

兔下颌骨来源骨髓间充质干细胞的体外培养及生物学特性**

李 松, 郭延伟, 房殿吉

In vitro culture and biological characteristics of rabbit mandible-derived bone marrow mesenchymal stem cells

Li Song, Guo Yan-wei, Fang Dian-ji

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have demonstrated that bone marrow mesenchymal stem cells are harvested primarily from femur or ilium, but there have been few reports describing mandible-derived bone marrow mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To investigate *in vitro* isolation, culture and biological characteristics of rabbit mandible-derived bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were harvested from rabbit mandible and isolated by density gradient centrifugation. Cells were adherently cultured *in vitro*, and passage 2 or 3 bone marrow mesenchymal stem cells were used for detection. Cell proliferation was detected by MTT assay. Fibroblast colony forming units were detected by examination of colony formation. The potential of bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts and adipocytes was detected.

RESULTS AND CONCLUSION: MTT assay showed that the cell growth curves of mandible-derived bone marrow mesenchymal stem cells exhibited incubation period, logarithmic phase and platform period. Colony-formation assays showed that cells exhibited the appearance of fibroblast colony forming units. After Aalizarin red and oil red O staining, there were mineralized nodules and lipid drops. These findings suggest that rabbit mandible-derived bone marrow mesenchymal stem cells show strong self-renewal and proliferative capacities and exhibit the potential of multi-directional differentiation.

Li S, Guo YW, Fang DJ. In vitro culture and biological characteristics of rabbit mandible-derived bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2477-2480. [http://www.crtor.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 以往研究表明骨髓间充质干细胞的获取来源主要是股骨或髌骨, 但下颌骨来源骨髓间充质干细胞的研究至今少有报道。

目的: 观察兔下颌骨来源的骨髓间充质干细胞体外分离、培养及其生物学特性。

方法: 体外分离培养兔下颌骨骨髓间充质干细胞, 取第2或3代检测。MTT法检测细胞增殖, 克隆形成试验检测细胞的克隆形成率变化, 并对其进行成骨和成脂诱导分化。

结果与结论: MTT法检测细胞增殖, 细胞生长曲线显示下颌骨骨髓间充质干细胞经历潜伏期、对数生长期和平台期。细胞克隆形成实验显示, 细胞呈成纤维集落形成单位外观。茜素红、油红O染色结果显示, 成骨诱导、成脂诱导后形成钙结节及脂滴。结果证实, 兔下颌骨分离出的骨髓间充质干细胞有强大的自我复制及增殖能力, 具有多向诱导分化的潜能。

关键词: 下颌骨; 骨髓间充质干细胞; 生物学行为; 增殖; 分化; 干细胞培养

缩略语注释: BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells, 骨髓间充质干细胞; CFU-F: colony forming unit-fibroblastic, 成纤维集落形成单位

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.002

李松, 郭延伟, 房殿吉. 兔下颌骨来源骨髓间充质干细胞的体外培养及生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2477-2480. [http://www.crtor.org http://cn.zgckf.com]

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology Hospital of Jiamusi University Hospital, Jiamusi 154000, Heilongjiang Province, China

Li Song★, Studying for master's degree, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology Hospital of Jiamusi University Hospital, Jiamusi 154000, Heilongjiang Province, China yitao1028@hotmail.com

Corresponding author: Fang Dian-ji, M.D., Master's supervisor, Associate chief physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology Hospital of Jiamusi University Hospital, Jiamusi 154000, Heilongjiang Province, China dianjifang@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81170935*

Received: 2011-12-08 Accepted: 2012-03-06

0 引言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有强大的自我复制、增殖能力及多向诱导分化的潜能^[1]。国内外对颌骨中BMSCs的研究很有限。实验从兔下颌骨中分离、体外培养、扩增, 获得形态均一的下颌骨BMSCs, 观察下颌骨来源BMSCs的自我复制增殖能力及成骨、成脂分化特性。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2010-12/2011-07在佳木斯大学生命科学实验中心实验室完成。

