

多孔丝素材料组织相容性的初步研究**☆

陆艳¹, 赵霞¹, 邵正中², 曹正兵², 蔡丽慧¹

A preliminary study on the histocompatibility of silk fibroin

Lu Yan¹, Zhao Xia¹, Shao Zheng-zhong², Cao Zheng-bing², Cai Li-hui¹

Abstract

¹Department of Otorhinolaryngology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; ²Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

Lu Yan☆, Doctor, Attending physician, Department of Otorhinolaryngology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China
luyan77@yahoo.com.cn

Correspondence to: Zhao Xia, Doctor, Professor, Department of Otorhinolaryngology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China
zhaoxiaabc@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30772400*; the Start-up Fund for Excellent Young Talents of Shanghai Medical College, No. 09L-12*

Received: 2011-02-15
Accepted: 2011-04-22

¹复旦大学附属华山医院耳鼻喉-头颈外科, 上海市 200040; ²复旦大学高分子系, 上海市 200433

陆艳☆, 女, 1977年生, 上海市人, 汉族, 2005年复旦大学临床医学专业毕业, 博士, 主治医师, 主要从事耳鼻喉科临床日常工作, 并参与科室教学及科研工作。
luyan77@yahoo.com.cn

通讯作者: 赵霞, 博士, 教授, 复旦大学附属华山医院耳鼻喉-头颈外科, 上海市 200040
zhaoxiaabc@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)34-06364-04

收稿日期: 2011-02-15
修回日期: 2011-04-22
(20101115019/M·W)

BACKGROUND: As one kind of naturally occurring polymers, silk fibroin has been widely used in tissue engineering research, which can be made into different forms for application. Scientists find many difficulties in histocompatibility study of silk fibroin, because it is made of protein and biodegradable. And there are few reports on the study on histocompatibility of silk fibroin.
OBJECTIVE: To perform a preliminary *in vivo* study on the histocompatibility of silk fibroin.
METHODS: Porous silk fibroin scaffolds were buried into the subcutaneous part of the back of SD rats. At 4, 6, 8 weeks after operation, general observation and histological examination were performed.
RESULTS AND CONCLUSION: The wounds healed up well after operation. Only thin connective tissue wrap was found on silk fibroin scaffold. Macrophages were observed in tissue section, and fibroblasts and capillary vessels could grow into the pore spaces. We found the border of the scaffolds break down at 8 weeks postoperatively, while the inside part remained as it was. Porous silk fibroin scaffold shows good histocytes attachment and has good histocompatibility. More study should be made on the mechanism and product of degradation *in vivo*.

Lu Y, Zhao X, Shao ZZ, Cao ZB, Cai LH. A preliminary study on the histocompatibility of silk fibroin. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(34): 6364-6367. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 丝素蛋白支架材料被植入生物体内后会发生降解且无法完全与宿主组织分离, 这类材料生物相容性的研究大多为体外实验, 其体内的组织相容性和降解过程的研究结果仍不充分。

目的: 初步观察多孔丝素材料的体内组织相容性。

方法: 将多孔丝素支架埋藏于SD大鼠背部皮下, 术后2, 4, 6, 8周分别取材, 对伤口局部及材料情况大体观察, 然后材料切片苏木精-伊红染色行组织学观察。

结果与结论: 动物伤口愈合良好, 多孔丝素表面形成极薄的纤维包裹, 周围组织反应轻微。组织切片见炎细胞浸润, 以巨噬细胞为主, 支架材料边缘孔隙内有成纤维细胞和毛细血管长入。8周时材料边缘部分可见支架结构崩解现象, 而材料内部变化不大。结果显示组织细胞可以沿多孔丝素支架表面贴附生长, 提示支架材料具有较好的组织相容性。

关键词: 丝素蛋白; 多孔支架; 组织工程; 组织相容性; 体内实验

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.34.023

陆艳, 赵霞, 邵正中, 曹正兵, 蔡丽慧. 多孔丝素材料组织相容性的初步研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(34):6364-6367. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

丝素来源方便, 性能优异, 且易于制备成不同形态, 在近10年来逐渐受到组织工程学者的青睐。

由其调控制备形成的不同孔径、孔隙率丝素蛋白多孔支架可以适应不同组织细胞修复需求, 且多孔隙的结构有利于支架内外营养物质的交换。

但这类支架由蛋白质构成, 植入生物体内后会发生降解且无法完全与宿主组织分离, 因而其体内的组织相容性实验研究仍存在不少困难。实验将多孔支架材料制成片状埋藏于大鼠体内, 以初步了解多孔丝素在动物体内组织反应过程, 探讨其做为组织工程支架材料的价值。

