

特约专栏

海藻酸钠水凝胶中粘附位点及空间构建 促进 MG-63 细胞铺展及成骨分化

孙 静, 卫 丹, 朱禹达, 钟美玲, 左一聪, 范红松

(四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心, 四川 成都 610064)

摘 要: 细胞粘附与铺展是三维水凝胶基质中贴壁依赖型细胞存活所必须的两个条件, 将细胞粘附位点的引入和凝胶中细胞铺展空间的构建相结合, 提出了同时含有 RGD 多肽和明胶微球的粘附型大孔水凝胶模型, 以促进细胞在其中的铺展与分化。该模型采用光交联海藻酸钠水凝胶为基础, 同时引入 RGD 多肽和明胶微球, 通过 RGD 多肽的共价接枝为细胞粘附提供前提, 利用明胶微球在 37 °C 下的快速降解性, 为细胞的进一步增殖和铺展以及分化提供所需空间。结果显示, 明胶微球的加入提高了凝胶的力学性能, 同时降低了凝胶的溶胀率。RGD 和明胶微球的引入能够很好地支持 MG-63 细胞在其中的增殖、粘附与铺展, 并显著提高其碱性磷酸酶活性, 上调成骨相关基因 (BMP-2, COL-I 和 OCN) 的表达。而在不含微球的 RGD-ALG 和 ALG 凝胶中, 细胞铺展及成骨分化均受到很大抑制。

关键词: 水凝胶; 明胶微球; RGD; 细胞铺展; 成骨分化

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2013)10-0623-07

The Construct of Cell Adhesion Sites and Degradation Space in Alginate Hydrogels to Enhance Spreading and Osteogenic Differentiation of MG-63 Cells

SUN Jing, WEI Dan, ZHU Yuda, ZHONG Meiling, ZUO Yicong, FAN Hongsong

(National Biomedical Materials Engineering Technology Research Center, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Adhesion and spreading of anchorage-dependent cells are two essential factors for their subsequent settlement and commitment in 3D hydrogel substrate. An adhesive macroporous alginate hydrogel system was suggested here to overcome the low cell affinity and high cell constraint of hydrogel substrates for cells encapsulated in them. RGD peptide was grafted onto the alginate molecule to support cell adhesion and gelatin microspheres were introduced into photocrosslinked alginate hydrogels to create macropores by their degradation at 37 °C for cell spreading and facilitate cell ingrowth as well as prolonged cell survival within hydrogels. With the incorporation of gelatin microspheres, the hybrid alginate hydrogels exhibited significantly enhanced mechanical properties and decreased swelling ratios. MG-63 cells in alginate hydrogel cooperated with RGD and gelatin microspheres exhibited a rapid proliferation and spread gradually with prolonged culture time, and their osteogenic differentiation was greatly facilitated, such as the high expression of BMP-2, COL-I and OCN genes. While in the pure alginate hydrogel (ALG) and hydrogels only capable of cell affinity (RGD-ALG), cells could just exhibit either a rounded shape or a spreading morphology with a very limited degree, and the osteogenic differentiation was also inhibited.

Key words: hydrogel; gelatin microsphere; RGD; cell spreading; the osteogenic differentiation

1 前 言

水凝胶因具有与细胞外基质相类似的物理性质以及独特的细胞装载方式, 已被广泛地应用在组织工程及细胞装载领域。水凝胶作为细胞载体的独特优势在于能够实现原位注射, 有利于细胞和基质的均匀分布, 可任意塑型, 具有良好的生物相容性, 为细胞的营养输送及新

收稿日期: 2013-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071272, 51273121)

第一作者: 孙 静, 女, 1986 年生, 博士研究生

通信作者: 范红松, 女, 1968 年生, 教授, 博士生导师

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2013.10.07

陈代谢产物的排出提供良好的传输通道等等^[1]。作为组织工程应用,水凝胶类材料常被用于软骨组织缺损修复与重建^[2],这首先来源于凝胶材料和自然软骨相似的物理性质,其次,水凝胶网络结构中有限的孔径能够限制软骨细胞的迁移和铺展,这恰好能够使软骨细胞维持其固有的球形形态,有利于维持软骨细胞表型,从而防止软骨细胞的去分化。但对于再生医学中最常用的成纤维细胞、成骨细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等这类贴壁依赖型细胞来说,水凝胶的应用却受到很大的限制^[3]:细胞粘附与铺展是贴壁依赖型细胞存活所必须的两个条件,它们需要贴附于适当的基质表面才能正常生长并表现出铺展形态。而普通水凝胶缺少细胞贴附界面和亲和位点,大大影响了这类细胞在水凝胶中的存活,并且由于受到凝胶网络结构的限制,细胞铺展受到抑制只能表现为球形,因此常常会发生细胞凋亡,这成为凝胶类材料在细胞传输及组织工程应用中需要解决的首要问题。

