[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61L 27/46 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480038360.5

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 100509064C

[22] 申请日 2004.11.4
[21] 申请号 200480038360.5
[30] 优先权
[32] 2003.11.4 [33] EP [31] 03292759.2
[86] 国际申请 PCT/FR2004/002844 2004.11.4
[87] 国际公布 WO2005/044326 法 2005.5.19
[85] 进入国家阶段日期 2006.6.21
[73] 专利权人 国家健康医学研究所
地址 法国巴黎
共同专利权人 南特大学
[72] 发明人 P·韦斯 J·古伊克斯
G·德古尔西 G·格里曼迪
C·维纳蒂埃尔
[56] 参考文献
US 6129761A 2000.10.10
WO 97/05911A1 1997.2.20
审查员 赵 莉
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 张力更

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 2 页

[54] 发明名称

水凝胶用于培养软骨细胞的用途和用于制备在水凝胶中整合的细胞的复合物的体外方法

[57] 摘要

本发明涉及随着 pH 而自交联的硅烷化羟乙基纤维素(HEC)或硅烷化羟丙基甲基纤维素(HPMC)水凝胶用于三维体外培养软骨细胞的用途。

1. 随着 pH 而自交联的硅烷化羟乙基纤维素（HEC）或硅烷化羟丙基甲基纤维素（HPMC）水凝胶用于三维体外培养软骨细胞的用途。

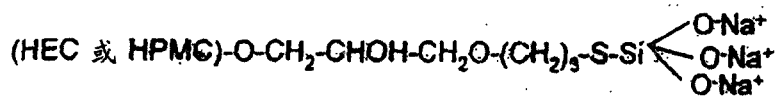
2. 权利要求 1 的用途，其中水凝胶通过 HEC 或 HPMC 与式（1）化合物的反应而获得：

$$X\,Si(OZ)_3 \qquad (1)$$

其中 X 表示卤原子或具有环氧官能团的烃基，Z 选自氢原子、碱金属和烷基。

3. 权利要求 1 或 2 所述的用途，其中 HEC 或 HPMC 携带占 HEC 或 HPMC 总干重的 0.5%至 5%的硅烷醇盐侧基或者硅烷醇碱金属盐或者铵盐的前体侧基。

4. 权利要求 1 的用途，其中水凝胶由下述简化式的聚合物形成：



。

5. 权利要求 2 的用途，其中所述烃基是 C_{2-20} 烃基。

6. 权利要求 2 的用途，其中所述烷基是 C_{1-5} 烷基。

7. 一种用于制备在水凝胶中整合的细胞的复合物的体外方法，该复合物用于注入软骨位点中，其中所述方法包括：在具有适合水凝胶交联的 pH 的生物缓冲液中，在适合软骨细胞在水凝胶中整合和三维培养的条件和时间周期下，将软骨细胞与随着 pH 而自交联的硅烷化羟乙基纤维素（HEC）或硅烷化羟丙基甲基纤维素（HPMC）水凝胶进行体外混合。

8. 一种用于制备在水凝胶中整合的细胞的复合物的体外方法，该复合物用于注入软骨位点中，其中所述方法包括：在具有适合水凝胶交联的 pH 的生物缓冲液中，在适合由能够进行软骨形成性分化的未分化细胞的分化得到的软骨细胞在水凝胶中整合和三维培养的条件和时间周期下，将所述未分化细胞与随着 pH 而自交联的硅烷化羟乙基纤维素（HEC）或硅烷化羟丙基甲基纤维素（HPMC）水凝胶进行体外混合。

9. 权利要求 7 的方法，包括下述的体外步骤：

- 在固体载体上的软骨细胞的单层扩增；

- 通过其单层扩增而去分化的扩增的软骨细胞的收集；

- 在具有适合水凝胶交联的 pH 的生物缓冲液中将去分化的扩增的软骨细胞与水凝胶混合，导致软骨细胞在水凝胶内整合并导致其再分化。

10. 权利要求 7 至 9 中任一项的方法，其中水凝胶通过 HEC 或 HPMC 与式（1）化合物的反应而获得：

$$X\,Si(OZ)_3 \qquad (1)$$

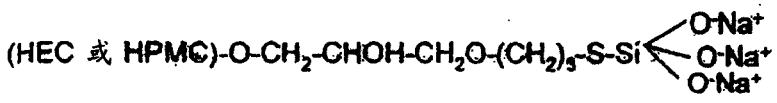
其中 X 表示卤原子或具有环氧官能团的烃基，Z 选自氢原子、碱金属和烷基。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述烃基是 C_{2-20} 烃基。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述烷基是 C_{1-5} 烷基。

13. 权利要求 7 至 9 中任一项的方法，其中 HEC 或 HPMC 携带占 HEC 或 HPMC 总干重的 0.5%至 5%的硅烷醇盐侧基或者硅烷醇碱金属盐或者铵盐的前体侧基。

14. 权利要求 7 至 9 中任一项的方法，其中水凝胶由下述简化式的聚合物形成：



。

水凝胶用于培养软骨细胞的用途和用于制备在水凝胶中整合的细胞的复合物的体外方法

技术领域

本发明涉及纤维素水凝胶用于软骨细胞的三维培养和在软骨位点用于其植入的用途。

背景技术

软骨是一种特殊的非血管化、非神经支配的坚固且弹性的支持性结缔组织。其存在于肋骨、胸骨、 鼻和耳中，也存在于关节中。软骨包含被称为软骨细胞的特殊细胞和主要由胶原纤维和蛋白聚糖组成的胞外基质（ECM）。

关节软骨可能是炎性源(风湿性关节炎、骨关节炎)、创伤源或与衰老相关（关节病）的众多损害的部位。这些软骨病变的建立导致较长期的胞外基质劣化和细胞性降低。不存在血管化和软骨细胞增殖使得这些组织具有低修复能力，这导致这些分解代谢过程成为不可逆过程。由于人口的老化，这些退化性病变目前影响了很大一部分比例的人口，因而其成为了一个主要的公共健康问题。在这方面，多年来科学界对再生功能性软骨组织的方法很感兴趣。

已经提出打磨软骨成形术、微骨折或者海绵化(spongialisation)外科技术，目的是刺激软骨的差的自发修复性能(Hunziker, 2002)。这些使得软骨下骨来源的血凝块形成的技术导致形成保持纤维性和暂时性(transitoire)的软骨组织(Shapiro 等, 1993)。同时也已经研究了用于移植具有软骨形成性质的组织的技术。使用骨膜或软骨膜自体移植和骨软骨组织(自体骨软骨镶嵌移植成形术)已经可以在植入后新生软骨类型的组织(Hunziker, 2002)。这些技术的众多局限性(移植物的不稳定性、钙化、临床效果的低再现性)和它们对修复病灶损伤的适应症的限制最近促使开发研究了新的组织工程技术，该技术适用于软

骨的创伤病症。

Brittberg 等首先提出了基于自体软骨细胞移植的修复方法(Brittberg 等,1994)。该方法以三个步骤来进行:首先从非承重区移出软骨片段以分离软骨细胞,其然后体外繁殖为单层,之后再植入损伤处的骨膜片下。其结果显示出修复了软骨缺损,但是患者必须忍受两次大的外科手术操作。而且仍然要确定其单层扩增后的细胞表型。

