

# 大鼠心肌细胞 H9C2 多元复合支架的制备及优选

刘婕<sup>1</sup> 刘旭<sup>1</sup> 朱小奕<sup>2</sup>

(1 青岛大学附属医院心血管外科, 山东 青岛 266003; 2 青岛大学环境科学与工程学院)

**[摘要]** **目的** 制备大鼠心肌细胞 H9C2 的聚己内酯(PCL)/壳聚糖(CS)多元复合支架,并优选有利于 H9C2 细胞生长的支架。**方法** 通过静电纺丝法制备 PCL/CS 支架(支架 A)、PCL/CS/氧化锌(ZnO)支架(支架 B)、PCL/CS/ZnO/碳纳米管(CNTs)支架(支架 C)三种多元复合支架,采用 X 射线衍射(XRD)、傅里叶红外光谱(FT-IR)、热重分析(TG)、拉曼光谱测试等方法验证支架制备是否成功,采用电镜观察及拉伸应力、水接触角、电导率、膨胀率检测等方法评估三种支架的理化特性,采用 DAPI 染色、电镜观察、CCK-8 实验等方法评估三种支架的生物相容性。**结果** XRD、FTIR、TG、拉曼光谱测试结果显示三种支架制备成功。电镜观察结果显示支架 C 的纤维直径显著长于支架 A、B( $F=73.050, t=8.724, 9.747, P<0.05$ );拉伸应力测试结果显示支架 B 的拉伸应力显著高于支架 A、C( $F=13.833, t=3.641, 3.802, P<0.05$ );水接触角检测结果显示三种支架皆亲水;电导率测试结果显示支架 B、C 的电导率显著高于支架 A( $F=798.780, t=32.155, 30.048, P<0.05$ );膨胀率测试结果显示,在 PBS 缓冲液中浸泡后,支架 A 第 5 小时膨胀率显著高于第 0.5 小时( $F_{\text{组内}}=53.103, P<0.05$ ),支架 C 在第 2~5 小时中各时间点膨胀率显著高于第 0.5 小时( $F_{\text{组内}}=103.748, P<0.05$ );在第 0.5~4 小时中各时间点,支架 A 膨胀率显著高于支架 B、C,在第 0.5~2 小时中各时间点,支架 B 膨胀率显著高于支架 C( $F_{\text{组间}}=35.226\sim 162.448, P<0.05$ )。DAPI 染色及电镜图像结果显示,在三种支架上培养 96 h 以后,支架 B、C 表面 H9C2 细胞数量较支架 A 增多。CCK-8 实验结果显示,支架 A、B、C 表面 H9C2 细胞在第 18 小时~第 5 天中各时间点的吸光度值均显著高于第 12 小时( $F_{\text{组内}}=37.159\sim 67.083, P<0.05$ );在第 12 小时~第 5 天各时间点,支架 C 表面 H9C2 细胞的吸光度值均显著高于支架 A、B( $F_{\text{组间}}=26.039\sim 80.994, P<0.05$ )。**结论** 大鼠心肌细胞 H9C2 的多元复合支架符合细胞外基质特征,能够支持心肌细胞生长,其中 PCL/CS/ZnO/CNTs 支架显示出较高的生物相容性,比纯 PCL/CS 支架在心脏组织工程中更具应用潜力。

