

文章编号:1004-7220(2010)01-0011-05

壳聚糖-脱细胞真皮三维材料作为骨组织 工程支架材料的研究

张 燕, 李瑞欣, 张西正, 郭 勇

(军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要:目的 观察 MC3T3-E1 成骨前体细胞在壳聚糖-脱细胞真皮三维支架材料上的黏附情况,并评价其细胞相容性。方法 通过冷冻干燥制备壳聚糖-脱细胞真皮三维支架材料,并测试其孔隙率、密度和吸水率,通过扫描电镜分析支架的微观形貌。采用体外培养细胞的方法,将 MC3T3-E1 细胞直接接种到壳聚糖-脱细胞真皮三维支架材料上,培养 2,3,4,5 h,各时间点各取 3 个样品,测定细胞在支架上的黏附率,确定最佳的细胞贴壁时间。将细胞接种到支架上,共培养 1,3,5,7,9,11,13 d,采用 MTS 方法绘制细胞增殖曲线,组织化学染色观察细胞形态,并利用材料试验机测试不同时间材料细胞复合物的压缩弹性模量。结果 壳聚糖-脱细胞真皮材料具有连通的多孔结构,孔隙率为 92.8%,密度为 97.96 g/L,吸水率为 $(2169 \pm 100)\%$ 。细胞相容性实验显示,成骨细胞易于在支架材料上黏附、增殖。结论 壳聚糖-脱细胞真皮材料具有连通的孔隙,孔径较均匀,MC3T3-E1 成骨前体细胞易在壳聚糖-脱细胞真皮三维支架材料上黏附、增殖,表明该支架材料具有良好的细胞相容性。

关键词: 壳聚糖; 脱细胞真皮; 孔隙率; 扫描电镜; 骨组织工程; 支架

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

Study on the three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds for bone tissue engineering

ZHANG Yan, LI Rui-xin, ZHANG Xi-zheng, GUO Yong (*Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Science, Tianjin, 300161, China*)

Abstract; Objective To observe the adhesion of MC3T3-E1 osteoblastic progenitor cells to the three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds, and evaluate the cytocompatibility of the scaffolds. **Method** The three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds were prepared by the freeze-drying method, the porosity, density and water absorption of which were measured. The microscopic morphology of the composite scaffolds was analyzed by the scanning electron microscopy (SEM). The MC3T3-E1 cells cultivated in vitro were seeded onto the composite scaffolds, and then co-cultured for 2, 3, 4 and 5 hours. At each time point, three specimens from each matrix were taken to determine the cell-adhesion rate and the best time of the cell-adhesion. The cells were seeded onto the composite scaffolds, and then co-cultured for 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 days. The MC3T3-E1 cells inside were evaluated with MTS test. The cell morphology was observed by the histological staining. The compression tests were performed using a Universal Testing Machine, at room temperature, as compared with no-cell-scaffolds. **Results** The three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds have high interval porosity with the porosity (92.8%), the density (0.09796 g/ml) and the water absorption $(2169 \pm 100)\%$. The cytocompatibility test shows that the seeded MC3T3-E1 cells can adhere to the scaffolds and proliferate. **Conclusions** The three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds have high interval porosity with the well-

收稿日期:2010-01-13

基金项目:国家自然科学基金重点项目(10832012)。

作者简介:张燕(1978-),女,研究方向:生物力学。

通讯作者:张西正, E-mail: z56787@sohu.com。

distributed diameter. The MC3T3-E1 cells are easy to adhere the scaffolds and proliferate which shows that the scaffolds have a good cytocompatibility.

Key words : Chitosan; Decellularised-derma; Porosity; Scanning electron microscopy; Bone tissue engineering; Scaffolds

通过将分离的细胞种在生物相容性及生物可降解性好的支架材料上可实现组织再生。大量研究表明合适的支架材料对于细胞黏附、扩增具有重要的作用^[1-3]。体外细胞培养法是研究骨移植材料生物相容性有用的方法之一,而且材料与细胞体外复合培养可直接观察细胞与生物材料复合生长的情况,利于了解细胞与材料相互作用的生物学反应,有助于组织工程支架材料的挑选^[4]。本实验通过冷冻干燥方法制备壳聚糖/脱细胞真皮复合支架材料,将体外培养的 MC3T3-E1 成骨前体细胞接种到支架上,考察细胞在支架上的黏附和增殖情况,评价该材料的细胞相容性,探讨将其用于骨组织工程支架的可能性。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

