

BMSCs与 PLGA 三维生物支架复合修复 喉软骨缺损的研究*

马林祥¹ 崔颖^{2**} 朱丽明¹ 潘欣宇¹ 王雪峰² 张本²

(1 辽宁医学院 锦州 121001 2 辽宁医学院附属第一医院 锦州 121001)

摘要 目的:探讨骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)与聚乳酸/羟基乙酸共聚物 (poly lactide-co-glycolide, PLGA)三维生物支架在软骨源性形态发生蛋白 1 (cartilage-derived morphogenetic protein 1, CDMP1)和转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)作用下向软骨细胞表型分化及体内修复喉软骨缺损的能力。方法:在体外高密度细胞悬液与 PLGA 共同构筑的三维立体培养体系下 CDMP1 和 (或) TGF- β_1 联合诱导 BMSCs 向软骨细胞分化,观察诱导后细胞表型的表达;将培养体系移植入动物体内,从大体、组织学方面观察其对喉软骨缺损的修复效果。结果:诱导后的培养体系可表达特异性软骨基质 型胶原和 GAG;将培养体系移植入动物体内,可有效地修复喉软骨缺损。结论:BMSCs 与 PLGA 三维生物支架在 CDMP1 和 TGF- β_1 作用下所得组织工程化软骨可以有效地修复喉软骨缺损。

关键词 软骨分化 骨髓间充质干细胞 软骨源性形态发生蛋白 1 转化生长因子- β_1 聚乳酸/羟基乙酸共聚物

中图分类号 Q819

创伤和疾病引起的头颈部软骨缺损的修复是临床耳鼻咽喉-头颈外科医师所面临的难题。多年来,人们在大量的动物实验和临床研究的基础上,应用自体、同种异体以及人工替代材料修复软骨缺损,取得了一定的疗效。然而移植软骨的来源限制,供区的再缺损,异体移植引发的排斥反应以及材料与机体难以很好融合等问题始终存在。组织工程技术的日益发展和成熟,为解决上述难题带来了希望。种子细胞、生物支架材料以及细胞生长因子是组织工程技术的基本要素。存在于骨髓基质中的 BMSCs,取材方便、增殖能力强,具有多向分化潜能,其作为种子细胞的巨大潜力受到组织工程学研究者的青睐^[1]。CDMP1 是骨形态发生蛋白家族中的新亚型,有特异的软骨诱导能力,可在异位诱导软骨形成^[2,3]。TGF- β_1 是软骨组织工程中常用的生

物活性因子,可以诱导 BMSCs 分化为软骨细胞,在组织工程修复软骨缺损的研究中具有重要的意义^[4]。PLGA 是目前组织工程中应用最广泛的支架。PLGA 为 PLA 和 PGA 按一定比例复合而成的人工合成生物支架,可以通过调节二者的比例来调控降解的时间和机械强度,以适应细胞生长的需要^[5]。本研究尝试 CDMP1 和 TGF- β_1 联合诱导 BMSCs 负载于 PLGA 上修复软骨缺损,对其修复效果做出初步评估,为耳鼻咽喉-头颈外科及相关科室遇到的软骨修复和功能重建提供新的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 本实验所需要的细胞来源于自然流产的 12~20 周胎儿。胎儿的使用均经孕妇同意。

1.1.2 主要试剂 DMEM、胎牛血清、青霉素、链霉素、胰酶、FITC 标记的 CD44、CD166 抗体、PE 标记的 CD34、CD45、CD90、HLA-DR 抗体、多聚赖氨酸均购自

收稿日期:2009-07-06 修回日期:2009-09-03

* 辽宁省自然科学基金项目 (20062198)、辽宁省教育厅创新团队项目计划 (2007T110)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:yingwu2002@163.com

