

· 基础研究 ·

纤维蛋白凝胶和脱钙骨基质支架材料复合软骨细胞修复兔膝关节软骨缺损的实验研究

何劼, 杨翔, 岳鹏举, 王冠宇, 郭亭, 赵建宁

(解放军第二军医大学南京临床医学院 南京军区南京总医院骨科, 江苏 南京 210002)

【摘要】 目的: 探讨纤维蛋白凝胶和脱钙骨基质支架材料复合软骨细胞作为软骨组织工程支架的可行性及有效性, 并为后续研究可注射性材料做基础。方法: 体外分离培养软骨细胞后接种到纤维蛋白凝胶和脱钙骨基质支架材料体外培养 4 周, 然后植入兔膝关节软骨缺损区继续培养 4、8、12 周后取材, 分别行大体、组织学、II 型胶原免疫组织化学观察。并进行 Wakitani 评分, 观察其体内修复关节缺损效果。结果: 大体观察 4 周后, 实验组软骨缺损区可有乳白色组织修复, 12 周可修复完全, 并无明显凹凸感。光镜下 8 周可见大量软骨细胞修复, 并在 TB 染色下见 II 型胶原比 4 周时明显增多。12 周时软骨陷窝结构形成, 细胞形态排列及 II 型胶原与正常软骨组织相近。结论: 纤维蛋白凝胶和脱钙骨基质支架材料复合软骨细胞可以作为软骨组织工程支架材料, 能够用于再生修复软骨的缺损。并为构建可注射性修复材料提供途径。

【关键词】 软骨细胞; 关节软骨; 组织工程; 纤维蛋白

Research of repairing rabbit knee joint cartilage defect by compound material of fibrin glue and decalcified bone matrix (DBM) and chondrocytes HE Jie, YANG Xiang, YUE Peng-ju, WANG Guan-yu, GUO Ting, ZHAO Jian-ning. Department of Orthopaedics, the Military General Hospital of Nanjing, the Clinical Medical College of the 2nd Military Surgeon University of Liberation Army, Nanjing 210002, Jiangsu, China

ABSTRACT **Objective:** To investigate the feasibility and effectivity of using compound material of fibrin glue and DBM as scaffolds for cartilage tissue engineering. **Methods:** Chondrocytes isolated from articular cartilage were seeded into prepared scaffolds, after incubation for 4 weeks in vitro. Chondrocytes and fibrin glue and DBM constructs were implanted in the joint cave of rabbit. The specimens were excised at the 4th, 8th, 12th week, examined grossly analyzed by haematoxylin cosine, toluidine blues staining and type II collagen immunohistochemistry reaction. Wakitani score was counted to evaluate the repairing effect. **Results:** Grossly analysis showed some ivory tissue filled the caves after 4 weeks and the caves were full filled with smooth surface after 12 weeks. The microscope showed a good deal of chondrocytes appeared after 8 weeks and more type II collagen than 4 weeks. Twelve weeks later, cartilage lacuna could be observed. The cells arrangement and the amount of type II collagen both showed the same as the natural one. **Conclusion:** Complicated material of fibrin glue and DBM as scaffolds can be used as scaffolds for cartilage tissue engineering.

Key words Chondrocytes; Articular cartilage; Tissue engineering; Fibrin

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(7): 523-526 www.zggszz.com

随着社会经济的发展, 生活水平的提高以及人口老龄化现象, 以关节软骨面损伤为主要表现的骨关节炎等疾病的发病率日益增加。为此, 如何微创修复损伤的软骨, 缓解患者痛苦、提高生活质量成为骨科临床一个亟待解决的问题。因软骨退变后纤维化, 软骨细胞及软骨含水量减少, 纤维等细胞外间质含量增加, 通过适当锻炼增加应力以及关节内注射透明质酸等药物虽可一定程度上修复损伤的软骨面并延缓其老化, 但毕竟并不理想。所以以选取种子细胞, 体外培养组织或器官

并移植到体内发挥功能的组织工程方法成为解决这一问题的突破口。作者选取免疫原性较低并具有较好降解能力的纤维蛋白凝胶与经过脱钙和降抗原处理后获得的脱钙骨基质混悬制成的复合支架, 体外培养软骨细胞 1 周后移植入兔膝关节软骨缺损处, 较好的修复了兔膝关节软骨缺损, 并为研制可注射性纤维蛋白凝胶复合支架提供可行性。

