

bFGF 和 IGF 对体外培养骨髓基质干细胞增殖及分化的影响

郝敬东* 张锡庆 王晓东 张德强 张学兰
(苏州大学附属儿童医院骨科, 江苏 苏州 215003)

【摘要】 目的 观察碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子(IGF)对体外培养骨髓基质干细胞(BMSc)增殖、分化的影响。方法 3~6 月龄的雄性 SD 大鼠处死后,取双侧股骨、胫骨的骨髓进行体外培养。将含有不同细胞因子的培养基分为 4 组:①bFGF 组;②IGF 组;③bFGF + IGF 组;④对照组。以上各组均含地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素 C、青霉素、链霉素。显微镜下观察 BMSc 的生长特性,用 MTT 法测得的细胞相对值绘制生长曲线。采用改良 Gomori 氏钙钴法计数碱性磷酸酶(ALP)阳性率的细胞。**结果** BMSc 在传代培养前两天,各组的细胞数量无明显变化,从第二至第八天,bFGF 组、IGF 组、bFGF + IGF 组的细胞数量均高于对照组,并且 bFGF + IGF 组明显高于其它 3 组。含细胞因子 3 组的 ALP 阳性率均高于对照组,bFGF + IGF 组的阳性率最高。**结论** bFGF、IGF 都能促进 BMSc 增殖及向成骨细胞分化,并且两者同时运用优于单独使用;bFGF、IGF 在促进 BMSc 增殖与分化时起协同作用。

【关键词】 干细胞; 细胞分化; 动物,实验

The effect of bFGF, IGF on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stem cells in vitro culture HAO Jingdong, ZHANG Xiqing, WANG Xiaodong, et al. The Affiliated Children's Hospital of Suzhou University(Jiangsu Suzhou, 215003, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factor (IGF) on proliferation and differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSc) in vitro culture. **Methods** The 3~6 months old male Sprague-Dawleg rats were killed, the marrow plugs obtained from bilateral femorae and tibiae were cultivated in vitro. The media were divided into four groups, according to contents of different cell factors. ①bFGF group; ②IGF group; ③bFGF + IGF group; ④control group. Dexamethasone, β -glycerophosphoric acid, vitamin C, penicillin, streptomycin were added in all above groups. The growth characteristics of BMSc were observed under the microscope, the relative value of the cells were measured and the growth curvature was drawn with MTT method. The ALPase positive cells were counted by the improved Gomori's method. **Results** At the beginning two days of culture, all of groups had no difference in cell quantity. From second to eighth day, the amount of cells in these three groups, including cell factors (bFGF, IGF, bFGF + IGF) were more than control group respectively, however, cells of bFGF + IGF group were the most in all groups. Cells of the groups including cell factors expressed rate of ALPase positive cells were more than the cells of control group, moreover, the cells of bFGF + IGF group which expressed the rate of ALPase cells were the most in all groups. **Conclusion** bFGF, IGF can enhance the proliferation and differentiation of BMSc into osteoblast, moreover, the effect of bFGF and IGF, added to media at the same time is better than the effect of bFGF and IGF added respectively. bFGF and IGF can promote the proliferation and differentiation of BMSc, with synergistic action.

【Key words】 Stem cells; Cell differentiation; Animals, laboratory

在过去 20 多年里,人们主要研究了单一细胞因子的相互关系得到了较多的关注,本实验的目的是探讨 bFGF、IGF 对 BMSc 增殖及转化作用的影响。

* 现已调入北京电力总医院骨科

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 DMEM 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);bFGF、IGF(Boster 公司);地塞米松、维生素 C(上海华美生物技术公司); β -甘油磷酸钠(Sigma 公司);实验动物为 3 月龄 SD 雄性大鼠(苏州大学医学院实验动物中心)。

1.2 BMSc 的分离、原代和传代培养 将 SD 大鼠处死后,75%酒精浸泡 10 min,无菌条件下取出动物的双侧股骨、胫骨,将其两端的干骺端切除,显露骨髓腔,用注射器将骨髓冲出,混入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基(含青霉素和链霉素各 100 U/ml、维生素 C 50 μ g/ml、地塞米松 10^{-8} mol/L、 β -甘油磷酸钠 10 mol/L)10 ml 在 50 ml 培养瓶中反复抽吸吹打,然后置入 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 饱和湿度下培养,5 d 后半量换液,以后 2~3 d 全量换液 1 次。待原代培养的细胞增殖至铺满瓶底时,在 37 $^{\circ}$ C 室温下用 0.25% 胰蛋白酶消化 5 min,使之成为单细胞悬液,以 1×10^4 /cm² 密度接种于 50 ml 培养瓶。

