

壳聚糖与 Ⅰ型胶原制备组织工程复合支架材料的扫描电镜研究

李容林, 李春阳¹, 张 伟²

(中山大学 1. 光华口腔医学院·附属口腔医院, 广东 广州 510080; 2. 中山医学院组织学胚胎学教研室神经科学教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】通过扫描电镜观察壳聚糖和 Ⅰ型胶原在不同温度下以不同比例制备成冻干状组织工程复合支架材料的微观结构, 以获得最佳浓度、比例、温度匹配组合, 制备理想的组织工程复合支架材料。【方法】在 -5℃、-20℃ 和 -80℃ 将不同浓度的壳聚糖、Ⅰ型胶原以及它们不同比例的混合液冷冻 12 h 后冻干 24 h, 扫描电镜观察不同材料表面和内部的微观结构, 并计算其平均孔径和孔隙率。【结果】壳聚糖、Ⅰ型胶原以及它们的混合液冻干后都形成白色海绵状固体, 冷冻温度越低冻干后材料的孔径越小, 孔隙率越低; 材料的浓度越高冻干后孔径越小, 孔隙率越低; 壳聚糖-Ⅰ型胶原混合液中壳聚糖含量越高, 材料冻干后孔径越小, 孔隙率越低。【结论】壳聚糖-Ⅰ型胶原复合支架的孔径和溶液浓度、二者配比以及冻干前的冷冻温度密切相关。

关键词: 壳聚糖; Ⅰ型胶原; 复合支架; 扫描电镜

中图分类号: O621.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0557-05

Micro-structure of Composite Tissue Engineering Scaffold of Chitosan and Type I Collagen with Scanning Electron Microscope

LI Rong-lin¹, LI Chun-yang¹, ZHANG Wei²

(1. Guanghua College of Stomatology, 2. Department of Histology and Embryology of Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To observe the various microstructures of frozen drying forms of tissue engineering scaffold, which was made of chitosan and type I collagen with their various proportions, concentrations, and under different temperatures by scanning electron microscope (SEM). To obtain the ideal combinant tissue engineering scaffold. 【Methods】Different concentration of chitosan, type I collagen and the mixed liquor of them in different proportions were frozen firstly for 12 h at -5℃, -20℃, and -80℃, respectively, then were frozen dried for 24 h, at last, the microstructure of the new materials were observed by scanning electron microscope, and the average pore diameters and interval porosities were calculated. 【Results】Platinum sponge solid were formed after chitosan, type I collagen and the mixed liquor of them were frozen drying. And the lower temperature materials were frozen before drying, the smaller pore diameter and lower interval porosity they had. The higher concentration of materials and higher proportion of chitosan in mixed liquor were, the smaller pore diameter and lower interval porosity they had. 【Conclusion】The pore diameters of chitosan-type I collagen composite scaffold are closely related with the concentration, proportion of materials and the freezing temperature before drying.

Key words: chitosan; type I collagen; composite scaffold; scanning electron microscope

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):557-561]

目前, 临床已应用壳聚糖和胶原作为组织工程的支架材料。壳聚糖(聚 1, 4-葡糖胺)是天然的

高分子多聚糖, 具有良好的生物组织相容性、生物可降解性和适宜的机械强度, 其缺点是脆性大、韧

收稿日期: 2006-05-28

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B31201003)

作者简介: 李容林(1954-), 男, 广东惠州人, 副主任医师, 课题负责人, 通讯作者。E-mail: gzlironglin@163.com

性差、降解慢和孔径小^[1]。胶原是一种天然蛋白质,广泛存在于动物的皮肤、骨、肌腱韧带和角膜等组织中,是动物体内含量最丰富的蛋白质^[2]。而单纯胶原机械强度较弱,降解过快。因此,目前将二者联合起来制备复合工程材料的研究越来越多^[3,4],对此复合材料进行微观研究的报道较少。然而,微观结构决定了材料的生物学特性。本研究将不同温度、不同混合比例以冻干法制备的复合材料进行微观结构观察,以获得最佳浓度、比例、温度匹配组合,制备出理想的组织工程复合支架材料,为临床更好应用此复合生物材料支架提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂和设备

