

· 基础研究 ·

可注射型及柱型藻酸钙载体联合运用修复兔膝关节软骨缺损的效果观察

何志伟, 赵建宁, 岳鹏举, 何颀, 王金良, 郭亭

(南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院骨科, 江苏 南京 210002)

【摘要】 目的: 使用软骨细胞、可注射藻酸钙及柱型藻酸钙载体, 修复兔股骨髁间非负重区骨软骨缺损, 观察同种材料不同形态联合修复的效果。方法: 将 24 只新西兰大白兔随机分成 4 组, 第 1 组给予注射藻酸钙凝胶修复, 第 2 组放置单纯柱型藻酸钙载体修复, 第 3 组放置柱型藻酸钙载体后于周缘注射凝胶, 第 4 组为空白不用任何支架材料修复。每只动物修复效果以 X_{ij} 表示, 以定量的方法统计出所有动物修复效果, 以评分的形式表示, 作统计学分析。结果: 实验组与对照组一共 4 组数据, 统计每组(i)中每只兔(j)膝关节软骨缺损修复效果评分 X_{ij} , 然后进行组间比较。根据单向方差分析的思想, 用 SPSS 12.0 软件计算 $F=69.0, P<0.05$, 联合修复组效果好于其他各组。结论: 柱型藻酸钙载体具有良好的成型效果且有一定的机械强度, 可注射藻酸钙凝胶具有良好的黏附性, 用于人工材料与正常结构的整合具有明显优势, 两者联合修复软骨缺损, 优势互补, 符合软骨组织工程的修复与整合的要求。

【关键词】 软骨; 膝关节; 支架; 创伤和损伤

Study on the effects of calcium alginate column scaffold combination with calcium alginate gel for repairing articular cartilage defects of rabbit's knee joint HE Zhi-wei, ZHAO Jian-ning, YUE Peng-ju, HE Xie, WANG Jin-liang, GUO Ting. Department of Orthopaedics, the PLA General Hospital of Nanjing, Nanjing 210002, Jiangshu, China

ABSTRACT **Objective:** To repair cartilage defects at non-weight-bearing area of the femoral condyle in rabbits with invitro amplified cartilage cell using calcium alginate column scaffold combined with calcium alginate gel injection, and to study repair effects of combination with different form of the same material. **Methods:** Twenty-four New Zealand rabbits were divided into 4 groups randomly. The wounds of rabbits in the Group 1 were repaired with injection of calcium alginate gel; the wounds of rabbits in the Group 2 were repaired with in planting of calcium alginate column scaffold; the wounds of rabbits in the Group 3 were repaired with in planting of calcium alginate column supporter firstly, and then injection of calcium alginate gel at the surrounding; and Group 4 is control group, the rabbits in the group were repair and without any support. The repair effects were demonstrated with X_{ij} , and the effects of all animals were studied with statistical analysis. **Results:** The X_{ij} scores of each rabbits were calculated, and the scores in four groups were compared. The statistical results showed that combination therapy was better than other methods ($F=69.0, P<0.05$). **Conclusion:** The calcium alginate with column shape has better shaping effects and certain mechanical strength. The calcium alginate gel has better stick nature and can be used to integrate artificial material with normal structure. They can be used together, which meeting the desire of repair and integration in cartilaginous tissue engineering.

Key words Cartilage; Knee joint; Stents; Wounds and injuries

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(12): 899-902 www.zggszz.com

软骨缺乏血运, 仅靠关节滑液提供大部分营养, 因此软骨组织的自身修复能力极其有限, 一旦损伤难以修复, 继发的创伤性关节炎、关节退行性变、关节僵直将会导致严重的功能障碍。以前的实验研究证实可注射藻酸钙凝胶及柱型藻酸钙载体复合体外扩增的软骨细胞均能修复软骨缺损。但是可注射藻酸钙凝胶成型效果不理想, 柱型藻酸钙载体在与自体

正常结构的整合上存在缺陷。因此, 本实验通过对同种材料不同形式的联合运用的效果观察, 寻找运用支架材料的新方式。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验动物 1 月龄新西兰大白兔(南京军区南京总医院动物实验中心提供)。

1.1.2 主要试剂 藻酸钠(青岛明月海藻公司提供), DMEM 培养液(Gibco 公司), 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司), II 型胶原酶(美国 Sigma 公司), 胎牛血清(Hyclone 公司), EDTA(上海

