

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.41.019

[http://www.crter.org]

刘奕, 谢林. 组织工程技术修复损伤关节软骨的研究与应用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(41):7310-7316.

组织工程技术修复损伤关节软骨的研究与应用**

刘奕¹, 谢林² (¹南京中医药大学, 江苏省南京市 210046; ²江苏省中西医结合医院骨科, 江苏省南京市 210028)

文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 组织工程方法修复关节软骨损伤已受到广泛关注, 逐渐成为组织工程研究的焦点。
- 2 文章增加的新信息: 文章分类介绍了组织工程的三要素, 又分别系统分析了各要素在关节软骨损伤修复方面的研究现状与进展。
- 3 临床应用的意义: 加快软骨组织工程方面的应用研究, 是促进组织工程从实验向临床转化的跨越。

关键词:

组织构建; 组织构建综述; 关节软骨; 组织工程; 干细胞; 支架材料; 生长因子; 研究进展; 省级基金

主题词:

软骨, 关节; 组织工程; 干细胞; 生物相容性材料; 细胞因子类

基金资助:

江苏省自然科学基金资助项目(BK2009458)*

摘要

背景: 软骨是一种无血管的组织, 软骨损伤后自身修复能力有限。当前用于治疗关节软骨损伤的方法从保守治疗到手术治疗多种多样。随着组织工程技术的发展, 关节软骨的修复又进入了新的高度。

目的: 综述组织工程方法修复软骨损伤的新进展。

方法: 由第一作者在 2013 年 5 月应用计算机检索 2000 至 2013 年 PubMed 数据库及 CNKI 数据库, 英文以 “cartilage tissue engineering, cartilage defect; stem cell, scaffold; growth factor” 为关键词, 中文以 “软骨组织工程, 软骨缺损, 干细胞, 支架, 生长因子” 为关键词, 选择内容与软骨组织工程、软骨损伤修复相关的文章, 同一领域文献则选择近期发表或发表在权威杂志文章, 共纳入 64 篇文献。

结果与结论: 软骨组织工程三大要素——种子细胞、支架和细胞因子, 三者必须协调发展和互利。现阶段组织工程方法修复关节软骨损伤的研究虽已取得很大进展, 但大多停留于实验探索阶段, 尚未应用于临床。随着新材料的不断研发, 新的组织工程软骨修复材料将兼顾材料学和生物科学的需要, 使其更接近机体自身组织生物学特性。在新的技术支持下, 动物实验研究也将向临床试验转变, 使关节软骨损伤的治疗取得突破性进展。

Tissue engineering technology for repair of articular cartilage injury

Liu Yi¹, Xie Lin² (¹Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China; ²Department of Orthopedics, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Cartilage is an avascular tissue and has a limited capacity for self-repair after injury. There are various methods for the treatment of articular cartilage injury ranging from conservation therapy to invasive surgery. With the development of tissue engineering technology, it provides a new way for treating articular cartilage injury.

OBJECTIVE: To review the new development of tissue engineering technology for repairing articular cartilage injury.

METHODS: The PubMed database and CNKI database were retrieved for articles from 2000 to 2013 by the first author with computer in May 2013. The key words were “cartilage tissue engineering, cartilage defect, stem cell, scaffold, growth factor” in English and Chinese. A total of 64 articles were included which related to cartilage regeneration and cartilage tissue engineering. For the articles in the same field, those published recently or in authorized journals were selected.

RESULTS AND CONCLUSION: The three elements of cartilage tissue engineering, seed cells, scaffolds and cytokines, must be coordinated and mutually beneficial development. At present, the research of tissue engineering for repairing articular cartilage injury has made a great progress. But the application in clinic has not enforced yet which is limited in experimental exploration stage. With the continuous development of new materials, the new tissue engineering cartilage repair materials should meet the requirement of material science and biological science, thus making the materials closely meet the biological characteristics of the self tissues. The animal studies will turn to clinical experiments with the support of new technique, which make a breakthrough in the treatment of articular cartilage injury.

刘奕★, 女, 1988 年生, 江苏省镇江市人, 汉族, 南京中医药大学在读硕士, 主要从事骨与关节中医药方面的研究。
zhangzhangajj@sohu.com

通讯作者, 谢林, 博士, 教授, 主任中医师, 江苏省中西医结合医院骨科, 江苏省南京市 210028

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2013)41-07310-07

收稿日期: 2013-04-25

修回日期: 2013-06-12

(201304255/M · C)

Liu Yi★, Studying for master's degree, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China
zhangzhangajj@sohu.com

Corresponding author: Xie Lin, M.D., Professor, Chief physician, Department of Orthopedics, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China

Received: 2013-04-25

Accepted: 2013-06-12

Subject headings: cartilage, articular; tissue engineering; stem cells; biocompatible materials; cytokines

Funding: Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2009458*

Liu Y, Xie L. Tissue engineering technology for repair of articular cartilage injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(41):7310-7316.

