

体外构建纯化骨髓间充质干细胞与壳聚糖生物支架复合体的实验研究

闫峰 张越林 岳伟 毛国超 王刚 左振兴 高珂

【摘要】 研究背景 壳聚糖作为组织工程中的常用支架材料,具有生物降解性强、抗原性低、生物相容性佳和无热原反应等优势。尝试将经分离纯化的SD大鼠骨髓间充质干细胞与自制的可吸收壳聚糖多孔支架共培养,研究其生物相容性,以为今后应用细胞-支架复合体植入中枢神经系统行替代治疗,实现神经细胞再生、神经功能修复奠定基础。**方法** 采用全骨髓贴壁培养法分离3周龄SD大鼠骨髓间充质干细胞,选择第3代细胞行流式细胞术纯化鉴定并与壳聚糖多孔支架于体外三维立体环境共培养。乙醇替代法检测壳聚糖多孔支架孔隙率;扫描电子显微镜观察支架内部结构、测量孔径大小,以及细胞在支架内部生长状态及其与生物支架融合情况;MTT法测定细胞在支架内增殖状况。**结果** 经体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞形态均匀、呈纤维状排列,混杂细胞比例明显减少;CD29和CD45RA阳性表达率分别为98.49%和0.85%,达高纯度表达;支架孔隙率为90%,支架内部为孔径均匀、相通的三维立体结构,细胞紧密贴附于支架微孔内壁上、黏附牢固,可见伪足伸出,与支架融合较为理想。支架对骨髓间充质干细胞增殖无明显影响,细胞生长状况良好。**结论** 壳聚糖多孔支架具备良好的孔径和孔隙率等性状,与骨髓间充质干细胞生物相容性良好,可作为干细胞移植的支架载体为今后细胞替代治疗中枢神经系统疾病的转化医学研究奠定基础。

【关键词】 骨髓细胞; 间质干细胞; 壳聚糖; 生物相容性材料; 细胞,培养的; 流式细胞术; 显微镜检查,电子,扫描

Experimental study on cultivation and purification of bone marrow - derived mesenchymal stem cells and its co-culture with chitosan porous scaffolds *in vitro*

YAN Feng¹, ZHANG Yue-lin¹, YUE Wei², MAO Guo-chao¹, WANG Gang¹, ZUO Zhen-xing³, GAO Ke³

¹Department of Neurosurgery, Shanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shanxi, China

²Department of Neurology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

³Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shanxi, China

Corresponding author: ZHANG Yue-lin (Email: zhangyuelin68@163.com)

【Abstract】 **Background** As commonly used scaffold material in tissue engineering, chitosan has many advantages, such as strong biodegradability, low antigenicity, good biocompatibility and no pyrogen reaction. This study aims to isolate, cultivate and purify Sprague-Dawley (SD) rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs), and to observe the growth of BMSCs when co-cultured with self-made chitosan porous scaffold *in vitro* and to test the biocompatibility of this tissue engineering scaffold, so as to lay the foundation for promoting nerve regeneration of transplant treatment. **Methods** Three-week-old healthy male SD rats were used in this study, and BMSCs were isolated and purified through bone marrow adherent culture method. The surface markers of BMSCs at Passage 3 were detected and identified by flow cytometry (FCM) and the BMSCs were three-dimensionally cultured *in vitro* on chitosan porous scaffolds produced by freeze-drying method. Ethanol alternative method was used to detect the chitosan scaffold porosity. Scanning electron microscope was used to explore the internal structure of the scaffold, measure

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2014.11.015

基金项目:陕西省科技研究发展计划项目(项目编号:2012KCT-16)

作者单位:710068 陕西省人民医院神经外科(闫峰,张越林,毛国超,王刚);300060 天津市环湖医院神经内科(岳伟);710061 西安交通大学第一附属医院神经外科(左振兴,高珂)

通讯作者:张越林(Email:zhangyuelin68@163.com)

the size of its aperture, and observe the morphology and development of the cells within the scaffold. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to determine the cells' proliferation. **Results** The cultured BMSCs were uniform and similar to fibrous arrangement, and mixed cells reduced obviously. The identification result of FCM showed the CD29 positive rate was 98.49% and CD45RA positive rate was only 0.85%. The chitosan scaffold had an interlinked, uniform similar three-dimensional porous structure and its aperture porosity was 90%. Some cells stretched out pseudopod and infiltrated into the porous structure of scaffold, even fusing with them. The BMSCs were seeded in the scaffold successfully. The chitosan scaffold had no obvious effect on BMSCs' proliferation. **Conclusions** Chitosan porous scaffolds have good structural character and biocompatibility, and can be used as an alternative cell-carrier for later cell replace treatment of central nervous system diseases.

