

特约专栏

中枢神经系统损伤修复生物材料研究进展

王颖, 何晋, 刘茜, 郭牧遥, 王秀梅, 崔福斋

(清华大学材料科学与工程系 再生医学与仿生材料研究所, 北京 100084)

摘要: 中枢神经系统损伤导致神经细胞死亡、组织破坏, 造成神经功能永久性缺失, 是长期困扰生物医学界的一大难题, 目前尚无有效疗法。组织工程技术不仅能通过纳米生物材料为神经细胞和神经纤维生长提供结构支持, 还能同时递送各种有利于神经再生修复的活性信号分子, 有望在促进中枢神经损伤组织修复的同时, 实现神经功能的重建, 为中枢神经损伤再生修复带来希望。结合国内外有关中枢神经系统组织工程研究的最新进展, 对中枢神经修复生物材料设计的主要策略、以及包括天然生物大分子和合成高分子在内的多种中枢神经修复生物材料的应用进行了详细综述。

关键词: 中枢神经系统; 组织工程; 纳米生物材料

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962 (2012)05-0011-09

Research Progress on Biomaterials for Treatment of Central Nervous System Injuries

WANG Ying, HE Jin, LIU Xi, GUO Muyao, WANG Xiumei, CUI Fuzhai

(Institute for Regenerative Medicine and Biomimetic Materials, Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Injuries to central nervous system (CNS) lead to severe and permanent neurological deficits. Tissue engineering is the most hopeful treatment by providing a regenerative environment in the CNS after injury as well as delivering cells to the injured site. Artificial scaffolds not only provide a suitable support for axonal regeneration and cellular migration, but delivery many bioactive molecules for neural repair. In this review we discuss the development of scaffolds and current strategies for designing scaffolds for CNS tissue engineering.

Key words: central nervous system (CNS) injury; tissue engineering; nanobiomaterial

1 前言

中枢神经系统(CNS)包括脑和脊髓, 可因缺血、出血、肿瘤、创伤等多种原因造成损伤, 引起大量神经细胞死亡、组织破坏, 严重影响感觉、运动和植物神经功能。其发病率、致残率高, 往往导致残疾等严重后遗症, 使病人生活质量显著降低。

由于中枢神经系统的再生能力有限, 成熟的神经元不能增殖分裂以替代损伤的细胞; 并且受损伤组织内又产生了抑制神经细胞和轴突生长的环境, 因此使其自身修复难以实现, 中枢神经系统损伤的治疗一直是世界性难题。

脑和脊髓损伤灶往往形成液化坏死腔, 有一定容积, 这使植入组织工程支架治疗成为可能。组织工程支架不仅可以填充组织缺损, 有利于内源性和外源性细胞依附、迁移和生长, 还能通过修饰各种活性物质来调控损伤灶周边微环境, 例如释放神经营养因子, 中和再生抑制因子, 调控神经干细胞、神经元、胶质细胞, 诱导轴突生长等, 建立一个适宜神经再生的环境, 突破种种再生障碍, 实现神经再生。目前在中枢神经损伤修复生物材料方面已经开展了大量工作, 在此, 我们对该领域国内外最新研究进展进行综述。

2 中枢神经损伤后神经病理学变化

临床上, 根据中枢神经的损伤病变发生的规律, 分为2个主要阶段: 原发性和继发性损伤。受损伤后瞬间引起的组织损害为原发性损伤; 在原发损伤基础上发生的多种因素参与的, 序列性组织自毁性破坏的过程称为继发性损伤, 主要因细胞凋亡, 微循环障碍, 小血管破

收稿日期: 2012-03-31

基金项目: 科技部973计划项目(2011CB606205); 国家自然科学基金资助项目(81070977)

作者简介: 王颖, 女, 1974年生, 助理研究员

通信作者: 崔福斋, 男, 1945年生, 教授, 博士生导师

裂出血, 自由基损害, 氨基酸兴奋性毒性, 钙超载, 电介质失衡和炎症等引起, 产生的组织破坏程度有时甚至超过原发性损伤^[1]。损伤数周后, 逐渐形成坏死腔, 周围被胶质瘢痕包裹^[2]。

众所周知, 中枢神经系统难以修复涉及内在、外在两方面原因, 内在原因主要是脑和脊髓内神经细胞缺少再生能力, 不能通过成熟神经细胞的分裂增殖来补充损失的细胞, 细胞一旦损伤死亡, 缺失是永久性的。外在原因则是损伤部位会形成抑制神经再生的环境(图 1), 包括多个方面: ①受损细胞的髓鞘会产生大量的抑制轴突生长的因子, 如 Nogo, 髓鞘相关蛋白(MAG)和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(OMgp)等。②损伤部位缺乏促进细胞再生的神经营养因子。③缺乏引导神经元轴突生长的相关胶质细胞支持。④损伤局部胶质细胞增生及瘢痕形成, 阻碍神经纤维再生。⑤缺乏少突胶质细胞形成髓鞘。⑥局部微循环差。以及⑦其它调控神经再生分子匮乏等。这些因素共同作用造成了中枢神经损伤修复的困难。

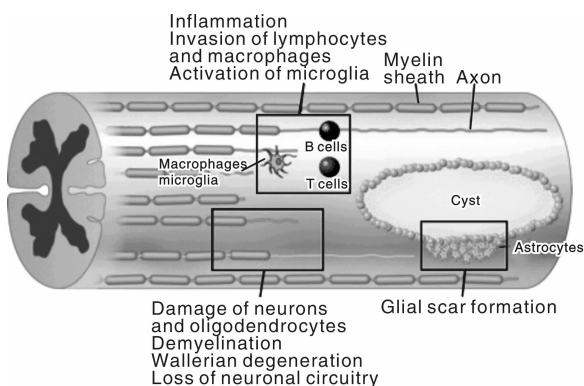


图 1 中枢神经系统损伤后局部病变示意图

Fig. 1 The neuropathology of central nervous system injury

3 中枢神经系统组织工程材料研究进展

组织工程技术为解决中枢神经再生障碍提供了极具希望的途径, 通过人工生物支架来填充损伤组织, 结合并释放活性因子, 减轻炎症反应, 减轻瘢痕形成, 支持种子细胞, 达到改善微环境, 促进神经细胞再生的目的。从国内外已经开展的多项用组织工程技术修复脑和脊髓损伤的研究看, 该技术已经显示出明显的优势, 也成为研究的热点。我们将重点总结水凝胶、纳米纤维等研究前沿的材料。