也已经研究了大量的植物或动物来源的三维基质,例如胶原海绵、纤维蛋白、透明质酸或藻酸盐(Cancedda 等,2003。与使用这些生物材料相关的病毒传播的风险以及在临床前试验期间观察到的炎性反应促使当前研究朝着完全合成的生物材料的方向发展(Hunziker,2002)。已经提出了使用聚合物,例如聚乳酸、聚乙醇酸、碳纤维、聚酯-氨基甲酸酯、达可纶和特氟隆,并且体外用于软骨细胞或者间充质细胞的 3D 培养。在软骨位点植入后,这些合成聚合物中的一些已引起免疫响应或炎症(Cancedda 等,2003)。

可注射的水凝胶组合物尤其描述于专利 US6,129,761 中。

发明内容

本发明人目前已经证实了在随着 pH 而自交联的水凝胶中三维培养软骨细胞以便在软骨位点中植入的益处。

所用水凝胶是随着 pH 而自交联的水凝胶,它由羟乙基纤维素(HEC)或羟丙基甲基纤维素(HPMC)水溶液形成,在该羟乙基纤维素(HEC)或羟丙基甲基纤维素(HPMC)上接枝有允许在 HEC 或 HPMC 链之间形成共价键的硅烷基团。

在国际专利申请 WO 97/05911 中,这种类型的聚合物材料被描述为与无机填料相结合。

这种材料优选由下述简化式的聚合物组成:

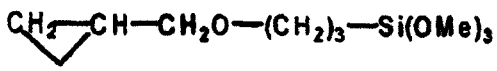
$$(\text{HEC 或 HPMC})\text{-O-X-Si}(\text{OZ})_3$$

其可以通过羟乙基纤维素(HEC)或羟丙基甲基纤维素与式(1)化合物反应而获得:

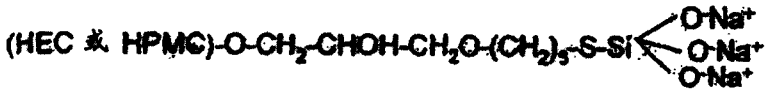
$$X\,Si(OZ)_3 \qquad (1)$$

其中 X 表示卤原子或具有环氧官能团的烃基，尤其是 C_{2-20} 烃基，Z 选自氢原子、碱金属和烷基，尤其是 C_{1-5} 烷基。

式(1)化合物例如可以是(3-缩水甘油氧基丙基)三甲氧基硅烷:

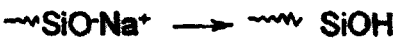


在碱性介质中，有机硅化合物接枝到 HEC 或 HPMC 上，环氧化物开环，并且甲氧基硅烷基团水解形成下述简化式的聚合物:



该聚合物优选是硅烷化的 HPMC 聚合物。

这种聚合物在 pH 高于或等于约 12.4 的水溶液中是稳定的。酸化该溶液导致粘度逐渐降低并且形成水凝胶。这种物理现象对应于聚合物的交联，该交联通过下述步骤进行: (i)将硅烷醇盐基团转化成硅烷醇基团:



然后通过下述步骤形成三维网络: (ii)一个硅烷醇与另一个硅烷醇的缩合:



和/或

(iii)硅烷醇与纤维素醚或取代基的环上羟基的缩合:



这种由于聚合物水溶液中 pH 降低而引起的共价类型的交联是可逆的，当介质的 pH 增加时，水凝胶再溶解。因此，在使用前，合成的聚合物可以是可溶解于碱性氢氧化钠溶液中的粉末的形式。凝胶化 pH 为 7 至 12，这取决于所希望的交联速率。

得到的凝胶通过高压灭菌法灭菌(例如，在 121℃下 20 分钟)。

在生物利用之前，碱性水溶液中的聚合物在交联之前也可以与生理学缓冲溶液混合。在整个混合物的交联之前，最终混合物的 pH 因而适应于所希望的处理时间。这个交联时间可通过振荡流变测定法测定，并且可以随着这种混合物的参数（主要是 pH 和温度）而在 5 分钟至 5 天之间变化(Bourges 等,2002a; Bourges 等,2002b)。

为了提供用于特定应用的适宜的交联速率，希望 HEC 或 HPMC 携带占 HEC 或 HPMC 总干重的 0.5%至 5%的硅烷醇盐侧基或者硅烷醇碱金属盐或者铵盐的前体侧基。

本发明涉及随着 pH 而自交联的这种类型的硅烷化 HEC 或硅烷化 HPMC 水凝胶用于三维体外培养软骨细胞的用途。

所使用的水凝胶尤其具有下述优点:

- 其与被整合（intégré）到其内部的软骨细胞是生物相容的;
- 软骨细胞紧密地整合到水凝胶中;
- 通过单层扩增去分化的软骨细胞在水凝胶内再分化，并且保持软骨细胞的特性;
- 所述交联可通过添加到水凝胶和软骨细胞的混合物中的生物缓冲液的 pH 来控制。

在水凝胶中培养的细胞优选为人或动物的软骨细胞，优选患有软骨损伤的患者的自体软骨细胞。这些细胞可以是例如取自软骨组织，例如来自关节软骨或者来自鼻软骨的一部分。

在水凝胶中培养的这些细胞也可以是能够进行软骨形成性分化的未分化细胞。因此也包括间充质干细胞或来自脂肪组织的干细胞。前者特别地可以从骨髓中取出得到(通常通过使用注射器从骨小梁例如长骨、髂嵴抽吸)，后者通过吸脂作用得到(通常是真空抽吸脂肪物质)。

然后，在存在水凝胶和允许软骨细胞表型诱导的条件下，培养这些未分化的细胞。这些条件优选为在常规培养基(DMEM 或 MEM)中的培养物，如果需要，给其中加入谷氨酰胺和抗生物，优选自体的、动物的或人类血清、或血清代用品和其它的软骨形成添加剂。实例具体地包括胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠、抗坏血酸、TGF-β、IGF-1、BMP(骨

形态发生蛋白)、地塞米松、亚油酸、BSA(牛血清清蛋白) 或丙酮酸酯。也可使用其它添加剂以诱导细胞的软骨形成分化。培养物优选在 37℃下和湿润条件下产生，并存在需要时可改变的氧浓度。已经发现缺氧是软骨细胞表型产生的重要原因。

本发明还涉及一种用于制备在水凝胶中整合的细胞的复合物（complexe）的体外方法，该复合物用于注入软骨位点中，其中所述方法包括: 在具有适合水凝胶交联的 pH 的生物缓冲液中，在适合软骨细胞，任选地由所述未分化细胞的分化得到的软骨细胞在水凝胶中整合和三维培养的条件和时间周期下，将软骨细胞或能够进行软骨形成性分化的未分化细胞与随着 pH 变化而自交联的硅烷化 HEC 或 HPMC 水凝胶进行体外混合。

