DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.012
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)05-0527-04

论著

兔骨髓基质细胞在诱导条件下的成骨特性

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

提 要:目的 观察兔骨髓基质细胞的生长特点及诱导条件下的成骨能力。方法 使用密度梯度离心分离兔骨髓基质细胞进行培养,保留贴壁细胞传代,观察在培养液中添加地塞米松、维生素C、β-甘油磷酸钠条件下骨髓基质细胞生长及成骨分化情况。结果 骨髓基质细胞呈成纤维细胞样表现,增殖能力强。诱导条件下第2代细胞的碱性磷酸酶活性明显增高,10~12 d达到最高峰,并且出现矿化结节。结论 使用本实验方法,获得的骨髓基质细胞成骨能力肯定,增殖能力强,可作为骨组织工程的种子细胞。

关键词:骨髓基质细胞;地塞米松;成骨诱导;成骨分化
中图法分类号:R329.24;R336 文献标识码:A

Osteogenic property of cultured rabbit marrow stromal cells under condition of bone induction

GU Zu-chao, LI Qi-hong, ZHAO Yu-feng, ZHOU Hong-xing, ZHOU Qiang (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the growth and osteogenic property of cultured rabbit marrow stromal cells (MSCs). Methods Marrow stromal cells were obtained by using gradient centrifuge method. The adhesive cells were preserved to passage culture. MSCs were cultured in a conditional medium in subculture including dexamethasone, vitamin C, and β-glycerophosphate, then the proliferation capability and osteogenic property were investigated. Results The adhesive MSCs were spindle-shaped and had strong capability of proliferation. The mineral nodules were observed 10—12 d later under osteogenic condition. Alkaline phosphatase (ALP) activity of MSCs at passage 2 were increased significantly, and reached a peak value in 10—12 d. Conclusion The MSCs obtained in our experiment have a strong activity of proliferation and osteogenic capacity. This study reveals that the MSCs can be used as the seed cells in the bone tissue engineering.

Key words: marrow stromal cells; dexamethasone; osteogenic induction; osteogenic differentiation

种子细胞的选择与培养是骨组织工程中最根本的环节,目前种子细胞的来源有松质骨、骨膜、骨髓及骨外组织[1],许多研究发现骨髓来源的种子细胞最具有优势。骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, MSCs)是来源于骨髓基质的一种间充质细胞,具有多向分化潜能,在一定的诱导下可向成骨细胞分化。本实验通过对兔骨髓基质细胞的培养与诱导,以期建立一种骨髓基质细胞培养及定向诱导的可行方法,为下一步组织工程人工骨的构建提供种子细胞。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

DMEM/F12培养基、胎牛血清(Hyclone,美国),地塞米松、维生素C、β-甘油磷酸钠、MTT(Sigma,美国),淋巴细胞分离液(上海试剂二厂),碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物制品公司),相差显微镜(Nikon,日本),Bio-rad 450型酶联免疫检测仪(美国)。

1.2 MSCs的原代培养

3~4月龄的健康日本大耳白兔(第三军医大学实验动物中心提供),体重为2.0~2.5 kg,雌雄不限。3%戊巴比妥钠1 ml/kg耳缘静脉注射麻醉,无菌条件下用16号骨穿针于股骨髁上作骨髓腔穿刺,抽吸双侧股骨骨髓共4 ml,缓慢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,吸取中间乳白色云雾状有核细胞层,D-Hanks液漂洗,1 500 r/min离心6 min,弃上清,加入基础培养液(含10%胎牛血清,100 U/ml青霉素及100 μg/ml链霉素),反复吹打制成单细胞悬液,以3×10^5个细胞/cm^2接种培养瓶,置37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内孵育,4 d后首次全量换液,弃去大量的悬浮细胞,以后每2~3 d根据培养液颜色换液。待细胞长满单层后,用0.25%的胰蛋白酶消化传代,接种密度为1×10^4/cm^2。

1.3 MSCs的诱导培养

取刚接种的第2代细胞,诱导培养液(含10%胎牛血清、地塞米松10^{-8} mol/L、维生素C 50 μg/ml、β-甘油磷酸钠10 mmol/L)培养,置37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内孵育。

1.4 MSCs生长与增殖测定

第2代细胞以1×10^3/孔密度接种于96孔培养板,分别加入基础培养基和诱导培养基,置入37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内孵育。于第1~8天每天用MTT法分析骨髓基质细胞的存活和增殖能力,选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值,绘制细胞生长曲线。并根据公式计算倍增时间(Td):$Td=\frac{Ig2}{IgNt-IgNo}$,其中t代表培养时间,No和Nt分别代表接种后和培养t小时后的细胞数[2]。

