DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.019
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
990 2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)11-0990-03

两种构建方法对组织工程骨种子细胞粘附和增殖的影响

秦 辉,许建中,周 强,王序全,罗 飞,赵 敏,朱 灏 (第三军医大学西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 比较普通的静置接种法和双相接种法在组织工程构建中的差异,探索更佳的体外构建策略。方法 采用静置接种法和双相接种法将不同浓度的羊间充质干细胞分别与同种异体冻干脱钙骨基质复合,体外构建组织工程骨,通过相差显微镜、光镜、扫描电镜观察及MTT检测等,了解细胞在材料中的粘附、生长情况。结果 两种方法均能使细胞在支架上较好的粘附、铺展、增殖,但单纯静置接种的接种细胞密度超过 2×10^6/ml 时上架细胞数不再增加,上架率低(<76%);双相接种法用于更高的接种密度,可明显提高细胞的上架率((80%)。结论 生物蛋白胶辅助的双相接种法可突破普通方法上架率低、即时上架细胞有限的瓶颈,不影响细胞的生长,是一种更佳的组织工程骨体外构建策略。

关键词:组织工程;双相接种技术;生物蛋白胶
中图法分类号:R318.08;R322.71;R329.28 文献标识码:A

Effects of two different methods of tissue engineered bone on cell adhesiveness and proliferation *in vitro*

QIN Hui, XU Jian-zhong, ZHOU Qiang, WANG Xu-quan, LUO Fei, ZHAO Min, ZHU Hao (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare the difference between the biphasic seeding technique and the routine method for the better strategy for the construction of tissue engineered bone *in vitro*. Methods Different densities of goat marrow stromal cells (MSCs) were seeded onto the allogenic freeze-dried demineralized bone matrix (FDBM) by routine seeding technique and biphasic seeding technique, respectively, and then cocultured *in vitro*. The adhesion and proliferation rates of MSCs by different seeding methods were evaluated by cell counting and MTT test. The complex was observed phase contrast microscopically, microscopically, and electron scanning microscopically in order to evaluate the interaction between cells and FDBM. Results MSCs could adhere to the surface and inner walls of FDBM network, and spread extensively and proliferate well by the two methods. But by routine seeding method, adhesive cells on the scaffolds did not increase when the densities of seeded cells surpassed 2×10^6/ml, and the adhesion rate was lower than 76%. However, by biphasic seeding technique aided by fibrin glue, this limit was broken and the adhesion rate of cells was 80% or more. Conclusion FDBM loaded with MSCs is feasible to produce tissue engineered bone, and the technique of biphasic seeding is more favorable than the routine seeding method, which can improve the seeding efficiency without impeding the cell growth.

Key words: tissue engineering; biphasic seeding technique; fibrin glue

组织工程骨替代自体骨修复骨缺损是医学的一个非常有前景的研究领域,种子细胞和支架材料如何在体外高效复合构建组织工程活骨是研究的主要内容之一。我们以羊自体间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为种子细胞、同种异体冻干脱钙骨基质(freeze-dried demineralized bone matrix, FDBM)为支架材料,探索采用双相接种法体外构建组织工程骨的可行性,并与传统的静置接种法相比较。

基金项目:国家"863"计划专题(2003AA5020);重庆市重点科技攻关项目(2003-13-6),西南医院科技创伤基金(2002-4)
Supported by the National "863" Projects of China (2003AA5020), the Key Scientific Research Foundation of Chongqing (2003-13-6), and the Funds for Trauma of Southwest Hospital (2002-4)

作者简介:秦 辉(1965-),男,四川省成都市人,硕士研究生,主治医师,主要从事组织工程技术和创伤外科方面的研究,现在成都市第三人民医院。电话:13540439439
通信作者:许建中,电话:(023)68754164,E-mail:loufly1009@hotmail.com

收稿日期:2003-10-31;修回日期:2004-03-20

1 材料与方法

1.1 FDBM的制备

取市售新鲜成年羊椎体松质骨,制成0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm全松质骨骨片,按文献[1]方法经脱脂、去抗原、脱钙、冻干

