

成纤维细胞在壳聚糖/PHEA 水凝胶膜上的粘附与生长行为

朱爱萍¹ 王石泉² 成大明¹ 陈 强¹ 刘崇江¹ 沈 健^{1*} 林思聪¹

¹(南京大学表面和界面化学工程技术研究中心,²医药生物技术国家重点实验室,南京 210093)

关键词 壳聚糖, 聚- $\alpha,\beta,2$ -羟乙基-DL-天冬酰胺, 水凝胶, L929 细胞, 粘附与生长

中图分类号 O636.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)01-0109-03

水凝胶是一类广泛溶胀于水,呈三维网状结构的聚合物具有很高的生物相容性,广泛地用于生物材料,如眼球的晶状体、人造脏器以及人造皮肤等。高含水量的水凝胶不利于细胞粘附,研究能使细胞粘附并生长的水凝胶是开发其在组织工程材料领域应用的关键,细胞易于粘附的水凝胶可用于细胞培养基材和组织工程移植支架材料。一般来说,由于细胞表面带有负电荷,带正电荷的基材表面(如,多聚素(Polylysine))有利于细胞粘附,而带有酸性或中性基团的材料不利于细胞粘附^[1],而且带高负电荷密度的基材会导致细胞新陈代谢的紊乱并抑制细胞生长^[2]。

壳聚糖是一种天然阳离子聚糖,具有生物相容性。Popowicz 等报道上皮细胞可在壳聚糖膜上生长^[3],成纤维细胞可在胶原与壳聚糖混合膜上生长,引入壳聚糖可增加细胞粘附但会抑制细胞的生长^[4]。PVA 与壳聚糖共混形成的高弹性水凝胶,当壳聚糖的组分超过 15% (wt)时,L929 细胞在水凝胶上的贴壁率随壳聚糖含量增加而增加,当其组分达到 40% (wt)时细胞的粘附与生长超过胶原^[5,6]。本文首次采用壳聚糖与生物相容的 α,β -聚 2-羟乙基-DL-天冬酰胺(PHEA)共混形成水凝胶,改变两者的比例,调节水凝胶中水含量,并用细胞培养的方法研究了 L929 细胞在壳聚糖/PHEA 水凝胶上的粘附与生长行为。

1 材料与方 法

1.1 材料及来源

壳聚糖的脱乙酰度为 90%。聚- $\alpha,\beta,2$ -羟乙基-DL-天冬酰胺(PHEA)自制,合成方法参考文献^[7],25%的戊二醛溶液作为交联剂。

1.2 壳聚糖/PHEA 水凝胶膜的制备

将片状壳聚糖溶解于 0.2mol/L 的醋酸水溶液中,加入一定量的 PHEA 和戊二醛溶液(戊二醛用量为壳聚糖(mol)的 1%),磁力搅拌,将上述混合溶液铺展在培养皿中,室温干燥 24h,然后真空干燥 24h,将复合膜浸入 0.1mol/L NaOH 溶液中

2h,用去离子水充分漂洗。水凝胶中 PHEA 的含量分别为 5, 10,20,30 以及 40% (wt)。每种水凝胶简称 PHEA-X(X 代表 PHEA 的重量分数)。纯壳聚糖膜制备过程同上。聚苯乙烯(PS)培养皿(NUNC,Denmark)作为参照材料。

1.3 含水量测定

水凝胶膜中含水量(w)定义为当膜在水中溶胀平衡时水的重量分数。将膜浸在 20℃ 的水中,达到溶胀平衡时,将膜表面水吸干,准确称取溶胀膜(W_1),然后 105℃ 真空干燥至衡重,准确称取干燥膜(W),则 w 可通过下述公式计算:

$$w = (W_1 - W) / W \times 100\%$$

1.4 细胞培养

细胞选用 L929 细胞系,培养液为 DMEM(含有 10% 的小牛血清(Gibco,USA,1% 的双抗(Gibco,USA))。细胞在 5% CO₂ 浓度,99% 的相对湿度的 37℃ 培养箱中培养。

1.4.1 细胞粘附实验:将直径为 10mm 的水凝胶膜置于 24 孔板内,并在每个孔内加入 1mL 1×10^5 个细胞。细胞培养 24h,每个孔内加入 500 μ L 50% TCA 溶液,放入 4℃ 冰箱 1h 后,将膜用蒸馏水漂洗 5 次,然后计数。在倒置镜下($\times 100$)计数,至少取 5 个不同的区域,计数值由两组独立的实验平均得到。培养 24h 后拍摄细胞的形态。