本领域技术人员可以使用任意的生物缓冲液。实例包括磷酸盐缓冲液(PBS,磷酸盐缓冲盐溶液)、HEPES 或 TRIS 缓冲液。也可以使用本领域技术人员已知的任意生物培养基，例如 DMEM 培养基或α-MEM 培养基(α最低基础培养基)。

优选地，所述方法包括下述的体外步骤:

- 在固体载体例如培养皿上的软骨细胞的单层扩增;
- 通过其单层扩增而去分化的扩增的软骨细胞的收集;
- 在具有适合水凝胶交联的 pH 的生物缓冲液中将去分化的扩增的软骨细胞与水凝胶混合，导致软骨细胞在水凝胶内整合并导致其再分化。

由硅烷化HEC或HPMC形成的水凝胶的流变学性质使得其能够被注射到植入位点，由此促进了非损伤外科手术的软骨细胞的向量化(vectorisation)。

在其中培养软骨细胞的水凝胶可被植入通常被软骨占据的损伤的位点。

目标损伤可以是与创伤后遗症相关的病灶软骨物质的损失，或者更一般地是任意骨关节的或人造的（plastique）软骨病状或损失。

本发明可应用于所有软骨组织的工程，所述软骨组织包括下述的

类型:

- 透明软骨(存在于鼻中隔、喉、气管环、关节、或者肋骨的胸骨端);
- 纤维软骨(存在于椎间盘、特殊的关节软骨和耻骨联合);
- 弹性软骨(存在于耳廓、外耳道、会厌、咽鼓管和喉软骨)。

椎间盘的修复是特别希望的。腰痛的病因未知,但可能归因于椎间盘和其不可避免的和衰老有关的退化。椎间盘是纤维软骨结构,其由四个位于相邻锥体之间的同心组织组成。外层是外部纤维环,其由明显定向的胶原纤维组成。内部纤维环具有较低胶原密度,比外部环的组织结构差一些。过渡区是将内部环与髓核分开的薄的纤维组织区,髓核为形成核心的胶性中央区。椎间盘为低血管化(hypovascularisé)的,具有有限的神经分布。在成年人中,椎间盘依靠营养物和代谢物的扩散来提供养料。椎间盘包含在主要由水、蛋白聚糖、胶原和非胶原蛋白组成的大量胞外基质中内含的相对少量的细胞。椎间盘的细胞合成这些大分子,并维护和修复这些胞外基质。在成年人中,软骨细胞是唯一的髓核细胞。内部纤维环、过渡区和相邻锥体的软骨板也包含软骨细胞,而外部环主要包含成纤维类型的细胞。在所有个体中都存在一定程度的椎间盘退化。已经发现了年龄与椎间盘退化之间的清楚的关联性。从生命的第二个十年开始已经观察到了该退化。由于后天的和遗传的因素,有椎间盘症状的人加速了正常衰老过程。

因此,本发明也涉及治疗人体或动物体的方法,包括通过注入如上所述的水凝胶来给药,该水凝胶例如通过使用上述方法事先已经体外植入了软骨细胞。

可以使用包括可杀菌注射器和配有一次性注射器内芯的连接件的系统来进行注射,例如使用 HAWE NEOS DENTAL 销售的注射器,其包括通过高压灭菌法灭菌的注射器(标号 440,注射器 Hawe-Centrix C-R®, Mark III)和连接件(标号 445)。

下述的附图和实施例用于阐述本发明,但不限制其范围。

附图说明:

图 1A 至 1C 示出了在对照条件下(不存在水凝胶)、或者与 si-HPMC 水凝胶对照,或者在存在放线菌素 D(5μg/ml)下培养 24、48 和 72 小时后软骨细胞的 MTS 活性。SW1353(图 1A)、C28/I2(图 1B)和人类鼻软骨细胞(图 1C)。在每个时期与对照组相比,*p <0.001。

图 2A 至 2C 示出了在对照条件下(不存在水凝胶)、或者与 si-HPMC 水凝胶对照,或者在存在放线菌素 D(5μg/ml)下培养 24、48 和 72 小时后软骨细胞的计数。SW1353(图 2A)、C28/I2(图 2B)和人类鼻软骨细胞(图 2C)。在每个时期与对照组相比,*p <0.001。

具体实施方式

实施例

实施例 1: 水凝胶的制备

材料:

- HPMC E4M®(Colorcon- Dow Chemical, 法国)
- 环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷(GPTMS)(Acros, 比利时)
- HEPES(Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- NaOH(VWR International, Fontenay-sous-Bois,法国)
- NaCl(VWR International)
- HCl 0.1M(Sigma Aldrich).
- 胎儿腓肠血清(FCS)(Dominique Dutscher,Brumath,法国).

a) 硅烷化羟丙基甲基纤维素(Si-HPMC)粉末的合成

以用量为 240 克的 HPMC 进行合成。所选的多糖是 E4M®。在 6 升烧瓶中,在有机溶剂中的非均相介质中使用环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷(GPTMS)进行合成(Bourges 等, 2002)。合成是在沸腾 3 小时下进行的。硅烷化 HPMC 首先用烘箱干燥 1 夜,然后冷冻干燥(Christ Alpha 1-4 ST)。

b) 硅烷化羟丙基甲基纤维素溶液的制备

将 6 克 Si-HPMC 粉末溶解在 200ml 的 0.2 M 的 NaOH 溶液中。搅拌该混合物 48 小时。然后在 0.09M 的 NaOH 溶液中透析 Si-HPMC 溶液 16 小时。之后，在 0.09M NaOH 溶液中再透析 2 小时。再将该 3%Si-HPMC 溶液等分并蒸汽灭菌(121℃,30 分钟)。

c) 诱导水凝胶交联

在层流净化罩下，通过混合 7.5ml 的 Si-HPMC 溶液和 7.5ml 的 HEPES 缓冲液，并加入 10%的 FCS 来即刻制备用于细胞培养的水凝胶。HEPES 缓冲液通过将 3.1 g 的 HEPES 和 0.8g 的 NaCl 溶解在 0.03 M HCl 溶液中来制备。然后将该溶液等分并蒸汽灭菌(121℃,30 分钟)。

涡旋搅拌该 HEPES/Si-HPMC 混合物 15 秒，然后以 1200 rpm 离心 2 分钟。将该混合物转移到培养皿中。1 小时后加入培养基。

d) 通过流变学物理表征水凝胶

装置和方法

为了表征水凝胶的交联，本发明人测量了两个流变学参数：分散模量 G"(液体的特征)和保持模量 G'(固体的特征)。通过使用装备有直径为 60mm 和角度为 1^0 的平面锥体(C60/1 titan 平面锥体，Thermo Haake)的流变仪来进行这种测量。切断面与板之间的间距为 0.053mm。在 37℃的温度下，在振荡模式下以 3 种振荡频率(1 Hz，3.2Hz 和 10 Hz)并在 1 帕斯卡的强加应力下测量，时间为 1,200,000 秒(13.8 天)。结果用 Pa 表示。

结果

在水凝胶的制备过程中，其具有粘性液体的特性。在其交联期间，它的物理特性朝着凝胶的特性发展。在实施例 1 中呈现的根据优选实施方案制备的水凝胶在其交联过程完成以后(10 天)由 1.5%的干聚合物和 98.5%的水（水含量与软骨的水含量相当）组成。水凝胶的计算的网格（maille）尺寸(0.22μm)看来小于细胞的尺寸。

