

基础研究

3D生物打印的微结构促进小鼠表皮干细胞的增殖和活性

刘煜凡^{1,2}, 黄沙⁴, 姚斌^{3,5}, 李曌³, 李想^{1,2}, 付小兵³, 吴旭^{1,2}¹南方医科大学, 广东 广州 510515; ²南方医科大学南方医院胸外科, 广东 广州 510515; ³解放军总医院第一附属医院全军创伤修复与组织再生重点实验室暨皮肤损伤修复与组织再生北京市重点实验室, 北京 100048; ⁴解放军总医院基础医学研究所, 北京 100853; ⁵南开大学医学院, 天津 300071

摘要:目的 探索不同构架的3D微结构对表皮干细胞增殖能力和细胞活性的影响并建立最佳3D生物打印模型。方法 通过采用不同尺寸:210、340、420 μm的打印喷头结合3D生物打印技术构建3种不同的含细胞3D微结构;利用荧光显微镜观察3D微结构中细胞形态及增殖现象;活/死细胞染色技术检测细胞活性;采用方差分析和样本t检验等方法进行统计学分析。结果 3种不同构架的3D微结构均可促进表皮干细胞增殖;打印后0、3、7 d之间,3组3D微结构在细胞活性水平上均逐步降低且差异有统计学意义($P<0.01$);与7 d时的细胞活性相比,3组3D微结构在14 d时的细胞活性均升高且差异有统计学意义($P<0.01$);与210 μm组和340 μm组相比,420 μm组3D微结构在长期培养中细胞活性水平最高($P<0.01$)。结论 420 μm组3D微结构能够稳定促进皮肤替代物中表皮干细胞的增殖能力并维持高细胞活性,为构建3D生物打印组织工程表皮以及全层皮肤模型奠定了基础。

关键词:3D生物打印技术;3D微结构;表皮干细胞;细胞增殖;细胞活性

Three-dimensional bioprinted microstructure promotes proliferation and viability of murine epithelial stem cells *in vitro*

LIU Yufan^{1,2}, HUANG Sha⁴, YAO Bin^{3,5}, LI Zhao³, LI Xiang^{1,2}, FU Xiaobing³, WU Xu^{1,2}¹Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Thoracic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ³Key Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of PLA, and Beijing Key Laboratory of Skin Injury, Repair and Regeneration, First Hospital Affiliated to General Hospital of PLA, Beijing 100048, China; ⁴Institute of Basic Medical Sciences, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; ⁵School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of different microstructures prepared by three-dimensional (3D) bioprinting on proliferation and viability of the murine epithelial stem cells *in vitro*. Methods 3D cell-laden microstructures were constructed using 3 different printing nozzles with diameters of 210, 340, and 420 μm. Fluorescence microscopy and the live/dead assay kit were used to observe the proliferation and viability of the murine epithelial stem cells in the microstructures. Results All the 3D cell-laden micro-structures were capable of promoting the proliferation of murine epithelial stem cells. In the 3 groups of micro-structures, the cell viability decreased significantly with time until 7 days after printing ($P<0.01$), but at 14 days after the printing, the cell viability increased significantly as compared with that at 7 days ($P<0.01$). The viability of the cells was significantly higher in the microstructure printed using a 420 μm nozzle than in the microstructures printed with 210 μm and 340 μm nozzles ($P<0.01$). Conclusion The microstructure printed with a 420 μm nozzle can stably promote the proliferation of murine epithelial stem cells and maintain a high level of cell viability, suggesting the feasibility of constructing tissue-engineered epidermis and full-thickness skin graft using 3D bioprinting technique.

Keywords: three-dimensional bioprinting; three-dimensional microstructures; epithelial stem cells; cell proliferation; cell viability

收稿日期:2017-02-12

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973计划”(2012CB518105);国家自然科学基金(81121004, 81671905)

Supported by National Key Basic Research Program (2012CB518105) and Supported by National Natural Science Foundation of China (81121004, 81671905).

