

· 综述 ·

藻酸钙复合材料在软骨组织工程中的应用前景

何志伟¹, 赵建宁²

(1. 南京大学医学院, 江苏 南京 210002; 2. 南京军区南京总医院军区骨科研究所)

【摘要】 软骨缺乏血运, 仅靠自身修复能力有限, 近年来随着组织工程的兴起, 构建出人工的组织工程化软骨来替代自身缺损的软骨组织已广为研究, 研究重点也集中在寻找适合软骨细胞生长, 且能满足自身内部环境并能降解的支架材料上。藻酸钙支架构建方式简单; 具有水凝胶及三维多孔结构 2 种形式; 在改变物理及化学因素的条件下能改变自身材料的力学及生物特性; 且能与其他因素 (如高分子聚合物、生长因子) 构建出新型的复合材料, 因此在软骨组织工程上具有一定的应用前景。本文主要概括了藻酸钙支架材料的特点和优势, 就复合其他成分 (生长因子、基因片段) 的藻酸钙水凝胶和三维结构 2 种不同形式, 联合整复软骨缺损甚至软骨及软骨下骨的应用前景作出展望。

【关键词】 藻酸钙; 组织工程; 软骨

Application perspective of calcium alginate composite in cartilage tissue engineering HE Zhiwei, ZHAO Jian-ning The Nanjing Hospital of Nanjing Military District of PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China

ABSTRACT Because of blood deficiency, cartilage have a limited in self-repair Using tissue engineering cartilage to substitute the part of self defect is becoming the hot topic of the study. The emphasis in it is how to find a kind of materials which can fit to cell's growth. Due to the self-ascendancy and simple-construction, calcium alginate shows us a wonderful prospect in tissue engineer. The main body of this article is to sum up the characteristic and the ascendancy of calcium alginate. Also it is concluded that how can repair defects of cartilage even the defect-chondro-cartilage when using calcium alginate which has two-difference patterns in this text.

Key words Calcium alginate; Tissue engineering; Cartilage

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(11): 789-791 www.zgsgz.com

软骨缺乏血运, 仅靠关节滑液提供大部分营养, 因此软骨组织自身修复能力极其有限, 一旦损伤难以修复, 继发的关节退行性变、创伤性关节炎将会导致严重的关节功能障碍。现代外科的发展实现了人类替换病损组织的梦想, 用于替换病损组织的材料包括异种、同种异体、自体组织和人工合成的材料, 但这些代替材料均有一定的局限性。“组织工程学”所构建模拟的正常结构越来越被关注。1987年美国科学基金会在华盛顿举办的生物工程小组会上提出了“组织工程”这个名词, 1988年被定义为“应用生命科学与工程科学的原理和方法, 在可控、可重复的条件下, 通过哺乳动物、人类 (包括患者本身) 特定细胞在网络构架上的体外培养及体内移植, 形成具有特定功能的组织和生物替代物”。因此组织工程不仅要求合适的种子细胞, 还需要合适的载体来携带种子细胞。藻酸钙是近年发现的一种理想的携带软骨细胞的材料, 它具有良好的生物相容性、可降解性^[1-3], 除了能提供细胞生长所需的三维支架外, 还能创造类似软骨基质的环境, 维持细胞的表型及其表达, 具有良好的应用前景。

1 软骨组织工程支架的特性

理想的软骨组织工程基质支架应具有以下特性^[4]: 具有良好的生物相容性, 在体外培养时无细胞毒性, 植入体内时不会引起机体炎症和排斥反应; 具有三维立体结构; 具有良好的表面活性, 能促进细胞的黏附并为细胞在其表面的增殖提供良好的微环境; 具有生物可降解性; 具有可塑性。与骨组织工程支架材料相比, 软骨组织工程支架材料对力学要求相对较低。

