

# 新型胶原支架材料的制备

曹成波<sup>1</sup>, 宋国栋<sup>2</sup>, 吴克安<sup>1</sup>, 张春联<sup>3</sup>, 吕荣晖<sup>1</sup>, 王 勇<sup>4</sup>

(1. 山东大学化学与化工学院, 山东 济南 250100; 2. 济南市中心医院, 山东 济南 250013;  
3. 山东大学校医院, 山东 济南 250061; 4. 山东大学控制科学与工程学院, 山东 济南 250061)

**摘要:**根据支架材料的要求及猪皮的特点, 采用多种化学、生物与物理综合方法处理猪皮得到了一种新型胶原支架材料, 并探讨了酶处理、复合、交联和 Co<sup>60</sup> 辐照对其性能的影响, 对其制备工艺进行了优化。该材料具有良好的微观渗透性、适当的降解速度和抗张强度, 有望成为一种较理想的组织工程支架材料。

**关键词:**胶原; 支架材料; 组织工程

**中图分类号:** TB347

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2006)S1-0183-03

## Preparation of new collagen scaffold materials

CAO Cheng-bo<sup>1</sup>, SONG Guo-dong<sup>2</sup>, WU Ke-an<sup>1</sup>, ZHANG Chun-lian<sup>3</sup>, LU Rong-hui<sup>1</sup>, WANG Yong<sup>4</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China;

2. Jinan Central Hospital, Jinan 250013, China; 3. Shandong University Hospital, Jinan 250061, China;

4. School of Control Science and Engineering, Shandong University, Jinan 250061, China)

**Abstract:** Considering the request of scaffold materials and the characteristics of pigskin, a new natural collagen material was made with special biological, chemical and physical methods. The effect of the enzyme treating, compounding, cross-linking and cobalt ray irradiation on its properties was investigated. The technology of preparation was optimized. The results indicated that this material had good microscopic permeability, suitable speed of biodegradation and good tensile strength. This material may be expected a kind of ideal scaffold material for tissue engineering.

**Key words:** collagen; scaffold material; tissue engineering

支架材料作为细胞外基质, 为细胞提供了黏附、生长、迁移、增殖和分化的环境, 在人工组织的构建中起着关键作用, 是组织工程重要的研究内容<sup>[1]</sup>。支架材料目前研究较多的有人工合成的可生物降解的聚合物和天然生物材料。前者可降解吸收且具有一定的机械强度, 但是细胞黏附性较差; 而后者具有良好的网状多孔结构和生物相容性, 适合细胞的排列生长, 因此被广泛应用<sup>[2]</sup>。

天然生物材料是天然生物组织经过系列处理得到的, 具有类似自然组织的组分和构型的生物材料。这种材料可有效、均等地分散组织和器官的张力和重力, 维持组织结构的正常形态, 为包埋在基质中的细胞提供适宜的物理和化学环境, 并形成网状支架, 在机体修复和替代中广泛应用<sup>[3]</sup>。在天然生物材料中, 真皮支架具有良好的生物相容性, 可以生物降解, 是支架材料的首选<sup>[4]</sup>, 如 Takami 等<sup>[5]</sup>用胰蛋白酶和 EDTA 或酵素 - II (Dispase II) 消化皮肤, 继之以润湿剂 Triton X-100 浸泡来制备真皮支架, 孙

红等<sup>[6]</sup>以 NaOH 消蚀法制备一种新型鼠无细胞真皮基 (ADM) 等。笔者首次采用多种化学、生物与物理的综合方法处理猪皮, 并对制备工艺进行优化, 得到了一种新型胶原支架材料。

## 1 材料和方法

(1) 主要试剂和仪器。胰酶和 1398 蛋白酶 (山东省沂水酶制剂厂), 胶原酶 (Invitrogen, 美国), 壳聚糖 (济南海得贝海洋生物工程有限公司), 透明质酸钠 (山东福瑞达生物化工有限公司), 戊二醛 (中国医药集团上海化学试剂公司), 精密剖层机 (泰兴市皮革机械厂), 转鼓 (无锡新达轻工机械有限公司), 真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司)。

