

文章编号 1006-8147(2017)05-0398-05

论 著

# 探究激活态雪旺细胞与生物可降解聚己内酯支架的生物相容性

樊保佑, 林 伟, 史桂东, 任一鸣, 魏志坚, 郝 岩, 周先虎, 冯世庆  
(天津医科大学总医院骨科, 天津 300052)

**摘要** 目的:探究激活态雪旺细胞(ASC)、非激活态雪旺细胞(SC)与生物可降解聚己内酯(PCL)支架的生物相容性。方法:实验组由结扎7 d Wistar 大鼠坐骨神经提取激活态雪旺细胞,对照组由未结扎大鼠坐骨神经提取非激活态雪旺细胞。将细胞分别种植在PCL支架上,通过CCK-8检测细胞增殖活性,通过结晶紫观察细胞分布,激光共聚焦显微镜观察细胞形态和功能表达。结果:ASC与SC相比S-100阳性率无明显差异;PCL支架上ASC增殖率明显高于SC;ASC能够贴附PCL纤维生长,可沿纤维长轴分布,进入支架内部,并且表达髓鞘碱性蛋白(MBP)。结论:激活态雪旺细胞比非激活态雪旺细胞能够更好地在PCL支架上生长,PCL支架具有良好的生物相容性。

**关键词** 激活态雪旺细胞;PCL支架;生物相容性

中图分类号 R68

文献标志码 A

## Study on the biocompatibility of PCL scaffold with activated Schwann cells

FAN Bao-you, LIN Wei, SHI Gui-dong, REN Yi-ming, WEI Zhi-jian, HAO Yan, ZHOU Xian-hu, FENG Shi-qing

(Department of Orthopedics, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

**Abstract Objective:** To study the biocompatibility of polycaprolactone(PCL) scaffold with activated Schwann cells(ASC) and normal Schwann cells(SC). **Methods:** There were two groups: ASC extracted from ligated sciatic nerves experiment group; SC extracted from normal sciatic nerves control group. Proliferation activity was tested through the CCK-8 test, and the distribution and shape of cells was observed by crystal violet staining and confocal laser scanning microscope. **Results:** There was no difference between ASC and SC in the positive rate of S-100; the proliferation rate of ASC was significantly higher than that of SC in PCL scaffold; ASC could attach PCL fiber and move along the long axis of the fiber into the scaffolds, and express myelin basic protein (MBP). **Conclusion:** Activated Schwann cells can grow better in PCL scaffold than non-activated Schwann cells, and PCL scaffold has good biocompatibility.

**Key words** activated Schwann cells; polycaprolactone scaffold; biocompatibility

外周神经损伤经常发生在车祸或工伤事故中。欧洲流行病学调查发现:每年1万人中有13.9人发生外周神经损伤。损伤神经发生退行性改变:Wallerian变性。雪旺细胞是参与Wallerian变性至关重要的一种细胞。雪旺细胞在发育过程中,来源于神经嵴,主要分为以下类型:髓鞘化雪旺细胞包绕轴突形成髓鞘、非髓鞘化雪旺细胞、突触周围的雪旺细胞和卫星细胞<sup>[1]</sup>。雪旺细胞在外周神经的发育、成熟过程中起到了非常重要的作用,在外周神经系统支持轴突、为轴突提供髓鞘和维持神经纤维完整性。外周神经损伤后,轴膜开始裂解,雪旺细胞失去

与轴突的连接,进入激活状态,转变成激活态雪旺细胞<sup>[2-6]</sup>。神经元成百上千的基因表达发生变化,包括很多转录因子,进而形成新的轴突;同样雪旺细胞也存在成千上万的基因表达发生改变,促使雪旺细胞从髓鞘化状态向促进再生状态转化<sup>[7-9]</sup>,雪旺细胞定向分布,诱导轴突的生长。因此雪旺细胞对外周神经的再生起到至关重要的作用。随着组织工程的发展,在诸多生物可降解材料中,聚己内酯(polycaprolactone, PCL)具有无毒性、可降解、良好的机械强度。PCL通过三羧酸循环分解,代谢产物直接进入肾脏排泄,在体内和体外的生物相容性较好。PCL已经应用于许多产品,比如说可吸收缝线、敷料等<sup>[10-11]</sup>、避孕装置、内固定物等<sup>[12-13]</sup>。其较长的降解周期,使得其可作为细胞移植的载体,为细胞移植提供一种基质载体的作用。近年来,虽然许多研究已将PCL用于治疗外周神经损伤,但是很少有研究将激活态和非激活态雪旺细胞与PCL支架

