

类人胶原蛋白-透明质酸血管支架的性能及生物相容性

孙秀娟^{1,3}, 范代娣^{1,2}, 朱晨辉^{1,2}, 马晓轩², 骆艳娥², 陈岚³, 郭佳庆²

1 西北大学 陕西省可降解生物医药材料重点实验室, 西安 710069

2 陕西省生物材料与发酵工程技术研究中心, 西安 710069

3 西北大学生命科学院, 西安 710069

摘要: 将类人胶原蛋白与透明质酸按不同比例复合, 控制透明质酸的终浓度(W/V)分别为 0、0.01%、0.05%、0.1%, 用京尼平交联, 采用真空冷冻干燥方法构建出血管支架材料。通过扫描电镜、XPS 分析、拉力测试、压力爆破实验、细胞毒性实验、血管支架细胞种植实验及小鼠皮下植入等方法对其表面超微结构、表面元素组成、力学性能、细胞毒性等级、细胞相容性、组织相容性进行了研究。结果表明: 当透明质酸的含量为 0.05% 时, 类人胶原蛋白-透明质酸支架的孔径比较均匀, 孔隙率达 94.38%, 应力为(1000.8 ± 7.9) kPa, 爆破压力为(1058.6 ± 8.2) kPa, 细胞毒性实验合格, 同时具有良好的细胞相容性、组织相容性及降解性能。

关键词: 类人胶原蛋白, 透明质酸, 血管支架, 生物相容性

Characterization and biocompatibility of human-like collagen-hyaluronic acid scaffold for blood vessel

Xiujuan Sun^{1,3}, Daidi Fan^{1,2}, Chenhui Zhu², Xiaoxuan Ma², Yan'e Luo², Lan Chen³, and Jiaqing Guo²

1 Shaanxi Key Laboratory of Degradable Biomaterials, Northwest University, Xi'an 710069, China

2 Biomaterials and Fermentation Engineering Center of Shaanxi, Xi'an 710069, China

3 Faculty of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: Human-like collagen (HLC) was cross-linked with hyaluronic acid by genipin in different ratio. The concentrations of hyaluronic acid in the mixture were 0, 0.01%, 0.05% and 0.1%. The blood vessel tubular grafts were then fabricated by freeze-drying. Microstructure, element composite, mechanical properties, cytotoxicity grade, and biocompatibility of different vascular scaffold groups were studied by scanning electron microscope (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), tensile test, burst pressure experiment, cytotoxicity experiment, endothelial cells planted in blood vessel scaffolds and hypodermic embedding of mice. The results showed that HLC-HA (0.05%) tubular scaffold exhibited interconnected well-distributed and porous structure and porosity of 94.38%; achieved the desirable mechanical property with stress of (1000.8±7.9) kPa and burst pressure of (1058.6±8.2) kPa, hypocytotoxicity, favourable cytocompatibility, hisocompatibility and disposition of degradation.

Keywords: human-like collagen, hyaluronic acid, blood vessel scaffold, biocompatibility

Received: October 7, 2008; **Accepted:** February 9, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20776119), Scientific Research Program of Shaanxi Provincial Department of Education(No. 08JK452), Scientific Technology Program of Xi'an City (No.YF07078).

Corresponding author: Daidi Fan. Tel: +86-29-88305118; E-mail: fandaiddi@nwu.edu.cn

国家自然科学基金项目 (No. 20776119), 陕西省教育厅专项科研计划项目(No. 08JK452), 西安市科技计划项目(No.YF07078)资助。

目前, 血管疾病如冠状动脉疾病和外周血管疾病的患病率逐年上升^[1], 急需大量具有良好的生物相容性和力学特性的血管替代物。采用化学方法合成的高分子材料和生物材料作为组织工程支架材料各有其特点, 但都存在一定的不足。将两者按照一定的方法组合可构建出一种新型的复合材料, 能够同时发挥出两者的优势^[2]。现今, 以胶原蛋白和透明质酸(Hyaluronic acid, HA)作为生物材料已成为当前组织工程的研究热点。

类人胶原蛋白(Human-like collagen, HLC)是采用基因工程与发酵技术, 并通过一系列分离纯化过程而得到的一种活性胶原蛋白。与动物胶原相比具有良好的生物学相容性、可加工性、水溶性、低排斥反应等优点, 且无病毒隐患^[3], 现已被应用于止血海绵及人工骨等方面的研究^[4-6]。

透明质酸是一种天然可降解且降解产物可以被机体吸收的生物医学材料, 在临床上用途十分广泛。HA 具有较强的黏弹性和润滑性, 经过交联能够形成连续的大分子网状结构, 不仅可以保持良好的生物相容性和天然的生物降解代谢方式, 而且具有更好的机械强度和稳定性^[7]。高分子透明质酸能主动刺激内皮细胞的增生和转移, 诱导体内血管生成^[8]; 降解后的低分子量 HA 具有促血管生成作用^[9]。因此本研究选用透明质酸作为构建血管支架的材料之一。

京尼平作为一种新型的交联剂, 不仅能形成稳定的交联制品, 与戊二醛相比还具有细胞毒性小、生物相容性好和应用领域广泛等优点, 是一种非常有前途的交联剂^[10]。李莉等^[11]用京尼平交联处理的血管组织具有较好的细胞相容性和力学性能; 姚芳莲等^[12]研究了加入壳聚糖-明胶复合体系的京尼平用量和其机械性能的关系。