为了确定水凝胶的物理性质，例如与交联过程的开始相对应的凝胶点、交联时间和水凝胶的网格尺寸，用三种不同的频率测定液体分

量(G")和弹性分量(G′)随时间的变化。G′/G"对因而对应于每个频率。描绘每对的 TanΔ，这三个曲线相交于一点：凝胶点。水凝胶的交联在其制备后 33 分钟开始，完成于 244 小时(10 天)后，在该完成时间，弹性分量(G^1)稳定在数值为 310 Pa 的水平。弹性分量的这个数值使得我们可以计算水凝胶的网格尺寸。

$$\xi=\left(\frac{KT}{G'}\right)^{1/3}=\left(\frac{1.38\times10^{-23}\times300}{310}\right)^{1/3}=\left(\frac{4.14\times10^{-21}}{310}\right)=23.7\text{ 纳米}$$

在上述制备条件下，水凝胶的平均统计网格尺寸（Xi）为 0.023 μm。

表 1: 3%Si-HPMC 水凝胶的流变学表征的结果

Si-HPMC 溶液体积	缓冲液体积	Si-HPMC %	最终的 Si-HPMC%	PH 混合物	G'	KT/G'	Xi(ξ) 微米	凝胶点（分钟）
1	1	3.00%	1.50%	7.37	310	1.3355E-23	0.023	33

实施例 2: 水凝胶的细胞毒性试验

材料和方法

2.1 细胞培养

a) 软骨细胞系

材料:

- Dulbecco's 改性 Eagle 培养基(DMEM)(Invitrogen 公司，Paisley, UK).
- Ham's F12 营养培养基(Invitrogen 公司).
- 青霉素/链霉素(Invitrogen 公司)
- L-谷氨酰胺(Invitrogen 公司)
- 胰蛋白酶/EDTA(Invitrogen 公司)。

本发明人使用的人软骨细胞系 SW1353 和 C28/I2 来自人软骨肉瘤(Mengshol 等，2000)和来自被类人猿病毒 40 的 T 抗原无限增殖化的人肋骨软骨(Goldring 等，1994)。在包含 5%CO_2 的湿润气氛和 37℃下，

在 DMEM 和 Ham's F12 体积/体积混合物中培养这些细胞，向该混合物中添加 10%的 FCS、1%的青霉素/链霉素和 1%的 L-谷氨酰胺(完全 DMEM/F12)。

每隔一天全部更新培养基。一旦细胞达到 80 至 90%的汇合，则用 2ml 的胰蛋白酶(0.025%)/EDTA(0.01%)处理它们。接着，在 37℃下培养 3 分钟，收集胰蛋白酶/EDTA 溶液，在 8ml 的完全 DMEM/F12 培养基存在下进行离心处理(8 分钟，1200 rpm)。在除去上清液后，用 10ml 的完全 DMEM/F12 重组细胞沉淀物(culot)。然后对细胞计数，并且以 10,000 细胞/cm^2 的密度分布于 25cm^2 的瓶中。

b) 初级软骨细胞

- 人鼻软骨细胞的分离

材料:

- Hank's 平衡盐(HBSS, Invitrogen 公司)
- 蛋白酶(Pronase, Sigma-Aldrich)
- IV 型胶原酶(Sigma-Aldrich)。

得到经过再造鼻整形术的患者通知许可后，取出人鼻软骨。在层流净化罩下，在 Hank's 平衡盐(HBSS)中洗涤鼻软骨 5 次，切片。然后，于 37℃下在包含 1 mg/ml 蛋白酶的 HBSS 中培养软骨切片 30 分钟。随后在 HBSS 中洗涤切片 3 次，再在包含 0.625 mg/ml 的胶原酶的完全 DMEM(10%FCS, 1%青霉素/链霉素和 1%L-谷氨酰胺)中搅拌培养 4 小时。将上清液以 1400rpm 离心 5 分钟。在 HBSS 中洗涤沉淀物 1 次，离心(8 分钟,1200rpm)，并且再悬浮于 10ml 的完全 DMEM 中。对细胞计数，将细胞转移到 25cm^2 瓶中，细胞密度为 10,000 细胞/cm^2。在 37℃和含有 5%CO_2 的湿气氛中培养细胞。每隔一天更新培养基。一旦细胞达到 80 至 90%的汇合，则用上面描述的胰蛋白酶/EDTA 处理。

- 兔关节软骨细胞的分离

材料:

- 透明质酸酶(Sigma-Aldrich)
- 胰蛋白酶(Sigma-Aldrich)

- 溶组织梭菌（*Clostridium histolyticum*）的 II 型胶原酶(290 U/mg, Sigma-Aldrich)
- 细胞筛(Falcon, Franklin Lakes, USA)。

正如 Ghayor 等（2000）在以前所描述的，在麻醉后通过颈脱位法杀死 12 或 13 天龄的新生兔子。在层流净化罩下，切下前爪和后爪，剥离它们的软组织。然后使其膝关节和肩关节脱位。使用解剖刀将关节软骨切成薄切片，得到的切片置于 HBSS 中。首先于 37℃下在 12ml 包含 0.05%透明质酸酶的 HBSS 中培养这些切片 10 分钟，然后于 37℃下在 6ml 包含 0.2%胰蛋白酶的 HBSS 中培养切片 15 分钟。在 HBSS 中洗涤 2 次后，将切片转移到包含 0.2%胶原酶的 HBSS 中，在 37℃下培养 30 分钟。

在包含 0.03%胶原酶的完全 DMEM 溶液中培养 15 小时，使切片经过最后的消化(digestion)步骤。用细胞筛过滤消化产物，收集并离心(8 分钟,1200rpm)。再将细胞沉淀物悬浮于 20ml 的完全 DMEM 中。对细胞计数，将细胞转移到 25cm^{2}瓶中，细胞密度为 10,000 细胞/cm^2。最后，在 37℃下和含有 5%CO_2的湿气氛中培养细胞。每隔一天更新培养基。一旦细胞达到 80 至 90%的汇合，则用上面描述的胰蛋白酶/EDTA 处理。

2.2. 水凝胶细胞毒性的研究

a) 试验条件

材料:

- Corning-Costar 24-孔培养皿(Corning BV, Schiphol-Rijk, 荷兰)。
- 放线菌素 D(Sigma-Aldrich)
- DMSO(Sigma-Aldrich)
- 甲基四唑鎓盐(MTS)(Cell Titer 96 MTS, Promega 公司, Madison, WI)。
- 苯基甲基亚砜(PMS)(Sigma-Aldrich)。
- 磷酸盐缓冲盐溶液(PBS, Invitrogen 公司)

