

• 临床研究 •

大鼠脂肪干细胞复合纳米羟基磷灰石/胶原/L-聚乳酸体内成骨的研究

张胜利¹, 邓展生^{2△}

(1. 重庆市中山医院 400013; 2. 中南大学湘雅医院脊柱外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 观察大鼠脂肪干细胞复合纳米羟基磷灰石/胶原/L-聚乳酸成骨的特性。方法 在体外分离、培养大鼠脂肪干细胞(ADMSCs),并接种于纳米羟基磷灰石/胶原/L-聚乳酸(nHAC/PLA)共同成骨诱导培养 7 d,将二者的复合体植入大鼠体内 4、8、12 周,观察成骨情况。倒置相差显微镜、流式细胞仪观察 ADMSCs 特征;将 ADMSCs 以含 10% 新生牛血清、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 D₃ 的高糖 DMEM 培养基进行成骨诱导培养,以 I 型胶原免疫组化染色、碱性磷酸酶活性、RT-PCR 检测骨钙素表达,了解其成骨特性;以 HE 染色法光学显微镜下观察 ADMSCs-nHAC/PLA 体内成骨的情况。结果 在倒置显微镜下,ADMSCs 呈成纤维细胞样长梭形外观;利用流式细胞仪对第 5 代 ADMSCs 的表面抗原分子进行检测,95% 表达 CD29;成骨诱导 7 d,ADMSCs I 型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性,胞浆呈棕黄色;ADMSCs 成骨诱导 14 d,碱性磷酸酶活性水平逐渐升高;成骨诱导 14、21 d,ADMSCs 表达骨钙素 mRNA 的 RT-PCR 鉴定显示在 280 bp 段有一条单一的目的条带。ADMSCs 复合 nHAC/PLA 植入体内 4、8、12 w,见类骨质形成;随着植入时间的延长,类骨质逐渐增加。结论 ADMSCs 复合 nHAC/PLA 具有良好的成骨能力,是骨组织工程较理想的构建方式。

关键词:骨;干细胞;组织工程;纳米材料**中图分类号:**R365.681**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)12-1533-03

**Bone construction with adipose derived mesenchymal stem cells on
nanohydroxyapatite/collagen/poly(L-lactid) in vivo**

ZHANG Sheng-li¹, DENG Zhan-sheng^{2△}

(1. Department of Orthopedics, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400013, China;

2. Department of Orthopedics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To observe bone construction with Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSCs) on Nano-hydroxyapatite/Collagen/ Poly(L-lactid) (nHAC/PLA) in Vivo. **Methods** The rat ADMSCs were observed under inverted microscope and examined using flow cytometric methods about CD 29. The 3rd passage rat ADMSCs were cultured in DMEM supplemented with 10% new born calf serum, dexamethasone, ascorbic acid, β -glycerophosphat and vitamin D₃ to be induced into osteoblast. The secretion of collagen type I was verified by immunocytochemistry staining. The levels of Alkaline Phosphatase were measured in 14d. The expression of bone gla protein mRNA was examined by RT-PCR. The ADMSCs-nHAC/PLA composites were implanted into rat back muscles for 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks. The composites and products were observed under light microscope with HE staining. **Results** The rat ADMSCs appeared fibroblast-like under inverted microscope. Flow cytometry showed that 95% of the 5th cells expressed CD29. After osteogenic induction, the secretion of collagen type I was positive with immunocytochemistry staining in 7d, the level of Alkaline Phosphatase gradually became higher in 14 days and the expression of bone gla protein mRNA showed positive at 280bp in 14 d and 21 d. The bone tissue were successfully constructed for 4, 8, 12 weeks. **Conclusion** The rat ADMSCs with nHAC/PLA could be used to construct bone tissue in Vivo.

