

聚吡咯薄膜上大鼠肝细胞生长的研究

江 怡^{1,3} 袁春伟¹ 李云晖² 浦跃朴² 吴 蕾¹

(东南大学生物医学工程系 南京 210096) (南京铁道医学院 南京 210009)

(南京脑科医院神经内科 南京 210029)

关键词 聚吡咯薄膜,大鼠肝细胞,生长,生物相容性,电刺激

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0521-04

聚吡咯(Polypyrrole)由于其具有的优良性质^[1~3],如导电、表面特性可控、生物兼容、稳定、易于制备,以及良好的物理、化学和机械性质,使其作为一种新型生物材料,得到了越来越广泛的重视和研究。一些文献报道了聚吡咯在神经再生、组织修补、细胞培养等方面的应用^[4~6],并取得了较好的结果。本文研究聚吡咯膜对大鼠肝细胞体外培养的生物兼容性和促进其生长的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 制备聚吡咯薄膜的材料:吡咯单体(Ge级,德国原装进口),对甲苯磺酸钠(江苏昆山年沙化工厂),去离子水。

1.1.2 培养液成分:每 500 mL 培养液含有基本培养液 RPMI-1640 培养基 450 mL,小牛血清 50 mL,双抗 100 U/mg。

1.2 方 法

1.2.1 聚吡咯薄膜的制备及装配:A.采用单池三电极系统在 ITO 导电玻璃表面恒电流电化学聚合聚吡咯薄膜,电聚合实验系统如图 1 所示,其中电解液为 0.01 mol/L 对甲苯磺酸钠,0.1 mol/L 吡咯水溶液,ITO 导电玻璃(工作电极),铂片(对电极),Ag/AgCl 参比电极(参比电极)聚合反应前均经过预处理,聚合电流为 1×10^{-3} mA/cm²。B.聚吡咯薄膜用导电银胶连出导线,并以硅胶绝缘,用高温消毒的凡士林粘在 24 孔培养板底部。细胞培养实验装置如图 2 所示。

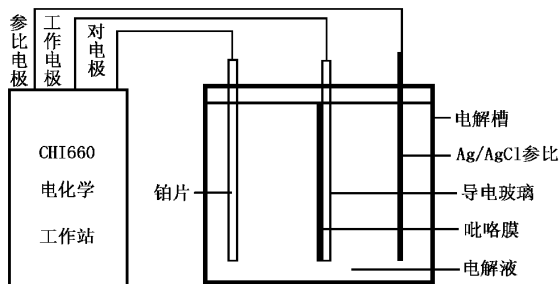


图 1 电聚合实验系统

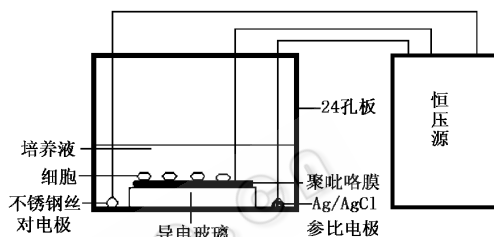


图 2 细胞培养实验装置

1.2.2 肝细胞悬液制备:选用体重 200 g 左右大鼠,脱颈椎处死消毒,取出肝脏,用 PBS 洗净,并用眼科弯剪剪成糜状,PBS 反复漂洗,然后用胰蛋白酶(0.25%)37℃消化 25 min,不停振荡,用 4 层纱布滤去碎组织,1000 r/min 离心 6 min,用 0.87% NH₄Cl 溶液 2 mL 振荡 1 min 破坏红细胞,再加入 PBS,1000 r/min 离心 6 min,如此用 PBS 离心洗涤 3 次,用台盼蓝染色法计数细胞数,将细胞悬浮于培养液中至所需细胞密度。

