论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1062-05

大鼠骨髓间充质干细胞与脱细胞脊髓支架体外共培养

王开见,任先军,蒋 涛,周长立,阴 洪 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 评价脱细胞脊髓支架在大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)体外培养中的作用,探索最佳接种浓度。**方法** 分离、培养及鉴定SD大鼠BMSCs,诱导BMSCs向神经元样细胞分化。制备脱细胞脊髓支架,将第3代BMSCs同脱细胞脊髓支架共培养,MTT法检测细胞增殖活性,比较与普通培养的差异;取第3代BMSCs以不同浓度[(0.5、1、2、3、4)×10^6/mL]接种于支架(脊髓支架修整0.5 cm小段),检测细胞在支架上的粘附率及上架细胞数,建立接种浓度与细胞粘附率、上架细胞数的关系回归方程;扫描电镜观察脱细胞脊髓支架形态以及细胞与支架的粘附情况。**结果** 成功实现BMSCs的分离及培养,BMSCs流式鉴定CD29、CD90阳性表达,向神经元诱导胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巢蛋白(Nestin)呈阳性表达;与普通培养相比,BMSCs在支架上细胞增殖活力显著提高($P<0.05$);细胞与支架的粘附率在接种浓度为2×10^6/mL最高,达到(79.6±2.7)%,单位体积上架细胞数达到(1.364±0.047)×10^6/cm^3;扫描电镜观察支架空间结构良好,细胞与支架粘附良好,共培养第3天较第1天细胞数量明显增加。**结论** 脱细胞脊髓支架具有多通道的空间结构,适合BMSCs粘附、存活、增殖,该支架是良好的天然脊髓组织工程材料。当粘附率及细胞上架数基本达到最大时的最佳接种浓度为2×10^6/mL。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;脱细胞脊髓支架;细胞共培养;组织工程
[中图法分类号] R318.08; R322.71; R331.22 [文献标志码] A

Co-culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells on acellular scaffold of spinal cord *in vitro*

Wang Kaijian, Ren Xianjun, Jiang Tao, Zhou Changli, Yin Hong (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of the acellular scaffold of spinal cord on the rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) cultured *in vitro* and explore the best inoculation concentration. **Methods** SD rat BMSCs were separated, cultivated and identified. The obtained BMSCs were induced to differentiate into neurons. The acellular scaffold of spinal cord was prepared. The BMSCs at the third passage were co-cultured with the acellular scaffold of spinal cord. MTT assay was applied to assay the cell proliferation on the BMSCs cultured alone or on the scaffold. The BMSCs at the third passage at different concentrations (0.5, 1, 2, 3, or 4×10^6/mL) were seeded on the scaffolds (with spinal cord scaffolds trimmed as 0.5 cm small section). and then the cell adhesion rates and cell numbers on scaffolds were detected to establish a regression equation of inoculation concentration with cell adherence rate and cell numbers on scaffold. Scanning electron microscopy was also used to observe the shape of acellular scaffold of spinal cord and the adhesion between the cells and scaffold. **Results** BMSCs were successfully isolated and cultivated, with positive expression of CD29 and CD90 detected by flow cytometry. After induction, the cells were positive to glial fibers acid protein (GFAP) and Nestin. Compared with the ordinary plates, BMSCs' proliferation activity on scaffolds was obviously strengthened ($P<0.05$). Cells adherence rate on scaffolds reached the highest level of (79.6±2.7)% when the cells were seeded at a density of 2×10^6/mL on the bracket. The maximum cell number per unit volume scaffold was(1.364±0.047)×10^6/cm^3. The adhesion of the cells on the scaffolds was very well under a scanning electron microscope. The number of co-cultivation cells was increased significantly in the third day than in the first. **Conclusion** The scaffold with multi-channel spatial structure is suitable for BMSCs

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271362);国家自然科学基金青年项目(31000438);全军医学科技"十二五"科研重点项目(BWS11C040)
[通信作者] 任先军,E-mail:ren_xianjun@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1706.007.html(2013-01-31)

adhesion, growth, and proliferation. So it is a good natural engineering material for spinal cord tissue. The best inoculation concentration is 2×10^6/mL, with best adherence rate and largest cell numbers.

