

特约专栏

干细胞用微纳支架及其临床应用前景

刘鑫^{1,2}, 孙剑飞^{1,2}, 顾宁^{1,2}

(1. 东南大学生物科学与医学工程学院 生物电子学国家重点实验室 江苏省生物材料与器件重点实验室, 江苏南京 210096)

(2. 苏州纳米科技协同创新中心, 江苏苏州 215123)

摘要: 微纳支架是一类在空间结构上具有微米或纳米尺度特征的仿生支架。与传统支架相比, 微纳支架具有优良的表面效应和尺寸效应, 因此在多种疾病的治疗中表现出极大的优异性。尤其是在与干细胞相结合后, 微纳支架-干细胞复合体可被广泛应用于组织工程修复、肿瘤治疗等领域。然而, 微纳支架的制备方法、种类、表面形貌、尺度以及内部结构序列等因素都影响着微纳支架-干细胞复合体的治疗效果。因此, 拟从微纳支架的制备方法以及微纳支架在干细胞治疗中的研究现状进行综述, 并对其临床应用前景进行展望。

关键词: 微纳支架; 干细胞; 制备方法; 现状; 前景

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2019)06-0533-09

Micro-Nano Scaffolds for Stem Cells and Its Clinical Application Prospects

LIU Xin^{1,2}, SUN Jianfei^{1,2}, GU Ning^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Bioelectronics, Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, School of Biological Sciences & Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China)

(2. Collaborative Innovation Center of Suzhou Nano-Science and Technology, Suzhou 215123, China)

Abstract: Micro-nano scaffolds are typically a type of bionic scaffold with micro- or nano-scale features structurally. Compared with traditional scaffolds, micro-nano scaffolds have excellent surface effects and size effects, and thus exhibit great superiority in the treatment of various diseases. Especially, micro-nano scaffold-stem cell complex can be widely used in tissue engineering repair, tumor treatment, and other fields when combined with stem cells. However, the preparation methods, material types, surface morphology, scale and internal structure sequence of micro-nano scaffolds are all crucial factors involved in the therapeutic effect of micro-nano scaffold-stem cell complex. Therefore, this paper intends to review the preparation of micro-nano scaffolds and the research status of micro-nano scaffolds in stem cell therapy and to prospect its clinical application.

Key words: micro-nano scaffold; stem cell; preparation methods; status; prospects

1 前言

干细胞是一类具有无限自我更新和分化潜能的多功能细胞, 在一定的诱导条件下, 可以定向分化为各种细

胞和组织。由于干细胞具备的这些特点, “干细胞治疗”概念被提出且已广泛应用于现代疾病的治疗。干细胞治疗是指通过体外分离、培养, 定向诱导干细胞分化, 培养出具有正常生理功能的细胞, 利用干细胞移植技术将其移植到体内, 代替那些损伤或非正常死亡的细胞, 达到治疗目的。干细胞移植入体内后发挥作用主要依赖其各种生物学活性, 包括增殖、迁移、粘附、分化和归巢等对体内微环境产生作用, 进而影响病灶的治愈。近年来, 干细胞治疗在临床疾病治疗上已取得显著疗效, 如白血病、血友病、骨缺损、脊髓损伤及癌症诊断^[1]等。

由于可以很好地模拟细胞外基质环境, 为细胞的生

收稿日期: 2018-10-30 修回日期: 2019-01-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFA0104302); 国家自然科学基金国际合作重点项目(61420106012)

第一作者: 刘鑫, 男, 1991年生, 博士研究生

通讯作者: 顾宁, 男, 1964年生, 教授, 博士生导师,

Email: guning@seu.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.201810023

长繁殖提供一个人为的生长空间,微纳支架已被广泛应用于组织工程领域。随着组织工程技术的迅猛发展,构建工程支架为干细胞生长繁殖提供人为的外环境变得至关重要。理想的支架应具备以下特点^[2]:①良好的生物相容性;②良好的生物降解性;③良好的力学性能;④更多的粘附位点。而微纳支架由于其良好的表面效应和尺寸效应,更符合微环境内组织结构特点而更利于细胞生长增殖、迁移、粘附和分化,这是微纳支架比传统支架更为显著的优势。目前微纳支架已被部分应用于临床疾病治疗(表 1),但仍然面临一些较为严重的体内应

用问题,如诱导干细胞分化为癌细胞、引起传染病的危险、人体免疫系统排斥等。随着微纳制造技术和干细胞基础研究的发展,微纳支架在干细胞中的应用被越来越深地发掘。这主要是由于微纳支架不仅兼具传统支架优良的机械性、较强的拉伸性、良好的生物相容性和可控的生物降解性,还具有相似的体内微环境结构、可控的亲疏水性、较强的细胞吸附率和更低的炎症反应^[3,4]。微纳支架复合干细胞的应用极具研究价值和发展前景,本文就微纳支架在干细胞治疗中的研究现状进行了综述,并对其临床应用前景进行了展望。

表 1 目前已批准用于临床或处于临床试验阶段的微纳支架
Table 1 Macro-nano scaffolds approved for clinical application and in clinical trials

Scaffold name	Scaffold composition	Main functions of scaffold	Research status	Research state
Igaki-Tamai	Polycaprolactone, PCL	Coronary artery disease	Preclinical assessment	Japan
Abbott BVS	Poly(lactic acid), PLA	Vascular injury	Phase II clinical trial	US
ART18Z	Poly(D,L) Lactide, PDLLA	Vascular injury	Phase I clinical trial	France
DESolve	Poly(L-lactide), PLLA	Vascular injury	Phase II clinical trial	US
REVA and ReZolve	Polyiodinated tyrosine alkyl carbonate	Atherosclerosis	Phase II clinical trial	US
XINSORB	PLLA and PDLLA	Vascular injury	Phase I clinical trial	China
DREAMS	Magnesium alloys, paclitaxel or rapamycin	Primary lesion of coronary artery and bone injury	Phase I clinical trial	Germany
Nerve graft	Chitosan, Gelatin and Chitin	Nerve injury	Phase III clinical trial	China
Nerve bridge [®]	Extracellular matrix	Nerve injury	CFDA approved in 2012	China
Avance [®]	Extracellular matrix	Nerve injury	FDA approved in 2009	US
Absorb GT1 [®]	PLA	Cardiovascular disease	FDA approved in 2016	US
Neuroflex(TM) [®]	Type-I collagen	Nerve injury	FDA approved in 2016	US
NeuroMatrix(TM) [®]	Type-I collagen	Nerve injury	FDA approved in 2016	US
Neurolac [®]	PLLCL	Nerve injury	CE approved in 2004	Holland
Neurotube [®]	PGA	Nerve injury	FDA approved in 2009	US
NeuraWrap [®]	Type-I collagen	Nerve injury	FDA approved in 2009	US
Small gap casing	Chitosan	Nerve injury	Phase I clinical trial	China

