

·基础研究·

·论著·

## 富含血小板血浆双相接种法构建组织工程骨

雷华,肖冉,曹蕊,吕晓岩,归来

(北京协和医学院·中国医学科学院·整形外科医院整形六科 北京 100144)

[摘要] 目的:传统的细胞接种法接种效率低,影响组织工程骨的成骨质量。本研究探讨富含血小板血浆双相接种法是否可以提高细胞接种效率、优化组织工程骨的构建。方法:分别用富含血小板血浆、乏血小板血浆重悬 BMSCs,灌注于三维多孔 PLGA 支架中,凝血酶促凝,体外培养。通过扫描电镜观察支架表面的细胞分布,通过检测支架内 DNA 含量、ALP 含量、成骨基因表达情况分析细胞的接种效率、增殖和分化情况,并与传统的接种方法进行比较。结果:富含血小板血浆和乏血小板血浆双相接种法均能提高细胞与三维支架的结合效率,富含血小板血浆还可以促进支架内细胞的增殖,同时不影响细胞的分化。结论:双相接种法可以提高细胞的接种效率;与普通双相接种法相比,富含血小板血浆双相接种法可以进一步优化组织工程骨的构建。

[关键词] 富含血小板血浆 细胞接种 骨组织工程

[中图分类号] R318 [文献标识码] A [文章编号] 1008-6455(2011)03-0402-06

### Constructing tissue engineering bone by a biphasic seeding strategy with platelet-rich plasma

LEI Hua, XIAO Ran, CAO Rui, LV Xiao-yan, GUI Lai

(The Sixth Department, Plastic Surgery Hospital, Peking Union Medical College, China Academy of Medical Sciences, Peking, Beijing 100144, China)

**Abstract:** **Objective** The conventional static seeding is not efficient in constructing tissue engineering bone, which impacts the quality of osteogenesis. This study wants to prove if a biphasic seeding strategy with platelet-rich plasma (PRP) can improve the conventional static seeding. **Methods** The BMSCs suspension in PRP or platelet-poor plasma (PPP) was infiltrated in 3D PLGA scaffolds, clotted by thrombin and cultured for different days. The cell seeding efficiency was evaluated by SEM and by measuring initial DNA contents in 3D scaffolds. The cell proliferation was evaluated by measuring DNA contents in 3D scaffolds in different culture days. The cell differentiation was evaluated by measuring ALP contents and osteogenesis gene expression in 3D scaffolds. **Results** PRP and PPP could improve the integration of cells and 3D scaffolds. PRP also could enhance the cell proliferation and did not impact the cell differentiation in 3D scaffolds. **Conclusion** The biphasic seeding strategy can improve the cell seeding efficiency. PRP can optimize the constructing of tissue engineering bone.

**Key words:** platelet-rich plasma (PRP); cell seeding; bone tissue engineering

骨组织工程学中,细胞与三位支架的结合即细胞接种是非常重要的步骤,目前常用的细胞接种方法仍是静置接种法,即细胞悬液直接滴加在支架表面。此方法适用于各种细胞和支架,但效率低,不仅细胞流失多,细胞也不易均匀分布于支架内部<sup>[1-2]</sup>。因此,有很多研究探讨如何将细胞高效且均匀地分布于支架内。其中有学者将细胞重悬于纤维蛋白原<sup>[3-6]</sup>或胶原<sup>[7-13]</sup>的溶液中,将此溶液灌注于支架中,再用促凝剂使溶液凝成凝胶,固定细胞于支架内,即双相接种法。研究表明此方法不仅使细胞与支架的结合效率提高,而且细胞可以灌注于支架内部,有利于细胞的均匀分布。

本研究试用富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)替代纤维蛋白原和胶原作为双相接种媒介改进细胞接种方法。因为 PRP(内含丰富自体纤维蛋白原)不仅具有与纤维蛋白原一样的双相性,更重要的是它含有大量血小板,血小板在促凝剂激活时释放大量的活性蛋白,其中包括多种生长

因子。所以理论上用 PRP 接种细胞时可以向支架中输送生长因子和其他活性蛋白,这样不仅可以机械性地将细胞固定于支架中,还可以进一步促进细胞的粘附、增殖、分化等生物事件。为证实我们的设想,本实验用传统静置接种法、乏血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)和 PRP 双相接种法构建细胞支架复合物,比较三种方法的接种效率,观察细胞在支架内的增殖和分化情况。

#### 1 材料和方法

1.1 山羊骨髓抽取:中国青山羊一只,5月,10kg。速眠新(长春军事医学科学院)1.5ml 肌肉注射麻醉。18号骨髓穿刺针于髂后上嵴抽取 5ml 骨髓。

1.2 BMSCs 原代培养及传代:人淋巴细胞分离液(Boster,武汉)密度梯度离心分层骨髓,取中层有核细胞层至 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中(Corning, Germany),加入基础培养基 4ml,主要成分高