**[关键词]** 羧甲基纤维素钠;壳聚糖;细胞外基质;组织工程;组织支架;肌细胞;心脏

**[中图分类号]** R318.1;R605

**[文献标志码]** A

## Preparation and optimization of composite scaffolds for rat H9C2 cardiomyocytes LIU Jie, LIU Xu,

ZHU Xiaoyi (Department of Cardiovascular Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To prepare composite scaffolds for rat H9C2 cardiomyocytes, and to optimize the scaffolds that facilitate the growth of H9C2 cardiomyocytes. **Methods** The electrospinning method was used to prepare three types of composite scaffolds, i.e., polycaprolactone (PCL)/chitosan (CS) scaffold (scaffold A), PCL/CS/zinc oxide (ZnO) scaffold (scaffold B), and PCL/CS/ZnO/carbon nanotubes (CNTs) scaffold (scaffold C), and the preparation of scaffolds was verified by the methods including X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, thermogravimetric (TG) analysis, and Raman spectroscopy. Electron microscopy and tensile stress, water contact angle, conductivity, and expansion rate tests were used to evaluate the physical and chemical properties of the three types of scaffolds, and DAPI staining, electron microscopy, and CCK-8 assay were used to evaluate the biocompatibility of the three types of scaffolds. **Results** XRD, FTIR spectroscopy, TG analysis, and Raman spectroscopy showed that the three types of scaffolds were successfully prepared. Electron microscopy showed that scaffold C had a significantly longer fiber diameter than scaffold A ( $F=73.050, t=8.724, 9.747, P<0.05$ ). The tensile stress test showed that scaffold B had a significantly higher tensile stress than scaffolds A and C ( $F=13.833, t=3.641, 3.802, P<0.05$ ). The water contact angle test showed that all three types of scaffolds were hydrophilic. The conductivity test showed that scaffolds B and C had a significantly higher conductivity than scaffold A ( $F=798.780, t=32.155, 30.048, P<0.05$ ). The expansion rate test showed that for scaffold A, the expansion rate at 5 h after immersed in PBS buffer was significantly higher than that at 0.5 h ( $F_{\text{intra-group}}=53.103, P<0.05$ ), and for scaffold C, the expansion rate at 2~5 h was significantly higher than that at 0.5 h ( $F_{\text{intra-group}}=103.748, P<0.05$ ); at each time point of 0.5~4 h, scaffold A had a significantly higher expansion rate than scaffolds B and C, and at each time point from 0.5 to 2 h, scaffold B had a significantly higher expansion rate than scaffold C ( $F_{\text{inter-group}}=35.226\sim 162.448, P<0.05$ ). DAPI staining and electron microscopy images showed that after the culture of H9C2 cardiomyocytes on the three types of scaffolds for 96 h, scaffolds B and C had a significant increase in the number of H9C2 cardiomyocytes compared with scaffold A.

CCK-8 assay showed that the absorbance values of H9C2 on scaffolds A, B, and C at each time point from 18 h to 5 days were significantly higher than those at 12 h ( $F_{\text{intra-group}}=37.159\sim 67.083$ ,

**[收稿日期]** 2024-02-27; **[修订日期]** 2024-06-12

**[通讯作者]** 刘旭, Email: peterxuxu@126.com; 朱小奕,

Email: xyzhu@qdu.edu.cn

$P < 0.05$ ), and at each time point from 12 h to 5 days, H9C2 on scaffold C had a significantly higher absorbance value than scaffolds A and B ( $F_{\text{inter-group}} = 26.039 - 80.994, P < 0.05$ ). **Conclusion** The composite scaffolds for rat H9C2 cardiomyocytes conform to the characteristics of extracellular matrix and can support the growth of cardiomyocytes, among which PCL/CS/ZnO/CNTs scaffolds show relatively high biocompatibility and have a greater potential than PCL/CS scaffolds in cardiac tissue engineering.

**[KEY WORDS]** Carboxymethylcellulose sodium; Chitosan; Extracellular matrix; Tissue engineering; Tissue scaffolds; Myocytes cardiac

心脏移植是目前临床治疗心脏衰竭的最终手段,但因其供体有限无法在临床上得到广泛应用。心脏组织工程(CTE)集合了生物学、材料科学和医学等学科的技术,是一种很有前途的治疗心功能受损的手段,其开发的用于重建心脏组织功能的替代品由种子细胞、生物材料和生物活性因子组成。心肌细胞可以播种于由生物材料组成的支架中,该支架为体外形成心肌组织提供了必要的微环境。然而,能够模拟心肌机电耦合能力的理想细胞支架目前较少<sup>[1]</sup>,如何较好地构建出符合心肌细胞外基质电生理特性的细胞支架已成为目前研究热点。本研究通过添加导电物质氧化锌(ZnO)纳米颗粒、碳纳米管(CNTs),使用静电纺丝法合成了基于聚己内酯(PCL)/壳聚糖(CS)的多元复合纳米纤维支架,验证并比较所制备支架的理化特性和生物相容性,优选更符合心肌细胞外基质特征的大鼠心肌细胞系 H9C2 多元复合支架,为心脏组织工程支架的应用提供新选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

