论著

文章编号:1000-5404(2012)04-0328-04

京尼平交联羊膜的制备及其体外性能研究

王 岚[1],赵 敏[1],陈卫军[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆市生物力学重点实验室[2])

[摘要] **目的** 初步探讨新型交联剂京尼平对脱细胞羊膜性能的影响及意义,并在体外对其细胞相容性进行研究。**方法** 用京尼平溶液交联羊膜30 min,使用光镜和扫描电镜进行形态学观察,在电子万能试验机上进行生物力学测试,以新鲜羊膜作对照,得出抗拉强度、断裂伸长率、弹性模量等,同时测定京尼平交联羊膜前后,羊膜组织的厚度及抗酶消化能力;以BALB/c 3T3小鼠成纤维细胞为实验细胞,采用MTT法在体外评估该材料的细胞毒性。**结果** 京尼平交联后的羊膜呈蓝色,保持了天然组织构架的完整,纤维连接更为致密。交联羊膜组的抗拉强度为(1.489±0.405)MPa,断裂伸长率为(25.337±5.137)%,弹性模量为(0.004 7±0.002 1)GPa,与新鲜羊膜[(0.704±0.139)MPa,(15.488±6.021)%,(0.002 9±0.011 8)GPa]相比,三者均明显增加($P<0.05$)。新鲜羊膜在第1天时已完全降解,交联羊膜至第4周观察结束时仍未完全降解,降解率为(74.62±3.81)%。该材料的相对增殖度较高,细胞毒性分级在0~1级。**结论** 经新型生物交联剂京尼平交联的脱细胞羊膜组织材料具有良好的生物力学特性且无细胞毒性,是一种较为理想的眼表治疗的替代材料和组织工程角膜的支架材料。

[关键词] 京尼平;羊膜;交联;力学性能;细胞毒性

[中图法分类号] R318.08;R318.18;R329.2 [文献标志码] A

Preparation and *in vitro* characterization of genipin-crosslinked human amniotic membrane

Wang Lan[1], Zhao Min[1], Chen Weijun[2] ([1]Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the characteristics and cytocompatibility of human-amniotic membrane (HAM) fixed with genipin *in vitro* and to provide a proper biomaterial for ocular surface reconstruction. **Methods** The de-epithelialized HAM were treated by 0.5% genipin for 30 min, then examined with naked-eye, light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Untreated HAM served as control. Subsequently, the biomechanics tests were also performed for the tensile strength, elongation at break, and elastic modulus of the treated and untreated HAM. Their thickness and collagenase digestion were measured and observed on the treated and untreated HAM. The cytotoxicity of the genipin-fixed materials was evaluated *in vitro* by MTT assay using a mouse-derived established cell line of BALB/c 3T3 fibroblasts as test cells. **Results** The genipin-crosslinked HAM was blue, with very-well-preserved collagen fiber. The tensile strength, elongation at break, and elastic modulus were(1.489±0.405)MPa, (25.337±5.137)%, and (0.004 7±0.002 1) GPa respectively in the treated HAM, significantly higher than the fresh control HAM [(0.704±0.139)MPa, (15.488±6.021)%, (0.002 9±0.011 8)GPa, respectively $P<0.05$]. Genipin-crosslinked HAM had increased resistance to collagenase digestion, significantly better than the fresh control HAM. The former was still existed until the end of the experiment (4 weeks) with a degradation rate of (74.62±3.81)%, while the later HAM was degradated completely on the first day. The relative growth rate (RGR) of genipin-fixed HAM was high, and the cytotoxicity of this material was grade 0 to 1. **Conclusion** The genipin-fixed HAM is a

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2007AC5014)

[通信作者] 赵 敏,电话:(023)89012262,E-mail:minzhao2002@yahoo.com.cn

promising material for ocular surface reconstruction, which can be used as a tissue engineering material for ocular surface treatment.

