

间歇式轴向压应力对组织工程骨种子细胞的黏附增殖与成骨分化促进作用的研究

朱聪¹ 黄国锋² 江惠祥² 吴本文¹ 林剑彪¹ 林伟斌¹ 高明明² 丁真奇¹

【摘要】目的 探究间歇式轴向压应力对组织工程骨种子细胞黏附、增殖与成骨分化能力的影响。**方法** 构建表达绿色荧光蛋白的兔骨髓间充质干细胞(rBMSCs)作为示踪种子细胞,运用旋转细胞培养仪将松质骨支架和种子细胞共培养7 d获得组织工程骨(TEB),实验组在第7~14天施加大小10 N、频率1 Hz、4 h/d的间歇式轴向压应力刺激,对照组常规培养,14 d后胰酶消化法获取两组种子细胞并比较其黏附、增殖和成骨分化能力。采用两组独立样本 t 检验进行统计学分析。**结果** (1)流式细胞术显示rBMSCs被成功提取分离。(2)倒置荧光显微镜及扫描电镜显示TEB中种子细胞与支架相容性良好。(3)活体荧光成像系统及扫描电镜显示应力刺激组种子细胞的生长状况要优于非应力刺激组,前者平均荧光密度及细胞数/500倍视野均大于后者,差异均具有统计学意义(平均荧光密度: $(3.75 \pm 0.34) \times 10^8$ vs $(2.91 \pm 0.22) \times 10^8$, $t = 2.90$, $P = 0.04$; 细胞数/500倍视野: 30.50 ± 4.43 vs 21.00 ± 5.13 , $t = 3.14$, $P = 0.01$)。(4)细胞黏附实验显示,应力刺激组种子细胞的75%细胞贴壁时间短于非应力刺激组,两组时间分别为 (3.00 ± 0.41) h、 (13.33 ± 1.70) h,差异具有统计学意义($t = 8.20$, $P < 0.01$),前者的最终细胞贴壁率高于后者($99.97\% \pm 0.34\%$ vs $85.83\% \pm 1.18\%$),差异具有统计学意义($t = 11.31$, $P < 0.01$)。(5)CCK-8检测显示,在培养第48~96 h,应力刺激组种子细胞的增殖能力优于非应力刺激组,将两者的450 nm吸光度值在第48小时(0.49 ± 0.02 、 0.40 ± 0.02)、72 h (0.76 ± 0.07 、 0.64 ± 0.04)和96 h (1.58 ± 0.07 、 1.34 ± 0.13)分别进行比较,差异均具有统计学意义($t = 5.15$ 、 2.57 、 2.86 , P 均 < 0.01)。(6)在成骨诱导14 d后,应力刺激组种子细胞的ALP和Ca结节染色阳性率要强于非应力刺激组:两组ALP染色阳性率分别为 $26.73\% \pm 4.56\%$ 、 $16.68\% \pm 3.89\%$,差异具有统计学意义($t = 3.33$, $P = 0.03$);两组Ca结节染色阳性率分别为 $41.81\% \pm 3.56\%$ 、 $27.40\% \pm 2.35\%$,差异具有统计学意义($t = 3.68$, $P = 0.02$)。**结论** 间歇性轴向压应力可促进组织工程骨种子细胞的黏附、增殖与成骨分化。

【关键词】 间歇性; 轴向应力; 骨髓间充质干细胞; 黏附; 增殖; 成骨分化

Intermittent axial compressive stress promotes adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of seed cells in tissue engineered bone Zhu Cong¹, Huang Guofeng², Jiang Huixiang², Wu Benwen¹, Lin Jianbiao¹, Lin Weibin¹, Gao Mingming², Ding Zhenqi¹. ¹Department of Orthopedic Surgery, Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University/909th Hospital of People's Liberation Army, Zhangzhou 363000, China; ²Department of Clinical Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China

Corresponding author: Huang Guofeng, Email: huangguofeng@xmu.edu.cn; Ding Zhenqi, Email: dingzhenqi175@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of intermittent axial compressive stress on adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of seed cells in tissue engineered bone. **Methods:** Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells that expressed green fluorescent protein were used as seed cells, a rotation training instrument was

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2018.06.003

基金项目: 国家自然科学基金(81371951); 军队后勤科研项目(CNJ16C013); 福建省自然科学基金(2016J05208)

作者单位: 363000 漳州, 厦门大学附属东南医院 中国人民解放军第909医院(全军创伤骨科中心)¹; 361102 厦门大学医学院临床医学系²

通信作者: 黄国锋, Email: huangguofeng@xmu.edu.cn; 丁真奇, Email: dingzhenqi175@163.com

used to co-culture cancellous bone scaffold and seed cells together for 7 days to obtain tissue engineered bone (TEB), then the TEB were divided into two groups. One group was subjected to cyclic uniaxial compressive stress stimulation of a magnitude of 10 N, frequency of 1 Hz, and duration of 4 hours per day from days 7 ~ 14, the other group had no stress stimulation. Finally, two groups of seed cells were obtained by trypsinization, and their ability of adhesion, proliferation and osteogenic differentiation were compared.

