

再生医学之鼻软骨组织工程研究进展

李雪盛¹ 孙建军^{1△}

[关键词] 软骨;组织工程;鼻科学;再生医学

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2019.12.027

[中图分类号] R765 [文献标志码] A

Regenerative medicine: the research progress of cartilage tissue engineering in rhinology

Summary In recent years, the cartilage tissue engineering technology has rapid development, and shows a bright prospect in the field of cartilage defect and repair. In this paper, the field of rhinology cartilage tissue engineering research progress were reviewed, with the purpose to understand the status quo, and determine the next step research direction. From the research in recent years, we found that although cartilage tissue engineering technique could play an important role in the field of rhinology, but the progress to date was still lagging behind. In the published literature, there were few basic and applied research about cartilage tissue engineering techniques for nasal diseases. There have a small amount of applied research report, mainly concentrated in the animal experiments. There are still quite a distance from a wide range of clinical application. Based on the existing research results, cartilage tissue engineering technique in nasal plastic and reconstruction surgery has great potential in clinic application and needs more further research.

Key words cartilage; tissue engineering; rhinology; regenerative medicine

组织工程技术是再生医学的重要分支,它是采用生物相容性支架和特定种子细胞,来恢复或重建受损组织器官的正常功能^[1]。生物支架材料除了为组织细胞提供适宜的生长环境外,还是多种生长因子的载体,营造适合细胞生长和分化的微环境。理想的组织工程支架材料应具有生物相容性、生物可降解性以及适当的力学特性,并易于获得、适用于临床。

1 鼻软骨组织工程应用范围

该技术可用于多种鼻科疾病的治疗,包括先天性和后天性软骨缺损,如先天性唇腭裂引起的鼻畸形,鼻部常见肿瘤(如鼻翼基底细胞癌)切除导致的鼻翼软骨缺损畸形,其治疗涉及隆鼻术、鼻中隔修复术、鼻翼重建术、鼻-颅面畸形联合重建术等。在这些可能应用到组织工程技术的手术中,软骨组织工程技术是关注的重点。

软骨组织由软骨细胞以及细胞外基质成分组成,软骨细胞来源于软骨膜中的间充质干细胞,负责合成和分泌细胞外基质,其主要成分包括Ⅱ型胶原蛋白和蛋白多糖。软骨组织不含血管成分,损伤后的再生能力非常有限,因此,软骨组织缺损的修复目前主要靠自体软骨移植或其他类型组织或生物材料替代^[2]。

2 自体软骨的局限性

目前,在外科手术中重建软骨缺损的最佳材料

仍是自体软骨,其局限性十分明显。首先,人体可供移植的自体软骨来源有限;其次,供区取材必然造成机体二次损伤及局部畸形;最后,移植自体软骨的雕刻成型十分复杂,对术者技巧的要求很高。上述这些局限性在一定程度上限制了自体软骨移植的应用范围。而其他种类的移植材料由于无法完美重建软骨功能以及可能由此带来感染、排斥等风险,也同样受到极大限制^[3]。

软骨组织工程技术的问世可谓“柳暗花明”,在理论上基本可以避免上述缺陷,在技术上完全具备重建受损或缺失组织的可行性,因此前景光明。

3 实验研究

3.1 体外研究

鼻部软骨组织丰富,主要是鼻中隔软骨、侧鼻软骨以及鼻翼,其中鼻中隔软骨容易获取,特别适用于软骨组织工程研究中的种子细胞。我们自2000年开始,在国内首先对人鼻中隔软骨细胞体外培养及增殖功能进行了系列研究^[4-6]。

研究发现鼻中隔软骨易于获得,分离的软骨细胞在体外培养条件下培养至第2代,细胞数量即可扩增至4倍。体外培养4代以内,可以保持细胞表型不变,合成软骨细胞标志物如糖胺聚糖、碱性磷酸酶以及Ⅱ型胶原^[4]。软骨细胞可以在体外冷冻长期保存,复苏存活率可达93%。为了在有限的传代次数中获得足够多的软骨细胞,我们采用琼脂包被培养皿,以促进细胞贴壁增殖,并在培养液中加入胰岛素促进细胞增殖。结果显示软骨细胞可以在琼脂表面保持圆形细胞形态,集簇生长,传至

