

· 文献综述 ·

组织工程方法修复关节软骨缺损

靳小兵 综述 姜思权 审校

(北京大学第三医院骨科, 北京 100083)

中图分类号: R684

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2005)08-0685-03

骨性关节炎或外伤等造成软骨丢失而引起的关节疼痛是中老人残疾的重要原因。关节软骨自身修复能力十分有限,因此,关节软骨损伤通常会导致更严重的关节软骨退变^[1,2]。骨科医生们采用软骨下骨钻孔、微骨折、软骨移植、自体软骨细胞移植等方法来修复和重建关节软骨,许多技术已被广泛应用于临床,并且取得了良好的短期随访结果。组织工程学科的兴起为关节软骨修复提供了新的选择,其基本原理为体外培养扩增的细胞结合基质材料构建出新的软骨组织以供移植。本文就关节软骨修复的现状,尤其是组织工程方法重建软骨的方法做一综述。

1 关节软骨损伤的分类

关节软骨损伤可分为 3 大类:基质断裂、全层缺损和非全层缺损。基质断裂主要是由于钝性损伤引起,细胞外基质虽然受到了破坏,但剩余的存活软骨细胞可通过增强它们的合成功能来修复组织。非全层缺损意味着软骨表层的断裂,但尚未累及软骨下骨。全层损伤是由贯穿整个软骨全层及软骨下骨的损伤造成,不同于其它类型损伤,全层损伤时骨髓中的干细胞有机会迁移到损伤区来修复缺损^[3]。软骨损伤后显示出极其有限的自我修复能力,通常的解释是成熟的软骨细胞代谢活力很低,损伤发生后软骨细胞往往被坚韧的细胞外基质包裹而难以到达损伤部位。

2 关节软骨损伤的传统治疗

最常用的方法是打磨或钻孔来穿透软骨下骨,人为造成全层损伤,形成血栓,为骨髓间充质干细胞的移行提供支架,然而这种方法最终形成的组织同正常软骨存在一定的差异。关节的被动活动对小的关节缺损往往有良好的疗效,并且对其它的治疗方法有促进作用,关节内注射药物如生长因子、类固醇类药物等可以促进软骨细胞的增殖及基质沉积。

自体软骨移植来源往往受限,而且这种方法必须考虑到对供区的损伤。同种异体软骨移植是有效的方法之一,但新鲜组织经常会引起免疫排斥反应^[4]。深低温冰冻后可减轻免疫排斥反应而且可以筛选供体组织,但深低温冰冻同样会降低组织的活力。取邻近区域的骨髓膜组织移植可以提供处于未完全分化状态的祖细胞,并被认为是有望在新环境下分化成软骨细胞^[5]。临床应用自体软骨细胞移植修复关节软骨缺损已有近 10 年历史,

从膝关节非负重区获取健康软骨细胞,单层培养扩增后注入软骨缺损区,细胞表面覆盖骨膜瓣,骨膜瓣缝合于软骨缺损的周缘,经关节镜和组织学随访,孤立性软骨缺损和多发性软骨缺损愈合的优良率分别达到 92% 和 67%,然而缺乏病例对照及评价方法存在明显缺陷是其不足之处^[6]。

3 组织工程软骨的构建及移植

3.1 支架材料

理想的软骨组织工程支架应具备以下特点:①良好的生物相容性,利于种子细胞的黏附、增殖、分化,可阻止细胞迁移出移植区,降解产物对细胞无毒害作用;②有足够的生物力学强度;③有良好的生物降解性,其降解速度应与软骨生长速度相匹配;④可制备成至少达 90% 以上孔性结构,可以为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^[7,8];⑤能有效地固定于软骨缺损部位;⑥能大规模制备,易于保存和消毒等。支架材料总体上可分为以胶原为代表的天然材料和以聚羟基乙酸(polyglycolic acid, PGA)、聚乳酸(poly-L-lactic acid, PLLA)为代表的人工合成材料。

研究表明当将软骨细胞培养在培养瓶等二维环境中时,细胞呈扁平状且分泌大量 I 型胶原而不是 II 型胶原,然而当生长在三维立体环境中时,软骨细胞可以保持其分化状态的表型及功能,因此,三维支架材料可以在促进软骨细胞增殖的同时保持其分化状态^[9]。没有种植细胞的支架材料本身也可以通过促进细胞迁移来促进软骨再生^[10]。

