

## 低强度脉冲超声波对体外培养的兔骨髓基质细胞成骨作用的影响

梁伟<sup>1</sup>, 苟三怀<sup>1\*</sup>, 齐进<sup>2</sup>, 魏立<sup>2</sup>, 欧阳跃平<sup>1</sup>, 刘岩<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 2. 上海市伤骨科研究所, 上海 200025)

**[摘要]** **目的:** 研究低强度脉冲超声波(LIPUS)对体外培养的兔骨髓基质细胞(BMSCs)成骨能力的影响。**方法:** 抽取新西兰白兔的骨髓, 体外分离纯化获取 BMSCs, 加入条件培养基后随机分为实验组和对照组; 实验组应用 LIPUS 对 BMSCs 每天作用 20 min, 对照组未予作用。通过倒置相差显微镜观察细胞增殖分化情况, 分别于 1、2、3 周后停止 LIPUS 作用, 应用碱性磷酸酶(ALP)和 Von Kossa 染色的方法鉴定细胞成骨性能。**结果:** BMSCs 经 LIPUS 刺激后, 细胞形态变大, 核增大, 核质比减小; 而对照组细胞相对扁平, 折光率降低。BMSCs 经 LIPUS 刺激 1、2、3 周后, ALP 活性均较对照组明显增高( $P < 0.05$ )。LIPUS 刺激 3 周后, 实验组钙结节像素值较对照组像素值明显增多( $P < 0.05$ )。**结论:** LIPUS 能促进条件培养基中的 BMSCs 向成骨细胞转化。

**[关键词]** 低强度脉冲超声波; 骨髓基质细胞; 细胞培养; 成骨能力

**[中图分类号]** R 329.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0603-04

### Effect of low intensity pulsed ultrasound on osteogenic potential of rabbit bone marrow stromal cells *in vitro*

LIANG Wei<sup>1</sup>, GOU San-huai<sup>1\*</sup>, QI Jing<sup>2</sup>, WEI Li<sup>2</sup>, OUYANG Yue-ping<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup> (1. Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Traumatic & Orthopaedics Institute of Shanghai 200025)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To explore the effect of low intensity pulsed ultrasound(LIPUS) on the osteogenesis of rabbit bone marrow stromal cells (BMSCs) *in vitro*. **Methods:** Rabbit bone marrow was drawn out and cultured with conditioned culture medium to harvest BMSCs; the third generation BMSCs were randomly assigned to the experimental group and the control group. The experimental group was exposed to LIPUS 20 min/day for 1, 2 or 3 weeks, and the control group received no treatment. The cell proliferation was observed under inverted microscope. Von Kossa staining and alkaline phosphatase(ALP) activity test were employed to assess the osteogenesis of the cells. **Results:** BMSCs became larger after being stimulated with LIPUS, with increased nuclei and decreased nuclear to cytoplasm ratio; BMSCs untreated with LIPUS was flat and had lower refractive index. ALP activities of LIPUS-treated (1, 2, and 3 weeks) BMSCs increased significantly compared with that of the control group( $P < 0.05$ ); the pixel value of calcification nodule in experimental group(after 3 weeks) was also higher than that of the control group( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** LIPUS can accelerate the osteogenesis of rabbit BMSCs in conditioned culture medium.

**[KEY WORDS]** low intensity pulsed ultrasound; bone marrow stromal cells; cell culture; osteogenic potential

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(6): 603-606]

骨髓基质细胞(BMSCs)是间充质来源的干细胞, 通常也被称为骨髓间充质干细胞。它具有来源广泛, 取材方便, 对供体损伤小, 易于分离培养, 体外增殖能力强的优点, 作为种子细胞在骨组织工程中具有广阔的应用前景。近几年, 有关 BMSCs 特性及其在骨组织工程中的应用取得了很大的进展, 但由于 BMSCs 的分化及成骨机制相当复杂, 能够分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞和肌细胞等<sup>[1]</sup>, 因此在体外培养过程中如何使其向成骨细胞转化, 并保持此特性至关重要。大量动物实验和临床试验已经证实了低强度脉冲超声波(LIPUS)在骨细胞和软骨细胞发育中发挥重要的作用, 能明显促进骨折愈合<sup>[2-4]</sup>。本实验采用贴壁培养的方法, 对 BMSCs 进行分离培