1 材料与方

1.1 实验材料 DMEM 培养基 (南京大学生物医学科学院), 胎牛血清, 胰蛋白酶-EDTA (Gibco 公司), 鼠抗人 II 型胶原单抗 (Calbiochem 公司), II 型胶原酶 (Sigma 公司), 纤维蛋白原 (100 mg 装, Sigma 公司), 凝血酶, 氯化钙注射液, 氨甲环

基金项目: 全军十一五重点攻关项目 (编号: 06G043)

通讯作者: 赵建宁 E-mail: zhaojianning.0207@163.com

酸注射剂(常药集团)。

1.2 实验对象与分组 实验动物为 2 只 2 周龄及 36 只 6 周龄、体重 2~3 kg 新西兰大白兔(由南京军区南京总医院动物实验中心提供)。2 只 2 周龄兔用于取膝关节透明软骨。36 只 6 周龄兔分成 3 组,编号后随机分为实验组(24 只,分别于 4、8、12 周各随机处死 8 只并取膝关节进行评分)、单纯支架组(6 只,分别于 4、8、12 周各随机处死 2 只并取膝关节进行评分)和空白对照组(6 只,分别于 4、8、12 周各随机处死 2 只并取膝关节进行评分)。

1.3 实验步骤

1.3.1 实验中所用溶液的制备 纤维蛋白原溶液(A液)及凝血酶溶液(B液):100 mg 纤维蛋白原中加入 2.5 ml 软骨细胞培养液吹打混匀作为 A 液,用于悬浮软骨种子细胞。40 mmol/L 氯化钙溶液制备内含凝血酶 50 IU/ml,氨甲环酸 20 mg/ml 作为 B 液,用于凝固纤维蛋白软骨细胞混悬液。

1.3.2 脱钙骨基质 (decalcified bone matrix, DBM) 的制备 取新鲜新西兰大白兔股骨,按改良的 Urist 方法^[1]依次操作制备 DBM。去除软组织,流水冲洗 6 h,风干后细锉刀将骨质磨成粉状,并用研钵反复研磨。200 目金属筛网筛过后用无水乙醇脱水 2 h,乙醚脱脂 1 h 后通风处过夜干燥,γ 射线 100 万 Rad 照射消毒,置-80℃冰箱冻干,保存备用。

1.3.3 软骨细胞采集及细胞悬液的制备 采用 Klagsbrum 法^[2]制备软骨细胞悬液。取新西兰大白兔(2 周龄)1 只,腹腔麻醉后,取后肢膝关节软骨,切取厚度约 2 mm,不超过软骨下骨板,软骨片切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小,PBS 液冲洗取下的软骨片 3 遍,将切取的软骨片置于 PBS 缓冲液中(含青、链霉素各 100 U/ml)。移入离心管内,加入 5 倍量的 0.25%胰蛋白酶 37℃振荡下消化 30 min,移出胰蛋白酶,PBS 液冲洗 2 次。加入 0.1% II 型胶原酶 8 ml,37℃下消化 12 h。将消化的细胞悬液经 200 目金属滤网滤过并移至离心管内,离心(500 r/min, 2 min)后取上清液至离心管内,再次离心(1 000 r/min, 8 min),弃上清液,加入 DMEM 培养液,充分吹打成细胞悬液。血细胞计数板计数,台盼蓝据染检测分离的软骨细胞活性,示活细胞浓度>90%。

按 2×10⁴ 个/cm² 的密度接种软骨细胞,置于培养箱(37℃, 5%CO₂)中培养,隔天换液,生长至 85%融合时以 0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA 消化传代。传代 2 代后,用 A 液制成细胞浓度为 1×10⁶ 个/ml,并 50 mg/ml DBM 的混悬液。

1.3.4 纤维蛋白凝胶/脱钙骨基质支架材料复合软骨细胞的体外培养 分别将混悬液与 B 液各 250 μl 滴入 48 孔板中混匀,可见混合液凝固成乳白色胶冻状。高倍光镜下见软骨细胞呈球形,均匀分布于支架中。每个培养孔内加入 1 ml 软骨细胞培养液,放置于培养箱(37℃, 5%CO₂)中培养,每隔 2~3 d 换液 1 次,培养 4 周。另外取纤维蛋白溶液与凝固液各 250 μl 滴入 48 孔板中凝固后置入培养箱中作空白对照。

