论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0370-04

嗅鞘细胞与聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物材料的细胞相容性研究

矫树生[1],李兵仓[1],陈建梅[2],游 华[1] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]南京军区福州总医院骨科,福州 350001)

摘 要:**目的** 探讨嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)与聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物[poly(DL-lactide-co-glycolide),PLGA]材料的细胞相容性。**方法** 将新鲜分离的OECs细胞悬液接种于PLGA膜上,然后用倒置相差显微镜、扫描电镜观察细胞生长及细胞与材料的附着情况;MTT、流式细胞术等方法测定OECs的细胞增殖和细胞周期变化。**结果** PLGA膜上培养OECs的形态特征、增殖能力、细胞周期及倍体水平等与正常培养的OECs相比,均无显著性差异($P>0.05$)。**结论** PLGA生物材料与OECs相容性好,适于构建组织工程化人工神经。

关键词:嗅鞘细胞;聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物;细胞相容性;人工神经

中图法分类号:R318.08;R322.8;R329.24 **文献标识码**:A

Cytocompatibility of biomaterial poly (DL-lactide-co-glycolide) with olfactory ensheathing cells

JIAO Shu-sheng[1], LI Bing-cang[1], CHEN Jian-mei[2], YOU Hua[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Department of 6, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Fuzhou General Hospital of Nanjing Command, Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the cytocompatibility between poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) and olfactory ensheathing cells (OECs) so as to found a basis to prepare an artificial nerve made of PLGA with OECs. **Methods** Freshly isolated OECs were seeded on PLGA membrane, and then their growth and adhesion to the membrane were observed at different time points by phase contrast inverted microscopy and scanning electron microscopy. The proliferation and the cell cycle of OECs were examined by MTT and flow cytometry. **Results** There was no statistically difference between the morphological feature, proliferative capacity and cell cycle of OECs cultured on PLGA membrane and those normally cultured ($P>0.05$). **Conclusion** The PLGA processes good compatibility with OECs, and it is suitable to construct tissue engineering artificial nerve with OECs.

Key words: olfactory ensheathing cells; poly (DL-lactide-co-glycolide); cytocompatibility; artificial nerve

嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)是一种介于施万细胞与星形胶质细胞之间的特殊类型的胶质细胞[1],具有促进神经再生和形成髓鞘的能力[2,3];聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物[poly(DL-lactide- co-glycolide),PLGA]由结晶态的聚乳酸和聚羟基乙酸聚合而成,被认为是一种较为理想的人工神经支架材料[4],但两者的生物相容性目前尚不知晓。为此,本研究拟用OECs复合PLGA导管修复周围神经缺损,将OECs接种于PLGA膜上,以正常培养为对照,观察两者的生物相容性,确定PLGA对OECs细胞形态、增殖能力、细胞周期及倍体水平等方面的影响,从而验证OECs复合PLGA制备组织工程化人工神经的可行性,为修复周围神经缺损奠定一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 PLGA膜的制备

参考Sundback[5]、张文捷等[6]的方法,将质量/容积比为5%的PLGA(85:15)三氯甲烷溶液加入玻璃培养皿内,使液高达0.5 mm,待三氯甲烷自然挥发48 h后,将PLGA膜置入冷冻干燥机内,以20 L/h、-0.1 MPa真空抽提三氯甲烷50 h,然后

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522604)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522604)
作者简介:矫树生,男,吉林省四平市人,硕士研究生,主要从事神经生长与修复方面的研究。电话:13930108190,E-mail:xiaojiao567@sina.com
通信作者:李兵仓,电话:(023)68757456,E-mail:bcli1118@yahoo.com
收稿日期:2007-03-22;修回日期:2007-12-21

