

鱼鳞胶原膜对大鼠骨髓间充质干细胞黏附增殖及成骨分化的影响

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3094>

陈亮, 孟姝, 程国平, 丁一

2095-4344.3094

投稿日期: 2020-05-06

送审日期: 2020-05-12

采用日期: 2020-06-09

在线日期: 2020-09-23

中图分类号:

R459.9; R394.2; R781.05

文章编号:

2095-4344(2021)16-02494-06

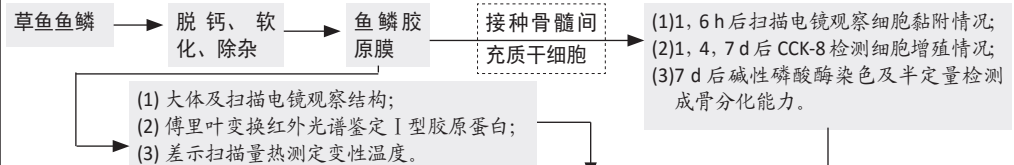
文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点—

△使用草鱼鱼鳞进行脱钙、软化、除杂,在保留鱼鳞基本外形的基础上创新性地制备出多板层状结构的鱼鳞胶原膜,并首次探索其骨组织再生的潜力;
△鱼鳞胶原膜具有较高的变性温度,克服了鱼类来源胶原变性温度过低的缺点,使其临床应用成为可能;

△鱼鳞胶原膜具有良好的细胞相容性和一定的成骨活性,满足引导性组织/骨再生中屏障膜的基本要求。



结论:

鱼鳞胶原膜由平行排列的I型胶原蛋白和嵌杂其中的羟基磷灰石组成,其变性温度为50.55℃,鱼鳞胶原膜表面细胞黏附良好,可促进骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化,具有良好的生物相容性及骨组织再生的潜力。

文题释义:

引导性组织/骨再生术:是指将屏障膜置于软组织与骨缺损之间,阻止干扰骨形成且迁移速度较快的结缔组织细胞和上皮细胞进入骨缺损区,并提供一定的空间,引导具有附着能力的牙周膜细胞和具有骨再生能力的前体成骨细胞优先进入骨缺损区,从而达到牙周组织/骨组织再生的目的。

I型胶原蛋白:胶原蛋白是动物和人体大多数软硬组织中最主要的结构蛋白,具有良好的生物相容性、低免疫原性和组织可降解吸收性。I型胶原蛋白是动物界含量最丰富的蛋白质之一,是人体内含量最丰富的基质蛋白,其构成大部分组织的细胞外基质,为细胞生长、增殖提供微环境和附着表面,是理想的医用生物材料。

摘要

背景:近年来鱼类来源胶原蛋白被视为哺乳动物胶原蛋白的潜在替代品,其在生物医学材料领域的研究逐渐成为热点,保留鱼鳞外形所得鱼鳞胶原材料具有优良的机械性能,目前尚无研究探索此类材料是否有骨组织再生的潜力。

目的:探讨鱼鳞胶原膜对大鼠骨髓间充质干细胞黏附增殖及成骨分化的作用。

方法:通过草鱼鱼鳞制备胶原膜,大体及扫描电镜观察鱼鳞胶原膜结构,傅里叶变换红外光谱分析鉴定胶原蛋白类型,差示扫描量热测定鱼鳞胶原膜变性温度;取第3代大鼠骨髓间充质干细胞,接种于胶原膜上培养为实验组,常规细胞贴壁培养为对照组。扫描电镜观察鱼鳞胶原膜上细胞黏附情况;CCK-8实验检测各组细胞增殖活性;碱性磷酸酶染色检测各组细胞成骨分化能力。

结果与结论:①鱼鳞胶原膜为方形,透光性较高,表面可见“年轮状”纹路,扫描电镜观察可见鱼鳞胶原膜为多板层状结构,由I型胶原和羟基磷灰石构成,变性温度测定结果为50.55℃;②鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞黏附良好,细胞增殖优于对照组,鱼鳞胶原膜表面细胞碱性磷酸酶活性高于对照组,差异均有显著性意义;③结果表明,鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞黏附良好,可促进骨髓间充质干细胞增殖及成骨向分化,具有良好的生物相容性及骨组织再生潜力。

关键词:干细胞;骨髓间充质干细胞;草鱼;鱼鳞;胶原;增殖;成骨分化

Effects of fish scale collagen membrane on adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells

Chen Liang, Meng Shu, Cheng Guoping, Ding Yi

State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Department of Periodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Chen Liang, Master candidate, Physician, State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Department of Periodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Corresponding author: Ding Yi, MD, Professor, State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Department of Periodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

口腔疾病研究国家重点实验室, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 四川大学华西口腔医院牙周病科, 四川省成都市 610041

第一作者: 陈亮, 男, 1996年生, 江西省吉安市人, 汉族, 四川大学华西口腔医学院在读硕士, 医师, 主要从事口腔医学研究。

通讯作者: 丁一, 博士, 教授, 口腔疾病研究国家重点实验室, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 四川大学华西口腔医院牙周病科, 四川省成都市 610041

<https://orcid.org/0000-0001-7595-1642> (丁一)

基金资助: 四川省科技厅应用基础研究项目(2020YJ0242), 项目负责人: 丁一

引用本文: 陈亮, 孟姝, 程国平, 丁一. 鱼鳞胶原膜对大鼠骨髓间充质干细胞黏附增殖及成骨分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(16):2494-2499.



