文章编号:1000-8608(2011)05-0637-07

胶原-壳聚糖复合支架体外三维培养神经干细胞

关 水1, 刘天庆*1, 葛 丹1, 陆瑞欣1, 马学虎1, 崔占峰2

(1.大连理工大学 大连市干细胞与组织工程研发中心,辽宁 大连 116024;
2.牛津大学 工程科学系,英国 牛津 DX1 3PJ)

摘要:采用冷冻干燥法制备了胶原-壳聚糖复合支架并通过层粘连蛋白(LN)进行结构修饰, 测定其物理性能特征,建立了胎鼠海马神经干细胞(NSCs)的三维培养体系,同时考察了 NSCs与胶原-壳聚糖复合支架的生物相容性.孔径、孔隙率、吸水率、降解率等参数的比较表 明,体积比为7:3的复合支架更适合于体外细胞培养的要求,并且NSCs在经LN修饰后支 架材料上的接种率得到明显提高;激光共聚焦显微镜及扫描电镜观察表明,NSCs能够在胶 原-壳聚糖复合支架内良好地生长、增殖及分化.这些结果为NSCs的进一步临床移植应用, 以及治疗神经系统疾病的新药筛选和机理研究等奠定了坚实的实验基础.

关键词:神经干细胞;三维培养;复合支架;胶原-壳聚糖 中图分类号:Q813.1 文献标志码:A

0 引 言

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)体外分 离培养的成功及神经生物学发育机制的深入研究, 为脑损伤后中枢神经系统功能重建、神经再生和神 经系统疾病的治疗提供了新的思路和途径,因此在 细胞移植、药物筛洗、转基因治疗及组织工程等方 面有着巨大的应用价值^[1~4].但是目前对于 NSCs 的体外培养主要还是采用传统的二维培养方式: 一种是以神经球(neurosphere)在培养器皿中悬 浮(suspension)培养,另一种是在经过处理的培 养器皿的表面单层贴壁(monolayer)培养^[5,6].细 胞由于脱离体内真实环境而影响生物学行为,因而 直接影响了 NSCs 的数量和活性, 体内细胞都是在 三维空间中生长、繁殖、分化并发挥其特定的生物 学功能的.体外细胞培养的一个重要原则是要最大 程度地模拟体内细胞生长环境.不同于传统的二维 培养方式,三维培养(three-dimensional culture) 是将细胞种植在一定的细胞外基质(extracellular matrix,ECM)中,ECM 蛋白充当生长支架,为细

胞提供三维的结构支承,使细胞间形成适宜的空间分布和细胞连接,而且为细胞提供特异性的生长和分化信号,形成与体内组织相似的细胞生长微环境,从而引导组织形成^[7,8].

三维培养是组织工程中最典型的培养方式, 在细胞扩增、组织构建等方面具有重要作用.近几 年来,采用具有三维结构的支架材料进行 NSCs 的培养已取得了成功^[9~11].2000年,O'connor等 将 NSCs 接种到 I 型胶原凝胶中实现三维培养, 发现 NSCs 能够在胶原凝胶中增殖并分化为神经 元和胶质细胞^[10];2004年,Ma 等进一步研究证 明,在三维胶原凝胶中,NSCs 可以分化为有功能 的神经环路,产生的神经元具有神经元极性、神经 递质、离子通道感受器及兴奋性的功能^[11].目前 国内外对于 NSCs 三维培养的研究仍处于初级阶 段,且大多采用胶原作为支架材料,但是纯胶原延 展性较低,易干裂,抗水性差,遇水易溶胀降解,因 此需要通过一定的改性提高胶原的拉伸强度及抗 降解能力,从而改善胶原的力学性能与抗水性,以

收稿日期: 2009-08-13; 修回日期: 2011-07-15.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30800288,30670525);教育部高等学校博士学科点新教师基金资助项目(20070141050);大连理工大学科研启动基金资助项目(1000893364).

