

医用聚氨酯多孔支架的制备及其与细胞共培养的研究

康 骋 沈志森 陈静静 竺亚斌

随着组织工程和再生医学的日益发展,工程化组织和器官的构建越来越受到关注。构建具有良好生物学性能的组织工程支架是此领域研究中的难点。聚氨酯(polyurethane, PU)具有优良的韧性、弹性、热稳定性和低毒性等,近 60 年来已被广泛应用于医学领域,如人工心脏瓣膜、人工皮肤、烧伤敷料、缝线、各种夹板、人工血管、牙科材料以及计划生育用品等^[1]。随着现代科技的不断进步和医用材料的逐渐开发,组织工程的目标也从单纯的缺损替代发展到组织结构与功能的双重修复,因此,具有合适的内部孔隙结构、能诱导细胞和组织生长和功能分化的 PU 多孔支架得到了更广泛的关注。本文就 PU 多孔支架的制备方法及其在细胞培养和组织修复中的应用作一概述。

一、PU 多孔支架的制备方法

支架的构建需要模拟体内细胞生长模式:细胞处于细胞外基质构成的立体网架结构,和周围微环境(cell niche)之间进行着复杂的物质、能量和信息的传输、交换。多孔支架本身拥有良好的孔隙结构,可模拟细胞外基质(ECM)的结构,使细胞在此类多孔支架上生长和分化;同时连通的孔隙又能保证营养物质的持续供应和排泄物的及时排出。因此,孔隙结构合适的多孔支架可模拟细胞生存的三维微环境,使体外培养的细胞能像在体内环境中正常生长,并分泌细胞外基质。以下就 PU 多孔支架的制备方法,以及这些方法的特点作一总结如下:

1. 静电纺丝法(electrospinning):静电纺丝法是聚合物溶液或熔体在静电高压电场中,克服液体表面张力的作用,在喷嘴处形成 Taylor 锥,然后形成喷射流,此喷射流在高压电场作用下产生频率极高的不规则螺旋运动,同时被迅速分裂或单一细化随着溶剂的迅速挥发,在接收板上获得微米至纳米级纤维的一种

纤维制备方法,简称电纺法。运用电纺法可以制备纤维直径介于微米至纳米级的不同外形的纤维状聚合物膜性支架,并依据所需支架的结构性能的要求进行设计和调,而且所制得的支架孔隙率和比表面积大,均一性高,孔之间连通性好,使这一技术在生物工程领域如制备仿生化和功能化的组织工程支架等方面得到了广泛地研究^[2,3],如纳米级无序排列的纤维状多孔支架容易模拟结构致密的结缔组织,而被用于尝试修复韧带缺损^[4]。电纺法制备的多孔支架可通过调节纤维的尺寸和排列,改变支架的内部结构,以此调控细胞的生长。研究发现随着纤维有序性的提高,鼠 L929 成纤维细胞沿纤维排列呈有序生长,同时表达更多的蛋白聚糖,表明有序的纤维排布有助于成纤维细胞的生长^[5]。Carlberg 等^[6]探讨了电纺丝纤维的直径与人胚胎干细胞(hESCs)分化成神经细胞的影响关系,发现当纤维直径在 $360 \pm 80\text{nm}$ 时,可明显促进干细胞向神经细胞的分化。

2. 激光致孔法(laser excimer):用单纯激光穿透 PU 膜,以制得多孔结构,这样制得的支架孔径大小单一,缺乏多变的孔结构^[7]。如果在电纺法基础上结合激光法可以改善微观的孔洞结构。McCullen 等^[8]首先以电纺法获得高比表面积的小孔纤维支架,然后采用激光法提高孔径,高比表面积能为细胞的黏附、生长提供充足的接触面,而大孔则可以提高细胞的渗入、改善物质的交换和运输,使人脂肪干细胞(hASCs)生长的微环境接近于细胞外基质的构造,有利于细胞的黏附和生长。

