DOI:10.16016/j.1000-5404.201511111

小肠黏膜下层冷冻凝胶用于细胞移植支架的研究

廖建贵[1],李 喆[1],曹 川[1],葛良鹏[2],李世荣[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院整形美容外科[1];400039 重庆,重庆市畜牧科学研究院[2])

[摘要] **目的** 利用猪小肠黏膜下层(small intestinal submucosa,SIS)制备一种可用于细胞移植的具有形态记忆功能的新型支架材料。**方法** 将脱细胞 SIS 粉末溶解,通过自制混匀装置,用不同浓度的碳化二亚胺冷冻交联制备不同参数的 SIS 冷冻凝胶。检测弹性形变及形态记忆功能。扫描电镜观察并测定孔径大小,检测吸水率、体外降解率和机械性能,观察小鼠成纤维细胞在支架上的黏附生长情况。**结果** SIS 冷冻凝胶压缩达 85% 以上仍可复原,可通过注射器注射。扫描电镜提示具有疏松多孔结构,孔隙相通,孔径大小为(106.63 ± 28.90)μm。随着碳化二亚胺浓度的升高,吸水率、细胞毒性差异无统计学意义,降解速率逐渐减缓,机械强度逐步提升。小鼠成纤维细胞在 SIS 冷冻凝胶上呈线形、纺锤形生长,有大量伪足,部分融合成片紧贴于材料表面及孔隙内壁。**结论** 具有弹性形变和形态记忆功能的可注射 SIS 冷冻凝胶生物、物理性能良好,是一种良好的细胞移植支架材料。

[关键词] 小肠黏膜下层;支架;冷冻凝胶

[中图法分类号] R318.08;R322.45;R329-33 [文献标志码] A

Small intestinal submucosa cryogel as scaffold for cell transplantation

Liao Jiangui[1], Li Zhe[1], Cao Chuan[1], Ge Liangpeng[2], Li Shirong[1] ([1]Department of Cosmetic Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing, 402460, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare a new scaffold with shape memory properties for cell transplantation by using porcine small intestinal submucosa (SIS). **Methods** The acellular SIS powder was dissolved, mixed with different concentrations of 1-ethyl-3-(3-dimethyllaminopropyldvb) carbodiimide hydrochloride (EDC) with a self-made mixing device, and crosslinked in the frozen condition. The elastic deformation and shape memory capability were detected. Scanning electron microscopy was used to perform morphological observation and detect the pore size, and the water absorption ability, biodegradation behavior and mechanical properties were detected. The mice fibroblasts were used for cell adhesion and proliferation study. **Results** SIS cryogel could be compressed over 85% and injected through a needle without any damage. The cryogel had porous and interconnected pore structure with average pore size of 106.63 ± 28.90 μm. There was no significant difference in water absorption ability and cytotoxicity at different concentrations of EDC. But the degradation became slow and mechanical strength was enhanced when the EDC concentration increased. Cells grew linearly and spindly on the SIS cryogel, and stretched out plenty of pseudopodiums. Some sections were integrated into film and stuck to the surface and pore walls. **Conclusion** Injectable SIS cryogel with elastic deformation and shape memory capability can be used as cell

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划, 2014AA020705);国家自然科学基金青年科学基金(31500790)

[通信作者] 李世荣,E-mail:zhengxing@vip.163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160131.1127.017.html(2016-01-31)

transplantation scaffold because of good biocompatibility and physical properties.

[**Key words**] small intestinal submucosa; scaffold; cryogel

Supported by the National High Technology R&D Program of China (863 Program) (2014AA020705) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (31500790). Corresponding author: Li Shirong, E-mail: zhengxing@vip.163.com

