

doi:10.3969/j.issn.1673-0364.2011.02.005

PLGA与大鼠嗅鞘细胞的生物相容性研究

崔颖 崔志明 徐冠华 王玲玲 孙郁雨 储惊蛰

【摘要】 目的 观察聚乳酸-乙醇酸聚合物[Poly(DL-lactic-co-glycolic acid), PLGA](LA:GA=75:25)与大鼠嗅鞘细胞的生物相容性。方法 将分离提纯的大鼠嗅鞘细胞接种于 PLGA 膜上,对照组以相同的细胞接种于多聚赖氨酸包被的圆玻片上。使用倒置显微镜、扫描电镜观察细胞的黏附和生长情况,并采用 MTT 法及荧光染色后电子图像统计分析检测支架对细胞的毒性。结果 嗅鞘细胞接种于 PLGA 膜上后良好生长,S-100 阳性细胞计数、胞体面积和细胞周长与对照组无显著差异($P>0.05$)。结论 PLGA 聚合物与嗅鞘细胞生物相容性良好,有望用于脊髓损伤修复的组织工程研究。

【关键词】 嗅鞘细胞 聚乳酸-乙醇酸聚合物 生物相容性 脊髓损伤

【中图分类号】 Q813.1+1,R318.08 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-0364(2011)02-0080-05

Biocompatibility of PLGA with Olfactory Ensheathing Cells in Rat CUI Ying, CUI Zhiming, XU Guanhua, WANG Lingling, SUN Yuyu, CHU Jingzhe. Department of Spine Surgery, Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China. Corresponding author: CUI Zhiming (E-mail:czmspine@163.com).

【Abstract】 Objective To explore the biocompatibility of Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) (LA:GA=75:25) with olfactory ensheathing cells (OECs) in rat. **Methods** The purified OECs were seeded on the PLGA membrane (PLGA group) and on the columns coated Poly-L-Lysine (control group). The adhesion and viability of OECs were observed by inverted microscope and scanning electron microscopy. MTT method and the computer image statistical software were used to determinate the survival and proliferation of OECs. **Results** OECs grew well on PLGA membrane. There were no significant differences in the activity of OECs. The number of S-100 positive cells, the area of the cell bodies and the perimeter of the cell between two groups ($P>0.05$). **Conclusion** The PLGA biomaterial has good biocompatibility with rat OECs. It could be an ideal tissue engineered scaffold material in the repair of spinal cord injury.

【Key words】 Olfactory ensheathing cells; Poly(DL-lactic-co-glycolic acid); Biocompatibility; Spinal cord injury

脊髓神经组织工程中理想的支架材料应具有好的生物相容性,无毒副作用。聚乳酸-乙醇酸共聚物[poly(DL-lactic-co-glycolic acid), PLGA]是一种可降解的高分子有机化合物,由不同比例的乳酸(LA)与乙醇酸(GA)聚合而成,是一种较理想的神经组织工程支架材料^[1]。嗅鞘细胞(Olfactory ensheathing cells, OECs)是一种特殊的神经胶质细胞,它可以通过神经营养、抑制胶质增生和瘢痕形成、成鞘作用等促进损伤脊髓的修复^[2-4]。本研究用大鼠 OECs 与 LA:GA=75:25 的 PLGA 膜进行体外共同培养,观察 PLGA 与 OECs 的生物相容性。

基金项目:江苏省“医学重点人才”资助项目(RC2007027),南通市社会发展科技计划项目(S2009014)。

作者单位:226001 江苏省南通市 南通大学第二附属医院脊柱外科。

通讯作者:崔志明(E-mail:czmspine@163.com)。

1 材料与方法

1.1 材料

出生 1~3 d 的 SD 大鼠(南通大学医学院实验动物中心);PLGA(LA:GA=75:25, IV=2.0 dl/g, 济南岱罡生物材料有限公司);DMEM/F12 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);NGFRp75 抗体(Santa Cruz 公司);Hoechst 33342、S-100 抗体(Sigma 公司);Alexa fluor 568、Alexa fluor 488(Invitrogen 公司)。

1.2 PLGA 膜的制备和体外降解检测

将 PLGA 溶于氯仿,配制成 10% (w/v) 的溶液,倒入模具中,液面高度为 0.5 mm,待溶剂自然挥发,脱模后放入真空干燥机干燥成膜。PLGA 膜用 70% 的乙醇灭菌,再用无菌生理盐水清洗 3 次,经紫外灯照射后无菌保存备用。

