

三种人工合成可降解血管支架材料体外生物相容性及表面改性研究

杨松林¹, 谷涌泉², 汪忠镐², 张 建², 陈 兵², 王连才³, 姜 明⁴, 郑江红¹, 刘庆阳^{1*}

(1. 上海交通大学附属第六人民医院整形外科, 上海 200233; 2. 首都医科大学宣武医院血管外科, 北京 100053; 3. 北京理工大学材料学院, 北京 100081; 4. 清华大学化工系高分子研究所, 北京 100084)

[摘要] **目的:**对聚对苯二甲酸丁二醇酯-*co*-聚对苯二甲酸环己烷二甲醇酯-*b*-聚乙二醇嵌段共聚物(T20)、聚3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯(PHBV)和聚对苯二甲酸丁二醇酯/聚乙二醇对苯二甲酸酯嵌段共聚物(PEGT/PBT)共三种人工合成的可降解血管支架材料进行体外生物相容性评价,并观察它们表面改性后对犬血管平滑肌细胞黏附生长的影响。**方法:**通过测定接触角观察三种支架材料的亲水性;MTT法、流式细胞术(FITC)及扫描电镜观察犬血管平滑肌细胞在T20、PHBV和PEGT/PBT三种支架上的增殖及生长情况,评价它们的体外生物相容性;采用明胶及多聚赖氨酸对三者进行表面预处理,MTT法比较三者表面改性后犬血管平滑肌细胞的黏附生长情况。**结果:**三种材料的接触角均小于90°,亲水性的大小顺序为:PEGT/PBT>T20>PHBV。MTT法显示犬血管平滑肌细胞可以在PHBV、PEGT/PBT、T20支架材料上黏附生长,接种24 h后细胞活性升高(PEGT/PBT>T20>PHBV, $P<0.01$),随后降低,72 h后又开始增高(T20>PEGT/PBT>PHBV, $P<0.01$);FITC荧光染色可见犬血管平滑肌细胞在载体上成片生长,状态良好;扫描电镜见犬血管平滑肌细胞在载体上呈片状融合生长,并见大量的细胞外基质。MTT法结果表明三种材料经过明胶或多聚赖氨酸表面改性预处理后细胞增殖活性明显高于未处理组($P<0.01$)。**结论:**T20、PHBV、PEGT/PBT血管支架材料具有良好的体外生物相容性,对其进行表面改性后可明显提高犬血管平滑肌细胞的黏附生长能力。

[关键词] 支架;血管;生物相容性;表面改性

[中图分类号] R 318.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0400-05

In vitro evaluation of biocompatibility and surface modification of 3 kinds of artificial graft material

YANG Song-lin¹, GU Yong-quan², WANG Zhong-gao², ZHANG Jian², CHEN Bing², WANG Lian-cai³, JIANG Ming⁴, ZHENG Jiang-hong¹, LIU Qing-yang^{1*} (1. Department of Plastic Surgery, The Sixth People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China; 2. Department of Vascular Surgery, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Science, Beijing 100053; 3. College of Materials, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081; 4. Institute of Polymer Science & Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the biocompatibility of 3 kinds of artificial, biodegradable graft materials, including T20 [Poly (butylene terephthalate)-*co*-poly (cyclohexylene dimethanol terephthalate)-*b*-poly (ethylene glycol)], PHBV (Poly3-hydroxybutyrate-Poly3-hydroxyvalerate) and PEGT/PBT [Poly (butylene terephthalate)/poly (ethylene glycol) terephthalate], and to study their effects on canine smooth muscle cells (SMCs) growth after surface modification. **Methods:** The contact angles were measured to compare the hydrophilicity of T20, PHBV, and PEGT/PBT scaffolds. Then SMCs were cultivated on these biodegradable scaffolds; their proliferation and growth were assayed by MTT assay, FITC and electron microscopic observation for evaluation of their *in vitro* biocompatibility. The growth of SMCs was also assayed on the 3 scaffolds after they were pretreated with gelatin or Poly-1-lysine. **Results:** The contact angles of 3 scaffolds were all less than 90° (PEGT/PBT>T20>PHBV). MTT assay showed that SMCs adhered to and grew well on T20, PHBV, and PEGT/PBT scaffolds. The cell viability began to increase 24 h after cultivation (PEGT/PBT>T20>PHBV, $P<0.01$), followed by a decrease, but increased again 72 h after cultivation (T20>PEGT/PBT>PHBV, $P<0.01$). FITC observation showed that SMCs grew well and electron microscopic observation showed a confluent growth of SMCs with abundant extracellular matrix. The viability of SMCs was significantly higher on scaffolds pretreated with gelatin or Poly-1-lysine than on those without pretreatment ($P<0.01$). **Conclusion:** T20, PHBV, PEGT/PBT have good *in vitro* biocompatibility; the scaffolds made of these materials can obviously improve cell attachment after surface modification.

