

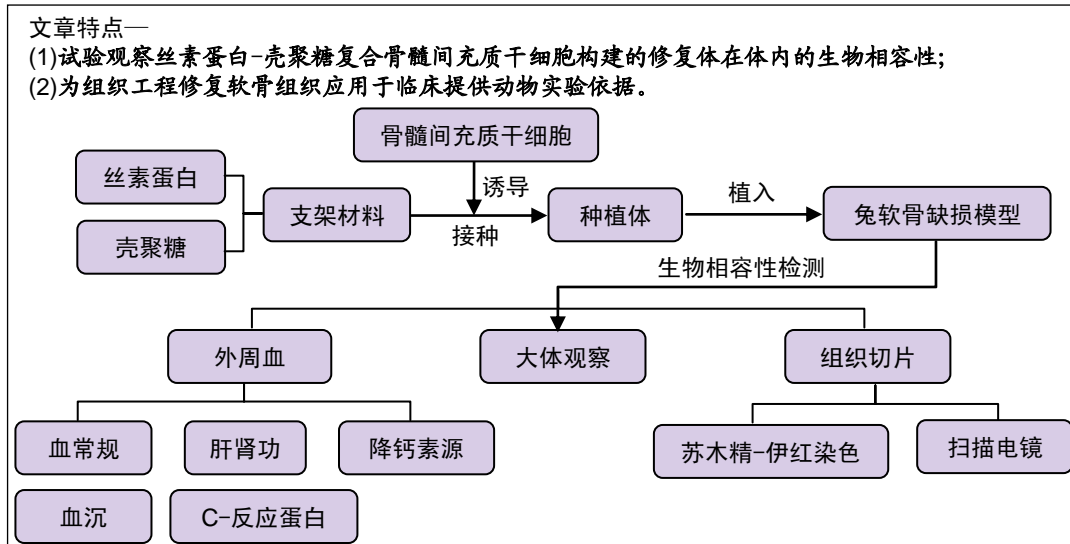
丝素蛋白-壳聚糖支架复合骨髓间充质干细胞体内构建组织工程化软骨的生物相容性

余荣峰, 张一, 陈龙, 王远政, 张彬, 黄琪翔(贵州省人民医院骨科, 贵州省贵阳市 550002)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1850

ORCID: 0000-0002-8139-1175(余荣峰)

文章快速阅读:



余荣峰, 男, 1984年生, 贵州省人, 汉族, 主治医师, 2012年遵义医学院毕业, 硕士。

通讯作者: 张一, 博士, 主任医师。贵州省人民医院骨科, 贵州省贵阳市 550002

文献标识码:A

来稿日期: 2019-06-24

送审日期: 2019-07-02

采用日期: 2019-07-23

在线日期: 2019-09-26



文题释义:

生物相容性: 是指生命体组织对非活性材料产生的一种性能, 一般是指材料与宿主之间的相容性, 包括组织相容性和血液相容性。

检测相容性的方法: 是将支架材料与种子细胞在体外共培养, 检测支架毒性、细胞活性、细胞增殖及细胞与支架的黏附情况等指标, 该方法具有客观性强、可重复性强、影响因素相对简单及敏感性高等特点。

摘要

背景: 课题组前期的研究中发现, 丝素蛋白-壳聚糖支架材料复合诱导后骨髓间充质干细胞在兔体内能修复缺损的软骨组织, 但对于该组织工程化软骨组织的生物相容性还未进一步研究。

目的: 研究丝素蛋白-壳聚糖支架材料复合骨髓间充质干细胞在体内构建组织工程化软骨的生物相容性。

方法: 使用丝素蛋白-壳聚糖按 1:1 比例混合制备三维支架材料, 提取兔骨髓间充质干细胞, 将诱导后的骨髓间充质干细胞与丝素蛋白-壳聚糖支架构建修复体, 再将修复体移植到兔关节软骨缺损模型中修复软骨组织。实验分为 3 组, 实验组植入诱导后骨髓间充质干细胞+丝素蛋白-壳聚糖支架, 对照组植入丝素蛋白-壳聚糖支架干预, 空白组未植入修复体。

结果与结论: ①实验成功制备丝素蛋白-壳聚糖三维支架材料及提取骨髓间充质干细胞, 并构建软骨缺损的修复体, 将修复体植入兔体内能成功修复缺损的软骨组织; ②建模后 2, 4, 8, 12 周, 3 组血常规、降钙素原、血沉、C-反应蛋白结果提示无明显的全身感染征象, 3 组血常规及肝肾功能各时间段比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); ③一般观察、苏木精-伊红染色及扫描电镜观察: 建模后 12 周, 相比其他两组, 实验组软骨缺损已修复, 支架材料已吸收, 修复组织周围未见炎性细胞, 修复组织已正常组织整合良好; ④结果证实, 丝素蛋白-壳聚糖支架复合骨髓间充质干细胞在体内构建的组织工程化软骨具有良好的生物相容性。

