

[文章编号] 1000-2200(2009)09-0753-03

· 基础医学 ·

改性聚乳酸与 Schwann 细胞的生物相容性研究

邵正仁¹, 颜 玲², 陈卡娜²

[摘要] 目的:对不同的改性聚乳酸材料进行 Schwann 细胞(SC)生物相容性观察。方法:采用细胞增殖度法,观察不同材料浸提液对 SC 增殖影响,进行毒性评级;采用相差显微镜、扫描电镜、荧光分光光度法观察细胞形态以及黏附情况。结果:除 2[#] 材料(PLA-g-HEMH)的高浓度浸提液毒级为 2 级外,其余毒级均为 0~1 级,细胞生长良好,其黏附性较未改性聚乳酸高,但所有材料 SC 的黏附性仍低于培养板($P < 0.01$)。结论:改性后的材料细胞生物相容性良好,其表面亲水性增加,但 2[#] 材料可能在改性过程中表面酸度增加,在处理上有必要改进。

[关键词] 生物医学工程;聚乳酸;Schwann 细胞;生物相容性材料

[中国图书资料分类法分类号] R 318.08 [文献标识码] A

Study of the biocompatibility of modified polylactic acid vector with Schwann cell

SHAO Zheng-ren¹, YAN Ling², CHEN Ka-na²

(1. Department of Anatomy, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030; 2. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou Guangdong 510630, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the biocompatibility of modified polylactic acid vector with Schwann cell. **Methods:** Immersed extraction of modified PLA affect to Proliferation and cytotoxicity stage of Schwann cell by MTT method, Schwann cell morphology and adhesion condition on surface of materials were observed by scanning electro microscope and Fluor spectrophotometer. **Results:** Cytotoxicity stage of modified polylactic acid vector were 0-1 stage, and the mumble of schwann cells and adhesion were better than unmodified PLA, but all materials were as good as culture well ($P < 0.01$). **Conclusions:** Modified polylactic acid vector have better biocompatibility with Schwann cell, and their cytotropism were improved.

[Key words] biomedical engineering; polylactic acid; Schwann cell; biocompatible materials

周围神经缺损的修复一直是医学界难题,缺少良策。随着组织工程的兴起,组织工程化神经的研究为神经缺损的修复提供了全新的思路和方法,成为新近研究的热点之一。随着组织工程的发展,有关生物可降解材料的研究越来越多,而生物相容性问题是影响生物医用材料临床应用的主要问题。作为组织工程的细胞支架,不仅要求具有一般材料的生物相容性,而且还要求有良好的细胞亲和性,不会引起细胞变性及不影响细胞生长、传代。目前聚乳酸(polylactic acid, PLA)作为一类重要的人工合成高分子材料,已应用于细胞生长的载体,并取得满意效果。然而,其不足之处是亲水性差,导致细胞的黏附性差。为此,有必要对 PLA 接枝亲水性基团进行改性。但改性后的材料是否具备良好细胞相容性,还需进一步研究。本实验通过对 PLA 接枝改性后材料进行 Schwann 细胞(SC)的生物相容性观察,以便

应用于神经组织工程的研究。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)PLA 改性材料 1[#]:消旋聚乳酸接枝乙烯基吡咯烷酮(PDLLA-g-NVP); 2[#]:消旋聚乳酸接枝甲基丙烯酸-g-羧乙酯(PDLA-g-HEMH); 3[#]:聚乳酸接枝甲基丙烯酸-g-羧乙酯(PLA-g-HEMH); 4[#]:聚乳酸接枝乙烯基吡咯烷酮(PLA-g-NVP)。(2)未改性材料 5[#]:PLA。

1.2 材料浸提液制备 按培养液/材料表面积为 2 ml/cm² 标准,即将 5 mm² 大小的材料加入培养液中 37 ℃ 浸泡 3 天。

1.3 主要仪器和试剂 采用 960 免疫酶联检测仪(德国生产)。MTT [3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, Sigma 公司产] 溶液,使用浓度 5 mg/ml。二甲基亚砜(DMSO)(香港生产)。

