

· 基础研究 ·

骨髓基质细胞与可降解明胶 聚羟基丁酸酯膜复合培养的生物合成功能分析

易诚青¹, 刘建湘², 刘日光³, 李新春⁴, 郭晓东²

(1. 上海交通大学附属第一人民医院骨科, 上海 200080; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科; 3. 贵阳医学院附属医院骨科; 4. 宁波市第一人民医院骨科)

【摘要】目的:从生物合成功能角度,探讨骨髓基质细胞(BMSCs)与可降解明胶 聚羟基丁酸酯(G-PHB)膜复合培养的生物相容性。方法:以 BMSCs分别与 G-PHB、聚羟基丁酸酯(PHB)、明胶(G)膜材料复合培养,并设立空白对照组,各组通过³H-TdR法检测DNA合成;考马斯亮蓝法检测蛋白质合成;对硝基苯磷酸盐法(PNP)测定碱性磷酸酶(ALP)水平;放免法测定骨钙素(OCN)表达;流式细胞术测定纤维连接蛋白(FN)表达。结果:G-PHB组DNA合成优于PHB组和空白对照组($P < 0.05$)。总蛋白合成与各对照组无显著性差异($P > 0.05$),但成骨特异性标志ALP、OCN以及细胞黏附指标FN均明显优于其他各组($P < 0.05$)。结论:G-PHB材料对于种子细胞BMSCs黏附、增殖与成骨定向分化有明显的促进作用,是一种有效上调细胞生物合成功能的新型可降解材料。

【关键词】骨髓基质细胞; 可降解的; 生物功能

Analysis of biosynthetic function on mixed culture of BMSCs and absorbable G-PHB membrane YI Cheng-qing^{*}, LIU Jian-xiang, LIU Ri-guang, LI Xin-chun, GUO Xiao-dong^{*} Department of Orthopaedics, the First Affiliated People's Hospital of Traffic University of Shanghai, Shanghai 200080, China

ABSTRACT Objective: To investigate biological compatibility on mix culture of BMSCs and absorbable G-PHB membrane basing on standpoint of biosynthetic function **Methods:** BMSCs were cultured with G-PHB, PHB and Glutin (G) membrane respectively to establish the blank control group. In the groups, the DNA and protein synthesis, Alkaline phosphatase (ALP) level, Osteocalcin (OCN) and fibronectin (FN) expression of BMSCs were respectively detected by ³H-TdR, Coomassie brilliant blue staining, para-nitro-pheneye phosphate (PNP), radioimmunoassay (RIA), flow cytometry (FCM). **Results:** The DNA synthesis in the G-PHB group was higher than that of the PHB and the blank control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in total protein synthesis were observed G-PHB group and other groups ($P > 0.05$). The ALP level, OCN and FN expression in G-PHB group were better than those of groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** The G-PHB has obviously auxo-action for adhesiveness and proliferation of BMSCs, and osteogenesis oriented differentiation. It is a new pattern and absorbable material which can effective cause up-regulation of biosynthesis function of cell

Key words: Bone marrow stem cells; Absorbable; Biological function

骨组织工程研究中,基质材料与种子细胞的生物相容性是决定成骨效能的关键一环。其中,材料对细胞生物合成的影响尤为重要,因其直接作用于细胞外基质的合成及细胞间信号的传导。以明胶和聚羟基丁酸酯交联成膜(G-PHB膜),可合成一种新型的生物可降解材料,降解产物无细胞毒性,且材料的降解时间和溶胀性能可调控,而骨髓基质细胞(BMSCs)已成为骨组织工程首选的种子之一。本研究将 BMSCs

