

# SDF-1 $\alpha$ 复合 Pluronic F-127 的构建及其对 BMSCs 的体外生物效应研究

田甜<sup>1</sup>, 程继光<sup>2</sup>, 周健<sup>1</sup>

**摘要** 目的 构建装载基质细胞衍生因子-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) 的 Pluronic F-127 新型复合材料, 并研究其对骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的体外生物效应。方法 构建装载不同浓度 SDF-1 $\alpha$  (200、50 ng/ml) 的 Pluronic F-127 复合水凝胶, 采用 Transwell 小室进行复合水凝胶对 BMSCs 的体外趋化实验。将 BMSCs 与复合材料均匀混合, 加成骨细胞诱导液进行培养, 并对其行碱性磷酸酶 (AKP) 活性测定及茜素红染色, 由结果可观察到 BMSCs 的成骨诱导分化情况, 并用 MTT 法检测复合培养后细胞的活性状况。结果 趋化实验结果显示, 含 SDF-1 $\alpha$  浓度为 200 ng/ml 的复合水凝胶对 BMSCs 的募集效果显著 ( $P < 0.05$ )。MTT 法证实了 Pluronic F-127 对细胞增殖不产生影响 ( $P > 0.05$ )。BMSCs-复合材料、单纯 BMSCs 在成骨诱导培养条件下, 两组细胞的 AKP 表达量均明显增高, 并且都高于非成骨诱导组 ( $P < 0.05$ ), 同时诱导组镜下可见明显的钙结节形成。结论 成功构建装载 SDF-1 $\alpha$  的 Pluronic F-127 新型复合材料, 其在体外对 BMSCs 有明显的趋化作用, 在细胞材料复合培养的三维支架中, BMSCs 能够存活并被成功诱导分化为成骨细胞。

**关键词** 基质细胞衍生因子-1 $\alpha$ ; Pluronic F-127 水凝胶; 骨髓间充质干细胞; 成骨诱导分化

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1096-04

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有多向分化能力, 被认为是最具潜能的种子细胞<sup>[1]</sup>。基质细胞衍生因子-1 $\alpha$  (stromal cell derived factor-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ ) 可通过其受体 CXCR4 对 BMSCs 起活化迁移的作用, 在众多的细胞因子/趋化因子中, SDF-1 $\alpha$  对 BMSCs 的归巢和定位尤为重要<sup>[2-3]</sup>。SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 轴对 BMSCs 迁移至骨折部位起着关键作用, 并且募集到骨折部位的细

胞可积极地参与软骨内的骨修复<sup>[4]</sup>。然而, 骨缺损处相对较低的骨再生能力限制了骨的再生数量<sup>[5]</sup>, 并且骨的再生修复主要取决于其募集的干细胞数量。因此, 增加骨损处 SDF-1 $\alpha$  的表达对其募集 BMSCs 以及骨损修复都起着关键作用。现通过构建复合 SDF-1 $\alpha$  的 Pluronic F-127 水凝胶, 探讨其在体外条件下对 BMSCs 的募集能力和促成骨作用, 期为应用细胞复合材料进行骨缺损的组织工程修复研究提供新的途径和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SD 大鼠, 清洁级, 4~6 周龄, 体重 60~80 g, 雌雄不限, 由安徽医科大学实验动物中心提供。

**1.1.2 仪器与试剂** 恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司); 自动酶标仪 (美国 Bio-tek 公司); 荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司); 大鼠 SDF-1 $\alpha$  (以色列 ProSpecbio 公司); 低糖型 DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 和胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司);  $\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松、维生素 C、MTT 和 Pluronic F-127 (美国 Sigma 公司); Transwell 小室 (美国 Costar 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京原平皓生物技术有限公司); 碱性磷酸酶试剂盒 (南京建成生物工程有限公司); 茜素红 (上海三爱思试剂公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠 BMSCs 的分离和培养** 取 4~6 周龄, 体重约 80 g 的 SD 大鼠。无菌条件下剥离双侧股骨和胫骨, 冲出骨髓, 采用全骨髓贴壁培养法, 分离培养 BMSCs 至第 3 代, 并对其行 PI/AO 染色以观察细胞的活性状况和形态。

**1.2.2 Pluronic F-127 水凝胶的配制及其与 SDF-1 $\alpha$  的复合** 将 Pluronic F-127 粉末与低糖 DMEM 不完全培养基以质量分数为 25% 的比例混合配制, 置于 4℃ 冰箱内, 至絮状白色颗粒完全消失。之后经 0.22  $\mu$ m 的滤器过滤于 4℃ 保存。冰浴下, 将不等量的 SDF-1 $\alpha$  分别滴入 Pluronic F-127 溶液中混匀, 使配制的复合液中 SDF-1 $\alpha$  浓度分别为 200、50 ng/ml, 以 2.5

