

动态力学刺激对三维培养软骨细胞作用的初步研究

范建文¹ 张姝江^{2▲} 董伟强² 李波³ 陈艺² 李立华³

1.广州市番禺区大石街社区卫生服务中心,广东广州 511430;2.广州医学院第一附属医院,广东广州 510000;
3.暨南大学材料科学与工程系 人工器官与材料教育部工程中心,广东广州 510000

[摘要] 目的 探讨在三维多孔支架环境里动态循环压力刺激对软骨细胞的作用。方法 原代培养兔软骨细胞,传代扩增后接种于1.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 聚乳酸多孔(poly-lactic acid, PLA)支架,培养5 d后,施加0.5、1、2 N的正弦动态循环压力,频率0.017 Hz,加压8 h,以无压力组(0 N)作为对照。标本做扫描电镜及组织学切片染色,观察细胞数量、形态及排列的变化。结果 在三维 PLA 多孔支架上,扫描电镜观察到,动态压力组细胞的增殖比无压力组更多,排列也更加有序;动态压力为2 N的时候,细胞增殖、形态比1、0.5 N及无压力组更好,贴附细胞计数与1、0.5 N及无压力组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 动态循环压力对于三维培养条件下的软骨细胞有促进增殖和有序排列的作用,但何种强度的压力更适合体外构建组织工程软骨尚需进一步研究。

[关键词] 组织工程;软骨细胞;动态压力;三维支架

[中图分类号] R318.17 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-7210(2012)12(a)-0011-03

Preliminary study of effect of dynamic compressive stress on three-dimensional cultured chondrocytes

FAN Jianwen¹ ZHANG Shujuan^{2▲} DONG Weiqiang² LI Bo³ CHEN Yi² LI Lihua³

1.Dashi Community Health Service Center of Panyu District in Guangzhou City, Guangdong Province, Guangzhou 511430, China; 2.The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Province, Guangzhou 510000, China; 3.Department of Material Science and Engineering, Ji'nan University Engineering Research Center of Artificial Organs and Materials of Ministry of Education, Guangdong Province, Guangzhou 510000, China

[Abstract] Objective To investigate the effect of dynamic compressive stress on 3-dimensional cultured chondrocytes. **Methods** Chondrocytes of New Zealand rabbit were obtained and proliferated on poly-lactic acid (PLA) porous scaffold with a size of 1.5 cm×0.5 cm×0.5 cm. The cell-scaffold composites were divided into 4 groups, and were exposed to 0, 0.5, 1 and 2 N dynamic cyclic compressive stress respectively for 8 hours (in a frequency of 0.017 Hz). Scanning electronic microscope was performed to examine the cell morphology on the scaffold, and histological staining was used to observe the cell proliferation and arrangement on the scaffold after compressive stress stimulation. **Results** On the 3-D PLA scaffold, cells proliferated and arranged better when they were exposed to dynamic cyclic compressive stress, and 2 N group was better than 1, 0.5 and 0 N groups ($P < 0.05$). The number of cells attached to scaffold in 2 N group was significantly different from that of 1, 0.5 and 0 N groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Dynamic cyclic compressive stress may be beneficial to chondrocytes proliferation and arrangement on 3-D scaffold, but what extend of strength will be the best condition needs further study.

[Key words] Tissue engineering; Chondrocyte; Dynamic compressive stress; Three-dimensional scaffold

关节软骨在损伤后缺乏自身修复能力,寻找合适的替代软骨修复损伤是近年的研究热点。体外构建组织工程软骨是修复软骨损伤的一种新手段^[1],并且随着研究的深入,力学刺激,尤其是压应力对软骨细胞在三维支架中黏附生长及分泌细胞外基质等的作用越来越受到重视。有研究表明,周期性压力能促进软骨细胞的增殖和基质的分泌^[2]。聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)支架是软骨研究中的常用支架材料,具有较好的力学强度,能传导应力并为细胞提供三维生长环境。在本研究中,笔者着重观察软骨细胞在体外三维 PLA 多孔支架上受到循环压应力时的增殖情况及形态改变。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

