

天然高分子复合人工肌腱组织细胞外基质的构建与表征

熊燕飞, 万里

武汉理工大学生物科学与技术系, 武汉 430070

摘要: 胶原与壳聚糖是 2 种具有较好生物相容性和一定力学强度的天然高分子, 可在肌腱组织工程中用于细胞外基质的构建, 但二者单独使用时各有不足。本研究利用二者性能上的互补, 在一定的外力场作用下, 采用 EDC/NHS 对 2 种天然高分子材料进行共价交联, 获得具有一定空间取向和力学强度的多孔支架, 然后引入细胞黏附因子 RGD 进行表面修饰, 构建了具有较好组织相容性和细胞亲和性及适当降解速率的人工肌腱组织细胞外基质。对基质材料的力学性能、亲水性、体外降解速率等的检测和显微观察, 结果显示: 所构建的多孔支架材料柔软富有弹性, 抗拉强度达: 15.0 Mpa, 相应形变为: 7.33%; 孔隙率: 79.4%; 吸水率: 772%; 保水率: 206%; 在 RPM1640 培养液(含 10% 胎牛血清)和入血清中, 3 周总降解率分别为 4.13% 和 37.2%, 其降解速率可与肌腱修复周期相吻合, RGD 修饰后材料对 3T3-L1 细胞具有较好的亲和性。有望成为理想的人工肌腱组织和人造皮肤细胞外基质, 或整形手术的软组织填充材料。

关键词: 天然高分子, 人工肌腱, 细胞外基质, 表面修饰

Preparation and Characterization of an Extracellular Matrix of Artificial Tendon Tissue from Natural Macromolecules

Yanfei Xiong, and Li Wan

Department of Biological Science and Technology, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

Abstract: Collagen and chitosan are well natural polymers to be used as extracellular matrix on tissue engineering because of their biocompatibility, certain mechanical strength and biodegradability. But there are some disadvantages when they are used to construct extracellular matrix respectively. This experiment utilized their complementary performances to prepare a composite extracellular matrix of artificial tendon tissue that had adequacy mechanics strength and good biocompatibility, cell affinity, biodegradability. Collagen and chitosan were covalently crosslinked using EDC and NHS to obtain a porous scaffold material that the porous was oriented under an external force. Then RGD peptide was covalently attached to scaffold material surface to improve its affinity with cells. The microstructure of scaffold material was observed under microscope and scanning electron microscope. Simultaneously, the physical performance, hydrophilicity, ecto-degradation rate and cell compatibility of scaffold material were measured in the experiments. The results showed that this scaffold material was soft and stretchy. Its tensile strength was 15.0 MPa, corresponding shape extension was 7.33%, and its porosity was 79.4%. Its water absorption rate and water retention rate were 772% and 206% respectively. Its degradation rate in RPM1640 culture medium with 10% fetal bovine serum and in human serum were 4.13% and 37.2% respectively after three weeks. These degradation rates are suitable for the rehab course of injured tendon. Moreover the degradation rates can be controlled by adjusting technological conditions and degree of cross linking. Significantly higher affinity with 3T3-L1 cell was detected on the scaffold material modified by RGD peptide. The various physical performances of this complex

Received: March 19, 2008; **Accepted:** August 25, 2008

Supported by: the Natural Science Fund of Hubei Province (No. 2006ABA313).

Corresponding author: Yanfei Xiong. Tel: +86-27-87884065; E-mail: kennemy@126.com

湖北省自然科学基金项目(No. 2006ABA313)资助。

scaffold material are appropriate for constructing extracellular matrix of artificial tendon tissue or artificial skin. Moreover, it could be used as soft tissue slurry for plastic surgery.

