

· 基础研究 ·

PLGA-[ASP-PEG]三嵌段基质材料对骨髓间充质干细胞黏附增殖及诱导成骨分化的研究

段智霞^{1,2}, 郑启新¹, 郭晓东¹, 白玉², 袁泉¹, 陈顺广¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430022; 2. 郑州市骨科医院, 河南 郑州 450000)

【摘要】 目的: 探讨聚乳酸聚乙醇酸共聚物(poly lactic acid-co-glycolic acid, PLGA)-天冬氨酸(asparagic acid, ASP)-聚乙二醇(poly ethylene glycol, PEG)三嵌段多元共聚物上骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的黏附、增殖及成骨分化情况。方法: 在 PLGA 支架材料中引入 PEG 和含有多个功能位点的 ASP, 制成 PLGA-[ASP-PEG] 三嵌段高分子支架材料。将材料与 MSCs 复合培养, 以未改性的 PLGA 支架材料作对照, 通过沉淀法、MTT 法和考马斯亮蓝法分别检测 MSCs 的黏附和增殖变化。用成骨诱导培养基培养 14 d 和 28 d, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色和钙结节染色了解 MSCs 成骨分化情况。结果: MSCs 在 PLGA-[ASP-PEG]材料表面贴壁生长, 细胞数目明显多于对照组。细胞黏附率检测显示, PLGA-[ASP-PEG]表面 MSCs 的黏附性能和增殖能力明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。MTT 比色实验显示 MSCs 在 PLGA-[ASP-PEG]三嵌段材料上培养 20 d 后, 吸光度(A)值为 1.336, 约为对照组 0.780 的 2 倍。培养 12 d 时, PLGA-[ASP-PEG]材料组的细胞蛋白含量为 66.44 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 对照组为 41.23 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 。成骨诱导培养基培养后, ALP 染色和钙结节染色均为阳性, PLGA-[ASP-PEG]三嵌段材料及其降解产物不影响 MSCs 的成骨分化。结论: PLGA-[ASP-PEG]能促进组织工程种子细胞在骨基质材料表面的黏附、增殖, 并能较好地保持细胞的形态, 对成骨分化无明显影响。

【关键词】 骨; 组织工程; 细胞黏附; 细胞增殖

Adhesion, proliferation and osteodifferentiation of bone mesenchymal stem cells on PLGA-[ASP-PEG] tri-block polymer scaffolds DUAN Zhi-xia*, ZHENG Qi-xin, GUO Xiao-dong, BAI Yu, YUAN Quan, CHEN Shun-guang. *Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the adhesion, proliferation and osteodifferentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) on the prepared lactic acid/glycolic acid/asparagic acid-co-polyethylene glycol (PLGA-[ASP-PEG]) tri-block polymer scaffolds. **Methods:** Modified PLGA with polyethylene glycol (PEG) and asparagic acid (ASP) that has many ligands, and then the synthesis PLGA-[ASP-PEG] tri-block polymer material was prepared. BMSCs were cultured in PLGA-[ASP-PEG] polymer material and poly lactic acid-co-glycolic acid (PLGA) were used as control group. Precipitation method, MTT assay and total cellular protein detection were used to test the adhesion and proliferation of BMSCs. After the third generation of BMSCs was cultured on PLGA-[ASP-PEG] tri-block polymer scaffolds for 14 day and 28 day with osteogenic supplements, the osteodifferentiation of MSCs were observed through alkaline phosphatase (ALP) staining and calcium tubercle staining. **Results:** BMSCs grew adherent to the surface of PLGA-[ASP-PEG] polymer scaffolds and the number of BMSCs was much higher than that of PLGA. The precipitation method suggested that adhesion and proliferation of BMSCs on the surface of PLGA-[ASP-PEG] was much higher than the control group ($P < 0.05$). MTT assay showed that after BMSCs were cultured for 20 days, the absorbance A of PLGA-[ASP-PEG] polymer scaffolds and PLGA were 1.336 and 0.780 respectively. Total cellular protein could image the adhesion and proliferation of BMSCs indirectly. After BMSCs were cultured for 12 days, the total cellular protein of PLGA-[ASP-PEG] and PLGA were 66.44 $\mu\text{g}/\text{pore}$ and 41.23 $\mu\text{g}/\text{pore}$ respectively. PLGA-[ASP-PEG] polymer scaffolds had well biocompatibility and cell adhesion. The positive results with ALP staining and calcium tubercle staining in both groups indicated tri-block polymer scaffold and its degradations had no effect on osteodifferentiation. **Conclusion:** PLGA-[ASP-PEG] could improve the adhesion and proliferation of seed cells on bone-matrix material, maintain the morphous of seed cells and had no obvious effect on cell osteodifferentiation.

