

文章编号:1004-7220(2010)01-0026-06

## 胶原-壳聚糖制备仿生多层结构软骨支架

单程, 孙晓丹, 战景林  
(清华大学材料科学与工程系, 北京100084)

**摘要:**目的 制备结构与天然软骨结构相似的仿生多层软骨支架。方法 采用先后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和液氮中冷冻的预冻方式,冷冻干燥法制备双层支架。采用 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻后,部分熔融再液氮重冻的预冻方式,冷冻干燥制备了厚度约 $2\text{ mm}$ 的仿生多层软骨支架。采用XRD和红外光谱观察胶原和壳聚糖的复合情况。采用SEM观察支架的形貌。对比了纯壳聚糖支架、纯胶原支架、胶原壳聚糖复合材料单层支架和仿生多层支架在干燥和湿润两种状态下的力学性能。**结果** 胶原和壳聚糖的复合存在化学反应,复合材料形成更好的孔结构,仿生多层支架从上至下分别具有致密层结构,圆形孔结构和垂直孔结构。支架材料在干燥和湿润状态下的力学性能有很大差别,仿生多层支架在湿润状态下各层具有不同的力学性能。**结论** 仿生多层软骨支架的结构接近于天然关节软骨多层结构,且在湿润状态下各层的力学性能有差异,有望更好地维持软骨细胞表型和提高软骨损伤修复效果。

**关键词:** 胶原; 壳聚糖; 仿生结构; 支架; 复合材料; 软骨

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

## Preparation of biomimetic multilayered scaffolds using collagen/chitosan for cartilage tissue engineering

SHAN Cheng, SUN Xiao-dan, ZHAN Jing-lin. (*Department of Material Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

**Abstract: Objective** Prepare biomimetic multilayered scaffold which has similar structure of natural cartilage. **Method** By lyophilizing the scaffolds which were prefrozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and in liquid nitrogen successively, we prepared double-layered spongy scaffolds. By partially thawing the prefrozen samples and refreezing them in liquid nitrogen before the final lyophilization, we prepared biomimetic multilayered scaffolds with about  $2\text{ mm}$  thickness. XRD and FT-IR were used to confirm the interaction between collagen and chitosan. SEM was used to observe the morphologies of the scaffolds. The mechanical properties of pure chitosan scaffolds, pure collagen scaffolds, composite single-layered scaffolds and biomimetic multilayered scaffolds were compared both in dry and wet conditions. **Results** There was chemical interaction between collagen and chitosan. Composite materials will form better pore structure. The biomimetic multilayered scaffolds have upright pores, round pores and a dense layer from bottom to top of the scaffolds. The scaffolds have quite different mechanical properties between dry and wet state. Under wet state, the different layers of the biomimetic multilayered scaffold have different mechanical properties. **Results** The biomimetic structure of the multilayered scaffold is very close to that of the natural articular cartilage, and the different layers of the biomimetic multilayered scaffold had different mechanical properties under wet state. These are hopefully beneficial to help maintain the phenotypes of chondrocytes and promote the repairing effect of cartilage defects.

**Key words:** Collagen; Chitosan; Biomimetic structure; Scaffolds; Composite materials; Cartilage

随着现代人们对运动生活的崇尚,软骨、骨等组织出现损伤的情况越来越多。关节软骨由于其生

收稿日期:2010-01-04

作者简介:单程(1985-),研究方向:软骨组织工程。

通讯作者:孙晓丹,副研究员, Tel: (010)62772977, E-mail: sunxiaodan@tsinghua.edu.cn。

物体中所处的特殊位置和功能作用,发生损伤是常见的,而软骨的自我修复能力差<sup>[1-2]</sup>,损伤如持续发展会引起功能障碍,严重影响生活质量。组织工程学是近20年来生物医学工程中一个快速发展的新领域,它的快速发展为软骨缺损的修复提供了新的方法<sup>[3-6]</sup>。天然软骨具有3层结构,浅表层内的软骨细胞较小,呈梭形,长轴与关节软骨表面相平行,中间层细胞呈圆形或卵圆形,排列不规则,深层的软骨细胞圆形,柱状排列,与软骨表面垂直,各层细胞及其细胞外基质在形貌上有很大的区别。制备多层软骨支架的研究在国内外已经有很多报道<sup>[7-8]</sup>,但涉及结构上仿生制备的报道较少。本实验分别制备了具有垂直孔与圆形孔的支架和具有垂直孔、圆形孔、致密层的支架。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

