

骨髓间充质干细胞作为干细胞参与生物材料异位诱导成骨**◆

李 涛, 宋国栋, 包崇云, 罗 恩, 刘 显, 王买全

Bone marrow mesenchymal stem cells as stem cells in inducing ectopic bone formation

Li Tao, Song Guo-dong, Bao Chong-yun, Luo En, Liu Xian, Wang Mai-quan

Abstract

BACKGROUND: *In vivo* bone tissue engineering is to implant biological materials with bone induction activity in the bone or non-bone region. The body served as bioreactor to construct tissue engineered bone to repair bone defects. Bone transplant with good biocompatibility and mechanical function developed a new therapeutic pathway for bone transplantation. However, the source of related stem cells remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate whether bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) participate in forming ectopic bone of biomaterial.

METHODS: BMSCs were separated and purified from male beagle dogs. BMSCs at passage 3 were transplanted into the female beagle dogs to establish models of allogeneic bone marrow transplantation. Simultaneously, biphasic calcium phosphate ceramic was implanted in erector spinae of receptor dog. Following 6 weeks, bone sample was harvested. Fluorescence *in situ* hybridization was utilized to trace bone transplant Y chromosome.

RESULTS AND CONCLUSION: Fluorescence *in situ* hybridization results demonstrated that chromosome Y had fluorescent signal expression in bone constructs, which suggested that BMSCs can be collected in the ectopic biomaterial region by blood circulation, and formed bone tissue. Results indicated that BMSCs participate in inducing ectopic bone formation, as a source of inducing ectopic bone formation.

Li T, Song GD, Bao CY, Luo E, Liu X, Wang MQ. Bone marrow mesenchymal stem cells as stem cells in inducing ectopic bone formation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(21): 3819-3822.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

West China College of Stomatology, Sichuan University, State Key Laboratory of Oral Diseases (Sichuan University), Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Li Tao★, Studying for master's degree, West China College of Stomatology, Sichuan University, State Key Laboratory of Oral Diseases (Sichuan University), Chengdu 610041, Sichuan Province, China
liyuntao_158@163.com

Correspondence to: Bao Chong-yun, Doctor, Professor, West China College of Stomatology, Sichuan University, State Key Laboratory of Oral Diseases (Sichuan University), Chengdu 610041, Sichuan Province, China
cybao9933@scu.edu.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. NSFC-30672337 *

Received: 2010-01-25
Accepted: 2010-04-06

摘要

背景: 体内骨组织工程是在骨或非骨部位植入具有骨诱导活性的生物材料, 利用机体作为生物反应器去构建组织工程骨, 以修复骨缺损。骨移植物所具备的优良生物相容性和机械性能为骨移植开辟新的治疗途径。然而, 其相关干细胞来源尚不清楚。

目的: 探索骨髓间充质干细胞作为干细胞是否参与生物材料的异位诱导成骨。

方法: 分离纯化雄性 beagle 犬的骨髓间充质干细胞。将培养至第 3 代骨髓间充质干细胞移植入雌性 beagle 犬体内, 建立同种异体骨髓移植模型, 同期将双相钙磷陶瓷植入受体犬竖脊肌内。6 周后, 获取骨构建物标本, 利用原位荧光杂交技术对骨移植物 Y 染色体进行示踪。

结果与结论: 原位荧光杂交结果显示 Y 染色体在骨构建物中有荧光信号表达, 表明骨髓间充质干细胞可通过血液循环途径募集到异位生物材料处, 形成骨组织。结果提示骨髓间充质干细胞参与生物材料异位诱导成骨, 是生物材料异位诱导成骨干细胞来源之一。

关键词: 双相钙磷陶瓷; 骨髓间充质干细胞; 骨缺损; 组织工程; 生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.21.005

李涛, 宋国栋, 包崇云, 罗恩, 刘显, 王买全. 骨髓间充质干细胞作为干细胞参与生物材料异位诱导成骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 13(21):3819-3822. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前, 因肿瘤、创伤、先天因素造成的大块骨缺损主要有自体骨移植和异体材料植入修复^[1], 其存在的供源不足和免疫排斥等问题已不能满足临床需要^[2-3]。体内骨组织工程是在骨或非骨部位植入具有骨诱导活性的生物材料, 利用机体作为生物反应器去构建组织工程骨, 以修复骨缺损。骨移植物的理想生物相容性和优良机械性能为骨移植开辟新的治疗途径^[4-5]。然而, 其相关干细胞来源尚不清楚。

本实验探索骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stems cells, BMSCs)是否是其干细胞来源之一。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2008-10/2009-06在四川大学口腔疾病研究国家重点实验室完成。

材料:

实验动物: 6月龄同源Beagle犬12只, 体质量10-15 kg, 由四川大学华西医学中心实验动物中心提供, 质量合格证: 川实动管质第122号。平

四川大学华西口腔医学院, 口腔疾病研究国家重点实验室(四川大学), 四川省成都市 610041

李涛★, 男, 1983年生, 河南省洛阳市宜阳县人, 汉族, 四川大学华西口腔医学院在读硕士, 主要从事体内组织工程的研究。
liyuntao_158@163.com

通讯作者: 包崇云, 博士后, 教授, 四川大学华西口腔医学院, 口腔疾病研究国家重点实验室(四川大学), 四川省成都市 610041
cybao9933@scu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)21-03819-04

收稿日期: 2010-01-25
修回日期: 2010-04-06
(20100125001/M·Q)

均分为4组, 每组1雄2雌混合饲养2周。

实验过程中对动物处置参照国家科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

主要试剂和仪器:

主要试剂和仪器	来源
双相钙磷陶瓷(biomaterials biphasic calcium phosphate, BCP)(106~212 μm, 粉体)	四川大学纳米生物材料研究中心
a-MEM 培养基、2.5 g/L 胰蛋白酶	GIBCO, USA
环孢菌素	南京制药有限公司
麦考酚酯	南京制药有限公司
STR BIOISH 原位杂交试剂盒	天津市灏洋生物试剂公司
1×70-SBF2 型倒置相差显微镜及照相系统	OLYMPUS, Japan
MCO-15AC 型 CO ₂ 恒温孵箱	SANYO, Japan
倒置荧光显微镜及原位荧光杂交系统软件 2.0	OLYMPUS, Japan
JSM-6060LV 扫描电子显微镜	日本电子株式会社
钴 60 相向放射系统	四川大学华西医院

实验方法:

扫描电子显微镜观察: 将双相钙磷陶瓷粉体材料经过喷金处理, 置于扫描电子显微镜下进行颗粒大小测试。

雄性 beagle 犬 BMSCs 的分离纯化: 参照 Silverira 等^[7]的方法。自雄性 beagle 犬的股骨抽取骨髓液 20 mL, 利用密度梯度离心法将抽取的骨髓用无血清培养液等量稀释后叠加于淋巴细胞分离液液面上, 2 000 r/min 离心 30 min, 吸取富含单个核细胞的乳白色界面层, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 a-MEM 培养基重悬细胞, 并接种于培养瓶, 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 孵育箱中培养。将培养至第 3 代的 BMSCs 供细胞移植用。

形态学观察: 将培养的原代, 第 1 代, 第 3 代 BMSCs 于倒置相差显微镜下观察, 比较其生长及形态特点。

BMSCs 同种异体移植: 利用 ⁶⁰Co 以 200 cGy (25 cGy/min) 对雌性 beagle 犬进行全身照射, 破坏雌性犬的免疫系统, 为细胞移植创造嵌合空间。参照 Feng 等^[8]的方法将培养至第 3 代的 BMSCs 以 4×10⁸/kg 移植量通过股骨骨髓腔途径移植入雌性犬体内。BMSCs 移植入骨髓腔的方法, 见图 1。



Figure 1 Method of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted into the bone marrow cavity

图 1 骨髓间充质干细胞移植入骨髓腔的方法

骨移植物的构建: 在细胞移植同期, 将制备好的双相钙磷陶瓷粉体材料植入雌性犬竖脊肌内。

Y 染色体示踪: 术后 6 周, 10% 氯化钾处死雌性受体犬。获取骨移植标本。40 g/L 多聚甲醛固定, 脱钙, 包埋制作石蜡切片。参照 STR BIOISH 原位杂交试剂盒具体方法, 对石蜡切片进行荧光杂交, 于倒置荧光显微镜下进行观察。

主要观察指标: 骨构建物中 Y 染色体的荧光信号表达。

设计、实施、评估者: 设计为第一作者, 资料收集、实施和评估为全部作者, 使用盲法评估。

2 结果

2.1 原代培养和传代的 BMSCs 形态 原代培养 4 d 后大部分细胞贴壁; 细胞呈梭形, 细胞核折光率较高, 5 d 后可见细胞集落形成。10 d 左右原代细胞铺满瓶壁。0.25% 胰蛋白酶消化传代。第 1 代 BMSCs 贴壁迅速, 30 min 可见细胞贴壁。第 3 代 BMSCs 增殖活跃, 4 d 后即可传代。见图 2~4。

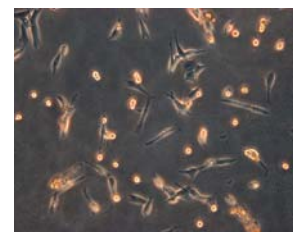


Figure 2 Primary bone marrow mesenchymal stem cells cultured for 4 d (Phase contrast microscope, ×200)

