

周军,唐志坚,吴雅奇,刘胜文,王煜

摘要 目的:明确Zn²⁺交联的海藻酸钠水凝胶(AH)三维支架的理化特性、超微结构、管道结构的稳定性;评价AH与脊髓神经干/祖细胞(NSPCs)的生物相容性。方法:采用Zn²⁺与海藻酸钠交联制备AH三维支架;光镜和扫描电镜评估其微管道结构;光谱分析仪测定盐酸洗涤后水凝胶内部残留Zn²⁺含量;分离和培养胎鼠(E₁₄)脊髓NSPCs;细胞培养环境下用磷酸盐缓冲液孵育AH三维支架18周,光镜下观察内部管道变化情况,测量重量变化;脊髓NSPCs与AH三维支架共培养,MTT法测定细胞存活率,免疫荧光染色检测NSPCs的分化。结果:AH三维支架管道直径为(93.26±6.24)µm,管道密度为(9.72±2.37)/mm²,管道孔隙率为(66.22±8.97)%;经过盐酸洗涤8次后,AH三维支架内Zn²⁺浓度为0.08 nmoL/mg;脊髓NSPCs在AH三维支架表面的存活率>90%,且可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。结论:AH三维支架仅含有极低浓度的Zn²⁺,且具有稳定的拓扑结构,与脊髓NSPCs有良好的生物相容性。

关键词 海藻酸钠水凝胶;三维支架;神经干/祖细胞;生物相容性

中图分类号 R741;R741.02 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20220210

The Physicochemical Properties of Alginate Hydrogel 3D Scaffold Crosslinked by Zn²⁺ and It's Biocompatibility with Spinal Cord Neural Stem/Progenitor Cells *ZHOU Jun, TANG Zhi-jian, WU Ya-qi, LIU Sheng-wen, WANG Yu. Department of Neurosurgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Hua-zhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China*

Abstract Objective: To clarify the physicochemical properties, ultrastructure, stability of alginate hydrogel (AH) crosslinked by Zn^{2+} and assess the biocompatibility of AH 3D scaffold with spinal cord neural stem/progenitor cells (NSPCs). **Methods:** AH 3D scaffolds were fabricated by crosslinking of alginate with Zn^{2+} . Then the scaffolds were viewed under the optical microscope and scanning electron microscope to view general and ultrastructure respectively. Optical spectrum analyzer was used to test the concentration of Zn^{2+} remained in the scaffold after being washed by HCl solution. After incubation in phosphate buffer saline for 18 weeks, the AH scaffolds were weighed and checked under the optical microscope for capillary structure. MTT method was used to quantify the survival rate of NSPCs co-cultured with AH for different days. The differentiation of NSPCs on AH 3D scaffolds was determined by immunofluorescence. **Results:** The capillary diameter of AH 3D scaffolds was (93.26±6.24) µm, while the porosity of capillaries was (7.83±1.58)% and the density was (68.41±6.51)/mm². The concentration of Zn²⁺ within the scaffold was 0.08 nmoL/mg after 8-time washing by hydrochloric acid. The spinal cord NSPCs could survive (>90%) well and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes on the AH 3D scaffolds. **Conclusion:** AH 3D scaffolds have a stable topological structure with few Zn²⁺ left and show great biocompatibility with spinal cord NSPCs.

Key words alginate hydrogel; 3D scaffold; neural stem/progenitor cells; biocompatibility

海藻酸钠是一种来自海藻细胞壁的高 分子聚合物。在二价阳离子的作用下形成 水凝胶(alginate hydrogel, AH)。AH 在制 药、心肌和骨骼修复中广泛使用^[1-3]。AH 与 中枢神经组织有着良好的组织相容性,并被 用于脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的研 究。采用传统方法交联得到的AH凝胶,其 拓扑结构有一定随机性,常呈蜂窝或海绵 状^[4]。我们前期研究发现采用重力渗透二价 阳离子(如Zn²⁺)的方法可以得到具有线性 微管道结构的AH三维支架,移植AH 后对 SCI有一定的修复作用^[5]。但是,AH三维支架的理化特性和生物学稳定性还需要进一步探索。

