



高强度双网络高分子水凝胶: 性能、进展及展望

陈咏梅^{①*}, 董坤^①, 刘振齐^①, 徐峰^{②*}

① 西安交通大学理学院, 非平衡物质结构及量子调控教育部重点实验室, 西安 710049;

② 陕西师范大学化学与材料科学学院, 西安 710062

* E-mail: chenym@mail.xjtu.edu.cn; fengxu@snnu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-31; 接受日期: 2012-02-15

国家自然科学基金(批准号: 51073127, 51173144)、高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20100201110040)、“中央高校基本科研业务费专项资金”(批准号: 109-08140018)和西安交通大学“新教师科研支持计划”(批准号: 08141001)资助项目

摘要 作为一种虽然含有 90 wt%的水, 但力学强度高达数十兆帕的高分子水凝胶材料, 双网络(double network, DN)设计思路对大幅度提高水凝胶力学性能以及推动其在生物材料中应用研究意义重大. 近年来高强度 DN 凝胶研究不断取得令人瞩目的进展, 在 DN 凝胶概念的基础上, 设计合成了天然和仿生 DN 凝胶、低摩擦和低磨损 DN 凝胶以及细胞亲和性高强度水凝胶, 并研究了 DN 凝胶的生物相容性和诱导关节软骨再生等生物材料性能. 高强度、多功能 DN 凝胶在生物材料中的研究极大地扩展了高分子水凝胶材料的应用范围. 本文综述了 DN 凝胶的设计思路, 分析了影响其性能的因素, 并对其未来发展进行了展望.

关键词

高分子水凝胶
双网络
细胞亲和性
摩擦磨损
生物相容性

1 引言

人类治疗疾病、进一步提高生活质量的美好愿望对生物材料的研究提出了更高的要求. 随着生物材料研究的深入, 已经开发出了多种多样的人工组织或器官, 部分产品已上市并用于常规的临床治疗, 但是这些产品大都由硬度高、不含水的无机或有机材料组成, 例如金属、塑料以及橡胶等. 虽然这些材料的力学性能具有优势, 但它们的含水率、柔软性、硬度和摩擦系数等参数与人体软组织, 例如血管、关节软骨和肌腱之间存在显著差距. 值得提出的是人体除了牙齿和骨头以外, 都是由生物软组织构成的. 严格地讲上述材料并不具有替代生物软组织的优势(表 1)^[1-8], 因此, 研究与生物软组织的结构和性能类似的“软、湿”高分子水凝胶材料具有重要的科学意义和应用价值.

高分子水凝胶(hydrogels)是一类具有化学或物理交联结构、可吸收大量水分但不溶于水的高分子或大分子聚集体, 它们在水中可保持一定形状和三维空间网络结构并迅速溶胀^[9], 因此也被称为“水材料”(图 1). 高分子水凝胶同时兼具固体和液体双重性质: 从宏观尺寸的角度来看, 高分子水凝胶具有并保持一定的形状, 施加一定的压力后会变形, 当去除压力后它会恢复原来的形状, 所以它具有固体的粘弹性; 从微观尺寸角度来看, 高分子水凝胶具有三维网络结构, 水溶性小分子可以在三维网络中自由扩散, 且扩散系数与在水溶液中接近, 所以它具有液体性质. 此外, 由于水合作用, 高分子链中的亲水性基团将水分子束缚在三维网络结构中, 从而赋予了高分子水凝胶良好的保水性能, 与海绵不同, 即使其遭受外力而被破坏, 水也难以从水凝胶网络中挤压出来.

表 1 人体软组织与不同人工材料性能比较

Soft tissue/Artificial materials	Elastic modulus	Water content (wt%)	Frictional coefficient	Tensile strength (MPa)	Ref.
Cartilage	0.45–0.80 MPa	70–85	~0.001	35.7	[1, 2]
Human forearm tendon	90.12–414.99 MPa	–	–	23.65–78.52	[3]
Hydrogel	< 1 MPa	> 70	0.01–0.001	<1	[4]
Silicone rubber	~25 (shore harness)	–	~ 0.50	4.0	[5]
Ultra-high molecular weight polyethylene	29 MPa	–	< 0.20	50	[6, 7]
Stainless steel	200 GPa	–	~ 0.10	–	[1, 8]

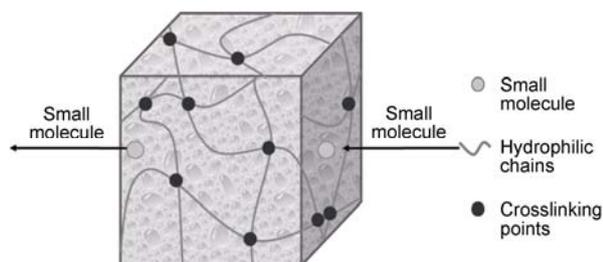


图 1 高分子水凝胶网络结构示意图

作为一种智能材料(intelligent material), 高分子水凝胶在体积相转变和刺激响应等方面的研究受到广泛关注. 例如, Tanaka^[10]首次发现给高分子水凝胶施加低电压会使其体积缩小, 当电压被切断时会恢复原来的形状, 从而实现由电能到机械能的转化. 这种与体积变化有关的现象能够用以制造开关、传感器和电能-机械转换器等. 该研究为著名的“相转变理论”奠定了基础. Osada^[11]将这种电能-机械能的转化发展为电能-化学作用-机械能之间的相互转换, 以电场控制表面活性剂十二烷基吡啶与聚电解质高分子水凝胶聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸)[poly(2-acrylamido-2-methyl-propane sulfonic acid), PAMPS]的相互作用, 从而获得了受电场诱导运动的高分子水凝胶“人工爬虫”, 其柔软的运动形态与真的爬虫极为相似, 且爬行速度可达 25 cm/min. 此外, Osada 等人^[12]还研究了温控“形状记忆”高分子水凝胶. 近年来又有很多研究者结合高强度双网络(double network, DN)凝胶的设计策略开发出了温度敏感^[13]、pH 敏感^[14]等高强度智能水凝胶材料.

与智能水凝胶材料相比, 高分子水凝胶作为生物材料的应用潜力还有待开发. 由于高分子水凝胶的三维网络结构和粘弹性与生物体内由生物大分子构成的细胞外基质(extracellular matrix)极为类似, 作为生物材料的高分子水凝胶已用于细胞支架^[15]、药物缓释^[16]、人造器官^[17]和医疗器械^[18]等研究和应用. 近年来, 高分子水凝胶因有望成为软组织修复甚至再

生的生物材料而引起了人们更多的关注^[19], 所以缩小高分子水凝胶与生物软组织之间的性能差距, 寻求与生物软组织性能匹配的高分子水凝胶材料, 最终达到以水凝胶材料替代受损的生物体软组织的目的, 是目前高分子水凝胶研究的重要问题之一.

但遗憾的是, 传统高分子水凝胶材料自身存在着一些难以克服的性能缺点, 要将其广泛地应用于生物材料还需要解决下列问题. 1) 提高水凝胶的机械强度. 在生理条件下, 许多软组织如血管、关节软骨、半月软骨、肌腱及韧带等都处于剧烈的机械动力环境之中, 例如关节软骨承受的压力约为 10 MPa, 只有能够承受如此高机械强度的材料才能保证其功能的正常发挥. 然而大多数高分子水凝胶十分脆弱, 例如天然来源的胶原蛋白(collagen)水凝胶能够承受的外力仅为数千帕, 而人工合成的 PAMPS 水凝胶能够承受的外力也只有几十千帕. 提高水凝胶的力学性能有助于扩展其在高强度软组织中的研究和应用. 2) 赋予水凝胶细胞亲和性. 细胞对生物软组织功能的发挥起到了举足轻重的作用, 例如软骨细胞分泌的胶原蛋白、透明质酸(hyaluronic acid, HA)及其他多糖有助于增强软骨强度和摩擦润滑; 血管内皮细胞分泌的糖萼(glycocalyx)具有抗凝血功能. 赋予水凝胶细胞亲和性有助于研究和开发活性人工软组织材料^[20, 21]. 3) 降低摩擦磨损性能. 许多生物软组织都呈现凝胶态, 如软骨就是一种由蛋白多糖, II 型胶原蛋白和大约 70 wt% 水分构成的典型的水凝胶^[22]. 正常软骨组织在关节中起到超低摩擦, 分担压力和吸收冲击能量等作用^[23]. 当正常软骨组织受损时, 难以通过现有医疗手段修复^[24]. 因此, 研究开发凝胶态人工软骨生物材料具有至关重要的意义. 设计合成兼具低摩擦、低磨损和高力学性能于一体的高分子水凝胶材料是其作为人工软骨替代材料研究面临的关键性挑战之一.

分析高分子水凝胶结构和性能之间的关系, 影响其力学性能的因素有四点. 1) 高分子聚合物的密

度. 高分子水凝胶中通常仅含有约 10 wt% 的高分子聚合物, 从而使得高分子水凝胶具有与溶液相似的流体性质, 导致其力学性能较低. 因此, 适当增加高分子聚合物密度可在一定范围内提高水凝胶的力学性能. 2) 网络结构的均匀性. 高分子水凝胶通过单体聚合交联或氢键、疏水作用、静电相互作用等非共价键而分别形成化学交联凝胶和物理交联凝胶. 传统高分子水凝胶在制备过程中不可避免地存在网络结构的不均匀性. 因此, 当受到外力时, 应力在网络中的分布不均匀, 在应力集中区域高分子链易于断裂而形成微小裂缝, 随后应力沿裂缝传播, 最终导致水凝胶损坏^[25]. 因此, 设计合成具有均匀网络结构的高分子水凝胶是提高其力学性能的有效方法之一. 3) 交联点的自由度. 传统化学和物理高分子水凝胶中交联点固定于水凝胶网络中, 在水凝胶拉伸或压缩过程中, 交联点处易产生应力集中而被破坏. 因此, 通过在高分子水凝胶网络中设计可随应力变化而灵活移动的交联点, 将应力分散于水凝胶的整体网络结构之中是提高水凝胶机械强度的有利切入点. 4) 高分子链的柔韧性. 高分子链, 尤其是中性的分子链在水溶液中具有一定的柔韧性, 可吸收外界应力. 但是一旦固定于水凝胶网络之中, 高分子链的柔韧性难以发挥, 导致水凝胶力学性能降低^[26]. 因此, 通过降低高分子链的交联密度甚至不交联, 最大限度地发挥高分子链的柔韧性, 有望提高高分子水凝胶的机械强度.