Abstract

BACKGROUND: In recent years, fish derived collagen has been regarded as a potential substitute for mammalian collagen, and its research in biomedical materials has gradually become a hot spot. Fish scale collagen materials with preserved fish scale shape have excellent mechanical properties, and there is no research to explore whether this material has the potential of bone tissue regeneration.

OBJECTIVE: To study the effect of fish scale collagen membrane on the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: The collagen membrane was prepared from *Ctenopharyngodon idellus* scales. The structure of collagen membrane was observed by naked eye and scanning electron microscope. The type of collagen was identified by Fourier transform infrared spectroscopy. The denaturation temperature of collagen membrane was determined by differential scanning calorimetry. Rat bone marrow mesenchymal stem cells at passage 3 were cultured *in vitro* on collagen membrane as experimental group; and those received conventional cell adherent culture were used as control group. The adhesion of cells on the collagen membrane of fish scale was observed by scanning electron microscope. The proliferation activity of cells in each group was detected by CCK-8, and the osteogenic differentiation ability of cells in each group was detected by alkaline phosphatase staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The fish scale collagen membrane was square and round, the light transmittance was high, and the "annual ring" pattern could be seen on the surface. Scanning electron microscope showed that the fish scale collagen membrane was multi-lamellar structure, which was composed of type I collagen and hydroxyapatite, and the denaturation temperature was 50.55 °C. (2) The adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells on the surface of fish scale collagen membrane was good, and the cell proliferation was better than that of the control group. The alkaline phosphatase activity of the surface cells of fish scale collagen membrane was higher than that of the control group, and the difference was statistically significant. (3) Results suggested that bone marrow mesenchymal stem cells on the surface of fish scale collagen membrane have good adhesion, which can promote cell proliferation and osteoblast differentiation, and has good biocompatibility and the potential of bone tissue regeneration.

Key words: stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; *Ctenopharyngodon idellus*; fish scale; collagen; proliferation; osteogenic differentiation

Funding: Applied Basic Research Project of Sichuan Science and Technology Department, No.2020YJ0242 (to DY)

How to cite this article: CHEN L, MENG S, CHENG GP, DING Y. Effects of fish scale collagen membrane on adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(16):2494-2499.

0 引言 Introduction

牙周炎是一种发生在牙周组织的慢性炎症性疾病,是成人失牙的首要原因,其主要病理变化之一是牙槽骨的吸收^[1]。

现有常规牙周治疗手段如洁刮术、根面平整术等,仅能阻止牙周病的进展,很难获得牙槽骨的再生^[2]。引导性组织/骨再生术(guided tissue/bone regeneration, GTR/GBR)是目前临床应用于牙槽骨再生的主要治疗方法,也是在种植手术时进行骨增量的主要手段。引导性组织/骨再生术是利用膜性材料作为屏障,阻挡牙龈结缔组织与牙根面接触,提供空间并引导牙周组织/骨再生的方法^[3-5]。临床上引导性组织/骨再生术中常用的屏障膜多为商品化的胶原膜,其中的主要成分是I型胶原蛋白,最常见的是猪或牛等哺乳动物来源。哺乳动物来源的胶原蛋白有以下缺点:①安全性方面:牛海绵状脑病和口蹄疫等人畜共患病可能会通过哺乳动物传播^[6];②宗教的限制^[7]:如犹太教和伊斯兰教不使用任何猪相关的产品,而印度教不使用任何牛相关的产品;③成本方面:哺乳动物源胶原蛋白纯化困难且昂贵^[8]。从鱼类到人类的人畜共患病风险较低,而且没有宗教限制,鱼鳞等水产品下脚料的成本也非常低,且其胶原蛋白安全易得,因此鱼类来源胶原蛋白是哺乳动物胶原蛋白的潜在替代品^[8]。

鱼鳞主要由I型胶原纤维和羟基磷灰石组成,其中胶原蛋白占鱼鳞总质量的50%~70%^[9],I型胶原纤维由羟基磷灰石增强,其三维结构高度有序^[10-11]。鱼鳞的主要成分与人体骨骼和牙本质的组成相似,且这种高度有序的天然多层结构具有较好的机械性能,可用于组织工程研究^[12],如人工角膜^[13]、可吸收骨钉等^[10],但尚无将鱼鳞胶原膜应用于骨组织再生的研究。该实验在保留草鱼鱼鳞基本外形和空间结构的基础上,成功制备了鱼鳞胶原膜,通过大体及扫描电镜观察其结构,傅里叶变换红外光谱分析鉴定其胶原蛋白类型,差示扫描量热仪测定其变性温度,并分析其对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)黏附、增殖及成骨

