

· 专题报道 ·

## 壳聚糖和磷脂化壳聚糖涂层膜对血管内皮细胞生长和血液相容性的影响

刘宗军<sup>1</sup>, 孟 晟<sup>2</sup>, 秦永文<sup>1</sup>, 钟 伟<sup>2</sup>, 金惠根<sup>3</sup>, 于 文<sup>3</sup>, 罗启剑<sup>4</sup>

(1. 第二军医大学长海医院心内科, 上海 200433; 2. 复旦大学高分子科学系, 聚合物分子工程教育部重点实验室, 上海 200433; 3. 上海中医药大学附属普陀医院心内科, 上海 200062; 4. 复旦大学附属华山医院药剂科, 上海 200040)

**[摘要]** **目的:** 观察聚合物壳聚糖(chitosan, CHI)和磷脂化壳聚糖(phosphorylcholine chitosan, PC-CHI)涂层膜对培养的血管内皮细胞增殖和迁移及血液相容性的影响。**方法:** 将 CHI 和 PC-CHI 均匀喷涂在培养皿底层制成聚合物膜, 以 316 L 不锈钢片做成不锈钢圆柱体槽, 将猪髂动脉内皮细胞接种于聚合物膜、不锈钢槽和不做任何处理的培养皿底部(空白对照组), 培养 24 h。光镜和扫描电镜观察细胞形态, 以 CCK-8 试剂盒测定细胞增殖, 并进行细胞迁移检测。以凝固法测定健康人血液在聚合物膜上作用 2 h 后的凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原测定(FiB)和凝血酶时间(TT)。**结果:** 动脉内皮细胞在 CHI 和 PC-CHI 膜上生长良好, 形态正常。培养 24 h, 内皮细胞在 CHI 和 PC-CHI 膜上的增殖率分别达 88.8% 和 77.8%, 存活内皮细胞数目较不锈钢片组显著增加( $P < 0.01$ ); 而 CHI 组的存活内皮细胞数目显著高于 PC-CHI 组( $P < 0.01$ )。培养 72 h, 内皮细胞在 CHI 和 PC-CHI 膜上迁移细胞数均显著高于 316 L 不锈钢片, PC-CHI 组较 CHI 组的细胞迁移数目显著增加( $P < 0.01$ )。PC-CHI 组、316 L 不锈钢片组和空白对照组的 APTT 较 CHI 组显著延长( $P < 0.05, P < 0.01$ ), FiB 显著增加( $P < 0.01$ )。各组间 PT 和 TT 均无明显差异。**结论:** CHI 和 PC-CHI 涂层膜有助于血管内皮细胞的增殖和迁移, 对内皮细胞的相容性良好。PC-CHI 较 CHI 有显著抗血栓形成作用。

**[关键词]** 壳聚糖; 磷脂化壳聚糖; 血管; 内皮细胞; 细胞增殖; 细胞运动

**[中图分类号]** R 541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0019-04

### Effects of chitosan and PC-chitosan-coated membranes on growth and hemocompatibility of vascular endothelial cells

LIU Zong-jun<sup>1</sup>, MENG Sheng<sup>2</sup>, QIN Yong-wen<sup>1</sup>, ZHONG Wei<sup>2</sup>, JIN Hui-gen<sup>3</sup>, YU Wen<sup>3</sup>, LUO Qi-jian<sup>4</sup> (1. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China; 2. Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Ministry of Education, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433; 3. Department of Cardiology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; 4. Department of Pharmacy, Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of chitosan (CHI) and PC-chitosan (PC-CHI)-coated membranes on the proliferation, migration, and hemocompatibility of vascular endothelial cells. **Methods:** CHI and PC-CHI were separately sprayed on the bottom of culture dish evenly to form the polymer membrane; the cylinder was made of 316 L stainless steel flake. Pig iliac endothelial cells (PIEC) were cultured on the polymer membranes, the stainless steel bottom of the cylinder, and the untreated bottom of culture dish (as blank control). Then the cell morphology was observed by light microscope and scan electron microscope; cell proliferation was measured by Cell Counting Kit-8 (CCK-8); and cell migration was also assayed. Whole blood activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), fibrinogen (FiB), and thrombin time (TT) were examined by clotting method. **Results:** PIEC grew well on the membranes of CHI and PC-CHI, with normal morphology. After 24 h culture, the proliferation rates of PIEC were 88.8% and 77.8% on CHI and PC-CHI membranes, respectively. The survived PIEC on CHI and PC-CHI membranes were significantly more than those on 316 L stainless steel flake ( $P < 0.01$ ), and those on CHI membrane were significantly more than those on PC-CHI membrane ( $P < 0.01$ ). After 72 h culture, the numbers of migration cells on CHI and PC-CHI membranes were significantly more than those on 316 L stainless steel flake ( $P < 0.01$ ), and those on PC-CHI membrane were significantly more than those on CHI membrane ( $P < 0.01$ ). APTT in PC-CHI, 316 L stainless steel flake, and blank control groups were significantly longer than that of CHI group ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), and FiB levels in the former 3 groups were higher than that of CHI group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Coating with CHI and PC-CHI can improve the proliferation and migration of vascular endothelial cells on the culture dishes, indicating an excellent biocompatibility of CHI and PC-CHI membranes. PC-PCH membrane has more potent antithrombotic effect than CHI does.