0 引言 Introduction

成熟的软骨是一种无血管的组织,成年人的软骨广泛存在于骨的关节面、肋软骨、气管、耳郭、椎间盘等处。关节软骨由1%的软骨细胞和99%的软骨外基质组成,基质又由胶原、蛋白多糖和水组成。关节软骨无血管和淋巴管提供养分,而且软骨细胞自身增殖能力有限。当关节发生创伤或退变后,软骨细胞及基质的组成、代谢均发生相应变化。代谢变化表现为软骨细胞合成反应减少以及软骨基质的断裂和丢失。关节软骨一旦损伤,自身难以修复^[1]。

传统用于修复关节软骨损伤的方法可分为两类:关节表面重建术,包括磨削术、钻孔术、微骨折术及关节镜下刨削术;生物移植术,包括骨软骨复合物、骨膜、软骨膜及细胞移植等^[2]。但各种治疗手段均存在一定局限性,通常不能完全恢复病损组织的正常形态,导致遗留疼痛及功能障碍^[3-4]。文献研究表明还没有任何一种治疗措施显示出比其他手段更具有优越性,目前尚无金标准的关节软骨损伤修复的临床路径^[3]。

近年来随着组织工程技术的发展,关节软骨的修复又进入了新的高度,一旦应用于临床,将具有划时代的意义。但目前组织工程技术修复关节软骨缺损仍主要处于动物实验阶段,临床尚处于起步阶段。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

检索人: 第一作者。

检索时间: 2013年5月。

检索数据库: PubMed 数据库, 网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; CNKI 数据库, 网址: <http://www.cnki.net/>。

检索词: 英文关键词为“cartilage tissue engineering, cartilage defect, stem cell, scaffold; growth factor”, 中文关键词为“软骨组织工程, 软骨缺损, 干细胞, 支架, 生长因子”。

文献检索的时间范围: 2000至2013年。

检索文献类型: 硕博学位论文及期刊文章为主。

1.2 资料筛选及评价

纳入标准: ①选择内容与软骨组织工程、软骨损伤修复相关的文章。②同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

排除标准: 重复研究或Meta分析类文章。

资料提取与文献质量评价: 计算机初检得到2 050篇文献,经阅读标题和摘要后进行初筛,根据文章主题、研究内容相关度及内容重复的研究进行排除,排除后筛选纳入64篇文献进行评价。

2 结果 Results

组织工程研究内容包括种子细胞、支架材料以及细胞因子。具体到软骨组织工程,其基本方法是提取自体或异体软骨细胞或软骨前体细胞^[5-6]。经体外扩增后,吸附于一种生物相容性好并可被人体逐渐降解吸收的细胞外基质上,该材料可以为软骨细胞提供适合其生存的三维空间,有利于软骨细胞获得足够的营养物质,使软骨细胞按预制形态的三维支架生长,然后将这种软骨细胞-生物材料复合体移植入体内病损部位,在生物支架降解的过程中,种植的软骨细胞继续增殖并分泌软骨基质,最终形成新的具有原来特殊形态和一定功能的软骨组织。

2.1 种子细胞 种子细胞是组织工程的重要因素之一。用于软骨组织构建的种子细胞有软骨细胞、骨髓基质细胞、骨膜组织以及脂肪组织来源的间充质细胞等^[7]。种子细胞的选择多种多样,各有利弊。软骨细胞增殖能力有限,经过几次体外传代培养后,单层生长的软骨细胞逐渐去分化,失去软骨细胞表型和再分化能力^[8]。第1代自体软骨细胞移植曾一度成为治疗关节软骨大面积缺损的主要方法^[9]。但是,在长期的临床应用中,软骨细胞流失及骨膜肥大等缺点也慢慢显露。目前的第2代自体软骨细胞技术是将细胞种植在支架材料上构建组织工程软骨修复缺损。

骨髓基质干细胞是一种来源于骨髓的成体干细胞,具有多向分化的潜能,可多方向分化为成骨细胞、软骨细胞、网状细胞、肌细胞等,是软骨组织工程中最有研究价值的种子细胞^[10]。在转化生长因子 β 1、胰岛素样生长因子、地塞米松等主要诱导剂存在的条件下可定向分化为软骨细胞,并表达软骨细胞特异的分子标记-II型胶原^[11]。吴俊等^[12]利用Transwell通透膜的特性,在隔离共培养条件下,利用软骨细胞自身分泌生长因子的特点,研究软骨细胞诱导骨髓基质干细胞向软骨细胞分化并形成软骨组织的能力。体外培养期间,实验组和对照组骨髓基质干细胞在支架上黏附良好并能分泌细胞外基质,RT-PCR检测示实验组II型胶原和蛋白聚糖有较强的表达,而对照组两者的

