

电纺纤维的刚度对 iPS-MSCs 黏附和迁移的影响

余哲泡, 袁卉华, 易兵成, 王先流, 张赵文斌, 张彦中
(东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620)

摘要 采用退火处理方法调控电纺聚左旋乳酸(PLLA)纤维的刚度,研究了纤维刚度变化对诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(iPS-MSCs)的形貌、增殖和迁移行为的影响.结果表明,退火处理对纤维的直径影响不大[退火前(1.26 ± 0.25) μm ,退火后(1.24 ± 0.26) μm],但提高了纤维结晶度和力学性能,导致纤维刚度增加1.73倍.将iPS-MSCs在退火处理的纤维支架上培养24 h后的细胞骨架铺展面积及7 d后的细胞增殖分别是未处理前的1.78和1.18倍.纤维刚度的提高影响iPS-MSCs的迁移并促进迁移相关基因 *Integrin β 1*, *RhoA* 和 *Rock1* 的表达上调.通过退火处理提高电纺 PLLA 纤维刚度可作为仿生支架构建中调控细胞生物功能的一个重要手段.

关键词 电纺纤维; 纤维刚度; 诱导多能干细胞来源的间充质干细胞; 细胞黏附; 细胞迁移

中图分类号 O631; R318.08

文献标志码 A

细胞迁移是机体内普遍存在的一种生理过程,对生命活动中的许多行为如胚胎发生^[1,2]、神经系统的形成^[3]及免疫应答^[4]等有重要影响.在组织修复与再生过程中,细胞迁移也起着至关重要的作用.白细胞的迁移可以吞噬入侵到体内的病菌,血管内皮细胞的迁移可以促进血管萌发和新生^[5],成纤维细胞的迁移有助于伤口愈合^[6],成骨细胞的迁移能够加强骨组织的再生等^[7,8].

研究生物材料的基底刚度大小对细胞结构和功能的影响,对提高基于生物材料的人体组织缺损的修复和再生质量有着深远的意义^[9].研究发现,神经元细胞在100 Pa基底刚度条件下分支增多^[10],乳腺上皮细胞在200 Pa的基底上可形成腺管结构^[11],骨骼肌细胞在12 kPa的基底上形成横纹结构^[12],而将软骨细胞从刚度较小的基底(3.8 kPa)转移到刚度较大的基底(7.4~19.9 kPa)上,细胞增生活跃,生长明显增强^[13].将胚胎干细胞(ESCs)种植在刚度较高的聚二甲基硅氧烷基质上时,能够促进ESCs早期的内胚层分化和末期的成骨分化^[14].研究表明,生物材料的刚度作为一种生物物理(或力学)信号,与生物信号和化学信号一样,也是影响细胞结构和功能的重要因素之一.

采用静电纺丝(Electrospinning)技术制备的超细纤维具有仿生天然细胞外基质(ECM)微-纳米结构的特性,已广泛用于皮肤、血管、神经及肌腱等组织的构建,是近年来组织工程与再生医学生物材料支架研究的热点^[15-17].研究表明,电纺纤维支架可通过组分复合、纤维取向及生物活性分子的化学接枝等方式明显促进细胞的黏附、增殖、分化及相关功能的表达^[18-21].但调控电纺纤维的刚度及其对细胞行为影响的研究报道还比较有限. Skotak 等^[22]采用戊二醛溶液交联处理的方法来改变明胶纳米纤维的刚度,发现纤维刚度的增大有利于增加软骨细胞的密度及功能蛋白的表达. Jiang 等^[23]采用化学交联的方法改变电纺多糖纳米纤维的刚度来研究其支持间充质干细胞(MSCs)向神经细胞转变的分化作用. Vatankhah 等^[24]研究了不同配比的电纺 Tecophilic[®]/明胶复合纤维的配体密度与刚度对血管平滑肌细胞(SMCs)的影响,并发现增加配体密度可以提高平滑肌细胞的收缩能力,增加刚度则可调节

收稿日期: 2017-08-08. 网络出版日期: 2018-03-27.

基金项目: 国家重点研发计划项目(批准号: 2016YFC1100203)、国家自然科学基金(批准号: 31570969, 31771050)和上海市科委基础研究重点项目(批准号: 14JC1490100)资助.

联系人简介: 张彦中,男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物材料方面的研究. E-mail: yzzhang@dhu.edu.cn

SMCs的增殖,二者之间表现为竞争抑制关系.尽管以上这些研究工作从纤维刚度的角度对细胞行为影响已经做了一些有益的探索,但通过化学交联或调节两种材料比例的方式来调控纤维刚度不可避免地带来额外因素(除刚度外)的影响,从而使研究的问题复杂化.因此,采取一种可排除化学因素的影响来调控电纺纤维刚度的方法,能比较精确甄别电纺纤维的刚度变化对细胞行为影响的作用程度和机理,对发展高度仿生的组织工程支架具有重要意义.

退火处理作为一种消除内应力和改善结晶度的常用手段,可以增强某些结晶度不高的聚合物材料的结晶度,从而改善其性能,并且在高分子材料领域已得到广泛应用^[25~27].我们^[28]采用退火处理改变纤维刚度而不影响纤维的其它性质,发现纤维刚度促进 MSCs 向成骨分化主要是通过 MIF 介导的 AKT/YAP/RUNX2 信号通路调控的.诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(iPS-MSCs)是近年来一类备受关注的组织工程用新细胞来源^[29],但目前针对电纺纤维刚度调控 iPS-MSCs 的行为尚未见报道.本文采用退火处理的方法改变电纺 PLLA 超细纤维的刚度,研究纤维刚度的变化对 iPS-MSCs 的黏附、铺展(细胞骨架)、增殖及迁移行为的影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

PLLA($M_n=1 \times 10^5$), 济南岱罡生物工程有限公司; 三氟乙醇(TFE), 上海达瑞精细品化学有限公司; 磷酸盐缓冲液粉剂(PBS, pH=7.4), 上海迪申生物技术有限公司; 胎牛血清(FBS), 浙江天杭生物技术有限公司; DMEM/F12 培养液, 杭州吉诺生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒, 日本 Dojindo 有限公司; 青-链霉素(P/S)、胰蛋白酶和罗丹明-鬼笔环肽(Phalloidin), 美国 Invitrogen 公司; 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI), 瑞士 Roche 公司.

