

技术与方法

应用多种水凝胶支架材料构建三维神经干细胞培养模型

吴玥婷^{1,2,3} 李朝晖^{4*} 崔占峰⁴ 刘庆喜³ 孙贺³ 张耀洲⁵¹天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193; ²天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457;³天津卫凯生物工程有限公司, 天津 300457; ⁴英国牛津大学, 生物医学工程研究所, Oxford OX13PJ, U. K.;⁵天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要 该研究以鼠尾胶原、透明质酸以及海藻酸钠为主要成分,同时添加功能化的层粘连蛋白形成12种生物材料支架。应用大鼠神经干细胞(rat neural stem cells, rNSCs)体外培养,比较了支架的生物相容性和功能特点。结果显示,鼠尾胶原和透明质酸支架形成的三维多孔结构利于rNSCs的黏附,培养7 d后,1 mg/mL胶原组内的细胞活力更强,而含15%交联剂的层粘连蛋白-透明质酸支架内细胞与神经突触相互缠绕,展现出更明显的神经元样生理形态和特异性蛋白。1.5%海藻酸钠胶珠内的细胞呈球体生长,更适用于进行细胞的大规模动态培养。该研究构建的支架与rNSCs具有良好的生物相容性,利于其增殖和分化。因此,rNSCs分化后的神经元与水凝胶构成的三维培养模型,有望进一步应用于神经退行性疾病的研究和相关药物检测中。

关键词 神经干细胞; 三维培养模型; 生物支架; 胶原; 透明质酸; 海藻酸钠

The Study of Three-dimensional Neural Stem Cell Culture Models Using Various Hydrogel Scaffolds

Wu Yueting^{1,2,3}, Li Zhaohui^{4*}, Cui Zhanfeng⁴, Liu Qingxi³, Sun He³, Zhang Yaozhou⁵¹Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193,China; ²Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China; ³Tianjin Weikai Bioeng Ltd.,Tianjin 300457, China; ⁴The Institute of Biomedical Engineering, Oxford University, Oxford OX13PJ, U. K.;⁵School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract In this study, naturally derived hydrogels including collagen, hyaluronic acid (HA) and sodium alginate were selected as the main components and functionalized with laminin to produce 12 types of scaffolds. Applied with rat neural stem cells (rNSCs) cultured *in vitro*, the comparison of the biocompatibility and functions among these scaffolds was studied. The results showed that collagen and HA based scaffolds possessed three-dimensional porous structures to support rNSCs adhesion after being cultured for 7 d. The 1 mg/mL of collagen-based scaffolds had superb support for rNSCs proliferation, while the synapses surrounded with the cells and even emerged the specific protein and shape of neuron in HA-based scaffolds functionalized laminin with 15% cross-

收稿日期: 2014-07-31 接受日期: 2014-10-13

国家科技部国际合作项目(批准号: 2011DFA31960)资助的课题

*通讯作者。Tel: +0044-186-5617654, E-mail: zhaohui.li@eng.ox.ac.uk

Received: July 31, 2014 Accepted: October 13, 2014

This work was supported by the Foundation of the International Cooperation Project of Science and Technology Ministry of China (Grant No.2011DFA31960)

*Corresponding author. Tel: +0044-186-5617654, E-mail: zhaohui.li@eng.ox.ac.uk

网络出版时间: 2014-12-24 11:09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141224.1109.001.html>

linker group. On the contrast, 1.5% sodium alginate-based scaffolds provided the microenvironment to allow neuronsphere formation, which were more suitable for large-scale dynamic culture of stem cell derived neurons. The selected hydrogels possessed excellent biocompatibility to support stem cell derived rNSCs viable and functioning during proliferation and differentiation. The *in vitro* 3D stem cell derived neuron model combined with various hydrogels developed here could be useful for neurodegenerative diseases research and drug testing.

Keywords neural stem cells; three-dimensional culture model; scaffolds; collagen; hyaluronic acid; sodium alginate

中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病每年至少会影响到两百万人的生活^[1-2]。体外研究这类疾病的神经模型主要是基于平面贴壁(二维)培养的神经瘤细胞,如SH-SY5Y^[3]、C6^[4]、PC12^[5]。这种培养细胞生长快,成本低并易于操作。然而,中枢神经系统发挥生理功能的环境是一个立体的三维体系。脑内的神经系统是由多种神经细胞在三维(three-dimension, 3D)空间的相互作用下形成的^[6-8]。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)可以不断增殖并分化为神经元、神经胶质细胞^[9],是体外重建神经模型的种子细胞。NSCs体外三维培养是将细胞接种于可以充当细胞外基质的生物材料构成的支架中,进行体外培养的技术。其优势在于克服了二维培养的弊端,最大限度模拟体内的微环境使细胞功能充分发挥,支撑细胞在空间上的黏附和伸展分化产生类三维组织特异性结构,应用于组织工程修复、新药开发以及疗效和毒理试验。体外三维模型构建的研究,目前主要集中在优化和改进三维结构支架材料以便提供更接近细胞体内生存环境的体外培养微环境,其中胶原^[10-11]、透明质酸^[12]、海藻酸钠^[13-14]等天然生物材料得到了广泛的关注。本研究主要针对适用于神经干细胞生长及分化的三种天然水凝胶(I型胶原蛋白、透明质酸、海藻酸钠)为主要成分,再添加层粘连蛋白(laminin)功能化修饰后形成的共12种三维支架,将大鼠神经干细胞分别接种在这12种三维支架中,并对细胞进行诱导分化7 d。对细胞在不同支架材料里的活性、生长和分化情况、诱导分化程度及功能性差异进行了比较。该研究对筛选支架材料及构建具有不同应用方向的体外三维神经模型具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