将 PLGA 膜剪成 2 cm × 2 cm 大小, 电子天平称重, 然后将样品膜浸泡于 pH 7.2 的 PBS 缓冲液中, 放入 37 °C 恒温箱内, 每周换液。定期取样, 蒸馏水冲洗, 干燥至恒重后称重。最后将降解的 PLGA 膜表面喷金, 在扫描电子显微镜下观察其表面形态。重量损失公式如下, 其中 M_1 是降解前的质量, M_2 是降解后的质量。

$$W = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\%$$

1.3 原代 OECs 的培养及纯化

出生后 1~3 d 的 SD 大鼠腹腔麻醉后断头处死, 无菌条件下分离双侧嗅球, 置于 DMEM/F12 基础培养液中。培养液清洗嗅球 2 次, 用眼科弯剪剪碎嗅球成 1 mm³ 的组织块, 加入 0.125% 胰酶置于 5% CO₂ 37 °C 培养箱中消化 20 min。用毛细吸管反复吹打至悬液呈乳白色, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的完全培养液中止消化 5 min。用 400 目不锈钢筛网滤过后收取细胞悬液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后加入培养液, 吹打均匀, 再次离心后弃上清, 加入含 10% FBS 的完全培养液及青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/mL, 毛细吸管吹打制成单细胞悬液, 接种于培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 分别培养 18 h 和 36 h 后, 将细胞悬液转移至另一培养瓶中。培养 48 h 后将细胞悬液吸至刻度离心管, 离心后弃上清, 加入完全培养液吹打均匀, 台盼蓝染色计数。培养至第 7 天的 OECs, 用 Hoechst 33342、S-100、NGFRp75 特异性抗体作免疫荧光染色鉴定纯度。

1.4 OECs 与 PLGA 膜共同培养

将浓度为 1 × 10⁶ cells/mL 的纯化 OECs 悬液接种于无菌 PLGA 膜上, 对照组则将同样的细胞接种于多聚赖氨酸 (PLL) 包被的圆玻片上。两者均置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中, 每 3 天行半量换液, 倒置显微镜下观察细胞形态。将与 OECs 共培养 1 d、3 d、5 d、7 d 的 PLGA 膜经过浸洗、固定、脱水、干燥、表面喷金后行扫描电镜观察。

1.5 免疫荧光抗体标记

分别于培养第 1、3、5、7 天吸出培养液, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 缓冲液浸洗 3 次, 封闭血清孵育 1 h, 加入兔抗大鼠 NGFRp75 与小鼠抗大鼠 S-100 一抗混合液 4 °C 过夜, PBS 缓冲液浸洗 3 次, 加入 Alexa fluor 568 羊抗小鼠与 Alexa fluor 488 羊抗

兔 IgG 混合液, 室温下作用 2 h, 封片, 荧光显微镜观察摄片。

1.6 OECs 在 PLGA 膜上的细胞增殖能力检测

共培养 1 d、3 d、5 d、7 d 后加入 5 mg/mL MTT 溶液, 37 °C 孵育, 再加入二甲基亚砷振荡溶解结晶, 用酶标仪测 570 nm 的 OD 值, 计算细胞相对增殖率 (RGR)。毒性分级标准如下: 0% 为 Ⅰ级, 1%~24% 为 Ⅱ级, 25%~49% 为 Ⅲ级, 50%~74% 为 Ⅳ级, 75%~99% 为 Ⅴ级, ≥100% 为 0 级。RGR 值越大, 级数越低, 则材料毒性越小。

1.7 图像处理 and 统计分析

在放大 200 倍的荧光显微镜下, 将摄取的照片导入图像处理系统, 应用捷达 801 系列形态学分析软件, 计数 200 倍视野内 S-100 阳性细胞数, 并通过图像处理系统得到相应照片中 S-100 阳性细胞的胞体面积和细胞 (包括突起) 周长, 每组均取 3 张切片的平均值作为统计数据, 以均数 ± 标准差表示, 使用 SPSS13.0 统计软件进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 实验结果

2.1 PLGA 膜的体外降解检测

PLGA 膜在 PBS 中的质量损失随时间延长而增加 (图 1), 开始 2 周质量损失较多, 但前 8 周平均降解速度较慢, 8 周后降解速度加快, 至第 12 周达到 14%。电镜下, PLGA 膜表面逐渐皱缩并出现纹理 (图 2)。

