

胶原-壳聚糖支架材料与间充质干细胞的组织相容性**

李晓龙¹, 穆长征², 马云胜²

Histocompatibility of bone marrow mesenchymal stem cell and collagen-chitosan scaffold

Li Xiao-long¹, Mu Chang-zheng², Ma Yun-sheng²

Abstract

BACKGROUND: Recent studies have showed that the collagen-chitosan complex scaffold can be used as nerve tissue engineering scaffold, but little evidence is available in the histocompatibility study.

OBJECTIVE: To observe rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) growth and differentiation in the surface of collagen-chitosan complex scaffold.

METHODS: Rabbit MSCs were isolated and cultured in serum-free medium. Flow cytometry was used to analyze the immunophenotype. The MSCs were planted on the gel scaffold (experimental group) and polylysine coated coverslip (control group), the cells were cultured in neural induction medium. The cell differentiation and growth characteristics were observed by inverted phase contrast microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The phenotype was CD29⁺, CD44⁺, CD166⁺. Inverted phase contrast microscope showed that: the MSCs grew well with the prominence process seen at 7 days in experimental group. The cells growth characteristics had no difference with the control group. The MSCs and collagen-chitosan complex scaffold have good histocompatibility.

Li XL, Mu CZ, Ma YS. Histocompatibility of bone marrow mesenchymal stem cell and collagen-chitosan scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(8): 1377-1380.

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

摘要

背景: 近年来一些研究发现胶原蛋白-壳聚糖复合支架材料可作为神经组织工程的支架材料, 但相关细胞相容性研究较少。

目的: 观察兔骨髓间充质干细胞在胶原蛋白-壳聚糖复合支架材料表面生长及分化情况。

方法: 分离培养兔骨髓间充质干细胞, 无血清培养液培养, 流式细胞仪检查细胞表型; 然后, 将其接种到凝胶支架材料表面(实验组)及多聚赖氨酸包被的盖玻片表面(对照组), 神经诱导培养基内培养, 倒置相差显微镜观察干细胞的生长及分化情况。

结果与结论: 细胞表型为 CD29⁺、CD44⁺、CD166⁺。倒置相差显微镜观察: 实验组中, 接种的骨髓间充质干细胞生长良好, 7 d 后可见有突起神经细胞, 细胞生长情况与对照组未见有明显差别。证实胶原蛋白-壳聚糖复合支架材料对骨髓间充质干细胞有良好细胞相容性。

关键词: 胶原蛋白; 壳聚糖; 骨髓间充质干细胞; 组织工程; 组织相容性; 支架材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.08.011

李晓龙, 穆长征, 马云胜. 胶原-壳聚糖支架材料与间充质干细胞的组织相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8):1377-1380. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Microscope Central Laboratory,
²Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Li Xiao-long, Experimentalist, Microscope Central Laboratory, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China
yunshengma@126.com

Correspondence to: Ma Yun-sheng, Doctor, Lecturer, Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Supported by: Innovation Team of Liaoning Province Education Department, No. 2006T062*; Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20072201*

Received: 2010-09-25
Accepted: 2010-11-11

0 引言

骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)可作为神经组织工程的种子细胞^[1-2]。近年来一些研究发现胶原蛋白-壳聚糖复合支架材料成为较好的多孔支架材料, 具有以下特点: 多肽序列来自于自然界, 生物降解性好, 无毒副作用, 促进细胞贴壁, 易获取或人工设计^[3-4]。可作为神经组织工程的支架材料, 但相关细胞相容性研究较少^[5]。

本实验将体外培养的BMSCs分别接种到自行设计构建的胶原蛋白-壳聚糖支架材料表面及多聚赖氨酸包被的盖玻片表面, 通过相差显微镜观察其生长及分化情况。

1 材料和方法

设计: 对比观察体外细胞学实验。

时间及地点: 实验于2008-09/2009-11于辽宁医学院完成。

材料:

