

[文章编号] 1000-1182(2011)04-0442-04

# 应用细胞片层技术构建功能性组织工程骨的动物实验研究

陈涛 王艳辉 卜令学 李宁毅

(青岛大学医学院附属医院 口腔颌面外科, 青岛 266003)

**[摘要]** 目的 细胞片层技术与传统的骨组织工程方法相结合构建功能性组织工程骨。方法 密度梯度离心法分离培养犬骨髓基质干细胞(BMSCs); 将向成骨细胞诱导后的BMSCs接种至温度反应性培养皿中, 37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养, 然后降温至20℃制备BMSCs细胞片层; 制备犬脱钙骨基质(DBM)及富血小板血浆(PRP); 将DBM/PRP/BMSCs细胞片层/BMSCs植入犬左侧背阔肌深面、右侧相应部位植入DBM/PRP/BMSCs, 观察其成骨效果。结果 当温度降至20℃时, BMSCs从温度反应性培养皿上完全脱落, 形成细胞片层, 将其覆盖于DBM/PRP/BMSCs, 其成骨效果优于不加细胞片层的组织工程骨。结论 细胞片层技术与传统的骨组织工程方法相结合可构建出较理想的功能性组织工程骨。

**[关键词]** 骨髓基质干细胞; 细胞片层技术; 组织工程骨

**[中图分类号]** R 782.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.04.027

**An animal experiment of construction of functional tissue-engineered bone with cell sheet technology** Chen Tao, Wang Yanhui, Bu Lingxue, Li Ningyi. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct functional tissue-engineered bone with cell sheet technology and method of traditional bone tissue engineering. **Methods** Canine bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) were isolated with the method of density gradient centrifugation and cultured. BMSCs were induced to differentiate into osteoblasts and cultured in temperature-responsive culture dishes at 37℃, 5%CO<sub>2</sub> and saturated humidity. BMSCs cell sheet was prepared when temperature was changed to 20℃. Demineralized bone matrix(DBM) and platelet-rich plasma(PRP) were prepared, and complex of DBM/PRP/BMSCs cell sheet/BMSCs was constructed and implanted under the left latissimus dorsi muscle. Complex of DBM/PRP/BMSCs was implanted under the right latissimus dorsi muscle. **Results** When temperature dropped at 20℃, BMSCs detached automatically from the temperature-responsive culture dishes and formed an intact cell sheet. The osteogenesis of the DBM/PRP/BMSCs cell sheet/BMSCs group was better than that of the DBM/PRP/BMSCs group. **Conclusion** Cell sheet technology combined with traditional bone tissue provides a new way for construction of ideal functional tissue-engineered bone.

**[Key words]** bone marrow mesenchymal stem cells; cell sheet technology; tissue-engineered bone

传统骨组织工程学广泛采用胰蛋白酶消化的方法收获和转移接种细胞, 造成了细胞的大量损失和细胞活性降低, 细胞利用率低, 难以形成致密的骨组织。因此, 研究解决具有较强生物活性种子细胞的收获和移植接种问题成为骨组织工程学发展的当务之急。本实验采用细胞片层技术(cell sheet technolo-

gy), 用温度反应性培养基的温度变化, 收获了完整的犬骨髓基质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)细胞片层, 以犬脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)为支架, 复合富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)后, 植入犬背阔肌下, 获得了较满意的功能性骨组织工程骨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康杂种犬(青岛大学医学院附属医院实验动物中心提供)12只, 体重20~25 kg。

1.1.2 主要仪器和试剂 DMEM低糖培养液(Gibico公

[收稿日期] 2010-08-09; [修回日期] 2011-03-21

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30872896); 山东省自然科学基金资助项目(Y2008C77)

[作者简介] 陈涛(1972—), 男, 山东人, 副教授, 硕士

[通讯作者] 李宁毅, Tel: 0532-82911875

司,美国);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(南京建成生物工程研究所);温度反应性培养皿(Nunc公司,日本)。健康杂种犬股骨(自备);低温离心机(Sigma公司,美国);倒置显微镜(Olympus公司,日本);JSM-840扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)(Jeol公司,日本);细胞培养箱(Thermo Forma公司,美国)。

