

# 调控血管内皮细胞行为的合成高分子水凝胶支架的研究进展

刘振齐<sup>1,3</sup>, 郑汶江<sup>1,3</sup>, 徐峰<sup>2,3</sup>, 陈咏梅<sup>1,3</sup>

- (1. 西安交通大学理学院化学学科, 非平衡物质结构及量子调控教育部重点实验室, 西安 710049;
2. 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049
3. 西安交通大学生物医学工程和生物力学研究中心, 西安 710049)

**摘要:** 血管内皮细胞是位于循环血液与血管壁内层之间的单层细胞, 它在血栓与止血、炎症与免疫反应、血管新生和动脉粥样硬化等一系列生理和病理过程中发挥着重要作用。以合成高分子水凝胶为模型材料研究体外调控血管内皮细胞行为, 对理解血管内皮细胞的生存微环境, 进而优化设计适用于组织工程基础研究和应用需求的高分子水凝胶材料具有实质性意义。综述了调控血管内皮细胞行为的合成高分子水凝胶支架的研究工作, 并对其未来发展进行了展望。介绍了无外来蛋白质修饰的条件下, 可促进细胞增殖的活性合成高分子水凝胶细胞支架; 以牛胎儿大动脉血管内皮细胞为例, 讨论了高分子水凝胶的临界电位与调控细胞行为之间的关系; 分析了调控细胞生存空间和动态运动行为的高分子水凝胶, 并引入了集高强度、细胞亲和性于一体的高分子水凝胶的设计思路。

**关键词:** 高分子水凝胶; 血管内皮细胞; 细胞支架; 细胞行为; 组织工程

中图分类号: O632.63

文献标志码: A

文章编号: 2095-2783(2012)09-0666-8

## Advances in synthetic hydrogels as scaffolds to manipulate behaviors of endothelial cells

Liu Zhenqi<sup>1,3</sup>, Zheng Wenjiang<sup>1,3</sup>, Xu Feng<sup>2,3</sup>, Chen Yongmei<sup>1,3</sup>

- (1. MOE Key Laboratory for Non-Equilibrium Synthesis and Modulation of Condensed Matter, Department of Chemistry, School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;
2. Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;
3. Biomedical Engineering & Biomechanics Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

**Abstract:** Endothelial cells are located on the inner surface of blood vessels as a monolayer, which separate the circulating blood from the tubular tissues. Endothelial cells play an important role in a series of physiological and pathological processes, such as thrombosis and hemostasis, inflammatory and immune response, angiogenesis as well as atherosclerosis. Manipulating cell behaviors in vitro using synthetic hydrogels as model materials is essential for understanding the microenvironment of endothelial cells and further designing hydrogels for basic research and potential application in tissue engineering. In this paper, we present a review on the advances in the synthetic hydrogel scaffolds that promote cell proliferation without surface modification of any cell adhesive proteins or peptides. The relationship between the critical Zeta potential of hydrogels and cell behaviors is discussed with bovine fetal aortic endothelial cells as an example. We also discuss the idea of designing hydrogels for manipulating living space and dynamic behaviors of endothelial cells, as well as that hydrogels possess both the biocompatibility and high strength for supporting proliferation of endothelial cells. Furthermore, the challenges, problems and future development of synthetic hydrogels as scaffolds to manipulate cell behaviors are proposed.

**Key words:** synthetic hydrogels; endothelial cells; cell scaffolds; cell behavior; tissue engineering

收稿日期: 2012-06-28

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(51073127, 51173144); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20100201110040); 中央高校基本科研业务费资助项目(109-08140018); 留学回国人员科研启动基金; 西安交通大学新教师科研支持计划资助项目(08141001); 高等学校学科创新引智计划项目(111计划 B06024); 国家重大国际(地区)合作研究项目(11120101002)

**作者简介:** 刘振齐(1988-), 男, 博士研究生, 主要研究方向: 高分子水凝胶调控细胞行为

**通信联系人:** 陈咏梅, 教授, 主要研究方向: 功能高分子水凝胶、生物材料, chenym@mail.xjtu.edu.cn

高分子水凝胶(hydrogel)能够为细胞生存提供“软、湿”(soft and wet)三维空间网络环境,便于细胞进行营养交换和废物排泄<sup>[1-2]</sup>,是最有潜力替代生体软组织的生物材料。虽然一些研究表明动物来源的天然高分子水凝胶是良好的细胞支架材料<sup>[3-4]</sup>,然而从动物体内提取天然材料不仅存在成分复杂、来源有限以及不同批次之间性能差异大等问题,而且还具有带来异物感染和排斥的危险性。此外,由于动物来源的天然高分子水凝胶成份复杂,难以说明某种成分或某个性能对细胞行为的影响,阻碍了细胞-生物支架材料相互作用机理研究。

近年来,合成高分子水凝胶因具有化学结构明确、性能稳定且易于调控、无异物感染、廉价和易于灭菌等优势,在调控细胞行为和功能研究方面取得了令人瞩目的研究进展。例如,聚丙烯酰胺水凝胶的弹性对细胞形态和运动行为有显著影响<sup>[5-8]</sup>;合成高分子水凝胶的弹性模量对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs)的分化起着决定性作用,当高分子水凝胶的弹性模量分别约为1 kPa、10 kPa和50 kPa时,MSCs分别易于分化为神经细胞、成纤维细胞和骨细胞<sup>[9]</sup>;值得关注的是,2010年Gilbert等<sup>[10-11]</sup>报道了当聚乙二醇水凝胶的弹性模量与肌肉的弹性模量(12 kPa)相近时,具有维持骨骼肌干细胞(skeletal muscle stem cell)自我更新的功能。此外,合成高分子水凝胶的小分子基团具有诱导MSCs定向分化的能力<sup>[12]</sup>:当将人体MSCs包埋培养在不同化学结构的高分子水凝胶中时,带有羧酸基的高分子水凝胶易于诱导MSCs分化为软骨细胞,带有磷酸基的高分子水凝胶易于诱导MSCs分化为成骨细胞,带有疏水基团的高分子水凝胶易于诱导MSCs分化为脂肪细胞。