作者简介:刘煜凡,在读硕士研究生,E-mail: liuyufandy@hotmail.com

通信作者:吴旭,教授,主任医师,博士生导师,E-mail:wuxu_southhospital@163.com

皮肤是人体最大的器官,其在维持机体内环境稳态及抵御外界环境伤害等方面有着不可或缺的重要地位^[1]。近年来,利用组织工程技术制成的组织工程皮肤替代物取得了巨大的进步,但针对组织工程表皮尤其是表皮衍生的皮肤附属器再生的研究却发展缓慢^[2-5]。没有正常的皮肤附属器如毛囊、汗腺等,导致愈合较慢、容易失败,且影响预后生活质量^[6-11]。因此,构建最佳组织工程表皮3D模型用于皮肤附属器分化的研究对促进皮肤再

生有重要意义^[12-13]。

近几年来,利用三维生物打印(3D生物打印)技术将生物相容性材料、种子细胞和支持组件等打印成复杂的具有功能的3D类组织用于创伤修复和组织再生医学的研究已陆续展开^[14-18]。已有研究表明,3D结构能够影响干细胞的分化能力^[19-21],且本研究团队在前期实验中应用3D生物打印技术,已经实现了小鼠表皮干细胞在3D微结构中的有效增殖并初步构建了3D生物打印组织工程表皮模型^[22-23]。但同时,本组研究人员发现,在实验中缺乏稳定诱导表皮干细胞增殖分化的最佳模型,且不同构架的3D微结构在促进小鼠表皮干细胞的增殖速率及维持细胞活性的高低上存在差异。不同构架的3D微结构对细胞增殖和细胞活性的影响尚未见文献报道。为了建立最佳的3D打诱导印模型用于皮肤再生,本组研究人员选择了3种不同直径的打印喷头用于构建不同的3D微结构模型,深入探讨不同构架的3D微结构对细胞增殖和细胞活性的影响。基于小鼠表皮干细胞直径的大小及本实验室前期在3D微结构仿生模型的参数的探索,我们选择直径分别为210、340、420 μm的打印喷头。

1 材料和方法

1.1 细胞分离和培养

小鼠表皮干细胞的提取与培养。选择胚胎期12.5 d的GFP-C57BL/6小鼠^[24](杰克逊实验室,美国),剪取其背部皮肤后,置于4 mL的0.01%磷酸盐缓冲液(PBS溶液)中,静置1 min并重复2次。然后将剪取的样本皮肤置于4 mL的2 mg/mL的II型中性蛋白酶溶液(Sigma)中静置30 min后,移入4 mL的2 mg/mL的I型胶原酶溶液(Sigma)中再次静置30 min。取出样本皮肤并置于无菌培养皿中剪碎后,加入4 mL的0.25%的胰蛋白酶-EDTA溶液(北京索莱宝公司)静置30 min。以上所有静置过程均在37 °C恒温培养箱中完成。经胰蛋白酶-EDTA消化完成后,加入4 mL胎牛血清(FBS,Gibco)终止消化并将样本移入15 mL离心管中,使用台式低速离心机1000 r/min,离心5 min。弃上清液,加入8 mL的DMEM/F12细胞培养基(Gibco)后将细胞沉淀吹打均匀后移入10 cm无菌培养皿中,放置于37 °C恒温培养箱中培养,48 h后观察细胞贴壁情况、换液。

1.2 生物打印墨水的制备

此次研究中选择的生物相容性材料为明胶(Sigma)和海藻酸钠(Sigma)。在室温条件下,将20 g明胶置于100 mL的PBS溶液中充分溶解后制成浓度为20%的明胶溶液。将8 g海藻酸钠置于100 mL的PBS溶液中在60 °C加热状态下充分溶解后制成浓度为8%的海藻酸钠溶液。每10 mL生物打印墨水中含有6 mL的

