

生物来源水凝胶在膀胱组织工程中的研究进展

安子彦¹, 肖树伟¹, 符伟军², 张旭²

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心 泌尿外科, 北京 100853

摘要:膀胱的修复重建一直是泌尿外科的重点研究方向, 近年来随着组织工程技术的不断进步, 这一问题有望从根本上得到解决。作为组织工程中最常用的支架材料之一, 生物来源水凝胶可以模仿天然组织的结构, 为细胞提供理想的生存环境和机械支持, 其具备良好的生物相容性、可降解性和可塑性等, 在膀胱组织工程中有广阔的应用前景。本文将对各种生物来源水凝胶材料进行介绍, 并综述其在膀胱组织工程中的研究进展。

关键词: 膀胱组织工程; 水凝胶; 生物材料; 混合支架; 3D 生物打印

中图分类号: R 694.6; R 318.16

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2021)02-0220-04

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2021.02.019

网络出版时间: 2021-03-25 12:44

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20210323.0937.002.html>

引用本文: 安子彦, 肖树伟, 符伟军, 等. 生物来源水凝胶在膀胱组织工程中的研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2021, 42 (2): 220-223.

Research advances in bio-derived hydrogel in bladder tissue engineering

AN Ziyan¹, XIAO Shuwei¹, FU Weijun², ZHANG Xu²

¹ Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ² Department of Urology, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: FU Weijun. Email: fuweijun@hotmail.com

Abstract: The repair and reconstruction of bladder has always been a key research direction in urology clinical practice. With the continuous progress of tissue engineering technology in recent years, this problem is expected to be solved fundamentally. Hydrogels which mimic structure of the native tissues have been used as one of the most common tissue engineering scaffold materials due to their ability in providing an ideal environment and mechanical support for cell survival, with the advantages of good biocompatibility, biodegradability and plasticity. This article will introduce the characteristics of bio-derived hydrogels and review their research advances in bladder tissue engineering.

Keywords: bladder tissue engineering; hydrogel; biology material; hybrid scaffold; 3D bioprinting

Cited as: An ZY, Xiao SHY, Fu WJ, et al. Research advances in bio-derived hydrogel in bladder tissue engineering [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2021, 42 (2): 220-223.

因肿瘤、创伤、炎症和医源性损伤而造成的膀胱受损患者需要进行膀胱切除, 为了维持患者的储尿排尿功能, 常需要用肠道替代法来重建膀胱, 但这种方法存在较多不足, 如代谢并发症、

吻合口感染、尿路感染、结石形成等^[1]。因此越来越多的研究者将目光转向了膀胱组织工程学, 尝试制备出人工膀胱用于修复受损膀胱^[2]。膀胱组织工程主要包括种子细胞、膀胱支架和生长因子三大部分。作为核心之一, 膀胱支架的理想材料应具备良好的生物相容性、低免疫原性和可降解性, 还应有合适的机械性能, 并使其能够起到防感染屏障作用。既往已经有许多材料被用于制作膀胱支架, 如大网膜、小肠黏膜下层、膀胱脱细胞基质 (bladder acellular matrix, BAM) 以及一些合成聚合物材料等, 但通常会导致移植物挛缩、降解残余、瘢痕形成、泌尿系炎症及结石等问题^[3]。生物来源水凝胶的成分和结构与天然细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 相似, 是一种三维网状结构的具有亲水性、不溶性的聚合物, 可以吸收大量水分或生物流体^[4]。与合成聚合物相比, 生

收稿日期: 2020-12-24

基金项目: 国家自然科学基金 (81873600); 北京市自然科学基金 (718 2154); 海南省重点研发计划社会发展专项课题 (ZDYF2016119); 海南省自然科学基金课题 (20158299); 海南省医药卫生重点科研项目 (14A110062); 教育部留学回国人员科研启动基金

Supported by the National Natural Science Foundation of China (818 73600); Beijing Natural Science Foundation (7182154); Special Project for Social Development of Major Program of Hainan Province (ZDYF2016 119); The Project of Natural Science Foundation of Hainan Province (20158299); Major Scientific Research Projects of Medicine and Health of Hainan Province (14A110062); Project of the Scientific Research Start-up Fund for the Returned Students of the Ministry of Education