天然材料如胶原等作为三维支架载体受到了广泛的关注。胶原作为支架材料的一大优点是可以被细胞中的消化酶识别,经改造和降解后可为新长入的组织提供空间。Caplan 等^[11]报道将骨髓基质干细胞种植于胶原凝胶中并植入兔的骨与软骨缺损区,发现可以重新生成骨和透明软骨,但新生组织的力学特性较正常组织下降,并且 24 周以后开始有退变的迹象。Lee 等^[12]用自体软骨细胞种植于 II 型胶原支架修复犬的关节软骨缺损,发现修复组织中纤维性组织成分明显减少。壳聚糖、脱钙骨、碳纤维等天然聚合物也被尝试用作细胞三维载体。

尽管有许多优点,但来源受限及潜在的病原微生物的污染限制了天然聚合物的应用。相反,人工聚合物可大规模生产并且其特性可根据需要进行改变,包括可降

解的聚合物,这种聚合物类似胶原,其设计了多孔结构以方便组织长入,并且其降解性避免了二次取出移植物的手术。生长因子和其它一些药性刺激因子同样可以涂于支架上面以刺激细胞进行增殖和分化。但是迄今只有少数人工合成的聚合物被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于人体。FDA 已经批准 PGA、PLLA 以及两者的复合物(PLGA)用于人体试验,现在大多数研究都集中于这几种材料^[13,14]。这些材料可通过水解作用降解,PLLA 具有更强的疏水性并较 PGA 更难以降解。王卫国等^[15]将成人关节软骨细胞体外扩增后种植于 PLGA 支架中,于体外和裸鼠体内分别培养软骨细胞-支架复合物,发现软骨细胞在 PLGA 支架内贴附生长良好,长期培养仍保持软骨细胞特性,裸鼠体内培养 8 周可形成软骨样组织。Sato 等^[16]认为表面包被了 I 型胶原的 PLGA 复合软骨细胞培养更有利于形成组织工程软骨组织。

上述载体材料的一大缺点是需要手术植入。因此,有学者应用纤维蛋白胶和凝血酶混合形成可降解的可支持软骨细胞增殖的纤维蛋白网状结构。当细胞、纤维蛋白胶和凝血酶混合物被注射于马的关节损伤处时,8 个月后形成新组织中糖胺多糖、II 型胶原及蛋白多糖的含量远较未处理组高^[17]。藻酸钙类水凝胶类材料也是近几年研究热点之一^[18],其具有亲水性好、易于细胞吸附、营养物质易于渗透等特点,但也存在体内吸收差和一定抗原性等缺点。翟喜成等^[19]以聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物(pluronic)负载软骨细胞注入兔髌骨关节面缺损区,其降解速度与软骨再生速度基本一致,且没有明显的免疫原性,12 周后材料完全吸收并有新生软骨形成。目前,常用的可注射性水凝胶还包括聚环氧乙烷及聚乙二醇等。

3.2 种子细胞

种子细胞的获取是组织工程软骨构建的基础,理想的种子细胞应具备以下特点:①取材方便,对供体损伤小,来源充足;②体外培养增殖能力旺盛,能持续保持细胞表型不变;③植入人体后能适应受区环境并保持或恢复原有细胞的功能。目前,最常用的种子细胞有软骨细胞、间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、脂肪来源的干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)。

软骨细胞分离和培养较为简单,但软骨细胞体外培养代谢缓慢,传代到第 6 代左右即出现去分化的现象,表型(特别是 II 型胶原)难以维持^[20],体外培养时间太长,形成的组织工程软骨则含有较多的纤维成分;另外,软骨细胞来源有限,取材不方便(常须关节镜或手术取材)。骨髓来源间充质干细胞(BMSCs)在体外大量扩增对其最终在体内形成软骨组织无明显影响并可分化成软骨和骨组织,正是由于这些特性,使之成为组织工程软骨构建中首选的种子细胞,但 BMSCs 的获取常需要进行局麻或硬膜外麻醉,给患者带来痛苦,且来源有限,每个成人只能抽取 10~20 ml 骨髓,只能得到少量的细胞(约 1MSC/10⁵ 基质支持细胞),须经体外大量扩增才能满足需要^[21]。另外,一种潜在的自体干细胞来源于脂肪组织,可在局麻下通过腹部的吸脂术获得,对患者

