

组织工程技术修复关节软骨的理论研究与进展☆

李晓声, 陈铁柱, 杜尧, 曾焱, 曾文魁

Tissue engineering techniques for repairing articular cartilage defects: Theoretical research and advances

Li Xiao-sheng, Chen Tie-zhu, Du Yao, Zeng Yan, Zeng Wen-kui

Abstract: Due to the poor repair and regeneration capacity of articular cartilage, traditional treatment cannot get satisfactory curative effect on it. However, tissue engineering provides a new way for repairing articular cartilage defects. Present research focus has come down to the following issues: the stability of cell characters and phenotypes during mass amplification of seed cells, the control of directional differentiation, the combination of multi-scaffold materials, the synergistic effect of multi-growth factors, the gene transfer technology for maintaining the expression of growth factors, etc. This article reviews the advances in seed cells, scaffold materials, growth factors of articular cartilage tissue engineering, pointing out their advantages and disadvantages as well as the research direction in the future.

Li XS, Chen TZ, Du Y, Zeng Y, Zeng WK. Tissue engineering techniques for repairing articular cartilage defects: theoretical research and advances. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(37):7363-7368.
[http://www.crter.cn http://en.zgckcf.com]

摘要: 由于关节软骨修复再生能力较差, 传统的治疗方法总体疗效欠佳。组织工程技术为修复关节软骨缺损提供了一个新的治疗途径。扩大种子细胞来源, 促使种子细胞大量扩增的同时维持细胞特性及表型稳定, 严格控制定向分化, 多种支架材料复合, 多种生长因子联合作用以及由基因转导技术维持生长因子表达等是目前研究热点。文章通过对关节软骨组织工程学种子细胞、支架材料、生长因子等方面的研究进展进行综述, 指出目前种子细胞、支架材料、生长因子的优缺点和下一步研究方向。

关键词: 关节软骨; 修复; 组织工程学

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.37.034

李晓声, 陈铁柱, 杜尧, 曾焱, 曾文魁. 组织工程技术修复关节软骨的理论研究与进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(37):7363-7368. [http://www.crter.org http://cn.zgckcf.com]

Department of Orthopedics, People's Hospital of Hunan Province (Hunan Normal University Affiliated Hospital), Changsha 410005, Hunan Province, China

Li Xiao-sheng☆, Doctor, Chief physician, Department of Orthopedics, People's Hospital of Hunan Province (Hunan Normal University Affiliated Hospital), Changsha 410005, Hunan Province, China
lxslid@sina.com

Correspondence to: Chen Tie-zhu, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, People's Hospital of Hunan Province (Hunan Normal University Affiliated Hospital), Changsha 410005, Hunan Province, China
ctzmzll@163.com

Received: 2009-03-06
Accepted: 2009-04-20

0 引言

关节软骨损伤后多不能自行修复, 即使小的损伤也能引起关节的明显症状, 关节软骨少数的自行修复多为纤维组织修复, 与正常的透明软骨在生物学上有很大的区别。传统的治疗方法, 如磨削成型术、关节灌洗术、钻孔微骨折、软骨以及软骨膜移植等, 总体疗效不佳。近年来随着细胞培养技术、移植技术及生命材料科学的发展, 组织工程学得到了迅速发展, 为修复关节软骨缺损提供了一个新的治疗途径。

1 学术背景

组织工程软骨应用工程学和生命科学原理将经体外分离、培养的高浓度的种子细胞种植于天然的或人工合成的具有良好生物兼容性和可降解性的聚合物支架, 使之植入人体后能够形成新的软骨组织从而达到软骨修复与重建的目的。软骨组织工程学为修复关节软骨缺损提

供了一个新的治疗途径, 近年来备受关注。

2 目的

为关节软骨损伤组织工程修复选择最佳的种子细胞、支架、生长因子等提供理论依据。

3 资料和方法

3.1 资料检索

检索人相关内容: 第一作者。
检索时间范围: 1999-01/2009-01。
检索关键词: 中文关键词: 软骨、组织工程; 英文关键词: articular cartilage、tissue engineering。

检索数据库: Midline 数据库和中国知网数据库。

检索文献量: 选取与组织工程修复软骨损伤相关文献, 中文篇 196 篇, 英文篇 359 篇。

3.2 检索方法

纳入标准: 与组织工程修复软骨损伤相关文

湖南省人民医院
暨湖南师范大学
附属医院骨科, 湖南
省长沙市
410005

李骁声☆, 男,
1957年生, 河南
省安阳市人, 汉
族, 2003年中南
大学湘雅医学院
骨科毕业, 博士,
主任医师, 主要从
事骨关节病与组
织工程学研究。
lxsld@sina.com

