

多肽水凝胶复合支架对大鼠脂肪干细胞体外增殖和分化的影响

彭莎莎¹,姚菁¹,陈刚¹,连小洁^{2,3},张晓军³,崔菡³,宋天喜³,夏阳^{1*},章非敏^{1*},顾宁⁴,崔福斋²

(¹南京医科大学口腔医学研究所,江苏南京 210029;²清华大学材料系,北京 100084;³北京奥精医药科技有限公司,北京 100176;⁴东南大学苏州研究院,江苏苏州 215123)

[摘要] 目的:研究多肽水凝胶复合髹金(nano-hydroxyapatite/collagen, nHAC)对大鼠脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)体外增殖和早期骨向分化的作用。方法:用1%的多肽水凝胶与nHAC制备复合支架,未复合水凝胶的nHAC为对照组,使用扫描电子显微镜(field emission scanning electron microscope, FESEM)和共聚焦显微镜(Confocal laser scanning microscope, CLSM)进行表征,将ADSCs接种到两种支架材料上,以CCK-8检测1、3、5、7 d的增殖情况,以碱性磷酸酶(ALP)活性为早期骨向分化指标,检测其3、5、7 d的活性。结果:多肽水凝胶在nHAC表面形成涂层,ADSCs在有涂层的nHAC上黏附、铺展得更好,两种支架上的ADSCs在1、3、5、7 d都持续增殖,其中两组间在1、3 d无差异,5、7 d有差异,实验组增殖更快($P < 0.05$);ALP值在3、5、7 d都持续增高,实验组更高,两组间有差异($P < 0.05$),但在3、5、7 d时两两比较差异不显著($P > 0.05$)。结论:多肽水凝胶复合支架材料能显著促进ADSCs的黏附增殖,对细胞早期骨向分化有一定的促进作用,但不如对细胞增殖的促进作用显著。

[关键词] 多肽水凝胶;纳米羟基磷灰石/胶原;脂肪干细胞;增殖;分化

[中图分类号] R329.28

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-318-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130306

The effects of peptide hydrogel composite scaffold on the proliferation and differentiation of RAT adipose-derived stem cells

Peng Shasha¹, Yao Jing¹, Chen Gang¹, Lian Xiaojie^{2,3}, Zhang Xiaojun³, Cui Han³, Song Tianxi³, Xia Yang^{1*}, Zhang Feimin^{1*}, Gu Ning⁴, Cui Fuzhai²

(¹Institute Of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084; ³Beijing Allgens Medical Science & Technology Co Ltd, Beijing 100176; ⁴Suzhou Institute, Southeast University, Suzhou 215123, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of peptide hydrogel composite scaffold on the proliferation and early osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells (ADSCs). **Methods:** Nano-Hydroxyapatite/Collagen (nHAC) scaffold was coated by 1% peptide hydrogel. nHAC without peptide coating was set as control. They were characterized by field emission scanning electron microscope (FESEM) and confocal laser scanning microscope (CLSM). ADSCs were chosen to seed onto the nHAC coated and uncoated with peptide hydrogel. CCK-8 kit was used to observe cell proliferation. The alkaline phosphate (ALP) activity was detected the early osteogenic differentiation. **Results:** Peptide coating was formed on the surface of scaffold. ADSCs adhered to and fully extended on the peptide hydrogel composite scaffold under CLSM. The data of proliferation and ALP continually increased in both groups. There was no difference in cell proliferation at 1 d, 3 d ($P > 0.05$). At 5 d, 7 d, ADSCs on the coated nHAC proliferated more significantly ($P < 0.05$). There was no difference among 3 d, 5 d and 7 d in the ALP activity ($P > 0.05$). **Conclusions:** The peptide hydrogel composite scaffold could improve adhesion and proliferation of ADSCs, and also can improve early osteogenic differentiation of the cell, although not so obvious as the former two.

