

## 羟基丁酸酯和羟基己酸酯共聚物的神经亲和性研究

杨吟野<sup>1,2</sup>, 李训虎<sup>1</sup>, 龚海鹏<sup>1</sup>, 陈国强<sup>1</sup>, 赵南明<sup>1</sup>, 张秀芳<sup>1\*</sup>

(1. 清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084;

2. 贵州民族学院物理系, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** PHA 具有良好的力学性能并能完全被生物降解, PHBHH<sub>x</sub> 是短链和长链单体共聚的 PHA, 具有硬度和韧性都好的特点。研究 PHBHH<sub>x</sub> 的亲水性、保持蛋白质在材料上有序结构变化的情况及 HeLa 细胞和鼠大脑皮层神经细胞在材料上的生长情况, 说明 PHBHH<sub>x</sub> 是很有希望的神经修复材料, 并且通过热分析法(DSC)得到其熔点, 使之便于以后的处理加工。

**关键词:** PHBHH<sub>x</sub>; HeLa 细胞; 神经细胞; 蛋白吸附; 熔点

**中图分类号:** Q421 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 6737 - (2001)02 - 0261 - 06

神经细胞通常不分裂, 神经受损会导致其功能丧失。目前应用于临床的神经修复方法有直接缝合法和自体移植法。前一种方法只适合于断损较小的情况, 后一种方法以肢体的其它功能受损为代价。针对上述两种方法的缺陷, 人们提出了人工神经导管法, 与自体移植相比, 该方法具有明显优越的组织学性能, 使之成为神经修复工作的热点。人工神经导管材料要求有良好的生物相容性、生物可降解性、较高的机械强度和亲水性等。聚羟基脂肪酸酯(PHA)是细菌胞内的一类具有相似结构的碳源和能源的储备物<sup>[1]</sup>。它的力学性能与聚乙烯、聚丙烯等热塑性材料类似, 并且可以完全降解进入自然界的生态循环。PHBHH<sub>x</sub> 是以 HB(3-羟基丁酸酯)单体为主要成分, 含有少量 HH<sub>x</sub>(3-羟基己酸酯)单体的一种 PHA, 其分子式如图 1 所示。随着 HH<sub>x</sub> 浓度的增加, 拉伸强度降低, 延展度增加, 使它包含了短链 PHA 和长链 PHA 的优点, 具有硬度和韧性都好的特点。最近, 在人的血细胞中发现较多量的 100 - 200 个单体的小分子 PHB<sup>[2]</sup>, 为其作为生物相容性及可降解材料提供了依据。我们以明胶为对照来评价 PHBHH<sub>x</sub> 的神经亲和性。

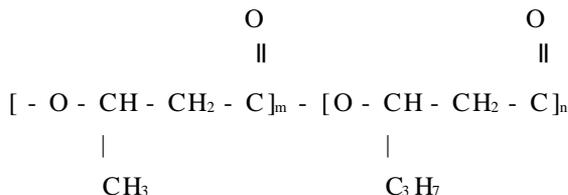


Fig. 1 The molecular structure of PHBHH<sub>x</sub>

收稿日期: 2000 - 09 - 11

基金项目: 国家 863 计划基金资助项目(No. 819 - 07 - 01)

作者简介: 杨吟野, 1969 年生, 讲师, 学生, 电话: (010) 62784766

\* 通讯作者: E - mail : zxf - dbs@mail.tsinghua.edu.cn.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

PHBHH<sub>x</sub>: PHBHH<sub>x</sub> 由水性需氧单胞菌合成的, 含 11mol %HH<sub>x</sub> 的共聚物, 分子量是 750kD ~ 1000kD; 由江门生物技术开发中心提供。1 克 PHBHH<sub>x</sub> 溶于 100 毫升氯仿中, 使溶液清澈, 最终浓度为 1%。

明胶: 本实验使用的明胶是电中性材料(pH7.1)。5 克明胶(BBL) 溶于 50 毫升去离子水中, 60℃ 水浴使其溶解。最终得到浓度为 10% 清澈的水溶液。

### 1.2 材料接触角的测量

在载玻片上铺膜, PHBHH<sub>x</sub> 自然风干, 明胶烘干。用 JY-82 型接触角仪对两种材料表面的静态接触角进行测量。测量前将去离子水滴加在材料表面。