【Key words】 Bone marrow cells; Mesenchymal stem cells; Chitosan; Biocompatible materials; Cells, cultured; Flow cytometry; Microscopy, electron, scanning

This study was supported by Science and Technology Research and Development Program of Shanxi Province (No. 2012KCT-16).

脑卒中和中枢神经系统损伤一直是神经科学领域的研究热点,神经元坏死后由于神经胶质瘢痕形成和生长抑制因子的作用使其自我再生能力显著减弱,目前临床采用的治疗方法主要局限在自体 and 异体移植促进神经损伤后轴突再生,但是上述治疗方法的术后恢复前景并不乐观。近年来,随着组织工程技术的发展,利用生物相容性材料辅助中枢神经系统损伤后修复成为更具开发潜力的治疗方法之一,为此类患者的治疗带来了曙光^[1-2]。组织工程的核心因素是种子细胞和支架材料,此为组织工程研究的基础。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一种多潜能成体干细胞,可向神经样细胞定向诱导分化,在中枢神经系统疾病细胞移植治疗中具有广阔的临床应用前景^[3-4]。壳聚糖作为组织工程中常用支架材料,具有生物降解性强、抗原性低、生物相容性佳和无热原反应等优势,应用极为广泛^[5-6],在本研究中,我们将骨髓间充质干细胞和自制可吸收壳聚糖多孔支架联合培养,研究其生物相容性,以为今后应用细胞-支架复合物植入中枢神经系统行替代治疗,实现神经细胞再生、神经功能修复奠定实验室基础。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验动物 无特定病原体(SPF)级 3 周龄健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠[生产许可证号: SCXK(陕)2007-001,使用许可证号: SYXK(陕)2007-003]4 只,体重约 100 g,相同生存环境,正常进食、饮水,12 h 昼-12 h 夜交替,一般情况良好,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

2. 试剂与药品 体积分数为 10% 的胎牛血清(FBS, 50 ml)和含 L-谷氨酰胺培养液(每 500 ml 含 2.50 mmol/L)的 DMEM/F12(1:1)培养基均为美国 HyClone 公司产品。质量分数为 0.25% 胰蛋白酶(0.25 g/100 ml)由以色列 Biological Industries 公司提供。流式细胞术所用抗体为小鼠抗大鼠 CD29-异硫氰酸荧光素(FITC)和小鼠抗大鼠 CD45RA-藻红蛋白(PE)单克隆抗体(1:100),均购自美国 BioLegend 公司。细胞活性检测试剂噻唑蓝(MTT)由美国 Amresco 公司提供。二甲基亚砜(DMSO)购自成都科龙化工试剂厂。制备壳聚糖多孔支架所用的主要原料壳聚糖粉末购自生工生物工程(上海)股份有限公司。其他辅助试剂如 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.20)、0.10 mol/L 氢氧化钠和体积分数为 10% 乙酸溶液均由陕西省人民医院中心实验室自行配制。

3. 主要设备 BT4KXL 冷冻干燥机为美国 VirTis 公司产品。5430 二氧化碳培养箱购自美国 Napco 公司。HH-1 恒温水浴锅由北京科伟永兴仪器有限公司提供。SW-CJ-1F 超净工作台为苏州安泰空气技术有限公司产品。720050 移液器为芬兰 Biohit Proline 公司产品。TD5A 离心机购自长沙英泰仪器有限公司。FACSCalibur 流式细胞仪由美国 Becton Dickinson 公司提供。Aquapro-III 超纯水设备购自美国 Aquapro International 公司。XSZ-PZ 倒置相差显微镜购自重庆光学仪器厂。BX41 + MP5.0 + IPE 荧光显微镜由日本 Olympus 公司提供。BL-320S 电子天平购自日本 Shimadzu 公司。JSM-840 TM-1000 扫描电子显微镜由日本 Hitachi 公司提供。K850 临界点干燥仪购自英国 Emitech 公司。