PCL 购自上海麦克林生化科技有限公司,ZnO 购买于上海西格玛奥德里奇贸易有限公司,CS、CNTs、甲酸、乙醇购自上海国药集团化学试剂有限公司,乙酸购自北京西美杰科技有限公司,DAPI、FITC-鬼笔环肽购自上海碧云天生物技术股份有限公司,青霉素-链霉素溶液、胎牛血清、多聚甲醛、PBS 缓冲液、大鼠心肌细胞系 H9C2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,CCK-8 实验试剂盒购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.2 PCL/CS 多元复合支架的制备及验证

向 3.5 mL 99.5%甲酸和 1.5 mL 88.0%乙酸的混合物中加入 0.8 g PCL 和 0.1 g CS 搅拌过夜,得到的溶液转移到 5 mL 一次性注射器中,放入静电纺丝机当中进行静电纺丝(在转速为 220 r/min、22 °C、相对湿度 35%的条件下持续进行 8 h,施加电压 17 kV,流量 0.1 mL/h,针距 10 cm),制备出 PCL/CS 支架(支架 A);向同样的甲酸、乙酸混合物

中加入 0.8 g PCL、0.1 g CS 和 0.05 g ZnO,搅拌过夜后通过静电纺丝机制备出 PCL/CS/ZnO 支架(支架 B);再向同样的甲酸、乙酸混合物中加入 0.8 g PCL、0.1 g CS 和 0.05 g CNTs,搅拌过夜后通过静电纺丝机制备出 PCL/CS/ZnO/CNTs 支架(支架 C)。采用 X 射线衍射(XRD)测试<sup>[2]</sup>、傅里叶红外光谱(FTIR)测试<sup>[3]</sup>、热重分析(TG)测试<sup>[4]</sup>、拉曼光谱测试<sup>[5]</sup>验证三种支架的组成及物质结构。

### 1.3 三种支架的理化特征评估

**1.3.1 扫描电子显微镜(SEM)观察支架纤维结构** 取三种支架喷金,用 SEM(JEM-2100F)在 10 kV 下对三种支架的纤维形貌进行观察,保存 SEM 图像并用 Image J 软件分析支架的纤维结构。

**1.3.2 支架的拉伸应力测试** 取三种支架,分别切成 5 cm×1 cm 大小的矩形碎片,放置在电子万能试验机(CMT6103)的夹具中,以 2 mm/min 的延伸速度纵向拉伸直至失效,将得到的数据用 Origin 软件进行分析,得出支架的拉伸应力。

**1.3.3 支架的水接触角测试** 取三种支架分别固定在载玻片上,向表面加入 3 μL 去离子水,待液滴平衡 3 s 后,使用水接触角分析仪(SCD200)测量水接触角。

**1.3.4 支架的电导率测试** 取三种支架,使用超高电阻测量仪(ST2643)在待测支架上设置三个电极,通过电流探头输入机器自动调节电流,同时在探头间测量电压,得到电阻率数据,取其倒数得到支架电导率。

**1.3.5 支架的膨胀率测定** 取三种支架测量其干质量,将支架在 PBS 缓冲液中浸泡 0.5 h 后取出,用滤纸吸除支架表面多余的水分后,立即测量支架的质量。重复上述实验,PBS 缓冲液中浸泡时间分别改为 1、2、3、4、5 h,其他步骤同前。支架各时间点的膨胀率通过相关公式<sup>[6]</sup>计算得到。

**1.3.6 支架的孔隙率测定** 将三种支架在 25 °C 的真空烘箱当中放置 24 h 以后,称重,再在体积分数 0.999 的乙醇中浸泡 24 h 以后,再次称重,静置挥发去除乙醇后再称重一次。支架的孔隙率根据相关公式<sup>[7]</sup>计算得到。

