

DOI: 10.7652/xjtuxb201310021

琼脂糖/胶原复合水凝胶的制备及性能研究

朱琳, 贺健康, 刘亚雄, 曲晓丽, 占利, 李涤尘, 靳忠民

(西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 针对胶原水凝胶力学性能及成形性能差的问题, 采用琼脂糖与胶原复合的方法制备了一种兼备良好生物学、力学及成形性能的琼脂糖/胶原复合水凝胶材料。研究了胶原与琼脂糖溶液的复合方式, 制备了具有相同胶原质量浓度、不同琼脂糖质量浓度的琼脂糖/胶原复合水凝胶。以胶原水凝胶为对照组, 从力学强度、微结构成形性和细胞相容性方面综合评价了不同琼脂糖/胶原复合水凝胶材料的性能。结果表明: 随着琼脂糖浓度的提高, 复合水凝胶的力学性能成倍增加, 微结构的成形性能也逐步改善, 但细胞相容性却逐渐降低。琼脂糖质量浓度为 0.004 g/mL、胶原质量浓度为 0.003 g/mL 的复合水凝胶能较好, 兼顾了水凝胶的力学性能、成形性及细胞性能。体内植入实验发现, 该配比的复合水凝胶在体内能有效减缓胶原水凝胶的降解, 并产生较低的免疫排斥反应。研究的琼脂糖/胶原复合水凝胶有望用于构建具有仿生血管系统的组织工程支架。

关键词: 组织工程; 微结构; 琼脂糖/胶原; 水凝胶; 支架

中图分类号: Q811.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2013)10-0121-06

Preparation and Properties of Composite Agarose/Collagen Hydrogel

ZHU Lin, HE Jiankang, LIU Yaxiong, QU Xiaoli, ZHAN Li, LI Dichen, JIN Zhongmin

(State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: Aiming at the poor mechanical property and formability of hydrogels, agarose is incorporated with collagen to prepare a composite hydrogel with good biological, mechanical and structural properties. The blending methods of agarose and collagen solutions are investigated, and the composite hydrogel solutions with same collagen content and different agarose contents are finally prepared. The comprehensive properties of the resultant hydrogels derived from different composite solutions are evaluated and compared with collagen hydrogel. The results indicate that with the increase of agarose content, the mechanical property and microstructure replication property of the composite hydrogels are gradually improved while the biological property decreases. The hydrogel with 0.003 g/mL collagen and 0.004 g/mL agarose is chosen as the optimal agarose/collagen composition. In-vivo implantation experiment verifies that such agarose/collagen composite hydrogel effectively weakens material degradation and simultaneously induce moderate rejection response. This agarose/collagen hydrogel is expected to be used for fabrication of organ scaffolds with biomimetic vascular system.

Keywords: tissue engineering; microstructures; agarose/collagen; hydrogel; scaffold

组织工程学是将工程学和生命科学相结合发展而来的一门新兴前沿交叉学科, 其核心就是建立细

收稿日期: 2013-03-11。 作者简介: 朱琳(1989—), 女, 硕士生; 贺健康(通信作者), 男, 讲师。 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51105298); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目。

网络出版时间: 2013-06-04

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1069.T.20130604.1445.002.html>

胞与生物材料的三维空间复合体,即具有生命力的活体组织,用以对病损组织进行形态、结构和功能的重建,以达到永久性功能替代的目的。其中,支架作为组织工程的核心要素,是细胞生长的模板和载体,对构建活性组织和器官具有重要意义。首先,支架应具有良好的生物性能,即细胞毒性小,降解产物危害小,免疫排斥反应小,适合细胞贴附等^[1]。其次,支架还需有适宜的力学性能和降解性能,这样才能将空间结构维持足够长的时间,满足细胞三维生长的需求^[2]。此外,支架还应具有合理的管道设计,以模仿自然的血管系统为支架内部的细胞提供营养物质与氧气^[3]。

