DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.035
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

[29] Cundy P J, Jofe M, Zaleske D J, *et al*. Physeal reconstruction using tissue donated from early postnatal limbs in a murine model[J]. J Orthop Res [J]. 1991, 9(3): 360-366.
[30] 李晓光, 邢国强, 邢 岩. 胚胎骨骺移植修复关节面缺损的实验研究[J]. 白求恩医科大学学报, 1997, 23(2): 160.
[31] owen C V, Bray P W, Boyer M I, *et al*. Short-term response of epiphyseal plate cell populations following selective devascularization and microsurgical revascularization[J]. Microsurgery, 1994, 15(8): 555-562.
[32] Klaus G, Jux C, Fernandez P, *et al*. Suppression of growth plate chondrocyte proliferation by corticosteroids[J]. Pediatr Nephrol, 2000, 14(7): 612-615.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2003)02-0173-03

综述

骨组织工程中种子细胞和材料的粘附

Adhesion of seeding cells to scaffoldsin tissue engineering of bone

周红星 综述, 杨 柳 审校 (第三军医大学附属西南医院骨科, 重庆 400038)

各种原因造成骨缺损的治疗一直是骨科界的难题之一。传统的治疗方法有自体骨移植、同种异体骨移植和生物材料替代等。这些方法均不同程度地存在着来源困难、免疫排斥及成骨能力不确定等缺点。在对较大骨缺损进行骨移植时, 新骨形成之前移植骨可能已被机体吸收, 造成植骨失败[1]。骨组织工程的提出和发展为这一医学难题开辟了新的解决途径。随着骨组织工程研究的快速发展, 组织工程化骨已成为最有希望进入临床应用的组织工程成果之一。

骨组织工程和其他组织工程一样, 需要3种基本生理因素: 种子细胞, 这些细胞可以由前体细胞诱导而来; 也可以在相似的微环境中生长产生。促进细胞生长和分化的生物因子, 这些生物因子可以由外源供给; 也可以是转化细胞产生的纯化蛋白; 也可以由骨基质或分泌细胞获得。支架, 这种支架是细胞赖以生长的材料, 它可以吸附粘附分子、分化因子和生长因子等生物活性物质, 可以逐渐被种子细胞产生的基质所替代[2]。其中, 细胞与支架材料的相互作用是组织工程研究的主要领域, 细胞与材料的粘附是基础, 细胞必须与材料发生适当的粘附才能进行迁移、分化和增殖。无论是在体外还是在体内, 最先直接与组织细胞接触并发生作用的是材料的表面, 因此细胞粘附到材料表面相当重要, 且粘附特性的差异也将会影响细胞的增殖、分化等一系列反应[3]。所以, 对种子细胞和材料粘附的研究不仅为骨组织工程研究筛选出适于种子细胞发挥生理功能的细胞外支架材料, 而且也可以为生产可用于临床的组织工程化活性骨提供主要的方法和手段。现就种子细胞与材料的粘附综述如下。

1 种子细胞与材料粘附的机制

种子细胞与材料表面粘附的位点称为粘附斑(Adhesion plaques), 这种局部接触是一种紧密连接, 细胞膜与材料表面的距离在10~15 nm之间。在体内这种连接除了血管内的内皮细胞外几乎没有, 因为血管内皮细胞要承受较大的血流动力压。种子细胞在材料表面的粘附是细胞膜上的受体与吸附于材料上的粘附蛋白发生作用的结果。成骨细胞主要功能是合成、分泌骨基质并促进基质钙化形成骨组织, 细胞内碱性磷酸酶(ALP)含量较高, 分泌Ⅰ型胶原、骨结合素、骨钙素、骨桥蛋白、纤维连接蛋白及一系列生长因子[4]。这些因子已被证明具有促细胞粘附的作用, 这些蛋白中均含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列(RGD)。这一序列被称做粘附序列, 当它被细胞膜表面的整和素受体特异识别后激活细胞内的细胞骨架蛋白、蛋白酶、蛋白激酶、磷酸酶和信号传导系统, 促使细胞发生一系列的生理生化反应, 铺展而粘附于材料上[5]。

2 种子细胞与材料粘附的影响因素

细胞与材料的粘附是一个包括多因素的复杂过程, 受多种因素的影响。由于种子细胞真正接触的是材料的表面, 因此材料的表面性质对种子细胞与材料的粘附有着主要的影响, 其影响因素主要有生物学因素和材料因素两个方面。

2.1 生物学因素

生物学因素是指同细胞膜的组成及其性能有关的因素, 包括细胞膜的荷电性质、细胞的代谢状态、细胞的亲疏水性、细胞的表面电荷、细胞膜分子的运动方向、细胞膜的柔韧性、细胞表面大分子结构改变而产生的近距位阻力、细胞与材料接触的时间等[6]。

