文章编号:1000-5404(2012)19-1985-04

论著

京尼平交联脱细胞猪膀胱的体外生物学性能研究

范雪梅[1],王颖楠[1],陈卫军[2],徐惠成[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院妇产科[1],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** 探讨新型生物交联剂京尼平对脱细胞猪膀胱性能的影响,为女性盆底功能重建提供理想的组织工程补片。**方法** 采用表面活性剂+酶消化法对猪膀胱进行脱细胞处理后,用0.625%京尼平溶液交联脱细胞膀胱72 h。通过HE、Weigert弹力纤维+VanGieson结缔组织(ET+VG)染色及扫描电镜进行组织形态观察,使用万能材料试验机检测材料生物力学性能,并对交联前后的脱细胞猪膀胱进行厚度、吸水性、体外胶原酶降解性能测定,以L929细胞为实验细胞,采用MTT法评估材料的细胞毒性。**结果** 京尼平交联脱细胞猪膀胱后呈深蓝色,保持了天然组织构架的完整,胶原纤维更加致密,吸水性提高,力学性能良好,脱细胞猪膀胱在第7天已完全降解,交联后在第28天降解率为2%。交联前后材料的细胞毒性为0~1级。**结论** 经天然交联剂京尼平交联的脱细胞猪膀胱吸水性好,具有良好的生物力学性能,抗酶解能力强且无细胞毒性,是一种较为理想的盆底重建材料。

[关键词] 京尼平;脱细胞猪膀胱;交联;力学性能;细胞毒性
[中图法分类号] R318.08;R322.62;R329.24 [文献标志码] A

In vitro biological characteristics of acellular porcine bladder crosslinked with genipin

Fan Xuemei[1], Wang Yingnan[1], Chen Weijun[2], Xu Huicheng[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, [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 acellular porcine bladder fixed with genipin *in vitro* in order to provide ideal biomaterials for the reconstruction of female pelvis. **Methods** Cellular components of porcine bladder were removed by detergent-enzymatic method. The acellular porcine bladder was crosslinked with 0.625% genipin for 72 h. The morphology of the obtained bladder was examined with hematoxylin and eosin staining, elastin/van Gieson staining and observed with scanning electron microscopy. Properties of the crosslinked acellular matrix were evaluated for tissue thickness, water absorption and *in vitro* enzymatic degradation. The cytotoxicity of the genipin-fixed materials was evaluated *in vitro* by MTT assay using a murine fibroblast cell line L-929. **Results** The genipin-crosslinked acellular porcine bladder was dark blue, with very well preserved collagen fibers. Cosslinked tissues had strong hydrophilicity and good mechanical properties, with a degradation ratio of only 2% after collagenase degradation for 28 d. While, the acellular porcine bladder was degradated completely at 7 d after collagenase treatment. The cytotoxicity of the materials was scored as grade 0 to 1. **Conclusion** The genipin-fixed acellular porcine bladder possesses the ability of good hydrophilia, cytocompatibility and resistance to enzymatic degradation. It can be used as an ideal tissue engineering material for the reconstruction of female pelvis.

[**Key words**] genipin;acellular porcine bladder;crosslink;mechanical properties;cytotoxicity

Corresponding author: Xu Huicheng, E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

近年来,盆底缺陷修复和重建手术有了较大的进步,目前认为加用组织替代物的术式是治疗盆底功能障碍的最佳手段,特别是重度和复发患者。当前临床使用的组织替代物主要是聚丙烯材料合成的不可吸收补片,性质稳定,疗效确切,但并发症多,如阴道侵蚀、疼痛、感染、出血、性交困难、器官穿孔、泌尿问题。为此,美国FDA就关于盆腔器官脱垂和尿失禁修复使用聚丙烯补片多次提出警告[1]。因此有必要寻求理想的组织替代物,而经过脱细胞处理的天然生物材料由于具有很好的生物相容性,在组织工程中得到了广泛

[通信作者] 徐惠成,E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

的应用。但脱细胞材料面临的最大问题是不易控制其自然降解周期和组织生长之间的平衡,可能在组织未充分修复完全时材料已完全降解。因此经交联处理的生物材料越来越受到研究者的重视,但常用的人工合成化学交联剂本身或其反应产物常常具有细胞毒性等不良反应[2]。京尼平是一种从栀子果实中提取的天然交联剂,和其他交联剂相比,其细胞毒性很小[3]。本课题组在前期研究[4]的基础上,采用京尼平交联脱细胞猪膀胱,在体外对材料的性能特征及细胞相容性进行研究,为进一步研究优化盆底补片材料提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

