

天然来源可注射水凝胶修复软骨缺损的研究进展

刘威 于晓巍

摘要 组织工程在软骨缺损修复中发挥重要作用,细胞、支架和生长因子是其3个基本要素。可注射水凝胶修复软骨缺损的优势在于,其交联前形状不固定,可填充不规则缺损,随后通过物理或化学交联使其凝固成固态水凝胶,以使缺损填充“严丝合缝”。天然材料凭借其类似于细胞外基质成分、可模拟机体组织微环境及有利于维持软骨细胞表型等特性成为软骨缺损修复支架的主流材料。该文就天然来源可注射水凝胶的研究进展作一综述。

关键词 可注射;水凝胶;组织工程;软骨修复

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2018.02.005

软骨组织由软骨细胞和细胞外基质组成。细胞外基质对软骨细胞的生长和分化至关重要,不仅可为软骨细胞提供物理信号,也可促进软骨细胞粘附和迁移。为软骨细胞提供良好微环境现已成为组织工程研究重点^[1-2]。软骨细胞生长在高度水化的三维微环境中,可分泌糖胺聚糖和Ⅱ型胶原蛋白等细胞外基质成分。糖胺聚糖和Ⅱ型胶原蛋白对细胞-支架复合体的生理特性和力学强度起着重要作用。其中,糖胺聚糖与硫酸软骨素和硫酸肝素一样,通过附着于细胞外的基质蛋白形成蛋白多糖发挥作用^[3-4]。

修复软骨缺损的组织工程支架需具备以下性质:①易于处理,在生理条件下能保持稳定性和可重复性;②细胞相容性和生物相容性良好;③易于填充缺损部位;④能促进新生软骨与周围软骨组织紧密结合;⑤可模仿软骨细胞外基质的性质并促进细胞成软骨分化^[5]。

1 组织工程软骨的意义

软骨主要由软骨细胞、胶原蛋白、蛋白聚糖和水组成,其成分虽不复杂,但具有高度特异性。不同于骨的巨大再生潜能,软骨因缺乏血运支持而修复能力有限。软骨损伤常导致瘢痕形成,造成结构和功能的永久丧失。关节面损伤因不能自行愈合,常进展为退行性关节病。软骨细胞在类似于天然环境(细胞外基质)的三维支架中可维持天然表型,并产

生细胞外基质的基本成分,进而促进软骨组织再生。

2 可注射水凝胶支架材料

可注射水凝胶支架材料众多,包括天然材料、合成材料、复合材料和混合材料。其中,天然材料凭借其类似于软骨细胞的细胞外基质成分、可模拟机体组织微环境及有利于维持软骨细胞表型等优势脱颖而出,成为软骨缺损修复支架的主流材料。下文主要简述各天然材料的特点及最新研究进展。

3 天然材料

天然聚合物衍生自生物大分子,不仅能为包裹的软骨细胞提供合适的三维微环境,还具备良好的生物相容性和生物活性。常见的天然聚合物包括透明质酸(HA)、胶原蛋白、海藻酸钠、壳聚糖、纤维蛋白及纤维素等。

3.1 HA

HA由 β -1,4糖苷键和 β -1,3-糖苷键交替连接的D-葡萄糖醛酸和D-N-乙酰葡萄糖胺构成,既是软骨细胞外基质的重要糖胺聚糖,也是滑液的主要成分。HA现已成为软骨组织工程的理想材料,其优势在于:①可显著抑制软骨溶解,并具有抗炎作用;②是天然软骨中蛋白聚糖的主要组成部分,在蛋白聚糖聚集体形成中发挥重要作用;③可经酶、透明质酸酶和自由基降解。多项研究通过制备HA水凝胶以验证HA修复软骨缺损的能力。Ha等^[6]将HA复合人脐带血间充质干细胞(hUCB-MSC)水凝胶植入6只小型猪的膝关节全层软骨缺损部位。术后12周,小型猪膝关节软骨标本大体观察和组织学分析显示,HA复合hUCB-MSC水凝胶有利于全层

