

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.03.007 [http://www.crter.org]
周继辉, 姚猛, 王岩松, 刘玉刚, 隋福革, 赵丛然, 田飞鹏, 何晓峰. 新型纳米支架与神经干细胞的凋亡[J].
中国组织工程研究, 2013, 17(3):419-426.

新型纳米支架与神经干细胞的凋亡***☆

周继辉¹, 姚猛², 王岩松², 刘玉刚², 隋福革¹, 赵丛然¹, 田飞鹏¹, 何晓峰¹

1 大庆龙南医院即齐齐哈尔医学院附属第五医院, 黑龙江省大庆市 163453

2 哈尔滨医科大学附属第二医院脊柱外科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

文章亮点:

- 1 新型胶原纳米组织工程支架性能良好, 可促进神经干细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 能够从基因表达水平调节神经干细胞的凋亡行为。实验旨在分析胶原纳米组织工程支架的性能, 检测其对神经干细胞凋亡行为及相关基因表达的影响。
- 2 以鹿骨作为载体材料尚未见报道。
- 3 实验通过一系列脱蛋白、脱钙等过程, 降低鹿松质骨的抗原性及免疫排斥反应。
- 4 经热源实验、急性毒性实验、溶血实验、凝血实验、小鼠肌袋实验检测证实结果鹿脱蛋白松质骨具有较好的生物相容性。而未经脱蛋白等一系列处理的新鲜鹿骨, 热源、急性毒性等检测实验结果不甚理想, 出现了轻度的溶血反应。
- 5 实验从基本性能分析证实定向及非定向纳米纤维膜是脊髓组织工程的理想支架材料。但细胞与材料的作用机制还有待进一步研究。

关键词:

生物材料; 纳米生物材料; 胶原; 纳米支架; 纤维膜; 组织工程支架; 增殖; 凋亡; 分化; 基因; 神经干细胞; 定向排列; 国家自然科学基金; 生物材料图片文章

摘要

背景: 胶原作为脊髓组织工程的良好支架有利于神经细胞及神经纤维的黏附和生长, 但机械性能较差, 需要在制备时提高其基本性能, 还应对种子细胞的生物学行为产生积极影响。

目的: 分析胶原纳米组织工程支架的性能, 检测其对神经干细胞凋亡行为及相关基因表达的影响。

方法: 采用电纺丝技术制备纤维定向排列及非定向排列的胶原纳米纤维膜, 并对其进行表征。将新生SD大鼠脊髓源性神经干细胞分别与纤维定向排列及非定向排列的胶原纳米纤维膜共培养, 并设置单独神经干细胞培养为对照, 检测细胞凋亡情况及相关基因表达变化。

结果与结论: 定向及非定向胶原纳米纤维膜的直径及形貌均达到纳米组织工程支架标准, 溶胀系数较高, 孔隙率较高, 力学性能佳。与对照组比较, 两胶原纳米纤维膜组神经干细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$), 细胞凋亡相关基因中 *bcl-2* 基因表达量明显增加, *bax* 及 *Caspase-3* 基因表达明显下降; 两胶原纳米纤维膜组神经干细胞凋亡率差异无显著性意义。表明新型胶原纳米组织工程支架性能良好, 能够抑制细胞凋亡, 从基因表达水平调节神经干细胞的凋亡行为。

New-type nano-scaffolds and neural stem cell apoptosis

Zhou Ji-hui¹, Yao Meng², Wang Yan-song², Liu Yu-gang², Sui Fu-ge¹, Zhao Cong-ran¹,
Tian Fei-peng¹, He Xiao-feng¹

1 Fifth Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University (Longnan Hospital of Daqing City), Daqing
163453, Heilongjiang Province, China

2 Department of Spinal Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin
150086, Heilongjiang Province, China

周继辉☆, 男, 1974年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2012年哈尔滨医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事脊髓组织工程研究。
ZHOUJIHUI321@163.com

通讯作者: 姚猛, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院脊柱外科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 王岩松, 副教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院脊柱外科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344
(2013)03-00419-08

收稿日期: 2012-08-08

修回日期: 2012-08-20

(20120608004/GW·W)

Zhou Ji-hui☆, Doctor,
Associate chief physician, Fifth
Affiliated Hospital of Qiqihar
Medical University (Longnan
Hospital of Daqing City),
Daqing 163453, Heilongjiang
Province, China
ZHOUJIHUI321@
163.COM

Corresponding author: Yao
Meng, Professor, Department of
Spinal Surgery, Second
Affiliated Hospital of Harbin
Medical University, Harbin
150086, Heilongjiang Province,
China

Corresponding author: Wang
Yan-song, Associate professor,
Department of Spinal Surgery,
Second Affiliated Hospital of
Harbin Medical University,
Harbin 150086, Heilongjiang
Province, China

Supported by: the National
Natural Science Foundation of
China, No. 30800260*; the
Natural Science Foundation of
Heilongjiang Province, No.
D200916*, D200902*

Received: 2012-08-08

Accepted: 2012-08-20

Abstract

BACKGROUND: As a good material for spinal cord tissue engineering scaffold, collagen is conducive to adhesion and growth of nerve cells and nerve fibers. But it needs to be improved in the preparation process because of its poor mechanical properties, not only to improve its basic performance, but also to have a positive impact on the biological behavior of the seed cells.

