

人关节软骨源性海绵的制备和评估^{☆◇}

张建党¹, 卢世璧^{◇2}, 袁 玫², 黄靖香², 孙明学², 赵 斌²

Preparation and evaluation of human articular cartilage-derived sponge

Zhang Jian-dang¹, Lu Shi-bi², Yuan Mei², Huang Jing-xiang², Sun Ming-xue², Zhao Bin²

Abstract

BACKGROUND: The repair of articular cartilage remains one of the most challenging topics in orthopedic research. Tissue engineering may be a promising way to restore functional hyaline cartilage of joints. Scaffold is one of the main elements in tissue engineering.

OBJECTIVE: To prepare human articular cartilage-derived sponge so as to provide a novel cartilage tissue engineering scaffold.

METHODS: Human articular cartilage-derived sponge was prepared using human articular cartilage. Human articular cartilage derived sponge was investigated by scanning electron microscope. Its porosity was detected by mercury intrusion porosimetry, and average pore diameter was determined by using scanning electron microscope image analysis system.

RESULTS AND CONCLUSION: Human articular cartilage-derived sponge presented with good anti-discreteness, with 100–200 μm pore diameter and 92% porosity. Human articular cartilage derived-sponge possessed the characteristics that afford it as a potential scaffold for cartilage tissue engineering.

Zhang JD, Lu SB, Yuan M, Huang JX, Sun MX, Zhao B. Preparation and evaluation of human articular cartilage-derived sponge. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41): 7617-7620.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 关节软骨损伤后的修复是目前骨科领域的难点之一, 组织工程的发展应用为关节软骨损伤的修复展示了诱人前景, 然而理想的支架却是组织工程软骨的成功构建的关键。

目的: 制备人关节软骨源性海绵, 为组织工程软骨提供合适的新型支架。

方法: 应用人关节软骨制备人关节软骨源性海绵。应用扫描电镜观察对人关节软骨源性海绵进行大体和微观观察, 观察人关节软骨源性海绵在紫外线照射前后的抗离散情况, 并采用压汞法测定其孔径和孔隙率。

结果与结论: 人关节软骨源性海绵的抗离散性能良好, 孔径大小在 100~200 μm, 孔隙分布均匀, 孔隙率为 92%。结果表明人关节软骨源性海绵具有良好的结构和孔隙率, 可作为软骨组织工程支架。

关键词: 关节软骨; 海绵; 支架; 组织工程; 胰蛋白酶

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.005

张建党, 卢世璧, 袁玫, 黄靖香, 孙明学, 赵斌. 人关节软骨源性海绵的制备和评估[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7617-7620. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Orthopaedics, the 306 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China;
²Institute of Orthopaedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Zhang Jian-dang[☆], Doctor, Associate professor, Department of Orthopaedics, the 306 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China
zhangjd1972@126.com

Received: 2010-04-06
Accepted: 2010-05-11

0 引言

骨关节炎、类风湿性关节炎或老年伴发的关节软骨病变甚为常见, 而关节软骨损伤后自身修复的能力极差, 目前尚无理想的治疗方法^[1]。近年来, 组织工程的发展应用为关节软骨损伤的修复展示了诱人前景。理想的支架是组织工程成功构建的关键一环^[2]。从仿生学角度分析, 无论合成材料或天然材料, 均不具备细胞外基质的功能和作用^[3], 因此, 研制新型拟生态的支架材料是组织工程支架材料的趋势之一。本实验应用人关节软骨拟制备出人关节软骨源性海绵, 以期能为软骨组织工程提供合适的新型支架。

1 材料和方法

设计: 单一样本实验

时间及地点: 于2003-06/2004-06在解放军总医院全骨骨科研究所完成。

材料: 人关节软骨来源于解放军总医院全骨骨科研究所, 实验已经过国家伦理委员会的批准。

主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
Triton X-100	德国 J.T.BAKER 化学试剂公司
胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
FD-1 冷冻干燥机	北京博医康技术公司
高速粉碎机	浙江温岭大德中药机械有限公司
标准筛	浙江上虞县纱筛厂

实验方法:

人关节软骨源性海绵的制备: 将人关节软骨用生理盐水冲洗干净后, 置入FD-1冷冻干燥机进行冻干处理12 h。经粉碎机粉碎, 筛取38~25 μm 大小的软骨微粒。加入10倍体积的0.25%胰蛋