胶原(酸可溶I型)采用与Pins等所描述的相同的方法<sup>[9]</sup>,从鼠尾腱提取。壳聚糖(脱乙酰度88%,分析纯,北京化学试剂有限公司),NaOH(北京化学试剂有限公司),冷冻干燥机FD-4(北京博医康实验仪器有限公司),12孔培养板(美国Costa),D/max X射线衍射仪(日本Rigaku),Magna 560富立叶红外拉曼光谱仪(美国Nigaoli),MiniMat 2000微型材料试验机(美国Rheometric Scientific)。

### 1.2 单层软骨支架制备

用2%的醋酸溶液配制2%的壳聚糖纯溶液,1%的胶原纯溶液,分别取两种溶液按壳聚糖与胶原的质量比为20:1混合,磁力搅拌使其充分反应待用。分别将纯壳聚糖溶液、纯胶原溶液、壳聚糖与胶原复合溶液注入到12孔板中,-20℃预冻,冷冻干燥得到单层软骨支架。

### 1.3 双层软骨支架制备

取壳聚糖与胶原的复合溶液注入A、B 2个12孔板中,-20℃预冻后取出。直接向A中再次注入复合溶液,浸入液氮中预冻后冷冻干燥得到双层软骨支架A;用电吹风使B板中预冻好的样品上表面快速融化掉肉眼可见的一层,再注入一层复合溶液,浸入液氮中预冻后冷冻干燥得到双层软骨支架B。

### 1.4 仿生多层软骨支架制备

取壳聚糖与胶原的复合溶液注入12孔板中,-

20℃预冻后取出,用高温太阳灯照射使预冻好的样品表面和底层均出现一定程度的融化,快速浸入液氮中预冻后冷冻干燥得到仿生多层软骨支架。

### 1.5 碱液处理

将上述制备得到的含壳聚糖的支架以质量分数5%的NaOH溶液浸泡6h以除去醋酸,取出后以大量去离子水反复浸泡冲洗使支架达到中性。

### 1.6 XRD分析

纯胶原、纯壳聚糖均为原始粉末料未经任何加工而进行测试得出的结果,复合材料为胶原与壳聚糖复合溶液经冷冻干燥后的三维多孔支架材料切成不漏光的薄片进行测试得出的结果,用橡皮泥黏附在样品板上,利用Rigaku D/max X射线衍射仪对材料进行分析,实验参数为:Cu K $\alpha$ ,40 kV,120 mA,速度4°/min,步距0.02°, $\lambda = 1.5418 \times 10^{-10}$  m (1.5418 Å)。

### 1.7 红外光谱分析

实验采用Nicolet Magna 560富立叶红外拉曼光谱仪。纯胶原、纯壳聚糖为原始粉末料经KCl压片进行测试得出的结果,三维多孔支架材料为直接进行测试。

### 1.8 SEM观察

支架完全干燥后,用刀片切开暴露内部,喷金后利用扫描电镜(Scanning Electronic Microscope, SEM)观察不同支架材料的微观形貌。

### 1.9 力学性能分析

实验采用MiniMat 2000微型材料试验机进行支架在干湿两种状态下的拉伸实验,量程选为0~20N,样品宽10 mm,高2 mm,夹持长度为5 mm,每组3个样品。双层支架由于其厚度较厚,没有进行力学性能测试。

### 1.10 统计学分析

使用单因子实验的离散模型对力学性能实验数据进行分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。利用Excel编辑公式计算。

## 2 结果

### 2.1 胶原与壳聚糖复合情况研究

X射线衍射谱图显示纯的壳聚糖和胶原各自在20°和19°附近有一个宽的非晶包(见图1,2),表明两者都是低结晶性高分子。对比复合材料的X射线衍射谱图,复合材料的XRD图像(见图3)并非纯