与 G-PHB 复合培养,分析细胞的生物合成功能,为探讨可降解 G-PHB 膜在骨组织工程中的应用提供前提与基础。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养基、胰蛋白酶(Gibco);噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、维生素 C、牛血清白蛋白(BSA)、考马斯亮蓝 G-250(Sigma); [³H]胸腺嘧啶核苷(³H-TdR,中科院上海原子能研究所);胎牛血清(北京军区兽医研究所);SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德生物公司);碱性磷酸酶试剂盒(北京中生生物公司);骨钙素(OCN)放免试剂盒(北方生物技术研究所);甘油磷酸钠、四环素、地塞米松(国内分析纯试剂);聚羟基丁酸酯(PHB)、明胶(G)、明胶聚

基金项目:国家自然科学基金青年项目(30200063)

通讯作者:易诚青 Tel: 021-63240090-3071 E-mail: yqcqfws@yahoo.com.cn

羟基丁酸酯 (G-PHB, 武汉大学)。

1.2 细胞体外培养 取 6~8 周龄新西兰白兔, 氯胺酮及异丙嗪复合肌注麻醉, 无菌条件下自双侧股骨大转子用 18 号骨穿针抽取骨髓 2~3 ml (注射器内预抽肝素-DMEM 抗凝液), 立即注入离心管内, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, PBS 洗 3 次, 去除上层组织液及脂肪, 吸取下层含 BMSCs 的细胞层, 以含 20% 胎牛血清的条件培养基重悬 (DMEM 培养液中加入地塞米松 10 nmol/L、甘油磷酸钠 10 nmol/L、维生素 C 50 μg/ml、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml)。将细胞以 1 × 10⁶/ml 的密度接种于 25 ml 培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 5~7 d 后首次换液, 以后每 3 d 换液 1 次, 细胞长满后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按所需细胞浓度传代。

1.3 细胞接种与分组 实验分为材料实验组 (G-PHB 组)、材料对照组 (PHB 组及 G 组) 和空白对照组。材料制备为直径与 24 孔培养板孔底一致, 厚度为 0.5 mm 的圆片, 分别预置于 24 孔培养板; 或按照材料面积每 25 cm² 加浸提介质 (选用生理盐水) 5 ml 的比例, 于 70℃ 无菌条件下浸提 24 h, 所得浸提液取上清备用。每组设 10 个样本, 每孔以 2 × 10⁴/ml 密度接种第 2 代或第 3 代细胞备用。

1.4 细胞 DNA 合成检测 采用 ³H-TdR 掺入法, 可以检测材料对细胞 DNA 合成的影响。各组细胞接种后第 1、2、4、8 天, 每孔加入 1 μCi ³H-TdR, 孵育 6 h 后弃上清, 0.1 mol/L PBS 避光放置 2 h 后, 于液体闪烁测量仪测定每孔的放射性 (CPM 值)。

1.5 细胞蛋白质合成检测 接种后分别于第 1、2、4、8 天吸弃原培养液, 每孔加入 0.05% 曲拉通 X-100 (Triton-100) 200 μl, 室温下放置 4 h 后振荡, 取细胞裂解液 100 μl, 加入考马斯亮蓝染液 1 ml, 混匀放置 5 min, 在波长 595 nm 处测各孔光吸收值。以 BSA 为标准品绘制标准曲线, 计算各组蛋白质含量。

1.6 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测 采用 ALP 检测试剂盒, 按对硝基苯磷酸盐 (PNP) 法测定细胞内 ALP 含量。各组细胞接种后第 1、2、4、8 天, 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 每孔加入 0.05% 曲拉通 X-100 (Triton-100) 200 μl, 4℃ 放置 12 h 后吹打 1 min, 然后加入 100 μl 的 PNP, 37℃ 孵育 30 min, 加入 0.1 mol/L NaOH 100 μl 终止反应, 于 410 nm 波长比色, 测定光吸收值。以 PNP 标准品绘制标准曲线, 计算各组 ALP 活性值。

1.7 OCN 表达水平检测 采用放射免疫法 (RIA) 测定材料对细胞 OCN 合成量的影响。各组细胞接种后第 1、2、4、8 天, 更换为无血清培养液继续培养 2 d, 取上清液, 按 OCN 试剂盒说明进行操作, 在计数仪上测各孔 OCN 值。

