

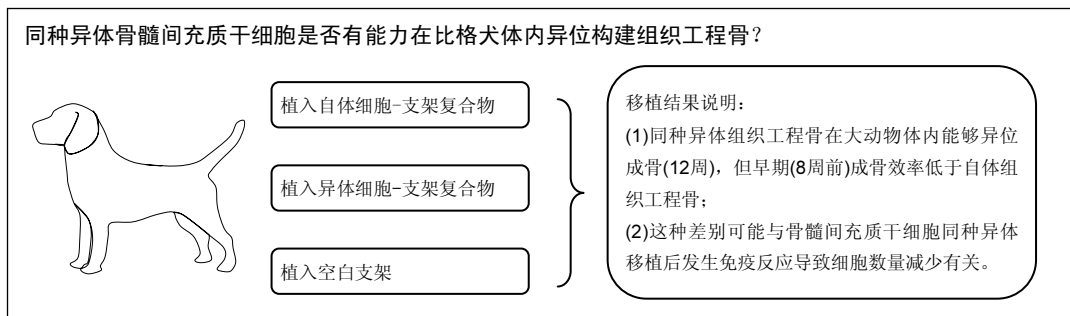
同种异体骨髓间充质干细胞在比格犬体内异位构建组织工程骨

武京国¹, 马燕², 曹霏霏², 王德峰¹, 张庆富¹, 张喜善¹, 李勇²(¹泰山医学院附属医院骨科, 山东省泰安市 271000; ²泰安市中心医院分院, 山东省泰安市 271000)

引用本文: 武京国, 马燕, 曹霏霏, 王德峰, 张庆富, 张喜善, 李勇. 同种异体骨髓间充质干细胞在比格犬体内异位构建组织工程骨[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(46):6845-6853.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.46.001 ORCID: 0000-0002-6406-5765(武京国)

文章快速阅读:



武京国, 男, 1983年生, 山东省滨州市人, 汉族, 2012年中国医学科学院 & 北京协和医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事骨科组织工程及免疫学方面的研究。

通讯作者: 李勇, 主治医师, 泰安市中心医院分院, 山东省泰安市 271000

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)46-06845-09

稿件接受: 2016-09-10

文题释义:

同种异体移植: 是指同种不同基因型个体之间的移植, 是临床最常见的移植类型, 也是移植免疫学研究的重点所在。

磷酸三钙: 又称磷酸钙。化学式 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 。白色晶体或无定形粉末。存在多种晶型转变, 主要分为低温 β 相(β -TCP)和高温 α 相(α -TCP), 相转变温度为 $1\ 120\text{--}1\ 170\text{ }^\circ\text{C}$, 熔点 $1\ 670\text{ }^\circ\text{C}$; 溶于酸, 不溶于水和乙醇。在人的骨骼中普遍存在, 是一种良好的骨修复材料。

摘要

背景: 选用同种异体骨髓间充质干细胞作为种子细胞成为将来组织工程领域发展的趋势。

目的: 分析同种异体骨髓间充质干细胞在比格犬体内异位构建组织工程骨的能力, 并观察骨髓间充质干细胞在体内成骨过程中的转归。

方法: 应用氯甲基苯甲酰氨荧光染料(CM-Dil)标记比格犬骨髓间充质干细胞, MTT 法检测标记细胞的体外增殖能力。将自体或异体骨髓间充质干细胞分别接种珊瑚、 β 磷酸三钙支架体外成骨诱导 7d 后, 植入比格犬背部皮下, 空白支架作为阴性对照。术后 3 d 及 1, 2, 4, 8, 12 周取材, 苏木精-伊红染色观察成骨情况, 应用 ipsp 软件统计分析成骨面积。PT-PCR 和 ELISA 法检测组织工程骨成骨过程中相关基因的表达。CM-Dil 组冰冻切片荧光显微镜下示踪骨髓间充质干细胞在体内的转归。

结果与结论: ①4-8 周时异体组织工程骨的成骨面积小于自体组织工程骨, 但到 12 周后 2 组无明显差异; ②4 周自体组织工程骨表达骨 γ 羧基谷氨酸蛋白高于异体组织工程骨, 提示后者先于前者进入骨矿化期; ③ELISA 检测发现自体组织工程骨的碱性磷酸酶和骨钙素表达量在 4 周左右高于异体组织工程骨, 到 12 周后趋于一致; ④通过 CM-Dil 标记骨髓间充质干细胞发现同种异体骨髓间充质干细胞的数量相比自体骨髓间充质干细胞有明显的减少; ⑤结果说明, 同种异体组织工程骨在大动物体内能够异位成骨(12 周), 但早期(8 周前)成骨效率低于自体组织工程骨, 这种差别可能与骨髓间充质干细胞同种异体移植后发生免疫反应导致细胞数量减少有关。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 骨髓间充质干细胞; 组织工程骨; 异位成骨; CM-Dil; 转归; 山东省自然科学基金

主题词:

间充质干细胞; 移植, 同种; 支架; 组织工程

基金资助:

山东省自然科学基金(博士基金)(BS2015SW030); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0614); 泰安市科技发展计划项目(2015NS1136)

Wu Jing-guo, M.D.,
Attending physician,
Department of
Orthopaedics, Affiliated
Hospital of Taishan Medical
University, Taian 271000,
Shandong Province, China

Corresponding author:
Li Yong, Attending
physician, Branch of Taian
City Central Hospital, Taian
271000, Shandong
Province, China

Ectopic osteogenesis of tissue-engineered bone using allogenic bone marrow mesenchymal stem cells in beagle dogs

Wu Jing-guo¹, Ma Yan², Cao Fei-fei², Wang De-feng¹, Zang Qing-fu¹, Zhang Xi-shan¹, Li Yong²
(¹Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Taishan Medical University, Taian 271000, Shandong Province, China; ²Branch of Taian City Central Hospital, Taian 271000, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Allogenic bone marrow mesenchymal stem cells as seed cells for tissue engineering have become the future trend of development.

OBJECTIVE: To investigate the osteogenic effects of allogenic bone marrow mesenchymal stem cells and the outcome *in vivo*.

