

冲击波诱导人骨髓基质细胞体内成骨研究*

胡军^{1)**} 邢达^{1)**} 张爱斌²⁾ 周江南³⁾

¹⁾华南师范大学激光生命科学研究所, 激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631;

²⁾汕头大学医学院第一附属医院, 汕头 515041; ³⁾中南大学湘雅医院骨科, 长沙 430078)

摘要 为了研究冲击波 (SW) 诱导人骨髓基质细胞 (hMSCs) 在动物体内成骨作用, 根据前期工作结果, 应用适宜能量冲击波 (10 kV, 500 次) 处理体外培养的 hMSCs, 将 SW 组和对照组 hMSCs 与羟基磷灰石 (HA) 载体复合后体外培养 2 周, 应用扫描电镜 (SEM) 检测细胞在载体表面的生长情况. 将 hMSCs-HA 载体复合体植入裸鼠皮下, 分别于术后 4 周、8 周取材进行组织学、四环素荧光标记、SEM 观察、碱性磷酸酶测定、RT-PCR 检测骨钙素 mRNA 表达. 结果表明, SW 组及对照组细胞与 HA 载体体外复合后生长良好, 且 SW 组细胞分泌较多的细胞基质; 细胞载体复合体植入动物体内后, SW 组载体表面有类骨组织形成, 而对照组 HA 载体表面无骨组织形成; SW 组与对照组的 hMSCs-HA 载体复合体碱性磷酸酶表达有显著性差异 ($P < 0.01$); SW 组 hMSCs-HA 载体复合体术后 4 周与 8 周表达骨钙素 mRNA, 而对照组则无表达. 提示 hMSCs 经适宜能量冲击波作用后与 HA 载体复合植入裸鼠体内具有成骨作用, 适宜能量的冲击波作为一种新的促进 hMSCs 成骨分化的方法, 可应用于组织工程领域.

关键词 冲击波, 人骨髓基质细胞, 羟基磷灰石, 组织工程, 成骨作用

学科分类号 Q 813.11

骨缺损、骨折不愈合是骨科临床常见的问题, 传统的治疗方法是自体骨移植, 但存在局部并发症和供骨数量不足等缺陷. 诱导成骨是近代发展的重要理论, Urist 首先提出间充质细胞在骨形态发生蛋白 (BMP) 的作用下可向成骨和成软骨方向分化, 此后国内外很多学者在该领域进行了广泛深入的探索. 骨髓基质细胞是近年来研究较为深入的一种间充质细胞, 目前已发现其在一定诱导因素下可向成骨细胞、成软骨细胞、神经元、肝细胞、脂肪细胞、视网膜细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、腱细胞及胰岛细胞等多方向分化. 冲击波是治疗泌尿系结石的物理疗法, 近年来的一些研究显示其可加速骨折愈合, 为进一步探讨其发生机制, 前期研究结果表明, 适宜能量冲击波 (500 次, 10 kV) 可促进体外培养的人骨髓基质细胞 (hMSCs) 增殖及分泌细胞基质, 同时向成骨方向分化^[1]. 本研究在此基础上, 应用适宜能量冲击波作用体外培养的 hMSCs 后与羟基磷灰石载体 (HA) 复合, 植入裸鼠体内, 观察其体内成骨作用.

1 材料与方法

1.1 hMSCs 培养

骨髓来源于一名自愿患者, 排除代谢性骨病和血液病. 该患者因颈椎骨折需取自体髂骨行颈椎融合术, 手术过程中, 应用装有 5 ml 肝素生理盐水 (1 U/ml) 的 20 ml 无菌注射器抽吸髂骨骨髓 15 ml, 立即混匀, 防止发生凝集. 参考 Majumdar 方法, 在超净工作台内取骨髓液 5 ml 缓慢注入 15 ml 无菌离心管内, 再加入等量的 PBS 液混合, 用吸管轻缓吹打均匀, 室温下离心 (1 000 r/min, 10 min), 去上清液, 再用适量 PBS 液洗涤, 吸管吹打均匀, 调节细胞密度至 4×10^7 个 /ml. 在离心管中先加入 5 ml 1.073 g/ml 的 Percoll 溶液, 再将 5 ml 细胞悬液轻缓地铺于其上, 离心 (1 000 r/min, 30 min),

* 广东省医学科研基金立项课题 (A2005439).

