

· 基础研究 ·

组织工程骨-80℃低温保存的初步研究

蓝旭, 文益民, 葛宝丰, 刘雪梅

(解放军兰州军区总医院脊柱外科, 甘肃 兰州 730050)

【摘要】 目的: 了解不同冻存方法对组织工程骨生物活性的影响。方法: 以骨髓基质干细胞(marrow stromal cells, MSCs)复合部分脱蛋白骨培养制备组织工程骨, 实验分为: A 组, 组织工程骨用添加冻存保护剂的保存液保存; B 组, 组织工程骨用不添加冻存保护剂的保存液保存; C 组, 组织工程骨未行低温保存; D 组, 单纯 MSCs 培养。A 组和 B 组的组织工程骨于-80℃深低温保存 3 个月, 3 个月后复温冻存的组织工程骨。扫描电镜观察 MSCs 的黏附和分布情况, MTT 法检测细胞活力, 对硝基苯磷酸法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性, 流式细胞仪分析细胞周期。结果: MSCs 在材料表面和孔隙内均可黏附和分布, 黏附于材料的细胞活力大小依次为 C 组>A 组>B 组 ($P<0.01$, $P<0.05$), 黏附于材料的细胞 ALP 活性大小依次为 C 组>A 组>B 组 ($P<0.01$)。各组细胞周期未见明显变化, 未见异倍体细胞。结论: 选择适宜的冻存保护剂对组织工程骨的生物活性有一定的保护作用。

【关键词】 组织工程; 骨; 低温保存

Preliminary study on cryopreservation of tissue engineered bone at -80℃ LAN Xu, WEN Yi-min, GE Bao-feng, LIU Xue-mei. Department of Spine Surgery, the General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To study the effects of various methods of cryopreservation on the bioactivity of tissue engineered bone. **Methods:** MSCs were cocultured with partially deproteinised bone to produce tissue engineered bone. The experiment was divided into A, B, C and D group. Group A: Tissue engineered bone was stored in preservation solution with cryopreservation medium. Group B: Tissue engineered bone was stored in preservation solution without cryopreservation medium. Group C: Tissue engineered bone was stored without cryopreservation. Group D: MSCs were cultured without cryopreservation. The tissue engineered bone of group A and B had been cryopreserved at -80℃ for three months and thawed three months later. The electronic scanning microscope was used to evaluate the adhesion and distribution of MSCs, cell viability was measured by MTT, ALP activity was detected by p-nitrophosphate, cell cycle was analysed by flow cytometry. **Results:** MSCs could adhere to the surface of the material and distribute in the hole of material. The cell viability of MSCs adhered to the material was C>A>B group ($P<0.01$, $P<0.05$). The ALP activity of MSCs adhered to material was C>A>B group ($P<0.01$). The cell cycles of different groups did not change significantly; the abnormal cells were not observed. **Conclusion:** The choice of proper cryopreservative solution could optimize the bioactivity of tissue engineered bone.

Key words Tissue engineering; Bones; Cryopreservation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(1): 49-51 www.zggszz.com

目前, 国内外骨库对于异体骨和异种骨的保存积累了丰富的经验, 但对于组织工程骨的保存却是一个空白点。相对于异体骨和异种骨的保存, 组织工程骨的保存需要更为严格的标准。如何使保存后的组织工程骨具有较好的生物活性, 需要进行相关研究。

1 材料与方

1.1 部分脱蛋白骨支架材料的制备 取脑死亡患者捐献尸体骨的干骺端, 修整为 1.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 大小。材料一侧为皮质骨, 另一侧保留部分松质骨, 共 24 块。生理盐水反复

冲洗, -70℃深低温冰箱冷冻后, 经脱脂、脱细胞和部分脱蛋白处理, 冷冻干燥机冻干。材料用双层血浆袋密封包装, 环氧乙烷消毒, 4℃冰箱冷藏保存。

1.2 组织工程骨的制备 取健康新西兰白兔 2 只, 双侧胫骨结节处备皮消毒, 无菌条件下穿刺抽取红骨髓 8 ml, 加入含肝素的 DMEM 培养液(Gibco 公司), 混匀后加入 3 ml 淋巴细胞分离液(Gibco 公司), 1 800 r/min 离心 10 min, 吸除中间层细胞后再离心, 所得细胞沉淀以 1×10^6 /ml 密度接种于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。待细胞相融合达 90% 生长面积时用 0.25% 胰蛋白酶(Sigma 公司)消化传代培养。细胞传至 3 代时, 移入含 1×10^{-8} 地塞米松、50 mg/L 维生素 C 和 1×10^{-2} mol/L β-磷酸甘油钠的 DMEM 培养液诱导培养 3 d, 诱导后的细胞表型经鉴定为