笔者开展了一系列合成高分子水凝胶作为细胞支架的基础研究工作,目的是寻找具有生物活性的“软、湿”高分子模型材料,并且期望通过研究细胞在这些模型材料上的黏附、伸展和增殖等行为,理解细胞生存所需微环境,在此基础上优化设计高分子水凝胶材料,以适应组织工程中体外细胞培养基础研究和应用的需求。这些研究包括建立了以无蛋白修饰的合成高分子水凝胶为活性细胞支架培养体系<sup>[13]</sup>,发现了一系列具有细胞亲和性的合成高分子水凝胶材料<sup>[14]</sup>,研究了合成高分子水凝胶的物理化学性能与多种细胞功能之间的关系以及相互作用机制<sup>[15-16]</sup>,并通过调控高分子水凝胶的物理化学性质和空间尺寸进而灵敏地控制细胞的增殖行为<sup>[17]</sup>、动态运动行为<sup>[18]</sup>和细胞的功能<sup>[19-20]</sup>等。笔者重点综述了合成高分子水凝胶调控血管内皮细胞行为的研究进展。

## 1 合成高分子水凝胶细胞支架

除了血液中的细胞(白血球、红血球等)之外,构成组织的绝大部分细胞(如血管内皮细胞、上皮细胞等)都属于贴壁细胞。在体内贴壁细胞以细胞外基质或其他种类的细胞为支架<sup>[21-22]</sup>,例如血管内皮细胞以血管平滑肌细胞为支架,血

管平滑肌细胞以细胞外基质为支架,这些细胞支架的杨氏模量约为10 kPa<sup>[23]</sup>。所以说,贴壁细胞在体内生存于“软”而“湿”的环境之中。但是目前常用的细胞培养支架,无论是组织培养用聚苯乙烯板(tissue cultured polystyrene, TCPS)还是玻璃板,都是“硬”而“干”(hard and dry)的材料,与细胞的体内生存环境截然不同。因此如果将细胞在“软、湿”水凝胶上培养扩增,细胞的生存环境将更接近于其在体内的生存环境。

### 1.1 直接在水凝胶表面培养细胞的方法

无论是天然高分子水凝胶(如壳聚糖、透明质酸)<sup>[24-26]</sup>还是合成高分子水凝胶(如聚乙烯醇[poly(vinyl alcohol), PVA], 聚氧乙烯[poly(ethylene oxide), PEO]和聚乙二醇[poly(ethylene glycol), PEG])均不能促进细胞扩增<sup>[27-29]</sup>。为了促进细胞扩增,通常采用在这些高分子水凝胶表面修饰胶原蛋白及细胞黏附蛋白(cell adhesive protein),例如纤连蛋白(fibronectin)、层粘连蛋白(laminin)等方法。这些从动物体内抽提得到的天然蛋白质虽然具有优越的促进细胞增殖生长的功能,但存在修饰浓度不均匀、高价和灭菌困难等缺点。

为了克服上述缺点,本课题组<sup>[13, 15-19]</sup>尝试寻找一些即使在无外来蛋白质修饰的条件下,也可促进细胞大量扩增的活性合成高分子水凝胶,建立了直接在合成高分子水凝胶支架上扩增细胞的方法。该方法具有操作简单、适用性广和无需考虑因蛋白质修饰而引起的变性与污染等优点。在此以在合成高分子水凝胶支架表面接种培养牛胎儿大动脉血管内皮细胞(bovine fetal aorta endothelial cells, BFAECs)为例进行介绍,其他贴壁细胞的培养方法均可借鉴此程序。

细胞培养流程如图1所示。将在磷酸盐缓冲溶液中浸泡交换平衡的水凝胶切成直径1.5 cm的圆柱状(厚度约为1.5~2 mm),高压灭菌(120 °C, 20 min)之后转移至24孔TCPS中,然后将1 mL密度为 $2.26 \times 10^4 \text{ cm}^{-3}$ 的细胞悬浮液播种于高分子水凝胶支架表面。为了将细胞均匀分散接种于高分子水凝胶表面,需逐滴(一滴约0.1 mL)将细胞悬浮液滴加于高分子水凝胶表面。接种完后小心地将载有细胞和高分子水凝胶支架的TCPS放置于细胞培养箱(37 °C, 5%CO<sub>2</sub>)中培养。每隔24 h更换一次培养液,注意在交换培养液时不要损伤水凝胶<sup>[13]</sup>。

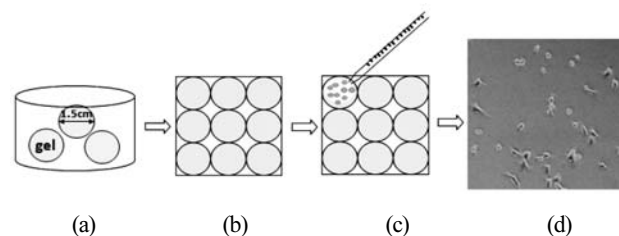


图1 直接在合成高分子水凝胶支架表面培养细胞的流程图。  
(a)水凝胶在磷酸缓冲液中平衡并灭菌;(b)将水凝胶移到TCPS中;  
(c)细胞播种;(d)细胞观察

Fig. 1 Procedures of directly culturing cells on synthetic hydrogel

scaffold. (a) Hydrogels are equilibrated in phosphate buffer solution and sterilized, (b) The hydrogels are moved into TCPS, (c) Cell seeding and (d) Cell observation

在细胞接种初期(6 h)细胞尚未进入分裂状态,只是黏附或伸展于水凝胶表面。黏附于水凝胶表面的细胞呈球形,轻微摇动时这些细胞不会从水凝胶表面脱离下来,表明细胞只是黏附于水凝胶表面,但是不会成活;伸展于水凝胶表面的细胞形态呈纺锤形或多边形,表明细胞处于成活状态。接种初期的细胞形态对细胞正常扩增有预示作用。接种初期细胞伸展率(呈纺锤形或多边形的细胞数与播种的总细胞数的比值)与长期细胞培养扩增成正比关系,即接种初期细胞伸展率越高,细胞越容易扩增;相反,接种初期细胞伸展率越低,细胞将不再扩增或少量扩增。