试剂及仪器	来源
壳聚糖与 I 型胶原蛋白	Sigma 公司
细胞培养基, 胎牛血清和胰蛋白酶	hyclone 公司
CD29, CD44, CD166, CD34 抗体	chemicon 公司
冷冻干燥机	北京格拉威尔科技公司
扫描电镜(HITACHI-3000N)	日本

实验动物: SPF级日本大耳白兔6只, 雌雄

¹ 辽宁医学院显微镜中心实验室, 辽宁省锦州市 121000; ² 辽宁医学院组织胚胎学教研室, 辽宁省锦州市 121000

李晓龙, 男, 1970年生, 辽宁省锦州市人, 汉族, 1996年辽宁医学院毕业, 实验师, 主要从事组织细胞微细结构研究。
yunshengma@126.com

通讯作者: 马云胜, 博士, 讲师, 辽宁医学院组织胚胎学教研室, 辽宁省锦州市 121000

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2011)08-01377-04

收稿日期: 2010-09-25
修回日期: 2010-11-11
(20100925020/W·Y)

不限, 1.5 kg左右, 购至中国医科大学实验动物中心, 许可证号: SYXK(辽)2008-0005。

实验方法:

BMSCs的制备: 耳缘静脉注射20 mg/kg氯胺酮麻醉兔子, 无菌条件下通过一个小切口暴露出胫骨的近中间平面, 用18号针头吸出2 mL血液, 采用贴壁培养方法获得间充质干细胞^[3], 10~14 d细胞接近融合, 然后用2.5 g/L胰蛋白酶-0.02% EDTA消化, 传代。用P2代细胞进行以下的实验。

胶原-壳聚糖支架制备: 称取壳聚糖0.2 g, 胶原蛋白0.6 g。将壳聚糖粉末溶于冰醋酸中配制成20 g/L的壳聚糖溶液, 后加入I 胶原蛋白。4 °C的冰箱中过夜, 注入模具后入-80 °C的冰箱中冷冻, 后与冷冻干燥机中-53 °C冻干24 h。支架成型后紫外线照射3 h使其交联, 环氧乙烷消毒后包装备用。

扫描电镜观察: 将支架样品裁剪成直径4 mm, 高2 mm大小的小片, 真空喷金后, 扫描电镜观察表面结构和孔径变化, 选择合适的放大倍数拍摄扫描照片。

细胞表型检测: 取P2代细胞, 制成浓度为 $1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液, 每管加500 μL 细胞悬液管。分别加入FITC或PE标记CD29, CD44, CD166, CD34和HLA-DR单克隆抗体。阴性对照加入抗鼠的FITC和PE单克隆抗体。室温孵育20 min, 流式细胞仪检测。

细胞周期检测: 取P2代细胞, 制成单细胞悬液, 细胞数量不少于 1×10^5 个, 乙醇固定30 min, PBS清洗后, 离心, 1 g/L RNase处理后离心, 加入10 g/L碘化丙啶0.5 mL染色30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

BMSCs与支架材料的细胞相容性试验: ①实验组: 将传代的干细胞以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于支架表面(已灭菌处理), 加入含有体积分数3%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养。②对照组: 将干细胞接种于涂布有多聚赖氨酸包被盖玻片表面, 培养条件相同, 用倒置相差显微镜观察细胞的形态变化。

