

· 基础研究 ·

体外负压培养对骨髓间充质干细胞成骨活性的影响

杨治¹, 朱养均¹, 程延¹, 尚保生¹, 常瑞¹, 何鹏¹, 张银刚²

(1. 陕西中医学院西电附属医院骨科, 陕西 西安 710077; 2. 西安交通大学第一附属医院骨科)

【摘要】目的:探讨体外负压培养对骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived stroma cells, BMSCs)成骨活性的影响。**方法:**取第 3 代 BMSCs 分为实验组和对照组, 实验组进行间歇性负压培养, 设置压力为 17 kPa, 每次 30 min, 每日 4 次, 干预 2 周; 对照组于普通 CO₂ 培养箱中常规培养。倒置显微镜下观察细胞形态, 检测 ALP 活性, 免疫组织化学检测 I 型胶原的表达, RT-PCR 检测 2 周后以及终止负压后 1、2、3 d 骨保护素(osteoprotegerin, OPG) mRNA 和骨保护素配体(osteoprotegerin ligand, OPGL) mRNA 表达水平。**结果:**诱导 2 周后, BMSCs 呈现出显著的成骨细胞特性, 与对照组比较, ALP 活性显著增加, I 型胶原表达阳性, 实验组细胞 OPG mRNA 表达水平显著提高, OPGL mRNA 表达水平显著降低, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。负压终止后 3 d, 两组细胞 OPG mRNA 和 OPGL mRNA 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**体外负压培养可以提高 BMSCs 成骨活性。

【关键词】 间充质干细胞; 骨髓; 成骨细胞; 细胞培养技术

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.12.014

Effects of negative pressure on osteogenesis in human bone marrow-derived stroma cells cultured in vitro YANG Zhi*, ZHU Yang-jun, CHENG Yan, SHANG Bao-sheng, CHANG Rui, HE Peng, ZHANG Yin-gang. *Department of Orthopaedics, the Xidian Hospital Affiliated to Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710077, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective: To investigate effects of intermittent negative pressure on osteogenesis in human bone marrow-derived stroma cells (BMSCs) cultured in vitro. **Methods:** The third passage cells were divided into negative pressure treatment group and control group. The cells in the treatment group were induced by negative pressure intermittently (pressure: 17 kPa, 30 min per time, and four times of each day). The cells in the control group were cultured in conventional condition. The osteogenesis of BMSCs was examined by phase-contrast microscopy. The alkaline phosphatase (ALP) activities were determined. The expression of collagen type I was detected by immunohistochemistry method. The mRNA expressions of osteoprotegerin (OPG) and osteoprotegerin ligand (OPGL) in BMSCs were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR). **Results:** BMSCs showed a typical appearance of osteoblast after 2 weeks of induction by intermittent negative pressure. The activity of ALP increased significantly, and the expression of collagen type I was positive. In the treatment group, the mRNA expression of OPG increased significantly ($P < 0.05$) and the mRNA expression of OPGL decreased significantly ($P < 0.05$) after 2 weeks, compared with the control. However, 3 days after the exposure to 2-week negative pressure, these were no significantly different from that of the control group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Intermittent negative pressure could promote osteogenesis in BMSCs in vitro.

KEYWORDS Mesenchymal stem cells; Bone marrow; Osteoblasts; Cell culture techniques

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(12): 1024-1027 www.zggszz.com

负压封闭引流技术可以迅速改善创面微循环, 促进创面肉芽组织生长^[1-2], 在创伤外科软组织损伤方面发挥了重要作用。但是该项技术对骨组织的影响如何、能否应用于骨修复则少有报道。笔者的前期研究发现 50 kPa 体外间断负压培养可以促进 BM-

SCs(bone marrow-derived stroma cells)OPG(osteoprotegerin) mRNA 的表达, 抑制 OPGL(osteoprotegerin ligand)的表达, 但同时细胞增殖受到抑制, 凋亡增加^[3-4]。为了再深入一步从细胞角度揭示负压对骨组织的作用机制, 验证负压技术经过改良应用于骨修复的可能性, 我们选择 BMSCs 为靶细胞, 研究体外间歇性负压培养对细胞成骨活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 胰蛋白酶, L-DMEM 培养基(GIBCO 公司, 美国); Percoll 分离液(Sigma 公司, 美国); ALP 试剂盒(南京建成生物工程研究所); 兔