### 1.2 水凝胶的化学结构及交联密度对细胞行为的影响

根据化学结构和所带电荷的不同,合成高分子水凝胶可分为中性、弱电解质及强电解质3种类型。中性高分子水凝胶不带可解离的基团,例如聚丙烯酰胺(poly(acrylamide), PAAm)和聚N,N-二甲基丙烯酰胺(poly(N,N'-dimethylacrylamide), PDMAAm)等;弱电解质高分子水凝胶带有羧酸基,例如聚丙烯酸(poly(acrylic acid), PAA)和聚甲基丙烯酸(poly(methacrylic acid), PMAA)等;强电解质高分子水凝胶带有可解离的磺酸基,例如聚2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸钠(poly(2-acrylamido-2-methyl-propane sulfonic acid sodium salt), PNaAMPS)和聚苯乙烯磺酸钠(poly(sodium p-styrene sulfonate), PNaSS)等。

以下综述BFAECs在上述3种带有不同电荷的高分子水凝胶表面的黏附及扩增行为。高分子水凝胶的化学结构显著影响细胞黏附、伸展及扩增行为,水凝胶促进细胞扩增能力按以下顺序逐渐减小:强电解质高分子水凝胶>弱电解质高分子水凝胶>中性高分子水凝胶。在中性水凝胶支架表面(PAAm和PDMAAm),虽然有大量细胞黏附,但细胞形态成球形,几乎不伸展,相应的细胞不再扩增;在带有羧酸基的弱电解质高分子水凝胶表面(PAA和PMAA),细胞伸展率随水凝胶交联密度的增加而增大,交联密度较高时细胞虽然扩增,但扩增速度缓慢,培养5 d后细胞分布呈分散状态,细胞密度较低,且细胞之间没有接触,不能达到汇合(confluent),只有当交联密度较低时细胞才能扩增到汇合<sup>[13]</sup>。有研究报道经PAA高分子链修饰的基板表面不利于细胞黏附、伸展和扩增<sup>[30]</sup>,另有研究报道只有少量细胞黏附于经PAA高分子链修饰的表面,并且细胞扩增速度非常缓慢<sup>[31]</sup>。在PAA水凝胶支架表面培养细胞的结果表明PAA水凝胶的交联密度显著影响细胞黏附、伸展和增殖行为,只要将PAA水凝胶的交联密度调节在适宜的范围内(摩尔分数1%~2%),PAA水凝胶就会具有促进细胞扩增的性能。在带有磺酸基的强电解质高分子水凝胶表面(PNaAMPS和PNaSS),细胞黏

附、伸展和扩增行为受交联密度影响较小,培养5 d后细胞可扩增汇合为单层细胞膜,并且细胞在这些合成高分子水凝胶支架表面的扩增速度与在胶原蛋白上的扩增速度接近,说明强电解质合成高分子水凝胶在较宽的交联密度范围(摩尔分数1%~15%)内显示出良好的促进细胞扩增的性能(如图2所示)<sup>[13]</sup>。

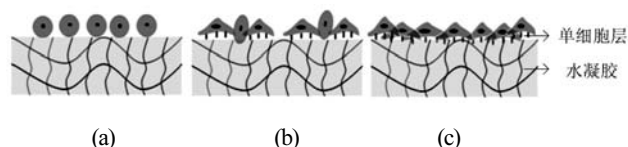


图2 细胞在中性(a)、弱电解质(b)和强电解质(c)水凝胶表面的形态示意图

Fig. 2 Schematic of cell morphology on different kinds of hydrogels, (a) non-ionic hydrogel, (b) weak electrolytic hydrogel and (c) strong electrolytic hydrogel

### 1.3 临界Zeta电位对细胞扩增行为的影响

有研究报道细胞与培养支架之间的相互作用与支架的表面电荷密切相关<sup>[32]</sup>,但是有关高分子水凝胶的表面电荷对细胞扩增行为影响的相关报道甚少。由于在无外来蛋白质修饰的条件下,高分子水凝胶的化学结构显著影响细胞黏附、伸展及扩增,因此,可利用该体系研究高分子水凝胶的Zeta电位与细胞扩增之间的关系。Zeta电位值越低,高分子水凝胶所带负电荷越多,其电荷密度越大;相反,Zeta电位值越高,高分子水凝胶所带负电荷越少,其电荷密度越小。高分子水凝胶的Zeta电位与化学结构和交联密度有关,并显著影响细胞扩增行为。通过测试PAAm、PAA、PMAA、PNaAMPS和PNaSS的Zeta电位,发现只要合成高分子水凝胶的Zeta电位在-20~-30 mV之间,水凝胶就具有支持细胞扩增至汇合的性能。该研究明确了高分子水凝胶的表面电荷与细胞扩增之间的关系。

在此基础上,笔者设想是否存在可以控制细胞生死命运的临界电位。为了证实这一设想,通过调节水凝胶电荷密度,进一步详细研究了Zeta电位与细胞扩增之间的关系。将强电解质单体NaAMPS和中性单体DMAAm共聚,改变NaAMPS在共聚水凝胶poly(NaAMPS-co-DMAAm)中的物质的量比(F),可以制得一系列具有不同电荷密度的共聚高分子水凝胶。当F从0升高至1.0时,poly(NaAMPS-co-DMAAm)的Zeta电位从-8.8 mV降低至-31.1 mV。这些结果说明调节F值可以有效地调节水凝胶的Zeta电位。

F值及Zeta电位与细胞伸展、扩增的关系如下:当F值为0.2时,Zeta电位为-10.5 mV,细胞伸展率约为30%,但是伸展的细胞不再扩增。当F值升高至0.3时,Zeta电位降低至-16.3 mV,细胞伸展率上升至约为40%,并且

伸展的细胞 5 d 后扩增至密度为  $2.0 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ ，此时细胞不能扩增至汇合，而是分散于水凝胶表面，且细胞之间没有接触<sup>[33]</sup>。

当  $F$  值升高至 0.4 时，Zeta 电位降低至  $-20.8 \text{ mV}$ ，细胞伸展率上升至 72%，并且伸展的细胞 5 d 后扩增至密度为  $1.1 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ ，此时细胞增殖至汇合，细胞之间接触紧密。当  $F$  值大于 0.5 时，Zeta 电位降低至低于  $-22.2 \text{ mV}$ ，细胞伸展率上升至高于 80%，并且伸展的细胞 5 d 后扩增至密度约为  $14 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ ，且细胞伸展率及细胞密度不再随  $F$  值的增大而显著变化（如图 3 所示）。

