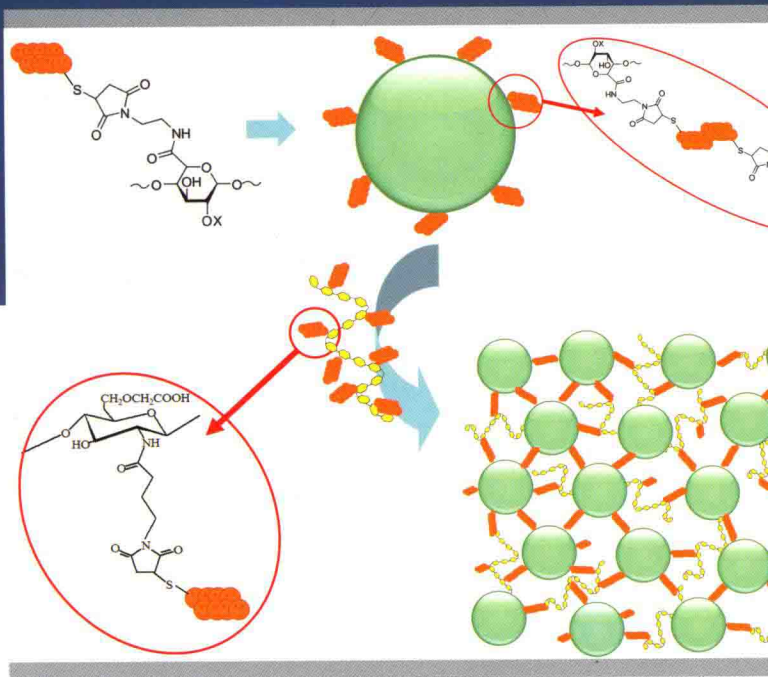


医用多聚糖材料

谈华平 著



科学出版社

医用多聚糖材料

谈华平 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书以组织工程和再生医学为应用背景,分别介绍了壳聚糖、海藻酸钠、透明质酸、硫酸软骨素、肝素和葡聚糖等医用多聚糖材料的结构和功能。简单介绍了医用多聚糖材料已经取得的一些科研成果,重点阐述药物载体材料和组织工程支架材料的设计、制备、改性和应用,其中的许多原则和技术也适用于其他再生医学材料的设计和制备。

本书可作为高等院校生物材料、高分子材料、材料学、生物医学工程、药物合成等专业的工程技术人员、研究生、本科生学习的参考书,同时对临床相关专业的医疗科研人员也有一定的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

医用多聚糖材料 / 谈华平著. — 北京: 科学出版社, 2015.6

ISBN 978-7-03-044621-3

I. ①谈…谈… 聚糖-高聚物-研究 IV. O636.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 124829 号

责任编辑: 张淑晓 孙静惠 / 责任校对: 张小霞

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 铭轩堂

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>

三河市骏杰印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 6 月第 一 版 开本: (720 × 1000) 1/16

2015 年 6 月第一次印刷 印张: 11 1/4

字数: 227 000

定价: 60.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

医用多聚糖材料是生物医用材料的一个重要组成部分，是一类用于诊断、治疗疾病和修复器官的天然高分子材料，具有延长患者生命、提高患者生存质量的作用。这方面的治疗技术有望为提高人类的健康水平做出积极贡献，同时也具有显著的社会效应和经济价值。

医用多聚糖材料主要用作细胞、药物和基因载体材料，广泛用于组织工程、药物控制释放、基因治疗等再生医学领域，按应用形式可分为水凝胶、多孔支架、微球、纳米颗粒、微胶囊和纤维材料等。近年来，我们对医用多聚糖材料开展了大量的研究，在参阅国内外同行科研成果的基础上，结合自己对材料制备技术和交联原理的理解，编写了本书。本书共 7 章，分别对壳聚糖、海藻酸钠、透明质酸、硫酸软骨素、肝素和葡聚糖等医用多聚糖材料的结构和功能作了介绍，重点阐述了药物载体材料和组织工程支架材料的设计、制备、改性和应用。

本书的编写得到国家自然科学基金（项目编号：51103071）、江苏高校优势学科建设工程、教育部留学归国人员科研启动基金及南京理工大学学术专著专项（第二批）等项目的资助，在此致以诚挚的感谢。高欣、范茗、孙进晨和肖超在搜集资料方面付出了辛勤的劳动。多年来，我的科学研究得到了浙江大学高长有教授、美国匹兹堡大学 Kacey Marra 教授和南京理工大学熊党生教授的指导和帮助。在此谨向他们表示衷心的感谢。

