

骨髓间充质干细胞复合可注射型geneX及转化生长因子β2的成骨诱导效应

蓝天, 李彪, 龚跃昆, 李多玉, 毕鑫, 杨毅(昆明医科大学, 云南省昆明市 650000)

文章亮点:

实验利用 geneX 与骨髓间充质干细胞/转化生长因子 β2 复合构成支架材料, 研究其在体外培养的生物学特性及成骨分化能力, 发现注射型 geneX 人工骨是一个良好的载体支架材料, 复合骨髓间充质干细胞与转化生长因子 β2 后表现出了良好的生物相容性, 能较好地促进骨髓间充质干细胞的成骨活性, 提升骨生成速度。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 可注射型 geneX 人工骨; 骨髓间充质干细胞; 转化生长因子 β2; 成骨诱导; 组织相容性

主题词:

转化生长因子 β2; 干细胞; 组织相容性

摘要

背景: 单一支架材料在不同程度不同范围内存在一些缺点, 因此近年来研究者选择复合支架材料, 将两种或多种具有一定互补特性的生物材料按一定方式与比例复合, 构造出新型复合材料。

目的: 探讨可注射型 geneX 人工骨复合骨髓间充质干细胞/转化生长因子 β2 的组织相容性及体外成骨诱导分化效果。

方法: 将可注射型 geneX 人工骨与兔骨髓间充质干细胞复合培养 5 d, 电镜观察人工骨的组织相容性。取第 3 代成骨诱导培养的兔骨髓间充质干细胞分 3 组培养, 单纯细胞组仅加入成骨诱导分化培养基, 细胞支架组加入 geneX 人工骨与成骨诱导分化培养基, 联合组加入 geneX 人工骨、转化生长因子 β2 与成骨诱导分化培养基, 培养 7, 14, 21 d 进行细胞形态学观察、碱性磷酸酶活性检测、MTT 检测、甲基百里香酚蓝检测及茜素红染色观察。

结果与结论: 骨髓间充质干细胞在可注射型 geneX 人工骨表面贴壁生长, 呈成纤维细胞形态, 细胞基质分泌旺盛。联合组细胞增殖、成骨诱导活性强于单纯细胞组、细胞支架组($P < 0.05$), 细胞碱性磷酸酶活性高于单纯细胞组、细胞支架组。表明可注射型 geneX 人工骨复合骨髓间充质干细胞/转化生长因子 β2 具有良好组织相容性及促成骨分化能力。

蓝天, 李彪, 龚跃昆, 李多玉, 毕鑫, 杨毅. 骨髓间充质干细胞复合可注射型 geneX 及转化生长因子 β2 的成骨诱导效应[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(28):4435-4438.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.28.002

Osteogenic induction of injectable geneX/bone marrow mesenchymal stem cells/transforming growth factor beta 2 composite

Lan Tian, Li Biao, Gong Yue-kun, Li Duo-yu, Bi Xin, Yang Yi (Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Single scaffold materials have some shortcomings to some extent or in different ranges. Therefore, new composite materials are developed in recent year, which are compounded by two or more materials with complementary characteristics in a certain manner or ratio.

OBJECTIVE: To investigate the histocompatibility and osteogenic induction of geneX artificial bone combined with bone marrow mesenchymal stem cells and transforming growth factor beta 2 (TGF-β2).

METHODS: Injectable geneX was co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells for 5 days, and under the electron microscope, the histocompatibility of the artificial bone was observed. Passage 3 rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were divided into three groups: simple cell group cultured with osteogenic medium, cell scaffold group cultured with geneX+osteogenic medium, combined group cultured with geneX+TGF-β2+osteogenic medium. After 7, 14, 21 days, cell morphology, alkaline phosphatase activity detection, MTT detection, methyl thymol blue detection and alizarin red staining were performed.

