

• 论 著 •

大鼠骨髓间充质干细胞体外分离及对原发性骨质疏松性骨折的实验研究*

李 鹏¹, 黄成硕^{2#}, 高 翔¹, 陈广谋², 刘志军², 曾 荣², 楚佳奇^{1△}

(1. 广东医学院附属医院干细胞研发与细胞治疗中心, 广东湛江 524001;

2. 广东医学院附属医院微创骨科研究室, 广东湛江 524001)

摘要:目的 用全骨髓贴壁分离法分离培养骨髓间充质干细胞, 通过建立原发性骨质疏松性骨折模型, 探讨骨髓间充质干细胞对骨质疏松性骨折愈合情况。方法 无菌条件下采集双侧股骨、胫骨骨髓, 用全骨髓贴壁分离法培养出原代骨髓间充质干细胞, 选取 11 周雌性 SD 大鼠 60 只, 卵巢切除术(OVX)建立骨质疏松模型后, 均做双侧骨折模型, 随机分成对照组(OVX 骨折不处理组)、生理盐水组(OVX 骨折+生理盐水组)和细胞治疗组(OVX 骨折+骨髓间充质干细胞治疗组), 术后于第 3 天、第 4、8 周分别进行 X-光扫描。结果 全骨髓贴壁法成功分离出骨髓间充质干细胞, 经流式细胞仪分析, 培养出来的细胞与骨髓间充质干细胞表面抗原一致。X-光结果表明, 细胞治疗组相比于其它组能加快骨质疏松性骨折愈合。结论 体外分离大鼠骨髓间充质干细胞对原发性骨质疏松性骨折愈合有促进作用。

关键词:骨髓间充质干细胞; 骨质疏松; 骨折**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.012**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2015)14-1984-03**Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on fracture healing in an ovariectomized rat model***Li Peng¹, Huang Chengshuo^{2#}, Gao Xiang¹, Chen Guangmou², Liu Zhijun², Zeng Rong², Chu Jiaqi^{1△}

(1. Stem Cell Research and Cellular Therapy Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524001;

2. Department of Orthopedic Surgery, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524001)

Abstract: Objective To assess the therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) on osteoporotic fracture healing. Methods Bone marrow of the rat bilateral femur and tibia bone tissue were collected, and BMSCs were isolated by the whole bone marrow adherence method. Sixty female 11-week-old SD rats were ovariectomized (OVX) to induce osteoporosis followed by bilateral fracture generation. Twenty rats were left without giving any further treatment (OVX controls), 20 received injection of saline (OVX+placebo control) and 20 were given injection of BMSCs (OVX+BMSCs). X-ray scan was performed at 3-day, 4-week and 8-week post-fracture, respectively. Results Flow cytometry analysis revealed that the isolated BMSCs express surface antigens similar to those reported previously. X-ray results showed that compared with OVX and OVX+placebo groups, BMSCs treatment markedly accelerated fracture healing of in osteoporotic rats. Conclusion Transplantation of BMSCs can effectively improve the healing of primary osteoporotic fracture.

Key words:Bone mesenchymal stem cells; Osteoporosis; Fracture

骨质疏松症(OP)是一种以骨量减少、骨组织微结构破坏, 骨脆性增加而易于发生骨折的一种全身代谢性骨骼疾病^[1]。骨质疏松性骨折(OPF)是骨质疏松症最严重的并发症, 因其组织学基础差、破骨细胞功能活跃、骨形成能力相对不足, 临床治疗较为棘手。OP 的病理机制主要与成骨分化能力减弱、成脂分化能力增强, 骨组织微循环血供减少有关。目前临床用于治疗 OP 的药物主要包括促骨形成和抑制骨吸收两种类型, 促骨形成药物有氟化物、甲状旁腺激素等, 抑制骨吸收药物包括选择性雌激素受体调节剂, 核因子-JB 受体活化因子抑制剂以及半胱氨酸蛋白酶 K 抑制剂等^[2]。这些药物初期骨量有所增加, 但最终导致成骨细胞功能减弱, 使 OP 的治疗长期停滞于“瓶颈期”。随着组织工程学和细胞治疗学的兴起, 干细胞移植治疗骨质疏松性骨折已逐步成为研究热点。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是成骨细胞的起源, 具有多向分化潜能, 在特定条件下可以向多种细胞包括成骨细胞分化, 且具有来源广泛、取材方便、扩增迅速、可塑性强、易转染和无免疫排斥问题、伦理之争等优点^[3]。因此, 本实验初步采用全骨髓贴壁分离法体外分离出 BMSCs, 探讨 BMSCs 向成骨细胞分化治疗原发性骨质疏松性骨折, 以期为临床应用提供理论依据, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF 级 SD 大鼠购于广西医科大学实验动物中心。低糖 DMEM 培养基, 胰蛋白酶, 胎牛血清(美国 Gibco 公司), 成骨诱导培养基, 成脂诱导培养基, 茜素红染液, 油红 O 染液(广州赛业生物科技有限公司), PE 标记的大鼠来源的抗 CD29、CD31、CD45、CD90 及 IgG(美国 BD 公司), 碱性磷酸酶(AKP)测试盒(南京建成生物)。

