

# 成纤维细胞在聚羟基丁酸酯表面黏附与种植研究

胡江<sup>1</sup> 胡平<sup>2</sup> 李涛<sup>1</sup> 蒋凌飞<sup>2</sup> 陈娟<sup>1</sup> 陶祖莱<sup>1</sup>

1 (中科院力学所国家微重力实验室, 北京 100080)

2 (教育部先进材料国家实验室 清华大学 化工系, 北京 100084)

**摘要** 可降解高分子聚合物广泛应用于组织工程, 其表面的黏附特性影响细胞的种植与生长。我们研究了成纤维细胞系 NIH3T3 在可降解材料聚羟基丁酸酯 (PHB) 表面的黏附和生长。应用线性变剪切流槽研究 NIH3T3 细胞在材料表面的黏附力学特性, 结果表明, 由于在 PHB 表面的临界脱离剪应力较低, 高密度接种时细胞趋于聚集; 在经多聚赖氨酸衣被的表面临界脱离剪应力提高, 细胞铺展生长。对三维 PHB 多孔支架种植细胞实验表明, 在 PHB 材料表面进行多聚赖氨酸衣被, 可以有效地提高细胞种植效率。

**关键词** 聚羟基丁酸酯 成纤维细胞 黏附 种植 组织工程

## The Adhesion and Seeding of NIH3T3 Fibroblast on PHB Surfaces

Hu Jiang<sup>1</sup> Hu Ping<sup>2</sup> Li Tao<sup>1</sup> Jiang L infei<sup>2</sup> Chen Juan<sup>1</sup> Tao Zula<sup>1</sup>

1 (National Lab of Microgravity, Institute of Mechanics, CAS, Beijing 100080)

2 (Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

**Abstract** Biodegradable polymers have been widely used in the field of tissue engineering. The adhesive characteristic of polymer surfaces is critical for cell seeding and growth. The adhesion and growth of NIH3T3 fibroblast on poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) was studied here, and the cell-surface adhesion strength was measured in a shear flow detachment assay. It showed that the critical shear stress for cell detachment was relatively low on PHB, thus cells tend to aggregate and detach from surfaces. On the other hand, cells tend to spread and formed monolayer on poly-lysine coated PHB surface. When the PHB foams scaffolds were coated by poly-lysine, the seeding percentage of cells was also greatly enhanced.

**Key words** Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) Fibroblast Adhesion Seeding Tissue engineering

## 1 前言

组织工程是生物医学工程领域中的新方向, 其技术核心是在可降解三维支架上通过细胞种植实现组织重建<sup>[1]</sup>。其中, 可降解聚合物材料得到了广泛的应用<sup>[2]</sup>。聚羟基丁酸酯 (PHB) 是一类由细菌发酵生产的新型可降解高分子材料, 具有良好的生物相容性和可降解性, 有可能作为组织工程用的支架<sup>[3]</sup>。基于材料表面的黏附与细胞生长、增殖、分化和组织发育密切相关, 黏附强度可影响工程组织的最终结构与功能<sup>[4]</sup>, 因此有必要研究细胞在材料表面的黏附行为, 并通过改变细胞的黏附强度来实现对细胞生长的调控。我们研究了成纤维细胞 NIH3T3 在 PHB 表面的黏附行为, 并通过多聚赖氨酸衣被实现了有效的细胞种植。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

聚羟基丁酸酯 (Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid, PHB) 购自清华大学生物系, 左旋多聚赖氨酸 (Poly-L-lysine)、Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (Poly-hEM E)、噻唑蓝 (Thiazolyl blue, MTT) 购自 Sigma 公司, 胎牛血清、DMEM 培养基购自 Hyclone 公司, 其余试剂为国产化学试剂。

### 2.2 材料制备

将分子量为  $6.35 \times 10^6$  的 PHB 溶于三氯甲烷中配成 5% 的溶液, 用匀胶机 (KW-4A 型, 中科院微电子中心研究部) 在载玻片 ( $2.6\text{cm} \times 6\text{cm}$ ) 上制备厚度为  $10 \sim 20 \mu\text{m}$  的透明 PHB 薄膜。