3. 盐析法(solvent casting/salt leaching):传统的盐析方法是将聚合物溶液和致孔颗粒(剂)制成均匀的混合物,再利用两者不同的溶解性或挥发性,去除混合体系中的致孔剂,从而得到多孔的聚合物支架。所用的致孔颗粒可以是盐粒子或蜡球微粒。这种方法的特点是可以透过致孔剂颗粒的大小和含量来调控支架的孔尺寸和孔隙率,也可以制得较大孔径的多孔支架;缺点是孔之间的连通性不好,从而影响细胞的正常生长。Sin 等^[9]对此传统的盐析法进行了改进,首先将 PU 溶于二甲基甲酰胺(DMF)和四氢呋喃

基金项目:宁波市社会发展择优项目(2012C5015);宁波市科技创新团队·第二层次(2012B82019)

作者单位:315211 宁波大学医学院(康骋、陈静静、竺亚斌);
315040 宁波大学医学院附属李惠利医院(沈志森)

通讯作者:沈志森,电子信箱:szs7216@163.com

的混合溶剂中,然后加入一定比例的食盐颗粒,混匀后以一定转速在离心机上离心,最后冷冻干燥制得 PU 多孔支架。结果表明,离心操作使支架的孔隙内部连通性明显提高,孔尺寸也更均匀^[10]。

4. 相分离法(phase separation):相分离法可分为冷冻相分离和热致相分离两种方法:(1)冷冻相分离法:以水、二甲亚砜(DMSO)等低温下呈结晶态的小分子溶剂作为聚合物的溶剂,使聚合物在一定温度下溶解,随着体系温度的逐渐降低,溶剂逐渐结晶,以冷冻干燥或其他溶剂抽提的方法去除晶态溶剂,最终获得具有多孔结构的聚合物支架。(2)热致相分离法(thermally induced phase separation, TIPS):在较高的温度下,将聚合物溶于高沸点的小分子溶剂,得到均相的聚合物溶液,然后逐渐降低温度,体系内逐渐产生液-液相分离或者固-液相分离,再运用萃取剂或冷冻干燥脱除溶剂的方法,以制得微孔支架,这种方法称为热致相分离法^[11]。此法也在制备聚己内酯(PLLC)、聚丙交酯(PLC)、以及相关共聚物的多孔支架中得到运用^[12]。

二、PU 多孔支架的改性

PU 虽然具有良好的机械性能、热稳定性和低毒性等性能,但其亲水性较差,呈生物惰性,不能支持细胞黏附和生长,组织相容性较弱,需要通过化学或物理的方法提高其生物活性,以满足作为生物医用材料的需要。支架的改性可分为本体改性和表面改性。本体改性通过在分子链上接枝活性基团,或在聚合物本体中共混入其他成分,以达到改善聚合物本体性质的目的。而表面改性是在不改变聚合物本体结构的前提下,运用物理或化学的方法对支架的表面结构进行改变,以达到提高支架的细胞和组织相容性的目的。

1. 本体改性:PU 本体改性是指通过调节分子链中软段和硬段的比例,或在分子链的软段或硬段上接枝亲水的功能基团,或者运用共混方法将亲水性较好的高分子混入 PU 中,形成聚合物互穿网络结构^[13]。孙春惠等将羟甲基丙烯酸酯引入端基,制备了端乙烯基 PU 预聚体,并与甲基丙烯酸甲酯共聚,合成了聚(氨基甲酸酯-甲基丙烯酸甲酯)共聚物,研究表明随着甲基丙烯酸甲酯含量的提高,PU 表面亲水性能提高,但机械强度有所下降^[14]。Wang 等^[15]将 PU 与 N-乙基吡咯烷酮(NVP)、丙烯酰胺(AAm)等共聚,其亲水性及生物相容性都得到了提高;PU 与脂肪族聚酯,如 PCL、聚羟基丁酸酯(PHB)、聚乳酸(PLA)

