

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.16.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200320.1528.003.html\(2020-03-23\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200320.1528.003.html(2020-03-23))

细胞膜片技术修复大鼠颅骨缺损的实验研究^{*}

李金达¹,黄颖利¹,赖仁相¹,肖 胤¹,肖 林¹,邱海英^{2△}

(1.重庆市涪陵中心医院口腔分院 408000;2.重庆市涪陵区妇幼保健院 408000)

[摘要] **目的** 探讨利用大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外构建成骨细胞膜片并用于修复大鼠颅骨缺损的可行性。**方法** 将大鼠 BMSCs 以高密度接种于培养皿中,并在体外向成骨细胞诱导 3 周,待形成膜片后用细胞刮刮起膜片,实验组将成骨细胞膜片植入大鼠 8 mm 直径颅骨缺损区,在非成骨诱导条件下诱导形成的细胞膜片植入大鼠 8 mm 直径颅骨缺损区为对照组,同时设置空白组。术后 6、12 周每组分别取材,进行大体观察、X 线检测和组织学检查。**结果** 在体外成功构建成骨细胞膜片,将膜片植入大鼠颅骨缺损处 12 周后观察到实验组较对照组有更多的新骨形成,组织学检查证实为新骨。**结论** 本实验成功构建成骨细胞膜片,为人类骨缺损的修复提供了新的方法。

[关键词] 组织工程;细胞膜片;骨髓;间充质基质细胞;骨

[中图法分类号] R318 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)16-2626-06

Study on the reparation of skull defect in rats based on cell sheet technology^{*}

LI Jinda¹,HUANG Yingli¹,LAI Renxiang¹,XIAO Yin¹,XIAO Lin¹,QIU Haiying^{2△}

(1.Oral Branch,Chongqing Fuling Central Hospital 408000;2.Chongqing Fuling Maternal and Child Hospital,Chongqing 408000,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the feasibility of using bone marrow stem cells (BMSCs) in vitro to construct osteoblasts cell sheet and repair skull defect in rats. **Methods** Rat BMSCs were inoculated in a culture dish with high-density and induced to osteoblasts for 3 weeks. The cell sheet was scraped by cells scrap after the formation of the cell sheet,and the osteoblastic cell sheet was implanted into the 8 mm diameter defect of the rat skull in the experimental group. The cell sheet formed under non-osteogenic induction was implanted into the 8 mm diameter defect area of the rat skull as the control group,and set the blank group. General observation,X-ray examination and histological examination were conducted at 6 and 12 weeks after the operation. **Results** The osteoblastic cell sheet was successfully constructed in vitro,and more new bone was formed in the experimental group than in the control group at 12 weeks after the cell sheet was implanted in the skull defect of the rats,which was confirmed as new bone by histological examination. **Conclusion** This experiment successfully constructed osteoblast membranes,which provided a new method for repairing human bone defects.

[Key words] tissue engineering;cell sheet;bone marrow;mesenchymal stromal cells;bones

我国每年因各种原因造成的骨缺损达数百万例,怎样修复这些骨缺损一直是临床工作中的难点。被誉为“金标准”的自体骨移植因存在供区不足及需开辟第二术区同时容易出现其他并发症的问题,其在临床上的应用受到一定的限制^[1]。近些年来,随着组织工程技术的发展,组织工程相关研究已经为骨缺损的

修复开辟了新的途径。通常组织工程骨的构建主要是将体外培养的成骨细胞接种于支架材料并用于修复骨缺损,虽然目前在全球生物材料的研究已经取得了很大的进展,但使用支架材料仍存在许多的不足,如存在免疫原性,支架材料的降解速率与骨组织的形成速率不匹配,支架材料容易造成宿主周围组织炎性

