

壳聚糖和明胶材料对血管平滑肌细胞的作用

张鲁华, 杨飞, 公衍道, 赵南明, 张秀芳

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 壳聚糖是一种具有发展前景的生物材料。研究了不同脱乙酰度壳聚糖、明胶及壳聚糖与明胶共混材料对血管平滑肌细胞生长的促进作用。在不同材料上培养细胞, 采集培养后第1天和第5天的图像, 在培养24、72、120 h时做MTT实验。此外, 还用酶联免疫检测(ELISA)方法测量了材料吸附细胞外基质蛋白的数量, 探讨细胞外基质蛋白在血管平滑肌细胞与材料相互作用中所起的作用。结果表明脱乙酰度高的壳聚糖材料能较好地促进血管平滑肌细胞的粘附、铺展和生长, 可能是一种具有一定应用前景的血管组织工程研究用材料。

关键词: 壳聚糖; 脱乙酰度; 细胞外基质蛋白; 明胶; 血管平滑肌细胞

中图分类号: Q6

1 引言

甲壳素是一种天然高分子化合物, 属于多糖, 其化学名是 β -(1 \rightarrow 4)聚-2-乙酰氨基-2-D-葡萄糖, 是由N-乙酰氨基葡萄糖以 β -1, 4糖苷键缩合而成。壳聚糖是甲壳素N-脱乙酰基的产物, 一般而言, N-乙酰基脱去55%以上的就可以称为壳聚糖。壳聚糖是一种具有优良生物相容性的生物可降解材料, 壳聚糖在哺乳动物体内可被溶菌酶降解, 降解产物是氨基糖。氨基糖可进入糖胺聚糖和糖蛋白的代谢循环, 也可以排出体外^[1]。人们越来越多地把壳聚糖应用于组织工程研究, 如心肌内皮细胞和上皮细胞^[2,3]、成纤维细胞^[4]、肝细胞^[5]、软骨细胞和角质形成细胞^[6]以及神经细胞^[7]的生物相容性研究等。全世界每年有相当数量的心血管病患者需要血管移植, 临床上主要使用隐静脉作为移植材料。但是有30%~40%的患者缺乏足够的隐静脉^[8], 这就使得血管组织工程成为一种需要。目前血管组织工程研究的主要方法是在体外的支架材料上培养血管平滑肌细胞和血管内皮细胞, 形成有功能的血管, 然后植入体内。本实验研究不同脱乙酰度壳聚糖、明胶及壳聚糖与明胶共混等材料对血管平滑肌细胞的生物学作用, 为筛选可以作为血管组织工程研究用的材料奠定基础。

细胞在材料表面的生长、增殖和分化的速度取决于细胞在材料表面初次贴壁和铺展的情况。

而细胞贴壁和铺展情况则受几个因素的影响, 一是材料的表面理化性质和超微结构, 再就是细胞外基质蛋白(ECM)中的粘连蛋白, 如纤粘连蛋白(fibronectin)和层粘连蛋白(laminin)。血清中含有的ECM分子可以非特异地吸附在材料表面, 然后与细胞膜表面受体整联蛋白(integrin)结合, 影响细胞行为^[9]。不同ECM分子在不同材料上的吸附情况是不一样的^[10]。本实验用ELISA方法研究纤粘连蛋白和层粘连蛋白在不同材料上吸附量的差异, 从而探讨细胞外基质蛋白在血管平滑肌细胞与材料相互作用中所起的作用。

2 材料与方法

2.1 材料的制备

我们使用以下几种材料:

Chi73: 1 g 脱乙酰度为73.3%的壳聚糖(国家海洋局第三研究所)溶于100 ml 1%乙酸溶液, 充分溶解后制得。

Chi85: 1 g 脱乙酰度为85%的壳聚糖(Sigma)溶于100 ml 1%乙酸溶液, 充分溶解后制得。

收稿日期: 2003-03-03

基金项目: 国家重大基础研究项目(973) (G1999064702)和国家863计划项目(2001AA625060)

通讯作者: 张秀芳, 电话: (010) 62783261, 传真: (010) 62794214, E-mail: zxf-dbs@mail.tsinghua.edu.cn