## 1.2 方法

1.2.1 BMSCs分离、培养与向成骨细胞诱导 抽取犬骨髓10 mL,密度梯度离心法分离犬BMSCs,以每毫升 $1 \times 10^6$ 个的密度接种于50 mL培养瓶,加入10 mL低糖DMEM培养液,置入37℃恒温、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱内原代及传代培养。取第2代BMSCs,接种于高糖的DMEM成骨诱导培养基(含15%胎牛血清,50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  维生素C,10  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  地塞米松,10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\beta$ -甘油磷酸钠),继续培养。

1.2.2 BMSCs成骨检测 钙结节von Kossa染色。

1.2.3 BMSCs细胞片层的制备 将第4代成骨诱导后的BMSCs,以每毫升 $1 \times 10^6$ 个细胞的密度接种于直径为3.5 cm的温度反应性培养皿中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内培养。培养皿内的BMSCs增殖融合达90%左右时,将其置于20℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内培养20 min,细胞片层脱落后,倒置显微镜下行形态学观察。

1.2.4 犬DBM的制备 去除新鲜杂种犬股骨的软组织、骨膜,-80℃超低温冰箱冷冻6个月,脱脂、脱钙、脱非胶原蛋白,冷冻干燥机冷冻干燥,制备2 cm×2 cm×5 mm大小的犬同种异体DBM。

1.2.5 PRP的制备和激活 PRP在手术的过程中同时制备装有4.2 mL ACD-A抗凝剂的50 mL无菌空针,自股静脉分别抽取30 mL血液,于4℃2次离心。第1次离心(2 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ )15 min,吸取全部上清液及交界下1~2 mm的红细胞至另一离心管,再次离心(4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ )10 min,血小板和少量红细胞沉淀在离心管底部。弃大部分上清液,剩余液体1 mL,即为PRP。1 mL PRP加入凝血酶200  $\mu\text{L}$ 激活,轻轻摇匀,约10 s,PRP凝成胶状物,将其包裹DBM/BMSCs复合体。

1.2.6 BMSC/BMSCs细胞片层/DBM/PRP复合体的构建 体内植入前24 h,消化BMSCs,将其悬液缓慢滴于DBM,至DBM完全浸透,置于37℃恒温、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内培养24 h,植入体内前,将PRP与制备的细胞片层刮取,轻轻铺盖于DBM表面,以备植入体内。

1.2.7 复合体的植入 实验犬氯胺酮20  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌注行基础麻醉后。双侧背部脱毛备皮消毒,弧形切口

依次切开皮肤、浅筋膜,向外侧翻其皮瓣,寻找背阔肌前缘,在背阔肌深面寻找并解剖分离出胸背动静脉束,在其周围左侧植入DBM/PRP/BMSCs细胞片层/BMSCs、右侧植入DBM/PRP/BMSCs,逐层关闭切口。术后1周内每日肌注青霉素200万,常规喂养高蛋白饲料,术后14 d拆线。分别于4、8、12周各处死2只犬,行大体观察及组织学检查。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态学观察

原代培养BMSCs,24 h可见少量细胞贴壁,贴壁细胞呈多角形、椭圆形或多形性生长;72 h可见多数细胞伸展贴壁;第7天可见细胞集落形成,呈漩涡状或辐射状生长(图1);第12天细胞完全融合,呈漩涡状,细胞界限不清,多为长梭形。

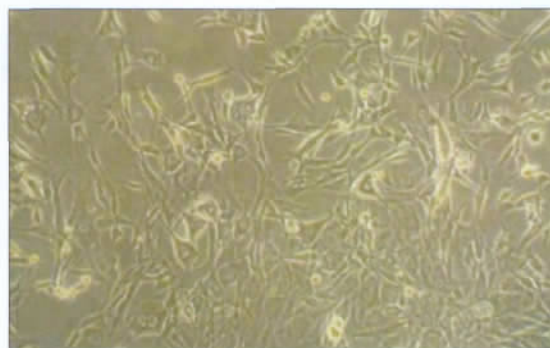


图1 原代培养第7天的BMSCs 倒置显微镜 ×100

Fig 1 BMSCs at 7 d after primary culture inverted microscope ×100

成骨诱导后的BMSCs增殖明显变缓慢,诱导第7天的细胞形态由长梭形向多角形、方形转化,细胞突起缩短。BMSCs成骨诱导21~28 d后,形成明显的圆形或卵圆形肉眼可见的钙化结节。von Kossa染色为黑色结节状(图2)。

