

DOI: 10.19338/j.issn.1672-2019.2024.11.001

· 论 著 ·

表面修饰的聚对苯二甲酸乙二醇酯倾斜纳米线板 对细胞生长的影响*

李志敏, 钟建斌, 冯钧, 常昭岩, 马建秀

(西北民族大学 医学部, 甘肃 兰州 730030)

摘要: **目的** 纳米材料在生物医学领域的应用上有独特优势, 多项研究表明材料的物理性质会影响到细胞的生长特性。本研究基于高分子聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 材料, 在 PET 表面进行纳米线角度修饰, 以观察基质表面物理特性改变对细胞生长的影响。**方法** 将张氏肝细胞分别培养在玻璃、聚苯乙烯 (PS) 和表面进行了不同倾斜角度修饰的 PET 材质上, 24 h 后收集不同基质上的细胞, 碘化丙啶 (PI) 染色后用流式细胞仪检测细胞周期。采用 MTT 法检测细胞存活率, 鬼笔环肽 (phalloidin) 和 DAPI 染色制作细胞爬片以观察细胞形态。**结果** 发现各组细胞的生长周期分布无明显差别, PET 纳米线板生长的细胞存活率与玻璃板的比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但此两者上的细胞存活率比在 PS 基质生长的低 ($P<0.05$), 而倾斜角为 40° 的 PET 纳米线板的细胞存活率与其他不同倾斜角度 PET 纳米线板比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。观察细胞形态发现生长于 10° 、 20° 的 PET 纳米线板上的细胞与其他角度的纳米线板和玻璃板相比表现出一定的生长方向性。**结论** 该研究证实了采用 PET 表面修饰的纳米线板作为细胞生长基质的可能性, 支持作用与传统玻璃材质类似, 其表面进行角度修饰后, 表现出引导细胞生长方向的作用, 在组织修复支撑等方面可能存在潜在的应用价值。

关键词: 聚对苯二甲酸乙二醇酯; 纳米线板; 表面修饰; 细胞生长方向

中图分类号: TB332

Effect of surface-modified PET nanowire plates on cell growth*

LI Zhimin, ZHONG Jianbin, FENG Jun, CHANG Zhaoyan, MA Jianxiu

(Medical College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, GanSu 730030, China)

Abstract: **[Objective]** Nanomaterials have unique advantages in their applications in the biomedical field, many studies have shown that the physical properties of materials could affect the growth characteristics of cells. This study is based on the polymer polyethylene terephthalate (PET) material, the nanowire angles were modified on the PET surface to observe the impact of changing the physical properties of the matrix surface on cell growth. **[Methods]** Zhang's hepatocytes were cultured on glass, polystyrene (PS) and PET materials with different surface tilt angles. After 24-hour growth the cells were collected from different substrates, and the cell cycle was detected by flow cytometry using propidium iodide (PI) staining. Using the thiazole blue (MTT) method to detect the cell survival rate, phalloidin and DAPI staining was used to prepare cell slides for observing cell morphology. **[Results]** We found that there was no significant difference in the growth cycle distribution of the cells in each group and the cell survival rate between PET and glass had no significant difference ($P>0.05$), but the cell survival rate on both plates was lower than that on PS matrix ($P<0.05$), and there was significant difference in cell survival rate between the PET nanowire plate with a tilt angle of 40° and other PET nanowire plates with different tilt angles ($P<0.05$). Observation of cell morphology revealed that cells grown on PET nanowire plates 10° , 20° showed a certain growth direction compared with nanowire plates and glass plates at other angles. **[Conclusion]** This study confirmed the possibility that the nanowire plate modified with PET surface can be used as a cell growth matrix, the support function is similar to the traditional glass material, after angle modification on its surface, it exhibits a guiding effect on cell growth direction and may have potential application value in tissue repair and support.