综上所述, 通过分子设计, 加强高分子水凝胶网络结构的规整度、提高交联结构自由度及发挥高分子链的柔韧性是提高水凝胶力学性能的 3 种有效设计策略. 实际上, 上述 3 种设计策略也是相辅相成的, 例如提高交联结构自由度在改善高分子链柔韧性的同时也解决了水凝胶网络结构不均匀问题. 拓扑凝胶(topological hydrogel, TP gel)^[27]和纳米复合凝胶(nanocomposite, NC gel)^[28]就是分别通过加强高分子水凝胶网络结构的规整度、提高交联结构自由度及发挥高分子链的柔韧性而提高水凝胶力学性能的典型例子. TP凝胶的特征为在其网络结构中设计了 8 字形交联点(figure-of-eight cross-linker), 高分子链穿梭于 8 字形交联点的上下 2 个环之中形成了均匀的网络结构. 当施加外力时, 高分子链犹如在滑轮上滑动一样随外力在 8 字形交联点中自由移动. 由于具有灵活的交联点, TP凝胶受到外力时易于大幅度变形, 可承受

较大的拉伸应力, 即使在外力作用下 TP凝胶也能够保持网络结构的均匀性, 从而使应力分散于整个凝胶网络中. NC凝胶的特征为在其网络中设计了双重交联结构, 即固定交联(高分子链交联于粘土表面)和动态交联(高分子链与高分子链之间的缠绕)结构. 双重交联结构是由于在 NC凝胶形成过程中, 高分子单体以纳米尺度的片状无机粘土为支架而聚合形成高分子链, 同时柔软的高分子链之间互相缠绕而形成的. 固定交联点为纳米无机粘土, 它起到给高分子单体提供聚合位点和支撑高分子链之间互相缠绕的作用; 动态交联点为互相缠绕的高分子链, 在外力作用下缠绕的高分子链之间在一定范围内可以互相滑动^[29]. 与 TP凝胶类似, NC凝胶同样可以承受较大幅度的拉伸应力.

双网络(double network, DN)凝胶的结构和性能不同于 TP凝胶和 NC凝胶^[30], 其结构特征为包含 2 种相互独立的网络结构, 一种为交联密度较高的聚电解质网络结构, 另一种为低交联或不交联的中性网络结构. 聚电解质网络结构为 DN凝胶提供了刚性的支架, 保持凝胶外形, 而柔性的中性聚合物填补于刚性网络中, 起到吸收外界应力的作用. DN凝胶不仅保持了传统水凝胶优异的物理性能, 例如粘弹性、高含水量、良好的透光性等, 而且突破了传统高分子水凝胶力学性能低的缺点, 其拉伸强度和压缩强度均可高达兆帕数量级^[31], 如此优越的力学性能是其他高分子水凝胶不可比拟的.

本文综述了 DN凝胶的设计思路, 分析了影响其性能的结构因素, 并介绍了天然 DN凝胶、低摩擦、低磨损 DN凝胶和细胞亲和性高强度水凝胶的设计, 仿生高强度水凝胶制备以及 DN凝胶的生物相容性和诱导关节软骨再生等满足生物材料要求的功能.

2 DN凝胶的性能、结构及加工

“双网络”术语来源于橡胶弹性体. “双网络”橡胶弹性体的制备过程如下: 首先将在无变形状态下交联的橡胶弹性体拉伸, 使缠绕的高分子链伸展, 然后在拉伸状态下进行第二次交联. 第二次交联后伸展状态的高分子链赋予橡胶弹性体各向异性的性质. DN凝胶虽然借鉴了橡胶弹性体的“双网络”概念, 但具有截然不同的含义. 典型的 DN凝胶是以传统的化学交联高分子水凝胶作为 DN凝胶的第一层网络

结构, 以其为模板, 在其中引入高密度, 低交联或不交联的第二层高分子网络形成的^[31].

DN 凝胶分两步制备得到: 首先合成带有负电荷的、较高交联密度的刚性高分子水凝胶作为第一层水凝胶网络结构, 然后在第一层水凝胶网络中溶胀大量中性高分子单体之后, 以第一层水凝胶网络为模板, 在其中制备中性的、低交联或未交联的高分子链为第二层凝胶网络结构^[31-36]. 由于负电荷的第一层水凝胶在水溶液中的溶胀性能很大, 当将其浸泡在高浓度的中性高分子单体溶液中之后, 大量的中性高分子单体溶胀于其网络之中, 因此, DN 凝胶的第二层网络中聚合物密度远大于第一层网络中聚合物密度^[31].

目前高强度 DN 凝胶的最优组合是以带负电荷的 PAMPS 水凝胶作为第一层网络结构, 中性的聚丙烯酰胺(polyacrylamide, PAAm)水凝胶作为第二层网络结构制备而成的, 用 PAMPS/PAAm 表示(图 2(a)). 虽然 PAMPS 和 PAAm 均为传统的化学交联水凝胶, 但是 DN 凝胶的力学性能并不是 2 种水凝胶力学性能的简单加和, 而是表现出协同作用. 与传统的化学交联 PAMPS 和 PAAm 水凝胶相比, DN 凝胶的压缩强度分别是 PAMPS 和 PAAm, DN 凝胶的压缩强度分别是 PAMPS 和 PAAm 单层网络水凝胶的 20 和 40 倍(图 3). 单轴压缩实验表明 PAMPS-4%/PAAm-0.1% (第一层高分子聚合物-交联剂摩尔浓度/第二层高分子聚合物-交联剂摩尔浓度)DN 凝胶抗压强度为 17.2 MPa, 破裂应变为 92%, 而 PAMPS 凝胶和 PAAm 凝胶的抗压强度分别只有 0.4 和 0.8 MPa, 破裂应变分别为 41%和 84%(图 4)^[31].

第二层网络的交联剂浓度显著影响 DN 凝胶的

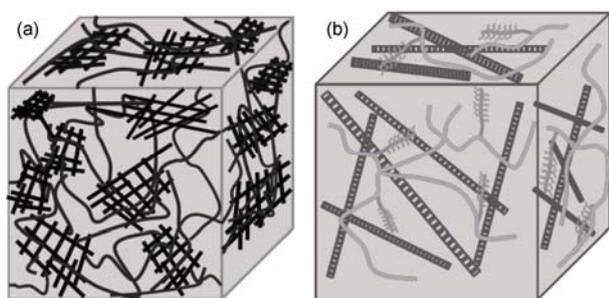


图 2 DN 凝胶(a)和关节软骨(b)的结构示意图

— Cross-linked PAMPS, ~ PAAm chains, ■■■■ collagen fibers, ~ HA, ~ PG

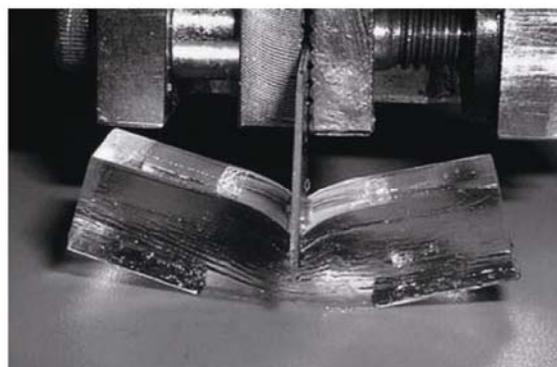


图 3 PAMPS/PAAm 双网络凝胶韧性照片^[30]

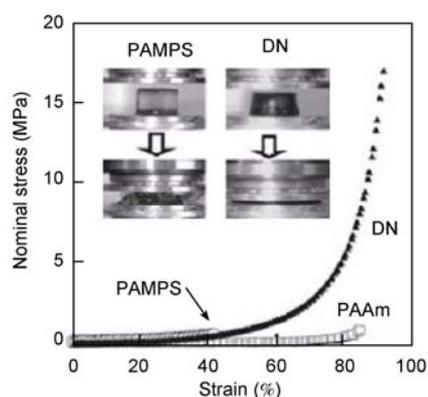


图 4 PAMPS/PAAm 双网络凝胶、PAMPS 凝胶及 PAAm 凝胶压缩应力-应变曲线(交联密度: PAMPS 4 mol%, PAAm 0.1 mol%)^[30]

力学性能, 只有在第二层网络低密度交联的情况下 DN 凝胶才表现良好的力学性能. 当保持第一层网络交联剂浓度为 4 mol%, 而将第二层网络交联剂浓度从 0 mol%逐渐增大到 1 mol%时, 虽然所有的 PAMPS/PAAm DN 凝胶的第二层网络里中性高分子单体的摩尔浓度与第一层网络中聚电解质单体摩尔浓度的比值(20)含水量(90 wt%)均不受第二层网络 PAAm 交联剂浓度的影响, 但是 DN 凝胶的力学性能却发生了显著变化, 其抗压强度随第二层网络 PAAm 交联剂浓度的减少而增大, 在交联剂浓度为 0 mol%时, DN 凝胶具有最高的断裂强度. 最近研究表明交联剂浓度为 0 mol%并不代表第二层网络 PAAm 没有被交联, 而是在制备第一层凝胶时, 一些交联剂 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺的双键仅仅只反应了一端, 其未反应的官能团仍然保留在第一层网络中, 当第二层网络聚合时这些未反应的官能团与 AAm 反应从而使得第二

层网络与第一层网络化学交联, 因此 DN 凝胶中存在内部交联反应^[32].