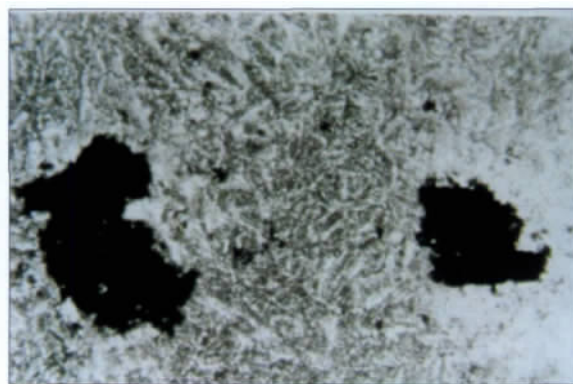


图2 在BMSCs密集区出现大面积黑染区域 von Kossa染色 ×250

Fig 2 A large area of black region in BMSCs density area von Kossa staining ×250

将温度反应性培养皿中诱导第7天的BMSCs,置于20℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养,细胞逐



步从培养皿底分离,20 min时细胞与细胞外基质一起脱落形成完整的细胞片层。倒置显微镜下见细胞形态发生变化,呈短梭形或多形性,界限不清(图3)。培养皿的细胞逐渐收缩,从皿底脱落形成一层致密的细胞片层。将形成的细胞片层接种至支架表面后培养1周,SEM下可见支架被细胞片层包裹,与支架附着良好。

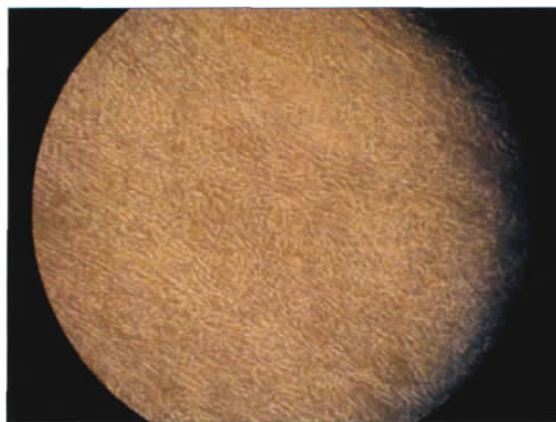


图3 BMSCs细胞片层形成后,细胞呈短梭形或多形性,界限不清 倒置显微镜  $\times 100$

Fig 3 BMSCs presenting short or spindle shape and unclear boundary in the cell sheet inverted microscope  $\times 100$

## 2.2 成骨组织学观察

复合体植入犬背阔肌术后4周,实验侧:成骨活跃,骨小梁周围有较多骨母细胞,小梁间毛细血管较多。对照侧:成骨稀少,血管少,骨小梁间纤维化。复合体植入犬背阔肌术后8周,实验侧:骨小梁粗大,成骨细胞活跃,小梁间毛细血管丰富,有新鲜纤维化。对照侧:骨小梁较粗大,小梁间血管较丰富,纤维化较明显。复合体植入犬背阔肌术后12周,实验侧:骨小梁规则、粗大,密度高,成熟骨小梁间纤维组织较少,血管密度减少(图4)。对照侧:骨小梁较少,血管较丰富,纤维化较明显(图5)。

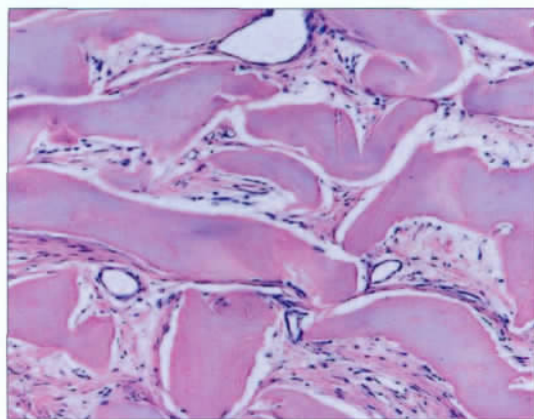


图4 12周实验侧:骨小梁规则、粗大,密度高,成熟骨小梁间纤维组织较少,血管密度减少 HE  $\times 100$

Fig 4 Experimental side of 12 weeks: Lots of thick and regular trabeculae, a few fibrous tissue and blood vessel among the mature bone trabecula HE  $\times 100$

