

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-10-0824-05

晚期内皮祖细胞在纳米聚-L-乳酸支架膜表面的粘附和增殖

卢辉俊¹, 冯章启², 顾忠泽², 刘长建¹

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院血管外科, 江苏省南京市 210008)

(2. 东南大学生物电子学国家重点实验室, 江苏省南京市 210096)

[关键词] 外科学; 聚-L-乳酸; 纳米有序纤维; 晚期内皮祖细胞; 组织工程

[摘要] 目的 通过比较晚期内皮祖细胞在纳米无序及有序聚-L-乳酸支架膜表面粘附、增殖情况, 为优化组织工程材料提供一种新途径。方法 通过静电纺丝技术制备纳米聚-L-乳酸纤维支架, 行低温等离子体技术改性及 I 型胶原表面涂覆, 与晚期内皮祖细胞复合培养, 并进行细胞双荧光染色鉴定, 通过不同时间点两组材料晚期内皮祖细胞粘附和增殖率的测定比较及光镜、荧光显微镜和扫描电镜观察支架材料对种子细胞形态特征等方面的影响。结果 制得的纳米聚-L-乳酸纤维孔径在 300 ~ 400 nm 之间, 孔隙率 > 90%; 细胞粘附 12 h 基本完成; 各时间点有序膜组增殖率明显高于无序膜组 ($P < 0.05$)。细胞在支架膜上生长良好, 无序膜组细胞生长较散在、杂乱; 有良好空间定向效果的有序纤维支架有利于细胞沿纤维定向附着、伸展、增殖, 分泌胞外基质。结论 晚期内皮祖细胞是理想的组织工程种子细胞来源; 纳米聚-L-乳酸有序膜支架能促进种子细胞在材料表面的粘附、增殖, 并能较好地保持细胞形态, 是一种理想的血管组织工程支架材料。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

Experimental Study of Adherency and Proliferation of Late Endothelial Progenitor Cells on Nanofibers Poly-L-Lactic Acid Scaffold

LU Hu-Jun¹, FENG Zhang-Qi², GU Zhong-Ze², and LIU Chang-Jian¹

(1. Department of Vascular Surgery, Medical School, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008 China; 2. State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096 China)

[KEY WORDS] Poly-L-Lactic Acid; Alignate Nanofibers; Late Endothelial Progenitor Cells; Tissue Engineering

[ABSTRACT] **Aim** To compare the adhesion and proliferation of late endothelial progenitor cells (EPC) isolated and expanded from rabbit peripheral blood cultured with nanofibers and alignate nanofibers synthetic poly-L-lactic acid (PLLA) scaffold in vitro for applications in vascular tissue engineering, thus to optimize PLLA scaffold materials. **Methods** Nanofibrous scaffolds of PLLA by electrospinning were modified by hypothermy plasma and type I collagen was coated onto the materials physically. In vitro, late EPC were cultured on the PLLA scaffold. Furthermore, cell incorporation of DiI-labelled ac-LDL and binding of FITC-UEA-I was determined by fluorescent microscopy. Adherency and proliferation of EPC in two groups at different time points were surveyed and to observe morphological change of late EPC on PLLA scaffold was observed by contrast phase microscope, fluorescent microscope and scanning electron microscope. **Results**

The nanofibrous scaffolds consists of fibers with diameters ranging from 300 nm to 400 nm, whose porosities were more than 90%. The adherency of late EPC on scaffold were completed in 12 hours. The proliferation of late EPC on alignate nanofibers scaffold was markedly increased compared to control groups in every time ($P < 0.05$). Late EPC grew well with PLLA scaffold, yet confused and disorderly in control groups. Late EPC could attach, extend, proliferate and secrete extracellular matrix following fibrous orientation in alignate nanofibers groups of PLLA, which majority of the fibers were oriented along the longitudinal axis which form a unique aligned topography. **Conclusions** Late EPC are ideal seeding cells for tissue engineering. Late EPC can adhere well to alignate nanofibers of PLLA and proliferate, keep well on cell morphology. This type of PLLA scaffold is a optimal candidate material for late EPC transplantation in vascular tissue engineering.

