

肝素水凝胶在骨组织工程中的应用

赵宇昊 何易祥 高昭 赵海燕 王文己

摘要 在骨组织工程研究中,骨细胞再生及干预调控对于疾病治疗具有重要临床意义。肝素水凝胶不仅组织相容性好,细胞毒性低,而且可诱导间充质干细胞分化修复骨缺损,并可作为细胞因子载体及诱导成软骨分化和控制药物释放,具有较好的生物学活性。该文就肝素水凝胶在骨组织工程中的应用进行综述。

关键词 肝素水凝胶;骨组织工程;应用

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2021.05.002

临床上很多疾病与骨和软骨缺损及再生相关,因此学者们对骨发育及修复的探究从未停止^[1]。作为新兴生物材料,肝素水凝胶在骨组织工程中的骨缺损修复、诱导分化等方面发挥重要作用。肝素广泛存在于体内,它的分子结构中含有大量磺基和羧基,表面带有大量负电,通过肝素结构上的特定结合域能静电吸附许多重要的生物分子,从而与生物活性蛋白相互作用^[2]。因此,肝素水凝胶除具有水凝胶的组织相容性好、溶胀不溶解等优点外,还具有参与调控细胞因子释放等生物学特性。

1 诱导间充质干细胞分化

间充质干细胞(MSC)可分化为骨细胞和软骨细胞,是一种很好的干细胞治疗来源,对于骨相关疾病的治疗尤为重要^[3]。肝素能与许多成骨细胞及骨祖细胞黏附相关蛋白相互作用,加之水凝胶本身具有交联网状的3D分子结构,因此肝素水凝胶可维持MSC存活,诱导MSC分化^[4]。Choi等^[5]将肝素泊洛沙姆/结冷胶双网水凝胶作为MSC载体进行培养,发现在肝素提供改善黏附增殖表面的前提下,两种水凝胶复合对细胞增殖有显著促进作用。而肝素泊洛沙姆水凝胶解决了天然多糖结冷胶在装载细胞时成胶温度高、凝胶本身缺乏配体结合部等问题,MSC存活且形态表现良好,表明肝素水凝胶不仅可以影响MSC,而且组织细胞毒性较低。Chen等^[6]研究提示,肝素水凝胶较明胶水凝胶更容易促进

MSC成软骨分化,抑制成骨分化。Seto等^[7]将MSC与成骨细胞共培养于肝素水凝胶中,MSC虽然成骨明显,但细胞边缘矿化却十分明显,这也提示肝素本身带有负电荷,因此可以选择性地与可溶性带正电荷的蛋白相互作用,从而影响成骨细胞分泌的细胞因子作用。此外,Kim等^[8]将肝素水凝胶与MSC共培养,结果显示MSC具有细胞黏附性好等优势,且经无血清培养条件培养的MSC生物学性能优于经普通细胞培养板培养的MSC,这也提示肝素水凝胶发挥作用并未借助吸附于肝素水凝胶表面的生物蛋白,而是肝素本身与细胞间的作用。

2 促进软骨细胞增殖

软骨组织的自我修复能力有限,结构复杂,不存在血管、神经或淋巴组织,因此损伤后不会发生明显再生,且修复后的软骨组织缺乏软骨正常功能所需的典型带状结构。目前研究表明,水凝胶具有软骨组织样特征,水凝胶吸水后可以保持稳定的结构,因此水凝胶是目前治疗软骨缺损的前沿研究方向^[9]。研究表明,肝素添加水凝胶后可显著抑制MSC成骨作用,促进软骨细胞表型增殖,加强成软骨作用^[6,10]。Moreira-Teixeira等^[10]探究右旋糖酐酞胺水凝胶对软骨修复的影响时掺入肝素,结果细胞发生黏附,并触发了右旋糖酐酞胺水凝胶中的细胞归位,证明在水凝胶中加入肝素能诱导细胞募集。肝素浓度改变可对细胞黏附、迁移、增殖和分化产生影响,原因可能为肝素与生长因子和趋化因子的高亲和力和力。因此,肝素水凝胶促进软骨修复除能诱导MSC分化外,还可能诱导周围细胞参与修复^[10]。Jin等^[11]的实验证实,水凝胶中加入肝素可增加水凝胶本身的溶胀性能,更好地为细胞输送营养;与单

基金项目:国家自然科学基金(82060394)、甘肃省自然科学基金(20JR10RA673)

作者单位:730000, 兰州大学第一临床医学院(赵宇昊、何易祥、高昭);730000, 兰州大学第一医院骨科(赵海燕、王文己)

通信作者:王文己 E-mail: ldyjyzwwj@163.com

纯右旋糖酐酪胺水凝胶相比,当肝素在水凝胶中占比达一半时,培养基中软骨细胞活力和增殖能力可达到最佳状态,并能促进细胞基质产生。Kunisch等^[12]研究发现,水凝胶中肝素的存在可防止软骨区矿化,有利于抑制钙化软骨成骨的长期发展,并使邻近水凝胶诱导的透明样软骨层Ⅹ型胶原明显增多,且肝素水凝胶参与Ⅱ型胶原和蛋白多糖调控,稳定软骨形成。Park等^[13]将转化生长因子(TGF)- β 3加入肝素水凝胶中,发现能更好地激活软骨细胞生物活性,为软骨再生提供了新的理论可能。

