

· 综 述 ·

## 关节软骨组织工程研究进展

郭发启<sup>1</sup>, 高书图<sup>2</sup>, 丁幸坡<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院 2008 级硕士研究生, 河南 郑州 450008;

2. 河南省洛阳正骨医院, 河南 洛阳 471002)

关键词 软骨, 关节 组织工程 综述

关节软骨损伤是临床多发病, 由于软骨的自身修复能力非常有限, 目前的治疗方法均不能实现软骨的生物修复, 缺损软骨的修复问题成为临床上较为棘手的问题之一。组织工程学的发展为解决这个问题提供了新思路, 使缺损软骨的完全再生成为可能。其基本方法是将自体或异体的组织细胞经体外培养扩增后, 接种到一种生物相容性良好、可吸收的生物材料上, 形成细胞生物材料复合物, 再回植到体内组织缺损部位, 随着生物材料逐渐被机体吸收, 细胞分化、生长成新的有功能的组织, 从而达到修复缺损的目的。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。

## 1 种子细胞

目前文献<sup>[1]</sup>报道的应用于软骨组织工程研究的种子细胞主要有: 自体软骨细胞、异体软骨细胞、成体干细胞、胚胎干细胞、其他来源的细胞。理想的种子细胞应具备以下特性: ①取材方便, 对供体损伤小, 来源充足; ②体外培养增殖能力旺盛, 能持续保持细胞表型不变; ③植入体内能适应受区环境并保持原有细胞的功能。

**1.1 自体软骨细胞** 自体软骨细胞是软骨构建效果最理想的种子细胞, 但人体内可供利用的软骨细胞数量极为有限, 取材创伤较大, 大量扩增后又极易发生老化与去分化, 丧失软骨形成能力<sup>[2]</sup>。因此, 应用自体软骨细胞构建软骨组织在临床上很难推广应用。

**1.2 同种异体软骨细胞** 同种异体软骨细胞来源充足、获取容易、可库存备用, 但却有一定的免疫排斥反应。

**1.3 成体干细胞** 成体干细胞 (adult stem cells, ASC) 可来源于骨髓、脂肪、皮肤、肌肉等各类组织, 分

布广泛, 可自体取材, 增殖力强且具有多分化潜能, 已成为当前组织工程种子细胞研究的重点和热点。目前经过体外实验证明具有软骨分化潜能的有: ①骨髓间充质干细胞; ②脂肪间充质干细胞; ③其他间充质干细胞。

**1.3.1 骨髓间充质干细胞** 骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是目前研究最多、应用最广的种子细胞之一。主要是因为 BMSCs 发现早、取材方便、创伤小、培养方法易普及。BMSCs 在多种条件下均表现出形成软骨的潜能<sup>[3]</sup>。目前, 国内外对 BMSCs 进行定向诱导使之分化为软骨细胞的方式大体可分为体外和体内两种方式。体外诱导包括体外细胞团聚诱导、体外单层细胞团诱导、体外三维支架环境中诱导与软骨细胞体外共培养诱导; 体内诱导包括体内软骨微环境诱导和基因转染诱导<sup>[4]</sup>。BMSCs 可在诱导因子作用下向软骨细胞分化, 有可能成为关节软骨组织工程研究理想的种子细胞来源<sup>[5]</sup>。但在目前的研究中, BMSCs 在构建软骨组织方面尚存在几个问题: 首先, BMSCs 构建软骨组织的力学性能不足<sup>[6]</sup>; 其次, 如何调控 BMSCs 定向分化成成熟的软骨细胞, 同时抑制其向肥大软骨细胞分化<sup>[4]</sup>, 也是目前需要解决的一个问题。

**1.3.2 脂肪间充质干细胞** 脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stromal cells, ADSCs) 的软骨分化潜能已被充分证实。马钰等<sup>[7]</sup>成功地利用 ADSCs 分化培养出软骨细胞, 并稳定传代, 同时表明软骨修复宜用 5 代以内的细胞。Cui 等<sup>[8]</sup>将 ADSCs 种植到聚羟基乙酸/聚乳酸支架材料上, 成功实现了 ADSCs 向软骨细胞的分化, 并进一步实现了猪非负重区关节软骨缺损的修复。与 BMSCs 相比, ADSCs 在人体内分布更广, 可利用的细胞总量更多, 而且所需的脂肪组织可