通讯作者: 陈铁
柱, 南华大学在读
硕士, 湖南省人民
医院暨湖南师范
大学附属医院骨
科, 湖南省长沙市
410005
ctzmzll@
163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2009)37-07363-06

收稿日期: 2009-03-06
修回日期: 2009-04-20
(20090306007/W·J)

献, 包括动物实验、临床研究、综述等, 不排除未随机实验以及盲法对照的文献。

排除标准: 重复研究和综述文献。

文献选择: 38 篇文献符合纳入标准, 排除的 517 篇为内容陈旧或重复文献。

文献质量评价: 38 篇文献中包括种子细胞^[1-13]、支架材料^[14-26]、细胞生长因子方面^[27-38], 其中动物实验和体边、体外、细胞学实验 35 篇^[1-2, 4-8, 10-26, 28-38], 临床研究 3 篇^[3, 9, 27]。

4 文献证据综合提炼

4.1 软骨组织工程学修复 关节软骨组织缺少血管系统, 淋巴系统和神经支配, 软骨细胞又被包围在致密细胞基质中, 组织损伤后自行修复能力很差, 直径大于 4 mm 者一般不能自发修复。传统的治疗方法未取得满意疗效且修复的组织往往非透明软骨而为纤维软骨。组织工程 1987 年由美国科学基金会(NSF)首先提出, 1988 年被正式定义为: 应用生命科学和工程学的原理和方法, 研究哺乳动物的正常及病理组织结构与功能的相互关系, 研究、开发用于修复、维持、改善人体各种组织或器官损伤后的功能和形态的人工生物替代物的一门新兴学科。组织工程软骨应用工程学和生命科学原理将经体外分离、培养的高浓度的种子细胞种植于天然的或人工合成的具有良好生物兼容性和可降解性的聚合物支架, 使之植入人体后能够形成新的软骨组织从而达到软骨修复与重建的目的。软骨组织工程研究涉及到种子细胞、支架材料和生长因子 3 个基本要素。

种子细胞: 种子细胞是软骨组织工程学中的基本要素之一也是首要环节, 选择理想的种子细胞是组织工程学中的关键。理想的种子细胞需具备以下条件: ①来源广泛、取材方便、对机体损伤少。②在体外培养中具有较强的增殖传代能力、保持良好的生物学活性和表型表达稳定。③植入体内能耐受体免疫、高质量地修复关节软骨缺损并能保持良好的远期疗效。目前研究用于软骨组织工程的种子细胞主要有软骨细胞、间充质干细胞以及胚胎干细胞等。

软骨细胞: 软骨细胞包括自体软骨细胞和同种异体软骨细胞。自体软骨细胞可以直接合成软骨特异性细胞外基质, 细胞成分单一, 易于培养分离, 避免免疫排斥反应。自体软骨细胞移植(ACI)首先由 Grande 提出, Brittberg

首先应用于临床。Roberts 等^[1]通过组织学和 MRI 监测发现应用 ACI 方法再生的组织具有透明软骨的性状; Vinatier 等^[2]用兔自体鼻软骨细胞联合可注射纤维素水凝胶体外培养 4 周后植入关节软骨损伤区, 植入 6 周后观察, 组织学上移植区组织与正常关节软骨相似, 免疫分析 II 型胶原提示修复的组织为透明软骨, 证实可注射纤维素水凝胶/自体鼻软骨是治疗软骨损伤的一种有前景的新方法。Krishnan 等^[3]报道 37 例自体软骨移植患者 2~7 年随访研究其临床效果基本令人满意。组织工程技术修复软骨缺损需要大量的细胞, 但自体软骨细胞取自人体正常组织, 来源受限, 多需关节镜或手术取材且增殖能力较低、易发生去分化, 限制了其临床应用。

同种异体软骨细胞具有来源广泛、取材容易、一次可获取大量细胞的优点, 且软骨组织缺少血管系统, 淋巴系统, 软骨细胞包裹在细胞基质里, 移植排斥反应较小, Song 等^[4]成功地将同种异体软骨细胞复合网状骨基质明胶移植修复了关节软骨缺损, 研究表明宿主对移植物有免疫反应但免疫反应不强。临床上可考虑收集新鲜尸体及流产胎儿的关节软骨增加来源, 采用了载体或微囊化包裹软骨细胞以减少排异反应。已有学者报道非关节区取材^[5]、永生软骨细胞等给软骨细胞来源开辟了新的方向^[6]。

