

· 实验研究 ·

# 骨髓间质干细胞与 I 型胶原修饰的 PLGA 黏附性的观察

张利<sup>a</sup>, 查振刚<sup>a</sup>, 周长忍<sup>b</sup>, 姚平<sup>c</sup>, 吴昊<sup>a</sup>, 林宏生<sup>a</sup>, 杨淑野<sup>a</sup>, 王双利<sup>a</sup>

(暨南大学 a. 附属第一医院骨科; b. 理工学院生物材料研究室; c. 医学院生理教研室, 广州 510630)

**摘要:** [目的] 优化骨髓间质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 体外分离培养技术, 改良生物材料聚乙醇酸-乳酸共聚物 (poly lactide-co glycolide, PLGA) 的细胞黏附性, 观察 BMSCs 与 I 型胶原修饰的 PLGA 的黏附性。[方法] 密度梯度离心法分离 BMSCs, 流式细胞分析法 (FACS) 对细胞表面抗原、细胞活力、细胞周期进行检测, 相差显微镜观察细胞形态。相分离法制做 PLGA, I 型胶原进行表面修饰, 取第三代干细胞与 PLGA 附和, 扫描电镜观察细胞与材料的黏附情况。[结果] BMSCs 可在体外分离扩增, 表达 CD29、CD44 和 CD106, 不表达 CD34 和 CD45, 细胞活力为 88.96%, G0-G1 细胞占 90.32%。细胞形态为长梭形, I 型胶原表面修饰的 PLGA 平均孔径为 100 μm, 与 BMSCs 有较好的黏附性。[结论] BMSCs 可在体外长期、稳定培养, 是理想的组织工程种子细胞。

I 型胶原表面修饰的 PLGA 与干细胞有较好的黏附性, 可用来做组织工程生物材料。

**关键词:** 骨髓间质干细胞; PLGA; 组织工程

**中图分类号:** R687

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1005-8478 (2007) 20-1566-04

**Adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells cultured on PLGA modified with collagen** ZHANG Li, ZHA Zhen-gang, ZHOU Chang-ren, et al Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital, Guangzhou 510630, China

**Abstract:** [Objective] To explore a method for isolating and culturing bone marrow mesenchymal stem cell (BMSCs) in vitro, and improve the cellular conglutination ability of biomaterial poly-lactide-co-glycolic acid (PLGA), and observe the adhesion of BMSCs cultured on PLGA modified with collagen. [Method] BMSCs were isolated and cultured in vitro. The cell exterior antigen, cell livingness and cell cycle were analyzed by flow cytometry method, and cellular configuration was observed continually under inverted phase-contrast microscope. PLGA was made by phase separation, and was modified with collagen. The third era BMSCs were cultured on PLGA, and its adhesion with biomaterial was observed scan electron microscope. [Result] BMSCs could be isolated and cultured in vitro, and express CD29, CD44, CD106, but not express CD34, CD45. The cell livingness was 88.96%, cells in G0-G1 period are 90.32%. The cell morphology was spindle. The average diameter of PLGA modified with collagen was 100 μm, and PLGA has good adhesion with BMSCs. [Conclusion] BMSCs could be cultured stability in vitro for long time, and is good seminal cell of tissue engineering. collagen can improve the cellular adhesion of PLGA, PLGA modified with collagen is the good biomaterial of tissue engineering.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cell; PLGA; tissue engineering

组织工程修复受损组织的基本方法就是将种子细胞种植于生物支架材料上, 经体外培养一定时间后再植入体内达到

修复和重建受损组织的目的, 所以细胞与生物支架材料的黏附性就成了构建组织工程化组织和器官的关键问题之一。本研究将体外提纯, 扩增的 BMSCs 种植到经 I 型胶原修饰的 PLGA 材料上联合培养, 扫描电镜观察其黏附情况, 观察 I 型胶原修饰的 PLGA 材料的细胞亲和性, 探索以 BMSC 为种子细胞, 以 I 型胶原修饰的 PLGA 为生物支架材料构建组织工程的可行性, 为临床组织工程的应用研究提供理论和实验数据。