作者简介:关 水(1976-),男,博士,讲师;刘天庆*(1959-),男,教授,博士生导师,E-mail:liutq@dlut.edu.cn.

更适合 NSCs 生长的微环境. 壳聚糖作为一种天 然多糖衍生物,具有优良的生物亲合性,其分子链 上丰富的羟基和氨基,可发生多种化学反应^[12]. 壳聚糖与胶原结合能够形成大分子聚电解质复合 材料,可以提高胶原的力学强度,并且可以延迟胶 原的降解时间. 因此本文针对胶原支架本身存在 的不足,采用冷冻干燥法制备胶原-壳聚糖复合支 架,建立体外 NSCs 的三维培养,同时考察 NSCs 与胶原-壳聚糖复合支架的生物相容性.

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 实验所用试剂如下:鼠尾 I 型胶原 (Cultrex[™], Trevigen Inc.);壳聚糖(上海伯奥生 物科技有限公司); DMEM 培养液(Gibco); RPMI-1640 培养液(Sigma); F12(Gibco); 胎牛血 清(华美生物工程公司); D-葡萄糖(Gibco); 胎牛血 清(华美生物工程公司); D-葡萄糖(Gibco); EGF (Gibco); bFGF(Gibco); HEPES(Roche); GlutaMax-1(Gibco); Heparin(Gibco); Lipid (Gibco); B27(Gibco); BSA(Gibco); AccutaseTM 酶(Sigma); Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit(Invitery, USA). 其他所有常规试剂均为分析 纯.

1.1.2 仪器 实验所用仪器如下:超净工作台 (CA-920-3,上海净化设备厂);血球计数板(XB-K-25,上海求精生化试剂仪器有限公司);离心机 (Z323,Hermle,Germany);CO₂培养箱(HERA cell,Kendro Laboratory Products,Germany);超 纯水机(Millipore-Q-Synthesis,France);水浴振 荡器(SHA-C,江苏安普电子工程有限公司);高 压灭菌器(SS-325,Tomy Kogyo Co. Ltd., Japan);冷冻干燥机(Labconco,USA);扫描电子 显微镜(S2520,Hitachi,Japan);荧光倒置显微镜 (IX70-131,Olympus Optical Co. Ltd.,Japan); FV1000 激光共聚焦扫描显微镜(Olympus Optical Co. Ltd.,Japan).

1.1.3 细胞 实验取孕 14 d 的昆明小鼠(购自 大连医科大学),按照实验室以前文献报道的方 法^[13,14]获取神经干细胞、进行原代及传代培养. 培养基由 DMEM/F12(1:1) 和 RPMI-1640 按 比例混合作为基础培养基,添加生长因子及其他 成分构成(其中 EGF,20 ng・mL⁻¹; bFGF,10 ng・mL⁻¹; Heparin,4 mg・mL⁻¹; HEPES,5 mmol/L; D-葡萄糖,9.151 g・L⁻¹; GlutaMax-1, 4.5 mmol/L; BSA,2 mg・mL⁻¹; 加适量 NaHCO₃ 调节 pH 至 7.2).本实验采用第三代细胞.

1.2 方 法

1.2.1 支架制备、交联及修饰

(1)制备

称取一定质量的壳聚糖粉末,完全溶解于 2%的乙酸,配制成 20 mg/mL 壳聚糖溶液,离心 除渣脱泡待用;胶原(Cultrex[™],溶解于 20 mmol/L乙酸中)储存于 2~8 ℃待用,储备液的 浓度为 5 mg/mL.分别将胶原与壳聚糖溶液按体 积比 9:1、7:3、5:5 充分混匀,离心除泡后加入 预冷的 96 孔板中(每孔 100 μ L),置于-84 ℃超 低温冰箱内预冻 2 h 后迅速转移至低温冷冻干燥 机中 12 h,再浸入 0.1 mol/L Na₂ HPO₄(pH 7.4) 中数小时以中和残留的乙酸,然后用蒸馏水反复 冲洗至中性,再冷冻干燥 8 h,即得壳聚糖-胶原复 合支架.

