

- 8 吴昊,晁福,杨鸿生,等. 山莨菪碱对兔肺缺血-再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2009,5:310-312
- 9 Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo; the role of molecular chaperones[J]. Annu Rev Biochem,2008,70:607-613
- 10 安立敏,胡健,夏经纲,等. 药理预适应对兔急性心肌梗死保护作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2010,2:104-106
- 11 Depre C, Kim S, John A, et al. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium[J]. Circ Res,2010 Sep 3,107(5):615-619
- 12 Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA, et al. Heat shock protein 70 gene-transfection protect mitochondrial and ventricular ar function against ischemia 2 reperfusion injury[J]. Eur J Neurosci,2009,30(8):1517-1526
- 13 Galois L, Etienne S, Grossin L, et al. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study[J]. Osteoarthritis - Cartilage,2009,12(10):779-786
- 14 Man K, Ng KT, Lee TK, et al. FTY720 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in normal and cirrhotic livers[J]. Am J Transplant,2005,5(1):40-49

(收稿日期:2013-01-07)

(修回日期:2013-03-12)

人牙周膜细胞复合壳聚糖-胶原温敏水凝胶 异种移植构建可注射骨组织的研究

李 颖 杨亚冬 谷子芽 杨 悦 傅 婷 张文元

摘 要 **目的** 观察人牙周膜细胞复合壳聚糖-胶原温敏水凝胶异种移植小鼠皮下的组织再生,评价其作为可注射骨组织的可行性。**方法** 将壳聚糖、胶原、 β -磷酸甘油钠按比例混合构建温敏性水凝胶。通过活/死细胞染色法检测人牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLs)在壳聚糖-胶原水凝胶三维培养中的存活。PDLs成骨预诱导后复合水凝胶注入小鼠背部皮下,6周后取出植入物,通过HE、Masson染色法观察组织的再生以及胶原纤维的形成。**结果** 壳聚糖-胶原水凝胶可支持PDLs的三维培养,体内实验表明无刺激性。复合细胞后的凝胶支架在动物皮下可形成血管化包块,结缔组织和胶原纤维形成明显高于无细胞的对照组。**结论** 壳聚糖-胶原温敏水凝胶是一种理想的可注射支架,复合PDLs有望构建可注射骨组织,修复骨缺损。

关键词 牙周膜细胞 壳聚糖 胶原 温敏水凝胶 成骨分化

[中图分类号] R318 [文献标识码] A

Transplantation of Human Periodontal Ligament Cells Embedded Thermosensitive Chitosan-collagen Hydrogel in an Immunocompetent Xenogeneic Animal Model. Li Ying, Yang Yadong, Gu Ziya, Yang Yue, Fu Ting, Zhang Wenyuan. Institute of Biological Engineering, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang 310012, China

Abstract Objective To access the potential application of human periodontal ligament cells (PDLs) embedded thermosensitive chitosan-collagen hydrogel for injectable bone tissue engineering. **Methods** Live/dead staining was used to access the survival of the PDLs cultured in the hydrogel scaffold. Osteo-induced PDLs embedded hydrogel was injected in the subcutaneous dorsum of ICR mice. After 6 weeks the implants were separated for HE and Masson staining. **Results** Most PDL cells can survive in the hydrogel scaffold after 3D culture. Cell-embedded hydrogel formed vascularized implants under the skin. Histological staining showed that increasing connective tissue and collagen fiber formation in the implants. **Conclusion** The thermosensitive chitosan-collagen hydrogel might be an ideal injectable scaffold. Combining it with PDLs is promising to injectable tissue engineering for bone regeneration.

Key words Periodontal ligament cells; Chitosan; Collagen; Thermosensitive hydrogel; Osteogenic differentiation

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2012KYB056);浙江省科技厅基金资助项目(2011F20015);浙江省科技计划项目(2013F10006);杭州市科技发展计划项目(20130633B35)

作者单位:310012 杭州,浙江省医学科学院生物工程所(李颖、杨亚冬、傅婷、张文元);310012 杭州口腔医院城西分院综合科(谷子芽);浙江省立同德医院病理科(杨悦)