基金项目 国家自然科学基金重点项目基金资助(81330042);国家自然科学基金面上项目(81371957);国家科技部中俄合作专项项目(2014DFR31210);国家自然科学基金国际合作与交流项目(81620108018);天津市科委重点项目(14ZCZDSY00044, 13RCGFSY19000)

作者简介 樊保佑(1990-),男,硕士在读,研究方向:脊髓损伤;通信作者:冯世庆, E-mail: sqfeng@tmu.edu.cn。

应用于外周神经损伤。因此本课题拟探究激活态和非激活态雪旺细胞在生物可降解 PCL 支架的生物相容性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料的制备** 通过静电纺丝制作 PCL 纤维支架。首先在室温条件下溶解 PCL 在由甲醇和氯仿组成的混合液(体积比为 1:5)中获得 15wt% 的 PCL 纺丝溶液。在常温常压环境下,将纺丝液加入纺丝管中,调节喷射流速为 6 mL/h,电场强度为+17 kV。PCL 纤维收集在一个 150 r/min 的旋转轴上,距离喷口 17 cm。将干燥的聚己内酯纤维膜用打孔器做成 6.5 mm 和 8 mm 大小备用。

**1.2 激活态雪旺细胞和非激活雪旺细胞培养** 实验分为两组:结扎坐骨神经来源的激活态雪旺细胞组和正常坐骨神经来源的非激活态雪旺细胞组。由 4 周龄 Wistar 大鼠提取雪旺细胞。结扎大鼠双侧坐骨神经,7 d 后将大鼠脱颈处死,75%乙醇浸泡 10 min,在超净台中,取出双侧坐骨神经和双侧臂丛神经。将坐骨神经和臂丛神经剪碎至 1 mm<sup>3</sup> 组织块,用胶原酶消化过夜,第 2 天终止消化,用增殖培养基(DMEM-F12、10%FBS、1%PS)种瓶。3 d 全量换液,7 d 传代。细胞传代至 P3 代进行染色鉴定和用于下一步实验。

**1.3 细胞鉴定** 将 4×10<sup>4</sup> 个细胞种在盖玻片上,放在 24 孔板中培养。第 3 天将细胞用 PBS 洗 3 遍,每遍 10 min,用 4%多聚甲醛固定 15 min 后,用 PBS 洗 3 次,每遍 10 min。加入封闭液(5% NGS+0.25% Triton-100),室温封闭 1 h,将多余液体吸出,然后加入一抗 S100(1:100)孵育液,4 ℃过夜。第 2 天,PBS 洗 3 次,每遍 10 min,加入二抗(FITC 标记的羊抗兔,1:500),放在暗盒中,室温 2 h。用 PBS 洗 3 次,每遍 10 min。加入 DAPI(100×),孵育 5 min 后,PBS 洗 3 次,封片。用荧光显微镜进行观察。

**1.4 细胞在 PCL 上的种植** 将 PCL 膜用 48 孔板打孔器做成圆形,用紫外线照射两面各 1 h 后,放于 48 孔板中,用硅胶环压住 PCL 膜,并用细胞培养基浸泡 2 h 备用。将 P3 代雪旺细胞用 Trison 消化成悬浮细胞,细胞密度为 4×10<sup>5</sup>/mL。在每个 PCL 膜上加 50 μL 细胞悬液,2 h 后,再加入 500 μL 细胞培养基。

