

负载软骨细胞的透明质酸可注射材料修复软骨缺损

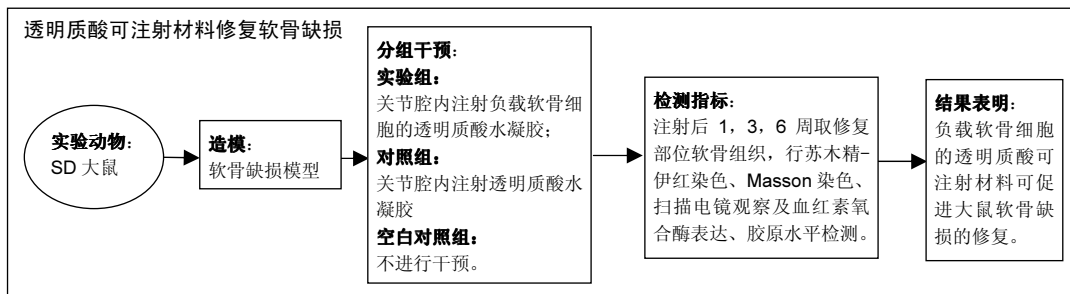
赵峰¹, 何薇², 刘少俊¹, 王辉¹, 吕亚军¹, 康凯¹, 张国平¹ (¹河北医科大学第一医院骨科, 河北省石家庄市 050031; ²河北医科大学第三医院手外科, 河北省石家庄市 050051)

引用本文: 赵峰, 何薇, 刘少俊, 王辉, 吕亚军, 康凯, 张国平. 负载软骨细胞的透明质酸可注射材料修复软骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(30):4787-4792.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.30.006

ORCID: 0000-0003-0240-9160(赵峰)

文章快速阅读:



赵峰, 男, 1978年生, 辽宁省北宁市人, 满族, 硕士, 副教授、副主任医师, 主要从事关节损伤与修复方面的研究。

通讯作者: 何薇, 河北医科大学第三医院手外科, 河北省石家庄市 050051

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)30-04787-06

稿件接受: 2017-05-10

文题释义:

透明质酸软骨修复支架材料: 透明质酸以其更高的结构孔隙率, 更大的比表面积, 更佳生物学性能在众多结构和性能具有差异的天然材料中脱颖而出。研究发现, 透明质酸可促进软骨细胞的黏附和增殖, 按正常性能生长, 利于移植软骨细胞与损伤软骨间的整合。已有研究证实, 透明质酸的纯度与其免疫原性呈负相关, 与生物相容性呈正比, 且其降解产物对创面愈合有益处。

摘要

背景: 在软骨组织工程材料中, 以透明质酸为代表的多聚糖材料因具备良好的材料细胞作用界面, 有利于软骨细胞的生长, 成为近年来的研究热点。

目的: 探究负载软骨细胞的透明质酸可注射材料修复大鼠软骨缺损的可行性。

方法: 取 90 只 SD 大鼠, 制备软骨缺损模型, 造模后第 2 天随机分 3 组干预, 实验组关节腔内注射负载软骨细胞的透明质酸水凝胶, 对照组关节腔内注射透明质酸水凝胶, 空白对照组不进行干预。注射后 1, 3, 6 周取修复部位软骨组织, 进行苏木精-伊红染色、Masson 染色、扫描电镜观察及血红素氧合酶表达、胶原水平检测。

结果与结论: ①苏木精-伊红染色: 注射后 6 周, 空白对照组以肉芽组织填充修复区; 对照修复部位被黄白色修复组织填满, 与正常软骨边界明显, 表面不平整, 淋巴细胞较 3 周时减少; 实验组修复组织呈半透明状, 与正常软骨边界模糊, 淋巴细胞较 3 周时明显减少; ②Masson 染色: 注射后 6 周, 实验组修复区胶原纤维合成状况最佳, 其次为对照组, 均强于空白对照组; ③扫描电镜观察: 注射后 6 周, 空白对照组修复区胶原纤维排列不规则, 部分断裂; 对照组修复区胶原纤维排列较整齐, 仍可见部分断裂; 实验组实验部位胶原纤维排列整齐, 与正常软骨边缘分界不明; ④血红素氧合酶表达与胶原水平: 注射后 6 周, 实验组血红素氧合酶表达高于对照组、空白对照组($P < 0.05$); 实验组注射后 1, 3, 6 周的胶原水平高于对照组、空白对照组($P < 0.05$); ⑤结果表明: 负载软骨细胞的透明质酸可注射材料可促进大鼠软骨缺损的修复。

关键词:

生物材料; 软骨生物材料; 透明质酸; 可注射材料; 软骨细胞; 大鼠; 软骨缺损

主题词:

透明质酸; 软骨细胞; 组织工程

基金资助:

河北省 2015 年医学科学研究重点课题计划(20150640)

Zhao Feng, Master, Associate professor, Associate chief physician, Department of Orthopedics, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China

Corresponding author: He Wei, Department of Hand Surgery, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Injectable hyaluronic acid carrying autologous chondrocytes repairs cartilage defects

Zhao Feng¹, He Wei², Liu Shao-jun¹, Wang Hui¹, Lv Ya-jun¹, Kang Kai¹, Zhang Guo-ping¹ (¹Department of Orthopedics, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China; ²Department of Hand Surgery, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In the cartilage tissue engineering materials, hyaluronic acid as the representative of

polysaccharide materials has good material-cell interface that is beneficial to the growth of chondrocytes, which has become a hot research topic in recent years.

OBJECTIVE: To explore the feasibility of injectable hyaluronic acid material loaded with chondrocytes to repair cartilage defects in rats.

METHODS: Ninety Sprague-Dawley rats were selected to prepare a cartilage defect model, and they were randomly divided into three groups at the 2nd day after modeling. The experimental group was injected with hyaluronic acid hydrogel loaded with chondrocytes into the articular cavity, the control group was injected with hyaluronic acid hydrogel into the articular cavity, and the blank control group received no intervention. At 1, 3 and 6 weeks after injection, the repaired cartilage tissues were taken out for hematoxylin eosin staining, Masson staining, and scanning electron microscope observation, and the expression of heme oxygenase and level of collagen were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Hematoxylin eosin staining: at 6 weeks after injection, granulation tissues filled the repair area in the blank control group. The control group was full of yellowish white tissues in the repair area, with distinct boundary with the normal cartilage, the surface was not smooth and the lymphocytes were reduced compared with those at 3 weeks. Repair tissue of the experimental group was semi-transparent and showed a fuzzy boundary with the normal cartilage, and moreover, lymphocyte was significantly reduced compared with those at 3 weeks. (2) Masson staining: at 6 weeks after injection, collagen fiber synthesis in the repair area in the experimental group was the best, successively followed by the control group and the blank control group. (3) Scanning electron microscope observation: at 6 weeks after injection, collagen fiber arrangement in the repair area was irregular and partially broken in the blank control group, and the arrangement became more orderly in the control group but still partially broken. The collagen fibers in the experimental group were arranged orderly, and the boundary with normal cartilage was unclear. (4) Expression of heme oxygenase and level of collagen: at 6 weeks after injection, the expression of heme oxygenase in the experimental group was higher than that in the control group and blank control group ($P < 0.05$). The levels of collagen in the experimental group at 1, 3 and 6 weeks after injection were higher than those in the control group and the blank control group ($P < 0.05$). To conclude, hyaluronic acid injectable material loaded with chondrocytes can promote the repair of cartilage defects in rats.

Subject headings: Hyaluronic Acid; Chondrocytes; Tissue Engineering

Funding: the Major Medical Research Project of Hebei Province in 2015, No. 20150640

Cite this article: Zhao F, He W, Liu SJ, Wang H, Lv YJ, Kang K, Zhang GP. Injectable hyaluronic acid carrying autologous chondrocytes repairs cartilage defects. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(30):4787-4792.

0 引言 Introduction

由于膝关节软骨部位无血管、淋巴和神经的分布,一旦损伤,难以得到有效修复^[1-3]。膝关节软骨损伤患者如得不到及时有效的治疗会导致病情加剧,最后演变成骨性关节炎,严重影响关节功能,增加患者的疾病负担^[4-6]。目前治疗膝关节软骨损伤的方法有运动治疗、药物治疗、手术治疗等^[7-9]。近年来随着生物工程技术的发展,越来越多的研究从骨组织工程领域探究软骨损伤的治疗,取得了一定成绩,尤其源自于自体软骨细胞的软骨缺损修复由于取材方便和无排斥反应,备受骨科医生关注^[10]。组织工程技术除要考虑种子细胞,载体材料也不容忽视。一直以来,天然材料是载体材料的首选,其中以透明质酸为代表的多糖材料因具备良好的材料细胞作用界面,有利于软骨细胞的生长,成为近年来的研究热点^[11]。基于此,研究以大鼠软骨缺损模型为研究对象,以负载软骨细胞的透明质酸可注射材料为载体材料,探讨该复合材料用于修复大鼠软骨缺损的可行性,以期对软骨损伤的治疗提供新的启示。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年6至10月在河北医科大学第一医院实验中心完成。

