

综述

髓核组织工程支架材料的研究进展

陈 竹^{1,2}, 刘 康^{1,2}, 林 宏¹, 罗翔伟², 冯 刚^{1,2}

(1 南充市中心医院骨科 637000; 2 川北医学院组织工程与干细胞研究所 637000 南充市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.09.19

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-09-0788-04

椎间盘退行性病变是一类高发病率和高致残率疾病, 由于椎间盘退变中晚期, 髓核组织往往已经发生了不可逆退变或损坏, 常规的临床治疗手段较难恢复其结构和功能, 而利用组织工程学方法重建具有生物学功能髓核组织成为研究方向之一。髓核组织工程支架是髓核组织工程的重要组成部分, 构建的髓核组织工程支架应模拟髓核的生长环境, 为种子细胞提供粘附增殖的空间, 可促进细胞的增殖分化, 最终形成人造髓核^[1-3]。组织工程支架主要分为天然生物材料支架和人工合成材料支架, 作者就其研究进展综述如下。

1 天然生物材料支架

1.1 壳聚糖及其衍生物

壳聚糖是一种聚阳离子体, 由甲壳素经脱乙酰反应后得到。由于壳聚糖具有抗菌、可降解的性能, 且其生物相容性较好, 因此被广泛的应用于生物医学领域, 尤其是用于制备组织工程支架。研究者常常利用壳聚糖的氨基与其他基团反应, 生成温敏型水凝胶。温敏凝胶可以随着温度变化而发生溶胶-凝胶变化, 由于支架在体内的凝胶态可以较好地模拟天然髓核的凝胶态, 故常被用于制备可注射型髓核支架^[4-6]。Roughley 等^[7]将磷酸甘油钠与壳聚糖混合, 制备出包裹细胞的组织工程支架, 研究者在支架上分别培养髓核细胞和纤维环细胞, 结果表明这种水凝胶支架可以较好地保留髓核细胞分泌出的细胞外基质, 也更有利于髓核细胞的再生。壳聚糖-磷酸甘油混合支架不仅能促进髓核细胞生长, 还具有一定的诱导作用, 可诱导干细胞向髓核和软骨分化。Richardson 等^[8]将间充质干细胞种植到壳聚糖-磷酸甘油支架上, 发现间充质干细胞在支架上培养 4 周后, 能表达出髓核和软骨细胞的特异性基因 SOX-9、COL II 和 Aggrecan, 表明这种支架可以诱导干细胞向髓核和软骨分化。壳聚糖支架的缺陷在于其机械性能较差, 且在生理环境中降解过快, 不能完全满足组织工程髓核支架的需求, 这也限制了壳聚糖支架的进一步应用。

1.2 细胞外基质支架

细胞外基质不仅是一种结构成分, 也是一种信息联络方式, 这种信息在引导细胞分化和组织构成上起重要作用^[9]。基于此, 研究者利用细胞外基质作为原料制备髓核组织工程支架: 一方面这样的支架包含细胞表面受体的特异识别位点, 可以很好的保存种子细胞而不流失, 且抗原性较弱, 不易引起排斥反应, 具有良好的组织相容性; 另一方面该基质的支架更为接近髓核细胞的生长微环境, 有利于细胞在支架上的粘附、生长和分化; 还能进一步将合成的天然细胞外基质作为支架使细胞聚集而构建组织, 控制组织结构并调控细胞表型^[9]。目前以细胞外基质作为髓核支架材料是髓核组织工程的研究方向之一。

1.2.1 单一的细胞外基质支架 髓核的细胞外基质主要包括胶原 II、透明质酸、硫酸软骨素。胶原 II 占正常髓核干重的 20%~25%, 随着椎间盘退行性病变的发生, 胶原 II 逐渐被胶原 I 所替代。近年来, 胶原常被用于制备组织工程支架。端胶原是胶原的一种衍生物, 具有温度敏感性, 在 4℃ 以下保持液体状态, 而在 37℃ 下可以转变为凝胶, 这种溶胶-凝胶的转变使得端胶原可以作为可注射的髓核组织工程支架。Daisuke 等^[10]以海藻酸盐支架作为对照组, 考察了端胶原作为髓核支架的可行性, 结果表明, 在端胶原支架上生长的髓核组织的水溶性较好, 能较好地保留髓核分泌的蛋白多糖, 从而更有利于髓核组织的再生。

