

MWNTs/PMMA 薄膜对大鼠棕色脂肪来源的心脏干细胞生物学特性的影响*

段翠密^{1)**} 孙红玉^{1)**} 原野^{2)**} 刘志强¹⁾ 汤戎昱¹⁾
王常勇¹⁾ 王春兰¹⁾ 冯兰兰¹⁾ 周瑾^{1)***}

(¹⁾军事医学科学院基础医学研究所前沿交叉学科研究室, 北京 100850; (²⁾军事医学科学院药物毒物研究所, 北京 100850)

摘要 近年来, 鉴于心肌组织独有的电生理特性, 应用导电纳米材料作为细胞支架开展心肌组织工程研究取得明显进展. 碳纳米管材料具有良好的力学性能和导电特性, 前期研究表明, 其具有促进新生鼠心肌细胞中未成熟心肌细胞增殖与成熟心肌细胞进一步发育的作用, 但尚未见碳纳米管材料对棕色脂肪来源的心脏干细胞(CSCs)生物学特性影响的研究报道. 为此, 本研究首先采用凝胶-溶胶法制备了羧基化多壁碳纳米管和聚甲基丙烯酸甲酯(MWNTs/PMMA)薄膜, 并通过一系列细胞学、免疫细胞化学及电镜检测方法, 系统评价了 MWNTs/PMMA 薄膜对大鼠棕色脂肪 CSCs 活力、增殖能力及向心肌分化效率的影响. 研究发现, 与明胶材料相比, MWNTs/PMMA 薄膜对棕色脂肪 CSCs 活力、增殖能力有明显促进作用, 并且明显增强其向心肌细胞分化的能力, 分化的心肌细胞具有明显可见的肌管结构, 并且表达介导细胞间电化学传导的缝隙连接蛋白 connexin43. 此外, 超微结构观察发现碳纳米管与细胞膜间及细胞与细胞之间可直接形成紧密连接, 调控细胞行为. 本研究首次探讨了碳纳米管导电材料对棕色脂肪 CSCs 生物学特性影响的规律, 证实碳纳米管导电材料具有良好的促心肌细胞分化作用. 作为一种新型导电纳米材料, 碳纳米管在心肌组织工程研究中具有良好的应用前景, 未来有望在心肌组织体外构建及心肌梗死治疗性应用中发挥潜在的价值.

关键词 碳纳米管, MWNTs/PMMA, 棕色脂肪 CSCs, 支架材料, 心肌分化

学科分类号 R318.08

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00289

在诸多纳米导电材料中, 碳纳米管导电材料具有导电性高、化学性能稳定、表面积大、机械强度高、容易结合其他基团进行功能修饰, 还可直接与蛋白质或 DNA 产生相互作用等特性, 吸引了材料学、物理学、电子学、生物学等领域众多科学家的极大关注, 成为了世界新材料领域的研究前沿和热点, 具有广阔的应用前景^[1-4].

在心肌组织工程研究中, 碳纳米管已被证实可促进心肌细胞黏附、增殖、发育与电生理特性的成熟. 2012 年, Meng 等^[5]将含有碳纳米纤维的可注射型水凝胶应用于心肌组织工程中, 发现碳纳米纤维的添加明显增加了水凝胶的导电特性以及心肌细胞的增殖和电传导能力. 此外, Martinelli 等^[6]将心肌细胞培养在碳纳米管基质上, 证实碳纳米管可通过与心肌细胞的直接接触作用, 促进未成熟心肌细胞增殖与成熟心肌细胞电生理特性的成熟.

碳纳米管可以通过不同方法与不同的支架材料

复合进行功能化修饰, 因而可增加碳纳米管的溶解性、生物相容性及降低细胞毒性. 目前基于碳纳米管的复合导电支架材料已经应用于组织工程研究领域, 其中包括与壳聚糖^[7]、胶原^[8]等天然材料以及聚(碳酸酯)氨酯^[9]等高分子聚合物复合. 聚甲基丙烯酸甲酯(polydimethylmethacrylate, PMMA), 是一种对人体无毒、透光性好、容易加工成所需形状的高分子聚合物, PMMA 和碳纳米管制备的复合材料在其他领域已有研究^[10], 但在生物组织工程中的研究鲜见报道.

* 国家自然科学基金重点项目(31030032), 国家杰出青年科学基金(31125013), 国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB606206), 国家高技术研究发展计划(863)(2012AA020506)和国家自然科学基金青年基金(31100697)资助项目.