DMEM 高糖培养基, 型胶原酶,胰蛋白酶,新生小牛血

清,磷酸缓冲液(PBS),多聚甲醛,2.5%戊二醛;1.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)多孔支架(济南岱罡生物工程有限公司),孔隙率85%;二氧化碳培养箱(Thermo 公司,美国),动态力学反应器(Bose 公司,美国),Nikon 倒置成像系统(Nikon 公司,日本),Leica 光学显微镜(Leica 公司,德国),扫描电镜(Quanta 200,FEI 公司,美国)。

1.2 实验方法

无菌条件下取1月龄新西兰白兔膝关节软骨,含双抗的PBS反复清洗,剪碎成1 mm×1 mm大小组织块,加入适量型胶原酶,37℃消化4 h;收集细胞,1 500 rpm 离心5 min,去上清,加入含20%小牛血清的DMEM高糖培养基,吹打成混悬液,接种到25 cm的培养瓶,扩增传代后,选择二代软骨细胞,0.25%胰蛋白酶-EDTA消化收集后,以 10^6 个/支架接种到PLA多孔支架上。培养7 d后,将复合软骨细胞的支架分为四组,每组两个标本。无压力组为不加压力的静态培养;其他三组置于动态力学反应器,分别施以0.5、1、2 N的动态循

[基金项目] 广东省广州市番禺区科技计划项目(2010-Z-100-1);广州医学院青年基金项目(2010A16)。

▲通讯作者

环压力,10 min 一个正弦周期(频率 0.017 Hz),加压 8 h。软骨细胞-PLA 支架标本分别以 2.5%戊二醛固定,送扫描电镜观察,多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色观察。每组切片随机选取 5 个视野,计数支架材料上的贴附细胞,取均值做统计学分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计学软件进行数据分析,计量资料数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电镜

未施加动态压力的软骨细胞-PLA 在电镜下可见细胞呈扁平状铺展,胞体不规则收缩,可见细胞核隆起,细胞数量少;0.5 N、1 N 及 2 N 动态压力作用后的软骨细胞在支架上呈拉丝状伸出伪足,胞体形态较圆,其中以 2 N 动态压力组此种形态细胞最多见(图 1)。

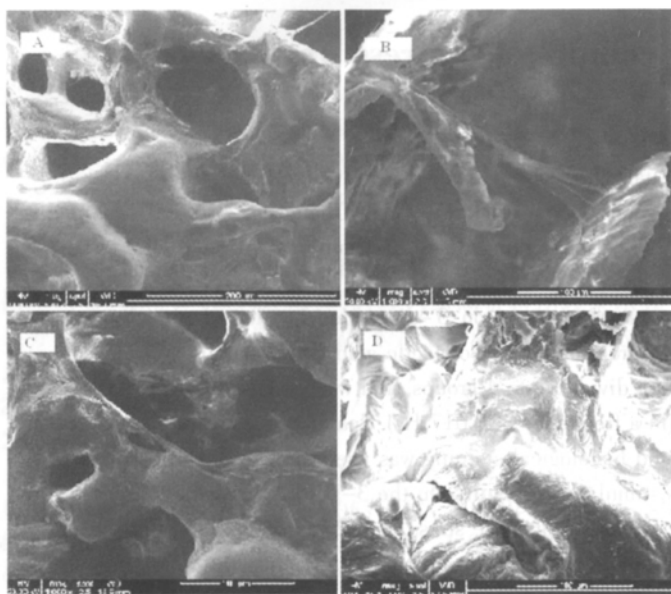


图 1 软骨细胞在 PLA 多孔支架表面的扫描电镜观察(1 000×)
A:0.5 N 动态压力组可见少量细胞沿支架表面分布,伪足伸展;B:1 N 动态压力组细胞沿支架表面分布,有拉丝状伪足伸出;C:2 N 动态压力组多数细胞沿支架表面分布,有拉丝状伪足伸出;D:无压力组细胞散在,胞体不规则,扁平样贴附生长

