

可注射藻酸盐支架与人骨髓基质干细胞的体外复合培养*☆

汪群力¹, 龚继承¹, 邹重文¹, 杨柏林¹, 罗伟国¹, 金丹², 魏宽海²

In vitro co-culture of injectable alginate scaffolds and human bone marrow stromal stem cells

Wang Qun-li¹, Gong Ji-cheng¹, Zou Zhong-wen¹, Yang Bo-lin¹, Luo Wei-guo¹, Jin Dan², Wei Kuan-hai²

Abstract

BACKGROUND: Injectable tissue-engineered bone is limited to animal experiments. If the human bone marrow stromal stem cells have a good biocompatibility with alginate, the injectable tissue engineered bone will be a very promising clinical treatment.

OBJECTIVE: To study the biocompatibility of human bone marrow stromal stem cells and injectable scaffold of calcium alginate gels *in vitro*.

METHODS: The second passage human bone marrow stromal stem cells were co-cultured with calcium alginate gels. Bone marrow stromal stem cells cultured with no material served as controls. The morphology and proliferation of the cells were observed by inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to semi-quantitatively evaluate the cell proliferation.

RESULTS AND CONCLUSION: The human bone marrow stromal stem cells co-cultured with calcium alginate gels grew well under inverted phase contrast microscope, and no significant difference was found between calcium alginate gels group and control group. Under scanning electron microscope, human bone marrow stromal stem cells adhered well to the calcium alginate gels and proliferated obviously. MTT results showed that the cell number had no significant difference between the two groups. It is suggested that calcium alginate gels have good biocompatibility with human bone marrow stromal stem cells.

Wang QL, Gong JC, Zou ZW, Yang BL, Luo WG, Jin D, Wei KH. *In vitro* co-culture of injectable alginate scaffolds and human bone marrow stromal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(21): 3895-3898. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前可注射组织工程骨的研究主要限于动物实验, 若人骨髓基质干细胞与藻酸盐生物相容性良好, 可注射组织工程骨将是极具前途的临床治疗手段。

目的: 体外观察人骨髓基质干细胞与可注射支架藻酸钙凝胶的生物相容性。

方法: 实验组将第2代人骨髓基质干细胞与藻酸钙凝胶复合培养, 对照组单纯接种骨髓基质干细胞。倒置相差显微镜、扫描电镜观察各组细胞形态及增殖情况, MTT法半定量检测细胞增殖情况。

结果与结论: 倒置显微镜下见实验组细胞生长良好, 与对照组无明显差异。扫描电镜见骨髓基质干细胞在藻酸钙表面贴附、增殖良好, 第6天时细胞已跨越微孔表面或向孔内生长。MTT法显示与对照组相比, 实验组细胞增殖能力不受影响。结果初步表明藻酸钙与人骨髓基质干细胞体外生物相容性较好。

关键词: 藻酸钙凝胶; 可注射; 人骨髓基质干细胞; 生物材料; 生物相容性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.21.022

汪群力, 龚继承, 邹重文, 杨柏林, 罗伟国, 金丹, 魏宽海. 可注射藻酸盐支架与人骨髓基质干细胞的体外复合培养[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(21):3895-3898. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Second Department of Orthopedics, the 187 Central Hospital of Chinese PLA, Haikou 571159, Hainan Province, China; ²Department of Traumatic Orthopedics, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Wang Qun-li☆, Doctor, Associate chief physician, Second Department of Orthopedics, the 187 Central Hospital of Chinese PLA, Haikou 571159, Hainan Province, China
Wangqunli2005@yahoo.com.cn

Supported by: the Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 808248*

Received: 2012-01-09
Accepted: 2012-02-21

0 引言

组织工程研究近年来发展迅速, 是治疗骨缺损、骨不连的理想模式。随着可注射组织工程支架的出现, 使得骨缺损、骨不连微创经皮注射治疗成为可能。与手术方法相比, 可注射性的组织工程骨治疗具有微创、经济、临床使用简便等优点。藻酸钠是来自海洋藻类植物中的无水D-甘露糖醛酸的聚合物, 可溶于水形成一定黏度的溶液, 藻酸钙为藻酸钠的置换物, 呈水凝胶状态, 是较理想的可注射组织工程支架材料^[1-2], 目前文献报道基本限于动物实验研究^[3-4]。

人骨髓间充质干细胞是存在于人骨髓中的

具有高度自我更新能力和多向分化潜能的干细胞群体。其在不同的理化环境和细胞因子的诱导下, 具有分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞甚至神经元样细胞等多系分化潜能。由于其具有易于分离、扩增及体外操作简便等特点, 现已成为干细胞治疗和组织工程研究领域广泛应用的一种成体干细胞。本课题将人骨髓基质干细胞与藻酸盐进行体外复合培养并观测其生物相容性, 为下一步的临床应用做准备。