胶原和纯壳聚糖 XRD 图像的简单叠加,主峰的半高宽有较大的变化,说明复合过程中发生了化学作用。红外光谱显示胶原蛋白的特征吸收峰  $1657\text{ cm}^{-1}$ 、 $1552\text{ cm}^{-1}$ 、 $1239\text{ cm}^{-1}$ ,分别对应着酰胺 I 带,酰胺 II 带和酰胺 III 带。壳聚糖在  $3435\text{ cm}^{-1}$  处的峰为羟基和氨基的伸缩振动,显示出羟基与羟基及羟基与氨基的氢键作用。对应于酰胺 I 带 ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ) 及 II 带 ( $1554\text{ cm}^{-1}$ ) 的峰不明显,说明壳聚糖的脱乙酰度较高,  $1324\text{ cm}^{-1}$  为酰胺 III 带的特征吸收,  $1383\text{ cm}^{-1}$  为  $\text{C}-\text{CH}_3$  的变形振动吸收峰,这 2 个吸收峰的存在,说明壳聚糖分子中还有一定数量的乙酰基<sup>[10-11]</sup>。胶原与壳聚糖复合后,在  $1643\text{ cm}^{-1}$  附近有吸收峰,其峰位与单一聚合物比较均发生了不同程度的位移,说明胶原与壳聚糖复合有氢键作用。在  $1381\text{ cm}^{-1}$ 、 $895\text{ cm}^{-1}$  等处的吸收峰均有不同程度的减弱或消失,说明胶原与壳聚糖的结晶被扰乱。

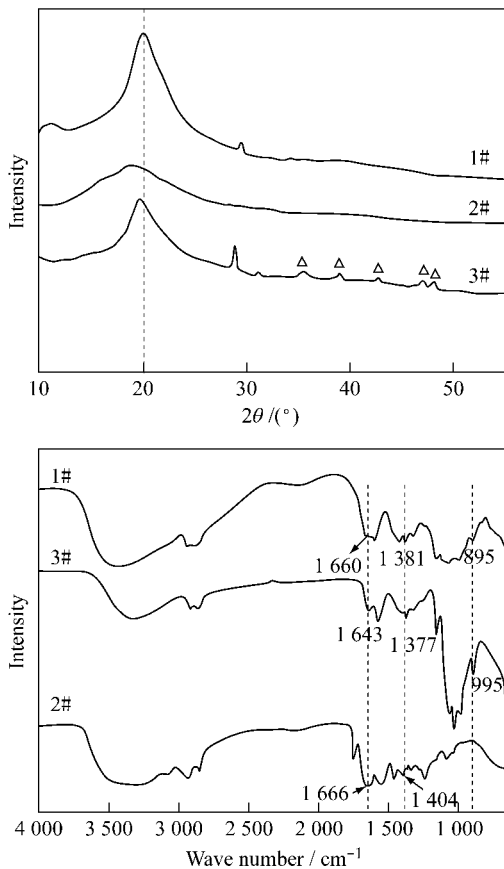


图1 XRD 和红外光谱分析图(1# 纯壳聚糖 2# 纯胶原 3# 复合材料)

Fig.1 XRD patterns and FT-IR spectra (1# pure Chitosan 2# pure Collagen 3# Composite material)

