

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.29.009

[http://www.crter.org]

李卫东, 崔志明, 徐冠华, 范建波, 保国锋, 孙郁雨, 王玲玲. 壳聚糖增强型左旋聚乳酸与嗅鞘细胞的生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(29): 5316-5322.

壳聚糖增强型左旋聚乳酸与嗅鞘细胞的生物相容性***

李卫东, 崔志明, 徐冠华, 范建波, 保国锋, 孙郁雨, 王玲玲(南通大学第二附属医院脊柱外科, 江苏省南通市 226001)

文章亮点:

1 实验纯化嗅鞘细胞时采用差速贴壁法去除其中大部分星形胶质细胞和成纤维细胞, 然后再用 Ara-c 处理 48 h, 再次去除剩余的成纤维细胞, 获得较高纯度的嗅鞘细胞。

2 多聚赖氨酸是目前公认的细胞培养的良好载体, 它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, 并能使细胞快速贴壁并减少团聚现象。大量研究已证实了多聚赖氨酸对神经细胞、内皮细胞等多种组织细胞有促贴壁作用。因此, 实验选择多聚赖氨酸与嗅鞘细胞共同培养作为本次实验的对照组。

3 采用体外复合细胞培养法评估壳聚糖增强型左旋聚乳酸支架与大鼠嗅鞘细胞的相容性, 发现两者有着良好的生物相容性。

4 为国内首次采用壳聚糖增强型左旋聚乳酸支架作为嗅鞘细胞载体进行相关研究, 但由于是通过对细胞形态观察和比较初步评估两者的生物相容性, 研究内容较为单一, 全面和详细评价生物相容性尚需要进一步深入研究。

关键词:

生物材料; 材料生物相容性; 壳聚糖; 左旋聚乳酸; 多聚赖氨酸; 嗅鞘细胞; 生物相容性; 共培养; 国家自然科学基金

缩略语:

壳聚糖增强型左旋聚乳酸复合支架: poly-L-lactic acid enhanced by chitosan, PLLA-Col

摘要

背景: 既往研究表明壳聚糖和左旋聚乳酸制备的复合支架与一些细胞有着良好的生物相容性。

目的: 观察壳聚糖增强型左旋聚乳酸支架与大鼠嗅鞘细胞的生物相容性。

方法: 将出生 1-3 d SD 大鼠的嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜上作为实验组, 设置嗅鞘细胞与多聚赖氨酸联合培养为对照组, 培养 1, 3, 5, 7 d 进行细胞增殖力检测和免疫荧光抗体标记检测。

结果与结论: 嗅鞘细胞可在壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜上存活, 细胞毒性评级为 I 级。实验组细胞形态呈圆形和椭圆形, 突起少, 细胞聚集成团; 接种 1 d 后, 可见部分细胞团的外围细胞伸出短小突起, 并渐向外周散开; 接种第 3 天, 见聚集成团的细胞扩散开来, 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, 细胞突起明显伸长, 形态仍以双极细胞和三极细胞为主, 并可见扁圆细胞和不规则三角形细胞; 接种第 7 天, 细胞密度增加, 突起伸展。对照组细胞形态与实验组具有类似特征。两组嗅鞘细胞数量、细胞周长和细胞面积差异无显著性意义($P > 0.05$)。表明壳聚糖增强型左旋聚乳酸支架与嗅鞘细胞具有良好的生物相容性。

Biocompatibility of olfactory ensheathing cells and poly-L-lactic acid reinforced by chitosan *in vitro*

Li Wei-dong, Cui Zhi-ming, Xu Guan-hua, Fan Jian-bo, Bao Guo-feng, Sun Yu-yu, Wang Ling-ling
(Department of Spinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have shown that composite scaffold of chitosan and poly-L-lactic acid has good biocompatibility with some cells.

OBJECTIVE: To study the biocompatibility of poly-L-lactic acid reinforced by chitosan and olfactory ensheathing cells.

METHODS: In experimental group, olfactory ensheathing cells from Sprague-Dawley rats aged 1-3 days were incubated onto chitosan-reinforced poly-L-lactic acid film. And in control group, olfactory ensheathing cells were co-cultured with poly-L-lysine. The proliferative ability of olfactory ensheathing cells was detected and the cells were observed with immunofluorescence histochemical staining at 1, 3, 5, 7 days after culture.