间充质干细胞: 间充质干细胞是具有向多种细胞系分化潜能的间充质前体细胞。间充质干细胞研究应用较多, 间充质干细胞具有: ①获取间充质干细胞的操作简单, 损伤小。②能迅速扩增, 并能保持分化能力, 故所需的起始细胞数量少。③间充质干细胞生成的软骨可以避免免疫排斥反应。④间充质干细胞能分化成不同的组织, 刺激诱导后可同时修复软骨和软骨下骨。⑤不涉及道德伦理问题。间充质干细胞传代繁殖能力强, 连续多次传代仍可保持良好的增殖分化潜能, 植入体内后能形成良好的透明样软骨和软骨下骨组织, 从而可达到完整的修复。间充质干细胞存在于多种成人组织中, 包括脂肪, 骨髓, 滑膜, 肌肉, 皮肤, 血液, 骨髓, 骨小梁等, 具有多向分化潜能, 不同的细胞因子可以诱导间充质干细胞向不同方向分化, 其中转化生长因子 α 转化生长因子 β 超家族转化生长因子 β 1、转化生长因子 β 3、骨形态发生蛋白 2、骨形态发生蛋白 6 能够刺激间充质干细胞向软骨分化。Bartholomew 等^[7]发现

间充质干细胞不表达活化T细胞的刺激因子B7和Cd40可能使其具有免疫特赦作用。赵子义等^[8]发现受关节腔环境影响,同种异体间充质干细胞能够分化形成软骨组织。Wakitani等^[9]报道24例骨性关节炎患者的24个膝随机分为两组,每组12例。填充自体骨髓间充质干细胞-胶原复合体的实验组、空白对照组,关节镜和组织学评分上实验组均优于对照组。韩志军等^[10]利用猪骨髓间充质干细胞,在含有转化生长因子 $\beta 1$ 的特定培养基内进行培养、诱导,免疫组织化学检测诱导细胞II型胶原分泌。将诱导分化的骨髓间充质干细胞接种于聚羟基乙酸支架上,将其作为实验组;对照组为未接种细胞的单纯聚羟基乙酸支架;植入自体猪皮下,分别于6,8,10周后取材,标本出现软骨组织外观,进行组织学切片可见软骨陷窝,II型胶原蛋白的免疫组织化学检测为阳性。实验表明猪骨髓间充质干细胞在成软骨诱导剂作用下,经体外和体内培养后,可生成组织工程化软骨。Guo等^[11]研究表明转化生长因子 $\beta 1$ 转染间充质干细胞/聚乳酸修复软骨损伤,体外培养2周后大量软骨样物质生成覆盖于支架上,移植生物体内24周后,大量透明软骨覆盖损伤软骨表面。Masuoka等^[12]利用脂肪间充质干细胞修复软骨缺损,12周后只有脂肪间充质干细胞组充满透明软骨,并高度表达II型胶原,表明其能有效修复软骨损伤。近年来有真皮间充质干细胞等报道用于修复软骨缺损。目前以间充质干细胞为种子细胞仍面临许多问题,如:哪些因素影响种子细胞的成软骨能力,软骨细胞的发育过程有哪些因素和因子的参与,间充质干细胞分离纯化及体外培养后的鉴定标准,如何防止修复组织退变等。

胚胎干细胞:胚胎干细胞是从胚胎早期内细胞团分离得到的、在体外培养的高度未分化细胞。胚胎干细胞来源还可利用体细胞核移植技术制造出具有与供核体细胞基因组完全相同的胚胎干细胞。人胚胎干细胞具有以下特点:①具有高水平的端粒酶活性并维持稳定的二倍体的正常核型。②无限制的对称分裂,进行非分化增殖或永久性自我复制。③并保持正常核型并表达一些干细胞特异的转录因子。④具有亚全能分化特性即向3个胚层来源的细胞类型分化的潜能。Bailey等^[13]实验表明修复颞下颌关节髁软骨损伤人脐带干细胞优于颞下颌关节髁软骨。如果将胚胎干细胞应用于临床的细胞替代治疗,需要解决如下问题:①保证足够细胞数目和细胞活性的同时防止其致癌性。②影响胚胎干细胞分化的条件,提高定向分化效率以及分化可控性。③胚胎干细胞衍生物移植导致的免疫排斥。④细胞的临床应用所面临的伦理学问题。

支架材料:组织工程中支架材料即人工的细胞外基质。理想的软骨组织工程支架材料的应具有:①良好的生物相容性,利于细胞贴附,无毒性,不引起炎症反应,

不能引起宿主的排异反应。②可塑性和一定的力学强度:可预先制作成一定形状并为新生组织提供一定强度的支撑,且可保持至新生组织具有自身生物力学特性。③良好的生物降解性:材料降解速率与种植入的细胞组织形成的速率匹配,组织再生后则被完全降解吸收,同时降解产物无毒,能及时排出体外。④具有三维立体多孔结构且至少达90%大小合适的孔隙,为大量种子细胞的黏附、生长、营养、代谢等提供良好条件,同时还能让血管长入支架。⑤良好的表面活性:激活细胞特异基因表达,维持细胞表型正常表达。⑥价格低廉,来源广泛,可以大量重复生产。根据来源主要有天然材料、人工合成材料和复合材料。

