

# 转壁生物反应器中动态分化组织工程软骨的实验研究

吕昌伟, 胡蕴玉, 白建萍, 廉凯

(第四军医大学西京医院全军骨科研究所, 陕西 西安 710032)

**摘要** 目的:在转壁生物反应器动态环境中分化骨髓间充质干细胞(bMSC),制备立体组织工程软骨。方法:穿刺吸取成年兔骨髓,分离扩增 bMSC,复合于纤维蛋白凝胶制成圆柱状三维组织(细胞密度  $2.0 \times 10^7/ml$ ),置于转壁生物反应器中进行分化培养,同时设单纯静止培养组。5 周后观测大体形态和组织学形态、和型胶原免疫组织化学表达,测量分化组织的细胞活力。结果:动态培养可以有效保持材料大体形态,甲苯胺兰染色阳性,无明显型胶原表达,大量表达型胶原,人工组织的细胞活力显著高于单纯静止培养方法。结论:转壁生物反应器培养明显改善组织工程软骨的活力,有利于进行三维材料体外软骨分化。

**关键词** 细胞培养; 免疫组织化学; 生物反应器; 软骨

**In vitro chondrogenesis of tissue engineered biomaterial in rotating wall vessel bioreactor** LV Chang-wei, HU Yun-yu, BAI Jian-ping, LIAN Kai. The Orthopaedics Research Institute of PLA, Xijing Affiliated Hospital of the Fourth Military Medical University( Shanxi Xi'an, 710032, China)

**Abstract Objective:**To induce the chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal stem cell in rotating wall vessel (RWV) bioreactor and make tissue-engineering cartilage in vitro. **Methods:**Bone marrow derived mesenchymal stem cells (bMSC) from adult rabbits were separated by gradient-density centrifugation and amplified in plates, and were mixed in fibrin sealant gel at final concentration of  $2 \times 10^7/ml$  and then incubated in RWV bioreactor at  $37 \pm 5\%CO_2$ . The parallel static culture was performed as control group. Gross appearance, histological section, immunohistochemistry and cell vitality were investigated after 5 weeks. **Results:**RWV bioreactor could preserve better gross appearance of compounded material, the sections revealed that Toluidine blue and collagen stain were obviously positive, and the cell vitality of culture in the RWV was higher than the control. **Conclusion:** RWV bioreactor can efficiently improve the cell activity of cartilage, and it is a preferable in vitro method for cartilage differentiation of three-dimension biomaterial.

**Key words** Cell culture; Immunohistochemistry; Bioreactors; Cartilage

骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cell, bMSC)来源广泛,获取简便,同时具备分化成为软骨细胞的巨大潜力,被视为解决种子细胞问题的有效出路。此外,在培养三维的人工组织工程软骨时候,材料中细胞的营养交换仅仅通过扩散作用,限制了立体培养的效果,那么能否用动态的流体环境改善组织的营养,并体外诱导组织工程软骨呢?本实验综合考虑这两方面问题,将旋转生物反应器引入组织工程软骨的体外培养,成功诱

导自体骨髓间充质干细胞软骨分化,完善体外三维结构材料的诱导培养方法。

## 1 材料和方法

**1.1 动物和材料** 新西兰大白兔 3 月龄 7 只,由第四军医大学动物实验中心提供。DMEM/F12(1:1)培养基(GIBICO 公司),转化生长因子(transforming growth factor  $\alpha_1$ , TGF  $\alpha_1$ , 由 SIGMA 公司提供), BB16CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Heraeus 公司),特级新生牛血清(Hyclone 公司),纤维蛋白胶(广州倍特生物制品公司)。

**1.2 成年兔骨髓的穿刺吸取** 动物全麻,常规消毒铺巾。兔自然侧卧位,双后肢自然伸直。双侧股骨

基金项目:全军医药卫生科研基金资助重大课题(01Z079)

通讯作者:吕昌伟 Tel: 029 - 3375291 E-mail: lvchangwei001@mail.china.com

粗隆部、坐骨结节穿刺,每个部位以预置 1 000 U 肝素的注射器吸取 2 ml 骨髓,同时适当震荡针管,以利于肝素和浓稠髓腔血迅速混合,匀速吸完,避免间断。共吸取骨髓血 10.0 ml,混合。

**1.3 骨髓间充质干细胞的分离扩增** 骨髓血离心洗涤 2 次(去除血清和脂肪颗粒),培养液 1:1 比例稀释,70 % Percoll 密度梯度离心分离(与分离液比例为 2:1),2 500 rpm 离心 25 min 后,吸取分层液上层云雾状细胞层。洗涤 2 次,转入孵箱,37 °C 5 % CO<sub>2</sub> 培养扩增。4 d 后首次换液,后隔日换液,分别传代扩增。培养液中加入 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 成为软骨诱导条件培养基。

