京尼平或紫外线交联制备的壳聚糖 / 藻酸盐复合支架材料比较 *

史 林[1] 文益民[2△] 李 含[1] 魏祥科[1] 张 涛[1]

(1 兰州大学第二临床医学院 甘肃 兰州 730030；2 兰州军区兰州总医院创伤骨科中心 甘肃 兰州 730050)

摘要 目的：比较京尼平或紫外线交联的壳聚糖 / 藻酸盐复合支架材料的降解率、孔隙率、含水量、细胞毒性以及生物力学等特性。**方法：**①按照交联方法不同分为：京尼平组、紫外线组。②扫描电镜下观察材料的表面结构以及检测材料的降解率、孔隙率、含水量、细胞毒性以及生物力学。**结果：**①紫外线组与京尼平组均表现为多孔隙结构，无明显差异。②紫外线组降解率高于京尼平组。③京尼平组与紫外线组的孔隙率差异无统计学意义，含水量差异比较有统计学意义。④两组均表现为较低的细胞毒性，良好的生物相容性。⑤京尼平交联组的生物力学特性较紫外线组显著提高。**结论：**京尼平交联的壳聚糖 / 藻酸盐复合支架材料，具有良好的生物学特性，为组织工程脊髓领域提供了非常具有潜力的材料。

关键词：京尼平；壳聚糖；藻酸盐；复合支架材料

中图分类号：R318.08 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2012)18-3442-04

Comparison of Genipin or Ultraviolet Crosslinking Prepared Chitosan/Alginate Composite Scaffold Material*

SHI Lin[1], WEN Yi-min[2△], LI Han[1], WEI Xiang-ke[1], ZHANG Tao[1]

(1 The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, 730030, China;

2 Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Orthopaedic Rauma Center, Lanzhou, 730050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate genipin (GP) or ultraviolet rays (UV) crosslinking effect on chitosan/alginate composite scaffold material for tissue engineering by comparing their degradation rate, porosity, water content, cytotoxicity and biomechanics properties. Methods: ①According to different cross-linking methods, biomaterials were divided into (GP)group, (UV)group. ②The surface structure of two groups was detected by scanning electron microscope (SEM). The material degradation rate, porosity, water content, cytotoxicity, and biomechanics properties were detected. Results: ①both UV group and GP group showed pore -rich structure, and there was no significant difference between the two groups. ②Degradation rate of UV group was higher than that of GP group. ③GP group and UV group had no significant difference in porosity. The difference of water content is meaningful in Statistics. ④GP group and UV group showed low cytotoxicity, good biocompatibility. ⑤ Biomechanics properties of GP group were significantly improved compared with UV group. Conclusion: Genipin crosslinked chitosan/alginate composite scaffold material has good biological characteristics. It is a potential material in tissue engineering of spinal cord field.

Key words: Genipin; Chitosan; Alginate; Composite scaffold material

Chinese Library Classification (CLC) : R318.08 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)18-3442-04

前言

壳聚糖和藻酸盐都属于天然可降解高分子材料，两者都具有良好的生物相容性，在生物医学以及组织工程领域都应用广泛。例如：壳聚糖与藻酸盐都被应用于微球囊的制备[1-4]，以及各种组织工程技术[5-8]等。生物力学性能差是它们的缺点，难以满足组织工程支架材料的一些要求[9]，人们往往通过交联反应来提高材料的力学性能[10]。交联方法包括物理交联、化学交联，传统的化学交联方法细胞毒性较大。京尼平作为一种新型交联剂，在交联效果相似的情况下，具备良好的生物相容性[11]。本研究主要探究紫外线、京尼平两种交联方法对壳聚糖 / 藻酸盐复合支架材料的降解率、孔隙率、含水量、细胞毒性以及生物力学等特性的影响。

1 资料与方法

1.1 材料与仪器

壳聚糖(美国 Sigma 公司)、藻酸盐(美国 Sigma 公司)、京尼平 (日本 Wako 公司)、DMEM/F12 培养液(美国 GIBCO 公司)、噻唑蓝(美国 Sigma 公司)、二甲基亚砜(美国 Sigma 公司)、溶菌酶 (USA)。LDZX 一 30KBS 立式电热压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；DP71 光学显微镜，Olympus 公司，日本；ZT-12J1 生物组织自动脱水机，湖北省孝感市亚光医用电子技术研究所；TB-718 生物组织包埋机，湖北省泰维医疗科技有限责任公司；CS-III 生物组织摊片烤片机，湖北省医用电子仪器

