

改性纳米羟基磷灰石/PLGA材料同骨髓基质干细胞复合后相关生物学评价**

谭羽莹¹, 张 舵¹, 李玉新², 孙 颖², 徐 洋³, 李 春¹, 金洪娟¹, 邵 英¹

Relative biological evaluation of hydroxyapatite nanocrystals surface-grafted with L-lactic acid oligomer/poly(lactide-co-glycolde) cultured with bone marrow mesenchymal stem cells

Tan Yu-ying¹, Zhang Duo¹, Li Yu-xin², Sun Ying², Xu Yang³, Li Chun¹, Jin Hong-juan¹, Shao Ying¹

Abstract

BACKGROUND: The hydroxyapatite nanocrystals surface-grafted with L-lactic acid oligomer/poly (lactide-co-glycolde) (PLGA/g-HA) composite material is preferable to good stability and favorable mechanical property. As scaffold cultured with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs).

OBJECTIVE: To study the bioactivity and biocompatibility of BMSCs cultured with PLGA/g-HA composite material *in vitro*.

METHODS: Third passage BMSCs of rabbits were cultured in PLGA/g-HA extract at different concentrations (10%, 30%, 50% and 80%), and cell proliferation was detected by MTT method. Meanwhile, the cell adhesion and morphology were observed with scanning electron microscopy.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no significant difference between 10% group and negative group at 1 and 3 days after culture. The cytotoxic grade was Grade 1 in all the four concentrations. BMSCs could stretch pseudopodium gradually and adherent on the surface of PLGA/g-HA firmly. The results indicated that: ①BMSCs could proliferate in PLGA/g-HA leaching liquor. ②BMSCs have a good state on the surface of PLGA/g-HA. And we can apply the scaffold to bone defect repair, because of its good biocompatibility and cellular adhesion.

Tan YY, Zhang D, Li YX, Sun Y, Xu Y, Li C, Jin HJ, Shao Y. Relative biological evaluation of hydroxyapatite nanocrystals surface-grafted with L-lactic acid oligomer/poly(lactide-co-glycolde) cultured with bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(25):4619-4622.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 改性纳米羟基磷灰石/聚乙交酯-丙交酯复合材料(L-lactic acid oligomer/Poly(lactide-co-glycolde), PLGA/g-HA)因具有良好的稳定性及机械性能, 目前备受关注。

目的: 观察骨髓基质干细胞和改性PLGA/g-HA体外复合后的细胞活性及生物相容性。

方法: 原代培养兔骨髓基质干细胞, 传代培养至第3代, MTT比色法检测在不同浓度PLGA/g-HA浸提液(10%、30%、50%、80%)中骨髓基质干细胞的增殖情况, 以及骨髓基质干细胞在PLGA/g-HA表面的黏附性及其细胞形态。

结果与结论: 于培养后1, 3 d测得在不同浓度浸提液下骨髓基质干细胞的A值, 10%浸提液组和对照组相比无显著性差异, 4种浓度浸提液的细胞毒性均为1级; 扫描电镜观察到骨髓基质干细胞在PLGA/g-HA表面逐渐伸展, 形成伪足, 最终牢固锚定在材料表面。提示在PLGA/g-HA的浸提液中骨髓基质干细胞能够发生增殖, 对细胞无毒性。骨髓基质干细胞可以黏附在PLGA/g-HA表面且形态正常, 生长状态良好, 证明PLGA/g-HA具有良好的相容性和黏附性, 可作为修复骨缺损的复合组织工程骨。

关键词: 羟基磷灰石; PLGA; 骨髓基质干细胞; 组织工程支架; 生物活性; 生物相容性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.25.015

谭羽莹, 张舵, 李玉新, 孙颖, 徐洋, 李春, 金洪娟, 邵英. 改性纳米羟基磷灰石/PLGA材料同骨髓基质干细胞复合后相关生物学评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(25):4619-4622. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

