

神经干细胞与胶原蛋白-硫酸肝素 生物支架生物相容性研究*

陈兴泳^{1,3} 唐荣华¹ 唐洲平¹ 谢雪微¹ 孟祥武¹ 胡树兵² 王 伟¹

摘要 目的:评价神经干细胞与胶原蛋白-硫酸肝素支架的生物相容性,探讨胶原蛋白-硫酸肝素支架作为中枢神经组织工程载体材料的可行性。**方法:**以冷冻干燥法制备胶原蛋白-硫酸肝素支架,体外培养新生小鼠海马神经干细胞。将神经干细胞与生物支架共培养,通过倒置相差显微镜、扫描电镜观察胶原蛋白-硫酸肝素支架内部结构和细胞生长状况。**结果:**制备的胶原蛋白-硫酸肝素支架材料具有纵行的、平行排列的微管结构。神经干细胞在支架上生长良好。**结论:**胶原蛋白-硫酸肝素支架与神经干细胞具有良好的生物相容性,有望作为中枢神经组织工程载体材料。**关键词** 神经干细胞;生物材料;胶原蛋白;硫酸肝素;神经组织工程

中图分类号:R49, R322.8 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-02-0135-03

Study of biocompatibility of neural stem cells with collagen protein-heparan sulfate scaffold/CHEN Xingyong, TANG Ronghua, TANG Zhouping, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(2): 135-137

Abstract Objective: To evaluate the biocompatibility of neural stem cells (NSCs) with collagen protein-heparan sulfate scaffold in vitro and to identify whether the materials could be used as scaffold in the central neural tissue engineering. **Method:** The collagen protein-heparan sulfate scaffold was made by frozen-lyophilized. Hippocampus-derived NSCs of neonatal mouse were cultured and combined with scaffold biomaterials in vitro. The microstructure of the material and the morphological changes of NSCs in the scaffold were observed under an inverted phase microscope (IPM) and scanning electron microscope (SEM). **Result:** The microtubes of scaffold were arranged in vertical and parallel manners and their three-dimensional structures were highly bionic. The NSCs could regenerate and differentiate in the scaffold in vitro. **Conclusion:** The scaffold has a good biocompatibility with NSCs and might be used as biological materials in central nervous tissue engineering.

Author's address Department of Neurology Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong university of Science and Technology, Wuhan, 430030

Key words neural stem cells; biological material; collagen protein; heparan sulfate; nervous tissue engineering

中枢神经组织工程是一个新兴领域,构建细胞和生物材料的三维空间复合体,作为组织、器官形态和功能的基础,寻找再生能力强的种子细胞和适合细胞生存的生物材料为组织工程的核心研究内容^[1]。本研究以乳鼠海马神经干细胞(neural stem cells, NSCs)为种子细胞,观察其在胶原蛋白-硫酸肝素支架的贴附、生长和分化情况,探索神经干细胞在胶原蛋白-硫酸肝素支架的生长规律,寻找适合中枢神经组织工程的支架材料,为中枢神经损伤后的再生和修复奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

I 型胶原蛋白 (Sigma, C9879),IV 型胶原蛋白 (Fluka, C5138),硫酸肝素(Sigma,H9902),DMEM/F12 (dulbecco's minimum essential medium/ F12) 基础培养基、神经细胞培养添加剂 B27,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),表皮

生长因子 (epidermal growth factor,EGF),小牛血清 (Sigma 公司);神经巢蛋白(nestin)抗体,SABC 试剂盒 (Chemicon 公司);冷冻干燥机(FD-1-50,北京博医康实验仪器有限公司),扫描电子显微镜 (日本 HITACHIS-520 型,由同济医学院电镜室提供),倒置相差显微镜。

1.2 方法

1.2.1 胶原蛋白-硫酸肝素生物支架的制备:分别称取 I 型胶原蛋白 450mg,IV 型胶原蛋白 10mg,硫酸肝素 1mg,放入 0.10mol/L 50ml 醋酸溶液中,在室温下以磁力搅拌器搅拌 120min,使上述 3 种溶质充分溶解混合成凝胶状悬浊液。将悬浊液放置 100ml 无

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570628, 30770751);华中科技大学医工医理交叉基金资助项目