Chi96: 1 g 脱乙酰度为 96.3% 的壳聚糖 (国家海洋局第三研究所) 溶于 100 ml 1% 乙酸溶液, 充分溶解后制得。

以上三种壳聚糖材料的表观粘度 $[\eta]$ 、粘度平均分子量 (Mv) 和脱乙酰度 (DD) 见表 1。

Table 1 Physicochemical characteristics of various chitosan samples

	Chi73	Chi85	Chi96
$[\eta]$ (mPa · s)	205	670	218.5
Mv $\times 10^5$ (g/mol)	2.72	9.72	2.91
DD (%)	73.3%	85%	96.3%

Chi852: 2 g 脱乙酰度为 85% 的壳聚糖 (Sigma) 溶于 100 ml 1% 乙酸溶液, 充分溶解后制得。

Gel: 0.2 g 明胶 (北京化学试剂公司) 溶于 100 ml 去离子水制得。

Gel9: 0.91 g 明胶 (北京化学试剂公司) 溶于 100 ml 去离子水制得。

GC: Chi85 与 10% 明胶溶液 (W/V) 以 10:1 (V/V) 的比例混合均匀。

TCD: 空白的细胞培养板 (Costar)。

以上壳聚糖和明胶材料的溶液加入细胞培养板后, 50℃ 烘干, 用 80% 乙醇洗至中性。使用前紫外线消毒 12 h 以上, 然后用无菌去离子水平衡 30 min, 最后用 DMEM 培养基平衡 2 h。

本文中未特别指出的试剂均为国产分析纯。

2.2 ELISA

配制 10 mg/L 纤粘连蛋白和层粘连蛋白 (北京大学医学部) 溶液和 10% 胎牛血清 (Hyclone) 作为抗原溶液。在铺好材料的 96 孔酶标板 (Costar) 上逐孔加入 200 μ l 抗原溶液, 37℃ 下温育 1 h, 弃去上清后, 用洗涤液 PBS-T (PBS-0.05% Tween20), 洗三遍, 每次 15 min。加入 200 μ l 封闭液 (0.5% BSA-PBS), 常温下封闭 2 h。弃去上清并洗涤后, 阳性孔中加入 200 μ l 一抗溶液 (北京大学医学部), 阴性对照孔中加入 200 μ l 的 PBS, 常温下温育 2 h。弃去上清并洗涤后, 加入 200 μ l 羊抗兔 IgG-HRP (北京中山生物技术公司), 常温下再温育 1.5 h。弃去上清并洗涤后, 逐孔加入邻苯二胺底物溶液 200 μ l, 避光反应 15 min 后, 加入 50 μ l 的 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪 (Biorad Model 550) 测 A₄₉₀。

2.3 血管平滑肌细胞的培养

血管平滑肌细胞 (VSMC) 购自协和医科大学基础医学细胞中心, 使用第 6~8 代, 接种密度为 2×10^4 cells/ml。所用培养基为高糖 DMEM (Hyclone) + 10% 胎牛血清 (Hyclone)。用上述配制好的材料溶液在 24 孔板 (Costar) 上铺膜, 每孔加入 0.5 ml 细胞悬液于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。接种 24 h 后换液, 然后每 48 h 换一次液。

2.4 细胞图像采集和 MTT 实验

采集细胞在 24 孔板上培养第 1 天和第 5 天的图像。

细胞在 24 孔板上培养到 24、72 和 120 h 时, 去掉培养基, 加入新的培养基, 再逐孔加入 100 μ l MTT (Sigma) 溶液 (5 g/L), 继续温育 4 h, 最后弃去上清, 每孔加入 500 μ l DMSO, 振荡 10 min, 将溶液吸入 96 孔板, 每孔 100 μ l, 用酶标仪测 A₅₇₀。

