



组织诱导性生物材料 国际发展动态

顾忠伟 等 编著



科学出版社
www.sciencep.com

组织诱导性生物材料 国际发展动态

顾忠伟 等* 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是第一部综述组织诱导性生物医用材料及其相关领域近 10 年来研究进展的学术专著,参与编写本书的九所高等学校相关专家分别从不同角度叙述了应用组织诱导性生物材料再生和重建软骨、皮肤、中枢和周围神经,以及血管/微血管、血管内膜组织的国际动态。

全书共分 12 章,第 1~2 章分别叙述了组织诱导性生物材料、生物活性材料诱导被损坏的组织再生的诱导作用;第 3~4 章介绍了软骨修复及诱导性材料;第 5~6 章介绍了皮肤原位诱导再生材料;第 7~8 章介绍了生物活性材料及其血管诱导再生;第 9~10 章介绍了抗凝血功能化表面构建与组织诱导;第 11~12 章介绍了神经组织修复与再生及生物材料对其的诱导作用。

本书基于国家重点基础研究发展计划(国家“973”计划)“组织诱导性生物医用材料基础研究”项目的进展,立足于组织诱导性生物医用材料研究的国际前沿,为开拓生物医用材料科学与工程发展的新方向,进一步促进我国在这一领域的深入研究提供参考。

图书在版编目(CIP)数据

组织诱导性生物材料国际发展动态/顾忠伟等编著. —北京:科学出版社, 2010

ISBN 978-7-03-028157-9

I. ①组… II. ①顾… III. ①人体组织学:生物材料学-研究 IV. ①R329
②R318.08

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 122248 号

责任编辑:霍志国/责任校对:宋玲玲

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏立印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 9 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010 年 9 月第一次印刷 印张:18

印数:1—2 000 字数:424 000

定价:56.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生物医用材料 (Biomedical materials), 又称生物材料 (Biomaterials), 是用于诊断、治疗、修复或替换人体组织或器官或增进其功能的一类高技术新材料。生物医用材料涉及亿万人的健康, 其作用药物所不能替代, 但与药品一样是保障人类健康的必需品, 是构成当代医学的两大支柱——生物技术和生物医学工程——的重要基础, 占有生物医学工程产品 (医疗器械) 市场的 40% 以上, 是当代科学技术中涉及学科最为广泛的多学科交叉领域。

生物医用材料的研发与应用虽已取得极大的成功, 但长期临床应用亦暴露出不少问题, 根本原因是基本上以“异物”存在于体内。现代医学正在向再生和重建被损坏的人体组织和器官、恢复和增进人体生理功能, 个性化和微创治疗等方向发展, 常规生物医用材料已不能满足医学发展的要求, 其时代正在过去。赋予材料生物结构和生物功能, 以充分调动人体自我康复能力, 诱导被损坏的组织/器官再生、或恢复和增进其生物功能, 实现病变或缺损组织的永久康复, 已是当代生物医学材料科学与工程发展重点和前沿, 传统生物材料改进和技术更新的方向。

但是, 一般观点认为无生命的生物医用材料不可能具有诱导组织再生的生物功能, 只有活性生物物质才可能诱导组织形成。基于国家“973”计划的支持, 我国学者发现并确证了一定组成和结构的生物材料可诱导骨的形成, 提出了机理假说; 研发出国际新一代人工骨——骨诱导人工骨, 获国家食品药品监督管理局颁发的生产注册证, 并应用于临床, 获 2007 年度的国家自然科学奖二等奖。进一步研究又发现生物材料可诱导软骨及其他非骨组织的形成, 在此基础上, 与国际生物材料科学家共同提出了组织诱导性生物医用材料 (Tissue Inducing Biomaterials), 即可直接诱导有生命的组织再生的生物材料。随着研究的深入, 组织诱导性生物材料的研究已成为国际生物材料科学研究的一个热点, 进一步研究可望开拓生物医用材料科学与工程发展的新方向。

为了进一步推动我国组织诱导性生物材料的研究, 深入揭示材料组织诱导作用的分子机制, 建立组织诱导性生物医用材料的设计原理和制造方法学, 形成较为完整生物医用材料组织诱导作用理论体系, 我们查阅了近十年来在此领域的国际研究进展, 编写了本书, 供热情关注生物医用材料研发和应用的科技工作者、临床医生、研究生及相关人员参考。希望通过本书能为促进我国生物医用材料科学与工程快速发展做出贡献。

感谢国家科技部“973”计划“组织诱导性生物医用材料的基础研究”项目 (2005CB623900) 的支持! 感谢本项目专家组的智慧与指导! 感谢所有为编写本书做出贡献的科研人员和研究生! 感谢科学出版社霍志国编辑的辛勤劳动! 并敬请广大专家和

