

骨组织工程中种子细胞的选择

Selection of seed cell in bone tissue engineering

王兆红 齐新生

WANG Zhaohong, QI Xinsheng

【摘要】 组织工程学是把材料学和生命学科有机结合的一门现代学科,材料学和细胞学的协同发展有效的促进了组织工程学的发展,材料载体学已取得了相当的发展,学者们面临着如何在骨组织工程中选择高效、便捷的种子,使工程化骨有效修复治疗骨缺损等骨骼疾病。细胞本文仅就组织工程学中种子细胞的发展一简要综述,以供读者参考。

【关键词】 成骨细胞; 骨髓基质干细胞; 基因重组细胞; 骨组织工程

【Key words】 Osteoblast; Mesenchymal stem cell_s(MSC_s); Recombinat cell; Bone tissue engineering

在骨组织工程中,作为种子细胞其应具有的条件为:对机体损伤小,取材方便;种子细胞在体外培养体系中增殖传代能力较强,并能保持良好的生物活性,培养衰减率低;移植入体内能高质量的修复骨缺损,且修复后远期效果良好;生物毒性低,组织相容性好,免疫活性低,致瘤性低。本文就近年来在组织工程中较多应用各类种子细胞特性作一简要综述,以供读者参考。

1 成骨细胞

成骨细胞作为骨组织工程中的经典组织细胞,它的分离、培养技术已经成熟,目前较多采用的培养方法为三维网孔培养法。即将成骨细胞种植于具有三维网孔特性的载体中,当成骨细胞种植于载体中时,细胞逐渐弥散于载体三维微小网孔空间,并通过细胞外基质粘附于载体三维网孔壁上。在它的分化增殖过程中,成骨细胞与载体之间的相互作用除受成骨细胞本身条件影响外,尚受载体的物理特性和化学组成、以及培养体系介质组成的影响。载体的性质影响其增殖、粘附、分化,载体成分如羟基磷灰石、载体表面形态、粗糙程度均可影响成骨细胞的粘附与增殖,体外试验中发现,成骨细胞在HA(羟基磷灰石)表面的矿化过程要强于钛表面矿化过程,原因在于等体积的HA表面积大于钛的表面积。Chang等^[1]在试验中对比研究发现成骨细胞与羟基磷灰石的亲和力强于钛与成骨细胞亲和力,粘附于羟基磷灰石表面的成骨细胞数显著多于钛表面。其它因素如细胞因子等,在有生长因子、多肽因子等存在条件下,成骨细胞生长活性大有增加。Ong等^[2]在成骨细胞体外培养模型中发现,有生长因子存在的条件下,成骨细胞表达I型胶原和ALP的活性增高,生物活性增强。同样培养介质对成骨细胞增殖与分化具有一定影响,Hankey等^[3]在培养人成骨细胞时发现,用热处理自体同源血清培养的成骨细胞无论从细胞增殖速度上还是在细胞表型上均优于

用胎儿血清培养的成骨细胞。

成骨细胞在向骨细胞分化过程中,自身分泌I型胶原、ALP等酶和蛋白类物质,Cooper等^[4]在研究中发现成骨细胞在分化过程中所分泌和表达的蛋白和酶按顺序有:早期表达的有I型胶原和碱性磷酸酶,较为晚期表达的为骨涎蛋白和骨钙素;最后表达的为骨桥蛋白。显然,检测这些酶和蛋白有助于判断成骨细胞的分化与增殖程度。

在骨组织工程中,成骨细胞作为种子细胞,同其他种子细胞相比,诱导分化相对较为简单,培养技术成熟,是一类较好种子细胞来源。但它存在的问题在于取材不便,对供者会有一定的损伤;没有统一的培养介质组成成分。

2 骨髓基质干细胞(MSC_s)

人们在骨髓中发现除有造血干细胞外,尚有一类细胞具有祖细胞的自我增殖、定向分化特性,该类细胞称为骨髓基质干细胞,骨髓基质干细胞既是骨髓基质细胞的祖细胞,又可作为骨、软骨、肌肉神经等组织的祖细胞。MSC_s易于分离获得,便于体外培养扩增,常用的分离方法为密度梯度离心法,贴壁筛选法,流式细胞仪法等。密度梯度离心后,可见骨髓基质干细胞呈贴壁样生长,即所谓的“贴壁样细胞”,该类细胞在光镜下形成细胞集落,细胞形态呈成纤维细胞样,体外倍增时间为33h,增值潜力巨大。细胞学上发现其表型不均一,该类细胞具有间质细胞,上皮细胞,内皮细胞等特性。在体外培养体系中,在地塞米松,β-磷酸甘油, VitC, BMP等因子诱导下,骨髓基质干细胞可向成骨细胞方向分化,该类诱导因子的具体作用机制目前仍不清楚。在体内实验中Bruder等^[5]证实骨髓基质干细胞具有促进骨折愈合能力,他将人MSC_s种植于陶瓷管载体中,将该人工骨植入无胸腺兔胫骨骨缺损处,8周后骨切片见有明显新骨形成,12周明显增加,其生物力学强度较对照组强,组织形态学发现见有编织骨和板层骨充满于陶瓷管小孔中。

