文章编号:1000-5404(2005)13-1351-04

论著

仿生髓核组织工程细胞支架的构建及初步理化指标分析

李长青,周 跃,张传志 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 设计构建一种新型仿生髓核组织工程的细胞支架,以用于髓核组织工程的实验研究。**方法** 以猪Ⅱ型胶原和透明质酸在pH 1~2的环境下混合,先行制备Ⅱ型胶原/透明质酸海绵,再以水溶性碳化二亚胺交联并复合6-硫酸软骨素,从而获得与生理条件下髓核细胞外基质主要成份相同的仿生髓核组织工程细胞支架。并对其理化指标进行初步分析。**结果** 所制备的支架材料为多孔结构,其孔径为89~132 μm,孔隙率为94.8%。含水能力为79.2%,热变性温度为74.6 ℃,糖胺多糖含量为224.6 mg/g,弹性模量为0.673 MPa。**结论** 我们对所制备支架材料的理化指标初步分析认为:该支架符合理想支架材料的结构要求。可对该支架的性能进行深入的研究。

关键词:Ⅱ型胶原;透明质酸;6-硫酸软骨素;支架;组织工程;髓核
中图法分类号:R68, R318.08 **文献标识码**:A

A novel and bionic scaffold of nucleus pulposus tissue engineering

LI Chang-qing, ZHOU Yue, ZHANG Chuan-zhi (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To design and construct a new bionic scaffold of nucleus pulposus tissue engineering. **Methods** The collagen-hyaluronic acid (HyA) matrices were prepared, and mixed with Collagen type Ⅱ (pH 1-2) and lyophilized. 6-chondroitin sulfate (CS) was covalently attached to collagen using 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). Afterwards the initial structure of bionic scaffolds was evaluated. **Results** The bionic scaffolds were porous structure, of which the pore size was 89-132 μm, the porosity was 94.8%. Water-binding capacity of resulting matrices was 79.2%, and the denaturation temperature was 74.6 ℃. Glycosaminoglycan (GAG) content was 224 mg/g, and the elastic modulus was 0.673 MPa. **Conclusion** Composition and tissue structure between the scaffolds are similar to the extracellular matrices of nucleus pulposus. The bionic scaffold is an ideal scaffold material of nucleus pulposus tissue engineering in structure. Further experiment is required on the biocompatibility of the novel scaffolds.

Key words: collagen type Ⅱ; hyaluronic acid; 6-chondroitin sulfate; scaffold; tissue engineering; nucleus pulposus

下腰痛是现代社会中一种常见病和多发病,作为发病率仅次于上呼吸道感染的疾病,是导致劳动力丧失的主要原因之一[1]。腰椎间盘突出症等椎间盘退行性变是引起下腰痛最常见的原因。研究开发符合椎间盘和/或髓核结构与功能的移植物,对退变椎间盘进行功能重建,已成为治疗退行性椎间盘疾病比较理想的解决方案。近年来组织工程学技术的迅速发展,为体外构建理想的椎间盘组织创造了极其有利的条件并提供了可能。采用组织工程学技术构建椎间盘的研究目前国外尚处于起步阶段,国内少见报道。目前应用于组织工程化髓核的细胞支架基本来源于骨或软骨组织工程的生物材料。尚少有报道髓核组织工程设计构建的专用支架材料。因此,探索构建理想的细胞支架,成为髓核组织工程研究的重点和难点之一。生理条件下髓核细胞外基质的主要成份为Ⅱ型胶原(collagen type Ⅱ, $C_{Ⅱ}$)、糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)、6-硫酸软骨素(6-chondroitin sulfate, 6-CS)和透明质酸(hyaluronic acid, HyA)等。由于$C_{Ⅱ}$与GAG带有相反电荷,极易形成聚合物(polyion complex, PIC),成为构建的难点。本研究设计构建了一种新型髓核组织工程支架材料,并对其结构进行初步分析。

作者简介:李长青(1970-),男,天津市人,博士,主治医师,讲师,主要从事脊柱外科基础与临床方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68774908, E-mail:younglee881@163.com

收稿日期:2004-09-20;修回日期:2005-01-27

1 材料与方法

1.1 $C_{Ⅱ}$/HyA 海绵的构建

1.1.1 $C_{Ⅱ}$/HyA 海绵的构建 将猪 $C_{Ⅱ}$（购自广州创尔生物科技有限公司）溶于 0.01 mol/L HCl（pH 2.3），4 ℃下搅拌，制成 1.25%（W/V）的 $C_{Ⅱ}$ 溶液，调整 $C_{Ⅱ}$ 溶液的 pH 值至 1～2。继续 4 ℃搅拌的条件下，按 9:1（V/V）比例逐滴加入以超纯水溶解的 4 ℃、1.25% HyA 溶液，速度控制在 0.5 ml/min。混合后，4 ℃下 300 r/min 搅拌 4 h，3 000 r/min、4 ℃离心 15 min 去除气泡，将混合溶液倾入一次性培养皿中，轻轻震摇，使液面平整，立即置于 -70 ℃冰箱冷冻。经两次冷冻干燥制成 $C_{Ⅱ}$/HyA 海绵。