3.1 水凝胶

水凝胶是高分子通过物理或化学作用相互交联形成的网络支架, 它富含水分, 具有多孔结构, 有利于物质交换, 细胞依附及其突起的生长延伸。水凝胶可通过调

节交联度达到与脑和脊髓组织相当的力学性能, 纳米结构又与细胞外基质相似, 因而在中枢神经修复中最受欢迎, 研究也最为广泛。目前已研究了多种高分子水凝胶, 按主成分来源可分为天然和合成高分子两大类。

3.1.1 天然高分子水凝胶

3.1.1.1 透明质酸水凝胶

透明质酸(Hyaluronic Acid)是大分子的线性粘多糖, 是细胞外基质的主要成分, 构成基质的骨架结构, 尤其在中枢系统细胞外基质内含量丰富^[3]。透明质酸以其独特的分子结构和理化性质在机体内显示出多种重要的生理功能, 如伤口愈合, 细胞迁移等, 目前已被广泛应用于手术后防粘连, 关节润滑, 医疗美容等方面。作为神经组织工程支架材料有良好的生物相容性和多种生物功能, 展示了广泛的应用前景。

Cui 的研究小组首先将透明质酸用于脑和脊髓损伤修复研究, 发现了这种天然高分子在神经修复方面的重要作用和应用价值。他们用化学交联的方法将其制备为疏松多孔的水凝胶支架模拟中枢神经系统细胞外基质结构(图 2), 并修饰各种活性分子, 取得了良好的效果。如在交联的透明质酸水凝胶上连接细胞外基质成分层粘连蛋白(Laminin), 将其移植到大鼠脑皮质, 发现该水凝胶能抑制损伤灶周边胶质瘢痕产生, 促使细胞和血管长入到支架内, 并且还能促进损伤灶内神经纤维的生长^[4]; 另外, 用多聚赖氨酸(Poly-D-Lysine, PLL)修饰的透明质酸水凝胶表现出良好的神经细胞亲和性, 神经细胞能在支架内生长形成网络; 同时, 在动物脑创伤修复研究与脑组织也有良好的相容性^[5]。此外, 由于透明质酸分子具有多种化学结合位点, 在凝胶上还能同时修饰多种有利于神经修复的活性分子以促进神经再生, 如在凝胶内接枝 Nogo 受体抗体, 使之持续缓慢释放, 能特异性拮抗中枢神经损伤后多种再生抑制分子的作用, 在脑和脊髓损伤的修复研究中都观察到支架释放的抗体可诱导和促进神经元和轴突生长, 在支架内能够观察到长入的神经元和神经纤维, 明显提高了损伤修复的效果^[6-7]。再者, 透明质酸凝胶还能与载有生物活性大分子的聚乳酸聚乙醇酸共聚物(PLGA)微球制备成缓释体系, 有效缓释神经营养因子等活性分子, 对细胞的调控和局部再生环境的调节起到重要作用^[8]。并且, 经修饰的透明质酸水凝胶对神经干细胞也有支持和调控作用, 干细胞不仅能在凝胶支架上粘附、增殖, 还能分化为较高比例的神经元^[9]。因此, 透明质酸水凝胶体系在中枢神经系统修复方面具有很多优势。

3.1.1.2 壳聚糖水凝胶

壳聚糖(Chitosan)由广泛存在于甲壳类动物外壳中

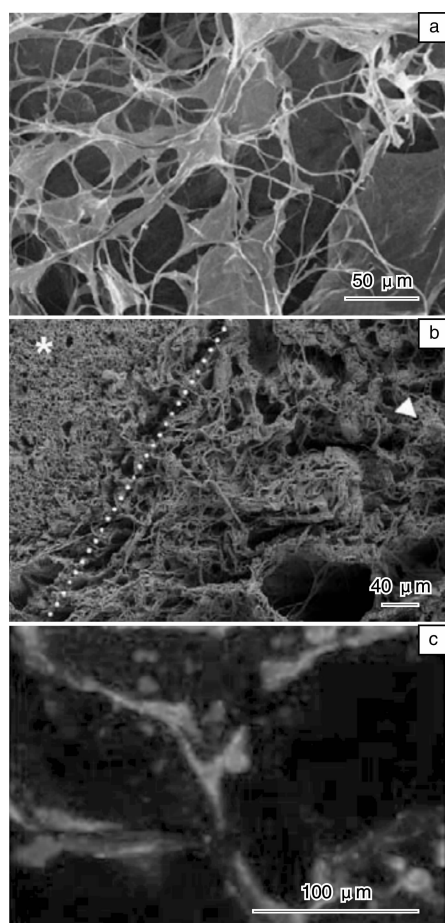


图2 (a)透明质酸水凝胶扫描电镜形貌, (b) Laminin 修饰透明质酸水凝胶修复脑损伤扫描电镜, 可见脑组织(*)与水凝胶(Δ)的界面整合良好, 细胞迁移到凝胶内部, (c)海马神经元在修饰 PLL 和 NgR 水凝胶上生长良好

Fig. 2 (a) The hyaluronic acid hydrogel morphology by SEM, (b) The repair of rat brain injury by hyaluronic acid hydrogel modified by laminin. It showed the good biocompatibility of hydrogel (Δ) with the brain tissue (*), and (c) the neurons of hippocampus grew well on the scaffold of hyaluronic acid hydrogel modified by PLL and NgR antibodies

