文章编号:1000-5404(2009)21-2037-04

论著

多聚赖氨酸修饰的山羊脱钙骨富集骨髓干细胞的性能评价

叶 青[1,2],谢 肇[1],罗 飞[1],刘曦明[3],杨 滔[1],许建中[1] ([1]第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038;[2]武警广西总队医院骨科,南宁 530003;[3]广州军区武汉总医院骨科,武汉 430070)

摘 要:目的 研究经多聚左旋赖氨酸修饰的山羊脱钙骨基质(demineralized bone matrix decorated with poly-L-lysine, PLL-DBM)的性能,为选择性细胞滞留技术(selective cell retention,SCR)提供一种对骨髓干细胞黏附性能良好的富集基质材料。**方法** 将取材于山羊股骨近端的松质骨去皮质理化处理制成脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM),用多聚左旋赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)对其进行修饰。扫描电镜分析其显微结构;氨基酸成分分析检测PLL与DBM的复合情况;通过纤维母细胞集落形成单位(CFU-F)计数,检测山羊PLL-DBM对骨髓干细胞的富集效果;在山羊横突间融合模型中,通过X线片及组织学评价其成骨能力。**结果** PLL-DBM具有天然网状孔隙结构系统,空隙内修饰有PLL形成的蜘蛛网样结构;PLL与DBM能较好地复合;山羊PLL-DBM对骨髓干细胞富集效果明显优于空白DBM($P<0.01$)。PLL-DBM的成骨能力与自体髂骨相当。**结论** 山羊PLL-DBM对骨髓干细胞有较好的富集效果,成骨能力强,是一种理想的富集基质材料。

关键词: 多聚左旋赖氨酸;脱钙骨基质;骨髓干细胞;富集基质材料
中图法分类号: R318.08; R322.71 **文献标识码:** A

Property of decalcified goat bone matrix decorated with poly-L-lysine in enriching bone marrow stem cells

YE Qing[1,2], XIE Zhao[1], LUO Fei[1], LIU Xi-ming[3], YANG Tao[1], XU Jian-zhong[1] ([1]Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Orthopaedics, General Hospital of Guangxi Armed Police Force, Nanning 530003; [3]Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To investigate the performance of the demineralized bone matrix decorated with poly-L-lysine (PLL-DBM) in order to develop a type of enrichment matrix with good enrichment effects of bone marrow stem cells for selective cell retention (SCR) technology. **Methods** Cancellous bones harvested from the goat proximal femurs were used to remove the bone cortexes and then prepared to DBM. PLL was used to decorate the surface and interspace of DBM. Electron scanning microscopy was used to observe the structure of PLL-DBM, while amine acid component of PLL-DBM were analyzed to observe the compound condition of PLL and DBM. Colony forming unit-fibroblast (CFU-F) was calculated to determine the enrichment effect of PLL-DBM on bone marrow stem cells. Osteogenic ability of PLL-DBM was observed in goat lumbar intertransverse graft bone model by X-ray and histological analysis. **Results** PLL-DBM had a natural mesh pore structure; and PLL formed spider web-like mesh structure in the interspaces. PLL was well bond with DBM. The enrichment ability of PLL-DBM for bone marrow stem cells was superior to that of DBM ($P<0.01$); Osteogenic ability of PLL-DBM was same as that of autologous bones. **Conclusion** The structure of PLL-DBM is profit to adhere marrow cells, which have better enrichment effect on marrow cells, and is a good enrichment matrix.

Key words: poly-L-lysine; demineralized bone matrix; marrow stem cell; enrichment matrix

临床对高成骨活性的骨修复材料的需求量大,体外扩增构建的常规组织工程骨构建时间长,不能满足随取随用的需要。因此可术中即刻构建的组织工程骨已成为一个研究热点。近年来欧美少数学者报道了一项术中富集骨髓干细胞构建组织工程骨(tissue engineered bone, TEB)的新技术——选择性细胞滞留技术(selective cell retention, SCR)[1-5],SCR的核心技术就在于如何提高基质材料对骨髓细胞的黏附效果。然

