

应用细胞片层技术构建组织工程骨***

陈涛¹, 王艳辉¹, 卜令学¹, 荆恒¹, 高振华¹, 谭帅¹, 王玲玲¹, 李宁毅²

Construction of tissue-engineered bone using cell sheet technology

Chen Tao¹, Wang Yan-hui¹, Bu Ling-xue¹, Jing Heng¹, Gao Zhen-hua¹, Tan Shuai¹, Wang Ling-ling¹, Li Ning-yi²

Abstract

BACKGROUND: Traditional bone tissue engineering faces shortcomings in harvesting or transferring cells. Cell sheet technology is a new skill for cell harvesting or transferring.

OBJECTIVE: To construct tissue-engineered bone using cell sheet technology and method of traditional bone tissue engineering.

METHODS: Canine bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated with the method of density gradient centrifugation and cultured. BMSCs were induced to differentiate into osteoblasts and cultured in temperature-responsive culture dishes at 37 °C, 5% CO₂ saturated humidity. BMSCs cell sheet was prepared when temperature was changed to 20 °C; demineralized bone matrix and platelet rich plasma (PRP) were prepared. The complex of DBM/PRP/BMSCs cell sheet/BMSCs was constructed and implanted under the left latissimus dorsi muscle. The condition of osteogenesis was observed at 4, 8 and 12 weeks after operation.

RESULTS AND CONCLUSION: When temperature dropped at 20 °C, BMSCs detached automatically from the temperature-responsive culture dishes and formed an intact cell sheet. The osteogenesis of the DBM/PRP/BMSCs cell sheet/BMSCs group was better than that of the DBM/PRP/BMSCs group. Cell sheet technology combined with traditional bone tissue provides a new way for construction of functional tissue-engineered bone.

Chen T, Wang YH, Bu LX, Jing H, Gao ZH, Tan S, Wang LL, Li NY. Construction of tissue-engineered bone using cell sheet technology. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(2): 191-195.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 传统的骨组织工程学在收获和转移细胞方面仍存在诸多不足, 细胞片层技术是收获种子细胞和对种子细胞进行转移的一项新技术。

目的: 应用细胞片层技术与传统骨组织工程相结合的方法构建组织工程骨。

方法: 密度梯度离心法分离培养犬骨髓间充质干细胞, 诱导其向成骨细胞分化。将诱导后的骨髓间充质干细胞接种至温度反应性培养皿中, 先 37 °C 饱和湿度培养, 然后降温至 20 °C 制备细胞片层; 将犬脱钙骨基质/富血小板血浆/骨髓间充质干细胞细胞片层/骨髓间充质干细胞复合体植入犬左侧背阔肌下, 术后 4, 8, 12 周, 观察成骨情况。

结果与结论: 当温度降至 20 °C 时, 骨髓间充质干细胞从温度反应性培养皿上完全脱落, 形成细胞片层, 将其覆盖于犬脱钙骨基质/富血小板血浆/骨髓间充质干细胞后植入犬背阔肌下, 其成骨效果明显好于不加细胞片层对照侧。说明应用细胞片层技术与传统的骨组织工程方法相结合可构建出较理想的组织工程骨。

关键词: 细胞片层; 骨髓间充质干细胞; 温度反应性培养皿; 成骨细胞; 骨组织工程
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.02.001

陈涛, 王艳辉, 卜令学, 荆恒, 高振华, 谭帅, 王玲玲, 李宁毅. 应用细胞片层技术构建组织工程骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 15(2):191-195.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

近年来,随着组织工程研究的不断发展,原有的种子细胞及接种方法的弊端日益显现。传统的骨组织工程学广泛采用胰蛋白酶消化的方法收获和转移接种细胞,造成了细胞的大量损失和细胞活性降低,细胞利用率低,难以形成致密的骨组织。因此,骨组织工程学的进一步发展必须解决种子细胞的收获和移植接种问题。

