

兔脂肪干细胞(ADSCs)与聚羟基乙酸/壳聚糖(PLGA/CS)支架材料生物相容性研究

李春波^{1▲} 王红^{2▲} 陈增淦^{1△} 陈统一¹ 张峰¹ 周建平¹ 崔磊³ 尹静波⁴

(¹ 复旦大学附属中山医院骨科, ² 普外科 上海 200032; ³ 上海交通大学医学院附属第九人民医院整形外科 上海 200011; ⁴ 上海大学材料科学与工程学院高分子材料系 上海 200444)

【摘要】 目的 探讨兔脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)作为种子细胞复合新型聚羟基乙酸(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)/壳聚糖(chitosan, CS)支架材料的生物相容性,为进一步构建组织工程化脂肪组织提供实验依据。方法 取雄性新西兰大白兔腹股沟脂肪组织, I型胶原酶消化分离出ADSCs进行培养,贴壁细胞至3~5代,评价其多向分化能力。将干细胞收集重悬后,以 1×10^7 /mL的密度接种于多孔PLGA/CS支架,形成细胞-支架材料复合物。培养7天后,扫描电子显微镜观察细胞在支架材料上的黏附生长和基质分泌情况,评价细胞与支架材料的生物相容性; Dil 荧光标记检测细胞在支架材料上的分布; Hoechst 33258 检测细胞在支架上的生长情况。接种1和7天后,分别对细胞-材料复合物行 Annexin V/PI 双染色法检测材料对细胞的毒性作用。用成脂诱导条件培养基诱导分化ADSCs及ADSCs支架材料复合物,7天后,尼罗红荧光染色液检测ADSCs在不同环境下的成脂分化能力。结果 原代培养的ADSCs呈成纤维细胞样外观,在相应诱导条件下能够分化为脂肪细胞和骨细胞。细胞接种于PLGA/CS支架材料上第8天分裂增殖达到高峰,扫描电子显微镜下提示ADSCs在支架表面贴附生长良好,并向孔隙内壁充分延伸,细胞周围形成丰富的基质成分。活死双染结合共聚焦显微镜显示材料对细胞活性无影响,尼罗红染色可见成脂诱导后的ADSCs细胞质内有红色脂滴颗粒形成。结论 多孔PLGA/CS支架与兔ADSCs具有良好的生物相容性,可作为构建组织工程脂肪组织的支架材料。

【关键词】 脂肪干细胞(ADSCs); 生物相容性; 组织工程; 聚羟基乙醇(PLGA); 壳聚糖(CS)

【中图分类号】 R 318.08 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2014.05.007

Biocompatibility of rabbit adipose-derived stem cells (ADSCs) with porous poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) and chitosan scaffold (CS)

LI Chun-bo^{1▲}, WANG Hong^{2▲}, CHEN Zeng-gan^{1△}, CHEN Tong-yi¹,
ZHANG Feng¹, ZHOU Jian-ping¹, CUI Lei³, YIN Jing-bo⁴

(¹ Department of Orthopedics, ² Department of General Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; ³ Department of Plastics, Shanghai Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China; ⁴ Department of Polymer Material, School of Materials Science and Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the biocompatibility of rabbit adipose-derived stem cells (ADSCs) and poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA)/chitosan (CS) scaffold and to provide experiment basis for building tissue-engineered adipose tissue. **Methods** ADSCs were isolated from subcutaneous

上海市科委重点攻关项目(10411953900)