天然可降解生物支架材料因来源于生物体本身而具有良好的生物相容性,因而成为组织工程支架材料的研究重点^[4-5]。例如,丝素蛋白/明胶多孔复合材料因其力学性能、降解性、生物相容性等方面具有明显优势,在软骨、韧带及肝组织工程等领域得到广泛应用,但该多孔材料不利于细胞均匀接种^[6]。水凝胶作为一种富含水分的软质材料,与体内软质组织与器官基质材料相似,并具有良好的生物相容性、细胞接种方便、适宜的机械性能等优势备受研究人员的青睐^[7]。在一系列人工合成和天然水凝胶材料中,胶原蛋白来自于生物体内,其免疫排斥反应小,而且其交联过程不需引入其他化学试剂,所以生物性能尤为突出^[8]。但是,胶原水凝胶成形性能差,难以实现复杂的支架结构制造,并且其降解速度很快,在体内环境难以与组织生长速度相匹配,这限制了胶原蛋白水凝胶在微结构组织工程中的广泛应用^[9]。针对该问题,研究者提出了许多解决方案,如戊二醛交联、紫外线光照^[10]等,但这些方法对胶原水凝胶的成形性能影响不大,并且将直接影响细胞活性。

琼脂糖作为一种天然多糖材料,具有细胞无毒性、降解缓慢、材料成本低等特点^[11]。通过降低溶液温度可以成形出在 37℃ 左右稳定的水凝胶结构,随着琼脂糖浓度的增加,所制备的水凝胶的弹性模量便会相应增大几个数量级。最近,有研究者将琼脂糖与胶原复合以制备具有良好性能的复合水凝胶材料,并对复合材料与细胞的微观作用机理进行了探讨^[12],但是并未对复合水凝胶的微结构成形性能、力学性能及体内相容性进行研究。基于此,本文重点研究了不同浓度的琼脂糖和胶原复合材料对所制备的水凝胶的力学性能、成形性能、细胞相容性能及体内免疫排斥性能的影响,以期得到最优综合性

能的琼脂糖/胶原复合水凝胶材料。

1 复合水凝胶的制备及性能测试

1.1 实验材料及设备

实验材料:琼脂糖(GENE 公司)、鼠尾胶原(本实验室提供)、冰乙酸(CH_3COOH)、氯仿(CHCl_3)、DMEM 高糖培养液(Gibico)、胎牛血清、青霉素、链霉素、大鼠肺成纤维细胞、live/dead 染色剂、CCK-8 染色剂。

实验设备:CMT6503 微机控制电子万能试验机(MTS SYSTEMS (CHINA) Co. Ltd)、等离子清洗机(Harrick Plasma,美国)、超净台、离心机、恒温培养箱、荧光显微镜、酶标仪。

1.2 原材料的制备

1.2.1 无菌鼠尾胶原 从鼠尾中抽离出鼠尾肌腱纤维,剪碎后置于体积浓度为 0.1% 的 CH_3COOH (冰乙酸)溶液中振荡约 3 d,将获得的黏稠溶液分装于离心管中,使用离心机离心 2 h;取离心后获得的上清液,置于冻干机中,−20℃ 冻干 48 h,得到胶原海绵;将胶原海绵再次用体积浓度为 0.1% 的冰乙酸溶解后,离心取上清液,以获得有菌胶原溶液;将胶原溶液置于透析袋中(截留相对分子质量为 3500D),置于体积浓度为 0.1% 的冰乙酸中透析 1 h,取出后置于体积浓度为 1% 的 CHCl_3 (氯仿)溶液中透析 1 h;准备体积浓度为 0.1% 的无菌冰乙酸,将透析袋置于其中,在磁力搅拌器上缓慢搅拌,每隔 1 d 用无菌冰乙酸换液,直至 7 d 透析完成,在 4℃ 条件下保存待用^[13]。

1.2.2 琼脂糖溶液 将一定量的琼脂糖溶液和去离子水混合,并将混合溶液放置在磁力搅拌器上,边搅拌边加热,等溶液沸腾后,琼脂糖便完全溶解,溶液呈透明状。将该溶液置于 95℃ 环境下保存备用。