细胞片层技术是组织工程中收获种子细胞和对种子细胞进行转移的一项新技术。实验采用细胞片层技术,利用温度反应性培养基的温度变化,收获了完整的犬骨髓间充质干细胞

(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)细胞片层,以犬脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)为支架,复合富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)后,植入犬背阔肌下,构建组织工程骨。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-04/10在青岛大学医学院附属医院中心实验室与动物实验室完成。

材料:

实验动物: 健康清洁级12~18月龄杂种犬12只,雌雄不限,体质量20~25 kg,由青岛大学医学院附属医院实验动物中心提供。实验中对

¹Department of Medical Image, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Chen Tao★, Master, Associate professor, Department of Medical Image, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Chentaojinxiang@163.com

Correspondence to: Li Ning-yi, Doctor, Professor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China
ningyili342@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30872896*; the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. Y2008C77*

Received: 2010-10-08
Accepted: 2011-01-10

¹ 青岛大学医学院附属医院医学影像科, 山东省青岛市 266003; 青岛大学医学院口腔颌面外科, 山东省青岛市 266003

陈涛★, 男, 1972年生, 山东省商河县人, 汉族, 2001年青岛大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事骨组织工程方面的研究。Chentaojinxiang@163.com

通讯作者: 李宁毅, 博士, 教授, 青岛大学医学院口腔颌面外科, 山东省青岛市 266003 ningyili342@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)02-00191-05

收稿日期: 2010-10-08
修回日期: 2011-01-10 (20100619006/WLM · Z)

动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求^[1]。

仪器和试剂:

试剂及仪器	来源
DMEM 低糖培养液	Gibco 公司, 美国
温度反应性培养皿	Nunc 公司, 日本
低温离心机	Sigma 公司, 美国
倒置显微镜	Olympus 公司, 日本
扫描电镜(JSM-840 型)	JEOL 公司, 日本
细胞培养箱	THERMO FORMA 公司, 美国

方法:

BMSCs的分离培养与诱导分化: 抽取犬骨髓 10 mL, 密度梯度离心法分离犬BMSCs^[2], 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于 50 mL 培养瓶中, 加入 10 mL 低糖DMEM培养液, 置入 37 °C 恒温, 体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内进行原代及传代培养。取第2代BMSCs, 接种于高糖DMEM成骨诱导培养基(含体积分数 15% 的胎牛血清、50 mg/L 维生素C, 10 nmol/L 地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠), 继续培养。用钙结节Von Kossa染色与茜素红染色检测成骨情况。

BMSCs细胞片层的制备: 将第4代成骨诱导后的BMSCs以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于直径为 3.5 cm 的温度反应性培养皿中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。培养皿内的BMSCs增殖融合达 90% 左右时, 将其置于 20 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养 20 min, 细胞片层脱落后, 倒置显微镜下观察细胞形态。

犬DBM的制备: 取杂种犬新鲜股骨, 去软组织、骨膜, -80 °C 超低温冰箱冷冻6个月, 脱脂、脱钙、脱非胶原蛋白, 冷冻干燥机冷冻干燥, 制备 2 cm×2 cm×5 mm 大小的犬同种异体DBM。

PRP的制备: PRP在手术的过程中同时制备。用装有 4.2 mL ACD-A 抗凝剂的 50 mL 无菌空针自股静脉分别抽取 30 mL 血液, 于 4 °C 2 000 r/min 离心 15 min, 吸取全部上清液及交界下 1.0~2.0 mm 的红细胞至另一离心管, 再以 4 000 r/min 离心 10 min, 血小板和少量红细胞沉淀在离心管底部。弃大部分上清液, 剩余液体 1 mL, 即为PRP。向其中加入凝血酶 200 μL 激活, 轻轻摇匀, 约 10 s, PRP凝成胶状物, 用于包裹DBM/BMSCs复合体。

BMSCs/BMSCs细胞片层/DBM/PRP复合体的构建: 体内植入前 24 h, 消化BMSCs将其悬液

缓慢滴于DBM上, 至DBM完全浸透, 置于 37 °C 恒温、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养 24 h, 植入体内前将PRP与制备的细胞片层刮取轻轻铺盖于DBM表面以备植入体内。