Keywords: natural macromolecule, artificial tendon, extracellular matrix, surface modification

临床肌腱损伤修复主要有3种途径:自体移植,这将造成新的组织缺损;异体移植,存在免疫排斥及供体严重不足等问题;人工肌腱替换,即组织工程化肌腱替换,是一种理想的组织损伤修复方式,目前仍处研究阶段,它是根据肌腱的生物学特征和力学性能,利用组织工程技术体外构建人工肌腱,用于体内移植替换受损肌腱。组织工程化肌腱具有活力和功能,植入后可与受体肌腱愈合,永久性替换缺损肌腱;不仅解决了供体来源问题,还可任意塑形,在重建功能的同时达到形态修复的目的。目前支架材料降解与细胞功能同步增长化、模拟人体的三维张力环境构造基质及细胞在材料上的黏附、增殖和功能分化等问题仍需进一步研究^[1,2]。

天然高分子材料在构建组织工程细胞外基质上具有许多优越性,如来源广泛、无毒、亲水、生物相容性及细胞亲和性好,且保留了正常组织内的网架结构,能够为种子细胞的黏附、增殖、分化和分泌细胞外基质提供三维结构。但在强度、加工性能和降解速率控制等方面有待提高。本研究利用壳聚糖和胶原2种天然高分子性能上的互补^[3,4],构建天然高分子复合基质,并通过化学交联及表面修饰,进一步改善材料的力学性能,降解速率及对细胞的亲和性,构建能满足肌腱组织生物学及力学性能要求的细胞外基质,有望成为较理想的人工肌腱组织细胞外基质材料^[5,6]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

I型胶原:自制I型胶原;壳聚糖:由潍坊科海甲壳素有限公司提供,脱乙酰度90%,粘均分子量30万;碳化二亚胺[EDC]:上海源聚生物科技有限公司;N-羟基琥珀酰亚胺(NHS):上海伯奥生物科技有限公司;2-吗啉乙烷磺酸(MES):Amresco公司;RGD三肽(GRGDSP系列):Sigma公司;人血浆:武汉理工大学医院提供;3T3-L1细胞:华中科技大学同济医学院细胞学实验室提供。

1.2 方 法

1.2.1 基 质 材 料 的 构 建

壳聚糖溶于0.3 mol/L醋酸溶液制成2.5%溶液,I型胶原溶于蒸馏水溶液制成5%溶液,去离子水透析24 h,稀碱溶液调至pH 5.0左右,按质量比 $m_{\text{胶原}}:m_{\text{壳聚糖}}$ 分别为2:1、1:2、1:4、1:8的比例混合,加入20 mmol/L的 Ca^{2+} 溶液2 mL,单向充分搅拌均匀,再按每克胶原0.05 mmol EDC和0.01 mmol NHS的量加入EDC(30 mmol/L)和NHS(10 mmol/L)的混合溶液^[5,7](临用前配制,立即加入),按同方向充分搅拌均匀,置往复式摇床中低速摇动,室温反应4 h,消泡过夜,-20°C低温冷冻48 h,冷冻干燥,制成各种外形的材料。

将所制材料依次浸于95%、75%、50%、20%等不同浓度的定型液中各0.5 h,取出,室温自然凉干,蒸馏水充分漂洗。

1.2.2 基 质 材 料 的 表 面 改 性

RGD即“精-甘-天冬”氨基酸三肽是粘附蛋白的活性结构,与细胞粘附、移动及识别等有关,常将其接枝到人工材料表面以赋予材料生物学功能信号,促进细胞黏附及其后细胞功能的表达。Hhersel U及Myles JL等研究表明^[8,9],RGD作为细胞黏附因子,其活性与含RGD的肽系列有关,GRGDSP的促黏附作用高于单纯的RGD三肽,故本试验采用GRGDSP系列对所制备的支架材料进行修饰。

低温条件下^[10],将支架材料置于含33 mmol/L EDC和20 mmol/L NHS的50 mmol/L的MES溶液中充分浸润,随即加入2 mg/mL GRGDSP溶液500 μL ,混匀,反应24 h后取出,蒸馏水洗涤,自然干燥。