¹解放军总医院第六医学中心 全军耳鼻咽喉头颈外科中心 (北京,100048)

[△]审校者

通信作者:孙建军, E-mail: jjsun85@sina.com

4 代均可保持圆形形态;胰岛素可以有效促进细胞增殖,细胞增殖数量显著增加^[5-6]。上述工作为鼻中隔软骨细胞作为软骨组织工程的种子细胞应用于临床提供了有力的实验基础。

为促进软骨细胞体外增殖,增加种子细胞数量供给,国外也有学者对软骨细胞体外培养条件进行了探讨。Chua 等^[7]研究了成人鼻中隔软骨细胞培养液中的胎牛血清或人血清含量以及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的最佳浓度。结果显示,培养液中含 5.0 ng/ml bFGF 和 10% 人血清的组合更安全且风险更小,且能有效促进细胞增殖。Chiu 等^[8]研究发现,将人鼻中隔软骨细胞置于生物反应器中培养,含有高浓度血清的培养液以及加入生长因子(bFGF 和转化生长因子 $\beta 2$)都可以使软骨细胞合成更多的糖胺聚糖以及 II 型胶原,所构建的软骨组织块体积也明显增加。提示体外条件下可以通过改变培养条件调节软骨的形成。Watson 等^[9]应用聚乙醇酸(PGA)作为支架,接种鼻中隔软骨细胞进行体外立体培养,结果发现,在 PGA 中加入纤维蛋白凝胶可以有效促进细胞增殖,并能稳定维持细胞外基质成分的产生。证明与 PGA 支架组合的纤维蛋白凝胶可促进软骨组织的产生,具有用于重建手术的潜在价值。

do Amaral 等^[10]在人鼻中隔软骨膜靠近软骨表面的软组织中发现一种具有成软骨活性的细胞群,表达间充质干细胞表面标志。它们显示出体外成骨和软骨的能力,但是不具有形成脂肪的潜力。这种细胞即使在培养系统中没有加入软骨生长因子,也有合成糖胺聚糖、II 型胶原蛋白和少量 I 型胶原蛋白的能力,表明它们是可靠的软骨组织工程种子细胞来源。

上述体外研究与其他部位软骨组织工程研究类似,主要集中于如何促进软骨细胞增殖、增加软骨细胞外基质合成、保持细胞表型稳定等环节,为未来鼻科软骨组织工程的后续研究提供了重要的实验基础。

3.2 体内研究

3.2.1 鼻中隔修复 Bermueller 等^[11]研究了海洋动物来源胶原材料在鼻软骨修复中的作用。由于大多数海洋物种是无脊椎动物,其胶原蛋白中一般不含诸如传染性病原体等对人类有潜在危害的化学物质,因此作为支架的安全性较高。胶原支架接种了来自大鼠和人的鼻软骨细胞,并原位植入大鼠模型中。结果表明,在体外培养过程中未见发生细胞毒性反应。植入体内以后,软骨细胞在支架内增殖并分泌细胞外基质成分,形成新生软骨,提示这种方法有可能应用于鼻中隔软骨重建。该团队在另一项研究中观察了脱细胞胶原基质的作用^[12]。体外实验中,通过接种大鼠鼻中隔软骨细

胞,发现该支架无明显细胞毒性作用;体内实验中,发现植入大鼠模型的脱细胞的异种胶原支架能够很好地支撑周围组织长入,从而阻止了鼻中隔穿孔的进一步发展,具备用于修复鼻中隔穿孔的潜在价值。

3.2.2 隆鼻术 该技术是可以应用软骨组织工程技术的另一个鼻科学领域。目前常用的自体移植术以及合成材料均存在来源有限、二次损伤、感染、排斥反应等各种明显的不足。Mendelson 等^[13]制备了一种双层生物可降解支架,上层为海藻酸凝胶,内含缓释 TGF β -3 的明胶微球,下层为多孔聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLGA),以 10 周龄 SD 大鼠为实验动物,将生物支架植入大鼠鼻背皮肤囊袋下,与鼻背软骨接触。植入 10 周后取材观察,发现含高剂量 TGF- β 3 的支架系统内有新生软骨形成,提示支架-生长因子系统可以原位募集软骨种子细胞,定位于支架系统内增殖,形成新生软骨。Wiggenhauser 等^[14]利用 3D 打印技术制备出精确形状的聚己内酯多孔隆鼻材料,植入迷你猪(minipigs)鼻背鼻骨表面,分别在 2、6 个月取材观察,发现植入材料有逐渐降解趋势,其空隙内有新生组织形成,未见明显的免疫排斥反应。6 个月后免疫组织化学染色发现植入材料空隙内富含 I、II 型胶原,番红 O 染色证实了新生软骨样组织的存在。我们推测,分化形成软骨细胞的种子细胞可能来源于植入材料周围骨膜组织中的间充质干细胞。