Keywords: polyethylene terephthalate; nanowire plates; surface modification; cell growth direction

收稿日期: 2024-03-12

* 基金项目: 2022 年西北民族大学校级大学生创新创业训练计划 (X202210742333)

[通信作者] 马建秀, E-mail: gsmjx@hotmail.com; Tel: 1338933093

随着纳米技术的发展, 纳米医学应运而生^[1], 其中纳米生物复合医用材料因可靠的生物相容性以及高度靶向性等优点被用于疾病的诊断、预防和治疗等方面^[2]。而聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 由对苯二甲酸与乙二醇酯缩聚而成, 具有耐高温、耐腐蚀、透明度高、强度高的特点, 广泛应用于各行业。由于 PET 对人体细胞和组织是惰性的, 而通过表面改性后的 PET 材料更具生物相容性^[3], 目前已被用于血管修复术、外科手术线^[4]、人工心脏瓣膜^[5]、人工血管等。多项研究表明使用 PET 或其改性材料的人工韧带在前交叉韧带手术中可显著促进骨隧道内的新骨生成以及骨整合^[6-9], 同时可促进血管内皮的增殖黏附^[10], 起到抗凝血作用从而提高其与血液的相容性^[11-13], 故应用纳米技术处理的 PET 材料可能会在生物医学领域发挥更加重要和广泛的作用。聚苯乙烯 (PS) 由苯乙烯聚合而成, 因稳定性、流动性、耐热性、易成型和廉价等优点被广泛应用于现代塑料工业^[14-15]。目前由 PS 制作的细胞组织培养瓶和培养皿是应用最广泛的细胞组织培养容器, 也是生物医学实验研究及临床检验微生物培养等研究的常用材料, 但其不耐腐蚀、随温度波动、易受机械应力的影响。本研究采用成立^[16]等制作的表面不同倾斜角度修饰的 PET 纳米线板, 常用的 PS 细胞培养器皿和玻璃材质细胞培养载体, 将张氏肝细胞在上述三种材质上培养后, 检测不同时间点的细胞活性和细胞周期, 观察细胞形态, 比较不同基质材料对细胞生长的影响, 以探究 PET 作为支持细胞生长材料的可行性与优势, 尤其倾斜角可能产生的其他影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

张氏肝细胞 (实验室冻存); cytiva DMEM 培养基 [格来赛生命科技 (上海) 有限公司]; 四季青胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司); 细胞增殖试剂盒 I (MTT) [西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司]; 二甲基亚砷 (DMSO) (上海碧云天生物技术有限公司); RNase Inhibitor (上海碧云天生物技术有限公司); 碘化丙啶 (PI) (上海碧云天生物技术有限公司); DAPI 染色液 (上海碧云天生物技术有限公司); 微丝红色荧光探针 (上海碧云天生物技术有限公司); PET 纳米线板

(由兰州大学物理科学与技术学院惠赠); PS 细胞培养瓶 (上海碧云天生物技术有限公司); 玻璃细胞培养瓶、盖玻片 (上海碧云天生物技术有限公司); 倒置生物显微镜 (厦门麦克迪奥实业集团有限公司); FACSymphony™ A3 流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司); Model 680 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将冻存的张氏肝细胞复苏后置于培养条件为 37℃, CO₂ 浓度为 5% 的孵箱中, 当细胞长满培养瓶 80% 时观察生长情况, 取生长良好的细胞分别种植于无倾角、10°倾角、20°倾角、30°倾角、40°倾角的 PET 纳米线板、PS 培养瓶以及玻璃板上, 平行培养三组, 严格按无菌操作方法培养 24 h、48 h、72 h, 在倒置显微镜下观察细胞, 并拍照。

1.2.2 MTT 检测细胞存活率 称取 MTT 0.5 g, 溶于 0.01 mol/L, 100 mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 用无菌 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 用铝箔纸包装, 放入 4°冰箱保存备用。胰酶消化各组培养皿的细胞, 并将浓度调至 1 × 10⁵/mL, 接着转移至 96 孔板内培养 12 h 后, 加入配好的 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL, 孵育 4 h 后, 每孔加入 150 μL 的 DMSO 后震荡 10 min, 酶标仪读取 570 nm 处的吸光值。