OBJECTIVE: To observe the properties of new nano-scaffolds for tissue engineering and to detect the changes of neural stem cell apoptosis and related gene expression affected by the nano-scaffold.

METHODS: Aligned and randomly oriented nanofibrous scaffolds were made of collagen by using electrospinning technology. Superficial morphous, porosity, mechanical property, swelling coefficient, degradation disposition were tested. Spinal cord derived neural progenitor cells were cultured and identified, and then the cells were cultured on aligned and randomly oriented collagen nanofibrous scaffolds. Cells cultured under normal conditions served as control group. The changes of neural stem cell apoptosis and related gene expression were tested.

RESULTS AND CONCLUSION: Superficial morphous of electrospun aligned and randomly oriented collagen nanofibrous scaffolds were in accordance with contrivable requisition, their porosities were supernal, mechanical properties were fine, swelling coefficients were satisfactory. Compared with the control group, apoptosis rate of cells cultured on aligned and randomly oriented collagen nanofibrous scaffolds decreased significantly ($P < 0.05$), expression level of apoptosis-related gene *bcl-2* significantly increased, *bax* and Caspase-3 significantly decreased. There was no significant difference between the cells on aligned and randomly oriented collagen nanofibrous scaffolds. These findings indicate that properties and histocompatibility of new nano-scaffolds for tissue engineering are satisfactory, which can inhibit and regulate cell apoptosis from the level of gene expression.

Key Words: biomaterials; nano-biological materials; collagen; nano-scaffolds; fibrous membrane; tissue engineered scaffolds; proliferation; apoptosis; differentiation; gene; neural stem cells; oriented arrangement; National Natural Science Foundation of China; biomaterial photographs-containing paper

Zhou JH, Yao M, Wang YS, Liu YG, Sui FG, Zhao CR, Tian FP, He XF. New-type nano-scaffolds and neural stem cell apoptosis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(3): 419-426.

0 引言

脊髓组织工程要素包括生物材料、细胞以及恰当的修饰剂(如细胞诱导分化剂), 3者有机结合, 协同作用, 可再生重建脊髓, 达到修复目的, 是近年来研究的热点。支架材料的自身性能及其对种子细胞生物行为的影响对脊髓损伤修复效果起到关键作用, 纳米技术在脊髓组织工程中前景广阔^[1-2]。实验旨在研究以电子纺丝技术制备的以胶原为原料的新型脊髓纳米组织工程支架的性能, 通过流式细胞技术检测其对神经干细胞凋亡的影响, 通过实时定量PCR技术检测细胞凋亡相关基因表达变化。

1 材料和方法

设计: 通过电子纺丝技术制备新型纳米纤维膜, 测试其基本性能并研究其对种子细胞凋亡行为的影响, 从基因表达水平进行分析。

时间及地点: 于2010年3月至2011年4月在大庆龙南医院即齐齐哈尔医学院附属第五医院及哈尔滨医科大学附属第二医院脊柱外科完成。

材料:

新型纳米支架对神经干细胞凋亡行为影响实验的主要试剂:

Main reagents:

试剂	来源
DMEM/F12(1 : 1)	Invitrogen, 美国
碱性成纤维细胞生长因子、表皮细胞生长因子	Chemicon, 美国
I型胶原蛋白、1, 1, 1, 3, 3, 3-六氟代-2-丙醇、5-溴脱氧尿嘧啶核苷、优质胎牛血清	SigmaAldrich 美国
兔抗巢蛋白多克隆抗体、鼠抗5-溴脱氧尿嘧啶核苷单克隆抗体、多聚赖氨酸、青、链霉素、二甲基亚砜、罗丹明(TRITC)标记山羊抗兔 IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗鼠 IgG	Sigma, 美国
胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶	Invitrogen, 美国

主要仪器:

Main instruments:

仪器	来源
240 型六门二氧化碳孵育箱、 ZHWHY-100 B 恒温培养振荡器、Multiskan MK 3 酶标仪	上海医用仪器设备厂
L 550 低速离心机	长沙医用仪器设备厂
奥林巴斯 IX 50 倒置相差显微镜、 奥林巴斯 PMTVC IC 05195 荧光显微镜	Olympus, 日本
海尔 BCD-256 KT 双门冰箱	青岛海尔冰箱厂
容声 BD/C-310 冰柜	广东容声冰箱厂
10, 100, 200 μ L 可调微量加样枪	上海医用激光仪器厂, 上海
Becton Dickinson 流式细胞仪	Sunnyvale, 美国
CamScanMX2 600FE 扫描电镜	英国
TS 2-60 输液泵	保定精密泵业有限公司, 中国
HB-F303-1-AC 高电压电源供应器	中国
Instron 3365 单轴力学拉伸机	英斯特朗, 美国
DSC-21E 数码摄影机	Sony, 日本
佳能 IXUS 115 数码照相机	Canon, 日本

实验方法:

新型纳米组织工程支架的制备及性能测试:

定向及非定向纳米纤维膜的制备: 静电纺丝装置包括输液泵, 高电压电源供应器和接地电极。

将 I 型胶原蛋白以 8% 质量体积浓度溶解于 1, 1, 1, 3, 3, 3-六氟代-2-丙醇中, 溶液被送入 1 个装有直径在 0.5 mm 不锈钢钝针的 5 mL 的塑料注射器中, 高电压电源供应器的正导联接在注射器金属针头的外表面。仪器准备就绪后, 输液泵以 0.5 mL/h 的注射速率推注溶液, 7 kV 的高电压作用于该溶液, 通过 1 个包被有铝箔的平板收集器在距针尖 10 cm 处收集非定向胶原纤维, 定向纤维则通过 1 个径在 50 mm 的鼓状物以 3 000 r/min 的速度旋转形成, 定向及非定向支架均在真空条件下室温干燥过夜。

表征的测试: 用扫描电子显微镜观测以胶原为原料的定向及非定向纤维纳米纤维膜的表征。将待测纳米纤维膜修剪成适当大小, 以双面胶将其粘于观察台上并编号, 喷金电流为 45 mA, 过程为 30 s, 连续喷金 2 次。加速电压为 24 kV, 以扫描电子显微镜以不同放大倍数观察, 选择合适图像拍照。

纤维直径及孔隙率的测定: 应用专用哈尔滨林业大学提供的专用图像分析软件分析扫描电镜图, 测算定向及非定向纳米纤维膜的直径及孔隙率, 分别选取 5 个图片, 每个图片随机选取 4 个纤维测量直径, 取均值为纳

米纤维膜的直径, 取 5 个图片孔隙率的均值为纳米纤维膜的孔隙率。

力学性能的测定: 将定向及非定向纳米纤维膜裁成 40 mm \times 5 mm 大小, 在 Instron 3 365 单轴力学拉伸机上测定其力学性能, 使用 100 N 称重传感器, 加载负荷速度为 10 mm/min, 每种类型的静电纤维支架有 5 个样本进行测定。

溶胀系数的测定: 支架对水的吸附能力由溶胀系数决定^[3]。首先, 将定向及非定向纳米纤维膜各取 10 个样本, 剪成矩形, 在去离子水中浸泡 12 h, 用滤纸将试样表面多余的水分吸除。溶胀系数按如下公式计算:

$$\text{溶胀系数}(\%) = (m_1 - m_0) / m_0 \times 100\%$$

其中 m_0 是支架最初的质量, m_1 是样品的湿质量, 取均值为纳米纤维膜的溶胀系数。

神经干细胞的培养和鉴定: 取新生 24 h 内的 SD 大鼠, 雌雄不拘, 平均质量 11.23 g, 由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供。乙醇浸泡 10 min 后在超净台下剪开皮肤, 取出脊柱, 用 2 个镊子挤压脊柱以收集脊髓, 置入冰镇 0.01 mmol/L PBS 中, 洗净血迹, 完整剥离脊膜并去除血管, 置入完全培养液中, 尽量剪碎, 剪成 0.5–1.0 mm³ 小块。把剪碎的脊髓组织过 200 目细胞筛以去除粘连的结缔组织纤维和大块组织, 浸入含 0.13% 胰蛋白酶、0.01% 木瓜蛋白酶、0.01% 脱氧核糖核酸酶的 Hank's 液中于孵箱中 37 $^{\circ}$ C 消化 7 min, 等量血清终止消化, 以火焰消毒的吸管轻轻吹打均匀制成单细胞悬液, 700 r/min 离心 7 min, 弃上清。以含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 液洗涤 2 次, 每次以 700 r/min 离心 7 min, 完全培养液用吸管轻轻吹打均匀, 锥虫蓝染色计数活细胞, 确定活细胞比率大于 95%, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于 25 mL 培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C、体积分数 95% O₂、体积分数 5% CO₂ 条件下静置培养, 培养液以 DMEM/F12 为基质, 含体积分数 0.02% 胎牛血清、20 μ g/L 表皮生长因子、10 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子和 0.002% 肝素^[4]。根据培养液颜色及细胞生长情况每 3 d 换液 1 次, 每 7 d 机械分离传代 1 次。将配好的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷/PBS 加入传代得到的神经干细胞悬液中, 使 DMEM/F12 培养基内含终浓度为 1 μ mol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷。放入饱和湿度的 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。以兔抗巢蛋白 (1 : 500) 多克隆抗体及鼠抗 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (1 : 100) 多克隆抗体为一抗, 加入罗丹明 (TRITC) 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 100) 及异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记山羊抗鼠 IgG 二抗 (1 : 100)

孵育, 进行双标免疫组织化学鉴定。

MTT法检测纳米组织工程支架与神经干细胞的生物相容性: 随机取96孔板将孔随机分为对照组、定向膜组、非定向膜组及空白组, 每组8孔, 将定向及非定向纳米纤维膜经紫外线消毒12 h, 以完全细胞培养液溶胀后以无菌剪刀裁成适当大小置于定向膜组、非定向膜组96孔板的孔底, 将铺好纳米组织膜的96孔板于紫外线下消毒12 h, 将神经干细胞制成单细胞悬液, 以微量加样枪吸取细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的神经干细胞悬液100 μL 加于对照组, 定向膜组, 非定向膜组每孔中, 以微量加样枪吸取细胞培养液100 μL 加于空白组各孔中。每日观察细胞生长状态及培养液颜色, 每2 d于每孔中加入约20 μL 培养液并轻轻吹打。于第1, 3, 5, 7, 9天各取4块96孔板按以下步骤进行MTT实验: 每孔加入MTT/PBS 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 条件下反应4 h; 再加入二甲基亚砜100 μL /孔, 振荡并适当吹打, 直至结晶完全溶解; 取出孔内的纳米纤维膜, 以完全细胞培养液为调零孔, 在分光光度计上选择波长490 nm读取A值, 计算8孔A值均数。

