

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.031

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.031

# 碳纳米管及其衍生物在组织工程领域的应用

张莹 综述 温朝辉 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科, 哈尔滨 150001)

**[摘要]** 碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)作为一种新型纳米级碳材料, 具有独特的机械性能、优异的电学、磁学和热学性能以及良好的生物相容性, 在生物医学领域备受关注。与其他物质结合时, CNTs能赋予其强度和其他有利特性, 因此在组织工程领域展现出良好的应用前景。

**[关键词]** 碳纳米管; 生物相容性; 组织工程

## Application of carbon nanotubes and its derivatives in tissue engineering

ZHANG Ying, WEN Zhaohui

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

**Abstract** Carbon nanotubes (CNTs) are a new type of nanoscale carbon material with excellent mechanical, electrical, magnetic and thermal properties and good biocompatibility, and have attracted much attention in the field of biomedicine. When combining with other substances, CNTs can improve their strength and provide other beneficial properties. This shows a good prospect in the field of tissue engineering.

**Keywords** carbon nanotubes; biocompatibility; tissue engineering

碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)是由石墨烯片材轧制成的无缝圆柱体, 单个石墨烯片产生单壁碳纳米管(single-wall carbon nanotubes, SWCNTs), 而多个石墨烯片组成多壁碳纳米管(multi-wall carbon nanotubes, MWCNTs)<sup>[1]</sup>。CNTs具有优异的机械性能, 如刚性、高柔韧性、高杨氏模量<sup>[2-3]</sup>、低密度、高表面积和高机械完整性; 且具有优异的电学、磁学和热学性能, 与其他材料组合可改善其基材性能。由于CNTs生物相容性高, 并具有高强度重量比、高拉伸强度、高化学

反应性, 可诱导缓慢而显著的生物降解, 这促进了CNTs作为生物材料在许多领域应用的研究, 尤其是在组织工程领域有着良好的应用前景。本文对CNTs及其衍生物的生物相容性及在骨组织工程、神经组织工程及心肌组织工程领域应用的研究进展作一综述。

### 1 CNTs的生物相容性

作为应用于活体的生物材料, 良好的生物相

收稿日期 (Date of reception): 2017-11-29

通信作者 (Corresponding author): 温朝辉, Email: wenzhaohui1968@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (51272058)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (51272058).

容性是首要条件。Benko等<sup>[4]</sup>研究钛涂层CNTs对小鼠成纤维细胞L929的生物相容性,证明其生物相容性良好。Kroustalli等<sup>[5]</sup>研究了MWCNT增强壳聚糖(chitosan, CS; MWCNT/CS)与内皮细胞和血管肌成纤维细胞接触生物学特性,结果表明:MWCNT/CS支持内皮细胞和肌成纤维细胞增殖,不引起细胞凋亡,不具有细胞毒性。Zhang等<sup>[6]</sup>将MWCNTs用羧酸基团(-COOH)、聚乙烯醇聚合物和仿生磷灰石在其表面上进行化学修饰,在表面修饰的MWCNTs的存在下培养人成骨细胞(MG-63细胞),结果表明成骨细胞活力显著提高,最高可达67.23%。在增殖阶段,仿生磷灰石改性MWCNT样品中的细胞比MWCNTs-COOH中明显增多。在化学修饰的MWCNTs存在下培养的成骨细胞的细胞形态没有明显变化,因此在MWCNTs表面修饰磷灰石可有效提高其生物相容性。

## 2 CNTs 材料在骨组织工程的应用

CNTs在各种领域中表现出优异的性能,其尺寸模拟成骨细胞细胞外基质中的三螺旋胶原纤维的结构,赋予其引导骨组织再生的能力<sup>[7]</sup>,使其成为组织工程学的理想选择。

