DOI:10.16016/j.1000-5404.201408210

论著

有序聚甲基丙烯酸甲酯电纺纳米纤维作为大鼠背根神经元负载支架的可行性研究

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];400013 重庆,重庆中山医院药剂科[2])

[摘要] **目的** 探讨具备有序或无序拓扑结构的聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate,PMMA)电纺纳米纤维材料作为原代大鼠背根神经元(dorsal root ganglion neurons,DRGn)负载支架的可行性。**方法** 构建具有随机或有序拓扑结构的PMMA电纺纳米纤维;利用PMMA薄膜组作为对照,分离纯化大鼠原代DRGn,利用慢病毒技术转染绿色荧光蛋白基因作为显色手段,分析在随机及有序纤维支架上DRGn神经突的生长能力以及神经突和电纺纤维的依存关系。**结果** 大鼠原代DRGn能够顺利在PMMA材料上贴壁并生长,在培养第2天,较之平面环境,DRGn未见平均神经突数量及神经突长度的明显区别,电纺纤维的拓扑结构对于DRGn神经突的生长具有明显的接触引导作用,在有序电纺纤维上DRGn能够生成和基质纤维延伸方向一致的神经突;通过GFP表达与背景纤维的合成图,发现在随机或有序电纺纤维上,DRGn神经突均能循纤维向前生长,但相比随机纤维,神经突似乎更倾向于接受有序电纺纤维的引导。**结论** 有序PMMA电纺纳米纤维具有作为神经损伤后大鼠DRGn负载支架的潜力。

[关键词] 静电纺丝;聚甲基丙烯酸甲酯;背根神经元;细胞培养;接触引导
[中图法分类号] R318.08;R322.81 [文献标志码] A

Feasibility of electrospun polymethyl methacrylate nanofibers with different topographic features as scaffolding for rat dorsal root ganglion neurons

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, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Pharmacy, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing, 400013, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the feasibility of electrospun polymethyl methacrylate (PMMA) nanofibers with different topographic features as scaffolding for rat dorsal root ganglion neurons (DRGns). **Methods** Ordered and disordered electrospun PMMA nanofibers were prepared to culture rat DRGns, with a PMMA film as control. Green fluorescent protein (GFP) gene as reporter gene was introduced into the DRGns through lentivirus to reveal the growth ability of the DRGns on different substrates, and to analyze the relationship between the neurites and the electrospun nanofibers. **Results** DRGns could adhere to and grow on the PMMA materials, and the topographic features could exert obvious contact guidance for neurite growth. DRGns cultured on the ordered nanofibers could form ordered neurites as compared with those cultured on the PMMA film and the disordered nanofibers, however, there were no differences in the average number and length of the neurites on the 2nd day. The merged images of GFP fluorescence and the nanofibers showed that the neurites were elongated along the nanofibers, and the ordered nanofibers could provide more support for the

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目(财社[2011]170号);国家自然科学基金(81100906);重庆市科委前沿与应用基础研究计划(CSTC2014jcyjA10061)
[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.20141205.1535.118.html(2014-12-03)

DRGns than the disordered nanofibers. **Conclusion** Ordered electrospun PMMA nanofibers have the potentiality as scaffolding for transplantable DRGns after neural injury.

[**Key words**] electrospinning; PMMA; dorsal root ganglion neurons; cell culture; contact guidance

Supported by the National Key Clinical Subjects Construction Program of China (2011-170), the National Natural Science Foundation of China (81100906), and the Frontiers and Application Basic Research Plan of Chongqing Science & Technology Committee (CSTC2014jcyjA10061). Corresponding author: Sun Xiaochuan, Tel: 86-23-89011151, Email: xiaochuansun11@hotmail.com