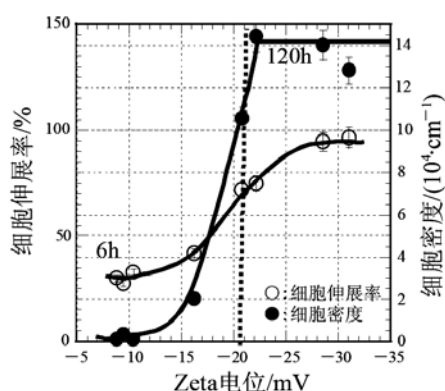


图 3 Zeta 电位对细胞扩增行为的影响

Fig. 3 Effect of Zeta potential on cell proliferation

上述研究说明高分子水凝胶的 Zeta 电位与细胞的伸展扩增呈反比关系，即合成高分子水凝胶的 Zeta 电位越低，越有利于细胞扩增。更为重要的是，细胞的扩增有一个临界 Zeta 电位， $\zeta_{\text{critical}} = -20 \text{ mV}$ （图 3），当水凝胶的 Zeta 电位低于该临界 Zeta 电位时，显示出良好的促进细胞扩增的性能。

#### 1.4 临界 Zeta 电位对蛋白质吸附的影响

高分子水凝胶的临界 Zeta 电位为何对细胞扩增具有如此显著的影响？可以预测由于作为细胞支架的高分子水凝胶带有负电荷，细胞表面也带有负电荷，所以带有负电荷的高分子水凝胶与同样带有负电荷的细胞之间不会直接产生相互作用，细胞扩增必定与细胞培养液中添加的血清中含有的细胞黏附蛋白在高分子水凝胶表面的“自动吸附”有关。蛋白质是一类两亲大分子，可预测其带正电荷的基团可与水凝胶的负电荷相互作用，“自动吸附”于水凝胶表面，这些吸附于水凝胶表面的蛋白质促进细胞的黏附扩增。如果上述预测正确，随高分子水凝胶 Zeta 电位降低，高分子水凝胶表面吸附的蛋白质的量就会增加。为了证实该预测，进一步研究分析了 poly(NaAMPS-co-DMAAm) 水凝胶的 Zeta 电位与其表面吸附纤连蛋白之间的关系<sup>[33]</sup>。

纤连蛋白是存在于血清中的一种典型的细胞吸附蛋白，已有研究报导纤连蛋白在促进细胞黏附、伸展及扩增

中占有重要地位<sup>[34-37]</sup>。激光共聚焦显微镜对吸附于水凝胶表面蛋白荧光强度分析表明，当  $F$  值小于 0.4，即 Zeta 电位高于  $-20.0 \text{ mV}$  时，蛋白荧光强度随  $F$  值的增大呈略为上升的趋势，但荧光强度较弱，表明纤连蛋白在水凝胶表面的吸附量很少。当  $F$  值增大到 0.4，即 Zeta 电位降低至  $-20.0 \text{ mV}$  时，荧光强度明显增大，表明纤连蛋白在水凝胶表面的吸附量增加。当将  $F$  值增大到 0.4 以上时，即 Zeta 电位低于  $-20.0 \text{ mV}$  时，蛋白荧光强度不再发生显著变化，表明  $F$  值为 0.4，即 Zeta 电位为  $-20.0 \text{ mV}$  时，纤连蛋白在水凝胶表面的吸附量达到饱和，不再随水凝胶 Zeta 电位的降低而增加。该结果说明纤连蛋白的吸附有 1 个临界 Zeta 电位， $\zeta_{\text{critical}} = -20.0 \text{ mV}$ ，当水凝胶的 Zeta 电位低于该临界 Zeta 电位时，蛋白质在水凝胶表面的吸附量增大并达到饱和<sup>[33]</sup>。值得一提的是，纤连蛋白吸附的临界 Zeta 电位与细胞扩增的临界 Zeta 电位一致，同为  $\zeta_{\text{critical}} = -20 \text{ mV}$ 。以上结果说明高分子水凝胶的电荷密度调节纤连蛋白在水凝胶表面的“自动吸附”，电荷密度越大，越有利于蛋白质吸附，进而促进细胞的伸展、扩增（如图 4 所示）。

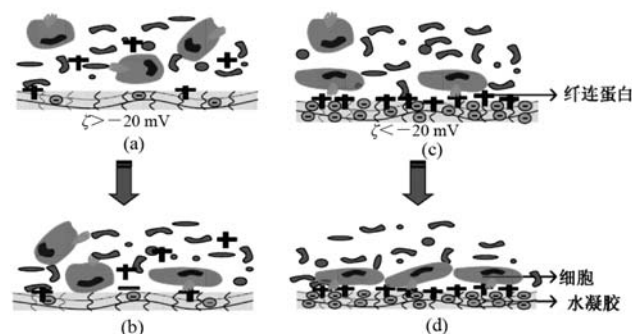


图 4 高分子水凝胶的临界 Zeta 电位影响蛋白质吸附及细胞扩增示意图。(a) 纤连蛋白在 Zeta 电位较高的水凝胶表面的吸附量较少；(b) 只有少量细胞黏附、伸展于水凝胶表面且不再扩增；(c) 纤连蛋白在 Zeta 电位较低的水凝胶表面的吸附量较多；(d) 大量细胞黏附、伸展于水凝胶表面且扩增至汇合

Fig. 4 Effect of critical Zeta potential on protein adsorption and cell proliferation. (a) The absorption of fibronectin on hydrogel is low under condition of low Zeta potential, (b) only a few cells adhere and spread on the hydrogel and the cells cannot proliferate, (c) the absorption of fibronectin on the hydrogel increases significantly with increasing Zeta potential, (d) many cells adsorb and spread on the hydrogel and the cells proliferate to be confluent

从常规看来，由于带有负电荷的细胞会与带有相同负电荷的材料发生静电排斥作用，细胞不会在带有负电荷的材料上增殖生长。但是上述研究结果打破了这一常规，证明只要合成高分子水凝胶的 Zeta 电位小于  $-20.0 \text{ mV}$ ，细胞就会在