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30973063); 陕西省卫生厅科研基金(编号: 2010D23); 西安市卫生局科技立项(编号: J2010B31)

Fund programs: Supported by National Natural Science Foundation of China (No.30973063)

通讯作者: 杨治 Tel: 029-84353957 E-mail: xgcgfd@126.com

抗 I 型胶原多克隆抗体, I 型胶原免疫组化试剂盒(武汉博士德生物技术公司);OPG, OPGL 引物(上海生工公司);2700 型 PCR 仪(ABI 公司, 美国);负压 CO₂ 培养箱(ASTECC 公司, 日本), 改装后具有智能负压功能(-60~0 kPa)。

1.2 细胞原代培养 采用梯度离心法进行细胞培养, 将髓骨性关节炎行关节置换手术患者捐赠的骨髓分装入离心管, 加入 L-DMEM 培养基 2 ml, 离心半径 8 cm, 1 500 r/min 离心 5 min。去除上层脂肪滴和上清, 以 D-Hank's 液重悬细胞后平铺于 Percoll 分离液上, 离心半径 8 cm, 1 500 r/min 离心 10 min, 吸取中间白膜层(单核细胞层), 以 D-Hank's 液洗涤, 加入 L-DMEM 培养基, 置入无菌培养瓶 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。

1.3 实验分组与方法 使用第 3 代细胞进行实验, 调节合适细胞密度分别接种于 6、24、96 孔板。实验组预先吸掉培养板内绝大部分培养液, 打开培养板盖及培养箱负压, 设置实验压力为 17 kPa, 每日 4 次, 每次 30 min, 负压干预 2 周, 严格无菌操作。每次负压干预完后补足培养板内培养液, 和对照组常规培养。

1.4 观测指标

1.4.1 细胞形态观察 每日在倒置相差显微镜下观察 2 组细胞生长情况及形态特点。

1.4.2 ALP 活性测定 2 周后, 考马斯亮兰微板法测定 2 组细胞每孔中细胞蛋白含量, ALP 试剂盒测定细胞 ALP 活性, 定量测定细胞中每毫克蛋白质 ALP 活性变化。

1.4.3 I 型胶原免疫组织化学染色 2 周后, 进行 I 型胶原免疫组织化学染色。一抗为兔抗 I 型胶原多克隆抗体, PBS 冲洗细胞爬片, 山羊血清封闭, 滴加 1:100 一抗, 4 °C 过夜, PBS 冲洗后滴加二抗, 37 °C 30 min, 滴加 ABC 试剂, 室温 20 min, PBS 冲洗, DAB 显色, 二甲苯透明, 中性树脂封片。细胞胞浆棕黄色为阳性, 胞浆无色或与背景颜色一致为阴性。细胞染色分为阴性、弱阳性、阳性、强阳性。

1.4.4 两组间 OPG 及 OPGL mRNA 表达水平 采用 RT-PCR 检测负压培养 2 周后及负压培养终止后 3 d 两组间 OPG、OPGL mRNA 表达水平。Trizol 提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 样品浓度和纯度, 取 2 μg 总 RNA, 逆转录试剂盒合成 cDNA, 加入 PCR 仪中扩增(94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环)。结果采用实时荧光定量 PCR 分析程序分析 Ct 值, 计算目的基因相对值 = 2^{-ΔΔCt}。OPGL 引物序列: 上游引物 5'-AGTGTCTA-GAGAGGAGGGCTTTGA-3', 下游引物 5'-CCG-

CACTGTGACTAGAACTTCAGA-3'; OPG 引物序列: 上游引物 5'-AGGAAATGCAACACACGACA-3', 下游引物 5'-TACTTTGGTGCCAGGCAAAT-3'; 内参照 β-actin 引物序列: 上游引物 5'-GAAGGTGAAG-GTCGGAGT-3', 下游引物 5'-GAAGATGGT-GATGGGATTTC-3'。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验, 负压终止后培养 3 d OPGL/OPG mRNA 的比较采用重复测量方差分析, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察细胞变化 实验组细胞增殖速度略低于对照组(图 1), 且细胞形态逐渐由梭形向多角形转化, 对照组细胞形态大部分为梭形。