用 γ 射线照射灭菌，无菌条件下干燥保存，备用。细胞培养前用 DMEM/F12 培养基孵育 2 h。

1.2　OECs 的分离

参考 Sasaki 等[7]方法进行，略加改良。简述为：选用新生 2 d 的 SD 大鼠（由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供），无菌条件下断头处死，暴露嗅球。剪去尾侧 1/3，取头侧 2/3 置于冰浴的 D-Hanks 液中。解剖显微镜下仔细剥离嗅球表面毛细血管及软脑膜，去除白质及灰质内层，将剩余的嗅神经层及颗粒层用 D-Hanks 液清洗，剪碎，置于 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 液中 37 ℃消化 20 min，终止消化后以1 000 r/min 离心 5 min，去上清，加入 DMEM/F12-20% FCS 培养基，用火焰抛光的 Pasteur 滴管轻轻吹打形成细胞悬液，200 目无菌筛网过滤去除细胞团块，调整细胞数至 $1\times10^{6}ml^{-1}$。

1.3　OECs 与 PLGA 膜复合培养

将浓度为 $1\times10^{6}ml^{-1}$ 的细胞悬液接种于 PLGA 膜上，24 h 后加入作用浓度为 10^{-5}mol/L 的 Ara-C，作用 36 h 后换上新鲜的 DMEM/F12-20% FCS 培养基继续培养。正常对照组将细胞接种于多聚赖氨酸包被的盖玻片上，处理同前。接种 3 ~ 4 d 后，用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min，PBS 清洗 3 次 × 5 min，封闭血清孵育 20 min，兔抗大鼠 NGFR p75（稀释度 1∶100）、小鼠抗大鼠S-100（1∶100）一抗混合工作液 37℃孵育 2 h，TRITC 标记的山羊抗兔 IgG（1∶50）、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG（1∶50）二抗混合工作液 37 ℃孵育 30 min，荧光显微镜下观察、摄像。

1.4　形态学观察

OECs 接种 PLGA 膜后，每日在倒置显微镜下观察细胞生长、增殖及细胞形态变化情况。细胞培养至 1、3、5、7 d 时，PBS 冲洗，2.5% 戊二醛固定，乙醇梯度系列脱水，临界点干燥，表面喷金后行扫描电镜观察。

1.5　MTT 比色法检测细胞增殖能力

分别于接种后 1、3、5、7 d 轻轻吸去上清，加入 MTT 溶液（DMEM/F12 + 20% FCS 稀释，终浓度为 1 mg/ml）37 ℃孵育 4 h，再加入等量的 DMSO（二甲基亚砜）37 ℃震荡孵育，待结晶产物完全溶解后，酶标仪上波长 570 nm 处检测每孔的光密度值[D(570)]，根据细胞相对增殖率（relative growth rate，RGR）公式[RGR = PLGA 的 D(570)/对照组 D(570) ×100%]计算出 OECs 在 PLGA 膜上的细胞相对增殖率。依照 1994 年国家卫生部《生物材料和制品的生物学评价标准》对 PLGA 材料的细胞毒性进行评价[8]。该标准规定，细胞相对增殖率等于 0 为 5 级，界于 1% ~24% 为 4 级，25% ~49% 为 3 级，50% ~74% 为 2 级，75% ~99% 为 1 级，≥100% 为 0 级。级数越低，细胞毒性越小，安全性越高。

1.6　流式细胞仪检测细胞周期及 DNA 倍体分析

OECs 接种 PLGA 膜后，分别于 1、3、5、7 d 用 0.25% 的胰蛋白酶 + EDTA 消化收集细胞，血清中和，离心，75% 乙醇重悬固定，制成细胞数为 $1\times10^{6}ml^{-1}$ 的单细胞悬液，4 ℃过夜。去除酒精固定液后加入 PI 染料（PI 50 μg/ml，RNA 酶 A 0.1 mg/ml），4 ℃继续孵育 25 min。用 Epics Elite Esp 型流式细胞仪（美国 Coulter 公司）进行检测，并根据 DNA 指数（DNA index，DI）公式计算出样品细胞的 DI 值，以确定 PLGA 材料对 OECs 的细胞周期、DNA 含量及倍体水平的影响。

