

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.35.005

透明质酸水凝胶修复大鼠软骨缺损的实验研究

赵峰¹, 何薇^{2△}, 刘桂兰³, 张国平¹, 王辉¹, 石硕¹, 刘少俊¹, 田德虎²

(1. 河北医科大学第一医院骨科, 石家庄 050031; 2. 河北医科大学第三医院手外科, 石家庄 050051; 3. 河北医科大学第一医院 VIP 病房, 石家庄 050031)

摘要:目的 观察透明质酸水凝胶对关节软骨缺损的修复效果。方法 选取 SD 大鼠 120 只, 分别编号标记后分为 A 组(自然修复组)、B 组(透明质酸组)、C 组(复合材料组), 每组 36 只, 剩余 12 只用于获取软骨细胞。大鼠股骨滑车全层软骨缺损(直径 2.5 mm, 深 3.0 mm)模型制备后, 分别用不同材料修复, 于不同时间点(10、20、40 d)通过组织学及生物化学方法评估修复效果。结果 各时间点组织学及生物化学评估 C 组软骨修复效果最佳, 其次为 B 组, 但修复效果均优于 A 组。结论 透明质酸水凝胶与周围组织相容性高, 生物降解性好, 有利于软骨细胞的存活、繁殖、分裂。

关键词:透明质酸; 生物相容性材料; 关节软骨; 修复外科手术

中图分类号: R684

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)35-4719-04

Experiment study on the repairing effect of hyaluronic acid hydrogel on rat articular cartilage defects

Zhao Feng¹, He Wei^{2△}, Liu Guilan³, Zhang Guoping¹, Wang Hui¹, Shi Shuo¹, Liu Shaojun¹, Tian Dehu²

(1. Department of Orthopedic, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050031, China; 2. Department of Hand Surgery, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050051, China; 3. Department of VIP Ward, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050031, China)

Abstract: Objective To observe the repairing effect of hyaluronic acid hydrogel on rat articular cartilage defects. Methods One hundred and twenty SD rats were randomly divided into group A (natural repair group), group B (hyaluronic acid group) and group C (composite material group), 36 rats was in each group and 12 rats were used to obtain cartilage cells. Full-thickness articular osteochondral defects (2.5 mm in diameter and 3.0 mm in depth) were created mechanically in femoral trochlea of rats. Histological and biochemical method were used to evaluate the repairing effect of different material at different points (10, 20, 40 d). Results Repairing effect of group C was best by histological and biochemical method at different points, followed by group B, and they were better than that of group A. Conclusion Hyaluronic acid hydrogel could provide cartilage cell proliferation for porous space truss structure, and could carry cartilage cells at the same time. the cellular space truss structure have high surrounding tissue compatibility and biodegradation, it is helpful for cartilage cell survival, reproduction and division.

Key words: hyaluronic acid; biocompatible materials; articular cartilage; reconstructive surgical procedures

关节软骨在关节功能上具有重要的作用, 完整的关节软骨是关节行使正常功能的基础。关节软骨是一种没有血液和淋巴供应的单一结缔组织, 由于软骨细胞分裂很慢, 所以其自身修复能力低下, 通常不能修复。因此, 目前软骨损伤的修复仍是学术界所关注的难题。伴随组织工程技术的飞速发展, 关节软骨缺损的修复亦取得了长足的进步, 但目前关节软骨缺损的修复仍不尽人意。本研究应用复合生物材料修复大鼠全层关节软骨缺损, 按照组织学和生化标准评价修复材料的修复效果, 为其应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源与分组 本实验选用平均体质量为(250±20)g 清洁级 SD 大鼠 120 只(河北医科大学动物实验中心), 分为 A 组(自然修复组)、B 组(透明质酸组)、C 组(复合材料组), 每组 36 只。剩余 12 只用于获取软骨细胞。