2.2 ALP 活性测定 2 周后, 实验组细胞 ALP 活性

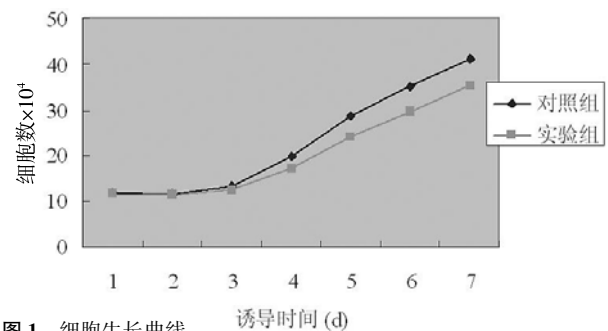


图 1 细胞生长曲线

Fig. 1 Cell growth curve

(15.68±1.97) mU/mg, 对照组(6.34±1.21) mU/mg, 两组比较, *t*=8.08, *P*=0.003, 实验组细胞 ALP 活性高于对照组细胞。

2.3 I 型胶原免疫组织化学染色 2 周后, 实验组 I 型胶原免疫组化染色细胞胞浆中出现大量黄褐色颗粒呈阳性反应, 而对照组呈阴性反应(图 2)。

2.4 2 组间 OPG、OPGL mRNA 表达水平比较 采用 RT-PCR 检测负压培养 2 周后及负压培养终止后 3 d 两组间 OPG、OPGL mRNA 的表达水平。结果显示: 间歇性负压培养 2 周后, 与对照组比较, 实验组细胞 OPG mRNA 表达水平提高, OPGL mRNA 表达水平降低, OPGL mRNA 与 OPG mRNA 的比率下降, 下降大约 70%, 结果见表 1。

2 组培养不同时间 OPGL/OPG mRNA 的比率见表 2。负压培养终止后 OPGL/OPG mRNA 比率的差异有统计学意义。负压培养终止后第 1 天, OPGL/OPG mRNA 比率下降, 下降大约 60%; 第 2 天 OPGL/OPG mRNA 比率有所上升, 但仍低于对照组。

3 讨论

3.1 负压技术用于骨修复的可行性 研究发现 60~80 kPa 的负压封闭引流有利于缩小创面, 刺激肉

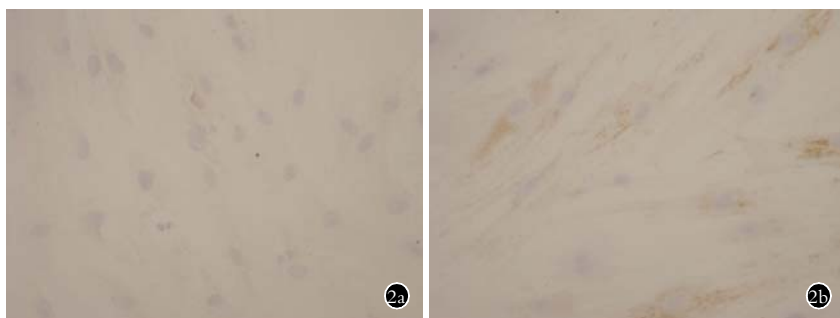


图 2 BMSCs 中 I 型胶原表达的免疫组织化学染色 (倒置相差显微镜×200) 2a. 对照组 2b. 实验组

Fig.2 Immunohistochemical staining for collagen type I of BMSCs (inverted phase contrast microscopy × 200) 2a. Control group 2b. Experimental group

表 1 培养 2 周后 2 组 OPG mRNA 和 OPGL mRNA 表达及其比例变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.1 Comparison of changes of OPG mRNA, OPGL mRNA and OPGL/OPG mRNA ratio after 2 weeks between two groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	OPG mRNA	OPGL mRNA	OPGL mRNA/OPG mRNA
实验组	1.74±0.19	0.49±0.15	0.39±0.09
对照组	1.00±0.26	1.00±0.39	1.00±0.38
t 值	9.677 6	3.652 4	4.119 1
P 值	0.000 2	0.014 7	0.009 2

表 2 负压终止后不同时间 OPGL/OPG mRNA 比率变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.2 Changes of OPGL/OPG mRNA ratio following cessation of negative pressure at different times ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天
实验组	0.46±0.11	0.72±0.19	0.96±0.19
对照组	1.00±0.20	1.00±0.20	1.00±0.20
F 值		7.69	
P 值		0.02	