(2) 胶原支架材料的制备。用剖层机剖取猪皮上层, 除去皮下组织, 然后进行浸水、脱脂、二次脱脂、滚酶堆置、臀部涂酶、浸灰、脱灰、浸硝、剖层、修边、称重等预处理<sup>[7-9]</sup>。然后在 pH 为 8.0 时, 用质量分数 0.3% ~ 0.5% 的胰酶处理 30 min, 质量分数

收稿日期: 2005-12-29

基金项目: 山东省自然科学基金重点项目 (Z2003C01)、山东省科技攻关重点项目 (031090155), 山东大学高层次人才引进科技专项资助

作者简介: 曹成波 (1965-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事仿生天然生物材料与组织工程研究, cbcao@sdu.edu.cn。

0.3% ~ 0.5% 的 1398 蛋白酶处理 2 ~ 3 h, 水洗后, 复合质量分数 1.0% 的壳聚糖 (60 min), 再用戊二醛进行交联, 并将浓度 10 g/L 的透明质酸钠溶液喷涂到肉表面, 真空冷冻干燥, 密封于无菌塑料袋中, 最后经过  $\text{Co}^{60}$  辐照消毒灭菌、备用<sup>[10]</sup>。

(3) 体外降解时间的测定<sup>[11]</sup>。准确称取 2 mg 支架材料置于盛有 1.9 mL Tris-CaCl<sub>2</sub> 缓冲溶液 (pH = 7.6) 的试管中, 然后加入新配制的 2 mL (100 Units) 胶原酶溶液, 将试管置于 37℃ 的环境中温育, 定时观察, 每次 3 个进行平行实验, 记下试样完全澄清的时间, 然后取平均值。

(4) 透水汽性能的测定<sup>[11]</sup>。采用类似 Aiba 法的杯水法测定, 取直径为 2 cm 的试管, 装满生理盐水, 使膜与液面接触, 中间不留空隙, 并沿试管侧面密封称重, 得  $M_0(\text{g})$ , 然后将体系放入 (36 ± 1)℃ 的干燥器里, 24 h 后称重, 得  $M_1(\text{g})$ 。并测试管的内切面积  $S$ 。透水汽率  $Wr$  按下式计算:  $Wr = (M_0 - M_1)/S$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶处理对新型胶原支架材料性能的影响

酶处理的目的是将非胶原成分在不破坏胶原纤维结构的前提下尽可能除去, 弱化胶原纤维的抗原性, 充分松散胶原纤维, 增大孔径和孔隙率, 提高渗透性。为此, 探讨了酶的作用时间、用量对新型胶原支架材料的降解性和透水汽性的影响。

#### 2.1.1 酶的作用时间对新型胶原支架材料性能的影响

表 1 所示的结果显示: 随着酶 (胰酶和 1398 蛋白酶) 的质量分数均为 0.3% 处理时间的增加, 材料的体外降解时间下降, 在 0 ~ 4.5 h 内下降幅度较大, 4.5 h 后没有明显的变化。其透水汽性随着酶作用时间的延长而增大。在 0 ~ 4.5 h 内增加幅度比较大, 4.5 ~ 9.0 h 时透水汽性增加趋缓。

表 1 酶的作用时间对新型胶原支架材料的降解性和透水汽性的影响

作用时间/h	0	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0
体外降解时间/min	1473	1449	1430	1408	1421	1419	1416
透水汽性/ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$	3052	3267	3394	3538	3529	3536	3595

#### 2.1.2 酶的用量对新型胶原支架材料性能的影响

表 2 所示的结果显示: 随着酶 (处理时间为 6 h) 用量的加大, 材料的体外降解时间逐渐减少, 透水汽性不断增加。酶质量分数在 0 ~ 0.3% 时对体外降解时间和透水汽性影响比较明显, 酶质量分数在