## 2.2 复合材料成孔性能研究

纯胶原形成的孔结构较为不连续,存在丝状的结构,而纯壳聚糖形成的孔结构差,呈鳞片状,复合材料孔结构均匀规整且孔径合适。

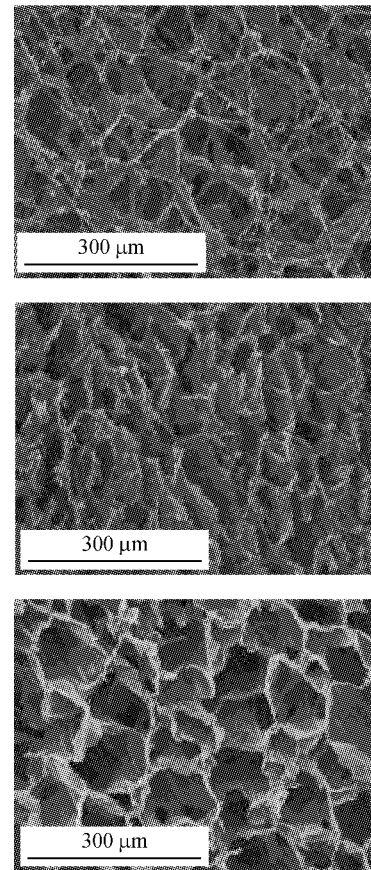


图2 不同材料成孔性能 SEM 照片(从左至右分别为纯胶原支架、纯壳聚糖支架、复合材料支架)

Fig.2 SEM images of the porous scaffolds composed of different materials (From left to right: pure collagen scaffold, pure chitosan scaffold, composite single-layered scaffold)

## 2.3 双层支架形貌分析

A 支架具有圆形孔和垂直孔两种结构,两结构的过渡均匀,没有明显的分界线,孔结构之间连通较好。B 支架圆形孔与垂直孔之间出现了一层明显的致密孔结构。

## 2.4 仿生多层支架形貌分析

仿生多层支架厚度约  $2.5\text{ mm}$ ,底层为垂直孔结构,中层为圆形孔结构,顶层为致密孔结构,各层间没有出现明显的分界,连通性好,该支架的结构与自然软骨的结构相似。

