

基础研究

去甲二氢愈创木酸交联猪去细胞
脊髓支架及其相关特性研究

张嗣晓, 陆继业, 梅 劲, 卢 斌, 罗科峰, 岳 兵, 蒋国强

(宁波大学医学院 315211 浙江省宁波市)

【摘要】目的:观察去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)交联猪去细胞脊髓支架的结构及性能。**方法:**取成年猪胸段脊髓,采用2次冻融化学萃取法对脊髓行去细胞处理,再用2.5g/L NDGA溶液进行交联处理。在体视显微镜及扫描电镜下分别观察猪去细胞脊髓支架及NDGA交联猪去细胞脊髓支架的结构。采用Instron生物力学测试仪检测正常猪脊髓(正常组)、猪去细胞脊髓支架(未交联支架组)及NDGA交联猪去细胞脊髓支架(交联支架组)的极限抗拉强度和弹性模量。取第4代SD大鼠星形胶质细胞分别与未交联支架和NDGA交联支架联合培养,采用CCK8法检测细胞生长率,评价支架的细胞毒性。将未交联支架和交联支架分别包埋至SD大鼠背部皮下,在1、2、4周取出检测其包埋后的降解率,并取包埋4周的组织行HE染色,评价支架的生物相容性。**结果:**正常组脊髓组织为圆柱状,呈乳白色,横切面可见灰质与白质分界明显;未交联支架基本保持原组织外形,呈白色半透明状,白质与灰质无明显分界;交联支架质地稍变硬,呈棕黄色。扫描电镜显示未交联支架与交联支架内的基质纤维保存完好,相互交织成网状三维结构,内部孔洞连通。未交联支架的抗拉强度及弹性模量较正常组显著性下降($P<0.05$);交联支架抗拉强度和弹性模量较未交联支架显著性增强,两组比较有统计学差异($P<0.05$),但仍低于正常组($P<0.05$)。星形胶质细胞在交联支架及未交联支架中均生长良好,共培养时间越久,OD值越大,两组相同时间点OD值比较无统计学差异($P>0.05$)。相同时间点交联组在体内降解率明显低于未交联组($P<0.05$)。包埋4周后未交联组支架HE染色可见炎症细胞及成纤维细胞浸润,并且有肉芽组织聚集在内部孔隙中;交联组支架炎症细胞明显减少,且可见新生血管状结构。**结论:**NDGA交联猪去细胞脊髓支架与未交联猪去细胞脊髓支架比较三维结构未见明显改变,但生物力学性能和体内抗降解能力显著性增强,生物相容性提高,且无明显细胞毒性,可作脊髓损伤修复的支架材料。

【关键词】 去细胞脊髓;去甲二氢愈创木酸;交联;生物力学

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.03.12

中图分类号:R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2016)-03-0270-06

Preparation and characteristic of nordihydroguaiaretic acid crosslinked porcine decellularized spinal cord scaffold/ZHANG Sixiao, LU Jiye, MEI Jin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(3): 270-275

【Abstract】 Objectives: To explore the construct and characteristic of nordihydroguaiaretic acid(NDGA) cross-linked porcine decellularized spinal cord scaffold. **Methods:** Porcine spinal cord scaffolds were decellularized by chemical extraction and crosslinked with 2.5g/L NDGA in solution. The structure of uncrosslinked and NDGA crosslinked decellularized spinal cord scaffolds were observed by stereoscopic microscope and scanning electron microscopy. Ultimate tensile strength and elastic modulus of normal porcine thoracic spinal cord, uncrosslinked and NDGA crosslinked decellularized spinal cord scaffolds were determined on instron mechanical testing instrument. The fourth generation of SD rat astrocytes were co-cultured with uncrosslinked and NDGA crosslinked decellularized spinal cord scaffolds, and CCK8 assay for cell growth rate was tested to evaluate the cytotoxicity of scaffolds. The ECM scaffolds were implanted subcutaneously on the dorsal side and were

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81570608); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY12H15002); 宁波市自然科学基金资助项目 (2015A610212)

