

基础研究

不同细胞接种密度构建组织工程椎间盘
的实验研究

辛洪奎, 张 超, 阮狄克

(第二军医大学海军临床医学院骨科 100037 北京市)

【摘要】目的:探索构建组织工程椎间盘时合理的细胞接种数量。**方法:**取孕 20 周自然流产的人胚胎椎间盘细胞为种子细胞, 聚乳酸-羟基乙酸 (polylactic-glycolic acid, PLGA) 材料为支架分别构建细胞接种密度为 0(A 组, 空白对照组)、 10^4 个/150 μ l(B 组)、 10^5 个/150 μ l(C 组)、 10^6 个/150 μ l(D 组)的细胞-支架复合物, 体外培养 48h 后植入裸鼠背部皮下, 8 周后取材行形态及 HE 和免疫组织化学染色组织学观察, 生化测定 I、II 型胶原蛋白和糖胺聚糖, 观察 BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine, 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷)标记细胞。**结果:**人胚胎椎间盘细胞可与 PLGA 支架在体外及裸鼠体内实现良好的复合并初步发挥生理功能。8 周时, 实验组复合物维持了良好的外形, 有效阻挡了外源纤维组织长入支架内部。细胞-支架复合物内有大量 BrdU 阳性细胞。C 组及 D 组细胞-支架复合物中胶原蛋白及糖胺多糖的表达量明显高于 A 组和 B 组, 差异有显著性($P<0.01$)。**结论:**人胚胎椎间盘细胞在体外培养条件下可与 PLGA 支架完成良好的立体结合, 细胞可顺利完成贴附及增殖。构建组织工程椎间盘时比较理想的细胞接种密度应不低于 10^5 个/150 μ l。

【关键词】椎间盘;组织工程;髓核细胞;支架材料

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-12-0925-04

Tissue engineering intervertebral disc: animal experiment seeded with different concentration of nucleus pulposus cells/XIN Hongkui, ZHANG Chao, RUAN Dike//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(12):925-928

【Abstract】 Objective: To study the feasibility of construction of intervertebral disc using tissue engineering methods and the effect of varying concentration of intervertebral disc cells seeded on the PLGA scaffolds. **Method:** Cells were isolated from a 20 week-old abortus. The 2nd generation of cells were used for cell-scaffold composite and the composite was observed in vitro by MTT assay and electronmicroscopy scanning. 40 cell-scaffold composites were constructed with different cell concentration of 0, 10^4 /150 μ l, 10^5 /150 μ l and 10^6 /150 μ l. Composites were incubated in vitro for 48 hours then implanted subcutaneously onto the dorsum of nude mice. The mice were killed and the implants were harvested 4 weeks after surgery, followed by a series of investigations: gross morphology, histology, immunohistochemical examination and biochemical analysis of glycosaminoglycans. **Result:** Cells attached to the PLGA scaffolds well and synthesized extra cellular matrices. MTT dying observation showed the color of the composite increased with the increasing cell number. Histology, immunohistochemical analysis and biochemical analysis of glycosaminoglycans indicated that composites loading cells of 10^5 and 10^6 had a better synthesis function than the other two groups, especially in type II collagen and GAG. Immunohistochemical analysis of BrdU marked cells proved that the cells in the composites were the human disc cells seeded in 4 weeks ago. **Conclusion:** PLGA scaffold is suitable for tissue engineering intervertebral disc and abortus intervertebral disc cells can well attach to the PLGA scaffolds. Composite loading cells of 10^5 and 10^6 might be helpful in maintaining composite function. The potential feasible cell quantity for tissue engineering intervertebral disc should not be lower than 10^5 /150 μ l.

【Key words】 Intervertebral disc; Tissue engineering; Nucleus pulposus cell; Scaffold

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Navy General Hospital, Beijing, 100037, China

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:30370389)

第一作者简介: 男(1978-), 医师, 医学硕士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)66958224 E-mail: xintodorov@yahoo.com.cn

通讯作者: 阮狄克

椎间盘退变性疾病是骨科临床常见的疾病之一。传统髓核摘除术和脊柱融合术解除了许多患者的痛苦, 但髓核摘除导致的脊柱失稳以及融合

后相邻节段退变等问题仍是脊柱外科医生面临的挑战。构建组织工程椎间盘,修复退变的椎间盘,从解剖结构和生理功能上重建脊柱运动功能单元,正成为国内外学者的研究热点。种子细胞的接种数量是组织工程学研究中的重要参数,对于构建有修复功能的组织器官十分关键^[1,2]。本实验以聚乳酸-羟基乙酸(poly-lactic-glycolic acid, PLGA)为支架,分别采用 4 种不同细胞接种密度进行体外组织工程椎间盘的构建,并植入动物体内观察,旨在探索构建组织工程椎间盘时最佳的细胞接种密度。