读者批评指正。

张兴栋 院士

国家生物医学材料工程技术研究中心（四川大学）

二〇一〇年六月于成都

目 录

前言

第 1 章 生物诱导性材料	1
1.1 引言	1
1.2 组织诱导再生体系的类型	2
1.2.1 只有体细胞参与的类型	2
1.2.2 体细胞与成体干细胞同时参与的类型	2
1.2.3 只有胚胎干细胞参与的类型	3
1.3 干细胞分化过程的基础研究	3
1.3.1 分化过程的跟踪	4
1.3.2 干细胞增殖与分化的调控	4
1.4 生物诱导性材料体系	5
1.5 结束语	8
参考文献	8
第 2 章 生物活性材料的诱导作用	12
2.1 引言	12
2.2 生物活性材料诱导的概念	12
2.3 生物活性材料的诱导过程	13
2.4 生物活性材料诱导作用的应用研究	15
2.5 结束语	17
参考文献	17
第 3 章 软骨修复及诱导性材料的现状和进展	19
3.1 软骨的组成结构及细胞外基质	19
3.2 软骨损伤及修复现状	20
3.3 软骨组织工程研究进展	21
3.3.1 种子细胞	21
3.3.2 支架材料	23
3.3.3 生长因子	26
3.3.4 软骨组织工程研究中存在的问题	27
3.4 组织诱导材料的提出以及软骨诱导材料的研究	27
3.4.1 材料诱导软骨的可行性	28
3.4.2 材料诱导软骨的应用及存在的问题	30
参考文献	31

第4章 关节软骨组织诱导材料的国际发展动态	38
4.1 关节软骨概述	38
4.1.1 软骨结构	39
4.1.2 关节软骨细胞	39
4.1.3 软骨基质成分与功能	40
4.2 临床关节软骨的治疗方法	41
4.3 复合软骨/骨组织修复材料的研究进展	42
4.4 一体化的关节软骨/骨复合修复体	47
4.4.1 一体化修复体的结构	47
4.4.2 一体化修复体的动物实验	48
4.5 未来关节软骨/骨诱导修复材料的发展方向	51
参考文献	52
第5章 皮肤原位诱导再生材料：进展与问题	59
5.1 皮肤修复材料的研究背景与发展历程	59
5.2 原位诱导皮肤再生材料的研究进展	61
5.2.1 国外原位诱导皮肤再生材料进展	61
5.2.2 国内原位诱导皮肤再生材料研究进展	62
5.3 皮肤原位诱导再生的关键科学问题与材料设计	67
5.3.1 原位诱导血管化	67
5.3.2 原位诱导细胞迁移	75
5.4 皮肤再生材料存在的问题与展望	80
参考文献	81
第6章 皮肤组织诱导性生物医用材料研究进展	88
6.1 皮肤组织诱导性生物医用材料的研究与开发	88
6.1.1 生物材料在修复皮肤缺损过程中可能发挥的作用	88
6.1.2 诱导真皮组织修复的材料	90
参考文献	93
6.2 皮肤修复过程中材料血管化诱导研究	95
6.2.1 血管新生研究的进展	95
6.2.2 皮肤修复中的血管新生	97
6.2.3 生物材料中的血管新生	98
参考文献	99
6.3 干细胞与组织诱导性皮肤修复材料研究	101
6.3.1 人工皮肤与干细胞	101
6.3.2 干细胞与皮肤损伤修复	102
6.3.3 存在的问题及前景展望	103
参考文献	104
6.4 皮肤组织诱导性为目标的材料生物学改性	105

参考文献	106
6.5 丝素蛋白医用生物材料引发免疫应答的研究	106
参考文献	109
第7章 血管生长相关“组织诱导”材料	110
7.1 研究背景及意义	110
7.2 国际研究现状及趋势	110
7.2.1 起治疗作用的药物、基因	110
7.2.2 起基因传递作用的基因载体（高分子载体）	113
7.2.3 起组织工程支架及控制释放作用的高分子支架材料	116
7.3 结语	123
参考文献	123
第8章 生物活性材料的诱导血管再生研究进展	136
8.1 血管再生的重要性及其途径	136
8.2 血管再生相关的细胞及生长因子	137
8.2.1 血管内皮祖细胞（Endothelial Progenitor cell, EPC）	137
8.2.2 血管再生相关的细胞因子	137
8.3 诱导血管再生的策略	139
8.3.1 细胞治疗	139
8.3.2 细胞因子治疗	146
8.3.3 基因治疗	147
8.4 血管再生治疗中的生物活性材料	156
8.4.1 血管再生基因治疗的载体	156
8.4.2 生物活性材料及其支架	161
8.5 血管网络的诱导再生	166
8.6 血管再生治疗的有效性和安全性	171
8.7 展望	171
参考文献	172
第9章 抗凝血功能化表面的构建	184
9.1 引言	184
9.2 支架材料的设计与加工	185
9.2.1 材料的选择	185
9.2.2 血管支架材料的结构与加工	186
9.3 材料表面抗凝血修饰	189
9.4 组织再生微环境的构建	190
9.4.1 生长因子的复合	190
9.4.2 可释放 NO 的新血管材料	191
9.4.3 转基因技术（Gene Transfection）	194
9.5 内皮祖细胞捕捉和快速内皮化	195