Xu等<sup>[8]</sup>测定了MWCNTs阵列对成骨分化培养基培养的人骨髓间充质干细胞矿化的影响,结果表明:在MWCNTs阵列上培养的人骨髓间充质干细胞播散良好,形成了众多的螺旋状细胞,并显示核周形态,表明MWCNTs阵列能促进骨髓间充质干细胞的成骨。Li等<sup>[9]</sup>评估了MWCNTs和石墨(graphene, GP)体外培养人脂肪干细胞的附着、增殖、成骨相关基因表达及其对体内异位骨形成的作用,结果显示:MWNTs能集中更多的蛋白质包括骨诱导蛋白质,这些蛋白质不仅可以改善细胞附着和增殖,还可将来源于软组织的可诱导细胞分化为成形的成骨细胞感应骨。Barrientos-Durán等<sup>[10]</sup>制作了羧基修饰的SWCNTs并研究其对人类胎儿成骨细胞(human fetal osteoblastic cell, hFOB)和鼠胚胎干细胞(murine embryonic stem cells, mESCs)的影响,体外研究表明:除细胞外基质矿化外,还表现为经典骨标记基因的表达增加和骨钙蛋白分泌增加。体内研究表明:将脱钙骨基质或软骨颗粒与SWCNTs复合形成同种异体骨移植于裸大鼠体内,并对异位骨形成进行分析,发现CNTs浸泡的种植体具有高渗透性和空隙连通性,在形成的组织中出现了大量的血管通道,招募了额外的成骨细胞,并在植入4周后发现了新的骨化区,表明

SWCNTs在体外和体内均具有高的骨诱导能力。

Gupta等<sup>[11]</sup>制备了聚乳酸-乙醇酸(polyactic-co-glycolic acid, PLGA)和SWCNT微球复合材料,接种小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3-E1细胞)并进行研究,结果表明:加入SWCNT产生可更大的压缩模量和极限抗压强度,与PLGA相比,SWCNT/PLGA复合材料具有更高的细胞增殖率和基因表达。Mikael等<sup>[12]</sup>将乙交酯(poly lactide-co-glycolide, PLGA)和MWCNTs结合制作三维多孔支架,研究显示:与纯PLGA支架(19, 166.38 MPa)相比,仅添加3%的MWCNTs,抗压强度和模量显著提高(35, 510.99 MPa);同时体外研究显示:细胞活力、增殖和矿化良好。Gutiérrez-Hernández等<sup>[13]</sup>将功能化的MWCNTs与天然的细菌纤维素(bacterial cellulose, BC; 由木葡糖酸醋杆菌分泌)混合,结果表明:与传统培养基相比,BC-MWNTs支架能更高程度地增强成骨细胞活力、黏附和增殖。Cheng等<sup>[14]</sup>研究表明与PLGA支架相比,CNT/PLGA复合支架具有更高的机械强度,MC3T3-E1成骨细胞的附着和增殖增加;与对照PLGA组相比,体外成骨研究显示:在CNT/PLGA支架上细胞分化的速率显著提高。提示CNT/PLGA支架具有机械强度和成骨性的组合效应,在骨组织工程中潜力巨大。

## 3 CNTs 复合材料在神经组织工程的应用

神经组织工程的目标是促进神经再生及修复,而CNTs因其具有良好的生物相容性及高电导率等特性,在神经组织工程领域得到广泛研究和应用。Lv等<sup>[15]</sup>利用静电纺丝技术制备了聚(乳酸-乙醇酸)/MWCNTs (PLGA/MWCNTs)支架,通过扫描电镜分析和免疫染色,得知PLGA/MWCNTs电纺纳米纤维支架可支持神经元尤其是星形胶质细胞的生长,并随MWCNTs浓度提高,神经细胞的存活率也相应提高,有望应用于治疗导致中枢神经系统脱髓鞘和轴突损伤的多发硬化症。

嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OEC)是外周和中枢神经系统的重要组成部分,具有施万细胞和少突胶质细胞的双重性质,被认为是治疗神经损伤最有希望的细胞候选者之一。OEC可直接参与轴突延伸和髓鞘形成,并分泌大量神经营养因子用于神经分化和成熟。Kabiri等<sup>[16]</sup>使用静电纺丝技术制造了掺入聚乳酸(poly L-lactic acid, PLLA)的SWCNTs纳米纤维复合支架,研究表明:用SWCNT掺杂PLLA聚合物可增加纳米尺