DMEM培养液、F12、B27、N2、bFGF、Glu-

tamax、Heparin、BSA、D-Glucose、EGF、laminin、Neurobasal培养基、BDNF、NGF购自Gibco公司; HEPES(Roche公司); RPMI-1640培养液、NaHCO₃、AccutaseTM、HyStem试剂盒、海藻酸钠、柠檬酸钠、CaCl₂、NaCl、反式维甲酸(RA)购自Sigma公司; 鼠尾I型胶原购自Trevigen公司; CCK-8购自上海贝博生物公司; Live/Dead viability-Cytotoxicity Kit购自Invitrogen公司; Anti-Nestin IgG、Anti-Tuj1 IgG、Anti-GFAP IgG购自Abcam公司; 山羊抗小鼠二抗IgG、TRITC标记山羊抗兔二抗IgG购自北京中杉金桥生物公司。酶标仪购自Sunrise公司; 荧光倒置显微镜购自Olympus公司; Operetta高内涵成像系统购自PE公司。

1.2 体外大鼠神经干细胞(rat neural stem cells, rNSCs)的分离和培养

取孕14 d的Sprague-Dawley(SD)大鼠,引颈处死后,剪开子宫壁,取出胚胎,于体式显微镜下去除胚胎头部的两层膜暴露整个脑部,取出海马区脑组织,用剪刀剪成1 mm³的碎片加入AccutaseTM 1 mL, 37 °C震荡酶解15 min, 120 ×g离心5 min,获得rNSCs后进行原代及继代培养。增殖培养基为DMEM/F12/RPMI-1640(1:1:1)混合作为基础培养基,添加生长因子EGF, 20 ng/mL; bFGF, 10 ng/mL; Heparin, 5 mg/mL; Hepes, 5 mmol/L; Glucose, 23.33 mmol/L; Glutamax, 3 mmol/L; BSA, 2 mg/mL; 加入2%荷尔蒙添加剂B27后用NaHCO₃调节pH值至7.2。

1.3 构建三维rNSCs-支架模型

将培养至第三代的rNSCs,用AccutaseTM裂解液解离成单细胞。

海藻酸钠(Alginate)胶珠组:将海藻酸钠(Sigma公司)用MilliQ水配制成1.5%和2.5%(w/v%)溶液,用制成的海藻酸钠溶液吹悬细胞并计数后,吸入1 mL注射器中。在磁力搅拌器转速为100 r/min的作用下,将海藻酸钠溶液通过孔径为5 mm针头

的注射器逐滴滴加到1.5%(w/v%) CaCl_2 溶液中, 滴定速度为1 mL/min, 固化时间为10 min, 针头与液面距离为10 cm。NaCl溶液和新鲜培养基分别洗涤3次后, 放入96孔板中即得到包埋细胞的海藻酸钠微胶珠三维构建物。

鼠尾胶原(Collagen)水凝胶组: 鼠尾胶原(Trevigen)溶解于20 mmol/L乙酸配制成胶原液浓度为2 mg/mL和4 mg/mL, 用0.1 mol/mL的NaOH调整pH至7.2, 置于冰浴中备用。调整细胞密度(接种终密度的两倍), 培养基吹悬细胞后与胶原液(1:1)混合均匀, 每孔添加36 μL 细胞与胶原混合液, 即鼠尾胶原终浓度为1 mg/mL和2 mg/mL。 CO_2 培养箱中孵育30 min, 即得到细胞-鼠尾胶原水凝胶三维构建物。

透明质酸(hyaluronic acid, HA)水凝胶组: HyStem试剂盒(Sigma公司)内冻干状固体HyStem™(巯基修饰的透明质酸HA)和Extralink™(聚乙二醇二丙烯酸酯, PEGDA)分别用脱气去离子水溶解后获得10 mg/mL储存液。HA与PEGDA(4:1和4:0.7)混合均匀后, 分别配得含20%和15%(v/v%)交联剂PEGDA的透明质酸溶液, 加入细胞沉淀中调整到接种密度。 CO_2 培养箱中孵育20 min, 即得到细胞-透明质酸水凝胶三维构建物。

