

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000024

有序排列聚甲基丙烯酸甲酯电纺纳米纤维作为大鼠原代雪旺细胞负载支架的可行性研究

夏海坚¹, 孙晓川¹, 刘 丹², 钟 东¹, 夏永智¹, 晏 怡¹, 唐文渊¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经外科, 重庆 400016; 2. 重庆中山医院药剂科, 重庆 400013)

【摘要】目的:探讨有序聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA) 电纺纳米纤维作为雪旺细胞负载支架的潜力。**方法:**构建有序 PMMA 电纺纳米纤维, 以随机 PMMA 电纺纤维作为对照, 纯化大鼠原代雪旺细胞并在纤维结构上进行培养, 利用慢病毒技术转染绿色荧光蛋白基因作为显色手段, 观察有序 PMMA 电纺纤维的拓扑线索在定向引导 SCs 生长上的作用, 分析细胞对纤维结构的依从性; 并在此基础上, 持续动态观察雪旺细胞对有序电纺纤维的依从性, 从而评价有序 PMMA 电纺纳米纤维作为神经损伤后植入性雪旺细胞负载支架的潜力。**结果:**雪旺细胞在随机及有序 PMMA 电纺纤维上均能顺利贴壁并生长; 较之随机电纺纤维, 雪旺细胞对有序纤维具有更好的依从性, 能够受其接触引导形成和纤维走行方向一致的定向生长, 并能够生成更长的细胞突起 ($P=0.0079$); 动态的观察则进而显示 SCs 对有序电纺纳米纤维的拓扑线索能维持稳定的依从性。**结论:**有序 PMMA 电纺纳米纤维具有作为神经损伤后植入性雪旺细胞负载支架的潜力。

【关键词】静电纺丝; 聚甲基丙烯酸甲酯; 雪旺细胞; 细胞培养; 接触引导

【中图分类号】R318.08

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-03

Feasibility of taking aligned electrospun polymethylmethacrylate nanofibers as rat primary Schwann cell loading scaffold

Xia Haijian¹, Sun Xiaochuan¹, Liu Dan², Zhong Dong¹, Xia Yongzhi¹, Yan Yi¹, Tang Wenyuan¹

(1. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Pharmacy, Chongqing Zhongshan Hospital)

【Abstract】Objective: To evaluate the potentiality of taking aligned polymethylmethacrylate (PMMA) electrospun nanofibers as Schwann cell loading scaffold. **Methods:** Aligned electrospun nanofibers were fabricated and primary rat Schwann cells were cultured on them; random PMMA nanofibers were served as control. Green fluorescent protein gene was transected by lentivirus and made as the reporting gene; the contact guidance exerted by the topographic feature of nanofibers on the growth of Schwann cells was revealed, and the microcosmic relation between the cell and the fiber was showed. Based on the findings mentioned above, the dynamic compliance of Schwann cells to aligned PMMA nanofibers was exhibited. Furthermore, potentiality of taking PMMA electrospun nanofibers as Schwann cell loading scaffold after neural injury was evaluated. **Results:** Schwann cell could adhere and grow both on random and aligned PMMA nanofibers. Compared with random nanofibers, aligned nanofibers could provide more supporting to Schwann cell, and on aligned fibers Schwann cells could grow along the axis of the fibers and form longer cell process ($P=0.0079$). Dynamic observation showed good compliance of Schwann cells to the topographic features of aligned nanofibers. **Conclusion:** Aligned PMMA electrospun nanofibers have the potentiality of being transplantable scaffold for loading Schwann cells after neural injury.