Results (1) Flow cytometry identification showed that rBMSCs were successfully isolated. (2) Inverted fluorescence microscope and scanning electron microscopy showed that the seed cells of TEB had good compatibility with the scaffold. (3) Results obtained from in vivo fluorescence imaging system and scanning electron microscopy showed that the growth of seed cells in stress-stimulation group was better than that in non-stress stimulation group. The average fluorescence density and cell number / 500-fold visual field of the former were larger than the latter, and the difference was statistically significant (average fluorescence density: $(3.75 \pm 0.34) \times 10^8$ vs $(2.91 \pm 0.22) \times 10^8$, $t = 2.90$, $P = 0.04$; cell number / 500-fold visual field: 30.50 ± 4.43 vs 21.00 ± 5.13 , $t = 3.14$, $P = 0.01$). (4) Cell adhesion experiments showed that cell attachment time of 75 % seed cells in stress-stimulation group. With the time of (3.00 ± 0.41) h and (13.33 ± 1.70) h respectively, the difference was statistically significant ($t = 8.20$, $P < 0.01$). Besides, the final cell adherence rate of the former was significantly higher than the latter ($99.97 \% \pm 0.34 \%$ vs $85.83 \% \pm 1.18 \%$), and the difference was statistically significant ($t = 11.31$, $P < 0.01$). (5) CCK-8 assay showed that the seed cells of the stress-stimulation group proliferated more rapidly than those of the non-stress stimulation group during the 48 th - 96 th h, and the 450 nm absorbance values were as follows: at the 48 th h, the values were 0.49 ± 0.02 and 0.40 ± 0.02 respectively, at the 72 th h, the values were 0.76 ± 0.07 , 0.64 ± 0.04 , at the 96 th h, the values were 1.58 ± 0.07 , 1.34 ± 0.13 , and the difference was statistically significant ($t = 5.15$, 2.57 , 2.86 , $P < 0.05$). (6) After 14 days since osteogenic induction, the positive rate of ALP and Ca nodule staining in seed cells of stress-stimulation group was significantly higher than that in non-stress stimulation group. The positive rates of ALP staining in the two groups were $26.73 \% \pm 4.56 \%$ and $16.68 \% \pm 3.89 \%$ respectively, and the difference was statistically significant ($t = 3.33$, $P = 0.03$). The positive rate of Ca nodule staining in the two groups were $41.81 \% \pm 3.56 \%$ and $27.40 \% \pm 2.35 \%$ respectively, and the difference was statistically significant ($t = 3.68$, $P = 0.02$).

Conclusion Intermittent axial compressive stress stimulation could accelerate adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of seed cells in TEB.

【Key words】 Intermittent; Axial stress; Bone marrow mesenchymal stem cells; Adhesion; Proliferation; Osteogenic differentiation

大段骨缺损的治疗是临床上的一个难题^[1]。自体骨移植是目前最常见的方法之一,但是存在供体骨有限,造成新的损伤等问题。组织工程骨(tissue engineered bone, TEB)移植是目前被认为最有前景的替代治疗方法^[2],其促进骨缺损修复的效果已在基础实验和临床研究中得到初步证实^[3-4]。

生物体内骨的生长与塑形受到机械应力刺激的调控^[5],发生骨折或骨缺损时,局部应力刺激环境的改变导致骨的修复受到影响。研究表明,对骨折或骨缺损部位施加适当的机械应力刺激可有效促进骨折愈合^[6-7]。前期研究发现,间歇性轴向压应力刺激可有效促进骨折的愈合,并根据此原理研制

出了叩击式机械应力刺激仪^[8],实验证实该仪器产生的间歇性轴向压应力对骨折与骨缺损的愈合具有良好的促进作用^[8-10]。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种储存于人体内的多能干细胞,是TEB最常用的种子细胞之一^[11]。有研究表明,适当的压应力可增强骨折部位MSCs中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性及I型胶原含量,促进MSCs及成骨细胞胞外基质合成^[12],从而促进骨折愈合;但在发生骨缺损时,这种间歇性轴向压应力通过何种途径对骨缺损的修复产生干预尚不明确。由于MSCs在骨损伤的修复中起到了关键作用,因

此本实验就间歇性轴向压应力对 TEB 种子细胞黏附、增殖和成骨分化能力的影响进行探索,以求探明其机制。

材料和方法

一、主要材料

1. 实验动物: 清洁级新西兰兔购自厦门大学实验动物中心。

动物伦理声明: 本文中所有动物实验由厦门大学附属东南医院(中国人民解放军第 909 医院)伦理委员会批准,同时遵循国际医学科学组织理事会颁布的《涉及动物的生物医学研究的国际指导原则》。

2. 试验试剂及耗材: 兔骨髓间充质干细胞(rabbit bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs)分离液(天津灏洋生物科技有限公司), DMEM/高糖培养基、青霉素/链霉素(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),乙醚(广东西陇化工股份有限公司),环氧乙烷(中国国药集团化学试剂有限公司), CD45 抗体(美国 Acris Antibodies 公司), CD44 抗体(美国 BD 公司), CD34 (美国 Thermo Fisher 公司), CD29 抗体(美国 Millipore Corporation 公司),山羊抗鼠二抗(江苏联科生物公司),携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)慢病毒(上海吉玛公司), CCK-8 (北京全式金公司),甘油磷酸钠、地塞米松、维生素 C (大连美仑公司)、ALP 和 Ca 结节染色试剂盒(北京雷根公司)。

3. 主要仪器: 细胞培养箱培养箱(美国 REVCO 公司),流式细胞仪(美国 Beckman 公司),高端分选流式细胞仪(美国 Beckman 公司),倒置生物显微镜(厦门麦克奥迪实业集团有限公司),旋转细胞培养仪(美国 Amersham Biosciences 公司),叩击式骨应力刺激仪(中国专利号: CN1803117, 厦门大博颖精医疗器械公司),场发射扫描电子显微镜(德国卡尔·蔡司股份公司),活体荧光成像系统(美国 INDEC BioSystems 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

二、方法

1. rBMSCs 的提取与分离: 用无菌骨髓针从 2 个月大的新西兰兔(800~1 200 g)髌骨中取 5 ml 红骨髓,立即用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗混匀骨髓液,而后以 250×g 离心 10 min,收集底层沉淀,再用 PBS 将细胞吹散调整至浓度为 $2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ /ml 备用。将 5 ml rBMSCs 分离液加入 15 ml 离心管,再将 3 ml 上述细胞悬液小心加至分离液上层,

以 450×g 离心 30 min,将单核细胞层收集至 15 ml 离心管, PBS 清洗 2 遍,最后收集细胞于含有 MSC 完全培养基(DMEM/高糖培养基+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素)的培养皿中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。