本研究首次利用类人胶原蛋白和透明质酸复合, 采用京尼平交联构建组织工程血管支架, 以期能构建出物理性能及生物相容性良好的血管支架。

1 材料和方法

1.1 材料

类人胶原蛋白由本实验室提供, 分子量为 97 kD; 透明质酸(HA)购自山东临朐华元生物工程有限公司; 京尼平购自上海璞光实业有限公司; BHK-21 细胞由第四军医大学基础医学部提供; 脐

带静脉内皮细胞(EVC304)由第四军医大学基础医学部提供; 1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; MTT(3-(4, 5-2 甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐)和二甲基亚砷(DMSO)购自 Amresco 公司; 胰蛋白酶购自 Sigma 公司; 所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

超低温冰箱 ULT1386-3-V34, 美国 REVCO; 真空冷冻干燥机 FREEZONE6, 美国 LABCONCO; 扫描电镜 S-570, 日本日立; 电子万能材料试验机 5565, 美国 INSTRON; XPS 光能电子分析仪 PHI-5400, 美国 PE; 冷冻切片机 CM1850, 德国 LEICA; 生物安全柜 ESCO-2, 新加坡 ESCO; 恒温培养箱, 美国 REVCO; 酶标仪 MULTISKAN MK₃, 美国 THERMO; 倒置显微镜, 日本 NIKON; 压力枪, PTCA 附件, 美国 Medtronic 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 管状血管支架的制备

将类人胶原蛋白和透明质酸按不同比例混合配制水溶液, 使透明质酸在混合溶液中的浓度分别为 0、0.01%、0.05% 和 0.1%。将混合溶液用磁力搅拌器搅拌 15 min 后, 加入交联剂京尼平, 京尼平的浓度为 0.625%。充分混匀后注入内径 5 mm、外径 7 mm 的管状模具。置于 4°C 交联 3 d 后, 转入 -80°C 超低温冰箱冷冻 2 h, 放入真空冷冻干燥机中冷冻干燥成形。

1.3.2 扫描电镜(SEM)分析

采用扫描电镜分析血管支架的超微结构, 将支架固定在短轴上, 用极化子 E5100SEM 包被系统在支架上喷金, 日立 S-570 扫描电镜在 15 kV 下对支架表面结构进行分析^[13], 并采用 WD-5 分析软件对支架孔径进行分析。

1.3.3 XPS 分析

将干燥的血管支架材料切成小薄片用双面胶带固定在直径 20 mm 的圆柱形载物台上, 当分析室的压力达到 8×10^{-8} mbar 时, PHI-5400(PE, USA)光谱仪记录各支架的 X 射线光电子能谱范围, 检测支架表面的化学元素及含量。

1.3.4 孔隙率的测定

选用一个体积为 10 mL 的比重瓶, 倒满乙醇称重 W_1 , 把重为 W_0 的血管支架浸入乙醇中, 脱气,

务必使乙醇充盈于多孔材料的孔中, 加满乙醇, 称重为 W_2 , 把浸满了乙醇的样品取出后, 称剩余的乙醇与比重瓶重 W_3 , 计算孔隙率 $= (W_2 - W_3 - W_s) / (W_1 - W_3)$ 。每组平行测 3 个样品。

1.3.5 机械性能测试

用电子万能实验材料机的拉伸夹具测试血管支架的拉伸强度。将管状血管支架材料剪成长 33 mm、宽 6 mm、厚 0.35 mm 的矩形, 将材料固定在拉伸夹具上, 以 2 mm/min 的速度在室温下分别进行干样和盐浴系统湿样的拉伸, 直到样品断裂为止, 得到测试样品的应力、应变及杨氏模量。每组平行测试 5 个样品。

1.3.6 血管支架压力爆破实验

将注满生理盐水的压力枪与血管支架一端连接, 另一端用夹子密封, 慢慢旋转调压阀使水压升高直至血管支架爆破, 记录此时读数, 每组血管支架平行测量 5 个样品。

1.3.7 细胞毒性实验

MTT 比色法分析材料的细胞毒性。依照 ISO 标准, 按 HLC-HA(0.05%) 血管支架材料质量与浸提介质(10%胎牛血清的 1640 培养基)体积比为 0.2 g/mL 材料介质比制备浸提液, 置 37°C 培养箱中, 3 d 后吸出浸提液, 取培养基浸提液作为 100% 浓度的材料浸提液, 再用培养基倍比稀释, 制成浓度分别为 100%、75%、50%、25% 的材料浸提液, 无菌封存, 4°C 保存备用。在 37°C、5% CO₂ 条件下培养 BHK-21 细胞, 传代后把 BHK-21 细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 吸去培养液, 分别加入 100%、75%、50%、25% 浓度的材料浸提液, 每组 6 孔, 每孔加 200 μ L。培养 48 h, 采用 MTT 法进行分析, 以完全培养基为空白对照, 计算细胞相对增殖率(Relative growth rate, RGR)。RGR=实验组吸光度值/空白组吸光度值 \times 100%, 并按美国药典中细胞相对增殖率与细胞毒性分级^[14]做出毒性评级。

