

基础研究

自组装 IKVAV 多肽纳米支架及其对背根神经节神经元细胞的作用

邹枕玮, 郑启新, 吴永超, 吴 斌, 宋玉林

(华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科 430022 武汉市)

【摘要】 目的:应用自组装 IKVAV 多肽纳米支架与鼠背根神经节神经元细胞 (DRGc) 联合培养, 观察其对 DRGc 的作用。**方法:**将多肽溶于 0.1M NaOH 溶液中, 调整 pH 值为 8.5, 多肽浓度为 0.01mg/ μ l, 与等体积 DMEM/F12 混合触发多肽自组装为凝胶支架, 透射电镜检测。采用原代分离培养方法获得 DRGc 单细胞悬液后分为实验组与对照组, 实验组中 DRGc 接种于凝胶支架表面, 对照组接种于多聚赖氨酸表面, 倒置相差显微镜观察神经元生长情况, 采用细胞计数结合免疫细胞化学染色方法, 观察 DRGc 的存活和轴突生长情况, 并行统计学分析。**结果:**透射电镜下显示自组装凝胶支架为编织状纳米纤维。实验组和对照组中 DRGc 培养 1d 时平均轴突长度分别为 $43.8\pm 10.4\mu\text{m}$ 、 $33.4\pm 5.75\mu\text{m}$; 培养 14d 时实验组和对照组中神经元数目分别为 36.50 ± 1.78 个/视野、 19.70 ± 3.71 个/视野, 神经元所占比例分别为 $(43.60\pm 4.83)\%$ 、 $(26.97\pm 4.90)\%$, 两组间比较有显著性差异 ($P<0.05$)。**结论:**自组装 IKVAV 多肽纳米支架能降低神经元的死亡率, 并诱导轴突的发生和生长, 具有支架及生物活性双重作用, 可作为神经组织工程支架材料。

【关键词】多肽; 纳米; 自组装; 背根神经节

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-06-0450-04

Effects of self-assembled IKVAV peptide nanofibers on dorsal root ganglion neurons/ZOU Zhenwei, ZHENG Qixin, WU Yongchao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(6): 450-453

【Abstract】 Objective:To observe the effects of self-assembled IKVAV peptide nanofibers on dorsal root ganglia neurons (DRGc) through co-culturing of DRGc and gel. **Method:**The peptide was dissolved in NaOH solution with pH value adjusted to 8.5 and the concentration of 0.01mg/ml, then the peptide was triggered to be self-organized into gel by the addition of DMEM/F12, which was detected under TEM. The DRGc suspension established by primary isolated culture methods, was divided into experimental group and control group. In experimental group (EG): DRGc were transplanted on the surface of 2-D gels, while in control group, DRGc were transplanted on the surface of poly-lysine. Growth of DRGc was observed by IPCM. DRGc's survival time and the length of neurite in both groups were observed by cell counting and immunohistochemistry methods, and these datas were put into statistical analysis. **Result:**TEM showed that the self-assembled gel was composed of network nanofibers. The neurite length of DRGc at 1st day in EG and CG was $(43.8\pm 10.4)\mu\text{m}$ and $(33.4\pm 5.75)\mu\text{m}$ respectively. The amount of neuron at 2st week for EG and CG were $36.50\pm 1.78/\text{EF}$ and $19.70\pm 3.71/\text{EF}$ respectively, with the percentage of $(43.60\pm 4.83)\%$ and $(39.04\pm 3.87)\%$ for EG and CG, which had significant difference ($P<0.05$). **Conclusion:**Self-assembled IKVAV peptide nanofibers, which can degrade the neuron mortality as well as promote neurite sprouting and growth, is a bioactivity scaffold, it can serve as a superordinary nerve tissue engineering scaffold.

