

壳聚糖及其改性材料对骨髓基质细胞的作用

杨明, 朱姗姗, 陈钺, 常智杰, 公衍道, 赵南明, 张秀芳

(清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 壳聚糖是一种广泛应用的生物可降解材料。该论文研究了几种与壳聚糖相关的材料对骨髓基质细胞生长和分化的作用。主要实验方法是在材料表面培养骨髓基质细胞并对其诱导促使其向成骨细胞方向分化。通过对细胞生长和分化情况的观察和测定, 对几种材料与骨髓基质细胞的亲和性作出了评价。另外, 通过 ELISA 法测定了细胞外基质分子在材料上的吸附量, 测量了各材料的表面接触角以研究细胞在材料表面的铺展和增殖。结果表明尽管壳聚糖本身与骨髓基质细胞并不具有很好的亲和性, 但通过与明胶混合, 壳聚糖的生物相容性得到了明显提高, 是很有应用前景的骨修复材料。

中图分类号: 壳聚糖; 明胶; 骨髓基质细胞; 细胞外基质分子; 蛋白质吸附

中图分类号: Q421 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2002)04-0456-06

壳聚糖是一种具有良好生物相容性的可降解生物材料^[1]。目前认为壳聚糖对多种细胞的生长均有促进作用, 但有关壳聚糖对骨髓基质细胞作用的报道尚不多见。骨髓基质细胞是一种多能干细胞, 在一定的条件下能够向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞等方向分化^[2]。本论文研究了壳聚糖和它的几种相关材料与骨髓基质细胞的亲和性, 这些材料包括壳聚糖(Chi)、壳聚糖和明胶混合(CAG)、壳聚糖和多聚赖氨酸混合(CPL)。多聚赖氨酸(PL)和明胶(Gel)作为参照。实验中, 在上述材料表面培养骨髓基质细胞并诱导其向成骨细胞方向分化, 研究材料与细胞的相互作用及其机理, 并根据骨髓基质细胞的增殖及分化情况, 比较各材料的骨髓基质细胞亲和性。

细胞在材料表面的生长、增殖和分化速度取决于细胞在材料表面初次贴壁和铺展的情况^[3]。而细胞的贴壁和铺展则受以下几个因素的影响。首先是材料的性质。已有研究显示细胞的初次贴壁和伸展受材料表面的理化性质影响, 如亲水性和表面电荷。本文测量了各种材料的表面接触角, 比较了各种材料的亲水性, 以研究材料和骨髓基质细胞相互作用的机理。决定细胞贴壁和伸展的另一个因素是细胞外基质(ECM)中的粘连蛋白, 如纤粘连蛋白(fibronectin)和层粘连蛋白(laminin)。纤粘连蛋白广泛地参与细胞行为, 最明显的例子是: 纤粘连蛋白可以作为粘连分子, 使细胞与其它细胞或基底结合。Lin 等用体外模型实验研究细胞吸附时, 发现

纯化的纤粘连蛋白可以增强细胞与细胞及细胞与基底之间的粘附作用。本实验采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)研究了纤粘连蛋白和层粘连蛋白在不同材料表面上吸附量的差异, 从而探讨细胞外基质分子在骨髓基质细胞与材料相互作用中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料的制备

我们使用如下几种材料, 其中壳聚糖(脱乙酰度 85%)、明胶和多聚赖氨酸均为 Sigma 公司产品。

Chi: 1%壳聚糖的乙酸溶液流延并在 50°C 烘干成膜, 然后用 80%乙醇洗至中性。

CAG: 将 100 ml 浓度为 1%的壳聚糖溶液, 与 10 ml 浓度为 10%的明胶溶液充分混合, 经流延成膜后, 用 80%乙醇洗至中性。

CPL: 量取 50 ml 浓度为 1%的壳聚糖溶液, 与 50 ml 浓度为 0.2 g/L 的多聚赖氨酸充分混合,

收稿日期: 2002-05-17

基金项目: 国家科技部“863 计划”项目(2001AA625060)和国家科技部“973”重大基础研究项目(G1999064702)