1.2.3 材 料 形 态 及 显 微 观 察

材料纵向切片,倒置显微镜观察,切面电镜扫描观察。

1.2.4 材 料 理 化 性 能 检 测

1) 拉伸强度:将材料剪成6.5 cm×0.5 cm长条,测量厚度,万能拉力试验机测定其拉伸强度(MPa)及相应的形变。

2) 孔隙率:裁取1 cm×1 cm的正方形材料,用

细丝线轻轻拴住,浸入准确体积(V_0)的无水乙醇中,赶净气泡,记录乙醇加材料总体积(V_1),轻轻拉出材料,至材料上无液滴滴下时,记录剩下乙醇体积(V_2),孔隙率按下式计算:孔隙率= $[(V_0-V_2)/(V_1-V_2)]$ 。

3) 亲水性

吸水率:将冻干的多孔基质材料置入装有无水 CaCl_2 的干燥器中,于室温下每隔3 h称重1次,直至样品恒重,称得样品重量 W_{dry} ,再将干燥过的样品浸入到重蒸水中,24 h后将材料取出,以滤纸将表面水份吸除后称重,得湿态重量 W_{wet} ,按下列公式计算吸水率:吸水率= $[(W_{\text{wet}}-W_{\text{dry}})/W_{\text{dry}}] \times 100\%$ 。

保水率: W_{dry} 测定同上,将用水润湿24 h的基质置于一预填有滤纸的离心管中,以500 r/min的速度离心3 min,称重记为 W_{wet} ,按下列公式计算保水率:保水率= $[(W_{\text{wet}}-W_{\text{dry}})/W_{\text{dry}}] \times 100\%$ 。

1.2.5 体外降解速率

准确称取一定量的恒重材料(重量 W_0),75%酒精浸泡,紫外灯杀菌,用灭菌过的 Hanks 缓冲液浸润后,分别加入 1640 培养液(含 10%小牛血清)和人血清,于 37°C 保育,1 周后取出,蒸馏水反复冲洗,干燥称重(W_t),计算降解速率,更换降解介质继续降解,连续观察3周。降解速率= $(W_0-W_t)/W_0 \times 100\%$ 。

1.2.6 对细胞的亲和性

对照 96 孔培养板的孔径大小,将材料剪成圆形小片,置 75%乙醇溶液中浸泡 2 h,取出,灭菌蒸馏水漂洗干净,紫外灯下照射 30 min。置无菌青霉素瓶中,灭菌蒸馏水浸泡,密封备用。

在培养孔底部分别垫入未改性材料(未改性组)和改性材料(改性组),接种 3T3-L1 细胞, RPMI1640 培养液(加 20%胎牛血清), 37°C , 5% CO_2 恒温培养箱中培养。分别于第 2 天、第 3 天取出部分材料,吖啶橙染色,荧光显微镜下观察细胞黏附情况。

2 结果与分析

按不同组分配比共制备了 4 种基质材料,分别标记为 ECM2-1、ECM1-2、ECM1-4、ECM1-8。

2.1 支架材料外观及显微形态

本法制得的多孔支架材料为白色海绵状,柔韧有弹性,水中浸泡不变形、不溶胀,保持良好的柔韧性和弹性(图 1)。



图 1 材料 ECM1-4 外观及在水中浸润后的形态
Fig. 1 Appearance of ECM1-4(left) and modality in water(right)

显微观察显示:ECM1-8 基质材料主要成纤维状,网络结构不完整;ECM1-4 成较均匀的网络状结构;ECM1-2 网络孔隙结构不均匀,制备时难以控制,ECM2-1 脆性较大,且有一定程度的吸水溶胀,未作进一步观察。由此可见,2 种天然高分子的比例明显影响材料的网络结构,ECM1-4 基质材料较理想,但在制备时应注意工艺条件的控制,防止胶原间的凝集(图 2)。