Key words: bone; stem cells; tissue engineering; nanometer-scaffold

骨缺损是骨科临床工作中经常遇到的难题。Vacanti 等^[1]提出的“骨组织工程”为骨缺损的治疗提供了新的思路。骨组织工程的基本过程包括种子细胞的选择和培养、种子细胞与生物材料复合后联合培养及细胞-支架材料复合体植入体内 3 个步骤。本试验将大鼠脂肪干细胞接种纳米羟基磷灰石/胶原/L-聚乳酸 [nanohydroxyapatite/collagen/poly (L-lactid) , nHAC/PLA] 观察其成骨情况,为选择理想的骨组织工程技术路线依据。

1 资料与方法

1.1 脂肪干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)的形态观察与表面抗原分子测定 以酶消化法自大鼠腹股沟区脂肪垫获取细胞,以低糖 DMEM 培养液培养、传代;倒置相差显微镜观察其形态;取第 5 代细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,PBS 液漂洗 2 次,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取 100 μL 单细胞悬液与饱和浓度的抗 CD29、CD34、CD44 兔抗大鼠单克隆抗体室温反应 30 min,PBS 液漂洗 2 次,与 FITC 标记的二抗避光作用 30 min,将标记后的细胞悬浮于 PBS 液中,进行流式细胞仪分析。

△ 通讯作者,E-mail:jzwkdeng@126.com。

1.2 ADMSCs 的成骨特性鉴定 将 ADMSCs 以含 10% 新生牛血清、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 D₃ 的高糖 DMEM 培养基进行成骨诱导培养,每 2~3 天换液 1 次。

1.2.1 I 型胶原蛋白染色—免疫组织化学法 用第 3 代 ADMSCs,制成细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,接种到预置清洁盖玻片的 6 孔培养板中,每孔接种 1 mL,补加成骨诱导培养基 1~2 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养。次日更换培养基,培养 7、14 d 后,取样行免疫组织化学染色。

1.2.2 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)含量的测定 将第 3 代 ADMSCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,接种于 24 孔细胞培养板,每孔 500 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中成骨诱导培养。分别于培养第 2、4、6、8、10、12、14 天收集细胞,调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,取 1 mL 细胞悬液进行细胞内 ALP 含量检测,每个时间点取 6 孔。将细胞悬液以 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;加入 1 mL 1% TironX-100,反复吹打,使胞浆内液外流,收集悬液置于 EP 管内,按 ALP 检测试剂盒说明,进行 ALP 检测。

1.2.3 骨钙素(bone gal protein,BGP)mRNA 的表达—逆转录聚合酶链反应 第 3 代 ADMSCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,接种于 6 孔细胞培养板,每孔 1 mL,再加入成骨诱导培养基 1~2 mL。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中成骨诱导培养 14、21 d,取样经提取 RNA、聚合酶链反应、产物分析等步骤进行检测。

1.3 ADMSCs-nHAC/PLA 复合体的体外构建与体内植入 用 0.25% 胰蛋白酶消化大鼠 ADMSCs,调整细胞悬液密度为 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 。接种 500 μL 细胞悬液到 24 孔细胞培养板内的支架材料上行成骨诱导培养,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中孵育 2 h;将材料翻面再次接种细胞,继续培养。复合培养 7 d,将细胞-支架材料复合体植入大鼠背部肌袋内 4、8、12 周后取材观察其体内成骨情况。

2 结 果

2.1 ADMSCs 形态与表面抗原特征 在倒置显微镜下,可见原代 ADMSCs 呈球形悬浮于培养基中,2 d 后细胞贴壁生长,形态逐渐呈成纤维细胞样长梭形外观;细胞传代稳定,传 10 代细胞形态、增殖特性仍无明显改变。利用流式细胞仪对第 5、10 代 ADMSCs 的表面抗原分子进行检测,95% 的细胞表达 CD29 (图 1)。

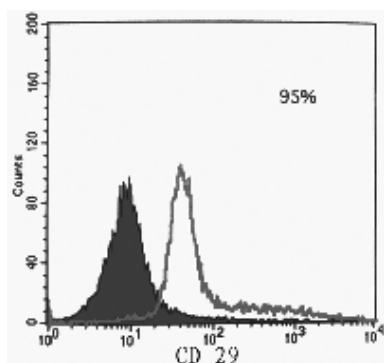


图 1 95% 的第 5 代细胞表达 CD29

2.2 ADMSCs 成骨特性 成骨诱导 7 d,ADMSCs I 型胶原蛋白免疫组织化学染色,胞浆呈棕黄色(图 2);ADMSCs 成骨诱导 14 d,ALP 水平逐渐升高(图 3);成骨诱导 14、21 d,ADMSCs 表达细胞 BGP mRNA 的 RT-PCR 鉴定显示在 280 bp 段有一条单一的目的条带(图 4)。