** 共同第一作者. *** 通讯联系人.

Tel/Fax: 010-68166874, E-mail: sisun819@yahoo.com

收稿日期: 2013-06-21, 接受日期: 2013-08-14

脂肪组织是干细胞的重要来源. 研究人员已相继分别从白色脂肪组织和棕色脂肪组织分离了间充质干细胞^[11]和心脏干细胞(CSCs)^[12], 并且证实, 白色脂肪组织来源间充质干细胞在心梗修复中具有明显的促血管化作用^[13], 但其向心肌分化的比例较低. 而棕色脂肪 CSCs, 具有较高的自发分化为心肌细胞的能力, 因此受到了心肌再生领域研究人员的青睐. 而且, 棕色脂肪在体内的活性和作用日益受到关注.

近年来, 研究人员进行了碳纳米管材料对干细胞分化的研究探索, 尤其是发现其对干细胞向心肌细胞、神经细胞的分化具有明显的促进作用^[14-15], 但其对棕色脂肪 CSCs 的生物学特性的影响尚未见报道.

为此, 本文首先采用凝胶-溶胶法制备羧基化多壁碳纳米管和聚甲基丙烯酸甲酯(MWNTs/PMMA)薄膜, 然后将大鼠棕色脂肪 CSCs 分别接种于明胶和 MWNTs/PMMA 薄膜上, 再通过一系列细胞学、免疫细胞化学及超微结构检测的方法, 系统评价了 MWNTs/PMMA 薄膜对大鼠棕色脂肪 CSCs 活力、增殖能力及向心肌分化效率的影响.

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

1.1.1 动物. SD 雄性大鼠(60~80 g)购自北京军事医学科学院实验动物中心.

1.1.2 仪器. 超声振荡器(昆山超声仪器制造有限公司); 真空恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); BX-51 显微镜及图像采集系统(OLYMPUS, JAPAN); 相差荧光倒置显微镜(Leica, Germany)及图像采集系统, 超净工作台(哈东联, 中国); CO₂ 培养箱(Thermo Forma, USA); 常温离心机(KUBOTA, JAPAN); HJ-1 型磁力搅拌器(江苏金坛荣华仪器制造有限公司); 超纯水制备仪(MILIPO, USA); BP121S 精密电子天平(Sartorius, Germany); 透射电镜、扫描电镜(军事医学科学院仪器检测中心配备); 低温高速离心机(Sigma, USA); 双波长酶标仪(BIO-RAD, USA)及垂直电泳及转膜装置(BIO-RAD, USA)等.

1.1.3 试剂. IV 胶原酶、Dispase II、0.05%胰酶、胎牛血清和 α -MEM 培养基, 均购自 GIBCO 公司; BrdU、cTnT、 α -Sarcomeric actinin (α -actinin)、connexin-43 和 Nkx2.5 抗体, 均购自 Sigma 公司; 标记 FITC 或 TRITC 的相应二抗、HRP 标记的相

应二抗和 DAPI, 均购自 Invitrogen 公司; Alamar Blue 购自赛驰生物技术有限公司; 彩色预染蛋白质分子质量标准购自碧云天生物技术公司; BCA 蛋白质检测试剂盒、超敏 ECL 发光液, 购自 Thermo Scientific 公司; 羧基化的多壁碳纳米管(MWNTs-COOH)购自中国科学院成都有机化学研究所, 平均管径均为 10~20 nm, 长度均为 10~30 μ m; 聚甲基丙烯酸甲酯粉(PMMA)和二甲基甲酰胺(DMF-NN)均为分析纯, 分别购自阿拉丁和国药集团化学试剂有限公司.

1.2 方法

1.2.1 MWNTs/PMMA 薄膜制备. MWNTs/PMMA 薄膜的制备参照文献[10], 具体步骤为: 先将 PMMA 与表面活性剂 DMF-NN 按质量比 1:30 混合, 在 50 $^{\circ}$ C 水浴超声振荡直至完全溶解; 然后加入 MWNT-COOH, 使其终浓度为 3 g/L, 水浴超声振荡 30 min 后, 于室温下静置 24 h; 最后将适量的混合液滴在载玻片上, 在一定范围条件下, 使之形成大小、形状和厚度一定的薄膜, 在 50 $^{\circ}$ C 烤箱中干燥 12 h 成厚度均匀的薄膜. 再经高压蒸汽或 ⁶⁰Co 辐照灭菌后, 常温储存备用.