α -MEM 培养基(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),MTS (Promega 公司),扫描电镜(Hitachi S-3400N),TECAN 酶标仪,Instron5865 材料试验机(美国,Instron 公司)

1.2 壳聚糖-脱细胞真皮支架制备

将新鲜猪皮经过脱脂、脱细胞处理制备成脱细胞真皮,粉碎后与壳聚糖溶解在1%的乙酸水溶液中(壳聚糖和脱细胞真皮的质量比为4:6),4℃预冷冻,-20℃冷冻,再通过冷冻干燥法制备脱细胞真皮/壳聚糖复合海绵状材料。

1.3 壳聚糖-脱细胞真皮支架材料的物理化学性能表征

1.3.1 支架形态学观察

HE染色观察支架脱细胞是否完全;支架喷金镀膜后在Hitachi S-3400N型扫描电镜下观察其微观形貌。

1.3.2 支架孔隙率和密度测定

采用液体置换法测定^[5],用量筒量取 V_1 体积的无水乙醇,取一定质量(W)的支架浸入其中,反复抽真空至无气泡逸出,量筒读数为 V_2 ,将含乙醇的支

架材料移出后,量筒读数为 V_3 ,支架孔隙率(P)为:

$$P = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3}, \text{ 支架密度 } d = \frac{W}{V_2 - V_3}, \text{ 测6个样品。}$$

1.3 吸水率

室温下,将干重为 W_{dry} 的材料浸入含有5 mL, pH为7.4,0.1 M PBS的六孔板中。24 h后样品($n=12$)从六孔板中移出,称重,记为 W_{wet} 。用以下方程来评估材料的吸水率:吸水率 = $\frac{W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}}{W_{\text{dry}}} \times 100\%$ 。

1.4 细胞相容性实验

1.4.1 MC3T3-E1 细胞在支架上的黏附率检测

取大小为4 mm × 4 mm × 3 mm的壳聚糖/脱细胞真皮支架材料酒精消毒后备用。将培养瓶内的MC3T3-E1细胞经胰酶消化,取细胞悬液均匀接种于支架上,不加培养液培养2,3,4,5 h,分别在各时间点取出复合支架3个样品,1 mL PBS液冲洗,用细胞计数板计算洗脱细胞数,从而得出黏附细胞的百分率^[3]。

1.4.2 细胞-支架共培养

将培养瓶内的MC3T3-E1细胞经胰酶消化、培养液稀释成密度为 $7.5 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液。取细胞悬液均匀接种于支架上,置于37℃,5% CO₂培养箱中培养,每2 d更换一次培养液。

1.4.3 绘制细胞增殖曲线

细胞增殖用MTS试验来测定。细胞-支架复合物共培养1、3、5、7、9、11、13 d各时间点取3块细胞-支架复合物进行MTS实验。在进行实验前,将原培养液移除,按试剂盒说明加入MTS/PMS和新鲜培养液。经过4 h的培养,振荡10 min,每孔吸出150 μL 培养液至96孔培养皿中,用TECAN酶标仪在波长为490 nm情况下测量A。所测量到的数据用Excel图表进行处理。

1.4.4 细胞形态观察

分别取细胞-支架复合物共培养3、5、9、13 d时的样品,经过固定、脱水、石蜡包埋、切片、HE染色后,在光镜下观察。

1.4.5 材料力学性能测定

利用 Instron5865 材料试验机对培养 3、7、13 d 的细胞-支架复合物样品进行力学性能测定,并与无细胞支架材料进行比较。

1.5 统计学方法

采用 SAS8.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 支架形态

HE 染色观察到支架脱细胞完全(见图 1),扫描电镜观察复合支架具有连通的多孔结构,孔隙大小约为 50-350 μm (见图 2)。

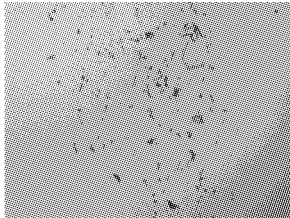


图1 无细胞支架 HE 染色(×100)
 Fig.1 HE staining of the acellular scaffold (×100)