表达较低或检测不到。实验结果显示, 实验组骨髓基质干细胞-支架复合物能基本保持原形, 组织学染色及免疫组织化学染色显示新生组织有明显的软骨陷窝形成并表达软骨特异性细胞外基质。对照组骨髓基质干细胞-支架复合物逐渐皱缩变形, 未见形成软骨样组织。雷鸣等^[13]利用藻酸盐微球包被骨髓基质干细胞进行定向诱导分化为软骨细胞实验。在含有转化生长因子 $\beta 1$ 、胰岛素样生长因子1诱导剂的诱导下, 实验组可见软骨细胞特异性的II型胶原强阳性表达, 骨髓基质干细胞定向分化为较为成熟的软骨细胞, 而未加任何生长因子的对照组则基本无表达。谭文成等^[14]联合应用转化生长因子 $\beta 1$ 、胰岛素样生长因子1、地塞米松将少量骨髓基质干细胞诱导成为软骨细胞后与骨髓基质干细胞以1:2的比例共培养, 探讨软骨细胞-动物源性骨软骨支架复合体修复兔膝关节骨软骨复合缺损的可行性和影响因素。研究证实, 共培养细胞中的骨髓基质干细胞能促进软骨细胞的增殖, 同时软骨细胞也为骨髓基质干细胞的分化提供软骨微环境, 从而为细胞复合到支架材料上、植入缺损区并进一步形成软骨和成骨提供重要前提。实验结果表明, 不植入支架和细胞的空白组骨软骨复合缺损处没有形成正常的透明软骨, 而实验组从4周起即有较为明显的软骨生成, 经苏木精-伊红染色和甲苯胺蓝染色均提示缺损区修复的软骨主要为透明软骨, 缺损处软骨和软骨下骨都得到有效修复。

李明波^[15]认为, 骨髓基质干细胞定向分化机制为: 间充质细胞凝集——软骨细胞增生——肥大软骨细胞前体细胞——肥大软骨细胞——软骨细胞凋零——被骨组织所替代。其过程中, Sox9基因参与软骨的形成, 表达于所有的软骨前细胞和分化的软骨细胞^[16], 而在肥大软骨细胞中几乎不表达, 它是成软骨过程中必需的转录因子, 缺少Sox9将引起软骨细胞分化阻滞, 这种阻滞发生在基质干细胞凝聚阶段, 同时会导致软骨细胞终末分化速度加快, 提前钙化^[17]。除了Sox9基因参与软骨的形成外, Sox基因家族的另外两个成员Sox5和Sox6也参与软骨细胞的分化调节过程。体外研究显示Sox5和Sox6可协同Sox9激活Col2a1增强子和Col2a1基因, 而Sox5和Sox6的双敲除实验结果证实敲除这两个基因的机体呈现严重的软骨发育不全, 缺乏软骨的实质^[18]。因此, Sox5, Sox6, Sox9对间叶细胞中软骨的发生和分化是至关重要的^[19]。

钱晓伟等^[20]研究了 Sox6 基因和 Col2a1 基因在骨髓基质干细胞分化为软骨细胞过程中的表达变化, 探索 Sox6 基因在骨髓基质干细胞成软骨分化中的作用。结果显示, Sox6 基因的表达在诱导后 3 h 即有所增加, 在诱导后 6 h 表达达到高峰, 随后迅速下降,

在诱导后 3-14 d 一直维持在较高水平。而作为成软骨分化的标志基因 Col2a1 基因的表达量在诱导的前 3 d 变化不明显, 甚至在诱导后 24 h 有一定程度的下降, 到诱导后 3 d 表达量才有所上升, 诱导后 7 d 上升明显, 表达量是同期未诱导组的 14.3 倍, 到了诱导后 14 d, 其表达量更是同期未诱导组的 35.8 倍。以上结果说明, Sox6 基因在成软骨分化的早期其表达量就明显上升, 在分化晚期表达一直处于较高水平, 提示 Sox6 基因在分化的晚期可能也发挥了一定的作用。

2.2 支架材料 支架材料是种子细胞与细胞因子修复软骨所必须的载体, 为种子细胞提供了附着、增殖、分化和代谢的场所, 也为细胞质分泌和旁分泌的细胞因子提供了暂时的附着点^[21]。

理想的软骨组织工程支架应具备下列特点^[22]: ①具有良好的生物相容性: 不论在体外或植入体内, 其支架本身或降解产物对细胞、组织和机体都应无毒副作用, 不引起机体的免疫排斥反应。②具有生物可降解性: 支架材料的降解吸收速率应与组织再生的速率相匹配, 降解率偏低材料可抑制基质的合成从而阻碍软骨组织的形成, 而降解率过高则会使三维空间结构快速消失。③具有三维立体多孔结构: 支架材料的孔隙率应达90%以上, 并有一定的坚韧性, 因为足够的孔隙率对软骨细胞在支架中均匀分布及其生长形成组织提供足够的空间, 且支架的孔径大小对软骨细胞的生长和胶原分泌有重要作用。④具有良好的表面活性: 支架应具备承载生长因子的能力, 能通过表面修饰、控释生物分子, 或对环境刺激做出响应等机制对种子细胞的黏附和生长进行调控, 为软骨细胞生长提供适宜的微环境。⑤具有可塑性和一定的机械强度性能: 支架在植入体内后, 一定时间内仍可保持原有的三维结构, 从而使新形成的软骨组织具有一定的外形。⑥具有一定的弹性: 支架种植入体内后不仅需要一定的强度, 而且还能传导关节活动时的应力, 提供或接近于软骨细胞生长发育所需要的生理环境。⑦具有良好的加工成型性: 良好的支架应易于加工成各种所需的形状和尺寸, 以便于大规模生产、应用。