材料: 选用健康2月龄新西兰大白兔5只, 体质量2.0~2.5 kg, 雌雄不限, 购自佳木斯大学动物实验中心, 动物许可证号: SCXK(黑)2010002, 普通饲料喂养。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
β-甘油磷酸钠、胰岛素、吡啶美辛、甲基噻唑基四唑(MTT)	Sigma
酶标仪	BIOTEK

方法:

兔下颌骨BMSCs体外分离及原代培养: 兔耳缘

佳木斯大学附属口腔医院口腔颌面外科, 黑龙江省佳木斯市 154000

李松★, 女, 1983年生, 吉林省长春市人, 汉族, 佳木斯大学在读硕士, 主要从事组织工程方向研究。
yitao1028@hotmail.com

通讯作者: 房殿吉, 博士, 硕士研究生导师, 副主任医师, 佳木斯大学附属口腔医院口腔颌面外科, 黑龙江省佳木斯市 154000
dianjifang@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02477-04

收稿日期: 2011-12-08
修回日期: 2012-03-06
(20111208001/WJ-S)

静脉空气栓塞处死, 无菌条件下游离兔下颌骨, 去净骨膜, 将游离下颌骨浸泡在体积分数75%乙醇中5 min。取出松质骨用含体积分数10%胎牛血清的DMEM反复吸吹后, Ficoll分离液2 000 r/min条件下离心20 min, 分离单个核细胞, 用完全培养基将分离的单个核细胞离心清洗2次, 1 000 r/min、5 min/次, 调整细胞浓度后, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于60 mm培养皿中, 加入完全培养基, 于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中进行原代培养^[2-3]。

兔下颌骨BMSCs传代培养: 分离培养的下颌骨BMSCs每隔2 d换液1次, 第9天原代培养结束并进行传代培养。细胞用PBS清洗3次, 0.25%胰蛋白酶消化, 1:2传代, 用同样方法传代至第7代。

MTT法检测BMSCs的增殖: 取P2细胞用0.25%胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 以每孔 $3 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于96孔培养板中, 每孔培养基体积200 μL。将培养板移入孵箱中, 每隔2 d换液1次, 于培养1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d各取3孔测试。将3孔消化下来的细胞放置另一块96孔板, 待细胞完全贴壁后每孔加入MTT溶液(质量浓度5 g/L) 20 μL, 37 °C, 继续孵育4 h。吸弃孔内上清液, 每孔加入DMSO 150 μL在酶联免疫检测仪上选择490 nm波长测定各孔光吸收值记为A值。测得数据应用SPSS 16.0软件进行处理, 以A_{490 nm}值为纵坐标, 以天数为横坐标, 绘制细胞生长曲线。

克隆形成试验检测BMSCs的克隆形成率: 将P2代下颌骨BMSCs用PBS清洗3次后0.25%胰酶消化, 以 10^2 细胞数接种于60 mm培养皿中, 加入完全培养基培养, 每隔2 d换液1次, 培养2周时, 大体可见克隆, 终止培养, PBS清洗2次, 40 g/L多聚甲醛固定30 min后, PBS清洗数次, 进行甲苯胺蓝染色1 d, 染色后再用PBS冲洗数次, 倒置显微镜下观察和记录。计数大于50个细胞的克隆集落。

$$\text{克隆形成率(\%)} = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

成骨细胞的诱导分化: 将P2或P3下颌骨BMSCs用PBS清洗3次后0.25%胰酶消化, 以3 000个/cm²密度接种于35 mm培养皿中, 24 h后待细胞贴壁, 更换为成骨诱导培养基(Dex 100 nmol/L、Vit C 50 mg/L、β-GP 10 mmol/L、体积分数10% FBS、1%青链霉素的DMEM培养基), 每隔3 d更换新鲜培养基, 每日添加Vit C(质量浓度 50 mg/L 共1滴), 诱导2周, 进行茜素红

