

肝脏组织工程纳米纤维支架材料的比较研究

褚薛慧¹ 施晓雷¹ 冯章启² 顾忠泽² 丁义涛^{1*}

¹(南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科,南京 210008)

²(东南大学生物电子学国家重点实验室,南京 210096)

Comparative Study of Different Nanofiber Scaffolds for Liver Tissue Engineering

CHU Xue-Hui¹ SHI Xiao-Lei¹ FENG Zhang-Qi² GU Zhong-Ze² DING Yi-Tao^{1*}

¹(Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008)

²(State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096)

摘要: 探讨海藻酸钠、壳聚糖和 PLGA 纳米纤维支架的机械稳定性、生物相容性及细胞在其表面的生长规律,寻找合适的肝脏组织工程支架材料。用静电纺丝的方法分别制备海藻酸钠、壳聚糖和 PLGA 纳米纤维支架,观察材料的机械稳定性及肝细胞在材料表面的活性和生长情况。接种后 0.5 h 内,肝细胞在壳聚糖和海藻酸钠材料表面贴壁,生长良好。第二天起,肝细胞在壳聚糖表面逐渐聚集生长,形成聚集体,而在海藻酸钠材料表面无聚集。第三天起,海藻酸钠材料发生溶胀,纳米结构破坏,而壳聚糖纳米支架保持完好。在观察期间,PLGA 材料表面一直没有肝细胞黏附。肝脏细胞不能在 PLGA 纳米材料表面黏附生长;壳聚糖具有良好的生物相容性,且肝细胞在壳聚糖纳米材料表面能形成球形聚集体;海藻酸钠生物相容性好,但机械稳定性差,容易降解,不能单独作为肝脏组织工程的纳米支架材料。

关键词: 肝组织工程; 纳米支架; 海藻酸钠; 壳聚糖; PLGA

Key words: liver tissue engineering; nano-scaffold; sodium alginate; chitosan; PLGA

中图分类号 R318 文献标识码 D 文章编号 0258-8021(2009)03-0476-05

引言

肝功能衰竭由于进展迅速、预后较差,是目前临床上较为棘手的一类症候群^[1]。肝移植是肝功能衰竭惟一有效的治疗措施,但由于其来源匮乏及存在的伦理问题,远远不能满足临床的需求^[2]。组织工程是近年来正在兴起的一门新学科,它为肝功能衰竭的治疗带来了曙光。组织工程的核心是建立由细胞和生物材料构成的三维空间复合体,而生物材料的好坏又在很大程度上决定了其中细胞的活性和功能,因此寻找合适的支架材料是人们一直孜孜以求的目标。近年来,纳米材料在组织工程中得到了广泛应用,并被证明具有良好的性能,但在肝组织工程中的应用却鲜有报道。为了寻找合适的肝组织工程的纳米纤维材料,本研究用静电纺丝的方法制备了

壳聚糖、海藻酸钠和聚乳酸-乙醇酸(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 3 种纳米支架材料,对其机械稳定性及生物相容性进行了评价,并观察了肝细胞在各自表面的生长规律。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的海藻酸钠购自连云港海藻酸钠工业有限公司,壳聚糖(脱乙酰度 88%)购自济南海得贝海洋生物工程有限公司,PLGA 购自济南岱罡生物技术有限公司,所有材料均为分析纯。主要培养试剂 RPMI1640、新生牛血清均购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 纳米支架材料的制备

(1)海藻酸钠纳米纤维支架的制备:海藻酸钠按

收稿日期:2008-06-03,修回日期:2009-02-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772129);南京市卫生局重点项目(ZKX06015)

*通讯作者。E-mail: yitaoding@hotmail.com

4%质量分数溶于水中,将溶液抽至玻璃注射器后,由注射泵驱动,在电场作用下纺至盖玻片上,纺完后用10%的氯化钙溶液固定,烘干备用。

(2)壳聚糖纳米纤维支架的制备:壳聚糖和 PEO 按 9:1 质量比称量作为溶质,乙酸和甲醇按 7:3 体积比称量作为溶剂,溶质在室温下按 2.6%质量比溶于溶剂。充分溶解并离心后抽吸至玻璃注射器中,由注射泵驱动,在电场作用下纺至盖玻片上,并用氨水固定,烘干备用。

