

·基础研究·

纳米 HA/CS 支架穿“靴”复合软骨样细胞 修复兔关节软骨和软骨下骨缺损

李劼若^{1,2}, 查振刚^{1,2*}, 邹松玮^{1,2}, 刘 宁^{1,2}, 张国威^{1,2}, 吴 昊^{1,2}, 林宏生^{1,2}, 姚 平³,
张嘉晴³, 屠 美⁴, 郑力恒^{2,5}, 谭文成^{2,6}

(暨南大学 1.附属第一医院骨科, 2.骨科疾病研究所, 3.医学院, 4.理工学院, 广东 广州 510630; 5. 澳门仁伯爵综合医院,
6. 澳门仁和医疗中心, 澳门 999078)

摘 要:【目的】观察把骨髓间质干细胞(BMSCs)诱导成的软骨细胞与纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架(nano-HA/CS scaffold)通过特殊的穿“靴”结构复合构建而成组织工程软骨复合体的可行性,并观察此复合体修复兔膝关节软骨及软骨下骨缺损的能力。【方法】原位复合和冷冻干燥相结合的方法制备 nano-HA/CS 支架,用聚四氟乙烯制作成圆柱形“靴”结构。把 BMSCs 经软骨诱导液诱导成软骨细胞后,接种于穿“靴”的 nano-HA/CS 支架底部,把细胞-支架复合物置入成软骨条件培养液中培养 2 周。扫描电镜观察 nano-HA/CS 支架结构及细胞-支架复合体结构。30 只新西兰大白兔的股骨髁制造直径 4 mm、深 8 mm 的骨软骨缺损,随机分为实验组、对照组、空白组,于缺损处分别植入经穿“靴”结构复合的软骨支架复合体、不经穿“靴”结构复合的软骨支架复合体,空白组仅造缺损,4、12 周后取材初步观察修复情况。【结果】BMSCs 经软骨诱导液诱导后转化成软骨细胞;制备的 nano-HA/CS 支架孔隙率为 92%,平均孔径为 125 μm ,与软骨细胞有较好的粘附性。大体观察实验组和对照组缺损均有类软骨样组织生长,空白组缺损明显,见纤维组织生长。苏木精-伊红染色切片观察实验组软骨缺损部分软骨细胞修复,成骨区部分骨样细胞修复,两者耦合处部分交叉,修复缺损程度及成骨区和成软骨区界面耦合情况明显优于对照组和空白组。3 组的大体评分和软骨组织学评分统计分析,实验组优于对照组和空白组。【结论】BMSCs 具有成软骨潜能,nano-HA/CS 支架具有较好的细胞相容性;软骨细胞与 nano-HA/CS 支架经过穿“靴”结构可成为组织工程软骨复合体,并初步证实有修复兔软骨及软骨下骨缺损的能力。

关键词: 纳米羟基磷灰石/壳聚糖;软骨细胞;软骨和软骨下骨缺损

中图分类号: R318

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)03-0281-06

Repairing Osteochondral Defect of Rabbits with Nano-HA/CS Scaffold Composite with Chondrocyte by Boot-shaped Structure

LI Jie-ruo^{1,2}, ZHA Zhen-gang^{1,2*}, HUAN Song-wei^{1,2}, LIU Ning^{1,2}, ZHANG Guo-wei^{1,2}, WU Hao^{1,2},
LIN Hong-sheng^{1,2}, YAO Ping³, ZHANG Jia-qing³, TU Mei⁴, CHEANG Lek-hang^{2,5}, TAM Man-seng^{2,6}

(1. Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2. Institute of Orthopaedic Diseases, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 3. School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 4. College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 5. Centro Hospitalar Conde de So Januário, Macau 999078, China; 6. Macau Centro Medico Ian Wo, Macau 999078, China)

Abstract: 【Objective】 To observe the condition of constructing the tissue engineered chondral composite constructing by co-culturing the chondrocyte which were induced from bone marrow stem cells (BMSCs) and nano-hydroxyapatite/chitosan scaffold (nano-HA/CS), under a boot-shaped structure after compositing. The effect of the composite on repairing the osteochondral defect of rabbits' knee were observed. 【Methods】 The technique of combining the in situ hybridization and freeze-drying was taken to fabricate nano-HA/CS scaffold. The cylindrical boot-shaped structure were made of polytetrafluoroethylene. The chondrocyte were induced from BMSCs by cultivating in the chondrogenic differentiation medium. Then they were seeded into the bottom of the nano-HA/CS scaffold whose top was covered by the boot-shaped structure. The composite was cultivated in the chondrogenic differentiation medium for 2