1.1.2 软骨细胞的获取 无菌条件下切取大鼠鼠剑突软骨, 将软骨剪碎, 0.25% 胰蛋白酶(法国 Gibco 公司) 37℃ 消化 3 min, 弃上清液, 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 下消化 1 h, 0.2% 胶原酶 II (拜昂生物公司) 37℃ 消化 2 h, 取上清液, 800 r/min 离心 10

min, 收集细胞。甲苯胺蓝染色, 鉴定软骨细胞。台盼蓝染色, 计数板计数并检测细胞活力大于 90%。在收集的细胞中加入少许培养液, 调整细胞密度至 1×10^5 个/mL, 漩涡振荡器混匀备用。

1.1.3 多聚糖生物材料的制备 将获取的软骨细胞加入 1% 透明质酸水凝胶(河北医科大学第一医院实验中心, pH: 6.8~7.8, 渗透压比: 1.0~1.2), 调整细胞密度至 5×10^4 个/mL, 漩涡振荡器混匀备用。

1.2 方法

1.2.1 手术方法

1.2.1.1 软骨损伤模型的制备 实验动物术前 12 h 禁食、4 h 禁水, 氯氨酮(1%、10 mg/kg)、咪达唑仑(1 mg/kg)左大腿中上部注射麻醉。麻醉后, 将实验动物仰卧、双下肢伸直位固定, 右下肢手术区 2% 碘酒、75% 乙醇消毒, 铺无菌手术单。于右膝前自髌骨上极 2.0 mm 处至髌骨下极 2.0 mm 处纵形切开皮肤, 于髌骨内缘内侧 1.0 mm 水平切开内侧支持带及关节囊, 将髌骨向外侧脱位, 屈膝 90° 显露股骨滑车。用直径 2.5 mm 空心钻在股骨滑车正中钻孔至骨质, 孔深 3.0 mm, 形成全层软骨缺损, 充分止血, 缝合内侧支持带及关节囊, 缝合皮肤。术毕

B 组关节腔内注射透明质酸水凝胶 0.1 mL, C 组关节腔内注射复合材料 0.1 mL, A 组自然修复。全部手术均由实验者在同一助手协助下完成。

1.2.1.2 术后处理 术后切口用 75% 乙醇每天消毒 1 次, 7 d 后拆线。

1.2.2 观察指标及检测方法

1.2.2.1 光学显微镜观察 分别于术后 10、20、40 d 每组处死 4 只实验动物, 切取修复区软骨组织, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, HE 染色, 光镜下观察软骨修复情况。术后 40 d 每组处死实验动物 4 只, 切取修复区软骨组织, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, Masson 染色, 光镜下观察胶原纤维合成情况。