软骨支架材料大致分为天然高分子材料、人工合成可降解材料、天然材料与合成高分子材料复合构造的新型生物材料和纳米材料 4 大类^[23]。

目前报道的天然高分子材料包括: 胶原、透明质酸、壳聚糖、血纤蛋白、藻酸盐、淀粉、脱细胞基质、蚕丝蛋白等^[24]。天然高分子材料具有无毒、无刺激、无免疫原性、无致突变效应, 其具有生物相容性、细胞亲和度好和降解性高等优点, 有利于种子细胞的生长、扩增。在早期的支架材料选择中, 胶原、壳聚糖及其复合物被选择较多。胶原是人体内含量最丰富的

蛋白,可被细胞酶类识别、标记、降解,有利于软骨细胞黏附、增殖和分化和表型的保持^[25]。相关研究表明软骨细胞在壳聚糖上主要表达为II型胶原,可见壳聚糖作为组织工程支架材料可促进软骨细胞生长并保持其功能,具有修复软骨缺损的能力^[26]。夏万尧等^[27]在壳聚糖、壳聚糖-胶原复合多孔支架上体外培养软骨细胞,结果显示,软骨细胞能在壳聚糖、壳聚糖-胶原复合多孔支架上黏附、伸展、增殖和发挥正常功能,在壳聚糖-胶原复合多孔支架上细胞黏附率更高,增殖能力更强,说明壳聚糖-胶原支架更适合软骨细胞生长、增殖。但Montembault等^[28]提出新观点,认为壳聚糖是细胞外基质分泌的诱导剂,使软骨细胞易于黏附在壳聚糖表面,而壳聚糖本身不起支架作用。其后的研究也慢慢凸显了此类材料的缺点:由于来源不同,结构与性能存在差异;大批量制备困难,且机械强度差,故近些年单独使用天然高分子支架逐渐较少。

人工合成可降解材料有聚乳酸、聚羟基乙酸、两者的共聚物聚乳酸乙醇酸、聚己酸内酯以及生物活性陶瓷类的羟基磷灰石、磷酸三钙等。由于其具有物理机械性能较好、降解时间可调控、来源不受限制等优点而被广泛关注^[29]。Heymer等^[30]应用聚乳酸胶原纤维支架复合人骨髓间充质干细胞修复全层软骨缺损,3周后即可观察到I型胶原纤维层形成,且纤维层的上1/3可见细胞分布均匀并明显向软骨细胞分化,其细胞外基质中富含蛋白多糖和II型胶原,RT-PCR分析有软骨形成,说明聚乳酸胶原纤维支架在体外能良好地修复软骨组织缺损。El Sayed等^[31]在聚羟基乙酸支架上接种鼻中隔及耳来源软骨细胞,取得显著效果,提示聚羟基乙酸材料可作为软骨组织工程支架材料。刘方红等^[32]采用聚乳酸乙醇酸支架复合骨髓基质干细胞移植修复关节软骨,实验术后第8周修复组织色泽已接近正常,与周围界线不清,修复表面平整;术后12周已与周围组织外观不易区别,关节活动度明显好转,而支架组与空白对照组术后4周即形成纤维组织,缺损明显,关节活动度明显受限,实验表明,相对于单纯支架移植组及空白组而言,聚乳酸乙醇酸支架复合骨髓基质干细胞成功修复了损伤的关节软骨。但目前人工合成材料最主要的缺点在于^[33]:亲水性不够,生物相容性不佳;降解较快,降解产物偏酸性,易使细胞中毒,不利于细胞生长;有一定的免疫原性且价格昂贵。

随着组织工程研究的不断深入与创新,学者们认识到单一的天然材料和人工合成高分子材料构成的三维支架难以满足器官组织工程基本要求,越来越多的学者使用交联的方法,将两种或两种以上的具有互补特性的生物材料,按一定比例和方式组合在一起,