壳聚糖(Sigma公司,脱乙酰度85%),型胶原(广州创尔生物技术有限公司),SAN YOMDF 2192A T型超低温保存箱(日本),Unicryo, MC2L-60 冷冻干燥机(德国),HITACHI S-3000N 扫描电镜(日本)。

1.2 壳聚糖-型胶原复合材料的制备

室温下将壳聚糖溶于0.2 mol/L乙酸并搅拌均匀,配成20、10和5 g/L的壳聚糖溶液,离心(7500 r/min) 30 min,用于除渣脱泡;型胶原以同等浓度乙酸配成4.60、2.30和1.15 g/L的胶原溶液,离心除泡。将溶液倾入预冷的24孔板中不同温度下冷冻12 h后移入冻干机冻干24 h,干燥保存。分组如下:-5℃冷冻后冻干的为A,其中A₁为2.30 g/L型胶原,A₂为20 g/L壳聚糖,A₃为型胶原-壳聚糖混合液(4.60 g/L胶原和20 g/L壳聚糖等体积混匀并离心除泡);与上对应,-20℃冷冻后冻干的分别编号为B₁、B₂和B₃;-80℃冷冻后冻干的分别编号为C₁、C₂和C₃;另外,-20℃冷冻后冻干的还有不同体积比的壳聚糖-胶原混合液,分别编号为B₄(1:3),B₅(3:1);以及B₆ 5 g/L壳聚糖,B₇ 20 g/L壳聚糖,B₈ 1.15 g/L型胶原,B₉ 4.60 g/L型胶原。

1.3 支架材料的扫描电镜观察

取以上不同种类的支架材料,分别对其表面、底面和内部结构喷铂金处理后置于扫描电镜下,加速电压20 kV,放大不同倍数观察。浸入液氮后折断材料,电镜扫描其内部结构,并在材料内部选取3个高倍视野(100倍),每视野测量10个孔径

值,计算材料的平均孔径。

1.4 支架材料的孔隙率测定

采用液体位移法测定支架的孔隙率^[5]。将支架样本切成5 mm×5 mm大小,置入体积为V₁的无水乙醇中,5 min后负压吸引脱气,使乙醇充分进入多孔支架的孔隙中,直至再无气泡逸出,此时乙醇体积(浸没支架)计为V₂。轻轻将浸满乙醇的支架样品取出,剩余乙醇体积计为V₃。支架的孔隙率如下计算: $e=(V_1-V_3)/(V_2-V_3)$,每个样本测5次,取其均值。

1.5 数据统计分析

对同一温度下制备的不同材料的平均孔径和孔隙率,同一材料不同温度制备后的平均孔径和孔隙率以及同一温度同种材料不同浓度制备后的平均孔径和孔隙率,以SPSS11.0作单因素方差分析,P<0.05计为差别有显著性意义。

2 结果

2.1 支架材料的大体观

冻干后的各种材料呈白色,表面粗糙,有的呈纤维状排列并有大小不等的隆起,材料内部呈海绵状多孔结构,其中胶原材料最为疏松,单纯壳聚糖材料最紧密,混合材料介于二者之间。材料体积较冻干前有不同程度的缩小,尤其以胶原组缩小明显。

2.2 不同支架材料的表面结构

在扫描电镜下,同种材料在不同温度制备下其表面结构不同。在2.30 g/L型胶原在-5℃冷冻后制备的材料表面呈膜状,有大小不一的孔洞(图1A),-20℃下制备材料表面密布较为均一的小孔(图1B),而-80℃下制备材料表面呈絮状(图1C),很少形成完整的孔。10 g/L的壳聚糖在-5℃冷冻后制备材料表面呈鱼鳞状(图1D),-20℃下呈膜状,间有大小悬殊的孔(图1E),-80℃条件制备的材料表面有膜覆盖,间有较大裂孔,膜上密布小孔(图1F)。而壳聚糖和型胶原等体积混合后在-5℃制备的材料,表面呈膜状,间有狭长裂孔,膜下可见网格状骨架(图1G),-20℃条件下制备的材料膜状表面上孔隙明显增多(图1H),而-80℃制备的材料表面与-5℃制备的类似(图1I)。壳聚糖和型胶原不同体积混合后在-20℃制备材料表面也不同,与等体积混合相比(图1H),壳

