

重组碱性成纤维细胞生长因子/I型胶原复合材料修复兔半月板无血运区软骨损伤**

尤 微, 熊建义, 曹清丽, 王大平, 肖德明

Recombinant basic fibroblast growth factor/type I collagen composite materials repair meniscal cartilage injuries in avascular zone of rabbits

You Wei, Xiong Jian-yi, Cao Qing-li, Wang Da-ping, Xiao De-ming

Abstract

BACKGROUND: Meniscal cartilage injury in the avascular zone is not greatly influenced by alone application of recombinant basic fibroblast growth factor (rbFGF), which may be associated with *in vivo* absorption and degradation. At recent years, collagen type I has been increasingly applied as a biological carrier.

OBJECTIVE: To study the effect of rbFGF/collagen type I composite materials used in repairing meniscal cartilage injuries of rabbits.

METHODS: A total of 36 healthy New Zealand rabbits were randomly divided into three groups, including blank control group, rbFGF group and rbFGF/collagen type I group. Models of meniscus injuries in avascular area were established in rabbits. The animals were killed in 2, 6, 12 weeks postoperatively, and meniscus were taken and observed both grossly and microscopically.

RESULTS AND CONCLUSION: No significant healing effect was seen in rbFGF group, but proliferation promoting reaction on fibroblasts in synovial membrane at the margin of menisci did exist. The lesion within the avascular portion of the meniscus could be healed by using rbFGF/collagen type I. The reparative tissue was fibrocartilaginous which was different from the normal tissue. Results show a potential effective method of the avascular meniscal injuries repaired by the composite of rbFGF and collagen type I.

You W, Xiong JY, Cao QL, Wang DP, Xiao DM. Recombinant basic fibroblast growth factor/type I collagen composite materials repair meniscal cartilage injuries in avascular zone of rabbits. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(34): 6293-6296. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 单独应用重组碱性成纤维细胞生长因子对无血运区半月板损伤的愈合无明显影响, 考虑主要与其在体内易被吸收和降解等有关。近年来 I 型胶原作为生物性载体的应用逐渐增多。

目的: 观察重组碱性成纤维细胞生长因子/I 型胶原复合材料修复兔半月板软骨损伤的效果。

方法: 选用健康新西兰大白兔 36 只, 首先在兔半月板上造成统一的无血运区损伤模型。随机分为空白对照组、重组碱性成纤维细胞生长因子组和重组碱性成纤维细胞生长因子/I 型胶原组。术后 2、6、12 周分批处死实验动物, 进行大体形态观察和组织学检查。

结果与结论: 重组碱性成纤维细胞生长因子组对无血运区损伤愈合无明显影响, 但对半月板边缘滑膜中成纤维细胞有明显的促增殖作用; 重组碱性成纤维细胞生长因子/I 型胶原组表现为纤维软骨样组织愈合, 但其愈合组织与正常半月板组织仍有差异。结果表明应用重组碱性成纤维细胞生长因子/I 型胶原复合型材料治疗半月板无血运区的损伤是一种有效的治疗方法。

关键词: 半月板; 软骨; 损伤; 重组成纤维细胞生长因子; I 型胶原

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.34.006

尤微, 熊建义, 曹清丽, 王大平, 肖德明. 重组碱性成纤维细胞生长因子/I 型胶原复合材料修复兔半月板无血运区软骨损伤 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(34):6293-6296. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

膝关节半月板损伤在临床上十分常见, 由于半月板在血运及力学环境方面的特点, 采用修补术治疗临床指征有限, 大量临床病例证明半月板部分或全切除术后将导致膝关节骨性关节炎, 并有发生韧带松弛及膝关节不稳定等并发症的可能^[1]。半月板中内部分无血液供应, 其营养主要来自滑液, 只有与胫骨缘连接的边缘部分(外围的10%~30%)能从滑膜得到

血液供应^[2]。如何促进半月板无血运区损伤愈合就成为膝关节创伤治疗的热点问题之一。半月板是典型的致密结缔组织, 细胞成分少, 富含 I 型胶原, 因此本实验采用 I 型胶原复合重组碱性成纤维细胞生长因子 (recombinational basic fibroblast growth factor, rbFGF) 治疗兔半月板无血运区的损伤, 取得了较满意的结果。

1 材料和方法

设计: 对比观察实验。

Department of Orthopedic Trauma, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China

You Wei★, Master, Attending physician, Department of Orthopedic Trauma, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China
uv1997@139.com

