

## 技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000008

# 具备不同拓扑结构的聚甲基丙烯酸甲酯静电纺丝 纳米纤维细胞支架的构建及鉴定

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

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经外科, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学药学院药理学教研室、重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**构建具有不同拓扑结构的聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)电纺纳米纤维,并探讨其作为植入性细胞支架的可行性。**方法:**采用静电纺丝技术构建具有随机或有序拓扑结构的 PMMA 电纺纳米纤维,利用 PMMA 薄膜作为对照,以其为基底培养 PC12 细胞,探讨 PC12 细胞在纤维支架上的神经突生长能力以及神经突对局部拓扑环境的反应。**结果:**成功制作外观良好的随机或有序 PMMA 电纺纤维,在 2 种拓扑结构的纤维系统上,纤维均在纳米层级,直径无统计学差异( $t=1.079, P=0.474$ );PC12 细胞能够在其上顺利贴壁、生长并分化,并能对电纺纤维的拓扑结构作出准确反应,在有序纤维系统上分化的神经突能够与纤维方向保持高度一致,且与在 PMMA 薄膜或随机电纺纤维上的细胞相比能够生成更长的神经突,差异有统计学意义( $q=35.36, P=0.006; q=29.23, P=0.009$ )。**结论:**有序 PMMA 电纺纳米纤维具有作为神经损伤后植入性细胞支架的潜力。

**【关键词】**静电纺丝;聚甲基丙烯酸甲酯;支架;PC12 细胞系;细胞培养

**【中图分类号】**R318.08

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2013-07-02

## Construction and evaluation of electrospun polymethylmethacrylate nanofibers with different topographic features as biological cell scaffold

Xia Haijian<sup>1</sup>, Liu Dan<sup>2</sup>, Zhong Dong<sup>1</sup>, Yan Yi<sup>1</sup>, Xia Yongzhi<sup>1</sup>, Tang Wenyuan<sup>1</sup>, Sun Xiaochuan<sup>1</sup>

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

2. Teaching and Research Section of Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology)

**【Abstract】Objective:** To produce polymethylmethacrylate (PMMA) electrospun nanofibers with different topographic features and to test their potential as scaffold after neural injury. **Methods:** Electrospinning was used to produce nanofibers with random and aligned topographic features, PC12 cells was cultured on nanofibers and PMMA film was served as control to reveal the respective neurite growth manner on different substrate. **Results:** Both the random and aligned PMMA electrospun nanofibers had fine surface character and there was no difference in fiber diameter detected ( $t=1.079, P=0.474$ ). PC12 cell could successfully adhere, grow and differentiate on each kind of substrate, and on aligned nanofibers the neurite which were also aligned as the orientation of the fibers were significantly longer than those cells cultured on random fibers and film ( $q=35.36, P=0.006; q=29.23, P=0.009$ ). **Conclusion:** Aligned PMMA electrospun nanofibers has the potentiality as scaffold after neural injury.

**【Key words】**electrospinning; polymethyl methacrylate; scaffold; PC12 cell line; cell culture

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 2 cm 以上的神经缺损,机体无法自行修复,需要进行周围神经

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

研究方向:神经再生研究。

通信作者:孙晓川, Email: sunxch1445@gmail.com。

基金项目:国家临床重点专科建设项目资助(编号:财社[2011]170号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000008.html>

段的自体移植,而自体周围神经组织不似皮肤组织,存在供体量的紧缺,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一大难题<sup>[1]</sup>;而中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤后的修复难度更大,面临 CNS 神经元再生能力更为有限和生长抑制环境的双重困难<sup>[2-3]</sup>。有关神经系统创伤后神经再生的相关

研究,是基础科学研究领域的一个重点。

在影响神经突生长的诸多因素中,可以将其分为生化因素和物理因素 2 大类。前者是神经科学经典的研究领域,以各种神经突生长促进或抑制因子为研究对象<sup>[2-3]</sup>;而影响神经突生长的物理因素是新近研究的热点,包括细胞培养基质的张力<sup>[4-5]</sup>、培养环境的电场及磁场<sup>[6-9]</sup>以及培养环境的拓扑结构<sup>[10-12]</sup>等。

针对神经系统损伤后存在组织缺损,再生神经突难以桥接(bridging)缺损两端的困境,本研究拟利用静电纺丝技术生产具有良好生物相容性、纳米层级的聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)纤维组织,并通过生产参数的调整形成纳米材料的不同拓扑结构,并观察神经细胞在其上的生长和分化特点,探讨电纺纳米纤维在作为神经系统损伤后细胞/组织支架的潜力。

