

类人胶原蛋白-丝素蛋白血管支架的制备及性能表征

朱晨辉^{1,2}, 范代娣^{1,2}, 马晓轩^{1,2}, 薛文娇², 惠俊峰^{1,2}, 陈岚³, 段志广¹, 麻璞⁴

1 西北大学 陕西省可降解生物医用材料重点实验室, 西安 710069

2 西北大学 陕西省生物材料与发酵工程技术研究中心, 西安 710069

3 西北大学生命科学学院, 西安 710069

4 西北大学化工学院, 西安 710069

摘要: 为了提高血管支架的力学性能, 将生物相容性良好的新型生物材料类人胶原蛋白(基因工程技术、高密度发酵生产)与丝素蛋白以质量比 9:1、7:3、5:5 复合, 采用真空冷冻方法制备管状血管支架。研究了不同配比血管支架材料的表面结构、表面元素组成、力学性能、降解和生物相容性。结果表明: 当类人胶原蛋白与丝素蛋白的质量比为 7:3 混合时, 类人胶原蛋白-丝素蛋白管状支架具有均匀的多孔结构, 孔径为(60±5) μm, 孔隙率达到 85%以上; 获得了较理想的力学性能: 应变为 50%±5%, 应力为(332±16) kPa; 具有相对慢的降解速率; 提高了细胞的黏附与增殖, 具有良好的生物相容性。

关键词: 类人胶原蛋白, 丝素蛋白, 血管支架, 生物相容性

Preparation and properties of novel human-like collagen-silk fibroin scaffold for blood vessel

Chenhui Zhu^{1,2}, Daidi Fan^{1,2}, Xiaoxuan Ma^{1,2}, Wenjiao Xue², Junfeng Hui^{1,2}, Lan Chen³, Zhiguang Duan¹, and Pu Ma⁴

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

2 Shaanxi Research & Development Center of Biomaterials and Fermentation Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China

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

4 School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: In order to improve tensile property of vascular scaffold, we blended silk fibroin with novel human-like collagen with the mass ratio of 9:1, 7:3 and 5:5 (W/W), and then fabricated blood vessel tubular graft by freeze-drying process. We studied microstructure, mechanical properties, elements composites, degradability and biocompatibility of vascular scaffolds. These results showed that tubular scaffold with mass ratio 7:3 exhibited interconnected porous structure with pore size at (60 ± 5) μm and porosity of 85%; achieved the desirable mechanical property (strain of 50% ± 5% and stress of 332 ± 16 kPa); had relatively slow degradation rate; could enhance cell adhesion and proliferation and had superior biocompatibility.

Received: March 28, 2009; **Accepted:** June 15, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20776119), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z246), Scientific Research Program of Shaanxi Provincial Department of Education (No. 08JK452), Xi'an Scientific Technology Program (No. YF07078).

Corresponding author: Daidi Fan. Tel: +86-29-88305118; Fax: +86-29-88302223; E-mail: fandaidi@nwu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 20776119), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA02Z246), 陕西省教育厅专项科研项目(No. 08JK452), 西安市科技计划项目(No. YF07078)资助。

Keywords: human-like collagen, silk fibroin, vascular scaffold, biocompatibility

血管损伤、缺血性疾病以及动脉瘤等都需要合适的血管移植物。组织工程血管因其良好的生物相容性和功能性而被认为是最具发展潜力的血管替代物,因此能够为细胞的黏附、增殖提供三维空间的血管支架也竞相成为人们的研究热点。目前,用于构建支架的生物材料依据来源和性质主要分为高分子可降解聚合物和天然生物材料^[1]。天然生物材料由于其良好的生物相容性而得到广泛研究,丝素蛋白和胶原蛋白是其中研究最多的两种^[2-3]。

丝素蛋白(Silk fibroin, SF)是从蚕丝中提取的天然高分子纤维蛋白,由于丝素蛋白具有优良的机械性能和生物相容性,通常制备成各种形状,如膜、海绵、无纺网而广泛应用到人工皮肤^[4]、骨^[5-7]等领域。由于其亲水性较差、降解慢而使其应用受到了限制。

胶原蛋白是脊椎动物的结构蛋白,因为其含有细胞的特殊黏附位点 Arg-Gly-Asp(RGD)序列而具有良好的生物相容性。因此,它在骨、皮肤及血管组织工程^[8-10]领域应用广泛。但胶原蛋白较差的机械性能使其应用受到很大限制,同时无法消除像疯牛病、猪瘟疫、禽流感等病毒隐患,人胶原(来自人胎盘、骨等)也同样无法消除肝炎、艾滋病等传染危险。

新型类人胶原蛋白^[11]是通过将由人源型胶原蛋白的 mRNA 逆转录生成 cDNA,再经过酶切、修饰后进行特定序列重复,并转化于大肠杆菌,通过高密度发酵、分离、纯化工艺而得到的一种高分子(分子量 97 kD)水溶性生物蛋白。类人胶原蛋白由于其优异的促细胞黏附、生长及无病毒隐患而被作为一种新型的生物材料应用于仿生人工骨的构建和止血海绵的研究^[12-15]。

由于单一材料构建的组织工程支架往往无法同时满足生物相容性、生物活性及一定的力学性能等特性,所以研究者通过将具有不同优异性能的材料复合,形成优势互补的新型复合支架材料。基于这个原理,本研究首次将具有良好生物相容性的类人胶原蛋白与优异机械性能的丝素蛋白复合,从改变支架预混合溶液的配比出发,经过真空冷冻干燥以