2 微纳支架的常用制备方法

相比于普通支架,微纳支架具有良好的表面效应和尺寸效应,为干细胞的生长繁殖提供了更多的黏附位点。且微纳支架的结构受多种因素的影响,因此结构调控更加灵活多变,可以根据不同的制备方法进行选择。微纳支架和普通支架也存在着紧密的联系。在组织工程领域,一般将生物支架分为 3 个尺度范围,影响着细胞的生长发育过程,包括毫米尺度(普通支架)、微米尺度和纳米尺度(微纳支架)。毫米尺度的支架主要决定着修复组织的总体形态,微纳米尺度不仅决定着组织的形态,还显著影

响细胞的迁移和生长,调控细胞的黏附和基因表达,这也是微纳支架的显著优势。需要根据损伤部位的应用需求做出恰当的选择,例如用于骨缺损支架的力学强度就要大于神经损伤和血管损伤支架所需的力学要求。微纳支架常用的制备方法有相分离法、分子自组合法、静电纺丝法、冷冻干燥法、发泡法和三维(3D)打印技术(表 2)等^[5,6]。

2.1 相分离法

相分离法主要用于微孔支架的制备,由介质的不同可分为热致相分离法、干相分离法和湿相分离法^[41]。热致相分离法是目前应用最广泛的相分离法之一。可应用于多种溶解度差而不能用于干、湿相分离法解决微孔成型

表2 微纳材料支架的制备方法

Table 2 Preparation methods of micro-nano material scaffold

Preparation methods	Representative materials	Average pore size	Reference
Phase separation	poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA		[7]
	Poly(L-lactide), PLLA	Most of them are microporous scaffolds	[8]
	Polycaprolactone, PCL		[9]
	Poly(D,L) Lactide, PDLA		[10]
	Gelatin		[11]
	Polyvinylidene fluoride, PVDF		[12]
Molecular self-assembly	Peptide nanofiber, PNF		[13]
	Hydrogel	Most of them are based on nano scale scaffolds	[14]
	Silk fibroin, SF		[15]
	Poly(lactic acid), PLA		[16]
	Iron-based nanomaterial		[17]
	Polyhydroxyalkanoates, PHA		[18]
Electrospinning	SF		[19]
	Chitosan, CS		[20]
	Gelatin	Most of them are based on nano scale scaffolds	[21]
	Hyaluronic acid, HA		[22]
	Collagen		[23]
	PLLA		[24]
Various composite materials	[25]		
Freeze-drying	SF	The pore size is affected by the	[26]
	CS	pre-freezing temperature	[27]
	Calcium alginate, CA	and rate, and generally	[28]
	Calcium phosphate tribasic, CPT	presents a micro-nano staggered	[29]
	Gelatin	distribution	[29]
Foaming	Polypropylene, PP		[30]
	SF		[31]
	Polyurethane, PU	Most of them are microporous scaffolds	[32]
	PCL		[33]
	Tricalcium phosphate bioceramics, TCP bioceramics		[34]
3D printing	nylon		[35]
	PCL		[36]
	Porous titanium, PT	The pore size can be adjusted according to requirements	[37]
	Acrylonitrile butadiene styrene, ABS		[38]
	Cellulose		[39]
Collagen	[40]		

的各种聚合物中。热致相分离法利用了一种高沸点、低挥发性的溶剂与聚合物混合, 继而降温冷却, 在此过程中产生体系相分离, 然后选择适当的萃取剂将溶剂萃取出来, 从而形成微孔结构。目前采用热致相分离法制备支架的材料主要有 PLGA、PLLA、PCL、PDLA 和 Gelatin 等^[7-11]。极性或非极性聚合物均适用于该方法, 且控制参数少、过程易连续稳定、孔隙均匀可实现各种微观结构, 在组织工程支架制备上具有独特的优势。微孔结构的大小主要受溶剂的种类、温度和材料本身特性影响。Giacchino 等^[8]利用热致相分离技术制备具有 100 和 200 μm 孔径的 PLLA 支架, 溶剂采用二氧六环与水的混合物, 溶剂去除采用真空冷冻干燥法, 通过不同的降温过程得到两种孔径的 PLLA 支架。Rezabeigi 等^[9]将 PCL 与二氯甲烷和正己烷组合形成三元体系的溶液, 在 $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行相分离, 冷冻干燥后得到 PCL 支架。

2.2 分子自组装

分子自组合法是利用非共价键分子间的作用力自主组装成图案。目前, 通过自组装形成的支架主要有 PNF^[13]、Hydrogel^[14]、SF^[15]、PLLA^[16]等。天然或合成大分子可通过自组装产生纳米级超分子结构或纳米纤维, 部分也可自组装成直径达到 $(7.6 \pm 1)\text{ nm}$ 的纳米纤维, 并已被用于研究神经祖细胞的选择性分化。此种方法制备的支架尺度较小、空间结构规则, 且易于人为调控, 展现了巨大的临床应用潜能。Hosseinkhani 等^[42]研究了通过肽-两亲物(PA)分子自组装形成的纳米纤维的三维支架, 通过调控 PA 的结构, 电荷和环境可自组装成薄片、球体、棒状物、圆盘或通道等形状。Gao 等^[43]通过自组装技术成功制备了含 RADA₁₆-c(RGDfK)的多肽 Hydrogel 支架, 并与 I 型 Gelatin-Hydrogel 支架和含精氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、丙氨酸(RADA₁₆)自组装肽 Hydrogel 支架进行比较, 发现其表现出良好的促神经祖细胞增殖和分化的潜能。

