

软骨细胞外基质在软骨组织工程中的研究进展

李云洁¹ 赵艳红¹ 杨强²

1.天津医科大学口腔医院正畸科, 天津 300070; 2.天津医院脊柱外科, 天津 300211

[摘要] 软骨组织工程是修复软骨缺损的有效方式, 需要理想的支架材料促进干细胞发挥再生性能。软骨细胞外基质(CECM)能够有效地模仿软骨细胞生存环境, 不仅对软骨细胞和干细胞具有良好的生物相容性, 满足支架材料的基本要求, 还能够促进软骨细胞分泌基质和诱导干细胞向软骨细胞分化, 是一种极具优势的支架材料。CECM良好的促基质分泌和诱导分化作用与其含有多种软骨相关蛋白有关。在实际应用中, CECM存在力学性能不强和细胞渗透不足等问题, 联合其他材料能在一定程度上弥补其不足, 因此寻找性能更加优化的复合方式是CECM的应用趋势。本文对CECM材料在软骨组织工程中的研究进展作一综述。

[关键词] 软骨细胞外基质; 软骨组织工程; 软骨再生; 干细胞

[中图分类号] R 783 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2019.02.016



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Development of cartilage extracellular matrix in cartilage tissue engineering Li Yunjie¹, Zhao Yanhong¹, Yang Qiang².
(1. Dept. of Orthodontics, Stomatological Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Dept. of Spine Surgery, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China).

Supported by: The National Natural Science Foundation of China (31300798, 31470937, 81572154); The Research Foundation of Tianjin Health Bureau (15KG125, 16KG114). Correspondence: Zhao Yanhong, E-mail: leafzh@126.com.

[Abstract] Cartilage tissue engineering, an effective way to repair cartilage defects, requires an ideal scaffold to promote the regeneration performance of stem cells. Cartilage extracellular matrix (CECM) can imitate the living environment of cartilage cells to the greatest extent. CECM not only exhibits good biocompatibility with chondrocytes and stem cells, which can meet the basic requirements of scaffolds, but also promotes chondrocytes to secrete matrix and induce stem cells to differentiate into chondrocytes; as such, this matrix is a better scaffold and has more advantages than existing ones. The promotion and induction effects could be related to various cartilage-related proteins inside. However, the practical application of this technique is hindered by problems, such as poor mechanical properties and insufficient cell penetration of CECM. Association with other materials can compensate for these inadequacies to a certain degree, and finding a combination mode with optimized performance is the application trend of CECM. This review focuses on research of CECM materials in cartilage tissue engineering.

[Key words] cartilage extracellular matrix; cartilage tissue engineering; cartilage regeneration; stem cells

软骨缺损目前尚无理想的治疗方式, 软骨组织工程是新兴的治疗方式^[1-3]。支架材料是软骨组织工程三要素之一, 需要有一定的力学强度, 对软骨细胞或干细胞具有良好的生物相容性, 可以为细胞提供三维空隙结构以利于其黏附、增殖并分泌软骨基质。软骨细胞外基质(cartilage extracellular matrix,

CECM)来自脱细胞的天然软骨或脱细胞的细胞分泌基质^[4-5], 含有胶原蛋白、黏蛋白多糖、硫酸软骨素、纤维蛋白和各种信号分子等多种成分, 能够最大程度地模仿细胞生存微环境^[6-7]。与普通支架材料相比, CECM更具有仿生意义, 是软骨组织工程支架材料研发的热点^[8-10]。本文详细介绍CECM作为支架材料的优势及不足之处。

[收稿日期] 2018-07-05; **[修回日期]** 2018-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金(31300798, 31470937, 81572154); 天津市卫生局科技攻关重点项目(15KG125, 16KG114)

[作者简介] 李云洁, 硕士, E-mail: 250883893@qq.com

[通信作者] 赵艳红, 副主任医师, 博士, E-mail: leafzh@126.com

1 CECM的生物相容性

现有脱细胞技术能够较彻底地将软骨组织脱细

胞,并保留大部分天然细胞外基质成分。由于机体免疫排斥反应物质主要存在于细胞膜上,因此彻底的脱细胞后,CECM材料对宿主具有良好的细胞生物相容性,并能够维持细胞原有表型,许多学者进行的一系列实验验证了这一结论。

李丙岩^[10]将猪关节软骨处理得到细胞外基质源性微粒,体外将软骨细胞与其共培养,观察到软骨细胞能在细胞外基质微粒表面快速增殖,并维持短梭形或多角形的形态。李坤等^[11]提取天然CECM制备取向性三维多孔支架,兔脂肪干细胞能够在支架中正常黏附、增殖,并长入三维孔隙中。卢强等^[12]发现,骨髓干细胞在CECM环境中也有良好的生长态势。以上实验证明软骨细胞和干细胞都可在CECM成分中正常存活并增殖,这为CECM在软骨组织工程中的应用提供了前提条件。