(2) 交联

将冻干后的支架小心取出,转移至 24 孔板 内,加入 2 mL 含 50 mmol/L 2-吗啉乙烷磺酸、50 mmol/L 碳化二亚胺及 50 mmol/L N-羟基琥珀 酰亚胺的体积分数为 0.4 的乙醇交联剂中室温交 联 6 h,移去交联剂,加入 0.1 mol/L Na₂ HPO₄ (pH 7.4)室温孵育 2 h,再用体积分数为 0.4 的 乙醇清洗 4 次,30 min/次,双蒸水反复洗至中性, 最后将 24 孔板置于超低温冰箱内预冻 2 h,再次 冷冻干燥,即得交联后的支架.

(3)修饰

将经环氧乙烷灭菌过的交联的胶原-壳聚糖 复合支架置于 24 孔板内,将 100 µL(10 µg /mL) 的层粘连蛋白(LN)小心悬滴于支架中,并将孔板 置于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中过夜,无 菌干燥后保存备用. 1.2.2 支架孔径、孔隙率、吸水率及降解率测定

(1)孔径(aperture)

取以上制备的不同比例的复合支架,真空喷 金导电处理后黏贴在金属模块上,在扫描电子显 微镜下观察支架材料内部的微观结构.选择合适 的放大倍数拍摄扫描照片,并在材料内部选取 3 个视野,每个视野测量 10 个孔径值,计算支架的 平均孔径.

(2) 孔隙率(porosity)^[15]

测量支架的质量,记为 m_0 ,体积记为 V_0 ,将 支架浸入无水乙醇(密度为 ρ_0)中 24 h,使乙醇溶 液充分进入到支架材料中,然后小心地将支架取 出,表面擦干,称其质量,记为 m,则支架内孔的体 积 $V_p = (m - m_0)/\rho_0$,每个样本测 3 次,取平均 值.支架孔隙率 $\epsilon(\%)$ 按下式计算:

 $\epsilon = V_{\rm p} / V_0 \times 100 \%$

(3)吸水率(water absorption)

测量支架的质量,记为 m_0 ,浸泡到三蒸水中 24 h后再次称重,记为 m_1 ,每个样本测3次,取平 均值.支架吸水率A(%)按下式计算:

 $A = (m_1 - m_0) / m_0 \times 100\%$

(4)降解率(degradation rate)

取 12 支 20 mL 试管分成 4 组,每组 3 支,分 别加入制备好的不同比例的干燥复合支架(质量 记为 m_0),再加入 10 mL 含溶菌酶 1×10⁵ U 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4),置于 37 ℃水浴 中振荡消化.分别于 1、2、3、4、5 和 6 周取出各组 样本,蒸馏水洗后冷冻干燥,称重,记为 m_i .支架 降解率 D(%)按下式计算:

 $D = (m_0 - m_t) / m_0 \times 100 \%$

1.2.3 支架内细胞接种率的测定及分布观察 根据孔隙率选取体积比为7:3 的胶原-壳聚糖复 合支架,将 NSCs 小心接种在支架上,细胞接种的 初始浓度为5×10⁶个/mL,体积为20 μL;未经 LN处理的支架作为对照组.接种率(%)按下式 计算:

接种率=<u>实际黏附细胞数量</u>×100%

培养4d后,加入10µg/mL Hoechst33342,

置于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中孵育 10 min,然后加入预冷的 4%多聚甲醛磷酸缓冲液固 定细胞(与培养液按 1:3 混合),10 min 后取出 支架,用 PBS 荡洗 3次,用刀片切成薄片(平均厚 度 50~100 μm),于荧光显微镜下观察.