体外细胞培养特别是规模化无血清培养技术的发展使细胞治疗的广泛应用成为可能。利用合适的生物支架复合细胞体外构建组织工程器官是未来的发展趋势。本研究以具有良好生物相容性且富含生长因子的SIS为原材料[1-6],通过制备SIS粉末,利用自制混匀装置将1-乙基-3-(3-二甲氨丙基)碳二亚胺盐酸盐[1-Ethyl-3-(3-dimethyllaminopropyldvb)carbodiimide hydrochloride,EDC]与SIS溶液共混后冷冻交联,成功制备了具有弹性形变能力和形态记忆功能的冷冻凝胶[7-12]。具有水凝胶所不具备的抗压、耐钳夹、多孔结构且孔隙相通等优点。可通过挤压变形后回弹主动吸附细胞。测定其吸水率、体外降解、机械性能、微观结构及生物相容性等特征,评估其作为细胞移植载体的应用价值。

1 材料与方法

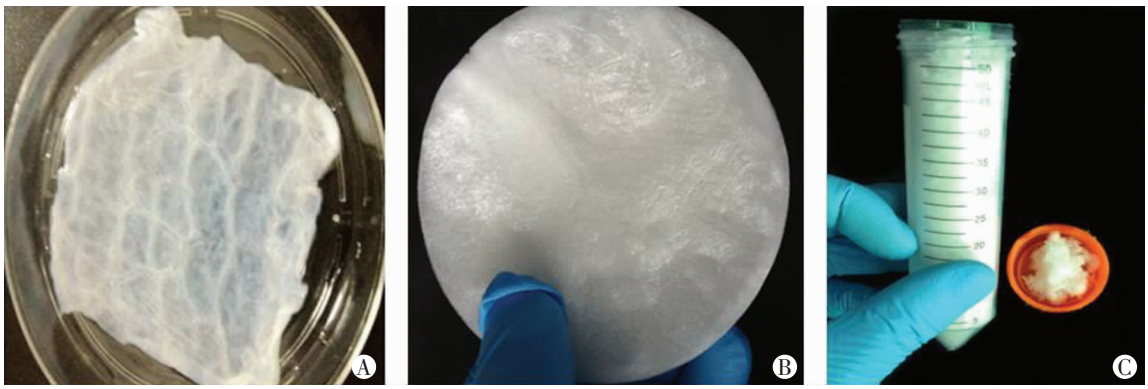
1.1 实验动物及试剂

新鲜猪小肠由重庆市畜牧工程研究院饲养场提供;新生绿色荧光转基因C57/BL小鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心购买。试剂:甲醇、三氯甲烷从科龙化工试剂公司购买(中国成都);EDC、N-羟基琥珀酰亚胺[(N-Hydroxysuccinimide,NHS)、2-(N-吗啉基)乙磺酸(2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, MES)]、Ⅰ型胶原酶、中性蛋白酶从sigma公司购买(美国);cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒从同仁化工购买(日本)。

1.2 SIS冷冻凝胶支架的制备

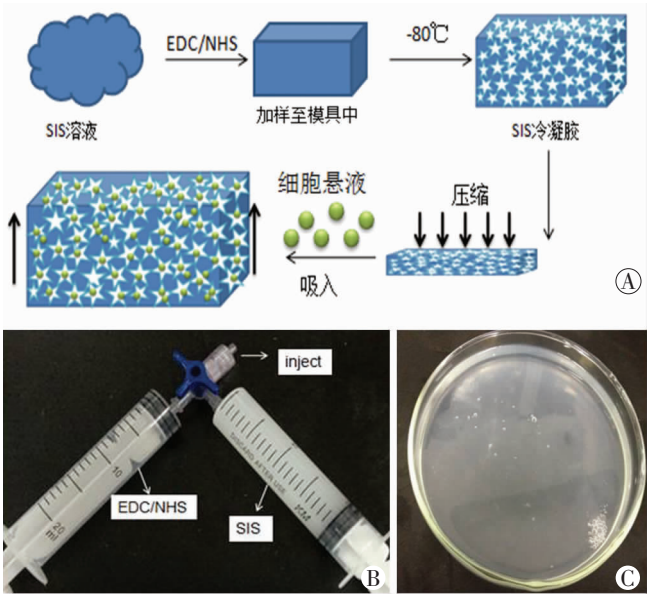
1.2.1 SIS粉末的制备 将新鲜猪小肠,按照文献[1]报道,首先通过机械方法去除浆膜层和肌层。甲醇和氯仿(1∶1,体积比)浸泡脱脂12 h,去离子水漂洗3次。0.05%胰酶/0.05%EDTA室温下消化12 h,水洗3次。含0.5%SDS的生理盐水振荡4 h后,生理盐水冲洗3次。0.5%醋酸浸泡过夜,打浆机(AUX HX-PB1018,中国广东)粉碎,室温下胃蛋白酶酶解2d后过滤。滤液经两次盐析离心后取沉淀。将沉淀溶于0.1%醋酸中,8KD透析袋透析24 h,冷冻干燥机(Coolsafe™ 55&110-4L/55-9L,丹麦)冻干。最后,将冻干的SIS海绵研磨(IKA A11 basic,德国)成粉末。置入50 mL离心管中,4 ℃保存(图1)。