Kim 等^[15]应用猪的脱细胞软骨基质粉末,制备成圆片状多孔材料,复合新西兰兔自体关节软骨细胞,体外培养 7 周后植入兔鼻背鼻骨及软骨表面,在术后第 4、8 周分别取材观察,分析植入部位的大体形态、影像学和组织学特征。结果发现实验兔动物没有出现术后炎症和感染的迹象,其隆鼻程度在术后 8 周的观察期内保持良好。术后组织学检查显示虽然支架内未形成大块新生软骨组织,但是材料间隙明显有软骨细胞增殖。提示该材料生物相容性良好,此软骨细胞-软骨脱细胞基质材料复合物具有用于隆鼻术的潜在价值。

3.2.3 鼻翼软骨缺损修复 此类缺损是局部皮肤肿瘤切除后的常见并发症,鼻翼软骨具有独特的几何形状以及生物力学特点,重建鼻翼软骨具有相当难度。Xu 等^[16]通过计算机断层扫描观察并扫描人体标本的鼻翼软骨,并通过 3D 打印技术制备出具有精确鼻翼软骨外形的 PLGA 多孔材料。经复合人鼻中隔软骨细胞,体外培养 4 周后植入裸鼠皮下。8 周后取材观察,发现植入物很好地维持了植入前的外形,外观呈白色软骨状。组织学观察证明有新生软骨形成,并在软骨细胞周围形成含 II 型胶原的软骨基质。上述新形成的软骨不仅在组织学

形态上与天然软骨类似,而且还具有优良的生物力学特性。上述结果提示,结合3D打印技术,通过软骨组织工程技术构建具有精确外形的再生软骨组织是可行的。

4 临床研究

4.1 鼻翼软骨缺损

目前临床策略多采用自体鼻中隔、耳廓软骨或肋软骨,这种重建方法无法避免软骨来源有限以及供区二次损伤的问题。Fulco等^[17]在一项研究中对组织工程化鼻翼软骨进行了临床实验,他们收集患者自体鼻中隔软骨细胞,接种到I型和III型胶原蛋白支架上,培养增殖后植入鼻翼区,随访1年后检查发现,重建的组织显示出与原生翼小叶相似的组织学特性,患者对手术的美学和功能结果满意。

4.2 鼻阀塌陷

Gentile等^[18]应用自体软骨细胞复合富血小板血浆治疗鼻阀塌陷,富血小板血浆为软骨细胞增殖提供生长因子,采用局部注射方式,属于微创治疗。共计11例患者参加该研究,均取得较满意的疗效,术后对其中2例患者局部取材进行组织学观察,发现有与正常组织相似的健康软骨形成。

4.3 隆鼻术

Yanaga等^[19]应用软骨组织工程技术对32例患者进行了隆鼻术。研究者将患者自体耳廓来源的软骨细胞体外扩增后与自体血浆复合,注入预制的鼻背皮肤囊袋中按压塑形。结果发现,体内孵育7d后局部可形成固体软骨组织;6个月后组织学检查发现形成了带软骨膜的成熟软骨。平均随访17个月,所有患者均取得良好的美学效果。作者认为,采用脂肪来源的间充质干细胞作为种子细胞,可以进一步防止因软骨取材造成的局部损伤。

5 未来趋势与方向

与其他领域的软骨组织工程研究类似,鼻软骨组织工程研究同样聚焦于种子细胞、基质材料、生长因子以及相关的构建技术。

5.1 种子细胞

迄今,自体软骨细胞仍是软骨组织工程种子细胞的理想选项,但是有限的组织来源以及扩增能力,在很大程度上制约了其在临床广泛应用。除成体软骨细胞外,干细胞被认为是软骨组织工程中有希望的细胞来源。目前的诸多研究证实,间充质干细胞可以在一定条件下诱导分化成软骨细胞^[20]。对间充质干细胞分化调控及远期转归进行研究,以期规避其可能存在的风险^[21],将是今后软骨种子细胞研究的重点。

