

研究简报

聚吡咯的生长及与神经组织相容性的研究*

陈树建 袁春伟¹⁾

(东南大学国家教育部分子与生物分子电子学重点实验室, 南京 210096)

王晓冬 张沛云 顾晓松

(南通医学院神经科学研究所, 南通 226001)

摘要 通过化学氧化和电化学氧化方法得到聚吡咯, 用所得到的聚吡咯与神经组织联合培养, 通过倒置光学显微镜和扫描电子显微镜观察其生物相容特性. 得知聚吡咯与神经组织有较好的生物相容性.

关键词 聚吡咯, 神经组织, 生物相容性

学科分类号 Q73

聚吡咯 (polypyrrole, PPY) 的功能研究开始于 20 世纪 80 年代初期, 由于它具有导电特性, 所以有关 PPY 的研究一直是人们关注的问题. 随着对导电聚合物基础研究^[1]深入的同时, PPY 的应用研究也全面展开^[2~4]. 缺损的周围神经的修复一直是一个难以解决的问题. 当前临床的方法是利用自体神经移植修复周围神经, 但是, 这方法有很多缺陷^[2], 因此, 人们迫切需要寻找新型的人工组织神经桥接物. 由于 PPY 易于制备, 稳定性好, 并且具有导电性, 所以利用之拟作神经再生的桥接物作研究. 背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 隶属于周围神经, 文献曾报道对 DRG 的电生理学和激活 Ca^{2+} 电流等研究^[5,6]. 但尚未见 PPY 对 DRG 的作用. 本文在利用聚吡咯管提供引导通道时通过电刺激再生动物周围神经 (坐骨神经) 的前期工作中, 研究 PPY 与动物周围神经 (SD 大鼠 DRG) 联合培养, 了解它们的生物相容性.

1 材料和方法

1.1 试剂

本实验所用水全经电热蒸馏水器蒸馏; 吡咯 (GC 级, 德国), 正己烷、二氯甲烷、甲醇 (A. R), 三氯化铁 (C. R), 氯化钾 (A. R); 基础培养液 (L₁₅培养液, Gibco 公司), 完全培养液 (L₁₅培养液含 10% 小牛血清).

1.2 仪器

电化学工作站, 高压釜, 细胞培养箱, HCP-2 临界点干燥仪 (HITCHI 公司), JFC-1100 离子溅射仪 (JEOL 公司), JEM-T300 扫描电子显微镜 (JEOL 公司), 等.

1.3 合成方法

使用前, 原装吡咯在 131 °C 下真空蒸馏, 得到

白色吡咯单体^[7].

1.3.1 化学合成: 用移液管取 1.70 ml 吡咯单体置于 50 ml 容量瓶, 再向容量瓶加蒸馏水 50 ml, 振荡, 使之混合均匀, 得 0.5 mol/L 吡咯溶液; 称 0.811 g FeCl_3 , 配成 0.5 mol/L FeCl_3 水溶液. 取 5 ml 吡咯单体于 50 ml 烧杯中, 向其中缓缓加入 11.25 ml FeCl_3 水溶液.

1.3.2 电化学合成: 电化学反应池为三电极体系, 三电极与电化学工作站相连接, 利用电脑跟踪扫描. 其中导电玻璃 (indium tin oxide conductive borosilicate glass, ITO, 南京 55 所) 经正己烷、甲醇和二氯甲烷各超声处理 10 min; ITO 为工作电极, 铂网为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极. 电解池中装有 0.1 mol/L 吡咯水溶液和 0.1 mol/L KCl 电解质.

1.4 PPY 与 DRG 联合培养

无菌条件下, 取新生 1~3 d 的 SD 大鼠 DRG, 在体视显微镜下剥除外膜, 用基础培养液洗涤, 将 DRG 分别与高压釜消毒的粉状 PPY 和膜状 PPY 分别放入预先用鼠尾胶包被的盛有圆形盖玻片和未包被的 48 孔培养板中联合培养, 完全培养液, 37 °C, 5% CO_2 , 每隔一天换液一次, 共培养三周.

1.5 生物相容性观察

取培养板, 在倒置光学电子显微镜下观察, 了解细胞生长及迁移情况; 同时取 DRG 与 PPY 膜联合培养的标本, 用基础培养液洗涤, 经 2% 戊二醛 (4 °C) 固定, 洗液洗涤, 再用 1% 锇酸 (4 °C) 后固定; 乙醇逐级脱水, 经 HCP-2 临界点干燥仪干

* 国家杰出青年科学基金资助项目 (39425006).