[KEY WORDS] stents; blood vessels; biocompatibility; surface modification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 400-404]

组织工程支架直接与生物体组织器官接触,因此要求其具有良好的细胞黏附性及生物相容性。研究材料生物相容性的方法很多,体外细胞培养法具有简单、快速、敏感性高及缩短生物材料研究周期的

[基金项目] 北京市科委计划基金资助(H020920040330)。Supported by Beijing Municipal Science & Technology Commission for Priority Project (H020920040330)。

[作者简介] 杨松林,博士,教授、主任医师。

* Corresponding author. E-mail: lqminnow@yahoo.com.cn

优点,可以作为检测材料对细胞毒性作用的方法;同时也可比较细胞在不同材料上的增殖情况^[1]。人工合成材料由于力学性能及降解速率都具有良好的可调控性,因而是目前制备血管支架最常用的基质材料。但合成材料由于没有细胞可进行识别的特定位置信息,即缺少细胞外基质中的各种生物信号及功能基因,因而直接影响了种子细胞在其表面的黏附。通过对材料进行表面预处理,使其具有良好的生物相容性、抗凝血性,适宜的表面亲/疏水性,还能产生所期望的细胞和分子间的响应性,从而提高细胞的黏附能力。

本研究应用体外培养法评价3种不同生物材料的体外生物相容性:聚对苯二甲酸丁二醇酯-*co*-聚对苯二甲酸环己烷二甲醇酯-*b*-聚乙二醇嵌段共聚物[poly(butylene terephthalate)-*co*-poly(cyclohexylene dimethanol terephthalate)-*b*-poly(ethylene glycol),PTCG20、T20],聚3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯(poly3-hydroxybutyrate-poly3-hydroxyvalerate, PHBV),聚对苯二甲酸丁二醇酯/聚乙二醇对苯二甲酸酯嵌段共聚物[poly(butylene terephthalate)/poly(ethylene glycol) terephthalate, PEGT/PBT];并观察应用明胶、多聚赖氨酸表面预处理后,3种材料对犬血管平滑肌细胞黏附生长的影响,为进一步研究它们作为血管组织工程载体材料的可行性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞及样品材料 细胞:犬血管平滑肌细胞(第Ⅲ代)(取犬股动脉进行原代培养扩增获得);样品材料:PHBV由清华大学化工系高分子研究所提供,PEGT/PBT、T20由北京理工大学材料学院提供。上述材料均做成实心膜片,并制成直径约1 cm,厚度2 mm的圆状膜片,其大小与24孔板的孔相符,灭菌采用紫外线照射方法灭菌,两面均照射8 h。

1.2 培养液及试剂 胎牛血清(FBS, Gibco公司);DMEM培养液(Gibco公司);胰蛋白酶(Sigma公司);MTT(methyl thiazolyl tetra zolium,四甲基偶氮唑盐, Sigma产品);二甲基亚砜(DMSO);10%多聚赖氨酸(poly-1-lysine, PLYS,中山公司);2%明胶(Sigma公司);异硫氰酸荧光素(FITC, Sigma公司);0.1% Triton-X 100(Sigma公司)。

1.3 主要设备 倒置光学、荧光共聚焦显微镜(O-LYMPUS,日本),扫描电镜(JSM-5510),MCO175型CO₂培养箱(SANYO,日本),自动酶标读数仪