1 材料与方法

1.1 椎间盘髓核细胞的分离与培养

孕 20 周自然流产胚胎,碘伏消毒后从背部正中切口,无菌条件下取出胸段及腰段脊柱,切取椎间盘,磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗 2 次,将其剪成约 1×1×1mm 小块,2g/L 胶原酶(GIBCO, 美国)消化 2h 后 1000r/min 离心 5min, PBS 冲洗 2 次,收集细胞接种于 100ml 培养瓶,加入含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 F12 培养基(GIBCO), 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养;倒置显微镜观察生长情况。细胞贴壁生长后每周换液 2 次,细胞单层融合后传代。

1.2 BrdU 标记种子细胞

原代培养细胞单层融合后用胰酶(GIBCO)消化 2min 后弃去上清液,加入 8ml F12 培养基,弯头吸管吹打后收集细胞悬液于 15ml 离心管中,离心后用 F12 培养基冲洗 2 次,加入含 10μmol/ml BrdU 及 10% FBS 的 F12 培养基 10ml,置于 37℃ 条件下孵育 1h。1000r/min 离心 5min,将标记后的细胞制成单细胞悬液后接种于 100ml 培养瓶, 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养。取 P2 代细胞作为种子细胞进行支架接种。

1.3 细胞-支架复合体的构建

将直径 10mm、高度为 3mm 的 PLGA 支架置于 75% 酒精中浸泡 2h,中间更换酒精 1 次,取出后用生理盐水反复冲洗,置入无菌离心管内, 3000r/min 离心 5min。将支架置于 24 孔培养板内,分别接种密度为 0(A 组、对照组)、10⁴ 个/150μl(B 组)、10⁵ 个/150μl(C 组)、10⁶ 个/150μl(D 组)细胞悬液,接种时将细胞悬液缓慢滴入支架内,以使细胞能均匀分布于支架内。10min 后每孔加入含

10% FBS 的 F12 培养基 1ml, 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养 48h。接种 24h 后分别取 B、C、D 组各 1 个复合物加入 1mg/ml 二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT, Sigma, 美国)200μl, 37℃ 培养 4h 后观察复合物显色情况并进行对比。

1.4 扫描电镜观察

细胞接种后体外培养 48h,取 2 个接种密度为 10⁵ 个/150μl 细胞的复合物及 2 个空白支架,将其水平切开, PBS 漂洗 2 次, 1.5% 多聚甲醛固定 2h, PBS 漂洗 2 次, 1% 戊二醛固定 1h, 50%、70%、90% 及无水乙醇梯度脱水,每次 5min,临界点干燥后离子溅射仪喷金,置于扫描电镜下观察。

1.5 动物体内植入

3 月龄裸鼠 40 只,均分为 A、B、C、D 组。无菌条件下取裸鼠背部正中切口切开皮肤,钝性分离皮肤与皮下组织后分别植入接种密度为 0、10⁴ 个/150μl、10⁵ 个/150μl、10⁶ 个/150μl 的细胞-支架复合物,缝合后相同条件下饲养,8 周后取出植入物,纵行分为两块,一块用于组织学检测,一块用于糖胺聚糖含量测定。

1.6 形态及组织学观察

将植入物固定后石蜡包埋切片,常规 HE 染色,显微镜下观察取出的细胞-支架复合物并与植入前进行大体形态对比。常规方法对各组植入物进行 I、II 型胶原蛋白免疫组化染色,应用 Leica Qwin 图像分析系统测量各组 I、II 型胶原蛋白免疫组化染色(兔抗人 I、II 型胶原蛋白多克隆抗体及免疫组化染色试剂盒均购自博士德公司)平均光密度值,同时检测 BrdU 标记细胞(切片及显色处理同 I、II 型胶原蛋白免疫组化染色,将一抗改为鼠抗人 BrdU 抗体)。

1.7 糖胺聚糖(GAG)的生化测定

用电子天平称取 10mg 标本,加入 1ml 木瓜蛋白酶,60℃ 条件下消化 24h。取 10μl 消化液加入到 90μl 1,9-二甲基亚甲蓝(1,9-dimethyl-methylene blue, DMB)进行染色反应,测定其在波长 595nm 处的吸光度,以不同浓度硫酸软骨素标准溶液吸光度值绘制标准曲线进行定量分析。