由于SCI后脊髓组织发生坏死,形成囊腔,脊髓神经环路被中断,而内源性的神经 干细胞对损伤组织的修复作用有限,大部 分参与形成胶质瘢痕,进一步阻止轴突的 再生¹⁶。因此,外源性细胞移植成为治疗 SCI的重要方法之一。AH三维支架作为移 植细胞的载体可以有效修复组织的连续性, 引导轴突再生。但是再生轴突为脊髓固有 作者单位 华中科技大学同济 医学院同济医院神 经外科 武汉 430030 基金项目 国家自然科学基金 (No. 81901895,81 571242) 收稿日期 2022-04-07 通讯作者 王煜 330722474@qq. com

I

Π

神经元纤维而非调节运动功能的皮质脊髓束,难以达 到满意的功能恢复^[7]。近年来研究发现,脊髓神经干/ 祖细胞(neural stem progenitor cells,NSPCs)具有更接 近脊髓组织特征,既可以分化成神经元发出大量轴突, 也可以促进皮质脊髓束在伤灶内的再生,重建神经功 能^[8]。本研究进一步明确Zn²⁺交联的AH三维支架的理 化特性,并在体外条件下探索AH三维支架与脊髓

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠由华中科技大学同济医学 院实验动物中心提供,同系交配后取孕14d的胎鼠。 本实验经过同济医院实验动物伦理委员会批准。

NSPCs的生物相容性,为下一步的体内研究提供依据。

1.1.2 主要试剂与材料 海藻酸钠粉末、明胶、氯 化锌粉末及六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate,HDI)、多聚甲醛、BCA蛋白测定试剂盒均 购于Sigma公司;无菌去离子水及无菌磷酸盐缓冲溶 液(phosphate buffer saline,PBS)购于Biosharp公司;不 锈钢模具、Neurobasal无血清培养基、B-27、神经营养 因子(脑源性神经营养因子、碱性成纤维生长因子、血 管内皮细胞生长因子、MDL28170)^[9]、胰蛋白酶、 Triton-100X及Tris缓冲盐溶液(Tris buffer saline,TBS) 均购于gibco公司;山羊血清、Tuj-1、Nestin及Olig2单 克隆抗体、Alexa Fluor 488 交联的荧光二抗、MTT增殖 检测试剂盒购于abcam公司;浓盐酸、高氯酸、叔丁醇、 干丙酮、浓硝酸均购于天津化工三厂。

1.2 方法

1.2.1 AH 三维支架的制备 将2g海藻钠酸粉末和 0.2g明胶溶于无菌去离子水,搅拌6h(1000 r/min),配 制成100 mL海藻酸钠明胶(增加支架的稳定性)混合 溶液,经聚醚砜膜(孔径0.2 μm)过滤后倒入圆柱形不 锈钢模具(直径5.0 cm,高度4 cm)。室温下静置24h 去除气泡。将氯化锌粉末溶于无菌去离子水(浓度 1 mol/L),经聚醚砜膜过滤后注入喷雾瓶,喷雾瓶口高 于海藻酸钠明胶混合溶液的液面20 cm喷洒至模具装 满氯化锌溶液。室温下静置48h后取出交联形成的 AH 三维支架置于无菌去离子水中浸泡4次(1 h/次)。 切除支架顶部和底部无管道结构部分后将其置于 500 mL 干丙酮溶液中浸泡4次(1 h/次)。将AH转移 到0.1 mol/L 的HDI-干丙酮溶液中固化4h后置于干丙 酮中浸泡洗涤4次(0.5 h/次)去除多余HDI。用吸水纸 吸除AH表面丙酮后置于70℃的500 mL 无菌去离子 水中浸泡直至凝胶表面无气泡产生(留取部分样本用 于残留离子测定)。将AH置于0.1 mol/L的盐酸中浸 泡8次(15 min/次)以去除多余的金属离子,再用无菌 去离子水浸泡AH至溶液pH呈中性。将所得到的AH 保存在75%酒精中备用。AH使用前,用无菌PBS洗涤 3次(1 h/次)。