芽组织迅速生长,促进创面愈合,这可能与其对软组织的机械性和生物学效应有关^[5-6]。血管内皮细胞种植于特格拉人工皮肤(integra)的体外实验对其细胞学机制进行了揭示,发现血管内皮细胞在没有负压的情况下迁移受限,而负压促进了血管内皮细胞的增殖和迁移,间歇性负压疗效优于连续性负压^[7]。笔者推测负压技术经过改良在应用于骨修复方面有一定的可能性,体内负压技术可以使骨组织受到机械牵张刺激,机械和生物学共同效应可能加速骨修复。

BMSCs 体外培养的氧浓度为 20%,而体内的氧浓度是 0.4%~4.7%^[8]。笔者发现 50 kPa 体外间歇性负压可以促进 BMSCs OPG mRNA 的表达,抑制 OPGL 的表达,但是细胞凋亡增加、增殖抑制,经过负压梯度优化,在 17 kPa 时情况得到改善^[3-4],故本实验采用 17 kPa 强度。骨组织修复障碍好发于中老年患者或骨系细胞增殖能力下降等,负压状态下的

细胞缺氧模拟了股骨头坏死及骨折等体内疾病状态,为今后研究体内负压技术对骨组织的影响奠定了基础。

3.2 体外负压培养提升 BMSCs 成骨活性的机制 本实验结果显示负压培养后细胞 ALP 活性提高,产生 I 型胶原,说明间歇性负压培养提升了细胞成骨活性,分析其主要原因是负压状态下的牵张机械刺激和细胞缺氧两种机制共同作用的结果。机械刺激是细胞生物进化过程中受到的基本刺激之一,可以对细胞的增殖、分化产生重要影响。大量体外研究已经证实机械刺激可以促进细胞成骨分化^[8-11]。Rubin 等^[12]认为细胞成骨活性的提高仅仅是 OPGL 变化的结果,而本实验结果显示成骨活性的提高是 OPG mRNA 表达水平提升和 OPGL 下降共同变化的结果,负压培养终止后第 1 天,OPGL mRNA 与 OPG mRNA 的比率仍下降,至负压培养终止后第 3 天有所上升,说明其对 OPGL/OPG 系统的影响是短暂的并且是可以积累的。细胞在负压条件下培养势必缺氧,研究发现低氧能增加大鼠 MSCs 骨形成能力^[13]。低氧引起 HIF-1 α 及其下游基因 VEGF 表达增加,从而改善骨组织血供、代偿低氧状态,HIF-1 α 介导的 VEGF 高表达可显著提高成骨细胞成骨能力^[14]。HIF-1 α 对于骨组织发育和塑形改建具有促进成骨细胞增殖和分化的作用,HIF-1 α 表达的提升可以加速细胞的成骨作用进而促进骨组织修复^[15]。本实验结果显示负压提高了细胞的成骨活性,与以上结论相同。但也有研究认为低氧抑制骨髓来源的多能成体干细胞、脂肪间充质干细胞的成骨分化^[16-17],与本实验结论相反,笔者认为其实验方法中细胞持续、长期低氧培养导致了相反的结论。

综上所述,经过系列研究证实间歇性负压能够提高 BMSCs 成骨活性,本实验实现了牵张力学刺激和细胞缺氧两者的有机结合。机械刺激的生物信号和 HIF-1 α 调控两者联合作用可能促进了细胞的成骨分化,为采用体外负压技术对组织工程支架材料复合 BMSCs 以及改良体内负压技术对骨组织修复影响的研究奠定了理论基础。

参考文献

[1] Kanakaris NK, Thanasis C, Keramaris N, et al. The efficacy of negative pressure wound therapy in the management of lower extremity trauma: review of clinical evidence [J]. Injury, 2007, 38 (Suppl 5): 8-17.
 [2] Mouës CM, Heule F, Hovius SE. A review of topical negative pres-