DI = PLGA 的 G_1 期细胞百分比/对照组 G_1 期细胞百分比。

1.7　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行配对 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　倒置显微镜观察

正常对照组细胞接种 4 h 后可见 70% 的细胞贴壁，分布均匀，形态以圆形为主。12 h 后 90% 细胞贴壁，部分聚集，部分散在分布，形态以圆形、椭圆形为主，个别细胞有突起形成。24 h 后贴壁细胞的形态逐渐趋于多样，部分为双极或三极，有短突起，部分为多极，胞体扁平。3 d 后细胞突起逐渐细长，形态与 Schwann 细胞相似，胞体饱满，呈梭形，立体感强。5 d 后双极或三极细胞细胞密度增加，胞体发亮，细胞间联系广泛。7 d 时细胞形态与 5 d 时基本相同。

PLGA 组细胞接种 4 h 后见大量细胞沉底，但并非完全贴壁，轻轻晃动易使部分细胞重悬，细胞牢固贴壁晚于对照组，一般需 5 ~ 6 h。接种 12 h 后，约 80% ~90% 细胞牢固贴壁，成团或散在分布，与对照组比较，成团者居多，胞体形态与对照组大体相同。24 h 后细胞形态趋于多样，但圆形、椭圆形细胞比例高于对照组。培养 3 d 后细胞从细胞团中迁出，细胞形态呈双极或多极，有明显的细长突起。培养 5 d 后细胞分布均匀，突起增长，细胞数量及形态上与对照组无明显差异。培养 7 d 后细胞数量略有增加，分布与 5 d 时无异，未观察到细胞衰老现象。

2.2　免疫组化鉴定结果

细胞培养 3 ~ 4 d 时 S-100、NGFRp75 免疫组化鉴定结果见图 1，两组 S-100 和 NGFRp75 双阳性细胞即 OECs 在两种培养条件下细胞形态相同，分布相似，OECs 的纯度均为 50% ~ 60%。