养和体外扩增, 观察 LIPUS 对其成骨潜能的影响, 期为 BMSCs 的分化调控提供实验基础。

### 1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂 3 月龄健康雄性新西兰大白兔 1 只, 体质量 2.4 kg, 由上海市伤骨科研究所动物实验中心提供。DMEM 培养液(Gibco), 10%胎牛血清(杭州四季青公司), 胰酶(trypsin 1:250 Difco), 碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(南京建成生物工程研究所), BCA 试剂(PIERCE)。条件培养

**[作者简介]** 梁伟, 博士. E-mail: orthodoc@163.com

\* Corresponding author. E-mail: ven15@163.com

基;在10%胎牛血清(FBS)低糖DMEM培养基中加入以下试剂(Sigma,USA): $1 \times 10^{-8}$  mmol/L地塞米松(Dex);10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠,50 mg/L维生素C。

1.2 实验仪器 立刻生™低强度脉冲超声波治疗仪,由杭州核新生物医疗技术有限公司提供。超声波强度为40 mW/cm<sup>2</sup>,超声波频率为1.5 MHz,脉冲频率为1 kHz,脉冲宽度为200 ms,间隙时间为800 ms。紫外分光光度仪(Beckman,USA);酶标仪(Wellscan MK2)。

1.3 取材及细胞培养 3%戊巴比妥钠按25 mg/kg浓度对新西兰白兔经耳缘静脉给药麻醉后,剪除双侧臀外侧区皮肤,碘伏消毒后切开皮肤、皮下及深筋膜,从臀大肌外侧肌间隙进入,充分暴露股骨,刮除骨外膜,将灭菌钻头自股骨上端骨骺端钻入髓腔内,取10 ml已肝素化处理的注射器抽取骨髓约5 ml。

无菌工作台上,用200目滤纱过滤骨髓,1 500 r/min( $r=8$  cm)水平离心4 min,将沉淀的细胞重悬于含10%胎牛血清(FBS)低糖DMEM培养基的培养瓶中(25 cm<sup>2</sup>),置于恒温二氧化碳细胞培养箱中培养(37℃、5%CO<sub>2</sub>、100%饱和湿度)。第5日首次进行半量换液,加入DMEM培养液,此后每周换液2次。

待培养皿中细胞融合成单层时,采用酶消化法+机械刮除法进行细胞传代:0.25%胰蛋白酶使贴壁细胞脱壁,并用橡皮细胞刮子将瓶底薄膜样物质刮下,将细胞悬液按1:3的比例接种,继续使用条件培养液培养。

1.4 LIPUS作用方式 将第3代BMSCs以 $1 \times 10^4$ /孔的密度接种于8块6孔培养板中,加入条件培养基。其中3块培养板应用LIPUS对BMSCs每天作用20 min,作用时间分别为1、2、3周,另3块培养板作为对照组未予作用,进行形态学观察并行ALP测定。余下的2块培养板中1块予以LIPUS作用3周,另1块未予作用,均培养3周,观察钙结节的形成。在立刻生™骨科超声治疗仪的治疗头上涂抹耦合胶,并紧贴在实验组培养板底部进行作用。

### 1.5 细胞鉴定

1.5.1 形态学观察 自接种之日起,每天在倒置相差显微镜下观察BMSCs的外观形态变化,及其贴壁生长分化、增生融合钙化情况,拍摄不同时期照片进行比较。

1.5.2 ALP定量测定 对LIPUS刺激的实验组和对照组的6孔培养板中细胞匀浆中ALP含量按

试剂盒说明书分别进行测定。计算公式如下:ALP=测定管光密度/标准管光密度×标准管含酚量(0.003 mg)/取样量中的蛋白含量(g)。

1.5.3 钙结节形成及观察 对LIPUS刺激的实验组和对照组的6孔培养板,应用Von Kossa染色法对培养细胞进行染色。采用Leica显微镜照相,以Leica Qwin图像分析系统进行图像分析:先将图像转换为256级灰度图像,每张图像选择4个高倍镜(×100),手动清除异常染色点,分析并自动计算细胞核灰度值,计算其方差。

