

生物材料表面蛋白质微图形对人体软骨细胞形态及蛋白表达的影响*

潘长江** 董云肖 聂煜东 王远亮

(重庆大学生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘要 主要研究采用微接触印刷术在生物材料表面制备的细胞外基质蛋白微图形对人体软骨细胞粘附、铺展以及蛋白质表达等细胞行为的影响。研究表明, 蛋白质微图形表面对细胞的粘附、铺展、排列以及细胞蛋白质表达具有明显的影响。细胞优先粘附在微图形蛋白区域, 微图形形状以及尺度明显影响细胞的粘附形态以及铺展程度, 同时也影响细胞生长过程中的Ⅱ型与Ⅵ型胶原蛋白的表达, 细胞的铺展行为与细胞的蛋白质表达具有一定的正相关性, 铺展较好的细胞表现出更好的Ⅱ型与Ⅵ型胶原蛋白表达。结果表明, 通过在材料表面制备细胞外基质蛋白微图形可以有效调控人体软骨细胞的生长行为与功能。

关键词 软骨细胞, 微图形, 蛋白质表达

学科分类号 Q291, R318

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00319

由于人体软骨的再生能力较差, 因此软骨缺陷治疗仍然面临挑战^[1]。目前, 主要采用自体软骨、异体软骨以及人工生物材料来修复缺损或病变的软骨组织。自体软骨的来源有限, 并且移植时会造成供体的二次损伤^[2]。异体软骨的潜在免疫反应以及较高的感染率可能会导致软骨功能的缺失^[3]。此外, 也有采用骨膜修复的方法治疗软骨缺陷, 但是其长期效果不佳^[4]。因此, 非常有必要发展新的治疗病变或缺损软骨组织的手段与方法。近年来, 组织工程的发展为软骨组织的完全替换或修复提供了新的方法。对于软骨组织工程来说, 软骨细胞在支架材料表面上的生长行为对于组织工程软骨的研究具有重要意义。细胞的粘附生长行为不仅与材料表面的化学微环境有关, 还与表面生物活性分子分布的几何结构和微图形形貌结构有关^[5-6], 因此, 通过对材料表面的生物活性分子进行精确的微图形设计, 从而构建微图形生物活性表面, 可同时改变表面的化学微环境以及建立精确的微图形结构, 有效调控细胞的生长行为和功能, 从而有利于通过组织工程的方法来修复病变缺损的软骨组织。

微接触印刷术(microcontact printing)是近年来

兴起的操作简单、价格低廉的软平板印刷术(soft lithography), 利用这种技术可以在生物材料表面制备从纳米到微米级的微图形生物活性表面^[7]。本文通过微接触印刷术将骨形态发生蛋白 2(BMP-2)固定在聚苯乙烯(PS)材料表面, 从而制备了一系列的细胞外基质微图形, 期望通过材料表面性能的图形化调控细胞的生长行为与功能。研究表明, 具有微图形细胞外基质的材料表面能够显著影响细胞的粘附铺展行为, 并进一步调控细胞的功能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

以下试剂购自 Sigma 公司: 骨形态发生蛋白 2 (BMP-2), 5- 羧基 - 四甲基若丹明 N- 琥珀酰亚胺酯 (TMRA), 磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4), Ⅵ型胶原蛋白 $\alpha 3$ 兔多克隆抗体, Ⅱ型胶原蛋白鼠多克隆抗体,

* 国家自然科学基金资助项目(30900294)。

** 通讯联系人。

Tel: 023-86258503, E-mail: changjiang@cqu.edu.cn

收稿日期: 2010-08-04, 接受日期: 2010-09-21

Alexa Fluor 594 荧光标记的羊抗兔免疫球蛋白 G, Alexa Fluor 488 荧光标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G, 4',6-二脒基-2-苯吡啶盐酸(DAPI).

