

氧化石墨烯修饰肽纳米技术 对人体多能干细胞的增值抑制作用研究

王 舒 陶 杨

重新市急救医疗中心 重庆 400000

摘要: 氧化石墨烯 (Graphene oxide, GO) 作为一种石墨烯的衍生物, 能够影响细胞行为和分化, 在干细胞治疗方面发挥着非常重要的作用。为了实现诱导人多能干细胞 (ihPSCs) 在干细胞治疗中的治疗前景, 本研究开发出简单安全的 ihPSCs 增殖和成骨细胞谱系生物材料。构建了含氧化石墨烯 (GO) 的聚己内酯 (PCL) 修饰成骨肽 (BFP-1) 微环境电纺纳米纤维支架, 以改善 ihPSC 的体外细胞生长和成骨能力。使用 CCK-8 测定法评估 ihPSCs 的粘附和增殖, 结果表明 ihPSCs 能够有效增殖并保持无基质凝胶的成骨肽涂层纳米纤维的多能性。该研究结果在加速 ihPSCs 在骨组织工程中的再生潜力方面具有相当大的应用前景。

关键词: 氧化石墨烯; 多能干细胞; 增值抑制; 研究

Inhibition of proliferation of human pluripotent stem cells by graphene oxide modified peptide Nanotechnology

Shu Wang, Yang Tao

Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing, 400000, China

Abstract: Graphene oxide (GO), as a derivative of Graphene, can affect cell behavior and differentiation, and plays a very important role in stem cell therapy. To realize the therapeutic prospect of induced human pluripotent stem cells (ihPSCs) in stem cell therapy, simple and safe ihPSCs proliferation and osteoblast lineage biomaterials were developed in this study. A polycaprolactone (PCL) modified osteogenic peptide 1 (BFP-1) microenvironment electrospun nanofiber scaffold containing graphene oxide (GO) was constructed to improve the cell growth and osteogenic ability of ihPSC in vitro. Adhesion and proliferation of ihPSCs were assessed using the CCK-8 assay, which showed that ihPSCs proliferate efficiently and maintain the pluripotency of matrigel-free osteogenic peptide-coated nanofibers. The results of this study hold considerable promise in accelerating the regenerative potential of ihPSCs in bone tissue engineering.

Keywords: Graphene oxide; Pluripotent stem cells; Value-added inhibition; Research

引言:

干细胞广义上定义为未分化的细胞, 这类细胞可进行自我更新, 也可分化产生一种或多种在体内具有特定功能的特殊细胞类型^[1-2]。然而, 基于干细胞的治疗本身存在一些材料本身无法克服的问题^[3]。这些问题导致干细胞研究与纳米技术应用之间产生了协同效应, 二者的互补作用极大的促进了干细胞疗法的发展, 拓展了纳米材料在医学应用中的范围^[4]。石墨烯因其特殊的物理化学性质成为纳米医学材料界一颗迅速崛起的新星^[5]。

石墨烯是一种由碳原子组成的原子薄片, 具有独特

的物理、化学和机械性能, 因其优异的性能而受到研究者关注^[6]。石墨烯及其衍生物氧化石墨烯 (GO) 的生物功能化能力使这些纳米材料备受关注, 并因其在生物技术中的众多应用引起了广泛关注, 包括生物测定、生物传感器、光热抗癌治疗和细胞电刺激。氧化石墨烯片显示出作为无细胞毒性、可转移和可植入的干细胞培养平台的潜力, 可以促进干细胞的附着和生长^[7]。

1. 实验过程

1.1 材料

1, 6-己二胺 (HDA)、平均分子量 (M_n) 为 80000

的聚己内酯 (PCL) 和羧甲基壳聚糖购自阿拉丁试剂有限公司 (中国上海)。1, 1, 1, 3, 3, 3-六氟-2-丙醇 (HFIP) 2-(N-形态) 乙烷磺酸 (MES) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 从 XFNANO (中国南京)。N-(3-(二甲氨基)丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 购自 AVT (上海) 制药科技有限公司。磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 成骨肽 BFP-1 (GQGFSYPYKAVFSTQ 序列) 购自江苏科根生物科技有限公司 (中国江苏)。