关键词:

丝素蛋白; 壳聚糖; 骨髓间充质干细胞; 组织工程; 生物相容性; 支架材料; 种植体; 软骨缺损; 软骨修复; 体内实验

中图分类号: R453; R363; R364

基金资助:

贵州省人民医院青年基金(GZSYQN[2015] 04), 项目负责人: 余荣峰; 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2015]2096 号), 项目负责人: 张一; 贵州省科技计划项目(黔科合成果[2019]4446), 负责人: 余荣峰

Biocompatibility of tissue engineered cartilage constructed *in vivo* by silk fibroin-chitosan scaffold carrying bone marrow mesenchymal stem cells

She Rongfeng, Zhang Yi, Chen Long, Wang Yuanzheng, Zhang Bin, Huang Qixiang (Department of Orthopedics, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China)

She Rongfeng, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Corresponding author: Zhang Yi, MD, Chief physician, Department of Orthopedics, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: Our previous studies have found that silk fibroin-chitosan scaffold carrying bone marrow mesenchymal stem cells can repair cartilage defect in rabbits, but further exploration on the biocompatibility of tissue engineered cartilage is yet to be done.

OBJECTIVE: To explore the biocompatibility of tissue engineered cartilage that is constructed *in vitro* by silk fibroin-chitosan scaffold with bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Three-dimensional silk fibroin-chitosan scaffolds were prepared in a ratio of 1:1. Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were extracted, induced and seeded onto the silk fibroin-chitosan scaffold to construct the cell-scaffold composite. The composite was then implanted into a rabbit joint defect model for cartilage repair. There were three groups in the present study: experiment group with implantation of induced bone marrow mesenchymal stem cells+silk fibroin-chitosan scaffold into the cartilage defect model, control group with implantation of silk fibroin-chitosan scaffold into the cartilage defect model, and blank group without implantation.

RESULTS AND CONCLUSION: The three-dimensional silk fibroin-chitosan scaffolds were successfully prepared and combined with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) to construct the tissue engineered cartilage for repair cartilage defects in rabbits. Blood routine parameters, procalcitonin levels, erythrocyte sedimentation rates and C-reactive protein levels detected at 2, 4, 8, and 12 weeks post-implantation indicated no obvious signs of systemic infection, and there was no damage to liver and kidney functions in the three groups. There were also no significant differences between the three groups in terms of blood routines and liver and kidney functions ($P > 0.05$). As shown by gross observation, hematoxylin-eosin staining and scanning electron microscope, in the experimental group, cartilage defects were repaired, with scaffold degradation, no presence of inflammatory cells, and good integration with surrounding tissues. Therefore, tissue engineered cartilage constructed *in vitro* by silk fibroin-chitosan scaffolds carrying bone marrow mesenchymal stem cells has good biocompatibility, which provides an experimental basis for tissue engineering approaches to cartilage repair.

Key words: silk fibroin; chitosan; bone marrow mesenchymal stem cells; tissue engineering; biocompatibility; scaffold; implant; cartilage defect; cartilage repair; *in vivo* experiment

Funding: the Youth Fund of Guizhou Provincial People's Hospital, No. GZSYQN[2015] 04 (to SRF); Guizhou Provincial Science and Technology Foundation Project, No. [2015]2096 (to ZY); Guizhou Science and Technology Plan Project, No. [2019]4446 (to SRF)

0 引言 Introduction

随着人口老龄化的不断加剧及意外事故的发生率不断增加,老年性关节炎退行性变及损伤性软骨缺损患者逐渐增多^[1-2],由于成人软骨几乎不能自我修复,故目前临床上对于该类患者的治疗存在巨大的挑战。随着患者疼痛症状的加重及功能出现障碍,部分患者最终的治疗方案将会选择关节置换或关节融合^[3-4]。自软骨组织工程的出现,让软骨组织的修复成为可能^[5]。丝素蛋白和壳聚糖均为天然的高分子材料,有研究证实二者均可以作为种子细胞载体修复软骨组织^[6-8],但二者单独作为支架材料存在不足,如干燥时易碎裂、降解较慢等^[9],因此课题组在前期的研究中发现,将二者按一定比例混合后制备的丝素蛋白-壳聚糖支架材料复合诱导后骨髓间充质干细胞在兔体内能修复缺损的软骨组织^[10],但对于该组织工程化软骨组织的生物相容性还未进一步研究。

因此,为修复缺损的软骨组织,同时检测组织工程修复体在体内的生物相容性,提供组织工程修复体在体内的安全性评估,该实验在前期研究的基础上,进一步观察丝素蛋白-壳聚糖复合骨髓间充质干细胞构建的修复体在体内的生物相容性,为组织工程修复软骨组织应用于临床提供动物实验依据。

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 于2016年3月至2018年12月在贵州省人民医院中心实验室和遵义医科大学中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康二三月龄新西兰大白兔,雌雄不限,体质量(2.5±0.2) kg,实验已经过贵州省人民医院动物伦理委员会批准,伦理审批号:伦审[2015]2-009号。实验