血管疾病临床主要治疗手段是血管移植术。但血管移植失败率仍非常高, 近 10 多年来迅速发展的组织工程学为临床寻求理想的血管移植植物带来了

希望。聚-L-乳酸 (poly-L-lactic acid, PLLA) 因其可靠的生物安全性、可降解性等特征, 被美国 FDA 作为第一批可降解吸收材料批准用于临床。静电纺丝得到的三维纳米 PLLA 有序支架膜在结构上与天然细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 更接近, 并有良好的生物相容性和细胞亲和性, 为细胞提供更好的微环境^[1,2]。本研究采用体外细胞培养法, 通过

[收稿日期] 2008-07-01 [修回日期] 2008-10-05

[作者简介] 卢辉俊, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为血管外科, Email 为 lhp696@sina.com。顾忠泽, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物电子器件、纳米仿生材料、光子晶体、生物传感等研究。刘长健, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血管外科。

比较晚期内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) [3-4] 在纳米 PLLA 有序和无序支架膜 [5-6] 上粘附和增殖的不同情况, 为今后血管组织工程支架材料的优化提供一种新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

新西兰大白兔, 体重 2.5~3.0 kg (金陵种兔场, 生产许可证号 SCXK 苏 2002-0030), 雌雄不限。纤维连接蛋白和兔淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司, DiI-ac-LDL 购自 Molecular Probes 公司, FITC-UEA-I 和 I 型胶原蛋白购自 Sigma 公司, EBM-2MV 培养基 (含 EBM-2 基础培养基和 rhEGF、VEGF、rhFGF-B 及 IGF-1 等生长因子) 购自 Cambrex 公司, CM-DiI 购自 Invitrogen 公司, 优质胎牛血清购自杭州四季青公司, 胰蛋白酶购自 Gibco 公司。日立 S-3000N 扫描电子显微镜。

1.2 纳米化多孔聚-L-乳酸的制备

参照文献 [7], 将 PLLA 的混合溶液 (二氯甲烷和二甲基甲酰胺体积比 3:1) 搅拌 2 h, 5000 r/min 离心, 再置溶液于玻璃注射器中 (5 mL, 6号针头), 在针头处加 10 kV 高电压, 以 0.5 mL/h 的速度推注溶液, 用收集装置接收纳米纤维, 收集装置与针头间距离保持在 15~20 cm 之间。利用静电纺丝技术将 PLLA 分别制备成纳米无序纤维 (铝箔平板型接收装置) 和有序纤维 (金属丝滚筒接收器, 1000 r/min), 保存在室温下真空干燥, 皆行低温等离子体技术改性及 I 型胶原表面涂覆, 环氧乙烷消毒备用。

1.3 兔外周血晚期内皮祖细胞的分离和培养

参照文献 [8], 麻醉后每只兔经心内采血 20 mL, 肝素钠抗凝, PBS 等体积稀释, 加入预先加有比重 1.096 兔淋巴细胞分离液离心管上层, 分离液和稀释血体积比为 3:7, 常温下 2000 r/min 离心 30 min, 吸取中间白膜层细胞, PBS 洗 2 次, 离心 2 次 (1000 r/min × 5 min), 弃上清, 留细胞沉淀, 重悬于 EBM-2MV (含 15% 胎牛血清) 全培养液中, 以 2×10^6 密度接种于预先包被好纤连蛋白 ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的 25 cm^2 培养瓶中, 置培养箱中培养, 3~4 天后换半液, 7 天后每 3~4 天换全液, 通过换液逐步淘汰不贴壁的细胞。细胞生长达到 80%~90% 汇合时按照 1:2 或 1:3 传代培养。每天倒置相差显微镜观察细胞生长状况。