1.3.8 血管支架细胞种植实验

将 HLC 和 HLC-HA(0.05%) 血管支架纵向剪开, 使用特制的圆形刀具将 2 组血管支架分别剪成 6 个直径为 1 cm 的血管圆片, 管腔面向上放入 24 孔细胞培养板中, 75% 乙醇浸泡 24 h 后, 吸弃 75% 乙醇, 加入 PBS 液反复冲洗 3 遍, 然后每孔加入 1 mL 10% 胎牛血清 1640 培养液并放入 37°C 细胞培养箱中

24 h, 然后吸去培养液, 将复苏的脐带静脉内皮细胞消化吹打成密度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液, 在放有血管支架圆片的 12 孔中每孔加入 0.5 mL 细胞悬液, 放入 37°C、0.5% CO₂ 培养箱 3 h 细胞贴壁后, 每孔再加 0.5 mL 细胞培养液。继续放入 37°C、0.5% CO₂ 培养箱培养 3 d, 倒置显微镜下观察后, 取出血管支架圆片固定, 进行常规扫描电镜检查, 观察种植细胞在血管片内表面的生长情况。

1.3.9 皮下植入实验

取健康成年雄性昆明小鼠 30 只, 体重为 28~32 g, 分成 5 组, 每组 6 只。参照国家关于外科植入物检测标准^[15], 乙醚麻醉, 背部脱毛后, 无菌条件下切开背部皮肤长约 1 cm, 将皮下组织沿背部肌肉深筋膜层表面向脊柱两侧作潜行分离。在脊柱两侧分别切开深筋膜层, 钝性分离背部皮肤, 将血管支架剪成长 1 cm、宽 0.5 cm 的试样(Co⁶⁰ 灭菌)植入背部皮下, 分别于术后 1、3、5 和 9 周, 按预定分组取植入材料处皮肤, 将所取皮肤组织标本置于 10% 中性甲醛固定 24 h 后, 石蜡包埋切片, 常规 HE 染色, 光镜下观察组织及材料降解情况。

1.3.10 统计方法

所测数据采用方差分析, 组间比较采用 *T* 检验完成, $P < 0.05$ 时为显著性差异。

2 实验结果

2.1 支架形态

如图 1 所示, 冷冻干燥后, 类人胶原蛋白-透明质酸血管支架呈均匀白色管状的外部形态。从图 2 可看出, 纯 HLC 与 HLC-HA(0.01%) 血管支架的表面结构不均一, 孔隙不规则; HLC-HA(0.05%) 的支架表面结构比较均一, 孔隙比较均匀、规则, 孔径为 (60 ± 9) μ m, 孔隙多于其他组样品; 与纯 HLC 和 HLC-HA(0.01%) 血管支架相比, HLC-HA(0.1%) 的支架结构有明显差异, 孔隙增多, 孔径为 (90 ± 8) μ m, 比较接近于理想血管支架的孔径要求 $(100 \sim 300)$ μ m^[2]。

2.2 XPS 表面元素分析

纯类人胶原蛋白的碳元素和氮元素含量分别为 71.78% 和 7.73%。透明质酸中碳元素和氮元素的含量分别为 79.64% 和 0.97%。氧元素在纯类人胶原蛋白和透明质酸中的含量分别是 20.49% 和 19.38%。从图 3 可以看出, 类人胶原蛋白-透明质酸复合支架的

碳元素和氮元素含量介于纯类人胶原蛋白和透明质酸的碳含量、氮含量之间，而氧元素含量均低于纯类人胶原蛋白和透明质酸的氧含量。

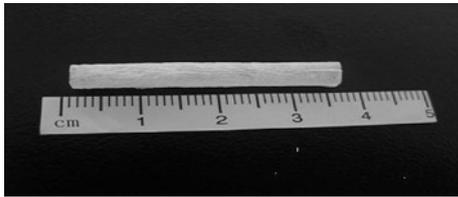


图 1 类人胶原蛋白-透明质酸血管支架的外部形态
Fig. 1 Appearance of human-like collagen-hyaluronic acid blood vessel graft.

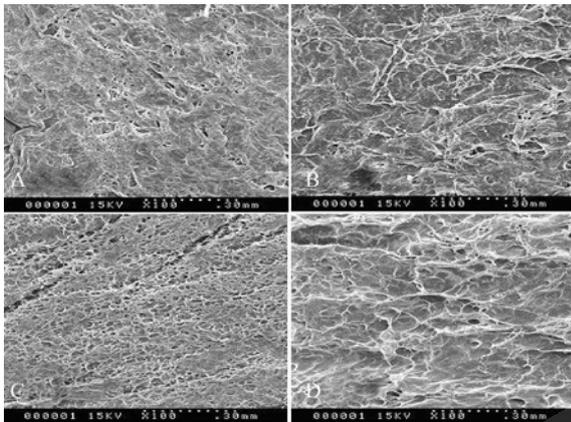


图 2 各种血管支架扫描电镜
Fig. 2 SEM micrographs of different blood vessel grafts. (A) HLC. (B) HLC-HA (0.01%). (C) HLC-HA (0.05%). (D) HLC-HA (0.1%).