1.3 材料

实验动物: 清洁级SD大鼠100只,雌雄不拘,体质量(245±23) g,由河北医科大学动物实验中心提供,合格证

编号为DK0709-0165。将其中90只大鼠按照随机数字表法分为空白对照组、对照组和实验组,每组30只,予以不同干预方式,余下10只用于软骨细胞的采集。

主要试剂: 0.25%胰蛋白酶(法国Gibco公司); 0.2%胶原酶II(拜昂生物公司); 甲苯胺蓝染色试剂盒(上海哈灵生物有限公司); 锥虫蓝染色细胞存活率检测试剂盒(碧云天生物技术公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 软骨细胞的采集 无菌下处死10只清洁级SD大鼠,取其剑突软骨,剪碎后,置于0.25%胰蛋白酶37℃消化5 min,静置分层后弃去上清液,再用此酶在37℃环境里消化60 min,0.2%胶原酶II 37℃环境里消化2 h,分层后取上清液,800 r/min离心10 min,收集细胞。先采用细胞分化软骨细胞甲苯胺蓝染色试剂盒进行染色,鉴定软骨细胞,再用锥虫蓝染色细胞存活率检测试剂盒进行染色,吸取少量经过染色的细胞,用血细胞计数板计数,检测细胞活力> 90%,在收集的细胞中倒入少量培养液,将细胞浓度调至 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$,震荡混匀。

1.4.2 复合材料的制备 在河北医科大学第一医院实验中心取0.8 g透明质酸,加80 mL去离子水,充分搅拌均匀后,加入1 mol/L HCl溶液透明质酸溶液,搅拌,直至其pH值达到4.75;先后加入0.3 g己二酸二酰肼、0.3 g碳二亚胺盐酸盐及1 mol/L氢氧化钠,直至pH值为7.0,制备8 g/L的透明质酸水凝胶凝胶(浓度为1%, pH值7-7.4,渗透压比为1.0-1.3),将其封装于采集的软骨细胞中进行培养,调整

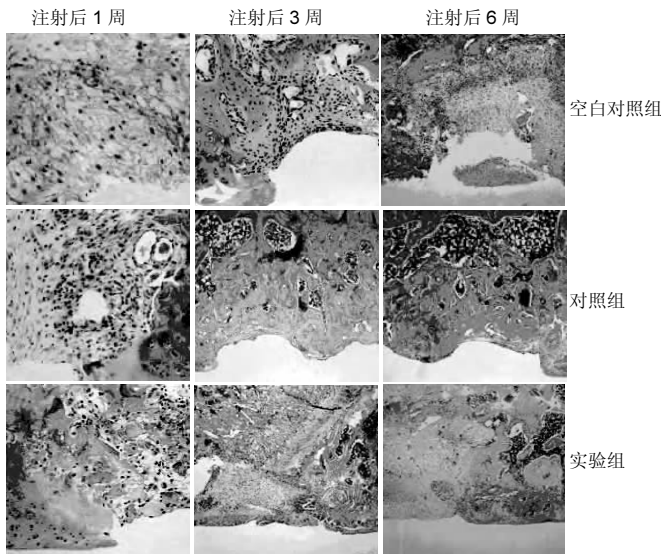


图 1 各组注射后不同时间点软骨缺损处病理学观察结果(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Figure 1 Pathological observation in each group at different time after injection (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图注: 注射后 6 周时, 空白对照组肉芽组织填满修复部位, 淋巴细胞较 3 周时明显减少; 对照组修复部位被黄白色修复组织填满, 与正常软骨边界明显, 表面不平整, 淋巴细胞较 3 周时减少; 实验组修复组织呈半透明状, 与正常软骨边界模糊, 淋巴细胞较 3 周时明显减少。

细胞浓度至 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 震荡混匀, 培养 1 周后待用。

1.4.3 动物造模及分组干预

大鼠软骨缺损模型的制备: 取 90 只 SD 大鼠, 术前 12 h 禁食、禁水, 7% 水合氯醛腹腔注射。待麻醉显效后, 将大鼠仰卧于手术台上、四肢拉直固定, 左下肢手术区备皮, 碘伏消毒, 铺无菌单。以左髌骨上下缘延伸约 2 mm 处为切入点, 在两点间纵向切开皮肤, 同时以髌骨内缘内侧 1 mm 处为切入点, 水平切开内侧支持带及关节囊, 将髌骨向外侧移位, 屈膝后可暴露股骨滑车。在股骨滑车正中钻孔至骨质, 制造全层软骨缺损状态, 止血后, 逐层缝合皮肤和肌层。

