

海绵状的小肠粘膜下层促进成骨样细胞增殖分化

房艳¹ 倪伟民^{2*} 单伟¹ 曾瑞霞¹ 刘学元¹

(1 辽宁医学院基础医学院 锦州 121000 2 辽宁医学院附属第一医院 锦州 121000)

摘要 目的:观察人脂肪干细胞(hADSCs)诱导分化的成骨样细胞在海绵状的猪小肠粘膜下层(SIS)表面的生长情况,探讨三维立体海绵状的SIS能否促进成骨样细胞的增殖和分化。方法:采用物理和化学结合的方法将猪近段空肠制备成脱细胞的SIS,再将薄膜状的SIS经液氮低温研磨制成微粒,交联后采用冷冻干燥技术重塑形为海绵状的SIS;原代培养hADSCs,流式术检测表面抗原,诱导其成骨、成软骨、成脂分化并染色鉴定;将诱导的成骨样细胞与海绵状SIS复合培养,扫描电镜观察细胞形态;应用SIS材料浸提液培养成骨样细胞,MTT法检测细胞增殖情况,ALP活度检测成骨分化情况。结果:脱细胞的SIS未见有核物质,海绵状的SIS呈三维立体状,具有大量均匀一致的孔隙;原代培养的hADSCs表达干细胞相关抗原,并可分化为成骨样细胞,茜素红将钙结节染成紫红色。成骨样细胞与海绵状SIS复合培养后,细胞生长旺盛增殖能力强,ALP表达量明显增加。结论:海绵状的SIS具有均匀的三维孔隙,细胞相容性好,能明显促进hADSCs来源的成骨样细胞的增殖及成骨分化,可成为骨组织工程新型的三维立体天然生物衍生材料。

关键词 小肠粘膜下层 成骨样细胞 支架材料 增殖分化

中图分类号 R318.08

经脱细胞处理的小肠粘膜下层(small intestinal submucosa, SIS)是天然细胞外基质生物衍生材料,具有和人细胞外基质非常接近的网架结构,主要由胶原、糖蛋白、蛋白多糖等组成,含有多种生长因子,能促进细胞的生长和分化^[1]。

脱细胞的SIS为半透明的薄膜,研究表明SIS能成功促进神经、血管、膀胱和尿道等膜性结构的修复和再生^[2-4]。SIS在骨组织工程中的应用主要在构建组织工程骨膜或修复颅盖骨等扁骨组织,修复效果较理想^[5]。但在长骨损伤导致大块骨质缺损时,薄膜状的SIS缺少足够的体积及力学支撑,很难达到良好的修复治疗效果。将薄膜状SIS按需制成具有一定体积和厚度的支架材料意义重大。

本课题组已成功将薄膜状的SIS制成微粒,再经交联冷冻干燥按模具制成海绵状SIS。但其是否仍具有良好的组织相容性,能否促进干细胞的成骨分化及成

骨样细胞的生长增殖尚无定论。因此,本实验拟原代培养人脂肪干细胞(human adipose derived stem cell, hADSCs),并诱导分化为成骨样细胞,在体外与海绵状SIS材料复合培养,评价细胞生长增殖及成骨分化能力,为骨组织工程提供新型的海绵状SIS生物支架材料。

1 材料与方法

1.1 组织来源和试剂

猪新鲜近段空肠由锦州市肉联加工厂提供。脂肪组织来自4例行腹部脂肪抽吸术的健康成年女性,无传染病和内分泌疾病。术前签署知情同意书,实验经医学伦理委员会批准。

L-DMEM、H-DMEM、胎牛血清、NaN₃、EDTA(Gibco),胰蛋白酶、 β -甘油磷酸钠(Sigma),碱性磷酸酶染色试剂盒、ALP活度检测试剂盒(凯基生物),CD29-PE、CD31-PE、CD34-PE、CD90-PE、CD73-PE、CD105-PE抗人单克隆抗体(eBioscience)。