1.2.2 AH 三维支架结构稳定性的测定 将 AH 置于 震荡切片机上切割成 5×5×5 mm 大小的立方体并放在 细胞培养皿中,加入 3 mL 无菌 PBS 没过 AH 后在培养 箱中孵育,每隔 3 天更换 1 次 PBS,每次换液后,光镜下 观察海藻酸钠 AH 的孔隙结构并用吸水纸吸出 PBS 后 称重,孵育时间 18 周。

1.2.3 AH三维支架离子残留测定 将尚未用盐酸浸 泡洗涤的样本切割成5×5×5 mm的立方体,冷冻干燥 后称重,并置于2 mL浓硝酸中,120 ℃下加热至浓硝酸 完全挥发,再次加入2 mL浓高氯酸,加热至完全挥 发。重复加入浓缩高氯酸直至残留物为无色,将其溶 解于0.5 mol/L硝酸溶液,光谱分析仪测定硝酸溶液中 金属离子含量。收集经过0.1 mol/L盐酸浸泡不同次数 后的AH,用无菌去离子水洗涤至中性,重复上述步骤, 测定不同盐酸洗涤次数后,AH中残留金属离子含量。

1.2.4 AH三维支架内明胶蛋白含量测定(BCA法) 将AH三维支架置于干燥器(60 ℃)内烘干,将标准蛋 白或干燥的支架并置于BCA工作液(37 ℃)中震荡浸 泡30 min,酶标仪(562 nm)测定吸光度。

1.2.5 AH超微结构分析 将AH放在震荡切片机上 切割形成2×2×2 mm大小的立方体,分别置于30%、 50%、70%、90%和100%的乙醇中梯度脱水(10 min/浓 度)后放在叔丁醇中浸泡5 min,经真空冷冻干燥48 h 后涂覆10 nm金膜,扫描电镜下观察超微结构。

1.2.6 脊髓来源的NSPCs的分离和培养 将孕期14 d 的 SD 大鼠断颈处死, 医用酒精浸泡, 剪开腹部取出子 宫, 在无菌 PBS 溶液中分离出胚胎。在冰上用无菌 PBS 清洗 3 次后置于培养皿中, 显微镜下分离胚胎脊髓, 剥除脊膜, PBS 清洗 3 次, 将脊髓剪成 1×1×1 mm的 组织块。用 0.25% 胰蛋白酶处理后过滤, 离心得到 NSPCs, 重悬于含有 2% B27 和神经营养因子的 Neurobasal 培养基中。

1.2.7 AH与NSPCs共培养 将得到的NSPCs悬液滴加到AH支架(2×2×2 mm,细胞数~10⁶/支架)的管道中或AH支架切片(0.5×4×4 mm,细胞数~10⁶/切片)上。将含有NSPCs的支架或切片置于含有2%B27-Neurobasal培养基的96孔板中培养,在不同时间

节点观察支架管道中细胞情况。

1.2.8 AH 对 NSPCs 存活率影响的测定 NSPCs 在 AH 切片上培养后,不同时间节点弃去培养基,PBS 清 洗后每孔加入MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL,培养箱中孵 育4h 后弃去上清,孔内加入二甲基亚砜 150 μL,振荡 10 min 后在酶标仪上测定每孔吸光值。

1.2.9 免疫荧光染色 将单独培养或与AH共培养细 胞用TBS洗涤后于多聚甲醛中固定15 min,TBS洗涤3 次,在含5%山羊血清/0.25% Triton X-100的TBS封闭 1 h,TBS洗涤3次,含有1%山羊血清的一抗在4℃下 孵育过夜,TBS洗涤3次后用荧光二抗在室温下避光 孵育2 h,TBS洗涤后荧光显微镜下观察结果并拍照。