【Key words】Polypeptide; Nano; Self-assembly; Dorsal root ganglion

【Author's address】Department of Orthopaedics, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500511)

第一作者简介: 男 (1983-), 医学硕士, 研究方向: 脊柱、脊髓损伤
电话: (027)85351419 E-mail: zouzhenwei1983@126.com

通讯作者: 吴永超

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是骨科治疗中的一个难题。SCI 会直接导致神经元的坏死、神经纤维中断、脊髓结构严重破坏。损伤局部形成的胶质瘢痕, 更是为 SCI 的修复带来了巨大挑战。

近年兴起的组织工程学方法为治疗脊髓损伤带来了新的思路,生物支架材料在脊髓组织工程中起重要作用。传统支架材料如无机材料、有机高分子材料以及天然蛋白质材料,普遍存在机械强度高、生物降解性差、降解物具有毒性、易产生免疫反应及无生物学活性等缺点,限制了它们在中枢神经组织工程的应用。为此需要寻找一种新的支架材料作为修复载体治疗 SCI。我们设计和构建了含 IKVAV(Ile-Lys-Val-Ala-Val)活性片段的多肽二维凝胶支架,并将背根神经节细胞(dorsal root ganglion cells, DRGc)接种于支架上进行培养,观察细胞的生长情况,为该支架材料在脊髓组织工程中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试剂:高糖 DMEM/F12 (Hyclone, USA); Recombinat Rat β -NGF (晶美公司); B27 添加剂 (大风公司); 1%胎牛血清 (Hyclone, USA); 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL)、胰蛋白酶、胶原酶 (凌飞公司); 兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、SABC 免疫组织化学试剂盒 (博士得公司); 多肽由本课题组设计合成, $C_{16}H_{31}O-NH-AAAGGGEIKVAV-COOH$; 新生大鼠 (由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。倒置相差显微镜 (inverted phase contrast microscope, IPCM) (Olympus 1 $\times$ 70/1 $\times$ 50, Japan), 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) (JEM-1230, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 多肽自组装为凝胶 将多肽溶于 0.1M NaOH 溶液中,用 0.1M HCl 溶液和无菌蒸馏水调节 pH 至 8.5,使多肽浓度为 0.01mg/ μ l。取 10 μ l 多肽液滴入 TEM 的滤网中,加入 10 μ l DMEM/F12 自组装成凝胶,晾干,磷酸钙染色,TEM 观察。

1.2.2 DRGc 的分离与细胞获得 取 10 只新生 SD 大鼠,无菌条件下处死后,背部切开皮肤及软骨,解剖显微镜下可见两侧椎体的外侧隐窝中有圆形透亮的脊神经节。逐个摘除神经节,并尽量剥除神经节表面的筋膜,均放入盛有 4 $^{\circ}$ C PBS 液的平皿中,用显微剪尽量将神经节剪碎。

用吸管将碎块移入加有 1mg/ml 胶原酶的离

心管中,37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 45min 后,1000r/min 离心 5min,弃去上清,然后加入 0.25%胰蛋白酶 3~5ml,37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化,至组织块成絮状,滴加 1~2 滴胎牛血清直接终止消化,1000r/min 离心 5min,小心移去消化液。向离心管加入含 50ng/ml NGF、2% B27 添加剂的 DMEM/F12 培养液,用吸管小心吹打,将其制成单细胞悬液。

1.2.3 DRGc 的培养 准备 2 个无菌 12 孔培养板,将清洁无菌的玻璃盖片放入培养板中,实验组和对照组各取 9 孔。对照组:0.1mg/ml PLL 37 $^{\circ}$ C 包被 6h, PBS 冲洗后备用; 实验组:0.1mg/ml PLL 37 $^{\circ}$ C 包被 6h, PBS 冲洗后,取 60 μ l 0.01mg/ μ l 多肽溶液置于玻片上,加入 60 μ l DMEM/F12,数秒钟即形成二维透明质软凝胶,检测凝胶渗液 pH 为 7.3。将细胞悬液计数后以 5×10^5 /ml 的浓度分别接种到对照组及实验组玻片上,置 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 培养箱中培养,每 3d 换液 1 次。

