

支架及无支架条件下构建组织工程软骨的研究进展

王金良, 赵建宁

(南方医科大学南京临床学院 南京军区南京总医院骨科, 江苏 南京 210002)

【摘要】 支架材料的研究是组织工程的研究热点之一, 软骨细胞复合培养给组织工程软骨的构建带来希望, 单一的材料诸如胶原、透明质酸、壳聚糖、纤维蛋白凝胶等已经证明可以与软骨细胞复合培养, 两种或者多种材料复合可以提高材料的性能, 更好地用于组织工程软骨的构建, 并满足软骨缺损修复的需要; 同样, 在无支架情况下应用软骨细胞聚集培养、沉淀培养的方法, 可以构建组织工程软骨, 并给软骨缺损的修复带来新希望, 但目前的研究较少。两者是组织工程软骨构建的两个主要方向。

【关键词】 组织工程; 软骨; 细胞培养; 支架; 综述文献

Progress in studying the construction of tissue engineering cartilage with or without various scaffolds WANG Jin-liang ZHAO Jian-ning. Clinical College of Nanjing Southern Medical University, Department of Orthopaedics Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China

ABSTRACT The study of scaffold is one of the focuses in tissue engineering. scaffold is cultivated with cartilage cells to construct tissue engineering cartilage. A single scaffold such as collagen, hyaluronic acid, chitosan, fibrin gel et al has been proved to succeed in cultivation with cartilage cell. The performance of scaffold could be improved by combining different materials and meet the need of repairing cartilage defects. The methods of cartilage cell aggregation culture and pept culture without scaffold has been proved to succeed in constructing tissue engineering cartilage and it brings new hope for people. However few studies are available. The two methods of constructing tissue engineering cartilage are two trends of cartilage tissue engineering.

Key words Tissue engineering; Cartilage; Cell culture; Scaffold; Review literature

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(10): 726-728 www.zggssz.com

20世纪60年代软骨细胞的分离和体外培养获得成功, 接着软骨细胞体内移植修复关节软骨也取得一定成果, 奠定了软骨组织工程的基础。构建组织工程软骨通常有2种主要的方法: 支架材料条件下与无支架材料条件下。本文就软骨细胞作为种子细胞, 体外在支架及无支架条件下构建组织工程软骨进行综述。

1 三维支架构建组织工程软骨

Benya等^[1] (1982)发现琼脂糖凝胶三维环境有利于体外培养的软骨细胞保持表型稳定, 甚至能使在单层培养中已经分化的软骨细胞重新返回原代细胞的高分化状态。自此, 探索各种适合的三维支架材料用于构建组织工程化软骨成为研究的热点。对各种材料的特性和在构建组织工程软骨中的应用分述如下。

1.1 胶原 胶原作为天然的生物材料, 其本身无毒性, 可被细胞酶类识别、标记、降解, 有利于软骨细胞黏附、增殖和分化; II型胶原和I型胶原都可作为支架材料, 关节软骨中主要为II型胶原, 但I型胶原容易获得, 与II型胶原有类似性, 常作为细胞培养的支架材料^[2-3]。Dorotka等^[4]发现胶原海绵维

持羊软骨细胞II型胶原的表达, 维持其表型的稳定。Stark等^[5]将I型胶原复合不同比例的橡胶, 研究软骨细胞在不同的胶原基质上培养组织工程软骨的适用性, 在所有的胶原基质上软骨细胞都有较高的活力并可以继续分化。Mukai等^[6]用II型胶原海绵培养兔肋软骨细胞可以很好地维持软骨细胞的表型, 但是次代的去分化软骨细胞在胶原海绵上培养时, 分化为肥大软骨细胞, 提示: 原代软骨细胞在胶原海绵上培养时更适合临床和实验室的应用。

1.2 透明质酸 1998年Aigner等^[7]研究了透明质酸苄基酯, 它是一种新近发展的半合成生物材料, 是可降解的软骨细胞培养支架。软骨细胞在这种支架内能表现出良好的生存能力、黏附性、再分化增殖能力, 在体外培养很长一段时间后, 软骨细胞仍能保持一定的表型, 意大利FIDIA先进生物聚合物公司已开发出直径40 μm的纤维无规则的透明质酸苄基酯无纺布Hyaff 11, 它可以作为三维支架构建组织工程软骨以修复关节软骨缺损^[8]。