2.2 OECs 的鉴定

Hoechst 33342、S-100、NGFRp75 特异性抗体作免疫荧光染色, 鉴定为 OECs 细胞, 纯度大于 91% (图 3)。

2.3 OECs 与 PLGA 膜共培养形态学观察

OECs 与 PLGA 膜共培养后, 逐渐由悬浮状态沉降到膜表面, 并在膜上附着展开, 至 12 h 后, 约 80% 细胞已黏附, 细胞呈圆形和椭圆形, 突起少, 胞体大, 聚集成团。接种 1 d 后, 细胞团的外围细胞伸出短小突起, 并向四周辐射散开, 细胞团较共培养前面积增大。接种第 3 天, 见细胞团扩散, 大部分细胞生成突起, 呈双极或三极, 以双极为主。接种第 5 天, 细胞在膜上迁移, 分布均匀, 突起伸长, 出现多极细胞, 并分泌较多细胞基质。接种第 7 天, 细胞密度增加, 突起伸展, 与对照组比较, 在膜上迁移的距离较小, 细胞较聚集, 细胞数量和形态与对照组无明显差异 (图 4)。

2.4 细胞增殖能力

OECs 与 PLGA 膜共培养,不同时间点的 OD 值见表 1,细胞毒性评级为 I,显示 PLGA 膜与 OECs 具有良好的相容性。

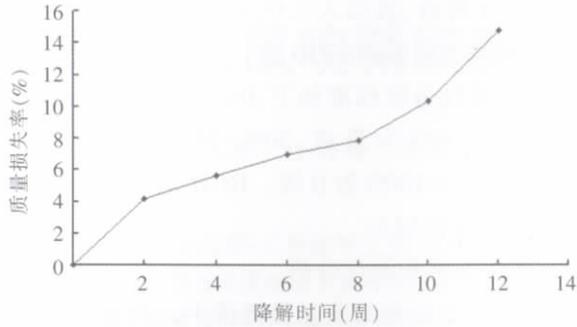
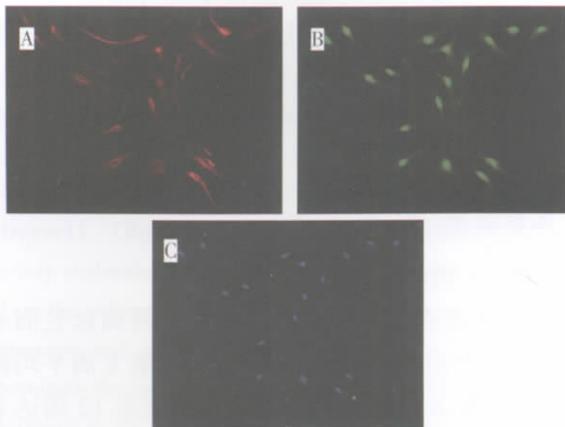


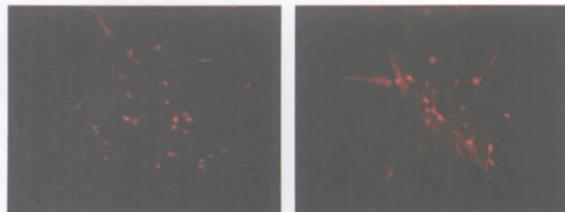
图 1 PLGA 膜体外降解 12 周质量损失曲线

Fig.1 Degraded curve of weight loss of PLGA membrane in 12 weeks in vitro



A: S-100 特异性抗体作免疫荧光染色
 B: NGFRp75 特异性抗体作免疫荧光染色
 C: Hoechst33342 特异性抗体作免疫荧光染色
 A: Immuno-fluorescent staining of S-100 special antibody
 B: Immuno-fluorescent staining of NGFRp75
 C: Immuno-fluorescent staining of Hoechst33342 special antibody

图 3 培养 7 d 的 OECs(200×)
Fig.3 OECs 7 days after culture (200×)

