

壳聚糖——一种具有应用潜力的组织工程支架材料

朱爱萍 吴 钧 张 娜 沈 健*

(南京大学表面和界面化学工程技术研究中心 南京 210093)

摘 要 作为一种生物相容及生物可降解的天然高分子化合物,人们对壳聚糖在生物材料领域应用潜力的认识日益深刻,应用开发日益增强。本文通过对壳聚糖与生物材料相关特性的分析,根据目前的研究成果,认为壳聚糖是一种很有潜力的组织工程支架材料。

关键词 壳聚糖 特性 组织工程 支架材料

Chitosan——Skeletal Materials for Tissue Engineering

Zhu Aiping, Wu Jun, Zhang Na, Shen Jian

(Center of Research on Surface and Interface Chemical Engineering and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract Chitosan is a natural polymer with biocompatibility and biodegradability. Recognition of the potential utility of chitosan is growing and the field of chitosan biomaterials is poised to experience rapid growth. This paper analyses the properties of chitosan which are important to biomaterials and points out that chitosan is a kind of potential skeletal materials for tissue engineering according to its research attainment in the field of tissue engineering.

Key words Chitosan, Properties, Tissue engineering, Skeletal materials

组织工程(Tissue Engineering)是指应用生命科学与工程学的原理及方法来设计、组建、维护细胞与组织的生长,以恢复受损伤的组织或器官的功能^[1],其技术特点是不需要移植整个器官和不易引起免疫反应。组织工程以组织修复和再生为研究对象。在进行组织修复、器官更换治疗时,目前通常采用细胞移植技术^[2],随着细胞培养技术制造人工组织和器官学科的迅速发展,组织工程材料也日益受到人们的重视。研究开发具有良好组织相容性的材料已成为组织工程发展的基石,并对加速组织工程的发展和组织工程的临床应用,起着十分关键的作用。作为组织工程细胞支架的生物材料,首先必须具有生物降解性、良好的生物相容性和细胞亲和性;其次,支架应具有足够大的表面以便于细胞粘附;最后,支架材料还必须具有一定的力学性能、可加工性和可消毒性^[3]。

壳聚糖(chitosan)是一种储量极为丰富的天然多糖,来源于甲壳类动物的外壳及某些真菌的胞壁。它植入生物体引起的排异反应小,可被体内的溶菌酶缓慢降解而吸收,即具有生物相容性和生物可吸收性;壳聚糖可制备成海绵膜材或纤维状支架材料,以满足组织工程对支架材料的各种要求。由于这些特点,人们对它在生物材料领域应用前景的认识日益深刻,对其研究与开发日益增强。本文通过对壳聚糖与生物材料相关的特性分析,介绍其研究成果,展示壳聚糖

朱爱萍 女, 31 岁, 博士, 讲师, 从事生物材料的研究。 E-mail: zapyz@yahoo.com *联系人

973 国家重点基础研究发展规划项目 G1999064705

2001-07-16 收稿, 2001-09-26 修回

是一种有潜力的组织工程支架材料。

1 壳聚糖基本性质

壳聚糖是甲壳素(广泛存在于虾蟹的外壳中)部分脱乙酰化衍生物,它是由 β (1 \rightarrow 4)相连的 D-葡聚胺与含量不等的 N-乙酰葡聚胺无规排列起来的一种线性聚糖。依赖于来源与制备过程,壳聚糖的数均分子量可从 50 到 1000Kda 变化,商品壳聚糖的脱乙酰度有从 50%到 90%。壳聚糖是一种半结晶性聚合物,结晶度与脱乙酰度密切相关。脱乙酰度为 0 和 100%时结晶程度最大,而中等程度的脱乙酰度结晶程度最小。这种稳定的结晶结构使得壳聚糖不能溶于中性水溶液,而当溶液 pH 小于 5 时,氨基的质子化使壳聚糖能溶解。这种 pH 依赖的溶解性质对壳聚糖的应用很重要,例如,浇铸不同浓度的壳聚糖溶液,然后在高 pH 溶液中或非水溶剂如甲醇中得到凝胶,拉伸这种凝胶,干燥后形成高强度纤维。壳聚糖膜和纤维已广泛地应用于工业,有关壳聚糖膜与纤维的制备和力学性质已有综述^[4]。

