

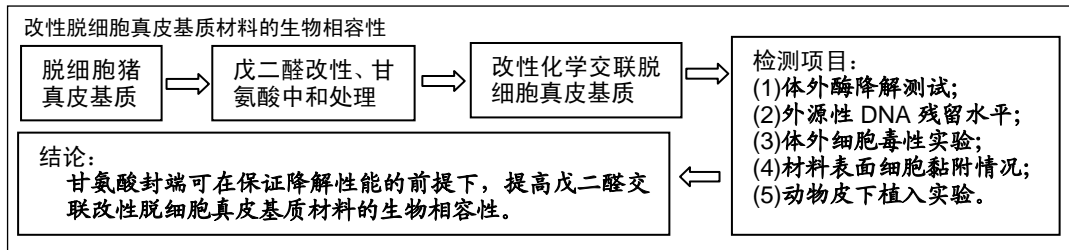
# 改性化学交联脱细胞真皮基质材料的生物相容性

李丽花<sup>1</sup>, 熊健<sup>2</sup>, 曹苹<sup>3</sup>, 钟梅玲<sup>1</sup>, 朱勇军<sup>1</sup>, 徐炜区<sup>3</sup>, 康文亭<sup>1</sup>, 余振定<sup>1</sup>, 谭荣伟<sup>1</sup> (<sup>1</sup>深圳兰度生物材料有限公司, 广东省深圳市 518107; <sup>2</sup>荆州中心医院骨科三病区, 湖北省荆州市 434000; <sup>3</sup>深圳市医疗器械检测中心, 广东省深圳市 518057)

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.1361

ORCID: 0000-0001-5999-2954(熊健)

文章快速阅读:



文题释义:

**脱细胞真皮基质:** 是去除了真皮中具有抗原性的细胞成分, 而保留了原有胶原纤维结构的真皮支架。脱细胞真皮基质的免疫活性较低, 不会诱发宿主组织的排斥反应, 能够为组织细胞提供一个良好的支架结构。

**戊二醛:** 是一种简单高效且应用广泛的交联剂, 具有活性高、反应快等优点, 但其本身具有较大的细胞毒性。

**甘氨酸:** 是人体内一种重要的非必需氨基酸, 对人体无毒副作用, 甘氨酸的氨基能与戊二醛的醛基反应生成席夫碱, 是有效的戊二醛中和剂。

摘要

**背景:** 脱细胞真皮基质存在降解速率较快且不可调控、力学性能不佳等天然材料固有的缺点, 对其进行戊二醛交联改性是常用到的改善措施, 然而戊二醛本身具有较大的细胞毒性, 会影响脱细胞真皮基质的生物相容性。

**目的:** 利用甘氨酸中和封闭戊二醛分子中未参与反应的醛基, 改善脱细胞真皮基质材料的生物相容性。

**方法:** 对脱细胞猪真皮基质依次进行戊二醛改性、甘氨酸中和处理, 作为实验组, 以单纯戊二醛改性的脱细胞真皮基质为对照, 利用DNA试剂盒检测实验组样品的DNA残留量。将未交联脱细胞猪真皮基质与实验组、对照组样品浸泡于胶原酶溶液中, 观察材料降解情况。分别以细胞培养基、高密度聚乙烯材料浸提液、实验组样品浸提液与对照组样品浸提液培养小鼠成纤维细胞, 培养24 h后, 采用MTT法检测细胞增殖率。将小鼠成骨细胞分别接种到实验组与对照组样品膜表面, 培养7 d后, 共聚焦显微镜下观察细胞状态。将实验组与对照组样品膜片分别植入新西兰兔(深圳市医疗器械检测中心提供)皮下, 2周后取试样及其周围组织, 进行苏木精-伊红染色观察。动物实验经深圳市医疗器械检测中心伦理委员会审批。

**结果与结论:** ①实验组样品DNA残留量为(3.12±0.7) μg/g; ②酶解8 h, 实验组与对照组的失重率无显著差异, 为18%~21%, 未进行戊二醛交联脱细胞猪真皮基质的失重率为100%; ③实验组与对照组样品浸提液中小鼠成纤维细胞的增殖率分别为98.1%, 90.3%, 细胞毒性均为1级; ④实验组膜片表面的小鼠成骨细胞繁殖旺盛, 分布较为均匀, 细胞骨架铺展较为充分; 对照组膜片表面的成骨细胞数量较少且细胞团聚在一起, 细胞骨架未充分铺展; ⑤植入皮下2周后, 两组膜片的胶原纤维结构均基本完整且清晰可见, 实验组植入部位周围组织炎症反应轻微, 对照组炎症反应较为严重; ⑥结果表明, 甘氨酸封端可在保证降解性能的前提下, 提高戊二醛交联改性脱细胞真皮基质材料的生物相容性。