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。周围神经系统具备一定再生能力,但一旦神经缺损超过2 cm,新生神经突无法桥接缺损两端,临床上需要行自体神经段移植。由于机体提供自体神经段的能力有限,故周围神经损伤的治疗仍困难[1];而中枢神经系统损伤后修复则更加困难。脊髓损伤的动物实验显示在损伤灶的头端和尾端存在较多新生神经突,但从伤后亚急性期开始,在损伤灶局部由于胶质瘢痕及空洞的逐渐形成,新生神经突由于欠缺胞外基质的支持,难以穿越瘢痕及空洞而向远方延伸;因此,构建可支持神经突再生的基质环境是损伤后神经再生的一个重要策略[2-3]。最近研究提示利用组织工程技术制作的静电纺丝纳米纤维是一种有潜力的植入型生物材料[4-7]。本课题组前期已成功制作具有良好生物相容性的随机或有序排列的聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)纳米纤维支架系统[6],PC12神经细胞系能够在其上顺利贴壁生长,并对纤维的拓扑结构作出准确反映[7]。神经细胞系和原代神经元存在诸多不同,关于PMMA电纺纤维系统能否作为原代神经元的生长负载支架,是值得探讨的问题。因此,本课题拟观察PMMA纳米纤维的拓扑线索对于背根神经元(dorsal root ganglion neurons, DRGn)神经突生长形态的影响,并分析DRGn神经突和电纺纤维的依存关系,旨在为电纺纤维细胞支架系统的后续在体实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 PMMA电纺纤维及薄膜的构建

PMMA(Sigma公司)被溶解于二甲基甲酰胺(Sigma公司)溶液中形成质量体积百分比为6.5%的溶液,通过配有30 G针尖的微量注射泵,该溶液以0.3 mL/h的速度喷出;针尖和收集系统的距离被分别设置为12 cm及20 cm,用以构建随机或有序排列的纤维系统。电纺过程的电压为10 kV。本实验电纺纤维的收集系统被设计为长方体形,15 mm×15 mm盖玻片通过卡槽固定在收集系统上,为达到电纺纤维呈随机或有序排列的需要,收集系统的转速被分别定为400 r/min或1 200 r/min,电纺纤维最终被收集在盖玻片上待用。

PMMA薄膜是通过将同样浓度的PMMA二甲基甲酰胺溶液覆盖于15 mm×15 mm盖玻片上构建而成。

上述PMMA电纺纤维和薄膜的构建过程均在湿度小于60%,22~24 ℃的室内环境下进行。PMMA材料构建完成后,真空烘箱内室温烘干以除去残留溶剂,紫外箱处理1 min(36 W,波长250 nm)以增加材料亲水性。

最后,将制有PMMA电纺纤维或薄膜的盖玻片通过生物实验级真空润滑油(Dow Corning公司)贴附于硅胶隔离片(Grace公司),形成内径为13 mm、容积为0.5 mL的细胞培养体系,在该体系中PMMA材料位于基底,经紫外线消毒后置于细胞培养皿(Corning公司)中供细胞培养用。

1.2 PMMA电纺纳米纤维的鉴定

1.2.1 PMMA电纺纳米纤维的形态观察 利用倒置显微镜(TE2000-S,Nikon公司)进行,分别在随机或有序纤维系统上观察纤维的排列方向。

1.2.2 PMMA电纺纳米纤维的纤维直径测定 对于所制作的随机或有序PMMA电纺纤维,分别在5批次的样本上随机选取3张显微图片,利用美国国立卫生署的Image J软件,在每张图上各测量50根纤维的直径,从而得到随机或有序纤维的平均直径。

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(均来自英国伦敦大学皇后玛丽医学院)。GFP慢病毒载体(LV-GFP)的制作具体参照文献[6],所得病毒颗粒经超速离心浓聚。采用梯度浓度法转染HEK293细胞测定病毒滴度。本实验所得LV-GFP的滴度为7×10^{10} TU/mL。

1.4 大鼠DRGn的分离、纯化及鉴定

分离和纯化的具体方法如下:①取出生2~3 d的Wistar大鼠,CO_2吸入麻醉后,断头处死;②游离背根神经节,置于预冷的F-12培养基(Gibco公司);③在立体显微镜下,剥除背根神经节的外膜,剪除神经根;④置于含0.125%胶原蛋白酶的F-12中,于37 ℃、5%