[**Key words**] genipin; human amniotic membrane; crosslink; mechanical properties; cytocompatibility

Supported by the Tackling Project for Sci & Tech Research Project of Chongqing (CSTC2007AC5014). Corresponding author: Zhao Min, Tel: 86-23-89012262, E-mail: minzhao2002@yahoo.com.cn

羊膜作为一种优良的生物膜,具有来源丰富、抗炎、抗血管化、促进上皮增生分化等优点,同时也是细胞生长移行的良好支架[1-2],在眼科的应用十分广泛,但由于羊膜薄而柔软,使用时极易褶皱、撕裂、不易缝合,使操作有一定难度,且移植后的羊膜易脱落溶解,作用期较短,常常达不到治疗的效果。近年来,经交联处理的生物材料越来越受到研究者的重视。传统的交联方法大多使用化学合成类交联剂,而这类交联剂本身具有相对较高的细胞毒性,其应用受到较多限制。京尼平是一种提取于传统中药杜仲的新型天然生物交联剂,来源于天然植物、细胞毒性小[3-4],有望解决其他化学交联剂固有的缺陷。本研究以人脱细胞羊膜为基体,采用京尼平进行交联,并在体外对此种材料的性能特征及细胞相容性进行研究,以期研制出一种可克服前述羊膜所存在的缺点的新型移植材料。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

新鲜人羊膜(由重庆医科大学附属第一医院妇产科提供),京尼平、胰酶、乙二胺四乙酸(EDTA)、胶原酶、MTT购自Sigma公司,小鼠胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3 cell,购自重庆医科大学组织胚胎学教研室),S-3400N型扫描电镜(日本日立公司),SpectraMax M2酶联免疫检测仪(美国Molecular Devices公司),精密厚度测量仪(精度0.01 mm,桂林广陆数字测控股份有限公司),冻干机(日本日立公司),精密电子天平(日本日立公司)。

1.2 材料的制备、交联及体外性能检测

1.2.1 羊膜的制备 新鲜羊膜取自健康剖宫产产妇的胎盘,产前血清学检查排除乙肝、丙肝、梅毒及获得免疫缺陷综合征。取材均在无菌操作下完成。将胎盘羊膜面用无菌生理盐水冲洗干净,自羊膜与绒毛膜间的潜在空隙钝性剥离羊膜,上皮面朝上置于无菌方盘中,抗生素生理盐水浸泡(含庆大霉素106 U/L、二性霉素B 2.5 mg/L)20 min。

1.2.2 羊膜的脱细胞及交联 将由上述方法新鲜获取并洗净血迹的羊膜组织在室温下自然风干5 min,浸入0.25%的胰酶和0.02% EDTA混合液中,于室温消化30 min,之后用刀片轻刮上皮,PBS冲洗,显微镜下观察,无上皮细胞,即得脱上皮细胞羊膜组织。将该脱上皮细胞羊膜组织浸入0.5%的京尼平溶液中30 min,整个交联过程在恒温振荡器中进行,以便交联液与被交联组织更加充分和均匀地接触。

1.2.3 组织形态学检测 将新鲜制备的脱细胞羊膜用10%福尔马林固定,经无水酒精梯度脱水,在光镜和HE染色下观察有无细胞残留。分别将新鲜、京尼平交联后的脱细胞羊膜行扫描电镜观察。

1.2.4 厚度测定 用滤纸吸干新鲜及京尼平交联后的脱细胞羊膜表面的水分,用厚度仪(精度0.01 mm)完成测试。

1.2.5 力学性能测试 分别将新鲜的及京尼平交联后的脱上皮羊膜剪成1.5 cm×4.5 cm长条状各8条,在RGT-5A微机控制电子万能试验机(深圳市瑞格尔仪器有限公司)上测试,整个实验过程用生理盐水保持试验样品的湿润,两端用同样尺寸的纱布包裹,然后进行加载实验和单向静载拉伸实验,以10 mm/min的速度对试样施加拉应力,试样破坏后,计算机自动输出各组标本的抗拉强度、断裂伸长率、弹性模量及曲线等。实验所有样品在生物力学测试前均反复拉伸3次进行预调(载荷范围0~5 N,应变率10 mm/min)[5]。

1.2.6 降解率测定 将制备好的新鲜脱上皮羊膜和京尼平交联后的脱上皮羊膜在室温下自然风干5 min,并剪取同样大小(2 cm×2 cm)的2种羊膜各5片,干燥后分别称取其干质量M,随即放入0.25%胶原酶溶液中(于37℃,恒温水浴箱中),隔天换液,并取出羊膜PBS清洗后2次干燥后测其干质量m。降解率=(M-m)/M×100%。