**关键词:**

引导骨组织再生; 屏障膜; 脱细胞真皮基质; 交联; 戊二醛; 甘氨酸; 中和; 降解性能; 生物相容性

中图分类号: R459.9; R318.08

## Biocompatibility of modified chemically cross-linked acellular dermal matrix

Li Lihua<sup>1</sup>, Xiong Jian<sup>2</sup>, Cao Ping<sup>3</sup>, Zhong Meiling<sup>1</sup>, Zhu Yongjun<sup>1</sup>, Xu Weiqu<sup>3</sup>, Kang Wenting<sup>1</sup>, She Zhending<sup>1</sup>, Tan Rongwei<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Shenzhen Lando Biomaterials Co., Ltd, Shenzhen 518107, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Third Ward of Orthopedics, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434000, Hubei Province, China; <sup>3</sup>Shenzhen Medical Device Testing Center, Shenzhen 518057, Guangdong Province, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Acellular dermal matrix has the disadvantages of natural materials such as rapid and unregulated degradation and poor mechanical properties. It is a commonly used improvement measure for glutaraldehyde cross-linking modification. However, glutaraldehyde itself has a high cytotoxicity, which affects the biocompatibility of acellular dermal matrix.

**OBJECTIVE:** To improve the biocompatibility of the glutaraldehyde cross-linked acellular dermal matrix by using glycine to neutralize remaining aldehyde groups.

李丽花, 女, 1986年生, 海南省海口市人, 汉族, 2010年武汉大学化学与分子科学学院毕业, 硕士, 工程师, 就职于深圳兰度生物材料有限公司, 主要从事生物医用材料产业化研究。

共同第一作者: 熊健, 男, 1978年生, 湖北省荆州市人, 汉族, 2014年武汉大学毕业, 在职博士, 副主任医师, 主要从事创伤修复研究。

通讯作者: 李丽花, 深圳兰度生物材料有限公司, 广东省深圳市 518107

文献标识码: B

稿件接受: 2019-03-15



Li Lihua, Master, Engineer, Shenzhen Lando Biomaterials Co., Ltd, Shenzhen 518107, Guangdong Province, China

Xiong Jian, Doctoral candidate, Associate chief physician, Third Ward of Orthopedics, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434000, Hubei Province, China

Li Lihua and Xiong Jian contributed equally to this work.

Corresponding author: Li Lihua, Shenzhen Lando Biomaterials Co., Ltd, Shenzhen 518107, Guangdong Province, China

**METHODS:** As an experimental group, the acellular porcine dermal matrix was cross-linked by glutaraldehyde and then neutralized by glycine. The control group was that acellular dermal matrix which was cross-linked by glutaraldehyde but not neutralized by glycine. The residual exogenous DNA of materials of the experimental group was detected by DNA kit. The uncrosslinked acellular porcine dermal matrix and the samples of the experimental group and control group were immersed in collagenase solution to observe degradation performance. Mouse fibroblasts were cultured in culture medium, high-density polyethylene extracts, sample extracts of the experimental group and control group, respectively. After 24 hours of culture, cell proliferation rate was determined by MTT assay. Mouse osteoblasts were seeded onto the membrane surface of the experimental group and the control group and cultured for 7 days. The cell status was observed under confocal microscope. The membrane materials of the experimental group and the control group were respectively implanted beneath the skin of New Zealand rabbits, and the samples with surrounding tissues were removed at 2 weeks later for hematoxylin-eosin staining observation.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The amount of DNA residues in samples of the experimental group was  $(3.12 \pm 0.7) \mu\text{g/g}$ . (2) After enzymolysis for 8 hours, there was no significant difference in the weight loss rate of samples between the experimental group and the control group (18%–21%), while the weight loss rate of samples without glutaraldehyde cross-linking was 100%. (3) After culture for 24 hours, the proliferation rates of fibroblasts cultured in the leaching liquor of samples in the experimental and the control groups were 98.1% and 91.3%, respectively. The results showed the level of cytotoxicity was both grade 1. (4) Osteoblasts spread evenly and multiplied vigorously on the membrane surface in the experimental group, while curled up and were few in number in the control group. (5) After membranes implanted beneath the skin of the rabbit for 2 weeks, tissues around the implant site of the experimental group showed a slight inflammatory response, while those in the control group showed severe inflammatory response. (6) These results suggest that glycine neutralizing remaining aldehyde groups could improve the biocompatibility of glutaraldehyde cross-linked acellular dermal matrix material on the premise of guaranteeing the degradation performance.

**Key words:** guided bone tissue regeneration; barrier membrane; acellular dermal matrix; cross-linking; glutaraldehyde; glycine; neutralizing; degradation performance; biocompatibility

## 0 引言 Introduction

Buser等<sup>[1]</sup>在1993年提出了引导骨组织再生的概念,引导骨组织再生技术的关键是将膜材料放置于骨缺损区与软组织之间形成物理屏障,阻止上皮组织长入骨缺损区,为骨组织再生创造相对封闭的空间<sup>[2]</sup>。引导骨组织再生屏障膜大致分为2种,一种是以聚四氟乙烯膜为代表的不可吸收屏障膜<sup>[3]</sup>;另一种是以胶原膜、聚乳酸膜为代表的可吸收屏障膜。不可吸收屏障膜具有暴露率高、并发症多等缺点<sup>[4-5]</sup>,且在骨愈合后需要行二次手术取出<sup>[6]</sup>;而可吸收屏障膜会在骨愈合过程中逐渐被人体吸收,无需另行手术取出,不仅降低了伤口感染率,还明显减轻了患者痛苦,在临床上备受青睐<sup>[7-9]</sup>。

