P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜载人骨髓间充质干细胞的生物相容性研究*

马敏先[1], 叶 川[2], 张俊标[1], 刘 琴[1], 朱婷婷[1], 王 永[1]
(1. 贵州医科大学附院 口腔修复科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院 骨科, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**: 探讨人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)在同轴电纺 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯(P3HB4HB)-明胶(GE)-聚乙烯醇(PVA)纤维膜上的生物相容性。**方法**: 将第 5 代 hBMSCs 细胞接种在同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜上作为实验组,单纯培养的 hBMSCs 细胞为对照组;采用 MTS 比色法观察接种 hBMSCs 细胞后 1、2 及 4 h 时两组细胞吸光度(*OD*)值,并测定接种 hBMSCs 细胞后的第 1、3、5 及 7 天时两组的细胞增殖情况;采用吖啶橙(AO)荧光染色及扫描电镜(SEM)观察细胞-材料复合物培养第 5 天时纤维膜的外观及结构,同时观察 hBMSCs 细胞的生长情况。**结果**: 随培养时间的增加,两组接种的 hBMSCs 细胞 *OD* 值呈上升趋势,实验组培养 4 h 时 *OD* 值高于对照组 ($P<0.05$);细胞增殖实验发现,2 组 hBMSCs 细胞的 *OD* 值随培养时间延长而升高,实验组 hBMSCs 细胞的 *OD* 值高于对照组 ($P<0.05$);同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜外观呈白色膜状、质地均匀,SEM 见纤维直径均匀一致,接种到纤维膜生长 5 d 的 hBMSCs 细胞形态舒展、细胞间相互连接,AO 染色可见完整的细胞膜,大量细胞黏附于纤维膜表面。**结论**: 同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜与 hBMSCs 有良好的生物相容性。

[关键词] 间质干细胞; 生物相容性材料; 明胶; 同轴电纺;3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯; 聚乙烯醇
[中图分类号] R318.17 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)10-1162-04
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.10.010

Biocompatibility of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Coaxial Electrospinning Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)(gelatin-polyvinyl alcohol) *in vitro*

MA Minxian[1], YE Chuan[2], ZHANG Junbiao[1], LIU Qin[1], ZHU Tingting[1], WANG Yong[1]
(*1. Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*;
2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the biocompatibility of human bone marrow mesenchymal stem cells with coaxial electrospinning poly membrane in vitro. **Methods**: Human bone marrow mesenchymal stem cells at passage 5 were seeded upon the coaxial electrospinning P3HB4HB-(GE-PVA) membrane as experimental group and upon conventional cultured hBMSCs cells as control group. MTS assay was adopted to observe the cell absorbance at 1, 2 and 4 hours and testing the seeded hBMSCs cells proliferation condition at 1,3,5,7 days of both groups. The out appearance and structure of cell and material compound cultured for 5 days were observed by using acridine orange fluorescent staining and scanning electron microscope, and observing growth condition of hBMSCs cells. **Result**: With the increasing of cultivating time, cell absorbance rate of both groups were increasing, the OD value of experimental group was higher than the control group at 4 h ($P<0.05$); cell proliferation experiment re-

*[基金项目]贵州省科学技术联合基金项目[黔科合 LG 字(2012)002 号]; 贵阳市科技计划项目[筑科合同(20141001)]
网络出版时间:2016-10-17 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20161017.1445.034.html

vealed that OD value of both groups hBMSCs cells increased as the growing time of cultivation, the hBMSCs cells OD value of experimental group increased more than control group ($P<0.05$); coaxial electrospinning P3HB4HB-(GE-PVA) membrane presented in a white membrane shape with even texture, diameter of SEM fiber showed uniformity; hBMSCs cells seeded on fiber membrane for 5 d presented in a form of stretching and inter-cellular connecting; AO staining showed complete cell membrane with substantial amount of cells adhere to the fiber membrane surface. **Conclusion**: Electrospinning P3HB4HB-(GE-PVA) membrane shows a good biocompatibility with human bone marrow mesenchymal stem cells.