RESULTS AND CONCLUSION: After osteogenic induction, bone marrow mesenchymal stem cells were fibroblast-like cells and adhered to the surface of geneX bone with strong secretion of extracellular matrix. Cell proliferation and osteogenic activity in the combined group were stronger than those in the simple cell and cell scaffold groups ($P < 0.05$). The alkaline phosphatase activity was also higher in the combined group than the other two groups. These findings indicate that the geneX/bone marrow mesenchymal stem cells/TGF-β2 composite has good histocompatibility and pro-osteogenic differentiation ability.

蓝天, 男, 1988 年生, 云南省昆明市人, 在读硕士, 主要从事骨关节外科研究。

通讯作者: 李彪, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 昆明医科大学, 云南省昆明市 650000

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)28-04435-04

稿件接受: 2015-05-27

http://www.crter.org

Lan Tian, Studying for master's degree, Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China

Corresponding author: Li Biao, M.D., Associate chief physician, Master's supervisor, Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China

Accepted: 2015-05-27

Subject headings: Transforming Growth Factor beta2; Stem Cells; Histocompatibility

Lan T, Li B, Gong YK, Li DY, Bi X, Yang Y. Osteogenic induction of injectable geneX/bone marrow mesenchymal stem cells/transforming growth factor beta 2 composite. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(28):4435-4438.

0 引言 Introduction

组织工程学的研究内容主要包括种子细胞、细胞因子和生物支架材料3个方面^[1], 骨组织工程的种子细胞及细胞因子已经做了多方面的研究。骨髓间充质干细胞是目前构建组织工程骨最有应用前景的种子细胞; 而对于细胞因子, 如碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子、骨形态发生蛋白及转化生长因子等细胞因子都进入了深入的研究。

而作为骨组织工程中非常的一个重要方面, 生物支架材料的研究同样具有重要的意义。目前各研究学者基本确立了对细胞载体支架材料的基本要求和特征, 适合的生物支架材料应具备以下特征^[2]: 必须具备较好的生物组织相容性; 具有三维立体多孔状结构; 具有良好的表面活性; 具有生物降解性; 具有良好的可塑性; 具有一定的弹性。但是, 迄今为止都没有一个公认是最好的支架材料。目前, 研究较多的支架材料均在不同程度不同范围内存在一些缺点, 因此最近几年来研究者选择支架材料时, 经常使用复合材料的方法, 将两种或多种具有一定互补特性的生物材料, 按一定方式与比例复合, 构造出新型复合材料^[3]。本次实验正是采用硫酸钙和β-磷酸三钙的复合材料geneX人工骨作为骨髓间充质干细胞的载体支架, 进行体外实验。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 观察性实验。

材料:

实验动物: 清洁级新西兰大白兔, 由昆明医科大学动物研究所提供。

复合材料组织相容性及成骨诱导实验的原材料及试剂:

原材料及试剂	来源
geneX人工骨	英国百赛公司
转化生长因子β2	美国PEPROTECH公司
DMEM培养基	Hyclone公司
胎牛血清	杭州四季青公司
肝素钠注射液	江苏万邦生化医药股份有限公司
兔抗CD44单克隆抗体	BD公司
碱性磷酸酶检测试剂盒、钙测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
噻唑蓝(MTT)	美国Gibico公司
TritonX-100	美国Sigma公司

实验方法:

兔股骨骨髓间充质干细胞的分离、培养、纯化、鉴定: 严格遵守无菌操作原则取出健康新西兰大白兔的双侧股骨干。将含兔股骨骨髓间充质干细胞培养液经吹打并离心后,

可见试管内液体分为3层, 即脂肪层、上清层和细胞沉淀层。吸除脂肪层和上清层, 用PBS冲洗, 离心(1 000 r/min 离心8 min), 反复冲洗3次, 将装有细胞沉淀层的培养瓶置于37 °C、含体积分数5%CO₂的细胞培养箱内培养, 使用贴壁法除去没有贴壁的悬浮细胞, 分离纯化细胞, 置于培养箱中培养, 经过反复多次的传代培养能够获得较为纯净的贴壁细胞。当传至P3代时, 使用免疫组化检测贴壁细胞的表面标记物CD44, 可以证实所得到的细胞就是骨髓间充质干细胞, 纯度比较高, 并且形态较为稳定, 故选取此代细胞用于后续实验。之后更换培养基为成骨诱导分化培养基, 放置于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中进行培养, 隔日用成骨诱导培养基(含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12+50 mg/L 维生素C+10 mmol/Lβ-甘油磷酸钠+10⁻⁸ mol/L地塞米松)来培养。阴性对照组未添加成骨诱导剂。

geneX支架材料的制作: 在无菌工作台上严格无菌操作制作geneX支架材料, 取出1支geneX人工骨粉末的注射器A, 另外一支2 mL无菌生理盐水的注射器B, 按照说明将两支注射器用连接器连接, 将含有生理盐水注射器B里的生理盐水通过连接器注射到注射器A管里, 使生理盐水和geneX人工骨粉末混合成泥状, 再将A管里的泥状geneX人工骨注射回B管里, 这样快速来回的将泥状geneX人工骨在两支注射器里充分混匀(大约1 min完成), 最后将泥状geneX人工骨材料在无菌洁净干燥的孔状模型上打出长约3 mm×2.5 mm大小形状相似的柱状geneX模型38块, 将放在DMEM培养液中浸泡, 以备下一步复合及体外实验备用。

geneX支架与骨髓间充质干细胞的复合: 取成骨诱导培养的第3代骨髓间充质干细胞, 用0.25%的胰酶消化后, 用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液洗涤2次, 然后以无血清培养液悬浮至细胞终浓度为2×10⁷ L⁻¹, 接种到已经处理好的geneX支架材料中, 使geneX支架材料刚好被骨髓间充质干细胞悬液浸润。将复合的geneX支架与骨髓间充质干细胞放在培养瓶中进行共培养, 隔日换液1次, 5 d后并在无菌操作台上将构建的骨块进行翻面, 让细胞能够均匀分布于geneX人工骨支架材料表面, 以备下一步体外培养备用, 并取出1块geneX支架材料在电镜下观察其结构。

体外成骨诱导培养及检测: 在前期实验得出的结论下得知, 1 μg/L的转化生长因子β2是能促进骨髓间充质干细胞成骨的最适质量浓度。将P3代骨髓间充质干细胞分为3组培养, 单纯细胞组仅加入45 mL的成骨诱导分化剂培养基; 细胞支架组加入含geneX支架材料的45 mL成骨诱导分化剂培养基; 联合组加入含geneX支架材料的45 mL成骨诱导分化剂培养基与10 μg/L转化生长因子β 25 mL(整个溶液中转化生长因子β2的质量浓度为1 μg/L)。一共接种

54瓶, 每组接种18瓶, 共取54个样品, 均在相同的环境下进行培养。

主要观察指标: 培养第7, 14, 21天, 观察细胞形态学变化, 同时进行碱性磷酸酶活性检测、MTT检测, 甲基百里香酚蓝检测细胞中钙离子含量及茜素红染色观察钙积累情况。

统计学分析: 使用SPSS 15.0统计软件进行统计分析, 本次实验所得的所有数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用的统计方法为方差统计分析, 以及用S-N-K法分析比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的分离、培养 由于分离培养后最初培养皿中造血细胞成分较多, 24 h时未见明显细胞贴壁, 48 h时可见少数细胞贴壁, 形态类似成纤维细胞, 72 h后可见少量长梭形细胞贴壁, 另还可见少量的红细胞, 大约5 d后可见大量细胞贴壁, 成集落。培养至第12天时, 可见细胞排列具有明显方向性, 形成集落, 在细胞贴壁达到满壁, 且达到90%左右融合时即用胰酶消化传代。首先使用胰蛋白酶进行消化, 2 min后可以见到细胞悬液为近似圆形, 传代后骨髓间充质干细胞大约于2 h开始贴壁, 贴壁后短时间便开始增殖。

