论著

文章编号:1000-5404(2010)17-1820-04

利用胶原和聚乙烯醇构建组织工程软骨支架

崔运利,王富友,谭洪波,张 颖,陈卫军,杨 柳 (400038 重庆,第三军医大学西南医院关节外科中心)

【摘要】 目的 依据仿生学原理,应用Ⅱ型胶原蛋白(type-Ⅱ collagen,CoⅡ)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate,CS)、透明质酸(hyaluronan,HA)和聚乙烯酸(polyvinyl alcohol, PA)来制备组织工程支架材料。方法 依据人体正常关节软骨细胞外基质主要成分Ⅱ型胶原、硫酸软骨素和透明质酸;添加高分子聚合物PVA来提高支架强度,应用冷冻干燥等技术制备复合支架,接种细胞体外静态培养7 d,通过力学测试、扫描电镜和组织染色等方法对支架进行检测。结果 支架孔隙均匀,孔隙率为93% ~95%,CoⅡ-CS-HA-PVA复合支架最大张力约为1.19 N,单纯CoⅡ-CS-HA复合支架约为0.55 N,差异有统计学意义($t=4.985$,$P=0.002$),细胞在支架上均匀分布,活力旺盛。结论 CoⅡ-CS-HA-PVA复合支架具备良好的生物相容性,可为种子细胞增殖分化提供一个适宜的环境,有很好的临床应用前景。

【关键词】 Ⅱ型胶原;硫酸软骨素;透明质酸;聚乙烯醇;组织工程;支架材料
【中图法分类号】 R318.08;R322.71;R329 【文献标志码】 A

Construction of scaffold for cartilage tissue engineering using collagen and polyvinyl alcohol

Cui Yunli, Wang Fuyou, Tan Hongbo, Zhang Ying, Chen Weijun, Yang Liu (Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To construct the scaffold for cartilage tissue engineering according to the bionics principles. Methods 3-dimensional scaffolds were prepared with type-Ⅱ collagen (CoⅡ), hyaluronan (HA) and chondroitin sulfate (CS) using the freeze-dry technology. Polyvinyl alcohol (PVA) was added to enhance their mechanical strength. The scaffolds were evaluated by SME, mechanical test and immunohistochemistry. Then 293 cells were seeded in scaffolds and cultured for 7 d *in vitro*. Data were analyzed by SPSS13.0. Results The pores of scaffold were uniform with a porosity rate of 93% -95%. The maximum tension of CoⅡ-CS-HA-PVA scaffold and CoⅡ-CS-HA scaffold was 1.19 N and 0.55 N, respectively ($t=4.985$, $P=0.002$). The distribution of cells was even in scaffolds. Conclusion The CoⅡ-CS-HA-PVA scaffold can provide a suitable environment for cell proliferation and differentiation, thus having a very good prospect in clinical application.

【Key words】 type Ⅱ collagen; chondroitin sulfate; hyaluronan; tissue engineering; scaffold material

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870639) and the Tackling Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (2009AC5018). Corresponding author: Yang Liu, Tel: 86-23-68765280, E-mail: jointsurgery@163.com

由创伤或骨疾病导致关节软骨缺损临床上十分常见,严重影响患者生活质量,已成为肢体残障的主要原因之一。关节软骨属于透明软骨,缺乏血管、神经,损伤后自身难以修复,临床现有治疗措施均存在明显缺陷,组织工程技术为其再生修复提供了新思路。软骨支架材料是组织工程软骨研究中的一个重要部分[1,2],理想的支架材料应尽量接近天然的软骨细胞外基质成分,并可以替代软骨细胞外基质作用,且支架孔隙率应达到90%以上、孔径为100 ~300 μm,以有利于细胞黏附与基质合成。本研究选取关节软骨细胞外基质的主要成分:Ⅱ型胶原蛋白(CoⅡ)、硫酸软骨素(CS)和透明质酸(HA)作为支架原材料,辅以具有较好生物相容性的聚乙烯醇(PVA)[3-5]来提高支架的强度,采用盐粒子造孔、冷冻干燥等技术制备海绵支架,并对其理化性能进行测试,为构建出理想的组织工程软骨支架材料提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Ⅱ型胶原蛋白(本实验室从猪膝关节软骨提取),硫酸软骨素、透明质酸(Sigma公司,美国),聚乙烯醇AH-26(国药集团化