各组干预方式: 造模后第 2 天, 空白对照组关节腔不做任何处理, 对照组在关节腔内注射单纯透明质酸水凝胶 0.1 mL, 实验组在关节腔内注射复合材料 0.1 mL。为预防伤口感染, 术后所有大鼠均肌注青霉素, 连续 3 d。

1.5 主要观察指标

光学倒置显微镜下进行组织学观察: 注射后 1, 3, 6 周, 每组各处死 10 只大鼠, 采集实验部位修复的软骨组织, 用 40 g/L 的多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 片厚约 4 μm , 行苏木精-伊红染色; 注射后 6 周行 Masson 染色, 在光学倒置显微镜下比较各组软骨组织修复和胶原纤维合成情况。

扫描电镜下进行精细结构观察: 注射后 6 周, 采集实验部位修复的软骨组织, 用 4% 戊二醛固定, 利用扫描电镜对软骨部位修复情况进行观察。

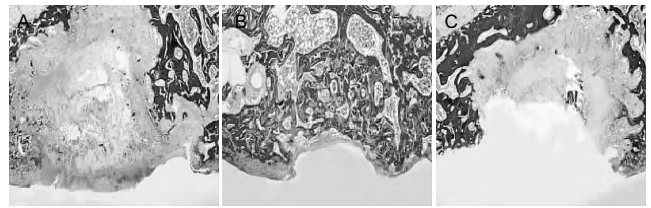


图 2 各组注射后 6 周时软骨缺损区 Masson 染色结果($\times 200$)

Figure 2 Masson staining results at 6 weeks after injection in each group ($\times 200$)

图注: 图中 A 为空白对照组, 胶原纤维合成情况不佳, 骨细胞不成熟; B 为对照组, 骨细胞开始成熟; C 为实验组, 成熟骨细胞较多。

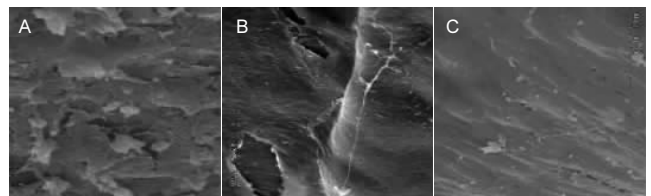


图 3 各组注射后 6 周软骨缺损区扫描电镜观察结果($\times 2 000$)

Figure 3 Scanning electron microscope observation of the defect region at 6 weeks after injection in each group ($\times 2 000$)

图注: 图中 A 为空白对照组, 胶原纤维排列不规则, 部分断裂; B 为对照组, 胶原纤维排列较整齐, 仍可见部分断裂; C 为实验组, 胶原纤维排列整齐, 与正常软骨边缘分界不明。

免疫组织化学测定血纤素氧合酶表达: 注射后 6 周, 采集实验部位修复的软骨组织, 在光学倒置显微镜比较各组血纤素氧合酶表达的异同, 并计算每 100 个细胞中的平均吸光度。

胶原含量测定: 注射后 1, 3, 6 周, 采集实验部位修复的软骨组织, 用羟脯氨酸试剂盒测定其羟脯氨酸含量, 根据羟脯氨酸占胶原含量的比例为 13.4%, 计算出胶原含量。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较使用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 动物术后一般情况 平均手术时间(20 ± 15) min, 平均出血量(10 ± 2) mL, 90 只大鼠中 2 只因麻醉、1 只因术中操作失误出现大失血死亡, 2 只因术后感染被剔除观察范围, 均于术后补充完整。注射后观察 6 周, 所有存活大鼠伤口愈合情况良好, 未出现神经损伤、切口裂开等术后并发症。

2.2 各组光学显微镜下组织学观察结果 空白对照组注射后 1 周时修复部位可见少许肉芽红色组织, 偶见淋巴细胞浸润; 3 周时组织变白, 边界清晰, 淋巴细胞较前增多; 6 周时肉芽组织显著增加, 已填满修复部位, 淋巴细胞明显减少。

对照组注射后 1 周时已被白色的再生组织充满, 与正常

软骨边界界限分明, 偶见淋巴细胞浸润; 注射后3周时修复区部位呈乳白色, 与正常软骨边界清晰可见, 淋巴细胞较前稍增多; 注射后6周, 该组修复部位被黄白色修复组织填满, 与正常软骨边界明显, 表面不平整, 淋巴细胞较前减少。