RESULTS AND CONCLUSION: Olfactory ensheathing cells could survive on the chitosan-reinforced poly-L-lactic acid film, and the cytotoxic grade was I. Morphology of the cells in the experimental group was round or oval, with little processes and the cells aggregated into groups. One day after implantation, the periphery cells of the mass extended short projections and gradually spread outward; 3 days after implantation, the cells spread and most of

李卫东, 1968 年生, 江苏省南通市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事脊柱外科的临床和基础研究。
xuguanh@hotmail.com

通讯作者: 崔志明, 博士, 副教授, 南通大学第二附属医院脊柱外科, 江苏省南通市 226001
czmspine@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)29-05316-07

收稿日期: 2012-12-04

修回日期: 2013-01-20

(20121028005/GW · W)

Li Wei-dong, Associate chief physician, Department of Spinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
xuguanh@hotmail.com

Corresponding author: Cui Zhi-ming, M.D., Associate professor, Department of Spinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
czmspine@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81271367*; the Social Technology Innovation and Demonstration Plan of Nantong City, No. HS2011009*; the Social Development and Technology Plan of Nantong City, No. S2010005*

Received: 2012-12-04

Accepted: 2013-01-20

the cells generated projections, most of which were bipolar or tri-polar; 5 days after implantation, cell processes significantly extended, most cells were bipolar and tri-polar cells, while some were oval cells and irregular triangular cells; 7 days after implantation, the cell density increased, and cell processes extended. Cell morphology of the control group had similar characteristics as the experimental group. There was no obvious difference between the control and the experimental group in number, perimeter or area of the cells ($P > 0.05$). It showed that chitosan-reinforced poly-L-lactic acid had good biocompatibility with olfactory ensheathing cells.

Key Words: biomaterials; material biocompatibility; chitosan; poly-L-lactic acid; poly-L-lysine; olfactory ensheathing cells; biocompatibility; co-culture; National Natural Science Foundation of China

Li WD, Cui ZM, Xu GH, Fan JB, Bao GF, Sun YY, Wang LL. Biocompatibility of olfactory ensheathing cells and poly-L-lactic acid reinforced by chitosan in vitro. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(29): 5316-5322.

0 引言

在组织工程修复神经系统损伤的研究中,理想的细胞支架应与活体细胞有良好的生物相容性^[1]。复合型支架材料就是将两种或两种以上的支架材料按一定比例和方式组合,通过相应的制备工艺构造出具有更理想生物相容性、力学强度和降解性等特点的细胞支架,从而更有利于种子细胞的存活和生长。复合型支架材料不是几种材料的简单叠加,而是各组分的有机结合,可以说既具备了单一支架材料的优点,又弥补了各自的不足,是传统单一支架基础上的优化^[2-3]。

目前组织工程中复合支架应用较多的是由两种不同材料制备而成的,如胶原-壳聚糖、明胶-壳聚糖等。

Cheng等^[4]设计了一种多孔壳聚糖神经导管,并在导管的内表面加入层粘连蛋白,将导管移植入大鼠T₈脊髓横断内,1个月后导管内在发现很多微管蛋白 β III阳性细胞和GAP-43阳性细胞,提示该复合支架有很好促进神经再生的作用。Li等^[5]把填充I型胶原的壳聚糖管植入大鼠脊髓缺损处,1年后发现大鼠近端轴突再生并穿过移植管到达远端脊髓,大鼠瘫痪后肢的运动功能恢复。Giannetti等^[6]将结合胶原蛋白的羟化异丁酸多孔海绵植入大鼠脊髓损伤处,4个月后发现大量轴突长入海绵并贯穿整个移植物,提示复合物移植有助于轴突的再生。Hurtado等^[7]将包含许旺细胞的纤维蛋白溶液填充于聚乳酸支架,植入大鼠脊髓缺损处,6周后发现有一定数量的神经轴突长入支架,再生轴突髓鞘化,同时大鼠后肢运动功能有所改善。Moore等^[8]制作了聚乳酸-乙醇酸共聚物多通道支架,加入许旺细胞悬液并移植入大鼠T₉横断处,1个月后有丰富的再生轴突通过支架全长,提示支架具有良好促进轴突再生的作用。Xu等^[9]用比率为60:40的聚丙烯腈/聚氯乙稀制成一种半透微管支架,将其与许旺细胞复合后植入大鼠脊髓损伤处,90 d后观察到脊髓头尾两断端都有轴突延伸入移植物中。此外,也有许多学者尝试使用3种或3种以上的材料制成复合支架用于脊髓损伤修复的研究之中。Woerly等^[10]把含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽的聚甲基丙烯酸酰胺凝胶支架植入T₁₀脊髓半切的大鼠脊髓内,观察到有再生轴突长

入支架,并穿过损伤区域,大鼠后肢运动功能部分恢复。之后,Woerly等^[11]又把凝胶支架植入成年猫的横断脊髓内,发现支架内瘢痕形成较少,再生的轴突髓鞘化。

嗅鞘细胞是目前较常见被选择用于脊髓损伤修复的种子细胞^[12-13]。

实验用热致相分离法制备壳聚糖增强型左旋聚乳酸复合支架(poly-L-lactic acid enhanced by chitosan, PLLA-Col),将大鼠嗅鞘细胞与PLLA-Col进行体外培养,观察其生物相容性,为PLLA-Col作为嗅鞘细胞载体治疗脊髓损伤的进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