一般来说,壳聚糖凝胶过程具有 pH 依赖性,但用甘油磷酸二氢钠来调节酸性壳聚糖溶液,体系 pH 达到 7.15 时,室温下壳聚糖仍然保持溶胶状态,但将其移到 37℃的生理环境中,壳聚糖能够从溶胶立刻转变为凝胶,即壳聚糖凝胶过程由 pH 依赖性转变为温度依赖性。利用此性质,可将生长因子原位释放至体内^[5]。

由此可见,当壳聚糖作为组织工程支架材料时,它的基本性质决定了其不仅具有较好的力学性能,而且易于加工成型,还能便于运载生物活性物质。

2 溶液中的阳离子性质及其高电荷密度

动物细胞在生理 pH 条件下,细胞表面都带有分布不均匀的负电荷,因此,壳聚糖在水溶液中的阳离子性质和高电荷密度可使得壳聚糖表面与带负电荷的细胞易产生静电吸引力,这有利于细胞的粘附。而且,高电荷密度使壳聚糖与许多水溶性阴离子聚合物形成不溶的聚电解质配合物(PEC)。例如,壳聚糖可与阴离子糖胺聚糖 GAGs 和藻酸钠以及合成聚阴离子如聚丙烯酸^[6,7]形成 PEC。由于壳聚糖电荷密度具有 pH 依赖性,当将这些 PEC 移至生理 pH 环境导致部分固定的聚阴离子解离。这一性质可用于原位负载生物活性聚阴离子如 GAGs 及 DNA。例如,从壳聚糖-肝素 PEC 中释放出的肝素可以促进移植物附近炎症细胞释放生长因子^[8],从 PEC 中释放出的 DNA 能保护核酸酶降解所生成的质粒,同时有利于与细胞膜有关的细胞迁移。

3 生物活性

壳聚糖结构中含有与 GAGs 共有的 N-乙酰葡聚胺组分。既然 GAG 具有与生长因子、细胞受体和粘附蛋白特殊的相互作用,那么具有类似结构的壳聚糖应同样具有相关的生物特性。已有报道,壳聚糖齐聚物具有对巨噬细胞刺激的效果,这与其含有 N-乙酰葡聚胺组分密切相关。壳聚糖及甲壳素都具有体内外嗜中性粒细胞趋化效应^[9]。许多研究考察了壳聚糖及其衍生物支架对组织的反应^[7,10~15],总的来说,这些材料引起的异物反应小,几乎观察不到纤维胶囊,形成的是正常的粒状组织,加快血管生成,呈现典型的治愈过程,短时期内(小于 7d),嗜中性粒细胞明显在移植物附近堆积,但又迅速分散,慢性炎症反应不会扩展。上面提到的壳聚糖及壳聚糖中的组分对免疫细胞的刺激作用,会引发原位细胞迁移,最终使得支架材料与组织整合。

4 降解

在体内,壳聚糖是通过酶水解而降解的,起主要作用的是溶菌酶。溶菌酶通常作用于 *N*-乙酰葡聚胺组分,许多研究结果表明,溶菌酶对壳聚糖的降解活性较低,降解的产物是不同长度的壳聚糖齐聚物,降解的速度强烈依赖于壳聚糖的结晶度。而结晶度又取决于壳聚糖的脱乙酰度。脱乙酰度大于 85% 的壳聚糖表现出低的降解速率,在体内可滞留几个月,而低脱乙酰度的壳聚糖降解得比较快。这个结论已通过用不同侧链分子的衍生化反应来验证。因为衍生化反应结果改变了壳聚糖分子链的堆积方式,增加了非晶态组分,因此经过衍生化的壳聚糖降解得较快。庄造霞等^[16]对壳聚糖膜的生物降解性进行了研究,结果表明经过 60d 壳聚糖膜降解 36.7%~40.4%,并且壳聚糖降解速率受其分子量影响,分子量越小,降解得越快。壳聚糖膜在动物体内降解研究表明,经过 20d 壳聚糖膜可降解 8.2%^[17]。总之,在生理环境下,壳聚糖能被组织中的酶慢慢吸收而逐渐降解。

总的来说,壳聚糖的降解速度比较慢,而组织工程对支架材料的降解速度又较高,要求材料的降解速度应与细胞的增殖速度相匹配,因此通过改性来提高壳聚糖的降解速度以满足细胞支架材料降解要求的研究还需加强。