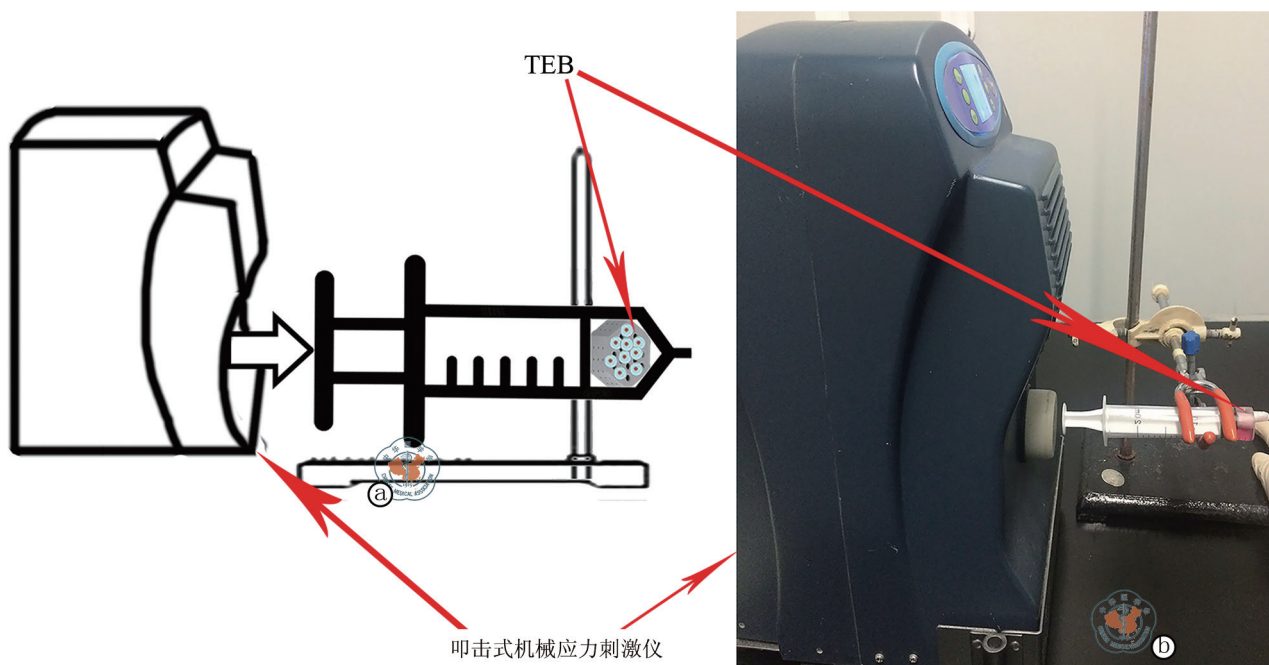
2. rBMSCs 表面分子的鉴定: 将第三代(passage 3, P3) rBMSCs 调整至浓度为 1×10^6 /ml,而后按照说明书用 CD45、CD44、CD34、CD29、山羊抗鼠二抗对其进行荧光着色,最后用流式细胞仪进行检测,用 CytExpert 软件进行数据分析。

3. 可稳定表达 GFP 的 rBMSCs 的构建: 将 P2 代 rBMSCs 浓度调整为 1×10^5 /ml, 2 ml/孔种植于 6 孔板,放置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。24 h 后用 MSC 完全培养基换液,添加携带 GFP 基因的慢病毒(感染复数 = 100)放置原培养箱培养,12 h 后弃去含病毒液培养基,加入 MSCs 完全培养基培养,2~3 d 后观察细胞荧光表达情况并用高端分选流式细胞仪对其分选,留取高表达 GFP 的细胞作为示踪种子细胞进行培养。

4. TEB 的构建: 取 6 个月大的小牛股骨头松质骨,将其切割成直径 8 mm、长 15 mm 的圆柱体样品,将样品置入质量百分比为 20%过氧化氢中脱蛋白 72 h (37℃下水浴箱孵育),再用乙醚循环脱脂 48 h,制成有密集微孔的脱蛋白脱脂松质骨支架(deproteinized and defatted cancellous bone scaffolds, DCBS),然后冷冻干燥,用环氧乙烷消毒后密封保存备用。将 P3 代稳定表达 GFP 的 rBMSCs 浓度调整为 3×10^5 /ml, 10 ml/管盛于 15 ml 离心管中,放入一块 DCBS,运用旋转细胞培养仪旋转培养,旋转参数为 20 r/min,持续 7 d。用倒置荧光显微镜及扫描电镜观察 TEB 中 rBMSCs 与 DCBS 的相容性。

5. 间歇性轴向压应力的添加: 运用叩击式机械应力刺激仪在第 7~14 天对实验组施加大小 10 N、频率 1 Hz、每次持续时间 5 s、间隔时间 3 s、4 h/d 的间歇性轴向压应力刺激(图 1)^[9],对照组常规培养无应力刺激。

6. TEB 生长状况的观察: 取应力刺激组和非应力刺激组 TEB 分别放置于 12 孔板中,每孔竖直放置一块 TEB 并做好标记,加适量 PBS 将支架充分浸润,用活体荧光成像系统观察并比较两组荧光强度。再将两组 TEB 各切取 5 mm×5 mm×5 mm 的组织块,4%多聚甲醛固定 3 h,然后用 PBS 洗涤 3 次,乙醇溶液脱水,干燥后,用叔丁醇脱水固定 4℃过夜,对样品进行包金和包膜。最后扫描电镜观察。细胞数/每 500 倍视野被用来统计比较两组种子细



注: a 图为间歇性轴向压应力施加于 TEB 的示意图; b 图为间歇性轴向压应力施加于 TEB 的实物图

图 1 间歇性轴向压应力施加于 TEB 的过程

胞的生存状态。

7. 种子细胞贴壁率的检测: 用 0.25 % 的胰蛋白酶消化法分别获取应力刺激组与非应力刺激组种子细胞, 将细胞按照 80 个/9 cm 培养皿比例分别种于 12 皿 9 cm 培养皿。每 2 小时各取出一皿, 观察并计数贴壁细胞数(细胞集落数), 每一个单独细胞集落计数为 1 个贴壁细胞。细胞贴壁率 = (贴壁细胞数 / 80) × 100 %。

8. 种子细胞增殖能力检测: 用同上方法获取两组种子细胞, 将细胞浓度调整为 2×10^4 /ml, 每孔 100 μ l 种植于 96 孔板, 放于 37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 培养箱。第 24、48、72 和 96 h, 分别按 10 μ l/孔的量将 CCK-8 试剂添加到相应孔内, 在 37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 培养箱孵育 2 h 后用酶标仪检测 450 nm 的吸光度值 (absorbance 450nm, A450)。