为了确定水凝胶的细胞毒性，将人初级软骨细胞，SW1353 和 C28/I2 细胞分布于 24-孔培养皿中，密度为 10,000 细胞/cm^2。在 37℃和含有 5%CO_2的湿气氛中培养 24 小时后，在存在(500μl Si HPMC/孔)或不存在(500μl 完全培养基)水凝胶下培养细胞 24、48 和 72 小时。在不存在水凝胶下培养的细胞还用放线菌素 D(5μg/ml)或其赋形剂(DMSO)处理，得到阳性细胞毒性对照。

b) MTS 试验

这种比色试验用于测定活细胞的线粒体在甲臜中氧化四唑鎓盐 MTS 的能力。形成的有色产物与线粒体的脱氢酶活性成正比。因此，吸收度测定能够定量细胞生存力。在上文描述的条件下培养 24、48 和 72 小时后，用完全培养基洗涤细胞，在 37℃下，在包含 48μg/ml PMS 和 2 mg/ml MTS 的 100μl MTS 试剂的存在下培养细胞 1 小时。用微量培养板读出器(MRX, Dynatech Laboratories, VWR International)在 490 nm 进行吸收度测定。结果以相对于对照条件（不存在水凝胶下培养的细胞）的 MTS 活性的百分数来表示。

c) 细胞计数

在上面规定的条件下培养 24、48 和 72 小时后，吸出含有或不含水凝胶的培养基，用 200μl 的胰蛋白酶/EDTA 代替。在 37℃下和含有 5%CO_2的湿气氛中培养细胞 2 分钟。然后收集细胞，并在 2ml 完全培养基中离心处理(8 分钟, 1200rpm)。将沉淀物再悬浮于 2ml 完全培养基中。用台盼蓝溶液(在 PBS 中，0.04%)对 Malassez 细胞进行活体染色后，对细胞计数。结果以每孔的细胞总数表示。

结果

2.3 人类鼻软骨细胞的表征

为了表征分离的人类鼻软骨细胞的表型，本发明人在分离之后和单层培养期间通过 RT/PCR 研究软骨细胞表型的特定标记的表达。该研究表明新分离的鼻软骨细胞(P0)表达胶原 II、聚集蛋白聚糖和胶原 X，以及胶原 I。在不同的途径中，本发明人观察到这些各种基因表达的变体。在 P0 和 P3 之间，II 型胶原的表达减少。在 P0 和 P1 之间，聚

集蛋白聚糖的表达降低。新分离的软骨细胞少量表达胶原 X，在 P3，不再能检测到胶原 X 的表达。相反，在 P2 和 P3 之间，I 型胶原的表达显著增加。

这些结果表明新分离的鼻软骨细胞表达胶原 II、聚集蛋白聚糖和胶原 X。在单层培养物中，这些软骨细胞标记的表达下降，其与 I 型胶原表达的明显增加相关联。

2.4 水凝胶的细胞毒性

a) 测定受到凝胶影响后培养的软骨细胞的 MTS 活性:

为了确定水凝胶对软骨细胞的细胞毒性效果，本发明人分析在 Si-HPMC 水凝胶影响下培养 24 小时、48 小时和 72 小时后，SW1353 和 C28/I2 细胞系和人类鼻软骨细胞的 MTS 活性。

结果表明 MTS 活性没有由于存在水凝胶而改变：对于 SW1353，C28/I2 软骨细胞和人类鼻软骨细胞，在对照培养条件和在受到水凝胶影响后的培养条件之间，没有观察到明显的不同。另一方面，在这种情况下作为阳性细胞毒性对照使用的转录抑制剂放线菌素 D从 24 小时开始引起 MTS 活性显著降低。在存在放线菌素 D 的 24 小时后，SW1353 和 C28/I2 软骨细胞和从人类鼻软骨分离的软骨细胞的 MTS 活性分别降低了 72%、69%和 86%(图 1A 至 1C)。

这些结果表明水凝胶不影响 SW1353 和 C28/I2 软骨细胞的 MTS 活性，也不影响人类鼻软骨细胞的 MTS 活性。

b) 台盼蓝计数:

为了确定水凝胶对细胞增殖的影响，本发明人通过台盼蓝染色来进行细胞计数。这种染色使得能够区分活细胞(白色)和死细胞(蓝色)。于水凝胶中培养 SW1353 和 C28/I2 细胞系及人类鼻软骨细胞 24 小时、48 小时和 72 小时后进行计数(图 2A 至 2C)。

在对照条件下和在 Si-HPMC 影响下进行培养期间，SW1353 和 C28/12 软骨细胞及人类鼻软骨细胞的数目没有观察到显著的不同。另一方面，从 24 小时开始，放线菌素 D 引起细胞数目的明显降低。用放线菌素 D 培养 24 小时后，SW1353 软骨细胞的数目降低了 88%，C28/I2

软骨细胞的数目降低了 81%。在用放线菌素 D 处理 24 小时后，人类鼻软骨细胞降低了 43%。

这些结果表明水凝胶没有改变 SW1353 软骨细胞、C28/I2 软骨细胞或人类鼻软骨细胞的增殖。

实施例 3: 在水凝胶中培养软骨细胞

3.1 三维培养软骨细胞的观察

材料和方法

实验条件

材料:

- 细胞示踪绿(CTG)(分子探针，Leiden，荷兰)。
- 乙啡啶（ethidium）同型二聚体-1(EthD-1)(分子探针)。

以 1 百万细胞/ml 水凝胶的比例将兔关节软骨细胞、SW1353 和 C28/I2 细胞悬浮在水凝胶中。将 500μl 的这种混合物放置在 24-孔培养基的孔中。然后，在完全培养基存在下培养细胞 48 小时、96 小时、1 周和 2 周。同时，通过加入包含 5μg/ml 放线菌素 D 的溶液进行阳性细胞死亡对照。使用细胞示踪绿(CTG)和乙啡啶同型二聚体 1(EthD-1)观察水凝胶内培养的细胞。CTG 是无色产品，其可自由地扩散经过细胞膜。其随后在细胞质中通过谷胱甘肽 S-转移酶转化成不能离开细胞的荧光产物。在活细胞中，CTG 产生绿色荧光。EthD-1 是 DNA 插入试剂，与核酸结合后，其产生的荧光增加 40 倍。其仅能穿透具有细胞膜损伤的细胞。这两类染色剂的组合使用可以使活细胞（绿色染色）和死细胞（红色染色）共同定位（colocalisation）(Magne 等，2003)。吸出培养基，用 400μl 的在完全培养基中的 5μM 的 CTG 溶液代替。在 37℃下培养细胞 1 小时。然后，用完全培养基代替 CTG 溶液，再次在 37℃下培养细胞 30 分钟。用 PBS 洗涤后，在室温下和在黑暗中，用 400μl 的在完全培养基中的 1μMEthD-1 溶液（不含 FCS）处理细胞 1 小时。最后移除培养基，吸出水凝胶，将其放置于载玻片和盖玻片之间。通过落射荧光显微镜法(Axioplan, Zeiss, Iena, 德国)

