

以胶原为基质的组织工程支架材料的制备及组织相容性研究

牟善松¹袁安德²袁美¹袁立华¹袁周长忍¹渊暨南大学生物医学工程研究所袁广东广州510632曰第一军医大学中心实验室袁广东广州510515冤

摘要 目的 制备一种以胶原为基质的组织工程支架材料并研究其血液相容性及组织相容性遥方法 采用物理尧化学及物理 / 化学方法对胶原材料进行交联遥结果 动态凝血试验显示通过不同方法交联后的胶原材料袁(瓷值随着与血液接触时间的延长而下降袁其中通过碳化二亚胺交联得到的胶原在与血液接触相同时间后测得的 D(瓷值最高曰溶血率的数据表明袁交联后的胶原材料溶血率均小于 5% 曰血小板粘附与变形电镜照片显示袁血液在 3 种材料表面均未引起血小板的变形袁且粘附数量较少遥结论 3 种交联法制备的胶原材料都有较好的血液相容性袁材料表面细胞生长状况良好袁表明材料具有良好的组织相容性遥

关键词 胶原曰交联试剂曰血液相容性曰组织相容性

中图分类号 院 318.08;R341.26 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588(2002)10-0878-02

Preparation and biocompatibility of tissue-engineered scaffold materials based on collagen

MOUShan-song¹,MAAn-de²,TUMei¹,LILi-hua¹,ZHOUC Chang-ren¹

¹Biomedical Engineering Institute, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Central Laboratory, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To prepare tissue-engineered scaffold material using collagen as the matrices and to study the blood compatibility and tissue biocompatibility of this material. Methods Physical, chemical and physical/chemical methods were used for the crosslinking of the collagen. Results Dynamic blood clotting tests indicated that the blood clotting index (BCI) of the crosslinked collagen materials prepared by different means decreased as their contact with the blood was prolonged, and the collagen material obtained after crosslink through 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide method showed the highest BCI after contact with the blood with incertain length of time. Hemolysis ratios of all the crosslinked collagen materials were shown to be much lower than 5%, well conforming to the requirement of biomaterials. Scanning electron microscopy showed that the platelets attached to the surface of the crosslinked collagen materials, having a fairly small number, were not morphologically distorted. Conclusion The collagen materials obtained by the 3 crosslink methods have good blood compatibility. The cells grow well on the surfaces of the materials, indicating their good biocompatibility.

Key words: collagen; cross-linked reagent; blood compatibility; histocompatibility

胶原蛋白是由动物细胞合成的一种生物高分子袁是人脊椎动物体内含量最多尧分布最广的蛋白质袁约占体内总蛋白质的 1/3 遥胶原具有低抗原性袁有良好的生物相容性和生物可降解性袁是最早被使用的天然生物材料之一遥但是胶原作为组织工程支架材料有一大缺点袁即机械强度差遥本研究采用 3 种方法对胶原进行交联袁并测试交联后的胶原的血液相容性及生物相容性遥

1 材料和方法

1.1 主要试剂

1-乙基-3-(3- 渊- 二甲基氨基丙基冤 碳化二亚胺 渊DC袁美国 ACROS 公司冤N- 羟基琥珀酰亚胺

渊HS袁美国 ACROS 公司冤2- 渊- 吗啉冤乙撑磺酸 渊MES袁香港 FARCO 公司冤

1.2 方法

1.2.1 胶原的制备 选择猪皮作为提取原料袁用酸溶法提取胶原遥将纯化后的胶原样品溶于 0.5mol/L 的醋酸溶液中袁冷冻离心袁取上清液袁除泡袁然后冷冻干燥得海绵状材料袁即胶原海绵遥

1.2.2 胶原的交联 采用物理交联渊HT 交联法冤尧化学交联渊DC 交联法冤尧物理 / 化学交联渊HT/EDC 交联法冤 3 种方法对胶原进行交联遥物理交联法是将 5 cm 伊 5 cm 胶原海绵放入真空干燥箱中袁0 益下抽真空 3 h 袁升温至 80 益尧加热 30 min 袁然后将真空干燥箱的温度升至 120 益尧加热 3 h 袁在保持真空的状态下降低真空干燥箱中的温度至室温后将材料取出遥化学交联法是将 5 cm 伊 5 cm 胶原海绵浸入 MES 的 40% 的乙醇溶液中渊H6.0冤室温浸泡 30 min 袁然后加入 EDC 和 NHS 室温下交联 8 h 遥物理 / 化学交联法是将 5 cm 伊 5 cm 胶原海绵先进行物理交联袁然后进行化

收稿日期 院 002-08-18

基金项目 院 国家科技部 863 项目 渊001AA625050冤

作者简介 院 牟善松 渊1963- 冤男袁山东日照人袁1988 年毕业于华南理工大学袁硕士袁助理研究员袁电话 院 20-85222062 袁 e-mail: tmuss@jnu.edu.cn 袁