**[KEY WORDS]** chitosan; PC-chitosan; blood vessels; endothelial cells; cell proliferation; cell movement

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 19-22]

步,使再狭窄率在有选择的病例中降至10%以下<sup>[1]</sup>。但目前应用的涂层支架局部释放的药物(如雷帕霉素等)在抑制平滑肌细胞增生的同时抑制了损伤内皮的修复,而且用于支架涂层的聚合物材料,组织相容性较差,易导致支架局部组织炎症反应<sup>[2]</sup>,这些均是导致支架内皮化延迟、局部血栓形成和“后期追赶”再狭窄的因素。因此选择合适的聚合物载体对药物涂层支架预防再狭窄的疗效和并发症的发生有重要影响。

壳聚糖(CHI)具有良好的生物相容性和生物可降解性,并且包含可反应的活性基团。CHI及其衍生物材料作为天然高分子组织工程材料越来越受到重视。CHI接上磷酸胆碱基团形成磷脂化壳聚糖(PC-CHI),可降低血栓形成,有可能是较好的涂层支架的药物载体。

本实验拟观察CHI和PC-CHI对动脉内皮细胞增殖和迁移及血液相容性的影响,探讨其作为涂层支架的药物载体的可能性。

## 1 材料和方法

1.1 材料 高糖DMEM(编号为SH30258.02)、胎牛血清、胰蛋白酶、PBS为美国HYCLONE公司产品,CCK-8试剂盒(编号为CK04-11)购自日本同仁化学研究所。猪髂动脉内皮细胞株(PIEC)由中国科学院细胞生物研究所提供。CHI购自上海自由人国际贸易有限公司(脱乙酰度78.6%,黏度90 mPa·s);三乙胺(TEA,AR)、三甲胺(TMA,AR)购自中国医药集团上海化学试剂公司;四氢呋喃(THF,AR)购自上海菲达工贸有限公司和桥分公司;2-氯-2-氧-1,3,2-二氧磷酐(2-chloro-2-oxo-1,3,2-dioxaphospholane,COP),参照Lucas-Edmenson法<sup>[3]</sup>进行。

1.2 PC-CHI的制备 在一个配有恒压滴液漏斗(与液封管相连)、低温温度计和磁力搅拌器的三口瓶中,按一定比例加入干燥的壳聚糖粉末、TEA和干燥的THF。搅拌,冷却至-17℃,缓慢滴入溶于一定量干燥THF的COP,历时3h,然后继续搅拌2h。整个过程控制温度在-17℃。自然升温至室温,再搅拌反应2.5h。除去TEA的氯化物(呈白色晶体状),30℃减压旋转蒸发除去溶剂THF;再次加入干燥THF,抽滤,滤液再次在30℃减压旋转蒸发将溶剂除去,得到淡黄色固体中间产物。在一个具活塞的厚壁单口烧瓶中加入干燥的乙腈和中间产物,摇匀,在加入一定量干燥TMA的乙腈饱和溶液。放入70℃的水浴锅中,保持48h。加热至75℃,把残余TMA赶入浓硫

酸中。氮气保护下,取出淡黄色产物。

以气流喷涂法将制备的壳聚糖和PC-CHI均匀喷吐在直径为3.5cm的培养皿底层,控制气流的流量和速度恒定使喷涂在培养皿上的量相等。喷涂后将培养皿烘干。

1.3 细胞培养 PIEC采用20%的胎牛血清、300 μg/ml L-谷氨酰胺、100 IU/ml青霉素和25 μg/ml链霉素的高糖DMEM培养基培养,在37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的条件下培养,实验时取对数生长期细胞。