1.2.4 DRGc 的形态学观察 在培养 1d 时,实验组、对照组中各取 3 孔,在倒置显微镜下观察细胞形态,每孔观察 10 个视野,200 倍放大倍数下用显微测量尺测量每个视野中神经元突起的平均长度(突起长度为胞体伸出突起处到突起末端的垂直距离),单位以 μ m 表示。

1.2.5 DRGc 鉴定及所占比例测定 在 12 孔培养板中培养 DRG 细胞 3d、14d 时,实验组、对照组中各取 3 孔,每孔随机观察和计数 10 个视野进行 NSE 免疫组织化学染色及苏木素染色; 4%多聚甲醛室温固定 1h, 0.01M PBS 清洗后,滴加 10%绵羊血清在盖玻片上,37 $^{\circ}$ C 烤箱孵育 30min,加入 1:200 兔抗鼠 NSE 抗体,于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, PBS 清洗后将 1:200 生物素化山羊抗兔 IgG 滴加在盖玻片上,放入 37 $^{\circ}$ C 烤箱孵育 30min, PBS 清洗后滴加 ABC 复合物, DAB 显色,清水冲洗后以苏木素复染细胞核,酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片。阳性细胞染棕黄色,倒置显微镜下计数 NSE 染色阳性细胞数及所有细胞数,两者比值为神经元细胞所占比例。

1.3 统计学处理

所有测定结果均以均数 $\pm$ 标准差表示,所有数据通过 SPSS 软件行 *t* 检验, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 自组装凝胶的鉴定

透射电镜观察显示含 IKVAV 活性部位的多肽溶液在 DMEM/F12 触发下自组装为凝胶,凝胶为编织状纳米纤维,纤维直径为 3~5nm,纤维间有较大空隙(图 1,后插页 II)。

2.2 DRGc 的鉴定

原代 DRGc 普通培养 3d 后倒置相差显微镜下观察示细胞胞体呈圆形、椭圆形和不规则形,胞体较大,光晕强,并伸出突起;神经元之间相互聚集,形成神经网络。培养的 DRGc 经 NSE 抗体免疫组化反应,显微镜下可见棕色阳性细胞,形态为圆形、椭圆形和不规则形(图 2,后插页 II)。

2.3 自组装多肽支架对 DRGc 的生物学作用

倒置相差显微镜观察:对照组中细胞于接种后 6~12h 开始贴壁,培养 24h 时有突起伸出,培养第 4d 时培养体系中出现明显的神经网络,培养 12d 时,大量神经元细胞内开始出现空泡,突起变细,细胞逐渐死亡(图 3,后插页 II)。实验组中,接种到二维凝胶表面的细胞 4~6h 即可贴壁,培养 24h 时即有明显的突起伸出,培养第 3 天时即可见明显的神经网络,培养第 12 天时,仅有少量神经元细胞胞浆内出现空泡(图 4,后插页 II)。

实验组中培养 1d 时,神经元轴突最长可达 60 μ m,平均突起长度为 43.8 $\pm$ 10.4 μ m;对照组中神经元培养 1d 时,最长突起长度为 44 μ m,平均突起长度为 33.4 $\pm$ 5.75 μ m;两组之间比较有显著性差异($P<0.05$)。

培养至 3d 时,实验组与对照组中神经元比例无显著差异,培养 14d 时,对照组中大部分神经元细胞死亡,实验组中神经元细胞比例显著高于对照组($P<0.05$,表 1)。

3 讨论

理想的脊髓组织工程支架材料应满足以下几个要求:①良好的生物相容性,在体内不会引起排斥和炎症反应。②具有可塑性和三维立体结构,必须是高度多孔的类似泡沫状,具有很大的内表面

积,有利于细胞以及相关基质分子的植入和黏附,同时还有利于细胞营养成分的渗入和代谢产物的排出。③具有良好的表面活性,能促进细胞的黏附并提供良好的细胞外微环境。④具有生物可降解性及适宜的降解速率^[1]。

