脐带间充质干细胞成骨方向分化的研究

余永春[1,2]，王伟新[1,3]，孙　洁[1,4]，刘　磊[1]

（1. 四川大学口腔疾病国家重点实验室，成都　610041；
2. 广州医学院附属第一医院口腔科，广州　510120；
3. 新乡医学院第一附属医院口腔科，河南新乡　453000；
4. 广东省口腔医院正畸科，广州　510280）

摘要：目的：探讨脐带间充质干细胞向成骨细胞方向分化的潜能，为骨组织工程提供一种丰富的干细胞来源。方法：胰酶和胶原酶Ⅰ型联合消化法获得脐带间充质干细胞；免疫细胞化学法对其表面标志物进行鉴定；化学诱导法诱导脐带间充质干细胞向成骨细胞方向分化；倒置显微镜观察其形态变化；茜素红对诱导后的细胞染色。结果：胰酶和胶原酶Ⅰ联合消化法分离的细胞贴壁生长，呈现成纤维细胞形态；免疫细胞化学显示脐带间充质干细胞表达CD29，CD44和CD105，但不表达CD31，CD34和CD105；成骨诱导后的脐带间充质干细胞逐渐聚集生长，在聚集细胞中央形成结节样团块；茜素红染色显示结节为钙化物。结论：脐带间充质干细胞具有向成骨细胞方向分化的潜能，为骨组织工程提供了一种来源丰富、免疫力低和低分化的种子细胞。

关键词：口腔颌面外科学；成骨分化；化学诱导；脐带间充质干细胞
中图分类号：R329　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2013)11-1040-06

Study on osteogenic differentiation potential of umbilical cord mesenchymal stem cells

YU Yongchun[1,2], WANG Weixin[1,3], SUN Jie[1,4], LIU Lei[1]

(1. *State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu* 610041, *China*;
2. *Department of Stomatolgoy, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou* 510120, *China*;
3. *Department of Stomatolgoy, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan* 453000, *China*;
4. *Department of Orthodontics, Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou* 510280, *China*)

Abstract: Objective: To explore the osteogenic differentiation potential of umbilical cord mesenchymal stem cells and provide a rich source of stem cells for bone tissue engineering. Methods: Trypsin and collagenase Ⅰ digestion method was used to obtain the umbilical cord mesenchymal stem cells. Surface markers were identified using immunocytochemical method. Chemical induction was used to induce umbilical cord mesenchymal stem cells into osteoblasts. Inverted microscope was used to observe the morphological changes. Alizarin red staining was used to stain the induced cells to check the osteogenic differentiation. Results: The cells isolated from umbilical cord using trypsin and collagenase Ⅰ digestion method showed the adherent growth and fibroblast morphology. Immunocytochemistry showed that the umbilical cord mesenchymal stem cells were positive for CD29, 40 CD44 and CD105 while negative for CD31, CD34 and CD105. Umbilical cord mesenchymal stem cells were accumulated into growth after osteogenic induction and the nodular clumps formed in the

基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金（20090181110057）；国家自然科学基金（81070802）
作者简介：余永春（1980—），男，讲师，主要研究方向：再生医学
通信联系人：刘磊，教授，主要研究方向：再生医学. E-mail：drliulei@163.com

center of the gathering cells. Then the osteogenic differentiation was determined by the production of calcium deposite detected by alizarin red staining. Conclusion: The umbilical cord mesenchymal stem cells have the osteogenic potential, which can provide the seeding cells with an abundant source, low immunity, and poor differentiation for bone tissue engineering.

Key words: oral and maxillofacial surgery; osteogenic differentiation; chemical induction; umbilical cord mesenchymal stem cells

0 引言

因外伤、肿瘤切除及发育畸形造成骨缺损的疾患，在口腔颌面部非常多见。目前，常用自体骨移植或人工骨移植解决此类疾患。然而，自体骨移植会影响供区的健康，人工骨移植面临存活较困难的问题。组织工程概念的提出为修复颌面部骨缺损提供了新的思路和方法。成骨细胞是终末分化细胞，其来源不足限制了骨组织工程的发展。寻找新的种子细胞来源，是骨组织工程需要解决的关键问题之一。骨髓间充质干细胞和脂肪干细胞在体内和体外都可成功地向成骨细胞方向分化。然而，骨髓间充质干细胞和脂肪间充质干细胞均具有一定的免疫原性，用于自体组织工程或免疫缺陷动物均可取得较理想的效果，但如用于异体植入则可引发一定程度的免疫排斥反应，严重者可导致实验失败。此外，作为成体干细胞，骨髓间充质干细胞和脂肪间充质干细胞仍然存在着来源有限、增殖能力不够强等缺点，难以构建组织工程临床化所必需的大规模干细胞库，用于临床仍具有难以克服的缺点。因此，从临床应用及产业化角度出发，寻找无免疫原性或低免疫原性、来源充足的种子细胞仍然是骨组织工程亟待解决的关键问题。脐带间充质干细胞来源于分娩过程中作为废弃物的脐带组织，其来源丰富、免疫源性低[1~3]、增殖能力强[4]、分化程度低[5~6]，有望成为骨组织工程的种子细胞。因此，研究拟在探讨脐带间充质干细胞向成骨细胞方向分化的能力，以期为骨组织工程获得理想干细胞来源提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