[**Key words**] bone marrow mesenchymal stem cells; acellular scaffold of spinal cord; cell co-culture; tissue engineering

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271362), the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(31000438) and the Key Project of "Twelfth Five-year Plan" for Medical Science and Technology of PLA (BWS11C040). Corresponding author: Ren Xianjun, E-mail: ren_xianjun@sina.com

脊髓损伤是一种严重威胁人类健康的疾病,由于脊髓损伤后极难再生,因此较难治愈。脊髓损伤修复一直是医学界的研究热点。目前治疗脊髓损伤的方法主要集中在细胞移植和组织工程。我们最早报道了脱细胞脊髓支架的研究工作[1-2]。构建脊髓组织工程核心包括细胞组织工程支架与种子细胞。脱细胞脊髓支架是天然的生物材料,它具有多通道的空间结构[1]、免疫原性极低[2]、生物安全性良好[3]等优点。目前运用较多的组织工程重要的种子细胞是骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs),特定条件下它能向多种细胞分化,如成纤维细胞、软骨、脂肪及神经元细胞等[4],适合于再生医学,对中枢系统的再生也具有重要的作用;此外因其取材简单,来源较广泛,易于体外扩增等特点运用广泛[5]。本研究以BMSCs为种子细胞,与脱细胞脊髓支架进行共培养,观察其在支架上的粘附、生长及增殖情况,以评价该支架材料应用于脊髓组织工程的可行性。

1 材料与方法

1.1 BMSCs制备

取3周龄SD大鼠2只(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),雌雄不限,体质量60~80 g。经脱颈处死后75%酒精浸泡消毒5 min,无菌条件下分离双侧胫腓骨。用含10%胎牛血清(HyClone,美国)+DMEM/F12培养基(HyClone,美国)冲洗骨髓腔,冲洗液1 000 r/min离心5 min,去脂肪和上清液后接种于培养瓶中培养、传代。

1.2 向神经元样细胞诱导

取第3代BMSCs 1×10^4/cm^{2}接种于6孔板,培养24 h后加入预诱导剂DMEM/F12+10 ng/mL bFGF(北京博奥森公司)预诱导24 h,再加入低糖DMEM/F12+0.2 mmol/L BHA(北京博奥森公司)诱导5 h后进行免疫荧光鉴定,鉴定的抗体为胶质纤维酸性蛋白(GFAP,北京博奥森公司)、巢蛋白(Nestin,北京博奥森公司)。

1.3 脱细胞脊髓支架的制备

取12周龄SD大鼠20只(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),雌雄不限,体质量250~300 g,取胸腰段脊髓。参照Guo等[6]的脱细胞方法制备支架。取4个小段置于EP管中密封,-20 ℃冰箱保存备用。剩下的支架材料冷冻干燥后置于EP管中密封,^{60}Co辐照消毒,12 kGy照射4 h,消毒后置于-20 ℃冰箱保存备用。

1.4 BMSCs与脱细胞脊髓支架共培养

1.4.1 用于细胞增殖活性检测的共培养 取第3代BMSCs,调整细胞数为1×10^5/mL,支架材料消毒后修整为0.2 cm小段,共20段。实验组(共培养组,$n=5$):每段接种10 μL置于4个96孔板(1段/孔,5孔/板),并设对照组(普通培养组,$n=5$):直接接种于4个96孔板内(10 μL/孔,5孔/板),分别每孔再加入培养基190 μL,每孔总量为200 μL。置于CO_2孵箱孵育(BB5060uv,德国),2~3 d换液1次,分别培养2、4、6、8 d后检测细胞增殖活性。

