

PLCL/纤维蛋白原静电纺丝膜片与兔骨髓间充质干细胞的体外生物相容性

金良 胡何节 方征东

摘要 目的 研究 PLCL/纤维蛋白原混纺膜片与兔骨髓间充质干细胞的体外生物相容性。方法 通过静电纺丝法制备 PLCL/纤维蛋白原纳米纤维膜片,并通过扫描电镜(SEM)及水接触角分析仪进行表征。以种植在 PLCL/纤维蛋白原膜片中的细胞作为实验组,以种植在聚苯乙烯培养板中的细胞作为对照组,并通过 MTT 法检测细胞在两组中的黏附、增殖情况。结果 分离培养的细胞符合间充质干细胞特性,PLCL/纤维蛋白原纳米纤维的平均直径为(305 ± 87) nm、水接触角为(70.21 ± 2.13)°,与聚苯乙烯相比,其对细胞的生长无明显影响。结论 PLCL/纤维蛋白原混纺膜片具有较好的生物相容性,在血管组织工程中有较大的应用潜力。

关键词 静电纺丝; 纳米纤维; 组织工程; 人工血管; 间充质干细胞

中图分类号 R 318.08; R 654.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2012)07-0776-05

心血管疾病在西方国家已是引起死亡的主要疾病,且最近的统计数据显示周围动脉疾病的发病率及由其导致的死亡率正逐年增加,血管置换手术或搭桥手术是最常见的心脏和周围动脉疾病的治疗方法,仅美国一年实施的心血管手术就超过 100 万例^[1-2]。自体静脉和动脉被认为是修复病变血管的最佳替代物,然而合适的自体血管替代品很可能无法获得,故将人工血管作为替代策略^[3]。该研究以

聚左旋乳酸己内酯 [poly(L-lactide-co-ε-caprolactone), PLCL] 和纤维蛋白原为原料,通过静电纺丝技术制备 PLCL/纤维蛋白原纳米纤维膜片,初步研究该膜片与兔骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的体外相容性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2 月龄新西兰白兔 6 只,清洁级,雌雄不限,平均体重 2 kg,由安徽医科大学附属省立医院实验动物中心提供。本实验所用动物已得到安徽医科大学伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器 PLCL(山东济南岱罡生物科技有限公司);冻干牛纤维蛋白原(美国 Sigma-Aldrich 公司);六氟异丙醇(HFIP,上海誉美化工有限公司);Ficoll 细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);DMEM/F12、胎牛血清(Hyclone 公司);小鼠抗人 CD29-FITC、大鼠抗人/小鼠 CD44-FITC、小鼠抗人 CD45-PE、小鼠抗人 HLA-DR-PE(eBioscience 公司),0.25% 胰蛋白酶(碧云天公司),青霉素、链霉素(华北制药集团),噻唑蓝(MTT, Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO, Amresco 公司)。倒置显微镜(Olympus 公司),酶标仪(Thermo Multiskan FC),静电纺丝装置(日本 Kato-Tech 公司),Stereoscan 360 扫描电镜(SEM)(英国 Cambridge 公司),接触角分析仪(德国 Dataphysics 公司)。

1.3 方法

1.3.1 兔 BMSCs 的分离、培养、鉴定 从兔胫骨抽

2012-02-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M199)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院普外科,合肥 230001

作者简介:金良,男,硕士研究生;

胡何节,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: huhejie@hotmail.com

action (PCR). The miR-194 gene was cloned into PIREsneo3 vector directionally after enzyme cut thus constructing the eukaryotic expression plasmid of PIREsneo3/miR-194. Then the recombinant PIREsneo3/miR-194 plasmid was transfected into the MCF-7 cell line by Lipofectamine, and miR-194 highly expressed cells was selected by G418 (600 μg/ml). The expression level of miR-194 was detected by real-time quantitative PCR. **Results** The recombinant PIREsneo3/miR-194 plasmid was constructed, and the MCF-7 cell line with highly miR-194 gene was screened. **Conclusion** miR-194 highly expressed MCF-7 cell line is established successfully, which will be a perfect target of miR-194 gene therapy and for observing its function in breast cancer cells.