基金项目 国家自然科学基金资助项目(编号 81071583)

通讯作者 归来 教授,博士研究生导师,主要研究方向 颅颌面外科 E-mail: guilaizhuren@163.com

糖 DMEM(Hyclone USA), 10% FBS(Hyclone USA), 100U/ml 青霉素(Sigma China), 100mg/ml 链霉素(Sigma China), 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 4 天首次换液, 随后 3 天换一次液。待细胞 90% 融合, 0.25% 胰酶消化细胞、收集、重悬, 以 5 000/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 75cm<sup>2</sup> 培养瓶中传代, 每 3 天换液一次。第三代细胞用于以下实验。

1.3 BMSCs 成骨诱导培养及鉴定: 诱导培养基的成分为 DMEM(Hyclone USA), 10% FBS(Hyclone USA), 100U/ml 青霉素(Sigma China), 100mg/ml 链霉素(Sigma China), 0.1 μM 地塞米松(Sigma USA), 10mM β-磷酸甘油酯(Sigma USA) and 0.17mM 维生素 C(Sigma USA)。将第三代细胞以 1 000/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 35mm 的培养皿中(Corning, Germany), 加入基础培养基孵育 24h, 换液, 加入诱导培养基成骨细胞诱导培养。每 3 天换液一次。

诱导 7 天后, 用 CAKP 试剂盒(中国南京建成生物工程研究所)进行 ALP 染色。成骨细胞胞质中可见红或棕色 ALP 阳性颗粒。诱导 14 天后, 用茜素红(中国阿拉丁试剂有限公司)进行钙结节染色。钙化结节呈现不同的红色。

1.4 PRP 和 PPP 的制备: 中国青山羊一只, 5 月, 10kg。速眠新 1.5ml 肌肉注射麻醉。50ml 注射器内含 5ml IACD(0.48g 柠檬酸, 1.32g 柠檬酸钠, 1.47g 葡萄糖溶于 100ml 双蒸水), 于颈静脉抽取全血 40ml, 离心 1 000g, 15min, 取上层血浆二次离心, 3 000g 20min。上层为清亮的 PPP, 移入另一 5ml 离心管中备用。中间层为白色的血小板团, 用吸管吸出移至另一离心管中。用少量 PPP 将血小板团重悬, 人工血小板计数, 调节浓度为 10<sup>6</sup>/μl 的 PRP 备用<sup>[14-16]</sup>。PPP 中血小板浓度 10<sup>4</sup>/μl。

1.5 PLGA 支架预处理: PLGA 支架由济南岱罡生物科技有限公司提供。PLA:PGA=75:25。孔径大小 100~300 μm, 空隙率 80%。将大块 PLGA 切成 5mm×5mm×3mm 小立方体, 供体外研究使用。PLGA 立方体浸泡于 75% 酒精中消毒 24h, PBS 漂洗 3 次, DMEM 孵育 30min, 取出至于无菌纱布上, 吸干大部分水分。

1.6 三种接种方法构建细胞/支架复合体: 方法一, 为传统静置接种法, 即 DMEM 重悬细胞, 调节细胞密度至 5×10<sup>6</sup>/ml。滴加 80 μl 细胞悬液/支架, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 2h, 移入六孔板, 每孔 5ml 诱导培养基。方法二, PPP 重悬细胞, 调节细胞密

度至 5×10<sup>6</sup>/ml。滴加 80 μl 细胞悬液/支架, 随即滴加 30 μl 凝血酶溶液(10 000IU 凝血酶(Sigma USA) 加入 10% CaCl<sub>2</sub>(Sigma China) 中), 加盖, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 30min, 移入六孔板, 每孔 5ml 诱导培养基。方法三, PRP 重悬细胞, 其余同方法二。每 3 天换一次液。接种后 24h 倒置显微镜下观察。

1.7 细胞/支架复合体电镜扫描: 细胞/支架复合体培养 3 天、7 天后, 2.5% 戊二醛固定, 30%~100% 的梯度乙醇脱水, 真空干燥, 表面喷金处理后在扫描电镜下观察照相。

1.8 细胞/支架复合体 DNA 定量分析: 分别于 1 天、5 天、9 天、14 天每组取 4 个细胞/支架复合体, PBS 漂洗两次, 放入 7ml 离心管中, 剪成小块, 加 1ml 骨细胞消化液<sup>[11,13]</sup>, 37°C 水浴 2h。将消化混合液吸入另一个 7ml 离心管, 超声细胞破碎机处理 5 次, 6s/次, 共 30s, 离心 200g, 5min, 取上清液待用。

上清液 40 μl 置于 96 孔黑色不透光酶标板内, 每个样本两个副孔, 每孔加 160 μl Hoechst 33258(Sigma USA) 测试液(1 μg/ml), 放入荧光酶标仪样品槽, 震荡混匀 30s, 选择激发波长 360nm, 发射波长 460nm, 测定样品的荧光强度。以小牛胸腺 DNA(Sigma USA) 做标准曲线。实验重复 3 次。

