

基础研究

兔骨髓间充质干细胞在壳聚糖支架上的诱导培养

张海龙,傅 强,赵 鑫,陈元贵,吴大江,侯铁胜

(第二军医大学附属长海医院骨科 200433 上海市)

【摘要】目的:观察在壳聚糖(Chitosan)三维支架上诱导兔骨髓间充质干细胞(rMSCs)向髓核样细胞分化的情况,探讨应用其制作组织工程髓核的可能性。**方法:**将体外培养的第3代 rMSCs 接种于经冷冻干燥法构建的壳聚糖三维支架上,在主要含有转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、胰岛素+转铁蛋白+亚硒酸钠(ITS)、地塞米松、丙酮酸钠的培养液中培养(实验组),同时设立对照组(非诱导组)。在培养 7d、14d、21d 时取标本行组织学检测,观察三维支架上 rMSCs 的生长及分化情况,对支架细胞复合物行 II 型胶原免疫组化检测,测定培养液中糖胺聚糖(GAG)含量及 II 型胶原的表达量,计算细胞外基质 GAG 含量。**结果:**rMSCs 在壳聚糖三维支架上生长状态良好,体外培养 7d、14d、21d 时,实验组培养液中细胞外基质 GAG 含量分别为: 55.8 ± 4.6 、 86.7 ± 5.8 、 $83.2 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,对照组培养液中细胞外基质 GAG 含量分别为: 34.2 ± 5.6 、 42.6 ± 4.8 、 $40.8 \pm 4.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,两组间相同时间点比较有显著性差异($P < 0.05$);II 型胶原蛋白电泳及 Western-blot 检测实验组在培养 14d 与 21d 时可见到 II 型胶原电泳条带,21d 时 II 型胶原蛋白含量多于 14d 时;对照组未见 II 型胶原表达。**结论:**rMSCs 在壳聚糖三维支架上培养生长良好,在特定的诱导培养液诱导下可以向髓核样细胞分化。

【关键词】骨髓间充质干细胞;组织工程;壳聚糖;支架;兔

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-05-0385-04

In vitro induced culture of the rabbit bone marrow mesenchymal stem cells on chitosan scaffolds/ZHANG Hailong, FU Qiang, ZHAO Xin, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18 (5): 385~388

【Abstract】Objective: To explore the characteristics of mesenchymal stem cells (rMSCs) derived from rabbit bone marrow which were cultured on three-dimensional scaffolds of chitosan, and discuss the feasibility of nucleus pulposus (NP) tissue-engineering regeneration. **Method:** The rMSCs were isolated from the rabbit bone marrow and then subcultured to the third passage. The rMSCs were seeded on the chitosan scaffolds and induced into NP-like cells by adding transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), dexamethasone, ITS (insulin/transferring/sodium selenite/ascorbic acid) into the medium. At the end of the every culture period (7d, 14d, 21d), the compound of scaffolds and rMSCs were processed for histological study, and the expression of collagen type II was analyzed with immunohistochemical study, the contents of GAG and collagen type II in culture medium were detected as well. Then the glycosaminoglycan (GAG) content in the extracellular matrix (ECM) was calculated. **Result:** The third passage cells grew well on the chitosan scaffolds. At the end of the every culture period (7d, 14d, 21d), the GAG contents in the ECM were $55.8 \pm 4.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $86.7 \pm 5.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $83.2 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in induced culture group vs. $34.2 \pm 5.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $42.6 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $40.8 \pm 4.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the control group. At each time point, there was significant difference in the GAG content in the ECM between control group and induced culture group ($P < 0.05$). The differentiation of rMSCs towards NP-like cells on the scaffolds was verified by the positive results of with sodium dodecyl sulfate polyacryl-amide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot. The content of collagen type II was higher in the induced group cultured for 21 days than 14 days. While there was no expression of collagen type II had been detected in the control group. **Conclusion:** Under certain conditions, the rMSCs growing on the scaffolds of chitosan may differentiate towards the NP-like cells.

