

人脐带间充质干细胞于不同通电情况下在聚吡咯上生长情况的形态

张 涵¹, 吴 昭², 黄 华¹, 孙晓丹², 安沂华¹

(1. 首都医科大学 北京市神经外科研究所, 北京 100050; 2. 清华大学 材料科学与工程系, 北京 100086)

【摘要】 目的 观察人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cell, hUC-MSC)与聚吡咯共培养后,在不同通电条件下形态学变化。**方法** 体外分离培养 hUC-MSC 并进行鉴定。循环伏安法制备聚吡咯(polypyrrole, PPy)薄膜。选择第 3~6 代的 hUC-MSC 与 PPy 共培养,分别采用控制电压和控制电流的方法对细胞进行刺激,利用电镜及光镜观察细胞形态学变化。不通电组作为阴性对照。**结果** 电刺激对细胞贴附、形态有较大影响,不同形式的电刺激对细胞形态影响的比较类似。**结论** 电刺激结合生物导电材料对细胞的贴附和形态可造成显著改变,可作为调控细胞生长的手段之一,需要进一步研究其控制条件。

【关键词】 间充质干细胞;聚吡咯;组织工程学;电刺激

【中图分类号】 R318.08 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0014-04

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.05.004

Morphology Study of Human Umbilical Cord Mesenchymal Cell Cultured on Polypyrrole in Application of Electric Stimuli

ZHANG Han¹, WU Zhao², HUANG Hua¹, SUN Xiao-dan², AN Yi-hua¹

(1. Department of Stem cell, Beijing Neurosurgical Institute, Capital Medical University, Beijing 100050, China;

2. Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

【Abstract】 Objective To observe the morphology change of human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSC) cultured on polypyrrole (PPy) under the conditions of different styles of electric stimuli. **Method** hUC-MSC were identified by flow cytometry and inverted phase contrast microscope. Passage 3 to 6 hUC-MSC were co-cultured with PPy. Current-controlled and voltage-controlled electric stimuli (ES) were applied to the cells. Cells cultured in α MEM with 10% fetal bovine serum and cells cultured on PPy without ES were used as control. Scan electron microscope (SEM) and inverted phase contrast microscope were used to observe the morphology change of hUC-MSC. **Result** The effect of ES on the adhesion and morphology change of hUC-MSC was evident and similar in different groups. **Conclusion** ES has distinct effect on hUC-MSC adhesion and morphology and can be used as a method of cell regulation. More research are needed.

【Key words】 Mesenchymal stem cell; Polypyrrole; Tissue engineering; Electric stimulus

【基金项目】北京市自然科学基金资助项目(2112017);国家 863“干细胞与组织工程”重大项目(2006AA02A115863)。

【作者简介】张涵(1980-),女,助理研究员,硕士,研究方向为中枢神经系统损伤修复与再生;并列第一作者:吴钊(1988-),男,博士生,研究方向为生物材料。

【通讯作者】安沂华(1972-),男,研究员,博士,研究方向为中枢神经系统损伤修复与再生,riveran@163.com;

孙晓丹(1975-),女,副教授,博士,研究方向为生物材料,sunxiaodan@mails.tsinghua.edu.cn。

神经系统作为生物体内电活动最为活跃的部分之一,电磁场作用对其有着特别重要的意义⁽¹⁾,成为神经系统损伤修复的研究热点之一。聚吡咯(PPy)是近年来新兴的具有较好组织相容性的导电材料。脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cell, hUC-MSC)是近年来间充质干细胞研究中的热点,是未来干细胞应用中的重要成员。然而,将 hUC-MSC 与 PPy 共培养,对不同条件的电刺激对细胞形态和贴附的影响的研究还十分少见。本实验将 hUC-MSC 与 PPy 共培养,对细胞在不同通电情况下的形态学变化进行研究,对阐明由 PPy 介导的直接电刺激对 hUC-MSC 的影响提供初步依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PPy 由清华大学材料系提供