Key words miRNA; transfection; breast cancer; plasmid

出骨髓后,使用动物 Ficoll 细胞分离液,通过密度梯度离心法分离出兔骨髓单个核细胞,以 1×10^6 /ml 的密度接种于 25 cm² 细胞培养瓶内,在瓶内加入 5 ml 含 20% 胎牛血清(FBS)、100 U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 DMEM/F12 完全培养基,置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养。48 h 后首次换液,以后每隔 2~3 d 换液 1 次,当细胞生长达到 80% 融合时进行传代。结合细胞形态及流式细胞仪检测,对培养的细胞进行鉴定。取 1~4 代生长良好并达到 80% 融合的细胞,采用流式细胞仪检测细胞表面抗原 CD29、CD44、CD45、HLA-DR 的表达情况。

1.3.2 兔 BMSCs 生长曲线的绘制 取生长状态良好的第 1、3 代细胞消化制备单细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^4 /ml,于 96 孔板中每孔接种 50 μ l 细胞悬液,每天换液。接种后每隔 24 h 取 10 孔,加 20 μ l MTT(5 mg/ml),置 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h,弃上清,PBS 轻柔洗涤 2 次,加 150 μ l DM-SO,置酶标仪中快速震荡 10 min,测其在 490 nm 波长处的吸光度,重复测量 3 次,取平均值,连续检测 9 d。以时间(d)为横坐标、吸光度(OD₄₉₀)为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.3.3 静电纺丝溶液的制备 以 HFIP 为溶剂,配制 8% (w/v) 的 PLCL 溶液;将 HFIP 与 DMEM/F12 基础培养基以体积比 9:1 混合,配制成混合溶剂,将纤维蛋白原溶于混合溶剂中配制成浓度为 100 mg/ml 的纤维蛋白原溶液;将 PLCL 溶液与纤维蛋白原溶液以体积比 2:1 混合,即为实验所需的溶液。

1.3.4 静电纺丝过程 将溶液在室温下充分搅动 1 h 后,将其装入带有 22 号不锈钢钝性针头的 10 ml 塑料注射器内。静电纺丝装置由注射器泵、高压电源及旋转轴组成。在聚合物溶液与收集装置之间加载 20 kV 电压。使用注射器泵让 PLCL/纤维蛋白原混合溶液以 2 ml/h 的流速通过 22 号钝性针头。收集用的圆轴由 303 号不锈钢棒(ϕ 6 cm; 长度 20 cm)组成。钝性针头到收集圆轴的距离为 15 cm,收集圆轴的转速约为 500 r/min,静电纺丝纤维被收集在包裹了铝箔的旋转圆轴上。为了使收集的静电纺丝膜片平整一致,让注射器泵以 10 mm/min 的速度来回横移,最后从圆轴上取下膜片,真空干燥 48 h 后备用。以上过程在室温下进行。

1.3.5 PLCL/纤维蛋白原混纺膜片的表面形态及水接触角的测量 在膜片上喷金镀膜后通过 Stereoscan 360 SEM 获取图像。选取 12 幅图像,从每

幅图像中随机选取 40 根纤维,通过 ImageJ(NIH) 分析,计算混纺膜片的纳米纤维直径。随机选取 5 个样本,在每个样本表面滴加 3 滴(5 μ l/滴)去离子水,使用接触角分析仪测量水接触角。

1.3.6 膜片对兔 BMSCs 黏附、增殖影响的检测 将膜片置于 75% 乙醇液中浸泡 30 min 后用 PBS 洗涤 5 次,每次 10 min,室温干燥 24 h。将灭菌后的膜片修剪成与 96 孔板孔底直径相近的圆块形,铺于 96 孔板底,加 100 μ l 完全培养基置细胞培养箱内孵育过夜,弃上清。取第 3 代对数生长期的 BMSCs,消化离心,调整细胞密度为 1×10^6 /ml,每孔加 100 μ l 细胞悬液继续培养。在黏附实验中,分别于细胞接种后 4、12 h,每孔加入 20 μ l MTT(5 mg/ml),继续孵育 4 h,弃上清,PBS 轻柔洗涤 2 次,加 150 μ l DM-SO,置酶标仪中快速震荡 10 min,将实验组上清移入不含膜片的孔内,测其在 490 nm 处的吸光度(OD₄₉₀),以不含细胞及膜片的孔为对照,每个时间点每组检测 10 孔,重复测量 3 次,取平均值,以时间(h)为横坐标、OD₄₉₀为纵坐标绘制细胞黏附条形图。在增殖实验中,设 4 个时间点:1、3、5、7 d,接种的细胞密度为 5×10^4 /ml,每 2 天换液 1 次,其余同黏附实验。