设计: 体外细胞学对比观察实验。

时间及地点: 实验于2011年4月至2012年2月在南通大学神经生物学研究所完成。

材料:

实验动物: 出生1-3 d SD大鼠20只,体质量20-30 g,由南通大学实验动物中心提供,动物生产许可证:SCXK(苏2008-0010),动物使用许可证:SYXK(苏2002-0022)。

壳聚糖增强型左旋聚乳酸与嗅鞘细胞生物相容性实验的主要试剂与仪器:

主要试剂与仪器	来源
左旋聚乳酸	济南岱罡生物科技 有限公司
胎牛血清、山羊血清, DMEM 和 F12 培养基	Gibro 公司
壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 85\%$)、阿糖胞苷、 胰蛋白酶、多聚赖氨酸	Sigma 公司
NGFRp75 抗体	Santa Cruz 公司
Hoechst33342、Anti-S-100-protein 抗体	Chemicon 公司
MTT	Amresco 公司
藻红蛋白(alexa fluor® 568)	Molecular Probes 公司
扫描电镜	S-3400, 日立公司
酶标仪	美国宝特 ELX800

实验方法:

嗅鞘细胞原代培养及纯化: 将新生SD大鼠腹腔注射复合麻醉剂Chlorpent 2 mL/kg麻醉后断头,分离大鼠双侧

嗅球,剪碎嗅球成 1 mm^3 的组织小块,加入 0.125% 胰酶,置于体积分数 $5\%\text{CO}_2$ 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中消化 20 min 。毛细吸管反复吹打,用加入含体积分数 10% 胎牛血清的基础培养液中消化 5 min 。筛网滤过后收取细胞悬液离心 10 min ,弃去上清液并加入培养液吹打均匀。再次离心后弃上清,加入含体积分数 10% 胎牛血清完全培养液,吹打制成单细胞悬液。锥虫蓝染色计数后以 $1\times 10^9\text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于 50 mL 培养瓶中,置于体积分数 $5\%\text{CO}_2$ 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱。培养 18 h 后将上清液连同未贴壁的细胞转种于另一培养瓶。继续培养 36 h 后将上清液连同未贴壁的细胞吸至刻度离心管,离心后弃上清加入含体积分数 10% 胎牛血清完全培养液和阿糖胞苷(终浓度为 $1\times 10^{-5}\text{ mol/L}$)。培养 48 h 后弃上清,用DMEM/F12冲洗贴壁的细胞并吸至刻度离心管,离心后弃上清。加入含体积分数 10% 胎牛血清完全培养液,吹打均匀后锥虫蓝染色计数。用Hoechst33342、S-100、NGFRp75特异性抗体作免疫荧光染色鉴定纯度。

PLLA-Col膜的制备: $70\text{ }^\circ\text{C}$ 下配制质量浓度 0.05 g/mL 的左旋聚乳酸/四氢呋喃溶液,在加热状态下将壳聚糖溶于 1% 的醋酸水溶液制成 5% 的壳聚糖溶液,再将乙醇逐渐滴入壳聚糖溶液,以 $2:1$ 的比例混溶,再按文献[14]提供的方法将壳聚糖乙醇溶液以 $40:100$ 的质量配比逐渐滴入左旋聚乳酸/四氢呋喃溶液,电磁搅拌、超声波振荡各 15 min 至壳聚糖颗粒分散均匀,倒入直径约为 16 mm 的圆柱模具制成厚约 2 mm 的PLLA-Col薄膜。

PLLA-Col膜与嗅鞘细胞的共同培养: 将浓度为 $1\times 10^9\text{ L}^{-1}$ 的纯化嗅鞘细胞悬液接种于PLLA-Col无菌膜上作为实验组,对照组则将嗅鞘细胞接种于多聚赖氨酸包被的圆玻片上。两组细胞均置于培养板中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 $5\%\text{CO}_2$ 饱和湿度的培养箱中培养,每 3 d 半量换液,在倒置显微镜下观察细胞形态。将与嗅鞘细胞共培养 $1, 3, 5, 7\text{ d}$ 的PLLA-Col膜经过浸洗、固定、脱水、干燥、表面喷金后行扫描电镜观察。