1.4 细胞双荧光染色鉴定

经体外诱导分化培养 16 天后的贴壁细胞与 10

mg/L DiI-ac-LDL 置培养箱孵育 4 h, PBS 洗 3 次, 用 2% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 漂洗后, 将 10 mg/L FITC-UEA-I 加于上述标本中, 37℃ 孵育 1 h, 倒置荧光显微镜下观察。

1.5 CM-DiI 标记

1 mL DMSO 溶解 CM-DiI 后, 配制成 2 mg/L CM-DiI PBS 溶液, 细胞在贴壁状态下 37℃ 孵育 5 min, 4℃ 15 min, PBS 洗 2 遍, 荧光显微镜观察, 胰酶/EDTA 消化, 再移植标记细胞到支架材料膜上。

1.6 沉淀法检测细胞粘附率

对照组为无序膜, 实验组为有序膜。消毒后纳米 PLLA 膜 ($24 \text{ mm} \times 24 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$) 置于超低吸附 6 孔培养板, 在每孔内植入材料 1 块 ($n=3$)。通过自然沉淀法调整第 3 代 EPC 浓度为 $1 \times 10^8/\text{L}$, 将细胞悬液 3 mL 滴加到材料上。孵育箱中复合培养 4 h, 12 h 和 24 h 后, PBS 轻轻洗涤 3 次, 去除未粘附的细胞。0.25% 胰蛋白酶消化, 收集细胞, 计数板计数, 计算细胞粘附率。

1.7 细胞增殖率的测定

24 h 内即有细胞增殖, 取复合培养 24 h、3 天和 7 天后材料, 步骤同上, 收集细胞, 计数板计数, 计算细胞增殖率。

1.8 相差显微镜观察细胞在膜上的形态和分布

实验步骤同上, 复合培养 4 h, 24 h 及 72 h 后观察拍片。

1.9 荧光显微镜观察细胞在材料上的形态和分布

实验步骤同上, 与 CM-DiI 标记细胞复合培养 48 h 后观察拍片。

1.10 电子扫描纤维镜观察

复合培养 72 h 后将材料取出, PBS 漂洗 3 次后用 2.5% 戊二醛固定, 30%~100% 梯度乙醇脱水, 真空干燥, 表面喷金处理后在电子扫描纤维镜下观察、摄像。

1.11 统计学分析

运用 SPSS 11.5 统计学软件行 *t* 检验比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 纳米纤维形貌变化

PLLA 纤维直径分布均匀, 其直径范围主要分布在 300~400 nm 之间, 孔隙率 > 90%, 且孔隙在三维方向上相互贯通。有序纤维具有良好的空间定向效果 (图 1)。

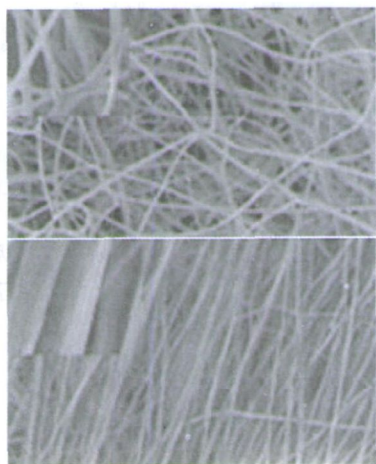


图 1 电子纤维镜检查 上为纳米 PLLA 无序膜, 下为纳米 PLLA 有序膜。

2.2 细胞形态学变化

新分离的单个核细胞圆形透亮(图 2), 接种数小时后开始贴壁, 4天后胞体增大, 第 9~12天迅速长成集落, 细胞呈铺路石样排列, 培养 14~18天, 细

胞生长至 80%~90% 汇合, 予以传代。细胞培养 1 个月可传代 5~7 次(传代比例为 1:3), 细胞数量可达 $10^7 \sim 10^8$ 个, 细胞状态始终保持良好。