制备出具有合适降解度、良好通透性、组织相容性好的软骨细胞体外培养支架复合材料^[34]。复合材料包括天然材料之间复合、天然材料与人工高分子材料复合、人工高分子材料之间复合,例如胶原-聚乳酸乙醇酸复合支架、胶原-透明质酸-硫酸软骨素复合支架,聚乳酸-聚羟基乙酸聚磷酸钙纤维-胶原复合支架等。既克服了单一材料的缺点,又使其具有高机械强度、可降解、易加工及良好亲水性、细胞相容性。杨红涛^[35]选用生物降解性和生物相容性良好的生物高分子材料聚己酸内酯(PCL)和壳聚糖共混,制成聚己酸内酯/壳聚糖支架材料,评价了共混支架材料在软骨组织修复中的运用。实验证明,软骨细胞在支架上黏附性良好,说明聚己酸内酯/壳聚糖材料的生物力学性能、生物相容性均与两种单独组分材料的性能相当。周晓中等^[36]将骨髓基质干细胞分别种植于聚羟基乙酸和羟基磷灰石支架后共同培养,生物胶粘连两种支架-细胞复合物形成骨髓基质干细胞-聚羟基乙酸-羟基磷灰石复合体,并植入兔膝关节修复关节软骨。实验结果显示术后20周,实验组可见缺损处修复组织似透明软骨样,表面光滑,基质异染,有很好的软骨下骨形成,新生组织与周围正常软骨已融合但仍可看到边界,其中无聚羟基乙酸纤维残留,但有切片可见少量羟基磷灰石结晶。高倍镜下,修复组织表面部分主要由分化良好的软骨细胞及包围它的异染基质组成,修复软骨已分层。张永红等^[37]以羟基丁酸-羟基辛酸共聚体为主体材料,制备出具有类似正常软骨结构层的仿生羟基丁酸-羟基辛酸共聚体一体化支架。研究发现^[37-38]:①羟基丁酸-羟基辛酸共聚体比早期多聚羟基烷酸(PHAs)类材料具有更优良的生物相容性、可降解性、柔韧性和可加工性,制备的支架能够承受更大的压力而不发生断裂。②通过改变致孔剂的粒径可以控制支架的孔径大小,通过变换致孔剂的加量可以调整支架的力学强度、孔隙率及孔隙连通性,从而制备出结构与功能不同的多层支架。③使用同一主体材料在同一溶剂作用下使得三层支架紧密相连,一体化程度较高,排除了使用生物胶等粘合剂容易造成支架各层分离和脱落的缺陷。④引入了小孔径中间过渡层的概念,既防止了骨细胞向软骨层的迁徙,又给骨细胞与软骨细胞提供了相对独立的细胞环境,还保障各层之间的体液交换。但同大多数酯类材料相似,单纯羟基丁酸-羟基辛酸共聚体支架的亲水性能较差、细胞黏附性不佳。经改良,羟基丁酸-羟基辛酸共聚体/脱细胞软骨基质支架在亲水性、细胞黏附率及细胞增殖活性等性能方面均明显增强。仿生羟基丁酸-羟基辛酸共聚体一体化支架的性能测试和细胞培养试验表明,支架的结构、力学强度与人体关节骨软骨相似,可以基本满足骨软骨组织工程支架的要

求。

近年来, 纳米材料越来越多地被运用于组织工程支架材料的构建。纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围(1-100 nm)或由它们作为基本单元构成材料。纳米相陶瓷, 特别是纳米羟基磷灰石(天然骨的组成), 由于它能促进矿化的形成, 而成为骨的替代材料。羟基磷灰石纳米晶体与胶原成分组成的复合材料是最接近天然骨结构的组织工程材料^[39]。李劼若等^[40]设计了一种特殊的穿“靴”结构: 将体外提纯、扩增的骨髓基质干细胞诱导成软骨细胞, 并接种于穿“靴”的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架的底部上联合培养, 使支架被“靴”覆盖的部分在构建软骨细胞复合体的过程中不与培养基接触, 令软骨细胞集中在无“靴”覆盖的支架部分, 使复合体填充到骨软骨缺损处时让宿主自身的成骨细胞填充到支架的深层和过渡层部分, 实现了一个支架同时修复骨软骨联合缺损的目的, 同时实现骨和软骨之间的良好耦合。Meng 等^[41]运用静电纺丝技术制备出载药聚乳酸乙醇酸/明胶纳米纤维药物缓释支架, 并研究了此支架的药物缓释特性。研究表明明胶含量增加、纤维随机排列、交联的处理和适宜的溶液 pH 值可增强药物缓释的作用。朱凌云等^[42]研究了纳米羟基磷灰石/聚磷酸钙纤维/聚乳酸骨组织工程支架复合材料的特性。结果表明, 纳米羟基磷灰石/聚磷酸钙纤维/聚乳酸支架复合材料具有三维、连通、微孔网状结构, 并具有较高的孔隙率和较好的压缩模量。

2.3 生长因子 对骨髓基质干细胞有明显软骨调节作用的生长因子和细胞因子有转化生长因子 β 、骨形态发生蛋白、胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子和表皮生长因子等。其他因素如三维环境培养、高密度接种、低氧、低血清及施加力学刺激等因素都有利于骨髓基质干细胞向软骨细胞方向分化^[43-44]。

