

综合评述

组织工程相关壳聚糖-明胶基生物材料

尹玉姬 姚康德* 刘文广 毛津淑 崔元璐 蔡开勇 赵 峰

(天津大学高分子材料研究所 天津 300072)

摘 要 壳聚糖的 *N*-乙酰基葡萄糖胺组成成分为糖胺聚的结构特征,而明胶则为胶原的部分变性衍生物,由其开发的生物材料呈现和前体相当的生物活性。本文综述了壳聚糖-明胶基生物材料的最近进展,包括用壳聚糖-明胶网络基生物材料制备膜材料、支架,且作为表面修饰剂用于组织工程。*N*-烷基化壳聚糖用作 DNA 释放的非病毒载体。这些生物材料在皮肤、软骨、骨组织工程和基因治疗方面呈现良好的应用前景。

关键词 壳聚糖,明胶,表面修饰剂,生物材料,组织工程,综述

中图分类号: O622; R318; Q813

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2004)03-0217-06

甲壳素是一种结构多糖,常与蛋白质以共价键结合形式存在。其脱乙酰化产物壳聚糖中的 *N*-乙酰基吡喃与细胞外基质中的糖胺聚糖(GAGs)结构类似,该碱性多糖具有独特的分子结构特征、化学性质及生物活性。壳聚糖已经被广泛应用于生物医学领域,如透析膜、可吸收缝线、药物释放载体、固定化酶载体。它可被溶菌酶缓慢降解为无毒的氨基葡萄糖后被人体完全吸收^[1~3]。

胶原是动物体内含量最丰富的蛋白质,属于不溶性纤维蛋白质,遍布于体内各种器官和组织,如皮肤、骨、软骨、肌腱、角膜等等。明胶是胶原部分变性衍生物,它主要由独特氨基酸序列甘氨酸-脯氨酸-羟基脯氨酸组成。这些序列使明胶可固定水分子而形成螺旋结构。胶原在生理条件下具有一定的抗原性,明胶则无抗原性。明胶容易制成浓溶液且价廉^[4,5]。

壳聚糖($pK_a=6.8$)和明胶(等电点 4.9)可形成聚电解质配合物(PEC),更能以戊二醛或水溶性碳二亚胺共交联形成杂混聚合物网络,该网络可作为 pH 响应药物释放载体^[6,7]。本文综述了壳聚糖-明胶网络生物材料在组织工程方面的相关研究进展,及其在组织工程领域中良好的应用前景。

1 壳聚糖-明胶网络

1.1 壳聚糖-明胶杂混聚合物网络膜

近年来皮肤移植已经从自体、同种异体和异种异体移植发展到组织工程表皮、真皮和全层人工皮肤移植。美国已经用胶原和糖胺聚糖构建皮肤取代物 Integra(Life Science)、Dermograft(Advanced Tissue Science)和 Apligraf(Organogenesis)。这些商品化组织工程皮肤已经被美国食品与药品管理局(FDA)批准^[8]。张其清等^[9]以碳二亚胺交联胶原和硫酸软骨素构建了人工皮肤,以提高胶原海绵的强度,人成纤维细胞在该多孔支架上的黏附、增殖情况优于胶原真皮取代物。伍津津等^[10]以胶原、壳聚糖、糖胺聚糖(6-硫酸软骨素、透明质酸、肝素)以及弹性蛋白为基质网架构建了组织工程化多层人工皮肤,成功地修复了裸鼠大面积皮肤缺损。

本研究组以壳聚糖-明胶网络水凝胶中的水为致孔剂,采用冷冻干燥法制备了壳聚糖与明胶杂混网络多孔支架^[11]。由细胞周期和细胞凋亡实验确认,将明胶引入到壳聚糖网络使成纤维细胞(L929)尽快进入 DNA 合成期,抑制材料触发的细胞凋亡。这可能是由于明胶能屏蔽壳聚糖过高的正电荷密度,从而利于细胞迁移^[12]。从这个意义上讲,壳聚糖-明胶网络和荷负电的透明质酸复合,更利于细胞的增殖,并减少凋亡^[13]。

