

·学科进展·

# 神经、骨及软骨组织工程学研究进展

杨志明

(华西医科大学附属第一医院,成都 610041)

**[摘要]** 组织工程化骨和软骨组织已初步用于临床修复骨和软骨缺损,显示了临床应用前景。在周围神经的组织工程研究中,已建立了 MSC 800 永生雪旺细胞系。用多孔、中空纤维管复合多种细胞外基质和雪旺细胞,有显著促进神经再生作用。用不同来源的成骨细胞与不同组成成分和结构的支架复合,在体内和体外都观察到成骨现象。在动态压力下培养软骨细胞,与高分子支架材料复合培养形成的软骨组织具有更好的形态和功能。

**[关键词]** 组织工程,骨,软骨,周围神经

组织工程学是 20 世纪 80 年代末期发展起来的一门新兴边缘学科。它是综合应用工程学和生命科学的基本原理、基本理论、基本技术和基本方法,在体外预先构建有生命的种植体,然后植入体内,修复组织缺损,替代组织、器官的一部分或全部功能。由于它是多学科高技术的开发及综合利用,因此具有强大的生命力,已成为经济发达国家如美国、日本、加拿大、澳大利亚及欧洲一些国家优先研究的重要领域,并且已取得十分突出的成果,某些领域已开始临床应用,极大地促进了临床医学的发展。

## 1 有关的背景

随着社会的发展与进步,疾病构成谱发生了改变。就临床医学骨科学而言,由于创伤,退行性改变引起的骨、软骨、神经等组织缺损,已成为导致残废,影响生活质量的重要原因。游离植皮术成功以后,就开始了自体组织移植,即在功能相对不太重要的部位切取组织修复缺损的部位,重建部分功能。在美国,用于修复骨缺损的植骨术是仅次于输血的组织移植。虽然总的临床效果较满意,但供体组织十分有限,且切取自体组织是一种创伤,有增加患者痛苦及并发症的危险,是一种以牺牲自体部分组织为代价的“以伤治伤”的办法,很多患者不能接受。本世纪 50 年代以后,即有人开始进行同种异体<sup>[1]</sup>、异

种组织(器官)移植的研究<sup>[2]</sup>,由于免疫排斥反应及供者来源的限制,同种异体移植只能挽救部分患者的生命。由于需长期使用免疫抑制剂,常导致致命的并发症。异种移植虽已被列入很多国家的重要研究领域,但远未达到临床适用阶段。因此,寻找创伤小,副作用少,方便适用的组织缺损的修复方法就成为重要的研究课题,于是人工材料体内植入,修复组织缺损及替代部分功能的研究被提到了科学研究的前沿。从 70 年代起,美国、日本、欧洲等已在进行生物玻璃陶瓷人工骨的研究。我国在 80 年代也开始了这方面的研究,到目前为止,能与人体组织愈合,引导或诱导细胞(组织)再生的适用型人工材料种类极为有限,远远不能满足临床医学的需要,且有很多科学问题尚需进一步研究。

70 年代出现了将分离、培养的软骨细胞与脱钙骨支架联合培养,试图研制软骨组织,结果失败,但这却是组织工程学的开端,为后来组织工程学的形成、发展提供了新的思路。根据不同的组织缺损,选择不同的支架材料和种子细胞,构建多种组织或器官,或许是修复人体组织、器官缺损的最理想方法。

## 2 国内外研究现状

虽然组织工程学正式提出来仅有 10 年时间,但

国家自然科学基金资助项目,批准号 39830100。

本文于 1998 年 12 月 28 日收到。

却很快成为世界各国的热门研究课题。走在世界前列的是美国。1988年,美国就以国家科学基金会(National Science Foundation)资助建立了一系列实验室。很多公司也以重金投入进行研究,如Medtronic公司向德克萨斯州伍德兰兹的Life cell公司投资2600万美元;Stryker公司资助马萨诸塞州霍普金顿的Creative BioMolecules公司骨组织工程研究;英国Smith Newpew公司投资7000万美元进行组织工程研究等,其研究领域涉及到骨、软骨、肌腱、韧带、神经、血管、皮肤、肌肉等。现现就周围神经、骨及软组织工程的研究进展综述如下。