修饰组将1 mg/mL的层粘连蛋白分别与不同支架材料以10%(v/v%)的比例涡旋混合, 使层粘连蛋白均匀地依附于支架内。

三种材料构成的12组细胞-支架构建物均置于96孔板内, 细胞量为 1×10^5 /孔, 上层添加200 μL 分化培养基(RPMI-1640为基础培养基, 添加5% FBS及1 $\mu\text{mol/L}$ 的RA, 用 NaHCO_3 调节pH值至7.2), 置于37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中静态培养。

1.4 细胞活力测定

吸弃12组支架-构建物上层培养基, 每孔加入100 μL (含10% CCK-8试剂液)的活力测定液, 置于37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育3 h后, 在450 nm波长下测定 D 值。接种24 h内为第0 d, 分别在第0, 3, 7 d测定细胞的 D 值, 比较不同支架间及修饰组与未修饰组之间的差异。

1.5 活细胞染色

利用Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit中两种荧光探针检测细胞在支架内存活的状态。弃掉三组细胞-支架构建物上层的培养基, 0.01 mol/L PBS浸洗3次, 每次5 min。配制Calcein AM及EthD-1工作液

至4 $\mu\text{mol/L}$, 添加100 μL 到96孔板上的每个样品孔中, 孵育30 min后, 吸弃染液并用0.01 mol/L PBS浸洗3次, 每次5 min。在倒置荧光显微镜下观测细胞三维构建物内的活细胞的分布。

1.6 三维构建物免疫荧光染色

为了观察细胞-支架三维构建物内rNSCs特异性标记物Nestin及分化后神经元及星形胶质细胞特异性标记物Tuj1和GFAP的表达情况, 对培养7 d的三维构建物进行了免疫荧光染色。海藻酸钠组将微胶珠用0.01 mol/L PBS溶液洗涤3次后, 将其置于55 mmol/L柠檬酸钠溶液中震荡作用10~15 min, 直到胶珠完全被柠檬酸钠溶解。离心后, 用分化培养基吹悬, 接种于96孔板培养, 12 h后吸弃培养基, 胶原和透明质酸组直接吸弃支架-细胞构建物上层的培养基, 用新鲜的0.01 mol/L PBS充分润洗3次。加入4%的多聚甲醛, 固定1 h后用0.01 mol/L PBS润洗3次。加入0.3% TritonX-100作用15 min后, 用羊血清封闭1 h。添加鼠抗Nestin单克隆抗体(1:250)、鼠抗Tuj1(1:250)单克隆抗体和兔抗GFAP(1:400)多克隆抗体(双染), 4 $^\circ\text{C}$ 过夜后加入FITC标记的羊抗兔和TRITC标记的羊抗兔二抗液, 避光孵育1 h后Hoechst核染20 min, 用PBS浸洗3次。Operetta高内涵成像分析系统(High Content System, PE)拍照并记录荧光强度。

1.7 数据分析

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析处理, 所有数据以均数 \pm 标准差表示, 各组间的数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

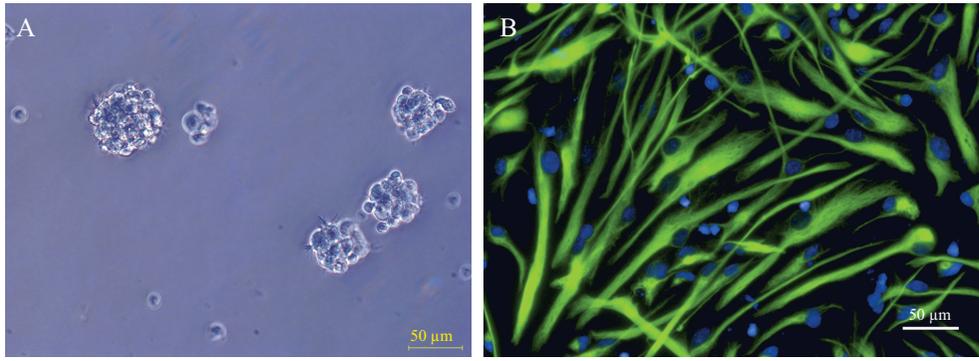
2 结果

2.1 扩增过程中rNSCs的生长状态及特异性蛋白的表达

将分离的原代rNSCs悬浮培养, 呈多个细胞聚集的神经球, 细胞形态饱满, 折光性强(图1A)。将悬浮培养至第二代的神经球用Accutase™细胞分离液解离成单细胞悬液, 接种于PORN和LN包被的玻片上, 24 h贴壁后进行神经干细胞特异性蛋白Nestin/Hoechst免疫荧光染色。倒置显微镜下记录染色结果, 如图1B所示, 第二代rNSCs中93%的细胞呈现Nestin阳性表达, 可认定其具有神经干细胞特征。

