

真皮来源细胞亚群修复小鼠颅骨缺损

王庭亮, 何金光, 张 阳, 李 丹, 董佳生, 祝 联(上海交通大学医学院附属第九人民医院整复外科, 上海市 200011)

文章亮点:

- 1 通过对皮肤中细胞进行分选富集, 从中获取需要的细胞亚群, 作为骨组织工程的种子细胞。所选用的分选标志是骨形成蛋白受体, 是在成骨分化过程中起关键作用的一类膜表面受体蛋白。
- 2 对分选获得骨形成蛋白受体 I B 亚型细胞进行体外研究鉴定, 证实其具有成骨分化的潜力, 并在体外种植于珊瑚支架上构建组织工程骨。
- 3 以颅骨缺损模型研究细胞修复骨缺损的能力, 采用影像学、组织学等方法评估实验构建的组织工程骨能够修复骨缺损, 表明其有促进骨再生的潜能。

关键词:

干细胞; 培养; 皮肤; 骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞; 骨组织工程; 珊瑚; 成体干细胞; 颅骨缺损; 国家自然科学基金

主题词:

皮肤; 骨形态发生蛋白受体, I 型; 颅骨

基金资助:

国家自然科学基金项目(81272019)

摘要

背景: 考虑到皮肤是全身最大的器官, 拥有丰富的皮肤毛细血管网, 可能存在足够的成体干细胞用于组织工程。

目的: 探讨真皮骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞的成骨潜能和修复骨缺损的能力。

方法: 采用组织学方法分析骨形成蛋白受体 I B 亚型细胞在皮肤中的定位和表达情况。新鲜皮肤组织制成单细胞悬液, 以表面蛋白骨形成蛋白受体 I B 亚型作为分选标志, 采用免疫磁珠分选获得骨形成蛋白受体 I B 亚型细胞。在体外进行成骨诱导分化, 并分别通过碱性磷酸酶染色和茜素红染色检测其碱性磷酸酶和钙结节的表达。将骨形成蛋白受体 I B 亚型细胞复合于珊瑚支架后修复小鼠颅骨缺损, 术后 6 周通过组织学方法, 术后 24 周通过影像学方法评估其修复骨缺损的能力。

结果与结论: 骨形成蛋白受体 I B 亚型细胞在皮肤中呈单个分散存在, 位于真皮网状层。通过免疫磁珠分选可获得表达骨形成蛋白受体 I B 亚型的细胞亚群。体外成骨诱导后, 碱性磷酸酶染色呈阳性表达, 茜素红染色显示大量的钙结节形成, 证实其在体外具有成骨分化能力。体内修复颅骨缺损 6 周后组织学结果显示在骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞复合珊瑚组可见大量新生骨形成; 24 周影像结果显示骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞复合珊瑚组的颅骨骨缺损组织基本完全修复。结果表明真皮来源的骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞亚群拥有成骨的潜能, 其可能是骨组织工程适合的种子细胞。

王庭亮, 何金光, 张阳, 李丹, 董佳生, 祝联. 真皮来源细胞亚群修复小鼠颅骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(19):3067-3073.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.19.020

Dermis-derived cell subpopulation is used to repair mouse calvarial defects

Wang Ting-liang, He Jin-guang, Zhang Yang, Li Dan, Dong Jia-sheng, Zhu Lian (Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract

BACKGROUND: In consideration of skin as the largest organ all over the body and its abundant vessels and vessel plexuses, there would be sufficient adult stem cells for tissue engineering.

OBJECTIVE: To investigate the osteogenic potential of dermis-derived bone morphogenetic protein receptor subtype IB (BMPR-IB) positive cells.

METHODS: In current study, histochemical analysis was adopted to study the localization and expression of BMPR-IB⁺ cells in skin. Fresh skin samples were digested into single cell suspension. Then, the surface marker BMPR-IB was used to isolate cell subpopulation by magnetic activated cell sorting from freshly prepared single cell suspension. After that, the osteogenic potential *in vitro* and *in vivo* was tested. Alkaline phosphatase staining and alizarin red staining were performed after osteogenic induction *in vitro*. The BMPR-IB⁺ cells were seeded onto coral scaffolds, and the scaffolds were used to repair critical-sized calvarial defects of mice. Histochemical

王庭亮, 男, 1989 年生, 江西省上饶市人, 汉族, 2015 年上海交通大学医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事组织工程与皮肤科学研究。

通讯作者: 祝联, 博士, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院整复外科, 上海市 200011

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)19-03067-07

稿件接受: 2015-04-14

http://www.crter.org

Wang Ting-liang, Master, Physician, Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Corresponding author: Zhu Lian, M.D., Chief physician, Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Accepted: 2015-04-14

analysis was performed at 6 weeks postoperatively and micro-CT analysis was carried out at 24 weeks postoperatively to evaluate the ability of bone repairment.