期形成力学性能及生物相容性均良好的新型类人胶原蛋白-丝素(HLC-SF)复合血管支架。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

类人胶原蛋白(Human-like collagen, HLC)由本实验室提供,分子量为 97 kD; B. mori 蚕茧购自易县蚕丝有限公司;血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells, VSMCs)购自武汉细胞库;细胞培养液 M199 购自 Gibico 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;所用的试剂均为分析纯。

1.1.2 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; 生物安全柜 ESCO-2, 新加坡 ESCO; 恒温培养箱, 美国 REVCO; 傅里叶变换红外光谱仪 NEXUS 870 型, 美国 NICOLET 公司; 酶标仪 MULTISKAN MK₃, 美国 THERMO; UV-VIS 分光光度计 2802PCS, 美国 UNICO。

1.2 实验方法

1.2.1 再生丝素蛋白溶液的制备

根据文献^[16]制备 B. mori 丝素蛋白。将蚕茧剪碎,用 0.02 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液溶解约 1 h, 脱去丝胶。然后将所得到的脱胶丝素蛋白用蒸馏水反复冲洗,再溶于 40% 的 CaCl₂, 水浴约 40 min, 将所得丝素溶液用透析袋(截留分子量 3500)透析,当所测溶液的电导率小于 4.0 μs 时中止透析。干燥所得丝素溶液,称重,计算出丝素溶液的浓度为 3~4 wt%。

1.2.2 HLC-SF 管状支架的制备

将浓度为 1.5 wt% 的 HLC 溶液加入到浓度为 3 wt% 的丝素蛋白(SF)溶液中,使 HLC:SF 的质量比为 9:1、7:3 和 5:5(分别记作 9:1 H-S、7:3 H-S 和 5:5 H-S)。轻轻搅拌 30 min, 过滤,除去气泡,倒入内径为 5 mm、外径为 7 mm 的管状模具,放入 -80 °C 冰

箱, 置于真空冷冻干燥机干燥成型。用作对照的类人胶原蛋白, 丝素蛋白管状支架的制备方法同上。

1.2.3 扫描电镜(SEM)分析

各种管状支架干燥, 分别喷金, 然后在 15 kV 加速电压下观察。由 SEM 图片分析软件 WD-5 得到多孔支架的孔径。

1.2.4 支架孔隙率的测定

孔隙率的测定采用液体替换法^[17]。本实验中使用的液体为异丙醇。将异丙醇放入量筒, 体积为 V_1 。然后将支架浸入异丙醇中 10 min, 此时异丙醇的体积为 V_2 。当支架从异丙醇中取出后, 此时异丙醇的体积为 V_3 。支架孔隙率 ε 根据公式: $\varepsilon = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100\%$ 计算。每种样品支架平行测定 4 个样品。

1.2.5 HLC-SF 血管支架的红外光谱分析

将不同质量比的 HLC-SF 血管支架和 HLC、SF 支架进行衰减全反射红外光谱分析。将表面平整的样品置于载物台上, 采用单次反射的衰减全反射附件, 在分辨率为 4 cm^{-1} 、扫描次数为 120、光谱范围为 $4000 \sim 650 \text{ cm}^{-1}$ 时记录各支架的红外光谱。

1.2.6 机械性能测试

各种血管支架的拉伸性能由 Instron 5565 型电子万能实验机检测(HLC、SF 为对照)。将样品制成直片: $15 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ (厚 $200 \mu\text{m}$), 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ PBS 缓冲盐浴中。采用 100 N 载荷传感器, 横梁的位移速度为 1 mm/min , 得到样品断裂时的应力与应变, 并计算出血管支架的杨氏模量。每种支架平行检测 6 个样品。

1.2.7 降解实验

取一定质量的 HLC-SF 血管支架分别置于 5 U/mL 胰蛋白酶 XI V (5 U/mg , Sigma) 溶液和 PBS 溶液(对照组)中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡孵育 20 d。分别于 5、10、15、20 d 取样, 蒸馏水冲洗, 冷冻干燥, 称重。计算支架降解后的剩余质量百分率。剩余的质量百分率 $= W_t / W_0 \times 100\%$, W_t 为消化一定时间后, 各时间点的剩余质量, W_0 为胰蛋白酶消化前的支架质量。

1.2.8 血管支架的生物相容性

1) VSMCs 细胞培养: 从液氮罐中取出保藏 VSMCs 细胞的冻存管, 立即投入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中快速晃动, 1 min 内使冻存液完全融解。无菌条件下, 用吸管

取出细胞悬液, 注入灭好菌的离心管, 加入 10 倍以上体积、含 20% 胎牛血清的 M199 培养基(含有 2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺, 100 U/mL 的青霉素和 0.1 g/mL 的链霉素), 混合, 离心, 弃去上清。再重复 1 遍, 以除去 DMSO。然后用培养基将细胞悬液适当稀释, 接种于培养瓶。在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养, 每天换液。当细胞生长至培养瓶底面积的 80% 时, 进行传代。首先吸去培养基, 加入 0.25% 胰酶, 轻轻转动培养瓶, 使消化液铺满所有细胞表面, 盖紧瓶口, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 条件下消化。当用倒置显微镜观察到胞质回缩、细胞间隙增大时加入含 20% 小牛血清的 M199 培养基, 终止消化。用吸管将细胞吹打均匀, 然后将细胞悬液接种于新培养瓶内, 每天换液。