2.2 材料因素

材料因素主要指材料表面的荷电特性、表面自由能、表面的亲疏水性、材料的化学结构以及材料的形态结构等。一般规律为亲水性的表面有利于种子细胞的粘附生长, 高表面能的材料表面有利于细胞的粘附与铺展。材料表面的电荷性质与电荷密度对细胞生长有重要的影响, 在无血清时, 细胞在带正电荷的材料表面上的粘附增加。主要是因为带正电荷的材料表面与带负电荷的细胞之间的静电作用有利于细胞的粘附。生物材料必须既能支持细胞的粘附, 又能使粘附细胞在材料上很

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39830100); 全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072)
作者简介: 周红星(1967-), 男, 河南省南阳邓州市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事骨组织工程中细胞与支架粘附的研究, 电话: (023)65317146。
通信作者: 杨 柳, E-mail: Jointsurgery@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2002-03-02; 修回日期: 2002-12-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

好地铺展与生长并维持种子细胞的表型[7]。材料本身及其降解产物必须对细胞无毒性,合适的材料表面能有选择性的吸附环境中的粘附蛋白,克服对环境中蛋白质吸附的无选择性,有利于增强对细胞的粘附性。材料的表面结构也影响种子细胞的粘附,粗糙的表面结构有利于细胞的粘附,且有利于生物膜的迅速再生长[8]。组织工程细胞支架须有一定的三维结构,且其多孔结构及孔径的大小都影响细胞的粘附、迁移及营养物质、信号传导物质及细胞代谢废物的交换[9]。骨组织工程的细胞支架材料也不例外。

3 种子细胞与材料粘附的研究现状

研究证明:种子细胞是通过细胞外基质介导而粘附于支架材料的。目前感兴趣的研究方向有:不同化学成分的支架材料对细胞粘附特性产生的影响;支架材料不同表面形态、粗糙度对种子细胞粘附行为产生的影响以及一些蛋白质和多肽因子对种子细胞粘附特性的影响。

3.1 骨组织工程应用的支架材料

支架材料无论是天然材料还是人工合成材料都必须有良好的细胞界面,良好的表面活性,有利于细胞的粘附,并为细胞在其表面生长、增殖、分泌基质提供良好的微环境。自从20世纪60年代Van de Putte等[10]把脱钙骨作为支架在实验动物身上异位成骨后。Kirker-Head等[11]应用BMP—2和PLA/PGA复合治疗羊股骨干骨缺损。经过近10年的发展,目前在骨组织工程中用作细胞支架的生物材料有天然高分子(如:甲壳素、壳聚糖、海藻酸盐、胶原蛋白等)、天然无机物(如:羟磷灰石、珊瑚礁等)、合成高分子(如:脂肪族聚酯、聚原酸酯、聚醚)及合金(如:钛、铝合金)等。这些支架材料都不同程度地存在着细胞亲和力低下的缺陷。

3.2 支架材料细胞亲和性的改建

随着细胞生物学、分子生物学及材料科学等相关学科的发展,细胞和细胞外基质材料之间的相互作用日益受到重视。一般情况下,细胞在中等湿润的材料表面粘附性最强,Mikos等[12]通过乙醇和水两步预湿方法,对细胞支架进行预湿,增加亲水性,使其对种子细胞的粘附性增加。骨组织工程中的细胞支架必须具有三维结构及相互连接的适宜大小的空洞,才有利于种子细胞的粘附、迁移和钙化,从而形成新骨。Mikos等[13]成功地应用层压技术合成了具有精细解剖形态的三维立体生物降解性聚合物泡沫,制成的特定形状、空隙率达90%的支架提高了细胞的粘附和增殖能力。Lee等[14]把天然可降解多聚物脱乙酰壳聚糖(Chitosan)和磷酸三钙(TCP)混合制成多空性三维泡沫状支架,提高种子细胞的粘附、增殖和钙化能力。以磷酸钙或磷酸二氢钙为主要原料,添加适量稳定剂、阻降剂,用熔铸拉丝法获得CPP纤维,并对其力学性能、降解性能、毒理学性能和生物相容性进行测定证明,这种材料可以作为骨组织工程支架材料[15]。我们实验室应用CPPf/PLLA/Ⅰ型胶原复合材料,按照不同的比例和方式制备的人工骨支架具有促进种子细胞粘附和增殖的作用(论文待发表)。Bujia等[16]选用多聚赖氨酸来包被PLA聚合物提高软骨细胞数,多聚赖氨酸除增加支架对细胞的吸附力外,还具有促细胞功能的作用。虽然PGA支架能促进种子细胞的粘附、增殖和分化,但是PLA、PGA降解后的酸性产物降低了聚合物周围的pH值,影响组织和细胞的粘附及生长。Agrawal等[17]采用碱性盐(包括碳酸钙、HA和碳酸氢钠复合PLA-PGA)来拮抗酸性降解产物对周围pH值的降低。Sims等[18]利用纤维蛋白单体在凝血酶作用下形成凝胶的天然过程制成纤维蛋白凝胶作为支架材料,这种聚合后的纤维蛋白凝胶具有生物相容性、可塑性好、吸附性强的优点,但其硬度远不能满足骨组织工程的需要。