1.9 细胞/支架复合体 ALP 活性定量分析: 取方法 8 中的上清液, 用碱性磷酸酶试剂盒(中国南京建成生物工程研究所)测定 ALP 活性。50 μl 上清液加 500 μl 缓冲液、500 μl 基质液, 充分混合, 37°C 水浴 3h。分光光度计 520nm 测定吸光度。吸光度的 OD 值代表复合体的 ALP 活性。实验重复 3 次。

1.10 细胞/支架复合体成骨基因相对定量分析: 每个复合体置入 2ml Eppendorf 管中, 加入 1ml Trizol(Invitrogen, USA), 剪碎复合体, 4°C 放置 1h, 待复合体完全溶解于 Trizol 提取总 RNA。根据反转录试剂盒(ABI, USA) 提供的实验步骤, 反转录合成 cDNA。各引物均由北京基莱生物科技有限公司合成。实时定量 PCR 反应体系为 25 μl ABI7900HT 定量 PCR 仪(ABI, USA) 的反应程序: 50°C 2min→95°C 10min→(95°C 15s→60°C 1min)×40 个循环→95°C 15s→60°C 1min→95°C 15s---20°C 终止反应。管家基因 GAPDH 作为内对照, 每个样本设置 3 个复孔。管家基因和目的基因的引物核苷酸序列, 产物大小, 退火温度总结于表 1。对于每一个样本 CT 值是 PCR 产物达到可探测的荧光强度时复制循

表 1 管家基因和目的基因的引物核苷酸序列、产物大小、退火温度比较

基因	引物核苷酸序列(5' →3')	产物大小(bp*)	退火温度(°C)
GAPDH	Forward AAGTTCACGGCAGTCAAG	182	60
	Reverse ACGTACTCAGCACCAGCATCAC		
ALP	Forward CCTACCAGCTCATGCACAACAT	173	60
	Reverse GGCCTTCTCATCCAGCTCATA		
Collagen I	Forward AGTTAGTCCTCCATGCCGACAC	261	60
	Reverse TAAGGAGGAAGACTGGAGCGAG		
Osteonectin	Forward CTGGACTCCGAGCTGACTGAAT	466	60
	Reverse TCTCGGTCAGGAGTTGTTGTC		

\*bp: 碱基对

环次数。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算每个目的基因每个时间点的相对表达水平。对于每一个目的基因  $\Delta\Delta CT = (C_{T,目的基因} - C_{T,管家基因})_{Time x} - 标准\Delta CT$  标准  $\Delta CT$  为 DMEM 组  $(C_{T,目的基因} - C_{T,管家基因})_{Time 0}$  [17]。

1.11 每个数值以平均值  $\pm$  标准差表示, 组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Tukey's test。设  $P < 0.05$  具有统计学显著差异性。表 1。

## 2 结果

2.1 BMSCs 成骨诱导培养 BMSCs 诱导培养 7 天后 ALP 染色为阳性, 诱导 14 天后 茜素红染色为阳性。说明本实验条件下, 自山羊骨髓中可分离培养出骨髓基质细胞, 经诱导后, 可成骨细胞分化(图 1)。

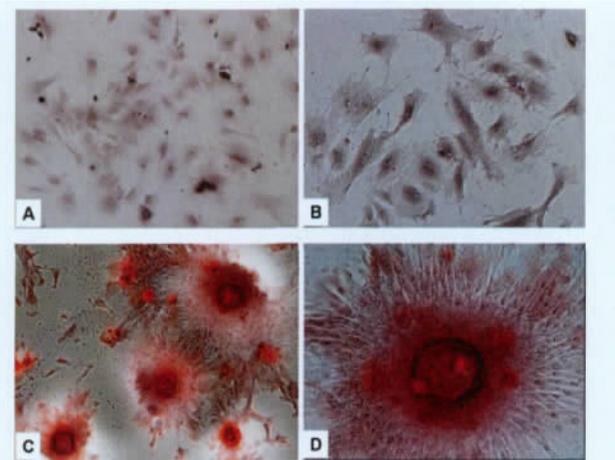


图 1 BMSCs 诱导后 ALP 染色和钙结节茜素红染色: A、ALP 染色阳性(100 $\times$ ); B、ALP 染色阳性(200 $\times$ ); C、钙结节茜素红染色阳性(100 $\times$ ); D、钙结节茜素红染色阳性(200 $\times$ )

2.2 三种接种方法接种效率比较 细胞接种后 24h, 光学显微镜下观察, DMEM 组的六孔板底以复合体为中心布满贴壁的 BMSCs, PRP 组六孔板底以复合体为中心布满血小板, PPP 组六孔板底清洁, 偶见单个细胞(图 2)。