流式细胞技术检测细胞凋亡情况的变化: 随机取25 mL培养瓶分为对照组、定向膜组及非定向膜组, 每组6个。将定向及非定向纳米纤维膜经紫外线消毒12 h, 以细胞培养液溶胀后以无菌剪刀裁成适当大小置于25 mL培养瓶的瓶底, 将铺好纳米组织膜的25 mL培养瓶于紫外线下消毒12 h, 将神经干细胞制成单细胞悬液, 以吸管吸取细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的神经干细胞悬液4 mL加于各组培养瓶中, 共培养7 d。

收集细胞, 制备单细胞悬液, 用体积分数70%乙醇固定, 离心后以预冷的PBS重悬细胞, 加入Rnase A(终质量浓度为60 mg/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用30 min, 加入碘化丙锭(PI, 终浓度为50 mg/L), 4 $^{\circ}\text{C}$ 暗染30 min, 流式细胞仪上进行染毒细胞内总DNA含量分析, 区分正常细胞和凋亡细胞。实验重复4次。

实时定量PCR检测相关基因表达变化:

RNA的提取: 与定向或非定向支架共培养7 d后的细胞, 消化为单细胞后抽提总RNA, 加入适量Trizol RNA提取剂(通常 10^6 个细胞加入1 mL)立即以移动液器进行抽打。抽打后静置5 min, 加入0.25 mL氯仿, 混匀并静置5 min, 离心10 min, 速度为12 000 $\times g$; 移上层液体, 加入适量异丙醇(体积比10 : 7)混匀并静置10 min, 离心10 min, 速度为12 000 $\times g$, 弃上清; 加入1 mL体积分数75%乙醇, 混匀并静置5 min, 离心5 min, 速度为12 000 $\times g$; 室温下使RNA沉淀干燥10 min, 以50 μL

RNase free H_2O 溶解RNA; 以核酸蛋白检测仪测定A值以确定有无蛋白质污染, $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 说明无污染; 用凝胶成像系统观察5s rRNA, 18s rRNA和28s rRNA条带以确定RNA的完整性, 完整地提取RNA可观察到完整的5s rRNA, 18s rRNA和28s rRNA条带。

反转录: 以RNase free H_2O 溶解RNA 1.0 μg , 配成12.0 μL 溶液, 变性条件为85 $^{\circ}\text{C}$ 作用5 min, 立即致冷防止复性; 按体积比1 : 1 : 4 : 1 : 8 : 1加入oligo(dT)、Random primer、10 mmol/L dNTP、RNase inhibitor、5 \times buffer、M-MLV共8 μL , 反应溶液共20 μL 在30 $^{\circ}\text{C}$, 42 $^{\circ}\text{C}$, 85 $^{\circ}\text{C}$ 各保温10, 50, 10 min; 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件保存。

定量PCR检测: ①引物测试: 反应条件与正式实验相同, 每对引物进行模板水对照。GAPDH: 上游引物5'ATC CTG CAC CAC CAA CTG CT3', 下游引物5'GGGCCATCCACAGTCTTCTG3'; 次黄嘌呤转磷酸核糖基酶: 上游引物5'TTC TTT GCT GAC CTG CTG GA3', 下游引物 5'CCC CGT TGA CTG GTC ATT ACA 3'; bax: 上游引物 5'GTG GTT GCC CTC TTC TAC TTT GC3', 下游引物5'GAG GAC TCC AGC CAC AAA GAT G3'; bcl-2: 上游引物 5'CTG GGA TGC CTT TGT GGA ACT3', 下游引物5'CCA GGT ATG CAC CCA GAG TGA 3'; Caspase-3: 上游引物 5'TAA GGA AGA TCA CAG CAA AAG G3', 下游引物 5'TGA GCA TTG ACA CAA TAC ACG 3'。②正式实验: cDNA 以1 : 20稀释, 编排反应顺序, 反应体系如下: SYBR Green PCR Master Mix (Roche)5 μL , cDNA 3 μL , 上游引物0.15 μL (1 $\mu\text{mol/L}$), 下游引物0.15 μL (1 $\mu\text{mol/L}$), 总体积11 μL 。通过用纯净水取代CDNA模板来建立无模板控制, qPCR反应按以下步骤进行: 在95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 min, 重复40个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 作用15 s, 然后60 $^{\circ}\text{C}$ 作用1 min退火和延伸), GAPDH和次黄嘌呤转磷酸核糖基酶作为两个管家基因, 所有PCR采用3个副孔并使用GAPDH及HPRT为内参。

