

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.16.011 [http://www.crter.org]

李凯, 吕少一, 周建业, 商青青, 邵自强, 胡盛寿. 不同浓度透明质酸水凝胶的细胞相容性[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(16):2927-2934.

不同浓度透明质酸水凝胶的细胞相容性★◆

李凯¹, 吕少一², 周建业¹, 商青青¹, 邵自强², 胡盛寿¹

1 北京协和医学院, 中国医学科学院, 国家心血管病中心, 阜外心血管病医院&心血管疾病国家重点实验室, 北京市 100037

2 北京理工大学材料科学与工程学院, 北京市 100081

文章亮点:

1 以前的研究多针对水凝胶的一种浓度或性能进行评价, 实验将不同浓度透明质酸水凝胶的黏弹性与干细胞的生长行为联系起来, 探讨水凝胶黏弹性与细胞生长和形态的关系, 从中寻找到适宜的水凝胶浓度。

2 在研究手段上, 细胞培养由传统的二维培养方式转向三维培养方式, 能更真实的反映干细胞在体内的表型和生长行为。

3 实验发现透明质酸水凝胶浓度的改变会影响干细胞三维静态培养的生长行为和表型, 8 g/L 的透明质酸水凝胶更适合大鼠骨髓间充质干细胞的三维培养。

关键词:

生物材料; 材料生物相容性; 组织工程; 透明质酸水凝胶; 机械性能; 骨髓间充质干细胞; 三维培养; 增殖; 性能

摘要

背景: 水凝胶呈半凝固的胶体状态, 可以实现细胞的三维立体培养, 消除普通培养皿中出现的“接触抑制”现象, 从而提高培养效率, 透明质酸水凝胶作为三维培养基质在干细胞和组织工程研究领域的应用已有报道。

目的: 探讨透明质酸水凝胶浓度的改变对其基本性能以及对大鼠骨髓间充质干细胞三维培养形态和增殖的影响。

方法: 制备 4, 8, 12 g/L 的透明质酸水凝胶, 观察其凝胶时间、溶胀率、降解速率以及黏弹性; 用这 3 种浓度透明质酸水凝胶包封骨髓间充质干细胞进行三维培养, 并以普通培养皿的二维培养作对照。通过激光扫描共焦显微镜观察不同培养条件下骨髓间充质干细胞的形态, 采用细胞计数法描绘骨髓间充质干细胞在不同浓度透明质酸水凝胶内的生长曲线。

结果与结论: 对于 4-12 g/L 的透明质酸水凝胶, 其浓度越大, 凝胶时间越短, 溶胀率越低, 降解速率越慢, 水凝胶弹性强度越大($P < 0.05$)。激光扫描共焦显微镜见骨髓间充质干细胞在透明质酸水凝胶内呈立体圆球形, 与二维培养时呈现的梭形明显不同; 同时, 细胞计数结果显示骨髓间充质干细胞在透明质酸水凝胶内的增殖率高于二维培养, 并以 8 g/L 透明质酸水凝胶的促增殖作用最明显($P < 0.05$)。可见不同浓度的透明质酸水凝胶性能存在差异, 对大鼠骨髓间充质干细胞的生长、增殖也有影响, 8 g/L 的透明质酸水凝胶更适合大鼠骨髓间充质干细胞的三维培养。

李凯★, 男, 1986 年生, 河北省石家庄市人, 汉族, 北京协和医学院在读硕士, 主要从事心血管组织工程的研究。

likai0203@163.com

通讯作者: 周建业, 硕士, 研究员, 北京协和医学院, 中国医学科学院, 国家心血管病中心, 阜外心血管病医院&心血管疾病国家重点实验室, 北京市 100037

zhoujy@263.net

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)16-02927-08

收稿日期: 2013-02-19

修回日期: 2013-03-14

(20130116009/WLM·W)

Cytocompatibility of hyaluronic acid hydrogels with concentration variations

Li Kai¹, Lü Shao-yi², Zhou Jian-ye¹, Shang Qing-qing¹, Shao Zi-qiang², Hu Sheng-shou¹

1 State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China

2 Department of Material Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Li Kai★, Studying for master's degree, State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China
likai0203@163.com

Corresponding author: Zhou Jian-ye, Master, Investigator, State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China
zhoujy@263.net

Received: 2013-02-19
Accepted: 2013-03-14

Abstract

BACKGROUND: Hydrogel, which is a kind of semi-solid materials, can be used for three-dimensional culture for mesenchymal stem cells. So it would improve efficiency of cultured cells by eliminating "contact inhibition", which is common in two-dimensional culture. Hyaluronic acid hydrogel as a three-dimensional culture matrix has been reported in the field of stem cells and tissue engineering research.

OBJECTIVE: To investigate the morphology and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the three-dimensional hyaluronic acid hydrogels with different properties.

METHODS: Three concentrations of hyaluronic acid hydrogels, 4, 8, and 12 g/L, were prepared and evaluated with their properties including gelation time, swelling ratio, degradation rate and viscoelasticity. Rat bone marrow mesenchymal stem cells were encapsulated and cultured in those hyaluronic acid hydrogels. Another rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the two-dimensional medium served as control. Morphology of the encapsulated bone marrow mesenchymal stem cells was observed by laser scanning confocal microscope. Growth curves of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the hyaluronic acid hydrogels with different concentrations were depicted using cell counting method.