胶原酶Ⅰ（Sigma 公司，美国）；胰蛋白酶（Sigma 公司，美国）；DMEM/F12 培养液（Gibeo 公司，美国）；β-甘油磷酸（Sigma 公司，美国）；TritonX-100（Amresco 公司，美国）；茜素红（Sigma 公司，美国）；EDTA（Sigma 公司，美国）；兔抗人 CD29，CD31，CD34，CD44，CD45，CD105 多克隆抗体、链酶亲和素－生物素－过氧化物酶复合物（strept avidin biotinylated complex，SABC）免疫组化试剂盒和二氨基联苯胺（diaminobenzidine，DAB）显色试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司，中国）。

1.2 脐带前期准备

脐带取自成都市第九人民医院妇产科健康足月妊娠的剖宫产儿，无菌采集后在 4～6 h 内处理。

1.3 脐带间充质干细胞的分离培养

取脐带，PBS 冲洗，去除脐带动静脉和表面的羊膜。剩下沃顿胶采用 0.1%胶原酶Ⅰ消化 10～14 h，然后加 0.125%胰酶消化 30 min 后，用含胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化，分别移至 2～3 瓶含有 DMEM/F12 培养基的 T-25 培养瓶中培养，每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况，待细胞长至 80%融合后，再进行传代培养。

1.4 脐带间充质干细胞分子表面标志检测

10^4 个脐带间充质干细胞接种于预置盖玻片的六孔板中，次日待脐带间充质干细胞贴壁以后，去除原有培养基，PBS 漂洗多次直至培养基洗净，4%的多聚甲醛固定 30 min，采用免疫细胞化学对其表型进行鉴定，所用一抗为 CD31，CD34，CD45，CD29，CD44 和 CD105.

1.5 脐带间充质干细胞的体外分化

将10^4个细胞接种到六孔板中，次日弃去原有培养基，加入成骨诱导液，诱导体系含10 mmol/L β-磷酸甘油钠、10^{-8} mol/L地塞米松和50 mg/L抗坏血酸，14 d后茜素红染色。

2 结果与分析

2.1 脐带间充质干细胞的形态学观察

脐带间充质干细胞原代生长缓慢，细胞大多为梭形，如图1所示。继续传代培养后细胞生长速度加快，细胞形态均一，呈现纺锤形，如图2所示。

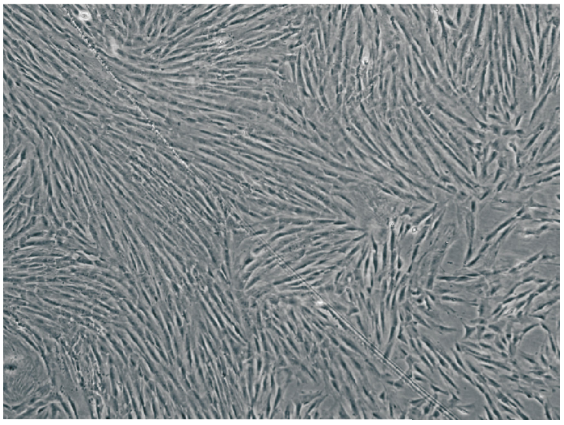

图1 原代脐带间充质干细胞（×40）
Fig. 1 Original umbilical cord mesenchymal stem cells（×40）

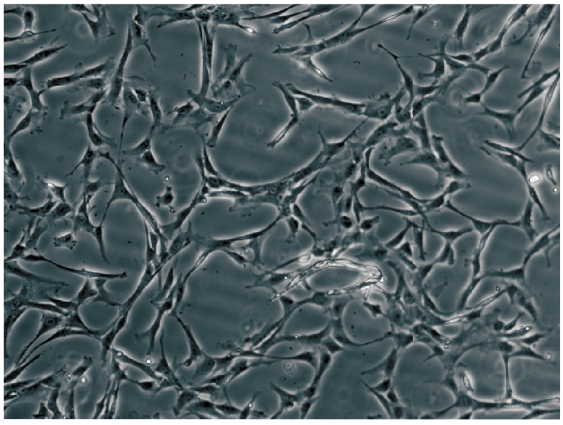

图2 第4代脐带间充质干细胞（×40）
Fig. 2 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 4（×40）