【Key words】electrospinning; polymethylmethacrylate; Schwann cell; cell culture; contact guidance

作者介绍: 夏海坚, Email: xiahaijian1@hotmail.com,

研究方向: 神经再生研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81100906); 重庆市科

委前沿与应用基础研究计划资助项目 (cstc2014jcyjA10061)。

国家临床重点专科建设项目资助项目 (编号: 财社[2011] 170号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1504.004.html>

(2014-03-24)

神经系统损伤后的神经修复是基础和临床研究的一个热点。周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)被认为具有一定的再生能力,但对于伤后超过 2 cm 的神经缺损,依靠新生的神经突无法桥接缺损两端,需要进行周围神经段的自体移植,但自体神经组织在供体的可提供量上存在很大的局限性,加上移植后势必会造成供体部位的神经功能缺损,所以严重的周围神经损伤仍是临床治疗的困难所在^[1];而中枢神经系统(central nervous system, CNS),如脊髓损伤损伤后存在损伤灶局部胶质瘢痕和空洞的形成,近端新生的神经突缺乏依附环境,难以穿越瘢痕和空洞而向远方延伸,加之 CNS 损伤后局部生长抑制环境的存在^[2-3],造成神经再生更为困难。PNS 和 CNS 损伤后的病理生理提示在伤后理想的修复过程中,需要引入一种适合植入的细胞支架系统,为新生组织提供必需的依附环境。

此外,鉴于周围神经和脊髓内的神经纤维均具有高度各向异性的特点,尚需要所设计的支架系统具备相匹配的拓扑结构,并能对依附其上的神经细胞提供相应的接触引导,以提高再生神经组织的生长效率、加快新生组织向远端延伸^[5-7]。

同时,在神经再生领域有潜力的治疗策略中,损伤区域的细胞移植被认为是具有临床应用潜力的治疗手段,可供移植的细胞包括雪旺细胞(Schwann cells, SCs)、嗅鞘细胞、神经干细胞、胶质祖细胞、以及骨髓基质细胞等^[4];其中,SCs 的移植被认为是迄今研究最为清楚,最具应用潜力的移植细胞类型^[8-9]。SCs 是 PNS 的成髓鞘胶质细胞, PNS 损伤后,移植的 SCs 不但能够模拟重建 B nger 带,为新生的神经突提供引导,还能分泌神经突生长所必须的各种神经营养因子及细胞外基质;新近的研究更发现 SCs 移植对动物脊髓损伤后的神经再生亦具有明显的促进作用。

本课题拟利用静电纺丝技术生产具有随机或有序拓扑结构的有序聚甲基丙烯酸甲酯(poly-methylmethacrylate, PMMA)纳米纤维支架系统,进行大鼠原代 SCs 的体外培养,以随机纳米纤维为对照,观察有序 PMMA 电纺纤维的拓扑线索在定向引导 SCs 生长上的作用,分析细胞与纤维结构的依存关系;并在此基础上,持续动态观察雪旺细胞对有序 PMMA 电纺纳米纤维的依从性,从而评价有序 PMMA 电纺纳米纤维作为神经损伤后植入性雪旺

细胞负载支架的潜力。

1 材料与方法

1.1 PMMA 电纺纳米纤维及薄膜的构建方法

将 PMMA(Sigma-Aldrich)溶解于二甲基甲酰胺(Sigma-Aldrich 公司)形成重量体积百分比为 6.5%的溶液,该溶液被放置在配有 30 G 针尖的微量注射泵内,以 0.3 ml/h 的速度释出;依据构建随机或有序排列纤维系统的不同目的,将针尖距收集系统的距离分别设置为 12 cm 和 20 cm(图 1)。静电纺丝电压大小为 10 kV DC。根据实验需要,该静电纺丝系统的收集系统被设计为长方体形,在 4 个相同的面上设有卡槽,能够固定 15 × 15 mm 大小的盖玻片;该长方体收集系统在电机驱动下沿长轴转动,依据构建随机或有序排列纤维系统的需要,收集系统的转速分别设置为 400 r/min 或 1 200 r/min,从而将收集的纤维附着在盖玻片上。

