维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0478-04

海藻酸钠凝胶对骨髓间充质干细胞生物学效应的初步研究

王 嫣[1],陈小菊[1],王 兰[2],左国伟[1],寇小琴[1],谭启华[1],周 兰[1],陈文直[1]

(1. 重庆医科大学生物医学工程系/医学超声工程研究所,重庆 400016;2. 英国剑桥大学生物工程学研究所,英国)

【摘 要】目的:初步探讨海藻酸钠凝胶对骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,bMSCs)的生物学效应。方法:将在海藻酸钠凝胶上培养的细胞设为实验组,在塑料培养板上的细胞设为对照组。以 MTT 法检测细胞在两种材料上的增殖;采用甲苯胺蓝染色观察细胞在凝胶上的生长形态;RT-PCR 检测 bMSCs 生长 6 天后的成骨相关基因。结果:两组的 bMSCs 均能迅速贴附、铺展进入增殖期;在实验组,细胞成集落样生长较明显,且形态发生改变,伸出较多的伪足,细胞间接触更为紧密;培养至第 6 天,进行成骨相关基因检测,发现对照组和实验组均有 I 型胶原和碱性磷酸酶表达,但它们在实验组的表达量高于对照组;同时,实验组骨连接蛋白为阳性表达,而对照组为阴性。结论:bMSCs 可能具有自发向成骨细胞分化的趋势;海藻酸钠凝胶具有促进干细胞向成骨细胞分化的生物学活性。提示海藻酸钠凝胶可能是比较适合的骨组织工程支架材料。

【关键词】海藻酸;骨髓间充质干细胞;增殖分化

【中国图书分类法分类号】R318 【文献标识码】A 【收稿期】2006-03-17

The effects of alginate gels on bone mesenchymal stem cells

WANG Yan,et al

(Department of Biomedical Engineering,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To examine the effects of alginate on bone mesenchymal stem cells (bMSCs).*Methods:* bMSCs were cultured on the alginate gels (experimental group) and tissue culture plastics (control group); the morphous of bMSCs was observed by microscope after toluidine blue staining; the growth curves were analyzed by MTT; and the expressions of osteoblast related genes (alkaline phosphatase, collagen I and osteonectin) were detected by RT-PCR when cultured for 6 days. *Results:* There were no difference in the cell proliferation between the experimental group and control group. The morphous of bMSCs in the experimental group was induced to be similar to that of osteoblasts and form colony proliferation obviously. The alkaline phosphatase and collagen I genes were positive in the two groups, but their expressions in the experimental group were higher; at the same time, osteonectin gene was positive in the experimental group and negative in the control group. *Conclusion:* bMSCs may differentiate into osteoblasts automatically when cultured for longer time and that alginate gels could promote this differentiation and may be suitable biomaterial of scaffold in bone tissue engineering.

【Key words】 Alginate;Bone Mesenchymal stem cell;Proliferation & Differentiation.

在骨组织工程中,选择理想的生物材料作为支架是关键的一步。目前,自然演化的多糖产物如海藻酸已开始应用于组织工程中。海藻酸是从褐藻中提取的一种酸性多糖,由古洛糖醛酸与甘露糖醛酸组成的嵌段聚合物,可与二价金属离子络合形成水凝胶。其生物相容性良好和凝胶过程温和等特点,使之在组织工程及医药等领域得到了广泛的应用[1]。迄今,尚未见到有关海藻酸对骨髓间充质干细胞(bMSCs)的生物学作用的报道。本实验通过检测在不使用成骨诱导剂的情况下,bMSCs 在海藻酸钠凝胶上的生长状况以及基因表达的变化,初步探讨海藻酸钠凝胶对 bMSCs 的生物学作用。

1 材料与方法:

1.1 海藻酸钠水凝胶的制备

用 0.1% PBS 配制 6%的海藻酸钠水溶液,搅拌均匀,高温高压(120℃,0.15MKp)下灭菌后在 4℃存放备用;种入细胞前用 α-MEM 稀释,终浓度为 3%。吸取 3%的海藻酸钠水溶液 700μl 滴入 12 孔塑料培养板的孔中,在孔内形成约 1mm 厚度的圆盘,再滴入 0.1%的 $CaCl_2$ 2ml 于圆盘上,静置

作者介绍:王 嫣(1978-),女,博士生,
主要研究方向:干细胞和组织工程。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30470885),
国家教育部创新团队发展计划(教技函[2005]33 号)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

