文章编号:1000-5404(2013)19-2069-04

论著

聚己内酯/胶原支架纳米纤维方向对小鼠成骨前体细胞形态、增殖和分化的影响

路 菊 (400038 重庆,第三军医大学科研部生物医学分析测试中心)

[摘要] **目的** 探讨聚己内酯/胶原(PCL/COL)支架纳米纤维方向对小鼠成骨前体细胞(MC3T3-E1)形态、增殖、分化的影响。**方法** 通过扫描电子显微镜(SEM)对非取向和取向的PCL/COL纳米纤维支架的形貌进行观察;将MC3T3-E1细胞接种在非取向与取向的PCL/COL纳米纤维支架上,通过SEM及激光共聚焦显微镜(LSCM)观察细胞在两组材料上的生长形态,CCK-8法检测细胞在两组材料上的增殖情况,Real-time RT-PCR检测细胞在两组材料上成骨分化的功能性基因Ⅰ型胶原(COLⅠ)、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)的表达情况。**结果** 非取向PCL/COL纳米纤维支架的纤维方向无规则,取向PCL/COL纳米纤维支架的纤维方向相同,两者纤维直径差异无统计学意义($P>0.05$),分别为(586±239)nm和(625±155)nm;SEM及LSCM检测结果显示MC3T3-E1细胞在非取向的纳米纤维上呈星形生长,细胞骨架呈不规则形态,而在取向纳米纤维上呈扁长形生长,且细胞骨架沿纳米纤维方向整齐排列;CCK-8检测结果显示在1、3、5 d和7 d MC3T3-E1细胞在非取向与取向PCL/COL纳米纤维支架上的增殖率比较差异无统计学意义($P>0.05$);Real-time RT-PCR检测结果显示MC3T3-E1细胞在两组材料上COLⅠ表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),而细胞在非取向组较取向组能表达更多的ALP和OCN,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 非取向和取向的PCL/COL纳米纤维支架均能提供一个良好的微环境,利于MC3T3-E1细胞的生长、增殖,同时非取向PCL/COL纳米纤维支架较取向PCL/COL纳米纤维支架更有利于MC3T3-E1细胞的成骨分化,是一种有应用前景的骨组织工程支架材料。

[关键词] 聚己内酯/胶原;纳米纤维;MC3T3-E1细胞;方向

[中图法分类号] R318.08; R322.71; R329.28 [文献标志码] A

Effect of poly(ε-caprolactone)/collagen nanofiber orientation on morphology, proliferation and differentiation in mouse preosteoblast MC3T3-E1 cells

Lu Ju (Biomedical Analysis Center, Division of Scientific Research Affairs, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of the direction of poly(ε-caprolactone) (PCL)/collagen (COL) nanofiber orientation on the morphology, proliferation, and differentiation in mouse preosteoblast cells (MC3T3-E1). **Methods** The morphologies of the random (bad-oriented) and aligned (well-oriented) PCL/COL nanofiber scaffolds were observed by scanning electron microscopy (SEM). MC3T3-E1 cells were cultured on the 2 kinds of nanofiber scaffolds to study the effects of fiber orientation on cell morphology through SEM and laser confocal microscopy (LSCM). The cell proliferation and numbers of viable cells were observed by cell counting kit-8 (CCK-8). Real-time RT-PCR was used to testify the mRNA expression of osteogenic markers, such as collagen type Ⅰ (COL Ⅰ), alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) to study the sense and response of MC3T3-E1 cells to different oriented scaffolds. **Results** The random PCL/COL nanofibers showed isotropic fiber alignments, the aligned nanofibers exhibited anisotropic fiber alignments. The difference of the fibers diameter was not statistically significant between the 2 scaffolds (586±239 *vs* 625±155 nm, $P>0.05$). SEM and LSCM showed that MC3T3-E1 cells exhibited a star-like shape and irregular cytoskeletons on the random nanofibers, while these cells on the aligned nanofibers had a prolate shape and elongated cytoskeletons along the aligned fibers. CCK-8 results showed that there was no significant difference in the proliferation rates of the cells on the random and aligned nanofiber scaffolds at 1, 3, 5 and 7 d ($P>0.05$). Real-time PCR demonstrated the differences in expression profiles of osteogenic markers in MC3T3-E1 cells cultured on 2 scaffolds. The expression levels of COL Ⅰ on random and aligned scaffolds were not signifi-