收稿日期: 2011-09-19

基金项目: 广东省自然科学基金(10151063201000052); 广东省医学科学技术研究基金(B2001160); 澳门科学技术发展基金(025/2010/A)

作者简介: 李劼若, 住院医师, 医学硕士, E-mail: ilorugaie@163.com; * 通信作者: 查振刚, 教授、主任医师, 博士生导师, E-mail: zhgzg@tom.com

weeks. The structure of nano-HA/CS scaffold and composite was observed by scanning electron microscope. The osteochondral defects in the epicondyle of femur, which was 4 mm in diameter and 8 mm in depth, were constructed in 30 New Zealand white rabbits. The rabbits were divided into three groups, experimental group (composite induced with boot-shaped structure grafted into the defect), control group (composite induced without boot-shaped structure), and blank group (with no implant). Finally the curative effect of specimens after 4 and 12 weeks were evaluated respectively. 【Result】 BMSCs can be induced to chondrocyte after cultivated in the chondrogenic differentiation medium. The nano-HA/CS scaffold with 92% interstice ratio and 125 μm diameter had a good adhesion with chondrocyte. In general, cartilage-like tissue were found in experimental group and control group, while fibrous tissue were found in blank group where the defect was still obvious. The HE staining showed that the cartilage defect was repaired by chondrocyte partly and the bone defect was repaired by osteoblasts partly in the experimental group. There was a crossing area in the cartilage-bone interface. Thus the repairing effect and coupling status of cartilage-bone interface in the experimental group was superior to the control group and blank group obviously. Statistical analysis of gross specimen and chondral histology also showed that the experimental group was superior to the other two groups. 【Conclusion】 BMSCs have the chondrogenic potentiality. Nano-HA/CS scaffold has good adhesion with chondrocyte. By co-culturing chondrocyte and Nano-HA/CS under a boot-shaped structure can construct the tissue engineered chondral composite, which was proved to be able to repair osteochondral defect in rabbits.

Key word: nano-hydroxyapatite/chitosan; chondrocyte; osteochondral defect

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3):281-286]

骨关节可因创伤、骨性关节炎、肿瘤等多种病因导致其表面的软骨及软骨下骨同时受损,机体难以自身修复该缺损。许多学者都通过不同的方法构建组织工程构建骨软骨复合体去修复骨软骨联合损伤^[1-3],研究表明这些方法有构建的组织工程化的软骨和骨组织之间的界面、移植体和宿主骨和软骨之间的界面耦合不理想等不足。实验设计制作特殊的聚四氟乙烯“靴”状结构,盖在纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架(nano-hydroxyapatite/chitosan scaffold, nano-HA/CS scaffold)上方,把诱导所得的软骨细胞和支架下半部分复合,在软骨培养基中培养后(图1),将复合体植入兔膝关节骨软骨联合缺损处,观察其修复。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂和仪器

健康新西兰兔 30 只(广东省医学实验动物中心,雌雄不限,2.0 ~ 2.5 kg);胎牛血清(fetal bovine serum FBS,天津 TBD 公司)、淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司);DMEM(Dulbecco minimum essential medium, Gibco 公司)干粉培养基、胰蛋白酶、TGF- β_1 (transforming growth factor- β_1 ,转化生长因子- β_1 , Peprotech 公司)、IGF-1(insulin-like growth factor-1,胰岛素样生长因子-1, Peprotech 公司)、地塞米松(Dexamethasone, DEX, Sigma 公司);流式细胞仪 FACS Aria(美国 BD 公司);纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架(暨南大学理工学院)。扫描电镜(日立公

司)。

1.2 软骨细胞的获取

从兔两侧髂后上棘骨髓穿刺抽取骨髓各 0.5 mL,密度梯度离心法^[4]提取 BMSCs 要,接种于含 100 mL/L 胎牛血清 DMEM 完全培养基中,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积百分比为 5% CO_2 培养箱静置培养,定期换液。待细胞长至 90%融合时(大约为 14 d),用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,按 1:3 传代。将 P5 代 BMSCs 悬液以 1×10^4 个/mL 接种于预先置入盖玻片的 6 孔培养板中,各孔加入 2 mL 软骨诱导液(FBS 100 mL/L、DMEM 10 g/L、Dex 10^{-7} mol/L、TGF- β_1 10 $\mu\text{g/L}$ 、IGF-1 10 $\mu\text{g/L}$)培养 2 周。