[**Key words**] mesenchymal stem cells; biocompatible materials; gelatin; coaxial electrospinning; poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate); polyvinyl alcohol

组织工程主要包括种子细胞、支架及细胞－支架构建技术,支架作为种子细胞增殖分化的场所,是组织工程研究成败的关键,因此,寻找一种良好的支架是组织工程研究的目标之一[1]。研究表明,仅使用一种材料作为支架时,一般不能获得所需支架的性能,如何利用不同材料制备支架,并在使用时发挥各自材料的优点,现已成为该领域的研究热点。同轴电纺技术所制备的纤维膜不仅具有普通静电纺丝技术形成的纳微米纤维,其结构与尺寸也更加接近细胞外基质的环境,同时还能复合多种材料并保持每种材料的性能[2-4]。聚(3-羟基丁酸酯-co-4-羟基丁酸酯)[poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-Hydroxybutyrate), P3HB4HB]是聚羟基脂肪酸酯家族中的一种高分子生物可降解材料,具有良好的机械性能和生物相容性,但存在亲水性差及细胞亲和力低的缺点;明胶(gelatin,GE)能够维持胶原的基本结构,作为支架组分时可以促进支架上细胞的黏附、生长和增殖,具有良好的亲水性和细胞亲和力,但成丝性较差[5]。聚乙烯醇(polyvinyl alcohol ,PVA)具有良好的生物相容性和成丝性[6],不同配比的 PVA/GE 纤维膜已应用于药物缓释和骨组织工程领域[7]。Sun[8]等通过同轴电纺技术将不同性质的材料联合使用,发挥不同材料的优势,弥补单一材料的缺点。因此,推测通过同轴电纺技术制备 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜,可能复合 GE、PVA 以增加纤维膜的细胞亲和力,使纤维膜同时具有 P3HB4HB 优良的力学性能、GE 良好的生物相容性及 PVA 良好的成丝性的特点。本研究采用同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)负载人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells,hBMSCs),观察 hBMSCs 的体外生物相容性,为组织工程的临床转化和应用提供实验数据。

1　材料与方法

1.1　材料、主要试剂与仪器

P3HB4HB(Mw = 280 000 Da)及 PVA(Mw = 186 000 Da)由清华大学高分子所提供,GE 来源于猪皮(Sigma,美国)。Thermo 3131 型 CO_2 培养箱(Thermo,中国),Nikon TE-2000 型倒置相差显微镜(Nikon,日本),L-DMEM 培养基(Gibco,美国),胎牛血清(杭州四季青,中国),MTS 试剂(Promega,美国)。

1.2　方法

1.2.1　hBMSCs 的分离与培养　取骨折患者骨髓(所有供者对实验均知情同意)放入含肝素的离心管,按照 1∶1(V∶V)加入 L-DMEM 混匀,1 000 r/min 离心 5 min(r 为 13.5 cm),去除上清液,用 L-DMEM 培养液(10% 胎牛血清、青霉素 100 000 U/L、链霉素 100 mg/L)重悬,加入 75 cm^2 培养瓶内,在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养,每 3 d 更换 1 次培养基。当细胞生长达 90% 融合时,加入 0.05% 胰蛋白酶、0.53 mmol/L EDTA 混合液传代培养。

1.2.2　纤维膜的制备　称取 GE 0.6 g,PVA 0.2 g 同时溶解于 10 mL 去离子水中,加热搅拌至完全溶解,制备成为 GE-PVA 混合溶液,以二氯甲烷为溶剂制备成 6% P3HB4HB 溶液,将两种溶液放置于 5 mL 注射器,以 P3HB4HB 为芯溶液,GE/PVA 为壳溶液,置于电纺机中,使用锡箔纸滚轴为接收器,设置正电压约 15 ~ 17 kV,负电压 1 ~ 2 kV,电纺温度 37 ℃,推注速度 0.5 mm/min,接受距离约 15 cm(从同轴喷头到接收器),将制备的纤维膜裁剪为实验所需大小后,双面分别紫外照射 4 h 除菌。