9. 种子细胞成骨能力检测: 用同上方法获取两组种子细胞, 将细胞浓度调整为 1×10^5 /ml, 2 ml/孔种植于 6 孔板, 放置培养箱培养。24 h 后弃去原培养基, 每孔添加 2 ml 预先配好的成骨诱导培养基(含有 10 % FBS 的 DMEM/高糖培养基、 10^{-2} mol/L 甘油磷酸钠、 10^{-7} mol/L 地塞米松、 3×10^{-4} mol/L 维生素 C), 诱导培养基每 2 天换液。而后按照说明书采用改良的钙钴染色法和茜素红染色法对诱导形成的 ALP 及 Ca 结节进行染色, 采用 Image Pro Plus 软件计算染色阳性率(positive rate of dyeing, PRD), 对两组 ALP 和 Ca 结节的表达量进行比较。

三、统计学分析方法

采用 Prism 5.0 统计软件进行统计分析, SUV_{\max} 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表达。有无应力刺激两组间的 SUV_{\max} 比较采用两独立样本 t 检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

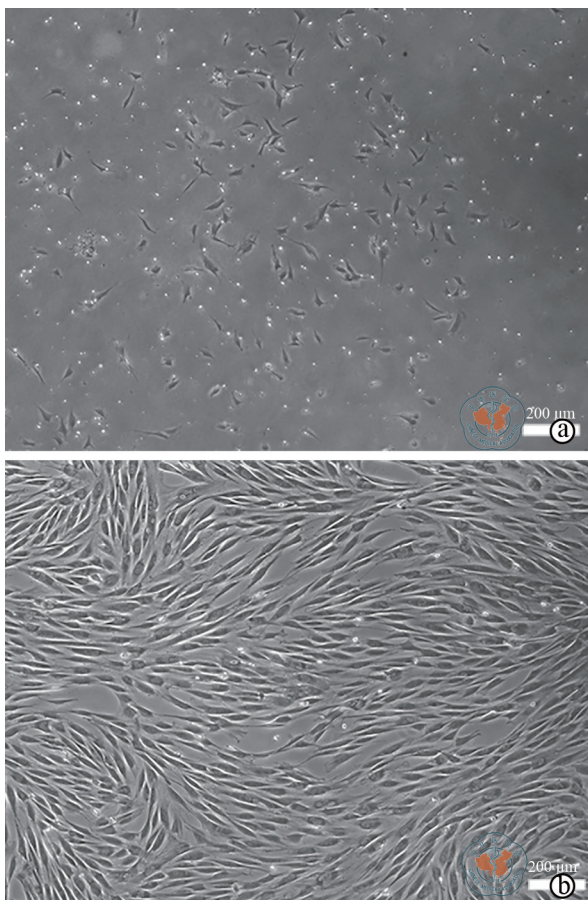
结 果

一、倒置生物显微镜观察及流式细胞术检测结果显示 rBMSCs 被成功提取

倒置生物显微镜观察显示, 刚生长出的 rBMSCs 呈梭形、三角形或圆形, 散在分布(图 2a), 成熟的 P3 代 rBMSCs 呈梭形或流线型, 紧密排列(图 2b)。流式细胞术检测结果显示, 提取的 MSC 高表达 CD44、CD29 分子(> 95 %), 低表达 CD45、CD34 分子(<10 %, 图 3)。该结果证实 rBMSCs 被成功提取分离。

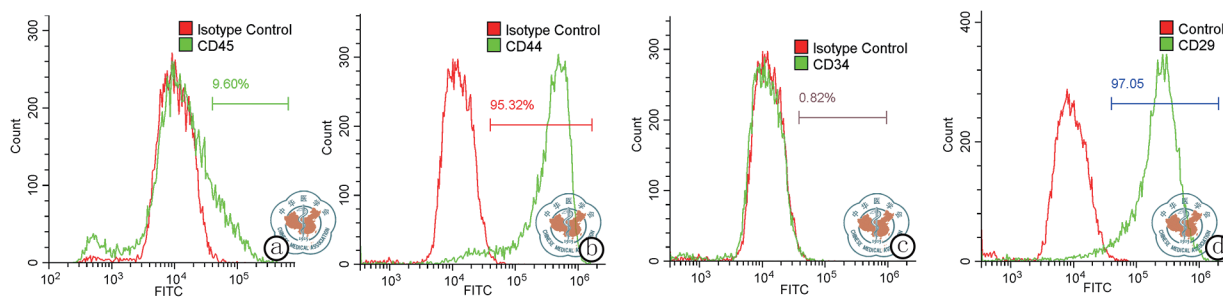
二、倒置荧光显微镜和扫描电镜结果显示 TEB 中种子细胞与支架相容性良好

倒置荧光显微镜显示, rBMSCs 被成功转染导入 GFP 基因从而表达 GFP (图 4a), 经分选后 GFP 的表达增强(图 4b)。扫描电镜显示, DCBS 为疏松多孔的结构(图 4c)。在 DCBS 与 rBMSCs 通过旋转细胞培养仪共培养后(图 4d), 倒置荧光显微镜和扫描电镜观察显示 rBMSCs 紧密黏附于 DCBS 上(图 4e、f), 这表明种子细胞与支架相容性良好。



注: a 图为刚生长出的 rBMSCs 呈梭形、三角形或圆形, 散在分布; b 图为 P3 代的 rBMSCs 呈梭形或流线型, 紧密排列

图 2 倒置生物显微镜下 rBMSCs 的形态(×60)



注: a~d 图为 P3 代 rBMSCs 表面分子 CD45、CD44、CD34、CD29 流式鉴定结果(空白对照或同型对照组用红色标示, 目的分子标记组用绿色标示)

图 3 rBMSCs 的表面分子流式鉴定结果

表 1 两组种子细胞生存活性、增殖及成骨分化能力评估指标比较($\bar{x} \pm s$)