作者简介: 杨明, 硕士生, 1976 年生, 电话: (010)62784766, E-mail: mingyang99g@mails.tsinghua.edu.cn

通讯作者: 张秀芳, 电话: (010)62783261, 传真: (010)62794214, E-mail: zxf-dbs@tsinghua.edu.cn

经流延成膜后,用 80% 乙醇洗至中性。

Gel: 0.2% 的明胶水溶液流延并在 50℃ 烘干成膜,然后用去离子水清洗三次。

PL: 在培养板底部加入 0.1% 多聚赖氨酸并静置 20 min,弃去上清后用去离子水洗三次。

1.2 材料亲水性的测定

在盖玻片上制备以上材料,处理后将去离子水滴加在材料表面,然后用接触角测量仪(JY-82 型)测量去离子水与各种材料的接触角。

1.3 蛋白质吸附实验

我们采用 ELISA 法研究材料对纤粘连蛋白和层粘连蛋白溶液中纤粘连蛋白和层粘连蛋白的吸附。分别配制以下蛋白质(抗原)溶液: 5 mg/L 的纤粘连蛋白溶液(FN), 5 mg/L 的层粘连蛋白溶液(LN)。在铺好以上五种材料的酶标板孔内逐孔加入 50 μ l 抗原溶液,置于 4℃ 过夜。弃去上清后,用含 0.05% Tween 20 的 PBS 溶液洗涤一次,加入 150 μ l 0.5% 的鸡卵清白蛋白溶液封闭,室温放置 2 h。弃去上清并洗涤后,在阳性孔中加入 50 μ l 第一抗体溶液(兔抗人纤粘连蛋白抗体和兔抗鼠层粘连蛋白抗体,北京大学医学部提供),阴性孔中加入 50 μ l PBS 作为对照,室温放置 1.5 h。弃去上清并洗涤后,逐孔加入 50 μ l 羊抗兔 IgG-HRP,室温放置 1 h。弃去上清并洗涤后,逐孔加入邻苯二胺(OPD)底物溶液 100 μ l,避光反应 10 min 后,每孔加入 50 μ l 的 2 mol/L H_2SO_4 中止反应,用酶标仪测定 A_{490} 。

1.4 骨髓基质细胞在材料表面的培养及诱导分化

取铺有材料的 24 孔培养板,接种细胞前经紫外线照射灭菌 6 h 以上。取经传代培养 5 代以内的人骨髓基质细胞(北京海淀医院赠送),经消化、离心后,加入含诱导剂的 DMEM 高糖培养基(除含有 10% 胎牛血清及 100 mg/L 青霉素与链霉素外,另含有 10^{-7} mol/L 地塞米松,0.05 g/L 抗坏血酸和 10 mmol/L β -甘油磷酸钠)制成细胞悬液,细胞密度分别为 1×10^5 细胞/ml(用于 MTT 实验)和 3×10^4 细胞/孔(用于长期培养)。在培养板上每孔加入 1 ml 的细胞悬液,在 37℃, 5% CO_2 下培养,每 3 d 更换一次培养基。骨髓基质细胞的培养与通常的细胞培养方法相同,不再赘述。

1.5 MTT 实验

在材料表面接种骨髓基质细胞后的 48 h,逐孔加入 100 μ l 浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液,在 37℃ 下继续培养 4 h。弃去上清后,每孔加入 2 ml

DMSO,振荡 10 min 后用 HITACHI U-3010 型分光光度计测定 A_{570} 。

1.6 经诱导分化的骨髓基质细胞碱性磷酸酶活性的测定

碱性磷酸酶的大量表达是成骨细胞的重要标志之一,因而通过测定细胞碱性磷酸酶的活性,可以检测骨髓基质细胞经诱导后向成骨细胞分化的程度及分化潜能。实验中通过测定被碱性磷酸酶水解的对硝基苯磷酸二钠(PNPP)的量来确定细胞内碱性磷酸酶的活性。