分化的影响,以探究天然鱼鳞来源胶原膜是否有促进骨组织再生的潜能。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察,体外细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年5月至2020年1月在四川大学华西口腔医院口腔疾病研究国家重点实验室完成。

1.3 材料 草鱼鱼鳞(购自四川省成都市农贸市场); α -MEM培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清、胰蛋白酶(美国Gibco公司);Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(日本Dojindo公司); β -甘油磷酸钠、抗坏血酸、地塞米松(美国Sigma公司);BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);体视显微镜、倒置显微镜及照相系统(日本OLYMPUS公司);扫描电镜(S4800,日本Hitachi公司);酶标仪(美国BioTek公司);真空干燥箱(DZF-6020,上海捷呈实验仪器有限公司);傅里叶红外光谱仪(iS10,美国Nicolet公司);差示扫描量热仪(Pyris 1,美国Perkin Elmer公司)。

实验动物: 雄性SD大鼠2只,三四周龄,SPF级,体质量约200g,购自成都市达硕实验动物有限公司。

实验方案经四川大学华西口腔医院伦理委员会批准,批准号为WCHSIRB-D-2017-217。

1.4 方法

1.4.1 草鱼鱼鳞胶原膜的制备 将草鱼鱼鳞洗净,去除表面的灰质和杂质,先使用80 mL氯仿:乙醇=1:1混合溶液处理1h,再使用80 mL 5%NaCl溶液处理1h,然后转移至100 mL 10%EDTA溶液中处理3h,再放入0.5 mol/L乙酸溶液中处理1h,最后用胃蛋白酶溶液喷洒在鱼鳞表面,1次/h,处理10h。将处理后的鱼鳞用体积分数为75%乙醇浸泡12h,取出后置于4 °C无菌PBS中备用。

1.4.2 草鱼鱼鳞胶原膜的结构性质及变性温度检测 大体观察鱼鳞胶原膜外形并照相;将样品剪碎、粘附和喷金后,扫

描电子显微镜观察其纵断面形态和结构；使用傅里叶变换红外光谱仪鉴定 I 型胶原蛋白，扫描范围：450–4 000 cm^{-1} ，次数：32，分辨率：4 cm^{-1} ；采用差示扫描量热仪测量变性温度，将干燥的鱼鳞胶原膜 10–15 mg 放入铝坩埚中，在氮气保护下，10–70 $^{\circ}\text{C}$ 内以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温测量，第 1 次测量消除热历史，记录第 2 次的测量曲线。

1.4.3 大鼠骨髓间充质干细胞的分离和培养 SD 大鼠颈椎脱臼处死，置于体积分数为 75% 乙醇溶液中浸泡 10 min，无菌分离双侧胫骨、股骨，反复用无菌 PBS 溶液 +20% 双抗冲洗，剪去双侧骨骺端，用无菌注射器抽取 5 mL 含体积分数为 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基反复冲洗髓腔并收集骨髓，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，重悬接种至培养瓶，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 培养箱中进行培养，24 h 后首次换液，之后每两三天换液 1 次，倒置相差显微镜观察细胞增殖数量、生长状态。当细胞融合 80% 以上时进行细胞传代，选择第 3–5 代骨髓间充质干细胞用于后续实验。

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源：	雄性 SD 大鼠的股骨、胫骨骨髓
原代培养方法：	全骨髓贴壁培养
基础培养基：	α -MEM 培养基
添加材料：	体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素
原代培养时间：	原代细胞培养 24–48 h 开始换液，之后每两三天换液 1 次，培养 7–10 d 开始传代
细胞传代：	细胞融合至 80% 用胰酶消化传至下 1 代，按 1 : 2 传代，约 5 d 传 1 代，共传 3 代
细胞鉴定：	成骨分化鉴定
伦理学批准：	实验方案经四川大学华西口腔医院伦理委员会批准，批准号为 WCHSIRB-D-2017-217

1.4.4 扫描电镜观察鱼鳞胶原膜上细胞黏附情况 取对数生长期、状态优良的第 3 代骨髓间充质干细胞制成 $5 \times 10^7 \text{L}^{-1}$ 的细胞悬液，接种于孔底预置无菌鱼鳞胶原膜的 6 孔板中，每孔 2 mL，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养 1，6 h，弃掉孔板中的培养基，PBS 清洗 2 遍，每孔加 1 mL 2.5% 戊二醛溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h，弃掉孔板中的 2.5% 戊二醛溶液，每孔依次加入体积分数为 50%，70%，90%，100% 乙醇溶液进行梯度脱水，每次脱水 10 min，每孔依次加入 50%，70%，90%，100% 醋酸异戊酯进行梯度脱醇，每次脱醇 10 min，将上述材料放入 CO_2 临界点干燥机中干燥 1 h，然后喷金使用扫描电镜观察骨髓间充质干细铺展情况。