这些高分子水凝胶上正常扩增,这与细胞培养液中的蛋白质在水凝胶表面的吸附有关。

## 2 高分子水凝胶调控细胞行为

### 2.1 调控细胞生存空间

微观空间尺寸大小对细胞行为影响的研究有助于理解在有限空间中生存的细胞性能,例如毛细血管中的血管内皮细胞生存于微米级的空间环境中。如前所述,具有特定化学结构的负电荷高分子水凝胶(PNaAMPS)具有促进细胞扩增的功能,然而中性高分子水凝胶(PAAm)不支持细胞扩增,根据此研究结果可设计高分子水凝胶微观空间模型。该模型以中性的水凝胶为模板,在此模板上,用激光扫描定向控制水凝胶合成的方法,在模板水凝胶表面聚合形成微观尺寸的负电荷 PNaAMPS 水凝胶图案,实现了在 PNaAMPS 水凝胶表面合成促使细胞生长的高分子水凝胶微观模型的设计<sup>[7]</sup>。BFAECs 有选择性地黏附扩增于 PNaAMPS 水凝胶图案上,且水凝胶微观模型尺寸大小对血管内皮细胞性能有显著的影响。当微观模型尺寸空间的宽度为 182  $\mu\text{m}$  时,细胞呈现两种排列方式,处于微观模型图案界限边缘的细胞呈梭状,处于微观模型图案中间的细胞大多为多角形;当微观模型图案的宽度为 23  $\mu\text{m}$  时,两排呈梭状的细胞呈现紧密排列方式;当微观模型图案尺寸的宽度与血管内皮细胞的尺寸大小相近的时候(11  $\mu\text{m}$ )细胞呈手拉手单列排列,此时细胞的长宽比例最大(如图 5 所示)。

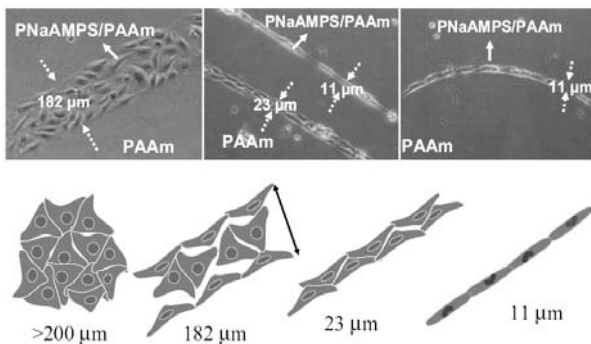


图 5 在 PAAm 水凝胶模板表面设计合成的 PNaAMPS 水凝胶微观模型图案及细胞形态。(a)培养 96 h 后的细胞显微镜照片;(b)根据显微镜照片画的细胞形态示意图

Fig. 5 PNaAMPS/PAAm micropatterned hydrogels and cell morphology. (a) micrographs of cells cultured on the micropatterned hydrogels (96 h), (b) schematic diagram of cell morphology according to the micrographs

### 2.2 调控细胞动态行为

细胞动态行为在一系列的生理活动中起着极其重要的作用,比如胚胎形成、免疫应答、伤口愈合以及癌细胞转移等。血管内皮细胞的运动行为对血管新生、肿瘤形成等具有重要

意义。血管新生是一个多步骤的过程,在该过程中激活的血管内皮细胞降解其细胞外基质(基底膜)后在血管周围间质(perivascular stroma)迁移、扩增,形成毛细管状出芽(capillary sprouts)。形成毛细管状出芽的细胞停止增殖,排列形成管状,沉积新的细胞外基质,最终形成新的血管<sup>[38]</sup>。因此研究不分裂增殖的血管内皮细胞的动态行为可揭示血管新生中的一些信息,但是不分裂增殖的血管内皮细胞的动态行为还鲜有报导。笔者的研究证明可在一定电荷密度的合成高分子水凝胶支架表面培养不分裂增殖的血管内皮细胞,并且水凝胶的电荷密度可调控细胞的运动行为。

通过改变共聚水凝胶 poly(NaSS-co-DMAAm)中负电荷单体对苯乙烯磺酸钠(sodium *p*-styrene sulfonate, NaSS)和中性单体 DMAAm 的物质的量比( $F = n_{\text{NaSS}}/n_{\text{NaSS+DMAAm}}$ ),固定交联剂 N,N-亚甲基双丙烯酰胺的摩尔分数为 4%时,可以设计合成一系列杨氏模量接近( $\sim 200$  kPa),然而 Zeta 电位在  $-8.8 \sim -20.5$  mV 之间变化的高分子水凝胶。

采用 poly(NaSS-co-DMAAm)水凝胶体系研究 Zeta 电位对 BFAECs 的行为发现,临界 Zeta 电位  $\zeta_{\text{critical}} = -14.0$  mV 显著影响细胞行为,在此电位两侧,细胞的动态行为存在明显的差别。当水凝胶的 Zeta 电位高于  $\zeta_{\text{critical}}$  时,细胞的伸展面积较小( $\sim 1000 \mu\text{m}^2$ ),运动速率较快( $\sim 1.4 \mu\text{m}/\text{min}$ );相反,当水凝胶的 Zeta 电位低于  $\zeta_{\text{critical}}$  时,细胞的伸展面积较大( $\sim 2000 \mu\text{m}^2$ ),运动速率较慢( $\sim 0.7 \mu\text{m}/\text{min}$ ) (如图 6 所示)<sup>[18]</sup>。

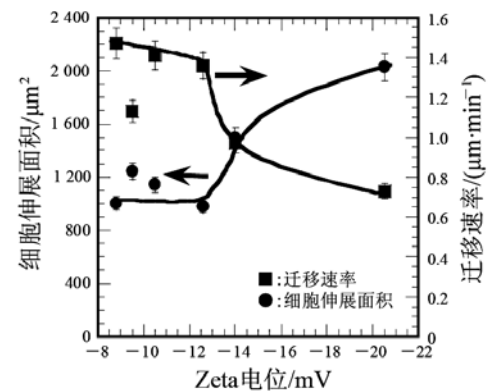


图 6 Poly(NaSS-co-DMAAm)凝胶的 Zeta 电位对细胞伸展面积(6 h)及迁移速率的影响

Fig. 6 Dependence of the spreading area at 6 h and migration velocity on Zeta potential of poly(NaSS-co-DMAAm) hydrogels

此外,当水凝胶的 Zeta 电位高于  $\zeta_{\text{critical}}$  时,尽管细胞不能分裂,但是在不断地变换形态,单个内皮细胞的形态在伸展状态到球状形态之间呈周期性振荡变化。当 Zeta 电位为  $-9.4$  mV 时,在水凝胶支架表面呈伸展状态的细胞的丝状伪足收缩,细胞从预先黏附的地方释放出来,然后变成球形并且迁移到另外一个位置(图 7-3)。该过程非常快,在 1 min 内便