1.2.2 棕色脂肪 CSCs 的分离和培养. 棕色脂肪 CSCs 的分离和鉴定按照我室已建立的方法^[16]. 在无菌条件下从 SD 大鼠肩胛骨下方分离棕色脂肪组织, 以冷 PBS 洗涤后剪碎, 随后用含 0.05%胰酶、0.1% IV 胶原酶和 0.1% Dispase II 混合消化酶于 37 $^{\circ}$ C 消化 30~60 min, 以含 10% FBS 的 α -MEM 培养基终止消化. 用 200 目的筛网过滤, 600 g 离心 5~8 min, 弃上清后加入红细胞裂解液去除血细胞, 计数细胞数量. 以 5×10^4 细胞浓度分别接种到 MWNTs/PMMA 薄膜和明胶包被(作为对照组)的盖玻片上, 隔天更换培养基并通过光学相差显微镜观察细胞生长与分化情况.

1.2.3 细胞活力测定. 应用 Alamar Blue 法, 以 1、3、5 和 7 天为时间点分别检测 MWNTs/PMMA 薄膜组和明胶组的棕色脂肪 CSCs 的细胞活力与增殖情况. 每组复孔 3~10 个, 每孔加入 200 μ l 细胞悬液, 约 5×10^4 个细胞, 置于细胞培养箱中孵育. 在指定的检测时间点加入 Alamar blue 试剂, 每孔 20 μ l, 孵育 20 h 后, 使用波长为 570 和 610 nm 双波长的酶标仪检测 A 值, 整理数据, 统计分析.

1.2.4 免疫荧光实验. 将培养 1、3、7 和 10 天的棕色脂肪 CSCs, 以 PBS 清洗后, 用 4%多聚甲醛固定; 再经 PBS 洗涤后加入 0.1% Triton-X-100 处

理 10 min; 以 5% 山羊血清封闭 30 min; 分别加入 BrdU(鼠抗 1:100)和 cTnT(兔抗 1:200)及 α -actinin(鼠抗 1:200)和 connexin43(兔抗 1:1 000)一抗混合液, 置于湿盒中, 4°C 孵育过夜; PBS 清洗, 避光条件下进行后续操作, 加入荧光标记的相应二抗, 室温作用 1 h; PBS 清洗, DAPI 复染细胞核 15 min, PBS 清洗后用甘油缓冲液封片, 荧光显微镜下观察摄片. 其中 BrdU 检测孔在固定前需经 10 μ mol/L 的 BrdU 20 μ l 孵育 2 h, 在固定后需依次加用 1 mol/L 盐酸和硼酸缓冲液处理.

1.2.5 Western blotting. 取培养 10 天的棕色脂肪 CSCs, 用冷 PBS 轻轻冲洗后用细胞刮收集细胞至离心管中, 2 000 *g* 离心 5 min, 弃上清; 根据细胞量加入裂解液, 用吸管吹散, 冰上放置 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液; 然后加入 5 \times SDS 溶液, 混匀, 95°C 煮 5 min. BCA 法蛋白质定量后, 每泳道以 50 μ g 蛋白量上样, 进行 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后将蛋白转移到 PVDF 膜. 封闭后, 分别加 α -actinin(1:500)、connexin43(1:8 000)一抗 4°C 孵育过夜. TBST 洗涤后加入 HRP 标记的相应二抗室温孵育 1 h. TBST 洗涤后, 用超敏 ECL 化学发光液孵育, 然后曝光显影. 同时, 以内参 GAPDH 作为对照, 根据目的蛋白与内参 GAPDH 的吸光度比值推测蛋白质表达量变化.

1.2.6 电镜检测. 取 7 天培养标本用 3%戊二醛固定, 经低温干燥后喷金, 做扫描电镜观察; 透射电镜标本经 3%戊二醛固定后再经 1%锇酸后固定 2 h, 脱水后以树脂包埋, 超薄切片后进行检测.

1.2.7 统计学方法. 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示. 采用 *t* 检验进行比较, *P* < 0.05 被认为有统计学意义.

2 结 果

2.1 MWNTs/PMMA 薄膜观察

制备的 MWNTs/PMMA 薄膜呈棕褐色透明状, 不易碎裂, 在一定条件限制下, 可根据需要控制其面积大小、形状和厚度, 经高压蒸汽或 ⁶⁰Co 辐照灭菌后无明显形态、结构和色泽变化; 高倍光学显微镜观察, 见碳纳米管均匀地分散在 PMMA 基质中, 形成了均匀分散的碳纳米管复合物薄膜(图 1).

