论著

文章编号:1000-5404(2005)16-1656-04

双相接种法体外构建组织工程骨

吕仁发,周 强,许建中,张劲松,王序全,李洪鹏 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察双相接种法构建组织工程骨的效果。**方法** 取健康志愿者骨髓,密度梯度离心法分离骨髓间充质干细胞并进行体外扩增、诱导分化,然后应用双相接种技术与脱钙骨基质(DBM)复合构建组织工程骨,并与静置接种方法进行比较,计算接种效率、测定碱性磷酸酶活性,并用倒置显微镜、扫描电镜观察。**结果** 与静置接种法相比,双相接种法不仅获得近100%的接种效率,而且在体外培养过程中,组织块中细胞的碱性磷酸酶活性均高于静置接种法,后者在第14天时碱性磷酸酶活性与前者第5天的水平相当。扫描电镜见双相接种法构建的组织块切面较平坦,孔隙较小,细胞包埋在胶原中,而静置接种法构建的组织块可见细胞,细胞外基质较少。**结论** 双相接种法是一种高效的组织工程骨构建方法,有利于提高接种效率和促进组织工程骨的体外成熟。

关键词:胶原凝胶;双相接种法;组织工程;骨髓间充质干细胞

中图法分类号:R318.08;R322.71;R329.2 **文献标识码**:A

Tissue-engineering bone fabricated with biphasic seeding *in vitro*

LU Ren-fa, ZHOU Qiang, XU Jian-zhong, ZHANG Jin-song, WANG Xu-quan, LI Hong-peng (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of fabricating tissue-engineering bone using biphasic seeding method. **Methods** Bone marrow was obtained from healthy adult volunteers, and then mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated using density gradient centrifugation and cultured *in vitro*. After induced with 50 mg/L ascorbic acid, 10 mmol/L sodium β-glycerophosphate and 10^{-8} mol/L dexamethasone for 5 d, MSCs were seeded to demineralyed bone matrix (DBM) using biphasic seeding as experimental group and using normal seeding as a control group. The adhersive rates were calculated respectively. At different time points, alkaline phosphatase (ALP) activity was detected and the structures were observed by invert microscope or scanning electron microscope (SEM). **Results** MSCs-DBM complex fabricated with biphasic seeding had higher adhersive rates and ALP activity than the control group ($P<0.05$). The ALP activity of the experimental group at day 5 after being fabricated was equal to that of the control group at day 14. **Conclusion** Biphasic seeding was an effective method in fabricating tissue-engineering bone. It could improve the efficiency of seeding and be benefitial to the MSCs-DBM complex maturation *in vitro*.

Key words: collagen gel; biphasic seeding; tissue engineering; bone marrow mesenchymal stem cells

研究表明[1,2]:种子细胞在支架中的密度及其分布对于工程化组织块的质量存在巨大影响。而目前采用的细胞悬液滴加接种法不仅种子细胞的密度难于提高,而且种子细胞在支架中的分布也不均匀。本研究采用胶原凝胶双相接种法和静置接种法构建组织工程骨,并进行体外培养,以比较两种构建方法的优缺点。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12培养基、胎牛血清(Hyclone公司,美国),地塞

基金项目:国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003AA205020),重庆市科学技术重点攻关项目(2004-21-3),西南医院科技创新基金资助项目(2002-4)

Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020), the Sci & Tech Project of Chongqing (2004-21-3) and the Research Foundation for Innovation Sponsored by Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002-4)

作者简介:吕仁发(1967-),男,湖北省随州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事骨组织工程方面的研究,现在解放军184医院骨科,鹰潭335000。电话:(023)65399053,E-mail:ytlrf@163.com

通讯作者:周 强,电话:(023)68765283

收稿日期:2005-01-30;**修回日期**:2005-06-24

米松、β-甘油磷酸钠、维生素 C、胰蛋白酶（Sigma 公司，美国），淋巴细胞分离液（天津 TBD 公司），脱钙骨基质（demineralized bone matrix，DBM）（由第三军医大学西南医院全军矫形外科中心提供）。

