

取向纳米纤维聚合物膜引导内皮细胞生长的作用

韩昭昭¹, 孔桦¹, 孟洁², 王超英³, 朱广瑾², 解思深³, 许海燕¹

(1. 北京协和医学院基础学院, 中国医学科学院基础医学研究所生物医学工程学系,
2. 生理学和病理生理学系, 北京 100005; 3. 中国科学院物理研究所, 北京 100080)

摘要 采用高压静电纺丝技术构建了聚氨酯(PU)取向纳米纤维聚合物膜, 研究了其引导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)生长的作用. 通过扫描电子显微镜对PU取向纳米纤维聚合物膜的形貌进行了观察; 通过细胞增殖试验, 研究了PU取向纳米纤维聚合物膜对HUVEC生长的促进作用; 通过激光扫描共聚焦显微镜观察细胞骨架中肌动蛋白、微管蛋白及纽蛋白纤维的形成情况, 探讨了取向纳米纤维聚合物膜对细胞迁移、骨架发育的影响. 此外, 还通过EUSA方法检测了生长在不同聚合物膜上的HUVEC分泌组织因子(TF)的数量, 探讨了取向纳米纤维结构对HUVEC抗凝血功能的影响. 实验结果表明, PU取向纳米纤维聚合物膜取向良好, 直径为300~500 nm; 该薄膜可明显促进HUVEC增殖; 引导HUVEC沿纺丝方向定向排列生长且呈抗凝血表型, 组织因子分泌量明显低于对照组PU光滑膜. 因此, PU取向纳米纤维聚合物膜可提供适合内皮细胞的良好生存与增殖环境, 在血管的修复与再生方面具有潜在的重要应用价值.

关键词 取向纳米纤维聚合物膜; 电纺丝; 血管内皮细胞

中图分类号 O631; TB383

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)05-1070-04

组织工程支架在促进细胞生长和引导组织再生中起着重要的作用. 天然细胞外基质(ECM)分布于细胞外空间, 由胶原纤维和多糖等构成, 可以看成是由纳米尺度的蛋白纤维构成的纳米纤维网络结构, 纤维表面连接着多种糖蛋白分子, 起到支持细胞生长、调控细胞形态及生长等作用^[1]. 因此, 构建纳米尺度的拓扑结构有可能获得与天然细胞外基质较为接近的结构, 诱导细胞在支架中的生长、增殖和功能, 甚至可以影响细胞的分化^[2,3]. 近年来, 纳米技术为设计和制备具有纳米纤维结构的细胞生长支架提供了可能性. 已有的实验结果表明, 利用电纺丝技术构建的纳米纤维支架可以模拟天然细胞外基质的结构, 为细胞提供“友好”的生长微环境^[4~8]. 内皮细胞作为天然血管内层覆盖的一层细胞, 可以感应周围环境的变化, 合成释放多种生物活性物质, 调节凝血与抗凝血^[9]. 近年来, 人们观察了内皮细胞在不同的支架上的增殖及表型等生物行为, 并对其功能进行初步研究^[10,11]. 天然内皮细胞在血管表面沿血流方向轴向排列生长, 细胞定向生长排列的方向影响细胞的分化、增殖及功能^[12,13]. 因此, 制作出适合内皮细胞生长的、具有适宜孔径的表面拓扑结构的支架, 以模拟天然细胞外基质结构, 促进内皮细胞生长, 维持正常表型和形态, 是组织工程化血管研究中的关键问题之一. 本文通过高压静电纺丝技术制备了具有取向纳米纤维结构的聚氨酯薄膜(ANF-PU), 研究了HUVEC在ANF-PU上的增殖、形态和抗凝血能力, 并讨论了其可能的机制.