▲Co-first authors

△Corresponding author E-mail: chen.zenggan@zs-hospital.sh.cn

adipose tissue in groin area of New Zealand white rabbit with the method of enzymatic digestion. The cells were cultured and passaged to 3-5 generation and its differentiation ability was evaluated. After 3-5 generation ADSCs were harvested, re-suspended with a density of 1×10^7 /mL and replanted into PLGA/CS scaffold, scanning electron microscope was used to reveal the microstructure of PLGA/CS and the growth of ADSCs on PLGA/CS scaffold 1 and 7 days after seeding for the evaluation of biocompatibility between ADSCs and PLGA/CS scaffold. The distribution of ADSCs on PLGA/CS scaffold appended with adipogenic inducing medium or basic culture medium was evaluated with Dil fluorescence and confocal microscopy. The proliferation of ADSCs on PLGA/CS scaffold appended with adipogenic inducing medium or basic culture medium was evaluated with hocheest33258. At 1 and 7 days post-seeding, the toxicity of PLGA/CS scaffold to ADSCs was assessed by Annexin V/PI fluorescence fluid. ADSCs and ADSCs-PLGA/CS complex were cultivated in adipogenic inducing medium for 7 days and the differentiated cells were identified by Nile red staining. **Results** Primarily cultured rabbit ADSCs presented fibroblast-like appearance and ADSCs cultured in adipogenic and ostogenic medium could differentiate into adipose cell and bone cells. The proliferation of cells on PLGA/CS scaffold with adipogenic inducing medium or basic culture medium went plateau phase on the 8 day. Scanning electron microscopy (SEM) showed that ADSCs could grow well on the PLGA/CS scaffold and abundant extracellular matrix (ECM) both on the surface and interior pore of scaffold. Annexin V/PI fluorescence staining and confocal microscopy demonstrated that the PLGA/CS scaffold could not affect the activity of ADSCs post-seeding. An amount of lipid droplet within cytoplasm of cells on the PLGA/CS scaffold was revealed by Nile red staining. **Conclusions** The porous PLGA/CS scaffold and rabbit ADSCs has excellent biocompatibility, which could be used as a tissue engineered scaffold for building adipose tissue.

【Key words】 adipose-derived stem cells (ADSCs); biocompatibility; tissue engineer; polylactic-co-glycolic acid (PLGA); chitosan (CS)

* This work was supported by the Key Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (10411953900).

组织工程的核心是形成细胞-支架材料复合物来重建缺损的组织,选用何种干细胞及支架材料仍是需要解决的重要问题。脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)是一类存在于脂肪组织基质中、具有极强的自我更新能力和多向分化潜能的干细胞,因而被广泛应用于组织修复和细胞替代治疗^[1-3]。ADSCs具有来源丰富、取材方便及对机体损伤小等优势,已成为脂肪组织工程理想的种子细胞^[4-5]。研究已经证实单一材料很难满足组织工程的需要,通过合适的方法将两种或多种类型的材料组合起来,可以得到性能更加优良的复合支架材料^[6]。聚羟基乙酸(polylactic-co-glycolic acid, PLGA)/壳聚糖(chitosan, CS)是由水溶性的 PLGA 的羧基和 CS 的氨基相互交联合成的一种高分子材料,具有良好的可降解性和生物相容性,在组织工程领域具有广阔的前景^[7]。本实验通过体外培养兔

ADSCs,观察其与多孔 PLGA/CS 支架复合材料的生物相容性,为进一步构建脂肪组织提供实验基础。

材料和方法

实验试剂及仪器 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 澳大利亚 JRH 公司);L-谷氨酰胺 300 g/mL,胰蛋白酶(上海实生生物技术有限公司);氯仿,抗坏血酸 50 g/mL,青霉素 0.0625 g/L,链霉素 100 g/L, I 型胶原酶(美国 Sigma 公司);Dil 染液(美国 Invitrogen 公司);PLGA/CS 由上海大学材料科学与工程学院提供。

兔 ADSCs 的分离培养 雄性新西兰大白兔 4 只(复旦大学附属中山医院实验研究中心),体重 1.5~2 kg。将兔麻醉后于无菌条件下取腹股沟处皮下

2.0~3.0 mL 脂肪组织,剔除血管及筋膜,PBS 冲洗 3 次。然后剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的脂肪颗粒,加入等体积、含量为 0.075% 的 I 型胶原酶,37 °C 恒温振荡消化 1 h。取等体积的完全培养基(含低糖 DMEM、10%FBS、100 g/L 链霉素、0.0625 g/L 青霉素)中和后,2 000 r/min (半径 15 cm)离心 10 min,去除杂质及上清,加入完全培养基重悬细胞,置于 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度的培养箱中进行单层细胞培养。24 h 后更换 1 次培养基,以后每 3 天换液 1 次。7~9 天后细胞生长融合达 80%~90%,经 0.5 g/L 胰酶-EDTA 消化,按 1:3 进行传代培养。

兔 ADSCs 的多向分化潜能 将第 3 代兔 ADSCs 以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 待细胞稳定贴壁后,更换为成脂诱导液(DMEM 培养液中含 1×10^{-6} mol/L 地塞米松、10 mg/L 胰岛素、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤和 0.02 mmol/L 吡啶美辛)及成骨诱导液(DMEM 培养液中含 1.0×10^{-7} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -磷酸甘油钠和 50 mg/L 左旋维生素 C)^[1]。每 3 天更换 1 次培养液,分别于培养 1 周和 3 周后行油红 O 及茜素红染色,倒置显微镜下观察并拍照。

