

组织工程化软骨修复关节软骨损伤研究进展

张洋洋 彭效祥 赵荣兰

摘要 关节软骨自身修复能力差,其损伤后的有效治疗成为临床难题。软骨组织工程中种子细胞、支架及生物活性因子是目前研究的热点。体内软骨生长的微环境中含有多多种生物活性因子,各因子间相互影响构成纵横交错的关系网。然而,外源性因子半衰期短,易降解,很难达到修复损伤软骨需要的浓度。转基因技术在组织工程中的应用实现了外源性生物活性因子在局部持续并高效的表达,促进了损伤软骨修复。该文就组织工程化软骨修复关节软骨损伤研究进展作一综述。

关键词 关节软骨;组织工程;损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2017.01.010

关节软骨损伤是临床骨科常见疾病之一,其发病率逐年升高。关节软骨缺乏血管、神经和淋巴组织,损伤后很难自行修复且力学性能也会随之改变。近年来,组织工程技术应用于修复关节软骨损伤和缺损的研究越来越受到重视。本文主要就软骨组织工程中应用的种子细胞、支架及基因工程来源的生物活性因子作一综述。

1 种子细胞

理想的种子细胞应来源广泛、易于分离,经诱导可向软骨细胞表型分化,合成和分泌关节软骨特异性基质。应用于软骨修复的种子细胞主要包括间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)和诱导多能干细胞(iPSC)等。根据来源的差异,MSC可分为骨髓间充质干细胞(BMSC)、脂肪干细胞(ADSC)、滑膜间充质干细胞^[1]及脐带血间充质干细胞^[2]等。ESC是处于未分化状态的多能干细胞,在特定的诱导条件下可分化成多种组织细胞。研究^[3-4]证实,ESC可经诱导向软骨细胞分化,形成明显的软骨样组织,并维持软骨组织表型。由于ESC来源于胚胎,涉及道德和伦理方面许多问题,因此限制了其在医学研究中的应用。相比之下,iPSC来源于成体细胞,不涉及伦理学问题。应用iPSC技术将患者自体细胞制备成专有干细胞,可大大降低免疫排斥反应^[5]。随着iPSC技术的快速发展,它已应用于修复关节软骨缺损的实验研究,为组织工程软骨提供了更广

泛的种子细胞来源^[6-7]。

2 支架

支架可以模拟软骨原生细胞外基质,有助于软骨组织在体内及体外的三维立体生长。理想的支架应具备:良好的生物相容性和可降解性,无毒性不良反应;较好的机械性能,以适应特定的环境;具有多孔结构,能支持营养运输及细胞迁移。

目前软骨组织工程应用的支架材料结构主要有多孔支架、水凝胶、纳米纤维、纳米球/微球。多孔支架可以根据需要,制定出相对精确的外部结构,也可通过不同的合成及加工条件改变其孔隙结构和机械特性^[8]。研究^[9]显示,改变多孔支架内孔隙定向可以调控支架的力学性能。支架内紧密相连的孔隙有利于细胞迁移、营养运输及机械刺激等。Bornes等^[10]将BMSC接种至多孔支架,成功实现成软骨细胞分化及软骨特异性基质沉积。水凝胶是具有三维网络结构的聚合物,吸水膨胀后可保持原有结构而不被溶解,并在膨胀状态下能保留大量的液体^[11]。在修复损伤软骨时,水凝胶的优势在于能提供微创的方式来填补任意大小的软骨缺损间隙。然而,与固体支架相比,水凝胶力学性能较弱且对其结构控制有限。研究^[12]显示,水凝胶的显微结构和力学性能与合成水凝胶的成分有关。纳米纤维网格具有较高的表面积/体积,利于接种种子细胞及携带药物。目前纳米纤维的制造技术主要有静电纺丝、相分离及自组装。纳米纤维支架密度低的特性能加快细胞浸润。与细胞团块培养相比,纳米纤维支架能增强成软骨细胞分化,增加软骨特异性基因表达及细胞外基质合成,促进细胞增殖^[13]。纳米球与微球的大小分别为1~10 nm和1~1000 μm,可作为细胞、基因、药物及其他成分的载体将其缓释到损伤软骨关

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2015HL025、ZR2012HQ034)

作者单位:261053, 潍坊医学院医学检验学系纳米医学技术研究所、潍坊医学院临床检验诊断学山东省“十二五”高校重点实验室、潍坊医学院附属医院山东省临床检验重点专科

