

Preparation and Evaluation of Biocompatibility of Acellular Dermal Matrix of Basa Fish (*Pangasius bocourti*)

Yuekun Wang, Hu Hou, Kai Zhang, Han Liu, Leilei Si, Bafang Li*

College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao Shandong
Email: wykun3344@163.com, *bfli@ouc.edu.cn

Received: Mar. 28th, 2018; accepted: Apr. 19th, 2018; published: Apr. 26th, 2018

Abstract

The low-immunogenic GA-BADM was derived from Basa fish (*Pangasius bocourti*) and prepared by decolorization, degreasing, decellularization and cross-linking. The microstructure of GA-BADM was evaluated by SEM. The biocompatibility of GA-BADM was investigated by blood compatibility, systemic acute toxicity, hypodermic implantation and cell compatibility according to the standards of Biological Evaluation of Medical Devices (GB/T 16886). The results showed that the GA-BADM was made up of double layers with one dense layer and another loose layer. The hemolysis rate of GA-BADM was far less than 5%, which implied high safety performance. After injection of GA-BADM extract, the weight of rats was increased, which meant no acute systemic toxicity. The samples with good histocompatibility, were gradually degraded after implanting *in vivo*. The samples had no cytotoxicity and could promote cell proliferation, which proved good cell compatibility. This study indicated that the GA-BADM materials had good biocompatibility, which provided a theoretical basis and technical guidance for the study of the acellular dermal matrix of aquatic organisms.

Keywords

Basa Fish Skin, Acellular Dermal Matrix, Biocompatibility, Biomedical Materials

巴沙鱼皮脱细胞真皮基质的制备及生物相容性评价

王月坤, 侯 虎, 张 凯, 刘 晗, 司磊磊, 李八方*

中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛
Email: wykun3344@163.com, *bfli@ouc.edu.cn
*通讯作者。

收稿日期：2018年3月28日；录用日期：2018年4月19日；发布日期：2018年4月26日

摘要

本研究以巴沙鱼皮为原料，通过脱色、脱脂、脱细胞和交联的方法，制备得到低免疫原性的巴沙鱼皮脱细胞真皮基质(GA-BADM)。通过扫描电镜探究GA-BADM的结构，通过GB/T 16886 医疗器械生物学评价标准规定的血液相容性试验、全身急性毒性试验、皮下植入试验以及细胞相容性试验探究GA-BADM的生物相容性。结果表明：样品呈双层膜结构，一侧疏松多孔，一侧致密光滑；材料溶血率远小于5%，安全性能高；GA-BADM浸提液注射后，大鼠体重呈现增加的现象，无全身急性毒性；材料植入体内，逐渐被降解吸收，具有良好的组织相容性；材料没有细胞毒性，且可以促进细胞增殖生长，具有良好的细胞相容性。本研究证实了GA-BADM材料具有良好的生物相容性，为开展水生生物脱细胞真皮基质的研究提供了理论基础以及技术指导。

关键词

巴沙鱼皮，脱细胞真皮基质，生物相容性，生物医用材料

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脱细胞真皮基质是一种由动物或人类皮肤制成的无细胞组织薄片。它去除了皮肤的全层表皮及真皮层中的全部细胞成分，保留了真皮的胶原成分和组织基本结构，同时也保留了基底膜成分，是一种较为理想的真皮替代物[1]。目前，脱细胞真皮基质的主要来源是猪皮和牛皮，而由于口蹄疫、疯牛病等疾病的传播和宗教信仰的限制，从水生生物中寻找替代来源变得越来越重要[2]。

巴沙鱼(*Pangasius bocourti*)是东南亚一带的重要经济鱼类，年产量 100 万吨以上，其加工食品远销世界 150 多个国家和地区。研究已经证实巴沙鱼皮可以被提取利用，具有制备生物材料的潜能。由于水生生物脱细胞真皮基质具有机械性能较差，热稳定性差，抗降解能力弱等缺点，这极大地限制了其在医用材料上的进一步发展[3] [4]。然而，随着改性技术的发展，水生生物脱细胞真皮基质的性能可以通过交联提升。戊二醛是一种传统交联剂，被广泛用于生物材料改性。

