文章编号:1000-5404(2014)04-0351-04

论著

聚甲基丙烯酸甲酯静电纺丝纳米纤维的拓扑结构对于PC12细胞神经突生长能力和方向的影响

夏海坚[1],刘 丹[2],钟 东[1],晏 怡[1],夏永智[1],唐文渊[1],孙晓川[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院神经外科[1],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[2])

[摘要] **目的** 探讨不同拓扑结构的聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)电纺纳米纤维对于PC12细胞神经突生长能力及生长方向的影响。**方法** 构建具有随机或有序拓扑结构的PMMA电纺纳米纤维并评估其生物相容性;利用PMMA薄膜作为对照,利用慢病毒技术转染绿色荧光蛋白基因作为显色手段,分析PC12细胞在纤维支架上的神经突生长能力和生长方向,以及神经突与纤维结构的依存关系。**结果** PMMA电纺纤维具有良好的生物相容性,PC12细胞能够在电纺纤维上顺利贴壁并分化;在PMMA薄膜、随机或有序纤维系统上,PC12分化生成的神经突的长度分别为(60.2±29.9)、(64.1±32.5)、(85.7±39.8)μm,和培养在薄膜及随机纤维上的细胞相比,培养在有序纤维上的PC12细胞能够分化出长度更长、且与纤维延伸方向一致的神经突($P<0.01$);相比随机电纺纤维,有序纳米纤维对PC12神经突更具引导作用。**结论** 有序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;PC12细胞系;细胞培养;接触引导
[中图法分类号] R318.08;R322.8;R364.33 [文献标志码] A

Influence of electrospun poly(methyl methacrylate) nanofibers with different topographic features on neurite growth and orientation of PC12 cells

Xia Haijian[1], Liu Dan[2], Zhong Dong[1], Yan Yi[1], Xia Yongzhi[1], Tang Wenyuan[1], Sun Xiaochuan[1]([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the influence of electrospun poly(methyl methacrylate) (PMMA) nanofibers with different topographic features on neurite growth and orientation of PC12 cells. **Methods** Electrospun PMMA nanofibers with random or aligned topographic features were produced and PC12 cells were cultured on them. The biocompatibility of the fibers was evaluated. With PMMA film as control, the neurite growth ability and orientation of PC12 cells were assayed using lentivirus-mediated green fluorescent protein transfection. **Results** The electrospun PMMA nanofibers had good biocompatibility, and could exert contact guidance to the neurite growth of PC12 cells. On aligned nanofibers, PC12 cells could form neuritis with greater length and better alignment, as compared to random nanofibers and films (length: 85.7±39.8 *vs* 64.1±32.5 *vs* 60.2±29.9 μm). **Conclusion** Aligned electrospun PMMA nanofibers can be used as a potential cell scaffolding after neural injury.

[**Key words**] electrospinning; PMMA; PC12; cell culture; contact guidance

Supported by the Project of National Key Clinical Department Construction of China (Cai She 2011-170). Corresponding author: Sun Xiaochuan, Tel:86-23-89011151, E-mail:xiaochuansun11@hotmail.com

周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)被认为具有一定的再生能力,但对于创伤后2 cm以上的神经缺损,机体无法自行修复,需要进行周围神经段的自体移植,而自体周围神经组织在供体提供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一大难题[1];而中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤后的修复其困难更为巨大,面临CNS神经元再生能力的更为有限和生长抑制环境存在的双重困难[2-3]。有关神经系统创伤后神经再生的相关研究,

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目([2011]170)
[通信作者] 孙晓川,电话:(023)89011151,E-mail: xiaochuansun11@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131129.1808.002.html(2013-11-29)

是基础科学研究领域的一个重点。

在影响神经突再生的诸多因素中,可以将其分为生化因素和物理因素两大类。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[2-3];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[4-5]、培养环境的电场及磁场[6-9]以及培养环境的拓扑结构[10-12]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,本课题拟利用静电纺丝技术生产具良好生物相容性、具有随机或有序拓扑结构的PMMA纳米纤维支架系统,进行PC12细胞的体外培养,观察PMMA纳米纤维的拓扑线索对于PC12细胞神经突的生长能力和生长方向的影响,旨在为电纺纤维支架系统的后续在体实验奠定前期基础。