1.3 统计学处理

本研究采用GraphPad Prism 8.0软件进行制图、数据数据处理和统计分析,符合正态分布以及方差齐性的计量资料以(x±s)表示。

2 结果

2.1 AH三维支架的管道结构及理化特性

Zn²⁺与海藻酸钠水溶液交联形成AH,大体结构颜 色呈半透明,弹性良好。光镜下,AH内含有均一线性 平行的微管道,管道分布均匀,管道直径为(93.26± 6.24)µm,管道密度为(9.72±2.37)/mm²,管道孔隙率为 (66.22±8.97)%。在扫面电镜下可见管道内部的微小突 起。交联的AH支架经过8次洗涤后其所含Zn²⁺剂量低 于0.1 nmoL/mg(0.08 nmoL/mg),明胶含量为(0.11± 0.03)mg/mgAH干重,且支架的管道结构能够保持长期 稳定,体外孵育18周后未发生明显降解反应,见图1。

2.2 脊髓NSPCs具有良好的增殖和分化能力

胚胎源性的脊髓NSPCs在含有神经营养因子的 Neurobasal培养基中培养后3d内聚集成球,干细胞标 记Nestin强阳性表达,1周后细胞球贴壁生长并分化成 神经元,延伸出大量的Tuj-1(+)的突起,部分细胞分化 成星形胶质细胞和少突胶质细胞,见图2。

2.3 AH对NSPCs增殖和分化的影响

脊髓NSPCs在含神经营养因子的Neurobasal培养 基中贴覆于AH表面成球生长,1周后部分分化成神经 元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。其细胞存活率> 90%,且随培养时间延长无明显变化。扫描电镜下可见 NSPCs粘附于管道表面,并分化成神经元细胞,见图3。



本研究探索了Zn²⁺交联的AH生物支架的理化特



注:(A-B)交联后AH的大体观;(C-D)光镜下AH的结构; (E-F)扫描电镜下AH内部管道的超微结构;(G-H)盐酸洗涤后 AH内Zn²⁺含量测定及体外稳定性检测(H);标尺=100 μm 图1 AH三维支架的制备和理化特征



注:(A-C)胚胎源性脊髓NSPCs的分离;(D-E)NSPCs成球 生长和鉴定;(F-J)体外培养7d后NSPCs向神经元、星形胶质细 胞和少突胶质细胞分化;标尺=100 μm 图2 脊髓NSPCs的分离和鉴定

网络结构柱征 证实了其扩持结构的独立。

性和超微结构特征,证实了其拓扑结构的稳定性及其 与脊髓NSPCs良好的生物相容性。

AH移植治疗SCI已经广泛用于动物实验的研究, 其优势在于:填充SCI形成的囊腔,恢复脊髓结构的连 续性;作为细胞的载体,减少移植细胞的用量;为移植细 胞提供免疫屏障,防止或减少排斥反应;持续释放生物 活性分子,并使其在局部发挥作用,提高治疗效率^[10]。 此外,AH内部的微管道结构还可以引导轴突呈接近生 理状态的线性生长,使更多的再生轴突跨过伤灶进入 正常脊髓组织建立突触联系^[11]。



注:(A-B)NSPCs在AH切片表面生长情况;(C)存活率检测;(D-F)向神经元和胶质细胞的分化情况;(G-I)NSPCs在AH 三维支架内的超微结构及神经元分化;标尺=100 μm。

图3 AH三维支架与NSPCs的生物相容性

虽然藻酸盐形成的AH在不同的疾病模型中已有 广泛的研究^[3],但大多数采用的AH无固定的拓扑结 构,其形态和结构受制备环境和技术的影响变异较 大。常用的方法包括二价阳离子(如Ca²⁺)直接混合或 三维打印^[10],这些方法形成的AH含有大量游离的二价 阳离子。与这些方法相比,AH三维支架的制备条件更 为苛刻。且制备过程中通过8次以上的盐酸洗涤后, Zn²⁺的检出浓度极低,从而避免过多的离子影响移植细 胞的存活或对受体组织造成附加损伤^[12]。此外,移植 物拓扑结构能够保持较长时间的稳定性是神经轴突持 续再生的重要前提^[10]。因此,通过体外模拟降解实验 发现,AH三维支架的管道结构能够保持稳定而不发 生降解。