**基金项目:** 广东省科技攻关项目 (2006B60501009), 广州市科技资助项目 (2006Z3 - E5211)

**作者简介:** 张利 (1977 - ), 男, 山东省德州人, 在读硕士, 研究方向: 骨关节疾病及组织工程学研究, (电子信箱) zlb20540@163.com

**通讯作者:** 查振刚, 博士, 教授, 主任医师, (电话) 13352851863, (电子信箱) zhzg@tm.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

SD大鼠 (广东省动物中心); PLGA (济南迈康公司, 分子量 10万单位); 胎牛血清 (FBS)、淋巴细胞分离液 (天津 TBD 公司); DMEM (Dulbecco minimum essential medium) 干粉培养基、胰蛋白酶、型胶原 (Sigma 公司); 流式细胞仪 FACS Aria (美国 BD 公司); CD29FITC、CD44FITC、CD106PE、CD34PE 和 CD45FITC (AnceI 公司); PI (Sigma 公司); 扫描电镜 (日立公司, 日本)。

### 1.2 PLGA 的制备合成及扫描电镜观察

70 25 的 PLGA 溶解于二氧六环匀速搅拌 3 h, 溶液浇铸平皿上, -20 放置过夜, 放入质量比为 30 70 的酒精溶液中萃取 8 h, 连续 3 次, 将结块样品放入真空机冷冻干燥。制备成 10 mm × 10 mm × 5 mm 大小的样品, 将上述得到的样品 10 个放入含 5 mg 型胶原的 5 ml PBS 溶液中振荡混合 1 h, 入真空机冷冻干燥。质量法测定其孔隙率<sup>[1]</sup>。取小块 PLGA 材料, 固定于 2% 的戊二醛 24 h, 0.1 mol/L PBS (pH 7.2) 洗 3 次, 不同梯度酒精逐级干燥, 样品镀金, 电镜扫描。

### 1.3 BMSCs 的体外培养

1 个月龄 SD 大鼠, 脱颈处死, 取双侧股骨, 剔净软组织, 75% 酒精浸泡消毒 5 min, PBS 洗 2 次, 剪断股骨一端后, 用带 5 号针头的注射器将体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM (含 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素和 20 U/ml 肝素) 冲洗股骨髓腔, 取混合骨髓液 4 ml 缓慢注入事先准备好的含 6 ml 的淋巴细胞分离液的离心管内, 800 g 离心 20 min, 取出中间层的单核细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱静置培养。5 d 后首次换液, 以后每隔 3 d 换液, 长满后传代, 取 P<sub>3</sub> 细胞进行实验。

### 1.4 BMSCs 的形态学观察

原代及传代培养的细胞, 用倒置相差显微镜逐日观察细胞生长、增殖情况及形态特征。

### 1.5 BMSCs 的鉴定

FACS 检测 BMSCs 的表面抗原, 将对数生长期的 P<sub>4</sub> 细胞消化分离 (37, 3~5 min), 收集细胞制成 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞/ml 的细胞悬液。加入 500 μl 适当稀释度的 FITC 标记抗人 CD29、CD44、CD45 单克隆抗体, PE 标记抗人 CD34 和 CD106 单克隆抗体, 反应 30 min 后检测。

### 1.6 BMSCs 的生长曲线, 细胞周期及活力的检测

取 P<sub>1</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>5</sub> 的细胞以 10<sup>4</sup> 个细胞/ml 接种于 24 孔培养板内, 每天同一时间消化 3 孔计数, 连续计数 8 d 绘制生长曲线。收集 P<sub>3</sub> 细胞, 制成 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞/ml 的细胞悬液, FACS 对 BMSCs 的细胞活力和细胞周期进行检测。