MTT 细胞活性测试结果表明,壳聚糖-明胶薄膜与人角质形成细胞的亲和性良好。壳聚糖对人角

2003-05-14 收稿, 2003-12-16 修回

国家重点基础规划项目(G199905305)、国家自然科学基金(59973014、5983002、59883002、50233020、50203007)、教育部南开大学-天津大学合作研究项目

通讯联系人: 姚康德, 1936 年生, 教授; E-mail: ripm@tju.edu.cn; 研究方向: 生物材料、组织工程材料与智能材料

质形成细胞有固定化作用,细胞粘附量大,但不能进一步增殖,因此,生长状况不好。明胶的加入有效改善了角质形成细胞在壳聚糖薄膜表面的生长。壳聚糖-明胶薄膜是一种具有一定应用前景的角质形成细胞转载用载体^[14]。

1.2 壳聚糖-明胶聚合物网络支架

壳聚糖与明胶由静电相互作用形成聚电解质配合物网络。以其中水为致孔剂采用冷冻干燥法可制备多孔支架。此多孔支架的孔隙结构与支架的性能密切相关。而支架的孔隙结构取决于预冻过程中形成的冰晶的形状和大小。因此,可由预冻溶液的固含量、预冻温度及预冻过程控制支架的立体结构。由壳聚糖与明胶的组成可调控该支架的力学性能^[15]。

采用冷凝板直接接触法可一步成型壳聚糖-明胶双层支架。该支架具有和人体皮肤相似的双层结构,支架总厚度约 1.72 mm,其中致密层厚度约 430 μm ,孔径呈梯度分布,冷凝板接触表面孔径小于 40 μm ,疏松层孔径较为均匀,大约是 100 μm (见图 1)^[16]。

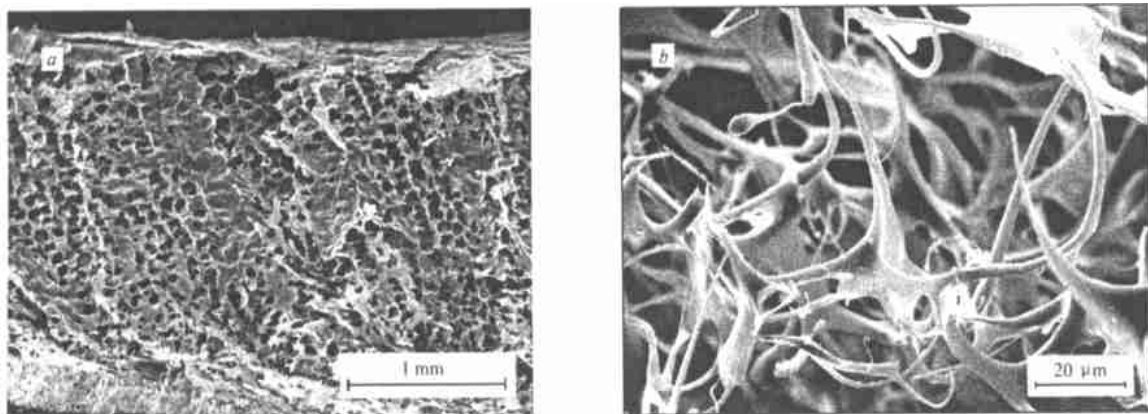


图 1 采用冷冻板直接接触制冷法制备的壳聚糖-明胶支架微结构

Fig. 1 The microphotos of the chitosan-gelatin scaffolds obtained by direct contacting freezing methods

a. the full picture of scaffold; b. the dense scaffold bottom

将成纤维细胞在壳聚糖-明胶支架内培养一段时间后,形成细胞/支架结构物,可作为人工真皮。将体外扩增的角质形成细胞 2 次接种于人工真皮结构物上,经过空气界面培养,可在体外构建具有模拟真皮和表皮双层结构的真皮替代物。壳聚糖-明胶双层支架表层的小孔可防止下层成纤维细胞向上生长,也防止表层角质形成细胞落入成纤维细胞层面。该支架的致密层虽然隔离了角质形成细胞与成纤维细胞,但同时又允许营养物质和生长因子及生物信使的传递。用透明质酸和壳聚糖-明胶网络复合制成的双层支架也能用作人工皮肤支架^[17]。