1.2 hADSCs的原代培养及鉴定

1.2.1 原代培养hADSCs 取成人吸脂术后的脂肪组

收稿日期:2013-01-29 修回日期:2013-03-22

* 通讯作者,电子邮箱:lnyxynwm@163.com

织, PBS 冲洗去除血液, 0.1% I 型胶原酶消化 1h, L-DMEM(含 10% 胎牛血清)终止消化, 800g 离心 5min, 弃上清, L-DMEM 重悬沉淀, 200 目滤网过滤, 3ml L-DMEM 混匀沉淀移入培养瓶, 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 每 3 天换液。

1.2.2 流式术检测 hADSCs 表面抗原 取 P3 的 hADSCs, 将密度为 1×10^6 /ml 的细胞悬液移入 EP 管, 每管分别加入 CD29、CD31、CD34、CD90、CD73、CD105 抗体各 20 μ l, 避光孵育 30 min, PBS 洗涤以去除未结合的抗体, 离心后加 PBS, 流式细胞仪检测。

1.2.3 hADSCs 向骨、软骨、脂肪的诱导分化 取 P3 的 hADSCs, 以 0.5×10^5 /孔的细胞悬液接种于铺有盖玻片的六孔板。待细胞达 90% 融合时更换诱导培养液(成骨诱导培养液: 含 10% FBS 的 H-DMEM、10mmol/L 的 β -甘油磷酸钠、 10^{-7} mol/L 地塞米松、5mg/L 抗坏血酸; 成软骨诱导培养液: 含 10% FBS 的 H-DMEM、 10^{-7} mol/L 地塞米松、37.5mg/L 抗坏血酸、1 μ mol/L 胰岛素、10 μ g/L TGF- β 1; 成脂诱导培养液: 含 10% FBS 的 H-DMEM、0.5mmol/L 的异丁基甲基黄嘌呤、 10^{-7} mol/L 地塞米松、10 μ mol/L 胰岛素和 200 μ mol/L 吡啶美辛)。37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 每 3 天换液。当诱导后细胞达 90% 融合时, 4% 多聚甲醛固定, PBS 漂洗。4w 时分别行茜素红、甲苯胺蓝和油红 O 染色, 光学显微镜观察。

1.3 海绵状小肠粘膜下层的制备

按 Abraham 等^[6]的方法制备 SIS, 物理方法处理, 取猪的新鲜近段空肠, 挑选管腔粗细均匀、管壁无破损、无淋巴结的部位, 剪成 10cm 肠段。用 40℃ 去离子水反复冲洗, 采用机械法刮除粘膜层、浆膜层和肌层组织。顺序化学浸泡脱细胞法, 100mmol/L EDTA 和 10mmol/L NaOH 的溶液浸泡 16h, 1mmol/L HCl 和 1mmol/L NaCl 的溶液浸泡 6~8h, 1mmol/L NaCl 的 PBS 浸泡 16h, PBS 浸泡 2h, 在含 0.1% C₂H₂O₃ 的 20% 乙醇溶液中浸泡 8h, 用含 0.05% NaN₃ 的 PBS 清洗 2h, 期间用去离子水反复冲洗。将化学法处理好的 SIS 在液氮中反复研磨成均匀一致的颗粒, 以 1:1 比例加入 PBS 常温调至糊状, 加入水溶性的交联剂。将悬浊液移入模具, 置于冷冻干燥机中(-50℃, 真空度 < 7 Pa) 20 h, 即可制得成型的“海绵状 SIS”支架材料, 分装密封, 环氧乙烷消毒备用。苏木素-伊红染色, 光学显微镜观察。2.5% 戊二醛固定, 脱水, 醋酸异戊酯置换, 二氧化碳临界点干燥, 真空喷金, 扫描电镜观察。

1.4 成骨样细胞与海绵状 SIS 材料的复合培养

将消毒待用的海绵状 SIS 支架材料置于 24 孔培养板中, 制备诱导后的成骨样细胞(浓度为 2×10^5 /ml)的细胞悬液接种至材料, 37℃、5% CO₂ 的孵箱内培养。复合培养 72h 后, 行戊二醛固定, 洗涤, 脱水, CO₂ 临界点干燥、喷金后, 扫描电子显微镜观察材料表面的细胞形态。