* 基金项目：全军医学科学技术研究 " 十一五 " 计划课题项目 (06MA081)

作者简介：史林 (1985-)，男，硕士研究生，研究方向：脊髓损伤与修复，电话：15193108008，E-mail: shilinlanzhou@126.com

△通讯作者：文益民，电话：13919913823

(收稿日期：2012-02-09 接受日期：2012-02-29)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

厂；超净工作台，苏州净化设备有限公司；MODEL 550 型酶标仪，BioRad 公司，美国；LGJ 一冷冻干燥机，军事医学科学院实验仪器厂；JSM5600LV 扫描电镜，日本电子株式会社。

1.2 壳聚糖 / 海藻酸钠支架材料的制备及交联

1.2.1 制备 称取一定量的壳聚糖溶于 2%乙酸，充分搅拌，制成 3 %的壳聚糖水凝胶；称取一定量的海藻酸钠溶于三蒸水，充分搅拌，制成 2 %的海藻酸钠水凝胶。将上述已制备好的水凝胶混合，以 200 r/min 的转速在磁力搅拌器上搅拌 30 min，形成壳聚糖 / 藻酸盐水凝胶。将所得水凝胶低压消泡，注入模具中，于 -80 ℃冰箱过夜，取出后快速置于预冷的冷冻干燥机中低压真空冷冻干燥 48 h。干燥完毕后，常温下脱模，复合支架材料浸泡于 1%NaOH (1mL/cm^2) 2 h，三蒸水反复冲洗至中性。低压真空干燥后可得成型的壳聚糖 / 海藻酸钠支架材料。

1.2.2 交联 京尼平组：将支架材料置于 0.5%的京尼平溶液中，交联 24 h，重新冷冻干燥；紫外线组：采用紫外线发生器，以 500 μW/m^2 的剂量照射 1 h，可使壳聚糖与海藻酸钠充分交联。将两组材料裁剪成所需大小并称取重量后，分别装入 90 mm 培养皿中，密封，60Co(20kGy)照射 24 h 后，4 ℃保存备用。

1.3 扫描电镜观察

将 5 mm× 5 mm× 2 mm 大小的材料真空喷金后，用扫描电镜观察材料表面结构以和孔径大小的变化，低倍拍摄扫描电镜照片。

1.4 降解率测定

分别记录材料重量(W0)，置于 2 mg/mL 溶菌酶的 PBS 溶液中，pH 7.4，温度 35 ℃，分别在 1 周，2 周，3 周，4 周取出，蒸馏水反复冲洗，重新冷冻干燥后称重 (W_1)。降解率 =(W_0-W_1) /W_0× 100%。

1.5 孔隙率测定

将一定体积 (V_0)，重量 (W_0) 的支架材料，浸入无水乙醇中至饱和，取出拭去表面液体称重 (W)，无水乙醇密度为 (ρ)，则孔隙率 = (W_1-W_0) ρ /V_0× 100%。

1.6 含水量测定

将支架材料在 PBS 溶液中浸泡 24 h 后取出，称重 (W_0)，然后将材料冷冻干燥后，称重为 (W)，则含水量 =(W_0-W_1)/W_0× 100%。

1.7 细胞毒性测定

将第 2 代 BMSCs 细胞悬液以 1× 10^6 个 /mL 浓度负压接种于支架上，置于 37 ℃、5%CO_2、饱和湿度条件孵育箱中孵育 4 h，然后将其置入 96 孔板，每孔加入培养液 200 μL，设为实验组；将细胞以密度为 1× 10^6/mL 接种于 96 孔板，每孔 200 μL，设为对照组；将支架材料置入 96 孔板，每孔加入培养液 200 μL，设为实验调零组；再设对照调零组，为单纯培养液 200 μL。继续在 37 ℃、5 %CO_2、饱和湿度条件孵育箱中孵育。培养 1、3、5 d，在预定的时间取出，每孔加入 MTT 20 μL，继续培养 4 h，终止培养，吸去孔内培养液，每孔加入二甲基亚砜 150 μL，摇床震荡 10 min，在酶标仪 490 nm 处测定 OD 值为 A 值。则细胞相对增殖率 (RGR)= 实验组平均 A 值 / 阴性对照组平均 A 值× 100%。将 RGR 转换成 6 级细胞毒性来评价支架材料是否合格。

