

·技术研究·

应用纤维蛋白胶复合细胞膜片构建人工软骨

周丽斌, 徐冰心, 丁瑞英, 韩浩伦, 王刚, 李保卫, 王鸿南, 吴玮
(解放军第306医院耳鼻咽喉头颈外科, 北京 100101)

摘要:【目的】利用细胞膜片具备良好的流动性,以及纤维蛋白胶的可塑性为其塑形,构建具备空间立体结构的软骨块。【方法】采用兔耳软骨细胞在培养瓶中进行体外培养形成细胞膜片,刮取后剪碎,另取离散软骨细胞,用纤维蛋白胶两种组分混悬细胞膜片和离散软骨细胞,滴加到48孔板中,在体外构建出圆片状的结构,经过体外培养后进一步植入裸鼠体内,培养8周后取材。采用大体观察及组织学、免疫组织化学等方法观察分析体内外培养的结构。【结果】获得成熟的圆片状组织工程软骨结构,组织学表现为成熟的软骨组织,免疫组化结果提示软骨细胞外基质内II型胶原蛋白高表达。但结构内软骨组织分布不均匀,岛状软骨组织之间的间隙内为未降解的纤维蛋白胶成分。在其中1个圆片结构中,发现局部骨化现象。【结论】纤维蛋白胶是一种良好的载体,用于复合软骨细胞膜片及软骨细胞,可成功构建出具备空间立体结构人工软骨结构。

关键词:纤维蛋白胶;细胞膜片;软骨组织工程

中图分类号:R687

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)01-0122-06

Cartilage Engineering Using Fibrin Gel and Chondrocyte Cell Sheets

ZHOU Li-Bin, XU Bing-Xin, DING Rui-Ying, HAN Hao-Lun, WANG Gang, LI Bao-Wei,
WANG Hong-Nan, WU Wei

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China)

Corresponding to: WU Wei, E-mail: entwuwei@126.com

Abstract: 【Objective】 To study the feasibility of Cartilage engineering using fibrin gel and chondrocyte cell sheets. 【Methods】 rabbit auricular chondrocytes were isolated and cultured to form cell sheets in flasks. The cell sheets were harvested using cell scrapers, and cut into fragments. The two precursor solutions of Fibrin gel were used to suspend the cell sheet fragments and isolated chondrocytes, and then added into the wells of a 48-well plate to form Gelatinous chondroid disc constructs. After in vitro culture, the constructs were implanted into nude mice. After 8 weeks, the constructs were harvested, and the specimens were evaluated using grossly observing, histological and immunohistochemical observation. 【Results】 Mature cartilage discs were obtained. The histomorphology of the explanted discs appeared non-uniform cartilaginous tissue comprise of regenerated cartilage islands with different size and irregular shape. Immunohistochemistry staining demonstrated that type II collagen highly expressed in the ECM of the cartilage islands. In 1 of the 8 discs, partial ossification was observed. 【Conclusion】 Fibrin gel is a favourable carrier. Artificial cartilage with stereochemical structure was constructed via combining the fibrin gel and chondrocyte cell sheets.

Key words: fibrin gel; cell sheets; cartilage engineering

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(1): 122-127]

既往研究发现,应用细胞膜片可以构建出与天然软骨结构类似的人工软骨块^[1]。但是,细胞膜片结构柔软,具有较高的可流动性,无法保持特定的立体形态,因而,仅采用细胞膜片技术,难以

构建特定形态的软骨。譬如在耳郭软骨的构建中,如果要构建人工耳郭软骨,则需要借助其他外源性支架材料。纤维蛋白胶(fibrin gel),又称纤维蛋白封闭剂(fibrin sealant)、纤维蛋白黏合剂

收稿日期:2016-09-24

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81401609)

作者简介:周丽斌,博士后,主治医师,E-mail:fmmumario@126.com; 吴玮,通信作者,主任医师,博士生导师,E-mail: entwuwei@126.com