2 壳聚糖或/与明胶等对聚乳酸的表面修饰

组织工程的发展对相关生物材料提出了新的挑战,如何提高生物材料对细胞的亲和性已经成为组织工程研究的关键问题之一。与天然材料相比,合成材料具有原料来源丰富、结构和性能可人为修饰和调控等特点。聚乳酸是获得美国 FDA 认证,并已广泛应用于临床的一类可生物降解的合成聚合物,但由于表面缺乏细胞识别位点,阻碍了在组织工程中的应用^[18]。为了解决这个问题,本课题组^[19]采用控制碱性水解的方法使聚 D, L-乳酸膜表面生成羧基,而后用水溶性碳二亚胺将壳聚糖固定在膜表面,结果表明聚乳酸膜材的接触角从 $(69 \pm 3)^\circ$ 降低到 $(49 \pm 1)^\circ$ (见表 1),经壳聚糖修饰后聚乳酸膜材对鼠颅骨成骨细胞的粘附、增殖和碱性磷酸酶活性都明显提高。O-羧甲基壳聚糖修饰聚 D, L-乳酸膜材亦促进成骨细胞的粘附、增殖与功能表达^[20]。通过 WSC 法和内陷法对丝素蛋白修饰聚乳酸膜的对比研究表明,内陷法能够更有效地固定丝素蛋白,提高改性膜与成骨细胞的亲和性;中等大小分子量(3×10^4)的丝素蛋白修饰的聚乳酸膜使成骨细胞更好地表达细胞功能^[21, 22]。用聚天冬氨酸对聚乳酸实施表面修饰时,可有效提高聚乳酸膜的亲水性及成骨细胞在其上的粘附、增殖和功能表达^[23]。

表 1 壳聚糖及其衍生物修饰聚乳酸膜和聚乳酸膜的接触角($n=4$, 平均值 $\pm$ 标准偏差)

Table 1 Water contact angles of chitosan and its derivatives modified PDLLA films and control($n=4$ mean $\pm$ SD)

Sample	Contact angle/deg
PDLLA	69 $\pm$ 3
Chitosan modified PDLLA	49 $\pm$ 1
<i>O</i> -carboxymethyl chitosan modified PDLLA	40 $\pm$ 2

以相分离、溶剂置换、冷冻干燥法制备聚-*L*-乳酸筛网, 其纤维直径 100~500 nm, 孔隙率 98% $\pm$ 0.5%, 孔隙尺度 3~17 μm 。用壳聚糖或/和明胶修饰此三维支架, 将牛关节软骨细胞种植于支架, 细胞粘附在筛网结点。14 d 后软骨细胞的数量增加了很多倍, 分泌大量细胞外基质, 细胞外基质沿支架材料中均匀分布的纤维结构有序分布, 说明软骨细胞在三维生物材料中粘附、增殖、分泌细胞外基质, 并维持圆球状的细胞形态(见图 2)。实验结果表明, 明胶和壳聚糖修饰聚乳酸支架材料, 更适于软骨细胞的粘附和增殖^[24]。