1.4.2 用于测粘附率及细胞上架数的共培养 取第3代BMSCs,调整细胞数为(0.5、1、2、3、4)$\times 10^6$/mL,支架材料消毒后修整为0.5 cm小段(体积约0.035 cm^3),共20段,置于5个96孔板内,分5组,每组4段,每孔1段,按5个浓度分别滴加至支架断面,以细胞悬液无明显溢出为主(每段接种量约30 μL),加培养基170 μL作为实验组。按5个浓度分别直接接种于96孔板内作为标准对照组。置于CO_2孵箱孵育24 h后分别行MTT检测。

1.4.3 用于电镜的共培养 取第3代BMSCs,调整为2×10^6/mL,支架材料消毒后修整为1.5 cm小段,共4段,将细胞接种于支架材料,置于6孔板上加培养基进行培养,隔日换液,培养1、3 d后分别取出用电镜液(3%戊二醛)固定。

1.5 观察指标

倒置显微镜观察下BMSCs形态及生长情况。取第3代BMSCs细胞于流式细胞仪(Mofio XDP,美国)上检测,检测抗体为CD34、CD29、CD45、CD90,并设同型对照,CD34、CD45为同一个同型对照。检测BMSCs向神经元诱导后神经元特异性标志物呈阳性表达的情况。MTT比色法检测细胞的增殖活力[7],测定波长为490 nm处光密度值[D(490)],并描绘细胞增殖曲线。MTT法检测计算粘附率及细胞上架数。通过标准组与实验组D(490)值对应的接种浓度值换算细胞数量。细胞粘附率=(1-散落细胞数/接种细胞数)×100%;细胞上架数=细胞接种数×细胞粘附率;单位体积的支架材料粘附细胞最大数量=粘附细胞数量/支架材料体积,根据计算结果描绘细胞粘附率及细胞上架数的曲线图。取制备的冷冻支架,解冻后电镜液固定,取出后和电镜液固定的共培养的细胞支架复合物用双蒸水浸泡10 min,再双蒸水清洗2遍,经冷冻干燥和喷金处理后扫描电镜(Hitachi S-3400,日本)下观察支架形态、细胞数量及粘附情况。

1.6 统计学方法

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,重复测试数据行重复测量方差分析,双样本均值比较行t检验。细胞粘附率、上架细胞数的数据采用多种曲线回归分析,在结果中选取

最优回归方程，$R^2 > 0.85$，$P < 0.05$ 时认为该回归方程回归效果具有意义。

2 结果

2.1 SD大鼠BMSCs的形态学观察

培养24 h有少许细胞开始贴壁，折光性增强；3 d后细胞开始发生变态变化，呈多边形或梭形，呈群落样生长；培养至7～10 d，细胞基本能长满瓶底。第2代BMSCs融合约90%的细胞形态呈漩涡状排列，为长梭形或多角形（图1）。

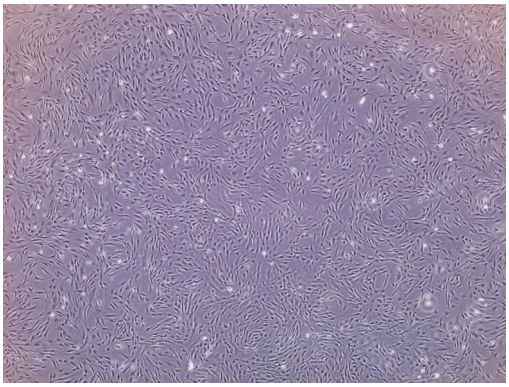


图1　倒置显微镜观察第2代BMSCs形态变化　（×40）

2.2 BMSCs的鉴定

检测BMSCs所表达的特异性抗原，CD29、CD90阳性率分别为99.8%、99.1%，CD34、CD45阴性率分别为0.4%、0.6%，同型对照均为阴性（图2）。