2) VSMCs 细胞的增殖: 将 HLC-SF 血管支架剪成与 96 孔板孔径大小相同的圆片, 以 $3 \times 10^3 \text{ cells/孔}$ 接种血管平滑肌细胞, 以类人胶原蛋白, 丝素蛋白支架为对照组, 每组 8 个平行样。培养到 3、8、15 d 时, 向该 96 孔板中每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT (5 mg/mL) 溶液, 孵育 4 h 后吸去培养液, 加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 振荡 10 min, 490 nm 为检测波长, 在酶联免疫检测仪上测定每孔的吸光度值。

3) VSMCs 细胞的形态观察: 细胞在支架材料上培养 7 d 后, 从培养液中取出, 用 PBS 漂洗 3~4 遍, 然后放入 2.5% 的戊二醛溶液过夜, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 分别用梯度乙醇与乙腈脱水。干燥后, 细胞形态用 SEM 观察。

4) 细胞-支架复合物的组织学观察: 将血管平滑肌细胞以 $3 \times 10^3 \text{ 个/mL}$ 种植于用 75% 乙醇灭菌处理的各种血管支架, 每隔 2~3 d 换液 1 次。15 d 后, 细胞-支架复合物从培养板中取出, 用灭菌 PBS 冲洗, 10% 中性甲醛固定, 苏木精-依红染色。

5) 血管支架的小鼠皮下植入实验: 取健康成年雄性小白鼠 12 只, 体重 $28 \sim 32 \text{ g}$, 分成 2 组, 每组 6 只。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, 将长 1 cm 、宽 0.5 cm 的试样(类人胶原蛋白和 7:3H-S 支架)植入背部皮下, 缝合。分别于术后 3 周、9 周将植入材料处皮肤取

出,并将所取组织标本置于 10%中性甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋切片,常规 HE 染色,光镜下观察植入材料周围组织的炎症反应。

1.2.9 统计学分析

实验数据用均值±标准偏差(SD)表示。采用 SPSS11.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 时具有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 HLC-SF 血管支架的 SEM 分析

组织工程支架的表面微结构(如孔的尺寸、分布、孔的形态及孔隙率)均影响细胞的黏附、增殖与分化。从图 1 可以看出:随着丝素添加量的增加,孔

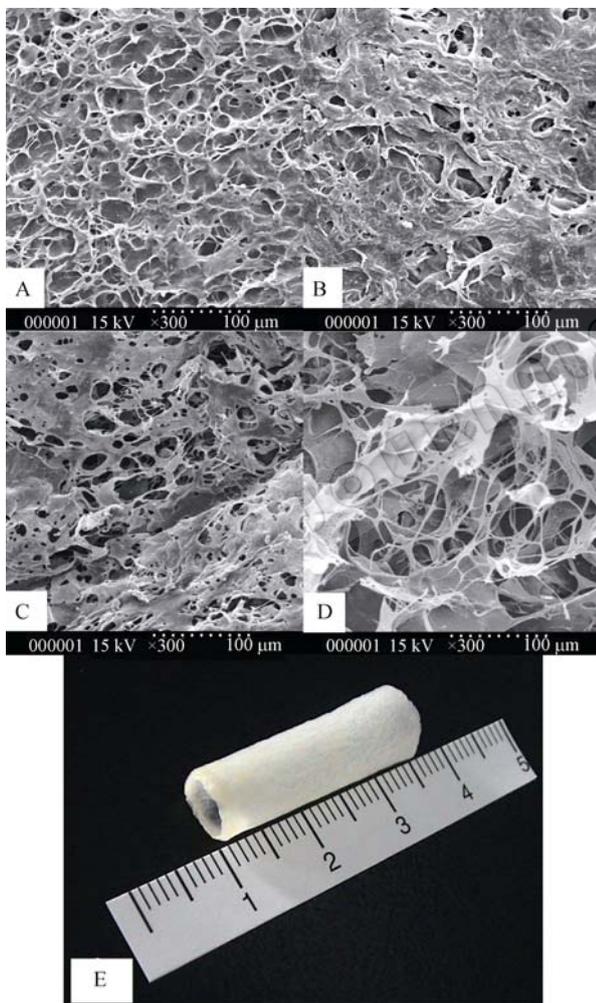


图 1 冷冻干燥的 HLC-SF 血管支架表面 SEM 扫描图片
Fig. 1 SEM images of freeze-dried HLC-SF vascular scaffolds. (A) 9:1 H-S. (B) 7:3 H-S. (C) 5:5 H-S. (D) SF. (E) tubular graft entire view.