的甲壳素(Chitin)脱乙酰形成, 是一种应用十分广泛的组织工程材料, 常用于皮肤、骨、肝脏等的有关研究^[10]。在神经修复中进行了大量研究, 结果发现壳聚糖与雪旺细胞、神经干细胞等有很好的亲和性^[11-12]。Li 等用壳聚糖套管填充胶原凝胶修复大鼠脊髓损伤, 发现该方法能诱导神经纤维在套管内生长到达损伤远端, 对脊髓损伤修复, 神经功能恢复有很大帮助(图3)^[13]。利用壳聚糖支架或微球作为载体治疗脑损伤的研究中也发现该材料有良好的生物相容性, 能够传递药物, 携带细胞, 对脑损伤有一定程度的修复作用^[14-15]。但也有研究发现, 壳聚糖作为植入性材料用于脑后, 可激活巨

噬细胞引起炎症反应, 对神经元可能会产生负面作用, 这可能限制其在中枢神经系统内的应用^[16]。如果用透明质酸对壳聚糖支架进行修饰, 则可大大降低这种炎症反应, 从而提高修复效果^[17]。

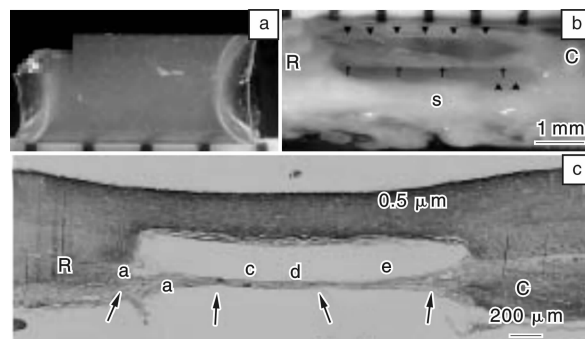


图3 壳聚糖套管填充胶原凝胶修复大鼠脊髓损伤研究: (a)显示材料形貌, (b, c)显示材料移植到脊髓损伤灶有利于神经纤维的长入

Fig. 3 Repair of spinal cord injury by chitosan tube filled with collagen gel: (a) chitosan tube filled with collagen gel and (b, c) the implantation in adult rats

3.1.1.3 海藻酸水凝胶

海藻酸(Alginate)是存在于褐藻中的一种多糖, 是 β -D-甘露糖醛酸(简称M)和 α -L-古洛糖醛酸(简称G)通过 $\beta(1-4)$ 糖苷键连接形成的一类线形阴离子聚合物。因具有良好的生物相容性和可吸收性, 也常用作组织工程修复材料^[18]。用海藻酸凝胶修复大鼠脊髓横断损伤研究中发现有上下行轴突纤维再生现象, 并且能形成突触, 说明海藻酸对脊髓损伤后轴突的再生有明显的支持作用^[19]。

3.1.1.4 胶原水凝胶

胶原蛋白(Collagen)是细胞外最重要的水不溶性纤维蛋白, 是构成细胞外基质的骨架成分, 具有良好的组织相容性和生物可降解性。目前已作为医用生物材料广泛应用于止血、整形、药物释放、手术缝线等方面, 在脑和脊髓修复, 神经重建应用方面也有很多研究。胶原凝胶可作为独立的组织工程支架填充组织缺损; 也能作为神经干细胞等细胞的载体进行移植修复脑和脊髓损伤; 还能用做药物缓释载体, 如移植到损伤灶内缓释NT-3, 对动物神经功能恢复有很大帮助^[20]。

3.1.1.5 其他天然高分子水凝胶

神经修复的研究中还采用其他多种天然高分子, 如琼脂糖(Agarose)、甲基纤维素(Methylcellulose)等, 这些材料同样具有良好的生物相容性, 然而由于琼脂糖、甲基纤维素在体内不能被降解, 所以应用受到一定限制。

3.1.2 人工合成分子水凝胶

由于人工合成高分子具有易得、价低、易制备、无免疫源性等优点,也常用于神经损伤修复生物材料研究,在中枢神经修复领域已研究了多种合成高分子水凝胶。

聚(甲基丙烯酸羟乙酯)(Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate), pHEMA)交联后有很好吸水性,营养物质、气体易于渗透,还能容纳细胞。将其制备为纵行管状结构植入到大鼠脊髓损伤灶后,观察到管内有轴突生长的现象(图 4)^[21],显示了其修复脊髓损伤的潜力。

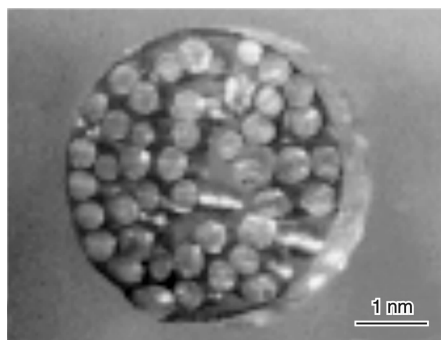


图 4 用于脊髓修复的有纵向管道的 pHEMA 水凝胶

Fig. 4 Optical image of pHEMA scaffolds with channels for spinal cord

聚[N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺](Poly[N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide], pHPMA)较 pHEMA 生物相容性好,用 pHPMA 水凝胶治疗猫脊髓横断损伤时观察到胶质细胞、血管和轴突都能长入到凝胶内,可明显减少胶质瘢痕形成,减轻损伤远侧的髓鞘退变^[22]。用含 RGD 短肽的 pHPMA 水凝胶携带间充质干细胞移植治疗脊髓损伤 5 周后也成功桥接了脊髓缺损,改善了部分脊髓功能^[23]。

聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)是一种低毒性高分子,与 pHEMA 相比具有能够被生物降解的优点,可用作神经营养因子的载体。可通过调节 PEG 凝胶交联程度调控因子释放行为,例如,将其用于神经营养因子(NT-3)的缓释,植入脊髓损伤灶后因子能持续缓释 2 周,大大促进了轴突的再生^[24]。

聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid), PLGA)是一种无毒性,生物相容性良好,可吸收的高分子材料,在生物体内能降解代谢,性能优良,因此被广泛用于药物缓释和组织工程修复材料。有报道显示,将 PLGA 制备为微球载体携带干细胞注入到大鼠脑梗塞灶,注入体可与脑组织整合,可能成为促进脑损伤修复有效的方法^[25]。

3.2 静电纺丝支架

静电纺丝技术能制成亚微米或纳米超细纤维,生成

的纤维支架与天然细胞外基质纳米结构相近,有比表面积大,孔隙率高,纤维直径和孔隙尺寸小等优点,对组织的再生与修复,细胞的体外大规模扩增,新型药物的研发等都有重要的影响,在中枢神经修复领域已有研究和应用。

3.2.1 天然纤维支架

胶原、层粘连蛋白、壳聚糖是研究最广泛的用于静电纺丝的天然分子。有研究显示壳聚糖纳米纤维能支持神经干细胞增殖,并且长出大量的神经突起^[26]。在体内植入,实验显示新生的神经和血管可沿壳聚糖纤维生长^[27]。并且,在纤维内能携带药物进行释放,如 6-氨基烟酰胺,可以有效抑制胶质细胞增生形成瘢痕,促进神经突起的生长,对脑损伤修复会有所帮助^[28]。

3.2.2 合成纤维支架

利用静电纺丝技术制备的人工合成高分子纤维支架有很多种,并且已经广泛应用于各种组织修复研究,在中枢神经损伤中也有一定效果。如聚乳酸(Poly-L-Lactic Acid, PLLA)纤维支架有助于引导背根节神经元生长,建立纤维联系^[29],在中枢神经损伤后对内源和外源移植的神经细胞的引导和再生都有很大帮助^[30]。将有取向性的 PLLA 纳米纤维支架移植到大鼠 3 mm 胸髓全断缺损区,可以极大促进再生的轴突长距离生长^[31]。另外,很多研究发现多种纳米纤维支架对神经干细胞都有很好的支持和引导作用。例如在聚氨基甲酸酯静电纺丝支架上培养人胚胎干细胞(hESC),细胞可以粘附在纤维上生长,并且这种纳米结构有利于诱导 hESC 分化为多巴胺能神经元^[32]。在其他研究中也类似发现,如聚己丙酰胺(PCL)电纺丝支架也可以诱导小鼠胚胎干细胞分化为神经细胞,并且增加神经突起生长的数量^[33]。这表明人工合成高分子静电纺丝支架在中枢神经修复方面可能会有所突破。

3.3 自组装多肽支架

自然界中广泛存在蛋白质自组装现象,利用天然蛋白质氨基酸序列-多肽自组装设计生物仿生材料是近年兴起的一个热门研究领域。通过合理调控多肽的分子结构以及改变外界的环境,多肽分子可以利用氢键,疏水性作用、 $\pi-\pi$ 堆积作用等非共价键力自发或触发地自组装形成形态与结构特异的组装体。由于多肽自身具有良好的生物相容性和可控的降解性能,利用多肽自组装技术构建的各种功能性材料在药物控制释放,组织工程支架材料以及生物矿化等领域有很好的应用前景^[34]。

近期,自组装多肽支架也成为很有应用前景的中枢神经组织工程材料。美国 MIT 的 Zhang 组开发的自组装多肽纳米纤维水凝胶 RADA16-I 不仅能诱导海马神经元

的增殖、迁移,还能促进其分化形成突触^[35-36]。在脑损伤修复模型研究中被证明能够修复光学通路和视觉功能。在移植到横断脊髓背侧束的大鼠体内,观察到了细胞的迁入,血管和轴突的增生。美国西北大学 Stupp 组发现含有 IKVAV 多肽的两亲性自组装纳米材料可以抑制神经干细胞向胶质细胞分化,促进神经元轴突生长,以及脊髓损伤区域神经纤维的再生^[37]。此外,在体内修复脊髓损伤实验中也发现将自组装多肽注射到损伤灶后能抑制胶质细胞过度反应和瘢痕形成,并能促进上下行神经纤维再生,使神经功能有很大程度改善^[38]。这些研究结果展示了自组装多肽在促进神经细胞和神经纤维生长,神经功能恢复方面的治疗前景。

4 中枢神经修复生物材料设计的前沿策略

4.1 发挥材料的细胞接触导向作用

组织细胞在培养基质上运动的线路被基质的性质所规定,即接触导向现象,这为材料的设计提供了思路。研究发现,细胞外基质中多种信号对细胞粘附、迁移、生长、分化都起到重要作用。因此,模拟细胞外基质是中枢神经修复材料设计的一个重要方向。通过在物理、化学、微观和宏观结构方面的模拟,有可能对细胞的各种生物学行为进行人为控制,使之有利于神经组织的修复。

4.1.1 材料表面的化学修饰

研究发现,细胞对其周围的化学环境极为敏感,在各种化学因素中,有关材料表面的化学官能团对细胞的影响研究最为深入。目前已经证实,不同的化学官能团表面可影响多种细胞行为,包括骨髓基质干细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、脂肪干细胞等^[39-42]。在对神经干细胞的调控方面也显示了明显的作用,如在氨基表面细胞的粘附、迁移率均较高,而在羧基表面的神经元分化率较高^[43]。这些结果提示不同化学官能团对细胞有不同影响,也为生物材料的个性化、功能化设计提供了新的思路。

4.1.2 材料粘弹性的调控

材料的粘弹性对细胞行为也有很大影响。例如骨髓基质干细胞在不同弹性模量的基质中生长分化方向会明显不同,在与脑组织近似的软质凝胶中培养能诱导分化出神经细胞,而在近似肌肉相对较硬的凝胶中则能向肌源性细胞分化^[44]。对神经干细胞调控方面也有类似发现,神经元生长最适合的弹性模量约为数百帕,这个数值恰好与脑组织性质非常接近^[45];相对神经元而言,胶质细胞在软质表面生长会受抑制。这样看来,通过粘