(LP400,巴斯德,法国);微量振荡器(WZ-ZA型,北京海淀电子医疗器械厂);接触角测角计(JY-80,承德仪器厂)。

1.4 3种材料的亲水性测定 T20、PHBV、PEGT/PBT的亲水性用接触角测角计测量。每种材料测量3次,取均值。

1.5 MTT法测定3种材料的体外细胞增殖活性 采用贴块法原代培养犬主动脉平滑肌^[2],将第Ⅲ代细胞消化后以 5×10^4 /孔定量接种于预先放置样品膜的24孔培养板内,每孔加含20% FBS的DMEM培养液1 ml,实验分PEGT/PBT、T20、PHBV组和各自的空白对照组,对照组材料上不接种细胞,同样加入含20% FBS的DMEM培养液。分别于接种后24、48、72 h取材料进行MTT检测:吸去培养液,用PBS洗2遍去除未黏附细胞,每孔加无酚红培养液1 ml及MTT 100 μ l,培养4 h,加入DMSO 1.0 ml/孔,震荡10 min。将溶液吹打混匀,吸取等份溶液至96孔板内,酶标仪(550 nm)测定光密度值(D_{550})。

以上实验重复3次,将对照组的平均吸收值作为空白值,其余各孔的吸收值减去空白值得到校正吸收值。

1.6 流式细胞术(FITC)及扫描电镜观察3种材料上犬血管平滑肌细胞生长情况 (1)将犬主动脉平滑肌第Ⅲ代细胞消化后以 5×10^4 /孔定量接种于预先放置样膜的24孔培养板,每孔加含20% FBS的DMEM培养液1 ml,培养3 d后取出检测。(2)异硫氰酸荧光素(FITC)染色:样品用DPBS清洗,除去未黏附细胞;多聚甲醛室温固定30 min;DPBS清洗;0.1% Triton-X 100透化5 min;FITC染色,室温进行60 min;DPBS清洗3次,蒸馏水清洗去盐;膜片干燥,封片,指甲油密封;共聚焦荧光显微镜下观察。(3)扫描电镜观察:样品用3%戊二醛固定,经脱水、干燥、喷金后进行扫描电镜观察。

1.7 MTT法测定3种材料表面改性后犬血管平滑肌细胞增殖活性 分别将3种材料用2%明胶溶液或10%多聚赖氨酸溶液浸泡,37 $^{\circ}$ C,24 h。将犬主动脉平滑肌第Ⅲ代细胞消化后以 5×10^4 /孔定量接种于预先放置样膜的24孔培养板,每孔加20% FBS的DMEM培养液1 ml。实验分9组,即每种材料分为明胶预处理、多聚赖氨酸预处理和未处理3组;设阴性对照组,其材料上不接种细胞。接种后24 h取材料进行MTT检测,方法同1.4。

1.8 统计学处理 统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理用SPSS 10.0软件进行方差分析。

2 结果

2.1 亲水性测定结果 3种材料的接触角都小于90°,接触角越小,亲水性就越高;3种材料亲水性的大小顺序为:PEGT/PBT>T20>PHBV。

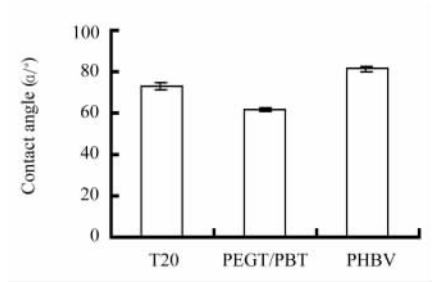


图1 3种材料的接触角测定

Fig 1 Contact angles of 3 kinds of material

$n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 3种材料的体外细胞增殖活性 MTT法测定结果 MTT法显示犬血管平滑肌细胞可在PHBV、PEGT/PBT、T20实心膜片上黏附生长,接种24h后细胞活性升高(PEGT/PBT>T20>PHBV,

$P<0.01$),随后降低,72h后又开始增高(T20>PEGT/PBT>PHBV, $P<0.01$)。详见图2。

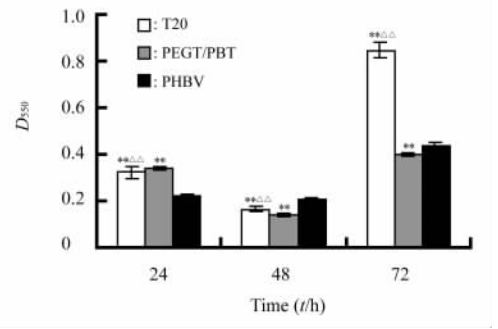


图2 犬血管平滑肌细胞在不同载体上的增殖

Fig 2 Proliferation of SMC on different scaffolds

* $P<0.01$ vs PHBV group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs PEGT/PBT group; $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 3种材料上犬血管平滑肌细胞生长情况的 FITC及扫描电镜观察结果 FITC荧光染色可见平滑肌细胞在载体上成片生长,状态良好(图3A~3C);扫描电镜见平滑肌细胞在载体上成片状融合生长,并见大量的细胞外基质(图3D~3F)。