嗅鞘细胞在PLLA-Col膜上的细胞增殖力检测: 两组均于共培养 $1, 3, 5, 7\text{ d}$ 后取6片,每片加入 5 g/L MTT溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h ,终止培养,弃上清液,再加入二甲亚砜振荡溶解结晶,用酶标仪测 $A_{570\text{ nm}}$ 值,计算细胞相对增殖率:

$$\text{细胞相对增殖率} = (\text{实验组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}) \times 100\%$$

以细胞相对增殖率进行毒性分级: 0% 为V级,细胞相对增殖率 $1\%-24\%$ 为IV级,细胞相对增殖率 $25\%-49\%$ 为III级,细胞相对增殖率 $50\%-74\%$ 为II级, $75\%-99\%$ 为I级, $\geq 100\%$ 为0级。细胞相对增殖率值越大,级数越低,则材料毒性越小。

免疫荧光抗体标记: 两组均于培养第7天吸出培养液,各取12片,于 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min ,每片加入小

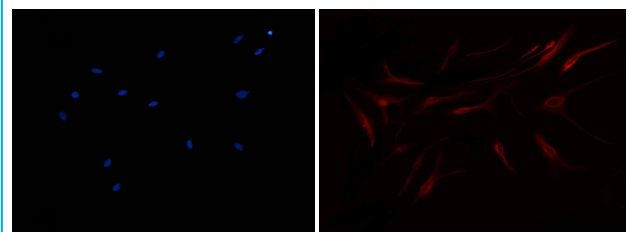
鼠抗大鼠S-100抗体 $100\text{ }\mu\text{L}$ ($1:200$),放入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内孵育过夜。次日晨吸去一抗,PBS清洗3遍后加入Alexa fluor[®] 568 $100\text{ }\mu\text{L}$ ($1:500$),避光室温下孵育 2 h 。相同PBS清洗甘油缓冲液封固。最终经PBS洗片后,常规脱水、透明、封固,在激发光波长为 596 nm ,吸收光波长为 495 nm 的荧光显微镜下观察并摄片。在放大 400 倍的荧光显微镜下将摄取的照片导入图像处理系统,对S-100阳性细胞作一般形态学观察,应用捷达801系列形态学分析软件,计数 400 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。

主要观察指标: 与PLLA-Col膜共培养前后的嗅鞘细胞形态学、细胞A值、细胞计数、胞体面积及细胞周长的变化。

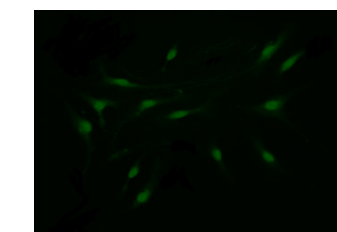
统计学分析: 实验计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用SPSS 13.0统计软件进行两两比较配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 培养嗅鞘细胞的鉴定和纯度 培养 7 d 时镜下细胞的形态包括双极(梭形)细胞、三极细胞、扁圆细胞和多极细胞等,以双极(梭形)细胞和三极细胞为主。Hoechst33342、S-100、P75 NGFR特异性抗体作免疫荧光染色鉴定为嗅鞘细胞,纯度大于 93% ,见图1。



A: Hoechst33342 特异性抗体作免疫荧光染色 B: S-100 特异性抗体作免疫荧光染色



C: NGFRp75 特异性抗体作免疫荧光染色

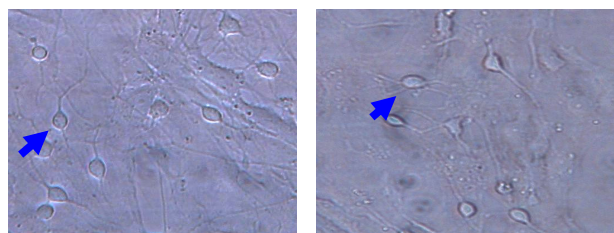
注:细胞3种抗体阳性表达率均为 93% 以上,细胞的形态包括双极(梭形)细胞、三极细胞、扁圆细胞和多极细胞等,以双极(梭形)细胞和三极细胞为主,具有嗅鞘细胞的典型特征。

图1 培养 7 d 的新生SD大鼠嗅鞘细胞($\times 200$)

Figure 1 Olfactory ensheathing cells from Sprague-Dawley rats cultured for 7 d ($\times 200$)

2.2 嗅鞘细胞与 PLLA-Col 膜共培养的形态学观察

见图2, 3。



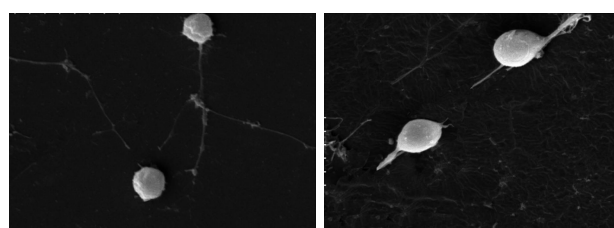
A: 对照组(接种于多聚赖氨酸)

