文章编号:1000-5404(2006)11-1145-03

论著

体外构建可注射性组织工程软骨的初步研究

王东武,杨 柳,段小军,李 忠 (第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 利用关节软骨细胞复合壳聚糖-磷酸甘油(chitosan/glycerophosphate, C/GP)凝胶,体外构建可注射性组织工程软骨,为微创方式治疗关节软骨缺损提供依据。**方法** 以体外培养扩增的兔关节软骨细胞为种子细胞,以自制温固化可注射C/GP凝胶为支架,按5×10^7/ml细胞浓度复合体外培养。于倒置显微镜下观察细胞形态与分布,四甲基偶氮唑盐(MTT)法计算培养1周时种子细胞存活率,培养4周时样本进行组织学及扫描电镜观察。**结果** 软骨细胞在7:1(体积分数)C/GP凝胶中保持球形,细胞存活率95%以上;HE染色可见软骨较为典型的陷窝样结构、软骨囊及同源细胞群等现象;甲苯胺蓝异染及免疫组化Ⅱ型胶原染色呈强阳性。**结论** 软骨细胞在C/GP凝胶中可存活并保持分泌软骨基质的功能,形成类软骨组织。温固化可注射性C/GP凝胶能作为软骨组织工程的载体材料。

关键词:关节;软骨细胞;壳聚糖;甘油磷酸钠;支架/组织工程
中图法分类号:R-33;R318.08;R318.17 **文献标识码**:A

Construction of injectable tissue engineered cartilage *in vitro*

WANG Dong-wu, YANG Liu, DUAN Xiao-jun, LI Zhong (Joint Surgery Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the biological behavior of chondrocytes in chitosan based hydrogel *in vitro* and to evaluate the possibility of chitosan and glycerophosphate mixed gel using as injectable scaffolds in tissue engineering. **Methods** A novel injectable thermosetting gel was made of chitosan and glycerophosphate mixture. Chondrocytes isolated by enzymic digestion from the articular cartilage of the young rabbits aged 3-4 weeks were cultured in monolayer system. After primary culture and subculturing, the cells were seeded in chitosan based gel in concentration of 5×10^7/ml *in vitro*. Characteristics of chondrocytes during 4-week culture were observed with invert microscope. MTT was used to detect the seed growth after one-week culture. In 4th week, after haematoxylin eosine and toluidine blue staining, the artifical cartilage was performed type Ⅱ collagen immunohistochemistry and observed by scanning electron microscope. **Results** Chondrocytes retained their round morphology, multiplied, and produced matrix in chitosan and glycerophosphate mixture gels. The results of immunohistochemistry were strongly positive. **Conclusion** That most chondrocytes appeared to occupy large areas of rough chitosan based gels, guarantees a suitable environment where chondrocytes secrete matrix macromolecules and preserve their round morphology *in vitro*. Chitosan and glycerophosphate mixture gel may be a vehicle for injectable tissue-engineered cartilage.

Key words: articular; chondrocyte; chitosan; glycerophosphate; scaffold/tissue engineering

临床用于治疗关节软骨缺损的方法虽然很多但都存在不足。应用组织工程技术治疗关节软骨缺损是目前被看好的方法之一。其基本思路是将一定数量的关节软骨细胞(或前体细胞、干细胞)接种到适宜的支架中,培养形成具有生物功能和组织结构的透明软骨,再移植到人体关节缺损部位,达到重建关节面的目的。另外,由于外科领域中各类腔镜的广泛应用,微创观念已成为大家的共识。应用可注射性组织工程软骨修复关节软骨缺损,则可取两者优长,具有很好的应用前景。本研究观察细胞在壳聚糖-磷酸甘油(chitosan/