3 实验结果

3.1 ELISA 法测材料对胞外基质蛋白的吸附量

图 1 为各种材料从纤粘连蛋白溶液中吸附纤粘连蛋白, 从层粘连蛋白溶液中吸附上层粘连蛋白, 以及从血清中吸附纤粘连蛋白和层粘连蛋白的实验结果。由图 1 可知各种材料从纤粘连蛋白溶液中吸附的纤粘连蛋白的量都比较大。对层粘连蛋白溶液中的层粘连蛋白的吸附情况是 Chi73、Chi85 和 Chi852 这三种材料吸附的量大于 Chi96, Gel、Gel9 和 GC 这三种材料吸附的量则小于 Chi96。对血清中的纤粘连蛋白吸附差别较大, Chi73、Chi85 和 Chi852 这三种材料吸附的量小于 Chi96,

Gel、Gel9 和 GC 这三种材料吸附的量则大于 Chi96。Chi96 对血清中的层粘连蛋白吸附量最少。

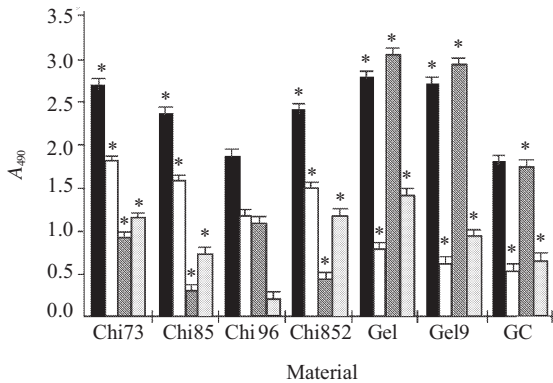


Fig.1 The adsorption of ECM proteins on all materials. FF-adsorption of fibronectin from fibronectin solution; LL-adsorption of laminin from laminin solution; SF-adsorption of fibronectin from serum; SL-adsorption of laminin from serum. $n=6$; Asterisk indicates statistically significant differences ($P<0.05$) relative to Chi96

■:FF; □:LL; ▨:SF; ▩:SL

3.2 在材料上培养血管平滑肌细胞的图像

图 2 为在各种材料上培养 VSMC 第 1 天的照片。由照片可知在细胞培养的第 1 天，细胞在 Chi73 和 Chi85 两种材料上铺展情况较差，而在 Chi96 上则铺展生长得较好，最接近 TCD 上的细胞。Chi852 要优于 Chi85。Gel、Gel9 和 GC 上的细胞数量较多，但与 TCD 上的细胞相比，细胞铺展不够，一部分细胞不是典型的纺锤体形。

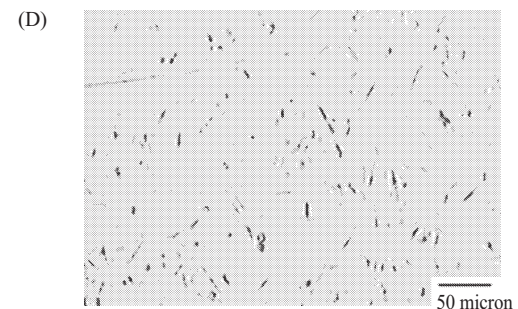
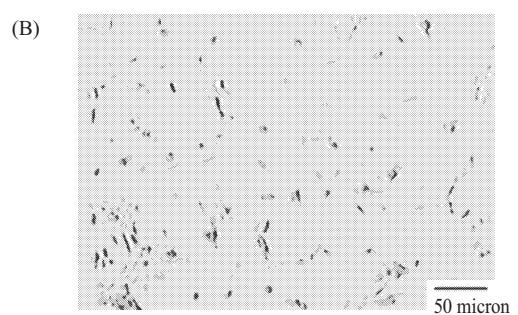
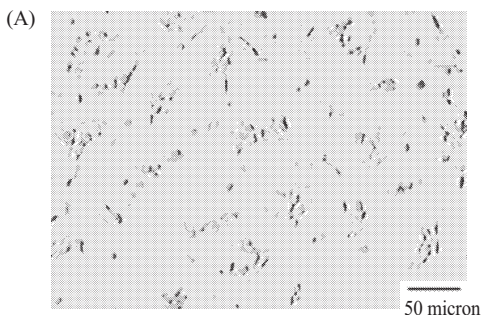


