

基于不同仿生纤维密度的细胞响应行为研究

周璟 唐寒 易兵成 沈炎冰 沈勇 薛苏桐 张彦中*

(东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620)

摘要 在组织再生中, 电纺纤维具有仿生天然细胞外基质(ECM)纤维结构的优势, 可为理解细胞对其生存微环境的动态重塑过程提供理想的研究平台, 但常规电纺纤维膜的致密性带来的纤维间纵横交叉相互牵掣问题, 最终导致其作用与表面呈纳米纤维状拓扑结构的实体材料类似, 因而不能“精准”了解细胞对仿生纤维微环境的重塑作用。该研究通过控制电纺纤维的沉积时间, 在经硅烷化处理的玻片上接收不同密度的明胶/聚己内酯(GT/PCL)纤维基质, 然后通过CCK-8、骨架染色、SEM、qRT-PCR、ELISA、免疫荧光染色等方法, 研究纤维密度变化对C3H/10T1/2细胞的形貌、增殖、ECM分泌及基质降解能力的影响。结果表明, 细胞活力与纤维密度相关, 合适的低密度微量纤维(103.0 ± 13.2) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 更利于实现细胞重塑纤维基质微环境。该研究为今后“精准”设计仿生纤维基质用于组织再生以及深入了解细胞-纤维间的相互作用提供了新的思路和研究基础。

关键词 电纺仿生纤维; 纤维密度; 细胞外基质; 基质降解; 重塑

Effect of Different Biomimetic Fiber Density on Cellular Responses

ZHOU Jing, TANG Han, YI Bingcheng, SHEN Yanbing, SHEN Yong, XUE Sutong, ZHANG Yanzhong*

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

Abstract In the field of tissue regeneration, electrospun fibers with the characteristics of biomimicking fibrous structure of the native ECM (extracellular matrix) could provide an ideal platform for exploring the dynamic remodeling process of cells in their residing microenvironment. However, the compactness of conventional electrospun fibrous mats with the nanoscaled fibers crisscrossing and entangling with each other, eventually leads to a topological phenomenon similar to that of the nanofiber-like topography embossed on the surface of a solid matter. Therefore, it is impossible to accurately determine the remodeling effect of cells on the biomimicking fibrous microenvironment. In this study, electrospun fibrous matrices of GT/PCL (gelatin/polycaprolactone) with varied fiber densities were prepared by varying the collecting time of the GT/PCL fibers deposited on prior-silanized glass slides. Then, the effects of fiber-density on the cytomorphology, proliferation, ECM secretion, and matrix degradation of the C3H/10T1/2 cells were examined by performing CCK-8 assay, cytoskeleton staining, SEM imaging, qRT-PCR, ELISA, and immunofluorescence staining. The results showed that the cell viability was correlated with the fiber-density, and there existed a suitable fiber-density (103.0 ± 13.2) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ from which cells remodeled the fi-

收稿日期: 2020-12-25 接受日期: 2021-02-20

国家自然科学基金(批准号: 32071345、31771050、31570969)、国家重点研发计划(批准号: 2016YFC1100203)和东华大学中央高校基本科研业务费学科交叉(理工科)重点计划项目(批准号: 2232019A3-09)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-67792374, E-mail: yzhang@dhu.edu.cn

Received: December 25, 2020 Accepted: February 20, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32071345, 31771050, 31570969), the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2016YFC1100203), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of Donghua University (Grant No.2232019A3-09)

*Corresponding author. Tel: +86-21-67792374, E-mail: yzhang@dhu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5505>

brous microenvironment effectively. This study paved the way for the precise design of biomimetic fibrous matrix for tissue regeneration and laid a foundation for furthering our understanding of cell-fiber interactions.

Keywords electrospun biomimetic fibers; fiber density; extracellular matrix; matrix degradation; remodeling

人体组织细胞大多生存于具有纤维网络状结构的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)微环境中。天然ECM是许多蛋白及多糖的复杂集合,在为组织/器官提供结构支撑的同时也调控着细胞的诸多生理行为,如黏附、增殖、迁移、分化等^[1]。在组织发育/再生进程中,细胞-ECM间表现出高度动态的相互调控作用^[2]。细胞在响应不同形式的刺激作用下,通过降解酶如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)降解基质,也通过细胞自身收缩力对基质结构进行调整(如纤维募集),并不断分泌合成新基质成分(如基质沉积),从而对微环境进行持续的动态重塑(remodeling)^[3]。正是细胞和基质间的这种动态调节实现组织的正常发育或再生。

应用于组织工程的生物材料支架旨在模拟靶组织细胞生存的基质微环境以促进组织再生和修复^[4]。通过电纺获得的纳/微米超细纤维可较好地模拟天然细胞外基质的超微结构微环境^[5]。但目前的研究大多是基于致密电纺纤维膜的物理特性对细胞行为的影响^[5],如纤维排列影响细胞肌动蛋白网络结构和黏着斑的分布^[6]及黏着斑大小^[7],纤维支架孔隙的大小影响细胞的附着、渗透^[8]及干细胞分化^[9]等,鲜有研究纤维特性对细胞降解基质能力的影响。而近年来有研究发现,动态线索(如基质降解率)同样会影响细胞行为, MMPs的适当降解基质将产生更多的生物活性域并改善细胞微环境^[10],基质降解可能是影响细胞行为的一项潜在指标^[11]。此外,致密电纺纤维膜基质/底本身的致密性导致纤维间横纵交叉相互牵掣,使细胞仅能对纤维膜的表面拓扑特性作出响应,因而很难准确观察到细胞的降解基质作用及重塑其生存微环境的能力^[12-15]。

为探究仿生纤维如何影响细胞降解基质、重塑其生存微环境,本研究提出通过控制电纺纤维的沉积时间,在经硅烷化处理的玻片上制备四组不同密度的无纺GT/PCL电纺纤维基质的研究思路,然后通过CCK-8、骨架染色、扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)、qRT-PCR、ELISA、免疫荧光染色等方法,研究纤维密度变化

对C3H/10T1/2细胞的形貌、增殖、胞外基质分泌及基质降解能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

主要试剂及耗材包括:聚己内酯(polycaprolactone, PCL,分子量80 000)、明胶(gelatin, GT,猪皮来源, A型)、2,2,2-三氟乙醇(trifluoroethanol, TFE,纯度 $\geq 99.0\%$)购自上海达瑞精细化学品有限公司; C3H/10T1/2购自中国科学院干细胞库(上海); DMEM低糖培养基购自杭州吉诺生物医药技术公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、链霉素/青霉素(penicillin/streptomycin, P/S)购自美国Gibco公司; CCK-8试剂购自杰美基因医药科技有限公司;动物基因组DNA快速抽提试剂盒购自上海希辉生物科技有限公司;小鼠基质金属蛋白酶-1, -2, -9(MMP-1, -2, -9) ELISA试剂盒、小鼠羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp) ELISA试剂盒购自上海凡科维生物有限公司;小鼠糖胺多糖(glycosaminoglycan, GAG) ELISA试剂盒购自上海语纯生物科技有限公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染料、鬼笔环肽染料购自美国Invitrogen公司; Anti-Laminin抗体、重组Anti-non-muscle Myosin IIA抗体、山羊抗兔IgG H&L购自英国Abcam公司。

主要仪器包括:酶标仪(ThermoFisher Scientific, Multiskan MK3型)、生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限公司, HE safe 1200A2型)、二氧化碳培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司, HF90型)、倒置荧光显微镜(日本Nikon公司, Ti-2型)、扫描电子显微镜(飞纳科学仪器有限公司, XL型)、激光共聚焦显微镜(德国ZEISS公司, LSM700)。

1.2 不同密度电纺纤维基质的制备与表征

采用常规的电纺丝方法制备随机取向的不同密度的GT/PCL纤维基质。具体方法是将GT、PCL溶解在TFE中,配制质量比为50/50的10 wt% GT/PCL溶液^[16]。纺丝前1 h,在纺丝液体系中加入0.4%的乙酸搅拌至纺丝液变澄清透明。将配制的纺丝液装入附有20 G针头的5 mL塑料注射器中,在20~25 °C、60%

