

· 实验研究 ·
Experimental Research

真皮多能干细胞复合聚乳酸支架修复关节 软骨全层缺损的实验研究

夏亚一, 鲁茂森, 袁凌伟, 邢 帅, 汪 静, 王翠芳, 汉 华, 沈海丽

(兰州大学第二医院骨科研究所, 甘肃兰州 730030)

摘要 [目的] 探讨真皮多能干细胞在软骨缺损修复中的可行性, 为扩大软骨缺损修复中种子细胞的选择提供实验依据。[方法] 以新生青紫蓝兔为研究对象, 机械法直接分离得到真皮组织, 采用酶消化法获取细胞, 利用干细胞贴壁粘附生长的特性获取高克隆细胞群, 并进行传代培养。使细胞浓度达到 1×10^6 /ml 与聚乳酸支架材料共培养一周后植入兔膝关节软骨全层缺损处, 用 3~5 个月龄青紫蓝兔 30 只, 60 个关节, 随机分为真皮多能干细胞/聚乳酸支架材料、聚乳酸支架材料、空白对照三组, 每组 20 个关节, 于术后 12 周空气栓塞处死实验兔, 对修复组织进行取材, 行 HE、甲苯胺蓝染色, 根据软骨缺损修复情况进行大体、组织学评分, 并进行统计学分析, 比较各组的评分差异是否具有统计学意义。[结果] 大体及组织学观察显示, 真皮干细胞/支架材料实验组修复组织表面光滑、呈透明样, 与周围软骨及软骨下骨整合良好, 而聚乳酸支架材料组有少许透明样软骨, 主要以纤维软骨修复, 空白对照组则表面有缺损, 以纤维软骨修复。大体及组织学观察后进行统计学评分分析, 显示 A 组修复效果最优、优于 B、C 组 ($P < 0.05$), B 组优于 C 组 ($P < 0.05$) [结论] 真皮多能干细胞修复关节软骨缺损效果明显, 恢复正常关节软骨结构, 可作为组织工程化软骨种子细胞之一。

关键词: 真皮多能干细胞; 聚乳酸; 关节软骨; 全层缺损; 软骨修复

中图分类号: R681.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005 - 8478 (2008) 21 - 1641 - 05

Experimental study on rabbits full - thickness articular cartilage defects repaired by cocultures of demal pluripotent stem cell seeded onto polylactic acid scaffold XIA Ya - yi, LU Mao - sen, YUAN Ling - wei, et al. Institute of Orthopaedics, the Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

Abstract: [Objective] To investigate the feasibility of the demal pluripotent stem cells in the repairing of cartilage defects. It was aimed to provide experimental basis in view of cartilage defects of expanding the repair of cartilage defects seed cells selection. [Method] Neonatal cyanotic blue rabbits were used. Demal tissue directly isolated through mechanical method and cells through enzymatic digestion were obtained. The growth characteristics of adherent adhesion of stem cells were used to obtain high cloned cells, which were subcultured. The cell concentration of 1×10^6 /ml was cultured with polylactic acid scaffold for one weeks, and the obtained result was implanted into full - thickness articular cartilage defects of rabbits. Thirty cyanotic blue rabbit (60 joints) for about 3~5 months were randomly divided into three groups: demal pluripotent stem cell / scaffold polylactic acid in group A, polylactic acid scaffold in group B, controls in group C. Twenty joints for each group. The rabbits were killed by air embolization at 12 weeks, restoration organization was extracted and stained by HE and toluidine blue. According to the repairing result of cartilage defect, gross and histologic scoring was made, and analyzed by statistics. The comparison of score difference between each groups was performed statistically. [Result] Gross and histological observation demonstrated that in group A organizations had smooth surface, appeared transparent, good integration with surrounding cartilage and subchondral bone. In group B there was a tiny transparent cartilage, and the fiber cartilage repair accounted for much proportion. The sur-

face of group C showed some defects, mainly characterized by fibrous cartilage repair. After gross and histological observations statistics score analysis was performed. Results showed that group A is the most optimal ($P < 0.05$), group B was better than group