**1.5 增殖检测** 设 1、2、3、4、5、6、7 d 时间点,每个时间点设 5 个平行孔。每天,将 48 孔板孔中细胞培养基吸出,滴加配好的 CCK-8 反应液(碧云天, C0037),150 μL/孔。放在 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中反应 1.5 h 后,每孔吸出 100 μL 加至 96 孔板,采用酶标仪检测各孔吸光度值(测量波长 450 nm,参

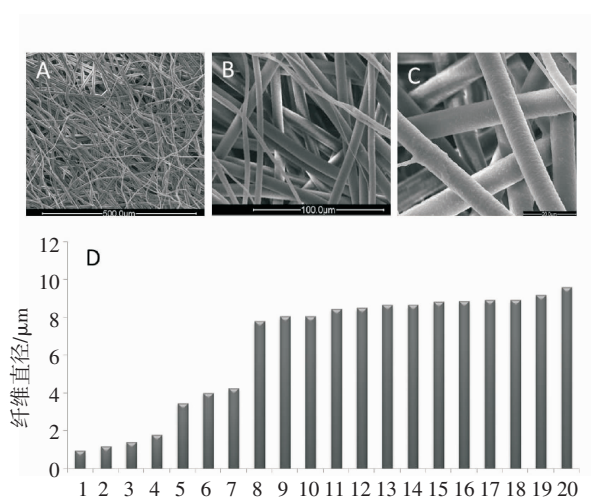
比波长 630 nm)。

**1.6 支架上细胞形态和功能检测** 将标本用 PBS 洗 2 遍,用 4%多聚甲醛固定 15 min 后,用 PBS 洗 3 次。加入封闭液,室温封闭 1 h。然后加入相应一抗,4 ℃过夜。第 2 天,PBS 洗 3 次后,加入相应二抗,室温 2 h。PBS 洗 3 次,加入 DAPI,孵育 5 min 后,PBS 洗 3 次。用激光共聚焦显微镜观察。一抗:S100/MBP;二抗:Cy3 标记的羊抗兔、FITC 标记的羊抗小鼠。结晶紫染色:将材料用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,然后滴加 200 μL 4%的多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 3 次,每次 10 min,滴加结晶紫染液至没过材料表面,5 min 后,PBS 洗净结晶紫染液。在倒置显微镜下进行观察。

**1.7 统计学分析** 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较用 *t* 检验,均数两两比较用 NewmanKeuls 方法。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 组织工程材料的性状** 本实验采用 PCL 作为支架材料,因为其稳定性和生物降解性。激光扫描电镜观察,纤维分布随机化,PCL 丝的平均直径为 8~10 μm(图 1)。



A、B、C 为不同放大倍数下的材料表面观察。D 为随机统计 20 根纤维的直径(μm)

图 1 PCL 支架的扫描电镜观察

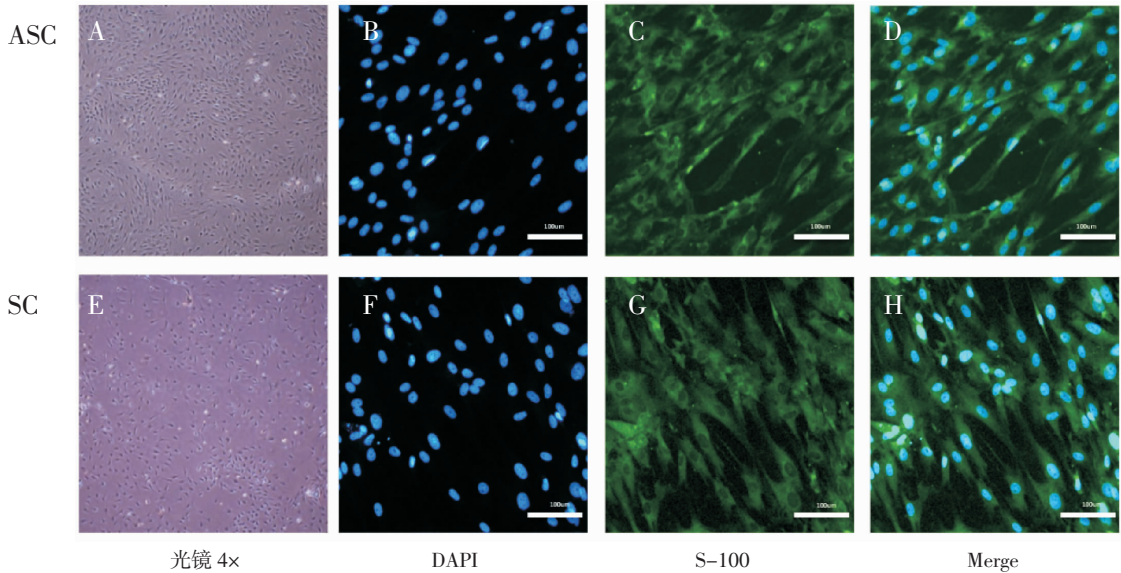
Fig 1 Observation of the scaffold by scanning electron microscopic