数据分析: Ct值代表反应体系中荧光信号强度达到域值时所经过的反应循环数, 其值越小, 则相应的基因表达越多。应用配套软件分析目的基因的相对表达量, 目的基因的相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta t}$, $\Delta\Delta t$ 为实验组中($\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$)与对照组 ($\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$)的差值, $2^{-\Delta\Delta t}$ 代表了实验组细胞目的基因表达与对照组细胞目的基因表达的差异倍数。实验重复4次。

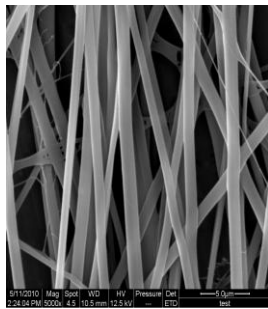
主要观察指标: 纤维定向排列及非定向排列的胶原纳米纤维膜的表征及其与神经干细胞共培养后细胞凋

亡及相关基因的变化。

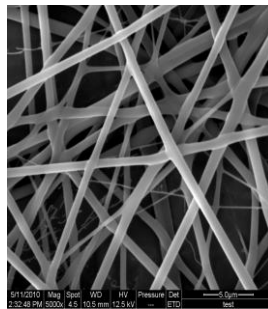
统计学分析: 采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 纤维定向排列及非定向排列胶原纳米纤维膜的性能 扫描电镜见定向纳米纤维膜纤维排列方向大体一致, 经专用图像计算系统测试, 纤维直径为 (694 ± 157) nm; 非定向纳米纤维膜纤维排列方向纵横交错, 纤维直径为 (785 ± 177) nm, 见图1。



a: 纤维定向排列胶原纳米纤维膜



b: 纤维非定向排列胶原纳米纤维膜

注: 定向纳米纤维膜纤维排列方向大体一致, 非定向纳米纤维膜纤维排列方向纵横交错

图1 纤维定向及非定向胶原纳米纤维膜的特征($\times 5000$)

Figure 1 Scanning electron microscope images of aligned collagen nanofibrous scaffolds and randomly oriented collagen nanofibrous scaffolds ($\times 5000$)

2.2 纤维定向及非定向胶原纳米纤维膜的孔隙率和溶胀系数 定向及非定向纳米纤维膜的孔隙率均大于70%,

分别为 $(79.31 \pm 2.87)\%$ 及 $(84.53 \pm 1.65)\%$, 溶胀系数分别为 386.11% 和 334.30%。

2.3 纤维定向及非定向胶原纳米纤维支架的机械力学性能 定向纳米纤维膜的弹性模量、拉伸强度及断裂伸长率分别为 (1.93 ± 0.82) MPa、 (31.02 ± 3.22) MPa、 $(5.90 \pm 0.85)\%$; 非定向纳米纤维膜的弹性模量、拉伸强度及断裂伸长率分别为 (1.73 ± 0.33) MPa、 (14.64 ± 3.23) MPa、 $(5.23 \pm 3.04)\%$ 。

2.4 神经干细胞的培养和鉴定结果 接种后的神经干细胞在显微镜下多为圆形, 原代培养1 d后, 多数细胞悬浮并单个存在, 细胞边缘及细胞核折光性好, 可见少量细胞聚集形成不规则团块, 细胞碎片及活性不佳的细胞沉于瓶底, 少量细胞贴壁。

原代培养2 d后, 仍以单个细胞为主, 细胞聚集形成较大的不规则的细胞团块, 并非神经球, 需将其吹散。原代培养二三天后, 细胞分裂增殖形成神经球, 大小不等, 最初由几个细胞组成, 随生长逐渐增大, 细胞数逐渐增多, 神经球悬浮于培养液中, 多呈椭圆形, 边界清楚, 在高倍显微镜下观察, 可见神经球中部细胞形态良好, 胞核及细胞边缘轮廓清晰, 折光性好, 若细胞数目过多导致中心部细胞营养供应不良则神经球中部细胞形态欠佳, 胞核及细胞边缘轮廓模糊且折光性差。

原代培养第7天神神经球已增大至包含一百乃至数百个细胞, 部分已增大至肉眼可见, 神经球中心细胞出现营养不良表现, 神经球仍以悬浮为主, 部分过大的神经球贴壁, 在瓶壁可见细胞碎片, 梭形贴壁的成纤维细胞, 此时应进行机械传并更换培养瓶, 传代后细胞的增殖速度与原代细胞基本相同。

双标免疫荧光组化鉴定结果显示, 培养获得的脊髓源性神经干细胞均表达神经干细胞的特有标志物巢蛋白, 在荧光显微镜下, 标记细胞为圆形, 显明亮的绿色荧光。同时表达5-溴脱氧尿嘧啶核苷, 在荧光显微镜下, 标记细胞为圆形, 显明亮的橙红荧光。荧光合成图像可见两种荧光同时表达。

2.5 MTT实验检测定向及非定向纳米纤维膜与神经干细胞的生物相容性实验结果 共培养第1天, 与定向及

非定向纳米纤维膜共培养的神经干细胞A值低于对照组, 自第3天起, 与定向及非定向纳米纤维膜共培养的神经干细胞A值均明显高于对照组, 并以定向纳米纤维膜组A值明显高于非定向纳米纤维膜组。经统计学分析, 自第3天起, 3组之间A值差异有显著性意义($P < 0.05$); 定向纳米纤维膜组明显大于非定向纳米纤维膜组及对照组($P < 0.05$), 非定向纳米纤维膜组明显大于对照组($P < 0.05$), 见表1。