2.3 向神经元样细胞诱导

诱导结束后免疫荧光鉴定神经元特异性标志物GFAP、Nestin均呈阳性表达（图3）。

2.4 细胞增殖活性检测

BMSCs与脱细胞支架材料共培养时间分别为2、4、6、8 d时，共培养组的细胞增殖活性比普通培养的细胞增殖活性显著性增加（$P < 0.05$，表1）。

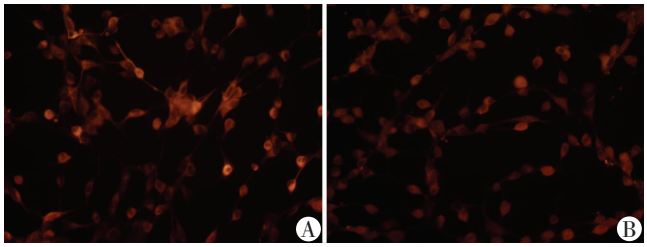


图3　免疫荧光鉴定神经元特异性标志物GFAP（A）、Nestin（B）的表达　（×400）

表1　培养不同时间BMSCs的增殖活性变化（$n = 5$，$\bar{x} \pm s$）

组别	2 d	4 d	6 d	8 d
共培养组	0.151 ± 0.012[a]	0.252 ± 0.026[a]	0.486 ± 0.032[a]	0.496 ± 0.035[a]
普通培养组	0.099 ± 0.017	0.191 ± 0.016	0.382 ± 0.025	0.437 ± 0.034

