

组织工程技术复合修复兔口腔黏膜的实验研究

武欣¹ 祝威¹ 王莘¹ 傅仲鹰¹ 陈玮伦¹ 杨田田¹

[摘要] 目的:探讨骨髓间充质干细胞(BMMSCs)与左旋聚乳酸/丝素蛋白(PLLA/SF)支架复合物修复兔口腔黏膜的可行性,同时评估 PLLA 与 SF 以何种比例混合构建组织工程口腔黏膜支架最理想。方法:分离、培养并鉴定 BMMSCs,将其置于 PLLA 与 SF 的质量配比为 70 : 30(P70S30)PLLA/SF 支架上复合培养 1 周后观察细胞表型有无改变;观察 BMMSCs 与 P70S30 的 PLLA/SF 支架复合物的口腔黏膜移植 1 周后的结构变化;比较细胞与支架复合物组、单纯支架组、创面自然修复组的创面愈合率。结果:①PLLA/SF 支架对 BMMSCs 的细胞表型无明显影响;②BMMSCs 与 P70S30 的 PLLA/SF 支架复合物口腔黏膜移植 1 周后与创面的融合较好;③以 PLLA 与 SF 的质量配比为 70 : 30 的复合物组愈合率最高,平均愈合率为 94.8%,与创面自然修复组及单纯支架组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:①BMMSCs 与 PLLA/SF 支架复合物具有构建理想的组织工程口腔黏膜的潜力;②PLLA 与 SF 的质量配比为 70 : 30 时最利于口腔黏膜创面的愈合,构建理想的组织工程口腔黏膜的潜力最大。

[关键词] 口腔黏膜修复;骨髓间充质干细胞;左旋聚乳酸;丝素蛋白

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.22.009

[中图分类号] R392.2 **[文献标志码]** A

Repairmen of the rabbit's oral mucosa by tissue engineering technology

WU Xin ZHU Wei WANG Ping FU Zhongying CHEN Weilun YANG Tiantian

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun, 130000, China)

Corresponding author: ZHU Wei, E-mail: zhuwei30000@163.com

Abstract Objective: This experiment proposed to complicate BMMSCs and PLLA/SF scaffolds, to study its repairing ability for rabbit oral mucosa wound, and try to evaluate the most potential mixed proportion of PLLA and SF for tissue engineering. **Method:** Separating, cultivating and identifying BMMSCs. Observing cell phenotype of BMMSCs after cultivating BMMSCs in P70S30 PLLA/SF scaffold for one week. Observing the structure change of BMMSCs and P70S30 PLLA/SF scaffold complexes after oral mucosa transplantation experiment for a week; Comparing the wound healing rate of composite of BMMSCs and PLLA/SF scaffold, PLLA/SF scaffold and nature repair. **Result:** ① There wasn't a significant effect of PLLA/SF scaffold on cell phenotype of BMMSCs. ② The wounds fused well with the oral mucosa transplanted composite of BMMSCs and P70S30 PLLA/SF scaffold after a week. ③ The healing rate of composite of BMMSCs and P70S30 scaffold was the highest. The average healing rate of composite of BMMSCs and P70S30 scaffold was 94.8%, whose difference was statistically significant compared with natural healing and pure scaffold ($P < 0.01$). **Conclusion:** ① The complex composed of BMMSCs and PLLA/SF scaffolds has the potential as an ideal scaffold for tissue engineering oral mucosa. ② The complex composed of BMMSCs and P70S30 PLLA/SF scaffolds is the most beneficial to wound healing of oral mucosa, and has the greatest potential for constructing tissue engineering oral mucosa.

Key words oral mucosal repairment; bone marrow mesenchymal stem cell; poly-left-lactic acid; silk fibroin

因疾病、创伤等原因所致的口腔黏膜大面积缺损是耳鼻咽喉头颈外科医生常需要面对的棘手问题。目前的研究结果证实,应用组织工程技术在具有健全免疫功能的高等哺乳动物体内,可完全再生接近正常组织结构的皮肤、骨、软骨与肌腱等组织,同时重建受损组织的功能^[1-5]。左旋聚乳酸(poly-left-lactic acid, PLLA)和丝素蛋白(silk fibroin, SF)的性能优良,生物相容性好。干细胞是目前公认的最为理想的组织工程细胞来源之一,作为干细