### 1.7 BMSCs 与 型胶原修饰的 PLGA 复合

取 P<sub>3</sub> 细胞, 调整浓度为 10<sup>6</sup> 个细胞/ml。已制作好的支架材料经 <sup>60</sup>Co 消毒后用无菌 DMEM 培养基反复冲洗, 培养箱内晾干, 把 PLGA 放于 24 孔板的孔底, 滴加 100 μl 的细胞悬液, 培养 1 h 后翻转, 再在另一面滴加 100 μl 细胞悬液, 培养 1 h 后加培养基淹没整个基质材料, 每周换液 2 次, 体外培养 2 周, 分别在复合后 1、7、14 d 取材, 作扫描电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 型胶原修饰的 PLGA 扫描电镜观察

合成的复合 PLGA 为多孔的三维立体结构, 电镜扫描可见: PLGA 内部形成大小不一的大孔和互连的小孔, 彼此相互交通, 支架四处均可见白色的微小 型胶原颗粒 (图 1)。应用质量法测得的孔隙率为 90%, 孔径在 50~200 μm 之间, 平均孔径为 100 μm。

### 2.2 BMSCs 形态学观察

原代细胞的观察: 刚接种的细胞呈球形悬浮于培养液中, 8~10 h 开始逐渐沉降贴壁, 48 h 少数贴壁细胞呈成纤维细胞样外形, 3~5 d 贴壁细胞开始增殖呈克隆生长, 5~7 d 后部分细胞成细胞团簇, 细胞多为梭形, 胞核明显为卵圆形或圆形。可见 1~3 个核仁, 胞质丰富、胞浆清晰。原代培养 12 d 可长满瓶底。培养液中的渣滓随换液被逐渐清除。

传代细胞的观察: 传代后的细胞增殖迅速, 2~4 h 开始贴壁, 6~8 h 贴壁基本完全, 于 3 d 细胞数量开始明显增多, 5~6 d 可长满瓶底, 融合成片状, 细胞排列更加整齐, 细胞均匀分布, 生长较均匀一致, 杂细胞已较少 (图 2)。传 6 代以上的细胞可见胞体增大, 胞质稀薄, 细胞的增殖速度较以前已有所减慢。传至 9~10 代细胞已出现衰老死亡现象。

### 2.3 BMSCs 鉴定

流式细胞表面抗原标志, CD29 表达为 97.98%, CD106 表达为 63.38%, CD44 表达为 52.61%, CD34 表达为 0.66%, CD45 表达为 0.57% (图 3a、b、c)。

### 2.4 BMSCs 生长曲线, 细胞周期及活力的检测

2.4.1 生长曲线 P<sub>1</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>5</sub> BMSCs 在接种的 0~1 d 细胞处于潜伏期, 2 d 细胞开始增殖, 3 d 进入快速生长期, 从 5 d 开始进入平台期 (图 4)。

2.4.2 细胞周期及活力 FACS 检测 P<sub>3</sub> 细胞的活力为 88.96% (图 5), 细胞周期中 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>: 90.32%, G<sub>2</sub>-M: 8.03, S: 1.50%, G<sub>2</sub>/G<sub>1</sub>: 0.15 (图 6)。

### 2.5 BMSCs 与 型胶原修饰的 PLGA 复合及增殖

扫描电镜观察发现 BMSCs 复合到 型胶原修饰的 PLGA 支架后 2 d, 即在 PLGA 基质材料上黏附和伸展, 呈成纤维样细胞。7 d 时细胞数量已明显增多, 与支架材料结合较紧密 (图 7)。14 d 时, 细胞增殖, 相互间融合, 并有大量的细胞外基质分泌, 大部分材料颗粒被覆盖 (图 8、9)。