基金项目: 国家高技术研究发展计划重大攻关课题(863计划)(2006AA02A122)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2006AA02A122)
作者简介: 叶 青,男,广西壮族自治区桂林市人,博士研究生,副主任医师,主要从事临床及骨组织工程相关方面的研究。E-mail: Yeqingllb2003@yahoo.com.cn
通信作者: 许建中, E-mail: xjzslw@hotmail.com
收稿日期: 2009-03-16;**修回日期:** 2009-05-11

而,上述学者所选用的基质材料均为空白脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)或松质骨碎片,这些材料均未经过表面修饰剂的修饰,其对骨髓细胞的富集效果有待进一步提高。为提高基质材料对骨髓细胞的富集效果,本课题组成员刘曦明等[6]前期报道将多聚左旋赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)修饰于人的DBM,使其富集效果有了显著的提高。本研究旨在将取材于山羊股骨近端的松质骨制备成多聚左旋赖氨酸修饰的山羊脱钙骨基质(demineralized bone matrix decorated with poly-L-lysine, PLL-DBM)材料,为PLL-DBM作为SCR技术的富集基质材料在实验或临床中应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

多聚左旋赖氨酸(相对分子质量为 150×10^3 ~ 300×10^3, Sigma公司, 美国);Cellect富集器(Depuy公司, 美国);真空抽滤机(武汉大学教学仪器厂);冷冻干燥机(LGJ-10,军事医学科学院实验仪器厂);扫描电镜(日立S-3400N, 日本);全自动氨基酸分析仪(日立I-8800,日本)。

1.2 DBM的制备

取山羊股骨远近端及髂骨松质部分,所截取骨块内不含软骨及皮质骨成分,初制为5 mm×5 mm×5 mm大小,取材各骨块的表观孔隙密度基本相同。参照Maddox等[7]方法将山羊骨块制备成DBM。^{60}Co辐射消毒,无菌袋真空包装,深低温(-80 ℃)储藏3个月。

1.3 PLL-DBM材料的制备

参照本课题组成员刘曦明等[6,8]制备人PLL-DBM的方法:无菌条件下,0.1%的PLL浸泡制备的DBM 20 h;真空负压抽滤机抽滤10 h直至外观无气泡溢出;置冷冻干燥机冷冻干燥48 h,^{60}Co辐射消毒,无菌袋真空包装,置-20 ℃冰箱保存。

1.4 检测方法

1.4.1 扫描电镜观察 PLL-DBM及DBM各10块,锐刀横切,酒精系列脱水,真空干燥,表面喷金,随机选择不同区域,进行扫描电镜观察分析,并用Labwrrks™图像分析系统对其孔径大小和孔隙率进行测定,孔径大小测定方法:于每个标本上随机测定10个孔径大小取其平均值,孔隙率测定方法是测定每个标本单位体积上空隙所占的比例,测定标本均为10个。

1.4.2 氨基酸成分分析 样品处理:PLL-DBM及DBM样品各10块分别打磨成粉,准确称取样品0.1 g于18 mm×180 mm的试管中,盐酸溶解过滤,烧杯中60℃恒温蒸干。稀释15倍用0.45滤膜过滤后用日立L-8800型全自动氨基酸分析仪上机分析。分析条件:1个样品分析周期53 min,分析时有2个柱,①分离柱:洗脱液流速0.4 ml/min,柱温70℃,柱压8.627 MPa;②反应柱:茚三酮及茚三酮缓冲液流速0.35 ml/min,柱温135 ℃,柱压0.490 MPa。

1.4.3 PLL-DBM材料对骨髓干细胞的富集效果检测 无菌操作下于山羊双侧髂后上棘共抽30 ml肝素化骨髓(肝素6 250 U/ml),应用Cellect富集器使骨髓缓慢流经DBM和PLL-DBM,循环3次后使骨髓细胞富集于DBM和PLL-DBM上,收集流出液。参照Hernigou等[9]的纤维母细胞集落形成单位(CFU-F)计数法,CFU-F即指骨髓干细胞,骨髓加入液及流出液各取4 ml制成单细胞悬液,按2×10^6个细胞接种到25 cm^2网格培养瓶中培养,每3天更换培养液。10 d后培养瓶中出现肉眼可见的集落终止培养,弃掉培养液,加纯甲醇5 ml固定15 min。弃掉固定液,行Giemsa染色20~30 min,并在倒置显微镜下放大25倍计数,纤维母细胞数 > 50为1个集落,用每10^6个骨髓细胞含有的CFU-F的平均数进行评定。干细胞浓度富集倍数计算公式:$\alpha=[(Vf_1\times Cf_1\times n_1)-(Vf_2\times Cf_2\times n_2)]/(Vf_1-Vf_2)\times Cf_1\times n]$。$Vf_1$为富集前骨髓体积;$Vf_2$为富集后所剩骨髓体积;$Cf_1$、$Cf_2$分别为富集前后有核细胞(NCS)浓度(用血细胞自动分析仪测定);n_1、n_2分别为富集前后细胞集落数。