通讯作者:张文元,电子信箱:zhangwy61@163.com

牙周病是一种慢性骨破坏性疾病,尤其是牙槽骨的破坏和丧失可导致牙齿脱落,严重影响患者生活质量。重建牙槽骨是治疗的关键,近年来组织工程研究为牙周再生治疗提供了新的希望。支架材料和种子细胞都是组织工程成功应用的重要因素。以凝胶材料为支架的可注射系统是组织工程的一种新的研究方向^[1]。凝胶材料在体外为液态,进入体内可快速

胶化,具有微创、操作简便,植入细胞分布均匀的优势。此外,凝胶材料具有流动性,可充盈至整个缺损区域,特别对不规则形状部位,如牙槽骨的修复具有重要价值。

壳聚糖是目前常用的一种生物材料。壳聚糖结合磷酸甘油钠盐后具有温敏性,在室温下保持液态,而当温度升高至生理温度(37℃)时,发生固化,其特性适合用作可注射凝胶支架^[2]。I 型胶原是天然骨组织细胞外基质的主要成分,免疫原性低,生物相容性好,能促进成骨矿化和新骨组织的形成^[3]。构建壳聚糖-胶原水凝胶可进一步提高壳聚糖凝胶支架的生物亲和力,并有效解决纯胶原支架在体内吸收降解过快的问题。本研究从人牙周膜组织中分离得到间充质样牙周膜细胞(periodontal pigment cells, PDLcs)成骨诱导预处理后,复合壳聚糖-胶原水凝胶异种移植于小鼠皮下,观察组织的再生,为构建可注射骨组织治疗骨缺损打下基础。

材料与方法

1. 材料:高糖 DMEM 基础培养基(Gibco),胎牛血清(四季青),青-链霉素 100×母液(Gibco),I 型胶原酶(Gibco),Dispase 酶(Roche),磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS),壳聚糖(上海博奥公司),地塞米松,β-磷酸甘油钠,维生素 C(美国 Sigma 公司),I 型鼠尾胶原溶液(5mg/ml,杭州生友公司),Live/Dead 细胞活力染色试剂盒(Invitrogen 公司)。ICR 小鼠购于浙江省医学科学院动物中心。

2. PDLc 的分离培养:取口腔门诊因正畸需要拔除的健康双尖牙或第 3 磨牙(患者年龄 20~30 岁,知情并同意),用 PBS 以从牙根到牙冠的方向冲洗牙体,彻底清除血污。刮取根中下 1/3 段的牙周膜组织,加入 3mg/ml 胶原酶和 4mg/ml Dispase 酶 1:1 混合消化液,37℃ 下消化 60min 后,加入细胞培养液中和。细胞培养液为添加 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养基。离心收集消化后的细胞和组织块,加入培养液悬浮后,转入 35mm 细胞培养皿,CO₂ 培养箱 37℃ 培养。

3. 壳聚糖-胶原温敏水凝胶的制备:将壳聚糖溶于 0.1mol/L 的盐酸,配制 2% 壳聚糖溶液。搅拌至完全溶解,纱布过滤后,高压蒸汽灭菌(121℃,15min),4℃ 保存。用双蒸水配制 50% β-磷酸甘油钠,抽滤灭菌。首先,将壳聚糖溶液和 I 型胶原溶液以 2:1(v/v) 混合后置于冰浴中,逐滴加入预冷的 β-磷酸甘油钠溶液,使其终浓度达到 6%。壳聚糖-胶原-β-磷酸甘油钠溶液在低温下可保持液态,当置于 37℃ 环境下,可发生固化成为凝胶,以下简称为壳聚糖-胶原水凝胶。

4. PDLcs 在凝胶中三维培养的活/死染色:将 PDLcs 细胞以 5×10^4 个/毫升悬浮于液态的水凝胶中,接种入 24 孔板,每孔 300μl。将细胞培养板置于 37℃ 培养箱内,凝胶固化后,

补入 500μl 细胞培养液,继续培养。当细胞三维培养第 3 天时,进行活/死细胞染色。按 Live/Dead 染色试剂盒说明书,加入 CalceinAM、PI 染料,激光共聚焦显微镜下观察。绿色为活细胞,而红色为死细胞。