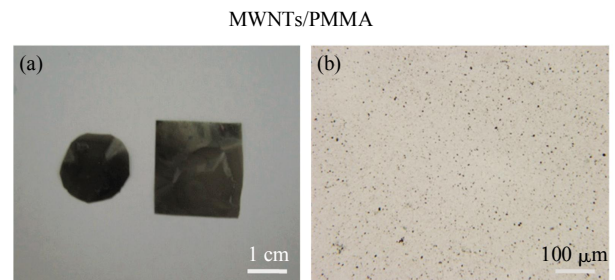


Fig. 1 Gross morphology (a) and optical microscope image (b) of MWNTs/PMMA thin film

2.2 培养细胞观察

分离的棕色脂肪 CSCs 在相差显微镜下呈圆形, 约 2 倍于红细胞大小, 核质比较大, 折光性好; 静置培养约 4 h 开始贴壁; 1 天时可见伪足样伸展; 实验组约 2~3 天可见能自发收缩的长梭形细胞(图 2、视频 1)(视频 1~4 见网络版附件 http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20130289&flag=1), 3 天后细胞数量明显增加; 7 天时细胞数量仍逐渐增多融合成片, 细胞形态进一步拉长, 自发收缩细胞增多, 收缩频率、幅度也有所加快加大(图 2、视频 2); 在培养 10 天时, 细胞数量进一步增多长满孔底, 自发收缩细胞

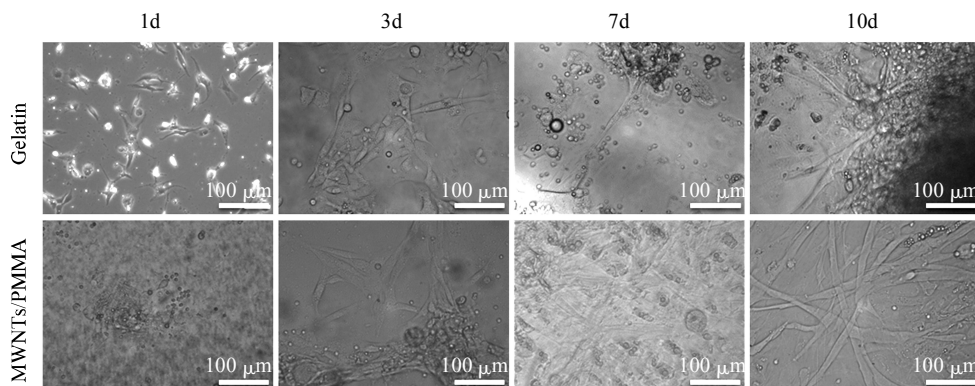


Fig. 2 Phase-contrast microscopy of brown adipose CSCs cultured on MWNTs/PMMA thin film and gelatin thin film at different times

多个集聚排列成束, 能产生一致性收缩并可见明显的肌管结构(图 2、视频 3)。而对照组细胞分化数量较少, 且分化开始时间相对延迟约在 3 天以后(视频 4)。

2.3 细胞活力和增殖检测

AlamarBlue 检测显示, 两组棕色脂肪 CSCs 对 AlamarBlue 试剂的代谢利用能力随培养时间的不断延长而增强, 培养上清颜色由 1 天检测时基本无

变化的蓝色渐变为 7 天检测时的桃红色, 表明活细胞数量和 / 或代谢能力不断提高, 将对应培养时间点测量数据进行统计处理后发现差异显著($P < 0.05$) (图 3a); BrdU 增殖细胞免疫荧光显示两组 BrdU 阳性细胞数量随着培养时间的延长也有增加趋势(图 3b), 培养 7 天以后显示比例逐渐降低(图 3c)。对应时间点检测比较相差非常显著($P < 0.01$)。与 Alamar Blue 测定的结果一致。