通讯作者: 赵建宁 025-80860016 E-mail: Zhaojianning.0207@163.com

试剂三厂,分析纯),氯化钙粉末(分析纯)。

1.1.3 仪器设备 CO₂ 细胞培养箱(德国贺利氏),倒置相差显微镜(Olympus),YJ-875 型超净工作台(苏州净化设备厂),冻干机(南京大学化学学院)。

1.2 方法

1.2.1 柱型藻酸钠载体的制备 将海藻酸钠溶解于双蒸水中制备 2%(w/v)的海藻酸钠溶液,分别通过直径 1.2、0.45 和 0.2 μm 的尼龙薄膜过滤器滤过,加入 0.4 g/L 的葡萄糖酸钙溶液,共同置于高 25 mm,直径 13 mm 的柱型容器中,放入冻干机中冻干,切成 5 mm 高的薄片备用。

1.2.2 软骨细胞的培养 2 周龄新西兰大白兔(南京军区南京总医院动物实验中心提供),雌雄不限,耳缘静脉空气栓塞处死,无菌切取膝关节股骨髁关节面,去除表面软组织,切取关节面软骨片,以 PBS(内含青霉素及链霉素各 100 U/ml)冲洗 2 遍,切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的软骨碎片,移入离心管中,加约 2 倍体积 0.3% II 型胶原酶,37 °C 孵箱内阶段消化 10 h(每隔 1 h 收集 1 次细胞,放入含 10%血清的 DMEM 培养液中保护),100 目不锈钢细胞筛过滤,800 r/min 离心 8 min,DMEM 洗涤 2 次。按每毫升 1×10⁵ 个细胞的密度接种于培养瓶中,加入含 20%小牛血清 DMEM 培养液(含青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml,维生素 C 50 mg/L),37 °C、5%CO₂ 孵箱中孵育,隔日换液 1 次,在相差显微镜下观察细胞的生长状况。收集第 3 代的软骨细胞用 DMEM 培养液制成细胞悬液,用血球计数板计数,台盼蓝染色检查活力,活力大于 85% 的细胞备用。

1.2.3 动物模型制备方法 将体外扩增培养的软骨细胞经 0.01%胰蛋白酶、0.02%EDTA 消化后细胞计数,加入质量分数为 1.2%的藻酸钠溶液使细胞密度为 1×10⁶ 个,按照体积比 10:1 加入 102 ml/L 氯化钙溶液,震荡混匀,吸入 5 ml 空针备用。将体外扩增培养的软骨细胞经以上蛋白酶消化后计数,使每毫升含细胞 1×10⁵ 个,将切成薄片的柱型藻酸钙支架置于 24 孔培养板中,每孔放入 1 个支架,滴入软骨细胞悬液后,加 DMEM 培养基于 37 °C CO₂ 孵箱中培养 7 d 备用。

1.2.4 分组方法 选用 24 只新西兰大白兔,随机分成 4 组,雌雄不限,每组 6 只,用直径 5 mm 的骨穿针于双后肢膝关节股骨髁间非负重区中央钻孔,深约 1 mm,达软骨全层,形状为圆形。第 1 组给予注射藻酸钙凝胶修复,第 2 组放置单纯柱型

藻酸钙载体修复,第 3 组放置柱型藻酸钙载体后于周缘注射凝胶,第 4 组为空白不用任何支架材料修复,行组间比较。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 大体观测 主要观察每组缺损区修复情况,每组修复区域中心部分支架残留情况,每组修复区与正常组织边界区是否存在裂隙,修复软骨组织的厚度,修复组织的表面光滑度。

1.3.2 组织学检查 将支架复合软骨细胞填充关节缺损区 12 周后处死动物,取股骨髁间非负重区的缺损区及周围 1 mm 组织,将取出组织行 HE 染色,观察不同组别修复缺损的中央处修复软骨组织的形态,包括新生软骨细胞数量、软骨细胞周围基质情况、新生软骨厚度,观察不同组别修复缺损区与正常组织过渡区的修复情况。根据修复组织的性状、染色、表面形态、整合情况、细胞形态、周围软骨有无退变等结构特征,参照 O'Driscoll, Keeley and Salter 组织形态学评分标准^[1],对各组修复效果 X_{ij} 进行定量评分。