1 实验部分

1.1 材料、试剂和仪器

聚氨酯(PU), 购自天津聚氨酯制品厂; 96孔培养板使用未进行蛋白修饰的聚乙烯板, 购自北京普博生物技术公司; CellTiter 96 AQ_{ueous} 非放射性细胞增殖分析试剂(MTS分析), 购自美国Promega公司; 抗- β -微管蛋白单抗、抗-纽蛋白-单抗、四甲基异硫氰酸罗达明标记的鬼笔环肽(phalloidin-tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate)、生物素偶联的抗小鼠IgG抗体、FITC标记的链亲和素蛋白(Streptavidin-

收稿日期: 2007-07-27.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 90606018)和国家纳米科学中心基金资助.

联系人简介: 许海燕, 女, 研究员, 主要从事生物材料方面研究. E-mail: xuhy@pumc.edu.cn

FITC)和4,6-二脒基-2-苯基吡啶,购自美国Sigma公司;人组织因子定量酶联免疫吸附试剂盒购自美国BPB公司;内皮细胞生长因子(EGGF)购自瑞士罗氏公司;胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司;牛I型胶原蛋白购自美国Sigma公司;其它试剂均为国产分析纯试剂.扫描电子显微镜(SEM, S-5200, Hitachi)、激光共聚焦显微镜(LEICA TCS SP2 SE, 德国)、酶标仪(Bio-Rad Automated EIA Analyzer).

1.2 用于细胞培养的材料制备

将PU溶于四氢呋喃(THF)配制成质量体积分数为5%的溶液,将溶液加入到玻璃模具中,待溶剂自然挥发后脱模得薄膜(S-PU).在50℃下真空干燥48h以彻底除去薄膜中的残余溶剂.膜的厚度约为200 μm.另配制质量体积分数为10% PU/THF溶液.用高压静电纺丝技术制备具有取向纳米纤维结构的薄膜(ANF-PU),采用水平旋转的收集屏,针尖至收集屏距离为20 cm,工作电压1.5 kV.薄膜经超声清洗后固定在PU薄膜上.将S-PU和ANF-PU铺垫在96孔与24孔板中.

1.3 细胞培养、接种和增殖实验及细胞骨架观察

根据文献[14]方法从正常人脐静脉分离内皮细胞(HUVEC),培养于添加有质量分数0.004% ECGF、15%胎牛血清、100 Unit/mL青霉素、100 Unit/mL链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺和50 μg/mL肝素的M199的完全培养基中,至70%~80%融合状态,采用同一脐带来源第二、三代细胞为实验细胞.

用20 μg/cm²牛I型胶原蛋白包被上述材料,在紫外灯下照射消毒1h.将HUVEC以适当的浓度接种于上述两种材料之上,置于细胞培养箱中,用MTS法检测培养1,5和7d后细胞的增殖情况,并计算出活细胞数.同样条件下重复3次.

分别接种HUVEC于ANF-PU和S-PU上,放入培养箱中孵育,在2和7d时将膜取出,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4)洗涤3次,用含1%蔗糖和4%甲醛的固定液在37℃水浴中固定15 min;按说明书中方法洗涤并做封闭处理,加入一抗-2%抗-β-微管蛋白单抗、2%抗-α-肌动蛋白-单抗及2%罗丹明标记的鬼笔环,于37℃避光放置1h.用Tween/PBS将样品洗涤3次.加入2%二抗,室温避光1h.用Tween/PBS将样品洗涤3次,每次5 min.加入2% FITC 标记的链亲和素蛋白,避光30 min,清洗;加入DAPI,于4℃避光1h,清洗,晾干后用5%甘油封片,用激光共聚焦显微镜(Confocal Vokogawa CSU10)观察.

1.4 组织因子的分泌和统计分析

接种HUVEC到铺好上述各种材料膜的24孔板中,细胞密度为62500个/孔,置于培养箱中培养2d后吸取培养孔中培养基上清液,用定量酶联免疫吸附试剂盒检测材料表面生长的HUVEC组织因子(TF)分泌量.同时利用MTS法检测培养板中细胞数,进而评价HUVEC组织因子分泌水平.所有数据以平均值±标准差表示,统计分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时认为有统计学显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 PU取向纳米纤维支架的形态