主要观察指标: ①胶原-壳聚糖支架电镜下结构。②流式细胞仪结果。③支架材料与细胞的相容性倒置相差显微镜观察。

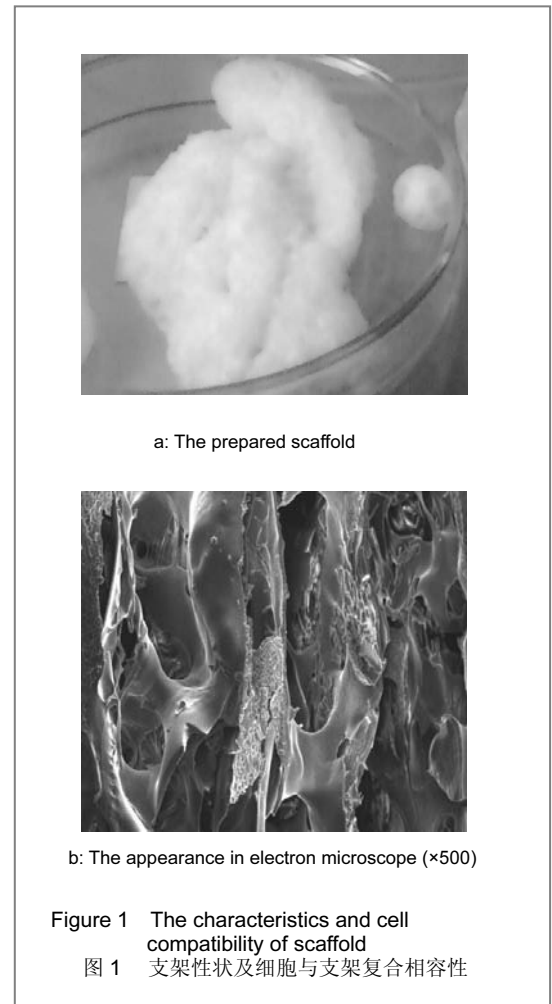
2 结果

2.1 胶原-壳聚糖支架大体和电镜下结构

大体观察: 支架呈圆柱型, 外观呈白色爆花

糖样, 可见表面布满孔隙。冻干的胶原-壳聚糖支架孔隙丰富, 大小比较均一, 且孔与孔之间相互联通构成了交通孔。见图1a。

电子显微镜图像: 互相交织排列的网状纤维, 支架材料的孔径在 $(298 \pm 36) \mu\text{m}$, 见图1b。



2.2 流式细胞仪结果 流式细胞仪检测显示细胞周期及细胞免疫表型为不表达CD34, 高表达CD44($94.1 \pm 1.5\%$)、CD29($88.6 \pm 2.6\%$)和CD166($72.3 \pm 2.7\%$), 组织相关抗原HLA-DR阴性表达, 见图2。

处于G₀/G₁期的细胞为($86.54 \pm 2.31\%$), 处于S期的细胞为($4.23 \pm 0.36\%$), 为G₂/M期的细胞为($9.23 \pm 0.73\%$)。结果显示处于G₀/G₁期的细胞多。

2.3 支架材料与细胞的相容性倒置相差显微镜观察

实验组: 干细胞在支架表面接种后7 d长势良好, 细胞贴附与支架表面和内部, 伸出长突起生长, 无细胞坏死, 见图3。

对照组: 干细胞贴壁, 7 d后长满玻片, 无细胞坏死。

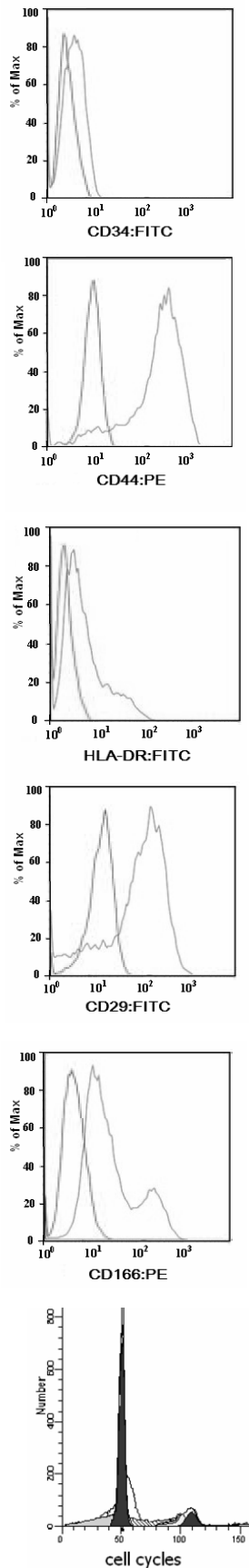


Figure 2 The cell phenotype and cell cycle by flow cytometry
图2 流式细胞仪检测细胞表型及生长周期

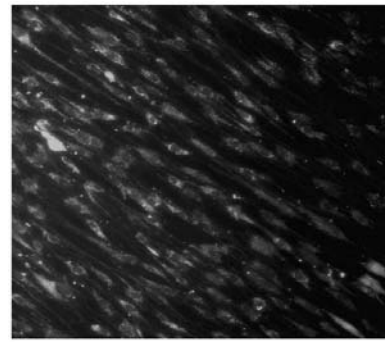


Figure 3 The growth characteristic after recombination of scaffold and cells ($\times 200$)
图3 细胞与支架复合后生长情况($\times 200$)