2.2 免疫细胞化学检测骨髓间充质干细胞CD44表达 根据骨髓间充质干细胞表面标记的特点, 选用传代至第3代的骨髓间充质干细胞进入实验。加入CD44抗体, 运用免疫组化染色检测CD44的表达, 骨髓间充质干细胞对CD44染色成阳性, 以此鉴定细胞纯度和骨髓间充质干细胞的表型。

2.3 骨髓间充质干细胞的成骨诱导分化 细胞在成骨诱导下逐渐由梭形分化为立方形, 进而变为多角形, 体积逐渐增大, 细胞浆较为丰富, 细胞器相对发达; 细胞表现层叠生长, 逐渐聚集, 可见形成多个散在细胞结节, 3周时可见结节中央形成矿化结节。诱导第1, 2天, 细胞数量变化不明显, 细胞数量从第3天开始出现明显增加, 第6天开始出现生长速度降低, 接种后5-7 d, 诱导与未诱导细胞在细胞数量上有明显差异($P < 0.05$)。

2.4 geneX人工骨与骨髓间充质干细胞复合前后的电镜观察 成骨诱导分化的骨髓间充质干细胞和geneX支架材料复合后5 d, 细胞在支架表面贴壁生长, 呈成纤维细胞形态生长, 细胞基质分泌旺盛, 显示了较理想的生物组织相容性(图1)。

2.5 细胞生长动力学 单纯细胞组吸光度值低于细胞支架组、联合组($P < 0.05$), 细胞支架组吸光度值低于联合组($P < 0.05$), 说明细胞支架组、联合组均有促进骨髓间充质干细胞增殖的作用, 并且联合增殖作用更明显, 见表1。

2.6 各组骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶的表达 单纯细胞组中碱性磷酸酶表达低于细胞支架组、联合组, 联合组细胞碱性磷酸酶表达高于细胞支架组, 见表2。

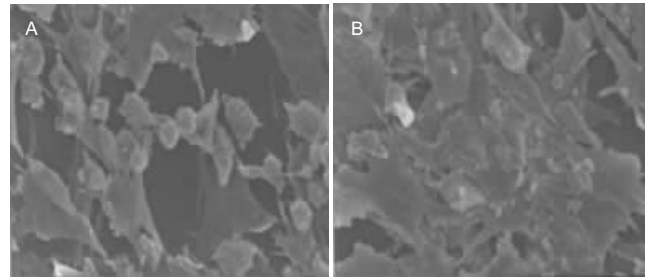


图1 扫描电镜观察与骨髓间充质干细胞复合培养前后的 geneX 人工骨($\times 100$)

Figure 1 Scanning electron microscope observation of geneX artificial bone before and after co-culture with bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 100$)

图注: 图中 A 为复合培养前的 geneX 人工骨; B 为复合培养后 5 d 的 geneX 人工骨。

表1 各组骨髓间充质干细胞不同时间内的吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Absorbance values of bone marrow mesenchymal stem cells at different time

组别	7 d	14 d	21 d
单纯细胞组	0.720 8 \pm 0.001 3	0.762 2 \pm 0.001 5	0.799 0 \pm 0.006 1
细胞支架组	0.734 5 \pm 0.004 0	0.790 2 \pm 0.002 1	0.830 4 \pm 0.006 9
联合组	0.776 5 \pm 0.007 0	0.823 9 \pm 0.009 5	0.903 3 \pm 0.009 8

表2 各组骨髓间充质干细胞不同时间点的碱性磷酸酶值 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Alkaline phosphatase activity in bone marrow mesenchymal stem cells at different time