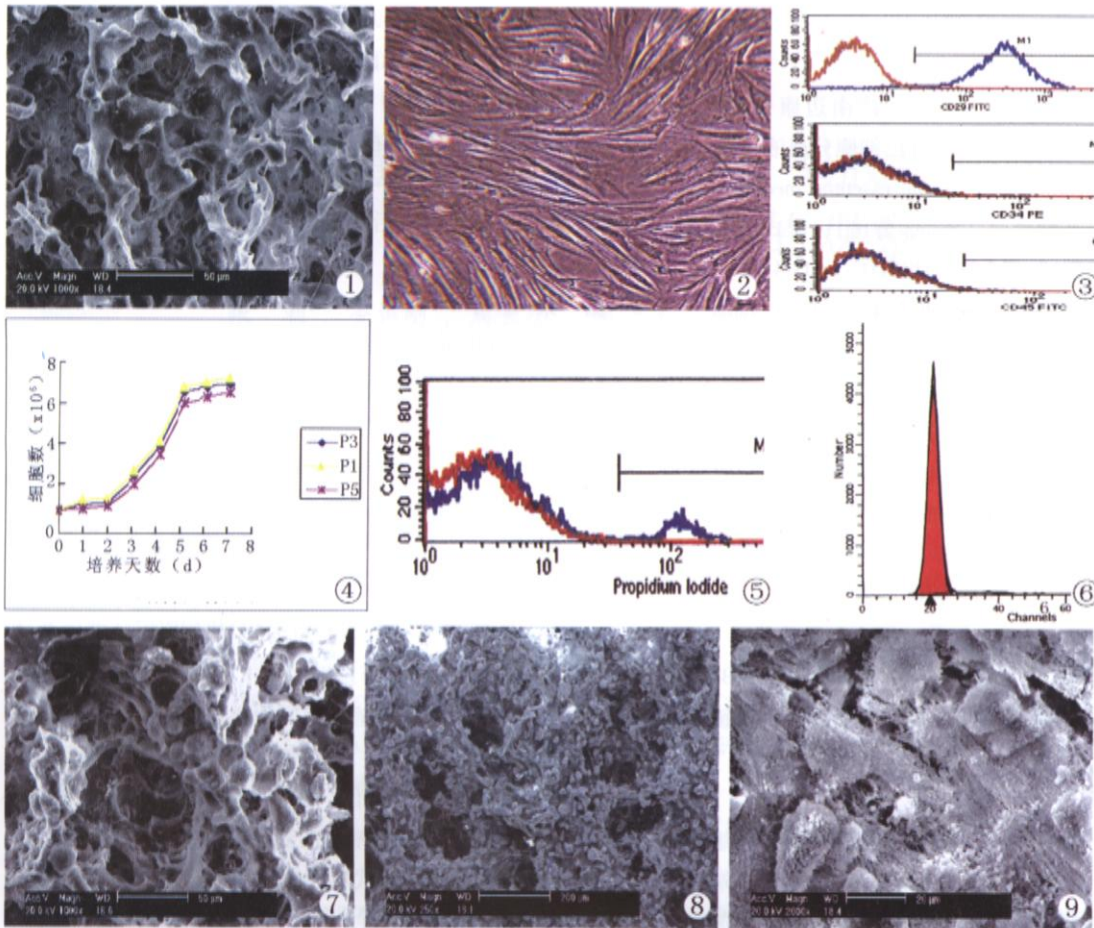


图 1 PLGA 电子显微镜扫描 (原放大倍数  $\times 1000$ )  
 图 2 原代培养 3 周, 细胞多呈梭形 (相差显微镜, 原放大倍数  $\times 100$ )  
 图 3 BMSCs 表面抗原 (a: CD29, b: CD34; c: CD45)  
 图 4 P<sub>1</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>5</sub> 细胞的生长曲线  
 图 5 BMSCs 的细胞活力  
 图 6 BMSCs 的细胞周期  
 图 7 BMSCs 附合 PLGA7d (原放大倍数  $\times 1000$ )  
 图 8 BMSCs 附合 PLGA 14 d (原放大倍数  $\times 250$ )  
 图 9 BMSCs 附合 PLGA14d (原放大倍数  $\times 2000$ )