1.2 纳米材料的制备

为消除物理浸没的 CMC, 3 w/v %CMC 溶液中浸没 24 h 后, 摇床中彻底冲洗处理过的样品。这个 GO@PCL- 然后完全冲洗 CMC 处理的样品。首先 GO@PCL-CMC 纳米纤维经 EDC 处理。HCl 和 NHS 在 0.1 M MES 缓冲液中放置 45 分钟。将 1 mM BFP-1 肽 (浸泡在 PBS 中) 添加到嵌入 GO@PCL 纳米纤维, 并在 4°C 冰箱中再培养 24 小时。纳米纤维支架的制备 (GO@PCL-BFP-1-CMC) 对于细胞实验, 在氮气流入下仔细清洗并干燥。该程序还用于制备饰有 BFP-1 和指定 BFP-1-CMC 的载玻片。根据之前的报告, 使用著名的改良技术构建 GO。将 96 ml 浓 H₂SO₄ 和 4 g 市售石墨充分混合, 平稳搅拌 45 分钟。为了保持反应, 以 20 ml min⁻¹ 的流速将 300 ml 去离子水注入反应室。同时, 将其连续搅拌 115 分钟。温度冷却后, 使用含有 8 ml H₂O₂ 的微量移液管将溶液滴入试管。使用高功率超声 (5 W/cm³) 10 分钟来传播和过滤原始产品。使用前一步骤的一系列迭代, 每次 10 μL 纯水作为最终冲洗液, 以中和和消除任何残留盐或残留物。在 55°C 下干燥三天, 在真空烘箱中干燥黑色粉末, 并将其储存在干燥器中。

1.3 细胞的接种与培养

ihPSC (hNF-C1 系) 和 hESC (H9 系) 也用于本研究。使用化学定义的 mTeSR1 培养基, 在 37°C 的加湿 5% CO₂ 培养箱中培养两种 ihPSCs。Matrigel 用 Dulbecco 改良的 eagle 培养基/F12 在 4°C 下以 1: 80 的比例稀释。每天喂食细胞, 每 3-4 天以 1: 3 的分裂比例传代一次, 以 0.5 mg/mL 的浓度处理 5.5 分钟。

1.4 CCK-8 测评 ihPSCs 的粘附和增殖

细胞增殖能力测评使用商品化的细胞计数分析试剂盒评估诱导的人类多能性干细胞 (ihPSCs) 和胚胎干细胞 (hESCs) 的活性。将 CCK-8 按预定的培养间隔 (12 小时和 1-5 天) 涂抹在每个孔中, 在黑暗中培养 2 小时。随后, 向细胞中添加 150 μL CCK-8 溶液, 并在 37.5°C 和 5% CO₂ 下培养 4 小时。使用 Victor3 1420 多标签计数器 (Perkinlemer, Waltham, MA), 在 450 nm 处测量活性代

谢细胞从黄色四氮唑盐 CCK-8 中提取的橙色甲紫染料。用生长介质轻轻清洗细胞, 然后添加 200 μL 生长介质进行后续培养。

2. 结果

在 BFP-1 富含肽的纤维支架和玻片上生长 12 小时和 1-5 天后, 使用 CCK-8 测定法评估 ihPSCs 的粘附和增殖。图 1 显示, 由于生物材料的高细胞相容性, 随着培养时间的增加, 细胞增殖显著增加。RGD-整合素相互作用可促进 BFP-1 肽的增殖和粘附, BFP-1 肽的密度影响 ihPSCs 的粘附。对于较长的培养周期 (3-5 天), 则 GO@PCL-BFP-1-CMC 纳米纤维的活性低于 BFP-1-CMC-glass 组, 这表明细胞更喜欢光滑的 2D 表面而不是 3D 表面。与其他两种 ihPSC 相比, 肽锚定纳米纤维支架上附着的 ihPSC 也比人胚胎干细胞多。尽管 2D 平板培养比 3D 纤维支架培养具有更高的细胞密度, 但多项研究表明, 纳米纤维表面明显促进细胞分化。目前, 纳米纤维表面已被用于操纵和加速原始生殖细胞样 ihPSCs、心肌细胞样 ihPSCs、肝细胞样 ihPSCs 和 ihPSCs 向神经元/神经细胞的分化。

