

无纺网与多孔海绵状材料作为软骨组织工程支架的适用性及体内降解性

孙安科¹, 孙靖², 孙伟¹, 张贺³, 陈伟⁴, 华泽权⁵ (解放军沈阳军区总医院, ¹耳鼻咽喉科, ³实验动物中心, ⁴医学实验科, ⁵颌面外科, 辽宁省沈阳市 110016; ²辽宁医学院2012级硕士研究生, 辽宁省锦州市 121001)

文章亮点:

实验的创新在于分别以聚羟基乙酸和聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物为作为支架负载软骨细胞, 构建组织工程软骨组织, 植入兔皮下后观察到聚羟基丁酸酯和聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵较聚羟基乙酸无纺网材料体内降解速率滞后, 但未影响组织工程软骨的成软骨效应, 两种不同设计的支架材料均适用于组织工程软骨构建。

关键词:

生物材料; 软骨生物材料; 聚羟基乙酸; 聚羟基丁酸己酸共聚物; 适用性; 降解性; 组织工程; 软骨; 体内

主题词:

生物相容性材料; 生物降解; 环境; 软骨; 组织工程

基金资助:

沈阳军区总医院院级重点基金课题(zy2009z0019)

缩略语:

聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), PHBHH

摘要

背景: 聚羟基乙酸无纺网与聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵具有良好的塑形适应性、生物降解性与生物相容性。

目的: 观察聚羟基乙酸无纺网与聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵作为软骨组织工程支架的适用性及体内降解性。

方法: 分别制备乳兔软骨细胞-聚羟基乙酸无纺网复合物、乳兔软骨细胞-聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵复合物。在实验组成年兔两侧背部皮下分别植入制备的两种复合物, 在对照组成年兔两侧背部皮下分别植入聚羟基乙酸无纺网与聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物。

结果与结论: 组织学观察显示, 以聚羟基乙酸无纺网获取的组织工程软骨, 植入 4 周时软骨细胞较小, 软骨内有较多聚羟基乙酸纤维残留, 8 周时软骨细胞较成熟, 包埋在陷窝内, 聚羟基乙酸纤维消失, 12 周时软骨细胞成熟, 基质分泌丰富, 无聚羟基乙酸存留; 以聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵获取的组织工程软骨, 植入 4 周时软骨细胞不成熟, 软骨基质内似“杂质”样材料残留物较多, 8 周时软骨细胞较成熟, 软骨基质内仍可见材料残留, 12 周时软骨基质材料残留基本消失。两组组织工程软骨特殊染色与免疫组织化学检测均显示再生软骨胶原与基质黏多糖生成良好, 软骨中均检测出 II 型胶原。表明两种材料作为软骨组织工程支架具有良好的适用性, 其降解时间均达到组织工程软骨构建的要求。

孙安科, 孙靖, 孙伟, 张贺, 陈伟, 华泽权. 无纺网与多孔海绵状材料作为软骨组织工程支架的适用性及体内降解性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(8):1172-1178.

Applicability and biodegradability *in vivo* upon polyglycolic acid nonwoven mesh and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) porous sponge as scaffolds for tissue engineered cartilage

Sun An-ke¹, Sun Jing², Sun Wei¹, Zhang He³, Chen Wei⁴, Hua Ze-quan⁵ (¹Department of Otorhinolaryngology, ³Centre for Experimental Animals, ⁴Department of Medical Laboratory, ⁵Department of Maxillofacial Surgery, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, Liaoning Province, China; ²Grade 2012, Postgraduate School, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Both polyglycolic acid (PGA) nonwoven mesh and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHH) show good applicability, biodegradability and biocompatibility with porous sponges.

OBJECTIVE: To explore the applicability and biodegradability *in vivo* of PGA nonwoven mesh and PHBHH porous sponge as scaffolds for tissue engineered cartilage.

METHODS: Rabbit chondrocytes were seeded onto PGA nonwoven mesh and PHBHH porous sponge respectively as scaffolds to form chondrocyte-PGA or chondrocyte-PHBHH composites by tissue engineering

孙安科, 男, 1962 年生, 河南省南阳市人, 汉族, 1985 年解放军第二军医大学毕业, 博士后, 主任医师, 主要从事软骨组织工程与喉软骨功能重建研究。

通讯作者: 华泽权, 主任医师, 解放军沈阳军区总医院颌面外科, 辽宁省沈阳市 110016

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.08.005
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)08-01172-07
稿件接受: 2013-12-07

Sun An-ke, M.D., Chief physician, Department of Otorhinolaryngology, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Corresponding author: Hua Ze-quan, Chief physician, Department of Maxillofacial Surgery, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Accepted: 2013-12-07

technique. The composites were implanted subcutaneously into the dorsum of the adult New Zealand white rabbits as experimental group. In addition, PGA nonwoven mesh and PHBHH porous sponge respectively were implanted subcutaneously into the dorsum of another rabbits as control group.

RESULTS AND CONCLUSION: Histological examination showed that for the tissue engineered cartilage using PGA nonwoven mesh as scaffolds a few smaller chondrocytes and some remainder of PGA fibers existed among the matrix of neocartilage after 4 weeks; near mature cartilage appeared without PGA fiber remainder after 8 weeks; then mature cartilage formed with a plenty of cartilage matrix and without PGA fiber remainder after 12 weeks. For the tissue engineered cartilage using PHBHH porous sponge as scaffolds, immature chondrocytes presented with more remainder of PHBHH similar to "foreign substance" in neocartilage after 4 weeks; and some remainder of PHBHH still remained after 8 weeks; up until 12 weeks, the remainder of PHBHH was invisible within the new cartilage. It was demonstrated to form rich cartilaginous matrix and type II collage through special staining and immunohistochemical test at 12 weeks after implantation. Both PGA nonwoven mesh and PHBHH porous sponge have good applicability and biodegradability as scaffolds for tissue engineered cartilage *in vivo*, and their biodegradability meets the requirement of constructing tissue engineered cartilage.