^{*} 基金项目:重庆市涪陵区级科技项目(FLKW,2017ABB1043)。 作者简介:李金达(1988—),主治医师,硕士,主要从事骨组织工程研究。

[△] 通信作者,E-mail:1598285889@qq.com。

反应等,均限制了组织工程的研究进展^[2]。与此同时,MOSCHOURISO 等^[3]学者提出了体外构建无支架组织工程组织的相关研究并取得了成功。基于以上研究,本实验将大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外诱导培养成为成骨细胞膜片,无需外支架,用于修复大鼠 8 mm 直径颅骨临界骨缺损,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

5 只 Wistar 大鼠,4 周龄,体重 60~80 g,雌雄不限;30 只 Wistar 大鼠,8 周龄,体重 155~175 g,雌雄不限,均购于重庆医科大学动物实验中心。DEME 培养基购于美国 Gibco 公司;胎牛血清购于美国 HyClone 公司;维生素 C、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、胰蛋白酶、抗坏血酸、碱性磷酸酶、茜素红购于美国 Sigma 公司。超净工作台(苏州净化设备厂);二氧化碳恒温培养箱(德国 Heraeus 公司);离心机(上海安亨科学仪器厂);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);高压灭菌锅(上海新华医疗器械有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 BMSCs 的获取及培养

通过颈椎脱臼法处死 4 周龄 Wistar 大鼠,利用眼科剪将大鼠双侧股骨及胫骨分离出来,同时将股骨和胫骨浸泡于含 1% 链霉素及青霉素的磷酸盐缓冲液(PBS)8 min。随后将胫骨和股骨两端剪断,利用注射器内的无菌 PBS 冲洗骨髓腔,冲洗出来的液体转至离心管,1 100 r/min 离心 6 min 后倒去上清液,加入 DMEM 完全培养基(含 15% 胎牛血清,100 U/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素、0.29 g/L L-谷氨酰胺),利用尖吸轻轻吹打液体,使细胞悬浮其中,之后将细胞接种至培养瓶中,再将培养瓶置于孵箱内培养。每 2~3 天更换细胞培养基,待细胞 90% 融合时,利用胰蛋白酶消化所得第 1 代细胞,利用同样方法获得第 3 代细胞用于实验。

1.2.2 体外构建成骨细胞膜片

将消化所得的第 3 代 BMSCs 以 9×10^4 个/cm² 密度接种于培养皿中,待细胞达到 75% 融合之后,则改用成骨诱导培养基培养(含 10% 胎牛血清 + 10 nmol/L 地塞米松 + 100 mg/L 维生素 C + 10 mmol/L β -甘油磷酸钠 + 100 U/mL 链霉素 + 100 U/mL 青霉素 + 0.29 g/L L-谷氨酰胺)。利用成骨诱导培养基继续培养 22 d。待膜片形成一定厚度时,利用 PBS 轻轻冲洗膜片 2 次,之后利用细胞刮刀沿着皿底边缘轻轻刮起膜片,使膜片与皿底分离,备用。

1.2.3 体外构建未分化细胞膜片

将第 3 代 BMSCs 以 9×10^4 个/cm² 密度接种于

6 孔板中,待细胞达到 75% 融合之后,改用 DMEM 未分化培养基培养(10% 胎牛血清 + 100 mg/L 维生素 C + 100 U/mL 青霉素 + 100 U/mL 链霉素 + 0.29 g/L L-谷氨酰胺)。利用未分化培养基继续培养 15 d。待膜片形成一定厚度时,利用 PBS 轻轻冲洗膜片 2 次,之后利用细胞刮刀沿着皿底边缘刮起膜片,使膜片与皿底分离,备用。

1.2.4 成骨细胞膜片碱性磷酸酶(ALP)活性检测

将连续诱导 15 d 形成的成骨细胞膜片,利用 PBS 轻轻冲洗 2 遍后,按照试剂盒说明书进行 ALP 染色,倒置相差显微镜下观察并拍照。

1.2.5 成骨细胞膜片茜素红活性染色

将连续诱导 22 d 形成的成骨细胞膜片,利用 PBS 轻轻冲洗 3 遍后,4% 多聚甲醛固定膜片 35 min, PBS 洗 4 次,然后在膜片上滴加 1% 的茜素红染液,使成骨细胞膜片完全浸润,常温条件下孵育 37 min, PBS 冲洗 4 次,倒置相差显微镜下观察并拍照。