作者简介: 夏亚一, (1966 -), 男, 教授, 博士生导师, 骨研所所长, 研究方向: 材料学、关节外科与组织工程, (电话) 0931 - 8942579, (电子信箱) xiayayi@yahoo.com.cn

C ($P < 0.05$)。 [Conclusion] Dermal multipotent stem cells for repairing articular cartilage defects obtained good result. It is feasible to be used as the seed cells for tissue - engineered cartilage.

Key words: dermal pluripotent stem cells; polylactic acid; articular cartilage; full - thickness defect; cartilage repairing

关节软骨是滑膜关节重要的结构和功能单位。由于软骨组织本身缺乏血管, 及修复损伤和缺损的未分化细胞, 软骨细胞包埋于胶原 - 蛋白多糖基质中, 限制了细胞的增殖和迁移能力, 所以一旦关节软骨发生损伤, 难以自身修复。若治疗不及时或不恰当, 难以形成正常的关节软骨, 就无法满足正常关节的功能需求, 将会导致严重的关节功能障碍^[1]。种子细胞选择是关节软骨缺损修复的重点内容。目前, 在软骨组织工程研究中应用的种子细胞主要是软骨细胞和骨髓间充质干细胞, 自体软骨细胞在体外和体内移植研究中均证实具有可靠的修复软骨效果。并且自体细胞移植在临床应用后, 其疗效已非常肯定, 但仍然有费用昂贵、操作复杂、手术创伤大、供区有限和术后需要长时间恢复等问题^[2]。异体软骨细胞游离于体液中又易受攻击, 因而不能单独用于软骨缺损的修复^[3]。骨髓间充质干细胞 (BMSC) 在特定的诱导条件下可以分化为软骨细胞, 但是骨髓供给量是有限的, 从骨髓中分离的骨髓基质干细胞数量很少, 体外扩增需要较长的时间, 短期效果肯定, 在软骨缺损修复的长期观察中发现暂时形成的透明软骨最终被纤维软骨或纤维组织所代替, 所以 BMSC 的应用受到一定的限制^[4]。而国内外研究提示, 真皮多能干细胞在软骨修复与重建中有潜在的应用潜能^[5]。而本实验就是进一步探索真皮多能干细胞在软骨修复中的可行性。

1 材料与方

1.1 实验材料

出生 2~5 d 青紫蓝兔 10 只, 3~5 个月龄青紫蓝兔 30 只 (购自兰州生物制品研究所), 聚乳酸支架材料 (购自济南岱罡生物科技有限公司生产)。培养基和试剂: DMEM/F12 和胎牛血清 (购自 Hyclone 公司); 维生素 C 和地塞米松 (购自 Sigma 公司); 纤维蛋白胶 (广州倍绣公司), PBS; 胰蛋白酶 (均购自博士德生物公司)。软骨源性形态发生蛋白 - 1 (CDMP - 1), 转化生长因子 1 (TGF - 1) (均购自 PEPRO-TECH 公司) 用 0.1% 的牛血清白蛋白 (购自 Sigma 公司) 稀释至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, -20 冷藏备用。

1.2 真皮干细胞的分离

取出生 2~5 d 的新生青紫蓝兔, 引颈处死, 75% 酒精消毒, 放于超净工作台上, 剪取背部全层皮肤, 无菌刀片去除皮下组织, 机械法分离真皮, PBS 冲洗 3 遍, 剪成 1 mm \times 1 mm 左右小块置于 0.25% 的胰酶中, 37 消化 40 min, 200 目滤筛过滤除去大块组织和碎片, 置离心管中, 用尖吸管充分吹打成单细胞悬液, 冰上静置 20 min, 1 200 r/min 离心 10 min, 接种于培养瓶。(培养条件为 DMEM/F12 + 10% 胎牛血清 + 0.1% 青霉素和链霉素, 37, 5% CO_2)。培养 1 d 后,