RESULTS AND CONCLUSION: We localized BMPR-IB cells *in situ* by immunohistochemistry that turned out to be expressed in the reticular layer of dermis and by single cells. Cell subpopulation which expressed BMPR-IB could be sorted by magnetic activated cell sorting. Alkaline phosphatase staining was obviously positive and lots of calcium modules were confirmed by alizarin red staining after osteogenic induction, indicating that BMPR-IB⁺ cells had the osteogenic potential *in vitro*. Histochemical analysis demonstrated that plenty of new bone formation was found in BMPR-IB⁺ cells group after 6 weeks *in vivo*. Micro-CT analysis revealed that BMPR-IB⁺ cells-coral scaffold complex could repair calvarial defects successfully after 24 weeks *in vivo*. These results indicated that dermis-derived BMPR-IB⁺ cells possessed adequate osteogenic potential. Moreover, they might be promising seed cells for bone tissue engineering.

Subject headings: Skin; Bone Morphogenetic Protein Receptors, Type I; Skull

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81272019

Wang TL, He JG, Zhang Y, Li D, Dong JS, Zhu L. Dermis-derived cell subpopulation is used to repair mouse calvarial defects. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(19):3067-3073.

0 引言 Introduction

创伤、肿瘤、慢性骨病等引起的大块骨缺损仍然是临床治疗的重大挑战。骨移植的需求近年来增长迅速, 据估计形成了每年18亿美元医疗费用。随着人口老龄化的加剧和对医疗水平需求的增加, 这个数据依然在快速增长。目前的方案主要是自体骨和同种异体骨移植, 然而它们的作用有限, 因此骨组织工程成为将来最有潜力的解决方案。骨组织工程的实现包括几个要点: 足够的种子细胞, 结构胜任且生物相容的支架材料, 合适的受区生长环境供支架细胞存活和塑形。

骨髓间充质干细胞一直是骨组织工程的“金标准”种子细胞。大量的研究都表明骨髓间充质干细胞能够用于骨组织工程修复骨缺损, 但也有其主要缺陷: 获取困难且细胞的量太少, 这一缺陷限制了它的使用, 因此, 发现合适的种子细胞至关重要。骨组织工程的种子细胞需要符合以下条件: 细胞来源丰富, 容易获取, 对身体造成的损害轻微, 拥有足够的成骨潜能。

皮肤是人体最大的组织器官, 拥有丰富的血管网, 在再生医学方面, 它的潜能长期被低估。Toma等^[1]第1次从皮肤中分离出成体干细胞称为皮肤来源前体细胞(skin-derived precursors, SKPs)。皮肤来源前体细胞具有多能性, 能分化产生神经胚层和中胚层起源的子代细胞, 它的发现提示皮肤中可能拥有具有成骨分化潜能可以用于组织工程的干细胞群体。

骨形成蛋白受体(bone morphogenetic protein receptors, BMPR)通过转导骨形成蛋白信号通路在骨生成过程中发挥重要作用。当骨形成蛋白与细胞表面I型和II型骨形成蛋白受体低聚复合体结合, II型骨形成蛋白受体使I型骨形成蛋白受体磷酸化。接着, 被磷酸化激活的I型骨形成蛋白受体使Smad1/5/8也发生磷酸化, 磷酸化后的Smad进一步和Smad4结合。该复合体转移至细胞核内, 调节成骨相关的基因转录, 如Dlx5和ALP。虽然骨形成蛋白受体各个亚型的确切作用并不完全明确, 但是一些研究表明骨形成蛋白受体IB亚型更倾向于转导成骨分化相关

的信号^[2-3]。课题组之前的研究显示使用骨形成蛋白受体IB亚型作为分选的表面标志从皮肤中分选获得的骨形成蛋白受体IB亚型阳性细胞有成骨分化潜能^[4]。

本研究采用骨形成蛋白受体IB亚型这一表面标志分选皮肤制成的单细胞悬液, 在体外和体内分别检测其成骨潜能, 以期能为骨组织工程提供有前景的种子细胞。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2013年1月至2014年6月在上海市组织工程研究重点实验室完成。

材料:

皮肤样本: 取自儿童常规包皮环切术, 年龄6个月-12岁, 该研究经上海交通大学医学院伦理委员会审查通过, 家长签署知情同意书。

实验动物: 雄性BALB/C裸鼠24只, SPF级, 8周龄, 体质量约20 g, 由复旦大学实验动物部提供, 许可证号: SYXK(沪)2009-0082。

实验方法:

组织学分析: 为了在皮肤原位定位骨形成蛋白受体IB亚型阳性细胞, 新鲜的包皮标本获取后用40 g/L多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋。使用抗人骨形成蛋白受体IB亚型抗体(ab78417, Abcam)作为一抗进行免疫组化染色, 具体过程按照产品说明书进行。

骨形成蛋白受体IB亚型阳性细胞分选: 获取的包皮样本取出皮下组织, 切成大小5 mm×2 mm的长条状, 然后置于8 U/mL I型中性蛋白酶(Worthington Biochemical Corporation)中4 °C浸泡过夜。次日分离表皮与真皮, 分离后的真皮剪成碎块, 然后置于2 g/L胶原酶(SERVA)中37 °C水浴振荡消化3 h。细胞悬液经40 μm细胞过滤器过滤制成单细胞悬液, 单细胞悬液被直接接种于10 cm培养皿(Becton-Dickinson)或标记后进行免疫磁珠分选。接种的细胞密度为1×10⁵/cm², 使用含有体积分数为10%胎牛血清(Gibco)的低糖DMEM培养液, 添加100 U/mL青霉素和