组别	7 d	14 d	21 d
单纯细胞组	0.523 7 \pm 0.003 3	0.807 4 \pm 0.018 1	0.867 4 \pm 0.006 2
细胞支架组	0.535 3 \pm 0.002 6	0.856 3 \pm 0.007 5	0.937 1 \pm 0.006 0
联合组	0.549 2 \pm 0.006 0	0.884 7 \pm 0.010 3	1.221 3 \pm 0.051 3

2.7 各组甲基百里香酚蓝MTB比色法钙定量检测 细胞支架组、联合组培养基培养下的骨髓间充质干细胞成骨诱导明显高于单纯细胞组($P < 0.05$), 且联合组成骨诱导活性优于细胞支架组($P < 0.05$), 见表3。

表3 各组兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后 MTB 比色法钙定量检测 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Quantitative determination of calcium using methyl thymol blue detection after osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells

组别	7 d	14 d	21 d
单纯细胞组	2.607 \pm 0.081	2.708 \pm 0.029	2.804 \pm 0.007
细胞支架组	2.729 \pm 0.035	2.843 \pm 0.010	2.993 \pm 0.028
联合组	2.835 \pm 0.060	3.075 \pm 0.103	3.651 \pm 0.123

2.8 各组骨髓间充质干细胞成骨诱导的形态学观察 各组细胞培养后, 利用茜素红染色, 电镜下观察细胞形态, 其中细胞支架组、联合组染色多于单纯细胞组, 其中联合组显色最明显, 说明复合geneX支架材料+转化生长因子β2对骨髓间充质干细胞的成骨诱导有促进作用, 且促进作用优于细胞支架组。

3 讨论 Discussion

组织工程学是一门新兴学科, 它将材料学及细胞生物学相结合, 使之构建新的组织或器官^[4], 其研究涉及细胞学、分子生物学和生物材料学等多个相关学科。而骨髓间充质干细胞因其有多向分化潜能特性, 且易于获得及增殖, 被认为是骨组织工程种子细胞的理想选择^[5-6], 本实验筛选获取骨髓间充质干细胞使用的是贴壁法, 也是目前较为普遍的一种骨髓间充质干细胞分离方法。诸多研究证实, 骨形成过程中有多种生长因子共同参与, 例如骨形态发生蛋白、胰岛素样生长因子、转化生长因子等^[7], 而转化生长因子 β 是一种具有对缔结组织、骨组织及免疫系统等细胞起到调节功能的单链多肽, 其调节作用包括两个方面: 分化诱导和细胞生长调节^[6]。转化生长因子 β 通过调节破骨细胞和成骨细胞的增殖分化起到影响骨基质合成的作用, 对骨质再生起到重要作用^[7]。因此本实验将转化生长因子 $\beta 2$ 作为复合支架材料的细胞因子。

为细胞提供结构支撑作用, 且起到诱导组织再生和控制组织结构的模板作用的支架材料是组织工程研究中的重点之一^[8], 所以支架材料在组织工程的构建中起着核心作用^[9-11], geneX材料采用 β -磷酸三钙和半水硫酸钙骨水泥混配而成, 该材料组织相容性好, 具有良好的诱导成骨作用, 降解速度与新生骨匹配, 早期强度接近皮质骨。因此, 实验选取了 β -磷酸三钙和硫酸钙复合物作为细胞载体支架进行研究。

将注射型geneX复合骨髓间充质干细胞/转化生长因子 $\beta 2$ 在成骨诱导培养基中进行培养, 通过MTT法检测骨髓间充质干细胞的增殖活性, 对结果进行分析, 发现geneX/转化生长因子 $\beta 2$ 支架对骨髓间充质干细胞的增殖活性有明显促进作用。本实验研究中因骨髓间充质干细胞本身即具有成骨活性, 而且要验证geneX支架材料对骨髓间充质干细胞有无毒性及抑制作用, 因此选择骨髓间充质干细胞, 骨髓间充质干细胞+geneX, 骨髓间充质干细胞+geneX+转化生长因子 $\beta 2$ 三组进行实验, 以期可以找出geneX人工骨对骨髓间充质干细胞的成骨影响, 以及骨髓间充质干细胞+geneX+转化生长因子 $\beta 2$ 支架材料的成骨分化活性。