1.2 BMP-2 微图形构建

首先制备荧光标记的 BMP-2 溶液, 将 60 μ l TMRA 溶液(25 mg/L 乙腈)与 1 ml BMP-2 溶液(25 mg/L PBS)充分混合, 室温下暗处反应 4 h, 过滤后存储在 4 $^{\circ}$ C 的环境中待用.

微接触印刷制备 BMP-2 微图形的过程如图 1 所示. 采用浇注固化的方法制备聚二甲基硅氧烷(PDMS)印章. 印章用乙醇与蒸馏水依次充分超声清洗后干燥, 将 BMP-2 溶液滴加到 PDMS 印章表面铺展吸附 3 min, N₂ 缓慢吹干后与聚苯乙烯(PS)表面充分接触 1 min 后取下印章, 获得 BMP-2 微图形. 本文主要制备了 3 种微图形, 图 2 表示了 3 种微图形的设计示意图及其典型荧光显微镜照片, 可以看出, 制备的微图形形态良好规整.

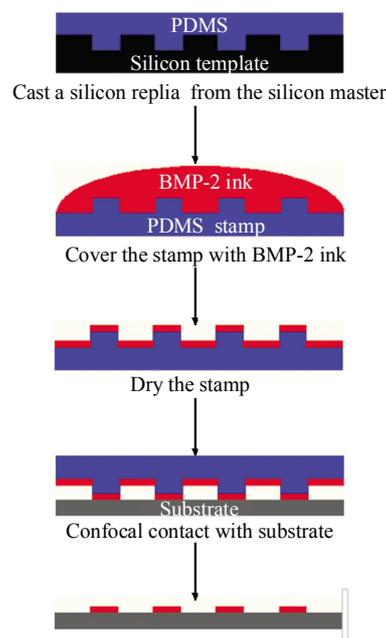


Fig. 1 The schematic diagram of fabrication of BMP-2 micropatterns by microcontact printing

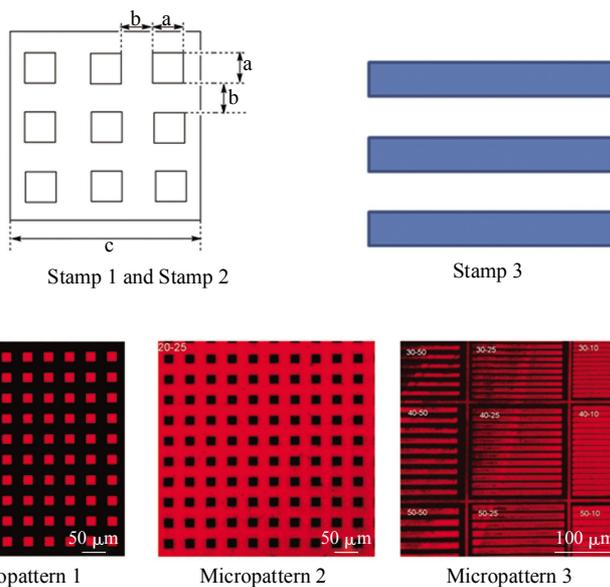


Fig. 2 The micropattern design and typical fluorescent images of micropatterns

The numbers in the pictures are the values of micropattern dimensions. The period of the structure is in μ m.

1.3 细胞分离和培养

人体软骨细胞通过标准的酶消化法获得, 软骨被切成小块后移入培养瓶, 然后加入含有胶原蛋白酶以及 DNase 的 DMEM 培养液, 在 5% CO₂(体积比)的环境中 37 $^{\circ}$ C 消化 24 h, 通过 70 μ m 的网状细胞过滤器过滤后离心得到细胞. 细胞在含有 5% 牛血清的 DMEM 培养液中培养(含有 50 mg/L 的庆大霉素, 5% CO₂)生长.

1.4 细胞粘附

将细胞接种在具有 BMP-2 微图形的材料表面, 培养 4 天后, 用无菌 PBS 润洗 2 次以便去掉没有粘附的细胞. 粘附的细胞用 3% 戊二醛 PBS 溶液固定 1 h, 干燥后进行荧光显微镜观察.