Subject headings: biocompatible materials; biodegradation, environmental; cartilage; tissue engineering

Funding: the grant from the General Hospital of Shenyang Military Region, No. zy2009z0019

Sun AK, Sun J, Sun W, Zhang H, Chen W, Hua ZQ. Applicability and biodegradability *in vivo* upon polyglycolic acid nonwoven mesh and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) porous sponge as scaffolds for tissue engineered cartilage. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(8):1172-1178.

0 引言 Introduction

以种子细胞和生物材料为基本要素, 以再生和应用预定形态软骨组织为基本目标的软骨组织工程研究已取得相当进展^[1-2]。组织工程化软骨构建的成功与否和生物支架材料的影响密切相关^[3]。理想的组织工程支架材料应有良好的生物相容性、可控降解性、适当的三维结构和强度要求。迄今, 天然和人工合成的、固体和液体的材料均有应用于组织工程研究的报道^[4]。实验分别以聚羟基乙酸和聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物 [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), PHBHH]为组织工程生物材料成功构建组织工程软骨组织^[5-6], 并对两者作为组织工程软骨细胞外基质材料的适用性与降解性进行了观察。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 观察性动物实验。

时间及地点: 于2010年1月至2011年12月在解放军沈阳军区总医院医学实验科及实验动物中心完成。

材料:

实验动物: 3 d龄新西兰白兔乳兔; 4-6月龄雄性新西兰大白兔7只, 体质量(2.5±0.5) kg, 随机分成实验组($n=4$)和对照组($n=3$), 均由解放军沈阳军区总医院实验动物中心提供。

实验方法:

兔软骨细胞的获取^[7]: 无菌条件下取乳兔肋软骨和关节软骨, 去净软骨膜, 0.1 mol/L灭菌PBS(含青、链霉素各200 U/mL)冲洗2遍, 0.25%胰蛋白酶先消化2 min, PBS冲洗3遍; 然后剪切成1.0-2.0 mm³碎块, PBS再浸洗1遍; 置50 mL小烧杯中, 加0.3% II型胶原酶, 37 °C搅拌消化, 自1 h起, 每半小时收集细胞1次, 直到全部固体物消失。所获细胞悬液, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清, 沉淀用

PBS洗2遍; DMEM/Ham-F12(1 : 1)混合培养液(含体积分数20% FBS)重悬细胞, 锥虫蓝染色, 细胞计数板(血球计数板)法计数(染色细胞判为失活力细胞, 拒染细胞为活力细胞)。以 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于100 mL培养瓶内, 48 h换液1次, 细胞贴满壁后传代。收集第3代培养软骨细胞, 离心后制成细胞悬液备用。

无纺网与多孔海绵作为软骨组织工程支架适用性及体内降解性实验的试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
Dulbecco's Modified eagle medium(DMEM)/Ham-F12 培养基	Gibco, 美国
II型胶原酶、多聚赖氨酸(相对分子质量189 000)、胰蛋白酶	Sigma, 美国
胎牛血清	浙江四季青生物制品公司
PHBHH(相对分子质量为 60×10^4)	清华大学化学工程系
成品聚羟基乙酸无纺网	美国 Albany International Co 公司
倒置相差显微镜	Olympus, 日本
CO ₂ 培养箱	Queue, 美国
免疫组织化学试剂盒	武汉博士德公司

聚羟基乙酸无纺网的规格与预处理: 聚羟基乙酸无纺网单根纤维直径15 μm, 纤维平均间距100-150 μm, 孔隙率为93%-97%, 厚度1.0 mm。使用时剪切成1.5 cm×1.5 cm片状, 以体积分数75%乙醇浸泡2 h, 取出后无菌环境下晾干半干, 大量PBS漂洗至少3遍, 干燥, 无菌多聚赖氨酸充分浸润, 干燥后备用。

多孔PHBHH的制备与预处理: 采用溶液浇铸、模压成形和颗粒滤沥方法将PHBHH絮状材料制备成多孔海绵状并测定其孔隙率^[8]。具体制备流程如下: 将定量PHBHH絮状材料置入球形耐热玻璃容器内, 加入一定比例的氯仿溶剂, 密封条件下加热回流, 磁性搅拌器充分搅拌。待溶

液成均匀的稀糊状后, 迅速倒入盛有氯化钠盐粒(筛分为150-200 μm)的广口瓶内, 密封瓶口, 室温下过夜(使材料自然渗入盐层内)。取材料与盐的混合物置入模具内模压成厚度为1.5 mm片状, 脱模样品置通风橱中至少48 h, 使氯仿充分蒸发。然后放入真空抽滤器中抽滤12 h以除去可能残留的氯仿。将所得样品置一金属网内, 悬于盛三蒸水的玻璃容器内, 磁力搅拌, 滤沥除盐, 三蒸水至少更换3次。除去盐粒的样品自然干燥后, 采用液体乙醇置换法测定其孔隙率为 $(92\pm 2)\%$ ^[9], 孔径100-150 μm , 厚度1.5 mm左右。应用时剪切成1.5 cm \times 1.5 cm片状, 以体积分数75%乙醇浸泡2 h, 取出后无菌环境下晾半干, 大量PBS漂洗至少3遍, 再干燥, 无菌多聚赖氨酸溶液浸充分, 干燥后备用。