METHOD: Bone marrow mesenchymal stem cells from beagle dogs were marked with chloromethylbenzoyl ammonia fluorescent dye (CM-Dil), and the proliferation of labeled cells was measured using MTT assay *in vitro*. Autologous or allogenic bone marrow mesenchymal stem cells were inoculated into coral and β -tricalcium phosphate scaffolds for 7 days osteogenic induction and then subcutaneously implanted into the back of beagle dogs. Dogs undergoing blank scaffold implantation served as negative controls. Hematoxylin-eosin staining was used to observe new bone formation at 3 days, 1, 2, 4, 8, 12 weeks after surgery. Bone formation area was statistically analyzed using ip software. In the CM-Dil group, frozen sections were made to trace the *in vivo* outcome of bone marrow mesenchymal stem cells under a fluorescence microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The osteogenesis speed in the allogenic bone tissue engineering group was faster than that in the autologous bone tissue engineering group at 4–8 weeks after implantation, but no significant difference between the two groups was found beginning at the 12th week. At 4 weeks after implantation, the expression of γ -carboxy glutamic acid protein in the autologous bone tissue engineering group was higher than that in the allogenic bone tissue engineering group, prompting the bone mineralization appeared earlier in the latter group than the former one. ELISA results showed that the expression of alkaline phosphatase and osteocalcin in the autologous bone tissue engineering group was higher than that in the allogenic bone tissue engineering group at 4 weeks after implantation, and then the expression showed no difference at 12 weeks. CM-Dil labeling results showed that the number of allogenic bone marrow mesenchymal stem cells was reduced significantly compared with that of autologous bone marrow mesenchymal stem cells. All these findings indicate that the ectopic osteogenesis of the allogenic tissue-engineered bone in large animals is found within 12 weeks after implantation, but the osteogenesis efficiency at early stage (within 8 weeks) is lower compared with the autologous tissue-engineered bone. This difference may be related to the post-implantation immunoreactions that lead to the reduction in cell number.

Subject headings: Tissue engineering; Mesenchymal Stem cells; Transplantation, Homologous; Stents

Funding: the Natural Science Foundation of Shandong Province, China, No. BS2015SW030; the Medical Science and Technology Development Plan of Shandong Province, No. 2016WS0614; the Science and Technology Development Plan of Taian City, China, No. 2015NS1136

Cite this article: Wu JG, Ma Y, Cao FF, Wang DF, Zang QF, Zhang XS, Li Y. Ectopic osteogenesis of tissue-engineered bone using allogenic bone marrow mesenchymal stem cells in beagle dogs. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(46):6845-6853.

0 引言 Introduction

因创伤、感染、肿瘤、先天性畸形等原因造成的骨缺损临床常见^[1], 目前的治疗方法主要包括自体骨移植、异体骨移植、人工骨替代品填充等, 但都存在一些不足之处^[2-3]。骨组织工程技术应用种子细胞符合可降解的生物支架材料, 形成组织工程骨修复缺损和功能重建^[4-5], 避免了自体骨移植造成的二次损伤和供体不足、异体骨移植的免疫排斥、人工骨替代品无骨诱导性和不能功能修复等缺点, 具有其他修复方法不可比拟的优势, 有望成为修复骨缺损的理想替代物。目前骨髓间充质干细胞

是组织工程骨构建过程中理想的种子细胞^[6], 然而自体骨髓来源的骨髓间充质干细胞存在因细胞体外培养扩增和安全性检测等因素造成患者需要长时间等待的问题, 而且不同患者因年龄、疾病、临床药物治疗等原因影响细胞质量和增殖分化能力^[7-9], 因此选用同种异体骨髓间充质干细胞(allogeneic, allo-BMSCs)作为种子细胞可能会成为将来组织工程领域发展的趋势。

实验应用体外向成骨方向诱导的比格犬骨髓间充质干细胞分别复合珊瑚支架和磷酸三钙支架材料, 然后将细胞-支架复合物植入同种异体比格犬(MHC错配)背

部皮下, 在术后不同时间点观察构建的组织工程骨的异位成骨情况。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外和体内分组对照观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年10月至2016年1月在泰山医学院附属医院骨科研究所完成。

1.3 材料

实验动物: 比格犬18只, 12月龄, 体质量13–15 kg, 雌雄不限, 北京玛斯生物技术有限公司提供。

试剂及仪器: Ficoll分离液(G&E, 瑞士); DMEM、Hank's液、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、双抗(GIBCO, 美国); 地塞米松、 β -磷酸甘油钠、维生素C、MTT(Sigma, 美国); CM-Dil(Molecular Probes, 美国); 碱性磷酸酶ELISA KIT (96t) DRE-9001、骨钙素ELISA KIT (96t) DRE-9002(优博奥生物科技有限公司, 北京); Trizol (Invitrogen, 美国); PCR Marker、RNA酶抑制剂(MBI)、焦碳酸二乙酯(DEPC)、反转录酶(M-MLV)、PCR反应缓冲液(10 \times)、TAE buffer(10 \times)、dNTPs(4 \times)、Oligo dT、溴化乙锭(EB)、琼脂糖(Promega, 美国); 天然珊瑚(西沙群岛, 海南); 磷酸三钙(β -TCP)(贝奥路生物材料有限公司, 上海); 倒置相差显微镜(Olympus, 日本); 酶标仪(Thermo Electron Corporation, 芬兰); 组织匀浆机(GLas-Col Homogenizer, 美国); 数控超声波细胞粉碎机(KBS-900)(昆山超声仪器厂, 江苏); PCR仪(Bio-Rad, 美国); 紫外分光光度计(Ultrospec 2100)(GE Healthcare, 瑞典); 全自动数码凝胶成像分析系统(UVP BioSpectrum AC, 美国); 高速恒温冷冻离心机(Hitachi, 日本); 激光扫描共聚焦显微镜(TCS-SP2)(徕卡, 德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 生物支架材料的制备和灭菌消毒

珊瑚支架制备: 选取西沙群岛产致密橙黄滨珊瑚, 加工成体积为8 mm \times 6 mm \times 3 mm大小。用5%次氯酸钠溶液浸泡2周, 3 d换液1次, 然后用三蒸水冲洗, 煮沸10 min \times 3次, 超声清洗(5次, 每次10 min)后80 $^{\circ}$ C烘干24 h, 高温高压灭菌后备用。

β 磷酸三钙支架制备: 加工成体积为8 mm \times 6 mm \times 3 mm大小, 超声清洗后烘干, 高温高压灭菌。

1.4.2 骨髓间充质干细胞的分离培养 比格犬以0.12 mL/kg剂量肌注氯胺酮/速眠新(两者2 : 1混合)麻醉, 常规备皮、消毒、铺巾, 用骨穿针于髂后上嵴穿入骨髓腔, 然后用含1 mL肝素(50 U/mL)的20 mL注射器