## 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(dimethylformame, DMF)(Sigma-Aldrich)形成质量体积百分比为 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(图 2),在 4 个相同的面上设有卡槽,能够固定 15 mm × 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。

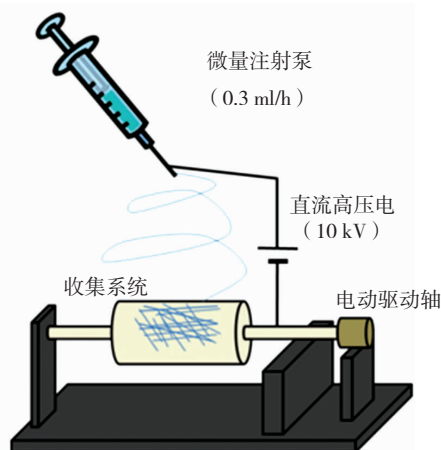


图 1 静电纺丝过程图解

Fig.1 Illustration of procedure of electrospinning in the study

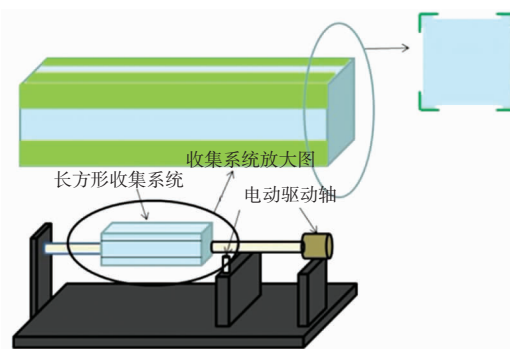


图 2 电纺设备收集系统的设计示意图

Fig.2 Design of the collector in the study

PMMA 薄膜的构建,通过将质量体积百分比为 6.5% 的 DMF PMMA 溶液覆于 15 mm × 15 mm 盖玻片上而成。

本实验 PMMA 电纺纤维及薄膜构建均在湿度小于 60.0%、温度 22 °C~24 °C 的室内环境下进行。所有构建的 PMMA 材料均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,以适当增加材料的亲水性。

### 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, 日本)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 Image J 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 以电纺纳米纤维为基底的细胞培养皿的建立

将具有 PMMA 电纺纤维或薄膜的盖玻片通过生物实验用真空润滑油(Dow Corning, UK)贴附于硅胶隔离片(Grace, USA),从而形成内径 13 mm,容积 0.5 ml 的细胞培养体系,PMMA 材料位于该体系的基底,再将此复合体双面紫外线消毒后置于 60 mm 细胞培养皿中,供最终使用(图 3)。

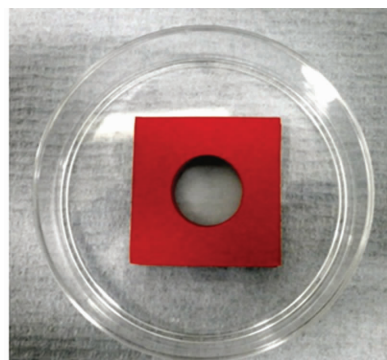


图 3 以电纺纤维为基底的细胞培养皿的构建

Fig.3 Construction of cell culture chamber by adhering silicon isolator to the coverslip deposited with nanofibers

#### 1.4 绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 慢病毒载体 (GFP lentivirus, LV-GFP) 的构建

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 LV-GFP 的具体制作依照 Dull 等<sup>[13]</sup>的经典文献进行, 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  $7 \times 10^{10}$  TU/ml。

#### 1.5 PC12 细胞在 PMMA 电纺纤维上的培养

将  $8 \times 10^4$  个 PC12 细胞 (由英国伦敦大学皇后玛丽医学院 Blizzard 研究所提供) 接种于随机及有序排列 PMMA 电纺纤维和 PMMA 薄膜上, 包含 PMMA 材料的培养皿提前用多聚赖氨酸 (Sigma) 包被, 培养基使用 RPMI1640 培养基 (Invitrogen), 添加 10% 胎牛血清 (Invitrogen)、5% 马血清 (Invitrogen) 以及 100  $\mu\text{g/ml}$  青链霉素 (Invitrogen)。在接种细胞同时转染 GFP 荧光报道基因 (取感染复数为 500), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱孵化, 24 h 后更换新鲜培养基, 之后培养基每 2 d 更换 1 次。于培养第 2 天, 在培养基中加入神经营养因子 (nerve growth factor, NGF) (Sigma), 促进 PC12 细胞分化。