1.2.2 冷冻凝胶的制备 将SIS粉末以10 mg/mL的终浓度溶于MES(0.1 mol/L,pH 5.5)缓冲液中,4 ℃下搅拌至完全溶解。将溶液转移至20 mL注射器,取适量不同浓度EDC/NHS交联液(EDC最终浓度梯度分别为:50、30、20、10、5 mmol/L)至另一注射器中,通过三通管相连(图2B)。往复推注混匀。溶液体积比:SIS∶EDC∶NHS=8∶1∶1。EDC/NHS摩尔比为2∶1。最后,将混匀的SIS溶液注入模具中(图2C),-80 ℃冷冻交联24 h。室温下溶解,Na_2HPO_4(0.1 mmol/L)溶液、蒸馏水各漂洗2 h。低温冷冻干燥机冻干,4 ℃保存备用。



A:白色半透明薄膜状SIS;B:SIS海绵;C:絮状SIS粉末

图1 SIS粉末制备不同阶段样品大体观



A:SIS 冷冻凝胶制备及细胞接种示意图;B:SIS 溶液与 EDC/NHS 交联剂混匀装置;C:含交联剂的 SIS 溶液

图 2 SIS 冷冻凝胶制备过程

1.3 SIS 冷冻凝胶扫描电镜观察

将冻干 SIS 冷冻凝胶样品液氮骤冷后折断,喷金处理,15 kV 加速电压下扫描电镜观察表面及横断面结构。随机选取 4 个视野,Image J 软件分析处理孔径大小。

1.4 不同 EDC 浓度交联制备的 SIS 冷冻凝胶物理性能检测

1.4.1 SIS 冷冻凝胶吸水率测定 将冻干样品剪切成 1 cm × 1 cm 大小。称质量(n = 6)记 M1,置于 12 孔板中,PBS 浸泡过夜。用镊子小心夹起冷冻凝胶的一角,滤纸吸除表面多余水分,再次称重,记 M2。按以下公式计算冷冻凝胶吸水率。冷冻凝胶吸水率 = (M2 – M1)/M1 × 100%

1.4.2 SIS 冷冻凝胶体外降解实验 将 1 cm × 1 cm 大小样品称质量(n = 3),记 M0。放入装有 15 mL 降解液的离心管中,降解液[13]为:含 12.5 U/mL Ⅰ型胶原酶的 Tris-HCl(50 mmol/L, pH 7.4,含 10 mmol/L 氯化钙)溶液。37 ℃水浴 100 r/min 振荡 7 d,每天取样,蒸馏水漂洗 3 次后冻干称质量,记 Mn。按以下公式计算冷冻凝胶剩余质量百分比:剩余质量百分比 = Mn/M0 × 100%。

1.4.3 SIS 冷冻凝胶机械性能检测 将 PBS 水合后的冷冻凝胶剪切成直径 1.5 cm 高 1 cm 圆柱状,置于动态力学试验机(TMA 800,美国)上,以 20%/min 速率压缩,记录其应力及应变[14]。

1.5 SIS 冷冻凝胶体外细胞培养及黏附增殖

1.5.1 GFP 转基因小鼠成纤维细胞分离培养 按照文献[15]报道方法将新生 GFP 小鼠皮肤组织用 PBS 洗涤后,剪成约 0.5 cm^2 大小。4 ℃下中性蛋白酶浸泡过夜。分离真皮组织,剪碎后用 2.5 mg/mL 胰蛋白酶在 37 ℃下消化 15 min。终止消化后离心重悬,后接种于培养瓶中。5% CO_2、37 ℃恒温孵箱孵育。