寸基板的电导率,使其有利于神经组织工程;SWCNT/PLLA复合支架还可促进OEC的黏附、生长、存活和增殖,提示将OEC的神经营养作用加入到SWCNT/PLLA支架的电学和微图案中,可促进轴突生长和神经胶质的移植。Kabiri等<sup>[17]</sup>进一步使用显微手术技术,将复合支架作为神经导管插入大鼠坐骨神经缺损中的8 mm间隙中,术后每2周应用坐骨神经功能指数(sciatic functional index, SFI)评估功能恢复情况。根据SFI评分和组织学评估推断,细胞/支架组的神经再生与自体移植组十分相似,结果表明:由SWCNT/PLLA纳米纤维支架和OEC制成的组织工程复合物可促进轴突生长和周围神经再生,表明其是神经组织工程中有希望的替代物。

Posypanova等<sup>[18]</sup>用电子显微镜和光学显微镜对CNTs薄膜包裹的石英玻璃上培养的神经元(PC12细胞)进行分析,结果显示:CNT能刺激PC12细胞的增殖并不抑制神经元分化。Fabbro等<sup>[19]</sup>研究结果表明将脊髓神经元镀在导电CNTs上可促进其发展。其微阵列实验表明CNTs平台在没有反应性胶质细胞增生的情况下可触发小胶质细胞的修复活动,说明MWCNTs支架可能能够改善恢复并促进分离的新生神经元的兴奋性;另一方面,MWCNTs可能模仿老化的环境,引发小胶质细胞修复过程,加速神经元的成熟。因此,将来或可利用导电纳米管结合的组织支架来促进神经再生工程中的细胞分化和修复途径。

Wu等<sup>[20]</sup>通过将修饰后的CNTs与甲壳素(Chitin)溶液在11% (wt) NaOH/4% (wt) 尿素水溶液中共混,开发出生物相容性甲壳素/碳纳米管(Ch/CNT)复合水凝胶,并在乙醇中进行再生,结果表明:Ch/CNT复合水凝胶的拉伸强度和断裂伸长率明显提高,溶胀率下降;Ch/CNT水凝胶还具有良好的血液相容性、体外生物降解性和生物相容性,对神经元(PC12细胞)和施万细胞(RSC96细胞)没有细胞毒性和神经毒性;此外,Ch/CNT复合水凝胶可明显增强神经元细胞黏附、增殖和神经突起生长,使得神经突的百分比和长度均有明显增加,表明其可作为神经再生中潜在应用的神经元生长底物。

#### 4 CNTs 复合材料在心肌组织工程的应用

CNT可与心肌细胞膜紧密相互作用,这种特性使得通过基于CNT的装置获得的电生理学记录得到强有力的改善。基于CNT(纯的或与生物相容

的聚合物混合)的支架可在生理范围内促进心脏细胞成熟,同时可支持和促进细胞活力和黏附,刺激促增殖程序并促进细胞分化。CNT支架还可对心肌细胞发挥病理性刺激,如病理性肥厚的保护作用。

Zhou等<sup>[21]</sup>将SWCNTs纳入水凝胶支架,在注入大鼠梗死心脏后,影响整体结构与宿主心肌,结果显示:SWCNTs能提供体外细胞微环境,有利于心肌收缩和电化学相关蛋白的表达;功能测试表明:SWCNTs是提高抑制心肌病理恶化影响性能的关键,说明CNTs支架具有促进心肌细胞分裂和成熟的能力,导电纳米材料在心脏组织工程修复心肌梗死中具有治疗潜力。Shin等<sup>[22]</sup>结合显微镜、生物学和电生理学方法和钙成像,以验证与明胶对照组相比,在MWCNTs的基底上培养的新生大鼠心室肌细胞是否获得生理上更成熟的表型,结果表明:CNTs基板刺激末端分化和生理生长的基因表达,其中R-肌球蛋白重链增加2倍,肌质网Ca<sup>2+</sup>ATP酶2 $\alpha$ 上调;相反,病理性肥大的标志物( $\beta$ -肌球蛋白重链、骨骼肌肌动蛋白、心房钠尿肽)保持不变,这些修饰与Connexin-43基因表达、缝隙连接和功能性合胞体的增加相平行。此外,CNTs似乎对苯肾上腺素的病理性刺激产生保护作用。CNTs上的心肌细胞表现出更为成熟的合胞体和细胞内钙信号转导的电生理表型。因此,与心肌细胞相互作用的CNTs具有促进生理生长和功能成熟的能力,这些特性在当前组织工程的领域中是独一无二的,为心脏修复创新疗法的开发中提供了前所未有的前景。

