

兔胫骨骨膜细胞膜片的体外构建

徐燕梅^{1,2}, 卓 瑾^{1,2}, 许雄程^{1,2}, 何梦娇^{1,2}, 林敏魁^{1,2}, 骆 凯^{1,2}, 朱丽芳³

摘要: **目的** 体外采用维生素 C 构建兔胫骨骨膜细胞膜片并检测其基本生物学特性。**方法** 培养兔胫骨骨膜细胞,采用维生素 C 诱导构建兔胫骨骨膜细胞膜片。采用显微镜对膜片进行观察,苏木精-伊红(H-E)及 Masson 染色检测膜片的结构及胞外基质;细胞活死荧光染色观察膜片的活力。**结果** 体外成功分离培养兔胫骨骨膜细胞,CCK-8 检测结果显示骨膜细胞增殖曲线呈 S 型增长,结晶紫染色显示其具有克隆形成能力,并具有多向分化能力。采用维生素 C 连续诱导 14 d,可获得半透明乳白色膜样结构。H-E 及 Masson 染色显示膜片由多层细胞及胞外基质构成,细胞活死荧光染色显示膜片由大量绿染的活细胞构成。**结论** 维生素 C 可成功诱导兔胫骨骨膜细胞膜片,有望应用于骨缺损再生修复。

关键词: 兔胫骨; 体外构建; 骨膜; 细胞膜片; 细胞外基质
文献标志码: A **文章编号:** 1672-4194(2021)06-0508-05

目前颌面部骨缺损常采用骨移植进行修复,但存在成骨效率低及免疫反应等不足。组织工程技术为颌面部骨组织缺损修复提供了一个新的治疗方式。其中,细胞膜片技术无需酶消化,可保留完整的细胞间连接及胞外基质结构,有望弥补传统组织工程技术的缺点^[1]。近年来,细胞膜片技术已被应用于各种组织再生研究中。Ohki 等^[2]于 2009 年首次将体外构建的人口腔黏膜上皮细胞膜片移植于食道癌患者体内,成功修补了缺损组织,这一开创性临床试验表明细胞膜片技术在临床诊疗中拥有巨大的潜能。Chen 等^[3]在将人牙周韧带干细胞膜片移植于牙周缺损中,证实该牙周韧带干细胞膜片在体内具有良好的生物安全性。骨膜细胞位于骨组织表面的纤维组织内其来源丰富,能够自我更新,并能够多向分化,在骨组织再生修复中发挥重要的作用^[4]。已有研究将骨膜移植于人上颌骨,成功实现了骨组织再生,提示骨膜细胞可成为骨缺损修复的种子细胞^[5]。本研究拟采用维生素 C 连续诱导法构建兔胫骨骨膜细胞膜片,并对其基本生物学特性进行研究,为利用骨膜细胞膜片修复颌面部骨缺损提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4 月龄雄性新西兰大白兔,体质量 2.2~2.4 kg[上海市松江区松联实验动物场(许可证号:SCXK(沪)2017-0008)]。

1.1.2 材料 改良 Eagle 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(澳大利亚 Wisent 公司);Ⅱ型胶原酶、维生素 C、茜素红(美国 Sigma 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);磷酸盐缓冲液(以色列 BI 公司);兔骨髓间充质干细胞成脂、成软骨诱导分化培养基(中国赛业生物科技有限公司);Masson 染液(福州迈新生物技术开发有限公司);结晶紫(中国西陇化工股份有限公司);苏木精、伊红(中国赛维尔生物科技有限公司);细胞活死荧光染色试剂(美国 Abcam 公司);碱性磷酸酶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.1.3 仪器 石蜡组织切片机(德国 Leica 公司);荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);CO₂ 培养箱(中国力新仪器有限公司);超净工作台(中国苏州净化设备有限公司);生物组织包埋机(中国金华科迪仪器有限公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔胫骨骨膜细胞体外培养 无菌状态下剥离兔胫骨骨膜,冲洗,组织剪碎成 1 mm×1 mm 大小,Ⅱ型胶原酶消化后,置入含 10% 胎牛血清培养液的培养瓶中,培养箱培养。待骨膜组织块之间细胞达 70%~80% 融合后,对细胞进行消化传代。