9.5.1 材料表面固定内皮细胞特征抗体	196
9.5.2 材料表面固定 RGD 等多肽	197
9.5.3 材料表面固定核酸适配体 (Aptamer)	198
9.5.4 其他修饰方法	199
9.5.5 EPC 动员	199
9.6 结束语	199
参考文献	200
第 10 章 血管支架表面功能化改性及表面诱导的国际发展动态	205
10.1 引言	205
10.2 表面抗凝血改性	206
10.2.1 构建抗凝惰性表面	207
10.2.2 构建抗凝活性表面	208
10.2.3 构建仿生化抗凝表面	209
10.3 表面抗增生改性	210
10.3.1 无聚合物药物涂层支架	211
10.3.2 聚合物药物涂层支架	212
10.4 表面内皮化改性与组织诱导	215
10.4.1 体外内皮化的发展和局限	216
10.4.2 体内内皮化的机制	217
10.4.3 体内内皮化的研究进展	218
10.5 问题和展望	233
参考文献	234
第 11 章 诱导中枢神经再生的材料研究进展*	243
11.1 引言	243
11.2 中枢神经再生材料	244
11.2.1 脑再生材料	244
11.2.2 脊髓再生材料	245
11.3 生物材料复合神经干细胞的研究	246
11.4 展望	247
参考文献	248
第 12 章 用于周围神经组织修复的生物材料研究进展	252
12.1 引言	252
12.2 组织再生	252
12.3 组织诱导生物材料与组织传导生物材料的区别	254
12.4 周围神经修复材料国外研究进展	254
12.4.1 生物衍生材料	255
12.4.2 非降解材料	257
12.4.3 可降解材料	258

12.5 国内研究进展	262
12.5.1 生物衍生材料	262
12.5.2 可降解材料	262
12.5.3 武汉理工大学神经修复材料的研究进展	264
12.6 展望	268
参考文献	269

第 1 章 生物诱导性材料

王幽香 沈家骢

(浙江大学生物医用大分子研究所；教育部高分子合成与功能构造
重点实验室)

1.1 引言

组织或器官的缺损与病变是影响人类生存质量的重大问题之一，而机体损伤和疾病康复过程中受损组织和器官的修复与重建是生物学和临床医学面临的重大难题，这个重大难题的解决离不开生物材料的参与。生物材料是一类与生物系统相互作用，用以评价、诊断、治疗、修复和替代人体病变或损伤的组织和器官以及增进其功能的材料^[1]。随着人口老龄化、中青年创伤的增多以及疑难疾病患者的增加和高新技术的发展，这一类材料的发展非常迅速。

生物医用材料的特征之一是生物相容性，包括组织相容性和血液相容性，即不引起生物体组织、血液等的不良反应；其二是生物功能性，即能够对损伤组织或器官进行修复、替代及再生。由于这两个特征的不断发展，生物材料的发展历程必然会从生物惰性材料发展到生物活性材料^[2]。所谓生物惰性材料是指一类在生物环境中能保持稳定、不发生或仅发生微弱化学反应的生物医学材料。通过改善材料本身的力学、生化性能，以使其能够在生理环境下有长期的替代、模拟生物组织的功能。由于人体内环境的多元性和复杂性，单一的惰性材料无法提供解决生物医用材料相容性及相关功能性问题的有效手段。生物活性材料是指一类通过化学、物理或生物的手段有效调控生物活性分子和细胞行为的医用材料。生物活性材料的产生和发展不仅能改善材料的生物相容性，还能增进细胞活性或新组织生长功能，为设计与制备具有活性功能的材料提供了崭新的途径。