碱性磷酸酶是一种较为成熟的成骨细胞标志性酶, 同时钙结节也是成骨细胞的一种标记物。本次实验选择了Gomori钙钴法作为碱性磷酸酶目标物的检测方法, 发现复合骨髓间充质干细胞+geneX+转化生长因子 β 支架材料的成骨效应相对其他实验组的成骨效应高($P < 0.05$), 说明geneX+转化生长因子 β 支架材料具有促进骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶表达额作用。最后利用钙沉积物与茜素红能够发生显色反应, 可以得到红色染色效果的茜素红法, 对实验中钙沉积物“钙结节”染色。不同品种的染料, 矿化结节与之发生反应可以呈现不同的颜色, 以此来对实验中各组钙结节进行测定。

综上所述, 本项研究验证了骨髓间充质干细胞具有很强的成骨分化能力, 是理想的骨组织工程种子细胞; 注射型geneX人工骨是一个良好的载体支架材料, 复合骨髓间充质干细胞+转化生长因子 $\beta 2$ 后表现出了良好的生物相容性, 能较好地促进骨髓间充质干细胞的成骨活性, 提升骨生成速度。

作者贡献: 实验构思及设计为第一作者和通讯作者; 第一、三、四、五、六作者共同完成实验实施、文献查询及论文写作; 通讯作者审校; 第一作者与通讯作者对本文负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学要求。

学术术语: geneX人工骨材料的特点? 该产品是一种用于填充骨缺损部位刺激骨生长的可吸收人工合成材料, 由磷酸钙和硫酸钙混合而成。该产品是一种骨空腔填料, 它用于填补于那些不影响骨结构稳定的骨空腔、骨缺损或裂缝, 如由外科手术、囊肿、肿瘤、骨髓炎或其他的外伤等原因所造成的骨空腔或缺损。

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] Perng CK, Kao CL, Yang YP, et al. Culturing adult human bone marrow stem cells on gelatin scaffold with pNIPAAm as transplanted grafts for skin regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 84(3):622-630.
- [2] 冯万文, 莱浙军, 李小民, 等. 骨髓间充质干细胞和软骨细胞共培养种子细胞特征及体内成骨活性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(3):442-446.
- [3] Yarlagaadda PK, Chandrasekharan M, Shyan JY. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng*. 2005; 15(3):159-177.
- [4] Moroni L, Schotel R, Sohier J, et al. Polymer hollow fiber three-dimensional matrices with controllable cavity and shell thickness. *Biomaterials*. 2006; 27(35):5918-5926.
- [5] Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, et al. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr*. 2006; 117(3):857-863.
- [6] Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, et al. Long-term In vitro Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res*. 2008; 68(11):4229-4238.
- [7] 郝伟, 姜明, 周东生, 等. rhBMP-2、bFGF双基因共转染兔骨髓间充质干细胞复合nHA/RHLC/PLA支架及其体内外成骨分化研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2011, 19(13):1130-1134.
- [8] 张凯, 王大平, 朱伟民, 等. 全骨髓间充质干细胞与纳米羟基磷灰石支架材料的体外相容性研究[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2011, 29(2): 213-221.
- [9] 许超, 李琪佳. 生长因子对骨髓基质干细胞诱导的成骨细胞的生物学作用[J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(14):1138-1139.
- [10] 王林, 马真胜, 雷伟, 等. 一体化灌注法体外构建活体人工骨的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2013, 15(6):1671-1675.
- [11] 向强, 邓聪颖, 郑文杰, 等. 成骨细胞特异性钙黏蛋白基因转染对骨髓基质干细胞成骨分化影响的研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2009, 11(3):1105-1108.