(3)PLGA 纳米纤维支架的制备:PLGA 粉末按 10%质量分数溶于六氟异丙醇,将溶液抽至玻璃注射器后,由注射泵驱动,在电场作用下纺至盖玻片上,直接烘干备用。

1.2.2 大鼠原代肝细胞的获取

大鼠原代肝细胞的获取采用改良的两步原位胶原酶灌注法^[3]。SD 清洁级大鼠在术前禁食半天,氯胺酮 5 mL/kg 肌肉注射麻醉,采用正中十字切口进腹。用套管针穿刺大鼠门静脉,结扎固定后,立即灌注 D-Hanks 液,剪断肝下腔静脉作流出道,直至肝脏内血液基本全部灌出,肝脏颜色变成土黄色为止。小心取下肝脏,置于无菌的培养皿中,再用注射器缓慢推灌预热的 37℃ 的 0.05% 型胶原酶 50 mL,消化 6~7 min 后,肝脏变软,表面可呈颗粒状改变。在超净台剔除结缔组织并机械研磨后,再用 200 目网筛过滤,所得细胞反复离心洗涤 3 次,制成肝细胞悬液。采用苔盼兰拒染实验检测细胞活性,超过 95% 的用于后续培养。

1.2.3 肝细胞在支架材料表面的接种及观测指标

将上述制备好的 3 种纳米纤维支架材料置于 6 孔板中,采用环氧乙烷消毒备用。将获取的原代大鼠肝细胞按 10^6 /mL 的密度接种于材料表面,培养液为 RPMI 1640 加 10% 的新生牛血清。细胞置于 37℃、5% CO₂ 浓度的培养箱中培养,每两天更换培养液一次,每天在倒置相差显微镜下观察细胞形态及贴壁情况。

为了了解细胞在各材料表面的黏附情况,每天对细胞进行计数。每次换液时,将收集的培养液在 2 000 r/min 转速下离心,沉积的细胞经洗涤后用细胞裂解液裂解,其中蛋白的浓度用 BCA 蛋白浓度试剂盒检测。由于每个细胞中总蛋白含量基本一定,所以每次脱落的细胞可以根据蛋白含量推算出来,而黏附细胞的数量也可以相应得到。

采用 MTT 法检测细胞的生长情况:在培养第三天的时候,每孔中加入 200 μ L MTT,37℃ 孵育 3 h 后,弃去上清,加入 200 μ L 二甲亚砜,溶解形成结晶。最后将溶液转移至 96 孔板中,在酶标仪上读取 570 nm 的 OD 值。

为了观察 3 种纳米支架的表面形态并评估其机械稳定性,将材料浸泡在 RPMI 1640 培养液中 3 d。并在浸泡前后用扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM) 对它们进行形态表征。将材料置于二氧化碳临界点干燥仪 (HCP-2, Hitachi, 日本) 中干燥,镀金后置于 SEM 发射场加以观察。

肝细胞在培养 3 天后,对其进行细胞活性的荧光染色。所采用染料为 Calcein-AM 及 Sytox Orange 双染 (Molecular Probes, 美国),前者进入活性细胞胞浆后,能被这些细胞内的酶催化降解,发出绿色荧光,后者能与死细胞的细胞核结合,发出红色荧光。

2 结果

2.1 肝细胞在纳米支架材料表面的形态观察

新鲜分离的原代大鼠肝细胞加入上述 6 孔板中的 3 种材料上后,0.5 h 内,肝细胞在壳聚糖及海藻酸钠纳米材料表面基本全部贴壁,细胞分布均匀,部分细胞可见典型的肝细胞双核现象。第二天,在壳聚糖纳米表面可见肝细胞有聚集生长的趋势,并形成小的聚集体,而在海藻酸钠纳米材料表面,细胞仍呈独立分布状态,细胞分布均匀,未见聚集生长现象。第三天,在壳聚糖纳米材料表面,可见肝细胞相互之间聚集生长更为明显,细胞之间连接紧密,形成较大的球形聚集体。而在海藻酸钠纳米材料表面,肝细胞有明显脱落,细胞数目大为减少,细胞之间独立分布。在整个观察期间,肝细胞在 PLGA 材料表面基本没有贴壁,大部分细胞呈悬浮状态(见图 1)。