[通信作者] 路 菊,电话:(023)68752348,E-mail:1344080835@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1517.006.html(2013-06-19)

cantly different ($P>0.05$), while ALP and OCN expression levels were significantly elevated on the random scaffold compared with the aligned scaffolds ($P<0.05$). **Conclusion** The random and aligned PCL/COL nanofiber scaffolds provides a good microenvironment for cell growth and proliferation, compared with the aligned PCL/COL nanofibers scaffolds. The random PCL/COL nanofiber scaffolds is more beneficial for the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells which may have potential applications in bone tissue engineering.

[**Key words**] poly(ε-caprolactone)/collagen; nanofiber; MC3T3-E1 cells; orientation

Corresponding author: Lu Ju, Tel: 86-23-68752348, E-mail: 1344080835@qq.com

研究表明,细胞能从其所处的环境中通过接触诱导感觉到微米和纳米级的几何学信号。细胞和不同形貌的基质材料之间的相互作用导致细胞产生特定的反应并影响细胞的分化[1]。为确定不同纤维方向的纳米形貌对成骨前体细胞分化的影响并发展一个骨组织工程仿生支架,在本研究中,我们将小鼠成骨前体细胞(MC3T3-E1)接种在非取向和取向的聚己内酯/胶原(PCL/COL)纳米纤维支架上,观察纤维取向不同对MC3T3-E1细胞形态、增殖和分化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

非取向和取向PCL/COL纳米纤维支架购于重庆大学生物工程学院,α-MEM培养基、优质胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶、1%青链霉素混合液、DAPI细胞染液、4%多聚甲醛和Trizol RNA提取液购自Sigma公司,磷酸盐缓冲溶液(PBS)购自北京中杉公司,CCK-8购自碧云天公司,Triton X-100购自Amresco公司,rhodamin phalloidin购自Biotium公司,Trizol试剂购自Invitrogen公司,反转录试剂盒购自Promega公司,荧光定量试剂盒Hot Start Fluorescent PCR Core Reagent Kits(SYBR Green Ⅰ)购自BBI美国公司,3211型细胞培养箱(美国Forma公司),HO45型恒温摇床(中科院武汉科学仪器厂),YJ-1450型超净工作台(苏州净化设备厂),OLYMPUS-IX70倒置相差显微镜(日本Olympus公司),R422低温低速离心机(德国Jouan公司)、24和96孔培养板(美国BD公司),S-3400N型扫描电镜(SEM,日本日立公司),激光共聚焦显微镜(LSCM,德国ZEISS公司),550型酶标测试仪(美国Bio-Rad公司),ABI 7500 Real-time PCR系统(美国ABI公司)。

1.2 材料微观结构观察

非取向和取向两组材料样品固定后喷金,其微观结构通过加速电压为15 kV的SEM来检测。获得显微图片后,通过图像分析软件(Image J 1.45s)来测量纤维的平均直径和角度分布(与纵轴所成角度),每个标本计数60根纳米纤维($n=3$)。

1.3 MC3T3-E1细胞培养

小鼠颅顶骨前成骨细胞亚克隆14(MC3T3-E1 subclone14)购自中国科学院细胞库。于α-MEM培养基(含10%胎牛血清,100 U/mL青、链霉素)、5% CO_2、37 ℃条件下常规培养。

1.4 材料的准备及细胞接种

将非取向和取向两组材料剪成直径1.5 cm的圆形,放置在24孔板中,75%的酒精消毒1 h,然后用无菌的PBS漂洗3次,每次5 min,用0.25%的胰蛋白酶消化生长达到90%融合后的MC3T3-E1细胞,制成5×10^5/mL的细胞悬液,然后将100 μL的细胞悬液滴加在材料表面,将24孔板置于5% CO_2、37 ℃条件下培养4 h,然后每孔加注3 mL α-MEM培养基继续培养。每2天换液1次,培养至7 d。