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270375);全军医学科学技术研究"十五"计划重点课题(01Z072);重庆市重点科技攻关项目(2003-13-6)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30270375), the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA (01Z072) and the Foundation for the Key Sci & Tech Research Project of Chongqing (2003-13-6)
作者简介:王东武(1974-),男,山西省孝义市人,硕士研究生,医师,主要从事软骨组织工程及关节软骨缺损修复方面的研究。电话:(023)68773007
通讯作者:杨 柳,电话:(023)68765280,E-mail:jointsurgery@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-09-29;**修回日期**:2006-03-19

glycerophosphate，C/GP）凝胶中的存活、生长和分泌软骨基质的功能，有望为微创方式修复关节软骨缺损摸索一种新的可注射性组织工程软骨。

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖（玉环，浙江）；甘油磷酸钠（Fluka，瑞士）；免疫组化染色试剂盒SABC（博士德，武汉）；小鼠抗兔Ⅱ型胶原单抗（Calbiochem，美国）；胰蛋白酶（Gibco，美国）；Ⅱ型胶原酶10 ml（Sigma，美国）

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞的获取与扩增 3～4周龄家兔，体质量300～400 g（第三军医大学实验动物中心提供），无菌操作取四肢关节软骨，切成1.0 mm^3颗粒，0.2%胶原酶消化，离心收集细胞。以$5\times10^4/cm^2$接种于培养瓶中，加完全培养液（DMEM＋10%胎牛血清），置37 ℃孵箱培育，隔日换液。细胞长满瓶底85%时，0.25%胰酶消化收集细胞，以$6\times10^3/cm^2$传代扩增细胞，备用。

1.2.2 可注射性C/GP温固化凝胶的制备[1] 实验用壳聚糖规格为：脱乙酰度95.11%，粘度155 mpa·s，分子量870×10^3，医用级。5 g壳聚糖溶解于250 ml 0.1 mol/L的稀盐酸，混匀，121 ℃消毒20 min；28 g磷酸甘油，以50 ml去离子水溶解，过滤除菌。按照（1～15）∶1梯度比混合配制C/GP复合溶液，分别测混合液的pH值及37 ℃条件下的凝固时间（以凝胶在容器内倒置90°不流动、不变形为凝胶形成的标准），选择最适混合比。

1.2.3 软骨细胞在C/GP凝胶中的培养与观察 传3代的软骨细胞，以5×10^7/ml密度，接种于C/GP（7∶1体积分数）混合溶液中，加入4孔培养板中培养，每孔加1 ml的细胞-C/GP复合物，置37 ℃孵箱10 min形成凝胶后，每孔加入完全培养液4 ml，每日换液。隔日在倒置显微镜下观察软骨细胞三维培养。

1.2.4 MTT法细胞活性检测[2] 取培养1周的软骨细胞-C/GP复合物，PBS漂洗后，加入含10 mg MTT的完全培养液20 ml，孵育1 h，对照组加入等量的不含MTT的完全培养液，倒置显微镜下观察细胞形态及分布，计算细胞存活率＝MTT染色阳性细胞数/同视野下所有细胞数×100%，倒置显微镜视野为随机选取，不少于10个视野。

1.2.5 组织学观察 取培养4周的软骨细胞-C/GP复合物，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋切片，行伊红-苏木精（HE）、甲苯胺蓝（TB）染色和免疫组织化学（SABC法）进行Ⅱ型胶原染色。实验共重复4次，免疫组化染色则以PBS替换Ⅱ型胶原单抗作为空白对照组。

1.2.6 扫描电镜观察 取培养4周生长良好的软骨细胞-C/GP复合物，戊二醛固定，锐刀横切，临界点干燥，表面喷金，扫描电镜观察细胞形态与贴壁情况。

2 结果

2.1 软骨细胞离体培养与传代

软骨细胞接种培养24 h以后开始贴壁、扩增，细胞形态呈多角型，5～7 d可长满瓶底的85%，此时细胞相互接触成片呈铺路石样外观。传代细胞4 h左右基本贴壁伸展，也呈现多角形，4～5 d即可铺满瓶底的85%以上。传4代以后梭形细胞逐渐增多，表示软骨细胞开始去分化。