第一作者简介: 男(1987-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱外科

电话: (0574)87035140 E-mail: 478345756@qq.com

通讯作者: 蒋国强 E-mail: jgq6424@hotmail.com

obtained after 1, 2, 4 weeks for degradation rate. And the 4w scaffolds were HE stained for biological compatibility evaluation. **Results:** The uncrosslinked and the NDGA crosslinked decellularized spinal cord scaffolds possessed a similar three dimensional matrix structure. Tensile strength and elastic modulus of decellularized spinal cord scaffolds were significantly enhanced by NDGA-crosslinkin, difference between the two groups was statistical significance($P<0.05$), but the parameters still lower than those of control group($P<0.05$). Astrocytes grewed well in both groups, OD value grewed as the co-culture time, and the cell proliferation assay by CCK-8 showed there was no statistic signification in the two groups ($P>0.05$) after co-culturing at 1 day, 3 days and 7 days. NDGA crosslinked decellularized spinal cord scaffolds had lower weight loss at each time point than the uncrosslinked acellular spinal cord scaffolds ($P<0.05$). The inflammatory cells in experiment group were significantly less than those in control group, and there were a lot of vascular structures without vascular endothelium in experiment groups as well. **Conclusions:** Porcine decellularized spinal cord scaffolds presents no obvious change in structure after NDGA-crosslinking, but there is significant improvement in the biomechanical properties and ability against in vivo degradation and no marked cytotoxicity. Hence, the NDGA crosslinked scaffolds are promising in tissue engineering for spinal injury.

[Key words] Decellularized spinal cord; Nordihydroguaiaretic acid; Crosslink; Biomechanics

[Author's address] Medical School of Ningbo University, Ningbo, Zhejiang, 315211, China

中枢神经系统再生能力有限,严重的脊髓创伤或者疾病往往导致患者感觉及运动功能的永久缺失,给患者家庭及社会造成沉重负担^[1]。近年来,去细胞组织支架成为研究的热点。去细胞支架是通过对组织器官进行人工萃取及去细胞处理而获得的天然组织支架,普遍具有良好的生物相容性及三维结构优势,被广泛应用于合成支架的替代而用于组织修复研究中^[2-4]。本课题组前期通过2次冻融结合化学萃取对猪脊髓进行去细胞处理得到了细胞外基质支架,但其存在自身结构稳定性差、抗降解能力弱、三维网状结构难以维持、异源移植过程中免疫排斥强等弱点,阻碍了其朝着临床方向的应用,需要进一步优化改良^[5]。生物交联改性可在一定程度上改善生物材料的上述缺点,但戊二醛等传统化学交联剂细胞毒性强,降低了材料的细胞相容性。去甲二氢愈创木酸(NDGA)是从绿檀等常青灌木中提取的天然产物,不仅具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、消炎等多种生物活性,还可作为一种生物相容性好的低毒交联剂交联胶原蛋白,改善其理化性能^[6-8]。本研究采用NDGA对猪去细胞脊髓支架进行生物交联处理,比较交联前后去细胞脊髓支架的形态特征、生物力学性能、抗降解能力、细胞毒性和生物相容性。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器

新生(24h内)SD大鼠5只,雌雄不限;雄性

SD大鼠32只,体重250~300g(温州医科大学实验动物中心提供)。DMEM-低糖培养基、胎牛血清(FBS)(Hyclone公司,美国),脱氧胆酸钠(Amresco,美国),Triton X-100(Sigma,美国),青霉素、链霉素混合液(上海博蕴生物有限公司),CCK-8细胞计数试剂盒(上海碧云天),台式恒温振荡器(THZ-22,江苏太仓市实验设备厂),普通光学显微镜及摄像系统、体视显微镜(Leica,德国),扫描电子显微镜(Hitachi S-3400,日本)及冰冻切片机(Leica,德国),Instron 1011型生物力学测试仪(Instron,美国)。