1.8 生物力学测试

实验参数控制：试样夹持长度为 4 mm，拉伸速度为 2 mm/min，在室温下进行拉伸试验，得到支架材料的最大载荷及杨氏模量($\bar{x}$± s，n=3)。

1.9 统计学处理

用 SPSS17.0 软件包对数据进行分析，各组间差异采用方差分析比较。数据以均数± 标准差表示，P<0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 材料的外观以及扫描电镜观察

壳聚糖 / 藻酸盐复合支架材料，紫外线交联组支架材料呈白色，质地较柔软；京尼平交联组支架材料呈深紫色，质地较硬。扫描电镜 (图 1) 见京尼平组与紫外线组均表现为多孔隙结构，孔径大小比较无明显差异。

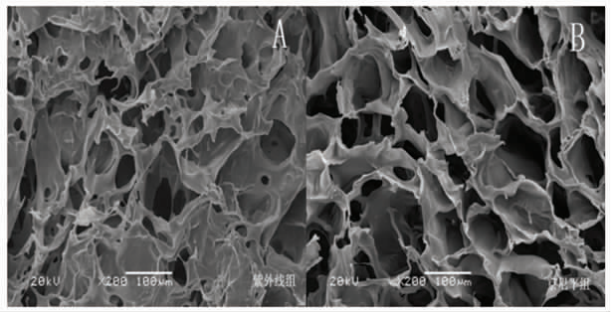

图 1 两组材料扫描电镜下观察(200×)，A 为紫外线组，B 为京尼平组

Fig.1 The SEM images of two groups(200×), A represented the UV group, B represented the GP group

2.2 两组材料的检测结果

2.2.1 体外降解率 两组材料在含 2 mg/mL 溶菌酶的 PBS 溶液中经 1、2、3、4 周进行体外降解测定，结果显示紫外线组高于京尼平组(图 2)。4 周时降解率紫外线组为 (24.68± 1.54) %，京尼平组为 (9.9± 1.2) %。统计学分析显示，两组材料降解率的差异比较有统计学意义(P<0.01)。

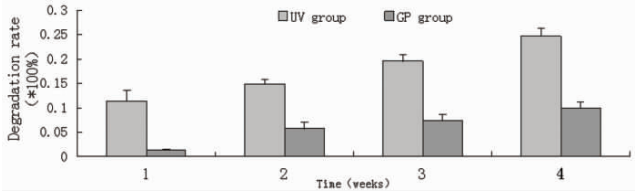

图 2 京尼平组和紫外线组在 1 周、2 周、3 周、4 周降解率的比较

Fig.2 Comparison of degradation rate of two groups for 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks

2.2.2 孔隙率 从表 1 可以看出京尼平组的孔隙率为 90.39± 0.49，紫外线组的孔隙率为 92.35± 3.28，实验证明，孔隙率越高，越有利于细胞生长[18]。经统计学分析，两组间差异无统计学意义。

2.2.3 含水量 京尼平组的含水量为 91.89± 1.16，紫外线组为 97.12± 0.12，紫外线交联后的材料含水量比京尼平组要高，差异比较有统计学意义 (P＜0.05) (表 1)。

2.3 细胞毒性试验

MTT 法检测结果，转换为细胞毒性级别均为 1 级或 0 级，属合格生物材料。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 两组支架材料孔隙率、含水量(%)

Table 1 The porosity and water content of two groups(%)

	Porosity	Porosity
GP group	90.39± 0.49	91.89± 1.16
UV group	92.35± 3.28	97.12± 0.12

2.4 生物力学试验

材料的力学特征是重要的参数之一。弹性模量(杨氏模量)等于应力 / 应变,京尼平组与紫外线组弹性模量差异比较有统计学意义($P<0.05$),京尼平组的抗拉伸性能优于紫外线组(表 3)。

表 2 与细胞相对增值率对应的细胞毒性程度

Table 2 The relative growth rate of cells corresponding to the degree of cytotoxicity

Degree of cytotoxicity	Relative growth rate	Evaluation of materials
0 级	≥ 100	Qualified
1 级	75-99	Qualified
2 级	50-74	Comprehensive evaluation
3 级	25-49	Unqualified
4 级	1-24	Unqualified
5 级	0	Unqualified