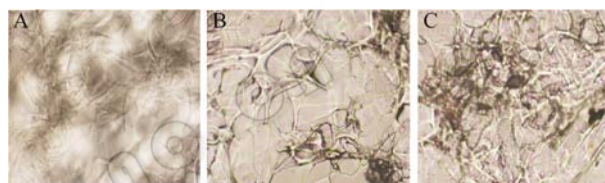


图 2 支架材料的横切片显微结构形态(100 \times)
Fig. 2 Microstructural aspects of the transverse slices of scaffold materials

A: ECM1-8; B: ECM1-4; C: ECM1-2

扫描电镜(图 3)观察可见,材料 ECM1-4 孔径较均匀,孔隙多呈纵向分布,具有一定的取向,孔径尺寸约 $150\sim 250\ \mu\text{m}$,可给细胞生长提供足够的空间,但孔径的均匀度仍需要进一步提高,可通过控制工艺条件如混合、交联度、冷冻速率等加以改善。

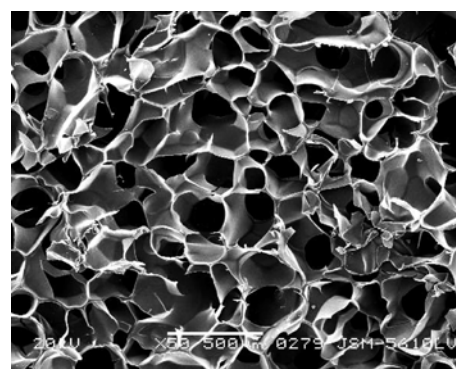


图 3 材料 ECM1-4 的微观形貌
Fig. 3 SEM micrographs of material ECM1-4

2.2 材料的力学性能

材料所能承受的最大拉力及其相应的形变,各

测定 8 个样本。结果见表 1。

表 1 材料所能承受的最大拉力及其相应的形变(%)
Table 1 The utmost intensity and corresponding shape extension(%) of materials

Materials	ECM2-1	ECM1-2	ECM1-4	ECM1-8
Tensile strength (MPa)	10.2±0.8	12.4±1.1	15.0±1.0	16.7±0.9
Extension rate (%)	5.67±1.26	8.17±0.76	7.33±0.29	7.00±0.50

在所观察范围内,不同材料所承受的最大拉力不同,拉伸强度在 10.2~16.7 MPa,相应形变也存在一定差别,随着壳聚糖含量的增多,支架材料拉伸强度增大,相应形变呈减小趋势。这是由于壳聚糖的强度高于胶原,胶原的韧性较壳聚糖大,所以胶原含量越大,材料韧性越好,但胶原比例过高时则会表现出脆性,如 ECM2-1。与天然肌腱相比,材料的拉伸强度和应变还有待提高^[11]。

2.3 孔隙率及亲水性

ECM2-1 发生一定程度的吸水溶胀,其他 3 种材料统计了 10 个样本数据,结果见表 2。孔隙率大小与原料配比、浓度、交联度及冻存速率等多种因素有关,表 2 数据显示,胶原与壳聚糖二者配比对空隙率的影响不可忽视,同时还会影响孔隙形态及分布。

表 2 材料孔隙率(V/V)及亲水性(%、g/g)
Table 2 Porosity(%、V/V) and hydrophilicity(%、g/g) of materials

Material	ECM2-1	ECM1-2	ECM1-4	ECM1-8
Porosity (%、V/V)	50.3±1.26	68.5±1.97	79.4±2.77	88.8±1.06
Absorption rate	distended	674±33	772±25	378±12
Retention rate	distended	268±25	206±17	158±11