#### 1.6 PC12 细胞神经突长度的测量

在 PC12 细胞培养第 4 天, 神经突分化满意, 用倒置荧光显微镜 (TE2000-S, Nikon) 取图, 利用 Image J 软件的 Free-hand Line 工具对培养在 PMMA 薄膜、随机及有序电纺纤维上的 PC12 细胞进行神经突长度的测量。在 3 个批次的样本上, 分别随机选取 5 个视野, 进行 PC12 细胞神经突长度的测量 (从突起的尖端到胞体的长度), 用每个细胞最长的神经突代表该 PC12 细胞神经突的分化水平。

#### 1.7 统计学分析

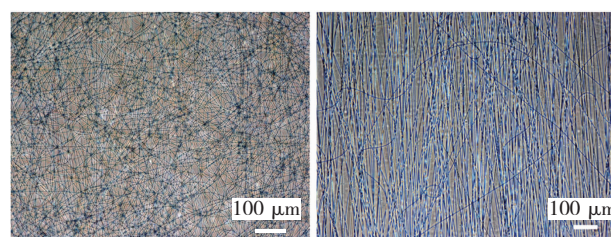
本实验采用不同批次制造的电纺纤维重复 3 次。用 Excel 2010 软件录入数据, 建立数据库。数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 2 组间比较用两独立样本  $t$  检验; 多组间比较利用单因素方差分析, 组间进一步比较采用 SNK- $q$  法。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

#### 2.1 随机或有序 PMMA 电纺纳米纤维的形态学观察

图 4 为依据上述方法构建的随机及有序 PMMA 电纺纳米纤维。在 2 种拓扑结构的纤维系统上, 均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。

利用 Image J 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  $(0.47 \pm 0.03) \mu\text{m}$ , 经比较两者之间差异无统计学意义 ( $t=1.079, P=0.474$ )。



A. 随机

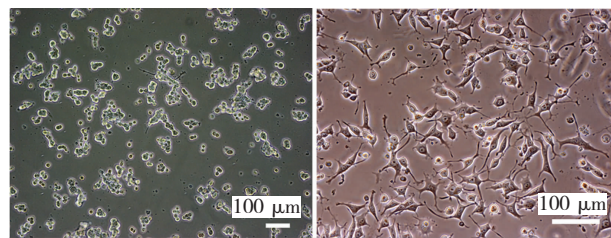
B. 有序

图 4 PMMA 电纺纤维光镜

Fig.4 Micrographic images of PMMA electrospun nanofibers

#### 2.2 PC12 细胞在 PMMA 电纺纤维上的培养

2.2.1 PC12 细胞在经典培养环境下的生长与分化特点 在常规细胞培养皿中, PC12 细胞在未添加 NGF 时, 细胞呈类圆形未分化状态, 极少见神经突起自发形成; 在添加足量 NGF 后约 2 d, 可见绝大多数细胞变扁, 且有一个或多个神经突起形成, 神经突的延伸方向呈随意、无序状态 (图 5)。



A. 培养第 1 天, 未添加 NGF

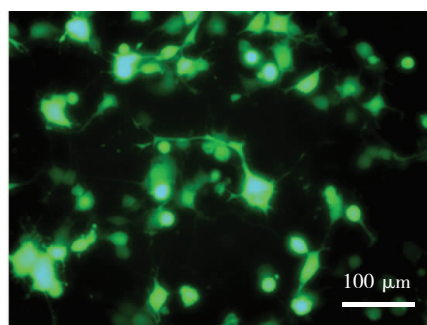
B. 培养第 3 天, 已添加 NGF

图 5 PC12 细胞在常规培养皿的生长及分化

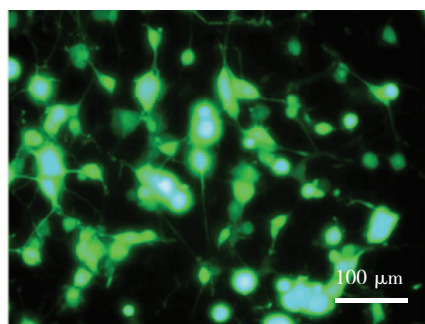
Fig.5 Growth and differentiation of PC12 cells on polystyrene chamber