1.5 细胞增殖测试

MC3T3-E1细胞在非取向和取向两组材料上的活性和增殖情况通过CCK-8法来检测。在第1、3、5、7天,用含10% CCK-8的新鲜培养基代替24孔板中的培养基,37 ℃的5% CO_2细胞培养箱中孵育3 h,细胞代谢后产生具有高度水溶性的黄色甲臜产物,用酶联免疫检测仪在450 nm波长处测定各孔光密度值[$D(450)$]。

1.6 SEM检测

MC3T3-E1细胞接种到非取向和取向两组材料上复合培养1 d后,移除孔板中的培养基,用PBS漂洗2次,3%的戊二醛固定30 min,再用PBS漂洗2次,用30%、50%、70%、80%、90%、95%和100%的乙醇梯度脱水,然后冻干样品,固定,喷金,SEM成像。

1.7 LSCM检测

MC3T3-E1细胞接种到非取向和取向两组材料上复合培养1 d后,移除孔板中的培养基,用PBS液漂洗2次,加入4%多聚甲醛室温固定20 min后,再用PBS漂洗2次。加入含0.1% Triton X-100的PBS,5 min后PBS漂洗2次。滴加25 μg/mL的细胞骨架染色液(rhodamin phalloidin),室温避光静置20 min。PBS液漂洗2次后,再滴加0.1%的细胞核染色液(DAPI),室温避光静置5 min后用PBS漂洗2次。采用LSCM观察MC3T3-E1细胞形态改变,细胞核呈蓝色荧光,细胞骨架微丝纤维F-actin呈红色荧光。利用Image J1.45 s软件分析MC3T3-E1细胞在不同支架上培养1 d后,LSCM检测所得图像中细胞骨架及细胞核的平均纵横比($n=60$)。

1.8 Real-time RT-PCR检测

MC3T3-E1细胞在两组材料上复合培养7 d后,细胞中Ⅰ型胶原(COLⅠ)、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)表达水平通过Real-time RT-PCR来检测。用Trizol试剂盒按说明步骤提取总RNA,选用$D(260)/D(280)$比值为1.8~2.0的RNA用作反转录。根据反转录cDNA合成试剂盒说明书进行cDNA合成。MC3T3-E1细胞COLⅠ、ALP和OCN基因与内参基因GAPDH引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列为:COLⅠ上游5′-CTTCACCTACAGCACCCTTG-3′,下游5′-TTGGTGGT-TTTGTATTCGATGA-3′;ALP上游5′-AGAAGGTGCAGCCCAGA-TG-3′,下游5′-GCAGCTCCACGTCAAAGATG-3′;OCN

上游 5′-GTCCTCCTGGTTCATTTCTTTGGGTAAC-3′，下游 5′-CACTACCTTATTGCCCTCCTGCTTGGAC-3′；GAPDH 上游 5′-GCCACCCAG-AAGACTGTGGAT-3′，下游 5′-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3′。取 cDNA 1.0 μL 配制成 20 μL PCR 反应液，在 ABI 7500 定量 PCR 仪中 95 ℃ 3 min，然后 3 步反应：94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 40 个循环。以同一样本的目的基因与管家基因 GAPDH 含量的差值作为评价目的基因表达水平的指标，同时以接种时的细胞样本作为参照。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因进行相对定量分析。

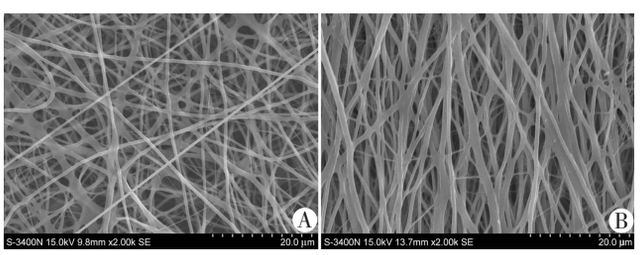
1.9 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较行独立样本均数的 t 检验。