1.3 壳聚糖 脱乙酰壳聚糖是自然界中广泛存在的天然壳聚糖的衍生物, 它最突出的优良特性之一是能够形成不同结构的高孔隙率材料^[9], 具有良好的理化生物特性, 通过改造修饰其侧链基团还可以赋予新的生物活性, 作为多糖类可以是软骨细胞良好的载体^[10]。Nettles等^[11]发现, 脱乙酰壳聚

糖支架可以较长时间维持软骨种子细胞与支架的黏附并保持其形态学特征。Griffon 等^[12]将壳聚糖种植软骨细胞后在生物反应器中培养 28 d 发现孔径率和孔径大小合适的材料可以产生较多的氨基葡聚糖 (GAG) 和 II 型胶原。

1.4 纤维蛋白凝胶 纤维蛋白凝胶是纤维蛋白单体在凝血酶作用下聚合成的具有可塑性、可黏附性、可降解性及生物相容性的立体网状结构凝胶,用这种凝胶包埋软骨细胞,为细胞的生存提供了三维空间支持;纤维蛋白凝胶的大小和形状能够根据需要而塑形,为组织工程化软骨提供了一种可选择的聚合物支架;来源于自身血液制备的纤维蛋白凝胶避免了免疫原性问题,可直接用于临床,具有取材简单、制备方便、韧性好等优点^[13]。将软骨细胞种植于不同的材料做对比研究,种植于纤维蛋白凝胶的软骨细胞增殖速度快于种植于聚乙醇酸 (PGA),其软骨细胞内 GAG 的 DNA 含量比种植于琼脂糖的少,但多于种植于壳聚糖和 I 型胶原的^[14]。

1.5 藻酸盐 藻酸钠又名海藻酸钠,是一种从海藻中提取的线状多糖,与软骨基质成分蛋白多糖结构相似,对机体无毒性、无免疫原性。关节软骨细胞包埋于藻酸盐串珠中培养可以维持软骨细胞的表型稳定^[15],有学者^[16]将兔关节软骨细胞复合藻酸盐材料培养,并修复兔关节软骨缺损取得了良好的效果。

1.6 脂肪聚酯 化学合成生物降解高分子材料中研究最多、应用最广的是脂肪聚酯,特别是聚乳酸 (PLA)、PGA 及其共聚物聚羟乙酸-乳酸 (PLGA)、聚 ε-己内酯 (PCL) 等。Vacanti 等^[17]最先报道将 PGA、PLA 作为软骨细胞体外培养基质材料,通过组织工程方法得到了新生软骨。刘建国等^[18]以聚己内酯、聚乳酸共聚物 (PCL/PLA) 作为细胞外基质,体外培养兔骨髓软骨细胞,实验发现, PCL、PLA 共聚物具有良好的表面活性,可作为组织工程骨髓软骨细胞的体外培养载体,是理想的细胞外基质替代物。最近研究发现^[19]PGA 复合猪的软骨细胞培养 28 d 后,基质中的软骨细胞数量多于正常的软骨组织, DNA 和 GAG 均较多地聚集,将鼠肋软骨细胞种植于 PLGA 材料,培养后呈现软骨组织表型:有软骨陷窝形成和 II 型胶原的表达^[20]。

1.7 聚 1,8-辛二酰枸橼酸盐 (POC) 日本最近研究一种新型材料,可吸收橡胶 POC,可以维持软骨细胞表型,与软骨细胞复合培养 28 d 形成软骨组织^[21]。

1.8 复合材料 将合成或天然材料复合也是提高材料性能的重要方法。聚氧化乙烯 (PEO)、聚乙烯醇 (PVA) 或胶原、纤维蛋白凝胶等具有良好的亲水性和细胞相容性,与聚酯复合可以改善后者的亲水性,促进软骨细胞及基质的均匀分布以及 GAG 的合成, PLGA 能增强胶原的机械强度,避免其形变。胶原海绵与 PLGA 复合时,胶原海绵促进细胞的黏附,提高细胞在 PLGA 微孔中的种植效率,细胞不断分泌基质,充满微孔,培养 6 周仍然可以保持细胞的圆形形态^[22]。硫酸软骨素与 I 型胶原或壳聚糖复合则能模拟软骨基质含 GAG 的环境,有利于软骨细胞保持表型以及增殖的基质合成。胶原和羟磷灰石复合作为支架材料有更强的机械性能,软骨细胞在 24 h 之内进入微孔并开始增生,细胞可以贴附在微孔的壁上,呈现圆形的细胞形态并分泌细胞外基质^[23]。把透明质酸、壳聚糖