1.2　方法

1.2.1　原代骨髓间充质干细胞的分离与培养　　参照 Stute 等[3]的方法：经成年健康志愿者髂后上棘抽取骨髓 15 ml，注入到 50 ml 离心管中，加入等体积空白 DMEM/F12 培养液稀释。在另取 8 只 10 ml 离心管中各加入 5 ml 密度为 1.077 g/ml 的淋巴细胞分离液，然后将 4 ml 经稀释后的骨髓沿离心管壁缓慢加入到分离液液面上方。2 000 r/min 离心 20 min，用吸管吸取血浆与淋巴细胞分离液之间呈乳白色的云雾状的有核细胞层，加入另一盛有 20 ml DMEM/F12 的 50 ml 离心管中漂洗并在 1 000 r/min 离心 5 min。移除上清液，加入基础培养液，并轻轻吹打，制成细胞悬液，以 2×10^6/ cm^2 的密度接种到盛有 8 ml 含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 原代培养液的 100 ml 培养瓶中，置于 37 ℃、含 5% CO_2 的孵箱中孵育。静置 24 h 使间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）充分贴壁，48 h 后首次全量换液，以后每隔 1 ~ 2 d 换液 1 次，至接种第 10 天细胞生长达 80% ~90% 融合时，移除培养液，用 2.5% 胰蛋白酶 4 ml 消化细胞约 5 min，见细胞由长梭形变成短梭形或椭圆形时加入 4 ml 含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中和胰酶，并用吸管吸取培养液轻轻吹打瓶壁使细胞与培养瓶分离。将细胞悬液移至 50 ml 离心管中，1 000 r/min 离心 5 min，去上清液，加入基础培养液制成细胞悬液，以 $1\times10^4/cm^2$ 的密度接种到 250 ml 培养瓶继续传代培养。

1.2.2　骨髓间充质干细胞的成骨诱导培养　　消化收集第 3 代的人 MSCs，以 $1\times10^4/cm^2$ 的密度接种到盛有 15 ml 含 10% 胎牛血清、10^{-8} mol/L 的地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 mg/L 维生素 C 诱导培养液的 250 ml 培养瓶中，置于 37 ℃、含 5% CO_2 的孵箱中孵育，隔天换液，诱导第 5 天，细胞达 80% 融合，可作组织构建之用。

1.2.3　DBM 予处理　　将已灭菌并 -70 ℃冻存的 DBM 取出，复温。在超净工作台中无菌条件下将 DBM 放入 6 孔板中并剪成约 4 mm×4 mm×4 mm 大小方块，加入基础培养基浸泡并反复换液以中和其中的酸性物质，直到培养液不再变色为止。吸出培养液，将培养板放入取出水盆的 37 ℃孵箱中使 DBM 块中的水分缓慢蒸发干。

1.2.4　组织工程骨的体外构建　　消化收集已经诱导 5 d 的第 3 代细胞，计数后分成两等分，离心并分装于两支 50 ml 离心管中。另取 1 支 50 ml 灭菌离心管置于冰浴中，在无菌条件下加入 4 ml 0.5% 胶原溶液、0.5 ml 10 倍 DMEM/F12、0.5 ml 优等胎牛血清，混匀，用 1 mol/L NaOH 将混合物的 pH 值调节到 7.4，制成胶原凝胶液。根据细胞数量取一定量已调制好的、尚未凝固的胶原凝胶液加入到一支盛有 hMSCs 的离心管中，轻轻吹打混匀，制成密度为 1×10^7/ml 凝胶-细胞悬液，立即用微量移液器滴加到 6 孔板中 DBM 块上，每块 50 μl，如此构建的组织块作为实验组。在另一盛有 hMSCs 的离心管中加入适量基础培养液，混匀，制成同样密度的细胞悬液，用微量移液器取细胞悬液滴加到 6 孔板中 DBM 块上，每块 50 μl，如此构建的组织块作为对照组。将 6 孔板放入 37 ℃、含 5% CO_2 的孵箱中孵育，5 min 后实验组细胞-DBM 复合物块翻面，10 min 后加入含 10% 胎牛血清的诱导培养液；对照组 2 h 后翻面，4 h 后加入诱导培养液，每孔 8 ml，置于孵箱中培养，在不同时相点分别取组织进行各项指标的观测。