1.2.2.2 扫描电子显微镜观察 术后 40 d 每组处死 4 只实验动物, 切取修复区软骨组织, 4% 戊二醛固定, 扫描电子显微镜观察软骨修复情况。

1.2.2.3 免疫组织化学测定 术后 40 d 每组处死实验动物 4 只, 切取修复区软骨组织, 光镜下观察染色情况及血红素氧合酶(HO-1)表达情况。

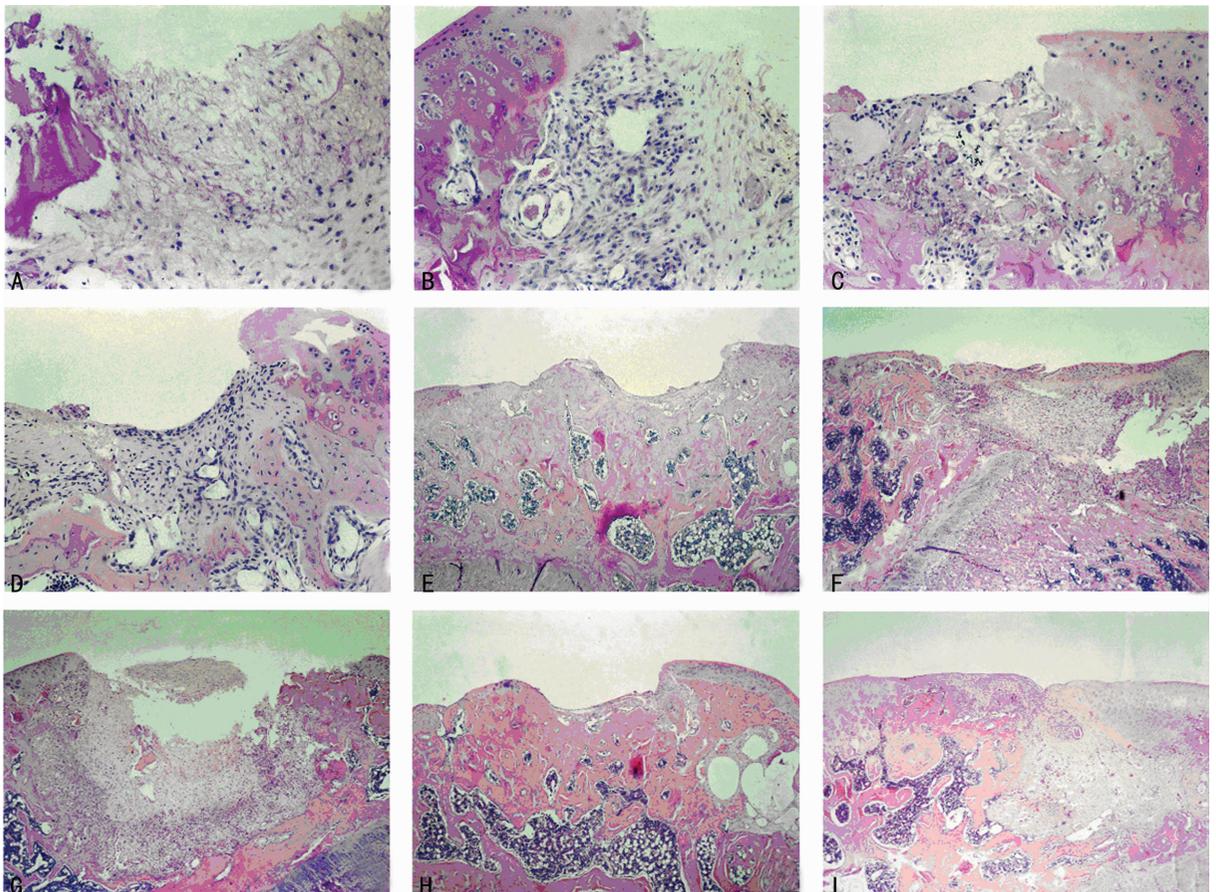
1.2.2.4 胶原水平测定 分别于术后 10、20、40 d 每组处死实验动物 4 只, 切取修复区软骨组织, 测定修复区软骨中羟脯氨酸水平, 根据胶原中羟脯氨酸平均水平为 13.4%, 计算出胶

原水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素或双因素方差分析行组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光学显微镜观察 标本 HE 染色显示, 术后 10 d A 组修复区底部可见少量红色肉芽组织, 表面被苍白色、较光滑的透明膜覆盖(图 1A); B、C 组修复区已被再生组织填满, 再生组织呈白色, 较软, 表面不平, 边界清晰(图 1B、C)。术后 20 d A 组修复区修复组织呈白色, 略硬, 表面不平, 界限清楚(图 1D); B、C 组修复区修复组织呈乳白色, 质韧, 表面较平整, 边界清晰(图 1E、F)。术后 40 d A 组修复区底部被肉芽组织充满(图 1G); B 组修复区被修复组织填满, 修复组织呈黄白色, 界限较清晰, 质韧, 表面不平(图 1H); C 组修复组织质韧, 呈半透明状, 与正常软骨边界不清(图 1I)。术后 10 d C 组修复区内可见以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润, 术后 20 d 淋巴细胞浸润更明显, 术后 40 d 淋巴细胞浸润减少。术后 10 d A、B 两组修复区内仅有轻微淋巴细胞浸润, 术后 20 d 淋巴细胞浸润较前稍微增多, 但明显少于 C 组, 术后 40 d 淋巴细胞浸润明显减少。标本 Masson 染色显示, C 组修复区胶原纤维合成情况最好(图 2A), B 组次之(图 2B), 都优于 A 组(图 2C)。