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (025) 3792506, E-mail: cwyy@seu.edu.cn

收稿日期: 1999-02-01, 修回日期: 1999-06-15

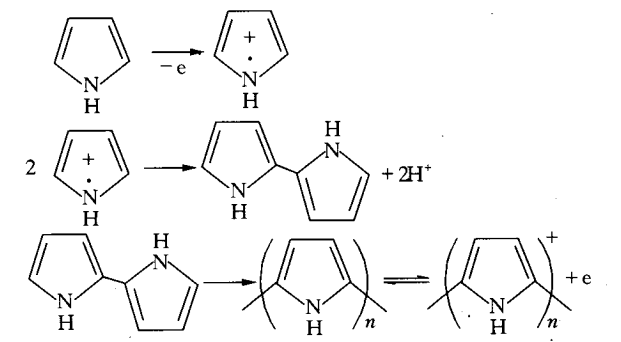
燥, 在 JFC-1100 离子溅射仪中喷金, 用 JEM-T300 扫描电子显微镜观察.

2 结果与讨论

实验中的 PPY 均掺杂 Cl^- .

2.1 氧化聚合

合成反应式如下:



反应式表明, 吡咯单体被氧化时, 先失去一个电子, 形成阳离子自由基, 它们相互碰撞而形成二聚体、多聚体, 最后形成高聚体. 其中氧化位置主要发生在 a 和 a' 位, 最后形成 a 和 a' 链的 PPY 阳离子, 溶液中的阴离子 Cl^- 掺杂进去, 从而得到掺杂阴离子 Cl^- 的 PPY. 化学氧化时, 以 FeCl_3 为氧化剂, 随着反应液的不 断振荡, 低聚小颗粒相互碰撞, 结成较大的粉状 PPY. PPY 具有较强的导电性, 粉末经压片后用四极法测得电导率为 $\delta = 14 \text{ s/cm}$; 电化学氧化时, 选择 KCl 为电解质和掺杂剂, 工作电极相对于参考电极的电压为 1 V 的恒压下, 迅速得到 PPY 薄膜, 随着时间的延长, 薄膜增厚, 颜色从深蓝色变为黑色, 其电导率约为 $\delta = 100 \text{ s/cm}$, 并且柔韧性和强度较好, 膜能从 ITO 上刮下来而不碎裂. 如图 1 所示, 在恒压 1 V 下,

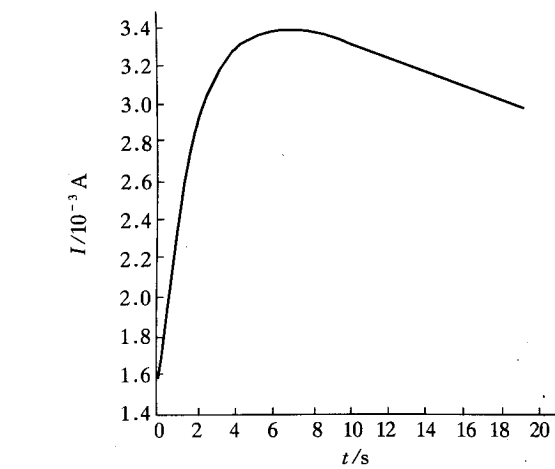


图 1 电化学氧化吡咯单体的 $I-t$ 曲线

得到 PPY 膜; 起始电流为 $1.571 \times 10^{-3} \text{ A}$, 之后电流迅速增大, 达到最大值 $3.391 \times 10^{-3} \text{ A}$ 时, 又逐渐降低. 电流的变化与膜厚度有关, 开始长膜时, 随着溶液中吡咯单体的迅速氧化, 离子迁移速度快, 电流迅速增大, 但掺杂阴离子 Cl^- 的 PPY 膜有一定的电阻, 当膜增厚时其电阻随着增大, 而溶液中吡咯单体的浓度降低, 所以出现电流减小的现象.

2.2 相容性的联合培养

图 2 给出了粉状 PPY 与 DRG 联合培养 10 d 时, DRG 的细胞朝粉状 PPY 定向生长情况 (箭头所指位置), 其中, 图 2 右下角为粉状 PPY, 左上角为 DRG; 图 3 说明, 联合培养 10 d 时, PPY 膜上 DRG 上神经细胞伸展出的细长突起 (箭头所指位置); 图 4 说明了联合培养三周时, 细胞生长旺盛, 其中图 4 上方为部分 DRG, 下方为细胞生长

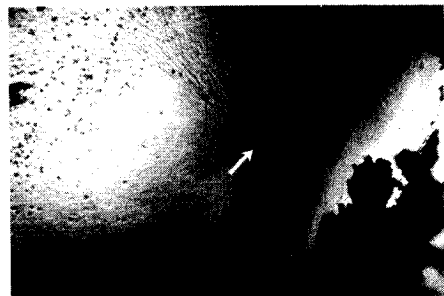


图 2 倒置光学显微镜下, 10 d 时 DRG 细胞向粉状 PPY 定向生长



图 3 倒置光学显微镜下 10 d 时神经元的长突起

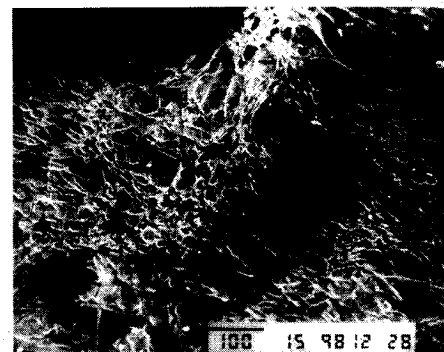


图 4 扫描电子显微镜下, 三周时 DRG 的细胞生长状况
标尺长度 $100 \mu\text{m}$.

