

人骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化条件的优化研究[▲]

李 帅 吕中静 孙晋虎*

(广西医科大学口腔医学院口腔颌面外科, 南宁市 530021)

【摘要】 目的 探讨使人骨髓间充质干细胞(MSCs)向成骨细胞诱导分化的高效诱导体系。**方法** 按照不同浓度的地塞米松、β-甘油磷酸钠和维生素 C 分将实验为 4 组,并设立空白对照组,诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞定向分化,应用碱性磷酸酶钙钴法染色检测分化的成骨细胞的成骨特性。**结果** 在地塞米松 10^{-8} mol/L、β-甘油磷酸钠 10^{-2} mol/L、维生素 C 3×10^{-4} mol/L 时,积分光密度值最高。**结论** MSCs 具备较强的增值能力和良好的成骨特性,可为骨缺损修复技术优化提供基础。

【关键词】 间充质干细胞;成骨诱导;碱性磷酸酶

【中图分类号】 R 329.24 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-6575(2011)01-0012-03

Optimization of osteogenic differentiation of human marrow mesenchymal stem cells

LI Shuai, LV Zhong-jing, SUN Jin-hu

(Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Objective To explore efficient induction system of inducing marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts. **Methods** Trial was divided into 4 groups according to different concentrations of vitamin C, dexamethasone and β-glycerophosphate, and the control group was set. Human marrow mesenchymal stem cells were induced into osteoblasts, then the characteristic of osteoblasts was detected by gomori method for alkaline phosphatase (ALP). **Results** Under the concentration of dexamethasone of 10^{-8} mol/L, β-glycerophosphate of 10^{-2} mol/L and vitamin C of 3×10^{-4} mol/L, integrated optical density was the highest. **Conclusion** Mesenchymal stem cells poses potential augment capability and excellent osteogenic characteristics, which provides foundation for technique optimization of bone defeat fixation.

【Key words】 Marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic induction; Alkaline phosphatase

人骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具有多向分化潜能的成体干细胞,在特定的条件下可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞、肌腱细胞等^[1],具有来源广泛、便于体外大量扩增和低免疫性的优点^[2,3],是组织工程学的种子细胞。地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素 C 是常用的 MSCs 定向成骨细胞分化的诱导剂。本研究拟结合不同浓度的地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素 C,寻找具有高效诱导 MSCs 向成骨细胞分化的诱导体系。

1 材料和方法

1.1 实验材料 实验试剂:地塞米松(索莱宝公司),β-甘油磷酸钠(索莱宝公司),维生素 C(索莱宝公司),DMEM/

F12(Hycone 公司),胎牛血清(Hycone 公司),青霉素 G 钠(大连制药厂),硫酸链霉素(大连制药厂),Hepes(MBCHEM 公司),谷氨酰胺(MBCHEM 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 人骨髓间充质干细胞的获取及培养 经髂后上棘穿刺抽取成人健康骨髓,通过密度梯度离心法^[4],将分离的细胞以 1×10^6 cells/mL 接种于一次性塑料培养瓶中。5% CO₂, 37℃, 饱和湿度条件下培养。48~72 h 首次全量换液,以后每 4 d 半量换液。待细胞生长至 90% 融合时应用 0.25% 胰酶 + 0.01% EDTA 消化传代。传代培养的 P1、P2 代细胞以 1 800 cells/孔接种于 96 孔板内,应用 MTT 法选择 570 nm 波长测定每孔的吸光度值(A 值),并绘制生长曲线^[5]。培养的第二代 MSCs 生长至 90% 融合时备用。

1.2.2 人骨髓间充质干细胞鉴定^[6,7] 取 1.2.1 培养的 P2 代细胞,应用流式细胞仪检测 CD34、CD45、CD90、CD105 表达情况,确定为 MSCs。

1.2.3 筛选成骨效率高的诱导体系 按不同药物浓度将实验分成 4 组,并设立空白对照组(表 1)。10% FBS 的

▲基金项目:广西科学基金(编号:0639017,0991118)和广西卫生计生重点科研课题(编号:重 200928)