Correspondence to: Xiong Jian-yi, Master's supervisor, Professor, Chief physician, Department of Orthopedic Trauma, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China
jianyixiong@126.com

Supported by: Science and Technology Projects of Shenzhen City, No. 200902033*

Received: 2010-04-13
Accepted: 2010-05-31

深圳市第二人民医院创伤骨科, 广东省深圳市 518035

尤微★, 男, 1979 年生, 汉族, 2008 年广州医学院毕业, 主治医师, 主要从事骨创伤及组织工程方向的研究。
uv1997@139.com

通讯作者: 熊建义, 硕士生导师, 教授, 主任医师, 深圳市第二人民医院创伤骨科, 广东省深圳市 518035
jianyixiong@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)34-06293-04

收稿日期: 2010-04-13
修回日期: 2010-05-31
(20100413006/M·Y)

时间及地点: 实验于2009-08/2010-02在深圳市第二人民医院组织工程实验室完成。

材料:

实验动物: 新西兰大白兔36只, 雌雄不限, 体质量2.0~3.0 kg, 由南方医科大学实验动物中心提供。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[3]。

实验材料: rbFGF由上海博升生物科技有限公司提供; 凝血酶由珠海经济特区生物化学制药厂生产; I型胶原溶液由广州市创尔生物技术有限公司生产。

方法:

rbFGF/I型胶原复合物的制备: 分别用2 mL等渗盐水溶解rbFGF 20 μg, 使rbFGF质量浓度为10 mg/L, 吸入注射器备用; 取另一注射器吸入等量I型胶原溶液; 两注射器分别连接三通管两头(另一头接自制注射器针头)。治疗时, 将两注射器同时匀速推注, 注射于治疗部位。

动物实验: 健康成年新西兰大白兔36只, 随机将兔分成3组, 分别为空白对照组、rbFGF组、rbFGF/I型胶原组。2.5%戊巴比妥钠(2.5 mg/kg)静脉全麻; 取双膝关节韧带内侧弧形切口, 沿髌骨内上缘至胫骨结节处切开皮肤, 用自制的半月板拉钩显露内侧半月板前角、体部及股骨髁软骨面; 用镰状刀片于内侧半月板前角和体部中央做一个长0.7 cm、宽0.3 cm的全层裂伤, 然后将rbFGF/I型胶原复合物一次性注入裂口, 至填充剂与半月板表面相平为止; rbFGF组每只兔每天每侧膝关节注射1 mL rbFGF 2.0 mg/L, 连续3周。空白对照组不用任何填充处理。分别于术后2, 6, 12周处死动物, 每组每个时间点4只共8个半月板, 行大体形态观察和组织学检查。

主要观察指标: 将半月板标本进行大体形态观察后, 再置入体积分数为10%甲醛溶液中固定1~3 d, 然后进行脱水、石蜡包埋, 标本采用苏木精-伊红染色, 光镜检查。

设计、实施、评估者: 全体作者共同完成, 评估采用盲法。

2 结果

2.1 大体观察 观察3组36只兔手术侧膝关节无切口感染及关节积液, 无半月板与关节面软骨粘连; 空白对照组、rbFGF组半月板裂口均未愈合, 未见组织填充; rbFGF/I型胶原组的全部半月板伤口均已被组织填充。

愈合组织的颜色较正常半月板组织深, 裂口较术前变窄, 其表面稍向内陷, 愈合组织与邻近半月板组织粘连紧密。

2.2 组织学检查

空白对照组: 术后2~12周共观察半月板24个, 各观察期裂口均未见愈合, 其边缘无软骨细胞增殖。

rbFGF组: 术后4周, 半月板裂口均未见愈合, 其边缘无软骨细胞增殖, 亦无软骨同源细胞群。术后12周, 半月板边缘滑膜中成纤维细胞、滑膜细胞明显增生, 血管也见增生。但裂口均未见愈合。见图1。