100 mg/L链霉素(Sigma)。单细胞悬液经抗人骨形成蛋白受体 I B亚型抗体(FAB5051P, R&D Systems)标记后采用流式细胞仪分析其表达率。

细胞悬液经离心后再次重悬于含体积分数为0.5%胎牛血清的PBS中,按照生产商的建议标记抗人骨形成蛋白受体 I B亚型抗体,并进一步标记磁珠二抗(130-048-801, Miltenyi Biotec)。标记完毕的细胞悬液通过自动磁珠分选仪(Miltenyi Biotec)进行分选,获得骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞。获得的细胞种植于培养皿,置于37℃,体积分数为5% CO₂培养箱中孵育,24 h后第1次换液以去除未贴壁的细胞,之后每3 d换液1次直到细胞长至80%融合,胰酶消化后传代。

细胞增殖和成骨分化能力鉴定: 细胞增殖用Alamar Blue法(Biosource International)进行检测。简单来说,将第3代骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞和未进行分选的的皮肤来源成纤维细胞(dermis-derived fibroblast, DFBs)分别以 2×10^3 /孔种植于96孔板,在37℃,体积分数为5% CO₂培养箱中孵育,加入10% Alamar Blue试剂,分别在24, 48, 72, 96 h后将培养的上清液转移至另一96孔板,在570 nm和600 nm处采用酶标仪检测其吸光度值并绘制曲线。

第3代骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞和皮肤来源成纤维细胞均进行成骨诱导,当培养细胞达到80%融合时,换用成骨诱导液,即在常规培养液中添加 10^{-8} mol/L地塞米松, 10 mmol/L β 甘油磷酸, 50 mg/L维生素C(均来自Sigma)。诱导7 d后进行碱性磷酸酶染色,诱导28 d后进行茜素红染色。

珊瑚支架的制备和特性: 珊瑚取自海南岛天然珊瑚礁, Micro-CT扫描(Scanco Medical AG)分析珊瑚的三维结构,孔径互相交联的珊瑚的孔隙率为 $(59.5 \pm 7.0)\%$,平均孔径大小为 (180 ± 55) μ m,孔壁厚度为 (88 ± 26) μ m。珊瑚被制成直径4 mm,厚度1mm的圆片,超声清洗,高温高压消毒后备用,典型的珊瑚支架图片如图1所示。

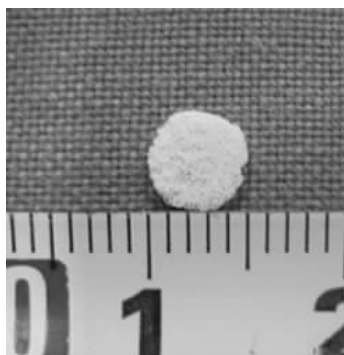


图1 珊瑚支架
Figure 1 Coral scaffold
图注: 珊瑚支架直径4 mm, 厚度1 mm。

细胞与珊瑚支架复合及其生物学特性: 第2代骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞和皮肤来源成纤维细胞达到80%融合时,分别经胰酶消化,离心,重悬至细胞浓度为 4×10^6 L⁻¹,然后以 1.5×10^7 /cm³(2×10^5 个细胞/支架)分别种植于珊瑚支架上,放置温箱中孵育1 h以便细胞贴附于支架,之后加满

培养液使液面覆盖支架。在常规培养液中孵育3 d后换为成骨诱导液,成骨诱导液每3 d更换1次。

骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞和皮肤来源成纤维细胞在珊瑚上的增殖情况: 分别将 5×10^3 细胞种植于支架上,置于24孔板内常规培养,待细胞贴附后(约12 h)加入10% Alamar Blue试剂,于12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h将培养上清液转移至96孔板,酶标仪测量其在570和600 nm处的吸光度值。未种植细胞的珊瑚支架同样用培养液孵育后作为对照组。

扫描电镜(Philips XL-30)观察骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞在支架上的贴附和生长情况: 细胞种植于支架后1, 3, 7 d, 2.5%戊二醛固定, 0.1%四氧化锇固定,梯度乙醇脱水, CO₂干燥器内干燥,喷金,扫描电镜下观察并拍照。以单纯的珊瑚圆片进行对照。

颅骨缺损模型制备: 24只8周龄裸鼠随机平均分成2组,每组12只。麻醉满意后,在头皮正中矢状切开约2 cm切口,暴露颅顶,棉签轻轻擦去右侧颅骨骨膜,用直径4 mm的空心钻在裸鼠右侧颅骨造成全层缺损,同时用单纯珊瑚支架、骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞复合珊瑚支架进行缺损修复。头皮切口用5-0尼龙线关闭(图2)。