分子自组装在自然界普遍存在,低聚肽、核苷酸和一些两性分子在满足化学互补性和结构兼容性的条件下由一些非共价键介导,主要是氢键、离子键、疏水性相互作用、范德华力,能形成热力学稳定的高阶结构^[2]。Holmes 等^[3]利用固相法合成出两种 Alg-Ala-Asp(RAD)寡肽,分别为 RAD16- I (AcN-RADARADARADA-CNH) 和 RAD16- II (AcN-RARADADARARADADA-CNH₂),并将肽链的 N 端和 C 端通过乙酰化和酰胺化修饰以防止其迅速降解。将寡肽溶解于 PBS 后调整溶液 pH 值和离子浓度,能形成肉眼可见的疏松的 Sapeptide 材料。高分辨率扫描电子显微镜观察示 RAD16- I 和 RAD16- II 交织成网状的纤维结构,纤维直径为 10~20nm。Sapeptide 材料中含有 RAD 序列,其结构与天然细胞外基质(ECM)中为细胞粘附受体提供结合位点的 RGD 序列(Arg-Gly-Asp)相似。他们将神经细胞置于材料中培养,发现轴突能按材料的表面轮廓呈树状伸长,与体内的神经细胞生长相似,不同于在普通材料表面的直线伸长。可见分子自组装技术能够从仿生角度设计出适合神经修复的材料。

本实验中 IKVAV 两亲性分子序列^[4,5]为: C₁₆H₃₁O-NH-AAAGGGEIKVAV-COOH,质谱仪测其分子量为 1351.6,高压液相色谱仪示其纯度为 98%。该序列中 C₁₆H₃₁O 是疏水性的,使分子聚集,而且含有长链的烷基尾 C₁₆H₃₁O,该结构可提高肽对氢离子敏感度。烷基尾逐渐缩短到无烷基尾时,肽对氢离子触发的自组装能力下降,最终不能自组装成凝胶。序列中 A3G3(-AAAGGG-),一方面与烷基起协同效应,另一方面使其后部的活性区域 IKVAV 伸出到纤维表面,从而暴露 IKVAV 的活性区域。E 为亲水性,使分子离散,当 pH 值>9

表 1 实验组与对照组培养 3d、14d 时的 DRGc 比例

($\bar{x}\pm s$, $n=30$)

组别	第 3 天			第 14 天		
	细胞总数	NSE(+)细胞数	DRGc 比例	细胞总数	NSE(+)细胞数	DRGc 比例
实验组	130.20 $\pm$ 13.23	39.30 $\pm$ 4.42	30.55 $\pm$ 1.69	84.40 $\pm$ 7.81	36.50 $\pm$ 1.78 ^①	43.60 $\pm$ 4.83 ^①
对照组	134.00 $\pm$ 8.34	38.70 $\pm$ 3.47	28.87 $\pm$ 1.56	73.10 $\pm$ 4.15	19.70 $\pm$ 3.71	26.97 $\pm$ 4.90

注:①与对照组比较 $P<0.05$

时,肽带负电荷,由于静电排斥阻止其自组装,当 pH 值<7.35,肽负电荷排斥作用消失,疏水基团聚集,聚集的多肽分子会有规律地自组装,形成轮辐样结构,亲水的 C 端 IKVAV 活性多肽位于结构表面,N 端疏水的多肽和烷基链位于结构内部^[6]。同样加入二价阳离子(如 Ca^{2+})后,带负电荷的肽可通过与阳离子之间的桥梁作用发生聚集,有利于自组装凝胶形成。

此外,两亲性肽自组装构建的新型组织工程支架材料还有以下优点:①含 IKVAV,IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val)来源于层粘连蛋白,能促进细胞粘附、迁移、分化、生长和轴突的延长;②反应条件简单,可由 DMEM/F12 触发;③凝胶粘弹性好,易于运输;④降解产物(氨基酸)可被机体吸收,无免疫反应及毒性反应;⑤凝胶呈多孔结构,为细胞提供足够的空间及表面积;⑥肽序列易于人工设计与修改以满足特定需求。

