

黄芪多糖-胶原-海藻酸钠-丝素蛋白 3D 打印支架的制备及其生物相容性研究

杜伟斌¹ 沈福祥¹ 杨亚冬² 陈荣良¹ 华爱兰¹ 王拓¹ 曹国平¹

[摘要] **目的:**应用 3D 打印技术制备黄芪多糖-胶原-海藻酸钠-丝素蛋白复合支架,分析其生物相容性。**方法:**2020 年 8 月至 2020 年 12 月,采用 MTT 法分析 HeLa 细胞增殖抑制率,选择黄芪多糖最适工作浓度区间;制备黄芪多糖-胶原-海藻酸钠-丝素蛋白 3D 打印支架,进行形态学观察。通过细胞共培养显微镜观察、Calcein-AM/PI 活死细胞双染、扫描电镜等比较,分析其生物相容性。**结果:**50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度黄芪多糖对细胞增殖抑制程度较低,且可促进细胞增殖。3D 打印支架孔径大小一致,间距统一,厚薄均匀。细胞共培养 5 d 后,向支架内部迁移,呈团簇状生长。染色可见细胞生长良好,无明显的细胞死亡现象。扫描电镜下可见丰富的细胞黏附在支架上,细胞间有突触相连。**结论:**胶原-海藻酸钠-丝素蛋白含黄芪多糖(工作浓度 25~400 $\mu\text{g/mL}$)的 3D 打印支架性能最佳,可为创面修复、软组织退肿等医用敷料的应用提供新思路。

[关键词] 黄芪多糖;胶原;海藻酸钠;丝素蛋白;支架材料;医用敷料

[中图分类号] R-3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)01-0001-04

Study of Preparation and Biocompatibility of Astragalus Polysaccharide-Collagen-Sodium Alginate-Silk Fibroin 3D Printing Scaffolds

DU Weibin¹ SHEN Fuxiang¹ YANG Yadong² CHEN Rongliang¹
HUA Ailan¹ WANG Tuo¹ CAO Guoping¹

¹ Department of Orthopedics, Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311201, China;

² Institute of Tissue Engineering, Zhejiang Province Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China.

Abstract Objective: To prepare astragalus polysaccharide-collagen-sodium alginate-silk fibroin 3D printing scaffolds and study its biocompatibility. **Methods:** From August 2020 to December 2020, the proliferation inhibition rate of HeLa cells was analyzed by MTT assay to select the optimal working concentration range of APS. Astragalus polysaccharide-collagen-sodium alginate-silk fibroin 3D printing scaffolds were prepared for morphological observation, and the biocompatibility was analyzed by cell co-culture microscopy, double staining of dead cells with Calcein-AM/PI and scanning electron microscopy. **Results:** Astragalus polysaccharide (50 $\mu\text{g/mL}$) had a low inhibitory efficacy on cell proliferation and promoted cell proliferation. The 3D printing bracket had uniform aperture size, spacing and thickness. After 5 d later of co-culture, the cells migrated to the inside of the scaffold and grew in clusters. Staining showed that the cell growth was well, and there was no obvious cell death. Scanning electron microscopy showed there were abundant cells adhesion on the scaffold and synaptic connection between cells. **Conclusion:** The 3D printing scaffolds with collagen-alginate-silk fibroin protein containing astragalus polysaccharide (working concentration 25 to 400 $\mu\text{g/mL}$) had the best performance, which can provide a new idea for the application of medical dressings such as wound repair and soft tissue swelling reduction.

Keywords: astragalus polysaccharide; collagen; sodium alginate; silk fibroin protein; scaffold material; medical dressings

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81904053)

浙江省医药卫生科技计划项目

(2020KY796, 2020KY797)

杭州市萧山区社会发展重大科技计划项目

(11216, 2019318)

¹ 浙江中医药大学附属江南医院(杭州市萧山区中医院)骨科(杭州, 311201)

² 浙江省医学科学院组织工程研究所(杭州医学院)

皮肤是免疫系统的重要组成部分,是外界与人体之间第一道保护屏障^[1-2]。骨科临床上各种原因引起的皮肤创面或软组织损伤越来越多^[3]。有研究发现黄芪具有很强的促血管再生作用,而这主要归功于其有效成分黄芪多糖^[4-5]。胶原蛋白具有低免疫原性,可为细胞的贴壁、生长、增殖和定向分化提供微环境^[6]。丝素蛋白具有良好的生物相容性和力学性能。海藻酸钠的水溶性作用有利于吸收创口的渗出物,并维持湿润的伤口环境^[7-9]。故应用 3D 打印技术制备黄芪多糖-胶原-海藻酸钠-丝素蛋白复合支架,分析其生物相容性,为医用敷料的应用提供新方法。