1.1.2 PIC 形成观测 分别提取已制备的 $C_{Ⅱ}$ 溶液和搅拌均匀的 $C_{Ⅱ}$/HyA 溶液各 100 μl 置于比色杯中，Beckman 800U 分光光度仪 500 nm 下、以 $C_{Ⅱ}$ 溶液的透过率作对照，测定 $C_{Ⅱ}$/HyA 溶液的透过率。

1.2 $C_{Ⅱ}$/HyA-CS 支架的构建

$C_{Ⅱ}$/HyA 海绵按每 50 mg 干重浸泡于 20 ml 含 50 mmol/L 2-吗啉乙烷磺酸（2-morpholi-noethanesulfonicacid，MES pH = 5.5）的 40% 乙醇溶液中 30 min（室温），然后浸泡在 20 ml 含 50 mmol/L MES、24 mmol/L EDC、5 mmol/L 琥珀酰胺（N-hydroxy-succinimide，NHS）和 2% 6-CS 的 40% 乙醇溶液中，室温（20～25 ℃）下交联 24 h。将此支架在 0.1 mol/L Na_2HPO_4 中清洗 2 次，共 1 h；1 mol/L NaCl 中清洗 2 次，共 2 h；2 mol/L NaCl 中清洗 24 h（期间更换 6 次），用超纯水清洗 10 次，冷冻干燥机中两次冻干得到 $C_{Ⅱ}$/HyA-CS 支架。^{60}Co 消毒备用。

1.3 支架材料的 GAG 含量及成分分析

1.3.1 GAG 提取 将标本称取质量后切碎，放入编号试管中，依顺序加入 0.1 mol/L NaOH 1.5 ml，制成匀浆；再加入 0.1 mol/L HCl 调至 pH = 7.4，加入 1 mg/ml 胰蛋白酶，混匀后 37 ℃保存 24 h。加入 60% 三氯醋酸至浓度 10%，保存 24 h。离心后留上清液；加入 4 倍体积无水乙醇，放置 48 h，再离心弃上清液，将沉淀物溶于 1 ml 蒸馏水中，即得 GAG 溶液。

1.3.2 GAG 含量测定 取 GAG 样品液 0.1 ml，准确加入 1.5 ml 阿尔率蓝染液，混匀。10 min 后，用 0.5 cm 厚度比色杯，于 480 nm 比色测定。

1.3.3 GAG 成分分析 将标准品和标本 GAG 溶液点样于聚丙烯酰胺凝胶上，进行 SDS-PAGE，取出后用阿尔率蓝-硝酸银染色[2]，经凝胶成像扫描，记录 GAG 各区带百分值。

1.4 支架材料 HE 染色、扫描电镜观察

取支架材料样品分别经石蜡切片、HE 及甲苯胺蓝染色或表面镀金后，在 Olympus 光学显微镜和 HITACHIS-3500N 扫描电镜下进行观察样品的孔性结构及支架的空间排列。并根据放大倍数，计算样品的平均孔径。

1.5 孔隙度测试

参照 Zhang[3] 氏液体置换法，支架材料样品的体积 $V = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) = V_2 - V_3$；孔隙度 $\varepsilon = (V_1 - V_3) \times 100\% / (V_2 - V_3)$。

1.6 含水能力测定[4]

取 5 mg 支架材料浸入 3 ml PBS 溶液（pH 7.2），20 ℃下孵育 1 h 后，倾去 PBS 溶液，并将吸水后的支架放在倾斜 60° 的洁净玻璃板上 2 min，以滤纸吸去渗出的水分，称湿重。计算含水能力 =（湿重 - 干重）× 100%/湿重。

1.7 变性温度[5]（denaturation temperature，T_d）

取 2 mg 支架材料置于 Perkin-Elmer DSC-7 热变性分析仪中，滴加 50 μl PBS 溶液（pH 7.2），20 ℃下孵育 2 h。以 5 ℃/min 的速度将温度升至 90 ℃，记录支架材料出现变性时的温度。与未交联支架材料（制备时仅未加 EDC 和 NHS，余同）作对比分析。