轻轻弃去悬浮细胞, 将贴壁细胞继续培养, 待长满瓶底 80% 后, 0.25% 胰酶消化, 常规传代。

1.3 真皮多能干细胞与聚乳酸支架共培养

第 2 代真皮干细胞进行传代培养, 0.25% 的胰酶消化后收集在 10 ml 离心管中, 计数, 1 200 r/min 离心, 弃上清液, 按 1 $\times 10^6/\text{ml}$ 的细胞浓度用吸管将细胞悬液缓慢逐滴滴加在已预湿聚乳酸材料上, (聚乳酸材料内部结构如图 1) 放置培养箱中 3 h 后, 加入条件培养液 (DMEM/F12, 10% 胎牛血清, 0.1% 青霉素和链霉素, 维生素 C 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 地塞米松 10^{-7} mol/L, CDMP - 1, 100 ng/ml, TGF - 1, 20 ng/ml) 培养两周。

1.4 动物模型制作与分组

选用健康 3~5 个月青紫蓝兔 30 只, 将其仰卧固定于实验动物台上, 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 耳缘静脉麻醉。备皮, 常规消毒铺巾, 取膝关节内侧纵行切口, 逐层切开达关节腔, 将髌骨推向外侧, 暴露双侧髌股关节面, 于股骨滑车关节面用直径为 4 mm 的钻头钻孔, 造成软骨全层缺损 (如图 2)。用生理盐水冲洗清除组织碎屑和血块后暴露缺损, 将细胞材料复合物填充至缺损处, 用纤维蛋白胶封闭后将髌骨复位, 分层缝合膝关节囊、组织、皮肤^[6]。随机分为 A 组: 真皮多能干细胞聚乳酸支架材料; B 组: 聚乳酸支架材料; C 组: 空白对照三组; 每组 20 个关节。术后标准饲料分笼喂养, 不固定膝关节, 不用抗生素。

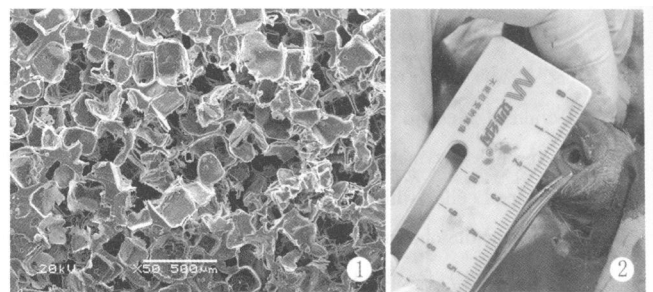


图 1 PLA 内部结构观察 $\times 50$

图 2 动物模型制作

1.5 获取标本

术后 12 周空气栓塞处死实验兔, 取软骨修复的标本行大体观察并记录后浸泡于 10% 甲醛固定, 0.1 mol/L EDTA 脱钙, 梯度逐级脱水, 缺损区纵行剖开, 石蜡包埋, 5 μm 厚切片, HE 及甲苯胺蓝染色光镜观察并记录观察结果。

1.6 大体观察

按照 Moran 大体形态学评分标准, 设 3 项指标: 损伤面轮廓恢复程度, 关节软骨表面, 关节软骨缺损^[7]。如表 1, 且将指标量化后行统计学处理。

表 1 Moran 大体观察指标评分标准

观察指标	分级	评分
损伤表面	完全	2
轮廓恢复程度	部分	1
	没有	0
关节软骨表面	半透明	2
	无光泽	1
	无色或不规则	0
关节软骨缺损	完全由正常软骨组织代替	2
	少许软骨组织代替	1
	无	0