基金项目: 全军医学科学技术“十一五”计划课题基金资助项目(编号: 06MA081)

通讯作者: 蓝旭 Tel: 0931-8975285 E-mail: lzyjw@sina.com

成骨样细胞。将支架材料用 DMEM 培养液浸泡 1 d 后弃残余液,每个支架材料以 1×10^6 /ml 密度接种经诱导培养的 MSCs,于 37 ℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养 7 d。

1.3 实验分组和组织工程骨的低温保存 实验分为:A 组,组织工程骨用添加冻存剂的保存液保存;B 组,组织工程骨用不添加冻存剂的保存液保存;C 组,组织工程骨未行低温保存;D 组,单纯 MSCs 培养(作为细胞学待定参考)。以含 15% 胎牛血清 DMEM 培养液为基本保存液,冻存保护剂的基本成分为二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、羟乙基淀粉和蔗糖,按照一定的比例合理搭配。降温步骤如下:将组织工程骨分装入含不同保存液的冻存管内,室温下放置 10 ~ 15 min,然后置于 4 ℃ 20 min,以 -1 ℃/min 降温至 -20 ℃,保存 30 min,再以 -1 ℃/min 降温至 -80 ℃,放入深低温冰箱保存。3 个月取出冻存管,快速置于 37 ℃ 水浴 1~2 min,直至保存液完全融化。

1.4 检测项目

1.4.1 倒置相差显微镜和扫描电镜观察 用倒置相差显微镜观察细胞与材料的黏附及细胞在材料孔隙内的分布。各组取组织工程骨 1 块, PBS 漂洗 3 遍,戊二醛固定,乙醇梯度脱水,标本经干燥和喷金处理后,用扫描电镜观察细胞在材料表面的黏附和分布。

1.4.2 MTT 法检测细胞活力 各组取组织工程骨 6 块,于培养板中加入 5 mg/ml 的 MTT,反应 4 h 后弃液,加入 DMSO,振荡 10 min,用酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)选择波长为 490 nm 读取光密度值(OD 值),分析细胞活力。

1.4.3 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测 各组取组织工程骨 6 块,消化并收集细胞。采用对硝基苯磷酸法^[1],用紫外、荧光、可见光高效分析仪(美国 Perkin Elmer 公司)测定 ALP 活性,了解细胞产生的 ALP 活性。

1.4.4 流式细胞仪检测 各组取组织工程骨 6 块,消化收集细胞并计数,PI 染液染色,用流式细胞仪(美国 Coulter 公司)检测细胞周期和 DNA 含量,计算 DNA 指数(DI 值),DI 值为待测样品 G₀G₁ 期细胞 DNA 含量与正常二倍体 G₀G₁ 期细胞

DNA 含量的比值。

1.5 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件包对组间计量资料行方差分析和 *q* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电镜观察结果 各组细胞在材料表面均可黏附,呈梭形或多角形,相邻细胞间有突起相互连接,细胞周围有网状胶原附着。其中, A 组和 C 组材料表面黏附大量细胞,并有较多胶原连接; B 组材料表面黏附细胞较少,胶原连接很少(图 1)。

2.2 MSCs 活力检测 黏附于材料的细胞活力: A 组(0.529 7 ± 0.013 1) U/L, B 组(0.392 6 ± 0.004 8) U/L, C 组(0.654 3 ± 0.003 9) U/L, D 组(0.712 3 ± 0.018 7) U/L, 细胞活力大小依次为 C 组 > A 组 > B 组, 各组间差异均有统计学意义(*F* = 53.642, *P* < 0.01, *P* < 0.05)。

2.3 MSCs ALP 活性检测 黏附于材料细胞的 ALP 活性: A 组(0.747 ± 0.026), B 组(0.433 ± 0.041), C 组(0.829 ± 0.026), D 组(1.122 ± 0.085) U/L, 细胞的 ALP 活性依次为 C 组 > A 组 > B 组, 各组间差异均有统计学意义(*F* = 79.19, *P* < 0.01)。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期 每块材料黏附细胞数分别为: A 组(2.29 ± 0.31) × 10⁵ 个, B 组(1.29 ± 0.28) × 10⁵ 个, C 组(3.35 ± 0.17) × 10⁵ 个, D 组(5.41 ± 0.16) × 10⁶ 个, 每块材料黏附细胞数的多少依次为 C 组 > A 组 > B 组(*F* = 660.28, *P* < 0.01)。各组细胞周期未见明显变化, 无异倍体细胞, 见表 1。