1 材料与方法

1.1 主要药物试剂和仪器

黄芪多糖(solarbio 公司),丝素蛋白(合肥博美生物公司),胶原蛋白 I 型(合肥博美生物公司),海藻酸钠(sigma 公司),噻唑蓝(solarbio 公司),L-DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Gemini 公司),3D 打印机(BioScaffolder 公司)。

1.2 方法

1.2.1 黄芪多糖浓度筛选 称取黄芪多糖 40 mg,加入 4 mL 双蒸水,配成 10 mg/mL 的浓度,用一次性抽滤器过滤除菌,放-4℃储存。用 HeLa 细胞进行药物的细胞毒性实验。

HeLa 细胞复苏后待长满瓶底,用 0.25%胰蛋白酶消化后,培养基吹打成单细胞悬液,细胞计数板计数,细胞悬液浓度为 1×10⁶个/mL,稀释 10 倍,以 1×10⁵个/mL 的浓度铺于 96 孔板,每孔 100 μL,37℃培养箱过夜后,用培养基将黄芪多糖稀释成浓度分别为 400,200,100,500,25,12.5,6.25 μg/mL,每孔 200 μL,每组设置 4 个孔。作用 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞增殖情况,各孔加入 100 μL MTT 试剂,混匀后放于 CO₂培养箱培养,4 h 后酶标仪 490 nm 波长检测 OD 值。计算比较细胞增殖量,选取黄芪多糖最适浓度进行后续实验。

表 1 48 h 后不同浓度黄芪多糖对 HeLa 细胞增殖的抑制作用(̄x±s)

浓度/(μg·mL ⁻¹)	400.00	200.00	100.00	50.00	25.00	12.50	6.25
OD 值	1.072±0.067	1.264±0.046	1.321±0.080	1.336±0.076	1.138±0.251	0.966±0.254	0.695±0.236
t	11.498	18.442	14.627	15.386	4.297	3.123	1.460
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	>0.05	>0.05

2.2 黄芪多糖-胶原-海藻酸钠-丝素蛋白 3D 打印支架制备后大体观

如图 1 所示,整个支架呈透明状,具有较好的成型性,支架孔径大小一致,间距统一,厚薄均匀,具有一定的力学性能,能承受镊子的挤压和拉伸而不变形,不断裂。

1.2.2 黄芪多糖-胶原-海藻酸钠-丝素蛋白 3D 打印支架的制备 1)称取海藻酸钠 0.8 g、丝素蛋白 0.8 g,溶解在 8 mL PBS 中,搅拌溶解,灭菌:70℃,30 min,共 3 次,1 次/d。

2)将上述配好并消毒完毕的水凝胶灌入打印料筒中进行 3D 打印。打印参数:边长 10 mm,层高 0.1 mm,打印针头 0.41 mm,打印压力为 160 kPa,每层 8 条,共打印 4 层,90°转角打印,料筒保持 37℃。

3)打印完成后立即加入 5%氯化钙,使材料固化,用 PBS 洗一下后移入 6 孔板,支架上滴加 150 μL 0.2%的 I 型胶原(含 50 μg/mL 黄芪多糖),该步骤均在冰上操作。加好后,将 6 孔板放入 37℃培养箱 2 h,使 I 型胶原由液体变成凝胶。

1.2.3 3D 打印支架细胞共培养后显微镜观察及细胞死活染色检测 每个支架上加入 1×10⁶个/mL 的 HeLa 细胞悬液 100 μL,1 h 后加入 2 mL 完全培养基继续 37℃培养。培养 1 d 和 3 d 后,显微镜下观察 HeLa 细胞生长情况,并用钙黄绿素-AM/PI 双染,浓度分别为 5 μmol/L 和 1.5 μmol/L,染色 30 min 后观察细胞在支架上生长情况。

1.2.4 3D 打印支架及细胞共培养后扫描电镜观察 切取约 2 mm 厚的支架横截面,用导电双面胶粘在金属托架上,喷铂金后,在扫描电镜下观察生物支架的内部结构、孔隙及孔径大小。