**1.4 纤维蛋白胶复合体构建** 溶解纤维蛋白原和凝血酶。分别消化收集扩增的间充质干细胞。每只动物扩增的 bMSC 利用纤维蛋白原溶液重悬细胞成为  $4 \times 10^7$ /ml,通过 Y 形共推针头混合,注入模具,37 °C 静置 10 min 充分成形,得 4 mm  $\times$  6 mm  $\times$  6 mm 圆柱形复合体(细胞终浓度  $2 \times 10^7$ /ml)。随机分为动态培养和静止培养 2 组。

**1.5 分组和体外诱导软骨形成** 转入旋转培养箱内(初以每分钟 5 转旋转培养 3 d,后每分钟 10 转),37 °C 5 % CO<sub>2</sub> 培养 5 周。隔日换液,此组为动态培养组。静态培养组多个样本于同样培养条件下单纯静止培养。

**1.6 观察指标** 观察材料复合体的大体形态、色泽、质地和体积变化。噻唑兰(MTT)比色反应测量细胞活力进行比较,每个样本测量 6 次。每组取另一标本常规固定脱水、石蜡切片,HE 染色和甲苯胺兰染色,Ⅰ型和Ⅱ型胶原免疫组织化学染色。同时设立无关细胞为阴性对照,而皮肤和关节软骨为阳性对照。

**1.7 统计分析** 动态培养组和静止培养组细胞活力进行单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 骨髓间充质干细胞分离培养** 穿刺吸取成年兔的骨髓损伤很小,术后动物生活不受影响。分离的 bMSC 增殖旺盛,首次换液后去除大量未贴壁悬浮淋巴细胞,7 d 后细胞融合,传代扩增迅速,形态趋于一致的圆梭形外观。

**2.2 细胞和蛋白胶复合材料的构建和旋转培养** 细胞和纤维蛋白原溶解液混合均匀,溶液操作性能优良,通过 Y 形共推针头与凝血酶良好混合成为一体,迅速凝固成形。材料半透明磁白色,质地柔软,

操作性能尚好,可以夹取,表面光泽若果冻样。于旋转培养时呈现悬浮翻滚样特殊形态,浮动于培养液中下部。材料处于动态应力环境状态下。

**2.3 细胞活力比较** 经过 MTT 测量 2 组样本的细胞活力,以静止培养为参考,比较旋转培养的影响,结果如图 1。

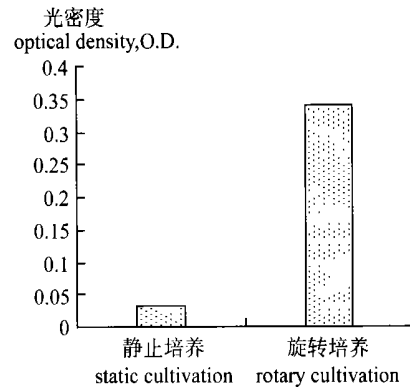


图 1 静止三维培养组和动态三维培养组细胞活力的直方图

Fig. 1 Histogram of cell vitality of static and dynamic culture groups using three-dimensional material

## 2.4 复合材料的软骨形成

**2.4.1 大体观察** 经过 5 周长期培养后,静止培养的材料体积明显缩小,破裂解体现象严重,大体形态丧失,成为多量 1~2 mm 碎片沉积于瓶底,材料颜色灰暗无光泽,轻触即碎;而动态培养的材料虽然整体体积相对也有一定缩小,但变化并不显著,材料较好保持圆柱形的大体形态,白色不透明,表面较为光滑。提示在本实验采用的载体材料中,长期静止培养对三维结构的人工组织影响较差,难以成功满足立体培养的需要。

**2.4.2 组织学切片和组化染色** 静止培养组材料破碎严重,碎片无法常规固定脱水,切片失败。而试验组材料顺利固定、包埋,切片后显示细胞和纤维蛋白胶复合良好,细胞均匀包埋于凝胶的三维支架结构中,细胞和材料结合紧密,在纤维蛋白胶的陷窝内生长,甲苯胺兰染色明显兰染,凝胶材料内部普遍出现均匀的强染色(见图 2),免疫组织化学染色发现明显Ⅰ型胶原表达(见图 3),无明显Ⅱ型胶原表达。

**2.5 统计分析** SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析:静止培养组材料细胞活力( $0.033 \pm 0.017$ )和动态培养组材料细胞活力( $0.322 \pm 0.039$ )存在显著统计学差异( $F = 1936.971, P < 0.01$ )。