B: 实验组(接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜)

注: 两组嗅鞘细胞具有相似形态特征, 均以双极细胞和三极细胞为主, 并可见扁圆细胞和不规则三角形细胞, 箭头所指为呈棱形的嗅鞘细胞, 有突起。

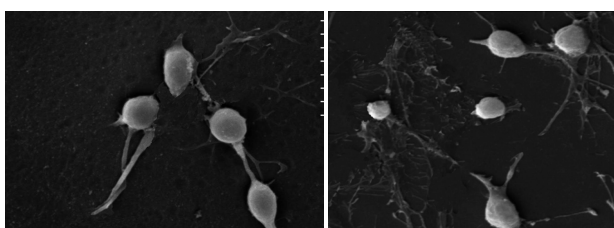
图2 嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜或多聚赖氨酸第7天的形态学观察(倒置显微镜, $\times 200$)

Figure 2 Morphological observation of olfactory ensheathing cells after incubated onto chitosan-reinforced poly-L-lactic acid film or co-cultured with poly-L-lysine for 7 d (Inverted microscope, $\times 200$)



A: 接种第1天, 嗅鞘细胞数量较少, 呈球形, 无明显突起

B: 接种第3天, 大部分细胞生成突起, 但较短小, 呈双极



C: 接种第5天, 细胞数量增加, 突起明显伸长, 形态以双极细胞和三极细胞为主

D: 接种第7天, 细胞密度增加, 突起伸展, 形态仍以双极细胞和三极细胞为主, 并可见不规则细胞

图3 将嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜上不同时间点的扫描电镜观察($\times 600$)

Figure 3 Scanning electron microscope observation of olfactory ensheathing cells after incubated onto chitosan-reinforced poly-L-lactic acid film ($\times 600$)

嗅鞘细胞与 PLLA-Col 膜共培养后逐渐沉降到膜表面, 细胞形态呈圆形和椭圆形, 突起少, 细胞聚集成团; 接种1 d后, 可见部分细胞团的外围细胞伸出短小突起,

并渐向外周散开; 接种第3天, 见聚集成团的细胞扩散开来, 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, 细胞突起明显伸长, 形态仍以双极细胞和三极细胞为主, 并可见扁圆细胞和不规则三角形细胞; 接种第7天, 细胞密度增加, 突起伸展。对照组细胞形态具有与实验组类似的特征。

2.3 嗅鞘细胞增殖力的检测结果

嗅鞘细胞与 PLLA-Col 膜共培养不同时间点的A值见表1, 两组细胞的A值均随着时间延长逐渐增大, 到7 d时最高; 细胞毒性评级为 I, 显示 PLLA-Col 膜与嗅鞘细胞具有良好的相容性。

表1 将嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜或多聚赖氨酸不同时间点的细胞A值

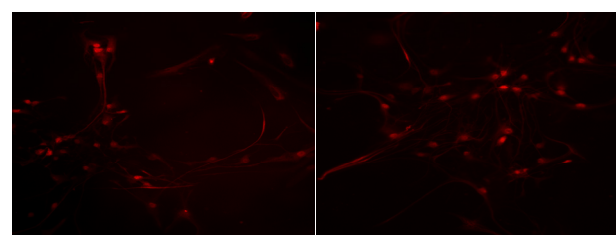
Table 1 Absorbance value of olfactory ensheathing cells after incubated onto chitosan-reinforced poly-L-lactic acid film or co-cultured with poly-L-lysine at different times ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	0.282 $\pm$ 0.033	0.341 $\pm$ 0.039	0.456 $\pm$ 0.035	0.625 $\pm$ 0.041
实验组	0.273 $\pm$ 0.028	0.306 $\pm$ 0.017	0.417 $\pm$ 0.040	0.584 $\pm$ 0.033
细胞相对增殖率	96.8%	89.7%	91.4%	93.4%

注: 实验组将嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜上, 对照组将嗅鞘细胞接种于多聚赖氨酸上; 实验组不同时间点细胞相对增殖率均在 75%以上, 细胞毒性为 I 级, 表明壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜具有良好的细胞相容性。

2.4 嗅鞘细胞免疫荧光检测结果

两组在镜下均可见S-100阳性细胞, 主要成双极和三极, 突起长, 分枝较多, 见图4; 两组S-100阳性细胞的数量、胞体面积和细胞(包括突起)周长比较差异均无显著性意义, 见表2。



A: 对照组(将嗅鞘细胞接种于多聚赖氨酸上)

B: 实验组(将嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜上)

注: 两组均可见 S-100 阳性细胞, 主要成双极和三极, 突起长, 分枝较多。

图4 将嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜或多聚赖氨酸上的 S-100 免疫荧光染色($\times 200$)