经整形外科吸脂术获得,由此可见,在种子细胞的来源上,ADSCs 较 BMSCs 更具优势。但 ADSCs 在软骨组织构建及缺损修复领域的研究与应用却远不如 BMSCs<sup>[9-10]</sup>,究其原因是目前常用的分离方法从脂肪组织中得到的细胞不可避免地会含有大量的混杂细胞,尚无法得到纯化的具有软骨分化潜能的 ADSCs 亚群。如果能解决细胞纯化的问题,ADSCs 将成为最有价值的种子细胞。

**1.4 胚胎干细胞** 在软骨组织工程研究中,对胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的研究开展的相对较晚。Fecek 等<sup>[11]</sup>诱导 ESCs 分化成软骨祖细胞,再增殖、分化成软骨细胞,与聚己酸内酯支架复合后,植入 129S1/SvImJ 鼠体内,4 周后检测发现软骨样组织产生。ESCs 主要是从胚囊期内细胞团得到的,属于高度未分化细胞,可分化为 3 个胚层的细胞,具有分化的全能性和增殖的无限性,有可能成为组织工程研究种子细胞的新来源。目前对 ESCs 的研究还需要解决几个问题:首先,如何进行纯化,以更有效地诱导 ESCs 向软骨细胞分化;其次,如何克服 ESCs 的免疫原性及致癌性;第三,如何解决伦理学问题。

**1.5 其他细胞** Pufe 等<sup>[12]</sup>报道了人类外周血中的程序性单核细胞源细胞具有生成 II 型胶原产生软骨细胞的潜能。Choi 等<sup>[13]</sup>发现人脐带源性多系祖细胞在胶原凝胶的三维培养中可以分化形成软骨细胞。Degistirici 等<sup>[14]</sup>将骨髓血中的非限制性体干细胞用于软骨的缺损修复研究。

## 2 支架材料

组织工程用细胞支架一般应具备良好的生物相容性、良好的生物可降解性、良好的材料-细胞界面及良好的消毒性能,并具有可加工的三维立体结构和一定的机械强度。选择合适的材料制备细胞支架是目前软骨组织工程研究亟须解决的问题<sup>[15]</sup>。目前细胞支架材料的研究热点为复合支架材料、改善性状及修饰表面的支架材料、仿生支架材料等。

**2.1 复合支架材料** 为了弥补单一材料的不足,制备出理想的软骨组织工程用细胞支架,学者们探索将不同的材料,通过适当的工艺混合,加工制备出新的复合支架材料。Shim 等<sup>[15]</sup>制得壳聚糖-聚乳酸-乙醇酸共聚物复合支架材料,研究发现其韧性和强度比单一材料好,吸水性较聚乳酸-乙醇酸共聚物也有很大提高,软骨细胞接种于该材料上后,表达 II 型胶原

的能力显著提高。

**2.2 改善性状及修饰表面的支架材料** 大部分支架材料本身具有各种不同的缺陷,为了弥补这种缺陷,使种子细胞能更好地在支架上生长、增殖,学者们尝试对支架材料性状进行改善及表面修饰。Chen 等<sup>[16]</sup>将 L-聚乳酸表面进行改性,结果显示能显著促进细胞的增殖。Sato 等<sup>[17]</sup>通过在胶原多孔支架的表面覆盖肝素化的聚苯乙烯膜,然后将软骨细胞种植于该支架上,结果显示细胞分化增殖能力明显提高。对支架材料进行改善性状及表面修饰对材料工程学的要求比较高,需要多种学科协作完成。对这类支架材料的研究应特别注重细胞与生物材料的相互作用,避免生物材料研究与种子细胞研究脱节<sup>[18]</sup>。