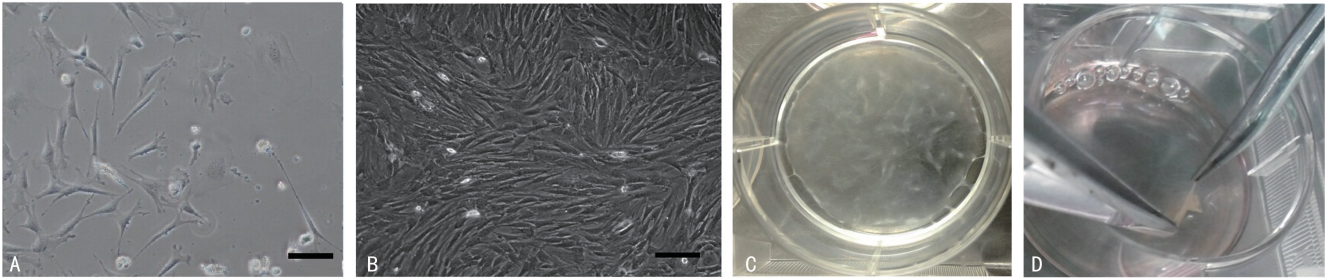
1.2.6 体内实验

选取 30 只 8 周龄 Wistar 大鼠,分成 3 组:实验组(植入成骨细胞膜片)、对照组(植入未分化膜片)和空白组,每组 10 只。将大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射(0.35 mL/100 g),待大鼠麻醉后,固定大鼠四肢,修剪去大鼠头部毛发,消毒头皮部位,铺巾完毕,在无菌条件下利用手术刀片沿颅中缝做矢状切口,切开皮肤,分离皮下组织,直至暴露骨膜表面。于大鼠顶骨处提起骨膜并注入 5 mL 生理盐水,使骨膜与颅骨分离,之后再切开并剥离骨膜,暴露出颅骨,用牙科钻制备直径为 8 mm 的大鼠颅骨全层圆形缺损,操作过程中利用生理盐水持续冲洗,降温,同时保护硬脑膜,术后利用无菌 PBS 冲洗术区,术后彻底去除缺损区内残余的碎骨块,按组分别植入不同复合物后,对位缝合创口。

术后 6、12 周每组各处死 5 只大鼠,观察大鼠颅骨缺损区的修复情况。大体观察结束后,将所有标本的颅骨缺损区分别进行 X 线拍摄,检测缺损区新生骨组织的形成情况。然后将各样本组织通过多聚甲醛固定后再用乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙 4 个月,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,6、12 周的标本组织分别进行 Van Gieson 染色观察分析。选择术后 12 周,每组选取 5 张横贯颅骨缺损区的片子,使用 NIH Image J 图像分析系统分析切片中新生骨组织的面积占全部缺损面积的百分比。

1.3 统计学处理

采用 one way ANOVA 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差



A:显微镜下 BMSCs 呈长梭形(倒置显微镜×100);B:第 1 代 BMSCs 细胞呈“漩涡状”生长(倒置显微镜×100);C:成骨细胞膜片呈一层薄膜状;D:利用镊子提起细胞膜片(标尺=100 μm)。

图 1 显微镜下 BMSCs 形态及细胞膜片大体观察

异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSCs 镜下观察及细胞膜片大体观察

倒置显微镜下观察到,提取原代细胞培养 3 d 后 BMSCs 呈长梭形,散在分布在瓶底。待原代细胞达到 90%融合后,用胰蛋白酶消化 BMSCs 传代培养,第 1 代细胞 15 h 后基本贴壁,此时大部分细胞呈长梭形,再经过 24 h 的培养后开始迅速增殖,继续培养 6 d 后细胞基本长满瓶底,呈漩涡状。高密度接种的 BM-SCs 在成骨诱导液中连续培养 21 d 后,可用肉眼观察到皿底有一层白色透明样且有一定厚度的薄膜,膜片周围向中央卷曲,在膜片表面可用肉眼观察到白色的矿化结节出现。利用细胞刮刀刮取膜片边缘,可以使膜片与皿底分离,分离后膜片自行卷曲,该膜片有一定的机械性能和弹性,可以用镊子小心提起,见图 1。