5 多孔支架材料

细胞支架材料必须有足够大的表面积以便于细胞粘附,因此,开孔材料表面比普通材料表面更有利于细胞培养,材料的孔径和孔隙率直接影响细胞的生长速率和繁殖速率。

壳聚糖可制备成多孔结构材料是其可用于组织工程支架材料的一个突出特点。目前报道较多的方法是通过冷冻及冷冻干燥的方法从壳聚糖-醋酸溶液中制备有孔材料^[18,19]。其原理是,冷冻时,冰的晶核从溶液中形成,冰晶慢慢长大,然后冷冻干燥使冰升华,从而得到多孔支架材料。其孔的尺寸和孔隙率可由改变冷冻温度和壳聚糖溶液浓度来控制,孔的取向则通过改变冷冻速度来控制。这个过程不用有机溶剂和添加剂,制备的是洁净的多孔生物材料。壳聚糖支架的形状,由溶液浇铸时的模子形状来控制,圆柱型支架可切成特殊的尺寸,用于体内移植;平面支架主要适合用于二维组织如人工皮肤与软骨;多孔的微球用于细胞扩增的生物反应器;管状的支架用于管状组织,如血管,多管微结构^[18]。

壳聚糖多孔支架材料的力学性质主要依赖于孔的尺寸和取向。水化后的壳聚糖支架的拉伸测试结果表明,多孔膜的弹性模量(0.1~0.5MPa)比无孔膜的(5~7 MPa)大为降低。孔隙及其取向差异使得多孔膜的伸长率可从无孔膜的 30%~100% 变化,最大伸长率出现在孔无规取向状态。-78℃ 下迅速冷冻得到 120μm 孔径的的支架材料,呈现二维分布杂化材料典型的应力~应变曲线:低应力下为低模量区,高应力下的模量可为低应力下模量的 2~3 倍,拉伸强度为 30~60kPa。

由壳聚糖制备的多孔材料,孔径和孔隙率都易于控制,只是多孔支架的力学性能有待于进一步提高。

6 化学衍生物

壳聚糖链的吡喃环上含有活性的羟基和氨基,它们能进行衍生化反应,结果不但能赋予壳聚糖特殊的生物活性而且能够调节壳聚糖的力学性质。例如,通过壳聚糖分子中的伯胺,对其进行侧基离子改性,使壳聚糖晶体结构受到破坏,非晶态部分增加,溶解性得以提高,力学性

能得以调节。当然,特定的性质依赖于侧基的性质,如碳原子数大于 5 的 *N*-烷基化衍生物溶解性会降低,在溶液中易于形成胶束。在壳聚糖表面所衍生的基团上固定生物活性分子,赋予其生物特性的报道较多,如多孔性的壳聚糖-羟基磷酸钙复合固定抗生素,缓慢释放的药物能预防骨髓炎;壳聚糖-GAG 配合物固定菌落细胞分泌的生长因子,可抑制平滑肌细胞生长;壳聚糖海绵支架固定血小板衍生生长因子(PDGF-BB),缓慢释放出的生长因子能够诱发或刺激骨形成^[20]。此外,壳聚糖硫酸化衍生物将壳聚糖的阳离子、止血、高 pH 不溶解性质相应地逆转成阴离子、抗凝血性及水溶的特性。壳聚糖可以衍生的基团很多。壳聚糖易于发生生化反应为拓宽其在组织工程材料方面的应用提供了无限的潜力。

7 壳聚糖的细胞相容性

有关壳聚糖与哺乳动物细胞相互作用已有报道,涉及的细胞包括成骨细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、角膜细胞以及肾上腺细胞等^[12,21,22],从组织修复和再生的角度来说,大多数情况下壳聚糖在与细胞的相互作用时,材料引起的异物反应少。Popowicz 等报道上皮细胞可在壳聚糖膜上生长,成纤维细胞可在胶原与壳聚糖复合膜上生长,引入壳聚糖可增加细胞粘附但会抑制细胞的生长。PVA 与壳聚糖共混形成的高弹性水凝胶,当壳聚糖的组分超过 15(wt)%时,L929 细胞在水凝胶上的贴壁率随壳聚糖含量增加而增加,当组分达到 40(wt)%时细胞的粘附与生长超过胶原;PVA/壳聚糖的复合膜比 PVA 膜更适合于细胞培养,细胞质网更易于铺展,细胞更易于粘附与生长^[23,24]。由于壳聚糖能够加快血管上皮细胞的生长,而 GAG 是一种细胞外基质聚糖,能阻止平滑肌细胞(SMC)的生长,壳聚糖-GAG 形成的离子配合物有可能很好地控制平滑肌细胞的生长^[25]。而由于血管内皮细胞不能很好地增殖、平滑肌细胞过多地增生,以及不适当的生理-力学性质,使得小直径血管移植悬而未决,组织工程的方法可以从根本上解决这一问题。尽管单独的壳聚糖不能用作血管接枝材料,但壳聚糖-GAG 复合物可以选作血管移植物材料,因为这一配合物支架材料能够控制细胞的生长,促进血管的再生。*N*-硫酸化壳聚糖衍生物会促进内皮细胞(HUVECs)细胞产生白介素(IL)-1 β ,IL-6 和 IL-8 因子以及肿瘤坏死因子,即 *N*-硫酸化壳聚糖衍生物能促进 HUVECs 细胞的功能化^[26]。以上壳聚糖与细胞相容性的基础研究证实了壳聚糖具有良好的生物相容性。