脱细胞基质膜是可吸收引导骨组织再生屏障膜材料中研究的热点之一,其制备的特点是通过物理、化学、生物等方法去除真皮组织中具有免疫原性的细胞成分,最终只保留胶原蛋白等细胞外基质成分及其原有的三维结构<sup>[10]</sup>。胶原蛋白是细胞外基质中的主要成分,具有多种生物学优势,比如良好的组织整合能力、弱免疫原性、促进细胞生长、促进伤口愈合、利于成骨细胞黏附等<sup>[11-14]</sup>。用于制备研究脱细胞基质膜的原材料有多种,包括猪真皮、牛真皮、人尸体皮等,其中猪真皮组织来源广泛,不会涉及伦理问题,也可避免牛源性原材料所存在的疯牛病病毒传播等风险,还能提高农副产业的附加值,具有较高的研究价值及商业价值。达静姝等<sup>[15]</sup>以HUVEC脐带内皮细胞为模型探讨猪/牛脱细胞真皮基质的新生血管化作用,发现脱细胞真皮基质与商售引导组织再生产品Bio-Gide膜具有相当或更好的成血管作用。张丽娜<sup>[16]</sup>将脱细胞真皮基质应用于口腔牙种植引导骨再生取得了良好的修复效果。

目前脱细胞基质膜虽已在口腔领域得到成功应用<sup>[17-19]</sup>,但其本身仍存在天然材料固有的缺点,例如降解速率较快且不可调控、力学性能较差等<sup>[20-23]</sup>。物理交联、化学交联及生

物交联是常用来改善这些缺点的技术手段,在化学交联方法中常用的交联剂戊二醛,具有简单高效、应用广泛的特点<sup>[24-25]</sup>,但其本身具有较大的细胞毒性,在被用于脱细胞基质改性时,材料的生物相容性往往会因戊二醛分子中残留的醛基而变差<sup>[26]</sup>。此次研究选用猪真皮组织作为原材料,通过一系列处理工艺制备出脱细胞基质膜,在膜片经过戊二醛交联改性之后,再用甘氨酸中和未反应的醛基,以提升材料生物相容性,降低材料植入早期宿主机体炎症反应。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年3至10月在深圳兰度生物材料有限公司研发中心实验室(广东省医用高分子植入材料工程技术研究中心)、深圳市医疗器械检测中心完成。

1.3 材料 新鲜猪皮组织购于普通市场;高密度聚乙烯、小鼠成纤维细胞株L-929、小鼠成骨细胞MC3T3(深圳市医疗器械检测中心提供);戊二醛(分析纯)、甘氨酸(Aladdin公司);E.Z.N.A.TM Mag-Bind Tissue DNA Kit试剂盒(Omega Bio-Tec公司);胶原酶、MTT溶液(Sigma公司);MEM培养基、胎牛血清、浸提介质(Gibco公司);酶标仪(Bio-Rad公司);二氧化碳培养箱(Thermo公司)。

**实验动物:** 6月龄健康雌性新西兰大白兔3只,体质量2.0–2.5 kg,由深圳市医疗器械检测中心提供。

1.4 实验方法

1.4.1 改性交联脱细胞真皮基质材料的制备

**预处理过程:** 将猪皮清洗干净,再去掉猪皮组织的表皮角质层与皮下脂肪组织,取真皮层,切割成合适大小,备用。

**脱细胞过程:** 将已切割好的真皮组织先用胰酶和7%NaCl溶液交替处理3次,再用1%NaOH溶液浸泡12 h,然后用PBS多次浸泡清洗。

**交联与中和过程:** 将脱细胞真皮基质浸泡在0.05%戊二

醛溶液中一定时间后取出,用纯水清洗3次,再用0.1%甘氨酸溶液中和未交联的醛基,中和完后纯水清洗,最后将皮片平铺于聚四氟乙烯平板上冷冻干燥,辐照灭菌,备用。

1.4.2 去细胞化的有效性评估 为验证脱细胞过程的有效性,对材料进行苏木精-伊红染色及DNA定量分析。

**显微镜观察染色切片:**使用梯度乙醇对基质膜进行脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色观察。

**残留DNA定量检测:**利用E.Z.N.A.TM Mag-Bind Tissue DNA Kit试剂盒检测。准确称取待测样品10 mg,剪成碎片,放入1.5 mL DNase-free无菌离心管内,加20  $\mu$ L蛋白酶K缓冲液和10  $\mu$ L蛋白酶K(20 g/L),加180  $\mu$ L DEPC水,56  $^{\circ}$ C水浴中消化3 h,具体操作过程按照试剂盒内说明书进行。向96孔黑色酶标板每孔加入125  $\mu$ L上述样品液和125  $\mu$ L PicoGreen荧光染料反应液,每份样品设3个复孔,加完后振荡混匀在室温下避光反应5 min,用酶标仪测定DNA荧光强度,测试条件:以480 nm为激发波长,520 nm为发射波长,530 nm为截止波长。用DNA标准样稀释成相应浓度做标准曲线,同时用DNA标准样模拟样品DNA提取过程作回收曲线。