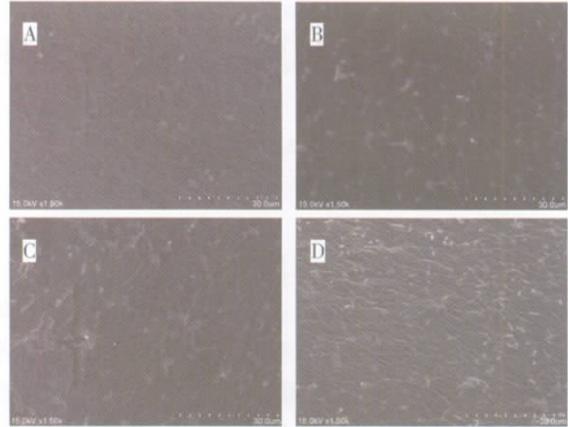


A: 共培养 5 d 的 OECs, PLGA 组
 B: 共培养 5 d 的 OECs, 对照组
 A: OECs 5 days after co-culture, PLGA group
 B: OECs 5 days after co-culture, control group

图 5 免疫荧光染色检查(200×)
Fig.5 Immuno-fluorescent staining observation (200×)

2.5 免疫荧光检测

S-100 阳性细胞的数量、胞体面积和细胞(包括突起)周长与对照组相比无显著性差异($P>0.05$)(表 2、图 5)。



A: 未降解; B: 降解 4 周; C: 降解 8 周; D: 降解 12 周
 A: Before degradation; B: 4 weeks after degradation; C: 8 weeks after degradation; D: 12 weeks after degradation

图 2 PLGA 膜体外降解实验扫描电镜观察(1 500×)
Fig.2 SEM observation of degradation of PLGA membrane (1 500×)

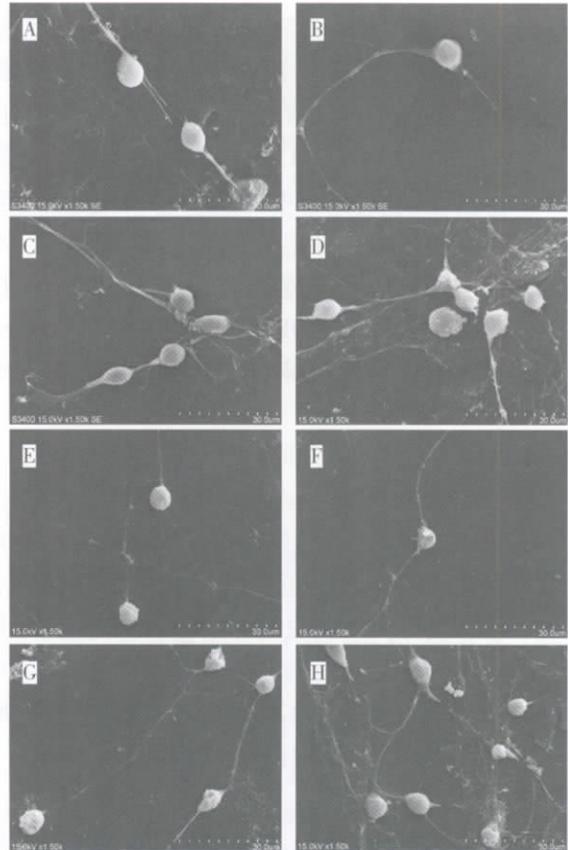


图 4 扫描电镜观察(1 500×): PLGA 组培养 1 d(A)、3 d(B)、5 d(C)、7 d(D); 对照组培养 1 d(E)、3 d(F)、5 d(G)、7 d(H)
 Fig.4 SEM observation (1 500×): PLGA group 1 d (A), 3 d (B), 5 d (C), 7 d (D) after culture; control group 1 d (E), 3 d (F), 5 d (G), 7 d (H) after culture

表1 两组不同时间点的OD值($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 OD values of two groups in different time ($\bar{x}\pm s, n=6$)

	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组 Control group(OD value)	0.287±0.024	0.353±0.029	0.471±0.029	0.647±0.033
PLGA组 PLGA group(OD value)	0.274±0.022	0.320±0.027	0.422±0.031	0.591±0.034
RGR	95.4%	90.7%	88.1%	89.4%

表2 两组的S-100阳性细胞数、胞体面积和细胞周长比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 S-100 positive cell count, cell bodies area and cell circumference of two groups ($\bar{x}\pm s, n=12$)

	S-100 阳性细胞数 S-100 positive cell count	胞体面积 (μm^2) cell bodies area (μm^2)	细胞周长 (μm) cell circumference (μm)
对照组 Control group	21.53±3.81*	368.43±22.49**	135.39±13.66***
PLGA组 PLGA group	19.88±3.26*	357.74±19.63**	127.42±11.85***

