

碳纳米管复合骨组织工程细胞支架的研究进展

温海林, 吕胡玲综述 万乾炳审校

(四川大学华西口腔医院修复科 四川 成都 610041)

[摘要] 近年来碳纳米管(CNTs)在组织工程细胞支架方面的研究进展较快。CNTs 对多数种子细胞的体外培养表现出较高的附着率与增殖率, 另外它和其他支架材料复合可明显增强机械强度, 可在骨、神经、血管组织工程方面得到应用。本文着重就 CNTs 在骨组织工程细胞支架的研究现状及应用前景作一综述。

[关键词] 碳纳米管; 骨组织工程; 细胞支架材料

[中图分类号] Q 245 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.04.024

Progress of carbon nanotubes in the cell scaffold of bone tissue engineering WEN Hai-lin, LÜ Hu-ling, WAN Qian-bing. (Dept. of Prosthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Recent researches about the application of carbon nanotubes(CNTs) in tissue engineering cell scaffold have developed rapidly. Cell culture suggest that CNTs displayed high rate of cell attachment and growth *in vitro* culture of most kinds of cells. Higher mechanical strength is also observed after CNTs is combined with other materials. So CNTs can be used for cell scaffold material of tissue engineering, and can be applied to several fields such as tissue engineering of bone, nerve and blood vessel. The related researches and the prospect of the application of CNTs in cell scaffold of bone tissue engineering are mainly reviewed in this paper.

[Key words] carbon nanotubes; bone tissue engineering; cell scaffold

骨肿瘤、骨外伤及炎症等原因所致骨缺损的修复是外科数世纪面临的难题, 其治疗方法通常有骨移植、骨延长和骨外固定等, 其中骨移植是最常用的治疗方法。骨移植材料根据来源大致可分为自体骨、同种异体骨、异种骨和人工骨。自体骨移植来源极有限, 且会增加患者的痛苦; 异体骨移植除存在排异反应外还有交叉感染的可能。利用骨组织工程培养的人工骨可根据临床实际情况塑形, 并且进行工业化生产, 是一种极富前景的骨修复与重建材料。骨组织工程有 4 个重要因素, 分别是足够的种子细胞、合适的支架材料、刺激骨分化形成的调控因子、充足的血液供应^[1]等。理想的支架材料应具备以下性质: 1) 良好的生物相容性; 2) 良好的骨传导性和骨诱导性; 3) 生物降解速度与骨生成的速度相匹配; 4) 孔隙率和孔径大小适宜; 5) 具有可塑性和一定机械强度; 6) 易于获取、消毒、储存和运输。

1 碳纳米管的结构及性质

1991 年日本的饭岛教授最先发现了碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs), 这为理论中理想的一维纳米系统提供了一个典型的实例。随后, 各国科学家围绕 CNTs 展开了各方面研究。

CNTs 是由碳原子形成的平面六边形石墨单层为基础卷曲而成的空心小管。CNTs 可分为多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)和单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)。虽然 CNTs 的直径在纳米量级, 但它的长度一般在微米量级, 具有极大的长径比。CNTs 可被看成是片状石墨卷成的圆筒, 具有石墨的性质, 如耐热、耐腐蚀、优良的传热及导电性。

由于其本身的特殊结构, CNTs 在力学、生物医学等很多方面均表现出色。在力学方面, 其杨氏模量平均为 1.8 TPa^[2], 比一般的碳纤维高一个数量级。CNTs 是世界上杨氏模量最高的已知材料之一。而且它的弯曲强度为 14.2 GPa^[3]。CNTs 具有极好的韧性, 在垂直其轴向施加压力时, 外加

[收稿日期] 2009-11-12; [修回日期] 2010-05-05

[基金项目] 四川省科技支撑计划基金资助项目(2008SZ0032)