细胞粘附作为细胞对材料的第一步响应,影响着细胞在生物材料上后续的铺展、迁移、分化、凋亡等行为^[4]。普通水凝胶,无论是合成高分子还是天然多糖类,由于缺乏合适的细胞/基质界面,一般都不能够支持贴壁类细胞的粘附与铺展。因此,许多研究试图通过引入粘附位点的方法以提高水凝胶的细胞亲和力,进而促进三维凝胶中的细胞粘附及细胞存活^[5]。这些方法可以归结为两类:1)化学基团修饰,通常是引入含细胞粘附位点或具有生物响应性的多肽类(如 RGD)^[6];2)与其他生物活性物质复合,如胶原^[7]、明胶^[8]等。

细胞在三维凝胶中除了受到生化信号分子的影响,同时还受到凝胶网络的物理束缚,凝胶网络对细胞的空间限制是阻碍细胞生长和组织形成的另一关键因素^[3,9]。引入细胞结合位点虽然可以为整联蛋白重组提供生物化学信号,但是由于凝胶网状结构的物理束缚,细胞仍然会被限制为球形。如具有活性粘附位点的胶原水凝胶可以很好地支持贴壁依赖型细胞在其表面的粘附,但在凝胶基质内部细胞不能表现出自然的拉伸/铺展状态,细胞分化功能也受到限制^[9-10]。研究发现,三维环境中恰当的空间界面构建对于细胞铺展具有重要作用:通过调控凝胶的降解特性,细胞铺展功能可以得到显著促进^[7,11-12]。因此,近年来关于在凝胶材料中细胞铺展空间的构建方面的研究越来越多,如特异性酶降解法^[13]、加入微制孔剂^[14]等,都可以达到在凝胶内制造空间和诱导孔穴形成的目的。此外,光降解凝胶^[15]的提出还能够实时调控凝胶组成,进而实现细胞行为的动态调控。

为获得适于组织工程构建的原位细胞复合水凝胶,

使其既具有恰当成型性能和初始力学强度,又具有促进细胞粘附和铺展进而促进细胞功能分化与表达的生物活性,本研究提出将细胞粘附位点的引入和凝胶中细胞铺展空间的构建相结合,制备同时含有 RGD 多肽并复合明胶微球的粘附型大孔水凝胶模型,以人成骨类细胞 MG-63 为模型细胞,考察其在三维水凝胶中的铺展、增殖及成骨分化功能。RGD 多肽的共价接枝为细胞粘附提供前提;明胶微球 37 °C 下快速降解,为细胞的进一步增殖和铺展以及分化提供空间。

2 实验材料和方法

2.1 试剂

海藻酸钠(Fluka);RGD 多肽: GCGYGRGDSPG(上海强耀生物科技有限公司);明胶,甲基丙烯酸酐, Ir-gacure 2959, FDA (Fluorescein Diacetate), PI (Propidium Iodide)和 MTT 均来自 Sigma 公司;其他未特殊注明的试剂均来自成都科龙试剂有限公司。

2.2 明胶微球的制备

70 °C 下,将 20 mL 浓度为 100 mg/mL 的明胶水溶液加入到 10 mL 的乙酸乙酯溶液中,700 rpm 搅拌 2 min 后,将混合溶液快速加入到 60 mL 食用油中,300 rpm 搅拌 1.5 min 得到乳状液。将乳状液转移至冰浴中快速冷却到 4 °C,300 rpm 继续搅拌 15 min 得到微球。将微球混合液再加入至预冷的乙醇溶液中搅拌 10 min,离心收集,并用丙酮反复清洗 5 次后空气中自然干燥,筛选得到 100 ~ 150 μm 的干燥明胶微球,使用前用 PBS 充分浸泡,离心弃上清后 4 °C 保存备用。

2.3 水凝胶的制备

甲基丙烯酸化海藻酸钠参考文献[16]的制备方法。4 °C, pH = 8 条件下,海藻酸钠上的羟基和甲基丙烯酸酐发生酯化反应,透析后冷冻干燥得到甲基丙烯酸接枝率为 50% 的甲基丙烯酸化海藻酸钠(MAA)。配制 3% (质量分数)的 MAA/TEOA(含 0.5% I2959)溶液,按质量比为 RGD: MAA = 0.385 : 1 加入 RGD 多肽(GC-GYGRGDSPG),室温下反应 1 h 后,加入与 MAA 等体积的明胶微球,混合均匀后加入到模具中,7.9 mW/cm² 紫外光照下交联得到粘附型的大孔海藻酸钠水凝胶。

2.4 凝胶性能测试

采用电子万能材料试验机(Shenzhen SANS Testing Machine)测试了凝胶的压缩强度和压缩模量,传感器为 200 N,试样为 8 mm × 2 mm 的圆柱形,加载速度为 0.3 mm/min,每组试样平行测 5 次。将凝胶化 24 h 的试样按 0.1 g/mL 加入 PBS 中浸泡,通过测定其质量随