作者简介:李帅(1982~),男,在读硕士研究生,研究方向:口腔颌面部整形。

*通讯作者

DMEM/F12 培养基中含有 2×10^4 cells/mL 浓度加入包被圆形玻片的 24 孔板。按每组 2 孔, 随机加入上述组别的实验因素。每 4 d 换液, 10 d 后行碱性磷酸酶钙钴法染色^[8], 同法重复取样 8 次。同一条件下, 放大 400 倍, 每张玻片随机取 6 个视野, image-pro plus 软件分析积分光密度值。

表 1 实验组浓度

| 实验分组 | 地塞米松 (mol/L) | β 甘油磷酸钠 (mol/L) | 维生素 C (mol/L) |
|--------|--------------|-----------------------|--------------------|
| 诱导 1 组 | 10^{-9} | 10^{-3} | 3×10^{-4} |
| 诱导 2 组 | 10^{-8} | 10^{-3} | 3×10^{-4} |
| 诱导 3 组 | 10^{-8} | 10^{-2} | 3×10^{-4} |
| 诱导 4 组 | 10^{-7} | 10^{-2} | 3×10^{-4} |
| 空白对照组 | 0 | 0 | 0 |

1.3 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 16.0 统计软件验证数据是否符合正态性和方差齐性, 符合时采用 t 检验, 否则采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 时表示差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察 原代接种 24 h 后可观察到很少量的细胞贴壁, 大多呈圆形或椭圆形; 48 ~ 72 h 后少部分细胞贴壁, 呈现梭形。初次换液后, 细胞生长加快, 局部呈单克隆样生长 (见图 1A)。细胞生长至 70% ~ 90% 融合时及时传代 (见图 1B)。传代培养时 MSCs 贴壁速度快。绝大部分

可在 24 h 之内贴壁, 呈现梭形。

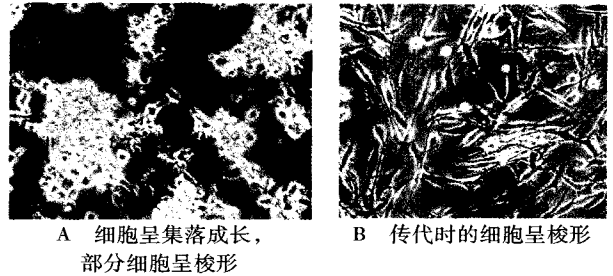


图 1 MSCs 的体外培养 ($\times 100$)

2.2 生长曲线 接种后 2 ~ 3 d, P1 代、P2 代细胞数量均下降, 接着在第 4 ~ 11 天细胞进入对数生长期, 但是 P2 代细胞较 P1 代细胞生长速度稍快, 后进入平台期。见图 2。