1.3.3 免疫组化 观察不同组别修复区域中心部分 II 型胶原表达的量(即染色的深浅程度),修复区域中心部分软骨细胞分布情况,修复区域与正常组织的过渡情况(是否存在裂隙),及支架残留情况。

1.3.4 电镜观察 主要观察柱形藻酸钙载体经低温冻干处理后内部三维空间结构情况,并测量出内部孔径大小,作出综合评价。

1.4 统计学处理 对各修复效果 X_{ij} 进行定量评分,统计结果作组间比较,根据单向方差分析的思想,用 SPSS 12.0 软件计算 F 值,进行统计学分析。

2 结果

2.1 大体观察 -20 °C 条件下冻干处理过的柱型藻酸钙载体疏松多孔,用镊子用力钳夹后破碎,滴入体外扩增的细胞悬液后可见红色细胞液浸透整个支架,支架亲水性好,植入兔膝关节软骨缺损区。12 周后,空白组软骨缺损仍然存在(图 1 所示);注射凝胶组观察可见缺损区较周围正常组织略膨隆,无明显裂隙存在,支架大部分降解(图 2 所示);填充柱型载体组可见白色支架结构仅残留部分,所形成软骨形态保持好,缺损周围与正常组织留有一定裂隙(图 3 所示);联合运用以上两种材料,缺损区软骨修复形态好,表面光滑,周围无裂隙(图 4 所示)。

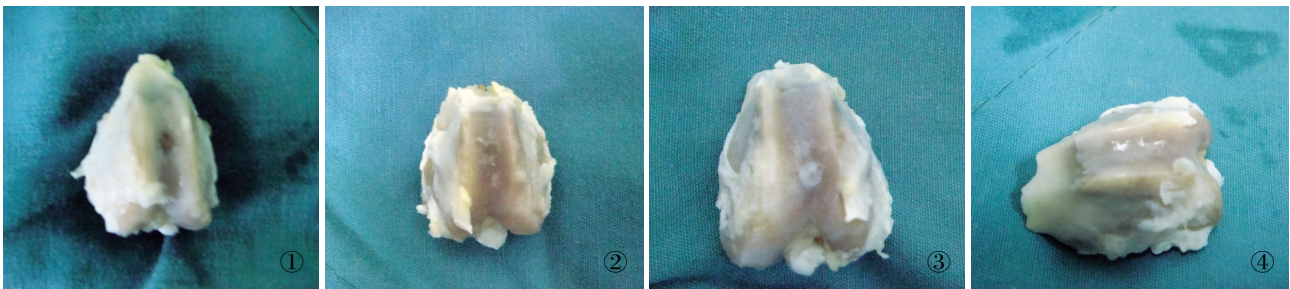


图 1 空白组软骨 图 2 12 周后可注射藻酸钙凝胶修复效果大体观察 图 3 12 周后柱型藻酸钙载体修复效果大体观察 图 4 联合运用 12 周后修复效果大体观察

Fig.1 Cartilage in the control group Fig.2 Repair effect of cartilage in calcium alginate gel injection group at the 12 th month after treatment Fig.3 Repair effect of cartilage in calcium alginate column supporter group at the 12 th month after treatment Fig.4 Repair effect of cartilage in combination therapy group at the 12 th month after treatment