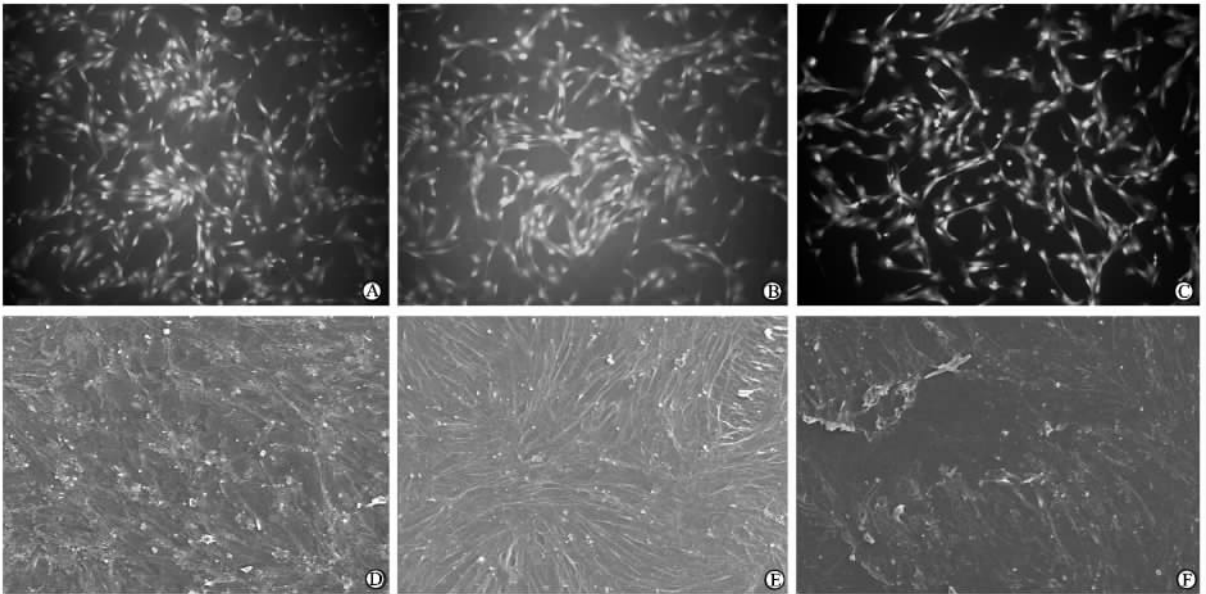


图3 犬血管平滑肌细胞在3种支架材料上的生长情况

Fig 3 Growth of SMC on 3 different scaffolds

A-C: FITC results; D-F: Electron microscopic observation results; A,D: PEGT/PBT; B,E: T20; C,F: PHBV

2.4 支架材料表面改性对犬血管平滑肌细胞黏附生长增殖活性的影响 MTT法结果显示,3种材料经过明胶或多聚赖氨酸处理后细胞增殖活性明显高于各自未处理组,有显著性差异($P<0.01$)。细胞

增殖活性 T20材料明胶处理组高于多聚赖氨酸处理组,PEGT/PBT材料明胶处理组低于多聚赖氨酸处理组,PHBV材料明胶处理组高于多聚赖氨酸处理组($P<0.01$)。详见图4。

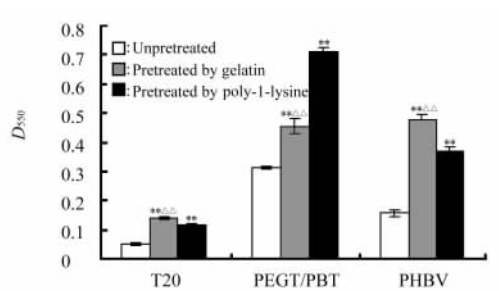


图4 材料表面预处理对平滑肌细胞贴附的影响

Fig 4 Influence on SMC adhesion by surface pretreatment

** $P < 0.01$ vs unpretreated group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Pretreated by poly-1-lysine; $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

