文章编号:1000-5404(2009)20-1969-04

论著

应用凝胶接种技术体外分层构建工程化骨软骨复合组织的初步研究

段小军,王富友,杨 柳,戴 刚,谭洪波,陈光兴,郭 林 (第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 应用组织工程原理,探索体外构建骨软骨复合组织的关键技术,为移植修复关节骨软骨组织缺损创造条件。**方法** 采用组织分层构建策略,用兔成骨细胞和羟基磷灰石支架材料,采用凝胶接种技术,体外构建组织工程骨;用兔软骨细胞和聚乳酸/聚磷酸钙纤维支架材料,采用凝胶接种技术,体外构建组织工程软骨;体外培养48 h后,利用界面间凹凸进行压配,并结合蛋白胶粘贴形成工程化骨软骨复合组织;将构建组织移植到裸鼠皮下,以相同大小无细胞复合的支架材料为对照组,术后12周取材进行病理分析。**结果** 采用凝胶接种技术,在体外可以初步构建组织工程骨和软骨,进而构建工程化骨软骨复合组织;工程化骨软骨复合组织移植到裸鼠皮下,术后12周实验组5例样本在成骨和成软骨区域观察到成骨和成软骨表现,但缺乏正常的钙化层界面结构,而对照组5例未观察到软骨组织形成。**结论** 采用组织分层构建策略,采用简单的压配技术和新型凝胶接种技术可以在体外初步构建工程化骨软骨复合组织。

关键词: 组织工程;骨软骨;成骨细胞;软骨细胞;支架材料
中图法分类号: R318.08;R322.71 **文献标识码:** A

Preparation of laminated construction of engineered osteochondral tissue with proteic-gel technology *in vitro*

DUAN Xiao-jun, WANG Fu-you, YANG Liu, DAI Gang, TAN Hong-bo, CHEN Guang-xing, GUO Lin (Centre for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the key technologies for the construction of engineered osteochondral tissue *in vitro* with tissue engineering principles. Methods With the aid of tissue laminated construction strategy, rabbit osteoblasts and hydroxyapatite ceramic (HAC) scaffold were used to construct tissue engineered bone *in vitro* with proteic-gel. Rabbit chondrocytes and PLLA/CPPf scaffold were employed to construct tissue engineered cartilage *in vitro* with proteic-gel. After cultured for 48 h, the engineered osteochondral tissue was prepared by press gomphosis between the 2 uneven interfaces and then pasted with albumin gel. Then the constructed was transplanted into nude mouse subcutaneously. Control group was made with the same composite scaffold but without sells. In 12 weeks after operation, the transplanted engineered osteochondral tissue was taken out for pathological analysis. Results The tissue engineered bone and cartilage were primary constructed *in vitro* with proteic-gel. The engineered osteochondral tissue was primary constructed. After transplantion into subcutaneous tissue for 12 weeks, all samples in the experiment group displayed bone and cartilage formation in the correspond ing area, but the calcified cartilage zone was not found on the interface of the bone and cartilage. However, the cartilage formation was not observed in the control group. Conclusion The engineered osteochondral tissue is primary constructed *in vitro* with the tissue laminated construction strategy and proteic-gel technology.

Key words: tissue-engineering; osteochondral tissue; osteoblast; chondrocyte; scaffold

---

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02A125);国家自然科学基金(30872619);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G079);重庆市国内科技合作计划(CSTC 2007AC5069);重庆市自然科学基金(CSTC 2006BB5357)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02A125), the National Natural Science Foundation of China (30872619), the Tackling Project of "Eleventh Five-year" for Medical Sci & Tech Research of PLA (06G079), the Project of Domestic Sci&Tech Cooperation Plan of Chongqing (CSTC 2007AC5069) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2006BB5357)

作者简介: 段小军,男,四川省渠县人,博士,副主任医师,主要从事骨与软骨组织工程学、关节外科方面的研究,发表论文41篇。电话:(023)68765295,E-mail:dxj9@163.com
通信作者: 杨 柳,电话:(023)68765280, E-mail:jointsurgery@163.com