1.8 体外生物降解性能观测[4]

5 mg 支架材料浸入 1 ml 含 0.05 mol/L $CaCl_2$ 与 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 7.4），37 ℃下孵育 1 h。加入 1 ml 含 200 U Ⅱ型胶原酶的 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 7.4）内，37 ℃消化 24 h 后，以 0.2 ml 0.25 mol/L EDTA 终止反应。冷冻干燥后称出剩余材料质量。计算体外生物降解性能 =（消化前质量-消化后质量）× 100%/消化前质量。与未交联支架材料作对比分析。

1.9 生物力学性能检测[6]

取交联和未交联的支架材料各 6 个，修剪成 1 cm × 4 cm 大小，放入 PBS（pH 7.2）中，20 ℃浸泡 1 h。用 HE-HOUNSFIELD 型拉力试验机进行弹性模量测试（拉伸速度为 1 mm/min）。

1.10 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS 11.5 统计软件中 Nonparametric Tests 进行数据正态性检验、单因素方差分析和组间比较。计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 PIC 形成观测

从图 1 可见在 pH 为 1～2，$C_{Ⅱ}$/HyA 溶液的透光率为（98.3 ± 1.3）%。表明：调定 $C_{Ⅱ}$ 溶液的 pH 至 1～2，加入 HyA 溶液，基本不形成 PIC。

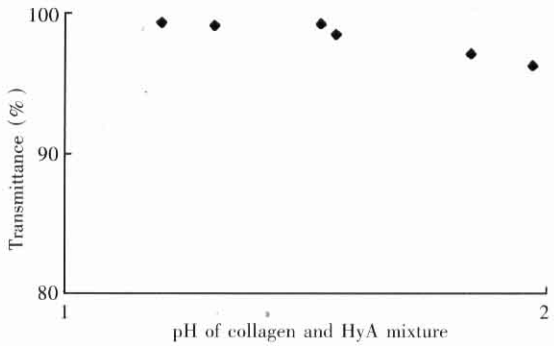


图 1 不同 pH 值下 $C_{Ⅱ}$/HyA 溶液透光率变化

Fig 1 The transmittance of polyion complex formation under the different pH of collagen Ⅱ/HyA solution

2.2 仿生支架材料中 GAG 含量及成分分析

支架材料中 GAG 含量平均为 224.6 mg/g，其中 HyA 约占

37.2%，CS 约占 62.8%。

2.3　仿生支架材料光、电镜观察

HE 染色显示：支架材料为嗜酸性，为较均匀的多孔结构，排列整齐(图 2)。甲苯胺蓝染色显示：支架染成紫红色，显示支架上复合有硫酸糖胺聚糖(图 3)。扫描电镜观察发现：支架材料为相互沟通的多孔结构，孔径比较均匀，直径为 89～132 μm(图 4)。

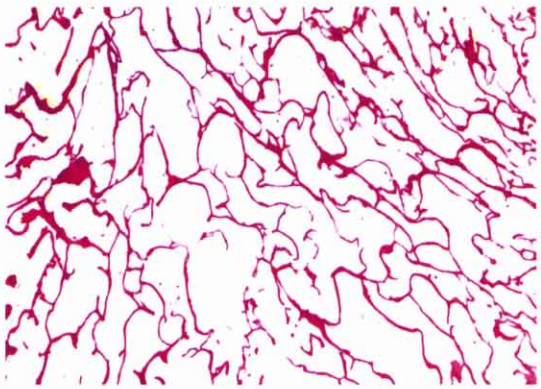


图 2　支架材料的多孔结构　(HE×100)

Fig 2　Porous structure of the scaffold　(HE×100)

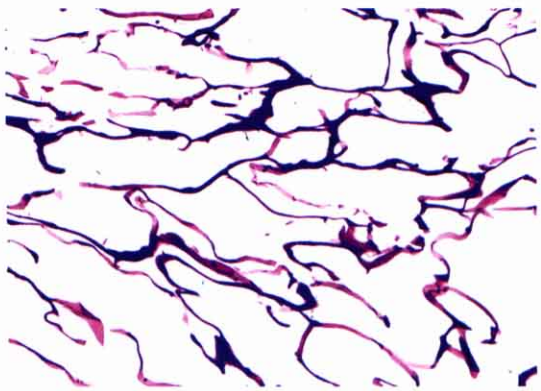


图 3　支架材料糖胺聚糖染色　(甲苯胺蓝染色×100)

Fig 3　Glycosaminoglycan content of the scaffold　(Dimethyl methylene blue×100)