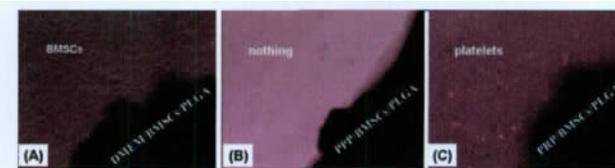


图 2 细胞接种后 24h 显微镜下观察(图中不透光的黑影为细胞/支架复合体)40 $\times$ : A、DMEM 组, 复合体周围大量 BMSCs 散落贴壁; B、PPP 组, 复合体周边清洁无细胞散落; C、PRP 组, 复合体周边散落大量血小板

扫描电镜观察显示, DMEM 组支架表面粘附的细胞明显较 PPP 和 PRP 组少, PPP 和 PRP 组支架表面不仅粘附大量细胞还有胶原纤维附着。7 天时, PPP 和 PRP 组支架表面的细胞呈现伸展平铺状态(图 3A、B)。

细胞接种后 24h, 细胞/支架复合体内 DNA 检测显示, DMEM 组的 DNA 含量显著低于 PPP 和 PRP 组( $P < 0.05$ ), 而 PPP

和 PRP 组的 DNA 含量无差别(图 4)。

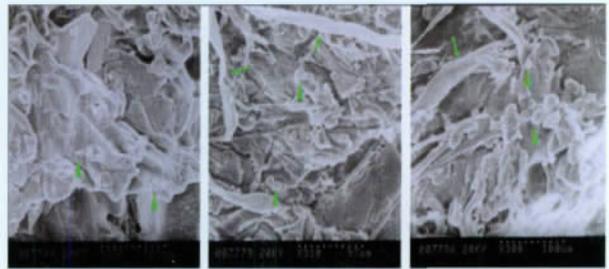


图 3A 接种 3 天后, 细胞支架复合物表面扫描电镜观察; 绿色三角指示细胞, 绿色箭头指示胶原纤维; PPP 和 PRP 组的细胞明显较 DMEM 组多

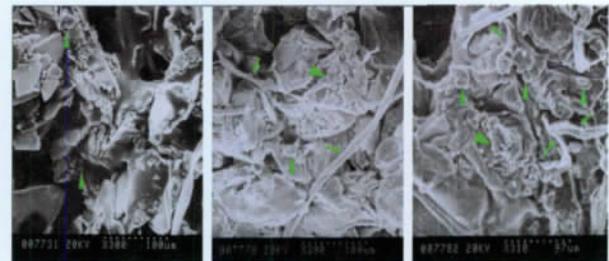


图 3B 接种 7 天后, 细胞支架复合物表面扫描电镜观察; 绿色三角指示细胞, 绿色箭头指示胶原纤维; PPP 和 PRP 组支架表面的细胞呈现伸展平铺状态; DMEM 组与 3 天无明显差异

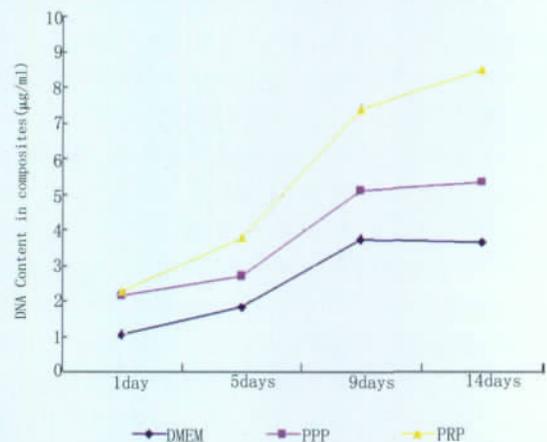


图 4 DMEM 组, PPP 组, PRP 组各时间点复合体中 DNA 含量;  $n=4$ , 数值以平均值  $\pm$  标准差

2.3 BMSCs/PLGA 复合体内 BMSCs 增殖比较: 复合体中 DNA 的含量代表 BMSCs 的数量, DNA 的增加表示 BMSCs 的增殖, 数据如图 4 所示。在 DMEM 组中, 从接种后 1~9 天, BMSCs 快速增殖 ( $P < 0.05$ ), 但从 9~14 天, BMSCs 增殖进入平台期 ( $P > 0.05$ )。PRP 组中的 BMSCs 显示了同样的趋势。但 PRP 组中的 BMSCs 自接种后 1~14 天, 一直显著增殖 ( $P < 0.05$ )。5 天, 9 天, 14 天 PRP 组的 BMSCs 显著高于其他两组 ( $P < 0.05$ )。9 天和 14 天时, PPP 组 BMSCs 数量显著高于 DMEM 组 ( $P < 0.05$ )。