1.4.5 CCK-8 法检测细胞增殖情况 将无菌鱼鳞胶原膜剪成直径 14 mm 的圆形，置于 24 孔板底部，设置 5 个复孔，取第 3 代骨髓间充质干细胞，以细胞密度 $1 \times 10^7 \text{L}^{-1}$ 接种于胶原膜上，每孔 500 μL ，以常规贴壁培养为对照组，在培养 1，4，7 d 每孔加入 50 μL CCK-8 溶液，37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 培养箱内孵育 1 h，将反应液转移至 96 孔板中，酶标仪 450 nm 波长测量各组细胞吸光度值，然后以时间为横坐标、吸光度

值为纵坐标绘图。

1.4.6 碱性磷酸酶检测 提前配制成骨诱导培养液：含体积分数为 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基，0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松，10 mmol/L β - 甘油磷酸钠，50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 抗坏血酸，1% 青霉素和链霉素，避光，4 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

碱性磷酸酶染色：取第 3 代骨髓间充质干细胞制成 $5 \times 10^7 \text{L}^{-1}$ 的细胞悬液，接种于预置无菌鱼鳞胶原膜的 6 孔板中，每孔 2 mL，以常规贴壁培养为对照组，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后更换为成骨诱导培养液，每两三天换液 1 次，7 d 后吸出培养液，PBS 清洗 2 次，4% 多聚甲醛固定 15 min，再次用 PBS 清洗 2 次，然后按碱性磷酸酶染色试剂盒说明进行染色，PBS 冲洗后体视显微镜下拍照。

碱性磷酸酶半定量实验：取第 3 代骨髓间充质干细胞制成 $5 \times 10^7 \text{L}^{-1}$ 的细胞悬液，接种于预置无菌鱼鳞胶原膜的 6 孔板中，每孔 2 mL，以常规贴壁培养为对照组，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后更换为成骨诱导培养液，每两三天换液 1 次。成骨诱导第 7 天，各组按碱性磷酸酶检测试剂盒说明进行染色，将反应液转移至 96 孔板中，使用酶标仪 405 nm 波长测定吸光度值，然后以组别为横坐标、吸光度值为纵坐标绘图。

1.5 主要观察指标 ①鱼鳞胶原膜的大体观及扫描电镜纵断面观；②鱼鳞胶原膜中胶原蛋白的类型；③鱼鳞胶原膜的变性温度；④鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞黏附、增殖及成骨分化情况。

1.6 统计学分析 以上实验均重复 3 次，使用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用独立样本 t 检验进行组间比较， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

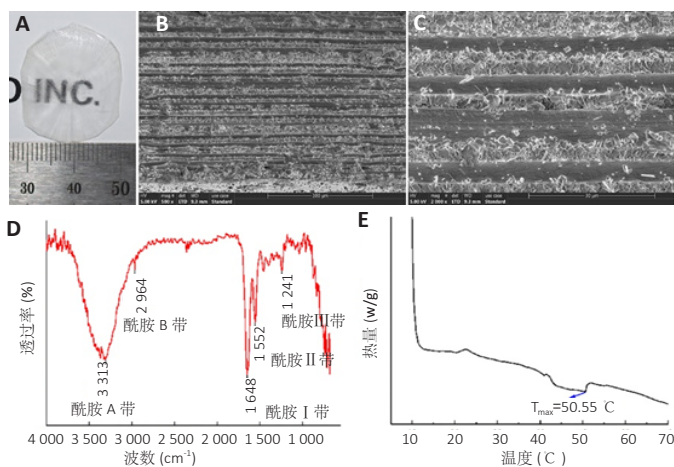
2.1 鱼鳞胶原膜的结构性质及变性温度 大体观察鱼鳞胶原膜为方形，直径约为 20 cm，透光性较好，边缘稍卷曲，中间表面粗糙，两侧质地较均匀，可见“年轮状”纹路，见图 1A；扫描电镜示纵断面为多板层样结构，平行排列的 I 型胶原蛋白之间嵌有羟基磷灰石晶体，见图 1B，C；傅里叶变换红外光谱结果显示鱼鳞胶原膜具有 I 型胶原蛋白的 5 个特征吸收带：酰胺 A 带、酰胺 B 带、酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带，见图 1D，说明鱼鳞胶原膜中的蛋白为 I 型胶原蛋白，且具有完整的三螺旋结构；差示扫描量热分析测定鱼鳞胶原膜的变性温度为 50.55 $^{\circ}\text{C}$ ，见图 1E。

2.2 鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞黏附检测结果 细胞接种 1 h 后，鱼鳞胶原膜表面的部分骨髓间充质干细胞伸出较多细长的伪足；细胞接种 6 h 后，绝大部分细胞都伸出伪足，且伪足延伸更远，细胞铺展充分，说明骨髓间充质干细胞在鱼鳞胶原膜上黏附良好，见图 2。