1.2.2 兔胫骨骨膜细胞增殖能力检测 将兔胫骨骨膜细胞以每孔 2×10³ 个接种于 96 孔板内,按照 CCK-8 试剂盒操作说明,检测培养 1、3、5 和 7 d 细胞的增殖能力。

收稿日期: 2021-08-25
基金项目: 国家自然科学基金项目(81870766);福建省医学创新课题(2020CX A048);深圳市龙岗区科技创新项目(LGK-CYLWS2019000434)
作者单位: 1. 福建医科大学 附属口腔医院牙周科,福州 350002;
2. 福建医科大学口腔医学院 口腔疾病研究重点实验室,福州 350002;
3. 北京中医药大学 深圳医院(龙岗)口腔科,深圳 518100
作者简介: 徐燕梅,女,福建医科大学 2021 级博士研究生
通信作者: 朱丽芳, Email: zwx33@126.com

1.2.3 兔胫骨骨膜细胞克隆形成能力检测 将兔胫骨骨膜细胞以每孔 1×10^3 个接种于 6 孔板内,每 3 d 换液,克隆集落形成后行结晶紫染色,拍照。

1.2.4 兔胫骨骨膜细胞多向分化能力检测 将兔胫骨骨膜细胞以每孔 5×10^4 个接种于 12 孔板,分别进行多向诱导,采用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、茜素红、油红 O 及阿尔辛蓝染色检测兔胫骨骨膜细胞的成骨、成脂及成软骨分化的能力。

1.2.5 兔胫骨骨膜细胞膜片构建及组织形态学观察 将兔胫骨骨膜细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种于 12 孔板,加入维生素 C 膜片诱导液,每 3 d 换液。连续诱导 14 d,待孔底部出现透明白色膜状物,采用细胞活死荧光染色检测膜片活力。分离细胞膜

片,石蜡包埋切片后 Masson 及苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, H-E 染色)。

2 结 果

2.1 兔胫骨骨膜细胞体外培养及增殖能力、克隆形成能力检测 兔胫骨骨膜经 II 型胶原酶酶消化后置于培养瓶培养 3 d,可见骨膜组织块边缘有细胞爬出,细胞形态主要呈短梭形或三角形(图 1A),传代后镜下观察细胞形态无变化(图 1B)。选择 3 代以内的细胞进行实验。CCK-8 检测结果显示,兔胫骨骨膜细胞生长曲线呈 S 型增长(图 1C)。体外培养 10 d,可见细胞克隆集落形成,结晶紫染色呈蓝色(图 1D)。

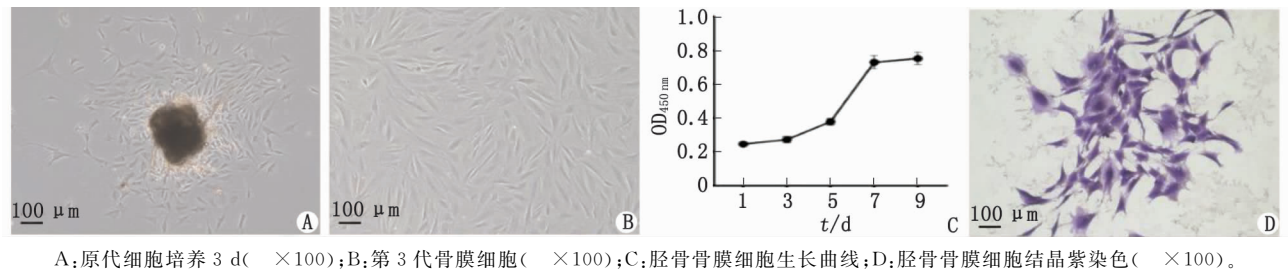


图 1 兔胫骨骨膜细胞体外培养
Fig. 1 Culture of rabbit tibial periosteal cells *in vitro*

2.2 兔胫骨骨膜细胞多向分化能力鉴定 兔胫骨骨膜细胞成骨诱导培养 7 d, ALP 染色呈深蓝色(图 2A);成骨诱导培养 21 d,茜素红染色可见大小不一、红染的矿化结节(图 2B);成脂诱导培养 21 d,