20 世纪 90 年代以来，随着细胞生物学、分子生物学、免疫学、遗传学等基础学科的迅猛发展以及干细胞和组织工程技术在现代医学基础研究与临床中的应用，诞生了再生医学^[3]。它是通过对机体修复与再生机理的研究，利用生命科学、材料学、医学及工程学的原理与方法，重建组织或器官结构和功能，实现机体的自修复与再生。广义的再生医学包括基因治疗、器官移植、组织工程等。而组织工程与组织原位诱导再生技术是再生医学领域的重要内涵，为再生医学开辟了新的技术途径。再生医学的本质是激活和调动机体自身修复与再生能力。再生医学的诞生对生物材料的制备提出了更高的要求，不仅要求材料自身具有优异的理化性能和可靠的生物安全性，而且要求材料能够诱导人体组织的自身修复、再生能力，从而达到使病变组织、器官最终完全或主要是由再生的自身天然健康组织或器官所取代^[4]。这种材料有别于生物惰性材料、生物活性材料，或可称之为生物诱导性材料。生物诱导性材料已成为生物医用材料未来发展最具有活力的

方向之一。

三维支架是用于修复与再生生物材料的主要形式之一，是种子细胞在形成组织之前赖以依附、增殖和生存的空间，为细胞的增殖、分化、营养交换、新陈代谢以及细胞外基质分泌等生理活动提供了空间场所。通过生物材料自身的物理化学特性及信息分子的负载实现细胞粘附、增殖、迁移、分化的诱导作用，形成组织诱导再生体系，可实现受损组织或器官的修复和再生。诱导作用是细胞生物学、再生医学、组织工程与材料学四大学科交叉融合、相互碰撞的最活跃的研究领域，必然能提供很大发展与创新空间。

1.2 组织诱导再生体系的类型

细胞是组织诱导再生的基本单元。干细胞具有无限分裂增殖的能力，同时具备分化成各种组织与器官的潜能，因此干细胞成为组织诱导再生最理想的研究对象^[3, 5]。采用干细胞移植可用于再生组织和器官，主要包括：利用干细胞增殖与分化的特性，将干细胞直引到组织与器官损伤处或再生的目标处，实现组织与器官的再生与修复；干细胞作为种子细胞，通过与支架材料的复合原位诱导组织与器官的修复。

高速发展的干细胞生物学不仅能提供足量的干细胞以供研究之用，并可跟踪分化过程，进而研究分化机理。大量实验已证明干细胞用于组织修复、置换与再生的可能性与优越性^[3]。这些成果表明：组织诱导再生研究已进入以干细胞为中心的时代，我们可以根据干细胞介入组织修复与再生的程度，把组织诱导再生体系分为只有体细胞参与、体细胞与成体干细胞同时参与、只有胚胎干细胞参与等三种类型。

1.2.1 只有体细胞参与的类型

应用生命科学与工程的原理，通过材料体系与体细胞的体外复合，从细胞水平和分子水平构建生物活性体，以重建受损组织或器官结构、恢复其功能^[6, 7]。例如将软骨细胞与多孔支架复合物植入裸鼠背部，可形成具有典型软骨细胞形态的类软骨组织^[8, 9]。通过胶原与羟基磷灰石复合，采用冷冻干燥的方法成功制备了上层为胶原、下层逐层过渡到以羟基磷灰石为主的复合一体化支架，为软骨组织工程支架的制备提供了新方法^[10, 11]。

1.2.2 体细胞与成体干细胞同时参与的类型

成体干细胞是存在于已分化组织中的未分化细胞，具有自我更新和分化形成特定组织的功能。按来源可分为表皮干细胞、造血干细胞、脂肪干细胞、神经干细胞、内皮干细胞、间充质干细胞等。随着成体干细胞研究的深入，研究者观察到部分成体干细胞可以突破其“发育限制性”，跨系甚至跨胚层分化为其他类型组织细胞^[12]。在正常情况下成体干细胞处于休眠状态，在病理状态或外因诱导下可表现不同程度的更新和再生性能，其中微环境是成体干细胞诱导再生的关键。组织诱导再生体系可通过对材料结构、组成及信息分子的调控，构建合适的微环境，赋予材料原位诱导体细胞或成体干细胞粘附、增殖、迁移或分化的性能，从而实现原位诱导受损组织或器官再生的目的^[13]。