除在骨髓中发现骨髓基质干细胞外,尚在骨骼肌、骨外膜等处分离出了MSC_s。从而扩大了组织工程中种子细胞的获

东南大学医学院附属中大医院骨科(原南京铁道医学院附属医院骨科),江苏 南京 210009

取范围。Gronthos 等^[6]从脂肪中分离出一类具有干细胞性质的细胞,流式细胞仪和免疫组化显示该类干细胞和骨髓基质干细胞具有相似的表型。证实其他组织中同样含有基质干细胞。该类细胞在向成骨细胞方向分化过程中也可以通过检测 型胶原和 ALP 水平加以反映 MSCs 定向分化程度。

Zvaifler 等^[7]在胎牛血清中培养人外周血间质干细胞,观察到该类干细胞以指数形式生长,细胞呈贴壁样生长,细胞形态呈成纤维细胞样。地塞米松、抗坏血酸、-甘油磷酸盐可促进细胞向成骨细胞方向分化,在含有以上三种物质的培养基中培养,5 d 后培养细胞开始表达碱性磷酸酶,而且,BMP-2 可成倍促进 ALP 的表达。2 周后 1/3 的培养细胞可与抗骨钙素抗体反应,表明培养细胞已具有成骨能力,在培养体系中也发现有脂肪细胞生成。在基质干细胞的标志上该作者认为抗 CD-105 阳性染色的培养细胞为骨髓基质干细胞,将之作为骨髓基质干细胞的标记之一。Barry 等^[8]利用 SH-2 单克隆抗体进行免疫沉淀测定、肽序列分析该干细胞表面抗原为 CD-105,分子量为 92kDa。为基质干细胞的分离筛选提供了理论依据。Phinney 等^[9]从不同年龄供者体内取材培养 MSCs,在年龄、性别和干细胞增长率之间无相关性,但在没有骨形成诱导因子存在情况下,ALP 表达水平在不同供者之间相差 10~40 倍。但有文献^[10]报道骨髓来源的骨髓基质干细胞的潜在分化潜能随供者的年龄而下降,该作者在供者标本中进行 RT-PCR 分析显示年龄在 50 岁以下的供者骨髓基质干细胞中碱性磷酸酶 mRNA 表达水平为年龄在 60 岁以上的 3 倍以上,认为随年龄的增大骨髓基质干细胞的分化潜能显著下降。即使在骨诱导因子存在情况下,供者之间骨特异性诱导基因的表达水平也有显著差异,说明现行培养的 MSCs 为处于不同分化时期、不同分化阶段,具有不同分化潜能的干细胞的混合。

3 同种异体成骨细胞和 MSCs

同种异体成骨细胞或 MSCs 来源广泛,可作为种子选择之一,但是在应用过程之中存在不同程度免疫反应,对于 MSCs 而言,甚至要求组织配型和使用免疫抑制剂。近年来有人使用人胚干细胞,该类细胞具有多向分化潜能,可作为种子细胞的选择之一,具有应用前景。多潜能性胚胎干细胞可分化为胎儿和成人的各种类型细胞,从此点而言它可作为骨组织工程中重要的种子细胞来源,在一定程度上可避免伦理学问题,Buttery 等^[11]在胎鼠胚胎干细胞培养基中加入 VitC、地塞米松、或维甲酸,胚胎干细胞定向向成骨细胞方向分化,在培养体系中可分离出矿化的骨小结构,该骨小结构包含型胶原细胞外基质和骨钙素。除 VitC 外,-甘油磷酸盐可显著诱导胚胎干细胞向成骨细胞分化外,该作者同时发现当鼠胚胎干细胞和胎鼠成骨细胞共培养时,胎鼠成骨细胞诱导干细胞诱导的成骨细胞数为单纯培养的 5 倍。

4 转基因细胞

在骨组织工程中,软骨细胞和 MSCs 定向分化和活性的维持需要生长因子的调控,可设想将生长因子基因转入 MSCs,利用转基因细胞表达高生物活性内源性生长因子,调控其自身生长分化,同时如能将免疫抑制基因转入异种细胞,可克服其免疫原性,扩大种子细胞范围。即近几年学者逐渐