2.3 静电纺丝法

静电纺丝技术自 Formulas 发明静电力制备聚合物纤维以来, 已有数十年的发展。静电纺丝的形成过程: 聚合物溶液位于针尖处呈球形液滴, 在高频电场的作用下变为圆锥形(即“泰勒锥”), 再形成射流并被拉伸成细纤维。静电纺丝法制备的支架一般以纳米级纤维支架为主, 目前采用静电纺丝技术制备支架的材料主要有 SF、CS^[20]、Gelatin、HA、Collagen、PLLA、PCL^[44]和各种复合材料。静电纺丝工艺相对于传统方法具有的优点包括高比表面积和孔隙率, 此外还可以通过改变工艺参数来调节一些特性, 例如纤维直径、三维结构及基体组成。所述工艺参数包括使用的聚合物与共聚物之间的关系、电压、流速、针与收集器之间的距离^[24]等。Lin 等^[45]使

用静电纺丝法成功制备出随机取向的 PLLA 纳米纤维, 并证明 PLLA 纤维支架可有效促进神经干细胞的粘附、生长和增殖, 展现了在神经组织工程中的应用潜力。

2.4 冷冻干燥法

冷冻干燥技术的基本过程是低温下使溶液凝固为冰晶, 通过抽真空使其升华, 在升华的位置形成支架孔隙。目前冷冻干燥法制备的支架有 SF、CS、CA、CPT、Gelatin 等^[29, 46]。冰晶形成是该方法的关键技术, 主要有两个阶段: 成核阶段和冰晶成长阶段。冰晶成长大小决定了支架孔径的大小, 而冰晶成长的大小受预冷冻温度和速率的影响, 因此制备支架的尺度可通过调控预冷冻温度和速率加以控制。一般冷冻干燥法制备的支架呈现微纳结构特征分布。此种制备方法不仅过程简单, 而且兼具上述制备方法高比表面积、高孔隙率等优点, 且空间结构易于调控、适合批量生产, 在临床应用中最具发展前景。Wang 等^[26]通过冷冻干燥法制备了含有银纳米颗粒的 SF/甲壳素(Chitin)纳米复合支架, 可用作伤口敷料。Bernhardt 等^[47]通过联合冷冻干燥和交联法制备了含有鲑鱼胶原蛋白和海蜇胶原蛋白的双相支架, 并成功应用于促进成骨和软骨细胞的分化调控。

2.5 发泡法

发泡法指利用气体作为致孔剂制备支架的方法, 主要分为化学发泡法和物理发泡法^[48]。其中化学发泡法应用较多, 常用的化学发泡剂有碳酸盐类^[49]、月桂酸钾^[50]、氯化铵^[51]、氧化剂^[31]等。物理发泡法所使用的发泡剂主要包括氧气(O_2)、二氧化碳(CO_2)、氮气(N_2)、一氧化二氮(N_2O)、碳氢化合物(C_nH_{2n+2})和氟利昂(CFC)等。发泡法制备的支架孔径分布多呈微米尺度, 但存在孔隙分布无法精确控制的问题。且此种方法制备的支架多呈闭孔结构, 如果将其与粒子浸出技术相结合, 则可以制备出连通的开孔结构支架。发泡法制备的支架孔隙率和结构受聚合物材料的结晶性、分子量、平衡时间和放气速率的影响。结晶性和分子量越高, 越难发泡且孔隙率越低; 平衡时间越长则孔隙率越高, 且放气速率对孔隙率影响较小。在支架制备过程中, 可以通过调控这些因素调节支架的空间结构。Maniglio 等^[31]使用 N_2O 作为发泡剂制备了 SF 多孔支架, 主要步骤是将质量分数 5% 或 2% 的 SF 溶液置于容器中, 并采用 0.55 或 1.1 MPa 的 N_2O 进行加压, 使其扩散溶解到溶液中并积聚在悬浮的 SF 中, 然后使容器倒置并通过打开减压阀将溶液通过喷嘴或针头挤出, 溶解气体的膨胀导致溶液在通过喷嘴或针头时瞬间发泡。这种发泡技术允许在温和的加工条件下用相对惰性的发泡剂使 SF 溶液饱和, 从而便于调节孔隙率来制备 SF 多孔支架。

2.6 3D 打印技术

3D 打印技术是一种新兴的高端技术, 采用计算机控制, 因此可精确调控支架的孔径大小和分布, 打印出各种形状的微纳尺度支架, 且成型性好、速度快、可规模化生产^[52]。它是一种以数字模型文件为基础, 运用粉末状金属或塑料等可粘合材料, 通过逐层打印的方式来构造物体的技术, 现已被广泛应用于三维多孔支架材料的打印, 常用的打印材料包括丝素蛋白、丝胶蛋白、水凝胶、PCL、PLA、PLGA、Nylon、PT 和 Collagen 等。此种方法由于采用了计算机辅助控制, 可以达到对支架结构的精确调控, 且支架的大小、形状分布可实现计算机模拟计算, 是未来极具临床应用潜力的支架制备方法之一。但由于目前该技术对材料特性要求高, 还未进行大规模推广。Chen 等^[36]利用 3D 打印技术制备了一种 Hydrogel 支架, 原材料由丝胶蛋白(sericin)和甲基丙烯酸酐改性的明胶(GelMA)组成, 打印出的支架具有高度膨胀性, 且具有规则的大孔结构, 有助于保持湿润, 用于伤口敷料以加速伤口愈合。同时, 该支架还有利于 L929 细胞的粘附和增殖。这些优异的支架性能可被用于伤口护理和药物递送等。