1.2.3 细胞黏附率　将纤维膜裁剪为 6 孔板底部大小,将第 5 代 hBMSCs 细胞按 1×10^6 个/孔接种至六孔板中的纤维膜,作为实验组,置于细胞培养箱中培养;另将等数目的 hBMSCs 细胞直接接种于另一 6 孔板作为对照组。于接种后 1、2 及4 h时,每组分别吸出 3 个孔未贴壁的细胞,PBS 漂洗 3 次,加入 1 mL 培养基后,每孔加入 MTS 200 μL,置细胞培养箱中继续孵育 2 h,使用酶标仪在波长 490 nm 处检测各孔吸光度(*OD*)值。

1.2.4 细胞增殖实验　将同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜裁剪为 24 孔板底部大小,置于 24 孔板内,将第 5 代 hBMSCs 细胞按 1×10^4 个/孔接种在纤维膜,作为实验组,置于 24 孔板培养;将等数目的 hBMSCs 细胞直接接种于 24 孔板作为对照组。于接种后的第 1、3、5 及 7 天时,两组分别取 4 孔中的 hBMSCs 细胞加入 MTS 200 μL 继续孵育 2 h,使用酶标仪在波长 490 nm 处检测各孔 *OD* 值。

1.2.5 细胞 - 材料复合物的电镜(SEM)扫描将接种 hBMSCs 细胞的纤维膜复合体培养至第 5 天时,PBS 漂洗 2 次,用 4% 戊二醛 4 ℃固定 3 h,梯度酒精脱水,干燥,喷金,使用 SEM 观察。

1.2.6 吖啶橙(AO)荧光染色观察　取出细胞 - 材料复合物体外培养 5 d 的样品,PBS 漂洗 2 次,用 95% 乙醇固定 30 min,滤纸吸干,1% 醋酸作用 30 s,PBS 清洗 1 min,加入 0.01% AO 染液染色 5 min,PBS 清洗 1 min,用 0.1mol/L $CaCl_2$ 分色 30 s,PBS 清洗 3 次,荧光显微镜下观察(使用激发波长 405 nm 的滤光片)。

1.3 统计学分析

实验数据用 SPSS 20.0 统计学软件处理,以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用两独立样本 t 检验比较细胞黏附率和细胞增殖率,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

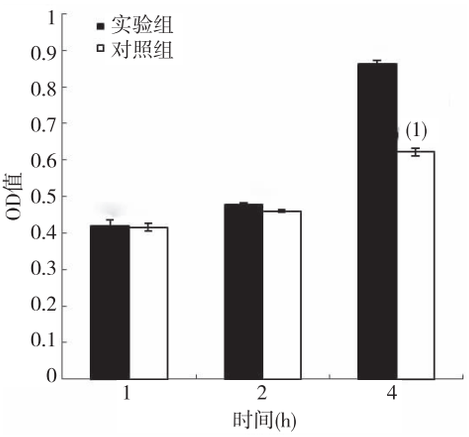
2 结果

2.1 细胞黏附率

接种 hBMSCs 细胞后,随培养时间的增加,两组 hBMSCs 细胞的 *OD* 值呈上升趋势。第 1 和第 2 小时实验组与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),第 4 小时的实验组 *OD* 值高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

2.2 细胞增殖

接种 hBMSCs 细胞后,2 组 hBMSCs 细胞的 *OD* 值随培养时间延长而升高,增殖曲线为“S”型,第 1 ~ 3 天的曲线较为平坦,第 3 ~ 5 天,曲线较为陡峭,之后曲线逐渐平缓,说明细胞增殖速率减慢,实验组 hBMSCs 细胞的 *OD* 值高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