2.2 三维支架内rNSCs的活力测定

rNSCs在12种三维支架内的 D 值显示, 接种后7 d内细胞保持着很高的活性。与第0 d(100%)相比,

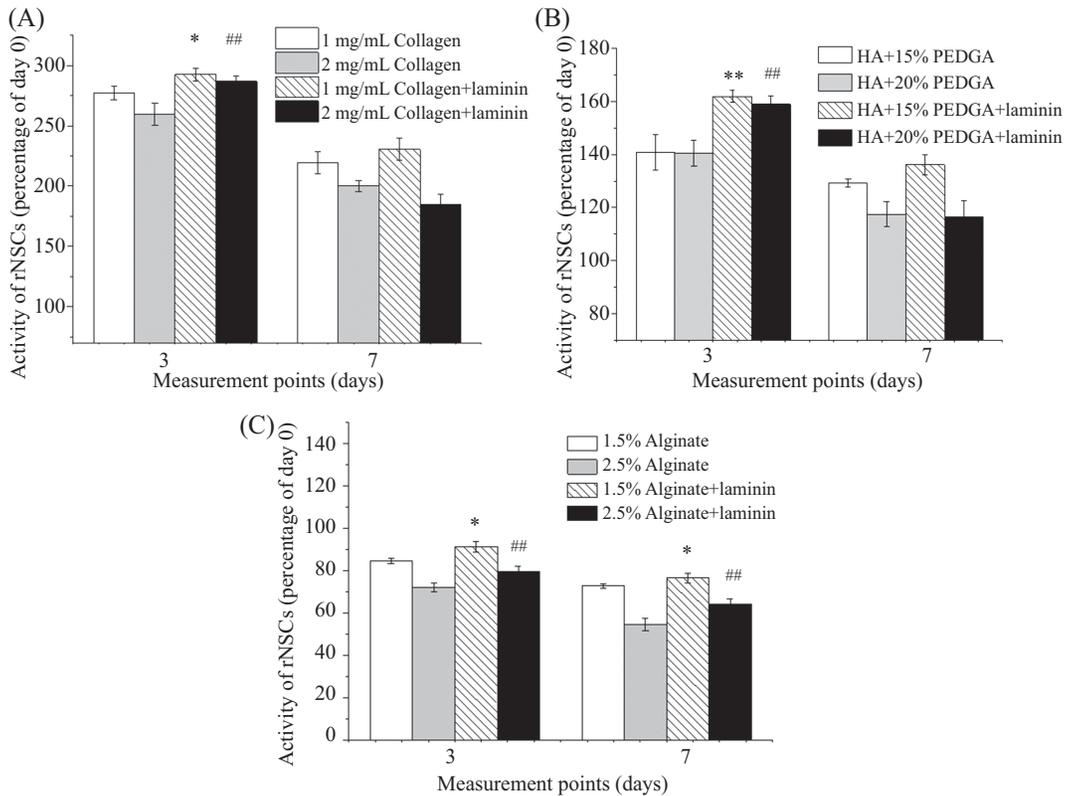


A: 第二代悬浮培养的rNSCs细胞球; B: 免疫荧光染色下大部分细胞呈Nestin阳性(绿色), 细胞核为蓝色。

A: the rNSCs of passage 2 grown as floating neurospheres; B: most of the cells were Nestin-positive (green) in immuofluorescence assay. The nuclei were shown with blue.

图1 rNSCs体外培养形态及鉴定

Fig.1 Morphology and identification of the rNSCs cultured *in vitro*



A: 胶原组; B: 透明质酸组; C: 海藻酸钠组。三次独立实验结果用均数±标准差表示, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$, 同一时间点下修饰了层粘连蛋白组与支架材料及浓度相同的未修饰组相比, *为同一支架材料的第一种浓度, #为同一支架材料的第二种浓度。

A: collagen group; B: HA group; C: alginate group. mean±SEM of three separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ modified laminin group vs unmodified group with same material and concentration of scaffold on the same measurement point, *standed for the first concentration of the same scaffold, #standed for the second concentration of the same scaffold.

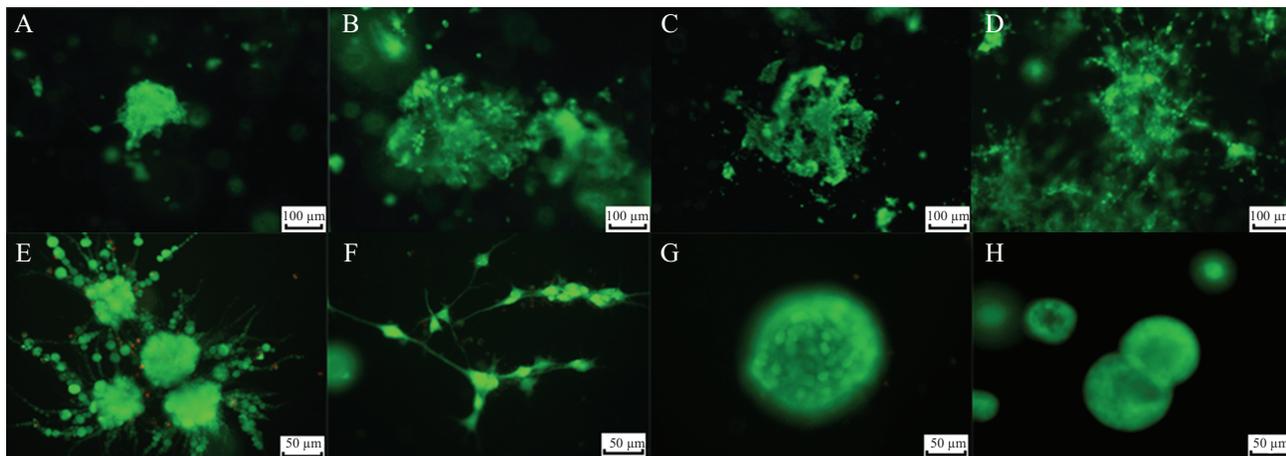
图2 细胞在胶原、透明质酸、海藻酸钠为主要材料的12种支架内第3, 7 d细胞活力比较