1 材料和方法

设计: 体外对比观察实验。

时间及地点: 实验于2009-07/2010-01在

¹解放军第一八七中心医院骨二科, 海南省海口市 571159; ²南方医科大学南方医院创伤骨科, 广东省广州市 510515

汪群力☆, 男, 1973年生, 湖北省黄冈市团风县人, 汉族, 2005年解放军第一军医大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事关节外科、关节镜、组织工程方面的研究。Wangqunli2005@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)21-03895-04

收稿日期: 2012-01-09
修回日期: 2012-02-21
(20120109018/M·W)

解放军第一军医大学组织工程实验室完成。

材料:

主要仪器和试剂	来源
相差显微镜	日本 Nikon 公司
扫描电镜	日本日立公司
CO ₂ 细胞培养箱	美国 Harris 公司
酶标仪	日本 Bio-Rad 公司
高糖 DMEM	Hyclone 公司
胎牛血清	杭州四季青生物制品有限公司
胰蛋白酶、地塞米松、 β 甘油磷酸钠和维生素 C	美国 Sigma 公司
四唑盐(MTT, 2 g/L)	上海申能博彩公司
藻酸钠	山东结晶集团股份有限公司
氯化钙	浙江衢州巨化试剂有限公司

方法:

骨髓基质干细胞分离培养: 选取临床自愿捐献骨髓的骨不连患者6例, 局部麻醉下无菌操作, 用16号骨穿针行髂骨穿刺, 抽取骨髓20 mL。离心并用100目钢网过滤后接种入培养瓶内, 加含体积分数为15%胎牛血清的高糖DMEM液, 置于CO₂孵箱内进行培养, 每3 d换液。待原代细胞长满瓶底, 用0.25%胰酶-EDTA液将贴壁细胞消化分离, 加条件培养基(DMEM培养液+体积分数为10%胎牛血清+10⁻⁸ mol/L地塞米松+10 mmol/L β -甘油磷酸钠+50 mg/L维生素C), 置于CO₂孵箱继续培养, 每2 d或3 d换液^[5]。

藻酸盐凝胶的配制: 用灭菌蒸馏水将藻酸钠溶解配成20 g/L的水溶液, 将其与30 mmol/L的氯化钙混合, 形成水凝胶。

细胞接种: 取第2代骨髓基质干细胞消化后计数, 以1.5×10⁴/孔接种于24孔培养板或置有盖玻片的培养皿, 每孔加入培养基1 mL。实验分为2组, 藻酸盐组每孔加3 mm×3 mm×1 mm的藻酸盐凝胶与细胞混合培养, 对照组单纯接种细胞, 于不同时间点观察及检测。

相差显微镜观察: 逐日使用相差显微镜观察两组细胞生长情况。

MTT法分析骨髓基质干细胞与藻酸盐复合培养的成活和增殖能力: 按上述方法接种细胞后, 于2, 4, 6, 8 d弃原培养基, 加入MTT 50 μ L, 置入37 °C CO₂孵箱内孵育4 h, 加入二甲亚砜1 mL, 振荡15 min使细胞裂解, 酶标仪上选择波长570 nm, 测定吸光度值。

扫描电镜观察: 将第2代骨髓基质干细胞消

化后计数板计数, 以1.5×10⁸ L⁻¹浓度用微量加样器将细胞均匀接种于小块状藻酸盐上, 分别于3, 6 d将接种细胞的生物材料取出, PBS漂洗, 2%戊二醛固定, 系列脱水, 乙酸异戊酯置换, 临界点干燥, 表面喷金后进行扫描电镜观察。

主要观察指标: ①复合在藻酸盐凝胶中的人骨髓基质干细胞形态。②与藻酸盐凝胶复合后的细胞增殖能力。

统计学分析: 所测数据在SPSS11.0上进行方差统计分析。P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 相差显微镜观察结果 接种后3 h对照组细胞有部分贴壁, 由圆形变为有2~4个突起的不规则形、多角形, 8 h后完全贴壁, 细胞呈多角形、梭形。细胞生长较快, 两三天后细胞克隆形成, 见图1, 6~8 d汇成单层。藻酸盐组细胞生长与对照组相似, 见图2。



Figure 1 Cultured human bone marrow stromal stem cells observed by inverted phase contrast microscope on 3 d (×100)
图1 倒置显微镜下观察培养第3天时的人骨髓基质干细胞生长情况(×100)