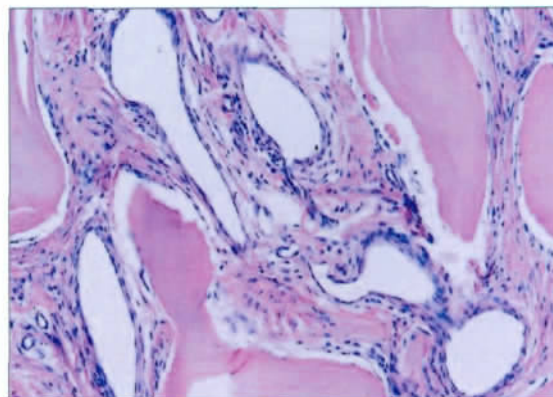


图5 12周对照侧:骨小梁较少,血管较丰富,纤维化较明显 HE  $\times 100$

Fig 5 Control side of 12 weeks: Less bone trabecula, rich blood vessels and lots of fibration exists HE  $\times 100$

## 3 讨论

细胞片层技术是医学组织工程中获取种子细胞以及对种子细胞进行转移的一项新技术。其将温度反应性聚合物共价结合到普通培养皿表面形成温度反应性的培养皿<sup>[1-2]</sup>。在37℃培养基的表面呈疏水性,细胞可在温度反应性培养皿表面附着、扩展和增殖。当温度降至临界温度(32℃)以下,聚合物表面则变为亲水性,并在培养皿表面和培养细胞之间形成水化层,细胞无需胰蛋白酶的消化作用便可自动从培养皿表面分离。经细胞片层技术收获的细胞含有细胞外基质的一层完整的片状结构,其含有离子通道、生长因子受体和连接蛋白等重要的细胞表面蛋白<sup>[3-4]</sup>。所以,应用细胞片层技术构建的组织结构更接近于正常的功能性组织。目前细胞片层技术已经应用于构建各种组织和器官,如构建牙周韧带、皮肤、角膜上皮和膀胱上皮等组织<sup>[5]</sup>;构建心肌、平滑肌、肾小球和肝小叶及构建骨等三维结构组织<sup>[6]</sup>。

本实验采用细胞片层技术与传统支架塑形方法相结合构建组织工程骨。BMSCs向成骨细胞诱导分化后制备BMSCs细胞片层。扫描电镜下可见通过细胞片层技术收获的BMSCs是含有细胞外基质的一层完整的片状结构。BMSCs片层保留了如离子通道、连接蛋白等重要的细胞表面蛋白,因此细胞间可以更好地进行信号传递,从而保持其功能的协调一致性<sup>[3]</sup>。BMSCs片层中的细胞排列致密,类似自然骨质形成过程中成骨细胞的排列状态,同时细胞片层收缩产生的应力对BMSCs的极化排列有一定的调节作用<sup>[7]</sup>。随着细胞周围矿物质的沉积和钙化,可形成类似板层状骨的组织结构。将形成的单层或多层BMSCs片层包裹可生物降解的支架材料后植入受区后,有望形成类似板层骨结构的功能性组织工程骨。

本实验制备的DBM由胶原网架构成,空隙大小

较一致。电镜观测表明:DBM为三维立体网孔结构,其孔隙率约为70%。这种三维立体网孔结构能为细胞黏附、增殖提供足够大的表面积,有利于其中血管的生成和成骨组织的营养代谢。PRP是通过离心自体全血而得到的血小板浓缩物,经凝血酶和氯化钙激活后,其中的血小板 $\alpha$ -颗粒膜蛋白释放出血小板衍生生长因子、转化生长因子- $\beta$ 、血管内皮生长因子、上皮生长因子、胰岛素样生长因子等生长因子。经酶联免疫吸附实验证实,PRP中除了胰岛素样生长因子以外,其余4种生长因子的浓度约为体内血液中正常浓度的3~8倍。并且PRP制备简便、快捷、价格低廉、对患者损伤小,无免疫排斥,不会传播疾病,许多研究证明PRP中的多种生长因子具有促进骨再生和血管生成的重要作用<sup>[8]</sup>。