1.2.3 聚吡咯薄膜与肝细胞生物兼容性的研究:将肝细胞以 3×10^5 个/mL 的密度种植在底部放置有聚吡咯薄膜(PPy)的 24 孔板中,每孔加 1 mL 细胞悬液,在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,同样条件将肝细胞培养在无聚吡咯膜的 24 孔板(TCPS)中作为对照组,24 h 后观察结果。

1.2.4 加电刺激后聚吡咯薄膜与肝细胞相互作用的研究:A.将肝细胞以 2×10^5 个/mL 的密度种植在底部放置和不放置聚吡咯薄膜的 24 孔板中,培养条件如上,24 h 后换培养液。B.将聚吡咯薄膜作为工作电极,给予 100 mV 恒电压 4 h 培养,以不锈钢丝为对电极,Ag/AgCl 丝为参比电极,同样条件作三组对照:1)无聚吡咯膜,不加电刺激;2)有聚吡咯膜,但不加电刺激;3)无聚吡咯膜,但在培养孔中放置两根不锈钢丝和一根 Ag/AgCl 丝分别作为工作电极、对电极和参比电极,在工作电极上加 100 mV 恒电压。C.再培养 24 h 后取出,用台盼蓝染色后血细胞计数板人工细胞计数法测细胞总

数及细胞存活率,用噻唑蓝(MTT)染色法测定活细胞量。

1.2.5 聚吡咯薄膜上肝细胞的生长曲线实验:A.将肝细胞以 2×10^5 个/mL的密度种植在底部放置有聚吡咯薄膜的24孔板中,同上培养,同样条件将肝细胞培养在无聚吡咯薄膜的24孔板中作为对照组;B.培养24h后取出,用同样方法测细胞总数,细胞存活率及活细胞量;C.换培养液,将聚吡咯薄膜作为工作电极,给予100mV恒电压4h培养,以不锈钢丝为对电极,Ag/AgCl丝为参比电极;D.再培养24h后取出,用同样方法测细胞总数,细胞存活率及活细胞量;E.如步骤C和D,重复两遍。

1.2.6 聚吡咯薄膜上肝细胞传代实验:A.将肝细胞以 2×10^5 个/mL的密度种植在底部放置有聚吡咯薄膜的24孔板中,同上培养,同样条件将肝细胞培养在无聚吡咯薄膜的24孔板中作为对照组;B.换培养液,将聚吡咯薄膜作为工作电极,同上述条件予以电刺激4h;C.再培养24h后取出,测细胞总数,细胞存活率及活细胞量;D.肝细胞分孔传代,一孔分为两孔,聚吡咯薄膜上生长的细胞仍传至有聚吡咯薄膜的孔中,每孔加0.5mL培养液,同上培养,同样条件肝细胞培

养在无聚吡咯薄膜的24孔板中作为对照组;E.换培养液,将聚吡咯膜作为工作电极,同上述条件予电刺激4h;F.再培养24h后取出,用同样方法测细胞总数,细胞存活率及活细胞量;G.重复D、F步骤2次。

2 结 果

2.1 聚吡咯与肝细胞生物兼容性的研究

结果显示聚吡咯薄膜上生长的细胞呈较为明显的生长优势,细胞数明显多于对照组,几乎长满孔底,呈亚融合状态;而观察聚苯乙烯24孔板表面细胞状态,细胞量较前者明显为少(照片略)。

2.2 加电刺激后聚吡咯薄膜与肝细胞相互作用的研究

如前述实验1.2.4,各实验组细胞计数及MTT法测得数据如表1所示,其中“细胞总数”是用血细胞计数板法测得的细胞总数;“活细胞数”是用细胞板计数法测时不被台盼蓝染色的细胞数;“细胞活率”=活细胞数/细胞总数;“MTT值”是用MTT法测得的吸光度值;“细胞倍数”=各组MTT值/对照组MTT值。每个数据是3个平行组的均值。