1.4.2 MTT 法:在经壳聚糖及壳聚糖/PHEA 复合溶液涂覆处理(预涂方法与水凝胶的制备方法相同)的 96 孔板中,将细胞培养 20~72h,每个孔内加入 40 μ L 2.5mg/mL 的 MTT(四甲基偶氮唑盐)溶液,37℃ 恒温 4h,加入 10% SDS 溶液 100 μ L 终止反应,在培养箱中过夜,然后 570nm 下酶联免疫检测仪测定吸光值,吸光值正比于细胞数量。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖/PHEA 水凝胶膜

壳聚糖与 PHEA 分子链之间形成的氢键协同戊二醛对壳聚糖链的化学交联,结果使壳聚糖与 PHEA 形成半互穿网络结构的水凝胶。这一复合体系的形成机理类同于姚康德

收稿日期:2001-07-16,修回日期:2001-10-12。

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)项目基金资助(No. G1999064705)。

* 通讯作者。Tel:86-025-3594933;Fax:86-025-3594404;E-mail:Shenjian@nju.edu.cn

等报道的壳聚糖/聚酯形成的半互穿网络结构的水凝胶^[8]。壳聚糖与 PHEA 形成的水凝胶膜中水含量随 PHEA 的含量增加而增加,并在 50%~80% (wt) 范围内变化。

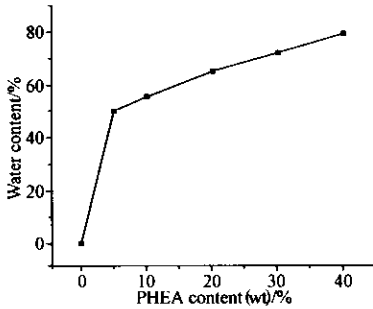


图 1 水凝胶膜中水含量与 PHEA 含量的变化关系

Fig. 1 Water content of the hydrogels as a function of PHEA content

2.2 细胞粘附

由表 1 可知,水凝胶中 PHEA 的含量对 L929 细胞的粘附影响很大,与壳聚糖的相对贴壁率 (R) 相比, PHEA-5 及 PHEA-10 的 R 值明显增大,这可能与 PHEA 中含有的酰胺基团密切相关。因为据研究表明,酰胺基团可以促进细胞的粘附与生长,Steel 等用各种含氮基团处理材料发现所有处理过的表面都支持细胞的粘附与生长,其中以酰胺单体处理过的

材料表面情况最好^[9]。而 PHEA-20, PHEA-30, PHEA-40 的值均大大减小,这个结果可能是因为当 PHEA 含量大于等于 20% 时,水凝胶中较高的含水量使得膜的接触角变小以及 PHEA 的复合使得膜的正电荷密度降低。因为只有合适的接触角和适当的电荷密度才有利于细胞粘附。这个结果表明,虽然高含量 PHEA 的复合使得膜中含有丰富的酰胺基团,但其带来的不合适的接触角和不适当的电荷密度因素最终起了主导地位,使得细胞不易在 PHEA 含量高的膜上粘附。

图 2 是培养 24h 后,不同样品上 L929 细胞的形态, PHEA-5, PHEA-10 及对照上的细胞大多呈现纺锤形,即已充

表 1 培养 24h 后各样品膜上粘壁 L929 细胞的计数结果

Table 1 Number of L929 fibroblasts on the sample surfaces after 24h of incubation

Sample	Number ($\times 10^4$) after 24h	Relative cell attachment (R/%)
PHEA-0	2.06 ± 0.2	39.6
PHEA-5	3.22 ± 0.3	61.9
PHEA-10	3.9 ± 0.3	75.0
PHEA-20	0.82 ± 0.3	15.8
PHEA-30	0.58 ± 0.5	11.2
PHEA-40	0.51 ± 0.3	9.8
Control	5.20 ± 0.5	100