1.2 方法

1.2.1 原发性骨质疏松性骨折模型的建立 选取雌性 11 周 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 按宫宇等^[3]的方法构建卵巢切除术(OVX)骨质疏松症模型。术后 3 个月行股骨骨密度扫描, 比较术前和术后骨密度确定骨质疏松造模成功后行双侧骨折造模。在距胫骨平台 2 cm 处用电锯做胫骨横截面约 2/3 骨缺损性骨折, 随机分成三组(OVX 骨折不处理组、OVX 骨折+生理盐水组、OVX 骨折+BMSCs 治疗组), 每组 20 只, 其中 BMSCs 注射数量 1×10^6 , 生理盐水各 20 μL 。

1.2.2 BMSC 原代分离及培养 脱颈法处死 5 周健康 SD 大鼠, 浸泡于 75% 乙醇消毒 10 min 后, 取其股骨胫骨, 剪去骨骼端, 露出骨髓腔, 用 L-DMEM 培养基冲出骨髓, 将冲出的骨髓制成单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 接种于 10%

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目(S2013020012866); 广东医学院科研基金面上培育项目(M2014048), 湛江市科技创新能力建设专项项目(2014A501), 广东省医学科研基金(B2014313), 湛江市科技计划项目(2014A06005)。 作者简介: 李鹏, 男, 助理研究员, 主要从事干细胞基础研究。 # 共同第一作者。 △ 通讯作者, E-mail:cqj12862@163.com。

胎牛血清的 L-DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。原代培养过程中,24 h 更换培养基,以后每 3 d 全量更换培养基。待细胞长至 70%~80% 融合时,胰酶消化按 1:2 比例进行传代培养。

1.2.3 BMSC 表面分子鉴定 收获 P3 代生长状态良好的细胞,0.25% 胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min, PBS 重悬细胞制成单细胞悬液分装于 EP 管中,每支 EP 管分别加入 PE 标记的大鼠来源的抗 CD29、CD31、CD45 和 CD90,对照组加入同型对照,混匀,室温避光孵育 20 min, PBS 洗去未标记抗体,加入 400 μL PBS 重悬细胞,流式细胞仪进行检测。

1.2.4 BMSCs 的成骨诱导 选取生长旺盛的 BMSC 接种于六孔板中,分别加入完全培养基、成骨诱导培养基,培养第 14 天进行茜素红染色,倒置显微镜观察。同时收集细胞上清液进行碱性磷酸酶(AKP)测定。

1.2.5 BMSCs 的成脂诱导 选取生长旺盛的 BMSC 接种于六孔板中,分别加入完全培养基、成脂诱导培养基,培养第 14 天进行油红 O 染色,倒置显微镜观察。

1.2.6 X-光观察骨折愈合 骨折术后第 3 天小动物成像系统观察确认胫骨处骨折造模成功,术后第四周,第八周分别观察不同处理组胫骨骨折处愈合情况。

2 结 果

2.1 去卵巢术前、术后 SD 大鼠股骨骨密度的测定 卵巢切除后大鼠股骨骨密度显著低于术前骨密度(BMD),差异具有统计学意义[(1.988±0.062) g/cm³ vs. (2.3573±0.158) g/cm³, P<0.05]。