2.2.2 PC12 细胞在 PMMA 薄膜、随机或有序电纺纤维上的生长分化特点 培养第 4 天, PC12 细胞在 PMMA 薄膜、随机和有序电纺纤维上的分化状况, 可见在 3 种不同拓扑结构的环境中, 细胞均能顺利贴壁, 并在 NGF 的诱导下顺利分化出神经突, 提示在上述生产条件下, 所制成的 PMMA 材料具有良好的生物相容性。在随机纤维系统上, PC12 细胞的神经突类似在薄膜平面环境中的分布特点, 神经突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 PC12 细胞神经突的延伸方向能够和电纺纤维的延伸方向保持一致, 提示 PC12 细胞能够感知培养局部微观拓扑环境的不同并作出相应反应 (图 6)。

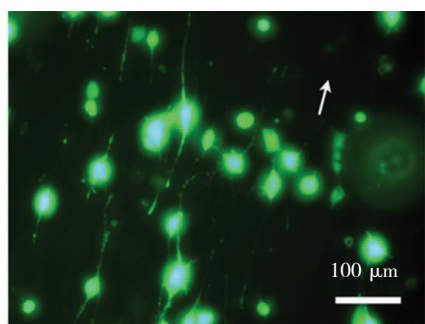
培养第 4 天, 在 PMMA 薄膜、随机或有序纤维系统 3 种培养环境中, PC12 细胞分化生成的神经突的长度分别为  $(58.2 \pm 25.9)$ 、 $(64.1 \pm 32.5) \mu\text{m}$  和  $(85.7 \pm 37.8) \mu\text{m}$ , 3 组间比较存在统计学差异 ( $F=33.72, P=0.008$ )。和培养在 PMMA 薄膜及随机纳米纤维上的细胞相比, 在有序电纺纤维上的 PC12 细胞能够生成更长的神经突 ( $q=35.36, P=0.006; q=29.23, P=0.009$ ); 和培养在 PMMA 薄膜上的细胞相比, 在随机电纺纤维上的 PC12 细胞所生成的神经突长度差异无统计学意义 ( $q=2.21, P=0.092$ )。



A. 在薄膜上 (绿色为 GFP 的表达)



B. 在随机纤维系统上 (绿色为 GFP 的表达)



C. 在有序纤维系统上 (绿色为 GFP 的表达)

箭头所指代表有序纤维系统纤维的延伸方向

图 6 PC12 细胞在 PMMA 薄膜及电纺纤维上的分化情况  
Fig.6 Growth and differentiation of PC12 cells on PMMA membrane, random and aligned electrospun nanofibers

### 3 讨论

静电纺丝技术最初被用于工业领域,但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<sup>[14-15]</sup>。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;同时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<sup>[16]</sup>。因此,制作外观完好、具有良好生

物相容性的电纺纤维具有重要意义,是将其运用于生物实验的前提和基础。

本研究采用 PMMA 作为原材料的原因是基于其高度的生物相容性,在临床上 PMMA 被广泛运用于多种植入性材料中,例如人工晶体以及骨水泥。在静电纺丝纤维系统的制作过程中,其质量取决于各个参数的控制和调整,如电纺电压、微量泵针头、收集系统距离、收集系统的设计及转速等。如参数调整不当,实验过程中易出现纤维中断、气泡生成、纤维方向性控制不佳等问题。另外,对于生产过程中的环境质量,也应该引起重视,如具有自发荧光的外来颗粒的沾染,会影响后续生物实验结果。此外,针对后续生物实验的需求,本实验在电纺纤维构建后,也摸索了其他辅助措施,如促进化学溶剂的挥发、增进材料表面的亲水性特征等,最终形成可供细胞培养用的纤维材料。

在电纺纤维材料制成后,如何将其顺利用于生物实验是一个急需解决的问题。面临的主要困难是在添加液体后,由于液体表面张力的作用,容易对纤维结构造成一定程度的破坏,出现纤维局部断裂或从盖玻片表面漂离的情况。针对这种情况,其他实验者也采取用胶水或贴带将纤维材料固定于玻片上的方法,但此时添加的胶水或贴带又有可能对培养的细胞产生生物毒性作用<sup>[9]</sup>。为此,在本实验过程中,运用了硅胶隔离片的方法,用生物实验用的真空润滑油将盖玻片的四周贴附于隔离片,而形成以电纺纤维为基底的培养皿。此种方法所用真空润滑油广泛用于制造神经元的分隔室模型(compartmented chamber)中<sup>[17-18]</sup>,最大程度上杜绝了模型制造过程中外来因素的影响。采用此方法,未再出现细胞培养过程中纤维断裂或漂离的情况。另外,本实验采用慢病毒技术感染 GFP 荧光报道基因作为显色手段,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),保证了后续的观察。