1.2.3 检测细胞周期 准备 60 mm 直径的 PS 细胞培养皿和玻璃培养皿, 将表面修饰的 PET 板裁剪成 5 cm × 5 cm 大小, 放置到较大的玻璃培养皿中, 将对数生长期张氏肝细胞按 1 × 10⁶ 个/mL 分别接种于上述三种培养皿中, 在各培养皿上培养 24 h 后倒去培养基, PET 纳米线板从旧皿中取出放置到新皿中, PBS 清洗两次后用胰酶消化, 离心收集细胞。用 PBS 清洗细胞 2 遍, 吸净离心管残余的 PBS 后, 加入 300 μL PBS 重悬, 将细胞吹散, 避免细胞成团, 随后在细胞悬液中缓慢滴加预冷的无水乙醇 3 mL, 置于 4℃ 固定过夜。于次日离心收集细胞, PBS 清洗 3 次后, 在避光条件下加 RNase (1 U/μL) 和 PI (50 μg/mL) 染色孵育 30 min。将检测样品转移到 5 mL 的流式管后检测细胞周期。

1.2.4 细胞形态观察 将玻璃爬片和不同倾斜角度的 PET 纳米线板分别置于 6 孔板中, 对数生长

期张氏肝细胞浓度调整至 5×10^5 个/mL 后悬滴各板上，放入 CO_2 孵箱，4 h 后取出将培养基轻轻沿孔板壁打入各孔继续培养 20 h，完成在不同表面特性材质上的细胞爬片，细胞爬片用 PBS 洗涤 2 次后，用 PBS 配制的 3.7% 甲醛溶液在室温下固定 20 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，再用稀释 100 倍后的罗丹明标记的鬼笔环肽 (phalloidin) 染液即微丝红色荧光探针染色，室温避光孵育 30 min 后吸去染色液，PBS 洗涤 3 次后，再用 DAPI 复染 10 min，冲去染液，滤纸吸取多余水分，加一滴荧光封片液后将爬片置于荧光显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行处理。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间用单因素方差分析进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 细胞存活率的比较

倾斜纳米线阵列和玻璃板的细胞存活率与 96 孔的 PS 板比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，

倾斜纳米线阵列的存活率与玻璃板比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，倾斜纳米线阵列组间的存活率 40° 与 0° 、 10° 、 20° 、 30° 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，后四组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

