文章编号:1000-5404(2011)14-1511-03

论著

应用高浓度Ⅱ型胶原蛋白构建组织工程软骨支架

崔运利,王富友,谭洪波,张 颖,熊 娟,杨 柳 (400038 重庆,第三军医大学西南医院关节外科中心)

[摘要] **目的** 构建有利于种子细胞黏附、增殖和分化的软骨组织工程海绵支架。**方法** 依据天然软骨主要成分,提取透明软骨Ⅱ型胶原蛋白,将提取的胶原蛋白通过高速离心进行浓缩,真空冷冻干燥制得海绵支架材料,应用化学交联剂EDC/NHS进行化学交联,对支架采用组织化学染色、体外降解实验、扫描电镜和接种细胞静态培养的方法进行相关检测。**结果** 支架具有良好的孔隙结构,孔径40~130 μm,孔隙率在90%以上,细胞在支架上增殖、分化良好。**结论** 构建的高浓度Ⅱ型胶原蛋白海绵支架具有良好的生物相容性,有较好的应用前景。

[关键词] 组织工程;软骨;Ⅱ型胶原蛋白;支架
[中图法分类号] R318.08;R322.71;R341 [文献标志码] A

Construction of scaffold for treatment of articular cartilage defect using high-concentration collagen Ⅱ

Cui Yunli, Wang Fuyou, Tan Hongbo, Zhang Ying, Xiong Juan, Yang Liu (Center of Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a sponge scaffold for cell adhesion, proliferation and differentiation in cartilage tissue engineering. **Methods** Collagen Ⅱ was extracted from hyaline cartilage, and was then subjected to high-speed centrifugation and vacuum freeze-drying to obtain a sponge scaffold. The sponge scaffold was soaked in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) for cross-linking. The sponge scaffold was evaluated by scanning electron microscopy, immunohistochemistry, degradation test and cell adhesion and culture. **Results** The sponge scaffold had a good pore structure, with pore sizes of 40 – 130 μm and porosity above 90%. Good cell proliferation and differentiation were found on the scaffold. **Conclusion** The sponge scaffold constructed from high-concentration collagen Ⅱ has excellent biocompatibility, and shows great promise in the treatment of articular cartilage defect.

[**Key words**] tissue engineering; cartilage; collagen Ⅱ; scaffold

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872619) and the Tackling Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06G079). Corresponding author: Yang Liu, Tel: 86-23-68765280, E-mail: jointsurgery@163.com

创伤和骨疾病常常导致关节部位软骨缺损,造成肢体残障,严重影响患者的生活质量[1-2]。组织工程软骨重建为软骨缺损提供了新思路,目前构建组织工程软骨支架的材料种类繁多,但各种材料都无法真正起到替代软骨细胞外基质的作用,分析其原因,主要是由于构建的细胞外基质生物相容性差或者生物力学无法达到天然软骨的要求。因此,如果我们尽可能应用天然软骨细胞外基质的主要成分来构建软骨组织工程支架材料,便会具备较好的生物相容性,在此基础上通过一些安全的改性方法来提高支架的力学强度,就可以为种子细胞的增殖、分化提供良好的三维环境。

软骨的细胞外基质主要为Ⅱ型胶原蛋白,目前应用Ⅱ型胶原蛋白构建支架采用的浓度均较低。本研究欲通过提高胶原蛋白溶液的质量百分比,来构建纤维较粗的海绵支架,为种子细胞提供有利于黏附的三维环境和减缓在体内的降解速度,应用化学交联的方法对支架进行改性,并对所构建的支架材料进行相关检测,旨在为制备出满足临床需要的组织工程软骨新型仿生基质材料提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Ⅱ型胶原蛋白[3](本实验室从猪膝关节软骨提取),PBS(博士德公司,中国),Tris-HCl(Novon,美国),番红O(Sigma公

[基金项目] 国家自然科学基金(30872619);全军医学科研"十一五"攻关项目(06G079)
[通信作者] 杨 柳,电话:(023)68765280,E-mail: jointsurgery@163.com