1.5 II 型与 VI 型胶原蛋白表达

采用免疫组化荧光染色方法对软骨细胞生长过程中表达的胶原蛋白 II 与 VI 进行表征. 细胞在材料

表面培养 5 天后, 首先用 3%戊二醛 PBS 溶液固定, 然后用含 0.1% Triton 的 PBS 溶液漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入一抗室温下反应 1 h 后用 PBS 溶液漂洗 3 次, 然后加入荧光标记的二抗室温反应 1 h, 干燥进行荧光显微镜观察. 一抗为: VI 胶原蛋白 $\alpha 3$ 兔多克隆抗体, II 型胶原蛋白鼠多克隆抗体; 二抗为: Alexa Fluor 594 标记的羊抗兔免疫球蛋白 G, Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G. 细胞核用 DAPI 进行染色, 用荧光显微镜观察 II 型与 VI 型胶原蛋白的表达情况.

1.6 胶原蛋白表达的定量表征

免疫组化染色的细胞蛋白表达进行荧光显微镜拍照后, 利用 Image-Pro Plus 软件计算细胞表达胶

原蛋白 II 与 VI 的面积以及细胞数量, 细胞蛋白表达表示为胶原蛋白面积 / 单个细胞数(area per cell).

2 结 果

2.1 细胞粘附

图 3 表示了人体软骨细胞在 BMP-2 涂覆的 PS 表面的粘附生长行为, 与没有涂覆 BMP-2 的 PS 表面比较可以看出, 随着接种时间的增加, 细胞粘附数量明显增加, 表明 BMP-2 具有促进细胞粘附生长的作用. 细胞从第 4 天开始发生明显的铺展, 培养 11 天后, 粘附在 BMP-2 涂覆的 PS 表面的细胞充分地铺展, 表明 BMP-2 具有促进细胞铺展的作用.

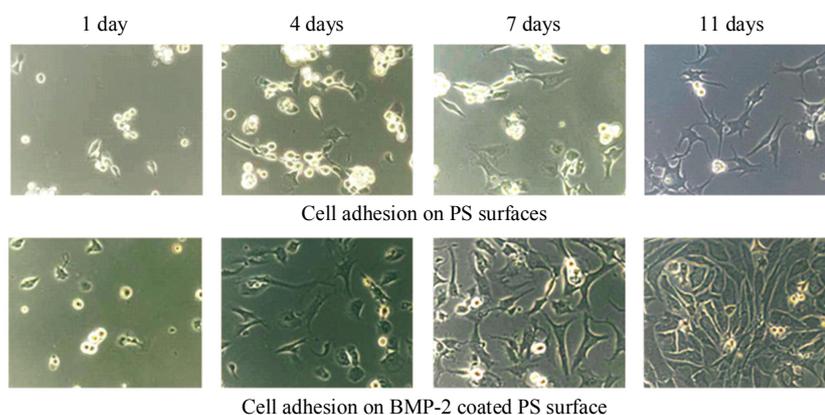


Fig. 3 The cell adhesion on PS surfaces and BMP-2 coated surfaces

图 4 表示了人体软骨细胞在不同细胞外基质微图形表面的粘附行为, 可以看出, 不同类型的图形对细胞的粘附铺展具有不同的影响, 即使是同一类型微图形, 图形的尺寸也影响细胞的粘附铺展. 图 4a~c 表示了人体软骨细胞在微图形(micropattern) 1 上的粘附情况, 细胞选择性地粘附在蛋白质区域. 当微图形的尺寸及其间隔尺寸显著大于细胞的尺寸时, 细胞优先粘附在微图形内部, 并且具有良好的铺展性能(图 4a). 当正方形微图形尺寸变小(尺寸与细胞大小相当)而其间隔增加时(图 4b), 粘附在微图形区域的软骨细胞铺展受到了明显的限制, 表明微图形对细胞形态的控制作用, 而当微图形之间的间隔进一步缩小时(图 4c), 细胞的粘附与铺展与在无序平面上细胞的粘附情况类似, 部分细胞具有很好的铺展性能. 图 4d~f 表示了人体软骨细胞在微图形 2 上的粘附情况, 细胞依然选择性地粘附在细胞外基质 BMP-2 构成的微图形区域, 细胞沿着 BMP-2 线生长, 从而使细胞被拉长, 拉长