1.8 细胞纤维连接蛋白 (FN) 表达水平检测 各组细胞接种后第 2 天, 收集细胞以多聚甲醛 (质量分数为 4%) 固定后离心, 0.5 ml PBS-BSA (体积分数 1%) 洗 1 次, 细胞沉淀悬浮于 300 μl 按 1:200 稀释的抗中, 室温放置 20 min, PBS-BSA 漂洗, 重悬于 300 μl 1:80 稀释的 FITC 标记抗中, 室温放置 20 min, 以 1 ml PBS-BSA 清洗, 0.5 ml PBS 悬浮, 流式细胞仪上机检测, 波长 525 nm, 至少计数 4 000 个细胞。

1.9 统计学处理 所测数据使用 SPSS 统计软件, 参数值以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞 DNA 合成检测结果 ³H-TdR 掺入法显示, G-PHB 组细胞 DNA 合成与 G 组无明显差异, 但明显优于 PHB 组及空白对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

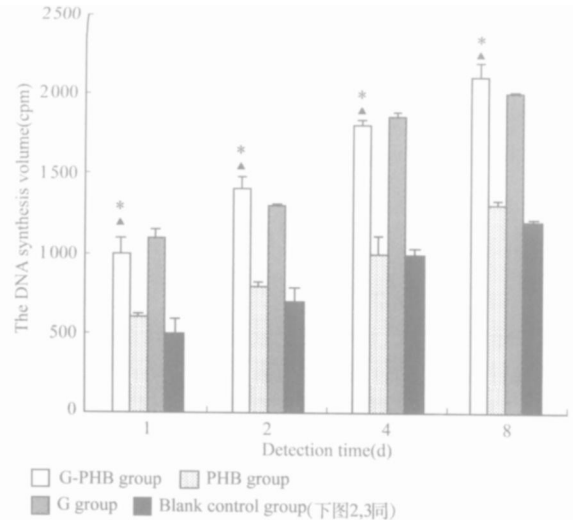


图 1 各组细胞 DNA 合成结果 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 The results of DNA synthesis of BMSCs in each groups (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

注: G-PHB 组与 PHB 组比较, * $P < 0.05$; 与空白对照组比较, $P < 0.05$

Note: G-PHB group compared with PHB group, * $P < 0.05$; with blank control groups, $P < 0.05$

2.2 细胞蛋白质合成检测结果 考马斯亮蓝染色结果表明, G-PHB 组与各对照组相比, 差异无显著性意义 (表 1)。

表 1 各组不同时间细胞蛋白合成值 (μg/ml, n = 8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The results of total protein synthesis of BMSCs in different times in each groups (μg/ml, n = 8, $\bar{x} \pm s$)

Table with 5 columns: Groups, 1 d, 2 d, 4 d, 8 d. Rows include G-PHB, PHB, G, and Blank control with numerical values and error bars.

注: 在细胞接种后 1、2、4、8 d, G-PHB 组与其他对照组相比, * $P > 0.05$ Note: 1, 2, 4, 8 days after cell inoculation, G-PHB group compared with the other groups, * $P > 0.05$

2.3 细胞内 ALP 与 OCN 活性检测结果 ALP 活性与 OCN 水平测定, 显示 G-PHB 组与其他对照组相比, $P < 0.05$, 差异有显著性意义, 说明 G-PHB 组 ALP 与 OCN 表达均优于其他各对照组 (图 2, 3)。