Figure 4 S-100 immunofluorescence staining of olfactory ensheathing cells after incubated onto chitosan-reinforced poly-L-lactic acid film or co-cultured with poly-L-lysine ($\times 200$)

表2 将嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜或多聚赖氨酸7 d后的S-100阳性细胞数、胞体面积和细胞周长变化

Table 2 Number, perimeter and area of the S-100 positive cells at 7 d after incubated onto chitosan-reinforced poly-L-lactic acid film or co-cultured with poly-L-lysine ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	S-100 阳性细胞数	胞体面积(μm^2)	细胞周长(μm)
对照组	17.83 $\pm$ 3.81	278.75 $\pm$ 28.96	91.33 $\pm$ 14.19
实验组	15.17 $\pm$ 4.28	256.67 $\pm$ 37.84	84.50 $\pm$ 17.09
<i>t</i>	1.61	1.59	1.43
<i>P</i>	0.136	0.140	0.181

注: 实验组将嗅鞘细胞接种于壳聚糖增强型左旋聚乳酸膜上, 对照组将嗅鞘细胞接种于多聚赖氨酸上; 两组 S-100 阳性细胞的数量、胞体面积和细胞周长比较差异均无显著性意义。

3 讨论

目前嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤已显示出良好的应用前景, 是较为理想的种子细胞^[15-18]。纯化嗅鞘细胞的方法较多, 一般有化学药物法、差速贴壁法、梯度离心法和免疫亲和吸附法, 其中免疫亲和吸附法纯化后细胞纯度可达99%以上, 但此法步骤繁琐, 需大量费用昂贵的一抗, 而且细胞经过反复清洗后活性下降, 从而影响了进一步的培养或移植。实验纯化嗅鞘细胞时采用Nash等^[19]报道的差速贴壁法去除其中大部分星形胶质细胞和成纤维细胞, 然后再用Ara-c处理48 h, 再次去除剩余的成纤维细胞, 从而获得较高纯度的嗅鞘细胞。目前对培养嗅鞘细胞的鉴别有多种特异性的标志物, 如GFAP、NGFRp75、S100等, 主要是根据标志物染色后反应的强弱和细胞的形态来鉴别嗅鞘细胞与其他神经胶质细胞和成纤维细胞等。在形态方面嗅鞘细胞与其他神经胶质细胞的最大区别之一是其细胞突起十分细长^[20]。实验结果发现所培养的细胞突起细长, 以双极和三极细胞为主, 且使用Hoechst33342、S-100及NGFRp75染色, 阳性表达率均为93%以上, 具有明显嗅鞘细胞的特征, 表明所培养为嗅鞘细胞。

作为组织工程的基础, 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^[21]。良好的细胞支架可以为种子细胞提供生长代谢的环境, 同时也是形成新的具有形态和功能组织的物质基础。研究表明, 细胞支架的性能不仅影响种子细胞的存活、增殖和分化等生物学行为, 而且决定了细胞移植后能否很好地与机体适应、结合以及移植修复组织损伤的效果^[22]。一般认为, 理想的细胞支架材料应该具有良好的生物相容性、生物可降解性、适当的力学强度和一定大小的孔径等特

点^[23]。

左旋聚乳酸是美国FDA最早批准的可应用于人体的一种合成聚合物材料, 具有无毒性、生物相容性好、在体内可完全降解吸收等优点, 在脊髓组织工程中也得到较多的应用, 但由于左旋聚乳酸所制成的材料力学强度较低, 其降解的产物呈酸性而易引起体内无痛炎症反应, 所以左旋聚乳酸在组织工程中更多的时候是与其他材料联合应用或制成复合支架^[24-26]。壳聚糖是得到广泛应用的天然生物材料, 属于碱性多糖, 具有良好的生物相容性, 可被制成具有一定力学强度的三维多孔支架, 同时它的降解性能可通过脱乙酰化程度来调节。壳聚糖的结构和某些性质与细胞外基质中的主要成分氨基多糖极其相似, 而且其表面高密度的正电荷有利于黏附带负电荷的细胞, 从而有助于与细胞非特异性吸附和增殖分化, 所以壳聚糖在脊髓、骨等组织工程研究中都得到广泛应用^[27-28]。因此, 将壳聚糖和左旋聚乳酸用一定方法制成复合支架, 既可提高支架的力学强度, 又可中和聚乳酸的酸性降解产物, 从而提高支架作为细胞载体的性能。Li等^[29]将左旋聚乳酸用壳聚糖纤维增强并与人成骨细胞混合培养, 发现细胞的黏附、生长和分化情况要明显优于细胞与左旋聚乳酸混合培养组。Zhao等^[30]将制备的蜂窝状微孔模式PLLA-Col复合支架与成纤维细胞混合培养, 发现细胞的黏附、存活和分化情况要明显优于单纯培养以及与壳聚糖混合培养组。Ku、Jiao等^[31-32]制备PLLA-Col并将支架与成骨细胞混合培养, 同样发现支架与成骨细胞有着良好的生物相容性。这些研究表明PLLA-Col复合支架可以作为多种种子细胞的载体并有着良好的生物相容性, 于是也提示它同样可能作为嗅鞘细胞的优良载体而被用于脊髓损伤的修复。