¹解放军 306 医院骨科, 北京市 100101; ²解放军总医院骨科研究所, 北京市 100853

张建党[☆], 男, 1972 年生, 河南省尉氏县人, 汉族, 博士, 副教授, 主要从事关节外科、脊柱外科研究。
zhangjd1972@126.com

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2010)41-07617-04

收稿日期:2010-04-06
修回日期:2010-05-11
(2010221001/ZW · Z)

白酶, 在37 °C消化24 h。离心后弃去胰蛋白酶, 再加入10倍体积的1% Triton X-100振荡72 h。离心后弃去Triton X-100, 然后用蒸馏水反复清洗48 h。离心后弃去蒸馏水, 置入冷冻干燥机进行冻干处理12 h。经8-Watt 312 nm的紫外线照射8 h, 完成人关节软骨源性海绵的制备。

人关节软骨源性海绵的特征观察:

人关节软骨源性海绵的抗离散性观察: 先将玻璃平皿中盛2/3的蒸馏水, 置于脱色摇床上, 再分别放入未经紫外线照射的人关节软骨源性海绵和经紫外线照射的人关节软骨源性海绵, 将摇床打开, 置于1档的位置进行振荡摇动, 持续摇动3 min。观察人关节软骨源性海绵在紫外线照射前后的抗离散情况。

人关节软骨源性海绵的孔隙率测定: 采用压汞法测量。首先测定多孔材料的体积, 然后对多孔材料抽真空, 达到0.003 5 MPa的真空后, 把汞充到多孔体的周围, 再从外部对汞加压, 由0.003 5 MPa加到420 MPa, 记录加在汞上的压力和加压过程中进入孔中汞的体积, 进入孔中汞的体积除以多孔材料体积就可以测得孔隙率。

人关节软骨源性海绵的扫描电镜观察: 把体积分数75%乙醇用滤纸过滤后, 分装于洁净的5 mL玻璃瓶中, 然后把关节软骨源性海绵在体积分数75%乙醇内固定24 h, 进行环境扫描电镜观察。

人关节软骨源性海绵的平均孔径测定: 采用扫描电镜图像分析系统, 计算其孔径, 选取5个视野, 每视野测量10个孔径值。

设计、实施、评估者: 全部作者, 均受过专业培训。

主要观察指标: 人关节软骨源性海绵的大体观察; 人关节软骨源性海绵的微观结构; 人关节软骨源性海绵的抗离散情况; 人关节软骨源性海绵的孔径和孔隙率。

2 结果

2.1 大体观察 人关节软骨源性海绵呈淡黄色, 轻触之有弹性, 肉眼即可见到孔隙, 见图1。



Figure 1 Gross observation of articular cartilage-derived sponge
图1 关节软骨源性海绵大体观察

2.2 扫描电镜观察 人关节软骨源性海绵孔径大小及分布较均匀, 并且孔隙相通, 孔壁表面粗糙, 见图2。

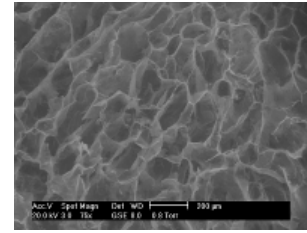


Figure 2 Scanning electronic microscopy showed that the scaffold had a sponge-like structure of high porosity
图2 关节软骨源性海绵扫描电镜图

2.3 人关节软骨源性海绵的抗离散观察 见图3。



a: Pre-oscillation of the sponge un-irradiated by ultra violet



b: Many particles appeared (white arrow) at 3 min after oscillation of the sponge un-irradiated by ultra-violet



c: Pre-oscillation of the sponge irradiated by ultra violet



d: No particles appeared at 3 min after oscillation of the sponge irradiated by ultra violet

Figure 3 Anti-discrete observation of human articular cartilage-derived sponge
图3 人关节软骨源性海绵的抗离散观察

未接受紫外线照射交联的关节软骨源性海绵在被放入蒸馏水后, 仅仅在开始摇荡五六秒时, 即见有碎粒脱离, 飘浮在蒸馏水中。随着摇荡时间的延长, 碎粒脱落越来越多(图3a, b)。而在接受紫外线照射后, 即便持续摇荡3 min, 仍未见到碎粒脱离(图3c, d)。

