DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.015
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
534 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0534-03

骨形态发生蛋白对人骨髓基质细胞的体外成骨分化影响

段小军[1],杨 柳[1],王铁翔[2],谭祖键[1] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[2]解放军第206医院外二科,吉林 134001)

提 要:目的 提取牛骨形态发生蛋白,并观察其对人骨髓基质细胞的体外成骨分化作用,为将骨形态发生蛋白与骨髓基质细胞用于进一步的骨缺损修复研究提供实验依据。方法 从小牛骨中提取骨形态发生蛋白,配制条件培养液,并作用于培养状态的人骨髓基质细胞,染色检测细胞碱性磷酸酶、Ⅰ型胶原表达情况,放免法测定培养液中骨钙素含量。结果 人骨髓基质细胞经诱导培养后,碱性磷酸酶、Ⅰ型胶原、骨钙素表达明显增加。结论 体外培养时,天然骨形态发生蛋白可促进人骨髓基质细胞的成骨分化。

关键词:骨形态发生蛋白;骨髓基质细胞;细胞培养;成骨分化
中图法分类号:R329.2;R341;R394-33 文献标识码:A

Effects of bone morphogenetic proteins on differentiation of human marrow stromal cells into osteoblasts *in vitro*

DUAN Xiao-jun, YANG Liu, WANG Tie-xiang, TAN Zu-jian (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of bone morphogenetic proteins (BMPs) on the differentiation of human marrow stromal cells (MSCs) into osteoblasts *in vitro* for experimental basis of MSCs in bone defect reparation. Methods BMPs were extracted from one-year-old bovine bone and then dissolved into RPMI1640 medium. Human MSCs were cultured with the prepared special medium, and then stained for alkaline phosphatase (ALP) and type Ⅰ collagen, measured for the amount of osteocalcin in the culture medium. Results After human MSCs were cultured with the prepared medium, the expressions of ALP and type Ⅰ collagen and the amount of osteocalcin were increased greatly. Conclusion Natural BMPs can promote human MSCs differentiated into osteoblasts *in vitro*.

Key words: bone morphogenetic proteins; marrow stromal cells; cell culture; osteogenic differentiation

1965年Urist[1]发现脱钙骨基质具有异位诱导成骨作用,后分离出有效成分为骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs),经多年实验研究从而建立了诱导成骨理论,为骨创伤修复愈合奠定了全新的理论和实践基础。本实验旨在观察天然BMPs对体外培养骨髓基质细胞(Marrow stromal cells, MSCs)向成骨系细胞分化的影响,为BMPs、MSCs应用于骨缺损、骨不连的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

甲醇、氯仿、盐酸、氯化钙、氯化锂(北京试剂公司),RPMI1640培养基、胎牛血清(Hyclone公司,美国),苯甲基磺酰氟、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(Sigma公司,美国),兔抗人Ⅰ型胶原抗体、DAB显色试剂盒(博士德公司),二步法免疫组化检测试剂盒(中山公司),骨钙素试剂盒(东亚公司),γ射线计数仪XH-6020型(西安国营262厂)。

基金项目:重庆市重点科技攻关基金资助项目(2000-08-55)。
作者简介:段小军(1972-),男,四川省渠县人,硕士研究生,医师,主要从事骨组织工程学方面的研究。电话:(023)68754000-73076
通信作者:杨 柳,E-mail:jointsurgery@mail.tmmu.com.cn,电话:(023)65317146
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

1.2 方法

1.2.1 牛骨BMPs的提取 参照文献[2],取新杀1岁左右小牛长管状骨皮质部分5 kg,粉碎成2 mm³以下骨粒。1∶1甲醇/氯仿脱脂,盐酸脱钙,氯化钙、乙二胺四乙酸、氯化锂脱蛋白制成骨基质明胶。然后在其中加入尿素、氯化钙、苯甲基磺酰氟抽提,将抽提液透析,后于4 ℃,18 000 r/min离心30 min,收集沉淀,再溶解于尿素、氯化钙、苯甲基磺酰氟中,3 500 r/min离心30 min,弃沉淀,上清液透析,产生乳白色絮状沉淀。于4 ℃,18 000 r/min离心30 min,收集沉淀,置冷冻干燥机中冻干,得灰褐色BMPs粗提物1.11 g。环氧乙烷消毒,-20 ℃保存备用。