2.2 脐带间充质干细胞的免疫表型检测

对第6代细胞采用免疫组织化学染色法检测，结果显示：造血干细胞表面标志CD45和CD34表达阴性，内皮细胞特征性抗原标志CD31不表达，CD29，CD44和CD105表达阳性（如图3～图8所示）。

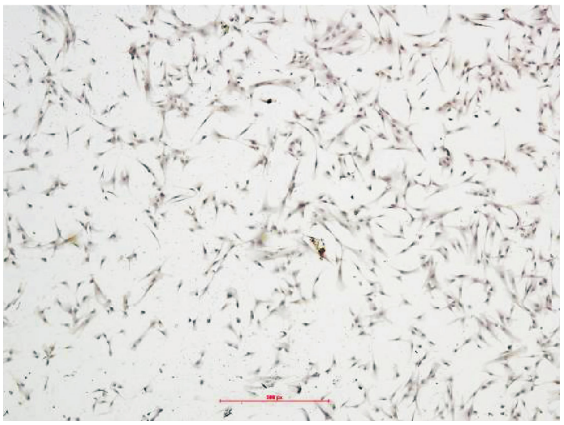

图3 第6代脐带间充质干细胞，CD31免疫组化染色阴性（×40）
Fig. 3 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 6 with negative（CD31×40）

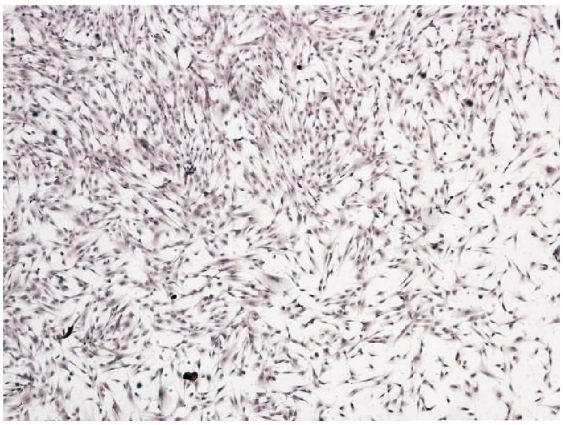

图4 第6代脐带间充质干细胞，CD34免疫组化染色阴性（×40）
Fig. 4 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 6 with negative CD34（×40）

2.3 脐带间充质干细胞的成骨诱导

成骨诱导5 d左右，细胞形态由梭形长成鳞片形、三角形或多角形等。2周时细胞生长变得密集，于中央可见到似结节状的结构，部分区域呈现出层叠样（如图9所示）。茜素红染色后，在显微镜下可观察到红色物沉积于细胞密集处，呈四周放射状的团块样，其中心的颜色较深（如图10所示），表明

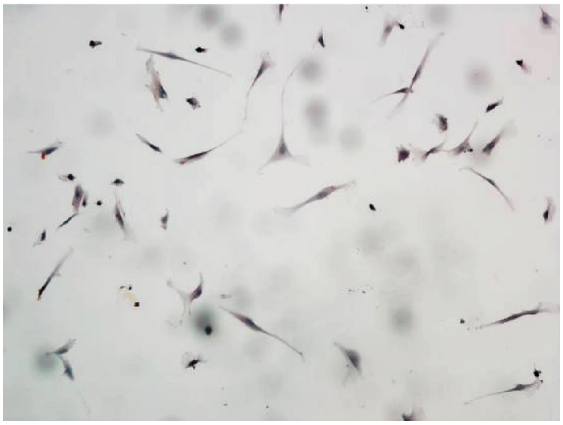

图 5 第 6 代脐带间充质干细胞，CD45 免疫组化染色阴性（×40）
Fig. 5 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 6 with negative CD45 (×40)