【Key words】 Bone mesenchymal stem cells; Tissue engineering; Chitosan; Scaffold; Rabbit

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai, 200433, China

第一作者简介:男(1976-),主治医师,在读博士,研究方向:脊柱外科

电话:(021)25072075 E-mail:haroldzhang@gmail.com

通讯作者:侯铁胜

腰椎间盘突出是引起腰腿痛的主要原因之一。传统的保守治疗和手术治疗虽然可在一定程度上缓解由椎间盘退变引起的临床症状,但不能

解决根本问题。髓核切除椎间融合术还会加速相邻节段椎间盘的退变。如何从根本上阻止和治疗椎间盘退变是目前临床医生面临的挑战。随着生物工程的进展及对椎间盘环境的研究,开发符合椎间盘或髓核结构与功能的移植物,为直接应用于椎间盘退变的治疗提供了可能性。文献报道了多种组织工程髓核的种子细胞及支架,支架主要来源于骨或软骨组织工程的生物材料^[1]。我们用壳聚糖(Chitosan)三维支架加入特定的诱导液培养兔骨髓间充质干细胞(rMSCs),观察其向髓核样细胞分化的情况,探讨应用其制作组织工程髓核的可行性,为椎间盘退变的生物治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 rMSCs 的分离培养

取 4 个月龄新西兰白兔 1 只(第二军医大学长海医院动物中心提供, Syxk 沪 2002-0026), 体重 2.5kg。无菌操作下抽取双侧股骨骨髓 2ml(内含 3000U/ml 的肝素 0.2ml)注入无菌离心管。在离心管中加入 10ml DMEM/F12 培养液, 1500r/min 离心 5~8min, 弃上清液, 再加入完全培养液(含 10% 胎牛血清、100IU/ml 青霉素、100IU/ml 链霉素)悬浮细胞, 计数后以 2.0×10^5 个/ml 的浓度接种于 T-25 培养瓶, 在 37℃、5% CO₂、100% 饱和湿度条件下进行培养和扩增。细胞铺满瓶底约 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 备用。传代培养时吸弃旧培养液, 用 PBS 洗去瓶内残存的培养液, 再加入 0.25% 胰酶 2ml 消化 3~5min, 800r/min 离心 5min, 弃上清液, 用含 0.1% FBS 的 DMEM 悬起细胞, 按 1:1.5 密度进行传代。

1.2 Chitosan 支架的构建

配制 1% 的冰醋酸溶液, 称取一定质量的壳聚糖粉末, 将壳聚糖完全溶解于稀醋酸溶液中, 用 80 目的滤布过滤后静置一段时间, 脱除溶液中的气泡, 制成终浓度为 2% 的壳聚糖凝胶。倒入玻璃培养皿, 置 -80℃ 冷冻 30min。移入冷冻干燥机内抽干 48h, 制成壳聚糖多孔支架。将支架裁剪成 1.0×1.0cm 大小, 用 75% 酒精浸泡消毒 30min 后用 PBS 反复冲洗 3 次, 尽量吸干。

1.3 rMSCs 在壳聚糖支架上诱导培养

将壳聚糖支架置入 24 孔板中, 实验组和对照组各 24 孔, 0.25% 胰酶消化收集传 3 代的 rMSCs,

用 DMEM 低糖培养液制成细胞悬液, 每个支架分别滴加 5×10^6 个/ml 细胞悬液 300μl。4h 后, 实验组加入 DMEM 低糖培养液、维生素 C、丙酮酸钠、地塞米松、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、ITS-X(胰岛素+亚硒酸钠+转铁蛋白+氨基乙酸); 对照组仅给予含 10% FBS 的 DMEM 低糖培养液。置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每隔 3~4d 换液 1 次, 分别收集培养 7d、14d、21d 更换的培养液, -20℃ 保存, 备检。

1.4 组织学检测

分别取培养 7d 的实验组和对照组各 3 个细胞支架复合物样本, 经 4% 多聚甲醛固定 24h, 石蜡包埋, 切片。行苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察。另取各 3 个培养 7d 的标本裁剪成 4×8mm, 真空喷金后粘贴在试样台上, 顶面向上, 放进扫描电镜中, 抽真空后, 选择合适的放大倍数拍摄扫描照片。