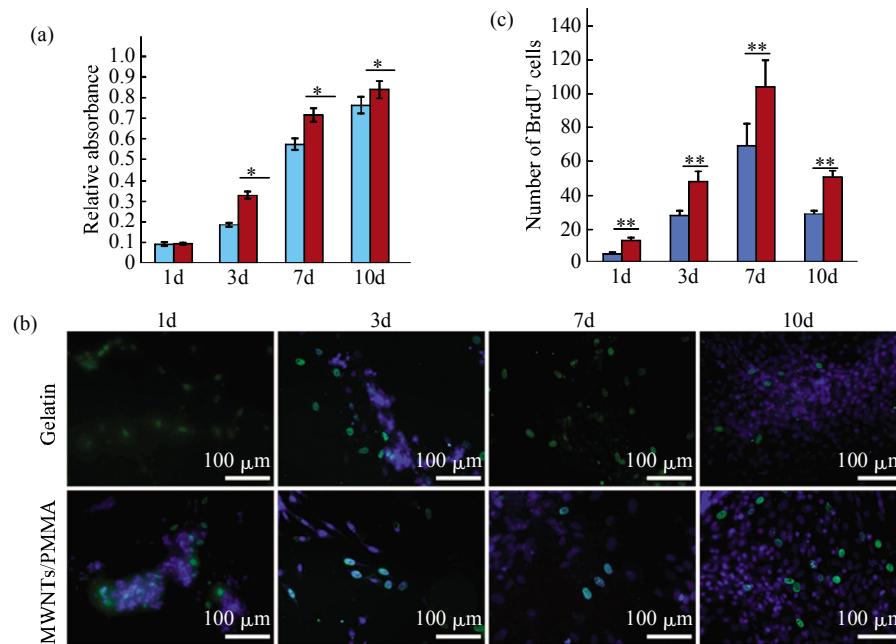


Fig. 3 MWNTs/PMMA thin film reduced the proliferation of brown adipose CSCs

(a) Alamar Blue assay was performed to observe the impact of MWNTs/PMMA thin film and gelatin thin film on the proliferation of brown adipose CSCs. (b) Brown adipose CSCs were cultured on the MWNTs/PMMA film and gelatin thin film for indicated time, the expression of BrdU (green) was detected by immunofluorescent staining. Nuclei were co-stained with DAPI (blue). (c) The quantification of BrdU-positive cells at different times in the two groups. The data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control. ■: Gelatin; ■: MWNTs/PMMA.

2.4 棕色脂肪 CSCs 向心肌分化能力检测

随着培养时间的延长, 两组中 α -actinin 阳性

细胞数量和 connexin43 阳性表达区域均逐渐增多, 尤其是在培养 7 天后更加显著(图 4a)。其中, 两组

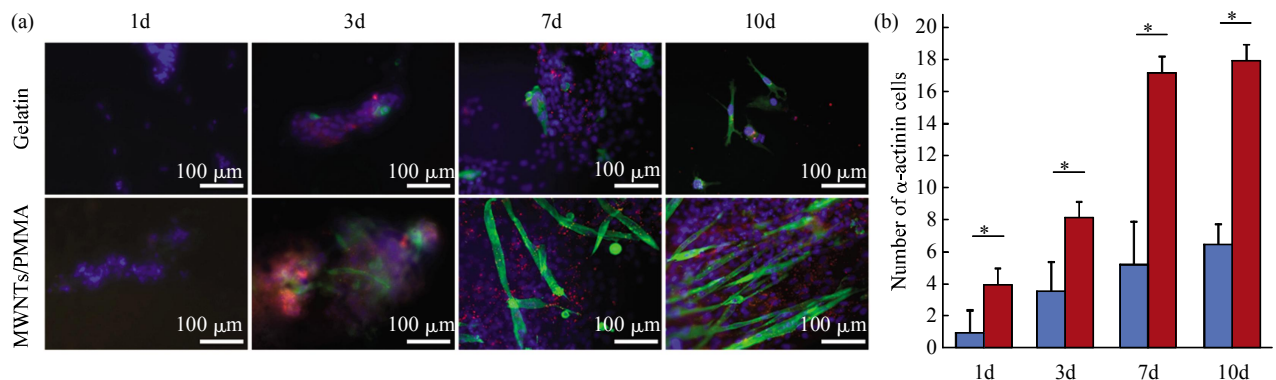


Fig. 4 MWNTs/PMMA thin film promoted the expression of α -actinin and connexin43 in brown adipose CSCs

(a) Brown adipose CSCs were cultured on the MWNTs/PMMA thin film and gelatin thin film for indicated time, the expression of α -actinin (green) and connexin43 (red) was detected by immunofluorescent staining. Nuclei were co-stained with DAPI (blue). (b) The quantification of BrdU-positive cells at different times in the two groups. The data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$ vs. control. ■: Gelatin; ■: MWNTs/PMMA.

α -actinin 阳性细胞数量比较, MWNTs/PMMA 组显著多于 Gelatin 组 ($P < 0.05$, 图 4b); connexin43 蛋白不仅在心肌细胞之间, 而且在心肌细胞与非心肌细胞以及非心肌细胞之间表达也比较丰富; Western blotting 的结果也进一步证实了实验组 connexin43 和 α -actinin 蛋白的含量较对照组显著增高(图 5).