TXR1020N30-30 型高压电源, 大连泰思曼科技有限公司; KDS-100 型微量注射泵, 美国 KD Scientific 公司; TM-1000 型扫描电子显微镜(SEM), 日本 Hitachi 公司; Rigaku D/MAX-2550PC 型 X 射线衍射(XRD)仪, 日本理光公司; DSC-204F1 型差示扫描量热分析(DSC)仪, 德国耐驰仪器制造有限公司; H5K-S 型万能材料测试仪, 英国 Hounsfield 公司; HF90 型 CO₂ 培养箱, 香港力康生物医疗科技控股有限公司; MK3 型酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; TI-S 型倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司.

1.2 PLLA 超细纤维的制备与退火处理

在室温下配制质量分数为 10% 的 PLLA/TFE 溶液, 常温下磁力搅拌 12 h 得到纺丝溶液, 进行电纺丝. 具体纺丝参数如下: 电压 10 kV, 注射速率 1 mL/h, 接收距离 15 cm, 室温, 环境湿度 20%~30%. 纺丝结束后, 将纤维膜放入真空干燥箱中干燥 48 h 以上以除去纤维中残留的有机溶剂. 将干燥的 PLLA 纤维膜(30 cm×30 cm)于 60 °C 热处理 3 h 并作退火处理, 然后缓慢冷却至室温, 备用.

1.3 PLLA 超细纤维的形貌与结构表征

通过 SEM 观察电纺 PLLA 超细纤维的表面形貌, 并用 ImageJ 软件测量纤维的直径大小. 采用 XRD 对纤维结晶性能进行分析. 采用 DSC 检测纤维的热学性能. 根据下式计算结晶度(X_c , %):

$$X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_f} \times 100\% \quad (1)$$

式中: ΔH_m 为熔融焓; ΔH_c 为冷结晶焓; ΔH_f 为 PLLA 聚合物 100% 结晶时的熔融焓(93 J/g)^[30].

1.4 PLLA 超细纤维的力学性能测试及刚度计算

分别剪取 8 条厚度均匀的长条形(10 mm×50 mm)纤维膜, 用螺旋测微器测量每个膜上 5 个不同点的厚度并取平均值, 在恒温恒湿条件(~25 °C, 相对湿度~50%)下测试纤维膜的拉伸力学性能. 仪器设置参数如下: 两钳口夹间距为 30 mm, 拉伸速率为 10 mm/min, 力传感器范围为 10 N, 根据下式计算分别得到拉伸应力(TS, MPa)和应变(ϵ), 并绘制拉伸应力-应变曲线.

$$TS = F/10h \quad (2)$$

$$\epsilon = l/30 \quad (3)$$

式中, F (N), h (mm)及 l (mm)分别表示拉伸力、样品的厚度及伸长长度. 根据拉伸应力-应变曲线得出

电纺 PLLA 纤维的杨氏模量,并通过下式计算纤维的刚度(k)^[24,31]:

$$k = EA/L \quad (4)$$

式中, E , A 及 L 分别表示纤维样品的杨氏模量、横截面积及长度($L=30$ mm).

1.5 iPS-MSCs 的生物学特性检测

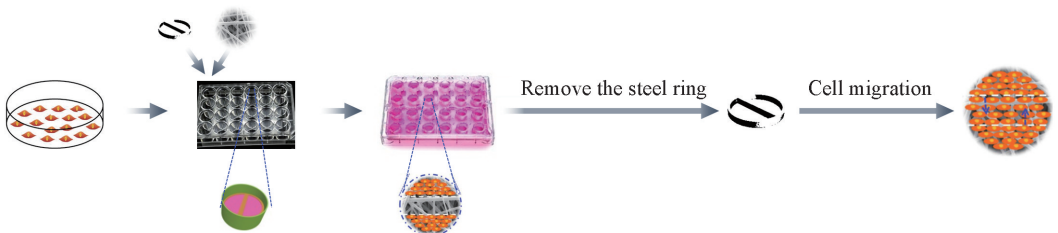
1.5.1 材料准备和细胞培养 将电纺 PLLA 纤维膜及经退火处理的 PLLA 纤维膜剪成相同大小并包裹在经严格清洗和灭菌处理后的玻片($\phi=15$ 或 35 mm)上,放入 24 孔或 6 孔细胞培养板中用紫外照射过夜(12 h)进行初步灭菌;用体积分数为 75% 的乙醇浸泡 2 h,作进一步灭菌处理,用 PBS 缓冲液漂洗 3 次,除去残留的乙醇.处理完成后,在每个孔中加入 500 μL 预先配制好的新鲜细胞培养液,放入 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 细胞培养箱中孵育过夜作预培养.将复苏好的 iPS-MSCs 悬液种植到带有纤维支架的 24 孔或者 6 孔板中,放入细胞培养箱中培养,隔天更换新鲜培养液.培养液组成:15% (体积分数) FBS+1% (体积分数) P/S+DMEM/F12 培养液.

1.5.2 细胞黏附铺展检测 将在纤维支架上培养 24 h 后的 iPS-MSCs 用 Phalloidin (荧光为红色) 和 DAPI (荧光为蓝色) 分别对其细胞骨架和细胞核进行染色,观察细胞的黏附铺展情况,并对其铺展面积进行定量分析.步骤如下:弃去原有培养液,加入 4% 多聚甲醛溶液固定细胞,用 0.1% 的 Triton X-100 溶液透膜处理,然后每孔加入浓度为 0.2% 的 Phalloidin 溶液 200 μL 进行细胞骨架染色,再加入 200 μL DAPI 溶液 (体积比 1:400) 进行细胞核染色;在倒置荧光显微镜上观察细胞黏附铺展情况.

1.5.3 细胞增殖情况检测 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞种植在纤维支架上的增殖情况.将培养到一定时间(1, 4, 7 d)的培养板从培养箱中取出,每孔加 20 μL 的 CCK-8 试剂,使用铝箔包裹培养板进行避光处理,放入培养箱继续培养 4 h.当细胞与 CCK-8 试剂充分反应后,从每个孔移取 200 μL 反应液转移到 96 孔培养板中,用酶标仪测定培养液在 450 nm 处的吸光值.

为了更直观地观察 iPS-MSCs 在不同刚度纤维支架上培养较长时间的生长状况及细胞形态,在细胞种植 4 及 7 d 后,弃去原有培养基,加入 2.5% 的戊二醛溶液固定,然后采用体积分数为 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 和 100% 乙醇进行梯度脱水处理,放入真空干燥箱完全干燥后,使用 SEM 观察细胞在纤维支架上的微观形貌.