负压抽取骨髓液4 mL, 加入4 mL Hank's液混匀, 小心加入含4 mL Ficoll淋巴细胞分离液的15 mL离心管中, 2 000 r/min离心20 min, 吸取中间白色云雾状的有核细胞层, DMEM洗涤2次, 离心后细胞计数, 将细胞悬液按 1.0×10^9 L $^{-1}$ 细胞浓度接种于直径10 cm的培养皿, 置于37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO $_2$ 培养箱内培养, 48 h后换液, 清除未贴壁细胞, 7 d后细胞克隆达80%融合, 胰酶消化, 按 5.0×10^7 L $^{-1}$ 细胞浓度传代。选取第2代细胞备用。

1.4.3 三系诱导分化及鉴定 ①成骨诱导: 成骨诱导培养基(10^{-8} mol/L地塞米松、0.01 mol/L β -磷酸甘油钠、0.05 g/L 维生素C、体积分数10%胎牛血清、1%双抗)培养骨髓间充质干细胞21 d, 40 g/L多聚甲醛固定, 碱性磷酸酶染色试剂盒染色; 体积分数为95%的乙醇固定1 h, 2%茜素红染色; 40 g/L多聚甲醛固定, 加入抗骨桥蛋白一抗和二抗, 免疫荧光检测。②成软骨诱导: 成软骨诱导培养基(10 μ g/L转化生长因子 β 1、40 μ g/L地塞米松、50 μ g/L维生素C、体积分数10%胎牛血清、1% 双抗)诱导培养14 d, 40 g/L多聚甲醛固定, 甲苯胺蓝、番红O染色; 40 g/L多聚甲醛固定, 加入抗II型胶原一抗和二抗, 免疫细胞化学检测。③成脂诱导: 成脂诱导培养基(0.5 mmol/L IBMX、 10^{-5} mol/L胰岛素、0.2 mmol/L 吡啶美辛、 10^{-6} mol/L地塞米松、体积分数10% 胎牛血清、1% 双抗)诱导培养14 d, 40 g/L多聚甲醛固定, 60%异丙醇处理, 油红O染色。

1.4.4 CM-Dil标记骨髓间充质干细胞 收集P2代骨髓间充质干细胞制成细胞浓度为 1.0×10^{10} L $^{-1}$ 细胞悬液(PBS悬浮), 每1 mL细胞悬液中加入40 μ L CM-Dil(1 g/L), 此时CM-Dil的终浓度为40 μ mol/L。细胞悬液置于37 $^{\circ}$ C, 3 min, 然后冰浴15 min, 洗涤后按 5.0×10^7 L $^{-1}$ 的细胞浓度接种到培养皿中。24 h后, 荧光显微镜下观察标记后的细胞, MTT法检测细胞的增殖能力。

1.4.5 细胞接种珊瑚、 β 磷酸三钙支架材料 收集CM-Dil标记的骨髓间充质干细胞, 分别以 2.0×10^{10} L $^{-1}$ 的细胞浓度接种珊瑚、 β 磷酸三钙支架, 成骨诱导培养基体外培养3 h、3 d、7 d, 2.5%戊二醛固定, 乙醇脱水干燥, 扫描电镜观察材料的孔隙率和接种后细胞-材料的黏附情况。复合物成骨诱导培养7 d后比格犬皮下植入(植入前12 h更换无胎牛血清的培养基, 以减少外源性胎牛蛋白植入后对受体造成的影响)。

1.4.6 细胞-支架复合物比格犬背部皮下植入及检测 比格犬术前12 h禁食, 并肌肉注射青霉素预防感染(剂量为 80×10^4 U)。氯胺酮/速眠新(两者以体积比2 : 1混合)

以0.12 mL/kg的剂量肌肉注射进行诱导麻醉后, 动物俯卧位放置并固定到手术台上, 常规备皮、消毒、铺无菌巾, 暴露手术视野。确定切口位置, 犬背部正中上次齐平肩关节, 下侧与两侧髂前上棘水平, 在正中线上平均做3个约4 cm的纵行切口, 电凝充分止血, 掀起皮肤, 用大血管钳和组织剪分别向两侧分层分离皮下、浅筋膜, 达到脂肪层浅层, 血管钳扩大范围形成约5 cm×5 cm的皮下腔隙(皮袋)。体外成骨诱导培养的细胞-支架复合物用0.9%的盐水小心将表面的培养基冲洗干净, 放入预先形成的皮袋中。用庆大霉素和生理盐水冲洗切口及周围皮下组织, 逐层关闭切口, 医用缝线分层缝合。术后肌肉注射青霉素(每次 80×10^4 U, 每天2次, 连续5 d)以预防感染。

1.4.7 实验分组 根据比格犬供、受体配对的情况, 按照比格犬植入的骨髓间充质干细胞来源不同, 实验分为3组, 自体细胞-支架复合物组(*autologous BMSCs-tissue engineering bone, Auto-TEB*)、异体细胞-支架复合物组(*allogeneic BMSCs-tissue engineering bone, Allo-TEB*)和空白支架材料对照组。每组3只比格犬, 每只犬背部6个皮袋, 每个皮袋中放入2块细胞-支架复合物。

1.4.8 取材及检测 分别于术后3 d及术后1, 2, 4, 8, 12周对每组3只犬背部皮下植入的组织进行取材(由于珊瑚支架降解速率快, 术后取材进行到第8周), 手术方法同上。每个时间点取出每只犬一个皮袋内的2块细胞-支架复合物, 用生理盐水将表面的血液冲洗干净, 手术刀小心平均切为2块, 其中一块放入体积分数4%的中性甲醛中固定, 另外一块快速投入液氮中, 然后转移到-80 °C低温冰箱中冷冻保存。

1.5 主要观察指标

1.5.1 苏木精-伊红染色及成骨面积分析 标本甲醛固定后行石蜡连续切片、苏木精-伊红染色, 倒置相差显微镜下观察自体 and 异体骨髓间充质干细胞构建的组织工程骨在比格犬皮下异位成骨的情况, 以及局部淋巴细胞的浸润。

骨髓间充质干细胞- β 磷酸三钙在体内2, 4, 8和12周异位构建的组织工程骨, 于高倍镜下(200×)对每个标本随机选取20个视野, 应用软件Image-Pro Plus 6.0.计算其成骨面积并对数据进行统计学分析。