1.4 统计学处理 用 SPSS 13.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Student *t* 检验比较实验组与对照组差异。

2 结果

2.1 兔 BMSCs 分离、培养、鉴定 骨髓血离心后从上到下分为 4 层:第 1 层为血浆,第 2 层为环状乳白色单个核细胞,第 3 层为透明分离液,第 4 层为红细胞。收集第 2 层单个核细胞进行培养,起始细胞呈小而圆的形态,悬浮于培养基中,24 h 后可见较多贴壁细胞,同时可见一些漂浮的死细胞及杂质,培养至第 3 天,可见细胞呈集落式生长,小而圆的细胞开始呈短梭形、纺锤形或不规则形,见图 1A。随着培养时间的延长,呈放射状排列的细胞集落逐渐增多增大,见图 1B。培养至第 5~6 天,细胞呈条索状或漩涡状生长,细胞分裂增殖活跃,见图 1C。培养至第 7~8 天,细胞约达到 90% 融合,见图 1D。随着传代次数增加,细胞形态趋于单一,见图 1E。

BMSCs 表面抗原 CD29、CD44 呈高表达,CD45、HLA-DR 低表达,CD29、CD44 的表达百分比随着细胞传代次数的增加而增加,CD45、HLA-DR 的表达百分比随着传代次数的增加而降低,见图 2。