2.2 HE 染色观察

无压力组的细胞在支架材料的空隙间及表面呈无序、散在贴附生长,细胞量少;0.5 N 动态压力组的软骨细胞相较于 1 N 和 2 N 动态压力组,细胞形态呈展开状,分布较零散;2 N 动态压力组可见在支架孔隙表面,有均匀分布,呈条状排列的软骨细胞,数量较多,比 1 N 动态压力组具有更密集的贴附生长以及更明显的排列方向一致性(图 2)。四组贴附细胞计数情况见表 1。

3 讨论

各种原因导致的关节软骨损伤是临床的常见疾病,异体软骨移植、假体代替以及自体骨膜移植等治疗方法效果不甚理想。组织工程化软骨为关节软骨的修复提供了新的途径,但是在体外简单的培养,软骨细胞与支架材料的复合物在胶

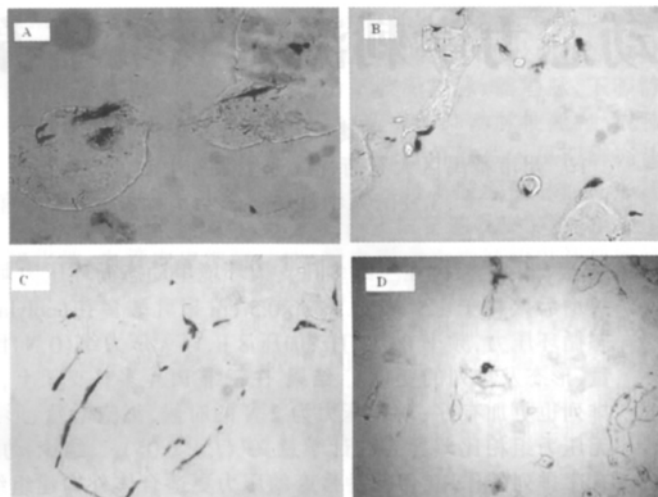


图 2 软骨细胞-PLA 支架复合物 HE 染色(200×)
A:0.5 N 动态压力组仅见少量平行排列的细胞,且形态较扁圆;B:1 N 动态压力组细胞数量相对增多,但贴附材料生长的细胞形态稍呈圆形;C:2 N 动态压力组可见较多细胞贴附材料生长,有一致的拉伸方向,形态细长;D:无压力组细胞散在,稀少,形态不规则

表 1 四组贴附细胞计数情况($\bar{x}\pm s, n = 5$)

| 组别 | 细胞计数(10%/mL) |
|-------------|------------------------------|
| 无压力组 | 1.6±1.67 |
| 0.5 N 动态压力组 | 1.4±1.14 |
| 1 N 动态压力组 | 5.2±2.59 ^a |
| 2 N 动态压力组 | 13.2±8.98 ^{a&b} |

注:与无压力组比较,^a $P < 0.05$;与 0.5 N 动态压力组比较,^b $P < 0.05$;与 1 N 动态压力组比较,^{a&b} $P < 0.05$

原基质以及力学强度等各方面都无法达到正常软骨组织的要求。有研究发现,静态压力对软骨组织有抑制作用^[3-4],而动态的压力刺激可以使软骨细胞分布更加均匀,改善细胞微结构,刺激细胞外基质的分泌^[5-6]。

Martin 等^[7]研究认为,生理条件下不同组织的受力环境是不同的,对特定组织,力的施加方式、强度、频率都尚需要详细研究。周期性压力可以促进软骨细胞的增殖和分泌基质,不同频率的周期性压力的作用效果不同。范卫民等^[8]对比三种不同频率的周期性压力发现,0.1 Hz 与 0.01 Hz 周期压力能更好地促进软骨细胞增殖,并且分泌更多型胶原和糖胺多糖,而在达到 1 Hz 频率时,软骨细胞增殖及基质分泌则低于无压力刺激组。持续的周期性压力也会抑制软骨细胞的正常功能,有研究发现,持续施加 24 h 压力可使软骨细胞的型胶原表达下调并出现凋亡^[9]。盛英俊等^[10]发现,采用 0~200 kPa、1 Hz 的动态压力,作用 8 h 能获得促进软骨细胞增殖,型胶原及糖胺多糖表达的最好效果。上述实验的支架采用的是无纺网支架,对动态应力的反应与实际的体内环境尚有差别。有研究者认为,在三维条件下,施加动态压力,有助于软骨细胞表型的分化和维持^[11-13]。

