

胶原蛋白化学交联技术的研究进展*

崔运利 综述, 杨 柳 审校

(第三军医大学西南医院关节外科中心, 重庆 400038)

关键词: 组织工程; 胶原蛋白; 化学交联技术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.043

中图分类号: R318; TB18**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)20-2790-03

胶原蛋白具有能够形成高强度的不溶性纤维、低免疫原性等特点^[1], 这些特点使其成为构建组织工程软骨支架较为理想的材料, 但单纯以胶原蛋白为材料所构建的组织工程支架, 其降解速度较快, 强度也比较差, 不能达到作为种子细胞支架的要求。因此, 需要对胶原蛋白进行改性以提高支架的性能。许多实验证明, 应用物理和化学交联剂等改性胶原蛋白的方法均可以使胶原蛋白支架在强度和抗水解能力等方面明显提高。其中使用物理交联法可以避免外源性有毒物质进入胶原蛋白内造成影响, 但是物理改性胶原蛋白的方法交联度很低, 且常常使交联的材料发生变性和一些不明确的不良反应, 因此, 常作为辅助方法。化学交联法可以使胶原蛋白支架性能明显提高, 而且用于交联的化学交联剂种类多, 但化学交联剂本身或其反应产物常常具有细胞毒性等不良反应, 或者其交联条件非常苛刻, 使得每种化学交联剂在实际的应用中都或多或少存在一定的局限性。因此, 在实际的应用中, 应根据实验目的, 把上述诸多因素考虑进来进行化学交联剂的选择。总之, 无论使用哪种交联剂进行交联, 理想的交联效果应是交联后的胶原蛋白具有良好组织相容性, 对接种在其上面的种子细胞无任何不良反应, 并且交联后的胶原蛋白在耐热性能、变性温度、抗水解能力、力学强度方面均能有所提高, 同时减慢胶原酶的降解速度和降低其遇水膨胀度。

1 化学交联法

1.1 醛类 戊二醛 (glutaraldehyde, GTA) 是带有刺激性气味的无色透明油状液体, 在组织工程中应用较早且十分常用的一种化学交联剂, 它可以明显提高交联后胶原蛋白支架的强度和解链温度, 有较好的交联效果, 并且价格低廉。GTA 的作用机制是与胶原蛋白中的自由氨基反应形成化合物。Chajra 等^[2]应用 GTA 与 EDC/NHS 交联胶原蛋白并对它们的交联效果进行对比, 发现使用 GTA 交联的胶原蛋白海绵支架强度比用 EDC/NHS 交联的效果好, 而且用 GTA 交联的胶原蛋白海绵支架的羟基磷灰石含量更适合骨软骨的修复。然而, 虽然 GTA 能提供有效交联, 明显改善胶原蛋白支架的机械性能, 但大量研究证实 GTA 有明显的细胞毒性, 少量的 GTA 残留就会对其周围的细胞产生不良反应, 且 GTA 具有变应原性特性。因此, 目前已较少作为交联剂应用于组织工程, 由于其有较好的交联效果, 常作为其他交联剂交联效果好坏的对照。

1.2 异氰酸盐类 1,6-己二异氰酸酯 (hexamethylene diisocyanate, HDI) 是一种脂肪族的双官能团异氰酸酯, 为透明无色液体, 稍有刺激性气味, 也可以用作胶原蛋白的交联剂, 并且有较好的交联效果。Naimark 等^[3]用 HDI 对胶原蛋白进行交

联, 发现 HDI 交联能显著提高胶原蛋白的机械性能, 并且同时还可降低钙化度。但 Luyn 等利用甲基纤维素培养系统对 HDI 的细胞毒性进行研究, 发现有中度细胞不良。因此, 由于异氰酸盐类具有明显的细胞不良反应, 近年在组织工程支架应用中用来改性胶原蛋白的研究已经很少, 但如果使用 HDI 进行胶原蛋白交联, 应该使用有效的清洗方法来去除对细胞有不良反应的物质。

1.3 京尼平 (genipin) 是从梔子果实中提取的活性化合物, 性状为白色晶体, 是一种很好的胶原蛋白和壳聚糖的天然交联剂, 目前, 京尼平在生物组织和生物材料等方面应用较多, 很多文献报道应用京尼平对胶原蛋白进行交联可以在机械强度方面获得较好的效果^[4-7]。通过一些鼠和犬的实验证实京尼平的细胞毒性极低, 而且应用京尼平所固定的产品具有良好的组织相容性, 京尼平是一种与 GTA 交联效果相当的交联剂, 而且其细胞毒性远远低于 GTA。Sundararaghavan 等^[8]应用京尼平来改性胶原蛋白凝胶, 并且对不同浓度的京尼平对细胞的影响做了研究, 发现经过京尼平改性后, 其机械性能明显提高, 但京尼平的凝聚物应小于 5 mM, 否则, 将会对细胞产生毒副作用。Ko 等^[9]利用京尼平交联胶原-硫酸软骨素-透明质酸, 结果表明未经过交联的胶原支架的解链温度是 (46.5 ± 1.09) °C, 而经过交联的胶原支架解链温度提高到了 (78.6 ± 1.26) °C, 并且还发现用京尼平进行交联的支架有良好的生物相容性和再现性, 未发现细胞不良反应。用京尼平交联所构建的胶原蛋白支架可以为软骨细胞的生长提供了一个良好的环境。