生物材料在临床使用过程中，需要与人的皮肤、血液等接触，有些医用材料甚至会长期的埋植于人体内，对临床使用阶段的医用材料必须要有严格的生物安全要求。因此，生物相容性是生物材料研究中需要考虑的首要问题[5]。根据医疗器械生物学评价 GB/T 16886 系列标准，进行生物材料的生物功能性试验，可以反映生物材料在体内外对实验对象的影响[6]。通过评价生物材料的生物相容性，有助于生物材料的研发和改进，为其临床应用提供可靠的参考依据。

近年来，脱细胞真皮基质膜成为研究的热点，但用鱼皮制备脱细胞真皮基质膜迄今未见有过报道。本研究以巴沙鱼皮为原料制备脱细胞真皮基质，通过戊二醛交联提升其理化性能，并根据 GB/T 16886 系列标准的方法对其生物相容性进行研究，为开展水生生物脱细胞真皮基质的研究提供理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料与仪器

2.1.1. 实验材料

巴沙鱼, 青岛市市北区沃尔玛超市; SPF 级雄性 Wista 大鼠, 青岛鲁抗实验动物技术有限公司; 戊二醛, 天津市瑞金特化学品有限公司; L929 成纤维细胞, MTT (噻唑蓝), CCK-8 细胞计数试剂盒, 上海信裕生物工程有限公司; 其它试剂均为分析纯。

2.1.2. 实验仪器

FD-1A-50 真空冷冻干燥机, 西安太康生物科技有限公司; JSM-840 扫描电子显微镜, 日本 JEOL 公司; HHS21-4 电热恒温水浴锅, 北京长安科学仪器厂; 电子精密天平, 奥豪斯国际贸易(上海)有限公司; 722s 可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; Power Wave XS2 酶标仪, 基因有限公司; AE2000 倒置显微镜, 广州市明美光电技术有限公司。

2.2. 实验方法

2.2.1. BADM 的制备

取新鲜鱼皮刮去残肉, 用自来水清洗干净并沥干。将鱼皮用 0.1% (w/v) 新洁尔灭溶液清洗消毒, 然后浸泡在 1% (w/v) 的 NaOH 溶液中 24 h, 每 6 h 换液一次, 脱去鱼皮中的脂肪。将脱脂后鱼皮浸泡在 1% (w/v) 的高锰酸钾溶液脱色处理 30 min, 然后将鱼皮浸泡在 2% (w/v) 的亚硫酸氢钠溶液脱色处理 1 h, 重复循环至鱼皮褐色褪去。将鱼皮置于 4% (w/v) 的 NaOH 溶液内消蚀处理 18 h, 间歇超声。经强碱消蚀处理的鱼皮清洗干净, 置于冰箱梯度冻融, 第一次冻结温度为 -20°C , 第二次冻结温度为 -40°C , 第三次冻结温度为 -80°C , 解冻温度均为常温, 冻融间隔时间为 4 h。将脱细胞后的鱼皮置于 0.25% (w/v) 戊二醛溶液中, 37°C 持续搅拌 10 min [7]。最后在冻干机中进行冻干, 得到改性巴沙鱼皮脱细胞真皮基质 (GA-BADM)。

2.2.2. SEM 观察

取将冻干的 GA-BADM 样品在真空下喷金, 用 SEM 观察其表面及断面, 加速电压 15 kV [8]。

2.2.3. 血液相容性

参照国标 GB/T16886.4-2011 医疗器械生物学评价中与血液接触安全要求, 采用腹主动脉取血法对 SD 大鼠取新鲜抗凝血。向 4 mL 新鲜抗凝血中加入 5 mL 的生理盐水稀释待用。GA-BADM 材料裁剪成 0.5 cm \times 2.5 cm 的小条, 称样 3 份, 每份 5 g。每份材料加入 50 mL 生理盐水浸泡 24 h, 倒去浸泡液, 加入 10 mL 生理盐水, 超纯水为阳性对照, 生理盐水为阴性对照。各组置于 37°C 下恒温水浴 30 min, 然后向各种分别加入稀释后的抗凝血 0.2 mL, 混和均匀, 在 37°C 下水浴 1 h。然后各组在 2000 rpm 条件下离心 5 min 后得上清液, 用 722s 型可见分光光度计于 545 nm 波长处测定各组的吸光度[9]。溶血率公式为: 溶血率 (%) = (样品吸光度 - 阴性对照吸光度)/(阳性对照吸光度 - 阴性对照吸光度) \times 100%。