实验组在1周和3周时的表现与对照组相似, 不同的是在该时间段淋巴细胞较其他两组浸润明显, 尤其以注射后3周尤甚; 在注射后6周时修复组织呈半透明状, 与正常软骨边界模糊, 淋巴细胞明显减少, 见图1。

2.3 各组显微镜下Masson染色结果 实验组修复区胶原纤维合成状况最佳, 其次为对照组, 均强于空白对照组, 见图2。

2.4 各组扫描电镜下观察结果 注射后6周, 空白对照组实验部位胶原纤维排列不规则, 部分断裂; 对照组修复区胶原纤维排列较整齐, 仍可见部分断裂; 实验组实验部位胶原纤维排列整齐, 与正常软骨边缘分界不明, 见图3。

2.5 免疫组织化学检测各组血红素氧合酶表达情况 注射后6周, 各组实验部位的细胞内均可见数量不等的阳性反应产物, 通过计算每100个细胞中的平均吸光度, 结果显示实验组和对照组血红素氧合酶阳性细胞数、平均吸光度高于空白对照组($P < 0.05$), 且实验组高于对照组($P < 0.05$), 见表1。

表1 各组注射后6周血红素氧合酶阳性细胞数及平均吸光度值的比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of mean absorbance value and positive cell number of heme oxygenase in rats among groups at 6 weeks after injection

组别	血红素氧合酶阳性细胞数	平均吸光度
空白对照组	11.45±4.67	0.221±0.079
对照组	17.34±3.23 ^a	0.512±0.025 ^a
实验组	21.34±5.24 ^{ab}	0.885±0.084 ^b
F	12.345	18.896
P	0.042	0.024

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.6 各组胶原含量测定结果 注射后1, 3, 6周, 实验组和对照组胶原含量高于空白对照($P < 0.05$), 实验组胶原含量高于对照组($P < 0.05$), 见表2。

表2 各组注射后不同时间点胶原含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/g}$)

Table 2 Comparison of collagen content at different time after injection among groups

组别	注射后1周	注射后3周	注射后6周
空白对照组	75.45±4.56	76.76±3.87	77.42±3.54
对照组	86.34±3.60 ^a	87.54±7.02 ^a	86.42±9.54 ^a
实验组	103.34±6.74 ^{ab}	105.85±7.08 ^{ab}	104.87±6.69 ^{ab}
F	21.217	18.453	11.731
P	0	0	0

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

正常膝关节主要由软骨细胞与细胞外基质组成, 其中胶原和蛋白多糖是构成基质的重要成分, 在维持关节软骨的弹性及硬度方面扮演重要角色。胶原纤维是基质中主要的大分子结构, 绝大部分为II型胶原^[12]。在膝关节发生损伤时, 软骨细胞的结构和功能会发生改变, 进而导致软骨关节的生物力学性能和力学性能发生变化, 常在后期演变成骨关节炎等膝关节退行性疾病^[13-15]。研究发现, I型胶原不表达于正常分化的软骨细胞, 而在关节软骨损伤后的再生软骨中可大量检测到^[16-18]。然而与II型胶原相比, I型胶原的生物力学性能和力学性能相差较远, 难以满足膝关节正常生理活动的需要^[19-20]。值得注意的是, 关节软骨无缺乏神经血管的营养供应, 组织代谢能力低, 因此软骨的自我修复能力有限。

近年来, 随着组织工程技术的发展, 使关节软骨损伤的治疗出现迅猛的发展^[21-22]。组织工程技术的关键就是获取少量组织细胞经过体外培养、扩增到最佳状态后, 附着在合适的支架材料上重新移植到体内形成新的具有活力的组织的过程^[23-24]。其中种子细胞和载体材料的选择是技术的核心^[25]。理想种子细胞因具备下列条件: 获取容易, 创伤小; 来源广, 使用安全; 具备较强的增殖和定向分化的能力等^[26-28]。

骨髓间充质干细胞、软骨细胞、胚胎干细胞等常被当做种子细胞运用于实验或临床, 其中对关节软骨的组成、功能起决定的软骨细胞常作为研究者的首选^[29]。软骨细胞可分为软骨细胞和异体软骨细胞。自20世纪国外学者首次报道对兔子实施软骨细胞移植术成功以来, 开启了软骨细胞移植用于软骨损伤治疗的大门, 在临床应用过程中备受研究人员青睐^[30]。国内朱如里等^[31]将取自白兔的软骨细胞在体外增殖后接种于胶原海绵支架上, 后移植于兔膝关节软骨缺损处, 进行大体组织学观察。该研究团队将此法推广到临床, 对8例软骨缺损患者先行关节镜下取软骨, 制备种植了软骨细胞的胶原膜, 再将其植入软骨缺损处, 最后进行系统康复治疗。结果显示, 无论是动物实验还是人体实践, 负载了自体软骨的复合材料在软骨的修复上均显示了良好的应用前景, 值得推广。那么, 用负载了同种异体软骨细胞的生物材料用于软骨细胞的修复, 效果究竟如何呢, 结果值得期待!