1.5.2 RT-PCR检测组织工程骨植入体内相关基因的表达

组织中总RNA的提取: 细胞-珊瑚支架复合物植入体内4周后取材, 快速投入液氮中。硬组织置于含有1 mL

Trizol的离心管中, 用组织匀浆器进行匀浆, 直至匀浆液呈无颗粒透明状, 将细胞裂解液转移到eppendorf管中。室温下静置5 min后, 4 °C $12\ 000 \times g$ 离心10 min, 取上清液, 加入200 μ L四氯甲烷, 剧烈振荡15 s后室温下静置10 min, 4 °C $12\ 000 \times g$ 离心15 min。此时管中液体分为3层(无色的上清水相、中间白色层和粉红色下层有机相), 小心转移上层水相到另一eppendorf管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀后室温放置10 min, 4 °C $12\ 000 \times g$ 离心10 min。弃上清, 加入1 mL体积分数75%的乙醇, 轻轻混匀后4 °C $12\ 000 \times g$ 离心5 min, 重复2次。小心移走上清, 室温下干燥沉淀, 加入ddH₂O溶解沉淀后-70 °C保存。

RNA的反转录(cDNA): 取提取的RNA样品, 用1×组织工程骨 Buffer稀释样品100倍, 测定样品在260 nm和280 nm的吸光度值, 以确定提取RNA的质量, 并计算RNA的浓度, 调整各组RNA浓度为200 mg/L。反转录反应体系为20 μ L。反转录反应程序为: 65 °C 5 min, 37 °C 2 min, 37 °C 60 min, 70 °C 15 min。

聚合酶链式反应(PCR): PCR反应程序及产物电泳检测同上, 并应用软件对电泳条带进行灰度扫描和半定量分析。

1.5.3 细胞-支架复合物成骨过程中碱性磷酸酶、骨钙素体内表达定量检测 用酶联免疫吸附测定(ELISA)的方法对犬体内组织工程骨成骨过程中的碱性磷酸酶、骨钙素表达进行检测。标本从-80 °C低温冰箱中取出, 解冻后用精密电子天平称质量, 使每块标本质量为0.05 g, 放置于EP管中, PBS冲洗干净后加入Tris-HCl缓冲液(pH=7.4) 0.5 mL, 研磨标本, 超声震荡粉碎(45 s, 间隔9 s, 4 °C), 然后取混合震荡液用ELISA试剂盒进行检测。具体步骤如下(以碱性磷酸酶为例): ①稀释标准品(10, 20, 40, 80, 120 U/L); ②加样: 空白孔只加入显色剂A、B和终止液; 标准品孔加入标准品50 μ L和链霉素亲和-HRP 50 μ L; 待测样品孔加入样品40 μ L、抗碱性磷酸酶抗体10 μ L和链霉素亲和-HRP 50 μ L (注意设置足够的复孔)。盖上封板膜后轻轻振荡混匀, 37 °C温浴60 min; ③洗涤: 揭开封板膜, 弃去液体并甩干, 每孔内加满洗涤液(30×浓缩洗涤液用蒸馏水稀释30倍), 静置30 s后弃去, 重复5次, 甩干; ④显色和终止: 每孔依次加入显色剂A 50 μ L、显色剂B 50 μ L, 振荡混匀后37 °C避光显色10 min。每孔加入终止液50 μ L终止反应(液体颜色由蓝色变为黄色); ⑤测定: 应用酶标仪检测, 空白孔调零, 450 nm波长下测量各孔的吸光度值

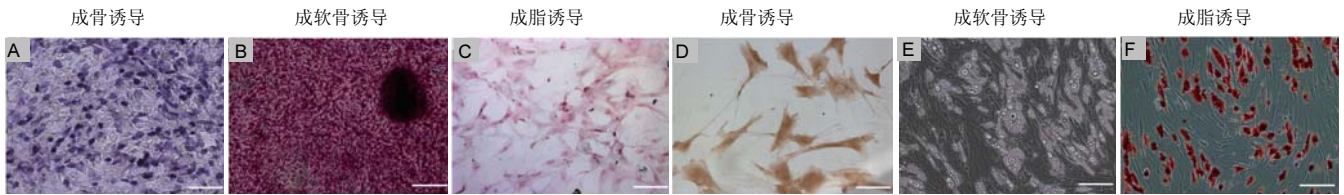


图1 骨髓间充质干细胞三系诱导后鉴定(标尺=100 μm)

Figure 1 Identification of bone marrow mesenchymal stem cells after osteogenic, chondrogenic and adipogenic induction (scale bar=100 μm)

图注: A 为碱性磷酸酶染色; B 为茜素红染色; C 为番红 O 染色; D 为 II 型胶原免疫组织化学; E 为光镜下观察; F 为油红 O 染色。

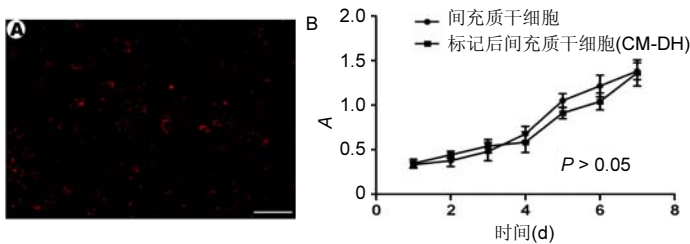


图2 细胞标记及增殖检测

Figure 2 Cell labeling and proliferation assay

图注: A 为骨髓间充质干细胞 CM-Dil 标记后发出红色荧光(标尺=100 μm); B 为细胞生长曲线。

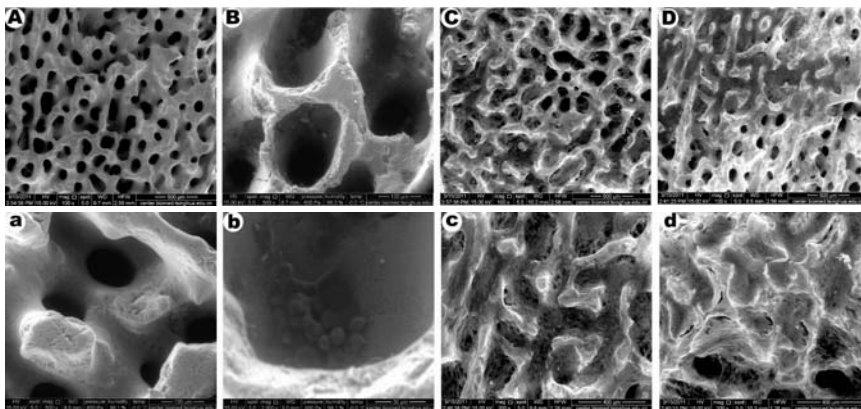


图3 扫描电镜观察骨髓间充质干细胞在珊瑚支架材料上的黏附生长情况

Figure 3 Adhesion and growth of bone marrow mesenchymal stem cells on coral scaffold under scanning electron microscope