### 3 讨论

骨基质材料是骨组织工程的关键构成要素。相对于不可降解的骨基质材料 (如 HA), 可降解的生物材料在植入体内后能最终被再生组织所取代, 无需 2 次手术取出, 成为临床上较为常用的骨替代品。PLGA 是乳酸和乙醇酸聚合而成, 是目前国内外常用的支架材料<sup>[2]</sup>, 其结构及亲水、疏水性可以通过两者的不同比例进行调节, 从而决定支架材料在体内的降解速率<sup>[3]</sup>, 它在体内降解的最终代谢产物为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O, 不在体内蓄积, 几乎没有毒副作用, 已被美国食品与药品管理局 (FDA) 批准用于缝线、暂时性支架和药物缓释载体<sup>[4]</sup>。胶原是一种软、硬组织工程经常使用的天然材料, 它可以增强细胞的黏附效果、避免反应物反应、增加生物的安全性, Hosokawa R<sup>[5]</sup> 等人已把胶原用来作为 bFGF、NGF、IGF- 等的载体, 并取得较好的结果。本实验用物理方法用型胶原修饰 PLGA, 增加它的细胞黏附性, 改良其生物活性, 本实验所制作的 PLGA 孔径在 50 ~ 200  $\mu\text{m}$  之间, 平均为 100  $\mu\text{m}$ , 完全符合 Yaylaoglu MB<sup>[6]</sup> 等人得出的结论 “支架材料的孔径略大于拟植入细胞的大小”。

BMSCs 是一种存在于骨髓网状间质内的非造血干细胞, 具有分化成各种间叶组织的功能。近年来研究表明 BMSCs 体外分离培养后, 在一定的诱导条件下具有向成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、脂肪细胞、心肌细胞、肝细胞等定向分化的能力<sup>[7]</sup>, BMSCs 为贴壁细胞, 它表面标志并非单一性, 它

表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志, BMSCs 能够不断自我复制而不分化, 在其增殖分化过程中表面标志不断变化。一般认为整合素家族成员 CD29, 黏附分子 CD44, CD106 等是 BMSCs 保持未分化状态时较为特异性的表面标志<sup>[8]</sup>, 虽然 BMSCs 与造血细胞共同存在于骨髓中, 但不表达造血系统的标志, 如 CD14、CD34 及白细胞共同抗原 CD45。本实验从骨髓中分离贴壁生长的 BMSCs, 流式细胞仪分析第 4 代 BMSCs 强表达 CD29, 表达 CD44 和 CD106, 而不表达 CD34、CD45, 证实其为 BMSCs 应用单核细胞分离液从骨髓中分离贴壁生长的 BMSCs 是一种经济、简单、有效的分离方法。本实验中分离所得的 BMSCs 在低糖 DMEM 培养基中扩增较迅速, 具有较强的增殖能力, 体外培养至第 8 代仍保持未分化状态, 为体外组织工程成骨提供了足够的准备时间。BMSCs 作为骨组织工程中首选的种子细胞, 具有取材方便, 增殖能力、成骨能力强<sup>[9]</sup>, 免疫原性弱<sup>[10,11]</sup>, 基因容易导入等优点, 在目前骨组织工程中应用非常普遍<sup>[12]</sup>。

细胞与基质材料的相互作用也是组织工程研究的主要领域, 其中细胞与材料的黏附是基础, 细胞必须与材料发生适当的黏附, 才能进行迁移、增殖和分化。实验结果表明: BMSCs 接种到支架材料上后 24 h 就已贴附、伸展。本实验通过扫描电镜观察发现: 复合 PLGA 支架上的 BMSCs 在 3 d 已牢固地附着于材料表面, 分泌胞外基质, 至复合后 14 d, BMSCs 增殖明显, 细胞和分泌的胞外基质已覆盖材料大部分颗粒, 提示 BMSCs 复合于 PLGA 后, 其黏附、增殖和分化特