1.5.2 体外细胞复合培养 将不同 EDC 浓度交联的冷冻凝胶用 75% 乙醇浸泡 2 h,无菌 PBS 漂洗。打孔器制备成直径 6 mm 大小,DMEM 浸泡,37 ℃恒温孵箱中预培养 24 h。无菌纱布挤压吸除水分后置入 96 孔板中。取第 3 代 GFP 成纤维细胞,调整至 1×10^5 个/mL,100 μL/孔接种在材料上。以相同处理的胶原海绵(北京益而康生物工程开发中心)为对照孔,仅含培养基的孔为空白孔。5% CO_2、37 ℃恒温孵箱孵育 3 d。CCK-8 试剂盒检测细胞毒性:将样品转移至新的 96 孔板中,以排除未黏附在支架上的细胞影响,每孔加入 100 μL DMEM 培养基和 10 μL CCK-8 溶液。在 37 ℃下孵育 4 h 后,吸取 100 μL 上清,用酶标仪测定在 450 nm 处光密度;倒置荧光显微镜观察支架上的成纤维细胞形态;4% 多聚甲醛中固定 24 h。乙醇逐级脱水,自然晾干后喷金,扫描电镜观察材料表面细胞情况。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计分析软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间比较采用单因素方差分析。

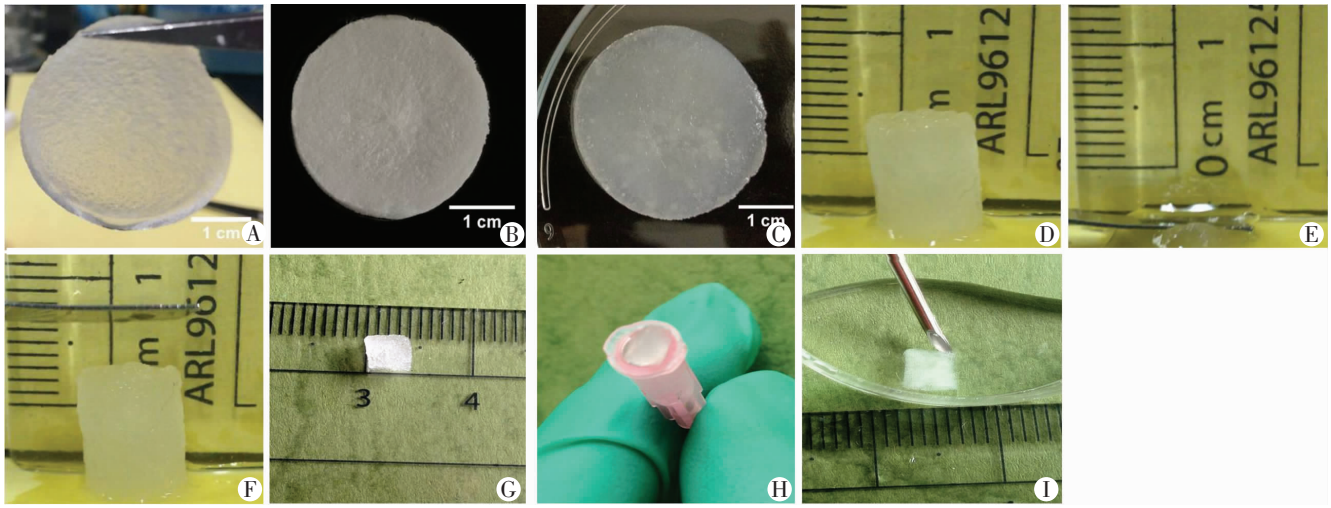
2 结果

2.1 SIS 冷冻凝胶大体观察及形态记忆功能测定

以 3.5 cm 直径培养皿为模具,3 mL/皿制备的 SIS 冷冻凝胶呈白色半透明状,厚 0.2 cm。可被夹持提取而不破碎。冻干后体积略变小,吸水后恢复原有形态(图 3A、B、C)。以 1.5 mL EP 管为模具制备的直径 0.6 cm、高 1 cm 圆柱状 SIS 冷冻凝胶压缩变形达 85% 以上仍未破碎,移除外力后立即恢复原有高度(图 3D、E、F)。而长 4 mm 厚 2 mm 大小正方形冷冻凝胶在通过注射器针头(直径 1.2 mm)注射前后形态和大小均未发生改变(图 3G、H、I)。