分组	平均荧光密度	细胞数 / 每 500 倍视野	吸光度值			染色阳性率(%)	
			48 h	72 h	96 h	ALP	Ca
应力刺激组	$(3.75 \pm 0.34) \times 10^8$	30.50 ± 4.43	0.49 ± 0.02	0.76 ± 0.07	1.58 ± 0.07	26.73 ± 4.56	41.81 ± 3.56
非应力刺激组	$(2.92 \pm 0.22) \times 10^8$	21.00 ± 5.13	0.40 ± 0.02	0.64 ± 0.04	1.34 ± 0.13	16.68 ± 3.89	27.40 ± 2.35
<i>t</i> 值	2.90	3.14	5.15	2.57	2.86	3.33	3.68
<i>P</i> 值	0.04	0.01	< 0.05	0.04	0.03	0.03	0.02

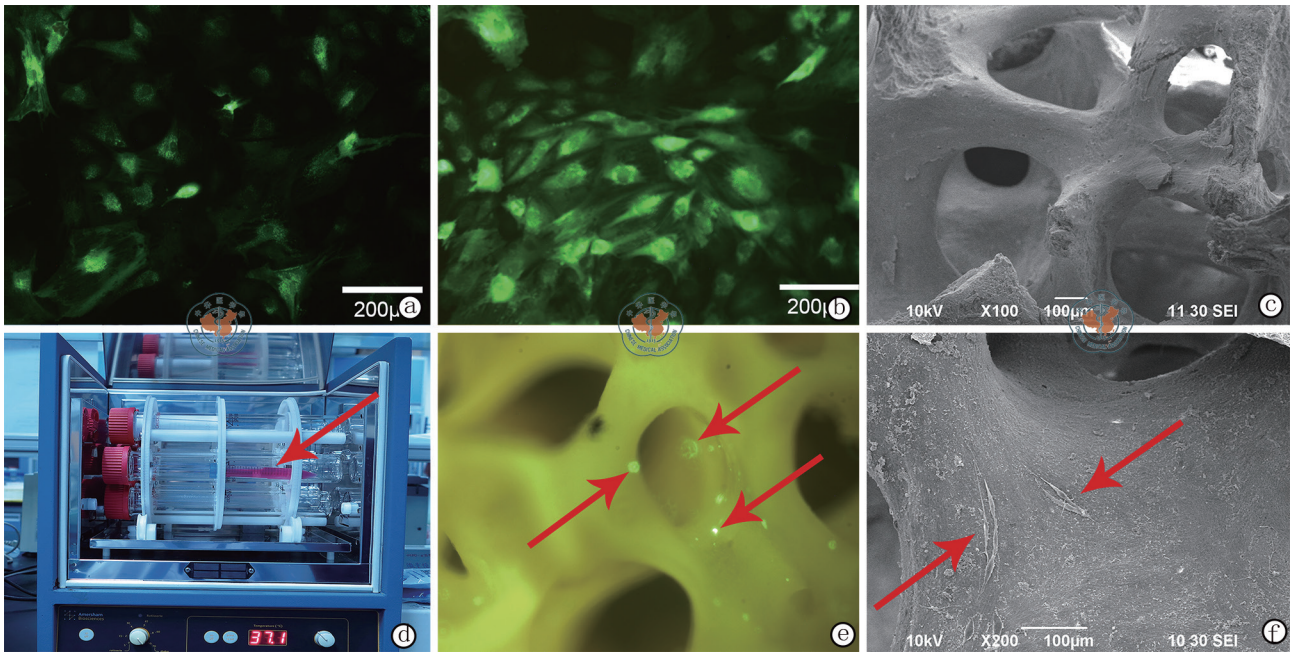
三、活体荧光成像系统和扫描电镜结果显示应力刺激组种子细胞生存情况优于非应力刺激组

活体荧光成像系统结果显示, 非应力刺激组 TEB 的荧光强度要弱于应力刺激组(图 5), 对两组平均荧光密度进行比较, 差异具有统计学意义 ($t = 2.90, P = 0.04$, 表 1), 这表明应力刺激组支架中种子细胞的生长状况要优于非应力刺激组。扫描电镜同样显示, 应力刺激组支架表面种子细胞的生长状况要优于非应力刺激组(图 6), 对两组细胞个数 / 每 500 倍镜视野比较, 差异具有统计学意义 ($t = 3.14, P = 0.01$, 表 1)。

四、细胞黏附实验结果显示应力刺激组种子细胞黏附能力强于非应力刺激组

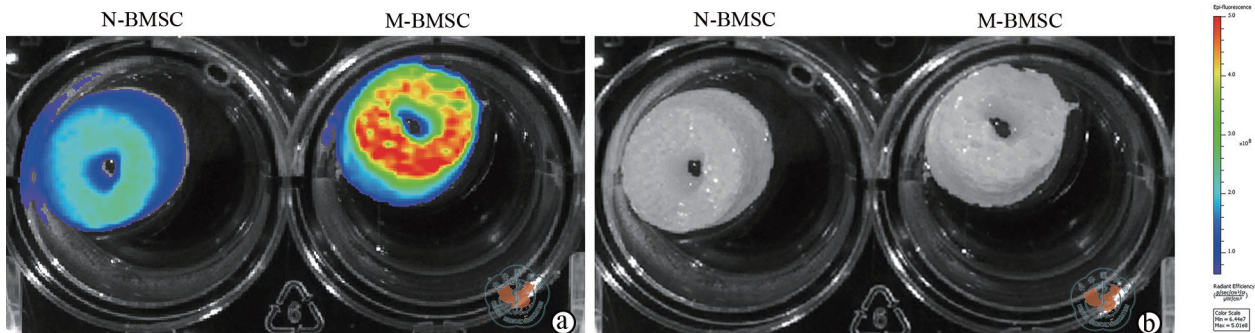
细胞黏附实验结果显示, 应力刺激组种子细胞在铺板 2 h 内约一半以上细胞完成贴壁, 在铺板后 10 h 内, 几乎所有的细胞已完成贴壁; 而非应力刺激组在铺板后 2 h 内只有近 25% 的细胞完成了贴壁, 在铺板后 10 h 内, 也大概只有 75% 的细胞完成了贴壁。应力刺激组 75% 细胞贴壁时间明显短于非应力刺激组, 两组时间分别为 (3.00 ± 0.41) h、 (13.33 ± 1.70) h, $t = 8.20, P < 0.01$, 差异具有统计学意义; 且前者的最终细胞贴壁率高于后者 $(99.97\% \pm 0.34\% \text{ vs } 85.83\% \pm 1.18\%)$, 差异具有统计学意义 ($t = 11.31, P < 0.01$, 图 7)。