### 1.3 吸附在材料表面蛋白的圆二色(CD)谱测量

在特殊的石英片上铺膜, 膜尽可能的薄。PHBHH<sub>x</sub> 自然风干, 明胶烘干。先将材料的本底用 JASCOJ-715 型极化光谱仪进行测量。配制 20mg/ml 的牛血清白蛋白(Sigma) 溶液, 将铺好膜的石英片浸泡于蛋白溶液中, 37℃ 下吸附 1 小时, 用 0.01mol/L PBS 缓冲液冲洗。然后测量, 波长范围 190 - 250nm, 叠加次数为 10 次。

### 1.4 DSC 测试

取 PHBHH<sub>x</sub> 薄膜 2mg, 然后用 Universal DSC 2910 热分析仪测量。升温速度为 10℃/min。

### 1.5 HeLa 细胞的培养

实验前在  $\phi 60$  的培养皿内铺膜, PHBHH<sub>x</sub> 和明胶各 5 个, 明胶烘干, PHBHH<sub>x</sub> 自然风干。平衡后, 紫外灭菌。取细胞, 用 0.25% 的胰酶于 37℃ 下消化后 1000r/min 离心。去上清, 加含血清培养液(低糖 DMEM + 双抗) 制成  $5 \times 10^4$  细胞/ml 的细胞悬液。将细胞悬液以 400ml/个接种在培养皿中, 于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 下培养细胞。培养 1 天、3 天分别采图, 观测材料对细胞的吸附、铺展和生长的影响。

### 1.6 胎鼠神经细胞的培养

实验前在  $\phi 60$  的培养皿内铺膜, PHBHH<sub>x</sub> 和明胶各 5 个, 明胶烘干, PHBHH<sub>x</sub> 自然风干。紫外灭菌。取胎鼠大脑皮层组织, 用 0.25% 胰酶消化 30 分钟后弃去胰酶, 加入培养液(DMEM 高糖培养基 + 10% 胎牛血清 + 50u/ml 青霉素与链霉素 + 0.6mg/ml 胰岛素) 吹打组织块, 制成浓度为  $5 \times 10^5$  cells/ml 的细胞悬液, 以每培养皿 4ml 接种于培养皿, 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养。3 天后, 弃去上清, 加入 2ml 培养液继续培养。定期用显微镜(Axiovert 10) 观察细胞, 并用图象采集卡采集细胞图象。

## 2 结 果

### 2.1 材料的亲水性测定

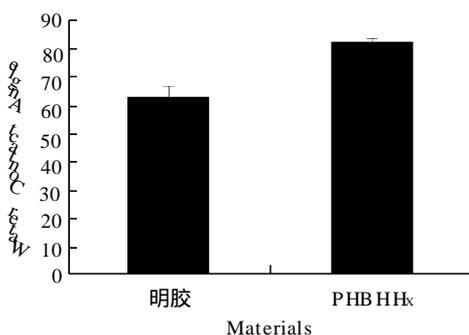


Fig. 2 The water contact angle of PHBHH<sub>x</sub> and gelatin. The number of test of every materials is exceed 6 times

材料的接触角越小,表明其亲水性越高。

从图 2 中可以看到,两种材料的静态接触角均小于 90 度,但 PHBHH<sub>x</sub> 的接触角大于明胶的接触角。

## 2.2 材料表面吸附蛋白的圆二色谱

图 3 为牛血清白蛋白吸附在 PHBHH<sub>x</sub> 和明胶材料上的 CD 谱线,其结构分析见表 1。

## 2.3 材料的熔点

图 4 为 PHBHH<sub>x</sub> 薄膜的 DSC 测试谱图,在 111.52 °C 有一个强烈的吸收峰,可知其为熔点。

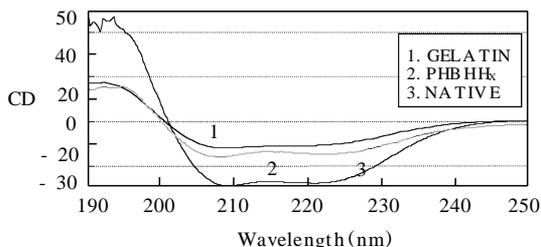


Fig. 3 The CD spectrum of serum albumin adsorbed on PHBHH<sub>x</sub> and gelatin

Table 1 The fraction of secondary structure of serum albumin in solution and adsorbed on materials measured by CD spectrum

	NATIVE	PHBHH <sub>x</sub>	GELATIN
- Helix (%)	36.4	31.5	30.1
- sheet (%)	23.0	11.8	30.8
- Turn (%)	11.7	21.4	8.6
Random (%)	28.9	35.3	30.6