理想的生物可降解合成材料应具备以下特点:

(1)良好的生物相容性,其本身或降解产物无毒性,不会引起炎症和免疫排斥反应;(2)适宜的生物降解性,其降解速度与组织再生速度相匹配,最后可以完全吸收;(3)良好的结构相容性,适当的强度和可塑性,能保持稳定的立体结构,植入后可以替代血管的结构和功能;(4)良好的表面相容性和一定的生物活性,材料表面有利于种子细胞的黏附和生长,并能通过表面修饰、预处理等机制对种子细胞的黏附和生长进行调控^[3]。因而在新材料应用到组织工程之前必须对其生物相容性进行评价。

PHBV是一种细胞内源性储藏物质,当其用作体内植入材料时,具有良好的生物相容性,无过敏反应,可通过降解而被吸收,并且可以通过改性而被用来作为血管组织工程的支架材料使用^[4]。PEGT/PBT及T20作为组织工程载体已经被多种细胞证实具有良好的生物相容性,但其在血管载体上的应用较为少见^[5,6]。

生物相容性的检测是材料能否应用于组织工程的关键。我们应用体外细胞培养法研究了犬血管平滑肌细胞相对于PHBV、T20和PEGT/PBT这3种材料的生物相容性。形态学观察结果提示,平滑肌细胞可以在3种载体上黏附生长,并在其表面连接成片,细胞形态为梭形,分泌细胞外基质;其增殖活性随时间推移逐渐增高。说明3种材料都能维持平滑肌细胞的形态及生长,具有良好的细胞相容性。

细胞在材料表面的生长主要分两个阶段,起初是细胞在材料表面的黏附和铺展,这和材料表面的物理化学性质有密切的关系;另一阶段是细胞在材料表面的分裂和生长,其受到多种因素的影响,包括

材料的内部结构,蛋白和材料表面的相互作用等。研究发现,材料的亲水性与细胞的贴壁生长有一定的关系,亲水性越大的材料有利于细胞的贴壁和生长^[7,8]。Gao等^[9]也证实,在种植细胞前用氢氧化盐处理材料表面可易于酯水解从而增加亲水性,有利于平滑肌细胞的黏附和血清蛋白的吸收。

从我们的实验中可以看出,接种24h后犬血管平滑肌细胞在3种材料上的黏附生长与亲水性的大小顺序关系与Webb等^[8]的实验结果相一致,但随时间推移,细胞生长无明确规律,考虑其原因是材料的物理特性在细胞黏附期起到了一定的作用,但在第二阶段,其他因素及条件对细胞生长的影响逐渐增加。如何能促进细胞在载体上的黏附和生长有待于研究人员的进一步努力。

人工合成材料与天然材料相比具有来源广泛,力学特性好,机械强度能满足移植需要的优点,但却不具备天然材料良好的生物相容性。这些人工聚合材料由于没有细胞可进行识别的特定位置信息,即缺少细胞外基质中的各种生物信号及功能基因,因而直接影响了种子细胞对其表面的黏附^[10]。通过对这些生物材料进行表面修饰,使其具有良好的生物相容性、抗凝血性、适宜的表面亲/疏水性及能产生所期望的细胞和分子间的响应性,可提高细胞在材料表面的黏附。

目前材料表面改性的研究主要集中于应用一些细胞外基质(ECM)蛋白,如胶原、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白等^[11]。刘彦春等^[12]应用10%多聚赖氨酸包埋支架后能够增强细胞吸附、促进细胞功能的发挥。本实验结果证实:3种材料经过2%明胶或10%多聚赖氨酸的表面预处理后,犬血管平滑肌细胞的黏附能力明显提高,提示通过对这些材料进行表面修饰可以提高血管平滑肌细胞在载体上的黏附生长。提示通过对材料进行改性可提高这3种材料的细胞黏附能力,有助于细胞在材料上的黏附生长。