RESULTS AND CONCLUSION: The higher concentration of hyaluronic acid hydrogels led to the shorter gelation time, lower swelling ratio, slower degradation rate and higher strength ($P < 0.05$). Bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the three-dimensional hyaluronic acid hydrogels showed a spherical shape and higher proliferation compared with those in normal culture. Meanwhile, rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured in 8 g/L hyaluronic acid hydrogels showed higher proliferation than those in 4 and 12 g/L hyaluronic acid hydrogels ($P < 0.05$). These findings indicate that concentration variations of hyaluronic acid hydrogels lead to changes in their mechanical properties. Hyaluronic acid hydrogel with a concentration of 8 g/L is more appropriate for three-dimensional culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells.

Key Words: biomaterials; material biocompatibility; tissue engineering; hyaluronic acid hydrogel; mechanical properties; bone marrow mesenchymal stem cells; three-dimensional culture; proliferation; properties

Li K, Lü SY, Zhou JY, Shang QQ, Shao ZQ, Hu SS. Cytocompatibility of hyaluronic acid hydrogels with concentration variations. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(16): 2927-2934.

0 引言

心肌梗死是目前人类健康的最大威胁, 由于心肌细胞几乎没有再生能力, 导致梗死的心肌组织最终由纤维组织替代, 心功能下降^[1]。近年来, 研究者将具有分化潜能的干细胞移植到心肌梗死部位, 试图达到恢复心脏功能的目的^[2-3]。但随着研究的开展, 发现超过90%的移植细胞在24 h内即大量逃逸, 细胞治疗的效果受到质疑^[4]。于是, 采用可降解的生物材料, 如胶原、Matrigel等作为细胞载体防止细胞逃逸的方法引起了关注^[5]。

可注射水凝胶除了能携带细胞之外, 还能为干细胞的存活和生长提供理想的微环境, 因此具有较大优势。透明质酸是一种分布在多种组织细胞外基质中的蛋白多糖^[6], 具有良好生物相容性, 并在生物发育和机体损伤修复过程中发挥重要作用。因此, 基于透明质酸的水凝胶已成为一种有前景的生物材料, 并在三维细胞培养、组织工程支架以及再生医学领域得到广泛应用^[7]。作为三维培养基质, 透明质酸水凝胶能够支持干细胞的生长行为, 例如干细胞的表型、活性、增殖、迁移和分化等, 更重要的是这些生长行为跟水凝胶的机械性能和内部结构关系密切^[8]。有研究指出, 干细胞对培养基质的硬度和结构能直接做出应答反应^[9-10], 从而影响自身的一些生长行为。在以往的关于透明质酸水凝胶的研究中多采用单一浓度, 因而目前关于透明质酸水凝胶浓度的改变对水凝胶的基本性能以及水凝胶内细胞生长行为的具体影响还没有完全认识清楚。因此, 在透明质酸水凝胶治疗应用之前, 分析设计水凝胶的优越性能以及建立利于干细胞存活和生长的最佳培养条件对于组织工程和再生医学的应用具有重要意义。

目前透明质酸水凝胶在心血管领域的应用研究较少, 文章对透明质酸水凝胶的特性作初

步研究, 制备不同质量浓度水凝胶并探讨浓度的改变对其基本性能以及对大鼠骨髓间充质干细胞生长、增殖、形态和分布的影响, 为进一步深入研究奠定基础。

1 材料和方法

设计: 水凝胶性能分析及细胞学体外实验。

时间及地点: 于2011年10月至2012年9月在北京协和医学院阜外心血管病医院心血管疾病国家重点实验室完成。

材料:

实验动物: 健康雄性4周龄SD大鼠20只, 体质量60 g左右, 由北京大学医学部提供, 许可证号: SCXK(京)2001-0012。动物饲养环境为清洁级, 实验过程对动物的处置符合相关动物伦理学要求。

不同浓度透明质酸水凝胶的性能及其对骨髓间充质干细胞形态和增殖影响检测中所用主要试剂与仪器:

Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
透明质酸水凝胶试剂盒 (HyStem Hydrogel)	BioTime Inc, 美国
IV型透明质酸酶, FITC-Phalloidin 染料	Sigma-Aldrich, 美国
胎牛血清、DMEM 细胞培养基	Gbico, 美国
MCR 301 型流变仪	Anton Paar Physica, 奥地利
IX81 型激光扫描共焦显微镜, IX70 型倒置荧光显微镜	Olympus, 日本
CD29-PE、CD34-PE、CD45-FITC、CD90-FITC 抗体	BD, 美国

方法:

透明质酸水凝胶的制备: 透明质酸水凝胶试剂盒 HyStem Hydrogel 内含冻干状固体 HyStemTM (经巯基修饰的透明质酸)、ExtralinkTM (聚乙二醇二丙烯酸酯) 和脱气去离子水3个组分, 水凝胶配制按照说明书进行。HyStemTM 和 ExtralinkTM 分别溶于脱气去离子水后形成凝胶工作液和交联剂工作液, 其中交联剂工作液浓度固定为2%, 凝胶工作液所需去离子水体积由最终体积减去交联剂用水体积计算而得。将两种工作液按比例混合, 待凝固后, 最终制备成4, 8, 12 g/L的水凝胶。