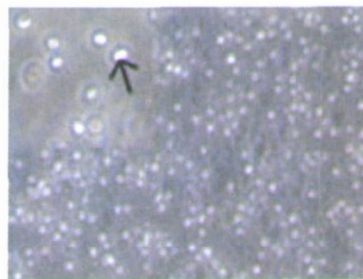


图 2 分离的单个核细胞 ($\times 100$)

2.3 双荧光染色鉴定

在倒置荧光显微镜下, 染色为红色表示细胞摄取 ac-LDL(图 3a), 染色为绿色表示其与 UEA-I 结合(图 3b), 能摄取 ac-LDL, 并能与 UEA-I 结合的双染色阳性细胞为正在分化的 EPC(图 3c)。

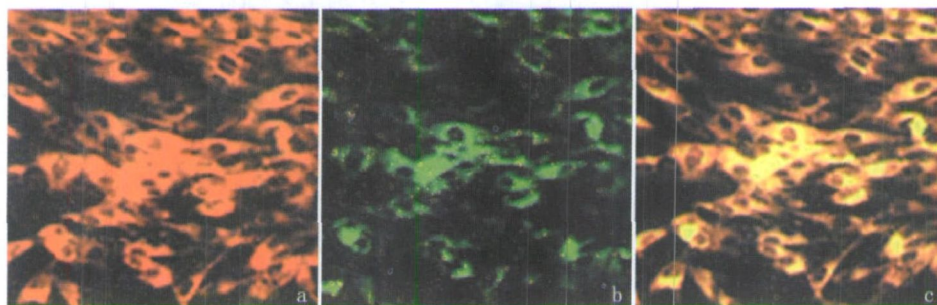


图 3 双荧光染色鉴定 ($100\times$)

2.4 细胞粘附率

4 h 无序膜组细胞粘附率高于有序膜组 ($P < 0.05$); 12 h 及 24 h 有序膜组细胞粘附率明显高于无序膜组 ($P < 0.05$)。组内 4 h 与 12 h 和 24 h 间差异有显著性 ($P < 0.05$), 12 h 与 24 h 比较差异无显著性(表 1)。

表 1 不同时间点两组材料晚期内皮祖细胞粘附率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	复合培养 4 h	复合培养 12 h	复合培养 24 h
无序膜组	46.93% \pm 7.29%	60.27% \pm 6.93% ^c	70.57% \pm 3.18% ^d
有序膜组	34.47% \pm 4.61% ^a	82.80% \pm 8.75% ^{bd}	87.20% \pm 5.53% ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与复合培养 4 h 组比较。

2.5 细胞增殖情况

有序膜细胞增殖率明显高于无序膜组 ($P <$

0.05)。无序膜组培养 3 天和 7 天细胞增殖率较培养 24 h 差异有显著性 ($P < 0.01$); 有序膜组随时间延长增殖率明显增加 ($P < 0.01$; 表 2)。

表 2 不同时间点两组材料晚期内皮祖细胞增殖率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	复合培养 24 h	复合培养 3 天	复合培养 7 天
无序膜组	70.57% \pm 3.18%	123.90% \pm 6.01% ^c	130.30% \pm 6.72% ^c
有序膜组	87.20% \pm 5.53%	151.40% \pm 2.96% ^{ac}	171.37% \pm 6.36% ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.01$, 与复合培养 24 h 组比较。

2.6 细胞在材料上的形态和分布

倒置显微镜下, 复合培养 4 h 内, 细胞即在材料上生长, 伸展良好, 多呈梭形散在分布, 随培养时间的延长, 可见较密集的细胞在 PLLA 纤维空间生长, 72 h 细胞增殖数量最多。各组细胞生长无明显衰

老、变形及异常分裂现象。有序膜各个时间点细胞均按有序纤维排列方向规律生长,并见连续的单层细胞(箭头所指处);无序膜细胞生长均较散在,增殖率也较低(图4)。倒置荧光显微镜下,呈红色荧光的EPC在支架膜上伸展良好,多呈梭形或圆形散

