

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01186

自制编织型三维支架对体外神经膜细胞生长的影响及体内降解观察

袁健东¹, 傅强^{2*}, 陈志明², 李忠海², 徐浩²

1. 温州医学院附属第一医院骨科, 温州 325000

2. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

[摘要] **目的:** 自制聚乙交酯-丙交酯(poly lactide-co-glycolide acid, PLGA)神经组织工程三维支架, 观察该支架对体外神经膜细胞生长的影响及其体内降解情况及炎症反应, 为后续研究奠定基础。**方法:** 通过熔融、纺丝、拉伸、编织等步骤制作编织型三维 PLGA 支架, 扫描电镜观察内部微管道的排列规律, 测量微管道孔径大小。将原代培养的神经膜细胞接种到编织型三维支架上, 采用倒置相差显微镜和扫描电镜观察细胞在支架上生长、黏附、增殖和凋亡情况, 并与细胞培养皿和胶原海绵培养细胞进行对照。将携带神经膜细胞的三维支架植入大鼠脊柱两侧肌肉中, H-E 染色观察支架在体内的降解情况及炎症反应。

结果: 支架外径为 3 mm, 微管道直径为 100 μm , 均匀平行排列。三维支架与细胞培养皿中的神经膜细胞细胞黏附率、增殖率无统计学差异, 与胶原海绵培养细胞差异有统计学意义($P < 0.05$); 三维支架与胶原海绵上的细胞凋亡率无统计学差异, 二者均低于细胞培养皿培养细胞, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。三维支架植入体内 12 周后完全降解, 周围无明显炎症细胞浸润。

结论: 自制编织型三维支架对体外神经膜细胞生长无不良影响, 体内能有效降解, 具有良好的生物相容性。

[关键词] 生物相容性; 聚乙交酯-丙交酯; 组织支架; 神经膜细胞

[中图分类号] R 608 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)10-1186-05

Influence of self-designed three-dimensional woven scaffolds on *in vitro* growth of Schwann cells and its *in vivo* degradation

YUAN Jian-dong¹, FU Qiang^{2*}, CHEN Zhi-ming², LI Zhong-hai², XU Hao²

1. Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

2. Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare a self-designed three-dimensional woven scaffold using poly lactide-co-glycolide acid (PLGA), and to observe the influence of the prepared scaffold on the growth of Schwann cells *in vitro* and its *in vivo* degradation. **Methods:** The 3D scaffolds were prepared by means of melt spinning, extension, weaving, and other procedures. The alignment of micro-tubules was observed under the scanning electronic microscope (SEM). The size of the micropores was also measured. Primary cultured Schwann cells were seeded on the 3D scaffolds, and the growth, adherence, proliferation, and apoptosis of Schwann cells were observed under inverted phase contrast microscopy and SEM; the results were compared between Schwann cells cultured in collagen sponge and culture dish. The scaffold carrying Schwann cells was implanted into the paraspinal muscle in rats, and H-E staining was used to observe the *in vivo* degradation and the inflammation responses. **Results:** The external diameters of the scaffold and micro-tubules were 3 mm and 100 μm , respectively, and the micro-tubules were arranged in an even and parallel manner. The adherence rates and proliferation rates of Schwann cells were similar between scaffold group and collagen sponge group, but both groups were significantly lower than the culture dish group ($P < 0.05$). The 3D scaffold degraded completely within 12 weeks, with no visible inflammatory cells around. **Conclusion:** The self-designed 3D scaffold has no harmful effect on the growth of Schwann cells, and it can degrade *in vivo*, showing a satisfactory biocompatibility.

[KEY WORDS] biocompatibility; poly lactide-co-glycolide acid; tissue scaffolds; Schwann cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(10):1186-1190]

[收稿日期] 2009-04-14 **[接受日期]** 2009-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金(30571887), 上海市青年科技启明星计划(06QA14068). Supported by National Natural Science Foundation of China(30571887) and Shanghai Rising-Star Program(06QA14068).