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后, ^{60}Co 消毒制成 FDBM。取部分样本作扫描电镜观察。使用前将FDBM 用 0.01 mol/L PBS 液反复漂洗, 再用含 10% 优质胎牛血清培养液浸泡 12 h, 甩干后备用。

1.2　骨髓基质细胞的分离、培养

于山羊髂后上棘处穿刺抽取 5 ml 骨髓(肝素抗凝), 与等体积 DMEM /F12 培养液混匀, 缓慢沿管壁加入到装有等体积 Percoll 液(密度为 1.073 kg/L)的离心管中, 2 500 r/min 离心 25 min, 吸取中间乳白色云雾状有核细胞层, D-Hanks 液漂洗后移至含 15% 优质胎牛血清 F12 培养液中, 以 3×10^5 个/cm^2 的细胞密度分瓶, 置 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内孵育, 隔日换液, 弃去不贴壁的杂细胞。待细胞融合成单层后消化收获细胞, 以 1×10^4 个/cm^2 的密度分瓶传代, 传代后培养液中胎牛血清浓度改为 10%, 余同前。

1.3　细胞-支架材料复合

1.3.1　静置接种法　　收集传代增殖后的第 2 代培养细胞制成 0.25×10^6/ml、0.5×10^6/ml、1×10^6/ml、2×10^6/ml、4×10^6/ml、10×10^6/ml 浓度的细胞悬液, 将 6 种浓度的细胞悬液分别以 0.05 ml/块滴入备用的 FDBM 中(每组 20 块), 充分渗入后, 在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下静置 5 h, 再加入培养液继续培养。

1.3.2　双向接种法　　上述细胞与医用生物蛋白胶(fibrin glue, FG, 广州倍特生物技术有限公司提供)主体胶配成 1×10^6/ml、4×10^6/ml、10×10^6/ml 浓度的细胞悬液, 以 0.05 ml/块滴入备用的FDBM 中(每组 20 块), 喷洒等量的催化剂, 5 min 后加入培养液继续培养。

1.4　上架率和贴壁率

接种 20 h 后, 将细胞支架复合物取出用 0.01 mol/L 的 PBS 轻轻漂洗 1 遍后置于新的培养板中培养, 对未上架的细胞计数, 计算细胞的上架率和上架细胞数。

1.5　MTT 法检测细胞活力

接种后 24 h 及 3、5、7、9 d 每个时间点每个细胞密度组各取 4 块组织工程骨置入 96 孔板中, 都加入培养基 200 μl、MTT (Sigma, 5 mg/ml) 20 μl, 反应 4 h, 弃液, 再加入二甲基亚砜(Sigma) 200 μl, 振荡 10 min 后各取 150 μl 在分光光度计上选择波长 490 nm 读取 A 值。同样方法测定标准浓度细胞的 A 值, 求得细胞数与 A 值的函数关系。

1.6　组织学检查

相差倒置显微镜下观察细胞于材料上生长情况。取联合培养 7 d 的复合物, 部分以 10% 中性甲醛液固定, 石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜观察; 部分样本以 3% 戊二醛溶液固定, 作扫描电镜检查。

1.7　统计学处理

实验数据用 Microsoft Excel 软件处理, 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较用双样本 t 检验。

2　结果

2.1　大体观察

医用生物蛋白胶为两种无色透明液体, 主体胶与种子细胞混合后仍无色微浑浊, 喷洒催化剂后逐渐形成乳白色半透明凝胶, 3 min 后凝胶不再变化, 加入培养液后凝胶不溶, 复合体沉底。

2.2　相差显微镜观察

分离提纯的原代 MSCs 呈圆形, 胞体透亮。5～6 d 细胞形成集落状, 形态为长梭形及多角形。9～12 d 细胞长满单层。经传代的细胞, 细胞形态更加单一, 4～6 d 细胞即可铺满瓶底。