1.4.3 体外降解实验 取未交联脱细胞真皮基质、单纯戊二醛交联脱细胞真皮基质与改性交联脱细胞真皮基质,将样品裁剪成2.5 cm $\times$ 2.5 cm大小,精确称量( $m_0$ )后放置于50 mL离心管中,加入15 mL浓度为80 U/mL的胶原酶溶液,使样品完全浸没,然后将离心管放置在37  $^{\circ}$ C 30 r/min的摇床中,到预设时间点(4, 8, 12, 24 h)后取出样品,去离子水清洗3遍后,冷冻干燥,称质量( $m_t$ ),计算样品失重率= $(m_0 - m_t)/m_0 \times 100\%$ 。

1.4.4 体外细胞毒性测 依据国家标准GB/T 16886.5-2017规定的方法进行样品的体外细胞毒性检测。

**样品浸提液制备:**无菌操作下取已经过辐照灭菌的改性交联脱细胞真皮基质,裁成2.5 cm $\times$ 2.5 cm大小,每片均匀剪成三四小片,按照3 cm $^2$ /mL的比例加入含血清培养基浸提介质,用15 mL离心管置于37  $^{\circ}$ C摇床100 r/min振荡浸提24 h。

**样品浸提液培养小鼠成纤维细胞:**取已培养至对数生长长期的小鼠成纤维细胞株L-929,用胰蛋白酶消化混匀后取20  $\mu$ L,立即用细胞计数仪计数,并根据实际测量的细胞密度加入适量细胞培养液,稀释成实验所细胞浓度约为 $1 \times 10^8$  L $^{-1}$ 的悬液,将细胞悬液接种至96孔板中,每孔100  $\mu$ L,于37  $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中培养24 h后,分4组培养,每组6个复孔:弃去原培养液,实验组每孔加入100  $\mu$ L改性交联脱细胞真皮基质浸提液,对照组加入100  $\mu$ L单纯戊二醛交联脱细胞真皮基质浸提液,阴性对照组每孔加入100  $\mu$ L高密度聚乙烯浸提液,空白对照组加入100  $\mu$ L含血清培养基浸提介质,于37  $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱继续培养24 h。高密度聚乙烯按0.2 g/mL的比例,与基质膜样品相同的方法浸提,并用0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌。

**MTT法检测细胞毒性:**将上述96孔板中的浸提液吸掉,每孔加入新鲜配置的MTT溶液50  $\mu$ L,继续培养2 h;小心去除孔内液体,加入100  $\mu$ L异丙醇后37  $^{\circ}$ C震荡培养10 min,使用荧光酶标仪570 nm和650 nm波长测定吸光度。细胞相对增殖率=实验组吸光度 $\div$ 空白对照组吸光度 $\times 100\%$ ,细胞增殖率与细胞毒性级别之间的对应关系见表1。实验重复3次。

表1 细胞毒性级别评价标准  
Table 1 Evaluation criteria for cytotoxicity grades

细胞相对增殖率	细胞毒性级别	细胞增殖能力
$\geq 100\%$	0级	优
$\geq 80\%$	1级	优
$\geq 50\%$	2级	良好
$\geq 25\%$	3级	一般
$\geq 1\%$	4级	差

1.4.5 膜表面细胞黏附实验

**膜表面接种MC3T3小鼠成骨细胞:**取单纯戊二醛交联脱细胞真皮基质膜与改性交联脱细胞真皮基质膜,裁剪成直径为1 cm的圆形,置于24孔板中,每孔缓慢滴加500  $\mu$ L小鼠成骨细胞MC3T3悬浮液于膜表面,使每个膜样品上接种 $1 \times 10^4$ 个细胞,在37  $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中培养。

**取样染色观察:**细胞在材料表面培养7 d后取样,先用37  $^{\circ}$ C温水浴的PBS轻柔地清洗2次,每次5 min,再固定于甲醛溶液中20 min,4  $^{\circ}$ C保存;待样品固定好,用PBS洗去固定液2次,每次10 min;0.1%Triton处理10 min,1%BSA封闭30 min,5 mg/L罗丹明-鬼笔环肽室温染色30-60 min,PBS清洗2次,每次10 min;DAPI染10 min,PBS清洗2次,每次10 min,吸去多余液体,加荧光封固液,共聚焦显微镜下观察。实验重复2次,每次每组设3个平行。

1.4.6 皮下植入实验 取3只健康的新西兰大白兔,麻醉后对其皮肤进行常规消毒,沿兔脊柱正中线两侧距脊柱约2 cm处进行皮下植入,植入量为1片/位点,每侧3个位点,实验组植入改性交联脱细胞真皮基质膜,对照组植入单纯戊二醛交联脱细胞真皮基质膜,实验组与对照组各占一侧。植入后缝合各层组织,关闭皮肤,将实验兔饲养在不锈钢笼舍,室温控制在19-23  $^{\circ}$ C。植入2周后处死实验兔,沿脊柱作纵向切口,打开皮肤充分暴露样品植入部位,取试样及其周围组织,置于体积分数10%甲醛中固定24 h后,使用梯度乙醇对切好的组织块进行脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色观察。动物实验经深圳市医疗器械检测中心伦理委员会审批。

