

聚羟基脂肪酸酯的亲水性改性及其与人脐静脉内皮细胞相容性的研究^{*}

孙 敏¹ 杨华嘯¹ 周 平^{1**} 潘銮凤^{2**} 刘 水²

(¹ 教育部聚合物分子工程重点实验室 复旦大学高分子科学系 上海 200433)

(² 复旦大学上海医学院分子生物学实验室 上海 200032)

摘 要 用丝素蛋白(SF)对微生物合成的高分子聚合物聚(3-羟基丁酸酯-co-3-羟基己酸酯)(PHBHHx)进行亲水改性,以提高材料的生物相容性.水接触角测定和表面自由能分析表明,丝素蛋白在支架表面吸附,使 PHBHHx 材料表面的水接触角从 90°降至 51°,表面自由能从 37.9 mJ/m² 增至 57.4 mJ/m²,因而增加了材料的亲水性.进一步对亲水性改性前后 PHBHHx 多孔支架与人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的相容性进行了比较.MTT 法细胞活力分析表明,细胞在支架上培养 3,5,7 天后,其在 SF 改性 PHBHHx 多孔支架上的活力显著高于在未改性的 PHBHHx 支架上的活力;扫描电镜观察细胞生长形貌表明,细胞在改性后多孔支架上黏附及生长 5 天后,形成了连续细胞单层,其生长状态优于在未改性的 PHBHHx 支架上的生长状态;胶原含量测定表明细胞在改性后支架上比在未改性支架上有更好的胶原分泌能力,即改性后支架更利于诱导 HUVECs 分泌细胞外基质(ECM)从而构建类似体内的生长环境.

关键词 丝素蛋白(SF),聚(3-羟基丁酸酯-co-3-羟基己酸酯)(PHBHHx),人脐静脉内皮细胞(HUVECs),生物相容性

聚(3-羟基丁酸酯-co-3-羟基己酸酯)(PHBHHx)是脂肪酸聚酯(PHA)家族中的新成员,是通过微生物发酵方法生产的一类可完全生物降解的热塑性聚酯^[1].陈国强等研究发现,比较聚羟基脂肪酸酯(PHA)家族中的聚羟基丁酸酯(PHB),聚羟基戊酸酯(PHV),聚羟基癸酸酯(PHO)和羟基丁酸酯与戊酸酯的共聚物(PHBV)等化合物,PHBHHx 用于生物医用材料具有更优异的力学性能和生物相容性^[2-3].改变羟基丁酸酯(HB)和羟基己酸酯(HH)的配比 x 可使 PHBHHx 的结晶度和断裂伸长率分别在 60% ~ 18%,5% ~ 850% 范围内变化^[4,5].Wang 等研究表明,用脂肪酶处理 7 周后,P(HB-co-12% HH)可降解 7%,而 P(HB-co-5% HH)和 P(HB-co-20% HH)的降解率均小于 3%^[6],说明 PHBHHx 降解与其中 HH 的比例 x 密切相关.Yang 证明,含 12% 羟基己酸酯(HH)的 PHBHHx 比 PHB 更有利于 L929 细胞的生长^[7].PHBHHx 在组织工程血管^[8,9]、心脏瓣膜^[10]和肺^[11]等领域亦被广泛关注.但是,PHBHHx 的生物相容性尚不十分理想,如何进一步提高其生物相容性,并发挥细胞在

支架上生长功能仍是近年来关注的重点^[11].

人们曾使胶原^[12]、白凝胶^[13]、黏联蛋白^[14]和丝素蛋白^[9,15]等天然蛋白与合成高分子材料表面进行相互作用,以提高材料的生物相容性,促进其在生物医用材料领域的更有效应用.比较各研究结果发现,丝素蛋白不仅来源广泛,性质稳定,而且在体内不易引发凝血,能长时间支持细胞的黏附与生长^[16,17].陈光等用再生丝素蛋白改性聚己内酯(PCL)材料表面,明显提高了材料的细胞相容性^[18];梅娜等研究了再生丝素蛋白改性 PHBHHx 多孔支架的最佳溶液浓度,并证明用 0.75 wt% 浓度的丝素蛋白改性后的 SF/PHBHHx 多孔支架与成纤维细胞有良好的生物相容性^[19].力学性能测试显示,P(HB-co-12% HH)膜的最大拉伸强度和断裂伸长率分别为(11.7 ± 0.5) MPa 和(204 ± 5)%.SF 改性后的 SF/P(HB-co-12% HH)膜的最大拉伸强度和断裂伸长率分别为(11.5 ± 0.5) MPa 和(175 ± 5)%^[19].两者相比,力学性能无显著降低^[19].张翼等研究发现,平滑肌细胞在 SF/PHBHHx 支架上的生长状态明显优于在未改性的 PHBHHx 多孔支架上的生长状态,