通信作者:赵荣兰 E-mail: zhaoronglan76@sina.com

节内^[14-15]。目前对于制备能长期释放生物活性因子的纳米球/微球尚需进一步探索。

3 生物活性因子

体内软骨生长的微环境中含有多种生物活性因子,各因子间相互影响构成纵横交错的关系网。但外源性因子半衰期短,易降解,很难达到修复损伤软骨需要的浓度。转基因技术能够实现外源性生物活性因子在局部持续并高效的表达,进而促进损伤软骨修复。目前研究的生物活性因子主要包括蛋白因子和微小RNA(miRNA)。

3.1 蛋白因子

转化生长因子(TGF)- β 参与调控软骨细胞中胶原和蛋白聚糖 mRNA 的转录,提高Ⅱ型胶原和蛋白聚糖含量,从而促进软骨样组织形成^[16]。此外,TGF- β 还可减少软骨细胞肥大及成骨分化,有助于促进关节软骨损伤修复时成软骨细胞分化的单一进程,改善活体内的软骨修复^[17]。研究^[18]显示,将转染 TGF- β 1 基因的人软骨细胞与正常软骨细胞共培养,转基因细胞持续合成的 TGF- β 1 以旁分泌方式作用于正常软骨细胞,诱导Ⅱ型胶原和糖胺聚糖合成。过表达的胰岛素样生长因子(IGF)-1 能显著促进损伤软骨修复,降低骨关节炎损伤区周围软骨退化^[19]。Ortved 等^[20]将转染 IGF-1 基因的马软骨细胞与纤维蛋白材料复合植入关节软骨缺损处,8 个月后缺损区以富含Ⅱ型胶原和软骨细胞的透明样软骨修复。此外,IGF-1 基因还能显著提高缺损处移植物的力学性能^[21]。骨形态发生蛋白(BMP)可促进组织工程种子细胞向软骨细胞表型分化及软骨细胞外基质合成,提高软骨修复效果。研究^[22]显示,将转染 BMP-4 基因的兔 ADSC 修复兔关节软骨缺损,术后 12 周再生组织内的软骨细胞在软骨陷窝内呈柱状排列,类似于正常软骨。BMP-2 可诱导滑膜源祖细胞成软骨细胞分化,上调Ⅱ型胶原、Ⅰ型胶原及蛋白聚糖水平,调控非肥厚性软骨形成^[23]。白细胞介素(IL)-1 对关节软骨细胞的作用主要表现在抑制Ⅱ型胶原、蛋白聚糖表达及软骨细胞增殖,促进基质水解酶合成及增加其活性^[24]。抗炎因子 IL-1 受体拮抗剂(IL-1RA)能与 IL-1 受体结合,阻断 IL-1 的上述作用。损伤关节的关节腔内保持一定浓度的 IL-1RA 能显著降低软骨退变和滑膜炎病变程度,抑制骨关节炎发展^[25]。将荷载 IL-1RA 基因的腺病毒注射到兔关节炎关节腔内,可显著抑制关节软骨退化,缓解关节炎症^[26]。Sox9 是软骨发育

过程中的关键转录因子,主要调控Ⅱ型胶原的合成。研究^[27]显示,在鼠骨骼发育完成后,由于关节软骨细胞内 Sox9 基因启动子区 DNA 和组蛋白甲基化,使 Sox9 表达大幅度减少。王震等^[28]将转染 Sox9 基因的 BMSC 修复兔关节软骨缺损,组织学检测显示缺损处以透明软骨样组织填充,软骨及软骨下骨修复良好。