在慢性SCI的动物模型中,AH三维支架与脊髓组 织有着良好的组织相容性,并促进少量的轴突再生,受 体大鼠表现出了一定的功能恢复^[13]。在急性SCI的动 物模型中,将骨髓间充质细胞^[11]、施万细胞^[5]和星形胶 质细胞种植于AH中移植到脊髓组织后,可见大量的 轴突生长进入伤灶,通过增加神经营养因子的表达或 正常脊髓内注射移植细胞,可以进一步诱导再生轴突 进入脊髓组织。由于再生的轴突来自脊髓固有神经 元,对肢体感觉和运动功能的恢复作用有限。因此,深 入了解AH的特性并优化移植策略才能进一步改善 AH的治疗作用。

脊髓NSPCs具有向脊髓神经元和胶质细胞分化的潜能,能很好的修复损伤的脊髓组织。移植脊髓

NSPCs至SCI病灶后分化成的神经元可以形成类似脊髓灰质的板层结构,其发出大量的轴突与正常脊髓组织内的神经元胞体形成突触连接^[14]。但脊髓NSPCs的细胞来源受到伦理学限制,难以满足大量SCI患者的需求。NSPCs联合AH移植则可以减少细胞的用量,且AH的拓扑结构可以引导再生轴突的定向生长。在本研究的体外试验中,NSPCs可以附着于AH表面成球生长,增殖和分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。AH与NSPCs良好的生物相容性为进一步的体内研究奠定了基础。

综上所述,本研究使用Zn²⁺与海藻酸溶液交联制 备的AH三维支架,具有良好拓扑结构稳定性和对脊 髓NSPCs的生物相容性,为探索AH三维支架联合 NSPCs在体移植对脊髓损伤的修复作用提供了依据。

参考文献

[1] Sack KL, Aliotta E, Choy JS, et al. Intra-myocardial alginate hydrogel injection acts as a left ventricular mid-wall constraint in swine[J]. Acta Biomater, 2020, 111: 170-80.

[2] Kim SH, Thambi T, Giang Phan VH, et al. Modularly engineered alginate bioconjugate hydrogel as biocompatible injectable scaffold for in situ biomineralization[J]. Carbohydr Polym, 2020, 233: 115832.

[3] Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials[J]. Macromol Biosci, 2006, 6: 623-633.

[4] Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering[J]. Acta Biomater, 2014, 10: 1646-1662.

[5] Liu S, Sandner B, Schackel T, et al. Regulated viral BDNF delivery in combination with Schwann cells promotes axonal regeneration through capillary alginate hydrogels after spinal cord injury[J]. Acta Biomater, 2017, 60: 167-80.

[6] 刘胜文,王煜,雷霆.神经干细胞移植治疗脊髓损伤研究新进展[J]. 神经损伤与功能重建,2021,16:27-28.

[7] Liu S, Blesch A. Targeted tissue engineering: hydrogels with linear capillary channels for axonal regeneration after spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2018, 13: 641-642.

[8] Hunt M, Lu P, Tuszynski MH. Myelination of axons emerging from neural progenitor grafts after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2017, 296: 69-73.

[9] Lu P, Graham L, Wang Y, et al. Promotion of survival and differentiation of neural stem cells with fibrin and growth factor cocktails after severe spinal cord injury[J]. J Vis Exp, 2014, (89): e50641.

[10] Liu S, Schackel T, Weidner N, et al. Biomaterial-Supported Cell Transplantation Treatments for Spinal Cord Injury: Challenges and Perspectives[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 430.

[11] Günther MI, Weidner N, Müller R, et al. Cell-seeded alginate hydrogel scaffolds promote directed linear axonal regeneration in the injured rat spinal cord[J]. Acta Biomater, 2015, 27: 140-150.

[12] Zündorf G, Reiser G. Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection[J]. Antioxidants Redox Signaling, 2010, 14: 1275-1288.

[13] Huang L, Wang Y, Zhu M, et al. Anisotropic Alginate Hydrogels Promote Axonal Growth across Chronic Spinal Cord Transections after Scar Removal[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2020, 6: 2274-2286.

[14] Kumamaru H, Lu P, Rosenzweig ES, et al. Regenerating Corticospinal Axons Innervate Phenotypically Appropriate Neurons within Neural Stem Cell Grafts[J]. Cell Rep, 2019, 26: 2329-2339.

(本文编辑:唐颖馨)