1.5 主要观察指标 改性交联脱细胞真皮基质的外源性DNA残留水平、体外降解速率、细胞毒性、细胞黏附及动物体内组织相容性。

1.6 统计学分析 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 去细胞化的有效性** 动物源医用生物材料中的细胞物质, 会引起宿主机体的炎症反应及刺激性免疫反应, 因此需要保证材料在制备时细胞被有效脱除<sup>[27]</sup>。将脱细胞处理前后的膜片分别进行苏木精-伊红染色, 观察细胞残留状况, 见**图1**: 未经脱细胞处理的猪真皮基质内可看到数量较多且完整的细胞核, 而经过脱细胞处理的猪真皮基质内未见细胞物质残留。

利用荧光染色法定量检测脱细胞真皮基质中的DNA残留量为(3.12±0.7) μg/g, 与商售脱细胞产品Bio-Gide中的DNA残留量(6.26±1.2) μg/g相比差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见**图2**, 满足文献中建议的阈值 $< 50 \mu\text{g/g}$ <sup>[28]</sup>。上述检测结果表明脱细胞猪真皮基质中的细胞物质已基本上被完全脱除, 可确保材料的低免疫原性。

**2.2 体外降解速率实验结果** 各膜片样品的体外酶降解速率, 见**图3**: 酶解4 h时, 未交联脱细胞真皮基质(曲线a)膜片的失重率达86%, 单纯戊二醛交联脱细胞真皮基质(曲线b)与改性交联脱细胞真皮基质膜片(曲线c)的失重率只有14%~17%; 酶解8 h时, 未交联膜片已完全降解, 失重率达100%, 而两交联膜片仍保持完整的形状, 失重率为18%~21%。在各时间点, 交联脱细胞真皮基质与两交联脱细胞真皮基质的失重率比较差异有显著性意义( $P$ 均 $< 0.01$ ), 两交联脱细胞真皮基质的失重率比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。可见经戊二醛交联改性后脱细胞基质的抗降解能力明显提升, 同时利用甘氨酸中和封闭裸露醛基不会对戊二醛交联带来的降解优势造成影响。

**2.3 体外细胞毒性实验结果** 小鼠成纤维细胞L929在各材料浸提液中培养24 h后的生长状态, 见**图4**, 3组细胞的生长状态相近无明显差异, 细胞均贴壁生长, 伸展良好, 大多数呈梭型, 细胞之间排列紧密, 显示出良好的生长状态。

阴性对照组、实验组、对照组的细胞增殖率分别为105.1%, 97.4%, 89.3%, 见**表2**, 甘氨酸中和前后膜片的浸提液均没有明显细胞毒性, 对细胞增殖能力均没有显著影响, 但对比之下, 利用甘氨酸封端膜片的浸提液中细胞增殖率更高, 表现出更优的细胞相容性。

表2 不同材料浸提液的细胞毒性

Table 2 Cytotoxicity grading of different material leaching solutions

组别	细胞增殖率平均值(%)			细胞增殖率平均值( $\bar{x} \pm s$ , %)	毒性等级
	第1次实验	第2次实验	第3次实验		
阴性对照组	105.1	97.0	109.0	103.7±6.1	0级
实验组	97.4	97.3	99.6	98.1±1.3 <sup>a</sup>	1级
对照组	89.3	95.1	86.5	90.3±4.4	1级

表注: 实验组采用改性交联脱细胞真皮基质浸提液; 对照组采用单纯戊二醛交联的脱细胞真皮基质浸提液, 阴性对照组采用高密度聚乙烯浸提液。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 细胞黏附实验结果** 将小鼠成骨细胞MC3T3接种到

膜片表面, 培养7 d后细胞在不同膜片表面的生长情况见**图5**: 交联改性脱细胞真皮基质膜片表面的成骨细胞繁殖旺盛且细胞分布较为均匀, 细胞骨架铺展得较为充分; 单纯戊二醛交联改性脱细胞真皮基质膜片表面的成骨细胞数量较少且细胞团聚在一起, 细胞骨架没有充分铺展开, 另外还可观察到少量残留的死亡细胞细胞核。实验结果表明戊二醛交联改性的脱细胞真皮基质膜, 经甘氨酸中和减少裸露醛基后, 有利于成骨细胞的黏附增殖, 膜片的细胞相容性明显提升。

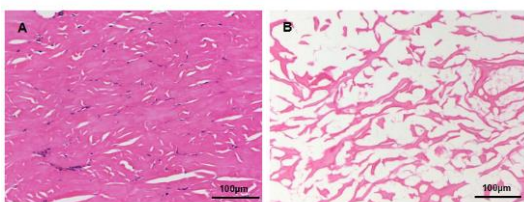
**2.5 皮下植入实验结果** 将膜片植入兔皮下2周后取出样品及周围组织, 苏木精-伊红染色观察组织炎症情况, 见**图6**: **图6A**代表的是实验组膜片及植入位点周围组织, **图6B**代表的是对照组膜片及植入位点周围组织, 两组膜片移植物的胶原纤维结构均基本完整且清晰可见, 纤维之间有少量毛细血管生长, 且移植周围有成纤维细胞增生, 两组切片的不同之处在于: 对照组膜片可见大量中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞弥漫散布, 炎症反应较为严重; 实验组膜片仅受到少量炎性细胞浸润, 表现出轻微的炎症反应, 实验结果表明用甘氨酸封闭戊二醛裸露的多余醛基, 能够有效降低基质膜皮下植入的早期炎症反应, 提升基质膜在体内的生物相容性。