1.3 琼脂糖/胶原复合水凝胶制备

胶原溶液与琼脂糖溶液的保存条件及成胶方式有很大差异:①胶原在 4℃ 条件下保存可保持其原有活性,其成胶条件应结合温度、pH 值和离子浓度,当溶液 pH 值调为 7.4 时,保证零度以上环境以及合适的离子浓度便可成胶,本课题组已对其成胶温度进行研究,发现 4℃、室温以及 37℃ 条件下对其成胶无显著影响,而考虑到包裹细胞时 4℃ 可能会影响细胞的活性,因此选用 37℃ 作为适宜的成胶温度;②琼脂糖在 60~90℃ 条件下可保持较好的流动性,在 37℃ 左右可成形稳定的水凝胶结构。由以上两种材料的成胶特性可知,因其存在较大温度差,

将胶原溶液与琼脂糖溶液混合在一起时,有可能导致其中一方先成胶,而无法灌注到模具中,应保证混合后溶液的温度稍高于 37℃,同时胶原溶液在 pH 值达到 7.4 时才成胶,因此我们设计两种复合方式,如图 1a 所示。方式一:先将胶原 pH 值调为 7.4,再和琼脂糖溶液混合制备出琼脂糖和胶原的混合液,然后注入到无结构模具中,待 1 h 后材料完全成胶脱模,得到琼脂糖/胶原复合水凝胶。方式二:先将胶原与琼脂糖溶液混合后,将混合液的 pH 值调为 7.4,制备琼脂糖/胶原复合水凝胶。图 1b 所示为两种复合方式下所制备复合水凝胶的微观形态。方式一制备的水凝胶内部有絮状物,应为部分胶原先成胶所致,方式二制备的水凝胶内部呈透明状,无絮状物,因此选用方式二制备琼脂糖/胶原复合水凝胶。如表 1 所示,本文制备了多种相同胶原(C)浓度与不同琼脂糖(A)浓度的琼脂糖/胶原复合水凝胶,以胶原水凝胶作为对照组,比较其力学性能、微结构成形性及生物相容性。

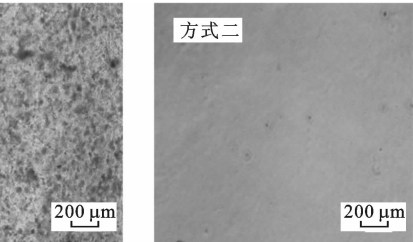
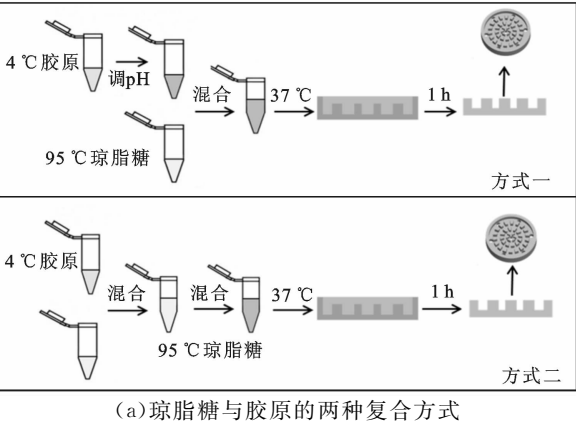


图 1 两种复合方式及所制备水凝胶的微观形态

表 1 不同琼脂糖浓度的复合水凝胶材料

水凝胶	$\rho(C)/g \cdot mL^{-1}$	$\rho(A)/g \cdot mL^{-1}$
0.6C	0.006	0.000
0.3C/0.3A	0.003	0.003
0.3C/0.4A	0.003	0.004
0.3C/0.5A	0.003	0.005
0.3C/0.6A	0.003	0.006