由于医用多聚糖材料的研究发展非常快，并限于作者的水平，书中不妥之处在所难免，敬请读者不吝批评、指正。希望本书的出版能给读者的工作或学习提供一些帮助，如能达成此愿，我将感到无比宽慰。

谈华平

2015 年 3 月于南京

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 医用材料	1
1.2 医用多聚糖	2
1.3 医用多聚糖的应用	3
1.3.1 细胞支架	3
1.3.2 药物和基因载体	12
1.4 展望	15
1.4.1 仿生生化支架设计	16
1.4.2 生长因子的传递	17
1.4.3 梯度诱导水凝胶材料	17
1.4.4 纳米医用多聚糖材料	17
参考文献	18
第 2 章 壳聚糖	19
2.1 分子结构	19
2.2 性能及应用	20
2.2.1 成膜材料	20
2.2.2 多孔海绵体支架	21
2.2.3 壳聚糖微球	22
2.2.4 水凝胶材料	26
2.3 壳聚糖的化学改性	27
2.4 乳糖-壳聚糖	29
2.4.1 膜表面材料	29
2.4.2 多孔支架材料	34
2.4.3 细胞聚集材料	36
2.5 琥珀酰壳聚糖	38
2.5.1 席夫碱水凝胶	38
2.5.2 自由基聚合水凝胶	47
2.6 季铵化壳聚糖	51

2.6.1 纳米载药微粒	51
2.6.2 纳米基因载体	52
参考文献	53
第3章 海藻酸钠	55
3.1 结构及性能	55
3.2 微凝胶	56
3.3 中空微胶囊	60
3.3.1 层层自组装法制备中空微胶囊	61
3.3.2 抗肿瘤药物在微胶囊中的沉积与释放	63
3.3.3 载药微胶囊的应用	66
3.4 水凝胶材料	68
3.4.1 离子交联	69
3.4.2 热致相转变	71
3.4.3 生物特异性结合	72
3.4.4 席夫碱交联	72
参考文献	90
第4章 透明质酸	92
4.1 结构及物性	92
4.2 透明质酸的改性及应用	93
4.2.1 交联	93
4.2.2 接枝	94
4.2.3 酯化	94
4.3 微球或纳米微粒材料	94
4.4 可注射型水凝胶	100
4.4.1 温敏型凝胶	100
4.4.2 分子特异性结合	105
4.4.3 第尔斯-阿尔德加成交联水凝胶	108
4.4.4 席夫碱反应水凝胶	112
参考文献	116
第5章 硫酸软骨素	117
5.1 结构及性能	117
5.2 层层自组装复合膜	118
5.3 自组装纳米微球	118
5.4 可注射型水凝胶	119

5.4.1 氧化硫酸软骨素/羧甲基壳聚糖水凝胶	120
5.4.2 明胶微球的制备与性能	127
5.4.3 明胶微球填充水凝胶	133
参考文献	140
第 6 章 肝素	142
6.1 结构及性能	142
6.2 应用	143
6.2.1 水凝胶	143
6.2.2 微球与微凝胶	147
6.2.3 多孔支架	151
6.2.4 表面改性	155
6.2.5 静电吸引层层自组装	156
参考文献	161
第 7 章 葡聚糖	162
7.1 来源与结构	162
7.2 葡萄糖响应性	163
7.3 可注射性水凝胶	165
参考文献	172

第1章 绪 论

1.1 医 用 材 料

生物医用材料 (biomedical materials), 亦称生物材料 (biomaterials), 是指能直接与生理系统接触并发生相互作用, 能对细胞、组织和器官进行诊断治疗、替换修复或诱导再生的一类天然或人工合成的特殊功能材料^[1]。这里所说的生理系统既包括体内 (*in vivo*) 的生理环境, 如血液、组织和细胞等, 也包括体外 (*in vitro*) 的生理环境, 如细胞培养盘和生物反应器中的细胞-培养液系统^[2]。

医用材料的特征之一是生物功能性 (biofunctionality), 即能够对生物体进行诊断、替代或修复; 其二是生物相容性 (biocompatibility), 即不引起生物体组织、血液等的不良反应。现代医学的进步与生物材料的发展密不可分, 如各种介入诊断和治疗导管、药物传递控释系统、创伤和烧伤敷料、血管内支架、人工关节与功能性假体等已得到广泛应用。因此, 医用材料与人类生命和健康密切相关, 其研究与开发既具有重要的科学和技术价值, 又具有重大的社会需求和巨大的经济效益。医用材料涉及材料、生物、医学、化学以及物理等诸多学科领域, 其使用又与生理系统相接触, 因此该材料的研究与开发具有一定的难度和挑战性。