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直流电。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 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空白盖玻片上,本研究随机或有序电纺纤维的收集时间均为30 s。

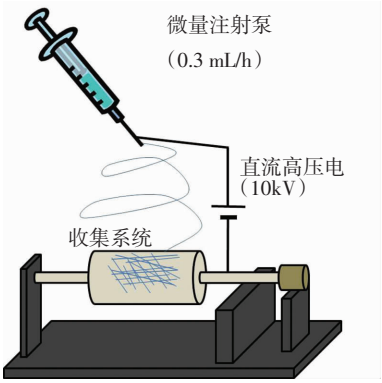


图1 本实验静电纺丝过程示意图

PMMA薄膜的构建是通过将质量体积百分比为6.5%的二甲基甲酰胺PMMA溶液覆于15mm×15 mm盖玻片上而成,其厚度约为10 μm。

本实验PMMA电纺纤维及薄膜构建均在湿度小于60%,温度22~24 ℃的室内环境下进行。所有构建的PMMA材料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。

电纺纤维制备完毕后,将覆有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(Corning公司),供最终使用。对于PC12细胞活力鉴定实验用的普通盖玻片对照,亦采取上述方法构建细胞培养体系。

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,在5个批次的样本上,分别随机选取3张显微图片,利用ImageJ(美国国立卫生署)图像处理软件在每张图片分别测量50根纤维的直径,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Blizard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[13]报道的进行,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7×10^{10}TU/mL。

1.4 PC12细胞在PMMA电纺纤维上的培养

对于PC12细胞在电纺纤维上的细胞活力鉴定,采用5-溴脱氧尿嘧啶核苷法(Brdu法)。将500细胞/mm^2的PC12细胞(由英国伦敦大学皇后玛丽医学院Blizard研究所提供)分别接种于普通盖玻片、PMMA薄膜以及PMMA电纺纤维(随机)上,上述培养基质提前用多聚赖氨酸(Sigma公司)包被,培养基使用RPMI1640培养基(Invitrogen公司),添加10%胎牛血清(Invitrogen公司)、5%马血清(Invitrogen公司)以及100 μg/mL青链霉素(Invitrogen公司)。在细胞贴壁后6 h,更换成具有10 μmol/L Brdu的新鲜培养基,重置于37 ℃、5% CO_2孵箱作用3 h。

对于PC12细胞神经突生长能力和生长方向的鉴定,将500细胞/mm^2的PC12细胞分别接种于PMMA薄膜,随机及有序PMMA电纺纤维上,基质包被及培养基使用同上。在接种细胞同时转染GFP荧光报道基因(取感染复数为500),37 ℃、5% CO_2孵箱孵化,24 h后更换新鲜培养基;于培养第2天,在培养基中加入100 ng/mL的神经营养因子(nerve growth factor, NGF, Sigma公司),促进PC12细胞分化。

1.5 Brdu免疫组化染色

贴壁的PC12细胞在含10 μmol/L Brdu的培养基中作用3 h后,4%多聚甲醛固定,在室温下用2 mol/L HCl作用5 min,再在55 ℃作用7 min,以使DNA变性。进行抗原阻断后加入1∶80鼠抗Brdu(DAKO公司),4 ℃下过夜;PBS液清洗后加入羊抗鼠Alexa Fluor 568抗体(Molecular Probes公司,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 μg/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)]封片。立刻在荧光

显微镜下观察取图(Leica LEITZ DMRD, 莱卡公司)。

对于 5 个批次的实验,分别在 10 × 物镜下选取 7 个视野,根据 DAPI 染色的结果计算贴壁 PC12 细胞的数量,并以此计算 Brdu 阳性细胞占贴壁细胞总数的比例。

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, 尼康公司)取图,利用 Image J 软件的 Freehand 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 5 个批次的样本上,分别随机选取 7 个视野,进行 PC12 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。每组测量的 PC12 细胞在 300 ~ 400 之间。

1.7 统计学分析

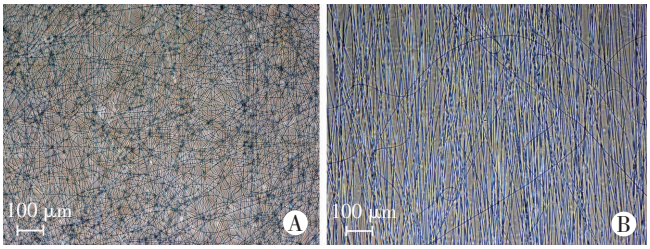
采用不同批次制造的电纺纤维重复 5 次,采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较行单因素方差分析。