** 通讯联系人.

胡军. Tel: 13016658421, E-mail: hjzkm@yahoo.com.cn

邢达. Tel: 020-85210089, E-mail: xingda@scnu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-02, 接受日期: 2006-01-05

去上清液, 收集界面上的细胞, 加入 DMEM 培养液清洗, 离心, 收集细胞, 应用 DMEM 培养液重新悬浮细胞, 调节细胞密度至 1.6×10^5 个/ml, 接种于 50 ml 培养瓶中, 在 37°C , 饱和湿度, 5% CO_2 培养箱中静止培养. 每天用倒置显微镜观察细胞, 第 3 天半量换液, 弃悬浮细胞. 以后每隔 3 天全量换液, 待细胞铺满瓶底 90% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞.

1.2 冲击波处理细胞

原代细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 制成细胞悬液, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 置于 15 ml 无菌聚丙烯管内, 密封瓶口. 细胞分为冲击波处理组 (SW 组) 与对照组. 根据前期研究结果, 将 SW 组聚丙烯管底部置于液电冲击波仪焦点处, 选用适宜能量冲击波 (10 kV, 500 次) 处理细胞^[1].

1.3 载体的处理

将 HA 载体制成 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 立方体, 孔径 $200 \sim 500 \mu\text{m}$, 孔隙率为 50%~60%. 蒸馏水反复冲洗使其表面无杂质, 高温高压消毒后将其浸泡在无菌的 D'Hank 液中 24 h, 烘干, 消毒后再烘干. 将其浸泡在无菌含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中备用.

1.4 细胞接种

细胞经冲击波处理后, 将 SW 组与对照组细胞悬液加入预先处理好的 HA 载体的 24 孔培养板中, 每孔加入的量应相等, 培养基液面应高于 HA 载体 3 mm.

1.5 扫描电镜观察 (SEM) 细胞与载体复合情况

SW 组和对照组细胞与 HA 载体复合后体外培养, 分别于 1、2 周随机取出 hMSCs-HA 复合体, 固定于 2.5% 戊二醛中, 系列脱水, 锇酸固定, 临界点干燥, 表面喷金后于 SEM 下观察 hMSCs 在 HA 载体表面与孔隙内的生长情况.

1.6 体内移植

hMSCs-HA 载体复合后体外培养 2 周, 在超净工作台中将其取出. 实验对象为 30 只裸鼠, 腹腔注入 2% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉后, 于其背部行一纵向切口, 分别将 SW 组与对照组 hMSCs-HA 复合体植入裸鼠皮下, 每只裸鼠植入 3 块复合体, 术后裸鼠于层流室内饲养.

1.7 四环素荧光标记

手术后第 3 周注入四环素 (50 mg/kg) 于裸鼠腹

腔内, 继续饲养 1 周后处死动物取出标本, 制作磨片, 于荧光显微镜下观察有无新骨形成的荧光标记.

1.8 光镜与 SEM 观察

手术后第 4 周、第 8 周处死动物, 取出 hMSCs-HA 复合体, 标本石蜡包埋、脱钙、制片、HE 染色, 光镜观察. SEM 观察标本固定于 2.5% 戊二醛中, 系列脱水, 锇酸固定, 临界点干燥, 表面喷金后于 SEM 下观察 hMSCs 在 HA 载体表面的成骨情况.

1.9 碱性磷酸酶测定

每块标本取出后, 首先放入 0.2% NP40 溶液中, 室温下离心 (1 500 r/min) 10 min, 取上清液, 应用碱性磷酸酶试剂盒检测碱性磷酸酶的活性, 每份样品测定时设测定管、标准管与空白管. 于 Beckman DU-640 分光光度计比色, 测各管吸光度, 根据公式 $\text{AKP} = (\text{测定管吸光度} / \text{标准管吸光度}) \times 0.005 \text{ mg} \times (100 \text{ ml} / 0.05 \text{ ml})$, 计算碱性磷酸酶含量.