径不断增加,孔隙率增大。可能的原因为丝素含量的增加,不仅促进了胶原蛋白与丝素间氢键的形成,而且加速了二者形成 β 折叠的过程,导致支架的孔径随丝素的含量不断增加。由 9:1 H-S 支架孔径的 $(50 \pm 3) \mu\text{m}$ 、7:3 H-S 支架孔径的 $(60 \pm 5) \mu\text{m}$ 增加到 SF 支架的 $(100 \pm 13) \mu\text{m}$, $P < 0.05$, 具有统计学差异。孔隙率由 85% 提高到 90%, $P > 0.05$, 无统计学差异。合适的孔径与孔隙率有利于细胞营养物质、氧的交换及废物的排出。

2.2 HLC-SF 血管支架的吸水性能

支架的吸收性能与支架的亲水性紧紧相关,是评价支架优劣的重要指标之一。各种血管支架浸入水中 24 h 后的吸水能力如图 2。丝素(SF)的吸水量最少 $(441\% \pm 32\%)$, 胶原蛋白(HLC)的最大 $(3230\% \pm 56\%)$, 而 9:1 H-S、7:3 H-S 和 5:5 H-S 支架的吸水能力介于二者之间,并且随着胶原含量的增加而增加。由于 2 种蛋白亲水性性能的不同,导致 2 种材料复合后的吸收能力因各种材料的添加量不同而出现差异^[18]。

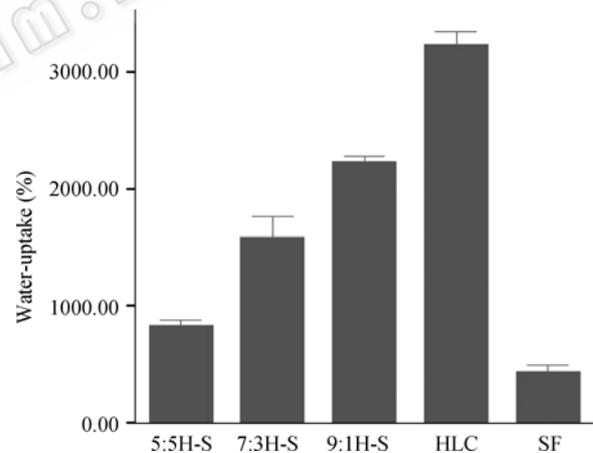


图 2 不同质量比的 HLC-SF 血管支架的吸水率

Fig. 2 Water-uptake ratio of HLC-SF vascular scaffolds with different weight ratio.

2.3 HLC-SF 血管支架的红外光谱分析

红外光谱分析可以从分子角度对单一材料和复合后的支架材料进行结构分析。从图 3 可以看出:纯丝素蛋白的酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III 带的吸收峰分别在 1624 cm^{-1} 、 1529 cm^{-1} 、 1236 cm^{-1} (图 3a), 这种现象表明 β 折叠和无定形结构同时存在于丝素蛋白支架中^[19-22]。当丝素蛋白与胶原蛋白混合后,不同质

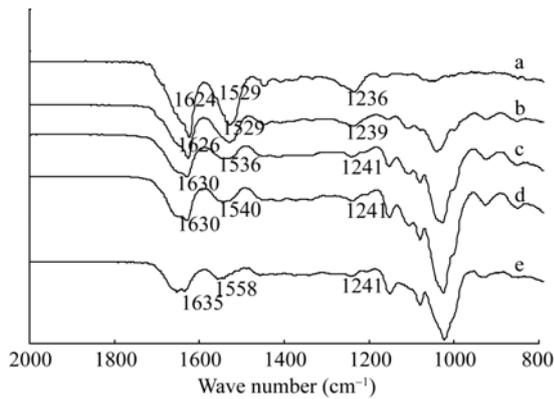


图3 HLC-SF 血管支架的衰减全反射(ATR-FTIR)光谱
Fig. 3 ATR-FTIR spectra of HLC-SF vascular scaffolds. a: SF; b: 5:5H-S; c: 7:3H-S, d: 9:1H-S, e: HLC.

量比的复合支架酰胺键出现了不同程度的红移, 分别位移到 1626 cm^{-1} 、 1630 cm^{-1} 、 1536 cm^{-1} 、 1540 cm^{-1} 、 1239 cm^{-1} 和 1241 cm^{-1} (图 3b~3d), 这种现象证明了较多的无定形丝素蛋白结构仍然存在于复合支架中。另一方面, 仅仅在胶原蛋白(图 3e)中出现的许多吸收键仍能够在复合支架中找到, 如 1023 cm^{-1} 和 1080 cm^{-1} 。这个特点也说明了丝素蛋白与胶原蛋白间形成了氢键, 和同时在复合支架中出现的酰胺 I、II 和 III 带的吸收是一致的。

2.4 HLC-SF 血管支架的力学性能分析

血管支架的力学性能尤为重要, 因为血管支架不仅要提供细胞生长的三维空间, 而且在组织构建的过程中能够经得起各种血液压力, 如爆破压力、剪切力等。本研究采用丝素与胶原蛋白复合的目的就在于利用丝素蛋白极好的弹性, 从而构建出力学性能优异的血管支架, 并将其作为血管的中间层结构。

图 4 表明了胶原蛋白与丝素各种配比支架应力的变化。5:5 H-S 和 7:3 H-S 血管支架的应力分别达到 $(378\pm 23)\text{ kPa}$ 和 $(332\pm 16)\text{ kPa}$, 通过 LSD 显著性分析, 这两种支架的应力和丝素蛋白 $(356\pm 9)\text{ kPa}$ 没有显著性差异, 而与类人胶原蛋白相比 $(214\pm 11)\text{ kPa}$, $P < 0.05$, 差异显著。