Key words Bones; Tissue engineering; Cell adhesion; Cell proliferation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(4): 282-284 www.zggszz.com

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30170270, 30200063, 30470483); 武汉市青年科技晨光计划(编号: 20045006071-10)

通讯作者: 郭晓东 E-mail: gxdwh@yahoo.com.cn

聚乳酸聚乙醇酸共聚物(poly lactic acid-co-glycolic acid, PLGA)是目前骨组织工程学研究中应用最多的支架材料^[1], 由于其分子链中缺乏活性功能基团, 表面疏水性较强, 对细胞的黏附能力较差, 致使生物学活性不理想, 限制了其在组织工程方面的广泛应用^[2]。要扩大 PLGA 在组织工程支架材料中的应用, 改进材料与细胞的亲和力, 增加材料自身的功能结合位点是关键。我们的实验通过对 PLGA 改性, 在分子链中引入具有良好生物相容性和亲水性的聚乙二醇(poly ethylene glycol, PEG)链段和含有多个功能位点的天冬氨酸(asparagic acid, ASP), 合成 PLGA-[ASP-PEG]三嵌段多元共聚物支架材料, 诱导骨组织工程种子细胞——骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的黏附和增殖, 进而向成骨方向定向分化。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、材料和实验动物 ①实验仪器: Axiovert 35 型倒置相差显微镜(Zeiss Corp 公司, 德国); X-650 型扫描电镜; RJ17-5031 型酶联免疫检测仪(Hitachi 公司, 日本); WFZ-26A 型紫外分光光度计(天津天光光学仪器有限公司); 低糖 DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司, 美国); 胰蛋白酶(Sigma 公司, 美国); 培养板(苏州欧普实验室设备有限公司); PLGA 共聚物(中山大学高分子研究所); PLGA-[ASP-PEG]共聚物(与中山大学高分子研究所合作研制)。②实验材料: 将 PLGA-[ASP-PEG]和 PLGA 材料分别制成 1.0 cm×1.0 cm×0.1 cm 的膜。平均相对分子质量为 2.215×10^4 。超声波清洗, 自然干燥, 环氧乙烷消毒备用。③实验动物: 4 周龄 SD 大白鼠 8 只, 雌雄不限, 体质量(120±15) g, 同济医学院动物实验中心提供。

1.2 实验方法及分组 实验动物 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 双侧下肢剪毛, 75% 乙醇浸泡消毒 30 min(将大白鼠头露于外面), 无菌条件下取出双侧胫骨和股骨, 剪除骨端。10 号注射器抽 1 ml DMEM 完全培养基(含 20% 小牛血清, 100 mg/ml 青、链霉素)自一端冲洗, 制成单细胞悬液, 以 3×10^4 /ml 细胞数接种至 100 ml 培养瓶中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 孵育箱中, 24 h 后全量换液, 以后每 3 d 换液 1 次。待细胞汇合成单层后, 用 0.25% 胰蛋白酶进行 1:3 消化传代, 接种密度 3×10^4 /ml, 继续培养, 取第 3 代细胞备用。实验分 2 组: 实验组为 PLGA-[ASP-PEG]三嵌段材料, 对照组为单纯 PLGA 材料。