A、D、G: A 组术后 10、20、40 d; B、E、H: B 组术后 10、20、40 d; C、F、I: C 组术后 10、20、40 d。

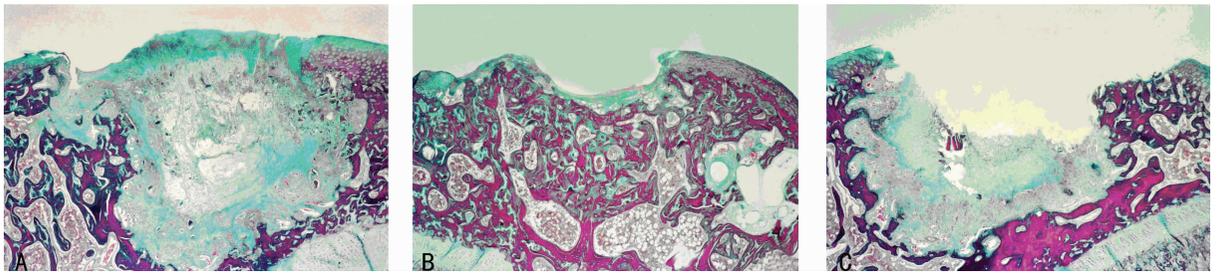
图 1 各组软骨组织 10、20、40 d 修复情况(HE 染色 $\times 200$)

2.2 扫描电子显微镜观察 术后 40 d A 组修复区胶原纤维排列紊乱, 纤维粗大, 部分断裂(图 3A)。B 组修复区胶原纤维排列较规整, 纤维较细, 部分断裂或凹陷(图 3B)。C 组修复区胶原纤维排列规整, 与关节面平行, 与正常软骨分界不清(图

3C)。

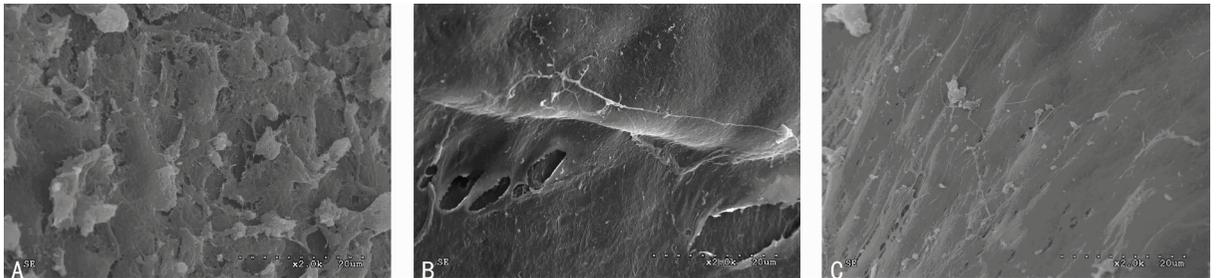
2.3 免疫组织化学检测 术后 40 d, 各组修复区细胞质内均可见棕黄色或黄色阳性反应产物, C 组数量最多, 分布均匀(图 4A); B 组数量较多, 分布不均(图 4B); A 组仅可见少许阳性产

物表达(图 4C)。



A: A 组; B: B 组; C: C 组。

图 2 各组软骨组织 40 d 修复(Masson 染色×200)



A: C 组; B: B 组; C: A 组。

图 3 各组软骨组织 40 d 修复(扫描电子显微镜×2 000)



A: C 组; B: B 组; C: A 组。

图 4 各组软骨组织 HO-1 表达情况(免疫组织化学×400)

2.4 II 型胶原水平测定 术后 10、20、40 d, 修复区组织中 II 型胶原水平 C 组最高, B 组次之, 均优于 A 组, 见表 1。

表 1 不同时间点修复区胶原水平($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{mg}$)