完成。呈球形的细胞然后在新迁移的位置停留 10 min 后开始出现板状伪足 (图 7-12), 15 min 后可显著观察到新生成的丝状伪足。20 min 后该细胞呈完全伸展的状态 (图 7-21), 丝状伪足和板状伪足在 30 min 后生长完全。该结果表明 1 个细胞从球状形态转变为完全伸展的形态需要的时间比其从完全伸展的形态转变为球状形态需要的时间长得多。然后该细胞并不分裂增殖, 而是又从完全伸展的形态进入另外一个转变为球状形态的周期。相反, 当 Zeta 电位低于  $\zeta_{critical}$  时, 内皮细胞除分裂增殖以外, 其形态维持在完全伸展的形态<sup>[18]</sup>。细胞的动态行为与细胞在水凝胶支架表面形成的黏着斑及细胞骨架蛋白的结构有关, 高分子水凝胶的电荷密度显著影响细胞的黏着斑及细胞骨架蛋白的结构。该研究表明除了高分子水凝胶的杨氏模量之外, 电荷密度也显著影响细胞的运动行为。

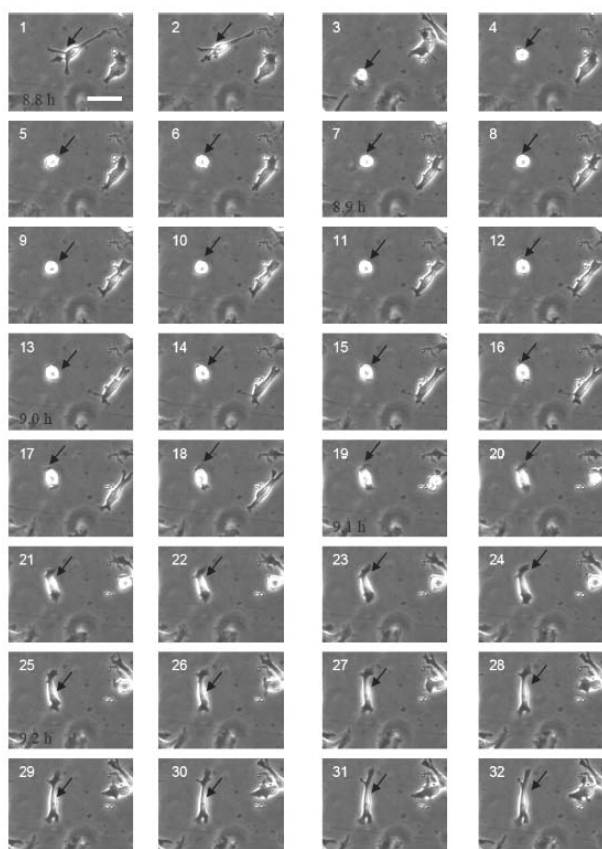


图 7 CCD 相机记录的在 Zeta 电位为  $-9.4\text{ mV}$  的 poly(NaSS-co-DMAAm) 凝胶表面培养细胞时, 在 8.8~9.3 h 期间时细胞形态的变化(拍摄间隔 1 min)

Fig. 7 A typical example of morphology change of a cell cultured on a poly(NaSS-co-DMAAm) gel of  $\zeta = -9.4\text{ mV}$  at 8.8~9.3 h recorded by CCD camera (time interval between successive images: 1 min)

### 2.3 调控细胞在高强度水凝胶表面的扩增

在生理条件下很多组织, 如血管、半月板、关节和筋腱, 都需要承受较强的机械力, 所以替代软组织的人工材料,

不仅需要具备良好的细胞亲和性, 还需具备较强的力学性能。但是, 高强度和支持细胞增殖两个性质要求正是一般合成高分子水凝胶不具备的, 限制了高分子水凝胶作为生物材料的研究与应用。前面表述的 PNaAMPS 和 PNaSS 水凝胶虽然具有良好的细胞亲和性, 但力学性能较弱。这些水凝胶中高分子的含量非常少, 只占其总质量的 10%, 从常规的概念看来, 难以想象这种含有 90% 水的材料会有多强的力学性能。高强度二元互穿网络型(double network, DN)水凝胶打破了合成高分子水凝胶力学性能低的常规概念<sup>[39-41]</sup>。DN 凝胶由两种相互独立的高分子网络构筑而成, 第 1 层网络是弹性大、脆性强的电解质成分, 例如 PNaAMPS, 第 2 层网络是柔软的中性成分, 例如 PAAm 和 PDMAAm。PNaAMPS/PAAm DN 凝胶的断裂强度为 17 MPa, 比 PAMPS 水凝胶的断裂强度(0.4 MPa)高出约 40 倍。如果 DN 凝胶具有良好的细胞亲和性, 将可研制出集高强度和高细胞亲和性于一体的水凝胶, 但是细胞培养结果表明细胞在 DN 凝胶表面并不扩增。究其原因, 在 DN 凝胶制备过程中, 第 2 层网络的中性成分覆盖在第 1 层网络表面, 使 DN 凝胶表面为中性, 不具有支持细胞扩增的性能。

为了使 DN 凝胶具有细胞亲和性, 需要在 DN 凝胶表面导入第 3 层带有电荷的网络, 但是将具有细胞亲和性的 PNaAMPS 导入 PNaAMPS/DMAAm DN 凝胶形成三元互穿网络型(triple network, TN)PNaAMPS/DMAAm/PNaAMPS 凝胶时, 与 PNaAMPS/DMAAm DN 凝胶相比, 其机械强度大幅度降低。所以说, 从水凝胶材料的角度来看, 水凝胶强度与细胞亲和性是一对矛盾, 强度高的高分子水凝胶含有中性高分子的成分多, 不利于细胞扩增, 而适合于细胞扩增的高分子水凝胶带有大量的负电荷, 不利于保持 DN 凝胶的机械强度。