胞中一员的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)在促进创面愈合方面有良好的应用前景^[6-13]。本研究组已率先通过对 PLLA/SF 支架进行全身过敏反应试验、急性毒性试验、溶血试验、热原试验,证实 PLLA/SF 支架具有良好的生物相容性,PLLA 与 SF 的质量配比为 70 : 30(P70S30)时最有利于 BMMSCs 在其上生长;并通过皮下植入试验及口腔黏膜植入试验证实 PLLA/SF 支架未引起排斥反应,与周围组织融合较好。本实验率先通过体内试验,研究将 BMMSCs 与 PLLA/SF 支架复合,用于修复兔口腔黏膜创面,并尝试构建理想的组织工程口腔黏

¹ 吉林大学第一医院耳鼻咽喉-头颈外科(长春,130000)
通信作者:祝威, E-mail: zhuwei30000@163.com

膜,同时评估 PLLA 与 SF 以何种比例混合构建组织工程支架最具潜力。

1 材料与方法

1.1 BMMSCs 的分离、培养及鉴定

①分离:用 75%乙醇给刚出生 1 d 的新西兰白兔进行消毒,剪取其大腿骨,使其骨肉达到完全分离的状态,掰断其一端的软骨,另一端用剪刀剪断,再用抽取了 L-DMEM 培养液的注射器针头注入掰断的骨头端,将 BMMSCs 冲洗到培养瓶内。②培养:培养于湿度适当、37℃、浓度为 5%的 CO₂ 培养箱,第 2 天换液,除去培养液及未贴壁细胞,用新鲜 L-DMEM 培养液取代,在之后的实验中隔天换液,细胞约 10 d 会长满整个培养皿。③鉴定:通过免疫荧光染色的方法将 BMMSCs 接种于一次性 35 mm 的培养皿内(密度为 2×10⁵ 个/ml),培养于湿度适当、37℃、浓度为 5%的 CO₂ 培养箱中,隔天换液,BMMSCs 约 10 d 会长满整个培养皿。除去培养液,Hanks 溶液连续 2 次洗涤,使用 4%多聚甲醛将其固定 30 min,在 BMMSCs 中加入 0.1 mmol/L PBS 液,于摇床上连续 3 次清洗,15 min/次;加浓度为 0.1%的 Triton X-100 进行 15 min 操作,浓度为 5%的山羊血清进行 1 h 封闭处理,然后分别加一抗(1:200 稀释,1:00 Rabbit anti-CD105)、一抗(1:200 稀释,1:200 Rabbit anti-CD44),并在抗体的稀释液内加 HOECHST 染料,保存于 4℃过夜,通过 0.1 mmol/L PBS 液连续 3 次洗涤,15 min/次。然后加二抗(1:400,Alexa Fluor555 羊抗兔的 IgG),避光保存于室温 1 h,再一次使用 0.1 mmol/L PBS 液进行洗涤,最后通过甘油封片。

1.2 PLLA/SF 支架使用前的预处理

由吉林大学化学学院提供 PLLA/SF 支架材料。操作步骤为:将支架材料制作成和 24 孔、96 孔培养板的大小一致的圆形小块,置于一次性的培养皿内,打开盖,使用紫外线直接照射,30 min/面,合计操作 1 h。照射完成后,将其浸泡在浓度为 75%乙醇内 30 min,利用 Hanks 溶液连续 3 次清洗,15 min/次。充分灭菌之后将支架材料取出,分别置于一次性 24 孔板、96 孔板中,然后浸泡于 L-DMEM 培养液保存过夜,培养于湿度适当、37℃、浓度为 5%的 CO₂ 培养箱中。

1.3 BMMSCs 在 PLLA/SF 支架上复合培养后的细胞表型改变观察

采用免疫荧光检测方法测定生长于 PLLA/SF 支架上的 BMMSCs 是否表达特异的细胞标记蛋白。如果接种于 PLLA/SF 复合纤维支架上的 BMMSCs 表面表达 CD44 和 CD105 抗原,则表明 PLLA/SF 复合纤维支架对 BMMSCs 的细胞表型