收稿日期: 2009-01-19;**修回日期:** 2009-03-09

创伤、感染及退变等导致的关节骨软骨缺损是医学临床常见疾病,常表现为顽固性疼痛和关节活动障碍,严重者可丧失其运动功能。由于关节软骨没有血管、神经和淋巴系统,自然修复能力低下,直径超过2~4 mm的骨软骨缺损几乎不能完全修复。目前临床常用治疗方法均存在明显缺陷,且难以使其真正达到自然修复再生。组织工程技术的迅速发展,为关节骨软骨缺损的再生修复治疗提供了新策略[1,2]。本实验旨在采用体外分层构建策略,在体外分别独立构建组织工程骨和组织工程软骨,在植入体内前再进行体外装配,该关键技术的研究将为进一步探索采用组织工程技术再生修复关节骨软骨缺损创造条件。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养基、优等胎牛血清(Hyclone公司),胰蛋白酶、EDTA(Sigma公司),鼠抗兔Ⅰ、Ⅱ型胶原抗体(New Marker公司);DAB显色试剂盒、S-P法免疫组化检测试剂盒(中山公司);塑料离心管(Nunclon公司)。人纤维蛋白原(莱士公司),凝血酶(丽珠集团)。珊瑚型羟基磷灰石支架材料(意华健公司)。L-聚乳酸(MV=10.3×104D)(中科院化学所高分子合成室提供),聚磷酸钙纤维(兰州铁道学院复合材料研究所合成)。OLYMPUS-IX70型生物倒置显微镜(Olympus公司)。

1.2 方法

1.2.1 种子细胞培养与鉴定

1.2.1.1 兔成骨细胞的培养及鉴定 ①原代培养:参考文献[3],从兔耳缘静脉推注空气处死2个月龄健康日本大耳白兔($n=5$),无菌条件下截取双侧股骨和胫骨,去除关节软骨,剪成数颗1 cm×1 cm×1 cm松质骨,PBS液体洗去骨髓后,置于含DMEM培养液的培养瓶中,48 h后首次换液,并移除松质骨,以后每3天换液。孵箱内培养条件:37 ℃、5% CO_2空气、饱和湿度。②传代培养:常规消化传代,以$1\times10^4/cm^2$的密度接种,取第2代细胞进行鉴定和组织构建。③细胞鉴定:对传代培养细胞进行HE染色、碱性磷酸酶染色(Gomori氏法)和Ⅰ型胶原免疫组化染色(S-P法)来分析细胞表型。

1.2.1.2 兔关节软骨细胞的培养及鉴定 ①原代培养:参考文献[4],无菌条件下,取四肢大关节处关节软骨,切成数颗1 cm×1 cm×1 cm软骨碎块,移入50 ml塑料离心管内进行三步酶消化法获取组织细胞;依次为1 g/L的胰蛋白酶及1 g/L的EDTA-Na_2混合消化液、1 g/L的透明质酸酶消化液、2 g/L的Ⅰ型胶原酶溶液;将组织消化液经300目筛网过滤后离心、洗涤、吹打为单细胞悬液,以$2\times10^4/cm^2$的密度接种于玻璃培养瓶进行原代培养,每2天用含10%胎牛血清的DMEM/Ham's-F12换液。孵箱内培养条件同前。②传代培养:常规消化传代,以$1\times10^4/cm^2$的密度接种,取第2代细胞进行鉴定和组织构建。③细胞鉴定:对培养细胞进行HE染色和Ⅱ型胶原免疫组化染色(S-P法)来分析细胞表型。