3 促进血管形成

在骨组织重建中,细胞募集与血管形成对于组织成活至关重要。有研究表明,肝素水凝胶具有恢复断裂血管连接的功能,可以完善上皮结构,同时肝素的抗凝特性并未影响组织再生^[14]。这表明肝素水凝胶促进血管再生存在可能。血管内皮生长因子(VEGF)是一种肝素结合生长因子,它从肝素水凝胶中缓慢、稳定释放,使得肝素水凝胶经VEGF修饰可在成血管方面发挥较好的作用^[15]。Krieger等^[16]利用脱硫肝素聚乙二醇二丙烯酸酯水凝胶释放传递外源性基质细胞衍生因子(SDF)-1 α ,从水凝胶中释放的SDF-1 α 可调节先天免疫反应,直接或间接参与微血管网络生长,显著增加周围微血管口径和数量。McGonigle等^[17]研究发现,肝素水凝胶联合骨保护素可有效刺激体内血管生成。Zieris等^[18]同时将成纤维细胞生长因子(FGF)与VEGF加入肝素水凝胶中,结果表明肝素水凝胶可以大量结合FGF-2和VEGF等细胞因子,交联固化,并可以分别调节FGF和VEGF释放,成血管作用明显。上述研究均表明,肝素水凝胶可通过控制释放含有肝素结合结构域的生长因子,成为有效的细胞因子传递基质,从而加速新生血管形成。

4 作为细胞因子载体

水凝胶结构含有80%~90%的水和三维多孔结构,而肝素分子本身呈负电性且具有特殊结构域^[19],可以与许多重要的生物蛋白如凝血酶、脂蛋白、生长因子、趋化因子、病毒外壳蛋白和细胞外基质蛋白等相互作用,两者相互结合实现肝素水凝胶在体内外的控释功能^[20]。肝素修饰促进了水凝胶整体与细胞因子结合的特异性和亲和力,具有细胞毒性低等优点。Chen等^[21]将低分子肝素加入羧甲基壳聚糖氧化硫酸软骨素水凝胶中,装载TGF- β 3作为外周血MSC的基质,以促进软骨修复,实验证

明水凝胶中低分子肝素使TGF- β 3凝胶化时间缩短,机械强度增高,降解速度减慢,TGF- β 3释放稳定持久。Chung等^[22]将负载骨形态发生蛋白(BMP)-2的肝素化纳米颗粒水凝胶用于增强骨再生,结果表明在肝素化纳米颗粒水凝胶作用下,培养基中获得成熟和高度矿化的骨,BMP-2促进新骨重塑作用明显增强。Kim等^[23]研究发现,肝素化壳聚糖水凝胶对BMP的生物活性具有保护作用,其可能机制为水凝胶通过抑制BMP拮抗剂Noggin活性来增强BMP效力。Levinson等^[24]将可注射肝素透明质酸水凝胶作为生物支架,装载TGF- β 1并有效控制其释放。肝素本身含有大量磺基和羧基,这使其分子本身带有负电^[2]。Peng等^[25]将带正电的小分子抗炎药物龙胆紫加入肝素水凝胶中,结果表明龙胆紫释放缓慢且可在释放后维持自身生物活性,为肝素水凝胶成为药物载体提供理论可能性。

5 结语

骨组织工程涉及骨与软骨细胞增殖、分化等,对于临床疾病治疗具有重大的指导意义。肝素水凝胶具有组织相容性好、免疫原性低、细胞毒性低、兼具一定的机械强度等优点,近年来被广泛研究。由于肝素本身的抗凝活性及自身电荷分布,对其羧基稍加修饰取代,就可用于凝胶合成。肝素水凝胶可诱导MSC分化修复骨缺损,并可作为细胞因子载体及诱导成软骨分化和控制药物释放,具有较好的生物学活性。但目前肝素水凝胶绝大部分的实验仅对实验对象进行现象分析,并未过多的探究肝素水凝胶生物活性具体机制,且实验较多偏向于体外研究,涉及动物体内的研究较少。此外,形成肝素水凝胶的交联分子材料种类繁多,如何选择更实用的材料,兼顾生物性能与费用,值得探究。

参考文献

- [1] Collins MT, Stratakis CA. Bone formation, growth, and repair[J]. Horm Metab Resh, 2016, 48(11): 687-688.
- [2] Sakiyama-Elbert SE. Incorporation of heparin into biomaterials[J]. Acta Biomater, 2014, 10(4): 1581-1587.
- [3] Jeon HJ, Yoon KA, An ES, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells combined with cartilage acellular matrix mediated via bone morphogenic protein 6 in a rabbit model of articular cruciate ligament transection[J]. Stem Cell Rev Rep, 2020, 16(3): 596-611.
- [4] Benoit DSW, Durney AR, Anseth KS. The effect of heparin-functionalized PEG hydrogels on three-dimensional human