天然材料:天然材料的优点在于接近于软骨细胞外基质,生物相容性好、细胞亲和性好、生物降解性好,含有生长因子类物质有利于细胞识别附着、增殖以及保持分化能力。目前,常用的软骨组织工程天然材料有:胶原、壳聚糖、藻酸盐、脱钙骨基质、明胶等。胶原本身是人体组织间的主要蛋白质,其免疫反应性低,能长时间稳定存在与体内,与细胞间有良好的反应性。Vinatier等^[2]用兔自体鼻软骨细胞联合可注射纤维素水凝胶体外培养4周后植入关节软骨损伤区,植入6周后观察,组织学上移植区组织与正常关节软骨相似,免疫分析II型胶原提示修复的组织为透明软骨。Xia等^[14]用冻干燥法制得壳聚糖/明胶复合物支架。将从猪自体软骨细胞种植在此复合支架上植入猪腹部皮下组织,植入后16周,此弹性软骨不仅保持正常的组织学形态和生物化学特性,还具有机械性能,软骨细胞在支架的间隙中增殖与自体软骨相似。藻酸盐主要从海藻中提取,与软骨基质成分蛋白多糖结构相似,藻酸盐水凝胶可塑性、亲水性好、营养物质易于渗透,藻酸盐降解产物对机体无毒性、无免疫原性。Geoffrey等^[15]用人类脂肪间充质细胞接种于藻酸盐体外培养2周种植于裸鼠皮下,术后12周可见与人类正常软骨细胞结构相似的细胞群,免疫学分析显示有II型、VI型胶原,生物化学证实有蛋白多糖,电镜可见软骨细胞,证明藻酸盐是一种优秀的三维支架。骨基质明胶(BMG)由天然骨经脱钙、去脂、去蛋白等处理后得到,其主要的成分为骨基质胶原,还存留骨形态发生蛋白和少量生长因子,因此BMG具有很好的生物相容性、可降解性、可塑性,无细胞毒性,并具有一定的机械强度。宋红星等^[16]以BMG负载软骨细胞,体外培养12d后植入同种异体新西兰兔膝关节软骨缺损。实验组术后24周关节软骨缺损以软骨组织修复,与周围软骨及软骨下骨愈合良好。此外以透明质酸^[17]、蚕丝、小肠黏膜等作为支架材料的也有报道^[18]。虽然天然材料应用广泛,但仍然存在一些缺点:力学性能较差、难以满足足够强度的支撑和保护,降解速度快,大量制备时质量差异波动较大,有传播疾病的危险等不足。

人工合成材料: 人工合成材料来源广泛, 可大批量生产, 能较精确地控制相对分子质量大小、形状等指标, 可根据需要调整物理、化学、生物力学等特性。聚乳酸、聚羟基乙酸、聚乳酸和聚羟基乙酸共聚物、Pluronic 等已广泛用于关节软骨组织工程。聚羟基乙酸和聚乳酸及聚乳酸和聚羟基乙酸共聚物已被美国 FDA 批准在人体内使用。Guo 等^[11]研究表明转化生长因子 $\beta 1$ 转染间充质干细胞/聚乳酸修复软骨损伤, 体外培养 2 周后大量软骨样物质生成覆盖于支架上, 移植生物体内 24 周后, 大量透明软骨覆盖损伤软骨表面。Di Carlo 等^[19]将牛软骨细胞种植于聚羟基乙酸、多孔珊瑚支架上并加入胰岛素样生长因子 1 或者转化生长因子 $\beta 1$ 生长因子体外培养, 0, 2, 6 周观察组织学形态、测定脱氧核糖核酸含量、I 型, II 型胶原蛋白、黏多糖含量以评估软骨形成特征, 实验表明两种支架均有利于软骨生长。Pluronic 是德国巴斯夫公司一类非离子表面活性剂注册商标, 其中 Pluronic F-127, 又叫聚聚亚烃, 由 70% 的聚氧化乙烯和 30% 的聚氧化丙烯构成的共聚物, 是常用的软骨组织工程材料。Pluronic 无毒副作用, 具有良好的生物相容性, 与细胞有良好的黏附性能, 无免疫原性, 并有一定的生物强度, 在体内可完全降解。王会才等^[20]采用微重力三维动态诱导骨髓间充质干细胞, 以 PluronicF-127 为细胞载体, 修复关节软骨缺损, 取得了良好的长期修复效果。人工合成材料同样也存在着缺点: ①亲水性较差, 细胞吸附力较弱。②代谢产物为酸性, 影响细胞和组织的生长还可能引起无菌性炎症。③材料降解时间无法在较大范围内调节, 难以适应在不同动物对象及不同组织上应用。④缺乏细胞识别信号表位, 不利于细胞特异性黏附及特异基因的激活。⑤免疫原性或致癌性可能。