本研究证实,由清华大学和北京理工大学提供的PHBV、T20和PEGT/PBT这3种材料对犬动脉平滑肌细胞的形态学和细胞黏附生长均无明显毒性影响,具有良好的生物相容性,PHBV及PEGT/PBT与国外相同载体的生物相容性基本类似,T20是北京理工大学自行研制的材料,本实验证实其具有较好的生物相容性能够满足组织工程支架材料的要求,对其进行明胶和多聚赖氨酸表面改性后可明显提高血管平滑肌细胞的黏附能力。这3种材料均可作为血管组织工程的载体材料应用,但由于应用于血管组织工程的载体是一个立体的三维结构,血管

平滑肌细胞在几种材料三维结构上的黏附及生长情况还有待于进一步研究和探索。

[参考文献]

[1] 郝和平 主编. 医疗器械生物学评价标准实施指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2000:100-110.
 [2] 刘庆阳, 谷涌泉, 罗 涛, 等. 组织工程动脉血管平滑肌种子细胞的构建[J]. 中国临床康复, 2005, 9:138-139.
 [3] Hunziker EB. Biologic repair of articular cartilage: defect models in experimental animals and matrix requirements[J]. Clin Orthop Relat Res, 1999, (367 Suppl):S135-S146.
 [4] Hill-West JL, Chowdhury SM, Sawhney AS, et al. Prevention of postoperative adhesions in the rat by in situ photopolymerization of bioresorbable hydrogel barriers[J]. Obstet Gynecol, 1994, 83:59-64.
 [5] Mahmood TA, Shastri VP, van Blitterswijk CA, et al. Tissue engineering of bovine articular cartilage within porous poly(ether ester) copolymer scaffolds with different structures[J]. Tissue Eng, 2005, 11:1244-1253.
 [6] Chen L, Xi T, Yang Z, et al. Effect of surface property of different polyether-ester copolymers on growth of smooth muscle cells and endothelial cells[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai

Ke Za Zhi, 2005, 19:481-485.
 [7] Hsieh CY, Tsai SP, Wang DM, et al. Preparation of gamma-PGA/chitosan composite tissue engineering matrices[J]. Biomaterials, 2005, 26:5617-5623.
 [8] Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 41:422-430.
 [9] Gao J, Niklason L, Langer R. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 42:417-424.
 [10] Jun HW, West J. Development of a YIGSR-peptide-modified polyurethaneurea to enhance endothelialization[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2004, 15:73-94.
 [11] Aper T, Teebken OE, Steinhoff G, et al. Use of a fibrin preparation in the engineering of a vascular graft model[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004, 28:296-302.
 [12] 刘彦春, 王 炜, 曹谊林, 等. 利用组织工程技术再生软骨组织的实验研究[J]. 中华显微外科杂志, 1999, 22:122-124.
 [收稿日期] 2005-12-29 [修回日期] 2006-03-20
 [本文编辑] 贾泽军, 邓晓群

cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesolides

Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] *Candida albicans* biofilms are structured microbial communities with high levels of drug resistance. Farnesol, a quorum-sensing molecule that inhibits hyphal formation in *C. albicans*, has been found to prevent biofilm formation by *C. albicans*. There is limited information, however, about the molecular mechanism of farnesol against biofilm formation. We used cDNA microarray analysis to identify the changes in the gene expression profile of a *C. albicans* biofilm inhibited by farnesol. Confocal scanning laser microscopy was used to visualize and confirm normal and farnesol-inhibited biofilms. A total of 274 genes were identified as responsive, with 104 genes up-regulated and 170 genes down-regulated. Independent reverse transcription-PCR analysis was used to confirm the important changes detected by microarray analysis. In addition to hyphal formation-associated genes (e.g., TUP1, CRK1, and PDE2), a number of other genes with roles related to drug resistance (e.g., FCR1 and PDR16), cell wall maintenance (e.g., CHT2 and CHT3), and iron transport (e.g., FTR2) were responsive, as were several genes encoding heat shock proteins (e.g., HSP70, HSP90, HSP104, CaMSI3, and SSA2). Further study of these differentially regulated genes is warranted to evaluate how they may be involved in *C. albicans* biofilm formation. Consistent with the down-regulation of the cell surface hydrophobicity-associated gene (CSH1), the water-hydrocarbon two-phase assay showed a decrease in cell surface hydrophobicity in the farnesol-treated group compared to that in the control group. Our data provide new insight into the molecular mechanism of farnesol against *C. albicans* biofilm formation.

[Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 584-589]