

# 自体成骨细胞的诱导培养及其生物学特性

杨福军 夏玉莲 李雨民 孙元明 刘征 刘宗礼 李贺达 杨学琪

**【摘要】** 目的 诱导培养来自自体骨髓间充质干细胞的成骨细胞或成骨细胞的前体细胞,进行自体成骨细胞异体骨复合移植实验研究。方法 抽取动物骨髓、抗凝稀释,以适当条件培养诱导,分化为成骨细胞并分析细胞生物学特性。成骨细胞生长在同种异体骨制成的载体上,形成复合物,植入人工缺损处,观察骨修复情况。结果 可以诱导培养出大量的成骨细胞或成骨细胞的前体细胞。自体成骨细胞异体松质骨复合物修复骨缺损的效果明显优于对照组。结论 本实验为自体成骨细胞异体骨复合移植的临床应用提供一个简单有效的方法。

**【关键词】** 细胞培养; 成骨细胞; 自体成骨细胞异体骨复合物; 移植

**Osteoblast induction and cultivation from bone marrow and its biological characteristics** YANG Fujun, XIA Yulian, LI Yumin, et al. Institute of Radiation Medicine, CAMS & PUMC, Tianjin 300192 China

**【Abstract】 Objective** To induce and cultivate osteoblast (OB) from bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) for transplanted of an autoosteoblast and allogeneic bone complex. **Methods** Bone marrow was collected and diluted with anticoagulant. The cells were cultured and induced into OB in conditional media. OB differentiation, growth and biological characteristics were observed, OBs were plated and grew on allogeneic bone slices, which were transplanted to bone defects. **Results** OB were induced from MSC and grew abundantly. The transplantation of auto-OB and allogeneic bone complex to repair bone defects had a markedly better result than that in control group. **Conclusion** This experiment provides a simple and effective method for clinical use of allogeneic bone complex transplantation.

**【Key words】** Cell culture; Osteoblast; Auto-osteoblast and allogeneic bone complex; Transplantation

骨髓间充质干细胞属于多能干细胞,在适当的条件下可以分化为前体成骨细胞和成骨细胞。20世纪60年代,已经有异体骨移植用于治疗骨髓炎的报道,近年来荷兰、比利时。法国、印度<sup>[1-4]</sup>等诸多学者在利用骨库的捐赠骨移植方面做了大量工作。

对成骨细胞的认识大部分是通过体外培养细胞而获得,近年来发展起来的组织培养技术已成为研究成骨细胞起源、形态、生化特性、分化发育及代谢调节等的重要技术。本项研究在原有研究的基础上<sup>[5,6]</sup>,参考有关资料<sup>[7-9]</sup>,成功地诱导骨髓内间充质细胞分化为成骨细胞及成骨细胞前体细胞,并进行了自体成骨细胞异体骨复合移植。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070828,30170360),天津市自然科学基金资助项目(033605911,013610411,023610111)

作者单位:300192 天津,中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所生物室(杨福军、夏玉莲、李雨民、孙元明、刘征);天津市第一中心医院骨科(刘宗礼、李贺达、杨学琪)

杨福军 E-mail: fujunyang@yahoo.com.cn

## 材料和方法

### 1. 试剂

$\alpha$ -MEM(HyClon产品),地塞米松(DEX),维生素C(Vc)(均为天津金耀氨基酸有限公司产品),胎牛血清(天津市川页生化制品有限公司产品), $\beta$ -甘油磷酸钠(MERCK产品),巴比妥钠,氯化钙,硫代硫酸钠,硫酸镁(均为AMRESCO产品),硝酸银(Promega产品),硝酸钴(Sigma产品,联星生物分装),SP系列试剂盒(北京中山公司产品),Cbf- $\alpha$ 1抗体(Santa Cruz产品)。

### 2. 自体成骨细胞的培养

无菌条件下取家兔股骨骨髓2 ml,置于含有肝素的抗凝管中。将2 ml骨髓用8 ml  $\alpha$ -MEM培养液稀释,细胞计数, $1 \times 10^7/\text{cm}^3$ 培养于25  $\text{cm}^2$ 培养瓶中(37 $^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ )。48 h后,换为含有50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Vitamin C,10  $\text{mmol}/\text{L}$   $\beta$ -谷氨酰胺和 $10^{-8}$   $\text{mol}/\text{L}$  DEX及10% FBS的 $\alpha$ -MEM继续培养。第5天时,去除悬浮细胞,