**2.2 细胞培养和细胞鉴定** 光镜下观察发现激活态雪旺细胞和非激活态雪旺细胞形态无明显差异,呈梭形或者三角形,激活态雪旺细胞增殖更快。将第 3 代激活态和非激活态雪旺细胞消化爬片 7 d 后,进行 S-100/DAPI 染色,通过免疫荧光显微镜观察,



发现激活态雪旺细胞阳性率达 (97.12±0.72)%,非激活态雪旺细胞阳性率达(96.20±0.79)%,两组细

胞纯度无差异( $P=0.08$ ),细胞形态在光镜下观察相同(图 2)。

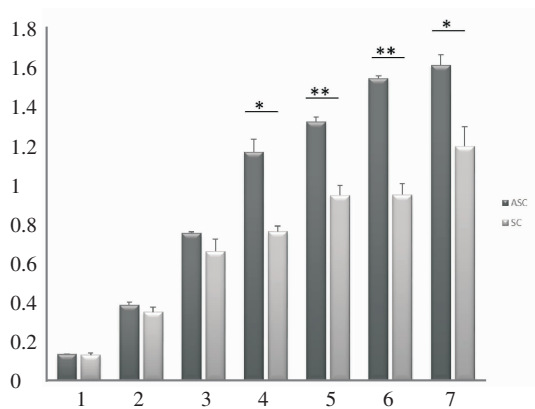


ASC:激活态雪旺细胞。A(光镜 4×)、B(DAPI)、C(s-100)、D(Merge)。SC:非激活态雪旺细胞。E(光镜 4×)、F(DAPI)、G(s-100)、H(Merge)

图 2 ASC 与 SC 的细胞鉴定

Fig 2 Identification of ASC and SC cells

2.3 激活态雪旺细胞与非激活态雪旺细胞在 PCL 上的增殖 将第 3 代激活态和非激活态雪旺细胞种植在 PCL 支架上进行 CCK-8 增殖检测。在 1~3 d, 激活态雪旺细胞和非激活态雪旺细胞增殖速率相近,但是在 3 d 后,激活态雪旺细胞增殖速率明显大于非激活态雪旺细胞,并且在第 5~6 天,非激活态雪旺细胞增殖趋于平稳,激活态雪旺细胞依然增殖明显。激活态雪旺细胞 7 d 达高峰(图 3)。