1.3.5 透射电镜观察并计算材料孔隙率 取体外培养 4 周的细胞支架复合物经 PBS 漂洗,2.5%戊二醛固定后,常规透射电镜制备标本行透射电镜观察(见图 1-2)。

1.3.6 纤维蛋白凝胶/脱钙骨基质支架材料复合软骨细胞修复兔膝关节软骨缺损 用直径 0.32 cm 钻头在 36 只分组完

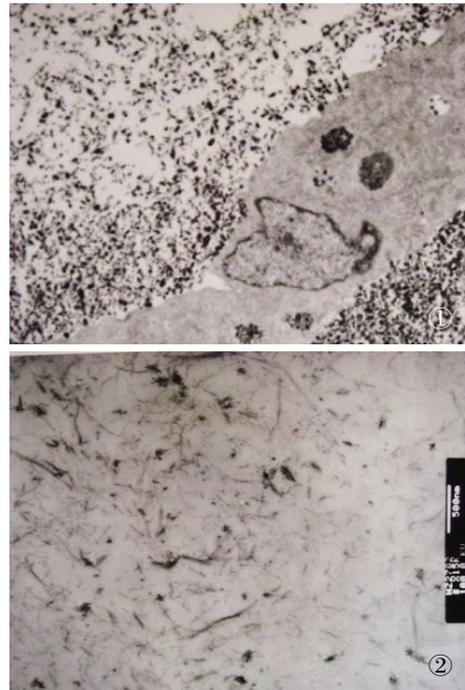


图 1 透射电镜下体外培养 4 周细胞支架复合物,可见部分细胞器及纤维蛋白原网状结构(×6000) **图 2** 电镜下对照组支架,可以观察到纤维蛋白原网状结构(×20000)

Fig.1 Compound material of the chondrocytes and scaffold cultured in vitro for 4 weeks, some cellular organs and network structure of the fibrin glue can be observed under transmission electron microscope (×6000)

Fig.2 Network structure of the fibrin glue of control group can be observed under transmission electron microscope(×20000)

毕的 6 周龄新西兰大白兔股骨髁关节面中心分别造成全层关节软骨缺损,深度约 2 mm,见创面少许渗血为止。实验组于缺损区植入体外培养 4 周的细胞支架复合物,细胞浓度为 4×10⁷ 个/ml,术后常规应用抗生素(头孢他啶 0.5 g, 1 次/d 肌注)5 d。按照标准动物饲养法饲养,各组分别于术后 4、8、12 周取材。

1.4 观察项目与方法 ①观察体外培养软骨细胞复合纤维蛋白凝胶支架的形态、结构,以及支架逐渐降解的情况。②观察兔膝关节软骨修复情况,关节软骨表面平整与否、色泽及质地、与邻近软骨结合情况,甲醛固定后石蜡包埋,苏木精-伊红染色。③根据 Wakitani 等标准^[3]进行组织学评分。

1.5 统计学处理 用 SAS 9.2 统计分析软件(由解放军第二军医大学统计学教研室提供)采用两因素三水平方差分析法,对实验组、单纯支架组及空白对照组分别于 12 周时取材的评分结果以及实验组分别于 4、8、12 周的评分结果进行方差分析,分别进行统计学处理。并对当时间及处理因素两者相互作用时的结果进行统计学处理。当 P<0.05 时,认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 体外培养软骨细胞复合纤维蛋白凝胶支架胶冻样结构形成与逐步降解 细胞混悬液与 B 液混匀后,可见混合液凝固成乳白色胶冻状。高倍镜下见软骨细胞呈球形均匀分布于支架中,DBM 微粒呈不透光物质分布于支架内。1 周后肉眼

观察支架周边开始逐步降解,呈虫蚀样改变,光镜下见软骨细胞数目增多,依旧呈球形,DBM 微粒周围软骨细胞密度较高。投射电镜计算孔隙率为(65.10±7.66)%。

2.2 修复关节缺损效果观察 软骨细胞纤维蛋白支架复合物植入体内 4 周观察:实验组大体可见软骨缺损区基本充填,修复组织呈乳白色,欠光泽,表面欠光滑,色泽与周围正常软骨区别比较明显;光镜(图 3a)见修复区较多幼稚软骨细胞聚集于浅层,以脱钙骨基质颗粒周围细胞量较多。细胞体积小,数量多,形态多长梭形,呈水平排列,深层细胞体积稍大,排列不规则,已出现典型的软骨陷窝结构,TB 染色示细胞外基质与 II 型胶原较正常组织少,与周围组织分界清楚。单纯支架组大体见支架修复充填骨质缺损,修复表面欠平整;光镜下观察见支架材料少许降解,靠近正常软骨组织区可见长梭形类成纤维细胞生长。空白对照组大体观察缺损区有明显凹陷,凹陷周边无光泽,不光滑;光镜下观察见缺损区边缘纤维组织生长,有血管侵入。