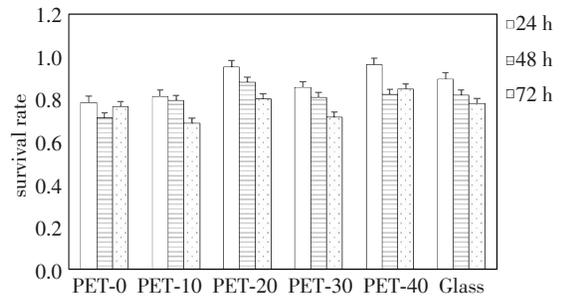


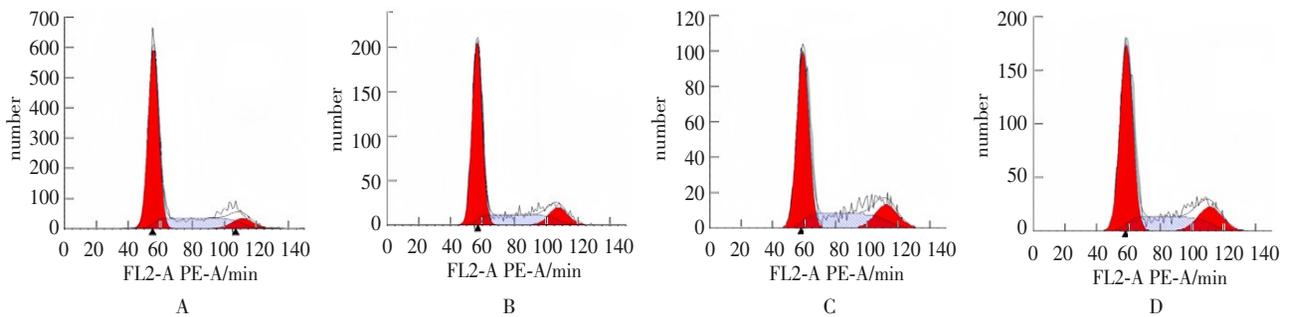
图 1 不同时间各组细胞存活率

2.2 细胞生长周期检测

由图 2 及表 1 可以观察到四组细胞的生长周期无明显不同。

2.3 细胞形态

细胞培养 24 h 后 PET-0、PET-30 与玻璃板的细胞形态没有明显变化，PET-10、PET-20 的细胞形态较玻璃板的有变化，见图 3。



A: 玻璃板; B: PET-0; C: PET-10; D: PET-20。

图 2 细胞生长周期

表 1 细胞生长周期检测 ($\bar{x} \pm s$)

材料	G1期	G2期	S期
glass	64.94 \pm 3.62	6.97 \pm 1.72	28.10 \pm 1.89
PET-0	63.38 \pm 4.05	9.50 \pm 1.68	27.12 \pm 3.85
PET-10	57.35 \pm 4.04	9.66 \pm 1.94	32.98 \pm 4.00
PET-20	60.57 \pm 3.17	14.16 \pm 2.01	25.26 \pm 1.67

培养 48 h 后 PET-0、PET-30 与玻璃板的细胞形态无明显变化，PET-10、PET-20 的细胞形态较

玻璃板的有变化，且表现出一定的生长方向性，见图 4。

培养 72 h 后 PET-0、PET-30 与玻璃板的细胞形态无明显变化，PET-10、PET-20 的细胞形态较玻璃板的有变化，表现出一定的生长方向性，与图 2 相比生长的方向性更为明显，见图 5。