### 1.4 大鼠心肌细胞 H9C2 在支架上黏附情况评估

将大鼠 H9C2 心肌细胞加入含质量分数 0.1 胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 kU/L 链霉素的培养基中,置于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。当细胞融合率约达 90% 时,以 1:2 的比例传代一次,随后分别将 10 000 个细胞接种到表面积为 1 cm<sup>2</sup> 的三种支架上。分别在 48、96 h 以后用 4% 多聚甲醛固定支架上的细胞,再用 DAPI 染色,使用荧光显微镜(尼康 A1R MP)观察并拍摄细胞图像。取培养 96 h 后用 4% 多聚甲醛固定的细胞,依次用体积分数 0.30、0.50、0.70、0.80、0.90、0.95、1.00 的乙醇溶液<sup>[8]</sup> 对其进行洗脱,使用 SEM 观察并拍摄细胞图像。

### 1.5 大鼠心肌细胞 H9C2 在支架上面的增殖能力评估

将三种支架置于 96 孔培养板中,并加入大鼠 H9C2 心肌细胞,置于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 0.5 h,每孔中加入 CCK-8 溶液 10 μL,孵育 1~4 h。重复上述实验,将细胞在培养箱中培养的时间分别改为 12 h、18 h 及 1、3、5、7 d,其他步骤同前。使用酶标仪测量各孔溶液在波长 450 nm 处的吸光度值,以吸光度值代表细胞的增殖能力。

### 1.6 统计学分析

使用 SPSS 25.0 对数据进行统计学分析。每个实验重复进行 3 次,结果取均值。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析或者重复测量设计的方差分析,两两比较则采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

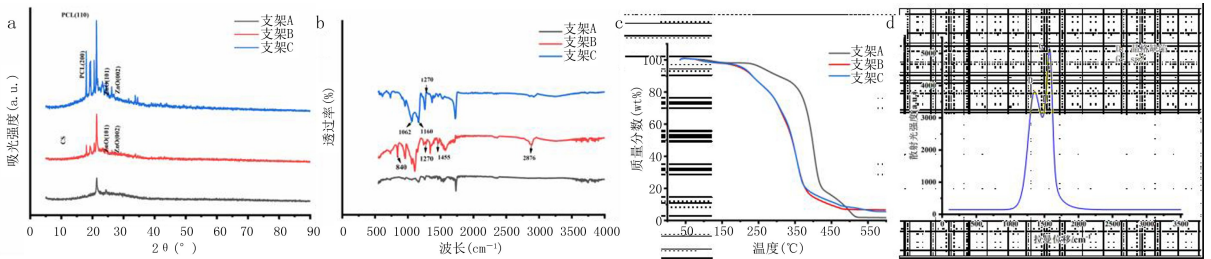
### 2.1 三种支架制备成功验证

XRD、FTIR 检测结果显示,PCL 和 CS 在三种支架中均存在,ZnO 在支架 B 中存在,ZnO、CNTs 在支架 C 中存在(图 1a、b);TG 检测结果显示,支架 B 中 ZnO 含量约为 6%,支架 C 中 CNTs 含量约为 5%(图 1c);拉曼光谱检测结果显示,支架 C 当中 CNTs 的结构缺陷和杂质含量均较少(图 1d)。