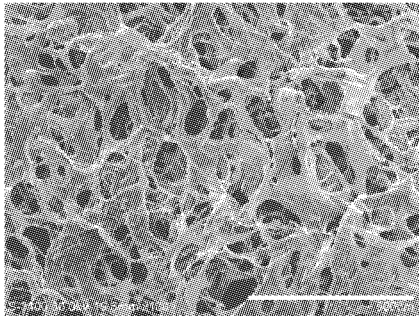


图2 支架材料,SEM(×100)
 Fig.2 Scanning electron micrographs of the acellular scaffold (×100)

2.2 支架孔隙率、密度

支架孔隙率为 92.8%,密度为 97.96 g/L。

2.3 支架吸水率

支架吸水率为(2 169 ± 100)%。

2.4 细胞相容性实验

2.4.1 MC3T3-E1 细胞在支架上的黏附率检测

细胞-支架复合物共培养 2,3,4,5 h,MC3T3-E1 细胞在壳聚糖-脱细胞真皮材料上的黏附率分别为

10%,40%,95%,95%,因此 4 h 时即可加入培养液进行培养。

2.4.2 绘制细胞增殖曲线

细胞-支架复合物共培养 1,3,5,7,9,11,13 d,MTS 方法绘制细胞增殖曲线(图 3)。其中 7、9、11、13 d 数据利用 SAS 软件分析 $P > 0.001$,说明无统计学差异。

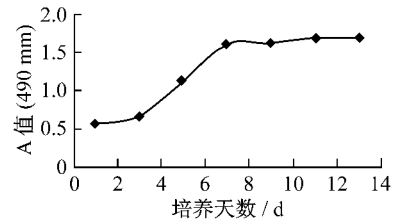


图3 细胞增殖曲线
 Fig.3 The curve of the MC3T3-E1 cells proliferation

2.4.3 细胞形态观察

将标本制片 HE 染色,第 3 天时细胞少量(图 4a),第 5 天时已开始增殖(图 4b),第 9 天时细胞发生粘连并开始形成长梭形(图 4c),第 13 天时长梭形细胞连接更加紧密(图 4d)。但材料内部细胞数量不多,出现支架材料内部"空化"现象(图 5)。

2.4.4 材料力学性能测定

对培养 3、7、13 d 的细胞-支架复合物进行力学测试,并与无细胞材料(测试前 1 d 将无细胞材料浸入培养液中)进行比较。将材料浸在 α -MEM 培养液中进行测试,采用 0.5 Hz 锯齿波形,预载荷为 0.1 N,以每分钟起始高度 15% 的速率进行压缩位移为起始高度 30% 的压缩应变。表 1 为所得细胞-支架的弹性模量,细胞支架复合物各组力学性能无显著差异,与纯支架材料力学性能相比也无显著差异(SAS 软件单因素 K($K \geq 3$)水平设计定量资料的方差分析)。

表 1 细胞-支架的弹性模量

Tab.1 Compressive Young's modulus of the cell-seeded scaffolds

细胞-支架共培养/d	弹性模量/kPa
纯支架(无细胞)	4.62 ± 1.20
3	4.99 ± 0.34
7	5.01 ± 0.18
13	4.97 ± 0.22

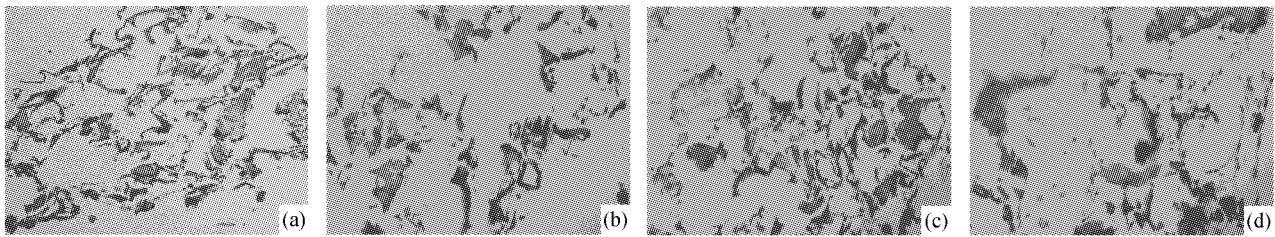


图4 细胞-支架复合物 HE 染色 (a) 培养第3天(200×); (b) 培养第5天(200×); (c) 培养第9天(200×); (d) 培养第13天(200×)
Fig.4 HE staining of the cell-seeded scaffolds (a) In culture 3 days(200×). (b) In culture 5 days(200×). (c) In culture 9 days(200×). (d) In culture 13 days (200×)