1.5.4 细胞迁移情况检测 伤口愈合试验(划痕试验)是细胞迁移研究中最简便、最常用的方法.传统的伤口愈合试验是用普通移液枪的枪头或其它尖锐物在汇合成片的单层细胞上划一道伤痕造成无细胞的“伤口”,然后通过一段时间后在倒置显微镜下观察“伤口”的逐渐“愈合”情况来表征细胞的迁移行为.但由于本文研究的基底材料是超细纤维膜,如果采用传统的划痕试验方法研究 iPS-MSCs 在纤维支架上的迁移情况,在划痕营造“伤口”的过程中很容易破坏纤维膜的原有形貌结构,这将影响纤维刚度变化对 iPS-MSCs 迁移行为的检测结果.因此,本文在传统伤口愈合试验的基础上做如下改进(见 Scheme 1):在含有纤维支架的膜片上,放置一个中间带有横杠的钢环将纤维膜片分隔,再将细胞种植在左右两边区域,从而在移除钢环后即可营造出一个类似于划痕试验中的“伤口”,通过表征 iPS-MSCs 迁移到“伤口”的数目评估纤维刚度的变化对细胞迁移行为的影响.具体操作过程如下:将经严格灭菌处理后的钢环和纤维膜片放入 24 孔细胞培养板中,每孔加入 500 μL iPS-MSCs 培养液对纤维支架进行预培养过夜;参照文献[32,33]方法,将待消化的 iPS-MSCs 用含有 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丝裂霉素 C(MMC)的细胞培养液在 37°C 下孵育 60 min(用于抑制细胞增殖,以避免细胞增殖对 iPS-MSCs 迁移的影响);清洗失去增殖能力的 iPS-MSCs 并消化处理,按照 1×10^5 Cell/孔的细胞密度种植到预培养过夜后的纤维支



Scheme 1 Schematic of cell migration experiment

架上; 培养 24 h 后将钢环移去并记为细胞迁移的 0 h 时刻, 对标记为 0 h 的 24 孔培养板上的 iPS-MSCs 进一步处理, 即弃掉原有培养液, 每孔加入 4% 的多聚甲醛溶液进行固定, 加入 200 μL 的 DAPI (1:400) 溶液对细胞核进行染色, 使用倒置荧光显微镜观察并记录细胞迁移的起始状态; 其余 24 孔板上的 iPS-MSCs 继续培养至 48 及 72 h 后, 按照上述方法处理后, 使用倒置荧光显微镜观察并记录 iPS-MSCs 的迁移情况。

1.5.5 迁移基因表达检测 为了解纤维刚度变化对 iPS-MSCs 迁移行为的影响, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测 iPS-MSCs 在不同刚度纤维支架上培养不同时间点 (24, 72, 96 h) 时与细胞黏附及迁移密切相关的 *Integrin β 1*, *RhoA* 和 *Rock1* 等基因的表达情况. 相关基因的引物序列如表 1 所示.

Table 1 Primer sequences of specific genes used for qRT-PCR

Gene	Forward primer sequence(5'-3')	Reverse primer sequence(5'-3')
<i>Integrinβ1</i>	ATGCCAAATCTTGGGAGAAT	TTTGCTGCGATTGGTGACATT
<i>RhoA</i>	AGCTTGTGTTAAGACATGCTTG	GTGTCCCATAAAGCCAACTCTAC
<i>Rock1</i>	GACTGGGGACAGTTTTGAGAC	ATCCAAATCATAAACCAGGGCAT
<i>GAPDH</i>	TGACCTCAACTACATGGTCTACA	CTTCCCATTTCTCGGCCTTG

1.6 统计学方法

应用 Origin 8.0 统计软件对定量实验数据进行统计学分析, 评价各个样品之间是否存在显著性差异. 数据以 $M \pm SD$ (平均值 \pm 标准偏差) 表示, 组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析 (One way ANOVA). 当任意两组数据差异概率 $P < 0.05$ (*) 时, 则认为它们之间存在显著性差异; 当 $P < 0.01$ (***) 时, 则认为它们之间存在极显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 PLLA 超细纤维的形貌观察

图 1 为采用电纺丝技术制备的 PLLA 超细纤维及其退火处理后的纤维形貌的 SEM 照片与粒径分布. 可以看出, 所制备的纤维形貌良好, 直径分布较均一, 对纤维进行 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火处理 3 h 后, 纤维之间没有出现纤维间的黏结现象 [图 1(A), (B)]; PLLA 超细纤维的直径为 $(1.26 \pm 0.25) \mu\text{m}$, 退火后的纤

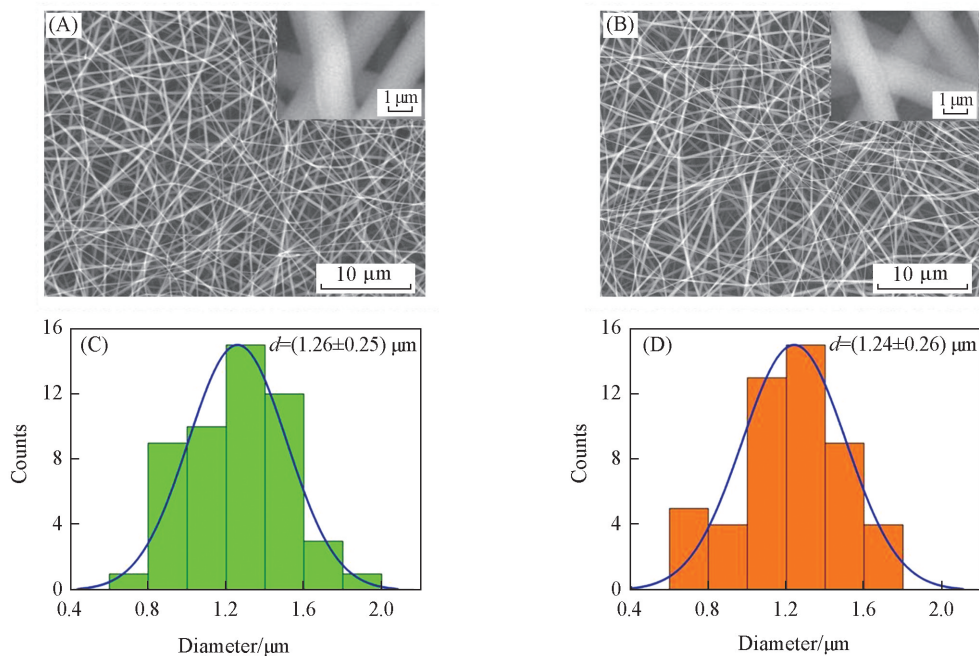


Fig.1 SEM images(A, B) and the diameter distribution(C, D) of electrospun PLLA fibers before(A, C) and after(B, D) annealing treatment

Insets of (A) and (B): high magnification SEM images of electrospun PLLA fibers before and after annealing treatment.