### 2.1 周围神经的组织工程学研究

周围神经由于其解剖结构、功能的特殊性,损伤后修复效果不好。由于神经损伤后的肌肉麻痹及感觉障碍,是导致残废的主要原因。周围神经缺损的修复经历了自体神经移植、同种异体神经移植、自体非神经组织移植、人工材料替代等阶段,但功能恢复率在70%左右。1979年Aguayo<sup>[3]</sup>将体外培养的乳鼠雪旺细胞种植到5mm长的血管段中,然后桥接大鼠的神经缺损,3—6周后取材,发现桥接体内有大量神经纤维再生,这为神经组织工程学的进一步研究奠定了基础。以后,在修复神经缺损的支架材料方面,先后使用了PAV/PNC管,变性骨骼肌,羊膜基底膜,聚丙烯/聚丙烯腈,I型胶原等。Plant<sup>[4]</sup>研究了一种多孔的聚甲基丙烯酸羟乙酸多孔纤维管,孔隙率为75%,孔径为10 $\mu\text{m}$ 以上,种植入雪旺细胞后桥接神经缺损,可显著促进神经轴突的再生。

在支架材料中,必须种植入一定数量的雪旺细胞,并且要使种植的雪旺细胞长期成活,分泌多种营养因子、生长因子,才能保护脊髓神经元,促进损伤神经的再生,其中细胞的数量及长期存活是发挥生理功能的关键。已有研究表明,至少以 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 浓度的雪旺细胞所分泌的神经营养因子、神经生长因子才能保护脊髓神经元、促进神经再生。在管状支架材料中复合雪旺细胞分泌的细胞外基质,如层粘连蛋白(Laminin)纤维连接蛋白(Fibronectin FN) I、IV型胶原凝胶、硫酸肝素蛋白等对植入雪旺细胞的成活、保护神经元、促进神经再生有十分重要的作用。

雪旺细胞是周围神经组织工程研究必须的种子细胞。研究发现,在传代一定代次以后,雪旺细胞的形态和功能都将发生改变。为获得雪旺细胞长期传代、保持功能,Gansmuller<sup>[5]</sup>建立了MSC 800永生雪旺细胞系。采用基因工程技术,将多种神经营养因

子基因转染入永生化雪旺细胞,获得既永生、又有高分泌功能的雪旺细胞,为周围神经组织工程研究提供了很好的种子细胞。

从临床应用的实际需要出发,用自体雪旺细胞虽然有无抗原性的优点,但却需预先切取自体神经分离培养、纯化、扩增雪旺细胞,对患者导致新的创伤。因此有不少研究者对异体及异种雪旺细胞移植进行了研究。Kim<sup>[6]</sup>用鼠雪旺细胞作同种异体移植修复坐骨神经缺损,发现再生神经的动作电位和神经传导速度与自体神经移植相当,骨髓纤维数多于自体移植组,且在移植后120天,鼠雪旺细胞仍然存活。Levi和Bunge<sup>[7]</sup>用人周围神经的髓鞘蛋白P<sub>0</sub>的单克隆抗体检测人胚胎雪旺细胞植入鼠坐骨神经,也证明这种异种移植的雪旺细胞能够成活,并参与了再生神经纤维的髓鞘形成。1997年Hermann<sup>[8]</sup>将成年鼠和成人的周围神经来源的雪旺细胞的混合悬液植入鼠的颞叶,发现有MHC I类和II类抗原的表达,而将鼠的雪旺细胞移植到人,则未见明显免疫反应,表明同种和异种雪旺细胞移植,即使在不使用免疫抑制剂情况下,也不发生明显免疫反应而能长期存活。

### 2.2 骨组织工程学研究

自1984年分离、培养成功成骨细胞之后,即开始了骨的组织工程学研究。1989年Lang<sup>[9]</sup>从新生小鼠中分离培养成骨细胞,与羟基磷灰石(HA)、明胶复合后植入同种系小鼠内,发现能明显提高新的骨组织重建。但Bagambisa<sup>[10]</sup>发现成骨细胞对材料有选择性。因此,骨组织工程学研究主要集中在支架材料的构建、种子细胞的筛选和标准化,以及细胞与支架材料间作用机制的研究方面。