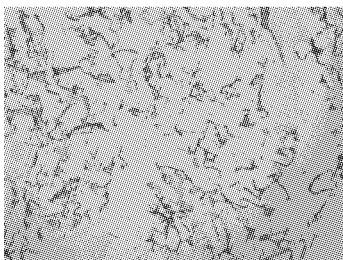


图5 细胞-支架复合物 HE 染色,13 d(100×)
Fig.5 HE staining of the cell-seeded scaffolds, 13 d(100×)

3 讨论

设计和选择应用于特定组织工程的孔隙结构要先了解材料的微结构与所要达到的材料的生物性能及力学性能之间的关系。据我们所知,孔隙结构越小,迁移过程越慢,因为这会对细胞移动及血管生长产生阻碍。很明显,当孔隙之间不连通时,这些过程就会停止。所以理想的支架材料必须具有足够大的孔隙结构($>100\ \mu\text{m}$) 以提供组织生长所需空间及短暂的力学支持^[6-8]。扫描电镜结果表明此支架具有足够大的孔隙结构。材料的力学性能分析表明细胞分泌的细胞外基质不足以提高材料的力学性能,这为以后对细胞-支架复合物进行力学加载提供了可研究空间,因为力学加载可能会促进成骨前体细胞 MC3T3-E1 的分化及矿化^[9]。

此外,近来体内和体外研究都表明外部应力是通过骨内多孔管状网络结构中的液体流动来传递的^[10-11]。基于此发现产生了对于多孔弹性材料模型的研究,这种材料内部力学信号的传导和放大也是通过多孔管状网络结构的液体流动来实现的。表1的弹性模量及材料的扫描电镜结果表明此材料为多孔弹性材料。此外,良好的吸水率也证明了这一

点。材料的吸水率不仅材料的形状及其形态,还影响细胞的生长。在组织工程细胞培养过程中,培养时间越长,所要求的材料的吸水率越高,因此材料吸水饱和膨胀所引起的变形可影响细胞的扩增及其分化。

随着组织工程支架材料的发展新型支架材料,不仅要具有一定的降解性、较高的孔隙率,而且还要有良好的生物相容性,以满足活体骨组织的重建^[12]。脱细胞胶原材料组织结构与细胞亲和性强,能为细胞黏附、增殖、分化及功能发挥提供近似体内组织发育的细胞外基质(ECM)支架条件,而壳聚糖(Chitosan, CS)因其促进培养的成骨细胞的生长及基质矿化沉积已被广泛的用于骨组织工程^[13],而且CS还具有良好的生物相容性、生物可降解性及易塑型成多孔结构(容许骨传导)^[14]。结合两者优点通过冷冻干燥制备出壳聚糖-脱细胞真皮多孔支架材料,通过冷冻干燥可制备具有高互穿性的开放多微孔结构,将聚合物溶液或凝胶在低温下进行冷冻,溶剂结晶形成冰晶,在低于冰点的温度下抽真空,溶剂升华后形成多孔结构。对于胶原的溶液,水均匀散布于其结构中,经过冷冻形成冰,在 $0\ ^\circ\text{C}$ 以下真空干燥。其中以水为致孔剂,无有机溶剂残留,且简单、可控,具有一定的优越性。而具有一定孔隙率的支架是细胞与周围环境进行营养物质交换,促进骨组织再生、修复的必要条件^[15]。

本实验采用的MTS法是材料生物安全性评价诸多标准中最重要、最常用的方法之一,它检测细胞存活和生长情况。MTS在PMS(phenazinemethosulfate)存在的条件下,可被活细胞线粒体中的多种脱氢酶还原成水溶性的有色甲瓖产物,颜色深浅与活细胞数在一定范围内呈正相关,凭此来判断细胞的