复合材料: 复合材料是以各种天然材料和人工合成材料为原料两种或两种以上的材料合成更适宜组织工程细胞培养的细胞支架材料。张永先等^[21]证实几丁糖无纺网经 10% 多聚赖氨酸包埋后, 对软骨细胞吸附性增强, 并且几丁糖具有良好的生物学特性。Huang 等^[22]发现用胶原-透明质酸膜和胶原-壳聚糖-透明质酸膜培养细胞, 增殖的细胞数高于用单纯胶原膜。卢华定等^[23]实验中聚乙烯醇与羟基磷灰石复合增强了力学强度, 尤其是抗压和抗剪切性能。孙和炎等^[24]研究自固化磷酸钙/纤维蛋白凝胶双相支架负载软骨细胞修复兔关节软骨缺损, 软骨细胞移植成功地修复关节软骨缺损, 同时对软骨下骨重建也起到一定的作用。王彦平等^[25]实验得出 β -磷酸三钙/聚磷酸钙纤维/聚左旋乳酸支架复合材料的力学性能和生物降解特性基本满足软骨组织工程的要求, 特别是 β -磷酸三钙的加入使降解液 pH 值保持在 6.0~7.0 之间, 避免了由于降解液呈酸性而引起的无菌性炎症反应。Chou 等^[26]实验指出凝胶/透明质酸/硫酸盐

软骨素 6/海绵共聚物能促进细胞外基质分泌和减少细胞外基质退化, 并具有足够力学强度等, 是一种良好的软骨组织工程支架。

目前软骨细胞培养支架, 虽然取得了巨大的进步但仍存在一定问题如降解速率与软骨组织形成不匹配, 生物相容性问题, 支架固定不确切, 机械强度和组织结构达不到预想效果以及引起不同的炎症反应、免疫原性和致癌性问题。相信应用纳米技术、多种材料复合及相关科学技术的发展, 人们一定会找到理想的软骨细胞培养支架。

细胞生长因子: 关节软骨组织内含有多种生长因子, 是其微环境中重要的部分, 参与软骨细胞生理生长各阶段。生长因子分两大类: ①促进作用的主要有: 转化生长因子 β 、成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、骨形态发生蛋白、血小板衍生生长因子等。②抑制作用的主要有: 白细胞介素、肿瘤坏死因子、白血病抑制因子等。它们可以直接应用或组成种子基质材料生长因子复合或转基因种子细胞控制释放等。

促进细胞生长因子: 转化生长因子 β 促进未分化或分化早期软骨细胞 DNA 合成、增殖和细胞外基质合成, 抑制成熟软骨细胞增殖和分化, 抵抗软骨基质分解代谢, 抑制 MMP、白细胞介素 1、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 等的活性的表达, 是当前作用最强的生长因子, 同时是强烈的免疫抑制剂, 作用比环孢素 A 强 1~10 万倍, 从而使同种异体细胞移植更加安全。目前已经发现 5 种, 存在人体的有转化生长因子 $\beta 1$ 、转化生长因子 $\beta 2$ 、转化生长因子 $\beta 3$ 三种。Guo 等^[11]实验表明转化生长因子 $\beta 1$ 能促进软骨修复的能力尤其是对退化性疾病导致的软骨损伤。石宗义等^[27]用转化生长因子 $\beta 1$ 直接注射于关节腔内, 有效促进关节软骨缺损修复, 临床治疗 9 例膝关节软骨缺损 3~9 个月随访, 优良率 100%, 未见骨软骨赘、创伤性骨关节炎和退化性改变发生。

成纤维细胞生长因子分为酸性成纤维细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子, 碱性成纤维细胞生长因子作用较强。碱性成纤维细胞生长因子是一种具有广泛生物活性的肽类物质, 是强力的软骨细胞有丝分裂原, 促进软骨细胞增殖分化, 维持细胞表型, 普遍存在于多种组织器官中。丁小邦等^[28]应用含碱性成纤维细胞生长因子的培养液培养自猪耳软骨细胞 2 周扩增达 70 倍, 约是对照组的 12.7 倍; 经碱性成纤维细胞生长因子作用的第 2 代软骨细胞和对照体相比, 具有更强的体内成软骨能力, 组织学表明新生软骨组织结构及其基质胶原和蛋白多糖的分布均接近正常耳软骨组织。