湿度的环境条件下,用精密注射泵以2.0 mL/h的纺丝速率在13 kV的电压下制备GT/PCL电纺纤维,接收距离为14.5~15.5 cm。

基于上述纺丝参数,采用直径为15 mm的硅烷化玻片,通过控制纤维接收时间(10 s、50 s、100 s、10 min)在玻片上沉积不同密度的GT/PCL纤维基质,分别标记为G1、G2、G3、G4。将电纺纤维样品在真空干燥箱中干燥处理后进行纤维形貌、密度表征及细胞培养。

SEM观察采集的纤维样品的纤维形态。将GT/PCL电纺纤维固定在粘有导电胶的扫描电子显微镜样品台上,低温喷金50 s后在10~15 kV加速电压下观察GT/PCL电纺纤维表面形貌,使用ImageJ软件分析纤维直径。

通过称重法^[17]确定纤维基质的密度,方法为:将直径为15 mm的硅烷化玻片接收纤维基质后的总质量记为 m , TFE洗去表面纤维基质后的玻片质量为 m_0 ,玻片面积为 s ,则纤维基质密度为 $d=(m-m_0)/s$ 。此外,基于SEM图片,将在纤维基质上任意两个纤维交点之间定义的纤维段长度^[17]作为与纤维密度相关的另一个表征参数。

1.3 细胞培养

将小鼠胚胎成纤维细胞(C3H/10T1/2)在含有DMEM-低糖、1%青霉素/链霉素和10%胎牛血清的培养基中复苏、培养和传代。本实验采用培养至12~15代的C3H/10T1/2。细胞接种时,将纤维样品放入24孔细胞培养板中,并用定制的不锈钢环固压,紫外光照射灭菌12 h后,用75%乙醇处理2 h。磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)清洗3次后,添加培养基预培养过夜。将C3H/10T1/2接种在不同密度的GT/PCL纤维基质上,在37 °C、5% CO₂条件下培养,每2天更换1次培养液。

1.4 细胞增殖检测

将C3H/10T1/2细胞以 2×10^4 个/孔的细胞密度接种于不同密度的GT/PCL纤维基质上,在24孔培养板中培养1天、3天。通过CCK-8比色法检测细胞增殖能力,方法为:吸出培养液,每孔加入300 μ L培养基和10 μ L的CCK-8试剂的混合液,37 °C孵育3天后,取100 μ L的细胞培养液转移至96孔板中,在450 nm波长处测量吸光度(D)值。

1.5 细胞染色、免疫荧光染色及定量分析

将C3H/10T1/2细胞以 9×10^3 个/孔的细胞密度稀

疏接种于24孔培养板内的不同密度的GT/PCL纤维基质上。培养3天后通过DAPI、F-肌动蛋白染色观察细胞形貌、铺展面积等。添加4%多聚甲醛室温固定30 min,用0.2%的Triton X-100通透10 min。F-肌动蛋白用200 μ L的Phalloidin染色液(1:40稀释液)避光染色30 min,细胞核用0.8 mg/mL的DAPI染色液室温避光染色10 min,观察肌动蛋白骨架形态和细胞形貌。

通过免疫荧光染色,观察与细胞收缩力相关的肌球蛋白(Myosin IIA)以及与新生细胞外基质形成相关的层黏连蛋白(Laminin)的表达情况。添加4%多聚甲醛室温固定30 min,用0.2%的Triton X-100通透10 min。用含0.3 mol/L甘氨酸的10%山羊血清室温封闭30 min以阻断非特异性染色。封闭标本时,按照数据表中推荐的稀释比例,用PBS配制工作液浓度的一抗。吸去封闭液,加入200 μ L稀释后的一抗,4 °C孵育过夜。PBS洗涤3次,每次5 min。添加用PBS稀释至工作液浓度的带荧光物质标记的二抗,室温下避光孵育1~2 h, PBS洗涤3次。最后,用DAPI染色法对细胞核进行染色, PBS洗涤3次。在染色24 h内,使用激光共聚焦显微镜观察和拍照。用ImageJ软件测量细胞的形态特征和进行荧光定量分析。

1.6 定量逆转录PCR(qRT-PCR)分析

将C3H/10T1/2细胞以 3×10^4 个/孔的细胞密度接种于24孔培养板内的不同密度的GT/PCL纤维基质上。培养3天后,采用qRT-PCR检测MMPs相关的mRNA表达,包括MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-14及TIMP-1。

根据制造商提供的说明书,使用BIOZOL细胞裂解液裂解纤维基质上的细胞并提取总mRNA。使用FastKing RT Kit(带有gDNase)试剂盒,按照说明书上的方案将mRNA反转录成cDNA。使用Super Real PreMius Plus(SYBR Green)试剂盒,用ABI Prism 7500荧光定量仪检测基因表达情况。所有检测基因均以管家基因(*GAPDH*)为标准进行归一化处理。qRT-PCR涉及到的引物如表1所示。

1.7 MMPs蛋白表达量测定

将C3H/10T1/2细胞以 2×10^4 个/孔的细胞密度接种于不同密度的GT/PCL纤维基质上,于24孔培养板中培养3天后,采用小鼠MMP-1、MMP-2及MMP-9 ELISA试剂盒分别检测MMP-1、MMP-2和MMP-9蛋白酶表达量。步骤为:取细胞培养基上清为待测样,

表1 qRT-PCR检测相关引物序列
Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

基因	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
Genes	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>GAPDH</i>	AAG AAG GTG GTG AAG CAG G	GAA GGT GGA AGA GTG GGA GT
<i>MMP-1</i>	TGT TTG CAG AGC ACT ACT TGA A	CAG TCA CCT CTA AGC CAA AGA A
<i>MMP-2</i>	ACC TGA ACA CTT TCT ATG GCT G	CTT CCG CAT GGT CTC GAT G
<i>MMP-3</i>	CCC AGG AAG ATA GCT GAG G	AAC TGC GAA GAT CCA CTG A
<i>MMP-7</i>	TCA CCC TGT TCT GCT TTG T	ATT CTG AGC CTG TTC CCA
<i>MMP-9</i>	GGA CCC GAA GCG GAC ATT G	CGT CGT CGA AAT GGG CAT CT
<i>MMP-14</i>	GGA GGG ACC AAA GGA GAG	GCT TGG AGG TGA GGG AA
<i>TIMP-1</i>	TCA CTG TTT GTG GAC GGA	AGG CTT CAG GTC ATC GG

在酶标板每孔加入50 μL 待测样品(需用样品稀释液稀释5倍)。封板膜封板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 而后弃去酶标板中液体并拍干, 利用工作浓度的洗涤液清洗5次, 弃去液体并拍干。加入50 μL 酶标试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min后, 洗涤5次并拍干。每孔先后加入50 μL 显色剂A与显色剂B, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色10 min, 加入50 μL 终止液, 15 min内在450 nm波长处测量吸光度(D)值。

1.8 纤维基质降解分析

将C3H/10T1/2细胞以 5×10^4 个/孔的细胞密度接种不同密度的GT/PCL纤维基质于24孔培养板中培养1天、7天、14天, 以用培养基孵育同样天数的纤维基质为对照。吸出培养基, 每孔用PBS清洗1次, 加入2.5%戊二醛溶液室温浸泡4 h。PBS清洗3次后, 用25%、50%、75%、95%、100%的乙醇梯度脱水, 每次脱水15 min, 之后用异丙醇置换乙醇3次, 放入 -80°C 冰箱过夜, 冻干后于真空干燥条件下保存。最后通过SEM观察纤维基质表面形貌。