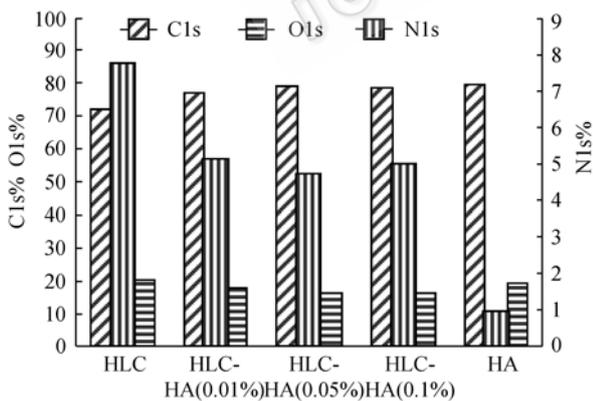


图 3 不同样品 C1s、N1s、O1s 峰的 XPS 分析图
Fig. 3 XPS C1s, N1s and O1s core level spectra of different samples.

2.3 材料孔隙率测定结果

高孔隙率的材料能够提供足够的空间并吸收足够的血液，表面积较大从而有利于体内物质的交换，

所以一般选择孔隙率大于 90% 的材料。由图 4 可看出，各组复合血管支架材料的孔隙率都在 90% 以上，明显高于对照组 HLC 的孔隙率，有较高的孔隙率。其中 HLC-HA(0.05%) 组孔隙率达到 94.38%。

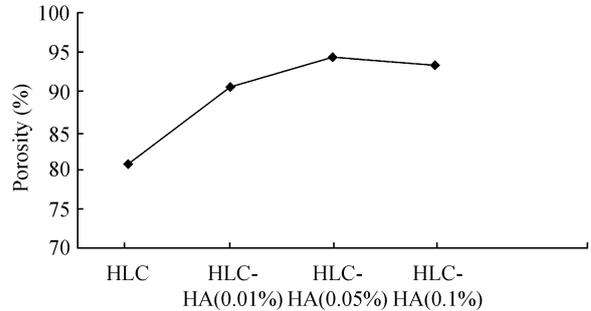


图 4 各组血管支架的孔隙率
Fig. 4 Porosity of different groups of blood vessel grafts.

2.4 血管支架的力学性能测试

各组血管支架材料的应力、应变及弹性模量如表 1 所示。通过干样测试发现 HLC-HA 复合支架的应力均大于纯 HLC 支架材料的应力。经 LSD 分析有显著性差异 ($P < 0.01$)，其他 3 组材料的应力均大于 HLC 支架材料的应力。而 3 组复合支架材料之间没有显著性差异 ($P > 0.05$)，其中 HLC-HA(0.05%) 支架的最大应力为 (1000.8 ± 7.9) kPa，纯 HLC 支架最小应力为 (216.7 ± 9.1) kPa；应变方面，HLC-HA(0.01%) 组支架相比其他组支架有显著性差异 ($P < 0.01$)；杨氏模量方面，HLC-HA(0.05%) 组和 HLC-HA(0.1%) 组的杨氏模量明显大于纯 HLC 和 HLC-HA(0.01%) 组。湿样测试中，HLC-HA 复合支架的应力、应变均明显大于纯 HLC 组血管支架。图 5A~5C 为室温下干样和湿样的应力应变曲线图，应力随应变的增大而增大，当支架断裂时，应力达最大值，然后突然下降。

2.5 血管支架压力爆破实验

从图中可以看出 HLC-HA(0.05%) 血管支架的爆破压力最大，达 (1058.6 ± 8.2) kPa。HLC-HA 复合血管支架爆破压力大于纯 HLC 组，表明透明质酸的加入增强了血管支架的耐受性、抗压性增大。

2.6 血管支架材料细胞毒性的测定

如表 2 所示，在浓度分别为 100%、75%、50% 和 25% 的 HLC-HA(0.05%) 血管支架材料的浸提液中，48 h 时 BHK-21 细胞的相对增殖率都在 90% 以上，随着浸提液浓度的降低，细胞相对增殖率依次升高，毒性评价均为 1 级，细胞毒性实验合格。

表 1 类人胶原蛋白-透明质酸支架材料的拉伸性能(n=5)

Table 1 Tensile properties for human-like collagen-hyaluronic acid scaffolds (n=5)

Samples	Name	Stress (kPa)	Strain (%)	Young's modulus (MPa)
Dry samples	HLC	216.7±9.1	8.5±0.5	3.4±0.4
	HLC-HA (0.01%)	815.6±8.6	20.1±0.8	4.6±0.5
	HLC-HA (0.05%)	1000.8±7.9	2.0±0.7	78.7±0.6
	HLC-HA (0.1%)	900.6±9.7	1.5±0.4	70.1±0.9
	HLC	110.5±1.5	8.9±0.6	1.6±0.5
Wet samples	HLC-HA (0.05%)	190.5±2.1	11.9±0.3	2.3±0.4
	HLC-HA (0.01%)	180.4±2.5	20.6±0.7	1.7±0.3