1.2 脊髓支架制备及交联

于当地屠宰场(塘下镇生猪定点屠宰场,浙江省温州市瑞安市广场西路)获取新鲜猪脊髓。取胸段脊髓,分离剔除外周组织,并将硬膜剥离,将其置于液氮冷冻(1h, -195℃),室温解冻,此为1次冻融循环,重复冻融循环1次。在上述脊髓冰冻状态下,用手术刀将脊髓横切成5~6mm厚度大小。去细胞过程主要由一系列震荡浴构成:①去离子水(1h, 4℃, 60rpm);②2% Triton X-100(3h, 室温);③去离子水清洗3次,每次20min;④1.0%脱氧胆酸钠(3h, 室温);⑤去离子水清洗3次,每次20min;⑥1% Triton X-100(3h, 室温);⑦去离子水清洗3次,每次20min;⑧0.5%脱氧胆酸钠(3h, 室温);⑨去离子水清洗3次,每次20min。未特别注明者转速均为120r/min。将制备得到的支架用青霉素、链霉素混合液浸泡保存,并取部分冷冻干燥,用于下一步实验。

化学交联:将 50mg NDGA 加入到 1ml 0.1N NaOH 及 9ml PBS 混合液中,得到 5mg/ml 的 NDGA 终浓度,再加入 10 μ l NaOH(10N),将其稀释至 2.5mg/ml 浓度^[3]。将制备的去细胞脊髓浸入 2.5g/L 的 NDGA 溶液,在 37℃ 条件下交联处理 24h,然后用 0.01mol/L PBS 振荡漂洗 3h,每小时换液 1 次。交联与未交联的去细胞脊髓样品经真空冷冻干燥后密封包装,于 -20℃ 保存。

1.3 形态学观察

肉眼观察交联与未交联去细胞脊髓的形状、色泽、质地等基本特征。将交联与未交联去细胞脊髓用 20g/L 戊二醛固定,暴露观察面,并经梯度浓度乙醇脱水,叔丁醇置换,临界点干燥,喷金处理后在扫描电镜下观察支架的超微结构。

1.4 生物力学特性

将正常猪脊髓、未交联及 NDGA 交联猪去细胞脊髓支架分为 3 组,每组随机取 4 个样品分别检测其生物力学性能。检测前,先将冻干样品修剪成 8mm 长度,在 0.01mol/L PBS 中浸泡过夜,充分再水化,再将待测样品两端固定于载荷检测器(Instron 1011 生物力学测试仪,美国),初始牵张负荷调节为 0,在 37℃、最大拉伸载荷 50N 条件下,以 5mm/min 匀速牵张,样品破坏后,计算机自动输出抗拉强度和弹性模量。

1.5 细胞毒性实验

用冰冻切片机将交联及未交联支架切成 500 μ m 薄片,在青霉素及链霉素混合液浸泡灭菌处理后,分别置于 96 孔板中,将前期培养的第 4 代星形胶质细胞稀释成 5 $\times 10^4$ 个/ml 分别加入其中,每组 5 个复孔,每孔 100 μ l,每 2 天更换一次新鲜培养基。于 1、3、7d 对细胞分别进行检测。按照 CCK-8 细胞毒性检测试剂盒说明操作:每孔加入 10 μ l,在 37℃ 孵育 4h;用酶标仪测定 450nm 处的吸光度。

1.6 体内降解率

取 24 只雄性 SD 大鼠分为 2 组,每组各 12 只。将大鼠麻醉后,先在背侧做一个小的皮肤切口(10mm 长),通过钝性分离筋膜层形成一个空腔,将交联与未交联支架分别包埋其中,缝合切口。分别在术后 1、2、4 周取出包埋支架,水洗冷冻干燥。测得包埋前支架干重为 W0,包埋后支架干重为 W1。降解率=(W0-W1)/W0 $\times 100\%$ 。

1.7 生物相容性

包埋同上述步骤 1.6,交联组及未交联组各 4 只雄性 SD 大鼠,在包埋 4 周后分别将支架取出,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察支架内炎症细胞浸润情况。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件,两组比较采用独立样本 *t* 检验,多组比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察

体视显微镜下可见正常猪胸段脊髓组织为圆柱状,颜色呈乳白色,横切面可见灰质与白质分界明显。经去细胞处理后基本保持原组织外形,呈白色半透明状,白质与灰质无明显分界,两者软脊膜均保持完整,NDGA 交联后支架质地稍变硬,颜色呈棕黄色(图 1)。扫描电镜显示,交联与未交联支架内的基质纤维保存完好,相互交织成网状三维结构,内部孔洞连通(图 2)。