2.2 肝细胞在各材料表面的黏附率

由图 2 可以看出,肝细胞在各组材料表面的黏附情况有很大的差别。肝细胞在壳聚糖纳米纤维支架表面黏附比较牢靠,其黏附率一直保持在 90% 以上。在海藻酸钠材料表面,肝细胞第一、二天的黏附率比较高,维持在 90% 左右,但到第三天,其黏附率急剧下降,只有 60% 左右。而在 PLGA 材料表面,肝细胞黏附率一直比较低,只有 10% 左右,第三天更是降到了 6%。在培养第三天,各组间黏附率有统计学差异 ($P < 0.05$)。

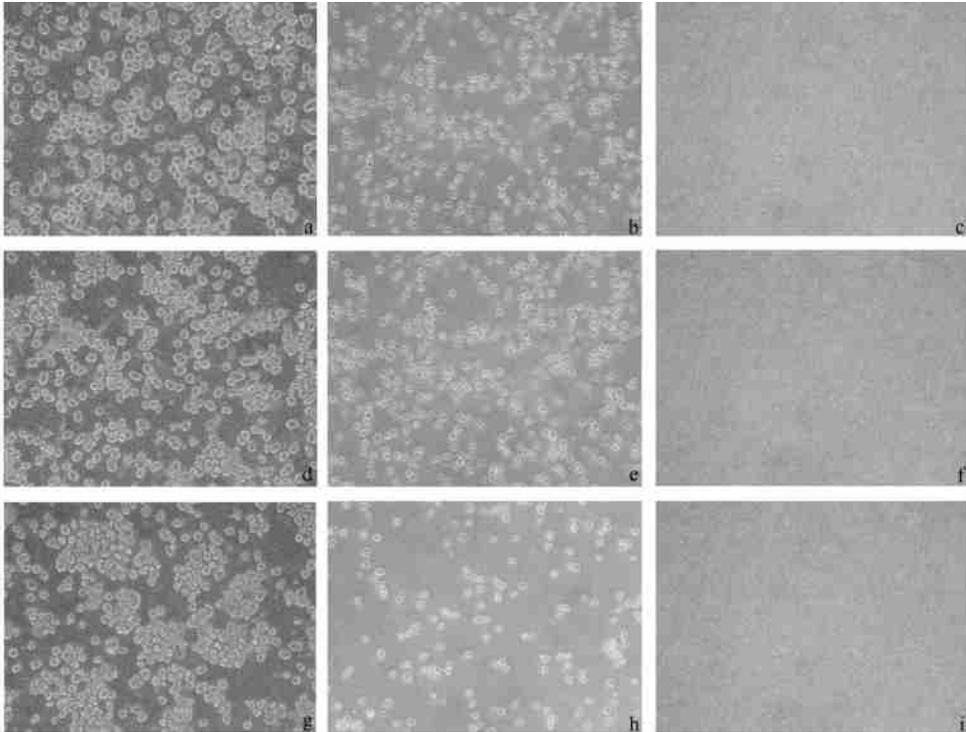


图1 肝细胞的形态观察(光镜, $\times 100$)。(a)~(c)第一天时,肝细胞分别在壳聚糖、海藻酸钠和 PLGA 表面; (d)~(f)第二天时,肝细胞分别在壳聚糖、海藻酸钠和 PLGA 表面; (g)~(i)第三天时,肝细胞分别在壳聚糖、海藻酸钠和 PLGA 表面

Fig.1 Morphology observation of the hepatocytes (light microscopy, $\times 100$). (a)~(c) at the first day hepatocytes on the substrates of chitosan, alginate and PLGA, respectively; (d)~(f) at the second day hepatocytes on the substrates of chitosan, alginate and PLGA, respectively; (g)~(i) at the third day hepatocytes on the substrates of chitosan, alginate and PLGA, respectively