五、CCK-8 检测结果显示应力刺激组种子细胞增殖能力强于非应力刺激组



注: a 图为流式分选前表达 GFP 的 rBMSCs (×150); b 图为流式分选后高表达 GFP 的 rBMSCs (×150); c 图为扫描电镜下 DCBS 的疏松多孔结构 (×100); d 图为组织工程骨的构建过程(箭头指示 TEB); e 图为倒置荧光显微镜下 TEB 种子细胞紧密黏附于 DCBS 表面及内部(×40), 箭头指示表达 GFP 的 rBMSCs; f 图为扫描电镜下 TEB 种子细胞紧密黏附于 DCBS 表面(×100) 箭头指示种子细胞

图 4 示踪种子细胞的构建及 TEB 的构建与验证



注: a 图为荧光激发条件下非应力刺激组与应力刺激组 TEB 荧光表达图像, 可见应力刺激组 TEB 荧光强度明显强于非应力刺激组; b 图为普通光照条件下非应力刺激组与应力刺激组 TEB 图像。N-BMSC 示非应力刺激组, M-BMSC 示应力刺激组

图 5 活体荧光成像系统下非应力刺激组与应力刺激组 TEB 培养 1 周后荧光强度比较

CCK-8 检测提示, 在第 24 小时, 应力刺激组与非应力刺激组 A450 无明显差异, 在而后的第 48 小时到第 96 小时, 应力刺激组 A450 均高于非应力刺激组, 对两者的 A450 在第 48、72 和 96 小时分别进行比较, 差异均具有统计学意义($t = 5.15、2.57、2.86, P 均 < 0.05$, 表 1)。且随着时间延长, 两组 A450 的差距越来越大(图 8)。这说明应力刺激组种子细胞的增殖能力强于非应力刺激组。

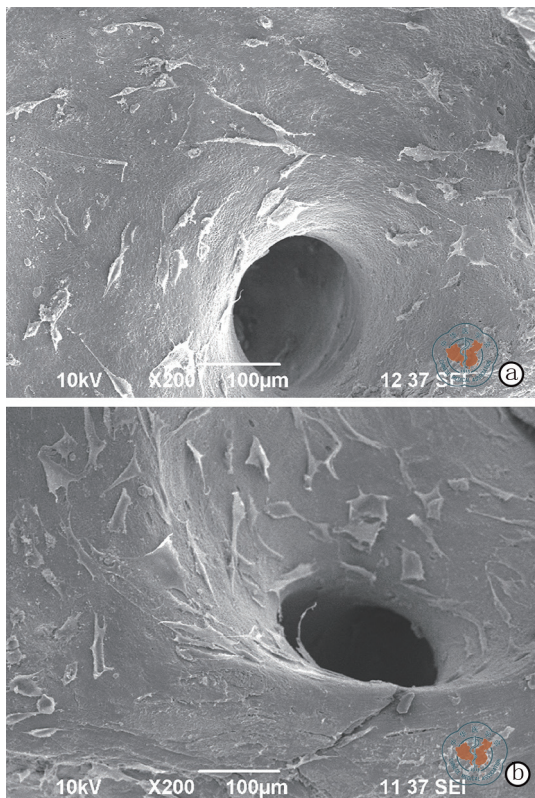
六、成骨诱导染色结果显示应力刺激组种子细胞成骨分化能力强于非应力刺激组

在经 14 d 的成骨诱导后, 对非应力刺激组及应力刺激组 ALP 及 Ca 结节进行染色分析, 结果显示非应力刺激组形成 ALP 和 Ca 结节均少于应力刺激组(图 9, 10), 对两组 ALP 与 Ca 结节的 PRD 分别

进行比较($t = 3.33、3.68, P 均 < 0.05$, 表 1), 这说明在种子细胞的成骨分化能力方面, 应力刺激组要强于非应力刺激组。

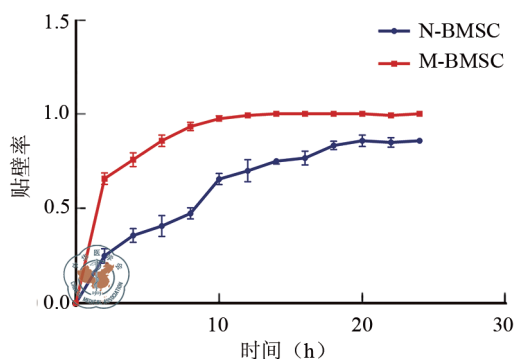
讨 论

前期研究发现, 大小 15 N、频率 1 Hz、4 h/d 的间歇性轴向压应力联合 DCBS 可促进兔骨缺损的修复^[9], 在本实验中, 考虑支架直接受力缺乏软组织的支撑作用, 应力大小被调整为 10 N, 实验证实该应力切实可行。其他学者也有用不同参数的周期性压应力进行研究: Shigao 等^[13] 将大鼠成骨细胞植入 I 型胶原海绵支架构建 TEB, 对其施加正弦压缩变形峰值为 0.2%, 频率分别为 0.2, 2, 10, 20, 40,



注: a 图为非应力刺激组培养 1 周后 TEB 表面种子细胞生存情况, 可见支架表面部分有种子细胞黏附; b 图为应力刺激组培养 1 周后 TEB 表面种子细胞生存情况, 可见支架表面绝大部分有种子细胞黏附; 两图比较可知应力刺激组种子细胞生存状况明显优于非应力刺激组