[作者简介] 袁健东, 博士. E-mail: amosdong2000@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873398, E-mail: johson.f@163.com

神经损伤修复研究的重点是让再生神经纤维在三维空间中有序规律地生长迁移,修复损伤区域。因此,研制出具有三维结构的神经组织工程修复支架是成功修复神经损伤的关键。目前常用的支架制备方法包括纤维粘结、溶剂浇铸、相分离、气体发泡、融化成型等^[1-3]。但这些方法存在制造过程不协调、致孔剂的使用、形状限制等明显局限性。因此,根据材料特性,选择合适的成形方式制作理想的组织工程材料是目前研究的热点。本研究以聚乙交酯-丙交酯 (poly lactide-co-glycolide acid, PLGA) 为主要原料,尝试采用新型编织工艺研制具有三维结构的神经组织工程支架,并观察该支架对体外神经膜细胞生长的影响及其体内降解情况,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 编织型三维支架的制作及观察 选择 PLA : PGA 为 9 : 1 的聚合材料 PLGA (Puiac 公司, 荷兰), 称取 100 g 聚合材料, 在 250℃ 的高温下熔融, 使用纺丝机 (东华大学自制) 纺丝, 细丝直径 25 μm , 拉伸后, 使用编织机 (上海香雪海设备加工厂) 编织细丝, 先编织成外径为 100 μm 的微导管, 对微导管进行 3.5% 壳聚糖 (海汇生物工程有限公司, 青岛) 表面喷涂处理。然后将 50 根微导管胶联编织成外径 3 mm 的支架, 对支架表面同样予以 3.5% 壳聚糖喷涂处理, 环氧乙烷消毒后真空包装, -4℃ 冷藏备用。将制备的支架喷金镀膜, 以扫描电镜 (JSM-6309LV 型, 日本) 观察支架的三维结构, 然后利用图像软件测量支架中微管道的管径。

1.2 实验动物及来源 新生 3 d 健康 SD 乳鼠 40 只, 平均体质量 (12 \pm 2) g; 8 周龄的健康雄性 SD 大鼠 32 只, 平均体质量 (200 \pm 20) g, 均由第二军医大学实验动物中心提供, 许可证 SYXK (沪) 2007-0003。对动物的处置参照国家科学技术部 2006 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[4]。

1.3 原代神经膜细胞 (Schwann cells, SCs) 的分离、纯化与培养 取 40 只新生 3 d 的 SD 乳鼠双侧坐骨神经, 利用植块法与消化法相结合的方法进行神经膜细胞的纯化, 然后将材料置入直径为 34.8 mm 的细胞培养孔内, 共计 12 孔进行体外扩增培养, 倒置相差显微镜下观察神经膜细胞生长情况, 细胞爬片后使用 S100 免疫荧光染色与 Hoechst 33342 (Sigma 公司) 核染色相比较鉴定神经膜细胞纯度。

1.4 三维支架对神经膜细胞体外生长的影响 将培养孔内的神经膜细胞用胰酶消化后, 制成密度为

1×10^6 / ml 的细胞悬液, 将细胞悬液用微量注射器注入 10 根 2.5 mm 长的 PLGA 支架内, 每个注入 0.1 ml, 然后置于 24 孔板培养基中分别培养, 隔天换液, 共培养 7 d (A 组); 以同法接种在胶原海绵 (B 组) 或预涂左旋多聚赖氨酸的 24 孔培养板 (C 组) 上培养 7 d 进行对照, 倒置相差显微镜下观察神经膜细胞生长情况。

定量分析 N-乙酰基- β -D-己糖胺酶活性测定细胞黏附率; MTT 法测定细胞增殖活性; 生物荧光检测半胱天冬酶-3 活性, 测定细胞凋亡。7 d 后将 A、B 两组的标本取出, 用 2.5% 戊二醛固定, 二甲砷酸缓冲液过夜, 乙醇、丙酮梯度脱水, 乙酸异戊酯置换, CO₂ 干燥, 真空干燥喷金, 扫描电镜下观察细胞在三维支架上的生长情况。

1.5 三维支架在体内的降解情况及炎症反应 神经膜细胞与支架共培养 7 d 后, 用 4% 水合氯醛, 300 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 固定四肢, 剃除术区鼠毛, 无菌条件下将试件植入大鼠脊柱两侧肌肉中, 左右侧各 1 枚。将上述大鼠随机分成 4 组 ($n=8$), 分别于术后 2、4、8、12 周四个时间点处死大鼠取出试件材料及周围肌肉组织, 先进行材料与周围组织的大体观察, 再镜下观察, 予以组织学分级。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Mann-Whitney *U* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自制编织型三维支架的电镜检测 新型三维支架外径为 3 mm (图 1A), 微管道直径为 100 μm , PLGA 细丝直径 25 μm , 横切面显示中空微管内径均匀一致 (图 1B), 轴向呈螺旋型上升排列 (图 1C、1D), 非常适合 SCs 的贴附生长, 为神经纤维再生提供了通道。