1.2.2 支架材料设计与准备 成软骨性支架材料(聚乳酸/聚磷酸钙纤维支架材料)的制备:参考文献[5],采用溶铸颗粒沥取法制备,首先在超净条件下,将氯化钠颗粒用分样筛选出直径300~450 μm的颗粒,将长的聚磷酸钙纤维剪成长度10 mm的短纤维丝。在超净条件下,将筛选氯化钠颗粒3.860 g、聚磷酸钙纤维0.483 g掺入含L-聚乳酸0.262 g的三氯甲烷溶液中,充分混匀;用预制模具熔铸成型;37 ℃三氯甲烷挥发48 h,期间适时脱模;干燥器内真空(20 L/h;-0.1 MPa)抽提溶剂24 h;双蒸水反复萃取样品中氯化钠颗粒,每6小时换水,共萃取72 h;室温下自然干燥24 h,干燥器内真空干燥48 h,经冻干机处理24 h,形成白色多孔状材料。5 mm×5 mm×5 mm体积、500 μm孔经的成骨性支架材料(羟基磷灰石支架材料)购自北京意华健公司。将骨软骨将结合的部位修整成凹凸样结构,以利于装配稳定。两部分支架材料用纸塑包装密封,环氧乙烷消毒,最后保存于真空干燥器内。随机选取部分材料进行扫描电镜观察微观结构。

1.2.3 工程化骨软骨复合组织的体外初步构建与培养 采用体外分层构建策略。

1.2.3.1 构建组织工程骨,参考文献[6],取珊瑚羟基磷灰石为支架材料,采用纤维蛋白凝胶技术体外构建种子细胞-材料复合体,并培养48 h。

1.2.3.2 构建组织工程软骨,取聚乳酸/聚磷酸钙纤维支架材料,采用纤维蛋白凝胶技术体外构建种子细胞-材料复合体,首先聚乳酸/聚磷酸钙纤维支架材料用PBS液体洗涤后尽量吸出水分,浸入人纤维蛋白原溶液(2 mg/ml)中30 min,无菌纱布吸去多余液体;参考文献[7],消化、调整软骨细胞悬液密度为5×10^7个/ml,再按9:1的体积比,加入PBS液体配置的凝血酶溶液(20 U/ml);在24孔培养板中,将种子细胞悬液滴加至支架材料内,随后滴加1~3滴50 mmol/L $CaCl_2$溶液以促进凝胶形成;30 min后,将构建的细胞-材料复合体移入培养瓶中培养48 h。

1.2.3.3 工程化骨软骨复合组织的体外装配 在组织工程骨和组织工程软骨界面用纤维蛋白胶适当喷涂(具体步骤参见公司提供的操作说明),再利用界面凹凸对合压配形成工程化骨软骨复合组织。

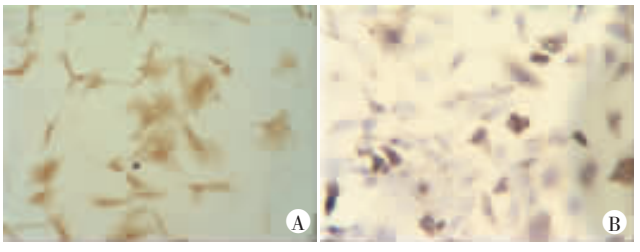
1.2.4 工程化骨软骨复合组织皮下移植 4周龄、体质量19~23 g健康裸小鼠10只(第三军医大学实验动物中心提供),术前于净化间的层流架内适应性生长1周。实验组5只植入体外预先构建的工程化骨软骨组织,对照组5只植入无细胞复合的、形状类似的空白复合支架。手术方法:采用1%戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔麻醉。手术台常规消毒铺巾,裸小鼠背部向上,铺小洞巾。切开或剪开裸小鼠背部肩胛区内侧皮肤约4 mm,止血钳轻微分离皮下组织间隙,用眼科镊小心夹持移植物,将其置于皮下组织间隙,用小圆针和3-0丝线全层缝合皮