1 材料和方法

设计: 形态学描述, 自身对照实验。

时间及地点: 实验于2008-11/2009-03在华山医院手外科实验室完成。

材料:

实验动物: 健康雌性Sprague-Dawley大鼠(SD大鼠)8只, 体质量220~250 g, 由复旦大学医学院实验动物部提供。

主要材料和仪器:

主要材料和仪器	来源
多孔丝素支架	复旦大学高分子系自行制备
1%硫喷妥钠	上海新亚药业有限公司
SMOIF SXP-1手术显微镜	上海医疗器械股份有限公司
LEICA DM IRB 光学显微镜	徕卡仪器有限公司

实验方法:

多孔丝素支架制备方法: 将废桑蚕生丝脱胶, 并将脱胶丝溶于LiBr水溶液中, 过滤, 浓缩后制成大约20%浓度的丝素蛋白溶液。按2:1的体积比率加入正丁醇, 低速搅拌后把丝素蛋白和正丁醇混合溶液灌入自备模具中, 经过冷冻干燥后即获得白色多孔支架。支架平均孔径为10~20 μm。

材料准备: 将已制备的多孔丝素支架(厚约1 mm)剪成1 cm×1 cm方形, 以体积分数为75%乙醇浸泡0.5 h, 然后再置入0.9% NaCl溶液浸泡超过24 h备用。

手术方法: 动物右侧背部脱毛。1%硫喷妥钠(5 mL/kg)腹腔注射麻醉后, 以安尔碘消毒局部皮肤。纵行切开颈下背部皮肤, 钝性分离, 将多孔丝素膜埋藏于皮下。缝合切口, 分笼饲养。

组织学检查: 术后2, 4, 6, 8周以大剂量硫喷妥钠腹腔注射处死动物各2只, 大体观察伤口局部、材料情况, 切取标本, 以中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 横断切片, 行苏木精-伊红染色, 光镜下观察。

主要观察指标: ①大体观察: 材料植入后动物恢复状况、生活习性改变, 伤口局部有无炎症反应, 及局部愈合情况; 取材时创面局部愈合状况、周围组织有无明显炎症反应, 材料表面有无纤维包裹, 周围组织有无反应性肉芽生成; 取材时材料外观形态变化。②苏木精-伊红染色组织学检查: 观察不同时间点组织纤维化反应、炎性细胞类型、支架崩解情况、是否存在组织坏死, 材料内有无组织长入。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 参加实验SD大鼠8只, 均进入结果分析, 中途无脱落。

2.2 大体观察 见表1。

表1 大体观察结果
Table 1 General observation

Time (wk)	Section number	Inflammatory reaction	Fbrous encapsulation	Granulation formation
2	2	Slight	Yes	No
4	2	Slight	Yes	No
6	2	Slight	Yes	No

动物苏醒后恢复良好, 局部伤口无红肿感染征象, 未发现明显全身反应, 进食睡眠等行为无明显异常。可见背部试样植入局部轻微隆起, 隐约可触及。不同时间取材时见局部皮肤伤口均愈合良好, 未发现周围皮肤、肌肉组织有明显充血、渗液或脓性渗出等征象, 见图1。可见丝素膜表面被一层菲薄、半透明的纤维膜包裹, 其形态、外观与植入前无明显变化, 周围组织炎症反应轻微, 未见明显肉芽形成, 见图2。



Figure 1 The wound healed up well while taking samples
图1 取材时见植入创面局部外观愈合良好

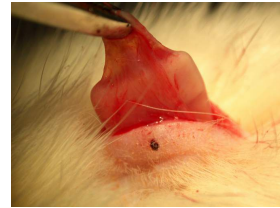


Figure 2 Thin connective tissue wrap could be found on the scaffold, and the inflammatory reaction surrounding the tissue was slight
图2 取出时见丝素支架表面被一层菲薄、半透明的纤维膜包裹, 周围组织炎症反应轻微

2.3 苏木精-伊红染色镜检结果 见表2。

表2 组织病理学观察结果
Table 2 Histopathology observation

Time (wk)	Section number	Fibration	Inflammatory cell type
2	2	Yes	Lymphocyte and macrophage
4	2	Yes	Lymphocyte and macrophage
6	2	Yes	Lymphocyte and macrophage
8	2	Yes	Mostly macrophage