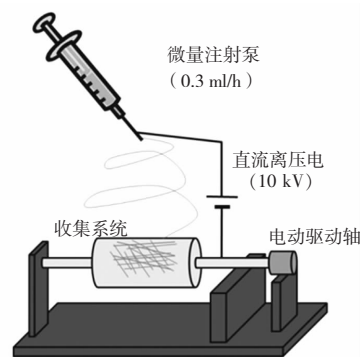


图 1 本实验静电纺丝过程图解

Fig.1 Illustration of procedure of electrospinning

本实验 PMMA 电纺纤维构建均在湿度小于 60%,温度 22 ℃~24 ℃的室内环境下进行。构建后的 PMMA 纤维被放置在真空烘箱内室温烘干,以除去残留的溶剂,然后被放置在紫外箱(36 W,波长 250 nm)处理 1 min,以适当增加电纺纤维的亲水性。

电纺纤维制备完毕后,将覆有 PMMA 电纺纤维的盖玻片通过生物实验用真空润滑油(Dow Corning 公司)贴附于硅胶隔离片(Grace 公司),从而形成内径 13 mm,容积 0.5 ml 的细胞培养体系,PMMA 纤维位于该体系的基底,再将此复合体双面紫外线消毒后置于 60 mm 细胞培养皿中(Corning 公司),供后续使用。

1.2 PMMA 电纺纳米纤维的特征鉴定

1.2.1 PMMA 电纺纳米纤维的表面形态观察 利用显微镜(TE2000-S, Nikon 公司)进行电纺纤维的形态学观察,观察在随机或有序 PMMA 电纺纤维系统上纤维的排列方向。

1.2.2 PMMA 电纺纳米纤维的纤维直径测定 对于 2 种拓扑形态的电纺纤维,分别随机选取 3 张显微图片,利用 ImageJ

图像处理软件在每张图片分别测量 50 根纤维的直径(共测量 150 根纤维),得到随机或有序 PMMA 电纺纤维的平均直径。

1.3 GFP 慢病毒载体(lentivirus, LV)的构建

绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)cDNA 被亚克隆进入 pRRL 转移载体(均由英国伦敦大学皇后玛丽医学院 Blizzard 研究所提供)。无自我复制性的 GFP 慢病毒载体(LV-GFP)的具体制作依照 Dull 等的经典文献进行^[10],所获得的病毒颗粒通过超速离心浓聚。病毒滴度的测定采用梯度浓度法转染 HEK293 细胞,根据表达 GFP 的细胞数量计算而得。本实验中所得的 LV-GFP 其滴度为 7×10^{10} TU/ml。

1.4 大鼠 SCs 的分离纯化

依据既往研究的经典方法^[9],SCs 从 P2-3 的新生 Wistar 大鼠分离所得。将 P2-3 的新生大鼠断头处死,游离坐骨神经和臂丛神经,去除神经外膜,置于 L15 培养基(Invitrogen)中;在 0.125% 的胰酶(Sigma-Aldrich)和 0.02% 的胶原蛋白酶(Type II, Worthington Biochemical Corporation)的作用下于 37 °C 孵箱中消化 35 min 后,1 ml 移液枪头反复吹打后;再消化 10 min,再用 200 μ l 的移液枪头反复吹打均匀,并加入等量的含血清培养基中和胰酶;混悬液在孔径为 70 μ m 的滤纸上过滤以除去组织碎片,滤出液在加入 15 ml 离心管后离心 10 min(1 000 r/min);移除上清液,底部的细胞块用 SCs 培养基(DMEM, 10%胎牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 庆大霉素, 25 ng/ml β -heregulin(R&D Systems), 2 μ mol/L forskolin(Sigma), 25 ng/ml 成纤维细胞生长因子(PeproTech) and 5 μ g/ml 胰岛素(Sigma))小心吹打均匀后,置于用多聚赖氨酸(10 μ g/ml, Sigma)包被的 10 cm 培养皿中待用。