2.4 BMSCs/PLGA 复合体 ALP 活性比较: DMEM 组和 PPP 组复合体的 ALP 活性自 1~9 天平稳上升, 9 天时的 ALP 活性显著

高于 1 天 ( $P < 0.05$ ) ,但自 9 天开始缓慢下降 ,14 天时的 ALP 活性仍然显著高于 1 天 ( $P < 0.05$ )。PRP 组 ALP 活性自 1~5 天平稳上升 ( $P > 0.05$ ) 5~9 天快速上升 ( $P < 0.05$ ) ,自 9 天开始平稳下降 ,但至 14 天 ALP 活性仍显著高于 1 天 5 天 ( $P < 0.05$ )。9 天 ,14 天时 PRP 组 ALP 活性显著高于其他两组 ( $P < 0.05$ ) ,PPP 组在 5 天 ,9 天时高于 DMEM 组 ,但并不显著 ( $P > 0.05$ ) ,14 天时两组达同一水平。数据如图 5 所示。

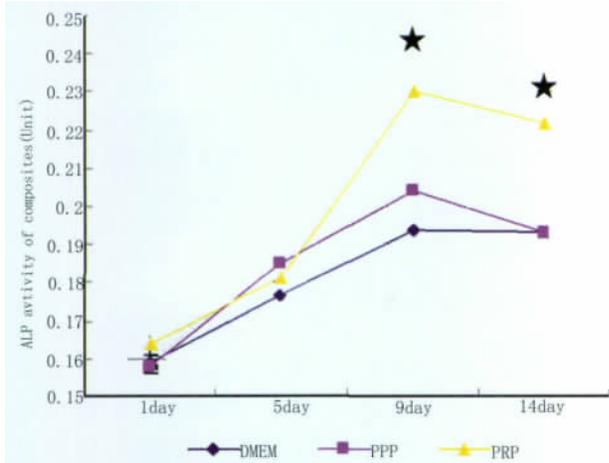


图 5 DMEM 组,PPP 组,PRP 组各时间点复合体 ALP 活性, n=4; 数值以样本吸光度 OD 平均值 ± 标准差

2.5. MSCs/PLGA 复合体成骨基因相对定量比较 如图 6。图 6A :1 天和 5 天 ,3 组的 ALP 表达无显著差异 ( $P > 0.05$ ) ,9 天时 PRP 组显著高于其他两组 ( $P < 0.05$ ) ,14 天时 ,PRP 组显著高于 DMEM 组 ( $P < 0.05$ ) 略高于 PPP 组 ( $P > 0.05$ ) ; 图 6B :1 天 ,5 天 ,9 天 DMEM 组的 Collagen 基因表达高于其他两组 ,但只有 5 天时有显著差异 ( $P < 0.05$ ) ,随着 DMEM 组下调 ,PPP 和 PRP 组上调 ,14 天时 DMEM 组表达最低 ,PRP 组表达最高 ,但彼此之间的差异不显著 ( $P > 0.05$ ) ; 图 6C :1 天时 ,PRP 组显著高于其他两组 ( $P < 0.05$ ) 5 天时 PPP 组显著高于 DMEM 组 ( $P < 0.05$ ) 略高于 PRP 组 ( $P > 0.05$ )。9 天时 ,3 组之间无显著差异。14 天时 ,PRP 组显著高于其他两组 ( $P < 0.05$ )。

总的趋势是 PRP 组的成骨性基因表达在培养早期明显低于其他两组 ,但随着培养时间延长 ,PRP 组的基因表达逐渐上调 ,14 天时都达到最高水平。

### 3 讨论

骨组织工程研究中 ,三维多孔支架已经广泛用于构建组织工程骨<sup>[18-19]</sup>。但是 ,细胞与支架的复合效率却不令人满意<sup>[2,20-27]</sup> ,而且有研究显示 ,体内的成骨只发生在支架的周边 ,在多孔支架的中心无骨组织形成<sup>[20,28-29]</sup>。这可能是由于在细胞接种时 ,细胞不能进入支架的内部<sup>[20]</sup> ,而且随着细胞的粘附和扩增进一步阻碍了细胞向支架内部移动<sup>[26]</sup>。可见 ,细胞接种是构建细胞 / 支架复合体的关键 ,直接影响骨再生的质量。因此 ,很多学者研究了有利于细胞均匀分布于三维多孔支架内的接种方法 ,例如低压接种系统<sup>[20]</sup> ,生物反应器灌