表 3 两组材料的最大载荷与弹性模量

Table 3 The maximum lord and Young modulus of two groups

	Maximum lord (N)	Young, modulus (N/mm²)
UV group	2.946	0.79± 0.16
GP group	9.121	1.44± 0.06

3 讨论

当前,可作为组织工程支架材料的有两类:①天然材料,如胶原、明胶、透明质酸钠、壳聚糖、藻酸盐等;②人工合成材料,如聚乳酸、聚乙醇酸、羟基磷灰石等。因为天然材料具有良好生物相容性、可降解性、方便、易得等优点,多数研究者把天然材料作为组织工程支架材料的首选。而怎样克服天然材料力学性能差的缺点,就成为本领域研究的热点。京尼平 - 新型的天然交联剂,在可形成稳定的交联制品的前提下,与传统交联剂戊二醛相比还具有细胞毒性小、抗降解能力强等优点,是一种非常有应用前景的交联剂[12-13]。

理想的组织工程支架材料应具备如下条件[14-16]:①生物相容性,不引起炎症及排斥反应;②生物可降解性,材料的降解与组织再生速率相匹配;③一定的机械强度。

实验表明,支架材料需有多孔性[17],孔隙率在 90% 以上,最有利于细胞黏附[18]。同时支架材料应具备良好的生物可降解性并且降解速率可控。本实验结果显示:孔隙率和含水量在两实验组中均在 90% 以上,扫描电镜显示京尼平组的孔径变化较紫外线组无明显变化,原因可能是冷冻干燥法制备的材料孔径变化主要受冷冻温度、降温速度、冰晶大小等方面的影响[19]。而京尼平交联组是在材料的孔隙形成以后进行的。体外降解率实验表明,京尼平交联后的支架材料抗降解性能显著提高。下一步实验主要在京尼平交联的温度、浓度以及时间等方面进行研究,以期达到人为控制降解速率的目标。

理想的支架材料应具备良好的生物相容性,对种子细胞无毒性,不引起炎症等不良反应。本研究通过 MTT 实验,京尼平组与紫外线组结果评价均为 1 级或 0 级,支架材料的细胞毒性实验合格。分析可能的原因为材料本身(壳聚糖、藻酸盐)以及交联剂(京尼平、紫外线)都属于天然生物材料,都具有良好的生物相容性和较低的细胞毒性。

生物力学性能是评价支架材料是否实用的重要指标。本实验结果显示:京尼平交联后的支架材料生物力学性能显著提高,验证了陈平等[20]关于京尼平交联后的脱细胞牛心包生物支架材料的最大应力、应变、弹性模量均高于对照组的研究。

综上所述,京尼平交联的壳聚糖 / 藻酸盐复合支架在组织工程材料的主要指标 - 降解性能、生物相容性以及生物力学性能等方面,都显示了其优越性,京尼平交联后的壳聚糖 / 藻酸盐复合支架材料在组织工程领域具有良好的应用前景。

参 考 文 献 (References)

[1] Mi FL, Sung HW, Shyu SS. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforce by a naturally occurring cross-linking agent[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 48: 61-72

[2] Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo M, et al. Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation [J]. The AAPS Journal, 2006, 7(4): 903-913

[3] 刘袖洞, 于炜婷, 王为, 等. 海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊及其生物医学应用[J]. 化学进展, 2008, 20(1): 126-139

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Liu Xiu-dong, Yu Wei-ting, Wang Wei, et al. Polyeletrolyte microcapsules prepared by alginate and chitosan for biomedical application [J]. Progress in Chemistry, 2008, 20(1): 126-139

[4] Seo SJ, Akaike T, Shirakawa M, et al. Alginate microcapsules prepared with xyloglucan as a synthetic extracellular matrix for hepatocyte attachment[J]. Biomaterials, 2005, 26(17): 3607-3615

[5] Jiang T, Abdel FW, Laurencin CT. In vitro evaluation of chitosan/poly (lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2006, 27(28): 4894-4903

[6] Chavez DME, Mora GJ, Gomez PU, et al. Facial nerve-regeneration through progesterone-loaded chitosan prosthesis. A preliminary report [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2003, 67(2): 702-711