张兴栋教授等对磷酸钙陶瓷骨诱导现象进行了系统、深入的研究,确证了磷酸钙陶瓷骨诱导现象的发生,探讨了磷酸钙陶瓷的骨诱导机理,得到了国际同行的认可。研究认为:磷酸钙陶瓷内吸附骨形成蛋白(BMPs)等内源性骨生长因子,诱使间充质细胞向材料表面迁移,并调控其向骨祖细胞分化,同时分泌骨细胞间特异性的粘连分子,使骨祖细胞对具有类自然骨组成和结构的磷酸钙陶瓷错误识别为骨,引起骨祖细胞分化、增殖、成熟为骨^[14]。通过材料在体内形成特殊的“生物修饰表面”及局部微环境,实现细胞外基质、细胞因子等活性物质的分配和重组,从而介导材料与细胞的作用。张兴栋教授的骨诱导现象与机理得到国际的认同,在2008年世界生物材料大会上特别设立了骨诱导材料的专题讨论会。

由于利用人体自身的体细胞或成体干细胞不会引起免疫排斥反应,不存在争议的伦理问题和可能的安全问题,因而受到越来越广泛的关注。但对于一些退行性疾病,很难获得足够的不受影响的干细胞,同时随着年龄的增长导致成体干细胞的功能衰退,影响干细胞的使用。成体干细胞在体内存量小,解决来源问题是面临的挑战之一。

1.2.3 只有胚胎干细胞参与的类型

胚胎干细胞是来自于囊泡阶段的内细胞团的多能性细胞系,能自我更新并具有发育全能性,即分化为属于外胚层、中胚层和内胚层范畴的各种细胞^[15]。通过重构胚胎发育的微环境,重新启动胚胎干细胞的发育程序,诱导胚胎干细胞向目标组织或器官分化、发育,可构建具有复杂结构和功能的组织或器官^[13]。Lin等将胚胎干细胞分化形成的表皮干细胞植于复合了成纤维细胞的胶原——明胶真皮再生材料中,并植入小鼠体内。结果发现:胚胎干细胞分化形成的表皮干细胞在体内能保持活性,分化形成了毛囊状及腺体状结构,同时没有发现严重的排异反应^[16]。胚胎干细胞的研究已成为再生医学领域的热点之一,2004年5月世界上首个国家胚胎干细胞库在英国伦敦建立,它可为糖尿病、癌症、帕金森病和阿尔茨海默病等疾病的研究和治疗储存提供干细胞。但胚胎干细胞的使用不仅存在伦理和安全问题,而且如何方便地获取大量的胚胎干细胞也是胚胎干细胞研究所面临的瓶颈问题。

1.3 干细胞分化过程的基础研究

分化过程是把握诱导作用的核心。从细胞与分子水平来把握分化过程,必须从基础工作做起,如干细胞的分离纯化、干细胞的特征及表征、跟踪分化过程等^[17]。

干细胞的种类很多,按来源可分为:(1)胚胎干细胞,是指从胚胎囊胚期内细胞群中获取的、具有全分化潜能的干细胞,可无限增殖并分化为多种细胞类型。(2)成体干细胞,是指存在于已分化组织中的未分化细胞,具有自我更新和分化形成特定组织的功能。部分成体干细胞(如造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞)可以突破其“发育限制性”,跨系甚至跨胚层分化为其他类型组织细胞。(3)诱导多能干细胞(iPS),是指利用逆转录病毒转基因编码的几个转录因子(Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4)使已经分化的细胞选择性地分化去干化为干细胞或干细胞样细胞,从而具备向多个胚层

组织分化的能力^[18]。作为组织诱导再生应用的干细胞必须符合以下标准：易获取；来源丰富，数量可满足治疗需求；易分离与纯化；免疫原性低；分化可控，无癌变风险；无伦理问题等。

1.3.1 分化过程的跟踪

可根据干细胞的形态、来源、表面特异性标记、干细胞功能、干细胞中特异性基因和转录因子对干细胞进行鉴别。通过对干细胞在体内的跟踪，可了解移植后干细胞的分布、迁徙及分化等生物学行为，评估干细胞移植的效果，进而提供更多的干细胞移植疗法的最优化信息。常用的手段主要包括抗原标记；荧光染料、荧光蛋白标记；核素标记；Y染色体标记；磁性纳米粒子标记；量子点标记等^[19~21]。Shah等采用量子点标记间充质干细胞，跟踪其向成骨细胞的分化过程。研究发现量子点标记不影响干细胞的分化过程，且经过分化得到的成骨细胞依然被量子点标记着^[20]。