在本实验中,笔者采用立体的三维多孔 PLA 支架,模拟体内软骨细胞的生长环境,了解在此情况下,周期循环压力对软骨细胞的影响。根据之前的文献数据,本研究选择了有利于刺激软骨细胞增殖及分泌基质的频率(0.017Hz)及时

(下转第 15 页)

状态下的DIC发生^[13]。TF一旦启动凝血途径,血管内皮细胞(VEC)上的TFPI将迅速改变构型,与TF介导的凝血因子复合物结合形成失活的F_a-TFPI-FV_a-TF而发挥其抗凝功能^[14]。游离的TFPI可能反映VEC的持续损伤,导致锚着于其上的高活性TFPI脱落。因此,同时检测游离的TF和TFPI水平,既可反映各自表达的动态变化,也能反映凝血功能的异常^[15]。本实验结果显示:造模组术后2h,TF浓度和TFPI浓度显著升高,其后,TF的表达呈进行性上升,而TFPI并没有进一步升高。说明脓毒症早期各种效应细胞表达并产生了大量的游离TF,启动并激活凝血系统,而后TF与TFPI的不同步升高,表明了脓毒症时存在凝血激活持续亢进状态,而抗凝的物质在质和量上出现了相对的不足。TFPI是正常附属内皮渠道的蛋白聚糖(PGs),PGs是黏多糖GAGs绑定的一个核心蛋白,在脓毒症中,促炎细胞因子减少在内皮表面的GAGs合成体,可以因此影响TFPI的功能,这也影响了凝血激活和抗凝过程的平衡,导致了凝血的激活与亢进^[16]。

综上所述,脓毒症时存在血小板减少和凝血异常,在凝血激活与亢进的同时,TF、TFPI表达出现不同步增加。由此推测,TF、TFPI表达增加的失衡可能是诱发凝血异常进而参与MODS发生的关键因素。

【参考文献】

- [1] Van DP. Tissue factor as an initiator of coagulation and inflammation in the lung [J]. Crit Care, 2008, 12, 6: 3.
- [2] Semeraro N. Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease [J]. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2010, 2 (3): 2010-2024.
- [3] Egorina EM, Sovershaev MA, Hansen JB. The role of tissue factor in systemic inflammatory response syndrome [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2011, 22(6): 451-456.

(上接第12页)

长(8h)。PLA三维多孔支架相对于无纺网有更加良好的力传导性能,采用动态压力并以正弦方式加压时,笔者观察到的确有促进细胞增殖和均匀分布的效果,细胞形态也随压力刺激而有所变化,沿应压力作用施加的方向排列。对比无压力组、0.5N动态压力组、1N动态压力组以及2N动态压力组,在同样施力变化频率及作用时间相同的条件下,细胞贴附生长数差异有统计学意义($P < 0.05$),显示以2N动态压力组效果最佳。这与之前在无纺网支架上观察到的效果相似。对于此类有一定力学强度的三维多孔支架材料,软骨细胞在其中生长的受力情况更接近体内环境;在适宜的动态周期循环压力作用下,其型胶原和糖胺多糖的合成分泌情况,有待于下一步的研究。

【参考文献】

- [1] 陆宁,卢世壁,王继芳,等.采用自体成熟关节软骨细胞的软骨组织工程修复[J].中华实验外科杂志,2005,22(3):293-296.
- [2] 范卫民,蔡俊.周期性压力对组织工程软骨的影响及其作用机制[J].中华实验外科杂志,2006,23(8):977-979.
- [3] Sharma G, Saxena RK, Mishra P. Differential effects of cyclic and static pressure on biochemical and morphological properties of chondrocytes from articular cartilage [J]. Clin Biomech, 2007, 22(2): 248-255.
- [4] 郭维华,李松,徐芸.不同静压力对大鼠踝突软骨细胞生物学特性的影响[J].华西口腔医学杂志,2007,25(6):603-605.