1.4 碳化二亚胺 目前 1-乙基-3-(3-二甲氨基) 碳化二亚胺较为常用, 碳化二亚胺的交联产物具有很低的免疫原性, 且未发现细胞毒性, 因此, 它的生物相容性很好, 并且可以产生较好的交联效果。许多实验常将碳化二亚胺与 NHS 联合使用, 并且取得了较好的交联效果。Ma 等^[10]关于加强胶原蛋白多孔支架稳定性的研究中, 应用 EDAC/NHS 进行交联, 结果显示用 EDAC/NHS 可以形成多孔支架, 并且具有较好的细胞相容性, 其作用机制是在胶原蛋白相邻的分子之间形成异构肽键。单独使用 EDC, 在浓度为 20 mM 进行交联时, 交联效果与强度要好于 GTA, EDC 在水性环境中反应的中间体快速发生水解, NHS 对中间物有稳固作用, 并且允许胺类反映, 并且再用乙醇作为溶剂的条件下, 可减少或限制有活性的 EDC 诱导剂的水解, 从而提高交联效果^[11]。有许多实验将 2 种交联剂联合使用来交联胶原, 实验表明交联后的胶原解链温度明显提高, 胺类含量降低^[12]。Pieper 等^[13]用 EDC/NHS 交联 II 型胶原基质, 实验结果表明经过 EDC/NHS 交联后, 解链温度较

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870639); 重庆市科技攻关基金资助项目 (2009AC5018)。

交联前提高 8 ℃, 抵抗胶原酶水解能力明显增强。Angele 等发现 EDC/NHS 交联后的胶原抗胶原酶水解的能力明显提高, 较低的浓度 (0.5 mg/mL) 就可以引起很大的变化, 但是高浓度 (30 mg/mL EDC/NHS) 反而使支架的抗折强度下降。

1.5 环氧化合物 (epoxy compound, EC) 是指分子中含有一个或多个环氧基的一类化合物, 包括环氧乙烷、环氧氯丙烷等, 目前 EC 对胶原物质交联作用的研究也较多, 并且发现交联效果较好, 与 GTA 的交联效果进行相比, 用 EC 交联后解链温度都有所提高, 但 EC 的交联速度明显慢于 GTA。经 EC 改性的胶原具有较好的生物学和物理学性能, 尽管 EC 完全反应时间较长, 交联胶原的变性温度比 GTA 交联者低。Wang 等^[14] 在应用 GTA 和 EC 交联胶原传输特性的研究中发现, 应用这 2 种交联剂交联的胶原膜都会导致茶碱和苯佐卡因扩散系数的降低, 其膨胀速度比未交联的胶原膜减少 50%。研究还发现应用 EC 交联后的胶原蛋白钙含量测试结果明显低于 GTA 交联的结果, 但经过优化 EC 结构 (环氧基数量、链结构等) 和反应条件 (温度、pH、促进剂等), 可获得更好的交联效果^[15], 因此, 经过优化的 EC 有望成为一种较为理想的化学交联剂。

1.6 酰基叠氮 二苯基磷酸盐 (DPPA) 酰基叠氮化合物可用于交联胶原。与 GTA 交联的胶原相比, 酰基叠氮的交联物不易钙化, 未发现有细胞不良反应, 交联后的胶原支架解链温度和强度也都明显提高。但是, 用酰基叠氮进行交联常常需要进行几天以上的反应和洗涤过程, 工艺十分复杂。Marinucci 等^[16] 采用 DPPA 进行交联胶原膜, 并且与未交联的膜和用 GTA 交联的膜进行对比, 结果发现应用 DPPA 交联的胶原期细胞的扩增速度明显高于未交联和使用 GTA 进行交联的胶原膜, 成纤维细胞在 DPPA 交联的胶原膜上产生的 TGF_{β1} 明显高于用 GTA 交联的胶原膜。目前许多研究均表明应用 DPPA 交联胶原支架有良好的细胞相容性, 细胞的扩增速度明显高于未交联的胶原支架, 但上述实验结果必须留心观察, 因为在体内反应是比较复杂的过程, 也许效果没有在体外的好。