司,美国),甲苯胺蓝(Sigma 公司,美国),天狼星红(Sigma 公司,美国),碳化二亚胺(EDC,Sigma 公司,美国),温控磁力搅拌器(上海君竺仪器制造有限公司,中国),pH 计(上海罗素科技有限公司,中国),Beckman 离心机(Beckman,美国),低温冷冻干燥机(Thermo Savant,美国),扫描电子显微镜(HITACHI3400,日本)。

1.2　海绵支架的制备

4%(质量百分比)Ⅱ型胶原蛋白海绵支架:将透析后的胶原蛋白装入离心桶,通过高速离心的办法将透析后的胶原蛋白浆浓度调整为4%,将离心后的胶原蛋白移入24孔板内,-20 ℃冰箱预冻24 h,再-80 ℃冰箱预冻2 h后,将孔板取出放入真空冷冻干燥机中冷冻干燥24 h。

1%(质量百分比)Ⅱ型胶原蛋白海绵支架:将提取的Ⅱ型胶原蛋白浓度调整为1%,搅拌均匀后移入24孔板内,-20 ℃冰箱预冻24 h,再-80 ℃冰箱预冻2 h后,将孔板取出放入真空冷冻干燥机中冷冻干燥24 h。

用EDC与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)联合使用交联,将胶原蛋白海绵支架浸在EDC/NHS溶液中,37 ℃条件下交联24 h[4-5],交联后冷冻干燥。

1.3　细胞-支架材料复合与培养

骨髓间充质干细胞取自4只6月龄,体质量37~40 kg的健康山羊(第三军医大学实验动物中心)骨髓,将骨髓间充质干细胞分离后培养,倒置显微镜每日观察细胞生长情况,待其贴壁长满单层后,消化、传代、扩增培养,收集第2代细胞[6-7]。

将24孔板内已经过钴60辐照消毒的支架,用PBS漂洗2次后,把支架内水分挤出,用滴管按1×10^7/ml的细胞密度滴加,待支架充分膨胀后停止,将24孔板放入细胞培养箱中;大约12 h,待细胞充分吸附在生物材料支架上后,在孔板内加入细胞培养液,置入37 ℃,CO_2的环境中静态培养。

1.4　检测指标

1.4.1　扫描电镜观察　　将支架材料置于铜板上,表面喷金后,应用扫描电镜对支架材料的微结构进行观察。

1.4.2　组织化学染色分析　　将支架材料石蜡包埋,将切片脱蜡后,行天狼星红染色和番红O染液染色;将静态培养10 d的细胞-支架复合体用2%的戊二醛在4 ℃的环境中固定24 h,HE染色观察细胞在支架上的形态及生长情况。

1.4.3　支架的体外降解实验　　将材料分成4组,每组6支,分别装入24孔板经过不同处理的海绵支架,分别称质量,质量记为W_0,加15 ml磷酸缓冲液(pH 7.4)、溶菌酶1×10^5 U,置于37 ℃水浴箱中。分别于1、2、3周和4周各组取出1个样本,双蒸水漂洗后,用滤纸吸去水分,真空冷冻干燥后称质量,质量记为W_t,则体外生物降解率为$(D)=(W_0-W_t)/W_0\times100\%$。

1.4.4　细胞相容性观察　　分别将培养14 d的软骨细胞-支架复合体取出,用10%甲醛固定,常规石蜡包埋,超薄切片,行HE染色,在光镜下观察支架上细胞形态。

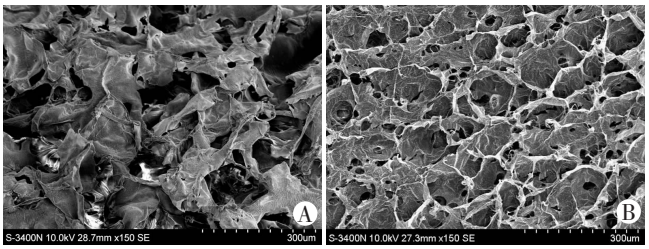
1.5　统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较行单因素方差分析。