* 2009-12-18 收稿,2010-02-22 修稿;国家自然科学基金(基金号 20673022)资助项目;** 通讯联系人,E-mail:pingzhou@fudan.edu.cn; lfp@shmu.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2010.09444

表明 SF 改性后的 PHBHHx 材料更适用于组织工程的人工心脏瓣膜^[1]。这为 SF/PHBHHx 材料在组织工程血管、瓣膜等领域的应用奠定了基础。

由血管、心脏瓣膜的生理组织结构可知^[20, 21], 构成受力中间层的成纤维细胞与平滑肌细胞负责组织重建^[22], 构成内皮层的内皮细胞则分泌血小板衍生因子, 起控制血凝, 降低血栓作用, 同时该细胞可以控制平滑肌等周围细胞的生长, 是组织工程研究中重要的细胞^[23]。因此, 研究组织工程材料与这 3 种细胞的相容性具有重要意义。

本工作拟用丝素蛋白对生物可降解高分子 PHBHHx 聚合物进行亲水性改性, 研究改性后的 SF/PHBHHx 多孔支架与人脐静脉内皮细胞的相容性。将丝素蛋白修饰的 PHBHHx 支架应用于构成心血管重要细胞之一——内皮细胞的相容性研究尚鲜见报道, 其结果对于评价该材料能否有效用作组织工程心血管支架具有重要意义。研究中, 将原代分离的脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 在多孔支架上接种, 观察细胞在支架上的活力及生长状态, 并分析内皮细胞在支架上分泌细胞外基质组分中胶原的含量, 从细胞功能性角度评价内皮细胞与 SF/PHBHHx 支架的相容性, 为该材料应用于心血管组织工程奠定理论基础。

1 实验部分

1.1 材料与制备方法

1.1.1 材料 实验所用 PHBHHx 聚合物由清华大学生命科学学院陈国强提供, 重均分子量为 100 kDa, 其中羟基己酸酯 (HH) 含量 x 为 12%。所用 0.75 wt% 浓度的再生丝素蛋白 (silk fibroin, SF) 溶液根据文献^[8]方法制备。

1.1.2 PHBHHx 二维膜和三维多孔支架制备

用溶剂挥发法制备二维 (2D) PHBHHx 膜。将 0.3 g PHBHHx 粉末溶于 7 mL 二氯甲烷溶液, 浇铸于直径为 6 cm 的培养皿中, 室温置于通风橱中 24 h, 待溶剂完全挥发后即得到厚度约为 100 μm 的 2D PHBHHx 膜。

溶剂浇铸——粒子洗脱法制备三维 (3D) 多孔 PHBHHx 支架。以 NaCl 盐晶粒作为致孔剂, 将粒径为 50 ~ 75 μm 的 NaCl 与 PHBHHx 聚合物粉末以质量比为 9:1 的比例加入到 20 mL 二氯甲烷溶液中。剧烈搅拌使 PHBHHx 聚合物溶解并使盐粒分散, 形成均匀糊状溶液。将此溶液浇铸在直径

为 6 cm 的玻璃培养皿中, 使溶剂在室温下于通风橱中自然挥发 24 h, 得到 NaCl/PHBHHx 复合物, 厚度约为 0.2 ~ 0.3 mm。将复合物在去离子水中浸泡 3 天, 每 6 h 换水。待 NaCl 晶体完全洗脱, 即得到多孔支架, 并将其真空干燥备用。陈光等^[8]证明, 致孔剂和化合物的质量比为 9:1 时, 所得多孔支架的孔隙率约为 85%。本工作所得多孔支架的孔隙率与前期报道^[8]一致。

1.1.3 丝素蛋白改性的 PHBHHx 二维膜与三维多孔支架的制备 将上述制备好的 PHBHHx 2D 膜或 3D 多孔支架浸润在体积比为 1:3 的水和丙酮混合溶液中 1 h, 使材料溶胀, 以利于丝素蛋白充分吸附^[9], 取出后用去离子水洗涤, 然后在 66.66 Pa 真空负压下于 0.75 wt% 的再生丝素蛋白溶液中浸泡 4 h。取出, 在液氮中预冷冻 5 min, 然后在温度为 -50°C, 真空度为 13.32 Pa 的条件下继续冷冻干燥 24 h。所制得的 2D 膜和 3D SF/PHBHHx 支架在 100% 甲醇中浸泡 30 min, 使丝素蛋白构象从易溶于水的螺旋态转变为不易溶于水的 β 折叠态, 从而固定在支架表面^[9, 10], 之后将支架样品真空干燥备用。