1.3 甲苯胺蓝染色软骨细胞

1%甲苯胺蓝染液染色 15 min, PBS 冲洗多余的染液,烘干、封片。

1.4 制作纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架

1.0 g CS、0.86 g KH_2PO_4 、2.5 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 溶解在 20 mL/L 乙酸溶液,搅拌 6 h 后离心去气泡,注满容器后放入浓 NaOH 溶液中^[5]。室温下放置 10 h 后获得凝胶体,将其浸入去离子水至中性,除去残留的 NaOH 后放入超低温冰箱预冷 6 h 后冷冻干燥成形(图 2)。

1.5 制作穿“靴”结构模具

用聚四氟乙烯制作成圆柱形桶形模具,底面圆外直径 10 mm,内直径 6 mm,高度 5 mm(图 2)。

1.6 软骨细胞复合到穿“靴”的支架上及其观察

纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架浸泡于 750 mL/L 乙醇中 24 h, DMEM 培养基冲洗支架后晾干后放

入 12 孔板中,向支架底部滴加 100 μL 软骨细胞悬液(10^6 个/mL)。实验组支架上方盖上无菌的聚四氟乙烯制作成圆柱形桶形模具,静置 2 h 后小心添加诱导培养液至模具下方,注意液面勿超过模具下沿,对照组不盖上模具,培养箱培养 2 周。复合后第 5 天取实验组标本,处理通过扫描电镜观察。

1.7 软骨细胞-支架复合体修复兔膝关节骨软骨缺损

实验新西兰兔麻醉后,在膝髌内侧行 2.5 cm 纵行切口,显露股骨髌关节面。用直径 4 mm 钻头在髌作一深 8 mm 的骨软骨缺损(图 3)。实验组和对照组分别把穿“靴”和不穿“靴”培养的软骨细胞-支架复合体植入缺损处,空白组植入空白支架。各组分别于术后第 4、12 周取材,进行大体观察和组织学检查。

1.8 大体和软骨组织学评分统计分析

采用大体评分标准^[6]和 O'Driscoll 组织形态学评分标准表分别对各标本进行评分,数据用 SPSS 13.0 版处理,采用完全随机区组设计的两因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