3.3 细胞粘附的仿生材料研究

随着科学的发展,仿生材料的出现大大提高了材料的细胞亲和性,在材料表面加入化学基团,如羟基,改变了材料表面的湿润度,提高材料表面对细胞的吸附能力,将胶原类蛋白质固定在材料表面,设计出接近组织中的反应条件界面。因为粘连蛋白及其肽序如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)是介导细胞与细胞外基质粘附的多肽连,在材料表面直接固定RGD序列可以促进受体介导的细胞对材料的粘附,RGD序列可被固有粘附蛋白受体特异性结合,在生物材料表面自发形成一分子层,为与受体介导的细胞反应提供了位点,进而促进细胞的粘附与伸展。Giglio等[19]把RGD序列固定在多聚吡咯后包被钛合金提高种子细胞的粘附及其成骨能力。双层膜与生物膜密切相关,因而以脂质膜介入,可提高材料表面的生物活性,引入荷电脂质、脂质聚合物和受体至双层可控制静电中:使聚合物具有一种类似锁钥(Lock and key)的力,这种修饰表面能调控材料表面与细胞间的相互作用[20]。从而,提高种子细胞在材料上的粘附和生长。

3.4 粘附因子介导粘附的研究

目前应用的促粘附因子既可以是转化细胞产生的纯化蛋白;也可以由骨基质或分泌细胞获得。无论来自培养基还是来自培养细胞自身分泌的蛋白质或多肽吸附在支架材料的表面,将改变材料表面的化学性质,增强细胞与材料的粘附。Webster等[21]应用纳米技术制成纳米陶瓷(材料颗粒小于100 nm),由于其能吸附玻璃体结合蛋白(Vitronectin),提高了种子细胞的粘附。充分显示特异蛋白在介导种子细胞粘附中起重要作用。bFGF能促进种子细胞的增殖并维持其表型。研究发现:bFGF有促进内皮细胞在材料和细胞外基质上粘附的作用。郑磊等[22]研究证明bFGF具有促种子细胞粘附的作用。Du等[23]研究发现胶原可以作为骨组织工程支架成分,并与HA微颗粒混合后具有生物活性,可以诱导种子细胞的粘附并向基质内迁移的作用。外源性Ⅰ型胶源有促细胞粘附及促分化作用。Ⅰ型胶原mRNA在不同代次种子细胞内均有表达,并随传代次数增加而逐渐减弱,提示在骨组织工程中需提供Ⅰ型胶原这一细胞外基质成分[24]。Roehlecke等[25]用Ⅰ型胶原包被钛合金作为支架,发现种子细胞表现出较高的粘附性和生长活性,提示Ⅰ型胶原可作为骨粘附分子和骨特异性生长因子的良好载体。

3.5 基因修饰细胞的研究

近年来国内外学者们在骨组织工程中对种子细胞的基因修饰进行了深入研究。他们把目的基因转染MSCs,使其长期或可控性的表达目的基因,通过自分泌或旁分泌的方式作用于MSCs自身或邻近细胞,从而达到促进细胞粘附、增殖和定向分化的目的。Cheng等[26]用腺病毒转染BMP-2基因到成年兔MSCs,体外培养1周后检出BMP-2,转染的MSCs能向成骨细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

方向分化, 实验组可检测到Ⅰ型胶原、骨桥接素、骨钙素 mRNA 表达较空白对照组明显; 再将转染的 MSCs 移植到自体脊柱 L_5 和 L_6 横突间隙, 通过 X 线和组织学检测证实转染组成骨明显, 而空白对照组无成骨。Moutsatsos 等[27] 利用遗传工程技术把四环素可控制表达的载体编码的 BMP-2 基因转入 MSCs, 通过体内和体外实验证明可用强力霉素控制 BMP-2 基因的表达, 从而实现基因表达的可控性。对种子细胞进行基因修饰, 目的是让其产生促进细胞分化、增生和粘附的生物因子, 增强其成骨能力, 修复骨缺损。但是这种技术的广泛应用还有许多问题需要解决, 如纯细胞的分离培养; 转染细胞分泌足够的目的生物因子; 机体对目的生物因子有较强的反应能力; 被转染基因的可控制性表达; 转染细胞无致瘤性[4]。