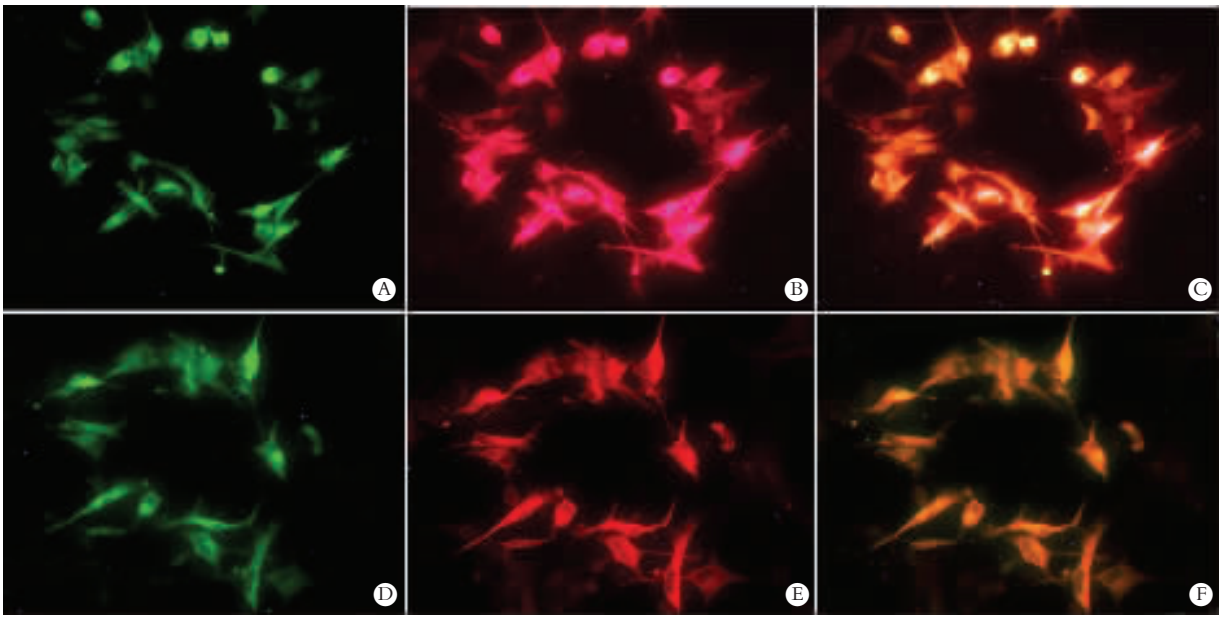
2.3　扫描电镜观察

正常对照组细胞培养 24 h 时，细胞散在或成团分布在盖玻片表面，有细的短突起形成（图 2A）；3 d 时细胞外基质开始形成，细胞突起明显增长，并可见小的次级分支（图 2B）。此后，随培养时间的增加，细胞突起不断延长，细胞间联系趋于广泛（图 2C）。

PLGA 膜在扫描电镜下为不规则半球形突起的界面，球形突起直径为 0.1 ~2 μm。PLGA 组细胞培养 1 d 时，细胞形态及分布特点与对照组相似，无明显差异（图 2D），3 d 时细胞分泌大量的细胞外基质，以利于细胞在半球形突起的 PLGA 膜表面黏附生长，同时背景可见成纤维细胞或星形胶质细胞存在（图 2E）。5 ~7 d 时，细胞的形态及数量与对照组无显著差异，但细胞间联系较对照组少（图 2F）。