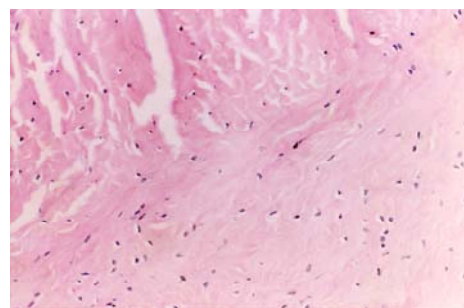


Figure 1 In recombinant basic fibroblast growth factor group 12 weeks postoperatively, the fibroblast and synovial cells proliferated significantly, angiogenesis could be seen. Healing of gap was not obviously (Hematoxylin-eosin staining, ×100)
图1 rbFGF组术后12周, 见成纤维细胞、滑膜细胞明显增生, 血管增生。裂口愈合不明显(苏木精-伊红染色, ×100)

rbFGF/I型胶原组: 术后2周见缺损为红色的胶原蛋白组织填充, 充满整个缺损区, 亦可见少量成纤维细胞样细胞; 术后6周, 镜下见缺损内被胶原纤维组织填充, 成纤维细胞为其主要的细胞成分; 术后12周, 所有缺损均被纤维软骨样组织填充。可见软骨细胞特有的软骨陷窝及软骨囊, 但修复的组织与邻近的正常半月板组织仍存在差异, 愈合组织中仍可见成纤维细胞样细胞。见图2, 3。

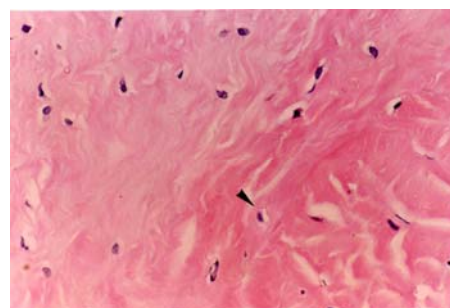


Figure 2 In recombinant basic fibroblast growth factor/collagen type I group 12 weeks postoperatively, healing of fibrocartilage could be seen (Hematoxylin-eosin staining, ×200)
图2 rbFGF/I型胶原组术后12周, 可见纤维软骨愈合(苏木精-伊红染色, ×200)

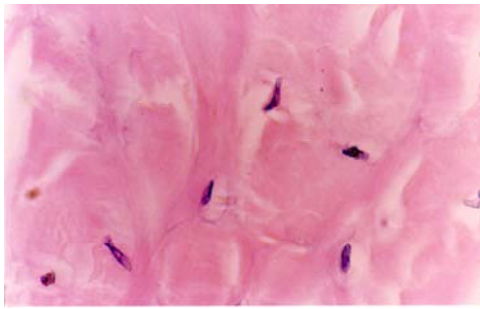


Figure 3 In recombinant basic fibroblast growth factor/collagen type I group 12 weeks postoperatively, fibrocartilage cells and fibroblasts could be seen in the callus (Hematoxylin-eosin staining, ×100)

图3 rbFGF/I 型胶原组术后 12 周, 愈合组织中可见纤维软骨细胞和成纤维细胞 (苏木精-伊红染色, ×100)

3 讨论

3.1 半月板无血运区损伤的转归 从实验结果可以看出, 空白对照组损伤的半月板, 在术后2~12周检查其裂口均未见愈合。此结果与国内外众多学者的研究结果一致, 即半月板无血运区损伤后, 不能自然愈合^[4]。

此外, Ghadially等^[5]的动物实验亦表明, 无论无血运区裂伤是否缝合, 在裂口处均无组织修复的反应, 电镜检查亦未提供半月板本身有修复的迹象。分析其不愈合的原因, 学者们考虑主要与以下因素有关: ①半月板游离缘75%~85%的区域没有血供, 不能给损伤的半月板提供修复所需的足够营养。②由于半月板软骨细胞本身的惰性以及创口处有丝分裂状态的软骨细胞数量较少, 使损伤处不能通过自身软骨细胞增殖、分泌基质和胶原纤维来填充缺损。③滑膜中的滑膜细胞在裂伤部位的积聚及演变可形成少量肉芽组织, 但由于细胞数量少, 滑液中没有纤维蛋白原, 不能形成纤维支架, 使新生的细胞不能移行生长, 且易被关节液冲洗掉, 达不到愈合的目的^[4]。

但近年的研究表明, 半月板并非一定是完全惰性的组织, 在一定的条件下, 半月板无血运区的损伤可产生纤维组织愈合^[6]。本实验中同样发现, 半月板无血运区损伤后4周, 裂伤边缘有少量的正常半月板组织的同源细胞群。之所以不能产生愈合, 考虑是因为进入分裂状态的细胞数少、所需营养不足, 起不到有效作用所致。因此, 作者认为, 半月板无血运区损伤不能自然愈合, 必须通过一定的外部条件因素来促使其愈合。

3.2 I 型胶原在半月板损伤愈合中的作用 I 型胶原是一种含糖蛋白质, 在自然界分布广泛, 主要分布在哺乳动物的结缔组织中, 作为多种组织如骨、皮肤、肌腱、血管及其他结缔组织的天然细胞外基质, 其结构非常有利于培养中细胞的黏附、增殖和分化, 能促使半月板纤维软骨细