1.4 水凝胶力学性能测试

使用微机控制的 CMT6503 型万能试验机测试支架的力学性能,测试之前将支架在磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中浸泡 24 h,加载速度为 1 mm/min,每种支架测试 3 个样品,绘出应力-应变曲线,得到平均的压缩模量。压缩模量定义为应力-应变曲线初始线性部分的斜率,即应变为 2%至 10%的部分。此外,将另一批支架在 PBS 缓冲液中分别浸泡 3 d、7 d,用相同的方法测试支架的长期力学性能。

1.5 水凝胶微结构成形性测试

实验中采用了如图 2 所示的模型作为研究水凝胶微结构成形性能的标准模型。首先在 Pro/Engineer 中设计数字化模型(见图 2a),使用快速成型国家工程中心的 SPS600B 快速成型机制造树脂模具(见图 2b),翻模获得包含微结构负型的硅胶模具(见图 2c)。硅胶模具在使用前应进行等离子清洗改善其亲水性,便于溶液灌注到微结构中。然后将配置好的琼脂糖/胶原混合溶液以及纯胶原溶液分别灌注到设计有微结构的硅胶模具中,于 37℃环境下静置 1 h 后将模具浸泡于 PBS 溶液中,使用镊子将水凝胶脱模,得到不同琼脂糖浓度的微结构水凝胶。使用数码相机对水凝胶拍照时,均保持水凝胶脱离 PBS 溶液。

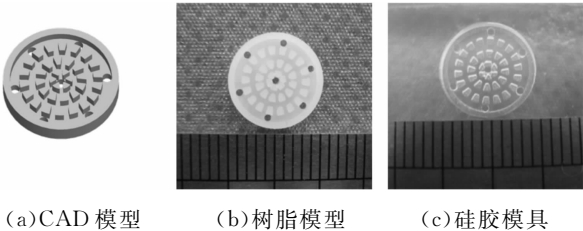


图 2 研究水凝胶微结构成形性的模具设计

1.6 细胞相容性测试

为评价所制备的水凝胶复合材料对细胞相容性的影响,将密度为 $1 \times 10^6/mL$ 的原代远交群(SD)大鼠肺成纤维细胞与不同配比的琼脂糖/胶原混合液、胶原溶液混合均匀后注入到无菌模具中,1 h 后脱模得到包含细胞的琼脂糖/胶原复合水凝胶、胶原水凝胶。然后置于 24 孔板中,每孔加入 1 mL DMEM 培养液(含体积分数为 10%的胎牛血清和 0.2%的青霉素与链霉素),置于 37℃培养箱中培养,每天更换培养液。在第 1、第 3 天用死活染色剂对水凝胶内的细胞进行死活染色,用荧光显微镜进行观察,细胞增殖情况用 CCK-8 试剂进行测定。

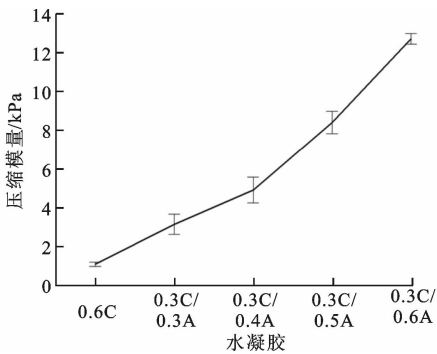
1.7 体内免疫排斥性测试

选取一种兼备良好力学性能、微结构成形性及细胞相容性的琼脂糖/胶原复合水凝胶,测试其体内免疫排斥性,并与 0.6C 水凝胶进行对比。将上述两种水凝胶溶液注入到无菌模具中,1 h 后脱模制备出所需水凝胶,然后进行 SD 大鼠腹腔大网膜植入实验,其中每只 SD 大鼠腹腔植入 4 个水凝胶样本。手术后第 3 天、第 10 天用戊巴比妥钠麻醉 SD 大鼠后,自原切口切开,将水凝胶及周围包裹的组织分离取材,于 10% 甲醛溶液中固定 48 h,进行组织切片与 H&E 染色观察,每组为 4 个平行样本。