(fibrin adhesive),由主体胶和催化剂两种组分组成,主体胶主要包含浓缩纤维蛋白原、Ⅷ因子和抑肽酶;催化剂含凝血酶和氯化钙。当两种组分混合后,可迅速形成不易降解的水凝胶结构。纤维蛋白胶具有良好的组织相容性,能较好地介导细胞信号传导和细胞间相互作用,其降解速度可调,可通过释放转化因子和血小板衍生生长因子促进细胞黏附和增殖,为细胞提供三维空间,有一定力学强度,能抵抗血流冲击^[2];具有较强的可塑性,使用安全,易操作,可促进组织再生等特性,因而也常被用于组织工程研究。本研究尝试利用细胞膜片具备良好的流动性,以及纤维蛋白胶的可塑性为其塑形,构建出具备空间立体结构的软骨块。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成年新西兰大白兔1只,雄性,2.24 kg。8周龄雌性BALB/c裸鼠6只,体质量18~25 g(北京维通利华实验动物技术有限公司,北京市朝阳区)。动物饲养于北京大学实验动物科学部SPF级动物中心,动物饲养及实验有创操作执行北大医学部实验动物研究相关标准。本课题研究获得解放军第306医院伦理委员会审批同意。

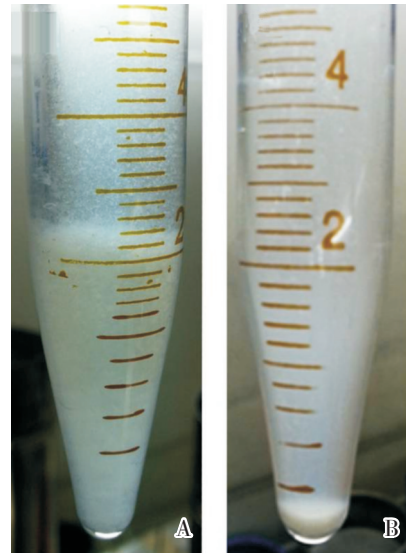
1.2 兔耳软骨细胞的分离和体外培养

采取肌注陆眠宁Ⅱ(首剂按体质量0.15 mL/kg,半小时后追加0.1 mL/kg)将实验兔全麻,通过无菌手术,切取一侧耳郭。用碘伏溶液浸泡、反复擦拭消毒后,于超净台中解剖耳郭软骨,完整去除皮肤皮下结缔组织及软骨膜,将软骨称重后用无菌刀片切碎至1 mm³大小,进而采用Ⅱ型胶原酶消化(37℃,12 h),提取原代细胞,进一步传代扩增培养。

1.3 软骨细胞膜片的构建及获取

应用225 cm²培养瓶进行细胞膜片的培养,方法详见文献报道^[1],取第3代软骨细胞在5个培养瓶中构建单层细胞膜片,2周后用细胞刮刀刮取细胞膜片。刮起后用无菌眼科剪将细胞膜片进一步剪碎,形成约1 mm×1 mm大小的细胞膜片的碎片。用PBS混悬、洗涤2遍,第3遍离心后,形成上层PBS清液和下层絮状的细胞膜片碎片沉淀(图1),吸去上层PBS缓冲液,细胞膜片碎片备用。

另取第2代软骨细胞,接种到5个225 cm²培养瓶中培养,达到融合状态后,加入胰酶,消化后离心收集离散软骨细胞(图1)。



A: the flocculent precipitate of the chondrocyte cell sheet fragments harvested from a 225 cm² flask. B: the precipitation of isolated chondrocytes harvested from a 225 cm² flask, using trypsin, the volume is much less than A.

图1 软骨细胞膜片碎片及离散软骨细胞离心后体积对比
Fig.1 Comparison of the volume of the chondrocyte cell sheet fragments and isolated chondrocytes

1.4 圆片结构的构建

将纤维蛋白胶提前从冰箱中取出,在37℃水浴中复温,以使易于溶解。分别抽取主体胶和催化剂溶解液,注入主体胶冻干粉和催化剂冻干粉,静置2 min后,轻轻转动,直至完全溶解,备用。取1 mL主体胶溶液,混悬细胞膜片碎片。用注射器均匀分布到48孔板的10孔中。取1 mL催化剂溶液,混悬离散软骨细胞。用注射器将催化剂-软骨细胞混悬液滴加到已滴加主体胶-细胞膜片的10孔中,使迅速结固,形成含有软骨细胞和软骨细胞膜片的圆片状的凝胶结构。主体胶溶液和催化剂溶液以1:1比例,滴加到48孔板的另外10孔中,构建成不含软骨细胞及膜片的纤维蛋白胶结构,作为无细胞的空白对照。所有结构结固后,在CO₂细胞培养箱中37℃静置5 min,取出,移入到6孔板中,加入软骨细胞培养液培养2 d。