Sigma公司 S-P试剂盒(福建迈新),鼠抗人型胶原单克隆抗体(福建迈新), PLGA(济南岱罡),淋巴细胞分离液(上海华精生物科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器 CO₂培养箱(德国 Heraeus),低速离心机(日本 KUBOTA)超净工作台(上海贺立),过滤器(PepcoTech),高压消毒锅(日本 HIRAYAMA),倒置显微镜(德国 LEICA),数码相机(日本 OLYMPUS), CCD成像系统(美国 CRD),超低温冰箱(日本三洋),组织切片机(德国莱卡),普通冰箱(海尔)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs的分离和培养 无菌条件下,取12~20周自然流产的胎儿股骨髓,过100目筛网,滤液转入离心管,用1.077g/ml淋巴细胞分离液进行密度梯度离心,2000r/min离心20min,取单个核细胞层,用无血清的L-DMEM洗涤细胞两次,2%苔盼兰染色,细胞计数,以 1×10^5 个/ml接种于培养瓶中。

1.2.2 倒置显微镜下观察细胞 用倒置显微镜观察细胞在不同培养时间的生长情况并绘制生长曲线。

1.2.3 细胞活率 苔盼兰及MTT法测定细胞活率。

1.2.4 细胞表面标志鉴定 流式细胞仪进行细胞表面标志的鉴定。

1.2.5 测定 PLGA 的孔隙结构和孔隙率 运用扫描电子显微镜观察 PLGA 的孔隙结构。用液体替代法测定 PLGA 孔隙率:取20ml烧杯装满水称重为W₁,样品重量为W_s,将样品放入水中,脱气,加满水称为W₂,取出样品后,剩余水+杯重为W₃。根据公式:孔隙率 = $(W_2 - W_3 - W_s) / (W_1 - W_3) \times 100\%$ 计算。

1.2.6 TGF- β_1 和(或)CDMP1定向诱导 BMSCs成软骨 调整第5代细胞浓度为 5×10^5 /ml,取12ml离心,去上清,等量不完全诱导液重悬,随机分为4组,每组3ml,向第一组加入TGF- β_1 至终浓度为10ng/ml;第二组加入CDMP1至终浓度为300ng/ml;第三组加入TGF- β_1 和CDMP1终浓度分别为10ng/ml和300ng/ml;第四组不加入生长因子。将各组所得的细胞悬液分别滴入PLGA,浸润6h后,徐徐加入完全诱导液(生长因子+H-DMEM+L-谷氨酰胺+牛血清白蛋白),每2~3天更换诱导液一次,共诱导21天。

1.2.7 细胞与 PLGA 复合物的观察 扫描电子显微镜观察细胞与 PLGA 复合物

1.2.8 TGF- β_1 与 CDMP1的定向诱导后细胞外基质的检测 冲洗诱导后细胞支架复合物,离心法收集洗脱

的细胞,使其形成小的细胞团,完全培养液继续培养一周,阿新蓝染色和免疫组织化学方法检测细胞蛋白多糖基质和型胶原的表达。

1.2.9 TGF- β_1 与 CDMP1定向诱导 BMSCs和 PLGA 修复软骨缺损的初步观察 取新西兰大白兔16只(2月龄,雌雄不限,体重1~1.2kg)。随机分为4组:组: TGF- β_1 组, n=4; 组: CDMP1组, n=4; 组: TGF- β_1 和 CDMP1组, n=4; 组:空白组, n=4。每只动物甲状软骨一侧做一0.5cm×0.5cm全层缺损,将4种细胞支架复合物分别植入到甲状软骨缺损处,术后常规喂养,第4周和第8周无痛处死动物,进行大体和组织切片观察。

2 结果

2.1 细胞培养

BMSCs接种时,其内血细胞混杂,成分不易分辨。3天后首次换液,可见贴壁细胞呈三角形、多角形或短梭形外观,在部分区域有细胞的小集落形成,数个至数十个细胞不等。8天后贴壁细胞体积增大,细胞形态基本一致,呈现典型的成纤维细胞形态。10~12天后贴壁细胞逐渐增多并连接成片,鱼群状排列。