复合体的植入: 6只实验犬分为3组, 每组2只, 实验犬肌注氯胺酮(20 mg/kg)麻醉后, 双侧背部脱毛备皮消毒, 弧形切口依次切开皮肤, 浅筋膜, 向外侧翻其皮瓣, 寻找背阔肌前缘, 在背阔肌深面寻找并解剖分离出胸背动静脉束, 在其周围左侧植入BMSCs/BMSCs细胞片层/DBM/PRP(实验侧)、右侧植入BMSCs/DBM/PRP(对照侧), 逐层关闭切口, 术后1周, 每天肌注青霉素 $200 \times 10^4 \text{ U}$, 常规喂养高蛋白饲料, 术后 14 d 拆线。

成骨观察: 分别于术后 4, 8, 12 周处死 2 只犬, 行大体及组织学观察。

主要观察指标: 培养细胞的形态, 及 BMSCs/BMSCs 细胞片层/DBM/PRP 复合体植入体内的成骨情况。

设计、实施、评估者: 实验设计与实施为第一、四、五、六、七作者, 评估为第二、三、八作者, 均受过系统培训。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验纳入 12 只杂种犬, 6 只用于 BMSCs 及同种异体 DBM 的制备, 剩余 6 只用于复合体的植入观察成骨情况, 用于观察成骨的 6 只犬均进入结果分析。

2.2 培养细胞及细胞片层的形态

原代培养的BMSCs: 原代培养 24 h, 可见少量细胞贴壁, 贴壁细胞呈多角形、椭圆形或多形性生长; 培养 72 h, 多数细胞伸展贴壁; 第 7 天可见细胞集落形成, 呈漩涡状或辐射状生长, 见图 1。

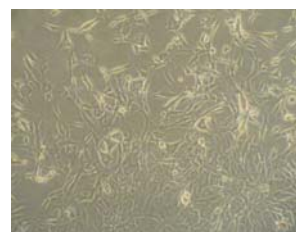


Figure 1 Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) at 7 d after primary culture (Inverted microscope, $\times 100$)
图 1 原代培养第 7 天的 BMSCs (倒置显微镜, $\times 100$)

第 12 天细胞完全融合, 呈漩涡状, 界限不

清, 多为长梭形, 见图2。

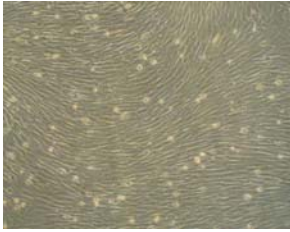


Figure 2 Bone marrow mesenchymal stem cells at 12 d after primary culture (Inverted microscope, $\times 100$)

图2 原代培养第12天的骨髓间充质干细胞(倒置显微镜, $\times 100$)

成骨诱导后的BMSCs: 成骨诱导后, 细胞增殖明显变缓慢, 诱导7 d, 细胞由长梭形向多角形、方形转化, 细胞突起缩短。成骨诱导21~28 d, 形成明显的圆形或卵圆形肉眼可见的钙化结节。Von Kossa染色为黑色结节状, 见图3; 茜素红染色为橙红色结节状, 见图4。

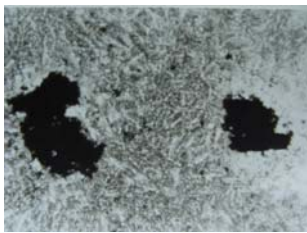


Figure 3 A large area of black region in cell density area after Von Kossa staining (Inverted microscope, $\times 250$)

图3 Von Kossa 染色见细胞密集区出现大面积黑染区域(倒置显微镜, $\times 250$)



Figure 4 Orange-red nodules formed after alizarin red staining (Inverted microscope, $\times 250$)

图4 茜素红染色为橙红色结节状(倒置显微镜, $\times 250$)