1.3 形态学观察 倒置显微镜下每日观察细胞生长情况及形态变化特点。

1.4 组织学检测

1.4.1 碱性磷酸酶染色 将培养 3 周附有细胞的盖玻片取出采用改良 Gomori 氏钙钴法测定,每张盖玻片随机计数 200 个细胞,计数 ALP 阳性细胞率。

1.4.2 钙结节染色 将传代培养 6~8 周附有细胞的盖玻片取出进行 Von kossa 染色。

1.5 细胞生长曲线 取生长良好的第 2 代 BMSc,0.25% 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,将此悬液按 1×10^4 /ml 的浓度接种于 96 孔培养板每孔 200 μ l。以培养基内含不同的细胞因子分为 4 组,Ⅰ组:bFGF 50 ng/ml;Ⅱ组:IGF 50 ng/ml;Ⅲ组:bFGF 和 IGF 各 50 ng/ml;Ⅳ组:对照组,分别以含不同细胞因子的培养基对细胞进行培养。每天每组取三孔细胞,采用血细胞计数板计数法计算每孔的细胞数。以培养时间为横轴,细胞数为纵轴绘细胞生长曲线。

1.6 MTT 比色法分析 BMSc 的增殖情况 以 1×10^4 /ml 浓度的细胞,200 μ l/孔接种于 96 孔平底培养板中,分别加入含不同细胞因子的 DMEM 培养基 200 μ l/孔,于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养,每日分别取三孔观察。方法:加入 200 μ l/孔 MTT(5 mg/ml)后,继续培养 5 h,吸去上清液,每孔加入 150 μ l 二甲亚砜,振荡 10 min 使结晶物充分溶解。选择波长 570 nm,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。

2 结果

2.1 相差显微镜观察 细胞接种后 24 h 可见部分大圆形单核细胞贴壁,第 3 天观察时发现表面漂浮大量的血细胞。5 d 后首次换液,观察可见培养瓶壁上有成纤维样细胞散在分布,其形状、大小各不相同。10~14 d 可见少量的集落形成,这些细胞被称为成纤维细胞集落形成单位(colony-forming unit-fibroblastic, CFU-F),细胞集落的中央部位细胞分布较密,外周细胞密度降低。20 d 时培养瓶内成纤维细胞集落数目增多,并且集落的直径增大,24 d 时观察见细胞基本铺满瓶底,用 0.25% 胰蛋白酶消化后进行传代培养,第三代时细胞出现重叠生长(图 1),传代后可见各种形态的成骨细胞(图 2),传至 8~10 代后,生长速度逐渐减慢,传代周期延长、细胞轮廓增强、细胞变得粗糙、胞内出现颗粒状堆积物。

2.2 碱性磷酸酶染色 将传代培养 3~4 周的 BMSc 经改良钙钴法染色后,BMSc 的胞浆中可见浅棕至棕黑色的细小颗粒,细胞着色程度不一,在细胞密集区反映强烈,ALP 阳性率可达 70% 以上($\times 100$,见图 3)。含细胞因子的 3 组 ALP 阳性率均高于对照组,bFGF + IGF 组的阳性率最高(图 4)。

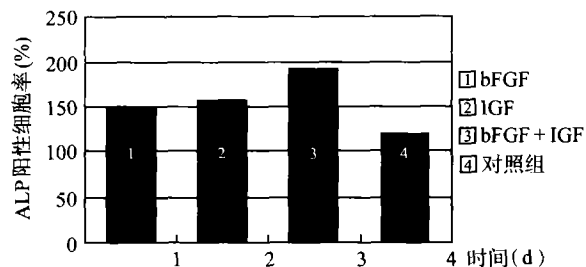


图 4 BMSc 传代 3~4 周时各组的 ALP 阳性细胞率

2.3 Von kossa 染色 BMSc 传代培养 6~8 周可观察到钙结节形成($\times 100$,见图 5),经 Von kossa 染色后阳性反映为黑色结节散布于盖玻片上。bFGF 和 IGF 组高于其它 3 组,对照组低于其它含细胞因子组。