* $P=0.267$ ** $P=0.228$ *** $P=0.141$

3 讨论

脊髓损伤后神经功能的恢复至今仍是困扰医学界的难题,组织工程研究的发展为脊髓损伤的修复带来了新的希望。OECs 移植治疗脊髓损伤已显示出良好的应用前景,Raisman 在其报道中较系统地提出 OECs 将是修复脊髓损伤最有应用前景的移植细胞。但单纯移植细胞往往会造成移植细胞流失,以及移植区仍留有组织缺损而不利于神经修复等不足,因此构建合适的细胞支架作为移植细胞的载体是保证移植成功的关键^[5-6]。理想的脊髓组织支架材料应该具有良好的生物相容性、可靠的机械强度、生物可降解性、高孔隙率和三维立体结构,以及可塑性和表面生物活性等特点,其中首要的是具备良好的生物相容性^[7-8]。

PLGA 由不同比例的乳酸(LA)与乙醇酸(GA)聚合而成,在体内通过酯键水解而使分子链断裂,逐渐生成 LA 和 GA 单体,其机械性能、强度、亲疏水性和降解速率等,均可以通过调节两者的不同比例进行调整^[9-10]。Moore 等^[11]将 LA:GA=85:15 的 PLGA 多通道支架复合雪旺细胞移植入脊髓横断的大鼠体内,1 个月后有丰富的再生轴突通过了支架全长。Teng 等^[6]将两种比例的 PLGA 制作的支架与神经干细胞复合移植入大鼠半切脊髓中,亦发现移植后神经功能得到明显恢复。这些研究表明,PLGA 可以作为多种种子细胞的载体。

由于 GA 单体比 LA 单体的降解速率快,所以 PLGA 膜的降解速率随着 GA 比例的增大而增加。在各种比例的 PLGA 材料中,75:25 的降解速率较适

中,因此我们选用此种比例的 PLGA 膜作为实验对象。体外降解实验显示,75:25 的 PLGA 膜在开始 2 周快速降解,之后进入平台期,第 8 周的降解速率缓慢,之后明显加快,这与 Wu 等^[12]的研究结果相似,但整体降解速率较其缓慢,可能是由于使用材料的物理形态不同所致。因为, Wu 等使用的多孔隙的支架比本实验使用的 PLGA 膜具有更大的接触面积,与溶液的接触面积越大,降解速率越快;另外,在体外实验中,多孔支架降解后所产生的酸性物质易聚集在支架孔隙内,不能快速扩散至周围溶液中,支架局部 pH 值的下降可以加速其降解。

支架材料的降解速率与脊髓组织修复的时间应能匹配。初始修复损伤脊髓时,移植的支架材料应具有足够的力学强度以维持损伤区域的稳定性,防止周围组织塌陷,从而支持神经轴突的延伸和局部组织的再生。随着轴突生长,支架材料应快速的降解,从而为再生组织让出空间,使其逐渐填充损伤区域,避免造成再生神经和组织的压迫。75:25 的 PLGA 材料在 8 周后快速降解的特性,符合大鼠脊髓损伤修复的时间规律,适合于大鼠脊髓损伤修复的研究。

多聚赖氨酸(PLL)可以通过改善培养皿的电荷状况及吸附培养液成分促进细胞贴壁^[13],是目前公认的细胞培养的良好载体,因此我们选择 PLL 与 OECs 共同培养作为对照组。本实验中,PLGA 膜与 OECs 共培养,通过倒置相差显微镜、扫描电镜、免疫荧光等观察显示,PLGA 组与对照组 OECs 的形态、数量和分布没有显著区别,S-100 特异性抗体免疫荧光染色阳性细胞的数量、胞体面积和细胞周长与对照组无明显统计学差异,表示 OECs 可以很好

地在 PLGA 膜上黏附、生长和迁移。MTT 检测细胞增殖率的结果显示在各时间点 OECs 在 PLGA 膜上的相对增殖率均在 75%~99% 之间,细胞毒性等级为级,表明 PLGA 对 OECs 无毒副作用。

体外复合细胞培养法研究生物材料的相容性可以直接观察细胞与生物材料复合生长的情况,较为敏感、客观。本实验观察到 OECs 能够在 75:25 的 PLGA 膜中存活、成熟和增殖,说明 OECs 与 PLGA 膜具有良好的生物相容性,从而表明 OECs-PLGA 膜复合物将有可能用于治疗神经系统损伤或病变。