表 1 各组材料对 MSCs 细胞周期和倍体水平的影响(n=6)
Tab.1 The influence of materials on the cell cycle and DNA index of MSCs in different groups (n=6)

组别	DNA 合成期(G ₁ , %)	DNA 合成期(S, %)	分裂前期及分裂期(G ₂ /M, %)	G ₁ 期 DNA 前含量(μg)	DI 值
A	73.6	13.5	12.9	44.6	1.02
B	66.2	10.0	23.8	42.5	0.96
C	75.8	11.2	13.0	51.3	1.03
D	76.2	9.5	14.3	66.7	-

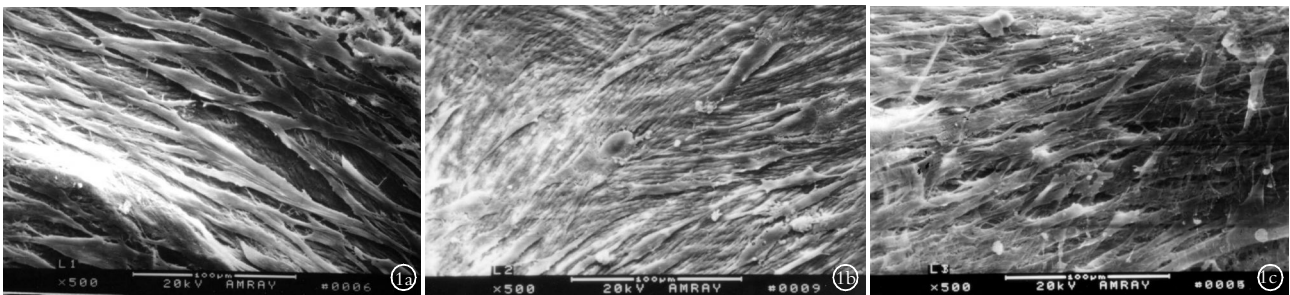


图 1 各组细胞与材料复合物扫描电镜观察(SEM×500) 1a.A 组,添加冻存剂保存复温后的组织工程骨,大量细胞黏附于材料表面,较多胶原连接 1b.B 组,未添加冻存剂保存复温后的组织工程骨,少量细胞黏附于表面,胶原连接较少 1c.C 组,未行低温保存组织工程骨,大量细胞黏附于材料表面,较多胶原连接

Fig.1 Scanning electronic microscope observation of cells cocultured with materials in different groups (SEM×500) 1a.Group A:Tissue engineered bone was stored in preservation solution with cryopreservation medium and thawed, lots of cells attached to the surface, many collagen fibers formed 1b. Group B:Tissue engineered bone was not stored in preservation solution with cryopreservation medium and thawed, a few of cells attached to the surface, few collagen fibers formed 1c.Group C:Tissue engineered bone was stored without cryopreservation, lots of cells attached to the surface of materials, many collagen fibers formed

3 讨论

低温冻存损伤机制主要是冻融时冰晶对细胞的机械性和渗透性损伤,表现在以下 2 个方面^[2]:①慢速冷冻过程中,细胞外液水分不断结晶造成游离水分减少,导致细胞内外渗透压不等,使得大量水分由细胞内向细胞外渗出,逐渐导致细胞内渗透压升高,造成“溶质性损伤”。②快速冷冻过程中,细胞内水分尚未转移到细胞外,而细胞内外同时结冰,细胞内冰晶机械性破坏细胞器和细胞核而导致细胞损伤,造成“细胞内冰晶损伤”。目前认为生物组织的冷冻损伤主要是“溶质性损伤”所产生的渗透压、电解质含量和 pH 值的改变作用于细胞膜脂质造成的细胞膜渗漏,在复温过程中,细胞膜渗漏使大量水分进入细胞内导致细胞水肿而死亡,称为渗透性休克^[3]。此外,复温过程中如复温速率较慢,则会再次形成冰晶加重细胞损伤。由于冷冻速率越快引起细胞内冰晶形成越多,而速率过慢又可导致“溶质性损伤”。因此,低温保存需要选择造成损伤最轻的降温速率。此外,复温速率对低温保存后细胞活力的恢复有很大影响,严格说复温过程是降温过程的逆函数^[4]。如果没有足够快的复温速率,细胞内再次形成冰晶的概率很高。为了减轻冷冻损伤,选择适宜的降温和复温速率是低温保存的一个关键环节。分阶段降温比匀速降温对细胞活力和功能影响小,因此本实验采用分阶段降温措施,降温速度 1~1.5 °C/min,3 个月快速复温,较好地保持了冻存细胞的活力和功能。