提出的“原位组织工程学”,Mason 等^[12]在兔的膝关节骨软骨缺损动物模型中,利用逆转录病毒载体稳定地转移人骨形态发生蛋白-7cDNA 到骨膜来源的兔间叶干细胞中。将骨形态发生蛋白-7 基因改良的细胞随后在单层培养中扩增,种植到聚乙醇酸生物载体中,将载体移植于软骨缺损模型中,检测转基因人工骨修复骨缺损情况,发现改良细胞移植组在 8 周和第 12 周达到接近完全的骨和关节软骨再生。首次报道了结合基因重组和组织工程技术治疗骨缺损。Gazit 等^[13]在鼠的桡骨阶段性骨缺损模型中,利用组织工程化多潜能间充质干细胞(表达 rh-BMP-2)作为种子细胞,该多能干细胞在移植入动物模型中前进一步转染 LaZ 基因,该基因表达-半乳糖苷酶,利用-半乳糖苷酶可以定位移植入体内的细胞位置,在体内 rhBMP-2 的表达和功能通过免疫组化和生物鉴定加以鉴定,重组多能干细胞的分化程度利用碱性磷酸酶染色加以衡量。结果证明重组细胞共表达-半乳糖苷酶和 rhBMP-2,移植术后 4 到 8 周荧光染色、X 线和组织形态测定法显示组织工程化间充质干细胞显著修复桡骨阶段性骨缺损。Marx 等^[14]在使用含有绿荧光素的特殊病毒载体转染鼠的基质干细胞,实验结果显著提高了转导率,同时可喜的是,转基因的表达并未影响到基质干细胞的增殖和分化。

5 种子细胞存在的问题和缺陷

种子细胞增殖、分化的调控合适条件,即能控制增殖,又能避免形成肿瘤。MSCs 体外试验中难以获得纯的干细胞,多数情况下为各种细胞的混杂;种子细胞与载体之间的相互作用,其具体环节知之尚少,目前所能知的仅为三维多孔多聚体支架结构可显著提高种子细胞迁移、增值、分化,较之传统的“二维”培养,该类培养方法效果要好得多。同时人工骨植入体内后提供一定机械支撑作用较为可靠。需要克服载体自身的缺陷。如载体的毒性问题、载体的抗原性问题、载体的合适降解速度等问题。基因细胞中,涉及的问题为转导率的低下、转基因表达的衰减以及筛选细胞标记的技术问题、以及潜在的致瘤性问题等。同时如何控制转入异源基因的基质干细胞的定向分化问题。到目前为止,重组细胞尚处于动物试验阶段,规模化的临床应用仍需进一步深入研究。

在体内情况下缺乏有效的方法测定载体与种子细胞之间的相互作用,ALP 和 型胶原仅能测定种子细胞的分化程度,但不能说明种子细胞在载体中的弥散程度,以及人工骨植入人体后,植入区周围正常细胞移入人工骨的程度如何加以判断。

6 结语

在骨组织工程中,成骨细胞和骨髓基质干细胞因其培养成本较低,分离方便,取材相对容易,目前仍作为种子细胞的首选细胞,在上二者之间,相比之下,骨髓基质干细胞取材更为方便,仅需骨髓穿刺即可,但其培养时需诱导干细胞向成骨细胞定向分化,培养条件、干细胞的分化潜能、分离纯化均会对人工骨性能产生一定影响。胚胎干细胞和转基因细胞随着在培养和技术上不断改进,正逐步克服自身的缺陷,因而具有巨大应用前景。载体技术的飞速发展和种子细胞技术的不断改进正加速骨组织工程的发展。新技术的发展不断扩大种子细胞的选择范围。高性能、高生物活性的组织化骨将造福于

广大患者。

参考文献

1 Chang YL, Stanford CM, Wefel JS, et al. Osteoblastic cell attachment to hydroxyapatite-coated implant surfaces in vitro. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, 14(2) :239-247.

2 Ong JL, Carnes DL, Sogal A. Effect of transforming growth factor-beta on osteoblast cells cultured on 3 different hydroxyapatite surfaces. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, 14(2) :217-225.

3 Hankey DP, McCabe RE, Doherty MJ, et al. Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. Acta Orthop Scand, 2001, 72(4) :395-403.

4 Cooper LF, Masuda T, Yihiekkila PK, et al. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted and plasma-sprayed titanium surfaces. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, 14(1) :37-47.

5 Bruder SP, Kuth AA, Shea M, et al. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Orthop Res, 1998, 16(2) :155-162.

6 Gronthos S, Franklin DM, Ledy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. J Cell Physiol, 2001, 189(1) :54-63.

7 Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res, 2000, 2(6) :477-488.

8 Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al. The monoclonal antibody SH-2 raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(1) :134-139.

9 Phinney DG, Kopen G, Righter W, et al. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. J Cell Biochem, 1999, 75(3) :424-436.

10 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.

11 Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. Tissue Eng, 2001, 7(1) :89-99.

12 Mason JM, Breitbart AS, Grande DA. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2000, 379(10) :171-178.

13 Gazit D, Turgeman G, Kelley P, et al. Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. J Gene Med, 1999, 1(2) :121-133.