1.6 统计学处理 应用SPSS 10.0软件对实验组和对照组ALP活性率及钙结节染色像素的差异进行*t*检验。

## 2 结果

2.1 BMSCs形态学观察 刚接种的第3代BMSCs呈圆形,大小不等(图1A);24 h后开始贴壁生长,大多数细胞为不规则梭形,有多个突起,少数细胞为三角形、多边形,半透明。周围悬浮细胞主要为血细胞和造血干细胞。5 d后半量换液去除悬浮细胞。10 d后形成纤维细胞集落,实验组大部分细胞呈梭形、多角形或纺锤形,细胞核变大,核质比变小(图1B);而对照组细胞生长缓慢,数量少,形态变扁,折光率降低(图1C)。体外培养21 d时,实验组与对照组的细胞折光率均进一步下降,较多细胞脱壁死亡(图1D)。

2.2 细胞匀浆中ALP的测定 第3代BMSCs经LIPUS分别作用1、2、3周后,实验组ALP含量均较对照组ALP含量明显增高,经统计学分析有显著性差异(表1)。

2.3 钙结节染色图像分析 经LIPUS作用3周后,BMSCs呈集落生长后开始形成黑色的钙结节(图2)。应用Leica Qwin图像分析系统进行分析后,发现实验组钙结节像素( $20\ 714 \pm 1\ 022$ )较对照组钙结节像素( $11\ 659 \pm 2\ 378$ )明显增多,经统计学分析有显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

BMSCs具有取材方便、对机体损伤小、体外培养增殖能力强、在特定因素作用下可向成骨细胞分化、不易老化等特点,作为骨组织工程学的种子细胞为骨缺损、骨不连的治疗带来了希望。BMSCs具有多向分化潜能,能够分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞和肌细胞等,成人骨髓中具有成骨能力的BMSCs数量仅占单核细胞的十万分之一,局

部无法保持有效浓度,成骨效率不高,严重限制了其在临床上的应用<sup>[5]</sup>。如果能提高 BMSCs 向成骨细

胞转化的效率,无疑会使 BMSCs 作为骨组织工程的种子细胞更有前途。

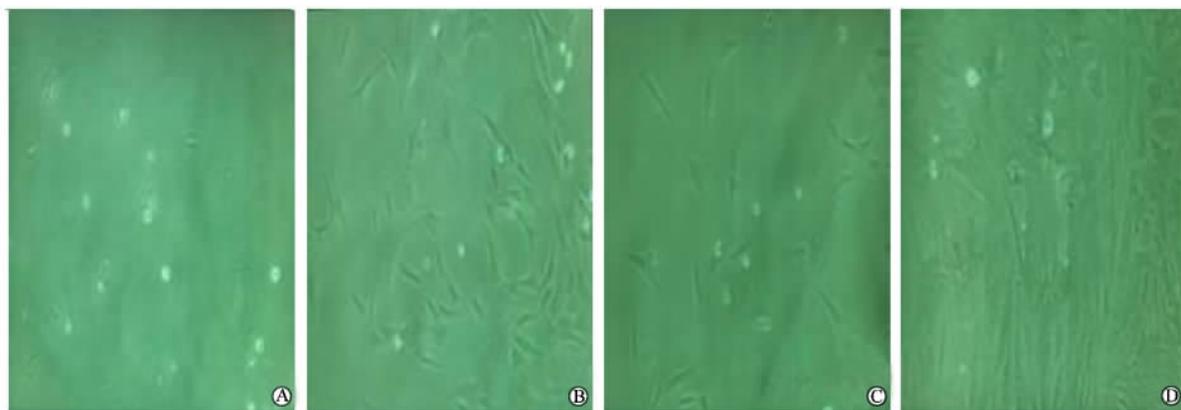


图1 低强度脉冲超声(LIPUS)对骨髓基质细胞(BMSCs)形态学的影响

Fig 1 Influence of low intensity pulsed ultrasound(LIPUS) on morphology of bone marrow stromal cells(BMSCs) (×100)

