

# PHBHHx 膜表面亲水改性及其与神经干细胞生物相容性

吕海侠<sup>1</sup>, 杨志倩<sup>2</sup>, 卢晓云<sup>2</sup>, 李明川<sup>2</sup>, 焦倩<sup>1</sup>, 陈新林<sup>1</sup>, 王媛媛<sup>1</sup>, 张雅利<sup>2</sup>

1 西安交通大学医学院神经生物学研究所, 陕西 西安 710061

2 西安交通大学生命科学与技术学院 生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049

吕海侠, 杨志倩, 卢晓云, 等. PHBHHx 膜表面亲水改性及其与神经干细胞生物相容性. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1216-1226.

Lü HX, Yang ZQ, Lu XY, et al. Biocompatibility of surface modified PHBHHx with rat embryonic neural stem cells. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1216-1226.

**摘 要:** 对羟基丁酸-羟基己酸共聚酯 (PHBHHx) 膜进行表面改性, 研究神经干细胞 (NSCs) 在改性后的 PHBHHx 膜表面的贴附、增殖及分化情况, 为开发新型脑组织工程支架材料奠定基础。采用溶剂挥发法制备 PHBHHx 膜, 扫描电镜观察其表面性状; 分别通过脂肪酶处理, NaOH 处理的方法对 PHBHHx 膜进行表面改性, 测量接触角以检测膜表面亲水性。分离培养孕 14.5 d 大鼠胚胎大脑皮质 NSCs, 接种在表面改性后的 PHBHHx 膜表面进行体外培养, 扫描电镜观察膜表面细胞形态, MTT 法检测细胞活力, 免疫细胞化学染色观察 NSCs 存活和分化情况。结果显示, 与未处理的 PHBHHx 膜相比, 脂肪酶、NaOH 处理能够显著提高 PHBHHx 膜表面亲水性, 增加 NSCs 在 PHBHHx 膜表面贴附数量; NSCs 在改性后的 PHBHHx 膜表面能够良好地存活并分化为神经元和胶质细胞。结果提示 PHBHHx 膜表面碱处理通过提高材料表面亲水性和粗糙程度, 增加其与 NSCs 的生物相容性, 改性后的 PHBHHx 材料是一种非常有潜力的新型脑组织工程支架材料, 有望在 NSCs 移植修复脑损伤中发挥作用。

**关键词:** 羟基丁酸-羟基己酸共聚酯, 神经干细胞, 表面改性, 生物相容性

**Received:** April 17, 2012; **Accepted:** June 6, 2012

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 81070998, 31070943, 31101266), Fundamental Research Funds for the Central Universities.

**Corresponding author:** Xiaoyun Lu. Tel/Fax: +86-29-82668463-423; E-mail: luxy05@mail.xjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81070998, 31070943, 31101266), 西安交通大学中央高校基本科研业务费专项资金资助。

# Biocompatibility of surface modified PHBHHx with rat embryonic neural stem cells

Haixia Lü<sup>1</sup>, Zhiqian Yang<sup>2</sup>, Xiaoyun Lu<sup>2</sup>, Mingchuan Li<sup>2</sup>, Qian Jiao<sup>1</sup>, Xinlin Chen<sup>1</sup>,  
Yuanyuan Wang<sup>1</sup>, and Yali Zhang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Neurobiology, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, Shaanxi, China

<sup>2</sup> Department of Biological Science and Bioengineering, Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

**Abstract:** To study the attachment, proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) on surface modified PHBHHx films and to establish the theory of PHBHHx application in NSCs-based brain tissue engineering. PHBHHx film was fabricated by a solution-casting method, and the morphology of the film was observed under scanning electron microscopy (SEM). The films were treated by NaOH or lipase, then the surface hydrophilic property was characterized using water contact angle measurement. NSCs were isolated from the cerebral cortex of rat embryos on embryonic day 14.5, and cultured on surface treated PHBHHx films. The morphology of NSCs attached on the film was visualized under SEM, and the survival and differentiation of NSCs were observed through immunocytochemical staining. Compared with the untreated PHBHHx films, the water contact angle of NaOH or lipase treated PHBHHx films decreased dramatically, and the number of NSCs attached significantly increased. NSCs survived well on treated PHBHHx films and differentiated into neurons and glial cells. The amelioration of hydrophilic property of PHBHHx film improved its biocompatibility with NSCs. PHBHHx can serve as a novel CNS tissue engineering biomaterial applied for NSCs transplantation, brain repairing and regeneration.