聚乙交酯-丙交酯是生物高分子材料聚乳酸(PLA)和聚羟基乙酸(PGA)的共聚物, 在骨组织修复材料中PLGA和羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)较为常用, PLGA的降解性虽好, 但是力学强度不足, 而HA的力学性能强, 但降解性较差, 所以将PLGA和HA复合有助于发挥各自的优点。具备良好的力学强度和降解性能的改性纳米HA/PLGA复合材料

(L-lactic acid oligomer/Poly(lactide-co-glycolde), PLGA/g-HA), 由中国科学院长春应用化学研究所提供。实验通过体外毒性实验评价材料的生物相容性, 旨在为将来PLGA/g-HA作为修复骨缺损的组织工程支架可行性和有效性做出铺垫和理论支持。

1 材料和方法

设计: 细胞体外观察实验。

时间及地点: 实验于2010-07/11在东北师

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China;
²National Engineering Laboratory for Druggable Gene and Protein Screening, Northeast Normal University, Changchun 130024, Jilin Province, China;
³Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Siming Branch of First Affiliated Hospital, Xiamen University, Xiamen 361002, Fujian Province, China

Tan Yu-ying★, Studying for master's degree, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
tyy_316@163.com

Correspondence to: Shao Ying, Doctor, Associate professor, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
lele_shao@163.com

Supported by: Science Frontiers and Cross-disciplinary Innovation Projects of Jilin University, No. 200903068*

Received: 2011-01-04
Accepted: 2011-04-15

¹ 吉林大学第一医院整形美容外科, 吉林省长春市130021; ² 东北师范大学药物基因和蛋白筛选国家工程实验室, 吉林省长春市130024; ³ 厦门大学附属第一医院思明分院整形美容外科, 福建省厦门市 361002

谭羽莹★, 女, 1985年生, 吉林省长春市人, 汉族, 吉林大学第一医院在读硕士, 主要从事整形美容外科及组织工程方面的研究。
tyy_316@163.com

通讯作者: 邵英, 博士, 副教授, 吉林大学第一医院整形美容外科, 吉林省长春市130021
leleshao@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)25-04619-04

收稿日期: 2011-01-04
修回日期: 2011-04-15
(20110104021/WL
•W)

范大学完成。

材料: 清洁级新西兰大耳白兔, 由长春高新医学动物实验研究中心提供。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
Percoll 分离液	Pharmacy, 瑞典
DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶	Gibco, 美国
IBMX、胰岛素、MTT	Sigma, 美国
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo, 美国
超净工作台	苏净集团安泰公司, 中国
倒置显微镜	Olympus, 日本
50 mL 塑料细胞培养瓶	Costar, 美国
酶标仪	Bio-RAD model680, 日本

实验方法:

骨髓基质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的分离、培养: 取1 d龄的清洁级新西兰大耳白兔于麻醉状态下处死, 无菌条件下取双侧股骨、胫骨, 剪除关节盘, 显露骨髓腔。使用DMEM冲洗骨髓腔至发白, 收集骨髓液加入Percoll分离液, 3 000 r/min 离心30 min, 吸取中间白色云雾状细胞层, PBS冲洗1 000 r/min离心5 min后, 加入DMEM重悬^[2]。获得的细胞放置到37 ℃、体积分数为5%CO₂ 孵箱内培养, 48 h后首次全量换液, 以后每两三天换液, 待细胞融合至80%~90%时, 传代培养。

BMSCs的诱导鉴定: 取第2代细胞, 以2×10⁴ 个/孔接种于6孔板中, 分别加入成骨诱导培养液(HDMEM培养基、体积分数为10%胎牛血清、10⁻⁸ mol/L地塞米松、50 μg/L维生素C、10 mmol/L β2-甘油磷酸钠、100 U/mL青霉素+100 U/mL链霉素)和成脂诱导培养液(LDMEM培养基、体积分数为10%胎牛血清、10⁻⁶ mol/L地塞米松、10 mg/L胰岛素、0.5 mmol/L IBMX、100 mg/L吡啶美辛), 每2 d换液, 成骨诱导后第2周行茜素红染色, 成脂诱导后第3周行油红O染色鉴定。