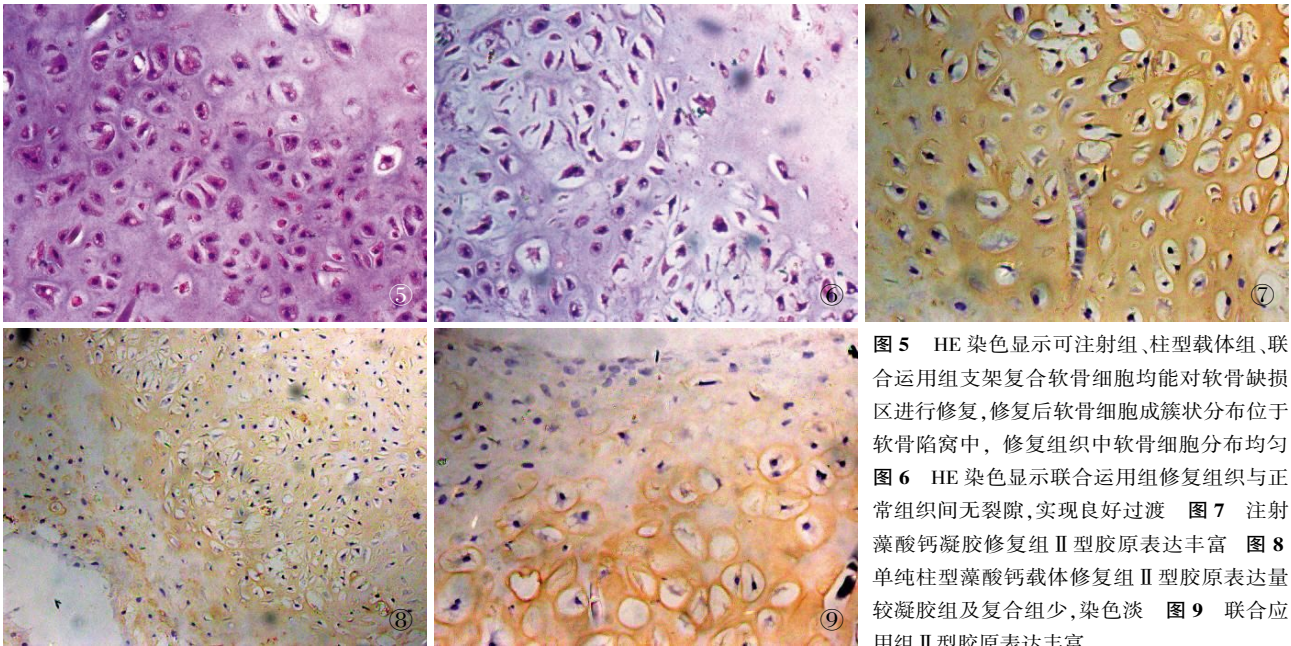


Fig.5 The results of HE staining showed that the cartilage was repaired in the calcinm alginate column group, calcium alginate gel group and combination therapy group, and the cartilage cells distributed in the cartilage lacuna in clustening **Fig.6** The results of HE staining showed that there were no space between repaired tissue and normal tissue in combination therapy group, and the transition was good **Fig.7** The type II collagen expressed abundantly in calcium alginate gel injection group **Fig.8** The expression of type II collagen in calcium alginate column supporter group was lesser than those of calcium alginate gel injection group and combination therapy group, and the stain was light **Fig.9** The expression of type II collagen was abundant in combination therapy group

2.2 组织学检查 本组实验以体内培养 12 周后为观察点, 将兔膝关节股骨髁间非负重区缺损修复处连同周围 1 mm 范围内正常软骨组织取材, 经脱钙处理后, 分别行 HE、亚甲基蓝、Masson 三色染色。12 周后染色结果可见除第 4 组外, 第 1、2、3 组可见材料基本已无残留, 新生软骨与周围正常软骨结构类似, 新生软骨数量较多及软骨周围基质丰富, 软骨细胞成簇状分布(图 5 所示)。HE 染色可见第 1 组新生软骨与周围正常软骨结构类似, 新生软骨与成熟软骨交界区镜下已经模糊, 且整合良好, 未见裂隙和明显的簇集状软骨细胞增生; 第 2 组与第 1 组比较可见软骨细胞于修复组织中分布均匀, 与正常组织交界处有一定的裂隙; 第 3 组修复组织中观察可见软骨细胞与正常组织区域中分布基本一致, 未见裂隙及交接性过渡改变(图 6 所示)。亚甲基蓝染色可见第 1、2、3 组修复的软骨组织软骨细胞周围均有大量细胞基质, 修复组织染色较正常组织染色稍淡。Masson 三色法染色观察第 1、2、3 组细胞周围及细胞内呈亮蓝色, 表明软骨胶原基质的合成与分泌功能旺盛; 第 4 组组织学染色见基本为纤维结缔组织。

2.3 免疫组化 II 型胶原的合成与分泌是软骨细胞维持其分化表型的特定指标, 缺乏 II 型胶原, 软骨细胞即会凋亡。取 12 周组标本行 II 型胶原免疫组化检测, 阳性对照为棕黄色。第 1 组(图 7 所示)、第 2 组(图 8 所示)、第 3 组(图 9 所示)染色以软骨细胞和陷窝周围明显, 成条索状分布, 与周围组织分界明显, 基质染色较周围正常软骨更为明显。

2.4 电镜 衡量支架微观结构的数据有孔的长度(L)、宽度(w)、孔壁的厚度(相邻两孔间的平均距离), 所有这些数据都能在电镜下通过几何学公式测量^[2]。孔洞有效尺寸可以通过