1.2.4 细胞死活检测 细胞以 5×10⁶ 个/mL的 初始浓度分别接种于不同体积比的胶原-壳聚糖 复合支架中,体积为 20 μL,置于 24 孔板内在 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养.采用 Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit 检测细胞在 支架内的存活.Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit 含有测量细胞活力的两种荧光探针.活细胞 能够与钙黄绿素(calcein AM,4 mmol/L)结合, 在激发光的作用下发出强烈的绿色荧光;而死细 胞由于细胞膜的破损,细胞内的核酸能够与乙啡 啶同型二聚体(EthD-1,2 mmol/L)结合,在激发 光的作用下产生强烈的红色荧光.具体操作方法 按照说明书进行,采用激光共聚焦扫描显微镜进 行观察.

1.2.5 统计学分析 各组实验分别重复 3 次,所 得数据以"平均数±标准误差"表示,学生 t 检验 进行显著性分析,以 P<0.05 认为有显著性差 异.

2 结果与讨论

2.1 胶原-壳聚糖复合支架的微观结构

本研究通过冷冻干燥法制备的胶原-壳聚糖 复合支架为白色、不透明、表面粗糙,具有一定弹 性的规则圆柱体(底面直径约为6mm,高约为3 mm),有的呈纤维状排列并有大小不等的隆起, 用手触摸感觉有弹性.图1所示为胶原-壳聚糖复 合支架(7:3)在扫描电镜下的超微结构,可以非 常清楚地看到支架上较大范围内的孔结构,孔与 孔之间相互连通形成孔道.但从图1(a)中也可以 看到,支架多孔结构的某些区域仍然不是很均匀, 这可能是由于在胶原和壳聚糖溶液混合过程中搅 拌不匀产生了气泡,经预冻后形成了较大的结冰 区,导致支架在冻干时局部冰晶直接升华,从而产 生了所谓的"无孔区".



Fig. 1 The microstructure of collagen-chitosan composite scaffolds

2.2 胶原-壳聚糖复合支架的性能特征

支架的孔隙形态,包括孔隙率、孔径大小和孔 径分布等对细胞增殖速度、支架降解动力学特性 和组织的力学特性等有着重要的影响.因此,组织 工程中使用的支架不仅要求其材料具有生物相容 性、生物可降解性,还要求具有高孔隙率、高比表 面积、孔隙内部连通性好等特性,以便于组织液扩 散和组织的形成.本实验所制备的不同体积比的 胶原-壳聚糖复合支架的孔径、孔隙率、吸水率、降 解率等参数如表1及图2所示.

- 表1 胶原-壳聚糖复合支架的孔径、孔隙 率、吸水率
- Tab. 1The aperture, porosity and water absorptionof collagen-chitosan composite scaffolds

体积比	孔径/μm	孔隙率/%	吸水率/%
9 : 1	$185\!\pm\!12$	84 ± 4.9	16.9 ± 2.0
7 : 3	$150\!\pm\!14$	88 ± 7.2	19.0 ± 1.2
5 : 5	$90\!\pm\!11$	91 ± 5.5	22.5 \pm 2.6





Fig. 2 The degradation rate of collagen-chitosan composite scaffolds in vitro

由表1可以得出,随着壳聚糖比例的增加,复 合支架的孔径逐渐减小,吸水率逐渐增大,而孔隙 率没有明显的变化.这些结果说明通过冷冻干燥 法制备的不同比例的胶原-壳聚糖复合支架,都具 有较高的孔隙率(90%左右),具备孔与孔之间的 连通,但是连通孔径之间存在一定的差别.胶原比 例太大,使得复合支架更加致密,孔壁变厚,孔径 变大,孔的数量减少,且分布不均.而且随着胶原 蛋白含量的增加,吸水率逐渐降低,导致降解速度 加快.

胶原在体内由胶原酶迅速降解,而壳聚糖则 主要由体液中的溶菌酶降解.这两种酶在体内的 含量不同,当溶菌酶分解了包裹在胶原纤维外的 壳聚糖后,胶原酶才能对胶原纤维进行降解^[16], 因此实验中仅采用溶菌酶考察胶原-壳聚糖复合 支架的降解速率.由图2可见,随着时间的延长, 不同体积比的胶原-壳聚糖复合支架的降解率同 趋势增加,且随着壳聚糖比例的增加,支架的降解 率呈依赖性提高,即5:5支架的降解率明显高于 7:3和9:1实验组的.需要指出的是,生物材料 的体内降解受多种酶的联合作用,不完全同于体 外降解情况,所以胶原-壳聚糖在溶菌酶中的模拟 降解只能宏观上评价不同体积比支架的体外降解 趋势的快慢.