BMSCs细胞片层: 温度反应性培养皿中的诱导第7天的BMSCs, 置于20℃、体积分数5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养, 细胞逐步从培养皿底分离, 20 min时细胞与细胞外基质一起脱落形成完整的细胞片层。光镜下见细胞形态发生变化, 呈短梭形或多形性, 界限不清, 见图5。培养皿的细胞逐渐收缩, 从皿底脱落形成一层致密的细胞片层。将形成的细胞片层接种至支架表面后培养1周, 扫描电镜下可见支架被细胞片层包裹, 与支架附着良好, 见图6。

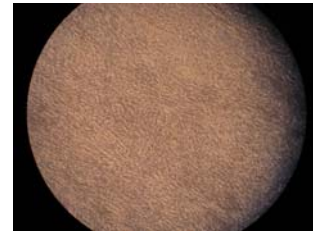


Figure 5 Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) presenting short spindle shape and unclear boundary in the cell sheet (Inverted microscope, $\times 100$)

图5 BMSCs 细胞片层形成后倒置显微镜下见细胞呈短梭形或多形性, 界限不清($\times 100$)

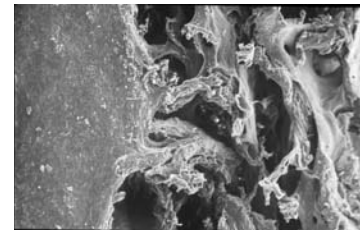
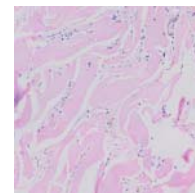


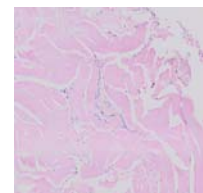
Figure 6 DBM wrapped with inverted microscope cell sheet well at 7 d (Scanning electron microscope, $\times 100$)

图6 细胞片层接种到脱钙骨基质7 d, 与支架附着良好(电镜, $\times 100$)

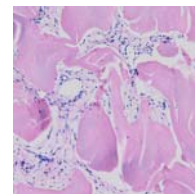
2.3 复合体植入犬背阔肌的成骨情况 见图7。



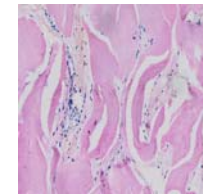
a: Experimental side, 4 wk



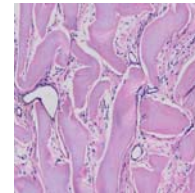
b: Control side, 4 wk



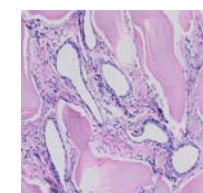
c: Experimental side, 8 wk



d: Control side, 8 wk



e: Experimental side, 12 wk



f: Control side, 12 wk

Figure 7 Osteogenesis after the complex implanted under the latissimus dorsi muscle (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

图7 复合体植入犬背阔肌后的成骨情况(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

复合体植入4周: 实验侧成骨活跃, 骨小梁周围有较多骨母细胞, 小梁间毛细血管较多, 见图7a。对照侧成骨稀少, 血管少, 骨小梁间纤维化, 见图7b。

复合体植入8周: 实验侧骨小梁粗大, 成骨细胞活跃, 小梁间毛细血管丰富, 有新鲜纤维化, 见图7c。对照侧骨小梁较粗大, 小梁间血管较丰富, 纤维化较明显, 见图7d。

复合体植入12周: 实验侧骨小梁规则、粗大, 密度高, 成熟骨小梁间纤维组织较少, 血管密度减少, 见图7e。对照侧骨小梁较少, 血管较丰富, 纤维化较明显, 见图7f。