用溶媒投放、颗粒沥滤制备 PHB 多孔泡沫片,

孔径控制在 200~ 400  $\mu\text{m}$ , 层压技术进一步将其复合成厚度 2 mm 的三维支架。将支架剪成  $d=15\text{ mm}$  的圆片备用。

### 2.3 多聚赖氨酸衣被

薄膜和支架预先用 75% 乙醇浸泡, 紫外照射灭菌。0.1 mg/ml Poly-L-lysine 衣被薄膜和支架 20 min, 无菌水洗一次, 接种细胞。

### 2.4 细胞培养与种植

小鼠成纤维细胞系 NIH3T3, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于细胞培养箱中培养。取对数生长期的细胞制备细胞悬液用于接种。

调整细胞悬液浓度为  $3 \times 10^4/\text{ml}$ , 在 PHB 薄膜、多聚赖氨酸衣被的 PHB 薄膜和盖玻片上接种细胞, ZEISS Axiovert-100 型倒置显微镜(相差 32 $\times$ )观察细胞的黏附生长过程。

24 孔板预先用 2.5% 的 Poly-HEMA 处理使其基底不黏附细胞<sup>[5]</sup>, 将三维支架置于 24 孔板中。将细胞悬液浓缩到  $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ , 滴加 200  $\mu\text{l}$  到支架上, 在细胞培养箱中静置 3 h, 补加 2 ml 培养基培养; 对照组细胞接入 60 mm 培养皿, 直接加入 2 ml 培养基培养。

### 2.5 黏附强度测定

接种成纤维细胞 1 h 后, 用线性变剪切流槽测定细胞在材料表面的黏附强度。流槽参照 U sam i S<sup>[6]</sup> 等的设计并加以改进。沿长轴选取 7 个固定点, 计数细胞在剪切作用作用后脱离的百分比, 做剪应力-脱离曲线, 得出使 50% 细胞脱离的临界剪应力来表征细胞在不同表面的黏附强度。每组实验做 3 次, 进行

统计分析。

### 2.6 MTT 法测定细胞数量

种植 24 h 后, 取出支架, Hank's 液洗 3 次, 转入另一个 24 孔板, 每孔加入 2 ml 培养基, 加入 5 mg/ml MTT 10  $\mu\text{l}$ , 细胞培养箱中孵育 4 h, 吸去上清液, 加入 2 ml 0.04 N HCl/异丙醇, 测定 570 nm 的光吸收值; 空白对照为未接种细胞的支架。每组实验做 3 次, 进行统计分析。

### 2.7 扫描电镜

种植 24 h 后, 取出支架, PBS 洗 3 次  $\times 5\text{ min}$ , 3% 戊二醛固定过夜, PBS 洗 3 次  $\times 5\text{ min}$ , 乙醇上行脱水, 乙酸异戊酯置换, 临界点干燥, 喷金, 扫描电镜观察。

### 2.8 统计分析

分析软件为 SPSS/PC+ 软件包, 数据采用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 3 实验结果

### 3.1 细胞黏附

细胞在多聚赖氨酸衣被的 PHB 薄膜表面迅速黏附, 接种后细胞即发生黏附, 但铺展较慢, 接种 6 小时后细胞才开始铺展, 24 h 后细胞充分铺展; 在载玻片上黏附较慢, 1 h 后大部分细胞黏附, 但在接种 2 h 后即发生铺展, 6 h 后细胞较充分铺展; 在未衣被的 PHB 薄膜表面, 由于细胞之间的黏附聚集作用, 随着时间的延长不断聚集形成逐渐增大的类球体结构(见图 1)。