**Keywords:** PHBHHx, neural stem cells, surface treatment, biocompatibility

神经干细胞 (NSCs) 是具有自我更新和多向分化潜能的细胞, 它能不断增殖, 并分化为神经系统主要的细胞类型 (神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞)<sup>[1]</sup>。NSCs 移植已成为目前促进神经损伤修复最有潜力的手段<sup>[2-4]</sup>。然而, 单纯的 NSCs 移植效果并不理想<sup>[5-7]</sup>。因此, 有需要、有必要在深入了解 NSCs 特性以及对于脑组织的修复作用的同时, 积极寻求能够促进 NSCs 在移植部位更好地存活并向损伤修复所需的细胞分化的策略。目前基于 NSCs 修饰<sup>[8-10]</sup>、NSCs 体外定向诱导分化后移植<sup>[11]</sup>、混合细胞共移植<sup>[12]</sup>以及干细胞-生物材料共移植<sup>[13-14]</sup>等的一些尝试取得了比较明显的效果, 在一定程度上提高了移植细

胞在移植部位存活及分化能力。特别是随着组织工程技术的快速发展, 以生物可降解材料为支架进行神经细胞培养的脑组织工程及其在脑组织损伤修复和神经系统重建中的应用成为一新兴的前沿领域<sup>[15-17]</sup>。新型脑组织工程支架材料的开发及生物相容性研究成为这一领域的研究热点之一。

聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 是一类可由微生物合成的具有良好生物相容性的天然生物可降解高分子材料<sup>[18-19]</sup>, 羟基丁酸-羟基己酸共聚酯 (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), PHBHHx) 是 PHA 家族中的一员<sup>[20-21]</sup>, 在生物相容性、生物活性及机械性能方面的性能优良, 与

多种细胞都具有良好的生物相容性<sup>[22-25]</sup>,是近年来在组织工程中被广泛关注的新型生物材料<sup>[19,26]</sup>。PHBHHx 作为外周神经修复支架材料和 NSCs 体外培养支架材料的研究已有报道<sup>[27-28]</sup>。但由于 PHBHHx 的聚酯性质,其表面疏水性强,阻碍了细胞在其表面的贴附生长,因此也限制了其应用范围<sup>[29]</sup>。有学者通过采用紫外辐照、丝素蛋白修饰等方法对 PHBHHx 材料进行改性处理<sup>[30-32]</sup>,提高了 PHBHHx 材料与成纤维细胞、血管内皮细胞等的生物相容性。本研究进行了 PHBHHx 膜材料表面改性条件的摸索,并研究了改性后 PHBHHx 膜与 NSCs 的生物相容性,为优化基于 PHA 材料的新型脑组织工程支架奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 PHBHHx 膜的制备及表面改性

#### 1.1.1 PHBHHx 膜的制备

溶剂挥发法制备 PHBHHx 膜<sup>[33]</sup>。15 mL 氯仿溶解 0.5 g PHBHHx, 60 °C 水浴助溶 1 h。通风橱中,将液体倾入 9 cm 玻璃培养皿中,室温下使氯仿挥发 1~2 d,待膜形成后置于 4 °C 老化 2 周。

#### 1.1.2 PHBHHx 膜的表面改性及处理

经老化后的 PHBHHx 膜用于表面改性处理,各组的处理方式分别为:对照组 (Control) 不做任何处理;碱处理组 (A),用 2 mol/L NaOH 室温处理 1 h<sup>[29]</sup>;酶处理组 (L),脂肪酶 (L3126, sigma) 37 °C 处理 24 h<sup>[34]</sup>;酶+碱处理组 (A+L),脂肪酶 37 °C 处理 24 h 后 2 mol/L NaOH 室温处理 1 h;碱+酶处理组 (L+A),2 mol/L NaOH 室温 1 h 后脂肪酶 37 °C 处理 24 h。

细胞接种之前,PHBHHx 膜经 75%乙醇浸

泡 2 h,紫外线照射正、反两面各 1 h 进行消毒。PBS 浸泡过夜,将膜裁剪成合适大小,放入 24 孔板内备用。

### 1.2 NSCs 的分离和培养

采用本实验室常规方法<sup>[35-36]</sup>分离孕 14.5 d 大鼠 (购自西安交通大学实验动物中心) 胚胎大脑皮质,细胞接种密度为  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$  个细胞/mL,以完全培养基进行常规培养,每 5 d 传代 1 次,第 3~8 代的 NSCs 用于实验。完全培养基成分:无血清的 DMDEM/F12 (1:1) 培养基添加 N2 (100×, GIBCO, USA)、B27 (50×, GIBCO, USA)、20 μg/L hEGF (GIBCO, USA) 和 10 μg/L bFGF (Sigma, USA)。NSCs 分化培养基成分:去除完全培养基中 hEGF 和 bFGF,并添加 1% 的胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)。

### 1.3 在 PHBHHx 膜培养 NSCs 及细胞活力测定

传代时,将细胞重悬于分化培养基中,并以  $4 \times 10^4$  个细胞/mL 的密度接种于预先放入培养板中的 PHBHHx 膜,每孔加培养基 500 μL,细胞培养箱内常规培养 7 d,每隔 3 d 半量换液 1 次。MTT 法测定 NSCs 细胞活力。