人体骨骼的主要功能是支持、承重、力的传导、保护内脏器官等,因此要求骨组织工程研究的支架材料应具有一定的抗压、抗张及抗扭转能力,既要有一定的强度,又要有一定的韧性。

在骨组织工程的研究中,已经采用了陶瓷类材料,如羟基磷灰石(Hydroxyapatite HA),双相羟基磷灰石(Biphasic calcium phosphat BCP),生物活性玻璃陶瓷(Bioactive glass ceramic BGC)等;高分子合成材料,如聚乳酸(Polylactic acid PLA),聚羟基乙酸(Polyglycolic acid PGA),以及它们的共聚物PLGA等;复合材料,如HA与PLA复合,HA与胶原复合,聚丙烯延胡索酸(Poly-propylene fumarate PPF)与不饱和直链多酯, $\beta$ -磷酸三钙复合物等。Niederauer将不同比例的PLA、PGA与生物活性玻璃陶瓷复合,制成

的新型支架材料,增加了存储模量及力学性能<sup>[11]</sup>。Maxian将5% HA,10% PLGA与1% I型胶原复合形成的新型支架材料改善了力学性能,具有诱导骨再生能力<sup>[12]</sup>。这些基本材料通过不同的设计,不同比例的复合,不同的制作工艺,可以达到接近正常骨的框架结构、孔隙、孔径及一定的生物力学强度,并有利于成骨细胞粘附、促进细胞分裂、增殖及DNA合成,提高碱性磷酸酶活性。

为骨组织工程研究的种子细胞是成骨细胞,它可从外骨膜、内骨膜、骨小梁、骨髓中分离培养。从骨髓中分离培养基质干细胞,由于干细胞的多分化潜能,在一定条件下向成骨细胞转化,是构建组织工程化骨组织的重要细胞<sup>[13]</sup>。更由于骨髓可从患者的髌骨中穿刺获得,因此最有可能作为自体细胞构建的组织工程化骨应用于临床。在最近的一项不同来源成骨细胞的体外比较研究中发现<sup>[14]</sup>,在培养条件下,骨髓基质干细胞、松质骨成骨细胞和骨膜成骨细胞的增殖能力以骨髓干细胞为最好,而胶原的合成能力,骨钙素的表达及ALP活性以骨膜成骨细胞为最好,钙化能力以骨膜和骨松质成骨细胞为最好。

成骨细胞与支架材料的三维培养受多种因素的影响,包括材料的理化性质,表面微结构及微环境。研究发现,复合陶瓷材料表面的微碱性环境有利于成骨细胞的增殖与粘附;氟元素能促进DNA合成,并提高ALP活性。胶原在骨结合素作用下,与钙结合,能引导骨再生。支架材料合适的表面结构、孔隙、孔径等都是影响成骨细胞粘附、增殖、发挥生理功能的重要因素。Garcia等<sup>[15]</sup>将纤维连接蛋白吸附在生物活性玻璃上,发现成骨细胞的粘附增加了,并证明是由于成骨细胞的FN受体与FN之间的相互作用的结果。邹力等<sup>[16]</sup>将兔的骨膜成骨细胞与磷酸钙陶瓷复合后,行同种异体移植,不仅附着在材料上的细胞成活,还能形成板层骨。

组织工程化管状骨由于所使用的支架材料量多,必需较快地血管化,才能使其成活,与受体骨愈合及发挥生理功能。曹谊林将复合有胎牛骨膜成骨细胞的可降解材料包裹裸鼠股动、静脉血管束,12周时,形成了带血管蒂的新的组织工程骨。华西医科大学将复合有成骨细胞及血管内皮细胞生长因子的管状中空钙磷陶瓷材料中间植入血管束,也形成了有血供的组织工程骨,为临床应用提供了血管化方法。Breitbart等将从新西兰白兔骨膜分离的成骨细胞经标记后,与PGA支架材料复合,修复兔颅骨