1.3 检测项目

1.3.1 细胞与材料复合情况 将制备好的 2 组材料分别置于 24 孔培养板, 取第 3 代 MSCs, 调整细胞密度为 1×10^5 /ml, 每片材料上加 0.5 ml 细胞悬液, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。分别于培养 1、3、5 及 7 d 在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

1.3.2 细胞黏附率检测 将制备好的 2 组材料分别置 24 孔培养板中, 取第 3 代 MSCs, 调整细胞密度为 1×10^5 /ml, 每片材料上加 0.5 ml 细胞悬液, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4、12 和 24 h 后, PBS 液冲洗, 去除未黏附的细胞。用 0.25% 胰蛋白酶进行消化, 收集细胞并计数, 计算细胞黏附率。黏附率=黏附细胞数/总细胞数×100%。

1.3.3 MTT 比色实验检测传代细胞成活与增殖 将 2 组材料分别置 96 孔板中, 收集第 3 代 MSCs 以 1×10^5 /ml 接种至

材料上($n=5$), 分别于 1、3、5、7、10、15 和 20 d 每组加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl, 培养箱继续培养 4 h, 终止培养, 去除上清液。每孔加入 150 μl DMSO, 震荡 10 min, 充分溶解结晶物, 选择 490 nm 波长, 用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度(A)值。

1.3.4 考马斯亮蓝法检测细胞总蛋白含量 将 2 组材料分别置 96 孔板中, 取第 3 代 MSCs, 调整细胞密度为 1×10^5 /ml, 每片材料上加 200 μl 细胞悬液, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 第 4、8 和 12 天取细胞裂解液 100 μl, 加入 1.0 ml 显色剂 CBBG250, 紫外分光光度计于 595 nm 测定吸光值。各组每个时点检测 5 个样本($n=5$)。

1.3.5 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色和钙结节染色 将制备好的 2 组材料分别置于 6 孔培养板中, 取第 3 代 MSCs, 调整细胞密度为 1×10^5 /ml, 每片材料上加 0.5 ml 细胞悬液, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞长至融合时, 换成骨诱导培养基(含 10% 小牛血清、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 mg/L L-抗坏血酸、 1×10^{-8} mol/L 地塞米松), 每 2~3 d 更换新鲜培养基 1 次。培养 14 d, 采用改良 Gomori 钙结显示 ALP 染色。培养 28 d 采用 Von-Kossa 法显示钙结节染色。

1.4 统计学处理 采用 SPSS V12.0 统计软件包进行分析, 结果以均数±标准差表示。组间比较采用成组设计定量资料 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞与材料复合后生长情况 倒置相差显微镜下观察, PLGA-[ASP-PEG]三嵌段材料表面复合培养 MSCs 4 h, 细胞即可贴壁, 呈圆形或椭圆形。1 d 时细胞在材料表面生长良好, 呈长梭形, 分布均匀。3 d 时细胞增殖, 数量增多, 呈梭形或多角形。5~7 d, 细胞数量明显增多, 呈单层生长, 长满瓶壁。单纯 PLGA 材料表面, MSCs 数量明显较少, 且随培养时间的延长, 细胞增加不明显。

2.2 细胞黏附率检测 2 组材料接种 MSCs 4、12 和 24 h 后, 黏附率结果见表 1。4 h 时, 实验组细胞黏附率高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。2 组 4 h 与 12 h 时的黏附率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。12 h 与 24 h 时的黏附率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 MTT 比色实验检测传代细胞成活与增殖 2 组材料接种细胞后分别观察 1、3、5、7、10、15 和 20 d, MTT 结果显示(见图 1): 培养 5 d 时, 实验组吸光值为 0.84, 对照组为 0.59, 2 组比较 $P = 0.023 < 0.05$; 到 10 d 时达平台期, 实验组为 1.34, 而对照组为 0.76, 2 组比较 $P = 0.034 < 0.05$ 。统计结果表明实验组细胞成活与增值高于对照组。