如前所述, poly(NaAMPS-co-DMAAm)水凝胶的临界电位  $\zeta_{critical} = -20.0\text{ mV}$  可以灵敏地控制细胞的黏附和扩增, 预计如果在 DN 凝胶表面导入具有临界电位的共聚物, 就有可能解决水凝胶强度与细胞亲和性的矛盾, 实现兼具细胞亲和性和高强度于一体的水凝胶的制备。因此, 将 poly(NaAMPS-co-DMAAm) ( $F=0.5$ ) 导入 PNaAMPS/DMAAm DN 凝胶, 制备了 PNaAMPS/DMAAm/poly(NaAMPS-co-DMAAm) TN 水凝胶, 其强度随第 3 层网络 poly(NaAMPS-co-DMAAm) 交联密度的增加而降低, 当交联密度为 0、2% 和 4% (摩尔分数) 时, TN 水凝胶的断裂强度分别为 3.0 MPa、2.31 MPa 和 1.36 MPa, 而 PNaAMPS 和 poly(NaAMPS-co-DMAAm) 单层网络水凝胶的断裂强度分别为 0.63 MPa 和 0.26 MPa<sup>[33]</sup>。

细胞培养实验结果表明当第 3 层网络 poly(NaAMPS-co-DMAAm) 的交联密度为 2% 和 4% 时, BFAEC 可扩增为单层细胞膜, 表现出良好的细胞亲和性, 但是当 poly(NaAMPS-co-DMAAm) 没有被交联时, BFAECs 只黏附于凝胶表面, 并不伸展。推断由于 poly(NaAMPS-co-DMAAm) 没有被交联,

可能造成以下原因而不利于细胞扩增: 1) poly(NaAMPS-co-DMAAm)只形成一些高分子链, 没有在 PNaAMPS/DMAAm DN 凝胶中形成稳定的网络结构, 易于从 PNaAMPS/DMAAm DN 凝胶中脱落下来; 2) 由于 poly(NaAMPS-co-DMAAm)没有被交联而呈刷状结构存在于 DN 凝胶表面, 高分子链的运动性强, 表面能较高。

上述研究结果表明通过改变高分子水凝胶的表面电荷可以合成兼具细胞亲和性和高强度的高分子水凝胶。该研究有助于解决高分子水凝胶强度弱, 难以适用于人工血管等需要承担较大压力的人工软组织中的应用问题。此外, 通过发挥血管内皮细胞在高强度合成高分子水凝胶支架上扩增的优势, 具有研制出与人体组织具有相同功能的人工替代组织的潜力。但是凝胶的强度还有待进一步提高, 该方面还需深入研究。

### 3 结 语

目前用于临床医疗的人工组织材料大多为金属、陶瓷、纤维和超高分子量聚乙烯等, 这些材料不仅结构与软组织存在较大差异, 而且力学性能难以与软组织匹配, 不具有作为软组织替代物的功能。生物体中除了牙齿和骨头以外, 其余部分均为含有大量水分的软物质。高分子水凝胶因具有与生物体软组织类似的三维网络结构、黏弹性和亲水性等性能而被视为最有潜力替代生物软组织的生物材料。近年来, 作为生物材料的研究主题之一的调控细胞性能和行为的合成高分子水凝胶材料的研究取得了长足的发展, 充分体现了合成高分子水凝胶材料性能稳定且易于调控的优势。将在无外源蛋白质修饰条件下, 直接在合成高分子水凝胶支架表面培养细胞的体系和方法引入调控细胞性能的生物材料的研究领域, 为探讨高分子水凝胶支架的化学结构和电荷密度对细胞扩增及动态运动行为的影响, 调控细胞生存空间的微环境以及合成集高强度和细胞亲和性于一体的三元互穿网络水凝胶的设计提供了新思路。相信合成高分子水凝胶优越的细胞亲和性和调控细胞的功能将会进一步促进高分子水凝胶在组织工程中的基础研究及应用。然而, 从目前研究情况来看, 依然存在着许多问题和不足, 需要解决和改进。

1) 可调控细胞性能和行为的合成高分子水凝胶体系的种类还有待拓展。目前无外源蛋白质修饰条件下, 调控细胞性能和行为的合成高分子水凝胶材料研究主要集中于少数几种高分子水凝胶体系, 并且尚未涉及生物降解性高分子等水凝胶体系的研究。由于生物降解性高分子水凝胶对生物材料的发展具有推动性意义, 因此, 今后还需拓展包括具有良好生物相容性的生物降解性合成高分子水凝胶体系。

2) 可调控细胞性能和行为的三维合成高分子水凝胶体系还有待研究。组织中的大部分细胞生存于三维微环境之中, 三维微环境对维持细胞功能具有决定性意义。例如二维体外

培养人体乳腺上皮细胞时, 其扩增出现异常, 类似肿瘤细胞, 但在三维环境中培养时, 细胞却呈现与体内相似的扩增行为, 并形成典型的乳腺组织; 三维培养胚胎干细胞比在二维体外培养时分化为造血干细胞的效率更高<sup>[42]</sup>。点击化学已经应用于合成新型细胞三维包埋水凝胶体系, 实现对反应空间和控制, 最终达到区域调控和指示细胞的目的<sup>[43]</sup>。点击化学可在温和条件下凝胶化, 从而实现在几乎不损伤细胞的情况下构建细胞三维培养微环境, 该方向的研究有力推动了新型三维细胞包埋高分子水凝胶的分子设计<sup>[44]</sup>。但是在传统合成高分子水凝胶的基础上开发设计三维细胞包埋体系有利于拓展调控细胞性能和行为的高分子水凝胶体系的种类和应用范围。

3) 具有细胞亲和性的高强度水凝胶还有待开发。目前研制的调控细胞性能和行为的合成高分子水凝胶材料还缺乏必要的力学性能, 具有细胞亲和性的高强度水凝胶的研究有助于解决高分子水凝胶强度弱, 难以适用于人工血管等需要承担较大压力的人工软组织中的应用问题。虽然通过改善高分子水凝胶的表面电荷可以合成兼具细胞亲和性的高强度高分子水凝胶, 但是凝胶的强度还有待进一步提高。