## 3 讨论 Discussion

戊二醛是一种常用的胶原蛋白交联剂, 具有活性高、反应快等优点, 对脱细胞真皮基质进行戊二醛交联改性是改善其降解速率与力学性能的有效手段。Harriger等<sup>[29]</sup>利用戊二醛交联胶原基质后, 材料的降解吸收时间明显延长, 但进一步的研究发现, 戊二醛的引入会导致材料的生物相容性变差。Rothamel等<sup>[30]</sup>利用体外细胞黏附实验对比戊二醛交联改性前后胶原基质的细胞相容性, 发现在经戊二醛交联的胶原基质表面几乎观察不到成骨细胞, 而在未经戊二醛交联的胶原基质表面成骨细胞数量较多且生长状态良好。由于戊二醛的细胞毒性主要来源于分子中的醛基, Cheung等<sup>[31]</sup>提出利用甘氨酸中和戊二醛醛基, 能有效降低戊二醛分子的细胞毒性。甘氨酸是人体一种重要的非必需氨基酸, 同时也是构成人体蛋白质的小分子物质, 无毒副作用, 生物相容良好, 在降低醛基毒性的同时不会引入新的毒性。此次研究利用戊二醛对脱细胞真皮基质交联改性后, 再利用甘氨酸中和封闭戊二醛分子中未参与反应的醛基, 细胞黏附实验与皮下植入实验结果表明材料的生物相容性得到显著提升, 具体表现为膜片表面细胞增殖数量明显增多且细胞形态良好, 同时皮下植入周围组织的炎症反应明显降低。

戊二醛分子中的醛基是一种具有较高活性的亲电基团, 又归类为活性羰基, 能与细胞蛋白质、脂质和核酸发生反应, 导致细胞损伤, 而带醛基的材料可通过改变蛋白质结构和功能、增加氧化应激和羰基应激而导致机体炎症甚至疾病<sup>[32]</sup>。在使用戊二醛对脱细胞真皮基质进行交联改性的过程中, 部分戊二醛分子中只有一个醛基参与了反应, 而另一个未参与





图注: 图中 A 为未进行脱细胞处理的猪真皮基质膜, 可见数量较多且完整的细胞核; B 为脱细胞处理后的猪真皮基质膜, 未见细胞物质残留。

图 1 细胞脱除前后真皮基质的苏木精-伊红染色切片(标尺为 100 μm)

Figure 1 Hematoxylin-eosin staining section of the dermal matrix before and after cell removal (scale bar=100 μm)

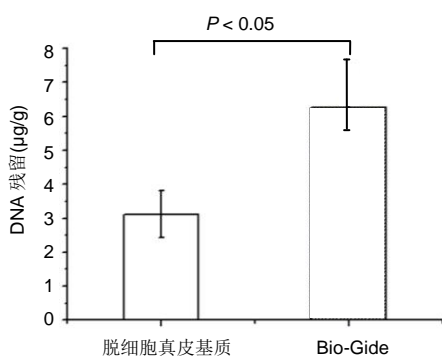
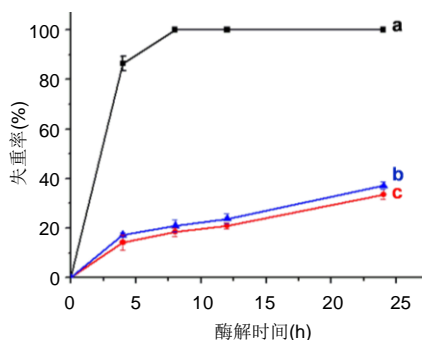


图 2 脱细胞真皮基质和 Bio-Gide 膜中的 DNA 残留量

Figure 2 Residual DNA content within the acellular dermal matrix and Bio-Gide membrane



图注: 曲线 a 为未交联脱细胞基质的降解速率曲线, 曲线 b 为单纯戊二醛交联脱细胞基质的降解速率曲线, 曲线 c 为戊二醛交联且甘氨酸封端的脱细胞基质的降解速率曲线。在各时间点, 交联脱细胞真皮基质与两交联脱细胞真皮基质的失重率比较差异有显著性意义( $P$ 均 $< 0.01$ ), 两交联脱细胞真皮基质的失重率比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