京尼平(成都康邦生物技术有限公司),三羟甲基氨基甲烷(BBI),苯甲基磺酰氟(北京鼎国生物技术有限公司),Triton X-100、DNA酶及RNA酶(生工生物工程上海有限公司),十二烷基硫酸钠(捷瑞生物工程有限公司),Ⅰ型胶原酶(Sigma公司,美国)。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),精密测厚仪(日本东洋精机),冻干机,扫描电镜,CO_2培养箱,CK2型倒置相差显微镜,Bio-Rad 680 XR型酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 脱细胞处理 采用表面活性剂+酶消化法[5-8],对新鲜猪膀胱进行脱细胞处理。取封闭饲养健康成年猪处死30 min内的膀胱,置入4 ℃生理盐水中尽快带回实验室,无菌PBS反复冲洗,剔除外周脂肪和结缔组织,沿膀胱颈部剪开膀胱,取无损伤、厚度均匀、大小不等(>20 mm×10 mm)组织,浸泡于三羟甲基氨基甲烷缓冲液(内含苯甲基磺酰氟0.035 mmol/L),室温下振荡搅拌48 h,间隔8~12 h更换缓冲液;再置入1% Triton X-100的三羟甲基氨基甲烷缓冲液,缓冲液同样含有苯甲基磺酰氟,室温下振荡搅拌48 h,间隔8~12 h更换缓冲液1次;转移至DNA酶和RNA酶的双酶消化液中室温消化24 h;漂洗后置入三羟甲基氨基甲烷缓冲液的1%十二烷基硫酸钠溶液中持续浸泡搅拌48 h,定时换液。PBS充分漂洗,4 ℃保存备用。

1.2.2 材料交联和固定 将已脱细胞处理的猪膀胱随机分成2组:A组为脱细胞组,B组为京尼平交联组。B组采用0.625%的京尼平溶液,pH=7.4,室温摇床交联72 h[9]。用2块玻璃平板将所有未交联和交联的脱细胞膀胱压平并固定,-80 ℃冰箱快速冷冻后,置于真空冷冻干燥机中,持续10 h左右。经密封包装后,送至第三军医大学辐照中心用^{60}Co γ射线照射除菌,4 ℃保存备用。

1.2.3 组织学检测 将A、B两组材料多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片。用HE染色观察交联前后的脱细胞情况和纤维排列;用Weigert弹力纤维+VanGieson结缔组织(ET+VG)染色法观察交联前后纤维的变化情况。用体积分数2.5%戊二醛和1%锇酸固定2组材料,梯度酒精逐级脱水,置换,临界点干燥后喷金,扫描电镜观察细胞脱落和纤维排列情况。

1.2.4 厚度 用精密测厚仪(精度0.000 1)对交联前后的组织厚度进行测量,观察交联前后组织的大体形态学变化。

1.2.5 吸水性检测 分别将2组材料放入盛有20 ml去离子水的烧杯中,放入前测定材料质量,浸泡24 h后再测定各材料的质量。吸水性由如下公式进行计算:吸水性(W)=(Wt-Wi)/Wi×100%。W代表材料的吸水能力,Wi是最初的材料质量,而Wt是去离子水浸泡24 h后的质量,每组材料共测定5个样本,算出5个W值,取其平均值最后代表每种材料的吸水性能。

1.2.6 生物力学检测 按照GB/T7742.1-2005,试样剪成长条状(约40 mm×10 mm),用RGT-5A微机控制电子万能试验机进行抗拉强度、弹性模量、断裂伸长率测定。测试条件:常温、常压下,加载速度为5 mm/min,断裂即停止加载。

1.2.7 体外降解 采用加了双抗的50 U/ml的Ⅰ型胶原酶溶液作为降解液,按组织质量(mg):降解液用量(ml)=1:0.5添加,37 ℃恒温震荡,每7天更换1次降解液。每天取样后将样品冷冻干燥后,称量,计算降解率,降解率(%)=(W-w)/W×100%,式中W是降解前样品干质量,w为降解后样品干质量[10]。

1.2.8 细胞毒性试验 参照ISO10993-5(2009)[11],采用细胞增殖度法检测各组材料的细胞毒性。以含血清10%的RPMI1640培养基为浸提介质,6 cm^2/ml为浸提比例,37 ℃浸提样品24 h制备浸提液。空白对照:含血清10%的RPMI1640培养基。阴性对照:聚苯乙烯(浸提方法同试验样品)。阳性对照:含0.5%苯酚溶液(由RPMI1640培养基配置)。L929细胞在96孔细胞培养板内,每孔加入100 μl上述细胞悬液,培养24 h后,分组换液:浸提液组(100%、50%、25%和12.5% 4个剂量)、阴性对照组、阳性对照组和空白对照组,每组5孔。培养24 h后,观察细胞形态,行MTT活性检测(在570 nm波长测光密度值),根据公式计算细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)。RGR=供试品组(阴性、阳性组)D(570)值/空白对照组D(570)值×100%。按照评级标准,对样品细胞毒性程度进行评价。RGR≥100%为0级,75%~99%为1级,50%~74%为2级,25%~49%为3级,1%~24%为4级,0%为5级。