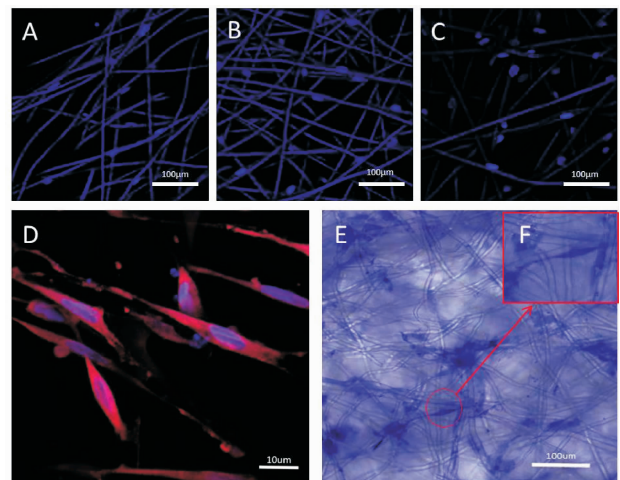
ASC:激活态雪旺细胞,SC:非激活态雪旺细胞( $\bar{x}\pm s$ )(\*\* $P<0.001$ ; \* $P<0.05$ )

图 3 激活态和非激活态雪旺细胞在 PCL 上的增殖

Fig 3 Proliferation of ASCs and SCs in PCL

2.4 激活态雪旺细胞在 PCL 上形态和功能观察 因激活态雪旺细胞的增殖和各种营养因子的表达高于非激活态雪旺细胞,因此对激活态雪旺细胞在

PCL 支架上的形态进行观察。通过 DAPI 染色,用激光共聚焦显微镜观察。激活态雪旺细胞能够粘附 PCL 支架上,1~7 d 细胞逐渐增多,并且激活态雪旺细胞能够长入 PCL 支架内部;通过 S-100/DAPI 染色观察发现细胞形态呈梭形或三角形,伸展良好。结晶紫观察发现激活态雪旺细胞多贴附纤维生长,纤维交叉处细胞较多(图 4)。

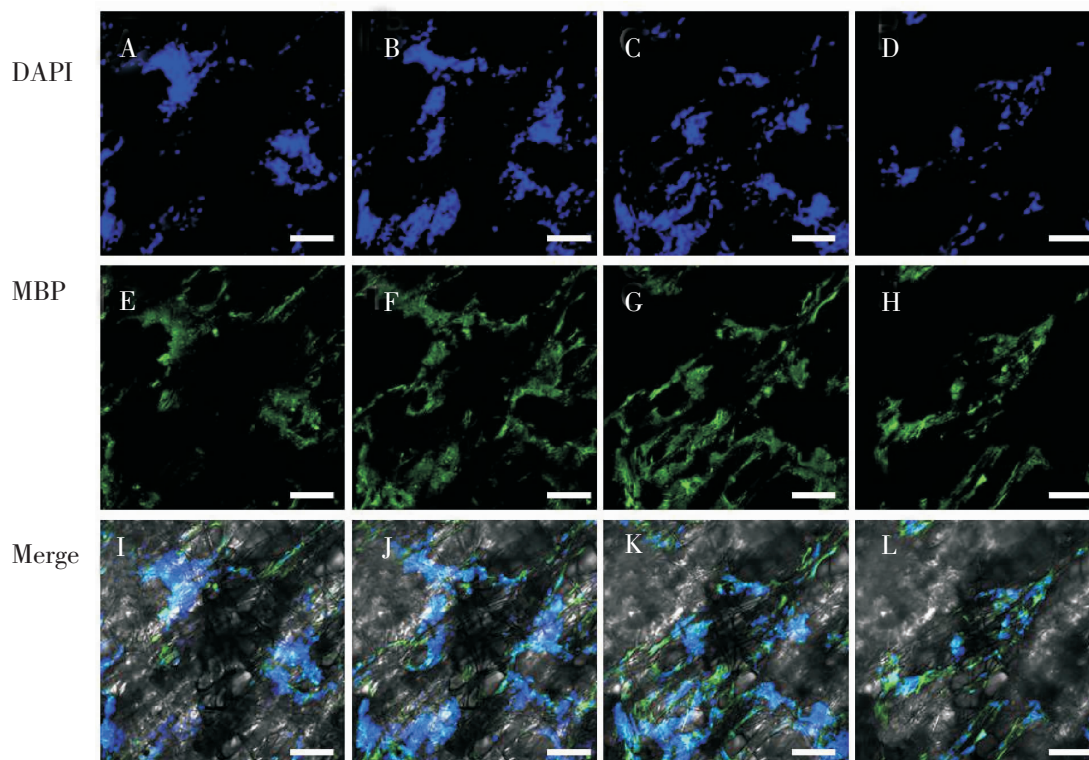


A-C 为 1、3、7 d 核染(DAPI);D 为 s-100/DAPI 染色;E-F 为 3 d 时结晶紫染色,F 为 E 图中红圈放大部分,可见雪旺细胞长轴紧贴 PCL 纤维生长