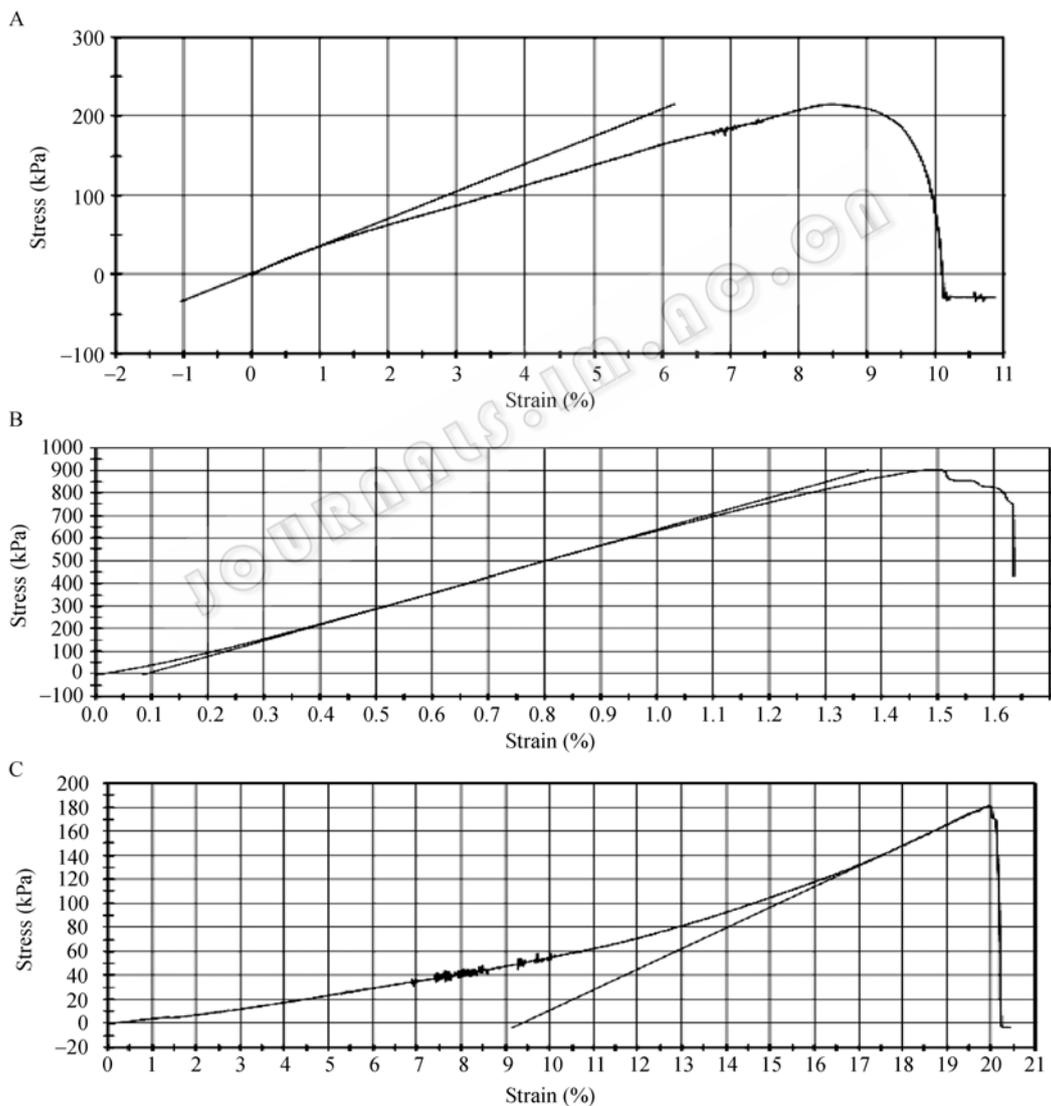


图 5 各组血管支架材料在室温下的应力应变曲线图

Fig. 5 Curve of stress-strain for groups of scaffolds were obtained at room temperature. (A) Dry scaffold of HLC-HA(0.1%). (B) Dry scaffold of HLC-HA(0.01%). (C) HLC-HA (0.01%) (in system of normal sodium).

表 2 血管支架材料细胞毒性的测定结果($n=6$, $\bar{x} \pm s$)Table 2 Results of cell toxicity were obtained from groups of vessel scaffolds ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	$OD_{490} (\bar{x} \pm s)$	RGR (%)	Toxicity fractionation
Blank	0.645±0.073	100	0
100% leaching liquor	0.591±0.053	91.77	1
75% leaching liquor	0.608±0.074	94.26	1
50% leaching liquor	0.638±0.062	98.91	1
25% leaching liquor	0.640±0.088	99.22	1

2.7 血管支架细胞种植实验

从图 7 中可以看出 HLC-HA(0.05%)(图 B、D)实验组和 HLC(图 A、C)空白组相比脐带静脉内皮细胞贴壁率明显增加,生长良好,细胞间呈现纤维连接。原因可能为透明质酸的加入促进了脐带静脉内

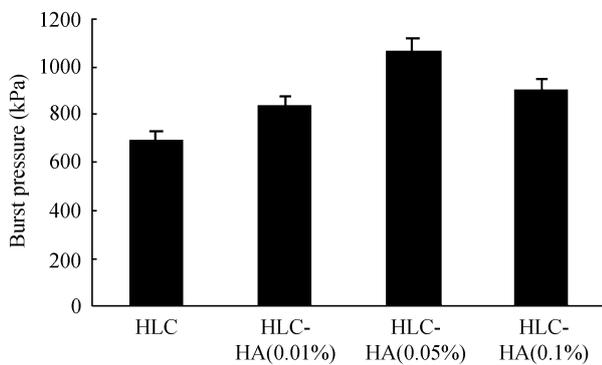


图 6 各组血管支架压力爆破实验结果

Fig. 6 Results of burst pressure experiment for groups of scaffolds ($n=5$).