1.5 ALP活性检测

第2代细胞以1×10^3/孔密度接种于96孔培养板,分别加

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100)
作者简介:顾祖超(1970—),男,四川省郫县人,博士研究生,主治医师,主要从事骨科临床及组织工程研究。电话:(023)68754000-73076
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

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

入基础培养基和诱导培养基，置37 ℃、5%CO_2、饱和湿度孵箱内孵育，分别于第2、4、6、8、10、12、14天收集细胞，调整细胞浓度至10×10^4/ml，取1 ml，1 000 r/min离心10 min，弃上清，加入1 ml 2%Triton X—100，4 ℃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OD值，计算出ALP活性，以U/L表示，并绘制ALP活性曲线。

1.6 统计学处理

实验所得数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS10.0统计软件，采用t检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 MSCs的原代培养

接种后MSCs在培养瓶底散在分布，呈圆形，胞体透亮，折光性好，细胞核呈卵圆形，与周围的红细胞和白细胞相互混杂。1~2 d后一部分细胞开始贴壁，细胞形态逐渐变成短梭形，形态与成纤维细胞类似，有少量细胞突起，细胞核较大，扁圆形。3 d后换液倒去大部分悬浮细胞，散在的贴壁细胞形态绝大部分为梭形，形态均一，其间有极个别的扇形和圆形的细胞。5~6 d细胞形成集落状，见图1，由10~20个细胞组成，形态为长梭形及多角形，此后细胞集落迅速增多，并且集落中的细胞明显增多，并融合成片，融合成片的细胞排列有一定的方向性，呈旋涡状排列，细胞基本上是长梭形的成纤维样细胞形态，见图2，此时扇形细胞和圆形细胞已基本消失，悬浮细胞随反复换液基本消失。12~14 d细胞长成单层，随培养时间的延长，细胞形成多层生长，并不发生接触抑制。



图1 MSCs原代培养形成成纤维细胞样集落单位 (×100)

Fig 1 Primary cultures of MSCs with appearance of fibroblast colony-forming units (×100)

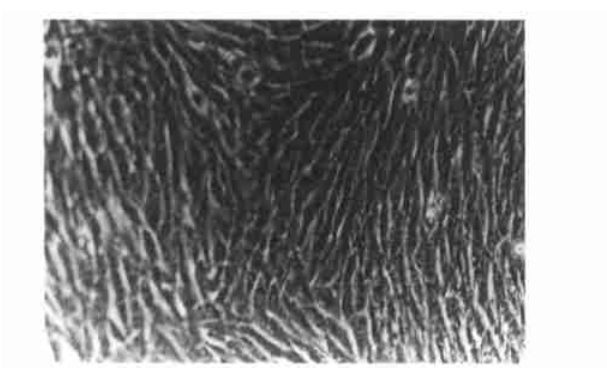


图2 MSCs原代培养形成旋涡状排列 (×100)

Fig 2 Primary cultures of MSCs in gyrate order (×100)

2.2 MSCs的传代培养

刚经传代的细胞为圆形，折光性好，接种后2~4 h细胞迅速贴壁、伸展，重新恢复梭形，10 h左右活细胞基本完成贴壁，细胞呈均匀生长，不再形成集落样生长，细胞形态更加单一，5~6 d细胞即可铺满瓶底，细胞排列仍有规则的方向性。连续培养14 d未见明显的钙化结节形成。

2.3 MSCs的诱导培养

贴壁细胞加入诱导培养基后，生长相对减缓，6~7 d长满单层，细胞为梭形和多角形，随培养时间延长，细胞呈多层生长，没有接触抑制，细胞形态逐渐变为多角形和方形，细胞外基质分泌增多，并包裹细胞，10~12 d形成明显的钙化结节，见图3。

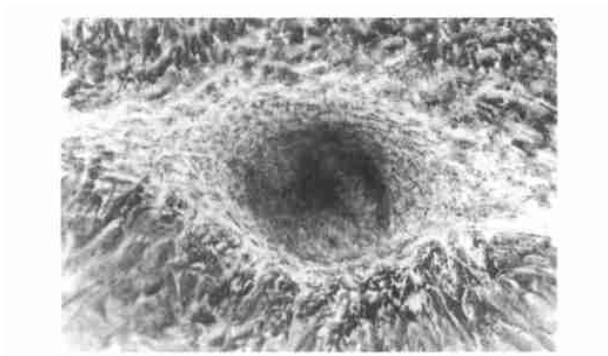


图3 第2代MSCs诱导后12 d出现矿化结节 (×100)