透明质酸(hyaluronan, HA)是一种广泛存在于哺乳动物中的细胞外基质, 也是髓核细胞外基质的重要成分之一, 在组织的生长和再生中起着重要作用。目前已有商用的透明质酸支架 HYADD3[®] 和 HYAFF120[®]。Antonio Gloria 等^[11]对 HA 及其衍生物 HYADD3[®] 和 HYAFF120[®] 支架的力学性能进行了考察, 结果示支架随着 HA 含量的增加支架的储存模量和耗损模量逐渐增加, 这些支架的流变学性能与天然髓核组织相似, 并且这些性质在注射入人体后不会改变。

1.2.2 复合的细胞外基质支架 单纯的细胞外基质作为髓核支架材料并不能较好地满足其生物学和力学的要求, 因此研究者趋向于将多种髓核外细胞基质混合制备髓核支架, 改善单一基质作为支架材料的缺陷, 从而较好地模拟髓核生长环境, 以满足髓核再生的需要。以 HA 为例, 研究表明单纯 HA 制备的支架容易被人体组织基质内广泛

第一作者简介: 女(1984-), 研究实习员, 硕士, 研究方向: 组织工程与干细胞

电话: (0817)2258108 E-mail: jessicachen1984@gmail.com

通讯作者: 冯刚 E-mail: genecloner@163.com

存在的透明质酸酶降解,不利于组织的再生^[12,13]。故 Laura 等^[14]以 1-乙基(3-氨基丁基)碳二亚胺(EDC)和羟基丁二酰亚胺(NHS)为交联剂,将 HA 与胶原 II 交联,制备了髓核组织工程支架,该支架具有三维多孔的结构特点,且支架的孔隙可通过交联剂的浓度进行调节;随着胶原 II 的加入,支架在较大程度上模拟了髓核的生长环境,髓核细胞在支架上生长良好,并且可以分泌出髓核细胞特有的细胞外基质胶原 II、胶原 I 和 Aggrecan。Huang 等^[15]利用胶原 II-透明质酸-硫酸软骨素制备了三维髓核支架,在其上种植兔髓核细胞,培养 28d,MTT 试验表明细胞在支架上生长状况良好,支架具有良好的生物相容性;通过 PCR 检测细胞的基因表达情况,结果表明髓核细胞表现出较高胶原 II 和 Aggrecan 表达,而胶原 I 的表达量较小。Damien 等^[16]考察了端胶原 II、透明质酸、Aggrecan 混合制备髓核支架的生物学性能,实验考察了支架的生物相容性和再生组织分泌蛋白聚糖的情况,发现在 2d 时的细胞培养中,单纯胶原支架内细胞贴壁最少,随着支架中成分的增加,髓核细胞的贴壁率逐渐增加;在支架的生物相容性和再生组织分泌蛋白聚糖实验中得到同样的结果。

近年来也有人不经交联制备支架,而是直接将动物髓核处理后作为髓核支架。Jeremy 等^[17]直接取猪的髓核,通过物理化学处理后,去除组织中的细胞和其他杂质,只保留细胞外基质,并在该支架上种植髓核细胞,与一般的髓核支架相比,该支架在溶胀性和力学性能上没有明显的差别,有利于人的脂肪干细胞的粘附生长和分化。

2 人工合成材料支架

天然支架材料能够在生物学性能上较好地模拟髓核,但是天然材料的缺陷在于其力学性能较差。目前来说,天然材料制备的髓核支架在力学性能上都与天然髓核存在一定差距^[18-21]。为了改善髓核支架的力学性能,一些人工合成的材料也被用于制备髓核支架。Boelen 等^[22]将 2-(4'-碘代苯甲酰基)-氧乙基-甲基丙烯酸酯(4IEMA)接枝到乙烯吡咯烷酮(NVP)与羟乙基甲基丙烯酸(HEMA)上,生成两种不同的髓核支架材料,这种支架材料呈凝胶状、无毒并且生物力学性能良好。研究者^[23]考察了支架的机械性能、流变学性能,并且对不同 4IEMA 含量的支架进行了力学性能的分析对比,天然髓核的杨氏模量一般在 0.2~4MPa 之间,而 NVP 含量为 95%的支架和 HEMA 含量为 95%的杨氏模量均在这个范围之内,而天然的髓核的剪切模量和相角一般为 11kPa 和 24°,就这两种材料的流变学性能来说,其剪切模量都较天然髓核略高,而 HEMA 为基础制备的支架相角则与天然髓核相近。综合目前材料来看,这两种支架的生物力学性能上优于天然支架,与天然髓核的力学性能相近,是一种良好的髓核支架。

聚磷酸酯的 Ca/P 比值为 0.5,具有骨诱导性;并且具有多孔三维立体的结构,被广泛应用于骨组织工程^[24,25]。近年来有文献报道这种材料在体外可以促进软骨细胞的生