1.5 圆片结构的体内植入及注射结构的构建

将体外培养2 d的圆片结构植入BALB/c裸

鼠。动物麻醉采用陆眠宁Ⅱ按体质量0.5 mL/kg。动物麻醉后,用碘伏擦拭消毒裸鼠背部,用剪刀剪开侧背部皮肤,长约1 cm,用止血钳沿皮下钝性剥离,形成皮下组织袋,将圆片结构置入袋内,拉拢缝合伤口。

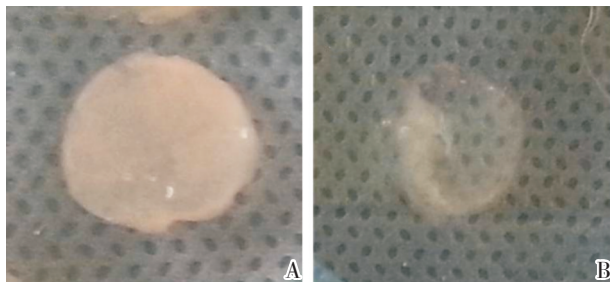
1.6 取材及标本分析

体内培养8周后,注射过量速眠宁Ⅱ,处死动物后取材。将标本与周围包裹软组织剥离,用作组织学分析,在中性甲醛溶液中固定24 h以上,钙化标本用EDTA脱钙1周,然后用梯度酒精脱水,石蜡包埋,制作5 μm厚的切片,行HE染色,软骨细胞外基质的分析采用甲苯胺蓝和番红O染色,采用方法见文献报道^[1]。

2 结果

细胞膜片刮起后,具有良好的流动性,剪碎之后的细胞膜片,流动性更高,悬浮于培养液中。由于细胞外基质的存在,以及细胞膜片的碎片呈絮状,离心后未达到像离散软骨细胞一样,紧致堆积,因而同样一个225 cm²培养瓶获得的细胞膜片碎片的体积远远大于离散细胞的体积(图1)。

用主体胶与细胞膜片碎片混悬后形成黏稠的混悬液,滴加催化剂溶液后,溶液迅速结固,1 min之内结固形成圆片形状的凝胶结构(图2)。体外培养2 d后,圆片结构较刚构建时,机械强度有所增加。组织学观察显示:此时的圆片结构中,软骨细胞膜片和离散软骨细胞均匀分布在纤维蛋白胶中,软骨细胞膜片和离散软骨细胞的周围均有初级的细胞外基质分泌,Ⅱ型胶原开始表达(图3)。而对对照组的纤维蛋白胶圆片经过体外连续培养2 d后,已完全水解,培养液中无法找到块状或片状结构。



A: construct of fibrin gel-chondrocytes-cell sheets; B: construct of fibrin gel without cell or cell sheet