Fig 3 Mineral nodule in second passaged MSCs on the 12th day cultured with dexamethasone (×100)

2.4 MSCs和诱导细胞的生长曲线

两种细胞的第2代生长曲线见图4，第1、2天细胞数量无明显增加，第3天开始细胞数量明显增加，MSCs在第6天达到最高峰，诱导细胞在第7天达到最高峰。统计学上两者的增殖能力没有显著差异($P>0.05$)。MSCs的倍增时间为33.6 h，诱导细胞为34.6 h，两者没有显著差异($P>0.05$)。

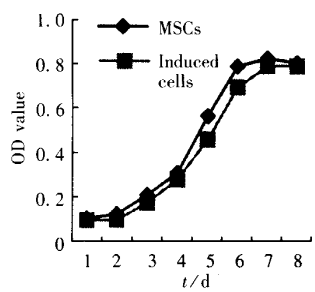


图4 MSCs及诱导细胞第2代生长曲线(MTT)

Fig 4 Growth curves of second passaged non-induced MSCs and induced MSCs (MTT)

2.5 地塞米松对MSCs分化的作用

地塞米松诱导后MSCs的ALP活性明显增高，见表1，图5，诱导后4 d即可见到ALP水平显著增高($P<0.01$)，随诱导时间的延长，ALP活性增高更明显，10~12 d达到最高峰，14 d时略有下降，仍高于对照水平($P<0.01$)。

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

表 1　MSCs 和诱导细胞在不同时间的 ALP 活性(U/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Alkaline phosphatase activity of second passaged non-induced MSCs and induced MSCs at different time points(U/L, $\bar{x}\pm s$)

	2days	4days	6days	8days	10days	12days	14days
MSC	11.5±0.62	14.1±0.32	15.58±0.68	16.85±0.62	18.25±0.31	18.43±0.51	18.10±0.67
Induced cells	11.85±0.76	19.3±0.67*	25.05±0.66*	31.08±0.49*	33.45±0.64*	34.0±0.39*	33.1±0.50*

*: $P<0.01$ *vs* MSC, $n=4$

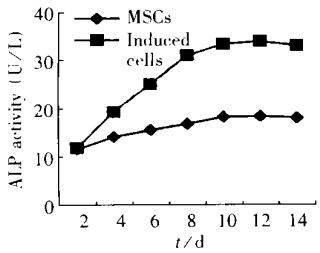


图 5　MSCs 和诱导细胞在不同时间的 ALP 活性(U/L)

Fig 5　Alkaline phosphatase activity of second passaged non-induced MSCs and induced MSCs at different time points(U/L)

3　讨论

Friedenstein[3] 及其合作者首先发现并证实骨髓中除了包含有造血干细胞外, 还存在一类可向成骨细胞、成纤维细胞、软骨细胞、脂肪细胞、网织细胞、内皮细胞和神经元等分化的细胞[4,5]。人们把这类细胞定名为骨髓基质细胞(Marrow stromal cells, MSCs)。由于MSCs的含量极低, 约占骨髓有核细胞的 0.001%~0.01%, 直接应用 MSCs 来修复组织缺损效果不佳, 因此有必要将 MSCs 进行体外大量扩增和诱导分化。

3.1　MSCs 的分离培养

MSCs 包括大量的血系细胞和少量的基质细胞, 要应用其中的基质细胞, 就必须将它从血系细胞中分离出来。目前常用的 MSCs 分离方法主要有 3 种: 贴壁分离筛选、密度梯度离心和流式细胞仪分离。我们采用密度为 1.077 的淋巴细胞分离液来分离 MSCs, 经过梯度离心后, 可以将绝大部分红细胞、脂肪细胞和血小板去除, 获得纯度较高的单个核细胞, 培养 1~2 d 即可见到细胞贴壁, 培养瓶内仍含有悬浮的造血细胞, 经过多次换液后即可去除悬浮细胞, 原代培养早期贴壁细胞中可见到一些圆形和扇形的细胞, 在原代培养末期这些细胞基本消失, 获得均一性较好的 MSCs。Cheng 等[6] 认为这些圆形和扇形的细胞可能是混杂的单核细胞及破骨前体细胞, 由于这些细胞在生长时需要 1, 25-$(OH)_2VitD_3$ 或集落刺激因子的作用, 因此在培养过程中将逐步消失。本方法改善了贴壁分离筛选法红细胞占据 MSCs 贴壁空间、减少基质细胞贴壁的缺点。流式细胞仪分离实验条件要求高, 需要的骨髓量大, 然而从一个部位每次抽取骨髓的量不应超过 2 ml, 否则将因吸出物中血量的增加而引起有核细胞数明显减少[7]。最近 Lisignoli[8] 的研究发现, 密度梯度离心的方法能增加 MSCs 分化成为成骨细胞克隆的数量。因而我们认为密度梯度离心分离方法是分离 MSCs 比较理想的一种方法。