图 2 原代细胞培养 4 d (相差显微镜, ×200)

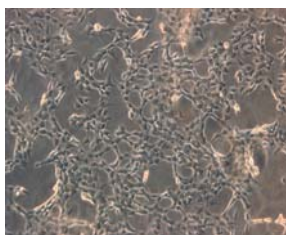


Figure 3 The first passage of bone marrow mesenchymal stem cells cultured for 1 d (Phase contrast microscope, $\times 200$)

图3 第1代细胞培养1 d(相差显微镜, $\times 200$)

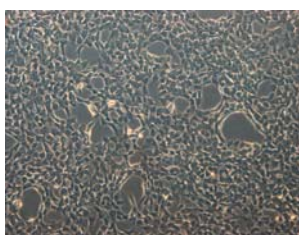
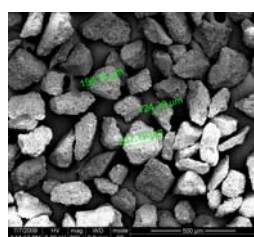


Figure 4 The third passage of bone marrow mesenchymal stem cells cultured for 1 d (Phase contrast microscope, $\times 200$)

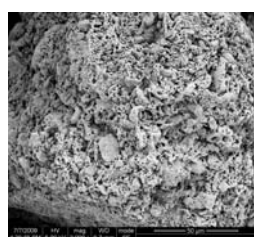
图4 第3代细胞培养1 d(相差显微镜, $\times 200$)

2.2 骨髓移植后大体观察结果 雌性受体犬经细胞移植和材料移植处理后,第2天出现食欲缺乏,呕吐症状。给予抗生素治疗1周后,其症状消失,食量增加。术后3周体质恢复到术前水平。

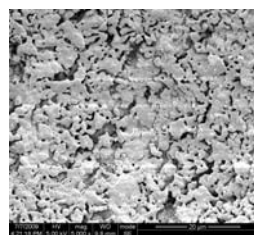
2.3 双相钙磷陶瓷粉体材料扫描电子显微镜观察结果 结果显示双相钙磷陶瓷粉体材料颗粒直径控制于106~212 μm 之间,具有良好的均一性。见图5。



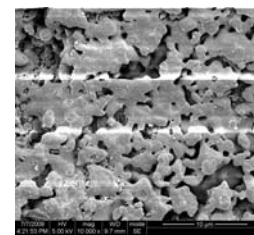
a: $\times 200$



b: $\times 2\ 000$



c: $\times 5\ 000$



d: $\times 10\ 000$

Figure 5 Scanning electron microscope results of biphasic calcium phosphate powder materials

图5 双相钙磷陶瓷粉体材料扫描电镜观察结果

2.4 原位荧光杂交 原位荧光杂交结果显示石蜡标本

中的成骨细胞核内有FITC标记Y染色体的绿色荧光探针的表达以及明显的骨小梁结构生成。见图6~8。

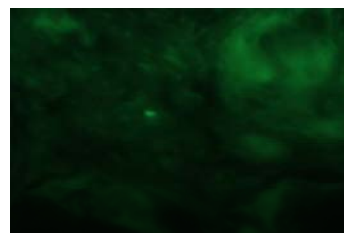


Figure 6 Y-chromosome fluorescence signal of the internal bone (Inverted microscope, $\times 1\ 000$)

图6 骨内部的Y染色体荧光信号(倒置显微镜, $\times 1\ 000$)



Figure 7 Y-chromosome fluorescence signal of the external bone (Inverted microscope, $\times 200$)

图7 骨外部的Y染色体荧光信号(倒置显微镜, $\times 200$)

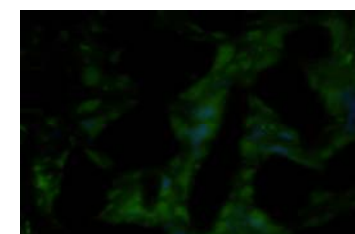


Figure 8 Y-chromosome fluorescence signal of the Trabecular (Inverted microscope, $\times 1\ 000$)

图8 Trabecular的Y染色体荧光信号(倒置显微镜, $\times 1\ 000$)

3 讨论

BMSCs的一个重要特性就是多向分化,它不仅能向成骨细胞,成软骨细胞等中胚层来源的骨组织细胞定向分化,在特定的诱导条件下,还可向其他中胚层和外胚层细胞分化^[9-10]。在组织工程领域,它是一种理想的种子细胞,在组织构建中发挥重要作用。而且,大量的实验研究已经证实当机体受到损伤时,BMSCs可以定植到损伤区域,分化为特定的组织细胞进行损伤修复。本实验通过同种异体骨髓移植的方法,对BMSCs进行示踪,证明BMSCs是否参与生物材料的异位诱导成骨。