3.2 miRNA

miRNA 表达谱在软骨发育、软骨细胞去分化及种子细胞成软骨细胞分化进程中均发生变化。因此,学者们认为 miRNA 在软骨损伤修复过程中发挥一定的作用。高表达的 miR-127-5p 能抑制 IL-1 β 诱导的基质金属蛋白酶(MMP)-13 合成及 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、p38 和核因子(NF)- κ B 活化,抑制骨关节炎软骨损伤^[29]。miR-140 可以直接作用于胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)-5、MMP-13 和含血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(ADAMTS)-5 等基因,对软骨稳态起调控作用^[30-31]。miR-142-3p 参与调控炎症介质高迁移率族蛋白(HMG)B1 介导的 NF- κ B 信号转导通路及前炎性因子合成,抑制软骨细胞凋亡及炎症发生^[32]。miR-148a 在骨关节炎软骨中表达降低,而高表达的 miR-148a 能下调Ⅰ型胶原、MMP-13 及 ADAMTS-5 基因表达,抑制软骨细胞肥大性分化及促进Ⅱ型胶原沉积^[33]。过表达的 miR-210 可促进Ⅱ型胶原、血管内皮生长因子(VEGF)及成纤维生长因子(FGF)-2 合成,修复软骨缺损,防止关节软骨退化等^[34]。miR-210 也可直接调控死亡受体 6(DR6),抑制 NF- κ B 信号转导通路^[35]。此外,miR-221 能抑制周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p27 表达,促进软骨细胞增殖;miR-483-5p 能抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路,促进软骨基质合成^[36]。miR-502-5p 可抑制 IL-1 β 诱导的细胞活力降低及凋亡增加,减缓 IL-1 β 引起的软骨细胞外基质代谢失衡和前炎性因子合成^[37]。

4 结语

组织工程技术应用用于修复损伤和缺损软骨是目前乃至今后研究的热点。虽然目前组织工程中种子细胞、支架和基因工程来源的生物活性因子等的研究已取得显著进展,但鉴于机体内环境的复杂性,成功的组织工程化软骨除了需调控上述要素间的相互作用外,还要考虑年龄、氧浓度和机械刺激等多因素的影响。尽管在组织工程软骨方面取得了一定的进

展,但具有成熟关节软骨基质、结构和机械性能的新一代工程化软骨尚未实现。目前组织工程化软骨修复关节软骨损伤仍面临无法精确控制软骨细胞分化程度、载体安全性及多基因治疗时多基因表达调控等诸多问题。相信随着生物技术的进一步发展及对软骨损伤机制研究的深入,软骨损伤修复研究会有突破性进展。