### 1.4 免疫细胞化学染色

细胞在膜表面贴附生长 7 d 以后,经 PBS 洗涤 3 次,0.3% Triton 室温处理 30 min,再用 PBS 洗涤 3 次后以 5% 的正常山羊血清室温封闭 1 h,与一定比例稀释的一抗 (Nestin 1:200, β tubulin III 1:200, GFAP 1:500) 室温孵育 2 h 后 4 °C 过夜,次日以 PBS 洗涤 3 次后与 FITC 标记二抗于暗环境室温孵育 2 h,以 DAPI 标记细胞核 (室温, 5 min),以 50% 的甘油缓冲液封片,荧光显微镜下观察。

## 1.5 扫描电镜样品制备

细胞在膜表面贴附生长 7 d, 经 PBS 洗涤 2 次后用 2.5% 的戊二醛 4 °C 固定; 再经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液浸洗 10 min 后用 1% 四氧化锇固定液 4 °C 固定 2 h; 再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液浸洗 10 min 后用乙醇梯度脱水并经乙酸异戊酯浸泡 10 min; 临界点干燥; 喷金后扫描电镜 (TM-1000) 下观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 表面改性处理增加 PHBHHx 膜亲水性

分别对 NaOH 处理, 脂肪酶处理以及 NaOH 联合脂肪酶处理后 PHBHHx 膜表面接触角进行测量, 结果提示: 各种处理方式处理后膜表面接触角与未处理的对照组相比都有明显降低 (图 1,  $P < 0.01$ ), 其中单纯 NaOH 处理 PHBHHx 膜表面接触角降低程度较单纯脂肪酶处理组更为明显 ( $P < 0.05$ ), 与 NaOH 与脂肪酶联合处理组间没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 NSCs 的培养与鉴定

由胚胎大鼠大脑皮质分离的原代细胞在完全培养基中呈悬浮状态生长, 培养 3~5 d 后可形成大小不等的神经球 (图 2A), 并随培养时间延长, 神经球直径不断增大; 在含 1% FBS 的分化培养基连续培养 7 d 后, 部分细胞仍然保持 nestin 阳性的未分化 NSCs, 另有部分细胞分化为 GFAP 阳性星形胶质细胞和  $\beta$ -tubulin III 阳性的神经元 (图 2B, C, D)。

### 2.3 PHBHHx 膜表面改性对 NSCs 贴附的影响

24 孔培养板中, 将 NSCs 接种在碱处理的 PHBHHx 膜表面, 以分化培养基培养 7 d, DAPI 染色后进行荧光显微镜观察 (图 3), 结果显示, 与未处理组 (3A) 相比, 碱处理显著增加了 NSCs 在 PHBHHx 膜表面的贴附生长 (3B), 扫描电镜观察膜表面细胞保持原有的神经细胞形态特点 (3C, D)。

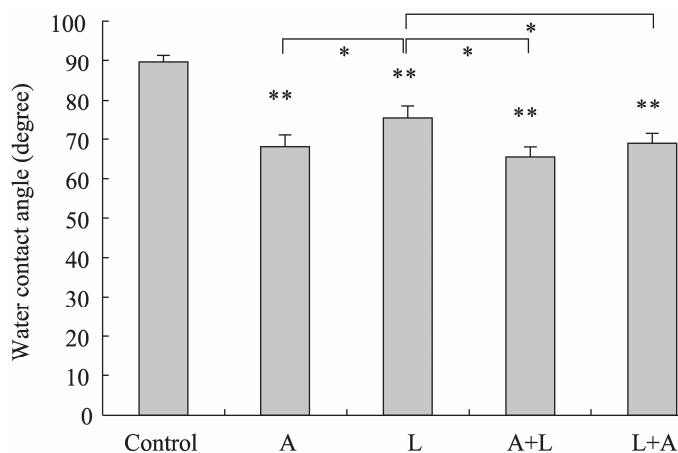


图 1 表面改性对 PHBHHx 膜表面接触角的影响

Fig. 1 Water contact angle after surface treatment. A: NaOH treatment; L: lipase treatment; A+L: NaOH treatment followed by lipase treatment; L+A: lipase treatment followed by NaOH treatment. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .



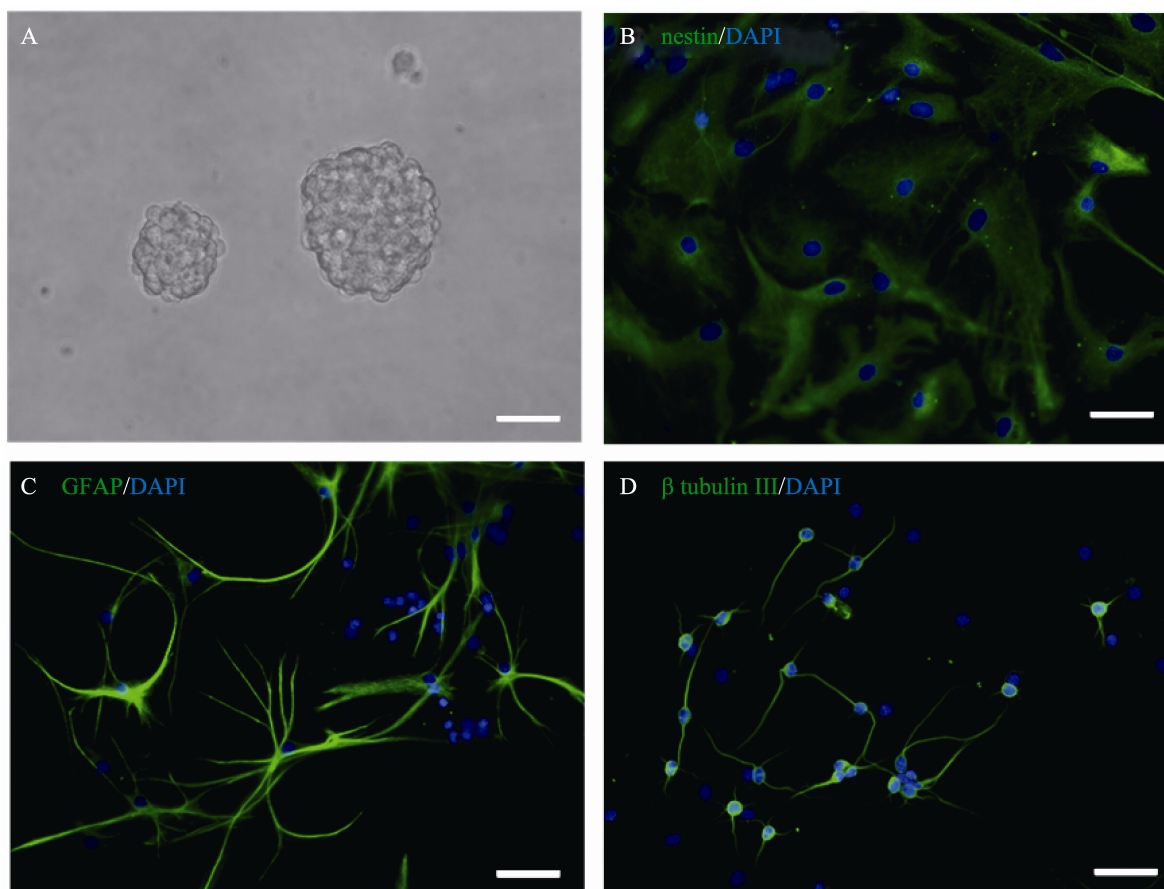


图2 NSCs 体外培养及鉴定

Fig. 2 Cultivation and identification of NSCs *in vitro*. (A) Neurospheres. (B) Nestin positive NSCs. (C) GFAP positive astrocytes. (D)  $\beta$ -tubulin III positive neurons. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Nestin, GFAP and  $\beta$ -tubulin III were in green. Scale bar=50  $\mu$ m.

#### 2.4 NSCs 在改性 PHBHHx 膜表面的增殖及分化情况

将单个 NSCs 接种于 PHBHHx 膜, 并以经多聚赖氨酸包被的盖玻片为对照, 分化培养基常规培养 3 d 后, MTT 检测 PHBHHx 膜表面贴附生长的 NSCs 活力, 结果提示: 在改性 PHBHHx 膜上生长的 NSCs 细胞活力明显增强 (图 4)。

分化培养基中培养 7 d, 以免疫细胞化学染

色法观察 NSCs 分化情况, 结果显示: 细胞在 PHBHHx 膜表面发生多向分化 (图 5), 分化为星形胶质细胞 (GFAP 阳性, A、B、C) 和神经元 ( $\beta$  tubulin III 阳性细胞, D、E、F)。随机选择的视野中, 显微镜下计数全部细胞、GFAP 阳性细胞、 $\beta$  tubulin III 阳性和 nestin 阳性细胞, 计算分化细胞比例, 结果显示在改性的 PHBHHx 膜表面生长细胞约有 30% 发生分化, 其中多数为  $\beta$  tubulin III 阳性神经元, 而其余的 70% 仍维持在未分化