Figure 2 Human bone marrow stromal stem cells co-cultured with calcium alginate gels on 3 d observed by inverted phase contrast microscope (×100)
图2 相差显微镜观察藻酸盐钙与人骨髓基质干细胞复合培养第3天时的生长情况(×100)

2.2 扫描电镜观察结果 藻酸盐与骨髓基质干细胞复合后第3天见支架上贴附细胞为梭形

或多角形表现,带多个突起,各细胞突起数目不等,长短粗细各异,胞体表面有颗粒状物,见图3;6 d时细胞成片生长,细胞跨越微孔表面或向孔内长入,见图4。

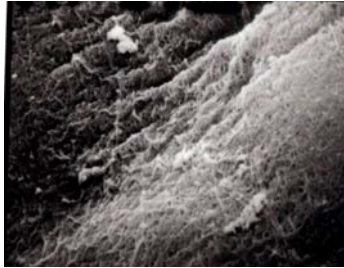


Figure 3 Structure of calcium alginate gels under scanning electron microscope ($\times 1\ 000$)
图3 扫描电镜观察藻酸钙凝胶结构($\times 1\ 000$)



Figure 4 Human bone marrow stromal stem cells co-cultured with calcium alginate gels on 6 d observed by scanning electron microscope ($\times 1\ 000$)
图4 扫描电镜观察藻酸钙凝胶与人骨髓基质干细胞复合培养第6天的超微结构($\times 1\ 000$)

2.3 MTT法测定细胞增殖情况 随培养时间的延长,各组吸光度值逐渐增加,到第6天最高,藻酸盐组在各时间点与对照组比较差异均无显著性意义($P > 0.05$),见表1。

表1 MTT法测定各组细胞培养不同时间点吸光度值
Table 1 Absorption coefficient by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	2 d	4 d	6 d	8 d
Control	0.142 $\pm$ 0.036	0.192 $\pm$ 0.016	0.398 $\pm$ 0.087	0.344 $\pm$ 0.045
Calcium alginate gels	0.141 $\pm$ 0.027	0.180 $\pm$ 0.025	0.386 $\pm$ 0.089	0.332 $\pm$ 0.042

3 讨论

可注射组织工程骨是将细胞-载体复合物注射入体内形成骨组织,从而达到修复骨缺损或骨不连的目的,具有创伤小和操作简单的特点^[6]。另外,修复不规则缺

损,可注射组织工程骨可直接注入缺损区,在固化前进行局部塑形,具有可塑性强的优点。目前,用于可注射骨材料的报道较多,如纤维蛋白凝胶、聚氧化乙烯水凝胶和藻酸盐,其中相对成熟的是藻酸盐^[7-8]。藻酸钠是可溶于水的明胶样碳水化合物,在其水溶液中加入二价阳离子作用下可发生聚合反应,形成网状结构的凝胶,藻酸钠溶液与氯化钙溶液混合,形成藻酸钙,交联过程均匀,具有良好的通透性,利于大分子通过,有利于其中的种子细胞进行营养物质交换和信号传递;其制备方法温和,形成的凝胶具有多孔状结构^[9-10]。操作时可将骨髓基质干细胞与藻酸钠溶液混合,注射时再复合氯化钙溶液,即可在体内形成藻酸钙凝胶与种子细胞的复合物,注射到特定部位并塑形,藻酸钙在体内以酶解方式降解,在体内降解时间报道不一致,但藻酸钙具有完全降解性^[11-13],是较理想的可注射组织工程骨的材料。

骨组织工程支架材料不仅要求高孔隙度的三维立体结构、良好的表面活性、可控生物降解性及可塑性与适宜的力学性能,同时组织工程对材料的要求主要有良好的生物相容性^[14]。生物相容性不仅影响种子细胞的生物学特性和培养效率,而且决定移植后能否与受体很好地适应并结合在一起,从而发挥其修复骨缺损的作用。以藻酸钙为载体的可注射组织工程骨已在小动物体内获得了成功,但要将其应用于临床,将其与人的种子细胞进行复合培养观察其生物相容性是必要的。在倒置显微镜下的观察发现,藻酸钙与人骨髓基质干细胞复合培养后,细胞生长、增殖旺盛,形态健康。扫描电镜观察发现细胞可在材料表面贴附、分裂增殖,藻酸钙与细胞的相容性很好。检测MTT结晶形成的量可以间接反映细胞数量与活力^[15]。作者通过MTT法检测发现藻酸钙与人骨髓基质干细胞复合培养后,与单纯细胞的对照组相比,细胞增殖能力不受影响。本实验的结果表明,藻酸钙与人骨髓基质干细胞的生物相容性良好,可以用作组织构建的支架材料,但其在体内构建的组织工程骨的成骨能力还需要临床前的体内植入研究一步验证。