1.3.2 干细胞增殖与分化的调控

干细胞的增殖与分化调控是一个极其复杂的过程，是由多个因素组成的一个庞大的维持干细胞自我更新能力的调控网络。

成体干细胞在机体组织中的居所可称为干细胞巢（stem cell niche），在干细胞巢集中所有控制干细胞增殖与分化的外部信号构成了干细胞生存与分化的微环境。微环境是调控干细胞分化行为，诱导组织再生的关键。微环境对干细胞的影响主要体现在3个方面，如图1-1所示：（1）释放可溶性信息分子。信息传导调节因子可分为两大类：分化抑制因子和生长因子。如白血病抑制因子能抑制胚胎干细胞分化，促进增殖。生长因子包括成纤维细胞生长因子、表皮生长因子等。另一方面，化学小分子也可有效调控干细胞的增殖与分化。（2）细胞外基质的调控。与人体组织中的多数细胞相同，干细胞与细胞外基质相接触。整合素是介导干细胞与细胞外基质粘附的最主要的分子，调控干细胞的功能，如粘附、形态和运动。整合素与其配体的相互作用为干细胞的非分化增殖提供了适当的微环境。如干细胞巢中的 $\beta 1$ -整合素可使上皮干细胞和神经干细胞保持自我更新状态。当 $\beta 1$ -整合素丧失功能时，上皮干细胞逃脱了微环境的制约，分化成角质细胞。细胞外基质通过调节 $\beta 1$ -整合素的表达和激活，从而影响干细胞的分布和分化方向。组织诱导再生体系中，良好的支架材料起到细胞外基质的作用，是对细胞外基质的结构和功能的仿生。因此生物材料的物理化学性质对干细胞的自我更新与分化同样产生很大的影响。（3）细胞间相互作用的影响。在干细胞巢中，干细胞通过跨膜蛋白与支撑细胞发生粘附作用，同时对干细胞的调控起着很大的作用。跨膜蛋白不仅能在胚胎阶段调控细胞功能^[22]，在成体组织中也能调控干细胞的自我更新和分化^[23, 24]。Song等将经过绿色荧光蛋白标记的神经干细胞与海马区胶质细胞共培养6天后，产生了大量的神经元，染色结果显示神经元和神经干细胞的标记物比对照组高出8倍。与脊髓来源的胶质细胞共培养，并不能促进神经干细胞的再生。由此可见，成体神经细胞的再生功能得益于海马胶质细胞所提供的适于神经干细胞定向分化的微环境^[25]。

通过调控干细胞所处的微环境诱导干细胞的定向分化，可用于组织修复和再生。但

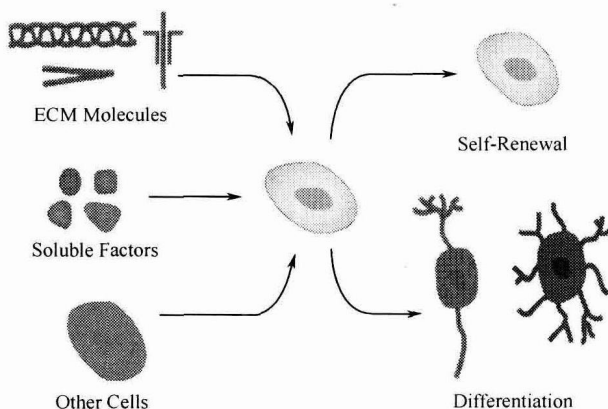


图 1-1 影响干细胞微环境的主要因素

由于胚胎干细胞的使用存在免疫原性，自体干细胞的来源受到很大限制，而使用异体干细胞必须克服排斥反应。采用去分化途径制备具有分化潜能的诱导多能干细胞是有效解决干细胞来源问题的有效手段^[26]。但由于利用去分化途径制备诱导多能干细胞过程中使用了癌基因和多条转录病毒载体的插入，且成功率低，安全性问题值得关注。已有研究表明：利用改变体细胞所处的微环境即“Niche”，可直接将体细胞诱导转变成为组织特异性干细胞或诱导多能干细胞。付小兵等在愈合的人体皮肤溃疡创面发现，表皮细胞经过表皮细胞生长因子（EGF）作用后可以转变为表皮干细胞或表皮干细胞样细胞^[27]。进一步研究通过细胞培养技术，在体外培养条件下可以方便地将已经分化的表皮细胞诱导成为表皮干细胞或表皮干细胞样细胞。经过形态学、免疫组织化学和流式细胞术等方法检测，这些去分化来源的表皮干细胞不仅具有类似于正常表皮干细胞的形态，而且可以重新表达表皮干细胞的重要标志，如角蛋白 19（K19）和 $\beta 1$ -整合素^[28]。