维直径为 $(1.24 \pm 0.26) \mu\text{m}$ [图 1(C), (D)]. 退火处理后纤维直径略有收缩, 但总体来看退火处理对纤维直径影响不大, 与文献[28]结果一致.

2.2 退火处理对 PLLA 超细纤维的结晶性能影响

图 2(A) 给出未处理及 60 °C 退火 3 h 后的 PLLA 超细纤维的 DSC 曲线. 表 2 给出了由 DSC 曲线获得的退火前后 PLLA 超细纤维的热学性能数据, 由表 2 可知, 未退火的 PLLA 超细纤维在升温过程中, 在 56.19 °C 出现一个玻璃化转变温度(T_g), 在 80.23 °C 出现冷结晶峰(T_c), 且在 179.38 °C 出现结晶熔融温度(T_m)^[34]; 退火的 PLLA 超细纤维的 T_g 为 58.51 °C, T_m 为 177.43 °C, 未出现 T_c ; 通过式(1) 计算电纺 PLLA 超细纤维的结晶度为 10.88%; 而当退火处理后, 冷结晶峰消失, 结晶度增大至 11.29%, 说明退火处理可以改变电纺 PLLA 超细纤维的大分子聚集态结构, 导致结晶度的略微增大.

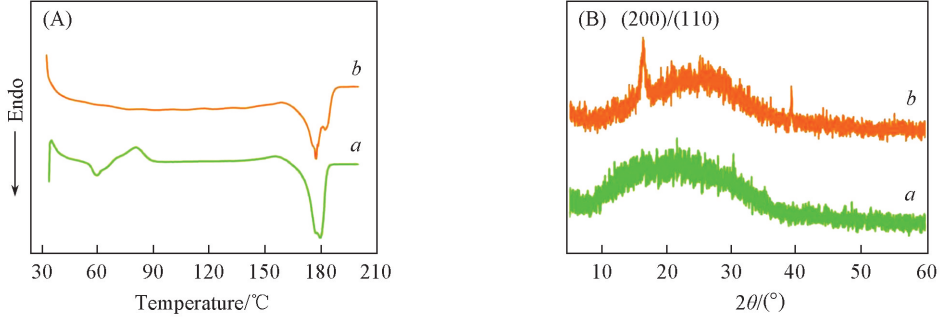


Fig.2 DSC(A) and XRD(B) analysis of electrospun PLLA fibers before(a) and after(b) annealing treatment

Table 2 Thermal data of PLLA fibers before and after annealing treatment

Sample	$T_g/^\circ\text{C}$	$T_c/^\circ\text{C}$	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta H_c/(\text{J} \cdot \text{g}^{-1})$	$\Delta H_m/(\text{J} \cdot \text{g}^{-1})$	$X_c(\%)$
PLLA	56.19	80.23	179.38	1.84	11.96	10.88
Annealing	58.51	—	177.43	—	10.50	11.29

图 2(B) 给出未处理及退火处理后的电纺 PLLA 超细纤维的 XRD 谱图. 可以看出, 未经退火处理的 PLLA 超细纤维的衍射图谱上未出现明显的结晶衍射峰, 这是因为, 一方面, 电纺丝过程并不能保证形成完善的聚合物分子结晶结构^[35,36]; 另一方面, 当退火温度在 T_g 以下时, PLLA 分子链还不能克服分子间的相互作用力而发生分子间的迁移和重排. 而当退火温度高于 T_g 之后, 经 3 h 的退火处理, 纤维膜在 16.4° 出现明显的 (200)/(110) 的晶面衍射^[34], 说明当温度升高时, 纤维内部分子链的迁移和重排过程迅速, 有利于电纺 PLLA 超细纤维内部形成晶体结构和结晶度的提高, 与 DSC 结果一致.

2.3 退火处理对 PLLA 超细纤维力学性能的影响

晶体结构是影响聚合物力学性能的主要因素之一, 结晶度和晶体尺寸的变化将直接影响聚合物材料的拉伸强度、韧性及模量等力学性能. 研究证明, 退火处理可以有效改变聚合物的晶体结构^[37]. 对退火后的电纺 PLLA 超细纤维进行拉伸性能测试和分析(图 3)可知, PLLA 超细纤维的杨氏模量为 $(110.66 \pm 14.94) \text{MPa}$, 拉伸强度为 $(5.19 \pm 0.38) \text{MPa}$; 退火后 PLLA 超细纤维的杨氏模量为 $(126.08 \pm 9.29) \text{MPa}$, 拉伸强度为 $(7.66 \pm 0.35) \text{MPa}$, 统计分析发现两者的杨氏模量具有显著性差异, 拉伸强度具有极显著性差异. 由此可知, 无论是拉伸强度或是拉伸模量, 退火处理的 PLLA 超细纤维均大于未退火处理的 PLLA 超细纤维, 说明退火处理可使电纺 PLLA 超细纤维的力学性能获得显著增强.

根据式(4) 计算纤维刚度可知, 退火后的 PLLA 超细纤维的刚度 $(3097.16 \mu\text{N/m})$ 明显大于没有经过退火处理的体系 $(1792.35 \mu\text{N/m})$, 纤维刚度增加了 1.73 倍[图 3(B)]. 因此, 通过退火处理可以增加这类超细纤维的刚度, 为研究电纺 PLLA 超细纤维的刚度变化对细胞行为的影响提供了依据.