凝胶时间测定: 水凝胶工作液和交联剂工作液混合均匀后, 立即用移液器吸取300 μL混合液转移到离心管内, 置于37 °C水浴并开始计时, 不时倾斜离心管观察溶液是否流动。当液体不再流动时, 则认为是形成凝胶, 记录此过程的时间。

溶胀实验: 采用溶胀实验比较不同质量浓度水凝胶的溶胀性能^[11], 以溶胀率表示。待水凝胶凝固成胶体后, 称质量得 m_i , 置于37 °C的PBS溶液中浸泡过夜, 至溶胀平衡, 从PBS中取出并再次称质量得 m_w , 计算溶胀率。

$$\text{溶胀率}(\%) = [(m_w - m_i) / m_i] \times 100\%$$

体外酶降解实验: 通过测定透明质酸酶降解水凝胶导致的质量损失获得^[11]。IV型透明质酸酶工作液用PBS配制, 浓度为300 μg/L。水凝胶凝固后在PBS溶液中溶胀至平衡, 称质量, 然后置于37 °C透明质酸酶工作液中至完全降解。降解速率通过公式计算得出。

$$\text{质量损失}(\%) = [(m_0 - m_t) / m_0] \times 100\%, \text{ 其中 } m_0 \text{ 是水凝胶的初始质量, } m_t \text{ 是降解 } t \text{ 小时后的质量}$$

黏弹性测定: 通过流变仪测定水凝胶的黏弹性, 黏弹性是以存储模量(G')和损耗模量(G'')的形式测量, 其中存储模量(G')代表弹性, 损耗模量(G'')代表黏性, 这两个参数代表材料的相对硬度^[11]。取3种浓度的透明质酸水凝胶, PBS中37 °C溶胀至平衡, 置于流变仪平行板顶部, 裁剪成直径25 mm圆形形状, 厚度为1.5 mm。流变仪动态振荡扫描频率的范围设置为0.1–10 Hz, 恒定剪切应力设为1%, 测量温度设为37 °C, 分别读取G'和G''。

骨髓间充质干细胞培养、鉴定及封装: 采用全骨髓贴壁法从SD大鼠分离获得骨髓间充质干细胞^[12], 采用颈椎脱臼法处死大鼠, 体积分数75%乙醇浸泡3 min, 无菌条件下, 取出大鼠股骨和胫骨, 剪除干骺端, 5 mL注射器吸取DMEM培养基反复冲洗骨髓腔于培养皿内, 将冲出的细胞转移到75 mL培养瓶内, 置于体积分数5%CO₂、37 °C细胞培养箱内培养, 48 h后首次换液, 以后每两三天换液1次。原代细胞以1:2的比例传代。取第2代骨髓间充质干细胞用于实验研究。

应用流式细胞仪鉴定细胞表型。收集生长状态良好的细胞, 2.5 g/L胰酶消化, 4 °C, 1 000 r/min离心5 min, 用PBS清洗细胞, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 分别加入单克隆抗体 CD34-PE、CD45-FITC、CD29-PE、CD90-FITC。同时每管样品设立同型阴性对照。避光冰上孵育45 min, 用体积分数2%小牛血清洗涤细胞3次, 以除去未结合抗体, 用含体积分数2%小牛血清的PBS 500 μL重悬细胞, 流式细胞仪检测分析。

封装细胞时, 将单层培养的骨髓间充质干细胞消化并离心收集, 用尚未凝固的透明质酸水凝胶混合液重悬细胞沉淀, 移液器反复吹打混匀, 在凝成胶体之前迅速移到96孔板中, 每孔100 μL, 然后置于体积分数

5%CO₂、37 °C细胞培养箱内。待透明质酸水凝胶凝固成胶体后,每孔再添加200 μL含有体积分数10%胎牛血清和体积分数1%青霉素/链霉素的DMEM细胞培养基,继续培养,细胞浓度为1×10⁹ L⁻¹。

骨髓间充质干细胞在水凝胶内的形态观察:包封的细胞用PBS洗涤后,40 g/L多聚甲醛室温固定30 min,体积分数0.1% Triton X-100室温孵育5 min,用FITC-Phalloidin在37 °C避光孵育1 h,DAPI孵育10 min,然后在激光扫描共焦显微镜下观察细胞形态。以普通二维培养的骨髓间充质干细胞作对照。

细胞计数法检测骨髓间充质干细胞在透明质酸水凝胶中的增殖能力:分别在第0, 2, 5, 8, 11天通过细胞计数法检测透明质酸水凝胶中骨髓间充质干细胞的增殖能力。吸去96孔板内的培养基,PBS洗涤后,每孔添加200 μL的IV型透明质酸酶工作液,待水凝胶降解完全后,骨髓间充质干细胞从水凝胶中完全释放出来,然后收集骨髓间充质干细胞,离心后弃上清,用DMEM培养基重悬细胞沉淀,混匀并吹打成单个细胞,用血球计数板进行细胞计数,细胞个数由公式得出。以普通二维培养的骨髓间充质干细胞作对照。

$N=(n/4) \times 10^4 \times \text{稀释倍数} \times V$, 其中 n 为血球计数板4个大方格内的细胞数, V 为细胞悬液总体积