1.4 细胞增殖度法(MTT 法) 采用 0.25% 胰酶和 0.1% II 胶原酶分步消化法培养的 SC 约 8 天,细胞铺满培养瓶,以 0.125% 胰酶消化单层细胞,10% 小牛血清培养基制成 1 × 10⁵/ml 细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μl,在 5% CO₂、37 ℃ 培养箱内孵育 24 h 后取出,加入不同程度稀释的浸提液(浸提原液 10%、25%、50%、100%) 每孔 100 μl,每浓

[收稿日期] 2009-03-23

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(001347)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 解剖学教研室,安徽 蚌埠 233030; 2. 中山大学附属第三医院 整形外科,广东 广州 510630

[作者简介] 邵正仁(1953-),男,副教授。

[通讯作者] 颜 玲,博士,主任医师,副教授。

度组浸提液 6 孔,空白对照组每组加 100 μ l 培养液,放入培养箱中培养,于 3、5、7 天取出培养板。分别加入 MTT 溶液每孔 20 μ l,5% CO₂,37 $^{\circ}$ C,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 100 μ l DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,用 960 免疫酶联检测仪检测,数据经 SPSS 统计软件处理,另按 6 级毒性分级法(见表 1)计算相对增殖度(RGR)毒级[RGR(%) = 实验组光密度(OD)值/空白对照组 OD 值]。

1.5 荧光分光光度计测定细胞黏附性 制作细胞密度和荧光量相关曲线,参考 Visser 的荧光法。

1.5.1 标准曲线 将 SC 制成不同密度细胞悬液,分别加 50 mg/L FDA 0.1 ml 室温 30 min;PBS 洗后分别加细胞裂解液 0.2 ml 裂解 30 min,移入石英比色杯,用 PBS 补足至 3 ml,RF-5000 荧光分光光度计测定荧光强度,绘制标准曲线。

1.5.2 黏附测定 (1)将圆形不同聚乳酸材料经 75% 乙醇消毒晾干后,放入 96 孔板,每孔加 0.1% 多聚赖氨酸 0.1 ml,4 $^{\circ}$ C 过夜后吸出每孔溶液。(2)将 1×10^5 /ml SC 悬液加入 96 孔板中的材料上,每孔 0.1 ml,放入 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 60 min。用 PBS 液轻洗 3 次,吸除未贴壁细胞。(3)每孔加 50 mg/L FDA 0.1 ml,室温静置 30 min 后,吸出,用 PBS 液轻洗 3 次。(4)加细胞裂解液 0.2 ml 裂解 30 min 后,用 PBS 液 0.1 ml 冲洗各孔中的聚乳酸材料,并将材料取出。将细胞裂解液及冲洗的 PBS 一起移入比色杯,PBS 补足至 3 ml,RF-5000 荧光分光光度计测定荧光强度,并在上述标准曲线条件下直接计算出细胞密度。再按下述公式计算出细胞黏附率:

$$\text{黏附率} = (\text{黏附细胞数} / \text{加入细胞数}) \times 100\%$$

1.6 细胞形态学观察 对上述加入不同浸提液的 96 孔板的细胞进行形态观察,并与对照孔细胞进行观察比较。将材料制成圆形试片,75% 乙醇消毒晾干后置于 96 孔板内,加 SC 1×10^5 /ml,每孔 100 μ l,5% CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 7 天后取出,常规制备扫描电镜标本观察。

1.7 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 相对增殖度及材料毒性评级 不同材料的浸提液不同浓度对 SC 的毒性检测通过 MTT 法得出 OD 值后,计算出细胞相对增殖度及毒性评级(见表 1~3)。3~7 天,1*~3*均为 0~1 级;4*、5*在 3 天时观察浸提原液为 100% 时,毒级为 2 级;而在 5、7 天时为 1 级,其它各浓度和时间点均为 0~1 级;2*