[基金项目] 国家973项目(2011CB606205);国家自然科学基金(50830102);苏州市国际科技合作项目(SH201114);江苏高校优势学科建设工程资助项目江苏省医学领军人才与创新团队;江苏省研究生创新工程(CXLX11_0724)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fmzhang@njmu.edu.cn; xiayangxy@sina.com

[Key words] peptide hydrogel; nano-hydroxyapatite/collagen; adipose-derived stem cells; proliferation; differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 318-322]

脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)是近年来在脂肪组织中发现的一群与骨髓间充质干细胞类似的具有多分化潜能和生物学特性的细胞^[1]。因其具有来源丰富、取材方便、对机体损伤小、增殖快、能多向分化、细胞获取量大等优点,已迅速成为组织工程学、再生医学和药物筛选等方面的研究热点。利用外源性因子、基因修饰、支架材料诱导等方式能成功诱导脂肪干细胞成骨性分化。目前体外或体内实验虽然证明了脂肪干细胞的成骨潜力^[2-4],但其分化成骨效能仍有待进一步提高。

本研究拟制备一种多肽水凝胶与羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite/collagen, nHAC)的复合支架材料(命名为 GnHAC),探讨其对 ADSCs 增殖和骨向分化能力的影响,并进一步预测其增强 nHAC 骨诱导性的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

多肽水凝胶(Beaver Nano™,广州赛业生物科技有限公司),SD 大鼠 ADSCs,广州赛业生物科技有限公司,取第 3~5 代进行相关实验。nHAC(北京奥精医药科技有限公司)。

SD 大鼠 ADSCs 完全培养基、SD 大鼠 ADSCs 成骨诱导分化培养基(广州赛业生物科技有限公司)。CCK-8 试剂盒(Cell Counting Kit-8,碧云天,中国)。鬼笔环肽(Cytoskeleton 公司,美国),DAPI(碧云天中国)。Triton X-100(国药集团化学试剂有限公司,上海)。胎牛血清(Hyclone 公司,美国),PBS (1×),0.25%胰酶-EDTA(GBICO 公司,美国),二甲基亚砜(DMSO,广州化学试剂厂)。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司)。

场发射扫描电镜(field emission scanning electron microscope, FESEM, Hitachi-4800, 日本),共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM, Zeiss LSM 710, Carl Zeiss 德国),酶标仪(ELX800, BioTek 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 多肽水凝胶复合支架的制备

将 ⁶⁰Co 照射消毒后的 nHAC 在无菌条件下制

成直径 5 mm,厚 1 mm 的小圆片,75%乙醇浸泡 4 h 后,PBS 反复清洗。

将经上述处理后的 nHAC 浸泡于 1%多肽水凝胶中,待表面完全被水凝胶润湿后取出,小心置于 96 孔板内,沿孔壁缓慢滴加细胞完全培养基,37℃ 无菌条件下放置 0.5 h 使水凝胶凝固,制成 nHAC/多肽水凝胶复合支架材料,标记为 GnHAC。

1.2.2 支架形貌表征

将 nHAC 和 GnHAC 彻底干燥、喷金,分别在 FESEM 下观察其表面形貌。

1.2.3 细胞增殖检测

nHAC 和 GnHAC 分别置于 96 孔板中,加细胞完全培养基,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中预培养 24 h 后,彻底吸净培养液。将 ADSCs 按 5×10⁴ 个/cm² 的密度分别接种于 2 种支架材料上,于 37℃、5% CO₂、100%湿度中进行培养。细胞黏附、增殖实验采用完全培养基。

CCK-8 检测:分别在培养 1、3、5、7 d 后,吸弃原培养液,每孔加入 100 μl 含 10% CCK-8 的完全培养基,继续孵育 4 h,振荡 3 min 后,吸取上清液至另一 96 孔板,酶标仪上波长 450 nm 测吸光度值。

1.2.4 共聚焦显微镜观察细胞铺展形态

细胞培养条件同 1.2.3 所述。将与 ADSCs 共培养 24 h 的 nHAC 和 GnHAC 用 PBS 冲洗后,4%多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 冲洗,0.25% Triton X-100 孵育 5 min 后再用 PBS 洗 3 次,加入鬼笔环肽室温染色 30 min,PBS 冲洗后加入 DAPI 室温染 30 s,上机观测。

1.2.5 细胞分化检测

支架预处理和细胞培养条件同 1.2.3。采用成骨诱导分化培养基。ALP 检测:分别在培养 3、5、7 d 后,用 PBS 清洗与 ADSCs 共培养的支架,反复冻融法裂解细胞,与 100 μl 反应底物 37℃孵育 2 h,取上清液置另一 96 孔板,用酶标仪于 405 nm 波长下测吸光度值。将 ALP 除以同组 CCK-8 均值进行统计分析,以排除细胞总蛋白量不同对 ALP 值的影响。

