

• 实验研究 Experimental research •

基于生物 3D 打印技术的芍药苷-海藻酸钠-明胶
皮肤支架体外生物相容性研究

余海洋, 游德淑, 顾晓诚, 梅峻豪, 秦立昊, 王 凯, 刘 纯, 王 云, 贾中芝

【摘要】 目的 探讨采用生物 3D 打印技术制备的芍药苷-海藻酸钠(SA)-明胶皮肤支架的体外生物相容性。**方法** 通过生物 3D 打印技术制备质量百分比分别为 0、1、3、5、10%的芍药苷-SA-明胶皮肤支架。采用扫描电子显微镜(SEM)观察其表面形态结构,高效液相色谱仪检测芍药苷累积释放浓度。将大鼠皮肤成纤维细胞与其共培养 3 d,行 Live/Dead 染色,观察支架表面细胞存活和生长状态,检测 1、2、3 d 时细胞增殖、羟脯氨酸和白细胞介素(IL)-6 表达水平。**结果** SEM 显示 5 组皮肤支架均呈多孔网状立体结构,孔隙均匀。3%组皮肤支架表面较其他 4 组光滑。药物累积释放量随着时间延长逐渐增加,10 %皮肤支架组在各时点的释放均高于其他 4 组。Live/Dead 染色显示细胞在 5 组皮肤支架表面均能较好地黏附,生长良好,SEM 显示 3%组皮肤支架活细胞数多于其他 4 组。3%组皮肤支架的细胞增殖率、羟脯氨酸分泌水平显著高于其他 4 组(均 $P < 0.05$),IL-6 表达水平显著低于 0 和 1%组($P < 0.01$),但高于 10%组($P < 0.01$)。**结论** 3%芍药苷-SA-明胶皮肤支架实现了生物效应与细胞毒性的平衡,具有良好的生物相容性和胶原蛋白分泌效应,可有效抑制炎症反应发生,有望为糖尿病足溃疡创面修复提供一种可降解的生物皮肤支架。

【关键词】 生物 3D 打印; 皮肤支架; 芍药苷; 海藻酸钠; 明胶; 生物相容性; 体外

中图分类号:R318 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2022)-06-0582-05

Bio-3D printing technique-based paeoniflorin-sodium alginate-gelatin skin scaffold: an experimental study of its biocompatibility in vitro YU Haiyang, YOU Deshu, GU Xiaocheng, MEI Junhao, QIN Lihao, WANG Kai, LIU Chun, WANG Yun, JIA Zhongzhi. Department of Interventional and Vascular Surgery, Affiliated Changzhou Municipal No.2 People's Hospital, Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu Province 213003, China

Corresponding author: WANG Yun, E-mail: wangy1230@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the biocompatibility of paeoniflorin-sodium alginate(SA)-gelatin skin scaffold that is prepared based on bio-3D printing technique through experiment in vitro. **Methods** By using bio-3D printing technique the skin scaffolds with the mass fraction of paeoniflorin-SA-gelatin of 0%, 1%, 3%, 5% and 10%(five groups in total) were separately prepared. Scanning electron microscope(SEM) was used to observe the surface morphology of the skin scaffold, and the cumulative release concentration of paeoniflorin was determined by high performance liquid chromatography(HPLC). The rat skin fibroblasts were co-cultured with the scaffold for 3 days. Live/Dead staining was performed on the 3rd day to observe the survival and growth status of the cells on the scaffold surface. The cell proliferation, hydroxyproline and IL-6 levels were tested on the 1st, 2nd and 3rd day separately. **Results** SEM demonstrated that the skin scaffold assumed a porous network stereoscopic structure appearance with uniform pores in all five groups. The scaffold surface of 3% group was smoother than that of all the other four groups. The cumulative release concentration of paeoniflorin was gradually increased with the time passing, the cumulative release concentration at each

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.06.012

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划面上项目(MS2021056),常州市卫生健康委重大科技项目(ZD201912)

作者单位: 213003 江苏 南京医科大学附属常州第二人民医院介入血管科(余海洋、顾晓诚、梅峻豪、秦立昊、王 凯、王 云、贾中芝)、放射科(游德淑)、中心实验室(刘 纯)

通信作者: 王 云 E-mail: wangy1230@sina.com.cn

time-point in 10% group was higher than that in the other four groups. Live/Dead staining revealed that in all the five groups the cells could well adhere to the skin scaffold surface and grew well. SEM showed that the number of survival cells on the scaffold surface in 3% group was larger than that in the other four groups. The cell proliferation rate and the hydroxyproline secretion level in 3% group were significantly higher than those in the other four groups ($P < 0.05$), while IL-6 expression level in 3% group was remarkably lower than that in 0% group and 1% group ($P < 0.01$) but prominently higher than that in 10% group ($P < 0.01$). **Conclusion** The paeoniflorin-SA-gelatin skin scaffold with 3% mass fraction achieves a balance between biological effect and cytotoxicity, and it carries good biocompatibility and collagen secretion effect, which can effectively inhibit the inflammatory reaction. It is expected that bio-3D printing technique-based paeoniflorin-SA-gelatin skin scaffolds with 3% mass fraction will become a biodegradable skin scaffold for the treatment of diabetic foot ulcer wound. (J Intervent Radiol, 2022, 31: 582-586)

【Key words】 3D bio-printing; skin scaffold; paeoniflorin; sodium alginate; gelatin; biocompatibility; in vitro

糖尿病足部溃疡导致的创面新生血管形成不良、局部炎性反应、血小板聚集等加重了创面局部细胞损伤,进而形成难治性创面,已成为临床上棘手的难题^[1-3]。芍药苷是一种中药单体成分,具有抗炎、镇痛、镇静、保护细胞活性、免疫调节等多种作用,广泛应用于临床^[4-6]。近年来,生物 3D 打印技术逐渐应用于人工皮肤支架制备^[7-9]。本研究采用生物 3D 打印技术,将芍药苷与海藻酸钠(sodium alginate,SA)、明胶制成人工皮肤支架,并对其生物相容性进行评价,以期糖尿病足部慢性创面的修复提供一种中药生物 3D 打印皮肤支架,促进糖尿病足部慢性创面愈合。

1 材料与方法

1.1 皮肤支架制备

生物墨水制备:将一定量的芍药苷完全溶解于 20 mL 去离子水,然后加入 0.8 g SA 粉末及装有 2 g 明胶颗粒的烧杯中,40℃水浴电磁搅拌 2 h,按照芍药苷的质量占明胶与 SA 总重百分比(wt%)分别制成 0、1、3、5、10%的生物 3D 打印墨水。

采用生物 3D 打印机(瑞士 RegenHU 公司)及其配套 BioCAD 软件设计的模型(15 mm×15 mm,厚度 4 层,间距 0.8 mm),将生物墨水加入 3D 打印机热熔针筒中,针筒加热至 40℃,然后调节为 37℃恒温,气压 0.25 MPa,距离 2 mm,打印速度 6 mm/s,针头 25 G,分别打印出 0、1、3、5、10%芍药苷-SA-明胶的皮肤支架。

1.2 皮肤支架药物释放

将透析袋(截留相对分子量 3 500)置于沸水中煮 10 min,待其活化后剪成半透膜,固定于扩散池的供给池与接受池之间;向接受池中加入 14.8 mL

已预热至 35℃ 的 0.9%氯化钠溶液作为接受液,注意排除气泡。转速为 200 r/min,向供给池中加 3 mL 0.9%氯化钠溶液并封口,将样品浸在 200 μL 0.9%氯化钠溶液中,30 min 后供给池中加完 0.9%氯化钠溶液及处理后的样品 35 mg,立刻启动透皮仪并开始计时;分别于 0.5、1、2、4、8、12、24、48、72 h 时点取出 0.6 mL 接受液,置于离心管中,加入 0.6 mL 35℃ 0.9%氯化钠溶液并排除气泡。样品 12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,过 0.22 μm 滤膜后用液相色谱仪检测。色谱条件:①流动相,甲醇:0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为 32:68;②检测波长,230 nm;③流速,1.0 mL/min;④柱温,30℃。

1.3 皮肤支架生物相容性

将皮肤支架与大鼠皮肤成纤维细胞共培养 3 d 后,行 Live/Dead 染色,荧光显微镜下观察皮肤支架表面细胞存活和黏附情况,扫描电子显微镜(SEM)下观察皮肤支架表面细胞黏附和生长情况。

将大鼠皮肤成纤维细胞与皮肤支架置入 24 孔板中,4×10⁴/孔密度种植,共培养 1、2、3 d,加入细胞计数试剂盒(CCK)-8 中检测细胞增殖情况;检测羟脯氨酸和白细胞介素(IL)-6 表达水平。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。所有实验至少重复 3 次,最后取实验数据平均值,以均数±标准差表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 皮肤支架宏观和微观结构

肉眼观:5 种规格皮肤支架均呈网格状,孔径均

匀(图 1)。SEM:5 种规格皮肤支架均为多孔网状立体结构,孔隙均匀,3%组皮肤支架表面较其他 4 组光滑(图 2)。

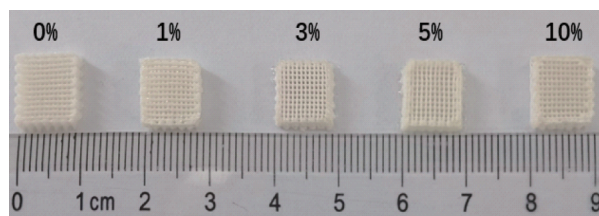


图 1 不同规格芍药苷-SA-明胶皮肤支架的宏观形貌

2.2 皮肤支架药物释放

药物累积释放量随着时间延长逐渐增加,10%皮肤支架组在各时点的释放均高于其他 4 组(图 3)。

2.3 皮肤支架细胞黏附和增殖

Live/Dead 染色:细胞与皮肤支架共培养 3 d 后,在各组皮肤支架表面均能较好地黏附与生长,

但 3%组皮肤支架活细胞数多于其他 4 组;SEM:细胞与皮肤支架共培养 3 d 时,细胞能在皮肤支架表面黏附和生长,见图 4。

CCK-8 检测细胞增殖率:在 1 d 时,0、1、3、5、10%组分别为 $(0.47 \pm 0.04)\%$ 、 $(0.39 \pm 0.02)\%$ 、 $(0.39 \pm 0.01)\%$ 、 $(0.38 \pm 0.02)\%$ 、 $(0.39 \pm 0.02)\%$,0 组显著高于 1、3、5、10%组($P=0.045$ 、 0.035 、 0.032 、 0.032),1、

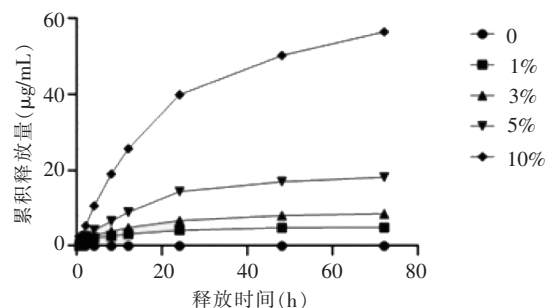


图 3 皮肤支架药物释放曲线

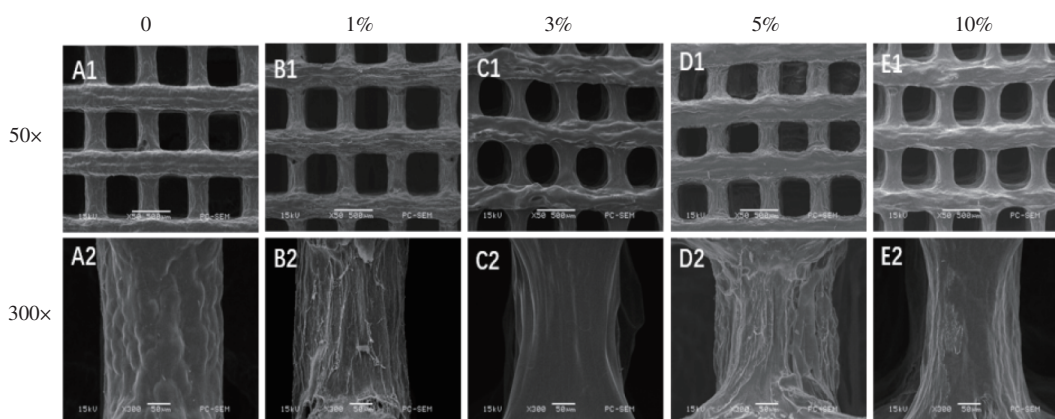
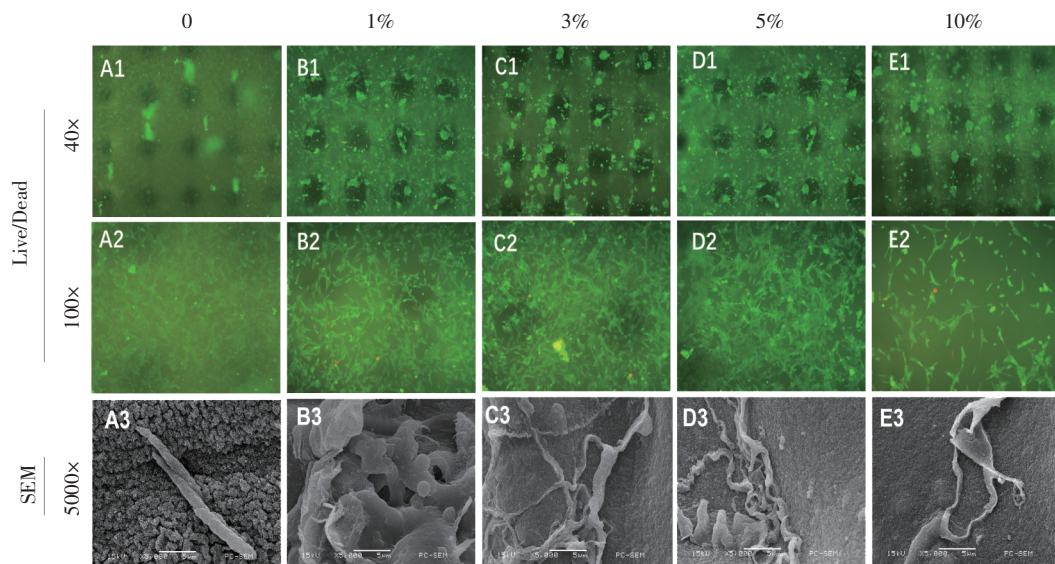


图 2 SEM 下不同规格芍药苷-SA-明胶皮肤支架的表面形貌



图中活细胞显示绿色,死细胞显示红色

图 4 大鼠皮肤成纤维细胞在 5 组皮肤支架表面生长情况

3、5、10%组间差异无统计学意义(均 $P>0.05$);2 d 时,0、1、3、5、10%组分别为 $(0.54\pm 0.02)\%$ 、 $(0.41\pm 0.02)\%$ 、 $(0.40\pm 0.02)\%$ 、 $(0.41\pm 0.01)\%$,0 组显著高于其他 4 组(均 $P<0.01$),1、3、5、10%组间差异无统计学意义(均 $P>0.05$);3 d 时,0、1、3、5、10%组分别为 $(0.74\pm 0.01)\%$ 、 $(0.74\pm 0.05)\%$ 、 $(0.85\pm 0.05)\%$ 、 $(0.7\pm 0.05)\%$ 、 $(0.56\pm 0.04)\%$,3%组显著高于 0、1、5、10%组($P=0.022, 0.048, 0.020, 0.002$),见图 5。

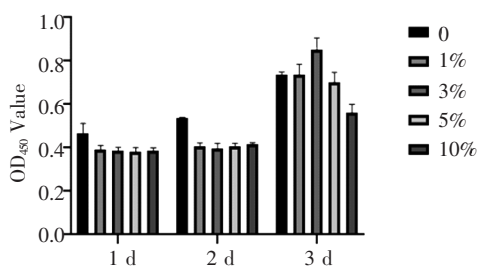


图 5 大鼠皮肤成纤维细胞增殖水平

2.4 皮肤支架对羧脯氨酸分泌的影响

细胞与皮肤支架共培养后羧脯氨酸分泌水平:1 d 时,0 组 $[(2.51\pm 0.03) \mu\text{g/mL}]$ 显著低于 3%组 $[(2.73\pm 0.06) \mu\text{g/mL}, P=0.006]$ 、5%组 $[(2.77\pm 0.12) \mu\text{g/mL}, P=0.020]$;2 d 时,0 组 $[(4.21\pm 0.10) \mu\text{g/mL}]$ 显著低于 1%组 $[(5.19\pm 0.28) \mu\text{g/mL}, P=0.005]$ 、3%组 $[(5.13\pm 0.23) \mu\text{g/mL}, P=0.003]$ 、5%组 $[(4.79\pm 0.33) \mu\text{g/mL}, P=0.043]$ 、10%组 $[(5.11\pm 0.10) \mu\text{g/mL}, P<0.01]$;3 d 时,3%组 $[(6.24\pm 0.34) \mu\text{g/mL}]$ 显著高于 0 组 $[(4.93\pm 0.12) \mu\text{g/mL}, P=0.003]$ 、1%组 $[(5.66\pm 0.17) \mu\text{g/mL}, P=0.030]$ 、5%组 $[(5.28\pm 0.17) \mu\text{g/mL}, P=0.012]$ 、10%组 $[(5.34\pm 0.41) \mu\text{g/mL}, P=0.042]$,见图 6。

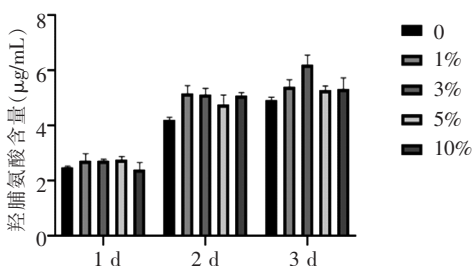


图 6 羧脯氨酸分泌水平

2.5 皮肤支架对 IL-6 分泌的影响

细胞与皮肤支架共培养后 IL-6 表达水平:1 d 时,0、1、3、5、10%组分别为 $(141.77\pm 16.19) \text{ pg/mL}$ 、 $(150.32\pm 0.69) \text{ pg/mL}$ 、 $(136.77\pm 15.03) \text{ pg/mL}$ 、 $(116.99\pm 10.12) \text{ pg/mL}$ 、 $(56.21\pm 8.04) \text{ pg/mL}$,10%组显著低于其他 4 组(均 $P=0.001$);2 d 时,0、1、3、5、10%组分别为 $(177.88\pm 8.00) \text{ pg/mL}$ 、 $(158.66\pm 11.86) \text{ pg/mL}$ 、

$(146.66\pm 14.51) \text{ pg/mL}$ 、 $(136.32\pm 4.91) \text{ pg/mL}$ 、 $(127.21\pm 3.34) \text{ pg/mL}$,0 组高于 3%组、5%组、10%组($P=0.031, 0.002, 0.001$),1 组高于 5%组、10%组($P=0.040, 0.011$);3 d 时,3%组 $[(165.1\pm 1.73) \text{ pg/mL}]$ 显著低于 0 组 $[(231.21\pm 10.59) \text{ pg/mL}, P<0.01]$ 、1%组 $[(180.77\pm 2.08) \text{ pg/mL}, P<0.01]$,显著高于 10%组 $[(142.54\pm 1.54) \text{ pg/mL}, P<0.01]$,见图 7。

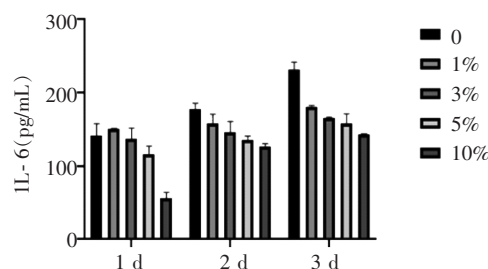


图 7 IL-6 表达水平

3 讨论

随着我国糖尿病患者逐年增多,糖尿病足溃疡发病率逐年升高,其治疗已成为临床上巨大挑战^[10-12]。人工皮肤在糖尿病足溃疡救治过程中发挥着重要作用^[13]。近年来生物 3D 打印技术飞速发展,通过该技术能快速获得个性化的人工皮肤支架,逐渐在糖尿病足溃疡救治方面展现出独特优势,但目前基于生物 3D 打印技术获得的皮肤支架仍处于起始阶段,需要深入研究^[13-14]。

生物 3D 打印技术的关键是生物墨水选择与制备,目前常用于生物墨水的材料有海藻酸盐、明胶、胶原蛋白、壳聚糖等,这些材料各有优缺点^[7]。本研究采用 SA、明胶及芍药苷作为生物墨水成分,主要优点是:SA 作为一种天然多糖,具有高稳定性、溶解性、黏性和安全性等特点^[15];明胶具有较高的生物相容性和可降解性,其在体内降解后不产生副产物,无免疫原性^[16];芍药苷具有抗炎、镇痛、镇静、保护细胞活性、免疫调节等多种作用,不但在糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变的防治中得到广泛应用,还在糖尿病足溃疡创面愈合过程中发挥着重要作用^[4-6]。本研究初步验证了应用 SA、明胶、芍药苷制作生物墨水,可获得较为理想的皮肤支架。虽然在宏观方面无法区分 5 组支架,但在微观结构上,3%芍药苷-SA-明胶皮肤支架较其他 4 组支架明显光滑,这种结构方面的差异,可进一步影响细胞生长黏附,从而证实 3%芍药苷-SA-明胶皮肤支架组较其他 4 组支架更加适宜细胞生长。

羧脯氨酸是构成结缔组织中胶原蛋白的主要

成分之一,在促进糖尿病足溃疡创面修复过程中发挥着极其重要的作用^[17]。胶原蛋白具有低免疫原性、良好的生物相容性,可促进创面修复,维持新生肉芽组织弹性和强度等功能,其量的多少直接影响糖尿病足溃疡创面修复过程^[18]。本研究证实,3%芍药苷-SA-明胶皮肤支架组羟脯氨酸分泌量显著高于其余4组(与前面证实的该支架更适宜细胞生长的结果一致)。这也与芍药苷药物浓度有关,随着累积释放量增加,其抗炎作用增强的同时也对细胞产生一定的杀伤作用,细胞数量多少是影响羟脯氨酸释放量的因素之一。因此,3%芍药苷-SA-明胶组皮肤支架具有较高的生物相容性,并可促进胶原蛋白分泌,从而加速糖尿病足溃疡创面愈合。

IL-6 是成纤维细胞产生的细胞因子之一,在炎症反应过程中起着重要作用^[19]。炎症细胞和炎症因子浸润导致了糖尿病足溃疡创面难以愈合。本研究发现 10%芍药苷-SA-明胶皮肤支架的 IL-6 表达水平显著低于其余 4 组,说明芍药苷可很好地抑制 IL-6 释放,减轻局部炎症反应,但其细胞毒性也随着药物浓度的增加而增大^[20],而 3%芍药苷-SA-明胶皮肤支架在降低局部炎症反应的同时具有较低的细胞毒性,可有效抑制支架局部炎症反应,从而加快糖尿病足溃疡创面修复。

糖尿病足溃疡创面愈合是一极其复杂的过程,包括抑制炎症反应、胶原蛋白沉积、新生表皮成纤维细胞增殖、血运重建等^[21]。本研究针对影响糖尿病足溃疡修复的主要因素进行的体外研究,发现 3%芍药苷-SA-明胶皮肤支架可促进成纤维细胞增殖和胶原蛋白释放,同时可有效抑制炎症反应,希望可为糖尿病足溃疡创面修复提供一种理想的皮肤支架。