2.4 人关节软骨源性海绵的平均孔径测定 人关节软骨源性海绵的孔径在100~200 μm , 孔隙分布均匀。压汞法测量关节软骨源性海绵的孔隙率为92%。

3 讨论

目前, 已有多种生物材料被制备成不同结构的支架, 按照来源不同, 可将其分为合成高分子材料和天然材料两大类。与合成材料相比, 天然材料的生物相容性良好, 有利于种植其上的软骨细胞的生长和增殖^[4]。因此, 研制新型拟生态的支架材料是组织工程支架材料的趋势之一。国外有人把硫酸软骨素与I型胶原或壳聚糖复合^[4-5], 模拟软骨基质富含糖胺多糖的环境, 结果发现这类支架有利于软骨细胞保持表型、细胞增殖和基质合成。软骨特异性细胞外基质成分如II型胶原和糖胺多糖, 不论体外或体内, 在调节软骨细胞表型和支持软骨发生方面都起关键作用, II型胶原是对软骨细胞的发生、分化和迁移具有重要的诱导作用^[6], 有利于关节软骨的再生, 而糖胺多糖可促进软骨细胞的黏附和扩增^[6-8]。人关节软骨源性海绵是关节软骨源性微载体聚集而成, 关节软骨源性微载体以II型胶原为主, 含有少许糖胺多糖^[9], 与软骨细胞有体外相容性良好^[10], 因此, 人关节软骨源性海绵应是非常理想的组织工程软骨支架。

从材料科学和工程学角度来看, 组织可被认为由细胞和细胞外基质组成的细胞合成物。细胞外基质不仅为软骨细胞的增殖、代谢、基质合成和组织形成提供了立体环境, 还为细胞信号传导和细胞间相互作用起媒介作用, 而细胞合成它们独特的细胞外基质。在组织工程中, 人工细胞外基质, 即临时支架, 可作为模板引导新生组织的生成, 为细胞生长提供适宜的微环境, 有利于种子细胞的黏附生长, 维持细胞的分化状态, 不影响细胞的增殖^[6]。支架的设计应主要考虑载体材料的构型。如孔径尺寸、孔隙之间的连通性、材料内部的表面积等等。基质材料上的开孔有利于水分、无机盐以及其它营养物质和细胞代谢产物的运输和交换, 从而更有利于细胞的正常生长和生理代谢^[3]。因此, 为了进行多层细胞的体外培养, 如何制备三维多孔结构的细胞载体已成为材料科学研究的热点。

支架的孔径尺寸和孔隙率是评定支架好坏的标准之一, 如果孔径尺寸太小, 细胞难以进入支架内部, 仅仅在材料表面生长, 表面细胞密度过高, 细胞分泌基质后, 迁移受限, 不利于细胞的进一步扩增。如果孔径太

大, 细胞加载困难, 大部分细胞将流失, 细胞在孔内缺乏支撑或依附, 无法均匀生长^[5]。作者曾成功制备人关节软骨脱细胞基质, 但其孔隙率太低^[11]。关节软骨源性海绵的孔径大小在100~200 μm , 孔隙分布均匀, 孔隙率为92%, 符合理想的组织工程支架的要求。

为增强关节软骨源性海绵的力学性质, 有必要对其进行进一步交联。增强材料交联方法通常有两种, 一种是使用物理方法, 如紫外线交联法; 另一种为化学方法, 如戊二醛交联法^[12]。戊二醛是一种化学固定试剂, 对细胞的毒性很大, 考虑到残留的戊二醛所可能引起的细胞毒性, 近年来人们已逐渐转向研究其它的交联方法^[12-14]。研究已经证实紫外线照射交联法可以降低胶原的降解速率、提高力学性能^[15]。基于以上原因, 本实验选择了紫外线照射交联法。把关节软骨源性海绵在紫外线灯下直接照射8 h即可, 该方法安全、方便、价廉。经抗离散实验证实经过紫外线照射交联的关节软骨源性海绵的抗离散性能得到明显增强。