3.2　MSCs 及地塞米松诱导细胞的生物学性状

传代的 MSCs 细胞贴壁非常迅速, 大部分细胞 2~4 h 即可贴壁, 具有很强的环境适应能力及较高的接种成活率, 传代细胞在接种 1~2 d 后迅速进入指数生长期, 6 d 左右达到生长的顶点, 传代细胞的倍增时间为 33.6 h。诱导细胞的生长曲线与未诱导细胞的生长曲线基本相似, 在 7 d 左右即可达到生长的顶点, 诱导细胞的倍增时间为 34.6 h, 两者统计学上没有显著的差异($P>0.05$)。魏宽海等[9] 的报道指出, 地塞米松浓度增大促进 MSCs 成骨分化的同时, 可抑制基质细胞的增殖。在本实验使用的浓度下, 地塞米松对 MSCs 的增殖作用没有明显的影响, 在将 MSCs 向成骨细胞诱导的同时, 不影响细胞的增殖, 可迅速大量地获得细胞, 为骨组织工程提供大量的种子细胞。

3.3　MSCs 的成骨分化

本实验采用 Kadiyala 等[10] 描述的成骨诱导方法, 即用地塞米松、维生素 C 和 β-甘油磷酸钠联合诱导。实验发现, 在传代的 MSCs 中加入诱导因素, 6~7 d 长满单层, 细胞为梭形和多角形, 逐渐形成多层生长, 没有接触抑制, 高密度区的细胞形态逐渐变为多角形和方形, 形态向成骨细胞方向转化, 细胞外基质分泌增多, 并包裹细胞, 10~12 d 形成明显的钙化结节。而未诱导组的 MSC 细胞形态仍为梭形, 重叠生长, 连续培养 10~12 d 未见到明显的钙化结节形成。ALP 活性检测发现诱导因素可显著地增加 ALP 的活性, 诱导后 4 d 即可观察到 ALP 活性增高, 并且 ALP 活性随诱导时间的延长而升高, 在 10~12 d 达到最高峰, 14 d 时 ALP 活性略有下降, 这可能是由于诱导细胞已经形成钙化所致。未诱导组细胞的 ALP 活性仍维持在较低的水平。ALP 是成熟成骨细胞的标志性酶之一, 在体外钙化过程中起关键性作用, 这主要是 ALP 能水解有机磷酸酶, 使局部磷酸根浓度增高, 而且可破坏钙化抑制剂, 从而启动钙化[11]。

本实验观察到在诱导细胞形成复层生长后, 细胞形态逐渐变为多角形和方形, 细胞外基质分泌增多, 并包裹细胞, 然后形成明显的钙化结节, 说明地塞米松促进 MSCs 向成骨细胞分化早期以促进基质合成为主, 后期则以促进钙化为主[12]。由于维生素 C 是体外培养细胞合成胶原的必须物质, 并且能调节 ATP 酶和 ALP 的活性及蛋白合成, β-甘油磷酸钠可为成骨细胞的功能活动提供磷离子, 作为 ALP 的底物, 因此在培养是加入维生素 C 和 β-甘油磷酸钠能加速 MSCs 向成骨细胞分化和钙化结节的形成[13]。

本实验的研究表明, 兔骨髓基质细胞在体外培养条件下增殖能力非常强, 而且成骨能力肯定, 因此非常

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

适合作骨组织工程的种子细胞。

参考文献：

[1] 李 静. 骨组织工程学研究进展及展望[J]. 国外医学：骨科学分册, 2001, 2(1): 5—9.
[2] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司, 1996. 136—137.
[3] Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Gersimov U V, *et al*. Bone marrow osteogenic stem cells in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. Cell Tissue Kinet, 1987, 20(3): 263—272.
[4] Bruder S P, Fox B S. Tissue engineering of bone: cell based strategies[J]. Clin Orthop, 1999, 366(Suppl): 68—83.
[5] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5 411): 143—147.
[6] Cheng S L, Yang J W, Rifas L, *et al*. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone[J]. Endocrinology, 1994, 134(1): 277—286.
[7] Mudchler G F, Boehm C, Easley K, *et al*. Aspiration to obtain osteoblast progenytor cells from human bone marrow: the influnce of aspiration volume [J]. J Bone Joint Surg (Am), 1997, 79(11): 1 699—1 709.
[8] Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, *et al*. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure[J]. Connect Tissue Res, 2001, 42(1): 49—58.
[9] 魏宽海, 裴国献, 郑 磊. 地塞米松对体外培养的骨髓基质细胞成骨特性的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(4): 232—234.
[10] Kadiyala S, Young R G, Thiede M A. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and in vitro[J]. Cell Transplant, 1997, 6(2): 125—134.
[11] 刘 侠, 乐以伦. 碱性磷酸酶与钙化[J]. 中国生物医学工程学报, 1997, 16(1): 71—82.
[12] Cheng S L, Zhang S F, Avioli L V, *et al*. Expression of bone matrix protein during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells[J]. J Cell Biochem, 1996, 61(2): 182—193.
[13] Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher A H, *et al*. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats[J]. Tissue Res, 1998, 254(2): 317—330.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)05-0530-01