CO_2孵箱中消化 2 h;⑤将消化后的背根神经元移入 500 μL DRGn 培养基中[即 BSF_2培养基,配制方法:500 mL F-12 培养基,加 5 mL N-2 补充剂(Invitrogen 公司),5 mL 青霉素/链霉素(100 mg/mL),以及 5 mL 30%浓度的 BSA],小心吹打至雾状,放置片刻,使较大的团块沉至试管底部后,将其余液体小心移至预先准备的 15% BSA 溶液中(1 mL 30% BSA +1 mL BSF_2),100 ×*g* 下离心 5 min;⑥弃去上清液,试管底部的细胞块用 150 μL 的 BSF_2培养基吹打均匀;⑦细胞密度计数后供后续实验使用。

DRGn 的鉴定采用抗 βⅢ Tubulin 和 DAPI 双重免疫组化染色。细胞样本用多聚甲醛固定后,一抗选择 1∶500 兔抗 βⅢ Tubulin(Abcam 公司),二抗选择 1∶1 000 羊抗兔 Alexa Fluor 488 抗体,封片用 1∶9甘油溶液[含 1 μg/mL DAPI(Sigma 公司)],在荧光显微镜下观察取图(Leica LEITZ DMRD,莱卡公司)。

1.5 大鼠 DRGn 在 PMMA 电纺纳米纤维上的培养

1.5.1 大鼠 DRGn 在 PMMA 电纺纳米纤维上的培养方法 以 PMMA 电纺纳米纤维或 PMMA 薄膜为基底的细胞培养皿的构建方法如 1.1 所述,后者作为对照,培养系统提前用多聚赖氨酸和层粘连蛋白(Sigma 公司)包被。包被过程如下:先用多聚赖氨酸包被过夜,灭菌 PBS 液清洗 5 min ×2 次后,再用 10 μg/mL 层粘连蛋白包被 2 h,待用。

分别将 3×10^3 DRGn 置于随机或有序 PMMA 电纺纳米纤维及 PMMA 薄膜。同时用 LV-GFP 转染 GFP(MOI 为 500)。为方便起见,以下用 GFP/DRGn 指代 LV-GFP 转染的背根神经元。培养过程中,每天更换半量培养基。每日在倒置荧光显微镜下观察。

1.5.2 GFP/DRGn 在 PMMA 材料上的形态学观察 预实验的结果显示,转染 DRGn 的 LV-GFP 约在转染病毒后 36 h,GFP 表达满意,所显示的绿色荧光足以显示胞体和神经突。故选择培养第 2 天作为 DRGn 神经突数量与长度计量的时间点;在培养第 3 天,此时神经突初步形成网络,进行神经突与基质纤维依存关系的分析。

在培养第 2 天,根据 GFP 荧光图像进行神经突数量的计量和长度的测量。超过神经元直径的细胞突起才被认定为神经突,而未超过神经元直径的细胞突起未列入计量范围。神经突的长度通过 Image J 软件的 Freehand Line 工具测量所得,包括从神经突的尖端至胞体的外缘,长度最长的神经突被认定为所测量 GFP/DRGn 的神经突长度。每个样本随机选取 5 个视野进行测算,且所有测算在有明确 GFP 表达的神经元上进行。将 GFP 的实时荧光表达和光镜下的背景纤维图像进行叠加,来分析 DRGn 神经突和电纺纤维的相互关系。

1.6 统计学分析

用不同批次的电纺纤维重复 5 次。采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较行 *t* 检验,单因素方差分析行多组间比较,组间比较用 Student-Newman-Keuls 法。

2 结果

2.1 随机或有序 PMMA 电纺纳米纤维的表观分析

制作的随机及有序 PMMA 电纺纤维均可见外观整齐,无明显空泡形成。在随机排列电纺纤维上,纤维呈各向随机、无序状态,而在有序纤维上,纤维具有高度方向性(图 1)。