图 3 为在各种材料上培养 VSMC 第 5 天的照片。由照片可知在细胞培养的第 5 天，细胞已经铺满大多数材料。Chi73 和 Chi85 上细胞数量较少、非纺锤体形的细胞较多。Chi96 和 TCD 上细胞生长情况最好。Chi852 要优于 Chi85。Gel、Gel9 和 GC 上的细胞生长情况较好，但与 TCD 上的细胞相比，细胞分布不是特别均匀，细胞形状不是特别一致。

3.3 MTT 实验测血管平滑肌细胞在材料上的粘附与生长情况

图 4 为在不同脱乙酰度壳聚糖材料上培养的 VSMC 的 MTT 实验结果，Chi96 上的细胞数量自始至终都高于 Chi73 和 Chi85。

图 5 为在明胶材料上培养的 VSMC 的 MTT 实验结果。Gel、Gel9 和 GC 上的细胞数量都比较多，Gel9 上的更多一些。

图 6 为在相同脱乙酰度但浓度不同的壳聚糖材料上培养的 VSMC 的 MTT 实验结果。Chi852 和 Chi85 上的细胞数量自始至终差别不大。

4 讨 论

在 ELISA 实验中，吸光度 A_{490} 并不代表材料表面吸附蛋白的绝对数量，而是代表能被抗体识别的蛋白的吸附量，即在一定程度上保持其天然结构的蛋白的吸附量。各种材料对蛋白溶液和血清中相同蛋白的吸附情况大不相同，可能主要是因为血清中多种蛋白竞争性吸附的结果。根据