用 PBS 液冲洗,之后 2~3 d 换液 1 次。培养 7~8 周。取一部分细胞做碱性磷酸酶染色及 Von Kossa 染色。待有 70%~80% 细胞融合时,用 0.25% 胰酶消化,1000 r/min 转离心 5 min,去除上清,用培养液洗 1 次,离心。

### 3. 碱性磷酸酶染色

配制孵育液。将 24 孔培养板孔内的培养液吸出,加 1 ml 冷丙酮置于 4℃ 待冷丙酮挥发。在孔内各加入 2.5 ml 孵育液,37℃ 温箱孵育 3 h。将 24 孔板取出,用蒸馏水冲洗 3~4 次,每次 1 min。2% 硝酸钴水溶液作用 8 min,蒸馏水冲洗 2~3 次,每次 1 min,2% 硫化铵水溶液处理 1 min,流水冲洗数分钟,再用蒸馏水冲洗 1 min,镜下观察,拍照。

### 4. Von Kossa 染色

吸除原培养液,PBS 冲洗 3 次。中性甲醛溶液固定 5 min。去离子水冲洗。5% 硝酸银溶液染色 30 min。紫外灯照射 1 h。去离子水冲洗。5% 硫代硫酸钠中和剩余的硝酸银。显微镜下观察,拍照,显示骨小节。

### 5. Chf $\alpha$ 1 免疫组织化学染色

培养有细胞的盖玻片用 PBS 冲洗后,按 Sana Cruz Biotech 免疫组化和染色试剂盒说明进行实验操作。镜下观察并记数 500 细胞,深染为抗体结合细胞,计算阳性细胞百分数。

### 6. 异体松质骨载体制备

取家兔肱骨及股骨,将松质骨切成 2 mm 的薄片。50℃ 水浴中超声清洗 2 h,每隔 15 min 换水 1 次。无水乙醇和二甲苯(2:1)浸泡 12 h,脱脂。双氧水浸泡 24 h,脱蛋白,0.6 M HCl 浸泡 5 min,脱钙。蒸馏水浸泡 2 h,清洗骨片。干燥,冷藏保存。使用前<sup>137</sup>Cs 照射(吸收剂量率为 90.6894 R/min)3 h 灭菌,备用。

### 7. 自体成骨细胞异体骨复合物制备

将上述洗后离心的细胞加含有 50  $\mu$ g/ml Vitamin C, 10 mmol/L  $\beta$ -谷氨酰胺和  $10^{-8}$  MDEX 及 10% FBS 的  $\alpha$ -MEM 冲打开,加入含有消毒骨片的 12 孔板内。每孔 2 ml。继续培养。待细胞爬满骨片后(约为 4 周),将骨片重新接种于兔右尺骨。同时将消毒但未附着成骨细胞的骨片接种于对照组骨缺损处。

### 8. 骨缺损及骨移植手术

常规骨科手术,乙醚麻醉。右侧尺骨造成 1.0 cm 节段性骨缺损,髓针固定。2 只 1 组,设空白对照组、对照组、实验组。空白对照组,缺损处不接种骨片和成骨细胞;对照组,缺损处植入无成骨细胞的异

体松质骨骨片;实验组(为取骨髓细胞的家兔),植入自体 OB 和异体松质骨的复合物。8 周及 12 周 X 线拍片,比较植入物的骨修复能力。12 周 HE 染色行组织学检查。定时拍 X 光片;观察接种骨片生长和缺损的修复情况。

## 结 果

### 1. 自体 OB 的诱导培养

骨髓细胞刚培养时,呈圆形,悬浮状,48 h 后可见细胞贴壁生长,大多仍为圆形,密布培养板底部,胞浆开始伸展。血细胞因不贴壁随换液而逐渐清除,培养液逐渐透亮,之后贴壁细胞逐渐呈梭形,有长的细胞突起,铺满瓶底,细胞核明显,呈椭圆形,甚至可见含 1~2 个核仁,胞浆内可见黑色颗粒。2 周后,大量梭形细胞中有少量多角细胞,呈星状,可形成花边样网状结构。传代培养,2 h 后可看到细胞贴壁,24 h 后则完全贴壁,呈棱形。

### 2. ALP 染色

200 倍光镜下可见染色深浅不一,细胞呈棱形、多角形、椭圆形等,形状各异,大小不等,细胞之间可连接成网状,酶活性部位是紫色细颗粒状,分布于整个胞浆,阳性细胞达 60% 左右(图 1)。400 倍光镜下,细胞染色是棕色,细胞内酶分布不均。其中可见少量多角细胞,呈星状,可形成花边样网状结构。