1.2.7 细胞毒性实验 将制备的京尼平交联羊膜材料(整个过程都保持无菌)按细胞培养液(DMEM培养液中含10%小牛血清,浸提介质)与京尼平测试样品表面积之比为1 ml/cm^{2}在37 ℃无菌条件下浸提72 h作为浸提液。将鼠成纤维细胞制备成每50 000个1 ml的细胞悬液,接种于96孔培养板中,每孔100 μl细胞悬液和100 μl材料浸提液,阴性对照组以100 μl细胞培养液代替材料浸提液,每组材料5个平行样,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养7 d,分别于2、4、7 d取出一个96孔板行MTT活性检测(在490 nm波长检查光密度值),按下列公式计算细胞相对生长率(RGR)。RGR=试样溶液光密度值/阴性对照溶液光密度值。依据RGR,再按国标"GB/T16886.5-2003"的标准[6]评定材料细胞毒性等级。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行处理,数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用配对t检验。

2 结果

2.1 组织形态学观察

京尼平交联后的羊膜外观为淡蓝色,半透明膜,质地柔韧,

易成形。扫描电镜下可见京尼平交联后的羊膜较新鲜羊膜纤维结构更加致密,均无细胞残留。见图1、2。

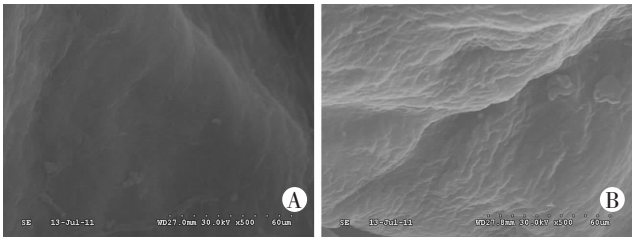


图1 新鲜羊膜(A)和京尼平交联羊膜(B)扫描电镜观察

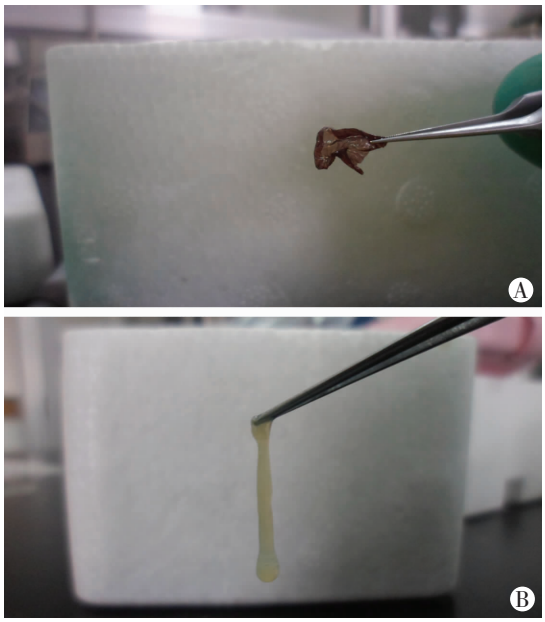


图2 京尼平交联羊膜(A)和新鲜羊膜(B)大体观察

2.2 厚度测定

组织厚度测定结果显示,2组羊膜相比较,京尼平交联后的羊膜组织略增厚,厚度(0.040±0.009)mm,与新鲜羊膜厚度[(0.038±0.010)mm]差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 力学性能测试

2组羊膜的应力-应变曲线分别如图3所示。新鲜去上皮羊膜的抗拉强度为(0.704±0.139)MPa,断裂伸长率为(15.488±6.021)%,弹性模量为(0.002 9±0.011 8)GPa;京尼平交联羊膜的抗拉强度为(1.489±0.405)MPa,断裂伸长率为(25.337±5.137)%,弹性模量为(0.004 7±0.002 1)GPa。2组各项指标比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 降解率测定结果

2组羊膜降解率测定结果,第1天观察结束时,新鲜脱细胞羊膜已完全溶解,呈悬液状。京尼平交联的羊膜组还保持了原有外观大小,第1天的降解率为(4.48±0.86)%,第3天的降解率为(4.96±1.39)%,第5天的降解率为(9.44±2.67)%。第1周降解率(15.25±4.08)%,第2周降解率为(34.93±6.07)%,第3周降解率为(50.49±4.77)%,第4周降解率为(74.62±3.81)%。