医用材料按照材料组成和性质可以分为医用金属材料、医用高分子材料、生物陶瓷材料、生物医用复合材料和生物医用衍生材料^[2]。由于人体绝大部分组织和器官都是由高分子化合物构成, 因此医用高分子材料在医学上有其独特的功效和特性, 发展前景广阔, 已成为医用材料研究最活跃的领域之一。

生物医用高分子材料按用途可分为人体功能替代或修复用高分子材料、药用高分子材料、高分子医疗器材及制品等。其中人体功能替代或修复高分子材料包括人工器官材料、功能修复材料、组织工程材料、医用黏合和缝合高分子材料等。药用高分子材料主要可以分为有药理活性的高分子药物、高分子药物载体材料、高分子薄膜包衣及控释膜材料、医药包装用高分子材料等。

生物医用高分子材料按生物性能可分为非生物降解高分子材料和可生物降解高分子材料两大类。

非生物降解高分子材料在生物环境中能长期保持稳定, 不发生降解、交联或物理磨损等, 并保持良好的力学性能, 如聚乙烯醇、聚乙烯、聚酰胺、聚丙烯、聚丙烯酸酯、聚甲醛、聚硅氧烷等。该类材料应用要求其本身不对机体产生明显

的毒副作用，主要用于药物释放、人体软、硬组织修复和人工血管、器官制造。

可生物降解高分子材料是指在植入人体并经过一段时间后能被逐渐分解或破坏的材料，植入物在完成使命后会分解或降解成无毒的小分子物质，并被排出体外。对这类材料的基本要求是生物相容性良好、高分子本身和降解产物均无毒；还要具有所需要的降解速率、适当的物理力学性能及可成型性。可生物降解高分子材料主要用于药物释放载体、非永久性植入器械、组织诱导再生和组织工程等。

目前常用的医用生物降解材料包括天然高分子材料和合成高分子材料两类。

天然高分子材料是由生物体内提取或自然环境中直接得到的一类大分子，具有良好的生物相容性和可降解性。天然高分子材料一般不具备足够的机械性能和加工性能，某些材料还会在体内引起异物免疫反应，因而在医学中应用更多的是经过化学改性的衍生物或与其他材料的复合物。天然高分子材料往往具有良好的生物安全性和生物相容性，但是天然高分子材料的降解速率一般都太快，而且因其来源不同，结构与性能存在批次间的差异。

天然高分子材料为动物体细胞外基质（ECMs）的主要组成以及其他一些生物体的提取物，主要为多聚糖材料和蛋白类材料，此外还包括一些生物合成聚酯。

多聚糖材料与蛋白质、核酸是与人类关系最为密切的三类天然高分子。多聚糖材料主要包括甲壳素（chitin）、壳聚糖（chitosan）、海藻酸盐（alginate）、透明质酸（hyaluronic acid）、肝素（heparin）、硫酸软骨素（chondroitin sulfate）、改性纤维素（cellulose）、琼脂（agar）、淀粉（starch）及葡聚糖（dextran）衍生物等。

蛋白类材料主要包括胶原（collagen）、明胶（gelatin）、血纤蛋白（fibrin）和蚕丝蛋白（silk protein）。

1.2 医用多聚糖

糖类通常又称“碳水化合物”，是指多羟基的醛、酮、醇及其氧化或还原衍生物，以及其糖苷键连接的多聚体^[3]。多聚糖（polysaccharides）是由单糖之间脱水形成糖苷键，并以糖苷键线形或分枝连接而成的链状聚合物。从功能上说，多聚糖不但是生物体，特别是植物体的主要组成，而且是生物体的主要能量来源。多聚糖具有显著的免疫活性，现已广泛应用于食品工业、医药工业和农业领域。多聚糖是除了蛋白质和核酸以外的一类重要的生物大分子，在自然界中广泛存在，主要来源于动物、植物、微生物。

动物多聚糖也是作为生命物质存在于动物体内。动物多聚糖分布较为广泛，大多来自动物结缔组织基质和细胞间质，是脊椎动物组织细胞外空间的特征组分。某些多聚糖还是动物体骨架的连接关节。动物多聚糖有壳聚糖、透明质酸、硫酸软骨素、角质素等。

植物多聚糖广泛存在于陆生植物和水生植物中，它们主要有两种功能：一种是形成细胞壁和基架物质；另一种是以淀粉和葡萄糖的形式作为储存物质。海洋多聚糖是天然多聚糖的重要部分，主要有海藻酸钠、褐藻多糖、螺旋藻多糖等。陆生植物多聚糖主要包括魔芋葡甘聚糖、人参多糖、黄芪多糖、当归多糖、红花多糖、枸杞多糖、蔗渣多糖、茶叶多糖、女贞子多糖等。