体外复合细胞培养法研究生物材料的相容性可直接观察细胞与生物材料复合生长的情况, 较为客观、敏感, 是目前较为常用的方法。而通过测定复合培养后细胞的数目、周长和胞体面积情况可以用于评价细胞存活和生长情况^[33-34]。多聚赖氨酸是目前公认细胞培养的良好载体, 它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, 使细胞快速贴壁并减少团聚现象。大量研究已证实了多聚赖氨酸对神经细胞、内皮细胞等多种组织细胞有促贴壁作用^[35-36]。因此, 实验选择多聚赖氨酸与嗅鞘细胞共同培养作为本次实验的对照组。在实验中将嗅鞘细胞与PLLA-Col膜混合培养, 结果表明嗅鞘细胞能够在PLLA-Col上存活, 生长于支架上的细胞与多聚赖氨酸组在细胞数量、面积、周长无明显统计学差异, 说明PLLA-Col支架的环境同样有利于嗅鞘细胞的存活与生长。

因此, 认为嗅鞘细胞与PLLA-Col复合物有着良好的生物相容性, 这一实验结果为嗅鞘细胞与PLLA-Col复合支架联合移植修复脊髓损伤提供了理论依据, 从而为今

后进一步体内研究工作打下了基础。

致谢: 感谢黄镇副教授的指导和帮助。

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(81271367); 南通市社会事业科技创新与示范计划项目(HS2011009); 南通市指令性社会发展科技计划项目(S2010005)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计,实验实施为全部作者,实验评估、资料收集、成文均为第一作者,通讯作者审校,第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 热致相分离法是Thermally Induced Phase Separation的简称,它是1981年由美国A.J.Castro提出的一种新的制备聚合物微孔膜的方法,并申请了专利。它的工艺过程及原理是在聚合物的熔点以上,将聚合物溶于高沸点,低挥发性的溶剂(又称稀释剂)中,形成均相溶液,然后降温冷却,在冷却过程中,体系会发生相分离。这个过程分两类,一类是固-液相分离(简称S-L相分离),一类是液-液相分离(L-L相分离)。控制适当的工艺条件,在分相之后体系形成以聚合物为连续相,溶剂为分散相的两相结构。这时再选择适当的挥发性试剂(即萃取剂)把溶剂萃取出来,从而获得一定结构形状的聚合物微孔膜。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Potter W,Kalil RE,Kao WJ. Biomimetic material systems for neural progenitor cell-based therapy. *Front Biosci*.2008;13: 806-821.
- [2] Chen BK,Knight AM,de Ruiter GC,et al.Axon regeneration through scaffold into distal spinal cord after transection.*J Neurotrauma*.2009;26(10):1759-1771.
- [3] Kubinová S,Syková E.Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury.*Regen Med*.2012; 7(2):207-224.
- [4] Cheng H,Huang YC,Chang PT,et al.Laminin-incorporated nerve conduits made by plasma treatment for repairing spinal cord injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(4): 938-944.
- [5] Li XG,Yang ZY,Zhang AF,et al.Repair of thoracic spinal cord injury by chitosan tube implantation in adult rats.*Biomaterials*. 2009;30(6):1121-1132.
- [6] Giannetti S,Lauretti L,Fernandez E,et al.Acrylic hydrogel implants after spinal cord lesion in the adult rat.*Neural Res*. 2001;23(4):405-409.
- [7] Hurtado A,Moon LDF,Maquet V,et al.Poly (D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds seeded with Schwann cells genetically modified to secrete a bi-functional neurotrophin implanted in the completely transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*.2006;27(3):430-442.
- [8] Moore MJ,Friedman JA,Lewellyn EB,et al.Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. *Biomaterials*. 2006;27(3):419-429.
- [9] Xu XM,Zhang SX,Li H,et al.Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord.*Eur J Neurosci*.1999;11(5):1723-1740.
- [10] Woerly S,Pinet E,Robertis L,et al.Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides(NeuroGelTM). *Biomaterials*.2001;22(10):1095-1111.
- [11] Woerly S,Doan VD,Sosa N,et al.Prevention of gliotic scar formation by neurogel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *J Neurosci Res*.2004;75(2): 262-272.
- [12] Tharion G,Indirani K,Durai M,et al.Motor recovery following olfactory ensheathing cell transplantation in rats with spinal cord injury. *Neurol India*.2011;59(4):566-572.
- [13] Lopes A.Olfactory ensheathing cells for human spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*.2010;24(8):772-773.
- [14] Cui YL,Qi AD,Liu WG,et al. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro.*Biomaterials*.2003;24(21):3859-3868.
- [15] Novikova LN,Lobov S,Wiberg M,et al. Efficacy of olfactory ensheathing cells to support regeneration after spinal cord injury is influenced by method of culture preparation.*Exp Neurol*.2011;229(1):132-142.
- [16] Harrop JS,Hashimoto R,Norvell D,et al.Evaluation of clinical experience using cell-based therapies in patients with spinal cord injury: a systematic review.*J Neurosurg Spine*.2012; 17(1):230-246.
- [17] Ozdemir M,Attar A,Kuzu I. Regenerative treatment in spinal cord injury. *Curr Stem Cell Res Ther*.2012;7(5):364-369.
- [18] Yazdani SO,Pedram M,Hafizi M,et al. A comparison between neurally induced bone marrow derived mesenchymal stem cells and olfactory ensheathing glial cells to repair spinal cord injuries in rat. *Tissue Cell*.2012;44(4):205-213.
- [19] Nash HH,Borke RC,Anders JJ. New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb.*Glia*.2001;34(2):81-87.
- [20] Jani HR,Raisman G.Ensheathing cell cultures from the olfactory bulb and mucosa.*Glia*.2004;47(2):130-137.
- [21] Crapo PM, Medberry CJ, Reing JE,et al. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*.2012;33(13):3539-3547.
- [22] Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. *Curr Opin Neurol*.2003;16(6):711-715.
- [23] Novikov LN, Novikova LN, Mosahebi A,et al. A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials*.2002;23(16):3369-3376.
- [24] Jin L, Feng ZQ, Zhu ML,et al. A novel fluffy conductive polypyrrole nano-layer coated PLLA fibrous scaffold for nerve tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol*. 2012;8(5): 779-785.