1.9 胶原及糖胺聚糖分泌检测

将C3H/10T1/2细胞在24孔培养板的不同密度的GT/PCL纤维基质上以 5×10^4 个/孔的细胞密度接种后培养3天。收集细胞培养液, 采用小鼠羧基末端ELISA试剂盒测定胶原分泌量, 采用小鼠糖胺多糖ELISA试剂盒测定糖胺多糖分泌量, 在450 nm波长处测量吸光度(D)值。

1.10 Y-27632处理后C3H/10T1/2降解基质能力检测

将C3H/10T1/2细胞以 2×10^4 个/孔的细胞密度接种不同密度GT/PCL纤维基质于24孔培养板中培养, 待种板2 h细胞基本黏附后, 采用Y-27632处理细胞并培养1天。随后对细胞骨架进行染色和形貌观察。

将C3H/10T1/2细胞以 5×10^4 个/孔的细胞密度接种于纤维基质于24孔培养板中培养, 待种板2 h

细胞基本黏附后, 采用Y-27632处理细胞并培养3天。检测C3H/10T1/2对*MMP-1*、*MMP-2*、*MMP-7*、*MMP-9*及*MMP-14*等基因的表达情况的影响, 采用ELISA试剂盒检测C3H/10T1/2对*MMP-1*、*MMP-2*、*MMP-9*、Hyp及GAG的表达情况的影响。

1.11 统计分析

所有数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用Origin 8.0软件分析实验数据, 用单因素方差分析(单向方差分析)分析数据间是否有显著性差异。各实验均独立重复3次($n=3$)。当 $*P<0.05$ 时认为有显著性差异, $**P<0.01$ 时认为有极显著性差异。

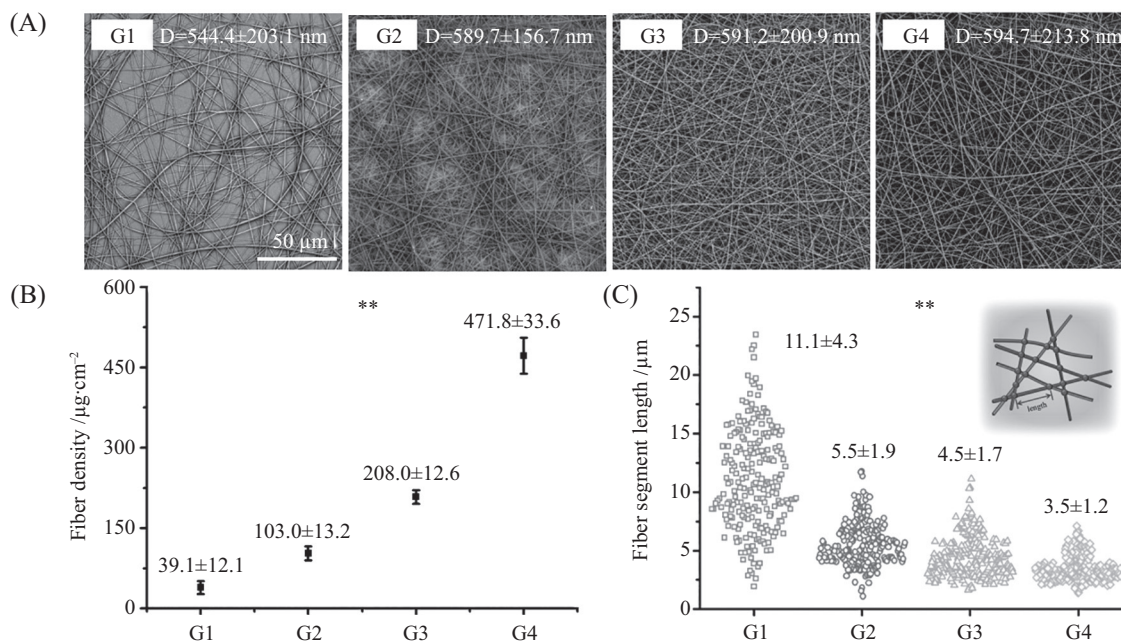
2 实验结果

2.1 GT/PCL纤维基质的制备与表征

基于传统电纺丝技术, 通过控制接收纤维时间, 可获得四组不同密度的GT/PCL纤维基质, 各组纤维直径相近(图1A), 在统计学上无显著性差异。课题组前期研究^[17]发现, hiPS-MSCs细胞行为对纤维密度具有依赖性, 且研究中使细胞行为具有差异性响应的纤维密度范围为: (37.7 ± 16.3) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、(103.8 ± 16.3) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、(198.2 ± 40.0) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 及(471.8 ± 32.7) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。因此, 经过量化比较后, 本研究选择收集10 s、50 s、100 s和10 min的G1、G2、G3和G4纤维基质, 纤维密度分别为(图1B): (39.1 ± 12.1) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、(103.0 ± 13.2) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、(208.0 ± 12.6) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 及(471.8 ± 33.6) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。作为另一个与纤维密度相关的量化参数, 纤维的任意两个交叉点之间定义的纤维段长度测量结果显示, 纤维段长度随着纤维密度的增加而减小, 且任意两组间的统计学差异明显(图1C)。

2.2 纤维密度影响细胞形貌、增殖及收缩力

纤维基质的拓扑结构等相关特性已被证明与细胞行为及功能相关^[5]。本研究将细胞在G1、G2、



A: SEM纤维形貌; B: 纤维密度量化; C: 纤维段长度定义(插图)及纤维段长度分布。** $P < 0.01$, 任意两组间比较。

A: fiber morphology via SEM imaging; B: fiber density quantification; C: definition of fiber segment length (inset) and distribution of fiber segment length. ** $P < 0.01$ comparing between any two groups.

图1 不同纤维密度的电纺GT/PCL纤维的形貌及密度表征

Fig.1 Morphology and density characterization of the electrospun GT/PCL fiber meshes with different fiber densities

G3、G4纤维基质上培养1天、3天后的细胞增殖结果(图2A)显示, 细胞的增殖能力与纤维密度有关, 其中G2(50 s)组中的细胞增殖显著高于其余三组。

细胞形貌结果(图2B)显示, 纤维密度较高的基质上(G3和G4)细胞形貌大多呈长梭形, 且后者形态更为瘦长; 而G1、G2组的细胞形貌大多呈铺展更强的多边形, 并以G2组中的细胞铺展更大。对细胞铺展面积量化后发现(图2C), G1与G3、G4组相比, 虽然细胞形态明显不同, 但细胞铺展面积无显著性差异; 仅G2组纤维基质上的细胞比其他三组铺展面积大很多。