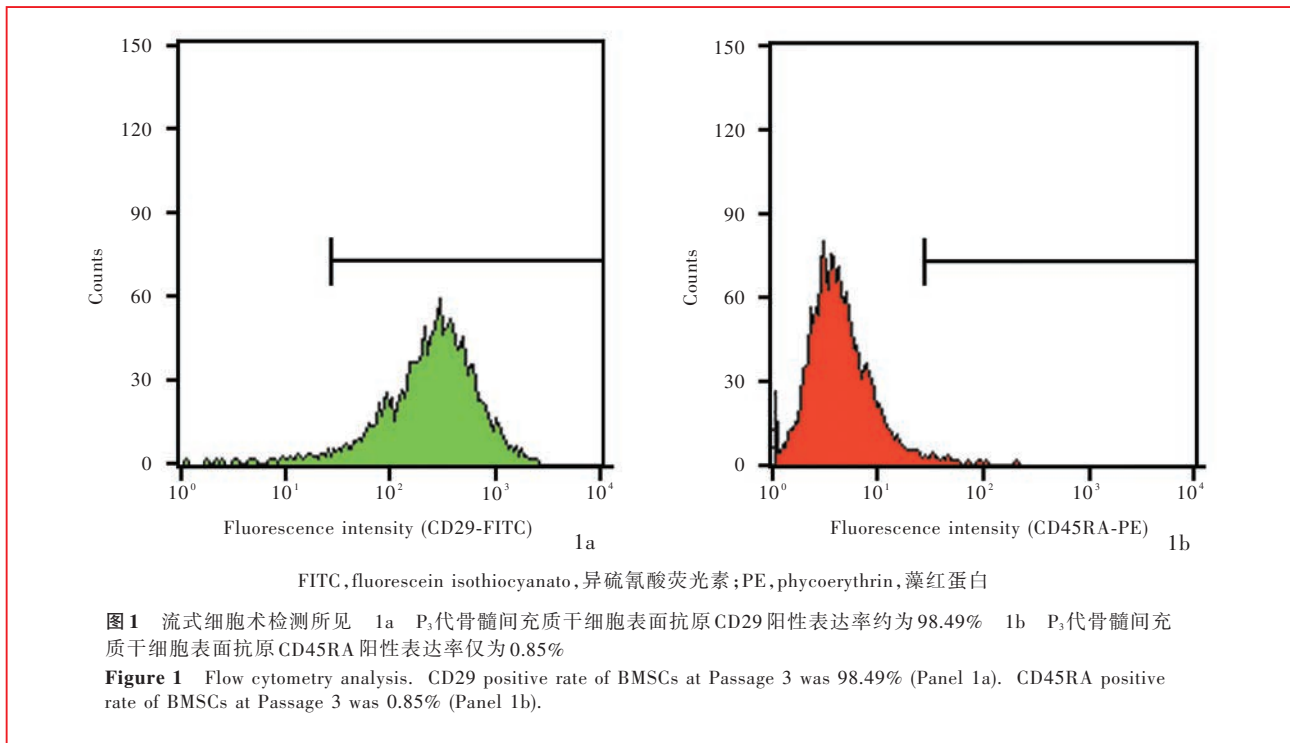
二、实验方法

1. 骨髓间充质干细胞纯化与鉴定 (1) 分离培养与纯化: SD 大鼠处死后于体积分数为 75% 乙醇溶液中浸泡 10 min, 剪切四肢, 刀片仔细搔刮四肢长骨上附着的肌肉、肌腱等组织并保持骨骼完整性。0.01 mol/L 灭菌磷酸盐缓冲液反复清洗后剪开长骨两端, 以显露骨髓腔为准, 尽量多保留骨质, 然后汲取 10×10^3 U/ml 含双抗 (青霉素和链霉素) 的 DMEM/F12 培养液 5 ml, 从一侧骨断端注入骨髓腔内至另一侧断端流出并移至 15 ml 无菌离心管, 再从另一侧断端注射培养液, 如此反复数次, 直至骨髓基本冲洗干净。同法收集四肢全骨髓, 15 ml 无菌离心管密封并经离心半径 16 cm、1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 滴加 10 ml 含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养液, 重悬后计数, 调整细胞密度至 $10 \times 10^3/100 \mu\text{l}$ 。接种于 25 cm^2 透气塑料培养瓶, 置 37°C 、体积分数为 5% 二氧化碳、饱和湿度培养箱, 原代细胞标记为 P_0 ; 培养 72 h 后首次更换全量新培养液, 以后平均每 3 天换液 1 次。当细胞铺满培养瓶底以质量分数为 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 1:2 比例传代。初次传代细胞标记为 P_1 , 再次传代标记为 P_2 , 以次类推, 传至第 3 代 (P_3) 时行细胞鉴定与共培养。(2) 细胞鉴定: 调整细胞密度至 $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$, 按照上机程序取 3 支 1.50 ml 无菌离心管, 各加入 100 μl 调整密度后的单细胞悬液, 分别加入 FITC 标记的小鼠抗大鼠 CD29 抗体 2 μl 、PE 标记的小鼠抗大鼠 CD45RA 抗体 1.25 μl , 混匀, 置 4°C 冰箱避光孵育 30 min, 向加入 CD29-FITC 和 CD45RA-PE 的 3 支无菌离心管中再分别加入 30 ml/L 细胞洗液 2 ml, 混匀、离心、弃上清, 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次; 最后 3 支离心管中再分别滴加 30 ml/L 细胞洗液 0.50 ml、混匀, 流式细胞仪检测细胞表面抗原阳性表达率并记录结果。