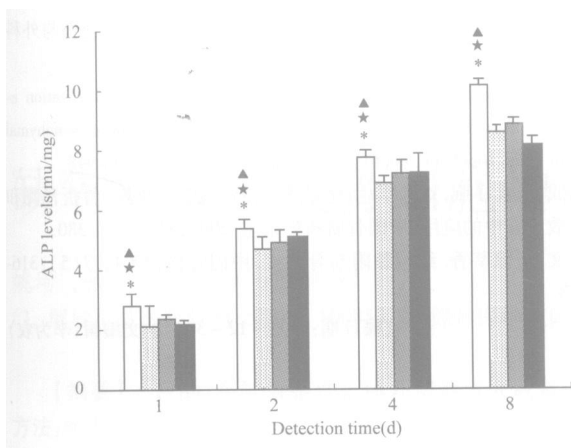


图 2 各组细胞 ALP水平 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 The ALP levels of BMSCs in each groups (n=8, $\bar{x} \pm s$)

注: G-PHB组与 PHB组比较, * P<0.05;与 G组比较, P<0.05;与空白对照组比较, P<0.05

Note: G-PHB group compared with PHB group, * P<0.05; with G group, P<0.05; with blank control group, P<0.05

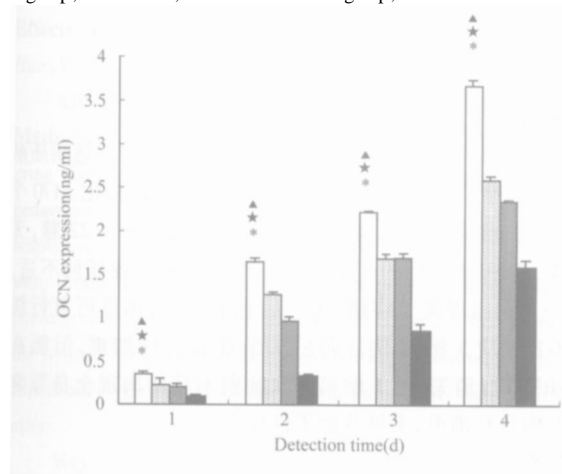


图 3 各组细胞 OCN表达水平 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 The OCN expression of BMSCs in each groups (n=8, $\bar{x} \pm s$)

注: G-PHB组与 PHB组比较, * P<0.05;与 G组相比, P<0.05;与空白对照组比较, P<0.05

Note: G-PHB group compared with PHB group, P<0.05; with G group, * P<0.05; with blank control group, P<0.05

2.4 FN表达水平检测结果 以流式细胞仪检测各组 FN表达, G-PHB组表达率为 (32.37 ± 2.57)%, PHB组为 (23.12 ± 5.11)%, G组为 (27.01 ± 1.49)%, 而空白对照组为 (9.87 ± 3.26)%, 组间比较显示, 各组间 FN表达率均存在显著性差异 (P<0.05), 其中 G-PHB组优于 G、PHB组及空白对照组。

3 讨论

在骨组织工程研究中, 对于材料的优化始终是人们致力解决的问题之一, 基质材料的性质直接影响着种子细胞的生物行为。本文试图从种子细胞生物合成功能的角度, 观察 G-PHB膜对细胞的影响, 分析这种新型的生物可降解材料在组织工程中的应用前景。

PHB是原核微生物在碳、氮营养失衡的情况下, 作为碳源和能源贮存而合成的热塑性聚酯, 其结构与性能更类似于化学合成的高分子聚酯^[1,2]。PHB与其他天然高分子比较, 具备良好的机械性能; 而与人工合成可降解聚酯相比, 它因为由生物合成, 所以有优良的组织相容性, 为极洁净的生物塑料。它在生物体内可以完全降解, 经酮酵解生成终产物 CO₂ 和 H₂O。

G为一种传统的可降解膜材料, 是胶原蛋白部分水解后得到的长肽链氨基酸成分, 具有脯氨酸等中性氨基酸和含有酸性或碱性侧链的氨基酸结构特性, 能够和宿主骨胶原末端的胺基或羧基相结合, 形成具有生物活性的化学性结合界面, 利于细胞的黏附和铺展, 因而生物相容性非常好^[3], 但极易降解, 单一用作组织工程基质材料, 无法维持组织修复的完成。