本研究应用细胞片层技术收获和转移BMSCs,避免了胰酶消化法对细胞造成的损伤,并且保留了大量的细胞外基质,大大提高了细胞的利用率和转移细胞的生物活性。应用细胞片层技术与传统的骨组织工程方法相结合,构建出较好的功能性组织工程骨。但这仅仅是初步研究,有望通过进一步深入研究,制备出类似板层骨结构的具有持续自体生长活力的功能性组织工程骨。

#### [参考文献]

- [1] Yan H, Tsujii K. Thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide) gel containing polymeric surfactant poly(2-(methacryloyloxy)de-

- cylphosphate): Correlation between rapid collapsing characters and micelles of polymeric surfactant[J]. J Oleo Sci, 2008, 57(7): 401-405.
- [2] Yamada N, Okano T, Sakai H, et al. Thermo-responsive polymeric surfaces: Control of attachment and detachment of cultured cells[J]. Makromol Chem Rapid Commun, 1990, 11: 571-576.
- [3] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction[J]. Biomaterials, 2003, 24(13): 2309-2316.
- [4] 荆恒, 李宁毅, 谭帅, 等. 骨髓基质干细胞的体外培养及其细胞片层制备[J]. 国际口腔医学杂志, 2010, 37(3): 272-274.
- Jing Heng, Li Ningyi, Tan Shuai, et al. Culture *in vitro* and the fabrication of cell sheet for bone marrow stem cells[J]. Int J Stomatol, 2010, 37(3): 272-274.
- [5] Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface[J]. Transplantation, 2004, 77(3): 379-385.
- [6] Gao Z, Chen F, Zhang J, et al. Vitalisation of tubular coral scaffolds with cell sheets for regeneration of long bones: A preliminary study in nude mice[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2009, 47(2): 116-122.
- [7] Yang J, Yamato M, Nishida K, et al. Cell delivery in regenerative medicine: The cell sheet engineering approach[J]. J Control Release, 2006, 116(2): 193-203.
- [8] Li NY, Yuan RT, Chen T, et al. Effect of platelet-rich plasma and latissimus dorsi muscle flap on osteogenesis and vascularization of tissue-engineered bone in dogs[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2009, 67(9): 1850-1858.

(本文编辑 汤亚玲)

## N-Cements——义获嘉伟瓦登特公司推出全新的树脂基粘接类水门汀系列产品

义获嘉伟瓦登特公司在2010年9月推出了自粘接树脂水门汀Multilink Speed,自此,N-Cements的全线产品全面推向中国市场。N-Cements的所有产品均基于义获嘉伟瓦登特公司在欧美市场获得成功的树脂水门汀产品开发而来,以合理的价格、卓越的粘接强度与美学效果为中国的牙医师提供完备的产品与服务。

Variolink N是一种多功能美学粘接系统,光-双固化设计,可以多种颜色选择,为美学修复体提供了强大地粘接支持。套装内包含经典的Syntac粘接系统,在确保粘接水门汀颜色稳定的同时提供了足够的粘接强度,确保无固位形修复体的永久粘接固位。Variolink N适用于粘接由玻璃陶瓷、二矽酸锂、树脂制成的美学修复体(贴面、嵌体、前牙单冠等)。

Multilink N是一种通用型高强度、自酸蚀、自固化树脂粘接水门汀,配合全瓷/树脂处理液(Monobond-S)及金属/氧化锆处理液(Metal/Zirconia Primer)使用,可用于粘接各种不同材料制成的各类修复体,包括金属、烤瓷、玻璃陶瓷、二矽酸锂、氧化锆陶瓷、烤塑等修复体,表现出强大持久的粘接强度并具有广泛的临床适应范围。

Multilink Speed是一种通用型自粘接、自固化树脂水门汀。由于特殊添加的义获嘉伟瓦登特公司革命性酸性单体MDP,Multilink Speed能直接与牙体硬组织产生强大的化学粘接力。Multilink Speed使用方法快捷简便,有效地减少临床步骤,节约操作时间,适用于所有高强度修复体,如二矽酸锂、氧化物陶瓷、金属、烤瓷、烤塑等修复体。

义获嘉伟瓦登特公司