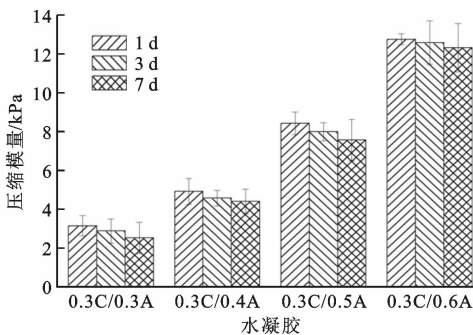
2 水凝胶性能测试结果

2.1 水凝胶的力学性能

应用微机控制的 CMT6503 型万能试验机测试水凝胶的力学性能结果如图 3 所示。图 3a 为水凝胶在 PBS 中浸泡 24 h 后所测得的压缩模量的结果,复合水凝胶的压缩模量远高于胶原水凝胶的压缩模量,其中 0.3C/0.4A 的压缩模量约为 0.6C 的 5 倍。此外,随着复合水凝胶中琼脂糖浓度的提高,其压缩模量逐步增大。图 3b 中,水凝胶在 PBS 中分别浸泡 3 d、7 d,其压缩模量相对于浸泡 1 d 的均无明显变化,说明复合水凝胶具有较强的体外力学稳定性。



(a) 琼脂糖含量对水凝胶压缩模量的影响



(b) 复合水凝胶的压缩模量随时间的变化规律

图 3 不同配比水凝胶的力学性能及随浸泡时间的变化规律

2.2 微结构成形性能

在微结构成形实验中,4 种不同配比的复合水凝胶与胶原水凝胶在 PBS 缓冲液中均可脱模,但 0.6C 各样本微结构破损很明显,由于其力学强度太低,一旦脱离 PBS 溶液结构均无法保持(见图 4a)。0.3C/0.3A 复合水凝胶虽然微结构不是很清晰,但相比 0.6C 成形性已有较大改善(见图 4b)。0.3C/0.4A 复合水凝胶已经可以完全复型出所设计的微结构,具有良好的成形性能(见图 4c)。0.3C/0.5A 复合水凝胶成形性则更好(见图 4d)。因此,0.3C/0.4A、0.3C/0.5A 复合水凝胶均具有良好微结构成形性。