4 参考文献

- [1] Drury JL, Boontheekul T, Mooney DJ. Cellular cross-linking of peptide modified hydrogels. J Biomech Eng. 2005;127(2): 220-228.
- [2] Gong TF, Fang CY, Chen W, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(18): 3613-3616. 龚泰芳,方彩云,陈文,等. 海藻酸盐的理化特性及其在组织工程研究和临床中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(18): 3613-3616.
- [3] Abbah SA, Lu WW, Chan D, et al. Osteogenic behavior of alginate encapsulated bone marrow stromal cells: an in vitro study. J Mater Sci Mater Med. 2008;19(5):2113-2119.
- [4] Yang C, Frei H, Rossi FM, et al. The differential in vitro and in vivo responses of bone marrow stromal cells on novel porous gelatin-alginate scaffolds. J Tissue Eng Regen Med. 2009;3(8): 601-614.
- [5] Wang QL, Pei GX, Zeng XL. Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi. 2004;6(7): 728-730. 汪群力,裴国献,曾宪利. 成年恒河猴骨髓基质干细胞的体外培养[J]. 中华创伤骨科杂志,2004,6(7): 728-730.

- [6] Yamada Y, Hata K, Ueda M. Injectable bone. Clin Calcium. 2002; 12(2):228-232.
- [7] Fuji T, Anada T, Honda Y, et al. Octacalcium phosphate-precipitated alginate scaffold for bone regeneration. Tissue Eng Part A. 2009; 15(11):3525-3535.
- [8] Krut MC, Persson C, Johansson G, et al. Towards injectable cell-based tissue-engineered bone: the effect of different calcium phosphate microparticles and pre-culturing. Tissue Eng. 2006; 12(2):309-317.
- [9] Chaudhary A, Raina M, McShane MJ, et al. Dissolved core alginate microspheres as "smart-tattoo" glucose sensors. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009; 2009:4098-4101.
- [10] Beckstead BL, Pan S, Bhrany AD, et al. Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering. Biomaterials. 2005; 26(31):6217-6228.
- [11] Damron FH, Yu HD. Pseudomonas aeruginosa MucD regulates the alginate pathway through activation of MucA degradation via MucP proteolytic activity. J Bacteriol. 2011; 193(1):286-291.
- [12] Damron FH, Qiu D, Yu HD. The Pseudomonas aeruginosa sensor kinase KinB negatively controls alginate production through AlgW-dependent MucA proteolysis. J Bacteriol. 2009; 191(7):2285-2295.
- [13] Forster RE, Thurmer F, Wallrapp C, et al. Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation. J Mater Sci Mater Med. 2010; 21(7):2243-2251.
- [14] Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. Biotechnol Prog. 2009; 25(6):1539-1560.
- [15] Hayama Y, Ueda K, Kuroyanagi Y. Optimum preservation for autologous cultured dermal substitutes. Ann Plast Surg. 2010; 65(3):338-343.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 海南省自然科学基金项目(808248)。

作者贡献: 实验设计为第六作者, 实验实施为第一、二作者, 实验评估为第三作者, 资料收集为第四、五作者。第一、二作者成文, 第七作者审校, 第一作者在文对文章负责。

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。

伦理要求: 患者对实验及治疗方案均知情同意, 自愿抽取骨髓。医院伦理道德委员会批准实施。

关键信息: 藻酸盐来源丰富, 藻酸钙为藻酸钠的置换物, 呈水凝胶状态, 是较理想的可注射组织工程支架材料。可注射的组织工程骨治疗骨不连微创、经济, 市场前景光明。

本期专题: 组织工程周围神经支架材料①

- 1 甲壳素神经再生室注入聚乳酸-聚乙醇酸-重组人促红细胞生成素微球促进缺损周围神经的修复——见2012年16卷12期2115页。
- 2 复合他克莫司聚乳酸-乙醇酸缓释导管修复大鼠神经缺损——见2012年16卷12期2099页。
- 3 同种异体神经复合体修复兔周围神经缺损——见2011年15卷34期6315页。
- 4 许旺细胞在不同孔径丝素蛋白支架上的生长——见2011年15卷25期4607页。
- 5 胶原蛋白-硫酸肝素神经生物支架材料的制备——见2011年15卷12期2125页。
- 6 纤维蛋白胶和医用OB胶联合几丁聚糖-胶原导管修复面神经损伤——见2011年15卷8期1331页。
- 7 胶原-壳聚糖支架材料与间充质干细胞的组织相容性——见2011年15卷8期1377页。