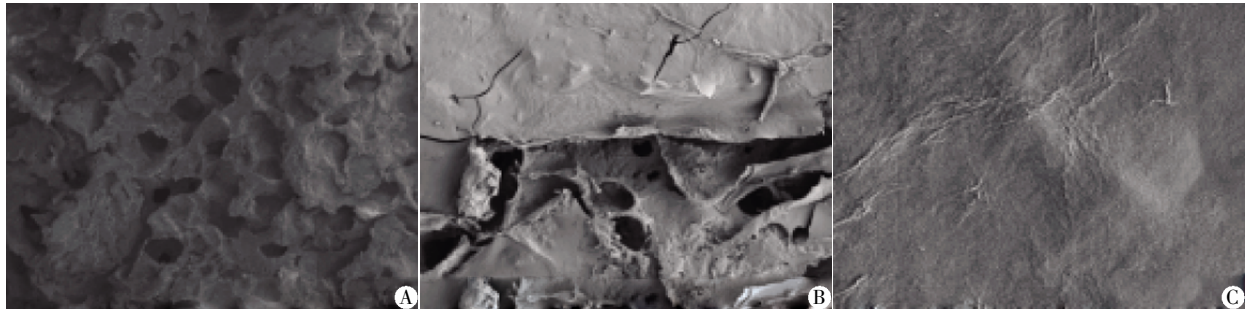
1.3 统计学方法

所有定量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示采用统计分析软件 SPSS17.0 进行重复测量数据方差分析,设定 $P \leq 0.05$ 为有显著差异。

2 结果

2.1 nHAC 和 GnHAC 的 FESEM 图片

图1为nHAC和GnHAC的FESEM图片,可见nHAC原为一种多孔结构,多肽水凝胶在其表面形



A:nHAC($\times 400$);B:GnHAC($\times 250$);C:水凝胶涂层的放大图($\times 3\ 500$)。

图1 nHAC和GnHAC的扫描电镜图

Figure 1 The SEM images of nHAC and GnHAC membranes

图2为ADSCs分别与nHAC和GnHAC复合培养1、3、5、7 d后的CCK-8结果,1 d两组的数值分别为 0.214 ± 0.013 和 0.217 ± 0.027 ,3 d两组的数值分别为 0.309 ± 0.043 和 0.384 ± 0.061 ,5 d两组的数值分别为 0.572 ± 0.017 和 0.751 ± 0.082 ,7 d两组的数值分别为 0.783 ± 0.022 和 1.388 ± 0.102 。重复测量资料的方差分析结果表明,两组在不同时间之间差异显著($F = 231.047, P < 0.05$),说明随时间变化,细胞数增加,且增加有统计差异。两组不同时间点之间的两两比较结果显示,两组1、3、5、7 d之间均有差异($P < 0.05$),nHAC组和GnHAC组之间存在显著差异($F = 441.281, P < 0.05$)。同一时间点上的两组间比较,1、3 d没有差异($P > 0.05$),5、7 d两组间差异显著,GnHAC组更高($P < 0.05$)。两组间的趋势分析结果显示,两种支架材料上ADSCs增殖的时间变化趋势不同,差异具有统计学意义($F = 70.024, P < 0.05$)。时间和分组之间存在交互效应($F = 27.925, P < 0.05$),说明GnHAC对细胞增殖具有显著促进作用。

2.3 ADSCs 在 nHAC 和 GnHAC 上的铺展

图3可见,CLSM观察ADSCs与nHAC和GnHAC共培养1 d后,GnHAC组可见细胞出现伪足伸展贴附于材料表面,细胞间紧密连接且互相桥联呈网状。而nHAC组未见明显细胞伸展桥联。说明GnHAC较nHAC更有利于ADSCs的早期黏附铺展。

2.4 ADSCs 在 nHAC 和 GnHAC 上的分化

图4为ADSCs接种在nHAC和GnHAC上成骨

成了一层涂层。但水凝胶涂层并未能完全均匀覆盖nHAC表面,nHAC表面仍暴露出有未被水凝胶涂层包裹的多孔结构。已形成的水凝胶涂层,局部有裂纹,高倍镜下为有不规则条索状突起的不光滑表面。