作者简介: 安子彦, 男, 在读硕士。研究方向: 膀胱组织工程。

Email: anzhiyan301@163.com

通信作者: 符伟军, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师。Email:

fuweijun@hotmail.com

物来源水凝胶可以保存一些天然分子,如生长因子、多糖和天然蛋白等,能够促进细胞生长分化和血管生成,具有抗菌作用,有更好的生物相容性、降解性和免疫原性,能为细胞生长提供机械支撑和水合环境,且来源丰富易获取、加工制作相对容易,其良好的生物相容性和可降解性适用于制作膀胱支架。这些优点引起了研究者的普遍关注。本文将对生物来源水凝胶的种类及其在膀胱组织工程中的研究进展进行综述。

1 胶原水凝胶

胶原是哺乳动物组织中含有最丰富的蛋白质,占全身蛋白质的20%-30%,其基本结构由3条多肽链相互缠绕而成,通过氢键和共价键彼此连接,结构稳定^[5]。胶原的抗原性低,可生物降解,但完全以水凝胶的形式存在时力学性能很差。为了改进这一缺点,Engelhardt等^[6]尝试将聚(乳酸-co-3-己酯)网状物镶嵌到两层胶原凝胶之间,然后进行塑性压缩,构建出一种混合支架,能够承受膀胱内压力,细胞在支架上的附着和增殖情况良好,具备膀胱组织再生的潜力。而且这种复合结构还克服了单纯胶原凝胶不适用于缝合的缺点,能够防止支架在体内收缩变形。与单纯聚(乳酸-co-3-己酯)网状物相比,混合支架在体内炎症反应更弱,不会发生强烈的细胞浸润,这可能是因为胶原层将聚合物与宿主细胞在物理上隔绝。因此将合成聚合物与生物水凝胶材料相结合可能是增强混合支架生物相容性的一种实用方法。Vardar等^[7]制备了一种可与纤维蛋白共价结合的人胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1),并将其层叠于经塑性压缩的胶原-纤维蛋白-胶原凝胶之间,以纤维蛋白为两层胶原之间的粘连材料,构建了一种多层复合支架。实验证明这种方法可以显著提升支架的力学性能,其抗拉力强度与天然膀胱组织相当,且增加了支架的密封性和可缝合性。此外IGF-1在支架内作用明显,可以有效诱导平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)增殖分化。说明胶原凝胶是一种合适的组织工程材料,为膀胱重建提供一种新的途径。

2 明胶水凝胶

明胶是胶原的衍生物,将胶原的天然三螺旋结构分解为单链分子可获得。为了将明胶用作生物材料,通常用共价交联方法克服其在常温下的不稳定性。近年来有研究者以明胶为原料,通过对甲基丙烯酰基进一步化学改性制得甲基丙烯酰

明胶(gelatin methacrylate, GelMA)水凝胶^[8]。GelMA保留了明胶的良好降解性和低免疫原性,可促进各种细胞的黏附与增殖,并且具有可调节的物理化学性质,在组织工程中有着极为广泛的用途。Xiao等^[9]将海藻酸二醛与明胶共价交联为水凝胶后包裹脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs),然后与BAM移植物、丝素蛋白网构建了一种“三明治”样复合支架:BAM作为防水屏障,水凝胶包裹ADSCs,丝网增强机械强度,并建立大鼠膀胱扩大成形术模型进行动物实验;结果表明该支架力学性能显著增强,具有良好的细胞相容性和力学性能。该水凝胶系统不仅模拟了ADSCs的细胞外基质生长微环境,还可以将其输送到所需的区域,促进膀胱缺损的形态恢复和平滑肌、神经的再生,加快膀胱功能恢复。被包裹的ADSCs还可以通过SDF-1 α /CXCR4途径发挥促血管生成作用。此外ADSCs加速了水凝胶的降解,减少了降解残余和炎症,但并不能完全消除因炎症形成的膀胱结石。总体来说,将明胶改性或制成杂化水凝胶后,在膀胱组织工程中能发挥更重要的作用。