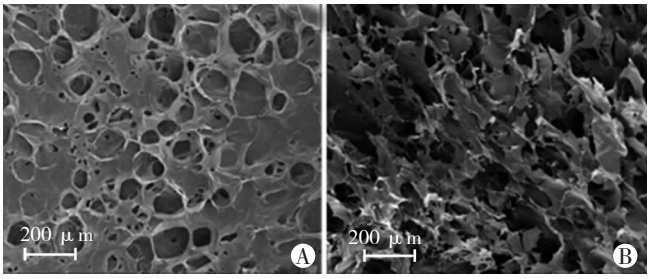
2.2 SIS 冷冻凝胶电镜结果及孔径大小

SIS 冷冻凝胶表面及断层扫描提示:冷冻凝胶具有多孔特性,且相互贯通,有利于细胞的爬行迁移及营养物质的交换(图 4)。冷冻凝胶孔径大小在 50 ~ 200 μm 之间呈正态分布,孔径大小为(106.63 ± 28.90) μm。



A:直径3.5 cm,厚0.2 cm大小冷冻凝胶;B:冻干后;C:复水后;D:直径6 mm,高1 cm大小冷冻凝胶压缩前;E:压缩中;F:压缩后即刻;G:长4 mm,厚2 mm大小正方形冷冻凝胶注射前;H:12号针头;I:注射后

图3 冷冻凝胶大体及弹性形变和形态记忆功能观察



A:表面; B:断面

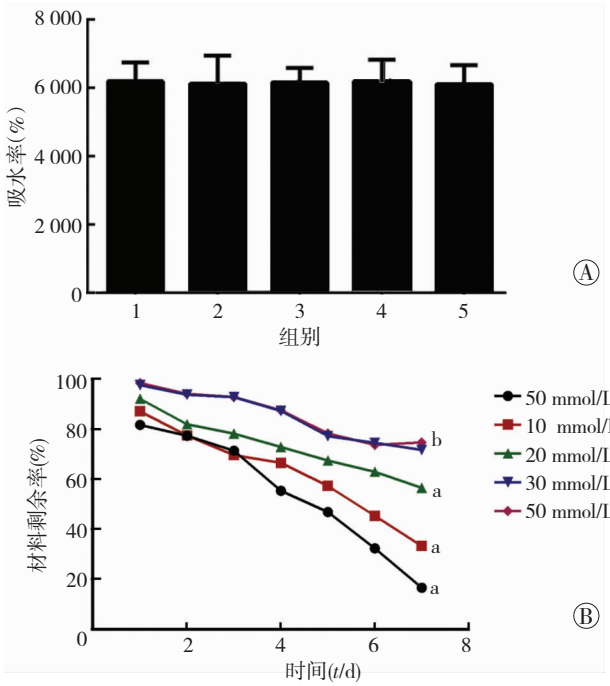
图4 扫描电镜观察冷冻凝胶变化

2.3 SIS冷冻凝胶的吸水率及体外降解

不同浓度EDC交联的冷冻凝胶吸水率差异无统计学意义($P>0.05$),吸水率为(6150.42±573.70)%(图5A)。随着EDC浓度升高,降解速率逐渐减缓,第7天时EDC浓度为5、10、20、30、50 mmol/L的各组材料剩余质量百分比分别为16.64%、33.29%、56.57%、71.67%、74.71%,差异有统计学意义($P<0.01$)。30 mmol/L和50 mmol/L组降解速率差异无统计学意义($P>0.05$,图5B)。