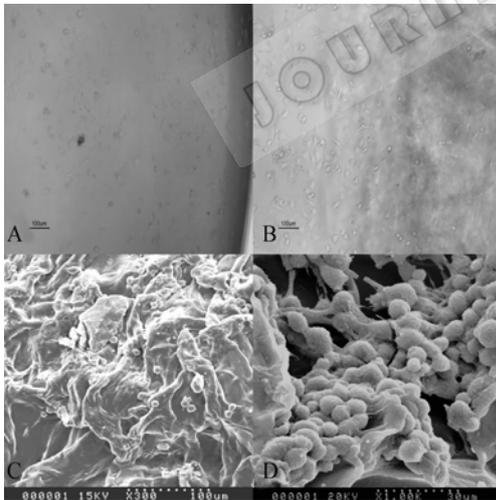


图 7 脐带静脉内皮细胞(EVC304)在血管支架内表面的生长情况:(A) 类人胶原蛋白(光学显微镜 10×);(B) 类人胶原蛋白-透明质酸(0.05%)(光学显微镜 10×);(C) 类人胶原蛋白(扫描电镜 300×);(D) 类人胶原蛋白-透明质酸(0.05%)(扫描电镜 1000×)

Fig. 7 Growth of endothelial cells from umbilical core vein in internal surface of blood vessel scaffolds. (A) HLC. (B) HLC-HA (0.05%). (C) HLC (SEM). (D) HLC-HA (0.05%) (SEM). Magnification: A, 10×; B, 10×; C, 300×; D, 1000×.

皮细胞在血管支架的黏附与增殖^[13],结果表明 HLC-HA(0.05%)血管支架的细胞相容性良好。

2.8 皮下植入实验

HLC-HA(0.05%)复合支架材料组植入小鼠皮下,1、3、5和9周时的取材样品经 HE 染色后置于普通光学显微镜下的观察结果如图 8 所示。从图中可以看出,植入材料 1 周时,周围组织有明显炎症,出现水肿(图 A);3 周后炎症有所减轻,材料部分降解(图 B);材料植入皮下 5 周后材料大部分已经降解,炎症基本消失,材料周围已有新生组织生成(图 C);9 周时炎症完全消失,材料完全降解(图 D)。

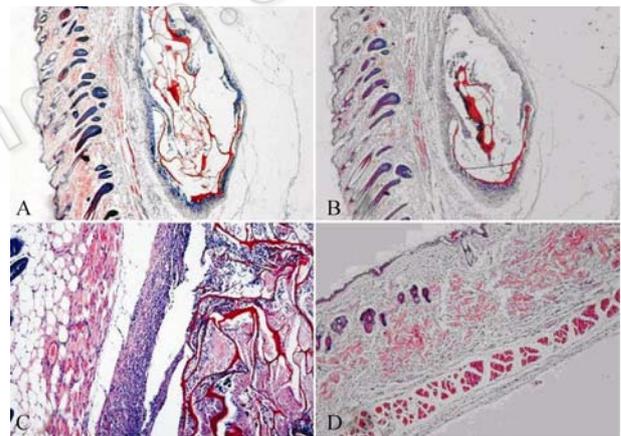


图 8 类人胶原蛋白-透明质酸(0.05%)皮下植入实验 HE 染色结果

Fig. 8 HE micrographs of human-like collagen-hyaluronic acid scaffolds (0.05%) implanted in mice for one week(A), three weeks (B), five weeks (C) and nine weeks (D). Magnification: A, 80×; B, 80×; C, 100×; D, 80×.

3 讨论

管壁微孔的大小是血管支架的一个重要性能参数。不论采用何种材料或工艺制成的人工血管,管壁构造中都应具备合适的孔隙率,所以对材料的孔径分布进行扫描电镜观察很有必要。研究表明,生物材料的孔隙率为 90%、孔径为 100~300 μm 时,最有利于细胞黏附与基质合成^[16]。本研究构建出的含

不同浓度透明质酸的类人胶原蛋白-透明质酸复合支架经扫描电镜观测, 结果发现 HLC-HA(0.05%) 支架孔径比较均匀, 孔隙明显增多。孔隙率测定结果表明各组复合支架之间无显著性差异, 孔隙率达 90% 以上, 均大于纯类人胶原蛋白支架的孔隙率, 符合血管支架的孔隙率要求, 其中 HLC-HA(0.1%) 支架的孔径达 60~90 μm , 比较接近于理想血管支架的孔径要求。原因可能为京尼平是一种环烯醚萜类的杂环化合物, 具有 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COO}^-$ 等多个活性官能团, 与氨基酸反应生成一个环烯醚萜的氮化物, 经脱水作用形成一个芳香族的单体, 该单体可能由于自由基反应的二聚作用形成环状的分子间和分子内交联结构, 将透明质酸与其作用可得环状交联 HA^[10,17,18], 所以京尼平及透明质酸的加入提高了复合支架的孔隙率。