1.3 统计学方法

计数资料采用 ̄x±s 表示,用 t 检验,P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同黄芪多糖浓度对细胞增殖的影响

当黄芪多糖浓度小于 25 μg/mL 时,细胞出现增殖抑制现象,黄芪多糖浓度在 25~400 μg/mL 之间,细胞仍然增殖明显,且在 50 μg/mL 浓度时达到最高峰,提示在制作模型时选用的药物浓度可在 25~400 μg/mL 之间(见表 1)。

2.3 3D 打印支架细胞共培养显微镜观察及细胞死活染色检测结果

培养 1 d 后,很多 HeLa 细胞爬到孔底,在孔底基本长满,但支架上仅在孔周围一圈长了细胞。用钙黄绿素-AM/PI 进行细胞死活染色,发现细胞基本都存活,仅有少量死亡。培养 5 d 后,细胞进一步长进支架

内部,两个孔间细胞已经连接,与黏附生长细胞不同,在支架上细胞呈团簇状生长。染色可以看到细胞生长良好,无明显细胞死亡现象(图 2a-f)。

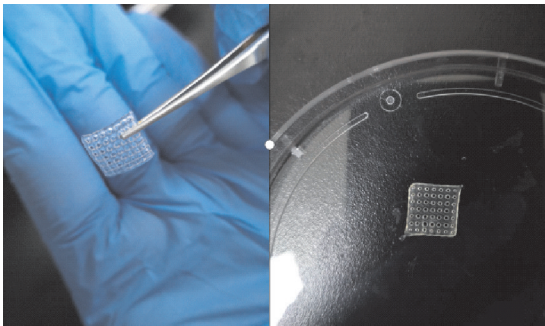
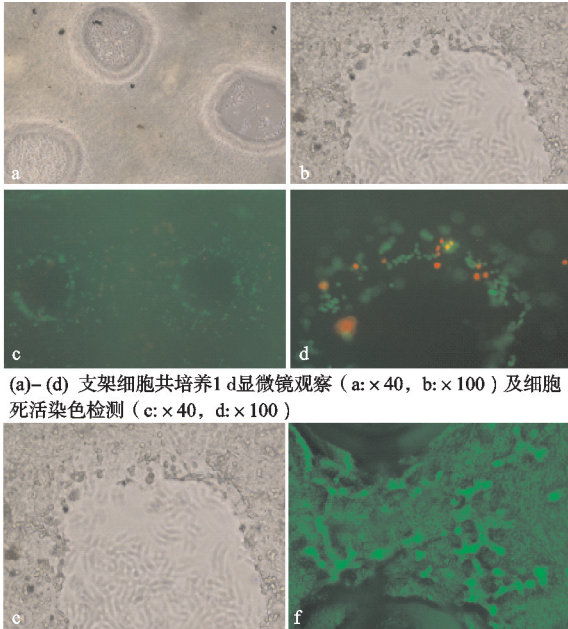


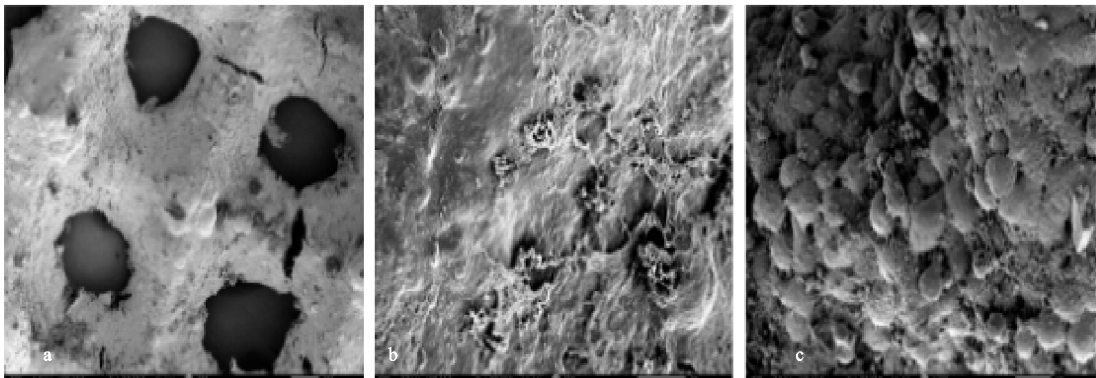
图 1 3D 打印支架制备后大体观



(a)-(d) 支架细胞共培养1 d显微镜观察 (a:×40, b:×100) 及细胞死活染色检测 (c:×40, d:×100)