动物的操作及处置过程经贵州省人民医院学术委员会审查,该项目操作遵循国际及国家颁布的有关生物学及实验动物伦理要求。

1.3.2 实验中使用的生物材料 见表1。

表1 实验中使用的生物材料信息

Table 1 Biomaterials used in the present study

项目	丝素蛋白	壳聚糖
来源	四川南充市丝绸有限公司	山东潍坊市海之源生物公司
组成成分	丝素蛋白	壳聚糖
材料外形	白色粉末状	白色粉末状
制备方法	从蚕丝中提取	甲壳质经脱乙酰反应后的产品
理化性质	良好的柔韧性和抗拉伸强度; 良好的生物相容性	有良好的生物相容性和器械性能
功能	提供种子细胞的载体	提供种子细胞的载体
不良反应	无	无

将丝素蛋白与壳聚糖以1:1比例混合,分别在搅拌器中充分混匀,倒入预制的模型中,-80℃冰箱中冷冻,然后用冷冻干燥机抽干水分干燥得到丝素蛋白-壳聚糖三维支架^[11]。

1.4 实验方法

1.4.1 抽取兔骨髓间充质干细胞进行分离、培养及诱导^[12] 取新西兰大白兔骨髓腔细胞进行分离及培养,将培养的细胞用细胞流式进行干细胞的鉴定^[13]。将鉴定为骨髓间充质干细胞的第3代细胞用诱导液(质量浓度10 μg/L转化生长因子β1、40 μg/L地塞米松、50 μg/L抗坏血酸、体积分数10%胎牛血清、HG-DMEM)进行细胞向软骨方向诱导。

1.4.2 诱导后骨髓间充质干细胞复合丝素蛋白-壳聚糖支架材料构建修复体 将丝素蛋白-壳聚糖支架材料制备成直径为5 mm,高为3 mm的圆柱体、灭菌。收集第3代经诱导后细胞调整细胞浓度为 $1.5 \times 10^{11} L^{-1}$,接种在经培养基浸

泡过的支架上，置于细胞培养箱中培养备用；并用扫描电镜观察细胞在支架材料的生长情况^[14]。

1.4.3 动物模型的制备及细胞支架修复兔膝关节软骨缺损 将54只新西兰大白兔随机分为3组，每组18只，实验组：软骨缺损模型植入诱导后骨髓间充质干细胞+丝素蛋白-壳聚糖支架，对照组：软骨缺损模型植入丝素蛋白-壳聚糖支架，空白组：软骨缺损模型未植入修复体。

造模方法：用体积分数0.7%戊巴比妥钠溶液6 mL/kg经耳缘静脉麻醉动物，消毒铺单后，取右膝关节内侧纵切口约2 cm，将髌骨向外侧脱位，暴露髌股关节的股骨面，制备一个直径约5 mm，深度约3 mm的圆形全层软骨缺损^[15]，将细胞支架修复体和单纯支架分别植入实验组和对照组，分层缝合切口，术后预防感染。

1.4.4 术后指标观察 各组分别在建模后2, 4, 8, 12周经耳缘静脉抽取兔外周血进行血常规、肝肾功能、降钙素原、血沉及C-反应蛋白等相关指标检测，检测方法采用全自动生化仪检查，主要观察兔全身炎症反应情况，肝肾功能检测主要观察修复体植入体内后有无肝肾功能损害表现。各组分别在建模后2, 4, 8, 12周抽取修复关节的关节液进行白细胞、脓细胞观察，观察修复体植入体内后局部有无炎症反应，检测方法在显微镜下观察，采用每高倍镜下有多少细胞为计算标准。各组分别在建模后12周麻醉后取材，取材范围为截取缺损修复处及周围正常软组织的股骨远端，进行大体观察，观察修复组织的形态、颜色及与周围正常组织整合情况；修复组织进行切片苏木精-伊红染色及扫描电镜观察，观察修复组织的组织学特性、周围炎症反应、支架残留、修复组织与正常组织的整合情况。

1.5 主要观察指标 骨髓间充质干细胞的分离、培养及诱导；观察干细胞在支架材料的生长情况；建模后2, 4, 8, 12周对实验动物外周血的血常规、肝肾功能、降钙素原、血沉及C-反应蛋白水平等项目进行检测，实验动物关节液白细胞及脓细胞检测，建模后12周取材进行修复组织大体观察、修复组织切片后苏木精-伊红染色及扫描电镜观察。

1.6 统计学分析 结果采用SPSS 19.0统计软件包进行处理分析，数据符合正态分布，所得数据为计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异比较采用单因素方差分析和LSD检验，以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入兔54只，实验过程中无死亡，有1只兔切口发生感染，经早期抗感染后治愈，最终进入结果分析54只。