染色检测。

成脂肪细胞诱导分化: 将P2或P3下颌骨BMSCs用PBS清洗3次后0.25%胰酶消化, 以 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于35 mm培养皿中, 待细胞长到70%左右时, 更换为成脂诱导液A(IBMx 50 mmol/L, Insulin 10 mmol/L, Dex 10^{-6} mmol/L, Indomethacin 200 μmol/L, 体积分数10%FBS, 1%青链霉素的DMEM培养基)进行成脂诱导, 3 d后更换成脂诱导液B(胰岛素 10 mmol/L、体积分数10%FBS、含青链霉素的DMEM培养基)进行维持。完成2个诱导周期后, 用B液维持3 d, 油红O染色。

主要观察指标: 兔下颌骨BMSCs形态、生长增殖曲线、克隆形成和成骨成脂诱导分化结果。

2 结果

2.1 兔下颌骨BMSCs形态 原代培养的下颌骨BMSCs, 24~48 h镜下观察为小圆形, 呈铺路石样广泛分布; 48 h后可见部分细胞形成集落, 部分细胞体积增大, 呈现条索状外形; 3 d镜下观察细胞集落增大, 并向外延展; 5 d细胞基本呈现条索状或三角形外观, 分布均匀; 7 d细胞已达到70%汇和, 细胞形态均一, 9 d原代培养结束, 以1:2传代, 共传7代, 见图1。

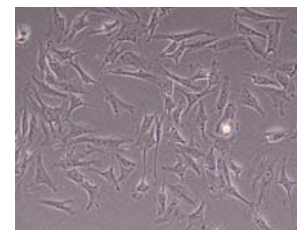


Figure 1 Morphology of rabbit mandible-derived bone marrow mesenchymal stem cells (×100)
图1 兔下颌骨骨髓间充质干细胞形态(×100)

2.2 兔下颌骨BMSCs生长曲线 见图2。

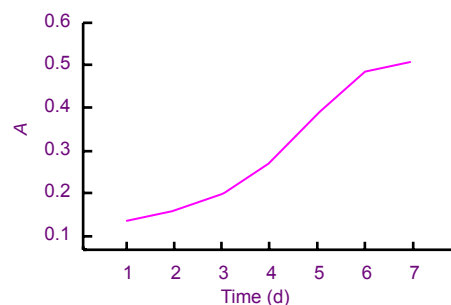


Figure 2 Growth curves of rabbit mandible-derived bone marrow mesenchymal stem cells
图2 兔下颌骨骨髓间充质干细胞生长曲线图

MTT法检测细胞增殖1~7 d的A值, 结果显示, 下颌骨BMSCs经历了潜伏期、对数生长期和平台期。

2.3 克隆形成试验结果 兔下颌骨BMSCs培养2周后, 单个细胞具有自我复制、增殖的特性, 成纤维集落形成单位(colony forming unit-fibroblastic, CFU-F)外观形成, 见图3, 克隆形成率为15%。

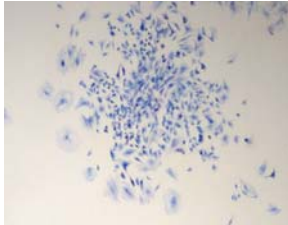


Figure 3 Fibroblast colony forming units during clone formation of rabbit mandible-derived bone marrow meenchymal stem cells under inverted microscopy (×40)

图3 兔下颌骨骨髓间充质干细胞克隆形成试验中的成纤维集落形成单位外观(×40)

2.4 兔下颌骨BMSCs成骨诱导分化 成骨诱导第5天见细胞开始聚合, 第7天聚合的中央部透光性差, 周围细胞形态稍有变化, 第14天见培养皿底壁有白色小结节, 茜素红染色呈阳性反应, 钙结节染成红色, 见图4。

Figure 4 Mineralized nodules stained by alizarin red in rabbit mandible-derived bone marrow meenchymal stem cells under inverted microscopy (×100)

图4 兔下颌骨骨髓间充质干细胞成骨诱导茜素红染色结果(×100)