试剂:αMEM(Hyclon 公司),胎牛血清(Hyclon 公司),无色低糖 DMEM(Gibco 公司),4%多聚甲醛(Sigma 公司),0.25%胰酶(含 0.02% EDTA)(Sigma 公司);细胞流式检测抗体(均为小鼠 IgG1 抗体):PE-CD29 单克隆抗体,FITC-CD44 单克隆抗体,PE-CD54 单克隆抗体,PE-CD45 单克隆抗体,FITC-CD106 单克隆抗体,FITC-CD14 单克隆抗体,PE-CD34 单克隆抗体,FITC-HLA-DR 单克隆抗体(美国 BD BDIS 公司);

主要仪器:电极:铜镀锌电极;扫描电镜(HITACHI TM-1000);FACSCalibur 流式细胞仪及 CellQuest 软件(Becton Dickinson)

1.2 hUC-MSC 分离培养与鉴定

选择健康的正常孕周的剖腹产产妇,经其同意后,于手术后取脐带约 5~10 cm,无菌条件下去除其表面羊膜及脐带内血管,取 Wharton's Jelly,于生理盐水中清洗 3 次后,剪成体积约 1 cm³的小块,置于含 10% 胎牛血清的 αMEM 培养基中采用贴壁法进行培养,每 5~7 d 进行传代。收集第 3~6 代的细胞,利用倒置相差显微镜和流式细胞仪进行鉴定。

1.3 PPy 制备

选用对甲基苯磺酸钠(TsONa)为支持电解质,加入对甲基苯磺酸(TsOH)为添加剂,采用三电极电化学体系制备 PPy 薄膜。

1.4 hUC-MSC 与 PPy 共培养及通电刺激

选择第 3~6 代的 hUC-MSC,制备成浓度为

0.25×10⁶/mL 的细胞悬液,接种于面积为 4 cm²的 PPy 表面,加入培养基 5 mL,置于 5% CO₂、37℃ 环境内共培养 24 h,换入无血清无色低糖 DMEM 作为通电时的培养基后进行通电刺激,通电后换回原含血清 αMEM 培养基。

1.5 实验分组

(1)对照组:将 hUC-MSC 置于盖玻片上,在含有 10% 胎牛血清的 αMEM 培养基中培养 3 d

(2)不加电组:将 hUC-MSC 于 PPy 共培养 3 d

(3)控制电压组:将 hUC-MSC 于 PPy 共培养 24 h 后,施加电刺激,将场强控制为 100 mV/mm,由于 PPy 上两电极间距离为 3.5 cm,因此控制电压 V=3.5 V,通电时间 t=1 h/d,连续通电 3 d。

(4)控制电流组:将 hUC-MSC 于 PPy 共培养 24 h 后,施加电刺激,将电流控制为 I=10 mA,通电时间 t=1 h/d,连续通电 3 d。

1.6 hUC-MSC 单独或与 PPy 共培养后 SEM 检测

hUC-MSC 单独或与 PPy 共培养并通电 3 d 后,室温下置于 4% 多聚甲醛中固定 4 h,生理盐水冲洗,扫描电镜观察细胞在 PPy 表面贴附情况及细胞形态变化。

1.7 hUC-MSC 与 PPy 共培养 4 d 后,收集其培养基,光镜下观察是否仍有细胞悬浮。

2 结果

2.1 hUC-MSC 鉴定

光镜下显示第 3~6 代时,单个细胞多呈梭形类似于成纤维细胞形态,折光性良好,细胞生长密度增加趋于融合时,呈现平行排列或典型鱼群样生长,均一性良好。采用流式细胞仪对第 3~6 代细胞进行检测发现其不表达造血干细胞标记 CD34、CD45、CD14、CD106 和 HLA-DR,而 MSCs 黏附分子和基质细胞标记 CD44、CD29、CD54 均呈高表达(数据未显示)。

2.2 hUC-MSC 单独或与 PPy 共培养后 SEM 观察

2.2.1 对照组

hUC-MSC 单独培养,电镜下可见 hUC-MSC 在盖玻片上贴附,细胞呈鱼群样或平行样排列,绝大部分呈梭形,形态饱满,边缘清晰,部分细胞伸出细长伪足。(彩插 2 图 1)