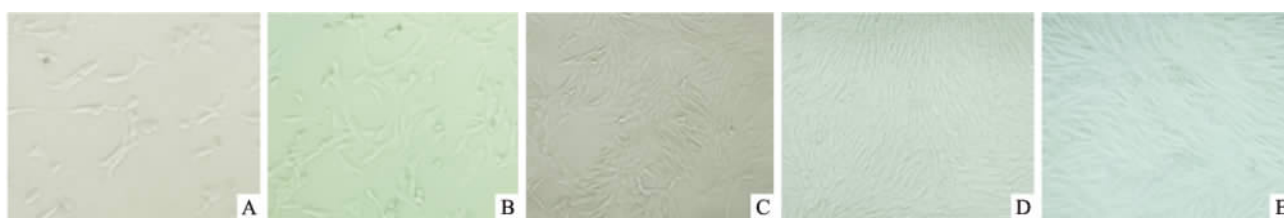


图1 兔 BMSCs ×100

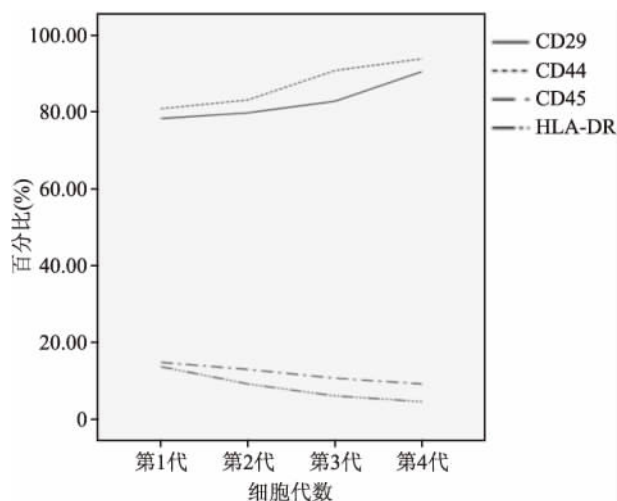


图2 兔 BMSCs 表面抗原 CD29、CD44、CD45、HLA-DR 的表达百分比

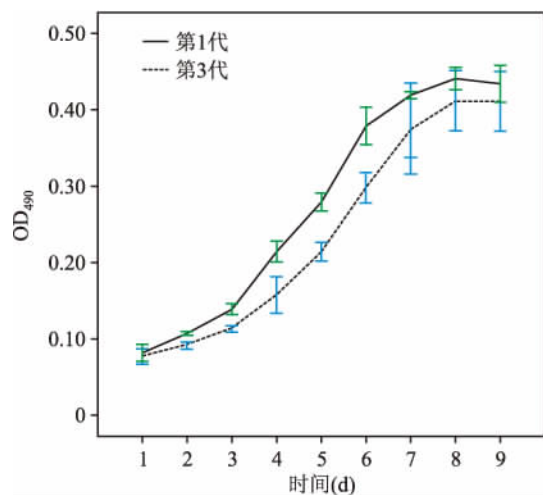


图3 兔 BMSCs 生长曲线

2.2 兔 BMSCs 生长曲线 兔第 1、3 代 BMSCs 生长曲线大致呈 S 形,第 3 代细胞生长曲线始终位于第 1 代的上方。第 1~3 天曲线较平坦,第 3~7 天曲线较陡峭,此后,曲线趋于平坦,甚至开始下降。

2.3 PLCL/纤维蛋白原纳米纤维膜片形态及水接触角 图 4 为 PLCL 溶液(8% w/v)与纤维蛋白原溶液(100 mg/ml)以体积比 2:1 混合后的静电纺丝

纳米纤维膜片的扫描电镜图和水接触角图,其平均纤维直径为(305 ± 87) nm,平均水接触角为(70.21 ± 2.13)°。见图 3。

2.4 膜片对兔 BMSCs 黏附、增殖的影响 在黏附实验中,细胞种植 4、12 h,实验组和对照组的细胞数差异无统计学意义;在增殖实验中,细胞种植第 1、3、5、7 天,实验组和对照组的细胞数差异亦无统计学意义。见图 5。

3 讨论

组织工程是一门交叉研究学科,其目的是应用工程学和生命科学的方法来发展生物替代品,以此恢复、保持或改善组织功能^[3],其涉及患者自体活细胞分离、三维支架制备、细胞与三维支架融合,以及将支架移植入患者体内等过程^[4]。聚氨酯类人工合成高分子材料具备良好的力学特性、低弹性模量以及高顺应性等特点^[1],在血管组织工程方面有巨大的应用潜力。人工合成材料由于缺乏细胞识别信号,生物相容性往往较差,解决这个问题的常用方法是在人工合成材料中加入适当比例的天然材料^[5]。纤维蛋白原是一种由肝脏合成并在血流中自由循环的 340 ku 糖蛋白类物质,对血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子以及其它细胞因子具有高亲和能力^[6],故可用于改善组织工程血管的生物相容性。

BMSCs 是构建组织工程血管的理想种子细胞,其体外分离方法主要有:密度梯度离心法、直接贴壁分离法、流式细胞分离法和免疫磁珠分离法^[7]。本研究采用密度梯度离心法,结合贴壁培养及换液传代,可获得纯度较高的 BMSCs。本实验观察了兔 BMSCs 从原代到第 6 代的生长规律,并绘制了第 1 代和第 3 代细胞的生长曲线。该曲线大体呈 S 型,反映了细胞从潜伏期到平台期的生长过程。从培养过程中发现,原代到第 2 代细胞虽然增殖能力较强,但是纯度偏低,第 3~5 代细胞不仅增殖能力较强,而且纯度也较高,从第 6 代开始,细胞增殖能力开始