1.4.4 PLL-DBM在山羊横突间融合模型成骨能力观察 取成年6~8月龄健康雄性青山羊10只,体质量22~25 kg(平均23.8 kg,第三军医大学实验动物中心),均暴露出双侧L3/4椎板及横突并去皮质化制备成植骨床。将5 g PLL-DBM材料整齐排列放入Cellect富集器滤碗中;分别于左右髂骨各抽取骨髓15 ml;将30 ml骨髓注入滤碗,通过富集器的负压抽吸作用骨髓缓慢流经PLL-DBM材料,反复3次构建富含骨髓细胞的骨移植材料。骨移植材料分2组:A组(PLL-DBM组)为PLL-DBM富集骨髓后的基质材料;B组为自体髂骨。于山羊L3/4右侧横突间隙及椎板骨床上植入A组材料,左侧横突间隙及椎板骨床上植入B组材料,2组所植骨量相等。分别于术后第8、16周行融合段X线片、组织学观察比较其成骨能力。

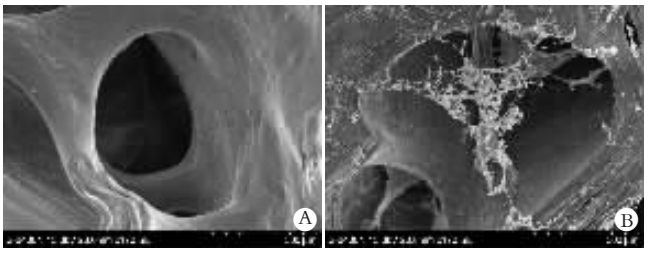
1.5 统计学分析

数值以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件对正态分布数据均数进行 t 检验。

2 结果

2.1 形态结构观察

扫描电镜观察见PLL-DBM的空隙结构与单纯DBM类似,均有天然的三维网孔结构,空隙率与空隙连通率高;PLL-DBM材料表面及网孔内壁可见乳白色PLL涂层覆盖,且PLL在空隙中形成蜘蛛网样的网状结构(图1)。DBM孔径大小为(478.51±8.03)μm,孔隙率为(80.25±7.46)%,PLL-DBM孔径大小为(472.51±7.02)μm,孔隙率为(78.15±6.45)%。



A:DBM;B:PLL-DBM

图1 DBM与PLL-DBM扫描电镜观察

2.2 氨基酸成分分析

PLL-DBM及单纯DBM中甘氨酸、精氨酸、赖氨酸等胶原类氨基酸含量均高,而无明显色氨酸、酪氨酸和半胱氨酸等强免疫原性氨基酸的波峰,二者相比无明显差异,但PLL-DBM较单纯DBM有明显的赖氨酸波峰。

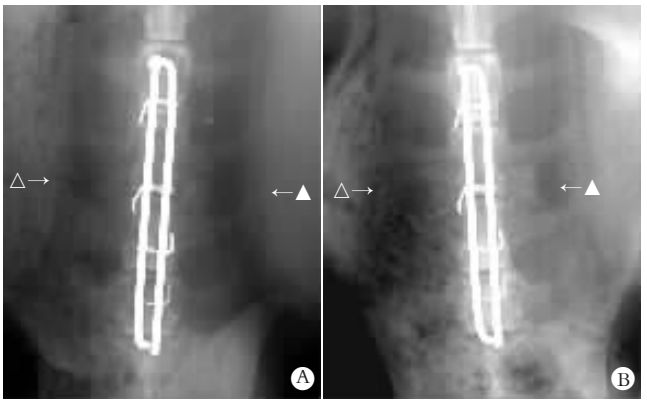
2.3 PLL-DBM材料对骨髓干细胞的富集效果检测

重复8次测量,每次PLL-DBM对骨髓纤维母细胞集落形成单位(CFU-F)的富集倍数分别为:5.84、5.30、5.47、5.93、6.34、4.82、5.63、6.12;DBM对CFU-F的富集倍数分别为:

2.32、2.47、1.85、2.08、2.22、2.36、1.92、2.62 倍。进行两样本均数比较的 t 检验,统计结果为:PLL-DBM 对 CFU-F 浓度富集倍数为(5.68 ± 0.49)倍,而 DBM 对 CFU-F 的富集倍数仅为(2.23 ± 0.27)倍,二者有显著差异($P < 0.01$)。

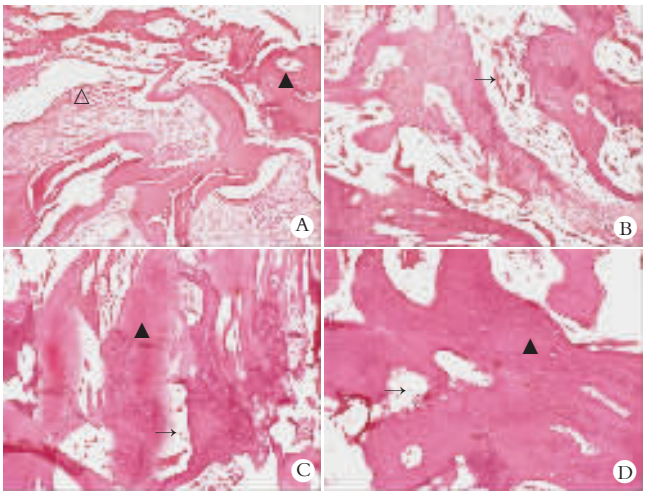
2.4　成骨能力观察

X 线显示:第 8 周时 PLL-DBM 组只在内侧靠近椎体处有较明显的成骨,融合范围及骨密度都不及自体髂骨组,自体髂骨组骨密度仍较低,与横突桥接部仍然可见骨间隙;第 16 周时,2 组的融合范围及骨密度均基本相当,骨密度与横突基本一致,与横突桥接处无间隙存在,均完全愈合(图 2)。组织学观察:第 8 周时 PLL-DBM 组组织块中仍然可见尚未成骨的纤维样组织,周围成骨明显(图 3A),自体髂骨组骨小梁连续,可见骨髓形成(图 3B);第 16 周时 2 组新生骨均比较成熟,均可见骨髓形成以及大量的编织骨形成(图 3C、D)。



A:第 8 周;B:第 16 周

图 2　不同时间 PLL-DBM 组(△)、自体髂骨组(▲)X 线表现



A:第 8 周 PLL-DBM 组　△:中央大量未成骨的纤维组织;▲:周围成骨明显;B:第 8 周自体髂骨组　↑:骨髓形成,骨小梁连续;C:第 16 周 PLL-DBM 组　↑骨髓形成;▲:编织骨形成;D:第 16 周自体髂骨组　↑:骨髓形成;▲:编织骨形成

图 3　不同时间 PLL-DBM 组、自体髂骨组组织学观察　(HE ×40)

3　讨论

本研究制备的羊 PLL-DBM 主要作为富集基质材料用于 SCR 技术,SCR 技术通过富集基质材料适当的网孔结构和良好的细胞黏附能力,在富集装置的负压作用下,使骨髓流经时选择性地黏附滞留骨髓干细胞、骨生长因子、血小板等有效成分,从而使骨髓干细胞等成分得以富集,而红细胞以及淋巴细胞很少被保留[10]。骨髓的成骨能力与骨髓干细胞浓度有关,骨髓浓缩后可增加成骨活性细胞的克隆形成能力[9],多位学者在实验与临床骨缺损修复术中应用 SCR ,获得了较满意的效果[1,3-5,10]。

本研究制备的青山羊完全脱钙 DBM 具备良好的生物相容性、可降解性、合理的三维立体孔隙-网架结构、可塑性和一定的机械强度以及良好的细胞-材料界面等特点[11]。但作为富集基质材料,单纯的 DBM 尚不能对骨髓中的干细胞等成分起到理想的黏附富集效果,因此,对 DBM 进行有效的表面修饰以提高其对骨髓细胞的黏附效果是必要的。