图注: A, a 为空白支架($\times 50$, 标尺=100 μm); B, b 为接种细胞 3 h 后(标尺=100 μm, 30 μm); C, c 为接种细胞 3 d 后($\times 50$); D, d 为接种细胞 7 d 后($\times 50$)。

(A值)。根据标准品浓度和对应的A值绘制标准曲线并计算其直线回归方程(应用软件CurveExpert 1.3), 再根据待测样品的A值在回归方程上计算出对应的样品浓度。

1.5.4 比格犬体内植入骨髓间充质干细胞(CM-Dil 标记)的示踪观察 取石蜡切片标本(选取1, 2, 4周3个时间点), 彻底脱蜡(温度控制在 37°C)后用DAPI染核, 置于激光扫描共聚焦显微镜下观察。以空白对照切片(骨髓间充质干细胞未标记)进行荧光调零, 除去其他组织细胞的荧光干扰, CM-Dil标记的骨髓间充质干细胞在波长488 nm处被激发出红色荧光, 结合光镜下图像和DAPI染核后的蓝色细胞核, 应用显微镜配置软件Volocity Demo5.4 (32bit) 进行荧光强度分析。

1.6 统计学分析 应用SPSS 16.0统计软件包对实验数据进行统计学分析。所测数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各样本总体进行正态性检验和方差齐性检验, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用Post Hoc分析的LSD、Bonferroni检验, 以及两独立样本的t检验, $P < 0.05$ 认为两组间差异有显著性意义。

2 结果 Results

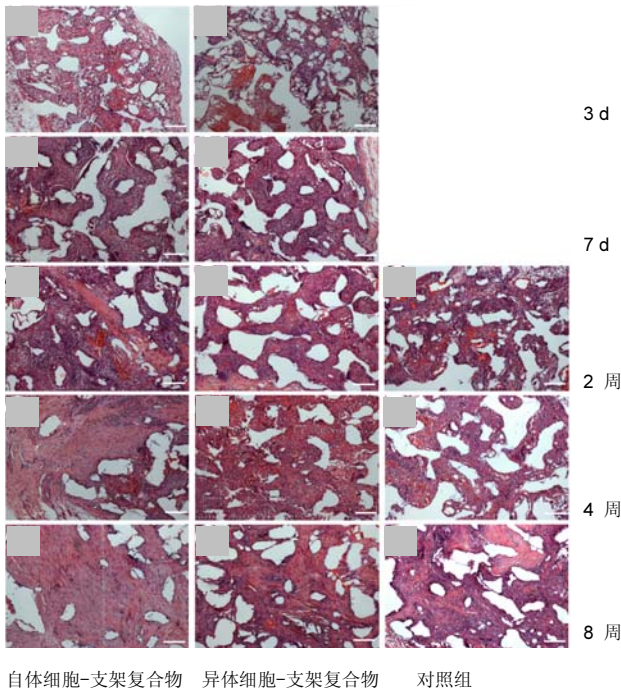
2.1 实验动物数量分析 实验选用比格犬18只, 分为3组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 骨髓间充质干细胞多向分化鉴定及CM-Dil标记

2.2.1 分化鉴定 骨髓间充质干细胞原代培养7 d, 贴壁细胞形态呈长梭形, 增殖迅速并生成大量克隆。成骨诱导21 d后, 碱性磷酸酶染色阳性(图1A), 茜素红染色可见成骨分化后钙质沉积(图1B); 成软骨诱导14 d后, 番红O染色阳性(图1C), II型胶原免疫细胞化学可见细胞分泌II型胶原(图1D); 成脂诱导14 d后, 镜下可见细胞质中大量脂滴出现(图1E), 油红O染色阳性(图1F)。

2.2.2 标记 CM-Dil标记骨髓间充质干细胞24 h后, 荧光显微镜下计数发现80%以上的细胞激发出绿色荧光、红色荧光(图2)。

MTT法检测结果显示7 d细胞增殖进入平台期, CM-Dil组与未标记组的生长曲线基本一致, 各个时间点比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 表明标记对细胞增殖活性无明显影响。



自体细胞-支架复合物 异体细胞-支架复合物 对照组
图4 细胞-珊瑚支架复合物皮下植入取材后组织学观察(苏木精-伊红染色, 标尺=100 μm)

Figure 4 Histological observation of cell-coral scaffold complex (hematoxylin-eosin staining, scale bar=100 μm)