**2.3 仿生支架材料** 随着细胞支架制备工艺的进步和材料类型的增多,为了给细胞在体外提供更加理想的生长环境,从而更好地修复缺损组织,学者们构建了具有类似细胞外基质结构及功能的纳米纤维结构支架<sup>[19]</sup>。这种支架有利于细胞在体外的生长、发育及细胞之间的信号传递。

## 3 生长因子

生长因子一般分两大类:①具有促进作用的因子,如转化生长因子、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具有抑制作用的因子,如白细胞介素、肿瘤坏死因子、白血病抑制因子等。生长因子可以直接应用于种子-基质材料-生长因子复合种子细胞的合成。目前应用研究比较热门的生长因子有以下几种。

**3.1 转化生长因子** 转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )是一种细胞生长和细胞外基质合成的多功能调节器,有 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$ 、TGF- $\beta_3$ 、TGF- $\beta_4$  4 种类型。TGF- $\beta$  可以促进软骨细胞增殖,增加蛋白多糖和 II 型胶原合成,抑制成熟软骨细胞增殖和分化,抵抗软骨基质分解代谢,是当前作用最强的生长因子,同时也是强烈的免疫抑制剂。TGF- $\beta$  可以刺激软骨细胞自身蛋白多糖、胶原的合成,也可抑制基质降解<sup>[20]</sup>。目前公认 TGF- $\beta$  在诱导 BMSCs 向软骨细胞转化方面起主要作用,可促进 BMSCs 向软骨细胞分化,并呈剂量依赖性。

**3.2 骨形态发生蛋白** 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)对软骨形成和骨形成都有促进作用,同时对软骨细胞的分化和细胞外基质的合成

也有调节作用。BMP-2 和 BMP-7 对软骨细胞和祖细胞基质的产生均有促进作用,BMP-2 可增强组织金属蛋白酶抑制因子、Sox9 基因、Ⅱ型胶原以及蛋白聚糖的表达;BMP-4 可以刺激糖胺多糖和Ⅱ型胶原等软骨基质的合成,而且能够抑制软骨细胞变肥大。

**3.3 胰岛素样生长因子** 胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)由两种相关多肽组成,即 IGF-1 和 IGF-2,其中前者作用较强。在正常的关节软骨中 IGF 具有维持软骨细胞代谢稳态的作用,对体外蛋白多糖的合成和分解起平衡作用,是主要的促进软骨细胞合成代谢的生长因子。研究表明 IGF 可促进软骨低聚基质蛋白基因的表达,通过分泌软骨低聚基质蛋白从而连接软骨基质中的纤维而促进软骨修复<sup>[21]</sup>。

**3.4 成纤维细胞生成因子** 成纤维细胞生成因子(Fibroblast growth factor, FGF)分为酸性和碱性两种,其中碱性成纤维细胞生长因子作用较强。研究表明 FGF 可以明显促进 BMSCs 向成熟软骨细胞分化<sup>[22]</sup>。

**3.5 软骨源性形态发生蛋白** 软骨源性形态发生蛋白(cartilage-derived morphogenetic protein, CDMP)家族有 3 个成员:CDMP-1、CDMP-2、CDMP-3。CDMP-1 是目前发现与软骨形态发生及发育相关最为特异的一类生长因子,不仅对软骨组织的正常生长起保持作用,尚能对关节软骨损伤起到修复作用。Quan 等<sup>[23]</sup>体外培养人残耳软骨细胞,发现 CDMP-1 对于软骨细胞的增殖和表型的维持起到较大作用。

**3.6 多种生长因子联合应用** 软骨的生长代谢是一个极其复杂的过程,需要多种生长因子的参与。一种细胞可能同时受到多个生长因子的调节,一种生长因子也可以同时作用于多种细胞,不同的生长因子之间相互影响、相互协同或相互拮抗,彼此形成纵横交错的复杂关系。因此,多个因子的联合应用以及其他因素与因子间的相互作用受到研究者的关注。潘海涛等<sup>[24]</sup>实验显示多种生长因子联合应用效果明显优于单独应用其中的一种。