以上结果表明,体积比为5:5、7:3、9:1的 胶原-壳聚糖复合支架的孔径、孔隙率、吸水率、降 解率等实验参数都符合体外细胞培养的要求.考 虑到孔径及其均匀性的差别,在以后的实验中,主 要采用体积比为7:3的胶原-壳聚糖复合支架来 进行 NSCs 的三维培养.

2.3 胶原-壳聚糖复合支架与 NSCs 的生物相容性

要实现 NSCs 在支架材料内的三维培养,首 先要求细胞很好地接种在支架材料上.细胞与支 架材料的黏附是组织工程研究细胞与材料间相互 作用的基础.影响黏附的因素主要有生物学和材 料学两个方面.就材料学方面来说,材料表面的亲 疏水性、表面自由能、荷电特性等对材料的黏附性 都存在较大的影响.细胞和胶原-壳聚糖支架的结 合在很大程度上依靠糖蛋白的连接.层粘连蛋白 (LN)能够为细胞在支架上的黏附提供良好的基 质膜环境,提高细胞与支架的黏附率.NSCs 能够 连结 LN 的第 11 位氨基酸,再由 LN 短臂上的球 形结构与 I 型胶原结合,从而使细胞与支架黏附 得更牢固.

因此本文首先考察了 NSCs 在经过 LN 修饰 的胶原-壳聚糖支架(7:3)内的接种率.由表 2 可 以看出:最初接种的细胞密度较高,但补加新鲜培 养基之后,有一部分细胞重新从支架上脱离,悬浮 于培养基中.在孵育 12 h后,置换培养器皿时计 数得到 30%~40%的细胞因为黏附不牢而脱落. 所以,要保证支架内的细胞总数,开始的接种密度 一定不能太低(一般高于 1×10⁶ 个/mL).对比 2 个实验组可以看出,LN 处理能够明显提高 NSCs 的接种率.

- 表 2 NSCs 在胶原-壳聚糖支架(7:3) 内的接种率
- Tab. 2 The inoculation rate of NSCs in collagen-chitosan (7:3) scaffolds

胶原-壳聚糖	细胞数/104			拉动
支架(7:3)	总数 (0 h)	脱附数 (1 h)	脱附数 (12 h)	1 ታ ተተ ዋ / / / 0
LN-未处理组	10	1.8 ± 0.36	4.1±0.22	41±4.2
LN-处理组	10	1.3 ± 0.28	3.2±0.25	55 ± 4.7^{1}
N 1) D <0				

注:1)P<0.05,与LN-未处理组比较

通过 Hoechst 荧光染色,本文进一步考察了 NSCs 在经过 LN 修饰的胶原-壳聚糖复合支架 (7:3)中的生长和分布情况.如图 3 所示,在经 LN 修饰的支架上,细胞黏附的数量明显多于未 经过修饰的.因此,经过 LN 修饰后的支架材料大 大改善了细胞在支架上的黏附能力,显著提高了 胶原-壳聚糖支架材料的生物相容性及对细胞的 亲合力,对细胞的黏附行为产生了不可忽视的影 响.