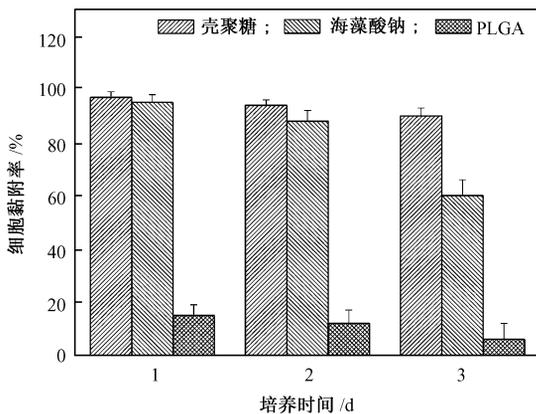


图2 肝细胞在各材料表面的黏附率

Fig.2 Cell attachment of hepatocytes on three different substrates

2.3 肝细胞在各材料表面的生长情况

用 MTT 比色法测定肝细胞的生长情况。由图 3 可以看出,在第三天的时候,各组材料表面肝细胞的吸光值有着显著的差别,壳聚糖纳米材料组为 0.68,海藻酸钠组为 0.38,而 PLGA 组只有 0.07,各

组间有统计学差异 ($P < 0.05$)。

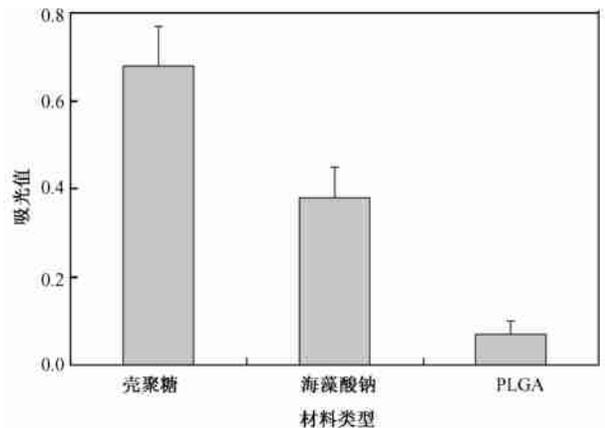


图3 肝细胞在各材料表面的生长情况

Fig.3 MTT assay of hepatocytes on three different substrates

2.4 纳米支架材料的电镜观察(SEM)

为了更好地了解 3 种材料的力学强度及机械稳定性,将 3 种材料分别在 RPMI 1 640 培养液中浸泡了 3 d,并在浸泡前后对它们分别进行了扫描电镜观

察。由图 4 可以看到,在浸泡之前,3 种材料均为纳米级别纤维构建的多孔支架结构。纤维粗细均匀并随机分布,纤维直径在 150 ~ 200 nm,而纤维之间的孔隙直径在 1 ~ 2 μm,这些结构很好地模拟了细胞在体内的拓扑结构,即细胞外基质的形态。在培养

液浸泡 3 d 后可以看出来,壳聚糖纳米纤维基本上仍保持它的形态和孔隙,其纳米拓扑性质没变;而海藻酸钠纳米纤维则发生了溶胀,纳米结构塌陷,孔隙结构消失,甚至出现了断裂;PLGA 在浸泡前后基本没有改变,很好地维持了它原有的结构和形态。