肤组织。术后处理:裸小鼠麻醉期间,注意保暖。术后置于净化间的层流架内,分笼常规饮食饲养。定期观察动物活动、伤口愈合情况及饮食量等。

1.2.5　移植物样本检测与统计学分析　　术后 12 周采用颈髓离断法处死动物,进行大体观察:观察移植物的大小、形态和与宿主组织关系,比较培养物质地变化。病理组织学检测:10% 甲醛溶液常规固定 24 h,而后用 EDTA 进行组织脱钙处理,石蜡包埋切片,常规操作进行 HE 染色,观察不同区域的细胞形态和组织结构。分析每个样本的成骨区域和成软骨区域,随机选取 5 个高倍视野,有阳性发现记 1 分。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件包进行,独立样本 t 检验。

2　结果

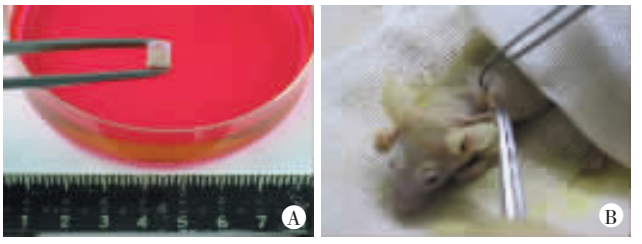
从兔松质骨和关节软骨中消化培养获得大量种子细胞,从松质骨来源的细胞呈不规则形或多角形,Gomori 氏法染色显示具有碱性磷酸酶活性,Ⅰ型胶原免疫组化染色呈阳性;从关节软骨来源的细胞呈多角形,在细胞密集区域呈“铺路石”样形态,Ⅱ型胶原免疫组化染色呈阳性(图 1)。扫描电镜观察两种支架材料均具有良好的空间结构,适宜的微孔直径,测得聚乳酸/聚磷酸钙纤维支架材料直径 300 ~ 450 μm,羟基磷灰石支架材料 300 ~ 500 μm(图 2)。在采用纤维蛋白凝胶接种技术后,可以将大量的种子细胞分别接种到羟基磷灰石和聚乳酸/聚磷酸钙纤维复合支架材料中,体外短期培养 48 h 后,可以观察到少量细胞脱落到培养瓶底,大量细胞滞留在支架材料内,通过界面间凹凸结构和蛋白胶可以在体外初步构建具有一定形态和机械性能的工程化骨软骨复合组织(图 3)。



A:成骨细胞Ⅰ型胶原免疫组织化学染色; B: 软骨细胞Ⅱ型胶原免疫组织化学染色

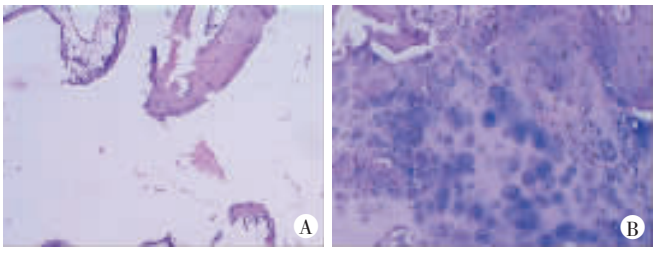
图 1　传代培养的种子细胞　(S-P ×200)

移植物样本检测:实验动物全部存活,切口甲级愈合,无红肿渗液等。2 组动物样本大体观察无明显差异,均无明显组织包膜形成,取材时移植物仍有明显硬度。病理组织学显示:实验组 5 个样本均可以观察到羟基磷灰石区域有明显骨组织形成,在聚乳酸/聚磷酸钙纤维复合支架区域有软骨样组织形成(图 4),而聚乳酸/聚磷酸钙纤维复合支架出现明显吸收,样本中未观察到典型的钙化层结构和潮线样结构;而对照组显示仅 1 个样本在羟基磷灰石区域的 3 个视野中观察到有少量骨组织形成,与实验组比较,统计学差异非常显著($P < 0.01$),而对照组全部样本均未在聚乳酸/聚磷酸钙纤维复合支架区域观察到软骨样组织形成,仅在该区域观察到纤维组织和散在巨细胞存在,也无典型的钙化层结构和潮线样结构。