聚糖和Ⅰ型胶原 1:3 体积比混合后材料膜上孔隙明显减小(图 1J),而壳聚糖和Ⅰ型胶原 3:1 体积混合材料表面膜状结构明显,很少有孔隙(图 1K)。在同一温度下(-20℃)同种材料不同浓度制备的材料表面结构也不相同,1.15 g/L Ⅰ型胶原表

面孔最小(图 1L),4.60 g/L Ⅰ型胶原表面孔最大(图 1M);而壳聚糖也类似,5 g/L 壳聚糖材料表面孔最小(图 1N),10 g/L 壳聚糖次之(图 1E),而 20 g/L 壳聚糖表面呈絮状(图 1O)。

2.3 不同材料内部结构及孔径大小

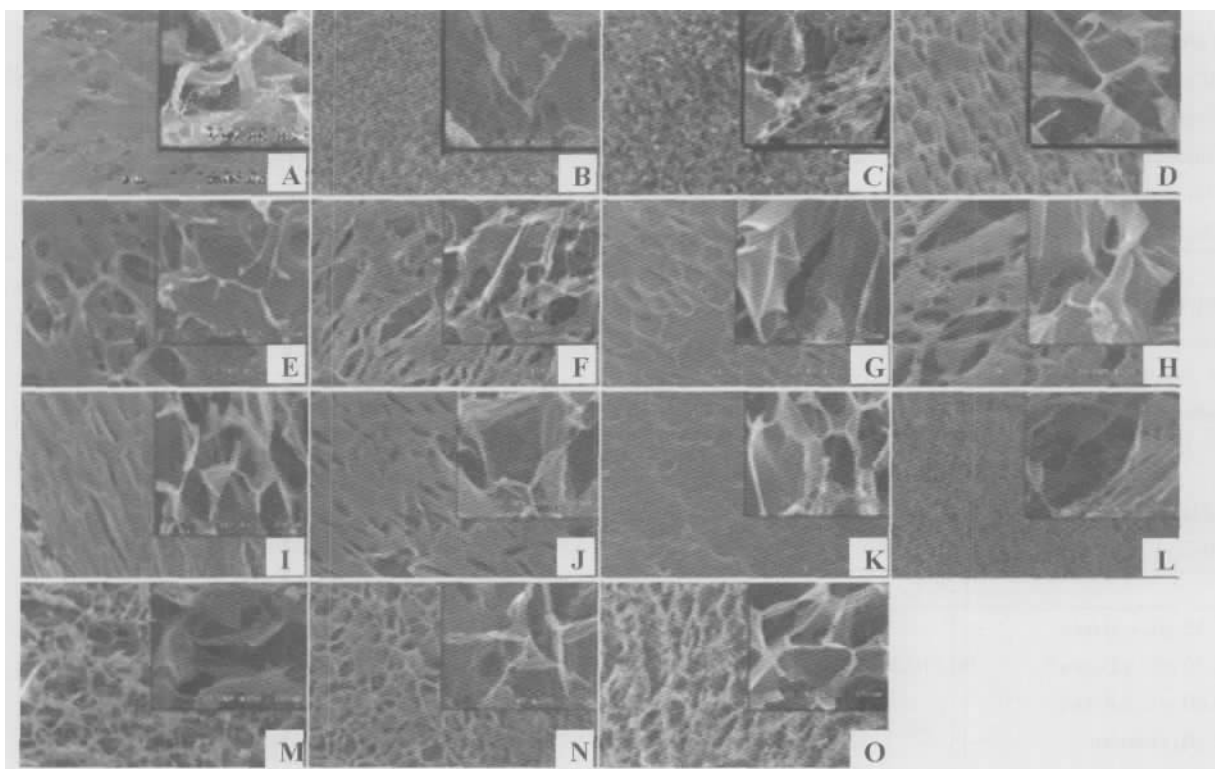


图 1 各种不同支架材料的表面和内部结构扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron microscopes of the surface and internal structure of different scaffolds