的细胞在 BMP-2 的方向表现出较好的铺展性能. 图 4g~i 表示了细胞在微图形 3 的粘附情况, 细胞优先吸附在 BMP-2 线上并且沿着 BMP-2 线生长, 但是当 BMP-2 线的宽度增加时, 细胞被拉长的程度减弱并进而导致铺展的性能变差(图 4i).

2.2 II 型与 VI 型胶原蛋白表达

图 5 表示了粘附在 PS 以及 BMP-2 涂覆的 PS 表面(无微图形), 细胞的 II 型与 VI 型胶原蛋白表达行为, 与对照样品 PS 相比, 粘附在 BMP-2 涂覆的 PS 表面的细胞数量明显增加, 其胶原蛋白表达也存在明显的不同, 在 BMP-2 涂覆的 PS 表面粘附的细胞表达出较多的 II 型胶原蛋白, 几乎不表达 VI 型胶原蛋白, 表明 BMP-2 并没有促进 VI 型胶原蛋白表达的作用. 粘附在 PS 表面的细胞也表达出 II 型胶原蛋白, 表明在材料表面的 BMP-2 可能不具备促进 II 型胶原蛋白表达作用而仅具有提供细胞生长位点的作用.

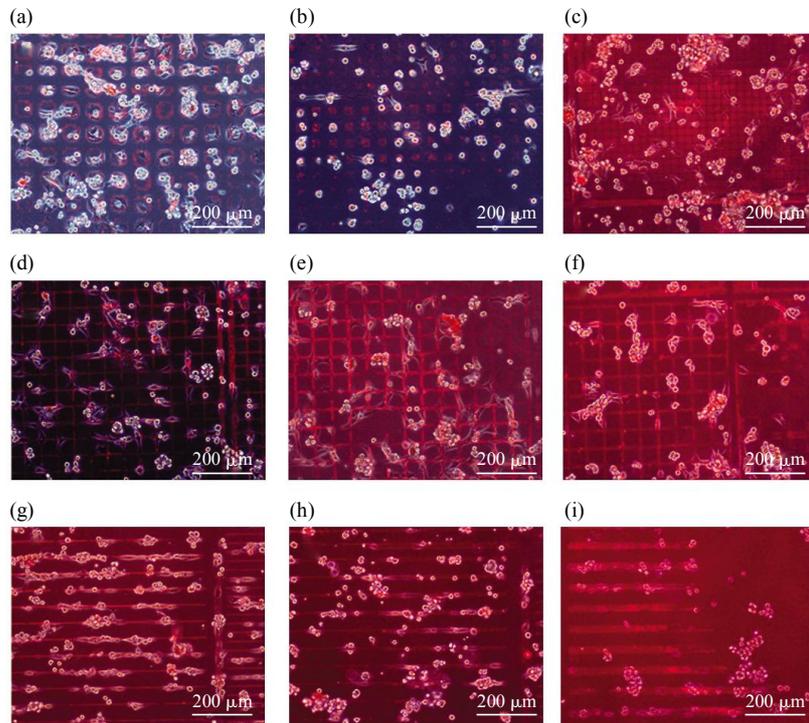


Fig. 4 The cell adhesion behavior of human chondrocytes on different BMP-2 micropatterns

(a, b, c) The effect of micropattern 1 on cell adhesion. (d, e, f) The cell adhesion on micropattern 2. (g, h, i) The influence of micropattern 3 on cell adhesion.