2.2.1 不加电组

电镜下可见 hUC-MSC 在 PPy 表面贴附,主要聚集贴附于局部地区,其他地区基本未见有细胞分

布。细胞基本呈长梭形,形态饱满,边缘较为清晰,可见细胞伸出细长伪足,细胞在密度较大的区域呈现平行排列生长。(彩插 2 图 2)

2.2.2 控制电压组

电镜下可见 hUC-MSC 在 PPy 表面贴附,主要聚集贴附于局部地区,其他地区也有分布。细胞基本呈扁平状,细胞间的分界不清,常汇合成片,在 PPy 表面突起较为明显时,细胞可伸展为扁平薄片状,部分细胞表面出现破损(彩插 2 图 3)。

2.2.3 控制电流组

电镜下可见 hUC-MSC 在 PPy 表面贴附,总体较为均匀,在部分地区更为密集,其他地区稍少。细胞基本呈扁平状,细胞间常汇合成片、分界不清。在细胞密度较大时局部有重叠增厚现象(彩插 2 图 4)。

2.3 光镜下观察 hUC-MSC 与 PPy 共培养 4 d 后培养基

光镜下可见 3 个实验组培养基中均有较多量细胞悬浮。将悬浮细胞离心后重新接种于培养瓶中,3~5 d 后仍可出现典型梭形细胞呈鱼群样生长。

3 讨论

神经系统的电活动活跃,电刺激对其损伤修复具有明显的影响。如何利用这个特性对神经损伤进行修复是近年来相关研究的方向之一。

hUC-MSC 是近年来干细胞研究中的热点,具有干细胞的基本特性即自我更新能力及多向分化潜能,目前认为,hUC-MSC 可能通过“替代作用”和/或“营养作用”促进神经系统损伤修复,虽然其修复机制尚未明确,但已有多项研究证明这种修复作用是十分显著的^[2-4]。而且其分离提取不对产妇和新生儿造成额外损伤,并规避了有关的医学伦理问题,体外培养方法较为简便,因此成为未来干细胞临床应用的重点研究对象之一。聚吡咯本身即具有导电性能,容易制备,表面特性易于改变,且具有良好的组织相容性^[5-7],可显著降低星形胶质细胞的黏附、聚集,减少胶质瘢痕的形成^[8],并可在外源性电场影响下促进粘附其上的神经细胞的轴突有方向性地延伸^[9]。本研究针对神经组织的特点,采用聚吡咯作为支架,与 hUC-MSC 共培养,对体外条件下不同通电情况对细胞的影响进行初步研究,可为将来将两者结合修复中枢神经系统损伤提供初步依据。

研究结果显示,电刺激对细胞形态学的影响主

要体现在以下几个方面:

(1) PPy 表面细胞分布

hUC-MSC 可在通电和不通电的情况下贴附于 PPy 表面,但贴附情况不尽相同。从对照组结果可见,普通培养条件下,在贴附条件适合的情况下,大部分细胞可均匀贴附于介质表面。当细胞培养于 PPy 表面且不通电时,大部分细胞集中于部分地区,其他地方细胞较少。相比之下,通电时贴附分布地相对均匀,控制电流时此种现象更为明显,提示电刺激可能促进细胞在局部迁移,但这改变很有限。同时,在两种不同方式的通电实验组中,均未发现细胞在 PPy 支架的正负极的分布有明显区别。

(2) 细胞形态

实验结果显示,电刺激对贴附于 PPy 上的 hUC-MSC 形态影响显著。对照组中,细胞保持梭形,形态饱满,分界清晰,细胞汇合少见。培养于 PPy 表面无电刺激时,hUC-MSC 基本保持梭形,细胞间分界清楚,呈平行排列或典型鱼群样生长;施加电刺激后,细胞主要呈扁平薄片状,细胞间常汇合成片、分界不清。不同形式的电刺激对细胞形态影响的比较类似。

产生上述现象的原因可能包括:

(1) 细胞形态改变的主要是由于细胞骨架的重组和细胞膜-骨架联系的解体。据报道,外加电刺激可以引起细胞骨架重排^[10],对细胞形状及变形产生重要影响,从而可能使细胞的外观产生显著变化,也对细胞的迁移产生了一定的促进。