软骨细胞与聚羟基乙酸无纺网和PHBHH多孔海绵的复合培养: 调整细胞悬液浓度为 $5\times 10^{10} \text{ L}^{-1}$, 采用多点播散方法将细胞悬液分别接种于经培养液预湿后约七成干燥的片状聚羟基乙酸无纺网与PHBHH多孔海绵材料上, 每种材料分别接种8片。细胞与材料复合后, 将负载软骨细胞的聚羟基乙酸无纺网与PHBHH多孔海绵材料各2片置于同一培养皿中(共用4个培养皿), 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 、饱和湿度培养箱内培养, 每48 h换液1次, 倒置显微镜下观察复合物边缘细胞生长及附着情况。细胞与材料复合物体外共同培养2周后植入动物体内。

聚羟基乙酸和PHBHH生物材料与软骨细胞复合物构建组织工程软骨: 3%戊巴比妥按30 mg/kg耳缘静脉注射麻醉, 固定动物于专用手术台上, 以脊柱为界, 分别在左右背部脱毛约4 cm \times 5 cm范围, 常规消毒后切开皮肤, 分离皮下组织, 分别将体外培养2周的聚羟基乙酸-软骨细胞复合物与PHBHH-软骨细胞复合物各2片植入成年兔皮下(一侧背部植入聚羟基乙酸-软骨细胞复合物, 另一侧植入PHBHH-软骨细胞复合物, 两片间距 $> 2 \text{ cm}$ 以上); 对照组植入同样大小的单纯聚羟基乙酸和PHBHH生物材料(每只

动物左右背部分别植入1片聚羟基乙酸材料和PHBHH材料)。切口缝合后耳缘静脉缓慢注射青霉素 $80\times 10^4 \text{ U}$, 送回动物中心饲养。

主要观察指标: 植入后4, 8, 12周, 两组各处死1只动物取材, 观察: ①以聚羟基乙酸无纺网和PHBHH多孔海绵为生物材料的组织工程软骨形成情况。②组织学检测: 了解聚羟基乙酸和PHBHH材料在组织工程软骨中的降解性。③特殊染色: Masson 三色染色评价组织工程软骨胶原生成情况; 阿尔辛蓝过碘酸雪夫反应染色了解组织工程软骨基质黏多糖分泌情况; 免疫组织化学染色检测组织工程软骨II型胶原表达。

2 结果 Results

2.1 软骨细胞与聚羟基乙酸无纺网和PHBHH多孔海绵复合培养情况 软骨细胞分别与两种支架材料复合体外共同培养2周, 倒置显微镜下可见PHBHH材料孔隙中胶冻样基质和聚羟基乙酸纤维上的胶冻状基质(图1A, B)。

2.2 以聚羟基乙酸无纺网和PHBHH多孔海绵为生物材料的组织工程化软骨形成情况 植入4周时取出组织工程软骨标本, 两者标本上均包裹一层密布血管的结缔组织, 剥去结缔组织见两者标本与植入前大小相当, 均呈乳白色软骨样结构, 软骨表面无血管分布(图1C); 8周时与12周时外观均呈瓷白色。

2.3 皮下植入实验组织学检测结果

以聚羟基乙酸无纺网为生物材料获取的组织工程软骨: 植入后4周, 苏木精-伊红染色可见软骨细胞较小, 软骨内有较多聚羟基乙酸纤维残留(图2A); 8周时软骨细胞较成熟, 包埋在陷窝内, 聚羟基乙酸纤维已消失(图2B); 12周时软骨细胞成熟, 基质分泌丰富, 未见任何聚羟基乙酸存留迹象。

以PHBHH多孔海绵为生物材料获取的组织工程软骨: 植入后4周, 镜下见软骨细胞不成熟, 软骨基质内材料残留(图2C), 8周时软骨细胞较成熟, 软骨基质内仍可见到材料

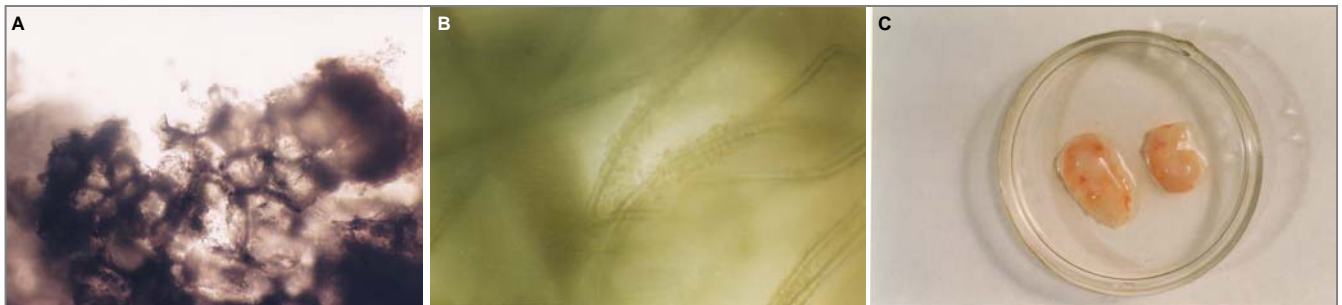


图1 兔软骨细胞分别与聚羟基乙酸无纺网和聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物复合培养2周及植入兔背部皮下4周的大体观察
Figure 1 Gross observation of rabbit chondrocytes co-cultured respectively with polyglycolic acid nonwoven mesh and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) porous sponge as scaffolds for 2 weeks as well as 4 weeks after subcutaneous implantation of the composites