2.2 细胞膜片的特征

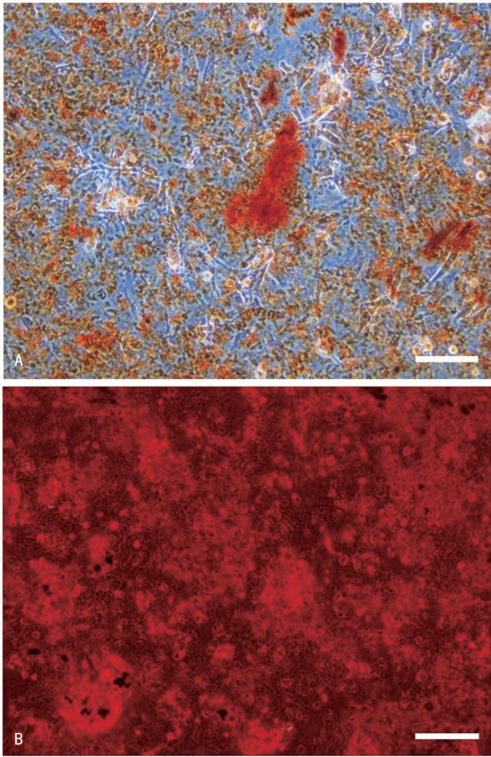
ALP 呈阳性,茜素红染色结果显示成骨细胞膜片中有成片的深红色颗粒状的物质,见图 2。

2.3 体内实验

大体观:术后 6 周,实验组缺损区边缘有一部分不透明物质,与缺损区周边骨质有少部分融合,触之偏硬。对照组缺损区边缘也有一部分不透明物质,但面积比实验组小,触之较软,而空白组缺损区则由一层透明的薄膜构成,触之很软。术后 12 周,实验组缺损区不透明物质较术后 6 周更明显,区域更大,触之组织更厚,且硬度更高,在缺损区分布不均匀。对照组不透明区域明显较实验组偏少,但较术后 6 周对照组偏多,触之硬度较 6 周更高。而空白组透明的薄膜增厚,无明显不透明区,但缺损区缺损边缘有少量不透明物质形成,见图 3。

X 线检测:术后 6 周,实验组及对照组有一部分絮状矿化阻射影,其中实验组阻射影面积较对照组更大,而空白组则呈明显透光影,无矿化组织。术后 12 周,实验组及对照组相较于术后 6 周,絮状阻射影面积都增大,密度均增高,但实验组比同期对照组不透

影面积更大,部分区域密度趋近于正常骨组织,而空白组缺损区域仍然呈明显透光影,但其缺损边缘有少部分不透光影,见图 4。



A:ALP 呈淡黄色;B:成骨细胞膜片茜素红染色呈现出深红色颗粒。

图 2 成骨细胞膜片钙沉积物的检测(倒置显微镜×100,标尺=100 μm)

组织学检查:术后 6 周,可见实验组、对照组、空白组缺损区域大部分仍然呈纤维组织覆盖,但在实验组缺损区散在有一些软骨样组织生成,其中可见许多软骨细胞,实验组缺损区新生骨面积占缺损区面积比对照组更大,而空白组仍为纤维组织,仅在缺损周围区域有少量新骨。术后 12 周,实验组缺损区域有更多的软骨转化为新骨组织,散在分布在缺损区域,放大图可见有许多成骨细胞、骨基质、骨陷窝等结构。对照组也有一些新生骨生成,散在分布于缺损区域,但实验组新生骨占缺损区比例较对照组更多,而空白