【基金项目】 国家自然科学基金(30870639);重庆市科技攻关项目(2009AC5018)
【通信作者】 杨 柳,电话:(023)68765280,E-mail:jointsurgery@163.com

学有限公司)，DMEM (C11885,上海英骏生物技术有限公司)，低温冷冻干燥机(Thermo Savant2081,美国)，扫描电子显微镜(HITACHI3400,日本)，RGT-5A 微机控制电子万能测试机(深圳市瑞格尔仪器有限公司)。

1.2 软骨支架的制备

1.2.1 CoⅡ-CS-HA 混合液配置 将Ⅱ型胶原蛋白溶于 0.5 mol/L 醋酸溶液中,磁力搅拌器搅拌使其完全溶解,制得终浓度为 1.5%(质量体积比)胶原蛋白醋酸溶液;边搅拌边向溶液中分别加入硫酸软骨素和透明质酸使其终浓度分别为 0.2%(质量体积比)和 0.1%(质量体积比)[6]。

1.2.2 10% PVA 水溶液的配置 将 10 g PVA 颗粒倒入盛有 100 ml 双蒸水的烧杯中,磁力搅拌器搅拌并加热至 80 ℃,使 PVA 颗粒完全溶解备用。

1.2.3 CoⅡ-CS-HA-PVA 溶液配置 将 CoⅡ-CS-HA 混合液与 10% PVA 水溶液分别按照 1∶1体积比进行混合,磁力搅拌器搅拌使其混合均匀。

1.2.4 NaCl 颗粒制孔 将 CoⅡ-CS-HA-PVA 溶液混匀后,用滴管移入 12 孔板内,每孔约 3 ml,20 ℃下,筛取粒径在 150 ~ 250 μm 之间的 NaCl 颗粒,将 NaCl 颗粒添加至孔板内搅拌,待达到饱和后,继续添加,直到 NaCl 颗粒堆积的高度为 3 mm 时停止,添加的同时充分搅拌使其混合均匀。

1.2.5 真空低温冻干 混匀后将 12 孔板置于 -20 ℃冰箱 4 h,-80 ℃冰箱 24 h;最后 -47 ℃低温冷冻干燥机中冻干,将冻干后的支架浸泡在超纯水中,去除盐粒子,即得 CoⅡ-CS-HA-PVA 海绵支架。

制备 CoⅡ-CS-HA-PVA 复合支架的同时制备不含 PVA 的 CoⅡ-CS-HA 复合支架,作为对照组。

1.3 软骨支架材料理化性能检测

1.3.1 超微结构观察和组织化学染色 取软骨支架材料,固定于铜台上,喷金后在扫描电镜下观察复合支架材料的形貌。对支架材料切片进行番红 O 染色。

1.3.2 孔隙率测定 采用液体置换法对支架材料的孔隙率测定,无水乙醇作为置换液。试管内初始无水乙醇的体积为 V_0,浸入支架待无气泡后,此时试管内液体总体积为 V_1,$V_1 - V_0$ 表示支架材料轮廓的体积。然后将材料从试管中取出,记剩余的无水乙醇的体积为 V_2,$V_0 - V_2$ 表示浸入支架材料的无水乙醇的体积,即支架材料孔隙的体积,$V_1 - V_2$ 则表示支架材料的总体积。根据公式 $P(\%) = [(V_0 - V_2)/(V_1 - V_2)] \times 100\%$ 计算孔隙率。

1.3.3 力学性能测试 将支架裁剪成长 2 cm,宽 0.5 cm,厚 0.25 cm 的条状,将两端固定,以每分钟 5 mm 的距离缓慢对材料进行拉伸试验,分析两种支架材料的力学性能。