### 3. Chf $\alpha$ 1 免疫组化染色

细胞是棕色,梭形、椭圆形、多角形,可见长的细胞突起,胞核清楚(图 1,2),可见到核中满布深棕色颗粒。散在有阴性的多角形细胞,细胞阳性率达 50% 以上。加入 10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠后,生成大量黑色的骨小结,光镜下呈圆形,直径约为 0.2 mm~0.4 mm(图 3)。

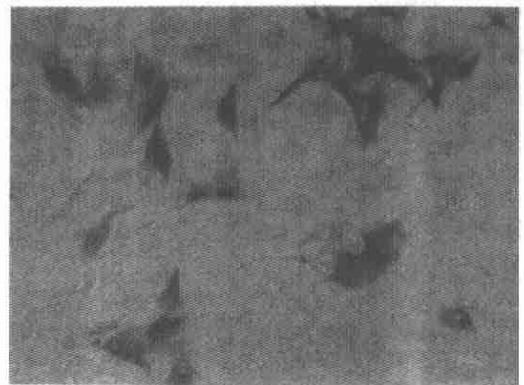


图 1 OB 内有深棕色颗粒 ALP 染色( $\times 200$ )

### 4. 自体成骨细胞异体骨复合物制备

兔松质骨载体经系列化学处理后,白色,多孔样

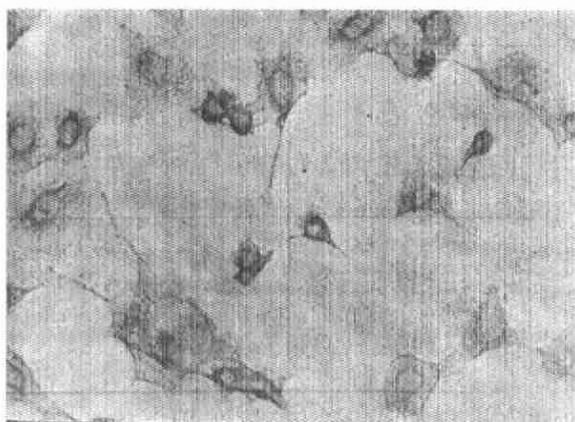


图2 CD61表达细胞阳性率达50%以上免疫组化染色( $\times 200$ )

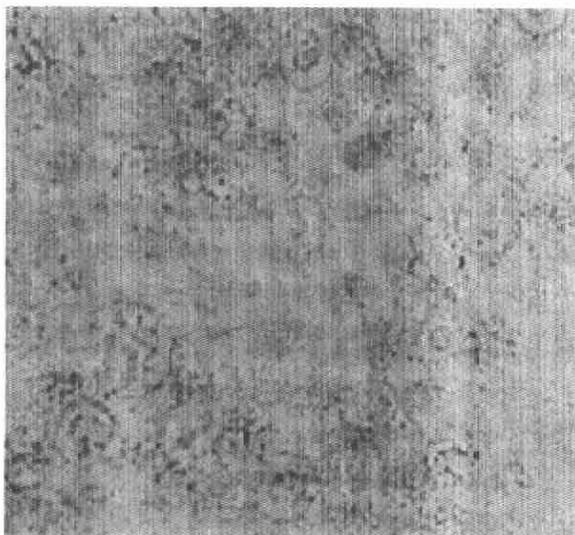


图3 黑色颗粒为骨小结 Von Kossa 染色( $\times 100$ )

结构。载体骨具有原骨的骨小梁、小梁间隙及骨内管腔系统,孔壁干净、光滑,未见其他物质残留。

细胞培养后10 d左右,培养液变清亮,细胞铺满培养瓶底部,大多仍呈圆形,胰酶消化后,细胞悬浮,重新接种于载体上。接种5 d后,骨载体表面边界模糊,呈现绒毛状,10 d左右将OB松质骨复合物植入骨缺损处。

### 5. 病理切片

12周后,光镜下可见对照组及实验组骨质显色均匀,骨小梁大小一致,结构完整,骨细胞及哈佛氏管大小一致,分布规律。空白对照仍为缺损。对照组发生骨不连(图4),缺损处被部分新骨、纤维组织、脂肪组织和肌肉组织填充。实验组,异体骨与缺损处上下结合界面有新骨组织形成,异体骨与缺损处上下紧密骨性结合,达到完全骨性融合,松质骨中骨组织生成数量多,同时可见软骨组织生成和软骨内化骨形成(图5)。