2014-02-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81070864)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 口腔颌面外科, 合肥 230032

作者简介: 田甜, 女, 硕士研究生;

周健, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zj@ahmu.edu.cn

ml 注射器抽取复合液置于 4 °C 保存备用。

**1.2.3 复合 SDF-1 $\alpha$  水凝胶对 BMSCs 的体外趋化作用** 采用 Transwell 小室趋化实验,检测体外条件下,复合 SDF-1 $\alpha$  水凝胶对大鼠 BMSCs 的趋化作用。实验组分两组,在其中一组的趋化体系下层放入 0.1 ml 含 SDF-1 $\alpha$  浓度为 200 ng/ml 的复合水凝胶,另一组则放入 0.1 ml 含 SDF-1 $\alpha$  浓度为 50 ng/ml 的复合水凝胶,两组体系下层均添加 0.4 ml 含 10% FBS 的培养基,对照组体系下层为单纯 0.5 ml 含 10% FBS 的培养基,各组均覆以孔径 8  $\mu$ m 的微孔聚碳酸酯滤膜,各组体系上层均加入 0.2 ml 含 10% FBS 的培养基,其中 BMSCs 浓度约  $5 \times 10^4$ /ml,每组 3 孔,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,10 h 后取出滤膜并刮去上层表面细胞,PBS 冲洗 3 次,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,倒置显微镜( $\times 400$  倍)下选 6 个随机视野观察、计数,将结果进行统计学分析。

**1.2.4 Pluronic F-127 凝胶的细胞毒性检测** 将第 3 代 BMSCs 消化、1 000 r/min 离心 3 min。实验组:细胞与 Pluronic F-127 溶液复合,细胞浓度调至  $8 \times 10^4$ /ml,每孔 200  $\mu$ l 接种于 48 孔板,放于 37 °C 培养箱待凝胶形成。对照组:取 200  $\mu$ l BMSCs 接种于 48 孔板,密度与实验组相同。两组均加 10% FBS 的培养基培养,分别于接种后的第 1、3、5、7 天各取 6 孔采用 MTT 法检测其吸光值(optical density, OD)。

**1.2.5 复合水凝胶三维培养 BMSCs 并诱导成骨分化** 取第 3 代 BMSCs 消化、1 000 r/min 离心 3 min。实验 A 组:冰浴下,将细胞重悬于含 SDF-1 $\alpha$  浓度为 200 ng/ml 的复合水凝胶,吹打混匀使细胞较均匀分布于复合材料中,调节细胞浓度约为  $5 \times 10^4$ /ml,将 BMSCs-复合材料混合液加入 24 孔板,每孔 300  $\mu$ l,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中,待凝胶形成,每孔加 700  $\mu$ l 含 10% FBS 的培养基。实验 B 组:细胞浓度为  $5 \times 10^4$ /ml,每孔 300  $\mu$ l 接种于 24 孔板,并加 700  $\mu$ l 含 10% FBS 的培养基。两组均培养 24 h 后,更换成骨细胞诱导液(含 10 mmol/L 的  $\beta$ -甘油磷酸钠、100 mmol/L 的地塞米松、0.05 g/L 的维生素 C、10% FBS、低糖 DMEM)进行培养。对照组情况同实验 B 组,培养基选用含 10% FBS 的培养基,不加成骨诱导液。分别于成骨诱导后的第 7、14 天,3 组各取 3 孔内细胞进行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)检测,用 BCA 法测定出各样本中的蛋白浓度,按 AKP 试剂盒说明书计算出样本产生 AKP 的量。并于诱导后 14 d 进行茜素红染色。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,将各组样本进行单因素方差分析,检验水准取  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 BMSCs 的体外培养** BMSCs 分离培养 24 h 后半换液,倒置显微镜下显示已有细胞贴壁,3~5 d 后细胞形态呈现多样:如纺锤形、多角形、梭形。约 14 d 细胞融合率达约 90%,可进行传代,传代后细胞形态逐渐趋向一致,主要为大而扁的梭形。PI/AO 染色结果显示细胞呈现明亮的绿色荧光,胞核清晰,细胞形态多为梭形,见图 1。