5.2 支架材料

支架材料是软骨组织工程重点研究方向之一,理想的软骨组织工程支架材料应具有以下特点:①良好的组织相容性;②可控制的降解特性;③良好

的适形性与可塑性,易于加工,适用于3D打印;④良好的生物力学特性;⑤良好的亲水性;⑥无细胞毒性,适于细胞吸附增殖。

5.3 3D打印

近年来,随着增材制造技术的发展,3D打印技术越来越多地应用于工程化软骨组织的构建^[22]。该技术的优势在于可以精确控制打印材料的三维形态与空间结构,能够做到个体化成形以及即时性构建^[23]。结合先进的数字影像扫描,将3D打印技术应用于鼻软骨组织缺损重建,是鼻软骨组织工程研究的重要分支领域。

总之,在广义软骨组织工程研究的基础上,结合鼻部软骨自身独特的生物学特点和生理功能,以及鼻部整形的特殊需求具有相当的挑战性。我们认为,采用适当的种子细胞以及支架材料、生长因子,设计合理的组织工程软骨再生策略(例如:传统移植、原位构建、可注射模式等),将是未来鼻部软骨组织工程修复与重建研究的重点和难点。

鼻软骨病变(或缺损)的修复作为鼻科组织工程技术的重要应用领域,迄今进展仍显滞后。在已发表的文献中,针对鼻科疾病的软骨组织工程技术的基础与应用研究还不多。虽有少量应用研究报告,但主要集中于动物实验,距临床应用尚有相当的距离。已有的研究结果提示,软骨组织工程技术在鼻部整形和重建等外科手术中具有广泛的应用需求与潜力,值得进一步研究。

参考文献

- [1] WORMALD J C, FISHMAN J M, JUNIAT S, et al. Regenerative medicine in otorhinolaryngology [J]. J Laryngol Otol, 2015, 129: 732—739.
- [2] LIANG X, WANG K, MALAY S, et al. A systematic review and meta-analysis of comparison between autologous costal cartilage and alloplastic materials in rhinoplasty [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2018, 71: 1164—1173.
- [3] GUPTA N, CRUZ M A, NASSER P, et al. Fibrin-Genipin Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering in Nasal Reconstruction [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2019, 128: 640—646.
- [4] 李雪盛, 黄金中. 培养状态下成人鼻中隔软骨细胞生物学特性的研究 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2000, 14 (11): 485—487, 530.
- [5] 李雪盛, 黄金中. 琼脂胰岛素对体外培养人鼻中隔软骨细胞生长增殖的影响 [J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2000, 35 (6): 77—77.
- [6] 黄金中, 李雪盛. 促进体外培养人鼻中隔软骨细胞增殖方法的研究 [J]. 耳鼻咽喉头颈外科, 2000, 7 (5): 294—297.
- [7] CHUA K H, AMINUDDIN B S, FUZINA N H, et al. Basic fibroblast growth factor with human serum supplementation: enhancement of human chondrocyte proliferation and promotion of cartilage regeneration