(1) 与实验组比较,$P<0.05$

图 1　接种后第 1、2 及 4 小时 hBMSCs 细胞的 *OD* 值

Fig. 1　The OD value of hBMSCs cells after seeded 1, 2 and 4 h

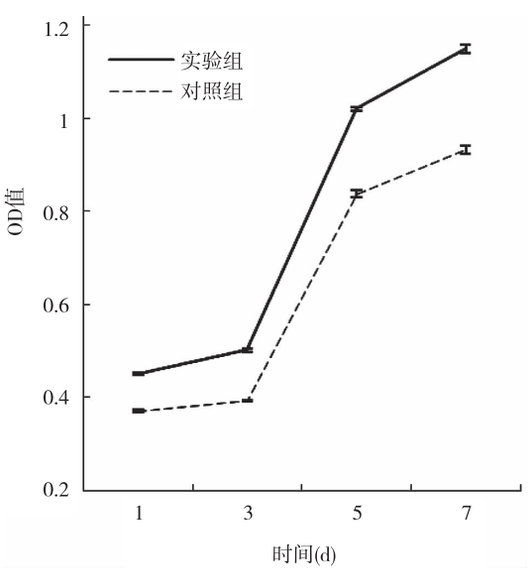
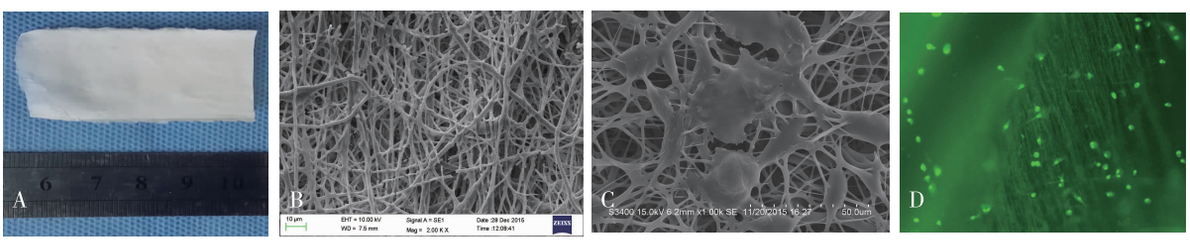


图 2　hBMSCs 细胞接种至同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜后的增殖情况

Fig. 2　The proliferation condition of hBMSCs seeded to coaxial electrospun P3HB4HB-(GE-PVA) fiber membranes

2.3　同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜及其上接种的 hBMSCs 细胞

如图 3A 所示,大体观察见同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜呈白色膜状,质地均匀,无明显凹凸不平;SEM 下见纤维直径均匀一致,呈三维网状相互连通的结构,见图 3B。hBMSCs 细胞接种至纤维膜第 5 天时生长良好,形态舒展,细胞间相互连接,见较多基质分泌(图 3C);AO 染色可见染色为绿色的健康细胞,具有完整的细胞膜,并可见大量细胞黏附于纤维膜表面(图 3D)。



注:A 为大体观,B 为(SEM,×2 000),C 为(SEM,×1 000),D 为(AO,×100)

图 3　同轴电纺 P3HB4HB-(GE-PVA)纤维膜及其上接种的 hBMSCs 细胞

Fig. 3　coaxial electrospun P3HB4HB-(GE-PVA) fiber membranes and hBMSCs cells seeded on it

3　讨论

当前组织工程支架材料主要通过天然材料和人工合成材料的各自优点进行互补,通过采用多种材料联合使用,弥补单一材料的缺点,以提高支架的综合性能。明胶作为胶原水解后的产物,保留了胶原的氨基酸组成,具有良好的生物相容性、生物降解性、促进细胞的生长等优点,已广泛应用于医学领域[9]。然而,由于天然材料均存在体内降解速度快、力学性能差的缺陷,使单纯使用明胶作为组织工程支架受到了限制,而明胶水溶液也存在着电纺成丝型差的问题。因此,本研究中在壳层溶液中加入了生物相容性良好、成丝性能良好的聚乙烯醇增强明胶溶液的可纺性能,使两种细胞黏附性较好的材料作为直接与细胞接触的纤维壳层,以促进细胞的种植与生长;将具有良好力学性能的 P3HB4HB 作为纤维的芯,作为纤维膜的支撑部分。