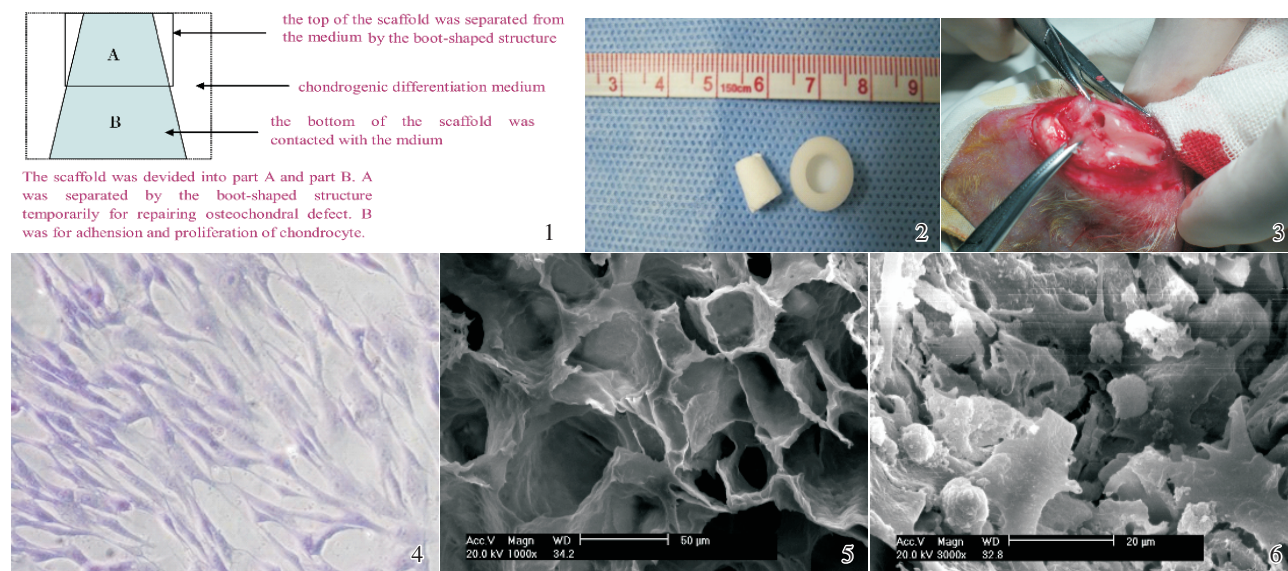


图 1 穿“靴”结构示意图

图 2 nano-HA/CS 支架与模具

图 3 骨软骨缺损

图 4 BMSCs 诱导 14 d 甲苯胺蓝染色阳性($\times 100$)

图 5 nano-HA/CS 支架扫描电镜观察

图 6 软骨细胞-支架复合物扫描电镜观察

2.1 细胞观察

加入成软骨诱导液培养后,BMSCs 体积逐渐增大,由成纤维样变为肾形或椭圆形。诱导 2 周后细胞经甲苯胺蓝染色,胞质均染上浅蓝色(图 4)。

2.2 扫描电镜观察 nano-HA/CS 支架及软骨细胞-支架复合物

nano-HA/CS 支架为多孔、网状结构,各孔串连、连通,多孔结构排列有方向,内部不见 HA 晶体聚集。应用液体置换法测得的孔隙率为 92%,孔径在 50 ~ 200 μm 之间,平均为 125 μm (图 5)。

软骨细胞种植到 nano-HA/CS 支架后黏附于支架上,细胞之间有相互融合,细胞伸出伪足深入支架空隙深处,支架内部见大量细胞外基质分泌,基质填充细胞和支架材料空隙之间使其结合紧密(图 6)。

2.3 体内新生组织工程化骨软骨复合组织观察

2.3.1 大体观察 术后 4 周,实验组缺损区被黄白色组织填充,表面基本平整,nano-HA/CS 支架已被吸收,软骨部分修复组织质地软于软骨下骨修复组织(图 7);对照组缺损存在,呈灰白色,缺损深层呈浅红色,nano-HA/CS 支架已被吸收,缺损修复处组织质地较实验组软(图 7);空白组缺

Fig.1 The block diagram of the boot-shaped structure

Fig.2 The nano-HA/CS scaffold and the boot-shaped structure

Fig.3 The osteochondral defect

Fig.4 Toluidine blue staining of the BMSCs after induced for 14 d

Fig.5 Scanning electron microscope observation of the nano-HA/CS scaffold ($\times 1\,000$)

Fig.6 Scanning electron microscope observation of the composite graft ($\times 3\,000$)