时间的变化规律考察各组凝胶在 PBS 中的溶胀率。溶胀率计算公式如下:

$$S = (w - w_0) / w_0 \times 100\%$$

其中 S 为溶胀率, w 为材料吸水后的质量, w_0 为凝胶的初始质量。

2.5 MG-63 细胞海藻酸钠凝胶体外培养

将 MG-63 细胞悬液按 1×10^7 cells/mL 密度分别接种于凝胶前溶液中, 溶液固化成凝胶后加入 DMEM 培养基, 置 37°C , 5% CO_2 培养箱内培养。

体外培养 1, 3, 5 d 后, 加入 0.5 mg/ml MTT, 37°C 孵育 4 h 后加入 DMSO 振荡, 酶联免疫检测仪在 490 nm 波长测定吸光度 (Optical Density, OD)。

通过 FDA/PI 染色, 激光共聚焦显微镜观察 MG-63 细胞在凝胶内的形态和分布。

采用 ALP 试剂盒 (Sensolyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit, AnaSpec) 检测细胞内碱性磷酸酶 (ALP) 的活性。

荧光定量 PCR 检测成骨相关基因的表达: 将载有细胞的凝胶经液氮速冻研磨后, 用 TRIZOL 常规提取总 RNA, 经逆转录试剂盒 (Bio-Rad, USA) 反转录成 cDNA。RT-qPCR 在 6 色梯度实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad, CFX960, USA) 上进行, 试剂盒为 SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, USA)。实验选择骨形态发生蛋白-2 (BMP-2), I 型胶原 (COL-I), 骨钙素 (OCN) 和 GAPDH 基因, 其引物序列见表 1。BMP-2, COL-I, OCN 和 GAPDH mRNA 的表达水平表示为阈值 (CT), 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值法来计算相对表达量, 看家基因 GAPDH 的表达作为内参来归一化结果, 所有样品分析 3 次。

表 1 PCR 引物序列及扩增长度

Table 1 PCR primers sequences for target genes

Symbol	Primers
GAPDH	5'-GCCAAGGCTGTGGCAAGGT-3' 5'-AGCTGGAGGAGTGGGTGTCG-3'
Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)	5'-TTACTGCCACGGAGAATGCC-3' 5'-CCCACAACCTCCACAACCA-3'
Collagen type I (COL-I)	5'-CACACGTCTCGGTCATGGTA-3' 5'-AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG-3'
Osteocalcin (OCN)	5'-GAGGGCAGCGAGCTAGTGAA-3' 5'-CCTCCTGAAAGCCGATGTGGT-3'

2.6 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差表示, 采用 AVONA 方法, t -检验法进行两两比较, $p < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 力学性能

组织工程支架材料的力学性能对于材料的实际应用

有着重要的意义, 具有良好力学性能的凝胶材料可以保证手术以及组织再生的过程中凝胶保持其原有形状, 支持细胞的生长。从湿态凝胶 25% 形变处的压缩模量 (图 1) 可以看出, 明胶微球的加入使得复合凝胶的力学强度显著提高 ($p < 0.05$)。

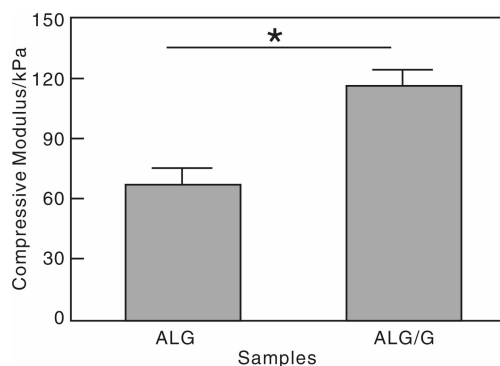


图 1 微球的加入对凝胶力学强度的影响

Fig. 1 The compressive modulus of the hydrogels

3.2 溶胀性能

由图 2 可以看出, 4°C 下, 含有明胶微球的复合凝胶 ALG/G 的溶胀率 ($\sim 23.2\% \pm 2.8\%$) 远远低于未经改性的光交联海藻酸钠凝胶 ALG ($\sim 72.5\% \pm 1.9\%$), 1 d 时二者的溶胀已基本达到平衡, 之后基本保持不变。相比之下, 37°C 时 ALG 的溶胀率有所增加 ($\sim 86.4\% \pm 2.7\%$), 但其随时间变化的整体趋势与 4°C 时类似, 基本保持不变。而复合凝胶在 37°C 下的溶胀率则呈现出先增加后下降的趋势, 这是由于 37°C 时复合凝胶的质量变化是由海藻酸钠吸水增加的质量和明胶微球逐渐降解减少的质量两者共同作用决定的。孵育前期 (1 d), 明胶的降解程度较弱, 海藻酸钠的吸水占主要部分, 导致凝胶的溶胀率显著增大; 之后 (2~4 d), 明胶的降解速度逐渐与海藻酸钠的吸水速度持平, 溶胀率表现出平