干细胞用微纳支架的制备目前已经发展出诸多方法, 由于不同方法存在各自的优缺点, 可以根据具体的使用要求选择合适的制备方法。

3 干细胞用微纳支架的临床应用基础

3.1 干细胞与微纳支架结合的必要性

干细胞由于其多向分化潜能特性, 可以定向分化为各种细胞, 为人类的健康和现代医学的发展注入了新的希望。干细胞移植是干细胞应用的主要方向之一, 在治疗白血病、脊髓损伤、心脏损伤修复、股骨头坏死、强直性脊柱炎等疾病上均发挥很好的疗效^[53, 54]。干细胞移植入体内的命运将显著影响干细胞在治疗疾病中的效果, 且利用纳米技术能够进一步体内示踪, 监测移植后的干细胞变化^[55, 56]。近年来, 随着组织工程概念的提出和发展, 构建生物工程支架将显著影响干细胞在体内的命运, 促进干细胞在疾病治疗中发挥更好的效果。

组织工程的基本原理是从活体内获得少量的组织, 利用分离培养方法将细胞从组织中分离出来并在体外进行培养扩增, 然后将得到的细胞与生物材料按照一定的比例混合从而形成细胞-材料复合物。然后将该复合物植入机体的组织或器官损伤部位, 随着生物材料在体内逐渐被降解代谢, 植入的细胞在体内增殖并分泌细胞外基质, 最终形成新的组织和器官, 达到修复创伤和重建功能的目的。组织工程的 3 要素: 种子细胞、生物材料和

生长因子。而干细胞和微纳支架就是良好的种子细胞和生物材料,微纳支架可以很好地模拟细胞内微环境,促进干细胞在体内的生长、繁殖、发育^[57, 58]。Mobasseri等^[59]发现R肽修饰PCL纳米纤维支架可显著促进人类间充质干细胞的增殖、粘附和维持细胞长期的活性,并影响人类间充质干细胞的信号转导。Cheng等^[60]以PCL为原料,通过相分离和颗粒浸出技术制备了纳米纤维和微孔组合(NFMP)支架。NFMP支架具有两个层次的构建特征,包括微米级孔隙和纳米级纤维。将支架与神经细胞共培养结果表明,NFMP支架可以显著促进神经分化,且支架的微孔结构可以促进细胞浸润,表现出了独特的微纳结构优势。

另外,干细胞的多分化潜能治疗临床疾病损伤中展现了巨大的应用潜力,但由于干细胞本身所处体内微环境的影响,其在临床上的应用也受到了极大的限制。

主要表现有:存在诱导干细胞分化为癌细胞的可能、有引起传染病的危险、可能导致人体免疫系统排斥等。微纳支架由于可以很好地模拟干细胞微环境,有效引导干细胞规避不利影响,展现了干细胞-微纳支架复合物的独特优势。综上所述,干细胞治疗要想在疾病治疗中发挥良好的治疗效果,结合微纳材料模拟干细胞外基质微环境显得尤为必要。

3.2 微纳支架在干细胞治疗中的临床前研究

干细胞在一定条件下,可以定向分化成机体内的功能细胞,几乎可以形成任何类型的组织和器官。特别是在再生医学领域,干细胞可应用于重建各种组织、器官及其它机体功能。因此,对干细胞移植于体内后的增殖、迁移、粘附、分化和归巢^[61]特性(图1)的研究就显得尤为重要。微纳支架在干细胞治疗中的作用主要是对干细胞上述行为施加积极影响来促进干细胞在体内发挥功能。

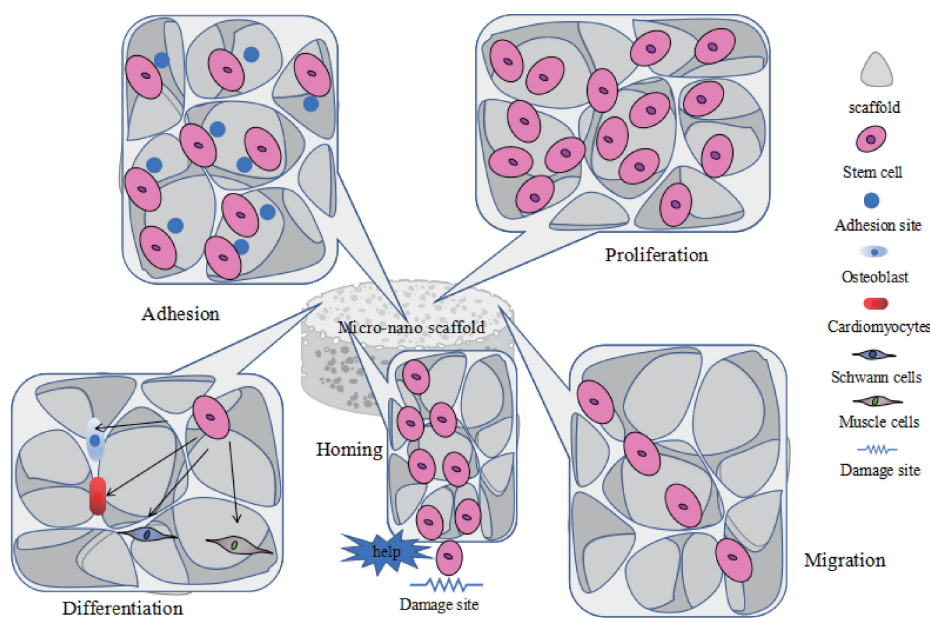


图1 微纳材料支架促进干细胞增殖、迁移、粘附、分化和归巢示意图

Fig. 1 Schematic of the micro-nano material scaffold promoting stem cell proliferation, migration, adhesion, differentiation and homing

3.2.1 干细胞治疗肿瘤的研究

癌症干细胞(CSCs)是具有自我更新能力的肿瘤起始物,是肿瘤耐药、复发和转移最有可能的原因。鉴于CSCs在肿瘤生物学中的巨大作用,有必要开发一种有效的培养系统来生长、维持和富集CSCs。3D细胞培养模型已被广泛用于肿瘤研究^[62, 63]。微纳支架较大的比表面积、连通的孔隙分布和利于干细胞生长的表面形貌被看作是良好的三维细胞培养模型。Wang等^[64]利用三维多孔CS支架和壳聚糖-透明质酸(CS-HA)支架培养胶质瘤