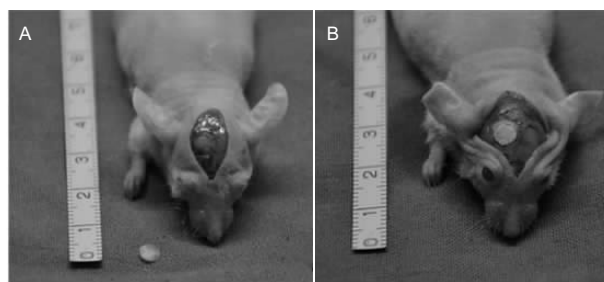


图2 颅骨缺损模型制备过程

Figure 2 Surgical procedures of calvarial defects

图注: 图中 A 为沿正中线切开小鼠头皮,空心钻在右侧颅顶造成直径4 mm 颅骨缺损; B 为珊瑚支架填充于颅骨缺损处。

细胞支架复合在体内成骨的情况: 术后6周,每组取6只裸鼠处死后获取其颅顶骨, PBS清洗后在40 g/L多聚甲醛中固定24 h,在10% EDTA-2Na溶液(pH7.4)中脱钙2周,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,分别进行常规的苏木精-伊红染色, Masson三色染色,免疫组化染色来评估新骨形成,结构重建和血管化。免疫组化使用的一抗为抗骨钙素抗体(ab93876, Abcam)。

micro-CT扫描分析骨形成: 术后24周,剩余的每组6只裸鼠进行micro-CT扫描分析骨形成。过量麻醉处死后,裸鼠头颅分别进行micro-CT扫描并进行三维重建,同时用软件(GE AW4.1)分析颅骨修复百分比。

主要观察指标: 组织学和影像学观察体内成骨情况。

统计学分析: 所有的实验数值均采用 $\bar{x} \pm s$ 的方式表达。两组间数据差异性均采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 真皮来源骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞体外生物学特性 其他研究者已经报道过很多的皮肤细胞表面标志, 但是还未有研究报道骨形成蛋白受体 I B 亚型作为细胞表面标志在皮肤中的表达。本实验分析了骨形成蛋白受体 I B 亚型在包皮组织的表达, 石蜡包埋切片后的免疫组化染色显示表达骨形成蛋白受体 I B 亚型标志的细胞分散存在, 主要见于皮肤的网状层, 极少数表达于皮肤乳头层。部分细胞表达呈现围绕小血管周的现象(图3)。

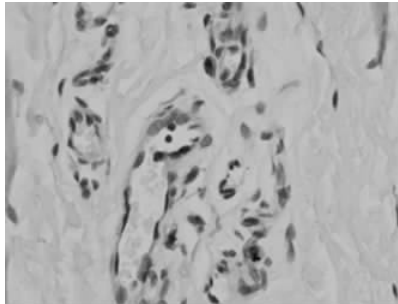


图3 骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞在皮肤定位($\times 200$)

Figure 3 Localization of bone morphogenetic protein receptor subtype IB-positive cells in the dermis ($\times 200$)

图注: 阳性细胞在皮肤中定位于真皮网状层, 围绕在小血管周围。

经磁珠分选后的骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞表现出均一的梭形, 而没有经过分选的皮肤成纤维细胞则表现出相对异质的外观。细胞增殖分析显示骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞在96 h 内的检测过程中一直保持增殖, 其增殖潜能曲线与皮肤成纤维细胞基本相似, 均有强的增殖能力。

碱性磷酸酶活性是成骨早期的一个重要标志, 在成骨诱导7 d 染色后可以观察到在骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞中呈强阳性表达, 在皮肤成纤维细胞中呈弱阳性表达。钙沉积是成骨晚期的一个重要标志, 在诱导28 d 后相差显微镜下可观察到骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞中有大量的折光性强的钙结节, 而在皮肤成纤维细胞中基本未观察到。茜素红染色证明了前述观察到的折光性强的结节即为钙结节, 证实骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞比皮肤成纤维细胞有明显更强的成骨能力(图4)。

2.2 细胞与珊瑚支架的相容性 观察骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞在珊瑚上的生长增殖情况, 与未分选的真皮成纤维细胞进行对照, 并以空白珊瑚作为空白对照, 描绘其生长增殖曲线(图5)。扫描电镜观察到骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞种植到珊瑚支架1 d 后, 细胞黏附于支架上并仍保持其梭形外观, 种植3 d 和7 d 可以看到细胞在珊瑚上生长良好, 增殖迅速, 并且分泌出丰富的细胞外基质(图6)。