Time (wk)	Disaggregation	Tissue necrosis	Tissue ingrowth
2	No	No	Yes
4	Yes	No	Yes
6	Yes	No	Yes
8	Yes	No	Yes

2周: 见丝素支架嗜伊红染色, 表面不规则, 内部有大小不等的孔隙。材料表面发现有成纤维细胞贴壁生长, 周围组织呈增生性改变, 可见炎性细胞浸润, 以淋巴细胞和巨噬细胞为主, 见图3, 4, 未发现组织坏死征象。

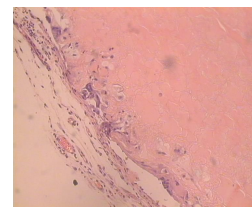


Figure 3 Fibroblast grows adherently on the surface of the material at 2 wk after operation. The surrounding tissue hyperplasticly changes, inflammatory cell infiltrate is visible, most of which are lymphocytes and macrophages. No signs of tissue necrosis are found (×200)

图3 植入2周时材料表面发现有成纤维细胞贴壁生长, 周围组织呈增生性改变, 可见炎性细胞浸润, 以淋巴细胞和巨噬细胞为主, 周围组织未见坏死征象(×200)

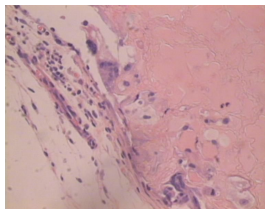


Figure 4 Fibroin scaffold is eosinophilic staining. The surface is not regular while there are big or small pores inside. Fibroblasts grow adherently on the surface of the material. Inflammatory cell infiltrate is visible, most of which are lymphocytes and macrophages (×400)

图4 植入2周时见丝素支架嗜伊红染色, 表面不规则, 内部有大小不等的孔隙。未发现明显崩解等变化。材料表面发现有成纤维细胞贴壁生长, 炎性细胞浸润, 以淋巴细胞和巨噬细胞为主(×400)

4周: 见材料内部部分区域嗜伊红染色消失, 支架结构有崩解现象, 但大体结构仍保持, 见图5。

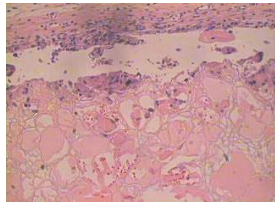


Figure 5 There is few parts with eosinophilic staining inside the material disappears at 4 wk after operation, which shows disaggregation phenomenon, while its general structure remains (×200)

图5 植入4周时材料内部个别区域嗜伊红染色消失, 支架结构有崩解现象, 但大体结构仍保持(×200)

成纤维细胞沿着材料表面及孔隙内生长, 有淋巴细胞和巨噬细胞浸润, 血管增生, 材料内部也可见新生毛细血管, 见图6, 未发现组织坏死征象。

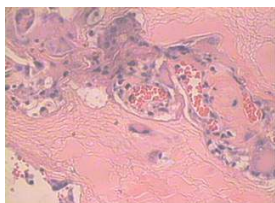


Figure 6 Fibroblasts grow along the surface of the scaffold or into the pores. There are lymphocytes and macrophages infiltrate. Vessel hyperplasia is visible, while new capillary vessel inside the material is obvious. No sign of tissue necrosis is found (×400)

图6 成纤维细胞沿着材料表面及孔隙内生长, 有淋巴细胞和巨噬细胞浸润, 血管增生, 材料内部也可见新生毛细血管, 未发现组织坏死征象(×400)

6周: 从材料内部结构来看并未发生很大变化。周围炎性细胞浸润, 淋巴细胞及巨噬细胞均存在, 与4周时比较无明显差别, 成纤维细胞等组织细胞逐渐深入材料内部生长, 见图7, 8, 未发现组织坏死征象。

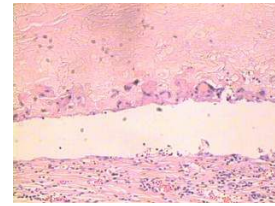


Figure 7 Inflammatory cell infiltrate is visible at 6 wk after operation. Histocytes gradually grow deep into the scaffold. No sign of tissue necrosis is found (×200)

图7 植入6周时材料周围炎性细胞浸润, 成纤维细胞等组织细胞逐渐深入材料内部生长, 未发现组织坏死征象(×200)