细胞系,探讨胶质瘤干细胞(GSCs)富集的行为。研究其形态、基因表达以及3D支架下细胞的体内致瘤性,并设置2D培养模型作为对照。结果显示,CS-HA支架培养细胞的体内致瘤能力大于2D支架和CS支架。研究结果还表明,CS-HA支架具有更好的富集GSCs的能力,可用于支持肿瘤生物学研究和新型抗癌疗法的开发。

3.2.2 干细胞体外重建人类疾病模型

体外构建人类疾病模型在临床医学的研究中已有相当长的历史,由于人类疾病发生发展的复杂性,以人类

本身作为实验研究对象来探讨疾病的病理机制,在推动医学科学的发展上较为缓慢。目前人类积累的临床经验不仅在空间和时间上都存在着诸多局限性,而且也会受到人道主义原则的限制^[65]。近些年来,随着材料科学和干细胞研究的不断发展,采用微纳材料支架复合干细胞构建体外人类疾病模型变为可能。目前成功利用干细胞支架构建的疾病模型有心脏支架模型、脑缺血模型、神经系统疾病模型、脊髓损伤模型、骨缺损模型等。

Zhen 等^[66]利用双光子诱导聚合(TPIP)技术制作了一个 3D 支架结构的生物感应心脏模型,这种 3D 心脏模型将是体外研究心脏疾病机制的重要进步。具体做法是通过将健康志愿者(WT)和长 QT 综合征 3 型(LQT3)患者的多能干细胞诱导的心肌细胞填充于合成的丝状矩阵,开发 3D 人心脏组织体外模型来模拟人心室心肌层(iPS-CM)。通过观察组织 3D 结构和心肌细胞的排列形状探讨疾病的情况。研究发现,LQT3 iPS-CM 表现出比 WT iPS-CM 更多的收缩性异常,且与具有高纤维刚度和 2D 表面的矩阵相比,细胞在低纤维刚度丝状矩阵上生长时更易受药物诱导而产生心脏毒性。这种人体 3D 心脏模型将帮助我们更好地了解 LQT3 疾病机制,并为此综合征制定更好的治疗策略。

3.2.3 干细胞药物筛选

当今药物的药理学、毒理学及药效学等研究基本都依赖于动物细胞系开展,然而种属之间存在的差异会产生不完全一样的药物疗效反应。且在临床实际用药中,由于不同个体之间的差异,个体对药物产生的反应与治疗效果不完全相同。微纳材料支架在干细胞中的应用为药物筛选建立了很好的条件和平台,其多半以人源性干细胞作为药物筛选试验的对象,可避免因种属差异对药物疗效产生误判。微纳材料支架在其中多扮演促进和引导干细胞分化的作用,为建立干细胞功能支架并引导以干细胞分化为目的细胞建立药物筛选模型^[67]。

药物筛选一般依赖于建立疾病模型发挥作用。Lu 等^[68]认识到,心脏毒性是临床药物消耗的主要原因之一。体外组织模型可以提供有效和准确的药物毒性筛选方法,是临床前药物开发和个体化治疗的理想选择。作者在预制的聚二甲基硅氧烷(PDMS)模具中,通过人自体转基因多能干细胞诱导的心肌细胞来制备心脏组织。用所形成的组织构建体表达心肌细胞特异性蛋白,如层粘连蛋白、胶原蛋白和纤连蛋白,且排列的肌节组织呈现长达 2 个月的稳定自主收缩。其功能表征显示,在 3D 组织中培养的心肌细胞具有更高的收缩速度和速率,并且与在 2D 单层组织中培养的细胞相比有着显著不同的药物应答。在这项研究中,临床相关的药物也进行了测试,

包括抗生素、抗糖尿病和抗癌药物。与传统活力测定相比,基于功能收缩的测定在预测药物诱导的心脏毒性效应方面更为敏感,证明了与临床观察的一致性。因此,作者制备的 3D 心脏模型显示出强大的应用潜力,可用于药物开发的早期安全性评估和个性化治疗的药物筛选。

3.2.4 干细胞病理学机制研究

病理学机制指的是人体各项机能出现功能性紊乱,从而导致疾病的发生与发展。疾病的发生和发展主要包括屏障防御功能下降、神经体液调节失衡、细胞和分子水平上的调节障碍。干细胞由于其多向分化潜能,可以再生多种细胞、组织和器官,大量用于病理学机制的研究。另外,微纳材料支架也为干细胞的生长繁殖提供了 3D 的微环境,进一步促进了干细胞在病理学中的研究。目前,微纳材料支架在干细胞治疗中参与病理学机制研究的有骨髓组织、表皮组织、角膜缘、骨骼肌、心肌、癌症等。干细胞功能支架主要在细胞和分子水平调节参与病理学研究,它们在各项疾病的发生发展、探讨有效的治疗方案上发挥着重要的作用^[69,70]。

Zhao 等^[71]研究了三维系统培养骨髓间充质干细胞(MSC)对肝癌细胞 HepG2 的抑制作用及其机制,建立了含有胶原/基质胶支架的 3D 系统培养 MSC,并将其与 2D 培养系统进行比较。结果表明,3D 支架中的 MSC 比 2D 支架中的 MSC 具有更高的增殖能力,且能够明显抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖。此研究有效地探讨了肝癌细胞的病理学机制,为临床肿瘤的治疗提供了参考。

3.3 影响微纳支架在干细胞治疗的主要因素

干细胞在体内的生长命运显著影响着干细胞在疾病治疗中的效果,微纳支架特有的微纳结构多孔分布可以很好地模拟细胞内微环境、影响细胞的命运,让细胞按照人为的想法发挥特定的功能。但其治疗效果在目前的应用中也受支架的多方面影响,例如:材料种类、表面形态、尺寸大小、表面电荷等^[72-74], 解决这些问题对提高干细胞的治疗效果、加快临床安全性转变尤为重要。