40min。待凝胶形成后弃去 $CaCl_2$,用 2ml α-MEM 浸泡,放入 4℃冰箱,每 24h 更换 α-MEM,72h 后用于细胞培养。

1.2 主要试剂及配制

250ml 塑料培养瓶,12 孔塑料培养板,购自美国 Corning 公司。试剂:海藻酸钠购自挪威 Novamatrix 公司;α-MEM 和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;RNA 试剂盒、随机引物(Olig dT)及逆转录酶(M-MLV)购自北京鼎国生物技术有限责任公司;$CaCl_2$、甲苯胺蓝由国营重庆无机化学试剂厂提供。MTT 为 Gibco 公司产品。(冲洗液:α-MEM,10%胎牛血清,10%青霉素/链霉素;培养液:α-MEM,10%胎牛血清,1%青霉素/链霉素。所有引物由上海生工合成,引物序列分别如下:)

I 型胶原

sense:5′-TAAAGGGTCATCGTGGCTTC-3′

antisense:5′-ACTCTCCGCTCTTCCAGTCA-3′

碱性磷酸酶

sense:5′-CTCCGGATCCTGACAAAGAA-3′

antisense:5′-ACGTGGGGGATGTAGTTCTG-3′

骨连接蛋白

sense:5′-AAACATGGCAAGGTGTGTGA-3′

antisense:5′-AGGTGACCAGGACGTTTTTG-3′

GAPDH

sense:5′-CGATCCCGCTAACATCAAAT-3′

antisense:5′-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3′

1.3 bMSCs 的分离、纯化及扩增

将 1 月龄 Wistar 大鼠(80g,购自重庆医科大学动物中心)断颈处死,无菌取出大鼠的四肢骨,用冲洗液将骨髓冲入离心管,1000r/min 离心 5min,用培养液重悬后,以 5×10^6 的细胞数接种入 250ml 塑料培养瓶中,在 37℃、5%CO_2、饱和湿度条件下培养。24h 后首次更换培养液,以后每 2~3 天换液。6~7 天细胞长满瓶底 90%,用含 10mmol/L EDTA 的 0.1% 的胰蛋白酶消化,重悬浮细胞并以 5×10^5 的细胞数接种于培养瓶中传代,2~3 天更换培养液。传至第 2 代备用。

1.4 MTT 检测 bMSCs 在海藻酸钠凝胶上的增殖

将 2 或 3 代 bMSCs 以 1×10^5 细胞/孔接种于已制备的海藻酸钠凝胶上(实验组)和塑料培养板上(对照组),分别在培养的 0、3、6、9 和 12 天进行 MTT 检测。首先检测 10^2、10^3、10^4、5×10^4、10^5、5×10^5、8×10^5 的光吸收值,并据此作出标准曲线;以后所测量的吸光度值与标准曲线相比较得出所测细胞数,并做出 bMSCs 在两种培养条件下的生长曲线。并于 3、6 和 12 天取出细胞用 4% 多聚甲醛固定 4h,PBS 冲洗,1% 的甲苯胺蓝染色 5min,观察 bMSCs 的生长形态。

1.5 RT-PCR

用 RNA 试剂盒,提取培养 6 天细胞的总 RNA,以 RNA 为模板加入随机引物及逆转录酶合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行成骨相关基因(I 型胶原、碱性磷酸酶和骨连接蛋白)的 PCR 扩增,反应条件为:预变性 94℃ 5min,变性 94℃ 30s,退火 58℃ 20s,延伸 72℃ 20s,不同引物的循环次数不同(I 型胶原 25 次;碱性磷酸酶 30 次;骨连接蛋白 20 次;GAPDH 25 次),最后延伸 10min,得到反应终产物。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,并采用 Quantity One 软件包对电泳条带进行半定量分析。

1.6 统计学分析:

MTT 数据采用 SPSS12.0 统计软件包进行 t 检验(n=3,t=-0.4575),$P\leq0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 bMSCs 的原代培养和扩增

骨髓有核细胞接种 48 h 后开始出现细胞附壁铺伸,呈短梭形或三角形,培养液中有大量密集的悬浮细胞;72 h 附壁铺伸细胞数量增多,呈分散独立的多细胞聚集性分布(图 1)。第 4、5 天开始形成典型的 bMSCs 簇状增生灶,且数量逐渐增多,细胞形态发生了根本变化,呈长梭形、漩涡状紧密排列。



图 1 bMSCs 原代培养 3 天,×200

2.2 bMSCs 在实验组和对照组表面的生长状况

塑料培养板上的细胞散在分布,呈均匀一致的梭形,数日后细胞呈漩涡状排列(图 2B)。3% 的海藻酸钠与 $CaCl_2$ 耦连后形成一红色圆柱形、凝胶状物质;且呈明显集落样生长,数日后集落逐渐扩大融合,集落中央形成钙化结节(图 2A)。