此外, PAAm 的重均分子量与 DN 凝胶的力学强度成正比关系^[33, 34]. 当 PAAm 的重均分子量低于 10^6 时, DN 凝胶如同单层网络 PAMPS 凝胶一样易碎, 其抗压强度和抗冲击强度分别只有 0.1 MPa 和 1 J/m²; 而当重均分子量高达 10^6 时, 抗压强度和抗冲击强度分别增大 200 和 1000 倍, 分别升高至 20 MPa 和 10^3 J/m².

由于增加交联剂浓度意味着减弱了高分子链的运动自由度, 含有未交联 PAAm 高分子链的 DN 凝胶呈现最高力学性能, 说明 PAAm 高分子链的运动自由度对 DN 凝胶的力学性能起着关键性作用. 综合考虑上述因素, 制备高强度 DN 凝胶的条件总结如下^[30].

1) 组成 DN 凝胶的第一层和第二层网络的 2 种高分子具有截然不同的性能. 刚性、脆弱的聚电解质高分子聚合物作为第一层网络, 而柔软、拉伸性能良好的中性高分子聚合物作为第二层网络. 如果第一层网络和第二层网络均为聚电解质高分子或中性高分子只能小幅度提高水凝胶的强度, 其强度不会有数量级的改变.

2) 第二层网络里中性高分子单体的摩尔浓度是第一层网络中聚电解质单体的 20~30 倍. DN 凝胶的强度与第二层网络里中性高分子单体的摩尔浓度成正比例关系, 只有第二层网络里中性高分子单体的摩尔浓度足够高时 DN 凝胶的强度才会达到 10 MPa 以上.

3) DN 凝胶的强度与第二层网络的交联密度成反比例关系. 第一层网络需要适当的交联密度, 而第二层网络低交联甚至未交联时有利于制备高强度 DN 凝胶. 如果第二层网络的交联剂浓度高于 0.1 mol% 时, DN 凝胶强度呈下降趋势.

4) DN 凝胶的强度与第二层网络里的中性高分子聚合物的分子量成正比例关系. 第二层网络里中性高分子聚合物的重均分子量必须大于 10^6 时才表现出较高的力学性能.

动态光散射分析表明 PAMPS/PAAm DN 凝胶网络不均匀性与其力学强度有关^[35]. 如前所述, 网络结构的不均匀性是造成传统水凝胶力学性能低下的关键因素之一, 那么为什么 DN 凝胶反而显示出如此高的力学性能呢? 在 DN 凝胶的网络结构中, 由于第一

层刚性 PAMPS 凝胶化是基于光引发的自由基反应, 其链增长和交联过程具有不可控性, 会造成水凝胶网络结构的不均匀性, 且在网络中存在许多大小不一的空洞(void), 这些空洞的大小远远大于 PAAm 链段半径, 允许大量的 AAm 单体在其中聚合. 当 AAm 单体在 PAMPS 网络中聚合时, 一部分 PAAm 高分子链与 PAMPS 高分子链之间相互缠绕, 另一部分则填补于 PAMPS 网络的空洞中, 在空洞中通过物理缠绕形成 PAAm 高分子链富集相, 所有 PAAm 高分子链之间形成柔软连续网络结构, 该结构决定了 DN 凝胶的力学性能 (图 2(a)). 当施加一定外力时, PAMPS 凝胶因较为脆弱而首先被损坏, 在 DN 凝胶中形成微观裂纹. PAMPS 网络的空洞中低交联或未交联的 PAAm 高分子链通过粘弹性损耗或者大量 PAAm 链变形而有效地吸收断裂能量, 阻碍微观裂纹的生长和延伸^[36, 37](图 5). 因此, 刚性、脆弱的第一层网络 PAMPS 在初期较低应力下充当断裂牺牲的角色, 而柔软、韧性的 PAAm 在后期高应力下起到承担凝胶大变形的角色.

上述 DN 凝胶的网络结构与关节软骨组织的结构类似. 关节软骨组织是一个复杂的蛋白多糖 (proteoglycan, PG) 凝胶复合体, 其生化结构决定着它的生物力学特性^[38]. 软骨细胞分泌的凝胶样蛋白多糖、胶原纤维等生物大分子基质是控制关节软骨力学性能的结构基础. PG 单体由糖胺聚糖侧链与核心蛋白共价连接构成, PG 聚集体由透明质酸(HA)和 PG 单体非共价结合而成, PG 单体通过连接蛋白连接于

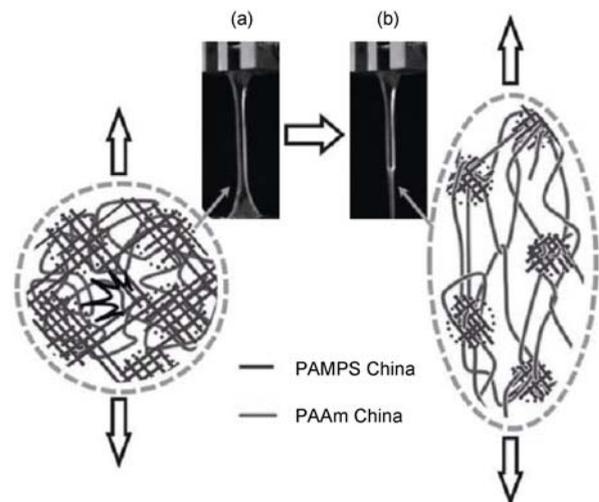


图 5 PAMPS/PAAm 双网络凝胶拉伸前(a)、后(b)凝胶网络结构示意图^[30]

HA 骨架链上. 高吸水性能的 PG 和胶原纤维构成了关节软骨网络结构骨架(图 2(b)). 胶原蛋白的重量占关节软骨干重的 50 wt%~80 wt%, 其主要组分是 3 股 α 多肽链螺旋排列而成的 II 型胶原蛋白, 也含有少量 IX 型和 XI 型胶原蛋白. II 型、IX 型和 XI 型胶原蛋白通过分子内和分子间高度交联, 紧密结合, 形成细长且直径较为均匀(~20 nm)的胶原纤维, 胶原纤维赋予关节软骨一定的形状和硬度, 是抵抗压力的主要成分. PG 聚集体中富含硫酸基和羧基, 高度密集的阴离子电荷间的排斥力形成高渗透压, 吸引大量水分子进入网络状凝胶中, 从而使关节软骨具有良好的弹性, 能够抵抗和分散载荷^[39, 40]. DN 凝胶中第一层较高交联密度的刚性网络的功能与关节软骨组织中的胶原纤维网状结构相似, 其第二层低交联或不交联的柔性高分子链的功能与 PG 聚集体相似.

结构上的随机性和不均匀性存在于大多数高分子水凝胶的网络结构中, 而 DN 凝胶恰恰利用 2 种高度不对称聚合物结构的不均匀性提高机械强度, 这与生物力学领域中不均匀性能大幅度提高机械强度有异曲同工之妙, 例如动物的骨头是不均匀多孔结构, 软骨组织中的网络结构也呈现不均匀性, 这些不均匀结构能够避免应力集中引起骨头和软骨组织受损^[41]. 此外, 调节 DN 凝胶的制备条件可大幅度调节其力学性能, 例如通过调节聚合物分子结构、第一层和第二层凝胶网络中聚合物的摩尔比以及交联剂浓度等参数, 可将 DN 凝胶的弹性模量调节在 0.1~1.0 MPa 之间, 拉伸强度调节在 1~10 MPa 之间, 抗压强度调节在 20~60 MPa 之间. 这些力学性能的调控有助于设计与不同软组织进行力学匹配的生物材料.

如前所述, 虽然 DN 凝胶总体力学性能优异, 但是单一凝胶网络力学性能却非常低, 且需要在第一层电解质凝胶网络中大量溶胀中性单体制备 DN 凝胶第二层网络. 因第一层凝胶显著溶胀, 并且因易碎而难以处理而难以通过设计复杂结构模具达到加工成型的目的. Gong 等人采用将刚性的第一层 PAMPS 凝胶网络制备成微米凝胶和以聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 凝胶为内模具(internal mold)的 2 种方法解决了 DN 凝胶成型加工问题. 采用 PAMPS 微米凝胶制备 DN 凝胶的过程如下: 将 PAMPS 微米凝胶(将块状 PAMPS 凝胶干燥后研磨得到^[42]或用乳化法合成^[43])浸没于含有 AAm 单体, 交联剂 MBAA 及引发剂的溶液中, 从而获得含有 PAMPS 颗粒的糊状物,

然后将该粘性流体灌入目标模具中 UV 引发聚合, 从而获得所设计形状的 DN 凝胶, 如采用半月板形状的模具可制备成具有半月板形状的 DN 凝胶. 以 PVA 凝胶为内模具制备 DN 凝胶的方法^[44]巧妙地利用了 PVA 凝胶易于成型且在水中溶胀时不易变形的优点, 其过程如下: 首先通过冷冻法制备具有一定形状的 PVA 凝胶, 如鸟、鱼、中国结等, 将该复杂形状的 PVA 凝胶浸泡在含有 AMPS 单体, 交联剂 MBAA 和引发剂的溶液中达到平衡之后, 在 PVA 凝胶中原位制备第一层 PAMPS 网络, 得到 PVA-PAMPS 凝胶. 然后再把 PVA-PAMPS 凝胶浸泡在含有 AAm 单体和引发剂的溶液中达到平衡之后, 在 PVA 凝胶中原位制备第二层 PAAm 网络, 且具有复杂形状的 PVA-DN 凝胶. 上述方法均在不损失凝胶力学性能的前提下解决了 DN 凝胶成型加工问题, 使得 DN 凝胶走向应用又向前跨进了一步.