A: 工程化骨软骨复合组织; B: 动物移植

图 3　培养中的工程化骨软骨复合组织及移植入裸鼠皮下观察

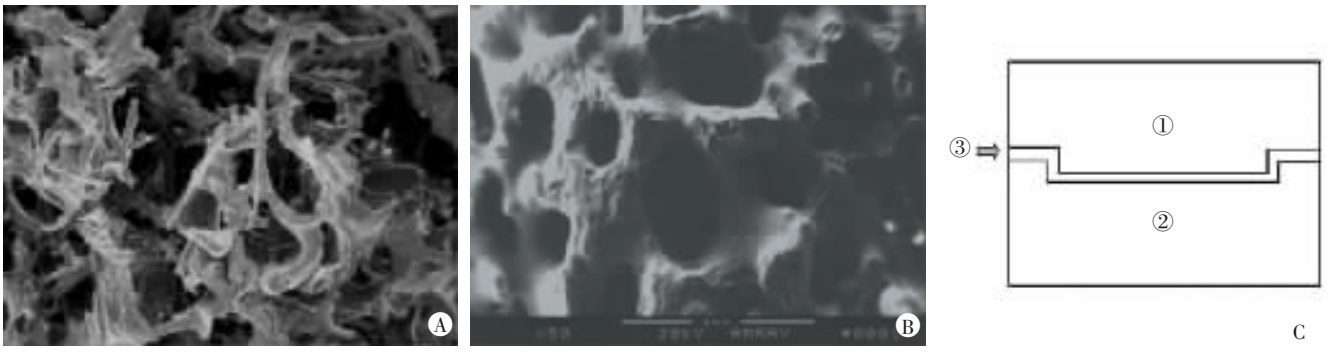


A:成骨区域; B:成软骨区域

图 4　移植物皮下移植后 12 周病理观察　(HE ×200)

3　讨论

目前单一组织工程软骨或骨的构建技术已日趋成熟,部分成果已试用于临床治疗,这些涉及种子细胞、



A:软骨材料区域 ×200; B:骨材料区域 ×50; C:界面设计示意图　①软骨材料区域;②骨材料区域;③不同组织间界面形状

图 2　支架材料的微观结构扫描电镜观察和界面设计示意图

支架材料、构建技术、动态培养和移植修复等的深入研究,为探索性研究骨与软骨复合组织构建创造了极为有利的条件[1,2,8,9]。而采用组织工程技术再生修复骨软骨复合组织缺损的研究,也必将极大地推动现代再生医学的发展。目前国内外对工程化骨软骨复合组织的研究尚处于起步阶段。根据构建策略的差异可分为3类。第一类,体外构建:①分层构建,这是最常见的策略,即在体外分别构建培养软骨和骨组织,在植入前将两者用可吸收线缝合、纤维蛋白胶粘合或光聚合形成一个整体,如Gao等[10]将扩增培养的MSCs分别向成骨细胞和成软骨细胞表型诱导后,与成软骨支架HYAFF-Ⅱ和成骨支架磷酸钙复合构建相应组织,再用纤维蛋白凝胶将两者粘合;②一体构建,体外制备一体化支架材料,然后在软骨区域接种成软骨性种子细胞,成骨区域根据情况接种或不接种成骨性种子细胞;如Chen等[11]用胶原海绵制作软骨支架,聚丙交酯-聚乙交酯共聚物(PLGA)和胶原制作骨支架,将狗MSCs接种于该支架,体外培养1周植入体内修复狗膝关节骨软骨缺损,术后4个月组织学检测表明,修复区域分别形成软骨和骨,但机械性能较差;第二类,体内构建:将体外扩增培养的种子细胞与可注射性生物材料混合,直接注入缺损区域产生修复行为,如Hoemann等[12]将体外扩增的软骨细胞与壳聚糖混合后通过关节镜注入兔体内修复骨软骨缺损,术后1周植入物与周围组织基本整合,组织学观察有软骨样细胞外基质产生;第三类,联合构建:将体外构建的骨组织植入体内修复骨部缺损,然后注入体外培养扩增的软骨细胞和生物材料混合物到软骨缺损,如Gao等[13]将可注射磷酸钙注入兔股骨髁负重区直径为3 mm的骨缺损中,再在软骨缺损区移植含自体骨髓祖细胞的工程化软骨,术后12周检测发现骨软骨区域再生修复。