表1 MTT 法检测定向纳米纤维膜、非定向纳米纤维膜与神经干细胞共培养不同时间点细胞的 A 值

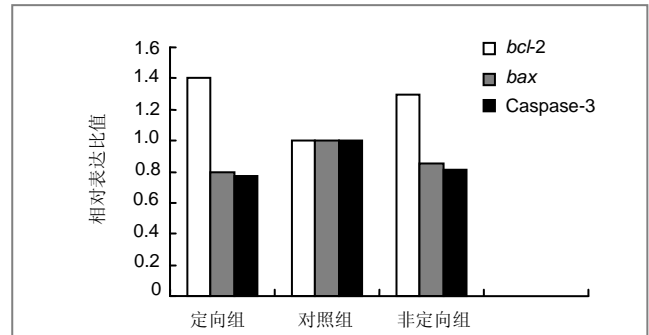
Table 1 Results of MTT experiments at different time point following coculture of neural stem cells with aligned and randomly oriented collagen nanofibrous scaffolds ($\bar{x} \pm s$)

时间	对照组	定向纳米纤维膜组	非定向纳米纤维膜组	F	P
1 d	0.24±0.09	0.32±0.01	0.35±0.01	143.027	< 0.05
3 d	0.43±0.02	0.71±0.02	0.58±0.01	349.037	< 0.05
5 d	0.70±0.02	0.87±0.02	0.70±0.02	101.645	< 0.05
7 d	0.80±0.02	0.97±0.01	0.89±0.01	160.905	< 0.05
9 d	0.89±0.01	0.94±0.01	0.92±0.02	37.444	< 0.05

注: 对照组为单纯神经干细胞培养; 定向及非定向纳米纤维膜与神经干细胞具有良好的生物相容性, 且两种纳米纤维膜有利于神经干细胞的生长及增殖。

2.6 流式细胞技术检测定向及非定向纳米纤维膜与神经干细胞共培养后的细胞周期结果 对照组细胞凋亡率为(10.55±0.33)%, 与定向纳米纤维膜共培养细胞的凋亡率为(8.89±0.31)%, 与非定向纳米纤维膜共培养细胞凋亡率为(9.27±0.17)%。经统计学分析, 各组之间比较差异有显著性意义($F=37.947$, $P < 0.05$); 定向纳米纤维膜组与对照组相比差异有显著性意义($F=52.288$, $P < 0.05$), 非定向纳米纤维膜组与对照组相比差异有显著性意义($F=46.598$, $P < 0.05$)。定向纳米纤维膜组与非定向纳米纤维膜组相比差异无显著性意义($F=4.607$, $P > 0.05$)。

2.7 实时定量PCR检测定向及非定向纳米纤维膜与神经干细胞共培养后细胞基因结果 与对照组比较, 与定向纳米纤维膜和非定向纳米纤维膜共培养细胞**bcl-2**表达量明显增高, **bax**及**Caspase-3**表达明显下降($P < 0.05$); 两纳米纤维膜组间3种基因表达水平差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图2。



注: 定向及非定向纳米纤维膜可通过升高 **bcl-2** 基因水平, 降低 **bax** 及 **Caspase-3** 基因水平, 抑制神经干细胞凋亡

图2 实时定量 PCR 检测定向及非定向纳米纤维膜与神经干细胞共培养 7 d 后细胞 **bcl-2**、**bax** 及 **Caspase-3** 基因的表达结果

Figure 2 Real-time quantitative PCR detection of **bcl-2**, **bax** and **Caspase-3** gene expressions in the neural stem cells cultured on aligned and randomly oriented collagen nanofibrous scaffolds for 7 d

3 讨论

脊髓损伤的修复属骨外科与神经外科交叉领域, 其临床治疗效果不佳, 为众多学者的研究热点。生物材料与种子细胞作为组织工程中的要素, 近年受到重点关注, 随着纳米技术等新兴技术的兴起及其在组织工程学中的应用, 使支架材料的构建及性能优化得到了快速发展^[5-6]。

胶原在动物体内广泛存在, 提炼工艺完善, 易于获得、加工及塑形, 与细胞膜整合素结合性能良好, 利于细胞的黏附, 通过整合素调节可促进细胞的增殖及移动。作为细胞外基质的主要成分, 其生物相容性及降解性能良好, 利于神经细胞及神经纤维的黏附及生长, 是脊髓组织工程中良好的支架原料。然而, 在实际应用中, 需通过制备技术发挥其优势, 同时须克服其机械性能差等缺点, 改进其理化及生物性能。随着纳米技术的兴起和发展, 经过纳米技术制备或处理的生物材料性能有了很大改善^[7-8]。

随着纳米纤维支架制备技术的发展, 电子纺丝技术逐渐取代了如相分离、自组装等传统技术, 成为目前制备纳米级支架的主要方法, 此方法操作相对简单, 控制性强, 可根据需要进行调整, 应用这种方法制备的支架孔隙率更高, 形态及尺寸具有更大的可调整性,