3 纤维蛋白水凝胶

纤维蛋白在伤口自然愈合过程中起着重要的作用,在外科手术中已被用作密封剂和黏合剂,且不会导致毒性降解或炎症反应。纤维蛋白水凝胶可以通过向含有凝血因子VIII和Ca²⁺的纤维蛋白原溶液中加入凝血酶制成,其降解速率可用蛋白酶抑制剂控制。纤维蛋白可从患者自身血液中提取,因此不会有异物反应的潜在风险^[10]。并且纤维蛋白水凝胶可被用来设计搭载血管内皮生长因子,促进组织的血管化和血液灌注^[11]。Jaimes-Parra等^[12]曾用膀胱基质细胞和纤维蛋白-琼脂糖支架构建生物工程膀胱黏膜模型,体外研究结果提示生物工程化的膀胱黏膜模型与天然膀胱黏膜具有相同的结构和相似的功能,但在细胞分化阶段效果不甚理想。最新研究发现通过调节纤维蛋白水凝胶的硬度可以影响细胞的分化方向^[13]。因此未来可尝试将纤维蛋白水凝胶用于膀胱组织工程并进行动物实验研究。

4 丝素蛋白水凝胶

丝素蛋白(silk fibroin, SF)是一种来源于昆虫的天然蛋白质,当前使用最广泛的丝素蛋白来源于家蚕,丝蛋白和丝胶是其主要成分。SF可以在水或各种溶剂中加工成具有不同化学功能的水凝胶、纤维或海绵^[14]。Floren等^[15]发现通过改变

SF 在水溶液中的浓度, 可以获得不同硬度的 SF 水凝胶, 且主要结构参数不变; 还发现 SF 水凝胶与生长因子结合后, 在一定培养时间 (72 h) 内可以增强人骨髓间充质干细胞向成熟平滑肌细胞分化的能力。这一发现表明通过设计细胞生长的微环境, 即调节水凝胶性能和生长因子, 可以简化复杂的细胞分化策略。Buitrago 等^[16]首次报道了由丝素蛋白和胶原组成的杂化水凝胶。这种丝素蛋白-胶原水凝胶克服了单纯丝素蛋白 (缺乏细胞黏附基序) 和单纯胶原蛋白 (细胞介导收缩) 的局限性, 加速了细胞的黏附, 并改善了抗收缩性以抵抗细胞的牵引力, 具有较高的抗变形能力; 并且在细胞三维培养中能长期保持人骨髓间充质干细胞的活力和增长。除此之外, Mauney 等^[17]运用凝胶纺丝技术, 将 SF 溶液制成纺丝凝胶后构建膀胱支架, 并在小鼠体内实施膀胱扩大术, 结果表明该支架能够促进尿路上皮细胞 (urothelial cells, UCs) 和 SMCs 再生, 减少了慢性炎症反应, 未见膀胱结石形成, 且尿流率、排尿量和膀胱容量均明显增加。以上研究表明, SF 水凝胶能够促进种子细胞的分化和增殖, 在膀胱组织工程中有良好的应用前景。

5 透明质酸水凝胶

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 由重复的二糖构成 (D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖), 是一种非硫酸化的线性糖胺聚糖, 存在于哺乳动物的所有组织中, 包括皮肤、脐带、软骨、滑液和玻璃体体液。通过化学交联、光交联或改性, HA 可以转变为具有不同生物学特性的水凝胶^[18]。Kihak 等^[19]用光聚合法制备了肝素-透明质酸水凝胶 (Hep-HA), 将人 ADSCs 包裹在其中构建三维细胞培养系统。实验观察发现在三维培养系统中, Hep-HA 可以有效促进 ADSCs 的生长、增殖和迁移, 并且 ADSCs 中分泌有较多的透明质酸酶, 能够加速 Hep-HA 的降解。Sivaraman 等^[20]将丙烯酸酯、HA 和 I 型胶原交联制备了一种复合水凝胶三维网状支架, 用于膀胱 SMCs 的包埋, 发现 HA 对复合水凝胶的力学性能有强化作用, 对复合支架的弹性模量 (刚度) 有显著影响; 且 HA 的降解促进了细胞的扩散和迁移, 使 SMCs 在支架上的分布增加。在种植 SMCs 并培养两周后显示该水凝胶支架的力学性能 (峰值应力、峰值拉伸力和弹性模量) 显著提高。因此基于 HA 的复合水凝胶不仅可以诱导促进细胞的分化与增殖, 还能改善支架机械性能, 具有很好的实用性。