### [参考文献](References)

- [1] Lee K Y, Mooney D J. Hydrogels for tissue engineering [J]. Chem Rev, 2001, 101(7): 1869-1879.
- [2] Hoffman A S. Hydrogels for biomedical applications [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2002, 54(1): 3-12.
- [3] James T L, Christina J L, Stacey F B, et al. Thin collagen film scaffolds for retinal epithelial cell culture [J]. Biomaterials, 2007, 28(8): 1486-1494.
- [4] Firel R, Sar S, Mee P J. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signaling [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2005, 57(13): 1894-1903.
- [5] Benigno K A, Lo C M, Wang Y L. Flexible polyacrylamide substrata for the analysis of mechanical interactions at cell-substratum adhesions methods [J]. Cell Biol, 2002, 69: 325-339.
- [6] Peyton S R, Putnam A J. Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion [J]. Cell Physiol, 2005, 204(1): 198-209.
- [7] Yeung T, Georges P C, Flanagan L A, et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion [J]. Cell Motil Cytoskel, 2005, 60(1): 24-34.
- [8] Pelham R J, Wang Y L. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(25): 13661-13665.
- [9] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. Cell, 2006, 126(4): 677-689.
- [10] Gilbert P M, Havenstrite K L, Magnusson K E G, et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture [J]. Science, 2010, 329(5995): 1078-1081.
- [11] Mickie B. Microenvironment mimicry [J]. Science, 2010, 329(5995): 1024-1025.
- [12] Benoit S W D, Schwartz M P, Dumey A R, et al. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells [J]. Nat Mater, 2008, 7(10): 816-823.
- [13] Chen Y M, Shiraishi N, Satokawa H, et al. Cultivation of endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels [J]. Biomaterials, 2005, 26(22): 4588-4596.

- [14] Chen Y M, Gong J P, Osada Y. Gel: A potential material as artificial soft tissue [M] // Matyjaszewski K, Gnanou K, Leibler L. *Macromolecular Engineering: Precise Synthesis, Materials Properties, Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, Germany, 2007.
- [15] Yang J J, Chen Y M, Gong J P. Spontaneous redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes on hydrogel surfaces [J]. *Tiss Eng A*, 2010, 16(8): 2529-2540.
- [16] Yang J J, Chen Y M, Gong J P. Gene expression, glycocalyx assay, and surface properties of human endothelial cells cultured on hydrogel matrix with sulfonic moiety: Effect of elasticity of hydrogel [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 95(2): 531-542.
- [17] Chen Y M, Shen K C, Gong J P, et al. Selective cell spreading, proliferation, and orientation on micropatterned gel surfaces [J]. *J Nanosci Nanotech*, 2007, 7(3): 773-779.
- [18] Chen Y M, Ogawa R, Kakugo A, et al. Dynamic cell behavior on synthetic hydrogels with different charge densities [J]. *Soft Matter*, 2009, 5(9): 1804-1811.
- [19] Chen Y M, Tanaka M, Gong J P, et al. Platelet adhesion to human umbilical vein endothelial cells cultured on anionic hydrogel scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(10): 1752-1760.
- [20] Kwon H J, Yasuda K, Ohmiya Y, et al. In vitro differentiation of chondrogenic ATDC5 cells is enhanced by culturing on synthetic hydrogels with various charge densities [J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(2): 494-501.
- [21] Bao G, Suresh S. Cell and molecular mechanics of biological materials [J]. *Nat Mater*, 2003, 2(11): 715-725.
- [22] Discher D E, Janmey P, Wang Y L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate [J]. *Science*, 2005, 310(5751): 1139-1143.
- [23] Wakatsuki T, Kolodney M S, Zahalak G I, et al. Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue [J]. *Biophys J*, 2000, 79(5): 2353-2368.
- [24] Chang Y Y, Chen S J, Liang H C, et al. The effect of galectin 1 on 3T3 cell proliferation on chitosan membranes [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(17): 3603-3611.
- [25] Chung T W, Lu Y F, Wang S S, et al. Growth of human endothelial cells on photochemically grafted Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) chitosans [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(24): 4803-4809.
- [26] Park Y D, Tirelli N, Hubbell J A. Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetration networks [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(6): 893-900.
- [27] West J L, Hubbell J A. Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration [J]. *Macromolecules*, 1999, 32(1): 241-244.
- [28] Schmedlen R H, Masters K S, West J L. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4325-4332.
- [29] Fittkau M H, Zilla P, Bezuidenhout D, et al. The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(2): 167-174.
- [30] Lee J H, Lee J W, Khang G, et al. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces [J]. *Biomaterials*, 1997, 18(4): 351-358.
- [31] Lee S D, Husiue G H, Chang P C T, et al. Plasma-induced grafted polymerization acrylic acid and subsequent grafting of collagen onto polymer film as biomaterials [J]. *Biomaterials*, 1996, 17(16): 1599-1608.
- [32] Narita T, Hirai A, Xu J, et al. Substrate effects of gel surface on cell adhesion and disruption [J]. *Biomacromolecules*, 2000, 1(2): 162-167.
- [33] Chen Y M, Gong J P, Tanaka M, et al. Tuning of cell proliferation on tough gels by critical charge effect [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 88(1): 74-83.
- [34] Calonder C, Matthew H W T, Tasse P R V. Adsorbed layers of oriented fibronectin: A strategy to control cell-surface interactions [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 75(2): 316-323.
- [35] Larsen M, Wei C, Yamada K M. Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(16): 3376-3384.
- [36] Polte T R, Eichler G S, Wang N, et al. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress [J]. *J Physiol Cell*, 2004, 286(3): 518-528.
- [37] Davis G E, Senger D R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization [J]. *Circul Res*, 2005, 97(11): 1093-1107.
- [38] Deroanne C F, Lapiere C M, Nusgens B V. In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49(3): 647-658.
- [39] Kaneko D, Tada T, Kurokawa T, et al. Mechanically strong hydrogels with ultra-low frictional coefficients [J]. *Adv Mater*, 2005, 17(5): 535-538.
- [40] Gong J P, Katsuyama Y, Kurokawa T, et al. Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength [J]. *Adv Mater*, 2003, 15(14): 1155-1158.
- [41] Azuma C, Yasuda K, Tanabe Y, et al. Biodegradation of high-toughness double network hydrogels as potential materials for artificial cartilage [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 81(2): 373-380.
- [42] Cushing M C, Anseth K S. Hydrogel cell cultures [J]. *Science*, 2007, 316(5828): 1133-1134.
- [43] Burdick J A. Bioengineering: cellular control in two clicks [J]. *Nature*, 2009, 460(7254): 469-470.
- [44] DeForest C A, Polizzotti B D, Anseth K S. Sequential click reactions for synthesizing and patterning three-dimensional cell microenvironments [J]. *Nat Mater*, 2009, 8(8): 659-664.