图注: ①图中A为软骨细胞与聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵材料复合培养, 可见材料孔隙中较多胶冻状软骨基质(倒置显微镜, $\times 100$)。②图中B为软骨细胞与聚羟基乙酸无纺网复合培养, 可见聚羟基乙酸纤维上有较多胶冻状软骨基质(倒置显微镜, $\times 100$)。③图中C中左为以聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵为细胞外基质材料获取的组织工程软骨, 右为以聚羟基乙酸无纺网为细胞外基质材料获取的组织工程软骨, 两组标本均呈乳白色软骨样结构。

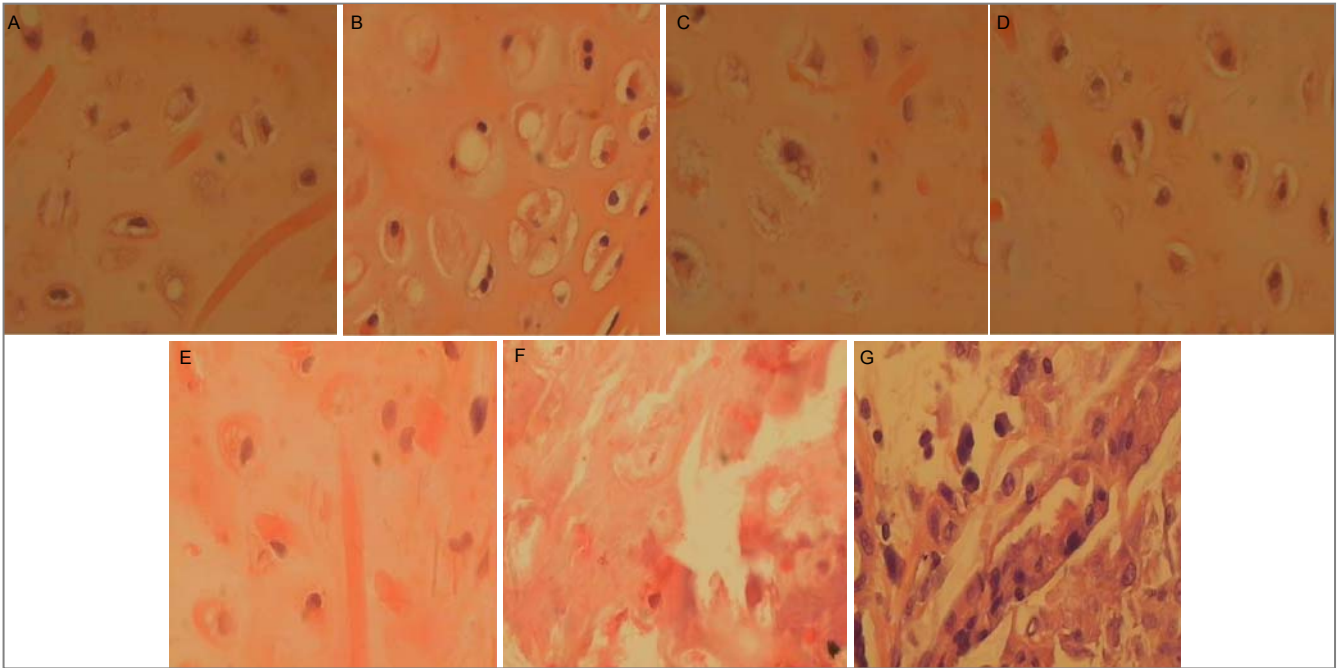


图2 聚羟基乙酸无纺网与聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物分别负载软骨细胞以及分别植入兔皮下的组织学观察(苏木精-伊红染色, ×400)

Figure 2 Histological observation of rabbit chondrocytes-polyglycolic acid nonwoven mesh, chondrocytes-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) porous sponge, polyglycolic acid nonwoven mesh, and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) porous sponge subcutaneously implanted into the dorsum of rabbits (hematoxylin-eosin staining, ×400)

图注: 图中 A 为聚羟基乙酸无纺网负载软骨细胞皮下植入 4 周, 组织工程软骨细胞较小, 软骨内有较多聚羟基乙酸纤维残留; B 为聚羟基乙酸无纺网负载软骨细胞皮下植入 8 周, 组织工程软骨细胞较成熟, 包埋在陷窝内, 聚羟基乙酸纤维已基本消失; C 为聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵负载软骨细胞皮下植入 4 周, 组织工程软骨细胞不成熟, 软骨基质内材料残留; D 为聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵负载软骨细胞皮下植入 8 周, 组织工程软骨细胞较成熟, 软骨基质内仍可见到材料残留; E 为单纯聚羟基乙酸无纺网皮下植入 4 周, 镜下聚羟基乙酸纤维残留较多; F 为单纯聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵皮下植入 4 周, 可见较多孔海绵状物; G 为单纯聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵皮下植入 8 周, 海绵状物明显减少, 但材料间隙组织细胞增多。