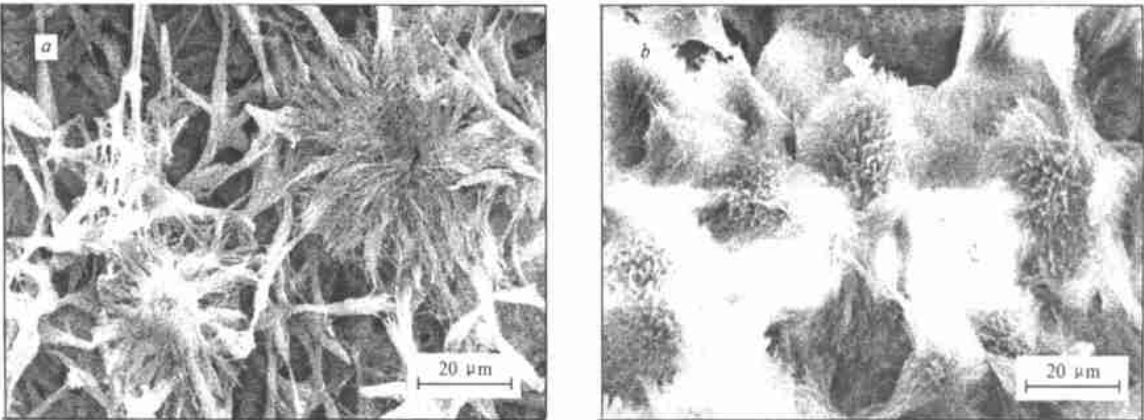


图 2 软骨细胞植入壳聚糖/明胶修饰聚乳酸支架培养 7 d (a)及 14 d (b)后的扫描电镜照片

Fig. 2 SEM micrographs of chitosan/gelatin modified PLLA scaffolds cultured into chondrocyte for (a) 7 days and (b) 14 days

3 磷酸钙/壳聚糖-明胶网络复合支架

骨折和骨缺损是严重的健康问题, 现有的骨修复或骨取代材料包括自体移植、同种异体移植和人工合成材料均不甚理想。皮质骨本身为脆性羟基磷灰石(HA)晶粒和柔性胶原原纤维的复合材料, 杨氏模量在 7~15 GPa 范围。大多数生物陶瓷的刚性比骨大得多, 而断裂韧性较差。因此, 只有将模量较高的陶瓷如 HA 与柔性的人工细胞外基质如聚乳酸、胶原等复合才能使合成材料的力学性能与骨相互匹配^[25, 26]。

据此, 本研究组^[27, 28]以水为致孔剂采用冷冻干燥法制备了 HA/壳聚糖-明胶网络复合支架和 β -磷酸三钙(β -TCP)/壳聚糖-明胶复合支架。材料组成、混合溶液固含量和预冻温度对复合支架的孔隙结构起到决定性作用。强度测试结果表明, β -TCP 的引入对壳聚糖-明胶支架的增强效果非常显著, 随着 β -TCP 添加量的增多, 支架的压缩强度与压缩模量都有较大程度的提高(见表 2)。鼠颅骨成骨细胞在 HA/壳聚糖-明胶复合支架能很好表达功能(见图 3), 培养 21 d 后可大量分泌 I 型胶原和蛋白聚糖等



图 3 将鼠颅骨成骨细胞在 HA/CS-Gel 复合支架中培养 21 d 后的光镜照片

Fig. 3 Light micrographs of a HA/CS-Gel composite scaffold initially seeded with 2.6×10^6 osteoblasts/cm and cultured for 21 days (H & E stain)

细胞外基质。将 β -TCP/壳聚糖-明胶支架植入兔皮下后早期出现轻微的炎症反应,至 12 周时材料内已无炎性细胞,胶原纤维已经取向,没有炎症反应,材料基本解体,说明此类支架的生物相容性良好(见图 4)。

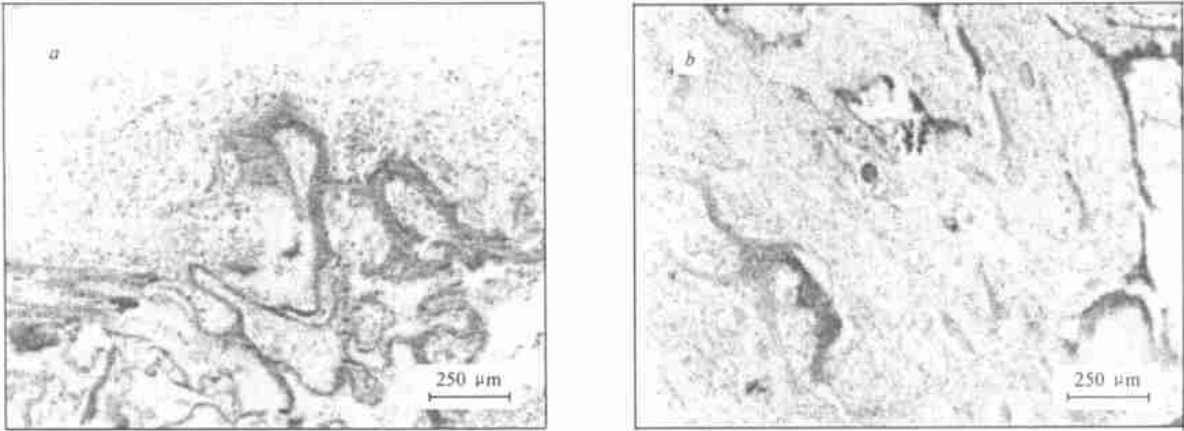


图 4 β -TCP/CS-Gel 复合支架植入兔皮下 2 周(a)以及 12 周(b)后的组织学照片
Fig. 4 H&E stained sections of subcutaneous tissue with infiltrated β -TCP/CS-Gel composite scaffolds for (a) 2 weeks and (b) 12 weeks