通过光学显微镜和扫描电子显微镜观察ANF-PU的形态,结果如图1(A)所示. ANF-PU为白色薄

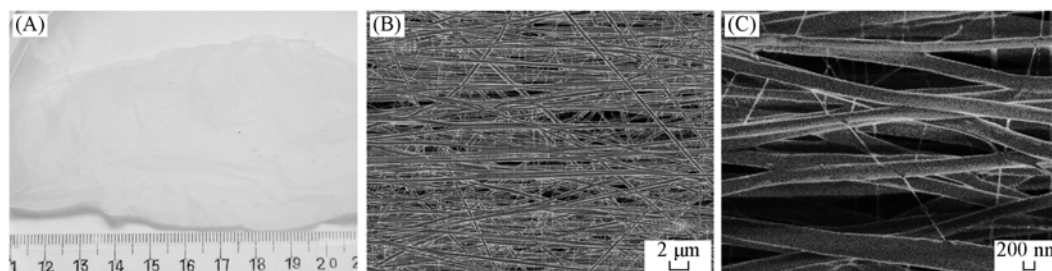


Fig. 1 Morphology of the aligned nanofibrous film of PU

(A) Optical graph shows that the film was a fabric-like film, its area reached tens of square centimeters; (B) SEM image presents the aligned nanofibers in the film, in which the image with low magnification shows that most of the fibers in the film were aligned with an average fiber diameter of 300—500 nm; (C) SEM image presents the aligned nanofibers in the film, in which the image with high magnification shows the interconnected pores among fibers.

膜,面积可达到几十平方厘米.图1(B)显示大部分纤维向着横轴方向排列,取向纤维直径为300~500 nm,中间有极细纤维将取向纤维相互连接,交织形成具有微米尺度孔隙的取向三维网络结构.其中纳米尺度纤维较好地模拟了天然细胞外基质中蛋白纤维的尺寸与结构,而孔隙有利于细胞的长入,营养成分和代谢产物的交换以及细胞的迁移.

2.2 细胞增殖能力

从图2可以看出,在7 d的培养时间内,两种材料上细胞均不断增殖,ANF-PU上细胞数均大于S-PU.培养1 d时两种材料无明显差异($P > 0.05$),但是培养5和7 d时,ANF-PU上的细胞数明显高于S-PU,具有显著性差异($P < 0.01$).结果表明,具有纳米尺度结构的ANF-PU具有显著促进和维持HUVEC增殖的功能,提示可能与纺丝薄膜具备三维纳米纤维结构,在纳米尺度模拟了天然细胞外基质的孔、脊和纤维结构^[15,16]有关.

2.3 细胞骨架的观察

图3给出了HUVEC在培养2和7 d后,分别在S-PU和ANF-PU上生长时的细胞骨架发育情况.可以看出,细胞在ANF-PU生长时,细胞沿纤维方向伸长生长,细胞骨架沿纳米纤维方向排列,肌动蛋白、 β -微管蛋白、钮蛋白均发育良好,排列整齐

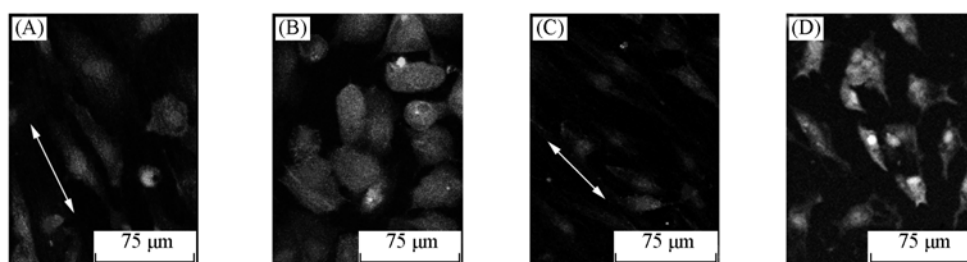


Fig. 3 Laser scanning confocal microscope images of HUVEC on the aligned nanofibrous film of PU (A, B) and smooth film of PU (C, D) cultured after 2 d (A, B) and 7 d (C, D)

Cells were stained with rhodamine-labeled phalloidin to visualize α -actin, FITC to visualize β -tubulin and vinculin, DAPI to visualize nuclei. Cell-seeding density: 31250 cell/cm². Double-headed arrows point out the direction of the cell arranged parallel to the direction of aligned nanofibers of the film.