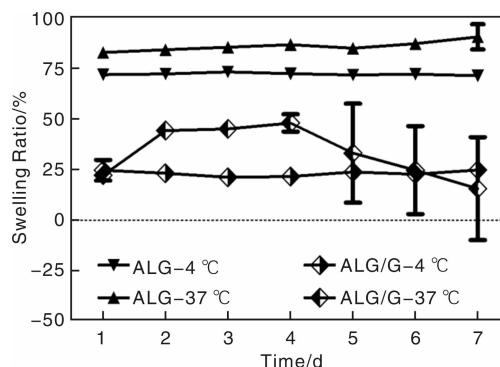


图 2 4°C 和 37°C 下, 明胶微球的加入对水凝胶溶胀性能的影响

Fig. 2 The swelling properties of the hydrogels in pH = 7.4 PBS at 4°C and 37°C

稳缓慢增加的趋势; 5 d 时, 海藻酸钠的吸水达到平衡, 而明胶的不断降解造成凝胶整体的溶胀率出现下降的趋势。

3.3 细胞活性检测

如图 3 所示, 随培养时间的延长, MG-63 细胞在粘附型大孔水凝胶 (RGD-ALG/G) 中表现出明显的增殖趋势, 且与其他材料相比, 同一时间点 RGD-ALG/G 中的细胞活性最高 ($p < 0.05$)。不含微球的 RGD 接枝的海藻酸钠凝胶 (RGD-ALG) 中, 细胞活性始终显著低于 RGD-ALG/G, 5 d 时细胞表现出明显增殖 ($p < 0.05$)。而未经改性的海藻酸钠凝胶 (ALG) 中, 未发现明显的细胞增殖, 且细胞活性始终保持较低的水平。

3.4 细胞形态

体外培养 1, 3, 5 d 后, 凝胶中细胞形态及分布情况如图 4 所示。随培养时间的延长, MG-63 细胞在 RGD-ALG/G 凝胶中不断增殖, 第 3 d 时微球周围出现明显的细胞铺展现象。微球的不断降解为细胞铺展及长入提供了所需空间, 5 d 时, 微球完全降解, 细胞逐渐长入微球降解所留的孔穴中, 表现出典型的纺锤形形态, 细胞伪足清晰可见, 并开始出现细胞融合现象, 为

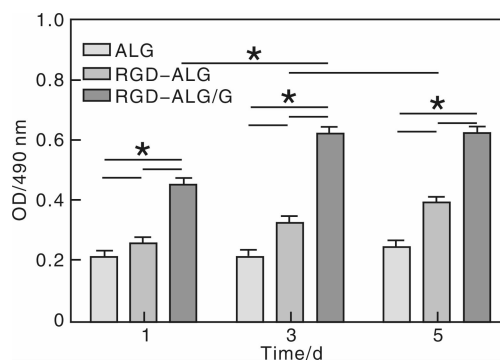


图 3 MTT 法测定 MG-63 细胞在不同凝胶内的增殖情况

Fig. 3 MTT analysis of the MG-63 cells encapsulated in the hydrogels

进一步的成骨分化和组织形成奠定基础。而在不含微球的 RGD-ALG 凝胶中, MG-63 细胞表现出缓慢的增殖趋势, 3 d 时细胞仍保持圆形, 5 d 以后才出现少量的细胞铺展现象, 且细胞的铺展程度有限, 铺展面积和铺展细胞的数量都远远不及 RGD-ALG/G。相比之下, 对照组 ALG 中的细胞始终保持圆形, 仅在第 5 d 时出现少量的细胞簇。