毒性,优点是可短期内检出样品对细胞新陈代谢的影响,并对毒性物质有较高的敏感性,做到快速评定材料生物安全性。与 MTT 比色法比较,具有显色稳定、可直接测定、灵敏度与数据的稳定性好等优点^[16-17]。实验结果表明,壳聚糖-脱细胞真皮支架材料具有很好地支持 MC3T3-E1 成骨前体细胞在材料表面生长、增殖等生物学行为,具有良好的细胞相容性。

体外细胞形态分析显示细胞生长良好,成骨前体细胞 MC3T3-E1 在壳聚糖-脱细胞真皮支架材料表面均有不同程度的黏附、增殖,对细胞的形态没有影响,说明材料有良好的细胞相容性,提供的三维立体空间结构为细胞提供了相对恒定的微环境,利于细胞的生长和繁殖,并与细胞形成了材料-细胞复合体。但同时由图也看出内部细胞数量不多,出现支架材料内部"空化"现象,原因可能是支架内部传质受限,营养不充分,这为以后力学加载提供了前提。因为力学加载不但能高效的输送氧气和营养物质,而且培养液流动能够对细胞产生机械应力刺激以调节种子细胞功能的发挥。

4 结语

本研究通过对壳聚糖-脱细胞真皮支架的体内外生物学相容性评估,发现壳聚糖-脱细胞真皮支架材料对细胞有很好的亲和性,能促进细胞黏附、生长、增殖和分化,具有很好的生物相容性,壳聚糖-脱细胞真皮支架材料在组织工程上是一类很好的生物相容性材料,满足组织工程新型支架材料的基本要求。

参考文献:

- [1] Rochaa LB, Gilberto G, Rossia MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(2): 449-456.
- [2] Chen BL, Wang DA, Feng LX. Study on the tissue engineering materials of cell compatibility [J]. *Hulunbeier Xueyuan Xuebao*, 2005, 13(5): 21-22.
- [3] Yamane S, Iwasaki N, Majima T, *et al.* Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(6): 611-619.
- [4] 李彦林, 杨志明, 韩睿, 等. 复合型完全脱蛋白骨的细胞相容性研究 [J]. *中国骨伤*, 2002, 15(10): 597-599.
- [5] Hu Q, Li B, Wang M, *et al.* Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: A potential material as internal fixation of bone fracture [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(5): 779-785.
- [6] Logeart-Avrangoglou D, Anagnostou F, Bizios R, *et al.* Engineering bone: Challenges and obstacles [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(1): 72-84.
- [7] Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: Current state and prospects [J]. *Annu Rev Med*, 2001, 52:443-451.
- [8] Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(3): 477-486.
- [9] Rath B, Nam J, Knobloch TJ, *et al.* Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts [J]. *J Biomech*, 2008, 41(5): 1095-1103.
- [10] Wang LY, Ciani C, Doty SB, *et al.* Delineating bones interstitial fluid pathway *in vivo* [J]. *Bone*, 2004, 34(3): 499-509.
- [11] Beno T, Yoon Y, Cowin S, *et al.* Estimation of bone permeability using accurate microstructural measurements [J]. *J Biomech*, 2006, 39(13): 2378-2387.
- [12] Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials [J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1014-1017.
- [13] Seol YJ, Lee JY, Park YJ, *et al.* Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(13): 1037-1041.
- [14] Seeherman H, Li R, Wozney J. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors [J]. *J Bone Jt Surg Am*, 2003, 85(Suppl 3):96-108.
- [15] Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, *et al.* BMP-induced osteogenesis on the hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis [J]. *J Biomed Mater Res*, 1998, 39(2):190-199.
- [16] 李苹, 蔡绍哲, 吴泽志, 等. MTS 法在磁控加载环境中细胞增殖测定中的应用 [J]. *西南农业大学学报(自然科学报)*, 2008, 28(4): 566-568.
- [17] Benard O, Madesh M, Anup R, *et al.* Apoptotic process in the monkey small intestinal epithelium: Association with glutathione level and its efflux [J]. *Free Radical Biol Med*, 1999, 26(3-4): 245-252.