通讯作者 院 袁美

学交联最后将胶原海绵冲洗干净冷冻干燥

1.2.3 血液相容性测试 胶原材料的血液相容性分别采用动态凝血试验血小板粘附性能试验及溶血试验进行评价

1.2.4 细胞培养 培养液制备院在富含胰蛋白酶化细胞渊伊0%ml的 DMEM 悬液中加入 10%胎牛血清和 12ng/ml 成纤维细胞生长因子细胞培养将浸泡于 DMEM 溶液中的材料置于 35mm 培养皿中然后用 3ml 的上述悬液在 37 益尧潮湿的 CO₂ 环境下培养细胞在材料上的生长状况通过倒置显微镜观察材料上的生长状况通过扫描电镜观察

2 结果与讨论

2.1 胶原材料的血液相容性

图 1 为胶原材料的动态凝血试验结果材料抗凝血性能与 D₅₀值呈正相关遥根据不同材料与血液接触相同时间后测得的 D₅₀值的高低和材料随着与血液接触时间的延长 D₅₀值变化的快慢程度来评价材料抗凝血性能的优劣遥从图 1 可以看出通过不同方法交联后的胶原材料 D₅₀值随着与血液接触时间的延长而下降袁其中通过 EDC 交联得到的胶原在与血液接触相同时间后测得的 D₅₀值稍高袁这是由于在 ACD 全血中加入 Ca²⁺ 后启动了凝血过程袁此过程是以 Ca²⁺ 为开始袁以血小板和凝血因子的活化为核心袁最后形成纤维蛋白的连锁反应过程遥Ca²⁺ 作用时间越长袁栓形成量就越多袁没有被不溶性纤维蛋白网在血凝块里的红细胞就越多袁因此血液稀释液的相对 D₅₀值自然会随时间的延长而降低遥

溶血率为血液与材料接触时红细胞的破坏程度遥

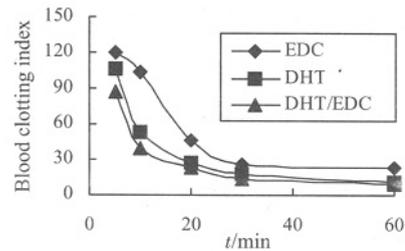


图 1 血液接触时间对抗凝血性能的影响
Fig.1 Effect of length of time for contact of tissue-engineered scaffold with blood on the blood clotting index
EDC:1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidemethod;
DHT:Dehydrothermalmethod

EDC尧HT尧HT/EDC3种交联法制备的胶原材料的溶血率分别为 0.28尧.51 和 0.61袁交联后胶原材料的溶血率均小于 5% 袁符合生物材料的使用要求遥其中袁 EDC 交联得到的胶原材料的溶血率最小遥胶原是由动物细胞合成的一种生物高分子袁是细胞外间质的主要成分遥由不同种类的动物分离出来的胶原极其相似袁不易被人体免疫系统作为外体识别袁因此具有低抗原性袁有良好的生物相容性遥所以交联后胶原的溶血率值均符合生物材料的使用标准遥

从 3 种交联法得到的胶原材料的血小板粘附与变形的电镜照片渊图 2尧看袁血液在 3 种材料表面均未引起血小板的变形袁且粘附的数量也较少袁说明交联后的胶原材料可以阻止血小板的变形和吸附遥

2.2 细胞培养

细胞培养试验表明各种交联后的胶原材料均呈阴性反应袁细胞能在材料表面很好地生长渊图 3尧袁说明本实验使用的交联剂及交联方法制备的胶原材料对细胞没有毒性遥

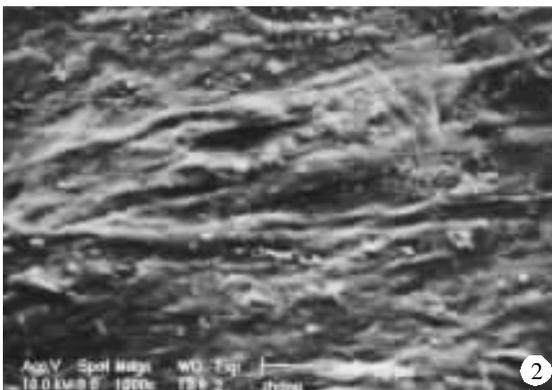


图 2 EDC 交联胶原血小板变形粘附照片渊EM, 伊000冤

Fig.2 Photos of plateletson themembrane surface of collagen cross-linked EDC method渊EM, 伊000冤



图 3 EDC 交联胶原表面细胞生长状况渊EM, 伊000冤

Fig.3 Growth status of cells on the membrane surface of collagen cross-linked EDC method渊EM, 伊000冤