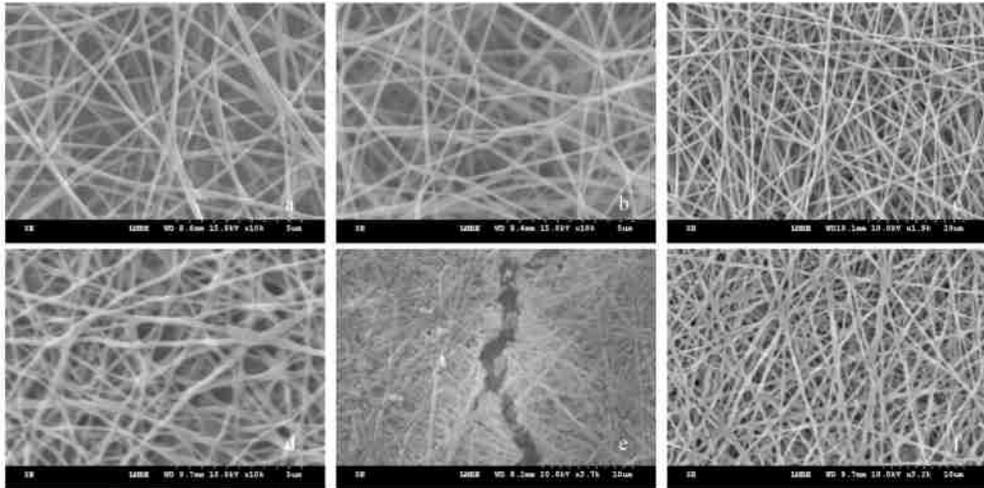


图 4 不同纳米支架材料在培养液浸泡 3 d 前后的扫描电镜图片。(a) ~ (c) 浸泡前的壳聚糖、海藻酸钠和 PLGA; (d) ~ (f) 浸泡后的壳聚糖、海藻酸钠和 PLGA

Fig. 4 SEM micrographs of different nano-scaffolds before and after immersion in culture medium for 3 days. (a) ~ (c) before immersion, the substrates of chitosan, alginate and PLGA; (d) ~ (f) after immersion, the substrates of chitosan, alginate and PLGA

2.5 肝细胞在支架材料表面的活性荧光染色

为了检验材料的生物相容性,对培养 3 d 后的材料表面细胞进行了细胞死活荧光染色,见图 5。从图中可以看出,在壳聚糖纳米纤维表面,细胞贴壁良好,均保持了良好的活性,基本没有死细胞存在,部分肝细胞形成聚集体生长,也保持了良好的活性;

在海藻酸钠材料表面,细胞数目下降,但大部分仍为活性细胞,只有少部分同时染上两种颜色,呈黄色,提示细胞可能处于凋亡阶段;在 PLGA 纳米材料表面,只有少量肝细胞零星分布在材料表面,且细胞染色均为红色,提示肝细胞大都已经死亡。

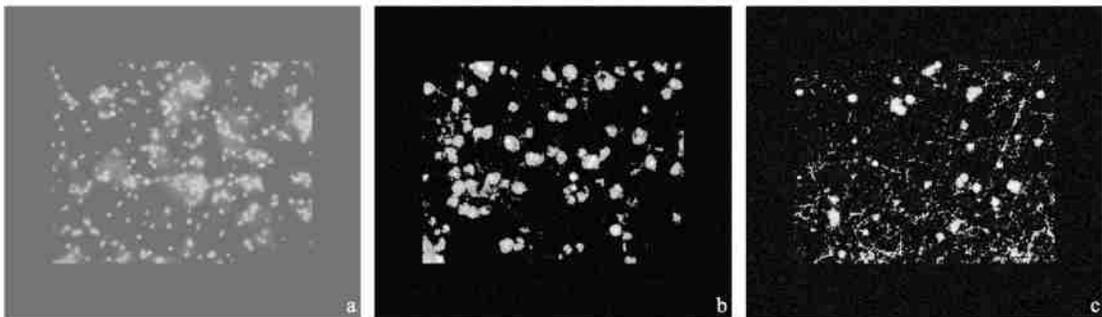


图 5 肝细胞在 3 种材料表面接种 3 d 后的死活荧光染色。(a) 壳聚糖;(b) 海藻酸钠;(c) PLGA

Fig. 5 Dead/live fluorescence double staining of hepatocytes on the surface of three nano-scaffolds 3 days after inoculation. (a) chitosan; (b) alginate; (c) PLGA