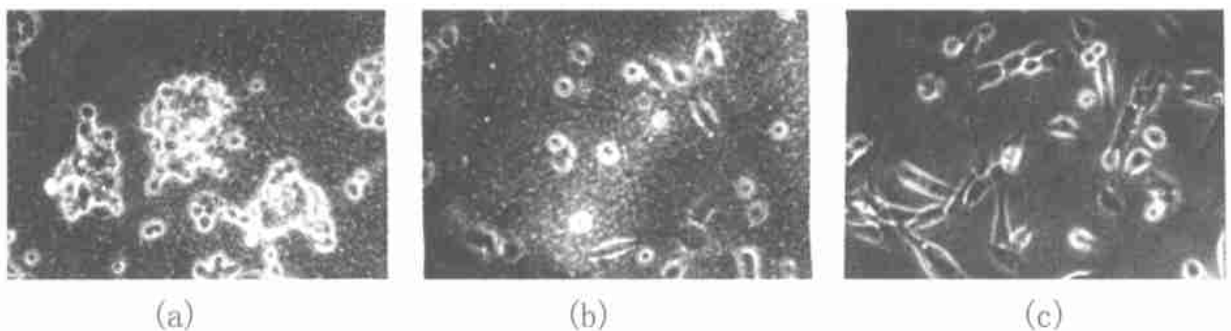


图 1 成纤维细胞在不同表面的黏附

(a) PHB 薄膜种植细胞 6h; (b) Poly-L-lysine 衣被的 PHB 薄膜种植细胞 6h; (c) 玻片种植细胞 6h

Fig 1 The adhesion of fibroblast on different surfaces

(a) Seeding on PHB film for 6h; (b) Seeding on Poly-L-lysine coated PHB film for 6h; (c) Seeding on glass cover slip for 6h

用线性变剪切流槽测定细胞种植后的临界脱离剪应力的结果表明, 细胞种植 1 h 后, 在多聚赖氨酸衣被的表面细胞临界脱离剪应力为  $9.51 \times 1.63$

dyne/cm<sup>2</sup>, 在无衣被表面为  $1.25 \times 0.38$  dyne/cm<sup>2</sup>, 而在载玻片表面为  $5.07 \times 0.68$  dyne/cm<sup>2</sup>(见图 2)。

### 3.2 细胞种植

细胞接种 24 h 后, MTT 法测定细胞接种效率. 取 60 mm 平皿对照组为 100% 接种效率, 经多聚赖氨酸衣被的支架接种率达到 60.7%, 而在未衣被的

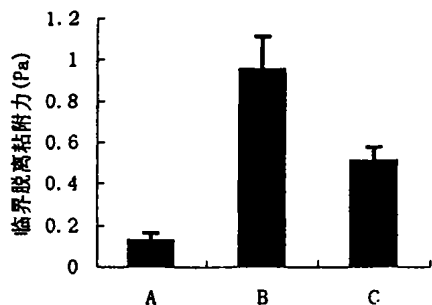
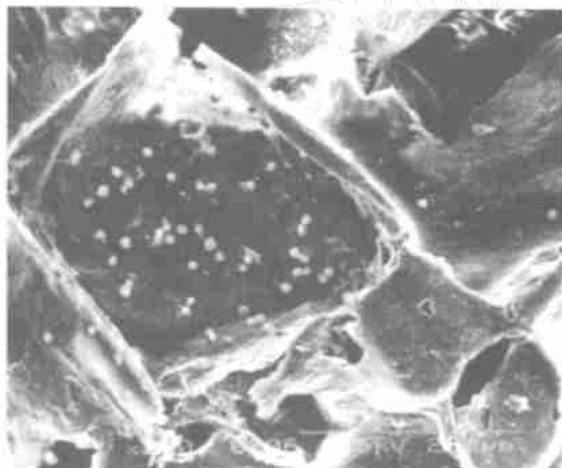


图 2 NIH3T3 细胞在不同表面的临界脱离剪应力

(A) PHB 薄膜种植细胞 1h; (B) Poly-lysine 衣被的 PHB 薄膜种植细胞 1h; (C) 载玻片种植细胞 1h

Fig 2 The critical shear stress for NIH3T3 cells detachment on different surfaces

(A) Seeding on PHB film for 1h; (B) Seeding on Poly-lysine coated PHB film for 1h; (C) Seeding on glass slide for 1h



(a)