该肽在常温下加入 DMEM/F12 后,在氢离子和二价阳离子的触发下形成疏松质软的凝胶。我们通过 TEM 观察证实该凝胶材料是编织状纳米纤维,纤维直径为 3~5nm,长度可达到数百纳米,纤维之间有一定空隙,可容纳细胞和水分子,在结构上是一种类似于天然 ECM 的仿生材料。

本实验参照 Sylvain 等^[7]的方法获得 DRGc 细胞,DRGc 富含成熟的感觉神经元,结构简单,适用于进行轴突导向、突触发生、神经元信号传导及神经营养因子等研究。将 IKVAV 多肽二维凝胶支架与新生大鼠 DRGc 细胞联合培养,结果表明,该二维凝胶支架能诱导神经元轴突的发生和延长;且能延长神经元在体外的存活时间,有神经营养作用,其作用机制可能是通过 IKVAV 与神经细胞表面的 LBP110 结合后通过信号传导上调细胞内 c-fos 基因的表达,从而促进细胞的生长和轴突的延长^[8,9]。因此,该材料在功能上也是一种类似天然 ECM 的仿生材料。

综上所述,含 IKVAV 活性位点的多肽自组装

材料对神经细胞有良好的细胞相容性,能诱导轴突的发生和延长,具有支架及生物活性双重作用,可作为一种新型的组织工程材料。在以后的工作中还可通过自组装方式形成三维支架材料,包裹种子细胞或营养分子,并通过注射技术运送到脊髓损伤局部,从而达到治疗目的。

4 参考文献

1. Novikova LN, Kellerth JO, Novikov LN. Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury[J]. Curr Opin Neurol, 2003, 16(6): 711-715.
2. Estroff LA, Hamilton AD. Water gelation by small organic molecules[J]. Chem Rev, 2004, 104(3): 1201-1218.
3. Holmes TC, Su Xing, Zhang S, et al. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(12): 6728-6733.
4. Niece KL, Hartgerink JD, Donners JJ, et al. Self-assembly combining two bioactive peptide-amphiphile molecules into nanofibers by electrostatic attraction[J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(24): 7146-7147.
5. 吴永超, 郑启新, 吴斌, 等. 异亮氨酸-赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸-缬氨酸多肽纳米纤维对神经干细胞生物学行为的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(11): 1398-1400.
6. Silva GA, Czeisler C, Niece KL, et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers[J]. Science, 2004, 303(5662): 1352-1355.
7. Andre S, Boukhaddaoui H, Campo B, et al. Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons[J]. J Neurophysiol, 2003, 90(6): 3764-3773.
8. Kibbey MC, Jucker M, Weeks BS, et al. β -Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin[J]. Proc Natl Acad Sci, 1993, 90(21): 10150-10153.
9. Chalazonitis A, Tennyson VM, Kibbey MC, et al. The alpha 1 subunit of laminin-1 promotes the development of neurons by interacting with LBP110 expressed by neural crest-derived cells immunoselected from the fetal mouse gut [J]. J Neurosci, 1997, 33(2): 118-138.

(收稿日期:2006-12-26 修回日期:2007-04-11)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

欢迎订购《中国脊柱脊髓杂志》2006 年合订本及 2007 年杂志

《中国脊柱脊髓杂志》2006 年合订本为精装本,分上、下卷,定价均为 88 元/册,上、下卷共 176 元。2007 年仍为月刊,定价 15 元/册,全年 180 元。本刊经理部可随时为国内外读者代办邮购(免邮寄费)。有需要者请与本刊经理部联系。地址:北京市朝阳区中日友好医院内《中国脊柱脊髓杂志》经理部,邮编:100029。联系电话:(010)64206649,64284923。E-mail 地址:cspine@263.net.cn。汇款时请在汇款单上注明“订购《中国脊柱脊髓杂志》2006 年合订本或 2007 年杂志”及所需册数。