胞尽早黏附、维持表型、形成集落, 并能刺激细胞分泌胶原等。

近年来, I 型胶原作为一种生物性载体的应用逐渐增多。有人研究了 I 型胶原作为某些骨生长因子(如骨形态发生蛋白)的生理释放系统, 证明可逐渐释放骨生长因子, 骨形态发生蛋白/I 型胶原可增强骨形态发生蛋白的诱导成骨活性^[7]。

胶原还被制成药物或生长因子缓释载体和基因治疗的载体, 更为重要的是, 胶原能为细胞的酶识别, 重塑及降解并为新生组织提供足够的空间, 胶原支架还能支持纤维血管组织长入, 而且外源性胶原还能刺激细胞分泌形成新的胶原基质^[8]。

半月板是典型的致密结缔组织, 细胞成分少, 富含 I 型胶原。从众多学者的研究结果可以预见 I 型胶原作为生物性支架载体在半月板、骨、皮肤、肌腱、血管等结缔组织修复中有着广阔的前景^[7,9-10]。

3.3 rbFGF/I 型胶原在半月板损伤愈合中的作用 近十几年的研究表明, rbFGF的作用范围十分广泛, 它有较强的诱导中胚层细胞转化为成纤维细胞的作用。通过体外细胞培养及动物体内实验证明, rbFGF在创伤愈合过程中起着重要的作用, 它能刺激创口内各类细胞的增殖, 这些细胞包括毛细血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和软骨细胞等。Forriol^[11]、Hoben等^[12]通过半月板软骨细胞培养证明, rbFGF能有效地刺激半月板软骨细胞内生成, 促进纤维软骨细胞进行有丝分裂及增殖作用。

本实验结果表明, rbFGF/I 型胶原复合物可增强 rbFGF的生物活性, 其实验结果比单用rbFGF的结果均要好, 可形成纤维软骨样愈合。但其愈合组织与正常半月板纤维软骨组织仍有差异, 其原因主要考虑为: ①半月板损伤愈合的观察时间不够长, 细胞尚未全部分化为成熟的纤维软骨细胞。②所给予的半月板损伤愈合的条件尚不完善, 如还需要其他生长因子的相互作用等。单独应用 rbFGF治疗半月板损伤, 发现对无血运区半月板的损伤愈合无明显影响, 考虑主要与半月板创口内无桥架材料以及 rbFGF无保护剂型及载体, 在体内易被吸收和降解等有关。

组织工程学材料主要是研究种子细胞、支架材料及细胞因子三方面问题, 本研究所探讨的是支架材料和细胞因子共同作用的复合型材料, 在后期的研究中, 将进一步引入种子细胞进行更深层次的研究, 以期能获得一种更理想的复合型组织工程材料。

4 参考文献

- [1] Webber RJ, Zitaglio T, Hough AJ Jr. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. J Orthop Res. 1988;6(1):13-23.
- [2] Wu ZD, Wu ZH. Beijing: People's Medical Publishing House. 2008: 786. 吴在德, 吴肇汉. 外科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 786.

- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [4] Stärke C, Kopf S, Petersen W, et al. Meniscal repair. Arthroscopy. 2009;25(9):1033-1044.
- [5] Ghadially FN, Wedge JH, Lalonde JM. Experimental methods of repairing injured menisci. J Bone Joint Surg Br. 1986;68(1):106-110.
- [6] Xiong JY, Wang DP, Chen QX, et al. Zhongguo Xiandai Shoushu Xue Zazhi. 2000;4(3): 191-192.
熊建义,王太平,陈其勋,等. 纤维蛋白粘合剂治疗半月板无血运区损伤的实验研究[J]. 中国现代手术学杂志, 2000, 4(3): 191-192.
- [7] Chang SC, Chung HY, Tai CL, et al. Repair of large cranial defects by hBMP-2 expressing bone marrow stromal cells: Comparison between alginate and collagen type I systems. J Biomed Mater Res A. 2010. [Epub ahead of print]
- [8] Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterials. 2000;21(5):431-440.
- [9] Chiari C, Koller U, Kapeller B, et al. Different behavior of meniscal cells in collagen II/I, III and Hyaff-11 scaffolds in vitro. Tissue Eng Part A. 2008;14(8):1295-1304.
- [10] Kasemkijwattana C, Kesprayura S, Chaipinyo K, et al. Autologous chondrocytes implantation with three-dimensional collagen scaffold. J Med Assoc Thai. 2009;92(10):1282-1286.
- [11] Forriol F. Growth factors in cartilage and meniscus repair. Injury. 2009;40 Suppl 3:S12-16.
- [12] Hoben GM, Athanasiou KA. Meniscal repair with fibrocartilage engineering. Sports Med Arthrosc. 2006;14(3):129-137.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 广东省深圳市科技计划项目(200902033)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 由于半月板无血运区解剖的特殊性, 如何促进该区软骨组织的愈合就成为膝关节创伤治疗的热点问题, 课题的设计主要是通过组织工程研究的方法对促进愈合的相关细胞因子和支架材料进行研究, 以寻求一种新的方法来解决半月板无血运区软骨愈合的难题。