Fig.2 The comparison of cells activity of rNSCs in 12 scaffolds of collagen, HA, and alginate after seeding 3 and 7 days

四组胶原支架组的细胞在第3 d及第7 d细胞活力分别高于250%和184%, 其中1 mg/mL胶原修饰组尤为突出, 7 d内扩增2.31倍(图2A)。可见鼠尾胶原的浓度对于凝胶的形成及支架结构内孔径大小等具有重要的意义, 胶原浓度越高, 形成的支架结构内孔径越

密集, 这虽然提高了支架的力学强度, 但rNSCs没有足够的生长空间, 不利于细胞的增殖和分化。

含15%交联剂的透明质酸组生长活力高于20%交联剂组(图2B)。添加PEGDA交联剂的目的主要是与透明质酸键合形成水凝胶^[15], 其支架结构内孔



A、B: 第3 d 1 mg/mL胶原组的rNSCs。A: 未修饰组; B: 修饰组; C、D: 第7 d 1 mg/mL胶原组的rNSCs。C: 未修饰组; D: 修饰组; E、F: 第3 d和第7 d rNSCs在15%交联剂的透明质酸修饰组; G: 第7 d rNSC在透明质酸未修饰组; H: 第7 d rNSCs在15%海藻酸钠修饰组。

A,B: the rNSCs in 1 mg/mL of collagen scaffolds at day 3. A: unmodified group; B: modified group; C,D: the rNSCs in 1 mg/mL of collagen scaffolds at day 7. C: unmodified group; D: modified group; E, F: the rNSCs in 15% HA+PEDGA modified group at day 3 and day 7; G: the rNSCs in unmodified HA group at day 7; H: the rNSCs in 15% alginate modified group at day 7.

图3 rNSCs在支架中培养3, 7 d后的活细胞染色(所有图片均为活细胞染色后的叠加效果图)

Fig.3 The distribution of live rNSCs in scaffolds after seeding 3 and 7 days (all the images were being overlaid)

径和交联的时间与PEGDA在整个交联体系中的含量成反比。由于交联剂含量为20%，支架成胶时间较短，可以在不损伤细胞的情况下快速交联，同时避免在未形成支撑孔道结构前细胞沉于凝胶底部贴壁生长。但交联剂含量过高所形成支架孔径较小，不利于细胞增殖；交联剂的比例过低（少于10%），交联的时间延长，形成的孔径较大，促进了水分子的渗透，直接影响了透明质酸的成胶质量，甚至不能形成水凝胶，无法满足支架材料的在力学特性上的要求。因此，经过优化的含15%交联剂的透明质酸修饰组的细胞活力突出，7 d内扩增1.36倍。

1.5%的海藻酸钠支架内的细胞活力高于2.5%海藻酸钠组，但7 d培养后未见增殖。这可能是由海藻酸钠本身材料的生物特性决定的。与鼠尾胶原和透明质酸不同，海藻酸钠为一种从海草中提取出来的多糖，本身没有支持细胞附着和生长所需的生物功能性。经过精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽段修饰后，可以很好地支持细胞生长分化及维持细胞的功能性^[16]。本次研究是采用物理方法将层粘连蛋白与海藻酸钠混合，而不是化学方法修饰，这可能是导致层粘连蛋白在提高细胞活性上没有充分发挥作用的原因。