损伤小,且获取相对容易。ADSCs 也具有向软骨细胞和成骨细胞等方向分化的能力^[22~25]。ADSCs 因与其它来源的干细胞相比易于获取、增殖能力强而具有明显的优越性,已经显示出了广泛的应用前景,成为近年来的研究热点。胚胎干细胞具有全分化潜能,可以无限增殖并分化成全身所具有的 200 余种细胞类型,从而有望形成机体的任何组织或器官。采用骨形态发生蛋白-2(BMP-2)和 BMP-4 作为调控诱导因子,在体外可以成功地诱导 ESCs 向软骨细胞分化^[26],证实胚胎干细胞有作为组织工程软骨种子细胞的希望,但控制 ESCs 细胞向特定细胞分化极为复杂,而且分化后的种子细胞在宿主体内是否具有致瘤性以及涉及到的伦理问题也是必须考虑的问题。

组织工程软骨的构建需要大量的种子细胞。软骨细胞体外单层培养经常会出现反分化,而且一般认为在单层培养条件下 MSCs 不会被诱导向软骨细胞分化,但转基因方法可以在某种程度上避免这一点^[27]。高密度软骨细胞培养也经常用来预防在二维环境培养时经常出现的软骨细胞的反分化。旋转培养瓶、微载体、灌注培养等在快速扩增大量细胞方面显示出了巨大的优势,这些优势反映在混合的均一性和培养条件的精确控制方面。

3.3 细胞因子

已经证实许多细胞因子在对软骨细胞的增殖代谢及干细胞向软骨细胞分化方面发挥重要作用,如转化生长因子- β (TGF- β)、骨形态发生蛋白(BMPs)、胰岛素样生长因子(IGFs)、成纤维细胞生长因子(FGFs)^[28], IL-10 等细胞因子对软骨细胞的保护作用同样值得重视^[29]。因各种细胞因子各有其优缺点,目前倾向于多种细胞因子联合使用或序贯使用。Pei 等^[30]发现序贯使用 TGF- β 、FGF-2 和 IGF-1,能使构建的软骨组织获得最好的生物化学和生物力学特征。

外用细胞因子价格昂贵,而且在使用过程中极易损失,基因增强的组织工程方法在这方面显示出优势,即将目的基因通过合适的载体转移至靶细胞,并在其中表达,从而达到促进细胞增殖或分化的效果。转染细胞合成分泌的内源性蛋白经过适当的翻译后修饰过程,具有更多可识别的配体,能更有效地同细胞表面受体结合,因此,其表达产物活性更高,所需产物量更小,大大减少了外源性重组蛋白大剂量反复使用的副作用。Madry 等^[31]的实验表明,种植于 PGA 支架的高表达 IGF-1 的基因修饰软骨细胞,能提高工程化软骨的生物化学和生物力学特征。目前,应用于软骨组织工程的基因治疗载体有反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒及脂质体等生物和理化方法,其中腺相关病毒因其可以定点整合、对人无致病性及可长期稳定表达而成为研究的热点,但其对软骨细胞及 MSCs 的转染效率低一直是困扰科学工作者的难题之一^[32,33]。

3.4 细胞和支架材料的结合

除种子细胞、支架材料的选择及细胞因子以外,细胞和支架材料的良好结合同样有助于形成有功能的软骨组织。细胞的种植密度至关重要,因为细胞种植密度太低可导致材料的网孔并不能被细胞完全充填而造成

纤维组织长入,这样会对形成组织的性能产生影响。另外,表面张力可对含有细胞的培养液进入人工合成的材料内部产生影响,因此,载体材料一般要用酒精预湿以使细胞更易进入材料内部。多聚赖氨酸和 II 型胶原包被也是促进细胞起始粘附的常用方法。试剂的毒性和培养条件下温度的变化也必须减少到最低程度以促进软骨组织的形成。

组织工程软骨是在细胞外基质替代物开发和种子细胞生物特性的结合研究基础上,借助于种子细胞与细胞外基质材料复合培养和移植技术而获得的。近年来,关于组织工程软骨的构建已取得很大进展,但距临床应用仍有很大差距,具体反映在:①构建的组织工程软骨后期容易退化;②免疫原性及致癌性等问题的困扰;③形成的软骨组织的力学性能不尽如人意;④形成的组织工程软骨如何同软骨下骨组织有效结合等。今后的研究仍将集中在理想种子细胞的获得,寻求生物相容性更好、力学适应能力更强的载体材料以及软骨种植和培养的最佳条件的探索。随着新的生物材料相继问世以及分子生物学、免疫学、细胞生物学、图像分析技术的提高和多学科技术的相互支撑,期望能出现商品化的组织工程软骨库,为关节软骨缺损提供大量可靠的修复材料。