2　结果

2.1　海绵支架超微结构

两种浓度所构建的Ⅱ型胶原蛋白浆支架材料内部均呈现均匀的多孔网状结构,并且孔通率较好(图1),4%的海绵支架纤维明显粗于1%海绵支架。4%的海绵支架孔径40~130 μm,孔隙率90%以上,1%海绵支架孔径30~120 μm,孔隙率92%以上。



A:4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架;B:1% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架

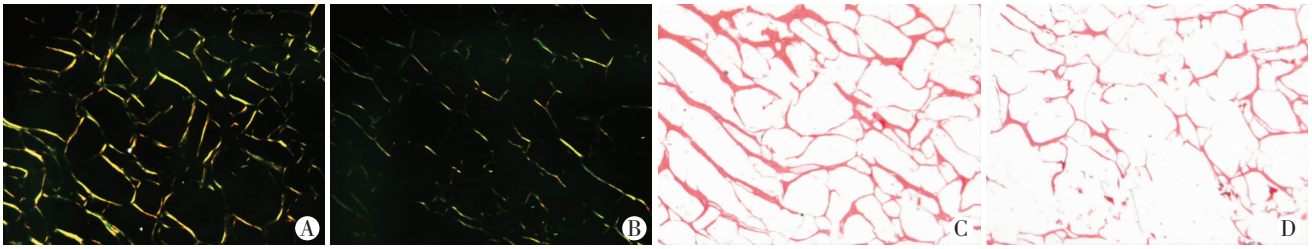
图1　支架材料扫描电镜观察

2.2　组织化学染色结果

天狼星红染色可见4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架纤维明显多于1% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架,纤维也粗于后者,海绵支架番红O染色,也可看到相同的结果。见图2。体外培养10 d的细胞-支架复合体HE染色观察,4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架细胞明显多于1% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架,4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架的胶原纤维较粗,更有利于细胞的黏附和增殖。见图3。

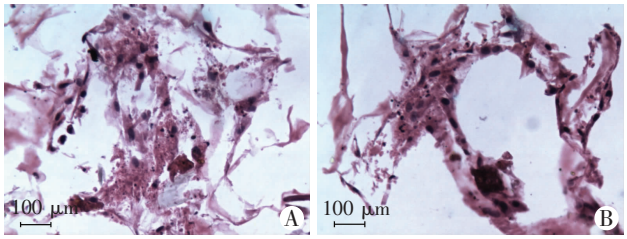
2.3　支架的体外降解率

经过1、2、3周和4周时间的降解,4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架较1% Ⅱ型胶原蛋白支架降解速度慢,4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架经EDC/NHS交联后的复合支架降解速度最慢,与交联前相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图4。



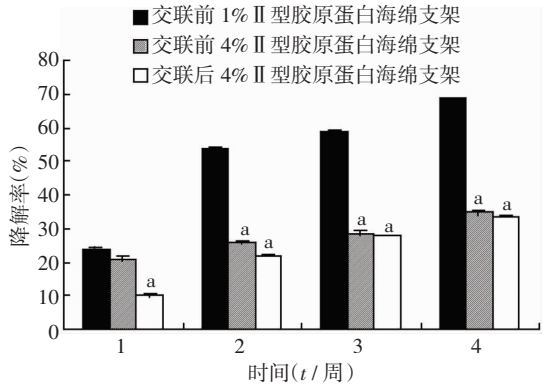
A:4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架天狼星红染色;B:1% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架天狼星红染色;C:4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架番红O染色;D:1% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架番红O染色

图2　支架材料的组织化学染色观察(×100)



A：4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架；B：1% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架

图 3　细胞-支架复合体 HE 染色观察（×200）



a：$P<0.05$，与交联前 1% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架比较

图 4　不同浓度Ⅱ型胶原蛋白海绵支架体外降解率比较

3　讨论

支架材料应该有利于细胞的增殖和分化，理想的支架应具备一定的孔隙率、孔通率和孔径[8]。目前用于构建支架的材料主要是人工合成材料和天然材料，人工合成材料来源广泛，但存在细胞毒副作用大和生物相容性差等问题，天然材料具备良好的生物相容性，但强度较差，因此要想为种子细胞提供最佳的生存环境，还是应尽量使用天然的软骨细胞外基质成分作为主要材料，然后应用化学改性技术来提高支架的强度。