1.10 RT-PCR 检测骨钙素 mRNA 表达

术后 4 周与 8 周取出细胞载体复合体, 研磨组织. 进行 hMSCs 总 RNA 提取, 逆转录反应, 聚合酶链式反应 (PCR) 和 PCR 产物电泳. 骨钙素的上游引物为 5' ATG AGA GCC CTC ACA CTC CTC 3', 下游引物为 5' CTA GAC CGG GCC GTA GAA GCG 3', 扩增产物为 303 bp (GenBank, X04143). 内对照基因 β -actin 上游引物为 5' GGC CAA CCG CGA GAA GAT 3', 下游引物为 5' CGT CAC CGG AGT CCA TCA 3', 扩增物大小为 168 bp (GenBank, M10277). 实验所用塑料制品均用 0.1% DEPC 处理并高压消毒, 玻璃仪器高温 180°C 烘烤 4 h. 应用 Eagle-Eye II 图文处理软件测量电泳条带综合密度, 将 SW 组与对照组的骨钙素 mRNA 与 β -actin mRNA 测量值的比值进行统计学分析.

2 结 果

2.1 SEM 观察细胞与载体复合情况

hMSCs 与 HA 载体体外复合培养 2 周后, SEM 观察发现细胞在载体表面生长增殖良好, 细胞已包被载体表面并突入到载体的孔隙内, 细胞间紧密粘附, 细胞突起互相融合. SW 组可见 MSCs 分泌的大量细胞基质存在于细胞表面及周围, 而对照组细胞基质分泌则不明显 (图 1).

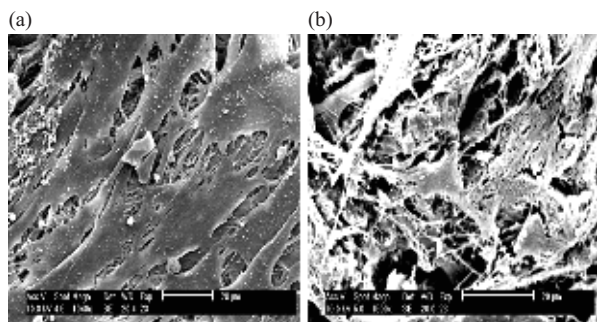


Fig. 1 SEM photomicrograph of hMSCs-HA composite before implantation

(a) The HA surface of SW group is almost covered by flat cells as well as a dense extracellular matrix 2 weeks after culture (Bar = 20 μm). (b) The HA surface is almost covered by flat cells, but few extracellular matrix than SW group 2 weeks after culture (Bar = 20 μm).

2.2 四环素荧光标记

术后 4 周将提前 1 周注入四环素的动物体内标本制成磨片, 荧光显微镜下观察, 发现 SW 组有明显线形荧光标记, 提示有新骨形成, 而对照组则无新骨形成(图 2).

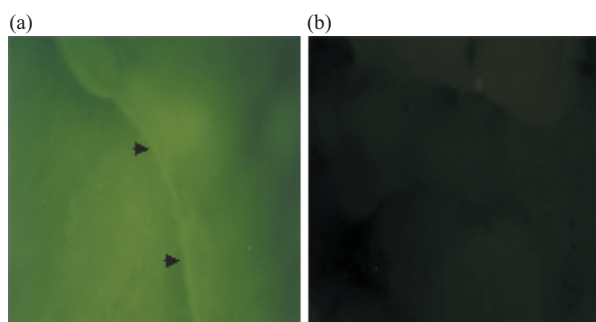


Fig. 2 Undecalcified section of composite 4 weeks after implantation under fluoroscopy

(a) Tetracycline labeling administered 4 weeks after implantation in SW group, and arrows indicate new bone formation ($\times 200$). (b) Tetracycline labeling line is not seen in control group ($\times 200$).