情况;图5为图4的局部放大,其中箭头所指的即为细长的突起.联合培养3 d时,DRG四周开始有细胞向外生长,随后的几天观察可知,DRG四周边缘细胞随着时间的延长,细胞迁移的距离逐渐增大,数量逐渐增多.细胞大多胞体呈梭形,有细长的双极;细胞有肩并肩或端对端排列迁移的倾向,最终抵达某处再聚集成特征性的细胞岛,DRG向外延伸的绝大多数细胞是雪旺氏细胞,它是一种周围神经系统的重要神经胶质细胞,在神经缺损再生过程中已证明具有关键的生物学作用.另外也可见少量神经细胞突起随雪旺氏细胞一起向外迁移,说明神经细胞突起可在PPY环境下向外伸延.通过实验观察可知,在有PPY膜的ITO上,DRG的细胞生长旺盛,交织成网,并且有细长的突起;而在图6

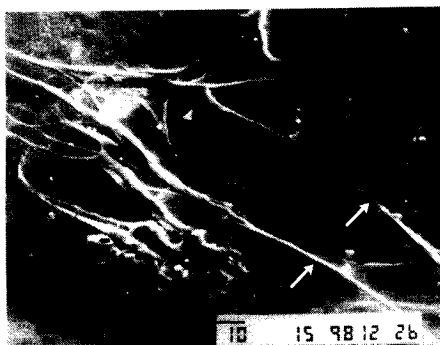


图5 扫描电子显微镜下,10 d时雪旺氏细胞的长突起
标尺长度10 μm.



图6 倒置光学显微镜下,20 d时PPY膜和ITO上雪旺氏细胞生长比较

中可看出,PPY膜(图6右深色部分)上的雪旺氏细胞的密度明显地大于ITO(图6左浅色部分)上的雪旺氏细胞的密度,表明在PPY膜上的雪旺氏细胞比ITO上的雪旺氏细胞生长旺盛.所有这些说明PPY与神经组织有较好的生物相容性.缺损神经的修复一直是难以解决的问题.神经缺损后,修复机理的研究工作涉及桥梁性作用、趋化性作用和微环境作用.其中桥梁作用是要求为再生的神经轴突提供跨越缺损部位的桥梁条件.在利用功

能材料桥接缺损神经时,选择材料的不同将决定它功能恢复的快慢和完全程度;由于PPY具有良好的导电性和有利于细胞生长的表面结构,因此选择它通过电刺激桥接缺损神经将有很大的意义.目前,我们正利用硅橡胶静脉插管作为模板研制PPY导管,同时将选择不同的离子作为电解质和掺杂剂,通过PPY管在电刺激条件下桥接神经再生.

参 考 文 献

- 1 Street G B. Polypyrrole from powers to plastics. In: Skotheim T A. Handbook of Conducting Polymers. New York and Base: Marcel Dekker, Inc. 1986. 265~292
- 2 Christine E S, Venkatram R S, Joseph P V, *et al.* Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. Appl Biol Sci, 1997, **94** (17): 8948~8953
- 3 Aoki T, Tanino M, Sanui K, *et al.* Sectors function of adrenal chromaffin cells cultured on polypyrrole films. Biomaterials, 1996, **17** (20): 1971~1974
- 4 Aoki T, Tanino M, Sanni K, *et al.* Culture of mammalian cells on polypyrrole-coated ITO as a biocompatible electrode. Synthetic Metals Proceeding of the International Conference on Science and Technology of Synthetic Metals, 1994, **71** (1-3): 2229~2230
- 5 Xu Z Q D, Zhang X, Grillner S, *et al.* Electrophysiological studies on rat dorsal root ganglion neurons after peripheral axotomy: Changes in responses to neuropeptides. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (24): 13262~13266
- 6 Garcia K D, Mynlieff M, Sanders D B, *et al.* Lambert-Eaton sera reduce low-voltage and high-voltage activated Ca^{2+} currents in murine dorsal root ganglion neurons. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (17): 9264
- 7 Reghu M, Subramanyam S V. Tunnel transport in polypyrrole at low temperature. Solid State Commun, 1989, **72** (4): 325~329

Research of Outgrowth of Polypyrrole and Its Biocompatibility with Nervous Tissue. CHEN Shu-Jian, YUAN Chun-Wei (National Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics of Southeast University, Nanjing 210096, China); WANG Xiao-Dong, ZHANG Pei-Yun, GU Xiao-Song (Neuroscience Institute of Nantong Medical College, Nantong 226001, China).

Abstract Polypyrrole doping anions was obtained with methods of chemical polymerization and electrochemical polymerization. Nervous tissue was cocultured with polypyrrole and its biocompatibility was observed with an inverted optical microscope and a scanning electron microscope. It is concluded that polypyrrole has good biocompatibility with nervous tissue.

Key words polypyrrole, nervous tissue, biocompatibility