XH-2 型超高频美容仪治疗老年疣 156 例

Treatment of 156 keratosis seborrhoeica with Type XH-2 ultra-high frequence beauty device

徐晓霞 （第三军医大学附属新桥医院整形美容科，重庆 400037）

1 临床资料

156 例均为门诊老年疣病人，男 57 例，女 99 例，年龄 40～70 岁，病程最短 3 个月，最长 30 年，其中面部最多，偶有一处病损部，多为多发散在分布，疣斑多是黄褐或淡褐色，约高出皮面，大小在 1 mm 至 1 cm 或数厘米之间。术前局部用 75%酒精常规消毒，再使用涂抹或喷洒表面局部麻醉药，3～10 min 后进行治疗。选择刀式电针，调节输出功率 50～70 W，控制输出强度 2～3 档。电针与皮肤垂直 90 度，对准病损部位刮出，术中注意保护正常组织，操作手法轻巧、精细准确，把病损部全部刮出。尽量避免出血或局部渗血，术毕创面无须包扎，用抗生素软膏涂抹创面，术后口服抗生素防止感染。一般在术后 1～3 d 创面有局部轻微肿胀，疼痛，少数人有少量渗出，不用特殊处理。术后 3～7 d 结痂后，局部瘙痒，应防止搔抓，以免影响创面愈合。术后 10～14 d 结痂应自然脱落，禁止强行剥脱。创面愈合前应避免水浸。在彻底脱痂以后的 1～3 月，创面处于恢复休整时期，此期口服维生素 C、维生素 E。避免阳光直接照射，以免增加色素沉着。本组 156 例，痊愈 148 例，复发 8 例行 2 次刮出后彻底痊愈。治疗后随访观察 148 例病人一期愈合。8 例病人治疗时，因创面损伤较宽过深，局部感染等原因，恢复期稍延长，所有病人愈合后看不出疤痕增生及凹陷，色素期过后，手术部位与正常皮肤色泽一致，效果满意。

2 讨论

老年疣是中老年常见的良性皮肤肿瘤，是一种皮肤老化现象，好发于皮脂溢出部分及日晒处，初期为粟粒大褐色扁平丘疹，逐渐增大呈疣状、似邮票状，触之有油腻感，表皮稍有光泽，底部呈圆、椭圆或不规则形，边界清楚，数目不定，一般无自觉症状。传统的治疗方法有：锐匙刮除、切除、冷冻、药物腐蚀等，但传统的治疗方法均存在术后疤痕，治疗不彻底，愈合时间长等问题。而 XH-2 型超高频美容仪的优点是：①成本较低，疗效较好；②该机是采用对人体无副作用的超高频电流，产生超高热气化，直接即刻去除老年疣病变组织时，创面无碳化坏死组织存留，易于分辨病变组织；③该机即刻产生的精细分层完全气化，精细程度每层可达微米深度，功率输出可灵活调节，对病变组织的大小、深浅、易于掌握，能精细快速地的气化清除[1]；④直观下刮出术可一次性清出干净。创面组织无活动性出血，损伤小愈合快。因而只要能正确掌握操作技巧，熟知病损结构、深度范围及术后防治感染，就能取得很好的治疗效果，具有推广价值。

关键词：美容；疣；治疗
中图法分类号：R752.505 文献标识码：B

参考文献：

[1] 赵新华, 陈 辉, 张 辉. XH-超高频皮肤整形手术仪的临床应用[J]. 中国美容医学杂志, 2000, 9(6): 422.

（编辑 张大春）

作者简介：徐晓霞(1966—)，女，湖北省天门市人，主管技师，主要从事美容整形方面的研究，发表论文 6 篇。电话：(023)68755114-74647

收稿日期：2002-03-15；修回日期：2002-04-24

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