1.5 制备 SIS 支架材料浸提液

参照 GB/T16886.12-2000 所规定的浸提液制备方法, 无菌条件下, 以材料表面积/浸提介质为 3cm²/ml 的比例, 加入成骨诱导培养液至盛有 SIS 支架材料的容器中。置于 37℃、5% CO₂ 的孵箱中孵育 24h 后提取容器中的液体, 即为浸提液, 应用此浸提液培养成骨样细胞。

1.6 MTT 法检测浸提液对成骨样细胞增殖能力的影响

制备浓度为 1×10^4 /ml 的成骨样细胞悬液, 接种至 96 孔板, 培养 24h 后更换为浸提液, 对照组加入普通的成骨诱导培养液, 分别培养 1、2、3、4、5d 后, 每孔加入 20 μ l MTT(5mg/ml), 37℃ 孵育 4h, 吸弃浸提液, 每孔加 DMSO 150 μ l, 震荡 10min, 选择 570nm 波长测定各孔的光吸收值(OD 值)。以时间为横轴, 光吸收值为纵轴绘制细胞增殖曲线。

1.7 检测浸提液对成骨样细胞 ALP 活度的影响

制备浓度为 1×10^5 /ml 的成骨样细胞悬液, 接种至 6 孔板, 培养 24h 后, 更换为浸提液, 对照组加入普通的成骨诱导培养液, 分别培养 1、3、5、7d 后, 胰酶消化制成单细胞悬液, 超声粉碎细胞, 按 ALP 活度检测试剂盒说明书进行碱性磷酸酶活度的检测。

1.8 统计学分析

所有数据均用均数 \pm 标准差表示, 用 SPSS13.0 软件, 采用 One-way ANOVA 进行数据分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 hADSCs 的形态及表面抗原表达

原代培养的 hADSCs 呈长梭形, 呈涡轮状紧密排列(图 1a)。传代培养后细胞生长速度快, 增殖能力强。流式细胞术分析显示, hADSCs 高表达间充质干细胞相关标志物 CD90、CD29、CD73、CD105; 不表达 CD31、CD34, 表明该细胞具有间充质干细胞特性, 但不含于内皮细胞、造血细胞等其他类型的细胞成分(图 1b)。

2.2 hADSCs 的诱导分化结果

hADSCs 成骨诱导培养后, 逐渐变成多角形, 聚集成钙化结节(图 2A)。4w 时行茜素红染色, 矿化结

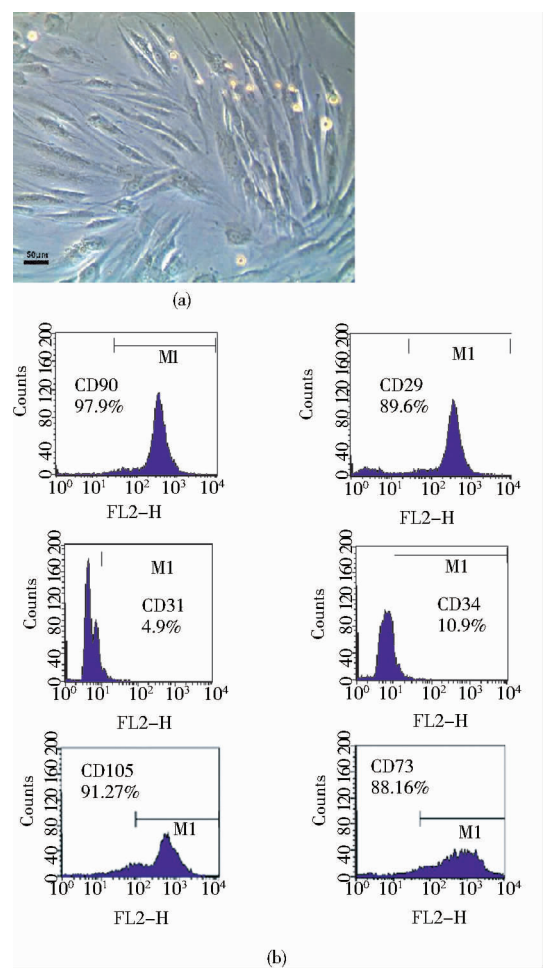


图1 原代培养的人脂肪干细胞
Fig.1 Primary cultured hADSCs

(a) Phase contrast microscope, $\times 100$
(b) The expression of surface antigen hADSCs