用于组织工程支架材料的基质,其亲水性能对细胞的贴附、生长以及营养物质的传递均至关重要。

从表 2 可以看出,随着胶原成分的增加,保水率增大,因胶原的亲水性较壳聚糖大,但吸水率还与孔隙率有关。

2.4 体外降解速率

ECM1-2、ECM1-4、ECM1-8 材料在 1640 培养液(10%小牛血清)和人血清中温育 3 周,各材料分别处理 8 个样本数据,降解率见表 3。

肌腱损伤修复主要发生在损伤后的 2~4 周,第 1 周为营养缺乏期,4 周后为重建期,故人工肌腱支架材料的形态和性能应维持 4~8 周左右比较合适^[12]。表 3 中的降解数据显示,ECM1-2、ECM1-4 和 ECM1-8 三种材料 3 周总降解率:1640 培养液(10%小牛血清)中分别为 8.06%、4.13%和 3.12%;人血清中分别为 45.2%、37.2%和 29.4%。在血清中的降解速率总体呈现出随时间逐渐减缓的趋势。ECM1-4 在血清中降解过半约需 6 周时间,基本能与肌腱组织的重建周期吻合^[1,12]。ECM1-4 在 RPM1640 培养液中及与种子细胞复合培养过程中降解不明显,且可保持材料固有形态,有望将其控制在植入体内后随着新生肌腱的形成而逐步降解。

2.5 材料对细胞的亲和性

综合比较其他各项性能,优选 ECM1-4 基质材料作为肌腱组织工程的细胞外基质,初步进行细胞培养观察,一方面验证细胞黏附因子 RGD 是否引入成功,同时观察材料对细胞黏附性能是否有所改善。图 4 为接种 3T3-L1 细胞后第 3 天荧光染色观察结果,图 4 显示修饰后材料对细胞的黏附明显增加。指示 RGD 黏附因子引入成功,材料对细胞的亲和性得到改善。但本实验仅初步作了 3T3-L1 细胞在材料上的粘附观察,肌腱种子细胞在材料上的粘附、大规模的细胞培养、材料与细胞间的相互作用及其改善等将在后续研究中进行。

表 3 体外降解速率(%/周)
Table 3 Ecto-degradation rate of materials(%/w)

Time	RPM1640 culture medium			Human serum		
	ECM1-2	ECM1-4	ECM1-8	ECM1-2	ECM1-4	ECM1-8
First week	1.15±0.34	0.98±0.49	0.72±0.14	29.40±0.58	21.07±0.76	19.93±0.52
Second week	3.43±0.39	1.70±0.13	1.22±0.12	12.74±0.60	12.11±0.61	3.68±0.31
Third week	3.69±0.27	1.51±0.82	1.21±0.20	11.06±0.34	9.52±0.23	8.47±0.25

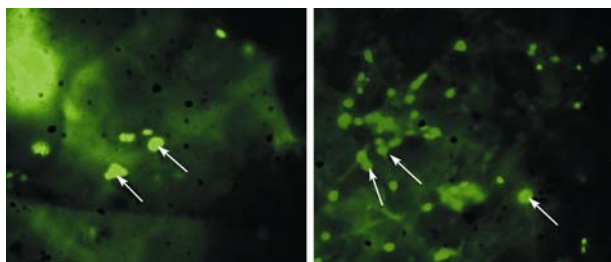


图4 3T3-L1细胞在改性前和改性后的材料ECM1-4表面上的黏附

Fig. 4 3T3-L1 cells adhere to the surface of the materials ECM-4 both before and after modification

Left: before modification; right: after modification. Arrows show nucleus which were dyed green