2.3 光镜观察

SW 组术后第 4 周标本切片 HE 染色观察发现, HA 的表面与孔隙内有类骨质形成, 其间可见成骨细胞, 基质相对较少, 而对照组载体表面与孔隙内则无新生类骨质. 术后第 8 周, SW 组 HA 载体表面与孔隙内的新生骨质增多, 成骨细胞被包于基质中, 对照组 HA 载体表面与孔隙内则为纤维组织, 未见成骨细胞与新生骨质(图 3, 4, 5).

2.4 扫描电镜观察

SW 组第 4 周与第 8 周 HA 载体表面均有新生

骨质包被, 并有大量的细胞基质成分, 而对照组 HA 载体表面则完全被纤维结缔组织包被, 可见大量的纤维束(图 6).

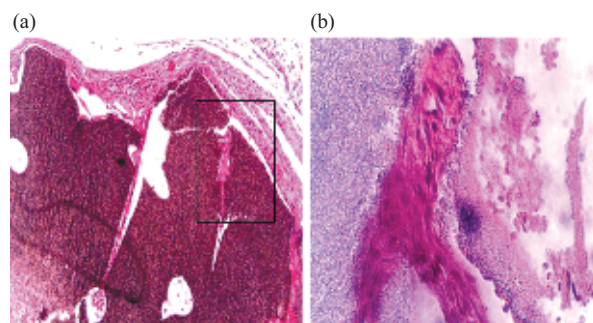


Fig. 3 The histology photograph of decalcified section of composite 4 weeks after implantation (HE stain)

(a) Composite of SW group 4 weeks after implantation. Indicate active new bone formation in the HA porous area ($\times 100$). (b) Higher magnification of the rectangular area in (a), indicate osteoblast and extracellular matrix ($\times 200$).

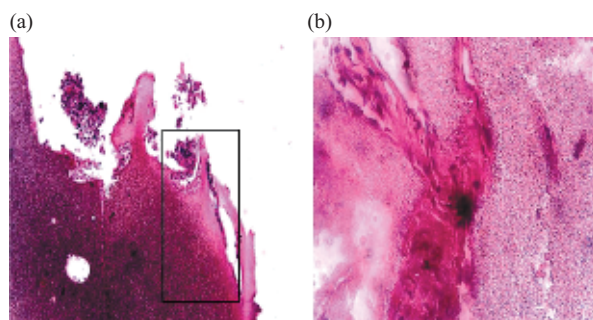


Fig. 4 The histology photograph of decalcified section of composite 8 weeks after implantation (HE stain)

(a) Composite of SW group 8 weeks after implantation. Indicate active new bone formation in the HA porous area ($\times 100$). (b) Higher magnification of the rectangular area in (a), indicate osteoblast and extracellular matrix ($\times 200$).

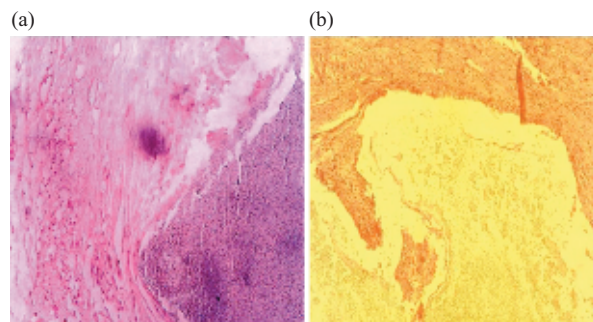


Fig. 5 The histology photograph of composite of control group 4 and 8 weeks after implantation (HE stain)

(a) Fibrous tissue in the HA surface in control group 4 weeks after implantation ($\times 100$). (b) Fibrous tissue in the HA surface in control group 8 weeks after implantation ($\times 100$).

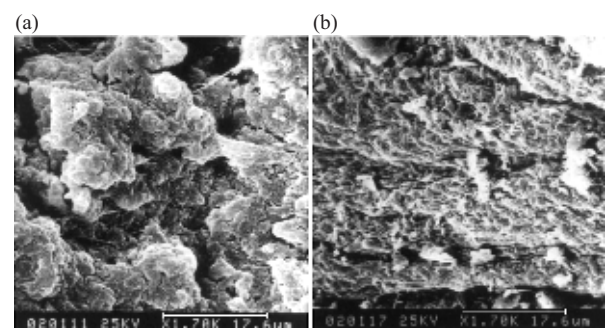


Fig. 6 SEM photomicrograph of composite 8 weeks after implantation
(a) New bone formation in the surface of HA scaffold of SW group 8 weeks after implantation (Bar = 17.6 μm). (b) Fibrous tissue surrounded the surface of HA scaffold of control group 8 weeks after implantation. (Bar = 17.6 μm).