软骨的再生;苏木精-伊红(HE)染色、番红固绿染色及Ⅱ型胶原染色均表明,植入材料组较未植入材料组软骨修复效果更好。Liu 等^[7]通过光诱导亚胺交联反应将邻硝基苯甲醇(NB)接枝到 HA,然后与富血小板血浆(PRP)复合制备原位光交联富血小板血浆(HNPRP)水凝胶。该研究表明,HNPRP 水凝胶可使细胞相容,且可原位成胶,形成坚固的水凝胶支架。研究同时发现,HNPRP 水凝胶不仅能控制生长因子释放,还显示出较强的组织黏附能力。进一步的体外实验显示,HNPRP 水凝胶可促进软骨细胞和骨髓间充质干细胞(BMSC)增殖和迁移。兔全层软骨缺损模型体内试验表明,HNPRP 水凝胶可实现一体化透明软骨再生,其疗效优于凝血酶活化的 PRP 水凝胶。以上研究结果表明,HNPRP 水凝胶非常适用于软骨缺损再生。

3.2 胶原蛋白

胶原蛋白约占全身蛋白质含量的 25%~35%,是细胞外基质的主要成分,存在于多种结缔组织中。Pulkkinen 等^[8]将载有兔自体软骨细胞的重组人Ⅱ型胶原(rhCⅡ)水凝胶移植到兔股骨髁间预设缺损中。造模后 6 个月发现,rhCⅡ组软骨填充更完整,且具有较高含量的蛋白多糖和Ⅱ型胶原蛋白,表明 rhCⅡ水凝胶促细胞增殖能力良好,有利于软骨组织再生。Almeida 等^[9]将猪关节软骨细胞外基质微粒与转化生长因子(TGF)- β 3 组合,制备功能化可注射纤维蛋白水凝胶。结果显示,相较于明胶对照组,新鲜分离的间充质干细胞(MSC)在软骨细胞外基质颗粒功能化纤维蛋白水凝胶中可产生更多的软骨组织,且软骨组织的Ⅱ型胶原蛋白免疫组化染色更深,并含有更高水平的糖胺多糖。研究表明,软骨细胞外基质成分能使纤维蛋白水凝胶功能化,进一步促进软骨的再生修复。

3.3 海藻酸钠

海藻酸钠广泛分布于褐藻细胞壁,与水混合可形成粘性胶状物^[10],常用于材料微胶囊化^[11]。有研究将人软骨干祖细胞包裹于 TGF- β 3 刺激的海藻酸钠微胶囊,逆转录-聚合酶链式反应分析发现,人软骨干祖细胞可分化为软骨细胞,表明海藻酸钠结合人软骨干祖细胞适用于软骨缺损的再生修复^[12]。此外,Adolphe 等^[13]通过检测海藻酸钠水凝胶支架和聚乙二醇(PEG)水凝胶支架中Ⅱ型胶原、蛋白聚糖和糖胺聚糖的表达水平,发现海藻酸钠水凝胶支架表现出比 PEG 支架更好的性能,并可诱导去分化的软骨细胞

再分化,而软骨细胞去分化为成纤维细胞将不利于软骨缺损的再生修复^[14]。海藻酸钠水凝胶支架还可作为细胞外基质,通过将细胞从周围机体组织吸引到基质,来促进组织愈合和新组织再生^[13]。

3.4 壳聚糖

壳聚糖具备良好的生物相容性和生物降解性,已广泛应用于可注射支架的制备。Li 等^[15]将绵羊软骨细胞体外混合于壳聚糖水凝胶,以制备组织工程化软骨支架。注射到羊体内后发现,软骨细胞可在该支架中存活并保持分泌基质的能力。24 周后,羊软骨缺损完全修复。壳聚糖水凝胶还有利于软骨细胞基质积累,可成为修复关节软骨缺陷的新方法,具有重要的临床应用价值^[15]。壳聚糖- β -甘油磷酸酯-羟乙基纤维素(CH-GP-HEC)水凝胶支架的生物相容性、生物降解性和细胞相容性均良好,可在生理温度(37℃)下从溶胶转变为水凝胶。Yan 等^[16]的研究发现,经 TGF- β 3 诱导的 MSC 在 CH-GP-HEC 水凝胶中表现出极高的生存能力和增殖率,BMSC 软骨分化能力也显著增强,表明该材料的细胞相容性良好。Zhao 等^[17]将体外培养 1 周的兔软骨细胞接种于 1,6-二异氰酸己烷和 PEG 结合制备的壳聚糖水凝胶中,形成组织工程软骨后移植到兔关节软骨缺损处。12 周后,壳聚糖水凝胶组软骨缺损全部修复,与软骨下骨紧密连接的再生组织与正常组织边界模糊。国际软骨修复协会(ICRS)大体和组织学评分显示,壳聚糖水凝胶组与其他组有显著差异,表明壳聚糖水凝胶支架可促进软骨细胞的黏附、增殖和分泌细胞外基质。