2.2 可注射性过C/GP凝胶的物理性状

壳聚糖稀盐酸溶液呈淡黄色胶动状透明液体，pH值为5.65，可4 ℃冰箱较长期保存，物理性状不发生改变；56%的甘油磷酸钠水溶液呈无色透明液体，pH值为8.91，此溶液在室温下已接近饱和，4 ℃冰箱中较长期保存，可有结晶析出，但微加热可再溶，不会影响溶液的物理性状。通过对不同C/GP混合的pH值以及凝固时间的观察发现，以7∶1混合的C/GP混合液pH值为7.2，具有适合细胞离体生长的酸碱环境，37 ℃下凝固时间为10 min，较好地满足可注射支架材料的要求，凝固时间过短不能完成必要的注射操作；过长则不利于收敛细胞。

2.3 软骨细胞在C/GP凝胶中三维培养

在倒置显微镜下观察发现细胞保持球形，定植在凝胶中，视角聚集到凝胶的不同层面可见软骨细胞呈三维较均匀分布。培养1周的细胞-C/GP复合物用MTT染色，倒置显微镜下观察可见活细胞质内有棕黑色结晶颗粒沉积，间接显示活细胞数量、形态及分布（图1）。计算细胞存活率达95%以上。

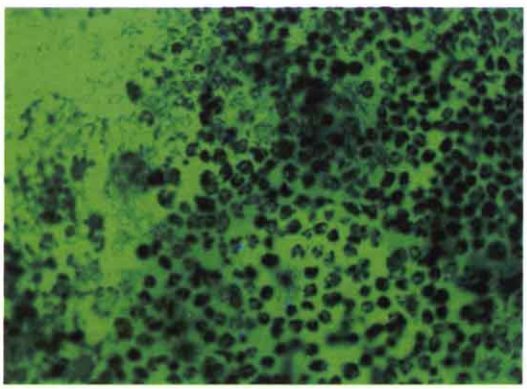


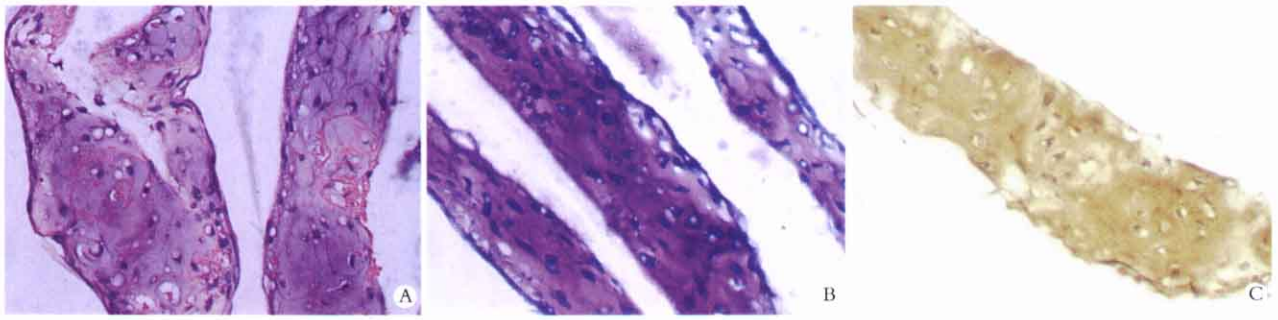
图1 体外培养1周的兔关节软骨细胞-C/GP复合物
（MTT ×200）

2.4 人工关节软骨的组织学形态与主要基质分泌

细胞凝胶复合物HE染色切片观察：C/GP凝胶在HE染色中呈强嗜伊红色，4周时可见少量残留支架呈红染，软骨细胞呈圆形或三角形，细胞嗜苏木精呈蓝色，可见较典型的软骨陷窝样结构、软骨囊及同源细胞群等现象，基质均匀弱蓝染（图2A）；甲苯胺蓝染色示细胞内及细胞周围基质有异染物质蛋白多糖，呈蓝紫色（图2B）；免疫组化染色显示组织间质Ⅱ型胶原，呈棕黄色（图2C）。组织学显示所复合组织形态为类软骨结构，且细胞有较强的分泌蛋白多糖和Ⅱ型胶原成分的能力。

2.5 扫描电镜观察

扫描电镜观察培养4周生长良好的细胞凝胶复合物：三维支架呈细颗粒状，细胞比较均匀分布包埋于支架中，细胞多呈球形，少数为多角形，可见细胞伸出伪足，黏附于支架，细胞直径10～80 μm。