图 5 应变测试表明: 5:5 H-S 和 7:3 H-S 血管支架的应变均高于类人胶原蛋白, 和丝素蛋白相当, 达到 $50\%\pm 5\%$ 。

图 4 和图 5 均说明了类人胶原和丝素适当比例

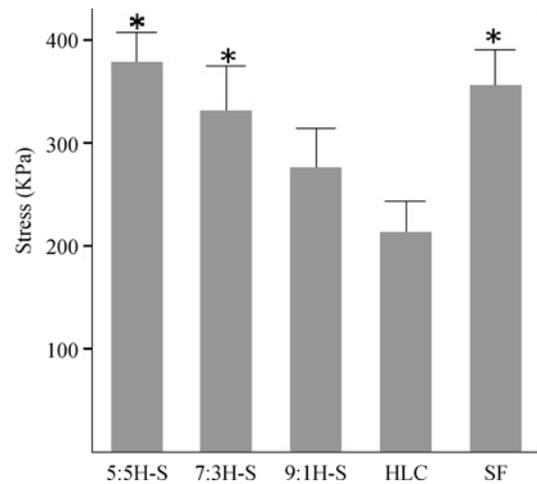


图4 不同 HLC-SF 血管支架的应力
Fig. 4 Stress of different HLC-SF vascular scaffolds. $*P < 0.05$.

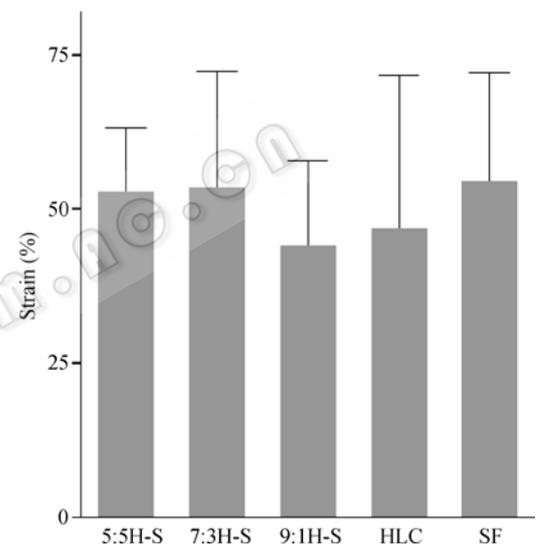


图5 不同 HLC-SF 血管支架的应变
Fig. 5 Strain of different HLC-SF vascular scaffolds.

的复合可以提高复合支架的应力和应变。当类人胶原蛋白与丝素蛋白的比例为 5:5 和 7:3 时, 管状支架的应力明显高于或接近于 Nerem 等^[23]用动物胶原 I 构建的管状支架 (350 kPa) , 应变也远远超过动物胶原 I 支架^[23](应变仅为 10%)。

2.5 HLC-SF 血管支架的降解性能

图 6 表示制备的 9:1、7:3、5:5 H-S 和 SF 血管支架在 5 U/mL 胰蛋白酶 XIV 溶液中 20 d 的降解过程。在 20 d 中, 所有支架在 PBS 中的质量均未发生变化, 就是说在一段时间内所有支架在 PBS 中很稳定。9:1 H-S 支架降解得较为迅速, 20 d 后质量剩

余 46%; 7:3 H-S 和 5:5 H-S 支架降解得较慢, 20 d 后, 质量为 60% 和 74%; SF 支架降解最慢, 还有 85% 的质量剩余。降解速率为 SF < 5:5 H-S < 7:3 H-S < 9:1 H-S。

酶溶液中各支架降解速率不同, 显然是由于丝素蛋白的含量不同所致。一方面, 由丝素蛋白本身的特性决定: 亲水性较弱, 机械强度较大, 这恰好与前述力学性能相符, 具有很强的抗酶降解能力; 另一方面, 当丝素与胶原蛋白复合后, 形成的支架材料的表面形态、粗糙度也不同, 粗糙的孔表面增加了与酶溶液的接触面积, 从而加速了支架材料的降解速率^[24]。由 SEM 表面分析可以看到: 当少量的丝素加入到胶原溶液中时, 形成的孔表面较丝素含量多的支架粗糙, 故其降解速率也快。

在组织工程研究中, 如何控制材料的降解速率从而与体内新生成组织相匹配, 仍然是目前尚需解决的问题。

2.6 HLC-SF 血管支架的生物相容性

2.6.1 VSMCs 在 HLC-SF 血管支架上的增殖

细胞能够在支架材料表面黏附、伸展与增殖是评价材料生物相容性的重要方法。当 VSMCs 在各支架材料培养 15 d 时(图 7), 9:1、7:3 H-S 支架的细胞增殖最快, 远远超过 SF 支架。细胞在材料表面增殖的差异是由生物材料很多性质决定的, 如材料的表面形态、元素组成和表面的化学状态^[25]。细胞黏附过程常常分 2 步完成。第 1 步, 通过材料表面和细胞间的物理、化学相互作用实现细胞在材料表面的自由黏附; 第 2 步, 黏附分子与细胞在材料表面的特异结合过程。ECM 黏附分子对细胞的黏附与增殖起着至关重要的作用。本研究中类人胶原蛋白是 ECM 的主要成分, 其所含有的 RGD 短肽序列是细胞黏附增殖的关键。另外, 羧基、羟基、表面亲水性氨基和多孔支架与细胞间的相互作用是促进细胞黏附、增殖的可能机理。