长,由于聚磷酸钙具有多孔的结构,可以模拟髓核的渗透性,因此也有人利用聚磷酸钙作为髓核支架^[26]。Séguin 等^[27]将聚磷酸钙粉末制备成薄片,在薄片表面种植牛的髓核细胞,培养 6 周后发现髓核在支架表面形成连续的组织,并且分泌出髓核的标志性蛋白聚糖;支架的强度、粘度与天然髓核并没有明显的差异。Darla 等^[28]将聚磷酸钙支架与细胞共同培养相结合,先在其上种植软骨细胞,培养使之形成透明软骨后再种植髓核细胞,培养 8 周后发现软骨细胞与髓核细胞共同培养,可增加髓核细胞的贴壁率,并且植入的髓核细胞生成了三维立体结构。但由于聚磷酸酯目前主要通过缩聚反应得到,产物分子量较低,加工性能较差,影响了聚磷酸酯的应用,改进合成技术,得到高分子量的聚合物是聚磷酸酯在组织工程领域应用的关键。

3 天然-人工复合材料

一个好的组织工程支架应该具有以下几个基本特点:(1)良好的生物相容性,无细胞毒性并能促进种子细胞的粘附生长;(2)具有与所构建的组织相似的力学性能;(3)材料可以降解,且降解速度与组织生成速度相一致。天然支架材料具有良好的生物相容性,尤其是混合多种髓核细胞外基质制备的支架,在生物成分上较大幅度地接近髓核的生长环境,并且具有一定的诱导性,对髓核组织的再生十分有利。但如前所述,其缺陷在于其力学性能较差,大部分天然材料制备的髓核支架都与生理状态的髓核有着较大的差距。人工合成的支架材料在力学性能上可以较大幅度的接近生理状态的髓核,但是其生物相容性较差,常常有一定的细胞毒性。天然-人工复合材料制备的组织工程支架相较于单一的支架,在生物学性能和力学性能上都能得到一定程度的改善,可较好地满足组织工程支架的要求。Alejandro 等^[29]将胶原与聚合物 poloxamine 混合制备组织工程支架,细胞毒性试验表明支架的细胞存活率可达 91%,力学测试表明支架的弹性模量和粘性模量增加了近 100 倍,材料的力学性能得到了较大改善。Yue 等^[30]将明胶和纳米羟基磷灰石共混制备组织工程骨支架,并对材料生物学性能和力学性能进行了考察。结果表明,支架与人骨髓干细胞共同培养 7 天后,支架细胞的生长状况明显优于对照组,表现出良好的生物相容性,材料的压缩模量为 1.98MPa,与天然骨的力学性能接近,能够满足骨组织工程支架的力学需要。为了得到同时兼具生物学和力学性能的支架,研究者也尝试将天然材料与人工合成材料混合,制备髓核组织工程支架。Su 等^[31]将透明质酸与脂肪酸酰肼反应生成新的聚合物,这种材料具有凝胶的特性,研究者在材料中包裹髓核细胞,考察其作为髓核支架的性能。比较不同 HA 和 ADH 含量支架的力学性能,结果表明,当 HA 含量为 6%时,支架的剪切模量为 11kPa,相角为 17.3°,均接近天然髓核的力学性能;细胞毒性试验表明随着 HA 含量的提高,材料的细胞毒性明显降低;考察髓核细胞在支架上的生长情况,结果表明 HA-ADH 支架上生长的细胞

分泌出更多的胶原Ⅱ,更有利于髓核细胞的生长分化。目前看来,这种天然材料与人工合成材料混合制备的髓核支架才能最大限度的满足髓核组织工程支架对生物学和力学的要求,更有利于再生髓核的构建。混合材料制备髓核支架将是髓核支架研究的重要趋势之一,将为髓核组织工程提供新的发展思路。