2.2 神经膜细胞的分离、培养及纯度鉴定 倒置相差显微镜下观察, 神经膜细胞聚合在一起呈端对端或者漩涡状排列 (图 2)。经测定实验培养的 SCs 纯度为 95.2%。

2.3 三维支架对神经膜细胞体外生长的影响

2.3.1 倒置相差显微镜下和扫描电镜观察结果 培养 3 d 后, 倒置相差显微镜下可见 A 组细胞在支架上贴壁生长 (图 3A), 培养 7 d, 贴壁细胞明显增多 (图 3B); B 组细胞黏附少, 7 d 后细胞黏附仍然很少 (图 3C); C 组细胞贴壁生长良好 (图 3D)。扫描电镜观察见: A 组有大量的 SCs 在支架材料内部贴附 (图 4A), 细胞突触“吸附”于支架上 (图 4B), 并在支架上形成肩并肩形状

(图 4C),且生长良好,并呈端对端生长;B组中有少量 细胞黏附,贴壁生长情况较差(图 4D)。

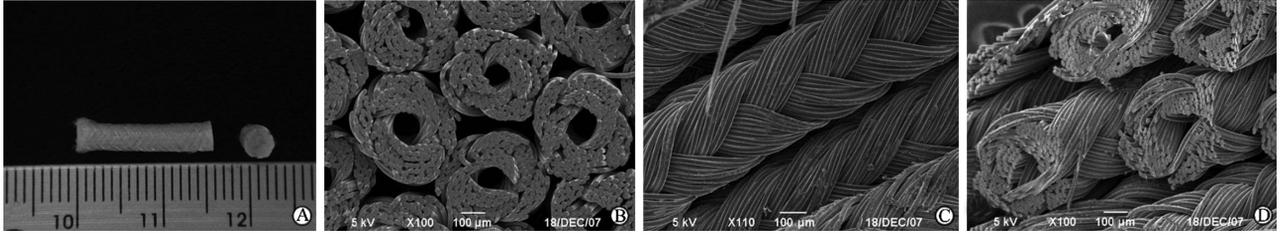


图 1 支架的大体图片和电镜下观察图片

Fig 1 Gross images of scaffolds and images under scanning electron microscope

A: Outline of the scaffolds; B: Cross-sectional structure; C: Longitudinal structure; D: Oblique plane structure. Original magnification: $\times 1$ (A), $\times 100$ (B), $\times 110$ (C), $\times 100$ (D)

2.3.2 细胞黏附率、增殖率、凋亡率观察结果 结果(表 1)表明:A组 3、6 h 的细胞黏附率比 C 组低,但无统计学差异;A 组明显高于 B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MTT 法检测结果显示 A 组细胞增殖情况优于 B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而与 C 组无统计学差异。细胞凋亡情况:A 组的 D 值明显低于 C 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),A 组与 B 组比较差异无统计学意义,表明 PLGA 支架和胶原海绵对于神经膜细胞具有很小或者几乎没有细胞毒性作用。