3 DN 凝胶在生物材料中的研究进展

调节 DN 凝胶的第一层网络和第二层网络的分子结构可以灵活控制 DN 凝胶的性质, 因此根据不同的研究目的可设计具有特定功能的高性能水凝胶. 在此重点针对天然 DN 凝胶的制备、DN 凝胶的摩擦磨损性、DN 凝胶的化学结构对细胞相容性的影响、兼具细胞相容性和高力学性能水凝胶的设计、仿生高强度水凝胶制备以及生物相容性和诱导关节软骨再生等方面的研究进展做以下总结.

3.1 天然 DN 凝胶的制备

天然高分子水凝胶通常表现出良好的生物相容性且广泛应用于生物材料领域. 将 DN 凝胶的设计原理应用于天然高分子, 有望制备得到高强度生物相容性高分子水凝胶. 下面以细菌纤维素(bacterial cellulose, BC)/明胶(gelatin)DN 凝胶为例进行说明^[45].

细菌纤维素是木醋杆菌属细菌(acetobacter xylinum)在液态发酵过程中, 由其分泌的胞外多糖在液体表面形成的凝胶状物质的主要成分, 在自然界可直接降解, 且具有优越的生物相容性. 细菌纤维素的纤维直径在 0.01~0.1 μm 之间, 弹性模量高达 1.5×10^4 MPa, 为一般纤维的数倍以上, 并且抗拉强度高^[45]. 大量纤维素纤维通过氢键形成纤维素凝胶(BC 凝胶)(图 6(a)). 扫描电子显微镜(scanning electron

microscope, SEM)观察表明 BC 凝胶中存在着致密与稀疏相互交替的层状结构, 层与层之间间隔约为 10 μm (图 6(d)). 该结构赋予 BC 凝胶各向异性的力学性能: 平行于层状结构方向有很高的拉伸模量(2.9 MPa), 而垂直于层状结构方向却只有很低的压缩模量(0.007 MPa). 由于 BC 纤维的疏水性, 造成 BC 凝胶保水能力差且缺乏粘弹性. 尽管通过发酵培养制备的 BC 凝胶中含水量约为 60 wt%, 施加外力时凝胶不易被损坏, 但水易从 BC 凝胶网络中挤压出来(图 6(b)), 且不会再次被吸收到凝胶网络之中, 即脱水后的 BC 凝胶不具有再溶胀性能. 这是由于 BC 纤维之间的氢键作用大于 BC 纤维与水分子之间的作用所致^[46]. 明胶是一种典型的生物医用高分子, 它是由细胞外基质胶原衍生而来的多肽, 胶原加热变性即制得明胶. 以 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC)交联制得的明胶凝胶具有良好的粘弹性和保水性能. 在不破坏明胶凝胶的前提下, 因承受外力而变形的明胶凝胶能够恢复其形态, 且脱水后能够再次吸水溶胀. 但是明胶凝胶的力学性能较差, 仅施加 0.2 MPa 的压力就会破裂.

利用 DN 凝胶的概念, 发挥 BC 和明胶 2 种天然高分子的优点并合理匹配, 有望制得高机械强度的生物相容性水凝胶. BC/Gelatin DN 凝胶的合成过程如下: 首先将 BC 凝胶浸泡到 30 wt% 的明胶水溶液中, 明胶逐渐扩散到 BC 凝胶网络结构中, 直到平衡. 然后将含有大量明胶的 BC 凝胶浸泡到 1 M EDC 溶液中, 使存在于 BC 凝胶网络中的明胶交联形成 BC/Gelatin DN 凝胶(图 6(a)).

广角 X 射线衍射分析(wide-angle X-ray diffraction, WAXD)表明在 BC/Gelatin DN 凝胶中 BC 的层状结构保存完好(图 6(e))^[45], SEM 观察表明明胶均匀填充于 BC 凝胶网络中纤维密度稀疏的空间(图 6(d)), 该结构预示 BC/Gelatin DN 凝胶保持着 BC 各向异性的力学性能. 实验结果证实 BC/Gelatin DN 凝胶表现出良好的抗压强度和拉伸强度, 其抗压缩模量为 1.7 MPa, 比 BC 凝胶的 0.007 MPa 高出 240 多倍, 比明胶凝胶的 0.16 MPa 高出约 11 倍. BC/Gelatin DN 凝胶的抗压强度为 3.7 MPa, 该强度在人工软骨压缩强度(1.9~14.4 MPa)范围之内, 比明胶强度高出 31 倍. 另外, BC/Gelatin DN 凝胶克服了 BC 凝胶粘弹性差的缺点, 在重复压缩应力作用下也能够恢复到应变前的

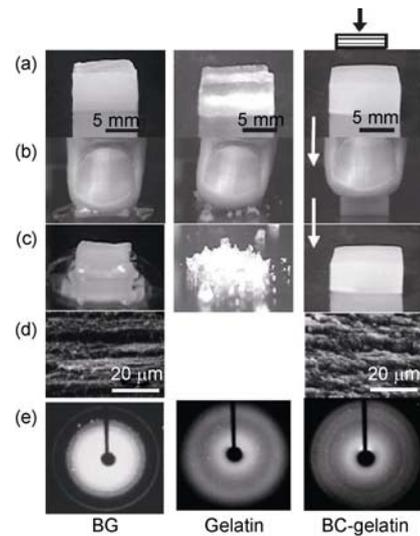


图 6 纤维素、明胶及纤维素/明胶双网络凝胶照片以及广角 X 射线衍射图

(a) 压缩前; (b) 压缩中; (c) 压缩 10 min 后; (d) 纤维素和纤维素/明胶双网络凝胶中层中结构扫描电镜照片; (e) 纤维素、明胶及纤维素/明胶双网络凝胶广角 X 射线衍射图^[45]

30%. 同样, BC 凝胶与一些高分子多糖, 例如海藻酸钠(sodium alginate), τ -角叉菜胶(τ -carrageenan)等配合形成的 DN 凝胶也具有较好的力学性能. 例如, BC/ τ -carrageenan DN 凝胶的压缩模量为 0.12 MPa, 分别比单纯的 BC 和 τ -角叉菜胶凝胶高出 17 倍和 13 倍^[45]. 总之, 引入双网络结构会提高天然高分子水凝胶的力学性能, 研究者可以根据不同的目的选择不同种类的 2 种高分子进行匹配.

3.2 仿生高强度 DN 水凝胶的制备

肌腱、关节软骨和肌肉等软组织中具有有序结构为保证这些软组织运动功能的正常发挥提供了基本保证. 如: 存在于肌原纤维节(sarcomere)中的肌凝蛋白(myosin)呈现液晶结构, 该液晶结构保证了肌肉纤维的平滑运动^[47, 48]. 设计具有各向异性结构的仿生 DN 凝胶可为体外模拟、研究软组织具有方向性的生理运动奠定基础. Gong 等人^[49, 50]将 DN 凝胶和聚电解质自组装的设计思路结合起来制备了具有光学各向异性的新型功能高强度 DN 凝胶. 该凝胶的制备方法如下: 首先通过在装有聚 2, 2'-磺酸钠-4,4'-联苯对苯二甲酰胺(poly(2, 2'-disulfonyl-4, 4'-benzidine terephthalamide), PBDT, 图 7(a))溶液的模具上端, 即垂直方向, 扩散 CaCl_2 溶液, 诱导半刚性结构的聚电解

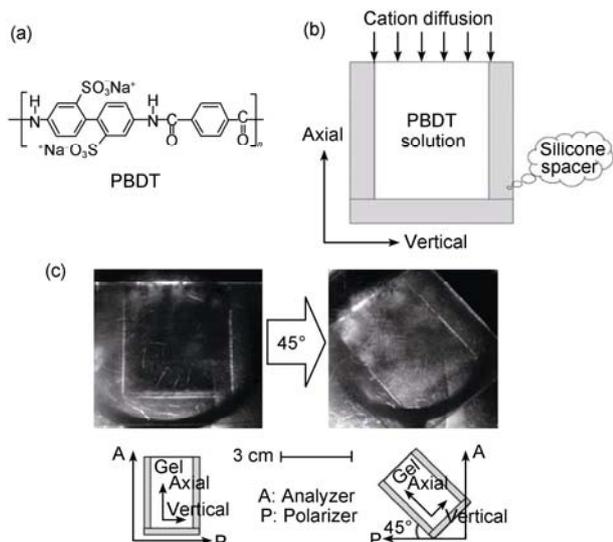


图 7 (a) PBDT 化学结构式; (b) 各向异性 A-DN 水凝胶的制备示意图; (c) 含 1 wt%PBDT 的 A-DN 水凝胶的偏光现象^[49]

质 PBDT 自组装形成光学各向异性水凝胶(图 7(b)). 然后将作为第一层网络的 PBDT 水凝胶浸泡在中性单体 AAm 及交联剂 MBAA 溶液中溶胀平衡, 再在 PBDT 水凝胶模板中引发 AAm 聚合即获得半透明的 PBDT/PAAm 各向异性 DN 凝胶(anisotropic double network gel, A-DN hydrogel). 在正交偏光显微镜下观察发现当偏振片平行于 CaCl_2 溶液扩散方向时水凝胶颜色变暗, 当偏振片与 CaCl_2 溶液扩散方向成 45° 时水凝胶变为透明(图 7(c)).