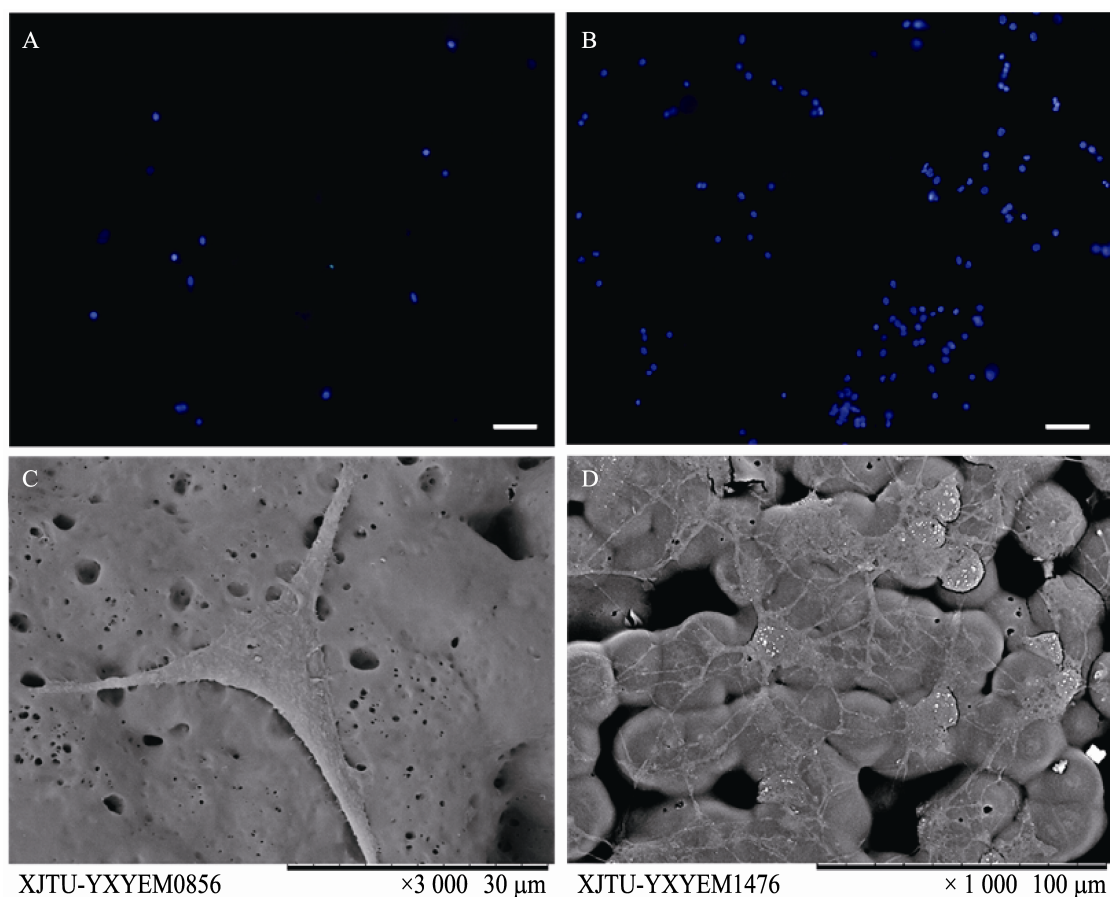


图 3 NSCs 在改性处理后的 PHBHHx 膜表面的贴附生长情况

Fig. 3 Attachment and survival of NSCs on alkali-treated PHBHHx film. Scale bar in A and B =  $100\ \mu\text{m}$ .

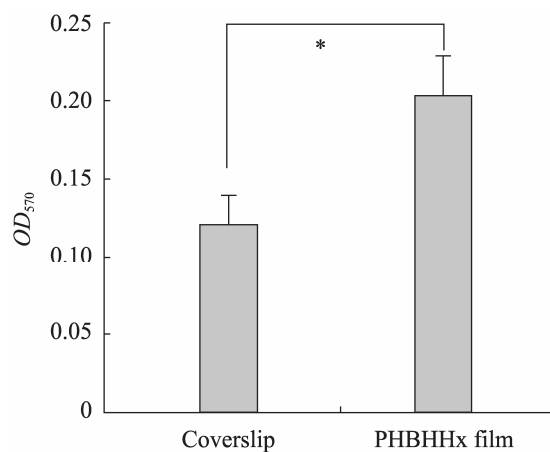


图 4 在改性的 PHBHHx 膜表面贴附生长的 NSCs 活力

Fig. 4 NSCs viability on the surface of modified PHBHHx films.