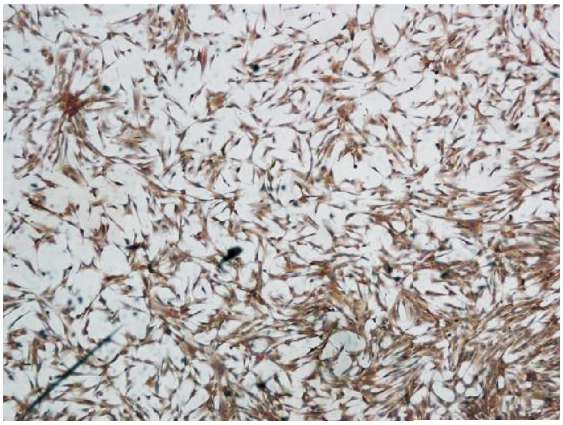

图 6 第 6 代脐带间充质干细胞，CD29 免疫组化染色阳性（×40）
Fig. 6 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 6 with positive CD29 (×40)

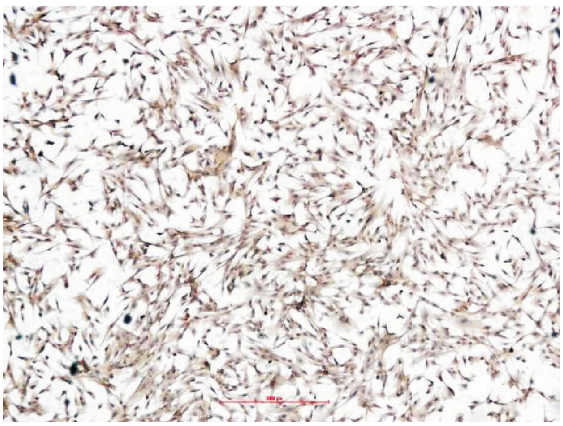

图 7 第 6 代脐带间充质干细胞，CD44 免疫组化染色阳性（×40）
Fig. 7 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 6 with negative CD44 (×40)

图 8 第 6 代脐带间充质干细胞，CD105 免疫组化染色阳性（×40）
Fig. 8 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 6 with negative CD105 (×40)

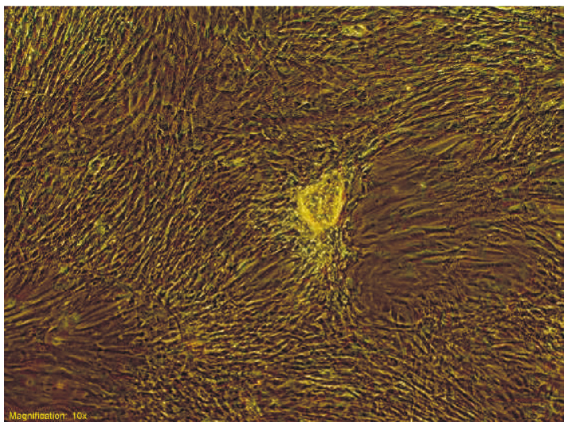

图 9 第 6 代脐带间充质干细胞成骨诱导 2 周（×40）
Fig. 9 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 6 with 2 weeks osteogenic induction (×40)

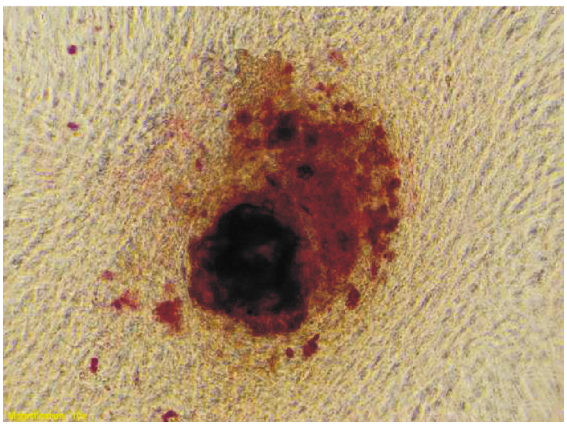

图 10 第 6 代脐带间充质干细胞成骨诱导 2 周，茜素红（×40）
Fig. 10 Umbilical cord mesenchymal stem cells of passage 6 with 2 weeks osteogenic induction, after alizarin red staining (×40)

脐带间充质干细胞在体外微环境下有成骨向分化的潜能。

3 讨论与结论

间充质干细胞首先从骨髓中发现，其必须具有表达CD105，CD73和CD90表面抗原，而不表达CD45，CD34，CD14，CD11b，CD79a，CD19和MHC-Ⅱ等抗原的特征[7]。在以往研究中，脐带间充质干细胞表达CD73，CD90和CD105[1,8]，而不表达CD31，CD34和CD45，也不表达MHC-Ⅱ[9]. 在该研究中，实验结果显示脐带间充质干细胞造血干细胞表面标志CD45和CD34表达阴性，内皮细胞特征性抗原标志CD31不表达，CD29，CD44和CD105表达阳性，表明实验成功地从脐带中分离出具有干细胞表型特征的脐带间充质干细胞。