软骨细胞纤维蛋白支架复合物植入体内 8 周观察:实验组可见软骨缺损区完全充填,修复组织呈乳白色,少许透明感,表面光滑,色泽与周围正常软骨区有稍许分别;光镜下(图 3b)观察软骨细胞数量多,长梭形,典型的软骨陷窝结构形成,TB 染色示细胞外基质与 II 型胶原较 4 周时观察明显增多,可见软骨同源细胞群现象。单纯支架组可见支架修复充填骨质缺损,乳白色,无明显光泽,修复表面尚平整;光镜下观察支架材料继续降解,速度较慢,靠近正常软骨组织区可见类成纤维细胞生长。空白对照组见缺损区有明显凹陷,凹陷周边凹凸不平;光镜下可见纤维组织瘢痕生长,单核细胞聚集。

软骨细胞纤维蛋白支架复合物植入体内 12 周观察:实验

组(图 4a)软骨缺损区修复面较光滑,表面无明显凹凸感,修复组织和周围软骨整合较紧密;光镜下(图 3c)观察见软骨细胞数量多,软骨陷窝结构形成,细胞形态排列及 II 型胶原与正常软骨组织相近。难以分辨界限(见图 5)。单纯支架组(图 4b)可见乳白色纤维组织修复缺损,表面欠光滑,无明显光泽;光镜下见支架材料大部降解,偶见软骨陷窝形成,TB 染色弱阳性。空白对照组(图 4c)仍存在有明显缺损及周边凹凸不平瘢痕组织充填;光镜下可见血管及淋巴侵入,瘢痕组织形成。

2.3 对各时期软骨缺损修复情况进行 Wakitani 评分 评分结果见表 1。实验组、单纯支架组及空白对照组分别于 12 周时取材的评分结果进行两因素三水平方差分析, $P<0.001$,说明实验组与单纯支架组及空白对照组间的差异有统计学意义,实验组修复效果比单纯支架组及空白对照组均优良。实验组分别于 4、8、12 周的评分结果进行方差分析, $P<0.001$,具有统计学意义,认为实验组 12 周修复效果较 4、8 周改善。当时间因素及处理因素相互作用时, $P=0.005 1$,具有统计学意义,说明两因素有交互作用,实验组在 12 周时效果最佳。

3 讨论

生物工程支架必须具备以下属性:可降解、生物相容性、表面积/体积比、机械强度以及神经、血管可渗透性。目前的生物载体材料中的天然材料主要包括胶原和纤维蛋白凝胶。其优点是生物相容性好,抗原性弱,其分子结构内含有丰富的、利于细胞黏附和结合的优点。但其所形成物的生物力学较差。

3.1 纤维蛋白凝胶(fibrin glue)^[4-5] 纤维蛋白是机体自身成分,哺乳动物种属之间差别很小,免疫源性很低。Homminga 等^[6]首先研究了软骨细胞在纤维蛋白凝胶中的生物学行为,利用兔关节软骨细胞,体外培养 7 d,发现软骨细胞在纤维蛋白凝