2.5 兔下颌骨BMSCs成脂诱导分化 成脂诱导3 d后见细胞核周围出现少许小圆形脂滴, 随着诱导时间的延长, 小脂滴数目增多, 并将细胞核推向一侧, 完成2个诱导周期后40 g/L多聚甲醛固定, 油红O染色, 脂滴染成橘红色, 见图5。

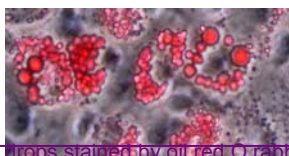


Figure 5 Lipid drops stained by oil red O rabbit mandible-derived bone marrow meenchymal stem cells under inverted microscopy (×200)

图5 兔下颌骨骨髓间充质干细胞成脂诱导油红O染色结果(×200)

3 讨论

BMSCs是指骨髓基质中具有较强增殖能力和多向诱导分化潜能的细胞群, 经体外培养诱导后, 可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞和神经细胞等多种细胞前体细胞的多潜能干细胞^[1-4]。BMSCs主要存在于骨髓中, 以往研究通常从髂棘抽取骨髓^[5-6], 或从离体的股骨、胫骨、肋骨中冲出骨髓获取BMSCs。近年来有国外学者尝试研究BMSCs新的取材来源, 及从这些部位获取的细胞是否具有干细胞的特性^[7-10]。

下颌骨来源BMSCs形态与以往取材来源的BMSCs相似, 不同在于原代培养时间较短, 9 d左右原代培养结束, 而以往取材来源的BMSCs原代培养通常为14 d左右。在体外分离培养条件下进行倒置显微镜观察, 下颌骨BMSCs最初是以小圆形的细胞存在; 24~48 h后, 细胞体积逐渐变大, 并呈鹅卵石或铺路石样贴壁生长; 72 h后, 贴壁细胞呈条梭状或三角形, 并形成集落, 呈漩涡状分布, 呈典型“CFU-F”外观^[4, 11]。

下颌骨BMSCs具有较强的自我复制、增殖的特性。实验应用MTT法检测细胞的增殖情况分析得出, 下颌骨BMSCs在体外培养条件下也经历细胞潜伏期、对数生长期、生长停滞期。从细胞生长曲线图上可观察到, 细胞接种后2 d内, 细胞只有少数增殖, 大多数仍处于待增殖状态; 第2天到第6天, 曲线明显斜向上升, 大量细胞复制增殖, 此时为细胞对数生长期; 第6天后, 细胞增殖减低, 多数处于停滞增殖的状态, 在曲线图上, 线段逐渐趋于水平。克隆形成试验表明下颌骨来源的BMSCs具有较强的单个细胞复制、增殖的特点, 克隆形成率为15%, 这表明细胞具有较强的独立生存能力。

下颌骨BMSCs体外经过成骨和成脂诱导, 形成了钙结节和脂滴, 说明下颌骨中分离获取的细胞群, 具有多向诱导分化潜能, 这与从髂骨或股骨中获取的BMSCs的生物学特性相同, 都可以多向诱导分化^[12-13]。与以往研究不同的是, 从股骨或髂骨来源的BMSCs体外成骨时间一般为21 d, 而下颌骨来源的BMSCs在同样的成骨诱导条件下, 诱导7 d时在培养皿底壁肉眼可见不透光的白色小点, 诱导14 d后形成钙化结节。

实验首次从兔下颌骨中分离获取BMSCs, 经体外培养、扩增后形态高度一致, 具有自我复制增殖的特性和多向诱导分化的潜能。实验对下颌骨来源BMSCs的生物学特性做了初步研究, 下颌骨来源BMSCs是否能够应用于未来临床治疗, 还需进一步深入研究。