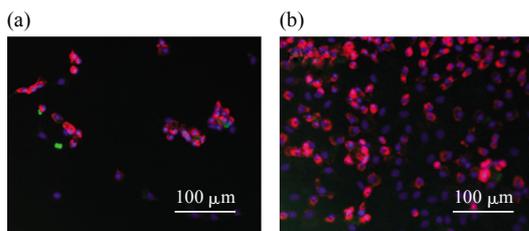


Fig. 5 The protein expression of human chondrocytes on PS (a) and BMP-2-coated PS (b) surfaces

Red: Type II collagen; Green: Type VI collagen; Blue: DAPI.

图 6 表示了典型的具有不同尺度的正方形微图形(微图形 1)对人体软骨细胞 II 与 VI 型胶原蛋白表达的影响,可以看出,微图形的尺度对细胞的蛋白质表达(细胞功能)具有明显的影响,当图形的尺寸与细胞的尺寸相当时(pattern 1-1),细胞选择性粘附在细胞外基质区域,但是细胞的铺展受到限制,同时,粘附的细胞基本不表达 VI 型胶原蛋白,但是表

达出一定量的 II 型胶原蛋白. 当图形之间的间隔变小时(pattern 1-2),细胞可以进行更好的铺展,表达出更多的 II 与 VI 型胶原蛋白. 细胞在微图形 2 上的粘附、铺展以及蛋白质表达行为与微图形 1 具有非常明显的区别,从图 7 可以看出,细胞沿着蛋白质的方向生长,由于微图形表现出一个网状结构,因此细胞也是沿着网格的方向进行铺展,其形态不再是圆形结构,细胞的铺展变形使细胞表达出更多的 II 型与 VI 型胶原蛋白. 细胞在微图形 3 上的蛋白质表达表示在图 8 中,不同 BMP-2 线的宽度以及间隔对细胞的蛋白质表达具有非常明显的影响,首先,细胞的粘附铺展沿着 BMP-2 线的方向,当 BMP-2 线比较宽时(大于细胞尺寸),细胞主要在 BMP-2 线内生长,并且沿着 BMP-2 的方向生长,其 VI 型胶原蛋白的表达受到限制,当 BMP-2 线的尺寸小于细胞尺寸时,细胞被拉长,表达出更多的 II 型与 VI 型胶原蛋白.