节呈阳性,细胞间可见被染成红色的矿化结节(图2B)。证实 hADSCs 经成骨诱导后可分化为成骨样细胞,具有成骨细胞的形态和特性。hADSCs 成软骨诱导培养后变为短梭形、多角形和类圆形,并在某些区域细胞聚集生长(图2C)。4w 时行甲苯胺蓝染色,呈阳性,镜下见蛋白多糖被染成蓝色(图2D)。hADSCs 更换成脂诱导培养液后细胞增殖缓慢,逐渐由长梭形变为多边形、圆形和椭圆形,细胞体积减小。1w 后胞浆内出现脂滴逐渐增多增大并聚集(图2E)。油红 O 染色阳性,细胞内出现大量红染颗粒(图2F),证明细胞内的颗粒为脂滴。

2.3 海绵状 SIS 形态学观察

重塑后的海绵状 SIS 具有三维立体结构,HE 染色未发现蓝染的核物质和细胞碎片(图3A),说明化学浸

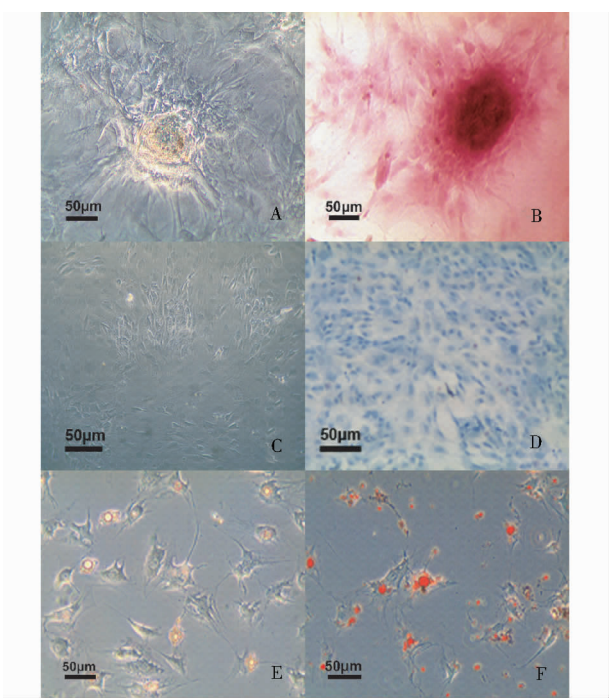


图2 hADSCs 成骨、软骨、脂肪诱导 ($\times 100$)
Fig.2 Osteogenic, chondrogenic, adipogenic induction of hADSCs

A, C, E: Phase contrast microscope, $\times 100$; B: Alizarin Red staining;
D: Toluidine blue staining; F: Oil Red O staining

泡法可以彻底去除细胞成分。扫描电镜观察可见 SIS 的纤维互相交织,形成大量较均匀的三维孔隙(图3B)。

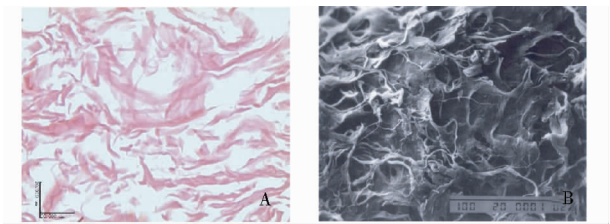


图3 经脱细胞处理重塑后的海绵状 SIS
Fig.3 The acellular spongelike small intestinal submucosa

A: Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$;
B: SEM image, bar = $100\mu\text{m}$

2.4 成骨样细胞与海绵状 SIS 复合培养的扫描电镜形态

复合培养 72h 后,可见成骨样细胞散在 SIS 的空隙内及材料表面。空隙内的细胞近似球形,形态饱满,并伸出突起。表面的细胞呈贴壁状态,形成细胞连接,生长状态良好,增殖旺盛(图4)。表明支架材料具有良好