1.3　观测指标

1.3.1　大体及倒置显微镜观察

1.3.2　接种效率　　接种效率以种子细胞与支架材料的粘附率来计算：

$$\text{粘附率}=\frac{\text{接种细胞总数}-\text{脱落细胞数}}{\text{接种细胞总数}}\times100\%$$

1.3.3　碱性磷酸酶活性检测（ALP）　　分别在接种后第 3、5、7、10、14 天各取 4 块工程化组织并分别放入 10 ml 离心管中，加入司徒镇强等[4]介绍的骨细胞消化液 1 ml，置于 37 ℃水浴中消化 6 h，其间间隙性振摇使组织块完全被消化。将消化完全的混合液置于冰浴中，再用超声细胞破碎机处理 5 次，6 s/次，共 30 s。然后1 000 r/min 离心 5 min，取上清液待用。按碱性磷酸酶试剂盒介绍的方法，取上述细胞裂解液 50 μl 按步骤加入 a、b、c 试剂，最后在紫外分光光度计下测定 A 值。最后根据公式算出碱性磷酸酶比活性：

$$\frac{\text{碱性磷酸酶}}{(\text{金氏单位}/100\text{ ml})}=\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}}\times\frac{\text{标准管含酚的量}}{(0.1\times0.05\text{ mg})}\times\frac{100\text{ ml}}{0.05\text{ ml}}$$

1.3.4　扫描电镜检查　　分别取培养 1 周的组织块用 PBS 液漂洗 3 次后放入 3% 戊二醛溶液中固定 48 h，酒精系列脱水，真空干燥，表面喷金，最后在扫描电镜下观察工程化组织的结构。

1.4　统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示，运用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　大体及倒置显微镜观察

双相接种约 10 min 后可见支架表面形成“白膜”，为胶原凝固所致，倒置显微镜下见细胞较均匀地分布于支架孔隙中，约 4 h 后细胞开始“发芽”形成突起，8 h 后细胞伸展良好，凝胶收缩出现裂隙，2 周时，胶原基质中可见大量具有一定折光性的细胞（图 1）。静置接种法在培养过程中无肉眼可见改变，倒置显微镜下见接种 8 h 后仍有大量细胞堆积在一起伸展不佳，2 周时支架孔隙侧壁可见新月形新生物形成（图 2）。

2.2　接种效率

种子细胞粘附率分别为：静置接种法（55.15 ±5.25）%，双相接种法（99.75 ±0.33）%。统计表明两种接种方法细胞粘附率相差非常显著，双相接种法优于静置接种法（$P<0.01$）。

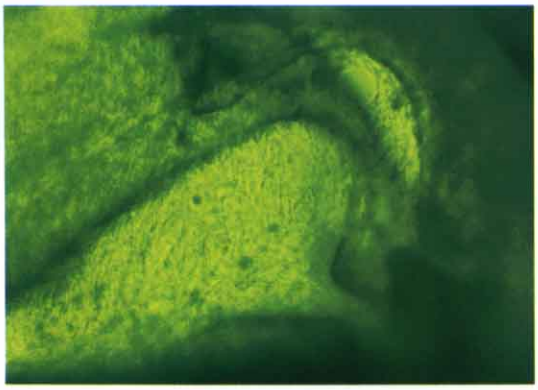


图1 双相接种法构建的组织工程骨体外培养14 d时，孔隙中可见大量具有一定折光性的梭形细胞 （倒置相差显微镜×100）

Fig 1 Tissue-engineered bone fabricated with biphasic seeding cultured for 14 days showed lots of refractive spindle cells in the pores of scaffold （Invert phase contrast microscope ×100）