表 2 不同 β -TCP 含量的 CS-Gel/ β -TCP 复合支架的力学性能及孔径大小($n=5$, 平均值 $\pm$ 标准偏差)

Table 2 Mechanical properties and average pore diameter of CS-Gel/ β -TCP composite scaffolds as function of β -TCP fraction($n=5$, mean $\pm$ SD)

$\omega(\beta\text{-TCP})/\%$	0	10	30	50	70
Yield compressive strength/MPa	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.34 ± 0.06	0.67 ± 0.08	0.88 ± 0.05
Compressive modulus/MPa	3.90 ± 1.08	3.94 ± 0.75	4.66 ± 0.30	7.21 ± 1.27	10.88 ± 3.54
Average pore diameter/ μm	322 ± 111	355 ± 89	322 ± 93	324 ± 86	323 ± 104

4 基因活化修饰层

组织工程支架材料还必须能介导细胞与生长因子的相互作用。以骨形态发生蛋白(BMP)为例,需要以适宜的支架材料复合,运输到骨缺损部位,在局部范围内发生作用,通过诸如缓慢释放的机制发挥效能。此时,BMP 负载量在每克人工基质中一般为微克量,而细胞释放的生长因子 BMP 负载量在每克骨基质中一般仅为纳克量,BMP 的剂量增大了 3 个数量级,这样高浓度的 BMP 对人体的影响尚不清楚,而每次治疗需要几千美金^[29]。因此,人们就将基因治疗与组织工程相结合,以非病毒载体负载质粒 DNA,随着 DNA 的控制释放,使相邻细胞转染而表达生长因子。

壳聚糖的 pK_a 为 6.3,与 DNA 可形成聚电解质配合物。壳聚糖基因释放载体与脂质体不同,它具有耐血清作用,有提高转染率的潜能。转染率的提高还依赖于载体对质粒 DNA 被细胞摄取前后的稳定作用。本研究组^[30]将 N -十二烷基壳聚糖与 DNA 形成球状聚电解质配合物(PEC),从原子力显微镜(AFM)观察到载体能有效防止 DNA 受核酸酶的水解(见图 5)。该 PEC 在盐水溶液中解离而释放出 DNA,释放量与离子类型及盐浓度相关。同时,以 N -十二烷基壳聚糖与荧光素酶的质粒 DNA 构建配合物,采用 ELISA 方法对照 N -十二烷基壳聚糖和脂质体对质粒 DNA(含 CAT 报告基因,宿主细胞为 C2C12 成肌细胞系)的转染效率,细胞分解液中 CAT 光密度分别为 0.96 和 1.2,说明 N -十二烷基壳聚糖的转染率接近脂质体^[31]。

为使 DNA 释放达到成骨细胞特异水平,合成了 N -丁基和 N -十六烷基壳聚糖,用水溶性碳二亚胺固定于经碱活化的聚乳酸薄膜表面。细胞相容性实验表明,鼠颅骨成骨细胞粘连性明显优于聚乳酸薄膜^[32]。因此,可将 N -烷基化壳聚糖同时作为表达生长因子的质粒 DNA 表面修饰物。这类基因活化修饰层,既能改善与成骨细胞的亲和性又能表达生长因子,因此,可促进骨重建。