[作者简介] 温海林(1986—), 男, 四川人, 学士

[通讯作者] 万乾炳, Tel: 13882193351

压力超过强度极限或弯曲强度时, CNTs 不会断裂而是发生超过 110° 大角度弯曲, 当外力释放后 CNTs 又恢复原状^[4]。在生物医学方面, CNTs 的研究及应用主要集中在组织工程细胞支架、生物传感器、肿瘤的诊断与治疗等。在组织工程方面尤以骨组织工程方面进展最为迅速, 研究资料最为丰富。在骨组织工程方面, CNTs 不能进行生物降解, 它们就像一个惰性框架, 细胞可以在其表面生长繁殖并沉淀新的活性物质, 再转变成正常的功能性的骨组织。

2 含有 CNTs 的骨组织工程细胞支架的研究进展

CNTs 应用于组织工程主要充当惰性框架的角色。下面的内容分为 CNTs 支架、CNTs 和天然可降解高分子的复合支架、CNTs 和人工合成的可降解高分子的复合支架、CNTs 和无机物的复合支架等几部分。

2.1 CNTs 支架

2006 年 Zanello 等^[5]率先用 CNTs 作为支架培养成骨细胞, 发现成骨细胞在 MWCNTs 和 SWCNTs 上均有很高的细胞生长率, 同时又有板状晶状物生成; 另外在 MWCNTs 上的成骨细胞表面形态发生改变, 其细胞膜功能也有所改变。这一研究结果扩大了骨组织工程支架材料的范围, 也为 CNTs 开辟了新的用途。后来 Firkowska 等^[6]采用平板印刷和逐层自组装的技术制造出具有高度重现性和可控塑形的 CNTs 单分子膜, 并用这些连续的单分子膜又组装成细胞支架。Giannona 等^[7]将 CAL-72 类成骨样细胞培养在周期性垂直排列的 CNTs 上, 发现细胞附着强度和扩展速度都明显提升, 同时 CNTs 的周期性垂直排列影响了细胞的生长、形态和排列取向。这给研究者提供了向往的前景: 可以进一步探索人造纳米物体影响细胞生长的机制, 更重要的是通过控制纳米物体的组成和物理性质引导种子细胞的生长。这使 CNTs 作为组织工程细胞支架向前迈进一大步。Usui 等^[8]使 CNTs 紧邻骨组织以探究其对骨的反应, 发现其几乎不引起局部炎症反应, 并可协助骨产生, 最后和骨整合成一新骨, 另外还可以加快人重组骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)刺激骨成熟的作用。该发现证明了 CNTs 生物材料用于关节置换和骨固定螺钉和固定板的可能。Narita 等^[9]发现 MWCNTs 可抑制破骨细胞的分化, 并可通过抑制一种

必要的转录因子来抑制破骨细胞的产生。该实验说明当 MWCNTs 用于骨生物材料时可协助骨的产生。而 Tutak 等^[10]通过在 SWCNTs 上培养的成骨细胞发现 CNTs 促进骨有丝分裂和组织发生的机制, 即 CNTs 先通过类似胞吞作用的途径进入成骨细胞, 引起急性毒性作用, 介导部分细胞崩解, 然后崩解的细胞释放出特定内源性因子, 刺激产生细胞外基质来加速剩余细胞的生命活动。

CNTs 作为单一组成支架材料的优点为: 生物力学性质佳, 具有较好的细胞附着率与增殖率。其缺点为: 完全不能降解, 意味着新骨形成的空间极有限。虽然 Firkowska 等^[6]花费很大功夫已制得可控塑形的 CNTs 单分子膜支架, 但是总体来说其可塑性难度较大, 特别是针对较大的和不规则的骨缺损。CNTs 和其他支架材料的复合有望解决本身的缺陷。