- [25] Boccafroschi F, Fusaro L, Mosca C, et al. The biological response of poly(L-lactide) films modified by different biomolecules: role of the coating strategy. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(9):2373-2381.
- [26] Huang WC, Yao CK, Liao JD, et al. Enhanced Schwann cell adhesion and elongation on a topographically and chemically modified poly(L-lactic acid) film surface. *J Biomed Mater Res A*. 2011;99(2):158-165.
- [27] Zheng L, Cui HF. Enhancement of nerve regeneration along a chitosan conduit combined with bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(9):2291-2302.
- [28] Yi X, Jin G, Tian M, et al. Porous chitosan scaffold and NGF promote neuronal differentiation of neural stem cells in vitro. *Neuro Endocrinol Lett*. 2011;32(5):705-710.
- [29] Li X, Liu X, Dong W, et al. In vitro evaluation of porous poly(L-lactic acid) scaffold reinforced by chitin fibers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90(2):503-509.
- [30] Zhao M, Li L, Li X, et al. Three-dimensional honeycomb-patterned chitosan/poly(L-lactic acid) scaffolds with improved mechanical and cell compatibility. *J Biomed Mater Res A*. 2011;98(3):434-441.
- [31] Ku Y, Shim IK, Lee JY, et al. Chitosan/poly(L-lactic acid) multilayered membrane for guided tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90(3):766-772.
- [32] Jiao Y, Liu Z, Zhou C. Fabrication and characterization of PLLA-chitosan hybrid scaffolds with improved cell compatibility. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80(4):820-825.
- [33] Liu Z, Jiao Y, Zhang Z, et al. Surface modification of poly(L-lactic acid) by entrapment of chitosan and its derivatives to promote osteoblasts-like compatibility. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83(4):1110-1116.
- [34] 徐冠华, 崔志明, 黄镇, 等. 纤维蛋白凝胶与大鼠嗅鞘细胞的生物相容性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(47): 9249-9252.
- [35] Nojehdehian H, Moztaezadeh F, Baharvand H, et al. Effect of poly-L-lysine coating on retinoic acid-loaded PLGA microspheres in the differentiation of carcinoma stem cells into neural cells. *Int J Artif Organs*. 2010;33(10):721-730.
- [36] Martín-López E, Nieto-Díaz M, Nieto-Sampedro M. Differential adhesiveness and neurite-promoting activity for neural cells of chitosan, gelatin, and poly-L-lysine films. *J Biomater Appl*. 2012;26(7):791-809.