在分布。各组细胞生长未见衰老及异常分裂现象;纳米无序膜见少量变形细胞;有序膜上见沿纤维丝定向生长的梭形细胞,并见沿纤维丝方向的细胞外基质分布(图5)。

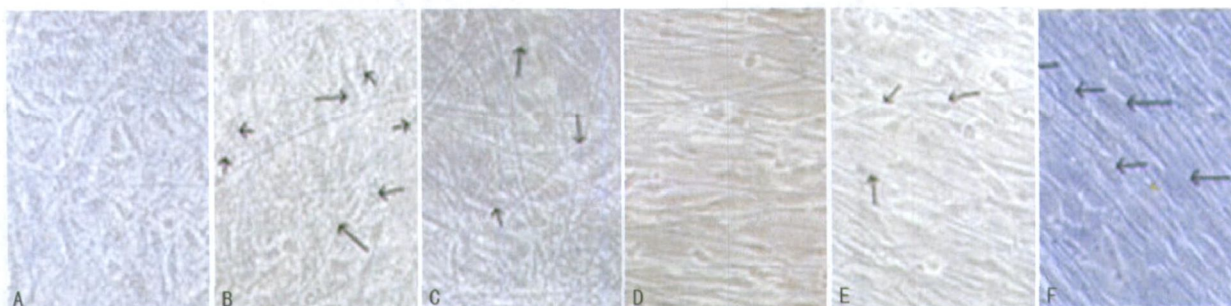


图4 倒置显微镜下细胞在材料上的形态和分布(100×) A为纳米 PLLA 无序膜,培养 4 h B为纳米 PLLA 无序膜,培养 24 h C为纳米 PLLA 无序膜,培养 3天; D为纳米 PLLA 有序膜,培养 4 h E为纳米 PLLA 有序膜,培养 24 h F为纳米 PLLA 有序膜,培养 3天。



图5 倒置荧光显微镜下细胞在材料上的形态和分布(200×,培养 48 h) 左为纳米 PLLA 无序膜,右为纳米 PLLA 有序膜。

2.7 扫描电镜下细胞在材料上的形态和分布

细胞在支架材料上粘附,形态多样,多为梭形和类圆形,表面伸出突起,细胞之间连接成片,表面有大量基质形成。随培养时间的延长,有序膜细胞与材料表面结合紧密,随材料纤维方向附着、伸展、定向生长,而无序膜细胞松散地粘附于纤维膜表面(表6)。

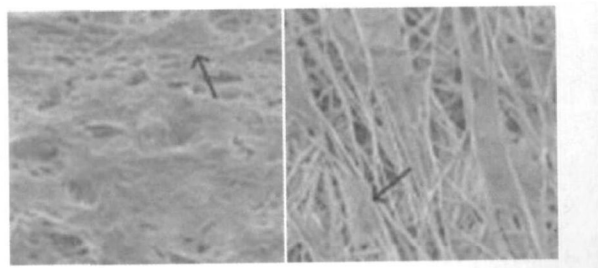


图6 扫描电镜下细胞在材料上的形态和分布(200×,培养 48 h) 左为纳米 PLLA 无序膜,右为纳米 PLLA 有序膜。

3 讨论

组织工程的一个重要方面是细胞支架的设计,材料应模仿 ECM 的结构和组成,为细胞粘附、增殖、分化提供便利条件。理想的组织工程支架材料必须满足以下条件: ①材料应在结构和功能上与天然 ECM 相似,具有良好的生物相容性; ②合适的可生物降解吸收性; ③合适的三维立体多孔结构、高孔隙率(>90%)和相连的孔形态; ④高的表面积和合适的表面理化性质; ⑤特定的三维外形和机械强度; ⑥易于消毒和保存。本研究制备的纳米无序纤维膜和有序纤维膜在结构上与 ECM 更接近,有序膜具有更好的空间定向效果。因聚酯类材料表面的疏水性和生物惰性,实验又采用低温等离子体技术与 I 型胶原涂覆的方法对膜进行了表面改性,为细胞提供更好的微环境。