间充质干细胞能向成骨细胞分化并不是一个自发过程，而是在一系列因子诱导下完成，这些因子包括糖皮质激素[10]、骨形态发生蛋白[11]、成骨素[12]和骨生长多肽[13]。目前，多数文献报道抗坏血酸、地塞米松和β-甘油磷酸钠组合的诱导剂可成功诱导间充质干细胞成骨向分化[14~15]。抗坏血酸是胶原合成和体外成骨所必须，主要促进胶原合成时赖氨酸和脯氨酸的羟基化，进而促进胶原基质蛋白的合成。β-甘油磷酸钠能为钙结节的形成提供足够的磷离子，促进钙结节的形成。地塞米松通过增强其受体与靶基因序列的结合而调控分化细胞中成骨基因的表达。GRIGORIADIS等[16]认为最佳的成骨诱导液为10^{-8} mol/L地塞米松、10 mmol/L的β-甘油磷酸钠和50 mg/L的抗坏血酸。PITTENGER等[17]采用上述诱导液成功诱导了干细胞向成骨细胞方向分化。本研究采用以上诱导液成功地将脐带间充质干细胞分化为成骨细胞，诱导后的细胞聚集生长，逐渐分泌出钙化物质，最后形成钙化结节。

脐带间充质干细胞因其来源广泛、增殖活性强、细胞数量多、免疫源性低、分化程度低以及无伦理学等优势，有望取代骨髓和脂肪间充质干细胞成为骨组织工程新的种子细胞来源。研究为获得理想的骨组织工程种子细胞提供了理论基础和数据支持。

[参考文献] (References)

[1] WEISS M L, MEDICETTY S, BLEDSOE A R, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease[J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 781-792.

[2] CHO P S, MESSINA D J, HIRSH E L, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells[J]. Blood, 2008, 111(1): 430-438.

[3] WEISS M L, ANDERSON C, MEDICETTY S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells[J]. Stem Cells, 2008, 26(11): 2865-2874.

[4] LU L L, LIU Y J, YANG S G, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials[J]. Haematologica, 2006, 91(8): 1017-1026.

[5] CARLIN R, DAVIS D, WEISS M, et al. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells[J]. Reprod. Biol. Endocrinol, 2006, 4: 8-21.

[6] HOYNOWSKI S M, FRY M M, GARDNER B M, et al. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells[J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, 362(2): 347-353.

[7] JAVAZON E H, BEGGS K J, FLAKE A W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging[J]. Exp. Hematol., 2004, 32(5): 414-425.

[8] WANG H S, HUNG S C, PENG S T, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1330-1337.

[9] HORWITZ E M, le BLANC K, DOMINICI M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2005, 7(5): 393-395.

[10] KAMALIA N, MCCULLOCH C A, TENEBAUM H C, et al. Dexamethasone recruitment of self-renewing

osteoprogenitor cells in chick bone marrow stromal cell cultures[J]. Blood, 1992, 79(2): 320-326.

[11] 霖霞，李玉冲. BMP-2 信号通路与成骨细胞分化[J]. 国际骨科学杂志，2009，30 (2)：132-136.
LIN X, LI Y C. The relationship between BMP-2 signaling pathway and osteoblastic differentiation[J]. International Journal of Orthopaedics, 2009, 30(2): 132-136. (in Chinese)

[12] SCOTT P B, NEELAM J, STEPHEN E H. Growth kinetics, self-renewal and osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive sub-cultivation and following cryopreser[J]. J. Cell Biochem., 1997, 64(2): 278-294.

[13] ROBINSON D, BAB I, NEVO Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells[J]. J. Bone Miner. Res., 1995, 10(5): 690-696.

[14] JAISWAL N, HAYNESWORTH S E, CAPLAN A I, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro[J]. J. Cell Biochem., 1997, 64(2): 295-312.

[15] HALVORSEN Y D, FRANKLIN D, BONO A L, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells[J]. Tissue Eng., 2001, 7(6): 729-741.

[16] GRIGORIADIS A E, HEERSCHE J N, AUBIN J E. Differentiation of muscle, fat, cartiage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived chonal cel population: effect of dexamethasone[J]. J. Cell Biol., 1998, 106(6): 2139-2151.

[17] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.