PC12 细胞是一个常用的神经细胞株,来源于鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,其可在 NGF 的诱导下生成神经突,是一个经典的神经元分化细胞模型<sup>[9]</sup>。在常规培养皿中的培养展现了该 PC12 细胞株在经典体外环境下的生长和分化能力。根据 PC12 细胞在 PMMA 薄膜以及随机或有序电纺纤维材料上的生长及分

化特点,发现 PC12 细胞能够敏感感知培养局部的拓扑环境,在随机纤维上神经突的排列方式呈无序状态,和薄膜平面环境环境下类似,而在有序纤维系统上,绝大多数神经突则能够和纤维的延伸方向保持一致,呈高度有序的状态,提示电纺纤维所提供的拓扑线索能够给 PC12 细胞神经突的延伸提供必需的接触引导。同时,发现在有序纤维系统上的 PC12 细胞能够分化出长度更长的神经突,因为神经突生长的本质之一是细胞骨架的延伸,推测其可能的机制可能和有序排列的神经突其细胞骨架延伸更节约能量,从而能够生长的更长有关<sup>[12]</sup>。本实验结果提示通过控制电纺纤维的空间排列方式能够影响所培养神经细胞神经突的生长形态与生长能力,此点具有重要实际意义,由于神经系统是具有高度方向性的结构,提示有序 PMMA 电纺纤维作为植入性细胞支架在引导神经再生中的潜力。

综上所述,本实验成功制作表现完好、具有良好生物相容性的 PMMA 电纺纳米纤维系统,通过参数控制,可产生随机或有序 2 种拓扑结构。PC12 细胞能够顺利在上面贴壁、生长并分化,且能够敏感感知局部的拓扑环境,在有序纤维系统上,能够分化生成和纤维延伸方向保持高度一致,且长度更长的神经突,提示有序 PMMA 电纺纳米纤维作为植入性细胞支架在引导神经生长上的潜力。

## 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 RK, Bashaw GJ. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2009, 32: 383–412.
- [4] Lamoureux P, Ruthel G, Buxbaum RE, et al. Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons[J]. *J Cell Biol*, 2002, 159(3): 499–508.
- [5] Koch D, Rosoff WJ, Jiang J, et al. Strength in the periphery: growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons[J]. *Biophys J*, 2012, 102(3): 452–460.
- [6] Patel N, Poo MM. Orientation of neurite growth by extracellular electric fields[J]. *J Neurosci*, 1982, 2(4): 483–496.
- [7] Pan L, Borgens RB. Strict perpendicular orientation of neural crest-derived neurons in vitro is dependent on an extracellular gradient of voltage[J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90(7): 1335–1346.
- [8] Kim S, Im WS, Kang L, et al. The application of magnets directs the orientation of neurite outgrowth in cultured human neuronal cells[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 174(1): 91–96.
- [9] Lei T, Jing D, Xie K, et al. Therapeutic effects of 15 Hz pulsed electromagnetic field on diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-treated rats[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61414.
- [10] Song M, Uhrich KE. Optimal micropattern dimensions enhance neurite outgrowth rates, lengths, and orientations[J]. *Ann Biomed Eng*, 2007, 35(10): 1812–1820.
- [11] 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.
- [12] Hoffman-Kim D, Mitchel JA, Bellamkonda RV. Topography, cell response, and nerve regeneration[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2010, 12: 203–231.
- [13] 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.
- [14] Xie J, Li X, Xia Y. Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research[J]. *Macromol Rapid Commun*, 2008, 29(22): 1775–1792.
- [15] Liu W, Thomopoulos S, Xia Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine[J]. *Adv Healthc Mater*, 2012, 1(1): 10–25.
- [16] 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.
- [17] Bertrand J, Winton MJ, Rodriguez-Hernandez I, et al. Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(5): 1113–1121.
- [18] Leinster VH, Joy MT, Vuononvirta RE, et al. ErbB1 epidermal growth factor receptor is a valid target for reducing the effects of multiple inhibitors of axonal regeneration[J]. *Exp Neurol*, 2013(239): 82–90.
- [19] Gerdin MJ, Eiden LE. Regulation of PC12 cell differentiation by cAMP signaling to ERK independent of PKA: do all the connections add up?[J]. *Sci STKE*, 2007(382): pe15.

(责任编辑:唐宗顺)