1.4 实验分组 实验分为空白对照组、壳聚糖组、PC-CHI组、316 L不锈钢片组。其中空白对照组采用不任何处理的直径为3.5cm的玻璃培养皿;壳聚糖组和PC-CHI组采用底部分别涂有壳聚糖和PC-CHI的直径为3.5cm的玻璃培养皿;316 L不锈钢片组采用以316 L不锈钢片做成的直径为3.5cm的圆柱形凹槽(类似直径为3.5cm的玻璃培养皿)。

1.5 以CCK-8试剂盒进行内皮细胞增殖分析 选对数生长期PIEC分别以 $5 \times 10^4$ /ml接种到4种容器的底部,每组设6个复孔。以含20%胎牛血清的高糖DMEM培养基培养24h后,吸取培养液,每孔重新加入200 μl的DMEM,再加入10 μl的CCK-8,孵育2h后,检测450 nm光密度值(D)。细胞增殖率(%)=[(实验组D<sub>450</sub>/对照组D<sub>450</sub>)]×100%。

1.6 细胞迁移检测 将盖玻片置于直径为3.5cm的培养皿中,选对数生长期PIEC分别以 $5 \times 10^4$ /ml接种于壳聚糖组、PC-CHI、316 L不锈钢片组的容器中,每组设6个复孔。细胞长满后,取出盖玻片,在显微镜下用无菌刮刀将盖玻片上的细胞沿直线刮除一侧,放回培养皿板中,继续培养72h。在显微镜下观察细胞迁移情况,以测定至刮线边缘外的细胞数目。每组观察3个盖玻片的细胞迁移数目,取均值。

1.7 凝血功能的检测 以凝固法(散射光比浊),用型号Sysmex CA-1500全自动凝血功能检测仪测定。抽取健康成人全血,迅速置于加入0.2 ml 109 mmol/L枸橼酸钠抗凝剂的抗凝管中,然后倒入底层涂有CHI和PC-CHI的培养皿中;以316 L不锈钢片和空白培养皿作为对照;作用1h,3 000 r/min(r=10 cm)离心15 min,取血浆,上机测定部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原浓度(FiB)和凝血酶时间(TT)。每组重复8次。

1.8 统计学处理 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件,两组间比较用非配对t检验;计数资料数据以%表示,用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

2.1 壳聚糖和PC-CHI对内皮细胞增殖的影

响 内皮细胞在壳聚糖和 PC-CHI 膜上生长状况良好,细胞形态呈典型的圆形或卵圆形,形态一致,分

布较均匀,有较多的细胞伸出伪足。见图 1、图 2。

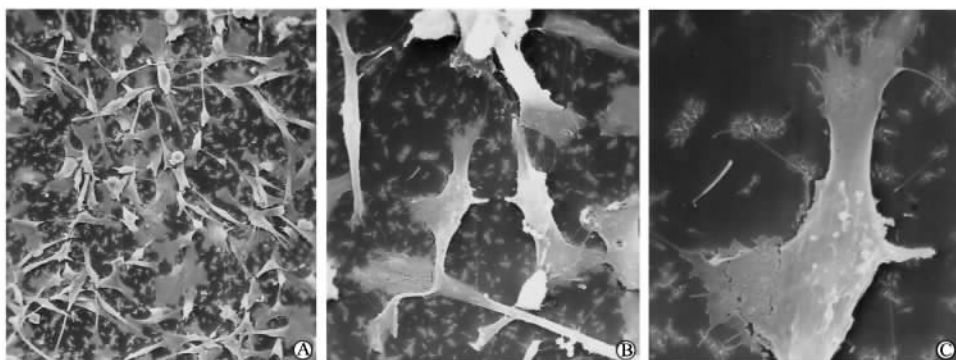


图 1 血管内皮细胞在 CHI 膜上生长的扫描电镜照片

Fig 1 Growth of vascular endothelial cells on CHI membrane by scanning electron microscope