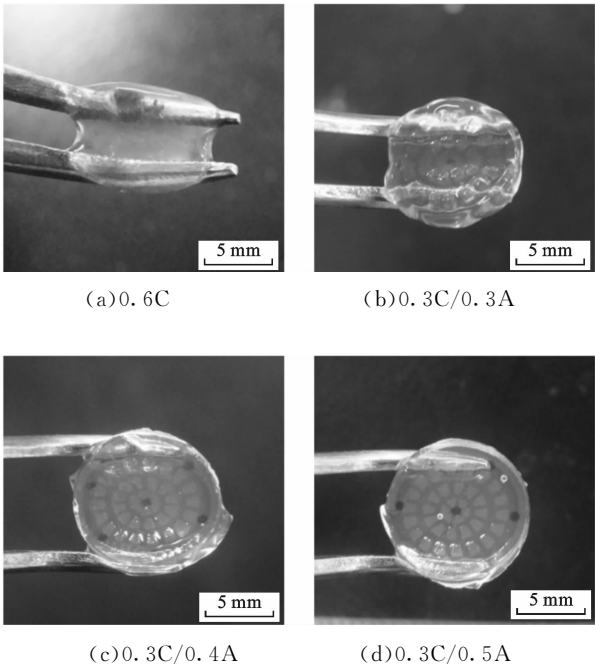


图 4 不同配比水凝胶的微结构成形能力对比

2.3 细胞相容性

应用死活染色方法测试的细胞生长情况如图 5 所示(本实验只比较活细胞增殖结果),测试材料分别为 0.6C、0.3C/0.3A、0.3C/0.4A、0.3C/0.5A、0.3C/0.6A。其中,0.6C 与复合水凝胶组相比,细胞有较大增殖,第 3 天时细胞在胶原水凝胶内部完全铺展生长,而复合水凝胶组内部的细胞均未完全铺展,且细胞数量在第 1 天内无显著差异。0.6C、0.3C/0.3A、0.3C/0.4A 这 3 组中的细胞数量在第 3 天时间里均较其他两组有较大增长,而 0.3C/0.5A、0.3C/0.6A 这两组的细胞数量第 3 天较第 1 天几乎没有增多,且细胞状态很差,说明 0.3C/0.5A、0.3C/0.6A 中的琼脂糖浓度偏高,水凝胶内部纤维网状结构过于致密而不适合纤维细胞铺展

及增殖。应用 CCK-8 试剂测试的 4 种不同配比的复合水凝胶的细胞增殖结果如图 6 所示,结果表明:培养第 1 天后,0.6C 中的细胞数量最高,4 种复合水凝胶中的细胞数量差异不大;培养第 3 天后,0.3C/0.3A、0.3C/0.4A 中的细胞有较大增殖,0.3C/0.5A、0.3C/0.6A 中细胞数量几乎不变,因此 0.6C、0.3C/0.3A、0.3C/0.4A 具有良好生物相容性。