2.2 CNTs 和天然可降解高分子的复合支架

2006 年 Kawaguchi 等^[11]将 CNTs 和藻酸盐水凝胶复合, 发现复合支架胶凝速度和机械强度都优于普通藻酸盐凝胶, 另外复合支架只引起温和的炎症反应, 并未发现有细胞毒性反应。Yildirim 等^[12]利用生物高聚物多喷嘴沉积系统制得分散的三维 CNTs-藻酸盐复合支架, 然后用拉曼光谱和显微硬度测试证明 CNTs 确实显著增强了复合支架的机械强度。培养的鼠心脏内皮细胞显示复合支架明显提高了细胞的附着率和增殖率。CNTs-藻酸盐凝胶复合支架有望用于组织工程。其优点为: 无毒、可塑形、三维立体多孔结构, 还可以同时充当生物因子的缓释系统, 并且藻酸盐来源丰富, 价格低廉。其缺点为: 降解速度难以控制; 机械强度虽较藻酸盐有明显提高, 但与临床要求尚有距离; 移入体内前的种子细胞体外培养阶段时间若过长, 胶体容易破裂, 而且难以长时间培养观察。

Abarrategi 等^[13]将 MWCNTs 和少量多孔且具有微通道的壳聚糖(chitosan, CHI)复合, 并培养 C2C12 鼠成肌细胞, 发现细胞的附着率、活性、增殖率都表现优异, 另外在 rhBMP-2 作用下 C2C12 细胞系向成骨细胞分化。该含 rhBMP-2 的 MWCNTs-CHI 复合支架可用于肌肉和骨组织工程。CNTs-CHI 复合支架的优点为: 良好的生物相容性和缓释性, 抑制炎症的作用。其缺点为: 生物力学性能尚不能满足临床需求, 难以应用于承重部位的骨缺损; 在含水的情况下难以塑形;

CHI 易被胶原酶降解, 降解速度仍难以控制。

2.3 CNTs 和人工合成的可降解高分子的复合支架

McCullen 等^[14]用质量分数为 1% 的 MWCNTs 和聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 制成直径达 700 nm 的静电纺丝, 脂肪间充质干细胞在该复合支架上能保持活性并生长, 沿纺丝纵向排列并堆积成三维结构。Koh 等^[15]将乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 和 CNTs 制得 PLGA-CNTs 复合物, 该复合物展现出良好的抗血小板黏附和活化的特性, 使该生物材料应用过程中不用担心血栓的形成。Armentano 等^[16]发现加入功能化后的 SWNTs 的 PLGA 在降解过程中可以自催化, 其中该复合物的组成和 SWNTs 的功能化起了关键性作用。Edwards 等^[17]制得由 9 层 MWCNTs 组成的丝状物和 PLGA 构成的复合支架, 发现 NR6 鼠成纤维细胞在上面生长、附着、增殖良好, 但是在复合支架不同大小的孔内的聚集表现不同。细胞在较大的孔中形成细胞团, 而在较小的孔中细胞分散均匀。

Verdejo 等^[18]将经化学修饰过的 CNTs 均匀分散在聚氨酯 (polyurethanes, PU) 泡沫中, 在它上面培养的成骨细胞没有显示出细胞毒性, 复合物也没有影响成骨细胞的分化和矿化, 从毒理学角度看, 固定在不可降解的物质中的 CNTs 比松散的 CNTs 毒性低。Meng 等^[19]将 MWCNTs-PU 制成直径为 300~500 nm 的纤维, 研究发现成纤维细胞在其上面的附着率、活性、增殖率以及迁移和聚集都表现极好, 而且细胞在其上面比在其他种类的支架上都产生更多的包括胶原在内的蛋白质。这 2 个实验说明 CNTs-PU 复合支架有望用于骨组织工程。Zawadzak 等^[20]以电泳法在 PU 泡沫外包覆了均匀的 CNTs 涂层, 然后将其置于浓缩模拟体液中, 发现包括羟磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 在内的磷酸钙复合物在其表面析出。Han 等^[21]将 MWCNTs-PU 制作成直径为 300~500 nm 的静电纺丝。实验发现内皮细胞可沿纳米纤维轴向迁移和聚集, 同时支架无血栓形成表现。