MTT 检测两组细胞的增殖,P=0.6595 无差异性,实验组的细胞在接种后很快进入增殖阶段,而对照组的细胞在前 3 天的增殖并不明显,但以后增殖迅速,第 9 天时,两组细胞数量接近。显示海藻酸钠凝胶不影响细胞的贴壁,而且能使细胞很快适应微环境的改变,迅速进入增殖阶段(图 3)。

2.3 对成骨相关基因表达的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com

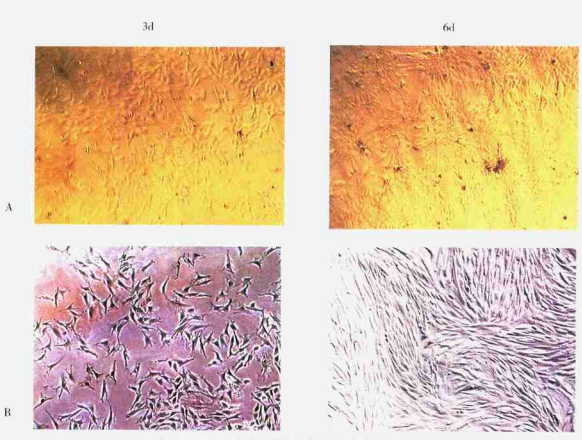


图 2 bMSCs 在海藻酸钠凝胶和塑料培养板上的生长情况
A: 海藻胶上的 bMSCs (× 100; 3d,6d)
B: 塑料板上的 bMSCs (× 100; 3d,6d)

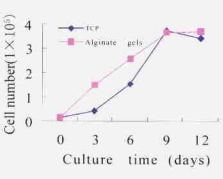
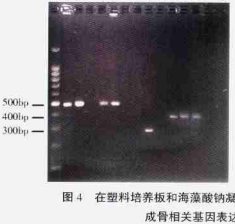


图 3 实验组和对照组细胞的生长曲线



1: Marker; 2~4: 碱性磷酸酶基因分别在对照组、实验组和原代细胞中的表达; 5~7: I 型胶原 (顺序同前); 8~10: 骨连接蛋白 (顺序同前); 11~13: GAPDH (顺序同前)。

图 4 在塑料培养板和海藻酸钠凝胶上的 bMSCs 的成骨相关基因表达

参见图 4。bMSCs 培养 6 天时,对照组和实验组均有碱性磷酸酶(2 和 3 道)和 I 型胶原(5 和 6 道)表达,但是实验组的碱性磷酸酶和 I 型胶原分别是对照组的 3.978 倍和 1.1445 倍;而骨连接蛋白则只在实验组细胞中(9 道)有表达,对照组中未见表达。

3 讨 论

组织工程学是生物医学工程领域中正在兴起的一门新学科,其核心是建立由细胞和生物材料构成的三维空间复合体,即具有生命力的活体组织,用以对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代。其研究主要包括 4 个方面:种子细胞性质的研究、生物材料的研究、构建组织和器官的方法和技术以及组织工程化组织的临床应用。其

维普资讯 http://www.cqvip.com

发展将有望从根本上解决组织和器官缺损所致的功能障碍或丧失的问题。

bMSCs由于取材方便、增殖快，且可向骨、软骨和脂肪等组织分化的多向分化潜能，在一定的诱导条件下，可分化为多种胚层细胞，为这些细胞的受损或缺如起再生和修复的作用[2]，因此成为组织工程中广泛应用的种子细胞。近年来用于诱导 bMSCs 向成骨细胞分化的诱导剂为地塞米松、β－甘油磷酸钠和 L－抗坏血酸[3]。有研究发现，常规培养的细胞无钙化结节形成，而当地塞米松、β－甘油磷酸钠等生长因子存在时就能诱导 bMSCs 向骨细胞方向转化。本实验在对照组细胞培养过程中，偶见集落生成现象，但未出现钙化结节；在检测培养 6 天的 bMSCs 的成骨相关基因时，发现其有碱性磷酸酶和 I 型胶原的表达，而在原代 bMSCs 这两种基因均为阴性。这提示 bMSCs 在传代培养过程中，在无促进成骨细胞分化的生长因子存在的条件下，自身也可能向成骨细胞分化，只是这种自发分化的效率不及诱导分化。据报道，加入诱导剂后 bMSCs 的 I 型胶原的 mRNA 从 2 天到 6 天表达有明显升高的趋势，7 天后碱性磷酸酶活性明显增高，并出现钙化结节[4-6]。