图2 圆片结构照片

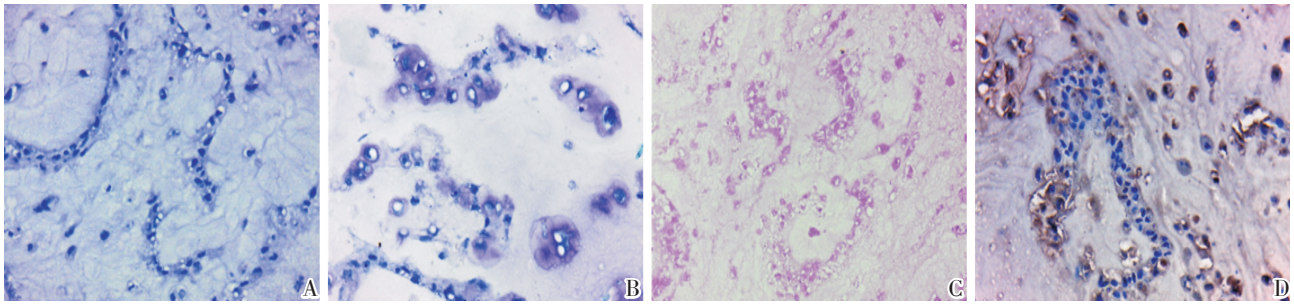
Fig.2 Photographs of the constructs

植入体内培养8周之后,所有的圆片结构均形成富有弹性的软骨样结构,呈白色半透明状,体积和形状较植入前无明显变化(图4)。组织学研究发现体内培养后的结构变成成熟的软骨组织,软骨细胞肥大,不再成层排列,软骨陷窝结构清晰(图5),但和天然人鼻中隔软骨相比,本实验构建的人工软骨中的软骨细胞不够均匀,部分结构软骨细胞的分布较为稀疏,间隙内为不含细胞的成分(通过对比体外培养2 d时的标本组织学结果(图3),考虑为尚未降解的纤维蛋白胶成分),软骨细胞周围富含糖胺多糖,Ⅱ型胶原蛋白高表达(图5)。另有部分结构内软骨细胞的分布密集,间隙较小,为软骨基质所充满,内含丰富的糖胺多糖,Ⅱ型胶原蛋白高表达(图5)。

在其中1个圆片软骨样结构中,发现表面钙化,质地坚硬(图4D)。组织学观察发现,已经形成骨性结构,稀疏的骨小梁形成,骨小梁之间为骨髓腔结构,血管网已经形成(图6)。进一步的甲苯胺蓝、番红O染色发现软骨部含有糖胺多糖,而骨化部位,呈嗜酸性,缺乏糖胺多糖(图7A-C)。免疫组织化学染色显示软骨部Ⅱ型胶原蛋白较强的阳性表达,骨化部位无Ⅱ型胶原表达(图7D)。

3 讨论

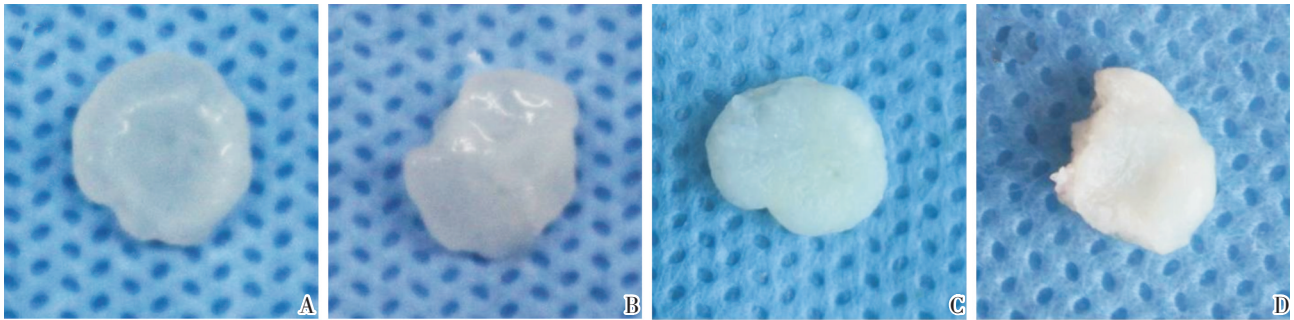
纤维蛋白原和凝血酶是从哺乳动物血中提纯,经过灭菌消毒,冻干制成,不含致热源。纤维蛋白胶的作用原理是模拟人体自身凝血反应最后阶段:当两种组分混合后,凝血酶将纤维蛋白原酶切水解,释放出纤维蛋白A肽及B肽,促进纤维蛋白原转化为纤维蛋白,形成纤维蛋白单体,后者聚合成不稳定的可溶性纤维蛋白纤维。凝血酶同时激活因子XIII,活性态的因子XIIIa在钙离子存在下参与纤维蛋白多肽的交联,使之形成不易降解的胶体凝块。目前,纤维蛋白胶在当前外科手术中已有广泛应用,主要用于止血、封闭组织创面。研究表明纤维蛋白网可提供基质和间皮趋化活性物质,纤维母细胞长入,新生的毛细血管形成,肉芽组织生成,促进创伤愈合。它已被大量的临床应用证实具有良好的组织相容性和完全的降解吸收性,可避免传播HIV、肝炎等人类血源性疾病的危险,常规局部使用,所以