转化生长因子超家族是骨髓基质干细胞成软骨诱导中最常用的生长因子, 包括转化生长因子 β 1-3、骨形态发生蛋白、激活素和抑制素等^[45]。转化生长因子 β 是软骨分化和发育中的关键细胞因子, 参与了软骨分化中的细胞聚集、增殖和分化阶段^[46]。转化生长因子 β 1、 β 2、 β 3均对骨髓基质干细胞有软骨诱导作用, 其中转化生长因子 β 1是软骨形成中主要的诱导物^[47], 转化生长因子 β 1可以促进软骨细胞增殖和成熟, 促进软骨细胞形成中 Sox-9、II 型胶原和 Aggrecan 基因的表达^[48]。杨亚冬等^[49]研究将转化生长因子 β 1包裹在壳聚糖微球内制成缓释微球, 分散在支架内, 制成负载转化生长因子 β 1壳聚糖微球的壳聚糖-丝素支架复合骨髓基质干细胞体外构建组织工程软骨, 观察将其移植修复兔膝关节软骨缺损的效果。

结果显示术后3个月实验组已经有较硬的类软骨组织填充修复, 切片见有软骨细胞规则排列, 表明负载转化生长因子 β 1壳聚糖微球的壳聚糖-丝素支架复合骨髓基质干细胞体外复合培养后移植治疗修复兔膝关节软骨缺损, 具有较好的疗效。在体外研究中, 转化生长因子 β 成功和高效地诱导了骨髓基质干细胞向软骨分化^[50], 同时研究表明, 转化生长因子 β 还有抑制炎症反应和促进基质金属蛋白酶抑制物3表达的作用^[51]。

在软骨正常的生理代谢过程中, 破坏因素和修复因素是处于一个精妙的平衡中, 破坏性因素(例如基质金属蛋白酶)超过了软骨自身的修复因素, 就导致软骨的破坏; 而人为造成的修复因素过度, 也会导致病变的发生, 例如, 在类风湿关节炎和骨关节炎的病理过程中, 修复性的细胞因子代偿性的大量表达和激活往往会导致软骨的骨化和骨赘的产生^[52]。Grimaud 等^[53]曾将转化生长因子 β 3 注射到关节腔用于修复软骨的损伤, 虽然刚开始有一定的修复作用, 但是转化生长因子 β 3 在关节腔内大量的激活导致了滑膜的增生和周围肌肉的水肿, 并恶化了关节液的组分, 最终导致了修复的失败。尽管转化生长因子 β 3 较转化生长因子 β 1 更能有效地诱导软骨形成, 但以转化生长因子 β 3 为主的诱导方案也存在早期诱导软骨细胞肥大的缺点, 表现为软骨细胞肥大标志基因, 如 X 型胶原的早期表达^[54]。而当骨形态发生蛋白 6、转化生长因子 β 3 与地塞米松联合应用时, 骨髓基质干细胞成软骨分化更有效, 同时 X 型胶原的表达也更多^[55-56]。

胰岛素样生长因子及成纤维细胞生长因子对机体的骨、软骨生长发育也起着重要的调控作用。胰岛素样生长因子有胰岛素样生长因子1和胰岛素样生长因子2两种, 两者结构相似但生物学作用有所不同, 在软骨组织中起主要作用的是胰岛素样生长因子1, 不仅促进软骨基质的合成, 更能刺激 II 型胶原和蛋白多糖的产生和释放并抑制其降解^[57]。Longobardi 等^[58]研究证实转化生长因子 β 1和胰岛素样生长因子1联合诱导骨髓基质干细胞, 形成的组织工程软骨在 Sox-9 表达及 II 型胶原、Aggrecan 数量方面均达到与生理软骨相似的程度, 提示胰岛素样生长因子1在成软骨诱导过程中具有重要作用。成纤维细胞生长因子家族包括 22 个结构上相关的蛋白质, 它们分别与成纤维细胞生长因子受体 1、2、3、4 中的 1 个结合, 对骨骼系统的生长发育具有重要调控作用^[59]。Solchaga 等^[60]实验证实成纤维细胞生长因子 2 增强了骨髓基质干细胞的增殖与分化, 能良好地保持骨髓基质干细胞的成软骨能力, 促进 II 型胶原的表达。Cui 等^[61]应用成纤维细胞生长因子 2/转化生长因子 β 1 联合促进软骨再生, 结果显示, 实验组高效地促进蛋白多糖的形成、细胞分化。

尽管生长因子是治疗各种原因导致的软骨损伤

的有效手段,但仍有许多问题需要解决:在诱导过程中生长因子需要用多久?最适宜的浓度是多少?以及如何控制此浓度保持不变?这些不确定的因素限制了生长因子在软骨分化中的应用^[62]。

3 讨论 Discussion

软骨组织工程起步不到半个世纪,还存在很多问题需要解决^[63]。其中个体化治疗仍然是当今医学的重点。组织工程软骨的治疗还需考虑到患者的年龄、骨发育状态以及病损部位、大小、阶段和深度等等^[64]。软骨组织工程三大要素——种子细胞、支架和细胞因子三者必须协调发展和互利。现阶段组织工程方法修复关节软骨损伤的研究虽已取得很大进展,但大多停留于实验探索阶段,尚未应用于临床。随着新材料的不断研发,新的组织工程软骨修复材料将兼顾材料学和生物科学的需要,使其更接近机体自身组织生物学特性。在新的技术支持下,动物实验研究也将向临床试验转变,使关节软骨损伤的治疗取得突破性进展。