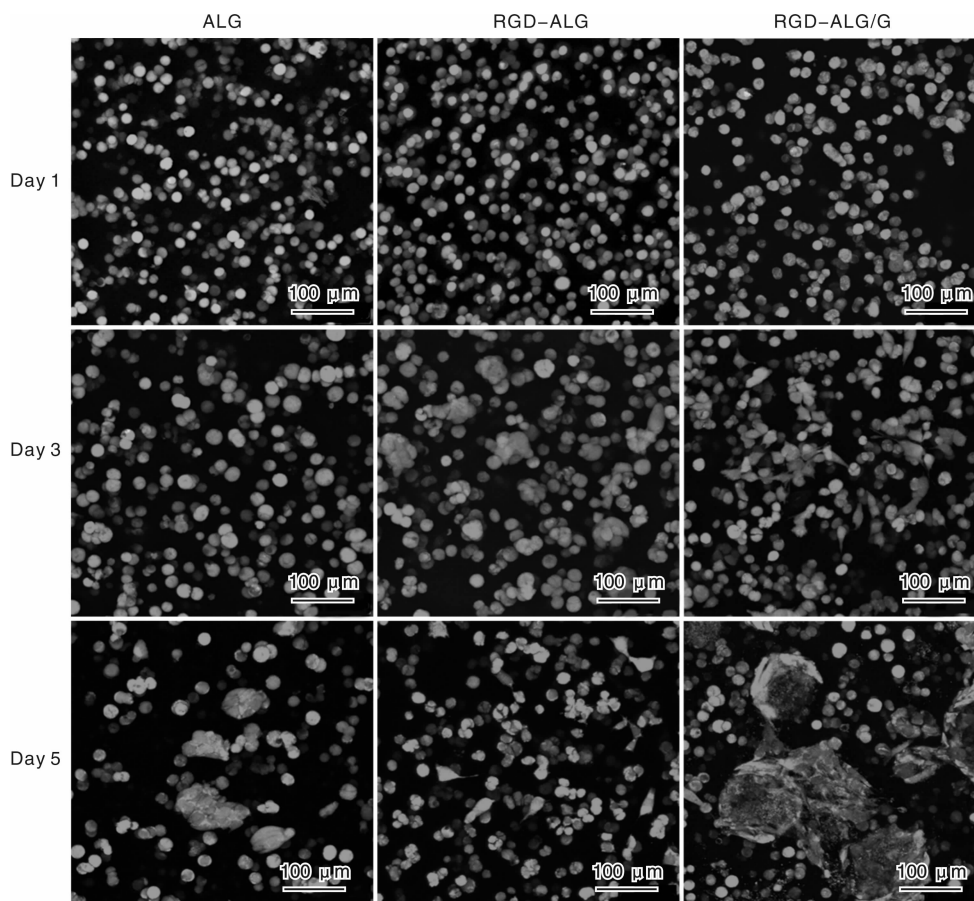


图 4 MG-63 细胞 - 凝胶体外培养 1, 3, 5 d 后 FDA/PI 染色的激光共聚焦照片

Fig. 4 Confocal microscopy images of MG-63 cells encapsulated in various hydrogels after culturing for 1, 3 and 5 days

3.5 碱性磷酸酶活性检测

如图 5 所示, RGD-ALG/G 中 MG-63 细胞的碱性磷酸酶表达在 14 d 时达到顶峰, 之后下降, 且同一时间点的表达远远高于其他材料组 ($p < 0.05$)。接枝了 RGD 但不含微球的 RGD-ALG 凝胶中, 碱性磷酸酶活性随培养时间的延长逐渐降低, 而对照组中未经任何改性的 ALG 凝胶中, ALP 的表达始终最低, 4, 14 和 21 d 之间未见显著性差异 ($p > 0.05$)。

3.6 基因表达

通过实时荧光定量 RT-PCR 技术, 考察了不同水凝胶内 MG-63 细胞体外培养 14 d 和 21 d 后, 成骨相关基因 (BMP-2, COL-I 和 OCN) 的表达, 结果如图 6 所示。同一时期, 除第 14 d 的 OCN 表达与 RGD-ALG 之间无显著性差异外 ($p > 0.05$), RGD-ALG/G 中所有基因的表达均显著高于其他材料组 ($p < 0.05$)。RGD-ALG/G 中 BMP-2 的表达在 14 d 时最高, 21 d 时显著下降, COL-I

和 OCN 的表达都随培养时间的延长逐渐增高; RGD-ALG 和对照 ALG 中, BMP-2 和 OCN 的表达随培养时间的延长基本保持不变, 而 COL-I 的表达随着时间的延长则表现出明显增加的趋势。

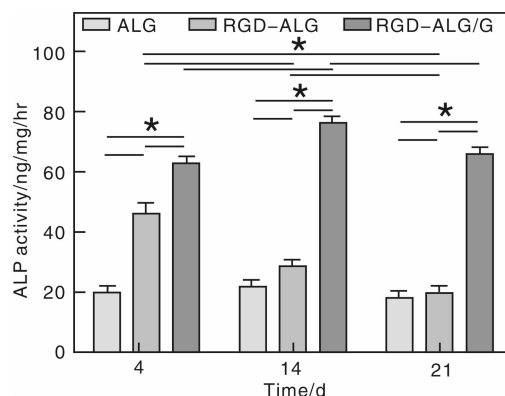


图 5 不同水凝胶内 MG-63 细胞的碱性磷酸酶活性
Fig. 5 Alkaline phosphatase expression of MG-63 cells culturing in the hydrogels