弹性的设计有可能得到预期的中枢神经修复材料。

4.1.3 材料宏观结构设计

在中枢神经修复研究中,材料的宏观结构也备受重视,这些结构设计主要针对脑或脊髓的解剖结构特点进行模拟,以达到仿生目的。研究证实,材料结构的仿生性对神经修复的确有调控的效果。例如,比较不同设计的脊髓修复支架发现,具有纵行长管状构造的支架对损伤轴突的长距离诱导作用最好,也能更好地诱导细胞迁移和血管长入^[46]。这提示我们在材料设计时要尽量模拟所修复部位的组织结构,以达到最佳修复效果。

4.1.4 材料微观结构的设计

目前的研究常采用微图案、微流道、电纺丝等方法对材料进行微米级甚至纳米级的设计,用于模拟细胞外基质纳米结构引导细胞的迁移和轴突生长。例如神经纤维在规整排列的纳米纤维上生长有取向性,会沿着纳米纤维的走行方向生长^[47]。此外,干细胞分化也会受到纳米纤维排列规律的影响,在有序的纳米纤维上骨髓基质干细胞、胚胎干细胞更倾向于分化为神经元,并且会引起细胞信号传导的变化^[48-49]。因此,在中枢神经修复材料微观结构设计方面更应考虑这一因素对细胞行为的影响。

4.2 利用材料传递生物活性大分子

中枢神经损伤病变复杂,局部微环境不但缺乏神经营养因子等再生必须的活性物质,而且还在局部产生再生抑制因子、炎症因子等不利因素,因此,对中枢神经损伤的修复需要向局部环境中补充相应的治疗性生物活性物质,才能达到理想的修复效果。

4.2.1 拮抗再生抑制因子

如前所述,脑和脊髓损伤后由于髓鞘崩解产生的 Nogo,髓鞘相关蛋白(MAG)和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(OMgp)等再生抑制因子共同作用于 Nogo 受体(NgR),通过激活 Rho/ROCK 信号通路改变细胞骨架使神经细胞、神经纤维再生受到抑制。因此,阻断这一通路将对脑和脊髓内神经再生起重要作用。多项研究表明,在神经修复材料内添加活性物质起到了明显的促进神经再生作用。如将 NgR 的抗体连接到透明质酸水凝胶上进行缓释,可明显促进神经元轴突生长;植入脑损伤灶可促进脑内神经元的迁移,诱导神经纤维生长;在脊髓内也明显促进损伤两端神经纤维的生长,得到了很好的修复效果^[6,7,50]。如果将这一通路的主要作用靶点的分子引入材料设计中,可能会得到意想不到的修复效果。

4.2.2 减轻炎症反应药物

减轻炎症反应是中枢神经损伤后常规的疗法,利用

生物材料传递抗炎药物可在局部产生较好的疗效,并且降低全身应用药物的副作用。例如利用琼脂糖凝胶和 PLGA 纳米粒在脊髓损伤局部释放抗炎药物甲基泼尼松,7 d 后使损伤灶体积明显减小^[51]。因此,在中枢修复材料应用中,尤其是急性期修复过程中,可以考虑将抗炎药物的缓释作为一种辅助的疗法。

4.2.3 传递神经营养因子

神经营养因子在损伤后保护神经细胞,促进神经再生方面有重要的、无可替代的作用。然而该类分子在脑或脊髓内直接应用受到很多限制,如半衰期过短,不能通过血脑屏障等。生物材料有利于解决该类生物活性大分子应用的问题,已有大量研究表明在各种材料内,采用不同方法携带释放神经营养因子等活性分子进行中枢神经修复,已取得良好效果并展示了很好的应用前景。如采用包封技术、高分子载体技术、固定化技术、肝素结合技术等将不同神经营养因子进行缓释,包括 NT-3, NGF, BDNF, GDNF, EGF, VEGF 等等,用于多种类型脑和脊髓损伤的修复,在神经细胞保护、干细胞增殖、诱导、神经纤维生长等多方面取得了众多成果,达到良好的修复效果^[52]。因此,材料设计可根据损伤部位、时机等不同需要引入神经营养因子来促进神经损伤修复。

4.3 传递细胞

由于中枢神经系统内神经细胞不能增殖这一特殊性,组织和细胞缺损,尤其是大范围的缺损难以通过自身修复实现,因而往往需要补充外源性细胞。实验表明,多种细胞可用于中枢神经损伤的修复,替代受损的神经细胞。脑内通常应用的有神经干细胞、骨髓基质干细胞、胚胎干细胞等;在脊髓内除以上细胞外,常用的还有雪旺氏细胞、嗅鞘细胞等。实验发现,如果用生物支架来携带细胞进行移植,往往比单纯的细胞悬液注射移植效果好,植入细胞能在支架材料上依附生长,可提高植入细胞的生存率,改善其生存状态,并对增殖和分化行为有一定的诱导作用,因而可收到事半功倍的良好修复效果。

4.4 细胞外基质蛋白修饰

细胞外基质为细胞提供一种富含生物调控因素的三维环境,并且能对细胞的生物学行为进行调节。在生物材料上修饰细胞外基质蛋白,不仅能模拟组织细胞外基质的结构,还能从功能上促进细胞粘附、迁移、增殖,调控细胞的分化^[53]。

4.4.1 细胞外基质大分子修饰

胶原(Collagen)、纤维粘连蛋白(Fibronectin)、层粘连蛋白(Laminin)是最常用的细胞外基质修饰蛋白。修

饰这类蛋白使支架材料有更好的生物相容性,也可增加对细胞调控的作用。例如,在 PLLA 电纺丝纤维表面包被 Laminin 蛋白使细胞粘附情况得到改善^[54]。另外,将蛋白分子共轭结合在支架上也是常用的修饰方法,比如将 I 型胶原分子连接到聚(甲基丙烯酸甲酯)和丙烯酸(PMMAA)支架上,使神经干细胞粘附和活力改善^[55],能抑制胚胎干细胞分化,维持干细胞特性^[56]。