等共混,材料的力学性能得到改善的同时也提高了其降解性能。

2. 表面改性:细胞外基质(ECM)对细胞生长、分化均有影响^[16,17],多孔支架除了在空间构型上模仿各种组织的三维物理结构,还需要在细胞-材料的界面模拟 ECM 的界面化学性能,支架表面的化学结构往往会对种植在其表面的细胞的黏附、增殖、生长以及分化具有非常重要的影响。这就要求支架在具有良好的本体性能外,还需要具有优异的表面性能。目前用于 PU 表面改性的方法主要有物理方法和化学方法:(1)表面涂层法(coating):属于物理改性方法,是将一种或几种活性组分通过物理吸附的方法涂布于支架的表面。此方法操作简单易行,且不受基底材料的影响,但缺点是由于涂覆层与基底间无化学键而易于脱落,同时涂覆量也难于控制,通常需要通过其他方法使涂覆层得以稳定存在。Chiarini 等^[18]采用浸渍法将丝素蛋白吸附于 PU 膜表面,然后通过醇处理以固定蛋白涂层,猪成纤维细胞的培养结果表明此蛋白涂层增加了细胞黏附率,提高了 PU 平面膜的细胞相容性。(2)表面接枝聚合:通过物理或化学方法活化聚合物表面,使其表面产生活性基团,以这些活性基团为反应位点,将目的分子如具有生物活性或良好亲水性的分子引入支架表面,以改善支架的表面化学性质。活化方法较多,主要包括氧化法、等离子体法、激光法、电子束轰击法、辐射、紫外光引发等等,可引入的目的分子或基团也因此而多样化,使原本比较惰性的聚合物表面因此变得丰富多彩。如 Guan 等^[19]将 PU 膜或多孔支架在过氧化氢溶液中进行紫外光照射,在其表面引入氧自由基($O\cdot$),利用自由基的反应活泼性,将甲基丙烯酸二甲胺基乙酯(DMA)、丙烯酰胺(AAm)、丙烯酸羟乙酯(HEA)、甲基丙烯酸(MAA)、明胶、以及精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸多肽(RGDS)等化学接枝于 PU 表面,分别得到了氨基化、羟基化、羧基化、酰胺化及阳离子化聚氨酯表面,这些活性表面促进了血管内皮细胞的铺展、黏附和增殖。说明接枝后支架表面的细胞相容性明显提高^[20]。孙东豪等采用低温等离子体技术,将丝素蛋白接枝于 PU 平面膜表面,通过扫描电子显微镜(SEM),全反射红外光谱(ATR-FITR),X 射线能谱等对 PU 膜表面的化学成分和拓扑结构进行了分析,经检测接枝改性后的 PU 表面亲水性提高,而力学性能与改性前的 PU 膜相近,这也说明了接枝反应仅发生在表面,其本体性质未发生明显变化。罗祥林等用

紫外光照射,使亲水性单体 N-乙基吡咯烷酮(NVP)和丙烯酸胺(AAm)在 PU 表面发生接枝反应,从而在 PU 表面形成亲水表层,亲水性明显提高,但亲水性改进程度跟接枝聚合物的种类、数量、接枝方法等因素有关。Bezuidenhout 等在 PU 多孔支架上胺解接枝肝素,改性管状支架的内表面,血管内皮细胞培养后发现,胺解接枝的表面内皮细胞数量更多,形态更铺展,分泌的 vWF 因子也更多,生长明显优于未接枝表面。Gong 等将聚乳酸多孔支架胺解后,运用层层自组装的方法把硫酸软骨素和胶原蛋白交替固定在支架的孔表面,在种植原代兔关节软骨细胞并培养 12 天后,细胞均匀分布于整个多孔支架,培养细胞的活性、增殖率和细胞外基质的分泌量均得到了显著提高。运用上述改性方法,还可在 PU 表面引入其他生物大分子,如纤连蛋白^[8]、胆固醇、壳聚糖^[13]、层黏连蛋白^[5]等。经这些方法处理后的 PU 支架在保持本体性能不发生明显改变的情况下,其表面亲水性和生物活性均得到了改善,从而使 PU 支架的细胞和组织相容性得到显著提高。