3 讨论

细胞片层技术是组织工程中收获种子细胞和对种子细胞进行转移的一项新技术。它是将温度反应性的聚合物共价结合到普通培养皿表面形成温度反应性的培养皿^[3-4]。在37℃的培养条件下, 培养基的表面呈疏水性, 细胞可在温度反应性培养皿表面附着、扩展和增殖。当温度降至临界温度(32℃)以下后, 聚合物表面变为亲水性, 并在培养皿表面和培养的细胞之间形成水化层。因此细胞无需胰蛋白酶的消化作用便可自动从培养皿表面分离。经细胞片层技术收获的细胞是含有细胞外基质的一层完整的片状结构, 含有离子通道、生长因子受体和连接蛋白等重要的细胞表面蛋白^[5-6]。因此, 应用细胞片层技术构建的组织结构更接近于正常组织。目前应用细胞片层技术已构建出牙周韧带、皮肤、角膜上皮和膀胱上皮以及心肌、平滑肌、肾小球和肝小叶及骨等三维结构组织^[5, 7-15]。

实验采用细胞片层技术与传统支架塑形相结合的方法构建组织工程骨。将BMSCs向成骨细胞诱导分化后制备BMSCs细胞片层。扫描电镜下可见通过细胞片层技术收获的BMSCs是含有细胞外基质的一层完整的片状结构。BMSCs片层保留了重要的细胞表面蛋白, 如离子通道、连接蛋白等, 细胞间可以更好地进行信号传递, 从而保持功能的协调一致^[5]。BMSCs片层中的细胞排列致密, 类似自然骨质形成过程中成骨细胞的排列状态, 同时细胞片层收缩产生的应力对BMSCs的极化排列有调节作用^[16]。随着细胞周围矿物质的沉积和钙化, 可形成类似板层状骨的结构。将形成的单层或多层BMSCs细胞片层包裹可生物降解的支架材料后植入受区后, 有望形成类似板层骨结构的组织工程骨。

实验制备的DBM由胶原网架构成, 空隙大小较均一。电镜观测结果表明, DBM为三维立体网孔结构, 其孔隙率约为70%。这种三维立体网孔结构能为细胞黏附、增殖提供足够的表面积, 有利于血管的形成和成骨

组织的营养代谢^[17]。

PRP是通过离心自体全血而得到的血小板浓缩物, 经凝血酶和氯化钙激活后, 其中的血小板颗粒释放出血小板源性生长因子、转化生长因子、血管内皮生长因子、表皮生长因子、胰岛素样生长因子等。经酶联免疫吸附实验证实, PRP中除了胰岛素样生长因子以外, 其余4种生长因子的浓度为体内正常浓度的3~8倍。PRP制备简便、快捷、价格低廉、对患者损伤小, 无免疫排斥, 不会传播疾病, 许多研究证明PRP中的多种生长因子具有促进骨再生的作用^[18-21]。

实验应用细胞片层技术收获和转移BMSCs避免了胰酶消化法对细胞造成的损伤, 保留了大量的细胞外基质, 显著提高了细胞的利用率和转移细胞的活性。应用细胞片层技术与传统的骨组织工程方法相结合, 构建出较好的组织工程骨。但仅仅是初步研究, 通过进一步深入研究, 有望制备出类似板层骨结构的组织工程骨。

4 参考文献

- [1] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [2] Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem. 2000;275(13):9645-9652.
- [3] Yan H, Tsujii K. Thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide) gel containing polymeric surfactant poly(2-(methacryloyloxy) decylphosphate): correlation between rapid collapsing characters and micelles of polymeric surfactant. J Oleo Sci. 2008;57(7):401-405.
- [4] Yamada N, Okano T, Sakai H, et al. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. Makromol Chem Rapid Commun. 1990;11:571-576.
- [5] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. J Biomaterials. 2003;24(13):2309-2316.
- [6] Jin H, Li NY, Tan S, et al. Guoji Kouqiang Yixue Zazhi. 2010;37(3):272-274.
荆恒, 李宁毅, 谭帅, 等. 骨髓基质干细胞的体外培养及其细胞片层制备[J]. 国际口腔医学杂志. 2010;37(3):272-274.
- [7] Akizuki T, Oda S, Komaki M, et al. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. J Periodontol Res. 2005;40(3):245-251.
- [8] Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, et al. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. Biomaterials. 2009;30(14):2716-2723.
- [9] Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. Transplantation. 2004;77(3):379-385.
- [10] Mimura T, Amano S, Yokoo S, et al. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. Mol Vis. 2008;14:1819-1828.
- [11] Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, et al. Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. BJU Int. 2004;93(7):1069-1075.
- [12] Shimizu T, Yamato M, Itoi Y, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. Circ Res. 2002;90(3):e40.
- [13] Yang J, Yamato M, Kohno C, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. Biomaterials. 2005;26(33):6415-6422.
- [14] Harimoto M, Yamato M, Hirose M, et al. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. J Biomed Mater Res. 2002; 62(3):464-470.