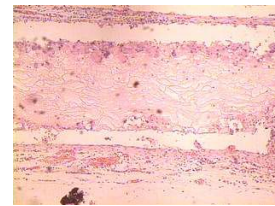


Figure 8 There are a few parts with eosinophilic staining inside the material disappears at 6 wk postoperatively, which shows disaggregation phenomenon, while its general structure remains (×200)

图8 植入6周时材料内部结构部分区域嗜伊红染色消失, 支架结构有崩解现象, 但大体结构与4周相比仍保持而未发生很大变化(×200)

8周: 材料边缘部分区域支架结构崩解现象较前明显, 出现较大孔隙, 但内部变化不大。组织细胞进一步长入材料, 炎细胞浸润以巨噬细胞为主, 血管增生减少, 但组织增生现象仍较明显, 见图9, 10, 未发现组织坏死征象。

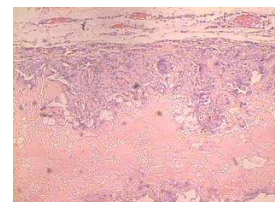


Figure 9 Histocytes grow more deeply into the scaffold. Inflammatory cell infiltrate is visible, most of which are macrophages. Vessel hyperplasia reduces inside the tissue, while hyperplasia still obvious. No sign of tissue necrosis is found (×200)

图9 组织细胞进一步长入材料, 炎细胞浸润以巨噬细胞为主, 血管增生减少, 但组织增生现象仍较明显, 未发现组织坏死征象(×200)

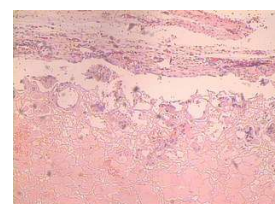


Figure 10 The border of the scaffold break down at some part at 8 wk postoperatively, while the inside part remained as it was (×200)

图10 材料边缘部分区域支架结构崩解现象较前明显, 出现较大孔隙, 但内部变化不大(×200)

3 讨论

众所周知,蚕丝制作的非吸收缝线在医学领域应用已有多年历史。随着组织工程技术的进步,科学家们从蚕丝中提取出天然高分子材料——丝素,并将其制备成各种形态应用于组织工程的各个领域^[1-2]。体外实验表明丝素蛋白是可被生物降解的,而且可以通过改变理化构象来调节其降解速度和程度^[3-5]。降解产物主要为游离氨基酸等,经研究其本身不仅对组织无毒副作用,还对如皮肤、牙周组织有营养与修复的能力,对肝脏功能的恢复亦颇有特色。丝素蛋白制成的多孔支架,可以调控形成不同孔径、孔隙率,适应不同组织细胞修复需求,且多孔隙的结构有利于支架内外营养物质的交换。

丝素蛋白支架材料被植入生物体内后会发生降解且无法完全与宿主组织分离,因而目前这类材料生物相容性研究更多局限于体外实验^[6-15],同时对丝素蛋白多孔支架体内的组织相容性和降解过程的研究结果仍不充分^[6]。实验将多孔丝素蛋白支架制成片状埋藏于大鼠体内,尝试了解多孔丝素在动物体内组织反应过程。一般而言,即便生物材料生物相容性再好,但植入体内后仍然会被看作异物,因此材料周围必然存在异物反应。而异物反应的强度和范围与生物相容性和生物降解性有着密切的关系。所以选择纤维包膜的形成、肉芽增生、炎细胞浸润及类型、周围组织的长入、是否存在组织坏死等方面来评价材料植入后局部反应,同时以材料外形变化、内部是否有崩解现象,材料与周围组织关系变化等来评价材料植入后改变。

作者在实验中修剪多孔丝素支架时发现,湿态的多孔丝素支架质地柔软,易于修剪成各种形状满足植入需要。取材时植入材料周围组织反应轻微,且材料表面有半透明纤维膜包裹。多孔丝素支架经苏木精-伊红染色呈嗜伊红色,表面形态不规则,内有大小不等的腔隙,材料周围表现出以淋巴细胞及巨噬细胞为主的慢性炎症反应过程,并且在周围有纤维囊壁形成。自2周开始即可在靠近材料边缘的腔隙内发现新生毛细血管长入,并可见成纤维细胞紧贴材料的不规则表面沿腔隙向内部生长,这种现象随着植入时间延长变得愈加明显,说明多孔丝素具有良好的表面性能,有利于间质细胞贴附生长。此外,由于支架的多孔隙结构使得材料具有一定通透性,有利于支架内外物质的营养代谢物质交换,可能也是造成组织长入明显的原因之一,而这也都是有利于组织修复的重要因素。