胰岛素样生长因子两种相关多肽组成, 即胰岛素样生长因子 1 和胰岛素样生长因子 2。胰岛素样生长因子 1 作用较强, 通过自分泌和旁分泌的方式刺激细胞分裂增殖促进蛋白聚糖和 II 型胶原的合成, 减慢基质的降解

并能抑制软骨细胞的凋亡。宋红星等^[29]用胰岛素样生长因子 1 作用于骨基质明胶-软骨细胞移植术后 24 周缺损区以透明关节软骨修复, 与宿主关节软骨及软骨下骨愈合良好, 软骨组织厚度、胶原染色与正常关节软骨一致, 软骨细胞呈柱状排列。Davies 等^[30]研究胰岛素样生长因子和转化生长因子 $\beta 1$ 对体外成熟牛关节软骨细胞增殖、合成硫酸多糖和胶原以及同时维持其胶原表型稳定的影响, 实验表明软骨细胞重新合成基质大分子。此外, 刺激软骨细胞胰岛素样生长因子 1 或转化生长因子 $\beta 1$ 诱导受体的表达促进软骨修复。实验证明联合应用胰岛素样生长因子 1 和转化生长因子 $\beta 1$ 时除了自动调节效应相互影响, 还可能通过调节受体的表达或内在因素等进一步修复软骨损伤。

骨形态发生蛋白属转化生长因子 β 超家族。1965 年 Urist 报道用脱钙骨基因植入肌肉诱导间充质细胞分泌为新骨后, 经进一步提纯得到了一种蛋白质即骨形态发生蛋白。近年来发现骨形态发生蛋白具有在体内、体外诱导间充质细胞或骨髓基质细胞增殖分化成软骨细胞的能力, 继而可分化为成熟软骨细胞, 能促进软骨细胞 DNA 合成胶原和蛋白多糖增加, 并可使已丢失软骨细胞表型的反分化软骨细胞向恢复软骨细胞方向分化, 其中, 骨形态发生蛋白 2、骨形态发生蛋白 3、骨形态发生蛋白 7 于软骨组织的形成和修复有密切关系。Nawata 等^[31]将肌肉源性间充质干细胞体外培养 10 d 后加入 0, 1, 10 mg 剂量的重组人类骨形态发生蛋白 2 植入成年大鼠腹部筋膜, 移植 4 d 后 10 mg 组表达 II 型胶原 mRNA, 5 周后大量软骨组织形成, 在 0, 1 mg 组中未发现软骨组织形成, 利用 10 mg 组浓度和方法修复软骨损伤 6 个月后恢复正常形态。潘海涛等^[32]实验骨形态发生蛋白/碱性成纤维细胞生长因子复合材料修复关节软骨缺损效果优于其他组。

多种生长因子联合应用: 软骨生长的微环境有很多生长因子, 不同的生长因子相互影响, 彼此形成复杂的网络关系, 软骨生长、代谢需要多种生长因子共同参与。目前研究者关注多个因子的联合应用以及其他因素与因子间的相互作用。潘海涛等^[32]实验显示联合应用效果明显优于单独应用其中一种因子。Loeser 等^[33]发现单层培养条件下, 胰岛素样生长因子 1 与转化生长因子 $\beta 1$ 联合应用对软骨细胞早期增殖有明显的促进作用, 胰岛素样生长因子 1 与骨形态发生蛋白 7 联合应用对软骨细胞生长能力相对于单用胰岛素样生长因子 1 时明显加强。Tay 等^[34]发现转化生长因子 $\beta 1$ 、碱性成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子联合应用较单个应用可以明显提高软骨细胞增殖并且保持成软骨能力。多个因子的联合应用可以更好地修复软骨缺损使其成为当今组织工程的研究热点, 但并非所有的生长因子之间的组合都是有利的, Kaplan 等^[35]发现胰岛素样生长因子 1、转

化生长因子 β 联合应用修复软骨并没有得到明显的改善, 机械强度也没达到理想强度。

基因转染技术: 软骨修复过程中需要多种的生长因子调控, 外源性生长因子半衰期短、作用时间短且浓度难以达到体内正常水平。研究证明通过基因转染技术修饰的软骨细胞或细胞支架能够促进损伤软骨细胞的修复和增殖分化, 又可以在软骨再生过程中持续、高效地在局部分泌生长因子, 从而可以促进软骨缺损修复。治疗基因转染靶细胞, 使靶细胞具有表达合适生长因子是基因转染的关键。