4 参考文献

1. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering [J]. J Biomed Mater Res, 2001, 55(2): 141-150.
2. Sachlos E, Czernuska JT. Making tissue engineering scaffold work: review on the application of SFF technology to the production of tissue engineering scaffolds [J]. Eur Cell Mater, 2003, 5: 29-40.
3. Liu C, Xia Z, Czernuska JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering [J]. Chem Eng Res and Des, 2007, 85(7): 1051-1064.
4. Park KM, Lee SY, Joung YK. Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration [J]. Acta Biomater, 2009, 5(6): 1956-1965.
5. Tan H, Chu CR, Payne KA. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering [J]. Biomaterials, 2009, 30(13): 2499-2506.
6. Qiu XJ, Jing D, Xiao MX. Biocompatibility of a chitosan-based injectable thermosensitive hydrogel and its effects on dog periodontal tissue regeneration [J]. Carbohydr Polym, 2010, 82: 1153-1160.
7. Roughley P, Hoemann C, Desrosiers E. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 388-396.
8. Richardson SM, Hughes N, Hunt JA. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels [J]. Biomaterials, 2008, 29(1): 85-93.
9. Sell S, Barnes C, Smith M, et al. Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers [J]. Polym Int, 2007, 56(11): 1349-1360.
10. Daisuke S, Jo JM, Toru I. Atelocollagen for culture of human nucleus pulposus cells forming nucleus pulposus-like tissue in vitro: influence on the proliferation and proteoglycan production of HNPSV-1 cells [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 346-353.
11. Antonio G, Assunta B. Rheological characterization of hyaluronic acid derivatives as injectable materials toward nucleus pulposus regeneration [J]. J Biomater Appl, 2010, 12 (Epub ahead of print).
12. Maleki A, Kjøniksen AL, Nyström B. Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different crosslinker agents [J]. Carbohydr Res, 2007, 342(18): 2776-2792.
13. Nobuhiko Y, Teruo O, Yasuhisa S. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels [J]. J Control Release, 1992, 22(2): 105-116.
14. Laura C, Estelle C, Diego VB, et al. Type II collagen-hyaluronan hydrogel a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering [J]. Eur Cells Mater, 2010, 20: 134-148.
15. Huang B, Li CQ, Zhou Y. Collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-Sulfate tri-copolymer scaffold for nucleus pulposus tissue engineering [J]. J Biomed Mater Res Part B, 2009, 8(2): 322-331.
16. Damien OH, Sibylle G, Martin S. An injectable cross-linked scaffold for nucleus pulposus regeneration [J]. Biomaterials, 2008, 29(4): 438-447.
17. Mercuri JJ, Gill SS, Simionescu DT. Novel tissue-derived biomimetic scaffold for regenerating the human nucleus pulposus [J]. J Biomed Mater Res A, 2011, 96(2): 422-435.
18. Nandan LN, Dawn ME, Robert LM. Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering [J]. J of Biomech, 2010, 43(6): 1017-1030.
19. Bron JL, Koenderink GH, Everts V, et al. Rheological characterization of the nucleus pulposus and dense collagen scaffolds intended for functional replacement [J]. J. Orthop Res, 2009, 27(5): 620-626.
20. Chou AI, Akintoye SO, Nicoll SB. Photo-crosslinked alginate hydrogels support enhanced matrix accumulation by nucleus pulposus cells in vivo [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(10): 1377-1384.
21. Reza AT, Nicoll SB. Characterization of novel photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels for encapsulation of nucleus pulposus cells [J]. Acta Biomater, 2010b, 6(1): 179-186.
22. Erik JH, Boelen, Catharina SJ, et al. Intrinsically radiopaque hydrogels for nucleus pulposus replacement [J]. Biomaterials, 2005, 26(33): 6674-6683.
23. Iatridis JC, Weidenbaum M, Seton LA, et al. Is the nucleus pulposus a solid or a fluid mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc [J]. Spine, 1996, 21(10): 1174-1184.
24. Grynaps MD, Pilliar RM, Kandel RA, et al. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications in vivo studies [J]. Biomaterials, 2002, 23(9): 2063-2070.
25. Pilliar RM, Filiaggi MJ, Wells JD, et al. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications; in vitro characterization [J]. Biomaterials, 2001, 22(9): 963-972.
26. Waldman SD, Grynaps MD, Pilliar RM, et al. Characterization of cartilaginous tissue formed on calcium polyphosphate substrates in vitro [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 62(3): 323-330.
27. Séguin CA, Grynaps MD, Pilliar RM, et al. Tissue engineered nucleus pulposus tissue formed on a porous calcium polyphosphate substrate [J]. Spine, 12(29): 1299-1307.
28. Darla JH, Cheryle AS, Jian W. Formation of a nucleus pulposus-cartilage endplate construct in vitro [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 397-405.
29. Alejandro S, Michael VS. Semi-synthetic collagen/polyoxamine matrices for tissue engineering [J]. Biomaterials, 2005, 26(35): 425-435.
30. Yue L, Yun L. Segmental bone regeneration using an rhBMP-2-loaded gelatin/nanohydroxyapatite/fibrin scaffold in a rabbit model [J]. Biomaterials, 2009, 30(31): 6276-6285.
31. Su WY, Chen YC, Lin FH. Injectable oxidized hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel for nucleus pulposus regeneration [J]. Acta Biomater, 2010, 6(8): 3044-3055.

(收稿日期: 2011-03-01 修回日期: 2011-04-12)

(本文编辑 刘彦)