组缺损区仍由成纤维细胞所占据,见图 5。统计分析显示术后 12 周,实验组新生骨组织占缺损区面积为 $(18.8 \pm 1.7)\%$,对照组为 $(4.3 \pm 2.3)\%$,空白组为 $(3.2 \pm 1.5)\%$ 。实验组比对照组及空白组有更多新

生骨组织的生成,差异有统计学意义($P < 0.05$),而对照组和空白组新生骨比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 6。

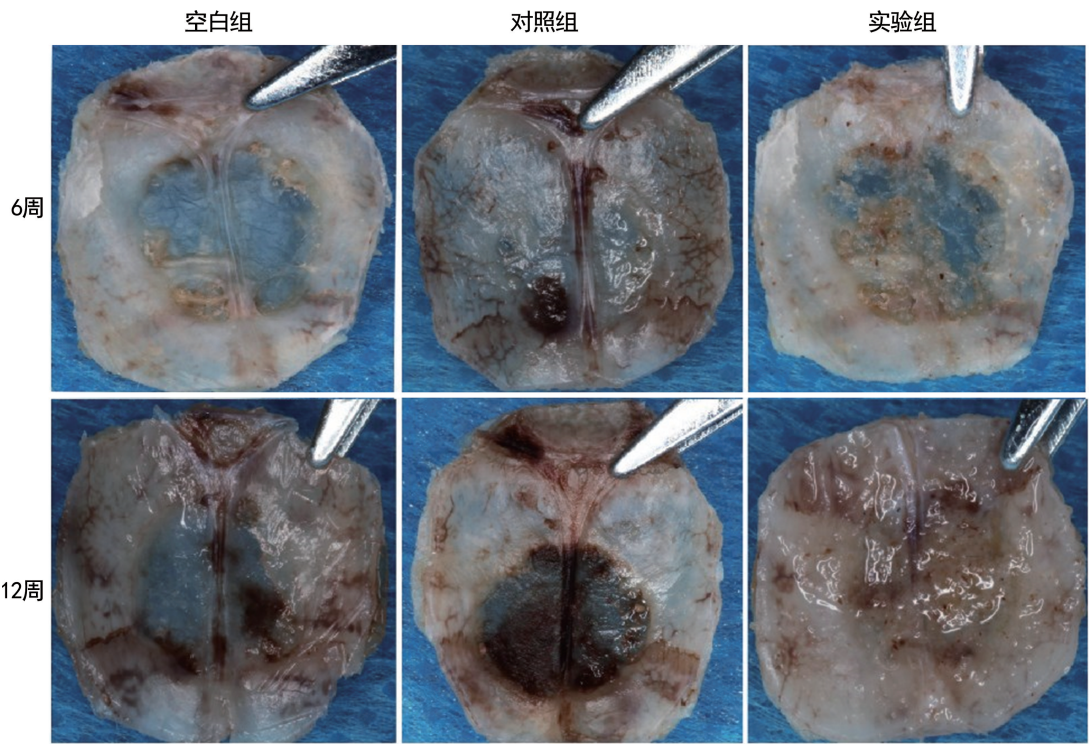


图 3 实验组、对照组、空白组大鼠颅骨大体观

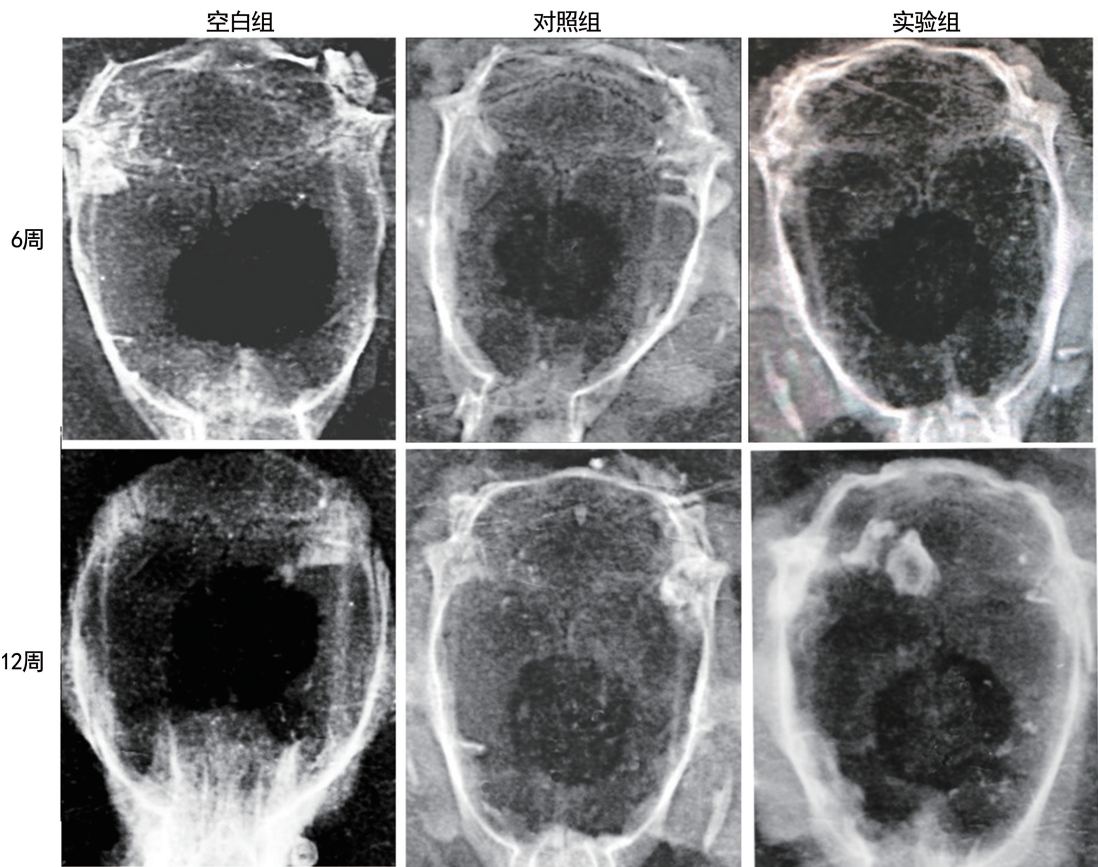


图 4 实验组、对照组、空白组大鼠颅骨 X 线检测

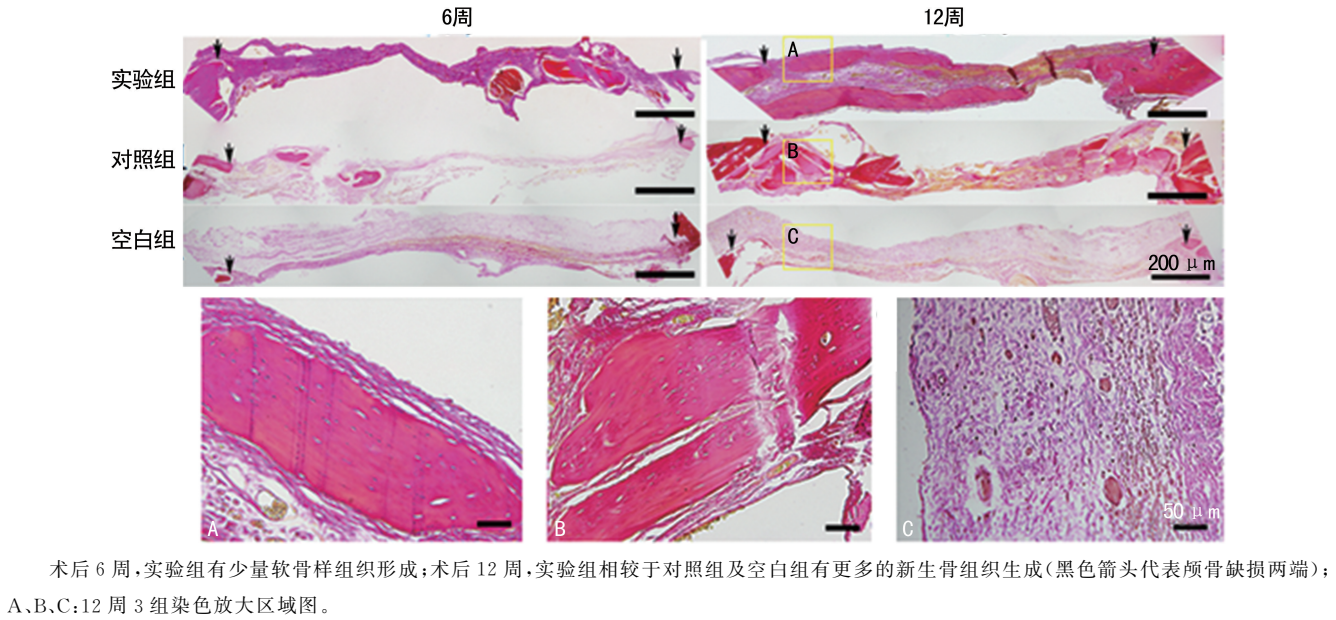