1.7 醌类 1,4-二(3,4-羟苯基)-2,3-二甲基丁烷 (NDGA), 作为一种可以改性胶原蛋白的交联剂, 也具有较好的交联效果, 用 NDGA 交联的胶原比用 GTA 交联的胶原的张力和弹性系数都有明显的提高, 其作用机制是通过将邻苯二酚官能团氧化成醌来进行交联反应, NDGA 交联的产物可为成纤维母细胞提供较有利的附着和增殖环境。有研究发现, NDGA 交联的胶原支架在体内有很好的稳定性, 并且在 NDGA 交联的多孔支架中应用葡萄糖传感器, 发现并未对葡萄糖传感器造成影响。Young 等^[17] 在用胶原蛋白构建支架, 并植入传感器来增强生物相容性的研究中, 应用 NDGA 进行交联来提高胶原支架的稳定性, 研究发现 NDGA 交联可以获得较好的稳固性, 当植入大鼠皮下 4 周后观察, 没有发现形态变化, 支架浸泡在胶原酶溶液中 4 周后, 溶解后的重量约保留最初的 70%, 而且还发现用 NDGA 交联对植入内部的传感器没有损害。KooB 等^[18-19] 应用 NDGA 交联胶原的研究中, 在对材料进行的拉伸试验和弹性系数测试中, 发现抗拉力强度明显高于天然的跟腱, 并且弹性系数与天然的跟腱相当。

2 结 语

胶原蛋白的理想交联方法应该是在保证所交联的胶原蛋白不变性的同时, 还要具备无毒副作用, 化学交联方法的交联度明显高于物理交联, 但由于存在引入外源有毒试剂, 化学反应残留物清除难、变色等问题, 使其在组织工程应用研究中均存在局限性。如采用 GTA、EC、紫外线等方法进行交联时, 胶

原蛋白会变黄; NDGA 处理过的胶原纤维会变棕色; 应用京尼平交联的胶原蛋白会变蓝色等, 变色的原因是使用的化学交联剂和氨基酸反应所致, 并且用化学交联剂交联后的胶原蛋白纤维上会出现脊和沿纵轴的裂隙, 造成这一现象的原因是纤维的下层结构和 (或) 由于交联剂反应所形成, 但是这种结构显现出有利于细胞的黏附和成纤维细胞的迁移, 胶原纤维表面粗糙的程度取决于化学交联剂的选用, 不同交联剂会形成不同的胶原纤维表面特征。在性能方面, 经过交联的胶原纤维解链温度会明显提高, 如应用 GTA 和 EC 交联的胶原蛋白纤维显示出了最高的热稳定性, 原因是它可以交联蛋白中大量的亚单位包括距离较远的亚单位, 但 GTA 具有明显的细胞毒性, EC 交联时间太长; 碳化二亚胺、NDGA、DPPA、京尼平等有较好的交联效果, 并且细胞不良反应很小, 是近些年应用相对较多的化学交联剂, 但目前很多实验都是在体外进行的, 其化学交联剂反应的环境远远没有体内的反应环境复杂, 所以在应用到体内时, 其交联效果和不良反应等问题是值得关注和研究的。

因此, 在应用化学试剂对胶原蛋白进行交联的应用中, 必须根据实验目的来选择不同的化学交联剂, 以保证交联后可以提高性能的同时还要达到保持胶原蛋白的生物活性, 并且对种子细胞没有毒副作用。有时某单一化学交联剂对胶原改性并不能满足材料的要求, 因此, 在胶原蛋白的交联中可采用 2 种或 2 种以上交联方法结合的办法。另外, 相关研究发现乙醛酸中的羰基活性较强, 易于与胶原侧链的氨基反应, 从而可提高收缩温度, 还有通过交联蛋白质分子中起重要作用的二硫键来改性胶原蛋白, 以提高其特性。虽然这 2 种目前在组织工程方面应用较少, 但为今后的研究提供了很有价值的思路。随着科学的发展, 上述化学交联剂在应用中各问题的克服和解决, 定能找到更好、更适合的胶原蛋白交联剂应用于组织工程的研究, 制作出与人体组织结构和性能相似的、安全的生物支架材料。

参考文献:

- [1] Sally R, Frenkel PE, Di Cesare, et al. Scaffolds for articular cartilage repair annals of biomedical engineering [J]. Annals of Biomedical Engineering, 2004, 32: 26.
- [2] Chajra H, Rousseau CF, Cortial D, et al. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects [J]. Bio-Medical Materials and Engineering, 2008, 18: 33.
- [3] Naimark WA, Pereira CA, Tsang K, et al. Cross-linking of bovine pericardial tissue; a potential role of the solvent environment in the design of bioprosthetic materials [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1995, 6: 235.
- [4] Chang Y, Lee MH, Liang HC, et al. Acellular bovine pericardial with distinct porous structures fixed with genipin as an extracellular matrix [J]. Tissue Engineering, 2004, 10: 881.
- [5] Sung HW, Chang WH, Ma CY, et al. Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003, 64: 427.
- [6] Sung HW, Liang IL, Chen CN, et al. Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking a-

gent (genipin) [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2001, 55: 538.