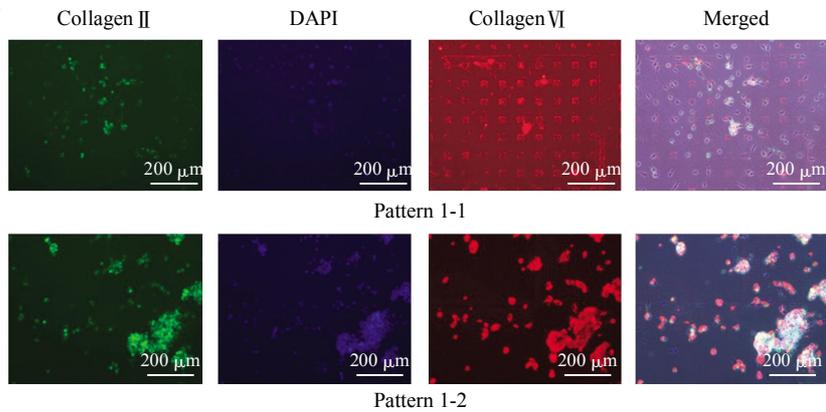


Fig. 6 The collagen II and VI expression of human chondrocytes on micropattern 1

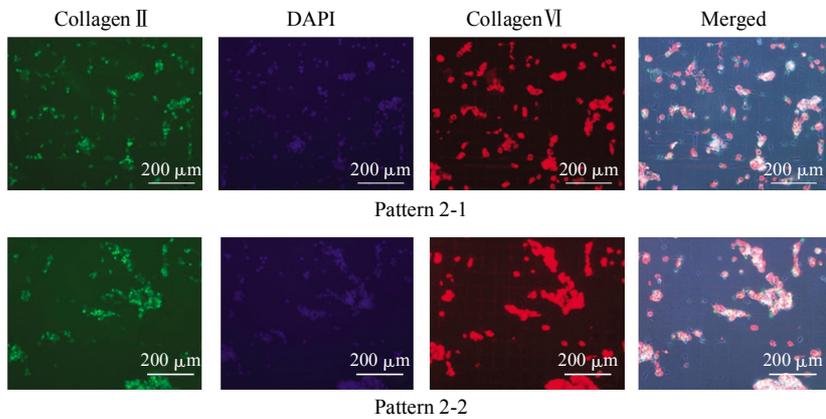


Fig. 7 The collagen II and VI expression of human chondrocytes on micropattern 2

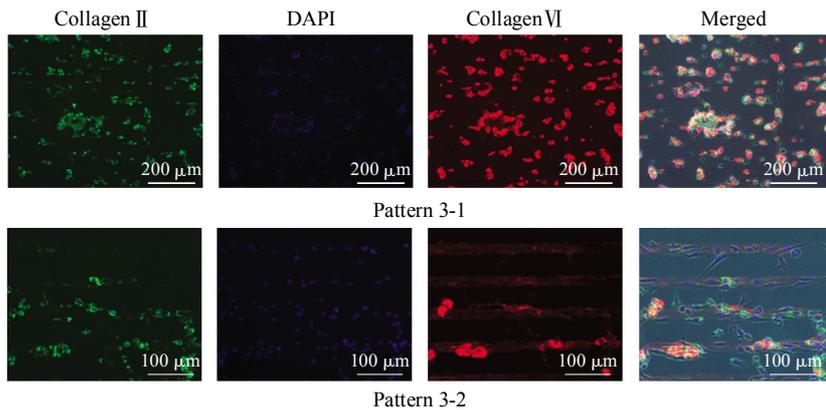


Fig. 8 The collagen II and VI expression of human chondrocytes on micropattern 3

3 讨 论

关节软骨因损伤或病变而导致衰退，甚至会发生退化性关节炎，据统计，有近 70% 的 65 岁以上老年人受退化性关节炎的影响^[8]。一般认为，软骨组织的修复再生能力很差，一旦损伤很难修复，目

前常用的软骨缺损修复手段(包括自体软骨移植、骨膜与骨膜移植术等)均存在不少的缺点^[9]。软骨组织工程为缺损软骨的修复提供了新的方法，对于软骨组织工程来说，软骨细胞必须在支架材料上生长，而材料的表面性能对软骨细胞的粘附、铺展、生长、蛋白质表达及其他的生物功能都具有重要的

影响. 本文通过微接触印刷术在材料表面制备不同的微图形生物活性表面, 期望通过研究软骨细胞的生长行为为软骨组织工程提供基础的数据资料.

骨形态发生蛋白(BMP-2)是体内成骨的重要促进因子, 具有较高的使用安全性和高效诱导成骨活性^[10]. 另外, BMP-2 在软骨细胞的成熟与分化中也起着重要的调节作用, 能够促进胚胎肢芽间质细胞的软骨形态发生, 并保持关节软骨的表型^[11], 因此, BMP-2 可以作为人体软骨细胞的细胞外生长基质. 本文通过微接触印刷术在聚苯乙烯表面制备了不同尺度的 BMP-2 微图形, 研究表明, 与不具有微图形表面的平面样品比较, 人体软骨细胞在三种不同的微图形表面表现出不同的粘附铺展行为, 微图形的种类以及微图形尺度对细胞的粘附铺展行为具有明显的影响. 因此, 通过控制材料表面细胞外基质的分布从而构建不同的微图形细胞外基质表面, 可以调控细胞的粘附行为.