分离所得的 SCs 通过抗 S100 免疫组化染色鉴定。在本课题中,只有高纯化率的(>95% SCs),传代 3 代以内的 SCs 被用于实验。

1.5 免疫组化染色

SCs 样本用 4%多聚甲醛固定。标本在室温下用含 10% 正常驴血清、1%牛血清白蛋白及 0.3% Triton X-100 的 PBS 进行抗原阻断 1 h 后;一抗选择 1:1 000 鼠抗 S100(Abcam),均稀释于阻断液中,4 °C 下过夜;PBS 液清洗后,二抗选择羊抗鼠 Alexa Fluor 568 抗体(Molecular Probes),稀释于 PBS,室温下作用 2 h;PBS 液清洗后,用 1:9 甘油溶液[含 1 μ g/ml 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)]封片;立刻在荧光显微镜下观察取图(Leica LEITZ DMRD, 莱卡公司)。

1.6 大鼠 SCs 在 PMMA 电纺纳米纤维上的培养

分离纯化所得的 SCs 经鉴定后,预先用 LV-GFP 转染 GFP 荧光报道基因(取感染复数为 500),37 °C、5%CO₂ 孵箱孵化,24 h 后更换新鲜培养基,约 36 h 后, GFP 表达明显,足以显示细胞胞体和突起,待用。

分别将 50 细胞/mm² 已转染 GFP 的 SCs 接种于随机及有序 PMMA 电纺纤维上,上述培养基提前用多聚赖氨酸(Sigma)包被,37 °C、5%CO₂ 孵箱孵化,并分别在 24 h、2 d、3 d、4 d 利用倒置荧光显微镜(TE2000-S, Nikon 公司)动态取图观察。

于培养第 1 天,取图后采用 Image J 软件的 Freehand Line 工具对培养在随机及有序 PMMA 电纺纤维上的 SCs 进行细胞突起长度的测量。在 3 个批次的样本上,分别随机选取 7 个视野,进行 SCs 细胞突起长度的测量(从突起的尖端到胞体的长度),用每个细胞最长的突起代表该 SCs 突起的生长水平。测量仅在有确切 GFP 表达的细胞上进行,每组测量的 SCs 在 200-300 之间。

1.7 统计学分析

本实验采用不同批次制造的电纺纤维重复 3 次。用 Excel 2010 软件录入数据,建立数据库。数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;两组间比较用两独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 本实验构建的随机或有序 PMMA 电纺纳米纤维

图 2 为本实验构建的随机及有序 PMMA 电纺纳米纤维。在两种拓扑结构的纤维系统上,可见纤维外观均匀整齐,没有中断与空泡形成。清晰可辨在随机排列电纺纤维上纤维排列方向呈各向随机、无序状态,而在有序排列纤维系统上纤维排列呈现高度的方向性。

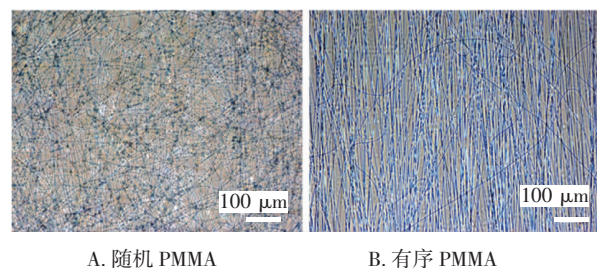


图 2 PMMA 电纺纤维的光镜所见

Fig.4 Micrographic images of PMMA electrospun nanofibers

利用 ImageJ 图像处理软件,测得随机或有序 PMMA 电纺纤维的平均直径分别为 $(0.49 \pm 0.04) \mu\text{m}$ 和 $(0.47 \pm 0.03) \mu\text{m}$, 经比较两者之间无统计学差异($t=1.079, P=0.474$)。