3.5 纤维蛋白

纤维蛋白是血凝块的重要组成部分,具有良好的生物降解性和生物相容性,常用于制作纤维蛋白组织工程支架,在软骨缺损修复中获得广泛应用。

纤维蛋白水凝胶是天然生物材料,作为组织工程支架具有许多优于合成材料的优点,包括:①生物相容性良好,能促进细胞黏附和迁移,并以可控方式降解;②能模仿天然血液凝固过程,并具备自组装成聚合物网络的能力;③作为细胞载体可减少细胞递送过程中的损失,保证细胞数量,增强细胞生存率和组织再生^[18]。

然而,纤维蛋白在修复软骨缺损方面并不像其他水凝胶一样对软骨细胞具有促进作用^[19]。纤维蛋白包裹的 BMSC 和脂肪间充质干细胞(ADSC)的软骨形成潜能较低^[19-21],需进一步功能化这种多功

能可注射水凝胶系统以优化软骨修复疗法。

3.6 纤维素

羟丙甲基纤维素(HPMC)是纤维素衍生物聚合物,溶解性良好,23℃时为液体,37℃时转变为固态水凝胶,可在体内制备可注射组织工程软骨^[22]。Xu等^[23]将ADSC包裹于HPMC水凝胶,并置于TGF-β1和碱性成纤维细胞生长因子的培养基,短期培养后,Masson三色染色、苦味酸-天狼猩红染色和阿尔辛蓝过碘酸雪夫(AB-PAS)染色均证实新生软骨开始分泌Ⅱ型胶原蛋白和糖胺聚糖等软骨样成分。动物实验中,ADSC与15% HPMC混合注射到裸鼠背部皮下组织,培养8周后,注射部位可观察到新生软骨。该疗法现已从实验研究转向临床,有望成为软骨缺损修复的新型治疗方式。

4 结语

软骨细胞的细胞外基质主要由胶原蛋白、蛋白聚糖和水组成。天然材料类似于其细胞外基质成分,因而细胞相容性和组织相容性均良好,可为软骨细胞提供有利于生存和繁殖的三维微环境。天然来源可注射水凝胶可同时包裹和缓释生长因子,并具备募集周围组织MSC向材料迁移的能力。此外,天然来源可注射水凝胶,可通过调控温度或pH使经B超引导注入关节腔的水凝胶液体转变为固体。既可实现微创治疗以减少患者痛苦及相关临床并发症,又能促进软骨再生,进而延缓关节炎进展。总而言之,天然来源可注射水凝胶的广泛普及和深入研究有望为众多软骨缺损患者带来治愈的可能,具有重要的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Yao X, Peng R, Ding J. Cell-material interactions revealed via material techniques of surface patterning[J]. *Adv Mater*, 2013, 25(37): 5257-5286.
- [2] Li Y, Rodrigues J, Tomás H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(6): 2193-2221.
- [3] Moreira Teixeira LS, Bijl S, Pully VV, et al. Self-attaching and cell-attracting in-situ forming dextran-tyramine conjugates hydrogels for arthroscopic cartilage repair[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 3164-3174.
- [4] Izumikawa T, Sato B, Kitagawa H. Chondroitin sulfate is indispensable for pluripotency and differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 3701.
- [5] Chen F, Yu S, Liu B, et al. An injectable enzymatically crosslinked carboxymethylated pullulan/chondroitin sulfate hydrogel for cartilage tissue engineering[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20014.
- [6] Ha CW, Park YB, Chung JY, et al. Cartilage repair using composites of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogel in a minipig model[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(9): 1044-1051.
- [7] Liu X, Yang Y, Niu X, et al. An in situ photocrosslinkable platelet rich plasma - complexed hydrogel glue with growth factor controlled release ability to promote cartilage defect repair[J]. *Acta Biomater*, 2017, 62: 179-187.
- [8] Pulkkinen HJ, Tiitu V, Valonen P, et al. Repair of osteochondral defects with recombinant human type II collagen gel and autologous chondrocytes in rabbit [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(3): 481-490.
- [9] Almeida HV, Eswaramoorthy R, Cunniffe GM, et al. Fibrin hydrogels functionalized with cartilage extracellular matrix and incorporating freshly isolated stromal cells as an injectable for cartilage regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2016, 36: 55-62.
- [10] Lansdown AB. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin[J]. *Wound Repair Regen*, 2002, 10(5): 271-285.
- [11] Endres M, Wenda N, Woehlecke H, et al. Microencapsulation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal progenitor cells from subchondral bone marrow in Ca-alginate for cell injection[J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(2): 436-444.
- [12] Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, et al. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts[J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 34(2): 211-220.
- [13] Adolphe M, Demignot S. Versatility of differentiated functions of cultured joint chondrocytes. Eventual usefulness in treatment[J]. *Bull Acad Natl Med*, 2000, 184(3): 593-600.
- [14] Mathe Z, Bucher P, Bosco D, et al. Short-term immunosuppression reduces fibrotic cellular infiltration around barium-M-alginate microbeads injected intraportally [J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(4): 1199-1200.
- [15] Li Y, Meng H, Liu Y, et al. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering [J]. *ScientificWorldJournal*, 2015, 2015: 685690.
- [16] Yan J, Yang L, Wang G, et al. Biocompatibility evaluation of chitosan-based injectable hydrogels for the culturing mice mesenchymal stem cells in vitro[J]. *J Biomater Appl*, 2010, 24(7): 625-637.
- [17] Zhao M, Chen Z, Liu K, et al. Repair of articular cartilage defects in rabbits through tissue-engineered cartilage constructed with chitosan hydrogel and chondrocytes[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(11): 914-923.
- [18] Du Z, Zhang Y, Lang M. Synthesis of functionalized Pluronic-b-poly(ε-caprolactone) and the comparative study of