细胞黏附率是评价细胞对生物材料表面活性的主要指标之一[10],细胞在生物材料表面的黏附率与细胞的接种浓度及附着的时间有关。本研究表明随黏附时间的增加,细胞黏附率增加,与对照组相比在第 4 小时实验组黏附率高于对照组($P < 0.05$)。原因可能是细胞黏附初期,细胞未能展开、爬行,仍然由于胰酶消化的作用而固缩成团,不能稳定的黏附于纤维膜上[10]。本研究所制备的同轴电纺 P3HB4HB/(GE-PVA)纤维膜具有高孔隙率,成三维立体结构,被胰酶消化后的细胞固缩成团,在黏附早期容易进入纤维膜内部,增加黏附的表面积,与文献报道一致[11-12]。

MTS 细胞增殖实验是检测材料生物相容性的敏感指标,可以将材料与细胞共同培养研究材料的生物相容性,此方法更直接和敏感。本研究的 MTS 结果显示在 hBMSCs 细胞接种于纤维膜上第 1、3、5 及 7 天时,实验组的 hBMSCs 细胞增殖率高于对照组,同时 SEM 观察及 AO 染色结果也印证了 hBMSCs 细胞在同轴电纺 P3HB4HB/(GE-PVA)纤维膜上可以良好生长和增殖。原因可能为电纺纤维具有仿生细胞外基质的物理结构,同时明胶具有仿生细胞外基质的化学结构,可以促进细胞的黏附及增殖作用,在实验中,明胶作为同轴电纺的壳层,与细胞之间相互作用,利于发挥明胶良好的生物相容性,促进细胞的生长。

综上,本研究通过将 hBMSCs 细胞接种于同轴电纺 P3HB4HB/(GE-PVA)纤维膜,并采用细胞黏附实验、细胞增殖实验、AO 染色、SEM 观察等方法证实 P3HB4HB/(GE-PVA)纤维膜可以促进 hBMSCs 的黏附、生长和增殖,与 hBMSCs 具有较好的生物相容性。

4　参考文献

[1] Naveen N, Lakshmi M, Anitha R, et al. Electrospinning of poly (3-hydroxybutyric acid) and gelatin blended thin films: fabrication, characterization, and application in skin regeneration[J]. Polymer Bulletin, 2013 (4): 2337-2358.

[2] Li D, Xia YN. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel[J]. Adv Mater, 2004 (14): 1151-1170.

(下转第 1170 页)

3　讨论

研究发现,在肝癌细胞 MHCC97-H、MHCC97-L、HepG2 中 Calpain 的家族成员 Calpain-2 的表达显著增多,提示 Calpain-2 可能促进肝癌细胞的发生、发展[8]。ALLM 是 Calpain 的细胞渗透性抑制剂,是一种蛋白酶的弱抑制剂,抑制活化的细胞诱导细胞的程序性死亡,抑制 Calpain-2 的活性,从而诱导肿瘤细胞的凋亡[9]。本研究结果显示,用 ALLM(1×10^{-4} mol/L)处理 MHCC97-H 72 h 后,Calpain-2 的表达减少。Calpastatin 是蛋白类抑制剂,是 Calpain 内源性抑制剂,作为有效的 Calpain-2 的抑制剂,特异性好,抑制剂活性高;用 Calpastatin (2×10^{-7} mol/L)处理 MHCC97-H,Calpain-2 的表达减少,尤其是 72 h 的 Calpain-2 的表达减少显著。Calpain inhibitor IV 是不可逆的细胞渗透性抑制剂,是 Calpain-2 的强效的抑制剂[6]。本研究显示,用 Calpain inhibitor IV(1×10^{-3} mol/L)处理 MHCC97-H,尤其是处理 72 h 后的 Calpain-2 的表达显著减少。Calpain inhibitor VI 是可逆的细胞渗透性抑制剂,是 Calpain-1 和 Calpain-2 的有效的抑制剂。本研究显示,用 Calpain inhibitor VI(7.5×10^{-6} mol/L)处理 MHCC97-H 72 h,Calpain-2 的表达减少。上述 Calpain 的 4 种不同种抑制剂在高浓度处理肝癌 MHCC97-H 细胞 72 h 后都能够抑制 Calpain-2 蛋白的表达。

4　参考文献

[1] Storr SJ,Carragher NO,Frame MC,et al. The calpain system and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2011(5):364 – 374.