此类复合支架的优点为: 具有优良的可降解性和可塑性, 而且细胞可沿支架的丝状结构定向生长与堆积。其缺点为: 亲水性尚需进一步改善, 机械强度尚不是特别理想, 材料表面不能与细胞产生生物性作用。

Wang 等^[22]将碳烷 (polycarbosilane, PCS) 和

MWCNTs 复合后种植于鼠的皮下和股骨中, 发现该复合物极少引起皮下炎症反应, 并可引导新骨形成。该复合物既可用于骨替代物和牙的种植体, 也可用于组织工程。Shi 等^[23]将 0.1% SWCNTs 和聚丙烯富马酸复合, 得到机械强度比聚丙烯富马酸强得多的复合物, 弹性模量和压缩模量增加 3 倍, 弯曲强度和屈服强度增加 2 倍。而且该复合物是可注射的, 有望被用于骨组织工程。CNTs 与 PCS、聚丙烯富马酸的复合还有待于进一步研究。

2.4 CNTs 和无机物的复合支架

CNTs 复合的无机物现在主要集中在 HA。Balani 等^[24]把 MWCNTs 均匀包覆在 HA 上, 包覆后的 HA 断裂韧度提升了 56%, 而结晶度提升了 27%。在 CNTs 表面作用协助下, 人成骨细胞在该复合支架上生长和繁殖良好。Tan 等^[25]先用十二烷基磺酸钠 (sodium dodecylsulphate, SDS) 使 MWCNTs 功能化, 然后将其浸泡在钙磷溶液中, 发现有纳米 HA 生成, 同时 MWCNTs 依然呈分散状态。

CNTs-HA 复合材料的优点为: CNTs 的加入改善了 HA 脆性大、抗折强度低的不足, 复合材料具有很好的骨传导性。其缺点为: 降解速度慢, 机械性质尚需进一步改善, 缺乏骨诱导性, 不适合长段骨缺损的修复。

3 CNTs 在骨组织工程中的血管化的研究进展

血管化和骨再生是骨愈合过程中的 2 个最基本环节。Meng 等^[26]研究了白蛋白、纤维蛋白原和新鲜人血浆在 SWCNTs 上的表现, 发现 SWCNTs 吸附的纤维蛋白原远多于白蛋白, 且未发现血细胞吸附在 SWCNTs 上, 由此可预测 CNTs 可用于人造血管等生物材料, 也可用于组织工程骨的血管化。

4 存在的问题和展望

CNTs 在应用中主要遇到 2 个方面的问题, 即分散性和生物安全性。CNTs 作为一种极富前景的组织工程支架材料, 展现出较好的细胞增殖率、附着率、骨传导性和骨诱导性。CNTs 作为一种新兴的骨组织工程支架值得深入研究, 特别是在降解速度和慢性毒性方面。