0.3% ~ 0.9% 时作用效果趋缓。

表 2 酶的用量对新型胶原支架材料的体外降解时间和透水汽性的影响

胰酶、中性蛋白酶质量分数/%	0	0.3	0.6	0.9
降解时间/min	1455	1421	1413	1409
透水汽性/ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$	3050	3529	3624	3644

### 2.2 壳聚糖的用量对新型胶原支架材料性能的影响

在新型胶原支架材料中复合天然活性生物材料壳聚糖, 可调节其降解性、细胞黏附性, 促进创伤愈合, 抑制瘢痕增生的功能。表 3 所示的结果显示: 壳聚糖 (黏度为 80 mPa·s) 复合质量分数在 0 ~ 0.6% 时可明显延长支架材料的体外降解时间, 随着复合量的增加, 降解时间增加趋势变缓; 复合壳聚糖后降低了材料的透水汽性, 但降低幅度不大。

表 3 壳聚糖用量对新型胶原支架材料的体外降解时间和透水汽性的影响

壳聚糖用量/%	0	0.5	1.0	1.5
降解时间/min	1451	1570	1582	1596
透水汽性/ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$	3250	3135	3053	2999

### 2.3 戊二醛的用量对新型胶原支架材料性能的影响

表 4 所示的结果显示: 戊二醛交联大大延长了新型胶原支架材料的体外降解时间 (经质量分数 0.2% 戊二醛交联过的复合胶原膜的降解时间为 23.3 h<sup>[11]</sup>), 并且通过调节戊二醛的用量可以将体外降解时间控制在比较宽的范围内 (25 ~ 52 h)。戊二醛交联后由于材料的胶原纤维被固定, 孔隙率增加, 所以其透水汽性也有所增加。

表 4 戊二醛交联对新型胶原支架材料的体外降解时间和透水汽性的影响

戊二醛质量分数/%	0	0.2	0.4	0.8
降解时间/h	25.7	29.6	34.9	51.5
透水汽性/ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$	2990	3012	3043	3115

### 2.4 $\text{Co}^{60}$ 辐照对新型胶原支架材料降解性的影响

$\gamma$  射线辐照除了具有消毒灭菌的作用, 还对胶原分子的共价键产生一定的作用, 可能打断某些键, 也可能引发自由基反应, 产生新的结合键。这些变化可能引起支架材料降解性的变化, 通过对新型胶原支架材料进行不同剂量的辐照, 研究辐照对其降

解性的影响。

表5所示结果表明:没有交联的试样经不同程度的辐照,其体外降解时间变化不大,交联试样的体外降解时间略有增加。只有当辐照剂量大于100 kGy时才能引起氨基酸的侧链断裂,由于本次实验剂量相对比较小,对肽链的结构影响不大。同时 $\gamma$ 射线与水相互作用会产生羟基自由基等活性粒子,这些活性粒子可导致部分胶原分子间的交联反应,所以在断键与交联共同作用下,没有交联试样的降解性没有明显变化,随着辐照剂量增大,交联作用稍大于对键破坏的影响。交联的试样由于胶原纤维被固定,辐照对肽链破坏的影响相对减弱,所以体外降解时间的增加幅度变大。

表5  $\text{Co}^{60}$ 辐照对新型胶原支架材料降解时间的影响

辐照量/kGy	体外降解时间/h				
0	23.0	23.8	28.7	32.4	40.1
15	24.0	25.8	31.2	35.7	42.0
20	24.2	26.1	32.5	37.2	43.3
25	24.8	27.0	34.9	38.7	45.2

注:试样从左到右依次为未复合未交联、复合质量分数1%壳聚糖未交联、复合质量分数1%壳聚糖同0.2%戊二醛交联、复合质量分数1%壳聚糖同0.4%戊二醛交联、复合质量分数1%壳聚糖同0.6%戊二醛交联。