1.2 SF/PHBHHx 支架的表征

1.2.1 水接触角测定与表面自由能分析

PHBHHx 膜及 SF/PHBHHx 膜的水接触角可反映膜的亲水性。水接触角测量采用视频光学接触角测量仪 (OCA15, Data Physics, Germany)。室温下, 将 10 μL 的蒸馏水滴加到待测膜表面, 并用图象分析系统分析接触角。液滴滴在表面 10 s 内读数。取 10 个不同观察点, 测量结果取平均后得到最终接触角值。

表面自由能可由所测量的水及二碘甲烷接触角根据公式 (1) 和 (2) 计算得到^[11]。

$$(1 + \cos\theta_1)\gamma_1 = 4(\gamma_1^d\gamma_s^d/(\gamma_1^d + \gamma_s^d) + \gamma_1^p\gamma_s^p/(\gamma_1^p + \gamma_s^p)) \quad (1)$$

$$(1 + \cos\theta_2)\gamma_2 = 4(\gamma_2^d\gamma_s^d/(\gamma_2^d + \gamma_s^d) + \gamma_2^p\gamma_s^p/(\gamma_2^p + \gamma_s^p)) \quad (2)$$

其中 θ_1 为蒸馏水在膜表面的接触角, θ_2 为二碘甲烷液体在膜表面的接触角。 γ_1 和 γ_2 分别为水和二碘甲烷的总表面自由能, γ_1^d 为水色散项 (非极性项) 的表面自由能, γ_1^p 为水非色散项 (极性项) 的表面自由能, 则水的总表面自由能 $\gamma_1 = \gamma_1^d +$

γ_1^p . 对于水, $\gamma_1^d = 22.1 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_1^p = 50.7 \text{ mJ/m}^2$, 则 $\gamma_1 = 72.8 \text{ mJ/m}^2$ ^[1]; 同理, 对于二碘甲烷, $\gamma_2^d = 44.1 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_2^p = 6.7 \text{ mJ/m}^2$, 则 $\gamma_2 = 50.8 \text{ mJ/m}^2$ ^[1]. 对于膜表面自由能 γ_s , 则有 $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$. 通过测量 θ_1 和 θ_2 , 根据公式(1)和(2), 可计算膜表面自由能 γ_s^d 、 γ_s^p 及 γ_s .

1.2.2 支架形貌的电镜观察 用扫描电镜(SEM, TS 5136)观察丝素蛋白改性前后支架的形貌. 观察前, 支架被溅射喷金 10 s, 在表面形成极薄金层. 加速电压为 20 kV.

1.3 细胞培养

1.3.1 细胞准备 人脐静脉内皮细胞分离培养是在无菌条件下取 25 cm 新鲜脐带(剖宫产), 分离出血管内膜层. 将其剪成约 1 mm 组织块, 均匀排放于培养瓶底部, 于 37°C、5% CO₂ 饱和湿度的孵育箱中静置 12~24 h. 待组织块在瓶底贴紧后, 添加培养液, 于孵育箱中培养, 每 3 天更换培养液 1 次. 待细胞长出, 汇合度达到 70%~80% 时, 以 0.025% 胰酶-0.01% EDTA 消化传代. 通过免疫荧光染色和形态观察鉴定内皮细胞, 取 3~6 代用于实验.

培养液组成为培养基 M199 (Gibco), 链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$, 青霉素 100 U/mL, 胎牛血清 (Gibco) 10% (V/V), 内皮细胞生长因子 EGF 20 ng/mL, 碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 2 ng/mL, L-谷氨酰胺 4 mmol/mL, 两性霉素 B 1 $\mu\text{g/mL}$, 氢化可的松 1 $\mu\text{g/mL}$.