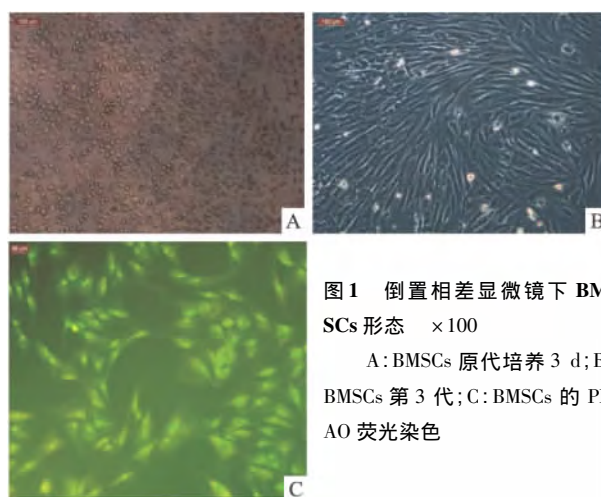


图 1 倒置相差显微镜下 BMSCs 形态  $\times 100$

A: BMSCs 原代培养 3 d; B: BMSCs 第 3 代; C: BMSCs 的 PI/AO 荧光染色

**2.2 含不同浓度 SDF-1 $\alpha$  的复合水凝胶对 BMSCs 的趋化测定** 将实验组和对照组迁移的 BMSCs 统计结果进行方差分析( $n = 18$ ,  $\bar{x} \pm s$ ),结果显示:3 组的细胞迁移数分别为:  $30.333 \pm 8.051$ 、 $20.111 \pm 4.575$ 、 $11.222 \pm 3.735$ ,组间  $F = 49.536$ ,根据分析结果 LSD 可知,相比含 SDF-1 $\alpha$  50 ng/ml 复合水凝胶组和对照组,含 SDF-1 $\alpha$  200 ng/ml 复合水凝胶组对 BMSCs 有明显的趋化效果( $P < 0.05$ ),在两实验组中,又以含 SDF-1 $\alpha$  200 ng/ml 复合水凝胶组趋化效果较佳( $P < 0.05$ ),见图 2。

**2.3 MTT 法测定细胞在 Pluronic F-127 凝胶中的增殖** 随着时间的延长,两组细胞测定的 OD 值均逐渐增高,在 7 d 时达到最大。在 1、3、5、7 d 各时间点,将两组的 OD 值进行单因素方差分析,结果显示: $F$  值分别为 0.000、1.122、0.153、0.439,由分析结果 LSD 得出各时间点两组 OD 值差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

**2.4 BMSCs 在复合水凝胶中诱导成骨分化的 AKP 检测** 结果显示,实验组与对照组的 AKP 在

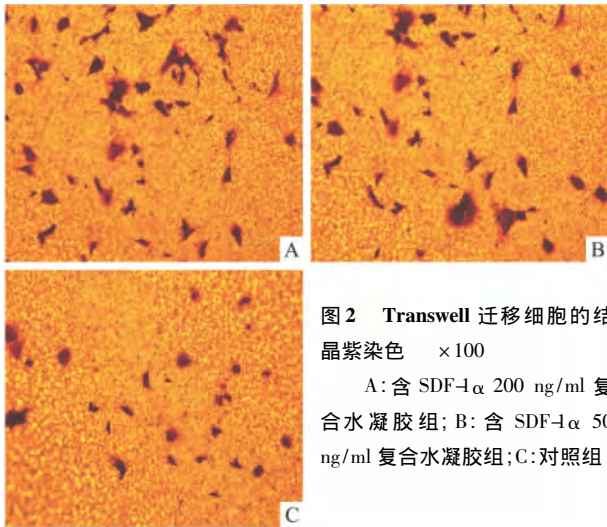


图2 Transwell 迁移细胞的结晶紫染色 ×100  
A: 含 SDF-1 $\alpha$  200 ng/ml 复合水凝胶组; B: 含 SDF-1 $\alpha$  50 ng/ml 复合水凝胶组; C: 对照组