2 结果

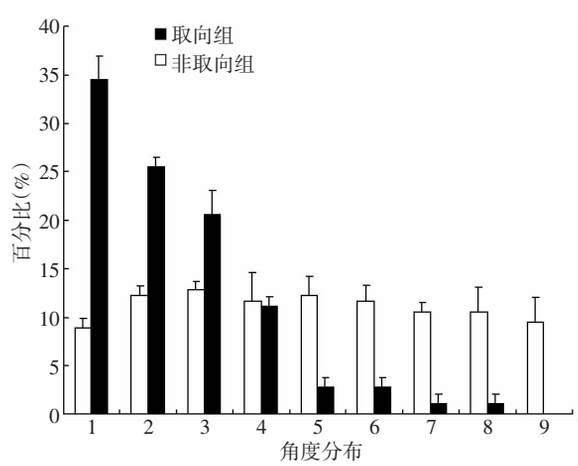
2.1 材料的形态特点

SEM 结果显示非取向和取向的 PCL/COL 纳米纤维支架的表面形态见图 1。两组材料的纤维直径相似[(586 ± 239) nm *vs* (625 ± 155) nm]，差异无统计学意义($P > 0.05$)。在非取向组所有纤维与纵轴形成的角度成平均分布，而在取向组 81.7% 的纤维与纵轴形成的角度从 0° ~ 30°(图 2)。



A：非取向组；B：取向组

图 1 PCL/COL 纳米纤维支架的电镜观察 (SEM)



1：0° ~ 10°；2：< 10° ~ 20°；3：< 20° ~ 30°；4：< 30° ~ 40°；5：< 40° ~ 50°；6：< 50° ~ 60°；7：< 60° ~ 70°；8：< 70° ~ 80°；9：< 80° ~ 90°

图 2 PCL/COL 纳米纤维支架中纤维与纵轴方向所成角度的百分比分布

2.2 细胞增殖结果

CCK-8 法检测 MC3T3-E1 细胞在两组材料上的活性和增殖(图 3)，在细胞材料复合物 7 d 的培养时间内，两组材料上 MC3T3-E1 细胞均不断增殖，培养 1、3、5 d 和 7 d 时两组材料上的 MC3T3-E1 细胞增殖率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

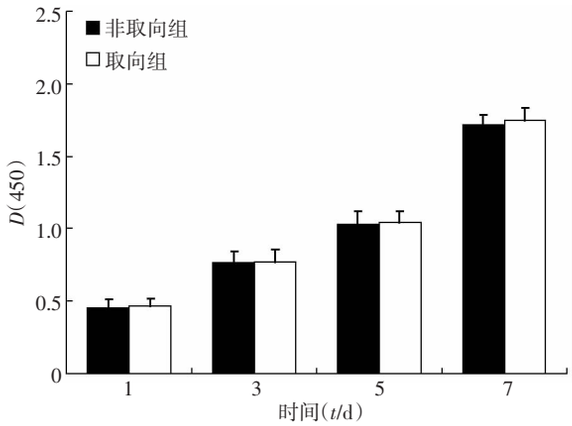
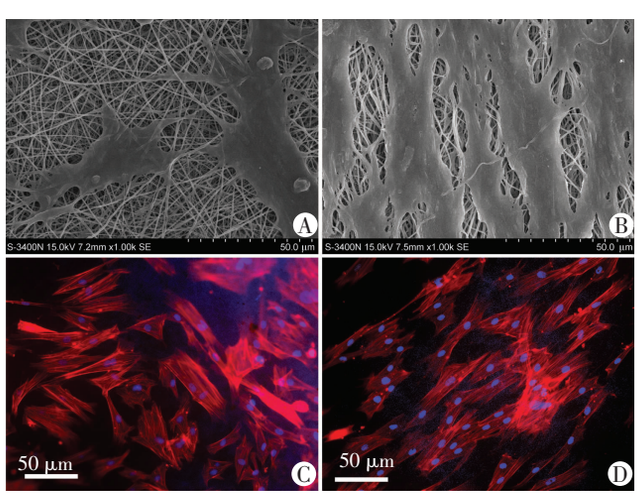