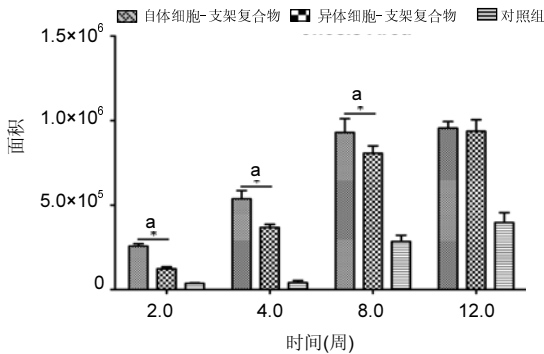


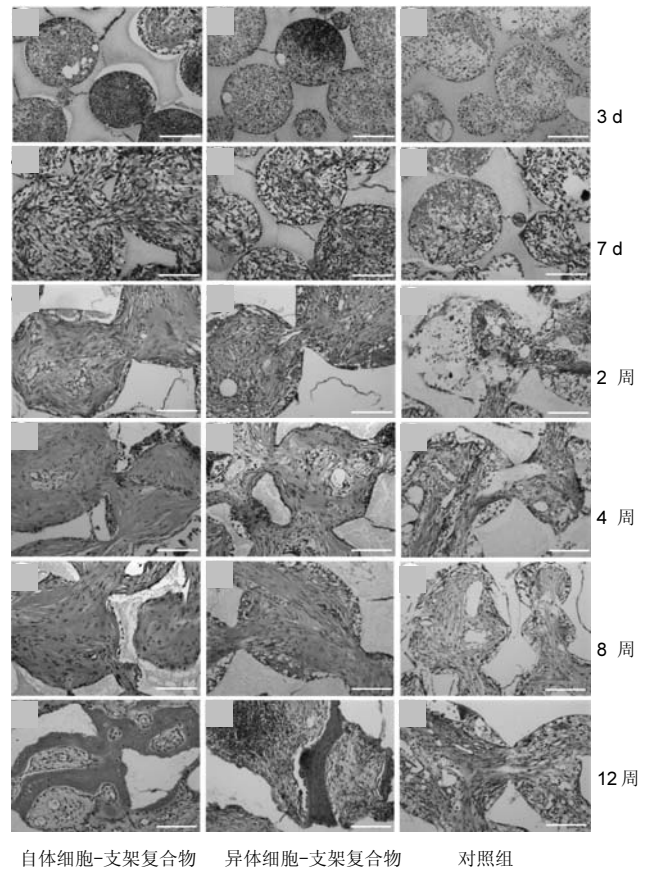
图6 细胞-β磷酸三钙支架复合物体内异位成骨取材后成骨量统计分析

Figure 6 Bone formation amount after implantation of cell-β-tricalcium phosphate scaffold complex

图注: 第 2, 4, 8 周自体组成骨面积均高于异体细胞组, ^a*P* < 0.05。

2.3 体外培养骨髓间充质干细胞-支架复合物电镜扫描观察结果 电镜扫描细胞-支架复合物发现, 接种3 d后细胞已分泌大量基质, 逐渐充满整个孔隙。复合物体外培养7 d置于荧光倒置显微镜下直接观察, 也看到激发出荧光的细胞在支架上黏附生长(图3)。

2.4 术后情况 术后3 d, 其中1只比格犬上部齐平肩关节处背部皮下细胞-支架复合物顶破皮肤外露(切口清创缝合后犬排出实验组), 考虑是术中分离皮下组织时因分离皮瓣过薄或感染造成。其余犬术后恢复良好, 无感染等情况发生。



自体细胞-支架复合物 异体细胞-支架复合物 对照组
图5 细胞-β磷酸三钙支架复合物皮下植入取材后组织学观察(苏木精-伊红染色, 标尺=100 μm)

Figure 5 Histological observation of cell-β-tricalcium phosphate scaffold complex (hematoxylin-eosin staining, scale bar=100 μm)

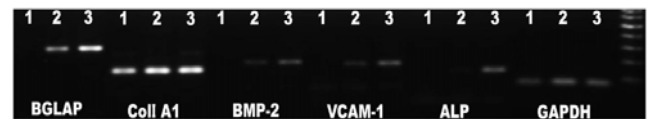


图7 RT-PCR检测组织工程骨体内异位成骨过程中相关基因的表达

Figure 7 RT-PCR detection of osteogenesis-related genes during ectopic bone formation

图注: 1 为对照组; 2 为自体细胞-支架复合物; 3 为异体细胞-支架复合物组。4 种基因自体组表达均高于异体组, 空白支架中不表达, I 型胶原在 3 组中均有表达。BGLAP: 骨γ羧基谷氨酸蛋白; BMP-2: 骨形态发生蛋白 2; VCAM: 血管细胞黏附分子; ALP: 碱性磷酸酶。

2.5 苏木精-伊红染色组织学观察结果

细胞-珊瑚支架复合物取材标本: 植入3, 7 d, 发现自体细胞组和异体细胞组无明显区别, 标本经甲酸脱钙处理后剩余的组织大部分为细胞-珊瑚支架复合物在体外成骨诱导培养过程中分泌的细胞外基质(I 型胶原蛋白为主); 到2周时, 两组均发现开始出现类骨基质, 提示骨质合成过程开始启动, 此时植入的骨髓间充质干细胞可能在发挥着重要的作用, 自身不但向成骨细胞、

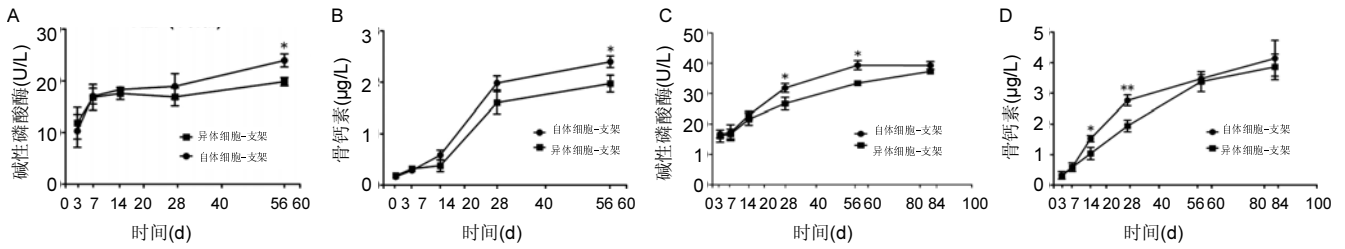


图8 组织工程骨体内异位成骨过程中碱性磷酸酶、骨钙素表达定量检测(ELISA法)

Figure 8 ELISA detection of alkaline phosphatase and osteocalcin expression during ectopic bone formation

图注: A, B 为细胞-珊瑚支架; C, D 为细胞- β 磷酸三钙支架。

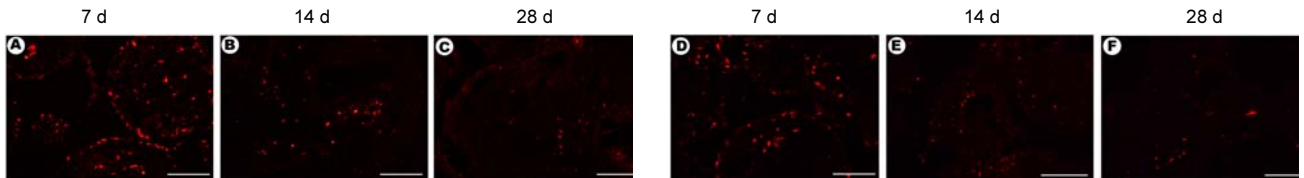


图9 激光扫描共聚焦显微镜观察体内组织工程骨成骨过程中 CM-Dil 标记的骨髓间充质干细胞数量变化(标尺=100 μ m)