2.2 生物力学特性

正常猪脊髓、未交联支架和 NDGA 交联支架的生物力学特性检测结果见表 1。正常猪脊髓经过去细胞处理后抗拉强度及弹性模量显著性下降($P < 0.05$)。NDGA 交联改性后,支架抗拉强度和弹性模量得到显著增强,与未交联组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但仍低于正常脊髓($P < 0.05$)。

2.3 细胞毒性实验

星形胶质细胞在交联组及未交联组中均生长良好。培养 1、3、7 时的 OD 值见表 2。两组共培养时间越久,OD 值越大,两组相同时间点 OD 值比较无统计学差异($P > 0.05$)。说明未交联支架和 NDGA 交联支架均无明显细胞毒性,且具有维持细胞活性和生长的能力。

2.4 体内降解率

未交联支架与交联支架在 1、2、4 周的失重率见表 3。相同时间点交联支架在体内降解率明显低于未交联支架($P < 0.05$)。

2.5 生物相容性

包埋 4 周后,未交联支架 HE 染色可见炎症细胞及成纤维细胞浸润,并且有肉芽组织聚集在支架的内部孔隙中;而交联支架的炎症细胞明显减少,且可见新生血管状结构(图 3)。

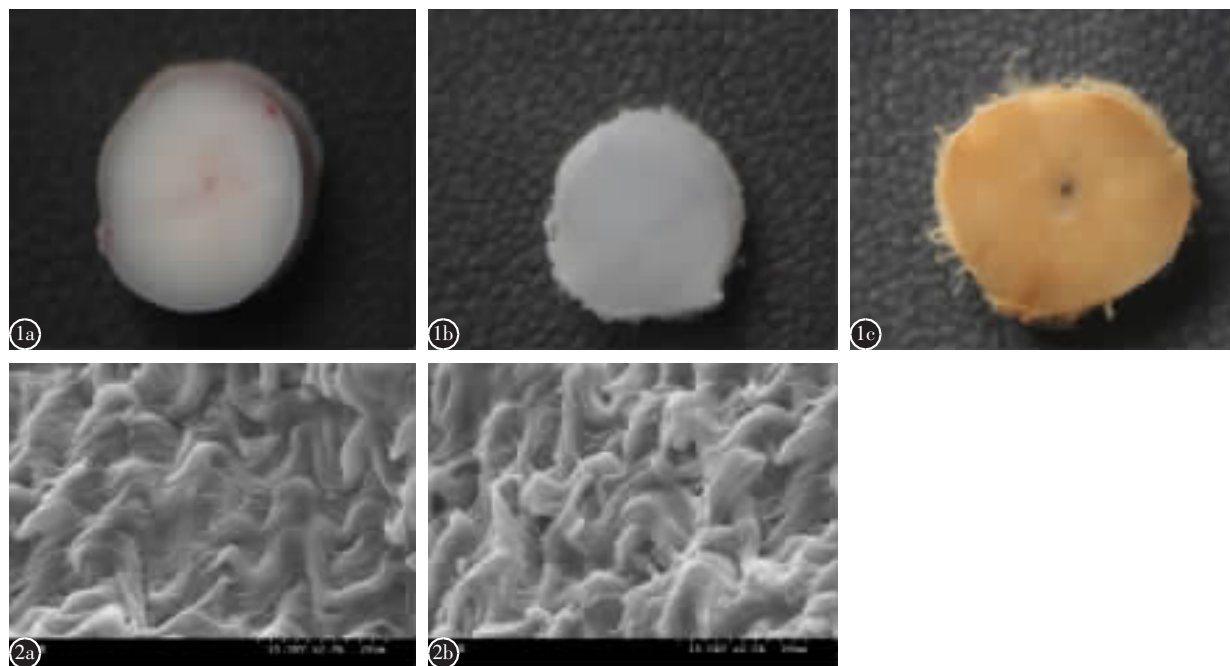


图 1 脊髓、去细胞支架和 NDGA 交联去细胞支架大体观察图像 ($\times 16$) **a** 正常猪脊髓 **b** 未交联去细胞支架 **c** NDGA 交联去细胞支架 **图 2** 扫描电子显微镜图像显示去细胞支架的基质纤维及三维结构保留完好 **a** 未交联去细胞支架 **b** NDGA 交联去细胞支架 ($\times 2000$)