2. 壳聚糖多孔支架制备与检测 (1) 冷冻干燥法制备壳聚糖多孔支架: 将 2 g 壳聚糖溶于 100 ml 体积分数为 1% 乙酸溶液, 37°C 水浴预热, 不断搅拌配制成质量分数为 2% 壳聚糖乙酸溶液; 滴加 1 ml/孔至 24 孔板, 4°C 预冷 6 h、置于 -25°C 冰箱过夜、冷冻干燥机内 -75°C 冷冻干燥 24 h; 每孔滴加 0.10 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml、水化 20 min, 磷酸盐缓冲液冲洗 2 min ($\times 3$ 次)、冷冻干燥成白色柱状固化物即制备成功。与细胞共培养前以体积分数为 75% 乙醇溶液浸泡 30 min, 磷酸盐缓冲液漂洗 10 min ($\times 5$ 次),

消毒处理后即可使用。(2) 乙醇替代法检测壳聚糖支架孔隙率: 壳聚糖多孔支架置一定体积 (V_1) 乙醇溶液中, 循环抽真空至无气泡逸出, 材料与乙醇总体积标记为 V_2 , “ $V_2 - V_1$ ” 即为壳聚糖多孔支架体积; 将含乙醇的壳聚糖多孔支架移出、记录所剩乙醇体积为 V_3 , “ $V_1 - V_3$ ” 即为壳聚糖多孔支架孔隙所占体积, 则支架总体积 $V = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) = V_2 - V_3$ 。壳聚糖多孔支架孔隙率为 $P(\%) = (V_1 - V_3)/V \times 100\%$ (P , 壳聚糖多孔支架孔隙率; V_1 , 乙醇总体积; V_2 , 壳聚糖多孔支架和乙醇总体积; V_3 , 含乙醇壳聚糖多孔支架移出后所剩乙醇体积)。(3) 扫描电子显微镜观察: 壳聚糖切成小块, 磷酸盐缓冲液清洗表面; 4°C 、质量分数为 2.5% 戊二醛固定液固定 2 h, 磷酸盐缓冲液浸洗 10 min ($\times 2$ 次); 4°C 、质量分数为 1% 四氧化锇固定液固定 2 h, 磷酸盐缓冲液浸洗 10 min, 梯度乙醇脱水 (30% 10 min、50% 10 min、70% 过夜), 90% 乙醇脱水 10 min ($\times 2$ 次)、100% 乙醇脱水 10 min ($\times 2$ 次); 丙酮置换 10 min ($\times 2$ 次), 临界点干燥仪对经置换处理的壳聚糖多孔支架进行临界点干燥处理, 金离子溅射法镀膜, 扫描电子显微镜观察、拍照, 检测生物支架内部结构和孔径。

3. 壳聚糖多孔支架与骨髓间充质干细胞共培养 (1) 培养方法: 超净工作台内取出在 DMEM/F12 完全培养基中浸泡的壳聚糖多孔支架, 制成 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 大小块状, 置于 24 孔培养板, 每孔滴加 1 ml 细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的 P_3 代骨髓间充质干细胞, 置 37°C 、体积分数为 5% 二氧化碳、饱和湿度培养箱孵育 30 min, 每 15 分钟轻振荡培养板 2 次, 每孔滴加 3 ml DMEM/F12 完全培养基, 置于 37°C 、体积分数为 5% 二氧化碳、饱和湿度培养箱继续共培养 48 h, 倒置相差显微镜观察细胞与支架吸附情况。(2) 扫描电子显微镜观察: 将体外共培养 48 h 的骨髓间充质干细胞与壳聚糖多孔支架复合体制成相应小块, 扫描电子显微镜观察细胞在支架内的生长状况。(3) MTT 法检测骨髓间充质干细胞在壳聚糖多孔支架内增殖情况: 取生长状态良好的 P_3 代骨髓间充质干细胞, 以体积分数为 0.25% 胰蛋白酶消化、悬浮细胞计数, 以 $10 \times 10^3/\text{孔}$ 细胞密度接种于按 $10 \text{ ml}/\text{cm}^2$ DMEM/F12 完全培养基与材料表面积之比浸泡 24 h 的壳聚糖多孔支架 (实验组) 96 孔板, 每孔体积 200 μl , 对照组以含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基继续培养, 隔天更换同种培养液。同时, 自接种第 3 天起, 分别于第 3、4、5、6、7 天终止



培养,每日同一时间取实验组与对照组各4孔滴加含5 mg/ml MTT的无血清DMEM/F12培养液200 μl,4 h后终止培养,弃孔内上清,加二甲基亚砜200 μl、置孵育箱培养15 min,摇床上低速振荡15 min,充分溶解结晶,酶标仪检测每孔吸光度值,观测骨髓间充质干细胞增殖情况,选择490 nm波长、调置零孔,每日重复检测4次,取平均值,连续检测5 d。

4. 统计分析方法 采用SPSS 13.0统计软件进行实验数据的处理与分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行两独立样本的t检验。统计推断的检验水准均为 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、骨髓间充质干细胞相关检测