使其形态结构与细胞外基质的三维拓扑结构更为相似, 从而更利于细胞黏附, 并可通过界面效应调节细胞的增殖与分化行为^[9]。因为此方法能精确调节纤维直径和排列方向, 以往难以加工的生物材料也可应用此法制备成纳米级支架, 亦可根据需要制成“核壳型”双层纳米纤维支架, 并可作为良好的药物缓释载体, 使纳米支架的制备技术得到了飞跃^[10]。大多数细胞外基质都是由纳米级胶原构成的三维拓扑结构, 通过静电纺丝技术制备的纳米支架表面形态结构与细胞外基质很相似^[11]。

基于上述原因, 应用电子纺丝技术制备了以 I 型胶原为原料的纳米组织工程支架, 期望获得理想的纳米组织工程支架, 通过表征测试发现定向纳米纤维膜纤维排列方向大体一致, 而非定向纳米纤维膜纤维排列方向纵横交错, 纤维直径符合纳米级支架材料的要求, 支架的表面特征符合实验设计要求。

组织工程支架材料能够有效填充组织缺损区域, 阻止瘢痕增生, 为种子细胞及内源性修复细胞提供栖息场所, 改善局部微环境, 促进细胞的增殖及向有利方向分化。成为理想的组织工程支架, 必须具备以下性能^[12]: 组织相容性良好, 几乎无免疫排斥反应, 局部及全身炎症反应轻, 对种子细胞及邻近组织无毒性, 与邻近组织能很好融合; 制备工艺完善, 纤维直径及方向具有强的可控性, 材料具有更高的孔隙率, 为细胞提供更好的生长空间并利于物质交换; 可按需制成在特定时间内逐步降解的材料, 易于按需塑形, 并可按需改善材料的力学性能, 在组织再生过程中性能稳定, 又能适时被新生组织取代; 具有与细胞外基质更为相似的三维拓扑结构, 可作为药物、基因、诱导因子的良好载体, 通过表面效应, 药物作用, 基因表达变化等作用使细胞增殖, 可诱导细胞向有利方向分化, 有利于组织的修复和功能的恢复。

通过对纳米纤维膜基本性能的测试, 定向及非定向纳米纤维膜均有较高的孔隙率, 同时也加大了纳米纤维膜的表面积, 扫描电镜结果说明它们的结构利于细胞的黏附与增殖; 同时二者的溶胀系数较高, 在溶胀后易于塑形, 可根据需要裁成适当大小并卷成同心圆状制成适当的支架, 其合适的孔尺寸、高的孔隙率, 为细胞提供更好的生长空间并利于物质交换, 新生组织可适时长入, 神经纤维可通过同心圆的中间通道导向长入。在机械性能测试中测试了弹性模量、拉伸强度及断裂伸长

率。弹性模量代表了支架的抗变形能力, 与材料的抗变形性成反比, 即其值越小支架的抗变形能力越强。断裂伸长率是支架发生断裂时断裂处的伸长率, 与材料的抗变形性成反比, 即其值越大, 支架的抗变形能力越差。拉伸强度则表示支架所能承受不发生断裂的最大拉伸力, 与材料的抗变形性成正比, 即其值越大, 支架的抗变形能力越强。脊髓组织的弹性模量 300 Pa ^[13-14], 两种纳米纤维膜的机械性能明显优于正常脊髓组织, 且在溶胀后其弹性更佳。从基本性能分析, 定向及非定向纳米纤维膜是脊髓组织工程的理想支架材料。

MTT实验是一种检测活细胞数量成熟可靠的方法, 常用于检测支架材料的细胞毒性, 在活细胞线粒体中的活性酶与MTT作用生成甲臜, 这是一种蓝色结晶物, 应用二甲基亚砷将其溶解后, 在特定波长下检测溶液的吸光度, A值与活细胞数量成正比。该方法可判定与支架共培养后细胞数目的变化, 从而分析支架对细胞的毒性大小, 支架对细胞增殖的影响。自共培养第3天起, 在定向及非定向纳米纤维膜表面的神经干细胞A值均明显高于对照组, 并且定向纳米纤维膜组A值明显高于非定向纳米纤维膜组, 即在定向膜表面的活细胞数量明显多于非定向膜表面的活细胞数量。电镜观察及MTT实验的结果说明定向及非定向纳米纤维支架对神经干细胞无毒性, 生物相容性良好, 并有利于神经干细胞的黏附与增殖。

作者研究了纳米纤维支架对神经干细胞生物行为的影响, 已经证实支架能够促进神经干细胞的增殖^[15]。流式细胞技术分析表明纳米纤维膜能够降低神经干细胞的凋亡率。细胞凋亡是细胞在体内外特定的生理或病理性因素诱导下发生的一种自发的、程序化的死亡过程。细胞内的基因直接控制着细胞凋亡的发生和发展。当细胞受到诱导凋亡因素作用后, 经有关细胞信号转导系统的传递而激活凋亡基因, 细胞发生凋亡; 细胞中同时也存在抑制凋亡的基因, 对促进凋亡的基因起拮抗作用。正常情况下, 促凋亡基因与抑凋亡基因处于动态平衡状态, 以维持机体细胞正常凋亡。基因家族是与细胞凋亡关系非常密切的一组基因家族, 通过编码的蛋白来发挥诱导或抑制凋亡的作用。其中, *bcl-2*和*bax*是一对正负调节凋亡的基因, *bax*基因具有促进细胞凋亡的作用, *bcl-2*基因则能抑制细胞凋亡。Caspase家族是细胞凋亡的主要执行者, 可灭活细胞凋亡的抑制物(*bcl-2*), 水解细胞蛋白质结构, 最终导