Figure 9 The number of CM-Dil-labeled bone marrow mesenchymal stem cells during ectopic bone formation under laser scanning confocal microscope (scale bar=100 μ m)

图注: 第 1, 2, 4 周荧光强度比较自体组均高于异体组($P < 0.05$)。A-C 为自体细胞-支架组, D-F 为异体细胞-支架组。

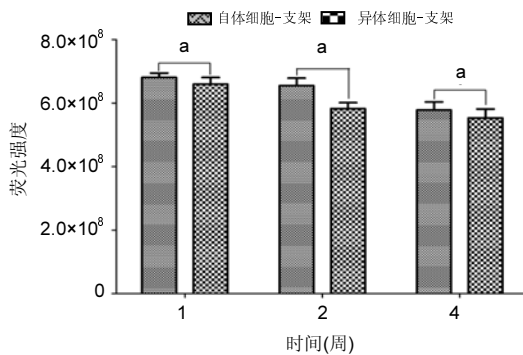


图10 定量检测体内组织工程骨成骨过程中 CM-Dil 标记的骨髓间充质干细胞

Figure 10 Quantitative determination of CM-Dil-labeled bone marrow mesenchymal stem cells during ectopic bone formation

图注: 第 1, 2, 4 周荧光强度比较自体细胞-支架组均高于异体细胞-支架组($^aP < 0.05$)。

骨细胞方向分化, 而且具有旁分泌功能, 而空白材料对照组由于没有细胞和基质的占位性作用, 大量成纤维细胞开始长入, 纤维组织逐渐形成; 4 周后, 组织切片上明显看到自体细胞组骨基质形成面积大于异体细胞组, 说明前者成骨速率可能快于后者, 提示异体细胞在体内受到了免疫排斥反应的影响; 8 周后, 自体组的成骨速率仍然快于异体组, 前者骨基质形成较后者丰富。由于珊瑚支架的降解速率较快, 异位成骨本实验中只追踪到第 8, 12 周时支架材料大部分已降解, 而此时骨形成还处于骨质合成期(胶原纤维形成), 还未到骨矿化期(羟基磷灰石形成), 因此给组织取材带来了困难(图4)。

细胞- β 磷酸三钙复合物取材标本: 植入 3, 7d 后仅看到大量的细胞浸润和纤维组织; 2 周后, 红染的类骨基质开始形成, 从支架材料孔洞的边缘向中央逐渐扩展, 提示植入的骨髓间充质干细胞在支架材料上贴壁生长, 增殖分化并逐渐向孔隙中央迁移, 空白支架同样开始长入纤维结缔组织; 4 周和 8 周观察发现, 自体组形成的类骨基质明显多于异体组, 尤其是到第 8 周, 前者已基本填满 β 磷酸三钙的整个孔隙, 实验结果同植入细胞-珊瑚复合物基本一致; 但是 12 周后, 两组均发现出现了成熟的骨基质, 提示异体组并未因为成骨速率的减慢而影响其成骨能力。但由于 β 磷酸三钙降解速率较慢(6 个月以上), 是否会影响新生骨的形成还有待于进一步观察(图5)。

2.6 细胞- β 磷酸三钙复合物体内异位成骨面积分析
第 2, 4, 8 周自体组成骨面积均高于异体细胞组($P < 0.05$), 说明在这个时间段里前者成骨速率大于后者, 提示具有成骨功能骨髓间充质干细胞的数量可能多于后者。但到体内 12 周, 两者成骨面积比较并无统计学差异, 说明异体细胞组虽然成骨速率减慢, 但不影响其成骨能力(图6)。

2.7 RT-PCR 检测组织工程骨植入体内相关基因的表达
骨 γ 羧基谷氨酸蛋白(BGLAP)、骨形态发生蛋白 2、血管细胞黏附分子、碱性磷酸酶 4 种基因在自体组和异体细胞组标本中表达, 空白支架中不表达, 而且自体组表达均高于异体组。I 型胶原在 3 组中均有表达(图7)。

2.8 组织工程骨体内碱性磷酸酶、骨钙素表达定量检测

细胞-珊瑚支架复合物: 骨质合成前期(4周内)自体/异体两组生成的碱性磷酸酶浓度没有显著性差异, 而且3-7 d是碱性磷酸酶产生的快速升高期, 之后其含量产生进入平坦期, 但到第8周时自体组高于异体组($P < 0.05$); 骨钙素体内检测结果显示其合成含量2-4周进入快速升高期, 同样到第8周自体组高于异体组。这种差异可能是造成异体组成骨速率减慢的原因之一(图8 A, B)。

细胞-β磷酸三钙复合物: 相比珊瑚支架, β磷酸三钙作为支架复合细胞植入, 发现碱性磷酸酶整体生成量高于珊瑚, 提示β磷酸三钙材料可能具有更好的组织细胞相容性和促进成骨能力, 而且碱性磷酸酶生成量曲线相对平缓, 没有过早进入平台期, 同时发现异体组在第4周和第8周2个时间点上碱性磷酸酶表达降低($P < 0.05$), 但12周后两者之间没有明显差异; 骨钙素的表达, 整体含量同样高于珊瑚支架, 自体/异体两组的差异时间点出现在了第2周和第4周, 到8周后2组骨钙素表达量没有明显差异(图8C, D)。

2.9 犬体内植入骨髓间充质干细胞(CM-Dil标记)的示踪观察 第1, 2, 4周2组荧光强度比较结果发现, 自体组均高于异体组($P < 0.05$), 并且第2周统计学差异最明显。由于2组体内植入时细胞数量一致($2.0 \times 10^{10} L^{-1}$), 这一结果说明进入体内异体组细胞减少速度(骨髓间充质干细胞死亡或迁移引起)快于自体组(图9, 10)。

3 讨论 Discussion

骨缺损的修复重建一直是临床工作中的常见问题, 目前自体骨移植是骨缺损治疗的“金标准”。自体骨因携带具有成骨活性的骨祖细胞和成骨细胞, 又给缺损区域提供了理想的空间结构的支撑, 因此具有良好的骨诱导和骨传导功能^[2]。但自体骨移植存在供区损伤、结构功能破坏的风险, 大面积骨缺损时移植骨量可能不足, 造成受区填充、塑性困难, 而异体骨移植或人工骨替代品各有不足之处, 无法达到自体骨移植的效果。组织工程骨既能给受区提供具有生物活性的骨髓间充质干细胞或成骨细胞, 又具有良好的骨传导能力和空间结构支撑, 能够根据受区缺损的不同需求任意塑性, 因此有望成为未来骨缺损修复的理想治疗方法。骨髓间充质干细胞是目前理想的种子细胞来源, 但临床工作中患者自身骨髓间充质干细胞的生物活性受年龄、体质、疾病、以