我们以 G和 PHB交联成膜, 对 PHB共聚改性, 并通过 G对 PHB表面修饰, 试图得到一种理化性能与生物性能均佳的生物衍生型膜材料。

作为骨组织工程的首选种子细胞之一, BMSCs是具有多向分化潜能的基质干细胞群, 因其来源广泛、取材方便、损伤小及成骨能力确切, 正日益受到重视^[4,5], 因而本实验选择 BMSCs为检测用的靶细胞, 对于材料的组织工程学应用有着实际意义。

经³H-TdR掺入法和考马斯亮蓝染色法检测, 可以发现 G-PHB材料的 DNA合成优于单纯 PHB组, 而蛋白质合成水平与各对照组比较差异无显著性。提示从生物合成总体水平来看, G-PHB交联改善了单纯 PHB的生物相容性。

然而, DNA与蛋白合成并不能全面阐述 G-PHB膜材料对细胞生物合成功能的作用。因为, 在骨组织工程中, 种子细胞要最终实现成骨, 必须借助于特定环境下细胞向成骨方向的定向分化。ALP和 OCN即为成骨的特异性指标, 其表达强度说明种子细胞在不同成骨分化阶段的成骨潜能^[6,7]。我们分别通过酶化学方法与放免法检测 ALP、OCN表达, 均发现 G-PHB组优于各对照组, 表明 G-PHB材料对于种子细胞 BMSCs的成骨趋向具有显著的诱导优势。

在种子细胞与材料的相互作用中, 细胞黏附能力也是细胞启动、发生及完成其生物行为的重要基础之一。人们发现, FN与细胞分化、黏附、迁移及增殖均有密切联系, 它的生物学功能首先表现为细胞的黏附作用, 对维持细胞基质稳定和将细胞锚定于基质上起重要作用^[8]。采用流式细胞术方法检测 FN表达率, 结果显示, G-PHB组 FN表达最强。这可能与 G-PHB膜通过交联改变了材料的亲(疏)水特性, 同时保留了明胶氨基酸残基的生物亲合性有关, 进一步证实 G-PHB适合作为 BMSCs的基质材料。

本文选取种子细胞一般生物学行为, 以及成骨定向分化的一些特异性指标进行研究, 发现 G-PHB膜材料对细胞生物合成功能具备确切的正向调控作用。然而, 种子细胞的生物合成功能涉及多因素多通路, 其调控机制非常复杂。要完全阐明 G-PHB与 BMSCs的相互作用, 并揭示在 G-PHB材料支持下, 种子细胞各种生物合成功能之间的联系与影响, 尚需更为深入的探讨。

参考文献

1 Doyle C, Tanner ET, Bonfield W. In vitro and in vivo evaluation of PHB and of PHB reinforced with hydroxyapatite. *Biomater*, 1991, 12: 841-847.

2 Yasin M, Tighe BJ. Strategies for the design of biodegradable polymer systems: Manipulation of PHB based materials. *Plastic*, 1993, 19: 15-27.

3 Choi YS, Hong SR, Lee YM, et al. Study on gelatin-containing artificial skin: Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomater*, 1999, 20: 409-417.

4 Herbertson A, Aubin JE. Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures. *Bone*, 1997, 21: 491-500.

5 金丹. 骨髓基质细胞成骨作用的研究进展. *国外医学: 创伤与外科基本问题分册*, 1999, 20 (3): 201-204.

6 Kihara T, Oshima A, Hirose M, et al. Three-dimensional visualization analysis of in vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316: 943-948.

7 杨成宇, 阮祥燕, 刘忠厚. 生化标志物在骨质疏松诊断、骨折预测和疗效观察中的应用. *中国骨质疏松杂志*, 2003, 9 (4): 371-380.

8 李文革, 徐莘香. 细胞黏附与骨发生. *中国骨伤*, 2004, 17 (5): 316-318.