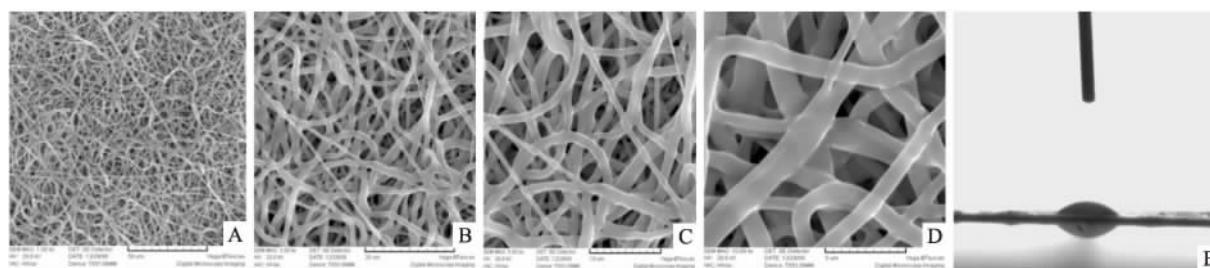


图4 PLCL/纤维蛋白原膜片的扫描电镜及水接触角图像

A ~ D: 扫描电镜图 放大倍数依次为1 000、3 000、5 000、10 000; E: 水接触角图

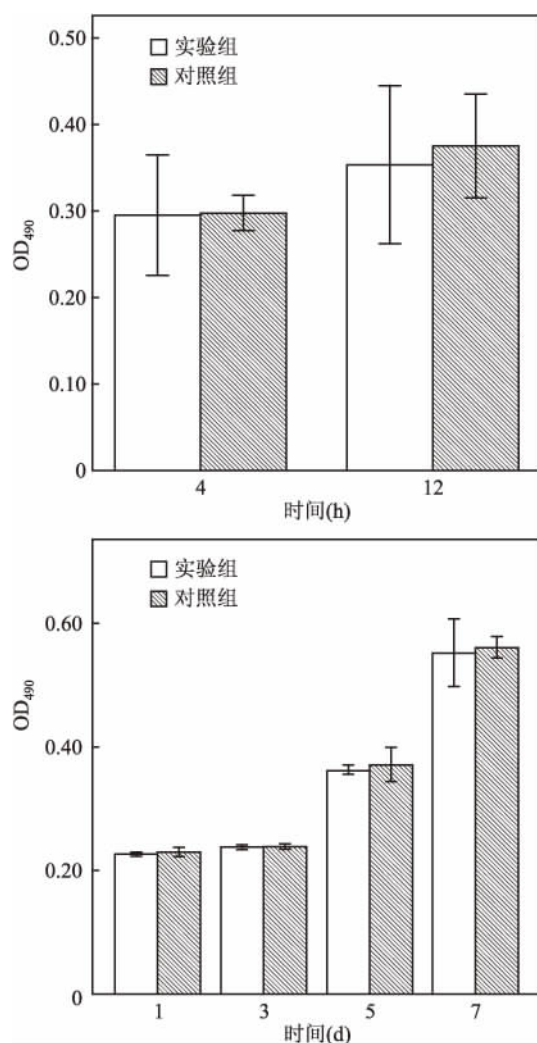


图5 兔第3代BMSCs的黏附增殖情况

减弱,故该研究选用第3代BMSCs。

虽然缺乏准确识别BMSCs的特异性标志物,但目前认为CD29、CD44、CD90、CD105等高表达,CD14、CD34、CD45、CD11b等低表达或不表达^[8-9]。目前对BMSCs的鉴定主要通过形态学和表面标记相结合的方法进行综合判断。本研究分离培养的细胞贴壁能力很强,刚从骨髓中分离时呈细小颗粒状,

后来呈梭形集落式漩涡状生长,随着传代次数增加,细胞逐渐呈均一的成纤维细胞形态;通过流式细胞仪检测第1~4代细胞,CD29和CD44表达率很高,CD45和HLA-DR表达率很低,并且随着细胞传代,CD29和CD44表达率呈上升趋势,CD45和HLA-DR表达率呈下降趋势。据此可以判定本研究分离培养的细胞为BMSCs。

静电纺丝技术是利用高压静电场产生微米级到纳米级的超细连续纤维结构,同时可以控制支架的成分、结构和力学特性。静电纺丝纳米纤维具有高表面积-体积比、高孔隙率和可变的孔径分布等特点,在形态结构上与天然细胞外基质是相似的^[10]。在电纺过程中,聚合物的浓度、电压、电纺距离及溶液流速是静电纺丝工艺的主要影响因素^[11]。

本实验制造的静电纺丝膜片平均纤维直径为 (305 ± 87) nm,位于天然细胞外基质纤维50~500 nm的范围之内^[12]。纳米纤维表面及内部纤维蛋白原的存在赋予其显著的细胞外基质特征,这对细胞的识别和迁移具有重要作用^[13]。其静态水接触角平均为 $(70.21 \pm 2.13)^\circ$,显著低于纯PLCL膜片的水接触角^[14]。这应归因于材料中纤维蛋白原的纳入,因为纤维蛋白原结构中存在亲水性的胺基和羧基官能团,而这些官能团在PLCL结构中是不存在的。此外,也可能是由于天然材料的纳入,减少或排除了膜片孔隙内的空气,以及增加了膜片的表面粗糙度^[15]。亲水性对细胞在材料上的黏附生长起重要作用,较小的水接触角意味着亲水性较强,即越有利于细胞黏附生长^[14]。因此本实验制备的PLCL/纤维蛋白原纳米纤维膜片基本具备适宜细胞黏附生长的特性,对兔BMSCs在体外的黏附、增殖无明显影响。