材料板预先准备: 将PLGA/g-HA裁剪成大小为20 mm×20 mm×0.5 mm的正方形, 所有材料面UV照射24 h, 充分浸泡于体积分数为70%乙醇中, 然后彻底洗去乙醇^[3]。

材料浸提液的制备: 将PLGA/g-HA裁成10 mm×5 mm×5 mm条状, 按医用植入材料生物学评价的国家标准, 即材料表面积(cm²): 浸提液体积(mL)=3: 1浸入DMEM培养基中, 放置到37 ℃, 体积分数为5%CO₂ 孵箱内浸泡48 h, 浸提液制成10%, 30%, 50%, 80% 4种浓度,

过滤后4 ℃留存备用。

MTT法测量BMSCs在浸提液中的增殖性: 取生长状况良好的第3代BMSCs调整至4×10⁷ L⁻¹ 的浓度接种于96孔板, 每孔100 μL细胞悬液, 周边用无菌PBS封堵, 24 h后BMSCs基本贴壁, 给与所有实验组换液, 分别加入浓度为10%, 30%, 50%, 80%材料浸提液及常规DMEM培养液, 每孔均100 μL, 每组设置10个复孔, 共铺设4板, 培养1, 3 d后检测, 培养板在检测前4 h, 每孔加入质量浓度为5 g/L的MTT 20 μL, 放入孵箱继续孵育4 h后, 吸弃孔内液体, 加入150 μL二甲亚砜振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 放入酶标仪调整波长至570 nm测量A值, 并计算细胞的相对增殖率(RGR)。

$$RGR = (\text{浸提液} A_{570} / \text{对照组} A_{570}) \times 100\%$$

参照美国药典及中华人民共和国国家标准对材料进行毒性分级(CTS)^[4-5]: 0级: RGR ≥ 100%; 1级: RGR 75%~99%; 2级: RGR 50%~74%; 3级: RGR 25%~49%; 4级: RGR 1%~24%; 5级: RGR=0。0~1级为合格; 2级应结合细胞形态分析, 综合评价; 3~5级不合格。

扫描电镜观察BMSCs在材料表面的黏附性及细胞形态: 将剪裁为20 mm×20 mm×0.5 mm材料板放入6孔板内用DMEM培养预湿, 取第3代BMSCs调整浓度至1×10⁹ L⁻¹, 充分吹匀, 吸取100 μL细胞悬液接种到支架表面, 放入培养箱内孵育4 h后取出, 每孔追加1 mL DMEM培养基, 每隔1 d换液。培养3 d后取出细胞培养板, 吸弃DMEM, 加入4%戊二醛在4 ℃下固定2 h, PBS反复冲洗2次, 10 min/次, 然后用梯度乙醇脱水, 依次浸入体积分数为70%、80%、90%和无水乙醇中, 每个梯度浸泡15 min, 临界点干燥喷金后, 行扫描电镜观察。

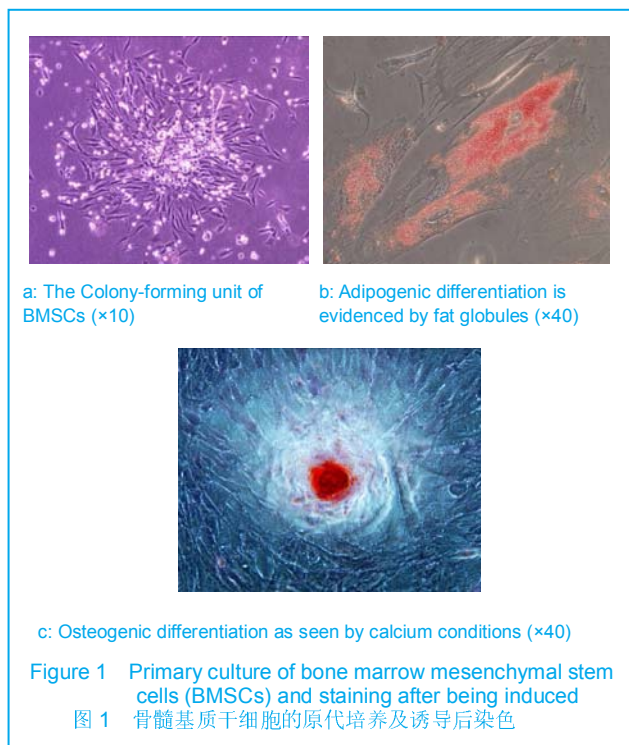
主要观察指标: ①BMSCs在PLGA/g-HA材料浸提液中的增殖情况。②PLGA/g-HA材料表面BMSCs的黏附情况及生长形态。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组别间使用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs的形态学观察及染色鉴定 由骨髓组织获取的原代BMSCs呈圆形, 折光性较