本研究将多聚赖氨酸(PLL)修饰于山羊 DBM 后结果显示能显著提高对骨髓细胞的黏附效果,其可能原因是:①赖氨酸残基固定在材料表面带正电荷,可增强带负电荷细胞的黏附能力[12];②多聚赖氨酸通过其氨基,与细胞表面的蛋白多糖结合,促进细胞黏附[13];③在 DBM 孔隙中形成更小的微孔网状结构,增加了表面积,并利于选择一定大小的细胞黏附。扫描电镜观察见 PLL-DBM 具有与单纯 DBM 同样的天然三维网孔结构,孔径大小为(472.51 ± 7.02) μm,孔隙率高达 78.15%。PLL-DBM 材料表面及网孔内壁可见乳白色 PLL 涂层覆盖,且 PLL 在空隙中形成蜘蛛网样的网状结构,这不仅有利种子细胞的黏附,而且有利于新骨的长入,为种子细胞的黏附提供了物理空间结构,符合较理想的骨组织工程支架材料的参数[14,15]。氨基酸成分分析结果显示 PLL-DBM 较单纯的 DBM 有更明显的赖氨酸波峰,说明 PLL 与 DBM 有着较好的复合。

Muschler 等[10]以空白 DBM、松质骨碎片或二者的混合物作为 SCR 技术的富集基质材料,报道过对骨髓有核细胞的富集倍数为 2.3 倍,由于这些材料均未经过表面修饰剂的修饰,其对骨髓细胞的富集效果有待进一步提高。本研究的结果显示,经过 PLL 修饰的山羊 DBM 对骨髓干细胞的富集倍数是 5.68 倍,明显优于空白 DBM 的 2.23 倍。在山羊横突间融合模型中,PLL-DBM 材料通过 SCR 技术术中快速富集骨髓细胞构建的骨修复材料可达到与自体髂骨相当的成骨效果。由此可见,为了提高 DBM 对骨髓干细胞等有效成分的富集效果以及其成骨效果,用 PLL 加以修饰的效果是非常明显的。

总之,PLL-DBM 材料不仅有着黏附种子细胞的理想物理空间结构以及良好的黏附效果,而且容易保存,运输方便,可随取随用,通过 SCR 技术能够安全、快速、低成本地构建组织工程骨,有较广阔的临床应用前景。

参考文献：

[1] Lee K, Goodman S B. Cell therapy for secondary osteonecrosis of the femoral condyles using the Cellect DBM System: a preliminary report [J]. J Arthroplasty, 2009, 24(1): 43 - 48.

[2] Jacobsen K, Szczepanowski K, Al-Zube L A, *et al*. The role of intraoperative bone marrow aspirate stem cell concentration as a bone grafting technique[J]. Tech Foot Ankle Surg, 2008, 7(2): 84 - 89.

[3] Brodke D, Pedrozo H A, Kapur T A, *et al*. Bone grafts prepared with selective cell retention technology heal canine segmental defects as effectively as autograft[J]. J Orthop Res, 2006, 24(5): 857 - 866.

[4] Block J E. The role and effectiveness of bone marrow in osseous regeneration[J]. Med Hypotheses, 2005, 65(4): 740 - 747.

[5] Kitchel S H, Wang M Y, Lauryssen C L. Techniques for aspirating bone marrow for use in spinal surgery[J]. Neurosurgery, 2005, 57(4 Suppl): 286 - 289.

[6] 刘曦明, 许建中, 陈庄洪, 等. PLL-DBM 支架材料富集骨髓有核细胞的效果评价[J]. 华南国防医学杂志, 2008, 22(2): 12 - 14.

[7] Maddox E, Zhan M, Mundy G R, *et al*. Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application [J]. Tissue Eng , 2000, 6 (4): 441 - 448.

[8] 刘曦明,许建中,陈庄洪,等. 新型骨髓干细胞富集材料的制备及其表征研究[J]. 华南国防医学杂志, 2008, 22(2): 9 - 11.

[9] Hernigou P, Poignard A, Manicom O, *et al*. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone[J]. J Bone Joint Surg Br, 2005, 87(7): 896 - 902.

[10] Muschler G F, Matsukura Y, Nitto H , *et al* . Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion[J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, (432): 242 - 251.