2.2 BMSCs 的形态学观察 来源于健康 5 周龄 SD 大鼠的 BMSCs 原代培养第六天可见放射状排列的细胞集落,伸出长短不一、粗细不均的突起,梭形细胞为主,胞浆丰富,胞核大、核仁清晰(见图 1)。

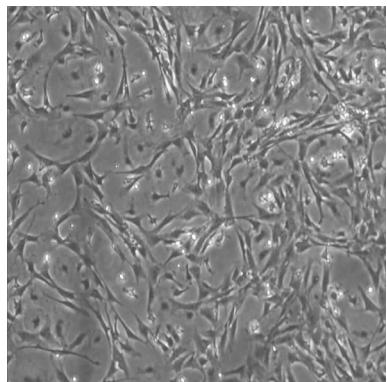


图 1 大鼠原代骨髓间充质干细胞的形态学(×40)

2.3 BMSCs 表面标志物的表达 流式细胞仪检测结果显示,CD29、CD90 在 BMSC 中表达阳性,两者阳性率分别为 99.4%、99.6%,而造血干细胞表面标志物 CD45,内皮细胞标志物 CD31 阳性率分别为 0.2% 和 2.0%(见图 2)(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.4 BMSC 成骨成脂诱导分化鉴定 大鼠 BMSC 经成骨诱导培养液培养 14 d,茜素红染色可见间质内含大量矿盐沉积的钙化结节呈红色,大鼠 BMSC 经成脂诱导培养液培养 14 d,油红 O 染色可见细胞内胞浆内有较多红色脂滴形成(见图 3、4)(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.5 SD 大鼠骨折愈合情况 SD 大鼠骨质疏松造模成功后进行双侧胫骨骨折造模,术后动物均成活,第三天 X-光观察 OVX 组、OVX 注射生理盐水组、OVX 注射 BMSCs 组,确认骨折造模成功,术后第四周,3 组骨折端都有少量骨痂生长,且 BMSCs 组骨痂在骨折端的包裹明显多于另外两组;术后第八周,BMSCs 组骨折线完全消失,骨折间隙的桥梁骨痂完全骨化,骨折端之间形成骨连接,已进入骨折端的塑形期,而另外两

组,骨痂尚未完全骨化,尚处于骨性愈合期(见图 5)(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

3 讨 论

骨质疏松造模目前国内外主流的造模方法有两种,一种是糖皮质激素导致的继发性骨质疏松,一种是由 Saville 在 1969 年建立的切除大鼠双侧卵巢模型,该模型现已被国内外众多学者认可,是标准化的绝经后骨质疏松模型^[4]。目前临幊上对于 OP 的发病机制和防治措施研究较多,而对骨质疏松性骨折(OPF)本身的研究尚未深入。OPF 是一种随着年龄的增加而导致骨量减少、骨显微结构异常、骨脆性增加或因轻度暴力或非创伤因素导致的骨折,又称脆性骨折^[5]。

OPF 伴有 OP 的存在使得 OPF 在治疗及愈合过程中受多种因素的影响。骨量、骨质量的降低使骨折愈合的时间延缓,骨愈合质量与力学强度减低,再骨折的风险显著增加,OP 加重极易再次发生骨折^[6-7]。因此目前对 OPF 的治疗除了单纯的外科治疗外需要同时重视 OP 的治疗,减少骨丢失防止再次骨折。另外在 OPF 愈合过程中能同时促进骨生长,提高骨质量预防骨折再次发生,对 OPF 的治疗有着重要的意义。

目前公认的 OP 发病机制是成骨细胞和破骨细胞在骨重塑过程中失衡,成骨细胞数量和活性降低,破骨细胞数量增加,导致骨形成减少,骨吸收增加,而成骨作用的减少使得骨量减少、骨显微结构损伤导致骨脆性增高,更容易发生 OPF。而成骨细胞来源于骨髓腔中一种多功能干细胞:骨髓间充质干细胞(BMSCs)。研究发现 OP 患者体内的 BMSCs 增殖能力下降,成骨分化能力显著减弱,骨组织成分减少,而成骨能力的降低使得 OPF 患者的骨折区域骨密度降低,愈合能力下降^[8-9]。因此移植健康的 BMSCs,增加干细胞增殖数量,加强成骨分化能力,促进新骨形成加快骨折区域愈合能力是治疗 OPF 的选择之一。Wang 等^[10]将 MSCs 嵌合入海藻酸钙凝胶中注射到骨质疏松性兔的股骨远端,8 周后发现与对照组相比,MSCs-藻酸钙凝胶组股骨骨小梁密度增加,骨生物力学强度提高。Ocarino 等^[11]将 MSCs 注射入骨质疏松性大鼠股骨的骨髓腔,2 个月后观察发现,大鼠股骨部的骨量明显增加。另外 Shen J 等^[12]将 GFP 标记的 BMSCs 移植到正常老化的骨质疏松性小鼠体内,发现与对照组小鼠相比,植入 BMSCs 组的骨密度及骨组织形态计量学分析均明显的改善。