15 mm直径的全层缺损,12周时已有大量新骨,用免疫荧光法检查,发现新骨由植入细胞形成<sup>[17]</sup>。由Creative BioMolecules公司的研究者用成骨细胞与加入OP-1的含钙的多孔材料联合培养制成的组织工程化骨,修复122例胫骨骨折患者,取得了与自体植骨相同的临床效果<sup>[18]</sup>,展示了临床应用前景。

### 2.3 软骨组织工程学研究

组织工程软骨是第一个组织工程化组织。自Wakitani 1989年将分离培养的软骨细胞种植入胶原中联合培养获得成功<sup>[19]</sup>,软骨组织工程研究发展非常迅速。由于软骨组织为单一细胞成分(软骨细胞),与多细胞成分的组织相比,构建相对较为容易。人体软骨在关节部位,主要承受压应力;在体表部位如耳壳,主要起支撑作用。因此,在构建组织工程化软骨选择支架材料时,应考虑到不同的部位及不同的功能。先后有采用胶原凝胶、纤维蛋白、PLA、PGA以及PLA/PGA共聚物PLGA等。由于PLGA的降解速度可由PLA与PGA的比例及它们的分子量来控制,因此是软骨组织工程研究的主要支架材料。在成形加工工艺方面,可采用铸模、纺丝编织等。根据不同需要,可成形为膜、海绵状、棒、块等。用于关节软骨修复多为块形或海绵形,用于气管缺损修复为螺纹形,用于肋软骨修复为块形,用于耳壳成形则铸造成耳壳外形。Cao将猪的肋软骨分离培养软骨细胞,分别与PGA, Calcium alginate和Pluronic复合植入自体皮下,发现Pluronic为支架的组织为弹力软骨,而PGA和 Calcium alginate为支架的组织为纤维软骨<sup>[20]</sup>,表明支架材料对组织的形成有明显影响。王跃等<sup>[21]</sup>将人胚胎软骨细胞种植入胶原海绵中,再植入裸鼠体内,也形成了透明软骨。

软骨组织工程的种子细胞是软骨细胞,可由关节软骨、髌板软骨、软骨膜等分离培养获得。传统的平面培养方法能获得单层细胞,贴壁后代谢率低,逐渐呈去分化现象,主要合成I型胶原,不能形成组织工程化软骨<sup>[22]</sup>。采用高密度和悬浮培养方法,则能获得形态与功能都很稳定的软骨细胞。Buschman等<sup>[23]</sup>发展了一种压力装置培养软骨细胞,发现在静态压力下,不利于细胞外基质的合成,而动态压力下则有利于合成基质。以后则研制成多种动态细胞培养装置,并发现在这种环境下培养,软骨细胞增殖能力及分泌糖胺多糖能力均强,而糖胺多糖又是软骨的主要细胞外基质。Sittinger采用了灌注培养系统<sup>[24]</sup>,能在长期培养中提供稳定的pH和营养物质。

Kato在1988年利用离心管内软骨细胞培养技

术,成功地培养出类软骨组织,颜炜群<sup>[25]</sup>在此基础上,研究了多种生长因子对软骨细胞的调控作用,成功地构建了骺板软骨,这是一种没有支架材料的由软骨细胞形成软骨组织的新方法。Shukunami等<sup>[26]</sup>从胎牛骺软骨中提纯一种软骨特异性功能基质 Chondromodulin-1 (ChM-1),是一种 25kDa 糖蛋白,在兔的软骨细胞培养中,发现 ChM-1 的表达显著高于成纤维细胞生长因子-2、 $\beta$  转移生长因子和甲状旁腺激素相关肽,并证明 ChM-1 能促进兔软骨细胞生长和克隆形成。

实用的组织工程化软骨需经过动物实验验证其体内表现。目前已形成了关节软骨、气管软骨、半月软骨、耳壳软骨等,并已部分进行了临床试用,如上海市第九人民医院已将自体软骨细胞构建的组织工程化关节软骨用于修复部分关节软骨缺损患者,已获得初步成功。