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。

利用 ImageJ 图像处理软件,测得随机或有序 PMMA 电纺纤维的直径分别为(0.49 ±0.04)μm 和(0.47 ±0.03)μm,经比较两者之间无显著差异($P > 0.05$)。



A:随机电纺纤维;B:有序电纺纤维

图 2 构建的 PMMA 电纺纳米纤维

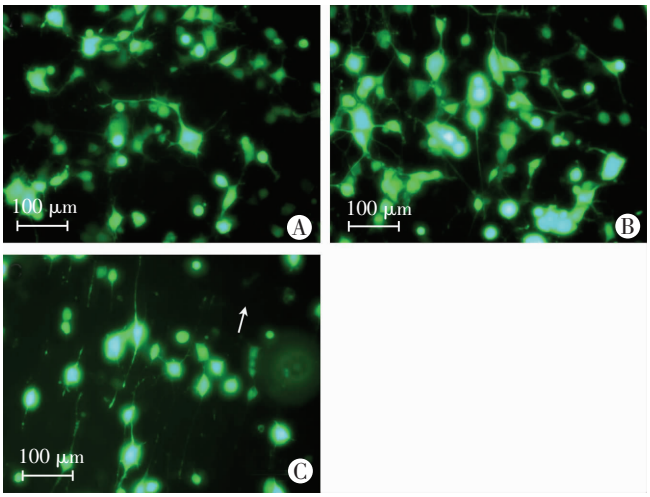
2.2 PC12 在 PMMA 电纺纤维上的细胞活力鉴定

PC12 细胞在普通盖玻片、PMMA 薄膜及电纺纤维系统(随机排列)上的 Brdu 染色结果统计,10 × 物镜下每个视野上的贴壁细胞数分别为(478 ±71)、(465 ±78)和(486 ±62),其中Brdu 阳性细胞数的比例分别为(58.3 ±4.3)%、(57.2 ±4.8)% 、(59.1 ±4.6)%,经检验两组数据均未见显著差异($P > 0.05$)。

2.3 PC12 在 PMMA 电纺纤维上的培养

2.3.1 PC12 细胞在 PMMA 薄膜、随机或有序电纺纤维上的生长分化特点 图 3 为培养第 4 天,PC12 在 PMMA 薄膜、随机和有序电纺纤维上的生长分化状况,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。在随机纤维系统上,PC12 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 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 能够感知培养局部微观拓扑环境的不同并作出相应反应。

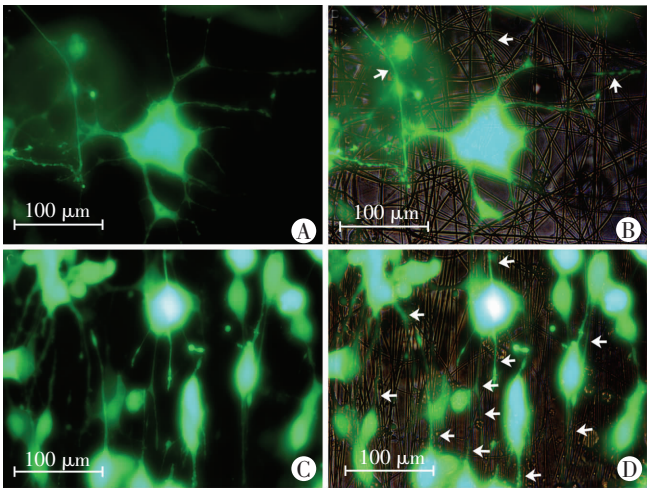
培养第 4 天,在 PMMA 薄膜、随机或有序纤维系统 3 种培养环境中,PC12 分化生成的神经突的长度分别为(60.2 ± 29.9)、(64.1 ±32.5)、(85.7 ±39.8)μm, 和培养在薄膜及随机纤维系统上的细胞相比,培养在有序纤维上的 PC12 细胞能够分化出长度更长的神经突($P < 0.01$)。