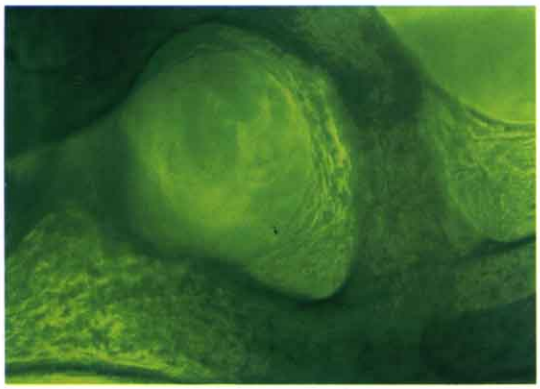


图2 静置接种法构建的组织工程骨体外培养14 d时，支架孔隙侧壁可见新月形新生物形成 （倒置相差显微镜 ×100）

Fig 2 Tissue-engineered bone fabricated with normal seeding cultured for 14 days showed crescent-shaped material in the pores of scaffold （Invert phase contrast microscope ×100）

2.3 碱性磷酸酶（ALP）含量测定

碱性磷酸酶活性值见表1所示。与同时期相比，双相接种法构建的组织工程骨碱性磷酸酶活性在培养第3天后开始明显高于静置接种法（$P<0.01$）。ALP活性变化曲线。

表1 两种构建方法在不同时期的ALP活性（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 ALP activity of complex fabricated by two different methods at different time（$\bar{x}\pm s$）

	n	Days in culture				
		3	5	7	10	14
Experimental group	4	5.65±0.36	10.19±0.36	15.62±0.5	16.60±0.37	18.51±0.38
Control group	4	3.72±0.24	7.32±0.12	9.12±0.04	9.61±0.02	10.15±0.082
t		8.954	15.293	25.696	37.394	43.504
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 扫描电镜（SEM）观察

静置接种法构建的组织块孔隙大，基质少，可见较多细胞贴孔隙周壁生长（图3）；双相接种法构建的组织块孔隙大部分被胶原基质充填，细胞被包被在基质中，表面少见细胞，孔隙中胶原基质由于其自身和种子细胞的收缩作用而出现裂隙，有助于培养液的渗透（图4）。

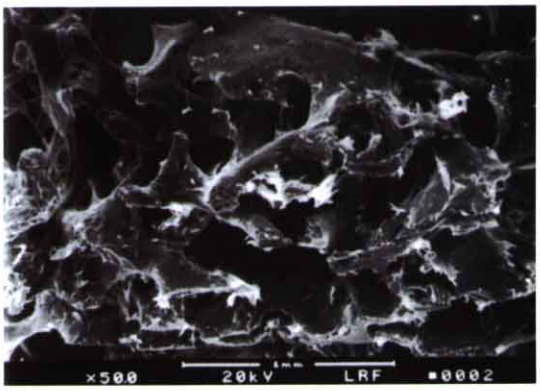


图3 静置接种法构建的组织块孔隙大，基质少，可见较多细胞贴孔隙周壁生长 （SEM×50）

Fig 3 Constructs fabricated with normal seeding had bigger pores and less matrix and many cells grew on the wall of the pores （SEM×50）



图4 双相接种法构建的组织块孔隙大部被胶原基质充填，细胞被包被在基质中，表面少见细胞，孔隙中胶原基质由于其自身和种子细胞的收缩作用而出现裂隙 （SEM×50）

Fig 4 Pores of the constructs fabricated with collagen matrix. Few cells could be seen in the surface because of being coated by collagen matrix. Fissure could be seen in collagen on account of cell contraction （SEM×50）

3 讨论

组织构建技术是组织工程研究极其重要的内容，由于细胞对于新环境的适应性、细胞与支架亲和力及重力等多方面因素的影响，使得种子细胞与支架材料的粘附率难于提高，特别是在高密度接种时，粘附率更低[5]；为了便于种子细胞与支架贴附需要在接种后不

加培养液的情况下静置一段时间。长时间处于无培养液环境又造成支架中细胞的大量死亡。这不仅造成种子细胞的极大浪费，而且种子细胞难于达到组织化所要求的细胞密度。如何提高接种效率，改善细胞在支架中分布状况以促进工程化组织成熟是尚未很好解决的技术难题。