藻酸钙来源丰富, 价格低, 无毒, 具有可吸收性、可注射性和良好的生物特性。藻酸钙凝胶形成过程较为简单, 一般认为按 1.2% (w/v) 比例把海藻酸钠溶于蒸馏水。海藻酸钠溶液的消毒可以用高压消毒, 也可以用过滤器过滤消毒, 采用高压消毒前把海藻酸钠溶液的 pH 值调整到 7.0~8.0。消毒好的溶液中加入氯化钙溶液, 即通过凝固形成藻酸钙凝胶^[5]。藻酸钙是由不同数量的古洛糖醛酸和甘露糖醛酸形成的多聚糖。藻酸钙凝胶的物理特性决定于多聚糖的组成、序列和聚合物分子大小^[6]。藻酸钙的强度随海藻酸钠和氯化钙浓度的不同而改变。藻酸钙凝胶多聚体中有 4 种二聚体序列结构, 藻酸钙凝胶的弹性与其二聚体的含量有关。如果古洛糖醛酸的量超过总量的 70%, 就能使形成的藻酸钙凝胶具有最低的皱缩、最高的力学强度、高孔隙率以及在 1 价离子溶液中较高

基金项目: 全军“十一五”重点攻关项目 (编号: 06G043)

通讯作者: 何志伟 E-mail: hezhiwei2000@hotmail.com

的稳定性^[7]。藻酸钙凝胶的降解(解体)过程实质上是凝胶的溶解过程:凝胶中的钙离子与周围环境中的 1 价非凝胶离子进行交换,从而使凝胶失去部分钙离子,降低了凝胶的离子交联程度,使凝胶向溶胶转变^[8];藻酸钙凝胶的含水量一般在 95%以上^[9],转变过程中存在水分向生理环境的流失,所以凝胶的体积缩小、强度降低。有文献报道,藻酸钙凝胶在生理缓冲液中存在 15 h 后机械强度将会比初始时损失 60%^[10]。因此,藻酸钙凝胶在体内的吸收主要是凝胶在降解(解体)过程(即凝胶溶胶转变过程)中水分在体内的吸收。

2 藻酸钙复合材料的应用

2.1 复合材料的概念

所谓复合材料就是通过一种或多种材料彼此间的复合来改善不同材料的缺点(如单一材料力学强度不足,存在一定的毒性,降解性差等等)来复合种子细胞,维持种子细胞的生长和表型的分化,在这一过程中还可以添加其他促进种子细胞生长的成分。

藻酸钙通过与高分子材料(如聚乳酸、聚羟基乙酸)的复合可以提高藻酸钙的力学特性和机械强度。通过复合一些较为公认的生长因子(如 FGF-2、BMP),可以促进软骨细胞的生长,更好地维持软骨细胞的表型。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,缺乏型胶原,软骨细胞即会凋亡。实验表明通过藻酸钙凝胶复合生长因子混合软骨细胞后充填软骨缺损区,型胶原免疫组化提示型胶原表达范围与正常软骨类似,基质染色较周围正常软骨更为明显^[11]。

2.2 藻酸钙复合材料的应用形式

藻酸钙复合材料按形态可分为预制成形的三维多孔支架和水凝胶材料。

2.2.1 预制成形的三维多孔支架

对制成一定形状的三维多孔支架来讲,一般可以通过表面打孔接种软骨细胞,软骨细胞对支架材料一般要求有较高的孔隙率,一般来讲孔隙率为 90%^[12],而且还要有一定的机械强度。有实验证明不同温度的低温冷冻可以影响藻酸钙支架材料内在三维孔径的变化,实验认为将藻酸钙于均一大气条件下置于 -20℃ 低温容器中冷冻后,其材料内部形成具有相同大小孔径,彼此联系很紧密的三维多孔结构,血清蛋白在此种材料内部具有较好的流动性,且此种材料能承受一定的压力^[13]。这种材料已经用于肝细胞的培养,并获得了体外实验的成功。该实验还进一步比较在不同冷冻机制下,藻酸钙内部材料的孔径、孔隙率的变化,发现经过液氮冷冻处理后的藻酸钙材料内部孔径变化和孔隙率呈梯度变化趋势^[13],结合这种梯度变化趋势,由于骨细胞对支架材料孔隙率要求较低(一般 55%左右,否则支架将没有较好的机械强度),对构建出能同时支持骨细胞生长和软骨细胞生长的双相支架材料有一定的前瞻性指导作用。