得到图像，使用 DC30 数码照相机记录(Kappa opto-electronics Gmbh, Gleichen, 德国)。

如上详细说明的，在培养 24、48 和 72 小时后，还用激光扫描的反向共聚焦显微镜方法(IFR 26, Caroline Vignes-Colombeix)显示凝胶中的细胞。共聚焦显微镜通过消除不属于焦平面的信号而产生清晰的图象。这种显微镜具有能沿着 Z 轴移动的载物台，以允许焦平面改变，因而可显示样品的各个面。使用荧光素异硫氰酸酯检测剂(FITC: λex = 488 nm; 收集的λem= 490 至 560nm)追踪 CTG 的荧光。通过玫瑰精检测剂(TRITC: λex=568nm, 收集的λem = 570 至 700 mn)显示 EthD-1 荧光。

结果

为了观察在水凝胶中三维培养期间软骨细胞的变化，本发明人对 SW1353 和 C28/I2 软骨细胞和兔关节软骨细胞进行染色(CTG 和 EthD-1)。然后，他们用荧光显微镜方法观察。在水凝胶内，SW1353 和 C28/I2 软骨细胞或兔关节软骨细胞是圆形的，被细胞示踪绿染成明显的绿色。很少有细胞显示出染成红色。在水凝胶中，SW1353、C28/I2 和兔关节软骨细胞三维发展，形成结节，其数目和尺寸随培养时间而增加。

为了提供对水凝胶中培养的细胞的三维观察，本发明人通过共聚焦显微镜方法辅助他们的观察。在这些研究中，仅仅报道了对 C28/I2 细胞的观察。共聚焦显微镜方法显示了与以前采用常规荧光显微镜方法得到的相同结果。这些细胞以结节的形状发展。用放线菌素 D 处理 48 小时后的细胞显示出明显的红色染色。很少有细胞保持绿色染色。这些结果表明，在我们的培养条件下，细胞示踪绿/乙啡啶同型二聚体-1 双重染色使得可以区分活细胞和死细胞。当前正在分析 SW1353 软骨细胞、人类鼻软骨细胞和兔关节软骨细胞的观察结果。

所有这些结果表明在水凝胶中三维培养时，SW1353 的 C28/I2 软骨细胞及兔关节软骨细胞保持它们的生存力。

3.2. 软骨细胞表型的分析

为了分析软骨细胞表型，用 RT-PCR 研究编码特定软骨细胞标记的信使的表达。

(a) 实验条件：

材料：

Trizol®试剂 (Invitrogen 公司)。

为了表征从人类鼻软骨分离的细胞的显型，在存在 Trizol®(处理 0, P0)下冷冻新分离的细胞的一部分。以 10,000 细胞/cm^2 的比例将其它部分的细胞分布于 25cm^2 瓶中。每周在上述的条件下次培养细胞(项目 a))。在一、二或三次处理后，在存在 Trizol®下于-80℃冷冻细胞(处理 1(P1)，2(P2)和 3(P3))。

从兔关节软骨中新分离的软骨细胞以 1 百万细胞/ml 水凝胶的比例分布，将 2ml 这种混合物放置在六孔培养皿的孔中。然后在存在 Trizol®下冷冻之前培养细胞 3 周。

(b) 总 RNA 的提取

材料：

-氯仿 (VWR)

-异丙醇 (Sigma Aldrich)

-乙醇 (VWR)

-琼脂糖 (Promega 公司)

-溴化乙锭 (EtBr) (Promega 公司)

-三硼酸 EDTA (TBE) (Invitrogen 公司)

从冰中解冻并刮取细胞：然后收集 Trizol® 溶液，在 4℃下以 12,000 rpm 离心 10 分钟。移除上面的相；加入 200μl 氯仿，旋涡搅拌混合物 15 秒。室温培养样品 10 分钟后，在 4℃下以 12,000 RPM 离心 15 分钟。移除水相，在存在 500μl 异丙醇下离心分离 (12,000 rpm, 15 分钟，4℃)沉淀总 RNA。移除上清液，用 75%的乙醇洗涤沉淀物，然后干燥。总 RNA 被置于 20μl 水中 。然后在 260nm 测定吸收率来评价 RNA 的分离的量。最后调节 RNA 的浓度至 1μg/μl。为了检查

提取的 RNA 的完整性，在包含 EtBr 的 TBE 缓冲液中的 1%琼脂糖上电泳分离 500ng 的总 RNA。在 100V 下迁移进行 30 分钟。用 UV 透照仪显示总 RNA。

(c) 通过 RT-PCT 的转录物的分析

- DNA 酶处理

材料:

- 脱氧核糖核酸酶 I(DNA 酶 I) 5U/μl(Invitrogen 公司)
- DNA 酶 I 缓冲液 10X(Invitrogen 公司)
- 乙二胺四乙酸(EDTA) 25mM(Invitrogen 公司)。

移出 2μg 的 RNA; 加入 1μl 的 DNA 酶 I 10X 缓冲液和 1μl 的 DNA 酶 I.(5 U/μl)，用无菌水调节体积至 10μl。然后，室温下培养样品 15 分钟。加入 1μl 的 25mM EDTA 终止反应，将反应产物在 65℃下放置 10 分钟。

- 逆转录(RT)

材料:

-脱氧核苷酸三磷酸酯(dNTP) 10mM(Invitrogen 公司)

-0.5μg/μl 六核苷酸引物(随机六聚体,Promega 公司六引物 C1181)

-禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶(AMV-RT) 10U/μl(Promega 公司)

-AMV-RT 缓冲液 5X(Promega 公司)

-RNA 酶抑制剂(RNAsin) 400U/μl(Promega 公司)。

预先用 DNA 酶处理的每个样品中加入 3μl 的 10 mM dNTP、3μl 的六核苷酸引物、6μl 的 AMV-RT 缓冲液、1μl 的 AMV-RT 和 1μl 的 RNAsin; 用无菌水调节体积至 30μl。用热周期计(Eppendorf Mastercycler,VWR)在下述条件下进行逆转录: 在 25℃下 10 分钟，在 42℃下 50 分钟，在 95℃下 10 分钟。然后，在-20℃下保存如此得到的单链互补 DNA 溶液(cDNA)，直到其被用于 PCR 反应 。

- 聚合酶链反应(PCR)

材料:

-特定的低聚物引物(MWG Biotech, Courtaboeuf,法国)

-Taq 聚合酶缓冲液 10X(Invitrogen 公司)

-Taq 聚合酶 5U/μl(Invitrogen 公司)

-$MgCl_2$ 50mM(Invitrogen 公司)。

通过使用向其中加入了 0.5μl 正义引物和 0.5μl 反义引物的 2μl 的 cDNA 溶液、5μl 的 Taq 聚合酶缓冲液、1.5μl 的 $MgCl_2$、0.5μl 的 Taq 聚合酶和 40μl 的水来进行 PCR。在下述条件下用热周期计(Eppendorf Mastercycler)进行 PCR 反应:在 94℃变性 3 分钟,然后在 94℃(变性)进行 20 秒的 30 次循环,在 60℃(杂交)20 秒和在 72℃伸长(élongation)20 秒。通过在 72℃伸长 10 分钟来完成 PCR 反应。该研究的结果表明得到的 PCR 产物处于指数式扩增阶段。引物的序列、杂交温度和扩增子的大小具体列在表 2 中(下文)。