20%明胶溶液、3 mL的8%海藻酸钠溶液和1 mL的细胞悬液(细胞密度为1×10⁷/mL)。

1.3 3D生物打印微结构模型

选择3种不同直径的打印喷头用以构建3组不同构架的微结构模型,分别标记为210 μm组、340 μm组和420 μm组。打印过程中所使用的打印喷头、打印针筒、生物打印墨水等均需高温高压消毒。将30 mL生物打印墨水均匀分配至3组打印针筒内,密封并置于0 °C保存1 h后,分别依次安装到3D生物打印平台(捷诺飞3D生物打印机,中国)以构建3D微结构仿生模型。在打印过程中,选择统一的打印参数,即3D微结构大小为20 mm×20 mm×3 mm,孔隙间隔为2.5 mm。完成打印后的含细胞的3D微结构用浓度为10%的氯化钙溶液在0 °C下交联10 min后,弃掉培养皿中剩余的氯化钙溶液,加入5 mL DMEM/F12细胞培养基(Gibco),置于37 °C恒温培养箱内培养。

1.4 细胞活性的测量

活/死细胞染色试剂盒(美国,Life)用于在打印后0、3、7、14 d等4个时间点,对3组样品进行染色。通过荧光显微镜(奥林巴斯,BX51)在高倍镜下观察可以看到绿染的活细胞和红染的死细胞二者之间分界清晰。为了进一步探索不同组之间细胞活性的区别,通过荧光显微镜(奥林巴斯,BX51)在高倍镜下随机选择5个视野,分别计数活细胞和死细胞,重复3次取平均值。计算细胞活性百分比,重复3次取平均值。利用Excel表格制成柱状图。进行该步骤实验时,应选用野生型C57BL/6小鼠用于提取表皮干细胞,细胞提取方法详见1.1。

1.5 细胞增殖的观察

为了直观地观察3D微结构中的细胞聚集成团和增殖状态,荧光显微镜(奥林巴斯,BX51)用于在打印后0、3、7、14 d等4个时间点,对3D微结构中细胞行为的变化做连续性观察并采集图片。

1.6 统计学分析

所有实验均独立重复3次以上,数据用均数±标准差表示。采用方差分析和样本t检验等方法进行统计学分析。当P<0.01认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3D生物打印微结构的特征

利用3种不同直径的打印喷头,210、340、420 μm,在生物打印墨水、打印参数及打印环境等条件均相同的情况下,构建3种不同构架的微结构,分别标记为210 μm组、340 μm组和420 μm组(图1)。在打印过程中,横竖交叉的层层叠加式打印模式良好地构建了稳定的三维立体模型(图1D~F)。在此次研究中,带有绿色免疫荧光标记的小鼠表皮干细胞用于镜下观察。通过荧光显