参 考 文 献

- [1] Mak J, Jablonski CL, Leonard CA, et al. Intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells improves cartilage repair in a mouse injury model[J]. *Sci Rep*, 2016, 6;23076.
- [2] Park YB, Song M, Lee CH, et al. Cartilage repair by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells with different hydrogels in a rat model[J]. *J Orthop Res*, 2015, 33(11);1580-1586.
- [3] Olee T, Grogan SP, Lotz MK, et al. Repair of cartilage defects in arthritic tissue with differentiated human embryonic stem cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(3-4);683-692.
- [4] Craft AM, Ahmed N, Rockel JS, et al. Specification of chondrocytes and cartilage tissues from embryonic stem cells[J]. *Development*, 2013, 140(12);2597-2610.
- [5] Tabar V, Studer L. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(2);82-92.
- [6] Ko JY, Im GI. Chondrogenic and osteogenic induction from iPSCs[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1357;441-450.
- [7] Lee J, Taylor SE, Smeriglio P, et al. Early induction of a prechondrogenic population allows efficient generation of stable chondrocytes from human induced pluripotent stem cells[J]. *FASEB J*, 2015, 29(8);3399-3410.
- [8] Chen S, Zhang Q, Nakamoto T, et al. Gelatin scaffolds with controlled pore structure and mechanical property for cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016, 22(3);189-198.
- [9] Arora A, Kothari A, Katti DS. Pore orientation mediated control of mechanical behavior of scaffolds and its application in cartilage-mimetic scaffold design[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2015, 51;169-183.
- [10] Bornes TD, Jomha NM, Mulet-Sierra A, et al. Porous scaffold seeding and chondrogenic differentiation of BMSC-seeded scaffolds[J]. *Bio Protoc*, 2015, 5(24);e1693.
- [11] Ahmed EM. Hydrogel: preparation, characterization, and applications. A review[J]. *J Adv Res*, 2015, 6(2);105-121.
- [12] Yuan L, Li B, Yang J, et al. Effects of composition and mechanical property of injectable collagen I/II composite hydrogels on chondrocyte behaviors[J]. *Tissue Eng Part A*, 2016, 22(11-12);899-906.
- [13] Coburn JM, Gibson M, Monagle S, et al. Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(25);10012-10017.
- [14] Sukarto A, Yu C, Flynn LE, et al. Co-delivery of adipose-derived stem cells and growth factor-loaded microspheres in RGD-grafted N-methacrylate glycol chitosan gels for focal chondral repair[J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(8);2490-2502.
- [15] Zhu S, Lu P, Liu H, et al. Inhibition of Rac1 activity by controlled release of NSC23766 from chitosan microspheres effectively ameliorates osteoarthritis development in vivo[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(1);285-293.
- [16] Tekari A, Luginbueh I R, Hofstetter W, et al. Transforming growth factor beta signaling is essential for the autonomous formation of cartilage-like tissue by expanded chondrocytes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3);e0120857.
- [17] Frisch J, Rey-Rico A, Venkatesan JK, et al. TGF- β gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(3);430-440.
- [18] Yoon HJ, Kim SB, Somaiya D, et al. Type II collagen and glycosaminoglycan expression induction in primary human chondrocyte by TGF- β 1 [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2015, 16;141.
- [19] Madry H, Kaul G, Zurakowski D, et al. Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF- I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model[J]. *Eur Cell Mater*, 2013, 25;229-247.
- [20] Ortved KF, Begum L, Mohammed HO, et al. Implantation of rAAV5-IGF-I transduced autologous chondrocytes improves cartilage repair in full-thickness defects in the equine model[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(2);363-373.
- [21] Griffin DJ, Ortved KF, Nixon AJ, et al. Mechanical properties and structure-function relationships in articular cartilage repaired using IGF- I gene-enhanced chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(1);149-153.
- [22] Shi J, Zhang X, Zhu J, et al. Nanoparticle delivery of the bone morphogenetic protein 4 gene to adipose-derived stem cells promotes articular cartilage repair in vitro and in vivo[J]. *Arthroscopy*, 2013, 29(12);2001-2011.
- [23] Chen Y, Caporali E, Stewart M. Bone morphogenetic protein 2 stimulates chondrogenesis of equine synovial membrane-derived progenitor cells[J]. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 2016, 29(5);378-385.
- [24] Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(4);R163.
- [25] Moutos FT, Glass KA, Compton SA, et al. Anatomically shaped tissue-engineered cartilage with tunable and inducible anticytokine delivery for biological joint resurfacing[J]. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, 2016, 113(31):E4513-E4522.
- [26] Wang HJ, Yu CL, Kishi H, et al. Suppression of experimental osteoarthritis by adenovirus-mediated double gene transfer[J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(16):1365-1373.
- [27] Zhang M, Lu Q, Miller AH, et al. Dynamic epigenetic mechanisms regulate age-dependent SOX9 expression in mouse articular cartilage[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 72:125-134.
- [28] 王震,梁大川,白洁玉,等. 慢病毒介导的 Sox9 基因在兔骨髓间充质干细胞的过表达促进软骨损伤修复[J]. 中国骨伤, 2015, 28(5):433-440.
- [29] Park SJ, Cheon EJ, Lee MH, et al. MicroRNA-127-5p regulates matrix metalloproteinase 13 expression and interleukin-1 β -induced catabolic effects in human chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(12):3141-3152.
- [30] Tardif G, Hum D, Pelletier JP, et al. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2009, 10:148.
- [31] Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis [J]. Genes Dev, 2010, 24(11):1173-1185.
- [32] Wang X, Guo Y, Wang C, et al. MicroRNA-142-3p inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting HMGB1 [J]. Inflammation, 2016, 39(5):1718-1728.
- [33] Vonk LA, Kragten AH, Dhert WJ, et al. Overexpression of hsa-miR-148a promotes cartilage production and inhibits cartilage degradation by osteoarthritic chondrocytes [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(1):145-153.
- [34] Kawanishi Y, Nakasa T, Shoji T, et al. Intra-articular injection of synthetic microRNA-210 accelerates avascular meniscal healing in rat medial meniscal injured model [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(6):488.
- [35] Zhang D, Cao X, Li J, et al. MiR-210 inhibits NF- κ B signaling pathway by targeting DR6 in osteoarthritis[J]. Sci Rep, 2015, 5:12775.
- [36] Yang M, Zhang L, Gibson GJ. Chondrocyte miRNAs 221 and 483-5p respond to loss of matrix interaction by modulating proliferation and matrix synthesis[J]. Connect Tissue Res, 2015, 56(3):236-243.
- [37] Zhang G, Sun Y, Wang Y, et al. MiR-502-5p inhibits IL-1 β -induced chondrocyte injury by targeting TRAF2 [J]. Cell Immunol, 2016, 302:50-57.

(收稿:2016-08-24; 修回:2016-11-20)

(本文编辑:翁洁敏)