表 2:参考基因的引物序列、杂交温度和扩增子的大小

基因	正义引物(S)和反义引物(AS)的序列	Tm	扩增子的大小
人肌动蛋白	S5 ′-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3′ AS 5′-AGTCTTCCCCTCCATCGTTG-3′	60℃	164pb
人和兔胶原 II(α1)	S 5′-GGCAATAGCAGGTTCACGTACA-3′ AS 5′-GAGGCGTGAGGTCTTCTGTGA-3′	60℃	108pb
人和兔聚集蛋白聚糖	S 5′-CCCTGGCAATGATGGCACTGTTC-3′ AS 5′-TGGCAATGATGGCACTGTTC-3′	60℃	117pb
人胶原 I(α2)	S 5′-CATGGAAACCGTGGTCAAACT-3′ AS 5′-ACCAGCGATACCAGGCAGAC-3′	60℃	186pb
人和兔胶原 X	S 5′-CAAGGCACCATCTCCAGGAA-3′ AS 5′-GCATTTGGTATCGTTCAGCGT-3′	60℃	131pb
兔胶原 I(α1)	S 5′-GATGCGTTCCAGTTCGAGTA-3 AS 5′- GGTCTTCCGGTGGTCTTGTA-3′	55℃	312pb

(d) 在琼脂糖凝胶上的分离

在三硼酸 EDTA 缓冲液(TBE) 1X 中于 2%琼脂糖凝胶上进行 PCR 扩增产物的电泳分离。使用 UV 透照仪通过溴化乙锭显示区带。扩增子的大小显示在表 2 中。

(d) 琼脂糖凝胶的半定量密度测量分析

使用 Leica Q500 软件(Leica Imagine Systems, Cambridge, UK)估计在 2%琼脂糖凝胶上得到的区带的强度，所述软件使得能够在各种试验条件下对扩增的转录物进行半定量的密度测量分析。结果表示为任意单位的相关基因/参考基因之比。

结果

为了检验在水凝胶内三维培养时兔关节软骨细胞的表型的保持，他们通过 RT-PCR 来评估编码 II 型胶原、聚集蛋白聚糖和胶原 X 的转录物的表达。同时也检验 I 型胶原的表达。

在单层培养期间，本发明人观察到 II 型胶原、聚集蛋白聚糖和胶原 X 的表达减少。三周后，II 型胶原仍只有少量表达，而再也检测不到 X 型胶原和聚集蛋白聚糖。同时，我们的结果表明，在三周单层培养后，I 型胶原的表达增加。

相反，当在水凝胶中三维培养细胞 3 周时，II 型胶原、聚集蛋白聚糖和 X 型胶原的表达得以保持。I 型胶原的表达不再受到刺激。

这些结果表明兔关节软骨细胞的三维培养使得软骨细胞标记(胶原 II、聚集蛋白聚糖和胶原 X)的表达得以保持。

实施例 4: 三维培养中软骨细胞的再分化的研究

为了研究在实施例 1 中制备的水凝胶中三维培养软骨细胞的再分化，单层培养新分离的人和兔鼻和关节软骨细胞 4 周，然后在水凝胶中三维培养并且同时单层培养 4 周。

在单层培养和三维培养 2、3、4 周后的每个处理中抽取总 RNA。用 RT-PCR 检测 II 型胶原和聚集蛋白聚糖、软骨细胞表型的特殊标记和 I 型胶原、软骨细胞分化的标记。

结果表明新分离的软骨细胞表达 II 型胶原、I 型胶原和聚集蛋白

聚糖。在单层培养期间，这些标记的表达发生了改变；在各种处理期间，II 型胶原和聚集蛋白聚糖的表达降低，直到其在三次处理结束时消失，而从第一次处理开始，I 型胶原的表达明显增加，并且在各种处理的过程中保持着明显的表达。因此，在单层培养的三次处理结束时，软骨细胞看起来是去分化的。然后，在水凝胶中三维培养软骨细胞期间，结果表明 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的表达增加，而且 I 型胶原的表达降低。这些结果说明在水凝胶中细胞具有恢复的软骨细胞表型。

这些结果表明所用的水凝胶可使以前去分化的软骨细胞再分化。

统计试验

所有的试验都进行三份。每个试验进行两次。用平均+/-标准偏差表示结果。使用 Anova 试验进行平均水平的比较研究。对于 $p<0.05$，结果被认为是具有显著差异。

实施例 5：鼻软骨细胞的皮下植入

按照前述实施例中的描述制备水凝胶，其整合了来自鼻软骨(HNC)的人软骨细胞。然后，将它们皮下植入裸鼠中，并保留 3 周。

在下述 5 个条件下进行试验：

(1) 植入前，在水凝胶中三维培养人类鼻软骨细胞 15 天；

(2) 在通过水凝胶植入前，单层培养人类鼻软骨细胞 15 天。

(3) 新分离的人类鼻软骨细胞，并通过水凝胶植入。

(4) 在通过水凝胶植入前，单层培养人包皮成纤维细胞。

(5) 仅仅水凝胶。

在回收植入剂期间，本发明人注意到植入后 3 周植入剂仍清楚可见。因此，在这三周中，水凝胶没有被再吸收。组织学分析表明对于包含 HNC 的三种条件(条件 1、2 和 3)来说，存在阳性软骨细胞沉淀物，这是因为阿尔新蓝在水凝胶中染色。因此，所有这些结果向我们表明：Si-HPMC 水凝胶使得能够在活体内 3 周后新生软骨类型的组织。

参考文献

- Bourges et al., 2002a, General properties of silated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications, Biopolymers 63(4) :232-8

- Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G, 2002b Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. Adv Colloid Interface Sci 99(3):215-28

- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L 1994 Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331(14):889-95

- Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R 2003 Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. Matrix Biol 22(1):81-91

- Ghayor C, Herrouin JF, Chadjichristos C, Ala-Kokko L, Takigawa M, Pujol JP, Galera P 2000 Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. J Biol Chem 275(35):27421-38

- Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbiser JL, Apperley JF 1994 Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. J Clin Invest 94(6):2307-16

- Hunziker EB 2002 Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage 10(6):432-63