- sure therapy in wound healing; sufficient evidence[J]? Am J Surg, 2011, 201(4): 544-556.
- [3] 杨治, 张银刚, 刘森, 等. 间歇性负压培养对人 BMSCs 骨保护素和骨保护素配体 mRNA 水平的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(11): 1354-1357.
- Yang Z, Zhang YG, Liu M, et al. Effects of intermittent negative pressure on the mRNA expression of OPG and OPGL in human BMSCs[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2008, 22(11): 1354-1357. Chinese.
- [4] Yang Z, Liu M, Zhang XG, et al. Effects of intermittent negative pressure on osteogenesis in human bone marrow-derived stroma cells[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2009, 10(3): 188-192.
- [5] Potter MJ, Banwell P, Baldwin C, et al. In vitro optimisation of topical negative pressure regimens for angiogenesis into synthetic dermal replacements[J]. Burns, 2008, 34(2): 164-174.
- [6] Bondokji S, Rangaswamy M, Reuter C, et al. Clinical efficacy of a new variant of a foam-based NWPT system[J]. J Wound Care, 2011, 20(2): 62-67.
- [7] Baldwin C, Potter M, Clayton E, et al. Topical negative pressure stimulates endothelial migration and proliferation; a suggested mechanism for improved integration of integra[J]. Ann Plast Surg, 2009, 62(1): 92-96.
- [8] Lewthwaite JC, Bastow ER, Lamb KJ, et al. A specific mechanomodulatory role for p38 MAPK in embryonic joint articular surface cell MEK-ERK pathway regulation[J]. J Biol Chem, 2006, 281(16): 11011-11018.
- [9] Friedl G, Schmidt H, Rehak I, et al. Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain; transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2007, 15(11): 1293-1300.
- [10] Jagodzinski M, Breitbart A, Wehmeier M, et al. Influence of perfusion and cyclic compression on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in 3-dimensional culture[J]. J Biomech, 2008, 41(9): 1885-1891.
- [11] Han SJ, Sniadecki NJ. Simulations of the contractile cycle in cell migration using a bio-chemical-mechanical model[J]. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 2011, 14(5): 459-468.
- [12] Rubin J, Murphy T, Nanes MS, et al. Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells[J]. Am J Physiol: Cell Physiol, 2000, 278(6): 1126-1132.
- [13] Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension; effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis[J]. J Cell Physiol, 2001, 187(3): 345-355.
- [14] Wang Y, Wan C, Gilbert SR, et al. Oxygen sensing and osteogenesis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1117: 1-11.
- [15] Towler DA. Vascular biology and bone formation; hints from HIF[J]. J Clin Invest, 2007, 117(6): 1477-1480.
- [16] D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, et al. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells[J]. Bone, 2006, 39(3): 513-522.
- [17] Malladi P, Xu Y, Chiou M, et al. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(4): 1139-1146.

(收稿日期: 2011-05-26 本文编辑: 连智华)

• 病例报告 •

慢性骨髓炎继发进展型巨大股骨远端表皮样囊肿 1 例

季卫锋, 童培建, 马镇川, 倪桂宝, 沈国华, 周海龙, 姚晓冬, 肖鲁伟
(浙江中医药大学附属第一医院骨伤科, 浙江 杭州 310006)

关键词 骨髓炎; 股骨; 表皮囊肿

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.12.015

Progressive huge epidermoid cyst of distal femur in chronic osteomyelitis: a case report and review of literature Ji Wei-feng, TONG Pei-jian, MA Zhen-chuan, NI Gui-bao, SHEN Gou-hua, ZHOU Hai-long, YAO Xiao-dong, XIAO lu-wei. Department of Orthopaedics, the First Hospital Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

KEYWORDS Osteomyelitis; Femur; Epidermal cyst

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(12): 1027-1029 www.zggszz.com

患者, 男, 60 岁, 因“左下肢肿胀疼痛 30 余年, 加重 1 年余”入院。42 年前因在水库洗澡后回家发现左下肢肿胀疼痛, 去当地医院就诊, 诊断为左股骨骨髓炎行手术治疗, 慢性骨髓

炎反复发作, 经抗生素治疗后缓解。近年来病情加重, 左大腿外侧出现窦道, 流脓。2009 年 1 月在当地医院摄 X 线片示: 左股骨远端硬化和透亮线, 边界不清, 并见骨膜反应(图 1a)。CT 示软组织扩张, 皮质破坏(图 1b)。行左股骨干骨髓炎钻孔减压术。2009 年 5 月肿痛复发在当地医院就诊, MR 示股骨远端

通讯作者: 季卫锋 E-mail: jiwefeng@zjtcn.net