2.4 bFGF 和 IGF 对 BMSc 生长曲线的影响 BMSc 在传代培养前两天,各组的细胞数量无明显变化,从第二至八天,bFGF 组、IGF 组、bFGF + IGF 组的细胞数量均高于对照组,并且 bFGF + IGF 组明显高于其它 3 组。

2.5 MTT 比色试验 为准确观察 bFGF 和 IGF 对 BMSc 生长的影响。我们将 MTT 加入细胞中,通过所生成的有色物质进行光比色,来了解细胞的增殖情况,以 MTT 测定所得的 OD 值作为细胞的相对

数,结果表明:bFGF、IGF 对 BMSc 的增殖都有明显的促进作用,并且同时使用 bFGF 和 IGF 效果更好(图 5)。

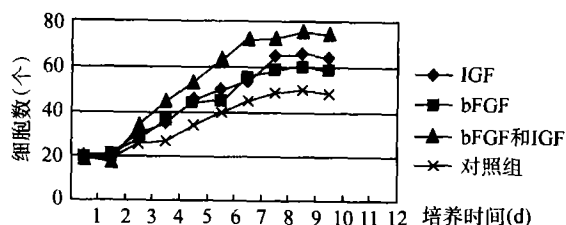


图 5 细胞生长曲线

3 讨论

3.1 骨髓基质干细胞 是指能够为造血干细胞提供结构和功能支持,并能影响造血干细胞分化的结缔组织成份。包括细胞网和细胞外基质。BMSc 是多种细胞的前体细胞,能够向成纤维细胞、网状细胞、脂肪细胞和成骨细胞方向转化^[1]。骨重建除受全身情况、内分泌等因素的影响外,骨微环境中生长因子和细胞因子的自分泌和旁分泌的调节更直接地控制骨重建。由于 BMSc 的多分化潜能,故摸索 BMSc 最佳体外培养条件,使 BMSc 多量、稳定地向成骨细胞转化对骨组织形成具有重要作用。BMSc 可以在无诱导条件下骨化,称为确定性骨源性前体细胞(determined osteogenic precursor cells, DOPC),也称作骨源性干细胞(osteogenic stem cell);而在骨组织以外组织中存在的干细胞需要骨基质和移行上皮来源的因子诱导骨化称之为诱导性骨源性前体干细胞(inducible osteogenic precursor cell, IOPC)。

3.2 bFGF 和 IGF 对 BMSc 增殖及分化的影响

bFGF 主要分布于垂体、脑、神经、视网膜、肾上腺和胎盘等组织中,尤其以垂体含量最高(0.5 mg/kg),其它组织中含量少,约为垂体的 1/10~1/50,在血清和体液中浓度极低。bFGF 是多肽家族的一员,有潜在的血管再生活性,并且在许多组织包括骨组织的生长、发育、修复中起关键作用,脊椎动物的肢体形成需要 FGF^[2,3]。成骨细胞系的细胞既能产生 bFGF 也能对储存在细胞外基质中高浓度的 FGF 应答^[4]。在多种动物模型上运用 bFGF 表明它能够刺激新骨形成、加速骨折愈合^[5-8]。成骨细胞起源于中胚层,在其表面存在着 FGFR,而成骨细胞本身合成的 bFGF 通过自分泌或旁分泌存在于骨基质中,当 bFGF 与成骨细胞表面的受体结合后,可以促使其向成骨细胞转化。

IGF 来源于啮齿类动物的颅骨,人类肿瘤细胞系和长骨在体外均有 IGF mRNA 的表达,并向条件培养基分泌 IGF。成骨细胞合成 IGF 并且具有 IGF 的 I 型和 II 型受体,IGF 对于成骨细胞具有促进增殖和分化的作用,因此 IGF 对骨重建有特别重要的作用。

3.3 地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素 C 的作用 地塞米松能够提高 BMSc 的 ALP 活性,促进向成骨细胞转化是 BMSc 体外培养的重要条件但却抑制其增殖^[9]。成骨细胞形成矿化结节,则必须有维生素 C 和 β -甘油磷酸钠存在,后者提供有机磷,维生素 C 则是合成胶原和骨形成的前提,并且调节成骨样细胞 ATPase、ALPase 和蛋白合成。

结果表明:bFGF、IGF 都能促进 BMSc 增殖及向成骨细胞分化,并且两者同时运用优于单独使用,说明 bFGF + IGF 在 BMSc 增殖与转化方面起相互协同、相互促进的作用。但由于 BMSc 的体内转化及增殖与多种因素相关,因此,下一步我们考虑进一步研究多种因子、不同浓度、交叉及序贯应用对 BMSc 的作用。