2.2 本实验分离纯化所得 SCs

图 3 为本实验分离所得大鼠原代 SCs,抗 S-100 染色阳性,绝大多数细胞呈双极形细胞形态。

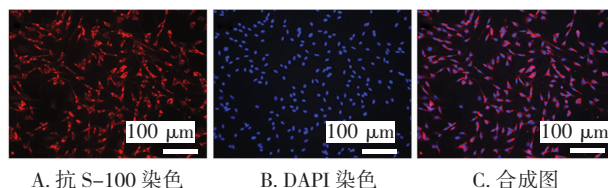


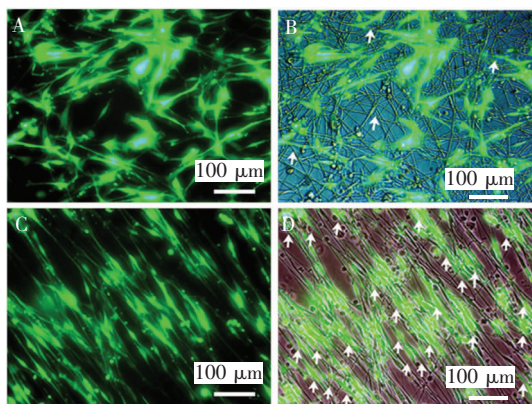
图 3 本研究分离纯化所得 SCs

Fig.3 Purified Schwann cells in the study

2.3 SCs 在随机或有序 PMMA 电纺纤维上生长特点及依从性的比较

图 4 为培养第 1 天,SCs 在随机和有序 PMMA 电纺纤维

上的生长状况,可见在两种不同拓扑结构的环境中,细胞均能顺利贴壁。在随机纤维系统上,SCs 的细胞形态与在常规细胞培养皿上类似,胞体及细胞突起的空间排列呈随机无序的状态;而在有序 PMMA 纤维系统上,绝大多数 SCs 胞体和突起的延伸方向能够和电纺纤维的延伸方向保持一致。经测量,发现在随机及有序电纺纤维上 SCs 细胞突起的长度分别为 $(67.1 \pm 39.6) \mu\text{m}$ and $(97.3 \pm 54.6) \mu\text{m}$,两者差异有统计学意义,在有序电纺纤维上的 SCs 能够生成更长的细胞突起 ($t=2.758, P=0.008$)。

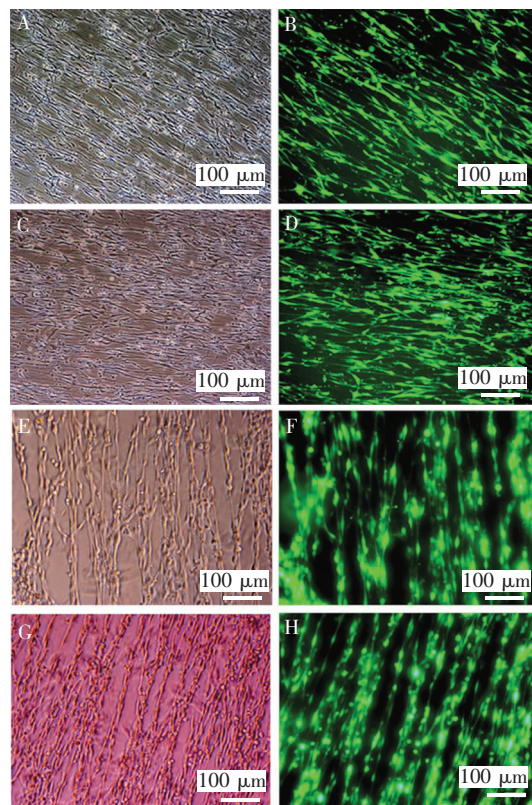


绿色为 GFP 表达,箭头代表 SCs 和纤维存在确切依附关系的部位
图 4 SCs 在随机 (A, B) 及有序 (C, D) PMMA 电纺纤维上的生长
Fig.4 Growth of SCs on random (A, B) and aligned (C, D) PMMA electrospun nanofibers