的细胞相容性,立体环境适合成骨细胞生长,并增加了支架的厚度和强度。

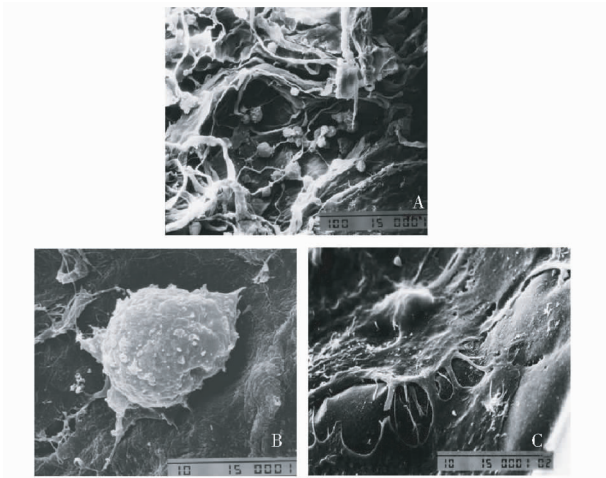


图 4 成骨样细胞与海绵状 SIS 复合培养 SEM 图像
Fig. 4 The growth of osteoblast-like cells in spongelike small intestinal submucosa, SEM image

A: The growth of cells in SIS, bar = 100µm; B: Round cell in space of SIS, bar = 10µm; C: Adherent cell on surface of SIS, bar = 10µm

2.5 MTT 法检测成骨样细胞在浸提液中的增殖活性

MTT 结果显示共培养后于第 2d 开始进入指数增殖期,随着培养时间的延长,两组的吸光度(OD 值)都逐渐增高($P < 0.05$),生长曲线类似,近似“S”形。表明浸提液与普通成骨诱导培养液均可保证成骨样细胞正常生长,经历了潜伏期和对数生长期。而在相同时间点两组的吸光度(OD 值)未见明显差异($P > 0.05$),表明浸提液培养的成骨样细胞可以保持良好的增殖潜能(图 5)。

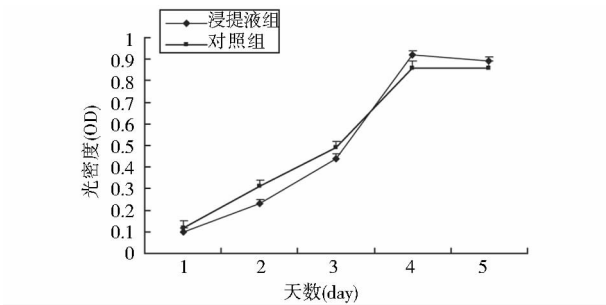


图 5 成骨样细胞的生长曲线

Fig. 5 The growth curve of osteoblast-like cells

2.6 ALP 活性检测

结果显示随着培养时间的延长,两组细胞 ALP 活

度都逐渐增高($P < 0.05$),表明浸提液与普通成骨诱导培养液一样可以促进成骨样细胞分泌碱性磷酸酶。在同一时间点浸提液组培养的细胞 ALP 活度略高于普通诱导液组($P < 0.05$),表明浸提液培养的成骨样细胞具有良好的成骨活性,ALP 表达量增多,SIS 能明显促进脂肪干细胞来源的成骨样细胞进行成骨分化(图 6)。