取出待测 24 孔培养板,弃去培养基并用 PBS 冲洗后,每孔加入 250 μ l 浓度为 0.1% 的 Triton X-100 溶液,轻轻吹打以使细胞充分裂解。分别从每孔中取出 100 μ l 裂解产物,加入 500 μ l 碱性磷酸酶底物溶液(含 20 mmol/L PNPP 及 0.1 mol/L $MgCl_2$ 的浓度为 1.5 mol/L 的 2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液),置于 37℃ 反应 30 min 后加入 2 ml 0.25mol/L NaOH 中止。然后使用 HITACHI U-3010 型分光光度计测定 A_{405} 。从每孔中再取出 100 μ l 细胞裂解液,使用 PIERCE 公司的 BCA 总蛋白试剂盒测定细胞内的总蛋白含量。最后用测得的总蛋白含量对碱性磷酸酶活性进行标准化处理,最终的碱性磷酸酶活性以每毫克蛋白质每分钟水解的 PNPP 的量 (nmol/min·mg) 为单位。

1.7 经诱导分化的骨髓基质细胞碱性磷酸酶染色

除测定碱性磷酸酶活性外,我们还通过组织化学染色的方法检验骨髓基质细胞碱性磷酸酶的表达,同时对骨髓基质细胞在材料表面的生长形态进行了观察。

取要进行染色的 24 孔培养板,弃去培养基,用 95% 乙醇固定 10 min。用蒸馏水洗涤数次后加入孵育液(含有 5 ml 3% β -甘油磷酸钠, 5 ml 2% 巴比妥钠, 10 ml 2% $CaCl_2$, 1 ml 2% $MgSO_4$ 和 10 ml 蒸馏水)在 37℃ 孵育 4-6 h。依次加入 2% 硝酸钴和 1% 硫化铵染色后,再用 0.5% 伊红进行复染。然后用 Nikon 显微镜进行观察并拍照。

2 实验结果

2.1 五种材料的接触角

图 1 显示各种材料表面的接触角。接触角越小,材料的亲水性就越强。由图可知, Gel 的亲水性最强, CAG 和 PL 次之,而 Chi 和 CPL 则相对较为疏水。

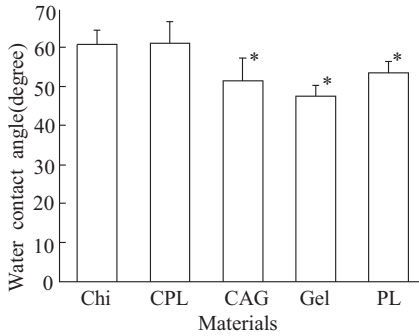


Fig.1 The water contact angle of all five materials.

N>6 surfaces, *P<0.05 relatively to Chi

2.2 ELISA 法测五种材料对蛋白质的吸附量

图 2 显示了各种材料对纤粘连蛋白和层粘连蛋白吸附的实验结果。由图可知: PL 对纤粘连蛋白的吸附能力最强; 与明胶相关的材料, Gel 和 CAG 次之; CPL 和 Chi 对纤粘连蛋白的吸附能力相对较弱。对层粘连蛋白的吸附, PL 的吸附量仍然最高, 与纤粘连蛋白吸附结果不同的是, Chi 和 CPL 也有较强的吸附层粘连蛋白的能力, 而 Gel 和 CAG 对层粘连蛋白的吸附能力最低。

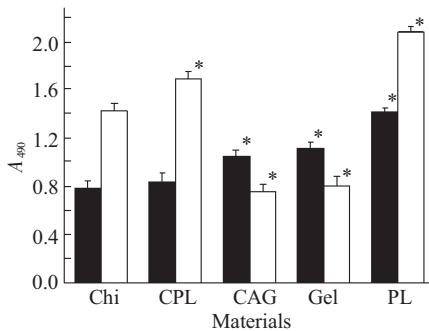


Fig.2 The ECM proteins adsorbed on all materials.