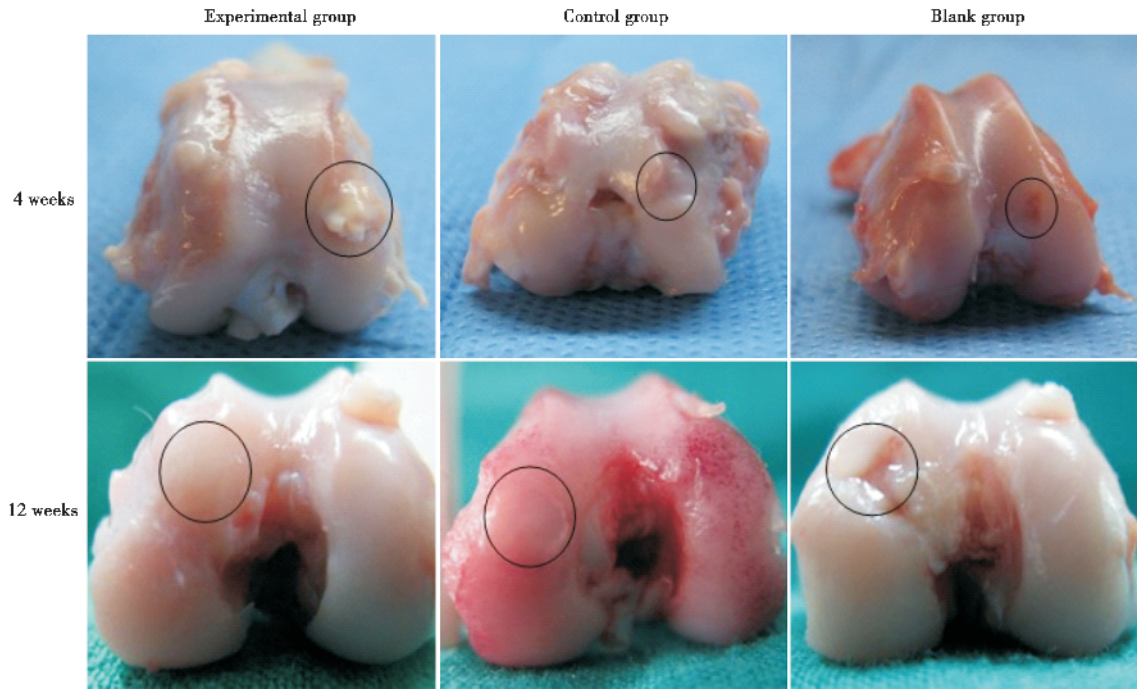


图 7 实验组、对照组和空白组两个时间点的大体观察

Fig.7 General shape of experimental group, control group and blank group at 2 time points

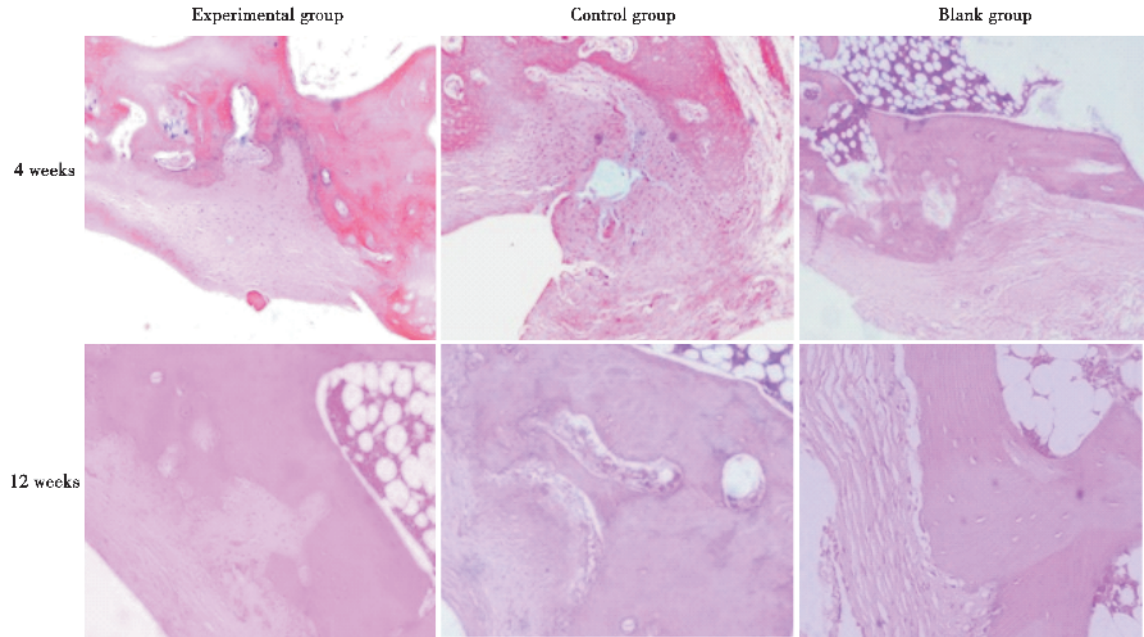


图 8 实验组、对照组和空白组两个时间点的 HE 染色观察

Fig.8 HE staining (×10) of experimental group, control group and blank group at 2 time points

损区缺损明显,未见修复,nano-HA/CS 支架已被吸收,缺损底部呈鲜红色,与缺损四周组织界线清楚(图 7)。

术后 12 周,实验组缺损区被黄白色组织填充,表面平整,深层组织硬度大于浅层组织,两者之间界线不明显(图 7);对照组缺损区部分被灰

白色组织填充,缺损仍存在,深层颜色较浅层深,质地较浅层硬,两者之间界线存在(图 7);空白组缺损区缺损明显,部分被白色质软组织填充,其余缺损边缘为白色质硬组织,与缺损四周组织界线清楚(图 7)。

术后 4 周和 12 周大体评分统计分析评分结

果见表 1、2。经完全随机区组设计的两因素方差分析,按 $\alpha = 0.05$ 水准,软骨修复的效果在两组时间的差别($F = 124.91, P = 0.000$)、不同处理方法组间的差别($F = 406.38, P = 0.000$)均有统计学意义,实验组明显优于对照组和空白组。