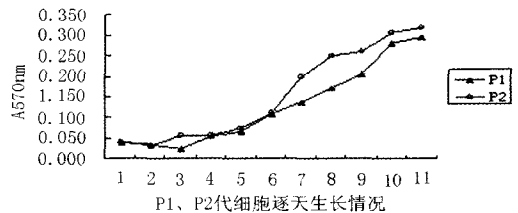


图 2 第 1 代 (P1)、2 代 (P2) 的生长曲线

2.3 人骨髓间充质干细胞表型 流式细胞仪检测表明, 人骨髓间充质干细胞不表达 CD34、CD45, 强表达 CD90、CD105。见图 3。

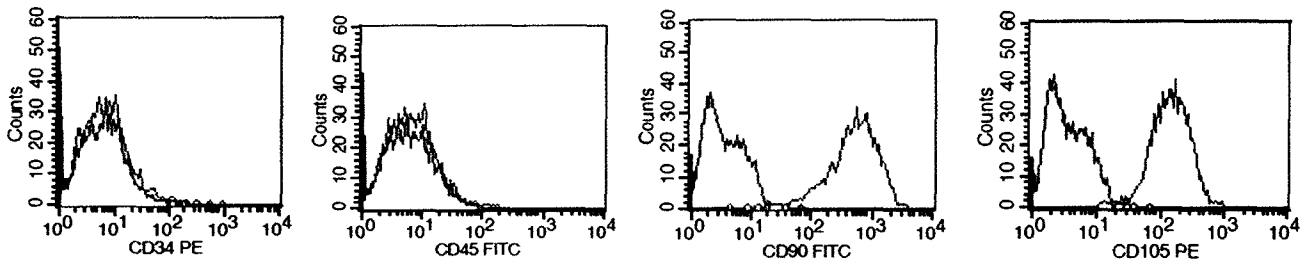


图 3 人骨髓间充质干细胞表型分析。红色表示阳性细胞, 绿色表示阴性细胞。

2.4 各组的积分光密度 4 个诱导组碱性磷酸酶钙钴法染色表达均呈强阳性, 但是表达程度有差异, 空白对照组碱性磷酸酶钙钴法染色的积分光密度值最低。经统计分析, 4 个诱导组的结果与空白对照组的结果比较有显著意义 ($P < 0.01$, 表 2)。4 个诱导组的结果之间比较表明, 诱导组 3 诱导效率最高, 诱导组 1、4 的诱导效率较低。

表 2 碱性磷酸酶钙钴法染色积分光密度

| 实验分组 | 样本量 | 积分光密度均数 \pm 标准差 |
|--------|-----|--|
| 诱导 1 组 | 8 | 634 500.14 \pm 236 744.43 |
| 诱导 2 组 | 8 | 716 254.91 \pm 179 467.99 |
| 诱导 3 组 | 8 | 808 213.05 \pm 241 609.81 ^{**} |
| 诱导 4 组 | 8 | 577 479.49 \pm 169 312.14 ^{*Δ} |
| 空白对照组 | 8 | 177 411.99 \pm 120 717.92 ^{**Δ} |

非参数秩和检验结果: 与第 1 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与第 2 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与第 3 组比较, ^{Δ} $P < 0.05$; 与第 4 组比较, ^{Δ} $P < 0.05$ 。

3 讨论

骨缺损修复一直是医学界的难题之一, 往往需要借助植骨术来治疗, 用于植骨的材料有自体骨、异体骨和人工骨等, 同时也带来了大量的问题, 如对供体部位带来比较大的损伤、继发性的畸形、人体的排异反应等, 同时提供的骨组织量也十分有限。MSCs 具备较强的增殖能力和良好的成骨特性, 为将来临床治疗骨缺损带来了希望。

MSCs 有多能分化特性, 是一种在组织工程学和基因治疗研究中有很好的应用前景的干细胞。地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 是常用的诱导 MSCs 向成骨细胞分化的诱导剂^[9]。地塞米松可以显著增加人骨髓间充质干细胞的 ALP 的量, 而 ALP 能够水解有机磷酸酶, 使细胞内的磷酸根浓度升高, 同时钙盐沉降, 从而开始钙化; β -甘油磷酸钠的主要作用是提供磷酸根离子, 使局部磷酸根离子浓度升高,

提供磷离子作为 ALP 作用的底物;维生素 C 则可调节成骨细胞 ALP 和胶原蛋白的合成^[10]。目前,仅仅是从地塞米松的角度来研究对 MSCs 定向成骨细胞分化的影响,而没有考虑 β -甘油磷酸钠和维生素 C 的浓度差异在 MSCs 定向成骨细胞分化中的影响,以及它们之间的关系。ALP 是成骨细胞分化成熟的重要标志之一,钙钴法染色后分析所得的积分光密度值差异可以用来评价 MSCs 向成骨细胞分化过程中的诱导效率。我们将地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 组合成不同的浓度,诱导 MSCs 向成骨细胞分化,寻找具有高效诱导 MSCs 向成骨细胞分化的诱导体系,以便于指导基础和临床应用。