2.2 细胞鉴定结果 从兔骨髓腔内抽取的细胞通过分离、培养，经鉴定为骨髓间充质干细胞，见图1，并对其进行扩增和诱导。

2.3 丝素蛋白-壳聚糖三维支架材料形态 将诱导后的第3代骨髓间充质干细胞成功接种在丝素蛋白-壳聚糖三维支

架材料上进行共培养，细胞在支架材料上生长及分裂良好，见图2。

2.4 兔血生化指标变化 将骨髓间充质干细胞与丝素蛋白-壳聚糖三维支架材料构建的修复体移植到兔膝关节软骨缺损模型进行软骨修复；修复体植入兔膝关节软骨缺损模型后，分别在建模后2, 4, 8, 12周经耳缘静脉抽取3组兔外周血进行血常规、肝肾功能、降钙素原、血沉及C-反应蛋白水平等相关指标的检测，结果比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)，见表2-4。

表2 各组血常规检查结果 ($\bar{x} \pm s, n=18, \times 10^9 L^{-1}$)
Table 2 Blood routine examinations

组别	2周	4周	8周	12周
实验组				
白细胞	10.24±0.86	9.82±0.67	8.86±0.65	8.27±0.48
中性粒细胞	4.58±0.25	4.20±0.32	3.55±0.43	3.48±0.37
淋巴细胞	5.88±0.85	5.82±0.62	4.82±0.55	4.53±0.47
对照组				
白细胞	10.56±0.93	9.10±0.88	9.00±0.75	7.98±0.65
中性粒细胞	4.64±0.15	4.38±0.42	3.75±0.78	3.22±0.61
淋巴细胞	5.98±0.12	5.43±0.62	4.75±0.98	4.62±0.58
空白组				
白细胞	9.88±0.82	8.81±0.23	8.84±0.75	8.10±0.23
中性粒细胞	4.39±0.55	4.33±0.62	3.49±0.28	3.52±0.45
淋巴细胞	5.45±0.45	5.62±0.35	4.79±0.41	4.39±0.86

表注：各组炎症细胞比较均差异无显著性意义($P > 0.05$)

表3 各组肝功能检查结果 ($\bar{x} \pm s, n=18, U/L$)
Table 3 Liver function examination

组别	2周	4周	8周	12周
实验组				
天冬氨酸氨基转移酶	46.58±2.52	33.87±2.68	35.12±1.78	35.78±2.05
丙氨酸氨基转移酶	48.50±5.23	40.48±3.15	38.78±2.78	35.30±4.53
对照组				
天冬氨酸氨基转移酶	44.37±1.59	35.57±2.22	36.62±1.18	33.98±2.45
丙氨酸氨基转移酶	46.78±4.98	39.28±4.03	38.18±2.18	33.25±5.01
空白组				
天冬氨酸氨基转移酶	44.81±2.01	33.12±1.68	33.69±2.98	34.66±1.85
丙氨酸氨基转移酶	48.92±3.64	38.79±2.85	36.22±2.98	36.88±4.02

表注：各组肝功能指标比较均差异无显著性意义($P > 0.05$)

表4 各组肾功能检查结果 ($\bar{x} \pm s, n=18$)
Table 4 Kidney function examination

组别	2周	4周	8周	12周
实验组				
肌酐($\mu\text{mol/L}$)	68.23±17.67	60.86±13.52	58.62±15.48	59.52±14.32
尿素氮(mmol/L)	5.47±1.01	5.32±0.79	5.68±0.56	4.95±0.59
对照组				
肌酐($\mu\text{mol/L}$)	69.69±14.91	63.49±12.82	56.66±17.28	60.72±14.62
尿素氮(mmol/L)	5.98±0.86	5.38±0.55	5.51±0.84	4.35±0.66
空白组				
肌酐($\mu\text{mol/L}$)	70.11±17.45	61.99±15.01	56.88±13.95	56.72±16.12
尿素氮(mmol/L)	5.33±0.69	5.43±0.38	5.48±0.76	4.75±0.45

表注：各组肾功能指标比较均差异无显著性意义($P > 0.05$)

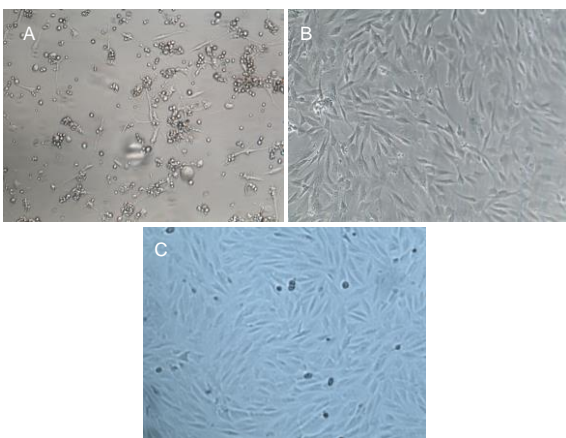
各组在干预后2, 4, 8, 12周抽血查降钙素原结果均

为阴性(< 0.05 μg/L), 血沉和C-反应蛋白结果也均为阴性。各组进行修复膝关节腔抽取关节液白细胞、脓细胞进行检测, 其结果均为阴性(0/HP)。

2.5 各组缺损部分组织学形态变化 干预后12周修复组织大体观: 实验组软骨缺损处已修复, 与周围正常软骨连接良好; 对照组修复组织表面不规则, 与周围正常软骨界限模糊; 空白组软骨缺损处修复不良, 缺损处仍有凹陷。