多孔 PLGA/CS 支架材料的制备 将相对分子质量为 1×10^5 的 PLGA 均匀溶解于 NaOH 溶液(pH=9)中,随后加入相对分子质量为 4×10^4 的 CS 粉末。将混合物充分搅拌 6 h(800 r/min),使 CS 粉末均匀分布在 PLGA 溶液。加入醋酸溶液调整至 pH=4.5,利用静电反应技术使 CS 粉末完全溶解。经 -90 °C 冷冻和干燥后,即获得多孔的 PLGA/CS 材料。裁剪至合适大小备用,用体积分数 2.5% 戊二醛固定过夜,乙醇梯度脱水,临界点干燥,喷金,扫描电子显微镜下观察支架材料的微细结构。

细胞-支架材料复合物的制备 将第 3~5 代兔 ADSCs 用 0.25% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 消化后,收集在 50 mL 离心管中,1 500 r/min (半径 15 cm)离心 5 min,弃上清液。加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液,计数,配制成 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 细胞悬液,用微量移液枪将细胞接种于经过灭菌的支架材料。置于培养箱中培养 4 h 后,添加培养基;24 h 后,把细胞-材料复合物移至 6 孔板,留待后续检测。

扫描电子显微镜下观察兔 ADSCs 的分布及细胞外基质的分泌 将 ADSCs 接种于 PLGA/CS 支架材料 7 天后,PBS 冲洗 2 次,体积分数 2.5% 戊二醛固定过夜,乙醇梯度脱水,临界点干燥,喷金,扫描

电子显微镜下观察支架表面细胞的生长情况,了解材料与 ADSCs 的相容性及黏附情况。

兔 ADSCs 在 PLGA/CS 支架材料上的增殖情况

分别于接种后第 1~12 天对支架材料上生长的兔 ADSCs 进行计数。将经成脂诱导的 ADSCs-PLGA/CS 复合物置于 EP 管中,将蛋白酶 K(0.5 g/L)溶液 1 mL 加入 EP 管中裂解细胞,56 °C 过夜消化。12 000 r/min (半径 15 cm)离心 15 min,吸出 40 μL 上清液移入 96 孔板,随后加入 Hoechst 33258 染液 160 μL ,混合均匀,于 37 °C 恒温箱里避光孵育 20 min,以酶标仪检测 360 nm 处的荧光强度(激发光波长为 465 nm)。未过成脂诱导的 ADSCs-PLGA/CS 复合物作为对照组。用同样方法检测未接种 ADSCs 的 PLGA/CS 材料在 360 nm 处的荧光强度,测定样本荧光值 = 复合物荧光值 - 材料荧光值。确定所测样本的 DNA 荧光强度,绘制标准增殖曲线。

Dil 荧光标记兔 ADSCs 在 PLGA/CS 支架材料上的增殖情况 收集消化后的 ADSCs,加入预先由无血清 DMEM 培养液稀释后的 Dil 染液(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),置于培养箱中孵育 15 min 后,1 500 r/min (半径 15 cm)离心 5 min,弃去染液,以新鲜生长培养基重悬细胞,将标记好的细胞接种于 PLGA/CS 材料,于第 1、7 天在共聚焦显微镜下观察细胞在支架材料上的生长情况。

Annexin V/PI 双染色法检测 PLGA/CS 支架材料对兔 ADSCs 的毒性作用 将细胞-支架材料复合物培养在培养箱中 1、7 天后,按荧光染色试剂盒的说明,将荧光试剂加入细胞-材料复合体,于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中染色 15 min。共聚焦显微镜下观察细胞的存活情况:活细胞呈绿色荧光,死细胞呈红色荧光。

尼罗红染色评价 ADSCs 在 2 维和 3 维环境下的成脂分化 将取传代培养 3~5 代兔 ADSCs 和 ADSCs-PLGA/CS 复合物加入到成脂诱导液中进行培养。成脂诱导 2 周后,弃去培养基,PBS 清洗 3 遍,质量分数 4% 的中性多聚甲醛固定 30 min。将尼罗红粉末溶于 DMSO 溶液,配成浓度为 1 mg/mL 的储存液,-20 °C 保存;再将尼罗红储存液溶于双蒸水中,配成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作液。将细胞置于尼罗红染液中常温避光孵育 10 min,弃去染液,双蒸水清洗,倒置共聚焦显微镜下观察并拍照(吸收光/激发光 = 552 nm/636 nm)^[8]。