微镜的镜下观察可以发现,0 d时,3组3D微结构中,细胞均呈现独立分散状态且分布均匀,未见细胞聚集和成团(图1G~I)。

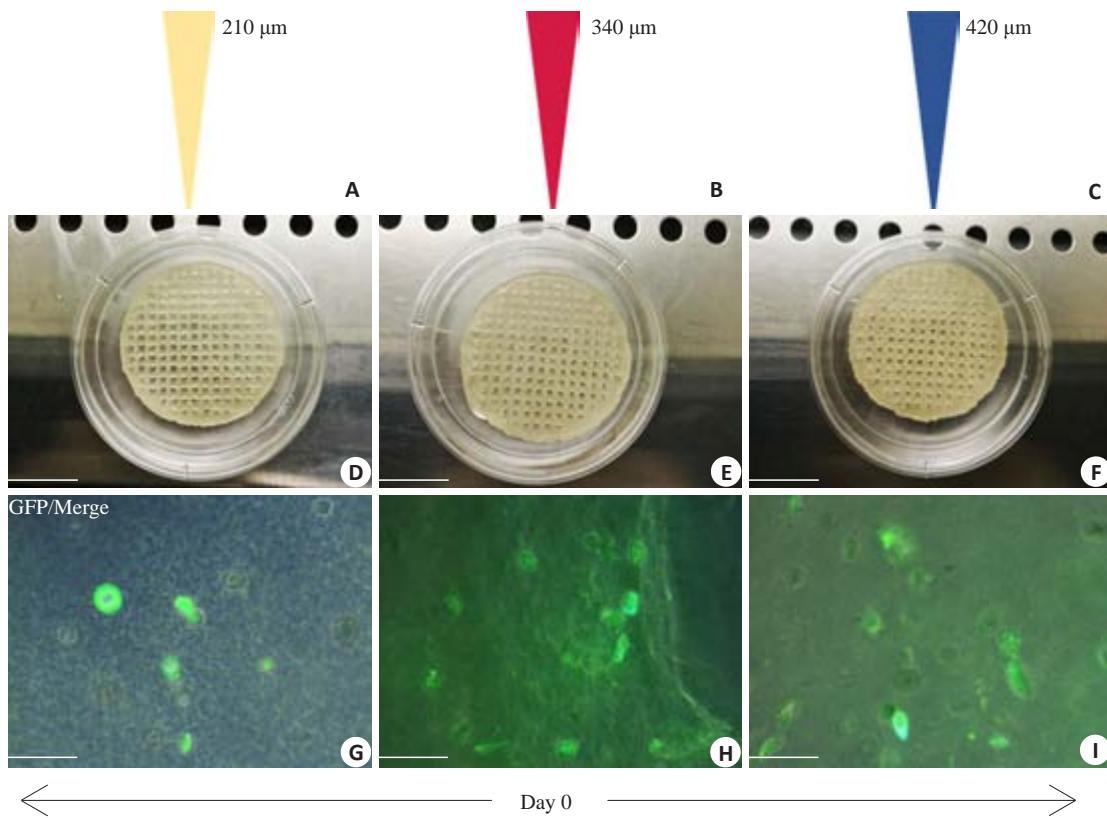


图1 3D生物打印示意图

Fig.1 Nozzles of different sizes used for 3D bioprinting and the microstructures printed using these nozzles. A: 210 μm nozzle; B: 340 μm nozzle; C: 420 μm nozzle; D, E, F: Microstructures printed with the 210, 340, and 420 μm nozzles, respectively (scale bar=1000 μm); G, H, I: Fluorescent micrographs of microstructures printed with the 210, 340, and 420 μm nozzles on day 0, respectively (scale bar=50 μm).

2.2 3D微结构促进小鼠表皮干细胞增殖

本次研究中,荧光显微镜用于对3组3D微结构中小鼠表皮干细胞的行为学变化进行连续性观察,最终选择了0、3、7、14 d等4个具有代表性的时间点。从图2中可以清晰地看到,在0 d的时候,3组3D微结构中的小鼠表皮干细胞均呈现独立分散状态,在培养后3 d,少量细胞开始聚集形成了只有2~3个细胞的团块(图2A~F)。从培养后7 d开始,3组3D微结构中的细胞团块相对于3 d时,细胞团块明显增殖变大且团块结构本身趋向复杂化(图2G~I)。继续培养至14 d后,从镜下能够更加清晰地观察到3组3D微结构中的细胞团块在继续增殖变大的同时形成了简单的立体结构(图2J~L)。在连续性观察的过程中我们发现,尽管3组3D微结构在构架上存在差异性,但对于培养过程中的细胞聚集和成团来说,不论是在时间点上还是在形态上,均未发现明显的差异性。