2.3.2 组织学观察 术后 4 周,支架已降解,实验组缺损周围有少许炎症细胞浸润,软骨缺损处深层缺损仍存在,浅层缺损被软骨样细胞修复,软骨下骨缺损部分存在,软骨和软骨下骨的界线存在(图 8);对照组缺损周围见炎症细胞浸润,修复细胞排列较实验组紊乱,软骨和软骨下骨缺损部分被软骨样细胞修复,软骨下骨缺损部分存在,软骨和软骨下骨的界线存在(图 8);空白组软骨缺损明显,见炎症细胞浸润和肉芽组织生长,软骨下骨缺损明显,软骨和软骨下骨界线清晰

(图 8)。

术后 12 周,实验组软骨缺损部分被软骨细胞修复,成骨区部分被骨细胞修复,软骨和软骨下骨的界线不存在,两者耦合处部分交叉,连接紧密(图 8);对照组软骨缺损部分被软骨细胞修复,软骨下骨缺损处被软骨细胞、骨细胞共同修复,软骨和软骨下骨的界线可见(图 8);空白组软骨、软骨下骨缺损明显,由纤维组织填满,底部边缘见骨组织增生,软骨和软骨下骨界线清晰(图 8)。

软骨组织学评分统计分析评分结果见表 3。经完全随机区组设计的两因素方差分析,按 $\alpha=0.05$ 水准,软骨修复的效果在两组时间的差别($F=36.96, P=0.026$)、不同处理方法组间的差别($F=133.00, P=0.007$)均有统计学意义,实验组优于对照组和空白组。

表 1 4 周大体评分结果
Table 1 The gross grading after 4 weeks ($\bar{x} \pm s$)

Group	Coverage of cartilage	Neocartilage color	Defect margins	Surface	Score
Experimental group	3.89 ± 0.33	2.44 ± 0.53	3.00 ± 0.70	2.33 ± 0.50	11.37 ± 1.22
Control group	2.20 ± 0.42	1.30 ± 0.48	1.60 ± 0.51	1.30 ± 0.48	6.40 ± 0.70
Blank group	0.40 ± 0.52	0.20 ± 0.42	0.20 ± 0.42	0.30 ± 0.48	1.10 ± 0.88

表 2 12 周大体评分结果
Table 2 The gross grading after 12 weeks ($\bar{x} \pm s$)

Group	Coverage of cartilage	Neocartilage color	Defect margins	Surface	Score
Experimental group	3.89 ± 0.33	2.78 ± 0.44	3.67 ± 0.50	3.33 ± 0.50	13.67 ± 1.00
Control group	3.00 ± 0.67	1.90 ± 0.57	2.40 ± 0.97	1.90 ± 0.57	9.20 ± 2.25
Blank group	1.50 ± 0.85	1.20 ± 0.92	1.10 ± 0.74	0.70 ± 0.95	3.30 ± 1.70

表 3 O'Driscoll 组织学评分结果
Table 3 The O'Driscoll histological grading ($\bar{x} \pm s$)

Group	4 w	12w
Experimental group	12.40 ± 0.89	17.00 ± 1.22
Control group	7.20 ± 2.68	9.80 ± 0.45
Blank group	1.40 ± 0.55	4.80 ± 1.30

3 讨 论

3.1 种子细胞

本实验采用的软骨细胞通过诱导自体的 BMSCs 获得,避免了采用自体软骨细胞来源十分有限、采用同种异体软骨细胞存在移植免疫的危

险、采用永生化软骨细胞难以稳定表型的困难,获取比较简单,而且来源充足。通过 TGF- β 1 等使 BMSCs 向软骨细胞方向分化是比较可靠的方法^[7],所得的软骨细胞与支架材料复合后能继续分泌细胞基质,最终长成软骨组织修复关节缺损,再次证实了 BMSCs 诱导所得的软骨细胞可以作为组织工程的种子细胞之一。

但是,无论是体外增殖后的 BMSCs 还是 BMSCs 体外诱导后所得的软骨细胞,传代后如何控制其表型的稳定,还有有效的调控其增殖防止出现恶变,是目前没有解决的问题。正因如此,经体外处理的种子细胞在组织工程的近年受到不少质疑,现在很多组织工程的研究都不使用经过体外各种方式处理的种子细胞,而是通过材料的特