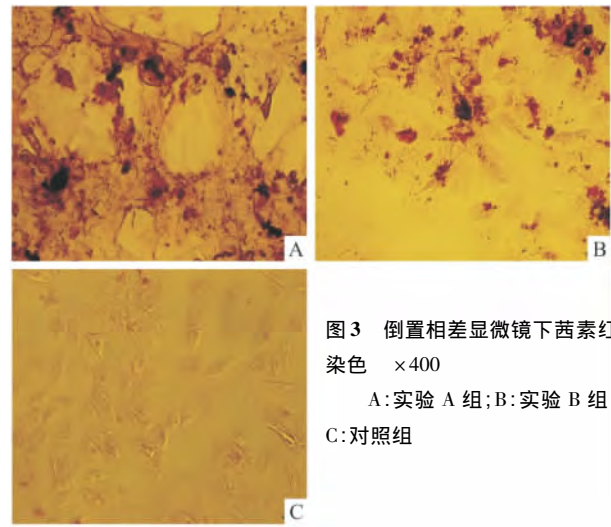


图3 倒置相差显微镜下茜素红染色 ×400  
A: 实验 A 组; B: 实验 B 组; C: 对照组

表1 MTT 法检测 BMSCs 在 Pluronic F-127 中的增殖 ( $n=6 \bar{x} \pm s$ )

组别	接种后培养时间(d)			
	1	3	5	7
实验	0.217 ± 0.124	0.492 ± 0.117	0.686 ± 0.131	0.904 ± 0.172
对照	0.216 ± 0.062	0.548 ± 0.100	0.718 ± 0.197	0.956 ± 0.150

诱导过程中的表达均逐渐增高,14 d 内呈增高趋势。将各组 AKP 数值进行组间单因素方差分析,在诱导 7 d 时,组间  $F = 121.188$ ,LSD 结果显示实验 A、B 两组的 AKP 表达在 7 d 时差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );在 14 d 时组间  $F = 25.810$ ,LSD 结果显示 A 组 AKP 表达高于 B 组 ( $P < 0.05$ )。实验 A、B 两组 AKP 的表达在 7、14 d 均明显高于未加诱导液的对照组 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表2 实验 A、B 组与对照组 AKP 的表达比较 ( $U/gprot n=6 \bar{x} \pm s$ )

组别	接种后培养时间(d)	
	7	14
实验 A	7.866 ± 0.796*	17.099 ± 3.834*#
实验 B	7.407 ± 0.223*	10.915 ± 0.383*
对照	3.883 ± 0.146	7.993 ± 0.477

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与实验 B 组比较: #  $P < 0.05$

2.5 矿化结节茜素红染色 诱导培养 14 d 后,进行茜素红染色,显微镜下,实验 A、B 组的细胞均可见橘红色钙结节团块,其形态、大小不等。而未加成骨诱导液的对照组则未见钙结节的形成,见图 3。

### 3 讨论

本研究的目的在于构建一种可释放 SDF-1 $\alpha$  的复合水凝胶,作为有生物活性的支架材料,并评价其对 BMSCs 的募集和促分化作用。假定装载 SDF-1 $\alpha$  的水凝胶可诱导 BMSCs 的募集,并因此增强了骨缺

损位点的骨再生,为了达到这个目的,通过物理吸附的作用,不同浓度的 SDF-1 $\alpha$  可被装载到水凝胶中,从而使获得的复合材料在体外可对 SDF-1 $\alpha$  进行缓释并对 BMSCs 募集增加,随后可进行体外材料细胞共同培养的实验。本研究显示 Pluronic F-127 可作为 SDF-1 $\alpha$  的有效载体,提供一个可控制 SDF-1 $\alpha$  释放的空间。此外,装载 SDF-1 $\alpha$  的 Pluronic F-127 在体外能明显引起 BMSCs 的募集,其对 BMSCs 的募集由实验结果看与装载 SDF-1 $\alpha$  浓度相关,但是否存在剂量依赖性,则依赖进一步研究明确。

SDF-1 按照其氨基酸序列可归为趋化因子 CXC 亚家族成员,又称为 CXCL12,包括 SDF-1 $\alpha$  和 SDF-1 $\beta$  两种,SDF-1 $\beta$  比 SDF-1 $\alpha$  多了 4 个氨基酸。人源性 SDF-1 基因位于 10 号染色体长臂,其种群间保守性极强,可在心、脑、肝、骨骼肌等组织中表达,与其受体 CXCR4 特异性结合形成 SDF-1/CXCR4 轴,从而发挥生物学效应。CXCR4 是一种 7 次跨膜的 G 蛋白藕连受体,广泛表达于 CD34<sup>+</sup> 细胞及炎症细胞表面。

SDF-1/CXCR4 轴可对 CD34<sup>+</sup> 细胞及循环淋巴细胞进行定向性诱导迁移,对造血、神经系统发育及干细胞运动、肿瘤发生等产生重要的生物学作用。不仅如此,SDF-1/CXCR4 轴还与血管再生关系密切,其可募集骨髓源性的干/祖细胞并能诱导细胞分泌血管生成因子,从而促进血管新生<sup>[6]</sup>,此外,SDF-1 还可与内皮祖细胞膜表面受体 CXCR4 结合,诱导成熟或不成熟的祖细胞动员,参与血管的生成<sup>[7]</sup>。