图 4 激光共聚焦显微镜及光镜观察激活态雪旺细胞在 PCL 上的粘附以及分布

Fig 4 To observe the adhesion and distribution of ASCs in PCL by confocal laser scanning microscopy and light microscopy

## 2.5 髓鞘碱性蛋白的表达 1 周后发现,激活态雪旺细胞在 PCL 材料中能够表达 MBP(图 5)。



A-L 为用共聚焦显微镜序列拍摄

图 5 培养 1 周后,激活态雪旺细胞在 PCL 能够表达 MBP

Fig 5 ASC could express MBP cultured in PCL for 1 week

## 3 讨论

外周神经损伤后,轴突轴膜开始崩解,髓鞘崩解,雪旺细胞向激活态转变,开始分裂增殖,并由受损神经的两端不断向受损处迁移,形成 Bungner 带,沿新生轴突并包裹形成髓鞘<sup>[14]</sup>。本研究通过结扎大鼠坐骨神经而达到预损伤坐骨神经的目的,7 d 后取结扎坐骨神经来源的激活态雪旺细胞为实验组,并取未结扎大鼠坐骨神经来源的雪旺细胞作为对照。细胞培养发现预损伤组雪旺细胞与对照组雪旺细胞形态无明显差异,预损伤组雪旺细胞较对照组雪旺细胞更易贴壁。S-100 染色发现两组阳性率差异无统计学意义。

聚己内酯纤维已应用于多种疾病的损伤修复。其特殊的碳链结构使其具有良好的柔韧性和可加工性,并且其具有生物可降解性,在体内和体外能够完全降解为水和二氧化碳,不会形成有毒物质对机体造成伤害。聚己内酯降解周期较长,因此可以为细胞提供长期的载体作用。静电纺丝技术合成的纤维直径在微米至纳米级别,并且随机排列的聚己内酯纤维能够有效模仿细胞外基质的外观形态。

检测材料对细胞毒性的方法有多种,本课题通

过 CCK-8 实验检测材料对细胞的毒性,同时检测细胞增殖。将两种细胞种植在 PCL 支架上,经过 CCK-8 检测发现,预损伤组的雪旺细胞在前 3 d 与对照组细胞增殖情况并无明显差异,但从第 5 天至第 7 天,预损伤组雪旺细胞增殖率明显高于对照组,并且预损伤组雪旺细胞增殖峰值要高于对照组。证明预损伤外周神经,髓鞘化的雪旺细胞激活,进入去分化状态,增殖加快。与之前研究发现雪旺细胞对损伤后的反应增殖加快结果相一致<sup>[15]</sup>。本研究还发现激活态雪旺细胞在 PCL 上能够成功表达 MBP,证明激活态雪旺细胞能够发挥为轴突提供髓鞘重要功能。以上结果证明 PCL 支架具有良好的生物相容性,并且与非激活态雪旺细胞相比,激活态雪旺细胞作为移植修复外周神经损伤的细胞更具有优势。

Bolaina-Lorenzo 等<sup>[16]</sup>用电纺丝/壳聚糖做成纳米支架与雪旺细胞共培养,虽然雪旺细胞能够很好地分布在支架上,但是纤维直径为  $(240 \pm 40)$  nm,细胞无法进入支架材料内部生长,无法形成有效的三维培养系统。也有研究应用电纺丝聚己内酯纤维联合胶原应用于外周神经损伤的修复<sup>[17]</sup>,同样形成的