综上所述, 本实验成功制备了人关节软骨源性海绵, 其具有良好的结构和孔隙率, 可作为软骨组织工程支架。在随后的实验中, 本课题将研究人关节软骨源性海绵构建组织工程软骨的可行性。

4 参考文献

- [1] Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(6):432-463.
- [2] O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(12):1795-1812.
- [3] Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*. 2005;9:23-32.
- [4] van Susante JL, Pieper J, Buma P, et al. Linkage of chondroitin sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials*. 2001;22(17): 2359-2369.
- [5] Sechrist VK, Miao YJ, Niyibizi C, et al. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: A novel biocompatible and biodegradable materials to support chondrogenesis. *J Biomed Mater Res*. 2000;49(4):534-541.
- [6] Pieper JS, van der Kraan PM, Hafmans T, et al. Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering. *Biomaterials*. 2002;23(15):3183-3192.
- [7] Zhang Y, Zhang M. Synthesis and characterization of macro-porous chitosan/ calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(3):304-312.
- [8] Denuziere A, Ferrier D, Damour O, et al. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials*. 1998;19(14):1275-1285.
- [9] Zhang JD, Lu SB, Yuan M, et al. *Zhonghua Guke Zazhi*. 2006; 26(1):43-46. 张建党, 卢世璧, 袁玫, 等. 人关节软骨源性微载体的制备[J]. *中华骨科杂志*. 2006;26(1):43-46.
- [10] Zhang JD, Lu SB, Yuan M, et al. *Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi*. 2005;7(9):844-847. 张建党, 卢世璧, 袁玫, 等. 关节软骨源性微载体与软骨细胞的体外相容性[J]. *中华创伤骨科杂志*. 2005;7(9):844-847.
- [11] Zhang JD, Lu SB, Yuan M, et al. Preparation of human articular cartilage acellular matrix. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2005;9(14):242-243. 张建党, 卢世璧, 袁玫, 等. 人关节软骨脱细胞基质制备实验[J]. *中国组织工程研究与临床康复*. 2005;9(14):242-243.
- [12] Huang-lee LL, cheung DT, Nimni ME. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. *J Biomed Mater Res*. 1990; 24(9):1185-1201.
- [13] van Luyn MJ, van Wachem PB, Olde Damink LH, et al. Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure to human fibroblasts. *Biomaterials*. 1992; 13(14): 1017-1024.

[14] Yao CH, Sun JS, Lin FH, et al. Biological effects and cytotoxicity of tricalcium phosphate and formaldehyde cross-linked gelatin composite. Mater Chem Phys. 1996;45(1):6-14.

[15] Weadock K, Miller E, Bellincampi L, et al. Physical cross-linking of collagen fibers: comparison of ultra-violet irradiation and dehydrothermal treatment. J Biomed Mater Res. 1995;29(11): 1373-1379.

来自本文课题的更多信息--

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: 成功制备一种新型的软骨组织工程支架-人关节软骨源性海绵, 为组织

工程软骨的构建提供一种新的方法。

提供临床借鉴的价值: 人关节软骨源性海绵是关节软骨源性微载体聚集而成, 关节软骨源性微载体以 II 型胶原为主, 含有少许糖胺多糖, 与软骨细胞有体外相容性良好, 因此, 人关节软骨源性海绵应是非常理想的

组织工程软骨支架。本研究制备的人关节软骨源性海绵的孔径大小在 100~200 μm, 孔隙分布均匀, 孔隙率为 92%, 符合理想的组织工程支架的要求, 为临床基础研究, 临床前景良好, 但尚需要进一步的动物实验和临床试验证实。

每期专题: 椎间盘退变机制与椎间盘组织工程分析^①

- 1 人正常椎间盘髓核细胞体外不同培养代次的生物学性状分析: 适应于组织工程椎间盘种子细胞的选择
- 2 体外培养人正常椎间盘髓核细胞与退变髓核细胞的生物学性状比较: 可以为干预退变髓核细胞提供最佳时机吗?
- 3 过氧化物酶 II 对体外培养人退变腰椎间盘髓核细胞的抑制作用
- 4 兔椎间盘成骨作用中的转基因人骨形态发生蛋白 7
- 5 雌激素影响去势雌兔腰椎间盘髓核中白细胞介素 20 和基质金属蛋白酶 3 的表达?
- 6 局部生物力学因素在 L5/S1 椎间盘突出症发病中的作用
- 7 转化生长因子 β 1 基因 509C/T 多态性与腰椎间盘突出症血瘀证及椎间盘退变程度的关联研究
- 8 骨形态发生蛋白 2 基因转染软骨细胞注入腰椎间盘损伤模型: 10 周测量蛋白多糖和胶原含量
- 9 纤维环穿刺法与纤维环切开法建立兔椎间盘退变模型