### 6. X线拍片

8周后,实验组,异体骨周围大量骨痂生长,两结合部骨折线已模糊,移植骨边缘部分呈虫蚀样吸收改变,对照组与实验组相似;空白对照仍为缺损,无骨痂形成。12周,实验组骨缺损基本消失,移植骨两端已与宿主骨连接,可见不规则骨髓腔,异体骨周围有环形骨痂包绕,并形成新的皮质,移植骨吸收明显(图6);对照组移植骨周围有骨痂包绕,吸收稍慢,髓腔不清楚(图7);空白对照骨缺损仍然存在,无骨痂影。

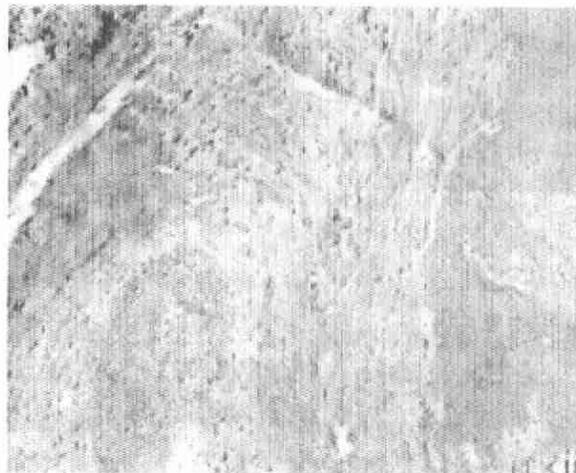


图4 骨不连。短端处为纤维组织充填(HE染色 $\times 100$ )

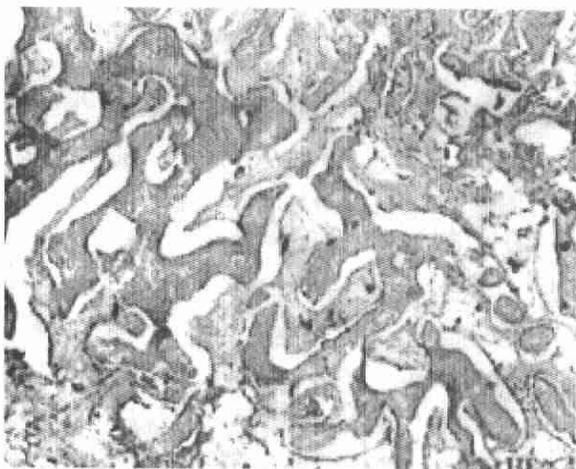


图5 断端局部骨痂处,示新生的骨小梁(HE染色 $\times 100$ )

## 讨 论

### 1. 成骨细胞的诱导培养及生物性特性

多能干细胞具有自我复制、增殖和多向分化潜能,包括造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)和非造血组织的干细胞即间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)。骨髓及脐血来源的HSC可以分化为各种类型的血细胞。骨髓来源的MSC在体内外都能诱导分化为OB<sup>[10]</sup>、成软骨细胞<sup>[10]</sup>、成脂肪细

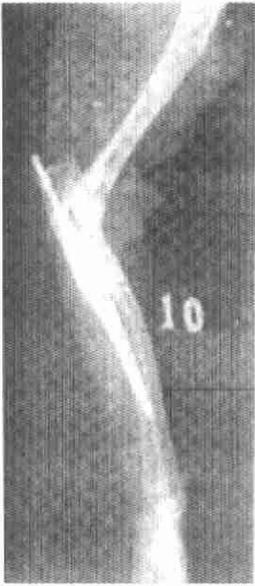


图6 实验组:12周后,骨缺损消失,植入物与宿主连接,骨吸收明显



图7 对照组:12周后,植入物周围有骨膜包裹

细胞、成肌细胞、骨髓基质甚至肝细胞和神经细胞<sup>[11,12]</sup>等,最终分化为骨、软骨、肌腱、肌肉、韧带、神经和脂肪等组织。同时在上述组织及血管、真皮中也发现有MSC,它们作为MSC的存储库,当发生意外伤害时,可以分化为相应的组织。

在细胞诱导培养中,DEX可以诱导骨髓干细胞向OB分化。10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠可以诱导OB生成骨小结,培养7 d就可以看到零星骨小结,16 d后数量明显增加,特别是加了 $\beta$ -甘油磷酸钠后。形成骨小结是OB体外培养时所展示出的成骨功能之一,表明OB已向成熟的骨细胞转化。