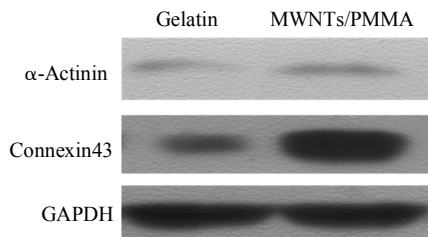


Fig. 5 MWNTs/PMMA thin film promoted the expression of cardiac markers in brown adipose CSCs

Brown adipose CSCs were cultured on the MWNTs/PMMA thin film or gelatin thin film for 10d, cells were collected for observing the expression of α -actinin and connexin43 by Western blotting.

2.5 超微结构检测

扫描电镜发现培养在 MWNTs/PMMA 薄膜上的细胞伸展良好, 成束分布且有伪足样突起(图 6a). 透射电镜可见, 水平切面棕色脂肪 CSCs

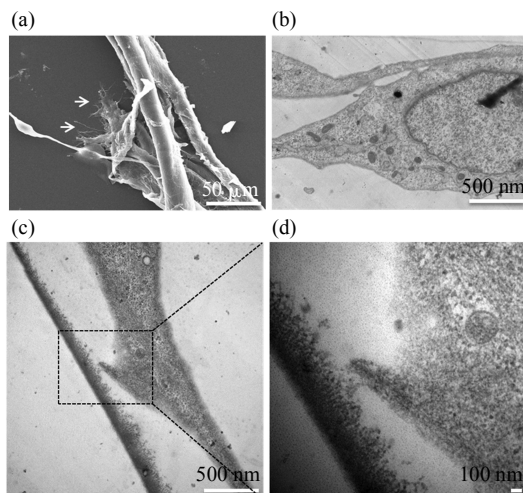


Fig. 6 Ultrastructural interaction between MWNTs and brown adipose CSCs

(a) SEM pictographs of brown adipose CSCs from brown adipose cultured on MWNTs/PMMA thin film. (b) TEM planar section of brown adipose CSCs grown on MWNTs/PMMA thin film reveals a better growth. (c, d) TEM sagittal sections illustrate nanotube-membrane contacts between cells.

超微结构清晰, 生物膜完整, 细胞间紧密连接(图 6b), 在矢状切面可见细胞膜突起与碳纳米管接触的区域结构(图 6c, d).

3 讨 论

随着生物材料研究范围的不断扩展, 新型导电纳米材料已经逐渐应用到组织工程研究领域, 其中, 碳纳米管材料因其良好的机械性能和导电特性, 被用于心肌组织工程研究中, 并且证实碳纳米管可促进心肌细胞增殖、发育与电生理特性的成熟^[6]. 考虑到干细胞作为种子细胞在心肌组织工程中潜在的应用前景, 针对碳纳米管对干细胞生物学特性影响的研究, 将进一步推动碳纳米管导电材料在心肌组织工程中的应用. 棕色脂肪 CSCs 具有较高的向心肌细胞自发分化的能力, 近年来受到了研究人员的广泛关注.

研究表明, 碳纳米管材料对多种干细胞的分化均具有明显的促进作用^[14-15, 17], 鉴于其具有导电纳米材料特殊的导电与力学特性, 以其作为支架组分, 用于干细胞培养, 可以为培养的干细胞提供特殊的微环境, 进而调控干细胞向特定方向分化. 其中, 有报道表明碳纳米管可以明显地促进胚胎干细胞^[4]、间充质干细胞^[17]等向神经细胞分化与发育. 与此同时, 研究人员还发现碳纳米管材料可以明显促进 MSC 向心肌细胞的分化^[15]. 本文采用凝胶-溶胶法, 克服了由于碳纳米管径向的纳米级尺寸和高表面能导致其在聚合物中容易发生团聚而分散性较差的弱点. 以 PMMA 为基质制备了分散均匀具有较好力学性能且灭菌方法处理方便的 MWNTs/PMMA 复合物薄膜(图 1), 然后将棕色脂肪 CSCs 接种在 MWNTs/PMMA 薄膜表面, 并以明胶薄膜作为对照. 发现与明胶材料相比, MWNTs/PMMA 薄膜可明显提高棕色脂肪 CSCs 的活力(图 3a)和增殖能力(图 3b, c), 表明 MWNTs/PMMA 作为培养细胞的支架材料, 无细胞生物学毒性, 而且观察到 MWNTs/PMMA 薄膜明显增强了其向心肌细胞分化的能力. 在培养 2 天时, 实验组开始出现形态拉长、呈肌细胞形态的细胞, 并且开始出现自发收缩(图 2、视频 1). 在培养 10 天时, 形态拉长、肌细胞样的细胞数量进一步增多, 可见明显的肌管结构, 并且细胞收缩频率逐渐加快并趋于稳定, 收缩更为有力(图 2、视频 3).