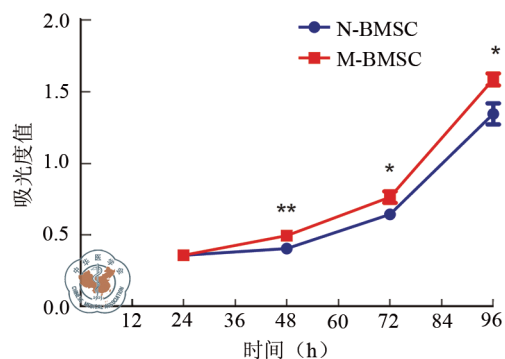
图 6 扫描电子显微镜下培养 1 周后两组种子细胞在 TEB 支架表面生存情况(×200)



注: 横轴为时间, 纵轴为种子细胞贴壁率, N-BMSC 示非应力刺激组, M-BMSC 示应力刺激组

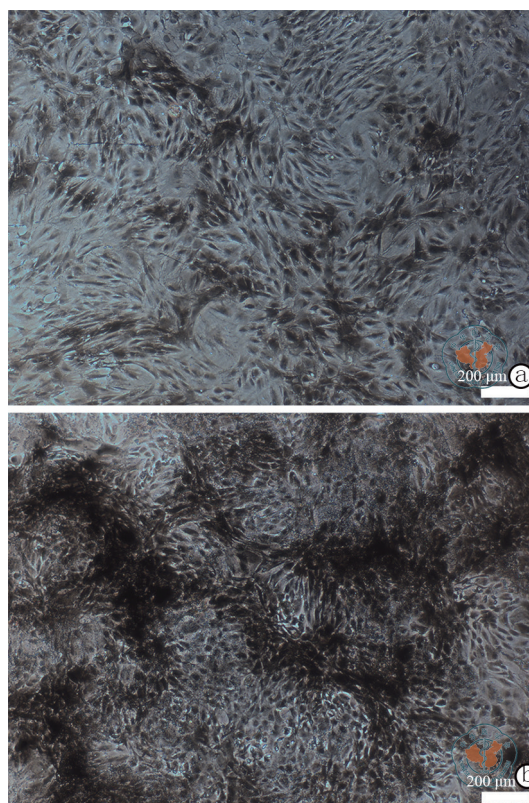
图 7 非应力刺激组与应力刺激组种子细胞贴壁率比较

60 Hz, 3 min/d 的压应力连续 14 d, 发现该应力可有效促进种子细胞矿化成骨, 且频率为 2 Hz 时效果最明显; Liu 等^[14]将产生 10 % 弹性形变, 频率 0.5 Hz, 2 h/次, 4 次/d, 4 h/ 每间隔的周期性压应力施加于聚氨酯支架与人 BMSCs 构建的 TEB, 发现 2 周后 BMSCs 增殖能力增强; Ravichandran 等^[15]对 TEB 施加生理应变值为 0.22 %, 频率 1 Hz, 4 h/d, 持续



注: 横轴为时间, 纵轴为种子细胞在 450 nm 波长处的吸光度值, N-BMSC 示非应力刺激组, M-BMSC 示应力刺激组; * 为 $P < 0.05$, ** 为 $P < 0.01$

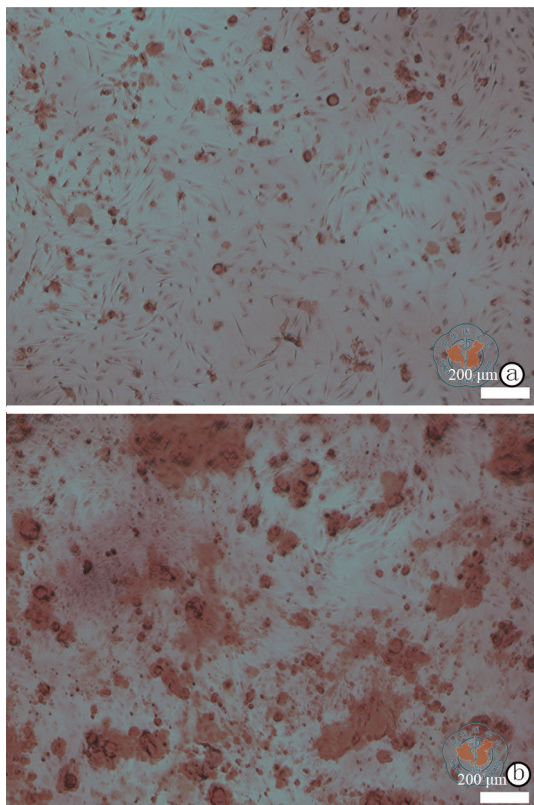
图 8 非应力刺激组与应力刺激组种子细胞在 450 nm 波长处的吸光度值比较



注: a 图为非应力刺激组种子细胞成骨诱导 2 周后 ALP 染色结果, 可见部分区域被染为灰褐色, 表明该处有 ALP 表达; b 图为非应力刺激组种子细胞成骨诱导 2 周后 ALP 染色结果, 可见大部分区域被染为灰褐色, 表明该处有 ALP 表达; 两图比较可知应力刺激组种子细胞成骨诱导 2 周后 ALP 的表达量优于非应力刺激组

图 9 倒置生物显微镜下非应力刺激组与应力刺激组种子细胞成骨诱导后 ALP 染色结果(改良 Gomori 钙钴法染色, ×60)

4 周的周期性压应力, 发现该应力可增强种子细胞的矿化成骨; 他们得出的结论与本实验得出的结论相类似。尽管本实验证实大小 10 N、频率



注: a 图为非应力刺激组种子细胞成骨诱导 2 周后 Ca 结节染色结果, 可见部分区域被染为橘红色, 表明该处有 Ca 结节表达; b 图为非应力刺激组种子细胞成骨诱导 2 周后 Ca 结节染色结果, 可见大部分区域被染为褐色, 表明该处有 Ca 结节表达; 两图比较可知应力刺激组种子细胞成骨诱导 2 周后 Ca 结节的表达量优于非应力刺激组

图 10 倒置生物显微镜下非应力刺激组与应力刺激组种子细胞成骨诱导后 Ca 结节染色结果(茜素红染色, $\times 60$)