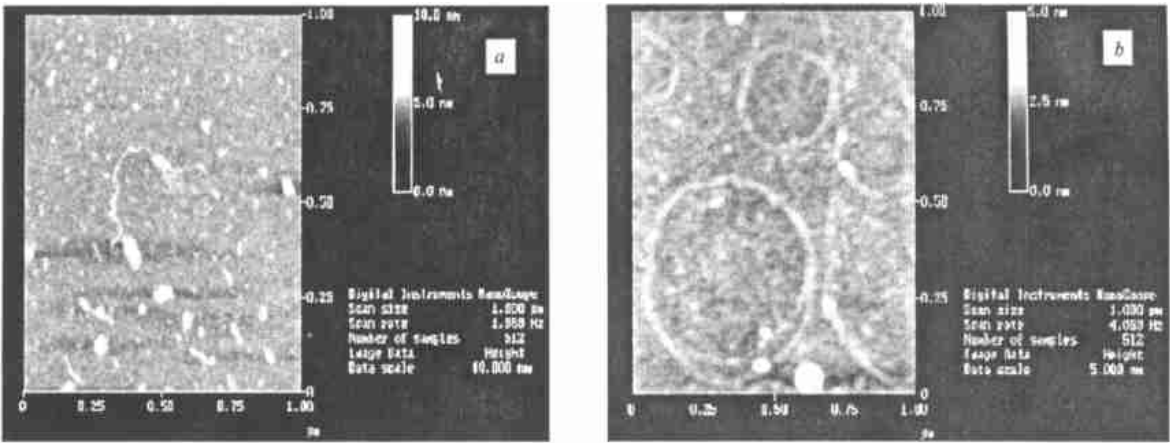


图 5 DNA 酶对裸 DNA(a)和 DNA/CS12(b)影响的 AFM 图像

Fig. 5 AFM images of (a) pure DNA and (b) DNA released from complex with the addition of DNase

5 展望

壳聚糖-明胶网络在组织工程领域中的应用前景明确。曹谊林等^[33]将其与猪软骨细胞复合构建细胞/支架结构物后植入猪腹部皮下, 手术后 16 周可观察到一些新软骨, 其糖胺聚糖分泌量达正常软骨的 78.6%, 说明壳聚糖-明胶网络可作为工程化软骨支架使用。壳聚糖-明胶网络与其它糖胺聚糖如透明质酸复合可进一步改善其对目标细胞的亲合性。但此类水凝胶型多孔支架的力学性能仍不能和承载组织相匹配。通过化学改性法如壳聚糖-接枝-聚乳酸实施分子复合^[34], 可望改善支架的力学性能。组织工程支架亦可在体内原位形成, Payne 等^[35]用酪氨酸酶催化明胶和壳聚糖形成凝胶, 将它们的混合溶液覆盖于复杂的伤口表面后可通过原位反应形成凝胶膜, 从而达到治疗的目的。

以上结果表明, 壳聚糖-明胶网络是一类很有应用前景的组织工程支架材料, 随着仿生程度的提高以及调控其纳米结构和表面拓扑结构, 此类多糖-蛋白质网络的性能将得到进一步的提高。

参 考 文 献

1 Yao K D, Peng T, Yin Y J, et al. *J M S-Rew Macromol Chem Phys*[J], 1995, C35: 155

2 Suh J K F, Matthew H W T. *Biomaterials*[J], 2000, 21: 2 589

3 VandeVord P J, Matthew H W T, DeSilva S P, et al. *J Biomed Mater Res*[J], 2002, 59: 585

4 Choi Y S, Hong S R, Lee Y M, et al. *Biomaterials*[J], 1999, 20: 409

5 Lin F H, Chen T M, Chen K S, et al. *Mater Chem Phy*[J], 2000, 64: 189

6 Yao K D, Yin Y J, Xu M X, et al. *Polym Intern*[J], 1995, 38: 77

7 Yin Y J, Yao K D, Cheng G X, et al. *Polym Intern*[J], 1999, 48: 429

8 YAO Kang-De(姚康德), YIN Yu-Ji(尹玉姬). *Biomaterials Related to Tissue Engineering(组织工程相关生物材料)* [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2003: 117

9 LIU Ling-Rong(刘玲蓉), ZHANG Li-Hai(张立海), ZHENG Qi-Qing(张其清), et al. *Chin J Repar Recon Surg*(中国修复重建外科杂志)[J], 2003, 17: 83