图 3 CCK-8 法检测 MC3T3-E1 细胞在两组材料上不同时间点的增殖活性

2.3 细胞形态及细胞骨架的观察

从 SEM 图像来看，细胞支架复合物培养 1 d 后，MC3T3-E1 细胞均能很好地粘附在两组材料上，MC3T3-E1 细胞在非取向的支架上表现为星形(图 4A)；相反，MC3T3-E1 细胞在取向的支架上表现为沿着取向纳米纤维基质生长的扁长形(图 4B)。从 LSCM 图像来看，MC3T3-E1 细胞在培养 1 d 后，在非取向支架上，细胞骨架发育良好，呈不规则形态(图 4C)，而细胞在取向支架上生长时，骨架沿纳米纤维方向整齐排列(图 4D)。定量分析 MC3T3-E1 细胞在不同取向的纳米基质材料上的反应，以细胞骨架及细胞核平均的纵横比(长轴与短轴)表示，MC3T3-E1 细胞骨架在非取向及取向的支架上纵横比分别是(2.61 ± 0.95)、(4.73 ± 1.50)；MC3T3-E1 细胞核在非取向及取向的支架上纵横比分别是(1.42 ± 0.22)、(1.87 ± 0.46)，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



A：MC3T3-E1 细胞接种在非取向 PCL/COL 材料上 1 d 后电镜观察；B：MC3T3-E1 细胞接种在取向 PCL/COL 材料上 1 d 后电镜观察；C：MC3T3-E1 细胞接种在非取向 PCL/COL 材料上 1 d 后激光共聚焦观察；D：MC3T3-E1 细胞接种在取向 PCL/COL 材料上 1 d 后激光共聚焦观察　细胞核 DAPI 染色显蓝色；细胞骨架 rhodamin phalloidin 染色显红色

图 4 MC3T3-E1 细胞接种在非取向和取向 PCL/COL 材料上 1 d 后观察

2.4 Real-time RT-PCR 检测结果

细胞与支架复合物培养 7d 后，Real-time RT-PCR 检测在两

组材料上MC3T3-E1细胞中成骨分化基因COLⅠ、ALP、OCN表达水平。MC3T3-E1细胞在非取向组较取向组COLⅠ表达水平要少[(1.47±0.55)*vs*(1.53±0.36)],但差异无统计学意义($P>0.05$);MC3T3-E1细胞在非取向组较取向组ALP、OCN表达水平明显增加[(1.67±0.43)*vs*(1.28±0.29),(1.87±0.44)*vs*(1.21±0.39)],差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