2.2 ADSCs 在 nHAC 和 GnHAC 上的增殖

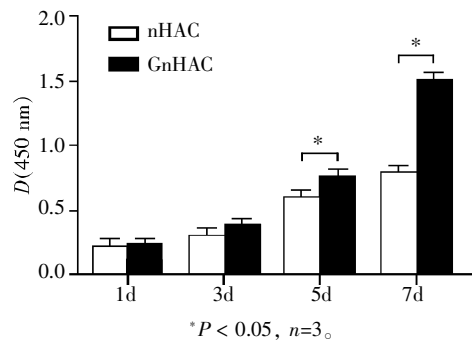
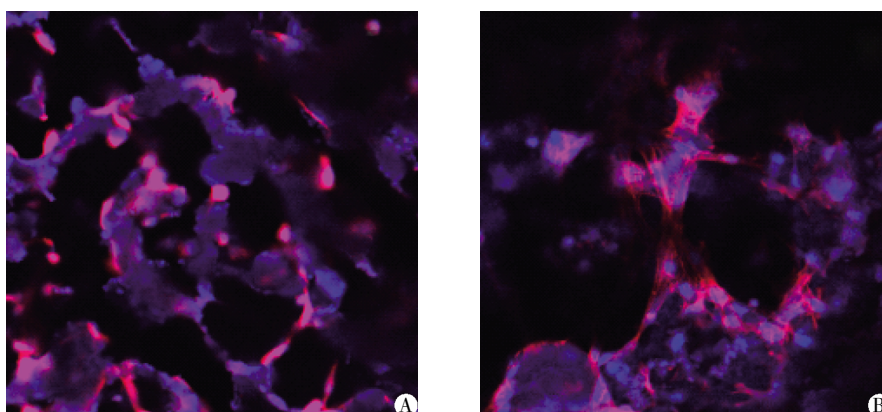


图2 CCK-8对nHAC和GnHAC上ADSCs增殖的检测结果
Figure 2 The CCK-8 results of ADSCs proliferation on nHAC and GnHAC

诱导培养3、5、7 d后的ALP活性,3 d两组的数值分别为 0.411 ± 0.102 和 0.439 ± 0.061 ,5 d两组的数值分别为 1.146 ± 0.113 和 1.454 ± 0.241 ,7 d两组的数值分别为 1.392 ± 0.301 和 1.786 ± 0.082 。重复测量资料的方差分析结果表明,两组内差异显著($F = 68.325, P < 0.05$),说明随时间变化,细胞逐步进行分化,产生的ALP逐渐增多。两组不同时间点之间的两两比较结果显示,在nHAC组3 d与5 d有差异($P < 0.05$);在GnHAC组3 d与5 d、3 d与7 d有差异($P < 0.05$)。nHAC组和GnHAC组之间的ALP增高状况存在显著差异($F = 9.800, P < 0.05$)。同一时间点上的两组间比较,3、5、7 d两组的ALP均无显著差异($P > 0.05$)。时间和分组间不存在交互效应($F = 1.710, P > 0.05$),两种支架材料上ADSCs分化的时间变化趋势一致,不具有统计学意义($F = 2.261, P > 0.05$)。



A: nHAC; B: GnHAC。

图 3 nHAC 和 GnHAC 与 ADSCs 共培养 1 d 后的 CLSM 照片($\times 4\ 000$)

Figure 3 CLSM photos of nHAC and GnHAC after culturing with ADSCs for 1 d($\times 4\ 000$)