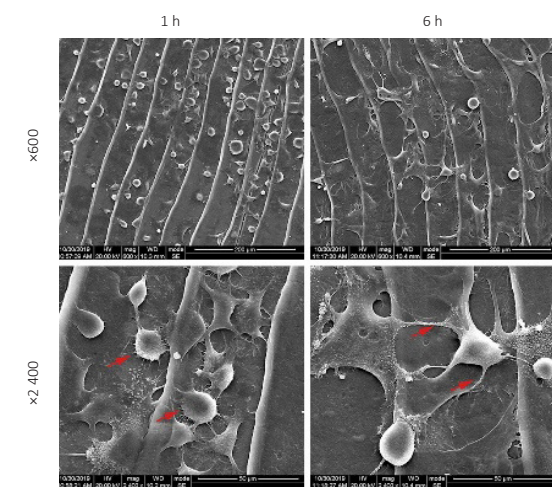
2.3 鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞增殖检测结果 CCK-8 法结果显示，1，4，7 d 鱼鳞胶原膜表面细胞增殖均优于常

规贴壁培养组, 见图 3, 说明鱼鳞胶原膜促进了骨髓间充质干细胞增殖。

2.4 鱼鳞胶原膜对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用 碱性磷酸酶染色可见, 鱼鳞胶原膜组染色较常规贴壁培养组更深, 40 倍显微镜下鱼鳞胶原膜组碱性磷酸酶染色阳性细胞更密集, 见图 4。半定量分析结果表明, 鱼鳞胶原膜表面细胞碱性磷酸酶活性增高, 与常规贴壁培养组差异有显著性意义, 见图 4E, 说明在矿化诱导条件下, 鱼鳞胶原膜对骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶表达具有更强的促进作用, 能促进骨髓间充质干细胞成骨向分化。



图注: A 为大体观, 鱼鳞胶原膜为方形, 直径约为 20 cm, 透光性较好, 边缘稍卷曲, 中间表面粗糙; B, C 为扫描电镜观察断面为多板层结构, 平行排列的 I 型胶原蛋白之间嵌有羟基磷灰石晶体 ($\times 500$, $\times 2\ 000$); D 为傅里叶变换红外光谱, 可见鱼鳞胶原膜具有 I 型胶原蛋白的 5 个特征吸收带; E 为差示扫描量热分析测定鱼鳞胶原膜的变性温度为 50.55 °C
Figure 1 | Structure, Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry thermogram of fish scale collagen membrane



图注: 细胞接种 1 h 后, 鱼鳞胶原膜表面的部分骨髓间充质干细胞伸出较多细长的伪足; 细胞接种 6 h 后, 绝大部分细胞都伸出伪足, 且伪足延伸更远, 细胞铺展充分。图中箭头所示细胞伪足
Figure 2 | Scanning electron microscope of cell adhesion on the surface of fish scale collagen membrane

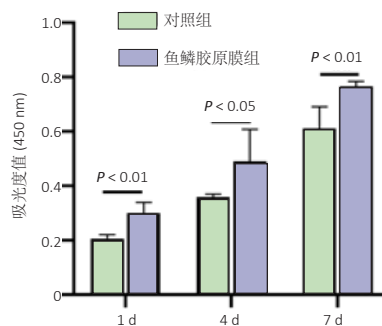
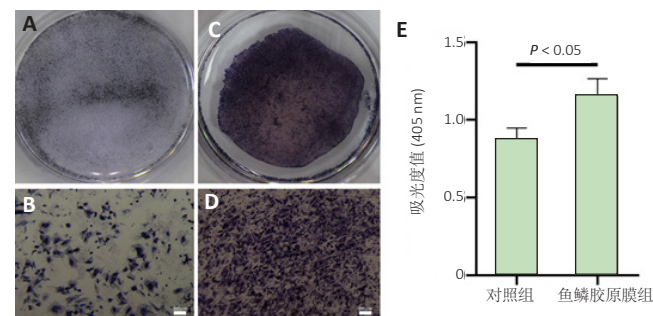


图 3 | 鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞增殖情况
Figure 3 | Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells on the surface of fish scale collagen membrane



图注: 图中 A, B 为对照组大体观察及 40 \times 显微镜下观察; C, D 为鱼鳞胶原膜组大体观察及 40 \times 显微镜下观察, 碱性磷酸酶染色阳性细胞更密集; E 为碱性磷酸酶活性半定量检测
Figure 4 | Effect of fish scale collagen membrane on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

3 讨论 Discussion

胶原蛋白是动物和人体大多数软组织中最主要的结构蛋白, 约占哺乳动物体内总蛋白的 30%, 在维持细胞外基质的生物学和结构完整性方面发挥重要作用^[14]。胶原蛋白具有低免疫原性、良好的生物相容性和生物可降解性, 并具有调节细胞形态、黏附、迁移和分化的功能^[15-16]。人体中超过 90% 的胶原蛋白是 I 型胶原蛋白^[8], 其应用最广泛, 用于再生医学、组织工程、药物递送等研究^[17]。I 型胶原蛋白来源广泛, 哺乳动物来源的胶原蛋白研究较多, 但由于人畜共患病的风险和宗教因素的限制, 研究者正在寻找其他的潜在替代品, 较多研究集中于水产品来源的胶原蛋白^[18]。鱼类产品生产加工过程中会产生多达 70% 的副产品, 其中有大量的鱼骨、鱼鳞等被作为下脚料丢弃, 近年来有关鱼类来源胶原蛋白的研究逐渐成为热点^[18-19]。如果能够对这些废弃副产品加以利用, 既能减少污染, 也能提高鱼产品利用率, 增加经济效益^[20]。