致谢: 首都医科大学附属北京口腔医院分子生物实验室各位老师对实验方法上的帮助, 感谢佳木斯大学生命科学中心实验室为本实验提供实验场所。

4 参考文献

- [1] Friedenstien AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol. 1966;16(3):381-390.
- [2] Zheng YH, He T, Kuang SJ, et al. Guoji Yiyao Weisheng Daobao. 2010;16(02):129-134.
郑有华,何滔,匡世军,等.人骨髓间充质干细胞体外分离培养及其生物学特性[J].国际医药卫生导报,2010,16(02):129-134.
- [3] Dvorakova J, Hrubá A, Velebný V, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. Cell Biol Int. 2008;32(9):1116-1125.
- [4] Owen ME, Cavé J, Joyner CJ. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. J Cell Sci. 1987; 87(5):73-81.
- [5] Fang DJ, Seo BM, Liu Y, et al. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Is an Optimal Approach for Plastic Surgery. Stem Cells. 2007;25(4):1021-1028.
- [6] Fang DJ, Liu Y, Zhang CM, et al. Beijing Kouqiang Yixue. 2006; 14(1):23-26.
房殿吉,刘怡,张春梅,等.骨髓间充质干细胞介导用于颌面整形的动物实验研究[J].北京口腔医学,2006,14(1):23-26.
- [7] Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. J Dent Res. 2009;88(3): 249-254.
- [8] Steinhady Y, Aslan H, Regev E, et al. Maxillofacial-derived stem cells regenerate critical mandibular bone defect. Tissue Eng Part A. 2008;14(11):1763-1773.
- [9] Yamaza T, Ren G, Akiyama K, et al. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. J Dent Res. 2011;90(3): 317-324.
- [10] Zheng YH, Liu JG, Su K, et al. Zhonghua Kouqiang Yixue Yanjiu Zazhi. 2009;3(2):151-158.
郑有华,张志光,苏凯,等.人髂突来源骨髓间充质干细胞的分离与鉴定[J].中华口腔医学研究杂志, 2009,3(2):151-158.
- [11] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 1998;279(5356):1528-1530.
- [12] Shahdadfar A, Frensdal K, Haug T, et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. Stem Cells. 2005;23(9):1357-1366.

- [13] Sudo K, Kanno M, Miharada K, et al. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and /or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. Stem Cells. 2007;25(7):1610-1617.
- [14] 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.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金资助项目(81170935), “骨髓间充质干细胞治疗下颌骨放射性骨坏死大型动物实验研究”。

作者贡献: 房殿吉为本实验设计、评估及对文章负责者; 实验实施、撰写及审核者为李松; 资料收集为郭延伟。

利益冲突: 本课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[14]。

文章概要:

文章要点: 实验观察兔下颌骨来源的骨髓间充质干细胞体外分离、培养及其生物学特性。

关键信息: 实验首次从兔下颌骨中分离获取骨髓间充质干细胞, 经体外培养、扩增后形态高度一致, 具有自我复制增殖的特性和多向诱导分化的潜能。

研究的创新点及不足: 实验的创新点在于骨髓间充质干细胞新的取材来源为兔下颌骨。下颌骨来源骨髓间充质干细胞是否能够应用于未来临床治疗, 还需进一步深入研究。

外国专家修饰的医学英语句型: “针灸在改善整体功能和认知功能方面优于单纯西药”

中文	英文修饰后	英文修饰前
针灸在改善整体功能和认知功能方面 优于 单纯西药	Acupuncture resulting in improved overall function and cognitive function was superior to western medicine.	Acupuncture in improving the overall function and cognitive function was better than Western medicine.
随机对照试验研究, 无论文章是否发表, 是否采用分配隐藏及盲法; ②研究文献为全文文献, 语言限于中英文	(1) Randomized, controlled trial, regardless of publication, to adapt to allocation concealment and blind method; (2) English or Chinese language.	(1) Randomized controlled trial, regardless of whether the published article, whether to adopt the allocation concealment and blind method; (2) language is in English and Chinese.
可合并的文献指有 5 篇 A 级证据、2 篇 B 级证据以及 15 篇 C 级证据都各自为独立的随机对照试验	The manuscripts were combined: five A-level evidence studies, two B-level evidence studies, and 15 C-level evidence studies, which were independent, randomized, controlled trials with different outcome indicators.	Literature was combined because of although a 5 A-level evidence, 2 B-level evidence and 15 C-level evidence were independent randomized controlled trials, with a different outcome indicators.