无明显影响。

1.4 通过体内植入试验对 BMMSCs 与 P70S30 PLLA/SF 支架复合物的生物相容性及修复兔口腔黏膜创面的效果进行评估

①将 BMMSCs 与 P70S30PLLA/SF 支架组成的复合物缝合于新西兰白兔口腔黏膜创面处,1 周后取包裹了移植物的组织,行组织固定、包埋、切片及苏木精-伊红染色,观察复合物的生物相容性。②创面愈合率统计。实验过程:将雄性新西兰白兔随机抽取 3 只,雌性新西兰白兔随机抽取 3 只组成一组,共分为 7 组(第 1 组:P70S30 支架与细胞复合物组;第 2 组:P60S40 支架与细胞复合物组;第 3 组:P50S50 支架与细胞复合物组;第 4 组:单纯 P70S30 支架组;第 5 组:单纯 P60S40 支架组;第 6 组:单纯 P50S50 支架组;第 7 组:自然修复创面组),分别用涂料标记。腹腔注射 10%水合氯醛麻醉,剂量为 3 ml/kg,通过兔四肢松软无力;角膜反射消失判断麻醉生效后取兔仰卧位,将兔的四肢固定在板上,头后仰,将兔的牙齿及舌上下悬吊固定,先后以 2%碘酒及 75%乙醇消毒兔口腔黏膜,铺无菌单。在无茵条件下,对禁食、禁水 12 h 的新西兰白兔口腔黏膜两侧各人为制造一直径 1 cm 的创面,对第 1~3 组,将体外培养的刚出生 1 d 的新西兰白兔的 BMMSCs 置入 PLLA/SF 支架组成复合物,并将该复合物缝合于新西兰白兔口腔黏膜创面处;对第 4~6 组,将支架缝合于新西兰白兔口腔黏膜创面处。对新西兰白兔继续禁食、禁水,每天进行观察并静脉点滴含有青霉素的生理盐水和葡萄糖。缝合 1 周后,给 7 组动物的创面摄片,将创面照片输入计算机,应用 DP2-BSW 显微图像控制及分析软件进行分析,计算创面愈合率。创面愈合率=(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积×100%。

1.5 统计分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。数据组间比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMMSCs 的分离、培养及鉴定和 BMMSCs 与 PLLA/SF 支架复合后的细胞表型变化结果

将 BMMSCs 接种到培养皿 7 d 后,在倒置显微镜下可以看到大部分细胞贴壁且成鱼群状。通过用抗体 CD105 和抗体 CD44 对原代培养的 BMMSCs 所做鉴定的图片可以判断,此次培养的细胞为 BMMSCs。采用免疫荧光检测方法测定生长于 PLLA/SF 支架上的 BMMSCs 表面 CD44 和 CD105 表达阳性,证实 PLLA/SF 支架对 BMMSCs 的细胞表型无明显影响。见图 1。

2.2 BMMSCs 与 PLLA/SF 支架组成的复合物的口腔黏膜植入实验结果

BMMSCs 与 P70S30 PLLA/SF 支架组成的复合物体内植入后,可以看到复合物与创面的融合较好,1 周后看到 PLLA/SF 支架材料有所降解,口腔创面有所愈合,无明显炎症反应加重,支架周围及支架降解部分有纤维结缔组织生长。见图 2。

2.3 愈合率统计学分析

BMMSCs 与 PLLA/SF 支架材料组成的复合物组愈合率高,其中以 PLLA 与 SF 的质量配比为 70 : 30 的复合物组愈合率最高,平均愈合率为 94.8%,PLLA 与 SF 的质量配比为 60 : 40 的复合物组平均愈合率为 90.7%,PLLA 与 SF 的质量配比为 50 : 50 的复合物组平均愈合率为 89.5%,PLLA 与 SF 的质量配比分别为 70 : 30、60 : 40 和 50 : 50 的单纯支架组对应的平均愈合率分别为 87.8%、85.4%和 83.6%,创面自然愈合组平均愈合率为 82.4%,PLLA 与 SF 的质量配比为 70 : 30 的复合物组愈合率较创面自然修复组及单纯支架组差别有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3。

3 讨论

组织工程学应用工程学与生命科学的原理和技术,在对哺乳动物正常与病理状态下结构和功能关系的正确认识的基础上,研究并开发相应生物替代物,用于恢复、改善受损组织及器官的形态结构和功能,从而重建缺损的组织器官,提高医学水平,保护人民健康^[1-3]。PLLA/SF 复合组织工程支架材料的物理性质和化学性质都是可控的,且理化性能优于各单一材料。这些优良的生物学性能和理化性质,使得 PLLA/SF 复合组织工程支架材料在应用于临床修复及作为改性材料方面潜力很大。作为干细胞中一员的 BMMSCs 因不存在道德伦理问题,且具有来源稳定、取材方便、体外培养增殖力强、自我更新能力强、具有多向分化潜能、细胞表型稳定、机体免疫耐受性高、可植入性和无致瘤性等特征,使其在修复及重建组织与器官中表现出了巨大潜力,是理想的种子细胞之一^[6-13]。