2.3 3D微结构对细胞活性的影响

在利用不同直径的打印喷头构建的3D微结构中,

活/死细胞染色技术用于检测打印过程及后续培养中小鼠表皮干细胞的活性。从图3可以明显地看出,在打印后0、3、7、14 d等4个观察时间点上,210 μm 组3D微结构的细胞活性(85.33%、83.15%、80.13%、84.90%)均明显低于340 μm 组(90.83%、87.67%、86.15%、89.40%)和420 μm 组(91.93%、88.73%、87.73%、90.47%)(图3)。通过方差分析和样本t检验等统计学分析后可得出,在0、3、7、14 d等4个时间点上,3组含细胞3D微结构之间在细胞活性值上的差异均有统计学意义($P<0.01$,图3)。同时,在分析各组细胞活性差异的过程中,打印后0~7 d之间,210 μm 组、340 μm 组和420 μm 组等3种不同构架的3D微结构在细胞活性水平上均呈现出逐渐下降的趋势且差异有统计学意义($P<0.01$),而在14 d时,3组含细胞3D微结构在细胞活性水平上相对于7 d时均表现出轻度升高且差异有统计学意义($P<0.01$,图3)。

3 讨论

表皮连同其派生的附属器,如汗腺、毛囊、皮脂腺等

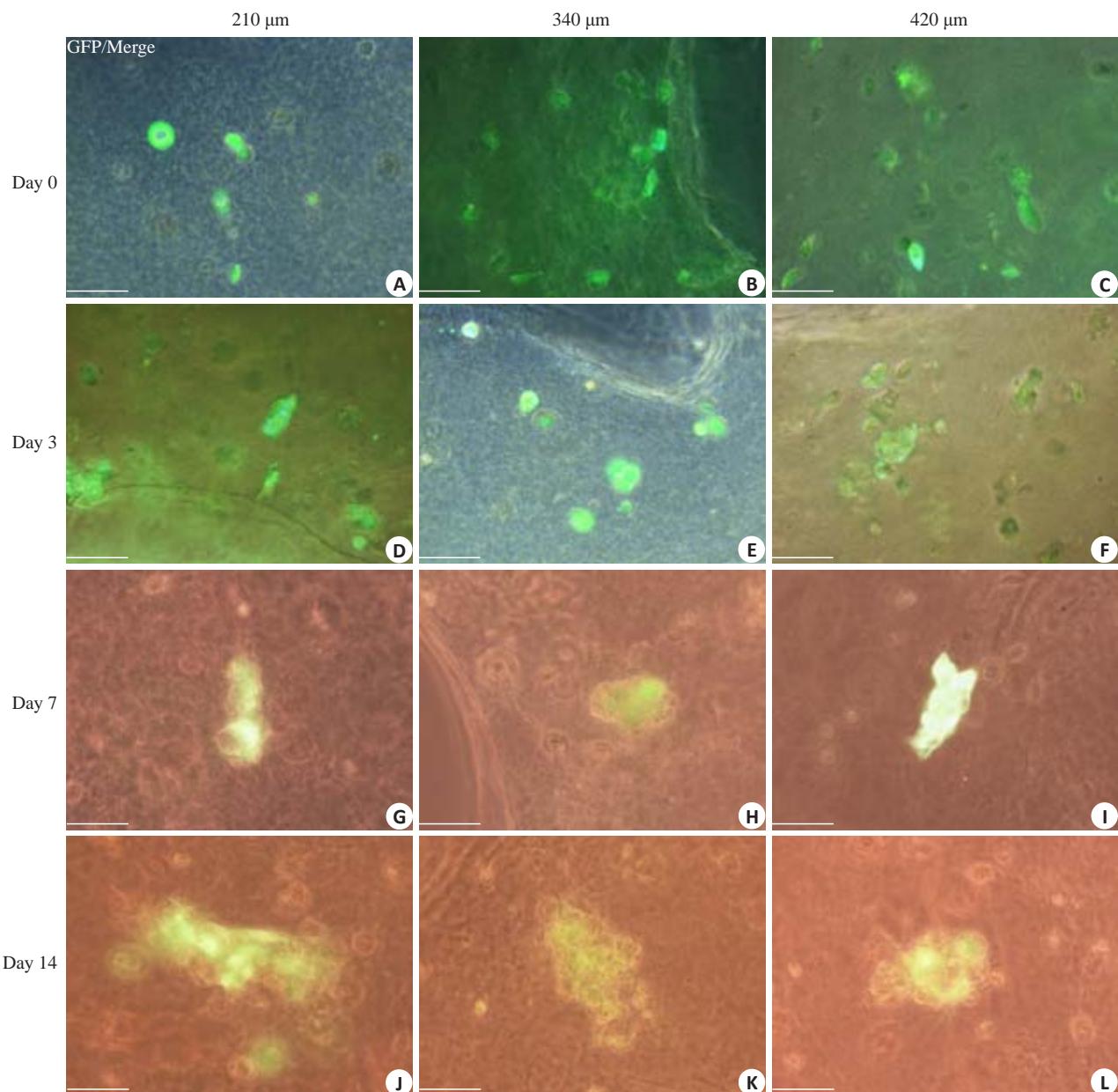


图2 3D微结构中小鼠表皮干细胞在不同时期的细胞聚集成团和增殖