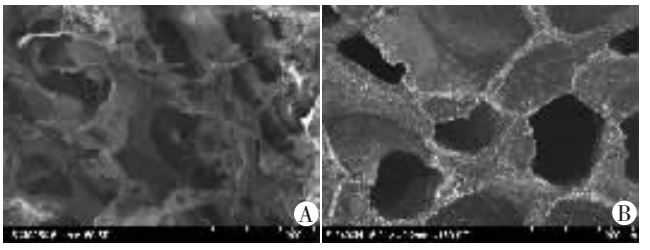
1.3.4 细胞相容性检测 将真空冻干的复合支架材料取出,用 PBS 漂洗 2 次,沥干后,放入 12 孔板内,保鲜膜密封后用 ^{60}Co 放射线照射 12 h 消毒备用。将处于指数生长期的 293 细胞悬液经 2 000 r/min × 15 min 离心后,收集细胞,按 1×10^5/ml 的密度分别接种于软骨支架上[7],约 12 h 后,待细胞充分粘附于支架后,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,常规培养。7 d 后将培养的细胞-支架复合体用 2.5% 的戊二醛固定 24 h,组织切片 HE 染色和扫描电镜观察细胞在支架上的生长情况及细胞形态。

1.3.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 软骨支架的超微结构观察

CoⅡ-CS-HA 海绵支架内部呈均匀的多孔网状结构,孔的形状近似圆形,各孔隙之间相互连通,孔径约为 70 ~ 300 μm,孔隙率约为 95%(图 1A);使用 NaCl 颗粒制孔的 CoⅡ-CS-HA-PVA 复合海绵支架孔隙分布均匀,孔通率良好,孔径为 150 ~ 250 μm,孔隙率约为 93%(图 1B)。

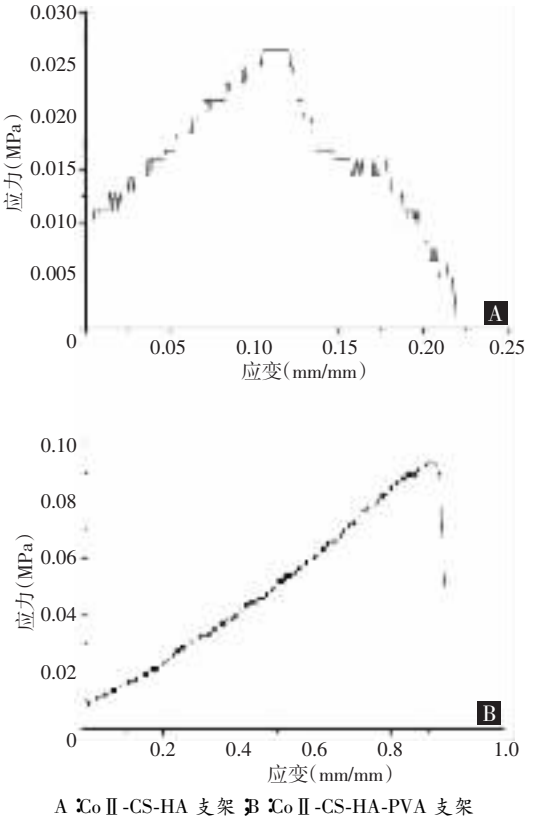


A:CoⅡ-CS-HA 海绵支架;B:CoⅡ-CS-HA-PVA 海绵支架

图 1 软骨支架材料超微结构观察 (SEM)

2.2 软骨支架的生物力学测试

经过力学测试仪分析,单纯的 CoⅡ-CS-HA 海绵支架其承受最大载荷约 0.55 N,拉断时伸长的距离约 2.91 mm(图 2A);经 NaCl 制孔的 CoⅡ-CS-HA-PVA 海绵支架所承受的最大拉力约 1.19 N,拉断时伸长的距离约 27.94 mm(图 2B),添加 PVA 的支架弹性明显提高,到达距离极限时突然完全断裂,未添加 PVA 的支架则缓慢断裂开,两种支架力学性能经 t 检验分析具有统计学意义($t = 4.985$,$P = 0.002$)。