- mesenchymal stem cell osteogenic differentiation [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(1): 66-77.
- [5] Choi JH, Choi OK, Lee J, et al. Evaluation of double network hydrogel of poloxamer-heparin/gellan gum for bone marrow stem cells delivery carrier [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 181: 879-889.
- [6] Chen J, Chin A, Almarza AJ, et al. Hydrogel to guide chondrogenesis versus osteogenesis of mesenchymal stem cells for fabrication of cartilaginous tissues [J]. *Biomed Mater*, 2020, 15(4): 045006.
- [7] Seto SP, Casas ME, Temenoff JS. Differentiation of mesenchymal stem cells in heparin-containing hydrogels via coculture with osteoblasts [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(3): 589-601.
- [8] Kim M, Kim YH, Tae G. Human mesenchymal stem cell culture on heparin-based hydrogels and the modulation of interactions by gel elasticity and heparin amount [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(8): 7833-7844.
- [9] Wei W, Ma Y, Yao X, et al. Advanced hydrogels for the repair of cartilage defects and regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2020, 6(4): 998-1011.
- [10] Moreira-Teixeira LS, Bijl S, Pully VV, et al. Self-attaching and cell-attracting in-situ forming dextran-tyramine conjugates hydrogels for arthroscopic cartilage repair [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 3164-3174.
- [11] Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, et al. Chondrogenesis in injectable enzymatically crosslinked heparin/dextran hydrogels [J]. *J Control Release*, 2011, 152(1): 186-195.
- [12] Kunisch E, Knauf AK, Hesse E, et al. StarPEG/heparin-hydrogel based in vivo engineering of stable bizonal cartilage with a calcified bottom layer [J]. *Biofabrication*, 2018, 11(1): 015001.
- [13] Park JS, Woo DG, Yang HN, et al. Transforming growth factor beta-3 bound with sulfate polysaccharide in synthetic extracellular matrix enhanced the biological activities for neocartilage formation in vivo [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 91(2): 408-415.
- [14] Zhao YZ, Lv HF, Lu CT, et al. Evaluation of a novel thermosensitive heparin-poloxamer hydrogel for improving vascular anastomosis quality and safety in a rabbit model [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73178.
- [15] Tae G, Scatena M, Stayton PS, et al. PEG-cross-linked heparin is an affinity hydrogel for sustained release of vascular endothelial growth factor [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2006, 17(1-2): 187-197.
- [16] Krieger JR, Ogle ME, McFaline-Figueroa J, et al. Spatially localized recruitment of anti-inflammatory monocytes by SDF-1alpha-releasing hydrogels enhances microvascular network remodeling [J]. *Biomaterials*, 2016, 77: 280-290.
- [17] McGonigle JS, Tae G, Stayton PS, et al. Heparin-regulated delivery of osteoprotegerin promotes vascularization of implanted hydrogels [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008, 19(8): 1021-1034.
- [18] Zieris A, Chwalek K, Prokoph S, et al. Dual independent delivery of pro-angiogenic growth factors from starPEG-heparin hydrogels [J]. *J Control Release*, 2011, 156(1): 28-36.
- [19] Wu J, Zhu J, He C, et al. Comparative study of heparin-poloxamer hydrogel modified bFGF and aFGF for in vivo wound healing efficiency [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(29): 18710-18721.
- [20] Go DH, Joung YK, Lee SY, et al. Tetronic-oligolactide-heparin hydrogel as a multi-functional scaffold for tissue regeneration [J]. *Macromol Biosci*, 2008, 8(12): 1152-1160.
- [21] Chen YR, Zhou ZX, Zhang JY, et al. Low-molecular-weight heparin-functionalized chitosan-chondroitin sulfate hydrogels for controlled release of TGF-beta3 and in vitro neocartilage formation [J]. *Front Chem*, 2019, 7: 745.
- [22] Chung YI, Ahn KM, Jeon SH, et al. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex [J]. *J Control Release*, 2007, 121(1-2): 91-99.
- [23] Kim S, Fan J, Lee CS, et al. Heparinized chitosan stabilizes the bioactivity of BMP-2 and potentiates the osteogenic efficacy of demineralized bone matrix [J]. *J Biol Eng*, 2020, 14: 6.
- [24] Levinson C, Lee M, Applegate LA, et al. An injectable heparin-conjugated hyaluronan scaffold for local delivery of transforming growth factor beta1 promotes successful chondrogenesis [J]. *Acta Biomater*, 2019, 99: 168-180.
- [25] Peng Y, Tellier LE, Temenoff JS. Heparin-based hydrogels with tunable sulfation & degradation for anti-inflammatory small molecule delivery [J]. *Biomater Sci*, 2016, 4(9): 1371-1380.

(收稿日期:2021-03-31)

(本文编辑:卢千语)