2.2.4. 全身急性毒性

参照国标 GB/T 16886.11 医疗器械生物学评价全身急性毒性要求, 我们对 GA-BADM 样品进行全身急性毒性实验。以 GA-BADM 浸提液为样品组, 生理盐水为阴性对照, 苯酚为阳性对照, 并通过腹腔注射上述液体。大鼠单笼单只饲养, 饲料按照 5 g/100g 体重的固定量添加, 注射 24 h、48 h 和 72 h 后观察并记录大鼠的反应状况和体重变化[10]。

2.2.5. 皮下植入

将雄性 Wista 大鼠麻醉后固定于鼠架台上，背部消毒，沿脊背中线开 0.8~1.0 cm 的切口。然后将复水软化的 GA-BADM 样品埋植其中，缝合包扎(图 1)。于术后 7、14、21、28 天取出 GA-BADM 样品，固定在 10% (v/v)福尔马林进行 H & E 染色[11] [12]。

2.2.6. 细胞毒性试验

L929 成纤维细胞(1×10^4 个/孔)接种于 96 孔板，常规培养 24 h 后换液。实验组加 GA-BADM 样品浸提液，空白对照组加培养液，阳性对照组加苯酚溶液。继续培养 24 h 后，每孔加入 200 μ L MTT 溶液，培养 4 h。随后，加入 DMSO 溶液(100 μ L 每孔)震荡 10 min。最后，用酶标仪测定其在 570 nm 处的吸光度。根据上述方法，调整细胞密度为 3×10^4 个/孔，培养第三天用倒置显微镜观察细胞形态。

2.2.7. 细胞增殖试验

CCK-8 细胞计数试剂盒用来评估细胞在 GA-BADM 样品上的增殖生长能力。L929 成纤维细胞(1×10^5 个/孔)接种于含 GA-BADM 样品和不含 GA-BADM 样品的 48 孔培养板中。分别于 1, 3, 5 天拿出一块培养板，加入 CCK-8 试剂培养 3 h，用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度。

2.3. 数据处理

运用 Origin 9.0 数据处理软件对实验结果进行处理，所有数据均为 6 次重复实验的平均值。采用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析($p < 0.05$ 为差异显著)。

3. 结果与讨论

3.1. 外观形态特征及微观结构

制备的 GA-BADM 样品呈白色，表面平整，冻干前质地柔软，易折叠，冻干后质地较硬，不易折叠。扫描电镜结果表明，GA-BADM 样品呈不规则的立体网状多孔结构(见图 2(A))，孔径范围为 10 μ m 到 200 μ m。CM Murphy [13]等研究发现，多孔结构有利于细胞的黏附和增殖。图 2(B)和图 2(C)可以看出，GA-BADM 样品具有双层结构，一面致密光滑，一面疏松多孔，有利于生物材料的应用[14]。