缝隙不足以使细胞渗入材料中进行生长,不能够有效的形成三维培养系统。有研究应用 2.6~36.5  $\mu\text{m}$  的 PCL 纤维应用于神经再生组织工程,发现 58% 的细胞在 PCL 纤维上的偏离角小于 10 度,证明了 PCL 纤维支架对神经再生的导向作用,能诱导轴突的再生的潜能<sup>[18]</sup>。通常,适于细胞营养物质交换的孔径在 200  $\mu\text{m}$  以下,本研究采用的电纺丝技术能够产生较高孔隙率,PCL 纤维支架纤维直径主要集中在 8~10  $\mu\text{m}$ ,在培养 7 d 后,激活态雪旺细胞能够顺利长入材料中,并且雪旺细胞贴附在 PCL 纤维上生长,细胞长轴沿着纤维长轴分布,证明了 PCL 纤维支架的功能导向作用,但是本实验中所使用的 PCL 纤维支架的纤维是随机分布的,因此后期可以改变纤维排列顺序,进行定向诱导神经元轴突的伸展。

本课题对比了激活态雪旺细胞与非激活态雪旺细胞在聚己内酯纤维支架上的活性,发现激活态雪旺细胞与 PCL 支架更具有良好的生物相容性,为后期体内实验奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Armati P J, Mathey E K. An update on Schwann cell biology – immunomodulation, neural regulation and other surprises [J]. *J Neurol Sci*, 2013, 333(1/2):68
- [2] Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells [J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(1):51
- [3] Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level [J]. *Prog Neurobiol*, 2012, 98(1):16
- [4] 冯世庆. 雪旺细胞移植治疗脊髓损伤研究进展[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2004, 4(5):276
- [5] 冯世庆, 孔晓红, 孙振辉, 等. 大鼠神经干细胞与小鼠雪旺细胞混合培养的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(1):81
- [6] 周先虎, 郝岩, 冯世庆, 等. 激活态雪旺细胞源性神经营养因子对脐血间充质干细胞分化的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(4):719
- [7] Nagarajan R, Le N, Mahoney H, et al. Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(13):8998
- [8] Arthur-Farraj P, Latouche M, Wilton D, et al. C-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration [J]. *Neuron*, 2012, 75(4):633
- [9] Barrette B, Calvo E, Vallières N, et al. Transcriptional profiling of the injured sciatic nerve of mice carrying the Wld (S) mutant gene: identification of genes involved in neuroprotection, neuroinflammation, and nerve regeneration [J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(8):1254
- [10] Middleton J C, Tipton A J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(21):2335
- [11] Ng K W, Achuth H N, Mochhala S, et al. In vivo evaluation of an ultra-thin polycaprolactone film as a wound dressing [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2007, 18(7):925
- [12] Woodruff M A, Hutmacher D W. The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century [J]. *Prog Polym Sci*, 2010, 35(10):1217
- [13] Puppi D, Chiellini F, Dash M, et al. Biodegradable polymers for biomedical applications [M] // *Optical Detection Theory for Laser Applications* / Wiley-Interscience, 2002:424
- [14] Stoll G, Müller H W. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights [J]. *Brain Pathol*, 1999, 9(2):313
- [15] Jessen K R, Mirsky R, Lloyd A C. Schwann cells: Development and role in nerve repair [J]. *Csh Perspect Biol*, 2015, 7(7):a020487
- [16] Bolaina-Lorenzo E, Martinez-Ramos C, Monleon-Pradas M, et al. Electrospun polycaprolactone/chitosan scaffolds for nerve tissue engineering: physicochemical characterization and Schwann cell biocompatibility [J]. *Biomed Mater*, 2016, 12(1):015008
- [17] Jang C H, Lee H, Kim M, et al. Effect of polycaprolactone/collagen/hUCS microfiber nerve conduit on facial nerve regeneration [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93(Pt B):1575
- [18] Sharifi F, Patel B B, Dzuilko A K, et al. Polycaprolactone microfibrous scaffolds to navigate neural stem cells [J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(10):3287

(2016-12-31 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