测量结果显示,随机或有序电纺纤维的直径分别为(0.49 ±0.04)、(0.47 ±0.03)μm,两者间无统计学差异($t = 1.079$, $P > 0.05$)。

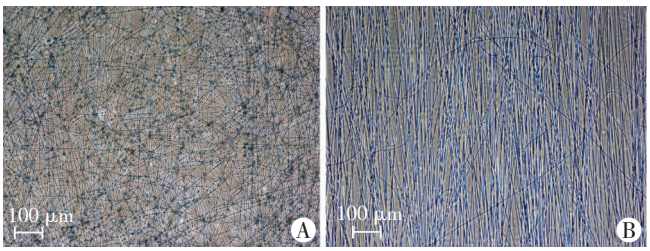
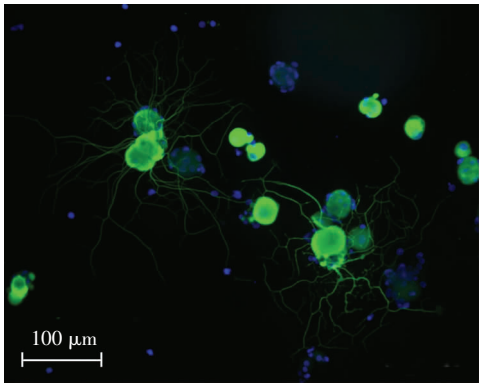


图 1 倒置显微镜观察随机(A)及有序(B)PMMA 电纺纳米纤维形态

2.2 分离纯化所得 DRGn

图 2 所示为所得 DRGn 的免疫细胞染色结果。DRGn 抗 βⅢ Tubulin 染色呈阳性,染色结果能够清晰显示胞体和神经突。在盖玻片这一经典体外培养环境中,神经突的空间排列呈现随机、无序的状态。



绿色:抗 βⅢ-Tubulin;蓝色:DAPI

图 2 培养第 2 天大鼠背根神经元染色结果

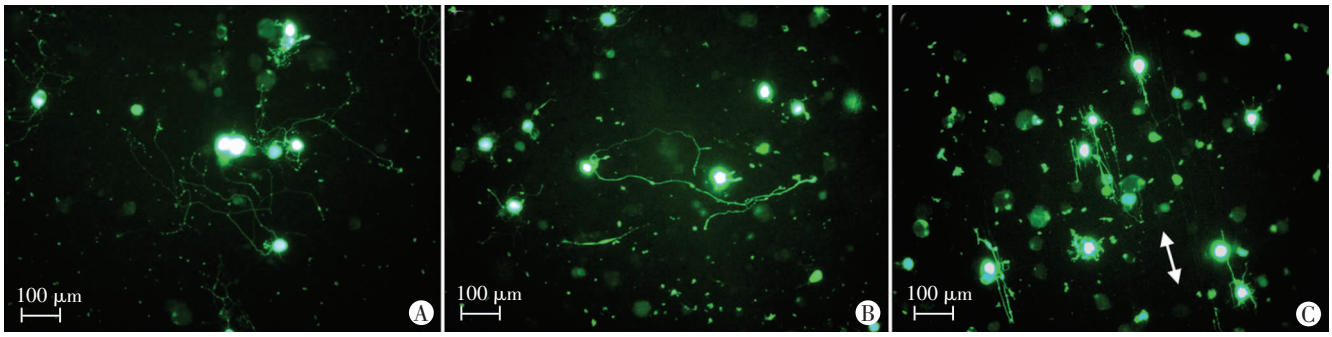


图3 培养第2天GFP/DRGn在PMMA薄膜(A)、随机电纺纤维(B)及有序纤维(C)上的生长 双向箭头:示有序纤维的延伸方向

2.3 GFP/DRGn在PMMA电纺纤维上的生长

GFP/DRGn在PMMA薄膜或电纺纤维上的生长如图3所示,GFP/DRGn能够在PMMA薄膜或电纺纤维上顺利贴壁并生长。在培养第2天,对于培养在PMMA薄膜、随机或有序PMMA电纺纤维上的GFP/DRG,其生成的神经突的数量分别为(3.3 ± 1.6)、(2.9 ± 1.2)个和(3.1 ±1.3)个,经比较未见神经突平均数量的明显差异($P>0.05$)。