本研究选择与心肌细胞机械收缩功能相关的心肌钙蛋白 α -actinin, 以及与心肌电化学传导功能

相关的电偶联蛋白 connexin43^[18]作为棕色脂肪 CSCs 心肌分化的检测指标。我们发现, 碳纳米管材料明显增强了棕色脂肪 CSCs 的 α -actinin 与 connexin43 蛋白表达, 不仅表达出现时间早且表达量也明显提高(图 4, 5); connexin43 蛋白不单纯存在于心肌细胞之间, 还存在于心肌细胞与非心肌细胞以及非心肌细胞之间。分化成的心肌细胞具有明显的肌管样结构, 并形成了介导细胞间电化学传导的缝隙连接(图 4b)。考虑到缝隙连接是心肌闰盘的主要组成成分之一, 在调控心肌组织电传导与兴奋收缩偶联中发挥了重要的作用^[19], 上述研究结果对于心脏干细胞向心肌分化具有重要的潜在价值。

我们推测碳纳米管材料发挥上述作用的一个主要方式是通过其与细胞膜的直接接触, 进而发挥细胞调控作用。而在实验中, 通过透射电镜检测, 显示碳纳米管能够与棕色脂肪 CSCs 细胞膜直接接触并形成紧密连接(图 6c, d), 与培养在碳纳米管支架材料上的神经细胞和心肌细胞相似^[6, 20], 也进一步证实了我们的推测。当然, 也不排除碳纳米管材料通过细胞外基质进一步发挥对干细胞分化的调控作用。另外, 扫描电镜研究发现, 在 MWNTs/PMMA 薄膜上培养的棕色脂肪 CSCs 有大量丝状伪足形成(图 6a), 而上述伪足的出现表明了碳纳米管材料提供了一种适宜的微环境, 利于细胞生存和进一步的分化发育, 因为有大量研究表明, 伪足是由细胞骨架肌动蛋白肌束驱动形成的^[21], 其形成的前提是有较为适宜细胞生存的微环境^[22]。上述结果也可能与碳纳米管材料能够提供一种具有导电、高力学强度的局部微环境有密切关系, 而这种局部微环境则可能是促成棕色脂肪 CSCs 向心肌细胞分化的关键。

综上所述, 本研究成功制备了具有分散及力学性能良好、储存以及灭菌处理方便等优势 MWNTs/PMMA 薄膜材料。首次探讨了碳纳米管导电材料对棕色脂肪 CSCs 生物学特性影响的规律, 证实碳纳米管导电材料具有良好的促进其向心肌细胞分化的作用。作为一种新型导电纳米材料, 碳纳米管在心肌组织工程研究中具有良好的应用前景, 未来有望在心肌组织体外构建及心肌梗死治疗性应用中发挥潜在的价值。

参 考 文 献

- [1] Tasis D, Tagmatarchis N, Bianco A, *et al.* Chemistry of carbon nanotubes. *Chem Rev*, 2006, **106**(3): 1105–1136
- [2] Dai H. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. *Acc Chem Res*, 2002, **35**(12): 1035–1044
- [3] Motta M, Li Y L, Kinloch I, *et al.* Mechanical properties of continuously spun fibers of carbon nanotubes. *Nano Lett*, 2005, **5**(8): 1529–1533
- [4] Lu F S, Gu L R, Mezziani M J, *et al.* Advances in bioapplications of carbon nanotubes. *Adv Mater*, 2009, **21**(2): 139–152
- [5] Meng X, Stout D A, Sun L, *et al.* Novel injectable biomimetic hydrogels with carbon nanofibers and self assembled rosette nanotubes for myocardial applications. *J Biomed Mater Res A*, 2012, doi:10.1002/jbm.a.34400
- [6] Martinelli V, Cellot G, Toma F M, *et al.* Carbon nanotubes promote growth and spontaneous electrical activity in cultured cardiac myocytes. *Nano Lett*, 2012, **12**(4): 1831–1838
- [7] Reves B T, Jennings J A, Bumgardner J D, *et al.* Preparation and functional assessment of composite chitosan-nano-hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *J Funct Biomater*, 2012, **3**(1): 114–130
- [8] Cao Y, Zhou Y M, Shan Y, *et al.* Preparation and characterization of grafted collagen multiwalled carbon nanotubes composites. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, **36**(10): 447–451
- [9] Khang D, Kim S Y, Liu-Snyder P, *et al.* Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly (carbonate) urethane: independent role of surface nano-roughness and associated surface energy. *Biomaterials*, 2007, **28**(32): 4756–4768
- [10] Jin Z, Pramoda K, Xu G, *et al.* Dynamic mechanical behavior of melt-processed multi-walled carbon nanotube/poly (methyl methacrylate) composites. *Chemical Physics Letters*, 2001, **337**(1–3): 43–47
- [11] Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002, **13**(12): 4279–4295
- [12] Yamada Y, Wang X D, Yokoyama S, *et al.* Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **342**(2): 662–670
- [13] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, *et al.* Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 2006, **12**(4): 459–465
- [14] Chao T I, Xiang S, Chen C S, *et al.* Carbon nanotubes promote neuron differentiation from human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **384**(4): 426–430
- [15] Mooney E, Mackle J N, Blond D J, *et al.* The electrical stimulation of carbon nanotubes to provide a cardiomimetic cue to MSCs. *Biomaterials*, 2012, **33**(26): 6132–6139
- [16] Liu Z, Wang H, Zhang Y, *et al.* Efficient isolation of cardiac stem cells from brown adipose. *J Biomed Biotechnol*, 2010, **2010**: 104296
- [17] Namgung S, Baik K Y, Park J, *et al.* Controlling the growth and differentiation of human mesenchymal stem cells by the arrangement of individual carbon nanotubes. *ACS Nano*, 2011, **5**(9): 7383–7390
- [18] Gros D B, Jongsma H J. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays*, 1996, **18**(9): 719–730
- [19] Mario Delmar. The intercalated disk as a single functional unit.

