

可吸收明胶海绵载体与骨髓间充质干细胞的相容性

王海燕 苏冠方 徐春玲

Biocompatibility of absorbable gelatin sponge as bone mesenchymal stem cells scaffold

Wang Haiyan, Su Guanfang, Xu Chunling. Department of Ophthalmology, Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China

Abstract Objective Bone mesenchymal stem cells (BMSCs) is a multiple potential stem cells and has a ability to differentiate into retinal cells. Therefore, BMSCs is becoming a seeding cells for the intraocular transplantation. The aim of this study was to investigate the biocompatibility of absorbable gelatin sponge and the possibility of gelatin sponge as BMSCs scaffold in intraocular transplantation. **Methods** BMSCs from femur marrow of Wistar rat aged 8 days were cultured and amplified in DMEM/F12 with 10% fetal bovine serum. The forth passage of cells were collected and identified by the detect of surface antigen of the cells using flow cytometry. The cells were co-cultured with absorbable gelatin sponge. The adhesive and proliferative biological activity of BMSCs on absorbable gelatin sponge was observed under the light microscope and scanning electron microscope. After 7-day cultivation, BMSCs were induced by conditioned medium of neonate rat retinal cells. The morphological changes of induced BMSCs on absorbable gelatin sponge were observed under the scanning electron microscope. The expression of neuron specific enolase (NSE) and nestin of induced cells was detected by immunohistochemistry. **Results** The flow cytometry showed that cultured cells were positive response for CD71 and CD44 and negative response for CD45 and CD34. After co-cultured with absorbable gelatin sponge under the condition of retinal cell-conditioned medium, BMSCs stucked to gelatin sponge in 24 hours and stretched out many pseudopods linked with the gelatin surface in 72 hours. Seven days later, gelatin sponge degraded and the survival cells could be seen under the scanning electron microscope. The cells were crosslinked and secreted large quantity of extra-cell matrix surrounding the gelatin sponge. BMSCs presented classical neuronal modality and connected with each others after induced by conditioned medium of neonate rat retinal cells. Immunohistochemistry showed that induced BMSCs had the positive response for NSE and nestin, showing the brown staining in cytoplasm. **Conclusion** BMSCs are able to stick, proliferate and differentiate on the absorbable gelatin sponge. So the absorbable gelatin sponge has good biocompatibility.

Key words bone mesenchymal stem cells; absorbable gelatin sponge; biocompatibility; tissue-engineering

摘要 目的 探讨可吸收明胶海绵的生物相容性,为其作为骨髓间充质干细胞(BMSCs)的有效载体进行眼内移植奠定基础。**方法** 体外培养 BMSCs,接种于可吸收明胶海绵,观察 BMSCs 的黏附、增生情况,采用乳鼠视网膜细胞条件分化液诱导,观察 BMSCs 的分化情况并行免疫组织化学鉴定。**结果** 在乳鼠视网膜条件分化液的环境中,接种后 72 h, BMSCs 伸出伪足黏附于可吸收明胶海绵表面。诱导后的细胞呈现神经元细胞的典型形态,免疫组织化学显示神经元特异性烯醇化酶(NSE)和巢蛋白(nestin)阳性。**结论** BMSCs 能够在可吸收明胶海绵上较好地黏附、增生及分化,可吸收明胶海绵具有良好的生物相容性。

关键词 骨髓间充质干细胞;可吸收明胶海绵;生物相容性;组织工程

分类号 R 774 R 318.08 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0743-04

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种多潜能成体干细胞,能够分化为视网膜

细胞^[1-2],因此可将其作为种子细胞进行眼内移植,用于视网膜细胞凋亡疾病的替代治疗。根据组织工程学原理,将细胞种植到支架上形成复合物,然后将此复合物植入眼内继续培养,可形成具有一定结构和功能的视网膜组织,从而能较好地进行眼科的“再生”治疗。

本课题为国家自然科学基金资助(30471858)
作者单位:130041 长春,吉林大学第二医院眼科
通讯作者:苏冠方 (Email: sugf@yahoo.com)

本实验选用可吸收明胶海绵作为 BMSCs 的生物载体,与 BMSCs 体外复合培养,旨在探讨其生物相容性,为以其作为 BMSCs 的有效载体进行眼内移植做准备。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