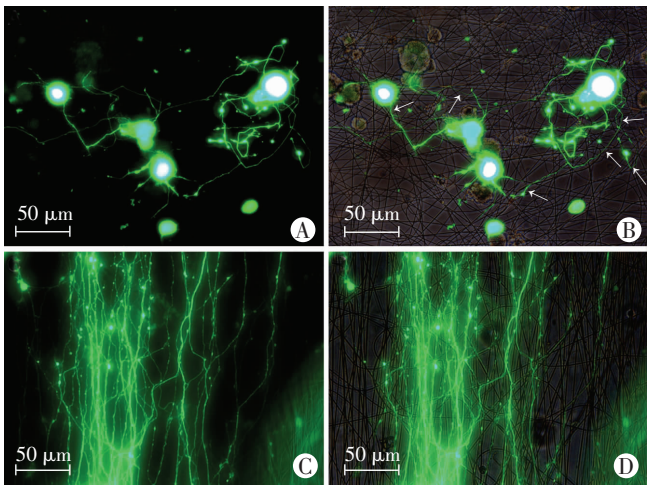
关于GFP/DRGn神经突的长度,培养第2天,在PMMA薄膜、随机或有序电纺纤维上,神经突长度分别为(143.7 ± 45.2)、(134.2 ± 38.7) μm和(138.4 ± 40.6) μm,各组之间亦未见明显差异($P>0.05$)。

另外明显可见在PMMA薄膜和随机纤维系统上,GFP/DRGn神经突的空间排列形式和在盖玻片上类似,呈随机、无序排列,而在有序纤维上,神经突能够沿基质纤维的延伸方向生长。

2.4 GFP/DRGn神经突和纤维结构的相互关系

如图4所示,通过GFP荧光和背景纤维的叠加,可以发现在随机或有序PMMA电纺纤维上,均能见绝大多数的神经突和基质纤维呈伴行的关系,神经突循纤维向远处延伸,故在有序纤维上,神经突的排列和纤维一样具有明显的方向性。

仔细分析神经突的走行和纤维的关系,可以发现在随机PMMA纤维系统上,大多数情况下神经突循纤维延伸,但在纤维交叉的地方,一些神经突改变其原先路径,跨越纤维间的一小段距离而攀附至另一根纤维,并依附其继续延伸。此种情况,在有序PMMA纤维上难以见到,神经突似乎更倾向于遵循有序纤维的引导而向远处延伸。



↑:示神经突改变原先依附纤维转而沿另一纤维的拓扑线索延伸的现象

A、B:随机纤维;C、D:有序纤维;A、C:GFP表达;B、D:GFP表达与基质纤维的合成图

图4 培养第3天GFP/DRGn神经突与随机或有序PMMA电纺纤维的相互关系

3 讨论

静电纺丝技术的组织工程价值最近被日趋重视[4-8]。电纺纤维的直径和细胞外基质纤维的直径类似;电纺纤维具有优异表面面积/体积比,能够为培养细胞提供充足贴壁空间;以及具有多孔性特点,有利于代谢物质的进出[9]。关于电纺纤维作为神经损伤后植入性支架的潜力值得深入研究[10-12]。