本实验中,采用组织分层构建策略,用兔成骨细胞和羟基磷灰石支架材料,采用凝胶接种技术,体外构建组织工程骨;用兔软骨细胞和聚乳酸/聚磷酸钙纤维支架材料,采用凝胶接种技术,体外构建组织工程软骨;体外培养48 h后,利用界面间凹凸进行压配,并结合蛋白胶粘贴形成工程化骨软骨复合组织;动物实验证实全部样本均在成骨和成软骨区域观察到成骨和成软骨表现,与其他技术比较,说明该技术路线简单可行,这为未来探索移植修复关节骨软骨组织缺损创造了极为有利的条件。本实验中还创新性采用了凝胶接种技术,使得种子细胞在支架材料内分布更均匀,显著提高接种效率。然而本研究中发现体外分层构建的工程化骨软骨复合组织,移植到皮下组织区域后,仍难以形成正常的钙化层界面结构和潮线样结构,这可能是体外构建与体内植入区域均缺乏应力刺激有关,或者局部微环境与关节软骨区域还存在显著性差异有关,这些推测还需要在未来进一步研究证实。

参考文献:

[1] Griffith L G, Naughton G. Tissue engineering—current challenges and expanding opportunities[J]. Science, 2002, 295(5557): 1009-1014.

[2] 杨 柳. 加强软骨与骨组织工程中关键技术的应用[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(3): 263-265.

[3] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1996: 98-200.

[4] 段小军, 杨 柳, 左镇华, 等. 应用聚集培养技术进行兔骨髓间充质干细胞体外成软骨诱导培养[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(3): 316-318.

[5] Freed L E, Marquis J C, Nohria A, *et al*. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers[J]. J Biomed Mater Res, 1993, 27(1): 11-23.

[6] 段小军, 张洪鑫, 杨 柳, 等. 改进型纤维蛋白凝胶种植技术在组织工程骨体外构建中的应用[J]. 生物医学工程与临床, 2006, 10(5): 271-274.

[7] 夏万尧, 曹谊林, 商庆新, 等. 组织工程化软骨组织形成的最佳细胞浓度和最佳形成时间的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 1999, 13(4): 244-248.

[8] Ito Y, Adachi N, Nakamae A, *et al*. Transplantation of tissue-engineered osteochondral plug using cultured chondrocytes and interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic cylindrical plugs to treat osteochondral defects in a rabbit model[J]. Artif Organs, 2008, 32(1): 36-44.

[9] 杨 柳, 段小军. 组织工程及其研究[M]//王正国. 外科学及野战外科学. 北京: 人民军医出版社, 2007: 354-362.

[10] Gao J, Dennis J E, Solchaga L A, *et al*. Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Tissue Eng, 2001, 7(4): 363-371.

[11] Chen G, Sato T, Ushida T, *et al*. Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen[J]. Tissue Eng, 2004, 10(3-4): 323-330.

[12] Hoemann C D, Sun J, Legare A, *et al*. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(4): 318-329.

[13] Gao J, Dennis J E, Solchaga L A, *et al*. Repair of osteochondral defect with tissue-engineered two-phase composite material of injectable calcium phosphate and hyaluronan sponge[J]. Tissue Eng, 2002, 8(5): 827-837.

(编辑 王 红)