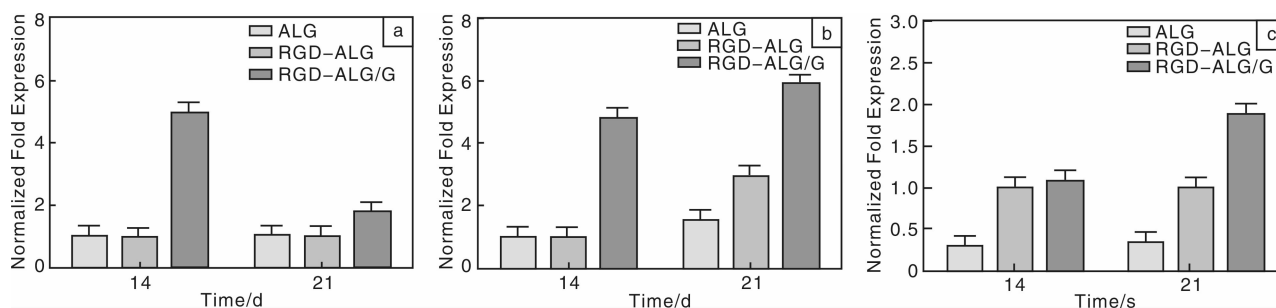


图 6 MG-63 细胞在不同凝胶内部培养 14 d 和 21 d 后的 (a) BMP-2, (b) COL-I 和 (c) OCN 的表达

Fig. 6 Quantitative gene expressions of MG-63 cells cultured in various hydrogels after 14 and 21 days by real-time RT-PCR

4 结果讨论

明胶微球的加入提高了凝胶的力学性能 (图 1), 同时降低了凝胶的溶胀率 (图 2)。越来越多的研究证明, 细胞外基质的力学强度对细胞响应性具有重要影响。Engler 等^[17]研究发现, hMSCs 在二位基质表面培养时, 弹性基质能够诱导 hMSCs 向神经方向分化, 而刚性基质则导致 hMSCs 向成骨方向分化。另外, Elliott J T 等^[18]发现, 具有较高力学强度的纤维基质中的细胞铺展和增殖远远优于低机械强度的纤维基质。4 ℃ 下, 含有明胶微球的复合凝胶 ALG/G 的溶胀率随时间变化很小, 而 37 ℃ 下的溶胀率则呈现先增加后降低的趋势, 这从侧面说明了明胶微球在水凝胶内逐渐降解, 初步表明明胶微球的引入能够成功构建大孔水凝胶体系。以 MG-63 细胞为模型细胞, 通过考察细胞在凝胶中的铺展、增殖以及成骨功能表达情况, 进一步验证了该粘附型大孔水凝胶在促进细胞粘附与铺展方面的可行性。

MTT (图 3) 和激光共聚焦结果 (图 4) 显示, MG-63

细胞在粘附型大孔水凝胶 (RGD-ALG/G) 中的细胞活性随培养时间的延长显著增加, 其 OD 值显著高于另外两组。培养 3 d 后已经出现明显的细胞铺展, 5 d 时铺展细胞显著增多, 表现出完全铺展开的纺锤形, 且呈球形分布于凝胶内部, 球与球之间出现细胞融合现象。图 4 直观地说明 RGD-ALG/G 中 RGD 和明胶微球的引入分别为海藻酸钠凝胶体系提供了粘附位点和降解空间, 能够显著促进细胞在其中的粘附、增殖与铺展。RGD 为细胞粘附提供前提, 细胞铺展首先沿着微球边缘最先出现, 伸出伪足, 随着微球的不断降解, 细胞逐渐长入降解后所留的孔穴中, 细胞-细胞之间逐渐出现细胞融合现象, 为进一步的成骨分化和组织形成奠定基础, 可以预见, 最终细胞铺展现象将会延伸到整个凝胶内部。而在仅含有细胞粘附基团的 RGD-ALG 凝胶中, MG-63 细胞表现出缓慢的增殖趋势, 虽然 RGD 的引入为细胞粘附提供了基础, 但由于三维凝胶网络对细胞的束缚作用, 大部分细胞基本仍被限制为圆形, 仅有少量的细胞在 5 d 以后开始出现有限的细胞铺展现象, 细胞的铺展

面积和铺展细胞的数量都远远不及 RGD-ALG/G。相比之下, 对照组 ALG 由于缺乏细胞粘附位点并且不能为细胞铺展提供足够的空间, MG-63 细胞在其中始终保持圆形, 仅在第 5 d 时出现少量的细胞簇。可见, 细胞亲和性和基质内部降解空间的构建是三维水凝胶内细胞粘附和铺展不可或缺的两个条件, 仅含有细胞粘附位点 (RGD) 的凝胶只能在一定程度上促进细胞的增殖, 并不能很好地支持细胞铺展, 势必会影响进一步的细胞功能的实现。

碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测和成骨相关基因的表达结果进一步证明, 粘附型大孔海藻酸钠水凝胶体系能够显著促进 MG-63 细胞在其中的成骨功能表达。碱性磷酸酶是一种成骨细胞的功能性酶, 在成熟的成骨细胞内高度表达, 对钙盐沉积过程中起重要作用, 其表达水平的高低是衡量成骨前体细胞向成骨细胞分化的重要指标之一, 其活性程度可用于反映成骨细胞的分化成熟程度和形成骨基质的能力, 通常被认为是成骨细胞分化的早期标志^[19]。RGD-ALG/G 中的 ALP 活性显著高于其他材料组, 初步说明 MG-63 细胞在 RGD-ALG/G 中的较高的成骨分化能力; 14 d 时 ALP 的表达水平最高, 21 d 时出现下降, 显示 RGD-ALG/G 中 MG-63 细胞在第 14 d 时已基本进入分化成熟期, 此后基质进一步矿化, 碱性磷酸酶维持在较高表达水平。BMP 属于转化生长因子- β (TGF- β) 超家族, 是成骨的重要信号分子。BMP-2^[19] 是 BMP 亚族的一个组员, 它具有体内诱导异位骨形成和载体外诱导多种细胞向成骨细胞分化的能力。I 型胶原 (COL-I)^[20] 是骨组织有机质的主要成分, 伴随着正常的骨组织发生过程高表达, 参与类骨质的形成过程, 其表达增强也是衡量成骨分化的重要指标。骨钙素 (OCN)^[21] 是成骨细胞的特征性标志蛋白, 只有分化成熟的成骨细胞和成牙质细胞才能产生, 在骨形成过程中对于细胞外基质蛋白之间的形成以及骨组织的矿化过程具有重要的调节作用, 其分泌异常将直接影响骨基质的形成与矿化。与 ALP 活性变化趋势一致, RGD-ALG/G 中 BMP-2 在 14 d 时表达最高, 21 d 时表达下调, 说明 14 d 时细胞已基本结束增殖期, 21 d 后进一步成熟以及矿化, 21 d 时的 COL-I 和 OCN 表达上调同样印证了这一结果。而 RGD-ALG 和对照 ALG 凝胶中, 成骨相关基因表达显著低于 RGD-ALG/G, 说明了 RGD 和明胶微球的同时引入能够显著促进 MG-63 细胞在海藻酸钠凝胶中的成骨功能表达。结合 RGD-ALG/G 中较高的细胞活性以及充分的细胞铺展, 本研究证实了三维凝胶网络中细胞粘附位点的引入和细胞铺展空间的构

建对于贴壁依赖型细胞功能表达的重要性, 本文中所提出的粘附型大孔水凝胶模型能够显著促进 MG-63 在凝胶内部的粘附与铺展, 增殖与分化, 为进一步的成骨功能表达及组织形成奠定基础。

5 结 论

(1) 将细胞粘附位点的引入和凝胶中细胞铺展空间的构建相结合, 提出了同时含有 RGD 多肽和明胶微球的粘附型大孔水凝胶模型: RGD 多肽的共价接枝为细胞粘附提供前提, 明胶微球在 37 °C 下快速降解为细胞的进一步增殖和铺展以及分化提供所需空间。

(2) RGD 和明胶微球的同时引入能够更好地支持 MG-63 细胞在其中的增殖、粘附与铺展, 并显著提高其碱性磷酸酶活性, 上调成骨相关基因 (BMP-2, COL-I 和 OCN) 的表达; 而在不含微球的 RGD-ALG 和 ALG 凝胶中, 细胞铺展及成骨分化均受到很大抑制。

参考文献 References

- [1] Lee KY, Mooney D J. Hydrogels for Tissue Engineering[J]. *Chemical Reviews*, 2001, 101: 1 869–1 880.
- [2] Elisseeff J, McIntosh W, Anseth K, et al. Photoencapsulation of Chondrocytes in Poly (Ethylene Oxide)-Based Semi-Interpenetrating Networks[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 51: 164–171.
- [3] Wang C, Varshney R R, Wang D A. Therapeutic Cell Delivery and Fate Control in Hydrogels and Hydrogel Hybrids[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, 62: 699–710.
- [4] Meredith Jr J, Fazeli B, Schwartz M. The Extracellular Matrix as A Cell Survival Factor[J]. *Molecular Biology of The Cell*, 1993, 4: 953.
- [5] Hern D L, Hubbell J A. Incorporation of Adhesion Peptides into Nonadhesive Hydrogels Useful for Tissue Resurfacing[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, 39: 266–276.
- [6] Lutolf M P, Raeber G P, Zisch A H, et al. Cell-Responsive Synthetic Hydrogels [J]. *Advanced Materials*, 2003, 15: 888–892.
- [7] Sun J, Xiao W, Tang Y, et al. Biomimetic Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Methacrylated Alginate and Collagen for 3D Pre-Osteoblast Spreading and Osteogenic Differentiation[J]. *Soft Matter*, 2012, 8: 2 398–2 404.
- [8] Xiao W, Liu W, Sun J, et al. Ultrasonication and Genipin Cross-Linking to Prepare Novel Silk Fibroin-Gelatin Composite Hydrogel[J]. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2012, 27: 327–341.
- [9] Grinnell F. Fibroblast Biology in Three-Dimensional Collagen Matrices[J]. *Trends in Cell Biology*, 2003, 13: 264–269.
- [10] Fringer J, Grinnell F. Fibroblast Quiescence in Floating Colla-