[2] Su LT,Chen HC, Gonzalez-Pagan O, et al. TRPM7 activates m-calpain by stress-dependent stimulation of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase[J]. J Mol Biol, 2010(4):858 – 869.

[3] Demarchi F, Schneider C. The calpain system as a modulator of stress/damage response[J]. Cell Cycle, 2007 (2):136 – 138.

[4] Goll DE. The calpainsystem[J]. Physiol Rev, 2003(3): 731 – 801.

[5] Goll DE, Thompson VF, Li H, et, al. The calpain system [J]. Physiol Rev, 2003 (3):731 – 801.

[6] Storr SJ,Lee KW,Woolston CM,et al. Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer[J]. Ann Oncol, 2012(9) :2289 – 2296.

[7] 唐佳艳. 钙激活中性蛋白酶在肝癌细胞迁移能力中的作用[J]. 贵阳医学院学报, 2011(3):356.

[8] Nakagawa TY,Brissette WH,Lira PD,et al. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice[J]. Immunity, 1999(2):207 – 217.

[9] Bania J, Gatti E, Lelouard H, et al. Human cathepsin S, but notcathepsin L,degrades efficiently MHC class II- associated invariantchain in nonprofessional APCs[J]. Proc Nat Acad SciUSA, 2003(11):6664 – 6669.

(2016-05-18 收稿,2016-08-23 修回)
中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 刘　华

(上接第 1165 页)

[3] Jin L, Wang T, Zhu ML, et al. Electrospun fibers and tissue engineering[J]. J Biomed Nanotechnol, 2012 (1): 1 – 9.

[4] Doan VHT, Hsiao SW, Ho MH, et al. Electrospun chitosan/hydroxyapatite nanofibers for bone tissue engineering[J]. J Mater Sci, 2013 (4): 1640 – 1645.

[5] Sajkiewicz P, Kołbuk D. Electrospinning of gelatin for tissue engineering – molecular conformation as one of the overlooked problems. Journal of Biomaterials Science[J]. Polymer Edition, 2014 (25): 2009 – 2022.

[6] Thuy N, Linh B, Lee BT. Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue engineering application[J]. J Biomater Appl, 2012 (27): 255 – 266.

[7] Yang D, Li Y, Nie J. Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs[J]. Carbohydr Polym, 2007 (3): 538 – 543.

[8] Sun ZC, Zussman E, Yarin AL, et al. Compound core-shell ploymer nanofibers by co-electrospinning[J]. Advanced Materials, 2003 (22): 1929 – 1932.

[9] Yang DZ, Li YN, Nie J, et al. Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs[J]. Carbohydrate Polymer, 2007 (3): 538 – 543.

[10] 张弢, 何志旭, 叶川, 等. 聚羟基丁酸/戊酸酯共聚物膜与人骨髓间充质干细胞的体外生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2014 (12): 1920 – 1925.

[11] Deepti SB, Singh Y, Dolly N, et al. Chitosan-HEMA-Gelatin macroporous scaffold for bone tissue engineering [J]. J Biomater Tissue En, 2015 (6): 479 – 485.

[12] Valerie M. Merkle, Zeng LK, et al. Core-shell nanofibers: integrating the bioactivity of gelatin and the mechanical property of polyvinyl alcohol[J]. Biopolymers, 2014 (4): 336 – 346.

(2016-06-10 收稿,2016-09-23 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵　毅