组别	10 d	20 d	40 d
A 组	80.83±4.91	81.03±5.01	80.94±5.35
B 组	90.35±9.59 ^a	88.39±7.96 ^b	89.17±8.52 ^b
C 组	99.78±7.56 ^a	105.55±7.49 ^a	101.97±7.34 ^a

^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与 A 组比较。

3 讨 论

关节软骨属于透明软骨, 其组织代谢活性较低, 没有血液供应和淋巴回流, 且软骨细胞分裂很慢, 所以其自身修复能力低下, 通常不能修复^[1-3]。因此, 如何促进损伤软骨的修复, 是长期以来的研究重点之一。随着组织工程技术的发展, 软骨损伤修复取得了一定的进展^[4-5]。目前, 软骨组织工程研究的内容主要集中在种子细胞、载体材料以及种子细胞与载体间的相互作用等。在组织工程材料应用过程中, 还要考虑种子细胞的相容性, 载体的附着性、降解性等, 所以目前尚无公认的较为理想的植入物^[6-7]。理想的载体材料应具有良好的组织相容性及可降解性, 应尽可能接近天然软骨细胞的外基质成分^[8]。目前

主要有人工合成材料和天然材料两大类。人工合成材料主要包括聚乳酸、聚羟基乙酸共聚物、羟基磷灰石等, 其表面缺乏细胞可以识别的位点, 因此不具备生物活性, 而且其降解产物可能存在一定毒性。天然材料主要有胶原、纤维蛋白凝胶、透明质酸等, 其生物相容性和可降解性均优于人工合成材料, 但因其来源不同, 结构与性能存在明显差异^[9-12]。

透明质酸是一种无硫酸基的多聚糖自然软骨基质, 其立体结构孔隙率高, 表面积和空间更大, 有利于细胞黏附生长、细胞外基质的沉积、营养和气体的进入、代谢产物排出, 是一种良好的材料-细胞作用界面。透明质酸能够通过受体结合软骨细胞, 提高细胞间的黏附性和细胞基质的埋藏作用, 对软骨的营养、软骨特性的维持以及关节的润滑均起着重要作用, 它可以维持软骨细胞的正常生长, 促进移植软骨细胞与损伤软骨间的整合^[13-16]。透明质酸纯度越高, 其免疫原性越低, 生物相容性越好, 且其降解产物有促进创面愈合的作用^[17-20]。透明质酸作为骨性关节炎治疗用药已在临床应用多年, 疗效满意, 不良反应少, 作为可注射材料操作简便易行, 因此本研究选用透明质酸作为载体材料。实验结果显示, 各时间点组织学及生物化学评估软骨修复效果 B 组均优于 A 组, 充分证明了透明质酸可促进软骨修复。

本实验中, 光学显微镜下各组修复区术后早期均可见以淋

巴细胞为主的炎性细胞浸润,以 C 组为著,随着时间延长,炎性细胞减少。注入修复材料 10 d 后,由于吞噬细胞的识别,修复区可见炎性细胞浸润,A、B 两组炎性细胞浸润程度相当,这表明透明质酸这种载体材料具有良好的生物相容性。各时间点炎性细胞浸润程度 C 组最明显,表明其免疫反应的根源在于软骨细胞表面的主要组织相容性抗原。免疫组织化学结果显示,A 组修复区阳性反应产物最少,说明其蛋白多糖的合成能力明显降低;在 C 组中修复区阳性反应产物最多,说明透明质酸的多孔网架结构有利于软骨细胞的生长,且细胞外基质富含蛋白多糖,这些都可以减缓软骨细胞 II 型胶原合成能力的退化。软骨的结构基础是胶原,因此判断软骨成熟程度的标志是胶原。本实验 Masson 染色显示 C 组修复区可见大量胶原纤维形成,明显高于 A、B 两组;羟脯氨酸水平 C 组最多,B 组次之,均高于 A 组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),这些均可证明这种修复材料可有效促进软骨修复。通过本实验可证实,透明质酸对软骨修复起促进作用,并且其多孔网架结构有利于软骨细胞生长、胶原和蛋白多糖的合成,其复合自体软骨细胞修复效果更佳。这种复合材料取材容易、制备简便,而且可制成注射剂型,是一种软骨修复较为理想的材料。