参考文献

- [1] Chung S, Ingle N P, Montero G A, et al. Bioresorbable elasto-

- meric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning[J]. *Acta Biomater* 2010 ,6(6) :1958 -67.
- [2] Uttayarat P , Perets A , Li M , et al. Micropatterning of three-dimensional electrospun polyurethane vascular grafts [J]. *Acta Biomater* ,2010 6(11) :4229 -37.
- [3] Aquirre A , Planell J A , Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 400(2) :284 -91.
- [4] Hang C , Chen R , Ke Q , et al. Electrospun collagen-chitosan-TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces* ,2011 82(2) :307 -15.
- [5] Soletti L , Hong Y , Guan J , et al. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts[J]. *Acta Biomater* ,2010 6(1) :110 -22.
- [6] Sell S A , McClure M J , Garg K , et al. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering[J]. *Adv Drug Deliv Rev* ,2009 61(12) :1007 -19.
- [7] Kitano Y , Radu A , Shaaban A , et al. Selection , enrichment , and culture expansion of murine mesenchymal progenitor cells by retroviral transduction of cycling adherent bone marrow cells[J]. *Exp Hematol* ,2000 28(12) :1460 -9.
- [8] Wulf G G , Jackson K A , Goodell M A. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts [J]. *Exp Hematol* , 2001 29(12) :1361 -70.
- [9] Lee J W , Gupta N , Serikov V , et al. Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury[J]. *Expert Opin Biol Ther* ,2009 9(10) :1259 -70.
- [10] Ju Y M , Choi J S , Atala A , et al. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels [J]. *Biomaterials* ,2010 31(15) :4313 -21.
- [11] Chung S , Moghe A K , Montero G A , et al. Nanofibrous scaffolds electrospun from elastomeric biodegradable poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) copolymer[J]. *Biomed Mater* ,2009 4(1) :015019.
- [12] Jeong S L , Kim S Y , Cho S K , et al. Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors[J]. *Biomaterials* ,2007 28(6) :1115 -22.
- [13] Zhao H , Ma L , Gong Y , et al. A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an *in vitro* evaluation[J]. *J Mater Sci Mater Med* ,2009 20(1) :135 -43.
- [14] Fang Z D , Fu W G , Dong Z H , et al. Preparation and biocompatibility of electrospun poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) /fibrinogen blended nanofibrous scaffolds[J]. *Appl Surf Sci* ,2011 257(9) :4133 -8.
- [15] Ku S H , Park C B. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering[J]. *Biomaterials* ,2010 31(36) :9431 -7.

***In vitro* biocompatibility between electrospun nanofibrous films of PLCL/fibrinogen and rabbit bone marrow mesenchymal stem cells**

Jin Liang , Hu Hejie , Fang Zhengdong

(Dept of General Surgery , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the biocompatibility between electrospun nanofibrous films of PLCL/fibrinogen nanofibrous films and rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*. **Methods** Electrospun nanofibrous films were fabricated from poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) , and characterized by scanning electron microscopy(SEM) and water contact angle analyzer. Take the cells seeded on PLCL/fibrinogen nanofibrous films as experimental group , and seeded on polystyrene culture plate as control group. The adhesion and proliferation results of rabbit BMSCs in two groups were detected by MTT assay. **Results** The cells used in this assay had the characteristics of mesenchymal stem cells(MSCs) . The average diameter and water contact angle of PLCL/fibrinogen nanofibrous was (305 ± 87) nm and (70. 21 ± 2. 13) ° , respectively. Compared with control group , rabbit BMSCs in experimental group were exhibited similar adhesion and proliferation. **Conclusion** Electrospun PLCL/fibrinogen nanofibrous films have good performance in biocompatibility aspect and great potential applications in vascular tissue engineering field.

Key words electrospinning; nanofibrous; tissue engineering; artificial vascular; mesenchymal stem cells