1. 纯化与鉴定 流式细胞术检测显示,P₃代骨髓间充质干细胞CD29阳性表达率为98.49%,CD45RA仅为0.85%,提示获得的细胞为纯度较高的骨髓间充质干细胞(图1)。

2. 形态学观察 经全骨髓贴壁培养法体外传代至P₃代时,骨髓间充质干细胞形态较为均匀,呈纤维状,混杂细胞比例明显减少(图2)。

二、自制壳聚糖多孔支架性能检测

1. 大体结构 大体观察呈“海绵”状圆柱结构,可根据实际需要修剪成不同形状(图3)。

2. 孔隙率测定 将1.08 ml乙醇($V_1 = 1.08$ ml)滴加至1.50 ml冻存管,然后加入一小块壳聚糖多孔支架,读取此时液面刻度为1.10 ml($V_2 = 1.10$ ml),移出支架并读取液面刻度为0.90 ml($V_3 = 0.90$ ml),根据公式计算壳聚糖多孔支架孔隙率为90%。

3. 扫描电子显微镜观察 壳聚糖多孔支架横断面可见内部密布大小相对均一的孔洞,呈三维立体状,孔之间相通性良好,孔径为80~200 μm,平均140 μm(图4)。

三、壳聚糖多孔支架与骨髓间充质干细胞共培养

1. 倒置相差显微镜观察 细胞接种至壳聚糖多孔支架48 h后均匀扩散至支架孔隙内,单个或团簇状附着于支架上(图5),轻摇培养板细胞团无漂动且散落在孔板底部的细胞较少,表明支架具有较强的亲水性和细胞吸附力。

2. 扫描电子显微镜观察 壳聚糖多孔支架与骨髓间充质干细胞体外共培养48 h后,骨髓间充质干细胞广泛分布于支架表面和孔内,细胞呈梭形并分泌细胞外基质(ECM)黏附于支架上,部分孔内可见细胞呈簇状生长,底层细胞呈梭形黏附于支架上,部分细胞分泌大量细胞外基质与支架黏附良好,并可见伸出的伪足生长入支架内,细胞在三维培养环境下生长状况良好(图6)。



图2 倒置相差显微镜观察显示,P₃代骨髓间充质干细胞较均匀,呈纤维状,混杂细胞比例明显减少 ×40

Figure 2 Inverted phase contrast microscope showed the BMSCs at Passage 3 were uniform and similar to fibrous arrangement, and the number of mixed cells reduced obviously. ×40



图3 壳聚糖多孔支架的大体形状 3a 修剪成圆形 3b 修剪成小块状

Figure 3 General shape of chitosan porous scaffolds. Round shape (Panel 3a). Diced shape (Panel 3b).

3. MTT法检测壳聚糖多孔支架对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响 壳聚糖多孔支架与骨髓间充质干细胞共培养第3天,实验组细胞增殖活性为 0.49 ± 0.01 ,与对照组(0.50 ± 0.01)相比,差异无统计学意义($t = 0.233, P = 0.629$);共培养第5天,实验组细胞增殖活性为 0.55 ± 0.026 ,高于对照组的 0.49 ± 0.036 ($t = 1.409, P = 0.235$);共培养第7天,实验组细胞增殖活性为 0.75 ± 0.01 ,低于对照组的 0.78 ± 0.02 ($t = 0.312, P = 0.756$),但差异均未达到统计学意义。表明两组细胞生长规律基本相似:自共培养第3天即显示出较强的增殖活性,此后细胞生长明显加速、成倍增长并进入对数生长期;至共培养第7天时,细胞生长速度减缓,提示壳聚糖多孔支架对细胞生长无明显抑制作用。

讨 论

基础与临床研究均已证实,壳聚糖作为支架载

体用于组织工程具有促进伤口愈合、瘢痕吸收、抗炎抑菌、药物缓释^[7-8],以及促进神经再生和修复作用^[9-10],与细胞外基质的主要结构氨基多糖极其相似,也是一种生物高分子聚合物^[6,11-12];因其具有良好的神经细胞亲和性,对脊髓神经元和周围神经生长有明显的促进作用^[13]。国内有学者对壳聚糖与视网膜神经细胞进行研究发现,配置成不同比例的壳聚糖对SD乳鼠视网膜神经细胞的生长具有明显的促进作用^[14]。