A: BMSCs of the experimental group at the 1<sup>st</sup> day after LIPUS treatment; B: BMSCs of the experimental group at the 10<sup>th</sup> day after LIPUS treatment; C: BMSCs of the control group at the 10<sup>th</sup> day after LIPUS treatment; D: BMSCs of the experimental group at the 21<sup>st</sup> day after LIPUS treatment

表1 实验组与对照组 ALP 含量

Tab 1 Comparison of ALP values of experimental and control groups

(n=6,  $\bar{x} \pm s$ , U/g protein)

Group	Time after stimulation by LIPUS(t/week)		
	1	2	3
Control	3.40±0.29	4.92±1.01	3.72±0.50
Experimental	5.05±0.43*	7.67±1.13*	5.21±0.29*

\* P<0.05 vs control group

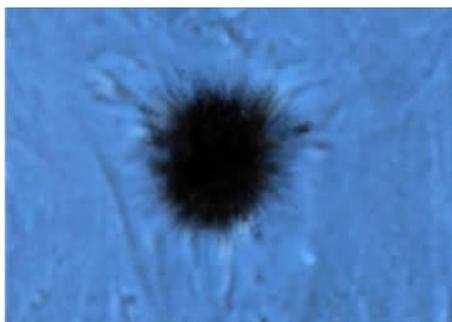


图2 LIPUS作用3周后 Von Kossa 染色的钙结节

Fig 2 Von Kossa staining of calcium nodules 3 weeks after LIPUS treatment(×100)

BMSCs 在体外培养时呈克隆样贴壁生长,由于造血干细胞呈悬浮生长,随换液被清除,巨噬细胞随传代而退化,定期传代到第3代可获得较高纯度的 BMSCs。倒置显微镜下动态观察发现,第3代 BMSCs 经 LIPUS 刺激后细胞核变大,核质比变小,细胞数目增多,生长加速,提示 LIPUS 对 BMSCs 的

形态和数量产生影响。

本实验将 ALP 作为 BMSCs 向成骨细胞转化的评价指标。ALP 是成骨细胞分化成熟的重要标志之一,可采用细胞化学染色或定量测定<sup>[6]</sup>。成骨细胞在体外培养时能形成矿化的细胞外基质,而矿化区经 Von Kossa 染色呈阳性反应<sup>[7]</sup>。实验中观察到第3代 BMSCs 培养2周时的 ALP 活力较1周和3周时的 ALP 活力高,说明 ALP 活力在成骨分化过程中与时间不是成正相关,它在2周之前处于上升阶段,2周左右达到峰值后逐渐下降。同一时期检测的实验组 ALP 活力均较对照组 ALP 活力增高,说明 LIPUS 对不同阶段的 ALP 活力均有促进作用。

影响 BMSCs 向成骨细胞分化的因素很多,包括物理、化学和生物等多种手段。目前研究较多的主要为生物因素: Dex、 $\beta$ -甘油磷酸钠、维生素 C、骨形态发生蛋白(BMP)、碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和转化生长因子(TGF- $\beta$ )。Dex 作为糖皮质激素能调节 BMSCs 的基因表达,从而促进其向成骨细胞分化,并能调节成骨样细胞合成胰岛素样生长因子(IGF),影响胶原合成的能力<sup>[7]</sup>。 $\beta$ -甘油磷酸钠对 Dex 的作用具有协同性,可提高 ALP 作用的底物磷酸离子,激活 ALP 促进有机磷向无机磷转化,加速钙盐沉积和骨质形成。维生素 C 为胶原合成所必需,还能调节 ATP 酶和 ALP 活性及非胶原基质蛋白的合成。