1.2.2 BMPs生物活性鉴定 取BMPs粗提物3mg植入昆明小鼠右后肢肌袋内,左后肢肌袋内植入相同体积的提取BMPs后所剩余残渣作为对照。术后10、20 d各处死2只,取植入物及周围组织行病理学检查(HE染色)。

1.2.3 BMPs对MSCs体外成骨分化作用的影响 (1)MSCs体外培养:参考文献[3],无菌条件下,从健康志愿者髂后上棘处用骨穿针穿刺,用内含肝素钠生理盐水(1 200 U/ml)的注射器抽出骨髓,注入含RPMI1640完全培养基(含10%胎牛血清、青霉素钠100 U/ml、链霉素100 U/ml)的培养瓶中,混匀后带入实验室。将细胞悬液在培养孵箱内静置2 h,然后缓慢吸取中上层细胞悬液至离心管中,加入RPMI1640培养液后离心(1 500 r/min×5 min),去上清液后加入RPMI1640完全培养基,吹打计数。以2×10⁵/cm²的密度接种于30 cm²培养瓶,48 h首次半量换液,以后每3 d全量换液,见图1。孵箱内培养条件:37 ℃、5%CO_2的空气、饱和湿度。(2)条件培养液的制备:将BMPs研

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

成粉末, 取 2 mg 置于 100 ml RPMI1640 培养液中, 4 ℃, 磁力搅拌 12 h, 使其达到饱和浓度, 过滤除菌, 用 RPMI1640 培养液做 1∶10 稀释后, 按 10%比例加入胎牛血清, 配成条件培养液。(3)BMP_S 对体外培养的 MSC_S 作用: 待原代细胞基本长满瓶底时, D-Hank 液洗涤 2 次, 3 ml 0.25%胰酶+0.01%EDTA 消化, 用 RPMI1640 完全培养基终止反应, 离心(1500 r/min× 5 min)后加入培养液, 吹打计数, 以 $3\times 10^3/cm^2$ 的密度接种 3 块 12 孔板, 其中 2 块培养板内含预处理的小玻片, 用于染色检测。24 h 全部换液, 每块培养板设试验组和对照组, 试验组用条件培养液, 对照组用 RPMI1640 完全培养基, 2 ml/孔, 每 2~3 d 换液。(4)检测: 待细胞长满板底时, 进行检测。①倒置显微镜观察: 观察细胞形态、数量等。②细胞碱性磷酸酶(ALP)染色: I 培养板中小玻片经 PBS 液漂洗, 95%酒精固定 15 min, 采用钙钴法(Gomori 氏法)染色, 阳性细胞呈棕色, 见图 2。随机计数 8 个高倍视野阳性细胞数。③Ⅰ型胶原的免疫组化染色: II 培养板中小玻片经 PBS 液漂洗, 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。随机计数 8 个高倍视野阳性细胞数。④骨钙素的含量测定: 收集II培养板中最后一次 48 h 培养液, 用放免法测定每孔骨钙素含量, 具体步骤见试剂盒说明书。⑤统计学方法: 应用 SPSS 医用统计软件包进行独立样本 t 检验处理。

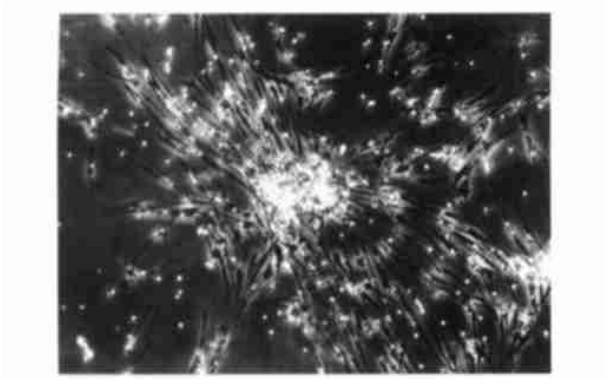


图 1　原代培养 6 d 时人 MSC_S (× 100)

Fig 1　Primary cultured human MSCS on the 4th day (× 200)