结 果

兔 ADSCs 的形态观察 ADSCs 培养 24 h 后,可见少量散在的贴壁细胞,以长梭形细胞为主,部分呈三角形或不规则形。72 h 后,可见较多的梭形贴壁细胞,生长速度快,后增生为形态相对均一稳定的成纤维样梭形细胞(图 1A),7 天后细胞融合至 80%~90%。第 3 代 ADSCs 为长梭形,形态均一,增殖速度较快(图 1B)。ADSCs 经成脂诱导 1 周后,可见细胞由长梭形变为椭圆形,经油红 O 染色可见细胞内大量红色脂滴形成(图 1C)。ADSCs 在成骨诱导培养 3 周后,可见细胞呈多层生长,经茜素红染色可见细胞周围基质出现红色钙盐沉积(图 1D)。

兔 ADSCs 在 PLGA/CS 支架材料上的分布 将 ADSCs 接种到 PLGA/CS 支架材料上复合培养,未接种 ADSCs 作为对照组(图 2A)。扫描电子显微镜可见 PLGA/CS 材料表面呈多孔状,孔径约 100~300 μm (图 2B,C)。兔 ADSCs 复合 PLGA/CS 培养 7 天后,可见细胞紧密附着于材料表面及孔壁,黏附生长,胞体呈高度铺展,相互交联并堆积复层生长,增殖状态良好,覆盖材料表面,表明 ADSCs 和 PLGA/CS 支架材料有较好的生物相容性(图 2D,E,F)。

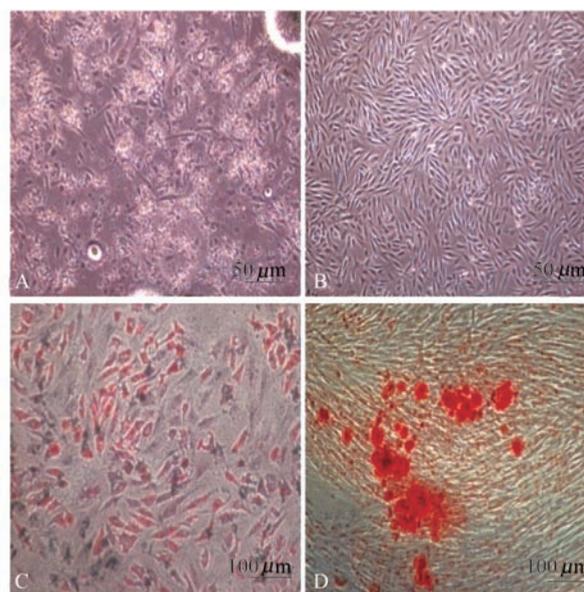


图 1 ADSCs 的形态特点及多向分化能力

Fig 1 Morphological character and multi-directional differentiation of ADSCs

A: Fibroblast-like uniform shape of ADSCs at passage 0 for 3 d; B: Long fusiform shape of ADSCs at passage 3 for 3 d with uniformity pattern and vigorous proliferation; C: Identification of adipogenic induction of ADSCs (oil red O staining); D: Identification of osteogenic induction of ADSCs (alizarin red staining).