本实验通过原代分离培养 BMSCs 后,显微镜下观察细胞形态及自我增殖能力,并通过细胞表面抗原鉴定,结果符合 BMSCs 表面标志物特征。提示该细胞是一种间充质干细胞并排除造血干细胞的可能。同时通过向成骨成脂分化,说明该细胞具有多项分化能力的特性,这些结果表明所培养的细胞即是 BMSCs。实验通过测定大鼠股骨骨密度的变化来评价去卵巢后骨质疏松模型建立是否成功,并结合 X-光观察移植 BMSCs 4、8 周后,胫骨骨折愈合较生理盐水组,空白对照组均明显加快。

综上所述,同种异体 BMSCs 移植对原发性大鼠骨质疏松性骨折具有一定的治疗作用。这为临幊治疗 OPF 提供了一种新的研究思路。尽管 BMSCs 的研究还有很多亟待解决的问题,比如如何控制干细胞定向分化,BMSCs 促进骨折愈合调控的具体分子机制等。随着认识的不断深入,该方法将有更广泛的临床应用前景。

参考文献

- [1] Lane NE. Osteoporosis: yesterday, today and tomorrow. Rheumatology, 2011, 50: 1181-1183.
- [2] Bandeira F, Costa AG, Soares Filho MA, et al. Bone markers and osteoporosis therapy. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2014, 58(5): 504-513.
- [3] 宫宇,王鸿飞,夏海军.全骨髓贴壁接触培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞[J].中国组织工程研究,2014,18(1):51-56.(下转第 1987 页)

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

100 片接触镜共培养出阳性共 3 片占 3%, 均为表皮葡萄球菌。术前及术后取镜片同时结膜囊均未检测到细菌。高透氧性角膜接触镜细菌培养阳性组与阴性组统计发现, 泪液分泌两组间差异有统计学意义 ($t = 6.45, P = 0.02 < 0.05$), 可能是导致细菌阳性的原因, 见表 1。

表 1 细菌培养阳性与阴性组间分析指标比较 $\bar{x} \pm s$

分析指标	阳性组	阴性组	t	P
年龄	26.0 ± 3.4	25.5 ± 4.8	0.17	0.86
眼压(mm Hg)	13.36 ± 1.10	14.80 ± 2.48	2.1	0.13
术前角膜厚度(μm)	480 ± 13.8	519 ± 27	1.68	0.15
术后角膜厚度(μm)	475 ± 13.52	506 ± 16.2	1.76	0.21
泪液分泌试验(mm)	10 ± 0.01	12 ± 0.4	6.45	0.02

3 讨 论

PRK, 即在去除角膜上皮后, 用准分子激光切削角膜前弹力层和部分角膜基质层, 从而改变角膜中央或周边前表面曲率, 达到矫正近视或远视的目的, 且因能更好维持术后角膜生物力学完整性, 避免角膜相关并发症, 因此, PRK 手术仍是目前矫正屈光不正, 安全有效预测性好的方法之一^[7]。但 PRK 手术常存在眼部不适、眩光、上皮缺损、非常容易感染, 从而导致严重的后果。因此 PRK 术后最让人关心的问题是如何加快术后恢复, 降低术后不适感, 预防术后 haze 及回退, 佩戴高透氧的角膜接触镜可以有效减轻术后疼痛等不适症状, 提高 PRK 手术疗效。但是配戴角膜接触镜最主要存在的问题是角膜炎症, 小到无菌性微侵润, 大到严重并发症发生, 致视功能严重受损。

从本研究中可以发现, 100 片接触镜共培养出阳性共 3 片, 占 3%, 均为表皮葡萄球菌。表皮葡萄球菌是凝固酶阴性葡萄球菌, 滋生于生物体表皮上的一种细菌, 在人体的皮肤等部位寄生, 是正常菌群类型, 多数为非致病菌, 许多报道也显示, 结膜囊正常菌群中最常见的菌群为表皮葡萄球菌, 但是, 近年来由于抗菌药物的大量使用及日益增多的侵袭性操作, 该菌已经成为医院感染的重要菌群, 尤其是在白内障摘除联合人工