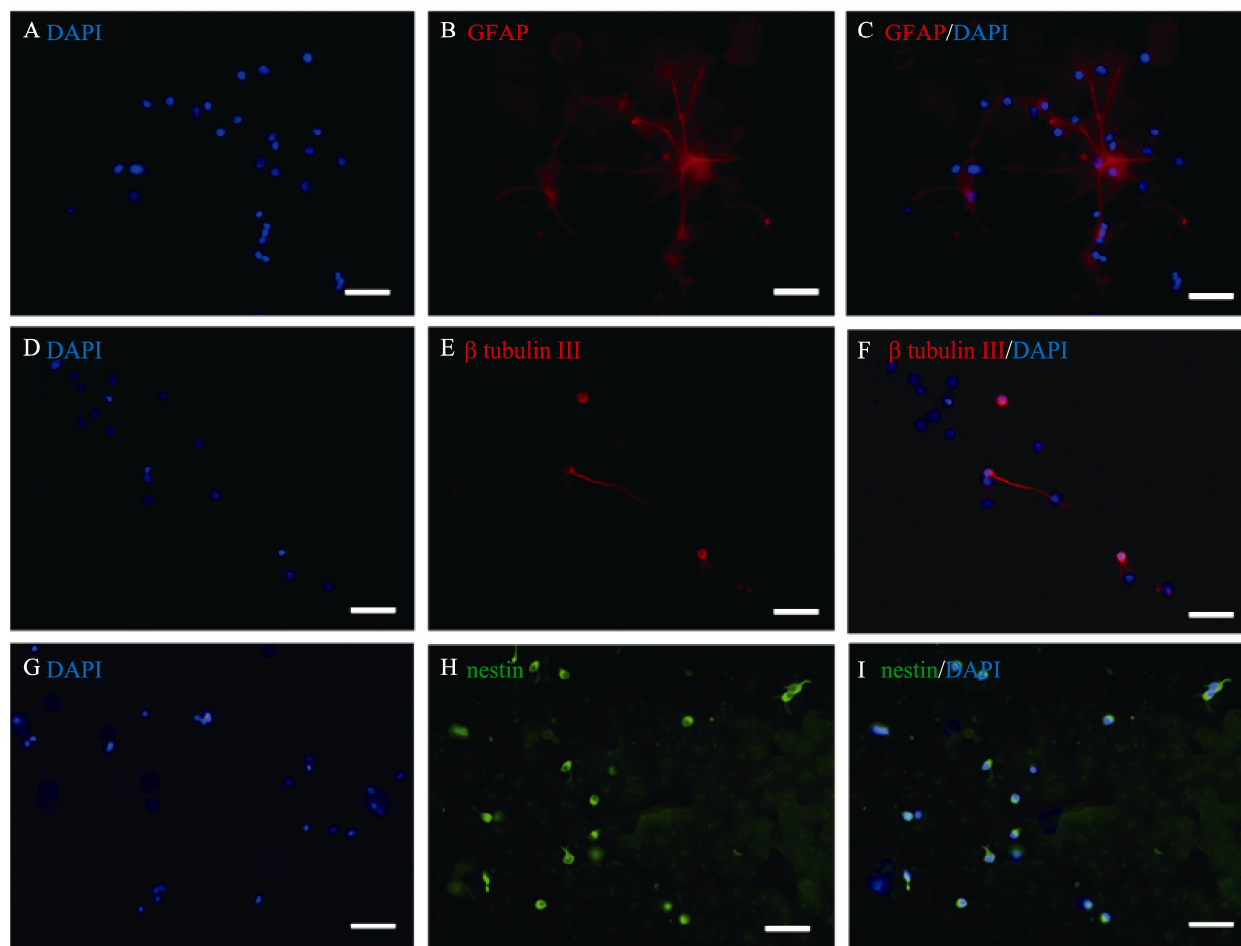


图5 NSCs在改性PHBHHx膜表面的分化情况

Fig. 5 Differentiation of NSCs on the surface of PHBHHx films. DAPI was in blue, nestin was in green, GFAP and  $\beta$ -tubulin III were in red. Scale bar=50  $\mu$ m.

状态;而在盖玻片上培养的细胞则有约90%的细胞发生不同方向的分化(图6),相对来讲,分化为 $\beta$  tubulin III阳性神经元和GFAP阳性细胞胶质细胞的比例(1.37)明显低于其在PHBHHx膜上的分化(2.14)。

### 3 讨论

生物可降解聚合物材料是组织工程学材料研究中最活跃的领域<sup>[37]</sup>。PHA家族是近年来在

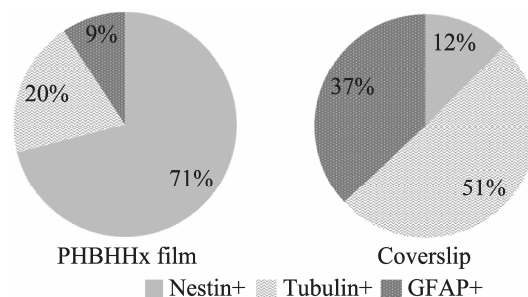


图6 NSCs在改性后PHBHHx表面分化比例

Fig. 6 Differentiation of NSCs on PHBHHx films.

组织工程中被广泛关注的新型生物材料<sup>[19,26]</sup>,由于各种 PHA 材料单体组成的不同,其机械性能和生物相容性也有很大差异。PHBHHx 是 PHA 家族中具有很好生物相容性的一员,由于其主链含有短链的 3-羟基丁酸单体和中长链的 3-羟基己酸单体,其机械性能和可加工性能均优于只含有短链单体的 PHA 材料,如聚羟基丁酸酯 (Polyhydroxybutyrate, PHB) 和羟基丁酸-羟基戊酸共聚酯 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV)。但由于 PHBHHx 的聚酯性质,其表面疏水性仍比较强,不利于细胞的贴附<sup>[29]</sup>。Zhao 等采用 NaOH 和脂肪酶分别处理 PHB 膜,结果显示脂肪酶处理能够显著改善 PHB 膜表面与成纤维细胞的生物相容性,NaOH 处理对 PHB 生物相容性的改善不明显<sup>[38-39]</sup>。本实验中以碱 (NaOH) 和脂肪酶对 PHBHHx 膜表面进行处理,结果显示两种处理方式都可以通过打断 PHA 材料主链中的酯键,增加被处理表面的羟基和羧基含量,从而提高 PHBHHx 膜表面的亲水性。扫描电镜的结果提示 NaOH 处理后 PHBHHx 膜表面出现很多细小的微孔,膜表面粗糙程度增加,最终促进了细胞在膜表面的贴附和生长。其中单纯的 NaOH 处理效果更为显著,而且处理方法简单,成本低廉,耗时较短,因此不失为一种简便而有效的 PHBHHx 膜表面改性手段。