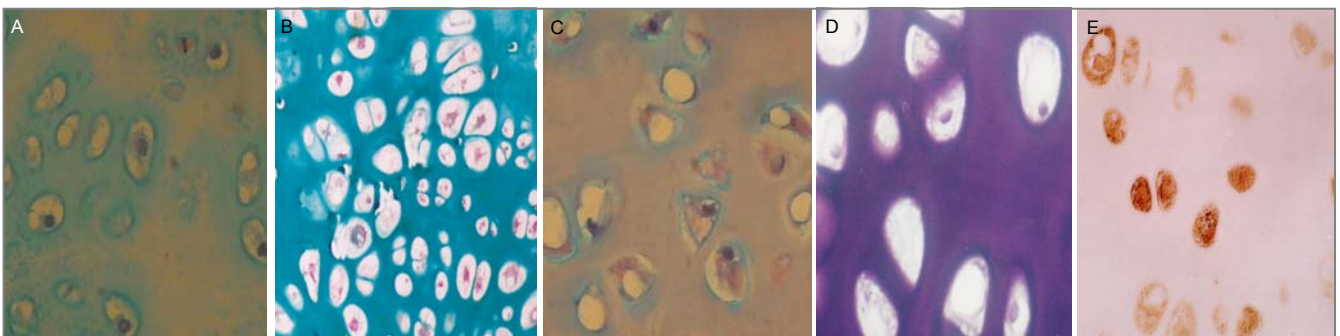


图3 聚羟基乙酸无纺网与聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物分别负载软骨细胞植入兔皮下(Masson 三色染色、阿尔辛蓝过碘酸雪夫反应染色及免疫组织化学检测×400)

Figure 3 Masson trichrome staining, Alcian Blue and Periodic Acid Schiff staining, and immunohistochemical detection of rabbit chondrocytes-polyglycolic acid nonwoven mesh and chondrocytes-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) porous sponge subcutaneously implanted into the dorsum of rabbits (×400)

图注: 图中 A 为聚羟基乙酸无纺网负载软骨细胞(或聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵负载软骨细胞)皮下植入 4 周, 软骨细胞陷窝之间胶原绿染较浅, 说明基质胶原含量较少(Masson 三色染色); B 为聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵负载软骨细胞(或聚羟基乙酸无纺网负载软骨细胞)皮下植入 8 周, 软骨基质绿染明显加深, 说明胶原含量逐渐增多(Masson 三色染色); C 为聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵负载软骨细胞(或聚羟基乙酸无纺网负载软骨细胞)皮下植入 4 周, 软骨细胞间及其周围淡紫色较浅, 说明基质黏多糖含量较少(阿尔辛蓝过碘酸雪夫反应染色); D 为聚羟基乙酸无纺网负载软骨细胞(或聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵负载软骨细胞)皮下植入 8 周, 软骨细胞间及其周围紫色较深, 说明基质黏多糖含量较多(阿尔辛蓝过碘酸雪夫反应染色); E 为聚羟基丁酸酯-聚羟基己酸酯共聚物多孔海绵负载软骨细胞皮下植入 8 周, 细胞胞质中 II 型胶原褐色阳性物较明显, 基质中也可检出 II 型胶原阳性物; 聚羟基乙酸无纺网负载软骨细胞组情况与此相似(DAB 显色)。

残留(图2D), 12周时软骨基质材料残留基本消失。

对照组: 单纯聚羟基乙酸植入4周, 镜下聚羟基乙酸纤维残留较多(图2E), 8周聚羟基乙酸纤维基本消失; 单纯PHBHH材料组, 植入4周可见较多孔海绵状物(图2F), 8周海绵状物明显减少, 但材料间隙组织细胞增多(图2G), 12周时软骨内未见材料残留。

Masson三色染色: 两种材料获取的组织工程软骨, 植入4周时均表现为软骨细胞陷窝之间胶原绿染较浅(图3A); 8周时及12周时染色明显加深(图3B), 说明胶原含量逐渐增多。

阿尔辛蓝过碘酸雪夫反应染色: 两种材料获取的工程组织软骨, 植入4周时基质均呈淡紫色(图3C), 8周及12周时染色均呈紫蓝色(图3D), 说明基质黏多糖分泌逐渐增多。

免疫组织化学染色: 两种材料获取的工程组织软骨, 植入4周时II型胶原均呈弱阳性, 主要分布于细胞胞质, 基质中几乎检不出阳性物; 8周时细胞胞质中阳性物明显增强, 基质中检出II型胶原阳性物(图3E); 12周时与8周时着色基本一致。

3 讨论 Discussion

三维可降解生物支架材料的选择对组织工程技术构建软骨组织非常重要, 它为细胞生长提供依附的支架和生长空间, 促进细胞生长成与支架预定形态一样的组织或器官。理想的软骨组织工程支架材料应具有良好的生物相容性、一定的三维空间结构及生物降解性, 其降解速率应与细胞增殖及组织生长速率相匹配, 即当移植的细胞形成与所需组织有相似形态时再逐步降解^[10-11]。

目前软骨组织工程所用生物材料主要有4大类: 天然生物材料(胶原、纤维蛋白和壳聚糖等)^[12]、人工合成生物材料(聚羟基乙酸和聚乳酸等)^[13]、由微生物合成的新型生物材料(聚羟基烷酸酯类生物材料及其共聚物等)和复合材料(聚乳酸-胶原和纤维蛋白-聚氨酯等)^[14-15]。软骨组织工程所选生物材料, 在生物相容性、机械强度、内部结构设计、细胞黏附性、降解速率控制、代谢微环境及塑形要求等方面各有其优缺点。虽然目前针对众多应用于软骨组织工程的生物材料尚缺乏系统的对照研究与统一标准, 也还没有一种生物材料能完全符合组织工程软骨构建与应用的要求, 但在塑形适应性、生物降解性与生物相容性等方面, 人工合成的聚羟基乙酸无纺网与自微生物中提取的新型生物材料PHBHH多孔海绵显示出较好的性能^[16-17]。