5. 动物移植实验:将单层培养 80% 汇合的 PDLcs 细胞用成骨诱导液(即添加 10nmol/L 地塞米松、10mmol/L β-磷酸甘油钠和 80μg/ml 维生素 C 的细胞培养液)预处理 1 周后,消化为单个细胞。以 1×10^6 个/毫升悬浮于液态的水凝胶中,用于动物体内移植。取 5 周龄 ICR 小鼠共 3 只,戊巴比妥腹腔麻醉,背部脱毛后消毒。(1)实验组:把含 PDLcs 细胞的凝胶溶液注射入小鼠背部皮下右侧,每个位点 500μl。(2)对照组:同一小鼠背部皮下左侧仅注射等量不含细胞的凝胶溶液。

6. 组织化学染色:细胞-凝胶复合物皮下移植 6 周后,过麻醉处死小鼠。取出皮下移植体,10% 甲醛溶液固定后,脱水,蜡块包埋,切片(4μm),并进行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)和 Masson 染色。

结 果

1. 壳聚糖-胶原温敏水凝胶的性状:壳聚糖-胶原-β-磷酸甘油钠溶液在室温下呈液态,透明度较好并具有流动性(图 1A)。37℃ 孵育后,20min 之内固化,失去流动性,呈灰白色凝胶状(图 1B)。因此,壳聚糖-胶原水凝胶具有温敏性。

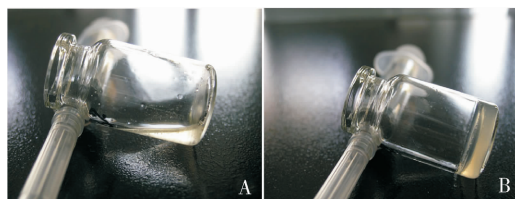


图 1 壳聚糖-胶原水凝胶的性状

A. 凝固前;B. 凝固后

2. 牙周膜细胞的形态:经酶消化后的牙周膜组织在贴壁 3~5 天后,有细胞从组织块边缘爬出。生长迅速,15 天左右可达到汇合。经 2~3 次消化传代,细胞呈均一的成纤维样形态,即 PDLcs(图 2),本研究中所用细胞为 P5 代以内。

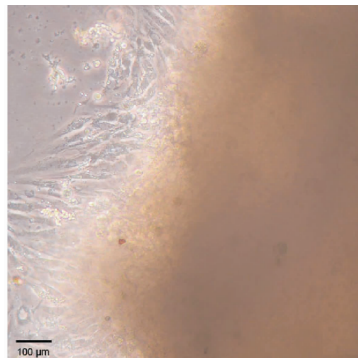


图 2 原代培养 PDLcs 细胞从组织块中爬出

3. 牙周膜细胞在壳聚糖-胶原温敏水凝胶中的三维培养:单层培养的 PDLCs 呈成纤维样形态,但在三维培养条件下,PDLCs 呈球形均匀分布于凝胶中。活/死细胞染色实验说明, >90% 的细胞可在凝胶中存活(图 3),壳聚糖-胶原水凝胶细胞毒性较小。

4. 细胞-凝胶复合物异种移植后的体内组织再生:细胞-凝胶复合物以及纯凝胶支架注射植入 ICR 小鼠皮下都可形成包块。6 周后,包块仍然位于皮下原位成胶处(图 4A)。包块周围无化脓、水肿、坏死等反应(图 4B、C)。分离植入物后,大体观察发现,实验组植入物外观呈淡红色,血管化明显(图 4D),而对照组植入物呈淡黄色,没有明显血管张入(图 4E)。