表1 各实验组及对照组大鼠肝细胞生长情况

	细胞总数 ($\times 10^5$ /mL)	活细胞数 ($\times 10^5$ /mL)	细胞活率 /%	MTT值 (At)	细胞倍数
聚苯乙烯对照组	3.42	2.53	74	0.337	1.00
聚吡咯膜加电刺激	6.08	4.26	70	0.690	2.05
聚吡咯膜无电刺激	4.25	3.44	81	0.403	1.20
无吡咯膜加电刺激	3.17	2.38	75	0.336	1.00

由表1可见,聚吡咯膜加电刺激实验组生长的细胞在细胞总数、活细胞数、MTT值和细胞倍数几方面均明显大于其他3组,与一般使用的聚苯乙烯培养板对照组比较,细胞数约为其2倍,细胞活率似乎稍低,聚吡咯膜不加电刺激实验组在以上几方面似乎较另两组稍高,但用*t*检验示聚吡咯加电刺激组与其它三组有明显差别($P < 0.05$);聚吡咯不加电刺激组与另两组三者之间无明显差别($P > 0.05$);由此可见,仅有电刺激并不能促进肝细胞生长,仅有聚吡咯膜也不能达到这样的促进作用,聚吡咯膜加电刺激实验组的结果是聚吡咯本身表面特性如易于吸附细胞外基质蛋白等和所加电刺激综合作用的结果。Wong J Y^[2]的工作也显示,当将同样条

件的电刺激加在ITO导电玻璃表面后,其上细胞在形态及功能上与无刺激组无区别,可见电刺激本身不是引起细胞生长加强的原因。Valentini R^[1]等的研究也说明增强细胞生长的效应并非仅由聚合物原来具有的表面特性引起,而是和加电刺激后的表面电荷效应密切相关,通过施加不同电压可迅速且可逆性地改变导电聚合物的表面特性,从而改变细胞在其上的贴壁、生长性质。Schmidt C. E^[4]等的研究也显示了这一点。

2.3 聚吡咯薄膜上肝细胞的生长曲线实验

如前述实验1.2.5,各实验时间细胞计数及MTT法测得数据如表2所示,各指标意义如上述,其中细胞倍数是实

表2 聚吡咯薄膜上及对照组大鼠肝细胞生长情况

	培养时间 /h	细胞总数 ($\times 10^5$ /mL)	活细胞数 ($\times 10^5$ /mL)	细胞活率 /%	MTT值 (At)	细胞倍数
聚吡咯膜上细胞生长情况	0	2.00	1.80	90	—	—
	24	1.92	1.61	84	0.213	1.10
	48	5.42	3.96	73	0.647	1.78
	72	8.92	6.96	78	0.895	1.68
	96	8.66	6.93	80	0.859	1.27
聚苯乙烯上细胞生长情况	0	2.00	1.80	90	—	—
	24	1.67	1.42	85	0.192	1.00
	48	3.67	3.34	91	0.364	1.00
	72	5.33	4.37	82	0.532	1.00
	96	6.25	4.88	78	0.677	1.00

验组 MTT 值同培养时间对照组 MTT 值之比。

由表 2 可见,在实验电刺激条件下,聚吡咯膜上肝细胞生长良好,较聚苯乙烯培养板有较大优势。作实验组与对照组细胞总数与时间的关系图,也即生长曲线,如图 3(细胞总

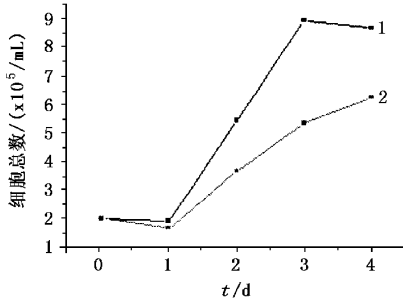


图 3 实验组与对照组生长曲线

数,活细胞数,MTT 值三者与时间的关系图与之类似,略)。由该图可见聚吡咯膜上的肝细胞生长较对照组明显迅速,先达到最大细胞密度,所达到的最大细胞密度也较对照组大,第 3 天后细胞数略减少。由图 4 可看出,培养第 1 天,两组