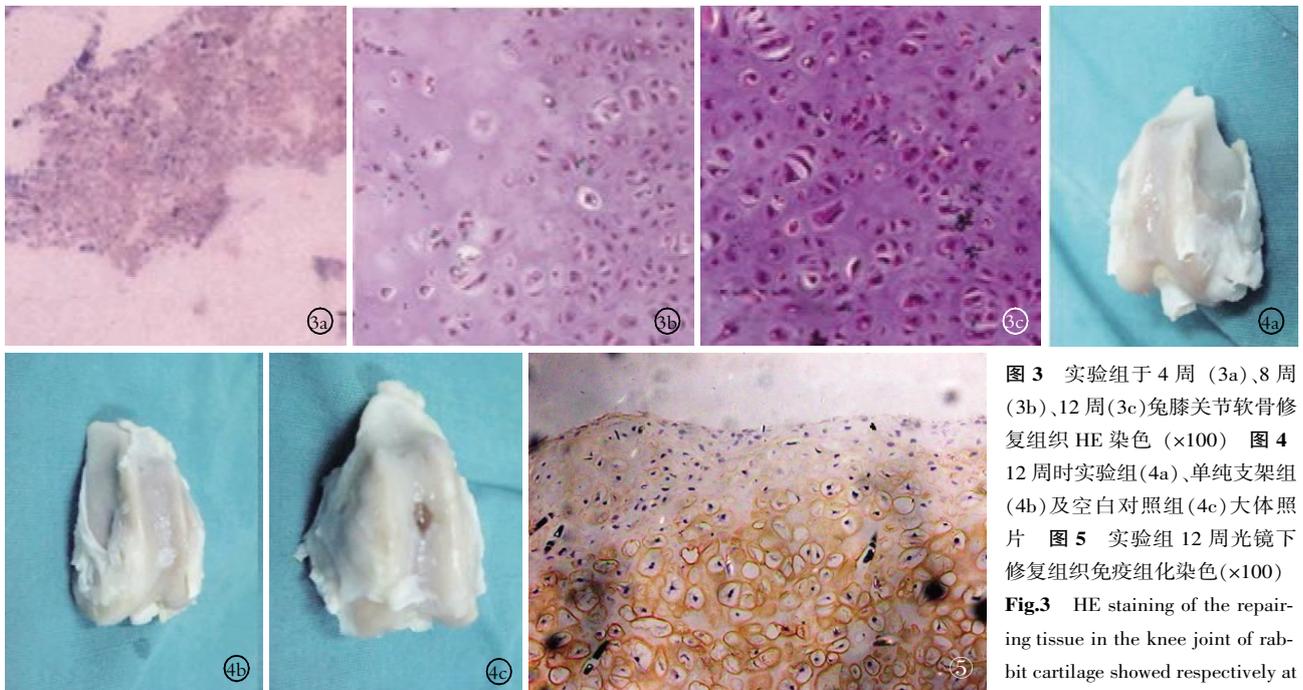


图 3 实验组于 4 周 (3a)、8 周 (3b)、12 周(3c)兔膝关节软骨修复组织 HE 染色 (×100) **图 4** 12 周时实验组(4a)、单纯支架组 (4b)及空白对照组 (4c)大体照片 **图 5** 实验组 12 周光镜下修复组织免疫组化染色(×100)

and 12th week (3c) (×100) **Fig.4** General pictures of the experimental group(4a)、simple scaffold group(4b) and the control group(4c) at the 12th week **Fig.5** Immunohistochemical staining of the repairing tissue in the knee joint of rabbit cartilage at the 12th week under optical microscope (× 100)

表 1 各个时期实验组、单纯支架组、空白对照组 Wakitani 评分($\bar{x}\pm s$, 分)

Tab.1 Wakitani score of the experimental group, the simple scaffold group and the control group on different times($\bar{x}\pm s$, score)

组别	4 周	8 周	12 周
实验组	11.86±1.29	9.64±1.60	5.42±1.68* [△]
单纯支架组	13.00±0.82	10.00±0.82	8.75±0.96
空白对照组	13.50±0.58	11.75±1.26	9.75±1.26

注:12 周时,实验组与单纯支架组、空白对照组组间比较,* $F=17.49$, $P<0.001$ 。实验组 12 周分别于 4、8 周的比较,* $F=82.26$, $P<0.001$ 。两因素共同作用时的比较,[△] $F=4.16$, $P=0.005$ 1

Note:At 12th week,compared among the 3 groups,* $F=17.49$, $P<0.001$ 。Compared among the results at three different times of the experimental group,* $F=82.26$, $P<0.001$ 。Compared among the results when the 2 elements acts together,[△] $F=4.16$, $P=0.005$ 1

胶中能够保持细胞形态和增殖活性,产生细胞外基质,纤维蛋白凝胶 3 d 后开始崩解,并随细胞浓度的增加而加速。作为软骨组织工程研究的载体材料,必须要有合理的可降解性能。一方面降解的时间要与软骨的形成相一致,另一方面降解过程中的代谢产物无毒性和其他不良反应。纤维蛋白在体内的降解是物理性的,无毒性问题。而降解速度太快,是其主要问题,本实验通过加入氨甲环酸,在 3 个观察时间点可见实验组缺损修复区表面基本保持平滑,而空白支架组缺损修复表面于光镜下观察有材料降解。一方面表明氨甲环酸减慢了纤维蛋白凝胶降解速度,使其与软骨细胞繁殖分化过程基本保持一致,另一方面表明支架材料复合种子细胞对于组织正常修复有益。通过调控纤维蛋白凝胶降解速度,扩大了其作为组织工程支架载体材料的应用范围。