Asahara 等^[3]首次分离并证实外周血中存在着能分化为血管内皮细胞的 EPC,并在体内证实了其生成血管的能力。其中干细胞具有强克隆增殖能力特性来鉴定的 EPC 称为内皮生长晕细胞(endothelial outgrowth cells, EOC)^[5,6,9]。研究发现晚期 EPC 具有比成熟内皮细胞更强的增殖、扩增能力,可连续传代培养 3 个月以上而未见明显衰老,且来源稳定、取材方便,是组织工程血管移植再内皮化理想的种子细胞来源。本研究选择能摄取 ac-LDL(功能鉴定),并能与 UEA-I 结合(表面标志)的双染色阳性细胞作为种子细胞,通过自然沉淀法将细胞悬液滴加到材料上进行体外复合培养,因支架厚度小于

2 mm, 故采用了静态复合培养方式培养。细胞粘附率及增殖率检测发现, 4 h 无序膜细胞粘附率反而高于有序膜, 提示无序膜组可能早期反而利于细胞粘附, 各组 12 h 与 24 h 比较无显著差异, 提示细胞粘附过程在 12 h 基本完成, 继续延长时间, 对细胞粘附率无显著改善。各时间点有序膜组增殖率明显高于无序膜组, 表明有序膜更利于细胞的增殖。

细胞与材料的相互作用是组织工程研究的主要领域, 其中细胞与材料的粘附是基础, 细胞必须与材料发生适当的粘附, 才能进行迁移、增殖和分化^[10]。在光镜及荧光显微镜下, 复合培养 4 h 内, 细胞在膜上贴壁并铺展良好, 呈红色荧光的细胞非常容易地长入支架膜中生长, 并见大量细胞外基质分布, 有序膜细胞呈定向生长和增殖, 而无序膜组细胞生长较杂乱。本研究结果发现, PLLA 膜材料对细胞有着极好的亲和性和相容性, 有序膜能够促进细胞粘附、定向迁移和增殖。

电子扫描显微镜发现, 种入纤维支架的细胞, 与其环境有良好的相互作用。但无序膜细胞铺展分布不均匀, 有团聚或成簇生长的现象, 不利于细胞的生长和增殖, 可能会随着培养时间的延长逐渐死亡。有序膜组细胞在纤维表面及孔隙内随纤维方向良好附着、伸展并分泌胞外基质。

本研究表明晚期 EPC 具有更强的增殖、扩增能力, 是组织工程理想的种子细胞来源; 纳米 PLLA 有序膜支架更有利于细胞沿纤维定向附着、伸展、增

殖, 分泌胞外基质, 是一种理想的血管组织工程支架材料。

[参考文献]

- [1] Bames CP, Sell SA, Boland ED, et al. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; **59**: 1 413-433
- [2] Bashur CA, Dahlgren LA, Goldstein AS. Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) meshes [J]. *Biomaterials* 2006; **27**: 5 681-688
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science* 1997; **275** (5302): 964-967
- [4] Kawamoto A, Losordo DW. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration [J]. *Trends Cardiovasc Med* 2008; **18**: 33-37
- [5] Fuchs S, Motta A, Migliarese C, et al. Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials [J]. *Biomaterials* 2006; **27** (31): 5 399-408
- [6] 肖方毅, 张怀, 余华, 等. 兔外周血两种内皮祖细胞的分离培养和鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007; **23** (4): 303-305
- [7] Rho KS, Jeong L, Lee G, et al. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing [J]. *Biomaterials* 2006; **27**: 1 452-461
- [8] Funcke F, Hoyer H, Brenig F, et al. Characterisation of the interaction between circulating and in vitro cultivated endothelial progenitor cells and the endothelial barrier [J]. *Eur J Cell Biol* 2008; **87**: 81-90
- [9] Mukai N, Akahori T, Kamaki M, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells [J]. *Experimental Cell Research* 2008; **314**: 430-440
- [10] Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; **59**: 1 392-412

(此文编辑 文玉珊)