可见脂滴形成,经油红 O 染色脂滴呈红色(图 2C);成软骨诱导培养 21 d,经阿尔辛蓝染色细胞呈蓝色(图 2D)。上述结果提示,兔胫骨骨膜细胞具有多向分化能力。

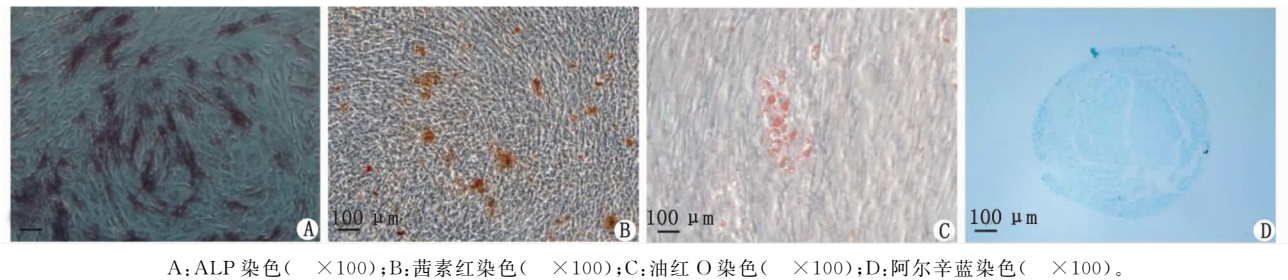


图 2 兔胫骨骨膜细胞鉴定
Fig. 2 Identification of rabbit tibial periosteal cells

2.3 兔胫骨骨膜细胞膜片的构建 兔胫骨骨膜细胞用维生素 C 诱导 14 d,孔板底形成透明白色膜片样结构,边缘卷曲(图 3A)。显微镜下可见细胞排列紧密(图 3B),用细胞刮刀轻轻地沿培养皿边缘缓慢剥离膜片,可获得完整的细胞膜片,质地柔软,膜片在液体中可完全舒展。

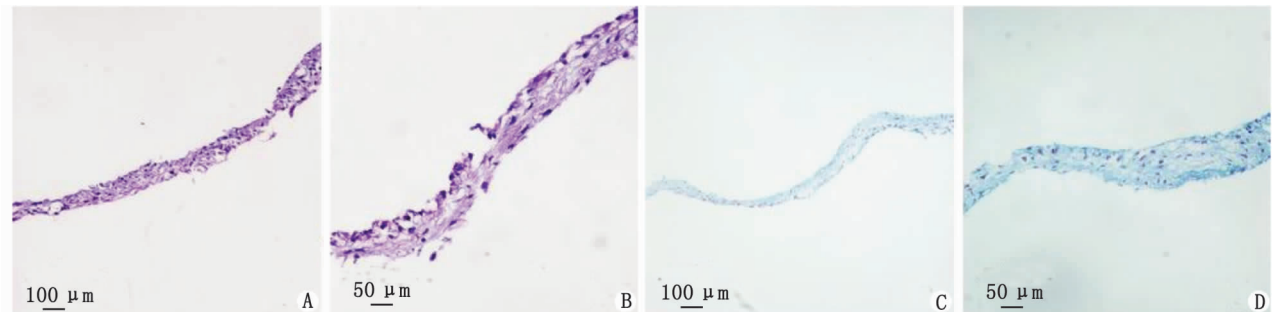
2.4 兔胫骨骨膜细胞膜片组织形态学观察 H-E 染色显示,膜片由多层细胞及丰富的细胞外基质构