3 讨论

细胞在体内生存的微环境大多是由胶原纤维及

其他细胞表面构成的纳米支架结构,除蛋白质是调节细胞生命活动的一个重要因素外,纳米级的支架结构界面是另一个重要因素^[4]。组织工程学研究发

现,一般支架材料可从3个尺度控制组织的生长发育^[5]:毫米尺度决定人工组织总的形态和大小;微米尺度决定支架孔隙的形态结构,从而调节细胞的迁移和生长;纳米尺度决定支架材料的表面化学或立体微观结构,能调节与其相接触细胞的黏附、伸展和基因的表达。为此,人们开始寻找各种合适的纳米材料来模拟细胞在体内的纳米拓扑结构,以希望能更好地提供细胞生长所需的微环境,延长细胞的生命,增强细胞的功能。

纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围(0.1~100 nm),或由它们作为基本单元而构成的材料。近年来,纳米技术得到了迅速发展,其应用领域也越来越广,尤其是骨^[6]、神经^[7-8]、膀胱^[9]、角膜^[10-11]等组织工程,均得到了良好的实验效果,但其在肝脏组织工程中的应用却鲜有报道。为了将纳米材料引入到肝脏组织工程,寻找肝细胞生长合适的纳米支架,本研究采用静电纺丝的方法制备了3种不同的纳米材料,研究了它们的机械稳定性和生物相容性,并观察了肝细胞在其表面的生长情况。

壳聚糖、海藻酸钠及 PLGA 是组织工程中应用较多的3种材料,在以往的研究中被证明具有良好的生物相容性和机械稳定性^[12-15]。本研究将这三种材料制成纳米纤维支架后培养肝细胞,发现肝细胞在壳聚糖和海藻酸钠纳米材料表面贴壁良好,而在 PLGA 纳米材料表面则基本没有贴壁,这提示肝细胞贴壁除了与材料的生物相容性有关外,与其所处的微环境也具有密切的联系。壳聚糖提取于甲壳类动物,是自然界惟一的碱性多糖、阳离子聚合物,在临床以及医药领域大量应用。海藻酸钠是从海藻中提取而来的一种天然聚合物,而 PLGA 是一种优良的人工合成生物材料。实验中细胞不能贴壁于 PLGA,可能与其表面疏水、带负电荷有密切的关系。有实验表明,疏水带负电的材料对细胞贴壁很不利,而在其表面修饰一些基团使其带上正电荷,则能促进细胞的贴壁^[16]。

在对材料机械稳定性的检测中,PLGA 展示了它作为人工合成材料的优越性。在培养液中浸泡3 d后,其结构基本都没有变化,形态保持良好。壳聚糖在浸泡后略有变形,但其纳米结构仍在,孔隙保持良好。而海藻酸钠则完全失去了原有的纳米结构,孔隙塌陷,纤维溶胀,甚至出现断裂,体现了较差的机械稳定性,这也可能正是肝细胞在其表面培养三天后,开始大量脱落的原因。

随着纳米材料在组织工程中的应用越来越广泛,其生物相容性也越来越受到人们的重视,很多人认为纳米材料对机体、对细胞存在一定的毒性作用,因此本实验对细胞在纳米材料表面的活性进行了检测。在实验中发现,壳聚糖和海藻酸钠体现了其作为天然材料良好的生物相容性,细胞基本都保持了良好的活性。海藻酸钠材料表面的细胞活性下降,可能也与其纤维发生溶胀、细胞即将脱落有关。PLGA 表面细胞由于不能贴壁,或者贴壁很少,在培养过程中慢慢失去了其活性,因而染色后表现为红色,因此其生物相容性要明显差于前两者。

在培养过程中还发现了一个有趣的现象,那就是肝细胞在壳聚糖纳米材料表面培养时,细胞逐渐形成了聚集生长,而该现象在既往的研究中也有类似的报道。Sung-Jan Lin 等将黑色素细胞培养在尼龙-壳聚糖材料表面后发现,细胞能在材料表面形成聚集体生长,而且壳聚糖所占比例越高,细胞聚集越明显^[17]。由此可见,壳聚糖具有使细胞聚集生长的特性。而细胞的聚集生长带来了一个明显的好处,就是能增加细胞与细胞之间的接触,加强细胞间的信号传导,促进细胞间的相互作用,从而能促进细胞的活性及功能。