1.5 培养液中糖胺聚糖(GAG)含量的测定

用二甲基亚甲蓝(dimethylmethylene blue, DMB)显色法检测细胞培养液中 GAG 含量。先制作 DMB 标准曲线: 分别取浓度为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100mg/L 硫酸软骨素标准液 100μl, 加入 2.5ml DMB 显色剂混匀, 反应 15min 后, 于 525nm 波长处比色, 测定吸光度, 绘制 GAG 含量标准曲线。分别取实验组和对照组培养 7d、14d、21d 时上清液 1ml(每组每个时间点 4 孔), 离心后取 100μl 细胞上清液, 加入 2.5ml DMB 反应 15min, 同法测定上清液的吸光度, 根据标准曲线求得上清液中 GAG 的含量(mg/L), 细胞外基质 GAG 含量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) = 上清液中硫酸 GAG 含量(mg/L) × 上清液总量(ml) / 培养瓶底面积(cm^2)。

1.6 支架上细胞的蛋白表达检测

分别取培养 14d、21d 的实验组和对照组细胞支架复合物, 经 PBS 漂洗 2 次后放入 50ml 的试管中, 用 CytoBuster 蛋白抽提试剂提取支架上的细胞蛋白。提取液转移到 10ml 的试管中, 14000r/min 离心 10min, 移去上清液, 用 90% 乙醇漂洗沉淀膜并风干。10M 尿素处理后, 置 100℃ 水浴 5min, 使蛋白质变性, 通过紫外分光光度仪定量, 在聚丙烯酰胺凝胶中加入等量的蛋白, 在 4%~15% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳。电泳结束后分为 2 组, 一组给予考马斯亮兰染色, 观察电泳条带; 另一组行 Western-blot 检测, 先在电泳转移液中放

置 15min, 然后 80V 持续 2h 电泳转移至硝酸纤维素膜上, 以 5% 脱脂奶室温包被 1h, 加鼠抗人 II 型胶原单克隆一抗 (工作浓度 1:1000), 室温下孵化 90min, 用 TBST (Tris-buffered saline+1% Triton) 缓冲液振荡漂洗硝化纤维素膜 5 次, 每次 10min, 加山羊抗鼠二抗 (Santa-Cruz 公司生产, 工作浓度 1:2000) 室温下孵化 90min, 用 TBST 缓冲液振荡漂洗硝化纤维素膜 5 次, 每次 10min, 转移至 ChemiLucent (工作浓度 1:1000) 的过氧化氢溶液中, 在暗室内将硝化纤维素膜与柯达底片重叠, 曝光摄影, 观察电泳条带。

1.7 统计学分析

所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 10.0 软件包进行统计学处理, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

rMSCs 原代培养 12h 后大部分细胞贴壁; 2~3d 后细胞形态呈较一致的多边形、梭形; 3~5d 后可见明显的集落形成, 增殖速度快, 集落之间互相互靠近。10~12d 细胞互相融合, 达 80%~90%, 细胞排列成比较均一的螺旋状或漩涡状。传 3 代的 rMSCs 贴壁迅速, 约 3h 大部分细胞贴壁, 细胞呈长梭形, 均匀分布, 形态均匀, 培养 7d 细胞 90% 融合, 细胞形态均匀, 平行排列, 呈螺旋状或漩涡状 (图 1, 后插页 I)。

构建的壳聚糖支架在肉眼下呈白色海绵状, 光镜下可见支架内的孔隙结构, 电镜下见支架的孔与孔之间相互连通构成了通孔 (图 2, 后插页 I)。

rMSCs 在 Chitosan 支架上培养 7d 时 HE 染色观察, 实验组和对照组的 Chitosan 支架均被染成红色, rMSCs 附着在支架上被染成蓝色 (图 3, 后插页 I), 两组间未见明显差异; 扫描电镜下观察 rMSCs 在壳聚糖支架上正常黏附生长, 细胞呈球形, 实验组可见到 3~5 个细胞形成的集落 (图 4, 后插页 I)。