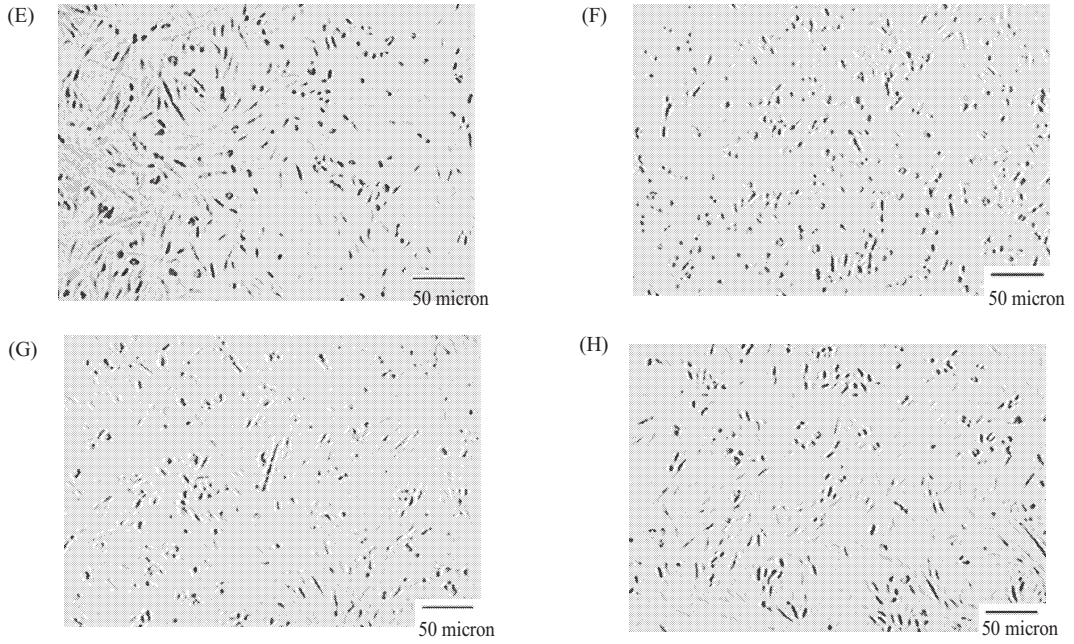
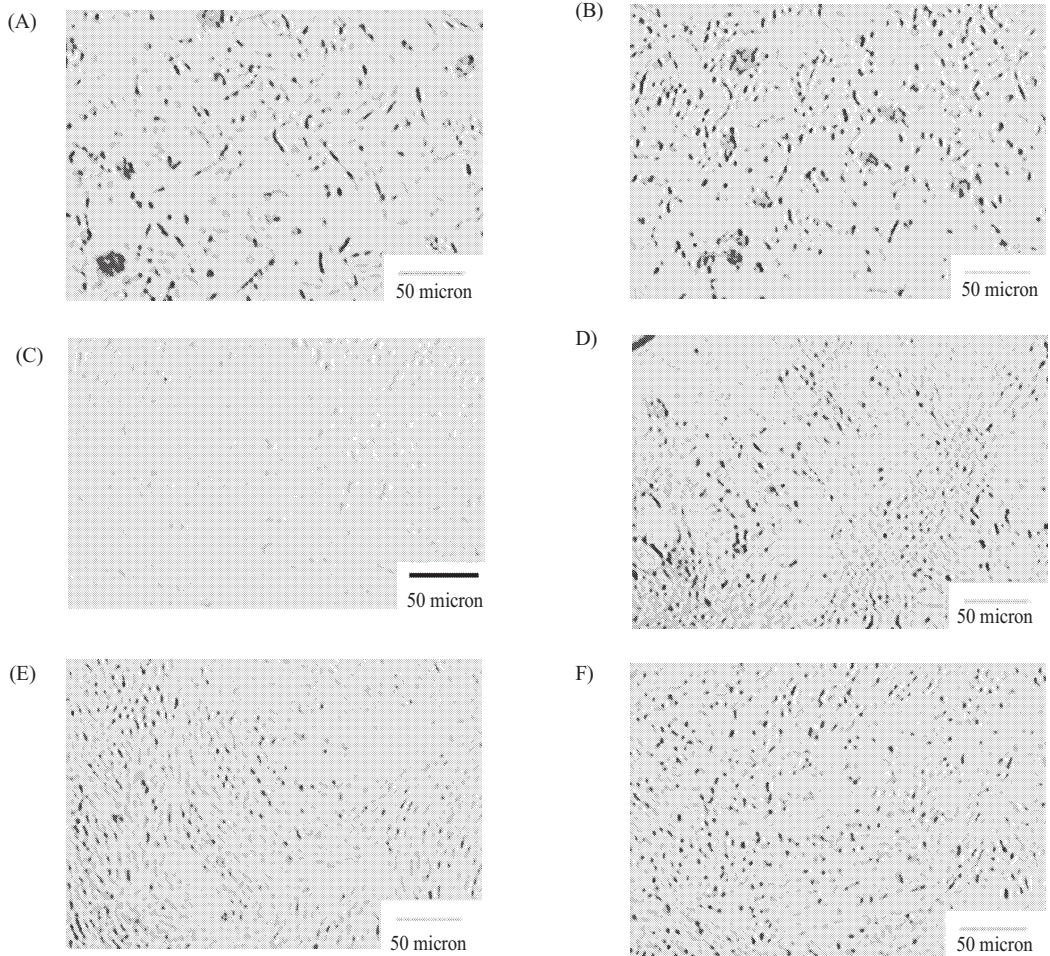


Fig.2 Photomicrographs of VSMC cells cultured for 1 day on various materials: (A) Chi73; (B) Chi85; (C) Chi96; (D) Chi852; (E)Gel; (F) Ge19; (G) GC; (H) TCD



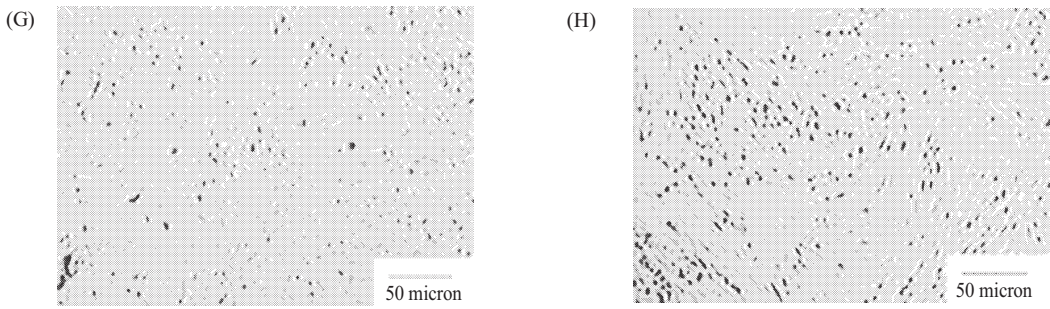


Fig.3 Photomicrographs of VSMC cells cultured for 5 days on various materials: (A) Chi73; (B) Chi85; (C) Chi96; (D) Chi852; (E) Gel; (F) Gel9; (G) GC; (H) TCD