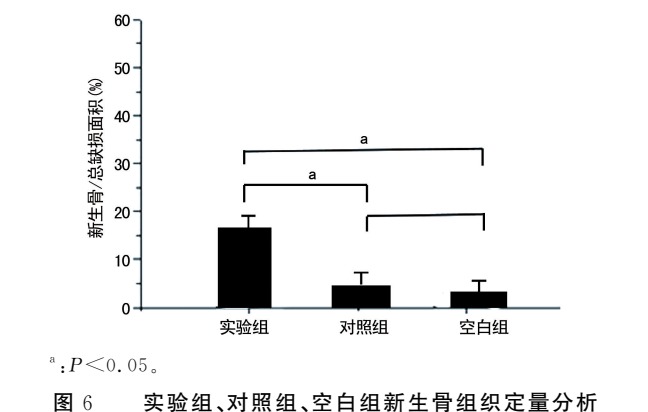


图 5 实验组、对照组、空白组 Van Gieson 染色



^a: $P < 0.05$.

图 6 实验组、对照组、空白组新生骨组织定量分析

3 讨 论

细胞膜片技术是由日本学者 OKANO 于 1993 年提出^[4],目前,细胞膜片技术已经广泛运用到组织工程的各个领域^[5]。该技术最大的优点是不需要胰蛋白酶消化细胞,这样既保存了细胞与基质之间、细胞与细胞之间的链接蛋白,同时也保存了在培养细胞过程中细胞不断分泌的细胞外基质,以及其中的许多生长因子^[6-9]。

近年来,利用细胞膜片技术已经成功构建出了许多软组织,如角膜、皮肤、心肌、骨、软骨等软组织^[10],而用于构建硬组织例如骨组织却少有相关报道。2010 年 MA 等^[11]利用兔的 BMSCs 成功修复了兔颅骨缺损。基于此,本实验基于细胞膜片技术在体外将大鼠 BMSCs 向成骨细胞诱导,并在体外成功构建出了无支架骨组织,通过观察,该组织具有一定的厚度及弹性,能用镊子提起,虽然该膜片早期机械性能不够,不易塑性,但将其植入大鼠颅骨临界骨缺损,也能成功修复大鼠颅骨大部分缺损区域。本实验的成功为骨缺损提供了一条新的途径,该方法无需外支架,

避免了支架材料植入体内导致炎症反应和支架材料降解速率与骨组织形成速率不一致的支架材料降解不足等问题^[12-17],同时结合了细胞膜片技术的诸多优点,避免了传统方法将细胞消化后再依附于支架材料,导致细胞间细胞外基质及相应的生长因子的破坏^[18]。现该技术已经得到大量的研究,获得了长足的发展,但通过该技术生产的新生组织仍然存在着无神经细胞调节及血供不足,重塑新生骨较难操作等问题仍然需要进一步的研究^[19]。