胶原与壳聚糖是2种具有较好生物相容性和一定力学强度的天然高分子,可在组织工程中用于细胞外基质的构建,但二者单独使用时各有不足。胶原蛋白所特有的三重螺旋肽链结构使它具有高拉伸强度、生物可降解性、低抗原活性、低刺激性和低细胞毒性及促进细胞生长等性能,但作为肌腱组织工程细胞外基质其强度仍然不够,且降解速率过快和不易控制。壳聚糖具有较高的力学强度,能抗蛋白酶降解,但其亲水性及细胞亲和性较差。本研究利用胶原和壳聚糖两种天然高分子性能上的互补,在一定的外力场作用下,采用EDC/NHS将二者进行共价交联构建的复合细胞外基质ECM1-4,不仅获得了15.0 Mpa拉伸强度和与肌腱组织重建周期相吻合的降解速率,且其降解速率可通过改善工艺条件和交联度进行调控,以满足不同用途的要求,降解产物无毒,且可被机体利用。同时,复合基质材料孔隙具有一定的空间取向,可为种子细胞的粘附、生长、迁移和分化提供空间引导,为进一步构建理想的人工肌腱组织奠定了基础。引入RGD粘附因子后,复合基质对3T3-L1细胞具有较好的亲和性,但与天然肌腱相比,材料的拉伸强度和应变性还有待进一步提高,这可通过加强外力场牵引改善高分子微晶状态和排列、控制交联度等手段加以改善。因此,本研究制备的复合高分子材料有望成为理想的人工肌腱组织和人造皮肤细胞外基质,或整形手术的软组织填充材料。但作为肌腱组织工程细胞外基质,需要对材料与肌腱种子细胞间的相互作用和影响作全面深入的研究。

REFERENCES

[1] Li ZH, Qu YL, Zhou JH, *et al.* The recent advances in the

study of tissue engineering tendon. *Orthop J Chin*, 2007, **15**(18): 1406-1407.

李宗虎, 曲彦隆, 周继辉, 等. 肌腱组织工程研究新进展. 中国矫形外科杂志, 2007, **15**(18), 1406-1407.

[2] Xiong YF, Huang L, Yang M, *et al.* Recent advances in tendon tissue engineering. *Biomed Engineering Clin Med*, 2006, **10**(4): 258-261.

熊燕飞, 黄磊, 杨敏, 等. 组织工程化肌腱. 生物医学工程与临床. 2006, **10**(4): 258-261.

[3] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science*, 2002, **295**(5557): 1009.

[4] Qin TW, Yang ZM. The recent advances in the study of tissue engineering tendon. *Chin J Rep Rec Surg*, 1998, **12**(4): 231-235.

秦延武, 杨志明. 组织工程化肌腱研究进展. 中国修复重建外科杂志, 1998, **12**(4): 231-235.

[5] Pieper JS, Oosterhof A, Dijkstra PJ, *et al.* Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials*, 1999, **20**: 847-858.

[6] Akiko I, Masataka S, Chen GP, *et al.* Collagen hybridization with poly (l-lactic acid) braid promotes ligament cell migration. *Mater Sci Engineering*, 2001, **17**(1-2): 95-99.

[7] Pieper JS, Hafmans T, Veerkamp JH, *et al.* Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects. *Biomaterials*, 2000, **21**: 581-593.

[8] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 2003, **24**(10): 4385-4415.

[9] Myles JL, Burgess BT, Dickinson BT. Modification of collagen by covalent grafting with RGD. *J Biomater Sci Polymer Edu*, 2000, **11**(1): 69-86.

[10] Park Si-Nae, Park Jong-Chul, Kim Hea-Ok, *et al.* Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 2002, **23**: 1205-1212.

[11] Quan TG, Chen P, Tang GZ, *et al.* Biomechanical properties of the extensor tendon of middle finger before and after anastomosis. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2008, **12**(2): 289-291.

权铁刚, 陈鹏, 唐广智, 等. 中指伸肌腱损伤缝合修复前后的应力变化特点. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, **12**(2): 289-291.

[12] Zhang QW, Yuan XY, Yao KD. Biomaterial for tissue engineering tendon repair. *Chin J Rehabil Theory Practice*, 2003, **9**(3): 178-181.

张庆伟, 袁晓燕, 姚康德. 组织工程化肌腱修复生物材料. 中国康复理论与实践, 2003, **9**(3): 178-181.