2.3 实验动物一般情况 在术后早期无死亡、感染、切口延迟愈合现象。术后远期也未出现一些并发症如癫痫、体重下降、畸形等。

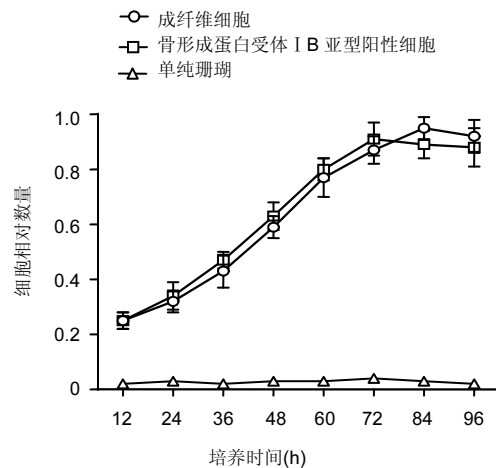


图5 细胞在珊瑚支架上的增殖曲线

Figure 5 Proliferation curve of cells seeded onto coral scaffolds

图注: 骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞与未经分选的真皮成纤维细胞生长增殖能力无明显差异, 均呈 S 形生长曲线。

2.4 体内移植物的早期分析 术后6周组织学分析新骨生成和血管化情况。苏木精-伊红染色和Masson染色均显示骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组修复缺损组织更致密, 而且骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组珊瑚的降解速度快于单纯珊瑚组, 说明细胞种植于珊瑚上可以加速珊瑚支架吸收。更重要的是, 在骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组, 可以见到大量的广泛分布的新生骨样组织, 说明开始了骨形成, 而单纯珊瑚支架组新生骨样组织极少。苏木精-伊红染色显示骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组颅骨缺损处由板障样组织修复, 显示有致密的内板和外板结构。

骨钙素是在成骨过程中分泌的主要非胶原蛋白基质, 经常作为分析骨形成的生化标志。免疫组化分析显示单纯珊瑚支架组中这些成骨的细胞外基质标志阳性率显著低于骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组。半定量组织学分析显示骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组阳性区域要明显大于单纯珊瑚支架组。

血管化对于移植组织的存活至关重要, 同样也是支架存活的重要标志。为了评估支架的血管化, 采用了表面标志CD31来显示其血管再生情况, CD31是血管内皮细胞表达的细胞表面标志。定量的组化分析显示骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组CD31表达远远高于单纯珊瑚组(图7)。

2.5 颅骨缺损修复的大体观和三维micro-CT分析 术后24周, 裸鼠过量麻醉处死后, 经大体观察和micro-CT扫描可见到骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组颅骨缺损组织基本完全修复, 而单纯珊瑚组可见明显的结缔组织覆盖缺损处, 不能完全修复。

经软件分析, 骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组颅骨修复的面积分数为(96.1 $\pm$ 3.1)%, 单纯珊瑚组为(64.3 $\pm$ 14.6)%, 两组比较差异有显著性意义。骨形成蛋白受体 I

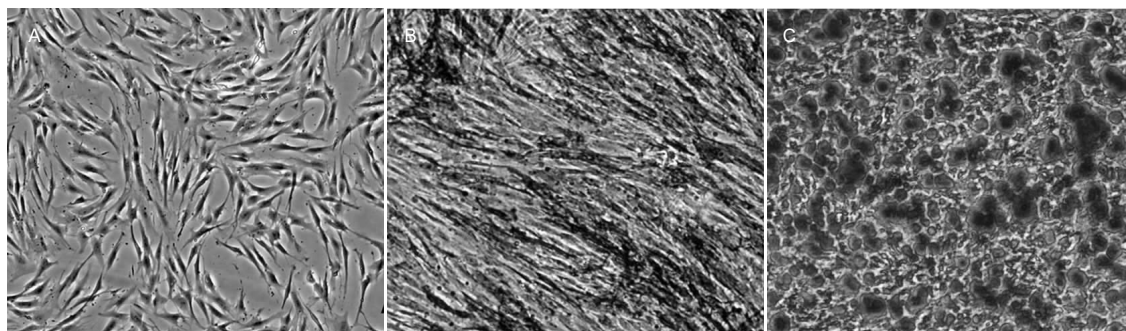


图4 成骨诱导前后骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞形态(倒置相差显微镜, $\times 100$)

Figure 4 Morphology of bone morphogenetic protein receptor subtype IB-positive cells before and after osteogenic induction (inverted phase contrast microscope, $\times 100$)

图注: 图中 A 为成骨诱导前骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞, 细胞呈纺锤状, 核深染; B 为诱导 7 d 骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞, 碱性磷酸酶染色呈现大量紫色的深染区域; C 为诱导 28 d 的骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞, 茜素红染色后大量的钙结节染成深红色。

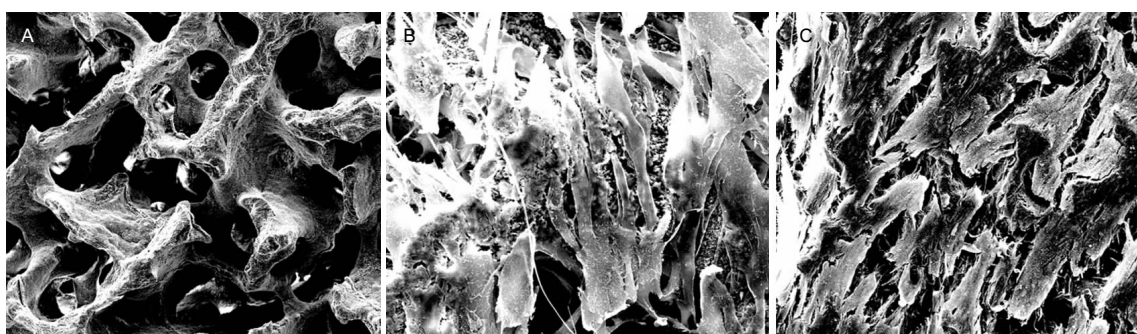


图6 扫描电镜观察骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞与珊瑚支架上的贴附和生长情况

Figure 6 Scanning electron microscope evaluation of the adherence and proliferation of bone morphogenetic protein receptor subtype IB-positive cells on the coral scaffold