临床上软骨损伤多为闭合性,因此特点对修复材料的选择趋于由固态转变为液态,移植方法也趋于由损伤较大的开放移植转变为简便、微创的关节腔注射。本实验尝试应用透明质酸复合软骨细胞进行关节腔注射来修复软骨缺损,结果显示此方法可行性好,疗效满意,为临床应用提供了理论依据。但由于软骨细胞的分离、培养直接关系修复效果,因此需进一步提高其分离培养的技术。

参考文献:

- [1] Hangody L, Várshelyi G, Hangody LR, et al. Autologous osteochondral grafting—technique and long-term results [J]. *Injury*, 2008, 39(Suppl 1): S32-39.
- [2] Redler LH, Caldwell JM, Schulz BM, et al. Management of articular cartilage defects of the knee [J]. *Phys Sportsmed*, 2012, 40(1): 20-35.
- [3] Martin I, Miot S, Barbero A, et al. Osteochondral tissue engineering[J]. *J Biomech*, 2007, 40(4): 750-765.
- [4] Jiang CC, Chiang H, Liao CJ, et al. Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite[J]. *J Orthop Res*, 2007, 25(10): 1277-1290.
- [5] Chiang H, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives[J]. *J Form Med Associat*, 2009, 108(2): 87-101.
- [6] Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(2): 243-262.
- [7] Mano JF, Reis RL. Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007, 1(4): 261-273.
- [8] Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(20): 2941-2953.
- [9] Erickson IE, Kestle SR, Zellars KH, et al. Improved cartilage repair via in vitro pre-maturation of MSC-seeded hyaluronic acid hydrogels[J]. *Biomed Mater*, 2012, 7(2): 024110.
- [10] Henson FM, Getgood AM, Caborn DM, et al. Effect of a solution of hyaluronic acid-chondroitin sulfate-N-acetyl glucosamine on the repair response of cartilage to single-impact load damage[J]. *Am J Vet Res*, 2012, 73(2): 306-312.
- [11] Podskubka A, Povesil C, Kubes R, et al. Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation on a hyaluronic Acid ester scaffolds (Hyalograft C) [J]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 2006, 73(4): 251-263.
- [12] Kayakabe M, Tsutsumi S, Watanabe H, et al. Transplantation of autologous rabbit BM-derived mesenchymal stromal cells embedded in hyaluronic acid gel sponge into osteochondral defects of the knee[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 343-353.
- [13] Julovi SM, Ito H, Nishitani K, et al. Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-13 in human arthritic chondrocytes via CD44 and P38[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(2): 258-264.
- [14] Laroui H, Grossin L, Léonard M, et al. Hyaluronate-covered nanoparticles for the therapeutic targeting of cartilage[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(12): 3879-3885.
- [15] Gomoll AH. Serum levels of hyaluronic acid and chondroitin sulfate as a non-invasive method to evaluate healing after cartilage repair procedures[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(4): 118.
- [16] Unterman SA, Gibson M, Lee JH, et al. Hyaluronic acid-binding scaffold for articular cartilage repair[J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(23/24): 2497-2506.
- [17] Kim SS, Kang MS, Lee KY, et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells and hyaluronic Acid injection on osteochondral defects in rabbits' knees[J]. *Knee Surg Relat Res*, 2012, 24(3): 164-172.
- [18] Jin R, Moreira Teixeira LS, Krouwels A, et al. Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair[J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(6): 1968-1977.
- [19] Chang J, Rasamny JJ, Park SS. Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin sealant[J]. *Arch Facial Plast Surg*, 2007, 9(3): 161-166.
- [20] Lee KB, Wang VT, Chan YH, et al. A novel, minimally-invasive technique of cartilage repair in the human knee using arthroscopic microfracture and injections of mesenchymal stem cells and hyaluronic acid—a prospective comparative study on safety and short-term efficacy[J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2012, 41(11): 511-517.