理想的转染载体应具有: ①高安全性, 无毒性, 无致癌致畸作用, 免疫原性低。②良好的稳定的转染效果和表达效果。③基因表达可控性。④可以大批量生产, 可重复性高。基因转染主要有病毒转染和非病毒转染。龙华等^[36]以腺病毒 AdEasy 为基因转移载体, 制备携带转化生长因子 $\beta 1$ 和骨形态发生蛋白 7 基因的高滴度腺病毒感染兔间充质干细胞与骨基质明胶(BMG)支架复合体外构建组织工程化软骨, 移植修复同种异体兔关节软骨缺损, 经组织染色和电镜观察可见前体软骨细胞大量增殖, 在体移植修复实验组新生组织为类透明软骨, 修复效果明显优于各对照组。得出间充质干细胞经携带转化生长因子 $\beta 1$ 和骨形态发生蛋白 7 基因的腺病毒感染后, 体外能向软骨细胞作定向分化, 可用于制备组织工程化软骨, 使提高关节软骨缺损的修复质量成为可能。Madry 等^[37]利用脂质体转染胰岛素样生长因子 1 基因转染软骨细胞植入藻酸盐支架中, 有 35% 转染率, 维持治疗程度的胰岛素样生长因子 1 表达了 32 d。郭晓东等^[38]发现当 3 μ L 脂质体介导 1 μ g 转化生长因子 $\beta 1$ 基因转染时, 能获得最佳转染效率和促间充质干细胞增殖及向成软骨方向定向分化效应; 转基因细胞无恶性转化倾向。基因治疗现在还处在实验探索阶段, 还存在许多问题如安全性能问题, 基因调控性差, 转染率较低等问题, 但随着对软骨细胞损伤机制研究深入, 基因转染技术的改进, 基因治疗将会在软骨细胞修复中广泛应用。

4.2 小结与展望 组织工程学修复重建关节软骨缺损给患者带来了完全康复的可能, 但还处于研究阶段, 要应用于临床需加强材料学、关节软骨细胞分子生物学等基础研究, 优化实验方法、制定组织工程软骨的评定标准和最佳指标。随着分子生物学、材料学、工程学、基因技术及纳米生物技术的发展, 将为关节软骨缺损患者带来福音!

5 参考文献

- [1] Roberts S, McCall IW, Darby AJ, et al. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther*. 2003;5:60-73.