材料于早期(3 天)时各不同浸提原液均为 2 级,5 天在浸提原液为 100% 时,毒级为 2 级(见表 1)。

表 1 SC 相对增殖度及材料毒性评级

浸提液 浓度(%)	1* 毒级	2* 毒级	3* 毒级	4* 毒级	5* 毒级
3 天					
10	123.7	0	65.3	2	118.3
25	125.1	0	73.7	2	117.9
50	99.3	1	70.8	2	87.8
100	113.	0	53.11	2	95.7
5 天					
10	91.7	1	96.0	1	157.5
25	95.8	1	95.2	1	153.1
50	87.1	1	76.8	1	107.8
100	85.3	1	54.3	2	148.9
7 天					
10	105.5	0	106.1	0	115.4
25	100.0	0	101.8	0	106.1
50	95.3	1	88.3	1	109.1
100	89.6	1	82.26	1	91.8

2.2 黏附率 改性后的材料 1*、3*、4*较 2*材料及未改性的 5*材料黏附率高,但所有材料与 SC 的黏附率均低于培养板(空白对照)材料($P < 0.01$)(见表 2)。

表 2 SC 与聚乳酸材料的黏附率(%) ($n_i = 20; \bar{x} \pm s$)

聚乳酸材料	黏附率(%)	F	P	MS _{组内}
1*(PDLLA-g-NVP)	32.5 \pm 2.3**			
2*(PLA-g-HEMH)	28.3 \pm 1.8**			
3*(PLA-g-HEMH)	33.2 \pm 2.3**	753.67	<0.01	4.003
4*(PLA-g-NVP)	32.2 \pm 2.1**			
5*(PLA)	30.9 \pm 1.7**			
对照	61.2 \pm 1.7			

q 检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$

2.3 材料浸提液对 SC 形态影响 除 2*材料浸提液培养 SC 3 天,有较多的圆形细胞外,其它的材料浸提液培养 SC 3 天,均可见多数细胞胞体呈梭形,伸出双极突起,少数为胞体三角形,伸出三个突起,突起较长,相互首尾连接。至第 5 天,细胞连接成片,7 天已生长成细胞单层。不同聚乳酸材料的浸提液对细胞形态无明显影响,仅是在高浓度(100%)时,与对照相比,每个时间点,短突起及圆形细胞数较多,尤其以 2*材料更为明显(见图 1)。

2.4 SC 在聚乳酸材料表面生长情况 在扫描电镜下 PLA 材料表面粗糙,呈微颗粒状突起,具有沟隙。材料复合 SC 培养 7 天,细胞附着材料表面,多呈梭形,部分细胞突起相互连接,细胞突起紧贴着材料表面,似与材料融为一体。细胞突起跨越微孔表面或

向微孔内长入,有较好的生物相容性。部分细胞突起细长。但细胞间连接较为松散,在材料上生长密度较稀。而改性后 PLA 较未改性的 PLA 材料表面细胞数目明显增多,但在 7 天时仍未能连接成片(见图 2)。

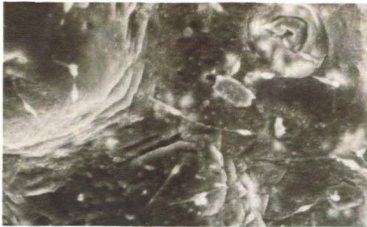


图 1 改性的 PLA 材料,表面复合较多 SC 生长($\times 300$)



图 2 未改性 PLA 材料,表面 SC 生长($\times 300$)