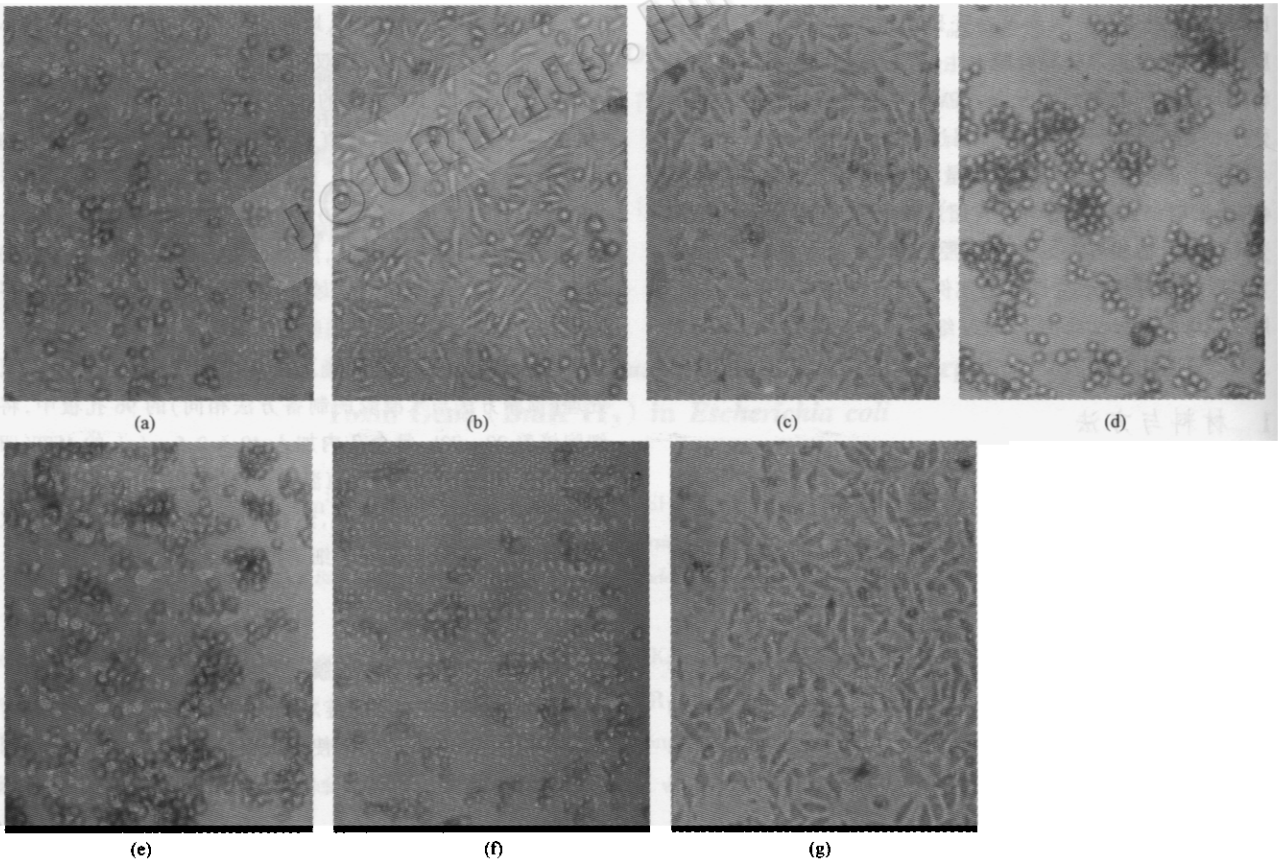


图 2 培养 24h 后 L929 细胞在各样品膜表面的形态

Fig. 2 Light micrographs of L929 fibroblasts adhering to: (a) Chitosan (b) PHEA-5 (c) PHEA-10 (d) PHEA-20 (e) PHEA-30 (f) PHEA-40 (g) Control taken at 24h after incubation

分铺展,而 PHEA-20, PHEA-30, PHEA-40 上的细胞绝大多数呈现圆形,细胞没有铺展。结合表 1 和图 2 结果可知,壳聚糖与 PHEA 形成一定含水量的水凝胶有利于细胞贴壁和铺展;高含水量的水凝胶不利于细胞粘附,即使粘附的细胞也不铺展。

2.3 细胞生长

MTT 染色深浅反应了活细胞数量多少。图 3 是细胞在不同样品膜上的培养时间与 570nm 下酶联免疫检测仪测定的吸光值的关系曲线。

由图 3 可知,细胞在壳聚糖及其水凝胶上的生长行为与对照样上的没有明显区别,这个结果可能是因为壳聚糖及聚天冬酰胺皆为生物相容性材料,都能不同程度地支持细胞的生长;其次是因为细胞是否在材料表面粘附对 L929 细胞系的生长影响不大,悬浮的细胞也能生长。有关粘附后才能生长的原代细胞如骨髓基质干细胞在这一复合膜上的粘附与生长行为正在研究之中。