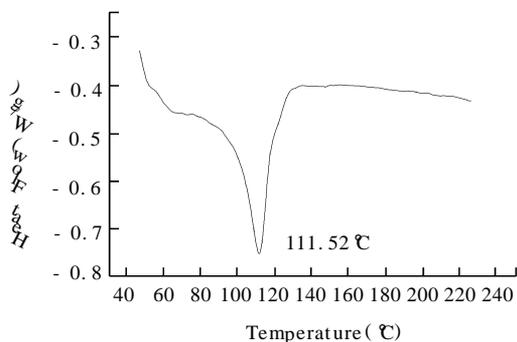


Fig. 4 Result of DSC experiment on PHBHH<sub>x</sub>

## 2.4 HeLa 细胞的生长状况

图 5a 为在 PHBHH<sub>x</sub> 材料表面培养 HeLa 细胞 1 天(上)、3 天(下)的结果;1 天后许多细胞已经贴壁、铺展,并且变成树叶型的扁平状,3 天后细胞在材料上已经长满。说明 PHBHH<sub>x</sub> 有利于 HeLa 细胞的生长。图 5b 为在明胶材料上细胞 1 天(上)、3 天(下)的生长情况,1 天后只有少数细胞贴壁,3 天后只有数量不多的细胞变成树叶型的扁平状。

## 2.5 胎鼠神经细胞的生长状况

图 6 为胎鼠大脑皮层神经细胞在两种材料上培养 6 天的情况。培养 1 天的图象反映神经细胞贴壁和铺展的状况,而培养 6 天的图象反映神经细胞生长的状况。a 图为在 PHBHH<sub>x</sub> 材料上培养细胞 1 天(上)、6 天(下)的情况,1 天后,PHBHH<sub>x</sub> 材料上的细胞已经变成扁平圆形,表明细胞已经贴壁,但没有铺展;培养 6 天之后,在 PHBHH<sub>x</sub> 材料上可清晰地看到神经元和神经元的轴突,某些轴突已开始聚集成束;b 图为明胶材料上培养细胞 1 天(上)、6 天(下)的情况,1 天后,细胞仍是细胞悬浮圆状,6 天后,明胶材料上只有细小的轴突长出。可以看出 PHBHH<sub>x</sub> 薄膜上细胞的生长情况好于明胶薄膜。