[图3(A)和图3(C)],其中培养7 d较培养2 d时发现HUVEC更加伸长,取向更加明显.培养2和7 d时细胞的平均长宽比分别为4和6.25,而在S-PU上,细胞呈扁平形态,平均长宽比为1.25,且无取向排列生长[图3(B)],7 d时,细胞呈不规则形态,细胞骨架不清晰[图3(D)].上述结果提示,细胞可以感受到它的生长环境,沿着定向纳米纤维方向生长,并随着时间的增长,取向更加明显.此外,相对于光滑的薄膜,HUVEC更适合在具有纳米纤维拓扑结构的薄膜上长时间生长.

2.4 组织因子的释放

图4显示了HUVEC在两种材料上生长2 d时每1000个细胞释放的TF量.由图4可见,细胞在

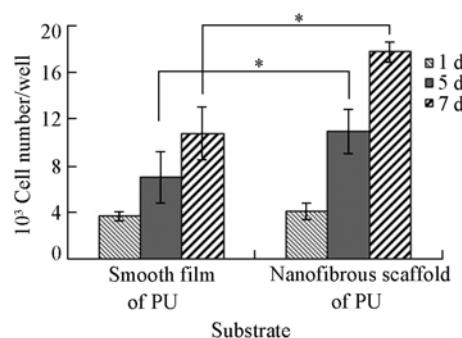


Fig. 2 Viability of the HUVECs growing on the substrates during 7 d

The cell numbers increased gradually over the culture time in both substrates, the film of PU with aligned nanofibrous structure had a higher cell number cultured for 5 and 7 d than smooth film. Mean \pm SD, $n = 3$, * $P < 0.01$. The cell number was measured by MTS assay. Cell-seeding density: 12500 cell/cm².

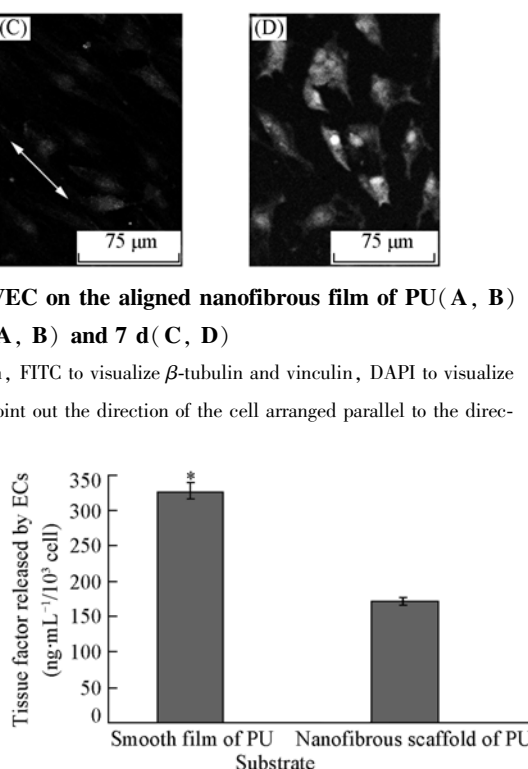


Fig. 4 TF release from the HUVECs seeded on the substrates

Cell-seeding density: 31250 cell/cm² and incubated for 2 d. Cells on the PU film with aligned nanofibrous structure release less TF than that on the smooth film. Mean \pm SD, $n = 3$, * $P < 0.05$. TF release was measured by using TF assay.

PU 取向纳米纤维支架上生长时,释放的 TF 量明显低于 PU 光滑平膜 ($P < 0.05$). TF 是启动外源性凝血的重要因子,由血管内皮细胞分泌.当内皮的完整性受到破坏时,内皮细胞释放出大量的 TF,引起凝血.实验结果表明,与 S-PU 相比,在 ANF-PU 上生长的 HUVEC 呈现抗凝血表型,不易引起凝血,完整性较好.