14 Marx JC, Allay JA, Persons DA, et al. High-efficiency transduction and long-term gene expression with a murine stem cell retroviral vector encoding the green fluorescent protein in human marrow stromal cells. Hum Gene Ther, 1999, 10(7) :1163-1173.

(收稿:2002-04-29 编辑:李为农)

北京世针传统医学培训招生通知
(原中国中医研究院针灸研究所针灸培训学校)

教社证字 A91048 号

我中心是经北京市东城区成人教育局批准,由世界针灸学会联合会主办的一所高等成人中医教育学校。本中心原为中国中医研究院针灸研究所针灸培训学校,是医务界最早开办针灸推拿培训的母校,位于北京东城全国著名的中医科研、医疗、教学中心——中国中医研究院内;依托这里得天独厚的人才优势及云集京城的名医专家,面向社会广大同行办学、传播名老中医专家经验,及特色疗法培训。尤其以传授名老针灸、推拿专家的临床经验的高级针灸、推拿进修班而闻名于社会。办学近二十年,为社会培训了两万余名针灸、推拿医师,学后他们的医术均有了不小的飞跃,得到患者和聘用单位的好评。同时由于我校办学经验丰富,办学正规、教学内容实用,服务周到,吸引了全国同行不远万里,源源不断地到这里充电,提高。

2003 年下半年办学安排如下:

一、举办学习班内容及安排:

全国高级针灸进修班:7月27日—8月10日,学费:1500元。此班为著名中医针灸专家临床经验传授班,属于国家一类中医药继续教育项目,授予25学分。将邀请程莘农、贺普仁、田从豁、于书庄、张士杰、金伯华、王居易等。他们将亲自授课,表演手法、传授特技、答疑解惑。通过学习,学员的医术均有显著提高,成为当地针灸骨干。

全国高级推拿进修班及高级按摩师资格取证班:6月1日—6月16日 7月31日—8月16日,学费2300元。

本着使学员学到和掌握更丰富、更全面的推拿、按摩理论知识和技能,顺利通过考核,优先竞争上岗的办学宗旨,将高级推拿进修班与高级按摩师取证班合二为一,我校重视理论联系实际,突出名师指导下的操练,使学员打下扎实的技术功底,练就一身过硬的技术本领,通过多期培训,考试通过率达99%。此班将邀请著名骨伤推拿专家臧福科、赵永刚等数位教授亲自授课和指导操练,本班招收具有八年以上从事按摩工作的人员或临床推拿医师等。学习班结束后,考核通过颁发中华人民共和国劳动和社会保障部印制的高级按摩师资格证书及北京世针传统医学培训中心结业证书。请提前1个月报名,报名时务必将身份证复印件、学历或工作证明、黑白1寸、2寸,彩色2寸照片各二张、300元报名费提前寄到学校。

经筋疗法及临床技能运用传授班:6月18日—6月30日

经筋疗法是以中医古典经筋理论为指导,结合现代运动解剖学、生物力学原理及临床实践而形成的新型非药物疗法。经筋疗法是治疗以筋性致因而造成的多种损伤病及50多种难病症,根据发病的不同阶段运用不同方法,例:“毫针刺法”、“拔罐法”、“特种针法”等达到消灶除病的目的。该班将邀请著名经筋疗法专家黄敬伟、薛立功、运动医学专家卢鼎厚及针刀学专家田纪钧等四位教授,亲自授课及传授各自针法临床应用技能技巧。学费:1200元 注:经筋疗法及临床技能运用传授班为国家中医药继续教育项目,20学分。

腹针疗法培训班:7月3日—7月8日

儿科疾病经络诊治方法与特点培训班:7月10日—7月14日(本班授予继续教育项目10学分)

中医美容培训班 7月16日—7月25日

此三班内容详情请索取招生简章。

针灸推拿函授班:应广大针灸推拿爱好者要求,我校继续开办此班。详情请索取招生简章。

二、报到日期及地点:

每班开学第一天为报到日,报到地点:北京市东城区南小街16号。中国中医研究院针灸研究所。报到时务必携带身份证,2寸免冠照片2张。

三、乘车路线:

外地学员:西客站乘122路至北京站,转乘地铁至东直门站或乘21路至西南门站,转乘地铁至东直门站;

北京站:乘地铁至东直门站,D口出站,向西200米即到中国中医研究院。

本市学员可乘106路、107路电车或24路汽车至小街即可。

四、学习班负责安排食宿(住宿费20元左右/天、食费用现金,根据北京地区消费标准,每人每天10~15元)、订购车票等费用自理。

五、报名:请寄:北京市东城区南小街16号中国中医研究院针灸研究所(邮编:100700) 联系人:裴玉珍女士 赵长龙先生

电话:(010)64007111或64014411 转2911、2781、2749