8 结束语

壳聚糖结构中含有可衍生化的活性羟基、氨基,可以用来负载生物活性因子;水溶液中阳离子性质及其高电荷密度,有利于细胞的粘附和用来离子改性;壳聚糖独特的化学结构决定了其与细胞与细胞外基质特殊而有益的相互作用,这些因素共同作用使壳聚糖具有良好的生物相容性;壳聚糖具有生物可降解性;壳聚糖是部分结晶性高分子,具有较好的力学性能,而且壳聚糖化学衍生化的结果可以调节其力学性能;壳聚糖易于制备成微相分离结构、多孔结构和纤维结构,即从结构上可适用于多种组织体系。以上这些性质决定了其在组织工程材料领域独特的应用价值,相信壳聚糖相关生物材料一定会在组织工程中起到良好的作用。

参考文献

- [1] Langer R, Vacanti J P. Science, 1993,260:920~926.
- [2] Wald H L, Sarakinos G, Lyman M D et al. Biomaterials, 1993,14(4):270~274.

- [3] 中华整形外科杂志, 2000, 16(6):328~330.
- [4] Hirano S, Midorikawa T. *Biomaterials*, 1998,19(1-3):293~297.
- [5] Chenite A, Chaput C, Wang D et al. *Biomaterials*, 2000,21: 2155~2161.
- [6] Gaserod O, Smidsrod O, Skjak-Braek G. *Biomaterials*,1998,19 (20):1815~1825.
- [7] Denuziere A, Ferrier D, Damour O et al. *Biomaterials*,1998,19(14):1275~1285.
- [8] Kratz G, Arnander C, Swedenborg J et al. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.*, 1997,31(2):119~123.
- [9] Usami Y, Okamoto Y, Takayama T. *J. Biomed. Mater. Res.*,1998,42(4): 517~522.
- [10] Onishi H, Machida Y. *Biomaterials*,1999,20(2):175~182.
- [11] Muzzarelli RA. *Cell Mol. Life Sci.*, 1997,53(2):131~140.
- [12] Eser Elcin A, Elcin Y M, Pappas G D. *Neurol. Res.*, 1998,20(7):648~654.
- [13] Elcin Y M, Dixit V, Lewin K et al. *Artif. Organs.*,1999,23(2):146~152.
- [14] Kratz G, Back M, Arnander C et al. *Scand. J. Plast. Recondtr. Surg. Hand. Surg.*,1998,32(4):381~385.
- [15] Hamano T, Teramoto A, Iizuka E et al. *J. Biomed. Mater. Res.*,1998,41(2):270~277.
- [16] Zhuang Z X, Sun Q F, Yang P S et al. *山东医科大学学报*,1996,34(4):337~339,348 .
- [17] 曹宗正, 卢凤琦, 王凤山 等. *生物医学工程学杂志*, 1995, 12(4):364~366.
- [18] Sundararajan V M et al. *Biomaterials*, 1999,20: 1133~1142.
- [19] Kang H W, Tabatay, Ioshito Y. *Biomaterials*, 1999,20(14):1339~1344.
- [20] Park Y J, Lee Y M et al. *Biomaterials*, 2000,21:153~159 .
- [21] Hamano T, Chiba D, Teramoto A et al. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 1998,9:985~1000.
- [22] Klokkevold P R, Vandemark L, Kenney E B et al. *J. Periodontol.*, 1996,67:1170~1175.
- [23] Koyano T, Minoura N, Nagura M et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998,39:486~490.
- [24] Chuang W Y, Young T H et al. *Biomaterials*,1999,20(16):1479~1487.
- [25] Foster A, Matthew H W T. *Proc.-NOBCCHE*, 1998,25:127~129.
- [26] Takashi M, Yukiko I, Nishimura S I et al. *J. Biomed. Mater. Res.*,43:469~472.