## 3 讨论

因为异体细胞移植容易造成免疫排斥,更为严

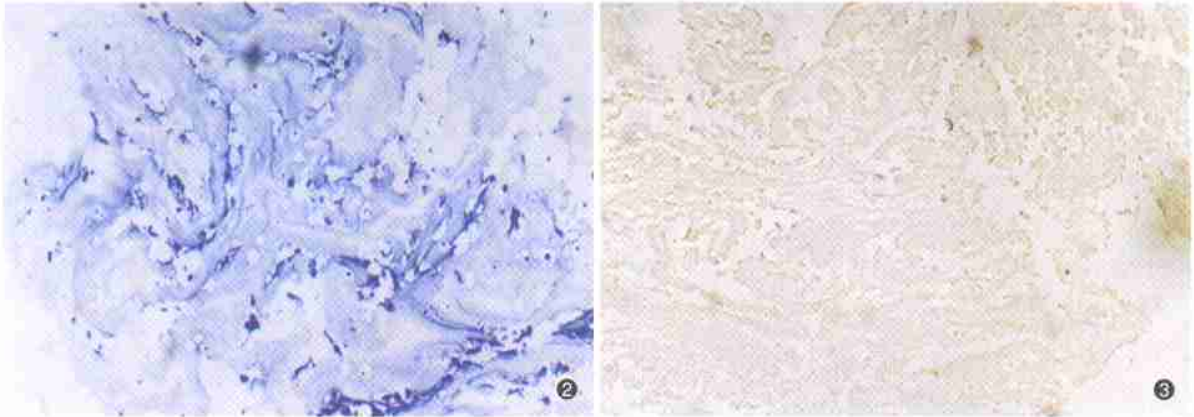


图2 旋转培养三维纤维蛋白胶复合物粘多糖沉积(甲苯胺兰染色, × 100倍)。图3 旋转培养三维纤维蛋白胶复合物Ⅱ型胶原表达(ABC免疫组织化学染色, × 100倍)

Fig2 Deposition of mucopolysaccharide in the cultured cells and fibrin glue compound of rotary cultivation group(Toluidine blue stain, × 100) Fig3 Ⅱ collagen expression of the cultured cells and fibrin glue compound of rotary cultivation group(ABC immunohistochemistry stain, × 100)

重的是还会传染供体的固有疾病,所以目前在软骨组织工程领域多提倡利用自体的细胞进行治疗<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞是成年动物骨髓中蕴含量非常丰富的原始细胞,传代多次后仍然保持分化成为骨、软骨的能力,取材简便创伤小,克服关节软骨细胞来源限制,是理想的组织工程前体细胞<sup>[2,3]</sup>。

目前体外构建组织工程软骨的能力有限,很重要的原因是材料内部的营养交换差<sup>[4]</sup>。生物反应器可以显著改善体外培养的营养交换<sup>[5]</sup>,有研究已经将生物反应器成功应用于软骨组装中,证明动态培养对体外构建三维组织的形态和质量均高于常规静止培养方法<sup>[6]</sup>。试验中也发现:转壁生物反应器中进行软骨分化,通过不规则的周期性流体剪切和瓶壁冲击等多重作用<sup>[7]</sup>,显著提高 bMSC 细胞活力,更好地维持了柔软的人造组织的大体形态,成功培养出立体的组织工程软骨组织。证明以成年动物为研究对象,动态的三维立体诱导培养可以明显诱发蛋白胶支架介导下的软骨形成。

纤维蛋白胶有着优越的生物相容性和生物降解性<sup>[8]</sup>,在凝血酶介导下快速凝固,可以使混悬其中的细胞固定在纤维蛋白凝胶形成生物网架中—多种研究都利用这一优点进行种子细胞的装配<sup>[9]</sup>。试验利用这一优势,一次性完成细胞支架的高效组合,保留

了细胞的全部活力和分化潜能,使得方法应用范围进一步扩大,为多种两相复合法为基础的软骨组织工程研究提供实验参考。

参考文献

- 1 Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res*, 2002, 4 (Suppl) :S63-68.
- 2 Murphy CL, Sambanis A. Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng*, 2001, 7 (6) :791-803.
- 3 Noel D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3 (7) :1000-1004.
- 4 Aung T, Miyoshi H, Tun T, et al. Chondroinduction of mouse mesenchymal stem cells in three-dimensional highly porous matrix scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61 (1) :75-82.
- 5 Nielsen L.K. Bioreactors for hematopoietic cell culture. *Annu Rev Biomed Eng*, 1999, 1 :129-152.
- 6 Solchaga LA, Seidel J, Zeng L, et al. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds. *J Faseb*, 2002, 16 (12) :1691-1694.
- 7 Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res*, 2002, 62 (1) :136-148.
- 8 Simonsen RJ. Pit and fissure sealant: review of the literature. *Pediatr Dent*, 2002, 24 (5) :393-414.
- 9 Doolin EJ, Strande LF, Sheng X, et al. Engineering a composite neotrachea with surgical adhesives. *J Pediatr Surg*, 2002, 37 (7) :1034-1037.