1.8 统计学分析

利用 SPSS 10.0 统计软件对结果进行统计学处理,检测结果用均数±标准差表示,各组均数间的比较用方差分析,均数间两两比较用 *q* 检验。

2 结果

20周龄胚胎已发育出与椎体界限清楚的椎间盘。经胶原酶消化 2h 后,大量椎间盘细胞可被分离出来,制成细胞悬液。接种培养瓶后 48h 内细胞即可贴壁伸展。镜下可见细胞胞质丰富,胞体饱满,呈短梭形,有 2 个或 2 个以上长短不一的突起,并随培养时间延长而向外延展。原代椎间盘细胞生长迅速,培养 1 周即可铺满瓶底 80%,达到传代要求。随传代次数增加,细胞极性逐渐增强,呈长梭形,似成纤维细胞,生长变缓(图 1,后插页 I)。3 个细胞-支架复合物加入 MTT 培养 4h 后均呈现出较为明显的紫色,颜色随接种密度增加而有明显的加深,B 组复合物表现为均匀的淡紫色,C 组复合物较 B 组有所加深并出现数个颗粒状深染区,D 组复合物则呈现出均匀、浓密的深紫色(图 2,后插页 I)。

P2 代细胞与支架复合物体外培养 48h 后扫描电镜下可见大量细胞贴附于支架内,并可观察到少量细胞外基质合成,对照组(未接种种子细胞)可观察到 PLGA 支架的超微结构(图 3,后插页 I)。

植入裸鼠体内 8 周后,细胞-支架复合物仍保持其原有形状,周围有一薄层纤维包膜形成,复合物表面由构建时的细颗粒状变得光滑、平整,支架外未见到髓核样组织形成,也没有观察到细胞外基质成分的合成。单纯支架植入组支架厚度降低,材料明显皱缩。

细胞-支架复合物切片 HE 染色后镜下可观察到细胞存在于支架内部,周围有大量细胞外基质形成,D 组复合物内细胞数量高于其余两组实验组,D 组及 C 组复合物内细胞多呈椭圆形或短梭形,而 B 组复合物内细胞极性明显增强,细胞呈长梭形,沿支架生长,细胞外基质成分较少。A 组可观察到少量纤维组织及新生血管长入材料内部,材料已基本吸收,细胞排列杂乱无章,细胞核大,胞浆及细胞外基质成分少,胞体更趋于卵圆形(图 4,后插页 I)。

免疫组化染色单纯支架植入组(A 组)未观察到 I、II 型胶原蛋白的表达,细胞-支架复合物置入组(B、C、D 组)复合物内均可观察到 I、II 型胶原蛋白的合成,且随着细胞接种数量的增加,II 型胶原表达逐渐增多,I 型胶原的表达未呈现出明显增多的趋势(表 1)。C 组及 D 组 GAG 的表达

表 1 各实验组细胞-支架复合物免疫组化染色 I、II 型胶原蛋白平均光密度值及 GAG 含量 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

	平均光密度值		GAG 含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
	I 型胶原蛋白	II 型胶原蛋白	
B 组	0.16 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.04	8.11 $\pm$ 1.34
C 组	0.15 $\pm$ 0.03 ^①	0.53 $\pm$ 0.02 ^②	15.8 $\pm$ 91.98 ^②
D 组	0.14 $\pm$ 0.02 ^{①③}	0.55 $\pm$ 0.02 ^{②③}	17.00 $\pm$ 1.65 ^{②③}

注:与 B 组比较^① $P>0.05$;^② $P<0.01$;^③与 C 组比较 $P>0.05$

量明显高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。复合物内细胞为 BrdU 阳性细胞,即为复合的种子细胞(图 5,后插页 II)。

3 讨论

细胞接种密度对于构建具有完整结构及良好功能的组织工程复合物意义重大。组织工程研究结果表明,细胞接种密度与组织工程产品的外形、厚度、重量以及细胞外基质的合成直接相关。较低的细胞接种密度会导致细胞外基质成分合成量的不足从而不能实现有效的修复功能,而细胞数量过多则会出现不必要的资源浪费^[3,4]。PLGA 复合多孔材料具有良好的生物相容性^[5],可以为细胞的增殖及分化提供适当的微环境,是良好的椎间盘组织工程支架材料。同骨髓间充质干细胞及自体髓核细胞、软骨细胞相比,胚胎椎间盘细胞作为种子细胞更加具有理论上的优势:椎间盘的退变从儿童时代就已经开始^[6],并且随着年龄增加退变程度逐渐加重,自体细胞取材不便,已存在某种程度的退变而不能很好地实现大量合成细胞外基质的功能;骨髓间充质干细胞虽然有来源广泛、易于分离培养等优点,由于其具有多向分化能力,如何创造适当的微环境诱导使其定向分化为椎间盘髓核细胞是目前还没有解决的难题;实验中我们发现胚胎椎间盘细胞具有易于贴壁、生长迅速等显著优点,又不存在退变等干扰因素,因此是组织工程椎间盘极为理想的种子细胞^[7]。但其来源有限,限制了其在研究中的广泛应用,如果能结合大规模的细胞培养及冻存技术,其在科研中的应用前景必将更为广阔。本研究采用人胚胎椎间盘细胞与 PLGA 支架共培养,48h 后可见大量细胞贴附于支架内。