[11] 李 强,何清义,许建中,等. 羊脱钙骨基质作为骨组织工程支架材料的性能评估[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 9 - 11.

[12] Wittmer C R, Phelps J A, Saltzman W M, *et al*. Fibronectin terminated multilayer films: protein adsorption and cell attachment studies [J]. Biomaterials, 2007, 28(5): 851 - 860.

[13] Qian L, Saltzman W M. Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification[J] . Biomaterials, 2004, 25(7 - 8) : 1331 - 1337.

[14] Xu H H, Simon C G Jr. Self hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering[J]. J Orthop Res, 2004, 22 (3): 535 - 543.

[15] 杨为中, 周大利, 尹光福, 等. 新型多孔磷灰石/硅灰石生物活性玻璃陶瓷材料的研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2004, 21(6): 913 - 916.

（编辑 吴培红）

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)21-2040-01

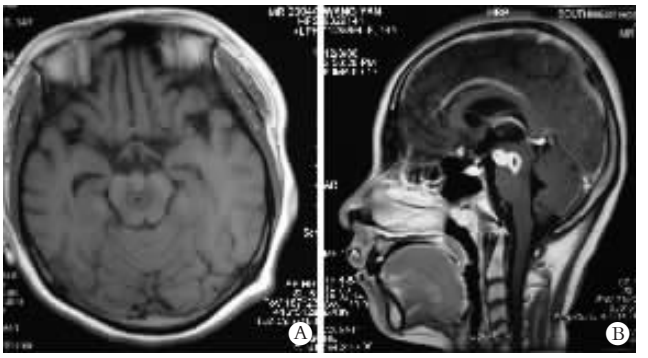
脑结核瘤致不宁腿综合征1例

马 海,陈康宁 （第三军医大学西南医院神经内科,重庆 400038）

脑结核瘤是1种少见的颅内占位性病变,临床表现缺乏特异性。不宁腿综合征(restless legs syndrome,RLS)是1种常见的神经系统感觉运动障碍性疾病,大多数RLS为原发性,继发性者较为少见。现报告1例脑结核瘤致不宁腿综合征患者的临床、MRI表现及治疗。

1 临床资料

患者,女性,14岁。因坐卧不宁4 d于2008年12月3日入院。患者于4 d前出现坐卧不宁,表现为不能久坐或安睡,每隔不到1 min即需来回走动,自诉双下肢有说不出的不适感,安静状态尤其如此,需来回走动方可缓解,夜间症状更为明显。由于腿部不适,睡眠差,躺下后反复蹬被子,夜间睡眠时间最多不超过2 h。无头痛发热,无肢体活动无力。患者生活质量严重下降,已不能继续上学。患者于2008年8月曾因反复发热、头痛、呕吐在我院诊断为结核性脑膜炎,住院治疗23 d后症状完全消失后出院,出院时继续抗结核治疗,未曾间断。本次入院后查体生命体征及神经系统未见明显阳性体征。辅助检查:头颅MRI(图1),胸片:双肺纹理清楚,胸部摄片未见异常。血常规、肝肾功脑脊液化验均无异常。结合患者曾有结核性脑膜炎病史,入院后初步考虑本患者为颅内结核感染,未能很好解释坐卧不宁表现。主要给予抗结核治疗,抗结核治疗方案如前。经过10余天治疗,患者主诉症状未见好转,于12月19日经过科室讨论,考虑本患者为中脑结核瘤致RLS,当日即给予多巴胺受体激动剂吡贝地尔缓释片50 mg/d,并继续抗结核治疗。患者的坐卧不宁症状很快缓解,1周后已基本可以安睡,每晚可以安睡7 h。半月后症状完全消失。1个月后随访,患者已经正常上学,嘱继续抗结核治疗。目前仍在随访中。



A:中脑内结节状、小囊状等T_1信号;B:增强扫描表现 病灶明显环状强化,提示中脑结核瘤

图1 脑结核瘤致不宁腿综合征的MRI表现

作者简介:马 海,男,陕西省绥德县人,主治医师,主要从事脑血管病介入治疗方面的研究,现在中铁二十局中心医院神经内科。E-mail:mahai18578@126.com

通信作者:陈康宁,E-mail:ckn_640827@126.com

收稿日期:2009-03-04;修回日期:2009-03-25

（下转2056页）