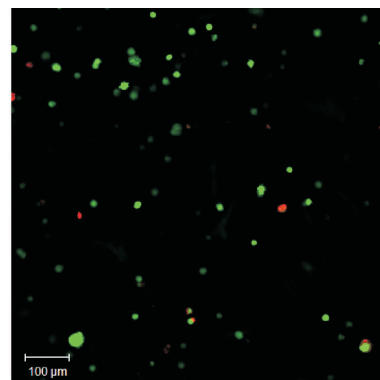


图 3 大多 PDLCs 在固化壳聚糖-胶原水凝胶中三维培养中存活



图 4 壳聚糖-胶原水凝胶复合成骨预处理的 PDLCs 后,植入 ICR 小鼠皮下的大体外观

A. 6 周后两组包块位置示意;B. 对照组移植植物皮下形态观察;C. 实验组移植植物皮下形态观察;D. 对照组移植植物大小;E. 实验组移植植物大小

HE 染色结果显示:实验组与对照组植入块周围都形成明显纤维细胞增生包裹支架。实验组支架内结缔组织生成量明显高于对照组,有致密胶原纤维生成,伴随新生毛细血管。对照组仅支架外围有少量疏松纤维组织形成。材料支架伊红染色强阳性,新生胶原纤维组织中可见未完全降解的材料颗粒(图 5)。Masson 染色结果与 HE 染色结果相似:对照组仅支架外围有少量纤维组织阳染,实验组支架中胶原纤维生成量明显高于对照组,支架内有大量致密胶原纤维生成(图 6)。

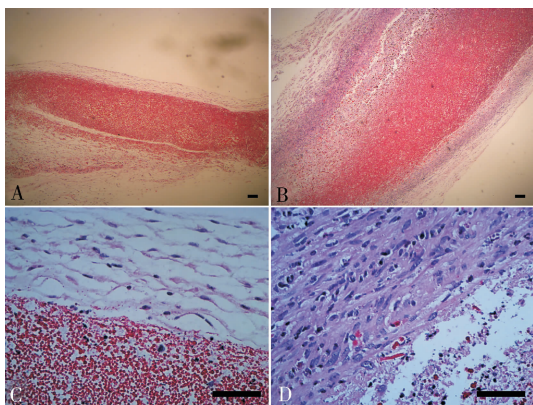


图 5 植入物 HE 染色组织学观察

对照组:纯壳聚糖-胶原水凝胶植入物(A. $\times 40$, C. $\times 400$);实验组:壳聚糖-胶原水凝胶复合成骨预处理 PDLCs 的植入物(B. $\times 40$, D. $\times 400$)。标尺 = 100 μm

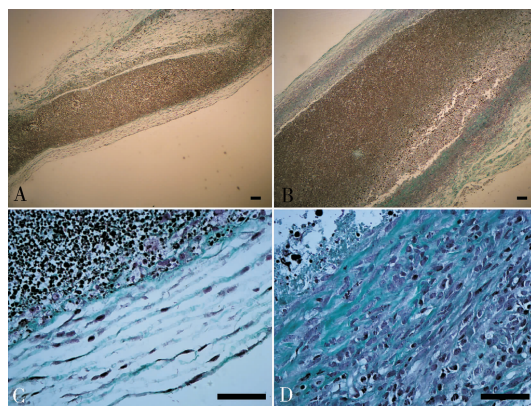


图 6 植入物 Masson 染色组织学观察

对照组:纯壳聚糖-胶原水凝胶植入物(A. $\times 40$, C. $\times 400$);实验组:壳聚糖-胶原水凝胶复合成骨预处理 PDLCs 的植入物(B. $\times 40$, D. $\times 400$)。标尺 = 100 μm

讨 论

可注射骨组织工程的研究为临床骨损伤的治疗和修复提供了一种新的方式。壳聚糖材料来源天然广泛,成本低廉,具有良好的生物相容性和抗菌性,是常用的支架材料之一,胶原则进一步增加材料的骨相容性^[2]。壳聚糖-胶原温敏水凝胶在体内迅速固化,操作方便,可能是理想的可注射支架材料。牙周膜细胞具有间充质干细胞相似的特性,增殖能力更

强,可参与体内牙槽骨的再生,易于成骨分化,因此是骨组织工程理想的“种子细胞”之一^[4]。本实验结合两者构建牙周膜细胞-壳聚糖胶原温敏水凝胶的可注射骨组织,观察皮下植入后的组织再生,为临床可注射骨组织的开发应用提供有价值的资料。