(收稿日期: 2005 - 12 - 30 本文编辑: 李为农)

· 短篇报道 ·

关节内注射透明质酸钠治疗膝骨性关节炎

贾经汉, 彭京, 李明

(广西中医学院瑞康临床学院, 广西 南宁 530011)

自 2002年 4月 - 2004年 4月采用膝关节腔内注射透明质酸钠结合功能锻炼治疗膝关节骨关节炎 160例 170膝, 均获随访, 疗效满意, 现报告如下。

1 临床资料

本组 160例, 男 64例, 女 96例; 年龄 44 ~ 72岁, 平均 59.2岁。双膝 10例, 单膝 150例; 出现症状时间 2个月 ~ 8年, 平均 4.9年。膝关节疼痛多于行走、久站、上下楼梯、跑步、下蹲时出现或加重, 休息后缓解, 部分有静息痛。全部病例均符合中华医学会风湿病学分会关于骨关节炎诊治指南(草案)膝骨关节炎诊断标准[中华风湿病学杂志, 2003, 11: 702-704], 而且有下列情况之一者剔除观察对象: 治疗前 2周内使用过镇痛药或糖皮质激素; 肝肾功能不全; 有药物过敏史; 孕妇或哺乳期妇女。每次给药后询问并登记不良反应, 要求患者停药后 6个月内来院复查, 进行疗效评价。

2 治疗方法

患者坐位屈膝 90°, 经髌下内侧或外侧入路穿刺, 针尖向腓窝方向穿刺进入关节腔内或平卧膝关节伸直位, 经髌上内侧或外侧穿刺, 针尖与额面平行, 斜向髌骨与股骨关节面的间隙进入关节腔, 抽尽关节积液, 注入透明质酸钠注射液(山东正大福瑞达制药有限公司产品 96卫药准字 X-286号) 2 ml, 注射后被动活动膝关节 2 ~ 5 min, 使药物均匀分布于关节表面, 拔针加盖无菌纱布局部皮肤消毒, 每间隔 1周重复注射, 5次为 1个疗程。期间未用其他消炎镇痛药物和相关的康复治疗。

3 治疗结果

按疗效标准[中华内科杂志, 1997, 36: 261], 患者经透明质酸钠注射液治疗 5周后, 各项症状和体征均有明显的变化。170个关节中达到临床缓解的为 16膝, 显效 127膝, 进步 22膝, 无效 5膝。在停止治疗的 6个月中, 有 55例未出现任何不适, 45例一直未出现关节疼痛, 久行后有酸胀痛, 休息可自行缓解。不良反应 5例, 4例注药后关节痛暂时性加重, 但能在 1 ~ 2 d内自行消失, 另 1例第 1次注射本药后出现全身荨麻疹, 2 h内自行消退, 未见其他不良反应。

4 讨论

目前临床上多用非甾体类镇痛消炎药物治疗急性期膝骨性关节炎, 这类药物对机体有不良反应, 尤其是对胃肠道的影响, 经常使患者不能耐受而影响治疗效果。透明质酸钠为关节滑液的主要成分, 在关节腔内起润滑、覆盖屏障、缓冲应力的作用, 当发生膝骨性关节炎后, 病理状态下的关节滑液中透明质酸钠分子量减小及浓度明显降低, 由此导致了关节滑液的生理作用障碍, 关节腔内给予外源性的透明质酸钠进行补充疗法, 使其覆盖于关节软骨表面保护软骨, 抑制炎症反应, 利于软骨修复, 或可刺激自身滑膜产生高分子量的透明质酸钠, 改善润滑功能, 部分透明质酸钠以某种形式进入软骨基质, 与糖蛋白结合, 有利于软骨损伤后的修复, 从而阻止病情进一步发展, 增加关节活动度。对重症患者疗效较差可能是由于患者大部分软骨已破坏, 滑膜已病损严重, 即使补充透明质酸钠也难以使之在短时间有较大程度地恢复。

(收稿日期: 2006 - 01 - 15 本文编辑: 王宏)