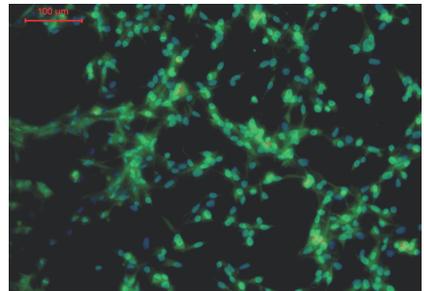


图 2 神经膜细胞纯度鉴定图

Fig 2 Identification of Schwann cells by Hoechst 33342 and S100 staining

Original magnification: $\times 100$

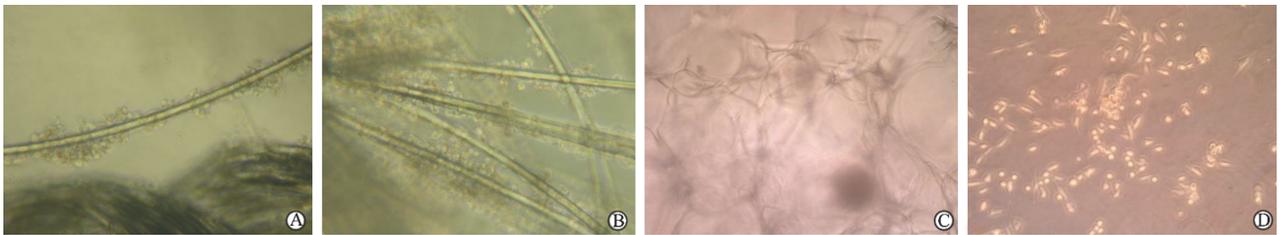


图 3 倒置相差显微镜下观察各组神经膜细胞的黏附情况

Fig 3 Adhesion of Schwann cells under inverted phase contrast microscope

A: Many cells were observed on the PLGA scaffolds after 3 d co-culture; B: A large number of cells were observed on the PLGA scaffolds after 7 day co-culture; C: A few of cells were observed on the gelatin sponges; D: Many cells were observed in culture media. Original magnification: $\times 100$

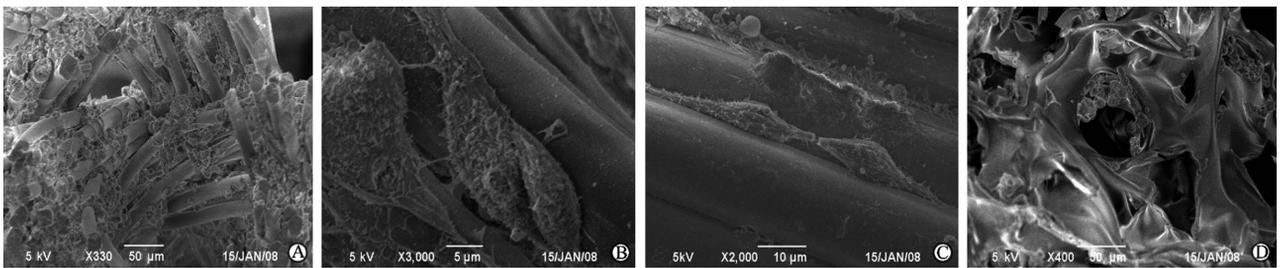


图 4 电镜下观察神经膜细胞在支架和胶原海绵上的黏附情况

Fig 4 Adhesion of Schwann cells on scaffolds and gelatin sponges under scanning electron microscope

A: A large number of cells adhered to the inner side of scaffolds; B: Pseudopodia of cells adhered to the scaffolds; C: Cells grew on the scaffolds in shoulder-to-shoulder manners; D: Few cells adhered to the inner side of gelatin sponges. Original magnification: $\times 330$ (A), $\times 3\ 000$ (B), $\times 2\ 000$ (C), $\times 400$ (D)

表 1 三维支架对神经膜细胞体外生长细胞黏附率、增殖情况及凋亡的影响

Tab 1 Influence of scaffolds on proliferation, adherence and apoptosis of Schwann cells

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

Group	Adherence rate of 3 h (%)	Adherence rate of 6 h (%)	Proliferation (D value)	Apoptosis (D value)
A	65±6*	71±4*	0.053±0.004*	0.278±0.003△
B	32±4△	36±3△	0.042±0.006△	0.265±0.003△
C	72±6*	80±4*	0.058±0.005*	0.579±0.004*

A: Self-designed three-dimensional woven scaffolds; B: Collagen sponge; C: Culture dish. * $P < 0.05$ vs B group; △ $P < 0.05$ vs C group

2.4 携带 SCs 的三维支架体内降解及炎症反应

2.4.1 大体观察 所有大鼠术后活动正常, 进食好, 伤口无感染。个别大鼠术后出现皮下筋膜下血肿, 术后 1 周术区轻度充血、红肿, 术后 2 周, 术区红肿消退, 伤口愈合好。2 周时材料表面有纤维膜包裹, 易分离, 与周围肌肉分界不清, 外观无明显变化。4 周时材料变形, 部分吸收, 可见细小的吸收空洞。8 周时材料明显吸收降解, 剩余少量残留物, 散布于组织中, 纤维包膜与材料结合紧密。12 周时材料完全降解吸收, 植入区周围均无坏死、脓肿。