理想的生物支架作为支持细胞生长的桥接材料,其自身性状是直接影响细胞黏附生长、增殖、迁移等活动的关键,应具备较好的组织相容性、可降解性、适宜的孔径和孔隙率等性状。因此,材料应具备多孔和孔间连通性,且孔径至少应 $> 50 \mu\text{m}$,孔隙率于70%~90%,才能为细胞生长提供足够的空间^[15]。目前,壳聚糖多孔支架的制备方法主要包括溶液浇铸-颗粒滤沥法、冷冻干燥法、液相分离技术、快速成型技术等,考虑到应用于中枢神经系统的壳聚糖支架材料为生物材料,高温会影响材料的生物活性,从而影响支架性能,故采取冷冻干燥法能够较好地满足要求^[16]。冷冻干燥法是利用深度冷冻的溶剂真空升华的原理制备多孔支架的方法,其优点在于:既能避免高温对支架表面生物活性分子的破坏,又能剔除加入待制样品中的有机溶剂(致孔剂),从而获得多孔的网状结构,较好地保持材料的生物活性,且不改变原材料的生物学特性^[17-18]。Amado等^[19]共制备出3种壳聚糖膜类型,其结果显示:唯有其孔隙率达90%,且孔径约 $110 \mu\text{m}$ 的膜方能明显促进神经细胞受损轴突的再生和功能的恢复。本实验采用冷冻干燥法制备的壳聚糖多孔支架孔隙率为90%、孔径为 $80 \sim 200 \mu\text{m}$,空隙相对均匀、连通性良好,能够充分满足细胞生长的要求。

骨髓间充质干细胞系从骨髓中分离培养获得的非造血干细胞,具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能,在一定条件下可定向诱导分化为神经细胞;经体外培养可大量增殖,长期传代后无分化,能够为干细胞移植提供良好的干细胞来源。作为组织工程的“种子细胞”和细胞替代治疗的细胞来源,骨髓间充质干细胞广泛应用于组织工程研究中,本实验采用的全骨髓贴壁培养法系从大鼠四肢长骨中分离、培养的骨髓间充质干细胞,经流式细胞术鉴定传代至第3代的骨髓间充质干细胞纯度极高,能够满足细胞移植需要^[20]。细胞在单层培养时,细

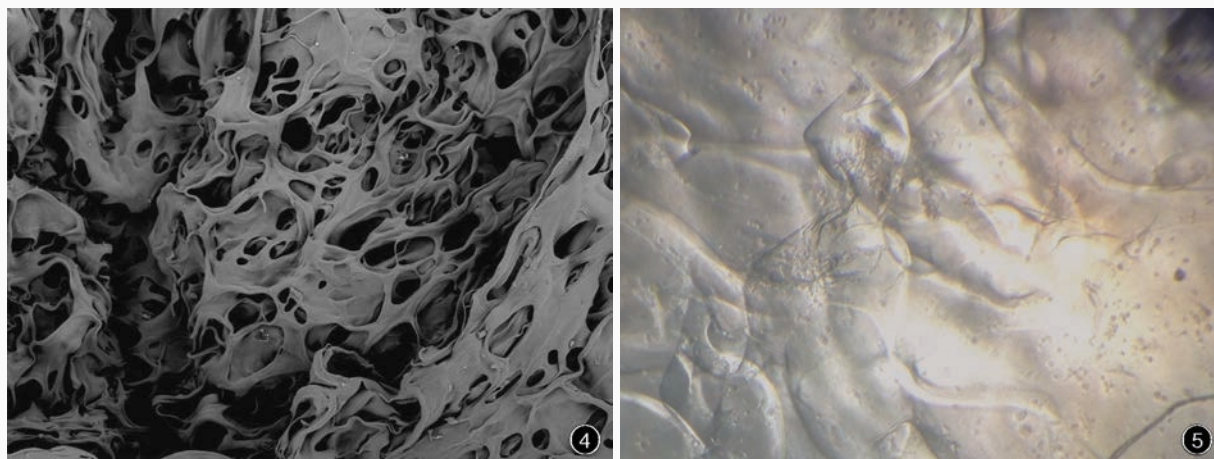


图 4 扫描电子显微镜观察显示,壳聚糖多孔支架横断面可见内部密布大小均一的孔洞,孔相通性较好,分布均匀的深层孔洞相通 $\times 150$ 图 5 壳聚糖多孔支架与骨髓间充质干细胞共培养 48 h 倒置相差显微镜观察显示,细胞均匀扩散至支架孔隙内,单个或团巢状附着于支架 $\times 40$

Figure 4 Cross section of chitosan porous scaffold under scanning electron microscope revealed densely distributed, uniform and interlinked holes. $\times 150$ **Figure 5** Inverted microscope showed the morphological changes of chitosan porous scaffolds and BMSCs at 48 h after co-culture. The cells infiltrated into the scaffolds and attach on the walls singly or in nest-like distribution. $\times 40$

