

· 脂肪源性干细胞与组织工程专题综述 ·

脂肪组织工程中新型支架材料的研究进展

王小毅 刘毅

【摘要】 脂肪组织工程是通过干细胞、支架以及生长因子这 3 类要素来实现组织器官的再生和修复。在过去几十年里,随着组织工程和再生医学的快速发展,为了更限度地模仿细胞外基质成分,各类生物材料支架已经被广泛应用于脂肪组织工程。研究者们通过静电纺丝、微加工、自组装、3D 打印等技术来探索适合脂肪组织工程的支架,其中主要包括天然生物材料及合成生物材料。优良的支架不仅能够填充缺损,而且能够通过控制化学成分和物理性质(如机械性能和微结构)来影响脂肪间充质干细胞的增殖和分化。因此,组织工程支架必须从基本性质上具有一定的仿生结构及功能,即“活”支架,这样才能彻底代替病损组织或器官。现笔者就近年来用于脂肪组织工程的各种新型支架作一综述。

【关键词】 生物材料支架;脂肪组织工程;细胞外基质

1 天然材料支架

1.1 脱细胞基质支架 天然材料支架在组织工程中的应用非常广泛,选择用于组织工程支架的天然材料是天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的化合物或从其他生物中提取的聚合物^[1-2]。许多研究表明,天然材料可以表现出类似于 ECM 的各种理化性质,并且具有生物相容性、可降解性和固有的生物学特性,这些特性可以使他们成为组织工程适宜的支架材料,例如胶原蛋白、透明质酸、脱细胞基质和壳聚糖等^[3]。其中,脱细胞 ECM 支架近年来已成为研究热点^[4]。将 ECM 作为支架应用于组织工程具有很大潜能,在组织脱细胞化期间,脂肪细胞从组织中排出,但是其天然的超微结构高度保存,将有利于调控干细胞的分化以及组织重建^[5]。Fu 等^[6]首先提出,将人类脂肪组织脱细胞外基质(extracellular matrix of human adipose tissue, hDAM)和人类脂肪来源干细胞(human adipose derived stem cells, hASCs)进行共培养应用于脂肪组织工程。结果显示,该支架不仅能够促进脂肪干细胞的增殖以及分化,并且具有较低的免疫原性,能够长时间存在于体内而不发生排斥反应。其中,ECM 支架材料由于其在组织形成和器官发育中的重要作用而被人们所熟悉并深入研究,而且 ECM 对于细胞的生物学行为,如迁移、增殖和分化等也有着直接的影响。因此,ECM 作为一种支架材料有着其独特的优势。然而,虽然脱细胞技术的发展日新月异,涌现了许多脱细胞方法,但现有脱细胞洗脱方法均存在一定的不足,如洗脱时间长,支架机械性能与完整脂肪组织相比有所下降,ECM 成分破坏严重,生长因子大量丢失等。因此,需要进一步改善其力学性能来满足脂肪组织工程要求。

1.2 天然材料复合支架 应用于组织工程的天然聚合物也有益于脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, ADSCs)的增殖^[7]。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是能够促进 ADSCs 增殖较为常见的天然生物材料。作为

ECM 的重要组成部分,通过高保水能力及溶胀性,可显著增强细胞在支架中的附着和迁移,并且形成的多孔结构能够为干细胞生长及增殖提供良好的空间。此外,ADSCs 能够在 HA 支架中形成小的共聚体,且以小共聚体的形式来促进营养物质的交换及代谢。由于 HA 具有良好的生物相容性、非免疫原性、高度吸湿性以及降解产物安全,无不良反应,HA 及其衍生交联产物已被广泛应用于组织工程^[8]。其他天然聚合物复合支架,如胶原-HA 支架和Ⅱ型胶原支架,也能够促进 ADSCs 的增殖^[9]。目前,壳聚糖、丝素蛋白、藻酸盐和天然磷酸钙^[10]也被用于在 3D 环境中培养 ADSCs,ADSCs 能够在该类支架上分化成脂肪细胞。但由于使用单一上述材料会出现降解速率较快或较慢,脂肪组织生成较少等缺点,因此,在组织工程领域的应用受到了限制。通过不同比例制备得到的各种复合 3D 支架与单一材料支架相比,具有更加优良的生物学及物理学特性(包括几何形状、孔隙率、机械强度、黏附率),能够更好地符合组织工程生物支架的要求。例如同接种于单纯藻酸盐支架的 ADSCs 相比,藻酸盐/明胶基质支架能够更好地促进脂肪生成^[11]。京尼平交联的丝素蛋白/壳聚糖支架与单纯的丝素蛋白支架相比,具有更好的机械性能以及可控的降解速率^[12]。