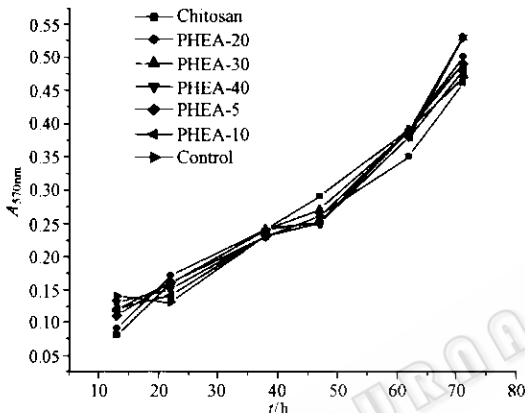


图 3 L929 细胞在不同样品上的生长曲线

Fig.3 Growth curves of fibroblast cells on samples

3 结论

PHEA 与壳聚糖形成低水含量的水凝胶有利于细胞的

粘附,高水含量的水凝胶抑制细胞的粘附。L929 细胞在壳聚糖以及壳聚糖/PHEA 复合水凝胶膜上的生长不受 PHEA 含量的影响。PHEA-5 及 PHEA-10 水凝胶能促进细胞的粘附,并能支持 L929 细胞的生长,可以用来选做细胞培养基材,或组织工程移植支架材料。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Macieira Coelho A, Berumen L, Avrameas S. Properties of protein polymers as substratum for cell growth *in vitro*. *J Cell Physiol*, 1974, **83**:379 ~ 388
- [2] Iio K, Minoura N, Aibo S, Nagura M, Kodama M. Cell growth on poly (vinyl alcohol) hydrogel membranes containing biguanido groups. *J Biomed Mater Res*, 1994, **28**:459 ~ 462
- [3] Popowicz P, Kuzycza J, Dolinska B, Popowicz J. Cultivation of MD-CK epithelial cells on chitosan membranes. *Biomed Biochim Acta*, 1985, **44**:1329 ~ 1333
- [4] Izume M, Taira T, Miyata T. A novel cell culture matrix composed of chitosan and collagen complex in chitin and chitosan, G. Skjackson-Break, T. Authonsen, and P. Sandford (eds.) Elsevier Applied Science, London, 1989, pp. 653
- [5] Koyano T, Minoura N, Nagura M *et al*. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on PVA/Chitosan-blended hydrogels. *J Biomed Mater Res*, 1998, **39**:486 ~ 490
- [6] Chuang Wen-Yuan, Young Tai-Horng *et al*. Properties of the poly (vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast *in vitro*. *Biomaterials*, 1999, **20**(16):1479 ~ 1487
- [7] Neri P, Antoni G, Benvenuti F, Coccola F, Gazzei G. Synthesis of α , β -poly[(2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide], a New Plasma Expander. *J Med Chem* 1973, **16**(8), 893 ~ 897
- [8] Yao K D, Peng T, Feng H B *et al*. Swelling kinetics and release characteristic of crosslinked chitosan polyether polymer network (Semi-IPN) hydrogels. *Journal Polymer Science (Part A, Polymer Chemistry)*, 1994, **32**:1213 ~ 1223
- [9] Suzuki M, Kishida A, Iwata H *et al*. Graft copolymerization of acrylamide onto a polyethylene surface pretreated with a glow discharge. *Macromolecules*, 1986, **19**:1804 ~ 1808

Attachment and Growth of Cultured Fibroblast Cells on Chitosan/PHEA-blended Hydrogels

ZHU Ai-Ping¹ WANG Shi-Quan² CHENG Da-Ming¹ CHEN Qiang¹ LIU Chong-Jiang¹ SHEN Jian^{1*} LIN Si-Cong¹

(¹ Department of Polymer Science and Engineering, ² National Key Lab of Pharmaceutical biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract The chitosan/PHEA-blended hydrogels were prepared from PHEA and chitosan in various blend ratios. The water contents of the hydrogels were in the range of 50% ~ 80% (wt). The attachment and growth of fibroblast cells(L929) on the hydrogels were studied. The results indicated the PHEA content in hydrogels has great effect on cell attachment but has little effect on the growth of L929 cells.

Key words chitosan, PHEA, hydrogel, L929 cells, cell attachment and growth

Received:07-16-2001

This work was supported by a grant from the Special Funds for Major State Basic Research (973) of China (No.G1999064705).

* Corresponding author. Tel:86-25-3594933; Fax:86-25-3594404; E-mail:Shenjian@nju.edu.cn