### 3 结语

通过以上的实验研究可知:酶的作用时间和用量对新型胶原支架材料的降解性和透水汽性的影响比较大,从酶的利用率和时间成本考虑,胰酶和蛋白酶质量分数在0.3%左右为宜,作用时间应在4.0 h左右;复合壳聚糖可适当延长新型胶原支架材料的体外降解时间,并可以起到桥梁的作用,增加了交联

效果,由于壳聚糖分子量大,黏度特别大,其质量分数在1.0%左右为宜;戊二醛交联可显著延长新型胶原支架材料的体外降解时间,并可通过改变交联的用量将降解时间控制在一个较宽的时间范围内,以满足不同支架的要求; $\text{Co}^{60}$ 辐照对支架材料的降解性影响较小,主要起到消毒灭菌的作用。该支架材料还可用于制备医用生物敷料和人工皮肤,用于不同程度的烧伤、创伤、皮肤溃疡、美容手术等领域,也可作为化妆品等细胞毒性试验的活性载体和实验用细胞培养的三维网络结构支架,具有广阔的市场应用前景和开发价值。

### 参考文献

- [1] 王身国,杨健,蔡晴,等.组织工程用生物材料及细胞支架研究进展[J].中华整形外科杂志,2000,16(6):328-330.
- [2] 曹成波,宋国栋,刘宗林,等.新型胶原基人工皮肤模型的建立[J].现代化工,2005,25(1):64-66.
- [3] Putnam A J, Mooney D J. Tissue Engineering: synthetic extracellular matrices[J]. Nat Med, 1996, 2: 824-826.
- [4] 杨志明.组织工程[M].北京:化学工业出版社,2002.
- [5] Takami Y, Matsuda T, Ycshitake M, et al. Dispace/detergent treated dermal matrix as a dermal substitute[J]. Burns, 1996, 22(3): 182-190.
- [6] 孙红,车鹏程,王学礼,等.一种新型无细胞真皮基质的研制[J].解剖学杂志,2003,26(2):172-174.
- [7] 白坚.皮革工业手册:制革分册[M].北京:中国轻工业出版社,2000.
- [8] 王鸿儒.皮革生产的理论与技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [9] 范军勤,曹成波,尹涛,等.国产材料生产猪皮防水鞋里革的工艺技术[J].皮革化工,1998,15(4):35-37.
- [10] 曹成波,吴克安.一种胶原基复合支架材料及其制备方法和用途:中国,1526764[P],2004-9-8.
- [11] 黄汉萍.以胶原复合膜为骨架的活性人工皮肤的研究[D].广州:暨南大学,2000. ■
- [12] 曹成波,王元生,杨裕民,等.壳聚糖/胶原复合支架材料的制备[J].材料研究学报,1998,12(5):531-534.
- [13] Nam J G, Choi H, Kim S H, et al. Synthesis and sintering properties of nanosized  $\text{In}_2\text{O}_3$ -10%  $\text{SnO}_2$  powders[J]. Scripta Materialia, 2001, 44: 2047-2050.
- [14] Grzeta B, Tkalcic E, Goebbert C. Structural studies of nanocrystalline  $\text{SnO}_2$  doped with antimony XRD and mossbauer spectroscopy[J]. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2002, 63(5): 765-772.
- [15] Sugimoto T. Preparation of monodispersed colloidal particles[J]. Adv Colloid Interface Sci, 1987, 28: 65. ■

(上接第182页)

- [4] Ristic N, Ivanda M, Popovic S, et al. Dependence of nanocrystalline  $\text{SnO}_2$  particle size on synthesis route[J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 2002, 303: 270-280.
- [5] Wang Junbo, Yang Mingge, Li Yingmin, et al. Synthesis of Fe-doped nanosized  $\text{SnO}_2$  powders by chemical co-precipitation method[J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 2005, 351(3): 228-232.
- [6] 王元生,杨裕民,黄兆新.二氧化锡纳米粉掺杂及其显微结构