微生物多糖主要来源于细菌和真菌，是细菌、真菌等微生物在代谢过程中产生的对微生物有保护作用的生物高聚物。微生物多糖一般由淀粉水解发酵生产，也可直接利用可溶性淀粉经微生物酶作用制得。

由于具有生物相容性和生物降解性，天然多聚糖广泛用作载体以固定或包埋药物、生物活性分子、蛋白质以及细胞等。多种多聚糖材料，如壳聚糖、透明质酸和海藻酸钠等，对细胞膜具有高亲和性，它们可被分别或同时制成胶体粒子或微球，用于运输活性分子通过黏膜（mucosa）或上皮细胞（epithelial cell）。

1.3 医用多聚糖的应用

医用多聚糖主要用于细胞、药物和基因载体材料，广泛用作药物控制释放、医用敷料、可吸收缝合线、人工皮肤、组织修复替代物以及组织隔离膜等。按应用形式可分为水凝胶、多孔支架、微球、纳米颗粒、微胶囊和纤维材料等。

1.3.1 细胞支架

医用多聚糖最重要的应用是作为细胞支架，用于组织工程和再生医学领域。

组织工程是近十年来发展起来的一门新兴学科，它是应用生命科学和工程原理及方法，利用生物材料构建一个三维支架来维护、增进人体细胞和组织的生长，用于组织和器官修复与替换，以恢复受损组织或器官的功能。作为一门多学科交叉的边缘学科，组织工程融合了细胞生物学、工程科学、材料科学和外科学等多个学科。

组织工程化构建在临床治疗上具有非常重要的意义，它避免了“挖肉补疮”式的自体移植与潜在免疫排斥的异体移植，同时在临时支架降解后将形成与自体组织生理功能一样的活组织，是比生物惰性的人工假体更为优越的一种组织修复方式。作为一种再生疗法，组织工程避免了器官移植存在的供体严重不足和长期伴有的抗免疫药物治疗的缺点。组织工程技术已成为继外科重建后的新治疗手段，这方面的治疗技术有望为提高人类的健康水平做出积极贡献，同时也具有显著的社会效应和经济价值。

图 1-1 描绘了组织工程的基本过程。组织工程的基本原理和方法是将体外扩

增的自体或异体细胞种植于体外构建的细胞外基质模拟物(支架)中,形成细胞/支架复合物。然后,将该细胞/支架复合物植入受损的组织或器官部位,通过植入细胞的增殖与分化以及类细胞外基质支架相匹配的降解吸收而形成结构和功能与目标组织或器官相一致的新组织或器官,从而达到创伤修复和功能重建的目的。组织工程学的产生是继细胞生物学和分子生物学之后,生命科学发展史上的又一新的里程碑。组织工程学标志着医学将走出组织移植、器官移植的范畴,步入制造组织和器官的新时代^[4]。

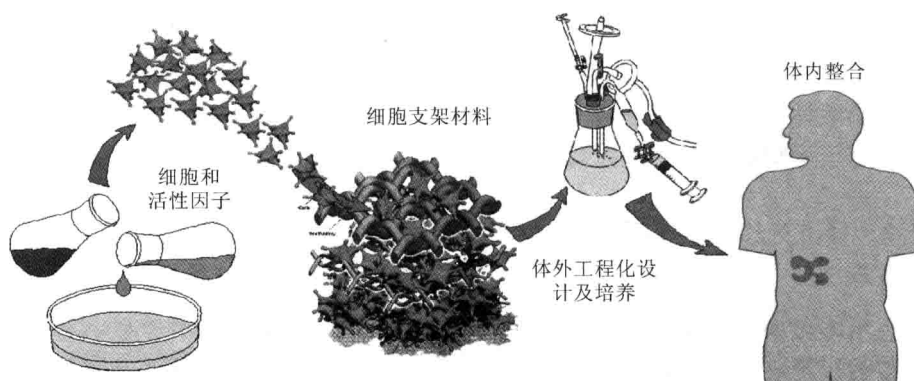


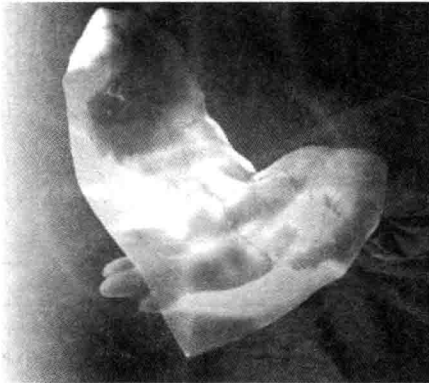
图 1-1 组织工程示意图

组织工程的关键问题之一是构建细胞和生物材料的三维空间复合体,该结构是细胞获取营养、气体交换、废物排泄和生长代谢的场所,是新的具有形态和功能组织、器官的基础。利用降解材料做成三维支架,使生物体的细胞在其表面繁殖增长;在生长出相应的组织或器官的同时,支架逐渐降解消失。