性未受明显影响。

综上所述, 本实验采用相分离法合成 PLGA, 经型胶原修饰后其大体形态、微结构等方面都令人满意。BMSCs 在体外复合 PLGA 后, 通过形态学观察, 发现 BMSCs 可在型胶原修饰的 PLGA 表面良好附着、伸展、增殖, 分泌胞外基质, 因此本文认为复合材料 PLGA 对细胞生长和功能表达无抑制作用, 型胶原可明显增加生物材料的细胞黏附性, BMSCs 可以在经型胶原修饰的 PLGA 表面长期增殖生长。作者将进一步深入研究材料的机械强度、理化性质、移植细胞的寿命及定向分化等问题, 为下一步将要进行的体内移植应用打下基础。

#### 参考文献:

- [1] 邹静韵, 杨华, 徐瑞兴. 聚乙二醇/聚对苯二甲酸丁二醇酯多孔细胞支架的制备与表征 [J]. 首都医科大学学报, 2003, 24 (3): 234 - 236.
- [2] Mah J, Hung J, Wang J, et al. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects [J]. Eur J Orthod, 2004, 26 (5): 475 - 482.
- [3] Di Toro R, Betti V, Spampinato S. Biocompatibility and intermedicated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymers [J]. Eur Pharm Sci, 2004, 21 (2 - 3): 161 - 169.
- [4] Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, et al. Role of bone substitutes [J]. Clin Orthop, 1996, 324: 55 - 65.
- [5] Hosokawa R, Kikuzaki K, Kimoto T, et al. Controlled local application of basic fibroblast growth factor (PGF-2) accelerates the healing of GRR: an experimental study in beagle dogs [J]. J Clin Oral Implants Res, 2000, 11: 345 - 353.
- [6] Yaylaoglu MB, Yildiz C, Korkusuz F, et al. A novel osteochondral implant [J]. Biomaterials, 1999, 20 (16): 1513 - 1520.
- [7] Xu WR, Oian H, Zhu W, et al. A novel tumor cell line cloned from mutated human embryonic bone marrow mesenchymal stem cells [J]. J Oncology Reports, 2004, 12 (3): 501 - 505.
- [8] De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow [J]. J Immunol Lett, 2003, 89 (2 - 3): 267 - 270.
- [9] 李章华, 彭吴, 廖文等. 间充质干细胞体内成骨的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14 (6): 680 - 689.
- [10] 张晓玲, 戴冠戎, 汤亭亭等. 未分化骨髓间充质干细胞的免疫学特性研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23 (2): 135 - 137.
- [11] 窦强兵, 孔荣, 朱六龙, 等. 同种异体的间充质干细胞复合纤维蛋白修复骨缺损 [J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14 (10): 766 - 768.
- [12] Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitation and recent advances [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32 (1): 160 - 165.

(收稿: 2007-01-24 修回: 2007-05-10)

## · 新书推介 ·

### 内 容 提 要

随着导航技术的发展, 矫形外科和创伤骨科从一种依赖于三维图像和手术经验的外科技术转变为计算机介导的重建及损伤基础上的介入治疗。这些技术将逐渐被广泛应用。本书分 8 章, 讲解了导航技术概述, 导航技术在颈椎内固定手术、胸腰椎内固定技术、骨盆后环损伤、骨盆前环及髌臼损伤、髌骨骨折、膝部骨折、四肢骨折中的应用。适于骨科临床医师及专业研究人员学习参考。需要者请与人民军医出版社发行部联系: 北京市 100036 信箱 188 分箱, 邮编: 100036, 电话: (010) 66882586, 传真: (010) 68222916 或到当地新华书店购买。