A: HE staining; B: toluidine blue staining; C: safranin O staining; D: immunohistochemical staining of type II collagen. A-C: the cell fragments and isolated chondrocytes distributed evenly in the construct. Primary ECM secretion surrounding the cells; D: type II collagen expression was observed. 400 ×

图3 纤维蛋白胶-软骨细胞-细胞膜片圆片结构的体外培养2天时标本的组织学及免疫组织化学表现

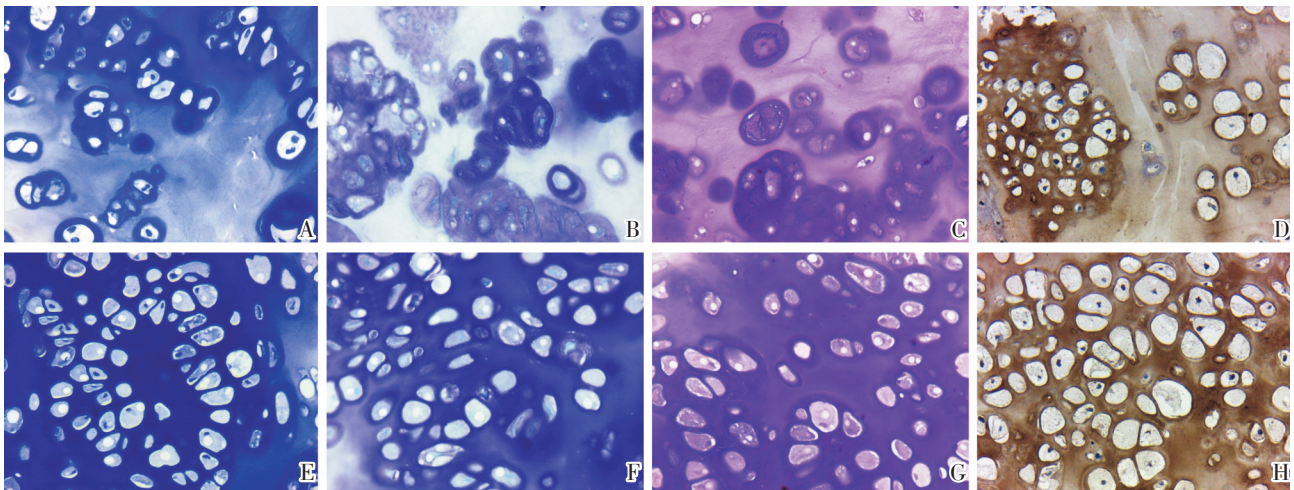
Fig.3 Histological and immunohistochemical appearance of the gelatinous chondroid discs comprise of fibrin gel, chondrocytes, and cell sheets



A&B: samples after 2 days in vitro culture, right before implantation into nude mice. C&D: samples after 8 weeks implantation in nude mice, appeared flexible cartilage discs, and D, partial ossification occurred.