(e)(f) 支架细胞共培养5 d显微镜观察 (e:×100) 及细胞死活染色检测 (f:×100)

图 2 支架细胞培养观察



(a) 放大倍数为100倍

(b) 放大倍数为800倍

(c) 放大倍数为1 300倍

图 3 3D 打印支架电镜图

增强免疫系统、抵御疾病、抗氧化、延缓衰老、改善心功能状态等功能,对血管内皮细胞增殖具有促进作用。在胶原中加入一定比例的丝素蛋白,能改善其机械物理性能,如提高力学和抗水性能,增强其对成

2.4 3D 打印支架和细胞共培养电镜结果

空支架孔径大小一致,孔间距统一约为 300 μm ,支架完整,无断裂破损情况。在高倍镜下可见空支架表面略有起伏,呈粗糙状,利于细胞黏附。培养 5 d 支架上的细胞,可见细胞密密麻麻地黏附在支架上生长,细胞间有突触相连(图 3a-c)。

3 讨论

目前全球人口老龄化加剧,近 10 年我国人口老龄化增长率在 11%~17%之间,而皮肤损伤、外伤后引起的软组织肿胀问题也随之增加,尤其是创面护理和愈合问题越来越受到关注。医用敷料在加速伤口愈合、预防和治疗感染等方面具有优良特性^[10-11]。目前医用敷料一般可分为传统医用敷料、生物敷料、人工合成敷料和功能复合敷料。传统医用敷料中的干性纱布类敷料来源广泛、成本低廉,但无法阻挡外界病原菌的入侵,存在破坏创口生长因子等缺点。生物敷料来源包括胶原蛋白、海藻酸盐、壳聚糖,具有可降解、利于细胞生长等优势。而人工合成敷料包括水凝胶敷料,功能复合敷料包括银离子敷料等研究也越来越广泛^[12-14]。

生物活性支架是组织工程三要素的核心,能为种子细胞提供三维的生活空间,营造利于创伤愈合的生物环境^[15]。与传统制备生物活性支架技术相比(冷冻干燥法、热致相分离法、静电纺丝法和制孔剂法等),3D 打印技术速度更快,效率更高,可制备出孔隙率和内部结构符合皮肤修复需求的生物活性支架。3D 打印技术根据预定的尺寸和孔隙率设计出符合皮肤细胞生长的三维结构,可通过对创面的有效覆盖,减少创面出血、体液渗出,降低感染概率,修复皮肤创面^[16-17]。黄芪具有益气补虚之功效,现代药理研究发现其具有

纤维细胞、皮肤表皮细胞的黏附性,为细胞提供长久的支持,以更好地匹配组织细胞的生长速度,而且可经过不同的处理方法达到不同的形态和孔隙要求,增强支架的弹性和多孔状结构^[18]。有研究者发

现^[19],明胶-海藻酸钠支架具有良好的生物可降解性,应用于创面后支架逐渐被降解,缺损组织可逐渐被肉芽组织所替代。

本研究从创面修复、软组织退肿等医用敷料这一热点出发,基于上述黄芪多糖、胶原、海藻酸钠、丝素蛋白这4种物质的性能优势,应用3D打印技术制备复合生物支架,探索最佳制备配比方案,分析了支架的细胞毒性、外观结构、生物相容性,结果显示:1)黄芪多糖浓度小于25 $\mu\text{g/mL}$ 时,对细胞增殖有明显影响,而在25~400 $\mu\text{g/mL}$ 之间时,促进了细胞增殖,且50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时增殖最明显,提示选用黄芪多糖浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 作为支架配比,在不损伤机体细胞的同时,可能发挥黄芪多糖促血管再生的最佳功效,这也与目前研究和课题组前期实验结果相一致。2)3D打印支架孔径大小一致,间距统一。支架与细胞共培养5 d后,呈团簇状生长,且染色可见细胞生长良好,无明显细胞死亡现象。扫描电镜下可见细胞在支架上黏附丰富,细胞间有突触相连,提示本研究支架具有良好外观结构和生物相容性,无明显细胞毒性。说明胶原-海藻酸钠-丝素蛋白含黄芪多糖(工作浓度25~400 $\mu\text{g/mL}$)的3D打印支架有利于细胞生长的三维结构,多孔结构利于细胞的增殖迁移、物质交换和组织的生长,可能是构建创面修复、软组织消肿等生物敷料的最佳配比,可以达到最佳效果。