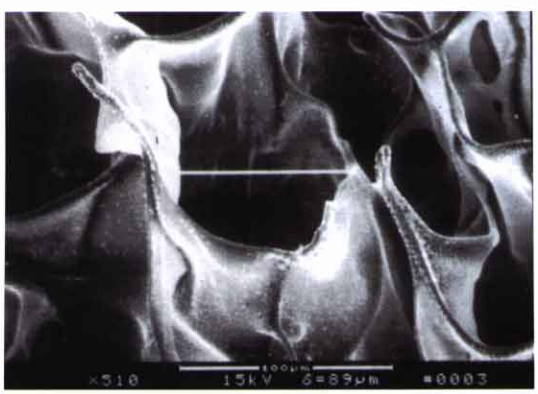


图 4　支架材料的超微结构　(SEM×510)

Fig 4　The ultrastructure of the scaffold　(SEM×510)

2.4　支架材料的结构特性

2.4.1　孔隙率　　支架材料孔隙率最大为 96.4%，最小为 92.6%，平均为(94.8±1.5)%。

2.4.2　含水能力　　支架材料含水能力最大值为 83.0%，最小值为 75.8%，平均为(79.2±2.8)%。

2.4.3　热变性温度　　交联支架材料的热变性问题由未交联的 58.1 ℃提高到 74.6 ℃。表明交联支架的热变性温度显著提高($P<0.01$)。

2.4.4　体外生物降解性能　　体外胶原酶降解实验显示交联支架的胶原酶降解率为 39.5%，而未交联支架的降解率高达 63.5%，表明交联的方法提高了支架材料对胶原酶降解的抵抗能力($P<0.01$)。

2.4.5　生物力学　　交联支架材料的弹性模量平均为 0.673 MPa，未交联支架的弹性模量平均为 0.216 MPa。提示：交联支架材料的力学性能显著提高($P<0.01$)。

3　讨论

组织工程学的研究已开展十多年，组织工程化皮肤在美国已获得 FDA 批准应用于临床治疗，组织工程化软骨、骨在其它部分国家开始试用于临床治疗。目前应用于组织工程化髓核的细胞支架基本来源于骨或软骨组织工程的生物材料，使用的均为Ⅰ型胶原或其它如聚羟基乙酸、藻酸钙盐、琼脂糖凝胶、纤维蛋白、壳聚糖等生物大分子，而生理条件下髓核中胶原成分为Ⅱ型胶原，由于上述这些生物大分子与Ⅱ型胶原相比，存在着结构和亲水性差异，因此不能复制出正常髓核的半凝胶状态，在结构和性能上存在着巨大的差异。本研究以猪 $C_{Ⅱ}$ 和 HyA、CS 等生理条件下髓核细胞外基质主要成分构建了一种新型的仿生髓核组织工程细胞支架。

由于 $C_{Ⅱ}$ 与 HyA 带有相反电荷，因此两种大分子混合极易形成 PIC，从而影响支架材料孔径结构的可控性。Taguchi 等[7]研究报道：在 4 ℃下调整 $C_{Ⅱ}$-HyA 混合物的 pH 值至 1～2 或加入 0.4 mol/L NaCl 的情况下，可有效抑制 PIC 的形成，混合物的光透过率分别为 80%和 50%左右。提示低 pH 值(1～2)更能有效地抑制 PIC 形成。我们根据 Taguchi[7]的研究成果，并加以改进：在 4 ℃下、加入 HyA 前，先将 $C_{Ⅱ}$ 溶液的 pH 值调至 1～2，在低温搅拌下以 0.5 ml/min 的速度加入 9∶1 的 HyA 溶液，低温充分搅拌后，以单纯 $C_{Ⅱ}$ 溶液做参照，测定 $C_{Ⅱ}$-HyA 混合物的光透过率时发现，应用改进的方法所制备混合物的光透过率高达 98.3%。结果表明：①低 pH 值(1～2)能有效抑制 PIC 形成；②我们改进的方法所制备的 $C_{Ⅱ}$-HyA 混合物基本没有 PIC 形成。

冷冻干燥技术是组织工程支架材料研究中常用的

方法之一。其原理:将支架原料制成溶液后,倾入模具,迅速冷冻为固相,-60 ℃下真空冷冻干燥,升温至冻融点时,已结成冰晶的溶剂和水分直接转变为气相,其原占据的空间形成孔隙。其孔径大小可由升温速度及 pH 值决定[8]。本研究应用冷冻干燥技术所制备的支架材料经光、电镜检查证实为 3D 的多孔结构,并且各孔间相互沟通,孔隙率达到 94.8%。支架材料的形状可由模具来塑形,具有可控性。