2.6.2 VSMCs 细胞的形态观察

图 8 为 VSMCs 种植于支架后的 SEM 照片。从图中可以看出: 在 HLC(图 8A)、9:1 H-S(图 8B)和 7:3 H-S(图 8C)支架上的细胞大部分已经铺展, 呈平滑肌细胞体外贴壁时的梭状, 仅有少量的细胞成圆

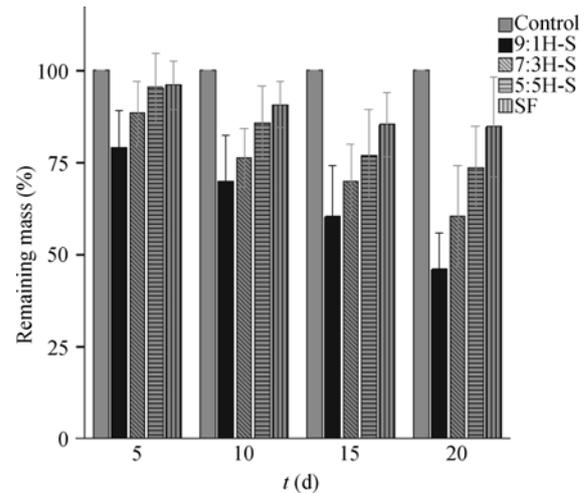


图 6 不同 HLC-SF 血管支架在不同时间的体外降解

Fig. 6 *In vitro* degradation of different HLC-SF vascular scaffolds at different time points. The degradation of scaffolds in PBS as control.

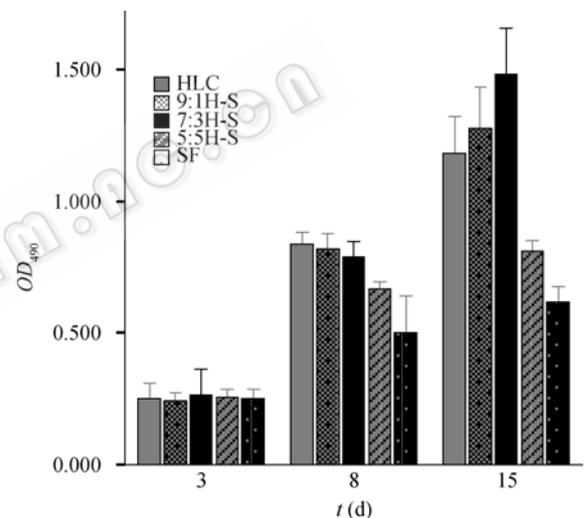


图 7 VSMCs 在血管支架上培养 3、8、15 d 后的 MTT 分析

Fig. 7 MTT analysis after VSMCs cells being cultured in vascular scaffolds for 3, 8 and 15 d.

形, 细胞和细胞支架由细胞分泌的基质所连接, 细胞生长旺盛。而 5:5 H-S(图 8D) 和 SF(图 8E)支架上生长的细胞大部分呈圆形。由此可知: HLC、9:1 H-S 和 7:3 H-S 支架比 5:5 H-S 和 SF 支架具有更好的促细胞生长的作用。与类人胶原蛋白更好的亲水性、更好的促细胞形成作用有关。

2.6.3 VSMCs 与 HLC-SF 血管支架复合物的组织学观察

细胞-支架复合物培养 15 d 的组织切片图如图 9

所示。15 d后, 在 HLC(图 9A)、9:1 H-S(图 9B)和 7:3 H-S (图 9C)细胞均已铺满支架并长入支架的内部, 细胞沿支架纤维生长。5:5 H-S(图 9D) 和 SF(图 9E) 生长的细胞数较少。H&E 染色更进一步证实了 HLC、9:1 H-S 和 7:3 H-S 支架更好地促细胞生长的作用。

2.6.4 血管支架的小鼠皮下植入实验

血管支架植入小鼠皮下时实验过程要严格无菌操作, 避免有操作不规范所带来的炎性反应。本实验可以初步检验材料在生物体内的相容性和免疫反应情况。图 10 是血管支架材料植入皮下 3、9 周时取植入材料处的皮下组织进行 H&E 染色的图片。当 HLC(图 10A)和 7:3 H-S(图 10C)支架植入 3 周时, 植入部位均有炎性细胞存在。9 周时, 炎性细胞均消失,

而在显微镜下看不到 HLC 支架的存在(图 10B), 7:3H-S(图 10D) 支架仍能够观察到, 大部分支架已降解。从实验结果可以看出: 复合丝素蛋白后, 明显延长了材料的降解过程。