作为组织工程的另一个研究热点, 支架材料承担着负载种子细胞的黏附增殖, 并提供一定的力学支撑和最适宜微环境的功能。理想的支架材料应具备以下特点: 具有良好的组织相容性; 适合细胞粘附和增殖的三维立体结构; 能降解, 可控制降解速度; 具有一定的可塑性和机械性强度^[32]。按来源支架材料可以分为人工合成材料和天然材料。前者以聚乳酸、金属材料、羟基磷灰石等为代表, 因其表面不具备生物活性, 加之其降解产物具有毒性的潜在可能在临床应用受到限制^[33]。后者如胶原、丝素蛋白、透明

质酸等, 以其良好的生物相容性和可降解性备受研究人员关注^[34-35]。其中, 在软骨修复支架材料中, 透明质酸以其更高的结构孔隙率, 更大的比表面积, 更佳生物学性能在众多结构和性能具有差异的天然材料中脱颖而出。研究发现, 透明质酸可促进软骨细胞的黏附和增殖, 按正常性能生长, 利于移植软骨细胞与损伤软骨间的整合^[36]。已有研究证实, 透明质酸的纯度与其免疫原性成负相关, 与生物相容性成正比, 且其降解产物有对创面愈合有益处^[37]。透明质酸在骨科作为治疗用药已实践多年, 作为可注射材料, 操作简便易行, 上述几点为本研究选用透明质酸作为生物载体材料的立足点。此次研究尝试应用负载了软骨细胞透明质酸可注射材料进行关节腔注射来修复软骨缺损, 试图证明与单纯使用透明质酸作为注射材料相比, 效果更优, 更具有可行性。

通过此次研究的病理图片可发现, 随着时间的增长, 空白对照组软骨缺损区在无任何外来生物材料干预的情况下, 按组织自然修复的特点, 以肉芽组织填充损伤部位为主。在术后1周时由于损伤的刺激淋巴细胞增多, 随着损伤的修复, 淋巴细胞减少; 对照组在术后1周时已被白色的再生组织充满, 显示了透明质酸良好的生物学性能, 但与正常软骨边界界限分明。作为一种异物, 由于吞噬细胞的识别, 可见淋巴细胞浸润, 在术后3周达到高峰。但在术后6周时, 随着透明质酸对组织的进一步修复, 淋巴细胞开始减少; 实验组在1周和3周时的表现与对照组相似, 但在该时间段淋巴细胞较其他两组浸润明显, 尤其以术后3周尤甚。该结果提示炎症反应强烈的根源可能与软骨细胞表面的主要组织相容性抗原有关, 具体原因尚待进一步探明。随后在术后3周时组织呈半透明状, 与正常软骨边界模糊, 淋巴细胞明显减少, 显示了复合材料良好的组织相容性。为了进一步评价骨组织的成熟度, 此次研究采用了Masson染色。既往经验表明骨中胶原纤维为I型纤维, 不成熟骨细胞绿染多, 成熟骨的Masson染色为红染多。此次研究Masson结果显示实验组修复区胶原纤维合成状况最佳, 明显高于其余两组, 进一步表明透明质酸可注射材料可有效促进软骨修复。

值得注意的是, 血红素氧合酶是血红素分解的限速酶, 该酶具有3种同工酶。其中血红素氧合酶参与多种病理生理过程, 可发挥抗炎、扩血管、改善微循环等作用, 使机体处于内稳态, 提高机体对缺氧、创伤、炎症等应激反应的耐受能力, 保护细胞免于损伤。研究结果显示, 注射后6周, 实验组血红素氧合酶阳性产物最高, 表明透明质酸的三维立体结构有助于软骨细胞的黏附和增殖, 升高的血红素氧合酶提高了软骨细胞对炎症刺激的抵抗能力, 为延缓合成软骨细胞II型胶原能力的退化提供良好的微环境; 对照组阳性表达产物次之, 显示了透明质酸良好的生物学性能, 但由于没有种子细胞的参与, 对软骨缺损的修复能力相对较差。修复程度与病理图片显示结果相一致; 空白对