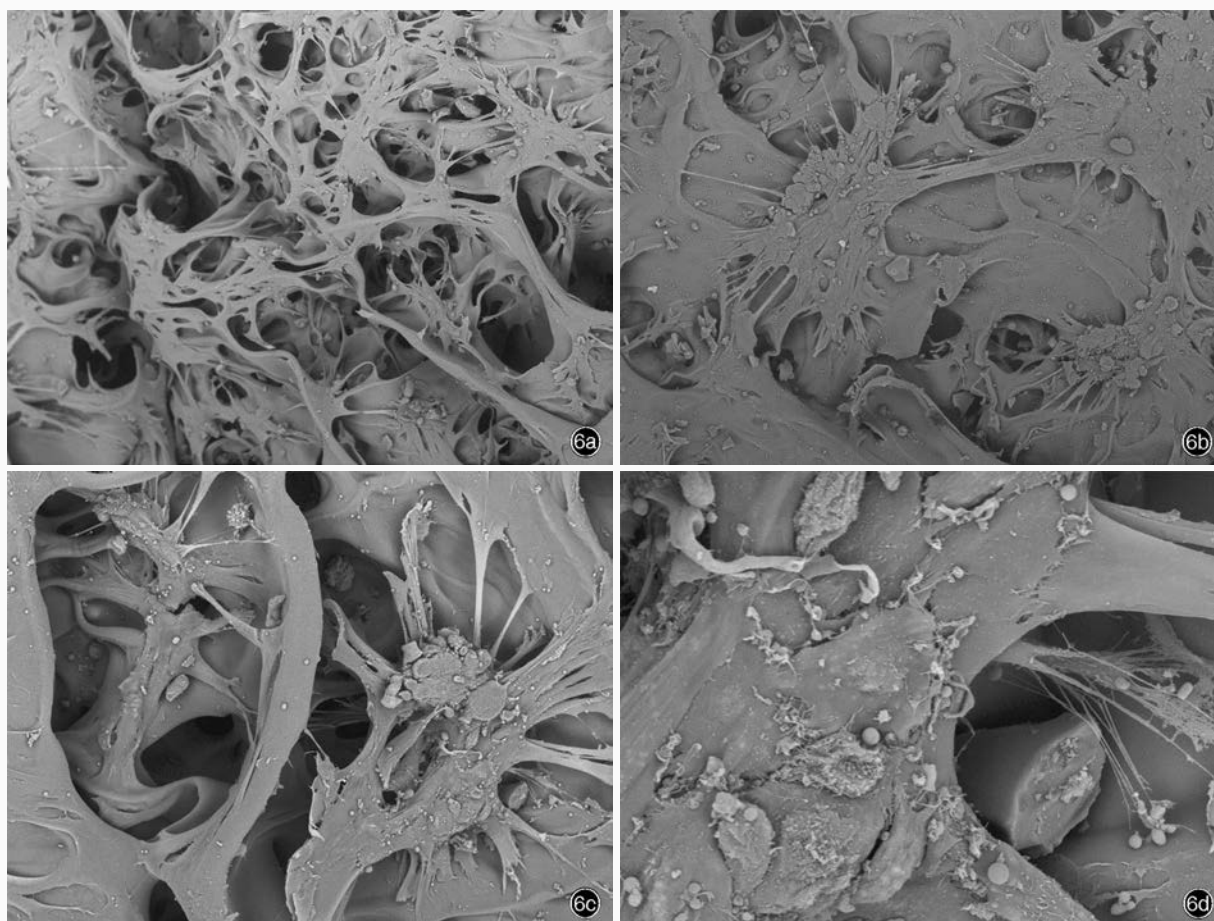


图 6 壳聚糖多孔支架与骨髓间充质干细胞共培养 48 h 扫描电子显微镜观察所见 6a 细胞广泛分布于支架表面和孔内 $\times 200$ 6b 细胞呈簇状生长并分泌细胞外基质黏附于支架 $\times 250$ 6c 细胞填充支架内孔并与其融合 $\times 500$ 6d 部分细胞伸出伪足生长入支架内 $\times 2500$

Figure 6 Scanning electron microscope findings of BMSCs and scaffolds at 48 h after co-culture. Cells infiltrated into the porous structure of scaffold (Panel 6a). $\times 200$ Cells adhered to the scaffold (Panel 6b). $\times 250$ Cells filled the hole of scaffold and fused with them (Panel 6c). $\times 500$ Some cells stretched out pseudopod and grew into scaffold (Panel 6d). $\times 2500$

细胞增殖、生长一段时间后常发生细胞间接触性抑制,从而抑制细胞生长和扩增,细胞-支架复合体的构建可为细胞提供三维立体摄取营养和生长代谢场所,利于细胞生长、黏附,避免细胞流失^[21]。扫描电子显微镜观察体外共培养 48 小时后的细胞生长状况,可见骨髓间充质干细胞在支架内生长良好:支架表面和孔内均匀分布、黏附大量骨髓间充质干细胞,并分泌细胞外基质黏附于支架表面,孔内细胞呈团块状生长,部分基底细胞呈梭形黏附,不易脱落,证实支架具有良好的亲水性和细胞黏附性;进一步 MTT 法检测壳聚糖多孔支架对细胞增殖活性的影响,结果显示:支架对细胞增殖无抑制作用,细胞可在支架所形成的三维立体环境中生长代谢并分泌细胞外基质,发挥正常功能。由此可见,骨髓间充质干细胞与壳聚糖多孔支架具有良好的生物相容性。