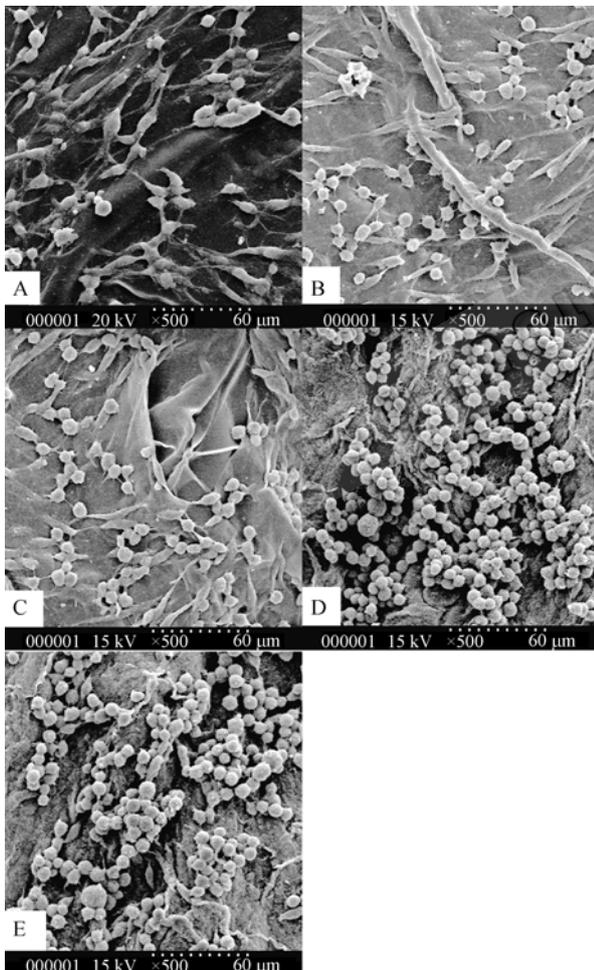


图 8 VSMCs 种植于血管支架 7 天后的扫描电镜图

Fig. 8 SEM micrographs of vascular scaffolds with VSMCs for 7 days. (A) HLC. (B) 9:1H-S. (C) 7:3H-S. (D) 5:5 H-S. (E) SF.

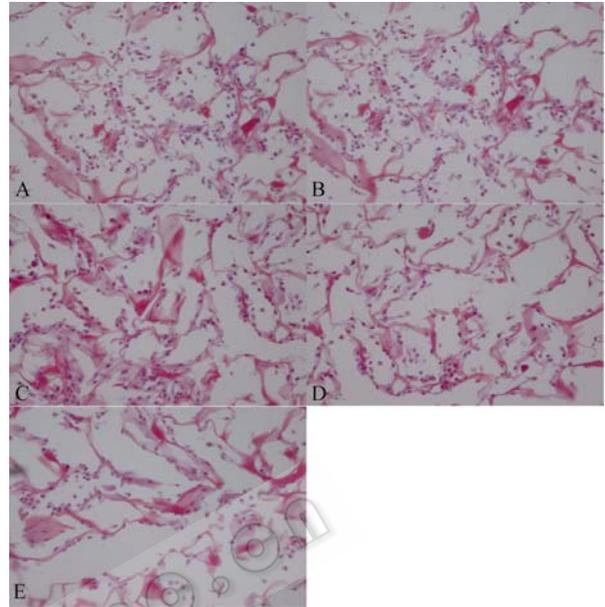


图 9 细胞-支架复合物培养 15 d 的组织切片图(20×)

Fig. 9 Histologic appearance (H&E) of cell-scaffold copolymer after 15 d in culture (20×). (A) HLC. (B) 9:1 H-S. (C) 7:3 H-S. (D) 5:5 H-S. (E) SF.

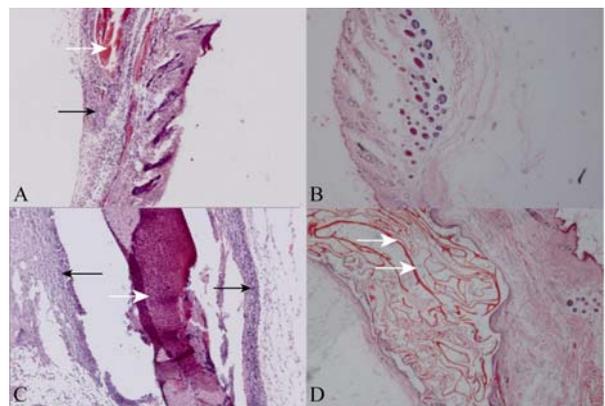


图 10 血管支架植入小鼠皮下不同时间的组织切片

Fig. 10 Histology H&E staining of subcutaneous vascular scaffolds implanted for different time. (A) HLC, 3 weeks. (B) HLC, 9 weeks. (C) 7:3 H-S, 3 weeks. (D) 7:3 H-S, 9 weeks. White arrows point to scaffolds; black arrows mark inflammatory cells.

生物材料植入体内均会引起免疫反应即异物反应和肉芽组织的形成。生物材料的化学组成、表面

形貌及降解产物不同可导致生物体的免疫反应增强或减小^[26]。由于天然生物材料如胶原、丝素的化学组成与生物体的组织成分相似,且其降解为组织可以利用的氨基酸,和人工合成的多聚物相比,可大大减少植入生物体引起的免疫反应^[27]。

本研究仅观察分析了支架材料的炎性反应并简单观察了支架材料的体内降解过程,对支架材料的降解研究还远远不够。在以后的研究中还需进一步考察支架植入体内后新生组织的形成及胞外基质的产生与支架的降解速率是否一致,二者存在怎样的动力学规律。