NSCs 联合生物材料移植治疗神经损伤已成为神经损伤修复以及功能重建领域新的热点。作为可用于促进神经损伤修复的生物材料,必须与其负载细胞 NSCs 有良好的相容性,既不产生细胞毒性,也不影响细胞功能。PHA 家族中多个成

员,包括 PHB, PHBHHx 和 PHBVHHx 均被尝试用于中枢及外周神经的支架材料<sup>[27-28,40-42]</sup>,其中 PHBHHx 材料显示出与神经干细胞、神经胶质细胞的良好生物相容性<sup>[27]</sup>。最近, Xu 等<sup>[27-28]</sup>的研究表明 PHBHHx 作为 NSCs 体外培养支架材料具有低细胞毒性、与 NSCs 有很好的相容性,并能够诱导 NSCs 向神经元方向分化。本研究结果提示,对 PHBHHx 膜表面的改性处理可以增加 NSCs 在其表面的贴附生长,而且 NSCs 活力明显高于玻璃片表面,细胞保持其原有的多向分化能力;在发生分化的细胞中以  $\beta$  tubulin III 阳性的神经元为主,这与 Xu 等报道的研究结果一致。除此之外,本研究还通过降低培养体系中的血清浓度, (由 Xu 等采用的 10% FBS 降至 1%), 能够更好地保留 NSCs 原有的增殖能力,使大约 70% 的细胞仍处于 nestin 阳性的未分化状态,这部分细胞能够在体内外进一步增殖,一方面为获得足量的移植细胞提供了保证,同时也为其在体内分化成“神经功能重建所需的特定细胞类型”奠定了基础。

本研究通过采用 NaOH 对 PHBHHx 膜进行表面处理,增加了 PHBHHx 膜表面亲水性和与神经干细胞的生物相容性,促进 NSCs 的贴附生长;在合适的培养条件下, NSCs 在 PHBHHx 表面不仅可以很好的存活,而且能够保持持久的增殖能力和多向分化能力。以上结果进一步提示 PHBHHx 是一种非常有潜力的中枢神经系统组织工程支架材料和神经干细胞移植的细胞载体材料,在神经损伤修复和功能重建方面有非常广泛的应用前景。

## REFERENCES

- [1] Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, et al. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(4): 668–676.
- [2] Mochizuki N, Moriyama Y, Takagi N, et al. Intravenous injection of neural progenitor cells improves cerebral ischemia-induced learning dysfunction. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(2): 260–265.
- [3] Thonhoff JR, Lou DI, Jordan PM, et al. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials *in vitro*. *Brain Res*, 2008, 1187: 42–51.
- [4] Arias-Carrion O, Yuan TF. Autologous neural stem cell transplantation: a new treatment option for Parkinson's disease? *Medical Hypoth*, 2009, 73(5): 757–759.
- [5] Lepore AC, Fischer I. Lineage-restricted neural precursors survive, migrate, and differentiate following transplantation into the injured adult spinal cord. *Exper Neurol*, 2005, 194(1): 230–242.
- [6] Lepore AC, Neuhuber B, Connors TM, et al. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS. *Neuroscience*, 2006, 142(1): 287–304.
- [7] Lepore AC, Han SSW, Tyler-Polsz CJ, et al. Differential fate of multipotent and lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult CNS. *Neuron Glia Biol*, 2004, 1(2): 113–126.
- [8] Wang D, Zhang JJ, Ma JJ, et al. Neural stem cell transplantation with Nogo-66 receptor gene silencing to treat severe traumatic brain injury. *Neural Regeneration Res*, 2011, 6(10): 725–731.
- [9] Shi Y, Zhou L, Tian J, et al. Transplantation of neural stem cells overexpressing glia-derived neurotrophic factor promotes facial nerve regeneration. *Acta Oto-Laryngol*, 2009, 129(8): 906–914.
- [10] Lee SI, Kim BG, Hwang DH, et al. Overexpression of bcl-X(L) in Human neural stem cells promotes graft survival and functional recovery following transplantation in spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 2009, 87(14): 3186–3197.
- [11] Zhang Y, Zhu C, Tao Y, et al. Differentiation of fetal rat neural stem cells into neurons induced by brain-derived neurotrophic factor. *J Clinical Rehab Tissue Eng Res*, 2008, 12(51): 10073–10076.
- [12] Yu HW, Cao B, Feng MY, et al. Combined transplantation of neural stem cells and collagen type I promote functional recovery after cerebral ischemia in rats. *Anat Rec*, 2010, 293(5): 911–917.
- [13] Cholas RH, Hsu HP, Spector M. The reparative response to cross-linked collagen-based scaffolds in a rat spinal cord gap model. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2050–2059.
- [14] Hansen K, Mueller FJ, Messing M, et al. A 3-dimensional extracellular matrix as a delivery system for the transplantation of glioma-targeting neural stem/progenitor cells. *Neuro Oncol*, 2010, 12(7): 645–654.
- [15] Wang YS, Zhou CW, Yao M, et al. Biodegradable parallel and porous HSPG/collagen scaffolds for the *in vitro* culture of NSCs for the spinal cord tissue engineering. *J Porous Materials*, 2012, 19(2): 173–180.
- [16] Shen CC, Yang YC, Liu BS. Peripheral nerve repair of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in a biodegradable reinforced nerve conduit. *J Biom Materials Res Part A*, 2012, 100A(1): 48–63.
- [17] Wang W, Lin JH, Tsai CC, et al. Biodegradable glutaraldehyde-crosslinked casein conduit promotes regeneration after peripheral nerve injury in adult rats. *Macromol Biosci*, 2011, 11(7): 914–926.
- [18] Wu Q, Wang Y, Chen GQ. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artif Cells Blood Substit Biotechnol*, 2009, 37(1): 906–914.