2.4 SIS冷冻凝胶的机械性能

SIS冷冻凝胶机械性能随着EDC浓度升高逐渐增强,表现为弹性模量的提升,压缩达80%时压缩模量分别为(1.304±0.029)、(1.556±0.042)、(1.978±0.170)、(2.103±0.043)、(2.868±0.113) kPa($P<0.01$,图6A)。应力-应变曲线进一步证实冷冻凝胶具有回弹复原能力(图6B)。

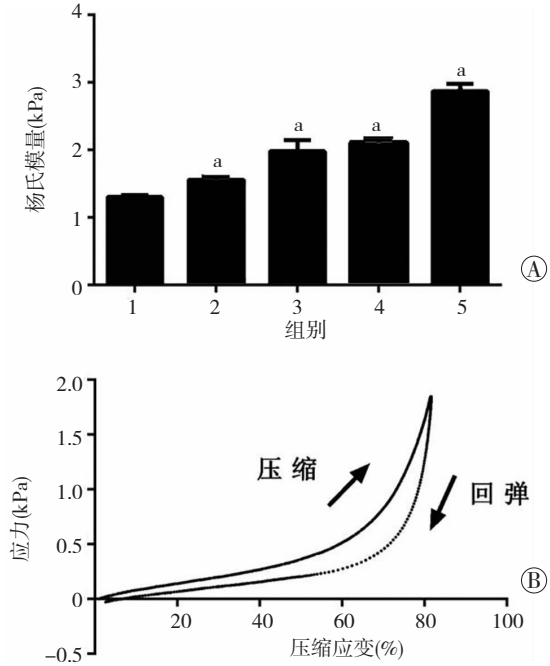


2:5 mmol/L组;2:10 mmol/L组;3:20 mmol/L组;4:30 mmol/L组;5:50 mmol/L组 A:不同浓度组吸水率比较;B:不同时间材料剩余率比较 a:$P<0.01$,与50 mmol/L组比较

图5 不同浓度组EDC对冷冻凝胶吸水率及体外降解速率的影响

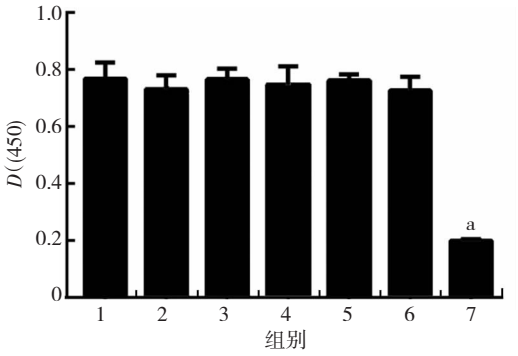
2.5 体外细胞的黏附及增殖

CCK-8检测光密度值提示:不同浓度EDC交联SIS冷冻凝胶光密度值差异无统计学意义($P>0.05$,图7)。



A:不同浓度 EDC 弹性模量比较　1:5 mmol/L 组;2:10 mmol/L 组;3:20 mmol/L 组;4:30 mmol/L 组;5:50 mmol/L 组;a:$P<0.01$,与 5 mmol/L 组比较;B:30 mmol/L 组应力-应变曲线分析