Wistar 乳鼠(吉林大学动物中心提供);可吸收明胶海绵(南京金陵药业股份有限公司);多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)、牛胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM/F12 培养液(美国 Gibco 公司);CD71 PE、CD44 FITC、CD45 FITC、CD34 FITC(美国 BD 公司);神经巢蛋白(nestin)单克隆抗体、1:200 兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)、1:500 羊抗兔过氧化物酶标记的二抗试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的分离培养 出生 8 d 的 Wistar 乳鼠麻醉处死后在无菌条件下抽取股骨骨髓,经 DMEM/F12 稀释后,1 000 r/min 离心 5 min,将沉淀用 DMEM/F12 稀释后缓慢加入预先准备好的含 Percoll 梯度分离液的试管中,2 000 r/min 离心 20 min,收取单个核细胞的界面层。PBS 洗涤 2 次后,加入含 10% FBS/DMEM/F12 的培养瓶内,在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下常规培养。48 h 后除去非黏附细胞,并更换新培养液。每隔 3 d 换液 1 次。当细胞铺满培养瓶底后,0.25% 胰蛋白酶消化,进行传代培养。

1.2.2 BMSCs 的流式细胞仪鉴定 取生长良好的第 4 代细胞,吸去培养液,0.25% 胰蛋白酶室温消化 3 min, PBS 洗 3 次,分别加入荧光标记的抗体,室温中静置 45 min, PBS 洗涤 3 次后,1% 多聚甲醛固定,应用流式细胞仪检测细胞表面抗原的阳性表达率,同型 IgG 作为相应的阴性对照。

1.2.3 可吸收明胶海绵的处理 取无菌明胶海绵成

品切成 5.0 mm × 5.0 mm × 3.0 mm 块状,浸入 1 g/L PLL 中室温下放置 12 h,用无菌 PBS 浸洗 2 次,用培养液浸洗 1 次,在接种细胞前用培养液预湿过夜,接种时用无菌滤纸吸去培养液,再滴加细胞悬液。

1.2.4 乳鼠视网膜细胞条件分化液的配制 取出生 3 d 内乳鼠视网膜,采用 0.25% 胰蛋白酶消化,加入含 10% FBS 的 DEME 培养液制成细胞悬液,接种于培养皿中,每隔 4 d 收集上清液,离心去除沉淀,将 7.5% FBS 与视网膜培养液 4:6 混合,得到视网膜细胞的条件分化液。

1.2.5 BMSCs 的接种及诱导 取第 4 代 BMSCs,接种于被 PLL 包被的可吸收明胶海绵,加入含 10% FBS 的 DEME/F12 培养液调整细胞密度为 2.0 × 10⁷/mL,不停快速搅拌细胞悬液,使较多细胞能够接种到明胶海绵上,并到达材料内部,在材料内均匀分布。培养 3 d 后,加入乳鼠视网膜细胞条件分化液进行神经诱导。以相同的实验条件,在另一细胞培养皿的底部加入无菌玻片,制成细胞爬片,以备免疫组织化学检测。

1.2.6 BMSCs 的扫描电镜观察 细胞接种后于培养 24 h、72 h 及诱导后将明胶海绵取出,加入 2% 戊二醛固定,梯度乙醇脱水,CO₂ 临界点干燥,真空表面喷金后,扫描电镜观察生长及分布情况。

1.2.7 诱导后细胞的免疫组织化学鉴定 取成功爬片的细胞,用 4% 多聚甲醛室温下固定 20 min, PBS 洗涤 5 min × 3 次,采用免疫组织化学染色试剂盒检测 NSE、nestin 的表达。

2 结果

2.1 BMSCs 的形态学观察及鉴定

倒置相差显微镜下见培养 24 h 后细胞开始贴壁,呈多角形,48 h 后贴壁细胞逐渐增加,呈菱形或长梭形,单层贴壁生长,新生细胞呈圆形位于中央,周边的细胞体积较大。流式细胞仪检测结果可见,CD71、CD44 阳性,CD45、CD34 阴性(图 1)。