人工血管作为体内血管的代用品, 首先应保持持久的强度、良好的抗机械疲劳能力, 这是人工血管在移植后能耐受长期血流冲击不发生变形破裂的关键, 也是组织工程血管目前研究的热点与难点, 而拉力测试能较好地反应这方面的性能。为了更直观地表征支架的机械性能对支架干湿样品分别进行了测试。HLC-HA 复合支架的干湿样应力与纯类人胶原蛋白支架相比有明显的统计学差异, 干样最大应力达 (1000.8 ± 7.9) kPa, 明显大于鲁强等^[17]研究的加入肝素的丝素蛋白-胶原蛋白支架的应力 (665 ± 5) kPa, 与李莉^[11]等所测新鲜血管拉力为 (1.08 ± 0.20) MPa 相近, 湿样最大应力达 (190.5 ± 2.1) kPa; 应变方面, 湿样 HLC-HA(0.01%) 组的最大应变为 $(20.6 \pm 0.7)\%$, 与干样 HLC-HA(0.01%) 组无明显差异。但与其他组相比有显著性差异。各组湿样之间弹性模量无统计学差异; 干样中 HLC-HA(0.05%) 和 HLC-HA (0.1%) 组与 HLC-HA(0.01%) 组和纯 HLC 组相比有显著性差异。原因可能为透明质酸的加入增强了支架的力学性能。随着透明质酸浓度的升高, 干样的应力和弹性模量均明显增大, 湿样的应力也明显增大, 但弹性模量无显著性差异。拉力测试结果表明透明质酸的加入改善了类人胶原蛋白的机械性能, 增大了血管支架的应力和粘弹性。

血管支架的耐压性越好, 使用的可靠性就越大, 爆破强度就是表示血管耐压性的一个力学性能。该实验结果表明透明质酸的加入增强了复合血管支架

的爆破强度, 其中 HLC-HA(0.05%) 血管支架的爆破压力最大, 抗压性最好。与自体血管的爆破压力 $(2700 \sim 5000 \text{ mmHg})$ ^[19] 相比还有一定差距。

体外细胞毒性实验是评价生物材料组织相容性的重要方法, 与体内实验相比具有简便、重复性好、实验条件易于控制等优点。本实验采用材料浸提液方式, 用 MTT 比色法^[20] 测定不同浓度浸提液中的细胞存活与增殖能力。本实验结果显示各浓度组的 HLC-HA(0.05%) 浸提液的细胞毒性等级均为 1 级, 支架材料的细胞毒性实验合格, 为进一步进行动物体内实验奠定了基础。

细胞相容性评价是确定支架材料能否实用的关键指标。本实验采用脐带静脉内皮细胞在血管支架种植的方法来检测血管支架的细胞相容性。脐带静脉内皮细胞在 HLC-HA(0.05%) 血管支架内表面生长黏附良好, 明显优于 HLC 空白组, 表明透明质酸的加入促进了脐带静脉内皮细胞在血管支架内表面的黏附与增殖, HLC-HA(0.05%) 血管支架的细胞相容性良好。

降解性能和组织相容性是评价组织工程血管支架的重要指标。理想的组织工程血管要求材料的降解速度与细胞的增殖速度相匹配^[21]。从实验结果看出在植入第 3 周时炎症反应开始减轻; 到第 5 周炎症反应基本消失, 材料开始降解; 第 9 周材料完全降解, 炎症反应完全消失, 新的组织已经生成; 而戊二醛交联材料的炎症反应一般持续 20 周左右。原因可能为所选材料类人胶原蛋白和透明质酸具有可降解性、生物相容性好的特点, 新型交联剂京尼平的细胞毒性较小, 因此复合支架材料的降解性能好, 有较好的组织相容性。

4 结论

本研究首次将类人胶原蛋白和透明质酸复合经京尼平交联构建出血管支架, 并对其物理性能和生物相容性进行了研究。结果表明复合支架材料的孔隙率达 90% 以上, 应力最大为 (1000.8 ± 7.9) kPa, 爆破压力最大 (1058.6 ± 8.2) kPa, 与纯类人胶原蛋白血管支架相比具有显著性差异; 复合支架的碳氮含量分别高于纯类人胶原蛋白和纯透明质酸的碳氮含量, 氧元素含量低于纯类人胶原蛋白和透明质酸的氧含量; 细胞毒性实验、血管支架细胞种植实验及小鼠