4.4.2 细胞外基质内寡肽修饰

鉴于使用大分子蛋白容易传播疾病等局限性,在材料修饰方面有很多研究利用细胞外基质蛋白的活性多肽、寡肽片段来替代大蛋白分子,既能发挥蛋白质的功能、活性,同时又方便使用。

例如,用 YIGSR 寡肽修饰凝胶可在体内诱导轴突生长延长 2 倍,在 RGD 寡肽修饰的材料研究中也发现有类似发现。在对神经干细胞的调控研究中也显示出了活性,将神经前体细胞包在 IKVAV 修饰的纳米纤维中,约有 1/3 的细胞分化为神经元。该结果有重要意义,为中枢神经损伤修复提供了调控细胞的新方法^[57]。

4.5 导电材料

神经细胞的电活动是其实现功能的重要方式,因而材料的电学特点可能对神经细胞有一定的调节作用。实验发现导电材料在体内或体外能促进神经纤维的生长^[58]。聚吡咯(Polypyrroles)和碳纳米管及碳纳米纤维是中枢神经内常用的导电材料,不仅有良好的细胞亲和性^[59],后者还在纳米结构上与细胞外基质有相似性^[60],有很好的神经损伤修复应用前景。

5 结 语

中枢神经系统损伤后的病变特点决定了利用组织工程技术治疗该类损伤的必要性和重要性,复杂的病变使单一的治疗策略难以奏效,因此利用生物材料的优势,通过材料的设计和优化,将多种有效的修复方法结合起来,必将给中枢神经系统损伤修复和治疗带来新的希望。

参考文献 References

- [1] Yang Yongping(杨永平), Lin Jiangkai(林江凯), Feng Hua(冯华). 实验性脊髓损伤病理生理变化研究进展[J]. *Journal of Military Surgeon in Southwest China*(西南军医), 2006, 8(4): 69-72.
- [2] Tator C H. Update on the Pathophysiology and Pathology of Acute Spinal Cord Injury[J]. *Brain Pathology*, 1995, 5(4): 407-413.
- [3] Mori M, Yamaguchi M, Sumitomo S. Hyaluronan-Based Biomaterials in Tissue Engineering[J]. *Acta Histochemica et Cytochemica*,

- 2004, 37 (1): 1–5.
- [4] Hou S, Xu Q, Tian W, *et al.* The Repair of Brain Lesion By Implantation of Hyaluronic Acid Hydrogels Modified with Laminin [J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 148 (1): 60–70.
- [5] Tian W M, Hou S P, Ma J, *et al.* Hyaluronic Acid-Poly-D-Lysine-Based Three-Dimensional Hydrogel for Traumatic Brain Injury [J]. *Tissue Eng*, 2005, 11 (3–4): 513–525.
- [6] Tian W M, Zhang C L, Hou S P, *et al.* Hyaluronic Acid Hydrogel as Nogo-66 Receptor Antibody Delivery System for the Repairing of Injured Rat Brain; in Vitro [J]. *J Control Release*, 2005, 102 (1): 13–22.
- [7] Wei Y T, He Yu, Xu C L, *et al.* Hyaluronic Acid Hydrogel Modified with Nogo-66 Receptor Antibody and Poly-L-Lysine to Promote Axon Regrowth after Spinal Cord Injury [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 95 (1): 110–117.
- [8] Wang Y, Wei Y T, Zu Z H, *et al.* Combination of Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffold and PLGA Microspheres for Supporting Survival of Neural Stem Cells [J]. *Pharm Res*, 2011, 28 (6): 1 406–1 414.
- [9] Pan L, Ren Y, Cui F, *et al.* Viability and Differentiation of Neural Precursors on Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffold [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87 (14): 3 207–3 220.
- [10] Lee K Y, Ha W S, Park W H. Blood Compatibility and Biodegradability of Partially N-Acylated Chitosan Derivatives [J]. *Biomaterials*, 1995, 16 (16): 1 211–1 216.
- [11] Yuan Y, Zhang P, Yang Y, *et al.* The Interaction of Schwann Cells with Chitosan Membranes and Fibers in Vitro [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (18): 4 273–4 278.
- [12] Scanga I V, Goralchouk A, Nussaiba N. Biomaterials for Neural-Tissue Engineering-Chitosan Supports the Survival, Migration, and Differentiation of Adult-Derived Neural Stem and Progenitor Cells [J]. *Canadian Journal of Chemistry*, 2010, 88 (3): 277–287.
- [13] Li X, Yang Z, Zhang A, *et al.* Repair of Thoracic Spinal Cord Injury by Chitosan Tube Implantation in Adult Rats [J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (6): 1 121–1 132.
- [14] Shi W, Nie D, Jin G, *et al.* BDNF Blended Chitosan Scaffolds for Human Umbilical Cord MSC Transplants in Traumatic Brain Injury Therapy [J]. *Biomaterials*, 2012, 33 (11): 3 119–3 126.
- [15] Turkoglu Omer Faritk, Eroglu Hakan, Oktay G. Local Administration of Chitosan Microspheres after Traumatic Brain Injury in Rats; a New Challenge for Cyclosporine-a Delivery [J]. *British Journal of Neurosurgery*, 2010, 24 (5): 578–583.
- [16] Crompton K E, Tomas D, Finkelstein D I, *et al.* Inflammatory Response on Injection of Chitosan/GP to the Brain [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2006, 17 (7): 633–639.
- [17] Song Xueming (宋学明), Wu Chunbo (吴春波), Chen Zhiqiang (陈志强). 透明质酸修饰壳聚糖复合支架在大鼠脑皮质损伤修复中的作用 [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* (中国组织工程研究与临床康复), 2010, 14 (29): 5 355–5 362.
- [18] Barralet J E, Wang L, Lawson M, *et al.* Comparison of Bone Marrow Cell Growth on 2D and 3D Alginate Hydrogels [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2005, 16 (6): 515–519.
- [19] Suzuki Y, Kitaura M, Wu S, *et al.* Electrophysiological and Horseradish Peroxidase-Tracing Studies of Nerve Regeneration Through Alginate-Filled Gap in Adult Rat Spinal Cord [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 318 (3): 121–124.
- [20] Lu D, Mahmood A, Qu C, *et al.* Collagen Scaffolds Populated with Human Marrow Stromal Cells Reduce Lesion Volume and Improve Functional Outcome after Traumatic Brain Injury [J]. *Neurosurgery*, 2007, 61 (3): 596–602.
- [21] Tsai E C, Dalton P D, Shoichet M S, *et al.* Synthetic Hydrogel Guidance Channels Facilitate Regeneration of Adult Rat Brainstem Motor Axons after Complete Spinal Cord Transection [J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21 (6): 789–804.
- [22] Woerly S, Doan V D, Sosa N. Prevention of Gliotic Scar Formation by NeuroGel™ Allows Partial Endogenous Repair of Transected Cat Spinal Cord [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2004, 5 (2): 262–272.
- [23] Hejcl A, Sedy J, Kapcalova M, *et al.* HPMA-RGD Hydrogels Seeded with Mesenchymal Stem Cells Improve Functional Outcome in Chronic Spinal Cord Injury [J]. *Stem Cells Dev*, 19 (10): 1 535–1 546.
- [24] Piantino J, Burdick J A, Goldberg D, *et al.* An Injectable, Biodegradable Hydrogel for Trophic Factor Delivery Enhances Axonal Rewiring and Improves Performance after Spinal Cord Injury [J]. *Exp Neurol*, 2006, 201 (2): 359–367.
- [25] Bible E, Chau D, Alexander M, *et al.* The Support of Neural Stem Cells Transplanted into Stroke-Induced Brain Cavities by PLGA Particles [J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (16): 2 985–2 994.
- [26] Liu T, Teng W K, Chan B P, *et al.* Photochemical Crosslinked Electrospun Collagen Nanofibers; Synthesis, Characterization and Neural Stem Cell Interactions [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 95 (1): 276–282.
- [27] Wang W, Itoh S, Konno K. Effects of Schwann Cell Alignment along the Oriented Electrospun Chitosan Nanofibers on Nerve Regeneration [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 91A (4): 994–1 005.
- [28] Schaub N J, Gilbert R J. Controlled Release of 6-Aminonicotinamide from Aligned, Electrospun Fibers Alters Astrocyte Metabolism and Dorsal Root Ganglia Neurite Outgrowth [J]. *J Neural Eng*, 2011, 8 (4): 046 026.
- [29] Corey J M, Lin D Y, Mycek K B. Aligned Electrospun Nanofibers Specify the Direction of Dorsal Root Ganglia Neurite Growth [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007,