### 2.2 三种支架的理化特征比较

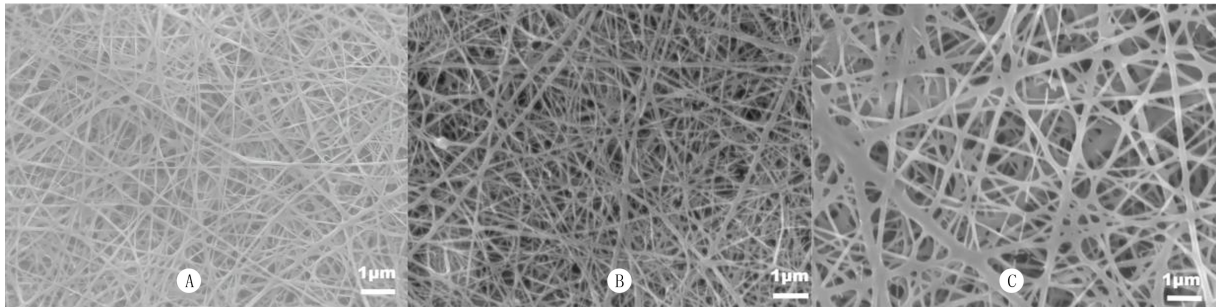
#### 2.2.1 SEM 观察支架纤维结构

SEM 图像显示,三种支架的静电纺丝纤维排布取向随机,相互连接,无明显液滴,支架 A、B、C 的平均纤维直径分别为  $(65.9 \pm 1.4)$ 、 $(62.6 \pm 3.5)$  和  $(118.6 \pm 4.3)$  nm,支架 C 的纤维直径显著长于支架 A、B ( $F = 73.050, t = 8.724, 9.747, P < 0.05$ )。见图 2。



a~c 分别为三种支架的 XRD 图、FTIR 图及 TG 图,d: 支架 C 的拉曼光谱

图 1 三种支架的 XRD、FTIR、TG 图和拉曼光谱检测结果



A~C 为支架 A~C 的静电纺丝纤维排布

图 2 三种支架扫描电镜图像(10 000 倍)

#### 2.2.2 三种支架拉伸应力比较

支架 A、B、C 的拉伸应力分别为  $(0.220 \pm 0.078)$ 、 $(4.310 \pm 1.120)$  和  $(0.040 \pm 0.020)$  MPa,三种支架的拉伸应力比较差

异显著,支架 B 的拉伸应力显著高于支架 A、C ( $F = 13.833, t = 3.641, 3.802, P < 0.05$ )。

#### 2.2.3 三种支架水接触角测试结果

支架 A、B、C

水接触角分别为 60.5°、76.1°、0°，表明支架皆亲水。

**2.2.4 三种支架电导率比较** 支架 A、B、C 的电导率分别为  $(0.404 \pm 0.016) \times 10^{-10}$ 、 $(0.079 \pm 0.025)$ 、 $(0.019 \pm 0.062)$  S/m，支架 B、C 的电导率均显著性高于支架 A ( $F = 798.780, t = 32.155, 30.048, P < 0.05$ )。

**2.2.5 三种支架膨胀率比较** 重复测量设计的方差分析结果显示，时间、支架类型及其交互作用均对支架的膨胀率具有显著性的影响 ( $F_{\text{时间}} = 118.110, F_{\text{支架类型}} = 112.327, F_{\text{交互}} = 30.237, P < 0.05$ )。单独效应结果显示，支架 A 浸泡于 PBS 缓冲液后第 5 小时的膨胀率显著高于第 0.5 小时 ( $F_{\text{组内}} = 53.103, P < 0.05$ )，支架 C 浸泡于 PBS 缓冲液后第 2~5 小时中各时间点膨胀率均显著性高于第 0.5 小时 ( $F_{\text{组内}} = 103.748, P < 0.05$ )；在第 0.5~4 小时中各时间点，支架 A 的膨胀率显著高于支架 B、C，在第 0.5~2 小时中各时间点，支架 B 膨胀率显著高于支架 C ( $F_{\text{组间}} = 35.226 \sim 162.448, P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2.6 三种支架孔隙率比较** 支架 A、B、C 的孔隙率分别为  $(99.011 \pm 8.610)\%$ 、 $(93.376 \pm 9.870)\%$ 、 $(94.418 \pm 3.700)\%$ ，各支架孔隙率均高于 90%，但

三种支架间比较无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

**2.3 三种支架上大鼠心肌细胞 H9C2 的黏附能力评估**

DAPI 染色结果表明，与支架 B、C 相比，支架 A 表面 H9C2 黏附数量有限。SEM 图像显示，在三种支架上培养至第 96 小时时，支架 B、C 表面 H9C2 黏附数量较支架 A 增多(图 3)，黏附的细胞不仅覆盖在纳米纤维表面，而且穿支支架的孔隙，支架 C 上的细胞几乎扩散到整个生物支架上。