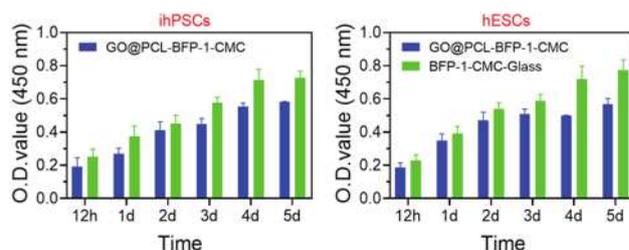


图 1 ihPSCs 和 hESCs 在修饰肽上的体外增殖 GO@PCL 不同培养时间的纳米纤维

3. 讨论与展望

在 BFP-1 富含肽的纤维支架和玻片上生长 12 小时和 1-5 天后, 使用 CCK-8 测定法评估 ihPSCs 的粘附和增殖结果显示随着培养时间的增加, 细胞增殖效应越来越明显, 表明本研究构建材料能够促进人体干细胞的增殖和分化, 为后续应用研究提供了可用的实验及参考材料。在最近的研究中, 石墨烯及其衍生物都被用作生物相容性基质, 用于促进各种干细胞的生长和自发分化, 如 hMSCs、hNSCs、iPSCs、hESCs、PDLSCs、hASCs 和 CSCs, 这可能会在组织工程和再生医学中产生各种应用。然而, 石墨烯基生物材料/器件及其应用的发展仍处于起步阶段, 需要更多的研究才能充分认识到石墨烯在所有医学领域的潜力和局限性, 但石墨烯和干细胞疗法的协同作用前景光明, 同时提高生物材料性能, 开发细胞运输和治疗的创新策略。

参考文献:

[1]S. Dobbenga, L.E. Fratila-Apachitei, A.A. Zadpoor, Nanopattern-induced osteogenic differentiation of stem cells - A systematic review, *Acta biomaterialia* 46 (2016) 3 - 14.

[2]V. Sottile, A. Thomson, J. McWhir, In vitro osteogenic differentiation of human ES cells, *Cloning & Stem Cells*. 5 (2) (2003) 149 - 155.

[3]A.P. Kishan, E.M. Cosgriff-Hernandez, Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: a review, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 105 (10) (2017) 2892 - 2905.

[4]S. Wang, F. Hu, J. Li, S. Zhang, M. Shen, M. Huang, et al., Design of electrospun nanofibrous mats for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 14 (7) (2018) 2505 -

2520.

[5]E. Saburi, M. Islami, S. Hosseinzadeh, A.S. Moghadam, R.N. Mansour, E. Azadian, et al., In vitro osteogenic differentiation potential of the human induced pluripotent stem cells augments when grown on Graphene oxide-modified nanofibers, *Gene*. 696 (2019) 72 - 79.

[6]A. Ardehshiryajimi, A. Khojasteh, Synergism of electrospun nanofibers and pulsed electromagnetic field on osteogenic differentiation of induced pluripotent stem cells, *Asaio Journal*. 64 (2) (2018) 253 - 260.

[7]F.S. Hosseini, F. Soleimanifar, A. Khojasteh, A. Ardehshiryajimi, Promoting osteogenic differentiation of human-induced pluripotent stem cells by releasing Wnt/ β -catenin signaling activator from the nanofibers, *Journal of cellular biochemistry* 120 (4) (2019) 6339 - 6346.