综上所述, 种子细胞和支架的相互作用非常复杂, 细胞粘附分子的作用及其间的调控机制尚未完全阐明, 还有待于深化研究。尽管促进细胞与材料粘附的研究已取得了可喜的成果, 但每个实验室的研究差异很大, 大都集中在材料学和介质介导粘附两个方面。目前, 对介质成分以及粘附的机理了解十分有限, 在材料方面还缺乏理想的支架材料和统一的支架制作方法; 基因修饰细胞还不理想。进一步的研究将模拟体内环境促进种子细胞与支架的相互作用、制作适合于骨组织工程的支架、改善种子细胞的成骨能力、深化基因修饰细胞的研究、增强基因表达的可控性。为骨组织工程的标准化及大量供应创造条件。

关键词: 骨组织工程; 细胞粘附; 支架; 骨缺损

中图法分类号: R318.08; R322.71　　文献标识码: A

参考文献:

[1] Brown K L, Cruess R L. Bone and cartilage transplantation surgery[J]. J Bone Jt Surg Am. 1982, 64(2): 270—279.

[2] Bruder S P, Fox B S. Tissue engineering of bone[J]. Cell based strategies. 1999, 367S: S68—83.

[3] Ikada Y. Surface modification of polymers for medical application[J]. Biomaterials, 1994, 15(10): 725-736.

[4] 杨　柳, 段小军. 骨组织工程学中种子细胞研究的前沿问题[J]. 中国临床康复, 2002, 6(4): 532—533.

[5] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials[J]. Biomaterials, 2000, 21(7): 667—681.

[6] 顾汉卿, 徐国风. 生物医学材料[M]. 天津: 科技翻译出版社, 1993. 40—71.

[7] Ma P X, Zhang R, Xiao G, Franceschi R. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly (a-hydroxyl acids)/hydroaptite composite scaffolds[J]. J Biomed Mater Res, 2001, 54(2): 284—293.

[8] Webb K, Hlady V, Tresco P A. Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49(3): 362—368.

[9] Quirynen M, Bollen C M. The influence of surface roughⅠness and surface-free energy on supra-and subgingival plaque formation in man[J]. J Clin Periodental, 1995, 22(1): 1—14.

[10] Van de Putte K A, Urist M R. Osreogenesis in the interior of intramuscular implantsof decalcified bone matrix[J]. Clin Othop Rel Res, 1966, 43(2): 257—270.

[11] Kirker-Head C A, Gerhart T N, Schelling S H, *et al*. Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2[J]. Clin Orthop, 1995, (318): 222-230.

[12] Mikos A G, Lyman M D, Freed L E, *et al*. Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture[J]. Biomaterials, 1994, 15(1): 55—58.

[13] Mikos A G, Sarakinos G, Leite S M, *et al*. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering[J]. Biomaterials, 1993, 14(5): 323—330.

[14] Lee Y M, Park Y J, Lee S J, *et al*. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges[J]. J Periodontol, 2000, 71(3): 410—417.

[15] 石宗利, 戴　刚. 一种新型骨组织工程材料-CPP 纤维的制备和性能[J]. 兰州大学学报(自然版), 2001, 37(2): 47—51.

[16] Bujia J, Sittinger M, Minuth W W, *et al*. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture[J]. Acta Otolaryngol (Stockh), 1995, 115(2): 307—310.

[17] Agrawal C M, Athanasiou K A. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 38(2): 105—114.

[18] Sims C D, Butler P E M, Cao Y L, *et al*. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes[J]. Plast Reconstr Surg, 1998, 101(6): 1580—1585.

[19] De Giglio E, Sabbatini L. Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties on RGD-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates[J]. J Biomater Sci plolym Ed, 2000, 11(10): 1073—1083.

[20] Sackmann E. Supported Membranes: Scientific and practical applications[J]. Science, 1996, 271(5 245): 43—48.

[21] Webster T J, Ergun C, Doremus R H, *et al*. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(3): 475—483.

[22] 郑　磊, 王　前, 魏宽海, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对成骨细胞粘附特性影响的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(5): 305—307.

[23] Du C, Cui F Z, Zhu X D, *et al*. Three-dimensional nano Hap/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 44(4): 407—415.

[24] 余希杰, 杨志明, 屈　艺, 等. 型胶原及其受体系统在种子细胞内的表达[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(4): 234—236.

[25] Roehlecke C, Witt M. Synergistic effect of titanium alloy and collagen type Ⅰ on cell adhesion, prolideration and differentiation of osteoblast-like cell[J]. Cells Tissues Organs, 2001, 168(3): 178—187.

[26] Cheng S L, Lou J, Wright N M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene[J]. Calcif Tissue int, 2001, 68(2): 87—94.

[27] Moutsatsos Ⅰ K, Turgeman G, zhou S, *et al*. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration[J]. Mol Ther, 2001, 3(4): 449—461.

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net