A：HE 染色　（×200）；B：甲苯胺蓝染色　（TB×200）；C：免疫组化染色　（SABC×200）

图 2　兔关节软骨细胞复合 C/GP 支架体外培养 4 周组织学观察

3　讨论

组织工程的出现和微创手术开展，使可注射性组织工程软骨的研究日益受到关注。

常用的可注射性医用材料很多，有蛋白纤维凝胶、藻酸钙凝胶、透明质酸、聚氧化乙烯酸、二甲基丙烯、聚丙烯延胡索酸复合乙烯凝胶、聚氧化丙烯等。但与上述支架相比，壳聚糖不仅具有良好的生物相容性、降解性，还具有抑菌、止痛，预防膝关节和屈肌腱黏连，预防创伤性关节软骨退变，减少关节手术后创伤性关节炎的发生等作用[3]。其理化性质和临床应用与透明质酸都有许多相似之处，如促进软骨细胞再生，维持软骨细胞分化表型，诱导软骨特有基质蛋白的 mRNA 表达，产生Ⅱ型胶原、Ⅲ型胶原和蛋白多糖。壳聚糖的降解产物可作为关节液中的硫酸角质素、硫酸软骨素及透明质酸的合成原料，是关节软骨的重要营养物质[4,5]。因此，壳聚糖已广泛用于组织工程的支架材料，但是温固化的 C/GP 凝胶与细胞复合构建可注射性组织工程软骨少见报道，本实验将用于药学研究中的 C/GP 载体，借鉴到软骨组织工程的构建上来，发现软骨细胞在 C/GP 凝胶中存活良好、维持表型、分泌蛋白多糖和Ⅱ型胶原，凝胶细胞复合物组织学特征为类软骨结构，初步构建出一种新型的可注射性组织工程软骨。

壳聚糖能溶解于酸性溶液，磷酸甘油的加入，将壳聚糖酸溶液改造成了温固化的 pH 依赖性溶液[1]。壳聚糖可有不同的分子量和脱乙酰度，发现 C/GP 溶液的凝固温度与壳聚糖分子量无关，而与壳聚糖的脱乙酰度相关，脱乙酰度越高则凝固温度越低，因此可通过选择不同脱乙酰度的壳聚糖来控制 C/GP 的凝固温度和时间。C/GP 复合物还作为细胞因子或药物大分子的缓释体系，通过调整其体内降解速度，制成可控制释放大分子速度的载体物质，这一特性对于支架包埋和释放生物活性因子是有意义的[6]。我们的实验初步证实 95% 脱乙酰度的壳聚糖稀盐酸溶液与磷酸甘油水溶液按 7∶1 容积比混合后，pH 值在人体生理范围，室温下保持液态，置于 37 ℃，10 min 内形成凝胶，能满足可注射性组织工程支架的术中操作要求。至于 C/GP细胞复合物直接注射关节软骨缺损部位内，能否满意填补缺损、保持细胞存活并发挥软骨的功能及力学特性还有待进一步的研究。

参考文献：

[1] CHENITE A, CHAPUT C, WANG D, *et al*. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ*[J]. Biomaterials, 2000, 12(21): 2155-2161.

[2] DONATI I, STREDANSKA S, SILVESTRINI G, *et al*. The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan[J]. Biomaterials, 2005, 26(9): 987-998.

[3] 曾　春，蔡道章，全大萍. 壳聚糖在软骨组织工程中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志，2005，19(10)：831-834.

[4] LU J X, PRUDHOMMEAUX F, MEUNIER A, *et al*. Effects of chitosan on rat knee cartilages[J]. Biomaterials, 1999, 20(20): 1937-1944.

[5] RISBUD M, RINGE J, BHONDE R, *et al*. *In vitro* expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue[J]. Cell Transplant, 2001, 10(8): 755-763.

[6] RUEL-GARIEPY E, LECLAIR G, HILDGEN P, *et al*. Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules[J]. J Control Release, 2002, 82(2-3): 373-383.

（编辑　龙　亮）