ALP染色可以显示细胞浆内的ALP,说明具有OB的生物学特性。

Cbfa1是OB区别于其他细胞的特异性表达蛋白<sup>[13]</sup>,用于作为检测OB的一个指标,特异性高,反映了OB分化的早期阶段。大鼠OB体外诱导培养,12 d以后细胞增殖逐渐减缓。分泌功能活跃,蛋白合成旺盛,此刻可见到大量免疫组化染色阳性细胞,Cbfa1表达阳性率高达50%。

## 2. 移植骨的选择

目前临床上同种异体骨经不同的处理后常用的有冷冻骨、冻干骨、脱钙骨基质、骨基质明胶和去抗原自溶同种异体骨<sup>[14,15]</sup>。虽然这5种骨都保留了骨生长因子的活性,但其抗原性和骨生长因子的纯度因处理方法不同而异。同种异体骨的生物相容性主要表现在抗原性方面,抗原成分主要来自骨髓细胞、

骨细胞、骨基质中的酸性蛋白和脂类。单纯冷冻或冻干只能消除部分抗原性,而将同种异体骨经过脱脂、脱蛋白、脱钙、脱水等综合化学处理后再冻结干燥,很大程度地削弱或消除了免疫原性,其中脱钙处理不仅除去一些抗原成分,还解除了无机矿物质对骨生长因子的抑制。

本文所使用的同种异体脱钙骨作为OB的载体材料有如下优点:①良好的组织相容性,彻底消除了抗原性,对种子细胞及邻近组织无免疫原性、无毒、无致畸性等;②良好的生物降解性,且降解率与组织生长率相适应;③良好的细胞-材料界面,利于细胞粘附,包含有利于OB生长、增殖及增强细胞活性的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP),为细胞在其表面生长、增殖、分泌基质提供良好的微环境;④良好的三维立体多孔结构,孔隙率达90%以上,类似泡沫状,具有天然骨的骨小梁、小梁间隙及骨内管腔系统,有利于传导成骨<sup>[16]</sup>,提供宽大的表面积和空间,可以吸收和容纳大量OB,利于细胞黏附生长及代谢;⑤良好的可塑性和机械强度,能根据需要预先制成一定的形状,且有一定的机械强度,为新生组织提供支撑。因此,是适合用于细胞种植的良好基质材料,为复合骨体内移植提供了良好的载体研究方向,有着广阔的应用前景。

本研究采用自体骨髓细胞体外扩增,和去抗原的同种异体松质骨三维立体培养后,共同植入动物体内,观察骨修复效果。X线拍片显示,这种方法所构建的组织工程化人工骨明显加速了骨修复进程,具有良好的生物相容性。本实验为把同种异体松质骨作为骨组织工程材料、体外组装OB以期达到植骨目的提供了一定的实验依据。

## 参 考 文 献

- 1 Velmeyer SB, Bloem RM, Petit PL. Microbiological screening of post-mortem bone donors-two case reports. *J Hosp Infect*, 2001, 47: 193-197.
- 2 Vilain J, Courtmans I. What future in the 21st century for tibial bone allografts in ossicular chain reconstruction: the state of the issue. *Acta Otorhinolaryngol Belg*, 2000, 54: 443-450.
- 3 Hernigou P, Gras G, Marinello G, et al. Inactivation of HIV by application of heat and radiation: implication in bone banking with irradiated allograft bone. *Acta Orthop Scand*, 2000, 71: 508-512.
- 4 Malhotra R, Morgan DA. P24 antigen screening to reduce the risk of HIV transmission by seronegative bone allograft donors. *Natl Med J India*, 2000, 13: 190-192.
- 5 孙元明, 杨福军, 李雨民, 等. 源于脾干细胞的破骨细胞诱导生成及培养. *中国地方病学杂志*, 2003, 22(2): 13-15.