作者贡献: 第一作者构思并设计本综述,第一作者解析相关数据,第一作者对文章负责。第二作者审校。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家和雇主或其他经济组织直接或间接的利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 纳米材料-在三维空间中至少有一维处于纳米尺度(1-100 nm)范围或由它们作为基本单元构成的材料。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000;21(24):2589-2598.
- [2] 范宏斌.体内诱导骨髓基质干细胞修复兔关节软骨缺损及其相关研究[D].西安:第四军医大学,2006:15-22.
- [3] Kinner B, Capito RM, Spector M. Regeneration of articular cartilage. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2005;94:91-123.
- [4] 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.
- [5] Chung C, Burdick JA. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(2):243-254.
- [6] Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, et al. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(2):300-322.
- [7] 杨强,彭江,卢世璧,等.组织工程骨软骨复合体修复犬膝关节负重区骨软骨缺损的实验研究[J].*中华骨科杂志*,2009,29(5):480-486.
- [8] 吴追乐,李民,刘献祥,等.BMSCs体外分离培养的实验研究[J].*福建中医学院学报*,2008,18(4):24-27.
- [9] 葛俊行,郝剑,朴哲,等.工程软骨支架的临床应用研究进展[J].*国际生物医学工程杂志*,2011,34(6):380-382.
- [10] 韦益毅.不同生物材料复合支架对关节软骨缺损的修复评价[J].*中国组织工程研究与临床康复*,2011,15(25):4723-4725.
- [11] Zhu L, Wu Y, Jiang H, et al. Engineered cartilage with internal porous high-density polyethylene support from bone marrow stromal cells: A preliminary study in nude mice. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2010 ;48(6):462-465.
- [12] 吴俊,薛珂,刘凯,等.软骨细胞与骨髓间充质干细胞隔离共培养构建组织工程化软骨[J].*苏州大学学报:医学版*,2012,32(2): 202-206.
- [13] 雷鸣,刘世清,刘宇兰,等.藻酸钠微球中骨髓间充质干细胞向软骨细胞的定向分化[J].*中国组织工程研究与临床康复*,2008,12(19): 3659-3662.
- [14] 谭文成,林宏生,张嘉晴,等.动物源性骨软骨支架修复兔膝关节复合缺损[J].*中国骨科临床与基础研究杂志*,2011,3(1): 51-59.
- [15] 李明波.透骨消痛颗粒诱导骨髓基质细胞向软骨细胞分化的实验研究[D].福建:福建中医学院,2009:6-7.
- [16] Cao L, Yang F, Liu G, et al. The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2011;32(16):3910-3920.
- [17] 曹慧慧,王昌留.Sox基因家族特点及其功能[J].*鲁东大学学报:自然科学版*,2011,27(1):58-63.
- [18] Smits P, Li P, Mandel J, et al. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*. 2001;1(2):277-290.
- [19] Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005;75(3):200-212.
- [20] 钱晓伟,谭湘陵,张贤,等.Sox6基因和Col2a1在大鼠bMSCs体外成软骨分化中表达及其意义[J].*江苏医药*,2012,38(19): 2240-2243.
- [21] 张佼佼,王冬青,王志强,等.组织工程软骨支架材料的应用选择[J].*中国组织工程研究与临床康复*,2011,15(29):5467-5470.
- [22] 王国海.组织工程方法修复关节骨软骨缺损的实验研究[D].广东:中山大学,2007:1-4.
- [23] 吴军成,霍然,吕仁荣.软骨组织工程中支架材料的文献回顾[J].*中国组织工程研究*,2012,16(3):522-526.
- [24] 初殿伟,王玮,王文良.骨软骨组织工程支架的研究现状[J].*武警医学院学报*,2009,18(3):240-244.
- [25] Yates KE, Allemann F, Glowacki J. Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes. *Cell Tissue Bank*. 2005;6(1):45-54.
- [26] Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, et al. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res*. 2000;51(4):586-595.
- [27] 夏万尧,曹谊林,商庆新,等.壳聚糖作为组织工程软骨支架的实验研究[J].*中华显微外科杂志*,2002,25(1):34-37.
- [28] Montebault A, Tahiri K, Korwin-Zmijowska C, et al. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie*. 2006 ;88(5):551-564.
- [29] 刘清宇,王富友,杨柳.关节软骨组织工程支架的研究进展[J].*中国修复重建外科杂志*,2012,26(10):1247-1250.