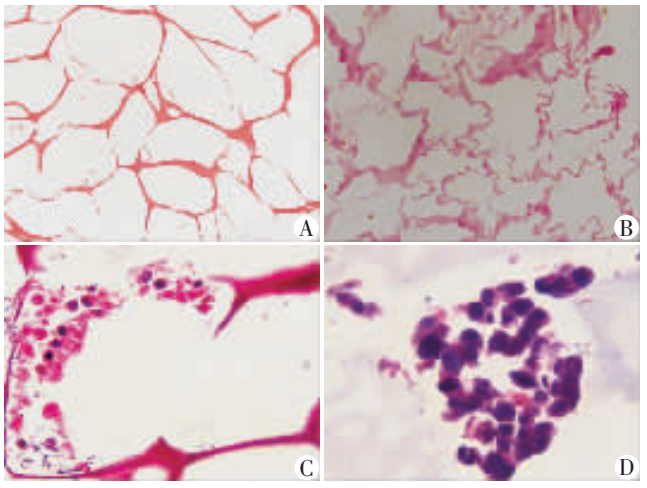


A:CoⅡ-CS-HA 支架;B:CoⅡ-CS-HA-PVA 支架

图 2 软骨支架生物力学应力-应变曲线

2.3 软骨支架材料相容性实验

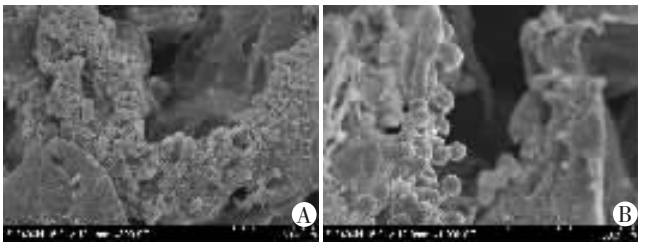
2.3.1 组织学染色观察 支架经过番红O染色，显示添加PVA组和未添加组的支架的均有较均匀的孔隙，并且各孔隙之间彼此相通，添加PVA的支架切片着色较浅（图3A、B）；细胞-支架复合体切片HE染色可见在孔隙内细胞黏附在孔壁上且生长旺盛，细胞形态良好（图3C、D）。



A：单纯CoⅡ-CS-HA支架番红O染色（×100）；B：单纯CoⅡ-CS-HA-PVA支架番红O染色（×100）C：CoⅡ-CS-HA与细胞共培养（HE ×400）；D：CoⅡ-CS-HA-PVA与细胞共培养（HE ×400）

图3 支架材料组织化学观察

2.3.2 扫描电镜超微结构观察 细胞在支架上培养7 d后，经戊二醛固定，扫描电镜观察，发现细胞在CoⅡ-CS-HA-PVA支架上可以紧贴于海绵支架的孔壁上，并且细胞生长情况良好，分布较均匀，其形态近似球形（图4A、B）。



A：CoⅡ-CS-HA-PVA与细胞共培养；B：CoⅡ-CS-HA-PVA与细胞共培养

图4 支架与细胞共培养扫描电镜观察

3 讨论

在组织工程中，支架材料不仅起支撑作用，保持原有组织的形状，而且还起到模板作用，因此，理想的支架材料应该可以为种子细胞提供一个有利于细胞黏附、增殖乃至分化的外环境。目前构建组织工程支架的材料很多，如天然材料、人工和合成高分子材料等，每种材料都各有优缺点，选用天然软骨成分如Ⅱ胶原来构建支架，发现支架具有良好的生物相容性[8]，目前提取方法已经很成熟[9]。有研究发现，透明质酸可以促进细胞的增殖[10]；Ko等[11]利用Ⅱ型胶原、透明质酸、硫酸软骨素混合构建海绵支架，细胞生长良好，有较好的生物相容性。李长青等[12]利用Ⅱ型胶原和透明质酸混合构建支架，具有较理想的支架结构，但利用这些天然材料构建支架的缺点是来源有限并且强度较差，无法为种子细胞提供一个良好的支撑环境；利用合成高分子聚合物作为构建支架的材料，可以使支架的强度大大提高，但缺点是在生物相容性方面，远不如天然的生物材料，Lee等[13]利用PVA和硫酸软骨素构建凝胶应用于组中工程，具有良好的生物相容性，但如何在组织工程支架的研究中，构建出既有良好的生物相容性又具有一定的强度的支架材料，是我们必须解决的关键问题。