图4 大体标本

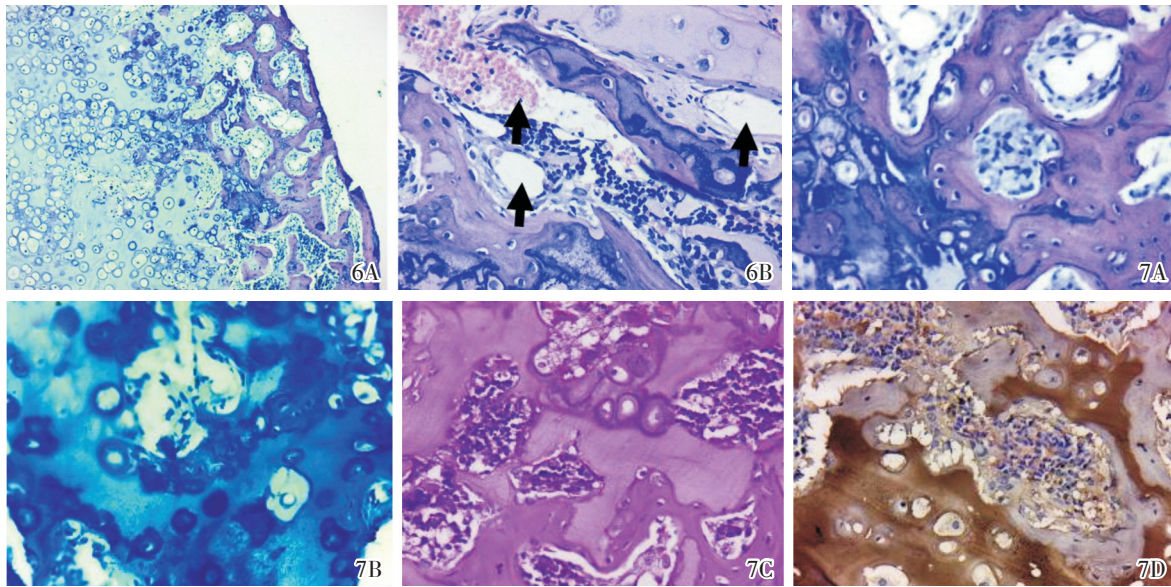
Fig.4 Gross view of the samples



A-D: in the areas with less cartilage islands, ECM appeared abundant sulfated GAG and intensive expression of type II collagen. Among the cartilage islands, the gaps were filled with acellularfibrin gel. E-H: cartilage areas with dense chondrocytes with small gaps. A&E: HE staining; B&F: toluidine blue staining; C&G: safranin O staining; D&H: immunohistochemical staining of type II collagen; 400 ×

图5 纤维蛋白胶-软骨细胞-细胞膜片圆片结构的体内培养8周时标本的组织学及免疫组织化学表现

Fig.5 Histological and immunohistochemical appearance of the engineered cartilage made from fibrin gel, chondrocytes, and cell sheets



6A: ossification in the right part(100×); 6B: the trabecula in the ossification area, arrows reveal the blood vessels formation in the gaps of the trabecula(400×)

图6 部分骨化结构的组织学表现

Fig.6 Histological appearance of the construct with partial ossification occurred

7A: HE staining; 7B: toluidine blue staining; 7C: safranin O staining; 7D: immunohistochemical staining of type II collagen. A-C: sulfated GAG was observed in the cartilage area, while was absent in the ossified area. D: type II collagen expression was observed in the cartilage area, while was absent in the ossified area. 400 ×

图7 骨化区域的组织学及免疫组化表现

Fig.7 Histological and immunohistochemical appearance of the ossified construct

产品安全性强。

纤维蛋白胶在软骨组织工程研究中的应用也很多^[3-6]。Vinatier等^[4]用纤维蛋白胶包裹兔鼻部软骨细胞,在体外进行三维培养,软骨细胞可以正常表达II型胶原和蛋白聚糖,并维持软骨细胞的表型。进一步用纤维蛋白胶包裹自体鼻部软骨细胞处理兔关节软骨缺损,在缺损区域形成透明软骨样组织。Munirah等^[5]的体内应用研究发现,用纤维蛋白胶处理后的聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架材料可以促进软骨组织的形成。Ahmed等^[6]发现纤维蛋白胶是可以促进骨髓间充质干细胞成软骨分化。

本实验利用细胞膜片及软骨细胞混悬液的流动性,以纤维蛋白胶作为载体,构建出人工软骨结构。结构内部,纤维蛋白胶将细胞及细胞膜片均匀混悬,并包裹塑形。细胞膜片占据大部分的体积空间,离散细胞填充细胞膜片之间的空隙。本实验研究发现,软骨细胞膜片在形成后,即开始分

泌软骨基质。应用纤维蛋白胶在体外构建成凝胶结构后,包裹于其间的软骨细胞膜片和软骨细胞可以正常代谢,并进一步分泌软骨基质。这说明纤维蛋白胶是一种良好的载体,对细胞无不良刺激,且通透性良好,以使培养液中的养分能够渗透至细胞周围。

