有细胞贴壁生长，28 d 时仍不能传代，其余培养瓶无细胞贴壁生长。前 3 组均数统计学分析，t 检验，P > 0.05，说明原代培养种植密度为 1× 10^6/ cm^2、3× 10^5/ cm^2、1× 10^5/ cm^2 时培养天数无统计学差异。首次换液为 1 d 的细胞组生长缓慢，原代培养> 20 d，为 2、4、6 d 的细胞组生长良好。对接种 96 h 后首次换出的培养液继续培养，发现仍有细胞可贴壁呈成纤维样细胞改变。

2.2 HE 染色

人 MSC_S 呈条索状、多角形，有长的突足，细胞核较大，核仁明显。诱导后多角形细胞明显增加。

2.3 ALP 染色

未诱导的细胞成团生长处染色阳性，其余部分阴性；细胞经 3 种方法诱导后，ALP 染色阳性细胞数> 50%，见图 1。

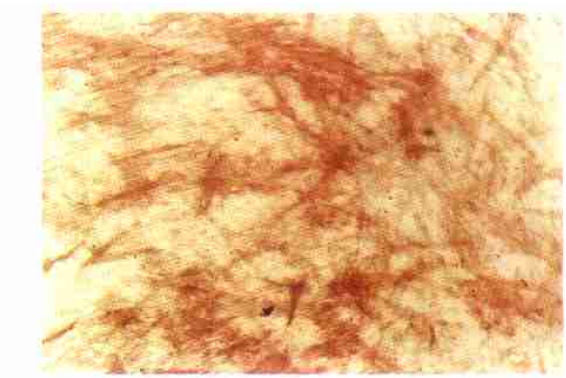


图 1 诱导后人 MSC_S ALP 染色 (Gomori× 100)

Fig 1 Induced human MSCS showing alkaline phosphatase expression (Gomori× 100)

2.4 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、骨钙素的免疫组化染色

未诱导的细胞染色阴性；细胞经 3 种方法诱导后，Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、骨钙素免疫组化染色阳性，见图 2、图 3。

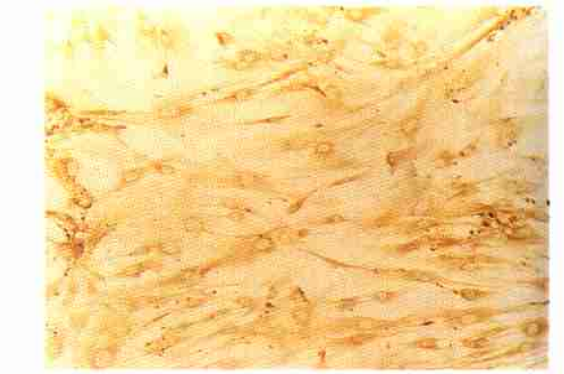


图 2 诱导后人 MSC_S Ⅰ型胶原的免疫组化染色 (S-P× 100)

Fig 2 Induced human MSCs showing collagen Ⅰ expression (S-P× 100)

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



图 3　诱导后人 MSC_S 骨钙素的免疫组化染色　(S-P× 100)

Fig 3　Induced human MSCs showing osteocalcin expression　(S-P× 100)

2.5　钙结节的染色

细胞长满瓶底后, 局部复层生长, 可呈结节状, 同时有些区域细胞却较稀疏。在地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素 C 等作用下形成的结节有阳性染色区, 其余培养方法中形成的结节染色为阴性, 见图 4。

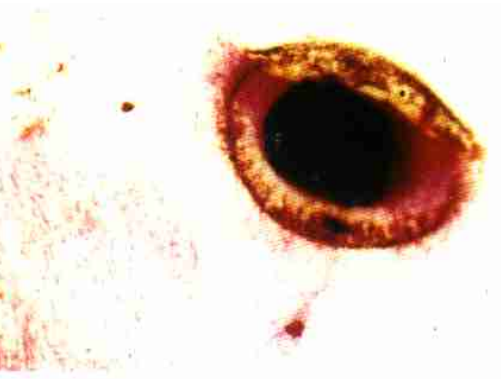


图 4　诱导后 MSC_S 形成的钙结节　(Von Kossa× 100)

Fig 4　Induced human MSCs showing calcium nodules　(Von Kossa× 100)