主要观察指标: ①不同质量浓度透明质酸水凝胶的基本性能。②骨髓间充质干细胞在二维培养以及在3种浓度水凝胶三维培养时的形态及增殖情况。

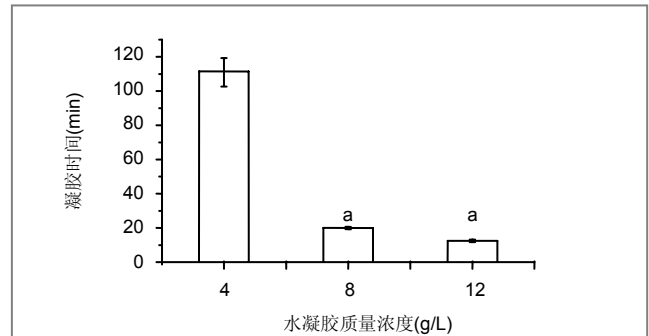
统计学分析: 采用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间的数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同质量浓度透明质酸水凝胶的制备及凝胶时间 按照实验设计制备不同质量浓度的透明质酸水凝胶。每种质量浓度的透明质酸水凝胶的凝胶时间均重复测定3次。实验结果显示,透明质酸水凝胶浓度越大,凝胶时间越短,即4 g/L的透明质酸水凝胶凝胶时间最长,为(111.5±7.8) min,8 g/L的透明质酸水凝胶的凝胶时间为(20.0±1.4) min,而12 g/L的透明质酸水凝胶的凝胶时间最短,为(12.5±0.7) min,见图1,3种质量浓度透明质酸水凝胶的凝胶时间比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.2 不同质量浓度透明质酸水凝胶的溶胀情况 每种质

量浓度透明质酸水凝胶的溶胀率均重复测定3次。实验结果显示,透明质酸水凝胶浓度越大,溶胀率越小。4 g/L透明质酸水凝胶溶胀率最高,为(56.16±3.59)%,而8,12 g/L透明质酸水凝胶溶胀率分别为(33.40±3.53)%和(21.00±3.62)%,见图2,3种质量浓度透明质酸水凝胶的溶胀率比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

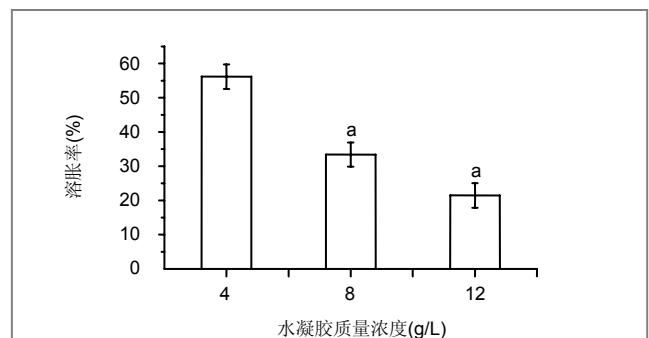


与4 g/L透明质酸水凝胶比, $^a P < 0.05$ 。

注:经比较发现8,12 g/L透明质酸水凝胶的凝胶时间明显少于4 g/L透明质酸水凝胶,即透明质酸水凝胶质量浓度越大,凝胶时间越短。

图1 不同质量浓度透明质酸水凝胶的凝胶时间比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 1 Gelation time of hyaluronic acid hydrogels with different concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与4 g/L透明质酸水凝胶比, $^a P < 0.05$ 。

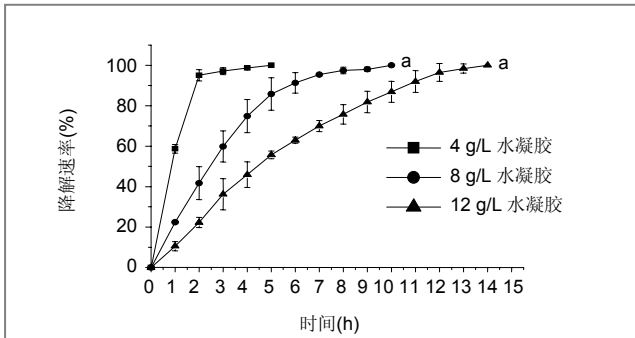
注:经比较发现8,12 g/L透明质酸水凝胶的溶胀率明显低于4 g/L透明质酸水凝胶,即透明质酸水凝胶质量浓度越大,溶胀率越小。

图2 不同质量浓度透明质酸水凝胶的溶胀率比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 Swelling ratios of hyaluronic acid hydrogels with different concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.3 不同质量浓度透明质酸水凝胶的体外酶降解速率 每种质量浓度透明质酸水凝胶的降解速率均重复测定3次。结果显示,透明质酸水凝胶质量浓度越大,其降解速率越慢。4 g/L透明质酸水凝胶降解最快,在3 h左右完全降解,8 g/L透明质酸水凝胶在8 h左右完全降解,

12 g/L透明质酸水凝胶降解最慢, 完全降解需要13 h左右, 见图3, 3种浓度透明质酸水凝胶的降解速率比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。