本研究主要是通过向胶原、透明质酸、硫酸软骨素这些具有良好生物相容性的支架材料中添加高分子聚合物PVA来提高所构建支架的机械强度，通过与不添加PVA的支架材料进行力学测试对比发现，添加PVA后的支架其弹性和机械强度明显高于未添加PVA组，这点恰恰可以加速种子细胞在支架内获取营养和加快体液的交换，以利于细胞的生长；通过利用NaCl颗粒制孔技术制孔，所构建的支架可以得到均匀的孔隙和良好的孔隙率及孔通率，漂洗去盐粒子的过程中，支架会吸水膨胀，待完全膨胀后，其可以呈现出与盐粒子粒径基本一致的孔径，此时仍具有良好的机械性能，放入细胞培养液中观察，可保持去盐后的体积，无收缩和膨胀，但在空气中使其完全干燥后，体积会明显缩小，孔隙率和孔通率也随之下降；生物相容性方面，通过在支架材料上接种293细胞后体外静态培养7 d后发现，细胞在单纯CoⅡ-CS-HA和CoⅡ-CS-HA-PVA两种复合支架上均可以粘附，生长旺盛，并且细胞的形态、增殖和分化均表现良好。

通过上述实验结果可知，添加PVA可以使CoⅡ-CS-HA支架的弹性和强度明显提高，最大载荷约为未添加PVA组支架的4倍，拉伸实验材料断裂时移动距离约为未添加PVA组支架的13倍，有效弥补了单纯的CoⅡ-CS-HA支架强度不够的缺点，并且添加PVA的CoⅡ-CS-HA支架对细胞没有明显的毒副作用；细胞在构建的CoⅡ-CS-HA-PVA复合支架上可以旺盛的生长，此支架具有良好的细胞相容性；因此，CoⅡ-CS-HA-PVA复合支架可以作为一个种子细胞良好的载体，供种子细胞黏附、生长、扩增，在组织工程的研究中具有良好的应用前景，下一步准备通过大动物实验来检验其修复功能。

参考文献：

[1] Chung C, Burdick J A. Engineering cartilage tissue[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(2): 243-262.

[2] Frenkel S R, Di-Cesare P E. Scaffolds for Articular Cartilage Repair [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(1): 26 - 34.
[3] Lee S Y, Pereira B P, Yusof N, *et al*. Unconfined compression properties of a porous poly(vinyl alcohol)-Chitosan-based hydrogel after hydration[J]. Acta Biomater, 2009, 5(6): 1919 - 1925.
[4] 李沁华, 莫小慧, 杜文旭. 聚乙烯醇- 透明质酸- 胶原组织工程支架研究[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2009, 30(3): 319 - 324.
[5] Schmedlen R H, Masters K S, West J L. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering[J]. Biomaterials, 2002, 23(22): 4325 - 4332.
[6] Ko C S, Huang J P, Huang C W, *et al*. Type II collagen-Chondroitin sulfate-Hyaluronan scaffold cross-linked by genipin for cartilage tissue engineering[J]. J Biosci Bioeng, 2009, 107(2): 177 - 182.
[7] 段小军, 王富友, 杨柳, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(20): 1969 - 1972.
[8] Lee C R, Grodzinsky A J, Spector M. Biosynthetic response of passaged chondrocytes in a type II collagen scaffold to mechanical compression[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 64(3): 560 - 569.
[9] Deyl Z, Miksik I, Eckhardt A. Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 790(1/2): 245 - 275.
[10] Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, *et al*. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels[J]. J Cell Physiol, 1999, 179(2): 142 - 148.
[11] Ko C S, Wu C H, Huang H O, *et al*. Genipin cross-linking of type Ⅱ collagen-Chondroitin sulfate-Hyaluronan scaffold for articular cartilage therapy[J]. J Med Biol Eng, 2007, 27(1): 7 - 14.
[12] 李长青, 周跃, 张传志. 仿生髓核组织工程细胞支架的构建及初步理化指标分析[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(13): 1351 - 1354.
[13] Lee C T, Kung P H, Lee Y D. Preparation of poly(vinyl alcohol)-Chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering[J]. Carbohydr Polym, 2005, 61(3): 348 - 354.