their pendant groups on the cellular internalization behavior [J]. J Mater Sci Mater Med, 2015, 26(4): 171.

[19] Liu H, Xiao Y, Xu H, et al. Reversible thermo-sensitivity induced from varying the Hydrogen bonding between the side residues of rationally designed polypeptides [J]. Chem Commun (Camb), 2015, 51(50): 10174-10177.

[20] Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, et al. The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSCs[J]. Biomaterials, 2013, 34(23): 5802-5812.

[21] Benders KE, van Weeren PR, Badylak SF, et al. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone

regeneration[J]. Trends Biotechnol, 2013, 31(3): 169-176.

[22] Fatimi A, Tassin JF, Quillard S, et al. The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices[J]. Biomaterials, 2008, 29(5): 533-543.

[23] Xu Y, Zhang J, Ma Y, et al. The role of adipose-derived stromal cells and hydroxypropylmethylcellulose in engineering cartilage tissue in vivo[J]. Cytotechnology, 2014, 66(5): 779-790.

(收稿:2017-09-25;修回:2017-11-09)

(本文编辑:王妮)

《国际骨科学杂志》第八届编辑委员会名单

顾问

戴尅戎 顾玉东 邱贵兴 徐建光 王 岩 曾炳芳 杨庆铭 侯春林 田 伟
裴国献 裴福兴 陈启明 郑诚功

主编

张长青

常务副主编(以姓氏拼音为序)

邓廉夫 姜保国 唐佩福 王坤正 袁 文 张伟滨 张英泽

副主编(以姓氏拼音为序)

柴益民 郭 卫 姜建元 马信龙 邱 勇 曲铁兵 王满宜 王秋根 王以朋
翁习生 严世贵 杨惠林 赵德伟 朱振安

常务编委(以姓氏拼音为序)

毕郑刚 蔡郑东 曹 力 陈 亮 陈世益 陈晓东 范存义 范卫民 郝定均
侯铁胜 胡懿邻 蒋电明 蒋 青 孔 荣 李 明 廖威明 刘 璠 刘 强
刘忠军 罗从风 牛晓辉 沈慧勇 田晓滨 王 蕾 王栓科 王义生 王 臻
卫小春 吴海山 夏 春 许建中 徐永清 阎作勤 杨述华 姚振均 查振刚
张先龙 赵劲民 郑秋坚 周东生

编委(以姓氏拼音为序)

陈博昌 丁 任 丁真奇 范顺武 冯建民 付中国 顾立强 官 众 郭晓山
郝永强 黄富国 霍洪军 纪 方 李建民 梁 裕 廖 琦 林伟龙 刘祖德
吕维加 梅 炯 潘志军 尚 剑 孙月华 汤亭亭 汤 欣 童培建 王 钢
王 友 王 跃 王志坚 吴景明 吴克俭 肖建如 肖涟波 徐向阳 徐又佳
杨 军 杨铁毅 尹宗生 禹宝庆 俞光荣 于秀淳 张保中 张开刚 张 堃
张世民 张亚东 赵 杰 赵金忠 赵 黎 赵 群 周 方 周一新 周 跃
朱仕文

秘书

杨庆诚