2.4 纤维刚度对 iPS-MSCs 生物学特性的影响

2.4.1 纤维刚度对 iPS-MSCs 黏附的影响 细胞与支架的相互作用是评价生物材料生物相容性的重要环节. 无论是在体外还是体内, 细胞在材料表面的黏附特性都是细胞与材料相互作用的最初表现, 并将影响后续的细胞迁移、增殖、分化等一系列功能. 从图 4(A, B) 可知, iPS-MSCs 在 2 种不同刚度的纤维支架上的生长良好, 细胞形态清晰; 但 iPS-MSCs 在 PLLA 纤维支架上呈现狭长细条形态生长, 而

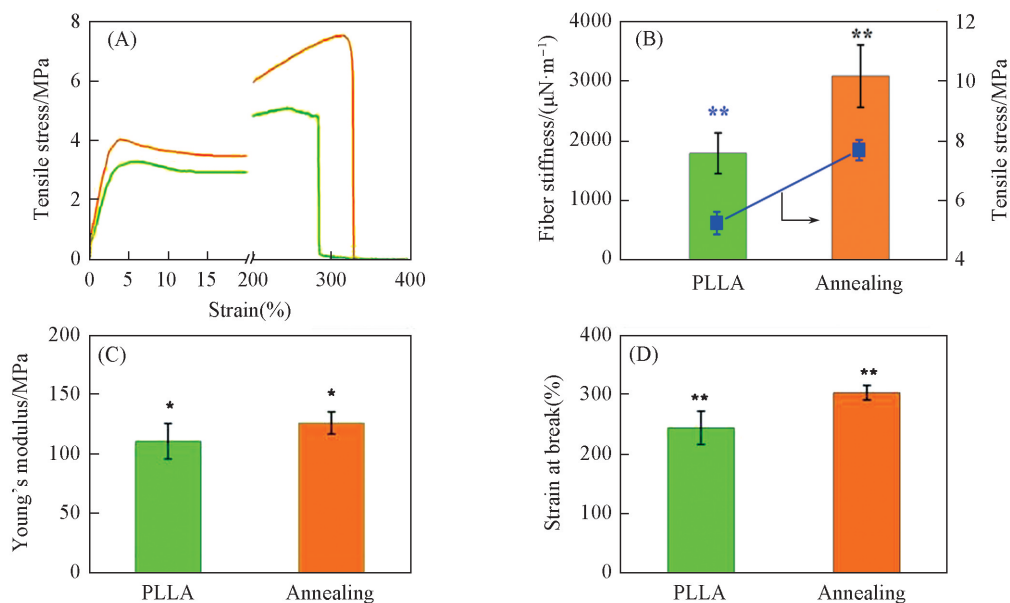


Fig.3 Tensile properties and stiffness of the electrospun PLLA fibrous membranes before and after annealing treatment

(A) Typical stress-strain curves; (B) tensile strength and fiber stiffness; (C) Young's modulus; (D) strain at break. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

在退火后的 PLLA 纤维支架上呈现多边型铺展形态生长。

为进一步了解电纺 PLLA 超细纤维的刚度变化对 iPS-MSCs 细胞骨架铺展情况的影响, 采用 ImageJ 软件对细胞骨架铺展面积进行定量分析. 由图 4(C) 可见, iPS-MSCs 在 PLLA 纤维支架上的细胞骨架铺展面积为 $(572.53 \pm 150.58) \mu\text{m}^2$, 在经退火处理的 PLLA 纤维支架上的细胞骨架铺展面积为 $(1018.31 \pm 364.29) \mu\text{m}^2$, 是未处理 PLLA 纤维支架的 1.78 倍, 且两者存在极显著性差异. 由此可知, PLLA 超细纤维刚度的变化对 iPS-MSCs 的黏附及细胞骨架的铺展情况有着重要的影响, 刚度较大的 PLLA 纤维支架更有利于 iPS-MSCs 的黏附和细胞骨架的铺展.

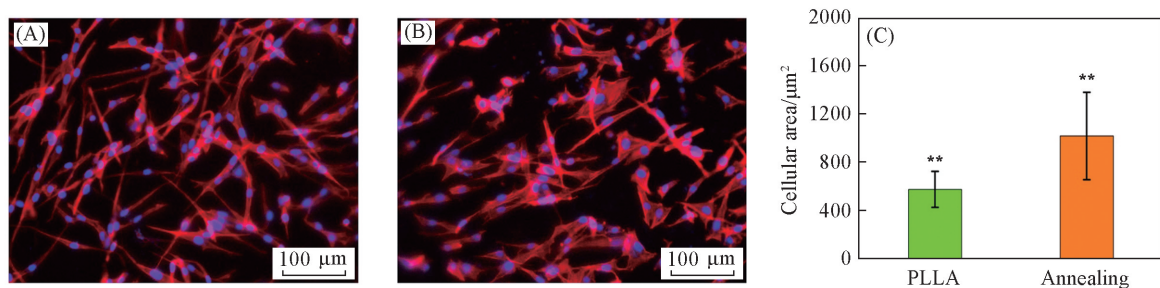


Fig.4 Fluorescent images of iPS-MSCs cultured on as-electrospun (A) and annealed electrospun PLLA fiber scaffolds for 24 h (B) and quantitative results of the spreading area of iPS-MSCs (C)

The F-actin (red) and nuclei (blue) of cells were stained by Rhodamine-phalloidin and DAPI, respectively. ** $P < 0.01$.

2.4.2 纤维刚度对 iPS-MSCs 增殖的影响 为更直观地观察纤维刚度的变化对 iPS-MSCs 细胞骨架铺展情况的影响, 将 iPS-MSCs 在不同刚度纤维支架上培养 4 和 7 d 后, 用 SEM 观察细胞的微观形貌. 从图 5 可以看出, iPS-MSCs 在 2 种不同刚度的纤维支架上生长良好, 随着培养时间的增加, 2 种纤维上的细胞数目均显著增多; 但在退火后刚度较大的 PLLA 支架上的细胞数量更为密集. 这些结果表明, 纤维刚度的变化对 iPS-MSCs 的增殖有重要的影响, 且 PLLA 纤维刚度较大的组别更有利于 iPS-MSCs 的增殖.