生物相容性和修复效果是组织工程组织器官修复的关键性问题。本课题组已对 PLLA/SF 复合支架的制备方法、生物相容性和理化性能进行了初步研究,证实 PLLA/SF 支架未引起全身过敏反应、急性毒性反应、溶血、发热反应及排斥反应;BMMSCs 在 PLLA 与 SF 的质量配比为 70 : 30 的复合纤维支架材料上的细胞增殖速率最快。BMMSCs 在支架上生长状态良好,细胞表型无明显变化。本实验结果显示,P70S30 的 PLLA/SF 支架与周围组织融合较好,修复黏膜创面愈合率最高,分析可能与 PLLA 和 SF 以 70 : 30 的质量配

比制备出的支架的理化性状与其他质量配比制备的支架不同有关:① P70S30 支架较 P60S40 和 P50S50 纤维直径大。② P70S30 支架的孔隙率最大。P70S30 支架纤维直径最大,孔隙率最高,能为细胞的长入和黏附提供更理想的环境,因此对细胞生长、与周围组织融合及创面修复更有利。总之,BMMSCs 与 P70S30 PLLA/SF 支架材料组成的复合物构建理想的组织工程口腔黏膜的潜力最大。

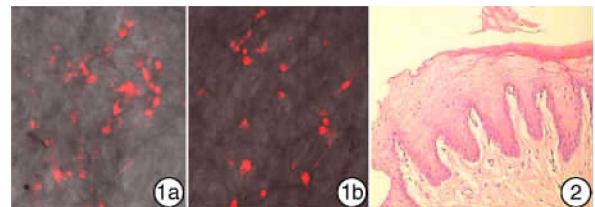


图 1 BMMSCs 图片 1a:CD44 鉴定的 BMMSCs 图片(×400);1b:CD105 鉴定的 BMMSCs 图片(×400);图 2 P70S30 载有 BMMSCs 的 PLLA/SF 支架组的苏木精-伊红染色结果(×20)

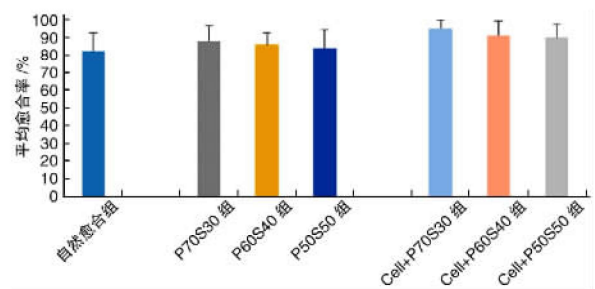


图 3 各组创面平均愈合率($n=6$)

参考文献

- [1] SLOFF M, SIMAIOFORIDIS V, DE VRIES R, et al. Tissue engineering of the bladder—reality or myth. A systematic review[J]. J Urol, 2014, 192: 1035—1042.
- [2] YAO D, LIU H, FAN Y. Silk scaffolds for musculoskeletal tissue engineering[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2016, 241: 238—245.
- [3] HOGAN M V, KAWAKAMI Y, MURAWSKI C D, et al. Tissue engineering of ligaments for reconstructive surgery[J]. Arthroscopy, 2015, 31: 971—979.
- [4] SHAMLOO A, MOHAMMADALIHA N, MOHS-ENI M. Integrative utilization of microenvironments, biomaterials and computational techniques for advanced tissue engineering[J]. J Biotechnol, 2015, 212: 71—89.
- [5] LANGER R, VACANTI J. Advances in tissue engineering[J]. J Pediatr Surg, 2016, 51: 8—12.
- [6] PARK D, LIM J, PARK J Y, et al. Concise review: stem cell microenvironment on a chip: current technologies for tissue engineering and stem cell biology[J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4: 1352—1368.