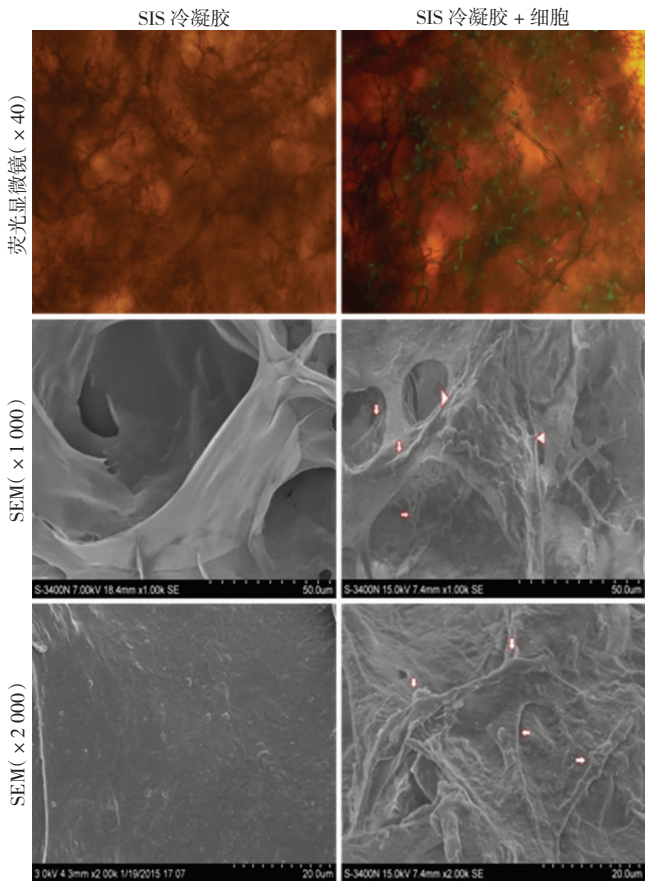
图 6　冷冻凝胶机械性能检测结果



1:对照组;2:5 mmol/L 组;3:10 mmol/L 组;4:20 mmol/L 组;5:30 mmol/L 组;6:50 mmol/L 组;7:空白对照组　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 7　CCK-8 检测不同浓度组 EDC 交联 SIS 冷冻凝胶细胞生长变化

小鼠原代 GFP 成纤维细胞体外复合培养 3 d 后荧光显微镜下可见 SIS 冷冻凝胶呈网状,细胞均匀分散在材料内部,且位于不同层次,导致部分细胞轮廓清晰,部分模糊。扫描电镜观察可见未接种细胞的冷冻凝胶呈多孔状,表面光洁。接种细胞材料表面可见细胞黏附在材料表面及孔壁上,呈线形、纺锤形扁平结构,并生长出大量伪足,表面凹凸不平(图 8)。



⇧:单个成纤维细胞;△:融合成片的成纤维细胞

图 8　SIS 冷冻凝胶与 GFP 小鼠成纤维细胞体外复合培养 3 d 荧光显微镜及扫描电镜观察

3　讨论

采用冷冻交联方法制备的 SIS 冷冻凝胶具有弹性形变能力和形态记忆功能。与水凝胶相比,具有耐压、抗钳夹、不易碎裂等优点,与海绵相比,具有可注射特性[7-9,11-12],能主动回弹吸附细胞(图 2A)。目前的冷冻凝胶多以藻酸盐、明胶为原材料,通过预先接枝甲基丙烯酰胺或己二酸二酰肼,再加入引发剂快速搅拌混匀,冷冻交联而成。制备过程较复杂,需要引入额外的化学基团。由于溶液较为黏稠,搅拌时间过长易导致交联定形,时间过短则混匀不充分。且无法避免气泡产生。

本研究制备的新型冷冻凝胶以 SIS 为原料,以 EDC 为冷冻交联剂。作为一种天然的细胞外基质材料,SIS 具有较好的组织相容性及较低的免疫原性,且富含生长因子,如 VEGF、bFGF、TGF-β、TNF-α 等,被广泛应用于膀胱、肌腱、骨膜、皮肤和腹膜缺损的修复[4]。而 EDC 作为一种水溶性零长交联剂,能够使胶原的氨基和羧基相连形成酰胺键,本身不残留在胶原

分子中,可通过水洗去除。与文献[7-12]报道制备的冷冻凝胶相比,无需接枝化学基团,避免了化工试剂的潜在生物毒性。我们采用自制的注射器混匀装置(图1B),利用溶液高速通过注射器针头产生的剪切力快速混匀,并保持溶液的流动性。混匀高效充分,转移加样方便,同时避免了气泡的产生,制备更为简便。

为了进一步了解冷冻交联原理及改进交联方案,我们对不同浓度EDC制备的冷冻凝胶生物、物理性能进行了检测。结果表明不同制备参数的SIS冷冻凝胶吸水率、细胞毒性相同,降解速率和机械强度不同。EDC在冷冻状态下同SIS从水溶液中析出,而水分子则形成冰晶致孔。在半溶解状态下发生交联反应,使溶液固化定形。室温下冰晶溶解后形成孔隙相通的多孔结构[10](图1A)。而EDC并不接枝到材料中,且可通过漂洗去除。因而对冷冻凝胶的吸水率和生物相容性无影响。而随着EDC浓度的升高,材料交联度相应提高,从而使冷冻凝胶机械强度提高,降解速度减缓。细胞与支架体外共培养荧光显微镜及扫描电镜提示细胞能够在支架上黏附生长。