图 6 为 iPS-MSCs 种植在不同刚度纤维支架上的定量增殖结果. 随着培养时间从 1 d 延长到 7 d, 细胞数目也逐渐增多, 说明 2 种不同刚度的纤维支架都具有较好的细胞相容性. 在培养 1 d 后, 在不同刚

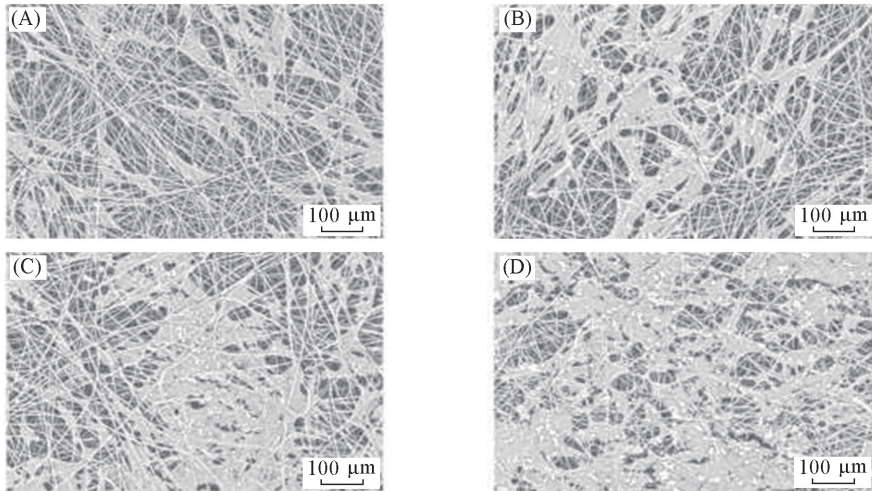


Fig.5 SEM micrographs of iPS-MSCs cultured on as-electrospun(A, C) and annealed electrospun PLLA fiber scaffolds(B, D) for 4 d(A, B) and 7 d(C, D)

度纤维支架上的细胞数目相差不大,这可能是细胞刚种植在纤维支架上,需要一定的环境适应时间.在培养4 d后,iPS-MSCs在不同刚度纤维支架上都有所增加,但增加的幅度不明显,在刚度较高的PLL A纤维支架上的细胞数目略多于在刚度较低的PLL A纤维支架;但在培养7 d后,iPS-MSCs已经对PLL A超细纤维支架材料的刚度变化做出明显的响应.在刚度较高的PLL A纤维支架上的细胞数目出现大幅度的增加;通过对iPS-MSCs第4天和第7天在纤维刚度不同的支架上的数目进行统计分析,发现它们都具有极显著性差异.表明PLL A纤维支架刚度较大时会有利于iPS-MSCs的增殖,与前述微观形貌生长状况观察的结果相一致.

2.4.3 纤维刚度对iPS-MSCs迁移的影响 采用改良的“伤口愈合试验”研究纤维刚度变化对iPS-MSCs迁移行为的影响.从图7可知,将iPS-MSCs种在带有特制钢环的不同刚度的纤维支架上24 h后,细胞能完全黏附在纤维支架的表面;移除钢环后细胞在不同刚度的纤维支架上形成了一个较好的类似于

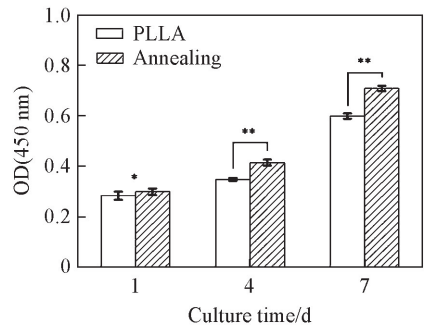


Fig.6 Proliferation of iPS-MSCs on as-electrospun and annealed electrospun PLLA fiber scaffolds

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

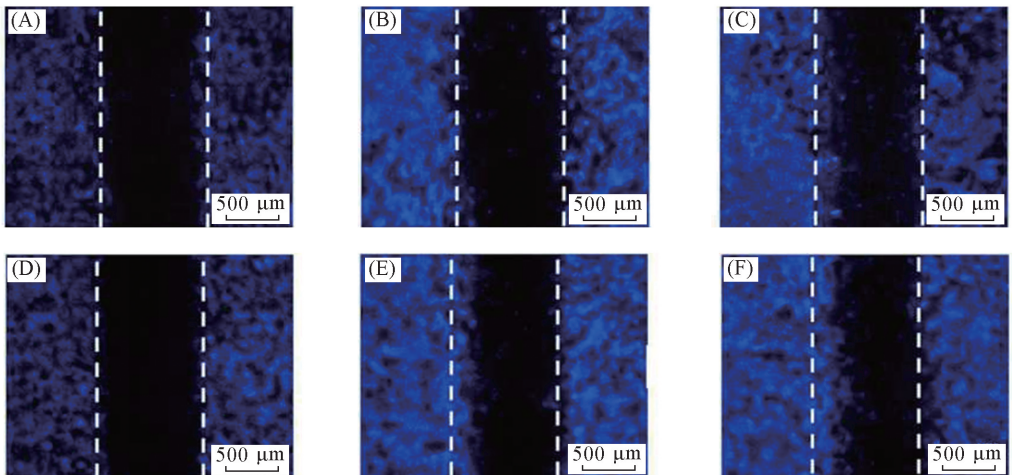


Fig.7 iPS-MSCs migration on as-electrospun(A—C) and annealed electrospun PLLA fiber scaffolds(D—F) for 0 h(A, D), 48 h(B, E) and 72 h(C, F)

“伤口”的空白区域. 继续培养 48 h 后, 发现 iPS-MSCs 在不同刚度纤维支架上都能朝“伤口”处迁移, 在刚度较大的退火 PLLA 纤维支架上 iPS-MSCs 迁移的数目更多一些; 培养到 72 h 后, iPS-MSCs 在不同刚度纤维支架上迁移的数目都有所增加, 但可以观察到在刚度较大的纤维支架上的迁移数量增加得更为明显.

为进一步了解 PLLA 超细纤维的刚度变化对 iPS-MSCs 迁移能力的影响, 利用 ImageJ 图形处理软件对迁移到“伤口”区域细胞的荧光强度进行定量分析以表征细胞迁移的数目. 由图 8 可知, iPS-MSCs 在不同刚度的纤维支架上培养的不同时间点 (48, 72 h), 刚度较大的退火 PLLA 纤维支架上迁移的细胞数目均高于未退火处理的 PLLA 纤维支架; 定量数据进一步说明了纤维支架刚度的变化对 iPS-MSCs 的迁移行为具有一定的影响.