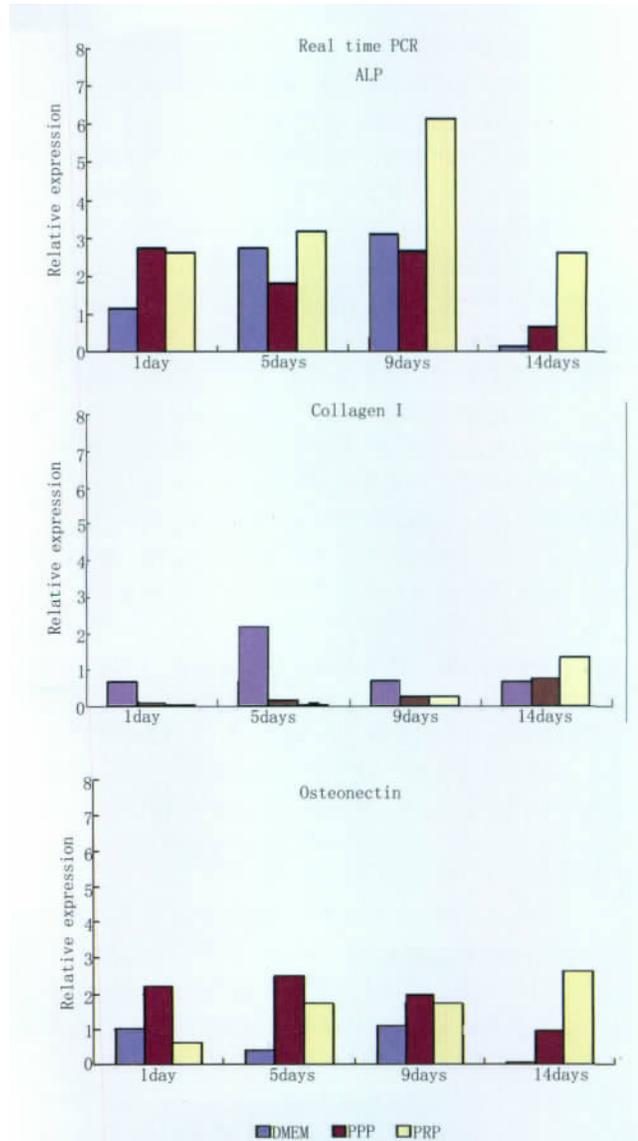


图 6 3 组复合体中 BMSCs ALP (A) , Collagen I (B) , and Osteonectin (C) 各时间点的相对表达。目的基因的相对表达是由其 CT 值与管家基因 GAPDH 的 CT 值相比较而得出 ; 对于每个目的基因 , 标准 Δ CT 均值是 DMEM 组在 1 天时目的基因与管家基因的差值平均值

注系统<sup>[2,21]</sup> , 旋转烧瓶接种法<sup>[7]</sup> , 离心接种法<sup>[25,27]</sup> , 及表面声波技术<sup>[26]</sup>。这些接种技术均表现出良好效果 ,但是有些需要特殊设备不利于普及推广 ,有些步骤繁琐、耗时长增加了污染的机会。与这些技术相比 ,由纤维蛋白原和胶原介导的双相接种法简单、经济、方便、适用于各种细胞和支架。它也属于静置接种法 ,但是与传统静置接种法不同的是 ,通过纤维蛋白原和胶原的变相功能可以把细胞固定在支架中 ,而且有研究表明此方法可以使细胞均匀分布支架中<sup>[3,7-13]</sup>。

另一方面 ,随着三维支架孔径增大孔隙率提高 ,支架表面积与体积的比值必然下降 ,所以致使只有与孔壁接触的细胞能够粘附于孔壁表面 ,而那些悬在孔中的细胞则会被培养基冲洗掉或沉淀至支架底部<sup>[7]</sup>。纤维蛋白原和胶原作为细胞接种媒介可以通过凝成凝胶将悬在孔中的细胞包埋固定在

支架内,从而提高细胞接种效率<sup>[3,7-10]</sup>。但是,其他接种方法没有这个功能,因此,我们认为由纤维蛋白原和胶原介导的双相接种法是值得推广和进一步研究的。

本研究用 PRP 代替纤维蛋白原和胶原作为双相接种媒介输送细胞至支架内,目的在于进一步改进双相接种法。

结果显示 PRP 和 PPP (自体纤维蛋白原) 都可以将 BMSCs 全部复合在支架中,几乎没有细胞散落;扫描电镜也显示 PRP 和 PPP 组复合体表面粘附大量细胞,在细胞接种后 24h, PPP 和 PRP 组复合体的 DNA 量显著高于 DMEM 组。这些都说明 PRP 与 PPP 一样可以通过凝胶作用显著提高细胞接种效率。但是,随着培养时间延长, PRP 组 BMSCs 的增殖速率显著较 PPP 组快,这表明 PRP 较 PPP 更能促进 BMSCs 的增殖。在以往的研究中,只有高浓度的 PRP ( $2.5 \times 10^8$  血小板/细胞支架复合体)才能有效促进细胞增殖,低浓度的 PRP ( $0.625 \times 10^8$  and  $0.16 \times 10^8$  血小板/细胞支架复合体)没有明显效应<sup>[30]</sup>。但是,我们的研究中 PRP 的浓度是  $0.8 \times 10^8$  血小板/细胞支架复合体,仍然显示明显的促 BMSCs 增殖作用。这可能是由于血小板和细胞一样充填并被固定在孔隙中,当血小板被凝血酶激活后,释放生长因子等大量活性蛋白,通过类似旁分泌的作用方式作用于周边的 BMSCs,所以,尽管 PRP 的浓度不高,但作用很强。而以往的研究,只是将 PRP 凝集在细胞支架复合物的表面,血小板释放的活性蛋白不容易渗入支架内部发挥作用,所以只有通过提高 PRP 浓度才能表现出明显的生物学效应<sup>[30]</sup>。