照组由于无生物材料的植入, 缺损部位完全依靠自然修复过程, 能力有限, 所以阳性产物表达最低, 另外, 在注射后不同时间点检测3组的II型胶原含量, 通过比较发现实验组最高。对照组比空白对照组高, 上述结果再次提示透明质酸的植入能促进软骨细胞II型胶原的表达, 尤其复合软骨细胞的透明质酸可注射材料修复效果更优, 可能与其多孔网架结构更利于软骨细胞的附着和生长、有助于胶原和蛋白多糖的合成有关, 这与赵峰等^[38]的报道是相符的。

综上所述, 通过6周的观察, 研究发现负载软骨细胞的具有立体三维结构的透明质酸可注射材料, 具有良好的生物学性能和生物相容性, 显著优于对照组和空白对照组(自然修复), 明显提高了软骨修复的能力, 为临床上软骨损伤疾病的治疗提供了一定理论依据。因此, 推测这种复合材料由于取材方便、制备工艺简单, 加之可制成注射剂型, 有望成为一种软骨修复的理想材料。然而由于样本量有限, 观察周期尚短, 其中的修复机制并未完全探明, 需要在后续的研究中进一步优化实验方案来完善。

作者贡献: 赵峰进行实验设计, 实验实施为吕亚军、康凯, 实验评估为王辉, 资料收集为刘少俊、赵峰、何薇成文, 张国平审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经河北医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为2015-4-15。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者赵峰、通讯作者何薇对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Orsi AD, Chakravarthy S, Canavan PK, et al. The effects of knee joint kinematics on anterior cruciate ligament injury and articular cartilage damage. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2016;19(5):493-506.
- [2] Lv YM, Yu QS. Repair of articular osteochondral defects of the knee joint using a composite lamellar scaffold. *Bone Joint Res.* 2015;4(4):56-64.
- [3] 王志学, 吕国枫, 丁勇, 等. 自体软骨细胞移植技术治疗膝关节软骨缺损的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(12):2372-2375.