胶原蛋白是细胞外基质的结构蛋白, 人体软骨中含有大量的胶原蛋白以及软骨细胞, 软骨中胶原蛋白含量减少会导致关节受力时容易加速磨损, 随着患者年龄增长, 就容易形成所谓的退化性关节炎, 因此, 胶原蛋白在维持正常人体软骨结构及功能方面具有非常重要的作用. II型胶原蛋白由软骨细胞产生, 因此, 软骨细胞生长过程中II型胶原蛋白的表达是表征细胞正常生长的重要指标, 正常的人体软骨细胞表现出较高的II型胶原蛋白与聚集蛋白聚糖的表达, 如果缺乏II型胶原蛋白的表达, 细胞将很快去分化为成纤维细胞表型. 过去的研究表明, 软骨细胞原型表达与细胞骨架结构有关, 而细胞骨架结构能够控制细胞的机械性能. 研究表明, 材料表面适当的微图形将会改善细胞的机械性能^[12], 并可以调控细胞的粘附、迁移、排列以及促进胶原蛋白II的表达^[13]. VI型胶原蛋白对保持人体软骨组织的完整性起到了重要的作用, 如软骨细胞的早期分化与VI型胶原蛋白的表达有关^[14-15]. 图9表示了本文研究的几种微图形活性表面对人体软骨细胞II型与VI型胶原蛋白表达的影响, 可以看出, 不同尺度的微图形对细胞的II型与VI型胶原蛋白表达具有明显的差异. 结合图6、图7以及图8可以看出, 能够引起细胞铺展变形的微图形导致了更多的II型与VI型胶原蛋白的表达, 细胞的铺展变形越大, 细胞的蛋白质表达功能就越强, 这就表明细胞的形态与细胞的蛋白质表达具有一定的关系, 因此, 通过制备微图形化的生物活性表面不仅可以实

现控制细胞的形态, 还能够实现细胞的选择性生长从而控制其功能.

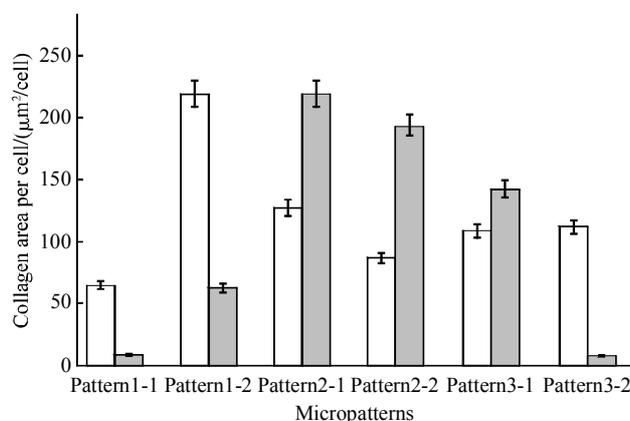


Fig. 9 The influence of different micropatterns on protein expression of human chondrocytes

□: Collagen II; ■: Collagen VI.

4 结 论

通过微接触印刷术成功地在材料表面制备了具有不同形态与尺寸的规整 BMP-2 微图形. 人体软骨细胞在不同的微图形活性表面表现出不同的粘附铺展行为, 这些不同的细胞粘附行为能够显著影响细胞的II型与VI型胶原蛋白表达. 因此, 通过控制生物材料的表面化学结构从而实现微图形化的生物活性表面, 将可能实现有效的调控细胞生长行为与细胞功能.

