

·基础研究·

大鼠骨髓基质干细胞的成骨诱导及鉴定*

郭立达¹ 王捷² 夏冰¹

摘要 目的:研究大鼠骨髓基质干细胞(BMSCs)在体外培养、诱导后的形态学改变及生物活性,探讨 BMSCs 作为骨组织工程种子细胞的可能性和可行性。**方法:**通过改良的骨髓培养法分离成年大鼠 BMSCs,经条件培养液诱导培养后,进行形态学观察和碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)的测定。**结果:**经过体外成骨诱导的 BMSCs 表现出增殖、聚集、结节和矿化期的阶段性形态特征,同时在诱导 2 周后表达 ALP 活性,在结节期和矿化期 OCN 表达呈阳性。**结论:**体外成骨定向诱导的 BMSCs 具有典型的成骨细胞的形态和功能性特征,可以作为骨组织工程的种子细胞。

关键词 骨髓基质干细胞;成骨诱导;碱性磷酸酶;骨钙素

中图分类号:R329.2,R49,R318 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-08-0678-02

Osteogenic inducement and identification of mesenchymal stem cells in rats/GUO Lida,WANG Jie,XIA Bing//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(8):678—679

Abstract Objective:To observe the morphological changes and phenotype characteristics of bone marrow stromal stem cells (BMSCs) during osteogenic inducement and to identify the feasibility as the seed cells for tissue engineering of bone. **Method:**BMSCs were isolated by modified method from adult rats, Osteogenic medium was used to stimulate BMSCs into osteoblast-like cells. The phenotype was examined with morphological method, and the levels of alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) were detected. **Result:**The osteogenic stimulated BMSCs represented the morphological change of osteoblast, phases of proliferation, aggregation, nodulation and mineralization could be observed. These cells also represented osteoblast-like cells functionally by an increased expression of ALP after two weeks of osteogenic stimulation, secretion of OCN during the phase of nodulation and formation of mineralized cellular nodes. **Conclusion:**BMSCs after osteogenic stimulation show the phenotype characteristics of osteoblast, and can be used for the seed cells of tissue engineering of bone.

Author's address Medical Research Center, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, 510010

Key words bone marrow stromal stem cells; osteogenic inducement; alkaline phosphatase; osteocalcin

骨髓基质干细胞 (bone marrow stromal stem cells, BMSCs) 具有多向分化潜能, 对供体损伤小, 易于分离培养, 体外增殖能力强。BMSCs 的成骨定向诱导是骨组织工程种子细胞研究的关注焦点。本研究观察 BMSCs 向成骨细胞分化过程中的细胞形态学变化, 进行成骨细胞生物学表型鉴定, 为 BMSCs 的分化机制研究和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 实验动物:成年 SD 大鼠, 雌雄不限, 体重 120—160g, 由广州军区广州总医院动物实验中心提供。

1.1.2 试剂:高糖 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), 胰蛋白酶 (Hyclone), 胎牛血清 (杭州四季清生物技术有限公司), β -甘油磷酸钠 (Sigma), 地塞米松 (Sigma), 维生素 C (Sigma), 羊抗大鼠骨钙素抗体 (美国 DSL 公司), S-P 免疫组化试剂盒 (福建迈新生物技术开发有限公司)。

1.1.3 成骨诱导液:基础培养液 (10% 胎牛血清 + 高

糖 DMEM + 100U/L 青霉素 + 100U/L 链霉素 + 2mmol/L 谷氨酰胺), 10mmol/L β -甘油磷酸钠, 10^{-7} mol/L 地塞米松, 50 μ g/ml 维生素 C。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的分离和培养:SD 大鼠麻醉后处死, 无菌条件下取股骨, 用含 10%FBS 的高糖 DMEM 培养液冲洗骨髓腔, 制成骨髓单细胞悬液。接种于培养皿中, 置 37℃、5%CO₂ 培养。于 48h 和 96h 半量更换培养液, 以后每 3d 全量换液 1 次。加入成骨诱导培养液进行分化培养, 对照组加入等量基础培养液。

1.2.2 显微镜观察:倒置相差显微镜观察体外培养细胞的生长、增殖、细胞形态的变化及钙盐沉积; 当细胞生长达到 80% 汇合时, 收集细胞, 3% 戊二醛固定, 常规超薄切片, 透射电镜观察细胞超微结构。

1.2.3 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色:采用 Gomori 改良钙钴法^[1]染色。

* 基金项目:广东省自然科学基金研究团队资助项目 (20023001)

1 广州军区广州总医院医学实验中心, 510010

2 通讯作者:王捷 (广州军区广州总医院医学实验中心)

作者简介:郭立达, 女, 硕士

收稿日期:2005-11-09

1.2.4 骨钙素 (osteocalcin, OCN) 的测定: 将细胞接种于预先放有玻片的 6 孔板内, 于诱导的第 12d 时, 用 PBS 洗净孔内的培养液, 3.6% 的甲醛固定液固定过夜, 加入 3% H_2O_2 10min, PBS 清洗 3 遍, 加入封闭血清 10min, PBS 轻洗, 加羊抗大鼠 OCN 一抗 (对照组加入等量的 PBS) 室温孵育 1h, 以下步骤按照 S-P 免疫组化试剂盒说明书进行操作。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察