1.3.2 细胞在支架上的培养 将直径为 15 mm 的 SF/PHBHHx 3D 多孔支架试样浸入 75% (V/V) 的乙醇溶液中过夜消毒, 之后紫外灯照射 2 h, 进一步消毒. 消毒后的支架在磷酸缓冲溶液 (PBS, pH = 7.4) 中浸泡冲洗 3 次, 置换出乙醇. 将数片该支架置于 24 孔培养板 (CostarTM) 中, 各孔中分别滴加 0.5×10^5 个/mL 脐静脉内皮细胞悬液 500 μL . 经过 1 h 的预培养后, 每孔中加入 1 mL 培养液. 培养液每隔 2 天更换. 培养液和培养条件同上.

1.4 细胞表征

1.4.1 MTT 细胞活力测试 用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT; Sigma) 方法表征人脐静脉内皮细胞在 PHBHHx 与 SF/PHBHHx 多孔支架上培养 1, 3, 5, 7 天时的生长活力. MTT 方法是常用的检测细胞活性的方法. 简述如下, 用无血清的培养液冲洗待测支架以除去

未吸附的细胞碎片. 然后将支架转移到另一培养板中, 加入 300 μL 无血清培养液和 30 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 并在培养箱中培养 3 h, 使活细胞与 MTT 形成紫色 MTT/线粒体结晶物. 将 MTT/线粒体结晶物用 200 μL 二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 并移取其中 150 μL 溶液至 96 孔板中进行细胞含量测定. 该测定使用自动酶标分析仪 (ELX 800, Bio-Tek), 检测波长 565 nm, 以纯 DMSO 溶液作为空白对照.

1.4.2 细胞形态的电镜观察 将细胞在 SF/PHBHHx 3D 多孔支架和纯 PHBHHx 支架上培养 3、5 天的试样取出, 用磷酸缓冲溶液淋洗两次, 并用 2.5% (V/V) 的戊二醛溶液在 4°C 时固定细胞, 然后将试样在一系列浓度为 30%、50%、70%、90% 和 100% (V/V) 的乙醇溶液中逐级脱水, 每次 5 min. 冷冻干燥 24 h. 冻干后样品喷金进行电镜观察.

1.4.3 胶原含量测定 将细胞在支架上培养 5、10、15 天的试样取出, PBS 缓冲溶液冲洗 2 次, 用 4% 多聚甲醛在 4°C 时固定 4 h. 用胶原含量试剂盒 (南京建成生物技术公司) 测量支架上的胶原含量. 按说明书步骤操作.

1.5 数据分析

各测量至少进行 3 次平行试验 ($n = 3$), 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差 (SD) 表示. 采用 One-way 差异比较方法中的 ANOVA 计算法进行多组数据的统计学评价. 当任意两组数据差异概率 $p < 0.05$ 时, 则认为它们之间存在明显差异, 当 $p < 0.01$ 时, 则认为它们之间存在显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 支架的性质

2.1.1 静态水接触角与表面自由能 一般情况, 亲水性表面比疏水性表面更有利于细胞吸附与生长. 对于疏水性的聚合物材料, 增加其表面亲水性有利于提高材料的细胞相容性. 我们前期研究证明^[6], 高浓度丝素蛋白溶液改性的二维 PHBHHx 致密膜比低浓度丝素蛋白溶液改性的致密膜更有利于细胞吸附生长. 但用高浓度丝素蛋白改性三维多孔 PHBHHx 支架, 会破坏多孔结构, 不利于细胞繁殖生长. 研究发现^[6], 丝素蛋白溶液改性三维多孔 PHBHHx 支架的最佳溶液浓度为 0.75 wt%. 因此本工作用 0.75 wt% 浓度的丝素蛋白溶液浸泡 PHBHHx 支架, 使丝素蛋白吸

附在支架表面,以改善 PHBHHx 聚合物的亲水性.由衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)证明,改性后的 SF/PHBHHx 支架表面出现 1652 cm^{-1} 和 1540 cm^{-1} 的丝素蛋白特征吸收峰,见图 1,表明丝素蛋白已吸附在 PHBHHx 表面.由于这种方法吸附丝素蛋白量较低,所以难以准确测得丝素蛋白在 PHBHHx 上的实际吸附量.

丝素蛋白改性 PHBHHx 膜前后的水接触角如图 2 所示. PHBHHx 的水接触角为 $(90 \pm 1)^{\circ}$,而纯丝素蛋白的动态水接触角为 $(53.4 \pm 0.6)^{\circ}$ [24],可见丝素蛋白的亲水性明显好于 PHBHHx 膜. SF/PHBHHx 膜的水接触角为 $(51 \pm 5)^{\circ}$,其较纯 PHBHHx 膜的水接触角小近 40° ,说明吸附的丝素蛋白有效降低了 PHBHHx 膜表面的疏水性,使改性后的 SF/PHBHHx 多孔支架表面更有利于细胞黏附生长.