微纳支架复合干细胞发挥治疗作用的效果受微纳支架的多方面影响。其主要是通过影响干细胞在体内的生物活性来影响干细胞在疾病治疗中的效果。例如微纳支架的种类^[72]主要分为天然材料的微纳支架和人工合成材料的微纳支架,天然的有 SF、CS、HA、Collagen、Chitin 等;人工合成的有 PLA、PGA、PCL、PLGA、硅胶管、聚四氟乙烯(PTFE)等。它们大多以聚合物的形式存在。天然材料的微纳支架由于可以更好地模拟细胞外基质,在干细胞治疗中发挥着重要的作用;人工合成材料可以人为调控材料的某些特性,包括硬度、成形性等。谭太贵等^[75]研究了 PLGA 与明胶膜支架材料对神经干细胞生

长、分化的影响,观察了神经干细胞在 PLGA 膜、明胶膜和两者混合膜上的生长和分化情况。结果表明,神经干细胞在 PLGA 膜表面无贴附,但可在 PLGA/明胶膜和明胶膜表面贴附、生长和分化,可用于中枢神经的修复。

微纳支架的表面形貌、尺度和支架内部的结构排列也显著影响干细胞治疗效果^[74, 76]。Prasopthum 等^[77]利用 3D 打印技术制备了类似于细胞外基质的纤维状结构,尺寸从纳米级到厘米级不等,并将其与具有光滑表面结构的传统支架进行对比。3D 打印支架的纳米纤维形貌显著增强了人类间充质干细胞的蛋白质吸收、细胞粘附和分化。这些具有既定结构和纳米级 ECM 模拟形态的 3D 打印支架在软骨和骨再生中具有良好的应用潜能。Ellis-Behnke 等^[78]设计了一种自组装肽纳米纤维支架,可以模拟轴突生长微环境,有效促进急性损伤部位的再生,并能在体内与大脑组织编织在一起。结果表明,自组装排列的纳米纤维与混乱排列的纳米纤维显示出不同的现象。

同种材料的不同制备方法也显著影响干细胞的行为,进而影响干细胞在体内的治疗效果。Namini 等^[79]采用静电纺丝和冷冻干燥方法制备了 PLGA/HA 纳米复合支架,并分别在上面培养人子宫内膜干细胞(hEnSC),分化为成骨细胞的行为。结果显示,冻干 PLGA/HA 支架上培养的培养细胞行为明显优于静电纺丝 PLGA/HA 支架。

微纳支架影响干细胞的治疗效果远不止上述的因素,是由于不同材料本身的复杂性决定的,包括材料的表面电荷、材料本身的化学组分、材料的浸润性等,这些因素均会影响微纳材料支架在干细胞治疗中的应用。

4 干细胞用微纳支架的发展前景

随着再生医学和组织工程技术的发展,干细胞作为种子细胞在疾病的创伤修复和组织器官再造方面发挥着传统医疗技术不可替代的作用。微纳支架作为支架材料中的优质选择,发挥着独特的作用和优势,特别是干细胞与微纳支架的有机结合,展示了巨大的应用潜力。例如,微纳支架高的比表面积为干细胞的生长繁殖提供了更多的粘附位点;微纳支架高的孔隙分布允许干细胞内外营养物质交换且研究表明具有促血管生长的作用;微纳支架的表面修饰,如结合特定的功能因子或图案化修饰等,可以人为调控干细胞的行为,包括诱导干细胞向目标细胞分化等,进一步影响干细胞在体内的命运。干细胞的研究作为再生医学的基础研究,虽然受到世界各国的普遍重视,但目前大部分的干细胞治疗技术尚处于临床试验阶段。这主要是因为对干细胞的诸多问题还没有完全理解,以及结合微纳支架的干细胞治疗也有许多问题还有待解决。例如,干细胞异质性分化、干细胞移

植入体内的免疫排斥、微纳支架介导的干细胞分化的背后机制不清楚、微纳米形貌调控细胞的形态,而形态变化与细胞增殖、分化等功能的关系不清楚、干细胞伦理问题等。世界各国的科研工作者也正致力于干细胞基础研究的深入开展,这些开发工作基于微纳支架复合干细胞,并应用于多种疾病的治疗,如机械性创伤疾病、免疫系统疾病、心血管系统疾病、遗传性疾病等。也有人将磁性纳米材料与功能支架融合,发挥功能支架模仿细胞外基质、促进细胞增殖、迁移和分化的作用,而磁性纳米材料独有的磁学特性可以发挥定向引导示踪、远程刺激和热疗作用^[80],两种材料的深度融合可以在疾病治疗中发挥更好的疗效。相信随着微纳材料科学的发展和干细胞与微纳支架的深度融合,干细胞微纳功能支架替代原生组织器官等变得极有可能。更多微纳支架在干细胞治疗中的作用将被开发。

5 结语

近年来,随着微纳技术的快速发展和干细胞基础研究的不断深入,复合干细胞的微纳功能支架将更加完善,在疾病治疗方面将发挥无可替代的作用,特别是在组织工程和再生医学领域,将为临床疾病的治疗和诊断做出巨大的贡献。研究者们将针对目前存在的问题继续深入探讨,特别是支架介导的干细胞分化背后的机制、关于微纳支架局部和全身生物相容性以及潜在毒性的知识等。干细胞移植后细胞的存活、分布和命运对回答有关剂量、递送途径或给药时机的问题至关重要。随着微纳技术和干细胞基础知识体系的完善,复合干细胞的微纳功能支架将会极大地促进再生医学的发展,为人类健康做出巨大贡献。

参考文献 References

- [1] TEHRANI R M, VERDI J, NOUREDDINI M, *et al.* Journal of Cellular Physiology[J], 2017, 223(5): 3831-3845.
- [2] YOON H, AHN S, KIM G. Macromol Rapid Commun[J], 2009, 30(19): 1632-1637.
- [3] LIN S T C, BHATTACHARYYA D, FAKIROV S, *et al.* International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials[J], 2014, 63(8): 416-423.
- [4] GIOVANNA D P, REVERCHON E, MAFFULLI N. Current Pharmaceutical Design[J], 2017, 23(26): 3759-3771
- [5] HOSSEINKHANI H, HOSSEINKHANI M, HATTORI S, *et al.* Journal of Biomedical Materials Research Part A[J], 2010, 94A(1): 1-8.
- [6] CHENG K, KISAALITA W S. Biotechnology Progress[J], 2010, 26(3): 838-846.
- [7] DÍAZ E, PUERTO I, RIBEIRO S, *et al.* Nanomaterials[J], 2017, 7(7): 173.