3.2 脱钙骨基质

3.2.1 DBM 的成骨作用机制 经脱钙、去蛋白处理后,含有多种成骨因子,DBM 是通过这些成骨因子诱导成骨发挥作用的。另外,DBM 具有天然孔隙结构,有利于骨活性物质和细胞因子长入,从而较好地发挥骨传导作用。DBM 通过诱导未分化的间充质细胞分化为软骨和骨细胞,然后通过钙盐沉积形成新骨。本实验中少量加入 DBM,利用其成骨活性促进软骨细胞的生长,并尽量减小颗粒大小,一方面可加速其降解,避免后期 DBM 成骨活性^[7-8],另一方面可避免颗粒大导致制作支架过程中聚集于材料底部,未能均匀分布于支架中。

3.2.2 DBM 的免疫原性 DBM 经过脱钙和降抗原处理后,具有良好的生物相容性。但过度降抗原处理将破坏过多的移植物内的成骨因子而降低脱钙骨基质的成骨活性。所以在本实验中严格掌握了制备 DBM 时对抗原性的处理步骤。

3.2.3 不同种类的 DBM 特性 DBM 分为完全 DBM、部分

DBM、去抗原自溶同种异体骨等。通过改变制备过程中的脱钙时间长短可以得到不同强度的骨基质。完全 DBM 具有可塑性和骨诱导活性,但不具有空间结构和良好的孔隙结构,因此缺乏骨传导性。而部分 DBM 具有一定的生物力学强度和具有骨传导性的良好孔隙结构,有利于微血管的长入和带来破骨细胞、骨髓基质干细胞、骨生成因子以及旧骨吸收和新骨形成。所以本实验采用部分 DBM 作为支架材料的组成部分。

纤维蛋白凝胶以及脱钙骨基质均具备作为支架材料培养软骨种子细胞的基本条件,生物相容性、可降解性等均较好,而且具备作为生长因子载体缓慢保存并缓慢释放的功能。纤维蛋白凝胶具有较大的表面积/体积比,孔隙率较大,一方面通过较大附着面积促进了软骨细胞的增殖、分化,另一方面促进营养物质在支架与周围组织的细胞间运输。通过加入氨甲环酸减慢其降解速度,达到材料的降解和软骨组织的形成同步化。并有 DBM 在降解同时缓慢释放其成软骨活性物质,促进了软骨组织的形成。本实验组在 3 个观察时间点均可见到修复缺损区表面较光滑平整,而空白支架组及空白对照组缺损充填表面凹凸不平,表明软骨细胞的生长与支架的降解速度基本保持一致。而且在整个实验周期,均未发现实验动物膝关节腔内游离体形成及明显滑膜充血等炎症反应,支架材料的组织相容性较好。然而对于 DBM 的后期成骨作用未能行长期观察,以及支架修复组织是否具有与周围正常组织良好结合能力等均需后期实验进行观察。纤维蛋白凝胶具有良好塑形能力,本实验的可注射性纤维蛋白凝胶为早期骨性关节炎及骨缺损修复提供了一种优良的复合支架材料。

参考文献

- [1] Reddi AH,Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. Proc Natl Acad Sci USA, 1972,69(6):1601-1605.
- [2] Klagsbrum M. Large -scale preparation of chondrocytes. Methods Enzymol,1979,58:560-564.
- [3] Wakitani S,Goto T,Pineda SJ,et al. Mesenchymal cell-based repair of large,full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg (Am),1994,76(4):579-592.
- [4] 马西. 纤维蛋白的形成与降解. 微循环学杂志,2002,4 (1):42-44.
- [5] Yamada Y,Boo JS,Ozawa R,et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. J Craniomaxillofac Surg,2003,31(1):27-33.
- [6] Homminga GN,Buma P,Koot HW,et al. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. Acta Orthop Scand,1993,64(4):441-445.
- [7] 何劼,赵建宁. 软骨组织工程中细胞因子功能的研究进展. 中国骨伤,2007,20(12):872-875.
- [8] 岳鹏举,赵建宁. 骨形态发生蛋白-2 促进骨缺损修复的研究进展. 医学研究生学报,2007,20(12):1302-1304.

(收稿日期:2009-01-04 本文编辑:王宏)