1.3 统计学分析

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 19.0统计软件对结果进行方差分析,行LSD检验。两组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 组织形态学观察

脱细胞猪膀胱冻干前呈半流体状,厚度及形状可调节。冻干后呈白色半透明状,交联后呈深蓝色,变厚半透明(图1)。HE染色及ET+VG染色光镜观察可见大量淡红色胶原,排列整齐,无蓝染核物质,无残留细胞(图2、3),经京尼平交联后,胶原纤维和弹力纤维都保存得很完整。扫描电镜观察,材料上未见细胞残留,细胞完全脱落,且纤维保存完好,排列紧密(图4),交联后纤维更加致密。

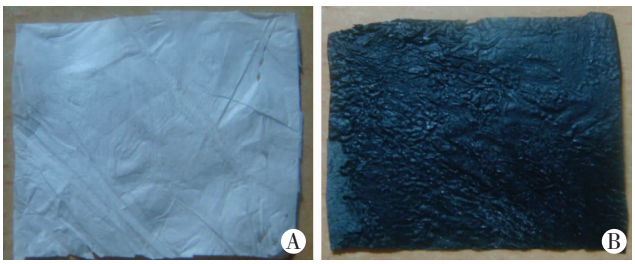


图 1　冻干脱细胞猪膀胱(A)和京尼平交联后脱细胞猪膀胱(B)大体观察

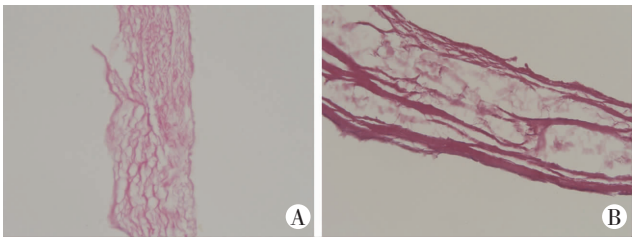


图 2　脱细胞猪膀胱(A)和京尼平交联后脱细胞猪膀胱(B)HE 染色观察　(×200)

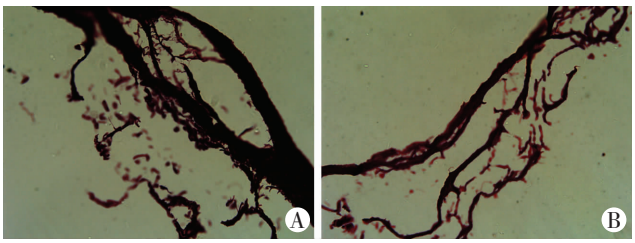


图 3　脱细胞猪膀胱(A)和京尼平交联后脱细胞猪膀胱(B)ET + VG 染色观察　(×200)

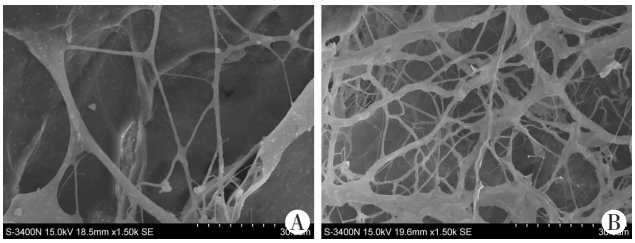


图 4　脱细胞猪膀胱(A)和京尼平交联后脱细胞猪膀胱(B)扫描电镜观察

2.2　厚度测定

交联后组织厚度明显增加,两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1　2 组材料的生物力学测试结果($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	厚度(mm)	断裂伸长率(%)	抗拉强度(MPa)	弹性模量(GPa)
脱细胞组	0.16 ± 0.10	17.57 ± 2.97	7.72 ± 0.91	0.034 ± 0.035
京尼平交联组	0.37 ± 0.14[a]	25.35 ± 2.68[a]	7.69 ± 1.17	0.007 ± 0.008[a]

a: $P < 0.05$,与脱细胞组比较

2.3　吸水性检测

脱细胞猪膀胱吸水率为(585 ± 73)%,交联后吸水率增加[(736 ± 97)%],差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4　力学性能测试