## 4 展 望

软骨组织工程学发展至今,已与临床应用非常接近,但要真正走向临床仍有很多具体的问题需要解决。只有解决了如何进行宏观组织块的体外培养、如何构建能满足体内力学环境要求的成熟的功能化组织工程化软骨<sup>[25]</sup>、组织工程化软骨如何植入体内并

发挥生理功能这 3 个难题,软骨缺损修复的组织工程化才能真正实现。目前来讲,种子细胞的选择以及成熟的组织工程化软骨的体外构建将是研究的热点。相信不久的将来,组织工程化软骨会应用到临床实践中,使软骨损伤的生物修复得以实现。

## 5 参考文献

- [1] Chiang H, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives[J]. J Formos Med Assoc, 2009, 108(2): 87-101.
- [2] Arévalo-Silva CA, Cao Y, Weng Y, et al. The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta porcine chondrocytes and tissue-engineered autologous elastic cartilage[J]. Tissue Eng, 2001, 7(1): 81-88.
- [3] 刘耀升, 刘蜀彬. 软骨组织工程研究中的干细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7): 1334-1337.
- [4] 张玲, 陈长永, 王佳琦, 等. 骨髓间充质干细胞在软骨组织工程化组织构建中的应用[J]. 中国美容医学, 2009, 18(2): 274-277.
- [5] Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications[J]. Gene Ther, 2008, 15(2): 109-116.
- [6] Mauck RL, Yuan X, Tuan RS. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(2): 179-189.
- [7] 马钰, 李青, 赵大庆, 等. 脂肪基质干细胞的分离培养及其作为软骨种子细胞的研究[J]. 细胞与分子免疫学志, 2007, 23(5): 463-465.
- [8] Cui L, Wu Y, Cen L, et al. Repair of articular cartilage defect in non-weight bearing areas using adipose derived stem cells loaded polyglycolic acid mesh[J]. Biomaterials, 2009, 30(14): 2683-2693.
- [9] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells[J]. Keio J Med, 2005, 54(3): 132-141.
- [10] Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(2): 418-429.
- [11] Fecek C, Yao D, Kaçorri A, et al. Chondrogenic derivatives of embryonic stem cells seeded into 3D polycaprolactone scaffolds generated cartilage tissue in vivo[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(8): 1403-1413.

- [17] Belisle AL, Bicos J, Geaney L, et al. Strain pattern comparison of double – and single – bundle anterior cruciate ligament reconstruction techniques with the native anterior cruciate ligament [J]. *Arthroscopy*, 2007, 23 ( 11 ) : 1210 – 1217.
- [18] Adachi N, Ochi M, Uchio Y, et al. Reconstruction of the anterior cruciate ligament. Single – versus double – bundle multistranded hamstring tendons [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2004, 86 ( 4 ) : 515 – 520.
- [19] Noyes FR, Schipplein OD, Andriacchi TP, et al. The anterior cruciate ligament – deficient knee with varus alignment. An analysis of gait adaptations and dynamic joint loadings [J]. *Am J Sports Med*, 1992, 20 ( 6 ) : 707 – 716.
- [20] Lee MC, Jo H, Bae TS, et al. Analysis of initial fixation strength of press – fit fixation technique in anterior cruciate ligament reconstruction. A comparative study with titanium and bioabsorbable interference screw using porcine lower limb [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2003, 11 ( 2 ) : 91 – 98.
- [21] Miller MD, Cole BJ. Textbook of Arthroscopy [M]. 朱振安, 王友, 译. 北京: 人民军医出版社, 2008: 40.
- [22] 余家阔, Paessler HH. 四股腘绳肌腱重建膝前交叉韧带

后骨隧道增宽与术后康复程序的关系 [J]. *中华外科杂志*, 2004, 42 ( 16 ) : 984 – 988.