3 小结

3 种交联法制备的胶原材料的血液相容性试验结果表明袁交联后的胶原材料都有较好的血液相容

性袁而且没有引起溶血反应袁其中 EDC 交联的胶原材料抗凝血性能更优一些袁血小板的粘附与变性试验表
渊下转 882 页冤

此病理性 Q 波仍是一个需要进一步探讨的问题

本实验结果表明病理性 Q 波的出现率在正对梗死的左侧胸区域上升而在相对应的右侧后背区域反而下降这些变化具有显著性差异这表明右侧后壁对应体表位置的 Q 波形成与其相对应的左侧壁的心肌电活动状况密切相关正常时右侧后壁出现 Q 波很大程度上受左侧壁心电活动的影响我们认为所有非心律失常病理性波形改变均出自两个原因被动电学性质的改变心肌病变通常表现为病变心电活动强度的下降一侧室壁减弱的电活动将导致同侧胸导联心电图 R 波振幅的减小但无论如何减弱也不会导致该侧心电图产生一个 Q 波样负波的波形改变被动电学性质的改变对侧心室的电活动对同侧胸表心电图的影响由此引起同侧胸导心电图的变化有关生物组织电学性质的研究给出了不同组织的电导率心肌组织的电导率为正常心肌静息状态下的值但作为电介质心肌组织在不同状态下应该具有不同的被动电学性质在除极阶段即动作电位的 0 期由于快速的离子跨膜运动心肌细胞具有最高的电导率在动作电位的其他期其电导率略有下降在静息期由于电活动的寂静其电导率显著降低因此我们推论在心肌细胞严重缺血或梗死的情况下其电导率大大低于正常静息时的电导率心肌组织作为电介质的平均电导率越低它对电场的衰减作用越小从而使作为源的其他心肌组织产生的电活动在体表产生的电势的绝对值越大因此一侧心室病变心肌组织电导率的下降既减弱其本身电活动对同侧胸表电场的贡献又加强对侧健康心

室电活动所产生的电场在同侧胸表的分布强度而这正是后一种影响使同侧心室的跨膜电位坡度基本是相反的这就是为什么左前壁梗死会导致左前壁心电图 Q 波出现增加而右后壁 Q 波减少甚至消失的原因我们认为典型的与等效的病理性 Q 波均系这种机制的产物对具体的病理波形究竟呈什么形态取决于病变心肌的严重性面积以及部位通常右心的电活动强度降低使其不能穿过两个心腔中的血液及较厚的左室壁进而影响到左胸的电场分布但是如果左室壁发生严重大面积梗死或严重缺血大量心肌组织电导率的下降可以使得右室电活动的影响得以穿透左室壁在左胸表产生病理性 Q 波因此左胸导的病理性 Q 波很少是假性的它们的意义清晰而确定相比之下正常情况下因右室壁较薄右胸导心电图经常包含了来自左室电活动的影响假性 Q 波较为常见当右室梗死发生时确定 Q 波是否来自右室壁便成为一个难题

参考文献

- 喻哲 尹炳生. 常规临床心电图学与头胸导联临床心电图学. 喻哲中国循环杂志, 1991, 6(1): 75-8.
- 喻哲 元柏民. 心血管病诊断标准. 喻哲北京: 学苑出版社, 1991. 156-7.
- 喻哲 杨均国, 李治安. 现代心电图学. 喻哲北京: 科学出版社, 1997. 197.
- 喻哲 Oosterom AV. Cell model-macroscopic source description. 喻哲 In: MacFarlane PW, Lawrie TD. Comprehensive electrocardiology. 喻哲 London: Pergamon Press, 1989. 152-5.
- 喻哲 David M, Harrild R. A flexible method for simulating cardiac conduction in three-dimensional complex geometries. 喻哲 J Electrocardiol, 2000, 33(3): 241-51.

连接 879 页

明交联后的胶原材料对血小板不粘附或粘附很少而且没有引起变形细胞培养试验显示细胞在交联后的胶原材料表面生长状况良好制备的胶原材料具有良好的生物相容性

参考文献

- 喻哲 Friess WG. Collagen-biomaterial for drug delivery. 喻哲 Eur J Pharm Biopharm, 1998, 45(2): 113-6.
- 喻哲 Scotchford MG, Cascone MG, Downes S, et al. Osteoblast response to collagen-PVA bioartificial polymer in vitro: the effects of cross-linking method and collagen content. 喻哲 Biomaterials, 1998, 19(1-3): 1-11.
- 喻哲 Wang MC, Pins GD, Silver FH. Collagen fibres with improved

strength for the repair of soft tissue injuries. 喻哲 Biomaterials, 1994, 15(5): 507-12.

- 喻哲 Pieper JS, Osterhof PJ, Dijkstra PJ, et al. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. 喻哲 Biomaterials, 1999, 20(9): 847-58.
- 喻哲 Zhou C, Lin S. Study on the oxygen permselectivity membranes. 喻哲 Polym Mater Sci Eng, 1997, 13(Suppl): 110-3.
- 喻哲 Zhou C, Yi Z. Blood-compatibility of polyurethane/liquid crystal composite membranes. 喻哲 Biomaterials, 1999, 20(22): 2093-7.
- 喻哲 屠湘同, 胡昕, 李香梅, 等. 抗凝血生物材料的合成[J]. 功能高分子学报, 1995, 8(2): 209-12.
- Tu XT, Hu X, Li XM, et al. Synthetic studies on the compatible biomaterials[J]. J Funct Polymer (Chin), 1995, 8(2): 209-12.