Figure 1 General observation of normal spinal cord and decellularized spinal cord scaffolds ($\times 16$) **a** normal spinal cord **b** non-crosslinked scaffold **c** NDGA-crosslinked scaffold **Figure 2** Scanning electron microscope of scaffold Microstructure and three-dimensional (3D) matrix were kept same after NDGA-crosslinking **a** non-crosslinked scaffold **b** NDGA-crosslinked scaffold ($\times 2000$)

3 讨论

生物支架是神经系统组织工程不可或缺的主体,去细胞脊髓支架主要由结构蛋白及功能蛋白特异排列构成复杂的三维网状结构,它不仅能桥接损伤的脊髓,为脊髓中神经轴突生长提供空间

表 1 脊髓与去细胞脊髓支架的抗拉强度与弹性模量
(Mpa, $\bar{x} \pm s$, $n=4$)

group	抗拉强度 Tensile strength	弹性模量 Elastic modulus
正常脊髓 Control group	3.083 $\pm$ 0.246	8.377 $\pm$ 0.528
未交联去细胞支架 Non-crosslinked scaffold group	0.470 $\pm$ 0.046 ^①	1.347 $\pm$ 0.145 ^①
NDGA交联去细胞支架 NDGA-crosslinked scaffold group	1.137 $\pm$ 0.080 ^{①②}	2.227 $\pm$ 0.194 ^{①②}

注:①与正常猪脊髓组比较 $P<0.05$;②与未交联去细胞支架组比较 $P<0.05$

Note: Compared with control group, $P<0.05$; compared with non-crosslinked group, $P<0.05$

表 2 大鼠星形胶质细胞在去细胞支架中培养不同时间点的吸光度
(OD 值, $n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of decellularized scaffold on astrocytes proliferation in different culture point(OD value)

时间点 Time point	未交联组 Non-crosslinked scaffold	NDGA交联组 NDGA-crosslinked scaffold
1d	0.893 $\pm$ 0.078	0.835 $\pm$ 0.093
3d	1.503 $\pm$ 0.151	1.410 $\pm$ 1.071
7d	2.693 $\pm$ 0.188	2.558 $\pm$ 0.185

表 3 去细胞脊髓支架在体内不同时间点的降解率
($n=5$, $\bar{x} \pm s$, %)

Table 3 Scaffolds' degradability of 1w, 2w and 4w of 2 groups

时间点(周) Time point	未交联组 Non-crosslinked scaffold	NDGA交联组 NDGA-crosslinked scaffold
1	13.42 $\pm$ 4.24	5.39 $\pm$ 0.87 ^①
2	36.51 $\pm$ 5.92	11.37 $\pm$ 1.37 ^①
4	85.75 $\pm$ 8.69	22.25 $\pm$ 2.87 ^①

注:与同时点未交联支架组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with non-crosslinked scaffold group at the same time, $P<0.05$

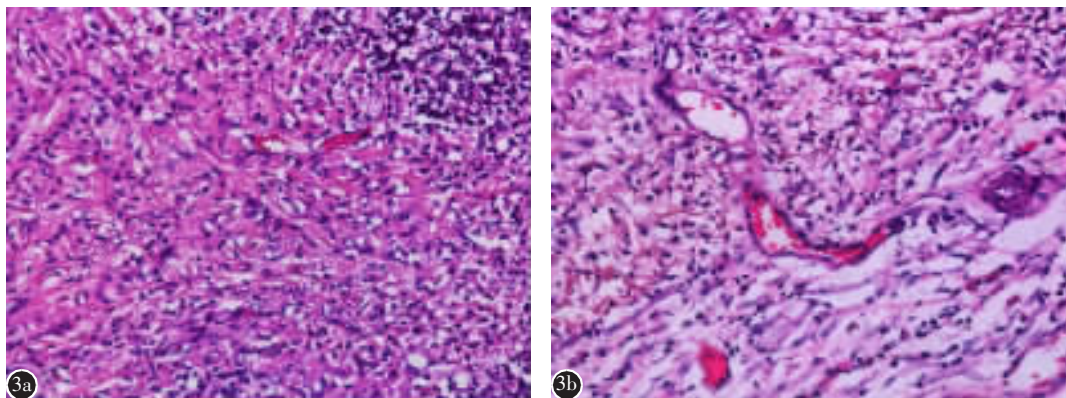


图3 体内包埋后支架 HE 染色可见 NDGA 交联支架内炎症细胞浸润减少,且可见大量新生血管状结构 a 未交联去细胞支架组 b NDGA 交联去细胞支架组(×200)