激光共聚焦扫描显微镜(laser scanning confocal microscope,LSCM)是 20 世纪 80 年代 发展起来的一种高精度分子细胞生物学分析仪 器,辅以各类免疫荧光探针或荧光染料与被测物 质特异性结合,不仅可观察固定的细胞组织切片, 还可以对活细胞的结构、分子、离子进行实时动态



图 3 胶原-壳聚糖(7:3)支架中 NSCs 的 Hoechst 荧光染色观察

Fig. 3 Hoechst fluorescence staining of NSCs in collagen-chitosan (7:3) scaffolds

观察和检测.因此通过 Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit 染色,应用 LSCM 技术,实时检 测了 NSCs 在经过 LN 修饰的胶原-壳聚糖(7: 3)支架内细胞的死活情况.如图 4 所示,培养 6 d 后,活细胞的比例(图 4(a),69.2%)明显大于死 细胞的(图 4(b),30.8%).但由图 4(c)可以看出, 单位细胞数量多的区域死细胞的数量也相应增加 (如图中方框所示,即图 4(a)与图 4(b)叠加后区 域),这可能是由于在一定空间内的细胞数量过 多,造成营养物质缺乏而导致细胞凋亡.图 4(d)



- 图 4 NSCs 在经过 LN 修饰的胶原-壳聚糖 (7:3)支架内 Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit 染色
- Fig. 4 Staining of NSCs in LN-treated collagen-chitosan (7:3) scaffolds by using the Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit

为 NSCs 在 Z 轴 (1.50 mm \times 1.50 mm \times 0.24 mm) 上叠加的三维成像照片,表明支架内的 NSCs 培养至第6d时状态良好,细胞仍然保持着 旺盛的增殖能力.

图 5 为 NSCs 在经过 LN 修饰的胶原-壳聚糖 (7:3)支架内增殖和分化的扫描电镜照片. 图 5(a)显示了 NSCs 以球状或团簇状黏附于支 架的孔壁或孔隙内;而图 5(b)则显示 NSCs 附着 在孔道壁上,分化的神经突触向外伸展,并相互交 织呈网状.这个结果进一步证明了胶原-壳聚糖复 合支架具有良好的生物相容性并提供适合 NSCs 生长的微环境,NSCs 能够在支架内良好地生长、 增殖及分化.



(a) 增殖

(b)分化

- NSCs 在经过 LN 修饰的胶原-壳聚糖 图 5 (7:3)支架内生长情况的扫描电镜观察
- The growth state of NSCs in LN-treated Fig. 5 collagen-chitosan (7:3) scaffolds via SEM

3 结 语

三维培养作为体外二维细胞系统的研究与组 织器官及整体研究的桥梁,既能保留体内细胞微 环境的物质及结构基础,又能展现细胞培养的直 观性及条件可控性优势.近几年来,随着干细胞与 组织工程技术的新兴发展,三维培养在组织形成、 血管发育和器官再造等发育生物学的分支领域得 到了广泛的应用;同时在筛选新药的疗效分析和 毒理实验方面,利用三维培养获得了和二维培养 方式完全不同的结果,也引起了药理学家的极大 兴趣[17].本文采用冷冻干燥法制备了胶原-壳聚 糖复合支架,通过层粘连蛋白进行结构修饰,并测 定了其物理性能特征,建立了胎鼠海马神经干细 胞(NSCs)的三维培养体系.通过孔径、孔隙率、吸 水率、降解率等参数的比较得出,体积比为7:3

的复合支架更适合于体外细胞培养的要求;激光 共聚焦显微镜及扫描电镜观察表明,NSCs 能够 在胶原-壳聚糖复合支架内良好地生长、增殖及分 化.这些结果对于 NSCs 的进一步临床移植应用, 以及治疗神经系统疾病的新药筛选和机理研究等 有明确的理论和工程实用意义. 然而由于技术条 件的原因,目前体外三维培养所创建的培养条件 仅处于亚最佳状态,培养的细胞仅具备有限的生 存能力和有限的分化程度,仍然有待于进一步发 展和完善.