2.5 碱性磷酸酶测定

术后第 4 周与第 8 周, SW 组与对照组的碱性磷酸酶表达有显著性差异 ($P < 0.001$), 而 SW 组术后第 4 周与 SW 组术后第 8 周碱性磷酸酶表达无显著性差异($*P > 0.05$). 详见表 1.

Table 1 The expression of AKP in SW group and control group after implantation (n=30)

	4 W		8 W	
	$\bar{x} \pm s$	P	$\bar{x} \pm s$	P
SW group	9.258 6 ± 0.832 3*		9.395 1 ± 1.436 3*	
Control group	4.810 9 ± 1.533 7	<0.001	4.071 5 ± 1.004 9	<0.001

* $P > 0.05$.

2.6 RT-PCR 检测骨钙素 mRNA 表达

SW 组于术后 4 周与 8 周均可检测到骨钙素 mRNA 的表达 (图 7), 而对照组则无表达.

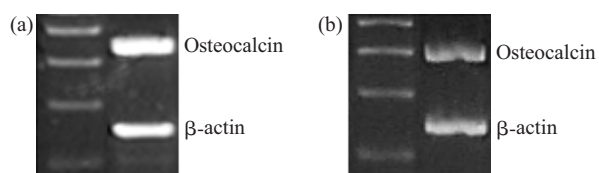


Fig. 7 The expression of osteocalcin mRNA was found in SW group 4 weeks (a) and 8 weeks (b) after implantation

3 讨 论

MSCs 是目前研究最为广泛的成体干细胞, 其骨、软骨、脂肪、造血基质及神经元样细胞等分化成熟的特性, 使其在组织工程中作为最佳种子细胞来源的地位令人瞩目, 近年研究表明 MSCs 又具有多细胞系横向分化的可塑性^[2]. 同时一些学者发现 MSCs 在一定条件下移植体内可形成骨组织. 由于骨髓中含有成骨性祖细胞, 许多作者应用骨髓修复骨缺损与促进骨折愈合, 在实验与临床方面已取得了一定的效果. 近年来随着骨组织工程的发展, 研究者们将 MSCs 与各种细胞载体复合植入体内, 证实可形成骨组织^[3].

Friedenstein 等将 MSCs 移入微孔滤膜扩散室内, 然后移植到动物体内继续培养, 发现小室内的 MSCs 可形成骨组织. Okumural 等应用地塞米松干预体外培养的 MSCs, 种植细胞于多孔生物活性陶瓷上, 再将细胞载体复合体植入到动物体内, 发现有新骨的形成. Ishaug 等^[4]应用地塞米松处理体外培养的 MSCs 后, 将细胞种植于多孔 PLGA 载体上, 移植体内 7 天可见新生骨形成, 并有血管的长入. 本研究前期实验表明应用适宜能量的冲击波 (10 kV, 500 次) 处理体外培养的原代 hMSCs, 通过形态学、组织学、碱性磷酸酶检测及骨钙素 mRNA 的表达, 证实冲击波可促进体外培养细胞向成骨方向分化^[1]. 为探讨冲击波处理细胞后能否在体内成骨, 本研究将 SW 组和对照组的 hMSCs 与羟基磷灰石载体复合培养 2 周后植入裸鼠皮下, 观察 SW 组与对照组细胞在体内成骨作用.