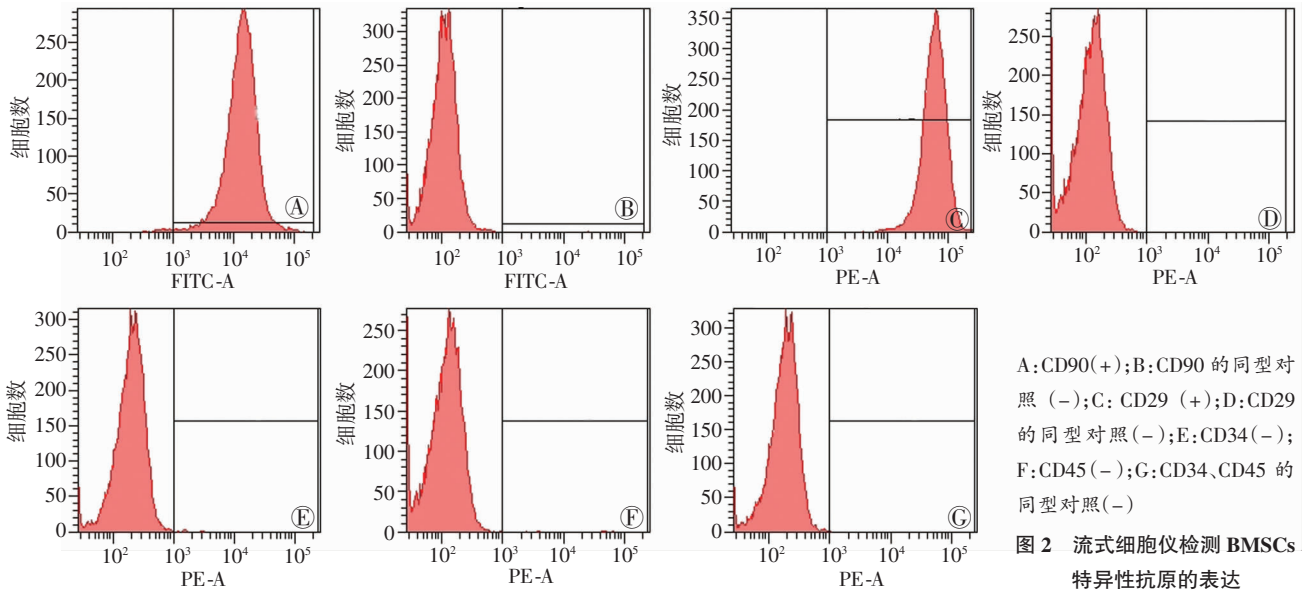
a：$P < 0.05$，与普通培养组比较

2.5 细胞粘附率检测

随着接种浓度的增加，粘附率也增加，接种浓度为2×10^6/mL时，粘附率最高，之后随着接种浓度增加，粘附率下降［接种浓度为（0.5、1、2、3、4）$\times 10^6$/mL时的细胞粘附率分别为（39.1 ± 12.3）%、（59.2 ± 6.4）%、（79.6 ± 2.7）%、（54.0 ± 4.0）%、（40.9 ± 3.9）%］。建立接种浓度与细胞粘附率的关系回归方程 $y = 1.138x^3 - 0.464x^2 + 0.053x - 0.089$（$R^2 = 0.899$，$P < 0.05$），绘制粘附率回归曲线（图4）。

2.6 BMSCs上架数检测

不同接种浓度下细胞的上架数随着接种浓度的增加而增加（表2）。当接种浓度为2×10^6/mL时，细胞上架数基本达到最大值，单位体积上架细胞数在此浓度时也基本达到最大值，再增加接种浓度，细胞上架数趋于平衡，基本不再增加。建立接种浓度与上架细胞数的关系回归方程 $y = 0.23\ln(x) + 0.022$（$R^2 = 0.901$，$P < 0.05$），绘制上架细胞数回归曲线（图5）。



A：CD90（+）；B：CD90的同型对照（−）；C：CD29（+）；D：CD29的同型对照（−）；E：CD34（−）；F：CD45（−）；G：CD34、CD45的同型对照（−）

图2　流式细胞仪检测BMSCs特异性抗原的表达

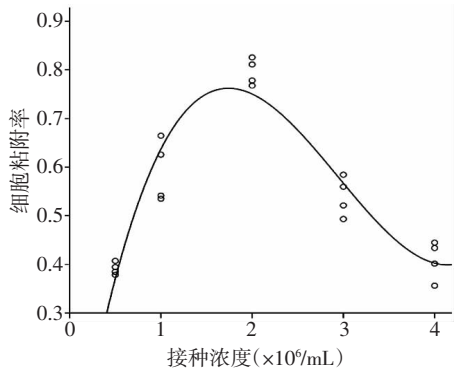


图4 BMSCs在脱细胞脊髓支架材料上的粘附率回归曲线

表2 不同接种浓度下BMSCs上架数($n=4, \bar{x} \pm s$)

接种浓度 (×10⁶/mL)	上架细胞数 (×10⁴)	单位体积上架细胞数 (×10⁶/cm³)
0.5	0.587 ± 0.019	0.168 ± 0.005
1	1.777 ± 0.192	0.507 ± 0.054
2	4.774 ± 0.164	1.364 ± 0.047
3	4.856 ± 0.364	1.387 ± 0.104
4	4.909 ± 0.477	1.402 ± 0.136