复合培养 20 h 观察, 静置接种组 MSCs 在 FDBM 支架上分布不均、细胞较少; 双相接种组细胞较多, 且分布均匀, 支架表面及内部的孔壁均有大量形态为圆形、椭圆形或长梭形的细胞生长。随培养时间的延长, 材料上的细胞逐渐增多, 细胞形态也逐渐转变为成纤维细胞样外观, 一些细胞横跨桥接较小的 FDBM 孔洞, 一些细胞在较大的孔边缘呈弦月状张开, 培养 7 d 后可见部分细胞分泌较多基质将 FDBM 的网孔铺满。

2.3　细胞计数

2.3.1　细胞上架率　　静置接种法接种密度从 0.25×10^6 个/ml到 1×10^6 个/ml 时的细胞上架率缓慢增加, 达到 1×10^6 个/ml时的细胞上架率最高(75.56±1.75) %, 接种密度超过 2×10^6 个/ml时细胞上架率显著降低, 接种密度为 10×10^6/ml 时仅为(10.02±1.06)%。双向接种法无此限制, 细胞上架率稳定在 80%以上, 高接种密度组明显高于静置法($P<0.01$)。

2.3.2　细胞上架数量　　从细胞上架的绝对数量来说, 静置接种法接种密度从 0.25×10^6 个/ml 到 2×10^6 个/ml 时的上架细胞数呈增加趋势, 更高的接种密度不会明显增加上架细胞数, 每块材料上的细胞不超过 5.3×10^4。双向接种法无此限制, 随接种细胞数量的增加上架细胞的数量几乎等比例增加, 4×10^6 个/ml 和 10×10^6 个/ml 组非常显著地高于静置法($P<0.01$), 每块材料上的细胞可高达 4.0×10^5。

MSCs 细胞数与 MTT 法检测的 A 值满足公式: $y=0.3432x+0.1333$, 由此计算出细胞的数量。

采用静置接种法, 前 3 d 生长曲线缓慢, 3～7 d 明显加快。双向接种法较低接种密度组与静置法的细胞增殖情况相仿, 而 10×10^6 个/ml 组自接种 24 h 后就一直快速生长, 5 d 左右达最大细胞数量, 见图 1。

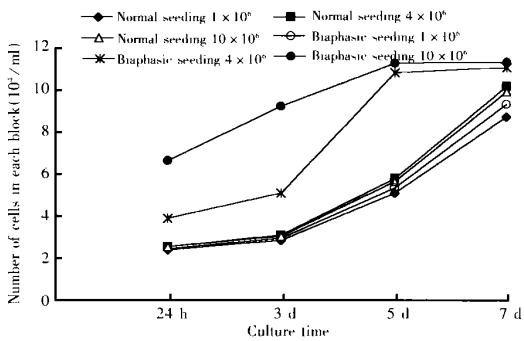


图 1　双向接种法与静置法上架细胞生长曲线比较(cells/ml)

Fig 1　Comparison of the growth curves of cells seeded by the two methods at different cell densities (cells/ml)

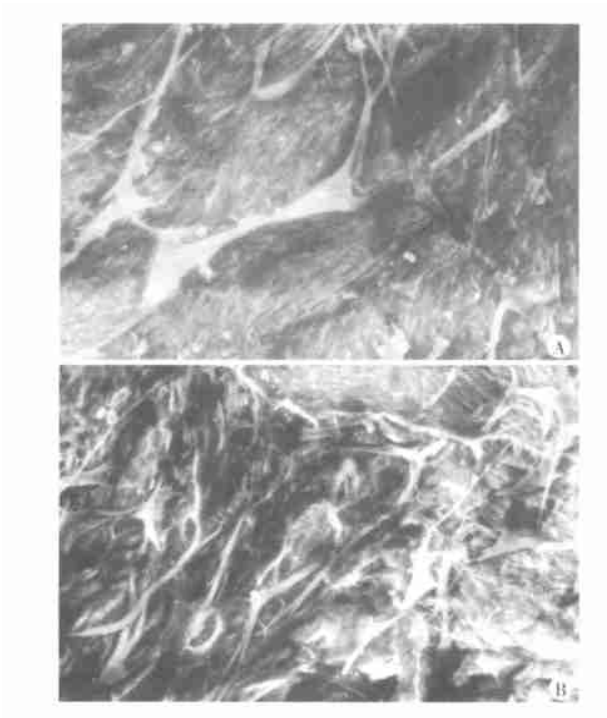
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 组织学观察