和胶原混合制成复合材料,其机械强度、抵制酶消化的能力以及含水能力均优于未复合单种材料,软骨细胞在该三维材料上培养 21 d 后,测定 GAG 和 II 型胶原的含量均较在胶原上培养形成的量多^[24]。Li 等^[25]用藻酸盐和壳聚糖的复合三维多孔材料可以促进细胞的增殖,增加软骨细胞 HTB-94 的表达。经透明质烷改良的 PLGA 多孔材料,可以增进软骨细胞的黏附, GAG 和总胶原的合成增加^[26]。

2 无支架条件下构建组织工程软骨

体外无支架培养技术主要有:单层细胞培养技术、聚集培养技术、沉淀培养技术。最初人们用细胞体外单层传代培养的方法,发现细胞的表型很快丢失,细胞向成纤维细胞转化, II 型胶原表达减少,并诱导出 I 型胶原的表达^[27]。但当高密度单层培养细胞时可以不断形成基质,将高密度关节软骨细胞接种于培养瓶内,8 周时形成软骨张弹模量为 13 MPa 达软骨中间部分水平,而胶原密度是正常软骨的一半^[28]。由于细胞在高密度时会形成可见的聚集物,通常称为聚集培养,余方圆等^[29]用酶消化法分离成年兔关节软骨细胞,分别低密度和高密度聚集培养,结果低密度培养时细胞表型在 3 代以后大部分丢失,而聚集培养时软骨细胞去分化减慢,3 代后的去分化细胞再行聚集培养,细胞表型部分恢复,从而证明聚集培养有利于维持软骨细胞表型,原代细胞聚集培养或传代以后聚集培养是较好地获取大量优良软骨细胞的培养方式。软骨细胞也可以在不同的底物表面培养,如 II 型胶原及各种的水凝胶等, Darling 等^[30]发现在聚集蛋白聚糖表面培养的软骨细胞比在 II 型胶原和培养板表面培养更优越,将在 II 型胶原培养基上已经去分化的软骨细胞重新植入聚集蛋白聚糖培养基表面,细胞由成纤维细胞表型重新转向软骨细胞表型,为组织工程软骨的构建提供新的方法。高浓度的细胞可以悬浮在各种水凝胶的表面,与底物表面不接触,而聚集形成可见的聚集物。Jerry 在琼脂糖培养板上接种软骨细胞,12 周后形成的组织外观与正常软骨组织相似, GAG 的干重达正常软骨中的 2/3,胶原干重含量达到正常软骨的 1/3,机械强度达到正常软骨组织的 1/3 多^[31]。离心管内沉淀培养首先由 Kato 等^[32]于 1988 年建立,软骨细胞在离心管内低速离心,形成团块后培养,形成软骨样的组织,随后有实验观察到离心管内沉淀软骨细胞进行培养时,产生较多与软骨组织相似的基质^[33]。杨志明^[34]应用无支架离心管培养技术构建组织工程化软骨,收集软骨细胞离心 5 min,形成的细胞团块在离心管内培养,至第 3 周时直径从 1 mm 增至 8 mm,团块外观透明,帽状,类似软骨组织,组织学观察呈软骨样组织,未见钙化, II 型胶原 mRNA 的表达与正常胚胎软骨相似。

在体外应用支架和无支架技术构建组织工程软骨是软骨组织工程的两个主要方向,而两种方法又各有其优缺点,材料可以任意塑形,但材料降解性能、降解产物毒性等问题有待考验,后者技术简便、设备简单,避开了材料的负面影响,但是生成的工程化软骨形状固定,大小较有限,需要更深入的研究。