Figure 1. The implantation process of GA-BADM
图 1. GA-BADM 的植入图

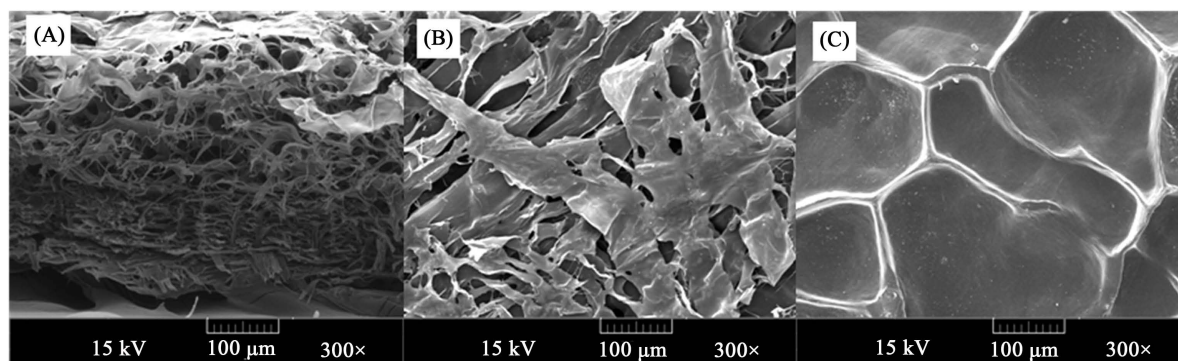


Figure 2. SEM photographs of GA-BADM ((A): Section; (B): Rough surface; (C): Smooth surface)

图 2. GA-BADM 的电镜图((A): 断面, (B): 粗糙面, (C): 光滑面)

3.2. 溶血率

溶血率是血液相容性的一项重要指标, 可以验证 GA-BADM 与血细胞之间是否具有相容性[15]。GA-BADM 与红细胞相接触后, 红细胞破裂释放出的血红素物质可被分光光度计在 545 nm 处检测出, 以此评定受试物的溶血程度, 溶血率越高, 表明受试物对血细胞的破坏程度越大。参照国标 GB/T 16886.4, 溶血率范围小于 5%, 则符合医用材料溶血率要求的; 溶血率大于 5%, 则判定医用材料对红细胞有破坏作用[16]。GA-BADM 的溶血率为 $1.76\% \pm 0.43\%$, 远低于医用材料的国家标准, 结果表明 GA-BADM 样品在国家生物材料的溶血性安全评价范围内。

3.3. 全身急性毒性

全身急性毒性实验可作为验证生物材料与动物个体是否具有生理相容性的一项重要指标[17]。表 1 所示为注射 24 h、48 h 和 72 h 后, 不同组别大鼠平均体重变化情况。可以看出实验组与生理盐水组相比, 没有出现体重明显减轻的情况, 均出现体重增加的现象, 注射后 72 h 内均未出现任何毒性症状。说明 GA-BADM 样品在国家生物材料全身急性毒性的安全评价范围内。

3.4. 皮下植入

本研究, GA-BADM 样品植入后, 术后大鼠背部伤口逐渐愈合, 未见组织坏死(图 3(A))。另外, GA-BADM 植入物术后各周, 均可看出原来形状。4 周后, 样品被含有血管的薄纤维状组织完全包裹, 与大鼠结缔组织紧密结合。图 3(B)为不同时间段植入物的显微照片, 可以看出样品被大鼠成纤维细胞、巨噬细胞逐渐侵入。4 周之后, GA-BADM 样品中胶原纤维仍可见, 未见淋巴细胞浸润带。Helenius G 等[18]研究发现, 4 周后植入物没有引起任何异物反应, 与大鼠结缔组织紧密结合, 说明了植入物具有良好的组织相容性。本研究结果与 Helenius G 等人的研究结果相似, 表明 GA-BADM 材料具有良好的组织相容性。

3.5. 细胞毒性

细胞毒性实验主要通过 MTT 比色法检测材料浸提液对 L929 成纤维细胞生长活性的影响, 评价材料的生物毒性[19]。如图 4 所示, GA-BADM 浸提液组与空白对照组的 OD 值没有显著性差异($p > 0.05$), 且均显著高于阳性对照组($p < 0.05$)。细胞培养三天后, 在倒置显微镜下观察样品组、空白对照组和阳性对照组的细胞生长状态(图 5), 发现样品组和空白对照组细胞生长状态良好, 细胞呈梭形, 贴壁成片生长, 而阳性对照组的细胞变圆, 皱缩死亡。结果表明, 细胞在 GA-BADM 浸提液中生长良好, 没有出现细胞毒性。

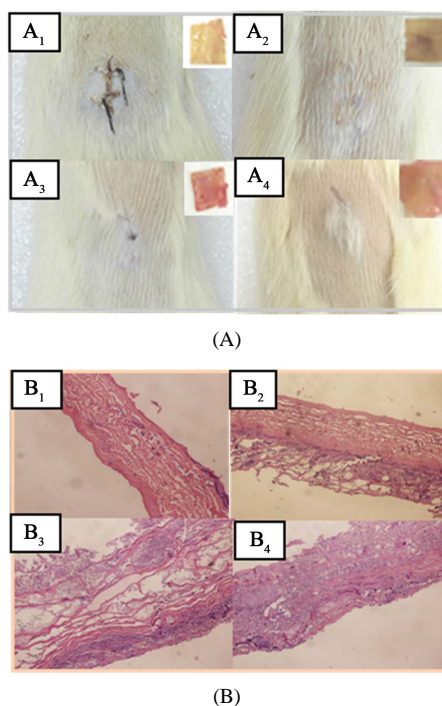


Figure 3. Subcutaneous immunoreaction of GA-BADM implants. (A) Recovery of rat's back around implanted GA-BADM and the GA-BADM implants at different time point; (B): Photomicrographs of the GA-BADM at different time point. A1- B1, A2- B2, A3- B3, A4- B4 mean 1, 2, 3, 4 weeks

图 3. GA-BADM 样品在皮下的免疫反应。(A) 不同植入时间的大鼠背部恢复情况和 GA-BADM 样品; (B) 不同植入时间, GA-BADM 样品的显微照片。A1、B1, A2、B2, A3、B3, A4、B4 分别代表 1, 2, 3, 4 周

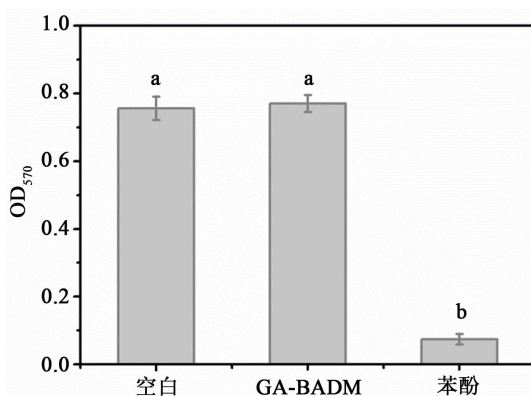


Figure 4. Cytotoxicity for L929 fibroblasts of extract from GA-BADM samples

图 4. GA-BADM 浸提液 L929 成纤维细胞毒性结果

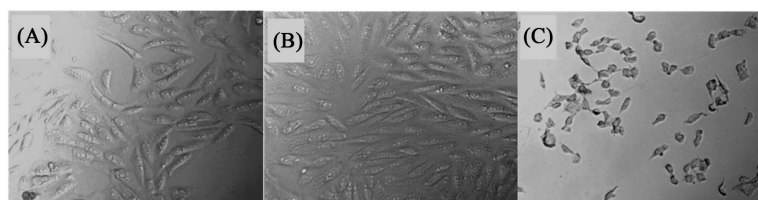


Figure 5. The growing status of cells of samples, negative control and positive control on the third day ((A) Negative control; (B) GA-BADM samples; (C) Positive control)

图 5. 样品组、空白对照组、阳性对照组的细胞在第三天的生长状态((A) 空白对照组; (B) 样品组; (C) 阳性对照组)

3.6. 细胞增殖

细胞能否在材料表面增殖生长是决定材料是否适用于组织工程领域应用的重要指标[20]。L929 成纤维细胞在样品上的增殖情况如图 6 所示, 细胞在 GA-BADM 材料表面和空白对照表面均出现了良好的增殖趋势, 差异不明显($p > 0.05$)。结果表明, L929 成纤维细胞可以在 GA-BADM 材料上增殖生长。研究表明, 脱细胞真皮基质的主要成分是胶原蛋白[21]。张其清等[22]人在另外的研究中发现胶原蛋白具有低免疫原性、生物相容性、可生物降解性等生物学性能。C. Röhlecke 等[23]人在前期研究中报道, 胶原蛋白制备的生物材料对细胞的黏附和生长活性有良好的促进作用。结果表明, 本研究制备的 GA-BADM 材料具有良好的生物相容性和促细胞增殖能力, 可以应用于医用材料领域。

4. 结论

本研究制备了改性巴沙鱼皮脱细胞真皮基质(GA-BADM), 通过 SEM 观察, 材料内部疏松多孔, 且具有双层结构, 有利于细胞的生长和黏附。本研究进一步从血液相容性、全身急性毒性、皮下植入以及细胞相容性对其生物相容性进行了研究, 结果表明 GA-BADM 材料无溶血性, 无全身急性毒性, 具有良好的组织相容性和细胞相容性, 为进一步探究鱼皮源脱细胞真皮基质的应用奠定了良好的理论基础。

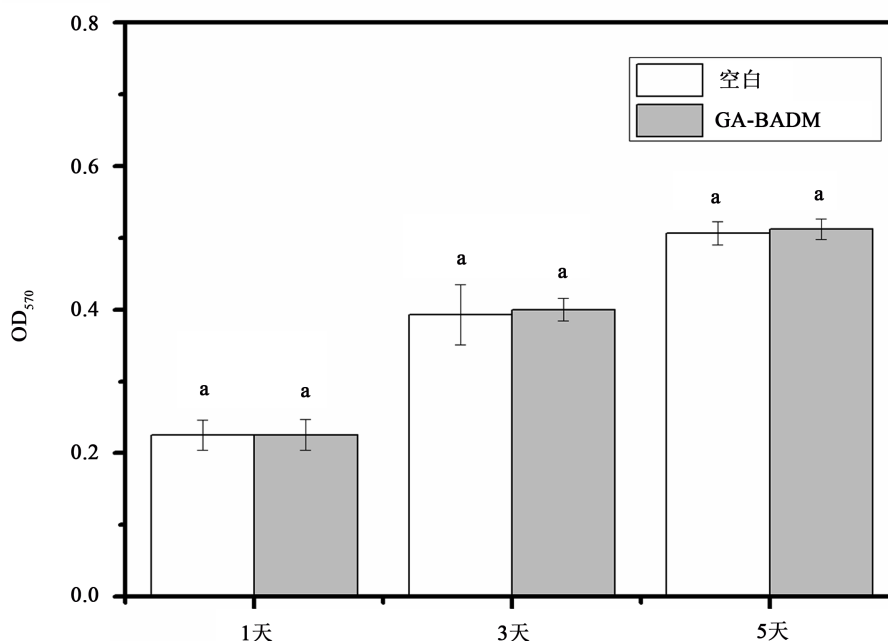


Figure 6. Cell proliferation for L929 fibroblasts on GA-BADM samples

图 6. GA-BADM 材料促进 L929 成纤维细胞增殖结果

Table 1. The average body weight of rats (g) (n = 6)

表 1. 各组大鼠的平均体重(g) (n = 6)

组别	注射前	注射后		
		24 h	48 h	72 h
生理盐水组	170	174	185	190
GA-BADM 样品	171	174	181	186
阳性对照组	169	158	167	179