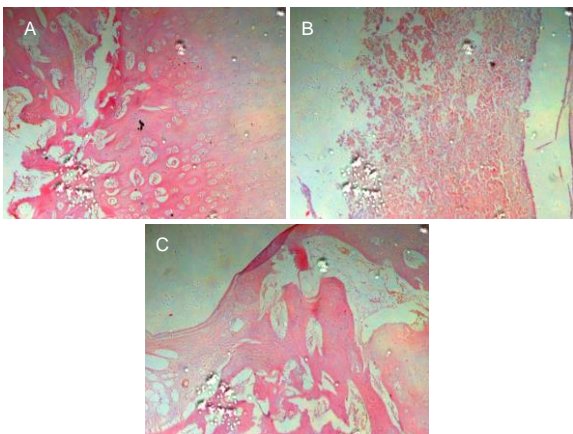
干预后12周修复组织苏木精-伊红染色: 实验组缺损处由透明软骨组织修复, 与周围正常组织连良好, 见软骨陷窝, 未见炎性细胞及支架材料, 见**图3A**; 对照组软骨缺损处见少许软骨组织修复, 未见炎性细胞及支架材料, 见**图3B**; 空白组缺损处由纤维样组织填充, 见**图3C**。

2.6 干预后 12 周修复组织超微结构变化 扫描电镜观察



图注: 图 A 为原代骨髓间充质干细胞培养 48 h 贴壁生长情况, 细胞呈梭形, 培养瓶中见杂细胞; B 为原代骨髓间充质干细胞培养 9 d 后观察, 细胞呈梭形贴壁生长, 细胞未见细菌污染, 细胞分裂状态良好; C 为第 3 代骨髓间充质干细胞培养 5 d 观察, 细胞生长良好, 未见细胞老化及细胞死亡情况

图 1 倒置显微镜下观察细胞生长情况(x100)
Figure 1 Growth of the cells under inverted microscope (x100)



图注: 图 A 为实验组见软骨细胞排列整齐、软骨陷窝, 未见支架残留; B 为对照组见少许软骨细胞, 未见支架残留; C 为空白组软骨缺损修复情况, 未见明显的软骨细胞, 见纤维组织填充

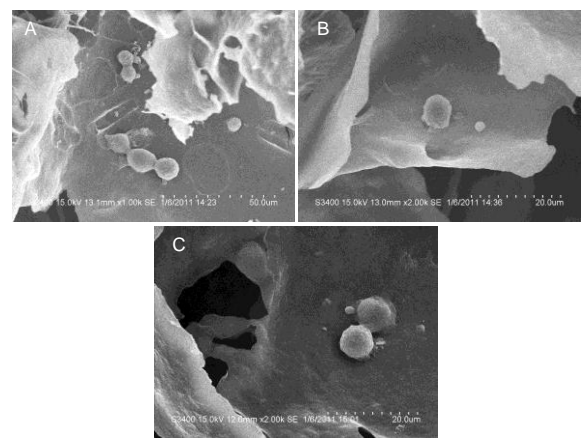
图 3 各组干预后 12 周修复组织细胞形态变化(苏木精-伊红染色, x100)
Figure 3 Morphological changes of the cells in the repaired tissues at 12 weeks after intervention (hematoxylin-eosin staining, x100)

显示, 实验组修复组织见软骨细胞及胶原纤维, 见**图 4A**; 对照组见大量的纤维组织填充, 见**图 4B**; 空白组缺损处见排列紊乱的纤维组织, 见**图 4C**。

2.7 生物相容性分析 见表5。

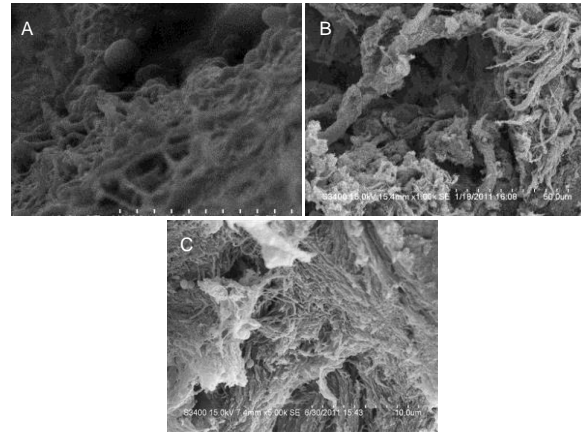
表 5 植入物或生物材料与宿主的生物相容性
Table 5 Biocompatibility of the implantation materials or biomaterials with the host