聚羟基乙酸是 α -聚酯类物质, 聚合物中酯键易于水解, 在体内降解成羟基乙酸单体, 部分由尿直接排出, 部分可酶解成甘氨酸。甘氨酸可用于蛋白质的合成或转化为丙酮酸盐, 从而参加三羧酸循环, 最终产生 CO_2 和水而排出, 对人体无任何损害^[18]。有研究探讨聚羟基乙酸负载软骨细胞在有免疫力动物修复同种异体甲状软骨缺损的可

行性, 实验以酶消化法获取3 d龄新西兰乳兔肋软骨和关节软骨细胞, 采用组织工程技术制备软骨细胞-聚羟基乙酸复合物, 体外共同培养1周后用于修复同种异体成年新西兰白兔甲状软骨缺损(实验组7只), 设单纯聚羟基乙酸材料修复组(对照A组4只)和单纯软骨细胞修复组(对照B组4只)作为对照实验。分别于术后不同时间取材, 对甲状软骨缺损的修复效果进行大体和组织学评价: ①体外培养阶段可见黏附于聚羟基乙酸纤维表面的细胞分泌出丰富的软骨基质, 呈蜘蛛网状分布于聚羟基乙酸纤维之间。②术后4周大体观察: 实验组修复区呈淡黄色, 与正常软骨界限分明。③组织学检查: 修复区内有软骨细胞生成和基质分泌, 但与正常软骨间存在界面无细胞区, 未见明显炎症细胞浸润; 8周时实验组修复区色乳白, 与正常软骨仍有界限; 镜下见修复区软骨细胞较成熟, 软骨基质含量丰富; 12周时实验组修复区呈瓷白色, 界面区软骨细胞不明显, 但修复区软骨细胞数量、形态和基质与正常软骨相似。④各时间点对照组大体观察修复区均呈不同程度的凹陷, 暗红色, 部分软组织充填其中, 质软; 组织学及特殊染色检查未发现软骨样结构及其分泌的基质成分, 新生软骨内未见血管生长, 表明聚羟基乙酸负载软骨细胞能修复具有正常免疫功能同种异体兔甲状软骨缺损, 但新生软骨与正常软骨间存在无细胞区界面, 无明显免疫排斥。有学者指出, 目前软骨组织工程聚羟基乙酸无纺网支架材料取得较好效果的纤维直径是 $15\ \mu\text{m}$ 左右, 孔径为 $150\text{--}200\ \mu\text{m}$, 厚度为 $1\ 000\ \mu\text{m}$ 左右, 孔隙率为 $90\%\text{--}95\%$ ^[19]。根据材料和加工工艺的差别, 其孔隙率可在 $80\%\text{--}95\%$ 间调节, 无纺网孔径可在 $20\text{--}100\ \mu\text{m}$ 间设定^[20], 通过孔隙构型和孔隙率的设定, 降解时间从4周-2年可控^[21]。Vacanti等^[22]首先将聚羟基乙酸无纺网用于组织工程软骨研究并成功获得新生软骨。目前聚羟基乙酸无纺网设计除应用于软骨组织工程外, 在组织工程血管^[23]、肌腱^[24]、角膜^[25]、皮肤及牙周组织等方面也有广泛的应用^[26-27], 并取得了初步成功^[28]。实验所购成品聚羟基乙酸无纺网单根纤维直径 $15\ \mu\text{m}$, 间距 $100\text{--}150\ \mu\text{m}$, 厚 $1\ 000\ \mu\text{m}$, 除生物相容性、降解性外, 符合组织工程生物材料多孔状、高孔隙率的基本要求。

聚羟基烷酸酯类材料是由微生物产生的聚酯类天然物质, 具有生物相容性好、无致炎性、无排斥性和易降解等特点^[29-30]。聚羟基烷酸酯类系列聚合物中, 随着单体碳数的增加, 力学性能存在着从脆性到黏性的转变。由于该系列聚合物种类较多, 且聚合物之间有较好的相容性, 通过对不同聚合物的优势组合, 可以得到具有更佳强度、韧性、生物相容性和可控降解性的组织工程支架材料^[31-32]。微生物制造的聚羟基烷酸酯类产品完全不含有人工合成生物材料可能残留的有害物质, 是极洁净的生物材料之一, 其体内最终产物是 CO_2 和水。作为一种新型生物材料, 在医学领域已展露出广阔的应用前景^[33-34]。聚羟基丁酸酯与聚羟基己酸酯共聚而成的优化材料PHBHH, 是具有中国自主知