Ⅱ型胶原蛋白是关节软骨的主要成分[9]，其低免疫原性、对细胞无毒副作用以及来源广泛的特点使其成为组织工程软骨支架构建的主要材料。Ko 等[10]应用Ⅱ型胶原为主要材料构建海绵支架，实验证实所构建的支架具有较好的细胞相容性。Buma 等[11]通过研究发现Ⅱ型胶原蛋白能加速种子细胞向软骨分化，通过对支架进行化学交联，提高了支架强度。Pieper 等[12]用 EDC/NHS 交联Ⅱ型胶原蛋白，结果表明经过 EDC/NHS 交联后，解链温度较交联前明显提高。目前应用Ⅱ型胶原蛋白构建支架所使用的浓度均较低，本课题组预实验发现低浓度构建的支架即使化学交联剂交联后强度仍较差，但发现提高胶原蛋白浓度再冻干后，制得的支架强度有所提高。

本研究应用关节软骨细胞外基质的主要成分Ⅱ型胶原蛋白为材料，对所提取的胶原蛋白用高速离心的方法来提高胶原蛋白的质量百分比，使其浓度达到 4% 来构建支架，与大多文献所采用的浓度 1% 构建的支架进行对比，用天狼星红和番红 O 染色观察到浓度为 4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架的胶原纤维明显增粗，更有利于细胞的贴壁和黏附，通过细胞-支架共培养，切片观察发现浓度为 4% 的支架更有利于细胞的黏附；海绵支架的体外降解实验结果显示，浓度为 4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架降解速度明显慢于 1% 海绵支架，将支架用 EDC/NHS 进行交联后，海绵支架降解速度较交联前明显减慢。另外对构建的支架应用扫描电镜进行微结构观察发现，4% Ⅱ型胶原蛋白海绵支架孔隙率仍然可以达到 90% 以上，孔径 40～130 μm，且孔通率良好。

综上所述，提高胶原蛋白浓度后所构建的支架既可以减慢降解速度，又可以使支架强度有所提高，接种细胞共培养证实具有良好的生物相容性，所以此支架在组织工程软骨缺损修复的临床应用上有较好的前景。

参考文献：

[1] Chung C, Burdick J A. Engineering cartilage tissue[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(2): 243－262.

[2] Mano J F, Reis R L. Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1(4): 261－273.

[3] Deyl Z, Miksik I, Eckhardt A. Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 790(1/2): 245－275.

[4] Ma L, Gao C, Mao Z, *et al*. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges[J]. Biomaterials, 2004, 25(15): 2997－3004.

[5] Barnes C P, Pemble C W, Brand D D, *et al*. Cross-linking electrospun type Ⅱ collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in ethanol[J]. Tissue Eng, 2007, 13(7): 1593－1605.

[6] 许澍洽，许扬滨. BMSCs 构建组织工程软骨的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志，2008，22(2)：163－166.

[7] 朱灏，许建中，周强，等. 人骨髓间充质干细胞体外增殖及成骨分化的增龄变化[J]. 第三军医大学学报，2005，27(1)：59－62.

[8] Nehrer S, Breinan H A, Ramappa A, *et al*. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes[J]. Biomaterials, 1997, 18(11): 769－776.

[9] 王富友，杨柳，段小军，等. 人体正常膝关节钙化软骨层组成成分研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(8)：687－690.

[10] Ko C S, Huang J P, Huang C W, *et al*. Type II collagen-chondroitin sulfate-hyaluronan scaffold cross-linked by genipin for cartilage tissue engineering[J]. J Biosci Bioeng, 2009, 107(2): 177－182.

[11] Buma P, Pieper J S, van-Tienen T, *et al*. Cross-linked type Ⅰ and type Ⅱ collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects--a study in rabbits[J]. Biomaterials, 2003, 24(19): 3255－3263.

[12] Pieper J S, van-der-Kraan P M, Hafmans T, *et al*. Crosslinked type Ⅱ collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering[J]. Biomaterials, 2002, 23(15): 3183－3192.

（**收稿**：2011-01-17；**修回**：2011-02-24）

（编辑　王　红）