- [J]. Singapore Med J, 2007, 48: 324—332.
- [8] CHIU L L, TO W T, LEE J M, et al. Scaffold-free cartilage tissue engineering with a small population of human nasoseptal chondrocytes [J]. Laryngoscope, 2017, 127: E91—E99.
- [9] WATSON D, SAGE A, CHANG A A, et al. Growth of human septal chondrocytes in fibrin scaffolds [J]. Am J Rhinol Allergy, 2010, 24: e19—22.
- [10] DO AMARAL R J, PEDROSA CDA S, KOCHER M C, et al. Isolation of human nasoseptal chondrogenic cells: a promise for cartilage engineering [J]. Stem Cell Res, 2012, 8: 292—299.
- [11] BERMUELLER C, SCHWARZ S, ELSAESSER A F, et al. Marine collagen scaffolds for nasal cartilage repair: prevention of nasal septal perforations in a new orthotopic rat model using tissue engineering techniques [J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19: 2201—2214.
- [12] ELSAESSER A F, BERMUELLER C, SCHWARZ S, et al. In vitro cytotoxicity and in vivo effects of a decellularized xenogeneic collagen scaffold in nasal cartilage repair [J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20: 1668—1678.
- [13] MENDELSON A, AHN J M, PALUCH K, et al. Engineered nasal cartilage by cell homing: a model for augmentative and reconstructive rhinoplasty [J]. Plast Reconstr Surg, 2014, 133: 1344—1353.
- [14] WIGGENHAUSER P S, BALMAYOR E R, ROTTER N, et al. In vivo evaluation of a regenerative approach to nasal dorsum augmentation with a polycaprolactone-based implant [J]. Eur J Med Res, 2019, 24: 6.
- [15] KIM Y S, PARK D Y, CHO Y H, et al. Cultured chondrocyte and porcine cartilage-derived substance (PCS) construct as a possible dorsal augmentation material in rhinoplasty: A preliminary animal study [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2015, 68: 659—666.
- [16] XU Y, FAN F, KANG N, et al. Tissue engineering of human nasal alar cartilage precisely by using three-dimensional printing [J]. Plast Reconstr Surg, 2015, 135: 451—458.
- [17] FULCO I, MIOT S, HAUG M D, et al. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial [J]. Lancet, 2014, 384: 337—346.
- [18] GENTILE P, SCIOLI M G, BIELLI A, et al. Reconstruction of alar nasal cartilage defects using a tissue engineering technique based on a combined use of autologous chondrocyte micrografts and platelet-rich plasma [J]. Plast Reconstr Surg Glob Open, 2016, 4: e1027.
- [19] YANAGA H, YANAGA K, IMAI K, et al. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair [J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117: 2019—2030.
- [20] VATS A, BIRCHALL M. Stem cells and regenerative medicine: potentials and realities for rhinology [J]. Rhinology, 2010, 48: 259—264.
- [21] OSENI A O, BUTLER P E, SEIFALIAN A M. Nasal reconstruction using tissue engineered constructs: an update [J]. Ann Plast Surg, 2013, 71: 238—244.
- [22] SHEN S, CHEN M, GUO W, et al. Three Dimensional Printing-Based Strategies for Functional Cartilage Regeneration [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2019, 25: 187—201.
- [23] PAUL G M, REZAIENIA A, WEN P, et al. Medical Applications for 3D Printing: Recent Developments [J]. Mo Med, 2018, 115: 75—81.

(收稿日期: 2019-08-23)

(上接第 1216 页)

- [26] 朱思翔, 彭本刚. 睡眠障碍对良性阵发性位置性眩晕治疗效果的影响 [J]. 中华耳科学杂志, 2016, 14(4): 549—550.
- [27] ICHIJO H. Onset time of benign paroxysmal positional vertigo [J]. Acta Otolaryngol, 2017, 137: 144—148.
- [28] SUGAYA N, ARAI M, GOTO F. The effect of vestibular rehabilitation on sleep disturbance in patients with chronic dizziness [J]. Acta Otolaryngol, 2017, 137: 275—278.
- [29] EDELMAN S, MAHONEY A E, CREMER P D. Cognitive behavior therapy for chronic subjective dizziness: a randomized, controlled trial [J]. Am J Otolaryngol, 2012, 33: 395—401.
- [30] TRAUER J M, QIAN M Y, DOYLE J S, et al. Cognitive Behavioral Therapy for Chronic Insomnia: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. Ann Intern Med, 2015, 163: 191—204.
- [31] CIPRIANI G, LUCETTI C, DANTI S, et al. Sleep disturbances and dementia [J]. Psychogeriatrics, 2015, 15: 65—74.
- [32] 王晶, 李晓燕, 吴飞凤, 等. 持续正压通气治疗头晕的临床疗效分析 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(8): 609—612.
- [33] SPENCE D W, KAYUMOV L, CHEN A, et al. Acupuncture increases nocturnal melatonin secretion and reduces insomnia and anxiety: a preliminary report [J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2004, 16: 19—28.
- [34] YIN X, GOU M, XU J, et al. Efficacy and safety of acupuncture treatment on primary insomnia: a randomized controlled trial [J]. Sleep Med, 2017, 37: 193—200.
- [35] HOU Z, XU S, LI Q, et al. The Efficacy of Acupuncture for the Treatment of Cervical Vertigo: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 7597363.

(收稿日期: 2018-12-04)