及射线和药物等治疗因素的影响, 抽取骨髓和细胞培养也不同程度的延长了治疗时间, 因此建立符合药品生产质量管理规范(Good Manufacturing Practice, GMP)标准的同种异体骨髓间充质干细胞干细胞库, 预构建特定形状的组织工程骨修复骨缺损, 是组织工程产品走向临床应用的必然要求。

本实验应用同种异体骨髓间充质干细胞分别复合珊瑚和β磷酸三钙构建组织工程骨。比格犬通过家系选择、MHC基因分析和单向MLC3种方法确保了供受双方MHC的错配, 也为将来同种异体骨髓间充质干细胞走向临床应用能否避免MHC配型提供了依据。Gotz等^[10]通过建立异位成骨模型发现, 动物皮下环境的成骨能力优于肌肉间隙, 因此实验将细胞-支架复合物植入比格犬皮下建立异位成骨模型。术后通过不同时间点组织取材的组织学观察, 发现体内组织工程骨的成骨过程中, 首先在支架材料表面形成类骨基质, 然后逐渐向材料孔隙的中央扩展, 说明骨髓间充质干细胞黏附于材料表面生长, 增殖分化为成骨细胞后开始分泌大量细胞外基质(主要是I型胶原纤维), 随着支架材料的降解, 骨基质逐渐填充整个材料孔隙, 并开始出现骨盐沉积(以羟基磷灰石结晶的形式沉积在胶原纤维上), 最终会完成骨的矿化而形成坚硬致密的骨组织。但实验中发现, 珊瑚在皮下环境中存在降解过快的缺点, 相关文献报道珊瑚在体内完全降解时间为3个月, 因此可能钙盐沉积、骨的矿化刚刚开始, 支架材料已经完全降解, 造成胶原纤维失去空间结构支撑而塌陷, 最终影响骨的形成。因此作者又选用β磷酸三钙作为支架材料, 文献报道其完全降解时间在6个月以上^[11-12], 实验中最长时间追踪到3个月, 发现成熟骨质已开始形成, 但仍存在大量未降解的材料占据空间, 提示支架材料有阻碍新生骨质形成的可能性。因此复合材料是将来组织工程中生物材料研究的方向之一, 它能够吸收各个单纯材料的优点。

组织工程骨体内移植后进行了成骨面积计算、RT-PCR基因表达分析、成骨指标碱性磷酸酶和骨钙素的检测。骨质苏木精-伊红染色红染, 通过计算红染区域面积推测骨质形成量, 发现4-8周时异体组的成骨面积小于自体组, 但到12周后2组无明显差异。RT-PCR基因表达分析中, BGLAP即骨钙蛋白, 该蛋白在骨形成进入矿化期后开始表达, 由成骨细胞分泌, 与钙离子结合促进骨的矿化, 实验中发现自体组4周时骨γ羧基谷氨酸蛋白表达高于异体组, 提示前者先于后者进入

骨矿化期。I 型胶原在 3 组中均有表达, 空白组大量成纤维细胞长入, 表达反而更高, 实验组 I 型胶原主要由骨髓间充质干细胞分泌, 组成骨的有机成分, 先于骨盐分泌并为其沉积提供支架, 同时也提供占位效应阻止了成纤维细胞的长入。骨形态发生蛋白 2 能够诱导间充质干细胞分化为成骨细胞, 细胞-支架复合物成骨过程中发现有少量的表达。血管细胞黏附分子 1 主要表达于血管内皮细胞, 标本中发现有血管细胞黏附分子 1 表达, 提示骨髓间充质干细胞可能具有促进组织血管化的作用。碱性磷酸酶表达也发现自体组高于异体组。ELISA 定量检测结果同样发现, 自体组碱性磷酸酶和骨钙素表达量在 4 周左右高于异体组, 到 12 周后趋于一致。

通过 CM-Dil 细胞标记示踪植入体内的骨髓间充质干细胞, 结果发现同种异体骨髓间充质干细胞的数量相比自体骨髓间充质干细胞有明显的减少, 这一现象解释了 Allo-TEB 组在体内植入早期成骨速率慢于 Auto-TEB 组的原因, 同时也证实了骨髓间充质干细胞在组织工程骨成骨过程中发挥着重要的作用。同种异体骨髓间充质干细胞移植数量的减少是否与免疫反应有关, 骨髓间充质干细胞的免疫原性和它所发挥的生物学作用是否可以共存, 还有待于进一步的研究。

作者贡献: 武京国进行实验设计, 实验实施为武京国、马燕、曹霏霏、王德峰, 实验评估为张喜善, 资料收集为张庆富, 武京国成文, 李勇审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经泰山医学院动物实验伦理委员会批准。实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者和通讯作者对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定

保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. J Bone Joint Surg Am.2003;85-A Suppl 3:82-88.
- [2] Zarate-Kalfopulos B, Reyes-Sanchez A. Bone grafts in orthopedic surgery. Cir Cir.2006;74(3): 217-222.
- [3] Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. Orthop Clin North Am.2000; 31(3):389-398.
- [4] Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG. Bone tissue engineering. Nat Med.1995;1(12): 1322-1324.
- [5] Service RF. Tissue engineers build new bone. Science. 2000;289(5484): 1498-1500.
- [6] Dahir GA, Cui Q, Anderson P, et al. Pluripotential mesenchymal cells repopulate bone marrow and retain osteogenic properties. Clin Orthop Relat Res.2000; (379 Suppl): S134-S145.
- [7] Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. J Cell Biochem. 2001;82(4): 583-590.
- [8] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone. 2003;33(6): 919-926.
- [9] Rose FR, Oreffo RO. Bone tissue engineering: hope vs hype. Biochem Biophys Res Commun. 2002;292(1): 1-7.
- [10] Gotz W, Lenz S, Reichert C, et al. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. Folia Histochem Cytobiol.2010; 48(4): 589-596.
- [11] Sciadini MF, Dawson JM, Johnson KD. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. J Orthop Res.1997;15(6): 844-857.
- [12] Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK, et al. Transcriptome analysis of beta-TCP implanted in dog mandible. Bone. 2011;48(4): 864-877.