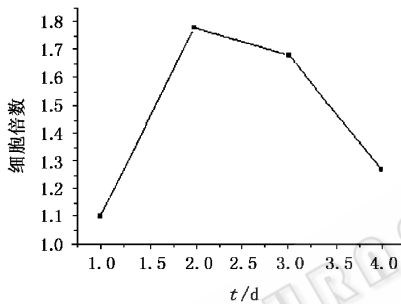


图 4 细胞倍数随时间变化关系

细胞数相近,第 2 天聚吡咯膜促进肝细胞增殖较对照组最明显,约为对照组 1.8 倍,第 3 天后两者差别逐渐减小,可能是因为实验组细胞增殖快,密度太大,已近铺满孔底,细胞彼此间接触抑制,并且随细胞大量生长,培养液中营养成分消耗和代谢产物积聚的缘故;*t* 检验结果显示各天实验组与对照组的细胞总数、活细胞数、MTT 值均有明显差别($P < 0.05$),

细胞活率均无明显差别($P > 0.05$)。

2.4 聚吡咯薄膜上肝细胞传代实验

如前述实验 1.2.6,各代肝细胞计数及 MTT 法测得数据如表 3 所示,其中各指标意义如上述,细胞倍数是实验组 MTT 值同培养代数对照组 MTT 值之比。

由表 3 作聚吡咯膜上和聚苯乙烯上肝细胞系演化图(图 5),每代细胞总数以每孔细胞总数 $\times 2^{n-1}$ 计,其中 n = 细胞

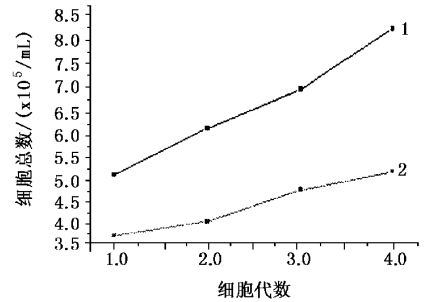


图 5 细胞系演化曲线

代数。可见肝细胞可在聚吡咯膜上连续传代生长,且聚吡咯膜上的肝细胞生长较对照组生长迅速,先进入对数生长期,图 6 示细胞倍数随时间无明显变化;*t* 检验结果显示各代实验组与对照组的细胞总数、活细胞数、MTT 值均有明显差别($P < 0.05$)细胞活率均无明显差别($P > 0.05$)。

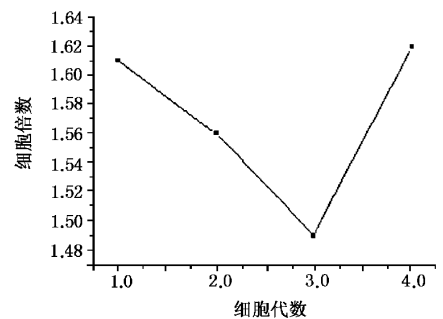


图 6 细胞倍数随时间变化关系

表 3 聚吡咯薄膜上及对照组各代大鼠肝细胞生长情况

	细胞代数	时间/h	细胞总数	活细胞数	细胞活率	MTT 值	细胞倍数
			$(\times 10^5/\text{mL})$	$(\times 10^5/\text{mL})$	/%	(At)	
聚吡咯	原代	48	4.83	4.20	87	0.562	1.61
	第二代	96	5.92	4.38	74	0.640	1.56
	第三代	144	6.83	5.53	81	0.749	1.49
	第四代	192	8.25	5.69	69	0.766	1.62
对照组	原代	48	3.42	2.74	80	0.350	1.00
	第二代	96	3.75	3.15	84	0.410	1.00
	第三代	144	4.5	3.24	72	0.502	1.00
	第四代	192	4.92	3.69	75	0.474	1.00