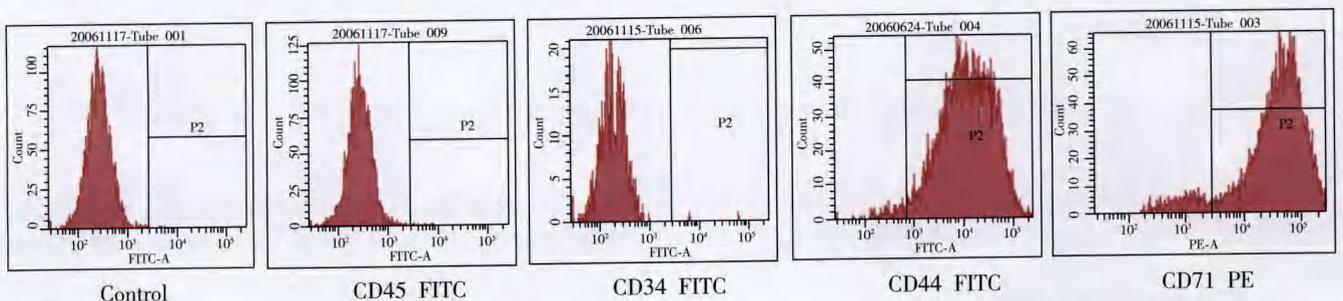


图 1 流式细胞仪显示 CD71、CD44 阳性,CD45、CD34 阴性

Fig. 1 Flow cytometric analysis shows that the cells present positive reaction for CD71 and CD44 and absent reaction for CD45 and CD34

2.2 可吸收明胶海绵的扫描电镜观察

可吸收明胶海绵为多孔的三维立体疏松结构,内部形成大小不一的大孔和互连的小孔,彼此相互交通,孔径为 150 ~ 400 μm ,开孔率 98%。

2.3 接种后 BMSCs 的形态学观察

倒置相差显微镜观察 BMSCs 接种于可吸收明胶海绵 24 h 后成团黏附于明胶海绵表面,晃动易脱落,72 h 细胞团增大,黏附于明胶海绵结构内,晃动不易脱落,7 d 细胞增生包绕整个明胶网架(图 2)。扫描电镜观察细胞接种 24 h 后呈圆形黏附于明胶海绵表面,细胞表面有颗粒状突起(图 3)。72 h 后细胞黏附于明胶海绵深部孔隙内,伸出伪足与明胶海绵表面相连(图 4)。7 d 明胶海绵略降解,细胞形态良好(图 5)。

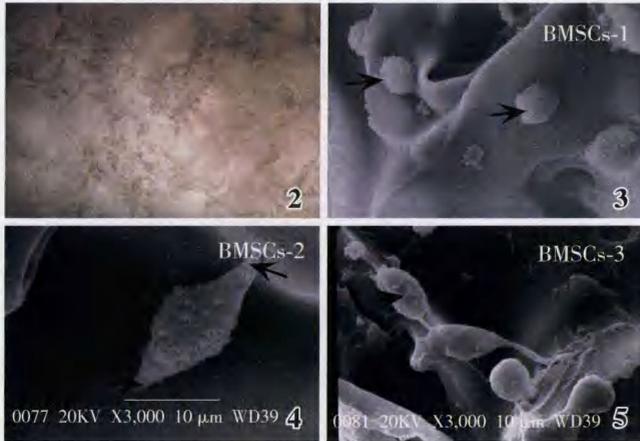


图 2 接种于明胶海绵 7 d 后 BMSCs 包绕整个明胶网架 图 3 BMSCs 接种 24 h 后呈球形黏附于胶海绵表面(箭头) 图 4 BMSCs 接种 72 h 后伸出伪足与明胶海绵表面相连(箭头) 图 5 BMSCs 接种 7 d 后形态良好,明胶海绵略降解(箭头)

Fig. 2 BMSCs encircled the absorbable gelatin sponge in 7 days after induced Fig. 3 BMSCs linked with the gelatin surface 24 hours after induced (arrow) Fig. 4 BMSCs stretched out pseudopod linked with the gelatin surface 72 hours after induced (arrow) Fig. 5 The morphous of BMSCs was normal, and the gelatin sponge degenerated 7 days later (arrow)

2.4 细胞爬片上 BMSCs 诱导后的形态学观察及免疫组织化学鉴定

扫描电镜观察诱导后细胞胞体收缩成锥形或球形,细胞突起变细、变长,黏附于可吸收明胶海绵表面(图 6)。免疫组织化学结果显示,部分诱导后细胞 NSE 染色阳性,胞浆呈深棕色(图 7);Nestin 染色阳性,胞浆呈棕红色(图 8)。