材料宿主反应	例数(n)
局部感染	0
过敏反应	0
免疫反应	0
排斥反应	0
致癌	0
肝肾功能损害	0



图注: 图 A-C 为在扫描电镜下观察细胞在支架上的生长情况, 细胞在支架呈圆形, 生长分裂情况良好

图 2 丝素蛋白-壳聚糖三维支架材料形态(扫描电镜, A: x1 000; B, C: x2 000)
Figure 2 Morphology of the three-dimensional silk fibroin-chitosan scaffold under scanning electron microscope (A: x1 000; B, C: x2 000)



图注: 图 A 为实验组修复组织在扫描电镜下放大 10 000 倍观察, 见软骨细胞及胶原纤维组织(x10 000); B 为对照组在扫描电镜下放大 5 000 倍观察, 见纤维组织填充软骨缺损处, 未见支架残留(x5 000); C 为空白组在扫描电镜下放大 5 000 倍观察, 见纤维组织填充软骨缺损处(x5 000)

图 4 各组干预后 12 周修复组织超微结构(扫描电镜)
Figure 4 Ultrastructure of the repaired tissues at 12 weeks after intervention under scanning electron microscope

3 讨论 Discussion

生物相容性是组织工程支架材料至关重要的因素,它决定着组织修复成功与否的关键^[16-17]。目前检测相容性的方法是将支架材料与种子细胞在体外共培养,检测支架毒性、细胞活性、细胞增殖情况及细胞与支架的黏附情况等指标,该方法具有客观性强、可重复性强、影响因素相对简单及敏感性高等特点^[18-19]。由于体外培养的组织工程修复体最终需在体内复杂环境因素影响下进行修复缺损的软骨组织,因此评估修复体在体内的生物相容性更有意义^[20-21]。目前在体外实验检测支架的相容性报告较多^[22-24],但将种子细胞接种在支架材料上植入体内检测其生物相容性的报告较少,因此实验利用体内实验检查组织工程的生物相容性,为评估组织工程在体内应用的安全性提供实验依据。

丝素蛋白和壳聚糖均是天然材料,大量的研究表明,单独将丝素蛋白或壳聚糖作为支架材料具有良好的细胞生物相容性^[25-28]。实验小组在前期的研究中已成功制备出符合软骨组织工程研究的丝素蛋白-壳聚糖三维支架材料,经检测其具有合适的孔径、高孔隙率等良好的理化性质^[29],符合支架材料三维结构与细胞黏附和生长的要求,同时该支架材料在体外具有良好的细胞相容性^[30],且将骨髓间充质干细胞与丝素蛋白-壳聚糖支架材料构建的修复体在兔体内能很好地修复缺损的软骨组织,但该修复体在体内的组织相容性未进一步研究,故实验在前期研究的基础上探讨丝素蛋白-壳聚糖支架复合骨髓间充质干细胞体内构建组织工程化软骨生物相容性。从实验的血常规、降钙素原、血沉及C-反应蛋白检测结果来看,丝素蛋白-壳聚糖支架复合骨髓间充质干细胞构建的修复体在体内无明显急性炎症反应;从肝肾功能检测结果来看,实验组与对照组均未发生肝肾毒性反应,说明该修复体具有体内安全性;为减少术后2周内因手术创伤引起的血常规、降钙素原、血沉及C-反应蛋白的变化,实验从修复体植入体内后2周开始取材,故2周前兔的全身炎症反应及肝肾功能改变实验结果无法准确反应,下一步的研究将提前检测时间及增加检测点。通过12周的监测,血常规、肝肾功能实验组与对照组均未见明显改变,说明该修复体长期植入后对动物的肝、肾功能无影响,材料对动物机体没有产生慢性毒性及慢性炎症反应。从兔关节腔积液检查结果来看,关节腔积液未检查出白细胞及脓细胞,说明修复体植入体内后局部无明显的炎症反应,可能因手术创伤导致兔膝关节滑膜损伤或兔个体差异,少部分实验动物关节液较少,需注射少量生理盐水稀释后抽取关节液,故部分实验数据可能存在误差。

组织工程生物材料植入体内对宿主的影响是一个复杂多变的演变过程^[31],其有4种表现:周围组织变性坏死,说明植入的修复体生物材料存在毒性;植入物被周围组织吸收,说明材料可降解且无毒性;植入物被周围组织形成包膜包裹,说明植入材料具有生物惰性;植入物与周围正常组织连接紧密、有机结合一起,说明材料无毒性且有良好