Sun等<sup>[23]</sup>将SWCNTs纳入胶原水凝胶(collagen hydrogels)制造了CNT/Col水凝胶,研究表明:CNTs的加入(高达1%, wt)对心肌细胞没有毒性,且增强了细胞的黏附和伸长;通过免疫组织化学染色、透射电镜和细胞内钙瞬变测量,发现CNTs的加入可显著改善细胞排列和组装,从而形成具有较强收缩能力的工程化心脏组织,基于CNT/Col水凝胶的心脏组织具有更好的功能,可改善细胞排列和心脏结构的性能。Martinelli等<sup>[24]</sup>结合显微镜、生物和单细胞电生理方法,研究证明:培养在MWCNTs基板上的新生大鼠心室肌细胞与CNTs形成紧密接触,且存活力和扩散力增加;同时还观察到心肌细胞电生理特性的变化,表明CNTs能够促进心肌细胞成熟。Liu等<sup>[25]</sup>通过静电纺丝制备了对齐的聚乳酸-乙醇酸共聚物/MWCNTs纤维,其杨氏模量和电导率显著增加,在导电纤维上培养的新生大鼠心肌细胞维持其生存力,诱

导细胞延伸, 并增强心肌细胞中的肌节 $\alpha$ -辅肌动蛋白和肌钙蛋白I的产生, 结果表明: 聚乳酸-乙醇酸/MWCNTs复合纤维在心脏组织工程中具有很大的潜力。提示CNTs及其衍生物对心肌细胞增殖、分化、成熟及心肌电生理均有积极影响, 在心肌组织工程中有广泛的应用前景。

## 5 结语

CNTs由于其优异的机械性能、电生理特性及良好的生物相容性, 在生物工程领域得到广泛研究和应用, 特别是在组织工程领域备受关注。多项研究<sup>[16,20-24]</sup>发现CNTs及其复合材料可促进细胞的黏附、增殖和分化。CNTs作为组织工程材料仍处于研究阶段, 仍有诸多问题亟待解决: 1)CNTs的大小、结构、形状、含量和表面反应性对复合材料的性能有重要影响, 研究不同形态的CNTs与细胞分化之间的关系有助于更好地提升复合材料的生物性能; 2)其生物安全性研究至关重要, 研究其修饰方法有助于获得实用性及安全性兼备的复合材料; 3)目前的研究局限于细胞和体外动物实验, 进一步研究其在体内代谢、降解及分子水平的作用机制可为临床应用奠定基础。因此CNTs作为新兴材料, 在组织工程领域的应用价值极具潜力, 值得进一步深入研究。