- [15] Gao Z, Chen F, Zhang J, et al. Vitalisation of tubular coral scaffolds with cell sheets for regeneration of long bones: a preliminary study in nude mice. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 47(2):116-122.
- [16] Yang J, Yamato M, Nishida K, et al. Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach. *J Control Release*. 2006;116(2):193-203.
- [17] Chen LQ, Li NY, Yuan RT, et al. Shanghai Kouqiang Yixue. 2007; 16(3):255-258.
陈立强, 李宁毅, 袁荣涛, 等. 犬脱钙骨基质复合骨髓间充质干细胞的体外培养[J]. 上海口腔医学, 2007, 16(3):255-258.
- [18] Tan S, Jing H, Gao ZH, et al. Complex of dog allogenic decalcified bone matrix and bone marrow stromal cell sheets. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(3):555-558.
- [19] Li NY, Yuan RT, Chen T, et al. Effect of platelet-rich plasma and latissimus dorsi muscle flap on osteogenesis and vascularization of tissue-engineered bone in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(9):1850-1858.
- [20] Chen T, Li NY. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(46):9168-9173.
陈涛, 李宁毅. 富血小板血浆及带血管肌筋膜在组织工程骨血管化中的作用: 组织影像学观察[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(46):9168-9173.
- [21] Li NY, Chen LQ, Chen T, et al. *Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi*. 2007;42(7):436-437.
李宁毅, 陈立强, 陈涛, 等. PRP在构建血管化口腔颌面部骨组织中作用机制的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2007, 42(7):436-437.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家自然科学基金资助项目 (30872896); 山东省自然科学基金资助项目 (Y2008C77), 课题名称: 应用细胞片层技术构建血管化组织工程骨的实验研究。

致谢: 袁荣涛, 陈立强, 金晓明医生参与实验的设计及手术, 特表衷心感谢。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 传统的骨组织工程学在收获和转移细胞方面仍存在诸多不足, 应用细胞片层技术收获和转移骨髓间充质干细胞避免了胰酶消化法对细胞造成的损伤, 保留了大量的细胞外基质, 明显提高了细胞的利用率和转移细胞的活性。

课题评估的“金标准”: 目前尚无“金标准”评价该课题主要结果指标。大多数研究应用显微镜进行细胞形态学及组织切片检查。

设计或课题的偏倚与不足: 构建出的组织工程骨体积不够大, 血管亦不够粗大, 应改进课题设计与实施, 以期构建出功能性血管化组织工程骨。

提供临床借鉴的价值: 研究结果对组织工程骨由基础向临床过渡具有重要意义。应用细胞片层技术与传统的骨组织工程方法相结合, 构建出较好的组织工程骨。研究对进一步构建血管化、具有天然骨结构的组织工程骨具有重要意义。

本期特稿: 组织构建中的细胞培养①: (本刊中文部)