3. 力学刺激:除了细胞赖以生长的支架的立体结构和化学性质外,支架的机械性能以及外界力学刺激等因素也对细胞的生长、分化起到一定的调控作用。Rowland 等在研究骨组织工程时发现,如果 ECM 的机械强度接近骨强度(elasticity of bone, Eb)时,有利于支架上种植的干细胞向成骨细胞分化,同时分泌成骨细胞的标志蛋白 Runx2;如果 ECM 强度达不到要求,即使支架表面接枝 I 型胶原或纤连蛋白,干细胞的分化能力也会显著降低(不能表达上述的特征性蛋白)。Li 等将人骨髓间充质干细胞培养于多孔 PU 支架,并采用特异的机械负荷加以诱导,促使干细胞向软骨细胞分化,表达软骨细胞特有蛋白,同时合成更多的细胞外基质——黏多糖。Asefnejad 等利用液-液相分离和盐析技术相结合的方法,制备了多孔支架,在其上共培养鼠 L929 成纤维细胞和软骨细胞,同时使多孔支架保持拉伸的状态,支架中细胞附着生长状态良好,明显优于未拉伸支架上的细胞,说明有力学刺激的多孔支架具有良好的生物相容性,更适宜成纤维细胞和软骨细胞的生长。上述研究表明,机械刺激对细胞的生长和分化有非常重要的作用,因此在构建支架时除充分考虑立体结构和化学组成等因素外,也需要考虑力学刺激、机械强度等其他因素。本课题组曾对多孔支架的制备以及支架的化学改性进行了细致深入的研究,系统探讨了静电纺丝法、相分离方

法及自制模具等技术制备 PU、PCL、PLA 等聚酯类聚合物多孔支架及管状支架,创立了以二元胺胺解的方法在聚酯类支架上引入可供反应的活性基团 NH_2 ,以此为反应位点,运用分步交联和层层自组装的方法将各种蛋白质等生物高分子引入支架表面,使原本惰性的聚合物支架上构建了一层生物活性表层,极大地促进了合成聚合物在工程化组织构建和再生中的应用。

三、展 望

组织工程多孔支架作为 ECM 的替代物,给体外培养的细胞以类似于体内的生长环境,在皮肤、骨骼、软骨、血管、膀胱等组织和器官修复方面的研究已取得了较大进展,在功能型器官及组织如肝脏、心肌、脑神经等方面的研究也取得了一定的成绩。不同的细胞或组织对支架的构造和表面性质有其特殊的需求,也因此研发了多种制备支架的技术和方法,但各种制备方法在调控微孔结构和理化性质上都具有其优势与不足,而人体内不同部位的组织具有各自的结构特点,这就要求选择合适的方法,或者几种方法取长补短,以制备具有不同特点的多孔支架,以模拟不同部位的组织构造。采用多种方法相结合制备多孔支架将会成为今后相关研究的方向之一。另外,由于 PU 表面的疏水性,不利于细胞的黏附和生长,因此合适的表面改性技术的选择也将是必需考虑的因素之一。总之,笔者认为理想的 PU 多孔支架需要综合考虑良好的本体性质、优异的表面生物相容性、合适的机械性能以及适当的力学刺激等诸多因素,这也将是 PU 多孔支架在组织工程和再生医学领域中得到进一步应用和发展的必要条件和研究方向。

参考文献

- 1 鲍俊杰,刘都宝,黎兵,等.医用聚氨酯材料研究进展[J]. 聚氨酯, 2007, 64: 72-79
- 2 Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review [J]. Tissue Engineering, 2006, 12: 1197-1211
- 3 Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, *et al.* Electrospinning of nanofibers [J]. J Appl Polym Sci, 2005, 96: 557-562
- 4 Bashur CA, Shaffer RD, Dahlgren LA, *et al.* Effect of fiber diameter and alignment of electrospun polyurethane meshes on mesenchymal progenitor cells [J]. Tissue Engineering (part A), 2009, 15(9): 2435-2445
- 5 Geissler EK, Angele P. Innovative blood vessels bring new life [J]. Blood, 2011, 118: 145-150
- 6 Carlberg B, Axell MZ, Nannmark U, *et al.* Electrospun polyurethane scaffolds for proliferation and neuronal differentiation of human embryonic stem cells [J]. Biomedical Material, 2009, 4(4): 045004
- 7 王克敏,李世荣,郭嘉.热致相分离技术制备组织工程支架[J]. 化