课题评估的“金标准”: 膝关节半月板无血运区愈合组织的病理组织切片中可见纤维软骨细胞和成纤维细胞及纤维软骨愈合。

设计或课题的偏倚与不足: 实验着重于动物基础实验, 若应用于临床治疗还需进一步研究。如果通过干细胞诱导分化为软骨细胞, 可更好地促进半月板无血运区软骨的修复。

提供临床借鉴的价值: 课题所得结论在膝关节半月板无血运区损伤的临床治疗中将会有重要的参考价值。

CRTER 杂志眼科方面生物材料研究的发稿方向: 本刊学术部

- | | | |
|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| ○ 人工角膜孔隙性支架材料的研究 | 培养研究 | ○ 眼眶重建修复材料的研究与应用进展 |
| ○ 水凝胶义眼台的生物相容性研究进展 | ○ 钛板联合羟基磷灰石人工骨眼眶重建 | ○ 人工晶状体光学材料对后囊膜混浊影响的荟萃分析 |
| ○ 不同生物材料人工晶体与后囊混浊相互关系的meta分析 | ○ 聚乳酸-碳酸酯共聚物作为视网膜脱离手术可吸收性填充材料的实验研究 | ○ 高密度多孔聚乙烯材料行眶缘凹陷充填再造术 |
| ○ 在爆裂性眼眶骨折修复中羟基磷灰石复合体应用的意义 | ○ 脱细胞生物材料及其在眼部的临床应用 | ○ 可吸收性复合材料修复羊眼眶下壁缺损的实验研究 |
| ○ 组织工程角膜支架材料 | ○ 异种巩膜及类似生物材料的研究 | ○ 异种角膜脱细胞基质和几丁糖载体构建角膜基质层的比较 |
| ○ 异种巩膜作巩膜上加压材料的实验研究 | ○ 海洋生物材料在眼科的应用及免疫学研究 | ○ 人工晶状体表面修饰技术研究 |
| ○ 注入型人工晶状体材料的合成 | ○ 聚乙烯醇-海藻酸钙-透明质酸复合水凝胶材料的含水特性 | ○ 明胶固定改性壳聚糖膜的制备与性能表征 |
| ○ 人工角膜的应用研究 | ○ 青光眼中生物材料应用研究 | ○ 羟基磷灰石及其聚合物复合材料在眼科的应用 |
| ○ 不同材料人工晶状体硅油黏附的比较 | ○ 不同种类人工晶状体在眼内位移产生的人工晶状体眼调节变化 | ○ 表面修饰人工晶状体的生物学性状 |
| ○ 不同高分子生物材料抑制小梁切除后瘢痕的形成 | ○ 不同材料眶内植入物在眼窝重建中的应用 | ○ 人工合成生物降解材料聚乳酸在眼科的应用 |
| ○ 脱细胞角膜材料的生物相容性研究 | ○ 后房型人工晶体植入有晶体眼矫正高度近视的安全性及稳定性 | ○ 新型可降解支架材料植入角膜的生物学反应研究 |
| ○ 钛板与羟基磷灰石复合人工骨在眼眶重建中的应用研究 | 高密度多孔聚乙烯材料矫正下眼睑退缩的临床观察 | ○ 羟基磷灰石微粒人工骨在眶骨整形中的应用 |
| ○ 组织工程角膜的研究现状和存在的问题 | 羟基磷灰石复合人工骨板修复眼眶内下壁爆裂性骨折 | |
| ○ 壳聚糖植入兔角膜的生物学反应 | 复合抗生素的人工骨及异体骨材料 | |
| ○ 人工角膜的新发展与新模型的临床评估 | | |
| ○ 兔角膜基质细胞在壳聚糖胶原共混膜体外 | | |