识产权的组织工程生物材料产品,不但具有聚羟基烷酸酯类生物材料的优点,而且价格低廉、来源充裕,是一种质优经济的生物材料,已有应用于软骨组织工程研究的报道^[35-36]。实验以PHBHH絮状物为原料,采用溶液浇铸、模压成形与颗粒滤沥方法制备PHBHH多孔海绵状材料,扫描电镜显示呈多孔海绵状,孔径与筛分氯化钠盐粒100-150 μm大小基本相符,经乙醇体积浸润法测定孔隙率大于90%,符合组织工程生物材料多孔状、高孔隙率和具有一定机械强度的基本要求^[37]。孙安科等^[37]以羟基丁酸酯与聚羟基己酸酯共聚絮状物为原料、氯化钠盐粒为致孔剂,采用溶剂浇铸、模压成形和颗粒滤沥技术制备多孔聚羟基丁酸酯与聚羟基己酸酯共聚物喉支架,负载软骨细胞后体外共同培养,通过大体形态、扫描电镜观察材料孔隙连续性及其与软骨细胞黏附、分布和生长情况。模压成形的组织工程聚羟基丁酸酯与聚羟基己酸酯共聚物材料塑形物类似喉软骨支架形态,滤沥除盐后整体结构呈多孔海绵状,具有良好的支撑性,孔隙率达(92±2)%,孔隙间连续性好,软骨细胞与材料黏附、生长及孔隙内分布状况良好,基质分泌旺盛。

由于具有一定的三维空间结构是组织工程支架材料的重要指标,所以理想的组织工程三维空间构型在制作上究竟以无纺网形式还是以多孔海绵结构成型还存在不同意见,有人认为无纺网组成的空间结构较好,而有的学者认为多孔结构更有利于组织结构的稳定^[38]。实验分别以一定设计的聚羟基乙酸无纺网与课题组自主制备PHBHH多孔海绵为生物材料,在体内外相同条件下观察无纺网结构与多孔海绵结构作为软骨组织工程细胞外基质材料的适用性及降解性。

实验结果表明聚羟基乙酸无纺网与PHBHH多孔海绵生物材料,相同的体内外环境条件下负载软骨细胞构建组织工程软骨,在不同的时间段均成功获取再生软骨组织。实验观察显示体外软骨细胞三维生长活跃,体内成软骨效应良好。说明实验所获取的聚羟基乙酸无纺网与自主制备的PHBHH多孔海绵生物材料作为软骨组织工程生物材料,具有良好的适用性。

一定的三维空间结构设计决定着组织工程支架材料体内外降解性。软骨组织工程研究表明,新生软骨的形成需要6-8周时间^[22]。因此,一般支架材料的生物降解时间也应设计在6周以后,由于聚羟基乙酸无纺网与PHBHH共聚物的降解时限设定宽限,可达4周-2年,通过事先设定各自制备与共聚的参数,可以达到所需的降解要求^[39-40]。目前组织工程生物材料无论是制备成无纺网状还是多孔海绵状均缺乏统一的制备模式与设备要求,多数是基于自主实验得出的经验性数据,聚羟基乙酸无纺网与PHBHH多孔海绵材料也远未达到商品化程度,大多数是一些大公司或实验室自己试制使用,或交流使用,在设计上也存在一定差异。本实验所采用的成品聚羟基乙酸无纺网及PHBHH多孔海

绵材料,前者纤维粗细、孔径大小及孔隙率等参数为公司定品,后者在获取PHBHH絮状材料的基础上以溶液浇铸、模压成形与颗粒滤沥方法自主制备成多孔海绵状材料。应用表明体外培养1周两者均未见降解迹象,体内植入4周,再生软骨内有较多聚羟基乙酸纤维及PHBHH杂质残留,8周聚羟基乙酸纤维已基本消失,但仍可见PHBHH杂质,12周再生软骨内PHBHH才基本消失。说明自主制备的PHBHH多孔海绵材料在组织工程软骨构建中较一定设计的聚羟基乙酸无纺网降解吸收滞后,尽管如此,以两种材料为细胞外基质所再生的组织工程软骨,其细胞生长及基质分泌均良好。说明所使用的聚羟基乙酸无纺网及PHBHH多孔海绵设计适用于软骨组织工程研究,降解时间达到组织工程软骨构建要求。

虽然实验使用一定设计的聚羟基乙酸无纺网与自主制备的PHBHH多孔海绵结构设计作为细胞外基质材料在组织工程软骨再生中均显示出较好的支架功能。但聚羟基乙酸无纺网存在价格昂贵、制作工艺复杂、目前尚不能自主制备、材料来源受国外大公司控制等不利因素。而PHBHH材料是一种具有我国自主知识产权的生物材料产品,来源充足、价格低廉,可自主制备成孔径与孔隙率符合软骨组织工程要求的多孔海绵状支架生物材料,显示出良好的应用前景。

致谢:感谢解放军沈阳军区总医院医学实验中心马东初主任、曹建平副主任技师、解放军沈阳军区实验动物中心汪洋主任、韩玉清技师与动物管理员杨师傅在细胞培养及动物实验中给予的支持与帮助。

作者贡献:实验设计为第一、六作者,实验实施为第一、二、三、四、五作者,实验评估为第一、三、六作者,资料收集为第一、二、三作者。第一作者成文、审校、对文章负责。

利益冲突:文章及内容不相关利益冲突。

伦理要求:实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语:聚羟基烷酸酯类材料-是由微生物产生的聚酯类天然物质,具有生物相容性好、无致炎性、无排斥性和易降解等特点。

作者声明:文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Marcacci M, Filardo G, Kon E. Treatment of cartilage lesions: What works and why? *Injure*. 2013;44 (Suppl 1):11-15.
- [2] Fishman JM, DeCoppi P, Elliott MJ, et al. Airway tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11(12):1623-1635.
- [3] 王海江, 陈启富. 组织工程支架材料研究进展[J]. 中国现代医生, 2012, 50(1): 27-29.
- [4] 李德保, 章庆国. 软骨组织工程支架材料研究进展[J]. 中国美容医学, 2009, 18(3): 408-410.