以标准样本硫酸软骨素含量为 X 轴, OD 值为 Y 轴作线性回归, 得到标准曲线方程为 $Y = 0.0033X + 0.0127$, 相关系数 $R^2 = 0.9622$ 。表明硫酸软骨素质量浓度在 0~100mg/L 范围内, 吸光度与含量呈良好的线性关系。根据标准曲线计算对照组与实验组在 7、14、21d 时培养液中 GAG 含量见

表 1。两组在 7d、14d、21d 时细胞外基质的 GAG 含量有显著性差异 ($P < 0.05$), 实验组细胞表达的 GAG 更多。

考马斯亮蓝染色结果显示, 在培养 14d 和 21d 时, 实验组均见分子量低于 150kDa 的条带, 且诱导培养 21d 时 II 型胶原条带强度稍强于 14d 时; 对照组未见相应条带 (图 5a, 后插页 I)。Western-blot 结果进一步证实支架上经诱导的 rMSCs 表达 II 型胶原, 诱导 21d 时的蛋白表达稍强于 14d 时, 对照组未检测到 II 型胶原的表达 (图 5b, 后插页 I)。

表 1 对照组与实验组培养不同时间细胞外基质 GAG 含量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

	7d	14d	21d
对照组	34.2±5.6	42.6±4.8	40.8±4.4
实验组	55.8±4.6 ^①	86.7±5.8 ^①	83.2±3.4 ^①

注: ①与对照组比较 $P < 0.05$

3 讨论

Sakai 等^[2]在改良的 II 型胶原蜂窝状支架上培养 lacZ 基因标记的 MSCs, 并把它们植入到经髓核抽吸诱导引起退变的兔椎间盘内, 8 周后行 β -糖苷酶染色检测, 结果表明移植的 MSCs 有活力, 椎间盘蛋白聚糖的含量增加。可见 MSCs 在 II 型胶原蜂窝状支架上培养能延缓椎间盘的退变。Risbud 等^[3]的研究证实, 在适宜的微环境条件下, MSCs 能分化成髓核样细胞, 并证实了在低氧环境及转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 存在的条件下, 能使 MSCs 趋于与髓核表型一致的方向分化; 将诱导后的 MSCs 应用于损伤及退变椎间盘动物模型中, 能促进退变组织的再生。Steck 等^[4]通过在 TGF- β 介导的诱导培养基上培养成体 MSCs, 结果证实经诱导后的 MSCs 基因表型与髓核细胞相似。为了阐述 MSCs 在调整退变椎间盘细胞外基质合成方面的潜在能力, Le Visage 等^[5]分别膜状培养髓核细胞、纤维环细胞及 MSCs, 同时共同膜状培养 MSCs 与髓核细胞、MSCs 与纤维环细胞, 检测 GAG 含量、评估 II 型胶原等, 结果显示 MSCs 与纤维环细胞共同培养组具有较高的 GAG 及 II 型胶原含量, 同时膜状沉淀物在大小上也优于其他组。为研究 MSCs 治疗椎间盘退变的潜在可能性提供了一个依据。Richardson 等^[6]以 4×10^6 个/ml 终浓度将 hMSCs 种

植在温敏的壳聚糖-磷酸甘油水凝胶中, 胶囊化 hMSCs, 给予 DMEM 低糖培养液及 FBS, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 4 周, 基因表达分析证实 hMSCs 经诱导分化能表达与软骨和髓核细胞相似的表型。由于体外培养的 MSCs 具有强大的增殖能力, 可以扩增 10⁹ 倍, 同时 MSCs 体外传代 12 次后仍能保持正常的染色体组型和端粒酶活性。鉴于其可获得性、可扩增性和可多向分化性, MSCs 可作为种子细胞。