- [4] Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis [J]. J Leukoc Biol, 2008, 83: 536-545.
- [5] Delgiudice LA, White GA. The role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in health and disease states [J]. J Vet Emerg Crit Care: San Antonio, 2009, 19(1): 23-29.
- [6] Bajaj MS. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor [J]. Thromb Haemost, 2001, 86(4): 959-972.
- [7] Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis [J]. Curr Opin Hematol, 2007, 4(1): 55-61.
- [8] 祝伟,吕青,陈华文,等.血必净注射液对脓毒症大鼠肠TLR4和NF- κ B的影响[J].中国医药导刊,2010,12(8):293-294.
- [9] Wang L, Bastarache JA, Ware LB. The coagulation cascade in sepsis [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(19): 1860-1869.
- [10] Akca S, Haji-Michael P, Mendonca D, et al. Time course of platelet counts in critically ill patients [J]. Crit Care Med, 2002, 30: 753-756.
- [11] 石献斌,田小平,石伟,等.冠心病患者血浆组织因子及组织因子途径抑制物变化分析[J].中国医药导刊,2011,13(2):1332-1333.
- [12] Levi M, Van DP. Two-way interactions between inflammation and coagulation [J]. Trends Cardiovasc Med, 2005, 15: 254-259.
- [13] Mosad E, Elsayh KI, Eltayeb AA. Tissue factor pathway inhibitor and P-selectin as markers of sepsis-induced non-overt disseminated intravascular coagulopathy [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2011, 17(1): 80-87.
- [14] 徐兆军,别华容,田敏,等.组织因子及组织因子途径抑制物在急性脑血管意外并发神经源性肺水肿中的变化研究[J].中国医药导报,2011,8(32):39-40.
- [15] Yasuda T. Plasma tissue factor pathway inhibitor levels in patients with acute pancreatitis [J]. J Gastroenterol, 2009, 44(10): 1071-1079.
- [16] Iversen N, Lindahl AK, Abildgaard U. Elevated plasma levels of the factor Xa-TFPI complex in cancer patients [J]. Thromb Res, 2002, 105: 33-36.

(收稿日期:2012-09-24 本文编辑:程 铭)

- [5] Waldman SD, Spiteri CG, Crynpas MD, et al. Long term intermittent compressive stimulations improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage [J]. Tissue Eng, 2004, 10(9-10): 1323-1331.
- [6] Elder SH, Sanders SW, McCulley WR, et al. Chondrocyte response to cyclic hydrostatic pressure in alginate versus pellet culture [J]. J Orthop Res, 2006, 24(4): 740-747.
- [7] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering [J]. Trends Biotechnol, 2004, 22: 80-86.
- [8] 范卫民,张广程,马益民,等.不同频率周期性压力对组织工程软骨的影响[J].中华实验外科杂志,2007,24:677-678.
- [9] Nakamura S, Arai Y, Takahashi KA, et al. Hydrostatic pressure induces apoptosis of chondrocytes cultured in alginate beads [J]. J Orthop Res, 2006, 24: 733-739.
- [10] 盛英俊,范卫民,马益民,等.不同持续时间的周期性压力对构建组织工程软骨的影响[J].中华创伤骨科杂志,2009,11(6):546-550.
- [11] Candiani G, Raimondi MT, Aurora R, et al. Chondrocyte response to high regimens of cyclic hydrostatic pressure in 3-dimensional engineered constructs [J]. Int J Artif Organs, 2008, 31(6): 490-499.
- [12] 余瑞新,杜远立.骨髓间充质干细胞向软骨分化的研究进展[J].中国医药导刊,2012,14(1):94,103.
- [13] 白雪东,胡蕴玉,侯黎升,等.复合bBMP骨软骨生物修复材料的实验研究[J].中国医药导刊,2010,12(11):1957-1958.

(收稿日期:2012-08-03 本文编辑:程 铭)