2.2.2 水凝胶材料

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,通过改变温度、酸碱度、经紫外线照射或者加入交联剂等方法,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,可以最小限度地减少创伤,符合现代微创手术的要求,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,凝胶化后可以减少细胞从多孔

支架的溢出,且不受材料厚度的影响。因此水凝胶类材料在修复软骨缺损中具有独特的优势。藻酸钙是一种理想的水凝胶载体材料,广泛应用于医学领域^[14]。

藻酸钙水凝胶复合软骨细胞的过程很简单,向海藻酸钠溶液中滴入软骨细胞溶液,形成海藻酸钠软骨细胞悬液,然后加入氯化钙溶液搅拌后就形成了复合软骨细胞的藻酸钙水凝胶,在水凝胶固化前,可以将它注射到软骨缺损区,这一方法很符合关节镜手术的操作要求。而且藻酸钙水凝胶具有一定的黏性,它也可作为一种黏合剂用于处理自体骨软骨柱与周围的整合上。由于藻酸钙水凝胶的自身优势,使目前关节镜在骨、软骨损伤的研究已经发展到藻酸钙凝胶复合骨髓基质细胞修复骨、软骨;骨软骨镶嵌成形术(Mosaicplasty)^[15]修复关节软骨缺损(其方法是从负重较少的股骨内外侧边缘区域取下多个小块圆柱状软骨移植序贯排列镶嵌状移植于骨软骨缺损区,该项技可以在关节镜下或通过有限切口完成)^[16]。

3 骨软骨的修复和整合

单纯的软骨损伤现在已经很少见,软骨全层以及包括软骨下骨的损伤带来了就软骨损伤更进一步的要求,既要修复软骨细胞又修复骨细胞。骨软骨再生是指替代破坏或缺损组织,通过局部微环境的应力刺激和组织塑形性逐渐恢复关节骨软骨各组成部分的形状和功能。影响骨软骨修复质量的几个关键因素为:新生组织与表面的整合;新生组织能否承受机体的正常力学环境;软骨下的整合等。而关节软骨良好整合包括两方面,一是软骨与软骨下骨的整合,二是软骨与周围软骨的整合,两者对新生组织的功能均至关重要^[17]。“整合”这个全新的理论观念可以指导将来研究的发展方向。目前的工程化骨软骨研究主要集中于 2 种不同的构建方法,即可注射和特定形态构造方法,藻酸钙这种材料在这 2 种方法上都存在着发展空间。

3.1 可注射型组织工程化骨软骨

由于骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)具有一定的分化能力,能分化为软骨细胞和骨细胞,在缺损区可重建软骨和软骨下骨结构。细胞因子是一种多肽类物质,具有传递信息、调节细胞的功能。在细胞的参与下,它不但能刺激,也能抑制细胞的分裂、分化及基因表达。IGF-1 是第 1 个被确认对关节软骨有自分泌作用的生长因子,可以促进胶原合成,控制基质合成和降解,对于保持软骨的功能最为重要;TGF- β 既能诱导 BMSCs 转化为软骨细胞,促进软骨细胞增殖、调节其分化及蛋白多糖和胶原合成,又能促使 BMSCs 向成骨细胞方向分化。因此结合藻酸钙凝胶可注射性的自身优势,实验证明 BMSCs-藻酸钙-生长因子复合材料经注射器注射于兔皮下能形成软骨及骨组织^[11]。