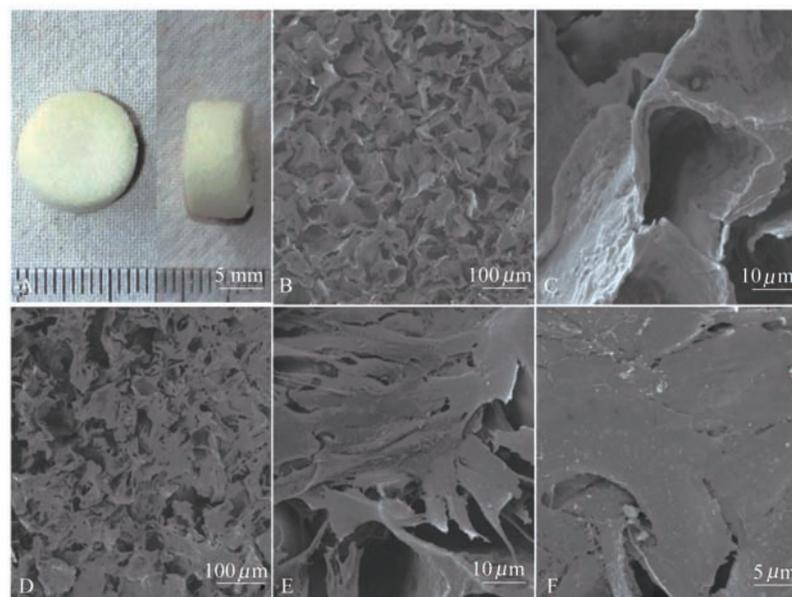


图 2 扫描电子显微镜下 ADSCs 在 PLGA/CS 支架材料上的生长及黏附情况

Fig 2 Growth and adhesion of ADSCs on PLGA/CS scaffold under SEM

A: Gross view of PLGA/CS scaffold; B and C: PLGA/CS scaffold under SEM; D, E and F: ADSCs-PLGA/CS complex under SEM.

兔 ADSCs 在 PLGA/CS 支架材料上的增殖情况 将 ADSCs-PLGA/CS 复合培养后进行 Hoechst 33258 检测,细胞曲线呈 S 形,培养 72 h 内细胞生长较慢,第 3 天后细胞进入对数生长期,第 8 天达到缓慢生长期,第 8~12 天上升缓慢,说明细胞基本布满支架材料;对照组细胞生长曲线与实验组相同(图 3)。说明 PLGA/CS 支架材料与 ADSCs 具有良好的生物相容性。

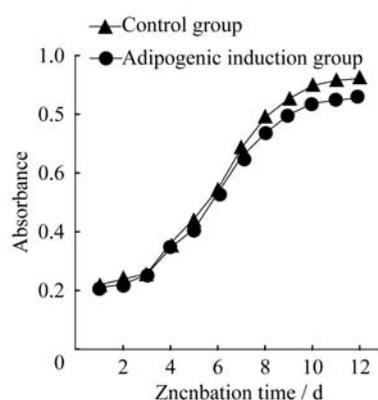


图 3 ADSCs 在 PLGA/CS 支架材料上的增殖情况

Fig 3 Proliferation curve of ADSCs on PLGA/CS scaffold

Dil 标记的兔 ADSCs 在 PLGA/CS 支架材料上的黏附情况 Dil 是一种亲脂性荧光染料,能与细胞膜结合以标记细胞,不影响细胞的生长和增殖。Dil 荧光标记结果显示:细胞在支架材料上黏附,并沿纤维方向延伸生长。随着培养时间的延长,细胞数量明显增多,至培养第 7 天细胞已经布满整个纤维支架表面,呈网格状分布(图 4)。

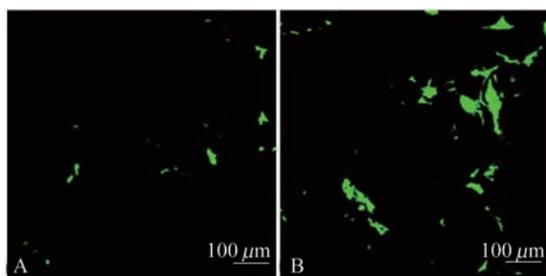


图 4 共聚焦显微镜下 ADSCs 在 PLGA/CS 支架材料上的黏附情况(Dil 荧光标记)

Fig 4 Adhesion of ADSCs on PLGA/CS scaffold under confocal microscopy (with Dil in fluorescence fluid)

A: The 1st day; B: The 7th day.

Annexin V/PI 双染色法检测兔 ADSCs 对 PLGA/CS 支架材料的毒性作用 Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依

赖性磷脂结合蛋白,能与位于细胞膜的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)高亲和力特异性结合。碘化丙啶(propidine iodide,PI)是一种核酸染料,它不能透过活细胞的细胞膜,但能够透过死细胞的细胞膜而使细胞核红染。将 Annexin V 与 PI 匹配使用,共聚焦显微镜下拍照可以区分活细胞和死细胞:活细胞呈绿色荧光,死细胞呈红色荧光。随着培养时间的延长,呈绿色荧光的细胞数量明显增多,至培养第 7 天细胞分布于整个支架材料,并呈簇聚集。呈红色荧光的死细胞数量并未见明显增加(图 5)。