细胞与 HA 载体体外复合培养 2 周后, SEM 观察发现, 细胞在载体表面生长增殖良好, 细胞已包被载体表面并突入到载体的孔隙内. SW 组可见 hMSCs 分泌的大量细胞基质, 而对照组细胞基质则不明显, 此时 SW 组与对照组细胞在载体表面生长形态已不相同, 提示 hMSCs 与载体复合后体外培养过程中已经发生了分化. 检测 SW 组与对照组 hMSCs-HA 复合体分泌的碱性磷酸酶, 发现第 4 周 SW 组与对照组的碱性磷酸酶有显著性差异 ($P < 0.001$), 第 8 周 SW 组与对照组的碱性磷酸酶亦有显著性差异 ($P < 0.001$), 而 SW 组第 4 周与第 8 周则无差异 ($P > 0.05$). 四环素荧光标记发现, 术后第 4 周与第 8 周 SW 组羟基磷灰石载体表面及边缘有

明亮的四环素荧光,说明有新生骨沉积,而对照组则无此现象。

SW组术后第4周,标本切片HE染色,观察发现,HA载体的表面与孔隙内有新骨形成,其间可见成骨细胞,基质相对较少。而对照组HA载体表面与孔隙内则无新生骨质,可见大量的纤维结缔组织。术后第8周,SW组HA载体表面与孔隙内的新生骨质增多,成骨细胞包被于基质中,对照组HA载体表面与孔隙内则为纤维组织,仍未见成骨细胞与新生骨质。扫描电镜观察发现,SW组第4周与第8周HA载体表面均有新生骨质包被,并有大量的基质成分,而对照组HA载体表面则完全被纤维结缔组织包被,可见大量的纤维束。

冲击波因其操作简便、价廉、疗效理想、损伤轻微等优点,使其在泌尿系结石治疗方面得到广泛应用。20世纪90年代初,一些作者开始尝试应用冲击波治疗骨科疾患。Haupt等^[9]首先发现SW可促进骨折愈合,提出可能是SW促进成骨活性的增加,但具体机制不十分清楚。本实验体内研究表明,出生后人MSCs体外经适宜能量SW干预后,应用组织工程的方法将其复合在细胞载体(HA)上,移植到动物体内可形成新骨,说明SW促进MSCs成骨分化是促进骨折愈合的重要机制之一。由于骨髓中的MSCs为多向分化的间充质细胞,故MSCs只有一部分细胞能够自然地成骨方向分化,研究发现,MSCs在体外的分化依赖于培养条件,一些作者的实验证实,地塞米松、 β -甘油磷酸钠、TGF- β 等因素可促MSCs向成骨方向转化,在相关的体外培养条件下,MSCs可以表达碱性磷酸酶和骨钙素。体内和体外的研究表明,骨形态发生蛋白(BMP)可快速诱导MSCs向成骨细胞方向分化。BMP-2可通过增加特殊的转录因子活性促进非定向祖细胞向成骨细胞系方向分化。此外,MSCs还分泌一些因子,包括G-CSF、GM-CSF、IL-6、IL-1 β 、TGF- β 和TNF等^[6]。这些因子在促进MSCs分化方面起着重要的作用,Wang等^[7]研究发现,适宜能量冲击波作用鼠的肢体后,体外分离培养骨髓基质细胞,实验组TGF- β_1 的分泌明显增加,同时检测到细胞向成骨方向分化。Takahashi等^[8]应用体外冲击波作用大鼠大腿内侧,应用原位杂交技术,早期检测到股骨骨髓基质细胞表达I型胶原与骨钙素,冲击波处理后的21天发现,实验侧股骨

骨矿含量与骨密度均增高。骨钙素是由成骨细胞合成的一种骨非胶原蛋白,在各种属间有很高的同源性。骨钙素的确切生理功能尚未完全明了,目前已知其与骨形成及转化有关,被认为是一种特异而敏感的成骨细胞分化晚期标志物,许多研究小组将其作为成骨鉴定的特异性方法。本研究hMSCs经适宜能量冲击波作用后与细胞载体复合植入裸鼠体内,术后4周及8周均可检测到骨钙素的表达,而对照组未检测到骨钙素的表达,说明适宜能量的SW具有诱导hMSCs体内成骨的作用,其发生机制尚需深入研究。