1.3 可注射式支架 可注射式支架是一种将流动性较好的生物材料作为支架,再将其与干细胞结合,通过注射方式来填充软组织缺损。该类支架具有手术创伤小、可塑性较强、水溶液环境有利于细胞黏附等优点,主要包括温敏型、交联型、复合型水凝胶支架。这种可注射式水凝胶支架具有良好的可控性,其机械特性(如凝胶时间、凝胶强度、降解速率)可通过改变催化物及聚合物的浓度得以控制。这种改性的水凝胶在软组织缺损微创手术及硬膜外手术中具有潜在的应用价值。广泛的硬膜外纤维化是脊柱手术后的常见并发症,并且可引起疼痛及粘连。Lin 等^[13]将含脂肪干细胞及脱细胞基质的 HA 制备成水凝胶,通过注射方式来重建硬膜外脂肪,结果表明,这种含有 DAM/ADSCs 的 HA 水凝胶支架能够诱导 ADSCs 形成脂肪组织,并且能够阻断纤维组织的侵袭,具有重要的临床应用价值和较广阔的发展前景。

DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.007

作者单位:兰州大学第二医院,甘肃 兰州 730000

通信作者:刘毅,Email:liuyi196402@163.com

2 合成材料

2.1 合成材料复合支架 ECM 能够为脂肪干细胞的生存提供良好的微环境,因此,各类支架都应尽可能模拟 ECM 的结构及功能。合成材料的优点在于可以针对支架特定的化学和物理性质(如孔隙率、表面特性和降解产物性质)进行优化^[14-15]。在理想情况下,用于组织工程的聚合物材料能够促进细胞增殖,并且当需要时可以调节干细胞分化成特定细胞系。Zonari 等^[16]提出,聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯(polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate, PHBV)与 ADSCs 复合可以诱导皮肤再生。PHBV 是聚羟基脂肪酸酯的一种,由微生物合成,具有良好的生物相容性和机械强度,最终降解产物是(R)-3-羟基丁酸,这是人体血液中的一种常见成分。近年来,PHBV 被作为一种可降解的组织工程材料而引发越来越多的关注。在这项研究工作中,PHBV 支架与周围组织融合良好,周围可见少许渗出和炎症细胞浸润,这可能有助于该支架快速降解。此外,PHBV 支架能够为细胞提供了一个相对湿润的环境,同时可刺激 ADSCs 分泌各种生长因子,这些因子能够加速血管形成和 ECM 沉积,减少瘢痕的形成。Frydrych 等^[17]通过冷冻干燥法制备出机械性能较柔软的聚甘油癩二酸酯(Polyglycerol sebacate, PGS)/聚 L-乳酸(Poly-L-lactic acid, PLLA)3D 共混物支架。体外细胞试验结果表明,PGS/PLLA 支架适合于 ADSCs 的培养,因其能够刺激 ADSCs 的增殖和 ECM 生长。扫描电镜观察发现,PGS/PLLA 支架具有丰富的多孔结构和良好的亲水特性,以及适合软组织填充的力学性能。因此,合成材料能够更好地控制支架的机械性能和生物化学性质,在组织工程和再生医学领域具有很好的发展空间^[18]。

2.2 纳米材料支架 有研究表明,使用纳米生物技术精确控制的支架微结构可以影响 ADSCs 的分化,支架的特性可以通过改变材料的微结构来实现。二氧化硅纳米粒子(silica nanoparticles, NP)可以通过激活细胞外信号相关激酶(extra-cellular signal-related kinase, ERK)1/2 来促进 ADSCs 的增殖。ERK 1/2 信号通路是与生物聚合物诱导干细胞增殖相关的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径。将 ADSCs 分别接种到含有 NP 和二氧化硅微粒的 1% FBS DMEM 培养基中,在 NP 的存在下,ADSCs 增殖速率显著增加,而对于 MP,则并没有观察到明显的变化,表明 NP 能够促进 ADSCs 的增殖,并且证明 MAPK 途径有可能是调节增殖的机制^[19]。因此,含有 NP 的支架可以促进 ADSCs 生长。

2.3 3D 激光辅助生物打印支架 生物打印方法有助于保持 ADSCs 的分化潜力。Gruene 等^[20]将 ADSCs 通过激光辅助生物打印技术封装在 3D 支架内。在该项研究中,研究者们将藻酸盐用作支架打印材料。藻酸盐是天然水凝胶,现已广泛用于组织工程领域。在打印过程中,将激光脉冲施加到能量吸收层(红色层),产生高压气泡并将悬浮的细胞推动到该区域下面;然后收集底部的液滴,再将底部产物用交联剂进行交联。对照组未进行激光打印,其余条件不变。将 ADSCs 细胞分别接种于实验组及对照组支架,然后在含有 10% FBS+1 μ mol/L 地塞米松+10 μ g/ml 胰岛素+