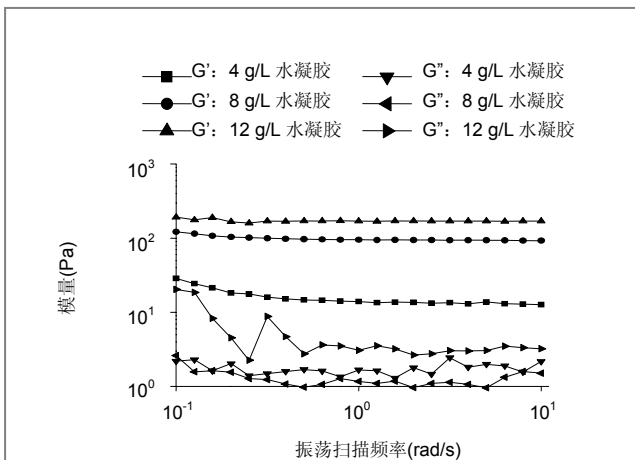
与 4 g/L 透明质酸水凝胶比, $aP < 0.05$ 。

注: 经比较发现 8, 12 g/L 透明质酸水凝胶的降解速率明显低于 4 g/L 透明质酸水凝胶, 即透明质酸水凝胶质量浓度越大, 其降解越慢。

图 3 不同质量浓度透明质酸水凝胶的降解速率比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 3 Degradation rates of hyaluronic acid hydrogels with different concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 不同质量浓度透明质酸水凝胶的黏弹性 见图4。



注: 根据不同振荡扫描频率下的存储模量(G')和损耗模量(G'')生成曲线图, 其中存储模量(G')代表弹性, 损耗模量(G'')代表黏性。测量结果发现, 随着透明质酸水凝胶质量浓度的增加, 其弹性强度逐渐增强; 而黏性则无此规律, 其中 8 g/L 的透明质酸水凝胶黏性最低。

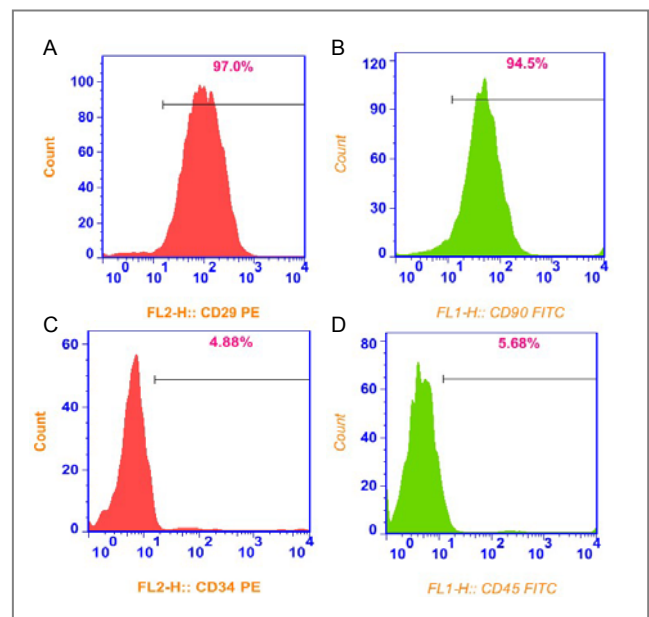
图 4 不同质量浓度透明质酸水凝胶的黏弹性比较

Figure 4 Viscoelasticity of hyaluronic acid hydrogels with different concentrations

根据不同振荡扫描频率下的存储模量(G')和损耗模量(G'')生成曲线图, 在整个频率范围, 同一浓度水凝胶的存储模量(G')要远远大于其损耗模量(G''), 说明水凝胶形成胶体后弹性占主导地位, 并且存储模量(G')在不

同的频率时较为稳定, 其值基本保持不变, 即水凝胶内部结构比较稳定。测量结果发现, 随着透明质酸水凝胶浓度的增加, 其弹性强度逐渐增强, 但 8, 12 g/L 的透明质酸水凝胶弹性强度较为接近, 4 g/L 的透明质酸水凝胶弹性强度很弱; 而黏性则无此规律, 其中 8 g/L 的透明质酸水凝胶黏性最低。

2.5 骨髓间充质干细胞的表型 流式细胞仪检测结果显示, 第2代大鼠骨髓间充质干细胞CD29, CD90抗原阳性率分别为97.0%和94.5%。仅有少量细胞表面抗原CD34, CD45阳性, 阳性率分别为4.9%和5.7%。见图5。