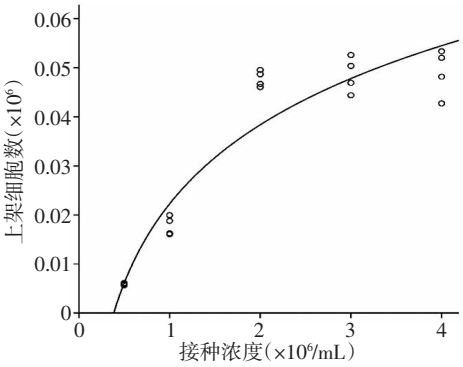


图5 BMSCs上架数回归曲线

2.7 扫描电镜观察脱细胞脊髓支架形态以及细胞在支架上的粘附情况

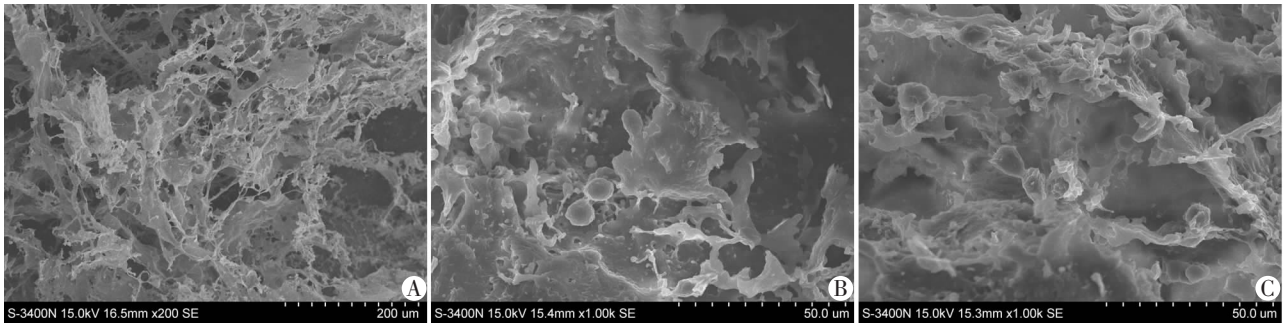
扫描电镜下该支架细胞成分大部分去掉,可见细胞脱落后多通道孔隙结构保存较好,各通道之间相互交通形成良好空间网状结构(图6A)。共培养1 d,可见细胞在多孔脱细胞支架上粘附良好,细胞以圆形为主(图6B);共培养3 d,细胞铺开,形态以多角梭形为主,细胞数量增多(图6C)。

3 讨论

BMSCs来源于骨髓中处于未完全分化的原始细胞,这些细胞在特定环境的诱导下,可分化为所在组织的表型细胞(如神经元细胞[4])。相对于其他干细胞(如胚胎脊髓神经元细胞、神经干细胞等),BMSCs取材简便,增殖活性强,易于体外扩张。由于来源于其自体,不受道德伦理因素的制约[8],目前已成为最重要和理想的组织工程种子细胞[9-10]。本实验中BMSCs向神经元样细胞诱导能表达神经元特异性标志物,故选择它作为种子细胞。

脊髓组织工程通过支架与种子细胞相复合,能够为轴突生长提供适合的微环境,有良好的多通道空间结构适于轴突生长,能够促进种子细胞的存活、生长、分化,因此近年来成为研究的热点。本实验组成功构建脱细胞脊髓支架。经脱细胞处理后的支架材料是一种天然的生物材料,较好地保存了抗原性低的糖蛋白、胶原、蛋白多糖等细胞外基质,并且多种调节细胞的生物活性因子也得以保留。本实验中支架与细胞共培养时的细胞增殖活力较普通培养显著提高,可能与支架材料保留了生物活性因子相关[11]。有研究表明,对SD大鼠脑组织经脱细胞处理后形成的细胞外基质支架能促进内源性血管生成因子(血管内皮生长因子和成纤维生长因子)等活性因子的形成,对血管生长有促进作用[12-14]。脱细胞脊髓支架是天然的细胞外基质,能形成良好的多通道空间网状结构,并且免疫原性大幅度下降。郭树章等[2]的研究表明,去除细胞后的细胞外基质在同种异体间免疫原性极低。