- [5] 孙安科,陈文弦,崔鹏程,等.以PGA 为三维支架同种异体工程化软骨的构建[J].解放军医学杂志,2001,26(10):748-749.
- [6] 孙安科,裴国献,胡平,等.组织工程化喉软骨的构建[J].中华耳鼻咽喉科杂志,2004,39(10):606-611.
- [7] 鄂征.组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1999:1-118.
- [8] Mikos AG,Sarakinos G,Leite SM,et al.Laminated three-dimensional biodegradable foams for uses in tissue engineering.Biomaterials. 1993;14(2):323-330.
- [9] Zhang R,Ma PX. Poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology.J Biomed Mater Res. 1999;44(4):446-455.
- [10] Kim BS,Mooney DJ.Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering.Trends Biotechnol. 1998;16(5):224.
- [11] Shim IK, Lee SY, Park YJ, et al. Homogeneous chitosan-PLGA composite fibrous scaffolds for tissue regeneration.J Biomed Mater Res A. 2008;84(1):247-255.
- [12] Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. Biopolymers. 2008;89(5):338-344.
- [13] Cohen SB, Meirisch CM, Wilson HA, et al. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. Biomaterials. 2003;24(15):2653-2660.
- [14] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials. 2005;26(33):6565-6578.
- [15] 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.
- [16] Be k CH, Ko YJ. Characteristics of tissue-engineered cartilage on macroporous biodegradable PLGA scaffold.Laryngoscope. 2006;116(10):1829-1834.
- [17] 吴俊,孙俊英,李海燕,等.以PHBV为支架构建组织工程化软骨[J].中国矫形外科杂志,2006,14(13):1016-1018.
- [18] 于娟,万涛,李世普.生物可降解聚材料聚羟基乙酸[J].生物骨科材料与临床研究,2005,2(6):50-56.
- [19] Puelacher WC, Mooney DJ, Ianger R, et al. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. Biomaterials. 1994;15(6):774-778.
- [20] Boyan DB, Hunnert TW, Dean DD, et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials. 1996;17(2):137-146.
- [21] Vacanti CA, Paige KJ, Kim W, et al. Experimental tracheal replacement using tissue engineered cartilage. J Pediatr Surg. 1994;27(3):201-204.
- [22] Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer Matrices. Clin Plast Surg. 1994;21(3):445-462.
- [23] 潘勇,黄蔚,艾玉峰,等.组织工程人工血管支架的预构[J].中华整形外科杂志,2003,19(1):44-46.
- [24] 李鹏程,程代薇,徐福,等.组织工程肌腱种子细胞的比较研究[J].组织工程与重建外科杂志,2006,2(3):134-136.
- [25] 胡晓洁,王敏,柴岗,等.组织工程技术构建兔角膜基质组织的实验研究[J].中华眼科杂志,2004,40(8):517-521.
- [26] 杨光辉,崔磊,刘伟,等.利用聚羟基乙酸构建组织工程皮肤的实验研究[J].中华实验外科杂志,2003,20(11):984-985.
- [27] 田敏,王贻宁,陈新明,等.PGA无纺网与PDLCs的3D共培养物在裸鼠体内的生长观察[J].口腔医学研究,2005,21(2):116-118.
- [28] 毛天球.组织工程的研究概况[J].实用口腔医学杂志,2000,16(2):74-76.
- [29] Luo L, Wei X, Cben GQ. Physical Properties and Biocompatibility of. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Blended with Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). J Biomater Sci Polym Ed. 2009;20(11):1537-1553.
- [30] 田频源,米钰,尚龙安,等.聚羟基烷酸酯的研究进展[J].化工进展,2009,28(3):468-476.
- [31] Zhao K, Deng Y, Chen J, et al. Polyhydroxyalkanoate(PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. Biomaterials. 2003;24(9):1041-1045.
- [32] 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.
- [33] Cool SM, Kenny B, Wu A, et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composite biomaterials for bone tissue regeneration: in vitro performance assessed by osteoblast proliferation, osteoclast adhesion and resorption, and macrophage proinflammatory response. J Biomed Mater Res A. 2007;82(3):599-610.
- [34] Veleirinho B, Coelho DS, Dias PF, et al. Nanofibrous poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration. Int J Biol Macromol. 2012;51(4):343-350.
- [35] 冷晔.聚羟基丁酸己酸酯及其在组织工程中的应用[J].生物医学工程学进展,2011,32(4):213-218.
- [36] 唐秀杰,胡平,吴清玉.聚羟基烷酸酯、聚丁二酸丁二酯及其共混材料的细胞相容性评价比较[J].生物医学工程学杂志,2007,24(4):790-793.
- [37] 孙安科,胡平,李万同,等.组织工程PHBH多孔材料喉支架的制备与细胞相容性研究[J].听力学及言语疾病杂志,2011,19(6):558-561.
- [38] Freed LE, Marquis JC, Nohria A, et al. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. J Biomed Mater Res. 1993;27(1):11-23.
- [39] 周栋,胡平,汪钢,等.聚羟基丁酸及其共聚物在体内组织相容性和降解率的实验研究[J].武警医学,2003,14(4):210-212.
- [40] 欧阳少平,丘远征,卢晓云,等.代谢工程技术调控3-羟基丁酸与3-羟基己酸共聚物PHBHx的微生物合成[J].生物加工过程,2003,1(1):60-65.