A:  $\times 300$ ; B:  $\times 1\ 000$ ; C:  $\times 3\ 000$

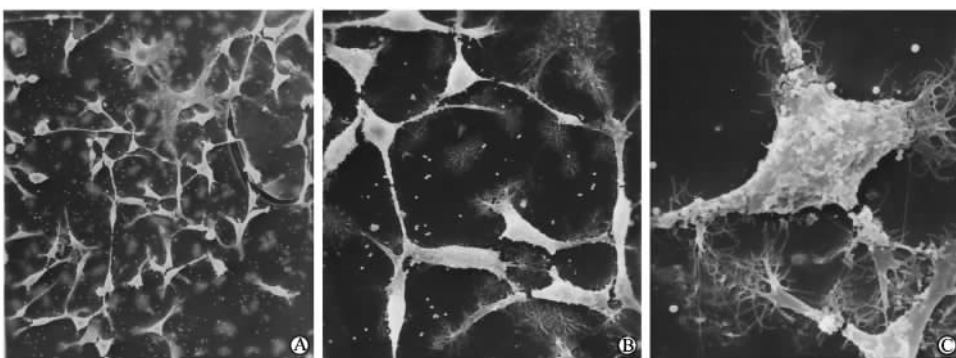


图 2 血管内皮细胞在 PC-CHI 膜上生长的扫描电镜照片

Fig 2 Growth of vascular endothelial cells on PC-CHI membrane by scanning electron microscope

A:  $\times 300$ ; B:  $\times 1\ 000$ ; C:  $\times 3\ 000$

动脉内皮细胞在壳聚糖组、PC-CHI 膜组、316 L 不锈钢片组和空白对照组生长 24 h 的  $D_{450}$  分别为  $0.847 \pm 0.004$ 、 $0.742 \pm 0.003$ 、 $0.085 \pm 0.010$  和  $0.954 \pm 0.005$ ,与不锈钢片组相比,壳聚糖组和 PC-CHI 膜组存活内皮细胞数目显著增加 ( $P < 0.01$ )。壳聚糖和 PC-CHI 膜细胞增殖率分别为 88.8% 和 77.8%,316 L 不锈钢片仅为 8.9%;壳聚糖组的存活内皮细胞数目显著高于 PC-CHI 组 ( $P < 0.01$ )。

2.2 壳聚糖和 PC-CHI 对内皮细胞迁移的影响  
与不锈钢片组相比,壳聚糖组和磷脂化壳聚糖组的细胞迁移数目显著增加 [ $(0.286 \pm 0.004)$  vs  $(0.011 \pm 0.002)$ ], [ $(0.301 \pm 0.004)$  vs  $(0.011 \pm 0.002)$ ],  $P < 0.01$ ]。PC-CHI 组较壳聚糖组的细胞迁移数目显著增加 [ $(0.301 \pm 0.004)$  vs  $(0.286 \pm 0.004)$ ],  $P < 0.01$ ]。

2.3 壳聚糖和 PC-CHI 对凝血功能影响 PC-CHI 组、316 L 不锈钢片组和空白对照组的 APTT 较

CHI 组显著延长 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),FiB 显著增加 ( $P < 0.01$ );而 PC-CHI 与 316 L 不锈钢片和空白对照比较均无显著差异,316 L 不锈钢片与空白对照比较均无显著差异。各组间 PT 和 TT 均无明显差异。见表 1。

### 3 讨论

选择组织相容性良好的聚合物材料作为涂层支架的材料,可以促进内皮细胞的生长,减少支架局部炎症反应,有助于 PCI 术后内皮损伤的早期修复,从而减少支架局部血栓形成,并可能减少再狭窄的发生。

壳聚糖是由 2-氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡萄糖通过  $\beta$ -1,4 糖苷键聚合的一种天然聚阳离子生物多糖,由于存在自由氨基和羟基,性质活泼,可用多种化学试剂进行修饰。壳聚糖可被降解为氨基葡萄糖,表现出良好的生物相容性;可以通过选择不同来源、不同

表 1 壳聚糖和 PC-CHI 对凝血功能影响  
Tab 1 Effect of CHI and PC-CHI on coagulation function

(n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	APTT(t/s)	PT(t/s)	FiB( $\rho_B/g \cdot L^{-1}$ )	TT(t/s)
CHI	21.9±3.3	10.3±1.2	1.5±0.3	18.3±2.5
PC-CHI	26.6±5.2	11.0±2.5	1.9±0.3**	17.4±1.3
316 L stainless steel	28.8±4.8**	11.1±0.2	2.0±0.5**	16.3±0.2
Control	28.1±5.4**	11.5±2.5	2.0±0.4**	18.2±1.9