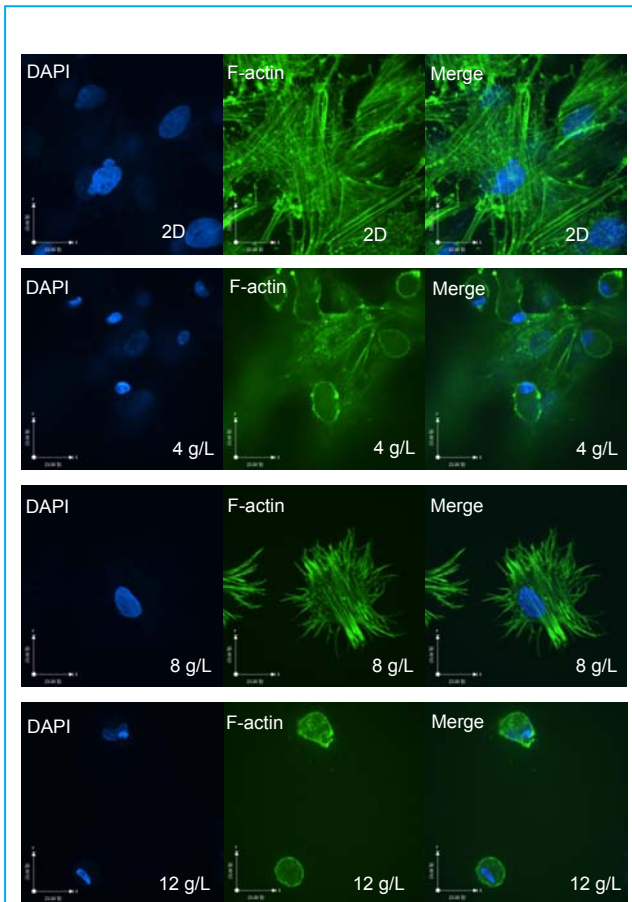
注: 流式细胞仪检测结果显示多数细胞表达间充质干细胞表面抗原 CD29(A), CD90(B), 而不表达造血细胞表面抗原 CD34(C) 和 CD45(D), 证实分离培养细胞为骨髓间充质干细胞。

图 5 分离培养的第 2 代大鼠骨髓间充质干细胞的表型

Figure 5 Cell phenotypes of passage 2 rat bone marrow mesenchymal stem cells

2.6 骨髓间充质干细胞在不同浓度透明质酸水凝胶内的形态 激光扫描共焦显微镜下分别观察骨髓间充质干细胞在二维培养和三维培养时的具体形态。在高倍镜下($\times 600$), 二维培养的骨髓间充质干细胞铺展充分, 呈典型梭形。4 g/L透明质酸水凝胶内的骨髓间充质干细胞可以铺展, 8 g/L透明质酸水凝胶内的骨髓间充质干细胞向四周均匀铺展, 而12 g/L透明质酸水凝胶内的骨髓间充质干细胞不能铺展, 呈圆球形, 见图6。同时, 共焦显微镜三维扫描成像分析显示, 骨髓间充质干细胞在8, 12 g/L透明质酸水凝胶内的分布比较均匀, 而在4 g/L透

明质酸水凝胶内有沉积现象, 底部细胞较多, 见图7。



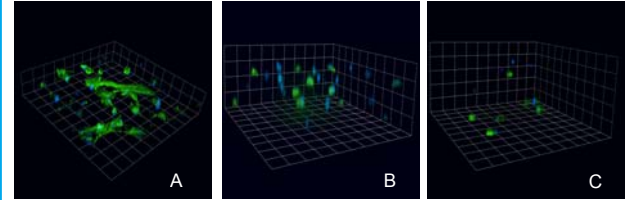
注: F-actin 为纤维状肌动蛋白, 能与鬼笔环肽(Phalloidin)特异性结合。用荧光标记的鬼笔环肽与 F-actin 结合后, 可以显示微丝骨架在细胞中的分布, 以观测细胞形态。4, 8 g/L 水凝胶内的骨髓间充质干细胞可以铺展, 而 12 g/L 水凝胶内的细胞不能铺展, 呈圆球形。

图6 骨髓间充质干细胞在二维培养和不同质量浓度透明质酸水凝胶内三维培养时的形态(激光扫描共焦显微镜, $\times 600$)

Figure 6 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells encapsulated in three-dimensional hyaluronic acid hydrogels and cultured on two-dimensional matrix observed by laser scanning confocal microscope ($\times 600$)

2.7 骨髓间充质干细胞在不同浓度透明质酸水凝胶内的增殖情况 分别在第0, 2, 5, 8, 11天通过细胞计数描绘骨髓间充质干细胞水凝胶三维培养的生长曲线, 每个时间点的样本量均为3个, 生长曲线显示骨髓间充质干细胞在第0-2天为生长稳定期, 从第2天开始进入对数生长期, 第8天开始进入平台期。研究发现, 在第5天以后, 骨髓间充质干细胞在透明质酸水凝胶三维培养表现出的增殖率要明显高于二维培养组, 其中8 g/L透明质酸水凝胶培养的骨髓间充质干细胞增殖率要高于4, 12 g/L的透明质酸

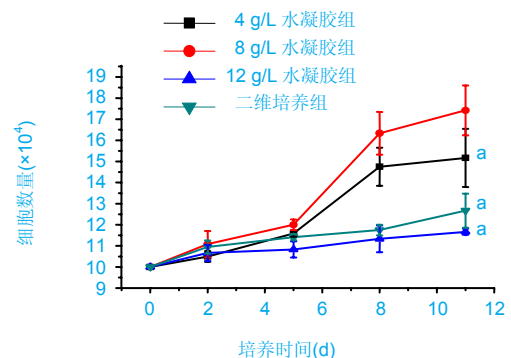
水凝胶, 12 g/L透明质酸水凝胶与二维培养的骨髓间充质干细胞表现出的增殖率均较低, 见图8, 这4组骨髓间充质干细胞的增殖率比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。