(2) 外加电刺激可能导致细胞膜弹性有一定程度的增加,因而进一步影响了细胞的运动以及细胞-细胞间作用^[11]。

(3) 对 hUC-MSC 来说,细胞膜与细胞骨架之间的联系相对分化成熟细胞较为松弛^[12],从而导致其对外界刺激更加敏感,对外界的反应也更加显著。

(4) hUC-MSC 与 PPy 共培养数天后仍有较多细胞未贴附,说明 PPy 虽然具有较好的组织相容性,但其表面性质仍然较不适宜 hUC-MSC,故这也是今后的工作中需要进一步改进的。同时也不排除因为外加电刺激对细胞产生影响,减低了 hUC-MSC 的贴附性。

此外,处于电场中和直接与导电材料接触对细胞的影响有着显著的不同。实验中所选择的外加电刺激强度主要依据以往文献报道的数据。其中场强 100mV/mm 及以上在研究电场对细胞作用时

较为常用^[13-14]; 电流 $I = 10\text{mA}$ 及以上在研究导电对细胞作用时较为常用^[15]。通过实验结果可以看出, 将适用于电场的数据直接套用于导电材料实验, 对于细胞的破坏性可能更大。

综上所述, 利用生理性电磁场或者外加电磁场对神经系统损伤修复是未来研究方向之一, 聚吡咯与 hUC-MSC 相结合在这个方面具有很强的可操作性, 但是现阶段仍然面临很多问题, 需要进一步的实验研究加以解决。

参考文献:

- [1] Campos L, Meng Z, Hu G, et al. Engineering novel spinal circuits to promote recovery after spinal injury[J]. J Neurosci. 2004, 3;24(9):2090-101.
- [2] Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model[J]. Exp Neurol. 2009, 216(2):439-48.
- [3] Koh SH, Kim KS, Choi MR, et al. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats[J]. Brain Res. 2008, 1229:233-48.
- [4] Low CB, Liou YC, Tang BL. Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy[J]. J Neurosci Res. 2008, 86(8):1670-9.
- [5] Garner B, Georgevich A, Hodgson AJ, et al. Polypyrrole-heparin composites as stimulus-responsive substrates for endothelial cell growth[J]. J. Biomed. Mater. Res. 1999, 44:121-129.
- [6] George PM, Lyckman AW, LaVan DA, et al. Fabrication and Biocompatibility of Polypyrrole Implants Suitable for Neural Prosthetics[J]. Biomaterials. 2005, 26:3511-3519.
- [7] Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP et al. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(17):8948-8953.
- [8] Stauffer WR, Cui XT. Polypyrrole Doped with 2 Peptide Sequences from Laminin. Biomaterials. 2006, 27(11):2405-2413
- [9] Zhang Z, Rouabhia, Wang Z, et al. Electrically Conductive Biodegradable Polymer Composite for Nerve Regeneration; Electricity-Stimulated Neurite Outgrowth and Axon Regeneration [J]. Artificial Organs. 2007, 31(1):13-22.
- [10] Titushkin, I, Cho M. Regulation of Cell Cytoskeleton and Membrane Mechanics by Electric Field: Role of Linker Proteins [J]. Biophysical Journal. 2009, 96:717-728.
- [11] Michael R. Cho, Hemant S. Thatte, Raphael C. Lee, et al. Reorganization of Microfilament Structure Induced by AC Electric Fields. FASEB J. 1996, 10:1552-1558.
- [12] Sarah Sundelacruz, Michael Levin, David L. Kaplan. Membrane Potential Controls Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells[J]. PLoS ONE. 2008, 3(11):3737-3752.
- [13] Nishimura KY, Isseroff RR, Nuccitelli R. Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds[J]. Journal of Cell Science 1996, 109:199-207.
- [14] Huai Bai, Colin D. McCaig, John V. Forrester, et al. DC Electric Fields Induce Distinct Preangiogenic Responses in Microvascular and Macrovascular Cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1234-1239.
- [15] Guixin Shi, Mahmoud Rouabhia, Shiyun Meng, et al. Electrical stimulation enhances viability of human cutaneous fibroblasts on conductive biodegradable substrates[J]. J Biomed Mater Res. 2008, 84A:1026-1037.

[修回日期] 2012-03-15