### 3 存在的问题及展望

组织工程学研究虽然历史较短,但却取得了巨大的进展。组织工程化骨及软骨已初步用于临床。在其他领域,如皮肤、肌、肌腱、韧带、血管、牙及牙周组织等,也取得了十分可喜的成绩,为最终在实验室制造成各种组织产品,用于修复组织缺损及重建功能,将最大程度地缓解自体组织、同种异体组织的严重短缺,挽救更多的生命及降低伤残率。同时,也由于组织工程广泛的开发与应用,将会提供更多的就业机会及创造出更多的经济效益。据估计,组织工程产品的市场额在今后的数年内,可达到 800 亿美元<sup>[17]</sup>,有可能成为国民经济的一个支柱性产业。不仅如此,由于组织工程学的跨学科性质,它的发展,将推动材料学、工程学、细胞生物学、分子生物学、遗传学等相关学科的发展,对临床医学的发展具有划时代的意义。但是,组织工程学研究还需进一步解决很多科学问题,包括:

(1)最适细胞附着、增殖的支架材料,合适的三维构架,表面性质,与受体组织的相互关系,生物学特征等。

(2)组织工程学研究的细胞,在体外培养条件下的生命周期,分泌功能,生长因子的作用及调控,肿瘤化倾向,细胞与材料的相互作用机制及其影响因素。

(3)种入支架材料的细胞所分泌的细胞外基质与支架材料的相互关系,材料降解与胞外基质分泌的同步性及其调控,植入细胞的作用及转归。

(4)组织工程化组织的生物相容性、免疫反应、体内的愈合过程、代谢改变、对药物的反应,与生长发育的关系,以及近期、远期结果。

(5)组织工程化产品的消毒灭菌、包装、储存、运输、评价标准等。

### 参 考 文 献

- [1] 赵克义. 器官移植问题的道德探讨. 中国医学伦理学, 1997, 54(4):54.
- [2] 何秋明, 李幼平, 李胜富. 异种移植社会伦理问题. 中国修复重建外科杂志, 1998, 12(6):363.
- [3] Aguayo Aj. Rat Schwann cell culture in vitro can ensheath axons regeneration in mouse nerves. *Neurol*, 1979, 29:589.
- [4] Plant G W, Hanly A R, Chirila T V. Axonal growth with in Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) sponges infiltrated with Schwann cells implanted into the lesioned rat optic tract. *Brain Res*, 1995, 671:119.
- [5] Gansmuller A, Clerin E, Kruger M et al. Tracing transplanted oligodendrocyte during migration and maturation: In the Shwerner mouse grain. *Glia*, 1991, 4:580.
- [6] Kim D H, Connolly S E, Kline D G et al. Labeled Schwann cell transplants versus sural nerve grafts in nerve repair. *J Neurosurg*, 1994, 80:254.
- [7] Levi A D O, Bunge R P. Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe combined immunodeficient mouse. *Exp Neurol*, 1994, 130:41.
- [8] Hermann S, Wunderlich G, Rosenbaum C et al. Lack of immune responses to immediate of delayed implanted allogeneic and xenogeneic Schwann cell suspension. *Glia*, 1997, 21(3):299.
- [9] Lang H, Mertens T H, Gerlack K L. Reimplantation of homologous cultured osteoblast-like cells for improvement of bone regeneration. *Int. J Oral Maxil Surg*, 1989, 181(4):244.
- [10] Bagaimbisa F B, Kappert H F, Schilliw. The reaction of osteoblast on the surface of dental implants. *J Oral-Maxil-Surg*, 1994, 52:52.
- [11] Neiderauer G G. Development of polylactide coglycolide/bioglass composites. 23rd Annual Meeting of the Society for Biomaterials. April 3, 1997, New Orleans. U.S.A. 581.
- [12] Maxian S. Cell behavior on material coated HA/Polymer/collagen scaffold. 23rd Annual Meeting of the Society for Biomaterials. April 3, 1997, New Orleans. U.S.A. 642.
- [13] Ozawa S, Kasugai S. Evaluation of implant materials in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials*, 1996, 17(1):23.
- [14] 余希杰, 杨志明. 骨组织工程的成骨细胞生物学行为研究. 华西医科大学博士研究生学位论文, 1998, 11.
- [15] Garcia Aj, Duchehne P, Boettiger D. Effect of Surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res*, 1998, 40(1):48.
- [16] 邹力, 杨志明, 黄富国等. 同种异体成骨细胞与钙磷陶瓷复合体内植入的实验研究. 中国修复重建外科杂志, 1997, 11(5):300.
- [17] Breithart A S, Grande D A, Kessler R et al. Tissue engineered bone repair calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr*