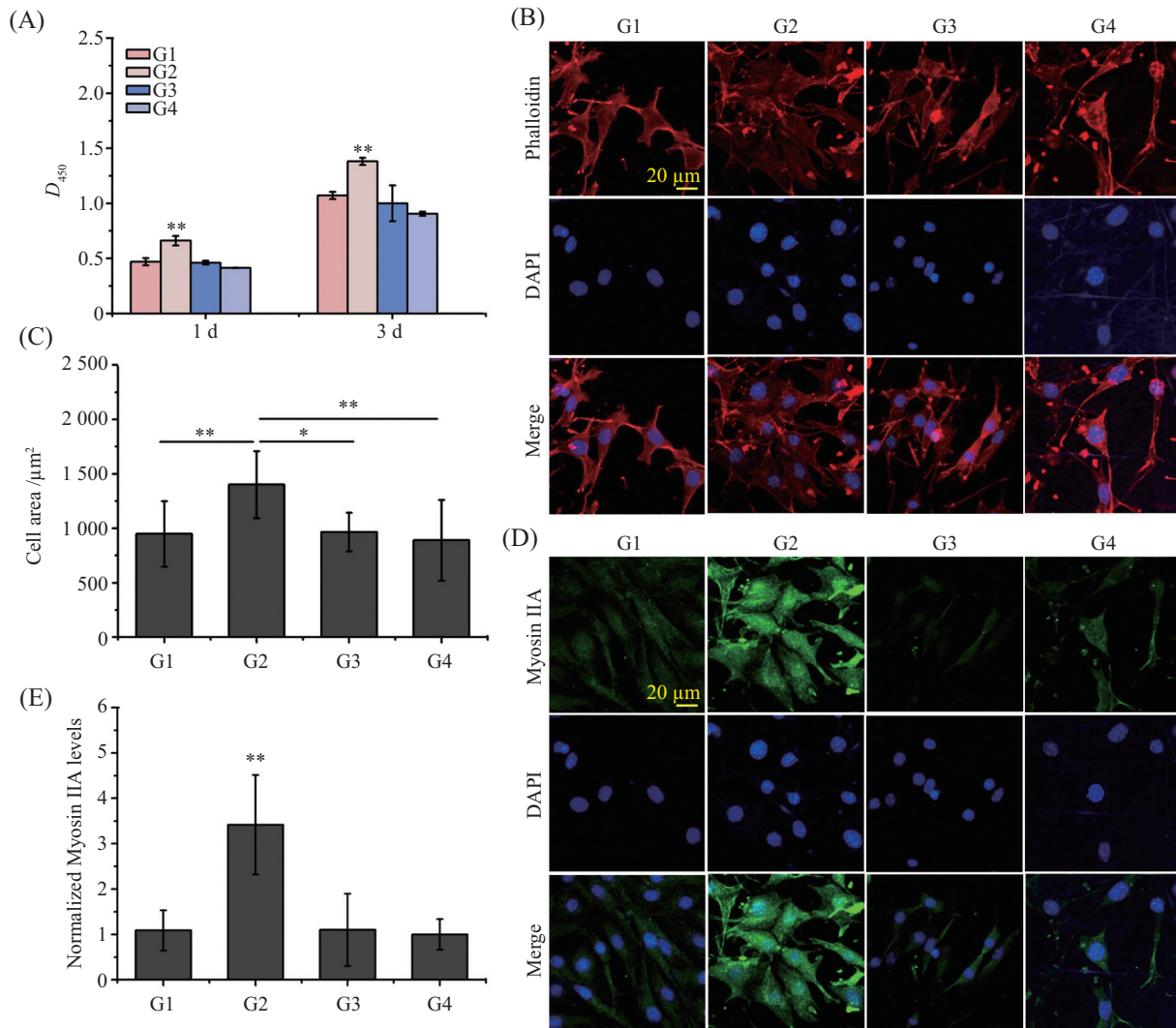
肌球蛋白II(Myosin II)在细胞运动与细胞内物质传输中起着重要作用^[17], 与细胞骨架的收缩力有关, 是细胞响应纤维基质力学特性的桥梁。因此, 细胞在纤维基质上培养3天后通过免疫荧光染色进一步检测Myosin IIA的表达情况, 结果(图2D和图2E)表明, Myosin IIA的表达量也受纤维密度的影响, 低密度纤维基质G2组中细胞的Myosin IIA表达量最高。

2.3 纤维密度影响细胞基质降解能力

通过在基因和蛋白水平检测细胞降解酶相关的基因和蛋白表达, 分析纤维密度对细胞降解基质能力的影响。在降解酶中, MMPs是细胞降解细胞

外基质分泌最主要的一类酶。MMP-1^[18], 又称胶原酶-1, 是典型的MMP, 主要功能是降解I型和III型胶原; MMP-2^[19]即明胶酶A, 表达广泛, 可降解明胶/胶原和多种基底膜成分; MMP-3^[20]在成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞、内皮细胞等中表达, 能降解ECM中的纤连蛋白、层黏连蛋白、胶原和软骨蛋白聚糖。MMP-7^[18]是最简单的一类MMPs并且能够降解多种ECM成分; MMP-9^[19], 即明胶酶-B, 在IV型和V型胶原降解中起作用; MMP-14^[21], 即MT1-MMP, 是一种能够切割明胶、纤连蛋白和层黏连蛋白的I型跨膜蛋白, 也为MMP-2的加工和激活所必需。TIMP-1^[22]通过与目标金属蛋白酶(例如胶原酶)形成复合物起作用, 并通过与它们的催化锌辅因子结合而使它们不可逆失活, 作用于MMP-1、MMP-2、MMP-7、MMP-9, 但对MMP-14不起作用。

qRT-PCR结果(图3A)表明, G2组中MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9和MMP-14的表达量均明显高于另外三组, 说明纤维基质密度为(103.0 ± 13.2) μg/cm²的G2组纤维基质能更好地诱导细胞的MMPs表达。作为验证, TIMP-1是MMPs的抑制剂, 在MMPs普遍表达量最高的G2组, 其TIMP-1基因表达量相对也最低。MMPs蛋白水平检测结果(图3B)表



A: 培养1天、3天后用CCK-8法测定细胞增殖情况; B: 培养3天后的细胞形貌, 细胞骨架(红色)和细胞核(蓝色); C: 基于(B)的细胞铺展面积定量; D: 培养3天后细胞Myosin IIA(绿色)的分布情况; E: 基于(D)的Myosin IIA荧光强度定量, 结果归一化至G4组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 组间比较。
A: cell proliferation by CCK-8 assay after culturing the cells for one and three days; B: cell morphology after three days of culture, cytoskeleton (red) and nucleus (blue); C: quantification of cell spreading area from the images in (B); D: distribution of Myosin IIA (green) in cells cultured for three days; E: quantification of the Myosin IIA fluorescence intensity from the images in (D), in which all the data are normalized to that of the G4 group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ comparing between two groups.

图2 不同密度GT/PCL纤维基质上C3H/10T1/2的增殖、形貌及细胞收缩力

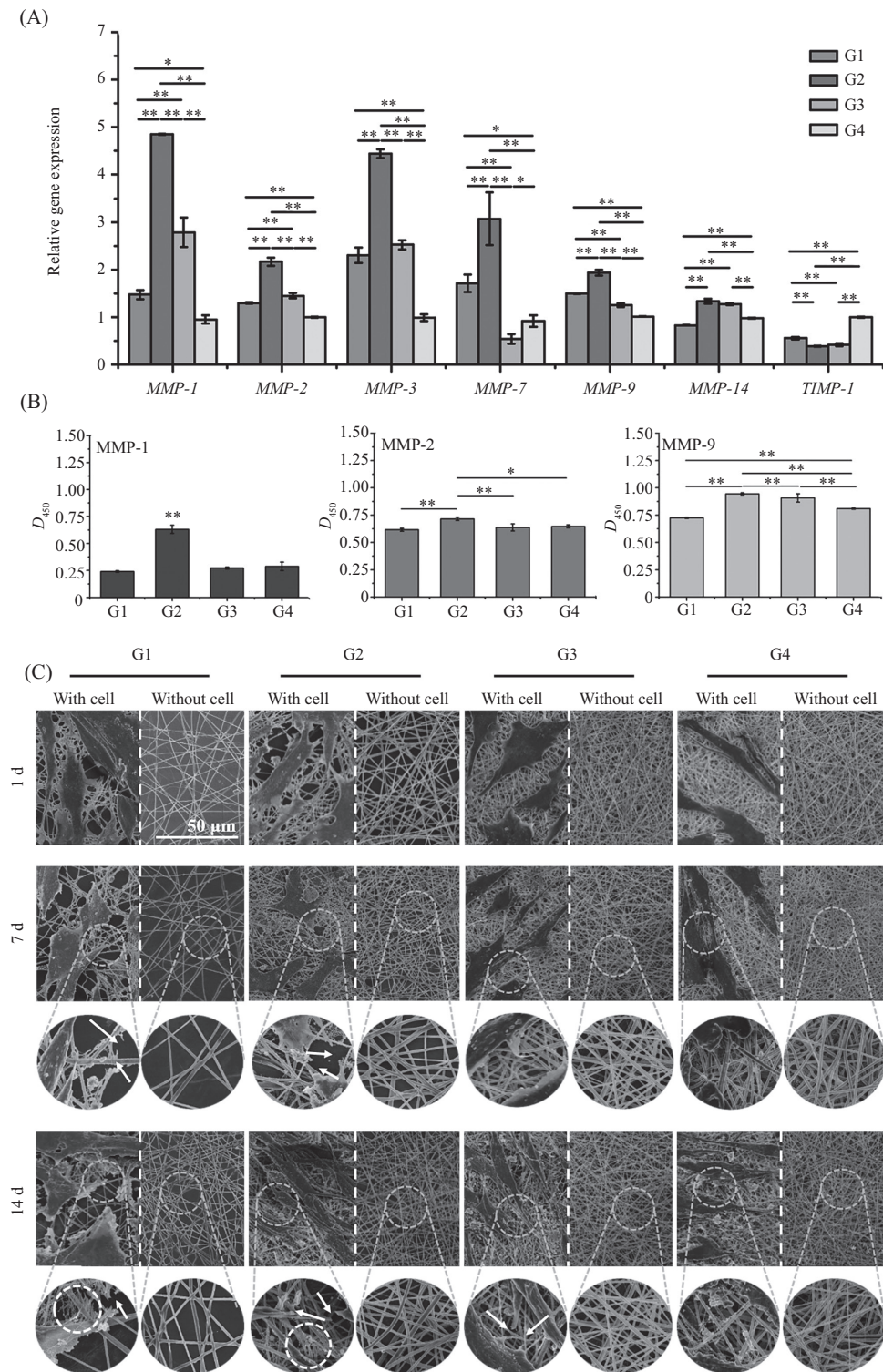
Fig.2 Proliferation, morphology, and cellular contractility of C3H/10T1/2 cultured on the fibrous GT/PCL with different fiber densities