此外,通过测量二碘甲烷在 PHBHHx 膜和 SF/PHBHHx 膜上的接触角,根据公式(1)和(2)分别计算了两种待测膜的色散项表面自由能(γ_s^d)和极性项表面自由能(γ_s^p)及总表面自由能(γ_s).表1为丝素蛋白改性前后PHBHHx膜的接

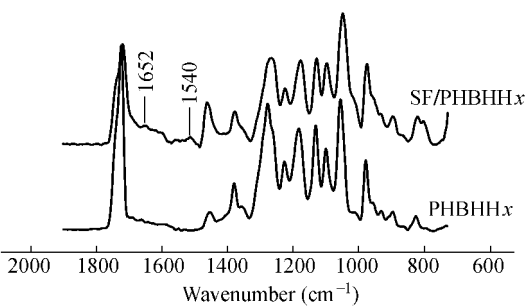


Fig. 1 ATR-FTIR spectra of PHBHHx and SF/PHBHHx scaffolds

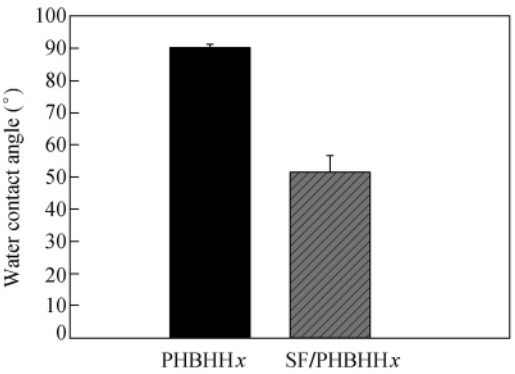


Fig. 2 Static water contact angle of SF/PHBHHx and PHBHHx films

Table 1 The contact angle and surface free energy of SF/PHBHHx and PHBHHx films

Sample	$\theta_{\text{H}_2\text{O}}(^{\circ})$	$\theta_{\text{CH}_2\text{I}_2}(^{\circ})$	Dispersive component of surface free energy (γ_s^d , mJ/m^2)	Polar component of surface free energy (γ_s^p , mJ/m^2)	Total surface free energy ($\gamma_s = (\gamma_s^d + \gamma_s^p)$, mJ/m^2)
SF/PHBHHx	51 ± 5	38 ± 2	40.5	16.9	57.4
PHBHHx	90 ± 1	46 ± 1	36.6	1.3	37.9

触角和表面自由能比较.结果表明, SF/PHBHHx 膜表面自由能为 $57.4\text{ mJ}/\text{m}^2$,较纯 PHBHHx 表面自由能 $37.9\text{ mJ}/\text{m}^2$ 增加了近 $20\text{ mJ}/\text{m}^2$.其主要原因是总表面自由能中的极性项增加,而色散项变化较小.极性项的显著增加说明丝素蛋白在膜表面吸附,导致 SF/PHBHHx 膜表面极性明显增大.

2.1.2 多孔支架形貌 SF/PHBHHx 多孔支架与纯 PHBHHx 多孔支架的形貌如图 3 所示.比较可见,用 $0.75\text{ wt}\%$ 丝素蛋白溶液改性后的 SF/PHBHHx 多孔支架表面(图 3b)与未改性 PHBHHx 支架表面(图 3a)基本相同,孔径约 $50 \sim 75\text{ }\mu\text{m}$.说明用低浓度的丝素蛋白溶液改性支架不会破坏支架本身孔结构.图 3(a)与 3(b)中均可见支架中存在孔中孔结构,这种结构与 2D 致密膜相比不仅为细胞生长提供更大的生长空间,而且有利于细胞生长过程中所需养分和代谢废物的运输.