该凝胶不仅具有光学各向异性, 而且具有力学各向异性. 例如当 PBDT 浓度为 1 wt% 时, 在平行于 CaCl_2 溶液扩散方向时水凝胶的弹性模量为 0.009 MPa, 而在垂直于该方向时水凝胶的弹性模量为 0.036 MPa. 另外, 当 PBDT 浓度高于其临界液晶浓度(1.5 wt%)时, 垂直于 PBDT 晶体方向上 A-DN 凝胶压缩模量可高达 0.35 MPa. SEM 观测表明当形成第一层网络时棒状 PBDT 在平行方向上聚集形成均匀网状结构, 且可在样品表面观测到 CaCl_2 晶体(图 8(a)), 这是由于在冷冻干燥制备样品的过程中形成 CaCl_2 晶体所致. A-DN 凝胶的丛状结构的排列方向与 PBDT 凝胶相同, 还有一些聚合物链与丛状结构缠绕形成较为致密的网络结构(图 8(b)). 说明 PBDT 水凝胶起到了决定 A-DN 凝胶网络骨架的作用, 第二层凝胶网络在其形成的模板上聚合形成(图 8(c)).

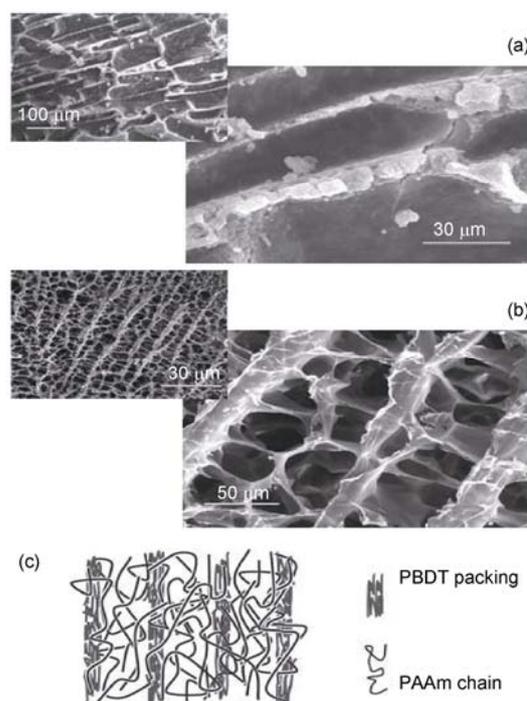


图 8 含 1 wt%PBDT 水凝胶扫描电镜图 (a) CaCl_2 交联的 PBDT 水凝胶; (b) A-DN 水凝胶网络; (c) 理想 A-DN 水凝胶网络示意图^[49]

3.3 低摩擦高强度水凝胶的设计

聚电解质高分子刷可有效降低表面摩擦. Klein 及其合作者报道了两片修饰有刷状聚电解质的云母表面之间摩擦时, 因静电排斥效应在水中表现出可观的润滑效应^[51], Osada 和 Gong 报道了在水凝胶表面修饰聚电解质高分子刷可有效降低与之产生静电斥力的摩擦副(平板玻璃板)的摩擦系数^[52, 53]. 低摩擦高强度水凝胶的设计借鉴了修饰聚电解质高分子而降低摩擦的思路. 在 PAMPS/PAAm DN 凝胶表面修饰与平板玻璃产生静电排斥的 PAMPS 线性高分子链或低交联剂浓度(0.1 mol%)的 PAMPS 水凝胶, 分别形成 DN-L 凝胶和三元互穿网络型(triple network, TN)凝胶. DN-L 凝胶和 TN 凝胶的抗压强度仍保持在兆帕量级, 分别为 9.2 和 4.8 MPa, 它们的弹性模量分别为 2.1 和 2.0 MPa, 比 DN 凝胶的弹性模量 0.8 MPa 高出一倍以上^[54].

当 DN, TN 和 DN-L 三种凝胶在水中与玻璃板摩擦时, 可以很清楚的发现摩擦力和摩擦系数均按 $\text{DN} > \text{TN} > \text{DN-L}$ 的顺序减小(图 9). 说明作为第 3 种网络成分 PAMPS 的引入, 特别是线性 PAMPS 高分

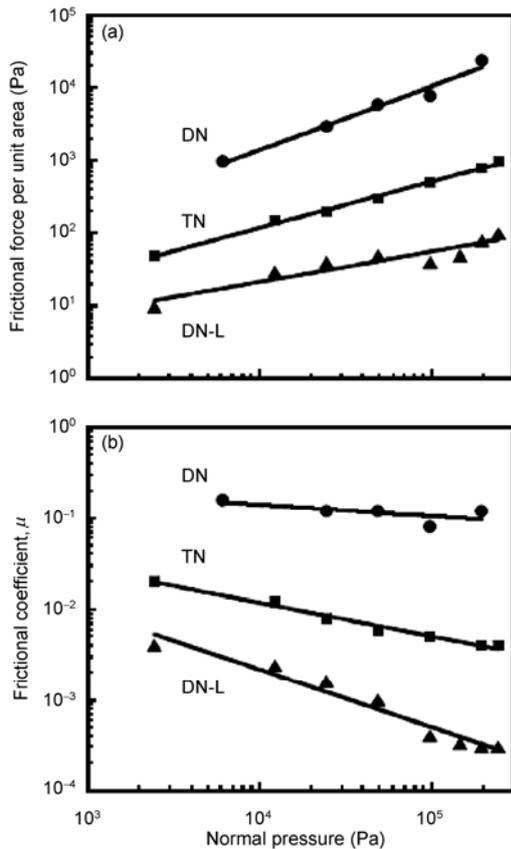


图9 DN, TN及DN-L三种凝胶与玻璃基板在水中摩擦时摩擦应力(a)、摩擦系数(b)随荷载变化图^[54]

子链的引入,有效地降低了高强度凝胶的摩擦力和摩擦系数.由于DN凝胶表面的PAAm易于吸附于平板玻璃表面产生吸附摩擦行为,所以表现出较高的摩擦系数($\sim 10^{-1}$).TN凝胶表面低交联剂浓度的PAMPS水凝胶与平板玻璃之间因静电排斥而产生排斥摩擦效应,摩擦系数降低到 $\sim 10^{-2}$,比DN凝胶低一个数量级.DN-L凝胶表面的PAMPS线性高分子链不但与平板玻璃之间静电排斥产生排斥摩擦效应,而且起到表面聚合物刷的作用,可使摩擦系数显著降低到 10^{-4} ,分别低于TN或者DN凝胶2个和3个数量级.需要强调的是,即使在垂直压力为接近关节软骨压力的 $10^3 \sim 10^5$ Pa测定时,DN-L凝胶仍然保持低摩擦系数,表明线性聚电解质高分子链在高荷载下仍能保持低摩擦性能^[54].

聚电解质高分子链有效降低高分子水凝胶表面摩擦行为的机理尚不完全清楚.推测其原因可能与增加了自由运动的高分子链和与之滑动的摩擦副界

面的水润滑层厚度有关.在相同压力下,水凝胶/摩擦副体系处于静止状态时,TN凝胶、DN-L凝胶与摩擦副界面的静态水润滑层厚度应该是一致的,摩擦测试时,水凝胶与摩擦副之间产生相对运动,水润滑层发生剪切流动,由于可自由运动的高分子链比水凝胶网络更容易移动和变形,从而使得有效水润滑层厚度增加,导致剪切抵抗减小,降低摩擦系数^[53].

3.4 高强度水凝胶的磨损性能

DN凝胶的高强度特性使其具有作为人工软骨材料的潜在应用价值.由于人体关节在人的一生中需要承受大概上百万次的循环摩擦,因此评价DN凝胶的耐磨性能就显得尤为重要.Yasada等人^[55]借鉴了测试人工关节中刚硬生物材料(例如超高分子量聚乙烯(UHMWPE))摩擦的球-板(pin-on-flat)往复摩擦磨损测试方法研究了DN凝胶的耐磨性能.该方法是用球状摩擦头接触平板DN凝胶样品表面,做高速往复运动后,用激光共聚焦扫描电子显微镜(confocal laser scanning microscope)观测样品表面被磨损的印记的深度来判断样品的耐磨性能.比较了PAMPS/PAAm, PAMPS/PDMAAm(poly(N, N'-dimethylacrylamide), BC/PDMAAm和BC/Gelatin四种含有合成或天然聚合物的DN凝胶的耐磨性能.在往复运动摩擦 10^6 次(等同于50 km)后, PAMPS/PAAm, PAMPS/PDMAAm, BC/PDMAAm, BC/Gelatin凝胶的平均磨损深度分别为9.5, 3.2, 7.8和1302.4 μm .令人惊奇的是PAMPS/PDMAAm DN凝胶的平均磨损深度非常接近于对照样品UHMWPE的磨损深度(3.33 μm).另外,尽管PAMPS/PAAm和BC/PDMAAm DN凝胶最大磨损深度约为UHMWPE的2~3倍,但是这些凝胶能够承受 10^6 次循环摩擦.表明PAMPS/PAAm, PAMPS/PDMAAm和BC/PDMAAm DN凝胶可以承受比普通水凝胶更大的磨损,且耐磨性能最优的PAMPS/PDMAAm DN凝胶具有作为人工软骨的潜在应用价值.然而,天然BC/Gelatin DN凝胶与其他合成DN凝胶相比耐磨性能显著降低,这可能是由于其低含水量、摩擦系数较高所致.