- 83A (3): 636–645.
- [30] Gertz C C, Leach M K, Birrell L K, *et al.* Accelerated Neurogenesis and Maturation of Primary Spinal Motor Neurons in Response to Nanofibers[J]. *Dev Neurobiol*, 2010, 70 (8): 589–603.
- [31] Hurtado A, Cregg J M, Wang H B. Robust CNS Regeneration after Complete Spinal Cord Transection Using Aligned Poly-L-Lactic Acid microfibers[J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (26): 6 068–6 079.
- [32] Carlberg B, Axell M Z, Nannmark U. Electrospun Polyurethane Scaffolds for Proliferation and Neuronal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells[J]. *Biomedical Materials*, 2009, 4 (4): 045004.
- [33] Xie J, Willerth S M, Li X, *et al.* The Differentiation of Embryonic Stem Cells Seeded on Electrospun Nanofibers into Neural Lineages[J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (3): 354–362.
- [34] Chen Ting(陈 婷), Lu Tingli(卢婷利), Wang Yunqing(王韵晴), *et al.* 多肽自组装及其在生物医学中的应用[J]. *Materials Review*(材料导报), 2011, 25 (10A): 90–95.
- [35] Semino C E, Kasahara J, Hayashi Y. Entrapment of Migrating Hippocampal Neural Cells in Three-Dimensional Peptide Nanofiber Scaffold[J]. *Tissue Eng*, 2004, 10 (3–4): 643–655.
- [36] Holmes T C, Lacalle S D, Su X. Extensive Neurite Outgrowth and Active Synapse Formation on Self-Assembling Peptide Scaffold[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (12): 6 728–6 733.
- [37] Silva G A, Czeisler C, Niece K L, *et al.* Selective Differentiation of Neural Progenitor Cells by High-Epitope Density Nanofibers[J]. *Science*, 2004, 303 (5 662): 1 352–1 355.
- [38] Tysseling-Mattiace V M, Sahni V, Niece K L. Self-Assembling Nanofibers Inhibit Glial Scar Formation and Promote Axon Elongation after Spinal Cord Injury[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2008, 28 (14): 3 814–3 823.
- [39] Phillips J E, Petrie T A, Creighton F P, *et al.* Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation on Self-Assembled Monolayers Presenting Different Surface Chemistries[J]. *Acta Biomater*, 6 (1): 12–20.
- [40] Fauchaux N, Schweiss R, Lutzow K, *et al.* Self-Assembled Monolayers with Different Terminating Groups as Model Substrates for Cell Adhesion Studies[J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (14): 2 721–2 730.
- [41] Barbosa J N, Barbosa M A, Aguas A P. Adhesion of Human Leukocytes to Biomaterials: an in Vitro Study Using Alkanethiolate Monolayers with Different Chemically Functionalized Surfaces[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 65 (4): 429–434.
- [42] Inoue S, Imamura M, Umezawa A, *et al.* Attachment, Proliferation and Adipogenic Differentiation of Adipo-Stromal Cells on Self-Assembled Monolayers of Different Chemical Compositions[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008, 19 (7): 893–914.
- [43] Ren Y J, Zhang H, Huang H, *et al.* In Vitro Behavior of Neural Stem Cells in Response to Different Chemical Functional Groups[J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (6): 1 036–1 044.
- [44] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, *et al.* Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification[J]. *Cell*, 2006, 126 (4): 677–689.
- [45] Saha K, Keung A J, Irwin E F. Substrate Modulus Directs Neural Stem Cell Behavior[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 95 (9): 4 426–4 438.
- [46] Scott J B, Afshari M, Kotek R. The Promotion of Axon Extension in Vitro Using Polymer-Templated Fibrin Scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (21): 4 830–4 839.
- [47] Cooper A, Bhattarai N, Zhang M. Fabrication and Cellular Compatibility of Aligned Chitosan-PCL Fibers for Nerve Tissue Regeneration[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 85 (1): 149–156.
- [48] Xie J, Willerth S M, Li X. The Differentiation of Embryonic Stem Cells Seeded on Electrospun Nanofibers[J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (3): 354–362.
- [49] Wang Y, Yao M, Zhou J, *et al.* The Promotion of Neural Progenitor Cells Proliferation by Aligned and Randomly Oriented Collagen Nanofibers Through Beta1 Integrin/MAPK Signaling Pathway[J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (28): 6 737–6 744.
- [50] Hou S, Tian W, Xu Q, *et al.* The Enhancement of Cell Adherence and Inducement of Neurite Outgrowth of Dorsal Root Ganglia Co-Cultured with Hyaluronic Acid Hydrogels Modified with Nogo-66 Receptor Antagonist in Vitro[J]. *Neuroscience*, 2006, 137 (2): 519–529.
- [51] Chvatal S A, Kim Y T, Bratt-Leal A M, *et al.* Spatial Distribution and Acute Anti-Inflammatory Effects of Methylprednisolone after Sustained Local Delivery to the Contused Spinal Cord[J]. *Biomaterials*, 2008, 29 (12): 1 967–1 975.
- [52] Mo L, Yang Z, Zhang A, *et al.* The Repair of the Injured Adult Rat Hippocampus with NT-3-Chitosan Carriers[J]. *Biomaterials*, 2009, 31 (8): 2 184–2 192.
- [53] Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, *et al.* Guidance of Glial Cell Migration and Axonal Growth on Electrospun Nanofibers of Poly-Epsilon-Caprolactone and a Collagen/Poly-Epsilon-Caprolactone Blend[J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (19): 3 012–3 025.
- [54] Koh H S, Yong T, Chan C K, *et al.* Enhancement of Neurite Outgrowth Using Nano-Structured Scaffolds Coupled with Laminin[J]. *Biomaterials*, 2008, 29 (26): 3 574–3 582.
- [55] Li W S, Guo Y, Wang H. Electrospun Nanofibers Immobilized with Collagen for Neural Stem Cells Culture[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008, 19 (2): 837–854.
- [56] Hashemi S M, Soudi S, Shabani I, *et al.* The Promotion of Stemness and Pluripotency Following Feeder-Free Culture of Embryonic Stem Cells on Collagen-Grafted 3-Dimensional Nanofibrous Scaffold[J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (30): 7 363–7 374.