成,所获得的细胞膜片厚度较为均一,细胞与细胞间连接紧密(图 4A、B)。Masson 染色显示,胞核为褐色,胶原纤维呈蓝色,细胞间可观察到蓝色的胶原纤维(图 4C、D)。

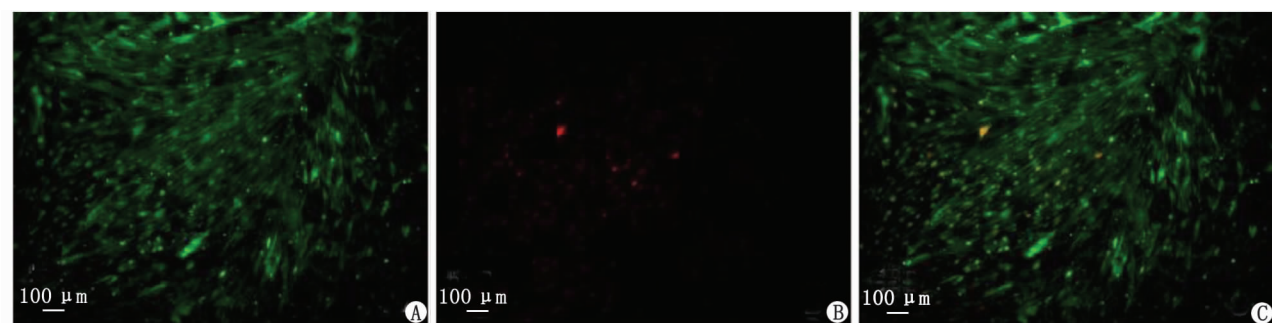
2.5 兔胫骨骨膜细胞膜片活死荧光染色 细胞活死荧光染色结果显示,兔胫骨骨膜细胞膜片主要由绿色荧光的活细胞构成,红色荧光的死细胞较少(图 5)。



A: 大体观; B: 镜下观($\times 100$)。
图 3 兔胫骨骨膜细胞膜片
Fig. 3 Rabbit tibial periosteal cell sheet



A、B: 膜片 H-E 染色(A: $\times 100$, B: $\times 200$); C、D: 膜片 Masson 染色(C: $\times 100$, D: $\times 200$)。
图 4 兔胫骨骨膜细胞膜片组织形态学观察
Fig. 4 Histological observation of the rabbit tibia periosteal cell sheet



A: 活细胞染色; B: 死细胞染色; C: 活死细胞染色。
图 5 兔胫骨骨膜细胞膜片活死荧光染色($\times 100$)
Fig. 5 Live-dead fluorescent staining of rabbit tibia periosteal cell sheet

3 讨 论

现有临床治疗对炎症、创伤等造成的颌面部骨缺损,多采用自体骨或异体骨移植作为常规手段。但这些方法存在诸多问题,比如自体骨的获取可造成供区大范围的损伤以及较大的术后反应;异体骨移植则存在免疫排斥和传染性疾病传播的风险等。细胞膜片技术可通过诱导自体细胞形成富含胞外基质的膜样结构,无需复合支架材料即可用于组织缺损的再生修复^[6-7]。鉴于细胞膜片技术在组织缺损

修复再生的应用前景,本研究通过体外分离培养胫骨骨膜细胞并构建细胞膜片,再对该细胞膜片的生物活性进行初步研究。

骨膜细胞作为颌面部骨缺损修复的种子细胞,具有极大的潜力。首先,骨膜作为骨祖细胞的来源,与骨形成有关^[8]。对于颌面部骨缺损来说,骨膜细胞在生物学上与骨的形成和修复更接近,与骨再生高度相关。其次,骨膜细胞来源丰富,具有自我更新及多向分化能力^[4]。本研究采用酶消化结合组织块法成功分离培养兔胫骨骨膜细胞,其增殖曲线呈