的生物相容性^[32-34]。从兔骨髓中提取的骨髓间充质干细胞在诱导因子的诱导下能向软骨细胞方向分化,将诱导后的细胞接种在支架材料上细胞生长分裂良好,且在前期的实验中也发现,该支架材料具有无毒、具有一定生物力学,可作为种子细胞的载体。修复体植入体内12周通过取材行大体观察、切片苏木精-伊红染色检测、扫描电镜观察,从结构可以看出,实验组12周时缺损的软骨组织已被透明软骨组织修复,修复面光滑,修复组织与周围正常组织能很好地有机结合,软骨修复厚度与正常软骨厚度基本一致,未见支架材料残留及炎性细胞浸润,说明丝素蛋白-壳聚糖支架复合骨髓间充质干细胞构建的修复体在体内有良好的组织相容性。对照组12周是缺损处主要以纤维组织修复为主,可见少许软骨样组织修复,但修复组织光滑度、大体组织抵抗性明显低于正常软骨组织,与周围组织整合稍差,未见支架材料残留及炎性细胞浸润,说明支架材料在体内无毒性且可降解。

课题组在前期的研究中发现,丝素蛋白-壳聚糖支架材料具有良好的细胞相容性,且该支架材料能作为种子细胞骨髓间充质干细胞的载体在体内很好的修复缺损的软骨组织。实验经过进一步研究发现,丝素蛋白-壳聚糖支架复合骨髓间充质干细胞构建的修复体在体内具有良好的生物相容性,为丝素蛋白-壳聚糖支架复合骨髓间充质干细胞构建组织工程修复软骨组织提供动物实验依据。但由于实验观察时间为12周,相对较短,对于种植体在体内长期的不良反应及晚期的致畸致癌相关性还有待进一步研究,且对于已修复的软骨组织生物力学及耐磨性仍需进一步观察。