The big figure showed the surface structure ($\times 100$) and the small figure in rectangle showed the internal structure ($\times 200$). A, B and C showed the type I collagen (2.30 g/L) scaffold which were frozen at -5℃, -20℃, and -80℃ respectively; D, E and F showed the chitosan (10 g/L) scaffold which were frozen at -5℃, -20℃, and -80℃ respectively; G, H and I showed the composite scaffold of chitosan and collagen (1:1) which were frozen at -5℃, -20℃, and -80℃ respectively; J and K showed the composite scaffold of chitosan and collagen (1:3 and 3:1) respectively which were frozen at -20℃; L and M showed the type I collagen (1.15 g/L and 4.60 g/L) scaffold respectively which were frozen at -20℃; N and O showed the chitosan (5 g/L and 20 g/L) scaffold respectively which were frozen at -20℃.

各种条件下制备的材料内部都呈海绵状多孔隙结构(见图 1 中小图),计算其孔径大小不一,结果如表 1。

2.4 不同材料的孔隙率

根据液体法测量所得各种材料的孔隙率结果如表 2。

3 讨论

3.1 本研究结果的提示

组织工程以种子细胞、支架材料、细胞因子作

为三要素。作为载体的支架材料是研究的热点之一^[6,7]。壳聚糖和胶原复合材料由于结合了两种材料的优点而弥补了各自的不足,而在基础研究和临床应用上都日益得到重视,它可以用来修复皮肤缺损^[8]、促进骨伤愈合^[9]以及治疗牙周病^[10]等。这种复合材料的用途广泛,能形成不同的复合结构,可在材料强度、降解速度、孔径大小、细胞承载等满足不同条件下组织工程的需要。因此,对不同条件下以不同方法制备的复合材料结构研究尤为必要。本研究结果提示支架材料的孔径和孔隙率和以下几方面密切相关。

表 1 不同材料在不同条件下制备后的孔径

Table 1 Pore diameters of different materials made in different conditions

	($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)		
	-5	-20	-80
1.15 g/L collagen		278 \pm 53 ⁴⁾	
2.30 g/L collagen ¹⁾	241 \pm 14	196 \pm 26 ⁴⁾	108 \pm 78
4.60 g/L collagen		148 \pm 14 ⁴⁾	
5 g/L chitosan		162 \pm 12 ⁵⁾	
10 g/L chitosan ²⁾	180 \pm 25	147 \pm 15 ⁵⁾	79 \pm 21
20 g/L chitosan		122 \pm 8 ⁵⁾	
Chitosan/collagen(1 3)		215 \pm 35 ⁶⁾	
Chitosan/collagen(1 1) ³⁾	229 \pm 46	158 \pm 26 ⁶⁾	98 \pm 25
Chitosan/collagen(3 1)		106 \pm 17 ⁶⁾	

One way ANOVA, 1) 2) 3) among three temperatures, $F=151.361, 62.729, 38.119$, respectively, and all $P=0.000$; 4) 5) 6) among three concentrations, $F=45.929, 27.841, 43.365$, respectively, all $P=0.000$; 1)- 6) post hoc test of LSD- t , between two groups of same number, all $P<0.001$

表 2 不同材料在不同条件下制备后的孔隙率

Table 2 Interval porosities of different materials made in different conditions

	($\bar{x} \pm s, \%$)		
	-5	-20	-80
1.15 g/L collagen		97.3 \pm 0.4 ⁴⁾	
2.30 g/L collagen ¹⁾	96.1 \pm 0.2	92.6 \pm 0.3 ⁴⁾	90.4 \pm 0.4
4.60 g/L collagen		90.4 \pm 0.6 ⁴⁾	
5 g/L chitosan		91.7 \pm 0.6 ⁵⁾	
10 g/L chitosan ²⁾	90.4 \pm 0.7	89.2 \pm 0.2 ⁵⁾	87.3 \pm 0.4
20 g/L chitosan		88.6 \pm 0.5 ⁵⁾	
Chitosan/collagen(1 3)		94.5 \pm 0.5 ⁶⁾	
Chitosan/collagen(1 1) ³⁾	94.4 \pm 0.5	90.8 \pm 0.5 ⁶⁾	88.9 \pm 0.7
Chitosan/collagen(3 1)		89.1 \pm 0.2 ⁶⁾	