(本文图 1-4 见后插页 1)。

参考文献

- 1 Nevo Z, Robinson D, Horowitz S, et al. The manipulated mesenchymal stem cells in regenerated skeletal tissues. *Cell Transplant*, 1998, 7: 63-70.
- 2 Martin GR. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Devel*, 1998, 12: 1571-1586.
- 3 Wilkie AOM, Morriss-Kay GM, Jones EY, et al. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr Biol*, 1995, 5: 500-507.
- 4 Globus RK, Ploulet J, Gospodarowicz D. Cultured bovine bone cells synthesis basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology*, 1989, 124: 1539-1547.
- 5 Baron J, Klein OK, Yanovski JA, et al. Induction of growth plate ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 1994, 135: 2790-2793.
- 6 Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, et al. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res*, 1998, 16: 654-659.
- 7 Nagai H, Tsukuda R, Mayahara H. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on bone formation in growing rats. *Bone*, 1995, 16: 367-373.
- 8 Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 942-949.
- 9 Su Li Cheng, Joseph W, Leonard R, et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 1994, 134: 277-286.

(收稿:2002-07-22 修回:2002-12-06 编辑:李为农)

兔颈椎终板胶原结构变化对运动节段力学性能的影响

(正文见 577 页)

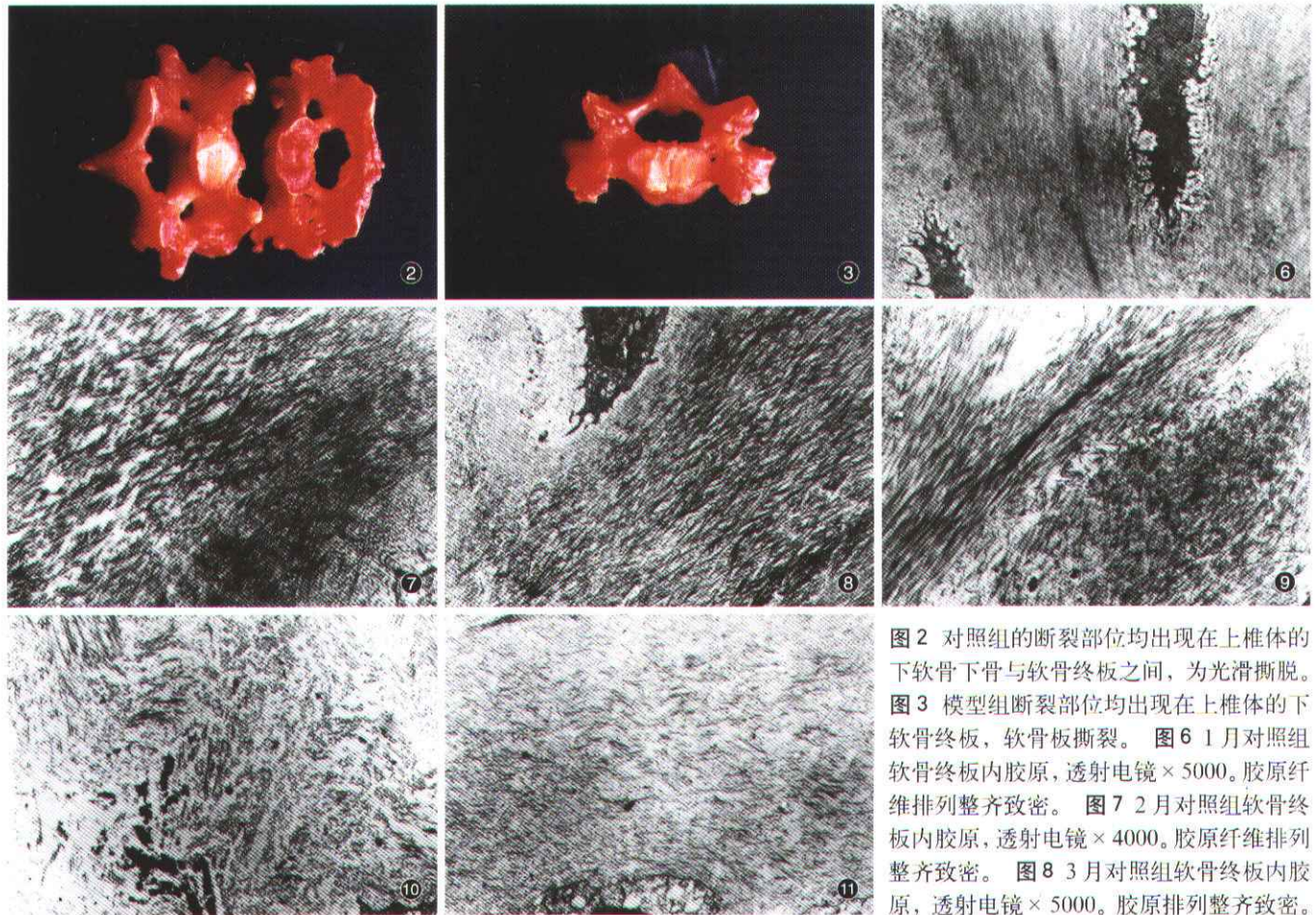


图 2 对照组的断裂部位均出现在上椎体的下软骨下骨与软骨终板之间, 为光滑撕脱。图 3 模型组断裂部位均出现在上椎体的下软骨终板, 软骨板撕裂。图 6 1 月对照组软骨终板内胶原, 透射电镜 $\times 5000$ 。胶原纤维排列整齐致密。图 7 2 月对照组软骨终板内胶原, 透射电镜 $\times 4000$ 。胶原纤维排列整齐致密。图 8 3 月对照组软骨终板内胶原, 透射电镜 $\times 5000$ 。胶原排列整齐致密。

图 9 1 月模型组软骨终板内胶原, 透射电镜 $\times 4000$ 。胶原纤维排列基本规整, 有少量胶原纤维排列紊乱。图 10 2 月模型组软骨终板内胶原, 透射电镜 $\times 4000$ 。胶原纤维排列紊乱、松散。图 11 3 月模型组软骨终板内胶原, 透射电镜 $\times 4000$ 。胶原纤维排列紊乱、松散、溶解。

bFGF 和 IGF 对体外培养骨髓基质干细胞增殖及分化的影响

(正文见 584 页)

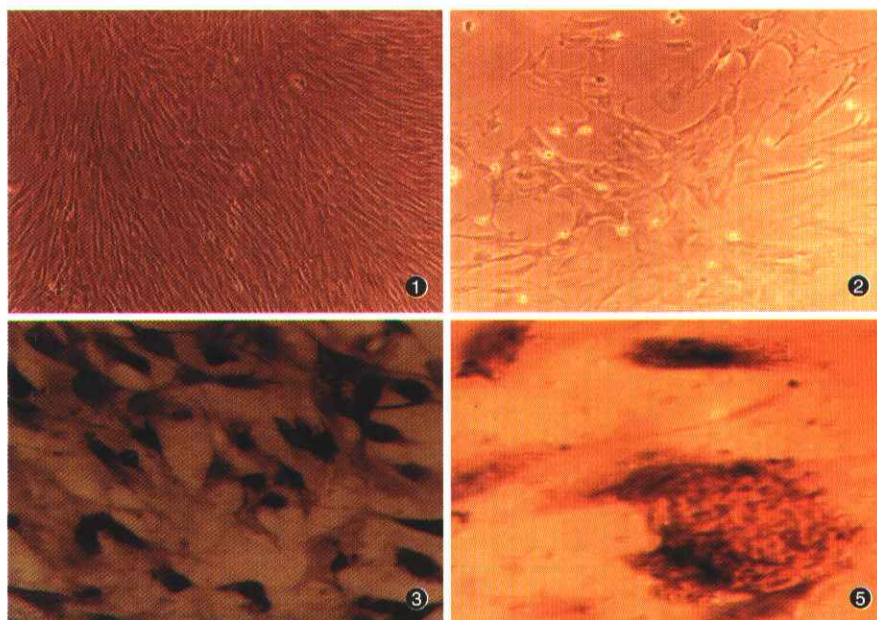


图 1 重叠生长的第三代 BMSC $\times 100$ 。图 2 呈梭形、多边形、三角形及不规则形态的成骨细胞 $\times 100$ 。图 3 BMSC 经改良钙钴法染色后, BMSC 的胞浆中可见浅棕至棕黑色的细小颗粒。图 5 BMSC 传代培养 6-8 周可观察到形成钙结节。