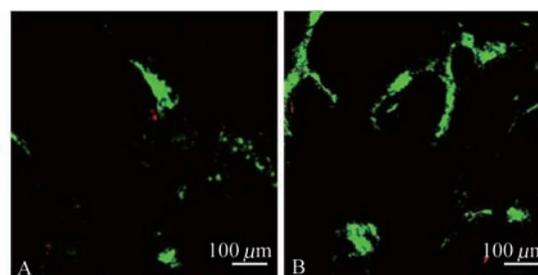


图 5 共聚焦显微镜下检测 PLGA/CS 支架材料对兔 ADSCs 的毒性作用(Annexin V/PI 荧光染色)

Fig 5 Toxicity of PLGA/CS scaffold to ADSCs under confocal microscopy (with Annexin V/PI fluorescence fluid)

A: On the 1st day; B: On the 7th day. Red fluorescence: Dead cells; Green fluorescence: Live cells.

尼罗红染色评价 ADSCs 在 2 维及 3 维环境下的成脂分化 ADSCs 和 ADSCs-PLGA/CS 支架材料复合物经成脂诱导液作用 7 天后,尼罗红染色,荧光显微镜下可见多个细胞的胞质内出现红色荧光的脂肪滴,细胞核显示不清。在 2 维培养条件下,可见细胞类似于第 3 代 ADSCs 分布(图 6A),细胞内形成大量呈红色荧光的脂滴(图 6B)。在 3 维培养条件下,细胞沿着材料的孔径呈网状分布(图 6C),细胞内形成大量呈红色荧光的脂滴(图 6D)。

讨 论

种子细胞在组织工程领域的应用一直以来都是研究热点。自 2001 年 ZuK 等^[1]发现 ADSCs 以来,ADSCs 因其具有取材方便、获取率高、对供区组织损伤小、体外扩增迅速以及多向分化潜能等优点,被广泛应用于组织工程和再生医学中^[5]。目前的研究已经证实,在不同诱导条件下,ADSCs 可以向脂肪、软骨、骨等细胞系分化,因此是一种具有多向分

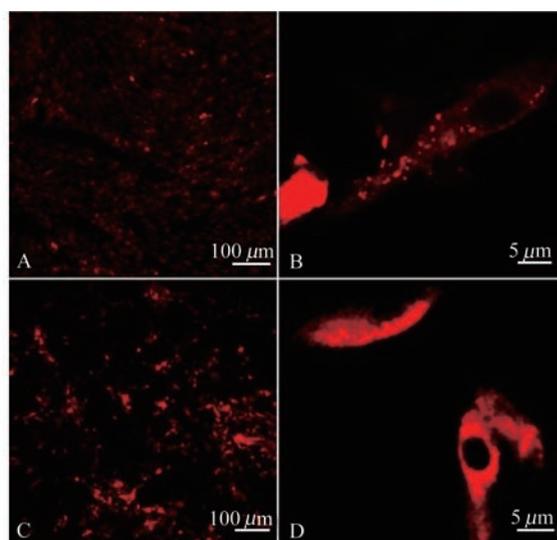


图6 尼罗红染色评价 ADSCs 与成脂诱导液作用 7 天后的成脂分化情况

Fig 6 Adipogenic differentiation of ADSCs cultured in adipogenic inducing medium for 7 days was evaluated by Nile red staining

A: The cells were similar to the distribution of ADSCs on the 3rd generation (2-D image); B: A great deal of lipid droplet with red fluorescence in the cells (2-D image); C: The cells distributed in a network along material aperture (3-D image); D: A great deal of lipid droplet with red fluorescence in the cells (3-D image).

化潜能的干细胞,为组织工程领域的研究提供了新的方向^[9-11]。本实验所涉及的分离培养 ADSCs 的方法主要参照 Cardozo 等^[12]的研究。兔腹股沟区皮下脂肪组织含有较丰富的干细胞,在取材时剔除血管及筋膜并用 PBS 反复冲洗,利用贴壁筛选法去除血细胞成分并分离出 ADSCs。分离培养的 ADSCs 具有很好的增殖能力,与成脂及成骨诱导液作用后可向脂肪细胞及骨细胞分化,油红 O 及茜素红染色进一步证实了其多向分化的能力。