(下转第 1789 页)

- approach to spontaneous temporal bone cerebrospinal fluid leaks; hearing improvement and success of repair [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2014, 150: 472—478.
- [15] BOO S H, GOH Y B, HAN C S. Repair of spontaneous cerebrospinal fluid otorrhea from defect of middle cranial fossa[J]. *Korean J Audiol*, 2013, 17: 148—151.
- [16] SON H J, KARKAS A, BUCHANAN P, et al. Spontaneous cerebrospinal fluid effusion of the temporal bone; repair, audiological outcomes, and obesity[J]. *Laryngoscope*, 2014, 124: 1204—1208.
- [17] JUNET P, BERTOLO A, SCHMERBER S. Spontaneous osteo-dural fistulae of petrous bone posterior wall[J]. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2013, 130: 341—343.
- [18] BROWN N E, GRUNDFAST K M, JABRE A, et al. Diagnosis and management of spontaneous cerebrospinal fluid-middle ear effusion and otorrhea[J]. *Laryngoscope*, 2004, 114: 800—805.
- [19] 朱学伟,丛贾囡,朱冬冬,等.经乳突联合中颅窝径路修补自发性脑脊液耳漏二例[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 48(6): 514—515.
- [20] NEELY J G, NEBLETT C R, ROSE J E. Diagnosis and treatment of spontaneous cerebrospinal fluid otorrhea[J]. *Laryngoscope*, 1982, 92: 609—612.
- [21] KIM S W, CHOI J H. Cerebrospinal fluid otorrhea caused by arachnoid granulation[J]. *Korean J Audiol*, 2012, 16: 152—155.
- [22] ALLEN K P, PEREZ C L, KUTZ J W, et al. Elevated intracranial pressure in patients with spontaneous cerebrospinal fluid otorrhea[J]. *Laryngoscope*, 2014, 124: 251—254.
- [23] VIVAS E X, MCCALL A, RAZ Y, et al. ICP, BMI, surgical repair, and CSF diversion in patients presenting with spontaneous CSF otorrhea[J]. *Otol Neurotol*, 2014, 35: 344—347.
- [24] NELSON R F, HANSEN K R, GANTZ B J, et al. Calvarium thinning in patients with spontaneous cerebrospinal fluid leak[J]. *Otol Neurotol*, 2015, 36: 481—485.
- [25] 杨大海,倪道凤,徐春晓,等.自发性脑脊液耳漏的诊治[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2009, 16(2): 62—64.
- [26] DANESHI A, AJALLOUEYAN M, GHASEMI M M, et al. Complications in a series of 4400 paediatric cochlear implantation[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2015, 79: 1401—1403.
- [27] GONEN L, HANDZEL O, SHIMONY N, et al. Surgical management of spontaneous cerebrospinal fluid leakage through temporal bone defects—case series and review of the literature[J]. *Neurosurg Rev*, 2016, 39: 141—150.

(收稿日期:2016-08-11)

(上接第 1784 页)

- [7] VAPNIARSKY N, ARZI B, HU J C, et al. Concise review: human dermis as an autologous source of stem cells for tissue engineering and regenerative medicine [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4: 1187—1198.
- [8] COSSON S, OTTE E A, HEZAVEH H, et al. Concise review: tailoring bioengineered scaffolds for stem cell applications in tissue engineering and regenerative medicine [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4: 156—164.
- [9] PASCHOS N K, BROWN W E, ESWARAMOORTHY R, et al. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9: 488—503.
- [10] ZHAO Y, WALDMAN S D, FLYNN L E. Multilineage co-culture of adipose-derived stem cells for tissue engineering [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9: 826—837.
- [11] DANG P N, DWIVEDI N, PHILLIPS L M, et al. Controlled dual growth factor delivery from microparticles incorporated within human bone marrow-derived mesenchymal stem cell aggregates for enhanced bone tissue engineering via endochondral ossification [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5: 206—217.
- [12] ABDUL RAHMAN R, MOHAMAD SUKRI N, MD NAZIR N, et al. The potential of 3-dimensional construct engineered from poly(lactic-co-glycolic acid)/fibrin hybrid scaffold seeded with bone marrow mesenchymal stem cells for in vitro cartilage tissue engineering [J]. *Tissue Cell*, 2015, 47: 420—430.
- [13] WANG P, LIU X, ZHAO L, et al. Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium [J]. *Acta Biomater*, 2015, 18: 236—248.

(收稿日期:2016-06-01)