3.5 细胞亲和性

细胞亲和性是评价生物材料的重要参数之一,研究组成DN凝胶的高分子成分对细胞亲和性的影响有助于设计同时具有良好细胞亲和性和高力学性

能的高分子水凝胶. 为了探讨合成高分子水凝胶的化学结构对细胞相容性的影响, 我们建立了直接在合成高分子水凝胶支架表面培养细胞的方法. 该方法的特点是在将细胞播种于高分子水凝胶支架之前, 无需对水凝胶支架修饰促进细胞粘附和扩增的蛋白质, 如胶原蛋白(collagen)及黏连蛋白(fibronectin)和纤连蛋白(laminin)等. 建立该方法的意义在于可以直接研究高分子水凝胶的化学结构与细胞亲和性之间的关系, 而不受蛋白质等生物分子的影响. 此外, 该方法简便易行, 无需考虑因蛋白质修饰而引起的变性、污染等问题. 前期研究表明合成高分子水凝胶的化学结构对多种血管内皮细胞, 包括人体脐带静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、人体冠状动脉血管内皮细胞(human coronary artery endothelial cells, HCAECs)^[56, 57]和牛胎儿大动脉血管内皮细胞(bovine fetal aorta endothelial cell, BFAEC)^[58, 59]以及人体关节软骨细胞(human articular chondrocytes)^[60, 61]和小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell)^[62]的细胞相容性均有影响. 在此以 BFAEC 为例介绍在探讨高分子水凝胶的化学结构和交联剂浓度对细胞亲和性影响的基础上, 综合考虑不同高分子组份的性能对细胞亲和性及水凝胶力学性能的影响, 设计制备兼具细胞亲和性及高强度性能的水凝胶.

由于 DN 凝胶的第一层网络和第二层网络的化学结构和交联剂浓度显著影响其力学性能, 所以研究这些参数对细胞亲和性的影响. DN 凝胶由阴离子和中性高分子聚合物构成, 因此测定了 2 种强电解质聚阴离子水凝胶, 聚 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸钠(poly(2-acrylamido-2-methyl-propane sulfonic acid sodium salt), PNaAMPS)、聚苯乙烯磺酸钠(poly(sodium *p*-styrene sulfonate), PNaSS), 以及 2 种中性水凝胶, 即 PAAm 和 PDMAAm 的细胞亲和性. 结果表明, 在中性 PAAm 和 PDMAAm 水凝胶支架上, BFAECs 粘附于水凝胶表面, 呈圆形并不伸展和扩增, 说明中性水凝胶对细胞伸展具有很强的抑制作用, 不利于细胞扩增. 该行为不随水凝胶交联剂浓度的变化而变化. 与中性水凝胶不同, BFAECs 在带有磺酸基的强电解质 PNaAMPS 和 PNaSS 水凝胶支架上表现出良好的伸展和扩增行为(图 10), 且扩增行为不受水凝胶交联剂浓度的影响. 当 PNaSS 水凝胶交联剂浓度为 4 mol%~10 mol%, PNaAMPS 水凝胶交联剂

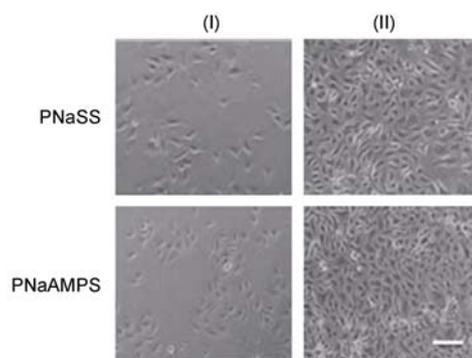


图 10 在 PNaSS 凝胶和 PNaAMPS 凝胶支架表面培养的牛胎儿主动脉血管内皮细胞(BFAECs)在培养初始阶段(I 列, 6 h)及培养一段时间(II 列, 120 h)后的相差显微镜照片(交联密度: PNaSS 10 mol%, PAMPS 6 mol%, 标尺 100 μm)^[59]

浓度为 2 mol%~6 mol%时, 培养 144 h 时, 细胞密度均大于 1.1×10^5 个/ cm^2 , 与在相同时间内胶原蛋白水凝胶支架培养的细胞密度接近. 表明在较宽的交联剂浓度范围内, 阴离子强电解质高分子水凝胶有利于细胞伸展和扩增. 上述结果表明水凝胶的化学结构显著影响细胞亲和性^[56, 57].

3.6 高强度细胞亲和性水凝胶的设计

如上所述, 强电解质水凝胶的细胞亲和性优于中性水凝胶, 在此基础上可以推测虽然 PNaAMPS/PDMAAm 和 PNaAMPS/PAAm DN 凝胶具有良好的力学性能, 但细胞亲和性较差. 这是因为 DN 凝胶中的中性成分 PAAm, PDMAAm 的含量是 PNaAMPS 的 10 倍以上, 且在制备 DN 凝胶的过程中, 将第二层 PAAm, PDMAAm 网络引入第一层 PNaAMPS 网络的过程中不可避免地有大量 AAm, DMAAm 聚合于 DN 凝胶表面. 细胞培养实验也证明了该推测, 虽然有大量细胞粘附于 DN 凝胶表面, 但细胞呈圆形并不伸展和扩增. 如果用手术刀将 DN 凝胶表面一层切掉再进行细胞培养时发现大部分细胞呈伸展状态且有所扩增. 该结果表明只有在 DN 凝胶表面修饰一定量的电荷才有助于提高其细胞亲和性. 于是我们设计了将 PNaAMPS 作为第 3 层网络引入 PNaAMPS/PDMAAm DN 凝胶中合成 PNaAMPS-4 mol%/PDMAAm-0 mol%/PNaAMPS-4 mol% TN 凝胶, 虽然 TN 凝胶的细胞亲和性显著提高, 但其力学性能与 PNaAMPS-4 mol%/PDMAAm-0 mol% DN 凝胶相比却显著降低.

因此从高分子水凝胶材料的角度来看,水凝胶强度与细胞亲和性是一对矛盾,高强度 DN 凝胶含有中性高分子的成分较多,不利于细胞扩增,而适合于细胞扩增的高分子水凝胶带有大量负电荷,不利于保持 DN 凝胶的机械强度. 为了实现兼具细胞亲和性和高强度性能水凝胶的制备,需要在 TN 凝胶表面平衡 PNaAMPS 和 PDMAAm 的量,即尽量引入少量 PNaAMPS(保证细胞扩增即可),而相应地引入大量的 PDMAAm 以保证凝胶的强度. 为此,进一步研究了共聚水凝胶 poly(NaAMPS-co-DMAAm)的 Zeta 电位与细胞亲和性之间的关系. 结果表明当 NaAMPS 和 PDMAAm 的摩尔比为 1:1, Zeta 电位为 -22.2 mV 时, poly(NaAMPS-co-DMAAm) 凝胶可促使细胞伸展并扩增. 于是将 poly(NaAMPS-co-DMAAm) 凝胶作为第三层网络引入 PNaAMPS-4 mol%/DMAAm-0 mol% DN 凝胶制备 PNaAMPS-4 mol%/DMAAm-0 mol%/poly(NaAMPS-co-DMAAm) TN 凝胶,发现当第 3 层网络的交联剂浓度为 2 mol%和 4 mol%时, TN 可促进细胞的扩增至汇合,培养 144 h 后细胞密度可达到 $10 \times 10^5/\text{cm}^2$. 第三层网络的交联剂浓度为 2 mol%和 4 mol%时, TN 凝胶压缩断裂强度分别为 2.31 和 1.36 MPa, 虽然比 DN 凝胶的 17.2 MPa 低很多,但比 poly(NaAMPS-co-DMAAm)单层网络凝胶的 0.26 MPa(2 mol%)和 0.63 MPa(4 mol%)分别高约 10 倍和 5 倍^[63]. 兼具细胞相容性和高强度的水凝胶在生物材料中有很广泛的应用前景,该方面研究还有待深入探索.

3.7 高强度水凝胶的生物相容性

将合成 DN 凝胶 PAMPS/PAAm 和 PAMPS/PDMAAm, 以及含有天然成分的 DN 凝胶 BC/PDMAAm 和 BC/Gelatin 植入兔子椎旁肌和皮下,检测分析 DN 凝胶周围的炎症细胞评价了高强度水凝胶的生物相容性^[64, 65]. 植入兔子皮下一周后,与阴性对照高密度聚乙烯和阳性对照含二乙基二硫代氨基甲酸锌的聚亚胺酯颗粒相比, BC/Gelatin DN 凝胶的炎症反应最低,与阴性对照相差无几,然而 PAMPS/PAAm, PAMPS/PDMAAm 和 BC/PDMAAm DN 凝胶的炎症反应较为强烈. 但是植入兔子皮下四周后, PAMPS/PAAm, PAMPS/PDMAAm 和 BC/PDMAAm DN 凝胶的炎症反应显著降低,而 BC/Gelatin DN 凝胶的炎症有所增加,其周围出现大量的纤维状凝聚体,并含有巨噬细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞等. 植

入兔子皮下 6 周后, PAMPS/PDMAAm DN 凝胶的炎症反应降低到比阴性对照还要低,但是,在植入兔子皮下一周后炎症反应最低的 BC/Gelatin DN 凝胶的炎症反应随实验时间的增长而有所增大. 动物实验表明 PAMPS/PDMAAm DN 凝胶的生物相容性最佳^[36].

3.8 高强度水凝胶诱导关节软骨再生

由于 DN 凝胶的力学强度与软骨组织接近,且具有较低的摩擦系数,有望成为替代软骨组织甚至诱导软骨再生的生物材料,所以进一步研究了 DN 凝胶诱导关节软骨再生行为. 该研究创建了一种新型的体内水凝胶自发诱导关节软骨再生模型:将 PAMPS/PDMAAm DN 凝胶直接植入在兔子髌股关节的股骨沟处人为制造的圆柱状骨软骨缺损(直径 4.3 mm, 深度 1.5 mm)中,且在 DN 凝胶与底部损伤处留有数毫米的空隙(图 11). 1 周后在植入的 PAMPS/PDMAAm DN 凝胶与骨头接触的对称三角区域观察到大量再生的细胞(图 12(e)), 2 周后在对称三角区域出现了含有丰富蛋白多糖(proteoglycan)的软骨状组织(图 12(f)), 3 周后软骨状组织的量增加(图 12(g)), 4 周后在缺损处充满了含有丰富蛋白多糖的软骨组织,并且出现了软骨下骨组织再生(图 12(h)), II 型胶原蛋白在再生的软骨组织和其临近软骨组织的连接处有较高的表达. 但是对照组(在软骨缺损处填充纤维或骨组织)没有观察到软骨再生(图 12(a)~(d)). 此外,采用目前使用较多的人工关节软骨替代材料聚乙烯醇凝胶和 UHMWPE 进行同样实验也没有观察到软骨再生. 该研究结果表明 PAMPS/PDMAAm DN 凝胶具有体内自发诱导骨软骨缺损的关节软骨再生的功能. 关节软骨缺损的功能修复仍然是关节外科领域的重大挑战^[62], 目前普遍认为透明软骨组织不能在体内再生.