N=6 surfaces, *P<0.05 relatively to Chi

■ fibronectin □ laminin

2.3 MTT 实验测得的骨髓基质细胞在五种材料表面的增殖

由于在细胞接种 48 h 后即进行 MTT 实验, 因此结果主要反映了骨髓基质细胞在材料表面的吸附、铺展和初期增殖的情况。通过显微镜观察可以看到: 骨髓基质细胞接种后的较短时间内, PL 上的细胞即开始贴壁铺展, 细胞形态由球形变为成纤维状; Gel 和 CAG 上的细胞也能较快地贴壁, 而且细胞的形态比 PL 上的细胞更为细长; CPL 和 Chi 上只有很少量的细胞形状变为成纤维状, 而且和 PL、Gel 及 CAG 相比, 细胞的铺展也不够充分, 其它大量细胞则始终呈球形。

图 3 为 MTT 实验结果。由图可知: PL 上的细

胞贴壁、增殖最为显著, Gel 和 CAG 其次, CPL 和 Chi 的值则远低于其它 3 种材料。

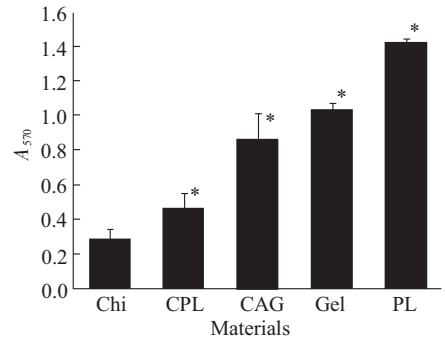


Fig.3 Growth of marrow stromal cells on all the materials. N=6 surfaces, *P<0.05 relatively to Chi

2.4 经诱导分化的骨髓基质细胞的碱性磷酸酶活性

图 4 显示在材料表面培养骨髓基质细胞并诱导其分化 4 d 和 16 d 后细胞的碱性磷酸酶活性。从培养 48 h 后的 MTT 实验和显微镜观察可知, Chi 和 CPL 表面仅有很少量的细胞贴壁并保持正常形态, 在培养 4 d 后, 不能检测到明显的碱性磷酸酶表达。而在 PL、Gel 和 CAG 表面生长的细胞, 在培养 4 d 后即可检测到碱性磷酸酶的表达, 而且随着时间的增加, 细胞在 PL、Gel 和 CAG 表面继续增殖并分化。在开始培养后的第 16 天, Chi 和 CPL 表面的细胞有较低量的碱性磷酸酶表达。而 PL、Gel 和 CAG 表面的细胞具有较高的碱性磷酸酶活性, 说明有大量的骨髓基质细胞经诱导后已经分化为成骨细胞。

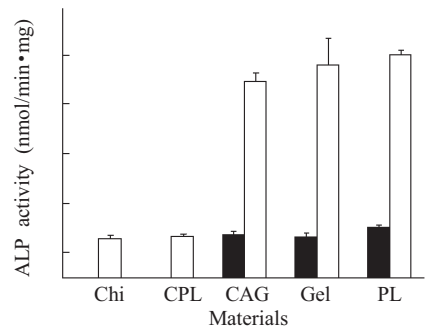


Fig.4 Alkaline phosphatase (ALP) activity of marrow stromal cells on all the materials. N=6 surfaces, *P<0.05 relatively to Chi ■ 4 d □ 16 d

2.5 经诱导分化的骨髓基质细胞碱性磷酸酶染色

图 5 为在材料表面培养并诱导 4 d 后的细胞碱性磷酸酶染色照片。培养 4 d 后, Chi 和 CPL 表面仅有少量细胞贴壁生长, 其中只有一部分呈成纤维状, 在接种初期大量圆形的细胞由于无法保持正常

形态,不能在材料表面继续生长。CAG、Gel和PL表面已经有一定数量的细胞生长,形态多为成纤维状,少量呈多角形,说明材料和骨髓基质细胞有良好的亲和性,能够促进细胞的贴壁和增殖。同PL表面的细胞相比,Gel和CAG表面的细胞形态

更为细长。从图中可见,到第4天的时候,PL表面有部分细胞呈弱的碱性磷酸酶阳性,其它材料表面的骨髓基质细胞则没有表现出明显的碱性磷酸酶阳性。图6为在材料表面培养并诱导16天后的细胞碱性磷酸酶染色照片。Chi和CPL表面仍然仅有