One way ANOVA, 1) 2) 3) among three temperatures, $F=506.788, 49.623, 163.323$, respectively, and all $P=0.000$; 4) 5) 6) among three concentrations, $F=361.312, 69.258, 202.519$, respectively all $P=0.000$; 1)- 6) post hoc test of LSD- t , between two groups of same number, all $P<0.01$ except that $P=0.042$ between 10 g/L vs. 20 g/L chitosan

3.2 支架材料冻干前冷冻温度对其表面结构的影响

对我们利用扫描电镜对不同冷冻温度下以冻干法制成的壳聚糖、型胶原和复合材料的表面观察,发现型胶原在不同温度下形成的表面结构差别明显:随着温度的降低,表面膜的孔隙越来越大。壳聚糖材料表面也能形成膜,但被较多孔隙分成小片,而且温度越低孔越多。按体积比 1 1 制成的壳聚糖-型胶原混合材料表面结构独特,类

似于在内部骨架上覆盖一层均匀一致的膜,膜上均匀分布很多孔。由于胶原可以作为 BMP 的缓释载体,亦可作为药物的缓释载体,所以复合膜表面孔径的大小和多少可能会影响复合因子的释放速率。

3.3 支架材料冻干前冷冻温度对其内部结构的影响

无论是 2.30 g/L 型胶原、10 g/L 壳聚糖,还是型胶原和壳聚糖不同比例混合材料,冻干前冷冻温度对其支架材料的内部孔径有显著性影响:随着冷冻温度的降低,所制成材料的孔径也随之变小。壳聚糖-型胶原复合材料(1 1)在-20 制成材料孔径约 110~190 μm , -80 制成材料孔径约 50~130 μm ,明显低于-5 条件下制成材料孔径(170~340 μm , $P<0.001$)。在 10 g/L 壳聚糖和 2.30 g/L 型胶原组情况也类似。这也提示我们可以通过选择不同的冻干前冷冻温度来获得不同孔径的支架材料。

3.4 支架材料的浓度对其内部结构的影响

在相同冷冻温度下,原料的浓度越高,制成材料的孔径越小。-20 下,1.15 g/L、2.30 g/L 和 4.60 g/L 型胶原制成材料的孔径大小平均分别约为 278、195 和 148 μm ,随原料浓度的增高孔径明显变小,三组间有显著性差别。在 10 g/L 壳聚糖组这种情况也得到了证实。

3.5 壳聚糖和型胶原的配比对复合支架材料内部结构的影响

壳聚糖和型胶原的混合比例影响制成材料的孔径,壳聚糖含量越高,孔径越小。-20 下,壳聚糖和型胶原 1 3 混合液冻成材料的孔径在 170~270 μm 间,1 1 混合液冻成材料孔径约 120~190 μm ,而 3 1 混合液冻成材料孔径降为约 80~140 μm ,三组间有显著性差别。这提示我们可以通过调节壳聚糖和型胶原混合比例来得到不同孔径的冻干材料。

除了通过扫描电镜直接测得以上结果外,我们还通过测试不同材料的孔隙率做了进一步验证。材料的孔径越大,分布越密,理论上其孔隙率亦越高。我们的结果表明,同等温度下材料浓度越高,孔隙率越低;同种材料冷冻温度越低,孔隙率越低;壳聚糖含量越高,孔隙率越低,间接证实了扫描电镜的结果。

综上所述,我们通过扫描电镜和测孔隙率的

方法证实了冷冻温度、原料浓度和配比影响着制成材料的孔径,为下一步测定不同支架材料的理化性质和对细胞因子释放的影响,以便为研制较为理想的不同要求的壳聚糖-型胶原复合支架提供更详尽资料。