在以往的研究中,静电纺丝制备的纳米纤维支架材料已被证明是优秀的用于组织再生的组织工程支架[2]。有研究表明,非取向纤维方向的支架可以部分地模拟天然骨细胞外基质的形貌特征和生物学功能,有利于骨髓间充质干细胞的成骨分化和组织工程骨的形成[3]。最近,取向的纳米纤维支架已广泛应用于神经、韧带和肌腱组织工程。然而,少有关于取向的纳米纤维支架对细胞成骨分化影响用于组织工程骨支架的研究。为确定不同纤维方向的纳米形貌对成骨前体细胞分化的影响和发展一个骨组织工程仿生支架,在本研究中,MC3T3-E1细胞接种于非取向和取向的PCL/COL纳米纤维支架上,随着培养时间的增长,细胞均能明显增殖,但同一时间点两组材料上的细胞增长率无明显差异。可能的解释是两组材料有相似的空隙率和孔径空间,利于细胞的生长。本研究结果可以看出,纤维取向已大大影响了MC3T3-E1的细胞形态及细胞骨架形态,在非取向PCL/COL纳米纤维支架上可以看到扁平、多角形的细胞及不规则形态的细胞骨架,而在取向PCL/COL纳米纤维支架上可以看到沿纤维方向定向排列的细长形的细胞及沿纳米纤维方向整齐排列的细胞骨架,定量分析结果也显示支架的纤维取向对MC3T3-E1细胞的细胞骨架及细胞核形态有明显的影响。接触诱导理论支持解释细胞形态与纤维排列之间的关系,具有特殊纳米形貌特征的基质通过与粘附细胞的丝状伪足和骨架相互作用诱导细胞的排列和迁移[4-5]。此外,细胞形态被认为是调节细胞生长和分化的一个重要因素,细胞形态的变化和细胞骨架的张力影响细胞的增殖和分化[6]。为了检测细胞形态变化对细胞成骨分化的影响,我们评估MC3T3-E1细胞在非取向和取向PCL/COL纳米纤维支架上复合培养7 d后COLⅠ、ALP、OCN mRNA的表达水平。结果表明,MC3T3-E1细胞在非取向和取向PCL/COL纳米纤维支架上,COLⅠ表达无统计学差异,可能的解释是COLⅠ虽然是成骨细胞分泌的细胞外基质的一个主要组成部分[7],但COLⅠ广泛存在于骨、软骨、肌腱等肌肉骨骼系统的组织中,不是成骨前体细胞向成骨细胞分化的特异性指标;与此同时,有意思的是MC3T3-E1细胞在非取向的PCL/COL纳米纤维上较取向的PCL/COL纳米纤维上能表达更多的ALP和OCN,且差异有统计学意义。可能的解释是ALP是细胞成骨分化的早期标志物[7],OCN是细胞晚期成骨分化的标志物[8],MC3T3-E1细胞在不同取向的纳米纤维支架上生长时,通过接触诱导伸出丝状伪足感知周围的纳米微环境,细胞骨架及细胞核的形态发生了明显改变,继而影响了细胞的分化,且非取向PCL/COL纳米纤维支架较取向PCL/COL纳米纤维支架提供的微环境更有利于MC3T3-E1细胞的成骨分化。由此可以推断,支架的纤维取向可能在调节成骨前体细胞向成骨细胞的分化中发挥重要作用,这与前人的研究结果相似——纤维取向会影响细胞骨架变化进而影响细胞核的组成和基因的表达[9-10]。

综上所述,非取向和取向PCL/COL纳米纤维支架材料均能提供了一个良好的微环境,适合MC3T3-E1细胞的生长、增殖,同时非取向PCL/COL纳米纤维支架较取向PCL/COL纳米纤维支架更有利于MC3T3-E1细胞的成骨分化,是一种有应用前景的骨组织工程支架材料。

参考文献:

[1] Higuchi A, Ling Q D, Chang Y, *et al*. Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate[J]. Chem Rev, 2013, 113(5): 3297-3328.

[2] Sridhar R, Sundarrajan S, Venugopal J R, *et al*. Electrospun inorganic and polymer composite nanofibers for biomedical applications[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2013, 24(4): 365-385.

[3] Kim H W, Lee H H, Chun G S. Bioactivity and osteoblast responses of novel biomedical nanocomposites of bioactive glass nanofiber filled poly(lactic acid)[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 85(3): 651-663.

[4] Wang Y, Gao R, Wang P P, *et al*. The differential effects of aligned electrospun PHBHHx fibers on adipogenic and osteogenic potential of MSCs through the regulation of PPARgamma signaling[J]. Biomaterials, 2012, 33(2): 485-493.

[5] Subramanian A, Krishnan U M, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration[J]. J Biomed Sci, 2009, 16: 108.

[6] Chen C S, Mrksich M, Huang S, *et al*. Geometric control of cell life and death[J]. Science, 1997, 276(5317): 1425-1428.

[7] Malaval L, Liu F, Roche P, *et al*. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation *in vitro*[J]. J Cell Biochem, 1999, 74(4): 616-627.

[8] Ehara A, Ogata K, Imazato S, *et al*. Effects of alpha-TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization[J]. Biomaterials, 2003, 24(5): 831-836.

[9] Mammoto A, Ingber D E. Cytoskeletal control of growth and cell fate switching[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(6): 864-870.

[10] Yin Z, Chen X, Chen J L, *et al*. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers[J]. Biomaterials, 2010, 31(8): 2163-2175.

(**收稿**:2013-03-28;**修回**:2013-05-29)

(编辑 张 维)