图 3 不同改性脱细胞真皮基质膜片在胶原酶溶液中的降解速率

Figure 3 Degradation curves of different samples in collagenase solution

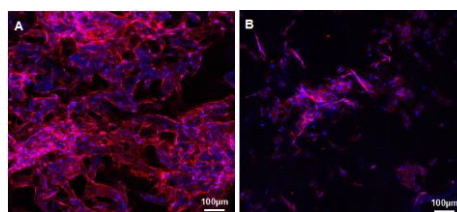
反应的醛基便会裸露在材料表面, 当细胞在材料表面发生黏附行为时, 这些裸露的醛基会对细胞发出毒性信号, 影响细胞的骨架形态以新陈代谢, 导致细胞骨架蜷缩甚至细胞凋亡; 相反, 当材料表面裸露的醛基被甘氨酸中和封闭之后, 醛基的毒性信号消失, 细胞能够在材料表面正常黏附、铺展、增殖。将带有醛基的材料植入动物皮下之后, 周围



图注: 图中 A 为高密度聚乙烯浸提液中的细胞生长状态; B 为改性交联脱细胞真皮基质浸提液中的细胞生长状态; C 为单纯戊二醛交联脱细胞真皮基质浸提液中的细胞生长状态。3 组细胞伸展良好, 显示出良好的生长状态。

图 4 成纤维细胞在不同材料浸提液中培养 24 h 后的生长状态(标尺为 50 μm)

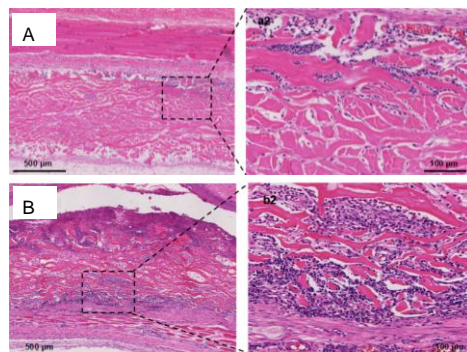
Figure 4 Growth states of fibroblasts cultured in different material leaching solutions for 24 hours (scale bar=50 μm)



图注: 图中 A 为改性交联脱细胞真皮基质膜表面, 成骨细胞繁殖旺盛且细胞分布较为均匀, 细胞骨架铺展得较为充分; B 为单纯戊二醛交联脱细胞真皮基质膜表面, 成骨细胞数量较少且细胞团聚在一起, 细胞骨架没有充分铺展开, 可见少量残留的死亡细胞细胞核。红色为罗丹明-鬼笔环肽, 蓝色为 DAPI 染色。

图 5 小鼠成骨细胞 MC3T3 接种于不同基质膜表面培养 7 d 后的共聚焦图(标尺为 100 μm)

Figure 5 Confocal micro-graphs of MC3T3 mouse osteoblasts cultured onto the surfaces of different matrix membranes for 7 days (scale bar=100 μm)



图注: 图中 A 为改性交联脱细胞真皮基质膜皮下植入周围组织炎症情况, 胶原纤维结构均基本完整且清晰可见, 纤维之间有少量毛细血管生长, 可见轻微炎症反应; B 为单纯戊二醛交联脱细胞真皮基质膜皮下植入周围组织炎症情况, 胶原纤维结构均基本完整且清晰可见, 纤维之间有少量毛细血管生长, 可见严重的炎症反应。

图 6 不同基质膜样品皮下植入 2 周后的苏木精-伊红染色组织切片

Figure 6 Hematoxylin-eosin stained tissue sections after subcutaneous implantation of different matrix membrane samples for 2 weeks

组织因感应到醛基的毒性刺激而产生防御机制, 释放出大量粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞, 试图通过吞噬作用和酶消化除去植入材料, 当醛基被生物相容性良好的甘氨酸消耗掉之后炎症因子减少, 机体释放出的炎性细胞也随之减少, 炎症反应降低。不同于细胞黏附和皮下植入实验, 体外细胞毒性实验由于是采用材料浸提液对细胞进

行培养,材料与细胞之间没有直接接触,细胞感应到的毒性刺激明显减弱,因而已用和未用甘氨酸中和的戊二醛交联改性膜片浸提液中细胞增殖率没有较大差异。

另外,在利用甘氨酸中和材料表面的醛基时,甘氨酸分子中只有一个氨基能与戊二醛分子中的醛基发生键合反应,不会形成交联,对膜片内部存在的交联结构无影响,因此利用甘氨酸中和封闭裸露醛基,既能体现戊二醛交联改性的抗降解优势又能保证材料具有良好的生物相容性。

**作者贡献:**李丽花与熊健为第一作者,共同负责实验设计与实施,钟梅玲、朱勇军、康文亭、徐炜区负责协助完成实验与资料收集,余振定和谭荣伟负责实验评估工作,曹革审核实验中生物统计学方法,李丽花负责成文、审校,第一作者共同对文章负责。

**经费支持:**该文章未接受任何经费支持。

**利益冲突:**文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

**机构伦理问题:**动物实验经深圳市医疗器械检测中心伦理委员会审批。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**写作指南:**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:**文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:**文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:**该文统计学方法已经全国医疗器械生物学评价标委会委员曹革专家审核。