参考文献:

- [1] KULBATSKI I, MOTHE A J, NOMURA H, et al. Endogenous and exogenous CNS derived stem/ progenitor cell approaches for neurotrauma [J]. Current Drug Targets, 2005, 6(1):111-126
- [2] MARTINO G, PLUCHINO S. The therapeutic potential of neural stem cells [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2006, 7(5):395-406
- [3] MCLEOD M, HONG M, SEN A, et al. Transplantation of bioreactor-produced neural stem cells into the rodent brain [J]. Cell Transplantation, 2006, 15(8-9):689-697
- [4] RUBIN L L. Stem cells and drug discovery: the beginning of a new era [J]. Cell, 2008, 132(4):549-552
- [5] REYNOLDS B A, WEISS S. Clonal population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell [J]. Developmental Biology, 1996, 175(1), 1-13
- [6] GAGE F H. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287 (5457):1433-1438
- [7] NAKAJIMA M, ISHIMURO T, KATO K, et al. Combinatorial protein display for the cell-based screening of biomaterials that direct neural stem cell differentiation [J]. Biomaterials, 2007, 28(6):1048-1060
- [8] ALAVI A, STUPACK D G. Cell survival in a threedimensional matrix [J]. Methods in Enzymology, 2007, 426:85-101
- [9] YANG F, XU C Y, KOTAKI M, et al. Characterization of neural stem cells on electrospun

poly (L-lactic acid) nanofibrous scaffold [J]. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2004, 15(12):1483-1497

- [10] O'CONNOR S M, STENGER D A, SHAFFER K M, et al. Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic Ca²⁺ response in threedimensional collagen gel [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2000, 102(2):187-195
- [11] MA W, FITZGERALD W, LIU Q Y, et al. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels [J]. Experimental Neurology, 2004, 190(2):276-288
- [12] FREIER T, KOH H S, KAZAZIAN K, et al. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation [J]. Biomaterials, 2005, 26(29):5782-5878
- [13] 刘天庆,戴明舒,葛 丹,等. 神经球内神经干/祖细胞活性与代谢研究[J]. 大连理工大学学报,2008, 48(6):811-818

(LIU Tian-qing, DAI Ming-shu, GE Dan, *et al*. Study of viability and metabolism parameters of NSPCs [J]. Journal of Dalian University of Technology, 2008, **48**(6):811-818)

- [14]关 水,刘天庆,葛 丹,等. 原儿茶酸对体外培养的神经干/祖细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国药理学通报,2009,25(4):448-452
- [15] WANG Y C, LIN M C, WANG D M, et al. Fabrication of a novel porous PGA-chitosan hydrid matrix for tissue engineering [J]. Biomaterials, 2003, 24(6):1047-1057
- [16] HIRANO S, ZHANG M, NAKAGAWA M, et al.
 Wet spun chitosan-collagen fibers, their chemical N-modifications, and blood compatibility [J].
 Biomaterials, 2000, 21(10):997-1003
- [17] PAMPALONI F, REYNAUD E G, STELZER E H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(10):839-845

Collagen-chitosan composite scaffold in vitro three-dimensional culture of neural stem cells

GUAN Shui¹, LIU Tian-qing^{*1}, GE Dan¹, LU Rui-xin¹, MA Xue-hu¹, CUI Zhan-feng²

(1. Dalian Research and Development Center for Stem Cell and Tissue Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. Department of Engineering Science, Oxford University, Oxford OX1 3PJ, UK $\,)$

Abstract: The collagen-chitosan composite scaffolds were fabricated by lyophilization technique, which were structurally modified by laminin (LN) protein, and their physical performance characteristics were determinated. Neural stem cells (NSCs) obtained from the fetal mouse hippocampus were cultured in the collagen-chitosan composite scaffolds and the biocompatibility was studied. The comparative results of different scaffolds with the parameters of aperture, porosity, water absorption and degradation rate show that the volume ratio of 7 : 3 is more suitable for cell culture in vitro and the inoculation rate of NSCs is markedly improved in LN-treated scaffolds. Through the observation of laser scanning confocal microscope (LSCM) and scanning electron microscopy (SEM), NSCs within collagen-chitosan composite scaffolds present good growth, proliferation and differentiation. These results provide a scientific experimental basis not only for further NSCs clinical transplantation applications, but also for the drug screening and mechanism research on the treatment of diseases of the nervous system.

Key words: neural stem cells; three-dimensional culture; composite scaffold; collagen-chitosan