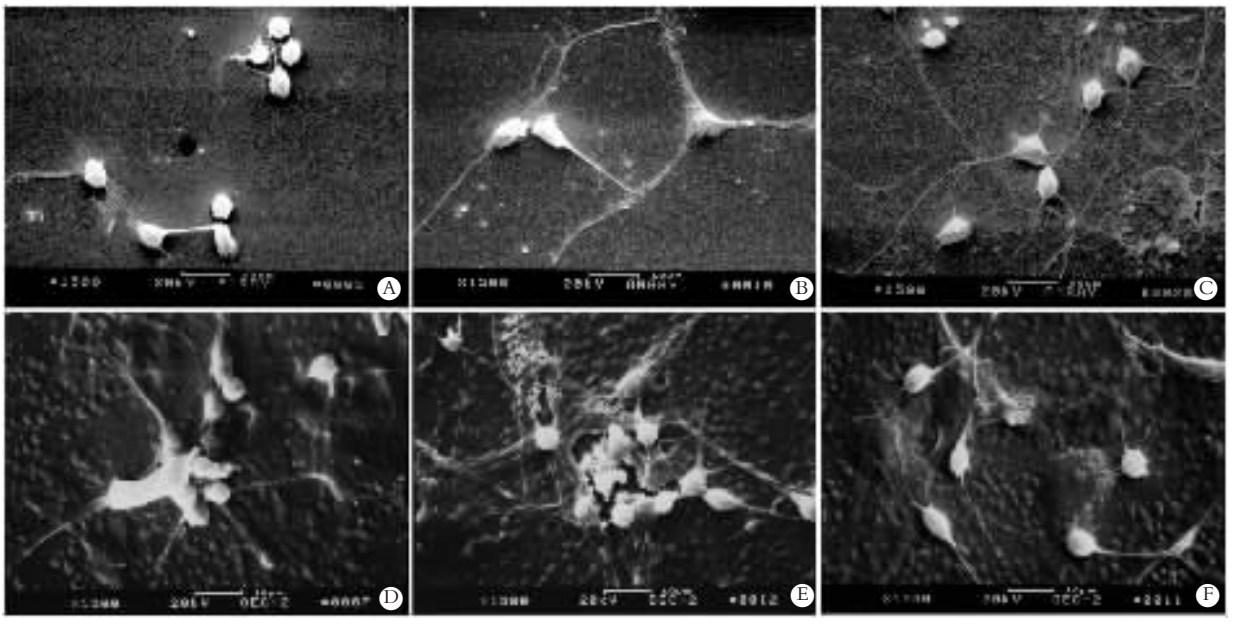
2.4　MTT 法检测细胞增殖情况

OECs 接种后各时相点测得的吸光度值[D(570)]及细胞相对增殖率列于表 1。OECs 接种于 PLGA 膜后 1、3、5、7 d 的细胞相对增殖率分别为 96.2%、89.4%、86.4%、90.6%，均大于 75%，小于 99%。根据 1994 年卫生部《生物材料和制品的生物学评价标准》，PLGA 材料的毒性实验评分为 1 级，PLGA 材料与 OECs 相容性良好。



A、B、C 分别为正常对照组 S-100、NGFRp75 和 S-100/NGFRp75 双标结果；D、E、F 分别为 PLGA 组 S-100、NGFRp75 和 S-100/NGFRp75 双标结果

图1 两组嗅鞘细胞培养3～4 d时免疫荧光观察 （荧光显微镜×600）



A、B、C 为正常对照组培养后第1、3、5天；D、E、F 为 PLGA 组培养后第1、3、5天

图2 两组嗅鞘细胞不同培养时间扫描电镜观察 （SEM×1 500）

表1 PLGA组与对照组各时相点吸光度值及细胞相对增殖率（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d		3 d		5 d		7 d	
	D(570)	RGR	D(570)	RGR	D(570)	RGR	D(570)	RGR
PLGA	0.372±0.008	96.2%	0.435±0.006	89.4%	0.524±0.005	86.4%	0.896±0.008	90.6%
对照组	0.386±0.004	–	0.487±0.005	–	0.606±0.006	–	0.989±0.006	–

2.5 细胞周期与DNA倍体分析

PLGA组与对照组OECs各个时相点的G_0/G_1期、S期细胞百分比及DI值列于表2。从表中可以看出，PLGA组的G_0/G_1期（DNA合成前期）细胞百分比不断减少，S期（DNA合成期）细胞不断增加，与对照组OECs的细胞周期变化趋势相同，说明PLGA材料并不影响OECs的细胞周期变化。同时可见PLGA组在细胞接种后1～7 d DI值均在（1.0±0.1）范围内，说明PLGA膜上培养的OECs为正常DNA二倍体细胞，无DNA异倍体

细胞出现，证实该材料对 OECs 无致癌性，二者联合应用对机体无害。

表 2　PLGA 组与对照组 OECs 细胞周期和 DNA 倍体分析结果

组别	1 d			3 d			5 d			7 d		
	G_0/G_1	S	DI	G_0/G_1	S	DI	G_0/G_1	S	DI	G_0/G_1	S	DI
PLGA	95.08	1.2	0.99	94.69	3.19	0.98	90.05	4.97	0.98	90.22	6.74	1.10
对照组	95.22	1.38	–	95.82	2.12	–	91.62	4.90	–	81.72	11.5	–

3　讨论

理想的组织工程人工材料除具有良好的结构相容性、适宜的力学性能和自行生物降解能力外，首先应具有良好的生物相容性。这要求材料本身或其降解产物对种子细胞和机体无致癌、致畸、致突变作用，不会引起炎症和免疫排斥反应，且能够为种子细胞提供良好的粘附和生长界面。本研究利用体外细胞复合培养法，探讨 PLGA 材料与 OECs 的生物相容性，为构建 OECs 复合 PLGA 导管的组织工程化人工神经打下基础[9]。

镜下观察细胞形态能够直观地了解细胞的黏附、增殖、分布和死亡情况，进而直接了解被测材料对种子细胞的细胞毒性。本实验通过相差倒置显微镜、扫描电镜和免疫组化鉴定等形态学观察发现，OECs 在 PLGA膜上的黏附性与对照组无显著差异，细胞的形态、数量与分布亦无明显区别，说明 PLGA 能为 OECs 的黏附和生长提供良好的生长表面。