如下关系反应; $d = (1 \times w)^{0.5}$ 。

经测量可知经冻干处理的藻酸钙支架三维孔径在支架顶部为 $(131 \pm 40) \mu\text{m}$, 中间为 $(166 \pm 56) \mu\text{m}$, 底部 $(170 \pm 57) \mu\text{m}$, 满足软骨细胞生长对支架直径的要求, 且结构均一, 能很好地维持软骨细胞的分化表型。

2.5 统计学结果 以定量的方法统计出所有动物修复效果(X_{ij}), 以评分的形式表示, 实验组与对照组一共 4 组数据, 统计每组中每只兔膝关节软骨缺损修复效果评分 X_{ij}, 然后进行组间比较。根据单向方差分析的思想利用 SPSS 12.0 软件计算 $F=69.0, P<0.05$, 所以 3 种方式的修复效果是不完全相同的, 由表 1 可见第 3 组(即联合运用凝胶及柱型藻酸钙载体)修复效果优于其他各组。

表 1 各组修复效果评分结果比较
Tab.1 Comparison of repair scores in four groups

组别	修复效果评分 X _{ij}						n _i	∑ _j X _{ij}	$\bar{x}_i \pm s$	∑ _j X _{ij} ²
1	20	15	11	14	19	12	6	91	15.2±3.7	1 447.0
2	19	11	14	15	17	20	6	96	16.0±3.3	1 592.0
3	21	22	24	21	22	20	6	130	21.7±1.4	2 826.0
4	8	7	10	7	8	9	6	49	8.2±1.2	417.0
合计	68	55	59	57	66	61	24	366	15.3±5.5	6 282.0

注: i 表示处理组号, i=1, 2, 3, 4; j 表示每组中受试动物, j=1, 2, 3, 4, 5, 6
Note: I is indicated treatment group, i=1, 2, 3, 4; j is indicated animal number in each group, j=1, 2, 3, 4, 5, 6

3 讨论

3.1 修复与整合的关系^[1] 影响软骨修复质量的关键因素

为：新生组织与周围组织的表面整合，新生组织能否承受机体的正常力学环境。关节软骨的良好整合包括 2 个方面：一是软骨与软骨下骨的整合；二是指软骨与周边软骨的整合。两者对新生组织的功能均至关重要。本实验发现可注射藻酸钙修复软骨与周围正常软骨两侧均整合良好，未见交界区有明显裂隙，局部胶原纤维过渡良好，退变轻微，软骨细胞簇集状增生较少，修复软骨厚度基本正常，而软骨下骨的修复及整合尤为满意。柱型藻酸钙也能完成软骨缺损修复，但在与正常组织过渡区存在一定裂隙，胶原纤维形成少。可注射藻酸钙凝胶较柱型藻酸钙载体软骨形态保持上具有明显劣势，且机械强度不够。

3.2 可注射藻酸钙凝胶在软骨修复中的作用 水凝胶是一类在水中溶胀并保持大量水分而又不溶解的聚合物，通过向海藻酸钠溶液中加入钙离子可使水凝胶由液态转变为固态并可任意塑形。利用这一特点，以水凝胶负载软骨细胞通过关节镜注入软骨缺损区并在原位凝胶化，且不受软骨缺损形状、大小和深度的限制。与预制成形的多孔支架相比，软骨细胞和基质在水凝胶中分布更为均匀，利用其自身的黏附性能达到与正常组织边界良好的黏附与整合^[3]。以前的实验证明质量分数 1.2% 的低黏度分析纯藻酸钠与 102 mmol/L 氯化钙按体积比 10:1 交联形成凝胶形状最好，凝胶具有良好黏附性^[1]。

3.3 柱型藻酸钙载体在软骨修复中的作用 随着向藻酸钙溶液中滴加的氯化钙浓度的升高，所形成的藻酸钙载体的机械强度也升高^[4]，但 $\geq 400 \mu\text{mol/L}$ 的氯化钙溶液形成的藻酸钙溶液中，软骨细胞的活性及分裂能力明显下降^[5]。低温冻干技术在制备藻酸钙柱型载体中的应用可实现藻酸钙凝胶内部孔隙率及三维孔状结构的微观改变，通过冻干机处理过的藻酸钙内部孔洞结构均一，孔隙率及孔径均能满足软骨生长的要求。将质量分数为 0.4% 的氯化钙溶液加入等体积的质量分数为 2% 海藻酸钠溶液中，低温冻干后，能维持软骨细胞分化表型且较单纯的藻酸钙凝胶具有更好的机械强度，能维持软骨的良好形状。

