

# 紫外线与戊二醛双重交联法构建真皮支架的研究

顾华 何黎 刘玲 金以超

**【摘要】** 目的 比较不同预冻温度及交联方法对胶原膜内部超微结构及成纤维细胞增殖的影响。方法 将牛 I 型胶原溶液 (10 g/L) 分别在 -20 ℃ 和 -80 ℃ 预冻 12 h 后, 放入 -70 ℃ 冻干机内冷冻干燥 48 h。利用扫描电镜测量 2 种预冻温度下胶原膜的内部孔径, 比较戊二醛交联法及紫外线 + 戊二醛双重交联法对胶原孔径的影响, 通过噻唑蓝 (MTT) 法检测人成纤维细胞在不同交联法制备的胶原膜中的增殖情况。结果 -20 ℃ 预冻胶原膜的孔径为  $(172 \pm 37) \mu\text{m}$ , -80 ℃ 预冻胶原膜孔径为  $(99 \pm 24) \mu\text{m}$ , 选择后者进行后续实验。经戊二醛交联后胶原膜孔径缩小, 种植后第 8 天, 成纤维细胞的吸光度值为  $1.534 \pm 0.013$ ; 紫外线联合戊二醛双重交联后胶原膜原有孔径不变, 种植后第 8 天成纤维细胞的吸光度值为  $3.778 \pm 0.010$ , 与前者比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 -80 ℃ 预冻后经紫外线 + 戊二醛双重交联法构建的胶原膜, 可作为体外真皮支架替代物。

**【关键词】** 胶原; 戊二醛; 紫外线; 成纤维细胞; 共同培养技术



Construction of dermal skeleton by double cross-linking with glutaraldehyde and ultraviolet radiation GU Hua, HE Li, LIU Ling, JIN Yi-chao. Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, P. R. China

Corresponding author: HE Li, Email: heli2662@hotmail.com, Tel: 0871-5329399

**【Abstract】** Objective To investigate the effects of preemptive freezing with different temperature and cross-linking methods on the ultrastructure of collagen membrane and its influence on human fibroblast proliferation. Methods Bovine collagen type I solution in concentration of 10 g/L was preliminarily frozen at -20 ℃ or -80 ℃ for 12 hours, and lyophilized at -70 ℃ for 48 hours. The diameter of apertures in collagen membranes prepared with two different preliminary temperatures were observed by scanning electron microscope (SEM) and compared. The preliminary freezing temperature of -80 ℃ was used for the following study. The apertures of collagen membrane performed with cross-linking glutaraldehyde and ultraviolet (UV) radiation cross-linking with glutaraldehyde (double cross-linking) after preliminary freezing were also compared. The proliferation of human fibroblasts inoculated in above cross-linking collagens were assessed by MTT assay, in terms of absorption value. Results The mean diameter of apertures of collagen membrane pre-frozen at -20 ℃ was  $(172 \pm 37) \mu\text{m}$ , while that at -80 ℃ was  $(99 \pm 24) \mu\text{m}$ . The apertures of collagen membrane were reduced in size after glutaraldehyde cross-linking, while those of double cross-linking showed no change in size. There was obvious difference in absorption value of fibroblasts 8 days after seeding between above two cross-linking methods ( $1.534 \pm 0.013$  for glutaraldehyde cross-linking,  $3.778 \pm 0.010$  for double cross-linking,  $P < 0.05$ ). Conclusion The collagen membrane after preliminary freezing at -80 ℃ and double cross-linking with UV radiation and glutaraldehyde may be used as a dermal skeleton substitute.

**【Key words】** Collagen; Glutaral; Ultraviolet rays; Fibroblast; Coculture techniques

深度烧伤后尽早封闭创面是提高患者存活率的关键因素之一。由于大面积深度烧伤存在自体皮严重不足, 异体或异种皮移植又面临排斥反应和潜在的感染风险, 因此运用组织工程技术研制皮肤替代物具有临床实用性。研究显示, 以胶原为主要原料构建的真皮支架植入细胞后可成为永久性真皮替代

物<sup>[1]</sup>, 但以往的方法尚不能同时满足真皮支架应具备的低降解率、高机械性能和适于细胞增殖等要求<sup>[2]</sup>。本研究拟比较不同制备法对胶原支架超微结构的影响及成纤维细胞在其中的增殖情况, 为进一步研制组织工程皮肤奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源及主要设备

牛肌腱 I 型胶原 (C9791) 购自美国 Sigma 公司, 0.5 mol/L 醋酸购自上海化学试剂公司。真空干燥

作者单位: 650031 昆明医学院第一附属医院皮肤科 (顾华、何黎、刘玲); 昆明医学院病理学教研室 (金以超)

通讯作者: 何黎, Email: heli2662@hotmail.com; 电话: 0871-5329399

机购自陕西省太康科技有限公司,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱 (LH-002-TY6911 型) 购自日本三洋公司, 扫描电镜 (Jem 100CX-II 型) 购自日本电子株式会社。