在种子细胞和支架材料研究的基础上,如何构建组织工程化组织或器官也是组织工程研究的重点内容。组织工程化组织或器官构建的主要内容包括:实现种子细胞与支架材料间有效地复合,细胞/支架复合物的体外培养条件的控制等。由于构建组织的多样化,以及不同组织所选用的种子细胞和支架材料的物理、化学和生物性能不尽相同,细胞与支架材料的复合是一个受到多方面因素影响的过程。具体的影响因素包括:①支架的宏观形状及尺寸和微观结构;②支架的物理化学性能,如电荷、吸水率、拓扑结构及细胞相容性等;③细胞的种类和种植密度;④细胞/支架复合物的体外培养方式;⑤培养环境中的应力等外界刺激。

组织工程技术几乎已被应用于人体中每一种实质器官的再生与重建研究,在皮肤、肌腱、软骨、骨、血管、尿道、心脏、角膜、神经系统、人工肝和人工胰脏等领域均取得了一定成绩,除大脑和胃以外的器官,都已被尝试采用组

织工程技术进行重建。皮肤、骨和软骨组织工程的研究开展最广泛，也最先获得成功（图 1-2）。近几年来，组织工程开始向产业化发展，越来越多的研究机构和公司开始投入到组织工程研究领域中来，组织工程学已成为一门具有广阔研究前景和巨大市场价值的新兴学科。



(a)



(b)

图 1-2 皮肤组织工程支架 (a) 和软骨组织工程支架 (b)

理想的组织工程用支架有以下的基本要求：①良好的细胞相容性。除满足生物材料的一般要求如无毒、不致畸，降解产物对细胞无毒害作用，不引起炎症反应之外，还要有利于种子细胞的黏附、增殖，更重要的是能激活细胞特异的基因表达，维持细胞的表型表达。②良好的生物降解性。支架材料在受损组织修复后应能降解，降解速率应与组织再生的速率相匹配。③具有三维立体多孔结构。具有适当的孔径、高的孔隙率及大的比表面积。④适当的机械强度。支架应具备与所修复组织相匹配的机械强度，为新生组织提供支撑，能维持组织器官的原有形态。⑤为了防止感染，支架还必须易于消毒和保存。

医用多聚糖材料是组织工程材料发展的一个重要方向，其本身来源于生物体，能保证足够的细胞亲和性和组织亲和性，最终降解产物为单糖，容易被机体吸收。该类材料的缺点是力学性能差，难以满足组织构建的要求，应用时需要改性。例如，在骨组织工程研究中，成骨细胞在壳聚糖等可降解材料制成的支架表面生长，骨细胞生长成熟后形成新的软骨或骨，与此同时，三维支架不断自动降解而排出体外。在材料中引入生长因子、黏附因子等，可以对细胞生长、分化、增殖起到促进作用。将骨细胞生长因子复合到多聚糖支架上，可以诱导具有自然骨功能的新骨再生。利用天然医用多聚糖材料，特别是天然细胞外基质成分对细胞有特别强的黏附、增殖、分泌基质作用，与具有一定力学强度的无毒、可降解的合成高分子复合，有望制备出更理想的支架材料。

组织工程支架为细胞和组织生长提供适宜的环境,随着细胞的分裂而逐渐降解和消失,从而将新的空间提供给组织和细胞,并使新生成的组织和器官具备与细胞支架相同的几何外形。

支架在构建组织工程化组织或器官中的主要作用包括:①为细胞的黏附提供物理支撑,并且将细胞准确地投递到受损部位;②为细胞的增殖、代谢提供空间;③提供特定的宏观与微观结构,引导细胞构建特定功能的组织或器官;④传递化学或力学信号,调控细胞的表型。组织工程支架的设计和构建涉及三个尺度的问题,分别为宏观结构(厘米以上尺度),即外形,微观孔径、孔隙率以及支架表面拓扑结构(微米级尺度),支架表面黏附蛋白以及基因对细胞的影响(纳米级尺度)。

按照手术操作方式,目前有两种类型的支架被大量用于组织工程化器官的构建,即植入型多孔支架和注射型水凝胶支架^[5]。

1. 植入型多孔支架

多数的植入型支架为“硬支架”,具有特定微结构,属于多孔型,孔径大小根据其制作工艺的不同而不同,一般为10~1000 μm 。支架的孔与孔之间相互连通,细胞可深入支架内部生长,同时营养液可渗入支架内部与细胞进行物质交换,从而实现细胞的立体培养。该类支架的优点是微结构如孔径和孔隙率易于调控,机械强度较好,易保持宏观的形状,操作比较方便,并可进行二次加工;缺点是必须通过外科手术才能使用,以合成聚合物为支架时细胞相容性较差。