6 细胞外基质水凝胶

ECM 是一种天然衍生材料, 包括生长因子、胶原、层黏连蛋白、纤维连接蛋白、糖胺聚糖和蛋白多糖, 为维持组织内稳态提供重要的生物因子和物理支撑^[21-22]。ECM 材料主要来源于猪组织, 在溶解后通过调节温度或 pH 可形成水凝胶^[23]。ECM 水凝胶是一种理想的生物材料, 它包含除活细胞之外的所有组织成分, 且具有良好的生物学特性。BAM 是来源于 ECM 的一种材料, 适用于修复和重建泌尿系统。但其表面致密平滑, 不能很好地促进平滑肌再生和血管形成, 可能导致膀胱纤维化并最终影响远期膀胱功能。因此 Jiang 等^[24]用胃蛋白酶酶解法将 BAM 制备为膀胱脱细胞基质水凝胶 (bladder acellular matrix hydrogel, BAMH)。由于凝胶过程中形成了新的化学键, 因此 BAMH 的热稳定性较 BAM 显著提高。研究发现生长因子在 BAMH 中的保存与释放良好, 且 BAMH 有助于内皮细胞的黏附与增殖。实验结果证明来源于膀胱的 BAMH 具有良好的生物相容性, 在泌尿外科领域具有广阔的应用前景, 如尿道重建、膀胱再生等。

7 水凝胶与 3D 生物打印

与传统组织工程学相比, 3D 生物打印可以跳过细胞种植过程, 通过计算机辅助建模, 3D 打印机将细胞、生物材料与生物活性因子相混合, 分层打印为仿生组织, 实现了对细胞分布和空间结构的精确控制^[25], 且这种工业化制作模式还可以避免因制作批次不同而导致的成品性能差异。事实上, 只有很少的天然或合成聚合物可以在温和的温度或细胞耐受的条件下用作 3D 生物打印的生物墨水。而胶原^[26]、明胶^[27]、丝素蛋白^[28]、ECM^[29]等因具有良好的可打印性、可降解性和稳定性被视为 3D 生物打印的首选材料。现在这种基于水凝胶的生物墨水已被广泛应用于多种组织工程中, 如皮肤^[30]、软骨^[31]和心脏^[32]等。在泌尿系统中, 既往有研究者通过 3D 打印机将聚己内酯/聚丙烯交酯-己内酯混合物与负载有 SMCs 和 UCs 的纤维蛋白水凝胶同时打印, 制作出的柱状尿道支架在结构、力学性能和细胞成分特征上与天然兔尿道非常接近^[33]。虽然目前还无研究者进行 3D 打印膀胱的实验, 但未来必定可以制备出符合预期机械性能和生化特性、具备正常功能的 3D 打印膀胱支架。

8 结语

现阶段多数膀胱组织工程的探索仍处在实验阶段。在基于水凝胶的膀胱移植物能够大规模应

用于临床之前,仍有几个问题需要解决:1)当前多数工程化膀胱组织中缺乏复杂的微血管系统,如何增强其构建血管网络的能力;2)探明水凝胶对细胞诱导分化作用的具体机制,以及对膀胱组织再生的影响;3)在构建多层复合支架时,明确水凝胶与其他材料间的相互作用,使支架性能达到最佳;4)探索制备新型水凝胶生物墨水及其在3D打印设备中的应用参数,以期实现3D生物打印技术对传统膀胱组织工程的变革。尽管存在诸多挑战,但未来水凝胶的不断更新和优化必将弥补这些不足,并为膀胱组织工程带来革命性的改变。