强, 无法辨认核结构, 培养至24 h后贴壁细胞伸出伪足, 呈多角形或梭形, 核多为单核, 2~5 d后部分细胞聚堆呈集落样生长, 见图1a, 并向周围以放射状延伸, 细胞核结构清晰可见。经定向诱导后, 油红O染色可见橙色圆形脂肪滴存在, 茜素红染色可见红色钙结节沉积, 见图1b, c。



2.2 BMSCs在PLGA/g-HA材料浸提液中的增殖情况见表1, 2。

表1 MTT 法检测不同浓度浸提液中 BMSCs 的增殖情况
Table 1 To assay the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in the different concentrations of leaching liquor by MTT method ($\bar{x} \pm s, A$)

Group	1 d	3 d
10% leaching liquor	0.849±0.020	1.195±0.019
30% leaching liquor	0.821±0.014	1.139±0.011
50% leaching liquor	0.776±0.016 ^a	1.063±0.010 ^a
80% leaching liquor	0.732±0.021 ^a	0.982±0.035 ^a
Negative	0.867±0.023	1.236±0.018

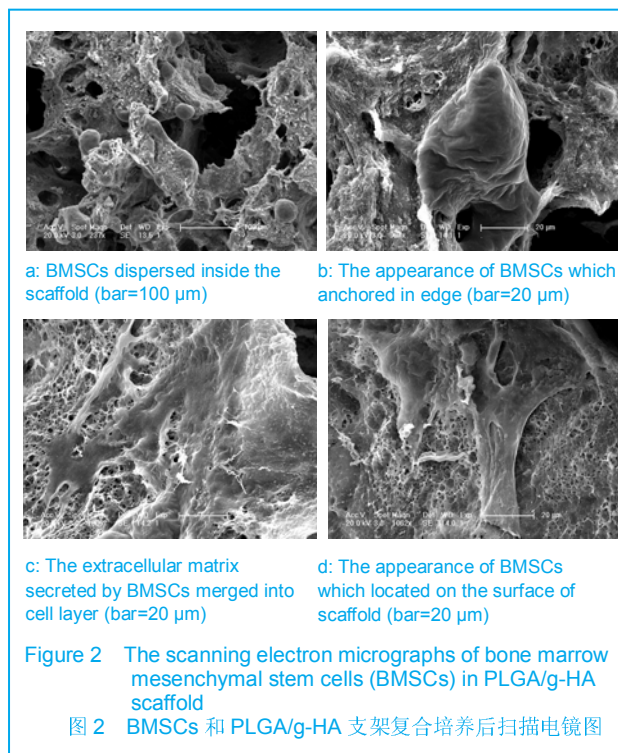
^a $P < 0.01$, vs. control group

表2 浸提液培养 1, 3 d 后 BMSCs 的相对增殖率及毒性分级
Table 2 The relative proliferation and cytotoxicity index of bone marrow mesenchymal stem cells after cultured for 1, 3 d by leaching liquor ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	1 d		3 d	
	RGR (%)	CTS	RGR (%)	CTS
10% leaching liquor	97.96	1	96.70	1
30% leaching liquor	94.69	1	92.21	1
50% leaching liquor	89.54	1	86.03	1
80% leaching liquor	84.43	1	79.48	1