此表现与拓扑异构酶 II 抑制 amsacrine 和 etoposide 的作用相同。因此, 作者认为 genistein 通过抑制拓扑异构酶 II 的活性来抑制破骨样细胞的形成<sup>[13]</sup>。半定量 RT-PCR、Northern 杂交和 ELISA 分析也显示<sup>[14]</sup>, genistein 剂量和时间依赖性地提高原代人成骨细胞 OPG 的 mRNA 和蛋白水平 2~6 倍, 其中最有效剂量为  $10^{-7}$  mol/L; 这种作用可被 ER 特异性拮抗剂 ICI182780 所抑制, 提示其刺激 OPG 的表达与 ER 直接相关; 同时, 这种促进作用不受蛋白合成抑制剂放线菌酮的影响, 说明 OPG 上调的效应与 OPG 基因转录有关。本实验通过半定量 RT-PCR 观察到, 在  $10^{-8}$  ~  $10^{-5}$  mol/L 剂量范围内, 应用各种浓度的 genistein, 其 OPG 和 RANKL 的表达都有增强, 最终在  $10^{-8}$  ~  $10^{-6}$  mol/L 剂量范围内增大 OPG/RANKL 比值, 呈正量效关系。从时间上看, 在加入  $10^{-6}$  mol/L genistein 0~12 h, OPG 和 RANKL 的比值时间依赖性地升高, 24 h 后有下降。浓度  $10^{-6}$  mol/L、作用时间 12 h 的效果最强。这一结果从分子角度为 genistein 防治骨吸收的作用提供了依据, 对 2 种因子蛋白表达的影响还需进一步研究。

#### 参 考 文 献

- Redlich K, Hayer S, Ricci R, et al. Osteoclasts are essential for TNF- $\alpha$ -mediated joint destruction. *J Clin Invest*, 2002, 110:1419-1427.
- Alper G, Mark RP, Rajiv K. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin  $b_3$ : implications in cell growth and differentiation. *Endocrine Reviews*, 2002, 23:763-786.
- Agnusdei D, Adami S. Effects of ipriflavone on bone mass and calcium metabolism in post menopausal osteoporosis. *Bone Miner*, 1992, 19(s1): 43-48.
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogen chemicals and phytoestrogen with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 1998, 139:4252-4263.
- 赵宁侠, 于世凤. 空泡型质子泵阻断剂 Baf. A1 抑制破骨样细胞体外骨吸收研究. *中华病理学杂志*, 1999, 28:436-439.
- 李铁军, 于世凤, 王晓敏, 等.  $1, 25(OH)_2D_3$  对小鼠骨髓细胞形成破骨细胞样细胞及其骨吸收效应的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(3):12-15.
- Gao YH, Yamaguchi. Inhibitory effect of genistein on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Bioch Pharm*, 1999, 58:767-772.
- Gioffi M, Caruso P. Inhibition of parathyroid hormone-stimulated resorption in cultured fetal rat long bones by the main metabolites of ipriflavone. *Calcif Tissue Int*, 1996, 58:419-422.
- American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. *J Bone Miner Res*, 2000, 15:2293-2296.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, 1999, 140:4367-4370.
- Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, et al. Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247:338-341.
- Takai h, Kanematsu M, Yano K, et al. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Bio Chem*, 1998, 273:27091-27096.
- Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology*, 2001, 142:3632-3637.
- Viereck V, Dker CG, Blaschke S, et al. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem*, 2002, 84:725-735. (收稿日期:2004-03-30)
- (上接第 266 页)
- 刘宗礼, 李贺达, 杨学琪, 等. 自体骨髓加入人工陶瓷复合移植成骨作用的实验评价. *天津医药*, 2000, 28:229-231.
- D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stemcells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*, 1999, 14:1115-1122.
- Chen JL, Hunt P, McElvain M, et al. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bonemarrow. *Stem Cells*, 1997, 15:368-377.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 2001, 344:385-386.
- Noth U, Osyczka AM, Tuli R, et al. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecularbone-derived cells. *J Orthop Res*, 2002, 20:1060-1069.
- Bellows CG, Heersche JN. The frequency of common progenitors for adipocytes and osteoblasts and of committed and restricted adipocyte and osteoblast progenitors in fetal rat calvaria cell populations. *J Bone Miner Res*, 2001, 16:1983-1993.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:10711-10716.
- Ducy P, Schinke T, Karsenty C. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 2000, 289:1501-1504.
- 孙世荃. 同种异体骨的制备方法及其成骨效果. *中华外科杂志*, 1996, 43:473.
- Urist MR, Dawson E. Inertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogeneic (AAA) bone. *Clin Orthop*, 1981, 154:97-113.
- 许永华, 旋新猷, 胡蕴玉, 等. 胶原-煨烧骨支架与成骨细胞相容性实验研究. *中国临床解剖学杂志*, 2000, 18:358-359. (收稿日期:2004-02-26)