皮下植入实验表明类人胶原蛋白-透明质酸(0.05%)血管支架细胞毒性实验合格,具有良好的细胞相容性、组织相容性及降解性,力学性能进一步改善后,在组织工程领域具有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] American Heart Association. 2000 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas: American Heart Association, 1999.
- [2] Wu YC, Cui L, Cao YL. The research and development of tissue engineering vessel. *J Tiss Eng Rec Surg*, 2006, **2**(5): 288–290.
吴莹琛, 崔磊, 曹谊林. 组织工程血管研究进展. *组织工程与重建外科杂志*, 2006, **2**(5): 288–290.
- [3] Mi Y, Xi JF, Fan DD, *et al.* The biocompatibility of human-like collagen. *J Northwest Univ (Nat Sci Ed)*, 2004, **34**(1): 66–68.
米钰, 惠俊峰, 范代娣, 等. 类人胶原蛋白生物相容性实验研究. *西北大学学报(自然科学版)*, 2004, **34**(1): 66–68.
- [4] Zhai Y, Cui FZ, Wang Y. Formation of nanohydroxylapatite on recombinant human-like collagen fibrils. *Curr Appl Phys*, 2005, **5**: 429–432.
- [5] Ma M, Fan DD. Hemostatic effect and histocompatibility of chitosan-human-like collagen on rabbit liver wound surface. *J Fourth Mil Med Univ*, 2007, **28** (12): 1122–1124.
马茂, 范代娣. 壳聚糖-类人胶原蛋白对兔肝创面的止血效果及组织相容性观察. *第四军医大学学报*, 2007, **28**(12): 1122–1124.
- [6] Zhai Y, Cui FZ. Recombinant human-like collagen directed growth of hydroxyapatite nanocrystals. *J Cryst Growth*, 2006, **291**: 202–206.
- [7] Huang SL, Ling PX. Crosslinking Hyaluronic acid application in medicine. *Food Drug*, 2004, **10**: 15–17.
黄思玲, 凌沛学. 交联玻璃酸在医药中的应用. *山东食品科技*, 2004, **10**: 15–17.
- [8] Liu JJ, Zeng CQ. Effect of hyaluronan in angiogenesis of tumor. *J Beihua Univ (Nat Sci)*, 2003, **10**(4): 393–395.
刘娇娇, 曾常茜. 透明质酸在肿瘤新血管生成中的作用. *北华大学学报(自然科学版)*, 2003, **10**(4): 393–395.
- [9] Wang YH, Wang FS, Guo XP. Angiogenesis effects of low molecular weight hyaluronic acid. *Chin Pharm J*, 2007, **5**(42): 664–666.
王彦厚, 王凤山, 郭学平. 低相对分子质量透明质酸的促血管生成作用. *中国药学杂志*, 2007, **5**(42): 664–666.
- [10] Huang ZB, Gu QS. A neotype crosslinking agent genipen application and development in biomedical engineering. *Shanghai J Biomed Eng*, 2003, **24**(1): 21–24.
黄治本, 顾其胜. 新型交联剂京尼平在生物医学中的应用与发展. *上海生物医学杂志*, 2003, **24**(1): 21–24.
- [11] Li L, Chen J, Yu XX. Preparing biological tissues for tissue-engineered vascular scaffold by crosslinking agent genipin. *J Clin Rehab Tiss Eng Res*, 2007, **11**(35): 6954–6957.
李莉, 陈健, 余喜讯. 生物交联剂京尼平改造生物性组织为工程化血管支架的实验. *中国组织工程研究与临床*, 2007, **11**(35): 6954–6957.
- [12] Yao FL, Li XQ, Yu X, *et al.* Crosslinking reaction of chitosan and gelatin with genipin. *J Tianjin Univ*, 2007, **40**(12): 1485–1488.
姚芳莲, 李学强, 于潇等. 京尼平对壳聚糖及明胶的交联反应. *天津大学学报*, 2007, **40**(12): 1485–1488.
- [13] Suzan TM, Paul J, Ronnie W, *et al.* Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials*, 2007, **28**: 1123–1131.
- [14] United States Pharmacopoeia Convention. Biological Tests/Biological Reactivity Tests, *In Vivo*. USP XXII. Rockville, 1993.
- [15] GB/T16886.5-2001/ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices-part 1: Evaluation and testing.
GB/T16886.1-2001/ISO 10993-1 医疗器械生物学评价-第1部分: 评价与试验.
- [16] Cao YL. Tissue Engineering. Beijing: Science Press, 2007: 625–636.
曹谊林. 组织工程学. 北京: 科学出版社, 2007: 625–636.
- [17] Lu Q, Zhang SJ, Hu K. Cytocompatibility and blood compatibility of multifunctional, fibroin/collagen/heparin scaffolds. *Biomaterials*, 2007, **28**: 2036–2313.
- [18] Sung HW, Liang IL, Chen CN, *et al.* Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslink agent (genipin). *J Biomed Mater Res*, 2001, **55**: 538–546.
- [19] Joseph D, Michael M, Robert M, *et al.* A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials*, 2003, **24**: 1241–1254.
- [20] Wang X, Shi YP, Zhu XT, *et al.* Evaluation on the cytotoxicity of polymeric material for medical use by MTT-assay. *Shandong J Biomed Eng*, 2003, **1**: 46–47.
王昕, 施熾萍, 朱雪涛, 等. MTT 法评价医用高分子材料的细胞毒性. *山东生物医学工程*, 2003, **1**: 46–47.
- [21] Wang X, Qu L, Dou ZY, *et al.* Biomaterials in tissue engineering scaffolds. *China Biotechnol*, 2003, **23**(10): 15–18.
王馨, 屈雷, 窦忠英, 等. 组织工程生物支架材料. *中国生物工程杂志*, 2003, **23**(10): 15–18.