- 1 甲壳素神经再生室注入聚乳酸-聚乙醇酸-重组人促红细胞生成素微球促进缺损周围神经的修复

黄亚洲(郑州大学第二附属医院骨科, 河南省郑州市 450014)

推荐理由: 周围神经损伤的治疗一直是临床工作中的难题, 仅手术修复损伤的神经往往达不到理想的效果。因此手术结合药物联合治疗成为治疗周围神经损伤与缺损的新方向。促红细胞生成素除了具有造血的作用以外, 对神经系统损伤的修复也起着重要作用, 其不但对中枢神经系统有明显的促进神经发育、提供保护、营养和再生的作用, 而且对周围神经损伤的修复也起着重要作用。但其促进周围神经损

伤修复的具体理论尚不十分清楚。实验旨在观测重组人促红细胞生成素对于大鼠双侧坐骨神经缺损功能恢复的影响, 并对人周围神经损伤治疗提供新的方向和依据。实验首次应用甲壳素神经再生室, 并且在其中加入聚乳酸-聚乙醇酸-重组人促红细胞生成素微球凝胶, 以观察其对坐骨神经再生的效果。

- 2 复合他克莫司聚乳酸-乙醇酸缓释导管修复大鼠神经缺损

林慧鑫(广州医学院附属深圳市沙井人民医院手外科, 广东省深圳市 518104)

推荐理由: 目前周围神经缺损的修复以自体神经移植最为常用, 并被认为是临床治疗的“金标准”。但自体神经供源有限, 切取后不可避免的造成供区神经功能的损害, 且供区神经与受区神经在直径上常不匹配, 特别是对粗大神神经缺损的修复更为困难, 极大地影响了神经的再生及功能恢复。因此, 寻找一种能替代自体神经移植的生物活性材料成为国内外学者的研究重点。

聚乳酸-乙醇酸作为一种生物可降解材料, 在组织工程学中有广泛的应用, 目前已有其制成的商品化的神经导管应用于临床, 对神经缺损的修复有一定的效果。但神经的再生速度较为缓慢, 单纯的聚乳酸-乙醇酸导管虽可以为缺损神经的再生创造一定的微环境, 却无法加快神经的再生速度。Sunderland的研究表明, 失神经支配的肌肉恢复神经支配的时间不能超过12个月, 否则肌纤维将出现变性、纤维化等不可逆改变, 丧失功能恢复的可能, 因此, 加快神经的再生速度同样非常重要。

他克莫司是从日本筑波山近郊土壤中的链霉菌N09993中提取出来的一种高效免疫抑制

剂, 研究发现其同时具有明显促神经再生作用。实验尝试将他克莫司复合到聚乳酸-乙醇酸中制成缓释导管修复大鼠的神经缺损, 并与自体神经移植相比较, 观察其修复效果。

- 3 同种异体神经复合体修复兔周围神经缺损

杨小华(承德医学院附属医院骨科二科, 河北省承德市 067000)

推荐理由: 周围神经缺损的修复是临床面临的一个难题, 自体神经移植也有诸多弊端。人工神经修复周围神经缺损, 促进神经再生, 是一项颇具应用前景和挑战性的研究工作。实验通过应用种植许旺细胞去细胞同种异体神经复合体修复兔坐骨神经缺损, 证实种植许旺细胞的去细胞同种异体神经复合体免疫原性非常小, 能够更有效地促进神经再生和功能恢复, 为异体神经修复神经缺损提供理论依据。

- 4 许旺细胞在不同孔径丝素蛋白支架上的生长

焦微(复旦大学附属华山医院麻醉科, 上海市 200040)

推荐理由: 实验观察许旺细胞在不同孔径丝素蛋白支架上的生长情况, 发现不同孔径丝素蛋白材料的表面可见许旺细胞生长情况不一。在10~20 μm 孔径材料支架上, 细胞浓度较低, 细胞表现为特异的双极性形态, 细胞与细胞之间或平行排列, 或首尾相连成细胞链; 细胞与细胞之间或平行排列, 或首尾相连成细胞链; 在50~60 μm 孔径丝素材料支架上, 细胞浓度较高, 细胞多为球形, 单个分散在多孔支架表面, 或呈现成团成串葡萄样聚集在孔的底部, 未延展成双极性形态, 只有极少量生长在孔与孔之间峰上的细胞呈双极样。说明多孔丝素蛋白支架的孔径对许旺细胞的黏附、生长有一定的影响, 许旺细胞更适合生长在孔径略大于胞体直径的支架材料上。