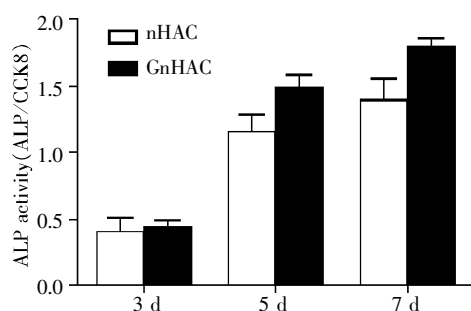


图 4 nHAC 和 GnHAC 的 ALP 活性检测结果

Figure 4 The ALP results of ADSCs on nHAC and GnHAC scaffolds

3 讨论

本研究使用的 nHAC 是一种纳米羟基磷灰石/胶原复合材料,是根据仿生原理制备的重组胶原矿化的支架材料,具有与天然骨相似的分级结构,与松质骨的力学性能接近。其互联孔洞尺寸为 $50\sim 500\ \mu\text{m}$,孔隙率 $60\%\sim 90\%$,良好的多孔网状结构可为种子细胞的生长及在材料上的增殖、分化和营养代谢提供生物支架。此外, nHAC 所含纳米级羟基磷灰石 (Hydroxyapatite, HA) 表面原子存在许多悬空键,具有表面效应,并且有不饱和性质,可以增强材料的生物活性。关于该材料的研究表明, nHAC 具有良好的生物相容性和骨传导性,在骨组织工程中具有良好的应用前景^[5-8]。但是该材料的骨引导性仍较弱。因此,本文考虑如何提高并增强 nHAC 的骨引导性。常规方法有两种,一是骨组织细胞与材料的复合,二是骨生长因子与材料的复合。骨组织细胞与材料的体外复合,要求模拟体内条件的三维细胞培养和保存技术。

目前已有多种水凝胶类生物材料被用于三维细

胞培养的研究,如琼脂糖、胶原蛋白、甲基纤维素水凝胶等。本研究使用的多肽水凝胶是由天然氨基酸合成的自组装肽,由 1% 的多肽成分和 99% 的水分组成。这些肽由亲水性和疏水性氨基酸交替组成,含有 RAD 序列,与整合素受体结合位点 RGD 序列相似。虽然不能确定 RAD 是否与 RGD 的作用相同,但已在几个不同类型的细胞^[9]研究其作为细胞黏附分子的作用。这些多肽已有被用于促进细胞附着,存活和增殖的研究^[10-11]。与其他基质相比,这种多肽水凝胶浓度较低,更有利于营养物质的扩散和细胞的迁移扩展;水凝胶体积不会因为温度或湿度等因素的影响而发生改变;成分明确,减少了不确定因素对细胞生长的影响,也避免了动物异源蛋白和病原体的污染。

这种多肽在一定盐离子浓度下可以自发组装成有序的纳米纤维支架,纤维直径在 $10\ \text{nm}$,比人工合成的高分子超细纤维小 1 000 倍,孔径为 $50\sim 200\ \text{nm}$,外观呈水凝胶状,其功能和形态均与天然的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 相似。此外,生物分子在这种纳米级的环境中弥漫缓慢,因此有可能建立一个局部的分子梯度,更加接近体内的情况^[12]。关于 3D 肽支架的研究表明,其能促进细胞的功能性分化,增强细胞的迁移活性,并促进细胞分泌胞外基质^[13-14]。当与其他多孔聚合物支架混合在一起,肽支架表现出可以增强成骨细胞的生长和分化,提示其在骨组织工程中的应用的潜力^[15]。

虽然多肽水凝胶的生物学性能良好,但其机械性能差,无法单独应用于组织工程领域。所以,在本研究中,将多肽水凝胶与 nHAC 支架材料复合,将多肽水凝胶作为对 nHAC 表面处理的方式,形成一种新型多

肽水凝胶复合支架材料。SEM 结果可以看到 nHAC 为三维多孔结构,多肽水凝胶在其表面形成涂层。

本研究主要对 ADSCs 的增殖和早期骨向分化进行了初步检测。CCK-8 检测结果显示,ADSCs 在多肽水凝胶复合支架材料上的增殖明显优于对照组。共聚焦显微镜观察,ADSCs 在有凝胶涂层的支架材料上黏附铺展的更好,进一步证明,多肽水凝胶复合 nHAC 能够作为良好的支架,使 ADSCs 在其表面和内部稳定生长。提示复合支架具有进一步完善成为细胞与支架复合的生物反应器的潜能。