Borkenhgen等^[11]的研究结果, 纤粘连蛋白有多个功能域, 其中一些可以直接与 I - IV型胶原结合, 而且纤粘连蛋白结合变性胶原(明胶)的能力远强于结合天然胶原的能力。这在一定程度上解释了 ELISA 实验中 Gel、Gel9 和 GC 三种材料吸附纤粘连蛋白较多的现象。材料表面的正电荷有助于加强材料与蛋白的相互作用, 从而使材料吸附细胞外基质蛋白^[12], 这是壳聚糖材料吸附细胞外基质蛋白的原因之一。结合细胞图像和 MTT 实验结果看, 吸附血清中纤粘连蛋白较多的材料, 细胞粘附、铺展和生长情况较好。细胞生长情况与材料对层粘连蛋白吸附情况的关系不甚明显。其他细胞外基质蛋白, 如玻粘连蛋白在材料与细胞的相互作用中也起着重要作用^[13]。因此, 需要结合材料对其他细胞外基质蛋白的吸附情况, 才能对细胞在材料上的粘附、铺展和生长情况与材料吸附细胞外基质蛋白情况的关系做出更好的解释。

MTT 实验结果代表细胞在材料上的代谢活

力。细胞在材料上的粘附、铺展与生长受多种因素的影响, 其中包括材料的理化性质, 材料表面吸附的细胞外基质粘附分子的量等。材料表面的粗糙程度、孔径和表面形貌也会影响细胞的粘附、铺展和生长^[14]。材料表面的正电基团能促进材料对细胞的粘附^[15]。光镜下 Chi73、Chi85 和 Chi96 的膜都比较光滑, 粗糙程度和表面形貌差别不大。细胞在 Chi96 上的粘附、铺展和生长情况大大优于在 Chi73 和 Chi85 上的情况, 这可能主要是因为 Chi96 上的氨基离子较多, 因而正电荷密度也较大的缘故。这可以从以下三个方面进行解释。第一, 材料表面的正电荷有助于加强材料与蛋白的相互作用, 从而使材料吸附更多的细胞外基质蛋白^[12]。吸附蛋白分子有利于材料对细胞的粘附。细胞被粘附在材料表面后, 会分泌一些细胞外基质蛋白, 进一步促进细胞在材料上的粘附。第二, 氨基离子可以与细胞膜表面和细胞外基质中的一些负离子基团发生离子相互作用, 从而促进细胞在材料上的粘附、铺展与生长^[16]。第三, Invi 等^[17]

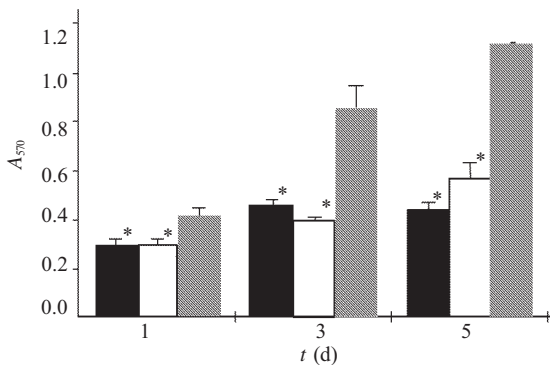


Fig.4 Growth of VSMC cells on different deacetylation chitosan materials. $n=6$; Asterisk indicates statistically significant difference ($P<0.05$) relative to Chi96