HE染色见细胞呈梭形贴附于FDBM表面和孔壁上，支架的浅层切片的细胞较多、而深层切片的细胞较少，周围可见红染的细胞外基质。

2.5 扫描电镜观察

复合培养9 d，扫描电镜下可见双相接种法有更多的细胞紧密贴附于FDBM网架上，向四周伸出伪足，分泌的细胞外基质包绕于细胞周围(图2)。



A：Normal seeding；B：Biphasic seeding

图2 静置法与双向接种法构建组织工程骨的扫描电镜观察 (SEM×600)

Fig 2 MSCs-FDBM cocultured for 9 d seeded by the two methods (SEM×600)

3 讨论

支架材料必须荷载足够数量的种子细胞才能保证所构建的组织工程骨在体内成骨，由于种子细胞来源有限，组织工程技术的临床应用需要二者的高效复合。采用常规静置接种法仍有大量种子细胞脱落，造成资源的浪费；而且上架细胞数有限，成骨修复能力受限。如何提高种子细胞的利用率和上架细胞数量是一个亟待解决的难题。

周强等[2]应用自制生物凝胶和三维支架材料，建立组织工程种子细胞的三维支架双相接种技术，发现种子细胞在三维支架材料中呈三维均相分布，促进了组织工程软骨组织的形成和成熟。我们利用这一原理，选用市售的纤维蛋白胶介导MSCs与FDBM高效复合体外构建组织工程骨。

细胞与支架材料的粘附是通过细胞膜上的受体来调节的，这些受体需要特异性地识别材料表面的粘附分子[3]。Passaretti等[4]认为FG能为细胞提供良好的细胞间基质和细胞间信号传递，对组织的形成有明显促进作用。国内有学者观察到以FG为载体的注射型骨修复材料可显著促进MSCs贴壁和向成骨细胞方向的分化[5]。因此，无论从生物安全性、物理性质和生物活性，FG都适合作组织工程双相构建技术的介质。

我们的实验证明双相接种技术简便易行，细胞上架率不随接种密度增高而显著下降，上架细胞数量随接种密度增高成比例增加，极大地提高了种子细胞的利用率。我们的实验观察发现随着接种密度和上架细胞数的增高，种子细胞进入生长迅速的对数生长期和细胞数量饱和的生长平台期的时间提前，而且通过双相接种技术附架细胞增殖速度明显快于静置接种法，说明FG可以促进细胞粘附、增殖，其原因可能是FG凝聚后形成的纤维网状结构，能够为高密度细胞提供足够的供氧环境和生长空间，从而提示较高的细胞密度可能为细胞增殖提供启动的生物信号。但不同接种密度组达到平台期其饱和细胞的数量差别不大，这可能是由于受到供养和氧供的限制或细胞间的接触抑制。所以组织构建策略中选择高密度接种快速收获比较符合组织工程临床应用的要求。采用双相接种技术以4×10^6个/ml的接种密度既避免了细胞浪费又可以和10×10^6个/ml组于接种5 d同时达到饱和上架细胞数量。是采用此方法的最佳的接种密度。双相接种技术对细胞分化、组织成熟和组织块体内转归的影响有待进一步实验观察。

参考文献：

[1] Urist M R, Mikulski A, Boyd S D. A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks[J]. Arch Surg 1975, 110(4): 416－428.

[2] 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.

[3] Hynes R O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion[J]. Cell, 1992, 69(1): 11－25.

[4] Passaretti D, Silverman R P, Huang W, *et al*. Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer[J]. Tissue Eng, 2001, 7(6): 805－815.

[5] 崔 赓，胡蕴玉，雷 伟，等. 可注射型骨修复材料对兔MSC增殖及分化的影响[J]. 中国矫形外科杂志，2003，11(1)：45－49.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net