传代培养细胞较原代细胞成份纯净,含较少混杂细胞。2天后大部分细胞已贴壁,细胞形态较舒展,4~5天可见细胞增殖,细胞呈现典型的长梭形,细胞数量增加,8~10天细胞长满瓶底。(图1)

2.2 苔盼兰及 MTT 法测定细胞活率

苔盼兰及 MTT 法测定细胞活率,原代为98%,第10代前细胞活率较好,达85%以上,第15代活率有所下降,至20代细胞活率只有75%。

2.3 流式细胞仪进行细胞表面标志的鉴定

从表1可以看出,无论是第5代还是第10代细胞,

表1 细胞表面标志鉴定

Table 1 Identification of cell surface markers

细胞代数	阳性	阴性
第5代	CD44, CD90, CD166	CD34, HLA-DR, CD45
第10代	CD44, CD90, CD166	CD34, HLA-DR, CD45
BMSCs (文献报道)	CD29, CD44, CD90, CD166, CD147	CD34, CD38, CD45, CD11a, CD14, HLA-DR

细胞的表面标志都是恒定的,这些表面标志的表达同文献报道的骨髓来源的 BMSCs 膜表面标志的表达,均不表达造血系统的标志 CD34、HLA-DR、CD45,而表达多种粘附分子的标志 CD44、CD90、CD166^[6](图2)。