10 ZHU Tang-You(朱堂友), WU Jin-Jin(伍津津), HU Lang(胡浪), et al. *Chin J Repar Recon Surg*(中国修复重建外科杂志)[J], 2003, 17: 113

11 Shen F, Cui Y L, Yao K D, et al. *Poly Intern*[J], 2000, 49: 1 596

12 Mao J S, Cui Y L, Yao K D, et al. *Biomaterials*[J], in press

13 MAO Jin-Shu(毛津淑), WANG Xiang-Hui(王向辉), CUI Yuan-Lu(崔元璐), et al. *Chin Sci Bull*(科学通报)[J], 2003, 98: 917

14 Mao J S, Wang X H, Yao K D, et al. *J Mater Sci*[J], 2003, 38: 2 283

15 Mao J S, Zhao L G, Yin Y J, et al. *Biomaterials*[J], 2003, 24: 1 067

- 16 Mao J S, Zhao L G, Yao K D, *et al.* *J Biomed Mater Res*[J], 2003, **64A**: 301
- 17 Mao J S, Liu H F, Yao K D, *et al.* *Biomaterials*[J], 2003, **24**: 1 621
- 18 Puleo D, Dee K C, Bizios R. *Biomaterials*[J], 1999, **20**: 2 201
- 19 Cai K Y, Yao K D, Cui Y L, *et al.* *J Biomed Mater Res*[J], 2002, **60**: 398
- 20 Cai K Y, Yao K D, Li Z, *et al.* *J Biomater Sci Polym Ed*[J], 2001, **12**: 1 303
- 21 Cai K Y, Yao K D, Cui Y L, *et al.* *Biomaterials*[J], 2002, **23**: 1 603
- 22 Cai K Y, Yao K D, Lin S B, *et al.* *Biomaterials*[J], 2002, **23**: 1 153
- 23 Cai K Y, Yao K D, Hou X, *et al.* *J Biomed Mater Res*[J], 2002, **62**: 283
- 24 Cui Y L, Hou X, Yao K D, *et al.* *J Biomed Mater Res*[J], 2003, **66A**: 770
- 25 Rhee S H, Suetsugu Y, Tanaka J. *Biomaterials*[J], 2001, **22**: 2 843
- 26 Kikuchi M, Itoh S, Tanaka J, *et al.* *Biomaterials*[J], 2001, **22**: 1 705
- 27 Yin Y J, Ye F, Yao K D, *et al.* *J Biomed Mater Res*[J], in press
- 28 Zhao F, Yin Y J, Yao K D, *et al.* *Biomaterials*[J], 2002, **23**: 3 227
- 29 Seriviu R F. *Science*[J], 2000, **289**: 1 498
- 30 Liu W G, Yao K D, Liu Q G. *J Appl Polym Sci*[J], 2001, **82**: 3 393
- 31 Liu W G, Yao K D. *J Control Release*[J], 2002, **83**: 1
- 32 Cai K Y, Lin S B, Yao K D, *et al.* *J Biomater Sci Poly Edn*[J], 2002, **13**: 53
- 33 Opitz F, Liu Y, Cao Y, *et al.* *Tissue Eng*[J], 2003, **8**: 1 205
- 34 Yao F L, Chen W, Wang H, *et al.* *Polymer*[J], 2003, **44**: 6 435
- 35 Chen T, Embree H D, Payne G F, *et al.* *Biomaterials*[J], 2003, **24**: 2 831

Chitosan-Gelatin Network Based Biomaterials in Tissue Engineering

YIN Yu-Ji, YAO Kang-De^{*}, LIU Wen-Guang, MAO Jin-Shu, CUI Yuan-Lu, CAI Kai-Yong, ZHAO Feng
(*Research Institute of Polymeric Materials, Tianjin University, Tianjin 300072*)

Abstract Chitosan in which the *N*-acetylglucosamine moiety is a structural feature found in glucosaminoglycans and gelatin is the partially denatured derivative of collagen. They exhibit related bioactivities as their precursor. The recent achievements on the chitosan-gelatin network based biomaterials are reviewed in this paper covers preparations of membrane, scaffold, surfaces modifier in tissue engineering as well as the utilization of *N*-alkylated chitosan as non-viral vector for DNA delivery. These biomaterials have promising perspectives in skin, cartilage, bone tissue engineering and gene therapy.

Keywords chitosan, gelatin, surface modification, biomaterial, tissue engineering, review