\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs CHI group

相对分子质量、不同脱乙酰度的壳聚糖或通过化学修饰,按照不同组织工程的要求控制其在体内的降解速度。同时由于壳聚糖材料对温度相对稳定,不会因长期处于体内较温和的环境下而发生变形、收缩现象,这些特点使壳聚糖作为新型血管支架涂层材料或载药控释系统显示出很大的优势<sup>[4]</sup>。将壳聚糖接上磷酸胆碱基团形成 PC-CHI,可降低血栓形成<sup>[5]</sup>,有可能是较好的涂层支架的药物载体。本实验初步探讨壳聚糖和 PC-CHI 作为支架涂层材料的生物学基础。

结果表明内皮细胞在壳聚糖和 PC-CHI 膜上生长良好,细胞形态正常,细胞伸出众多伪足于聚合物膜,表明壳聚糖和 PC-CHI 对内皮细胞的相容性良好,有助于内皮细胞的黏附和生长。培养 24 h,内皮细胞在壳聚糖和 PC-CHI 膜上的增殖率已高达 88.8%和 77.8%,316 L 不锈钢片仅为 8.9%。培养 72 h,内皮细胞迁移数显著高于 316 L 不锈钢片。这表明相对于 316 L 不锈钢片,壳聚糖和 PC-CHI 可促进内皮细胞的增殖和迁移。可能是由于其刺激细胞分泌生长因子、细胞因子,使之作用于细胞加快增殖迁移。壳聚糖能与体内阴离子多聚体肝素形成电解质复合物,促进细胞有丝分裂,诱导合成生长因子,并延长其半衰期<sup>[6]</sup>。

本实验亦表明,CHI 组的 APTT 较 PC-CHI 组、316 L 不锈钢片组显著缩短,FiB 显著降低;而 PC-CHI 组与 316 L 不锈钢片组比较均无显著差异。提示 CHI 有促进血栓形成作用,这与 CHI 激活凝血因子,启动内源性凝血途径有关。而 PC-CHI 较 CHI 有显著抗血栓形成作用。提示 PC-CHI 与 316 L 不锈钢片比较,在促进血管内皮细胞生长的同时,并无促进血栓形成作用。

实验中有趣的是,壳聚糖较 PC-CHI 显著促进内皮细胞增殖,但促进内皮细胞迁移的程度小于 PC-CHI,可能的解释是:壳聚糖由于带有大量的氨

基,本身是一种带正电的天然高分子材料,其对于蛋白和细胞等表面带负电荷的粒子特别容易吸附。细胞贴附情况的改善对于内皮细胞的增殖,自然是有促进作用的。但是在引入了磷酸胆碱基团后,一方面壳聚糖的带电量有所下降,另外,由于磷酸胆碱基团有非常好的抗吸附作用,在提高了抗血栓作用的同时,细胞在材料表面的贴附有所下降,从而其促进内皮细胞增殖的效率稍有下降<sup>[7]</sup>。

总之,壳聚糖和 PC-CHI 可促进内皮细胞的增殖和迁移,从而提示 PC-CHI 涂层的支架较金属裸支架(316 L 不锈钢)明显促进 PCI 术后损伤内皮的早期修复,而 PC-CHI 较壳聚糖有显著抗血栓形成作用。在活体动物模型中是否如此有待于进一步的研究。

[参考文献]

[1] Bbbapulle M N, Eisenberg M J. Coated sents for prevention of restenosis;part 1[J]. Circulatoon, 2002, 106: 2734-2740.  
 [2] van der Giessen W J, Lincoff A M, Schwartz R S, et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and non- biodegradable polymers in porcine coronary arteries [J]. Circulation, 1996,94:1690-1697.  
 [3] Edmundson R S. Oxidation of cyclic phosphorochloridites[J]. Chem Ind,1962(42):1828-1829.  
 [4] Hsu SH,Whu SW,Tsai CL.,et al. Chitosan as scaffold materials; effects of molecular weight and degree of deacetylation [J]. J Polym Res, 2004,11:141-147.  
 [5] 张秀彩,钟伟,孟晟,等.磷脂聚合物的研究进展[J].高分子通报,2004,69: 65-72.  
 [6] Ma L,Gao C,Mao Z, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering[J]. Bio-materials, 2003, 24: 4833-4841.  
 [7] Iwasaki Y, Tojo Y, Kurosaki T, et al. Reduced adhesion of blood cells to biodegradable polymers by introducing hosphorylcholine moieties[J]. J Biomed Mater Res , 2003,65A: 164-169.

[收稿日期] 2006-08-22

[修回日期] 2006-11-27

[本文编辑] 曹静