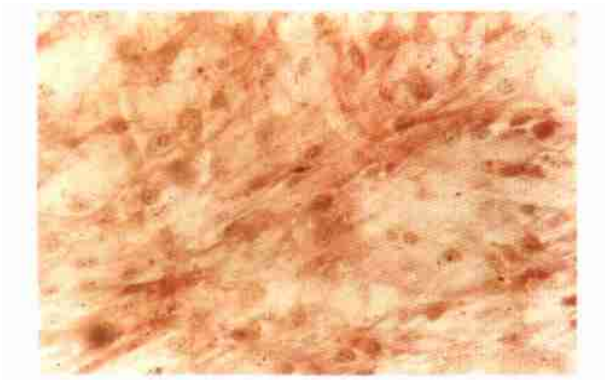


图 2　人 MSC_S ALP 染色试验组 (Gomori× 200)

Fig 2　Alkaline phosphatase expression in induced human MSCS (Gomori× 200)

2　结果

BMP_S 植入后 10 d 可见软骨细胞团形成, 20 d 可见编织骨形成, 诱导成骨率 4/4。对照组仅有少量炎性细胞浸润, 未见软骨细胞、成骨细胞, 诱导成骨率 0/4。

2.1　倒置显微镜观察

原代培养: 48 h 有极少数细胞贴壁呈成纤维样细胞改变, 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。贴壁细胞多呈条索状, 少数呈多角形, 个别呈不规则形, 有长的细胞突起, 胞核明显, 甚至可见 1~2 个核仁。培养 12~14 d 长满瓶底。传代培养 MSC_S 经诱导后, 多角形、不规则形细胞增多, 体积变大, 含较多胞浆颗粒, 见图 1。

2.2　ALP 染色

未诱导的 MSC_S 阳性数 20%, 呈弱阳性; 细胞经诱导后, 阳性细胞数达 40%~60%, 呈强阳性, 见图 2。

2.3　Ⅰ型胶原的免疫组化染色

未诱导的细胞染色阴性; 细胞经诱导后, Ⅰ型胶原免疫组化染色阳性数 40%~50%, 细胞浆呈浅棕色。

2.4　骨钙素含量测定结果

见表 1。

表 1　两组的骨钙素含量测定(ng/ml)

Tab 1　Amounts of osteocalcin at different time points (ng/ml)

	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}\pm s$
BMP_S	6.79	6.50	6.68	4.91	6.13	9.82	6.805±1.628 *
Control	1.83	1.77	1.79	1.89	1.64	2.53	1.908±0.316

*: $P<0.01$ *vs* control

3　讨论

骨缺损、骨不连的传统治疗多采用自体骨移植, 存在移植物来源有限、增加供区并发症等缺陷。为了提高医疗技术, 改善生存质量, 找出一种科学的、合理的、并发症较少的新技术势在必行。为此组织工程学给人们带来了希望, 应用组织工程学技术, 可在体外构建人工骨, 再植入体内修复骨缺损。这一新技术的优点有移植物具生物活性、来源广泛、可预制成形、抗原性低、避免了异位取骨的并发症等。这种技术的核心包括生长因子和种子细胞等多方面的研究与应用。

自从 1965 年 Urist 对 BMP_S 研究至今, BMP_S 被证明是一类能在啮齿类动物体内的非骨骼位置诱导骨组织形成的低分子量的多肽物质, 属疏水性糖蛋白, 酸性环境稳定, 中性蛋白酶可破坏其活性。由于 BMP_S 不溶于水, 植入体内后释放较重组 BMP 慢, 且生物诱导活性更高, 因此目前天然 BMP_S 的应用价值并不比重组 BMP 低。1986 年 Urist 等[4] 首先将 50 mg BMP_S 植入病人指骨内生软骨瘤刮除后残腔内, 残腔很快有新骨形成并愈合。1988 年 Johnson[5] 将 BMP_S 与明胶或聚乳酸复合, 植入病灶, 治愈 12 例难治性股骨骨不连。

近年来对骨组织工程的种子细胞深入研究发现: MSC_S 取材容易, 对机体损伤小; 体外培养时增殖力强、可诱导稳定表达成骨细胞表型; 植入体内后能继续产生成骨活动等特点[6]。Petite 等[7] 将羊的骨髓基质细胞、骨髓与支架材料复合后, 植入羊跖骨骨缺损处, 发现骨髓基质细胞组植入后成骨能力明显优于植入单纯的支架材料和骨髓组。