综上所述,本研究通过胶原-海藻酸钠-丝素蛋白含黄芪多糖(工作浓度25~400 $\mu\text{g/mL}$)的3D打印支架具有低细胞毒性,良好的孔隙空间结构和稳定的塑形能力。该生物支架材料可作为外用敷料,在皮肤修复及软组织消肿等应用中具有一定潜能。但本支架发挥作用的内在机制及动物实验研究产生的实际性能有待进一步明确。

参考文献

- [1] DU W, HE L, WANG L, et al. Experimental vascular protective shield combined with vacuum sealing drainage prevents pressure on exposed vessels and accelerates wound repair[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(5): 3059-3069.
- [2] SU L, ZHENG J, WANG Y, et al. Emerging progress on the mechanism and technology in wound repair[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109191.
- [3] DU W, BAO G, HU H, et al. An mRNA sequencing analysis of the healing-promoting role of electroacupuncture in rat skin wound model[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(4): 1462-1475.
- [4] LI X, QU L, DONG Y, et al. A review of recent research progress on the astragalus genus[J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 18850-18880.
- [5] HAN R, TANG F, LU M, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates H_2O_2 -induced human umbilical vein endothelial cell injury[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 4027-4034.
- [6] 胡兴峰, 李青松, 季亮, 等. I型胶原蛋白生物膜在损伤肌腱内源性愈合过程中的作用[J]. *局解手术学杂志*, 2021, 30(2): 103-107.
- [7] 徐海伦, 满振涛, 李伟. 丝素蛋白生物支架在骨组织工程中的应用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28(23): 2165-2169.
- [8] 舒华金, 吴春萱, 杨康, 等. 快速膨胀海藻酸钠/二氧化硅纤维复合支架的制备及其快速止血功能的应用[J]. *材料工程*, 2019, 47(12): 124-129.
- [9] 卞徽宁, 孙传伟, 陈华德, 等. 虎杖苷对成纤维细胞生物学特性的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(33): 6111-6115.
- [10] OBAGI Z, DAMIANI G, GRADA A, et al. Principles of wound dressings: a review[J]. *Surg Technol Int*, 2019, 35: 50-57.
- [11] CHADWICK P, OUSEY K. Bacterial-binding dressings in the management of wound healing and infection prevention: a narrative review[J]. *J Wound Care*, 2019, 28(6): 370-382.
- [12] 刘嘉鑫, 安丽萍, 贾耀飞, 等. 壳聚糖表面改性钛合金材料的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2020, 33(12): 1175-1178.
- [13] 杨国辉, 丁丽青, 方艳, 等. 纳米银抗菌敷料治疗糖尿病足创面感染的效果[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(10): 1562-1565.
- [14] 邓金星, 林君德, 邓飞扬. 纳米银医用抗菌敷料、康复新液与湿润烧伤膏联合应用治疗Ⅳ期压疮的疗效分析[J]. *中国烧伤创疡杂志*, 2020, 32(4): 245-247.
- [15] WANG C, CAO X, ZHANG Y. A novel bioactive osteogenesis scaffold delivers ascorbic acid, β -glycerophosphate, and dexamethasone in vivo to promote bone regeneration[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31612-31625.
- [16] KIM B S, AHN M, CHO W W, et al. Engineering of diseased human skin equivalent using 3D cell printing for representing pathophysiological hallmarks of type 2 diabetes in vitro[J]. *Biomaterials*, 2021, 272: 120776.
- [17] DAIKUARA L Y, YUE Z L, SKROPETA D, et al. In vitro characterisation of 3D printed platelet lysate-based bioink for potential application in skin tissue engineering[J]. *Acta Biomater*, 2021, 123: 286-297.
- [18] SHERA S S, BANIK R M. Development of tunable silk fibroin/xanthan biopolymeric scaffold for skin tissue engineering using L929 fibroblast cells[J]. *Journal of Bionic Engineering*, 2021: 103-117. DOI: 10.1007/S42235-021-0004-4.
- [19] 陈珍玉, 张小宁, 罗钰昕, 等. 丝素蛋白/姜黄素复合膜敷料促进皮肤创面愈合的评价[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(16): 2554-2561.

(收稿日期: 2021-08-24)