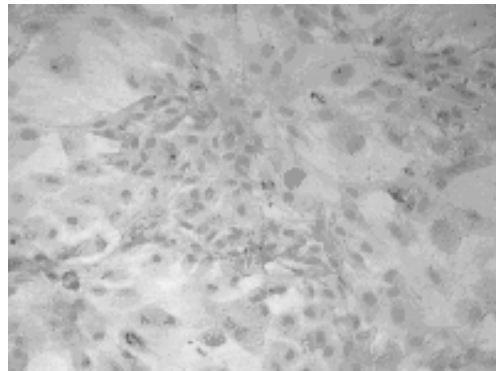


图 2 I 型胶原蛋白免疫组织化学染色;成骨诱导 7 d,胞浆呈棕黄色(SP 法, $\times 100$)

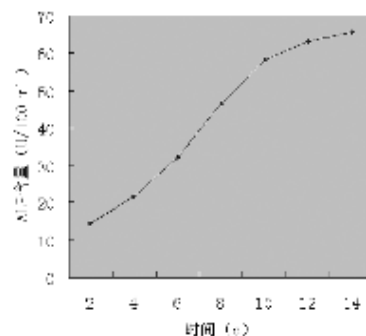


图 3 成骨诱导 ADMSCs 不同时间点 ALP 含量

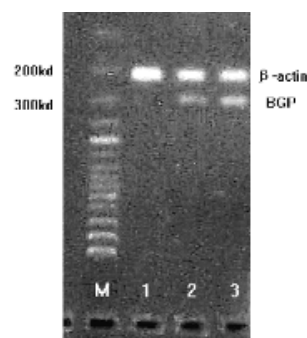


图 4 成骨诱导 14 d、21 d 细胞骨钙素 mRNA 表达,201 bp 和 280 bp 处分别出现内参和目的条带

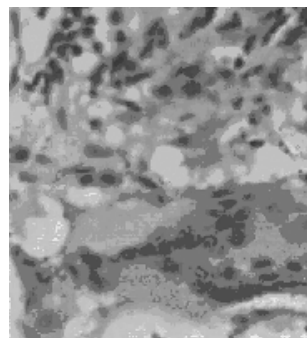


图 5 细胞-支架材料复合体植入 12 周,骨质呈均质样(光学显微镜 $\times 40$)

2.3 ADMSCs-nHAC/PLA 体内成骨 大体观察,细胞-支架材料复合体与周围组织间有少量纤维组织,无明显粘连及炎性分泌物;组织块呈淡黄色至黄白色,质地较硬;随着体内植入时间的延长,硬度逐渐增加。HE 染色光学显微镜、扫描电镜观察,细胞-支架材料复合体植入 4 周后,细胞贴壁生长,类骨质沿孔壁分布,在孔隙内呈稀疏的网状结构;植入 8 周后,类骨质填满孔隙,出现融合区域;植入 12 周后,类骨质呈均质样结构,相互融合;支架材料边缘模糊,孔壁变薄,部分支架材料崩解(图 5)。类骨质内可见毛细血管生成,其管腔内可见大量红细胞,未见明显炎性细胞浸润。

3 讨 论

2001 年,Zuk 等^[2]利用人吸脂术获得的脂肪组织成功分离出一种成体干细胞,呈成纤维细胞样外观,称为 ADMSCs。De Ugarte 等^[3]报道由吸脂术获取的 1 000 mL 人体脂肪组织中可获得 5.5×10^{10} 个细胞,这提示脂肪组织中间充质干细胞数量较多、来源充足。另外,ADMSCs 生长迅速,体外培养的倍增时间为 16 h,经短暂的潜伏期后,细胞即进入对数生长期^[3],而且在本实验中发现,ADMSCs 在体外培养可稳定传代 10 代,这说明 ADMSCs 具有强大的增生分裂能力,可能实现细胞的大规模扩增,是骨组织工程理想的种子细胞。