明, 各组MMP-1、MMP-2、MMP-9表达量趋势与qRT-PCR的结果一致。

通过SEM形貌观察MMPs对各组纤维基质的降解程度, 并以无细胞培养的纤维基质为参照。PCL是一种降解周期较长的生物可降解聚酯材料, 其在体内外降解方式主要为水解, 且降解时间超过两年^[23], 此外若有生物酶时(如由巨噬细胞所表达的脂肪酶^[24]), 生物酶可通过催化PCL中存在的酯键水解的方式加速PCL降解^[25]。而明胶通常可被多种包括MMPs在内的蛋白酶降解^[26]。首先, 通过观察被培养基浸泡

1天、7天、14天后的纤维基质(不含细胞)可以确定, 虽然纤维基质中的明胶含量高达50%, 但在无细胞的环境中基质并不会在短期内(14天内)发生形变、黏连、降解等现象, 所以四个实验组中的纤维差异性降解及形貌变化可认为是由细胞的降解作用所引起, 几乎可以排除纤维自身的水解降解作用。

与对照组相比, 细胞培养1天后低密度纤维基质(G1、G2组)发生局部纤维变形, 该现象可能是细胞对纤维施加力作用所致。而密度相对较高的G3、G4组几乎无该现象发生。培养7天后, 纤维密度较



A: 培养3天后MMPs相关基因(*MMP-1*、*MMP-2*、*MMP-3*、*MMP-7*、*MMP-9*、*MMP-14*、*TIMP-1*)的表达情况; B: 培养3天后ELISA检测细胞MMPs相关蛋白(*MMP-1*、*MMP-2*、*MMP-9*)的表达定量; C: 孵育1天、7天、14天后SEM观察纤维基质的降解程度(箭头所指为基质降解区域, 圆形放大图中的虚线圈出部分为新生细胞外基质结构)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 组间比较。

A: expression of MMPs-related genes (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-9*, *MMP-14*, *TIMP-1*) after culturing the cells for three days; B: expression of MMPs-related proteins (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*) detected by ELISA after three days of culture; C: SEM imaging for observing degradation of fiber matrix after culturing the cell-fiber constructs for 1 day, 7 days and 14 days (arrows indicate the degradation area and dotted circles within the magnified images in circular shape showing the structure of the newly secreted ECM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ comparing between two groups.

图3 不同密度GT/PCL纤维基质上C3H/10T1/2的MMPs表达及降解纤维基质形貌观察

Fig.3 MMPs expression of C3H/10T1/2 on fibrous GT/PCL meshes with varied fiber densities and morphological observation of the fiber degradation

低的G1、G2组开始有少量的纤维基质断裂, 猜测细胞此时通过分泌降解酶与“拉扯”纤维共同介导纤维基质降解。但在密度相对较高的G3、G4组仍未观察到该现象。培养14天后, 纤维密度较低的G1、G2组纤维断裂部分增多, 且密度相对较高的G3组开始观察到明显的纤维基质局部断裂, 而G4组依旧未观察到此现象。与1天、7天不同, 14天时四组纤维基质除了纤维降解程度的差异外, 还观察到细胞周边有明显的极为纤细并密集排列的网络状纤维出现, 尤以G1、G2组最为明显, 猜测是细胞分泌的新生细胞外基质(图3C)。

2.4 纤维密度影响细胞分泌细胞外基质组分

ECM成分主要包括纤维结构蛋白(如胶原蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白等)、特殊蛋白(如生长因子、整合素结合蛋白等)和蛋白多糖(proteoglycans)。作为细胞外基质的主要组成成分, 胶原、糖胺聚糖及层黏连蛋白常常被用于新生细胞外基质的主要检测目标组分, 以观察细胞对其生存微环境的重塑能力。

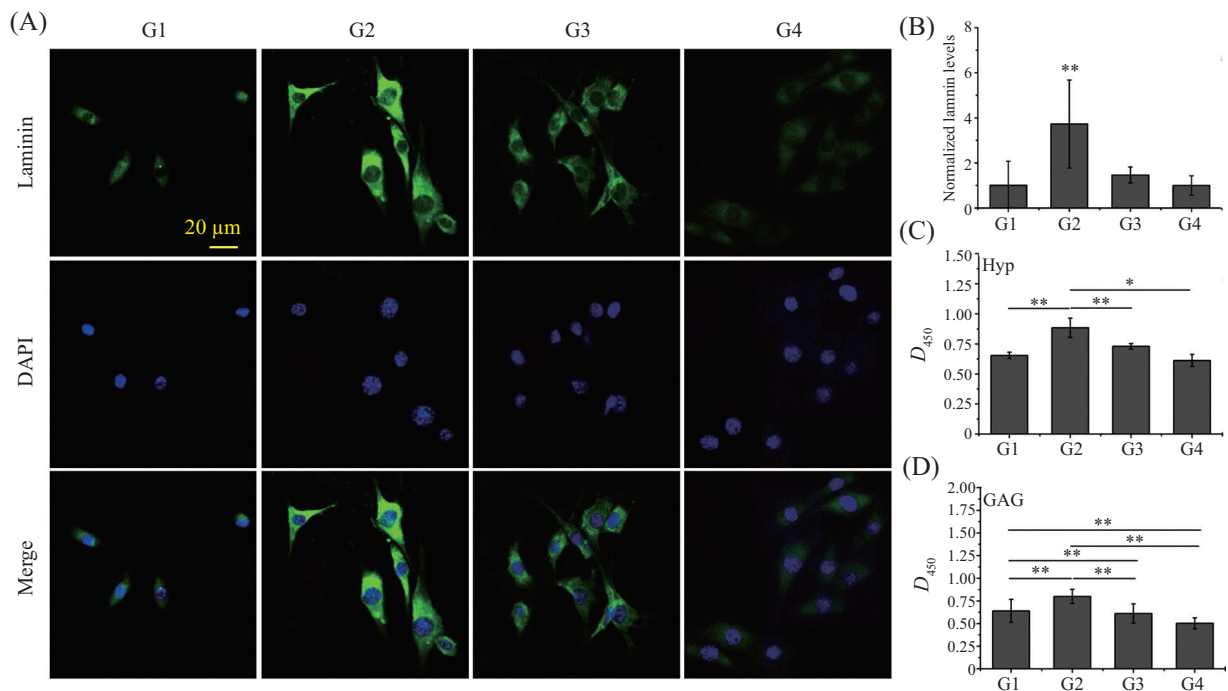
层黏连蛋白的免疫荧光染色图像及荧光定量结果显示, G2组细胞的Laminin表达量最高(图4A和