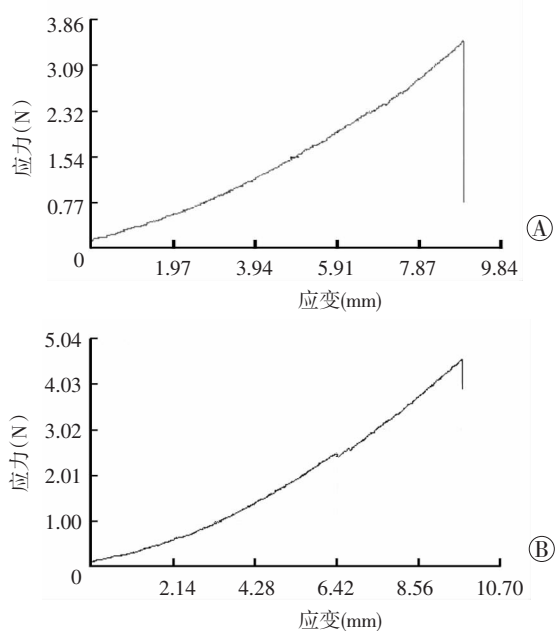


图3 新鲜羊膜(A)和交联羊膜(B)应力-应变曲线

2.5 细胞毒性实验

镜下可见,京尼平材料浸提液培养的细胞生长良好。MTT检测在第2、4、7天的细胞生长率分别(95.3±2.5)%、(109.1±8.1)%、(103.2±13.1)%。其细胞毒性分级:第2天为1级,第4天,第7天为0级。均属合格,无细胞毒性,可以用作生物材料。

3 讨论

羊膜特有的结构和生物学活性,使其成为较理想的生物材料。目前羊膜在眼科得到广泛的应用,并已成为眼科研究和应用的热点。羊膜植片的主要作用在于提供一个使眼表上皮在其上生长的基底膜,完成眼表的重建,保护和促进残留的角膜上皮愈合或者起到填充物的作用[7-8]。但在这些使用过程中由于羊膜自身存在的太薄、易卷曲、易皱褶、易撕裂、不易缝合,且术后很快就发生溶解等缺点,使得羊膜的临床效果较易受到影响。近年来,一些学者也通过生物技术对羊膜进行生物学改良,但主要是通过改变羊膜结构(去除上皮细胞或改变上皮细胞性质)及成分(吸附特殊药物,使羊膜固有化学成分发生变化)来实现[9-10]。随着组织工程生物材料研究的不断进展,经交联处理的异种或同种异体生物材料越来越受到研究者的重视,羊膜作为一种优良的生物学材料,有望通过交联而对其进行生物学性状改良,克服目前使用中存在的一些缺点,而应用于实际。

京尼平属提取于传统中药杜仲的天然生物交联剂。它是一种环烯醚萜类化合物,具有羟基、羧基等多个活性官能团[11],可以与生物组织中赖氨酸、羟赖氨

酸及精氨酸等残基的自由氨基反应[12],进而使生物材料交联。初步研究[13]表明,京尼平对生物材料的交联是一种环状交联,而且会生成一种称为栀子蓝的深蓝色色素[14],该色素可用于食品染料。京尼平克服了常见交联剂在处理生物组织方面的缺点,低细胞毒性,而且由其交联的生物组织在移植后不易钙化[15]。

本实验将新鲜去上皮羊膜用 0.5% 京尼平溶液在 37℃交联 30 min[16],所得羊膜外观为蓝色半透明膜,质地柔韧,较易成形,经交联后的羊膜所呈现出的蓝色不会影响光线穿透,而且还更便于眼表移植后的观察。扫面电镜结果显示京尼平交联后的羊膜保持了羊膜的天然结构且纤维连接更加致密。

机械力学测试结果显示:京尼平交联后的羊膜组织厚度并未明显增加但在测试时产生的最大应力明显高于新鲜组织,在最大应力处产生的应变(即断裂伸长率)也高于新鲜羊膜;在弹性模量方面,京尼平交联的羊膜高于新鲜羊膜,这说明交联后的羊膜组织略显僵硬,但韧性较好,具有更好的黏弹性,这也是作为眼表移植材料所需要的。京尼平交联的羊膜力学性能优良,强度和韧性都较好,有足够强度以承受缝合力和眼表面张力,也有一定的弹性能够弯曲和随眼运动时扩张,以致不压迫眼球,能给眼表重建手术提供一个光滑而有弹性的表面,具有较好的临床应用前景[5]。