支架上只有 7.4% (见图 3)。

扫描电镜进一步观察细胞的生长形态, 发现细胞在衣被材料上大量铺展生长, 而在未衣被的材料上只有少量的细胞且大多数细胞未铺展 (见图 4)。

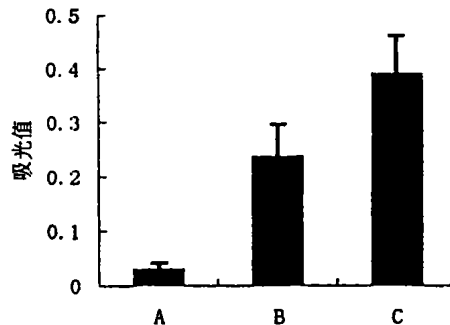
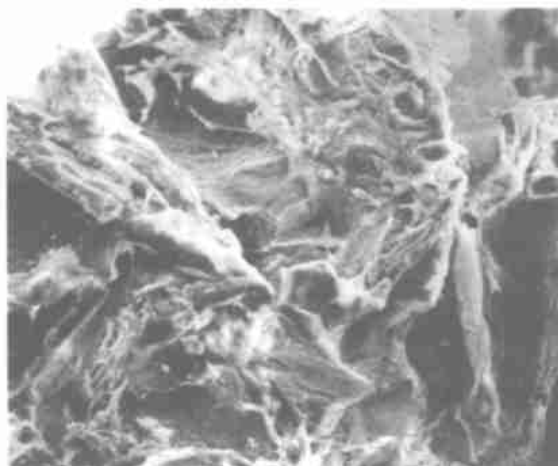


图 3 NIH3T3 细胞的种植效率

(A) PHB 支架种植细胞 24h; (B) PHB 支架+ Poly-lysine 衣被种植细胞 24h; (C) 60mm 培养皿对照种植细胞 24h

Fig 3 Seeding efficiency of NIH3T3 cells on different surfaces

(A) Seeding on PHB scaffold for 24h; (B) Seeding on Poly-lysine coated PHB scaffold for 24h; (C) Seeding on 60 mm petri dishes for 24h



(b)

图 4 成纤维细胞在聚羟基丁酸酯三维支架上的生长形态

(a) 未衣被支架接种细胞 24h; (b) 多聚赖氨酸衣被支架接种细胞 24h

Fig 4 The growth morphology of NIH3T3 cells on scaffolds

(a) Seeding on non-coated PHB scaffold for 24h; (b) Seeding on Poly-lysine coated PHB scaffold for 24h

## 4 讨论

细胞在材料表面的生长形态与细胞-材料表面黏附力和细胞之间的作用力之比有关<sup>[4]</sup>。细胞以高密度接种时, 当细胞和材料表面的黏附力较弱, 细胞之间易发生聚集而形成类球体; 当细胞和材料表面的黏附力较强, 细胞在材料表面黏附并铺展生长成单层。我们的研究发现, 由于 NIH3T3 细胞在聚羟基丁酸酯表面黏附力弱, 细胞发生聚集生长。在进行三维种植时, 细胞形成聚集体而脱离材料表面, 难以

实现有效的种植。多聚赖氨酸衣被是一种有效促进细胞在聚合物表面黏附与生长的方法<sup>[7]</sup>, 用多聚赖氨酸衣被后, 通过多聚赖氨酸与细胞表面的静电吸引作用, 促进细胞在材料表面的黏附力, 有效地促进了细胞的黏附, 避免类球体的形成, 在三维种植时, 大大提高了细胞种植效率。但是多聚赖氨酸通过促进细胞的黏附而引发细胞的铺展, 其机理不同于由黏附蛋白和整合素介导的黏附与铺展过程。虽然在初期细胞能很快与多聚赖氨酸衣被的表面黏

(下转第 551 页; Continued on Page 551)