3 讨论

脊髓损伤后因神经细胞变性坏死, 不能再生, 轴突脱髓鞘, 胶质瘢痕形成, 局部的微环境发生改变等, 使其治疗及康复非常困难^[6]。目前研究将神经组织工程运用于神经损伤的治疗, 促使神经细胞的再生, 恢复脊髓的支架结构及脊髓的轴突有效连接, 提供再生或既有轴突的保护与营养供给^[7-8]。Yu等^[9]在实验中证实: 从新生骨髓中获取的BMSCs移植到脊髓损伤处, 主要分化为神经元。现有的神经支架材料包括无机材料、有机高分子材料及各种表面改性的材料^[10-11], 然而, 它们的硬度较大, 生物相容性差, 细胞在材料表面黏附差, 植入体内导致血栓形成, 生物降解差, 降解后的产物很难被机体有效利用^[12-13]。这些难以克服的缺点限制它们在脊髓损伤修复中的应用。

近年来一些研究开始利用多肽作为神经组织工程的支架材料^[14], 它在机体内可降解为氨基酸, 成为生物体的营养物质, 具有一定的弹性及韧性^[15], 胶体状的多肽支架材料包裹细胞后可通过注射运送到身体的特定部位如脊髓损伤处^[16-17]。作者等设计了仿生的胶原蛋白-壳聚糖支架, 将这种支架与BMSCs复合后发现细胞生长良好, 并有突起延伸。倒置相差显微镜发现实验组的干细胞与对照组的干细胞生长良好, 无细胞死亡。表明支架材料并非为阻止干细胞的生长, 实验组可观察到干细胞明显的突起生长。对照组细胞长势良好, 很快长满瓶底。

本实验结果证实作者设计构建的凝胶支架对于BMSCs有良好细胞相容性, 是一种新型的神经组织工程的支架材料^[18-19]。由于多肽支架材料的生物相容性好, 以后可根据需要, 对多肽的活性位点、电荷及疏水基团进行改变, 从而设计出更优良的多肽, 可自组装为或三维的凝胶支架材料^[20-21]。

4 参考文献

[1] Senel S, Lkinci G, Kas S, et al. Chitosan films and hydmgels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pham.* 2000.193(2):197-203.

[2] Elvira M, Damjan R, Duval E, et al. Fibrin gel improved the Spatial Uniformity and Phenotype of Human Chondrocytes Seeded on Collagen Scaffolds. *Biotechnol Bioeng.* 2007.96(2): 364-370.

[3] Park YJ, Lee YM, Park SN, et al. Plaelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials.*2002; 21(2):153-159.

[4] Zhi XD,Wang W,Bao DY.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007; 11(5):1065-1068.
智晓东,王伟,包大禹.壳聚糖导管结合碱性成纤维细胞生长因子修复大鼠坐骨神经缺损[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(5):1065-1068.

[5] Griffin DJ, Sedighi MR, Schaeffer, et al. Chitosan Scaffolds: interconnective pore size and car tilage engineering. *Acta Biomater.*2006; 2(3):313-320.

[6] Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, et al. Enhancing the vacularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspher. *J Biomed Mater Res A.*2003; 65(4): 489-497.

[7] Alberto Di Martino, Michael Sittinger, Makarand Risbud. Chitosan:A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering.*Biomaterials.*2005;26(30):5983-5990.

[8] Ou YB,Fan WM,Ma YM,et al.Jiangsu Yiyao. 2007;33(9): 904-906.
欧阳彬, 范伟民, 马益民, 等. 壳聚糖、II型胶原和PGA三种支架体外构建组织工程软骨的比较研究[J].江苏医药,2007; 33(9): 904-906.