对于鱼鳞胶原蛋白的提取, 通常将其溶解在有机酸中, 但单纯酸法提取产量较低, 而使用酶处理鱼鳞可以增加胶原溶解度, 提高胶原蛋白的产量, 同时降低其抗原性^[21]。多数研究使用酸和酶复合提取法, 最终从鱼鳞中分离得到 I 型胶原蛋白的沉淀, 这种提取方法比较简单, 且产率较高^[18], 但酸酶复合法的缺点是破坏了鱼鳞天然多板层、致密的胶原结构。以往关于鱼鳞胶原蛋白的研究多是水解胶原蛋白, 或是

将提取后的胶原蛋白分子进行改性,再应用于组织工程支架研究中^[22-25],未改性的鱼鳞胶原蛋白制备的组织支架材料机械性能较差、体内降解速度较快^[25]。该研究的创新点在于,在保留了鱼鳞外形和空间结构的基础上,去除了角蛋白、脂肪、钙等杂质,使鱼鳞脱钙、软化,成功使用新方法制备了鱼鳞胶原膜,并首次探索鱼鳞胶原膜在骨组织再生中的潜力,扫描电镜观察鱼鳞胶原膜为多板层状结构,平行排列的I型胶原蛋白纤维之间嵌有羟基磷灰石,是一种天然的多层材料。有研究用类似的制备方法用于制造人工角膜^[13]、可吸收骨钉^[10],但该研究的制备过程较之更为简单高效。VAN ESSEN等^[26]制备出的鱼鳞片在体外、体内均有良好的生物相容性,未出现过敏及炎症,缝合植入兔角膜基质袋后,角膜缘出现血管化,并且保持透明,上皮细胞健康生长,说明鱼鳞片可作为角膜重建的支架材料。人工角膜相应的研究正在进行临床转化,CHEN等^[27]将售前产品BioCornea植入猪角膜穿孔模型,结果显示短期植入用于处理角膜穿孔是安全有效的;YUAN等^[28]将BioCornea植入兔眼6个月后,所有人工角膜均无溶解、变性,且保持透明完整。近年已有鱼鳞胶原蛋白在口腔医学领域的研究报道:水解鱼鳞胶原蛋白可诱导人牙周膜细胞成骨分化^[29];微波辐射技术合成的鱼鳞胶原蛋白/羟基磷灰石复合材料可用于牙科组织再生^[30];鱼鳞胶原蛋白支架具有制造组织工程化口腔黏膜等效物的潜力^[31];静电纺丝制备的鱼胶原蛋白/生物活性玻璃/壳聚糖复合纳米纤维膜,对变形链球菌具有一定的抗菌活性,并且能够促进人牙周膜细胞的黏附、增殖和成骨分化,动物实验进一步表明复合纳米纤维膜能够促进犬根分叉病变中的牙槽骨再生^[23]。

鱼类来源胶原蛋白的变性温度通常低于哺乳动物^[18],一定程度上限制了鱼类来源胶原蛋白的生物医学应用。LIU等^[32]报道草鱼鱼鳞胶原蛋白的变性温度为35℃左右,低于人体温度,而该研究中草鱼鱼鳞胶原膜的变性温度为50.55℃,远高于文献报道的变性温度,其原因可能是实验制备鱼鳞胶原膜过程中未破坏鱼鳞的空间结构,所得到的不是胶原蛋白分子,而是胶原蛋白原纤维。胶原蛋白原纤维比提取的胶原蛋白分子更稳定,因为分子间和分子内相互作用稳定了胶原的三螺旋结构,胶原蛋白原纤维的变性温度通常高于提取的胶原蛋白^[33]。正是因为保留了鱼鳞的空间结构和基本外形,鱼鳞胶原膜的机械性能和热稳定性都得以提高。临床引导性组织/骨再生术中常用的商品化Bio-Gide®膜是一种非交联的、猪源的纯I型和III型胶原膜,具有双层结构^[34]。尽管纯胶原蛋白支架具有出色的生物学特性,但其机械性能、抗酶降解性较差^[6],可以通过物理处理或化学试剂进行胶原蛋白的分子间交联,从而改善其物理及化学性能^[3, 15, 35]。

牙周炎患者出现骨缺损后,满足手术适应证的情况下可通过引导组织再生术实现牙槽骨及其他牙周组织的再生;当疾病进一步发展失牙后,在失牙患者的种植治疗中也常采用引导骨再生术实现牙槽骨增量的目的;当需要远期种植