- 1–12.
- [19] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 2005, 26(33): 6565–6578.
- [20] Zhao K, Deng Y, Chen JC, et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, 2003, 24(6): 1041–1045.
- [21] Wang YW, Wu Q, Chen GQ. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. *Biomaterials*, 2004, 25(4): 669–675.
- [22] Wang Y, Bian YZ, Wu Q, et al. Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*, 2008, 29(19): 2858–2868.
- [23] Wu S, Liu Y, Tang Y, et al. Intravascular biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2011, 15(38): 7066–7070.
- [24] Zhou J, Peng SW, Wang YY, et al. The use of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tarsal repair in eyelid reconstruction in the rat. *Biomaterials*, 2010, 31(29): 7512–7518.
- [25] Qu XH, Wu Q, Chen GQ. *In vitro* study on hemocompatibility and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *J Biomater Sci*, 2006, 17(10): 1107–1121.
- [26] Chen GQ, Wu Q, Wang YW, et al. Application of microbial polyesters-polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Key Eng Mater*, 2005, 288/289: 437–440.
- [27] Bian YZ, Wang Y, Aibaidoula G, et al. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 2009, 30(2): 217–225.
- [28] Xu XY, Li XT, Peng SW, et al. The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 3967–3975.
- [29] Shen F, Zhang E, Wei ZJ. *In vitro* blood compatibility of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) and the influence of surface modification by alkali treatment. *Materials Sci Engineering C*, 2010, 30(3): 369–375.
- [30] Shangguan YY, Wang YW, Wu Q, et al. The mechanical properties and *in vitro* biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials*, 2006, 27(11): 2349–2357.
- [31] Sun M, Zhou P, Pan LF, et al. Enhanced cell affinity of the silk fibroin-modified PHBHHx material. *J Mater Sci Mater in Med*, 2009, 20(8): 1743–1751.
- [32] Li XT, Sun J, Chen S, et al. *In vitro* investigation of maleated poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for its biocompatibility to mouse fibroblast L929 and human microvascular endothelial cells. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 87A(3): 832–842.
- [33] Zheng Z, Bei FF, Tian HL, et al. Effects of crystallization of polyhydroxyalkanoate blend on surface physicochemical properties and interactions with rabbit articular cartilage chondrocytes. *Biomaterials*, 2005, 26(17): 3537–3548.
- [34] Xuerong FAN, Liuliu SU, Qiang W, et al. Modification of polylactic acid fibers with lipases. *J Textile Res*, 2009, 30(3): 58.
- [35] Lu H, Liu Y, Li M, et al. Isolation, culture and identification of neural stem cells in rats. *J Xi'an Jiaotong Univ*, 2002, 23(5): 428.
- [36] Zhang P, Li W, Gao M, et al. Culture and identification of neural stem cells from mouse embryos. *Chin J Contemp Pediatrics*, 2011, 13(3): 244–247.
- [37] Wu S, Liu Y, Cui B, et al. Intravascular

- biocompatibility of decellularized xenogenic vascular scaffolds/PHBHHx hybrid material for cardiovascular tissue engineering. *Chin J Biotech*, 2008, 24(4): 610–616.
- 吴松, 刘迎龙, 崔彬, 等. 3-羟基丁酸与 3-羟基己酸共聚酯在心血管组织工程中的应用. *生物工程学报*, 2008, 24(4): 610–616.
- [38] Zhao K, Yang X, Chen GQ, et al. Effect of lipase treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. *J Materials Sci Mater Med*, 2002, 13(9): 849–854.
- [39] Yang XS, Zhao K, Chen GQ. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials*, 2002, 23(5): 1391–1397.
- [40] Wang L, Wang ZH, Shen CY, et al. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. *Biomaterials*, 2010, 31(7): 1691–1698.
- [41] Chen WH, Tong YW. PHBV microspheres as neural tissue engineering scaffold support neuronal cell growth and axon-dendrite polarization. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8(2): 540–548.
- [42] Novikova LN, Pettersson J, Brohlin M, et al. Biodegradable poly-beta-hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair. *Biomaterials*, 2008, 29(9): 1198–1206.