既往研究已经发现骨缺损治疗中 BMP_S 是有效的

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

生长因子，MSCs是较佳的种子细胞，那么将两者联合应用骨缺损的治疗是否可行？我们通过此实验，发现适宜浓度BMPs存在时MSCs仍可良好的增殖代谢；而且在体外培养时，天然BMPs可促使MSCs的ALP、Ⅰ型胶原、骨钙素表达明显增加，即明显的促成骨分化作用。这可能是因为MSCs中有较多的未分化细胞，BMPs与该细胞膜表面特异的膜受体结合，通过信号转导途径，激活细胞相应基因表达可以促进成骨作用的蛋白。本实验为同时应用BMPs、MSCs来增强骨缺损修复能力提供了实验基础。对这方面的不断深入研究，使我们相信骨组织工程学技术不久便会进入临床应用阶段，造福于广大患者。

参考文献：

[1] Urist M R. Bone formation by autoinduction[J]. Science, 1965, 150(698): 893—899.
[2] 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.
[3] Peter S J, Lu L, Kim D J, *et al*. Marrow stromal osteoblast function on a poly (propylene fumarate)/β-tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite[J]. Biomaterials, 2000, 21(12): 1 207—1 213.
[4] Urist M R, Kovacs S, Yates K A. Regeneration of an enchondroma defect under the influence of an implant of human bone morphogenetic protein [J]. J Hand Surg (Am), 1986, 11(3): 417—419.
[5] Johnson E E, Urist M R, Finerman G A. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions: a preliminary report[J]. Clin Orthop, 1988, 230(5): 257—265.
[6] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue [J]. Science, 1997, 276(4): 71—74.
[7] Petite H, Viateau V, Bensaid W, *et al*. Tissue—engineered bone regeneration[J]. Nat Biotech, 2000, 18(9): 959—963.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)05-0536-02

肝胆手术患者健康教育需求调查分析

Investigation on need of health education for patients undergoing hepatobitiary surgery

张 坤 （解放军第47医院急诊科，新都 610500）

随着医学模式的转变，整体护理的开展，健康教育已成为一种治疗手段被应用于临床[1]。为了解肝胆手术患者的健康教育需求，实施针对性的护理，作者于2001年3至6月对200例肝胆手术患者进行了健康教育需求调查。

1 对象与方法

调查对象200例，男112例，女88例，年龄6～81岁。其中肝脏手术69例，胆囊手术131例。采用拟健康教育调查表，内容包括：①入院健康教育需求；②术前健康教育需求；③术后健康教育需求；④出院健康教育需求；⑤获得健康教育知识方式的选择；⑥出院后健康教育咨询方式的选择。由责任护士将表发放给病人，讲明每项内容及填表方法。发出调查表203份，回收有效卷200份，回收率为98.5%。

2 结果

2.1 入院健康教育需求程度，见表1

表1 入院健康教育需求程度

项目	强烈需要		一般需要		不需要	
	例数	%	例数	%	例数	%
治疗方案及效果	172	86.0	16	8.0	12	6.0
了解病情	168	84.0	27	13.5	5	2.5
各种检查相关知识	83	41.5	83	41.5	34	17.0
心理疏导	47	23.5	92	46.0	61	30.5
医院科室环境、规章制度	35	17.5	95	47.5	70	35.0

2.2 术前、术后健康教育需求，见表2、表3

表2 手术前健康教育需求程度

项目	强烈需要		一般需要		不需要	
	例数	%	例数	%	例数	%
了解手术安全性及效果	173	86.5	17	8.5	10	5.0
了解自己的病情	154	77.0	26	13.0	20	10.0
了解术前准备知识	87	43.5	76	38.0	37	18.5
活动、休息指导	51	25.5	89	44.5	60	30.0
饮食指导	68	34.0	95	47.5	37	18.5
家属指导	40	20.0	87	43.5	73	36.5
心理指导	51 2	5.5	79	39.5	70	35.0

表3 手术后健康教育需求程度

项目	强烈需要		一般需要		不需要	
	例数	%	例数	%	例数	%
了解自己的病情	105	52.5	39	19.5	56	28.0
体位与活动指导	101	50.5	51	25.5	48	24.0
各种管道的护理知识	99	49.5	51	25.5	50	25.0
饮食指导	102	51.0	71	35.5	27	13.5
用药指导	110	55.0	51	25.5	39	19.5
术后并发症预防指导	128	64.0	26	13.0	46	23.0
特殊情况指导	93	46.5	49	24.5	58	29.0

（下转539页）

作者简介：张 坤(1971—)，女，辽宁省丹东市人，护师。电话：(028)3413648
收稿日期：2001-06-10；修回日期：2002-01-05

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