手术时,为维持牙缺失处的牙槽骨高度,也需要使用引导骨再生术进行位点保存^[36]。引导性组织/骨再生术的关键在于屏障膜的阻挡作用,在牙周或种植手术中屏障膜的机械性能及生物活性至关重要,屏障膜不仅需要维持和稳定血凝块及植入物^[37],还应具有良好的生物相容性和成骨生物活性^[38]。目前临床使用的屏障膜无法兼具所有功能,Bio-Gide®膜具有优异的生物相容性和成骨活性,但其机械性能较差、体内降解速度较快^[6];金属增强的钛膜具有出色的机械性能,可稳定维持成骨空间,但其无成骨活性且刚性过大易出现膜暴露^[37]。

骨髓间充质干细胞增殖活跃,具有多向分化潜能,且其来源方便,提取、培养及扩增均比较容易^[39-40],是一种较常用的组织工程体外实验细胞。在细胞黏附实验中,扫描电镜显示骨髓间充质干细胞在鱼鳞胶原膜表面有较好的黏附,细胞在鱼鳞胶原膜上充分铺展;在细胞增殖实验中,鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞增殖优于常规贴壁培养;从细胞黏附、增殖情况反映出鱼鳞胶原膜具有良好的生物相容性。碱性磷酸酶是成骨细胞前体成骨向分化的重要标志物^[41],在碱性磷酸酶染色实验中,鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞染色较常规贴壁培养组更深,在40倍镜下观察可见碱性磷酸酶染色阳性细胞也更加密集;而在碱性磷酸酶半定量检测中,鱼鳞胶原膜表面骨髓间充质干细胞分泌碱性磷酸酶的活性高于常规贴壁培养组;这些结果表明,鱼鳞胶原膜能促进骨髓间充质干细胞成骨向分化。该研究中鱼鳞胶原膜机械强度和热稳定性较佳,既显示出了良好的细胞相容性,又具有一定的成骨活性,初步实验结果显示鱼鳞胶原膜可以满足屏障膜的基本功能。

综上所述,该研究通过对草鱼鱼鳞进行脱钙、软化、除杂,创新性地制备出多板层状结构的鱼鳞胶原膜,结果显示鱼鳞胶原膜由平行排列的I型胶原蛋白和嵌杂其中的羟基磷灰石组成,其变性温度为50.55℃,鱼鳞胶原膜表面细胞黏附良好,可促进骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化,具有良好的生物相容性及骨组织再生的潜力。课题组将继续对这一新型材料的理化性能改进,进行相应的动物实验,进一步验证鱼鳞胶原膜在体内的成骨作用,并探索其对牙周炎再生的应用潜能。

作者贡献: 实验设计为陈亮、程国平、丁一,实验实施为陈亮、程国平,实验评估为陈亮、孟姝,资料收集为陈亮。

经费支持: 该文章接受了“四川省科技厅应用基础研究项目(2020YJ0242)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

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中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经四川大学华西口腔医院伦理委员会批准,批准号为WCHSIRB-D-2017-217。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。