1 Hz、4 h/d 的周期性单轴向压应力对增强 TEB 种子细胞的黏附增殖及成骨分化能力切实有效, 但此参数是否为最适宜参数尚不确定。

也有研究表明, 压应力刺激促进骨损伤的修复主要是通过促进 MSCs 向软骨分化间接实现的: Youngmee 等^[16]利用聚 L-丙交酯-己内酯和 rBMSCs 构建 TEB, 对其施加产生 5% 弹性形变, 频率 0.1 Hz, 10 d 的压应力刺激, 发现该应力刺激可促进 rBMSCs 向软骨细胞分化。这些结果上的差异可能与 TEB 的构建和应力刺激参数及作用时间的长短不同有关。Brunellia 等^[17]运用聚己酸内酯和细胞基质类似物制造的支架与人类胚胎中胚层祖细胞共培养构建 TEB, 对其施加产生 5% 弹性形变及 1% 弹性形变的周期性压应力, 发现在培养初期, 循环载荷抑制了局部的矿物沉积; 但在培养后期, 循环载荷会诱导矿物的形成。这也说明了应力刺激作用的时间不同其对 TEB 产生的影响也不相同。

机械应力刺激诱导 MSCs 的成骨分化受到多种分子及多条信号通路的共同调控。有研究指出 β -连

环蛋白, YAP 和 MKL1-SRF 旁路途经对于胞外应力刺激向胞内的起到了关键作用^[18]。Chen 等^[19]研究证实 AMPK-SIRT1 旁路途经在拉伸应力诱导 MSCs 成骨分化过程中起到了重要的调节作用。Song 等^[20]研究发现, 机械应力刺激可通过 PI3K/Akt/GSK-3 β / β -连环蛋白旁路途经促进 MSCs 的成骨分化。随着研究深入, 更多的调节因子及信号通路将被发现, 但目前该种应力刺激是通过何种分子机制促进 MSCs 向成骨分化尚不明确, 仍有待进一步研究。

本实验证实了机械应力刺激可促进 TEB 种子细胞的黏附增殖及成骨分化, 结合动物实验结果, 这种应力刺激可能是通过增强 TEB 中种子细胞的黏附能力、增殖能力及成骨分化能力从而促进骨缺损的修复, 这为临床上将该种应力刺激与 TEB 相结合治疗骨缺损提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- 1 Molina CS, Stinner DJ, Obremsky WT. Treatment of traumatic segmental Long-Bone defects: a critical analysis review[J]. JBJS Rev, 2014, 2(4).
- 2 Roseti L, Parisi V, Petretta M, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017, 78:1246-1262.
- 3 Poblath AM, Johnson KA, Schell H, et al. Establishment of a preclinical ovine screening model for the investigation of bone tissue engineering strategies in cancellous and cortical bone defects[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17:111.
- 4 Roddy E, Debaun MR, Daoud-Gray A, et al. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives[J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2018, 28(3):351-362.
- 5 Chen JH, Liu C, You LD, et al. Boning up on Wolff's law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone[J]. J Biomech, 2010, 43(1, SI):108-118.
- 6 Jagodzinski M, Krettek C. Effect of mechanical stability on fracture healing - an update[J]. Injury, 2007, 38 Suppl 1:S3-10.
- 7 Lee SH, Moon JH, Jeong CM, et al. The mechanical properties and biometrical effect of 3D preformed titanium membrane for guided bone regeneration on alveolar bone defect[J]. Biomed Res Int, 2017:7102123.
- 8 Yao JF, Shen JZ, Li DK, et al. Rap system of stress stimulation can promote bone union after lower tibial bone fracture: a clinical research[J]. Int J Med Sci, 2012, 9(6):462-466.
- 9 Huang G, Liu G, Zhang F, et al. Combination of heel-strike like mechanical loading with deproteinized cancellous bone scaffold implantation to repair segmental bone defects in rabbits[J]. Int J Med Sci, 2017, 14(9):871-879.
- 10 黄国锋, 陈奇, 叶永贤, 等. 骨应力刺激仪叩击治疗促进兔胫骨缺损内成骨及支架降解的实验研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2016, 18(10):895.
- 11 Radtke CL, Nino-Fong R, Esparza GB, et al. Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue-and periosteal tissue-

- derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 2013, 74(5):790-800.
- 12 Bosetti M, Sabbatini M, Nicoli E, et al. Effects and differentiation activity of IGF-I, IGF-II, insulin and preptin on human primary bone cells[J]. Growth Factors, 2013, 31(2):57-65.
- 13 Tanaka SM, Tachibana K. Frequency-Dependence of mechanically stimulated osteoblastic calcification in Tissue-Engineered bone *in vitro*[J]. Ann Biomed Eng, 2015, 43(9):2083-2089.
- 14 Liu C, Abedian R, Meister R, et al. Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds[J]. Biomaterials, 2012, 33(4):1052-1064.
- 15 Ravichandran A, Lim J, Chong M, et al. *In vitro* cyclic compressive loads potentiate early osteogenic events in engineered bone tissue[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017, 105(8):2366-2375.
- 16 Jung Y, Kim SH, Kim YH, et al. The effects of dynamic and three-dimensional environments on chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. Biomedical Materials, 2009, 4(5):055009.
- 17 Brunelli M, Perrault CM, Lacroix D. Short bursts of cyclic mechanical compression modulate tissue formation in a 3D hybrid scaffold[J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2017, 71:165-174.
- 18 Uzer G, Fuchs RK, Rubin J, et al. Concise review: plasma and nuclear membranes convey mechanical information to regulate mesenchymal stem cell lineage[J]. Stem Cells, 2016, 34(6):1455-1463.
- 19 Chen X, Yan JK, He F, et al. Mechanical stretch induces antioxidant responses and osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells through activation of the AMPK-SIRT1 signaling pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 126:187-201.
- 20 Song F, Jiang D, Wang T et al. Mechanical Stress Regulates Osteogenesis and Adipogenesis of Rat Mesenchymal Stem Cells through PI3K/Akt/GSK-3beta/beta-Catenin Signaling Pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 2017:6027402.

(收稿日期 :2018-10-23)

(本文编辑 :蔡晓珍)

朱聪,黄国锋,江惠祥. 间歇式轴向压应力对组织工程骨种子细胞的黏附增殖与成骨分化促进作用的研究 [J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版),2018,8(6):334-342.