A:PMMA 薄膜;B:随机电纺纤维;C:有序电纺纤维 绿色为 GFP 的表达;↑:示有序纤维系统纤维的延伸方向

图 3 PC12 细胞在 PMMA 薄膜及电纺纤维上的神经突生长情况

2.3.1 PC12 细胞神经突和电纺纳米纤维的依从关系 图 4 显示为 PC12 细胞神经突和不同拓扑结构 PMMA 电纺纤维的依从关系。在 GFP 荧光与背景纤维结构的合成图上,在随机或有序电纺纳米纤维上,均能发现神经突沿纤维走行的现象。但在 2 种基质上不同的是,在随机纤维系统上,此种现象发现较少,PC12 的很大一部分神经突并未发现和纤维存在确切的伴行现象;而在有序纤维系统上,则能发现大多数的神经突和纤维延伸方向一致,和纤维存在伴行的关系,提示 PC12 神经突的延伸更倾向于接受有序纤维提供的接触引导。



A、B:随机电纺纤维;C、D:有序电纺纤维;B、D:分别为 A、C 与基质纤维的合成图像 绿色为 GFP 的表达;↑:示 PC12 神经突与纤维结构有确切依从关系的部位

图 4 PC12 细胞神经突与不同拓扑结构电纺纤维的依从关系

3 讨论

周围神经系统和中枢神经系统损伤后的神经再生是神经科学研究的一个热点。除了经典的各种导致生长促进或抑制的生化因素的研究外,近年来关于局部物理因素对神经突的影响亦逐渐引起重视。

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[14-16]。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,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[17]。因此,电纺纤维系统具有潜在的作为伤后植入性支架的潜力,有必要对其进行深入研究。

本课题旨在体外评估不同拓扑结构的电纺纤维对于神经细胞神经突生长的引导作用,故选择了具有稳定理化性质、不能降解的PMMA,该材料具有良好的生物相容性,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。PC12细胞的活力鉴定实验提示,本实验构建的纤维材料和经典的盖玻片玻璃环境相比无明显生物毒性存在,细胞在贴壁和活力上无明显区别。

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[18]。本研究显示PC12细胞能够敏感感知培养局部的拓扑环境,提示电纺纤维所提供的拓扑线索能够给PC12神经突的延伸提供相应的接触引导。进一步通过GFP表达与背景纤维的合成图,更发现PC12细胞的神经突更易接受有序PMMA电纺纤维的接触引导,在有序纤维上形成更多的伴行关系。

本研究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生长的神经突其细胞骨架延伸更节约能量,从而能够促进生长有关[12]。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,本实验发现PMMA电纺纳米纤维能够为PC12细胞的神经突的生长提供接触引导,相比随机排列的纤维系统,有序电纺纤维对PC12神经突更具引导作用,在有序纤维上PC12能够生成沿纤维方向排列、且长度更长的神经突,提示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 M L. Innovative treatment of peripheral nerve injuries: combined reconstructive concepts[J]. Ann Plast Surg, 2012, 68(2): 180-187.

[2] Yu T W, Bargmann C I. Dynamic regulation of axon guidance[J]. Nat Neurosci, 2001, 4 Suppl: 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] Lamoureux P, Ruthel G, Buxbaum R E, *et al*. Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons[J]. J Cell Biol, 2002, 159(3): 499-508.

[5] Koch D, Rosoff W J, 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 M M. Orientation of neurite growth by extracellular electric fields[J]. J Neurosci, 1982, 2(4): 483-496.

[7] Pan L, Borgens R B. 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 W S, 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 K E. Optimal micropattern dimensions enhance neurite outgrowth rates, lengths, and orientations[J]. Ann Biomed Eng, 2007, 35(10): 1812-1820.

[11] Liazoghli D, Roth A D, Thostrup 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 J A, Bellamkonda R V. 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] 谢红, 卢华, 黄华, 等. 载药聚乙烯醇/海藻酸钠静电纺丝纤维的改性及其药物体外释放研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(23): 2485-2489.

[17] Hurtado A, Cregg J M, Wang H B, *et al*. Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers [J]. Biomaterials, 2011, 32(26): 6068-6079.

[18] Gerdin M J, Eiden L E. Regulation of PC12 cell differentiation by cAMP signaling to ERK independent of PKA: do all the connections add up? [J]. Sci STKE, 2007, 2007(382): pe15.

(收稿:2013-10-08;修回:2013-11-07)

(编辑 王小宴)