作者贡献: 实验设计为第一作者和通讯作者。实验实施为第一、二、三、四、五作者。实验评估为第一作者、通讯作者、第二作者。资料收集为第一、二、三、四、五作者。

经费支持: 该文章接受了“贵州省人民医院青年基金(GZSYQN[2015]04)”“贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2015]2096号)”及“贵州省科技计划项目(黔科合成果[2019]4446)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道,不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验已经经过贵州省人民医院动物伦理委员会批准,伦理审批号:伦审[2015]2-009号。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对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,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”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] MARTÍN-HERNÁNDEZ C, FLORÍA-ARNAL LJ, GÓMEZ-BLASCO A, et al. Metaphyseal sleeves as the primary implant for the management of bone defects in total knee arthroplasty after post-traumatic knee arthritis. *Knee*. 2018;25(4):669-675.
- [2] ASHRAF S, KIM BJ, PARK S, et al. RHEB gene therapy maintains the chondrogenic characteristics and protects cartilage tissue from degenerative damage during experimental murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019 doi: 10.1016/j.joca.2019.05.024.
- [3] KHOSHBIN A, STAVRAKIS A, SHARMA A, et al. Patient-reported outcome measures of total knee arthroplasties for post-traumatic arthritis versus osteoarthritis: a short-term (5- to 10-year) retrospective matched cohort study. *J Arthroplasty*. 2019;34(5): 872-876.
- [4] ZIEGLER P, FRIEDERICHS J, HUNGERER S. Fusion of the subtalar joint for post-traumatic arthrosis: a study of functional outcomes and non-unions. *Int Orthop*. 2017;41(7):1387-1393.
- [5] DELIORMANLI AM, ATMACA H. Biological response of osteoblastic and chondrogenic cells to graphene-containing PCL/bioactive glass bilayered scaffolds for osteochondral tissue engineering applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018;186(4):972-989.
- [6] RIBEIRO VP, DA SILVA MORAIS A, MAIA FR, et al. Combinatory approach for developing silk fibroin scaffolds for cartilage regeneration. *Acta Biomater*. 2018;72:167-181.
- [7] MIRAHMADI F, TAFAZZOLI-SHADPOUR M, SHOKRGOZAR MA, et al. Enhanced mechanical properties of thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(8):4786-4794.
- [8] KIM CH, PARK SJ, YANG DH, et al. Chitosan for tissue engineering. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1077:475-485.
- [9] VISHWANATH V, PRAMANIK K, BISWAS A. Optimization and evaluation of silk fibroin-chitosan freeze-dried porous scaffolds for cartilage tissue engineering application. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;27(7):657-674.
- [10] DENG J, SHE R, HUANG W, et al. A silk fibroin/chitosan scaffold in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells to repair cartilage defects in the rabbit knee. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(8):2037-2046.
- [11] ZENG S, LIU L, SHI Y, et al. Characterization of silk fibroin/chitosan 3D porous scaffold and in vitro cytology. *PLoS One*. 2015;10(6): e0128658.
- [12] KOPECKY PW, BYUN S, VANDERPLOEG EJ, et al. Sustained delivery of bioactive TGF- β 1 from self-assembling peptide hydrogels induces chondrogenesis of encapsulated bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(5):1275-1285.
- [13] DUCRET M, FARGES JC, PASDELOUP M, et al. Phenotypic identification of dental pulp mesenchymal stem/stromal cells subpopulations with multiparametric flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2019;1922:77-90.
- [14] GOMATHYSANKAR S, HALIM AS, YAACOB NS, et al. Compatibility of porous chitosan scaffold with the attachment and proliferation of human adipose-derived stem cells in vitro. *J Stem Cells Regen Med*. 2016;12(2):79-86.
- [15] BRENNER JM, VENTURA NM, TSE MY, et al. Implantation of scaffold-free engineered cartilage constructs in a rabbit model for chondral resurfacing. *Artif Organs*. 2014;38(2):E21-E32.
- [16] AFEWERKI S, SHEIKHI A, KANNAN S, et al. Gelatin-polysaccharide composite scaffolds for 3D cell culture and tissue engineering: towards natural therapeutics. *Bioeng Transl Med*. 2018;4(1): 96-115.
- [17] DIVAKAR P, MOODIE KL, DEMIDENKO E, et al. Quantitative evaluation of the in vivo biocompatibility and performance of freeze-cast tissue scaffolds. *Biomed Mater*. 2019 doi:10.1088/1748-605X/ab316a.
- [18] AGRAWAL P, PRAMANIK K, VISHWANATH V, et al. Enhanced chondrogenesis of mesenchymal stem cells over silk fibroin/chitosan-chondroitin sulfate three dimensional scaffold in dynamic culture condition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018; 106(7):2576-2587.
- [19] DEGERATU CN, MABILLEAU G, AGUADO E, et al. Polyhydroxyalkanoate (PHBV) fibers obtained by a wet spinning method: good in vitro cytocompatibility but absence of in vivo biocompatibility when used as a bone graft. *Morphologie*. 2019; 103(341 Pt 2):94-102.
- [20] TITORENCU I, ALBU MG, NEMECZ M, et al. Natural polymer-cell bioconstructs for bone tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(2):165-174.
- [21] XIANG P, WANG SS, HE M, et al. The in vitro and in vivo biocompatibility evaluation of electrospun recombinant spider silk protein/PCL/gelatin for small caliber vascular tissue engineering scaffolds. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;163:19-28.
- [22] ZHUANG Y, ZHANG Q, FENG J, et al. The effect of native silk fibroin powder on the physical properties and biocompatibility of biomedical polyurethane membrane. *Proc Inst Mech Eng H*. 2017;231(4):337-346.
- [23] CAO L, LU C, WANG Q, et al. Biocompatibility and fabrication of RGO/chitosan film for cartilage tissue recovery. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;54:199-203.
- [24] PERRIER-GROULT E, PÉRÈS E, PASDELOUP M, et al. Evaluation of the biocompatibility and stability of allogeneic tissue-engineered cartilage in humanized mice. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217183.
- [25] SINGH BN, PRAMANIK K. Fabrication and evaluation of non-mulberry silk fibroin fiber reinforced chitosan based porous composite scaffold for cartilage tissue engineering. *Tissue Cell*. 2018;55:83-90.
- [26] ERICKSON AE, SUN J, LAN LEVENGOOD SK, et al. Chitosan-based composite bilayer scaffold as an in vitro osteochondral defect regeneration model. *Biomed Microdevices*. 2019;21(2):34.
- [27] XIAO H, HUANG W, XIONG K, et al. Osteochondral repair using scaffolds with gradient pore sizes constructed with silk fibroin, chitosan, and nano-hydroxyapatite. *Int J Nanomedicine*. 2019;14: 2011-2027.
- [28] ZHAO YH, NIU CM, SHI JQ, et al. Novel conductive polypyrrole/ silk fibroin scaffold for neural tissue repair. *Neural Regen Res*. 2018;13(8): 1455-1464.
- [29] 余荣峰, 邓江, 黄文良, 等. 丝素蛋白/壳聚糖三维支架材料的制备方法[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(47):8821-8824.
- [30] DENG J, SHE RF, HUANG WL, et al. Fibroin protein/chitosan scaffolds and bone marrow mesenchymal stem cells culture in vitro. *Genet Mol Res*. 2014;13(3):5745-5753.
- [31] 张敏波, 彭齐峰, 马亚萍, 等. 3D打印微小颗粒骨/聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架材料的物理性能及其生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(14):2215-2222.
- [32] JONES JR, TSIGKOU O, COATES EE, et al. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials*. 2007;28(9):1653-1663.
- [33] SEYEDMAJIDI M, HAGHANIFAR S, HAJIAN-TILAKI K, et al. Histopathological, histomorphometrical, and radiological evaluations of hydroxyapatite/bioactive glass and fluorapatite/bioactive glass nanocomposite foams as cell scaffolds in rat tibia: an in vivo study. *Biomed Mater*. 2018;13(2):025015.
- [34] WESTHAUSER F, SENGEL AS, REIBLE B, et al. In vivo models for the evaluation of the osteogenic potency of bone substitutes seeded with mesenchymal stem cells of human origin: a concise review. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017;23(12):881-888.