Fig.2 Clustering and proliferation of murine epidermal stem cells in 3D bioprinted microstructure using different nozzles at different time points (scale bar=50 μm).

结构共同构成了机体的“第一道屏障”。皮肤在维持机体水盐平衡、调节体温和抵御外环境伤害等方面起到了重要的作用^[25-28]。大面积创伤后形成的瘢痕组织不仅无法起到抵御外环境伤害的屏障作用,也因其瘢痕组织内不含有汗腺、毛囊、皮脂腺等正常的皮肤附属器而难以实现皮肤组织原有的生理功能。由此可见,皮肤附属器的再生研究非常重要。3D生物打印技术作为一项新兴的技术被广泛用于医学研究领域,基于3D生物打印技术构建三维仿生模型有力促进了再生医学的发展^[14-18],本研究组前期利用3D生物打印技术建立组织工程表皮模型用于皮肤附属器再生的研究。

本研究表明,210 μm组、340 μm组和420 μm组,

这3组不同构架的含细胞3D微结构均能促进小鼠表皮干细胞的有效增殖,且这三组模型在促进增殖的效应上无明显差异。由此得出,具有生物相容性的三维立体结构对小鼠表皮干细胞的增殖具有显著的促进作用,而结构本身的差异性对小鼠表皮干细胞的增殖影响不大。干细胞能够稳定发挥其功能的必要条件除了有效的细胞增殖以外,高细胞活性也是其必要条件之一。然而,在进一步的研究中发现,尽管210 μm组、340 μm组和420 μm组的3D微结构在促进小鼠表皮干细胞的增殖效应上无明显差异性,但在长期地培养观察中,本组研究人员通过活/死细胞染色技术的应用揭示了3组不同构架的3D微结构在维持细胞活性方面的差异。图3表