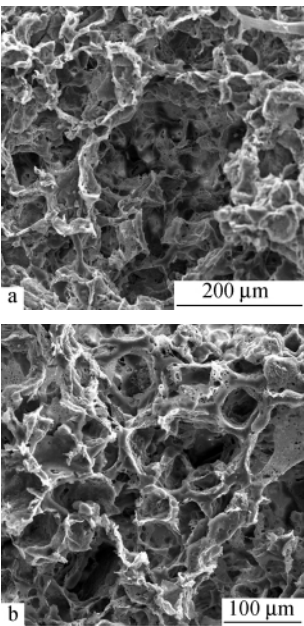


Fig. 3 The morphology of PHBHHx scaffold (a) and SF/PHBHHx scaffold (b) observed by SEM

2.2 SF/PHBHHx 支架与内皮细胞的相容性

2.2.1 MTT 细胞活力检测 MTT 分析中的光密度值与支架上活细胞数目成正比,因此光密度大小反映细胞在不同支架、不同生长时间的数量和生长活力.图 4 为 HUVECs 细胞在支架上的生长活力分析.由图可见,细胞接种到支架上 1 天后,SF/PHBHHx 支架的光密度值略大于 PHBHHx 支架的光密度值.说明细胞接种后,在 SF/PHBHHx 支架

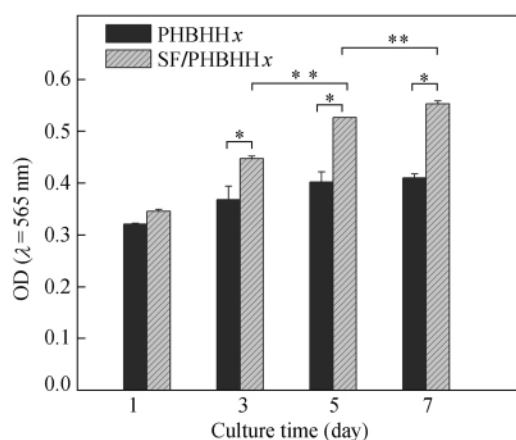


Fig. 4 MTT assay of cells on the SF/PHBHHx and PHBHHx scaffolds ($n = 4$)

* : $p < 0.05$ when comparison of cell activity on SF/PHBHHx and PHBHHx scaffolds at the same culture time;

** : $p < 0.01$ when comparison of cell activity on the same type of scaffolds at different culture time

上的活细胞数目略多于 PHBHHx 支架,但两者并无显著性差异.随着培养时间增加,3、5、7 天后,SF/PHBHHx 与 PHBHHx 多孔支架上细胞数目均在增加,但由光密度值可见,前者细胞数目增加更多.比较细胞培养 3 天与 5 天,5 天与 7 天多孔支架上的细胞数目可见,它们均具有显著性差异(图 4 中 ** 所示).同时,SF/PHBHHx 多孔支架上细胞数目明显高于 PHBHHx 上细胞数目,两者在培养 3、5、7 天后均存在明显差异(图 4 中 * 所示).说明,随着培养时间的增加,HUVECs 细胞在 SF/PHBHHx 多孔支架上的吸附、生长、增殖均优于未改性的 PHBHHx 支架.

2.2.2 支架上的细胞形貌 HUVECs 细胞在支架上的生长形貌如图 5 所示.细胞培养 3 天后,PHBHHx 支架上内皮细胞仅部分黏附生长(图 5a),而 SF/PHBHHx 支架上细胞基本已成片生长,即汇合较高(图 5b).将图 5(a)中圆圈所示部分放大,可见仅有少量细胞外基质分泌,见图 5(a)插图,但将图 5(b)中圆圈所示部分放大,可明显看到细胞伪足伸展,彼此相连,有较多细胞外基质分泌,见图 5(b)插图.细胞继续培养至 5 天后,未改性的 PHBHHx 支架上内皮细胞仅部分生长(图 5c),但 SF/PHBHHx 支架上内皮细胞已形成连续的单细胞层,汇合成片,覆盖大部分基质表面(图 5d).放大可见连续细胞层的波谷形貌,见图 5(d)插图.

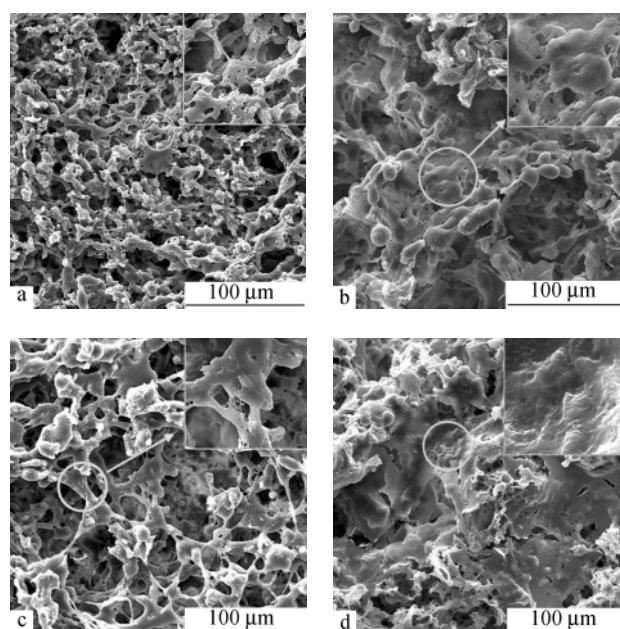


Fig. 5 SEM observation of HUVECs morphology on the scaffolds at different culture time