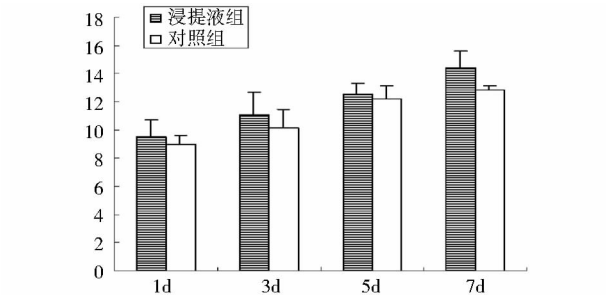


图 6 成骨样细胞的 ALP 活度值

Fig. 6 ALP activity value of osteoblast-like cells

3 讨论

2001 年 Zuk 等^[7]成功分离培养了 ADSCs,脂肪组织获取方法简单,单位体积组织内干细胞含量大,迅速成为组织工程种子细胞理想来源。由于 ADSCs 缺乏特异性标记,因此要结合多种抗原表型的检测。本实验检测结果为 CD90 (97.9%)、CD29 (89.6%)、CD31 (4.9%)、CD34 (10.9%)、CD73 (88.16%)、CD105 (91.27%)这与前人研究结果基本一致^[8],符合干细胞抗原表达情况。hADSCs 具有多向分化潜能,在成骨诱导液培养下形态逐渐变为多角形并聚集成团,经茜素红染色发现有阳性的钙结节,是成骨样细胞分泌的矿化物质形成,表明诱导后的细胞具备分泌骨组织有机成分的能力,可以称为成骨样细胞^[9] hADSCs 成软骨诱导培养后具有软骨细胞的多角形和类圆形,并分泌蛋白多糖。hADSCs 在成脂诱导培养液中可由长梭形变为多边形、圆形和椭圆形,并形成脂滴。

理想的支架材料应具有良好的生物相容性、可降解性及一定的孔隙率,为种子细胞的增殖分化提供必要的三维空间及力学支撑。SIS 是采用健康成年猪的空肠,经物理和化学方法处理而制成的不含细胞、无免疫原性、具有良好的细胞相容性和力学性能的天然细胞外基质生物材料^[10]。本实验按 Abraham 等^[6]的方法,实验发现取材最好是屠宰后 2h 内的新鲜空肠,韧性较强,如经过多次冻融,组织结构容易破碎。冲洗时

使用 40℃ 左右的去离子水,尽可能彻底清洗残余组织,维持肠壁结构生物活性。经化学法处理的 SIS 不含细胞,病毒全部灭活,可以安全地应用于机体内。本课题组将薄膜状的 SIS 在液氮冷冻状态下研磨成颗粒,此过程耗时较长,每次待研磨的 SIS 面积小于 10cm²。再用水溶性的交联剂进行交联聚合,有助于形成互联的多孔结构。入模具后经冷冻干燥制成海绵状的 SIS 支架材料。经光镜检测未发现蓝染的核物质和细胞碎片,说明化学浸泡法可以彻底去除细胞成分。扫描电镜观察可见海绵状 SIS 的纤维互相交织,形成大量较均匀的三维孔隙。

但海绵状 SIS 能否具有良好的细胞相容性,以及是否适合成骨细胞生长增殖和成骨分化目前尚无定论。体外实验是将细胞或组织与支架材料或支架浸提液复合培养,检测细胞生长、增殖及功能等相关指标,是进一步完成体内实验的基础,是评价支架材料组织相容性的重要依据^[1]。因此本研究将诱导成功后的成骨样细胞与海绵状 SIS 复合培养,扫描电镜显示成骨样细胞散在 SIS 的空隙内及材料表面,空隙内的细胞较多近似球形、形态饱满,材料表面的细胞呈贴壁状态,形成细胞连接,表明此支架材料具有良好的细胞相容性,大量的空隙更适合成骨细胞立体生长。通过 MTT 法检测浸提液对成骨样细胞增殖的影响,发现经浸提液培养的成骨样细胞仍具有旺盛的增殖潜能。本实验又应用 ALP 活度检测试剂盒检测浸提液培养后细胞的成骨分化情况,发现浸提液培养的成骨样细胞具有良好的成骨活性,ALP 表达量增多,SIS 能明显促进脂肪干细胞来源的成骨样细胞进行成骨分化。

本实验证实海绵状 SIS 材料在体外可以促进成骨样细胞的增殖和成骨分化,为种子细胞提供足够的生长空间和机械支撑,为修复长骨骨质缺损提供了一种三维立体的新型生物衍生支架材料。但在动物体内其能否促进骨组织再生,尚待后续的体内实验进行验证。

参考文献

[1] Hoganson D M, Owens G E, O' Doherty E M, et al. Preserved

extracellular matrix components and retained biological activity in decellularized porcine mesothelium. *Biomaterials*, 2010, 31 (27):6934-6940.