在体外观察的基础上,对复合物进行体内植入并追踪其转归是组织工程研究的重要手段。对复合物的大体形态及组织学观察初步反应了植入

后的细胞存活、增殖及合成状况。细胞接种数量对组织工程复合物外形及内部细胞形态的影响已被诸多研究证实^[3,4,8]。本研究对支架外形的良好保持及支架表面的变化提示植入细胞增殖良好并发挥功能;切片后 HE 染色可发现植入细胞在材料内分布均匀,周围有细胞外基质形成。C 组及 D 组复合物内细胞形态同正常椎间盘细胞形态一致,胞体饱满,胞外基质丰富,证实细胞保持了良好的增殖与合成功能。但 B 组复合物内细胞形态更接近于退变椎间盘细胞的形态,胞体呈梭形,胞浆及细胞外基质成分少,可能原因在于细胞接种数量不足使细胞难以维持正常的表型及生理功能而发生了去分化现象^[9]。在动物实验的第 8 周各实验组均检测到了 BrdU 抗体染色阳性细胞,证实支架内存在的细胞是植入的种子细胞而非周围组织侵入细胞。

胶原及糖胺多糖是细胞外基质的重要组成部分,各型胶原所占比例的变化更是引起和加重椎间盘退变的重要因素。随着年龄的增加,Ⅱ型胶原含量明显降低,而Ⅰ型及Ⅲ型胶原蛋白增多。同时,胶原连接蛋白的表型也发生改变,从而导致椎间盘组织在机械负荷的作用下更易发生退变^[10,11]。当椎间盘细胞由于发生退变而导致其合成糖胺多糖的量减少时,椎间盘的结构和形状就会发生改变,从而降低其吸收和分散负荷的能力,在长期机械负荷的作用下,加速了椎间盘退变的进展^[12]。因此,对细胞外胶原及糖胺多糖成分的检测能直观地反映所构建组织工程复合物的功能状况。接种细胞数量对细胞外基质成分的表达有着重要的影响。有研究表明,随着接种细胞数量的增加,组织工程产品表达胶原及糖胺多糖的能力也随之增强^[3,8]。本实验中,各实验组Ⅱ型胶原染色均为强阳性,较Ⅰ型胶原染色显色更加明显,说明细胞外基质中Ⅱ型胶原的含量比例明显多于Ⅰ型胶原,与退变的椎间盘相比,所构建的组织工程复合物更加符合正常髓核组织的生化特点。随着细胞接种数量的增加,细胞外胶原及糖胺多糖的表达量也明显增加,C 组及 D 组复合物与 B 组复合物在Ⅱ型胶原染色的及糖胺多糖表达量的差别说明 B 组实验动物细胞接种数量偏少,无法实现大量合成胞外基质的生理功能。因此,在构建组织工程椎间盘时,理想的接种密度应该为 10^5 个/ $150\mu\text{l}$

或高于这一密度。

4 参考文献

1. Nirmalanandhan VS, Levy MS, Huth AJ, et al. Effects of cell seeding density and collagen concentration on contraction kinetics of mesenchymal stem cell-seeded collagen constructs[J]. Tissue Eng, 2006, 12(7):1865-1872.
2. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, et al. How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials [J]. Biomaterials, 2002, 23 (16):3319-3328.
3. Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, et al. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 1994, 23(1):49-53.
4. Panossian A, Ashiku S, Kirchhoff CH, et al. Effects of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue engineering[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 108(2):392-402.
5. Yang F, Qu X, Cui W, et al. Manufacturing and morphology structure of polylactide-type microtubules orientation-structured scaffolds[J]. Biomaterials, 2006, 27(28):4923-4933.
6. Videman T, Nummi P, Battié MC, et al. Digital assessment of MRI for lumbar disc desiccation: a comparison of digital versus subjective assessments and digital intensity profiles versus discogram and macroanatomic findings [J]. Spine, 1994, 19(2):192-198.
7. 张超, 阮狄克, 张荣风, 等. 组织工程椎间盘的构建及体外观察 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(5):478-481.
8. Chang SC, Rowley JA, Tobias G, et al. Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(4):503-511.
9. Rieder E, Seebacher G, Kasimir MT, et al. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells[J]. Circulation, 2005, 111(21):2792-2797.
10. Pokharna HK, Phillips FM. Collagen crosslinks in human lumbar intervertebral disc aging [J]. Spine, 1998, 23 (15):1645-1648.
11. Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, et al. Soft-tissue aging and musculoskeletal function[J]. J Bone Joint Surg Am, 1993, 75(10):1533-1548.
12. Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies[J]. Microsc Res Tech, 1994, 28(5):398-408.

(收稿日期:2008-06-24 修回日期:2008-07-22)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)