图4B)。小鼠羟脯氨酸ELISA检测结果(图4C)显示, 胶原的表达量在G2组中最高; 除蛋白成份外, ELISA检测糖胺聚糖结果也表明, G2组细胞表达的GAGs量最高(图4D)。由此推测, 在四组不同密度的纤维基质中, G2组纤维密度在最优促进细胞降解纤维基质的同时, 也能更大程度地介导细胞形成自身的ECM, 从而重塑其生存的基质微环境。

2.5 Rho/ROCK信号通路

目前有研究表明, 纤维密度会影响细胞的Rho/ROCK信号通路。Myosin II作为Rho/ROCK通路的下游参与者, 在细胞-ECM的力学传导中起着重要作用^[27-29]。已有的研究结果发现, 纤维密度的改变会影响细胞分泌Myosin IIA。所以猜测纤维密度可能是通过Rho/ROCK信号通路影响细胞的基质降解能力。Y-27632是该信号通路最常用的一种抑制剂, 所以本部分研究选用低密度组G2(Low density)及高密度组G4(High density)为研究对象, 观察Y-27632的添加对细胞形貌、基质降解能力、新生细胞外基质分泌能力的影响。

荧光倒置显微镜下可以观察到(图5A), 在未添



A: 培养3天后细胞的Laminin分布情况, Laminin(绿色)和细胞核(蓝色); B: 培养3天后细胞的Laminin荧光强度定量并归一化至G4组; C: 培养3天后细胞分泌羟脯氨酸的ELISA定量分析; D: 培养3天后细胞分泌糖胺聚糖(GAGs)的ELISA定量分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 组间比较。

A: Laminin distribution after culturing the cells for three days, Laminin (green) and nucleus (blue); B: quantification of the Laminin expression from the images in (A), in which all the data are normalized to that of the G4 group; C: expression of hydroxyproline assayed by ELISA after three days of culture; D: expression of GAG (glycosaminoglycan) assayed by ELISA after three days of culture. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ comparing between two groups.

图4 不同密度纤维基质上新生细胞外基质表达情况

Fig.4 Expression of newly produced extracellular matrix in cells cultured on fibrous substrates with different fiber densities

加抑制剂的时候,细胞会“顺应”纤维支架而生长,细胞轮廓清晰、应力纤维明显、整体呈现“井然有序”的状态;而加入抑制剂后,细胞轮廓变得松散、应力纤维不明显、整体呈现“懒散”的状态。无论纤维基质密度高低,经Y-27632抑制处理后,细胞感受来自纤维基质力学特性的能力变弱,使细胞形态发生显著改变。

qRT-PCR结果(图5B)显示,无论是低密度还是高密度纤维基质,在添加抑制剂之后均会出现细胞的MMPs相关基因表达量显著降低的情况。其中MMP-3可以降解胶原、糖胺聚糖、纤连蛋白、层黏连蛋白和弹性蛋白等细胞外基质组分^[30],同时参与众多其他生物学功能,例如细胞增殖、血管生成以及其他MMPs(如MMP-1、MMP-7和MMP-9)的合成诱导^[31],由于其多重角色作用,猜测即使在信号通路抑制后其表达量也高于其他MMPs。ELISA检测MMP-1、MMP-2、MMP-9等蛋白表达的结果趋势与基因检测结果趋势一致(图5C)。Rho/ROCK信号通路的抑制,并非单纯地使细胞MMPs表达量降低,而是让细胞对来自纤维基质的力学信号敏感度变弱,导致与降解相关的蛋白整体表达量均降低。有趣的是,Y-27632的抑制作用似乎对低密度纤维组中的细胞影响更大。

进一步观察Y-27632抑制前后细胞分泌新生细胞外基质能力的变化,ELISA结果(图5D)显示,Rho/ROCK信号通路的抑制与否,对细胞分泌胶原及糖胺聚糖无显著影响。猜测可能是由于细胞培养时间短暂,此时细胞处于降解纤维基质的能力大于细胞外基质形成能力的时期,细胞形成自身ECM尚在初期,导致影响不明显。

3 讨论

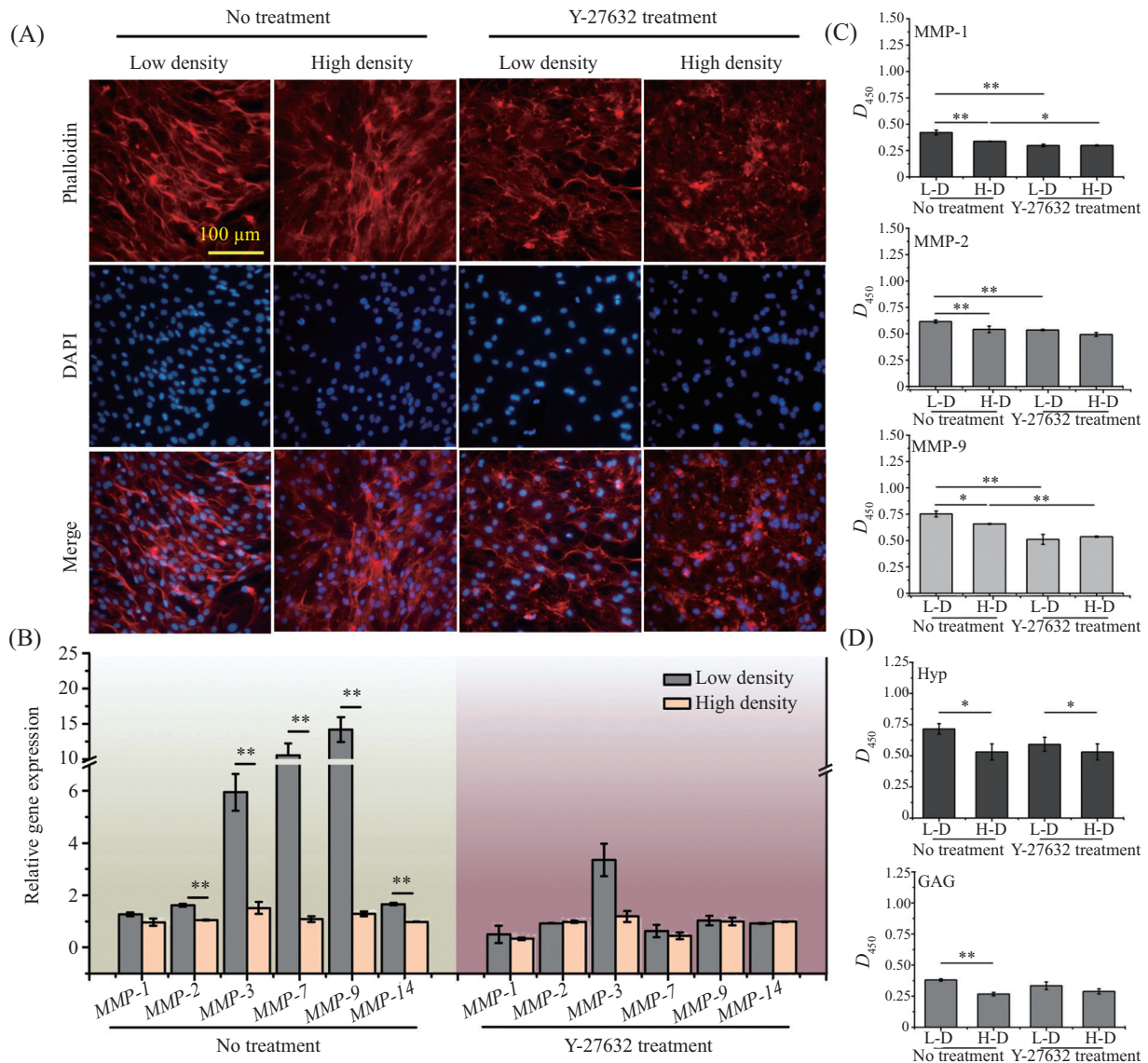
细胞-ECM间高度动态的相互调控作用在组织发育/再生中至关重要。近年来有研究将(干)细胞植入不同降解程度的水凝胶基质以观察其干性维持能力,并发现高降解度的水凝胶基质可更好地保持细胞活性并维持干性^[32]。而电纺纤维基质虽然具有仿生ECM超微结构和力学柔顺性的优势,但往往存在纤维致密性、细胞仅能在表面活动的不足,因而研究中常常忽略了细胞对纤维基质的降解潜力及主动重塑作用。基于上述背景,本文以C3H/10T1/2为细胞模型,通过降低电纺GT/PCL纤维基质密度来研究