■ : Chi73; □ : Chi85; ▨ : Chi96

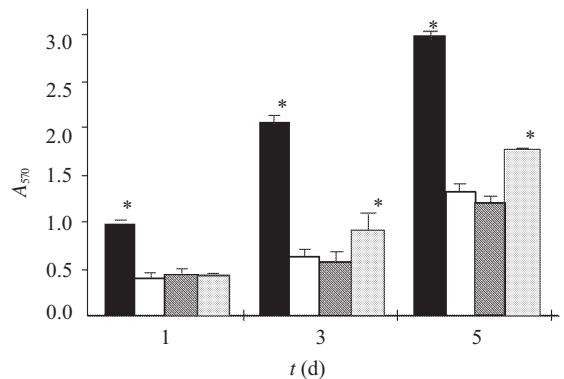


Fig.5 Growth of VSMC cells on different gel materials. $n=6$; Asterisk indicates statistically significant difference ($P<0.05$) relative to Gel

■ : TCD; □ : GEL; ▨ : GC; ▩ : GEL9

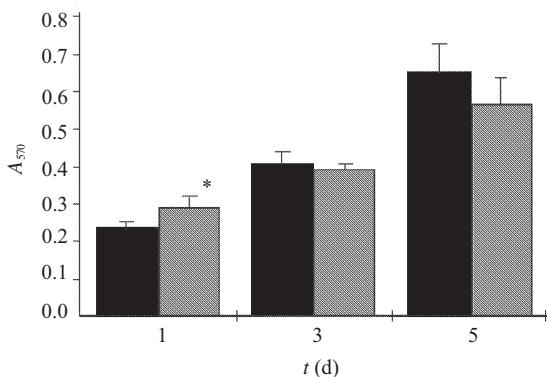


Fig.6 Growth of VSMC cells on the chitosan materials made with different concentration chitosan solutions. $n=6$; Asterisk indicates statistically significant difference ($P<0.05$) between the two materials.

■ : Chi85; ■ : Chi852

的研究表明壳聚糖的寡聚糖在血清中含有的血小板源生长因子 (PDGF) 的作用下, 可以与 VSMC 表面的受体相互作用, 促进细胞的生长, 这需要 4 个或 4 个以上的氨基葡萄糖。壳聚糖的脱乙酰度越大, 氨基葡萄糖的含量百分比越高, 局部形成 4 个或 4 个以上的氨基葡萄糖的可能性增大, 从而也促进了细胞的生长。因此, 壳聚糖的脱乙酰度越大, VSMC 生长情况越好。脱乙酰度高的壳聚糖材料可作组织工程血管支架的深层材料。

明胶是胶原水解后的产物, 其结构与胶原蛋白结构类似, 其中含有 Arg-Gly-Asp (R-G-D) 细胞结合结构域, 能够与细胞膜上的受体整联蛋白 (Integrin) 作用, 促进细胞的贴壁。Gel、Gel9 和 GC 三种材料吸附纤粘连蛋白较多, 也促进了 VSMC 的粘附与生长。Gel 和 Gel9 上的细胞虽然形状不是特别一致, 但数量甚至比 Chi96 上还多。因此明胶的 VSMC 的生物相容性较好, 但是明胶成膜后降解非常快, 无法在上面长期培养细胞, 因此不能用于组织工程研究中。GC 成膜较好, 与壳聚糖类似, 但是细胞的生长情况优于 Chi85, 而更接近明胶。原因可能是 GC 是壳聚糖与明胶的混合物, 壳聚糖分子的自由氨基能够与明胶的侧链相互作用, 改变壳聚糖的性质, 使 GC 膜的生物学性质与明胶更为相似。

从 MTT 实验结果来看, 细胞在由相同脱乙酰度但浓度不同溶液制备的壳聚糖材料上的数量没有显著的差别, 这是在意料之中的。但是从细胞图像看, Chi852 要优于 Chi85。这可能是浓度不

同的溶液成膜情况有差异造成的, 这需要进一步的研究。

壳聚糖可以很好地支持血管内皮细胞的生长^[12]。由本文实验结果可知, 不同脱乙酰度壳聚糖、明胶和壳聚糖与明胶共混材料都有良好的生物相容性, 在体外可以支持 VSMC 的生长。Chi96 和 GC 这两种材料不仅对 VSMC 有较好的亲和性, 而且成膜情况较好, 可能是具有一定应用前景的血管组织工程研究用材料。

参考文献:

- [1] Pangburn SH, Trescony PV, Heller J. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*, 1982,3:105~108
- [2] Malette WG, Quigley HJ, Adickes ED. Chitosan effect in vascular surgery, tissue culture and tissue regeneration. In: Muzzarelli RAA, Jeuniaux C, Goodday GW. Chitin in nature and technology. New York: Plenum press, 1986. 435~442
- [3] Popowicz P, Kurzyca J, Dolinska B, Popowicz J. Cultivation of MDCK epithelial cells on chitosan membranes. *Biomed Biochim Acta*, 1985, 44:1329~1333
- [4] Izume M, Taira T, Kimura T. A novel cell culture matrix composed of chitosan and collagen complex. In: Sajak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P. Chitin and chitosan. Amsterdam: Elsevier Applied Sciences, 1989. 653~666
- [5] Elcin YM, Dixit V, Lewin K, Gitnick G. Xenotransplantation of fetal porcine hepatocytes in rats using a tissue engineering approach. *Artif Organs*, 1999,23:146~152
- [6] Denuziere A, Ferrier D, Damour O, Damour A. Chitosan chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials*, 1998, 19:1275~1285
- [7] Yang F, Li XH, Cheng MY, Gong YD, Zhao NM, Zhang XF. Performance modification of chitosan membranes induced by gamma irradiation. *Journal of Biomaterials Applications*, 2002, 16(3):215~226
- [8] Moneta GL, Porter JM. Arterial substitute. In: Sabiston DC. Review of surgery. PA: Sanders Philadelphia, 1992. 540~548
- [9] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 2000. 97~105
- [10] Horbett TA. Principles underlying the role of adsorbed plasma

- proteins in blood interactions with foreign materials. *Cardiovasc Pathol*, 1993,2:137s~148s
- [11] Borkenhgen M, Clemence JF, Sigrist H, Aebischer P. 3-Dimensional extracellular-matrix engineering in the nervous-system. *Journal of Biomedical Material Research*, 1998, 40:392~400
- [12] 龚海鹏, 钟映辉, 公衍道, 赵南明, 张秀芳. 多聚赖氨酸改性壳聚糖对神经细胞的作用. *生物物理学报*, 2002, 16(3): 553~560
- [13] Janeta N, David JM. Smooth muscle adhesion to tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 2000, 21:2025~2032
- [14] Lampin M, Warocquier-Clerout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of biomedical materials Research*, 1997, 36:99~108
- [15] Hamano T, Suzuki H, Teramoto A, Lizuka E, Abe K. Functional culture of human periodontal fibroblast (HPLF) on polyelectrolyte complex (PEC). *Pure Appl Chem*, 1998, A35(3):439~455
- [16] Sipehia R. X-ray photoelectron spectroscopy studies, surface tension measurements, immobilization of human serum albumin, human fibrinogen and human fibronectin onto ammonia plasma treated surfaces of biomaterials useful for cardiovascular implants and artificial cornea implants. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol*, 1993, 21: 647~658
- [17] Inui H, Tsujikubo M, Hirano S. Low molecular weight chitosan stimulation of mitogenic response to platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59: 2111~2114

CULTIVATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS ON CHITOSAN AND GELATIN FILMS

ZHANG Lu-hua, YANG Fei, GONG Yan-dao, ZHAO Nan-ming, ZHANG Xiu-fang

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Chitosan, a positively charged polysaccharide, has shown to be a structural material of promise for a number of tissue engineering applications. The role of the degree of deacetylation (DD) on some biological properties of chitosan films was investigated in vitro. The potential of chitosan, gelatin, and gelatin-chitosan complex materials for controlling the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) was also evaluated. Material films were seeded with VSMC for culture up to 7 d. In 1 and 5 d culture, phase contrast microscopic images of the cells on each surface were digitally captured. Cell growth was evaluated by the MTT assay at 24, 72 and 120 h. The results indicate that all materials were biocompatible with VSMC and VSMC proliferation increased when the DD of chitosan films increased. In conclusion, DD plays a profound role in VSMC cell adhesion and proliferation.

Key Words: Chitosan; Degree of deacetylation; Extracellular matrix proteins; Gelatin; Vascular smooth muscle cell