- [8] CONOSCENTI G, SCHNEIDER T, STOELZEL K, *et al.* Materials Science & Engineering C[J], 2017, 80: 449–459.
- [9] REZABEIGI E, WOOD-ADAMS P M, DREW R A. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials[J], 2017, 105(8): 2433–2442.
- [10] ZHANG L, ZHENG Y, XIONG C. Bulletin of Materials Science[J], 2015, 38(3): 811–816.
- [11] UZ M, BUYUKOZ M, SHARMA A D, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2017, 53: 293–306.
- [12] ZHANG H, ZHENG J, ZHAO Z, *et al.* Journal of Membrane Science [J], 2013, 442: 124–130.
- [13] HE B, OU Y, CHEN S, *et al.* Materials Science & Engineering C[J], 2017, 74: 451–458.
- [14] SUN Y, LI W, WU X, *et al.* ACS Applied Materials & Interfaces[J], 2015, 8(3): 2348–2359.
- [15] YIN Z, WU F, ZHENG Z, *et al.* ACS Biomaterials Science & Engineering[J], 2017, 3(10): 2617–2627.
- [16] LIN Y J, ZHANG T X. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research[J], 2008, 12(36): 7081–7084.
- [17] HU K, SUN J, GUO Z, *et al.* Advanced Materials[J], 2015, 27(15): 2507–2514.
- [18] HOOKS D O, REHM B H A. Applied Microbiology & Biotechnology [J], 2015, 99(19): 8045–8053.
- [19] YI B, ZHANG H, YU Z, *et al.* Journal of Materials Chemistry B[J], 2018, 6(23): 3934–3945.
- [20] PEREAO O K, BODE-ALUKO C, NDAYAMBAJE G, *et al.* Journal of Polymers & the Environment[J], 2016, 25(4): 1175–1189.
- [21] VIEIRA T, SILVA J C, BORGES J P, *et al.* European Polymer Journal[J], 2018, 103: 271–281.
- [22] TANG Y, CHEN L, ZHAO K, *et al.* Composites Science & Technology [J], 2016, 125: 100–107.
- [23] LUO X, GUO Z, PING H, *et al.* International Journal of Biological Macromolecules[J], 2018, 113: 476–486.
- [24] SHARIFI F, ATYABI S M, NOROUZIAN D, *et al.* International Journal of Biological Macromolecules[J], 2018, 115: 243–248.
- [25] LIU ABANI M G, KARIMIAN R, MEHRAMOUB, *et al.* International Journal of Biological Macromolecules[J], 2018, 114: 961–971.
- [26] WANG S D, MA Q, WANG K, *et al.* ACS Omega[J], 2018, 3(1): 406–413.
- [27] MENON A H, SOUNDARYA S P, SANJAY V, *et al.* Carbohydrate Polymers[J], 2018, 195: 356–367.
- [28] PANKONGADISAK P, SUPAPHOL P, SUWANTONG O. Polymers for Advanced Technologies[J], 2017, 28(7): 849–858.
- [29] 廖银琳, 王卉, 张克勤. 印染[J], 2012, 38(10): 48–53.
LIAO Y L, WANG H, ZHANG K Q. Dyeing and Finishing[J], 2012, 38(10): 48–53.
- [30] YANG C G, WANG M H, XING Z, *et al.* RSC Advances[J], 2018, 8(36): 20061–20067.
- [31] MANIGLIO D, BONANI W, MIGLIARESI C, *et al.* Journal of Biomaterials Science Polymer Edition[J], 2018, 29(5): 491–506.
- [32] FERKL P, TOULEC M, LAURINI E, *et al.* Chemical Engineering Science[J], 2017, 172: 323–334.
- [33] SALERNO A, IANNACE S, NETTI P A. Materials Letters[J], 2012, 82: 137–140.
- [34] ALMIRALL A, LARRECQ G, DELGADO J A, *et al.* Biomaterials [J], 2004, 25(17): 3671–3680.
- [35] AZIMI P, ZHAO D, POUZET C, *et al.* Environmental Science & Technology[J], 2016, 50(3): 1260–1268.
- [36] CHEN C S, ZENG F, XIAO X, *et al.* ACS Applied Materials & Interfaces[J], 2018, 10(40): 33879–33890.
- [37] BOSE S, BANERJEE D, SHIVARAM A, *et al.* Materials & Design [J], 2018, 151: 102–112.
- [38] CHEN S, LU J, FENG J. Industrial & Engineering Chemistry Research [J], 2018, 57(11): 3923–3931.
- [39] XU X, ZHOU J, JIANG Y, *et al.* Journal of Biomaterials Science Polymer Edition[J], 2018, 29(12): 1498–1513.
- [40] NOCERA A D, COM D, SALVATIERRA N A, *et al.* Biomedical Microdevices[J], 2018, 20(2): 26.
- [41] 任杰. 热致相分离制备有机和无机纳米复合组织工程支架材料的方法: CN1792379 A[P]. 2005–06–28.
REN J. Method for Preparing Organic and Inorganic Nano Composite Tissue Engineering Scaffold Material by Thermally Induced Phase Separation: 1792379 A[P]. 2005–06–28.
- [42] HOSSEINKHANI H, HOSSEINKHANI M, KOBAYASHI H. Journal of Bioactive & Compatible Polymers[J], 2006, 21(4): 277–296.
- [43] GAO M Y, TAO H Y, WANG T, *et al.* Journal of Bioactive and Compatible Polymers[J], 2017, 32(1): 45–60.
- [44] ZHANG L Z, CHEN S Y, LIANG R Y, *et al.* Journal of Biomedical Materials Research Part A[J], 2018, 106(12): 3123–3134.
- [45] LIN C, LIU C, ZHANG L, *et al.* International Journal of Molecular Medicine[J], 2018, 41(2): 697–708.
- [46] LI G, XUE C, WANG H, *et al.* Carbohydrate Polymers[J], 2018, 194: 225–235.
- [47] BERNHARDT A, PAUL B, GELINSKY M. Marine Drugs [J], 2018, 16(3): 91.
- [48] 杨琦, 索进平. 化学与生物工程[J], 2014, 31(5): 32–36.
YANG Q, SUO J P. Chemistry & Bioengineering[J], 2014, 31(5): 32–36.
- [49] KIM T K, YOON J J, LEE D S, *et al.* Biomaterials[J], 2006, 27(2): 152–159.
- [50] MA L, HE Y, LUO P Y, *et al.* Russian Journal of Applied Chemistry [J], 2016, 89(2): 304–314.
- [51] MENG T, YI F, CHENG H, *et al.* ACS Applied Materials & Interfaces [J], 2017, 9(49): 42883–42892.
- [52] LEE H, YANG G H, KIM M, *et al.* Materials Science & Engineering C[J], 2017, 84: 140–147.
- [53] BOZDAĞ S C, YÜKSE M K, DEMIRER T. Cell Biology and Translational Medicine[J], 2018, 1: 17–36.