(a) and (c) show the cells cultured for 3, 5 days, respectively, on the PHBHHx scaffolds; (b) and (d) show the cells cultured for 3, 5 days, respectively, on the SF/PHBHHx scaffolds; The inserted images are in the magnification of 1000

2.2.3 细胞分泌的胶原含量 胶原是细胞分泌的细胞外基质中主要组成之一,在组织中起力学支撑作用.体外培养细胞能否分泌以及分泌多少细胞外基质是判断细胞生长状态和功能表达是否正常的重要参数.图6显示 HUVECs 细胞在 SF/PHBHHx 支架和未改性 PHBHHx 支架上培养 5、10 和 15 天后分泌的胶原含量.从图6可见,随着培养时间的增加,HUVECs 分泌的胶原含量显著增多,而且改性后支架上细胞分泌的胶原含量

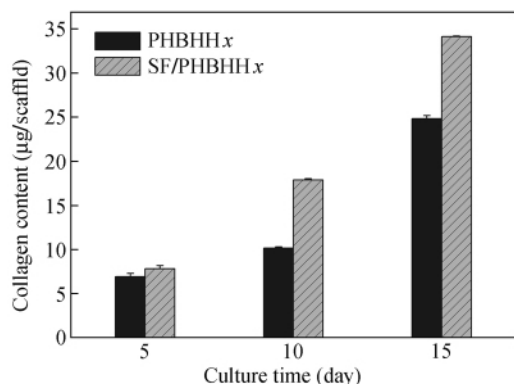


Fig. 6 The secreted collagen content of cells on SF/PHBHHx and PHBHHx scaffolds for different culture time

明显高于未改性支架.可见,SF/PHBHHx 支架更有利于细胞的生长,分泌,即有利于其功能性表达.

3 结论

水接触角测定和表面自由能分析表明,丝素蛋白在 PHBHHx 表面吸附,增大了支架表面的自由能,提高了该材料的亲水性.MTT 分析表明,丝素蛋白表面改性 PHBHHx 后,HUVECs 细胞在 SF/PHBHHx 多孔支架上的吸附、增殖优于未改性的 PHBHHx 支架.SEM 细胞形貌观察也表明 HUVECs 细胞在改性后 SF/PHBHHx 支架上的生长状态优于在 PHBHHx 支架上的状态.胶原含量测定从细胞功能性表达的角度证明,HUVECs 细胞在 SF/PHBHHx 多孔支架上分泌的胶原含量高于未改性的 PHBHHx 支架.因此,HUVECs 细胞与 SF/PHBHHx 多孔支架的相容性好于未改性的 PHBHHx 支架,表明丝素蛋白对 PHBHHx 的表面改性明显提高了该支架材料的生物相容性.

致谢 感谢清华大学生命科学学院陈国强提供 PHBHHx 聚合物.