参考文献:

- [1] RAO S B, SHARMA C P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential[J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 34(1): 21- 28.
- [2] WAHL D A, CZERNUSZKA J T. Collagen - hydroxyapatite composites for hard tissue repair[J]. *Eur Cell Mater*, 2006, 28(11): 43- 56.
- [3] LEE J Y, KIM K H, SHIN S Y, et al. Enhanced bone formation by transforming growth factor- beta1- releasing collagen/chitosan microgranules[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 76(3): 530- 539.
- [4] ZHANG Y, CHENG X, WANG J, et al. Novel chitosan/ collagen scaffold containing transforming growth factor- beta1 DNA for periodontal tissue engineering [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(1): 362- 369.

- [5] ZHANG R, MA P X. Poly (alpha- hydroxyl acids)/ hydroxyapatite porous composites for bone -tissue engineering I preparation and morphology[J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44 (4): 446- 455.
- [6] 曾春,蔡道章,全大萍,等. TGF- 1 壳聚糖缓释微球的制备和体外检测[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3): 347- 350.
- [7] 冉炜,郭冰,李轶,等. 可降解骨组织工程支架材料修复兔下颌骨缺损的实验研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(3S): 18- 20.
- [8] BRAYE F, HAUTIER A, BOUEZ C, et al. Skin substitutes reconstructed in the laboratory: application in burn treatment[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2005, 53(10): 613- 617.
- [9] SHIN S Y, PARK H N, KIM K H, et al. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration [J]. *J Periodontol*, 2005, 76 (10): 1778- 1784.
- [10] ZKINIC G, SENEL S, AKINCIBAY H, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen porphyromonas gingivalis[J]. *Int J Pharm*, 2002, 235(1- 2): 121- 127.

(编辑 刘清海)

(上接第 556 页 from page 556)

2005:121- 123.

- [2] KARINE A K, JACOB T J, THOMPSON G M. The human anterior lens capsule: cell density, morphology and mitotic index in normal and cataractous lenses [J]. *Exp Eye Res*, 1987, 45(6):865- 874.
- [3] REDDAN J R. GIBLIN F J, DZIEDZIC D C, et al. Hydrogen peroxide affects specific epithelia sub populations in cultured rabbit lenses [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995,36(2):289- 299.
- [4] WU K, KOJIMA M, SHUI Y B, et al. Ultraviolet B- induced corneal and lens damage in guinea pigs on low- ascorbic acid diet[J]. *Ophthalmic Res*, 2004,36(5): 277- 283.
- [5] SEGEV F, MOR O, SEGEV A, et al. Downregulation of gene expression in the ageing lens: a possible contributory factor in senile cataract[J]. *Eye*, 2005,19 (1):80- 85.
- [6] KUBO E, SINGH DP, AKAGI Y. Gene expression profiling of diabetic and galactosaemic cataractous rat lens by microarray analysis[J]. *Diabetologia*, 2005,48

(4):790- 798.

- [7] HAWSE J R, DEAMICIS- TRESS C, COWELL T, et al. Identification of global gene expression differences between human lens epithelial and cortical fiber cells reveals specific genes and their associated pathways important for specialized lens cell functions[J]. *Mol Vis*, 2005,11:274- 83.
- [8] IVANOV D, DVORANTCHIKOVA G, PESTOVA A, et al. Microarray analysis of fiber cell maturation in the lens[J]. *FEBS Lett*, 2005,579(5):1213- 1229.
- [9] VRENSSEN G, KAPPHOF J, WILLEKENS B, et al. Morphology of the aging human lens [J].*Lens Eye Toxic Res*,1990,7(1):1- 30.
- [10] COSTELLO M J, OLIVER T N, COBO L M, et al. Cellular architecture in age -related human nuclear cataract [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992,33(11): 3209- 3227.
- [11] MOODY DE, ZOU Z, MCINTYRE L. Cross- species hybridisation of pig RNA to human nylon microarrays [J]. *BMC Genomics* 2002, 3(1):27- 30.

(编辑 刘清海)