参考文献

- [1] Di Toro R, Betti V, Spampinato S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymers [J]. *Eur J Pharm Sci*,2004,21(2-3):161-169.
- [2] Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Cell therapy for spinal cord regeneration [J]. *Adv Drug Deliver Rev*,2008,60(2):263-276.
- [3] Franssen EH, de Bree FM, Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord [J]. *Brain Res Rev*,2007,56(1):236-258.
- [4] Guest JD, Herrera L, Margitich I, et al. Xenografts of expanded primate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection [J]. *Exp Neurol*,2008,212(2):261-274.
- [5] Potter W, Kalil RE, Kao WJ. Biomimetic material systems for neural progenitor cell-based therapy [J]. *Front Biosci*,2008,13:806-821.
- [6] Teng YD, Lavik EB, Qu X, et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99(5):3024-3029.
- [7] Novikova LN, Kellerth JO, Novikov LN. Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury [J]. *Curr Opin Neurol*,2003,16(6):711-715.
- [8] Krych AJ, Rooney GE, Chen B, et al. Relationship between scaffold channel diameter and number of regenerating axons in the transected rat spinal cord [J]. *Acta Biomaterialia*,2009,5(7):2551-2559.
- [9] Takezawa T. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behavior [J]. *Biomaterials*,2003,24(13):2267-2275.
- [10] Qiu LY, Zhu KJ. Novel biodegradable blends of poly [bis(glycineethyl ester) phosphazene] and polyesters or polyanhydrides: compatibility and biodegradable characteristics [J]. *Polym Int*,2000,49(11):1283-1289.
- [11] Moore MJ, Friedman JA, Lewellyn EB, et al. Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration [J]. *Biomaterials*,2006,27(3):419-429.
- [12] Wu L, Ding JD. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering [J]. *Biomaterials*,2004,25(27):5821-5830.
- [13] Kim J, Williams JC. Rapid prototyping of patterned poly-L-lysine microstructures [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*,2006,1:2110-2113.
- [14] Au P, Tam J, Fukumura D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature [J]. *Blood*,2008,111(9):4551-4558.
- [15] Koike N, Fukumura D, Gralla O, et al. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels [J]. *Nature*,2004,428(6979):138-139.
- [16] Ying X, Zhe X, Hellem S, et al. Endothelial cells influence the osteogenic potential of bone marrow stromal cells [J]. *Biomed Eng Online*,2009,8:34.
- [17] Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing [J]. *Plastic Reconstr Surg*,2002,109(7):2384-2397.
- [18] Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, et al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells [J]. *Tissue Eng*,2003,9(1):95-103.
- [19] Villars F, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF [J]. *J Cell Biochem*,2000,79(4):672-685.
- [20] Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, et al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells [J]. *Tissue Eng*,2003,9(1):95-103.
- [21] Villars F, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF [J]. *J Cell Biochem*,2000,79(4):672-685.

(收稿日期:2011年1月19日;修回日期:2011年2月28日)

(上接第 69 页)

Biomaterials,2009,30(4):508-517.

- [8] 肖彩雯,范先群,周慧芳,等. 转染人血管内皮生长因子基因的组织工程骨修复眼眶壁骨缺损的实验研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*,2009,5(2):65-69.
- [9] 王永刚,裴国献. 血管束植入在组织工程骨血管化构建中的作用[J]. *解放军医学杂志*,2007,32(1):26-28.
- [10] Lokmic Z, Stillaert F, Morrison WA, et al. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct [J]. *FASEB J*,21(2):511-522.
- [11] Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, et al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells [J]. *Tissue Eng*,2003,9(1):95-103.
- [12] Villars F, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF [J]. *J Cell Biochem*,2000,79(4):672-685.

- [13] Au P, Tam J, Fukumura D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature [J]. *Blood*,2008,111(9):4551-4558.
- [14] Koike N, Fukumura D, Gralla O, et al. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels [J]. *Nature*,2004,428(6979):138-139.
- [15] Ying X, Zhe X, Hellem S, et al. Endothelial cells influence the osteogenic potential of bone marrow stromal cells [J]. *Biomed Eng Online*,2009,8:34.
- [16] Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing [J]. *Plastic Reconstr Surg*,2002,109(7):2384-2397.
- [17] Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, et al. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential [J]. *FASEB J*,2005,19(6):665-667.

(收稿日期:2011年2月1日;修回日期:2011年3月7日)