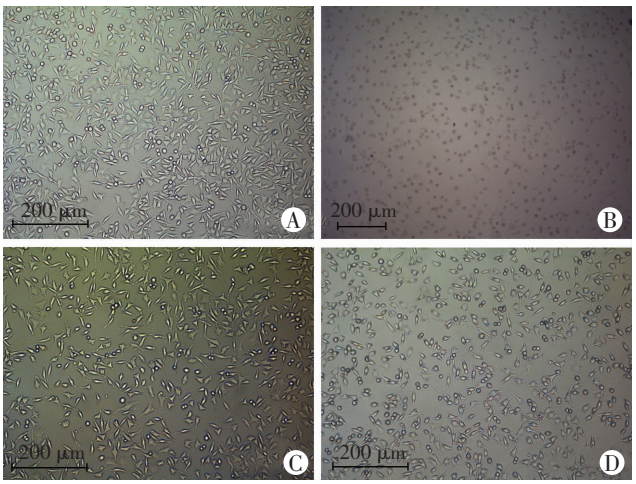
2 组材料的力学测试结果见表 1。交联后抗拉强度无变化,弹性模量下降,断裂伸长率明显提高,表明交联后的材料脆性降低、弹性更好,这与盆底重建对替代材料的要求相符。

2.5　体外降解

脱细胞组第 7 天完全降解,而交联组在 28 d 后的降解率为 2%,基本无降解。表明交联后材料的抗酶降解能力明显提高。

2.6　细胞毒性

倒置显微镜观察在细胞培养 24 h 时阳性对照浸提液中细胞正常形态消失,细胞核固缩、细胞崩解成碎片;2 组材料的 4 个浓度组浸提液中的细胞生长良好,细胞数量明显增加,与阴性对照组相似。见图 5。从表 2 可见,阳性对照材料毒性为 4 级,阴性对照材料毒性为 0 ~ 1 级,2 组材料的 4 个浓度组的细胞毒性分级为 0 ~ 1 级,为合格医用材料。



A:阴性对照组;B:阳性对照组;C:50% 浓度的脱细胞组;D:100% 浓度的京尼平交联组

图 5　倒置显微镜观察 2 组培养 24 h 细胞形态

表 2　2 组细胞毒性

组别	D(570)值	细胞增殖率(%)	细胞毒性等级	组别	D(570)值	细胞增殖率(%)	细胞毒性等级
100% 浓度的京尼平交联组	0.381 ± 0.031	100 ± 8	0 ~ 1	100% 浓度的脱细胞组	0.447 ± 0.023	97 ± 8	0 ~ 1
50% 浓度的京尼平交联组	0.385 ± 0.028	101 ± 1	0	50% 浓度的脱细胞组	0.447 ± 0.026	98 ± 9	0 ~ 1
25% 浓度的京尼平交联组	0.355 ± 0.011	93 ± 4	1	25% 浓度的脱细胞组	0.470 ± 0.027	103 ± 9	0 ~ 1
12.5% 浓度的京尼平交联组	0.351 ± 0.034	92 ± 7	1	12.5% 浓度的脱细胞组	0.430 ± 0.028	94 ± 4	1
阴性对照组	0.378 ± 0.024	99 ± 6	0 ~ 1	阴性对照组	0.462 ± 0.036	101 ± 8	0 ~ 1
阳性对照组	0.050 ± 0.003	13 ± 1	4	阳性对照组	0.048 ± 0.002	11 ± 1	4

3 讨论

脱细胞膀胱主要由Ⅰ型、Ⅲ型胶原和弹性蛋白组成[8,12],也包含细胞外基质以及各种生长因子[5]等,这种结构特点有利于材料植入体内的重构。目前,脱细胞膀胱已成为泌尿生殖外科研究和应用的热点,但还少见脱细胞膀胱进行交联和盆底修复应用方面的报道。

研究表明京尼平对生物材料的交联是一种环状的分子间和分子内交联[2],而且会生成一种称为栀子蓝色素的深蓝色物质。京尼平不仅细胞毒性低,文献报道应用京尼平对生物材料进行交联可以在机械强度方面获得较好的效果[10,13-14],通过动物体内实验证实京尼平有良好的生物相容性[15]。

本研究用京尼平交联脱细胞猪膀胱后,材料呈深蓝色半透明,柔韧,可剪裁成不同形状,适宜阴道内放置。扫描电镜和ET+VG染色显示,经京尼平处理的脱细胞膀胱主要由胶原纤维和弹力纤维组成,纤维增多、致密、保存完整,组织的整体结构保持较好。