- 学与生物工程, 2006, 1: 1-3
- 8 McCullen SD, Gittard SD, Miller PR, *et al.* Laser ablation imparts controlled micro - scale pores in electrospun scaffolds for tissue engineering applications [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2011, 39 (12): 3021-3030
- 9 Sin DC, Miao XG, Liu G, *et al.* Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation [J]. *Materials Science and Engineering*, 2010, 30(1): 78-85
- 10 Verdonk R, Verdonk P, Huyse W, *et al.* Ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for treatment of partial meniscal lesions [J]. *Am J Sports Med*, 2011, 39 (4): 774-782
- 11 Kim JK, Lee JI, Lee DH. Self - assembled block copolymers: Bulk to thin film [J]. *Macromolecular Research*, 2008, 16(4): 267-292
- 12 Molladavoodi S, Gorbet M, Medley J, *et al.* Investigation of micro-structure, mechanical properties and cellular viability of poly(L - lactic acid) tissue engineering scaffolds prepared by different thermally induced phase separation protocols [J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2013, 17: 197-286
- 13 邓茂盛, 周彩元, 吴晓青, 等. 医用聚氨酯材料的研究进展 [J]. *聚氨酯工业*, 2010, 25(2): 1-4
- 14 孙春惠, 王凤英. 环保型水性聚氨酯的改性研究 [J]. *精细石油化工进展*, 2010, 11(6): 50-52
- 15 Wang WS, Ping P, Jing XB, *et al.* Biodegradable polyurethane based on random copolymer of L - lactide and L - caprolactone and its shape - memory property [J]. *Appl Polym Sci*, 2007, 104 (6): 4182-4187
- 16 Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5 beta1 function [J]. *Science*, 2009, 323: 642-644
- 17 Martino MM, Mochizuki M, Rothenfluh DA, *et al.* Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 1089-1097
- 18 Chiarini A, Petrini P, Bozzini S, *et al.* Silk fibroin/poly (carbonate) - urethane as substrate for cell growth: in vitro interactions with human cells [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 789-99
- 19 Guan JJ, Gao CY, Feng LX, *et al.* Surface photo - grafting of polyurethane with 2 - hydroxyethyl acrylate for promotion of human endothelial cell adhesion and growth [J]. *Biomaterials Science*, 2000, 11(5): 523-536
- 20 Gao CY, Guan JJ, Zhu YB, *et al.* Surface immobilization of bioactive molecules on polyurethane for promotion of cytocompatibility to human endothelial cells [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2003, 3 (3-4): 157-162
- (收稿日期: 2012-11-22)
(修回日期: 2012-12-12)

应用骨科方法治疗血栓闭塞性脉管炎的研究进展及展望

边振宇 李茂强 王雪鹏 朱六龙

血栓闭塞性脉管炎 (thromboangiitis obliterans, TAO) 是一种非粥样硬化血管节段性炎性疾病, 常累及上肢及下肢的多个中、小型动静脉, 原因不明。其病理特点为动脉及静脉内均可见炎性血栓, 而血管壁的炎症反应较轻, 包括内弹力膜在内的血管壁的正常结构通常完整, 这与动脉硬化不同。血栓闭塞性脉管炎在欧美国家发生率低, 而在地中海、中东及包括我国在内的远东地区发生率较高, 患者绝大多数为青壮年男性^[1]。有研究表明本病是一种自身免疫性疾病^[2]。

一、TAO 的治疗概况

近年来不断有新的技术和方法应用到 TAO 的治疗中去, TAO 的截肢率也有所下降, 但迄今为止 TAO 的治疗并没有突破性的进展, 但不少学者仍然认为它

是一种难治性疾病, 高位截肢占 17.5%, 指趾足切除占 23.9%^[3,4]。目前临床常用的保守治疗方法包括戒烟 (尤其避免间接吸烟)、防寒保暖、步行锻炼和高压氧治疗以及扩血管、抗凝和抗血小板药物治疗, 但对于终末期病人药物治疗效果差^[5]。

TAO 引起缺血的原因主要是肢体的中小血管的节段性炎症, 管腔内形成炎性血栓, 导致血流障碍, 肢体缺血, 从而引发症状。如能够增加肢体的循环, 改善血供必将极大改善症状, 甚至完全缓解。目前有多种手术治疗方法, 但这些手术方法都有相应的局限性和缺点。血管重建术仅局限在 5% ~ 10% 的病人, 因为该病常常累及中小动脉, 大部分病人就诊时已无手术指征、手术难度大、远期通畅率不高^[6]。动静脉转流术主要适用于闭塞动脉的远端没有满意的流出道, 而不能施行其他血管重建手术和其他治疗方法效果不佳的病人。但此术式不符合正统 (动脉 - 动脉) 的

作者单位: 310006 杭州市第一人民医院

通讯作者: 边振宇, 电子信箱: abe - august@163.com