致细胞降解。在此过程中, **Caspase-3**是细胞凋亡重要的效应分子, 可活化DNA酶, 降解染色体, 最终引起细胞凋亡。

bax基因具有促进细胞凋亡的作用, **bcl-2**基因则能抑制细胞凋亡。因此, **bcl-2**和**bax**二者表达的相对水平(即**bax/bcl-2**)是影响细胞凋亡的重要因素, **bax/bcl-2**越高, 细胞凋亡越易发生, 否则反之。此外, **Caspase**家族是细胞凋亡的主要执行者, 可灭活细胞凋亡的抑制物(**bcl-2**), 水解细胞蛋白质结构, 最终导致细胞降解^[16-18]。在此过程中, **Caspase-3**是细胞凋亡重要的效应分子, 可活化DNA酶, 降解染色体, 最终引起细胞凋亡。实验采用实时定量PCR实验技术检测了与纳米纤维膜共培养后神经干细胞凋亡基因表达水平的变化, 结果表明**bcl-2**基因表达量明显增加, 而**bax**及**Caspase-3**基因表达量明显下降, 纳米纤维膜能够从基因表达水平调节抑制神经干细胞凋亡的发生。

基金资助: 国家自然科学基金项目(30800260), 黑龙江省自然科学基金(D200916, D200902)。

作者贡献: 姚猛、王岩松进行实验设计, 实验实施为周继辉、刘玉刚, 实验评估为姚猛、王岩松, 资料收集为周继辉, 周继辉成文及审校, 周继辉对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Hou TY,Wu YM,Zhang YB.Zhonghua Chuangshang Zazhi. 2005;21(4): 316-318.
侯天勇,伍亚民,张玉波.组织工程脊髓修复脊髓损伤的研究进展[J].中华创伤杂志,2005,21(4): 316-318.
- [2] Jiang ZG,Li YH,Bi XB,et al.Zhongshan Daxue Yanjiusheng Xuekan. 2007;28(2): 20-25.
江志羔,黎银焕,毕小彬,等.生物材料应用于脊髓损伤修复的研究进展[J].中山大学研究生学刊,2007, 28(2): 20-25.
- [3] Keyes-Baig C,Duhamel J,Fung SY,et al. Self-assemblingpeptide as a potential carrier of hydrophobic compounds.J Am Chem Soc.2004;126(24):7522-7532.
- [4] Tzeng SF. Neural progenitors isolated from newborn rat spinal Cords differentiate into neurons and astroglia. J Biomed Sci.2002;9(1):10-16.
- [5] Wang M,Zhai P,Chen X,et al.Bioengineered scaffolds for spinal cord repair. Tissue Eng Part B Rev.2011;17(3): 177-194.
- [6] Madigan NN,McMahon S,O'Brien T, et al.Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds.Respir Physiol Neurobiol.2009;169(2):183-199.
- [7] Patino MG,Neiders ME,Andreana S, et al. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. J Oral Implantol. 2002;28(5):220-225.
- [8] Madaghiale M,Sannino A,Yannas IV,et al.Collagen-based matrices with axially oriented pores. J Biomed Mater Res A.2008;85(3):757-67.
- [9] Prabhakaran MP,Ghasemi-Mobarakeh L,Ramakrishna S.Electrospun composite nanofibers for tissue regeneration.J Nanosci Nanotechnol.2011;11(4):3039-3057.
- [10] Xie J,MacEwan MR,Schwartz AG,et al.Electrospun nanofibersforneural tissue engineering. Nanoscale.2010; 2(1):35-44.
- [11] Christens on EM,Anseth KS,van den Beucken JJ,et al. Nanobiomaterial applications in orthopedics.J Orthop Res. 2007;1:11-22.
- [12] Subramanian A,Krishnan UM,Sethuraman S.Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration.J Biomed Sci.2009;16:108.
- [13] Sparrey CJ,Choo AM,Liu J,et al.The distribution of tissue damage in the spinal cord is in?uenced by the contusion velocity. Spine (Phila Pa 1976). 2008;33(22):E812-819.
- [14] Kroeker SG,Morley PL,Jones CF,et al. The development of an improved physical surrogate model of the human spinal cord--tension and transverse compression.J Biomech.2009; 42(7):878-883.
- [15] Wang YS,Yao M,Zhou JH,et al.The promotion of neural progenitor cells proliferation by aligned and randomly oriented collagen nano?bers through b1 integrin/MAPK signaling pathway. Biomaterials.2011;32(28):6737-6744.
- [16] Martinou JC,Youle RJ.Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. Dev Cell.2011;21(1): 92-101.
- [17] Ishikawa T,Watanabe N,Nagano M,et al. Bax inhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. Antioxid Redox Signal. 2011;15(12):2975-2987.
- [18] Miao EA,Rajan JV,Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. Immunol Rev. 2011;243(1):206-214.