5 参考文献

[1] Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, et al. Cell-based bone

- tissue engineering[J]. PLoS Med, 2007, 4(2) :e9.
- [2] Treacy MM, Ebbesen W, Gibson JM, et al. Exceptionally high young modulus observed for individual carbon nanotubes[J]. Nature, 1996, 381 :678-680.
- [3] Wong WE, Sheehan PE, Lieber CM. Nanobeam mechanics :Elasticity, strength, and toughness of nanorods and nanotubes[J]. Science, 1997, 277(26) :1971-1975.
- [4] Iijima S, Brabec C, Maiti A, et al. Structural flexibility of carbon nanotubes[J]. Chem Ps, 1996, 104(5) :2089-2092.
- [5] Zanello LP, Zhao B, Hu H, et al. Bone cell proliferation on carbon nanotubes[J]. Nano Lett, 2006, 6(3) :562-567.
- [6] Firkowska I, Olek M, Pazos-Peréz N, et al. Highly ordered MWNT-based matrixes :Topography at the nanoscale conceived for tissue engineering[J]. Langmuir, 2006, 22(12) :5427-5434.
- [7] Giannona S, Firkowska I, Rojas-Chapana J, et al. Vertically aligned carbon nanotubes as cytocompatible material for enhanced adhesion and proliferation of osteoblast-like cells[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2007, 7(4/5) :1679-1683.
- [8] Usui Y, Aoki K, Narita N, et al. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects[J]. Small, 2008, 4(2) :240-246.
- [9] Narita N, Kobayashi Y, Nakamura H, et al. Multiwalled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function[J]. Nano Lett, 2009, 9(4) :1406-1413.
- [10] Tutak W, Park KH, Vasilov A, et al. Toxicity induced enhanced extracellular matrix production in osteoblastic cells cultured on single-walled carbon nanotube networks [J]. Nanotechnology, 2009, 20(25) :255101.
- [11] Kawaguchi M, Fukushima T, Hayakawa T, et al. Preparation of carbon nanotube-alginate nanocomposite gel for tissue engineering[J]. Dent Mater J, 2006, 25(4) :719-725.
- [12] Yildirim ED, Yin X, Nair K, et al. Fabrication, characterization, and biocompatibility of single-walled carbon nanotube-reinforced alginate composite scaffolds manufactured using freeform fabrication technique[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008, 87(2) :406-414.
- [13] Abarrategi A, Gutiérrez MC, Moreno-Vicente C, et al. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes[J]. Biomaterials, 2008, 29(1) :94-102.
- [14] McCullen SD, Stevens DR, Roberts WA, et al. Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells[J]. Int J Nanomedicine, 2007, 2(2) :253-263.
- [15] Koh LB, Rodriguez I, Zhou J. Platelet adhesion studies on nanostructured poly(lactic-co-glycolic-acid)-carbon nanotube composite[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 86(2) :394-401.
- [16] Armentano I, Dottori M, Puglia D, et al. Effects of carbon nanotubes(CNTs) on the processing and *in-vitro* degradation of poly(DL-lactide-co-glycolide)/CNT films [J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(6) :2377-2387.
- [17] Edwards SL, Church JS, Werkmeister JA, et al. Tubular micro-scale multiwalled carbon nanotube-based scaffolds for tissue engineering[J]. Biomaterials, 2009, 30(9) :1725-1731.
- [18] Verdejo R, Jell G, Safinia L, et al. Reactive polyurethane carbon nanotube foams and their interactions with osteoblasts[J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 88(1) :65-73.
- [19] Meng J, Kong H, Han Z, et al. Enhancement of nanofibrous scaffold of multiwalled carbon nanotubes/polyurethane composite to the fibroblasts growth and biosynthesis [J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 88(1) :105-116.
- [20] Zawadzak E, Bil M, Ryszkowska J, et al. Polyurethane foams electrophoretically coated with carbon nanotubes for tissue engineering scaffolds[J]. Biomed Mater, 2009, 4(1) :015008.
- [21] Han Z, Kong H, Meng J, et al. Electrospun aligned nanofibrous scaffold of carbon nanotubes-polyurethane composite for endothelial cells[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2009, 9(2) :1400-1402.
- [22] Wang W, Watari F, Omori M, et al. Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007, 82(1) :223-230.
- [23] Shi X, Sitharaman B, Pham QP, et al. Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2007, 28(28) :4078-4090.
- [24] Balani K, Anderson R, Laha T, et al. Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts *in vitro*[J]. Biomaterials, 2007, 28(4) :618-624.
- [25] Tan QG, Zhang K, Gu SY, et al. Mineralization of surfactant functionalized multi-walled carbon nanotubes(MWNTs) to prepare hydroxyapatite/MWNTs nanohybrid [J]. Applied Surface Science, 2009, 255(15) :7036-7039.
- [26] Meng J, Song L, Xu H, et al. Effects of single-walled carbon nanotubes on the functions of plasma proteins and potentials in vascular prostheses[J]. Nanomedicine, 2005, 1(2) :136-142.