冻存保护剂是减少冷冻损伤的另一个重要方法,其保护机制可能是防冻剂与水分子形成氢键,使最低共熔点降低,从而减轻或避免了冷冻复温过程中冰晶对细胞的损伤^[5]。由于各种冻存保护剂的作用机制不同,单一保护剂很难达到效果理想的冷冻保护要求,目前常采用多种冻存剂组成的混合保护剂。本实验采用含 15%胎牛血清的 DMEM 培养液为基本保存液,冻存保护剂的基本成分为 DMSO、羟乙基淀粉和蔗糖,3 种成分按照一定浓度和比例合理搭配。冷冻前渗透到细胞内的 DMSO 在细胞内外产生一定的摩尔浓度,降低细胞内外未结冰溶液中电解质浓度,从而保护细胞免受高浓度电解质损伤,同时细胞内水分不会过度外渗,避免细胞结构过度脱水皱缩^[6]。羟乙基淀粉通过竞争结合水的氢原子,使冰晶生成速

度减慢,减弱水的固化过程,可以降低细胞外溶质浓度过高造成的细胞损伤^[7]。低分子不可渗透物质蔗糖能在降温时向细胞外转运细胞内溶质,而复温时则作用相反,从而减轻细胞渗透性损伤^[8]。目前对于混合性冻存剂的研究主要是寻找对相应组织和细胞具有保护效果最佳、毒性最小、不同种类和不同含量冻存剂的组合。本实验采用 DMSO、羟乙基淀粉和蔗糖混合物为组织工程骨的冻存保护剂,结果添加冻存剂组与不添加冻存剂组相比较,细胞周期未见明显变化,无异倍体细胞出现,复温后的组织工程骨生物活性得到了极大程度的改善,但与未行低温保存的新鲜组织工程骨相比较,其生物活性尚有一定的距离。

参考文献

- 1 方福德,周吕,丁濂,等.现代医学实验技巧全书.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,2002. 557-563.
- 2 O'Brien FJ,Harley BA,Yannas IV, et al. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 2004, 25(6): 1077-1086.
- 3 Kotobuki N,Hirose M,Machida H, et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng*, 2005, 11(5-6): 663-673.
- 4 Ji L,Pablo JJ,Palecek SP. Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88(3): 299-312.
- 5 Kofron MD,Opsitnick NC,Attawia MA, et al. Cryopreservation of tissue engineered constructs for bone. *J Orthop Res*, 2003, 21(6): 1005-1010.
- 6 Ebertz SL,McGann LE. Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation. *Cryobiology*, 2004, 49(2): 169-180.
- 7 Gole MD,Poulsen D, Marzo JM, et al. Chondrocyte viability in press-fit cryopreserved osteochondral allografts. *J Orthop Res*, 2004, 22(4): 781-787.
- 8 Krut MC,deBruijn JD,Yuan H, et al. Optimization of bone tissue engineering in goats: a peroperative seeding method using cryopreserved cells and localized bone formation in calcium phosphate scaffolds. *Transplantation*, 2004, 77(3): 359-365.

(收稿日期:2007-03-19 本文编辑:王宏)

第四届全国骨创伤专题研讨会征文通知

由中华医学会创伤学分会、《中华创伤杂志英文版》编辑部举办的第四届全国骨创伤专题研讨会将于 2008 年 6 月在云南大理召开。征文内容:脊髓、周围神经损伤的治疗与功能修复,四肢创伤骨折的诊治经验,骨质疏松症性骨折的防治,中西医结合治疗骨折、软组织损伤,微创手术在骨与关节损伤中的应用,交通伤救治经验等。征文要求:未公开发表的论文摘要(中文,约 500 字)1 份,包括文题,作者单位、姓名,邮编及电话,并附一与纸样文字内容相同的软盘或通过 E-mail 投稿。会议将邀请国内(外)知名专家教授与会作专题讲座并从征文中挑选部分论文作大会发言。会议期间将评选优秀论文,并颁发优秀论文证书,将选出部分优秀论文在《中华创伤杂志英文版》刊登。本次研讨会将出版论文集,被收录论文并出席会议者将颁发论文证书并授予国家 I 类继续教育学分。截稿日期:2008 年 3 月 31 日。收稿地址:重庆市大坪长江支路 10 号《中华创伤杂志英文版》编辑部 宋双明主任收,邮编:400042,电话:(023) 68757483,68711977,传真:(023)68711977,E-mail:edcjt@public.cta. cq.cn 或 p_yy1109@sina.com。来稿务请在信封上注明“会议征文”。欢迎通过 E-mail 投稿,但务请注明通信地址、邮编、电话。

会议确切日期、地点及安排请留意第二轮通知,第二轮通知将于 2008 年 5 月发出。