研究证实,利用组织工程方法构建脂肪组织,除了具有足够数量的种子细胞外,还要有一定的 3 维空间的生物可降解支架。理想的生物材料应具备:(1)良好的生物相容性,不仅能与接种的细胞相容和还能与回植体内周围其他组织相融合;(2)可控的生物降解性,降解后的代谢物对机体无损害、无毒性;(3)一定的机械强度和可塑性;(4)立体多孔的结构;(5)半渗透性,以利于小分子的交换。目前用于组织工程的支架材料来源有天然生物材料和人工合成材料。常用的人工材料包括:活性陶瓷羟、基磷灰石、磷酸三钙、聚乳酸、聚乙醇酸、PLGA 共聚物、

聚乙烯、聚丙烯、聚氯乙烯以及某些金属材料等,天然生物材料主要包括:胶原、几丁质、葡聚糖、硫酸软骨素、纤维蛋白凝胶、珊瑚、灭活动物骨等^[13]。PLGA 是由聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)和聚羟基乙酸(polyglycolic acid, PGA)形成的共聚物,具有良好的生物相容性和力学性能,对机体无毒性及免疫原性,其降解产物是机体正常的代谢成分。PLGA 的结构和亲/疏水性及降解率可以通过 PLA 和 PGA 的比列进行调节^[14]。PLGA 表面活性和机械性能良好,能促进种子细胞的黏附、增殖和分化,同时可控的降解速率同步于组织形成速率,因而有利于组织的再生与修复。近年来,PLGA 已经被广泛的应用于软骨、骨、脂肪组织工程及药物缓释系统等领域^[15]。但是 PLGA 具有较高的水溶性,不能形成稳定的结构无法为细胞的黏附和增殖提供合适的微环境。CS 是甲壳素脱乙酰基后的产物,无毒,无气味,可吸收,具有良好的生物相容性和促进细胞黏附和增殖的优点,广泛应用于生物医学材料领域^[16-18]。CS 的游离羟基和 PLGA 的羧基发生交联反应,使支架强度提高。壳聚糖可以在 PLGA 表面形成一层膜性结构,有效弥补单纯 PLGA 支架材料易溶性和稳定性不足等问题^[7]。研究表明,联合 CS 的稳定性及 PLGA 的生物活性制备的复合支架,比单一成分支架具有更好的生物和机械性能。

本研究我们选用孔径为 100~300 μm,孔隙率为 90%、PLGA:CS 为 1:1 的 PLGA/CS 作为支架材料^[6],观察其与兔 ADSCs 复合情况,并进一步探讨其是否可作为脂肪组织工程的支架材料。电子显微镜下发现细胞在支架表面和支架孔壁上能很好地黏附、伸展和生长。ADSCs 不仅能黏附在材料表面,还能生长进入材料的空隙内,说明 PLGA/CS 支架为 ADSCs 提供了良好的 3 维空间,能容纳更多数量的细胞。Dil 荧光标记检测结果显示,细胞在支架上黏附,并沿纤维方向延伸生长,随着培养时间的延长,细胞数量明显增多。Hochest 33258 检测兔 ADSCs 在多孔 PLGA/CS 上的生长曲线,结果显示以 1×10^3 /mL 接种于材料上的细胞生长良好,植入 8 天后细胞数量达到最大值。Annexin V/PI 双染色法提示支架材料对细胞的活性无毒性作用,且不影响细胞的增殖。实验证实 PLGA/CS 具有良好的生物相容性,能够为组织工程种子细胞的生长提供适宜的 3 维空间。当把细胞-支架材料复合物植入体内时,支架材料逐渐降解,ADSCs 逐渐分化为脂

肪细胞,并分泌特定的细胞外基质,最后构成稳定的疏松网络结构。

ADSCs 经过成脂诱导培养后,胞内有大量的脂滴形成。使用油红 O 染色法进行形态学检测,其原理是油红 O 可以特异性使甘油三酯等中性脂肪着色。但是对于三维支架材料上 ADSCs 的成脂诱导形态检测,此种方法具有局限性。尼罗红染色剂是一种亲脂性的恶嗪类荧光染料,与脂类物质(包括蜡酯和三酰甘油)以及各种脂肪酸结合后,在激发波长 485 nm 处显示为红色^[8]。在本研究中,细胞-支架材料复合物经过成脂诱导液作用 7 天后,加入尼罗红染液,脂滴显示红色。此方法可以直观地观察到成脂诱导的 ADSCs 形成脂滴的形态。