参考文献

- 1 姜思权. 软骨修复和重建基础研究的现状. 当代医学, 2001, 7: 35-51.
- 2 姜思权. 骨关节炎的病理与发病因素. 中华骨科杂志, 1996, 16: 56-59.
- 3 Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. J Orthop Sports Phy Ther, 1998, 128: 192-202.
- 4 Goldberg VM, Caplan AI. Biologic resurfacing of articular surfaces. AAAOS Inst Course Lect, 1999, 48: 623-627.
- 5 Gillogly SD, Voight M, Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. J Orthop Sports Phys Ther, 1998, 28: 241-251.
- 6 Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al. Two to 9 year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. Clin Orthop, 2000, 374: 212.
- 7 Seal BL, Otero TC, Panitch A, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. Mate Scie Eng R, 2001, 34: 147-230.
- 8 Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. Prog Mate Scie, 2001, 46: 273-282.
- 9 Risbud M. In vitro expression of cartilage specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. Cell Transplant, 2001, 10: 755-763.
- 10 Athanasiou K, Korvick D, Schenck R. Biodegradable implants for the treatment of osteochondral defects in a goat model. Tissue Eng, 1997, 3: 363-373.
- 11 Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, et al. Principles of cartilage repair and regeneration. Clin Orthop Rel Res, 1997, 342: 254-269.
- 12 Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, et al. Effects of cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondrol defect in a canine model. J Orthop Res, 2003, 21: 272-276.
- 13 Chen G, Ushida T, Tateishi T. Preparation of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams by use of ice microparticles. Biomaterials, 2001, 22: 2563-2567.
- 14 石柱欣, 王身国, 贝建中. 聚乳酸与聚乳酸-羟基乙酸多孔细胞支架的制备及孔隙的表征. 功能高分子学报, 2001, 3: 7-11.
- 15 王卫国, 姜思权. 利用 PLGA 细胞支架再生人关节软骨的实验研究. 中国现代医学杂志, 2003, 13: 1-5.
- 16 Sato T, Chen GP, Ushida T, et al. Tissue-engineered cartilage by in vivo culturing of chondrocytes in PLGA-collagen hybrid sponge. Mate Scie & Eng C, 2001, 17: 83-89.
- 17 Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, et al. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. J Orthop Res, 1994, 12: 485-497.
- 18 Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part I: structure, gelation rate, and mechanical properties. Biomaterial, 2001, 22: 511-521.
- 19 翟喜成, 王英振. Pluronic F-127 负载同种异体软骨细胞修复兔全厚关节软骨缺损的实验研究. 中国矫形外科杂志, 2003, 11: 1053-1055.
- 20 Stokes DG, Liu G, Dharmavaran R, et al. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box(SOX) transcription factors. Biochem J, 2001, 360: 461-470.
- 21 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. Science, 1999, 284: 143-147.
- 22 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multileage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. Tissue Eng, 2001, 7: 211-226.
- 23 Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290: 763-769.
- 24 鞠晓东, 姜思权, 田华等. 脂肪间充质干细胞的基体生物学特性及向成骨细胞诱导分化的实验研究. 中华实验外科杂志, 2004, 21: 654-657.
- 25 鞠晓东, 姜思权, 马庆军等. 脂肪间充质干细胞的成骨诱导分化. 骨与关节损伤杂志, 2004, 19: 390-393.
- 26 Kramer J, Hegert C, Guan K, et al. Embryonic cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. Mech Develop, 2000, 92: 193-205.
- 27 Wang WG, Lou SQ, Ju XD, et al. In vitro chondrogenesis of human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in monolayer culture: activation by transfection with TGF-beta2. Tissue & cell, 2003, 35: 69-77.
- 28 杨物鹏. 软骨细胞培养及其调控. 中国矫形外科杂志, 2000, 7: 800-803.
- 29 Wang Yueqing, Lou Siquan. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro. Chinese Medical Journal, 2001, 114: 723-725.
- 30 Pei M, Seidel J, Vunjak-Novakovic G, et al. Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294: 149-152.
- 31 Madry H, Padera R, Seidel J, et al. Gene transfer of a human insulin-like growth-factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. Hum Gene Ther, 2002, 13: 1621-1626.
- 32 Goater J, Muller R, Kollias G. Empirical advantages of adeno-associated viral vectors in vivo gene therapy arthritis. J Rheumatol, 2000, 27: 983-989.
- 33 Ju XD, Lou SQ, Wang WG. Effect of hydroxyurea and etoposide on transduction of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cell by adeno-associated virus vectors. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25: 196-202.

(收稿日期 2005-05-23)

(修回日期 2005-06-27)