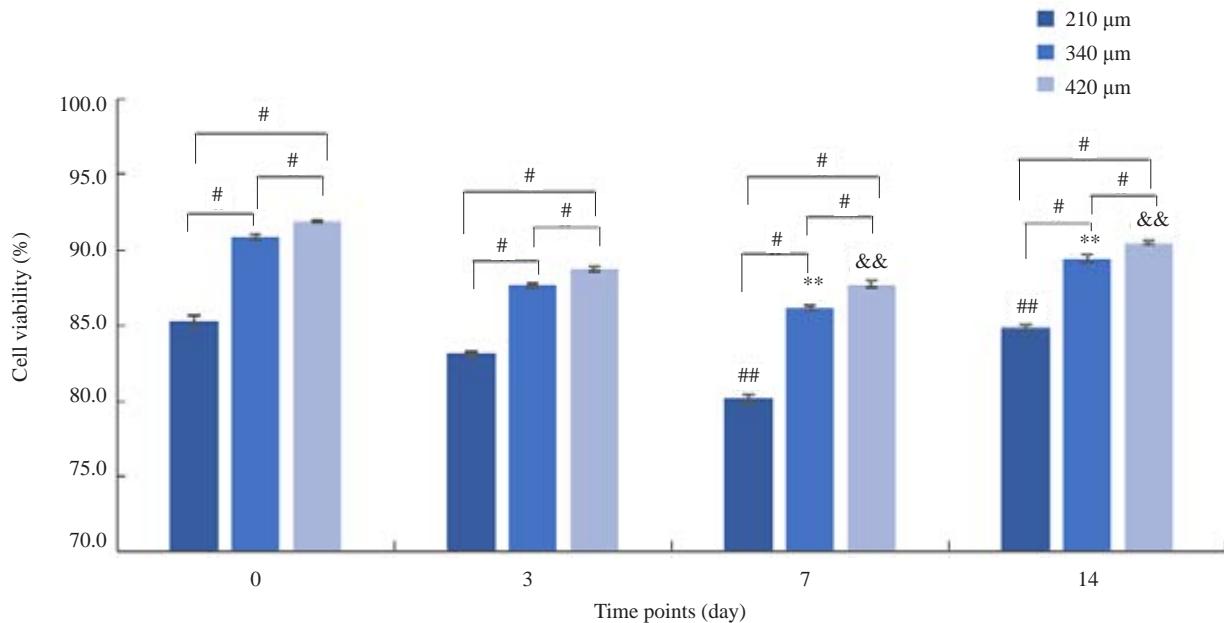


图3 在不同时期,210 μm组、340 μm组和420 μm组3D微结构中细胞活性的差异

Fig.3 Comparison of viability of murine epidermal stem cells in the 3D bioprinted micro-structures using different nozzles at different time points ($n=3$). $^{\#}P<0.01$; $^{**}P<0.01$ between 7 and 14 days in 210 μm group; $^{**}P<0.01$ between 7 and 14 days in 340 μm group; $^{&&}P<0.01$ between 7 and 14 days in 420 μm group.

明,在0、3、7、14 d等4个观察时间点上,210 μm组3D微结构的细胞活性水平明显低于340 μm组和420 μm组($P<0.01$);相对于210 μm组和340 μm组,420 μm组3D微结构在长期培养过程中能够维持高细胞活性($P<0.01$)。值得注意的一点是,在分析各组细胞活性差异的过程中,打印后0~7 d之间,210 μm组、340 μm组和420 μm组等3种不同构架的3D微结构在细胞活性水平上均呈现出逐渐下降的趋势且差异有统计学意义($P<0.01$),而在14 d时,3组在细胞活性水平上与7 d时相比均表现出轻度升高且差异有统计学意义($P<0.01$)。本团队认为这一现象的出现存在两种可能性:3D微结构中的小鼠表皮干细胞在7~14 d时的增殖速率较快,细胞增殖速率超过了细胞死亡速率,因此在这一时期内,3组3D微结构在细胞活性水平上均形成了一个上升趋势;3D微结构中的小鼠表皮干细胞的增殖速率恒定,但部分死亡细胞或凋亡细胞会随着生物材料的降解逐步分离出3D微结构,相对地形成了高倍镜下单一视野内的活细胞计数增多进而导致细胞活性升高的现象。以上两种假设仍需要进一步的研究验证。

已有3D生物打印技术的研究主要集中在3D微结构对于细胞分化的作用^[19-23],对于细胞增殖和活性的影响还没有人关注。本研究发现420 μm组3D微结构仿生模型不仅能够促进小鼠表皮干细胞的有效增殖,而且能够在长期培养中维持高细胞活性。在3D仿生结构中,本研究为3D生物打印组织工程表皮的进一步分化

提供了最佳的物理环境,为3D生物打印微环境对细胞的影响提供了新的理论。

参考文献:

- [1] Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E, et al. Skin wound healing and phytomedicine: a review[J]. Skin Pharmacol Physiol, 2014, 27(6): 303-10.
- [2] Chen DM, Jarrell A, Guo CT, et al. Dermal beta-catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation[J]. Development, 2012, 139(8): 1522-33.
- [3] Rognoni E, Gomez C, Pisco AO, et al. Inhibition of beta-catenin signalling in dermal fibroblasts enhances hair follicle regeneration during wound healing[J]. Development, 2016, 143(14): 2522-35.
- [4] Breedis C. Regeneration of hair follicles and sebaceous glands from the epithelium of scars in the rabbit[J]. Cancer Res, 1954, 14(8): 575-9.
- [5] Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, et al. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development[J]. Dev Cell, 2002, 2(5): 643-53.
- [6] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views[J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2896-902.
- [7] Deng WM, Han Q, Liao LM, et al. Engrafted bone marrow-derived Flk-1(+) mesenchymal stem cells regenerate skin tissue[J]. Tissue Eng, 2005, 11(1/2): 110-9.
- [8] Lu CP, Polak L, Rocha AS, et al. Identification of stem cell populations in sweat glands and ducts reveals roles in homeostasis

- and wound repair[J]. Cell, 2012, 150(1): 136-50.
- [9] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics[J]. Circ Res, 2004, 95(1): 9-20.
- [10] Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis [J]. Stem Cells, 2007, 25(10): 2648-59.
- [11] Lu C, Fuchs E. Sweat gland progenitors in development, homeostasis, and wound repair[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4(2): a015222.
- [12] Fu XB. Wound care study and translation application: a team's work in China[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2014, 13(2): 84-7.
- [13] Fu X. Wound care in China: from repair to regeneration [J]. Int J Low Extrem Wounds, 2012, 11(3): 143-5.
- [14] Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(8): 773-85.
- [15] Murphy SV, Skardal A, Atala A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(1): 272-84.
- [16] Ringeisen BR, Kim H, Barron JA, et al. Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells[J]. Tissue Eng, 2004, 10(3/4): 483-91.
- [17] Ananthanarayanan A, Narmada BC, Mo XE, et al. Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering [J]. Trends Biotechnol, 2011, 29(3): 110-8.
- [18] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. Biomaterials, 2000, 21(24): 2529-43.
- [19] Huebsch N, Lippens E, Lee K, et al. Matrix elasticity of void-forming hydrogels controls transplanted-stem-cell-mediated bone formation[J]. Nat Mater, 2015, 14(12): 1269-77.
- [20] Caiazzo M, Okawa Y, Ranga A, et al. Defined three-dimensional microenvironments boost induction of pluripotency [J]. Nat Mater, 2016, 15(3): 344.
- [21] Chaudhuri O, Gu L, Klumpers D, et al. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity [J]. Nat Mater, 2016, 15(3): 326.
- [22] Huang S, Yao B, Xie JF, et al. 3D bioprinted extracellular matrix mimics facilitate directed differentiation of epithelial progenitors for sweat gland regeneration [J]. Acta Biomater, 2016, 32(32): 170-7.
- [23] Liu NB, Huang S, Yao B, et al. 3D bioprinting matrices with controlled pore structure and release function guide *in vitro* self-organization of sweat gland[J]. Sci Rep, 2016, 6(3): 10.
- [24] Xie JF, Yao B, Han YT, et al. Cytokeratin expression at different stages in sweat gland development of C57BL/6J mice[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2015, 14(4): 365-71.
- [25] Sato K, Kang WH, Saga K, et al. Biology of sweat glands and their disorders.I.normal sweat gland function [J]. J Am Acad Dermatol, 1989, 20(4): 537-63.
- [26] Sato K, Kang WH, Saga K, et al. Biology of sweat glands and their disorders.II.Disorders of sweat gland function [J]. J Am Acad Dermatol, 1989, 20(5 Pt 1): 713-26.
- [27] Cheshire WP, Freeman R. Disorders of sweating[J]. Semin Neurol, 2003, 23(4): 399-406.
- [28] Liu S, Zhang HS, Duan EK. Epidermal development in mammals: key regulators, signals from beneath, and stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(6): 10869-95.

(编辑:孙昌朋)