Figure 3 HE staining after embedding test showed the inflammatory cells in experiment group were significantly less than the control group, and there were a lot of vascular structure without vascular endothelium in experiment group as well a non-crosslinked scaffold b NDGA-crosslinked scaffold(×200)

和营养,还能作为种子细胞移植后的土壤,改善局部微环境,并调节细胞生物学进程,引导细胞的生长、增殖、分化、迁移以及凋亡,从而促进脊髓神经的再生^[9,10]。

理想的组织工程支架不仅要有良好的三维空间结构,还必须具备一定的抗降解能力、机械强度以及良好的生物相容性,使其移植到体内后能持续保持原有形态,避免在体内过快降解吸收,并为脊髓组织的修复重构及种子细胞的生长、增殖、迁移提供足够的空间支持和力学支撑^[11,12]。良好的生物相容性可确保支架在体内不会引起强烈的免疫排斥和炎症反应。利用交联剂对支架进行交联处理,使脊髓细胞外基质(ECM)中的大分子链间形成化学键连接,能在一定程度上改善去细胞脊髓支架的抗降解能力和生物力学性能。戊二醛(glutaric dialdehyde,GA)是一种常用的化学交联剂,但其较强的细胞毒性及对支架钙化作用^[6],限制了进一步临床应用。NDGA 是从绿檀等常青灌木中提取的天然产物,具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、消炎等多种生物活性^[13,14]。NDGA 的儿茶酚基团氧化为有活性的醌基,氧化后的单体既可自身聚合生成聚去甲二氢愈创木酸,也可与蛋白质的自由氨基通过 Michael 加成反应形成共价键,从而稳定生物衍生材料结构,改善其理化性能。有研究表明,NDGA 可作为一种生物相容性好的低毒交联剂交联支架中的胶原蛋白^[7,15]。

在本研究中,应用 NDGA 交联猪脊髓去细胞支架,以提升支架结构稳定性及机械属性。结果显

示,NDGA 交联后的去细胞脊髓支架超微结构未见明显改变,其中基质纤维结构依旧保持良好。由于需要支撑细胞生长,因此足够的结构稳定性和机械属性对于组织工程支架至关重要。在本研究中,将交联支架与未交联支架包埋至大鼠背部皮下,观察发现二者在 1、2、4 周时的降解率分别为 13.42%、36.52%、85.75%和 5.39%、11.37%、22.25%,NDGA 交联后的猪去细胞脊髓支架较未交联的支架抗降解能力显著增强,稳定性提升,有助于维持其原有形态,从而避免了体内移植后支架快速降解。

抗拉强度和弹性模量分别代表了支架所能承受的最大应力以及在应力作用下的形变率,是支架生物力学性能检测的重要指标。对猪去细胞脊髓支架的检测显示,猪脊髓经去细胞处理后抗拉强度和弹性模量显著下降,而通过 NDGA 交联处理后,支架的抗拉强度和弹性模量可得到明显改善,但与正常脊髓的生物力学性能仍存在一定差距。

细胞毒性是支架材料交联处理后可能存在的一大弊端。本研究采用 CCK8 试剂检测了大鼠星形胶质细胞在支架薄片中的生长情况。结果显示,星形胶质细胞在 NDGA 交联去细胞脊髓薄片中的生长率与其在未交联支架中非常接近,均未观察到明显的细胞毒性,表明 NDGA 交联后并未增加支架的细胞毒性。