有实验显示经高浓度 PRP 做用的 BMSCs,其 ALP 活性下降,因此认为 PRP 抑制 BMSCs 的成骨分化<sup>[30-31]</sup>。本实验结果显示,在培养早期(5 天内) PRP 组 ALP 活性与其他两组无明显差异,可这个时期 PRP 组的 BMSCs 数量却明显较其他两组多,这似乎表明 BMSCs 的成骨分化被抑制。但是随着培养时间延长, PRP 组 ALP 活性迅速上升,到 9 天、14 天已经显著高于其他两组。因此,我们认为并不是 PRP 抑制了 BMSCs 的成骨分化,而是由于 PRP 的促细胞增殖作用使 PRP 组中的 BMSCs 在培养早期大多数处于有丝分裂状态或刚刚完成分裂,也就是处于未分化状态,当 BMSCs 完成增殖,开始发育成熟转变为成骨细胞,ALP 活性也随之增加。Arpornmaeklong 等的研究也表明经高浓度的 PRP 作用的细胞支架复合体,细胞 ALP 活性在 15 天后开始增高<sup>[30]</sup>。

为了进一步明确 PRP 对 BMSCs 成骨分化的影响,我们对细胞支架复合体中成骨性基因 ALP、Collagen、Osteonectin 的表达进行相对定量分析。结果显示,在细胞支架复合体培养早期, PRP 组 3 个成骨基因的表达较其他两组低,但是随着培养时间延长,表达迅速上调,ALP 在 9 天时达各组最高水平, Collagen 和 Osteonectin 14 天时达到 3 各组最高水平。此结果与 ALP 活性分析结果相符,这说明 PRP 并不是抑制了 BMSCs 的成骨性分化,而是因为培养早期, BMSCs 处于增殖状态,当其完成增殖时必然会向成骨方向分化,也就是说, PRP 不是抑制了 BMSCs 的分化,而是由于促进细胞增殖的原因而使分化推迟了。

PRP 已经被广泛应用于临床及实验研究,除了与 BMSCs 或自体松质骨颗粒混合可以促进骨组织再生外<sup>[14,32-34]</sup>,它还可以用于像面颈部除皱、乳房缩小或增大等美容整形手术,以减少术后血肿、血清肿、瘀斑、肿胀<sup>[36-37]</sup>。PRP 还被用于置入牙种植体或人工骨移植周围以提高和加速骨整合<sup>[16,38]</sup>。但据我们查阅的大量文献,至今没有研究将 PRP 用于细胞接种,我们首次提出 PRP 双相接种法,经实验检测,效果良好。

从本实验方法可以看出, PRP 双相接种法是一个很实用的接种方法。PRP 可以由自体全血经两步离心获得,无毒、无免疫源性,因此说此方法既安全又经济。如果与其他方法结合,如低压接种法、离心接种法,可能会更有效地输送细胞至三维多孔支架内。此方法也适用于其他细胞系的接种,用于其他组织的组织工程学研究,如脂肪、软骨。

#### 4 结论

本研究结果显示,以富含血小板血浆 (PRP) 为媒介的双相接种法,不仅可以大大提高 BMSCs 接种于三维多孔 PLGA 支架的效率,还可以促进 BMSCs 在支架中的增殖,同时不抑制其成骨性分化。这些结果说明 PRP 双相接种法在组织工程骨构建中具有实际应用价值,为组织工程骨的临床应用奠定一定基础。

#### [参考文献]

- [1] Li Y, Ma T, Kniss DA, et al. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices[J]. Biotechnol Prog, 2001, 17(5):935-944.
- [2] Wendt D, Marsano A, Jakob M, et al. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity [J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 84(2): 205-214.
- [3] Karp JM, Sarraf F, Shoichet MS, et al. Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: An in vivo study[J]. J Biomed Mater Res A, 2004, 71(1):162-171.
- [4] Chim H, Schantz JT. Human circulating peripheral blood mononuclear cells for calvarial bone tissue engineering [J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(2):468-478.
- [5] Zheng YX, Ringe J, Liang Z, et al. Osteogenic potential of human periosteum-derived progenitor cells in PLGA scaffold using allogeneic serum [J]. J Zhejiang Univ SCIENCE B, 2006, 7 (10): 817-824.
- [6] Jaquie?ry C, Schaeren S, Farhadi J, et al. In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells [J]. Ann Surg, 2005, 242(6):859-868.
- [7] Toh YC, Ho ST, Zhou Y, et al. Application of a polyelectrolyte complex coacervation method to improve seeding efficiency of bone marrow stromal cells in a 3D culture system[J]. Biomaterials, 2005, 26 (19):4149-4160.
- [8] Ushida T, Furukawa K, Toita K, et al. Three-dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds [J].