4 结论

肝细胞不能在 PLGA 纳米材料表面贴壁生长,而在壳聚糖和海藻酸钠材料表面生长良好,而且肝细胞在壳聚糖纳米材料表面还能形成球形聚集体。壳聚糖和 PLGA 纳米材料具有良好的机械稳定性,在溶液中能很好地保持其纳米拓扑结构;而海藻酸钠纳米材料机械稳定性较差,不能在溶液中保持原有的纳米结构。因此,PLGA 和海藻酸钠都不宜单独作为肝脏组织工程的纳米支架材料,而壳聚糖是构建肝组织工程的良好候选材料。今后将继续研究肝细胞在壳聚糖纳米纤维材料表面的功能表达及相关机理,并尝试将这种材料应用到肝脏组织工程中来。

参考文献

- [1] Khashab M, Tector AJ, Kwo PY. Epidemiology of acute liver failure[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2007, 9(1): 66-73.
- [2] Verdonk RC, van den Berg AP, Slooff MJ, et al. Liver transplantation: an update[J]. *Neth J Med*, 2007, 65(10): 372-380.
- [3] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. *Methods Cell Biol*, 1976, 13: 29-83.

- [4] Curtis ASG, Casey B, Gallagher JO, *et al.* Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important [J] ? *Biophysical Chemistry*, 2001, **94**: 275 - 283.
- [5] Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, *et al.* Effects of synthetic micro and nano-structured surfaces on cell behavior [J]. *Biomaterials*, 1999, **20**: 573 - 588.
- [6] Zhu Xiaolong, Eibl O, Scheideler L, *et al.* Characterization of nano hydroxyapatite /collagen surfaces and cellular behaviors[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, **79**(1) : 114 - 127.
- [7] Yang F, Murugan R, Wang S, *et al.* Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2005, **26** (15) : 2603 - 2610.
- [8] Johansson F, Carlberg P, Danielsen N, *et al.* Axonal outgrowth on nano-imprinted patterns [J]. *Biomaterials*, 2006, **27** (8) : 1251 - 1258.
- [9] Pattison MA, Wurster S, Webster TJ, *et al.* Three-dimensional, nano-structured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications[J]. *Biomaterials*, 2005, **26**(15) : 2491 - 500.
- [10] Diehl KA, Foley JD, Nealey PF, *et al.* Nanoscale topography modulates corneal epithelial cell migration [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2005, **75A** (3) : 603 - 611.
- [11] Karuri NW, Porri TJ, Albrecht RM, *et al.* Nano- and microscale holes modulate cell-substrate adhesion, cytoskeletal organization, and α -beta 1 integrin localization in SV40 human corneal epithelial cells[J]. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2006, **5** (4) : 273 - 280.
- [12] Seo SJ, Kim IY, Choi YJ, *et al.* Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold[J]. *Biomaterials*, 2006, **27**: 1487 - 1495.
- [13] Seo SJ, Akaike T, Choi YJ, *et al.* Alginate microcapsules prepared with xyloglucan as a synthetic extracellular matrix for hepatocyte attachment[J]. *Biomaterials*, 2005, **26**: 3607 - 3615.
- [14] Fukuda J, Khademhosseini A, Yeo Y, *et al.* Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and cocultures[J]. *Biomaterials*, 2006, **27**: 5259 - 5267.
- [15] Bini TB, Gao Shujun, Wang Shu, *et al.* Development of fibrous biodegradable polymer conduits for guided nerve regeneration[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2005, **16** (4) : 367 - 375.
- [16] Chun KW, Yoo HS, Yoon JJ, *et al.* Biodegradable PLGA microcarriers for injectable delivery of chondrocytes: effect of surface modification on cell attachment and function[J]. *Biotechnol Prog*, 2004, **20** (6) : 1797 - 1801.
- [17] Lin SF, Hsiao WC, Jee SH, *et al.* Study on the effects of nylon-chitosan-blended membranes on the spheroid-forming activity of human melanocytes[J]. *Biomaterials*, 2006, **27**: 5079 - 5088.

刊号: ISSN 0258 - 8021
CN 11 - 2057/R

编辑部电话: 010 - 65248786
邮发代号: 82 - 73 定价: 20.00 元

ISSN 0258-8021



9 770258 802053