化学小分子的信号介导同样可用于体细胞的去分化调控。通过加入名为 reversine 的化学小分子可使人成肌纤维细胞转变为诱导多能干细胞，这种诱导多能干细胞进一步通过不同活性因子的调控，可分化形成脂肪细胞和成骨细胞^[29, 30]。因此通过非转基因的方法，利用改变体细胞所处的微环境即“Niche”，也是一种获得组织干细胞或诱导多能干细胞的重要途径。去分化过程将成为新的研究焦点之一，对干细胞生物学是一个重大的机遇，同时也面临着严峻的挑战。

1.4 生物诱导性材料体系

要实现组织与器官的修复与再生，必然涉及种子细胞、信息以及生物材料这三大要素。细胞是再生的基本单元，由于干细胞具有分化成各种组织与器官的潜能，成为组织诱导再生最理想的研究对象；信息是调控的核心，对干细胞的增殖与定向分化产生很大影响；生物材料是种子细胞与信息的载体。如何实现三者的有效结合、制备具有生物诱导性的材料体系实现人体组织的自身修复和再生，是再生医学面临的重大挑战之一。

材料与信息一定程度的结合，可调控细胞的粘附、增殖、迁移与分化，成为生物诱

导性材料。已有研究表明：通过对成体干细胞所处微环境即“Niche”的结构和功能模拟，将生物材料与细胞微环境有效结合，构建仿细胞外基质的生物诱导性材料对干细胞的增殖与分化起着重要的调控作用^[31]。支架材料是用于修复与再生的生物材料的主要形式之一，是种子细胞在形成组织之前赖以生存和依附的空间，包括三维多孔支架^[32,33]、薄膜支架^[34]、微粒支架^[35]、凝胶支架^[36~38]与微胶囊^[39]等。作为诱导组织再生的生物诱导性材料起到细胞外基质的作用，是对细胞外基质的结构和功能的仿生。生物诱导性材料对干细胞的分化调控受很多性质的影响，如材料的组成、物理性质、拓扑结构、图案化表面、化学改性表面、信息分子的负载与有效传递等不同层次。

材料的组成影响着干细胞的分化调控。间充质干细胞在诱导骨组织再生中具有潜在的应用前景，而羟基磷灰石与人体骨成分相似，有利于间充质干细胞的生长及向成骨细胞的分化^[40,41]。Zhao 等分别制备了壳聚糖-明胶多孔支架及羟基磷灰石复合壳聚糖-明胶多孔支架，研究了羟基磷灰石组分对间充质干细胞粘附、增殖及分化的影响。对比结果显示：羟基磷灰石组分有利于间充质干细胞在材料表面的粘附，增殖速度显著提高。碱性磷酸酶活性测定结果表明，羟基磷灰石组分的存在使间充质干细胞向成骨细胞分化的比例增大^[41]。

材料的物理性质是调控干细胞自我更新和分化的重要参数。凝胶支架由于具有很高的吸水率，与一些天然组织的生物学特性具有相似性，常用于体外成体干细胞的分化调控研究^[36]。而生物体内不同组织软、硬性能相差巨大，干细胞在不同硬度的材料表面显示出不同的分化调控特性。Engler 等制备了聚丙烯酰胺的交联凝胶，通过表面胶原的修饰，调节微环境的弹性模量，分别制备了模拟脑、肌肉、骨组织模量的表面。研究表明：干细胞培养初期，可通过添加生长因子调节干细胞的分化；几周后，干细胞的分化更依赖基体弹性模量的调控。在模拟骨组织的高模量表面，干细胞有利于诱导分化成成骨细胞，在模量低的表面则有利于分化成神经细胞^[42]。

材料的拓扑结构控制再生组织的结构、尺寸和形貌，作为连接细胞和组织的框架，引导组织生长成特定形态，如纤维、平面结构、三维多孔结构等。Xie 等研究了胚胎干细胞在取向和无规聚己内酯（PCL）纳米纤维表面的分化行为，通过神经元和星形胶质细胞特异性抗体染色，发现取向 PCL 纳米纤维支持胚胎干细胞向神经细胞分化，且可诱导神经轴突的形成^[43]。三维多孔支架常用于组织与器官的修复，孔的尺寸应能允许细胞的生存，且孔间应相互贯通，以利于营养物质和细胞代谢产物的传送。孔径大小同样影响着干细胞的分化。通过制备孔径大小不同的聚 L-乳酸（PLLA）多孔支架，研究发现随着孔径的增大，导致胚胎干细胞向造血细胞前体分化的比例减少；随着胚胎干细胞种植密度的增大，分化的造血细胞前体的比例明显增大^[32]。