目前诱导 MSCs 定向成骨细胞分化的方法有化学药物、细胞因子、物理刺激、转基因、中药提取液等^[11],但是它们存在生物安全性问题,操作过程繁琐,以及对实验者和基础实验条件有比较高的要求。地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 无毒、无免疫原性、无致瘤性,生物安全性高,可直接应用于人体,而且价格低廉,获取广泛。本研究正是基于以上优点结合地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 优点,应用它们不同浓度组成的诱导体系,为研究结果在临床上的应用奠定基础。

本研究显示, P2 代 MSCs 经流式细胞仪检测不表达 CD34、CD45,强表达 CD90、CD105。由此,可以证明我们体外扩增的细胞是骨髓间充质干细胞。多体系成骨诱导筛选结果表明,诱导组 3 诱导的 MSCs 的积分光密度值最高,而诱导组 4 诱导的 MSCs 的积分光密度值最低,统计分析进一步揭示诱导组 3 的诱导效率最高。这说明地塞米松浓度在 10^{-8} mol/L 时较地塞米松浓度为 10^{-7} mol/L 和 10^{-9} mol/L 时诱导效率较高, Ogston 等^[12]亦发现地塞米松在这一浓度级别具有较高的成骨诱导效率。经分析诱导组 2 和诱导组 3 的诱导结果我们可以得知, β -甘油磷酸钠在 10^{-2} mol/L 时诱导分化的效果比浓度在 10^{-3} mol/L 时的效果好,这说明地塞米松、 β -甘油磷酸钠在诱导 MSCs 分化为成骨细胞过程中存在协同作用。因此,地塞米松 10^{-8} mol/L、 β -甘油磷酸钠 10^{-2} mol/L、维生素 C 3×10^{-4} mol/L 时,人骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化的效率最高。由于维生素 C 是人体正常代谢必需的成分,而且维生素 C 在 3×10^{-4} mol/L 浓度级别也是人体组织细胞正常代谢比较合适的条件,因此研究中没有比较不同浓度的维生素 C 对诱导效果的影响。虽然本研究采用的诱导体系(地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C)具有较高的生物安全性,并且初步筛选了 MSCs 的

高效成骨诱导体系,但经其诱导分化的人骨髓间充质干细胞和成骨细胞有无畸形、成瘤等生物安全问题尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284 (5411):143 - 147.
- [2] Gieseke F, Bohringer J, Bussolari R, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells [J]. Blood, 2010, 116(19):3770 - 3779.
- [3] Han KH, Kang HG, Gil HJ, et al. The immunosuppressive effect of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells on both primary and secondary alloimmune responses [J]. Transpl Immunol, 2010, 23 (3):141 - 146.
- [4] Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow [J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 9):1827 - 1835.
- [5] 杜振宗,任华,张超纪,等. 成人骨髓间充质干细胞的分离、鉴定和生物学特性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12 (43):8495 - 8499.
- [6] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8 (4):315 - 317.
- [7] Kim J, Kang JW, Park JH, et al. Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(1):117 - 126.
- [8] 王洪复. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术 [M]. 2001:60 - 61.
- [9] Park JB. The Effects of Dexamethasone, Ascorbic Acid, and beta-Glycerophosphate on Osteoblastic Differentiation by Regulating Estrogen Receptor and Osteopontin Expression [J]. J Surg Res, 2010.
- [10] Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease [J]. J Nippon Med Sch, 2010, 77 (1):4 - 12.
- [11] 胡炜,俞兴,徐林. 骨髓基质细胞诱导分化成骨方法及相关研究进展 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(1):169 - 172.
- [12] Ogston N, Harrison AJ, Cheung HF, et al. Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics [J]. Steroids, 2002, 67(11):895 - 906.

(收稿日期:2010-11-05 修回日期:2010-12-27)

微创医学技术信息动态

国内首家中医经络养生研究所成立

据《健康报》2010年10月22日报道,国内首家中医经络养生研究所在北京“鹤年堂”挂牌成立。中医世家第七代传人、国家“七五”和“八五”项目课题负责人、经络养生大师李定忠教授出任首席专家。