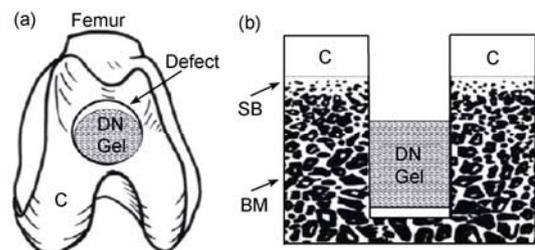


图 11 软骨修复示意图

(a) DN 凝胶移植于髌股关节的股骨沟缺损中; (b) 移植后缺损处横截面示意图; (c) 软骨(注意: DN 凝胶与底部缺损处留有数毫米的空隙)(SB: 软骨下骨, BM: 骨髓)^[66]

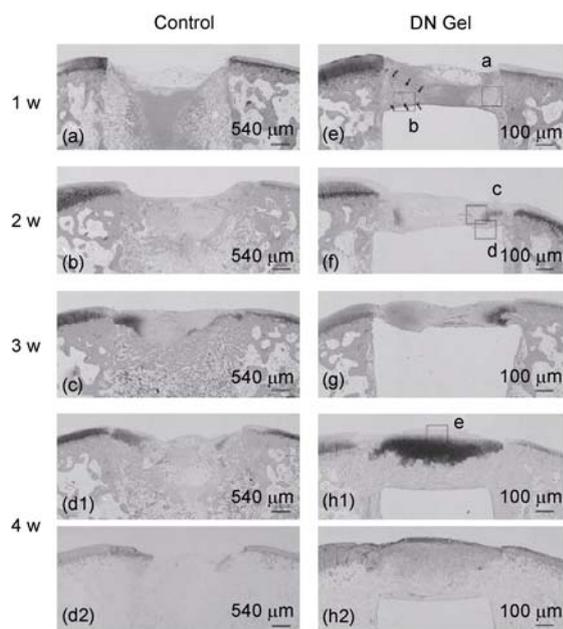


图 12 体内透明软骨组织再生组织学染色照片(低放大倍率 $\times 2$)

(a)~(d1) 用纤维和骨组织填充缺损处作为对照; (d2) 在未经处理的缺损处未发现 II 型胶原表达; (e) 一周后, 经 DN 凝胶处理的缺损处出现凝血块, 并在缺损处的对称性三角区域(箭头处)的靠近骨骼和凝胶间的区域出现细胞富集; (f) 两周后, 与软骨类似的富含蛋白多糖的组织在三角区域出现, 并在三周内保持增长; (g)~(h1) 四周后, 随着软骨下骨组织逐渐被修复, 在缺损处填满富含蛋白多糖的组织; (h2) 四周后, II 型胶原在靠近关节表面区域表达高于在其底部区域表达^[66]

该研究揭示 DN 凝胶有望推动手术修复关节软骨缺损。

4 结语与展望

随着世界石油储存量的减少, 能源危机越来越紧迫。高分子含量少、水含量占大部分的高分子水凝胶不仅是一类公认的环保材料, 而且在生物材料方面具有良好的应用前景。目前, 人工生物材料大都为金属、陶瓷、Teflon 纤维以及超高分子量聚乙烯等坚硬且不含水的材料, 由于大部分生物器官是由软组织构成的, 因此它们在实际应用中存在局限性, 不能作为替代生物软组织的材料。与生物软组织的结构和性能类似的高分子水凝胶材料是非常具有魅力的人工软组织材料, 因此设计和制备符合生物材料要求的力学和生物学性能的新型水凝胶将促进人工生物软组织材料的开发。

高强度 DN 凝胶将双网络概念引入凝胶设计领域, 为设计制备符合生物材料要求的新型高分子水凝胶材料提供了创新思路。自 2003 年第一篇 DN 凝胶论文发表以来, 作为高强度、高性能的代表性“软、湿”高分子材料, DN 凝胶在高强度和多功能设计以及力学性能分析方面已经得到了长足的进展, 为推动高分子水凝胶在生物材料领域的研究发挥了举足轻重的作用, 未来势必会引来人们更多的关注。但是实际上高强度 DN 凝胶功能化的方法和应用研究依然处于起步阶段, 还需在以下几个方面做出改进。(1) 高强度 DN 凝胶体系的种类还有待拓展。目前高强度 DN 凝胶的研究主要集中于少数几种高分子水凝胶体系, 并且天然和降解性高分子水凝胶体系的研究较少。天然和降解性高分子水凝胶在生物材料研究中占有重要地位, 以天然和降解性高分子为基础的 DN 凝胶体系的研究将有助于拓展高强度高分子水凝胶材料的种类和应用范围。(2) 高强度 DN 凝胶体系中高分子的匹配还有待探讨。虽然 PAMPS/PAAm DN 凝胶在一定的制备条件下显示出良好的力学性能, 但该组合只是一个特例。动态光散射研究表明 PAMPS 和 PAAm 强烈相互缠绕^[67], 小角中子散射研究表明这 2 种高分子在水中易于产生相互作用^[68, 69]。但是并非所有的电解质/非电解质高分子组合都会得到高力学性能的 DN 凝胶。所以有必要研究更多的高分子之间的相互作用, 筛选出“DN 凝胶组合库”, 便于多种类高性能 DN 凝胶的制备。(3) 具有电、磁、光性能的 DN 凝胶体系还有待开发。目前高强度 DN 凝胶主要集中于提高力学性能以及满足生物材料性能要求而设计的研究。预计今后新型高强度 DN 凝胶的研究与开发还将扩展到具有导电性、磁性、发光性能等凝胶体系的研究。具有电、磁、光性能的 DN 凝胶的研究对未来高强度水凝胶的功能化研究具有挑战性。(4) 高强度自愈合 DN 凝胶体系还有待研究。自愈合水凝胶有望解决组织工程中难以用人工方法修复植入生物体的软材料的区域性损伤, 以及延长植入水凝胶材料的工作寿命和提高其安全性等问题^[70, 71]。由于目前研制的 DN 凝胶的第一层网络为共价键交联, 所以一旦受损凝胶就不会再恢复其力学性能。如果引入具有自我修复功能的非共价键(疏水作用、氢键、静电吸引、 π - π 堆叠以及结晶作用等)或可逆动态共价键(酰胺键、亚胺键和 Diels-Alder 反应等), 将有助于制备高强度自愈合 DN 凝胶。

参考文献

- 1 Joseph M M. Biomechanics of cartilage. *Biomechanical Principles. Part I Chapter 5.* 66–79
- 2 Kerin A J, Wisnom M R, Adams M A. The compressive strength of articular cartilage. *Proc Instn Mech Engrs, Part H*, 1998, 212: 273–280
- 3 沙川华, 陈孟诗, 吴佳, 等. 人体前臂肌腱生物力学特征实验研究. *体育科学*, 2010, 30(3): 42–45
- 4 Chen Y M, Gong J P, Osada Y. Gel: A potential material as artificial soft tissue. In: Matyjaszewski K, Gnanou Y, Leibler L, eds. *Macromolecular Engineering: Precise Synthesis, Materials Properties, Applications.* Weinham: Wiley -Vch, 2006. 2689–271828
- 5 邵龙泉, 赵铨民, 赵信义. SY-1 和 MDX4-4210 硅橡胶拉伸性能、邵氏硬度的测定. *实用口腔医学杂志*, 2004, 20: 201–203
- 6 熊党生. 离子注入超高分子量聚乙烯的摩擦磨损性能研究. *摩擦学报*, 2004, 24: 244–247
- 7 陈战, 王家序, 秦大同. 超高分子量聚乙烯的性能及在机械中的应用. *机械工程材料*, 2001, 25(8): 01–03
- 8 万轶, 熊党生. 激光纹理化改善不锈钢摩擦性能的研究. *哈尔滨工业大学学报*, 2006, 38: 137–139
- 9 Osada Y, Kajiwara K. *Gels Handbook.* New York: Academic Press, 2001
- 10 Tanaka Y, Nishio I, Sun S T, et al. Polyurethanes as specialty chemicals: Principles and applications. *Science*, 1973, 218: 467–469
- 11 Osada Y, Okuzaki H, Hori H. A polymer gel with electrically driven motility. *Nature*, 1992, 355: 242–244
- 12 Osada Y, Matsuda A. Shape-memory gel with order-disorder transition. *Nature*, 1995, 376: 219–221
- 13 Fei R C, George J T, Park J, et al. Thermoresponsive nanocomposite double network hydrogels. *Soft Matter*, 2012, 8: 481–487
- 14 Naficy S, Razal J M, Whitten P G, et al. A pH-sensitive, strong double-network hydrogel: Poly (ethylene glycol) methyl ether methacrylates- Poly(acrylic acid). *J Polym Sci Pol Phys*, 2011, 10: 1002–1009
- 15 Gilbert P M, Havenstrite K L, Magnusson K E G, et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*, 2010, 329: 1078–1081
- 16 Zhang Y L, Tao L, Li S X, et al. Synthesis of multiresponsive and dynamic chitosan-based hydrogels for controlled release of bioactive molecules. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 2894–2901
- 17 Mao L J, Hu Y J, Piao Y S, et al. Structure and character of artificial muscle model constructed from fibrous hydrogel. *Curr Appl Phys*, 2005, 5: 426–428
- 18 Pogue B W, Patterson M S. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *J Biomed Opt*, 2006, 11: 041, 102–116
- 19 Benoit S W D, Schwartz M P, Durney A R, et al. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat Mat*, 2008, 7: 816–823
- 20 Gerecht S, Burdick J A, Ferreira L S, et al. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104: 11298–11303
- 21 Cushing M C, Anseth K S. Hydrogel cell cultures. *Science*, 2007, 316: 1133–1134
- 22 Simha N K, Carlson C S, Lewis J L. Evaluation of fracture toughness of cartilage by micropenetration. *J Mater Sci Mater*, 2004, 15: 631–639
- 23 McCutchen C W. *Lubrication of Joints, the Joints and Synovial Fluid.* New York: Academic Press, 1978
- 24 Fukuda A, Kato K, Hasegawa M, et al. Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor. *Biomater*, 2005, 26: 4301–4308
- 25 Furukawa H, Horie K, Nozaki R, et al. Swelling-induced modulation of static and dynamic fluctuations in polyacrylamide gels observed by scanning microscopic light scattering. *Phys Rev E*, 2003, 68: 031406.1–031406.14
- 26 Yoshida R, Uchida K, Kaneko Y, et al. Comb-type grafted hydrogels with rapid de-swelling response to temperature changes. *Nature*, 1995, 374: 240–242
- 27 Okumura Y, Ito K. The polyrotaxane gel: A topological gel by figure-of-eight cross-links. *Adv Mater*, 2001, 13: 485–487
- 28 Haraguchi K, Takehisa T. Nanocomposite hydrogels: A unique organic–inorganic network structure with extraordinary mechanical, optical, and swelling/de-swelling properties. *Adv Mater*, 2002, 14: 1120–1124
- 29 Haraguchi K, Takehisa T, Fan S. Effects of clay content on the properties of nanocomposite hydrogels composed of poly(N-isopropylacrylamide) and clay. *Macromolecules*, 2002, 35: 10162–10171
- 30 Gong J P. Why are double network hydrogels so tough. *Soft Matter*, 2010, 6: 2583–2590
- 31 Gong J P, Katsuyama Y, Kurokawa T, et al. Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength. *Adv Mater*, 2003, 15: 1155–1158
- 32 Nakajima T, Furukawa H, Tanaka Y, et al. True chemical structure of double network hydrogels. *Macromolecules*, 2009, 42: 2184–2189