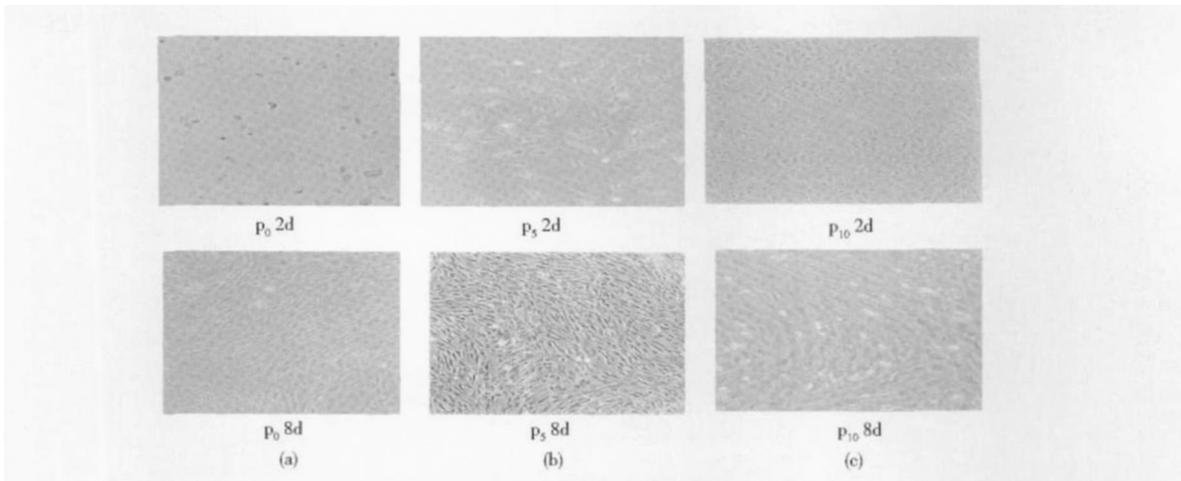


图 1 原代及传代后的细胞培养图片

Fig 1 Picture of BMSCs

(a) Primary culture (b) 5th generation (c) 10th generation

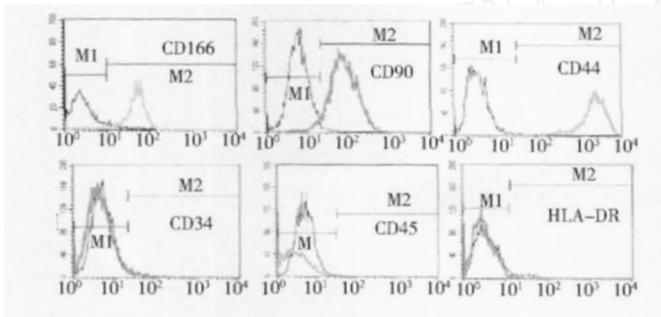


图 2 流式细胞仪鉴定

Fig 2 Identification of flow cytometry

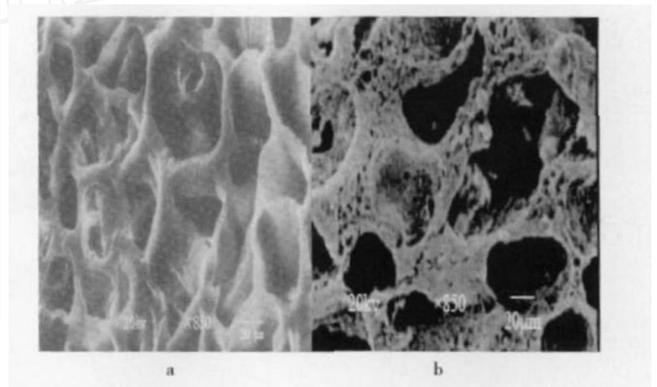


图 3 扫描电镜观察

Fig 3 SEM images

(a) Porous structure fabricated within the cross-section and the interior surface (b) Under the effect of CDMPI and TGF- β_1 , BMSCs

in the PLGA stent

2.4 测定 PLGA 的孔隙结构和孔隙率

扫描电子显微镜观察 PLGA 的孔隙结构,孔隙较多,孔与孔之间相互连通,孔隙直径大约为 60 ~ 160 μ m (图 3a)。

扫描电子显微镜观察诱导后 BMSCs 与 PLGA 复合物,观察诱导后细胞与 PLGA 的复合情况 (图 3b)。

液体替代法测定 PLGA 孔隙率为 90%。

2.5 诱导后 BMSCs 细胞外基质的检测

显微镜下观察,阿新蓝染色法和免疫组织化学方法检测细胞蛋白多糖基质和 I 型胶原的表达,第一、二、三组均呈阳性,第四组呈阴性 (图 4)。

2.6 组织工程化软骨在动物实验中观察

实验动物观察:实验动物无 1 例死亡,一般术后 1 天恢复进食,3 天进食、活动恢复正常;术后 1 周时,体重较术前有不同程度的减轻 (0.95 \pm 0.12),2 周时基本

恢复至术前水平 (1.14 \pm 0.11),4 周时均增加 (1.32 \pm 0.14)。颈部切口均为一期愈合,植入物无脱出,无异物及免疫排斥反应。

工程化软骨大体观察发现术后 4 周,第一、二、三组动物缺损处色泽淡红,新生组织和周围软骨基本平齐,与正常软骨组织间有明显的边界,其性状接近正常软骨;第四组,软骨缺损处,明显凹陷,呈鲜红色。术后 8 周第一、二、三组创面平整,呈白色,与正常软骨边界依然可见,但较四周时模糊;第四组,凹陷较四周时变浅,呈粉红色 (图 5)。