本实验采用了较高浓度的胶原酶溶液对羊膜进行消化,结果显示在第 4 周观察结束时,京尼平交联后的羊膜仍未完全降解,而新鲜羊膜在第 1 天就已完全降解。结果表明京尼平交联后的羊膜抗酶的消化能力明显增强,提示京尼平羊膜可以延长在眼表停留的时间,确保眼表有足够时间进行修复。

细胞毒性实验是反应材料生物相容性的重要指标,本实验中材料浸提液对小鼠成纤维细胞增殖无明显影响,说明京尼平交联羊膜具有良好的细胞相容性。Sung 等[4]报道通过 MTT 试验和细胞集落试验,发现京尼平交联的材料毒性远低于戊二醛材料,在戊二醛交联制品上所接种的细胞无一存活,而在培养 3 d 后的京尼平交联制品上布满了 3T3 成纤维细胞。

综上所述,京尼平是一种有效的天然无毒的生物交联剂,交联后的羊膜其微观与整体结构与交联前相差不大,保持了其完整性。这样的结构有利于周围受体细胞长入[17];交联羊膜的力学性能表明,其具有较好的韧性、黏弹性,适合做眼表移植材料;交联羊膜细胞毒性很小,可用作生物材料,其有效性有待进一步证明。

参考文献:

[1] Sangwan V S, Burman S, Tejwani S, *et al*. Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders[J]. Indian J Ophthalmol, 2007, 55(4): 251 – 260.

[2] Shay E, Kheirkhah A, Liang L, *et al*. Amniotic membrane transplantation as a new therapy for the acute ocular manifestations of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis [J]. Surv Ophthalmol, 2009, 54(6): 686 – 696.

[3] Xu L, Davis S K, Hagness S C, *et al*. Microwave imaging via space-time beamforming: experimental investigation of tumor detection in multilayer breast phantoms [J]. IEEE Transact Microwave Theory Tech, 2004, 52(8): 1856 – 1865.

[4] Sung H W, Huang R N, Huang L L H, *et al*. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 1999, 10(1): 63 – 78.

[5] 柯宁, 赵敏, 李臻, 等. 胶联羊膜的制备及生物力学研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2008, 27(1): 112 – 116.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 16886.5-2003 医疗器械生物学评价第 5 部分: 体外细胞毒性试验[S]. 2003.

[7] Liu J, Sheha H, Fu Y, *et al*. Update on amniotic membrane transplantation [J]. Expert Rev Ophthalmol, 2010, 5(5): 645 – 661.

[8] 周世有, 陈家祺, 陈龙山, 等. 羊膜移植重建静止期眼结膜表面的远期疗效分析[J]. 中华眼科杂志, 2004, 40(11): 745 – 749.

[9] 潘志强, 张文华, 武宇影. 培养角膜缘干细胞羊膜移植治疗碱烧伤动物的实验研究[J]. 中华眼科杂志, 2000, 36(1): 32 – 35.

[10] 瞿小妹, 褚仁远, 周行涛. 羊膜载释药物对渗入眼内的促进作用[J]. 眼科研究, 2003, 21(4): 362 – 364.

[11] Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, *et al*. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results [J]. J Cataract Refract Surg, 2008, 34(5): 796 – 801.

[12] Nickerson M T, Farnworth R, Wagar E, *et al*. Some physical and microstructural properties of genipin-crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels[J]. Int J Biol Macromol, 2006, 38(1): 40 – 44.

[13] Somers P, De-Somer F, Cornelissen M, *et al*. Genipin blues: an alternative non-toxic crosslinker for heart valves? [J]. J Heart Valve Dis, 2008, 17(1): 682 – 688.

[14] Yao C H, Liu B S, Chang C J, *et al*. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials[J]. Materials Chemistry and Physics, 2004, 83(2/3): 204 – 208.

[15] Koo H J, Lim K H, Jung H J, *et al*. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103(3): 496 – 500.

[16] Sung H W, Hsu H L, Shih C C, *et al*. Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds[J]. Biomaterials, 1996, l7(14): 1405 – 1410.

[17] 李莉, 陈健, 余喜讯. 一种新型人工食道用生物材料的制备及其性能研究[J]. 医疗卫生装备, 2008, 29(10): 1 – 3, 9.

(**收稿**:2011-09-13;**修回**:2011-10-19)

(编辑 张 维)