**2.4 三种支架上大鼠心肌细胞 H9C2 的增殖能力评估**

重复测量设计的方差分析结果显示，时间、支架类型及其交互作用均对 H9C2 细胞吸光度值有显著影响 ( $F_{\text{时间}} = 139.357, F_{\text{支架类型}} = 38.762, F_{\text{交互}} = 12.542, P < 0.05$ )。单独效应结果显示，支架 A、B、C 表面的 H9C2 细胞在第 18 小时~第 5 天中各时间点的吸光度值均显著性高于第 12 小时 ( $F_{\text{组内}} = 37.159 \sim 67.083, P < 0.05$ )；在第 12 小时~第 5 天中各时间点，支架 C 表面 H9C2 细胞的吸光度值均显著高于支架 A、B ( $F_{\text{组间}} = 26.039 \sim 80.994, P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 三种支架各时间点膨胀率比较 ( $\chi/\%, n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 0.5 小时	第 1 小时	第 2 小时	第 3 小时	第 4 小时	第 5 小时
支架 A	1.900±0.102	2.036±0.077	2.037±0.070	2.157±0.057	2.215±0.060	2.430±0.068
支架 B	1.398±0.045	1.444±0.028	1.502±0.038	1.579±0.075	1.624±0.057	1.773±0.083
支架 C	0.692±0.047	0.789±0.020	1.094±0.053	1.570±0.028	1.651±0.039	2.388±0.059

表 2 三种支架上大鼠心肌细胞 H9C2 各时间点增殖能力比较 ( $A, n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 12 小时	第 18 小时	第 1 天	第 3 天	第 5 天
支架 A	0.378±0.012	0.527±0.019	0.557±0.029	0.742±0.024	0.843±0.026
支架 B	0.415±0.022	0.560±0.019	0.661±0.044	0.894±0.021	1.061±0.032
支架 C	0.650±0.002	0.820±0.036	0.930±0.025	1.031±0.024	1.178±0.031

### 3 讨 论

心脏组织工程的发展为体外构建人体组织及器官带来了希望，其中心脏组织生物支架为受损心肌的功能修复提供了可能。适用于心脏组织工程的生物支架应具备良好的生物相容性、三维网状结构和导电性等特征，上述特征对于刺激心肌细胞的黏附和增殖至关重要。

本研究拉伸应力测试结果显示，支架 B 的拉伸应力显著高于支架 A、C。PCL 可使支架在拉伸应力下延展良好，而 CS 较高的带电基团水平提高了支架的断裂强度，支架 B 拉伸应力的增强可归因于

ZnO 在支架纤维结构中的有效分散及其自身界面的相互作用<sup>[9-10]</sup>，而支架 C 应力较低可能是由于 CNTs 团聚阻碍了 ZnO 的分散，使支架力学性能表现较差<sup>[11]</sup>。既往研究表明，应力强度较小的支架更能模拟早期心肌组织的机械微环境，促进心肌细胞某些功能的成熟<sup>[12]</sup>，因此支架 A、C 比 B 更符合理想的心肌组织模拟生长基质环境。本研究水接触角测试结果表明支架 C 的亲水性更高，可能是因为 CNTs 具有亲水性基团，如羧基基团<sup>[13]</sup>，而支架的亲水性增加会促进细胞对支架的黏附<sup>[14]</sup>。SEM 镜下支架 C 的纤维直径变大，可能是由于外加场强和溶液的黏性增加，致使纺丝液射流不稳定引起的<sup>[15]</sup>。



图 3 三种支架的 SEM 图像(箭头处为细胞)