## 参考文献

- Kalbacova M, Broz A, Kong J, et al. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells[J]. *Carbon*, 2010, 48(15): 4323-4329.
- Yang Z, McElrath K, Bahr J, et al. Effect of matrix glass transition on reinforcement efficiency of epoxy-matrix composites with single walled carbon nanotubes, multi-walled carbon nanotubes, carbon nanofibers and graphite[J]. *Compos Part B*, 2012, 43(4): 2079-2086.
- Shuai C, Liu T, Gao C, et al. Mechanical reinforcement of diopside bone scaffolds with carbon nanotubes[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 19319-19329.
- Benko A, Frączek-Szczypta A, Menaszek E, et al. On the influence of various physicochemical properties of the CNTs based implantable devices on the fibroblasts' reaction in vitro[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26(11): 262.
- Kroustalli A, Zisimopoulou AE, Koch S, et al. Carbon nanotubes reinforced chitosan films: mechanical properties and cell response of a novel biomaterial for cardiovascular tissue engineering[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24(12): 2889-2896.
- Zhang F, Weidmann A, Nebe JB, et al. Osteoblast cell response to surface-modified carbon nanotubes[J]. *Mater Sci Eng C*, 2012, 32(5): 1057-1061.
- Duan S, Yang X, Mei F, et al. Enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on poly(L-lactide) nanofibrous scaffolds containing carbon nanomaterials[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(4): 1424-1435.
- Xu B, Ju Y, Cui Y, et al. Carbon nanotube array inducing osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 51: 182-188.
- Li X, Liu H, Niu X, et al. The use of carbon nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs in vitro, and ectopic bone formation in vivo[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(19): 4818-4827.
- Barrientos-Durán A, Carpenter EM, Zur Nieden NI, et al. Carboxyl-modified single-wall carbon nanotubes improve bone tissue formation in vitro and repair in an in vivo rat model[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 4277-4291.
- Gupta A, Main BJ, Taylor BL, et al. In vitro evaluation of three-dimensional single-walled carbon nanotube composites for bone tissue engineering[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(11): 4118-4126.
- Mikael PE, Amini AR, Basu J, et al. Functionalized carbon nanotube reinforced scaffolds for bone regenerative engineering: fabrication, in vitro and in vivo evaluation[J]. *Biomed Mater*, 2014, 9(3): 035001.
- Gutiérrez-Hernández JM, Escobar-García DM, Escalante A, et al. In vitro evaluation of osteoblastic cells on bacterial cellulose modified with multi-walled carbon nanotubes as scaffold for bone regeneration[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 75: 445-453.
- Cheng Q, Rutledge K, Jabbarzadeh E. Carbon nanotube-poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering applications[J]. *Ann Biomed Eng*, 2013, 41(5): 904-916.
- Lv ZJ, Liu Y, Miao H, et al. Effects of multiwalled carbon nanotubes on electrospun poly (lactide-co-glycolide)-based nanocomposite scaffolds on neural cells proliferation[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2017, 105(5): 934-943.
- Kabiri M, Oraee-Yazdani S, Dodel M, et al. Cytocompatibility of a conductive nanofibrous carbon nanotube/poly (L-Lactic acid) composite scaffold intended for nerve tissue engineering[J]. *EXCLI J*, 2015, 14: 851-860.
- Kabiri M, Oraee-Yazdani S, Shafiee A, et al. Neuroregenerative effects of olfactory ensheathing cells transplanted in a multi-layered conductive nanofibrous conduit in peripheral nerve repair in rats[J]. *J Biomed Sci*, 2015, 22: 35.
- Posypanova GA, Gaiduchenko AI, Moskaleva EY, et al. Neuronal differentiation of PC12 cell line and murine neural stem cells on the

- carbon nanotubes films[J]. *Tsitologia*, 2016, 58(2): 91-98.
19. Fabbro A, Sucapane A, Toma FM, et al. Adhesion to carbon nanotube conductive scaffolds forces action-potential appearance in immature rat spinal neurons[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73621.
  20. Wu S, Duan B, Lu A, et al. Biocompatible chitin/carbon nanotubes composite hydrogels as neuronal growth substrates[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 174: 830-840.
  21. Zhou J, Chen J, Sun H, et al. Engineering the heart: Evaluation of conductive nanomaterials for improving implant integration and cardiac function[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 3733.
  22. Shin SR, Jung SM, Zalabany M, et al. Carbon-nanotube-embedded hydrogel sheets for engineering cardiac constructs and bioactuators[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(3): 2369-2380.
  23. Sun H, Jing Z, Zhu H, et al. Carbon nanotube-incorporated collagen hydrogels improve cell alignment and the performance of cardiac constructs[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 3109-3120.
  24. Martinelli V, Cellot G, Toma FM, et al. Carbon nanotubes promote growth and spontaneous electrical activity in cultured cardiac myocytes[J]. *Nano Lett*, 2012, 12(4): 1831-1838.
  25. Liu Y, Liang X, Wang S, et al. Electrospun poly (lactic-co-glycolic acid)/multiwalled carbon nanotube nanofibers for cardiac tissue engineering[J]. *J Biomater Tissue Eng*, 2016, 6(9): 719-728.

本文引用: 张莹, 温朝辉. 碳纳米管及其衍生物在组织工程领域的应用[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(4): 874-878. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.031

**Cite this article as:** ZHANG Ying, WEN Zhaohui. Application of carbon nanotubes and its derivatives in tissue engineering[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(4): 874-878. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.031