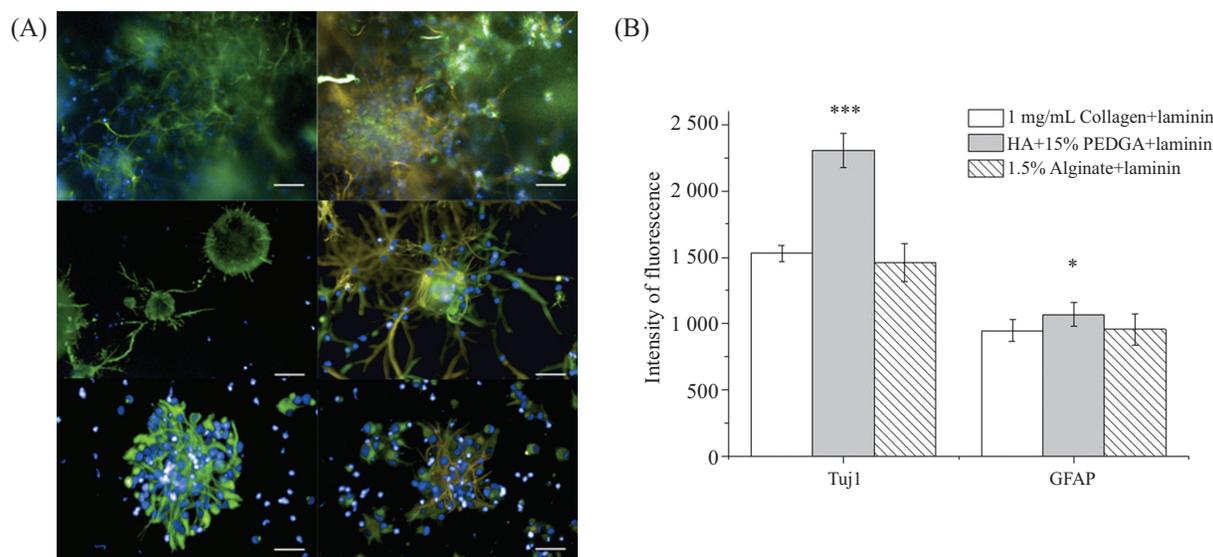
经过SPSS 17.0软件统计分析，第3 d经过修饰后的三种材料支架内的细胞活力均高于相同材料构成的未修饰组，且存在显著性差异，而第7 d时只有

海藻酸钠修饰组依然存在显著性差异。可见，层粘连蛋白在细胞接种后的3 d内，对细胞的活力有显著性的影响；在培养后期，细胞的活力主要由支架的生物组成成分及支架结构特性决定，而海藻酸钠组由于支架本身无生物活性成份，所以对细胞增殖没有贡献。

2.3 三种支架材料内rNSCs形态及活细胞染色结果

不同浓度的胶原水凝胶内的rNSCs生长形态并没有显著的差异。接种第3 d后，未修饰层粘连蛋白组的rNSCs仍然保持致密的团簇状态(图3A)，而修饰组的细胞形成松散的团簇结构，少数处于边缘的细胞有向外延伸的趋势(图3B)。经过7 d的培养，未修饰组的细胞形态与修饰组第3 d的形态相似，开始出现松散状(图3C)。修饰组细胞沿着支架材料迁移明显，支架内的细胞由团簇逐渐向三维空间迁移，与相邻团簇间细胞相遇并形成连接，形成空间上的三维结构(图3D)。可见，层粘连蛋白对于细胞的黏附和迁移起到了促进作用，为干细胞向神经元转化提供了有利的细胞外基质环境。

透明质酸水凝胶中的rNSCs培养7 d后保持着很高的活率。只有15%交联剂的修饰组(图3E)在第3 d时神经球周围就出现了许多突触，几个神经球相互聚集，其边缘的神经突触交织在一起，突触的周围有少量细胞的死亡，并且在第7 d(图3F)出现神经元样的轴突与树突的形态，神经节明显^[17]。而其他



A: rNSCs在胶原、透明质酸及海藻酸钠修饰组中Nestin、Tuj1及GFAP的表达, 左侧绿色区域为Nestin阳性, 右侧绿色为Tuj1阳性, 黄色为GFAP阳性, 蓝色为细胞核。标尺=50 μ m; B: rNSCs在三种支架内Tuj1和GFAP荧光强度的比较(* P <0.05, *** P <0.001, 透明质酸支架与其他两种材料支架相比)。

A: the Nestin, Tuj1 and GFAP expressions of rNSCs in collagen, HA and alginate modified groups. Green area represented Nestin positive on left hand, while Tuj1 and GFAP were shown with green and yellow respectively on the right. The nucleus were blue. Scale bars=50 μ m; B: the fluorescence intensity of Tuj1 and GFAP in three types of scaffolds (* P <0.05, *** P <0.001 HA scaffolds vs the other two different materials scaffolds).

图4 rNSCs在三种材料中分化培养7 d后特异性蛋白的表达

Fig.4 The specific protein expression of rNSCs embedded in the three scaffolds after differentiated 7 d

条件的透明质酸组仍旧保持紧密的团簇状生长(图3G)。

不同浓度配比所制备的海藻酸钠微胶珠表面无明显差异, 呈现白色半透明状, 多为规则的球体。rNSCs在以不同浓度的海藻酸钠为主要支架材料的微胶珠中均保持团状球形生长(图3H), 与其他两组水凝胶中所形成的团簇是不同的。随着培养时间的延长, 细胞球会出现与周围的细胞球边缘融合在一起的形态。