- [2] Roeder R A, Lantz G C, Geddes L A. Mechanical remodeling of small intestine submucosa small-diameter vascular grafts-a preliminary report. *Biomed Instrum Technol*, 2001, 35 (2):110-120.
- [3] Greca F H, Noronha L, Bendhack M, et al. Use of small intestine submucosa as ureteral allograft in pigs. *Int Braz J Urol*, 2004, 30 (4):327-334.
- [4] Ayyildiz A, Akgül K T, Huri E, et al. Use of porcine small intestinal submucosa in bladder augmentation in rabbit; long-term histological outcome. *ANZ J Surg*, 2008, 78 (1-2):82-86.
- [5] Keskin M, Kelly C P, Moreira-Gonzalez A, et al. Repairing critical-sized rat calvarial defects with a periosteal cell-seeded small intestinal submucosal layer. *Plast Reconstr Surg*, 2008, 122 (2):400-409.
- [6] Abraham G A, Murray J, Billiar K, et al. Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51 (3):442-452.
- [7] Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue; implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001, 7 (2):211-226.
- [8] Tang L, Yin Y, Zhou H, et al. Proliferative capacity and pluripotent characteristics of porcine adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Cell Reprogram*, 2012, 14 (4):342-352.
- [9] Pan Feng, Bai Shuling. The experimental research on cultivation and differentiation of rabbit BMSCs *in vitro*. *Jie Pou Ke Xue Jin Zhan*, 2005, 11 (1):12-15.
- [10] Lawrence B J, Maase E L, Lin H K, et al. Multilayer composite scaffolds with mechanical properties similar to small intestinal submucosa. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 88 (3):634-643.
- [11] Yang B, Zhou L, Sun Z, et al. *In vitro* evaluation of the bioactive factors preserved in porcine small intestinal submucosa through cellular biological approaches. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 93 (3):1100-1109.

Spongelike Small Intestinal Submucosa Matrix Can Promote Osteoblast-like Cells Proliferation and Differentiation

FANG Yan¹ NI Wei-min² SHAN Wei¹ ZENG Rui-xia¹ LIU Xue-yuan¹

(1 Department of Anatomy of Basic Medical College of LiaoNing Medical University, Jinzhou 121000, China)

(2 Department of Neurosurgery of the First Affiliated Hospital of LiaoNing Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract Objective: Observe the growth of osteoblast-like cells induced and differentiated by human adipose stem cells (hADSCs) in the spongelike porcine small intestinal matrix (SIS). Explore ability of three-dimensional SIS promote osteoblast-like cells proliferation and differentiation. Methods: acellular SIS is prepared by combination of physical and chemical methods with porcine proximal jejunum. Particles was made with film-like SIS by milling-in liquid nitrogen cryogenic grinding. And the particles has been reshaped spongelike after crosslinked by freeze-drying technology. hADSCs is isolated and cultured by enzymatic digestion. And surface antigen has been identified by flow cytometry. hADSCs has been induced and differentiated into osteoblast-like cells、chondroblast-like cells and adipocyte-like cells. The osteoblast-like cells is cultured in cavernous SIS. Cell morpholog is observed by scanning electron microscope. Osteoblast-like cells is cultured in material extracts of SIS. The cell viability is evaluated with MTT. Osteogenic differentiation is detected by ALP activity. Results: Spongelike SIS is three-dimensional stereo-scaffold with a great of regular three-dimensional pore. Stem cell-associated antigen is expressed by primary hADSCs. hADSCs can differentiated into osteoblast-like cells stained by alizarin red. Osteoblast-like cells can proliferate and express ALP obviously in cavernous SIS. Conclusion: spongelike SIS with three-dimensional pores presents superior cytocompatibility, and it can promote osteoblast-like cell differentiated by hADSCs proliferate and increase osteogenic activity significantly. It can became a novel three-dimensional natural biological materials for bone tissue engineering.

Key words Small intestinal submucosa matrix Osteoblast-like cells Scaffold Proliferation and differentiation