[7] Bozkir A, Saka OM. Chitosan-DNA nanoparticles: Effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency[J]. Journal of Drug Targeting, 2004, 12(5): 281-288

[8] Kawase M, Michibayashi N, Nakashima Y, et a1. Application of glutaradehyde Crosslinked Chitosan as a Scaffold for hepatocyte Attachment[J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(6): 708-710

[9] 李冰一, 蔺嫦燕. 组织工程支架材料的研究进展[J].生物医学工程与临床, 2007, 11(30): 241-245
Li Bing-yi, Lin Chang-yan. Advances in tissue engineering scaffold materials[J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2007, 11 (30): 241-245

[10] 陈强, 吕伟娇, 张文清. 醛交联剂对壳聚糖复合膜性能的影响[J]. 华东理工大学学报:自然科学版, 2005, 31(3): 398-402
Chen Qiang, Lu Wei-jiao, Zhang Wen-qing. Effect of aldehydes on the properties of the composite chitosan films[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2005, 31(3): 398-402

[11] 王培伟, 陈宗刚. 静电纺壳聚糖 / 胶原蛋白复合纳米纤维的细胞相容性[J].中国组织工程研究与临床康 复, 2008, 12(1): 5-9
Wang Pei-wei, Chen Zong-gang. Cell biocompatibility of electrospun chitosan/collagen composite nanofibers [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(1): 5-9

[12] Sung HW, Huang RN, Huang LL, 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

[13] Mi FL, Tan YC, Liang HF, et a1. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant[J]. Biomaterials, 2002, 23(1): 181-191

[14] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering [J]. Trends Biotechnology, 1998, 16(5): 224-230

[15] Reed e, Vun Jak-Novakovic G. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering[J]. Biotechnology, 1994, 12(7): 689-693

[16] Nerem RM, Sambanis A. Tissue engineering:from biology to biological substitutes[J]. Tissue Eng, 1995, 1(1): 3-13

[17] Uebersax L, Hagenmuller H, Hofmann S, et al. Effect of scaffold design on bone morphology in vitro [J]. Tissue Eng, 2006, 12 (12): 3417-3429

[18] 曹谊林. 组织工程学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 625-636
Cao Yi-lin. Tissue Engineering [M]. Beijing: Science Press, 2007: 625-636

[19] Zhao Jie, Lian Xiao-Feng, Hou Tie-Sheng, et al. Anterior debridement and bone grafting of spinal tuberculosis with one-stage instrumentation anteriorly or posteriorly[J]. 2008, 23(1): 332-335

[20] Kuo YC, Ku IN. Effects of gel concentration,human fibronectin, and cation supplement on the tissue-engineered cartilage [J]. Biotechnol Progress, 2007, 23: 238-245

[21] 陈平, 李新华, 刑万红. 京尼平交联的脱细胞牛心包生物支架材料的实验研究[J].中国医药导报, 2010, 7(6): 28-29
Chen Ping, Li Xin-hua, Xing Wan-hong. Experimental study of genipin crosslinked acenular bovine pericardium for biological scaffold materials[J].China Medical Herald, 2010, 7(6): 28-29

(上接第 3524 页)

[13] 左勇.呼吸道感染患者血浆内毒素水平测定的临床价值[J]. 检验医学与临床,2011,8(7):862-863
Zuo Yong. The clinical value of the level of endotoxin in respiratory tract infection[J]. Lab Med Clin, April, 2011, 8(7):862-863

[14] Molor-erdene P, Okajima K. Urinary trypsin inhibitor LPS-induced hypotension suppressing tumor necrosis factor-production through inhibition of Egr-1 expression [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288 (3):1265-1271

[15] 孙国仙.急性呼吸道感染患儿 C 反应蛋白、白细胞计数、免疫球蛋白检测的意义[J]. 中国现代医生,2011,49(20):115-116
Sun Guo-xian. Significance of C-reactive protein, white blood cell count and immunoglobulin detection in children with acute respiratory infection[J]. China modern doctor, 2011, 49 (20):115-116

[16] 周永贤,黄瑞玉,周才.降钙素原在新生儿败血症诊断中的应用[J]. 广东医学,2011,32(5):629-630
Zhou yong-xian, Huang Rui-yu, Zhou Cai. Procalcitonin in the diagnosis of neonatal sepsis[J]. Guangdong Medical Journal, 2011, 32 (5): 629-630

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net