此外, 采用 qRT-PCR 检测了 iPS-MSCs 在不同刚度纤维支架上培养不同时间点 (24, 72, 96 h) 时与细胞黏附、迁移密切相关的 *Integrinβ1*, *RhoA* 和 *Rock1* 等基因的表达情况 (图 9), iPS-MSCs 在不同刚度纤维支架上培养不同时间点 (24, 72, 96 h) 时, 在退火处理后的 PLLA 纤维支架上培养的 iPS-MSCs 的 *Integrinβ1*, *RhoA* 和 *Rock1* 基因的表达水平相对于在未处理的 PLLA 纤维支架上的 iPS-MSCs 的表达均获得上调. 说明纤维支架刚度的变化对 iPS-MSCs 的黏附、迁移相关基因的表达具有一定的促进作用.

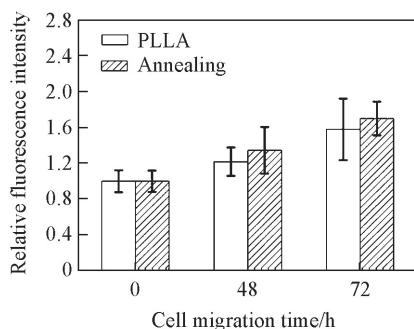


Fig.8 Quantitative measurement of iPS-MSCs migration after culturing the cells on as-electrospun and annealed electrospun PLLA fibrous scaffolds for 0, 48 and 72 h

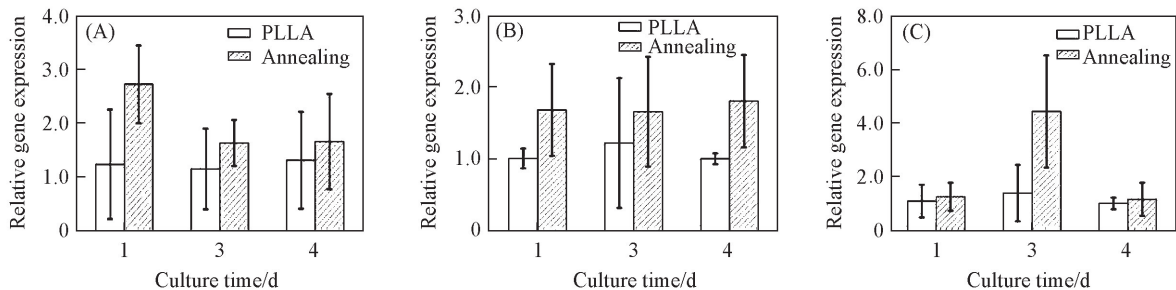


Fig.9 Migration-related genes expression of iPS-MSCs cultured on as-electrospun and annealed electrospun PLLA fiber scaffolds for 1, 3 and 4 d

(A) *Integrinβ1*; (B) *RhoA*; (C) *Rock1*.

研究表明, 基质刚度的提高有利于细胞的迁移; 这主要是由于基质刚度能够改变细胞内的 ECM 的组装并增加其活性, 促进细胞骨架的铺展, 进而影响细胞的黏附和迁移^[38,39]. 刚度的增强还能激活整合蛋白来增大粘着斑, 从而刺激 Rho/ROCK 信号通路, 增加细胞收缩性, 促进细胞迁移和侵入^[40,41]. Vatankhah 等^[24]发现随着基底硬度的增加, 细胞的黏附、铺展、增殖都逐渐增加, 这与本文的研究结果相一致. 尽管本文有限的体外细胞生物学实验证明了电纺 PLLA 纤维刚度对 iPS-MSCs 的黏附及增殖有着促进作用并对迁移造成一定影响, 但纤维刚度是如何影响细胞的特定功能表达及对细胞相关信号通路产生影响的分子机制还有待进一步研究.

3 结 论

采用退火处理的方法改变电纺 PLLA 超细纤维的刚度, 证明退火处理几乎不改变纤维的直径 [退火前 (1.26±0.25) μm, 退火后 (1.24±0.26) μm], 但可以改变电纺 PLLA 超细纤维的大分子聚集态结构, 导致结晶度的略微增大, 使电纺 PLLA 超细纤维的力学性能获得显著增强, 纤维刚度增大. 细胞实验发现, iPS-MSCs 在不同刚度的电纺 PLLA 超细纤维支架上均能较好地生长, 但在经退火处理的纤维支架上培养 24 h 后的细胞骨架铺展面积及 7 d 后的细胞增殖, 分别是未处理的 1.78 倍和 1.18 倍. 迁

移实验发现纤维刚度的提高促进 iPS-MSCs 迁移相关基因 *Integrin β 1*, *RhoA* 和 *Rock1* 的表达水平上调并影响其迁移. 结果表明, 退火处理可以提高电纺 PLLA 纤维刚度, 对 iPS-MSCs 的黏附和增殖有着促进作用并对其迁移造成一定影响, 可作为组织工程中通过调节仿生纤维支架理化性能来调控细胞生物功能的重要手段.