2.4 考马斯亮蓝测定 2 组材料接种细胞观察 4、8 和 12 d 后, 细胞总蛋白含量检测结果见表 1。各时点相比, 实验组细胞蛋白含量高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 ALP 染色和钙结节染色 MSCs 分别与 2 组材料复合后经成骨诱导培养基培养 14 d, 细胞呈聚集、复层生长, 细胞形态逐渐变为多角形和立方形等, 细胞外基质分泌增多, ALP 染色可见多数细胞胞浆有黑色颗粒沉着, 为 ALP 阳性细胞。阳性率: 实验组为(82.2±15.6)%, 对照组为(67.4±8.3)%, $P = 0.135 > 0.05$, 差异无统计学意义。2 组材料经条件培养基培养 28 d, Von-Kossa 法染色显示钙结节阳性。

表 1 不同时点两组材料细胞黏附率及细胞的蛋白质含量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of adherency and protein contents of BMSCs in two groups at different time points($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞黏附率(%)			细胞蛋白质含量($\mu\text{g}/\text{孔}$)		
	4 h	12 h	24 h	4 d	8 d	12 d
PLGA-[ASP-PEG]组	47.900 \pm 1.038*	70.300 \pm 2.380**	72.500 \pm 1.577***	33.270 \pm 3.681 Δ	52.390 \pm 1.060 $\Delta\Delta$	66.440 \pm 2.375 $\Delta\Delta\Delta$
对照组	28.200 \pm 1.260	46.000 \pm 1.761**	49.800 \pm 0.694***	21.160 \pm 2.179	36.880 \pm 3.794	41.230 \pm 2.003

注: *与对照组比较, $P=0.012 < 0.05$, 实验组细胞黏附率高于对照组; **4 h 与 12 h 比较, $P=0.029 < 0.05$, 认为延长有利于细胞黏附; ***12 h 与 24 h 比较, $P=0.360 > 0.05$, 提示细胞的黏附过程在 12 h 基本完成, 继续延长, 对 BMSCs 的黏附率无显著改善。 Δ 与对照组比较, $P=0.035 < 0.05$; $\Delta\Delta$ 与对照组比较, $P=0.049 < 0.05$; $\Delta\Delta\Delta$ 与对照组比较, $P=0.022 < 0.05$

Note: *Compared with control group ($P=0.012 < 0.05$), the adhesion rate of PLGA-[ASP-PEG] group was higher than control group. **In group comparison, there was statistical difference between 4 hours and 12 hours ($P=0.029 < 0.05$) which indicated BMSCs could be improved by prolonged time. ***In group comparison, there was no statistical difference between 12 hours and 24 hours ($P=0.360 > 0.05$) which suggest BMSCs' adhesion were finished within 12 hours, prolonged time had no influences on cells adhesion rate. Δ Compared with control group, $P=0.035 < 0.05$; $\Delta\Delta$ Compared with control group, $P=0.049 < 0.05$; $\Delta\Delta\Delta$ Compared with control group, $P=0.022 < 0.05$

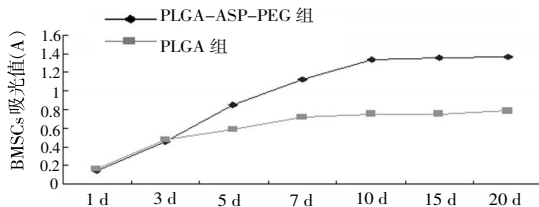


图 1 两种材料不同时点 BMSCs 增殖情况

Fig.1 Proliferation of BMSCs in two groups at different time points

3 讨论

为了提高细胞与支架材料间的黏附能力, 对支架材料进行必要的改性非常重要, 即在保持材料物理、力学性能的前提下引入可促进细胞黏附、生长的生物活性分子, 可显著改善材料的细胞相容性^[3]。材料表面的亲(疏)水平衡是调节蛋白质吸附、影响细胞黏附的一个重要因素。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(PEG)多肽序列具有良好的亲水性, 不具有免疫原性, 是目前作为亲水性组分引入聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)、PLGA 分子链中最常用的物质^[4-5]。