壳聚糖-胶原温敏水凝胶作为可注射支架材料,在组织工程应用中已有报道。大多研究认为:壳聚糖-胶原温敏水凝胶具有良好的生物相容性,可支持多种细胞体内及体外的三维培养。大多细胞在凝胶中存活率 > 90%,并且可支持细胞的长期培养与增殖。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSC) 作为种子细胞的应用最为多见, BMSC 体外预分化处理后包裹于壳聚糖-胶原水凝胶中可促进多种组织的再生,如骨、软骨组织或髓核的再生^[5-8]。其他一些细胞复合壳聚糖凝胶的三维培养应用也有报道。Lu 等^[9]发现壳聚糖温敏水凝胶复合胚胎干细胞后移植心肌梗死动物模型病灶区,可改善心脏功能。Leipzig 等^[10]发现交联细胞因子的壳聚糖凝胶可更有效促进神经干细胞三维培养下生长与定向分化,有望用于神经再生的治疗。目前,牙周膜细胞与壳聚糖-胶原温敏水凝胶相关生物相容性研究还未见报道。与其他成体组织来源细胞相比, PDLC 细胞组织来源广泛、造成创伤微小、伦理争议小,特别在牙周组织再生拥有良好的应用前景^[13]。本实验中,壳聚糖-胶原水凝胶支持 PDLCs 的三维培养,大部分细胞可在凝胶支架中存活,与其他细胞系的实验结果相似。壳聚糖中添加胶原成分有利于提高支架的生物相容性, Wang 等^[12]发现壳聚糖温敏水凝胶中胶原成分的添加可促进骨髓间充质干细胞在支架中的铺展,使三维培养下的细胞形态接近与二维培养。然而,本研究未发现 I 型胶原具有明显促进细胞铺展的作用,牙周膜细胞在凝胶三维培养下呈球形,而平面培养时细胞形态呈纺锤形。这可能与不同研究中,细胞来源或 I 型胶原的种类不同有关。

本研究将人牙周膜细胞复合壳聚糖-胶原温敏水凝胶异种移植入 ICR 小鼠皮下发现,实验组植入物内血管化以及结缔组织、胶原纤维等软组织的再生显著高于对照组。血管化是组织再生成功的一个重要指标,新生毛细血管负责营养支架内细胞,保证新生组织的存活和功能^[13]。胶原纤维的增生是早期成骨的一个重要指标,细胞合成分泌胶原形成胞外基质,构成胶原网络,再由磷酸钙以结晶形式沉积于胶原网架上,形成矿化的基质^[14]。因此,细胞-凝胶支

架移植细胞外胶原形成明显增加,可促进骨组织再生。目前细胞移植治疗机制仍有存在争议,植入细胞本身可能通过增殖和分化重建组织,也有研究认为植入细胞通过分泌多种细胞因子,吸引周围宿主长入支架促进组织再生^[15]。本研究对 PDLCs 进行了成骨诱导预处理,可提高其成骨分化率,但宿主细胞也可能参与了植入物胶原纤维增加和血管化的过程,需要对植入细胞进行标记示踪等进一步研究了解其机制。

然而,本研究未观察到成熟的矿化组织的形成。Sun 等^[7]利用骨髓间充质干细胞复合壳聚糖-胶原凝胶种植动物皮下也观察到结缔组织等软组织的形成,但未见硬组织。类似结果在传统固体支架的皮下移植如丝素、生物陶瓷、胶原等也有报道。这可能与材料成分骨传导性和诱导性不强有关,今后可通过加入具有良好骨传导性的材料,如羟基磷灰石 (HA) 来改良。此外,动物皮下移植的宿主环境本身不利于成骨,而在植入骨缺损部位时, PDLCs 也可能通过旁分泌作用,吸引或刺激周围骨组织生长,从而促进骨修复。

综上所述,壳聚糖-胶原温敏水凝胶可支持牙周膜细胞的三维培养,无细胞毒性。水凝胶生理温度下迅速固化,是理想的可注射支架之一。壳聚糖-胶原温敏水凝胶复合成骨诱导的牙周膜细胞有望构建可注射骨组织,修复骨缺损。特别是牙槽骨缺损,有望增加牙槽骨骨量,为牙周病治疗提供希望,也可提高种植牙成功率。

参考文献

- Li Y, Rodrigues J, Tomas H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications [J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(6): 2193-2221
- Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2339-2349
- Yang XB, Bhatnagar RS, Li S, *et al.* Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(7-8): 1148-1159
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine [J]. *J Dent Res*, 2009, 88(9): 792-806
- Hoemann CD, Chenite A, Sun J, *et al.* Cytocompatible gel formation of chitosan-glycerol phosphate solutions supplemented with hydroxyl ethyl cellulose is due to the presence of glyoxal [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 83(2): 521-529
- Kim KS, Lee JH, Ahn HH, *et al.* The osteogenic differentiation of rat muscle-derived stem cells in vivo within in situ-forming chitosan scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(33): 4420-4428
- Sun B, Ma W, Su F, *et al.* The osteogenic differentiation of dog bone