周强等[6]利用胶原这一脊椎动物和人体最主要的结构蛋白在特定条件下可交联形成凝胶的特性，首先将细胞与胶原凝胶液均匀复合，然后在凝胶凝固之前将细胞-凝胶复合物接种到适宜的支架上，最终获得细胞-胶原凝胶-支架复合物。这种以凝胶为接种媒介，分两阶段接种的方法，称为双相接种法。他们采用双相接种法构建组织工程软骨不仅获得了近 100% 的种子细胞粘附率，同时构建的组织工程化软骨在维持软骨细胞的表型及组织结构等方面均取得良好效果。本研究应用双相接种技术构建组织工程骨，获得平均 99.75% 的细胞粘附率，明显高于静置接种法。

Li 等[7]的研究证实高密度和均匀接种的组织块中有更多的种子细胞处于 S 期，表明高密度有利于接种后细胞的持续增殖。本实验中双相接种法构建的组织块从第 5 天开始 ALP 活性明显高于静置接种法。直到第 14 天时，静置法构建的组织块的 ALP 活性才达到双相接种法第 5 天的水平。ALP 活性增高可能是多方面因素共同作用的结果：一方面双相接种的组织块中有更多的种子细胞；另一方面可能是双相接种的工程化组织中种子细胞以更快的速度增殖；第三，接种于胶原凝胶中的 MSCs 能更充分地表达其成骨表型。Mizuno 等[8]研究发现：I 型胶原能诱导 MSCs 向成骨细胞分化，这种作用是胶原分子中 DGEA 序列与 MSCs 膜上 $\alpha_2\beta_1$ 受体结合而介导信号传递的结果。

双相接种法构建的工程化组织中的种子细胞从一开始便处于三维立体的环境之中，细胞与细胞之间有胶原基质相互间隔，这种立体的生长环境是细胞赖以维持其表型的基础。而静置接种法构建组织的初期，细胞在支架中或处于二维平面上，或相互直接地紧密接触，堆积在一起，随着胶原基质的不断分泌、积累，支架的孔隙逐渐缩小，细胞才逐渐进入立体的环境之中。本实验观察到双相接种的细胞在 4 h 已开始出现突起，8 h 已在胶原凝胶中均匀分布并向四周形成大量突起，而静置接种法 8 h 细胞仍堆积在一起，难以伸展。由此推测静置法高密度接种可能存在细胞间抑制，伸展缓慢和贴附能力下降可能是这种抑制的表现。

无论从细胞数量，还是 ALP 活性，双相接种法构建的工程化组织均比静置接种法提前达到较为理想的状态，有利于工程化组织的体外熟化。综上所述，双相接种法不仅可在高密度情况下获得高的接种效率，而且胶原凝胶提供的生存环境有利于种子细胞的增殖和表型的表达，是一种值得推荐的组织工程骨构建方法。

参考文献：

[1] Saini S, Wick T M. Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19(2): 510 - 521.

[2] Vunjak Novakovic G, Freed L E. Culture of organized cell communities [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 33(1 - 2): 15 - 30.

[3] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, *et al*. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use[J]. Exp Hematol, 2004, 32(12): 1212 - 1225.

[4] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版西安公司，2004. 161 - 162.

[5] 柴　岗，张　艳，王　敏，等. 人骨髓基质细胞诱导成骨细胞和脱钙骨粘附率的研究[J]. 实用美容整形外科杂志，2003，14(2)：66 - 69.

[6] 周　强，李起鸿，戴　刚，等. 关节软骨细胞三维支架双相接种体外生成软骨组织的观察[J]. 中华骨科杂志，2002，22(6)：372 - 376.

[7] Li Y, Ma T, Kniss D A, *et al*. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices [J]. Biotechnol Prog, 2001, 17(5): 935 - 944.

[8] Mizuno M, Kuboki Y. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen[J]. J Biochem (Tokyo), 2001, 129(1): 133 - 138.

（编辑　王　红）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg)，但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部