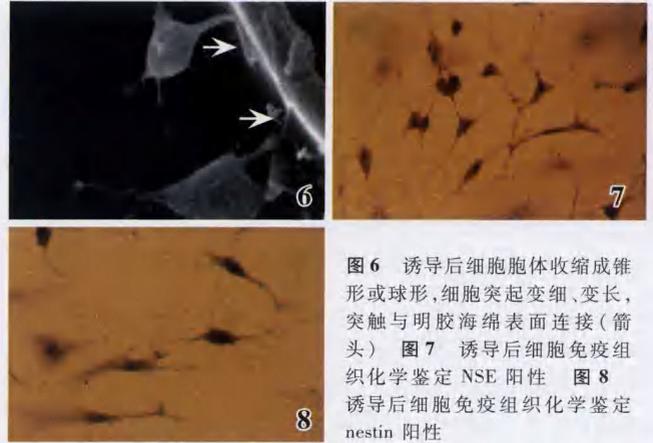


图 6 诱导后细胞胞体收缩成锥形或球形,细胞突起变细、变长,突触与明胶海绵表面连接(箭头) 图 7 诱导后细胞免疫组织化学鉴定 NSE 阳性 图 8 诱导后细胞免疫组织化学鉴定 nestin 阳性

Fig. 6 After induction the cells showed taper or round body with long neuritis, which linked with the gelatin surface (arrow) Fig. 7 NSE coloration was positive reaction after induction Fig. 8 Nestin coloration was positive reaction after induction

3 讨论

多种视网膜退行性病变,如视网膜色素变性、年龄相关性黄斑病变等均可造成视细胞大量死亡,导致严重的视力障碍。组织工程材料的出现为此类疾病的治疗提供了新的思路。如何选择合适的种子细胞及运载种子细胞的生物材料是研究的重点。

由于 BMSCs 易于获得、可高效扩增并且具有多分化潜能,目前已成为一种较理想的种子细胞。本实验利用全骨髓液贴壁培养法分离 BMSCs,并通过传代培养对 BMSCs 进行纯化,然后通过流式细胞仪鉴定 BMSCs 的表面抗原,显示 CD71、CD44 阳性,CD45、CD34 阴性,证实获得的细胞是 BMSCs。

如何选择合适的承载种子细胞的生物支架材料是另一个关键问题。理想的载体材料应该具有生物安全性、三维结构、可降解以及良好的生物相容性等特点。本研究采用的可吸收明胶海绵材料是由胶原蛋白部分水解生成的高分子多肽聚合而成,临床广泛应用于可吸收填充物,无毒性和抗原性,无组织不良反应,可降解^[3],具有较高的生物安全性。同时实验中扫描电镜观察,其为多孔三维立体疏松结构,内部形成大小不一的大孔和互连的小孔,彼此相互交通,孔径为 150 ~ 400 μm ,开孔率 98%,具有良好的三维结构,能够为细胞提供空间和支架使细胞向各个方向生长,避免“接触抑制”。目前对生物材料的生物相容性评价主要有体内直接植入法和体外复合细胞培养法^[4]。本实验采用后者,通过直接观察 BMSCs 与可吸收明胶海绵复合生长的黏附、增生、分化的生物学行为,评价可吸收明胶海绵的生物相容性。

由于可吸收明胶海绵材料是由胶原蛋白部分水解生成的产物,理论上作为支架材料其细胞的黏附能力略差。在材料表面以蛋白质、多肽、氨基酸等生物活性分子进行包被可提高细胞的黏附性能^[5]。PLL是由多个氨基酸片段通过共价键及范德华力等聚合而成,其所含的氨基、羟基可模仿细胞外基质,从而改善材料的表面活性,提高细胞的黏附性,促进细胞的生长、繁殖及发挥正常的功能^[6-7]。

本研究发现 BMSCs 与 PLL 包被的可吸收明胶海绵复合培养后, BMSCs 伸出伪足黏附于可吸收明胶海绵表面,并逐渐向可吸收明胶海绵的深层孔隙内移行,而且互相交联,7 d 可见细胞增生包绕整个明胶网架,可吸收明胶海绵略降解,但细胞形态良好。目前 BMSCs 的神经诱导方法很多,主要包括化学诱导法、细胞因子诱导法等。其中学者们对于化学诱导法存在很多质疑,虽然 Pacary 等^[8]及 Sagara 等^[9]对化学诱导方法进行了改进,但化学诱导试剂仍存在可能的细胞毒性,而细胞因子诱导法则不存在这种问题,同时可以在一定程度上模拟体内的微环境使细胞能够更好地分化^[10]。乳鼠视网膜条件分化液含有促进原始视网膜干细胞分化发育的细胞因子及神经胶质细胞产生的各种细胞因子,如胶质源性生长因子和细胞介质等^[11],研究证明其可很好地模拟体内的视网膜微环境以促进 BMSCs 分化^[12-13]。利用乳鼠视网膜细胞条件分化液诱导后,扫描电镜下观察发现细胞呈神经元细胞的典型形态,胞体收缩成锥形或球形,细胞突起变细、变长,且突触与明胶海绵表面很好地连接。免疫组织化学鉴定显示诱导后细胞 NSE、nestin 染色阳性,证明其分化为神经元细胞。这些结果提示 BMSCs 能够在 PLL 修饰的可吸收明胶海绵上较好地黏附、增生及分化,证明可吸收明胶海绵具有良好的生物相容性,因此可作为 BMSCs 的有效载体进行眼内移植。