为了下一步将其用于异源移植,还需评估其生物相容性。将交联支架与未交联支架分别包埋

至大鼠背部皮下 4 周,取出后固定,并作 HE 染色,结果显示在未交联支架内有炎症细胞及成纤维细胞浸润,并且有肉芽组织聚集在支架的内部孔隙中;而在 NDGA 交联支架内部及外周炎症细胞浸润都明显较少。说明 NDGA 交联的脊髓去细胞支架生物相容性得到了一定程度的改善,与以往的研究结果^[4-6]一致。考虑到支架内 DNA 已基本去除,胶原的自由氨基酸基团如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 等介导了当前免疫排斥反应^[16,17],这些化学基团经过 NDGA 交联后得到结合固定,减弱了支架抗原性^[18]。也有学者认为这可能与未交联支架的快速降解有一定关系,因为 ECM 支架降解后的多肽碎片会诱导炎症反应,形成纤维包裹,炎症细胞浸润等。

相比于其他类型的生物交联剂如京尼平、氧化海藻酸钠等,NDGA 具有价格便宜、获取容易等优势。但 NDGA 只在弱碱性环境中可溶,因此 24h 交联浸泡在 NDGA 碱液中,支架的蛋白成分可能会遭到一定程度破坏变性,这需要进一步的研究证实。

综上所述,NDGA 交联的猪去细胞脊髓支架具有良好的大体与微观结构,其生物力学性能和体内抗降解能力得到有效改善,未发现明显的细胞毒性,并且在一定程度上改善了支架的异物排斥反应,从而提高了生物相容性。该支架在脊髓损伤修复的组织工程研究中可能具有广阔的应用前景。

4 参考文献

- Jazayeri SB, Beygi S, Shokraneh F, et al. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review [J]. *Eur Spine J*, 2015, 24(5): 905-918.
- Song L, Murphy SV, Yang B, et al. Bladder acellular matrix and its application in bladder augmentation [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(2): 163-172.
- 张建色, 王辉, 邵培刚, 等. 去细胞全肾生物支架的制备与鉴定[J]. *解剖学报*, 2012, 43(2): 253-257.
- 邵营宽, 严夏霖, 饶志恒, 等. 大鼠胰腺去细胞天然支架生物相容性的鉴定[J]. *解剖学报*, 2014, 45(4): 561-568.
- Jiang T, Ren X, Tang J, et al. Preparation and characterization of genipin-crosslinked rat acellular spinal cord scaffolds [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(6): 3514-3521.
- Lu JM, Nurko J, Weakley SM, et al. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update[J]. *Med Sci Monit*, 2010, 16(5): A93-A100.
- Koob TJ, Hernandez DJ. Material properties of polymerized NDGA-collagen composite fibers: development of biologically based tendon constructs[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(1): 203-212.
- Lü X, Zhai W, Zhou Y, et al. Crosslinking effect of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on decellularized heart valve scaffold for tissue engineering[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2010, 21(2): 473-480.
- Crapo PM, Medberry CJ, Reing JE, et al. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(13): 3539-3547.
- Brown BN, Badyalak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction [J]. *Transl Res*, 2014, 163(4): 268-285.
- Volpato FZ, Führmann T, Migliaresi C, et al. Using extracellular matrix for regenerative medicine in the spinal cord [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(21): 4945-4955.
- Gao M, Lu P, Bednark B, et al. Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(5): 1529-1536.
- 笪琳萃, 龚梅, 王旻, 等. 新型交联方法在生物衍生材料中的应用进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28(6): 777-783.
- Ju YM, Yu B, West L, et al. A novel porous collagen scaffold around an implantable biosensor for improving biocompatibility(II): long-term in vitro/in vivo sensitivity characteristics of sensors with NDGA- or GA-crosslinked collagen scaffolds[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 92(2): 650-658.
- Koob TJ, Hernandez DJ. Mechanical and thermal properties of novel polymerized NDGA-gelatin hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(7): 1285-1292.
- Cao H, Xu SY. EDC/NHS-crosslinked type II collagen-chondroitin sulfate scaffold: characterization and in vitro evaluation[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(2): 567-575.
- Koch H, Graneist C, Emmrich F, et al. Xenogenic esophagus scaffolds fixed with several agents: comparative in vivo study of rejection and inflammation[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 948320.
- Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses[J]. *Biomaterials*, 1997, 18(2): 95-105.

(收稿日期:2015-12-22 末次修回日期:2016-02-29)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)