MTT 比色法为细胞毒性实验的经典方法[10]。MTT 的作用靶点位于线粒体，而线粒体的数量多少及活性决定了细胞活力，因此 MTT 法测得的比色值能灵敏地反应出所测材料对细胞的毒性损害[11]。本实验利用该法检测了 OECs 在 PLGA 膜上的增殖能力。结果表明，OECs 在 PLGA 膜上各时相点的细胞相对增殖率均大于 75%，细胞毒性评价为 1 级，证实 PLGA 对 OECs 无明显毒性作用。

细胞周期检测与 DNA 倍体分析是评价生物材料是否具有致癌性的客观、有效方法[12]。本实验利用流式细胞仪对 OECs 接种于 PLGA 膜后不同时相点的细胞周期和 DNA 倍体水平进行检测。结果证实，PLGA 对 OECs 的细胞周期无显著影响，复合培养 1、3、5、7 d 后的 DI 值均在正常范围内，从而表明 PLGA 对 OECs 无致癌性，二者合用安全、可靠。

综上可以认为，PLGA 对 OECs 的形态特征、粘附增殖能力、细胞周期及倍体水平等多方面无有害作用，二者具有很好的相容性。结合其他有关 PLGA 生物力学性能、体内生物降解等有关报道[13]，我们认为 PLGA 与 OECs 合用，能够构建一种用于周围神经缺损修复的适宜人工神经。

参考文献：

[1] Barnett S C, Chang L. Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend? [J]. Neurosci, 2004, 27(1): 54 – 60.

[2] Guntinas-Lichius O, Angelov D N, Tomov T L, *et al*. Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons [J]. Exp Neurol, 2001, 172(1): 70 – 80.

[3] Dombrowski M A, Sasaki M, Lankford K L, *et al*. Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells [J]. Brain Res, 2006, 1125(1): 1 – 8.

[4] Boccaccini A R, Blaker J J, Maquet V, *et al*. Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications [J]. Mater Sci and Engi: C, 2005, 25(1): 23 – 31.

[5] Sundback C A, Shyu J Y, Wang Y D, *et al*. Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material [J]. Biomaterials, 2005, 26(27): 5454 – 5464.

[6] 张文捷，李兵仓，王建民，等. PLGA 神经诱导管的制作及其神经再生诱导作用 [J]. 重庆医学，2005，34(4)：525 – 527.

[7] Sasaki M, Lankford K L, Zemedkun M, *et al*. Identified olfactory ensheathing cells transplanted into the transected dorsal funiculus bridge the lesion and form myelin [J]. J Neurosci, 2004, 24(39): 8485 – 8493.

[8] 贾文英，史弘道. 细胞毒性试验评价医用装置生物相容性的研究概况 [J]. 实用美容整形外科杂志，2001，12(5)：253 – 255.

[9] 布林白乙拉，钟　环，谈山峰. 银杏提取液对嗅神经鞘细胞分化的影响 [J]. 郑州大学学报·医学版，2006，41(6)：1136 – 1137.

[10] Chen P R, Chen M H, Sun J S, *et al*. Biocompatibility of NGF-grafted GTG membranes for peripheral nerve repair using cultured Schwann cells [J]. Biomaterials, 2004, 25(25): 5667 – 5673.

[11] Bisson I, Kosinski M, Ruault S, *et al*. Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells [J]. Biomaterials, 2002, 23(15): 3149 – 3158.

[12] Mao J S, Cui Y L, Wang X H, *et al*. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis [J]. Biomaterials, 2004, 25(18): 3973 – 3981.

[13] Wu L B, Ding J. *In vitro* degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering [J]. Biomaterials, 2004, 25(27): 5821 – 5830.

（编辑　王　红）