本实验运用细胞与支架共培养,共培养2~6 d细胞共培养组较普通培养组增殖明显增加,培养6 d后共



A:脱细胞脊髓支架;B:共培养1 d;C:共培养3 d

图6 扫描电镜观察脱细胞支架形态以及细胞在支架上的粘附情况

培养组与普通培养组增殖速度都减慢，但共培养组增殖活性降低更为明显。分析其原因，可能是培养到第6天时，共培养组的细胞因其生长过快，整个支架材料完全被细胞覆盖，细胞呈堆积性生长，由于缺少了支架材料和细胞之间的相互作用，导致共培养的细胞增殖活性减慢更为明显。对细胞接种浓度与细胞粘附率的回归分析显示，二者呈3次函数关系。当细胞接种浓度较低时上架细胞率随接种浓度上升，但细胞粘附率存在极值，当接种浓度过高时细胞粘附反而减小。在接种浓度为 2×10^6/mL 左右时粘附率最大。对细胞接种浓度与上架细胞数的回归分析显示，二者呈对数函数关系，在接种浓度 $>2\times10^6$/mL 时，函数值增长减慢，提示 2×10^6/mL 基本为最佳接种浓度，单位体积上架细胞数在此浓度时也基本达到最大值 $(1.364\pm0.047)\times10^6/cm^3$，接种浓度过大易造成细胞浪费，不利于细胞增殖，此外还易导致BMSCs功能老化，体外培养时间延长。Ishaug-Riley 等[15]的实验证实，在低浓度细胞接种更有利于细胞增殖。Shalumon 等[16]研究得出最大细胞粘附率在90%以上，而本实验得到最大粘附率仅为(79.6±2.7)%。分析原因可能是本实验支架脊髓组织经脱细胞处理后支架形态结构不易维持，特别是在吸水后支架容易变形，此外脱细胞不可能完全，导致细胞碎片残留也是不利于细胞粘附的原因。本实验发现要把细胞彻底去除对支架结构的损伤过大，这就要求尽可能把细胞去除的同时要完好地保留支架的形态，这是脑脊髓等含脂、水分多的组织脱细胞后普遍存在的问题，有待进一步研究。

综上所述，脱细胞脊髓支架具有多通道的空间结构，适合BMSCs粘附、存活、增殖，该支架是良好的天然脊髓组织工程材料，对脊髓组织工程有着较好的运用前景。

参考文献：

[1] 郭树章，任先军，蒋涛，等. 脱细胞脊髓天然支架的制备及形态学观察[J]. 中国矫形外科杂志，2007，15(3)：226－228.

[2] 郭树章，任先军，蒋涛，等. 大鼠脱细胞异体脊髓支架的免疫原性研究[J]. 中国矫形外科杂志，2007，15(16)：444－446.

[3] 郭树章，任先军，蒋涛. 脱细胞脊髓支架生物安全性的体外研究[J]. 中华创伤杂志，2010，26(10)：930－933.

[4] Ni W F, Yin L H, Lu J, *et al*. *In vitro* neural differentiation of bone marrow stromal cells induced by cocultured olfactory ensheathing cells [J]. Neurosci Lett, 2010, 475(2): 99－103.

[5] Derubeis A R, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances[J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(1): 160－165.

[6] Guo S Z, Ren X J, Wu B, *et al*. Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility[J]. Spinal Cord, 2010, 48(7): 516－581.

[7] Li Y, Huang W, Huang S, *et al*. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(1): 85－90.

[8] Bareyre F M. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury [J]. J Neurol Sci, 2008, 265(1/2): 63－72.

[9] Lee H S, Huang G T, Chiang H, *et al*. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis[J]. Stem Cells, 2003, 21(2): 190－199.

[10] Abukawa H, Terai H, Hannouche D, *et al*. Formation of a mandibular condyle *in vitro* by tissue engineering[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2003, 61(1): 94－100.

[11] Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M, *et al*. Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors [J]. Biomaterials, 2004, 25(18): 4513－4520.

[12] Ribatti D, Conconi M T, Nico B, *et al*. Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane[J]. Brain Res, 2003, 989(1): 9－15.

[13] Christenson E M, Anseth K S, van-den-Beucken J J, *et al*. Nanobiomaterial applications in orthopedics[J]. J Orthop Res, 2007, 25(1): 11－22.

[14] Balasundaram G, Sirivisoot S, Zhang L, *et al*. Nanoengineering for bone tissue engineering[M]// Khademhosseini A, Borenstein J, Toner M, *et al*. Micro and nanoengineering of the cell microenvironment: technologies and applications. Norwood: Artech House, 2008: 431－460.

[15] Ishaug-Riley S L, Crane-Kruger G M, Yaszemski M J, *et al*. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers[J]. Biomaterials, 1998, 19(15): 1405－1412.

[16] Shalumon K T, Binulal N S, Selvamurugan N, *et al*. Electrospinning of carboxymethyl chitin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(4): 863－869.

（**收稿**：2012-12-03；**修回**：2013-01-09）

（编辑　龙　亮）