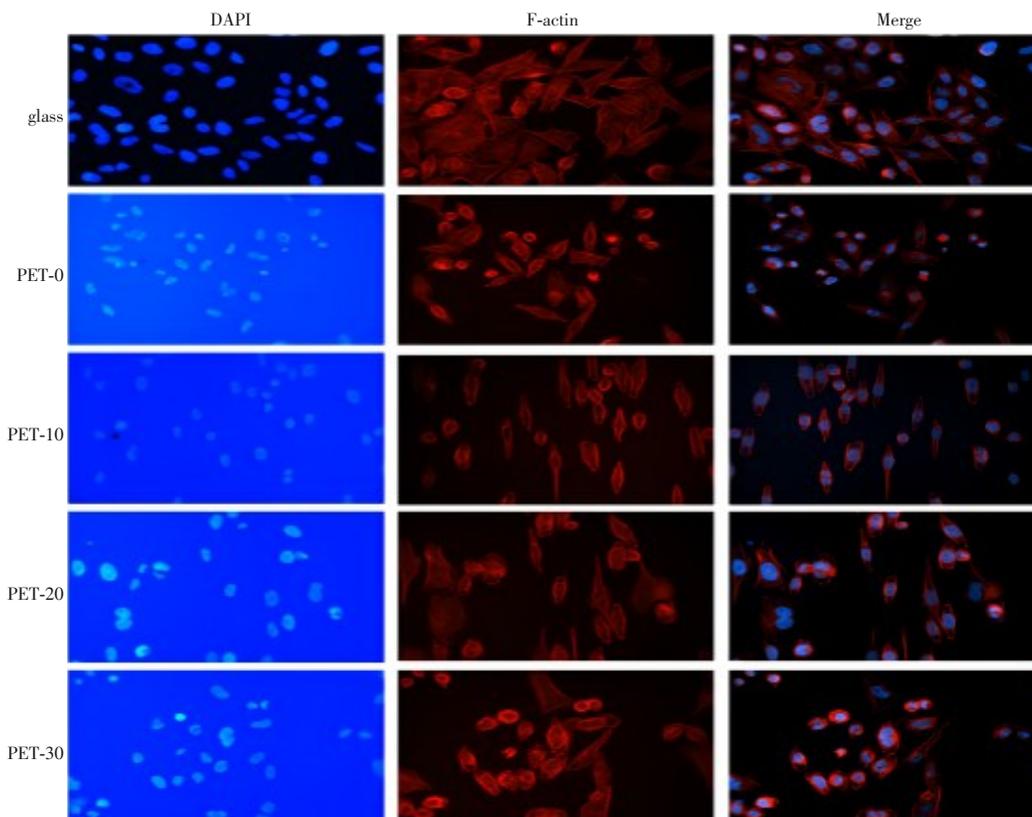


图 3 24 h 细胞骨架及核染色

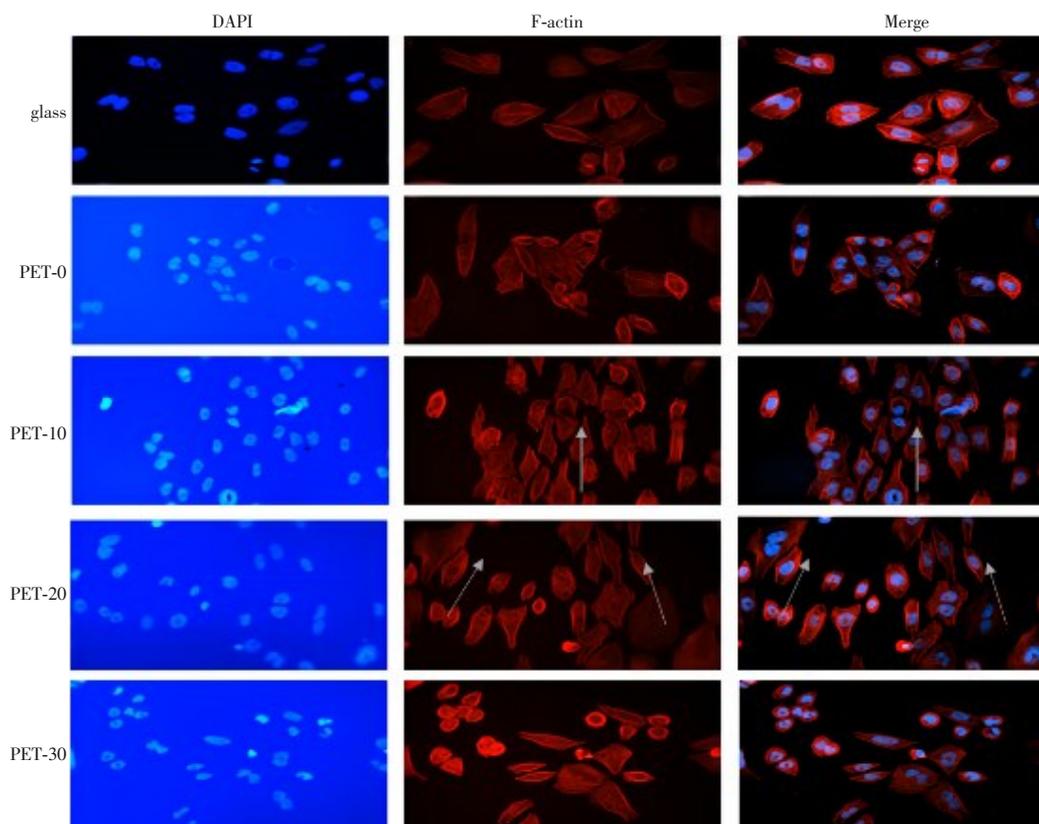


图 4 48 h 细胞骨架及核染色

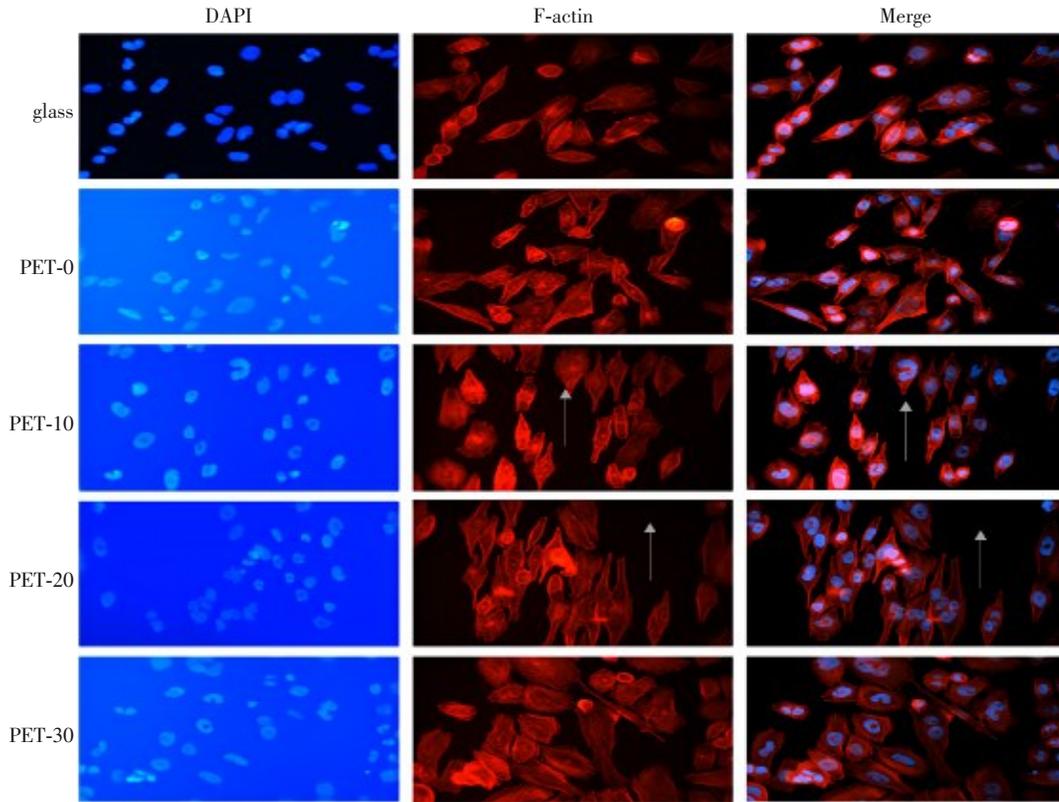


图 5 72 h 细胞骨架及核染色

3 讨论

PET 材料自产生起因其稳定的性质被广泛应用于食品包装及化工产业，随着经济全球化，我国及全世界对绿色生态环境愈加重视，废旧物品的回收和再利用已成为各国的一项战略目标，故利用 PET 材料制备新性能的环保材料也成为趋势^[17]，但 PET 材料在重要医学生物领域的应用大多仍没有新突破。本实验用由兰州大学物理科学与技术学院惠赠的不同倾斜角度的纳米 PET 阵列与 PS 和玻璃板做对比研究。倾斜角纳米线阵列是用 Ar⁺轰击 PET 片表面原始起伏结构，利用其所带的电荷，通过库伦力的作用改变 Ar⁺束的入射角度完成各向异性刻蚀，以制备形貌不同的纳米线阵列。得到的纳米线阵列的不同形貌可能会对细胞的形态与功能产生影响^[16]。

实验显示 PET 纳米线板的细胞存活率与 PS 板有统计学差异，与玻璃板比无统计学差异，而不同倾斜角度的 PET 纳米线板 0°、10°、20°、30° 四组间无统计学差异，且上述四组与 40° 组的 PET 纳米线板存在差异。说明与普通玻璃板比 PET 板可以支持细胞生长，但未表面改性的 PET 板细胞存活率不如 PS 板，多项研究表明改性后的 PET 材