本研究结果表明,hMSCs在体外经过适宜能量冲击波(10 kV, 500)处理后,与细胞载体复合植入到动物体内,可向成骨方向分化。揭示了其促进骨折愈合的机制,为临床应用冲击波治疗骨折不愈合及延迟愈合提供了理论基础。适宜能量冲击波作为一种新的促进hMSCs成骨分化的物理方法,可应用于组织工程领域。

参 考 文 献

- 1 胡军,张爱斌,刘晓岚,等.冲击波诱导人骨髓基质细胞成骨分化及机制的研究.中华实验外科杂志,2005,22(2):147~150
Hu J, Zhang A B, Liu X L, *et al.* Chinese Journal of Experimental Surgery, 2005, 22(2): 147~150
- 2 王韞芳,裴雪涛.成体干细胞的可塑性及其在再生医学应用中的思索.科学通报,2003,48(7):750~753
Wang W F, Pei X T. Chin Sci Bull, 2003, 48(7): 750~753
- 3 Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. J Biomed Mater Res, 1996, 32(3): 481~492
- 4 Ishaug S L, Crane G M, Miller M J, *et al.* Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. J Biomed Mater Res, 1997, 36(1): 17~28
- 5 Haupt G, Haupt A, Ekkernkamp A, *et al.* Influence of shock wave on fracture healing. Urology, 1992, 39(6): 529~532
- 6 Chen D, Ji X, Harris M A, *et al.* Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and type IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. J Cell Biol, 1998, 142(1): 295~305
- 7 Wang F S, Yang K D, Chen R F, *et al.* Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF- β_1 . J Bone Joint Surgery, 2002, 84-B(3): 457~461
- 8 Takahashi K, Yamazaki M, Saisu T, *et al.* Gene expression for extracellular matrix proteins in shockwave-induced osteogenesis in rats. Calcified Tissue International, 2004, 74(2): 187~193

Extracorporeal Shock Wave Promotes Postnatal Human Bone Marrow Stromal Cells Osteogenesis *In vivo**

HU Jun^{1)**}, XING Da^{1)**}, ZHANG Ai-Bin²⁾, ZHOU Jiang-Nan³⁾

¹⁾MOE Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

²⁾The First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China;

³⁾The Department of Orthopaedics of Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract It is known that extracorporeal shock wave (SW) may promote healing of fracture. A previous study reported that SW promoted human bone marrow stromal cells (hMSCs) towards osteoblasts *in vitro*. To study the osteogenesis ability of hMSCs treated by shock wave in porous hydroxyapatite (HA) *in vivo*, primary hMSCs of SW group and control group were cultured in the porous HA for 2 weeks and then implanted into subcutaneous sites of nude mouse. These implants were harvested and prepared for the biochemical analysis of alkaline phosphatase activity by AKP kit, histological analysis of decalcified and undecalcified sections and morphology by scan electric microscope (SEM), as well as osteocalcin mRNA expression by RT-PCR 4 weeks and 8 weeks after implantation. It showed that cells of SW and control group almost covered the rough surface of HA before implantation and the extracellular matrix of SW group was abundant by SEM photomicrograph. The histological analysis and SEM photomicrograph showed active bone formation 4 weeks and 8 weeks after implantation, as well as tetracycline labeling under fluoroscopy analysis in SW group. Alkaline phosphatase in supernatants of the implants detected 4 weeks and 8 weeks after implantation in SW group was higher than in control group ($P < 0.001$). The expression of osteocalcin mRNA was found 4 weeks and 8 weeks after implantation in SW group. The results suggest that postnatal hMSCs treated by SW could form bone tissue *in vivo* using tissue engineering technique, and this new method would be applied in the field of bone tissue engineering.

Key words human bone marrow stromal cells (hMSCs), hydroxyapatite, tissue engineering, osteogenesis, shock wave

* This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Medical Research from the Agency of Hygiene of Guangdong province China.

**Corresponding author.

HU Jun. Tel: 13016658421, E-mail: hjzkm@yahoo.com.cn

XING Da. Tel: 86-20-85210089, E-mail: xingda@scnu.edu.cn

Received: November 2, 2005 Accepted: January 5, 2006