图注: 图中 A 为种植前, 显示珊瑚的多孔相互联结结构($\times 200$); B 为种植 3 d, 细胞黏附于珊瑚孔壁上贴壁生长, 有少量细胞外基质分泌($\times 500$); C 为种植 7 d, 细胞快速增殖, 已完全覆盖珊瑚孔壁, 有大量的细胞外基质分泌($\times 500$)。

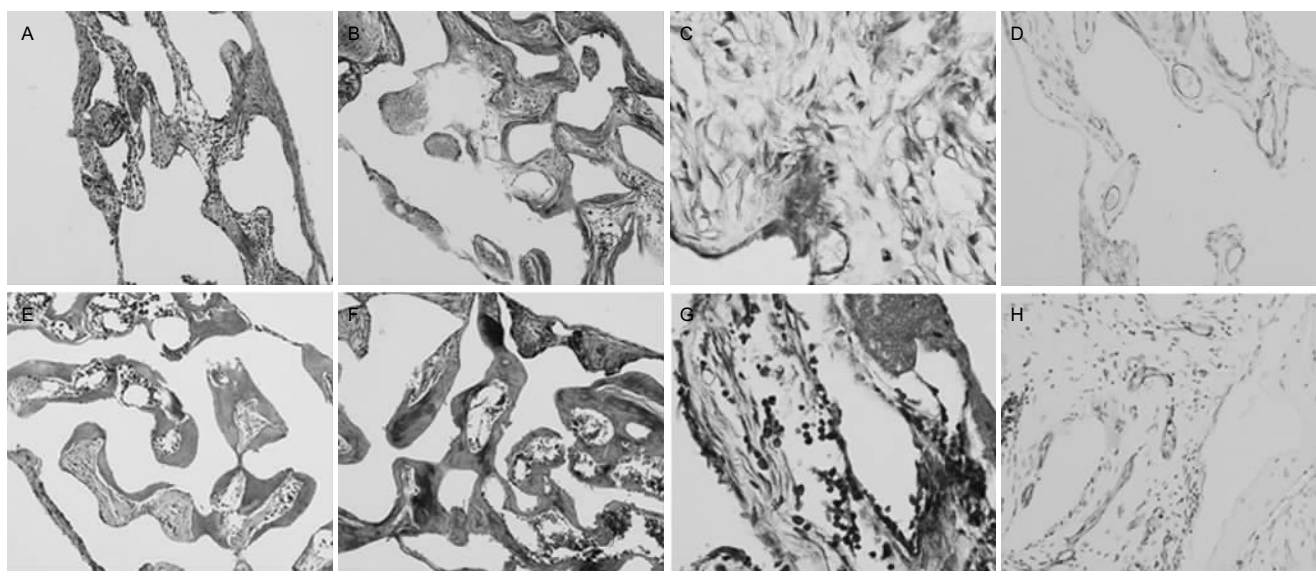


图7 细胞支架复合体内成骨能力鉴定($\times 100$)

Figure 7 Osteogenic potential of the complex *in vivo* ($\times 100$)

图注: 图中 A-D 为单纯珊瑚组; E-H 为骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组。A, E 为苏木精-伊红染色, 骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组大量的新生骨样组织形成, 而单纯珊瑚组只见少量结缔组织; B, F 为 Masson 染色, 骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组生成大量胶原组织, 而单纯珊瑚组形成的胶原明显少; C, G 为骨钙素免疫组化染色, 棕色为阳性区域, 可见骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组阳性区域明显大于单纯珊瑚组, 说明生成了更多骨钙素; D, H 为 CD31 免疫组化染色, 新生血管内皮被染成棕色, 可见骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组血管密度远大于单纯珊瑚组。