骨髓移植作为血液疾病的有效治疗途径,在临床上大量应用。本实验采用BMSCs在同源beagle犬体内进

行骨髓移植, 获得成功, 供体细胞在受体骨髓腔内达到了稳定的嵌合状态。而且, 与造血干细胞骨髓移植不同, 受体在术后所出现的低免疫排斥反应, 证明了BMSCs在免疫功能方面具有调节作用^[11]。Zhou等^[12]发现BMSCs能促进心脏异体移植的成活率。在骨髓移植方面, 实验证明造血干细胞和骨髓间充质干细胞联合移植能促进造血干细胞嵌合率以及抑制移植抗宿主病的发生^[13-14]。

动物在接受放疗和使用环孢菌素后, 出现呕吐, 食欲不振, 体质量下降等症状, 致使其生理状态缺乏一致性^[15-18]。术后使用抗生素和维生素治疗1周后, 生理状态恢复到术前。

本实验通过原位荧光杂交技术证明BMSCs参与体内生物材料的异位诱导成骨, 为后续生物材料异位成骨机制研究提供理论基础。关于BMSCs分化成骨的机制与材料物理形貌和化学因素的关系, 目前在国内外尚无明确报道。本课题组在后续实验中发现, 骨形态发生蛋白, 血管内皮生长因子含量在成骨标本周围量大, 于是猜测其可能在BMSCs成骨向分化中发挥关键作用, 其具体机制有待于进一步探索。

4 参考文献

- [1] Berven S, Tay BK, Kleinstueck FS, et al. Clinical applications of bone graft substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation. *Eur Spine J*. 2001;10 Suppl 2:S169-177.
- [2] Caldora P, Donati, Capanna R, et al. Studio istomorfologico degli espianti di innesti omoplastici massivi: Risultati preliminari. *Chir Org Mov*. 1995;80:191-205.
- [3] Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(7):971-986.
- [4] Zhang XD, Zou P, Wu C, et al. A study of porous block HA ceramics and its osteogenesis. In: Ravaglioli A, Krajewski A. *Bioceramics and the Human Body*. Elsevier Applied Science. 1991:408-415.
- [5] Ripamonti U. The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73(5):692-703.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [7] Silveira ACC, Lima RS, Penha EM, et al. Harvest and characterization of mesenchymal canine stem cells from adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009;128(1-3):342.
- [8] Feng Q, Chow PK, Frasson F, et al. Nonhuman primate allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by intraosseous vs intravenous injection: Engraftment, donor cell distribution, and mechanistic basis. *Exp Hematol*. 2008;36(11):1556-1566.

- [9] Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*. 1999;14(5):700-709.
- [10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- [11] Aksu AE, Horibe E, Sacks J, et al. Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clin Immunol*. 2008;127(3):348-358.
- [12] Zhou HP, Yi DH, Yu SQ, et al. Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft. *Transplant Proc*. 2006;38(9):3046-3051.
- [13] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-1441.
- [14] Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(5):321-334.
- [15] Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-1446.
- [16] Katritsis DG, Sotiropoulou P, Giazizoglou E, et al. Electrophysiological effects of intracoronary transplantation of autologous mesenchymal and endothelial progenitor cells. *Europace*. 2007;9(3):167-171.
- [17] Yang YJ, Qian HY, Huang J, et al. Atorvastatin treatment improves survival and effects of implanted mesenchymal stem cells in post-infarct swine hearts. *Eur Heart J*. 2008;29(12):1578-1590.
- [18] Schrappe M. Risk-adapted stratification and treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Radiat Prot Dosimetry*. 2008;132(2):130-133.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 本课题得到国家自然科学基金(NSFC-30672337)资助。

致谢: 感谢四川大学口腔疾病研究国家重点实验室李小龙副教授和华西医院放疗科大力的帮助和支持。

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 本课题采用同种异体移植骨髓间充质干细胞, 运用原位荧光杂交技术检测母体内 Y 染色体的方法充分证明了参与异位诱导成骨的干细胞是经血液来源于骨髓基质。这是试验方法的一次创新。

课题评估的“金标准”: 本课题利用 FISH2.0 软件对原位荧光杂交的结果进行评估, 为国际公认的指标。

设计或课题的偏倚与不足: 实验动物在接受放疗和使用环孢菌素后, 出现呕吐, 食欲不振, 体质量下降等症状, 致使其生理状态缺乏一致性, 从而导致在实验实施过程中出现一定的偏倚和不均一性。

提供临床借鉴的价值: 本实验结果为利用骨诱导活性的生物材料构建组织工程骨从而修复骨缺损提供临床依据, 并且为骨髓间充质干细胞参与异位成骨的机制研究提供理论基础。