本研究不足:仅进行体外实验研究,未进行体内验证,下一步将开展糖尿病大鼠慢性创面的动物实验,以验证以上理论;SEM 下观察 5 组皮肤支架上的细胞数量明显减少,可能与皮肤支架的脱水处理会引起细胞脱落有关;3%芍药苷-SA-明胶皮肤支架的降解时间曲线,仍需要进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Aumiller WD, Dollahite HA. Pathogenesis and management of diabetic foot ulcers[J]. JAAPA, 2015, 28: 28-34.
- [2] Jneid J, Lavigne JP, Scola BL, et al. The diabetic foot microbiota: a review[J]. Human Microbiome J, 2017, 9: 1-6.
- [3] Hobizal KB, Wukich DK. Diabetic foot infections: current concept review[J]. Diabet Foot Ankle, 2012, 3: 1-8.
- [4] Wang P, Wang W, Shi Q, et al. Paeoniflorin ameliorates acute necrotizing pancreatitis and pancreatitis-induced acute renal injury[J]. Mol Med Rep, 2016, 14: 1123-1131.
- [5] Jia Z, He J. Paeoniflorin ameliorates rheumatoid arthritis in rat models through oxidative stress, inflammation and cyclooxygenase 2[J]. Exp Ther Med, 2016, 11: 655-659.
- [6] 张育贵,张淑娟,边甜甜,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中草药, 2019, 50:3735-3740.
- [7] Pahlevanzadeh F, Mokhtari H, Bakhsheshi - Rad HR, et al. Recent trends in three-dimensional bioinks based on alginate for biomedical applications[J]. Materials(Basel), 2020, 13: 3980.
- [8] Zhou G, Liu W, Zhang Y, et al. Application of three-dimensional printing in interventional medicine[J]. J Intervent Med, 2020, 3: 1-16.
- [9] 陈 川,周 耕,卢 川,等. 三维打印快速仿形技术在介入医学领域的应用价值[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25:734-737.
- [10] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362: 1090-1101.
- [11] 胡晓晓,李茂全,姜金霞. 持续冲洗负压封闭引流联合光子治疗在糖尿病足溃疡的疗效及护理[J]. 介入放射学杂志, 2018, 27:672-676.
- [12] Eguchi K, Nagai R. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology[J]. J Clin Invest, 2017, 127: 14-23.
- [13] Abaci HE, Guo Z, Doucet Y, et al. Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2017, 242: 1657-1668.
- [14] Mofazzal Jahromi MA, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri SM, et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: preventing infection and facilitating wound healing[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 123: 33-64.
- [15] 顾其胜,朱 彬. 海藻酸盐基生物医用材料[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11:5194-5198.
- [16] Su K, Wang C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research[J]. Biotechnol Lett, 2015, 37: 2139-2145.
- [17] 张 茜,卜德懿,田永鑫,等. 胶原纤维的酶解液中羟脯氨酸含量测定方法的优化[J]. 皮革科学与工程, 2019, 29:25-30.
- [18] 胡 康,张 伟. 胶原蛋白作为医用生物材料对缺损组织修复、再生及重建的作用与意义[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23:317-322.
- [19] 陈 炜,赵 磊,牛素平,等.不同炎症因子对细菌性血流感染所致脓毒症患者的早期诊断价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26:165-170.
- [20] Cao W, Zhang W, Liu J, et al. Paeoniflorin improves survival in LPS-challenged mice through the suppression of TNF- α and IL-1 β release and augmentation of IL-10 production[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11: 172-178.
- [21] Liu S, Zhang Q, Yu J, et al. Absorbable thioether grafted hyaluronic acid nanofibrous hydrogel for synergistic modulation of inflammation microenvironment to accelerate chronic diabetic wound healing[J]. Adv Healthc Mater, 2020, 9: e2000198.

(收稿日期:2021-08-13)

(本文编辑:边 信)