支架纤维直径增大可致拉伸应力降低,更有利于心肌细胞生长。高孔隙率有利于支架中空气和水分的渗透,本研究三种支架的孔隙率均大于 90%。天然心肌组织具有一定电导率<sup>[16]</sup>,本研究支架 A 几乎不导电,导电性材料 ZnO 和 CNTs 的添加使支架 B、C 更适用于心脏组织工程。支架的高膨胀率会导致植入物松动,并对周围组织和微环境造成压力<sup>[17]</sup>。支架在 PBS 溶液中浸泡过久会导致其崩解,从而影响支架的膨胀率。为更好地测量支架的膨胀率,本研究在 PBS 溶液浸泡支架 0.5~5 h 内观察支架膨胀率,结果显示在第 0.5~4 小时中各时间点,支架 A 膨胀率显著高于支架 B、C,在第 0.5~2 小时中各时间点,支架 B 膨胀率显著高于支架 C。ZnO、CNTs 的加入使支架的膨胀率变低,有利于支架微结构的维持。本研究中含有 CNTs 成分的支架 C 在维持体内形状、支持组织发育和承受体内各向应力方面更能满足心脏组织工程的需要<sup>[18]</sup>。另外,高孔隙率的支架能为细胞在支架上的迁移和增殖提供充足机会,也保障了支架的保水能力,为细胞的初始生长和生物活性分子的持续释放创造了合适环境。本研究中三种支架的孔隙率均大于 90%,并且支架间无显著差异。

为评估支架表面生物相容性,本研究将大鼠心肌细胞 H9C2 孵育 48、96 h 后,通过 DAPI 染色和 SEM 图像观察细胞的附着情况,发现支架 C 显著改善了细胞在支架上的黏附密度及范围,ZnO、CNTs 的加入明显补偿了支架 A 低生物活性的缺陷。已有研究表明,ZnO 可以刺激血管及骨组织形成,加速器官修复<sup>[19-20]</sup>,CNTs 也有利于促进组织再生及强化<sup>[21]</sup>。为进一步观察三种支架上的细胞增殖情况,本研究检测了 H9C2 在支架上孵育第 12、18 小时及第 1、3、5 天时的吸光度值,结果表明三种支架上细胞增殖强度均随时间处长而增高,且各时间点支架 C 上的细胞增殖强度均显著高于支架 A、B。心肌细胞 H9C2 在支架 C 上表现出良好的生长潜力,分析原因,可能是由于 CNTs 增加了细胞黏附的位点<sup>[22]</sup>,为大鼠心肌细胞的培养提供了更合适的微环境。

本研究存在的一定的局限性。首先,本研究检测出添加了 ZnO、CNTs 的复合支架具有导电性,但心肌细胞在支架上生长行为的改善与导电性增加间关系仍待进一步深入研究;另外,本研究对支架上细胞生长行为的研究时间有限,所获结果可能不适用于评估更长研究时间内支架上细胞的生长情况。

综上所述,本研究成功制备了包含 ZnO、CNTs 成分的用于心脏组织工程的 PCL/CS 多元复合支架。其中,PCL/CS/ZnO/CNTs 支架表现出优越的微观结构,具有与心肌细胞外基质较符合的电生理特性,更能促进大鼠心肌细胞黏附和增殖,为体外构建心脏组织提供了一定实验基础。