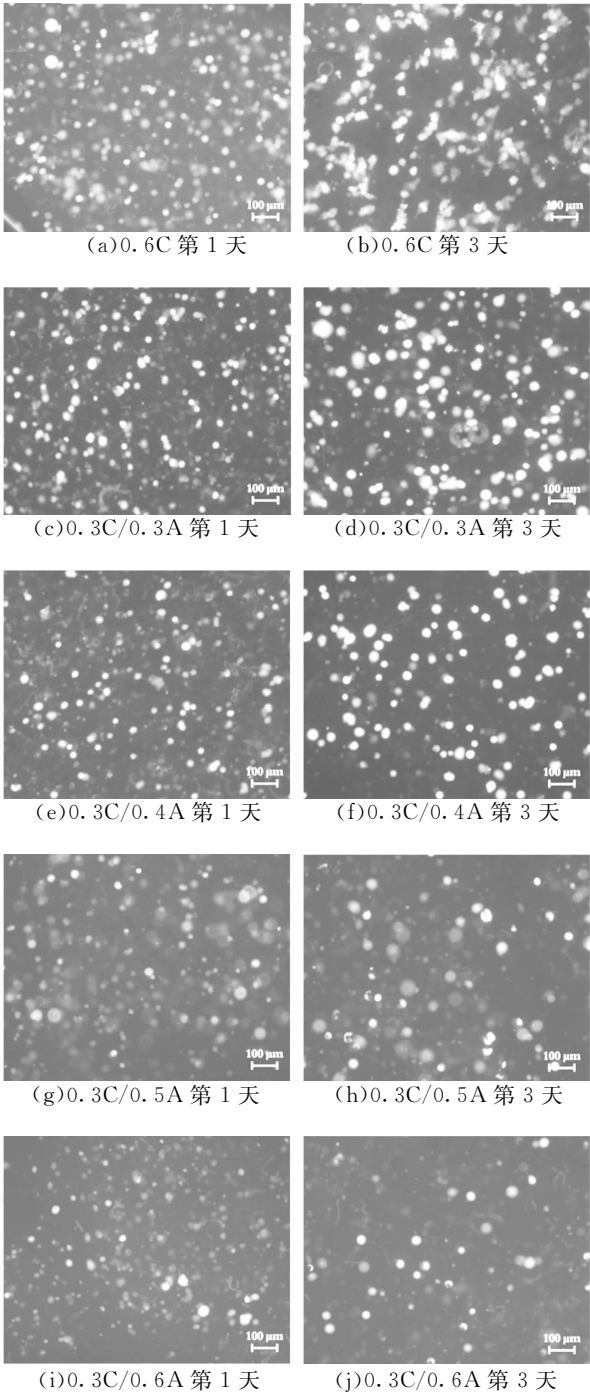


图 5 不同配比水凝胶对细胞相容性的影响

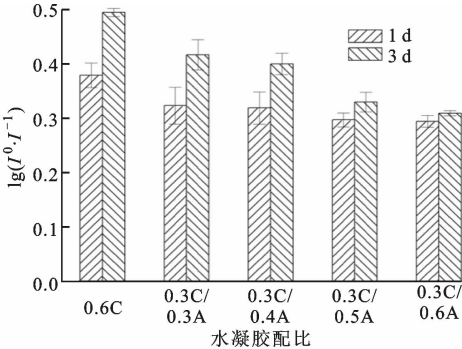


图 6 CCK-8 检测细胞在不同配比水凝胶中的增殖结果

2.4 水凝胶体内免疫排异性

通过对不同配比水凝胶的力学性能、成形性能及细胞相容性实验结果进行分析,选取 0.3C/0.4A 复合水凝胶进行体内免疫排异实验。于第 3 天、第 10 天将水凝胶及周围包裹的组织分离取材进行 H&E 切片染色,染色结果如图 7 所示。0.3C/0.4A 水凝胶周围的炎症细胞较 0.6C 多,但均属于较低的免疫排异反应。此外,0.3C/0.4A 水凝胶的降解速度较慢,10 d 内材料无明显降解,炎症细胞多分布在支架周围,而 0.6C 降解严重,炎症细胞在支架内部和周围分布均匀。

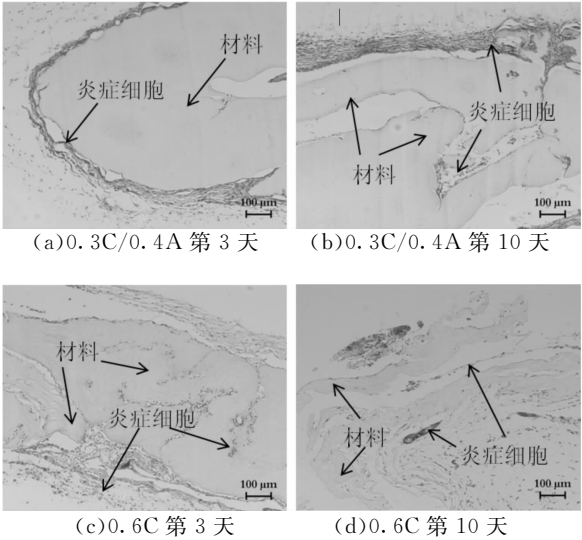


图 7 H&E 染色检测两种水凝胶的体内免疫排异结果

3 讨 论

组织工程支架为细胞提供依附生长的载体,其材料构成及微结构特征均会对细胞的生长产生影响,因此良好的组织工程支架需兼备生物相容性和微结构成形性,但目前的支架材料往往难以达到此要求。胶原蛋白因其优越的生物学性能而广泛应用于组织工程领域,但其成形性能差,难以实现复杂微

结构的设计。然而,良好的结构是维持人工组织中营养供给、细胞生长和功能表达,以及血管化的重要手段。为了构建具有仿生血管系统的组织工程支架,提高胶原水凝胶的强度及微结构成型性成为当前生物制造领域的研究重点。文献[13]系统深入地分析了 pH 值、温度、离子浓度等成胶条件对于胶原纤维直径、孔径大小的影响,从而改变其力学性能。但通过调节胶原的成胶条件仅能在很小范围内改变其力学强度。为此,文献[12]将 0~0.01 g/mL 的琼脂糖与 0.000 5 g/mL 胶原复合制备复合水凝胶,并对其储能模量进行测量,用以表征该材料的回弹性能。结果表明,随着琼脂糖的质量浓度从 0 增加到 0.010 g/mL,水凝胶的储能模量增大了两个数量级,揭示了复合琼脂糖可大幅度提高胶原水凝胶力学性能的可能性。但是,该文并没有对琼脂糖/胶原的压缩力学性能、结构成型性及体内免疫排异性能进行研究。