- Heart Rhythm, 2004, **1**(1): 12–13
- [20] Cellot G, Cilia E, Cipollone S, *et al.* Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts. *Nat Nanotechnol*, 2009, **4**(2): 126–133
- [21] Lin G H, Forscher P. Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *J Cell Biol*, 1993, **121**(6): 1369–1383
- [22] Dalby M J, Gadegaard N, Riehle M O, *et al.* Investigating filopodia sensing using arrays of defined nanopits down to 35 nm diameter in size. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**(10): 2005–2015

Influence of MWNTs/PMMA Thin Film on Cellular Behavior of Cardiac Stem Cells From Brown Adipose*

DUAN Cui-Mi^{1)**}, SUN Hong-Yu^{1)**}, YUAN Ye^{2)**}, LIU Zhi-Qiang¹⁾, TANG Rong-Yu¹⁾,
WANG Chang-Yong¹⁾, WANG Chun-Lan¹⁾, FENG Lan-Lan¹⁾, ZHOU Jin^{1)***}

¹⁾ Department of Advanced Interdisciplinary Studies, Institute of Basic Medical Sciences and Tissue Engineering Research Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

²⁾ Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract Considering the structure and electrophysiological properties of native myocardium, significant progress has been made in cardiac tissue engineering based on nano-conductive materials. Carbon nanotubes possess the good mechanical and electrical properties and previous study have showed carbon nanotubes can promote cardiac cells adhesion, proliferation and maturation, and enhance cell-cell electrical coupling. However, cell behavior of carbon nanotubes on brown adipose-derived cardiac stem cells (CSCs) has not been investigated. Here, we first prepared multiple-walled carbon nanotubes (MWCNTs) / polymethylmethacrylate (PMMA) thin film according to the reported study. And then, we explored the influences of MWNTs/PMMA thin films on cell viability, proliferation and cardiac differentiation of brown adipose-derived CSCs were evaluated. We demonstrated MWNTs/PMMA thin films has no obvious effect on cell viability and proliferation of brown adipose CSCs compared to those on gelatin thin film. Furthermore, we observed brown adipose CSCs on MWNTs/PMMA thin films exhibited significantly higher amounts of α -actinin and connexin43. By transmission electron microscopy, we found that carbon nanotubes were in direct contact with cell membranes and regulated cell behavior. We first explored the influence of carbon nanotubes on brown adipose-derived CSCs and found that carbon nanotubes promoted the cardiac differentiation of brown adipose-derived CSCs. This study may be benefit to promote the therapeutic application of carbon nanotubes in myocardial infarction.

Key words carbon nanotubes, MWNTs/PMMA, brown adipose-derived CSCs, cardiac differentiation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00289

*This work was supported by grants from The Key Program of National Natural Science Foundation of China (31030032), National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar (31025013), National Basic Research Program of China (2011CB606206), National High Technology Research and Development Program of China (2012AA020506) and The National Natural Science Foundation of China (31100697).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel/Fax: 86-10-68166874, E-mail: sisun819@yahoo.com

Received: June 21, 2013 Accepted: August 14, 2013