参 考 文 献

- [1] ZHAI Zhong-He(翟中和), WANG Xi-Zhong(王喜中), DING Ming-Xiao(丁明孝). Cell Biology(细胞生物学)[M], Beijing: Higher Education Press, 2005: 97—105
- [2] Laurencin C. T., Ambrosio A. M. A., Borden M. D., *et al.*. Annu. Rev. Biomed. Eng. [J], 1999, **1**: 19—46
- [3] Dunn G. A.. Cell Behavior[M], Cambridge: Cambridge University Press, 1982: 247—280
- [4] Xu C., Inai R., Kotaki M., *et al.*. Tissue Engineering[J], 2004, **10**(7/8): 1160—1168
- [5] Mo X. M., Xu C. Y., Kotaki M., *et al.*. Biomaterials[J], 2004, **25**(10): 1883—1890
- [6] Sun T., Mai S., Norton D., *et al.*. Tissue Engineering[J], 2005, **11**(7/8): 1023—1033
- [7] Li W. J., Tuli R., Okafor C., *et al.*. Biomaterials[J], 2005, **26**(6): 599—609
- [8] Xu C. Y., Inai R., Kotaki M., *et al.*. Biomaterials[J], 2004, **25**(5): 877—886
- [9] McGuigan A. P., Sefton M. V.. Biomaterials[J], 2007, **28**(16): 2547—2571
- [10] Boura C., Muller S., Voegel J. C., *et al.*. Clinical Hemorheology and Microcirculation[J], 2005, **33**(3): 269—275
- [11] Williamson M. R., Black R., Kieley C.. Biomaterials[J], 2006, **27**(19): 3608—3616
- [12] Kidoaki S., Matsuda T.. J. Biomed Mater. Res. A[J], 2007, **81**(3): 728—735
- [13] Singhvi R., Kumar A., Lopez G. P., *et al.*. Science[J], 1994, **264**(5159): 696—698
- [14] Jaffe E. A., Nachman R. L., Becher C. G., *et al.*. J. Clin. Invest. [J], 1973, **52**(11): 2745—2756
- [15] Abrams G. A., Goodman S. L., Nealey P. F., *et al.*. Cell Tissue Res. [J], 2002, **299**(1): 39—46
- [16] Abrams G. A., Schaus S. S., Goodman S. L., *et al.*. Cornea[J], 2000, **19**(1): 57—64

Growing Behavior of Endothelial Cells on Electrospun Aligned Nanofibrous Film of Polyurethane

HAN Zhao-Zhao¹, KONG Hua¹, MENG Jie², WANG Chao-Ying³,
ZHU Guang-Jin¹, XIE Si-Shen³, XU Hai-Yan^{1*}

(1. Department of Biomedical Engineering, 2. Department of Pathology, Institute of Basic Medical Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China;
3. Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The nanofibrous film of polyurethane(PU) with aligned topography was fabricated by electrospinning for human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) growth. The morphology of nanofibrous film was observed and characterized by scanning electron microscopy(SEM). The cells growth behavior including proliferation, cytoskeleton formation of actin, tubulin and vinculin, and tissue factor(TF) release was investigated *via* cell viability assay, confocal observation and TF assay. The average diameter of the generated fiber was around 300—500 nm. The experimental results indicate that the aligned nanofibrous film of PU exhibited promotional influence on the cell proliferation. It was also observed that the film possessed an advantage of supporting HUVEC migrating and aggregating along the axis of the aligned nanofibers, which is one of the important functions in the process of endothelium regeneration. It was also demonstrated that the endothelial cells growing on the film expressed non-thrombogenic phenotype with low tissue factor released. These results indicate the favorable interactions between ECs and the film, implying that the aligned nanofibrous film of PU has a promising potential for vascular engineering.

Keywords Aligned nanofibrous polymer film; Electrospun; Vascular endothelial cell

(Ed.: H, J, Z)