**文章版权:**文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:**这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Buser D,Dula K,Belser U,et al.Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. Int J Periodontics Restorative Dent.1993; 13:29-45.
- [2] Dimitriou R,Mataliotakis GI,Calori GM,et al.The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. BMC Med.2012;10(1):81-104.
- [3] Crump TB,Rivera-Hidalgo F,Harrison JW,et al.Influence of three membrane type on healing of bone defects.Oral Surg Oral Med Oral Histol.1996;82(4):365-374.
- [4] Bottino MC,Thomas V,Schmidt G,et al.Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective.Dent Mater. 2012;28:703-721.
- [5] Cucchi A,Vignudelli E,Napolitano A,et al.Evaluation of complication rates and vertical bone gain after guided bone regeneration with non-resorbable membranes versus titanium meshes and resorbable membranes. A randomized clinical trial. Clin Implant Dent Relat Res. 2017;19(5):821-832.
- [6] Miron RJ,Fujioka-Kobayashi M,Buser D,et al.Combination of Collagen Barrier Membrane with Enamel Matrix Derivative-Liquid Improves Osteoblast Adhesion and Differentiation. Int J Oral Maxillofac Implants. 2017;32(1):196-203.
- [7] Kaushal S,Kumar A,Khan MA,et al.Comparative study of nonabsorbable and absorbable barrier membranes in periodontal osseous defects by guided tissue regeneration.J Oral Biol Craniofac Res.2016;6(2):111-117.
- [8] Jung RE,Fenner N,Hämmerle CH,et al.Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12–14 years.Clin Oral Implants Res. 2013;24(10):1065-1073.
- [9] Caballé-Serrano J,Munar-Frau A,Ortiz-Puigpelat O,et al.On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. J Clin Exp Dent.2018;10(5):e477-e483.
- [10] 李祚,张恒,唐历波.膜生物材料及在组织工程中的应用:“引导膜再生理论”的展望[J].中国组织工程研究, 2018,22(22):3595-3601.
- [11] Gentile P,Chiono V,Tonda-Turo C,et al.Polymeric membranes for guided bone regeneration. Biotechnol J. 2011;6(10):1187-1197.
- [12] Wang J,Wang L,Zhou Z,et al.Biodegradable polymer membranes applied in guided bone/tissue regeneration: a review.Polymers. 2016;8(4):115.
- [13] Behring J,Junker R,Walboomers XF,et al.Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review.Odontology. 2008;96(1):1-11.
- [14] Sheikh Z,Qureshi J,Alshahrani AM,et al.Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. Odontology.2017;105(1):1-12.
- [15] 达静姝,陈武.异种脱细胞真皮基质对新生血管作用的研究[J].口腔生物医学,2016,7(4):187-190.
- [16] 张丽娜.不同口腔修复膜材料在牙种植中引导骨再生的应用效果对比[J].系统医学,2017,2(23):117-119.
- [17] Lutz R,Neukam FW,Simion M,et al.Long-term outcomes of bone augmentation on soft and hard-tissue stability: a systematic review. Clin Oral Implants Res. 2015;26(11):103-122.
- [18] Parma-Benfenati S,Roncati M,Galletti P, et al. Resorbable dome device and guided bone regeneration: an alternative bony defect treatment around implants. A case series.Int J Periodontics Restorative Dent.2014;34(6):749-755.
- [19] Porcaro G, Busa A, Bianco E, et al. Use of a Partial-thickness Flap for Guided Bone Regeneration in the Upper Jaw. The journal of contemporary dental practice. 2017;18(12):1117-1121.
- [20] 陈一宁,但卫华,但年华.脱细胞真皮基质的改性及应用概述[J].材料导报, 2018,32(13):2311-2319.
- [21] Gielkens PF,Schortinghuis J,de Jong JR,et al.Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT.Clin Oral Implants Res.2008;19(5):516-521.
- [22] Ferreira AM,Gentile P,Chiono V,et al.Collagen for bone tissue regeneration. ActaBiomaterialia. 2012;8(9):3191-3200.
- [23] Calciolari E,Ravanetti F,Strange A,et al.Degradation pattern of a porcine collagen membrane in an in vivo model of guided bone regeneration. J Periodontal Res.2018;53(3):430-439.
- [24] Lu HK,Lee SY,Lin FP.Elastic modulus, permeation time and swelling ratio of a new porcine dermal collagen membrane.J Periodontal Res.1998;33(5):243-248.
- [25] Rothamel D,Schwarz F,Sager M, et al. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. Clin Oral Implants Res.2005;16(3):369-378.
- [26] Speer DP,Chvapil M,Eskelson CD,et al.Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials.J Biomed Mater Res.1980;14:753-764.
- [27] Gilbert TW,Freund JM,Badylak SF.Quantification of DNA in biologic scaffold materials. J Surg Res.2009;152(1):135-139.
- [28] Crapo PM,Gilbert TW,Badylak SF.An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011;32(12):3233-3243.
- [29] Harriger MD,Supp AP,Warden GD,et al.Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice.J Biomed Mater Res. 1997;35(2):137-145.
- [30] Rothamel D,Schwarz F,Sculean A,et al.Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells.Clin Oral Implants Res.2004;15(4):443-449.
- [31] Cheung HY,Brown MR.Evaluation of glycine as an inactivator of glutaraldehyde. J Pharm Pharmacol. 1982;34(4):211-214.
- [32] 李盼盼.活性羰基化合物诱导的氧化应激致细胞能量代谢障碍和毒性的机制[D].咸阳:西北农林科技大学,2015.