料更具生物相容性^[3]，故对 PET 纳米线板表面改性使之更好的支持细胞生长还待进一步研究。40° PET 纳米线板与其他倾斜角度的 PET 板对细胞的存活性存在差异，可能与倾斜角度过大，造成对细胞表面物理性的损害相关。曾有论著指出哺乳动物的神经细胞生长可与其所处环境的形貌有关，神经细胞在平坦的膜面上通常直线生长，当遇到障碍时会出现反折与“穿膜现象”^[18]。也有研究表明细胞黏附与排斥特性与纳米结构有关，而与纳米线阵列的表面化学成分与湿润度无关^[19]，这可说明细胞生长的方向性与细胞生长引导材料的结构相关，与其他因素无关。本研究中，在倾斜纳米线阵列生长的细胞其形态特征与未做倾斜角的 PET 材料相比，呈现出形态的更加趋于相同和生长方向的一致性；本研究中细胞生长方向和形态的更加均一和排列整齐与细胞周期无关，说明对细胞的生长进程无明显干扰，不会造成由于细胞周期改变而导致的后续问题。

参考文献

- [1] 王海成, 邓玲, 闫智然, 等. 纳米材料与生物医学的联姻: 纳米医学[J]. 金属世界, 2014(5): 17-21, 25.
- [2] 谢克亮, 赵长安. 纳米技术在医学领域中的应用研究进展[J].

- 新医学, 2004, 35(6): 383-385.
- [3] 梁梅妮. 丝素蛋白对PP和PET的表面改性及改性后材料表面矿化研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [4] IKADA Y. Surface modification of polymers for medical applications[J]. *Biomaterials*, 1994, 15(10): 725-736.
- [5] 万昌秀, 段友容, 乐以伦, 等. 生物材料表面改性抗细菌粘附的方法研究[J]. *四川大学学报(工程科学版)*, 2000, 32(6): 67-70.
- [6] 王星. 表面改性PET韧带材料的清洗消毒及PET骨结合研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [7] 马盼. 生物活性锆掺杂羟基磷灰石对PET人工韧带骨整合的影响[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2021.
- [8] 黄建明. GRGDSPC多肽表面修饰PET人工韧带促进腱骨愈合的实验研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [9] 杨建军. 羟丙基纤维素表面修饰对促进聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)材料与骨组织愈合的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- [10] 刘云肖. 生物大分子层层组装改性PET及其内皮细胞相容性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [11] 俞洪飞. 医用涤纶材料表面磷酸胆碱仿生改性及其抗凝血性能研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2011.
- [12] 李方. 涤纶材料表面改性及其抗凝血性能研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2005.
- [13] 马晓星. 低温等离子体表面改性PET材料及其抗凝血性能的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2007.
- [14] 丁云江, 李文雯, 戴春发, 等. 聚苯乙烯填充机理研究[J]. *石油和化工设备*, 2023, 26(4): 17-19, 12.
- [15] 吴耀琴, 赵志平, 郭鹏, 等. 纳米材料改性聚苯乙烯的研究进展[J]. *鲁东大学学报(自然科学版)*, 2023, 39(1): 71-82.
- [16] CHENG L, DOU W, BAI S, et al. Controllable fabrication of patterned oblique nanowire array and its application as a reflection grating[J]. *Sci Adv Mat*, 2013, 5(9): 1179-1183.
- [17] 向帅. 再生PET原位成纤增强复合材料的研究[D]. 华南理工大学, 2013.
- [18] 朴东旭, 陈晓东, 毛立江. 神经细胞生长行为的仿生学思考—材料的形貌学作用[J]. *生物医学工程学杂志*, 1999, 16(S1): 127-129.
- [19] 赵领洲, 胡良圣, 霍开富. 钛合金表面准排列纳米线阵列排斥细胞黏附的机制[J]. *医学争鸣*, 2011, 2(5): 42.

(张咏 编辑)