- [57] Silva G A, Czeisler C, Niece K L. Selective Differentiation of Neural Progenitor Cells by High-Epitope Density Nanofibers[J]. *Science*, 2004, 303 (5 662): 1 352 – 1 355.
- [58] Kems J M, Fakhouri A J, Weinrib H P. Depolarization Stimulates Lamellipodia Formation and Axonal but not Dendritic Branching in Cultured Rat Cerebral Cortex Neurons[J]. *Neuroscience*, 1991, 40 (1): 93 – 107.
- [59] Schmidt C E, Shastri V R, Vacant J P, *et al.* Stimulation of Neurite Outgrowth Using an Electrically Conducting Polymer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94 (17): 8 948 – 8 953.
- [60] Tran P A, Zhang L, Webster T J. Carbon Nanofibers and Carbon Nanotubes in Regenerative Medicine[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61 (12): 1 097 – 1 114.

打印技术制备高分子的移植器官

德国科学家开发出一种生物相容的可打印的高分子材料，从而可以利用三维打印技术制备移植用的器官。

应用于组织工程的生物材料需要满足各种各样的要求，包括材料表面的物理化学性质、可设计性、功能化和生物相容性。此外，组织工程中的生物支架是作为模板来指导组织的生成，其内部孔隙网络和它外部几何结构都需要得到精密的控制来促进细胞迁移和成功的血管化。为了实现这些目标，生成组织工程支架的新方法将重点放在了快速成型(rapid prototyping, RP)技术上。利用层层自组装的加工方式制备的组织工程支架，通过一些适当的安排和设计，能够与体内需要的孔隙度和机械强度相匹配。然而，某些已经成功应用于血管植入的常规材料并不适合使用RP技术进行加工。目前非常迫切地需要一种新的可加工的生物材料，在增强细胞粘附的同时，其粘度和表面张力还能满足3D打印加工技术的要求。

在斯图加特和波茨坦的弗劳恩霍夫研究院 (Fraunhofer Institutes)，与斯图加特大学和维尔茨堡大学一同努力，开发了一种生物相容的聚丙烯网络，可以通过 3D 打印加工的方法制备人造组织支架。科学家们设计了两种高分子材料，可以满足印刷工艺的流变要求。他们使用了一种生物相容性好的可溶性光引发剂来控制 UV 光固化，并且与目前研究材料的各种性质进行了比较。

在这项研究中，科学家们制备了不同的聚合物表面并且接种了细胞进行培养。并通过评估细胞的生长，生存状态和功能，研究了细胞 - 材料之间的相互作用和生物相容性。他们的结果表明，这些材料不仅满足 RP 加工工艺的要求，而且具有很好的细胞生物活性。

基于各种优良的特性,这种新型混合聚合物很有希望成为未来组织工程中支架设计和制备的备选材料。在即将开展的工作中,科学家们将继续研究这种材料的各种可调性能,如拉伸模量和拉伸强度,以及使用特殊的细胞生长因子进行表面修饰,用于增强细胞粘附。

(来源: Materials Views)