2 CECM对软骨细胞的促分泌作用

CECM不仅有良好的生物相容性,而且能够促进软骨细胞分泌细胞外基质,继而修复软骨缺损。由于不同种属来源的CECM成分含量有差异,通过自体与异体实验对象作用结果可以分析不同来源的CECM对软骨细胞的不同影响。

通过研究自体CECM作用于软骨细胞可发现,软骨细胞在自体CECM环境中能够旺盛生长繁殖并分泌软骨基质。唐成^[13]使用兔骨髓间充质干细胞分泌的软骨基质膜制备三维多孔状支架,将自体软骨细胞植入此支架中进行成软骨实验,用胶原支架作对照。体外培养4周后,结果发现,使用软骨基质支架组新生软骨内基质含量更多、分布更均匀,特定基因和蛋白表达更高;体内植入3周后,软骨基质支架组新生软骨的体积增长和均质性均优于对照组,具有更高的软骨基质成分和抗压强度。由此证明,软骨基质支架相对于普通支架明显促进了软骨细胞分泌细胞外基质。

由于自体来源的CECM在临床使用中面临来源不足、创伤性大等问题,很难在临床广泛应用,因此探索异体CECM是否具有相同功效具有重要意义。高钺等^[14]在人的脱细胞软骨基质中培养兔关节软骨细胞,发现兔软骨细胞能够很好地增殖,这是促进细胞行使功能的首要前提。Yang等^[15]将兔关节软骨细胞与猪关节CECM共培养,与使用普通培养基培养的兔软骨细胞相比表现出更好的成软骨性能。单纯从某一实验结论来看,异体来源的CECM对于软骨细胞的功能同样具有促进作用,但对同一种软骨细胞而言,自体与异体CECM的作用效果是否具有

差异还缺乏实验验证。

3 CECM对干细胞向软骨细胞分化的诱导作用

3.1 CECM与刺激因子的协同作用

起初研究者只将CECM材料作为支撑材料来使用^[6],后来学者们发现它还能增强刺激因子诱导干细胞向软骨细胞分化的作用。有研究者^[17]将脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)分别在塑料瓶、ADSCs来源的CECM和滑膜间充质干细胞(synovium-derived mesenchymal stem cells, SDSCs)来源的CECM中培养,使用添加转化生长因子- β 3(transforming growth factor- β 3, TGF- β 3)或TGF- β 3和骨形态发生蛋白-6(bone morphogenetic protein-6, BMP-6)的无血清诱导培养基培养细胞。培养一段时间后发现,使用ADSCs和SDSCs来源的CECM培养的细胞,其增殖数量都是普通塑料瓶中培养细胞的6~8倍,并且表现出相似的软骨形成指数。这些实验结果表明,CECM与刺激因子的协同作用能够增强ADSCs向软骨细胞分化的潜能,并且CECM的来源对诱导作用无显著影响。Almeida等^[18]的实验也得出类似的结论。

3.2 CECM单独诱导对干细胞的作用

CECM能增强生长因子的促分化作用,一方面可能因其与生长因子相互作用,另一方面可能由于CECM能直接作用于细胞,本身就能起到促分化作用。Tang等^[19]在没有生长因子诱导的情况下研究CECM支架能否诱导干细胞向软骨细胞分化。该研究将骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)接种到CECM支架上,分别加入和不加入TGF- β 3进行培养,用胶原支架作对照。培养3周后发现,CECM支架组和添加TGF- β 3的胶原支架组都有均质的软骨样组织生成,黏蛋白多糖和II型胶原含量较高,软骨相关基因如II型胶原纤维 α ₁、聚集蛋白聚糖(aggrekan, ACAN)、SRY样HMG盒9基因(SRY-related high mobility group-box gene9, SOX9)均有较高水平的表达。这些实验结果说明,CECM支架在没有生长因子的情况下也能诱导骨髓干细胞向软骨细胞分化。Sutherland等^[20]也进行了类似的验证,发现单独使用CECM就能引导干细胞移动、黏附和增殖,并分化为软骨细胞分泌软骨基质,且与对照组TGF- β 3的诱导作用无明显差异,进一步证明了CECM一体多能的优点。自体或异体来源的CECM均能达到这种效果^[21],而且作用细胞种类广泛。已有研究^[22-24]发现,人脐带Wharton胶间充质干细胞也受CECM调节分化。