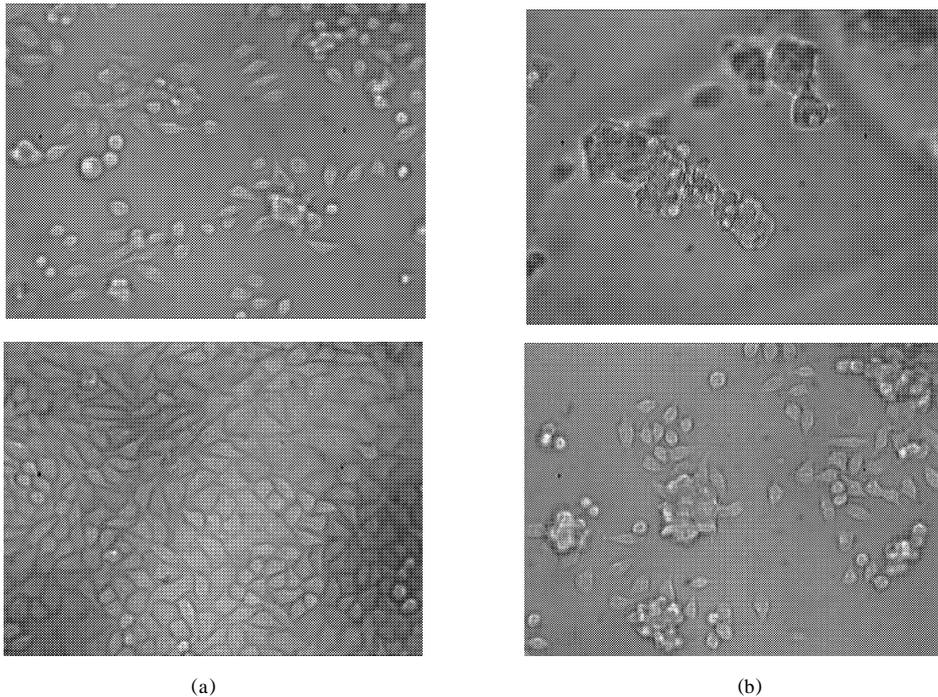


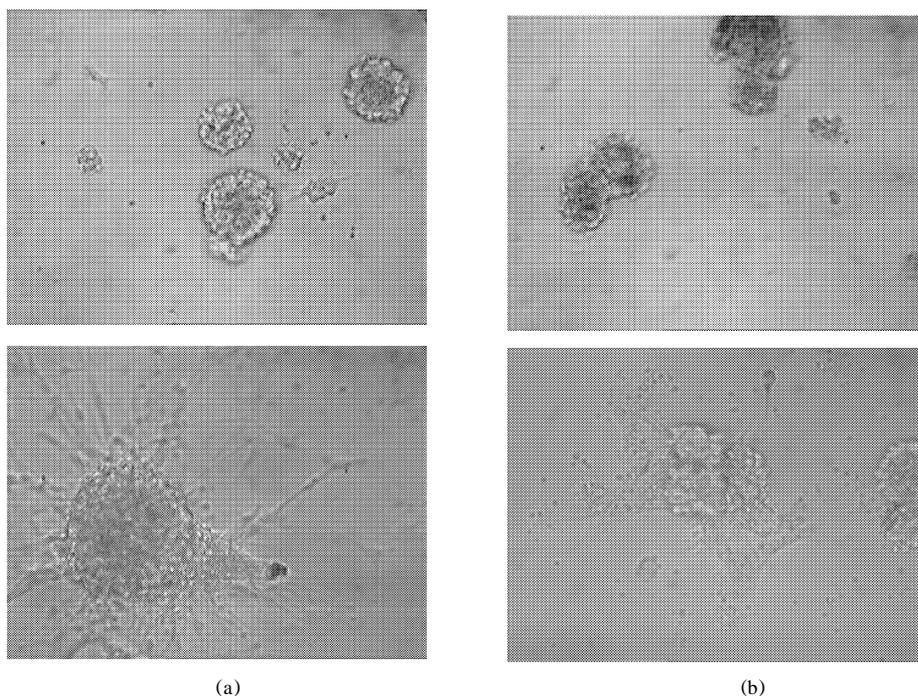
Fig. 5 The growth condition of HeLa cells cultured on (a) PHBHH<sub>x</sub> and (b) gelatin for 1 day(top) and 3 days(below)

### 3 讨 论

我们的主要目的是评价 PHBHH<sub>x</sub> 材料的神经细胞亲和性。当我们评价材料的神经细胞亲和性时,胎鼠大脑皮层神经细胞的培养结果应作为主要指标,而 HeLa 细胞的培养结果则为辅助指标。神经细胞在材料上的贴壁、铺展和生长受多种因素的影响。一方面,材料表面的性质,如亲水性和表面电荷都会影响材料与细胞的相互作用。另外一些因素,如材料表面的粗糙程度、材料的孔径和表面形貌等,也会影响细胞在材料表面的行为。另一方面,材料吸附细胞外基质粘附分子(laminin 和 fibronectin)和保持其结构的能力也影响细胞的贴壁、铺展和生长<sup>[3,4]</sup>。

我们从 PHBHH<sub>x</sub> 的分子式可知,其没有表面电荷。并且通常作为生物材料的明胶是一种中性材料。通过测量材料的接触角可知,PHBHH<sub>x</sub> 材料的亲水性略小于明胶材料。一般认为亲水性的表面有利于细胞的粘附和生长;但非常亲水的表面,如水凝胶和琼脂糖,同样不利于细胞的粘附和生长;有利于细胞粘附和生长的基质是中等吸湿度的材料。本研究组的龚海鹏等<sup>[6]</sup>以明胶为对照,在对壳聚糖材料进行神经亲和性研究时,发现明胶材料的亲水性好于壳聚糖材料,但培养神经胶质瘤细胞的情况逊于壳聚糖材料。

根据 M. Lampin 等人的研究,疏水性材料比亲水性材料吸附的蛋白更多,但亲水性材料能促进对蛋白的弱可逆吸附,从而保持被吸附蛋白的结构不变<sup>[5]</sup>。但奇怪的是,通过 CD 谱可知,PHBHH<sub>x</sub> 材料对蛋白吸附的性质与明胶材料类似,对有序结构的改变都比较小,而且从



**Fig.6** The growth status of fetal mouse cerebral cortex nerve cells on (a) PHBHH<sub>x</sub> and (b) gelatin for 1 day (top) and 6 days (below)