本课题选择PMMA作为电纺原料的原因基于该材料具有稳定理化性质,且不能降解,不会对培养环境造成附加影响,PMMA是多种临床植入性材料的原料。

DRGn是神经科学体外实验常见的原代神经元类型,为尽量减少成纤维细胞和雪旺细胞的掺杂,本实验选择新生大鼠为对象,采集背根神经节来获得DRGn。

在预实验的基础上,本实验最终选用慢病毒感染GFP基因作为显色手段,该技术方便实时观察,也可避免常规染色过程对培养系统造成的损伤(预实验发现,在染色过程中,因添加和抽吸试剂造成的表面张力变化易对基质纤维造成损伤)。

本研究显示大鼠背根神经元能够在随机及有序PMMA纤维系统上顺利贴壁并生长,提示PMMA电纺纤维能够给予原代神经元必需的基质支持,而DRGn能够敏感感知生长局部拓扑环境的变化并作出相应反应[13-14]。本研究未发现DRGn平均神经突数量及神经突长度的明显区别,提示较之经典的平面体外培养环境,PMMA纳米纤维的三维拓扑环境对DRGn的生长无明显负面影响。

DRGn能够在PMMA电纺纤维上生长,但所生成的神经突究竟是依附在纤维结构上,还是依附在电纺纤维所附着的玻璃上,是值得仔细分析的。前者提示PMMA纤维对DRGn生长的支持良好,后者则相反,提示其作为植入性支架的作用有限[13]。通过GFP荧光和基质纤维的重合,揭示出DRGn的神经突和纤维结构的毗邻关系。在随机或有序PMMA电纺纤维上,均可见神经突依纤维而行,而不是附着在盖玻片的玻璃上,提示较之玻璃环境,DRGn的神经突易于接受电纺纤维的引导,其能给予DRGn充分的基质支持。

在不同的拓扑环境中,发现DRGn和电纺纤维的微观关系是有所区别的[13]。在随机PMMA纤维上,神经突在纤维交叉的地方,常见其改变其原路径,跨越纤维间的一小段距离而依附至另一根纤维并延伸,此种情况,在有序PMMA纤维上难以见到,在后者神经突更倾向于严格遵循某一纤维前行,保持高度有序的生长状态。这提示有序纤维对DRGn生长的接触引导作用更强。

综上所述,本实验发现大鼠原代DRGn能够在PMMA电纺纳米纤维上顺利贴壁并生长,在检查时间点,相比平面环境,DRGn在神经突数量及长度上无明显区别;纤维系统的拓扑结构DRGn具有明显的接触引导作用,不管在随机或有序电纺纳米纤维上,神经突均能循纤维而行,但在两种拓扑环境里DRGn的反应有所不同,相比随机纤维系统,神经突似乎更倾向于沿有序电纺纤维生长。鉴于周围神经或脊髓白质纤维具有明显的方向性,本实验提示有序PMMA电纺纳米纤维具有作为神经损伤后组织/细胞支架的潜力。

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] Xie J, Li X, Xia Y. Putting Electrospun Nanofibers to Work for Biomedical Research[J]. Macromol Rapid Commun, 2008, 29(22): 1775-1792.

[5] Liu W, Thomopoulos S, Xia Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine[J]. Adv Healthc Mater, 2012, 1(1): 10-25.

[6] 夏海坚, 刘丹, 钟东, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(4): 351-354.

[7] 夏海坚, 刘丹, 钟东, 等. 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[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(4): 515-519.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Lim S H, Mao H Q. Electrospun scaffolds for stem cell engineering[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(12): 1084-1096.

[11] Capkin M, Cakmak S, Kurt F O, *et al*. Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs[J]. Biomed Mater, 2012, 7(4): 045013.

[12] Phipps M C, Clem W C, Catledge S A, *et al*. Mesenchymal stem cell responses to bone-mimetic electrospun matrices composed of polycaprolactone, collagen I and nanoparticulate hydroxyapatite[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16813.

[13] Hoffman-Kim D, Mitchel J A, Bellamkonda R V. Topography, cell response, and nerve regeneration[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2010, 12: 203-231.

[14] 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.

(**收稿**:2014-08-29;**修回**:2014-10-28)

(编辑 王小寒)