

• 基础研究 •

间歇性压力培养环境对兔骨髓基质干细胞增殖的影响

彭磊^{1,2}, 胡蕴玉², 徐华梓¹, 王臻², 许松峰², 孙峥², 王胜¹

(1. 温州医学院附属二院骨科, 浙江 温州 325000; 2. 第四军医大学西京医院骨科研究所)

【摘要】 目的: 研究间歇性压力培养环境对兔骨髓基质干细胞(MSC)增殖的影响, 探讨假体置换术后活动所需的最适宜压力。方法: 以新西兰兔的骨髓基质干细胞为实验材料, 通过噻唑盐(MTT)比色试验, 观察间歇性压力对骨髓基质干细胞增殖的影响。结果: MSC在60、100 kPa间歇性压力培养环境下MTT反应的OD值小于对照组, 压力值越大, OD值越小($P < 0.05$)。而20 kPa间歇性压力情况可显著促进MSC增殖, 并随时间增加而增强。在实验第7天时, 实验组OD值高于对照组($P < 0.05$), 差异有显著性意义。结论: 关节置换术后早期下地活动产生的较大应力, 会明显抑制骨髓腔内MSC的增殖, 不利于骨的重建愈合, 临床应当避免。然而, 较小的间歇性压力对MSC增殖有明显的促进作用, 提示关节置换患者可在较小压力范围(< 20 kPa)内进行早期关节被动活动训练, 有利于关节术后骨的重建愈合。

【关键词】 骨髓基质干细胞; 关节成形术, 置换; 细胞增殖

Osteoblast proliferation of rabbits bone marrow stromal cells cultured under intermittent stress PENG Lei^{1,2}, HU Yun-yu, XU Hua-zi, WANG Zhen, XU Song-feng, SUN Zhen, WANG Sheng. * Department of Orthopaedics, the 2nd Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College Wenzhou 325000 Zhejiang, China

ABSTRACT Objective To study the effect of bone marrow stromal cells (MSC) on different intermittent stress and explore the optimum pressure for the activity after prosthesis replacement. **Methods** Using MTT testing osteoblast of rabbits bone marrow stromal cells cultured under controlled intermittent stress environment which proliferation was measured. **Results** Under 60, 100 kPa intermittent stress, optical density (OD) was similar with that under continual stress. However, under 20 kPa intermittent stress, the OD was higher than control group ($P < 0.05$). The longer period of observation was, the higher OD was. **Conclusion** Early out of bed activity after total hip replacement operation, may bring about major stress on MSC in medullary cavity and is harmful of patient reestablish. But minor stress can accelerate MSC proliferation. This indicates that after total hip replacement operation, early on of bed activity may bring about intermittent stress on MSC in medullary cavity and is beneficial of patient rehabilitation.

Key words Bone marrow stromal cells; Arthroplasty, replacement; Cell proliferation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007; 20(2): 92-93 www.zggsszz.com

骨髓基质干细胞(MSC)来源的成骨细胞是骨髓腔内主要的受力细胞, 在人工关节转换病例中, 其生命活动状况与假体传导压力有密切关系, 本文应用可控压力细胞加载装置和通过噻唑盐(MTT)比色试验, 观察间歇性压力对MSC增殖的影响, 以期揭示间歇性压力对关节置换骨愈合进展及其术后活动影响的生物学机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验仪器 超净工作台(中国四达净化技术研究所), CO₂培养箱(NATURE, U.S.A), YMT-Z倒置显微镜(OLYMPUS, JAPAN), DG3022型酶联免疫检测仪(国营华东电子管

厂、第四军医大学联合研制)。实验材料: 无血清DMEM培养液, 含10% FBS的DMEM(含1 U/L青霉素及100 mg/L链霉素) 25 ml 100 ml培养液, 24孔、96孔培养板(Gibco U.S.A), 含2% FBS的DMEM(含1 U/L青霉素及100 mg/L链霉素) 胎牛血清(FCS, 浙江金华), 噻唑蓝(MTT)(Sigma), 胰蛋白酶(上海生化试剂厂), ABC试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 兔MSC的培养 出生1个月的新西兰幼兔1只, 断头处死, 无菌条件下取四肢长骨, 纵行剖开, 用DMEM培养液冲洗骨髓腔, 轻轻吹打, 静置1 min, 使大块组织沉降, 取上清接种于10个25 ml培养瓶中进行培养。24 h后换液, 去除未贴壁的血细胞, 以后每3 d换液1次。细胞长满培养瓶底部后, 用0.25%胰酶常规传代, 传代比例为1:3倒置显微镜上

观察细胞的生长情况。

矿化结节染色:取第 3代细胞,胰酶消化,接种在 25 ml 培养瓶中,用矿化液(含 20%胎牛血清、2 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 μg/ml 维生素、10 nmol/L 地塞米松)连续培养 30 d 在倒置显微镜下观察矿化结节形成情况。取 30 d 标本,95%乙醇固定后行 VonKossa 染色,观察矿化结节的形成情况。

1.2.2 细胞加载装置 本实验所用的细胞加载装置是可控压力细胞加载装置(由第四军医大学口腔医院修复科自行研制并提供本课题组使用)。该装置主要由高压储气室、控压加载室、气流量调控器、压力检测器、计时器组成。高压储气室储备 5% CO₂、95% 空气,气压大于 1.0 MPa,控压加载室通过气流量调控器与高压储气室连接,并由压力检测器和气流量调控器控制加载室内压力,室内压力与设定压力之误差小于 5%。

1.2.3 细胞加载方法 首先,按实验方案设定、调试控压加载室气压值;继之,将细胞培养板放入加载室内,关闭室门;再开启气流量调控器向加载室充气加压。到达预定加载时间后,通过排气阀排气减压并打开室门。接受加载后的细胞重新放入 CO₂ 培养箱培养或加入试剂染色以观察数量。