- 33 Na Y H, Kurokawa T, Katsuyama Y, et al. Structural characteristics of double network gels with extremely high mechanical strength. *Macromolecules*, 2004, 37: 5370–5374
- 34 Tanaka Y, Kuwabara R, Na Y H, et al. Determination of fracture energy of high strength double network hydrogels. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 11559–11562
- 35 Tsukeshiba H, Huang M, Na Y H, et al. Effect of polymer entanglement on the toughening of double network hydrogels. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 16304–16309
- 36 Kurokawa T, Furukawa H, Wang W, et al. Formation of a strong hydrogel-porous solid interface via the double-network principle. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6: 1353–1359
- 37 Yasuda K, Gong J P, Katsuyama Y, et al. Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels. *Biomater*, 2005, 26: 4468–4475
- 38 Bachrach N M, Valhmu W B, Stazzone E, et al. Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment. *J Biomech*, 1995, 28: 1561–1569
- 39 晏丹, 周广东, 曹谊林. 关节软骨生化结构及其与力学性能关系研究进展. *上海交通大学学报(医学版)*, 2009, 29: 341–345
- 40 Khalsa P S, Eisenberg S R. Compressive behavior of articular cartilage is not completely explained by proteoglycan osmotic pressure. *J Biomech*, 1997, 30: 589–594
- 41 Wainwright S A. *Axis and Circumference: The Cylindrical Shape of Plants and Animals*. Cambridge: Harvard University Press, 1988
- 42 Saito J J, Furukawa H, Kurokaw T, et al. Robust bonding and one-step facile synthesis of tough hydrogels with desirable shape by virtue of the double network structure. *Ploym Chem*, 2011, 2: 575–580
- 43 Hu J, Hiwatashi K, Kurokawa T, et al. Microgel-reinforced hydrogel films with high mechanical strength and their visible mesoscale fracture structure. *Macromolecules*, 2011, 44: 7775–7781
- 44 Nakajima T, Takedomi N, Kurokawa T, et al. A facile method for synthesizing free-shaped and tough double network hydrogels using physically crosslinked poly (vinyl alcohol) as an internal mold. *Ploym Chem*, 2010, 1: 693–697
- 45 Nakayama A, Kakugo A, Gong J P, et al. High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose. *Adv Fun Mater*, 2004, 14: 1124–1128
- 46 Olsson R T, AziziSamir M A S, Salazar-Alvarez G, et al. Making flexible magnetic aerogels and stiff magnetic nanopaper using cellulose nanofibrils as templates. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 584–588
- 47 Haque M A, Kamita G, Kurokawa T, et al. Unidirectional alignment of lamellar bilayer in hydrogel: One-dimensional swelling, anisotropic modulus, and stress/strain tunable structural color. *Adv Mater*, 2010, 22: 5110–5114
- 48 Haque M A, Kurokawa T, Kamita G, et al. Rapid and reversible tuning of structural color of a hydrogel over the entire visible spectrum by mechanical stimulation. *Chem Mater*, 2011, 23: 5200–5207
- 49 Yang W, Furukawa H, Gong J P. Highly extensible double-network gels with self-assembling anisotropic structure. *Adv Mater*, 2008, 20: 4499–4503
- 50 Dobashi T, Furusawa K, Kita E, et al. DNA liquid crystalline gel as adsorbent of carcinogenic agent. *Langmuir*, 2007, 23: 1303–1306
- 51 Raviv U, Giasson S, Kampf N, et al. Lubrication by charged polymers. *Nature*, 2003, 425: 163–165
- 52 Gong J P, Kurokawa T, Narita T, et al. Synthesis of hydrogels with extremely low surface friction. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 5582–5583
- 53 Ohsedo Y, Takashina R, Gong J P, et al. Surface friction of hydrogels with well-defined polyelectrolyte brushes. *Langmuir*, 2004, 20: 6549–6555
- 54 Kaneko D, Tada T, Kurokawa T, et al. Mechanically strong hydrogels with ultra-low frictional coefficients. *Adv Mater*, 2005, 17: 535–538
- 55 Yasuda K, Gong J P, Katsuyama Y, et al. Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels. *Biomater*, 2005, 26: 4469–4475
- 56 Chen Y M, Tanaka M, Gong J P, et al. Platelet adhesion to human umbilical vein endothelial cells cultured on anionic hydrogel scaffolds. *Biomater*, 2007, 28: 1752–1760
- 57 Yang J J, Chen Y M, Gong J P. Gene expression, glycocalyx assay, and surface properties of human endothelial cells cultured on hydrogel matrix with sulfonic moiety: Effect of elasticity of hydrogel. *J Biomed Mater Res, Part A*, 2010, 95A: 531–542
- 58 Chen Y M, Ogawa R, Kakugo A, et al. Dynamic cell behavior on synthetic hydrogels with different charge densities. *Soft Matter*, 2009, 5: 1804–1811
- 59 Chen Y M, Shiraishi N, Satokawa H, et al. Cultivation of endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels. *Biomater*, 2005, 28: 4588–4596
- 60 Yang J J, Chen Y M, Gong J P. Spontaneous redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes on hydrogel surfaces. *Tissue*

- Eng, 2010, 16: 2529–2540
- 61 Kwon H J, Yasuda K, Ohmiya Y, et al. In vitro differentiation of chondrogenic ATDC5 cells is enhanced by culturing on synthetic hydrogels with various charge densities. *Acta Biomater*, 2010, 6: 494–501
 - 62 Liu J F, Chen Y M, Yang J J, et al. Dynamic behavior and spontaneous differentiation of mouse embryoid bodies on hydrogel substrates of different surface charge and chemical structures. *Tissue Eng, Part A*, 2011, 17: 2343–2357
 - 63 Chen Y M, Gong J P, Tanaka M, et al. Tuning of cell proliferation on tough gels by critical charge effect. *J Biomed Mater Res, Part A*, 2009, 88A: 74–83
 - 64 Tanabe Y, Yasuda K, Azuma C, et al. Biological responses of novel high-toughness double network hydrogels in muscle and the subcutaneous tissues. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19: 1379–1387
 - 65 Azuma C, Yasuda K, Tanabe Y, et al. Biodegradation of high-toughness double network hydrogels as potential materials for artificial cartilage. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 81A: 373–380
 - 66 Yasuda K, Kitamura N, Gong J P, et al. A novel double-network hydrogel induces spontaneous articular cartilage regeneration in vivo in a large osteochondral defect. *Macromol Biosci*, 2009, 9(4): 307–316
 - 67 Huang M, Furukawa H, Tanaka Y, et al. Importance of entanglement between first and second components in high-strength double network gels. *Macromolecules*, 2007, 40: 6658–6664
 - 68 Tominaga T, Tirumala V R, Lin E K, et al. The molecular origin of enhanced toughness in double-network hydrogels: A neutron scattering study. *Polymer*, 2007, 48: 7449–7454
 - 69 Tominaga T, Tirumala V R, Lee S, et al. Thermodynamic interactions in double-network hydrogels. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 3903–3909
 - 70 Wang Q G, Mynar J L, Yoshida M, et al. High-water-content mouldable hydrogels by mixing clay and a dendritic molecular binder. *Nature*, 2010, 463: 339–343
 - 71 Nowak A P, Breedveld V, Pakstis L, et al. Rapidly recovering hydrogel scaffolds from self-assembling diblock copolypeptide amphiphiles. *Nature*, 2002, 417: 424–428