- [7] Chih-Shen Ko, Chun-Hsien Wu, Hsin-Ho Huang, et al. Genipin cross-linking of type II collagen-chondroitin sulfate-hyaluronan scaffold for articular cartilage therapy [J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2007, 27: 436.
- [8] Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, et al. Genipin-induced changes in collagen gels: correlation of mechanical properties to fluorescence [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008, 87(2): 308.
- [9] Ko CS, Huang JP, Huang CW, et al. Type II collagen-chondroitin sulfate-hyaluronan scaffold cross-linked by genipin for cartilage tissue engineering [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107: 177.
- [10] Ma L, Gao CY, Mao ZW, et al. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges [J]. Biomaterials, 2004, 25: 2997.
- [11] Catherine P, Barnes, Charles W, et al. Cross-linking electrospun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in Ethanol [J]. Tissue Engineering, 2007, 13: 1593.
- [12] Pieter B, Jeroen S, Pieper T, et al. Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects-A study in rabbits [J]. Biomaterials, 2003, 24: 3255.
- [13] Pieper JS, van der Kraan PM, Hafmans T, et al. Crosslinked

type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering [J]. Biomaterials Vol, 2002, 23: 3183.

- [14] Wang SY, Hsieh CY, Wang DM, et al. Mass transfer characteristics of glutaraldehyde-crosslinked and epoxy-crosslinked collagen films [J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2003, 23: 165.
- [15] 但年华, 但卫华, 曾睿, 等. 环氧化合物及其在胶原改性中的应用 [J]. 材料导报, 2006, 20: 119.
- [16] Marinucci L, Lilli C, Guerra M, et al. Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphorylazide: an in vitro study [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003, 67: 504.
- [17] Young MJ, Yu BZ, Koob TJ, et al. A novel porous collagen scaffold around an implantable biosensor for improving biocompatibility. I. In vitro/in vivo stability of the scaffold and in vitro sensitivity of the glucose sensor with scaffold [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007, 87: 136.
- [18] Koob TJ, Hernandez DJ. Material properties of NDGA polymerized collagen fibers: development of biologically-based tendon constructs [J]. Biomaterials, 2002, 23: 3.
- [19] Koob TJ, Daniel J, Hernandez Z. Mechanical and thermal properties of novel polymerized NDGA-gelatin hydrogels [J]. Biomaterials, 2003, 24: 1285.

(收稿日期: 2010-02-10 修回日期: 2010-03-10)

· 综 述 ·

阿尔茨海默病的磁共振成像诊断*

张启川, 张 冬[△]综述, 邹利光, 王文献 审校

(第三军医大学新桥医院放射科, 重庆 400037)

关键词: 阿尔茨海默病; 磁共振; 内侧颞叶

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.044

中图分类号: R749.16; R445.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)20-2792-04

阿尔茨海默病 (alzheimer's disease, AD) 是一种最常见的痴呆症, 占 50%~60%, 它是以进行性认知功能障碍和记忆损害为特征的神经退行性疾病。国内调查结果显示, 65 岁以上人群中, 10%~15% 有认知功能障碍, 而这些人中绝大部分是 AD 患者。随着中国人口的老年化, AD 患者逐渐增多, 因其带来巨大社会负担, 使 AD 已成为老年医学研究的一个热点。

AD 的特征性病理改变包括: 神经斑、神经元纤维缠结沉积和基底前脑胆碱神经元丢失。过去, 相关学者认为 AD 首先累及部位为海马, 近几年来, 多数学者认为内嗅区皮层才是 AD 最早受累部位。内嗅区皮质是神经元纤维缠结最初发生的地方, 并且缠结的密度与痴呆的严重程度成正相关^[1]。AD

早期症状出现后, 通过药物干预, 可明显延缓向痴呆转化的速率, 提高患者生存质量及自理能力^[2-3]。心理测验和量表检查在 AD 的诊断、疗效评估等方面均起着重要作用。但许多因素如: 测验或评定者的经验、测评时间和环境、被测评对象的配合程度及其文化程度等均影响测评的准确性^[4]。磁共振成像是中枢神经系统疾病诊断的较好手段之一, 不仅可以从形态学观察病变, 还能够对脑组织局部的功能状态进行评定, 在 AD 的诊断与鉴别诊断中起着越来越重要的作用。本文就 AD 的 MRI 诊断进展做一较全面的总结和阐述。

1 脑组织结构的 MRI 测量

许多研究表明对 AD 有诊断价值的脑组织结构测量包括

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970799); 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2008BB5285)。△ 通讯作者, 电话: (023) 68755315; E-mail: hszhanged@163.com。