组织工程技术可为种子细胞提供载体,有望成为实现神经细胞再生、神经功能修复的有效方法之一。但壳聚糖在机体内如何实现可控性降解并参与细胞分裂、增殖、迁徙,相关影响因素和机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Elias PZ, Spector M. Implantation of a collagen scaffold seeded with adult rat hippocampal progenitors in a rat model of penetrating brain injury. *J Neurosci Methods*, 2012, 29:199-211.
- [2] Yu H, Cao B, Feng M, Zhou Q, Sun X, Wu S, Jin S, Liu H, Jin L. Combined transplantation of neural stem cells and collagen type I promote functional recovery after cerebral ischemia in rats. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293:911-917.
- [3] Huang B, Tabata Y, Gao JQ. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents and potential targeted gene delivery vehicle for brain diseases. *J Control Release*, 2012, 162:464-473.
- [4] Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Rico MA, Vaquero J. The severity of brain damage determines bone marrow stromal cell therapy efficacy in a traumatic brain injury model. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, 72:1203-1212.
- [5] Tan TG, Ma JJ, Zhang WZ, Su X, Wang LK, Feng XZ. Feasibility study of chitin as a central nervous system scaffold material. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2006, 6: 134-138. [谭太贵, 马景鑑, 张文治, 苏心, 王立凯, 冯喜增. 壳聚糖作为中枢神经系统支架材料的可行性研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2006, 6:134-138.]
- [6] Ji C, Khademhosseini A, Dehghani F. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2011, 32:9719-9729.
- [7] Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue - engineering. *Biomaterials*, 2005, 26:5983-5990.
- [8] Shim IK, Suh WH, Lee SY, Lee SH, Heo SJ, Lee MC, Lee SJ. Chitosan nano-/microfibrous double-layered membrane with rolled-up three-dimensional structures for chondrocyte cultivation. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 18:157-163.
- [9] Andelic N. The epidemiology of traumatic brain injury. *Lancet Neurol*, 2013, 12:28-29.
- [10] Walker PA, Shah SK, Jimenez F, Aroom KR, Harting MT, Cox CS Jr. Bone marrow-derived stromal cell therapy for traumatic brain injury is neuroprotective via stimulation of non-neurologic organ systems. *Surgery*, 2012, 152:790-793.
- [11] Gulbake A, Jain SK. Chitosan: a potential polymer for colon-specific drug delivery system. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9: 713-729.
- [12] Santander-Ortega MJ, Peula-Garcia JM, Goycoolea FM, Ortega-Vinuesa JL. Chitosan nanocapsules: effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 82:571-580.
- [13] Wang W, Itoh S, Matsuda A, Ichinose S, Shinomiya K, Hata Y, Tanaka J. Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84:557-566.
- [14] Yang H, Zhao Y. Chitosan promoting the growth of in vitro cultured retinal nerve cells of SD baby rats. *Huazhong Ke Ji Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban)*, 2010, 39:116-119. [杨红, 赵燕. 壳聚糖促进体外培养 SD 乳鼠视网膜神经细胞生长的初步研究. *华中科技大学学报(医学版)*, 2010, 39:116-119.]
- [15] Senel S, Lkinci G, Kas S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm*, 2000, 193:197-203.
- [16] Kong L, Ao Q, Wang A, Gong K, Wang X, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *J Biomater Appl*, 2008, 22:223-239.
- [17] Ji C, Annabi N, Khademhosseini A, Dehghani F. Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO₂. *Acta Biomater*, 2011, 7:1653-1664.
- [18] Wu X, Liu Y, Li X, Wen P, Zhang Y, Long Y, Wang X, Guo Y, Xing F, Gao J. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomater*, 2010, 6: 1167-1177.
- [19] Amado S, Simões MJ, Armada da Silva PA, Luís AL, Shirosaki Y, Lopes MA, Santos JD, Fregnan F, Gambarotta G, Raimondo S, Fornaro M, Veloso AP, Varejão AS, Maurício AC, Geuna S. Use of hybrid chitosan membranes and N1E-115 cells for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. *Biomaterials*, 2008, 29:4409-4419.
- [20] Feng B, Yang TS, Liang LL. The culture, proliferation and identification of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tianjin Yi Yao*, 2009, 37:400-402. [冯斌, 杨庭树, 梁丽玲. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养、扩增与鉴定. *天津医药*, 2009, 37:400-402.]
- [21] Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem Eng Res Des*, 2007, 85:1051-1064.

(收稿日期:2014-09-10)