3.2 特定形态的组织工程化骨软骨

通过冷冻干燥处理的成形藻酸钙材料,由于存在孔径的梯度变化^[13],设想可以分别接种骨细胞、软骨细胞,构建出骨端和软骨端,并在骨软骨结合处实现良好的过渡^[18],在理论上也能构建出组织工程化骨软骨的模型,目前还缺乏相关的研究结果。

4 藻酸钙复合材料的临床及实验室应用(前瞻性)

目前临床应用藻酸钙复合材料主要集中在颌面部的矫形

中,通过注射水凝胶复合材料于软骨缺损区,固化后完成对缺损区的修复。而将藻酸钙材料通过关节镜注入到关节软骨缺损区的临床研究还未见有成熟的报道。在关节腔内液体流动的环境中,此种材料能否与周围正常的软骨组织良好整合,以及其抗压能力,还有待进一步的研究证明。可以设想将藻酸钙材料的不同形态结合:以冷冻干燥条件下得到的适合缺损区形状的成形三维多孔结构充填缺损区,周围以水凝胶藻酸钙复合材料作为黏合剂;这种形式的结合可以既解决了提高抗压能力又改善了人工组织与周围组织的整合。

5 基因疗法(设想)

随着目前对基因的认识进一步加深,以及基因疗法的兴起,给组织工程一个启示,就是能否利用基因工程的方法将所需要单一或多个生长因子的编码基因转入种子细胞,使细胞在增殖分化的同时长期稳定表达所需要的生长因子,通过自分泌或旁分泌的途径来进一步促进其增殖和分化,而不需要反复不断的注射细胞因子,也能解决局部细胞因子持久性和浓度不足的问题。

参考文献

- 1 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.
- 2 Perka C, Spitzer RS, Lindenhayn K, et al Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants J Biomed Mater Res, 2000, 49(3): 305-311.
- 3 Ahqvist KF, Wang L, Wang J, et al Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks Ann Rheum Dis, 2001, 60(8): 781-790.
- 4 徐虎,胡蕴玉,刘松波,等.可注射性藻酸钙凝胶载体组织工程性软骨的实验研究.中华骨科杂志,2000,20(9):533-536.
- 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,2006,10:350-353.
- 6 金岩.组织工程学原理与技术.西安:第四军医大学出版社,2004.

- 7 Marijnissen WJ, Van Osch GJ, Aigner J, et al Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering Biomaterials, 2002, 23(6): 1511-1517.
- 8 Shoichet MS, Li RH, White ML, et al Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and a garose Biotechnol Bioeng, 1996, 50(4): 374-381.
- 9 Wee S, Gombotz WR. Protein release from alginate matrices Adv Drug Deliv Rev, 1998, 31(3): 267-285.
- 10 LeRoux MA, Guilak F, Setton LA, et al Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration J Biomed Mater Res, 1999, 47(1): 46-53.
- 11 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.
- 12 Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, et al Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition Tissue Eng, 2001, 7(5): 557-572.
- 13 Zmora S, Glicklis R, Cohen S Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication Biomaterials, 2002, 23(20): 4087-4094.
- 14 黄华扬,尹庆水,曹正霖,等.自体骨软骨镶嵌移植术修复关节软骨病损.骨与关节损伤杂志,2001,16(3):168-169.
- 15 张海宁,侯筱魁.自体骨软骨镶嵌移植成形术.中华骨科杂志,2004,24(10):628-630.
- 16 O Driscoll SW. Preclinical cartilage repair: current status and future perspectives Clin Orthop Relat Res, 2001, (391 Suppl): 397-401.
- 17 李文辉,侯筱魁,汤亭亭,等.藻酸钙复合材料构建组织工程化骨软骨的实验研究.中国矫形外科杂志,2004,12(7):517-520.
- 18 Sherwood JK, Riley SL, Palazzo R, et al A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair Biomaterials, 2002, 23(24): 4739-4751.

(收稿日期:2007-04-28 本文编辑:王玉蔓)