S 型增长,具有克隆形成能力;通过成骨、成脂及成软骨诱导,验证了其具有多向分化能力。

Okano 等^[9]报道使用温敏培养基,通过改变温度可获得完整的细胞膜片。随着科学技术的进步,陆续有报道多种构建细胞膜片的方法,如羊膜基底膜法、磁力组织工程法、pH 反应系统法等。羊膜基底膜法是将细胞接种于羊膜上,在 Transwell 小室中培养获取细胞膜片^[10];磁力组织工程法是将精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸结合磁性阳离子脂质体添加至由亲水性、中性的共价水凝胶层组成的培养皿表面,于培养皿下置磁铁,细胞膜片形成后移去磁铁,利用磁力分离获得细胞膜片^[11];pH 反应系统法是将聚(丙烯酰胺盐酸盐)以及聚(苯乙烯磺酸钠)层层沉积在导电氧化锡电极上组成培养基底,细胞接种于此培养基底上,待细胞膜片形成后,通过降低 pH 值获取细胞膜片^[12]。上述构建膜片的方法由于操作较为复杂,不利于推广应用。而维生素 C 诱导法具有操作简单的特点,对设备无特殊要求,所构建的生物学性能的膜片被广泛使用。

维生素 C 作为胶原脯氨酰羟化酶的辅因子,调节细胞外基质/胶原稳态^[13]。Wei 等^[14]利用维生素 C 成功诱导牙周膜干细胞形成细胞膜片。Horimizu 等^[15]用维生素 C 构建人骨膜膜片,与人富血小板纤维蛋白复合,植入裸鼠颅骨缺损中,显示有新骨的形成。本课题组前期^[16]已成功使用维生素 C 构建骨质疏松大鼠骨髓基质细胞的膜片。本研究采用维生素 C 对兔胫骨骨膜细胞进行培养,成功构建了细胞膜片。H-E 染色及 Masson 染色显示,膜片由多层细胞及细胞外基质构成,膜片厚度均匀。细胞活死荧光染色结果显示,膜片主要由绿色荧光的活细胞构成。

本研究采用维生素 C 诱导法成功构建了骨膜细胞膜片,为利用骨膜细胞膜片修复颌面部骨缺损提供一定的实验依据。尽管如此,对骨膜细胞膜片形成的具体机制尚需要做进一步分析,同时由于骨再生过程调节因素复杂,后续还将通过体内实验,进一步验证骨膜细胞膜片的成骨能力并阐明其骨再生作用机制。相信通过进一步的研究,骨膜细胞膜片将有助于颌面部骨缺损的再生治疗。

参考文献:

[1] Lu Y,Zhang W,Wang J,et al. Recent advances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration: From prepara-

tion to application[J]. *Int J Oral Sci*,2019,11(2):17-30.

[2] Ohki T,Yamato M,Ota M,et al. Endoscopic transplantation of human oral mucosal epithelial cell sheets—World’s first case of regenerative medicine applied to endoscopic treatment[J]. *Gastro-Intest Endosc*,2009,69(3):253-254.

[3] Chen F M,Gao L N,Tian B M,et al. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: A randomized clinical trial[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016,19(7):33.

[4] Hah Y S,Joo H H,Kang Y H,et al. Cultured human periosteal-derived cells have inducible adipogenic activity and can also differentiate into osteoblasts in a perioxisome proliferator-activated receptor-mediated fashion[J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(11):1116-1128.

[5] D’Aquino R,Trovato L,Graziano A,et al. Periosteum-derived micro-grafts for tissue regeneration of human maxillary bone[J]. *J Transl Sci*,2016,2(2):125-129.

[6] Ito M,Shichinohe H,Houkin K,et al. Application of cell sheet technology to bone marrow stromal cell transplantation for rat brain infarct [J]. *J Tissue Engineering and Regenerative Medicine*,2017,11(2):375-381.

[7] Li M,Ma J,Gao Y,et al. Cell sheet technology: A promising strategy in regenerative medicine [J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(1):3-16.