生物诱导性材料通过表面或界面与细胞直接接触，表面特性是调控干细胞增殖与分化的重要因素。图案化表面是调控胚胎体尺寸与形状的有效手段，胚胎体的尺寸与形状影响着细胞与细胞、细胞与细胞外基质、细胞与可溶性因子的相互作用，进而影响干细胞的分化^[44~46]。通常采用的干细胞培养方法形成的胚胎体尺寸分布不均匀，降低了胚胎体定向分化的效率。图案化表面的构建可调节阵列的尺寸，通过在微井外接枝不同分子量的聚乙二醇（PEG），可以将胚胎干细胞的生长限于微井内，从而制备尺寸均一的

胚胎体^[47]。Palecek 等人制备了三维的图案化材料, 长期培养胚胎干细胞, 形成了均匀的胚胎体。在培养 2~3 周后, 90% 胚胎干细胞保持未分化状态, 并依然具有分化潜能。通过调节图案化的大小与深度, 可获得不同尺寸的均匀胚胎体^[48]。

生物诱导性材料还可通过材料表面的化学改性有效调控干细胞行为^[49]。Harrison 等研究了聚(α -羟基酯)支架的亲水性对干细胞增殖的影响, 结果表明: 经 KOH 处理后, 支架表面的亲水性和粗糙度明显提高, 干细胞的增殖速度明显增大并保持分化潜能^[50]。细胞外基质组成是影响成体干细胞微环境的重要因素。通过支架材料界面负载细胞外基质组成是调控干细胞分化的重要手段。Hwang 等通过免疫荧光染色检测细胞分泌特异性蛋白的性能, 考察了不同细胞外基质组成如胶原、透明质酸、RGD 修饰的聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)水凝胶对间充质干细胞分化的影响, 研究结果显示: 经 RGD 修饰的水凝胶中, 间充质干细胞分化形成的细胞可表达多糖、II 型胶原等软骨细胞特异性细胞外基质^[51]。Shin 等则研究了间充质干细胞在明胶修饰的聚丙交酯-聚己交酯共聚物膜表面的粘附、增殖和分化情况。结果表明经明胶修饰后, 间充质干细胞在膜表面高度铺展, 增殖速度明显增大; 碱性磷酸酶活性测定结果表明, 经明胶修饰后间充质干细胞向成骨细胞分化的比例增大^[52]。

信息分子是干细胞增殖与分化调控的最重要的手段之一。将可控释放的可溶性信息分子与生物材料有效结合, 信息分子可调控细胞的粘附、增殖、迁移与分化, 诱导组织的再生。通过将白血病抑制因子(LIF)固定到马来酸酐共聚物薄膜表面, 在至少 2 周的时间内老鼠的胚胎干细胞保持未分化状态并具有多能性^[34]。该方法可用来研究材料表面固定的各种信息分子对干细胞调控的影响。生长因子种类很多, 其中成纤维细胞生长因子、表皮生长因子在干细胞研究中应用广泛。例如表皮生长因子(EGF)对神经干细胞而言是一种有效的促细胞分裂剂。Iwata 等通过二价镍螯合方法将表皮生长因子定向固定到基材表面, 通过对表面 EGF 含量的优化, 体外培养 5 天后细胞的数量增加了 32 倍, 且 98% 的增殖细胞依然产生神经干细胞的标记物。这类扩增后的神经干细胞可在体外继续培养并保持分化潜能^[53]。在进一步的研究中, 他们合成了新型的多功能嵌合蛋白, 整合了促识别的基体结合位点(His10)、表皮生长因子(EGF)、睫状神经营养因子(CNTF)、凝血酶断裂位点(TCS)以及屏蔽 CNTF 作用的绿色荧光蛋白。研究发现凝血酶的添加与否对神经干细胞在该表面的分化行为有显著的影响。在未添加凝血酶的条件下培养, 由于睫状神经营养因子的作用被屏蔽, 表皮生长因子起主要作用, 表现为神经干细胞的增殖; 当添加凝血酶后, 睫状神经营养因子发挥作用, 68% 的干细胞分化成星形细胞^[54]。化学小分子对干细胞的分化调控受到越来越多的关注, 如 TWS119 可以诱导胚胎干细胞或者表皮干细胞分化为神经细胞^[55], Purmorphamine 可以诱导间充质干细胞分化为成骨细胞^[56]。进一步研究信息分子诱导的干细胞分化调控机制、实现信息分子的有效负载和控制释放依然是生物诱导性材料体系研究的关键问题。

因此通过对成体干细胞所处微环境的结构和功能模拟, 构建仿细胞外基质和信息分子有效负载的生物诱导性材料, 有效调控干细胞的定向分化, 从而激发和诱导人体组织的自身修复、再生能力, 实现病损组织的形态和结构再生、功能重建, 已成为生物医学