目前，越来越多的研究者开始使用海藻酸钠凝胶作为骨组织工程的支架材料。据报道，使用古洛糖醛酸含量为 70%的海藻酸钠制备的支架材料适宜于 bMSCs 的贴壁和生长[7,8]，因此本实验选择高古洛糖醛酸的海藻酸钠作为细胞基质替代物。海藻酸对 Ca^{2+} 的结合能力较强，加入 $CaCl_2$ 后，海藻酸钠与 Ca^{2+} 进行耦连，立即形成凝胶。值得注意的是，培养液中 Ca^{2+} 浓度过高不利于 bMSCs 贴壁生长，但是可通过换液来消除这一影响因素。

海藻酸钠凝胶为半透明物质，在倒置像差显微镜下观察可看到细胞倾向于集落样生长，且在培养过程中，可逐渐观察到集落中央的细胞重叠生长；在成骨诱导中，细胞聚集成集落样，重叠生长，集落中央形成钙化结节，von Kossa 染色可看到黑色、成团块的钙化物质是成骨标志之一[4]；本实验中，因为海藻酸钠凝胶是以 Ca^{2+} 为耦联剂，为避免其干扰，改用了甲苯胺蓝染色，从图 3 可见在海藻酸钠凝胶上的细胞重叠生长，呈立方形、锥形，胞核大而圆，居中，从胞浆伸出较多的丝状伪足，与周围的细胞有更多的接触（由于是从凝胶上取像，图片颜色受到了干扰）。因此，我们认为实验组的细胞在培养 6 天后细胞形态上已显现出向成骨细胞分化的趋势，而对照组细胞的形态尚无类似改变。

为进一步证实成骨分化的存在，我们检测了 3 种成骨相关基因的表达，包括碱性磷酸酶、I 型胶原和骨连接蛋白。碱性磷酸酶(ALP)[9]是成骨细胞的早期标志酶，在成骨过程中水解磷酸酯，为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸，有利于成骨，是成骨分化开始的标志；I 型胶原在成骨早期的表达增加[10-13]；骨连接蛋白[14]也是成骨细胞的表型之一，可能协同其它基质成分共同调节组织的形态发生，在成骨早期有一定作用。培养 6 天后这 3 种早期成骨相关基因在实验组都有表达，且前 2 种基因的表达量明显高于对照组，与加入成骨诱导剂后所检测的结果类似[5,6]；同时，在实验组还有骨连接蛋白表达。进一步提示海藻酸钠凝胶可能具有促进 bMSCs 向成骨细胞分化的生物学作用。

综上，从形态学观察到成骨相关基因的检测结果提示，海藻酸钠凝胶对 bMSCs 的生物学效应类似成骨诱导剂，可以促进 bMSCs 向成骨细胞分化，是骨组织工程中比较适合的支架材料。是否在用海藻酸钠凝胶做骨支架材料的同时，不使用成骨诱导剂而又能够保证 bMSCs 顺利实现成骨分化，这尚待深入研究。

参 考 文 献

[1] Wang K, He ZHM. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002;44 (5): 117-126.

[2] 吕铁伟，田 杰，朱 静，等.大鼠骨髓间充质干细胞适宜分离和培养条件的研究[J].重庆医科大学学报,2004;29(6):715-717.

[3] Jose' J. M, Alejandro E, Paulette C. Mesenchymal Stem Cells[J]. Exp Biol Med, 2001;226(6):507-520.

[4] Zhang WCH, Chen ZHX, WangHP, et al. Bone marrow stromal cells differentiate into adipocytes and osteoblasts [J]. Chin J Osteoporos, 2005;11(1):45-48.

[5] Chen DF, LI H, Zhou JH, et al. Osteogenesis characteristics of cultured rat mesenchymal stem cells under bone induction condition [J]. J Chin Integr Med, 2004;2(5):375-378.

[6] Chen HQ, Han J, Li L, et al. Osteoealcln and Type I Collagen mRNA Expression of Rat Marrow Stromal Cells under Induction Condition [J].J Wcums,2002;33(2):200-203.

[7] Wang L, Shelton RM, Cooper PR, et al. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering [J]. Biomaterials, 2003;24(20): 3475-3481.