- [54] UDE C C, MISKON A, IDRUS R B H, *et al.* Military Medical Research[J], 2018, 5(1): 7.
- [55] ZHU J, ZHOU L, XINGWU F. New England Journal of Medicine[J], 2006, 355(22): 2376-2378.
- [56] CHEN B, SUN J, FAN F, *et al.* Nanoscale[J], 2018, 10(16): 7369-7376.
- [57] LEACH J K, WHITEHEAD J R. ACS Biomaterials Science & Engineering[J], 2017, 4(4): 1115-1127.
- [58] LIN J, ZHOU W, HAN S, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2018, 70: 1-11.
- [59] MOBASSERI R, TIAN L, SOLEIMANI M, *et al.* Materials Science & Engineering C[J], 2017, 84: 80-89.
- [60] CHENG K, KISAALITA W S. Biotechnology Progress[J], 2010, 26(3): 838-846.
- [61] YU Y X, SUN B B, YI C Q, *et al.* Frontiers of Materials Science[J], 2017, 11(2): 93-105.
- [62] HE J, XIONG L, LI Q, *et al.* Oncotarget[J], 2018, 9(1): 1326-1345.
- [63] EGUCHI T, SOGAWA C, OKUSHA Y, *et al.* PloS One[J], 2018, 13(2): e0191109.
- [64] WANG X Z, DAI X L, ZHANG X Z, *et al.* Biochemical & Biophysical Research Communications[J], 2018, 498(4): 1052-1057.
- [65] LIU C, OIKONOMOPOULOS A, SAYED N, *et al.* Development[J], 2018, 145(5): UNSP dev156166.
- [66] ZHEN M, SANGMO K, FINNEGAN M A, *et al.* Biomaterials[J], 2014, 35(5): 1367-1377.
- [67] 田胜男, 王博, 李琦, 等. 中国组织工程研究[J], 2017, 38(5): 815-820.
TIAN S N, WANG B, LI Q, *et al.* Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research[J], 2017, 38(5): 815-820.
- [68] LU H F, LEONG M F, LIM T C, *et al.* Biofabrication[J], 2017, 9(2): 025011.
- [69] 李玉林, 李一雷, 张秀英. 干细胞组织工程研究进展对病理学的影响[C]//中华医学会病理学分会2005年学术年会. 宜昌: 中华医学会病理学分会, 2005: 6-8.
LI Y L, LI Y L, ZHANG X Y. 干细胞组织工程研究进展对病理学的影响[C]//Chinese Society of Pathology 2005 Academic Annual Meeting. Yichang: Chinese Society of Pathology, 2005: 6-8.
- [70] 周立枫. 中外健康文摘[J], 2011, 08(11): 285-286.
ZHOU L F. The Chinese and Foreign Health Abstract[J], 2011, 08(11): 285-286.
- [71] ZHAO D, HOU L, PAN M, *et al.* Applied Biochemistry & Biotechnology[J], 2017, 184(1): 212-227.
- [72] ARAVAMUDHAN A, RAMOS D M, NIP J, *et al.* Journal of Biomedical Nanotechnology[J], 2013, 9(4): 719-731.
- [73] MARINO A, FILIPPESCHI C, MATTOLI V, *et al.* Nanoscale[J], 2015, 7(7): 2841-2850.
- [74] GITTENS R A, MCLACHLAN T, OLIVARESNAVARRETE R, *et al.* Biomaterials[J], 2011, 32(13): 3395-3403.
- [75] 谭太贵, 马景鑑, 张文治, 等. 天津医药[J], 2006, 34(9): 640-641.
TAN T G, MA J J, ZHANG W Z, *et al.* Tianjin Medical Journal[J], 2006, 34(9): 640-641.
- [76] LABUSCA L S, HEREA D D, RADU E, *et al.* Journal of Nanoscience & Nanotechnology[J], 2018, 18(7): 5143-5153.
- [77] PRASOPHTHUM A, SHAKESHEFF K, YANG J. Biofabrication[J], 2017, 10(2): 025002.
- [78] ELLIS-BEHNKE R G, LIANG Y X, YOU S W, *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA[J], 2006, 103(13): 5054-5059.
- [79] NAMINI M S, BAYAT N, TAJERIAN R, *et al.* Journal of Orthopaedic Surgery & Research[J], 2018, 13(1): 63.
- [80] SAPIRLEKHOVITSER Y, ROTENBERG M Y, JOPP J, *et al.* Nanoscale[J], 2016, 8(6): 3386-3399.

(编辑 张雨明)