在聚合物表面接枝带有对细胞的黏附和生长具有促进作用的氨基酸及其衍生物, 是实施生物材料表面改性的另一途径。在材料表面固定的氨基酸及其衍生物可以与细胞膜表面的蛋白多糖结合, 促进细胞的黏附, 还可以增加材料的表面电荷浓度, 提高细胞的黏附力。

我们的实验在以往实验的基础上, 以 ASP-PEG 交替预聚物为引发剂引发丙交酯、乙交酯开环共聚, 合成 PLGA-[ASP-PEG]三嵌段多元共聚物。在 PLGA 分子链中同时引入具有能与肽链结合的含有氨基结合位点的 ASP 以及亲水性强、对细胞和多肽蛋白相容性好的 PEG 链段。细胞与材料复合培养观察发现, MSCs 在 PLGA-[ASP-PEG]材料表面贴壁生长, 细胞数目明显多于单纯 PLGA 材料表面。通过对不同时点细胞黏附率的测定发现, MSCs 在材料表面的黏附在 12 h 与 24 h 无明显变化, 即黏附过程在 12 h 基本完成, 继续延长, 对 MSCs 的黏附率无显著改善。MTT 比色实验检测传代细胞黏

附与增殖情况, MSCs 在实验组材料上培养 20 d 后, A 值为 1.336, 约为对照组 0.780 的 2 倍, 表明实验组活细胞数明显多于对照组。同理, 考马斯亮蓝通过测定细胞内蛋白总量, 间接反映细胞黏附及增殖情况。结果表明, 培养 12 d 时, 实验组材料表面黏附的细胞明显多于对照组, 间接说明 PLGA-[ASP-PEG]三嵌段材料生物相容性好, 细胞黏附力强的特点。

支架材料与种子细胞黏附、增殖后, 在细胞因子作用下诱导细胞向特定方向分化是组织工程学研究的目的。ALP 染色和钙结节染色是目前较常用的检测 MSCs 成骨分化的手段。本组实验表明, MSCs 与 2 组材料复合后经条件培养基培养, ALP 染色和钙结节染均为阳性, 尽管 ALP 阳性率在 2 组材料中有所不同, 但无统计学意义, 差异考虑为细胞在 2 种材料上的黏附率不同造成的, 与材料的成骨诱导无关。实验表明, PLGA-[ASP-PEG]三嵌段材料及其降解产物不影响 MSCs 的成骨分化。

参考文献

- 1 Ren T, Ren J, Jia X, et al. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. J Biomed Mater Res A, 2005, 74(4):562-569.
- 2 Karp JM, Shoichet MS, Davies JE. Bone formation on two-dimensional poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds in vitro. J Biomed Mater Res A, 2003, 64(2):388-396.
- 3 Lieb E, Tessmar J, Hacker M, et al. Poly(D, L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers control adhesion and osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. Tissue Eng, 2003, 9(1):71-84.
- 4 李宏卫, 张栋华, 祁兵, 等. 乳酸和乙醇酸共聚物膜的细胞亲和性实验研究. 南京医科大学学报(自然科学版), 2005, 25(12):959-961.
- 5 全大萍, 高建文, 廖凯荣, 等. 聚乳酸-聚乙二醇-聚乳酸三嵌段共聚物的降解性能. 功能高分子学报, 2002, 15(4):391-394.

(收稿日期:2007-11-06 本文编辑:连智华)