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: 文章统计学方法已经通过四川大学生物统计学专家审核。

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] SLOTS J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol* 2000. 2017;75(1):7-23.
- [2] DE JONG T, BAKKER AD, EVERTS V, et al. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontol Res*. 2017;52(6):965-974.
- [3] CHU C, DENG J, SUN X, et al. Collagen Membrane and Immune Response in Guided Bone Regeneration: Recent Progress and Perspectives. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017;23(5):421-435.
- [4] SALLUM EA, RIBEIRO FV, RUIZ KS, et al. Experimental and clinical studies on regenerative periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2019;79(1):22-55.
- [5] RAMSEIER CA, RASPERINI G, BATIA S, et al. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontol* 2000. 2012;59(1):185-202.
- [6] JIN S, SUN F, ZOU Q, et al. Fish Collagen and Hydroxyapatite Reinforced Poly(lactide-co-glycolide) Fibrous Membrane for Guided Bone Regeneration. *Biomacromolecules*. 2019;20(5):2058-2067.
- [7] AHMED R, HAQ M, CHUN BS. Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Int J Biol Macromol*. 2019;135:668-676.
- [8] LIM YS, OK YJ, HWANG SY, et al. Marine Collagen as A Promising Biomaterial for Biomedical Applications. *Mar Drugs*. 2019;17(8):467.
- [9] LIANG X, FENG S, AHMED S, et al. Effect of Potassium Sorbate and Ultrasonic Treatment on the Properties of Fish Scale Collagen/Polyvinyl Alcohol Composite Film. *Molecules*. 2019;24(13):2363.
- [10] CHOU CH, CHEN YG, LIN CC, et al. Bioabsorbable fish scale for the internal fixation of fracture: a preliminary study. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(17-18):2493-2502.
- [11] HSUEH YJ, MA DH, MA KS, et al. Extracellular Matrix Protein Coating of Processed Fish Scales Improves Human Corneal Endothelial Cell Adhesion and Proliferation. *Transl Vis Sci Technol*. 2019;8(3):27.
- [12] ANG Z, WANG Y, FENG Q, et al. Hierarchical structure and cytocompatibility of fish scales from *Carassius auratus*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;43:145-152.
- [13] MATTHYSSEN S, VAN DEN BOGERD B, DHUBGHAILL SN, et al. Corneal regeneration: A review of stromal replacements. *Acta Biomater*. 2018;69:31-41.
- [14] RICARD-BLUM S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978.
- [15] DONG C, LV Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers (Basel)*. 2016;8(2):42.
- [16] FERREIRA AM, GENTILE P, CHIONO V, et al. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2012;8(9):3191-3200.
- [17] CHOWDHURY SR, MH BUSRA MF, LOKANATHAN Y, et al. Collagen Type I: A Versatile Biomaterial. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1077:389-414.
- [18] SILVA TH, MOREIRA-SILVA J, MARQUES AL, et al. Marine origin collagens and its potential applications. *Mar Drugs*. 2014;12(12):5881-5901.
- [19] RUAN J, CHEN J, ZENG J, et al. The protective effects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale collagen hydrolysate against oxidative stress induced by tributyltin in HepG2 cells. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(4):3612-3620.
- [20] WANG L, AN X, YANG F, et al. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chem*. 2008;108(2):616-623.
- [21] EN SLIMANE E, SADOK S. Collagen from Cartilaginous Fish By-Products for a Potential Application in Bioactive Film Composite. *Mar Drugs*. 2018;16(6):211.
- [22] MUTHUKUMAR T, ARAVINTHAN A, SHARMILA J, et al. Collagen/chitosan porous bone tissue engineering composite scaffold incorporated with Ginseng compound K. *Carbohydr Polym*. 2016;152:566-574.
- [23] ZHOU T, LIU X, SUI B, et al. Development of fish collagen/bioactive glass/chitosan composite nanofibers as a GTR/GBR membrane for inducing periodontal tissue regeneration. *Biomed Mater*. 2017;12(5):055004.
- [24] LI Q, MU L, ZHANG F, et al. A novel fish collagen scaffold as dural substitute. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;80:346-351.
- [25] KARA A, TAMBURACI S, TIHMINGLOGLU F, et al. Bioactive fish scale incorporated chitosan biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2019;130:266-279.
- [26] VAN ESSEN TH, VAN ZIJL L, POSSEMIERS T, et al. Biocompatibility of a fish scale-derived artificial cornea: Cytotoxicity, cellular adhesion and phenotype, and in vivo immunogenicity. *Biomaterials*. 2016;81:36-45.
- [27] CHEN SC, TELINIUS N, LIN HT, et al. Use of Fish Scale-Derived BioCornea to Seal Full-Thickness Corneal Perforations in Pig Models. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143511.
- [28] YUAN F, WANG L, LIN CC, et al. A cornea substitute derived from fish scale: 6-month followup on rabbit model. *J Ophthalmol*. 2014;2014:914542.
- [29] LIU C, SUN J. Hydrolyzed tilapia fish collagen induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biomed Mater*. 2015;10(6):065020.
- [30] ILYAS K, QURESHI SW, AFZAL S, et al. Microwave-assisted synthesis and evaluation of type 1 collagen-apatite composites for dental tissue regeneration. *J Biomater Appl*. 2018;33(1):103-115.
- [31] SUZUKI A, KATO H, KAWAKAMI T, et al. Development of microstructured fish scale collagen scaffolds to manufacture a tissue-engineered oral mucosa equivalent. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2020;31(5):578-600.
- [32] LIU Y, MA D, WANG Y, et al. A comparative study of the properties and self-aggregation behavior of collagens from the scales and skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Int J Biol Macromol*. 2018;106:516-522.
- [33] MORI H, TONE Y, SHIMIZU K, et al. Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabis saira*). *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(1):174-181.
- [34] WILLERSHAUSEN I, BARBECK M, BOEHM N, et al. Non-cross-linked collagen type I/III materials enhance cell proliferation: in vitro and in vivo evidence. *J Appl Oral Sci*. 2014;22(1):29-37.
- [35] GU L, SHAN T, MA YX, et al. Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. *Trends Biotechnol*. 2019;37(5):464-491.
- [36] BASSIR SH, ALHAREKY M, WANGSRIMONGKOL B, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of Hard Tissue Outcomes of Alveolar Ridge Preservation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33(5):979-994.
- [37] RAKHMATIA YD, AYUKAWA Y, FURUHASHI A, et al. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res*. 2013;57(1):3-14.
- [38] OMAR O, ELGALI I, DAHLIN C, et al. Barrier membranes: More than the barrier effect? *J Clin Periodontol*. 2019;46 Suppl 21(Suppl Suppl 21):103-123.
- [39] KIM DK, KIM JI, HWANG TI, et al. Bioengineered Osteoinductive Broussonetia kazinoki/Silk Fibroin Composite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(2):1384-1394.
- [40] HE Y, CHEN D, YANG L, et al. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):263.
- [41] NAKATSU Y, NAKAGAWA F, HIGASHI S, et al. Effect of acetaminophen on osteoblastic differentiation and migration of MC3T3-E1 cells. *Pharmacol Rep*. 2018;70(1):29-36.

(责任编辑: MZH, ZN, TXY)