Pluronic F-127 是一种非离子表面活性共聚物 (PEO-PPO-PEO),由聚氧乙烯 (PEO) 与聚氧丙烯 (PPO) 组成,具有温度依赖性变化的物理特性并可重复发生,在体内约 6 周可完全降解吸收,无明显的

免疫排斥反应等特点。作为细胞支架,Pluronic F-127 在组织工程中已广泛应用于软骨、皮肤等的构建。本实验表明 Pluronic F-127 与 BMSCs 之间的生物相容性良好, BMSCs 在复合 SDF-1 $\alpha$  水凝胶三维支架中的生长、增殖也较为稳定,在此基础上本实验将 BMSCs 成功诱导分化为成骨细胞,由此,可设想为干细胞工程治疗骨损的研究提供新的思路和方法。但在同时,本研究显示 Pluronic F-127 强度较差,降解速度较快,这给体外实验的进行增加了较大的难度,这些不足在一定程度上限制了其作为骨修复材料的使用。

本研究表明装载 SDF-1 $\alpha$  的 Pluronic F-127 新型复合材料,对 BMSCs 具有募集和诱导成骨分化的能力,通过改善骨创部位的微环境,来促进内源性 BMSCs 在损伤部位的募集,参与骨缺损修复,为新型颌面骨修复材料的制备提供实验依据,最终达到治疗骨、软骨缺损的目的。然而,复合 SDF-1 $\alpha$  水凝胶对 SDF-1 $\alpha$  的释放规律以及细胞-复合凝胶共同培养的具体机制并不明确,还需进一步的深入研究。

## 参考文献

- [1] Fong E L S, Chan C K, Goodman S B. Stem cell homing in musculoskeletal injury [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(2): 395-409.
- [2] Honczarenko M, Le Y I, Swierkowski M, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors [J]. *Stem cells*, 2006, 24(4): 1030-41.
- [3] Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4 [J]. *Science*, 1999, 283(5403): 845-8.
- [4] Kitaori T, Ito H, Schwarz E M, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model [J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2009, 60(3): 813-23.
- [5] Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials—biological foundation and preclinical evidence: a systematic review [J]. *J Clin Periodontol*, 2008, 35(s8): 106-16.
- [6] Takahashi M. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction [J]. *Circ J* 2010, 74(3): 418-23.
- [7] Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis [J]. *Trends immunol*, 2007, 28(7): 299-307.

## Incorporation of SDF-1 $\alpha$ in Pluronic F-127 hydrogel and its biological effect on BMSCs *in vitro*

Tian Tian<sup>1</sup>, Cheng Jiguang<sup>2</sup>, Zhou Jian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Stomatologic Hospital College, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032; <sup>2</sup>Stomatologic Hospital College, Anhui Medical University, Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To detect the effect of Pluronic F-127 hydrogel combined with stromal cell derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) on bone mesenchymal stem cells (BMSCs)' biological effect *in vitro*. **Methods** Transwell chamber was used to detect the effect of Pluronic F-127 hydrogel combined with various concentration of SDF-1 $\alpha$  (200, 50 ng/ml) on BMSCs' migration. The BMSCs were osteogenesis cultured in 3-dimensional scaffold SDF-1 $\alpha$ -Pluronic F-127 hydrogel, then alkaline phosphatase (AKP) activity and alizarin red was evaluated, and MTT was used to explore the cytoactive of BMSCs after cultured in SDF-1 $\alpha$ -gel. **Results** The result of chemotaxis displayed that the concentration of SDF-1 $\alpha$  200 ng/ml in hydrogel had obvious effect on migration of BMSCs ( $P < 0.05$ ). MTT confirmed Pluronic F-127 had no effect on cell proliferation ( $P > 0.05$ ). Compared with control group, BMSCs-gel group and pure BMSCs group's AKP had significantly increased in the circumstances of osteogenesis induction ( $P < 0.05$ ), and calcium nodule could be found in the induction group. **Conclusion** The composite material F-127 loaded with SDF-1 $\alpha$  significantly promotes chemotactic migration of BMSCs *in vitro*, BMSCs can survive and be induced differentiation into osteoblast in the 3-dimensional scaffold SDF-1 $\alpha$ -gel.

**Key words** stromal cell derived factor-1 $\alpha$ ; Pluronic F-127 hydrogel; bone mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation