

微尺度水凝胶与组织工程

孙 静,卫 丹,杨 棵,肖文谦,范红松*

(四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心,成都 610064)

摘要:水凝胶已被广泛应用于组织工程、药物控释、生物传感器等生物医学领域。随着微制造技术的发展,在纳微米尺度范围内制备形状和尺寸与自然组织相匹配的工程化水凝胶为解决血管化困难、复杂组织结构模拟、多细胞接种等组织工程难题带来了曙光。本文将主要讨论微尺度水凝胶在组织工程领域的研究现状,重点介绍微尺度水凝胶的合成方法及其在血管化和复杂组织结构模拟方面的应用。

关键词:组织工程;微制造;微凝胶;组装;组织构建

引言

组织工程学是应用生命科学与工程学的原理与技术,在正确认识哺乳动物的正常及病理两种状态下的组织结构与功能关系的基础上,研究和开发用于修复、维护、促进人体各种组织或器官损伤后的功能和形态的生物替代物的一门新兴学科^[1]。它的基本原理是将少量种子细胞经体外扩增后与支架材料复合,在体外预先构建一个有生物活性的种植体,然后植入人体组织或器官的病损部位,生物材料作为细胞生长的支架逐渐被机体降解吸收,同时细胞不断增殖、分化,形成新的并且形态、功能与相应组织或器官相一致的组织,从而达到创伤修复和功能重建的目的^[2]。其中,可降解三维立体支架材料起着非常重要的作用,它是细胞种植的场所和组织再生的模板,是引导组织再生和控制组织结构的关键因素^[3]。尽管生物材料与组织工程已经取得了巨大进展(如组织工程皮肤和软骨等),但目前仍存在的诸多问题,如难以对天然组织的复杂结构和形态学进行精确仿生以及血管化困难等,仍然在很大程度上阻碍了复杂组织与器官的构建^[4]。

在正常机体中,细胞紧贴血管分布,因为血管可以为其提供营养物质和氧气并及时移除代谢废物和二氧化碳。通常,植入体中的种子细胞只有在血管周围 $150\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 的范围内才能通过营养物质的扩散得以继续存活,如果不能快速建立血管,就难以构建真正有功能的器官^[5]。因此,如何设计与构建具有与天然血管功能相似的脉管网络是制造和维持工程化组织正常功能的一个非常重要的因素。目前,常见的组织工程血管化的途径之一是在支架中同时接种内皮细胞和平滑肌细胞,并通过生长因子的释放以达到促进血管生成的目的。然而这种方法最大的问题在于,在形成血管的这段时间内可能会有大量的细胞已经由于营养物质供给的缺乏而过早地丧失了活性,导致工程化组织的失效。另一种预构建血管结构的方法则能够尽可能避免这一问题,即在支架移植前于其中人工构造微血管,同时这种人工微血管还能在移植后与宿主的血管整合在一起,而如何构建这种可控的血管结构并确保其移植后具有所需功能仍是组织工程所面临的巨大挑战之一。

细胞-细胞、细胞-基质间的相互作用以及组织结构对于调节细胞行为具有重要作用,如在骨髓中胚胎造血干细胞与成骨细胞和内皮细胞之间的紧密联系^[6]。然而,尽管组织工程化支架中的细胞具有一定的自组装的能力以使它们重获细胞间相互作用,但这些作用往往会在细胞接种和组织隔离的过程中彻底

10.14028/j.cnki.1003-3726.2016.05.010

收稿:2015-09-07;修回:2015-11-25;

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071272,51273121);

作者简介:孙静(1986—),女,博士,研究方向为组织工程;

* 通讯联系人:范红松(1968—),女,教授,博士生导师,研究方向为组织工程,E-mail:hsfan@scu.edu.cn.

消失^[1, 7]。另外,很难做到将细胞均匀地接种到支架内部,大多数细胞只能停留在支架表面。因此,如何促进细胞间相互作用,控制特定的组织结构,以及如何将细胞均匀种植于支架中成为功能化组织构建的关键。

微米级的工程化水凝胶,即至少有一维尺寸在微米尺度的水凝胶,有望解决组织工程领域中的诸多问题,如血管组织的构建以及复杂组织的结构和三维细胞微环境的仿生模拟等^[8]。作为细胞载体,水凝胶具有其独特的优势:首先,在热、光、pH 变化、离子等条件作用下可由液态转化为固态,实现原位注射和任意塑型^[9, 10];其次,细胞既可以贴附于凝胶表面,又能够包裹于凝胶中,特别是三维细胞包裹,为细胞在基质中的均匀分布提供可能,凝胶的网络结构和通透性为细胞生长、营养输送及新陈代谢产物的排出提供良好的传输通道^[11];更重要的是,与微制造技术相结合,可以方便地得到从微尺寸到宏观尺度范围的凝胶单元(从 $<1\mu\text{m}$ (亚细胞水平)到 $>1\text{cm}$ (组织级)水平),为通过微小单元结构控制实现大块组织的微结构设计提供可能^[8, 12]。微尺度水凝胶发展至今,从最早的凝胶微囊用于保护细胞免受宿主免疫系统的攻击,到现今各种凝胶性质调控(粘附性、强度、细胞信号、形状和尺寸等)的研究,已在组织工程领域受到越来越多的关注。本文将就组织工程微尺度水凝胶的制备方法,及其在血管化、细胞接种及复杂组织构建方面的应用作简要介绍。

1 微凝胶的制备

微制造技术的发展使得制备各种形状、尺寸可控的微尺度水凝胶成为可能,也为自然组织的复杂结构模拟与功能再建提供了新的途径^[13]。如图 1 所示,常用的合成微凝胶的技术主要包括乳化法^[14]、光刻技术^[15]、微模塑技术^[16]以及微流体技术^[17]等。

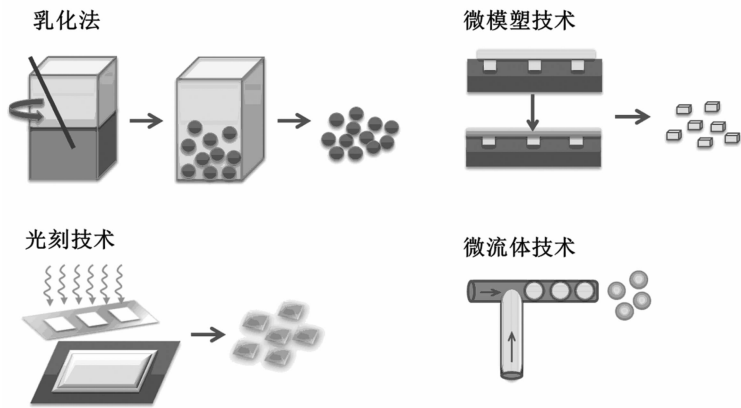


图 1 组织工程中常用的微尺度水凝胶制备技术

Figure 1 Microfabrication techniques to synthesize microscaled hydrogels for tissue engineering

1.1 乳化法

乳化法是微凝胶制备中最常用的一种方法,该方法最大的优点是简单易行。通过控制搅拌速度、溶液粘度以及表面活性剂等即可调节凝胶的尺寸,但是与其它方法相比凝胶的尺寸分布通常比较大,并且凝胶形状不可调,只能形成球形微凝胶。琼脂糖、海藻酸钠和胶原的微凝胶均可用该方法制得,载细胞的微凝胶常被用在细胞免疫隔离、生物反应器及干细胞生物学分析等方面^[18]。

1.2 光刻技术

光刻技术最早被用在微电子工业中,随着各种可光交联的天然和合成预聚物的出现,该方法已被广泛应用于微尺度组织工程中图案化组织和支架的制备,是一种廉价的、稳定性好的、能够批量制备大面积样品的方法,目前其分辨率可以实现从微米到 100nm 以下^[19]。在模板上涂覆可光交联的预聚液薄层,上方覆上光掩模,紫外光照射到的区域即交联形成凝胶,凝胶尺寸可从微米级到毫米级不等,通过计算机设

计和平板印刷进行掩膜设计可以方便地控制微凝胶单元的 shape 和尺寸。由于光聚合反应可在室温或生理条件下进行,光固化速度快(从不到一秒钟到几分钟),反应条件温和,对细胞和组织损伤小,因此光刻技术常被用于制备包裹细胞的微凝胶^[20],精确定位包覆细胞,模拟体内的细胞微环境,控制细胞与细胞之间以及细胞与基质之间的相互作用^[21,22]。目前,光刻技术的应用还存在一些限制,如可光交联材料的局限、紫外交联对细胞活性的影响等。在具体实验中,需要对紫外光的强度、曝光时间以及光引发剂的浓度进行很好地调节,以确保细胞的活性不受自由基以及紫外光的影响。

1.3 微模塑技术

微模塑技术是广泛用来制备功能可控凝胶的方法之一,该方法的崛起源于软刻蚀技术中二甲基硅氧烷模板(PDMS)的应用,由此产生了各式各样的微模具结构^[23,24]。软刻蚀是通过表面刻制有细微结构的弹性印章把微米、亚微米甚至是纳米级的微图形复制到目标物质上去的一种微制造方法,将预聚物浇注到图案化的弹性印章上,然后瞬间胶化可得到具有各种形状和大小的微粒结构^[15,19]。采用微模塑技术制得图案的形状和大小可以被精确地控制在 $1\mu\text{m}$ 以下到 $500\mu\text{m}$ 以上。PDMS 是最常用的制备弹性印章的优良材料,可以实现微米级图案的复制,具有低温固化、无毒性等诸多优点,但是也存在一些缺点,如 PDMS 遇到很多有机溶剂会发生溶胀现象,一些几何图形不能很好地从 PDMS 模具上脱模等。除了 PDMS,其它材料也可以用来制备图案化的弹性印章,如聚氨酯或者特氟龙等,且具有更高的表面能和制造分辨率,可制备出可控形状和大小的纳米级粒子,但目前这种高分辨率纳米粒子的应用仅限于药物传输^[24]。微模塑法还可以用来构建三维水凝胶微结构:将凝胶前溶液浇注到可溶性模板上,胶化后模板溶解,于是形成内部含有贯通大孔的三维凝胶^[25]。

1.4 微流体技术

微流体技术是指在微观尺寸下控制、操作和检测复杂流体的技术,是在微电子、微机械、生物工程和纳米技术的基础上发展起来的一门全新交叉学科,着重于构建微流体通道系统来实现各种复杂的微流体操纵功能^[26]。通过改变微通道的尺寸、流体速率和液滴形状可以得到不同大小和形状的微粒;利用不同微通道将不同性质的溶液(如分别具有不同特性粘度的两种或多种溶液)在通道出口处融合,就能够得到具有不同分子信号的梯度材料,这种梯度材料对于细胞行为的调控及复杂组织的构建是非常有意义的;通过选择微流道数目,控制溶液组成、粘度及流体流速等,还可以得到非对称粒子^[27~29]。上世纪 90 年代以来,微流控芯片技术得到了快速发展,具有小型化、集成化、高通量和低消耗等特点,已成为一种新的生物医学研究评价平台,在细胞生物学研究领域中受到了极大的关注。微流体技术在微小结构制造方面具有很大的优势,该方法的优点在于对构建物形状及尺度的有序控制,缺点在于加工技术要求设备及条件均较苛刻,且微流体制造过程对于细胞活性的维持及制造过程的操作要求很高,还有待进一步深化和寻求更简单及细胞友好的方法。

2 微凝胶在组织工程中的应用

微凝胶和微制造技术的联合应用能够克服目前组织构建的许多局限性,在组织工程构建中具有独特的优势。通过控制凝胶单元的尺寸,可以方便地实现细胞微环境的调控。例如, $0.1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ 的微凝胶可以用来模拟单个细胞微环境, $10\mu\text{m}\sim 400\mu\text{m}$ 用以模拟细胞簇结构,而 $400\mu\text{m}$ 以上的微凝胶则可以模拟多个细胞簇之间的相互作用。本文将从组织工程的两种构建方式——“自上而下”和“自下而上”两个方向(如图 2 所示),着重介绍微凝胶在血管化及多细胞的复杂组织结构模拟方面的应用。

2.1 “自上而下”组织工程应用

“自上而下”的组织工程方法旨在利用微制造技术来控制大块支架材料的微观结构特性(如图 2a 所示)^[8,30]。“自上而下”组织构建中,微凝胶最早被用作在已有的组织工程支架中制造可控的形貌性质,如微血管结构构建,可以通过在大块支架材料中构建微流体通道实现^[31]。Lee 等^[32]利用微流体技术首先制备复合血管内皮细胞的海藻酸钠空心凝胶微纤维,再将其嵌入含平滑肌细胞的大块凝胶基质中,7 天

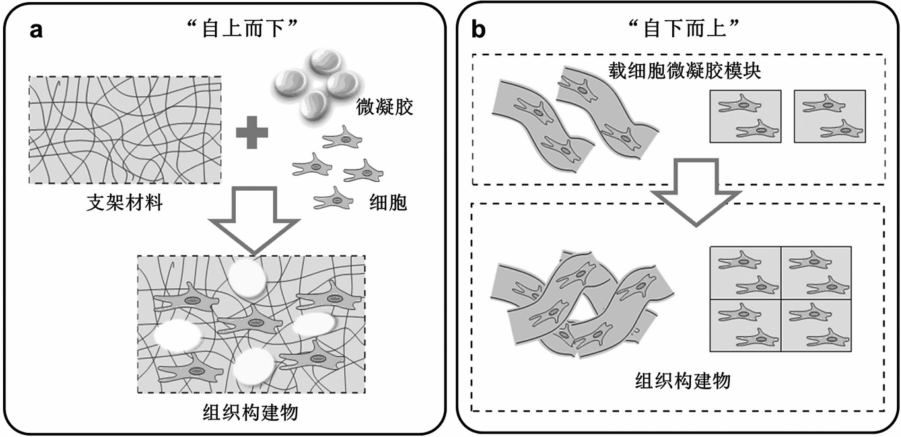


图 2 微尺度水凝胶的(a)“自上而下”和(b)“自下而上”组织工程应用

Figure 2 Microscaled hydrogels for (a) top-down and (b) bottom-up tissue engineering applications

后可以观察到内皮化的血管通道结构形成。除了微血管结构模拟,微凝胶还可作为暂时性的模板,用以在大块支架材料中构建所需孔结构。例如,Sun 等^[33]在海藻酸钠水凝胶中引入 37℃ 下能够快速降解的明胶微球,构建了具有可控大孔结构的海藻酸钠水凝胶。结果显示,三维凝胶基质中的这种大孔结构设计不仅促进了营养物质的交换,同时也为贴壁依赖型细胞在凝胶内部的快速增殖与铺展提供所需空间(如图 3 所示)。

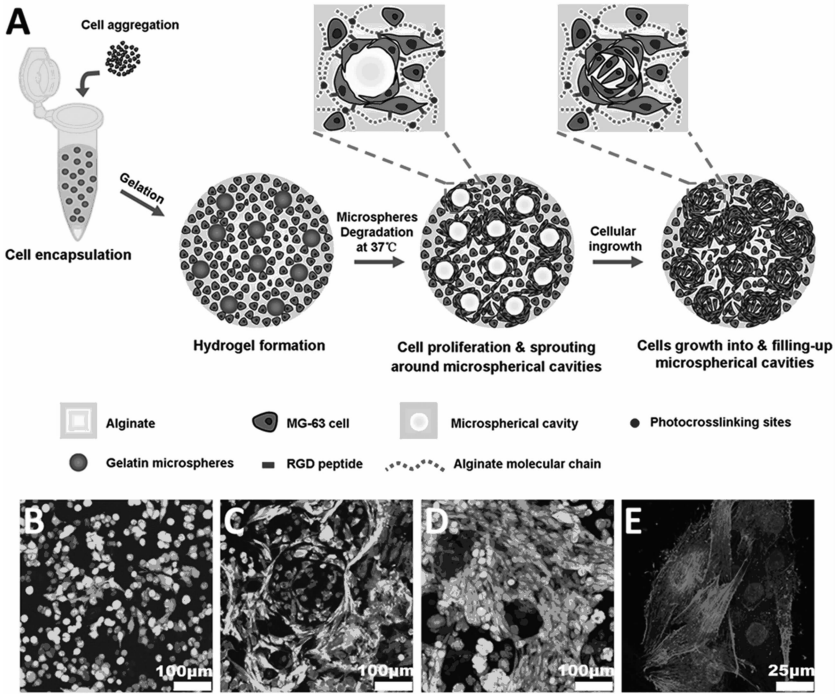


图 3 明胶微球构建粘附型大孔海藻酸钠水凝胶并促进细胞铺展与迁移^[33]

Figure 3 The adhesive macroporous alginate hydrogel constructed by gelatin microspheres to promote cell spreading and migration^[33]

微凝胶还可用于调控三维支架材料中细胞间的相互作用。例如,采用电泳法可以将细胞固定在瞬间凝胶化的凝胶特定区域内,以控制细胞团的大小,从而探讨三维环境中细胞-细胞间的相互作用,进而实现工程化组织构建^[34]。结合 3D 组织打印技术,微凝胶还可用于制备具有不同孔隙结构的凝胶片层,凝

胶片层本身或通过层层叠加均可获得具有特定组织微结构的三维组织工程支架^[35]。然而,无论是制造分辨率方面还是复杂仿生形态的支架材料制备方面,“自上而下”的方法在构建组织的复杂结构方面还存在许多问题,如难以在三维支架结构中精确沉积不同种类的细胞和细胞外基质等。

2.2 “自下而上”组织工程应用

组织工程构建也可以由更小的构件组装而成。大多数生物组织都是由数百个微米级重复单元组成的,这些单元是由多种不同类型的具有特定三维微结构、组织特异性以及功能特性的细胞(如胰岛、肾或血窦、骨细胞等)相互作用而成^[36]。“自下而上”的方法旨在通过模仿体内重复功能单元的组织结构,由较小的单元组装进而形成更大的组织,能够从纳微米尺度层面进行组织的仿生结构设计(见图 2b)^[37]。例如,肝脏的基本功能单元是肝小叶,如果能够制造出六边形的小叶微结构单元,再将这些重复功能单元通过一系列的堆积组装最终将能够获得具有类似自然肝脏组织的复杂结构与功能的工程化组织。

目前已有一些利用微凝胶和微尺度制造组装技术实现一些组织或器官构建的报道,如血管、肝脏组织、骨单位构建等。Hasan 等^[38]将一同轴针头置入孔腔状微流体 PDMS 中,于不同孔腔位置处注射含不同细胞的明胶预聚液,再通过光交联成胶再挤出模具,成功构建了具有血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞分层分布的血管凝胶纤维。Sefton 等^[39]在生物反应器内,将内部包裹 HepG2 肝细胞、外表面接种内皮细胞的棒状胶原微凝胶进行灌注培养。在灌注的作用下,细胞外基质的分泌与粘结能够使微凝胶之间自发紧密结合,最终组装形成一个微型类肝脏组织复合体,并在微凝胶模块之间形成相互贯通的通道,成功模拟了组织中的微血管结构,表现为凝血时间推迟。Sun 等^[33]利用两步光刻蚀的方法制备内环包裹 HUVEC 细胞外环包裹 MG63 细胞的具有同轴双环结构的微凝胶阵列,通过微凝胶的顺序组装,获得了具有血管细胞/骨细胞分层分布的贯通管状组装体,模拟了天然骨单位中内部贯通血管结构外部骨组织结构的结构特点(见图 4)。

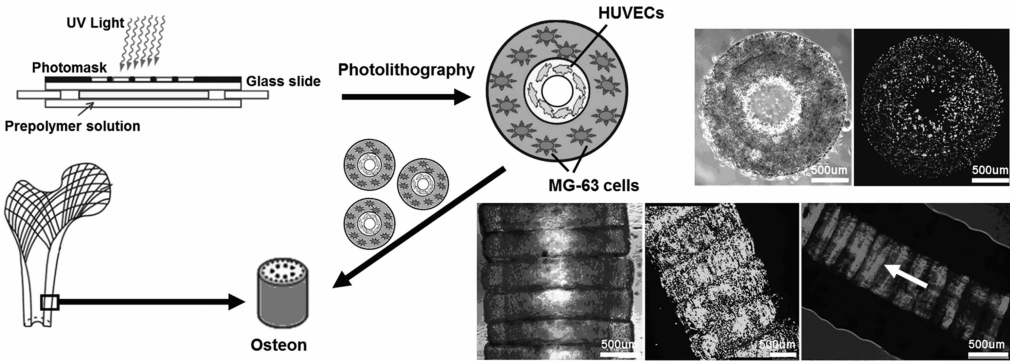


图 4 光刻蚀技术制备 HUVEC/MG63 细胞分层分布的双环微凝胶及其组装构建类骨单位^[33]
Figure 4 The double-ring microgels with HUVECs/ MG63 cells stratified distribution fabricated by photolithography technology and their assembly to construct osteon-like structure^[33]

3 微尺度水凝胶在组织构建中的优势及挑战

综上,基于微尺度水凝胶及“自下而上”方法组装构建工程化组织复合体在组织工程中具有很好的应用前景,其优势主要体现在以下几点:首先,微尺度水凝胶能够在纳微米层面上实现三维细胞微环境模拟,通过调节微凝胶的形状和大小,可以实现材料表面拓扑结构对细胞功能的调控;其次,与微制造技术相结合,可以实现复杂、不规则结构的微凝胶单元制造,从而在微尺度上模拟复杂组织的微观精细结构,最终通过微凝胶的组装实现组织的微观到宏观的结构构建;最后,利用光刻、微流体等微制造技术,可以实现微尺度水凝胶中不同功能细胞的区域化有序接种,有望在结构模拟的基础上实现组织的功能仿生。

尽管从理论上讲,单元组装制造技术可以获得组织的复杂结构,但迄今为止,大多数研究还停留在结

构的构建上,获得功能性再生组织的成果并不多,微尺度水凝胶的应用仍然面临许多挑战,如发展更为先进与可行的微制造技术,开发智能化、批量化同时又细胞相容的微单元组装方法,以及材料的生物活性有限问题等。其中,缺乏既适于微制造及组装过程,又具有良好的细胞生物活性的材料是制约该技术发展的重要原因。普通水凝胶由于缺少细胞贴附界面和亲和位点,大大影响了细胞在水凝胶中的存活,更难以实现对于特定细胞的形态表达及细胞行为的精确调控,甚至细胞包裹到水凝胶中几天或几周之后就会出现凋亡,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^[40]。未来,“自下而上”组织构建需要在发展更为先进与可行的制造技术的同时,建立起适用于单元组装成型并具有一定细胞功能的材料体系,最终实现组织的结构仿生并功能仿生。

4 结语

微尺度水凝胶的制备为组织工程中自然组织的复杂结构模拟与功能重建提供了新的途径,并显示出很好的应用前景。一方面,在“自上而下”组织构建中,微凝胶可以用来在大块支架材料中构建微血管和微观结构;另一方面,微凝胶可以作为“自下而上”组织构建的功能化微模块用来模拟组织微小结构,再通过模块的逐级组装实现三维组织的宏观构建。然而,要实现真正的功能化组织或器官重建,还需要不断地努力开发新型先进功能材料,在组织结构模拟的基础上,进一步对组织工程构建物进行细胞外基质的功能构建。

参考文献

- [1] Langer R, Vacanti J. *Science*, 1993, 260(5110):920~926.
- [2] Lanza R, Langer R, Vacanti J P. *Academic Press*, 2011.
- [3] Salgado A J, Coutinho O P, Reis R L. *Macromol Biosci*, 2004, 4(8):743~765.
- [4] Niklason L E, Langer R. *JAMA-J Am Med Assoc*, 2001, 285(5):573~576.
- [5] Carmeliet P. *Nat Med*, 2000, 6(4):389~395.
- [6] Calvi L, Adams G, Weibrecht K, Weber J, Olson D, Knight M, et al. *Nature*, 2003, 425(6960):841~846.
- [7] Griffith L G, Swartz M A. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(3):211~224.
- [8] Khademhosseini A, Langer R. *Biomaterials*, 2007, 28(34):5087~5092.
- [9] Katz J S, Burdick J A. *Macromol Biosci*, 2010, 10(4):339~348.
- [10] Stuart M A C, Huck W T, Genzer J, Müller M, Ober C, Stamm M, et al. *Nat Mater*, 2010, 9(2):101~113.
- [11] Slaughter B V, Khurshid S S, Fisher O Z, Khademhosseini A, Peppas N A. *Adv Mater*, 2009, 21(32/33):3307~3329.
- [12] Chan V, Zorlutuna P, Jeong J H, Kong H, Bashir R. *Lab Chip*, 2010, 10(16):2062~2070.
- [13] Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti J P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8):2480~2487.
- [14] Lau T T, Wang C, Wang D A. *Compos Sci Technol*, 2010, 70(13):1909~1914.
- [15] Whitesides G M, Ostuni E, Takayama S, Jiang X, Ingber D E. *Compos Sci Technol*, 2001, 3:335~373.
- [16] Fukuda J, Khademhosseini A, Yeo Y, Yang X, Yeh J, Eng G, et al. *Biomaterials*, 2006, 27(30):5259~5267.
- [17] Ling Y, Rubin J, Deng Y, Huang C, Demirci U, Karp J M, et al. *Lab Chip*, 2007, 7(6):756~762.
- [18] Dang S M, Kyba M, Perlingeiro R, Daley G Q, Zandstra P W. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78(4):442~453.
- [19] Xia Y, Whitesides G M. *Annu Rev Biomed Eng*, 1998, 28(1):153~184.
- [20] Liu V A, Bhatia S N. *Biomed Microdevices*, 2002, 4(4):257~266.
- [21] Luo Y, Shoichet M S. *Nat Mater*, 2004, 3(4):249~253.
- [22] Khetan S, Burdick J A. *Soft Matter*, 2011, 7(3):830~838.
- [23] Kim E, Xia Y, Whitesides G M. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(24):5722~5731.
- [24] Yeh J, Ling Y, Karp J M, Gantz J, Chandawarkar A, Eng G, et al. *Biomaterials*, 2006, 27(31):5391~5398.
- [25] Golden A P, Tien J. *Lab Chip*, 2007, 7(6):720~725.
- [26] Domachuk P, Tsioris K, Omenetto F G, Kaplan D L. *Adv Mater*, 2010, 22(2):249~260.
- [27] Xu S, Nie Z, Seo M, Lewis P, Kumacheva E, Stone H A, et al. *Angew Chem-Int Ed*, 2005, 44(5):724~728.
- [28] Burdick J A, Khademhosseini A, Langer R. *Langmuir*, 2004, 20(13):5153~5156.

[29] Roh K H, Martin D C, Lahann J. Nat Mater, 2005, 4(10):759~763.

[30] Branco M C, Schneider J P. Acta Biomater, 2009, 5(3):817~831.

[31] Chrobak K M, Potter D R, Tien J. Microvasc Res, 2006, 71(3):185~196.

[32] Lee K H, Shin S J, Park Y, Lee S H. Small, 2009, 5(11):1264~1268.

[33] Sun J, Wei D, Zhu Y, Zhong M, Zuo Y, Fan H, Zhang X. Biomaterials, 2014, 35(17):4759~4768.

[34] Albrecht D R, Underhill G H, Wassermann T B, Sah R L, Bhatia SN. Nat Methods, 2006, 3(5):369~375.

[35] Tan W, Desai TA. Biomaterials, 2004, 25(7/8):1355~1364.

[36] Costanzo L. Saunders Elsevier; Philadelphia, USA; 2006.

[37] Elbert D L. Curr Opin Biotechnol, 2011, 22(5):674~680.

[38] Hasan A, Paul A, Memic A, Khademhosseini A. Biomed Microdevices, 2015, 17(5):1~13.

[39] McGuigan A P, Sefton M V. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(31):11461~11466.

[40] Wang C, Varshney R R, Wang D A. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(7/8):699~710.

Microengineered Hydrogels for Tissue Engineering

SUN Jing, WEI Dan, YANG Ke, XIAO Wen-qian, FAN Hong-song*

(National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Hydrogels have been extensively used in biomedical applications such as tissue engineering, drug delivery and biosensing. The use of microfabrication technology to engineer the size and shape of biologically relevant microscaled hydrogels has generated new opportunities in addressing challenges in tissue engineering such as vascularization, tissue architecture and cell seeding. Here, the actualities of the research in microengineered hydrogels for tissue engineering applications are reviewed. We will initially provide an overview of the various approaches used to fabricate hydrogels with microscale features, and then discuss their applications in addressing the challenges of vascularization and tissue complexity within tissue engineered constructs.

Key words: Tissue engineering; Microfabrication; Micro-scaled hydrogel; Assembly; Tissue construction