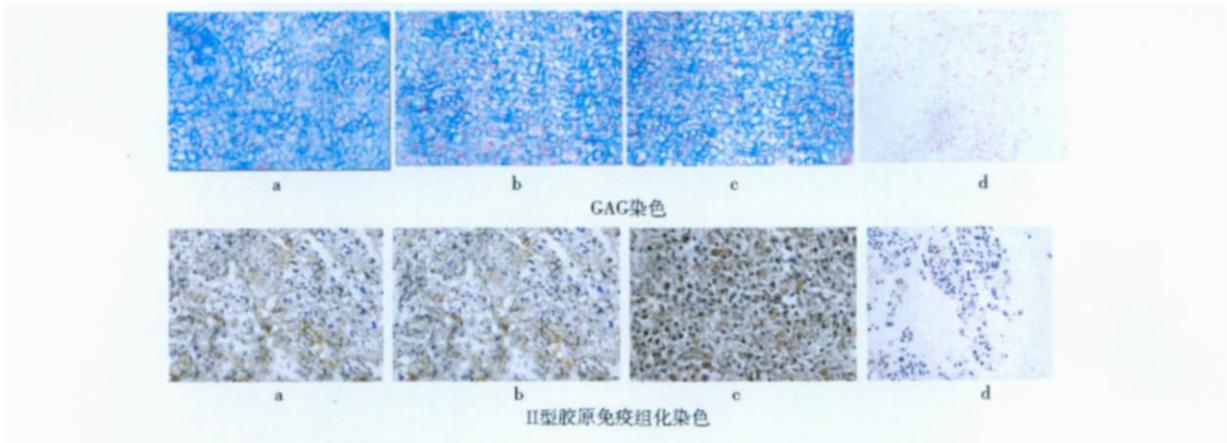


图 4 组织学检测

Fig 4 Histology examination

(a) TGF-₁ Group (b) CDMP1 Group (c) TGF-₁ and CDMP1 Group (d) Blank Group



图 5 实验动物观察

Fig 5 Observation of experimental animals

(a) preoperative (b) postoperative (c) 8 weeks after operation

组织切片观察:术后 4 周组织切片观察,软骨缺损区未见明显炎症反应,第三组缺损区新生组织 II 型胶原和 GAG 染色阳性;第一、二组上述染色为弱阳性,第四组上述染色为阴性。8 周时,第三组缺损区类软骨细胞形成, II 型胶原免疫组化和阿辛兰染色阳性,第一、二组染色为弱阳性,第四组染色为阴性。第四组缺损处基本为纤维结缔组织充填(图 6)。