由表1可知, 浓度为10%浸提液组和对照组及30%浸提液组相比, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 50%、80%浸提液与对照组相比, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 证明高浓度材料浸提液对BMSCs的体外增殖呈负性影响, 但以上CTS均在1级, 符合标准要求。

2.3 BMSCs在PLGA/g-HA材料表面的黏附情况
BMSCs在支架表面能够黏附, 并伸展形成伪足固定于支架材料表面, 部分细胞已融合成细胞层, 可见分泌的细胞外基质, 见图2, 说明支架具有良好的细胞相容性, 观察可知BMSCs更易锚着于孔隙边缘和支架表面相对凸起部位。



3 讨论

由创伤、变性、过劳、骨折、畸形导致的骨缺损需骨再生修复, 人类骨组织已被证实具有自我修复的能力, 但是严重骨缺损时, 骨组织无法自主修复^[6]。近代组织工程的快速发展, 开辟了骨缺损治疗的新方法, 组织工程的主要目的是将种子细胞复合在支架材料上, 在支架材料逐步降解的同时, 复合的细胞能够分化、增殖成为新的组织或器官^[7]。

BMSCs是一种具有自我更新能力和多向分化能力的干细胞, 在体外不同的诱导条件下可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、肌肉细胞、神经细胞等多种细胞^[8-9]。针对BMSCs的分离方法, Bourzac等^[10]证实, 在比较传统贴壁法、Percoll分离法、Ficoll分离法中, Percoll分离法所得的BMSCs数量及自我更新潜能最佳。所以实验选取Percoll分离法, 获得的细胞易增殖,

分化能力良好,但如果仅仅把扩增培养的细胞置入骨缺损处,将导致细胞的流失,无法成骨,所以良好的支架材料应用,才能为细胞提供黏附和生长的空间。

HA/PLA复合材料曾被许多科学家作为骨缺损修复的选择,然而一般的HA/PLA混合体系中,HA与PLA基质复合后,其界面结合力较差,暴露在生理环境中,HA与聚合物基体的界面层首先遭到破坏,HA颗粒很快从PLA基质中脱离,材料界面处易发生分离,导致材料过早失效^[11]。由中国科学院长春应化所开发出的PLGA/g-HA,在无催化剂的条件下,利用乳酸缩合的方法先制备末端含有羧基的低分子乳酸,然后利用低聚乳酸与HA反应获得聚乳酸接枝的纳米HA,改善了纳米粒子与基质材料间的界面相容性,提高了界面结合力,增强复合材料的热稳定性和机械性能^[12-13]。

理想的组织工程支架材料应具备以下几个条件:①生物相容性。其本身或降解产物对种子细胞和机体无毒性,不会引起炎症和免疫排斥反应。②骨诱导性和骨传导性。③生物降解性和降解可调性。④合适的力学强度。⑤开放多孔性。⑥可塑性及易加工性。组织工程应用的最终目的还是植入人体,所以其生物安全性也是首要具备的条件,同时理想的支架材料还应具有良好的表面性质,便于细胞的黏附、分化和增殖。实验采用了体外浸提液法利用MTT比色法来评价新型PLGA/g-HA的生物相容性。MTT比色法在大范围抗肿瘤药物筛选、细胞毒性实验、生物活性检测等领域应用广泛,尤其在评价细胞毒性方面,现已成为研究人员的不二选择^[14]。通过数据可知,细胞活性随浸提液浓度增加、培养时间延长而有所下降,BMSCs在对照组DMEM培养液中随培养时间延长,细胞数量和活性增高,10%浸提液组与对照组细胞的生长速度相近,无明显差异,而在50%,80%浸提液组中,BMSCs活性较对照组低,差异有显著性意义($P < 0.01$),表明高浓度的材料浸提液对细胞生长有一定影响,现分析如下:①PLGA/g-HA材料为可降解材料,释放出的乳酸影响细胞周围的酸碱环境,导致pH值降低,细胞活性有所下降。②HA接近于骨中无机物成分,所以生长在含有 Ca^{2+} 、 P^{5+} 等元素浸提液中,BMSCs有向成骨细胞分化的趋势,致使分裂增殖活性较未分化细胞减弱,具体原理仍有待进一步实验论证。综上所述,PLGA/g-HA复合材料满足组织工程对生物材料的要求,可以作为修复骨缺损的组织工程支架材料,由于BMSCs具有多向分化潜能,与类似材料复合后可应用到脂肪组织工程^[3]、修复骨软骨缺损等^[15],且Caplan等^[16]认为,移植的MSCs不仅能对刺激产生反应和分化,还能根据需要修复处宿主细胞的化学诱导而分泌生物活性因子。所以有理由相信,复合有BMSCs的PLGA/g-HA材料应用不仅仅局限于骨组织工程。