3.4 可注射藻酸钙凝胶及冻干处理的藻酸钙载体联合运用

两种材料的不同形态的联合运用比较好地解决了软骨组织工程中修复和整合的问题，既满足了力学上的要求，又实现了正常组织与修复组织的良好过渡。在修复过程中，凝胶被用作“黏合剂”，利用其黏附性和即时塑形性来处理边界的整合。柱型载体具有良好的框架结构，在成型形态上具有无与伦比的优势，其力学上的强度远大于凝胶，且通过改变塑形过程中物理、化学条件的改变，如在标准大气压下 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻干能实现材料在三维结构上的变化^[5]，能更好地满足软骨生长条件，实现材料内部结构微观上的变化。联合运用藻酸钙凝胶及柱型载体 12 周后复合物仍保持植入时的形态和大小，质地硬度接近正常软骨组织，表面平滑，修复软骨与周围正常软骨两侧均整合良好，未见交界区有明显裂隙，局部胶原纤维过渡良好，退变轻微，软骨细胞簇集状增生较少，修复软骨厚度基本正常。

3.5 联合运用的意义及前景 临床中骨性关节炎及关节软骨损伤，软骨缺损多为较大范围的剥脱，缺损区较大直径一般大于 4 cm，且缺损周缘边界不规则，单一运用可注射凝胶修复难以保证形态上的要求且强度一般，而单独用柱型载体边界区域的整合效果一般。因此，联合运用同种材料的不同形式能实现材料劣势的互补，这一对材料新的运用方式能实现修复与整合的统一，给组织工程化软骨的应用提供新的思路。

参考文献

[1] 李文辉,侯筱魁,汤亭亭,等.可注射性藻酸钙凝胶修复整合兔膝关节骨软骨缺损实验研究.中国矫形外科杂志,2005,13(5):372-375.
 [2] Sharon Z,Rachel G,Smadar C. Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. Biomaterials,2002,23:4087-4094.
 [3] 郭全义,卢世璧.藻酸钙的特性及在软骨组织工程的应用.中国矫形外科杂志,2006,14(3):216-218.
 [4] 陈书军,陈富林,雷德林,等.特定形态软骨的构建.中国修复重建外科杂志,2001,15(3):176-178.
 [5] 王晋平,庞永刚,赵大庆,等.不同浓度藻酸钙复合软骨细胞体外培养的实验研究.生命科学研究,2006,10(4):350-353.

(收稿日期:2008-06-24 本文编辑:连智华)

“奇正杯”止痛消肿外用药临床应用有奖征文通知

奇正止痛贴膏和青鹏膏剂是临床上广泛应用于骨骼肌肉疼痛的外用止痛药。为了更好地总结和评估奇正止痛贴膏和青鹏膏剂的临床疗效和交流临床用药经验,《中国骨伤》杂志社与西藏奇正藏药股份有限公司联合举办“奇正杯”止痛消肿外用药临床应用有奖征文活动。

征文内容:奇正止痛贴膏和奇正青鹏膏剂在骨伤科临床应用中的疗效观察。

征文要求:必须是未公开在杂志上发表的原创性的临床研究论文。在论文格式上按照《中国骨伤》杂志的论文格式,必须设有对照组,并附中英文摘要,请注明第一作者姓名、单位及科室、通讯地址和邮政编码,并附上单位介绍信。征文截止日期:2009年12月15日(以投稿者当地邮戳为准)。收稿地址:北京市朝阳区北四环中路131号中国藏学研究中心501室市场部,邮编:100101;也可通过电子邮件以Word格式投稿,E-mail:zhengwen_qz@sina.com(注明“奇正征文”)。

征文评选:由主办单位聘请国内著名专家组成评审委员会,对收到的全部论文进行严格、公正的评审。评出:特等奖1篇,奖金10000元;一等奖2篇,奖金5000元;二等奖5篇,奖金3000元;三等奖8篇,奖金2000元;优秀奖20篇,奖金1000元。未获奖论文第一作者将获得价值200元的纪念品一份。获奖的优秀论文通过审稿后择优在《中国骨伤》杂志上发表。