综上所述,我们研发的SIS冷冻凝胶,具有弹性形变能力和形态记忆功能,生物相容性良好。耐压、抗钳夹,不易碎裂,便于移植。制备简易,易于生产。在皮肤修复及注射填充方面有很好的应用前景。

参考文献:

[1] Luo J C, Chen W, Chen X H, *et al*. A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS)[J]. Biomaterials, 2011, 32(3): 706-713. DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.09.017

[2] Wu S, Liu Y, Bharadwaj S, *et al*. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering[J]. Biomaterials, 2011, 32(5): 1317-1326. DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.10.006

[3] Choi J W, Park J K, Chang J W, *et al*. Small intestine submucosa and mesenchymal stem cells composite gel for scarless vocal fold regeneration[J]. Biomaterials, 2014, 35(18): 4911-4918. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.03.008

[4] Kim K S, Lee J Y, Kang Y M, *et al*. Small intestine submucosa sponge for *in vivo* support of tissue-engineered bone formation in the presence of rat bone marrow stem cells[J]. Biomaterials, 2010, 31(6): 1104-1113. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.10.020

[5] Zhang J, Wang G Y, Xiao Y P, *et al*. The biomechanical behavior and host response to porcine-derived small intestine submucosa, pericardium and dermal matrix acellular grafts in a rat abdominal defect model[J]. Biomaterials, 2011, 32(29): 7086-7095. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.06.016

[6] Lin H K, Godiwalla S Y, Palmer B, *et al*. Understanding roles of porcine small intestinal submucosa in urinary bladder regeneration: identification of variable regenerative characteristics of small intestinal submucosa[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2014, 20(1): 73-83. DOI: 10.1089/ten.TEB.2013.0126

[7] Bidarra S J, Barrias C C, Granja P L. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering[J]. Acta Biomater, 2014, 10(4): 1646-1662. DOI:10.1016/j.actbio.2013.12.006

[8] Bencherif S A, Sands R W, Bhatta D, *et al*. Injectable preformed scaffolds with shape-memory properties[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(48): 19590-19595. DOI:10.1073/pnas.1211516109

[9] Koshy S T, Ferrante T C, Lewin S A, *et al*. Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels[J]. Biomaterials, 2014, 35(8): 2477-2487. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.11.044

[10] Kirsebom H, Rata G, Topgaard D, *et al*. Mechanism of Cryopolymerization: Diffusion-Controlled Polymerization in a Nonfrozen Microphase. An NMR Study[J]. Macromolecules, 2009, 42(14): 5208-5214. DOI: 10.1021/ma900566d

[11] Chang K H, Liao H T, Chen J P. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Acta Biomater, 2013, 9(11): 9012-9026. DOI:10.1016/j.actbio.2013.06.046

[12] Thornton A J, Alsberg E, Albertelli M, *et al*. Shape-defining scaffolds for minimally invasive tissue engineering[J]. Transplantation, 2004, 77(12): 1798-1803.

[13] Li J, Ren N, Qiu J, *et al*. Carbodiimide crosslinked collagen from porcine dermal matrix for high-strength tissue engineering scaffold[J]. Int J Biol Macromol, 2013, 61: 69-74. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.038

[14] Zhao X, Kim J, Cezar C A, *et al*. Active scaffolds for on-demand drug and cell delivery[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(1): 67-72. DOI: 10.1073/pnas.1007862108

[15] Xu R, Luo G, Xia H, *et al*. Novel bilayer wound dressing composed of silicone rubber with particular micropores enhanced wound re-epithelialization and contraction[J]. Biomaterials, 2015, 40: 1-11. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.10.077

(**收稿**:2015-11-17;**修回**:2015-12-20)

(编辑 黄 超)