致 谢

感谢国家自然科学基金资助项目(31471606); 青岛海洋生物医药研究院资助项目(M17F02)对本研究工作的支持。

声 明

本研究所用动物在无病原体环境中饲养, 涉及动物及其护理的程序符合美国国立卫生研究院指南, 且已被中国海洋大学伦理委员会批准。

参考文献

- [1] 史新立, 谭芳奕, 陈冰. 脱细胞真皮基质材料的研究及应用[J]. 透析与人工器官, 2009, 20(2): 34-40.
- [2] 赵利敏, 张庆泉, 孙岩, 等. 异种脱细胞真皮基质在鼻中隔缺损修复中的应用[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2009(5): 31-32.
- [3] 龚明. 巴沙鱼皮胶原蛋白的理化性质及其止血应用研究[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 江西师范大学, 2015.
- [4] 竺可桢. 物理学[M]. 北京: 科学出版社, 1973: 1-3.
- [5] 宋金红. 巴沙鱼皮明胶生产工艺研究及工厂设计[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [6] 周辉, 梁瑜. 多种生物材料细胞生物相容性及其安全性的系统评价[J]. 中国组织工程研究, 2009, 13(38): 7559-7562.
- [7] 邓乐君, 樊鸿浩, 李伟达, 等. 可吸收止血材料的生物相容性研究进展[J]. 中国生物医学工程学报, 2016, 35(2): 241-246.
- [8] Umashankar, P.R., Arun, T. and Kumari, T.V. (2011) Short Duration Gluteraldehyde Cross Linking of Decellularized Bovine Pericardium Improves Biological Response. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **97A**, 311-320. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33061>
- [9] 陈博. 新生小牛与成人皮肤组织学及生物力学性能的比较和牛脱细胞真皮基质的制备[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 第三军医大学, 2012.
- [10] 张伶俐, 朱蔚精, 谭云飞, 等. 生物材料溶血性标准化评价方法比较: 溶血率法和氰化高铁血红蛋白法[J]. 生物医学工程杂志, 2004, 21(1): 111-114.
- [11] 刘良明, 田昆仑, 范小青, 等. 异丁基壳聚糖多功能敷料的生物安全性[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(5): 39-42.
- [12] Shin, Y.N. (2007) An *in Vivo* Study of the Host Tissue Response to Subcutaneous Implantation of Plga- and/or Porcine Small Intestinal Submucosa-Based Scaffolds. *Biomaterials*, **28**, 5137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.014>
- [13] 冯玉萍. 胎牛皮脱细胞真皮基质在组织工程中的应用[D]: [博士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [14] Murphy, C.M., Haugh, M.G. and O'Brien, F.J. (2010) The Effect of Mean Pore Size on Cell Attachment, Proliferation and Migration in Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, **31**, 461. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
- [15] 但年华, 但卫华, 曾睿, 等. 碳化二亚胺改性脱细胞猪真皮基质的性能研究[J]. 功能材料, 2007, 38(8): 1389-1392.
- [16] 李鸿, 李玉宝, 严永刚, 等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 多孔材料制备和生物安全性初步评价[J]. 生物医学工程杂志, 2008, 25(5): 1126-1129.
- [17] 许乾慰, 肖世英. 脂肪族聚氨酯弹性体肝素化的血液相容性[J]. 中国组织工程研究, 2007, 11(13): 2415-2419.
- [18] 王春仁, 姜华, 曹宏英, 等. 止血防粘连生物纸的生物相容性研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2007, 26(2): 293-295.
- [19] Helenius, G., Backdahl, H.A., Nannmark, U., Gatenholm, P. and Risberg, B. (2006) *In Vivo*, Biocompatibility of Bacterial Cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **76**, 431-438. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30570>
- [20] 王昕, 施熾萍, 朱雪涛, 等. MTT 法评价医用高分子材料的细胞毒性[J]. 生物医学工程研究, 2003, 22(1): 46-47.
- [21] 金丹, 裴国献, 王前. 骨髓基质细胞与生物活性玻璃陶瓷和聚乳酸生物相容性的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(1): 39-43.
- [22] Wei, P., Laurell, L., Geivelis, M., Lingen, M.W. and Maddalozzo, D. (2000) Acellular Dermal Matrix Allografts to

Achieve Increased Attached Gingiva. Part 1. A Clinical Study. *Journal of Periodontology*, **71**, 1297-1305.
<https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.8.1297>

[22] 张其清, 王淳. 胶原蛋白-合成高分子复合材料的研究现状和发展方向[J]. 中国科学基金, 1995(4): 14-18.

[23] Roehlecke, C., Witt, M., Kasper, M., Schulze, E., Wolf, C., Hofer, A., *et al.* (2000) Synergistic Effect of Titanium Alloy and Collagen Type I on Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation of Osteoblast-Like Cells. *Cells Tissues Organs*, **168**, 178. <https://doi.org/10.1159/000047833>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-7613, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ms@hanspub.org