- [2] Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A, et al. An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(4):1259-1267.
- [3] Krishnan SP, Skinner JA, Carrington RW, et al. Collagen-covered autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans of the knee: two-to seven-year results. *J Bone Joint Surg Br*. 2006;88(2):203-205.
- [4] Song HX, Li FB, Shen HL, et al. Repairing articular cartilage defects with tissue-engineering cartilage in rabbits. *Chin J Traumatol*. 2006;9(5):266-271.
- [5] Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, et al. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng*. 2004;10 (5-6):762-770.
- [6] Chen WH, Lai WF, Deng WP, et al. Tissue engineered cartilage using human articular chondrocytes immortalized by HPV-16 E6 and E7 genes. *J Biomed Mater Res A*. 2006;76(3):512-520.
- [7] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30 (1):42-48.
- [8] 赵子义, 杨雷, 徐鹏, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞关节腔内成软骨分化的实验研究[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(20): 1340-1343.
- [9] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(3):199-206.
- [10] 韩志军, 刘晓峰, 任华. 猪骨髓间充质干细胞体外诱导构建组织工程化软骨[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(2): 209-212.
- [11] Guo X, Zheng Q, Yang S, et al. Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomed Mater*. 2006;1(4):206-215.
- [12] Masuoka K, Asazuma T, Hattori H, et al. Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane sealing in rabbits. *Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;79(1):25-34.
- [13] Bailey MM, Wang L, Bode CJ, et al. A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage. *Tissue Eng*. 2007;13(8):2003-2010.
- [14] Xia W, Liu W, Cui L, et al. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;71(2): 373-380.
- [15] Geoffrey R, Jeffrey M, Dawn M, et al. Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(2):763-769.
- [16] 宋红星, 沈惠良, 王民, 等. 松质骨骨基质明胶负载软骨细胞移植修复兔膝关节软骨缺损[J]. *中华风湿病学杂志*, 2003, 7(11): 678-680.
- [17] Chou CH, Cheng WT, Kuo TF, et al. Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: the results of real-time polymerase chain reaction. *J Biomed Mater Res A*. 2007;82(3): 757-767.
- [18] Derek B, James L, Steven P, et al. Fibrochondrogenesis of Free Intraarticular Small Intestinal Submucosa Scaffolds. *Tissue Eng*. 2004;10:129-137.
- [19] Di Carlo BB, Hu JC, Gross T, et al. Biomaterial effects in articular cartilage tissue engineering using polyglycolic acid, a novel marine origin biomaterial, IGF-I, and TGF-beta 1. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2009;223(1):63-73.
- [20] 王会才, 张震宇, 辛伟光. 微重力三维动态诱导骨髓间充质干细胞复合可注射型支架材料 Pluronic F-127 修复关节软骨缺损[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(14): 2609-2612.
- [21] 张永先, 侯春林, 宝建中, 等. 几丁糖作为软骨细胞培养支架的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8(7): 671-673.
- [22] Huang HP, Mou SS, Ma AD. preparation of a composite membrane with collagen scaffold material for tissue culture. (Chinese). *Di Yi Jun yi Da xue Xuebao*. 2004;24(7):832-833.
- [23] 卢华定, 蔡道章, 刘青, 等. 聚乙烯醇/羟基磷灰石复合水凝胶移植修复兔膝关节软骨缺损[J]. *中国矫形外科杂志*, 2004, 12(21-22): 1701-1703.
- [24] 孙和炎, 卜海富, 张学瑜, 等. 双相支架负载软骨细胞修复兔关节软骨缺损[J]. *临床骨科杂志*, 2004, 7(3): 322-325.
- [25] 王彦平, 朱凌云, 王秀丽, 等. β -磷酸三钙/聚磷酸钙纤维/聚左旋乳酸复合材料的物理及其降解性能[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(21): 52-54.
- [26] Chou CH, Cheng WT, Kuo TF, et al. Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: the results of real-time polymerase chain reaction. *J Biomed Mater Res A*. 2007;82(3): 757-767.
- [27] 石宗义. 转化生长因子 β 1 促进关节软骨缺损修复的临床应用[J]. *中国现代医药杂志*, 2006, 8(7): 37-39.
- [28] 丁小邦, 程宁新, 陈兵, 等. 应用 b-FGF 刺激的软骨细胞构建自体组织工程化软骨的研究[J]. *中华整形外科杂志*, 2004, 20(3): 215-218.
- [29] 宋红星, 李佛保, 刘森, 等. 胰岛素样生长因子-1 对软骨细胞移植修复关节软骨缺损的作用[J]. *中华创伤杂志*, 2001, 17(11): 679-680.
- [30] Davies LC, Blain EJ, Gilbert SJ, et al. The potential of IGF-1 and TGFbeta1 for promoting "adult" articular cartilage repair: an in vitro study. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(7):1251-1261.
- [31] Nawata M, Wakitani, Nakaya H, et al. Use of bone morphogenetic protein 2 and diffusion chambers to engineer cartilage tissue for the repair of defects in articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(1):155-163.
- [32] 潘海涛, 林欣, 宋磊. 骨形态发生蛋白/碱性成纤维细胞生长因子复合材料修复关节软骨缺损的实验研究[J]. *首都医科大学学报*, 2006, 27(3): 397-399.
- [33] Loeser RF, Pacione CA, Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2188 - 2196.
- [34] Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, et al. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng*. 2004;10:762-770.
- [35] Kaplan BA, Gorman CR, Gupta AK, et al. Effects of transforming growth factor Beta and insulinlike growth factor 1 on the biomechanical and histologic properties of tissue-engineered cartilage. *Arch Facial Plast Surg*. 2003;5:96-101.
- [36] 龙华, 袁华, 马保安, 等. 腺病毒介导 TGF- β 1 及 BMP-7 基因共表达感染骨髓基质干细胞修复兔关节软骨缺损[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2008, 23(6): 471-474.
- [37] Madry H, Kaul G, Cucchiari M, et al. Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther*. 2005; 12:1171-1179.
- [38] 郭晓东, 杜靖远, 郑启新, 等. TGF- β 1 基因转染间充质干细胞的量效关系及安全性研究[J]. *同济医科大学学报*, 2001, 30(2): 125-128.

关于作者: 第一作者与通讯作者构思并设计本综述, 同时分析并解析相关数据, 经 3 次修改, 所有作者共同起草, 第一作者与通讯作者对本文负责。

利益冲突: 无利益冲突。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

此问题的已知信息: 软骨损伤后不能自行痊愈, 传统治疗方法疗效欠佳, 组织工程学的发展为修复关节软骨缺损提供了一个新的治疗途径, 组织工程学修复重建关节软骨缺损给患者带来了完全康复的可能。

本综述增加的新信息: 文章分别对组织工程中的种子细胞、支架、细胞因子三要素的研究进展进行综述, 并对其优势和存在的不足进行阐述。提出了目前存在的问题, 及今后研究的方向: 种子细胞需扩大来源, 防止种子细胞异化突变, 降低排斥反应等; 细胞支架需解决降解速率与软骨组织形成不匹配、生物相容性问题, 支架固定不确切、机械强度和组织结构达不到预期效果以及引起不同的炎性反应、免疫原性和致癌性问题; 生长因子需要研究各种生长因子促进软骨最适浓度、各种生长因子最佳配伍、以及基因转染等方面。