3 讨 论

我们采用电化学聚合法在恒电流下制备聚吡咯膜,所制得聚吡咯薄膜均匀透明,性质稳定,不溶于水,可耐生物工作中常用的高温消毒。

实验结果显示聚吡咯膜对大鼠原代肝细胞具有良好的生物兼容性,加电刺激后对其生长有明显的促进作用,并设置了几组对照,结果支持聚吡咯膜上的肝细胞生长较对照组明显迅速是聚吡咯本身特性如表面性质等和所加电刺激综合作用的推论。我们又绘制了大鼠肝细胞在聚吡咯膜表面生长的生长曲线,发现聚吡咯膜上细胞较对照组先达到最大细胞密度,所达到的最大细胞密度也较大,另外大鼠肝细胞在聚吡咯膜上的传代实验证明大鼠肝细胞可在聚吡咯膜上连续传代生长,且聚吡咯膜上的肝细胞生长较对照组生长迅速,先进入对数生长期。

从以上工作可以看出,聚吡咯生物兼容性良好,加电刺激后对大鼠肝细胞生长具有一定的促进作用,Aoki^[6]的工作显示聚吡咯能支持细胞的正常功能,同时聚吡咯又具备可根据需要制成各种形状结构的优点,因而我们认为聚吡咯可能成为肝细胞体外大量培养和肝移植支持物的适宜候选材料。

目前提出的关于聚吡咯促进细胞生长作用机理的主要观点有:在电场作用下细胞膜表面各种生物活性分子,生长因子,粘附受体,离子通道和细胞骨架蛋白,如肌动蛋白重新分布^[7,8],细胞外基质蛋白组合变化,形成有利于细胞生长的薄膜^[9],细胞蛋白质合成增加^[10],培养液中电场诱导的离子分子梯度等。我们的工作显示,聚吡咯膜对细胞生长的促进作用是聚吡咯本身特性如表面性质等和所加电刺激综合作用的结果,因此尚不能支持最后一种观点。更深的有关导电聚合物促进细胞生长机理的工作,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Valentini R F. *Biomaterials*, 1992, **13**(3):183~190
- [2] Wong J Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, Apr 12, **91**(3):3201~3204
- [3] Diaz A F, Kanazawa K K. *Chem Scr*, 1981, **17**:145
- [4] Schmidt Christine E. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1997, **94**:8948~8953
- [5] Williams R L. *Materials J Science :Materials in Medicine*, 1994, Vol. 5, No. 6~7
- [6] Aoki Takashi. *Biomaterials*, 1996, Vol. 17, No. 20
- [7] Stewart R. *Dev Biol*, 1995, **171**(2):340~351
- [8] Erskine L. *Dev Biol*, 1995, **171**(2):330~339
- [9] Evans Margaret D M. *J Biomedical Materials Research* 1998, Vol. 40, No. 4
- [10] Siskin B F. *Brain Res*, 1989, **485**:309~316

Investigation on the Stimulation Effect of Polypyrrole Film on Rat Hepatic Cells

JIANG Yi¹ YUAN Chun-Wei¹ LI Yun-Hui² PU Yao-Pu² WU Lei¹

¹(Department of Biomedical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096)

²(Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009)

³(Department of Neurology, Nanjing Brain Hospital, Nanjing 210029)

Abstract Polypyrrole (PPy) films were prepared at 1×10^{-3} mA/cm² electropolymerization current density on indium-tin oxide (ITO) substrate. The PPy films were well-distributed, translucent, stable and insoluble. Moreover, they can be sterilized by steam disinfection. Rat hepatic cells were cultured on these films. The results show that PPy films have good biocompatibility and they can accelerate cell growth under electrical stimulation. The cells on PPy films reach the largest cell density earlier than the cells on tissue culture polystyrene (TCPS). Furthermore, rat hepatic cells can generate on PPy films. The cells on PPy films grow faster and enter logarithmic growth phase earlier than those on TCPS.

Key words Polypyrrole films, rat hepatic cell growth, biocompatibility, electrical stimulation