CECM作用优良离不开其内丰富的蛋白成分。天然软骨来源的CECM本身含有大量信使蛋白分子和细胞黏附锚定位点,黏附过程就依靠软骨细胞通过多配体蛋白聚糖和磷脂酰肌醇蛋白聚糖等膜蛋白固定于基质中。一些膜通道蛋白也起到锚定作用,比如锚定蛋白CII,其与II型胶原蛋白和整合蛋白相互作用,将软骨细胞连接到胶原分子和纤维连接蛋白上。CECM中天然信号分子可以募集更多的干细胞到达缺损部位,启动修复和再生过程;而募集来的干细胞又可促进更多的血管内皮细胞迁移而来,同时也会分泌更多的血管内皮生长因子,从而有利于组织再生的形成和维持;同时CECM又可以促进BMSCs的成软骨向分化,抑制其骨向分化,最终达到了软骨修复和再生^[25]。Toh等^[26]通过分析CECM主要成分与不同细胞群的相互作用,发现基底膜上的蛋白质分子在此过程中也发挥了调节作用。

4 CECM与其他材料联合使用

单独使用天然CECM提取物作为软骨组织工程支架材料也存在一些不足之处,比如提取过程中某些成分丧失,机械性能不强等,为此众多学者竭力寻找能与CECM优势互补的其他材料以联合使用。比如脱细胞处理后,CECM基质比正常软骨中糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)含量降低^[27],而壳聚糖分子与软骨基质中的GAG结构相似,并且携带的正电荷与II型胶原的负电荷有静电作用可加强交联、提高强度,因此杨强^[28]制备了CECM/壳聚糖复合支架,兼具两种材料的优点,在诱导BMSCs成软骨过程中表现出更好的性能。为了克服CECM强度不足的问题, Yang等^[29]将丝素蛋白和CECM结合在一起生成复合支架。复合材料支架能在一定程度上弥补CECM的不足,具有更加光明的应用前景。

综上所述,CECM是具有广阔应用前景的软骨组织工程支架材料,其天然成分及含量是目前人工合成材料无法达到的。实际应用中还存在一些困难,比如提取工艺复杂,获取率低;CECM颗粒孔隙率低、不易塑形;CECM三维多孔支架存在细胞渗透力不足等问题。为解决这些问题,需要更深入探索CECM的成分和含量,改进制备工艺减少成分丢失,或寻找与其联合使用的更好的材料,使其优势得到更充分的发挥。

[参考文献]

- [1] Suchorska WM, Augustyniak E, Richter M, et al. Modified methods for efficiently differentiating human embryonic stem cells into chondrocyte-like cells[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2017(71): 500-509.
- [2] Zeineddine HA, Frush TJ, Saleh ZM, et al. Applications of tissue engineering in joint arthroplasty: current concepts update[J]. *Orthop Clin North Am*, 2017, 48(3): 275-288.
- [3] Wang XY, Li ZH, Shi T, et al. Injectable dextran hydrogels fabricated by metal-free click chemistry for cartilage tissue engineering[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 73: 21-30.
- [4] Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, et al. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(8): 2414-2440.
- [5] Choi B, Kim S, Lin B, et al. Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6(22): 20110-20121.
- [6] Kiyotake EA, Beck EC, Detamore MS. Cartilage extracellular matrix as a biomaterial for cartilage regeneration[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1383(1): 139-159.
- [7] Ng J, Wei YY, Zhou B, et al. Extracellular matrix components and culture regimen selectively regulate cartilage formation by self-assembling human mesenchymal stem cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 183-194.
- [8] Pak J, Lee JH, Park KS, et al. Regeneration of cartilage in human knee osteoarthritis with autologous adipose tissue-derived stem cells and autologous extracellular matrix[J]. *Biores Open Access*, 2016, 5(1): 192-200.
- [9] Monibi FA, Cook JL. Tissue-derived extracellular matrix bioscaffolds: emerging applications in cartilage and meniscus repair[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 23(4): 386-398.
- [10] 李丙岩. 关节软骨细胞外基质源性微粒的制备及生物相容性评估[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2014: 1-87.
- [11] Li BY. Preparation of particles derived from articular cartilage extracellular matrix and biocompatibility assessment [D]. Beijing: Medical School of Chinese PLA, 2014: 1-87.
- [12] 李坤, 赵艳红, 徐晨, 等. 基于软骨细胞外基质的取向支架的制备及评价[J]. *华西口腔医学杂志*, 2017, 35(1): 51-56.
- [13] Li K, Zhao YH, Xu C, et al. Development and characterization of oriented scaffolds derived from cartilage extracellular matrix[J]. *West Chin J Stomatol*, 2017, 35(1): 51-56.
- [14] 卢强, 张莉, 彭江, 等. 可注射性组织工程软骨源性微粒体的微观结构及其生物相容性观察[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(9): 688-691.