注: A: 骨髓间充质干细胞在 4 g/L 水凝胶内的分布不均匀, 有沉积现象; B: 骨髓间充质干细胞在 8 g/L 水凝胶内的分布较为均匀; C: 骨髓间充质干细胞在 12 g/L 水凝胶内的分布较为均匀。

图7 激光扫描共焦显微镜三维成像分析骨髓间充质干细胞在不同质量浓度透明质酸水凝胶内三维培养时的分布情况($\times 200$)

Figure 7 Three-dimensional image showing distribution of bone marrow mesenchymal stem cells encapsulated in three-dimensional hyaluronic acid hydrogels by laser scanning confocal microscope ($\times 200$)



与 8 g/L 水凝胶组比, $^a P < 0.05$ 。

注: 经比较发现骨髓间充质干细胞在 8 g/L 透明质酸水凝胶内增殖率要高于 4, 12 g/L 水凝胶组及二维培养组。

图8 不同质量浓度透明质酸水凝胶三维培养和普通二维培养时骨髓间充质干细胞的数量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 8 Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells encapsulated in three-dimensional hyaluronic acid hydrogels with different concentrations and cultured on two-dimensional matrix ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

透明质酸是一种线性黏多糖, 在多种组织细胞外基

质中广泛分布^[13]。在胚胎发育时期,透明质酸能够提供支架结构,帮助传导信号,促进细胞的增殖、迁移和分化。在机体损伤修复过程中,透明质酸贯穿血管新生的整个环节,低分子量的透明质酸能够募集内皮细胞到血管损伤部位,促进内皮细胞的增殖和迁移^[14]。而透明质酸在心肌组织含量丰富,这提示透明质酸很可能会参与心肌损伤修复的过程。因此,课题组设想基于透明质酸的可降解水凝胶在心血管修复中可能会发挥重要作用。

首先,水凝胶具备一定的机械性能——黏弹性,在细胞三维培养时,这种机械性会影响干细胞的生长行为,特别是骨髓间充质干细胞的表型、增殖及分化^[15],骨髓间充质干细胞在软基质中倾向于分化为神经细胞,在硬基质中倾向于分化为成骨细胞,而在软硬适中的基质中倾向于分化为心肌细胞,这跟整合素配体信号传递作用以及传感器将机械刺激传递给细胞骨架关系密切^[16]。水凝胶的机械性能还影响其他细胞的功能发挥,尤其是心肌细胞,在与心肌组织基质相似的环境中培养时能够保持稳定的节律性兴奋,而培养基太软或太硬会造成心肌细胞过度伸张和收缩^[17]。Prestwich等^[18]发现,化学修饰可以改变透明质酸水凝胶的性能特点,通过添加交联剂和调整水凝胶浓度能任意调整和控制其机械性能,从而制备性能理想的水凝胶。实验中黏弹性测定结果显示随着水凝胶质量浓度的增加,其强度逐渐增强。这可能是由于水凝胶内透明质酸分子的含量增多,水凝胶内部网格交联程度密集,最终造成水凝胶强度增强。在高强度水凝胶内培养的骨髓间充质干细胞表现出的增殖率很低,同时细胞几乎不能铺展,原因可能是水凝胶内部网格交联密度高以及孔径太小,阻碍营养物质和氧分子的运输和扩散^[19],也限制了骨髓间充质干细胞的铺展空间,导致细胞呈圆球形,而在低强度水凝胶内骨髓间充质干细胞可以向四周均匀铺展,并能表现出较强的增殖能力。但是,水凝胶强度过低,会造成内部交联程度差,导致骨髓间充质干细胞在水凝胶内分布不均匀,会沉积在水凝胶底部。此外,实验发现,随着振荡频率的改变,水凝胶的弹性模量(G')基本保持不变,说明其内部结构较为稳定,即能够为细胞的生长提供稳定的培养环境。骨髓间充质干细胞在8 g/L水凝胶内既能铺展,又具备相对较强的增殖能力,可能比较适合骨髓间充质干细胞的培养。改变交联剂浓度用量也会改变水凝胶的黏弹性,进而影响干细胞的生长行为,具体的影响机制需要进一步研究。

其次,线性的透明质酸经交联成水凝胶后形成了三维立体、不同孔径的网格,为细胞的存活和生长提供了三维培养环境。与传统的二维平面培养相比较,三维培养至少具备3大优势:①三维培养使细胞可以在多层次空间内活动,实验发现,8 g/L的水凝胶三维培养的骨髓间充质干细胞在胶内多层均匀分布,同时表现出的增殖率要明显高于二维培养组,这可能是因为三维培养消除了细胞“接触抑制”的影响,细胞增殖数量明显升高。②三维培养方式能更好地模拟细胞体内的生理环境,并能真实反映细胞活动和细胞间相互作用^[20],直接影响细胞表型和生长行为,包括细胞形态、活性、迁移、增殖以及分化等。实验发现骨髓间充质干细胞在水凝胶三维培养时,呈立体圆球形并且可以铺展,这可能更接近骨髓间充质干细胞在体内时的结构形态及生物功能^[21],并与二维培养呈现的梭形有明显区别。另一方面,骨髓间充质干细胞膜表面分子CD44是透明质酸分子的受体之一^[22-23],透明质酸分子也有可能通过与受体分子CD44的相互作用开启胞内信号通路,促进了细胞的增殖,但实验未进行验证,有待更为深入的研究。③已有研究证实,利用生物材料为干细胞构造仿生三维培养环境可以长期维持干细胞的活性以及多向分化潜能。Mohand-Kaci等^[24]利用透明质酸水凝胶构建三维培养环境,大鼠骨髓间充质干细胞培养28 d后,仍然维持较高的活性,并且高表达其特异性标记物,经诱导后,能分化为脂肪细胞、成骨细胞和平滑肌细胞。当然,不同凝胶浓度带来的凝胶内部网格密度、孔径大小以及性能差异,是影响上述优势发挥的关键因素。