- [30] Heymer A, Bradica G, Eulert J, et al. Multiphasic collagen fibre-PLA composites seeded with human mesenchymal stem cells for osteochondral defect repair: an in vitro study. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(5):389-397.
- [31] El Sayed K, Marzahn U, John T, et al. PGA-associated heterotopic chondrocyte cocultures: implications of nasoseptal and auricular chondrocytes in articular cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(1):61-72.
- [32] 刘方红, 张秋芳. 骨髓基质干细胞复合PLGA支架修复兔关节软骨缺损[J]. 中国老年保健医学, 2011, 9(4): 5-6.
- [33] 李炜. 组织工程骨软骨修复材料的研究进展[J]. 健康必读, 2012, 11(5): 518-519.
- [34] 张新. 不同材料构建组织工程软骨及支架的应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(8): 1491-1495.
- [35] 杨红涛. 聚己酸内酯壳聚糖共混材料用于软骨组织工程支架的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009: 1-52.
- [36] 周晓中, 张文智, 吕维佳, 等. 多聚乙醇酸-羟基磷灰石复合体为支架的骨髓基质细胞修复兔关节软骨缺损[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(8): 617-620.
- [37] 张永红, 许钰, 林汲, 等. 羟基丁酸-羟基辛酸共聚体/脱细胞软骨基质支架的细胞黏附性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(25): 4585-4588.
- [38] 郭霄飞, 张永红, 杜美丽, 等. 羟基丁酸与羟基辛酸共聚物一体化骨软骨组织工程支架的制备及性能[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(16): 2865-2868.
- [39] 张金超, 刘丹丹, 周国强, 等. 纳米材料在组织工程中的应用[J]. 化学进展, 2010, 22(11): 2232-2237.
- [40] 李劫若, 查振刚, 姚平, 等. 纳米羟基磷灰石壳聚糖支架与诱导骨髓间充质干细胞体外构建软骨支架复合体[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(3): 411-416.
- [41] Meng ZX, Xu XX, Zheng W, et al. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;84(1):97-102.
- [42] 朱凌云, 王彦平, 石宗利, 等. 纳米羟基磷灰石/聚磷酸钙纤维/聚乳酸骨组织工程复合支架的特性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3): 431-433.
- [43] 韦宋谱, 丁道芳, 王学宗, 等. 骨髓间充质干细胞的培养及向软骨细胞诱导的方法学研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(11): 1017-1019.
- [44] 刘志强, 程红斌, 刘建国, 等. 骨髓间充质干细胞在关节软骨损伤中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(2): 373-375.
- [45] Wang MK, Sun HQ, Xiang YC, et al. Different roles of TGF- β in the multi-lineage differentiation of stem cells. *World J Stem Cells*. 2012;4(5):28-34.
- [46] Narcisi R, Signorile L, Verhaar JA, et al. TGF β inhibition during expansion phase increases the chondrogenic re-differentiation capacity of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(10):1152-1160.
- [47] Barry F, Boynton RE, Liu B, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001;268(2):189-200.
- [48] You M, Peng G, Li J, et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds coated with PHA granule binding protein PhaP fused with RGD peptide. *Biomaterials*. 2011;32(9):2305-2313.
- [49] 杨亚冬, 张文元, 房国坚. 负载TGF- β 1微球的壳聚糖丝素支架复合骨髓间充质干细胞修复兔关节软骨缺损的实验研究[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(6): 70-75.
- [50] Spagnoli A, O'Rear L, Chandler RL, et al. TGF-beta signaling is essential for joint morphogenesis. *J Cell Biol*. 2007 ;177(6): 1105-1117.
- [51] Qureshi HY, Sylvester J, El Mabrouk M, et al. TGF-beta-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene in chondrocytes is mediated by extracellular signal-regulated kinase pathway and Sp1 transcription factor. *J Cell Physiol*. 2005;203(2):345-352.
- [52] 郑东, 刘国辉, 杨述华, 等. 转化生长因子- β 3融合蛋白促进骨髓基质干细胞向软骨分化的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(1): 104-107.
- [53] Grimaud E, Heymann D, R dini F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 ;13(3):241-257.
- [54] Mueller MB, Fischer M, Zellner J, et al. Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs*. 2010;192(3):158-166.
- [55] Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(2):411-418.
- [56] Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(3):914-919.
- [57] 邓娟. 骨髓基质干细胞定向分化为软骨细胞的研究进展[J]. 海南医学, 2012, 23(14): 126-129.
- [58] Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res*. 2006;21(4):626-636.
- [59] 刘瑾春, 刘霞, 曹谊林. 体外诱导BMSCs向软骨分化的方法研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(5): 618-623.
- [60] Solchaga LA, Penick K, Porter JD, et al. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2005;203(2):398-409.
- [61] Cui X, Breitenkamp K, Lotz M, et al. Synergistic action of fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 enhances bioprinted human neocartilage formation. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(9):2357-2368.
- [62] Wang WG, Lou SQ, Ju XD, et al. In vitro chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in monolayer culture: activation by transfection with TGF-beta2. *Tissue Cell*. 2003;35(1):69-77.
- [63] 程越, 田京. 纳米支架与关节软骨重建[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(12): 2265-2269.
- [64] Pape D, Filardo G, Kon E, et al. Disease-specific clinical problems associated with the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):448-462.