吸水性能是理想支架材料的重要评价指标,高的吸水性能有利于营养的传输和细胞在材料上生长[16],交联后材料吸水性能增加,有利于纤维细胞增殖、组织修复。

本研究生物力学性能结果显示:京尼平交联后,材料厚度增加,其原因可能是交联剂使胶原分子之间形成分子内和分子间交联,拉近了胶原分子的距离,组织收缩。交联后材料的抗张强度无明显变化,可能是由于组织厚度的影响,交联后组织厚度大约增加了1倍。断裂伸长率是材料的脆性指标,值越大则脆性越小,交联后断裂伸长率明显增加,提示材料脆性降低。弹性模量越大,材料的刚性就越强,弹性则越差,交联后材料的弹性模量降低提示材料的弹性增强。分析表明交联后的脱细胞猪膀胱力学性能得到改善,符合盆底重建替代材料的要求。

本研究体外降解实验说明,京尼平交联的脱细胞猪膀胱体外抗酶解能力明显增强,材料的稳定性提高,在体内停留时间延长,能保证有足够长的时间修复薄弱、受损组织。

为了检测材料的生物相容性,细胞毒性实验是材料初选时的必测项目,本研究采用间接接触方法,通过细胞的增殖率来测定细胞的生长增殖情况,从而间接检测材料对细胞的毒性作用。材料浸提液4个浓度组对小鼠成纤维细胞的增殖均无明显影响,说明京尼平交联的脱细胞材料不会干扰生物细胞的正常功能,可以认为该材料对人体是安全的。

综上所述,京尼平交联的脱细胞猪膀胱,吸水性强,维持了很好的力学性能,稳定性高,细胞毒性小。初步研究表明,用其来作为盆底重建的支架材料,有很好的应有前景。

参考文献:

[1] US Food and Drug Administration. FDA Safety Communication: UPDATE on Serious Complications Associated with Transvaginal Placement of Surgical Mesh for Pelvic Organ Prolapse[EB/OL]. (2011-07-13) [2012-05-02] http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm262435.htm.

[2] Sung H W, Liang I L, Chen C N, *et al*. Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin)[J]. J Biomed Mater Res, 2001, 55(4): 538-546.

[3] Bedran-Russo A K, Pereira P N, Duarte W R, *et al*. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007, 80(1): 268-272.

[4] Liu L, Li D, Wang Y, *et al*. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic (porcine) extracellular matrix (ECM) scaffold for pelvic reconstruction[J]. Int Urogynecol J, 2011, 22(2): 221-227.

[5] Badylak S, Meurling S, Chen M, *et al*. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model[J]. J Pediatr Surg, 2000, 35(7): 1097-1103.

[6] Merguerian P A, Reddy P P, Barrieras D J, *et al*. Acellular bladder matrix allografts in the regeneration of functional bladders: evaluation of large-segment (>24 cm) substitution in a porcine model[J]. BJU Int, 2000, 85(7): 894-898.

[7] 袁铭,李汉忠,张玉石,等. 无细胞基质组织工程膀胱生物支架材料的生物力学特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(36): 7007-7011.

[8] Reddy P P, Barrieras D J, Wilson G, *et al*. Regeneration of functional bladder substitutes using large segment acellular matrix allografts in a porcine model[J]. J Urol, 2000, 164(3 Pt 2): 936-941.

[9] 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, 17(14): 1405-1410.

[10] 田聪, 万荣欣, 刘欣, 等. 生物交联剂京尼平交联牛心包生物支架材料的性能[J]. 中国生物医学工程学报, 2011, 30(2): 281-286.

[11] ISO 10993-5: 2009. Biological evaluation of medical devices: Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity[S]. 2009.

[12] Dahms S E, Piechota H J, Dahiya R, *et al*. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human[J]. Br J Urol, 1998, 82(3): 411-419.

[13] Haag J, Baiguera S, Jungebluth P, *et al*. Biomechanical and angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue[J]. Biomaterials, 2012, 33(3): 780-789.

[14] 王岚, 赵敏, 陈卫军. 京尼平交联羊膜的制备及其体外性能研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(4): 328-331.

[15] Gu Z, Zhang X, Yu X, *et al*. Biocompatibility of genipin-fixed porcine aorta as a possible esophageal prosthesis[J]. Materials Science and Engineering C, 2011, 31(7): 1593-1601.

[16] Ahn H H, Kim K S, Lee J H, *et al*. Porcine small intestinal submucosa sheets as a scaffold for human bone marrow stem cells[J]. Int J Biol Macromol, 2007, 41(5): 590-596.

(**收稿**:2012-03-23;**修回**:2012-05-02)

(编辑 吴培红)