2.4 rNSCs在支架内分化培养7 d后特异性蛋白的表达

为了进一步评价细胞-支架构建物中的rNSCs的分布及分化情况, 对三维状态下培养了7 d的细胞进行了免疫荧光染色。如图4A所示, 细胞均匀分布于细胞-支架构建物内, 均表达神经干细胞特异性蛋白Nestin阳性、神经元特异性蛋白Tuj1阳性、星形胶质细胞特异性蛋白GFAP阳性。可见, 三种材料的支架材料与rNSCs有良好的相容性, 对其分化有促进作用。Operetta高内涵成像分析系统分析后得出(图4B), 含15%交联剂的透明质酸修饰组Tuj1和GFAP的荧光强度均高于其他两种材料, 且存在统计学差异, 即促分化作用更明显。

3 讨论

本研究主要比较了以I型鼠尾胶原、透明质酸、海藻酸钠为主要材料采用不同的制备方法得到的12种支架, 实验所用的分离、培养的大鼠胚胎神经干细胞通过常规的增殖方法, 呈神经球悬浮生长、免疫细胞化学染色呈Nestin染色阳性。

目前, 应用NSCs在体外构建神经样组织仍处于实验阶段, 尚无标准化的实验方法, 然而将三维培养技术应用用于体外神经再生医学工程已逐渐得到关注^[18-19]。无支架的神经球是其中一种三维NSCs培养模型, 这种模型易于研究细胞与细胞之间的相互作用, 但对研究细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)间的相互作用帮助有限^[20]。同时, 细胞球模型无法提供给细胞生长所需的空间构架, 因此对于像神经细胞这类需要足够空间生长和分化的细胞类型不完全适用。相比之下, 采用生物材料做支架进行三维培养的模式更适于体外神经细胞的培养。作为NSCs理想的组织工程材料在选择和制备上应具备以下条件^[21]: (1)具有一定的三维空间, 应有适当的孔隙结构以适于轴突生长; (2)具有很好的生物相容性; (3)能成为携带促进神经生长分子的释放系统, 维持较长时间对神经修复所需因子的供

表1 以鼠尾胶原、透明质酸、海藻酸钠为主要材料的12种支架的比较

Table 1 The comparison of twelve scaffolds with collagen, hyaluronic acid and sodium alginate as the main materials

组别 Group	主要成分 Component	透光性 Transparency	易操作性 Controllability	成球度 Spheronization	rNSCs增殖 rNSCs proliferation	rNSCs分化 rNSCs differentiation
1	1 mg/mL Collagen	★★★	★★★		★★★	★
2	2 mg/mL Collagen	★★★	★★★		★★★	★
3	1 mg/mL Collagen+laminin	★★★	★★★		★★★	★★
4	2 mg/mL Collagen+laminin	★★★	★★★		★★★	★★
5	HA+15% PEDGA	★★★	★★★		★★	★
6	HA+20% PEDGA	★★★	★★★		★★	★
7	HA+15% PEDGA+laminin	★★★	★★★		★★	★★★
8	HA+20% PEDGA+laminin	★★★	★★★		★★	★★
9	1.5% Alginate	★	★	★	★	★
10	2.5% Alginate	★	★	★★★	★	★
11	1.5% Alginate+laminin	★	★	★	★	★
12	2.5% Alginate+laminin	★	★	★★★	★	★

应; (4)具有促进细胞生长的细胞外基质成分。据此我们筛选了三种适于神经细胞生长的天然水凝胶作为支架材料,包括I型鼠尾胶原、透明质酸和海藻酸钠。每种材料选择两种适宜浓度,并对这两种浓度的水凝胶分别进行与层粘连蛋白的物理修饰,这样就形成了12种不同材料和制备方法的水凝胶。将体外分离的大鼠胚胎神经干细胞接种到这12种水凝胶中,从而形成了12种“细胞-支架”的三维模型。通过培养及相关生物实验检测,筛选出最佳的适宜于不同用途的体外三维神经模型。

CCK-8和活细胞染色结果显示,三维培养下rNSCs生长状态均良好,说明这三种支架材料与大鼠胚胎神经干细胞具有很好的相容性并保持干细胞的基本特性,均可作为体外构建rNSCs的三维培养模型的备选来源。同时对12种支架在透光性、易操作性、成球度、促进rNSCs增殖及分化五个方面进行了比较,如表1所示。总的来说,相对于二维单层培养,三维培养下的细胞在明场下观测相对困难,操作上也需要特殊的工艺。但三维培养下神经干细胞的增殖和分化以及神经元细胞的生理功能有明显优势。就这三类支架材料相比,作为脑内细胞外基质主要成分的鼠尾胶原和透明质酸所制备的水凝胶支架在透光性及易操作性上占有很大优势。纤维状结构相互交联给细胞提供了较大的表面积,易于细胞增殖,1 mg/mL鼠尾胶原支架尤为明显。层粘连蛋白是细胞生长环境中必不可少的细胞外基质,经过层