- Surg, 1998, **10**(13):567
- [18] 钱建初译. 创造奇迹. 商业周刊(中文版), 1998, **11**:16.
- [19] Wakitani S, Kimura T, Horooka A et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocyts embedded in collagen gel. J Bone Joint Surg (Br), 1989, **71**:74.
- [20] Cao Y, Rodrigug A, Vacanti M et al. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), Calcium alginate and pluronics in the engeneering of autologous porcine cartilage. J Biomater Sci Polym Ed, 1998, **9**(5):475.
- [21] 王跃, 杨志明. 人胚软骨细胞与胶原海绵复合的组织工程研究. 华西医科大学博士研究生论文, 1998, 11.
- [22] Layman D L, Sokologg L, Miller E J. Collagen Synthesis by articular chondrocytes in monolayer cultured. Exp Cell Res, 1972, **73**:107.
- [23] Buschman M D, Glyghand Y A, Grodyinsky A J et al. Mechanical compression modulated matrix biosynthesis in chondrocyte agarose culture. J Cell Sci, 1995, **108**:1497.
- [24] Stitinger M, Schultg O, Keysger G et al. Artificial tissues in perfusion culture. Int J Artif Organs, 1997, **20**(1):57.
- [25] 颜伟群. 培养软骨细胞再形成生长板样软骨组织研究. 实验生物学报, 1994, **27**(2):193.
- [26] Shukunami C, Hiraki Y. Expression of cartilage-specific functional matrix chondromodulin-I mRNA in rabbit growth plate chondrocytes and its responsiveness to growth stimuli *in vitro*. Biochem-Biophys-Res-Commun, 1995, **249**(3):885.

## PROGRESS IN TISSUE ENGINEERING RESEARCH ON NERVE, BONE AND CARTILAGE

Yang Zhuming

(Department of Orthopedic Surgery, First University Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

**Abstract** Tissue engineered bone and cartilage have been applied in clinic repairing bone and cartilage defect, and it has good prospect in clinic application. In the tissue engineering of peripheral nerve, it has been established MSC 800 Schwann's infinite cell line. It can be significantly promote nerve regeneration used porous hollow fiber tube composite with various extracellular matrix and Schwann's cells. Osteogenesis can be observed *in vitro* and *in vivo* used osteoblast of different sources composite with scaffold materials of different component and structure. It has better morphosis and function of cartilage tissues which come from chondrocyte cultured in dynamic pressure and composited with macromolecular materials.

**Key words** tissue engineering, bone, cartilage, peripheral nerve

·资料·信息·

### 杰出青年科学基金实施五年成效显著

1999年6月10—11日国家自然科学基金委员会在北京召开“纪念国家杰出青年科学基金实施五周年报告会”。国家科技部部长朱丽兰、国家自然科学基金委员会主任张存浩院士出席开幕式并讲话。

朱丽兰在讲话中充分肯定了国家杰出青年科学基金的作用,并用实例阐述了人才与机制,观念与机制的关系。朱丽兰说,我们的视野要宽,心胸要宽,要从整个青年一代的成长出发,要从中华民族整体利益的角度考虑问题。

张存浩在会上介绍了国家杰出青年科学基金的设立和运作情况。

国家杰出青年科学基金是由科学家倡议,国务

院1994年批准设立的。基金实施5年来,资助总金额约2.68亿元,共资助了426名优秀青年学者。1998年新增设的海外青年学者合作研究基金和香港青年学者合作研究基金,分别资助了海外28名和香港2名高水平青年学者在国内(内地)开展合作研究。

国家杰出青年科学基金受资助者中,342名为回国留学人员,约占80%。具有博士学位的399人,约占94%。其中国内培养的博士所占比例逐年提高,由1994年的47%上升到1998年的68%。获资助者平均年龄37岁,最小的29岁。

(下转224页)