[9] Yu LM, Kazazian K, Shoichet MS. Peptide surface modification of methacrylamide chitosan for neural tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2007 ;82(1):243-255.

[10] Wu JQ,Yang TF.Shengwu Yixue Gongcheng Zazhi. 2008;12(6): 1349-1353.
吴佳奇,杨天府.多孔P A66/n-HA复合MSCs修复兔膝关节软骨缺损的初步研究[J].生物医学工程杂志,2008,12(6):1349-1353.

[11] Li Z,Cen L.Zuzhi Gongcheng yu Zhongjian Waike Zazhi. 2007; 3(4): 189-192.
李喆,岑莲. 巯基化壳聚糖支架材料的研究[J].组织工程与重建外科杂志,2007,3(4): 189-192.

[12] Kim GH. Electrospun PCL nanofibers with anisotropic mechanical properties as a biomedical scaffold. *Biomedical materials.*2008;3(2):25010.

[13] Jose MV, Thomas V, Johnson KT, et al. Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia.*2009; 5(1):305-315.

[14] Geffre CP, Bliss CL, Szivek JA, et al. Sensate scaffolds coupled to telemetry can monitor in vivo loading from within a joint over extended periods of time. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;84(1):263-270.

[15] Simon JL, Michna S, Lewis JA, et al. In vivo bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds assembled by direct ink writing. *J Biomed Mater Res A.* 2007;83(3):747-758.

[16] Meng S, Rouabhia M, Shi G. Heparin dopant increases the electrical stability, cell adhesion, and growth of conducting polypyrrole/poly(L,L-lactide)composites.*Journal of biomedical materials research.* 2008; 87(2):332-344.

[17] Tan AR, Ifkovits JL, Baker BM, et al. Electrospinning of photocrosslinked and degradable fibrous scaffolds.*Journal of biomedical materials research.*2008;87(4):1034-1043.

[18] Jose MV,Thomas V,Johnson KT,et al.Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering.*Acta biomaterialia.*2009;5(1):305-315.

[19] Pabbruwe MB, Esfandiari E, Kafienah W, et al. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials.* 2009 ;30(26):4277-4286.

[20] Valmikinathan CM, Tian J, Wang J, et al. Novel nanofibrous spiral scaffolds for neural tissue engineering. *Neural Eng.* 2008; 5(4):422-432.

[21] Chang WC, Hawkes E, Keller CG, et al. Axon repair: surgical application at a subcellular scale.*Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010;2(2):151-161.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 辽宁省教育厅创新团队基金项目基金(2006T062); 辽宁省自然科学基金(20072201)。

作者贡献: 设计为第一作者、第三作者实施、评估者为第二作者。

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: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

本文创新性:

提供证据: 检索数据库与时间: 用英文 collagen, chitosan, scaffold 检索 PubMed 数据库, 用中文胶原, 壳聚糖, 支架检索 cnki 数据库, 确定本文具有先进性。

创新性特点说明: 本文与同类研究相比采用新型的支架壳聚糖与胶原蛋白复合制备组织工程支架材料并应用于干细胞与之共同培养得以研究其组织细胞的相容性问题, 结果表明该支架材料和细胞结合良好。



CRTER 杂志综述文章体例: 本刊中文部

文题:	1.2 入选标准	3.4 本研究的局限性
作者:	1.3 质量评估	4 参考文献
单位:	1.4 数据的提取	5 辅文
摘要:	1.5 统计学分析	致谢:
背景:	2 结果	关于作者:
目的:	2.1 纳入文献基本情况分析	基金资助:
方法:	2.2 文章相关临床内容分析	利益冲突:
结果与结论:	2.3 文章相关实验室检查内容分析	伦理批准:
关键词:	3 讨论	此问题的已知信息:
0 引言	3.1 临床相关内容的优劣分析	本综述增加的新信息:
1 资料和方法	3.2 实验室相关内容的优劣分析	临床应用的意义:
1.1 资料来源	3.3 作者的分析意见	