ALP 是一种含锌的磷酸单酯水解酶,它可使局部磷酸根浓度升高,破坏钙化抑制剂,促进羟基磷灰石的形成,是 ADSCs 开始向成骨方向分化的标志之一。本实验对与两种支架材料共培养 3、5、7 d 后的 ADSCs 进行了 ALP 活性的检测。结果表明,GnHAC 的 ALP 值高于 nHAC 组,且组间差异显著。但在进一步进行两组间同一时间点的两两比较时,却发现 3 个时间点的差异都不显著。这提示,水凝胶对 ADSCs 在 nHAC 上向成骨方向分化有促进作用,但不如对细胞增殖的促进那么显著。在本研究中,仅检测了 ALP 活性一个骨向分化的指标,其他相关指标包括成骨相关基因检测,钙结节染色和定量分析等将在后期研究中逐步完善。

从本实验结果可以看出,多肽水凝胶复合 nHAC 是良好的支架材料,与纯 nHAC 相比,更适宜 ADSCs 的黏附、增殖,并可促进其早期骨向分化。但本研究中,nHAC 与水凝胶的结合力还不是很强,从扫描电镜图片可见,水凝胶对 nHAC 的覆盖并不完全。后步可通过对 nHAC 的表面处理,增强其与水凝胶的结合力和水凝胶的覆盖率,以进一步提高复合支架材料的生物学性能。

此外,ADSCs 在复合支架上的体外晚期分化、体内的转化和生长过程还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Zuk PA,Zhu M,M izuno H,et al. Multilineage cells from human adipose tissue:implications for cell- based therapies[J]. Tissue Eng,2001,7(2):211-228
- [2] Ravichandran R,Venugopal JR,Sundarrajan S,et al. Precipitation of nanohydroxyapatite on PLIA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage[J]. Biomaterials, 2012,33(3):846-855
- [3] Marino G,Rosso F,Cafiero G,et al. Beta-Tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells;*in vitro* study [J]. J Mater Sci Mater Med,2010,21(1):353-363
- [4] Levi B,James AW,Nelson ER,et al. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects[J].PLoS One,2010,5(6):e11177
- [5] 穆晓红,赵子义,徐 林,等. 骨髓间充质干细胞在纳米晶胶原基骨内生长以及成骨潜能[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(3):391-394
- [6] 孙 伟,李子荣,史振才,等. 纳米晶胶原基骨和骨髓间充质干细胞复合修复兔股骨头坏死缺损的研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2005,19(9):703-706
- [7] Hao W,Dong J,Jiang M,et al. Enhanced bone formation in large segmental radial defects by combining adipose-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 2 with nHA/RHLC/PLA scaffold [J]. Int Orthop,2010,34(8):1341-1349
- [8] Hu NM,Chen Z,Liu X,et al. Mechanical properties and *in vitro* bioactivity of injectable and self-setting calcium sulfate/nano-HA/collagen bone graft substitute [J]. J Mech Behav Biomed Mater,2012,12(8):119-128
- [9] Zhang S,Holmes TC,DiPersio CM,et al. Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment[J]. Biomaterials,1995,16(18):1385-1393
- [10] Zhang F,Shi GS,Ren LF,et al. Designer self-assembling peptide scaffold stimulates pre-osteoblast attachment, spreading and proliferation[J]. J Mater Sci Mater Med, 2009,20(7):1475-1481
- [11] Yang Z,Zhao X. A 3D model of ovarian cancer cell lines on peptide nanofiber scaffold to explore the cell-scaffold interaction and chemotherapeutic resistance of anticancer drugs[J]. Int J Nanomedicine,2011,6(1):303-310
- [12] Zhang S. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for study of 3-d cell biology and beyond[J]. Adv Cancer Res,2008,99(1):335-362
- [13] Ozeki M,Kuroda S,Kon K,et al. Differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts in a self-assembling peptidehydrogel;*in vitro* and *in vivo* studies[J]. J Biomater Appl,2011,25(7):663-684
- [14] Kopesky PW,Vanderploeg EJ,Sandy JS,et al. Self-assembling peptide hydrogels modulate *in vitro* chondrogenesis of bovine bone marrow stromal cells [J]. Tissue Eng Part A,2010,16(2):465-477
- [15] Bokhari MA,Akay G,Zhang S,et al. The enhancement of osteoblast growth and differentiation *in vitro* on a peptide hydrogel-polyHIPE polymer hybrid material[J]. Biomaterials,2005,26(25):5198-5208

[收稿日期] 2012-11-27