[8] Barralet JE, Wang L, Lawson M, et al. Comparison of bone marrow

（下转第 536 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

面，粒酶 B 可以直接裂解效应性 Caspase-3 前体，使之活化。活化的效应性 Caspase-3 可以直接或间接地酶解与细胞存活所必需的中间丝蛋白、DNA 断裂因子(DFF)和核酸内切酶等一系列蛋白，从而引起靶细胞染色质 DNA 片段化，胞质浓缩，细胞骨架解体等一系列病理改变，导致细胞凋亡[8]。本研究结果显示，Caspase-3 于实验各组肾小管上皮细胞均有表达，以肾小管中的近曲小管表达较明显，而肾小球未见表达，这与 TUNEL 法显示的凋亡细胞分布一致。进一步观察，与正常对照组相比，Caspase-3 在缺血再灌注损伤后肾小管上皮细胞表达明显增强，阳性细胞数显著增加；经红花注射液治疗后，与缺血再灌注组相比较，治疗组肾小管上皮细胞 Caspase-3 不仅表达强度显著减弱，而且阳性细胞数也明显减少。上述结果提示，红花注射液具有抑制 Caspase-3 表达的作用，该作用可能通过以上机制阻止 Fas / FasL 系统、粒酶 B / 穿孔素系统的激活，从而抑制细胞凋亡的发生。

Bcl-2 (B-cell lymPhoma / leukemia-2)是研究最早的与细胞凋亡相关的基因之一，bcl-2 可通过直接调节线粒体膜的通透性，抑制促凋亡因子的释放对 Caspase-3 产生影响。线粒体内含有细胞色素 C、第 2 个线粒体源的 Caspase 激活物 (Smac / Diablo) 和核酸内切酶 G 等多种促凋亡因子。其中细胞色素 C 能促使 Apaf-1 （促凋亡蛋白酶激活因子 -1）及 Caspase-9 酶原信号复合体的形成，使 Caspase-9 活化并激活 Caspase-3 从而导致细胞凋亡，具有促凋亡作用[9]。本实验表明，与缺血再灌注组相比较，治疗组 bcl-2 表达强度明显增强，其阳性细胞数明显增加，提示红花注射液具有促进 bcl-2 表达的作用；bcl-2 的大量表达可降低线粒体膜的通透性，阻止促凋亡因子释放，引起 Caspase-3 表达减少，从而抑制细胞凋亡的发生。

综上所述，Caspase-3 和 bcl-2 是重要的凋亡相关基因，前者促进细胞凋亡而后者阻止细胞凋亡。本研究发现，在肾缺血再灌注损伤中，红花注射液能够抑制 Caspase-3 和促进 bcl-2 表达，具有抗细胞凋亡的作用，这可能是红花注射液抗凋亡的重要分子机制之一。

（致谢：重庆医科大学解剖教研室孙善全教授对本课题提供的无私帮助）

参 考 文 献

[1] Schumer M , Colomber MC , Sawczuk JS, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia [J]. Am J Pathol, 1992; 140 (4) : 831-838.

[2] 罗 嘉，方治平，周黎明，等.红花注射液对大鼠局灶性脑缺血后梗死体积和神经元凋亡相关蛋白 bcl-2，Caspase-3 表达的影响[J].中国中药杂志，2004; 29 (10) :977-980.

[3] 刘秉乾，武玉东，马腾骧，等.血红素氧和酶 -1 对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中华实验外科杂志，2004; 21 (12) : 1531-1532.

[4] Tzeng SH , Ko WC , Ko FN, et al. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids[J].Thromb Res,1991; 64:91-100.

[5] Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V,et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease[J].Am-J-Med, 1999; 107(5): 489-506.

[6] Nagata S.Fas ligand-induced apoptosis [J].Annu Rev Genet,1999; 33:29-55.

[7] Ju ST , Cui H, Panka DJ, et al. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by $CD4^+$ Th1 and $CD8^+$ cytotoxic T cell[J]. Proc Natl Acad Sci USA ,1994; 91:4185-4189.

[8] MacDonald G, Shi L, Velde CV, et al.Mitochondria-dependent and independant regulation of granzyme B-induced apoptosis [J].J Exp Med, 1999; 189:131-144.

[9] Meier P, Finch A, Evan G.Apoptosis in development [J].Nature, 2000; 407(6805):796-801.

（上接第 481 页）

cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels [J]. J Mater Sci Mater Med, 2005;16(6):515-519.

[9] Auhin J E, Liu F, Malaval L, et al. Osteoblast and chondmblast differentiation[J]. Bone, 1995;17(2 s): 77S-83S.

[10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999;284:143-147.

[11] Gori F, Thomas T, Hicok KC, et al. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation[J]. J Bone Miner Res, 1999;14:1522-1535.

[12] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Chfa1:A transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. Cell, 1997;89:743-754.

[13] Stein GS, Lian JB. Molecular mechanism mediating proliferation/differentiation interrrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype[J]. Endocr Rev, 1993;14:424-442.

[14] Hauge EM, Quesel D, Eriksen EF, et al. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers[J]. J Bone Miner Res, 2001;16(9):1575-1582.