4 参考文献

- [1] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China.Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animal.1988-10-31.
- [2] Zhao L, Zhao JL, Wan L, et al. The study of the feasibility of segmental bone defect repair with tissue-engineered bone membrane:a qualitative observation. *Strategies Trauma Limb Reconstr.* 2008;3(2):57-64.
- [3] Choi YS, Park SN, Suh H. The effect of PLGA sphere diameter on rabbit mesenchymal stem cells in adipose tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(5):2165-2171.
- [4] USPC. Biological Test/Biological Reactivity Tests, in vitro. USP 27,2004.
- [5] 中华人民共和国国家标准.医疗器械生物学评价第5部分:体外细胞毒性实验[S]. GB/T 16886.5-1997.
- [6] Jayasuriya AC, Shah C. Controlled release of insulin-like growth factor-1 and bone marrow stromal cell function of bone-like mineral layer-coated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(1):43-49.
- [7] Langer R. Tissue engineering: perspective, challenges, and future directions. *Tissue Eng.* 2007;13(1):1-2.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-147.
- [9] Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 2006;7:14.
- [10] Bourzac C, Smith LC, Vincent P, et al. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J.* 2010;42(6):519-527.
- [11] Zhang SM, Liu J, Zhou W, et al. Interfacial fabrication and property of hydroxyapatite/poly(lactide) resorbable bone fixation composites. *Current Appl Phys.* 2005;5(5):516-518.
- [12] Qiu XY, Chen L, Hu JL, et al. Surface-modified hydroxyapatite linked by L-lactic acid oligomer in the absence of catalyst. *Polymer Sci: Part A: Polymer Chemistry.* 2005;43(21):5177-5185.
- [13] Cui Y, Liu Y, Cui Y, et al. The nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with L-lactic acid oligomer for bone repair. *Acta Biomater.* 2009;5(7):2680-2692.
- [14] Heuff G, Steenbergen JJ, Van de Loosdrecht AA, et al. Isolation of cytotoxic Kupffer cells by a modified enzymatic assay: a methodological study. *J Immunol Methods.* 1993;159(1-2):115-123.
- [15] Xue D, Zheng Q, Zong C, et al. Osteochondral repair using porous poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite hybrid scaffolds with undifferentiated mesenchymal stem cells in a rat model. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(1):259-270.
- [16] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006;98(5):1076-1084.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 吉林大学科学前沿与交叉学科创新项目(200903068)。

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计,实验实施为全部作者,实验评估为第一、二作者,资料收集为第一作者,第一作者成文,第二作者审核,通讯作者对文章负责。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 索检PubMed 1990-01/2011-01有关骨髓基质干细胞、组织工程支架、生物相容性方面的研究。发现该新型支架材料的制备及聚合工艺国内外少有研究,相关技术已申请专利,课题组成员曾参加国家自然科学基金项目,对生物材料的研究积累了丰富的经验,具有一定科研能力,并通过前期针对新型PLGA/g-HA复合材料理化性质的探索,得出充分的论据支持其有可能成为组织工程支架材料,进而获得吉林省科技发展计划项目资助。