2.4.2 组织学检测 2 周时材料表面的纤维包膜疏松, 与周围肌肉组织分界不清, 材料表面有疏松纤维组织生长, 以中性粒细胞和淋巴细胞为主, 有少量淋巴细胞浸润(组织学分级 ≤ I)。4 周时材料表面的纤维结缔组织较 2 周时致密, 伴有个别淋巴细胞浸润(组织学分级 ≤ I), 清晰可见白色的支架材料(图 5A)。8 周时材料周围可见个别淋巴细胞浸润, 支架大部分降解, 剩下少量白色降解残余物(图 5B)。12 周时材料完全降解, 未见明显的炎症细胞。

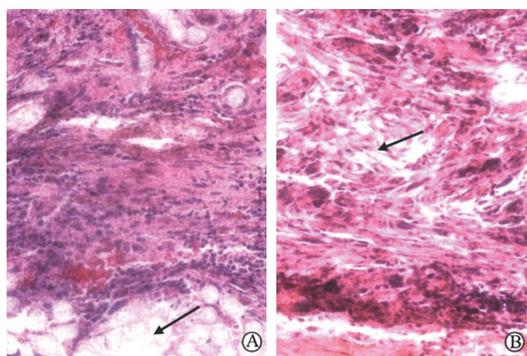


图 5 植入体内后支架的降解情况

Fig 5 H-E staining of scaffold degradation *in vivo* after implantation

A: Clear white materials (black arrow) were observed after 4 weeks; B: A small number of white remnants of scaffold degradation (black arrow) were observed after 8 weeks. Original magnification: ×400

3 讨论

神经损伤修复对生物支架的要求较高, 理想的组织工程支架应具备以下特征: (1) 良好的生物相容性; 无毒、不致畸, 有利于细胞黏附、增殖, 降解产物对细胞无毒害作用; (2) 三维立体多孔结构; (3) 良好的生物降解性: 支架材料降解率与组织细胞生长率相适应, 并可人为调控; (4) 良好的材料/细胞界面; (5) 良好的力学性能^[5-6]。目前常用支架材料主要包括聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)、乙烯、乙醇共聚物、血纤维蛋白、壳聚糖等^[7-10], 其中以 PLGA 最常用。其是可降解的合成生物材料, 具有良好的生物相容性, 仅引起轻微炎症反应, 降解产物对植入体无毒害。Hadlock 等^[11]将聚羟基乙酸和聚乳酸共聚物制成导管并成功移植神经膜细胞; 李文萍等^[12]在 PLGA 支架上成功培养神经膜细胞。因此, 本研究选用 PLA : PGA 为 9 : 1 的 PLGA, 降解时间约为 3 个月。

生物支架内部需要足量的中空管道, 这不但为细胞的大量植入提供了空间, 也有利于营养物质和氧气的交换, 从而促进细胞增殖^[13-14]。因此, 采用合适的生物材料及制造工艺制备恰当的中空三维结构支架是目前研究的热点^[15-18]。本研究采用新的材料制作工艺, 以熔融方式纺细丝, 拉伸后以像编“辫子”一样编织出微管道, 然后再胶联聚合编织出任意形状的支架, 为组织工程支架的制作提供新方法。由于 PLGA 体内直接降解成酸, 从而产生了局部酸性微环境, 而 pH 值的降低可加速材料的自身催化降解, 结果在材料周围将形成一个强酸环境, 可能引起炎症反应影响细胞功能^[19-20]。因此, 本研究在研制支架过程中, 在微导管与支架外层均喷涂 3.5% 壳聚糖, 壳聚糖是弱碱性材料, 生物相容性好, 可被吸收降解, 以此中和局部的酸性物质, 减少局部炎症反应及对细胞的伤害。

本研究的生物相容性分析结果表明, PLGA 三维支架对神经膜细胞的黏附、增殖无毒害作用, 不引起细胞凋亡, 证明 PLGA 支架材料不会损伤神经膜细胞, 是生物相容性良好的生物材料。扫描电镜结果证实, 新型 PLGA 三维支架具有三维立体结构, 内部的微管道排列有序, 相互平行, 且管道内 PLGA 细丝呈螺旋状上升, 与细胞共培养结果也表明这样的结构有利于神经膜细胞突触黏附, 同时中空的微管道能为细胞提供广阔的空间, 使细胞能在三维空间中有序规律地生长, 具有三维结构的新型支架也能为日后植入神经损伤区提供稳定空间。体内的生