参 考 文 献

- [1] Aman A., Piotrowski T., *Developmental Biology*, **2010**, 341, 20—33
- [2] Keller R., *Current Opinion in Cell Biology*, **2005**, 17, 533—541
- [3] Hatten M. E., *Annual Review of Neuroscience*, **1999**, 22, 511—539
- [4] Friedl P., Weigelin B., *Nature Immunology*, **2008**, 9(9), 960—969
- [5] Rossant J., Howard L., *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **2002**, 18, 541—573
- [6] Braiman-Wiksman L., Solomonik I., Spira R., Tennenbaum T., *Toxicologic Pathology*, **2007**, 35, 767—779
- [7] Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R., *Science*, **2003**, 302 (5651), 1704—1709
- [8] Lauffenburger D. A., Horwitz A. F., *Cell*, **1996**, 84, 359—369
- [9] Nemir S., West J. L., *Annals of Biomedical Engineering*, **2010**, 38(1), 2—20
- [10] Flanagan L. A., Ju Y. E., Marg B., Osterfield M., Janmey P. A., *Neuroreport*, **2002**, 13(18), 2411—2415
- [11] Paszek M. J., Zahir N., Johnson K. R., Lakins J. N., Rozenberg G. I., Gefen A., Reinhart-King C. A., Margulies S. S., Dembo M., Boettiger D., Hammer D. A., Weaver V. M., *Cancer Cell*, **2005**, 8, 241—254
- [12] Engler A. J., Griffin M. A., Sen S., Bonnetmann C. G., Sweeney H. L., Discher D. E., *Journal of Cell Biology*, **2004**, 166, 877—887
- [13] Subramanian A., Lin H. Y., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2005**, 75A, 742—753
- [14] Evans N. D., Minelli C., Gentleman E., LaPointe V., Patankar S. N., Kallivretaki M., Chen X. Y., Roberts C. J., Stevens M. M., *European Cells & Materials*, **2009**, 18, 1—14
- [15] Mauck R. L., Baker B. M., Nerurkar N. L., Burdick J. A., Li W. J., Tuan R. S., Elliott D M., *Tissue Engineering Part B, Reviews*, **2009**, 15, 171—193
- [16] Li W. J., Laurencin C. T., Cateson E. J., Tuan R. S., Ko F. K., *Journal of Biomedical Materials Research*, **2002**, 60, 613—621
- [17] Sill T. J., von Recum H. A., *Biomaterials*, **2008**, 29, 1989—2006
- [18] Yin Z., Chen X., Chen J. L., Shen W. L., Nguyen T. M. H., Gao L., Ouyang H. W., *Biomaterials*, **2010**, 31, 2163—2175
- [19] Zhang Y. Z., Ouyang H. W., Lim C. T., Ramakrishna S., Huang Z. M., *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*, **2005**, 72B, 156—165
- [20] Yoo H. S., Kim T. G., Park T. G., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2009**, 61, 1033—1042
- [21] Zhang Y. Z., Venugopal J., Huang Z. M., Lim C. T., Ramakrishna S., *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2583—2589
- [22] Skotak M., Noriega S., Larsen G., Subramanian A., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2010**, 95A, 828—836
- [23] Jiang X., Nai M. H., Lim C. T., Visage C. L., Chan J. K. Y., Chew S. Y., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2015**, 103, 959—968
- [24] Vatankhah E., Prabhakaran M. P., Semnani D., Razavi S., Zamani M., Ramakrishna S., *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2014**, 6, 4089—4101
- [25] Takasaki M., Ito H., Kikutani T., *Journal of Macromolecular Science-Physics*, **2003**, B42, 403—420
- [26] Furuhashi Y., Kimura Y., Yoshie N., Yamane H., *Polymer*, **2006**, 47, 5965—5972
- [27] Arias V., Odelius K., Högglund A., Albertsson A. C., *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2015**, 3, 2220—2231
- [28] Yuan H. H., Zhou Y. X., Lee M. S., Zhang Y. Z., Li W. J., *Acta Biomaterialia*, **2016**, 42, 247—257
- [29] Xie J., Peng C., Zhao Q. H., Wang X. L., Yuan H. H., Yang L. L., Li K., Lou X. X., Zhang Y. Z., *Acta Biomaterialia*, **2016**, 29, 365—379
- [30] Dersch R., Liu T. Q., Schaper A. K., Greiner A., Wendorff J. H., *Journal of Polymer Science Part A, Polymer Chemistry*, **2003**, 41, 545—553
- [31] Simonet M., Stingelin N., Wismans J. G. F., Oomens C. W. J., Driessen-Mol A., Baaijens F. P. T., *Journal of Materials Chemistry B*, **2014**, 2, 305—313
- [32] Kark L. R., Karp J. M., Davies J. E., *Clinical Oral Implants Research*, **2006**, 17, 321—327
- [33] Kolambkar Y. M., Bajin M., Wojtowicz A., Huttmacher D. W., Garcia A. J., Guldborg R. E., *Tissue Engineering Part A*, **2014**, 20, 398—409
- [34] Puiggali J., Ikada Y., Tsuji H., Cartier L., Okihara T., Lotz B., *Polymer*, **2000**, 41, 8921—8930

- [35] Deitzel J. M., Kleinmeyer J. D., Hirvonen J. K., Beck Tan N. C., *Polymer*, **2001**, *42*, 8163—8170
- [36] Zong X. H., Kim K., Fang D. F., Ran S. F., Hsiao B. S., Chu B., *Polymer*, **2002**, *43*, 4403—4412
- [37] Pan P. J., Zhu B., Kai W. H., Dong T., Inoue Y., *Macromolecules*, **2008**, *41*, 4296—4304
- [38] Halliday N. L., Tomasek J. J., *Experimental Cell Research*, **1995**, *217*, 109—117
- [39] Pelham R. J., Wang Y. L., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1997**, *94*, 13661—13665
- [40] Katsumi A., Orr A. W., Tzima E., Schwartz M. A., *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, *279*(13), 12001—12004
- [41] Wang F., Weaver V. M., Petersen O. W., Larabell C. A., Dedhar S., Briand P., Lupu R., Bissell M. J., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1998**, *95*, 14821—14826

Effects of Electrospun Fiber-Stiffness on Adhesion and Migration of iPS-MSCs[†]

YU Zhepao, YUAN Huihua, YI Bingcheng, WANG Xianliu,
ZHANG Zhaowenbin, ZHANG Yanzhong*

(College of Chemistry, Chemical Engineering & Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract The stiffness of as-electrospun poly-*L*-lactic acid (PLLA) fibers was altered by annealing treatment, and then influence of fiber stiffness on the morphology, proliferation and migration of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells (iPS-MSCs) were evaluated. The results showed that annealing treatment had negligible influence on the diameter of PLLA fibers [before: $(1.26 \pm 0.25) \mu\text{m}$ and after: $(1.24 \pm 0.26) \mu\text{m}$]. However, fiber crystallinity and mechanical properties were enhanced, which resulted in 1.73 times stiffer than that of fibers before annealing treatment. The cell spreading area and proliferation of iPS-MSCs cultured on the treated PLLA scaffold after 1 and 7 d of incubation were 1.78 and 1.18 times higher, respectively, than that of untreated scaffold. The increase of fiber stiffness can affect the migration of iPS-MSCs and promote up-regulated expression of the migration-related genes *Integrin β 1*, *RhoA* and *Rock1*. Collectively, this study demonstrated that increasing fiber stiffness by annealing may be used as an important modality to regulate cell biological functions of the cells in engineering tissues.

Keywords Electrospun fiber; Fiber stiffness; Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells (iPS-MSCs); Cell adhesion; Cell migration

(Ed.: W, Z)

[†] Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC1100203), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31570969, 31771050) and the Key Project of Science and Technology of Shanghai Municipality, China (No. 14JC1490100).