晶体植入术后, 表皮葡萄球菌已成为化脓性眼内炎最常见的致病菌。因此, 特别强调无论是眼表 PRK 手术, 还是内眼手术, 术前结膜囊无菌化准备工作中, 要注意常见菌的无菌化工作, 术中严格无菌操作, 术后的预防感染工作的重要性。本组研究显示, 高透氧性角膜接触镜细菌培养阳性组与阴性组统计发现, 泪液分泌两组间差异有统计学意义 ($t = 6.45, P = 0.02 < 0.05$), 可能是导致细菌阳性的原因。

综上所述, 高透氧性水凝胶角膜接触镜目前无论在角膜生物特性、主观舒适度、视觉质量及镜片沉淀物等多个方面都具有明显优越性, 实现了连续配戴的安全性, 满足了 PRK 术后使用的要求。但是表皮葡萄球菌引起的角膜感染应该引起足够的重视, 尤其是对于泪液分泌异常的患者, 首先要提高临床标本的送检率, 降低漏检率, 根据药敏结果合理正确地使用抗生素, 才能使 PRK 这一治疗近视的成熟手术方式实现全方位的安全、有效、精准。

参 考 文 献

- [1] Sher NA, Bowers RA, Zobel RW, et al. Clinical use of the 193 nm excimer laser in the treatment of corneal scars[J]. Arch Ophthalmol, 1991, 109(4): 491-498.
- [2] Allan BD, Hassan H. Topography-guided transepithelial photorefractive keratectomy for irregular astigmatism using a 213nm solidstate laser[J]. J Cataract Refract Surg, 2013, 39(1): 97-104.
- [3] Hessert D, Tanzer D, Brunstetter T, et al. Topical cyclosporine A for postoperative photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis[J]. J Cataract Refract Surg, 2013, 39(4): 539-547.
- [4] 詹素华, 庞国祥, 金玉梅, 等. 准分子激光角膜切削术治疗中低度近视后五年疗效分析[J]. 中华眼科杂志, 1999, 35(4): 277-279.
- [5] 蔡可丽, 李镜海. 准分子激光角膜切削术后 2 年结果分析[J]. 中国实用眼科杂志, 1998, 16(1): 27-29.
- [6] Chung JL, Seo KY, Yong DE, et al. Antibiotic susceptibility of conjunctival bacterial isolates from refractive surgery patients[J]. Ophthalmology, 2009, 116(10): 1067-1074.
- [7] Cordove JE, Tenorio G, Garcia MM, et al. Conjunctival bacterial flora determination in the preoperative of cataract surgery[J]. Rev Med Hosp Gen Mex, 2008, 71(1): 77-82.

(收稿日期: 2015-03-08)

(上接第 1985 页)

- [4] Saville P. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: a model of osteoporosis. Journal of the American Geriatrics Society, 1969, 17(2): 155-166.
- [5] Jackuliak P, Payer J. Osteoporosis, fractures, and diabetes. Int J Endocrinol, 2014, 2014: 820615.
- [6] Hao YJ, Zhang G, Wang YS, et al. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. Bone, 2007, 41(4): 631-638.
- [7] Giannoudis P, Tzioupis C, Almalki T, et al. Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different? A basic science perspective. Injury, 2007, 38 Suppl 1: S90-99.
- [8] Prall WC, Haasters F, Heggebo J, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to bmp-2 stimulation. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440(4): 617-622.
- [9] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells

and their differentiation to osteoblasts. Aging Cell, 2008, 7(3): 335-343.

- [10] Wang Z, Goh J, Das De S, et al. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. Tissue Eng 2006, 12(7): 1753-1761.
- [11] Ocarino Nde M, Boeloni JN, Jorgetti V, et al. Intra-bone marrow injection of mesenchymal stem cells improves the femur bone mass of osteoporotic female rats. Connect Tissue Res, 2010, 51(6): 426-433.
- [12] Shen J, Tsai YT, Dimarco NM, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice. Sci Rep, 2011, 1: 67.

(收稿日期: 2015-03-08)