REFERENCES

- Chen G Q, Wu Q. *Biomaterials*, 2005, 26: 6565 ~ 6573
- Zhao K, Deng Y, Chen J C, Chen G Q. *Biomaterials*, 2003, 24: 1041 ~ 1047
- Qu X H, Wu Q, Zhang K Y, Chen G Q. *Biomaterials*, 2006, 27: 3540 ~ 3545
- Shimamura E, Kasuya K, Kobayashi G, Shiotani T, Shima Y, Doi Y. *Macromolecules*, 1994, 27: 878 ~ 883
- Doi Y, Kitamura S, Abe H. *Macromolecules*, 1995, 28: 4822 ~ 4826
- Wang Y W, Mo Wu Q, Yao H L, Wu Q, Chen J C, Chen G Q. *Polym Degrad Stab*, 2004, 85: 815 ~ 821
- Yang X S, Zhao K, Chen G Q. *Biomaterials*, 2002, 23: 1391 ~ 1397
- Misra S K, Valappil S P, Roy I, Boccaccini A R. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 2249 ~ 2253
- Zhang Yi (张翼), Zhou Ping (周平), Pan Luanfeng (潘鸾凤), Xie Shangzhe (谢尚哲), Sun Min (孙敏), Li Wenting (李文婷). *Acta Chimica Sinica (化学学报)*, 2007, 65: 2935 ~ 2940
- Mei N, Zhou P, Pan L F, Chen G, Wu C G, Chen X, Shao Z Z, Chen G Q. *J Mater Sci-Mater Med*, 2006, 17: 749 ~ 754
- Qu X H, Wu Q, Liang J, Zou B, Chen G Q. *Biomaterials*, 2005, 26: 6991 ~ 6998
- Li J, Yun H, Gong Y D, Zhao N M, Zhang X F. *J Biomed Mater Res Part A*, 2005, 75A: 985 ~ 992
- Prasad Chennazhy K, Krishnan L K. *Biomaterials*, 2005, 26: 5658 ~ 5663
- Pankajakshan D, Philipose L P, Palakkal M, Krishnan K, Krishnan L K. *J Biomed Mater Res Part B*, 2008, 87B: 570 ~ 576
- She Z D, Jin C R, Huang Z, Zhang B F, Feng Q L, Xu Y X. *J Mater Sci-Mater Med*, 2008, 19: 3545 ~ 3552
- Vepari C, Kaplan D L. *Prog in Polym Sci*, 2007, 32: 991 ~ 999
- Altman G H, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan R L, Chen J S, Lu H, Richmond J, Kaplan D L. *Biomaterials*, 2003, 24: 401 ~ 408
- Chen G, Zhou P, Mei N, Chen X, Shao Z Z, Pan Luanfeng, Wu C G. *J Mater Sci-Mater Med*, 2004, 15: 671 ~ 678
- Sun M, Zhou P, Pan L F, Liu S, Yang H X. *J Mater Sci-Mater Med*, 2009, 20: 1743 ~ 1751
- Aikawa E, Whittaker P, Farber M, Medelson K, Padera R F, Aikawa M, Schoen F J. *Circulation*, 2006, 113: 1344 ~ 1349
- Taylor P M, Allen S P, Yacoub M H. *J Heart Valve Dis*, 2000, 9: 150 ~ 158
- Chen Guang (陈光), Zhou Ping (周平), Pan Luanfeng (潘鸾凤), Mei Na (梅娜), Wu Chungeng (吴春根), Chen Xin (陈新),

- Shao Zhengzhong(邵正中). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 2004, 62: 992 ~ 999
- 23 Lavender M D, Pang Z Y, Wallace C S, Niklason L E, Truskey G A. *Biomaterials*, 2005, 26: 4642 ~ 4648
- 24 Bai L Q, Zhu L J, Min S J, Liu L, Cai Y R, Yao J M. *Appl Surf Sci*, 2008, 254: 2988 ~ 2993

BIOCOMPATIBILITY OF PHBHHx AND SILK FIBROIN-MODIFIED PHBHHx SCAFFOLDS WITH HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS

SUN Min¹, YANG Huaxiao¹, ZHOU Ping¹, PAN Luanfeng², LIU Shui²

(¹Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Ministry of Education, Macromolecular Science Department, Fudan University, Shanghai 200433)

(²Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032)

Abstract Silk fibroin (SF) was used to enhance the biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) porous scaffold through surface-coating. The decrease in the water contact angle from 90° to 51° and the increase in the surface free energy from 37.9 mJ/m² to 57.4 mJ/m² on the basis of comparison of SF modified PHBHHx films with SF un-modified ones, respectively, demonstrated that SF was successfully anchored on the surface of PHBHHx, enhancing the PHBHHx hydrophilicity. In order to verify the influence of the modification on the cells growth, the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were seeded on the SF/PHBHHx scaffolds with un-modified PHBHHx scaffolds as control. MTT assay quantitatively demonstrated that HUVECs adhered faster and proliferated better on the SF/PHBHHx porous scaffolds than on the un-modified PHBHHx scaffolds at day 3, 5 and 7. The cell morphologies observed by SEM at day 5 indicated that HUVECs formed continuous cell monolayer on the SF/PHBHHx scaffolds, while they did not on the un-modified PHBHHx scaffolds. Also, the higher collagen content on the modified scaffolds demonstrated that more extracellular matrices (ECM) were secreted by HUVECs similar to the environment of the cell growing *in vivo*. Therefore, the SF-modified PHBHHx is potential to be applied into the cardiovascular tissue engineering.

Keywords Silk fibroin (SF), Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx), Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), Biocompatibility