微量的电纺GT/PCL基质密度对细胞降解基质能力及基质重塑的促进作用。

课题组前期研究表明,电纺纤维基质存在一个最佳的纤维密度,即 $(103.8 \pm 16.3) \mu\text{g}/\text{cm}^2$,并通过提供合适的黏附位点密度来提供有利的拓扑和力学线索,从而激活细胞体内的力学转导机制^[17],最终表现为增强的细胞活力。基于此,本研究采用了不同材料的纤维基质以及不同种类的细胞验证这些研究结果,发现与上述纤维密度范围基本一致的G2组 $[(103.0 \pm 13.2) \mu\text{g}/\text{cm}^2]$ 的确更有利于细胞生长,具体表现在包括更有利于细胞增殖、铺展及使细胞具有更强的细胞收缩力等细胞行为(图2);在此基础上,本研究也发现该纤维密度也能更好地诱导细胞的MMPs表达(图3),促进纤维基质的降解,以及分泌更多的新生细胞外基质以重塑其生存微环境。

Myosin II是应力纤维形成的重要组成部分^[27-29],有研究发现,抑制Myosin IIA的表达会造成MMPs(MMP-2、MMP-9)的分泌受到抑制^[33]。因此我们猜测,不同的纤维密度赋予基质不同的力学性质,Rho/ROCK信号通路传导,导致细胞Myosin IIA表达不同和表现出细胞收缩力的差异,进而影响MMPs的表达(图6)。本研究发现,G2组细胞的Myosin IIA表达量最高,并且能够分泌更多的MMPs相关标志物,从而证实了该猜想。同时,通过SEM也观察到G2组的支架降解程度也相对较高。细胞外基质的降解与形成一直处于动态平衡中,细胞为维持基质重塑的动态平衡,同时会分泌更多的细胞外基质蛋白以维持稳态。同样,在G2组观察到大量的新生细胞外基质的表达(如糖胺聚糖、胶原、层黏连蛋白等,图4),并且从SEM上也能观察到(图3C)极纤细的网络状纤维基质的出现。

而作为Myosin IIA的上游信号通路,Rho/ROCK信号通路在应力纤维形成和细胞对外界的感知中均起着至关重要的作用,与细胞增殖、细胞骨架变化和应力纤维形成有着复杂的联系^[27-29]。使用该信号通路的特异性抑制剂Y-27632^[34]对细胞进行处理后的结果发现,当使用Y-27632时,细胞形态会由原先“有序”生长变得“松散”。为进一步阐明Rho/ROCK途径在细胞响应纤维基质密度的降解过程中的作用,我们测试了使用抑制剂前后的MMPs的表达量,发现MMPs标记物表达下降,并且低密度纤维上的细胞比高密度纤维上的细胞受到的影响更为明显,



A: 培养1天后细胞的形貌变化, 细胞骨架(红色)和细胞核(蓝色); B: 培养3天后通过qRT-PCR检测细胞的MMPs相关基因(*MMP-1*、*MMP-2*、*MMP-3*、*MMP-7*、*MMP-9*、*MMP-14*)的表达; C: 培养3天后通过ELISA检测细胞的MMP-1、MMP-2、MMP-9蛋白表达; D: 培养3天后细胞分泌脯氨酸和糖胺聚糖的定量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 组间比较。

A: morphological observation after culturing the cells for one day, cytoskeleton (red) and nucleus (blue); B: expression of MMPs related genes (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-9*, *MMP-14*) assayed by qRT-PCR after three days of culture; C: expression of MMP-1, MMP-2, and MMP-9 proteins assayed by ELISA after three days of culture; D: quantification of hydroxyproline and glycosaminoglycan expressions after 3 days of culture. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ comparing between two groups.

图5 添加Y-27632前后对不同密度纤维基质上的细胞形貌、MMPs分泌、新生细胞外基质形成的影响

Fig.5 Effects of Y-27632 on morphology, MMPs secretion and new ECM formation of the cells cultured on fibrous substrates with different fiber densities

但似乎没有对细胞分泌新生细胞外基质造成同样的影响(图5)。我们猜测,可能是由于细胞培养时间短暂,此时细胞处于降解支架的能力大于细胞外基质形成能力的时期,细胞形成自身细胞外基质尚在初期,所以表现不明显。

从电纺纤维基质的结构特性看,细胞基质降解能力对纤维密度的依赖性体现在,纤维密度的改变

会使纤维支架局部力学(纤维段)及整体的力学性能发生改变^[35],从而使细胞感应到不同的力学刺激,做出不同程度的细胞响应行为;另外,纤维密度的改变使细胞感应到不同的拓扑结构,比如,G2纤维密度可以提供合适的细胞黏附位点密度使细胞黏附、铺展^[17],从而激活Rho/ROCK途径,促进细胞体内的力学信号传导^[28],最终刺激细胞表达更多的降

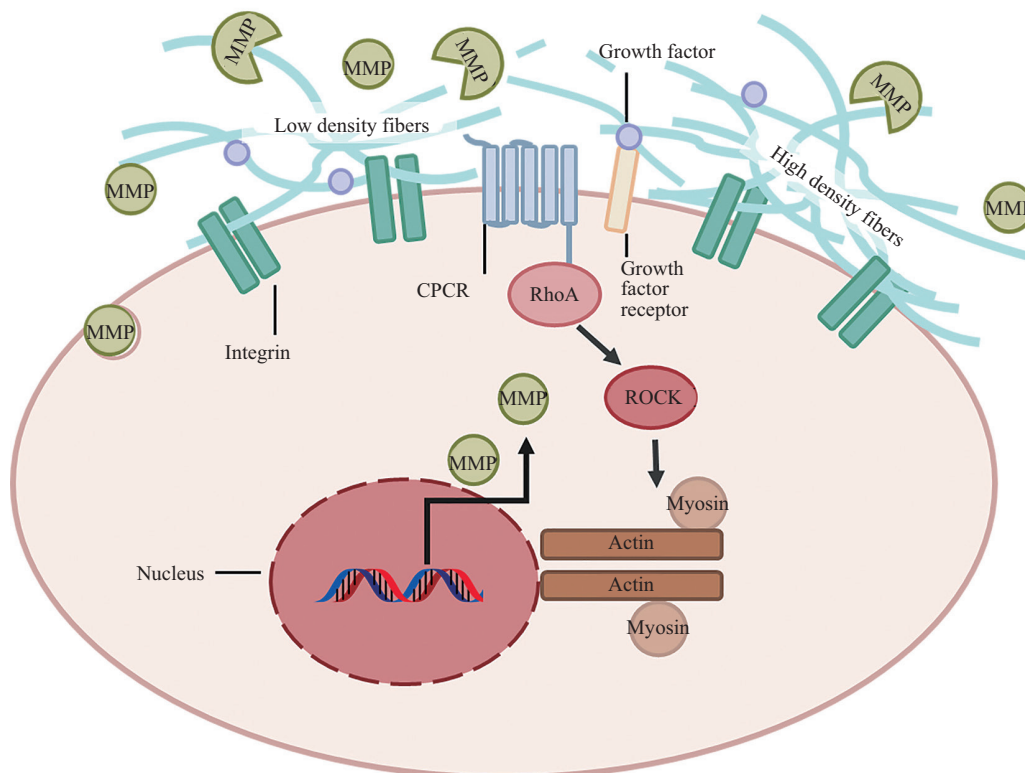


图6 纤维基质密度影响细胞表达MMPs原理图

Fig.6 Schematic diagram of the effect of fiber density on the expression of MMPs in cells