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科,武汉,430030

2 华中科技大学材料学院

3 福建省立医院神经内科

4 通讯作者:唐荣华(华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科,武汉,430030)

作者简介:陈兴泳,男,在读硕士,住院医师

收稿日期:2007-05-29

菌输液瓶, 负压抽真空后, 置 4℃冰箱保存, 以便充分混合。用医用注射器将胶原蛋白-硫酸肝素悬浊液注入内径 5.0mm、长为 15.0cm 的硅胶管模具中, 以医用缝合线系紧密封两端, 先放入-80℃冰箱冷冻 4h, 再缓慢浸入-180℃液氮中, 完全浸入液面后, 继续在液氮中保留 60min。将硅胶管从液氮罐取出, 再转入-80℃冰箱中 30—60min。将 15.0cm 长的胶原蛋白-硫酸肝素悬浊液的硅胶管冰冻体切成 2.0cm 短节段, 移入冷冻干燥机中, 冷冻干燥(冷阱-50℃, 真空度<7Pa)20h, 即可制得已干燥成型的胶原蛋白-硫酸肝素支架材料。以紫外线照射 30min, 既可使胶原蛋白与硫酸肝素之间充分交联^[2], 又可达到材料消毒作用, 将经上述处理后的材料密封备用。

1.2.2 乳鼠 NSCs 的培养:取新生(<24h)小鼠一只, 断颈处死, 75%乙醇浸泡消毒, 无菌操作取出脑组织, 仔细剔除脑膜和血管, 分离出海马, D-Hanks 缓冲液洗血污, 用眼科剪剪成 1mm³ 左右的组织块, 剪碎过程中适量加入 0.2%胰酶消化液(0.5ml/g), 加入少量培养液并将其移至 10ml 离心管中, 用细口吸管反复吹打 20 次, 使成匀浆状, 过 100 目筛网后 1500r/min 离心 5min, 弃上清, 用 NSCs 基础培养液(DMEM/F12, 20g/L B27 添加剂、青霉素 1×10⁵U/L, 链霉素 1×10⁵U/L), 并加入 EGF(终浓度为 20μg/L)和 bFGF(终浓度为 20μg/L)定容至 5ml。在显微细胞计数板下调节细胞密度为 1×10⁶ 个细胞/ml, 把细胞吹匀后接种于 50cm² 培养瓶中。放入 37.0℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。6—7d 后将形成的神经球离心吹打制成单细胞悬液, 以 1 传 2 的比例进行传代扩增培养, 将传至第 2 代的细胞浓度调整为 1×10¹⁰/L 待用。

1.2.3 NSCs 的诱导分化和鉴定:选取生长良好的 NSCs 球, 以一定的密度种植到放有小盖玻片(预先涂有多聚赖氨酸)的 24 孔板中, 分化培养液为含 50ml/L 小牛血清的 DMEM/F12(含 20g/L B27 添加剂)。分别于接种后的 4h 和 1、3、7d 取出小盖玻片, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)小心漂洗 2 遍, 吸净液体后, 用纯丙酮固定 30min。采用免疫细胞化学 SABC 法对贴壁的 NSCs 球进行 nestin 免疫细胞化学染色以鉴定其干细胞源性。

1.2.4 支架与细胞共培养:将 12 根长 10 mm 的硫酸肝素-胶原蛋白支架材料置于 6 孔培养板中, 每孔各 2 根。取预制好的 1×10¹⁰/L 单细胞悬液每孔接种 1.5ml, 并浸没支架, 用含 50ml/L 小牛血清的 DMEM/F12(含 20g/L B27 添加剂)培养液诱导分化。每日使用倒置相差显微镜观察细胞与生物材料附着及生长、分化等情况。

1.2.5 扫描电镜观察:将胶原蛋白-硫酸肝素支架材料切成横断面、纵截面, 真空喷金镀膜, 在扫描电镜下观察内部微孔结构, 运用图像分析软件对微孔的孔径进行计算, 按实际孔径=(放大率×微孔面积)/(标尺长度×孔周长), 应用 SPSS13.0 软件对测得的数据进行统计分析。接种 5d 后, 将细胞-支架复合物培养板中每孔各取出 1 根, 25g/L 戊二醛固定, 系列脱水, 醋酸异戊酯置换, 真空干燥, 表面喷金后进行观察。