在应用组织工程方法重建缺损的组织时,移植组织在体内需维持较长时间是一个巨大的挑战。因此,支架材料降解的时间必须要和重建组织生成的时间相适应。Patrick 等^[19]研究发现,将脂肪前体细胞复合到 PLGA 支架材料上,再回植入大鼠体内后 2 个月,形成脂肪组织数量最多;随后逐渐减少;5 个月后,生成的脂肪组织完全消失。因此,为了构建合适的组织工程脂肪组织,支架材料的降解时间必须达到 2~5 个月。研究证实,通过调整 PLGA 与 CS 的比例,可以改变 PLGA/CS 支架材料的降解率^[6]。为了获得合适的支架材料,进一步研究需要通过调整 PLGA 和 CS 的比率来改变支架材料的降解率,使其满足不同类型组织的生成。

本研究成功分离了兔 ADSCs,并验证了其向成脂、成骨分化的能力。将兔 ADSCs 种植在 3 维多孔 PLGA/CS 支架材料上,显示了良好的生物相容性,PLGA/CS 对兔 ADSCs 的黏附、增生、分化和分泌功能均无明显影响。研究证实,PLGA/CS 可以作为构建组织工程的支架材料,但是体外实验尚不能完全反映该支架材料长期植入体内可能发生的生物学效应,此生物材料是否适合机体组织工程脂肪组织的构建,还有待进一步的体内实验予以证实。

参 考 文 献

- [1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211 - 228.
- [2] 朱艳霞, 宋克东, 文鹏飞, 等. 体外培养脂肪组织来源于细胞与胶原/壳聚糖复合支架的亲水性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(31): 6155 - 6160.
- [3] Xu J, Chen Y, Yue Y, et al. Reconstruction of epidural fat with engineered adipose tissue from adipose derived stem cells and PLGA in the rabbit dorsal laminectomy model [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(29): 6965 - 6973.
- [4] Cho SW, Kim SS, Rhie JW, et al. Engineering of volume-stable adipose tissues [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(17): 3577 - 3585.
- [5] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. *Keio J Med*, 2005, 54(3): 132 - 141.
- [6] Cao B, Yin J, Yan S, et al. Porous scaffolds based on cross-linking of poly(L-glutamic acid) [J]. *Macromol Biosci*, 2011, 11(3): 427 - 434.
- [7] Wang W, Cao B, Cui L, et al. Adipose tissue engineering with human adipose tissue-derived adult stem cells and a novel porous scaffold [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2013, 101(1): 68 - 75.
- [8] Venugopal B, Fernandez FB, Babu SS, et al. Adipogenesis on biphasic calcium phosphate using rat adipose-derived mesenchymal stem cells: *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100(6): 1427 - 1437.
- [9] Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 113(2): 585 - 594.
- [10] Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation [J]. *Methods*, 2008, 45(2): 115 - 120.
- [11] Gao S, Zhao P, Lin C, et al. Differentiation of human adipose derived stem cells into neuron-like cells which are compatible with photocurable three-dimensional scaffolds [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(7-8): 1271 - 1284.
- [12] Cardozo AJ, Gomez DE, Argibay PF. Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes [J]. *Gene*, 2012, 511(2): 427 - 436.
- [13] Kim HJ, Park SH, Durham J, et al. *In vitro* chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with silk scaffolds [J]. *J Tissue Eng*, 2012, 3(1): 2041731412466405.
- [14] 戚超, 杨志明, 黄富国, 等. 体外构建与体内构建组织工程的比较研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(7): 857 - 859.
- [15] Boquest AC, Shahdadfar A, Brinckmann JE, et al. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 325: 35 - 46.
- [16] Shi C, Zhu Y, Ran X, et al. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine [J]. *J Surg Res*, 2006, 133(2): 185 - 192.
- [17] 鲍慧婧, 邹俊, 尹硕, 等. 脂肪干细胞构建组织工程化角膜机制组织 [J]. *复旦学报: 医学版*, 2010, 37(6): 631 - 636.
- [18] Chen A, Hou C, Bao JL, et al. Antibiotic loaded chitosan bar: An *in vitro*, *in vivo* study of a possible treatment for osteomyelitis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1999, (366): 239 - 247.
- [19] Patrick CW Jr, Zheng B, Johnston C, et al. Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds [J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(2): 283 - 293.

(收稿日期: 2013-12-24; 编辑: 段佳)