通过 GFP 表达与背景纤维结构的合成图,在随机或有序电纺纳米纤维上,均能发现 SCs 沿纤维走行的现象。但在两种基质上不同的是,在随机纤维系统上,此种现象发现较少,很大一部分 SCs 并未发现和纤维存在确切的伴行现象,而是贴壁在纤维结构以外的盖玻片上;而在有序纤维系统上,则能发现大多数的 SCs 胞体与细胞突起均能和纤维延伸方向一致,并和纤维存在严格依附及伴行的关系,提示有序 PMMA 电纺纤维能够为 SCs 提供更加充分的依附环境,SCs 对有序电纺纤维具有更好的依从性。

2.4 SCs 和有序 PMMA 电纺纳米纤维的动态依从关系

在上述研究的基础上,图 5 旨在不同时间段,动态显示 SCs 和有序 PMMA 电纺纳米纤维的依从关系。在培养第 1 天,显示 SCs 严格沿有序 PMMA 电纺纤维贴壁并生长,细胞呈典型的双极形态,虽然纤维周边的盖玻片有和纤维表面一致的多聚赖氨酸包被环境,但 SCs 显然更易接受有序纤维的接触引导。在培养第 2 天,可见 SCs 在增殖后,生长较为密集,但发现绝大多数细胞仍旧依附在纤维上,并沿纤维呈有序生长。在第 3 及第 4 天,增殖后的 SCs 在有序纤维上的排列更为密集,但通过培养图像及 GFP 表达,仍可见 SCs 紧密贴附在有序纤维上有序生长,细胞呈条索状规律分布,而并未离开纤维结构向盖玻片上迁移,提示 SCs 对有序 PMMA 电纺纤维的拓扑结构能够维持稳定的依从性,有序电纺纤维具有作为 SCs 负载支架的可行性。



A, B. 培养第 1 天; C, D. 培养第 2 天; E, F. 培养第 3 天; G, H. 培养第 4 天

图 5 SCs 在有序 PMMA 电纺纤维上的动态观察

Fig.5 Dynamic observation of SCs on aligned PMMA nanofibers

3 讨论

神经损伤后组织工程支架的设计是神经再生研究领域的一个重要方向。理想的组织细胞支架不但要求为组织提供足够的依附环境,具备良好的生物相容性,还需要根据移植区域神经纤维的分布特点,具备相匹配的拓扑结构,并能对所依附细胞提供相应的接触引导,以提高新生组织的生长效率。

静电纺丝技术最初被用于工业领域。通过对制造过程生产参数的精确调整,可以形成随机或有序等多种拓扑结构的纤维材料。新近发现利用多种高分子材料制成的电纺纤维在组织工程领域具有潜在重要价值^[11-13]。电纺纤维具有的微米甚至纳米层级的纤维结构,和生物组织细胞外基质的纤维尺寸类似,而细胞外基质被认为在神经细胞的正常生长、分化及迁移中具有重要作用;另外,电纺纤维具有良好的表面面积/体积比,能够为细胞提供充裕贴壁空间;以及电纺纤维具有的多孔性特点,作为植入

性材料,能够利于营养物质的进入和代谢废物的排出^[11-12]。因此,电纺纤维系统具备作为伤后植入性支架的潜力。本课题选择具有稳定理化性质,且具有良好的生物相容性,被广泛运用于临床植入性材料中的 PMMA 作为原料,生产电纺纳米纤维,探讨 PMMA 电纺纤维作为 SCs 负载支架的可行性。

在方法学上,本实验同时采用慢病毒技术感染 GFP 荧光报道基因作为显色手段,有利实时动态观察,也避免了常规免疫组化染色过程中因试剂和溶液的反复添加对培养系统造成的冲击和损伤(添加、抽吸造成的表面张力易对纳米纤维造成损伤),保证了 SCs 和纤维依存关系的观察。