综上所述,本实验的成功为将来利用人类自体 BMSCs 用于修复骨缺损提供了一个新的思路,同时也提供了有力的动物实验依据。

参考文献

- [1] TATSUMI K, OKANO T. Hepatocyte transplantation: cell sheet technology for liver cell transplantation [J]. Curr Transplant Rep, 2017, 4(3): 184-192.
- [2] KASAI Y, TAKEDA N, KOBAYASHI S, et al. Cellular events and behaviors after grafting of stratified squamous epithelial cell sheet onto a hydrated collagen gel [J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(5): 691-704.
- [3] MOSCHOURIS K, FIROOZI N, KANG Y. The application of cell sheet engineering in the vascularization of tissue regeneration [J]. Regen Med, 2016, 11(6): 559-570.
- [4] LU Y, ZHANG W, WANG J, et al. Recent ad-

- vances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration; from preparation to application[J]. *Int J Oral Sci*, 2019, 11(2):17-25.
- [5] EGAMI M, HARAGUCHI Y, SHIMIZU T, et al. Latest status of the clinical and industrial applications of cell sheet engineering and regenerative medicine[J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(1):96-106.
- [6] BUTLER M T, WALLINGFORD J B. Planar cell polarity in development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(6):375-388.
- [7] ITO M, SHICHINOHE H, HOUKIN K, et al. Application of cell sheet technology to bone marrow stromal cell transplantation for rat brain infarct[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(2):375-381.
- [8] KIEHART D P, CRAWFORD J M, ARISTOTELOUS A, et al. Cell sheet morphogenesis: dorsal closure in *Drosophila melanogaster* as a model system[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33:169-202.
- [9] KOBAYASHI J, AKIYAMA Y, YAMATO M, et al. Design of temperature-responsive cell culture surfaces for cell sheet-based regenerative therapy and 3D tissue fabrication[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1078:371-393.
- [10] TANG Z, OKANO T. Recent development of temperature-responsive surfaces and their application for cell sheet engineering[J]. *Regen Biomater*, 2014, 1(1):91-102.
- [11] MA D, REN L, CHEN F, et al. Reconstruction of rabbit critical-size calvarial defects using autologous bone marrow stromal cell sheet[J]. *Ann Plast Surg*, 2010, 65(2):259-265.
- [12] OKADA K, MIYATA T, SAWA Y. Insurance systems and reimbursement concerning research and development of regenerative medicine in Japan[J]. *Regen Med*, 2017, 12:179-186.
- [13] KOMAE H, ONO M, SHIMIZU T. Cell sheet-based vascularized myocardial tissue fabrication[J]. *Eur Surg Res*, 2018, 59(3):276-285.
- [14] LEE J, SHIN D, ROH J L. Development of an in vitro cell-sheet cancer model for chemotherapeutic screening[J]. *Theranostics*, 2018, 8(14):3964-3973.
- [15] LI M, MA J, GAO Y, et al. Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine[J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(1):3-16.
- [16] MOSCHOURIS K, FIROOZI N, KANG Y. The application of cell sheet engineering in the vascularization of tissue regeneration[J]. *Regen Med*, 2016, 11(6):559-570.
- [17] OKA M, MIYABE Y, SUGIURA N, et al. Cell sheet engineering and kidney diseases[J]. *Contrib Nephrol*, 2018, 195:74-80.
- [18] YANG J, ZHAO S, JI Y, et al. Cell sheet-based multilayered liver tumor models for anti-cancer drug screening[J]. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(2):427-435.
- [19] 项桦, 陈锐, 武姗, 等. 基于细胞膜片技术构建三维真皮样组织的体外研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2020, 34(1):116-123.

(收稿日期:2020-01-04 修回日期:2020-03-22)