粘连蛋白修饰后的支架具有很好的促细胞黏附及迁移的能力,更好地促进神经干细胞黏附及新生轴突生长,以含15%交联剂的透明质酸修饰组尤为明显,且促神经干细胞分化能力优于胶原蛋白和海藻酸钠微胶珠,无论是形态还是特异性蛋白的荧光强度都存在明显优势。海藻酸钠微胶珠可以为细胞提供一个相对稳定的生存微环境。由于海藻酸钠材料本身没有较多的生物活性成分,并且胶珠内部的类似液态的环境可以使细胞能够自由地移动,便于细胞球生成或细胞球之间的融合,适合大规模的神神经球培养。

总之,三种材料的支架均有自身独特的优势,可以针对神经干细胞研究的不同需要,选择优化的体外三维模型进行研究或应用。本实验只是初步研究和评估了12种支架内大鼠神经干细胞在三维构建物中的形态、增殖和分化情况,其中涉及了组织工程和神经干细胞方面的内容,为后期有针对性地研究三维培养的神经干细胞,以及将其应用于药物筛选和神经塑形及功能重建等方面提供了基础性支持。

参考文献 (References)

- 1 Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009; 7(1): 65.
- 2 Ma T, Klann E. PERK: A novel therapeutic target for neurodegenerative diseases? *Alzheimer's Res Ther* 2014; 6(3): 30.
- 3 Jeong EY, Kim S, Jung S, Kim G, Son H, Lee DH, *et al.* En-

- hancement of IGF-2-induced neurite outgrowth by IGF-binding protein-2 and osteoglycin in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 2013; 548: 249-54.
- 4 Tiffany-Castiglioni E, Hong S, Qian Y. Copper handling by astrocytes: Insights into neurodegenerative diseases. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29(8): 811-8.
- 5 Zusiak SP, Pubill S, Ribeiro A, Leach JB. Hydrolytically degradable poly (ethylene glycol) hydrogel scaffolds as a cell delivery vehicle: Characterization of PC12 cell response. *Biotechnol Prog* 2003; 29(5): 1255-64.
- 6 Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 2008; 88(3): 983-1008.
- 7 Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, *et al.* Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 2005; 120(3): 421-33.
- 8 Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, *et al.* Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet* 2007; 39(8): 969-76.
- 9 Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, *et al.* *In vivo* clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell* 2001; 145(7): 1142-55.
- 10 Cui Y, Lu C, Meng D, Xiao Z, Hou X, Ding W, *et al.* Collagen scaffolds modified with CNTF and bFGF promote facial nerve regeneration in minipigs. *Biomater* 2014; 35(27): 7819-27.
- 11 Sancho A, Vázquez L, De-Juan-Pardo EM. Effect of cold storage on collagen-based hydrogels for the three-dimensional culture of adipose-derived stem cells. *Biofabr* 2014; 6(3): 035017.
- 12 Gaston J, Thibeault SL. Hyaluronic acid hydrogels for vocal fold wound healing. *Biomater* 2013; 3(1): e23799.
- 13 Bouhadir KH, Lee KY, Alsberg E, Damm KL, Anderson KW, Mooney DJ, *et al.* Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnol Prog* 2001; 17(5): 945-50.
- 14 薛伟明, 于炜婷, 刘袖洞, 贺欣, 王为, 马小军. 载细胞海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究. *高等学校化学学报* (Xue Mingwei, Yu Weiting, Liu Xiudong, He Xin, Wang Wei, Ma Xiaojun. Chemical method of breaking the cell-loaded sodium alginate/chitosan microcapsules. *Chemical Journal of Chinese Universities*) 2004; 25(7): 1342-6.
- 15 李凯, 吕少一, 周建业, 商青青, 邵自强, 胡盛寿. 不同浓度透明质酸水凝胶的细胞相容性. *中国组织工程研究* (Li Kai, Lü Shaoyi, Zhou Jianye, Shang Qingqing, Shao Ziqiang, Hu Shengshou. Cytocompatibility of hyaluronic acid hydrogels with concentration variations. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2013; 17(16): 2927-34.
- 16 Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomater* 1999; 20(1): 45-53.
- 17 Lei WL, Xing SG, Deng CY, Ju XC, Jiang XY, Luo ZG. Laminin/ β 1 integrin signal triggers axon formation by promoting microtubule assembly and stabilization. *Cell Res* 2012; 22(6): 954-72.
- 18 Irons HR, Cullen DK, Shapiro NP, Lambert NA, Lee RH, Laplaca MC, *et al.* Three-dimensional neural constructs: A novel platform for neurophysiological investigation. *J Neural Eng* 2008; 5(3): 333-41.
- 19 Tsutsui K, Taira M, Sakata H. Neural mechanisms of three-dimensional vision. *Neurosci Res* 2005; 51(3): 221-9.
- 20 Sowa MB, Chrisler WB, Zens KD, Ashjian EJ, Opresko LK. Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells. *Mutat Res* 2010; 687(1/2): 78-83.
- 21 Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, *et al.* Evaluation of *in vitro* proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res* 2002; 69(6): 869-79.