- gen Matrices Decrease in Serum Activation of Mek and Raf but not Ras [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 20 612 – 20 617.
- [11] Gillette B M, Jensen J A, Wang M, *et al.* Dynamic Hydrogels: Switching of 3D Microenvironments Using Two-Component Naturally Derived Extracellular Matrices [J]. *Advanced Materials*, 2010, 22: 686 – 691.
- [12] Liu Y, Chan-Park M B. Hydrogel Based on Interpenetrating Polymer Networks of Dextran and Gelatin for Vascular Tissue Engineering [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 196 – 207.
- [13] Sakai S, Ito S, Ogushi Y, *et al.* Enzymatically Fabricated and Degradable Microcapsules for Production of Multicellular Spheroids with Well-Defined Diameters of Less than 150MM [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 5 937 – 5 942.
- [14] Lau T T, Wang C, Wang D A. Cell Delivery with Genipin Crosslinked Gelatin Microspheres in Hydrogel/Microcarrier Composite [J]. *Composites Science and Technology*, 2010, 70: 1 909 – 1 914.
- [15] Kloxin A M, Kasko A M, Salinas C N, *et al.* Photodegradable Hydrogels for Dynamic Tuning of Physical and Chemical Properties [J]. *Science*, 2009, 324: 59 – 63.
- [16] Chou A I, Nicoll S B. Characterization of Photocrosslinked Alginate Hydrogels for Nucleus Pulposus Cell Encapsulation [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 91: 187 – 194.
- [17] Engler A J, Sen S, Sweeney, *et al.* Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification [J]. *Cell*, 2006, 126: 677 – 689.
- [18] Medaniel D P, Shaw G A, Elliott J T, *et al.* The Stiffness of Collagen Fibrils Influences Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype [J]. *Biophysical Journal*, 2007, 92: 1 759 – 1 769.
- [19] Lian J B, Stein G S. Development of The Osteoblast Phenotype: Molecular Mechanisms Mediating Osteoblast Growth and Differentiation [J]. *The Iowa Orthopaedic Journal*, 1995, 15: 118.
- [20] Aubin J E. Advances in The Osteoblast Lineage [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 1998, 76: 899 – 910.
- [21] Jundt G, Berghäuser K H, Termine J, *et al.* Osteonectin-A Differentiation Marker of Bone Cells [J]. *Cell and Tissue Research*, 1987, 248: 409 – 415.

中科院上海应用物理研究所研制成一种可熨烫修复型超疏水棉布

超疏水纺织品具有透气防水的特性，是与人们日常生活关系最为密切的材料。近年来，超疏水纺织品的使用耐久性，如耐洗涤性、耐磨擦性等，成为学界研究的一个热点问题。中科院上海应用物理研究所、中国科学院核辐射与核能技术重点实验室辐射高分子课题组在前期利用辐射接枝技术获得耐洗涤超疏水棉布的基础上（《Adv Mater》，2010, 22: 5 473 – 5 477），研制成一种可熨烫修复型超疏水棉布。

在李景辉研究员的指导下，博士生吴景霞通过辐射接枝甲基丙烯酸正己酯和甲基丙烯酸正十二酯获得超疏水棉布，继而对其耐磨擦性能进行了深入研究。按 GB/T 3920 – 2008 规范，在 44.8 kPa 压力下，超疏水棉布分别被铜柱磨擦 8 000 次和 9 000 次后，其超疏水性才被破坏（接触角小于 150°）；而经蒸汽熨烫（约 200°）后，棉布的超疏水性得到了恢复。可熨烫修复的机理在于：由于辐射的穿透作用，疏水的接枝链段在纤维的表面与内部均匀分布，而当表面的接枝链段被磨耗后，通过高温处理可使纤维内部的接枝链段迁移至表面，从而修复其超疏水性。

更为有意义的发现是，如果一开始就对超疏水棉布进行周期性熨烫，如每 2 000 次磨擦进行一次熨烫，则可极大延长其寿命。如甲基丙烯酸正己酯接枝的棉布在磨擦 16 000 次后其超疏水性才遭破坏，是未经熨烫的两倍，而甲基丙烯酸正十二酯接枝的棉布可以耐磨擦超过 24 000 次。

相关成果于近期发表在 Nature 出版集团旗下的国际综合性学术期刊《Scientific Reports》上（《Sci Rep》，2013, 3: 2 951）。

该项研究得到了国家自然科学基金、中科院知识创新工程领域前沿项目、中国科学院战略先导专项、上海市自然科学基金等基金的资助。

（来源：中国科学院）