殊性质,诱导体内自身的种子细胞附着。因此,原来组织工程中三要素之一的种子细胞的内涵已经发生了深刻的变化。

3.2 支架材料

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)具有良好的骨传导性和生物相容性,但是它为颗粒状,存在脆性大、降解慢的不足。通过纳米技术改进的纳米羟基磷灰石改变了 HA 脆性大的不足,具有表面效应大、生物活性及相容性好的优点。壳聚糖(chitosan, CS)是一种天然聚阳离子生物多糖,吸附作用较强,可以成为生长因子的载体。本实验通过原位复合与冷冻干燥方法相结合制得的 nano-HA/CS 支架平均孔径达 125 μm ,电镜观察软骨细胞复合后粘附良好并有伪足伸出,植入体内后 4 周均降解等,是结合了两种材料优点的结果。

“组织诱导生物材料”的概念被提出,如无生命的多孔磷酸钙陶瓷可具有活性生物物质特有的诱导骨再生的作用^[18]。通过有诱导功能的材料诱导机体自身的干细胞迁移到病变处进行修复,避免了通过使用经体外处理的自体干细胞或同种异体干细胞引起的恶变。

3.3 复合体构建方法

软骨复合体构建方法包括如构建骨和软骨后通过物理方法把两者连接^[9],但存在如通过缝合物理会损伤机体、缝合介质降解时间不匹配等不足^[10]。本实验设计一种特殊的穿“靴”结构,使支架被“靴”覆盖的部分在构建软骨细胞复合体的过程中不与培养基接触,令软骨细胞集中在无“靴”覆盖的支架部分复合,让该复合体进入动物体内关节缺损处时,诱导实验动物的成骨细胞移动到支架的深层和过渡层,通过一体化支架完成软骨合并和软骨下骨缺损的修复。实验采用单相支架,通过此比较容易实施的“靴”结构,使复合体在关节腔和软骨下骨不同的微环境中扩增,尽可能接近生理的微环境,减少外界环境对缺损修复的影响。

实验中不同的支架的吸水能力略有不同,在穿“靴”的培养模式中不同的吸水能力会造成软骨细胞层和空白支架层界面的不同,影响实验的重复性,因而还需改进工艺,使支架的内部结构尽可能均一。

3.4 进一步展望

本实验主要探索一种新的构建软骨-支架复合体的方法去修复关节缺损,修复的远期作用、力学性能如何还需深入研究。要通过组织工程学的

方法去解决关节骨软骨修复难题的路还很长,如改进支架材料的构成及工艺,使其具有能诱导机体自身种子细胞、负载多种生长因子、力学性能良好等优点,还有研制生物反应器,使复合体能在符合关节微环境的反应器内培养等。

参考文献:

- [1] Nastaran M, Pauline M. Tissue engineering of human cartilage and osteochondral composites using recirculation bioreactors [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (34): 7012-7024.
- [2] Vassilis K, David K. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (27): 5474-5491.
- [3] Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88(3): 503-507.
- [4] 林建华,王日雄,陈雷,等.自体骨髓间充质干细胞复合胶原膜修复兔膝关节全层软骨缺损的实验研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(12): 1229-1234.
- [5] Hu Q, Li B, Wang M, et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(5): 779-785.
- [6] Wayne JS, McDowell CL, Shields KJ, et al. In vivo response of polylactic acid-alginate scaffolds and bone marrow-derived cells for cartilage tissue engineering [J]. *Tissue Eng*, 2005, 11(5-6): 953-963.
- [7] Kuh SU, Zhu Y, Li J, et al. Can TGF- β 1 and rhBMP-2 act in synergy to transform bone marrow stem cells to discogenic-type cells [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2008, 150(10): 1073-1079.
- [8] Yang Y, Yao QQ, Pu XM, et al. Biphasic calcium phosphate macroporous scaffolds derived from oyster shells for bone tissue engineering [J]. *Chem Engin J*, 2011, 173(3): 837-845.
- [9] Knecht S, Erggelet C, Endres M, et al. Mechanical testing of fixation techniques for scaffold-based tissue-engineered grafts [J]. *Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 83 (1): 50-57.
- [10] Hunziker EB, Stähli A. Surgical suturing of articular cartilage induces osteoarthritis-like changes [J]. *Osteoarthritis Cart*, 2008, 16(9): 1067-1073.

(编辑 徐杰)