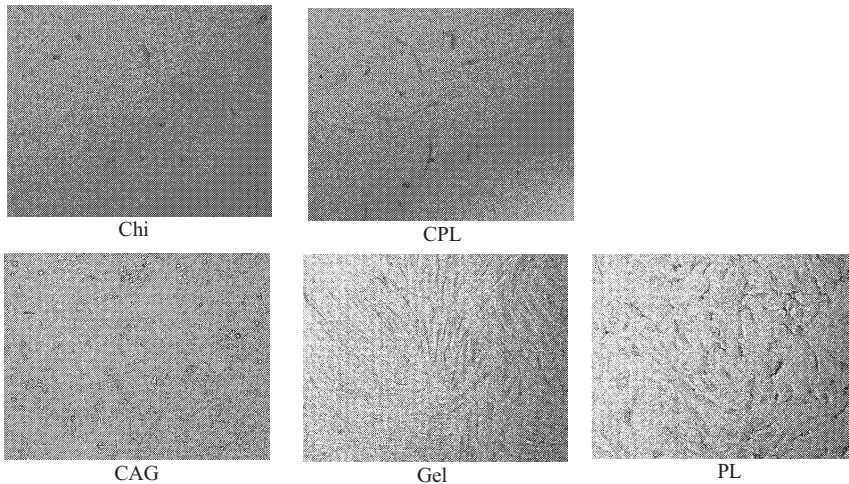


Fig.5 Photos of ALP staining of marrow stromal cells cultured for 4 days on all materials(100x)

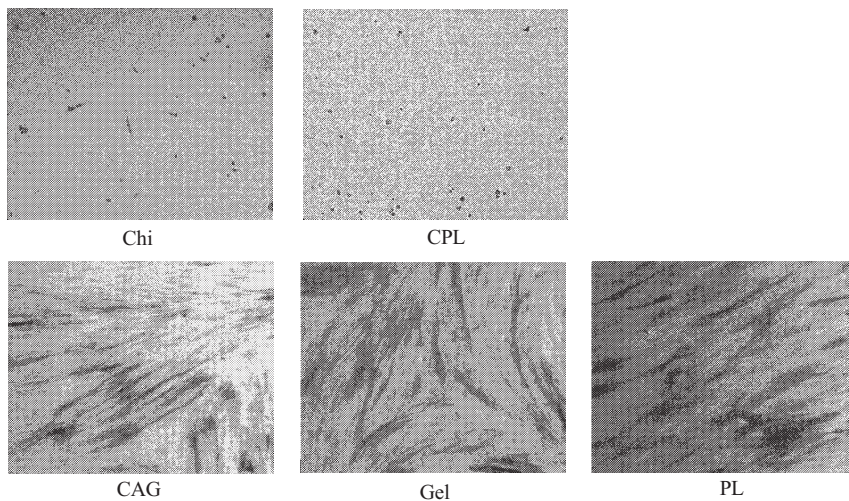


Fig.6 Photos of ALP staining of marrow stromal cells cultured for 16 days on all materials(100x)

很少量细胞生长,且无明显的碱性磷酸酶阳性。其中Chi表面几乎没有成纤维状细胞贴壁,只有少量圆形细胞。CPL表面可见少量成纤维状或多角形细胞,但形态较为纤细,说明细胞的贴壁生长不够充分。由此可见Chi和CPL与骨髓基质细胞的亲和性较差。在PL、Gel和CAG表面,骨髓基质细胞已经铺满材料表面,形态呈成纤维状。PL表面的细胞大多沿单一方向平行排列,而Gel和CAG表面的细胞排列方向并不唯一。三种材料表面均有大量细胞呈碱性磷酸酶强阳性,说明骨髓基质细胞经诱导已经分化为成骨细胞。以上现象表明骨髓基质细胞在PL、Gel和CAG表面不仅能够贴壁、增

殖,经诱导后还能够分化为成骨细胞,说明这三种材料具有良好的骨髓基质细胞相容性。

3 讨 论

细胞在生物材料表面的吸附、贴壁、铺展和生长是衡量材料生物相容性的重要指标之一。这个过程受很多因素的影响,包括材料的表面化学成分、物理化学性质以及表面形貌等等。有很多生物分子参与细胞在材料表面的吸附过程,如细胞外基质蛋白、细胞膜蛋白、细胞骨架蛋白等^[9]。当细胞非特异性吸附在材料表面后,会分泌如纤粘连蛋白、层