纤维蛋白胶应用于体内止血的研究中,一般在术后第2~3天,于纤维蛋白网周边出现毛细血管和纤维母细胞增殖,5~7d创面纤维蛋白被吸收,组织愈合。在本研究中,空白对照在体外培养2d后,完全水解。Eyrich等^[7]在纤维蛋白原溶液中添加钙离子,可使纤维蛋白胶保持长期稳定,且在软骨组织工程应用中,不影响软骨的增殖、细胞外基质、II型胶原等软骨组织基质成分的形成。Meinhart等^[8]采用添加纤溶抑制剂(抑肽酶和氨甲环酸),亦可使纤维蛋白胶在软骨组织工程研究中保持4周的稳定性,且对种子细胞(软骨细胞)的表型无显著影响。抑肽酶和氨甲环酸均是临床常

用的纤溶酶抑制剂,抑肽酶可抑制纤维蛋白溶酶的激活因子和纤维蛋白溶酶,氨甲环酸主要通过阻滞纤维蛋白原、纤维蛋白与血小板受体上的赖氨酸结合部位对纤溶酶产生竞争性抑制作用,明显减缓纤维蛋白胶的降解。

在本实验中未混合软骨细胞及细胞膜片的对照组,纤维蛋白胶在体外培养2 d即完全水解,而文献报道中,纤维蛋白胶在用于手术止血时,术后5~7 d即被机体吸收。纤维蛋白胶在体内降解的过程是通过纤溶酶的作用,因而推测本实验观察到的纤维蛋白胶在体外培养过程中的水解,可能是由于软骨细胞培养液中加入的胎牛血清中含有纤溶酶成分。当然,这还有待通过实验进一步证实。如果在含有细胞膜片和软骨细胞的结构中的纤维蛋白胶也发生水解,那么其中的细胞膜片和软骨细胞将失去赖以固位的凝胶包裹和支持,重新变成细胞及膜片的混悬液,不过本实验发现,含有细胞及膜片成分的结构,其中的纤维蛋白胶在体外培养过程中并未发生水解,说明细胞膜片、软骨细胞以及纤维蛋白胶已经形成一个整体,软骨细胞及软骨细胞膜片的存在大大减缓了纤维蛋白胶的水解,其作用机理,也需要进一步实验研究探索。而植入体内8周时,纤维蛋白胶仍有未完全吸收的纤维蛋白胶成分。软骨组织之间存在间隙,是由于体外构建时细胞或膜片之间存在较大间隙,由纤维蛋白胶充填,8周时软骨细胞及细胞分泌的基质未能充满间隙,也没有其他组织长入。这说明软骨细胞及膜片的存在,软骨的形成,可以抑制纤维蛋白胶的降解,或者纤维蛋白胶已经转化成为新生软骨结构的一部分,远期转归如何,有待进一步研究。

另外,研究中观察到的人工软骨的局部骨

化现象,尽管发生率(1/8)较低,但仍是需要特别关注的问题。人工软骨骨化可能和结构周围的微环境相关,有学者认为是和组织血运不畅、局部缺氧所致,其确切机制以及远期的转归,未骨化的软骨是否会进一步骨化等,尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhou L, Ding R, Li B, et al. Cartilage engineering using chondrocyte cell sheets and its application in reconstruction of microtia [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 73-80.
- [2] Zhang X, Zhang Y. Tissue engineering and regeneration using biodegradable scaffolds [J]. *Panminerva Med*, 2015, 57(4): 147-152.
- [3] 符培亮,张雷,吴海山.半月板组织工程研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2013, 27(4): 486-491.
- [4] Vinatier C, Gauthier O, Masson M, et al. Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 89(1): 176-185.
- [5] Munirah S, Kim SH, Ruszymah BH, et al. The use of fibrin and poly (lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis [J]. *Eur Cell Mater*, 2008, 21(15): 41-52.
- [6] Ahmed TA, Giulivi A, Griffith M, et al. Fibrin glue in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(3-4): 323-335.
- [7] Eyrich D, Brandl F, Appel B, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(1): 55-65.
- [8] Meinhart J, Fussenegger M, Höbbling W. Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction [J]. *Ann Plast Surg*, 1999, 42(6): 673-678.

(编辑 刘清海)