3 讨论

研究表明,SC 作为周围神经的胶质细胞,在周围神经损伤修复过程中大量增殖,沿着神经基膜管表面迁移形成 Bungner 带,并分泌细胞外基质和黏附分子,释放 20 多种神经营养因子,因此,SC 不但为再生神经轴突提供生长通道,并发挥营养趋化作用^[1,2]。故在神经组织工程研究中,SC 常作为种子细胞,因此,研究 SC 与人工高分子材料的细胞相容性,检测选用的神经支架材料的细胞毒性是神经组织工程研究的第一步。理想的高分子材料应能够有利于 SC 生长,而不发生抑制作用。随着材料科学研究的进展,目前已有许多的组织相容性较好的材料应用于组织。PLA 作为一类重要的高分子材料,具有一定机械强度和良好加工性能的生物可降解材料,它在体内先降解成人体代谢产物乳酸,参与体内的糖类代谢循环排出体外,其组织细胞毒性小,组织相容性好,故 PLA 是一种较理想的组织工程材料^[3]。但多存在亲水性差、对细胞黏附性弱等不足。SC 只有牢固地与材料黏附,才能进一步迁移生长,发挥生物活性功能。因此,有必要对 PLA 材料进行接枝改性,增加亲水性和细胞的黏附性。而改性后材料是否对 SC 存在毒性以及其亲水性、黏附性如何,有必要进一步研究。

本实验通过 MTT 细胞相对增殖度法,对几种不同方法改性的 PLA 材料进行体外细胞培养毒性实

验(6 级毒性分级法),结果表明,不同改性材料,除 2[#]材料外,在 5、7 天,所有改性材料在不同浸提液浓度下均为 0~1 级;2[#]材料于早期(3 天)时各不同浸提原液均为 2 级,5 天在浸提原液为 100% 时,毒级为 2 级。从 MTT 法所得的光吸收度的值数据综合来看,高浓度浸提原液其所测得的 OD 值较小。从形态观察结果分析,SC 在不同改性材料的浸提液中培养,生长状态良好,可见大量细胞分裂增殖。除 2[#]材料早期细胞有较多的未伸展细胞外,其它组可见多数细胞胞体呈梭形,突起相互首尾连接。至第 5~7 天,细胞连接成片。故不同聚乳酸材料的浸提液对细胞形态无明显影响。扫描电镜所见 SC 黏附于不同改性的 PLA 材料表面,呈正常的梭形,并有较长的细胞突起,形态良好,无明显改变,进一步从形态上说明改性后的材料对细胞基本无明显毒性作用,生物相容性良好。且改性后的聚乳酸材料较未改性的聚乳酸材料黏附的细胞数明显增多,但总体来说,细胞密度仍较稀,未能融合成片。从荧光法进一步观察 SC 与不同材料黏附性,所得结果与材料毒性实验以及细胞形态观察相吻合。虽然经过改性后聚乳酸材料亲水性及细胞的黏附性有明显的改善,但仍存在不如培养板材料的亲水性好,故仍有待于进一步改进。此外,建议应用该材料时,最好采用一些生物活性物质对材料表面进行修饰,以进一步提高改进材料表面的黏附性^[4],促进 SC 的黏附^[5],为细胞在其表面生长、增殖和分泌功能发挥提供良好的微环境。

本实验中观察到 2[#]PDLA-g-HEMH 材料黏附性较低,与未改性聚乳酸近似。分析其原因,可能为改性后虽然提高了材料表面的亲水性,但可能存在改性后增加材料酸度,对细胞生长有一定的影响。尤其是高浓度浸提液对细胞增殖影响较为明显。故在处理和清洗上仍有研究改进的必要。

[参 考 文 献]

- [1] Ide C. Peripheral nerve regeneration[J]. *Neurosci Res*, 1996, 25(2):101-121.
- [2] Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, et al. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve; different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA[J]. *J Cell Biol*, 1992, 119(1):45-54.
- [3] Hovis WD, Buchholz RW. Polyglycolide bioabsorbable screws in the treatment of ankle fractures[J]. *Foot Ankle Int*, 1997, 18(3):128-132.
- [4] Darribere T, Koteliansky VE, Chernousov MA, et al. Distinct regions of human fibronectin are essential for fibril assembly in an vivo developing system[J]. *Dev Dynam*, 1992, 184(1):67-70.
- [5] Yoshii S, Yamamoto T. *In vivo* guidance of regenerating nerves by laminin-coated filament[J]. *Exp Neurol*, 1987, 96(2):469-473.