- marrow mesenchymal stem cells in a thermo – sensitive injectable chitosan/collagen/beta – glycerophosphate hydrogel: in vitro and in vivo [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(9): 2111 – 2118
- 8 Dang JM, Sun DD, Shin – Ya Y, *et al.* Temperature – responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disk cells [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(3): 406 – 418
 - 9 Lu WN, Lu SH, Wang HB, *et al.* Functional improvement of infarcted heart by co – injection of embryonic stem cells with temperature – responsive chitosan hydrogel [J]. *Tissue Engineering, Part A*, 2009, 15(6): 1437 – 1447
 - 10 Leipzig ND, Wylie RG, Kim H, *et al.* Differentiation of neural stem cells in three – dimensional growth factor – immobilized chitosan hydrogel scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(1): 57 – 64
 - 11 Seo BM, Miura M, Gronthos S, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149 – 155
 - 12 Wang L, Stegemann JP. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with beta – glycerophosphate for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 3976 – 3985
 - 13 Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(4 – 5): 300 – 311
 - 14 Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, *et al.* Bone regeneration: current concepts and future directions [J]. *BMC Med*, 2011, 9: 66
 - 15 Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, *et al.* Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8): 1888 – 1897

(收稿日期:2013 – 07 – 28)

(修回日期:2013 – 08 – 26)

量子点联合磁微粒技术检测 HBsAg 方法的建立及评价

何紫琪 李从荣 杨艳兵 吴 青 余 华

摘 要 **目的** 建立并评价一种基于量子点、磁微粒技术检测 HBsAg 的方法。**方法** 以针对 HBsAg 不同抗原决定簇的抗体与量子点及磁微粒偶联,利用双抗体夹心原理检测 HBsAg,用荧光定量 PCR(qPCR)、ELISA 法同时检测 120 例临床标本,并对比分析其检测效果。**结果** 磁微粒(magnetic nanoparticles, MMS)、量子点(quantum dots, QD)偶联抗体最佳浓度分别为 50 μg/ml、25 μg/ml,本法对 HBsAg 最低检出浓度为 1 ng/ml;本法的敏感度、特异性分别为 93.3%、86.7%;本法检测效果与 ELISA 一致,但其检测速度更快。**结论** 基于量子点、磁微粒技术检测 HBsAg 的方法方便、迅速,具有较高的敏感度与特异性,可以作为 HBsAg 快速筛查的方法。

关键词 量子点 磁微粒 HBsAg ELISA

[中图分类号] R575 [文献标识码] A

Establishment and Evaluation of the Method of Detection for HBsAg Based on Quantum Dots and Magnetic Nanoparticles. He Ziqi, Li Congrong, Yang Yanbing, Wu Qing, Yu Hua. *Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China*

Abstract Objective To establish and evaluate a method of detection for HBsAg based on quantum dots and magnetic nanoparticles. **Methods** The antibodies which can combined HBsAg on the quantum dots and magnetic nanoparticles were fixed, and then the HBsAg which double antibody sandwich principle were detected. Totally 120 cases of clinical specimens were detected with both qPCR and ELISA methods, and then compared and analysed their detection efficiency. **Results** The optimal antibody concentration which conjugated MMS and QD were 50 μg/ml and 25 μg/ml, respectively. The minimum detectable concentration of HBsAg was 1 ng/ml. The sensitivity and specificity of this method were 93.3% and 86.7%, respectively. Compared with ELISA, this method had a good consistency, while its test time was shortened. **Conclusion** The test method established in this study has been demonstrated to be specific, sensitive, easy and rapid for HBsAg detection, and it may also be practical.

Key words Quantum dots; Magnetic nanoparticles; HBsAg; ELISA

基金项目:湖北省卫生厅采供血基金资助项目(CGX2010 – 4)

作者单位:430060 武汉大学人民医院检验科

通讯作者:李从荣,硕士生导师,电子信箱:congrongli33@hotmail.com