然而通过物理手段实现 BMSCs 向成骨细胞分化的研究一直进展缓慢。近年来,脉冲超声波在骨

科疾病的治疗中得到广泛应用和越来越多的重视,大量动物实验和临床试验已经证实了 LIPUS 在骨细胞和软骨细胞发育中发挥重要的作用,能明显促进骨折愈合。目前有关 LIPUS 对 BMSCs 分化影响的实验报道甚少,本实验通过观察 LIPUS 对体外培养的 BMSCs 成骨能力的影响,证实了在 LIPUS 刺激下,条件培养液中 BMSCs 的 ALP 活性、钙结节形成均明显增强,而张超等<sup>[8]</sup>发现 LIPUS 对在标准培养液中培养的人 BMSCs 的 ALP 活性和骨钙素分泌量无明显影响。本实验结果与张超等的发现并无矛盾,因为本实验中 BMSCs 体外培养采用的是条件培养液,包含有 Dex、 $\beta$ -甘油磷酸钠、维生素 C,张超等采用的是标准培养液。Dex 在条件培养液中起主导作用,能使 BMSCs 进入分化状态,在 BMSCs 向多种组织分化的过程中都不可缺少<sup>[9-10]</sup>。本实验提示 LIPUS 很可能在促使 BMSCs 向成骨细胞分化中发挥作用,也为进一步进行相关研究,实现 BMSCs 分化的调控和保持可持续性成骨潜能奠定了基础。

[参考文献]

[1] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications [J]. Stem Cells, 2001, 19: 180-192.

[2] Parvizi J, Wu C C, Lewallen D G, et al. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression [J]. J Orthop Res, 1999, 17: 488-494.

[3] 王琪, 苟三怀, 刘岩, 等. 低强度脉冲超声在骨折愈合中的作用 [J]. 第二军医大学学报, 2004, 25: 673-675.

[4] 梁伟, 苟三怀, 刘岩, 等. 碱性成纤维细胞生长因子在低强度脉冲超声治疗骨折过程中的表达 [J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(3-4): 233-235.

[5] Mueller S M, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges [J]. J Cell Biochem, 2001, 82: 583-590.

[6] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 2004: 163.

[7] Watts N B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling [J]. Clin Chem, 1999, 45: 1359-1368.

[8] 张超, 梁国穗, 张颖恺, 等. 低强度脉冲超声波刺激对人骨髓基质细胞和骨膜细胞生物学效应的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 279: 657-660.

[9] Dennis J E, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma [J]. Stem Cells, 2002, 20: 205-214.

[10] Cheng S L, Zhang S F, Mohan S, et al. Regulator of insulin-like factor I and II and their proteins in human bone marrow stromal cell by dexamethasone [J]. J Cell Biochem, 1998, 71: 449-458.

[收稿日期] 2007-01-14

[修回日期] 2007-04-15

[本文编辑] 孙岩

## 《神经科病——名家医案·妙方解析》和 《眼科病——名家医案·妙方解析》已出版

中医临床案例教学系列丛书之《神经科病——名家医案·妙方解析》和《眼科病——名家医案·妙方解析》已于2007年1月由人民军医出版社出版。大32开,平装。

《神经科病——名家医案·妙方解析》ISBN 978-7-5091-0625-9,定价45.00元。全书共分22章分别对22种神经系统疾病古今名家医案作了系统整理和分析,重点指出医案的精要之处,揭示名医独特的学术思想、知常达变的诊治技巧和遣方用药的特色。

《眼科病——名家医案·妙方解析》ISBN 978-7-5091-0657-0,定价35.00元。全书以现代病名为纲,扼要阐述疾病特征与中医证属和经典辨证论治,并精选了古今著名中医医家的经典医案,系统介绍了病史、辨证及诊治经过,重点对处方作了详细解析,指出了医案的精要之处,揭示了名医独特的学术思想、知常达变的诊治技巧和遣方用药的特色。

这两本书可供中医、中西医结合临床专业案例教学时作为教材使用,也可供广大中医、中西医结合眼科临床工作者阅读参考。

由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市100036信箱188分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168 E-mail:wanglan@pmmmp.com.cn