3 结论

当 HLC 与 SF 以质量比 9:1、7:3、5:5 复合时,力学性能测试表明 5:5、7:3 H-S 支架呈现出接近于 SF 的应力与应变;体外酶降解实验证明 5:5、7:3 H-S 支架具有较慢的降解速率;体外细胞生物相容性研究 MTT 法、SEM 及 H&E 均显示 7:3、9:1 H-S 支架具有良好的促细胞黏附、增殖的作用;体内的动物学实验更进一步验证了 7:3 H-S 支架良好的生物相容性。因此,构建的 7:3 H-S 支架无论在机械性能,还是生物相容性方面,均是优异的类人胶原蛋白-丝素复合血管支架,有望在组织工程血管领域中得到广泛的应用。

REFERENCES

- [1] Liu Y, Tan Z. Study of scaffold on tissue engineered blood vessel. *Med J Wuhan Univ*, 2006, **27**(1): 124–129.
刘阳, 谭最. 组织工程血管支架研究进展. 武汉大学学报(医学版), 2006, **27**(1): 124–129.
- [2] Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*, 2001, **221**: 1–22.
- [3] Wang YZ, Kim HJ, G Vunjak-Novakovic, *et al.* Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, 2006, **27**: 6064–6082.
- [4] Huang SP. The applications of silk fibroin membrane on man-made skin. *Shandong Text Sci Technol*, 2003, **6**: 49–51.
黄素平. 多孔丝素膜在人造皮肤上的应用. 山东纺织科技, 2003, **6**: 49–51.
- [5] Kim UJ, Park J, Kim HJ, *et al.* Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials*, 2005, **26**: 2775–2785.
- [6] Hofmann S, Hagenmüller H, Koch AM, *et al.* Control of *in vitro* tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*, 2007, **28**: 1152–1162.
- [7] Hu K, Lv Q, Cui FZ, *et al.* Biocompatible fibroin blended films with recombinant humanlike collagen for hepatic tissue engineering. *J Bioact Compat Pol*, 2006, **21**(1): 23–37.
- [8] Cedola A, Mastrogiacomo M. Orientation of mineral crystals by collagen fibers during *in vivo* bone engineering: an X-ray diffraction imaging study. *Spectrochim Acta B*, 2007, **62**(6/7): 642–647.
- [9] Simionescu DT, Lua QJ, Song Y, *et al.* Biocompatibility and remodeling potential of pure arterial elastin and collagen scaffolds. *Biomaterials*, 2006, **27**: 702–713.
- [10] Nillesena STM, Geutjesa PJ, Wismansa R, *et al.* Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials*, 2007, **28**: 1123–1131.
- [11] Fan DD. A kind of human-like collagen and preparation method: China Patent, ZL 01106757.8.
范代娣. 一种类人胶原蛋白及其制备方法: 中国专利, ZL 01106757.8.
- [12] Zhai Y, Cui FZ. Recombinant human-like collagen directed growth of hydroxyapatite nanocrystals. *J Cryst Growth*, 2006, **291**: 202–206.
- [13] Wang Y, Cui FZ, Zhai Y, *et al.* Investigations of the initial stage of recombinant human-like collagen mineralization. *Mat Sci Eng C-Bio S*, 2006, **26**: 635–638.
- [14] Zhai Y, Cui FZ, Wang Y. Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils. *Curr Appl Phys*, 2005, **5**: 429–432.
- [15] 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.
- [16] Lv Q, Cao CB, Zhang Y, *et al.* Preparation and properties of insoluble fibroin films by novel method. *Chem J Chinese U*, 2004, **25**: 1752–1755.
- [17] Shao ZZ, Fritz V. Materials: surprising strength of silkworm silk. *Nature*, 2002, **418**(6899): 741–743.
- [18] Ma L, Gao C, Mao Z, *et al.* Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 2003, **24**: 4833–4841.
- [19] Petrini P, Parolari C, Tanzi MC. Silk fibroin-polyurethane scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci-Mater M*, 2001, **12**: 849–853.

- [20] Mathur AB, Tonelli A, Rathke T, *et al.* The dissolution and characterization of *Bombyx mori* silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films. *Biopolymers*, 1997, **42**(1): 61–74.
- [21] Yoshimizu, H, Asakura T. The structure of *Bombyx mori* silk fibroin membrane swollen by water studied with ESR, ¹³C-NMR, and FT-IR spectroscopies. *J Appl Polym Sci*, 1990, **40**: 1745–1756.
- [22] Tsuboi Y, Ikejiri T, Shiga S, *et al.* Light can transform the secondary structure of silk protein. *Appl Phys A-Mater*, 2001, **73**: 637–640.
- [23] Berglund JD, Mohseni MM, Nerem RM, *et al.* A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials*, 2003, **24**: 1241–1254.
- [24] Kim UJ, Park J, Kim HJ. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials*, 2005, **26**: 2775–2785.
- [25] Wang YJ, Yang CR, Chen XF. Development and characterization of novel Biomimetic composite scaffolds based on bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine for tissue engineering applications. *Macromol Mater Eng*, 2006, **291**: 254–262.
- [26] Zhou CR. *Biomaterials*. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2004: 114–141.
周长忍. 生物材料学. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 114–141.
- [27] Santavirta S, Kontinen YT, Saito T, *et al.* Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg Br*, 1990, **72**: 597–560.



本 期 广 告 索 引

企业	版位	企业	版位
东曹达(上海)贸易有限公司	封底	生物谷网站	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
赛默飞世尔科技有限公司	封三	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	泰州贝今生物技术有限公司	内页