Mitchell 等^[4]研究发现,ADMSCs 可表达间充质干细胞的表面标志 CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166,这就为干细胞的鉴定和纯化提供了依据和途径。而刘凯等^[5]利用流式细胞仪分别检测了 ADMSCs 接种 12、72 h 的表面抗原分子,结果表明 CD29 均呈高表达,Stro-1 无明显表达,CD105、CD166 阳性率在原代细胞增殖后显著增加。这说明 CD29、CD105、CD166 是鉴定 ADMSCs 的可靠指标。本研究从 SD 大鼠腹股沟脂肪垫中分离出的细胞,对其第 5 代进行流式细胞仪检测,95% 的细胞表达 CD29,与文献报道的人 ADMSCs 类似。因此,本实验中获取的细胞即 ADMSCs。

骨形成的过程由 3 个阶段构成,即伴有细胞扩增的基质分泌、基质成熟和基质钙化^[6]。每个阶段有不同的基因顺序表达,其产物就成为鉴定成骨细胞及其活性的指标。I 型胶原由 2 条 α_1 链和 1 条 α_2 链缠绕而成, α_1 链中的天冬氨酸-甘氨酸-谷氨酸-丙氨酸序列可以被成骨细胞表面的特异性受体 β 整合素亚单位识别,增强成骨细胞蛋白激酶 C 的活性。其表面的骨钙素结合的位点,对矿物沉积有诱导作用,可促进新骨形成^[7]。I 型胶原蛋白是成骨细胞早期分泌的指标之一。ALP 是一种含锌的磷酸单酯水解酶,在 pH 值 9.2~9.4 的环境中,可以水解有机磷酸、释放无机磷,使局部磷酸根浓度升高,并破坏钙化抑制剂,促进羟基磷灰石的形成。ALP 的表达标志着向成骨细胞分化的开始,与成骨细胞的分化、成熟呈正相关^[8]。BGP 是一种维生素 K 依赖酶修饰的骨基质非胶原性蛋白,是骨组织的特异性蛋白。BGP 的表达在细胞融合之后,参与后期基质钙化,是成骨细胞晚期标志物之一^[9]。本实验联合应用多种方法对代表成骨细胞早、中、晚期功能的指标,包括 I 型胶原、ALP、骨钙素进行了鉴定,结果表明 SD 大鼠 ADMSCs 具备向成骨细胞分化的能力、具有成骨细胞的生物学特性。

细胞-支架材料复合体植入体内 4、8、12 周,均可见类骨质形成,而且随着植入时间的延长,类骨质的形成逐渐增加,这说明大鼠 ADMSCs 在体内具有良好的成骨能力。在类骨质内新生毛细血管的生成,为细胞在局部的代谢提供了保证;组织块周围未见炎性细胞浸润,表明大鼠背部肌袋内的正常组织与组织块间未发生免疫排斥反应。

本实验探索了以大鼠 ADMSCs 为种子细胞、以为 nHAC/PLA 支架材料构建组织工程骨的方法,取得了初步的成果;但存在观察时间不长、未证实能否修复骨缺损等不足,需要在进一步的实验中加入研究。

(致谢:衷心感谢清华大学材料系崔福斋教授惠赠纳米羟基磷灰石/胶原/L-聚乳酸材料及相关文献。)

参考文献:

- [1] Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering[J]. Science, 1993,260(14):920.
- [2] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies[J]. Tissue Eng, 2001,7(2):211.
- [3] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow[J]. Cells Tissue Organs, 2003, 174(3):101.
- [4] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. The immunophenotype of human adipose derived cells: temporal changes in stromal and stem cell-associated markers[J]. Stem Cells, 2005,11(1):569.
- [5] 刘凯, 吕小杰, 周广东, 等. 原代脂肪基质细胞增殖前后细胞表面标志变化的研究[J]. 组织工程和重建外科杂志, 2006,2(3):128.
- [6] Owen TA, Aronow MA, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in the expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix[J]. Cell Physiol, 1990,143:420.
- [7] Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003,35(9):1301.
- [8] Ryden M, Dicker A, Gotherstrom C, et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311:391.
- [9] Tracy RP, Andrianorivo A, Riggs BL, et al. Comparison of poly-clonal and monoclonal antibody-based immunoassays for osteocalcin: a study of sources of variation in assay results[J]. Bone Miner Res, 1990,5:451.