参 考 文 献

- [1] Mandelbaum B R, Brownw J E, Micheli F L, *et al.* Articular cartilage lesions of the knee. *The American J Sports Medicine*, 1998, **26**(6): 853-861
- [2] Miljkovic N D, Cooper G M, Marra K G. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2008, **16**(10): 1121-1130
- [3] Lee S H, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deli Rev*, 2007, **59**(4-5): 339-359
- [4] O'Driscoll S W. Current concepts review-The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surgery*, 1998, **80**(12): 1795-1812
- [5] Christopher S C, Milan M, Sui H, *et al.* Geometric control of cell life and death. *Science*, 1997, **276**(5317): 1425-1428
- [6] Drik L, Bernhard W H, Christian D, *et al.* Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci*, 2004, **117**(1): 41-52
- [7] Quist A P, Pavlovic E, Oscarsson S. Recent advances in microcontact

- printing. Anal Bioanal Chem, 2005, **381**(3): 591–600
- [8] Gillogly S D, Voight M, Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocytes implantation. J Orthop Sports Phys Ther, 1998, **28**(4): 241–251
- [9] 于娟, 闫玉华, 万涛. 软骨组织工程研究进展. 生物骨科材料与临床研究, 2005, **2**(3): 31–36
Yu J, Yan Y H, Wan T. Orthopaedic Biomechanics Materials and Clinical Study, 2005, **2**(3): 31–36
- [10] Richard D J, Sullivan T A, Shenker B J, *et al.* Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. Dev Biol, 1994, **161**(1): 218–228
- [11] Kramer J, Hegert C, Guan K, *et al.* Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation *in vitro*: activation by BMP-2 and BMP-4. Mech Dev, 2000, **92**(2): 193–205
- [12] Darling E M, Pritchett P E, Evans B A, *et al.* Mechanical properties and gene expression of chondrocytes on micropatterned substrates following dedifferentiation in monolayer. Cell Mol Bioeng, 2009, **2**(3): 395–404
- [13] Barbucci R, Torricelli P, Fini M, *et al.* Proliferative and re-differentiative effects of photo-immobilized micro-patterned hyaluronan surfaces on chondrocytes cells. Biomaterials, 2005, **26**(36): 7596–7605
- [14] Quarto R, Dozin B, Bonaldo P, *et al.* Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocytes differentiation. Development, 1993, **117**(1): 245–251
- [15] Sekiya I, Larson B L, Vuorio J T, *et al.* Comparison of effects of BMP-2, -4, and -6 on *in vitro* cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. Cell Tiss Res, 2005, **320**(2): 269–276

Effects of Protein Micropatterns of Biomaterials Surfaces on Human Chondrocytes Morphology and Protein Expression*

PAN Chang-Jiang**, DONG Yun-Xiao, NIE Yu-Dong, WANG Yuan-Liang

(Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, College of Bioengineering, Chongqing University, Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

Abstract In order to study the effects of extracellular matrix (ECM) protein micropatterns on biomaterials surfaces fabricated by microcontact printing (μ CP) on human chondrocytes adhesion, spread and protein expression, the bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) was printed onto polystyrene (PS) surface to fabricate the ECM protein micropatterns by μ CP. Three kinds of excellent micropattern were obtained successfully according to the fluorescent images. The human chondrocytes were seeded on PS (control samples), BMP-2 coated PS surface and PS surface with BMP-2 micropatterns, respectively. As compared with control samples, the human chondrocytes on BMP-2 coating exhibited better growth and spread behavior, at the same time, the BMP-2 coating also cannot promote expression of collagen II and VI. On the other side, the results concerning BMP-2 micropatterns indicated that the protein micropattern surfaces have significant influence on cell adhesion, spread, alignment and functions. The cells preferentially adhered on micropattern protein zones. The micropattern shape and its sizes affected not only the cell adhesion morphology and spread degree but also the type II and VI collagen expression. The spread behavior of cell has some positive connections with protein expression and the cell with more spread expressed more type II and VI collagen. These results suggested that the ECM protein micropatterns can effectively regulate human chondrocytes growth and functions.

Key words chondrocyte, micropattern, protein expression

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00319

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30900294).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-86258503, E-mail: changjiang@cqu.edu.cn

Received: August 4, 2010 Accepted: September 21, 2010