粘连蛋白和胶原蛋白等细胞外基质分子, 这些分子与材料表面结合后, 能够通过和细胞表面的整合素相互作用介导细胞在材料表面的特异性吸附。因此材料吸附细胞外基质分子的能力会影响材料对细胞的吸附。材料的亲水性也是影响材料和细胞相互作用的一个因素。根据 Webb 等^[9]的研究结果, 当材料暴露于稀释血清时, 亲水性材料比疏水性材料更能够促进细胞在材料表面的吸附和铺展, 亲水性材料上的细胞的细胞骨架也更有组织。另一方面, 据 Lampin 等^[9]的研究, 尽管疏水材料比亲水材料能够吸附更多的蛋白, 但亲水性材料能够可逆地吸附蛋白质, 从而保持被吸附蛋白质的正常构象。

我们通过 ELISA 实验和测定材料的接触角研究了材料吸附细胞外基质分子的能力和材料的亲水性, 并结合 MTT 实验研究了这些因素对材料吸附骨髓基质细胞的影响。在 ELISA 实验中, 由于吸附在材料表面的蛋白质的量是通过抗原 - 抗体的相互作用反映的, 因此吸光度 A_{490} 代表了材料所吸附的能够被抗体识别的蛋白质含量, 即在一定程度上保持其天然构象的蛋白质含量。由于多聚赖氨酸是一种带有正电荷且具有良好亲水性的生物分子, 在几种材料中对纤粘连蛋白和层粘连蛋白的吸附能力最强, 从而对骨髓基质细胞有较强的吸附并促进其增殖的能力。明胶是胶原水解后的产物, 保持了一定的胶原蛋白的生物活性。而胶原蛋白本身就是一种细胞外基质分子, 能够通过整合素的作用促进细胞的贴壁和生长。另外, 根据 Borkenhen 等^[7]的研究结果, 纤粘连蛋白有多个功能结构域, 其中一些可直接与 I - IV 型胶原结合, 而且纤粘连蛋白结合变性胶原(明胶)的能力远远强于结合天然胶原的能力。这也在一定程度上解释了 ELISA 实验中纤粘连蛋白在明胶表面有较高吸附量的现象。CAG 材料对纤粘连蛋白的结合能力虽然弱于 PL 和 Gel, 但仍然明显高于 Chi 和 CPL。从 ELISA 实验结果还可以看出, Gel 和 CAG 虽然吸附纤粘连蛋白的能力较强, 但对层粘连蛋白的吸附则明显弱于 PL、Chi 和 CPL。Gronthos 等^[8]的研究结果表明, 类成骨细胞同纤粘连蛋白的结合能力最强, 其次为 I 型、IV 型胶原以及玻连蛋白(vitronectin), 同层粘连蛋白的结合能力则较弱。这说明在类成骨细胞的吸附过程中, 纤粘连蛋白所发挥的作用可能比层粘连蛋白更为重要。因此尽管 Gel 和 CAG 对层粘连蛋白的吸附较弱, 但由于其对纤粘连蛋白的吸附作用较强, 从而能够更有效地促进细胞的贴壁和铺展。

另外, Gel 和 CAG 比 Chi 和 CPL 更为亲水, 因此对细胞有更强的吸附能力。壳聚糖是几丁质经过脱乙酰处理后的产物, 含有大量的自由氨基, 可以形成很强的分子内和分子间氢键, 这可能对细胞的贴壁造成了一定的阻碍。CPL 是壳聚糖与多聚赖氨酸的混合物, 但壳聚糖的生物相容性并没有因为多聚赖氨酸的加入得到显著提高, 这可能和材料中多聚赖氨酸的含量较低有关。CAG 是壳聚糖与明胶的混合物, 由于壳聚糖分子带有自由氨基, 能够与明胶的侧链相互作用, 从而改变了壳聚糖分子内和分子间的原有氢键组合, 对改变壳聚糖的表面性质发挥了较大作用。从骨髓基质细胞在材料表面培养的照片中也可看出, 细胞在 CAG 表面的形态与 Gel 表面的细胞形态较为接近, 均为细长的成纤维状, 且排列方向不唯一。这可能和 Gel 及 CAG 内部形成的纤维结构有关。