0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤+0.2 mmol/L 吡哆美辛的 DMEM 培养基中培养 21 d。分别在第 3 天、第 7 天评价脂肪细胞标记物的表达,其中包括脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)、脂肪细胞脂肪酸结合蛋白(adipocyte fatty acid binding protein, aP2)和过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR- γ 2)来研究细胞分化的程度。通过实时逆转录酶-聚合酶链反应(real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)测量目的基因表达。在第 3、7、21 天,打印组中的 LPL、aP2 和 PPAR- γ 2 的表达水平明显高于非打印组。油红 O 染色结果显示,在生物打印组和非打印组中均可观察到脂肪细胞的生成。这项研究证实,激光辅助生物打印技术对 ADSCs 增殖和分化不仅无明显的负面影响,并且可以上调 ADSCs 的分化。因此,激光辅助生物打印技术在脂肪组织工程支架应用中具有广阔的前景。

3 其他类型支架

由生物材料产生的化学和物理效应可以明显影响 ADSCs 的分化。一方面,化学成分明显影响干细胞的分化能力。例如,胶原具有良好的生物降解性,体内通过胶原酶,使胶原蛋白被降解为小的蛋白质分子、小分子多肽和氨基酸,降解产物可作为组织细胞的营养成分被人体吸收利用,而不存在天然 ECM 中的藻酸盐不能直接与干细胞相互作用。因此,与藻酸盐相比,胶原可支持 ADSCs 分化成更多的谱系。当 ADSCs 封装在胶原蛋白中时,ADSCs 可以分化为皮肤、骨、软骨、腱、韧带、肺和神经^[21]。另一方面,物理性质也在调节干细胞的分化中发挥重要作用。例如,当干细胞封装在聚己内酯(poly caprolactone, PCL)中时,ADSCs 倾向于分化为间充质细胞(如骨、腱和软骨),因为 PCL 的机械性能与体内间充质组织结构相似^[22]。使用不同类型的生物材料,或通过涂层方式改变生物材料的机械或导电性能也可以上调支架中 ADSCs 的增殖。研究表明,聚乳酸-聚吡咯(polylactic acid-polypyrrole, PLA-PPy)支架能够促进 ADSCs 的增殖^[23]。PPy 是导电材料,而 PLA 是绝缘的。纯 PPy 的电导率较高导致电流密度过大,不利于细胞贴附;PPy 的电导率在电流、细胞和介质的共同作用下出现了大幅度下降,因而不能用于长期细胞电刺激试验。该复合材料具有良好的电导稳定性,在此研究中,研究者们用不同的电刺激来调节该支架的导电性能。电刺激可以作为刺激 ADSCs 增殖以及分化的潜在因素,免疫荧光图像中,可以清晰观察到 PLA-PPy 支架中 ADSCs 的数量及黏附率明显高于 PLA 支架,表明 PLA-PPy 支架中 ADSCs 的增殖速率比单纯 PLA 支架中更高,DNA 含量分析也与证实了这一结果。当使用 PLA-PPy 支架时,脂肪细胞 DNA 的表达量明显增加。因此可以得出结论,导电支架有益于 ADSCs 的增殖。

4 存在的问题

一般来说组织工程支架材料应该具备以下几个必要的性质,其中包括低毒性及免疫原性、良好的生物相容性、降解速度与组织再生速度相匹配等。然而大多数生物支架仅具有其中的某一部分性质。比如可注射式支架降解速度较快,无法满足细胞生长周期要求,而像某些合成材料,例如 PHBV

及 PGS/PLLA 支架虽然降解产物无毒,但由于其力学性能较强,因此,比较适合骨组织工程支架。虽然生物材料具有良好的生物相容性,但因大多数来源于动物(如胶原、明胶及壳聚糖等),如果长时间存在,可能会诱导免疫反应。此外,生物材料在体内随时间的降解过程,有可能产生严重的宿主免疫反应。ECM 不仅为细胞提供结构支持,而且能够影响细胞的生长、分化和凋亡。因此,一种理想的支架材料应尽可能满足 ECM 的各种功能结构,才能够符合组织工程的要求。未来支架的发展方向应该是多种材料复合而成的支架,因为天然生物材料和合成高分子材料都存在一定不足,如果将两者按照一定的方法组合并构建具有诱导血管生成作用的复合材料,将具有广阔的应用前景。ADSCs 可在 3D 打印支架中分化成多种组织细胞,参与促进各种损伤的修复再生,是一种很有前景的脂肪组织工程支架,但目前研究尚处于早期阶段。相信在不久的将来,研究者们一定会找到更符合组织工程应用的支架材料。