在多孔支架的制作过程中,除选材和后处理,对于支架性能影响最大的步骤是多孔支架的制备。制备工艺决定了支架的整体外形、微观结构以及部分力学性能和降解性能。目前制备组织工程支架的技术非常多,对于多聚糖材料,应用最广泛的是冷冻干燥法和静电纺丝法。

基于热致相分离原理的冷冻干燥法(freeze-drying)是制备天然高聚物组织工程用三维多孔支架的主要方法之一。天然高聚物与分散体系形成的凝聚物或凝胶在冷冻过程中,由于冰晶晶粒生长而形成连续的互相贯穿的结构。在这一过程中,高聚物可以穿插到晶粒之间的空隙中。当冰晶在真空中升华除去后,得到多孔的海绵型支架。该方法最大的优点是制备温度低,可以保证不破坏天然高聚物材料的生物活性,尤其适用于壳聚糖、海藻酸钠和透明质酸等多聚糖材料。

2. 注射型水凝胶支架

通常情况下,细胞体外培养的环境无法完全模拟人体内部的细胞生长环境,因而细胞在体外培养时很容易丧失其功能性表达,不能进行正常的基质分泌、分化和增殖。注射型水凝胶支架能够为细胞的分裂与分化提供更接近于天然细胞外基质的化学与物理环境,并且有可能通过注射等微创方式将复合有种子细胞的聚

合物注射到所需部位,避免了创伤性的外科手术,特别适用于微创伤的修复。

1) 水凝胶的特点

水凝胶是一类重要的组织工程支架材料,是少量亲水性大分子与大量水的结合体,其中亲水性大分子之间有适度的交联(物理交联或化学交联),能够保持水凝胶的固态结构。水凝胶既可以直接植入体内作为组织的替代材料,也可在水凝胶交联之前与细胞悬液混合,然后交联形成水凝胶/细胞复合体,在体外进行细胞的三维立体培养;或者通过注射的方法将材料和细胞的混合物注入体内组织缺陷处,然后在体内交联,以修复受损的组织。水凝胶支架材料丰富多样,包括无机材料、天然高分子材料和合成高分子材料。表 1-1 中列举了近来报道较多的部分多聚糖水凝胶材料。

表 1-1 多聚糖水凝胶材料

交联类型	固化机理	多聚糖举例
物理交联	碱基配对(氢键作用)	壳聚糖、海藻酸钠
	温敏交联(相分离)	海藻酸钠、壳聚糖、透明质酸
	分子特异性识别	海藻酸钠、葡聚糖、透明质酸
化学(共价)交联	席夫碱反应	海藻酸钠、透明质酸、葡聚糖、硫酸软骨素、纤维素
	第尔斯-阿尔德加成反应	透明质酸
	迈克尔加成	透明质酸、肝素
	点击化学	壳聚糖、透明质酸、硫酸软骨素、海藻酸钠
	自由基聚合(光、热引发)	海藻酸钠、透明质酸、壳聚糖、硫酸软骨素
	酶交联	肝素、壳聚糖

水凝胶作为组织工程支架具有以下优缺点。

优点:①微创治疗;②凝胶的水溶液环境有利于保护细胞;③水凝胶基体有利于营养物质和细胞分泌物的运输;④易采用细胞黏附配体进行改性。

缺点:①操作难控制;②机械强度较低;③形状保持能力差;④消毒困难。

水凝胶材料最突出的特点是可通过注射的方法植入所需部位,在一定条件下原位形成三维支撑体,避免了创伤性的外科手术,降低了手术难度,容易被患者接受。此外,水凝胶尤其适合填补任意形状的缺损,其物理形态和天然软组织也比较接近,从临床使用的角度考虑,特别适用于软组织的微创修复。

由于水凝胶支架要负载细胞和细胞生长因子,因此注射后溶液凝胶化的条件必须是温和的。作为组织工程支架,还需考虑可注射水凝胶的机械性能。对于软骨和骨等承重组织,支架需具有足够的机械强度以支撑所修复的组织,特别是在修复的早期,需要降解速率慢的材料,能够在较长的时间内维持其结构完整性和

机械性能。例如，天然软骨本身是一种高度水合的凝胶组织结构，由包埋在Ⅱ型胶原和糖胺聚糖（glycosaminoglycan, GAG）的软骨细胞构成。水凝胶具有与软骨相类似的结构和物性，因此，水凝胶支架非常适合用于软骨的修复与再生。