参考文献

- 1 Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels Cell

- 1982, 30(1): 215-224.
- 2 Suzuki T, Bessho K, Fujimura K, et al Regeneration of defects in the articular cartilage in rabbit temporomandibular joints by bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2002, 40(3): 201-206
 - 3 Diluch DR, Jordan LC, Mierisch CM, et al Matrix stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defect. *Arthroscopy* 2000, 16(6): 571-577.
 - 4 Dorotka R, Toma CD, Binderreiter U, et al Characteristics of ovine articular chondrocytes in a three dimensional matrix consisting of different crosslinked collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005, 72(1): 27-36.
 - 5 Stark Y, Suck K, Kasper C, et al Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Exp Toxicol Pathol* 2006, 57(4): 305-311.
 - 6 Mukaida T, Urabe K, Nause K, et al Influence of three dimensional culture in a type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. *J Orthop Sci* 2005, 10(5): 521-528.
 - 7 Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, et al Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater Res* 1998, 42(2): 172-181.
 - 8 Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, et al Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff 11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials* 2001, 22(17): 2417-2424.
 - 9 Suh K, Mathew HW. Application of chitosan based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000, 21(24): 2589-2598.
 - 10 郭亭, 赵建宁. 关节软骨缺损的治疗进展. *医学研究生学报*, 2004, 17(8): 744-748.
 - 11 Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng* 2002, 8(6): 1009-1016.
 - 12 Griffon DJ, Sedighi MR, Schaeffer DV, et al Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater* 2006, 2(3): 313-320.
 - 13 Peretti GM, Randolph MA, Zaporozhan V, et al A biomechanical analysis of an engineered cell scaffold implant for cartilage repair. *Ann Plast Surg* 2001, 46(5): 533-537.
 - 14 Moutw J, Case ND, Guldberg RE, et al Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, 13(9): 828-836.
 - 15 Damm C, Fay J, Schunke M, et al Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure. *Orthopade* 2000, 29(2): 91-99.
 - 16 Yu FY, Lu SB, Zhao B, et al Joint resurfacing using allograft chondrocytes embedded in alginate gel. *Chin Med J* 2006, 86(13): 886-890.
 - 17 Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plant Surg* 1994, 21(3): 445-462.
 - 18 刘建国, 徐执扬, 齐欣, 等. 三维多孔生物降解活性支架材料在软骨组织工程中的应用. *国外医学: 骨科学分册*, 2001, 22(1): 45-47.
 - 19 Griffon DJ, Sedighi MR, Schaeffer DV, et al Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater* 2006, 2(3): 313-320.
 - 20 Baek CH, Lee JC, Jung YG, et al Tissue engineered cartilage on biodegradable macroporous scaffolds: cell shape and phenotypic expression. *Laryngoscope* 2002, 112(6): 1050-1055.
 - 21 Kang Y, Yang J, Khan S, et al A new biodegradable polyester elastomer for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2006, 77(2): 331-339.
 - 22 Chen G, Sato T, Ushida T, et al Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng* 2004, 10(3-4): 323-330.
 - 23 Lu H, Cai D, Fen Z, et al Culture of chondrocytes using collagen hydroxyapatite composite scaffolds in vitro. *Chin J Rapid Reconstr* 2006, 20(2): 144-147.
 - 24 Yan J, Li X, Liu L, et al Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2006, 34(1): 27-39.
 - 25 Li Z, Zhang M. Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005, 75(2): 485-493.
 - 26 Yoo HS, Lee EA, Yoon JJ, et al Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2005, 26(14): 1925-1933.
 - 27 Kinoshita M, Yashiki S, Ota Y, et al Subculture of chondrocytes on a collagen type I-coated substrate with suppressed cellular dedifferentiation. *Tissue Eng* 2005, 11(3-4): 597-608.
 - 28 Fedewa MM, Oegema TR Jr, Schwartz MH, et al Chondrocytes in culture produce a mechanically functional tissue. *J Orthop Res* 1998, 16(2): 227-236.
 - 29 余方圆, 卢世璧. 兔关节软骨细胞聚集培养的生物学性状观察. *中华外科杂志*, 2006, 44(12): 848-851.
 - 30 Darling EM, Athanasiou KA. Retaining zonal chondrocyte phenotype by means of novel growth environments. *Tissue Eng* 2005, 11(3-4): 395-403.
 - 31 Hu JC, Athanasiou KA. A self-assembling process in articular cartilage tissue engineering. *Tissue Eng* 2006, 12(4): 969-979.
 - 32 Kato Y, Iwanobu M, Koike T, et al Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes. Regulation by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85(24): 9552-9556.
 - 33 Stewart MC, Saunders KM, Burton-Wurster N, et al Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res* 2000, 15(1): 166-174.
 - 34 杨志明. 应用无支架离心管培养技术构建组织工程化关节软骨. *中华骨科杂志*, 2000, 20(9): 521-524.

(收稿日期: 2007-04-28 本文编辑: 王玉蔓)