参考文献:

- [1] Wang L, Johnson JA, Zhang Q, et al. Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering[J]. *Acta biomater*, 2013, 9(11):8921-8931.
- [2] Wang M, Yu L. Transplantation of adipose-derived stem cells combined with decellularized cartilage ECM: a novel approach to nasal septum perforation repair[J]. *Med Hypotheses*, 2014,82(6): 781-783.
- [3] Gomathysankar S, Halim AS, Yaacob NS. Proliferation of keratinocytes induced by adipose-derived stem cells on a chitosan scaffold and its role in wound healing, a review[J]. *Arch Plast Surg*, 2014, 41(5):452-457.
- [4] Porzionato A, Sfriso MM, Pontini A, et al. Decellularized Human skeletal muscle as biologic scaffold for reconstructive surgery[J]. *Int J Mol Sci*, 2015,16(7):14808-14831.
- [5] Hosseinkhani M, Mehrabani D, Karimfar MH, et al. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine[J]. *World J Plast Surg*, 2014, 3(1):3-7.
- [6] Fu RH, Wang YC, Liu SP, et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering[J]. *Cell transplant*, 2014,23(4-5): 621-630.
- [7] Mathews S, Mathew SA, Gupta PK, et al. Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2014,8(2): 143-152.
- [8] La Gatta A, De Rosa M, Marzaioli I, et al. A complete hyaluronan hydrodynamic characterization using a size exclusion chromatography-triple detector array system during in vitro enzymatic degradation[J]. *Anal Biochem*, 2010,404(1):21-29.
- [9] Debnath T, Shalini U, Kona LK, et al. Comparative analysis of chondrogenesis from cartilage tissue and alginate encapsulated human adipose stem cells[J]. *Journal of Arthroscopy and Joint Surgery*, 2015, 2(2):67-74.
- [10] Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities[J]. *Biomaterials*, 2012,33(6):1748-1758.
- [11] Yao R, Zhang R, Luan J, et al. Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation[J]. *Biofabrication*, 2012,4(2):025007.
- [12] Vishwanath V, Pramanik K, Biswas A. Optimization and evaluation of silk fibroin-chitosan freeze dried porous scaffolds for cartilage tissue engineering application[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2016, 27(7):657-674.
- [13] Lin CY, Liu TY, Chen MH, et al. An injectable extracellular matrix for the reconstruction of epidural fat and the prevention of epidural fibrosis[J]. *Biomed Mater*, 2016,11(3):035010.
- [14] Fitzgerald JF, Kumar AS. Biologic versus synthetic mesh reinforcement: what are the pros and cons?[J]. *Clin Colon Rectal Surg*, 2014,27(4):140-148.
- [15] Znalezionia J, Ginterov á P, Petr J, et al. Determination and identification of synthetic cannabinoids and their metabolites in different matrices by modern analytical techniques a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2015,874:11-25.
- [16] Zonari A, Martins TM, Paula AC, et al. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring[J]. *Acta biomater*, 2015,17:170-181.
- [17] Frydrych M, Román S, Macneil S, et al. Biomimetic poly(glycerol sebacate)/poly (l-lactic acid) blend scaffolds for adipose tissue engineering[J]. *Acta Biomater*, 2015,18:40-49.
- [18] Hosseinkhani M, Mehrabani D, Karimfar MH, et al. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine[J]. *World J Plast Surg*, 2014,3(1):3-7.
- [19] Kim KJ. Silica nanoparticles increase human adipose tissue-derived stem cell proliferation through ERK1/2 activation[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015,10:2261-2272.
- [20] Gruene M, Pflaum M, Deiwick A, et al. Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells[J]. *Biofabrication*, 2011,3(1):015005.
- [21] Taghiabadi E, Nasri S, Shafieyan S, et al. Fabrication and characterization of spongy denuded amniotic membrane based scaffold for tissue engineering[J]. *Cell J*, 2015,16(4):476-487.
- [22] Burdick JA, Vunjaknovakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(2):205.
- [23] Peltó J, Björninen M, Pälli A, et al. Novel polypyrrole-coated polylactide scaffolds enhance adipose stem cell proliferation and early osteogenic differentiation[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013,19(7-8): 882.

(收稿日期:2016-07-02)

本文引用格式:王小毅,刘毅.脂肪组织工程中新型支架材料的研究进展[J]. 中国美容整形外科杂志, 2017,28(12):726-728. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.007