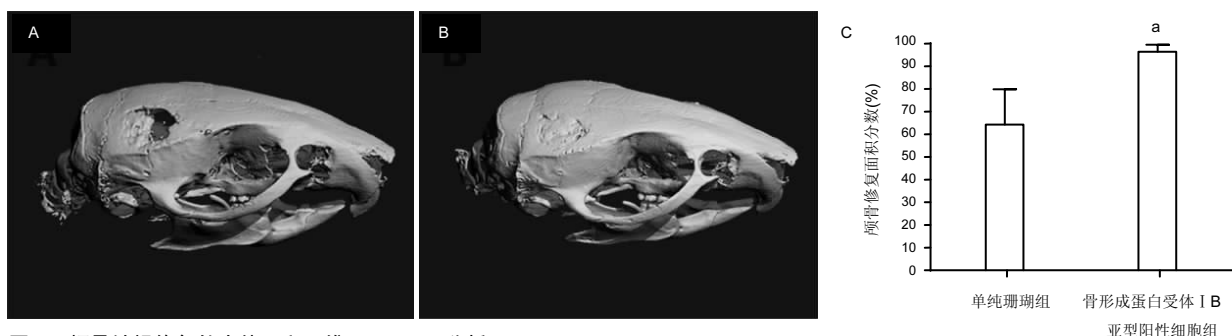


图8 颅骨缺损修复的大体观和三维 micro-CT 分析

Figure 8 Gross observation and micro-CT analysis of repaired calvarial defects

图注: 图中 A 为单纯珊瑚组, 缺损的颅骨只有一部分被骨组织修复, 仍有较大区域由结缔组织连接未被修复; B 为骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞组, 颅骨缺损完全被骨组织所修复, 表面光滑, 骨折线不明显; C 为两组颅骨修复的面积百分数, 与单纯珊瑚组比较, ^a $P < 0.05$ 。

B亚型阳性细胞组修复后的新生颅骨更接近于正常颅骨, 而单纯珊瑚组更多地表现出残留的珊瑚形态(图8)。

3 讨论 Discussion

骨组织工程种子细胞的探索虽然取得了许多进展, 如骨髓间充质干细胞和脂肪间充质干细胞早已被发现并进行了深入研究。然而骨髓间充质干细胞在骨髓中的含量极低, 难以获得足够的数量。脂肪间充质干细胞虽然容易获取, 但是其细胞组成群体复杂, 难以进行质量控制^[6]。这些因素制约了骨组织工程种子细胞的发展。骨形成蛋白受体 I B亚型在骨形成蛋白信号传导过程中起重要作用^[6-7], 当下调骨形成蛋白受体 I B亚型表达时会明显减少碱性磷酸酶的活性, 而碱性磷酸酶是成骨分化早期的一个重要标志。本研究通过免疫磁珠从皮肤中分选得到表达骨形成蛋白受体 I B亚型标志的贴壁细胞亚群, 表现出明显更高的成骨分化潜能。随后的体内实验显示由骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞和珊瑚构建的组织工程骨能有效修复裸鼠的颅骨缺损。皮肤来源的骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞具有如下优势: 容易获取, 供区损伤小, 细胞群体均一, 确切的成骨潜能, 可以反复获取^[8]。

免疫组织化学分析表明骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞在皮肤的定位有以下基本特性: 单个分布, 主要位于真皮网状层, 可能的血管周定位。这些定位特性暗示骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞可能与血管周细胞相关。血管周细胞在许多组织器官中被发现并被描述成间充质干细胞的另一种表述^[9-10]。由此猜测, 骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞可能是间充质干细胞的一个亚群, 拥有成骨分化潜能并表现出血管周的定位。Driskell等^[11]发现皮肤中上层真皮和下层真皮的细胞是由不同来源的细胞组成, 并且表现出明显不同的功能。实验发现骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞主要存在于真皮下层而几乎不出现在真皮上层, 说明其可能也是有一个共同的细胞来源, 这个结论与刚才提到的研究结果不谋而合。但是, 本实验结果仍然缺少对骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞和血管的关系以及它的细胞来源的精确研究, 因此目前还不能得出一个确切的结论。

真皮骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞修复骨组织的可能机制有三点: 其一, 自身进行成骨分化沉积骨基质; 其二, 释放在成骨相关或成血管相关的生长因子和信号分子, 促进相关成骨分化和血管形成; 其三, 形成诱导成骨细胞和成血管细胞迁移至目的位置的微环境。在本研究中, 从体外实验可知骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞可以向成骨分化, 在体内仍可保持其分化趋势, 说明其本身的成骨分化和骨基质的沉积在其中发挥了重要的作用。此外, 从结果中可见其血管密度比未种植细胞的单纯珊瑚显著增高, 说明真皮骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞通过释放一些因子, 促进新生血管的形成。虽然其确切机制尚未完全阐明, 但是可以明确真皮骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞在体内可促进骨的再生和修复, 可以初步用作骨组织工程的种子细胞。

间充质干细胞是一群拥有不同层次分化潜能的细胞群。不同组织的间充质干细胞可能拥有三向、二向、单向分化等多水平的分化潜能^[12-13]。Vaculik等^[14]使用各种标志(CD271, CD73, SSEA-4等)从皮肤中分选间充质干细胞, 显示不同标志分选获得的间充质干细胞亚群拥有完全不同水平的分化潜能。本研究检测了骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞的成脂潜能和成软骨潜能, 但是结果表明并不具有这些分化潜能, 与未分选的皮肤细胞结果相同, 表明骨形成蛋白受体 I B亚型阳性细胞只是拥有单向分化潜能的细胞亚群, 只能被诱导向成骨分化。