2 结果

2.1 胶原蛋白-硫酸肝素支架电镜扫描

胶原蛋白-硫酸肝素支架材料外观为规则的圆柱体, 弹性、柔韧性较好, 质地均匀(图 1, 见前置彩色插页 5)。扫描电镜照片上可见材料的纵切面材料微管结构均匀, 基本相互平行; 纵向走行的微管之间相互独立, 且呈封闭状态(图 2, 见前置彩色插页 5), 其微管直径平均约为 124.11μm; 材料横切面内部微管的横截面基本为圆形, 直径大小较为均匀(图 3, 见前置彩色插页 5)。

2.2 小鼠脑 NSC 的培养、鉴定

原代细胞培养 3d 后, 可见很多由几十个细胞组成的悬浮细胞团, 即神经球(图 4, 见前置彩色插页 5)。神经球呈圆形或类圆形, 直径大小不等, 最大可达 114.26μm, 折光性强。传代培养 5—6d 后神经球形成达高峰; 传代细胞神经球产生较快, 3d 就可产生大量的神经球。将第 2 代神经球接种于铺有多聚赖氨酸的盖片上让其贴壁生长, 可见部分细胞贴壁, 呈散在均匀分布, 突起长出, 神经细胞连成丝状、网状(图 5, 见前置彩色插页 5), nestin 巢蛋白免疫组织化学染色呈 nestin 阳性(图 6, 见前置彩色插页 5), 神经球发出很强的绿色荧光(FITC 染色), 表明克隆球的细胞为具有增殖能力的 NSCs。

2.3 神经干细胞与支架共培养

倒置相差显微镜观察 5d, 神经干细胞聚集成神经球逐渐向支架贴附生长, 少数神经干细胞贴在支架表面分化、生长。一部分神经干细胞向支架内部迁徙生长(图 7, 见前置彩色插页 5), 扫描电镜下可见支架上生长的神经球(图 8, 见前置彩色插页 5)。神经干细胞形态和生长特性与单独培养细胞无差异。

3 讨论

细胞移植修复神经功能缺损成为目前研究热点, 本研究组前期实验观察到嗅鞘细胞移植可以促进自身免疫性脑脊髓炎的髓鞘修复, 改善运动功能, 有保护神经元的作用^[3]。脑出血后病灶是移植治疗的

靶点, 但单纯细胞移植由于缺乏附着点和空间结构支持而呈漂浮状态, 无良好的移植微环境将不利于细胞存活和发挥正常功能。因此在损伤部位桥接神经组织工程支架材料受到了广泛关注, 可作为移植治疗的载体及移植后的生长支架, 对脑出血病灶起支撑填充作用, 待细胞分化增殖填充后又可自行降解。采用组织工程学方法构建器官来修复或替代损伤的组织、器官是一种新途径^[4]。

神经干细胞具有自我增殖和多向分化潜能, 能分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞。研究表明^[5], NSCs 可用于“细胞治疗”来治疗中枢神经系统退行性病变和功能重建, 通过将新的细胞移植到中枢神经系统内来替代因损伤或疾病而缺失的神经细胞具有十分重要的意义。目前已有神经干细胞移植治疗临床应用的报道^[6]。神经干细胞可以作为种子细胞在生物支架上分化、增殖、生长, 在恢复视神经功能的研究方面已经取得了良好效果^[7]。因此, NSCs 可作为种子细胞应用于神经系统组织工程。

有报道使用包埋在胶原中的神经前体细胞来修复大鼠 15mm 坐骨神经的缺损已获得成功^[8], 缺点是缺乏一定的机械强度, 难于塑形, 支架材料在体内降解过快^[9]。硫酸肝素(heparan sulfate, HS)是存在于细胞表面和细胞间质中的一系列蛋白聚糖, 是细胞外基质的重要组成部分。细胞基质中硫酸肝素可以快速、可逆结合 bFGF, 而 bFGF 对神经细胞生长发育有着重要营养支持作用。硫酸肝素将 bFGF 固定于细胞外基质中, 作为 bFGF 的仓库, 当需要发生有丝分裂的作用时, 依靠特殊的机制将 bFGF 释放出来。Zehe 等^[10]研究发现细胞外基质硫酸肝素蛋白聚糖起到“分子阱”作用, 介导成 FGF-2 穿过胞质膜引发释放; 而当硫酸肝素缺乏时则可抑制 FGF-2 介导的细胞信号传导及细胞增殖反应^[11]。因此, 在神经组织工程支架材料中引入硫酸肝素, 将可能富集损伤周围环境中的神经营养因子, 如 bFGF; 还可促进 bFGF 的生物活性, 更好地保护和引导神经再生。本实验制备的胶原蛋白-硫酸肝素支架材料内部空间结构具有纵行平行排列的孔道系统, 移植细胞将在支架内部线性结构的“指引”下定向生长, 大大促进轴突再生, 避免无序缠结而形成神经瘤, 促进移植细胞的分化生长以利于其充分发挥修复作用。