解酶参与基质降解以及新生细胞外基质的合成。

4 结论

本研究通过改变电纺GT/PCL纤维基质的密度,探究了C3H/10T1/2响应不同纤维密度的细胞行为变化,验证了即使选择不同的纤维基质和细胞,仍然存在一最适纤维密度 $[(103.0 \pm 13.2) \mu\text{g}/\text{cm}^2]$,在该密度的纤维基质上细胞展现出最强的细胞“活力”和功能表达。我们发现,该最适纤维密度能够诱导细胞分泌更多的基质金属蛋白酶和促进细胞对纤维基质的降解,以及分泌更多的新生细胞外基质组分。本研究提出的低密度电纺纤维网络具有简化传统密集纤维基质的复杂性的优势,有助于加深我们对细胞与其微环境相互作用的理解,也为今后“精准”设计仿生纤维基质增强细胞与纤维间的相互作用,以及实现对伤病组织的有效再生提供了依据。

参考文献 (References)

- [1] HUMPHREY J D, DUFRESNE E R, SCHWARTZ M A. Mechano-transduction and extracellular matrix homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(12): 802-12.
- [2] THERY M. Micropatterning as a tool to decipher cell morpho-genesis and functions [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(24): 4201-13.
- [3] QU H W, FU H Y, HAN Z Y, et al. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(45): 26252-62.
- [4] KATTA P, ALESSANDRO M, RAMSIER R D, et al. Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector [J]. *Nano Lett*, 2004, 4(11): 2215-8.
- [5] KENNEDY K M, BHAW-LUXIMON A, JHURRY D. Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: implications for scaffold design and performance [J]. *Acta Biomater*, 2017, 50: 41-55.
- [6] YIN Z, CHEN X, CHEN J L, et al. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(8): 2163-75.
- [7] KUBOW K E, CONRAD S K, HORWITZ A R. Matrix microarchitecture and Myosin II determine adhesion in 3D matrices [J]. *Curr Biol*, 2013, 23(17): 1607-19.
- [8] DI CIO S, GAUTROT J E. Cell sensing of physical properties at the nanoscale: mechanisms and control of cell adhesion and phenotype [J]. *Acta Biomater*, 2016, 30: 26-48.
- [9] FAROOQUE T M, CAMP C H, jr, TISON C K, et al. Measuring stem cell dimensionality in tissue scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9): 2558-67.
- [10] NI Y, TANG Z, YANG J, et al. Collagen structure regulates MSCs behavior by MMPs involved cell-matrix interactions [J]. *J Mater Chem B*, 2018, 6(2): 312-26.
- [11] PENG Y, LIU Q J, HE T, et al. Degradation rate affords a dynamic cue to regulate stem cells beyond varied matrix stiffness [J].

- Biomaterials, 2018, 178: 467-80.
- [12] GOONOO N, BHAW-LUXIMON A, JHURRY D. *In vitro* and *in vivo* cytocompatibility of electrospun nanofiber scaffolds for tissue engineering applications [J]. RSC Adv, 2014, 4(60): 31618-42.
- [13] LIN Y A, OU Y C, CHEETHAM A G, et al. Rational design of MMP degradable peptide-based supramolecular filaments [J]. Biomacromolecules, 2014, 15(4): 1419-27.
- [14] QI Y, QI H, HE Y, et al. Strategy of metal-polymer composite stent to accelerate biodegradation of iron-based biomaterials [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(1): 182-92.
- [15] WU L B, DING J D. *In vitro* degradation of three-dimensional porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering [J]. Biomaterials, 2004, 25(27): 5821-30.
- [16] FENG B, TU H, YUAN H, et al. Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL [J]. Biomacromolecules, 2012, 13(12): 3917-25.
- [17] TANG H, YI B, WANG X, et al. Understanding the cellular responses based on low-density electrospun fiber networks [J]. Mat Sci Eng C-Mater, 2021, 119: 111470.
- [18] ZULMA X, YUNT Z X, ASCHENER Y, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis [M]. Amsterdam: Elsevier, 2019: 99-112.
- [19] INKLATER E, JEWETT C E, PREKERIS R. Cell polarity in development and disease [M]. Pittsburgh: Academic Press, 2018: 121-46.
- [20] SIRES U I, GRIFFIN G L, BROEKELMANN T J, et al. Degradation of entactin by matrix metalloproteinases-susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites [J]. J Biol Chem, 1993, 268(3): 2069-74.
- [21] IMAI K, OHUCHI E, AOKI T, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2 [J]. Cancer Res, 1996, 56(12): 2707-10.
- [22] GRZELECKI D, KOWALCZEWSKI J. Comment on: "comparison of several biomarkers (MMP-2, MMP-9, the MMP-9 inhibitor TIMP-1, CTX-II, calprotectin, and COMP) in the synovial fluid and serum of patients with and without septic arthritis" [J]. Joint Bone Spine, 2020, 87(5): 517-8
- [23] SUN H F, MEI L, SONG C X, et al. The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant [J]. Biomaterials, 2006, 27(9): 1735-40.
- [24] BANERJEE A, CHATTERJEE K, MADRAS G. Enzymatic degradation of polycaprolactone-gelatin blend [J]. Mater Res Express, 2015, 2(4): 045303.
- [25] GAN Z H, YU D H, ZHONG Z Y, et al. Enzymatic degradation of poly(epsilon-caprolactone)/poly(DL-lactide) blends in phosphate buffer solution [J]. Polymer, 1999, 40(10): 2859-62.
- [26] HUANG A, HONDA Y, LI P, et al. Integration of epigallocatechin gallate in gelatin sponges attenuates matrix metalloproteinase-dependent degradation and increases bone formation [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 6042.
- [27] KANEKO-KAWANO T, TAKASU F, NAOKI H, et al. Dynamic regulation of myosin light chain phosphorylation by Rho-kinase [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39269.
- [28] MAHARAM E, YAPORT M, VILLANUEVA N L, et al. Rho/Rock signal transduction pathway is required for MSC tenogenic differentiation [J]. Bone Res, 2015, 3: 15015.
- [29] MEHRA A, GUERIT S, MACREZ R, et al. Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood-brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin [J]. J Neurosci, 2020, 40(8): 1778-87.
- [30] CHAUDHARY A K, SINGH M, BHARTI A C, et al. Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) promoter (-1171 5A-> 6A) polymorphism in oral submucous fibrosis and head and neck lesions [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 369.
- [31] SAGE E H, REED M, FUNK S E, et al. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis [J]. J Biol Chem, 2003, 278(39): 37849-57.
- [32] MADL C M, LESAVAGE B L, DEWI R E, et al. Maintenance of neural progenitor cell stemness in 3D hydrogels requires matrix remodelling [J]. Nat Mater, 2017, 16(12): 1233-42.
- [33] SEMELAKOVA M, GRAUZAM S, BETADTHUNGA P, et al. Vimentin and non-muscle Myosin IIA are members of the neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 9 (NEDD9) interactome in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. Transl Oncol, 2019, 12(1): 49-61.
- [34] MAEKAWA M, ISHIZAKI T, BOKU S, et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase [J]. Science, 1999, 285(5429): 895-8.
- [35] TUNG W T, WANG W, LIU Y, et al. Mechanical characterization of electrospun polyesteretherurethane (PEEU) meshes by atomic force microscopy [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2019, 73(1): 229-36.