- 1 人正常椎间盘髓核细胞体外不同培养代次的生物学性状分析: 适应于组织工程椎间盘种子细胞的选择
- 2 体外培养人正常椎间盘髓核细胞与退变髓核细胞的生物学性状比较: 可以为干预退变髓核细胞提供最佳时机吗?
- 3 原代培养小鼠关节软骨细胞的分化与诱导
- 4 脂肪干细胞与软骨细胞的共培养
- 5 组织块培养法和酶消化法分离髌韧带细胞的比较
- 6 组织工程肌腱细胞研究模型的构建: SD大鼠尾腱细胞可行吗?
- 7 4.1蛋白家族在大鼠脑皮质神经细胞中的表达和定位4脂肪干细胞与软骨细胞的共培养
- 8 构建原代分离培养与鉴定小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的方法及模型
- 9 小鼠内皮祖细胞的培养和移植

1 人正常椎间盘髓核细胞体外不同培养代次的生物学性状分析: 适应于组织工程椎间盘种子细胞的选择

叶冬平(暨南大学第四附属医院, 广州市红十字会医院, 广东省广州市 510220)

推荐理由: 椎间盘组织一旦出现退变, 很难逆转。通过体外构建组织工程椎间盘的方法治疗椎间盘退行性疾病已经成为目前脊柱领域研究的新方向。髓核细胞是组织工程椎间盘种子细胞的主要来源之一, 但体外培养条件下, 细胞会

随着传代次数的增多出现“去分化”现象, 因此, 种子细胞的选择必须有一定的代次限制。实验通过对人髓核软骨样细胞进行体外培养和生物学特性观察, 比较不同代次髓核细胞的形态学、增殖特性, 以及细胞的主要细胞外基质成分表达情况, 从而为种子细胞的选取提供依据。

2 体外培养人正常椎间盘髓核细胞与退变髓核细胞的生物学性状比较: 可以为干预退变髓核细胞提供最佳时机吗?

梁伟国(暨南大学第四附属医院, 广州市红十字会医院, 广东省广州市 510220)

推荐理由: 椎间盘退行性变是引起下腰痛的主要原因, 它与坐骨神经痛和椎间盘突出、脱垂等疾病关系密切。人体椎间盘是一个承受载荷却又缺乏血管的结构, 因而容易发生退行性变, 但椎间盘退变的机制尚不明确。实验通过对人正常椎间盘髓核细胞与退变髓核细胞的培养及生物学性状比较分析, 观察其生物学特性, 认识退变髓核细胞的细胞学退变时机, 以期研究椎间盘退变机制、椎间盘组织工程学、基因治疗等提供理论基础。

3 原代培养小鼠关节软骨细胞的分化与诱导

金 旻(解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆市 400042)

推荐理由: 软骨细胞培养是研究软骨细胞增殖、分化等生物学行为及机制的最有力工具

之一。由于体内外生长条件差别大, 传统体外培养的软骨细胞无论形态上还是功能上与正常关节透明软骨相比均有较大差距。然而目前最大的问题是长时间传代培养后软骨细胞合成分泌细胞外基质的能力下降, 易去分化为成纤维细胞。C57BL/6小鼠是目前应用最广泛的转基因鼠和敲基因鼠的背景鼠。实验应用Ⅱ型胶原酶和胰蛋白酶结合消化法体外培养扩增C57BL/6小鼠关节软骨细胞并进行诱导分化, 为研究软骨发育提供了良好的实验基础。

4 脂肪干细胞与软骨细胞的共培养

张 勇(解放军第二军医大学南京临床医学院, 解放军南京军区南京总医院骨科, 江苏省南京市 210002)

推荐理由: 近年来, 具有强大增殖能力和多向分化潜能的干细胞, 尤其是脂肪来源的间充质干细胞在软骨组织工程中的作用引人注目。然而传统的诱导脂肪干细胞定向分化成软骨细胞, 需要大量细胞因子的参与, 费用昂贵, 不能广泛应用于临床。有研究发现关节软骨微环境可以诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞定向分化。目前, 关节软骨对脂肪干细胞是否有类似作用尚不清楚。实验通过软骨细胞与脂肪干细胞共培养, 探讨软骨细胞能否诱导脂肪干细胞向软骨细胞定向分化, 以期修复关节软骨损伤提供新方法。