2.6　生长曲线

根据公式[5] $T_D = t \times \log 2 \times (\log N_t - \log N_o)^{-1}$ 得出人 MSC_S 倍增时间 36 h, 成骨诱导后倍增时间 41 h, 生长曲线见图 5。

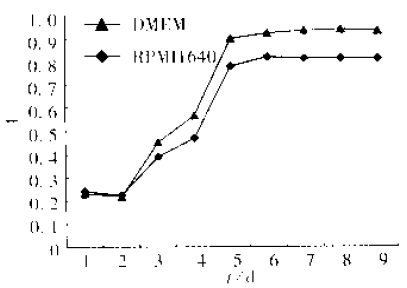


图 5　2 组细胞的生长曲线

Fig 5　Growth curves of 2 groups of cells in different culture media

2.7　贴壁率

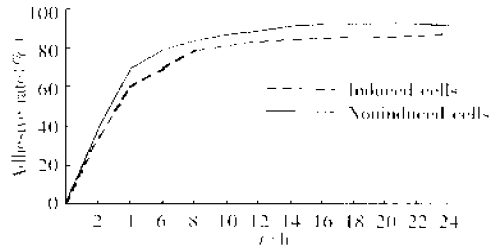


图 6　2 组细胞的贴壁率

Fig 6　Adhesive rate of 2 groups of cells

3　讨论

骨组织工程学的理想种子细胞应具备: 取材容易, 对机体损伤小; 体外培养时增殖力强、易稳定表达成骨细胞表型; 植入体内后能继续产生成骨活动; 无致瘤性等特点[6]。近年来研究结果表明: MSCs 是多潜能干细胞, 可存在于骨髓、脂肪中[7], 它能增殖成非分化的细胞并具有分化成多种中胚层组织细胞的潜能, 与性能优越的支架材料复合培养, 再植入骨缺损处, 能产生明显的促修复作用[8]。在目前异体细胞移植免疫未根本解决之前, 可从病人髂骨穿刺获得 MSC_S, 作为自体种子细胞构建组织工程化骨应用于临床。

我们对人 MSC_S 原代培养的部分条件进行研究发现, 种植细胞密度较高时由于红细胞、白细胞比重大于 MSC_S 而首先沉积于瓶底, 细胞密度高时细胞代谢废物和死亡细胞亦明显增加, 从而严重影响 MSC_S 贴壁生长。原代培养 MSCs 的贴壁过程较长, 细胞分离后应尽快接种, 早期尽量不要晃动培养瓶。原代培养接种密度为 $1\times 10^5 \sim 3\times 10^5/cm^2$, 48h 后半量换液, 以后每 3 d 全量换液的方法较合理。未诱导的 MSC_S 不表达Ⅰ、Ⅱ型胶原或骨钙素, 经化学药物作用(如地塞米松、β-甘油磷酸、维生素 C)或生长因子(rh-BMP_2、BMP_S)作用后, MSCs 表达Ⅰ、Ⅱ型胶原和骨钙素, 具有成骨细胞表型。培养中 MSC_S 形成细胞团时可不经外界诱导, 而部分细胞自动分化表达碱性磷酸酶活性。诱导的成骨细胞表型细胞在地塞米松、β-甘油磷酸、维生素 C 存在时, 可在细胞聚积成团处形成钙化结节。

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为紫色结晶物, 二甲基亚砜能溶解此结晶物, 用酶联仪在 490 nm 波长处测定其吸收值, 可间接反映活细胞数量与功能[5]。本实验生长曲线反映出: ①细胞诱导后增殖速度将减慢; ②细胞诱导后生长饱和密度将下降。细胞诱导前后均有较高的贴壁率, 接种 4 h 后超过 60%的细胞贴壁, 12 h 基本完成, 以后贴壁率仅略增加; MSCs 经成骨诱导后, 贴壁率稍有下降。

我们相信在解决几个重要问题后, 骨组织工程学

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

技术会很快进入临床应用阶段。它们包括:①细胞与性能优越的支架材料复合三维培养;②人工骨体内植入后的营养供给;③人工骨的体内改建研究。总之,骨组织工程学拓展了现代医学研究领域,将改变对骨疾病和创伤的治疗观念,具有提高病人生存质量、延长寿命等重大意义。

参考文献:

[1] 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.
[2] 李 静,曹宜林,崔 磊. 骨组织工程学研究进展及展望[J]. 国外医学:骨科学分册, 2001, 22(1): 5—9.
[3] Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, *et al*. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC_S) and stromal cells[J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57—66.
[4] Mizutani H, Urist M R. The nature of bone morphogenetic protein (BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatin[J]. Clin Orthop, 1982, 171(11): 213—223.
[5] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版西安公司, 1996. 186—187.
[6] 杨 柳,段小军. 骨组织工程学中种子细胞研究的前沿问题[J]. 中国临床康复, 2002, 6(4): 532—533.
[7] Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, *et al*. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell—based therapies[J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211—228.
[8] Bruder S P, Kraus K H, Goldberg V M, *et al*. The effect of implants loaded witi autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects[J]. J Bone Joint Surg, 1998, 80(7): 985—996.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2002)05-0512-01

膝关节成形术病人围手术期的护理

Perioperative nursing for the patients undergoing total knee arthroplasty

尹芝华,刘春玲,吴新军 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

膝关节成形术是使用人工假体置换病变的股骨髁和胫骨平台,主要用于治疗全膝关节病变,如:严重骨性关节炎、类风湿性关节炎、关节疼痛或强直等疾病。它能有效解除膝部疼痛,增加关节活动度,矫正畸形,提高患者生活质量。

1 临床资料

2000年6月至2001年4月,我科共施行膝关节成形术11例13膝,其中,男7例,女4例,双膝2例。年龄63~79岁,膝关节严重退行性骨关节炎8例,类风湿性关节炎3例。查体:行走均有跛行,膝关节疼痛难忍,患膝外翻畸形,严重影响工作及生活。X线提示患膝关节面严重破坏,关节间隙变窄。

治疗:该手术在持续硬膜外麻醉或腰麻下进行,手术方式以半限制型假体表面置换为主。

2 结果

11例患者13膝,术后无1例出现患肢明显肿胀及感染,膝关节疼痛消除,关节功能恢复良好,畸形完全矫正。经短期随访,膝关节屈曲活动达110~135°不等,行走步态恢复良好。

3 围手术期护理

3.1 术前护理

3.1.1 术前准备 术区可或不备皮[1],但应重视术区清洁,还需注意全身其它部位有无感染灶:如口腔感染、皮肤疖肿、脓痰、手足癣等,如有则需治愈后方可考虑手术。由于人体表面存在大量细菌,术前必须清洁、洗澡,减少暂驻细菌,清除长驻细菌,以降低切口感染率[1]。若备皮应注意保护皮肤完整性,以保证手术的如期进行。常规完善肝肾功、血常规、凝血功能、心电图及胸透等检查。术前日合血、皮试等。

3.1.2 术前功能锻炼 为使膝关节置换后具有良好的关节稳定性和负重、伸屈功能,患者入院后即予讲解功能锻炼的重要性及锻炼方法,以此争取患者的积极配合。并与患者、家属共同制定康复目标与计划。训练病人掌握功能锻炼的方法及注意事项:(1)股四头肌的锻炼方法:患者平卧或坐位,足尖朝上绷紧腿部肌肉,直腿抬高,足跟距床面20 cm。(2)膝关节的锻炼方法:①平卧,膝关节主、被动活动屈曲,或借助肢体关节功能锻炼器(如CPM机)进行患肢被动屈曲训练。②坐于床缘,两膝下垂,双足悬空。似"钟摆"来回摆动膝关节。

3.2 术后护理

3.2.1 一般护理 术后切口用消毒敷料弹力绷带加压包扎后松开止血带(松紧以能插入一指为宜)。患肢予抬高20~30°,严密观察肢端血循环、动度及感觉情况及伤口有无渗出。保持伤口敷料干燥,若有渗出应及时更换。

3.2.2 引流管护理 术后感染是关节置换术的严重并发症,将直接影响手术成败。据报道全膝关节置换术的感染率约1%~2%[2]。我们采用术后关节腔放置引流管,8~12h后首次开放持续负压引流,24~48 h后拔除。该方法与传统的比较:它避免了早期开放负压引流可能增加关节腔的积血积液,而且如有积血积液,又利用其对关节腔形成的压力,达到自然压迫止血的目的;后期(8~12 h)又彻底地持续负压引流,使切口部

(下转515页)

作者简介:尹芝华(1970—),女,湖南省邵东县人,主管护师,主要从事骨科护理方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)65318301-73076

收稿日期:2001-10-15;修回日期:2002-03-15

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