由于丝素支架由蛋白质构成,故而未能以常规方式对取材后支架结构进行定量测定,而仅仅以组织病理学观察为主。在有限的8周实验观察期中,自4周起发现支架崩解现象,但直到8周时支架内部结构仍未出现明显变化,可见在进一步实验观察中需要更好地设定观察周期以期了解丝素多孔支架的体内降解行为。而且,由于样

本数量不足,未能对支架周围炎性细胞数量、类型等进行有效统计。此外,根据不同组织修复的需求,对多孔支架的孔径、孔隙率也有着不同的要求,而这些又会对组织反应、修复及材料降解带来何种影响,也是在进一步实验中需要仔细考虑的问题。

4 参考文献

- [1] Liang JW,Wu JL,Wang WX,Fangzhi Keji Jinzhan. 2010(5):24-27.51. 梁继文,吴桂林,王维杏.天然蚕丝及再生蚕丝作为生物材料的应用[J].纺织科技进展,2010(5):24-27,51.
- [2] Murphy AR, Kaplan DL. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. J Mater Chem. 2009;19(36): 6443-6450.
- [3] Horan RL, Antle K, Collette AL, et al. In vitro degradation of silk fibroin. Biomaterials. 2005;26(17):3385-3393.
- [4] Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. Int J Mol Sci. 2009;10(4):1514-1524.
- [5] Wang Y, Rudym DD, Walsh A, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. Biomaterials. 2008;29(24-25): 3415-3428.
- [6] Tang X, Ding F, Yang Y, et al. Evaluation on in vitro biocompatibility of silk fibroin-based biomaterials with primarily cultured hippocampal neurons. J Biomed Mater Res A. 2009;91(1):166-174.
- [7] Ma L, Wang H, Li YJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Lincuang Kangfu. 2007;11(40):8021-8024. 马亮,王洪,李艳军,等.三维丝素支架材料制备及其与骨髓间充质干细胞的生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(40):8021-8024.
- [8] Yan T, Zhang MC, Guoji Yanke Zazhi. 2008;8(8):1557-1559. 闫涛,张明昌.组织工程角膜支架材料再生丝素膜的生物相容性[J].国际眼科杂志,2008,8(8):1557-1559.
- [9] Qian YQ, Shen YX, Lu ZF, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi. 2009;23(11):1365-1370. 钱玉强,沈忆新,陆政峰,等.嗅鞘细胞与丝素蛋白纳米纤维生物相容性研究[J].中国修复重建外科杂志,2009,23(11):1365-1370.
- [10] Ghanaati S, Orth C, Unger RE, et al. Fine-tuning scaffolds for tissue regeneration: effects of formic acid processing on tissue reaction to silk fibroin. J Tissue Eng Regen Med. 2010;4(6):464-472.
- [11] Etienne O, Schneider A, Kluge JA, et al. Soft tissue augmentation using silk gels: an in vitro and in vivo study. J Periodontol. 2009;80(11):1852-1858.
- [12] Mandal BB, Das T, Kundu SC. Non-bioengineered silk gland fibroin micromolded matrices to study cell-surface interactions. Biomed Microdevices. 2009;11(2):467-476.
- [13] Mandal BB, Kundu SC. Non-bioengineered silk fibroin protein 3D scaffolds for potential biotechnological and tissue engineering applications. Macromol Biosci. 2008;8(9):807-818.
- [14] Acharya C, Ghosh SK, Kundu SC. Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion. J Mater Sci Mater Med. 2008;19(8):2827-2836.
- [15] Yang Y, Chen X, Ding F, et al. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. Biomaterials. 2007;28(9):1643-1652.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(30772400); 上海医学院青年骨干科研启动基金(09L-12)(B类)(部分资助)。

作者贡献: 由赵霞、陆艳完成实验设计,陆艳、曹正兵、蔡丽慧负责实验实施,实验评估为赵霞、陆艳、邵正中。陆艳完成收集资料及撰写成文,赵霞教授审核,陆艳、赵霞教授(作为通讯作者)对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 丝素蛋白支架植入体内后无法彻底与周围组织分离,因而其体内生物相容性研究在国内外均甚少报道。本课题尝试通过体内埋藏实验观察丝素蛋白在生物体内组织及材料反应过程,了解多孔丝素支架在生物体内的组织相容性,为丝素蛋白支架在组织工程领域的应用提供一定参考信息。