参考文献

- 1 Chan YY, Sandlin SK, Kurzrock EA, et al. The current use of stem cells in bladder tissue regeneration and bioengineering [J]. *Biomedicines*, 2017, 5 (1): E4.
- 2 Atala A. Tissue engineering of human bladder [J]. *Br Med Bull*, 2011, 97: 81-104.
- 3 Atala A, Bauer SB, Soker S, et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty [J]. *Lancet*, 2006, 367 (9518): 1241-1246.
- 4 Catoira MC, Fusaro L, di Francesco D, et al. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2019, 30 (10): 115.
- 5 Sorushanova A, Delgado LM, Wu ZN, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development [J]. *Adv Mater*, 2019, 31 (1): e1801651.
- 6 Engelhardt EM, Micol LA, Houis S, et al. A collagen-poly (lactic acid-co-ε-caprolactone) hybrid scaffold for bladder tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (16): 3969-3976.
- 7 Vardar E, Larsson HM, Engelhardt EM, et al. IGF-1-containing multi-layered collagen-fibrin hybrid scaffolds for bladder tissue engineering [J]. *Acta Biomater*, 2016, 41: 75-85.
- 8 Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2015, 73: 254-271.
- 9 Xiao DD, Yan H, Wang Q, et al. Trilayer three-dimensional hydrogel composite scaffold containing encapsulated adipose-derived stem cells promotes bladder reconstruction via SDF-1α/CXCR4 pathway [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9 (44): 38230-38241.
- 10 Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties [J]. *Subcell Biochem*, 2017, 82: 405-456.
- 11 Sacchi V, Mittermayr R, Hartinger J, et al. Long-lasting fibrin matrices ensure stable and functional angiogenesis by highly tunable, sustained delivery of recombinant VEGF₁₆₄ [J]. *PNAS*, 2014, 111 (19): 6952-6957.
- 12 Jaimes-Parra BD, Valle-Díaz de la Guardia F, Arrabal-Polo MÁ, et al. Ex vivo construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: a preliminary study [J]. *Int J Urol*, 2016, 23 (1): 85-92.
- 13 Kim JS, Kim TH, Kang DL, et al. Chondrogenic differentiation of human ASCs by stiffness control in 3D fibrin hydrogel [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522 (1): 213-219.
- 14 Wang HY, Zhang YQ. Processing silk hydrogel and its applications in biomedical materials [J]. *Biotechnol Prog*, 2015, 31 (3): 630-640.
- 15 Floren M, Bonani W, Dharmarajan A, et al. Human mesenchymal stem cells cultured on silk hydrogels with variable stiffness and growth factor differentiate into mature smooth muscle cell phenotype [J]. *Acta Biomater*, 2016, 31: 156-166.
- 16 Buitrago JO, Patel KD, El-Fiqi A, et al. Silk fibroin/collagen protein hybrid cell-encapsulating hydrogels with tunable gelation and improved physical and biological properties [J]. *Acta Biomater*, 2018, 69: 218-233.
- 17 Mauney JR, Cannon GM, Lovett ML, et al. Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (3): 808-818.
- 18 Highley CB, Prestwich GD, Burdick JA. Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 40: 35-40.
- 19 Gwon K, Kim E, Tae G. Heparin-hyaluronic acid hydrogel in support of cellular activities of 3D encapsulated adipose derived stem cells [J]. *Acta Biomater*, 2017, 49: 284-295.
- 20 Sivaraman S, Ostendorff R, Fleishman B, et al. Tetronic (®)-based composite hydrogel scaffolds seeded with rat bladder smooth muscle cells for urinary bladder tissue engineering applications [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2015, 26 (3): 196-210.
- 21 Naba A, Clauser KR, Ding HM, et al. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era [J]. *Matrix Biol*, 2016, 49: 10-24.
- 22 Fernández-Pérez J, Ahearne M. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 14933.
- 23 Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, et al. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function [J]. *Acta Biomater*, 2017, 49: 1-15.
- 24 Jiang D, Huang JW, Shao HL, et al. Characterization of bladder acellular matrix hydrogel with inherent bioactive factors [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 77: 184-189.
- 25 Cui H, Nowicki M, Fisher JP, et al. 3D Bioprinting for Organ Regeneration [J/OL]. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601118>.
- 26 Marques CF, Diogo GS, Pina S, et al. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2019, 30 (3): 32.
- 27 Wang XH, Ao Q, Tian XH, et al. Gelatin-based hydrogels for organ 3D bioprinting [J]. *Polymers (Basel)*, 2017, 9 (9): E401.
- 28 Chawla S, Midha S, Sharma A, et al. Silk-based bioinks for 3D bioprinting [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7 (8): e1701204.
- 29 Dzobo K, Motaung KSCM, Adesida A. Recent trends in decellularized extracellular matrix bioinks for 3D printing: an updated review [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (18): E4628.
- 30 Kim BS, Kwon YW, Kong JS, et al. 3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: a step towards advanced skin tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2018, 168: 38-53.
- 31 Vega SL, Kwon MY, Burdick JA. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering [J]. *Eur Cell Mater*, 2017, 33: 59-75.
- 32 Jang J, Park HJ, Kim SW, et al. 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair [J]. *Biomaterials*, 2017, 112: 264-274.
- 33 Zhang KL, Fu Q, Yoo J, et al. 3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: an in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment [J]. *Acta Biomater*, 2017, 50: 154-164.