与传统的多孔支架材料相比，水凝胶支架具有类似体内环境的特质，更有利于细胞的分化与功能表达，从而实现组织的再生。细胞体外培养的环境无法完全模拟人体内部的细胞生长环境，细胞在体外培养时很容易丧失其功能表达（去分化），不能进行正常的基质分泌、分化和增殖。机械应力通过培养基质作用于细胞，可调节不同组织细胞的生长和表型表达，因此在新生组织生长过程中通过基质材料给予适当的应力作用是必要的。用水凝胶制备的可注射型支架具有无创或微创的优点，细胞完全处于凝胶包围中，凝胶的应变易于对细胞产生应力刺激，能够为细胞的分裂与分化提供更接近于天然细胞外基质的化学与物理环境，是细胞支架的一个重要组成部分与发展方向。注射型水凝胶支架具有重要的临床应用价值和很大的发展前景，必将有力推动组织工程技术的发展。

用于临床治疗时，水凝胶既可以直接植入体内作为组织的替代材料，也可在水凝胶交联之前将细胞悬浮于液态前驱体组分中，混合后直接注射到缺损部位，然后在体温下快速原位交联成型。所需营养由体液交换提供，细胞可渗透其中进行生长，最终修复受损的组织。图 1-3 为水凝胶材料作为细胞支架在组织工程中的应用示意图^[6]。

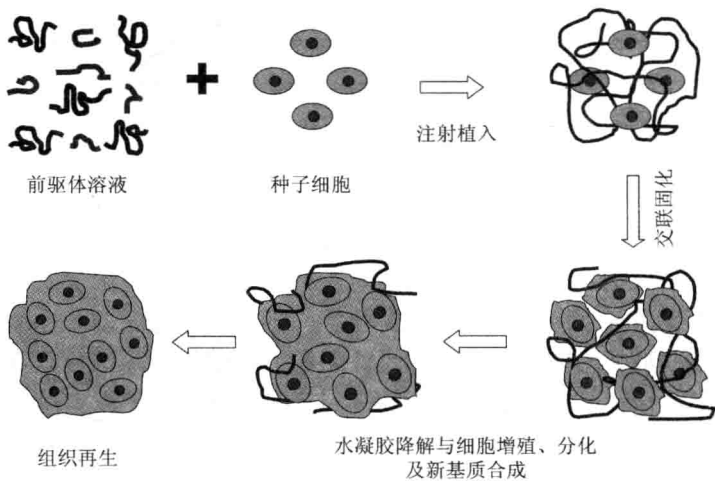


图 1-3 可注射水凝胶材料在组织工程中的应用示意图^[6]

水凝胶支架材料丰富多样，主要包括天然高分子材料和合成高分子材料。这两类材料各有优缺点，通常来说，天然高分子材料作为支架时，其细胞相容性较

好;合成高分子材料作为支架时,其机械性能较好。

水凝胶支架的首要任务是运载种子细胞。水凝胶具有高度水合的三维聚合物网络,为软骨细胞的黏附、增殖和分化提供了空间。经过十多年的发展,已有多种适合负载细胞或干细胞的水凝胶支架被制备出来,并进行了大量的体外和体内的组织工程化研究,取得了丰富的研究成果。大量体外实验从多角度研究了水凝胶支架的强度、细胞生长因子负载,以及支架材料本身性质对种子细胞和组织再生的影响。天然多聚糖材料,如透明质酸或者海藻酸制备的水凝胶力学性能相对较弱,但能更好地促进分化软骨显型和Ⅱ型胶原表达。

水凝胶支架的另一个重要功能是传递细胞生长因子。在运输细胞的同时,水凝胶支架也为化学和生物信号修饰提供了平台。以往细胞生长因子等激素蛋白药物的给药方式主要是口服或静脉注射^[7]。由于酶解作用,大部分给药将被代谢或消耗。这不仅造成浪费,还会对身体产生副作用。例如,为了促进局部软骨形成,传统给药方式需要大量的细胞生长因子(激素类蛋白),但会导致一些严重的副作用,包括非靶组织的钙化、新软骨化、形成动脉粥样硬化斑块甚至肿瘤。这些对软骨或骨组织具有营养和促进作用的因子,对其他组织很可能是不利的,因此,局部、靶向给药对于水凝胶支架负载细胞生长因子是非常必要的。