除了适当的营养来源, 细胞还需要有助于生长和增殖的微环境。组织工程支架能够提供细胞的附着位点, 并且允许营养物质和代谢产物的扩散, 易于建立细胞间的接触^[7]。相对于单层培养环境, 三维组织工程支架环境更易使细胞维持其表型。理想的支架微环境应尽量模拟组织需要的环境^[8]。用于培养细胞的支架应具有: ①良好的组织相容性; ②可降解性和降解速率可控性; ③无抗原性; ④维持复合的种子细胞形态和表型, 并增进细胞的黏附与增殖, 诱导椎间盘再生; ⑤有一定孔隙率; ⑥有良好的力学性能。椎间盘组织工程研究中具有以上潜能的支架包括胶原支架、琼脂糖支架、藻酸盐支架、聚乙醇酸支架和壳聚糖支架等。

目前, 对壳聚糖支架的研究相对较多。Nettles 等^[9]为了探索壳聚糖在软骨组织工程中作为细胞支架的可行性, 将来源于猪软骨的细胞接种于冷冻干燥法构建的壳聚糖支架上, 在生物反应器中培养 28d 后, 观察到壳聚糖支架可以促进细胞的黏附并能维持细胞的形态, 细胞在支架上可以合成细胞外基质。壳聚糖是唯一一种带正电荷的碱性多糖, 其结构类似于糖胺聚糖。壳聚糖凝胶的阳离子特性, 使其容易捕获软骨或椎间盘细胞产生的高价阴离子蛋白聚糖, 从而有利于椎间盘基质功能的维持。壳聚糖与 GAG 分子结构相似, 具有良好的组织相容性。将壳聚糖支架植入缺损处, 一般只会引起很小的异物排斥反应。在修复过程中, 壳聚糖可以加快伤口愈合, 这可能是通过刺激免疫细胞分泌生长因子、细胞因子, 促进缺损周围细胞增殖, 从而加速植入支架与正常组织融合^[10]。

要成功达到在支架材料上将 rMSCs 向椎间盘细胞诱导的目的, 必须首先解决 rMSCs 与材料间的粘附问题。如果细胞和支架材料间没有形成很好的粘附, 将导致细胞大量流失, 而支架上细胞数量过少, 三维培养就没有实际意义。为提高细胞

与三维支架间的粘附率, 我们在接种后 4h 加细胞培养液, 在三维壳聚糖材料上诱导 rMSCs, II 型胶原蛋白电泳及 Western-blot 检测分析均呈阳性表达, 说明本研究采用的诱导方法能在三维支架上成功诱导 rMSCs 向髓核样细胞分化; 而未加诱导因子的三维支架上细胞的 II 型胶原免疫组化、Western-blot 检测为阴性, 说明三维支架只是为细胞提供了诱导空间, 而在诱导过程中起关键作用的还是诱导因子, 支架本身不能实现 rMSCs 向椎间盘细胞的定向分化。

4 参考文献

1. Seguin CA, Grynblas MD, Pilliar RM, et al. Tissue engineered nucleus pulposus tissue formed on a porous calcium polyphosphate substrate[J]. Spine, 2004, 29(12): 1299-1306.
2. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration[J]. Biomaterials, 2003, 24(20): 3531-3541.
3. Risbud MV, Albert TJ, Vresilovic EJ, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy[J]. Spine, 2004, 29(23): 2627-2632.
4. Steck E, Bertram H, Abel R, et al. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(3): 403-411.
5. Le Visage C, Kim SW, Tateno K, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis[J]. Spine, 2006, 31(18): 2036-2042.
6. Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels[J]. Biomaterials, 2008, 29(1): 85-93.
7. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in co-culture system[J]. Spine, 2004, 29(14): 1508-1514.
8. Zhao F, Grayson WL, Ma T, et al. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development [J]. Biomaterials, 2006, 27(9): 1859-1867.
9. Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering[J]. Tissue Engineering, 2002, 8(6): 1009-1016.
10. Ma L, Gao C, Mao Z, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering [J]. Biomaterials, 2003, 24(26): 4833-4841.

(收稿日期: 2007-05-23 末次修回日期: 2008-03-10)

(英文编审 陆 宁)

(本文编辑 卢庆霞)