[8] Xiao H,Wang L,Zhang T,et al. Periosteum progenitors could stimulate bone regeneration in aged murine bone defect model[J]. *J Cell Mol Med*,2020,24(20):12199-12210.

[9] Okano T,Yamada N,Sakai H,et al. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide) [J]. *J Biomed Mater Res*,1993,27(10):1243-1251.

[10] Takizawa S,Yamamoto T,Honjo K I,et al. Transplantation of dental pulp-derived cell sheets cultured on human amniotic membrane induced to differentiate into bone[J]. *Oral Dis*, 2019,25(5):1352-1362.

[11] Ito A,Ino K,Kobayashi T,et al. The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (31): 6185-6193.

[12] Guillaume-Gentil O,Semenov O V,Zisch A H,et al. pH-controlled recovery of placenta-derived mesenchymal stem cell sheets[J]. *Biomaterials*,2011,32:4376-4384.

[13] D’Aniello C,Cermola F,Patriarca E J, et al. Vitamin C in stem cell biology: Impact on extracellular matrix homeostasis and epigenetics[J]. *Stem Cells Int*,2017,2017:8936156.

[14] Wei F,Qu C,Song T,et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity [J]. *J Cell Physiol*, 2012,227(9):3216-3224.

[15] Horimizu M, Kubota T, Kawase T, *et al.* Synergistic effects of the combined use of human-cultured periosteal sheets and platelet-rich fibrin on bone regeneration: An animal study[J]. *Clin Exp Dent Res*, 2017, 3(4): 134-141.

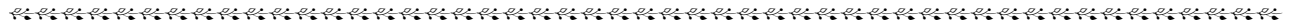
[16] 何梦娇, 江俊, 郑宝玉, 等. 骨质疏松大鼠骨髓基质细胞膜的体外构建研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8): 21-26.

Construction of Rabbit Tibial Periosteal Cell Sheets *in Vitro*

XU Yanmei^{1,2}, ZHUO Jin^{1,2}, XU Xiongcheng^{1,2}, HE Mengjiao^{1,2}, LIN Minkui^{1,2}, LUO Kai^{1,2}, ZHU Lifang³
1. Department of Periodontology, Hospital of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China;
2. Key Laboratory of Oral Diseases, School of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China;
3. Department of Stomatology, Shenzhen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine (Longgang), Shenzhen 518100, China

ABSTRACT: **Objective** To explore the effects of Vitamin C treatment of constructing rabbit tibial periosteal cell sheets *in vitro* and characterize their basic biological characteristics. **Methods** The rabbit tibial periosteal cells were isolated and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. The rabbit tibial periosteal cell sheet formation was observed under an inverted microscope. In order to assess the morphology of cells sheets and extracellular matrix, hematoxylin and eosin (H-E) and Masson staining were employed. The viability of the cell sheet was evaluated by the live and dead cell assay. **Results** Rabbit tibial periosteal cells could be successfully isolated and cultured *in vitro*. The result of CCK8 showed that the growth curve of cells was S-type. Crystal violet staining indicated that periosteal cells culturd *in vitro* had clony formation ability. And it possessed multifunctional differentiation potential. Furthermore, isolated cells could construct the rabbit tibia PCs sheet when incorporated with Vitamin C for 14 days. The constructed rabbit tibial periosteal cell sheets were translucent and composed of film-like structure. H-E and Masson staining showed that the cell sheets were predominant of rabbit tibial periosteal cells and abundant with ECM. When observed with live and dead fluorescence staining, cell sheets were presented with a higher percentage of live cells. **Conclusion** The rabbit tibia periosteal cell sheet can be successfully constructed by utilizing Vitamin C, which could be a novel path for bone defect repair.

KEY WORDS: rabbit tibial; *in vitro* construction; periosteum; cell sheet; extracellular matrix
(编辑:张慧茹)



《福建医科大学学报》

双月刊 CN 35-1192/R 邮发代号 34-66

欢迎投稿

欢迎订阅