- Helix 的改变来看, PHBHH<sub>x</sub> 材料吸附蛋白的改变量为 13.45%, 而明胶材料吸附蛋白的改变量为 14.59%, 说明 PHBHH<sub>x</sub> 材料吸附蛋白的二级结构更接近天然态。并且, 尽管明胶能大量吸附 fibronectin, 但对 laminin 的吸附较差<sup>[6]</sup>, 这也表明, laminin 在神经细胞的贴壁和铺展方面起更重要的作用<sup>[7]</sup>。

PHBHH<sub>x</sub> 是由菌株合成的天然材料, 一般来说, 天然材料往往含有某些有助于细胞粘附和保持细胞分化功能的信息。从在两种材料上培养 HeLa 细胞和培养胎鼠大脑皮层神经细胞的情况来看, PHBHH<sub>x</sub> 材料上两种细胞的生长情况明显好于明胶材料上细胞的生长, 说明 PHBHH<sub>x</sub> 材料的神经亲和性好于明胶材料, 这是作为评价神经修复材料的一个重要指标。并且, X-ray 射线衍射的结果证明 PHBHH<sub>x</sub> 共聚物的结晶度随 HH<sub>x</sub> 单体的增多而下降, 结晶速率不会随 HH<sub>x</sub> 单体的引入而降低太多<sup>[8]</sup>, 而且通过 DSC 实验可知 PHBHH<sub>x</sub> 有明确的熔点, 从而使其易于后处理加工。所以, 通过以上实验和分析, PHBHH<sub>x</sub> 是很有希望的神经修复材料。

#### 参考文献:

- [1] Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Use of Bacterial Polyhydroxyalkanoates[J]. *Microb Rev*, 1990, 54:450 - 470.
- [2] Reusch RN, Sparrow AW, Gardiner J. Transport of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in human plasma[J]. *Biochem Biophysics Acta*, 1992, 1123:33 - 40.

- [3] Feng - Hui Lin , Chun - Jen Liao , Haw - Chang Lin , et al. *Behavior of fetal rat osteoblasts cultured in vitro on the DP - bioactive glass substratum. Materials Chemistry and Physics*[J], 1997,49:270 - 276.
- [4] Huber M, Heiduschka P, Kiele S, et al. *Modification of glass carbon surfaces with synthetic laminin - derived peptides for nerve cell attachment and neurite growth*[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998,41:278 - 288.
- [5] Lampin M, Legris C, Degrange M, et al. *Correlation between substratum roughness and wettability cell adhesion and cell migration*[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997,34:99 - 108.
- [6] Gong Hai - Peng, Zhang Xiu - fang. *Studies on nerve cell affinity of chitosan - derived materials*[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000,52:285 - 295.
- [7] Mieko Matsuzawa, Kazutoshi, Koji Sugioka, et al. *A biocompatible Interface for the geometrical guidance of central neurons in vitro*[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998,202:213 - 221.
- [8] Shimamuna E, Kasuya, Kobayashi K. *Physical Properties and biodegradability of Microbial Poly (3 - hydroxybutyrate - co - hydroxycaproate)*[J]. *Macromol*, 1994,27:878 - 880.

**STUDIES ON THE NERVE CELL AFFINITY OF POLY  
(3 - HYDROXYBUTYRATE - CO - 3 - HYDROXY HEXANOATE) (PHBHH<sub>x</sub>)**

YANG Yin - ye<sup>1,2</sup>, LI Xun - hu<sup>1</sup>, GONG Hai - peng<sup>1</sup>,  
CHEN Guo - qiang<sup>1</sup>, ZHAO Nan - ming<sup>1</sup>, ZHANG Xiu - fang<sup>1\*</sup>

- (1. *Department of Biological Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;*  
2. *Physics Department, Guizhou Institute for Nationalities, Guizhou, Guiyang 550025, China)*

**Abstract :** PHA is a kind of materials with excellent mechanical properties and complete biodegradability. PHBHH<sub>x</sub>, long chain and short chain monomer polymerized PHA, has a better tenacity and rigidity. In our experiment, Hela cells and fetal rat cerebral cortex nerve cells were cultured on PHBHH<sub>x</sub> respectively, and the nerve cell affinity of the materials were evaluated by measuring the water contact angle of the materials and the circular dichroism (CD) of proteins adsorbed on the materials. Results indicate that PHBHH<sub>x</sub> is one of the promising nerve restoring materials. DSC method was used to determine the melting point of the materials so that it will be convenient to process the materials later.

**Key Words :** PHBHH<sub>x</sub>; Hela cells; Nerve cells; Protein adsorption; Melting point