## 1.2 方法

**1.2.1 不同预冻温度胶原膜的制备** 将 1 g 牛 I 型胶原粉末在 100 mL 0.5 mol/L 的醋酸溶液中充分溶解,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下  $2500 \times g$  离心 1 h, 分别取 1 mL 放入 2 个  $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$  培养皿中, 置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  及  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱过夜。将预冻后的胶原迅速转入  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻干燥 48 h 成膜, 备用。重复上述操作 3 次, 样本统一用于以下实验。

**1.2.2 胶原膜的交联** (1) 戊二醛交联膜。将不同预冻温度制备的冻干胶原膜直接浸泡于体积分数 0.25% 的戊二醛溶液中, 于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下交联 24 h。(2) 双重交联膜。紫外线的强度为  $7.11\text{ mW}/\text{cm}^2$ , 能量为  $12.8\text{ J}/\text{cm}^2$ 。将不同预冻温度冻干胶原膜先置于锡纸上放入紫外线交联仪 (2400 型, 加拿大 Stratagene Cloning Systems 公司) 交联 30 min, 翻转胶原膜重复交联 30 min, 再浸泡于体积分数 0.25% 戊二醛溶液中  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下交联 24 h。

**1.2.3 成纤维细胞的分离及培养** 将经 dispase 酶消化后揭去表皮的真皮组织剪碎, 采用含体积分数 15% 小牛血清的 DMEM 培养液进行成纤维细胞原代培养, 当细胞逐渐增多至培养瓶底面积的 80% 时传代, 常规培养。本实验采用第 3~8 代成纤维细胞。

**1.2.4 构建含细胞真皮支架** 将不同交联方法制备的胶原膜浸泡于含体积分数 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 置入  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育 2 h, 使胶原膜达无水流动状态。在其表面滴加成纤维细胞悬液, 接种密度为  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ , 常规培养过夜。次日缓慢加入上述培养液 20 mL 继续培养, 使其成为含细胞真皮支架。

## 1.3 观察指标

**1.3.1 形态学观察** (1) 比较所制 2 种胶原膜外观。(2) 利用扫描电镜观察不同预冻温度及不同方法交联后的胶原膜, 用电脑图像分析软件测量其内部孔径, 根据结果选取适宜温度下预冻的孔径较小的胶原膜进行后续实验。(3) 已接种成纤维细胞的 2 种不同方法交联的胶原膜于培养后第 7 天取样, 经常规切片, 于光学显微镜下 (HE 染色) 及扫描电镜下观察细胞生长情况。

**1.3.2 细胞活力检测** 将已接种成纤维细胞的 2 种胶原膜于培养后第 2、5、8 天取样, 用噻唑蓝 (MTT) 法在酶标仪上 (波长  $570\text{ nm}$ ) 测量其吸光度值。

## 1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 14.0 软件进行统计学处理, 采用配对  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 胶原膜外观

冻干后的胶原膜表面呈天鹅绒状, 有比较规则的小孔隙, 出气面可见大小不等、形状不规则的裂隙。戊二醛交联膜脆性较大, 吸水后不易膨胀。双重交联膜吸水性强, 柔韧性好, 不易破碎。

### 2.2 扫描电镜观察结果

**2.2.1 不同温度预冻胶原膜观察结果** 经不同温度预冻过夜再冷冻干燥形成的胶原膜, 胶原纤维相互连接成多孔网状结构, 网孔大小基本一致。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冻胶原膜的内部孔径为  $107.2 \sim 205.1\text{ }\mu\text{m}$  [ $(172 \pm 37)\text{ }\mu\text{m}$ ], 见图 1。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冻胶原膜的孔径为  $62.2 \sim 133.6\text{ }\mu\text{m}$  [ $(99 \pm 24)\text{ }\mu\text{m}$ ], 与前者比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。后续实验统一采用  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  为预冻温度制备胶原膜。



图 1  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冻胶原膜 扫描电镜  $\times 100$

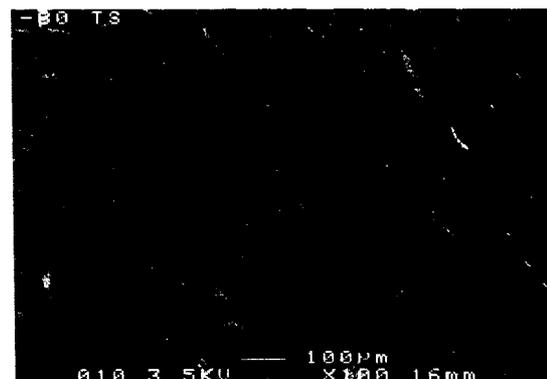


图 2  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冻胶原膜 扫描电镜  $\times 100$

**2.2.2 不同交联方法的观察结果**  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冻胶原膜经戊二醛交联后, 内部孔径明显缩小介于  $2.6 \sim 13.4\text{ }\mu\text{m}$  [ $(7 \pm 4)\text{ }\mu\text{m}$ ], 大小不一, 与交联前比