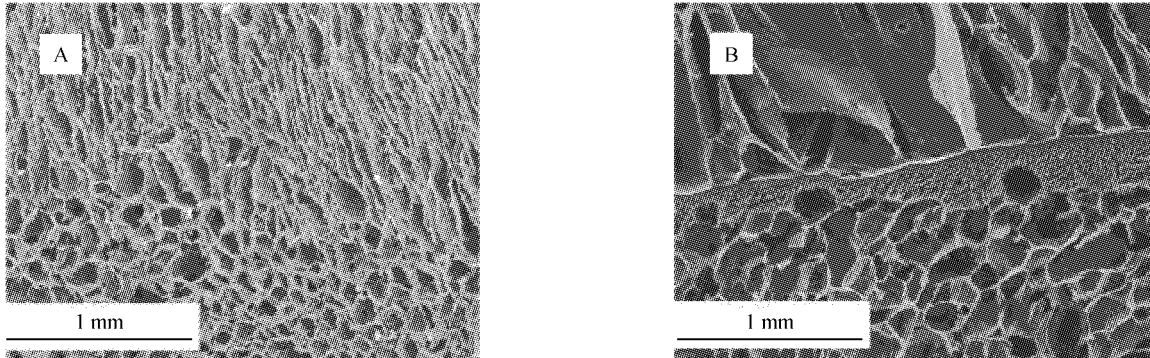


图3 双层支架 SEM 照片  
 Fig.3 SEM images of double-layered spongy scaffolds

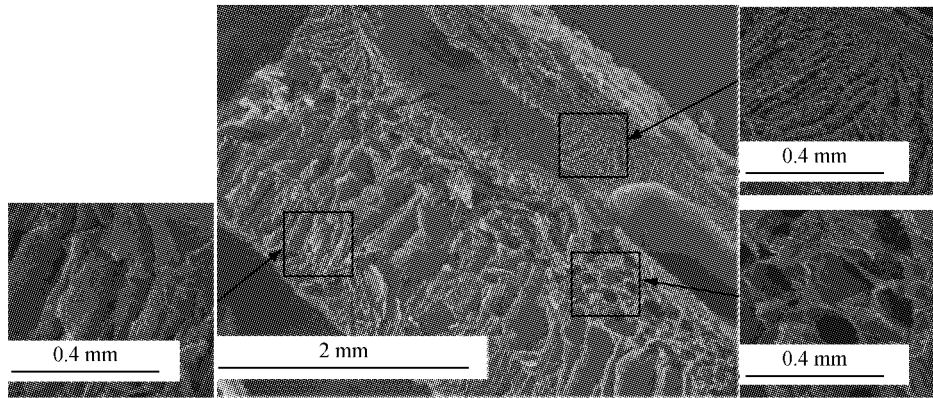


图4 仿生软骨支架 SEM 照片  
 Fig.4 SEM image of biomimetic multilayered scaffold

## 2.5 软骨支架力学性能分析

除了干燥状态下,纯壳聚糖支架与仿生支架的断裂伸长率无显著差异 ( $P > 0.05$ ),不同材料和制备方式得到的支架在各自的干燥和湿润状态下,拉伸断裂强度和断裂伸长率都有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。复合材料的拉伸断裂强度远远大于纯胶原支架,在湿润状态下,其断裂伸长率显著大于纯壳聚糖支架。仿生支架由于存在垂直孔结构,使其拉伸断裂强度和断裂伸长率较复合材料的单层支架均有所下降,但从干燥状态下的数据看出,其拉伸断裂强度仍约为纯胶原单层支架的3倍,具有足够的强度,而在湿润状态下,其断裂伸长率也可达到96%,可形变量也较大。值得注意的是,仿生多层支架在湿润状态下的拉伸曲线后期出现了大平台,其断裂趋势放缓,这说明其各层的力学性能在湿润状态下有差异。

表1 支架力学性能

Tab.1 Mechanical properties of the scaffolds

样品	拉伸断裂强度/kPa	断裂伸长长度/mm	断裂伸长率/%
纯胶原支架(干燥)	128 ± 18	1.20 ± 0.10	24 ± 2
纯壳聚糖支架(干燥)	546 ± 62	0.80 ± 0.10	16 ± 1
复合材料单层支架(干燥)	502 ± 51	1.00 ± 0.10	20 ± 2
仿生支架(干燥)	375 ± 52	0.75 ± 0.15	15 ± 3
纯壳聚糖支架(湿润)	153 ± 7	6.20 ± 0.20	124 ± 4
复合材料单层支架(湿润)	148 ± 8	7.80 ± 0.25	162 ± 5
仿生支架(湿润)	78 ± 11	4.80 ± 0.45	96 ± 9

## 3 讨论

早在1743年,Hunter提出软骨一旦破坏即不可自身修复,软骨的人为干预修复一直受到重视,但至

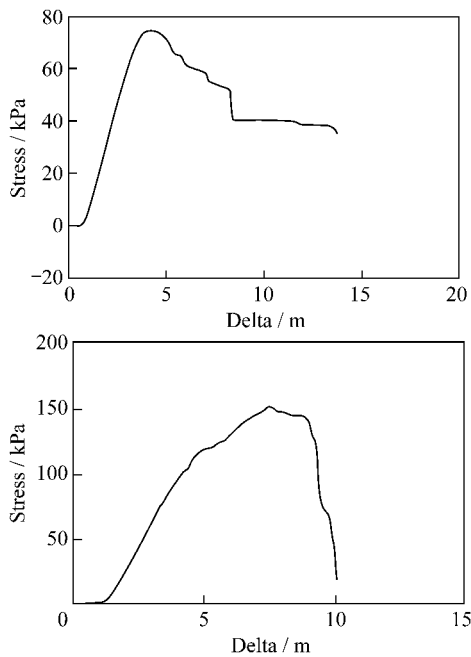


图5 支架湿润状态下的拉伸曲线(左图为仿生多层支架,右图为复合材料普通单层支架)

Fig.5 tensile profile of the wet scaffolds (left: biomimetic multilayered scaffold; right: composite single-layered scaffold)