天然软骨细胞外基质中含有大量的活性大分子,这些活性大分子为软骨细胞的存活及活动提供适宜的微环境,并通过信号传导系统影响细胞的代谢、功能、黏附、迁移、增殖和分化等行为。目前,水凝胶已广泛地应用于输送细胞生长因子,以促进组织的修复与再生,其中研究较为广泛的细胞生长因子主要包括转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)和碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等。虽然使用细胞生长因子能取得较好的促软骨生成效果,但这些促软骨生长因子在水凝胶中释放较快,其本身也极易失活,结果使软骨生成能力受限。除了承担运载药物的基本功能以外,组织工程用水凝胶还应起到保护和稳定细胞生长因子的作用。

总体上,在水凝胶支架中引入细胞生长因子等诱导信号以促进和控制软骨形成十分重要。另外,力学信号和动态培养能够刺激种子细胞的软骨分化和新基质分泌,能增强工程化软骨的机械和功能化性质。因此,联合支架内化学诱导与外界力学信号在利用水凝胶支架制备功能性软骨方面存在着巨大的潜力。

2) 水凝胶的固化类型

水凝胶支架一般必须将凝胶的前驱物或大分子单体与活细胞复合后,在较短的时间内采用合适的物理或化学方法将其固化成为三维支架。因此,固化机理直接影响整个凝胶形成过程的动力学、水凝胶支架的稳定性,以及细胞在凝胶内部的存活与生长。组织工程用水凝胶的固化方法主要有离子交联、自由基聚合、热

致相转变、共轭反应、分子自组装和特异性结合等交联手段。

离子交联是指带电荷的聚合物与带相反电荷的多价离子或聚合物作用，通过离子键合作用形成水凝胶。某些天然多糖及其衍生物是高分子聚电解质，采用离子引发交联可以形成凝胶，并且产生特殊的刺激响应性，如 pH 等。海藻酸盐是一种天然衍生多糖，其水溶液通过与二价离子如 Ca^{2+} 的相互作用呈现出可逆凝胶化反应，这些阳离子与海藻酸链上的古洛糖醛酸单元相互作用形成离子键桥，即“蛋盒结构”。海藻酸凝胶是被最广泛用作细胞外基质类似物的支架，具有良好的生物相容性，有利于体外细胞的培养，最有希望成为一种商品化的可注射性软骨修复用生物材料。

自由基聚合交联是使带有不饱和或光敏性官能团的前驱物在热或者光作用下发生自由基聚合或交联形成共价键交联水凝胶。自由基的产生主要通过添加热引发剂或者光引发剂，引发大分子单体上的官能团进行聚合和交联。热引发聚合中，官能团一般是 $\text{C}=\text{C}$ 双键，主要采用氧化还原引发体系。氧化还原引发剂水溶性较好，活性较高，但氧化还原体系不可避免地会引起整个水凝胶体系 pH 的变化，并且其副产物可能会影响细胞的存活和生长，所以引发体系的选择至关重要。软骨组织工程中常用的有过硫酸铵/四甲基乙二胺 (APS/TEMED) 和过硫酸铵/抗坏血酸等，主要用于接枝双键的高分子及其衍生物的交联。因此，该凝胶体系须注意引发剂种类的选择、引发剂及副产物的生物毒性、聚合中温度和 pH 的变化。光引发聚合中，含光敏性官能团（如叠氮）的前驱物可在紫外光照射下直接聚合；含双键官能团的前驱物可通过加入光引发剂（如 I2959）后在紫外光照射下聚合。光引发聚合速率相对较快，而且副产物较少。但须严格控制紫外光的照射强度及照射时间、光引发剂浓度以及反应时的温度变化。热引发聚合与光引发聚合比较，后者聚合速率快，对细胞影响较小，但由于紫外光的透过率有限，不能用于较深组织的修复，而前者无此限制。自由基交联形成的凝胶为共价键交联，凝胶结构比较稳定，强度较高，而且反应可控制性较好，易于手术中的操作，但由于需其他物质参与，并伴有化学反应，因此对细胞的影响较大。通过对引发体系各项参数的优化及其他操作条件的严格控制，能够降低或消除体系对细胞的影响，以满足组织工程的需要。通常采用自由基聚合交联的水凝胶支架的机械性能比较优异，这正是软骨组织工程应用中所希望的特性之一。采用不同类型、浓度的引发剂以及不同交联剂的比例，交联聚合物具有显著不同的特性，其中交联剂的比例影响交联密度，从而影响最终的机械性能。然而，这种方法面临的挑战是，固化时间的控制必须符合临床上的应用，以免水凝胶固化时间不当引起注射材料周围组织的坏死。

热致相转变主要是指聚合物溶液通过温度的改变形成凝胶，当温度变化时，聚合物分子链物理缠结形成交联网络结构。这种水凝胶的形成不需要其他化学试