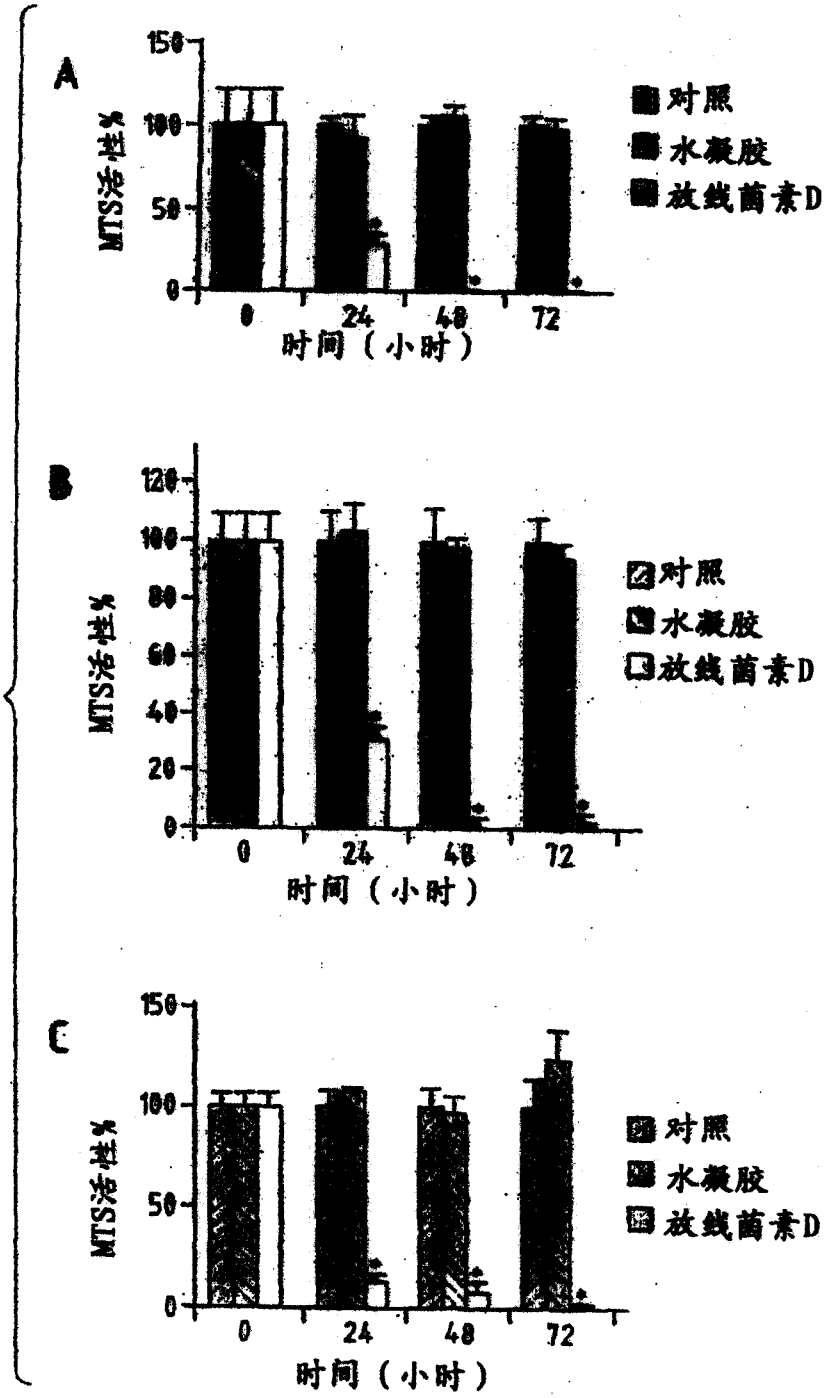
- Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J 2003 Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization : possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. J Bone Miner Res 18(8):1430-42

- Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE 2000 Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear

factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. Arthritis Rheum 43(4):801-11

- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ 1993 Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 75(4):532-53

图1


A
MTS法 %
150
100
50
0
0
24
48
72
时间（小时）
对照
水凝胶
放线菌素D
B
MTS法 %
120
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
时间（小时）
对照
水凝胶
放线菌素D
C
MTS法 %
150
100
50
0
0
24
48
72
时间（小时）
对照
水凝胶
放线菌素D

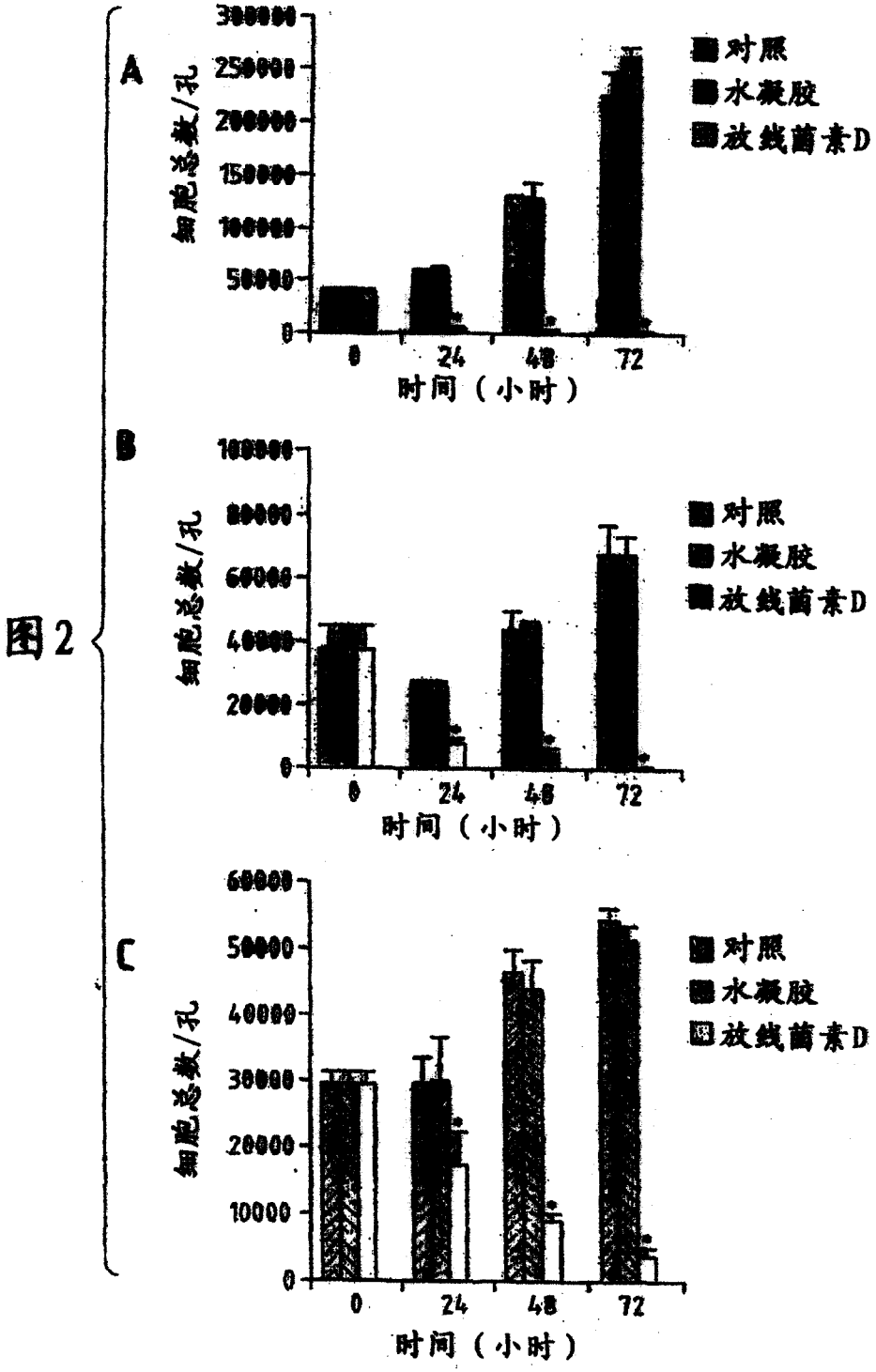


图2