- Lu Q, Zhang L, Peng J, et al. Micromechanism and biocompatibility of cartilage derived microcarrier for injectable tissue engineering cartilage[J]. Orthopedic J Chin, 2009, 17(9): 688-691.
- [13] 唐成. 自体骨髓间充质干细胞外基质 (ECM) 支架在软骨组织工程中的应用研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2013: 1-113.
- Tang C. Application of autologous bone marrow mesenchymal stem cell extracellular matrix (ECM) scaffold in cartilage tissue engineering[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2013: 1-113.
- [14] 高钺, 刘舒云, 黄靖香, 等. 人脱细胞软骨细胞外基质对异种软骨种子细胞的影响[J]. 中国医药生物技术, 2014, 9(2): 81-87.
- Gao Y, Liu SY, Huang JX, et al. Effects of human extracellular matrix of chondrocytes on heterogenous chondrocytes[J]. Chin Med Biotechnol, 2014, 9(2): 81-87.
- [15] Yang W, Lee S, Jo YH, et al. Effects of natural cartilaginous extracellular matrix on chondrogenic potential for cartilage cell transplantation[J]. Transplant Proc, 2014, 46(4): 1247-1250.
- [16] Dürr J, Goodman S, Potocnik A, et al. Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin[J]. Exp Cell Res, 1993, 207(2): 235-244.
- [17] He F, Pei M. Extracellular matrix enhances differentiation of adipose stem cells from infrapatellar fat pad toward chondrogenesis[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2013, 7(1): 73-84.
- [18] Almeida HV, Eswaramoorthy R, Cunniffè 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.
- [19] Tang C, Jin CZ, Xu Y, et al. Chondrogenic differentiation could be induced by autologous bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffolds without exogenous growth factor[J]. Tissue Eng Part A, 2016, 22(3/4): 222-232.
- [20] Sutherland AJ, Beck EC, Dennis SC, et al. Decellularized cartilage may be a chondroinductive material for osteochondral tissue engineering[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0121966.
- [21] Tavassoli A, Matin MM, Niaki MA, et al. Mesenchymal stem cells can survive on the extracellular matrix-derived decellularized bovine articular cartilage scaffold[J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(12): 1221-1227.
- [22] 赵鹏, 刘舒云, 卢世璧, 等. 软骨细胞外基质对脐带Wharton胶间充质干细胞生物学性状的作用[J]. 中国矫形外科杂志, 2013, 21(11): 1127-1132.
- Zhao P, Liu SY, Lu SB, et al. Effects of the cartilage extracellular matrix on the biological characteristics of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in the umbilical cord [J]. Orthopedic J Chin, 2013, 21(11): 1127-1132.
- [23] 肖统光, 郝春香, 荆晓光, 等. 关节软骨细胞外基质/人脐带Wharton胶复合多孔支架的制备及评估[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(22): 3470-3475.
- Xiao TG, Hao CX, Jing XG, et al. Preparation and evaluation of an articular cartilage extracellular matrix/human umbilical cord Wharton gel composite scaffold[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2017, 21(22): 3470-3475.
- [24] Thakkar S, Fernandes H, Moroni L. Decellularized extracellular matrix scaffolds for cartilage regeneration[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1340: 133-151.
- [25] 王之发. 细胞外基质支架材料在软骨组织再生和骨组织工程中应用的初步探讨[J]. 西安: 第四军医大学, 2016: 1-130.
- Wang ZF. Preliminary study on the application of extracellular matrix scaffolds in cartilage regeneration and bone tissue engineering[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2016: 1-130.
- [26] Toh WS, Foldager CB, Hui JH, et al. Exploiting stem cell-extracellular matrix interactions for cartilage regeneration: a focus on basement membrane molecules[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2016, 11(8): 618-625.
- [27] 谭洪波, 段小军, 杨柳, 等. 透明软骨材料经脱细胞处理后细胞外基质成分变化的比较[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(19): 2028-2032.
- Tan HB, Duan XJ, Yang L, et al. Alteration of extracellular matrix in decellularized articular cartilage treated by different technologies[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2013, 35(19): 2028-2032.
- [28] 杨强. 以软骨细胞外基质为基础构建组织工程软骨以及骨软骨复合体的实验研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2008: 1-208.
- Yang Q. Experimental study on preparation of tissue-engineered cartilage and osteochondral complex based on the extracellular matrix of chondrocytes[D]. Beijing: PLA Military Medical Training College, 2008: 1-208.
- [29] Yang Q, Teng BH, Wang LN, et al. Silk fibroin/cartilage extracellular matrix scaffolds with sequential delivery of TGF- β 3 for chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells[J]. Int J Nanomedicine, 2017(12): 6721-6733.