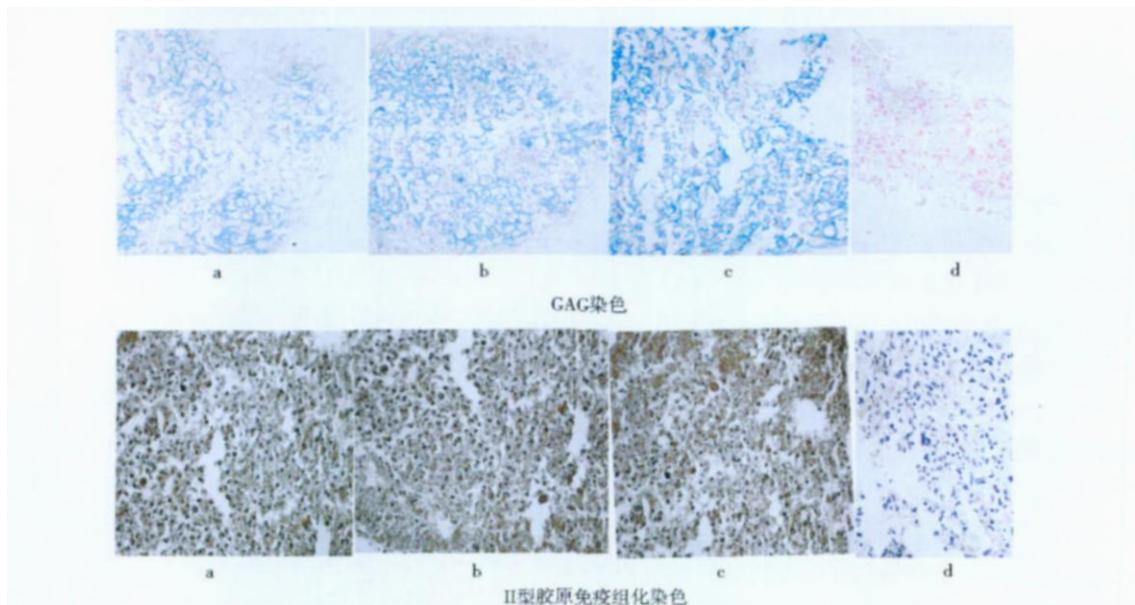


图 6 组织学检测

Fig 6 Histology examination

(a) TGF-₁ Group (b) CDMP1 Group (c) TGF-₁ and CDMP1 Group (d) Blank Group

3 讨论

软骨组织工程技术的发展,为最终解决临床所面临的软骨缺损的修复难题提供了新的思路和方法。软骨组织工程技术主要包括种子细胞、生物支架和生长因子三个基本因素^[7]。本研究主要探讨了后两个因素在 BMSCs 向软骨细胞分化及软骨组织修复中的作用,并对其修复效果做出初步的评价。

BMSCs 具有较强的增殖能力和多向分化潜能,其作为种子细胞有巨大潜力。国内外有关动物来源的 BMSCs 的研究已相当广泛,也取得了丰硕的研究成果,然而关于人体来源的 BMSCs 的研究较少,本实验研究人骨髓来源的 BMSCs,为进一步应用于临床作有益的探索。Bochev 认为:骨髓来源的 MSCs 与胎盘或新生儿其它组织来源的 MSCs 相比具有更好的分化为软骨组织的潜力^[8]。故本研究采用骨髓来源的 MSCs,即 BMSCs。

CDMP1 具有特异的软骨诱导能力,可在异位诱导软骨形成^[7]。TGF- β_1 可以诱导间充质细胞分化为软骨细胞,在组织工程修复软骨损伤的研究中具有重要的意义。本研究意在探讨二者联合作用能否提高 BMSCs 向软骨细胞分化的能力。

合成组织工程材料可以根据具体组织或器官的特点进行专门设计,其表面性能以及生物降解速率都可进行调节,且具有较好的力学和加工性能。合成组织工程材料的种类多、选择范围广,是组织工程材料的一个重要来源^[9,10]。PLGA 是目前组织工程中应用最广泛的支架。PLGA 为聚乳酸/羟基乙酸共聚物,在体内代谢为 CO₂ 和 H₂O,对人体无害。PLA 是一种无毒、无刺激性、具有良好生物相容性的支架材料、可生物降解吸收、强度高、可塑性,其降解半衰期约为 6~8 周,可以提供足够时长的支架作用。PGA 为一种生物相容性支架,易于参加体内的代谢,降解半衰期约为 2 周,由于降解速度过快,在工程化软骨尚未形成之前不能提供足够的支撑强度。二者复合而成的 PLGA 可以通过改变二者之间的比例,调控其机械强度和降解速度。

软骨细胞间质的化学成分主要包括胶原蛋白,蛋白多糖和少量的非胶原蛋白。软骨组织中的胶原主要为 I 型胶原,占胶原总量的 90% 以上。蛋白多糖是通过一个蛋白质核心连接的多糖类大分子聚集体。由一条长约 300 nm 的核心蛋白和 100 条以上的糖胺多糖 (GAG) 链通过共价键连接所构成。本实验中,4 周时第

三组缺损区新生组织 I 型胶原和 GAG 染色阳性;第一、二组上述染色为弱阳性,第四组上述染色为阴性;8 周时,第三组缺损区类软骨细胞形成, I 型胶原免疫组化和 GAG 染色阳性,第一、二组染色为弱阳性,第四组染色为阴性。第 8 周时第四组缺损处基本为纤维结缔组织充填。说明 TGF- β_1 与 CDMP1 都具有诱导 BMSCs 向软骨细胞分化的作用,并且在 CDMP1 和 TGF- β_1 联合诱导下 BMSCs 可以更好地向软骨细胞分化。