理想的骨再生支架需要满足以下两方面的要求: 首先必须是生物相容的, 细胞能够黏附、增殖、分化、细胞外基质沉积; 其次, 机械相容要求提供必要的强度, 合适的微观结构供血管化, 合适的降解速度让新骨形成^[15]。珊瑚作为天然材料, 它的孔隙结构和无机钙化合物使它成为骨组织工程的重要候选材料。珊瑚的降解速度在不同的研究中相差很大, 可能与几个因素相关: 珊瑚的种类和切割方向; 移植局部的环境和血供条件; 移植动物的健康状况。虽然不确定加载的细胞是否在破骨细胞的聚集和激活过程中发挥了什么样的作用, 但实验结果显示加载了细胞的珊瑚在体内比未加载细胞的降解速度更快。

血管化是骨组织工程成功的另一个重要因素^[16], 因为种植于支架上的细胞的成活主要依赖新生的血管来提供养分, 因此新骨的形成与足够的新生血管长入密切相关。一些方法可以用于促进血管化, 包括支架制作的孔径更合适血管长入、增加血管生长因子、体外预血管化、体内预血管化等, 这些手段可以单独采用或联合使用, 本实验中没有采用这些方法, 但是观察到珊瑚支架的孔隙率和孔径大小适合血管长入。

实验从皮肤中分选骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞, 与珊瑚支架复合构建组织工程骨, 结果显示其能够修复裸鼠颅骨缺损。但是仍然有几个不足: 首先对于骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞的定位和它与血管之间的关系研究还不清楚; 其次采用裸鼠避免了讨论免疫问题, 但是作为种子细胞免疫问题的研究是非常重要的; 再次骨形成蛋白受体 I B 亚型作为骨形成蛋白的受体, 探讨骨形成蛋白对骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞的作用是非常有必要的, 在进一步的研究将着重回答这些问题。

综上所述, 研究表明皮肤来源的骨形成蛋白受体 I B 亚型阳性细胞在体外能够成骨, 构建的组织工程骨在体内能够修复骨缺损, 表明其有促进骨再生的潜能。

致谢: 感谢上海市组织工程研究重点实验室(上海市整复外科研究所)在实验实施完成过程中给予的大力帮助。

作者贡献: 实验设计为祝联, 实验实施为王庭亮, 实验评估为何金光, 资料收集为李丹、张阳。王庭亮成文, 祝联、董佳生审校, 王庭亮、祝联对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: ①皮肤样本取自儿童常规包皮环切术, 年龄 6 个月-12 岁, 由上海交通大学医学院伦理委员会审查通过, 家长签署知情同意书。②动物实验方案由上海交通大学医学院实验动物伦理委员会审批通过。

学术术语: 骨形成蛋白受体-是一类表达在细胞膜表面的糖蛋白受体, 参与转导细胞外的骨形成蛋白分子信号到细胞内的过程, 已知它的缺陷与多种先天畸形相关: 如并指畸形, 手及手指发育不良等。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

[1] Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005;23(6):727-737.

- [2] Singhatanadgit W, Salih V, Olsen I. Shedding of a soluble form of BMP receptor-IB controls bone cell responses to BMP. *Bone*. 2006;39(5):1008-1017.
- [3] Singhatanadgit W, Salih V, Olsen I. RNA interference of the BMPR-IB gene blocks BMP-2-induced osteogenic gene expression in human bone cells. *Cell Biol Int*. 2008;32(11):1362-1370.
- [4] He J, Dong J, Wang T, et al. Bone morphogenetic protein receptor IB as a marker for enrichment of osteogenic precursor-like cells in human dermis. *Arch Dermatol Res*. 2011;303(8):581-590.
- [5] Manini I, Gulino L, Gava B, et al. Multi-potent progenitors in freshly isolated and cultured human mesenchymal stem cells: a comparison between adipose and dermal tissue. *Cell Tissue Res*. 2011;344(1):85-95.
- [6] Singhatanadgit W, Olsen I. Endogenous BMPR-IB signaling is required for early osteoblast differentiation of human bone cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011;47(3):251-259.
- [7] Sahni V, Mukhopadhyay A, Tysseling V, et al. BMPR1a and BMPR1b signaling exert opposing effects on gliosis after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2010;30(5):1839-1855.
- [8] Crigler L, Kazhanie A, Yoon TJ, et al. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. *FASEB J*. 2007;21(9):2050-2063.
- [9] Bouacida A, Rosset P, Trichet V, et al. Pericyte-like progenitors show high immaturity and engraftment potential as compared with mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e48648.
- [10] Caplan AI. New era of cell-based orthopedic therapies. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009;15(2):195-200.
- [11] Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*. 2013;504(7479):277-281.
- [12] Chen FG, Zhang WJ, Bi D, et al. Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 16):2875-2883.
- [13] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- [14] Vaculik C, Schuster C, Bauer W, et al. Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 1):563-574.
- [15] Foschi F, Conserva E, Pera P, et al. Graft materials and bone marrow stromal cells in bone tissue engineering. *J Biomater Appl*. 2012;26(8):1035-1049.
- [16] Ma J, Both SK, Yang F, et al. Concise review: cell-based strategies in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(1):98-107.