然而移植时机的选择尚需进一步探讨,本研究发 现体外培养 7 d 后细胞增生且形态良好,明胶海绵略降解,王建业等^[14]将明胶海绵用于动物体内实验发现 1 周后明胶海绵开始部分液化,4 周后明胶海绵形成的

凝胶膜吸收,因此选取 7 d 这一时间点将负载 BMSCs 的可吸收明胶海绵移植入眼内是比较合适的,但尚需体内实验来进一步证明。另外如何在稳定的培养条件下大量扩增可吸收明胶海绵上的 BMSCs? 如何使 BMSCs 的分化状态更加良好? 仍是有待解决的问题,从而有望为眼病的治疗提供较好的材料来源。

参考文献

- 1 Minoru T, Yasushi A, Haruhiko Y, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina [J]. *Stem Cells*, 2002, 20: 279 - 283
- 2 Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye [J]. *J Neurosci*, 2003, 23 (21): 7742 - 7749
- 3 李瑞恒, 王丽英, 孙煦. 明胶海绵在改良泪囊鼻腔造口术中的应用 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2008, 22 (4): 381 - 382
- 4 赵廷宝, 范清宇, 周勇, 等. 复合骨形成蛋白骨修复材料的生物相容性研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2002, 9 (2): 155 - 157
- 5 潘海涛, 郑启心, 郭晓东, 等. I 型胶原在 PLGA- [ASP-PEG] 表面修饰对兔骨髓基质干细胞生物力学的影响 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2006, 8 (10): 938 - 943
- 6 Liu S, Hoke D, Julian J. Heparin/heparan sulfate (HP/HS) interacting protein (HIP) supports cell attachment and selective high affinity binding of HP/HS [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25856 - 25862
- 7 孙晋客, 刘锋, 范卫民. 不同材料包埋的 PGA 支架对软骨细胞体外培养的影响 [J]. *江苏医药*, 2006, 32 (7): 642 - 644
- 8 Pacary E, Legros H, Valable S, et al. Synergistic effects of CoCl₂ (2) and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119 (13): 2667 - 2678
- 9 Sagara J, Makino N. Glutathione induces neuronal differentiation in rat bone marrow stromal cells [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33 (1): 16 - 21
- 10 Magaki T, Kurisu K, Okazaki T. Generation of bone marrow-derived neural cells in serum-free monolayer culture [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 384 (3): 282 - 287
- 11 原慧萍, 葛坚, 段永恒, 等. 体外诱导室管膜下区神经干细胞分化为视网膜神经细胞样细胞的研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2003, 39 (6): 357 - 360
- 12 徐春玲, 苏冠方, 牟大鹏, 等. 乳鼠视网膜细胞诱导骨髓间充质干细胞分化为视网膜神经节样细胞 [J]. *眼科研究*, 2008, 26 (3): 174 - 178
- 13 牟大鹏, 苏冠方, 徐春玲, 等. 骨髓间充质干细胞向视网膜神经节样细胞的诱导分化 [J]. *眼科新进展*, 2009, 29 (2): 94 - 97
- 14 王建业, 翟饶生. 明胶海绵对兔肌腱粘连及愈合的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 27 (12): 5300 - 5304

(收稿: 2009-05-13 修回: 2009-07-06)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者 · 作者 · 编者

本刊对论文所附照片的要求

论文所附照片如为组织切片、细胞培养图, 投稿时应网上传输, 稿件一经采用应将图片在专业洗像处洗成照片, 并通过邮局寄至本刊编辑部。照片应清晰, 对比度好, 尺寸一致。其他类照片如网上发送则要求单位像素每英寸至少 300 线以上。请作者按此要求投稿, 以免由于图片质量而影响刊出。

(本刊编辑部)