BMSCs 接种 48h 后, 出现较多贴壁细胞, 经换液去除悬浮细胞, 72h 后开始增殖, 生长良好, 贴壁较均匀, BMSCs 呈纤维状, 梭形, 有突起, 约 7—9d 时, 细胞汇合成片, 其融合率可达到 80% (图 1, 见前置彩色插页 7)。

2.2 细胞超微结构观察

透射电镜下 BMSCs 的细胞核较大, 形态幼稚。第 1 代 BMSCs 胞浆内具有丰富的线粒体、粗面内质网及核糖体, 高尔基体也较发达 (图 2, 见前置彩色插页 7)。

2.3 ALP 染色

未诱导 BMSCs 的 ALP 活性较弱, ALP 染色呈阴性 (图 3, 见前置彩色插页 7); 经成骨诱导后, 细胞胞质中呈现棕黑色颗粒或块状沉淀, 为 ALP 阳性反应部位 (图 4, 见前置彩色插页 7)。

2.4 OCN 测定

未诱导的 BMSCs 几乎没有 OCN 阳性染色; 而诱导 14d 后的 BMSCs 的 OCN 明显增加, 胞浆中充满棕色的阳性颗粒 (图 5—6, 见前置彩色插页 7)。

3 讨论

许多研究表明 BMSCs 作为种子细胞具有广泛的应用前景^[2-3]。本实验发现体外培养的大鼠 BMSCs 完全贴壁后进入活跃增殖阶段, 生长至连续的一层后, 增殖速度减慢, 并可多层生长。在成骨诱导剂 (地塞米松、维生素 C 和 β -甘油磷酸钠) 的作用下局部聚集成灶状, 逐渐形成细胞结节, 分泌骨基质并最终形成矿化结节。整个过程大约经历 3—4 周, 这与体外培养的成骨细胞经历的阶段, 即细胞增殖期、细胞聚集期、细胞结节形成期和矿化期大致相同^[4], 只是在形成时间上向后延迟 1 周左右, 延迟的时间可能就是 BMSCs 向成骨细胞分化演变的过程, 该过程是逐渐完成的。

细胞的贴壁和伸展过程中的细胞形态改变与细胞骨架重组相一致, 同细胞的增殖和分化有密切关

系^[5]。本实验中 BMSCs 在成骨诱导培养基中培养 7d 后, 细胞形态即开始发生改变, 14d 后改变最为明显, 由长梭形变为短柱状, 并有许多突起, 印证了细胞形态与细胞增殖分化的关系。ALP 活性的提高是 BMSCs 向成骨细胞分化的重要标志^[6]。从培养的第 2 周 ALP 染色即出现阳性反应, 并随培养时间延长逐渐增强, 染色后可见大部分诱导细胞的胞浆被染成棕黑色, 其活性明显高于未诱导的阴性对照组细胞。在成骨细胞表型形成过程中, OCN 的表达呈现发育阶段特异性, 在细胞结节形成时开始表达, 基质矿化时达到最高水平^[7]。在 BMSCs 诱导培养的最初 7d 中, 诱导组和未诱导组 OCN 均处于较低的水平; 从第 2 周开始诱导组 BMSCs 的 OCN 分泌逐渐增加, 与 OCN 的表达呈阶段特异性相符。Collin^[8]研究认为 OCN 的表达出现在成骨细胞培养的第 3 个阶段, 第 4 个阶段进入表达高峰, 整个过程在 2 周内基本完成, 也就是说, OCN 的表达出现在成骨细胞培养的第 7—9d, 而在第 9—15d 表达明显增加。

本实验定向诱导的 BMSCs 具有典型的成骨细胞的形态和功能性特征, 表达 ALP 活性, 分泌产生 OCN, 符合骨组织工程中种子细胞应具备成骨能力的要求。BMSCs 经过诱导 1 周后即开始表达 ALP 活性, 证明 BMSCs 已经进入成骨细胞的转化过程, 并且仍然可以保持一定程度的增殖活性。所以, 可以选择成骨诱导培养 10d 的 BMSCs 作为骨组织工程的种子细胞。

参考文献

- [1] Sun SZ, Liu SH, Wei FC, et al. The ALP activity of cultured dental coronal and root pulp cells in vitro [J]. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2004, 13(6): 531—533.
- [2] 程颢, 付小兵, 盛志勇. 干细胞: 未来疾病治疗的新希望 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(2): 178—180.
- [3] In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering [J]. Biomaterials, 2005, 26(16): 3173—3185.
- [4] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix [J]. J Cell Physiol, 1990, 143(3): 420—430.
- [5] Lynch MP, Stein JL, Stein GS, et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization [J]. Exp Cell Res, 1995, 216(1): 35—45.
- [6] Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1 [J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(5): 841—852.
- [7] Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype [J]. Endocr Rev, 1993, 14(4): 424—442.
- [8] Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, et al. Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture [J]. Calcif Tissue Int, 1992, 50(2): 175—183.