本实验中,术后 4 周,第一、二、三组动物缺损处色泽淡红,新生组织和周围软骨基本平齐,与正常软骨组织间有明显的边界,其性状接近正常软骨;第四组,软骨缺损处,明显凹陷,呈鲜红色。术后 8 周第一、二、三组创面平整,呈白色,与正常软骨边界依然可见,但较四周时模糊;第四组,凹陷较四周时变浅,呈粉红色。术后 4 周组织切片观察,软骨缺损区未见明显炎症反应,第三组缺损区新生组织 I 型胶原和 GAG 染色阳性;第一、二组上述染色为弱阳性,第四组上述染色为阴性。8 周时,第三组缺损区类软骨细胞形成, I 型胶原免疫组化和阿辛兰染色阳性,第一、二组染色为弱阳性,第四组染色为阴性。第四组缺损处基本为纤维结缔组织充填。修复的缺损处软骨性状接近正常软骨。说明在细胞悬液与生物工程支架构建的三维立体培养体系中,软骨细胞均能够较好地生长发育。

本实验证明, BMSCs 在 CDMP1 和 TGF- β_1 联合诱导下可以更好地向软骨细胞分化;分化所得软骨细胞与 PLGA 复合后可以有效地修复软骨缺损,为耳鼻咽喉头颈外科及相关部门遇到的软骨修复和功能重建提供新的途径和方法。

参考文献

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 (5411): 143~147
- [2] Eric Steck, Helge Bertram, Rainer Abel, et al. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 403~411
- [3] Bai X W, Xia Z F, Pan Y Q, et al. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 325 (2): 453~460
- [4] Cui Y, Wang H. Differentiation plasticity of human fetal articular chondrocytes. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 2006, 135 (1): 61~67

- [5] Francisco Amalich-Montiel, Silvia Pastor, Alejandro Blazquez-Martinez, et al Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma *Stem Cells*, 2008, 26: 570 ~ 579
- [6] Christian Elabd, Amelle Basillais, H  le Beaupied, et al Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis *Stem Cells*, 2008, 26: 2399 ~ 2407
- [7] Bartlett W, Gooding C R, Carrington R W J, et al Autologous chondrocyte implantation at the knee using a bilayer collagen membrane with bone graft *Journal of Bone and Joint Surgery*, 1987 (3): 330 ~ 332
- [8] Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, et al Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production *in vitro* *Cell Biology International*, 2008: 32 (4): 384 ~ 393
- [9] Quinn TM, Hunziker EB, Hauschmann H J. Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13 (8): 672 ~ 678
- [10] Ruzymah B H, Chua K, Latif M A, et al Formation of *in vivo* tissue engineered human hyaline cartilage in the shape of a trachea with internal support *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2005, 69 (11): 1489 ~ 1495

The Experimental Study of Repairing Laryngic Cartilage Defect by Transplanting the Compound of Bone Mesenchymal Stem Cells and PLGA Porous Foam Scaffolds

MA Lin-xiang¹ CUI Ying² ZHU Liming¹ PAN Xin-yu¹ WANG Xue-feng² ZHANG Ben²

(1 Department of Otolaryngology in Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

(2 Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

Abstract Objective: To evaluate the feasibility of repairing laryngic cartilage defect by mesenchymal stem cells and PLGA porous foam scaffolds under the effect of cartilage-derived morphogenetic protein 1 and transforming growth factor- β_1 by tissue engineering techniques Methods: *In vitro*, under the effect of CDMP1 and TGF- β_1 , BMSCs and PLGA porous foam scaffolds were cultured to investigate the expression of cartilaginous phenotype The histological staining for glycosaminoglycan using alcian blue dye-binding method and immunohistochemical staining of cartilage-specific protein collagen were used to identify chondrogenic differentiation of BMSCs Results: BMSCs cultured in the medium containing CDMP1 and TGF- β_1 expressed collagen and glycosaminoglycan Transplanted into the body, BMSCs-Biology stent can repair laryngic cartilage defects Conclusion: Under the effect of CDMP1 and TGF- β_1 , BMSCs-Biology stent can differentiate into the chondrogenic phenotype and can effectively repair laryngic cartilage defects

Key words Differentiation Bone marrow mesenchymal stem cells Bone morphogenetic proteins 1 Transforming growth factor- β_1 PLGA