SCs 是 PNS,甚至 CNS 损伤后细胞移植治疗的重要细胞类型。本研究显示,大鼠原代 SCs 在 PMMA 电纺纤维上能够顺利贴壁及生长;但通过观察胞体及突起和纤维的依附关系,发现在随机纤维系统上,很大一部分 SCs 依附在纤维所贴附的盖玻片上,而非纤维上;与此形成鲜明对比的是,在有序纤维系统上,绝大多数 SCs 能够贴附在纤维上行严格的定向生长,细胞呈明显的双极形细胞形态;同时发现在有序电纺纤维上的 SCs 能够生成更长的细胞突起。该结果提示大鼠原代 SCs 对 PMMA 轴向有序纤维具有良好的依从性,能够在其上贴壁并生长,有序电纺纤维能够为 SCs 提供充分的依附环境,并能为 SCs 提供接触引导而促进其生长。

对 SCs 在有序纤维上的动态观察,则进一步显示 SCs 对有序 PMMA 电纺纤维提供的拓扑线索能够维持稳定的依从性。随着培养时间的推进,SCs 在纤维支架上不断增殖,单位空间的细胞数量不断增多,虽然有序纤维之间的盖玻片表面具有和纤维表面相同的多聚赖氨酸包被环境,但 SCs 一直未见脱离纤维,而向玻璃环境迁移,SCs 保持在有序纤维上严格的定向生长。因为定向排列后的 SCs 所形成的 Bunger 带能够给新生神经突提供延伸通道,本研究在有序纤维上培养的 SCs 似乎模拟了这一过程,在有序纤维上的 SCs 是否确实能够加快神经突的生长及髓鞘化,需要后续深入的研究。

综上所述,本实验发现相比随机纤维系统,SCs 对有序 PMMA 电纺纳米纤维具有更好的依从性,能够在其上贴壁并生长,并能接受其接触引导而生成

更长的细胞突起,动态的观察则进一步证实 SCs 对有序电纺纳米纤维能够维持稳定的依从性。本研究显示有序 PMMA 电纺纳米纤维具有作为神经损伤后植入性 SCs 负载支架的潜力,值得后续更加深入的探讨。

参 考 文 献

- [1] Ducic I, FU R, Iorio ML. Innovative treatment of peripheral nerve injuries: combined reconstructive concepts[J]. *Ann Plast Surg*, 2012, 68 (2): 180-187.
- [2] Yu TW, Bargmann CI. Dynamic regulation of axon guidance[J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(s1): 1169-1176.
- [3] O'donnell M, Chance R K, Bashaw G J. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2009 (32): 383-412.
- [4] Tetzlaff W, Okon EB, Karimi-Abdolrezaee S, et al. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(8): 1611-1682.
- [5] Song M, Uhrich KE. Optimal micropattern dimensions enhance neurite outgrowth rates, lengths, and orientations[J]. *Ann Biomed Eng*, 2007, 35(10): 1812-1820.
- [6] Liazoghli D, Roth AD, Thstrup P, et al. Substrate micropatterning as a new in vitro cell culture system to study myelination[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2012, 3(2): 90-95.
- [7] Hoffman-kim D, Mitchel JA, Bellamkonda RV. Topography, cell response, and nerve regeneration[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2010 (12): 203-231.
- [8] Lavdas AA, Papastefanaki F, Thomaidou D, et al. Schwann cell transplantation for CNS repair[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(2): 151-160.
- [9] Luo J, Bo X, Wu D, et al. Promoting survival, migration, and integration of transplanted Schwann cells by over-expressing polysialic acid[J]. *Glia*, 2011, 59(3): 424-434.
- [10] Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system[J]. *J Virol*, 1998, 72(11): 8463-8471.
- [11] Xie J, Li X, Xia Y. Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research[J]. *Macromol Rapid Commun*, 2008, 29(22): 1775-1792.
- [12] Liu W, Thomopoulos S, Xia Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine[J]. *Adv Healthc Mater*, 2012, 1(1): 10-25.
- [13] Hurtado A, Cregg JM, Wang HB, et al. Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(26): 6068-6079.

(责任编辑:唐宗顺)