骨髓基质细胞在材料表面的分化程度和分化潜能主要通过测定细胞内的碱性磷酸酶活性及细胞碱性磷酸酶染色来评价。Chi 和 CPL 表面的细胞在培养并诱导 4 d 后, 没有检测到明显的碱性磷酸酶活性。即便在诱导 16 d 后, 也仅检测到较低水平的碱性磷酸酶表达。造成这一现象的原因除诱导时间较短, 对细胞的基因调控影响不明显外, 材料表面吸附的细胞数量过少, 且材料对细胞生长的支持作用较差, 细胞不能保持正常的生理功能, 也是导致这一现象的重要原因。PL、Gel 和 CAG 表面的细胞在培养并诱导 4 d 后, 即可检测到碱性磷酸酶的表达。在诱导 16 d 后, 细胞铺满材料表面, 细胞内碱性磷酸酶活性的测定和细胞碱性磷酸酶染色的结果均证实了碱性磷酸酶的高量表达。这说明这三种材料不仅能够促进骨髓基质细胞的贴壁和增殖, 还能够保持细胞的正常功能并向成骨细胞方向分化, 具有良好的骨髓基质细胞亲和性。

通过以上分析可知, 尽管壳聚糖本身与骨髓基质细胞并不具有非常好的亲和性, 但通过与明胶混合, 材料的生物相容性得到了显著提高, 是一种很有希望的骨修复材料。

4 结 论

通过与明胶混合, 壳聚糖的生物相容性得到了显著提高。

通过体外培养并诱导, 骨髓基质细胞在生物材料表面能够增殖并分化为成骨细胞, 有希望在今后

应用于临床骨损伤修复。

材料的表面化学成分、理化性质及材料的其它因素共同影响骨髓基质细胞在材料表面的行为。

参考文献:

- [1] Tokura S, Nishimura SI, Sakairi N, et al. Biological activities of biodegradable polysaccharide[J]. *Macromol Symp*, 1996,101:389-396.
- [2] Mark FP, Alastair MM, Stephen CB, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999,284:143-147.
- [3] Elghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Bioactive material template for in vitro synthesis of bone [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1995,29:359-370.
- [4] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials[J]. *Biomaterials*, 2000,21:667-681.
- [5] Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading and cytoskeletal organization [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998,41:422-430.
- [6] Lampin M, Warocquier-Clerout R, Legris C, et al. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997,36:99-108.
- [7] Borkenhgen M, Clemence JF, Sigrist H, et al. 3-Dimensional extracellular-matrix engineering in the nervous-system[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998,40:392-400.
- [8] Gronthos S, Stewart K, Graves SE, et al. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells [J]. *Journal of Bone Mineral Research*, 1997,12:1189-1197.

THE INFLUENCE OF CHITOSAN AND ITS MODIFIED MATERIALS ON MARROW STROMAL CELLS

YANG Ming, ZHU Shan-shan, CHEN Yue, CHANG Zhi-jie, GONG Yan-dao, ZHAO Nan-ming, ZHANG Xiu-fang
(Department of Biological Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Chitosan is a kind of widely used biodegradable materials. In order to explore the ability of several chitosan related materials to promote the growth and differentiation of marrow stromal cells, marrow stromal cells were cultured and induced into osteoblasts on these materials. By observing and investigating the growth and differentiation of the cells on these materials, the affinity of these materials for marrow stromal cells were evaluated. In addition, the wettability of these materials and the adsorption amount of extracellular matrix molecules on all these materials were measured to study the cell behaviors of marrow stromal cells. Results showed that although chitosan did not have very good affinity for marrow stromal cells, the biocompatibility of chitosan was apparently enhanced after mixing with gelatin. The mixture of chitosan and gelatin is a promising material for bone repairing.

Key Words: Chitosan; Gelatin; Marrow stromal cells; Extracellular matrix molecule; Protein adsorption