1 人正常椎间盘髓核细胞体外不同培养代次的生物学性状分析: 适应于组织工程椎间盘种子细胞的选择

叶冬平 (暨南大学第四附属医院, 广州市红十字会医院, 广东省广州市 510220)

基金资助: 广州市医药卫生重点项目 (2008-ZDi-15), 广州市医药卫生重点项目 (2009-ZDi-04)。

推荐理由: 通过体外构建组织工程椎间盘的方法治疗椎间盘退行性疾病已经成为目前脊柱领域研究的新方向。髓核细胞是组织工程椎间盘种子细胞的主要来源之一, 但体外培养条件下, 细胞会随着传代次数的增多出现“去分化”现象, 因此, 种子细胞的选择必须有一定的限制。目前用作组织工程椎间盘研究的种子细胞主要来源于体外培养的髓核细胞, 而体外培养的髓核细胞传至一定代次后即出现老化现象, 老化的细胞失去生长能力不适于组织工程研究。

实验通过对人髓核软骨样细胞进行体外培养和生物学特性观察, 比较不同代次髓核细胞的形态学、增殖特性, 以及细胞的主要细胞外基质成分基因表达情况, 从而为种子细胞的选择提供依据。见 2010 年 24 期 4376-4379 页。

2 体外培养人正常椎间盘髓核细胞与退变髓核细胞的生物学性状比较: 可以为干预退变髓核细胞提供最佳时机吗?

梁伟国 (暨南大学第四附属医院, 广州市红十字会医院, 广东省广州市 510220)

基金资助: 广州市医药卫生重点项目 (2008-ZDi-15), 广州市医药卫生重点项目 (2009-ZDi-04)。

推荐理由: 美国的最新研究统计显示, 因下腰痛造成的直接医疗支出和间接损失保守估计为每年 196 亿美元, 给社会医疗带来沉重负担。椎间盘退行性变是引起下腰痛的主要原因, 它与坐骨神经痛和椎间盘突出、脱垂等疾病关系密切。人体椎间盘是一个承受载荷却又缺乏

血管的结构, 因而容易发生退行性变。作者通过对人正常椎间盘髓核细胞与退变髓核细胞的培养及生物学性状比较分析, 观察其生物学特性, 为研究椎间盘退变机制、椎间盘组织工程学、基因治疗等提供理论基础。见 2010 年 28 期 5155-5158 页。

3 过氧化物酶 II 对体外培养人退变腰椎间盘髓核细胞的抑制作用

刘玉林 (南方医科大学附属珠江医院骨科, 广东省广州市 510282)

推荐理由: 目前广泛认为椎间盘退变是细胞学和生物化学因素共同作用的结果, 椎间盘退变主要表现为髓核细胞数量的减少和细胞外基质合成的减少。随着椎间盘变性的发生, 细胞外基质合成下降, 最终导致了椎间盘疾病的发生。有研究对退变性椎间盘髓核组织进行双向凝胶电泳及质谱分析发现了一种正常椎间盘髓核组织中罕见的蛋白——过氧化物酶 II。已有研究认为过氧化物酶 II 是过氧化物酶家族中最具代表性的蛋白, 可参与多种细胞功能活动, 包括抗氧化损伤、细胞分裂和分化、信号转导和细胞凋亡等。过氧化物酶 II 对椎间盘退变有促进作用, 由此设想用过氧化物酶 II 的抑制剂封闭其基因表达, 可延缓或逆转椎间盘退变。

实验以此观察了过氧化物酶 II 对体外培养的人退变腰椎间盘髓核细胞的活性和 II 型胶原合成的影响。实验为过氧化物酶的研究方向提供新思路, 同时为椎间盘退变的研究提供了参考依据。见 2010 年 11 期 1915-1918 页。