(收稿 2010-03-15 修回 2010-04-09)
(编辑 王 红)

(上接 1811 页)

FIB 1.53 g/L, TT 19.8 s; 心脏彩超心包腔内可见片状液性暗区, 左室侧壁 S/D = 3/1 mm, 提示"微量心包积液"; 胸部 X 线片示心胸比率为 0.52, 心影形态大小正常。3 月 17 日血象基本恢复正常, 骨髓象: 增生活跃, G/E = 2.09/1, 原、幼淋巴细胞 0.03, 成熟淋巴细胞 0.25, 粒细胞系、红细胞系、巨核细胞系增生正常, 诊断"L_1-CR"。3 月 28 日查 WBC 2.2×10^9/L, RBC 3.52×10^9/L, Hb 112 g/L, BPC 341×10^9/L, PT1 3.20 s, APTT 48.1 s, FIB 0.72 g/L, TT 20.4 s; 心肌酶谱 AST 14.3 U/L, LDH 162.3 U/L, a-HBDH 184.4 U/L, CK 21.1 U/L, CKI 35.2 U/L, TnT 1.10 ng/ml; 心脏彩超示心包积液完全吸收, 胸透心影形态正常。化疗结束后 1 周凝血检查正常, 给每周 2 次甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside, cytosar, Ara-C)、地塞米松(dexamethasone, DXM)三联鞘注, 脑脊液理化检查均正常。4 月 15 日开始用原 VDCLP 方案行第 2 疗程化疗。2010 年 5 月 13 日出院时查血常规、心肌酶谱、心脏彩超与胸部 X 线片检查均正常, 骨髓象完全缓解。

2 讨论

小儿急性白血病是以发热、贫血、出血和肝脾淋巴结肿大为临床特征, 若症状典型一般诊断不难, 但当某脏器损害致某一局部症状较为突出时, 临床表现复杂而不典型, 尤其在贫血、出血等全身症状不明显时, 极易引起误诊而延误治疗[2]。小儿心包积液的病因国内外学者报道以化脓性及结核性心包炎为首位, 病毒感染、肿瘤及自身免疫性疾病次之[8]。白血病心包渗液表现非常少见[9]。本病例病发之初外周血象变化不明显, 无骨痛及肝脾肿大等典型白血病表现, 而以低烧、胸闷、心慌、气短, 心影增大、心包积液为首发症状, 故诊为病毒性心包炎, 治疗 3 d 体温不降, 白细胞数增高, 请血液科会诊骨穿, 方确诊为 ALL-L_1, 用 VDCLP 方案化疗 1 个疗程, 骨髓象达 CR 后心包积液也随之消失, 心影形态恢复正常。

本例的诊治要点是早期的发热、心包积液与儿科治疗中的持续发热、血象变化, 终以血液科会诊骨髓象确诊; 其难点是病发之初无典型白血病表现, 而以少见的心包积液为首发症状, 误诊为病毒感染性心包炎。通过本案例的诊治提示临床医师对常见的心包积液, 按常规治疗无效者, 要考虑引起心包积液的少见、罕见病因, 重视血常规的变化情况, 及时行骨髓像检查, 以减少临床漏诊、误诊率。

参考文献:

[1] 杨菁, 张永红. 重视儿童急性淋巴细胞白血病的规范化诊断和治疗[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2008, 13(6): 286 - 288.
[2] 乐少华, 李健. 儿童急性白血病少见首发临床表现 22 例报告[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2010, 15(1): 29 - 31.
[3] 盛琦, 袁晓军, 张勤, 等. 急性淋巴细胞白血病并发中枢神经系统白血病临床分析[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2008, 13(4): 166 - 168.
[4] Basu D, Siddaraju N, Murugan P, *et al*. Cytologic aspects of T-cell acute lymphoblastic leukemia presenting as a massive pericardial effusion: a case report[J]. Acta Cytol, 2009, 53(3): 337 - 340.
[5] Arat N, Bakanay S M, Yildiz E, *et al*. Complete regression of massive cardiac involvement associated with acute T cell leukemia following chemotheraphy[J]. Eur J Echocardiogr, 2008, 9(3): 388 - 390.
[6] Chaves F P, Quillen K, Xu D. Pericardial effusion: a rare presentation of adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. Am J Hematol, 2004, 77(4): 381 - 383.
[7] 林淑琴, 李康猷, 周舜辉. 心包积液的少见病因及误诊分析[J]. 中国全科医学, 2009, 12(16): 1527 - 1529.
[8] 邢淑华, 张宏艳, 陈静, 等. 小儿心包积液病因分析[J]. 河北医药, 2008, 30(5): 623 - 624.
[9] 林凤茹, 郭晓楠, 任金海. 恶性血液病诊治和疗效标准[M]. 第 2 版. 北京: 人民军医出版社, 2010: 233.

(收稿 2010-05-19 修回 2010-06-11)
(编辑 吴培红)