交联技术是指胶原分子内部和胶原分子间通过共价键结合实现提高胶原纤维的张力和稳定性,降低其免疫原性的目的。交联涉及胶原中的赖氨酸、羟赖氨酸、组氨酸等残基。EDC 是化学性质极为活泼的化合物,能使氨基和羟基之间形成酰氨基,其既可与羧基结合,也可与氨基结合。通常羧基与 EDC 反应生成中间产物,再与另一分子的氨基反应而形成耦联物[9]。在交联过程中加入 CS,使得胶原分子内部和胶原分子间相互结合的同时,共价结合到胶原分子上。CS 的加入,可以提高胶原分子的强度和稳定性,并提高支架材料的含水能力。NHS 能够提高 EDC 交联反应的速度和胶原交联的程度。并且 Pieper 等[5]证实 NHS 能够有效地提高 CS 共价结合的数量和支架材料的变性温度。本课题中所制备的 C_{II}/HyA 海绵,通过 EDC + NHS 交联、复合了 CS,成功制备了仿生髓核组织工程的支架材料。通过交联所制备的支架孔隙排列比较整齐,孔隙大小比较均匀,孔径为 89 ~ 132 nm。GAG 的含量达到 224 mg/g。

理想支架材料的结构应当具备:①良好的孔隙率和适宜的孔径大小;②一定的生物力学强度;③结构稳定;④可降解性。我们所制备的支架材料具有 89 ~ 132 nm 的孔径,能够适合髓核细胞的生长;94.8%的孔隙率不仅能够保障细胞生长所需营养物质的交流和代谢产物的排出;也能保障在应力作用下,支架-细胞复合体中所含水分的交流。支架材料中 GAG 含量为 224 mg/g,含水能力达到 79.2%,其含水能力与生理条件下髓核组织的含水能力相当。0.673 MPa 的弹性模量表明该材料具有一定的生物力学性能。

T_d 是评价支架材料结构稳定的一个重要指标,其高低取决于支架材料的含水能力,并受支架材料交联程度及交联支架材料的化学结构的影响[4]。我们所得到交联后支架的 T_d 为 74.6 ℃,显著高于未交联组的 58.1 ℃。表明我们所设计制备的支架材料具有良好的热稳定性能和高的交联程度。体外胶原酶降解率也是反映支架材料稳定程度的重要指标之一,同时也反映支架材料的化学稳定性能。实验结果显示,交联支架材料的体外酶降解率较未交联组显著降低。表明交联支架材料具有更好的稳定性能,以抵抗胶原酶的降解作用,同时也表明该材料仍然具有一定的可降解性。

本实验以生理条件下髓核 ECM 中的主要成分 C_{II}、HyA、CS,应用冷冻干燥技术和交联技术,所设计、构建的仿生髓核组织工程支架材料具有良好的孔隙率、适宜的孔径大小、一定的生物力学强度和良好的结构稳定性及可降解性,具备了理想支架材料的结构特点。同时所获得的支架材料具有与生理条件下髓核组织相当的良好的含水能力。因此从结构上分析,我们所制备的支架材料是比较理想的髓核组织工程支架,可对其进行更加深入的生物性能研究。

参考文献:

[1] Andersson G B. Epidemiologic aspects on low-back pain in industry [J]. Spine, 1981, 6(1): 53 - 60.

[2] Moller H J, Heinegard D, Poulsen J H. Combined alcian blue and silver staining of subnanogram quantities of proteoglycans and glycosaminoglycans in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1993, 209(1): 169 - 175.

[3] Zhang R, Ma P X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 45(4): 285 - 293.

[4] Liu L S, Thompson A Y, Heidaran M A, *et al*. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration [J]. Biomaterials, 1999, 20(12): 1097 - 1108.

[5] Pieper J S, Hafmans T, Veerkamp J H, *et al*. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects [J]. Biomaterials, 2000, 21(6): 581 - 593.

[6] Pieper J S, Oosterhof A, Dijkstra P J, *et al*. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate [J]. Biomaterials, 1999, 20(9): 847 - 858.

[7] Taguchi T, Ikoma T, Tanaka J. An improved method to prepare hyaluronic acid and type II collagen composite matrices [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 61(2): 330 - 336.

[8] Doillon C J, Whyne C F, Brandwein S, *et al*. Collagen-based wound dressings: control of the pore structure and morphology[J]. J Biomed Mater Res, 1986, 20(8): 1219 - 1228.

[9] 曹正国, 李成章. 常用蛋白交联方法及其对胶原的影响[J]. 国外医学生物医学工程分册, 2001, 24(4): 187 - 191.

(编辑 陈聪连)