1.2.4 分组 将生长良好的第 3~4代 MSC 按 1×10⁴ 个/孔随机接种于 4 块 24 孔培养板,14 h 后细胞完全贴壁,换新鲜含 10% FCS 的 DMEM。按压力施加类型不同分为持续性和间歇性压力,每块培养板的细胞为 1 个大组,随机将 4 块培养板分为 4 个大组即:对照组、20 kPa 间歇组、60 kPa 间歇组、100 kPa 间歇组。每大组按观察期分为 4 个小组即:1 d 3 d 5 d 7 d 组。每小组样本(细胞)为 6 孔。对照组不予加压,20 kPa 60 kPa 100 kPa 间歇组分别在每天施以 20 kPa 60 kPa 100 kPa 的压力 5 min 2 次。

1.2.5 MSC 的存活和增殖的检测方法 在规定的观察期,分别给相应的实验小组加入噻唑蓝(MTT, 5 mg/ml Sigma U. S. A) 60 μl 继续孵育 4 h 后吸弃孔内液体备检。当各组观察期的反应均完成后,每孔加入二甲基亚砷(DMSO,西安化学试剂厂) 600 μl 充分振荡 10 min 使结晶物充分溶解,用酶联免疫检测仪(Bio-Rad U. S. A)测定各孔细胞 490 nm 波长的光吸收值(OD 490 nm)。

1.2.6 数据处理 各组光吸收均值用 SPSS 13.0 软件,采用单因素 4 水平定量资料的方差分析进行统计学处理。

2 实验结果

2.1 细胞生长状况 原代培养后,细胞在第 5~7 d 内可见细胞从组织块边缘游出,以组织块为中心成放射状向外排列,细胞呈长梭形,伸展良好,胞体丰满,胞浆均匀,5 代以前细胞生长旺盛,生长状态良好。矿化结节染色阳性。

2.2 不同间歇压力对不同观察期间 MSC 的 OD 值影响(见表 1) 自实验第 1 天起,各实验组 MSC 的 OD 值逐渐升高。实验的第 3 天,对照组、20 kPa 组与 60 kPa 组间 OD 值比较差异无显著性意义(P > 0.05),但均高于 100 kPa 组;实验的第 5 天,4 组 OD 值比较, F = 19.985, P < 0.01。60 kPa 组、100 kPa 组值均数均小于对照组、20 kPa 组;实验的第 7 天,4 组 OD 值比较 F = 19.985, P < 0.01。60 kPa 组、100 kPa 组值

均数均小于对照组、20 kPa 组。

表 1 骨髓基质干细胞在不同间歇压力作用下的光吸收值(OD) ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Mean and standard deviation of optical density(OD) under different intermittent stress in MSCs ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	光吸收值(OD)			
	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	0.297 ± 0.038	0.678 ± 0.039	1.368 ± 0.056	1.632 ± 0.070
20 kPa 组	0.298 ± 0.038	0.695 ± 0.057	1.435 ± 0.042	1.877 ± 0.070
60 kPa 组	0.292 ± 0.021	0.663 ± 0.059	1.243 ± 0.051	1.550 ± 0.084
100 kPa 组	0.273 ± 0.039	0.552 ± 0.055	1.062 ± 0.080	1.303 ± 0.097

3 讨论

3.1 MSC 对机械力效应的力学模型 MSC 转化来的成骨细胞是关节置换手术后主要的应力细胞,同时具有合成胶原形成胶原纤维,分泌重要的活性物质以调控骨内组织的代谢等功能。MSC 生活在骨髓腔中,该组织既是细胞物质交换的媒体又是传递和缓冲应力的介质。假体积压受力发生位移的同时,必然挤压骨内松质骨的组织液致使其组织液液压亦即 MSC 的受力改变,因此,通过改变液压的方式实施对 MSC 加载能比较好地模拟临床关节置换术后情况^[1]。

3.2 应力对 MSC 增殖的影响 通过向压力培养箱持续注入 3 种持续加压的混合空气,作用于鼠成骨样细胞持续性压力,证实持续性压力(Continuous compression pressure)对成骨细胞有抑制作用^[2]。本研究用可控压力细胞加载装置和 MTT 法^[3]观察了体外环境下正压力对 MSC 增殖的影响,结果表明:MSC 在小剂量压力下间歇作用后,有明显的促进增殖作用,并且该压力增殖作用具有时间效应。

Mukherjee 等^[3]报道关节置换术后的早期被动关节锻炼(CPM)能够产生 0.6~20 kPa 的压力,证实关节置换早期功能锻炼有利于关节的修复,在此压力范围条件下机械压力有利于调节关节发生及其成熟。本实验同样观察到较小的压力间歇条件下能够促进 MSC 的增殖。从而提示早期的关节被动活动训练(<20 kPa)有利于关节初次或者翻修手术后骨和假体的愈合以及周围骨的改建,而关节置换术后早期下地易引起压力过大,导致骨愈合细胞的增殖抑制,从而更易引起假体松动下沉。

参考文献

- Mauney JR, Sjöström S, Blumberg J, et al Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Calcif Tissue Int* 2004; 74(5): 458-468
- Liu AL, Zhang ZM, Zhu BF, et al Mechanical vibration protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Cell Biol Int* 2004; 28(12): 905-911.
- Mukherjee N, Saris DB, Schultz EM, et al The enhancement of periosteal chondrogenesis in organ culture by dynamic fluid pressure. *J Orthop Res* 2001; 19(6): 1213.

(收稿日期: 2005-07-14 本文编辑: 连智华)