心为  $r$  的任意点的剪应力:

$$\tau_r = \frac{T}{I_p} r$$

最大剪应力:  $\tau_{\max} = \frac{T}{W_p}$

式中:  $I_p$ —极惯性矩 ( $mm^4$ )

$$I_p = \int_A r^2 dA$$

$W_p$ —抗扭抵抗矩 ( $mm^3$ ),

$$W_p = \frac{I_p}{r}$$

$r$ —圆半径;  $T$ —扭矩

对空心厚壁圆筒:  $I_p = \frac{\pi D^4}{32} (1 - \alpha^4)$

$$W_p = \frac{\pi D^3}{16} (1 - \alpha^3)$$

式中:  $\alpha = \frac{d}{D}$

$d$ —圆筒内径;  $D$ —圆筒外径

实验中得到的是扭转角与扭矩 ( $T$ ) 的关系, 这时, 骨的扭转变形:

$$\varphi = \frac{TL}{GI_p}$$

式中:  $\varphi$ —扭转角, 单位为弧度;  $GI_p$ —骨的抗扭刚度。

单位长度的扭角:  $\theta = \frac{\varphi}{l} = \frac{T}{GI_p}$

由上述公式可以计算出长骨所能承受的最大剪应力 ( $\tau_{\max}$ ), 剪切弹性模量 ( $G$ )。

骨的成分与生物力学指标之间的关系变化是复杂的, 需采用多方面的因素来衡量, 总体而言, 骨矿含量的变化对弹性区的影响较大, 而有机质的变化对塑性区的变化影响较大。在实验中, 利用压缩实验的试件, 根据阿基米德原理得到试件的体积和湿重, 可顺便得到皮质骨的密度 (湿重/体积)。另外, 在用长骨做弯曲实验前, 先称长骨的重量, 实验后注意收集好断裂后的全部骨试件, 在高温炉中加热到 800, 保持 5 h 以上, 即可除去大鼠骨中的全部有机质, 随炉冷却, 取出骨试件, 称重, 加热后与加热前重量之比即是骨矿含量。

## 参 考 文 献

- 1 Pleker RF, Friedlaender GE, Markham TC, *et al*. Effects of freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res*, 1984; 1: 405
- 2 Fun YC. *Biomechanics*. New York: Springer-Verlag Inc, 1981: 384
- 3 杨桂通, 吴文周. 骨力学. 北京: 科学出版社, 1989: 59-61
- 4 Lewis JL, Goldsmith W. The dynamic fracture and prefracture response of compact bone by split Hopkinson bar method. *J Biomech*, 1975; 3: 27
- 5 王以近, 王介麟. 骨生物力学. 北京: 北京人民军医出版社, 1989
- 6 Burstein AH, Zika JC, Heiple KG, *et al*. Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Jt Surg*, 1977; 59A
- 7 龚志钰, 李章政. 材料力学. 北京: 科学出版社, 1999

(收稿: 2001-09-24)

(上接第 543 页; Continued from Page 543)

附, 但细胞的铺展较慢, 利用其它表面修饰手段如引入 RGD 多肽<sup>[8]</sup>来提高细胞在材料表面的黏附和铺展有待进一步的研究。

## 5 结 论

(1) 成纤维细胞系 NIH3T3 在未衣被的 PHB 表面趋于聚集, 在经多聚赖氨酸衣被的表面单层铺展生长, 这一现象与细胞-材料表面的黏附强度有关

(2) 多聚赖氨酸衣被可以有效的提高细胞在 PHB 泡沫支架上的种植效率。

## 参 考 文 献

- 1 Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science, 1993; 260 (5110): 920
- 2 Mooney DJ, Mikos AG. Growing new organs. *Sci Am*, 1999; 280(4): 60

- 3 Wong WH, Mooney DJ. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In: *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*. Boston: Birkhauser, 1997: 51-82
- 4 Powers MJ, Rodriguez RE, Griffith LG. Cell-substratum adhesion strength as a determinant of hepatocyte aggregate morphology. *Bio Technol Bioeng*, 1997; 53(4): 415
- 5 Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature*, 1978; 273(5661): 345
- 6 Usami S, Chen HH, Zhao YZ, *et al*. Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Annal Biomed Eng*, 1993; 21: 77
- 7 Hu M, Sabelman EE, Lai S, *et al*. Polypeptide resurfacing method improves fibroblast's adhesion to hyaluronan strands. *J Biomed Mater Res*, 1999; 47(1): 79
- 8 Mooney DJ, Park S, Kaufmann PM, *et al*. Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. *J Biomed Mater Res*, 1995; 29(8): 959

(收稿: 2000-07-11)