物相容性实验显示,植入的支架周围未见大量聚集的淋巴细胞和巨噬细胞,表明支架材料未引起机体明显的炎症反应,并且经过3个月的降解,支架材料完全代谢。

综上所述,本研究采用新型编织工艺以PLGA为主要原料自行设计制作了具有三维中空管道结构的支架,初步分析结果表明其具有良好的生物相容性,并且其具有的三维螺旋状上升微管道系统有利于细胞的黏附生长,非常适合作为神经损伤修复的组织工程支架,支架降解时间约为3个月,具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Lee S J, Kim S Y, Lee Y M. Preparation of porous collagen/hyaluronic acid hybrid scaffolds for biomimetic functionalization through biochemical binding affinity[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007, 82: 506-518.
- [2] Derham C, Yow H, Ingram J, Fisher J, Ingham E, Korrosis S A, et al. Tissue engineering small-diameter vascular grafts: preparation of a biocompatible porcine ureteric scaffold[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14: 1871-1882.
- [3] Wei J, Chen F, Shin J W, Hong H, Dai C, Su J, et al. Preparation and characterization of bioactive mesoporous wollastonite - Polycaprolactone composite scaffold[J]. Biomaterials, 2009, 30: 1080-1088.
- [4] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. [2006-09-30] http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm
- [5] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260: 920-926.
- [6] Freed L E, Vunjak-Novakovic G, Biron R J, Eagles D B, Lesnoy D C, Barlow S K, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering[J]. Biotechnology (N Y), 1994, 12: 689-693.
- [7] Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering[J]. Biomaterials, 2005, 26: 2603-2610.
- [8] Nisbet D R, Yu L M, Zahir T, Forsythe J S, Shoichet M S. Characterization of neural stem cells on electrospun poly(epsilon-caprolactone) submicron scaffolds; evaluating their potential in neural tissue engineering[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2008, 19: 623-634.
- [9] Hung C H, Lin Y L, Young T H. The effect of chitosan and PVDF substrates on the behavior of embryonic rat cerebral cortical stem cells[J]. Biomaterials, 2006, 27: 4461-4469.
- [10] Willerth S M, Arendas K J, Gottlieb D I, Sakiyama-Elbert S E. Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells[J]. Biomaterials, 2006, 27: 5990-6003.
- [11] Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti J P. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration[J]. Tissue Eng, 2000, 6: 119-127.
- [12] 李文萍, 朱家恺, 籍涛, 王建云, 利春叶. 许旺细胞在人工神经支架材料上三维培养的体外活性研究[J]. 中华显微外科杂志, 2002, 25: 31-33.
- [13] Kannan R Y, Salacinski H J, Butler P E, Seifalian A M. Artificial nerve conduits in peripheral-nerve repair[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2005, 41(Pt 3): 193-200.
- [14] Hofmann S, Hagenmüller H, Koch A M, Müller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D L, et al. Control of *in vitro* tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds[J]. Biomaterials, 2007, 28: 1152-1162.
- [15] Sarkar S, Isenberg B C, Hodis E, Leach J B, Desai T A, Wong J Y. Fabrication of a layered microstructured polycaprolactone construct for 3-D tissue engineering[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2008, 19: 1347-1362.
- [16] Oh S H, Park I K, Kim J M, Lee J H. *In vitro* and *in vivo* characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method[J]. Biomaterials, 2007, 28: 1664-1671.
- [17] Yoon S J, Park K S, Kim M S, Rhee J M, Khang G, Lee H B. Repair of diaphyseal bone defects with calcitriol-loaded PLGA scaffolds and marrow stromal cells[J]. Tissue Eng, 2007, 13: 1125-1133.
- [18] Pattison M A, Wurster S, Webster T J, Haberstroh K M. Three-dimensional, nano-structured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications[J]. Biomaterials, 2005, 26: 2491-2500.
- [19] Jilek S, Walter E, Merkle H P, Corthésy B. Modulation of allergic responses in mice by using biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres[J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114: 943-950.
- [20] Yoon S J, Kim S H, Ha H J, Ko Y K, So J W, Kim M S, et al. Reduction of inflammatory reaction of poly(D, L-lactic-co-glycolic Acid) using demineralized bone particles[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14: 539-547.

[本文编辑] 贾泽军