水凝胶的其他性能对细胞治疗也发挥着积极作用,比如凝胶形成需要一定的时间,可以完成细胞混合,并在凝固前注入心肌组织;由于水凝胶的溶胀特性,可以从周围组织吸收液体成分,包括细胞因子,自由水等,可以为移植细胞提供养分并帮助改善注射部位的微环境^[25];降解的透明质酸分子会参与到损伤修复的过程,对于水凝胶内干细胞释放的细胞因子也会起到控释作用^[7]。因此,采用透明质酸水凝胶作为细胞载体进行细胞治疗,具有良好的应用前景。

实验仅是初步研究,对3种不同浓度的透明质酸水凝胶进行了凝胶时间、溶胀率、降解速率、黏弹性等基本性能表征,并评估了大鼠骨髓间充质干细胞在其中的分布、形态和增殖状况,实验表明8 g/L的透明质酸水凝胶性能较为优越。更多的性能评价、对移植干细胞的影响,包括向心肌细胞和血管内皮细胞分化的影响,体

内命运和作用等尚需大量的研究工作。

致谢: 感谢阜外心血管病医院&心血管疾病国家重点实验室刘学文老师、李君老师、孟健老师以及北京协和医学院基础医学院周军老师提供的技术上的帮助。

作者贡献: 第三作者进行实验设计, 第一、二、四作者进行实验实施, 实验评估为第三、五、六作者, 第一作者成文, 第三作者修改、审校, 第一、三作者对文章负责。

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Anversa P, Kajstura J, Leri A, et al. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation*. 2006;113(11):1451-1463.
- [2] Meyer G P, Wollert K C, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006;113(10):1287-1294.
- [3] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-705.
- [4] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1199-1209.
- [5] Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, et al. Injectable bioartificial myocardial tissue for large-scale intramural cell transfer and functional recovery of injured heart muscle. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;128(4):571-578.
- [6] Zhang WQ, Huang YS, Zhi XX. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(23):4515-4518. 张文强, 黄岳山, 支晓兴. 透明质酸在临床医学中的应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(23):4515-4518.
- [7] Prestwich GD. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *J Control Release*. 2011;155(2):193-199.
- [8] Lawyer T, McIntosh K, Clavijo C, et al. Formulation Changes Affect Material Properties and Cell Behavior in HA-Based Hydrogels. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:737421.
- [9] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-689.
- [10] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001;294(5547):1708-1712.
- [11] Suri S, Schmidt CE. Photopatterned collagen-hyaluronic acid interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomater*. 2009;5(7):2385-2397.
- [12] Cai P, Zhu SX, Su YM, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009;13(36):7073-7077. 蔡鹏, 朱绍兴, 苏一鸣, 等. 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞及其诱导分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(36):7073-7077.
- [13] Xu X, Jha AK, Harrington DA, et al. Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks. *Soft Matter*. 2012;8(12):3280-3294.
- [14] Yee D, Hanjaya-Putra D, Bose V, et al. Hyaluronic Acid hydrogels support cord-like structures from endothelial colony-forming cells. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(9-10):1351-1361.
- [15] Lei Y, Gojini S, Lam J, et al. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials*. 2011;32(1):39-47.
- [16] Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(2):205-219.
- [17] Young JL, Engler AJ. Hydrogels with time-dependent material properties enhance cardiomyocyte differentiation in vitro. *Biomaterials*. 2011;32(4):1002-1009.
- [18] Prestwich GD, Liu Y, Yu B, et al. 3-D culture in synthetic extracellular matrices: new tissue models for drug toxicology and cancer drug discovery. *Adv Enzyme Regul*. 2007;47:196-207.
- [19] Lee M, Wu BM, Dunn JC. Effect of scaffold architecture and pore size on smooth muscle cell growth. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(4):1010-1016.
- [20] Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):839-845.
- [21] Chen X, Thibault SL. Response of fibroblasts to transforming growth factor-beta1 on two-dimensional and in three-dimensional hyaluronan hydrogels. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(23-24):2528-2538.
- [22] Kutty JK, Cho E, Soo LJ, et al. The effect of hyaluronic acid incorporation on fibroblast spreading and proliferation within PEG-diacrylate based semi-interpenetrating networks. *Biomaterials*. 2007;28(33):4928-4938.
- [23] Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, et al. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(27):11298-11303.
- [24] Mohand-Kaci F, Assoul N, Martelly I, et al. Optimized hyaluronic acid-hydrogel design and culture conditions for preservation of mesenchymal stem cell properties. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(4):288-298.
- [25] Yoon SJ, Fang YH, Lim CH, et al. Regeneration of ischemic heart using hyaluronic acid-based injectable hydrogel. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;91(1):163-171.