- [23] Caborn DN, Selby JB. Allograft anterior tibialis tendon with bioabsorbable interference screw fixation in anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *Arthroscopy*, 2002, 18 ( 1 ) : 102 – 105.
- [24] Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo [J]. *Rheumatology ( Oxford )*, 2008, 47 ( 2 ) : 126 – 131.
- [25] 胡钢锋, 陈江涛, 毕大卫, 等. 自体肌腱重建膝前交叉韧带的研究进展 [J]. *中医正骨*, 2010, 22 ( 2 ) : 31 – 34.
- [26] Fahey M, Indelicato PA. Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament replacement [J]. *Am J Sports Med*, 1994, 22 ( 3 ) : 410 – 414.
- [27] Tomford WW. Principles of preservation of soft tissue allografts [J]. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 1998, 6 ( 2 ) : 124 – 130.
- [28] Maletius W, Gillquist J. Long – term results of anterior cruciate ligament reconstruction with a Dacron prosthesis. The frequency of osteoarthritis after seven to eleven years [J]. *Am J Sports Med*, 1997, 25 ( 3 ) : 288 – 293.

(2010-06-29 收稿 2011-02-17 修回)

(上接第 25 页)

- [12] Pufe T, Petersen W, Fändrich F, et al. Programmable cells of monocytic origin ( PCMO ) : a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II – producing chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26 ( 3 ) : 304 – 313.
- [13] Choi YS, Im MW, Kim CS, et al. Chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood – derived multilineage progenitor cells in atelocollagen [J]. *Cytherapy*, 2008, 10 ( 2 ) : 165 – 173.
- [14] Degistirici O, Jäger M, Knipper A. Applicability of cord blood – derived unrestricted somatic stem cells in tissue engineering concepts [J]. *Cell Prolif*, 2008, 41 ( 3 ) : 421 – 440.
- [15] Shim IK, Lee SY, Park YJ, et al. Homogeneous chitosan – PLGA composite fibrous scaffolds for tissue regeneration [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84 ( 1 ) : 247 – 255.
- [16] Chen R, Curran SJ, Curran JM, et al. The use of poly ( l – lactide ) and RGD modified microspheres as cell carriers in a flow intermittency bioreactor for tissue engineering cartilage [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 ( 25 ) : 4453 – 4460.
- [17] Sato M, Ishihara M, Ishihara M, et al. Effects of growth factors on heparin – carrying polystyrene – coated atelocollagen scaffold for articular cartilage tissue engineering [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 83 ( 1 ) : 181 – 188.
- [18] 张厚安, 李敏, 唐思文. 骨组织工程用细胞支架生物材料

的研究进展 [J]. *机械工程材料*, 2007, 31 ( 12 ) : 4 – 7.

- [19] Vasita R, Shanmugam IK, Katt DS. Improved biomaterials for tissue engineering applications; surface modification of polymers [J]. *Curr Top Med Chem*, 2008, 8 ( 4 ) : 341 – 353.
- [20] Kramer J, Böhrnsen F, Schlenke P, et al. Stem cell – derived chondrocytes for regenerative medicine [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38 ( 3 ) : 762 – 765.
- [21] Tian H, Stogiannidis I. Up – regulation of cartilage oligomeric matrix protein gene expression by insulin – like growth factor – I revealed by real – time reverse transcription – polymerase chain reaction [J]. *Acta Biochim Biophys Sin ( Shanghai )*, 2006, 38 ( 10 ) : 677 – 682.
- [22] Kanematsu A, Marui A, Yamamoto S, et al. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor [J]. *J Control Release*, 2004, 99 ( 2 ) : 281 – 292.
- [23] Quan YZ, Zhuang HX, Liu T, et al. The experimental study on the effect of CDMP – 1 on proliferation of residual ear chondrocytes of microtia cultured in vitro [J]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 2007, 23 ( 3 ) : 241 – 243.
- [24] 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.
- [25] Yow KH, Ingram J, Korossis SA, et al. Tissue engineering of vascular conduits [J]. *Br J Surg*, 2006, 93 ( 6 ) : 652 – 661.

(2010-10-22 收稿 2010-11-15 修回)