今仍然没有理想的修复方式。1987年由美国自然科学基金会(NSF)在华盛顿的生物分会上率先提出了组织工程概念,组织工程的出现为软骨损伤修复提供了新的方法。软骨组织工程研究涉及到种子细胞、支架材料和生长因子3个基本要素。支架材料在组织工程中扮演着人工细胞外基质的角色,有着十分重要的意义。早在组织工程概念提出前的1977年,Green等就将分离、培养的软骨细胞与脱钙骨支架联合培养,并认识到支架材料的重要性。胶原是多种组织包括软骨组织的主要成分和细胞外基质,壳聚糖的化学结构类似于关节软骨基质中的氨基多糖(GAG),在软骨组织工程中两种材料已经有了很多的研究。Lu等<sup>[12]</sup>将壳聚糖注射到大鼠关节内,发现壳聚糖不仅没有引起炎症反应,而且具有促进软骨修复的能力。Montembault等<sup>[13]</sup>将分离出来的人的软骨细胞种植在纯壳聚糖水凝胶上,发现软骨细胞与壳聚糖水凝胶紧紧结合在一起,并形成壳聚糖和软骨细胞的聚集物。Yates等<sup>[14]</sup>将牛关节软骨细胞种植在胶原海绵支架上4周,数据显示胶原海绵

支架能够有利于软骨细胞的粘附、增殖、分化和表型的保持。Willers等<sup>[15]</sup>在I型、III型胶原膜支架上接种软骨细胞,并植入有3mm软骨缺损的兔膝关节,结果细胞支架复合物增殖分化形成健康软骨,12周时完全修复软骨缺损。

胶原和壳聚糖单独作为支架材料时存在各种问题,一些研究尝试将两种材料复合以得到更良好的性能。Shi等<sup>[16]</sup>采用冻干法,将I型胶原和脱乙酰度88%壳聚糖制备成多孔海绵状三维支架,体外培养软骨细胞和支架复合物,发现支架促进了软骨细胞的增殖、分化并维持其表型。Huang等<sup>[17]</sup>发现用胶原-透明质酸膜和胶原-壳聚糖-透明质酸膜培养细胞,增殖的细胞数高于用单纯胶原膜。一些研究还表明,支架的三维结构以及培养中的力学环境也会影响软骨细胞的生长和表型。Malda等<sup>[18]</sup>的研究结果显示,将软骨细胞种植于大孔凝胶微载体可使其高效增殖并维持其分化能力。Zehbe等<sup>[19]</sup>利用电化学水溶液分解及冷冻干燥的方法制备的具有垂直取向的孔道结构的胶原/凝胶纤维支架,接种软骨细胞体外培养3d后细胞在支架表层呈与表面平行排列生长,在支架内部呈纵向排列生长,类似于天然关节软骨的细胞排列结构。Haddo等<sup>[20]</sup>还将具有密闭紧凑外层和多孔内层的两层结构膜用于软骨细胞的移植,密闭紧凑层用来防止细胞扩散入关节滑液,多孔层有利于细胞的黏附和侵入,获得了满意的长期效果。

本实验以生物相容性良好的壳聚糖与胶原为原料,利用XRD和红外光谱确定了两种材料的复合发生了氢键作用,相对于单一材料复合材料可以形成更好的孔结构。实验的中心在于制备厚度在3mm以内可望用于动物模型且具有仿生结构的软骨支架,这一类的报道在国内外都还少见。利用先后于-20℃和液氮中冷冻的预冻方式制备双层支架时发现,在加入第二层溶液前少量溶解已冻好样品,预冻时形成的结构发生了“坍塌”,在液氮中快速冷冻时水无法完成-20℃冷冻时的结晶来回复原来的结构,而是形成了较小的结晶,冷冻干燥后在垂直孔和圆形孔之间形成了致密孔的结构。以此为依据,利用-20℃冷冻后,部分熔融再液氮重冻的预冻方式,熔融过程使用太阳灯照射使得模具和样品上表面均受热,样品底层紧贴模具的部分和样品

上表面均出现融化,上表面还伴随着部分水分的蒸发。在置入液氮中预冻时,模具底部直接接触液氮,由于温度梯度的作用,使得样品底层形成垂直型的晶粒,而上表面由于离液氮远,温度梯度不足以形成垂直型晶粒,其快速冻结就形成了小晶粒,中间为原-20℃预冻后未融化的部分,保持其原来的结构,冷冻干燥后形成厚度仅2.5 mm并由上向下具备致密层,圆形孔和垂直孔的仿生结构。通过拉伸实验发现,支架在湿润状态下具有很大的断裂伸长率,并且宏观上具有良好的柔韧性,可满足对其进行剪切、移植等操作的要求。力学分析还表明,在湿润状态下,仿生结构支架的各层具有不同的力学性能。这种仿生支架结构接近于天然关节软骨的多层结构,有望更好地维持软骨细胞表型和提高软骨损伤修复效果。