理想的载体材料应该具有良好的组织相容性、生物降解性、生物活性等^[12]。生物材料的生物相容性包括生物安全性和生物功能性。对生物材料相容性研究有很多方法, 其中常用的有体内直接植入法和体外复合细胞培养法两种。体内直接植入由于受多

种体内环境因素的影响, 较难准确反映生物材料与组织细胞的相容性。而体外复合细胞培养可以直接观察细胞与生物材料复合生长的情况, 较前者更为敏感、客观^[13], 是近年来研究生物材料相容性的主要方法。因此, 本实验选用胶原蛋白-硫酸肝素支架与 NSCs 在体外复合培养, 结果发现两种生物材料对细胞的生长无明显不良影响。通过形态学观察, 发现 NSCs 可以在胶原蛋白-硫酸肝素支架逐渐贴附, 并在其表面形成干细胞球, 还能进一步增殖、分化。随着培养时间的延长, 细胞长入孔隙内。说明支架有很好的细胞亲和性, 支架孔径较适合细胞粘附生长。可见胶原蛋白-硫酸肝素支架与 NSCs 具有良好的生物相容性。

本实验结果显示, 胶原蛋白、硫酸肝素两种生物材料, 与神经干细胞具有良好的生物相容性, 胶原蛋白-硫酸肝素生物支架有望作为中枢神经组织工程载体材料, 联合神经干细胞移植于脑出血病灶, 从而促进脑出血患者神经功能康复。

参考文献

- [1] Rice MA, Dodson BT, Arthur JA, et al. Cell-based therapies and tissue engineering [J]. Otolaryngol Clin North Am, 2005, 38 (2):199—214.
- [2] 顾其胜, 蒋丽霞主编. 胶原蛋白与临床[M]. 第 1 版. 上海: 第二军医大学出版社, 2003. 68—86.
- [3] 郭守刚, 靳峰, 汪春娟, 等. 嗅鞘细胞移植对实验性变态反应性脑脊髓炎髓鞘修复及运动功能的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22 (1):18—20.
- [4] Lavik E, Langer R. Tissue engineering : current state and perspectives [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 65(1):1—8.
- [5] Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous stem [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(7):862—871.
- [6] 张儒有, 郑永日, 安沂华, 等. 神经干细胞移植治疗脑卒中后遗症 50 例临床效果分析[J]. 中国临床康复, 2006, 10(9):138—139.
- [7] Ellis -Behnke RG, Liang YX. Nano neuro knitting: Peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision[J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(13): 5054—5059.
- [8] Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair[J]. Brain Res, 2003, 974(1-2):17—24.
- [9] 孙天成, 孔清泉, 杨志明. 天然生物支架材料在软骨修复中的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(6):461—464.
- [10] Zehe C, Engling A, Wegehingel S, et al. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(42):15479—15484.
- [11] Xu X, Rao G, Quiros RM, et al. In vivo and in vitro degradation of heparan sulfate (HS) proteoglycans by HPR1 in pancreatic adenocarcinomas. Loss of cell surface HS suppresses fibroblast growth factor 2-mediated cell signaling and proliferation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(4):2363—2373.
- [12] Fansa H, Keilhoff G. Comparison of different biogenic matrices seeded with cultured Schwann cells for bridging peripheral nerve defects[J]. Neurol Res, 2004, 26 (2): 167—173.
- [13] Neumann A, Reske T, Held M, et al. Comparative investigation of the biocompatibility of various silicon nitride ceramic qualities in vitro [J]. J Mater Sci Mater Med, 2004, 15(10): 1135—1140.