本文采用的琼脂糖/胶原复合水凝胶制备方法,关键在于琼脂糖与胶原复合方式的选取,即采用将琼脂糖溶液与胶原溶液先等比混合再调节 pH 为 7.4,然后置于 37 °C 成胶的复合方式。包裹细胞时只需在调 pH 值后加入细胞团吹打均匀,注入模具待其成胶即可。该方法对接种的细胞没有毒副作用,可应用于组织工程领域。力学性能测试实验表明,不同配比的水凝胶在 PBS 溶液中浸泡 1 d 后随琼脂糖浓度的增高其压缩模量成倍增加,其中 0.3C/0.4A 的水凝胶压缩模量约为 0.6C 的 5 倍,在 PBS 中浸泡 3 d、7 d 后各配比水凝胶压缩模量均无明显降低,说明该复合水凝胶力学性能稳定。成形性测试实验表明,复合琼脂糖后的水凝胶微结构成形能力大幅度提高,0.3C/0.4A、0.3C/0.5A 水凝胶均可完整复制出所设计的微结构,具有良好成形性。

细胞相容性测试实验表明,随着琼脂糖浓度的增高水凝胶中细胞增殖数量下降,当琼脂糖质量浓度达到 0.004 g/mL 时为转折点,在第 3 天时 0.3C/0.3A、0.3C/0.4A 细胞数量均有较大增殖,而 0.3C/0.5A、0.3C/0.6A 细胞增殖幅度很小。0.3C/0.5A、0.3C/0.6A 水凝胶中微观纤维网络结构过于致密,导致成纤维细胞无法大面积铺展增殖。通过测试复合水凝胶的力学性能、微结构成型性与细胞相容性,可选 0.3C/0.4A 复合水凝胶。此外,0.3C/0.4A 及 0.6C 水凝胶的免疫排异性测试实验

结果表明,0.6C 水凝胶中炎症细胞较 0.3C/0.4A 中少,0.6C 水凝胶在第 3 天时已开始降解,炎症细胞长入水凝胶内部,第 10 天降解加剧,炎症细胞已均匀分布在水凝胶内部,说明 0.6C 水凝胶降解速度快。0.3C/0.4A 水凝胶第 3 天无降解趋势,少量炎症细胞沿周围分布,第 10 天内部仅有少量炎症细胞,周围炎症细胞增多,但仍属于正常范围。说明 0.3C/0.4A 水凝胶在产生较低免疫排异反应时仍可大幅度减缓水凝胶的降解速度,为组织生长提供长期支撑。

4 结 论

针对目前水凝胶材料很难兼备力学性能、成形性、细胞相容性及免疫排异性的难题,本文采用琼脂糖和胶原复合的方法制备高性能复合水凝胶。通过研究不同琼脂糖浓度对复合水凝胶力学性能、成形性、生物相容性及免疫排异性的影响发现,加入少量的琼脂糖可有效增强胶原水凝胶的胶原力学强度,并改善水凝胶的结构成形性能。当琼脂糖的质量浓度大于 0.005 g/mL 时,将极大影响复合水凝胶的细胞相容性。最终选取 0.3C/0.4A 作为兼备良好力学性能、成形性、细胞相容性的复合水凝胶材料。体内植入实验显示,加入琼脂糖减缓了水凝胶材料的体内降解,并且产生较低的免疫排异反应,该复合水凝胶有望用于构建具有仿生血管系统的组织工程支架。

参考文献:

- [1] 孙明学,许文静,卢世璧. 组织工程技术应用面临的问题[J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(17): 1285-1286
- [2] GRIFFITH L G. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, 961(1): 83-95.
- [3] SONG Y S, LIN R L, MONTESANO G, et al. Engineered 3D tissue models for cell-laden microfluidic channels[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(1): 185-193.
- [4] ZAVAN B, BRUN P, VINDIGNI V, et al. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies[J]. Biomaterials, 2005, 26(34): 7038-7045.

(下转第 136 页)