- Cell Transplant, 2002, 11(5):489-494.
- [9] Taira M, Araki Y. Scaffold consisting of poly (lactide-caprolactone) sponge, collagen gel and bone marrow stromal cells for tissue engineering[J]. J Mater Sci Lett, 2001, 10(2):1773-1774.
- [10] Sittinger M, Huttmacher DW, Risbud MV. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration[J]. Curr Opin Biotechnol, 2004, 15(5):411-418.
- [11] 吕仁发, 周强, 许建中, 等. 双相接种法体外构建组织工程骨[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(16):1656-1659.
- [12] 秦辉, 许建中, 王序全, 等. 双相接种技术构建组织工程骨的异位成骨观察[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(16):1660-1662.
- [13] 吕仁发, 周强, 许建中, 等. 种子细胞双相接种技术促进组织工程骨体外成熟的研究[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(4):291-295.
- [14] Yamada Y, Ueda M, Naiki T, et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration [J]. Tissue Eng, 2004, 10(5-6):955-964.
- [15] Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold[J]. Biomaterials, 2006, 27(9):1817-1823.
- [16] Weibrich G, Hansen T, Kleis W, et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration [J]. Bone, 2004, 34(4):665-671.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C (T)</sup> Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [18] Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering [J]. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86-A(7):1541-1558.
- [19] Trojani C, Weiss P, Michiels JF, et al. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel [J]. Biomaterials, 2005, 26(27):5509-5517.
- [20] Wang J, Asou Y, Sekiya I, et al. Enhancement of tissue engineered bone formation by a low pressure system improving cell seeding and medium perfusion into a porous scaffold [J]. Biomaterials, 2006, 27(13):2738-2746.
- [21] Glowacki J, Mizuno S, Greenberger JS. Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture [J]. Cell Transplant, 1998, 7(3):319-326.
- [22] Schneider GB, English A, Abraham M, et al. The effect of hydrogel charge density on cell attachment [J]. Biomaterials, 2004, 25(15):3023-3028.
- [23] Burg KJ, Holder WD Jr, Culberson CR, et al. Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(4):642-649.
- [24] Aththoff B, Aulin C, Adel?w C, et al. Polarized protein membrane for high cell seeding efficiency [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007, 83(2):472-480.
- [25] Roh JD, Nelson GN, Udelsman BV, et al. Centrifugal seeding increases seeding efficiency and cellular distribution of bone marrow stromal cells in porous biodegradable scaffolds [J]. Tissue Eng, 2007, 13(11):2743-2749.
- [26] Li H, Friend JR, Yeo LY. A scaffold cell seeding method driven by surface acoustic waves [J]. Biomaterials, 2007, 28(28):4098-4104.
- [27] Godbey WT, Hindy SB, Sherman ME, et al. A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds [J]. Biomaterials, 2004, 25(14):2799-2805.
- [28] Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, et al. Promotion of bone formation using highly pure porous b-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells [J]. Biomaterials, 2002, 23(23):4493-4502.
- [29] Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxapatite [J]. J Biomed Mater Res, 1996, 32(3):481-492.
- [30] Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, et al. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2004, 33(1):60-70.
- [31] Ogino Y, Ayukawa Y, Tsukiyama Y, et al. The effect of platelet-rich plasma on the cellular response of rat bone marrow cells in vitro [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005, 100(3):302-307.
- [32] Dallari D, Fini M, Stagni C, et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination [J]. J Orthop Res, 2006, 24(5):877-888.
- [33] Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, et al. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone [J]. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits [J]. Clin Oral Implants Res, 2005, 16(5):622-629.
- [34] Graziani F, Ducci F, Tonelli M, et al. Maxillary sinus augmentation with platelet-rich plasma and fibrinogen cryoprecipitate: a tomographic pilot study [J]. Implant Dent, 2005, 14(1):63-69.
- [35] Kassolis JD, Reynolds MA. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation [J]. J Craniofac Surg, 2005, 16(2):280-287.
- [36] Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery [J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107(1):229-237.
- [37] Marchac D, Greensmith AL. Early postoperative efficacy of fibrin glue in face lifts: a prospective randomized trial [J]. Plast Reconstr Surg, 2005, 115(3):911-916.
- [38] Yamada Y, Ueda M, Hibi H, et al. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study [J]. Cell Transplant, 2004, 13(4):343-355.

[收稿日期]2010-11-23 [修回日期]2011-01-19

编辑 / 张惠娟