#### 参考文献:

- [1] Mahmoudifar N, Doran PM. Tissue engineering of human cartilage and osteochondral composites using recirculation bioreactors [J]. *Biomaterials*,2005,26(34): 7012-7024.
- [2] Peretti GM, Campo-Ruiz V, Gonzalez S, *et al.* Tissue engineered cartilage integration to live and devitalized cartilage: a study by reflectance mode confocal microscopy and standard histology [J]. *Connect Tissue Res*,2006,47(4): 190-199.
- [3] Sedrakyan S, Zhou ZY, Perin L, *et al.* Tissue engineering of a small hand phalanx with a porously casted polylactic acid-polyglycolic acid copolymer [J]. *Tissue Eng*,2006,12(9): 2675-2683.
- [4] Ikada Y. Challenges in tissue engineering [J]. *Journal of The Royal Society Interface*,2006, 3: 589-601.
- [5] Yan J, Qi N, Zhang Q. Rabbit articular chondrocytes seeded on collagen-chitosan-GAG scaffold for cartilage tissue engineering in vivo [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*,2007,35(4):333-344.
- [6] Shao XX, Huttmacher DW, Ho ST, *et al.* Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits [J]. *Biomaterials*,2006,27(7): 1071-1080.
- [7] 吴刚,王迎军,陈晓峰,等. 多层软骨组织工程支架的制备 [J]. *中国生物医学工程学报*,2007,26(4):612-617.
- [8] Moutos FT, Guilak F. Composite scaffolds for cartilage tissue engineering [J]. *Biorheology*,2008,45(3-4):501-512.
- [9] Pins G D, Christiansen DL, Patel R, *et al.* Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties [J]. *Biophysical Journal*,1997,73: 2164-2172.
- [10] Chen ZG, Mo XM, He CL, *et al.* Intermolecular interactions in electrospun collagen-chitosan complex nanofibers [J]. *Carbohydrate Polymers*,2008,72: 410-418.
- [11] Chen ZG, Mo XM, Qin FL. Electrospinning of collagen-chitosan complex [J]. *Materials Letters*,2007,61:3490-3494.
- [12] Lu JX, Prudhommeaux F, Meunier A, *et al.* Effect of chitosan on rat knee cartilages [J]. *Biomaterials*,1999,20(20):1937-1944.
- [13] Montembault A, Tahiri K, Korwin Zmijowska C, *et al.* A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering [J]. *Biochimie*,2006,88:551-564.
- [14] Yates KE, Allemann F, Glowacki J. Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes [J]. *Cell Tissue Bank*,2005(1): 45-54.
- [15] Willers C, Chen J, Wood D, *et al.* Autologous chondrocyte implantation with collagen bioscaffold for the treatment of osteochondral defects in rabbits [J]. *Tissue Eng*,2005,7-8: 1065-1076.
- [16] Shi DH, Cai DZ, Zhon CR, *et al.* Development potential of a biomimetic chitosan / type II collagen scaffold for cartilage tissue engineering [J]. *ChinMed J (Engl)*,2005,17: 1436-1443.
- [17] Huang HP, Mou SS, Ma AD. Preparation of a composite membrane with collagen scaffold material for tissue culture [J]. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao*,2004,24(7):832-833.
- [18] Malda J, Kreijveld E, Temenoff S, *et al.* Expansion of human nasal chondrocytes on macro porous microcarriers enhances redifferentiation [J]. *Biomaterials*,2004,24: 5153-5161.
- [19] Zehbe R, Libera J, Gross U, *et al.* Short-term human chondrocyte culturing on oriented collagen coated gelatine scaffolds for cartilage replacement [J]. *Biomed Mater Eng*,2005,15(6):445-454.
- [20] Haddo O, Mahroof S, Higgsd, *et al.* The use of chondrocyte membrane in autologous chondrocyte implantation [J]. *The Knee*,2004,11:51-55.