- [4] Eckstein F, Wirth W, Lohmer LS, et al. Five-year follow-up of knee joint cartilage thickness changes after acute anterior cruciate ligament rupture. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67(1): 152-161.
- [5] Brill R, Wohlgenuth WA, Hempfling H, et al. Dynamic impact force and association with structural damage to the knee joint: An ex-vivo study. *Ann Anat.* 2014; 196(6): 456-463.
- [6] Zhu Y, Wu X, Liang Y, et al. Repair of cartilage defects in osteoarthritis rats with induced pluripotent stem cell derived chondrocytes. *BMC Biotechnol.* 2016; 16(1): 78.
- [7] Tahami SM, Rad SM. Outcome of ACL Reconstruction and Concomitant Articular Injury Treatment. *Arch Bone Jt Surg.* 2015; 3(4): 260-263.
- [8] 王永成, 袁雪凌, 汪爱媛, 等. 膝关节骨软骨损伤的治疗策略[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(1): 113-118.
- [9] 鄢志辉, 杨柳, 郭林, 等. 关节镜下双极射频消融治疗外侧半月板撕裂合并外侧间室软骨损伤的疗效分析[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(1): 13-16.
- [10] Niemeyer P, Porichis S, Steinwachs M, et al. Long-term outcomes after first-generation autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee. *Am J Sports Med.* 2014; 42(1): 150-157.
- [11] Chen P, Zhu S, Wang Y, et al. The amelioration of cartilage degeneration by ADAMTS-5 inhibitor delivered in a hyaluronic acid hydrogel. *Biomaterials.* 2014; 35(9): 2827-2836.
- [12] Tangerino Filho EP, Fachi JL, Vasconcelos IC, et al. Effects of microcurrent therapy on excisional elastic cartilage defects in young rats. *Tissue Cell.* 2016; 48(3): 224-234.
- [13] Whittaker J, Woodhouse LJ, Nettel-Aguirre A, et al. Evidence of early post-traumatic osteoarthritis and other negative health outcomes 3–10 years following knee joint injury in youth sport. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015; 23(7): 1122-1129.
- [14] Li H, Chen C, Chen S. Posttraumatic knee osteoarthritis following anterior cruciate ligament injury: Potential biochemical mediators of degenerative alteration and specific biochemical markers. *Biomed Rep.* 2015; 3(2): 147-151.
- [15] Vos LM, Kuijer R, Huddleston Slater JJ, et al. Inflammation is more distinct in temporomandibular joint osteoarthritis compared to the knee joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72(1): 35-40.
- [16] Jabaji Z, Brinkley GJ, Khalil HA, et al. Type I collagen as an extracellular matrix for the in vitro growth of human small intestinal epithelium. *Plos One.* 2014; 9(9): e107814.
- [17] Paesen R, Sanen K, Smisdom N, et al. Polarization second harmonic generation by image correlation spectroscopy on collagen type I hydrogels. *Acta Biomater.* 2014; 10(5): 2036-2042.
- [18] Liu S, Wu J, Liu X, et al. Osteochondral regeneration using an oriented nanofiber yarn-collagen type I/hyaluronate hybrid/TCP biphasic scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2015; 103(2): 581-592.
- [19] Yang YH, Ard MB, Halper JT, et al. Type I Collagen-Based Fibrous Capsule Enhances Integration of Tissue-Engineered Cartilage with Native Articular Cartilage. *Ann Biomed Eng.* 2014; 42(4): 716-726.
- [20] Hosseini Y, Verbridge SS, Agah M. Bio-inspired microstructures in collagen type I hydrogel. *J Biomed Mater Res A.* 2015; 103(6): 2193-2197.
- [21] Wei Y, Bai L. Recent advances in the understanding of molecular mechanisms of cartilage degeneration, synovitis and subchondral bone changes in osteoarthritis. *Connect Tissue Res.* 2016; 57(4): 245-261.
- [22] 徐敬, 赵建宁, 徐海栋, 等. 关节软骨损伤修复研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(3): 455-461.
- [23] 樊东力, 张一鸣. 生物医用材料和组织工程技术在组织修复中的应用及进展[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(19): 1909-1913.
- [24] Chen W, Chen S, Morsi Y, et al. Superabsorbent 3D Scaffold Based on Electrospun Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016; 8(37): 24415-24425.
- [25] Chen G, Lv Y, Dong C, et al. Effect of internal structure of collagen/hydroxyapatite scaffold on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2015; 10(2): 99-108.
- [26] Song K, Yan X, Zhang Y, et al. Numerical simulation of fluid flow and three-dimensional expansion of tissue engineering seed cells in large scale inside a novel rotating wall hollow fiber membrane bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2015; 38(8): 1527-1540.
- [27] Whyte GP, Gobbi A, Sadlik B. Dry Arthroscopic Single-Stage Cartilage Repair of the Knee Using a Hyaluronic Acid-Based Scaffold With Activated Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Arthrosc Tech.* 2016; 5(4): e913-e918.
- [28] Wang Y, Hu J, Jiao J, et al. Engineering vascular tissue with functional smooth muscle cells derived from human iPSCs and nanofibrous scaffolds. *Biomaterials.* 2014; 35(32): 8960-8969.
- [29] Maturavongsadit P, Luckanagul JA, Metavarayuth K, et al. Promotion of In Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells Using In Situ Hyaluronic Hydrogel Functionalized with Rod-Like Viral Nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2016; 17(6): 1930-1938.
- [30] 王震, 梁大川, 白洁玉, 等. 慢病毒介导的 Sox9 基因在兔骨髓间充质干细胞的过表达促进软骨损伤修复[J]. 中国骨伤, 2015, 28(5): 433-440.
- [31] 朱如里, 郑闽前, 马永平, 等. 自体软骨细胞移植修复关节软骨缺损的基础及临床应用研究[J]. 南通大学学报: 医学版, 2012, 32(6): 458-460.
- [32] Lin YX, Ding ZY, Zhou XB, et al. In vitro, and In vivo, Evaluation of the Developed PLGA/HAP/Zein Scaffolds for Bone-Cartilage Interface Regeneration. *Biomed Environ Sci.* 2015; 28(1): 1-12.
- [33] Kaderli S, Boulocher C, Pillet E, et al. A novel biocompatible hyaluronic acid-chitosan hybrid hydrogel for osteoarthritis therapy. *Int J Pharm.* 2015; 483(1-2): 158-168.
- [34] 谷雅. 骨科金属内置物材料的生物学特性及应用进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(6): 536-539.
- [35] 陈旭, 李国英. 胶原/透明质酸共混体系的相容性及相互作用研究[J]. 功能材料, 2013, 44(8): 1136-1140.
- [36] 宁洪艳, 韩宏岩, 吕强, 等. 纳米纤维家蚕丝蛋白软支架制备及性能[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(6): 1507-1512.
- [37] 刘效仿, 张健, 侯蕾, 等. 透明质酸促进撞击性膝关节软骨损伤修复的实验研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2014, 16(12): 1094-1098.
- [38] 赵峰, 何薇, 刘桂兰, 等. 透明质酸水凝胶修复大鼠软骨缺损的实验研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(35): 4719-4722.