**作者声明:**所有作者均参与了研究设计、论文的写作及修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

### [参考文献]

- [1] GOMES M R, CASTELO FERREIRA F, SANJUAN-ALBERTE P. Electrospun piezoelectric scaffolds for cardiac tissue engineering[J]. *Biomater Adv*, 2022,137:212808.
- [2] RAKHMANOVA A, KALYBEKKYZY S, SOLTABAYEV B, et al. Application of response surface methodology for optimization of nanosized zinc oxide synthesis conditions by electrospinning technique[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2022, 12(10):1733.
- [3] AYTAC Z, IPEK S, EROL I, et al. Fast-dissolving electrospun gelatin nanofibers encapsulating ciprofloxacin/cyclodextrin inclusion complex[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 178:129-136.
- [4] COMMARIEU B, COMPAORÉ M, DE BOËVER R, et al. Ultra-high tg thermoset fibers obtained by electrospinning of functional polynorbornenes[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2022, 12(6):967.
- [5] HAJIKHANI M, KOUSHEH S, ZHANG Y, et al. Design of a novel SERS substrate by electrospinning for the detection of thiabendazole in soy-based foods[J]. *Food Chem*, 2024, 436: 137703.
- [6] ASGHARI F, RABIEI FARADONBEH D, MALEKSHAHI Z V, et al. Hybrid PCL/chitosan-PEO nanofibrous scaffolds incorporated with A. euchroma extract for skin tissue engineering application[J]. *Carbohydr Polym*, 2022,278:118926.
- [7] PEZESHKI-MODARESS M, ZANDI M, RAJABI S. Tailoring the gelatin/chitosan electrospun scaffold for application in skin tissue engineering: An in vitro study[J]. *Prog Biomater*, 2018,7(3):207-218.
- [8] LI F H, ZHANG B, CHEN G, et al. The novel contributors of anti-diabetic potential in mulberry polyphenols revealed by UHPLC-HR-ESI-TOF-MS/MS[J]. *Food Res Int*, 2017, 100(Pt 1):873-884.
- [9] KHAN A U R, HUANG K, ZHAO J Z, et al. Exploration of the antibacterial and wound healing potential of a PLGA/silk fibroin based electrospun membrane loaded with zinc oxide nanoparticles[J]. *J Mater Chem B*, 2021,9(5):1452-1465.
- [10] SHALUMON K T, ANULEKHA K H, NAIR S V, et al. Sodium alginate/poly (vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings[J]. *Int J Biol Macromol*, 2011,49(3):247-254.
- [11] YARAHMADI A, MOHAMMADIAN SEMNANI H, ABDOS H. Simultaneous effects of carbon nanotube content and diameter size on microstructure and mechanical properties of double pressed double sintered Al/carbon nanotube nanocomposites[J]. *J Mater Eng Perform*, 2022,31(9):7423-7435.
- [12] ENGLER A J, GRIFFIN M A, SEN S, et al. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: Pathological implications for soft or stiff microenvironments[J]. *J Cell Biol*, 2004,166(6):877-887.
- [13] YADAV R, VENKATESU P. Functionalized carbon nanotubes modulate the phase transition behavior of thermoresponsive polymer via hydrophilic-hydrophobic balance[J]. *Polymer*, 2019,178:121573.
- [14] WEI A F, WANG J, WANG X Q, et al. Morphology and surface properties of poly (L-lactic acid)/captopril composite nanofiber membranes[J]. *J Eng Fibres Fabr*, 2012, 7(1): 155892501200700.
- [15] NEZARATI R M, EIFERT M B, COSGRIFF-HERNANDEZ E. Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013, 19(10):810-819.
- [16] QAZI T H, RAI R, DIPPOLD D, et al. Development and characterization of novel electrically conductive PANI-PGS composites for cardiac tissue engineering applications[J]. *Acta Biomater*, 2014,10(6):2434-2445.
- [17] TATEISHI T, CHEN G P. Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering [M]//Advanced Biomaterials VI. Stafa: Trans Tech Publications Ltd., 2005:59-62.
- [18] CORREA-DUARTE M A, WAGNER N, ROJAS-CHAPANA J, et al. Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as scaffolds for cell seeding and growth[J]. *Nano Lett*, 2004,4(11):2233-2236.
- [19] SHITOLE A A, RAUT P W, SHARMA N, et al. Electrospun polycaprolactone/hydroxyapatite/ZnO nanofibers as potential biomaterials for bone tissue regeneration[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2019,30(5):51.
- [20] RAHMANI A, HASHEMI-NAJAFABADI S, ESLAMINE-JAD M B, et al. The effect of modified electrospun PCL-nHAnZnO scaffolds on osteogenesis and angiogenesis[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2019,107(9):2040-2052.
- [21] WEBSTER T J, WAID M C, MCKENZIE J L, et al. Nanobiotechnology: Carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants[J]. *Nanotechnology*, 2004,15(1). Doi:10.1088/0957-10.1088/4484/15/1/009.
- [22] STOUT D A, RAIMONDO E, MAROSTICA G, et al. Growth characteristics of different heart cells on novel nanopatch substrate during electrical stimulation[J]. *Biomed Mater Eng*, 2014,24(6):2101-2107.