1.7 光镜观察

将标本蜡块包埋、切片, 行 HE 染色和甲苯胺蓝染色, 按照 wakitani 法评分标准的组织学结果评分表进行评分。设 5 项观察指标: 细胞形态学、基质染色 (异染性)、表面规则性、软骨厚度、与周围软骨整合度^[8] (如表 2)。且将指标量化后行统计学处理。

表 2 wakitani 软骨缺损组织学评分标准

观察指标	分级	评分
细胞形态学	透明软骨	0
	透明软骨为主	1
	纤维软骨为主	2
	少量软骨	3
	无软骨	4
基质染色 (异染性)	正常	0
	轻度减少	1
	明显减少	2
	无异染性颜色	3
表面规则性	光滑	0
	中等	1
	不规则	2
	极度不规则	3
软骨厚度	>2/3	0
	1/3 ~ 2/3	1
	<1/3	2
与周围软骨整合度	边缘完全整合	0
	一侧边缘整合	1
	未整合	2

1.8 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件包行多变量方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 真皮干细胞的分离培养结果

倒置显微镜下可以观察到细胞经体外培养 6 h 后有少量贴壁; 接种到培养瓶第 2 d, 细胞稀疏, 成多角形、长索形等不规则形状 (图 3a); 培养 4 d 时, 细胞长满培养瓶大部分, 多呈长索形或纤维索条形 (图 3b); 5 d 时融合成片, 细胞计数达到 $2 \times 10^6 / \text{ml}$ (图 3c)。常规用 0.25% 胰蛋白酶消化传代后

1 周长满瓶底。胎盘蓝染色后活细胞计数, 生长曲线 (图 4) 可见: 接种第 1 d, 少量细胞死亡, 细胞增殖不明显, 第 2 d 细胞开始迅速增长, 第 3 d 细胞数接近最大, 第 4 d 开始, 细胞增殖缓慢。

2.2 大体观察

2.2.1 A 组 软骨缺损处与周围正常软骨结合紧密, 表面光滑, 修复组织与正常软骨移行, 其高度、质地、颜色接近于正常软骨, 边界模糊。(图 5)

2.2.2 B 组 修复组织未完全覆盖缺损, 表面凹凸不平, 修复不完整, 表面不光滑。(图 6)

2.2.3 C 组 可见缺损处有部分修复, 填充不全, 修复组织表面不平整, 不透明, 与周围界限明显。(图 7)

2.3 光镜观察

2.3.1 A 组 缺损处被成熟、新生类软骨细胞修复, 同源性良好, 排列较整齐, 与软骨下骨结合紧密。(图 8, 图 11)

2.3.2 B 组 缺损处多被纤维软骨细胞修复, 同源性及细胞排列欠佳, 与周围软骨结合不紧密。(图 9, 图 12)

2.3.3 C 组 纤维组织覆盖缺损处不完全, 偶可见少量软骨细胞, 多为核深染的骨细胞。(图 10, 图 13)

2.4 统计学结果分析: 如表 3, 表 4。

表 3 术后 12 周大体评分结果 (n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	损伤表面轮廓恢复程度	关节软骨表面	关节软骨缺损	总分
A	1.80 \pm 0.523 [#]	1.85 \pm 0.366 [#]	1.75 \pm 0.550 [#]	5.40 \pm 0.681 [#]
B	1.03 \pm 0.510 [*]	1.01 \pm 0.394 [*]	0.95 \pm 0.394 [*]	3.05 \pm 0.826 [*]
C	0.15 \pm 0.366	0.40 \pm 0.308	0.20 \pm 0.308	0.51 \pm 0.671

注: [#]与 B 组、C 组比较, $P < 0.05$; ^{*}与 A 组、C 组比较, $P < 0.05$

表 4 术后 12 周组织学评分结果 (n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞形态学	基质染色	表面规则性	软骨厚度	与周围软骨整合度	总分
A	0.60 \pm 0.821 [#]	0.50 \pm 0.671 [#]	0.35 \pm 0.410 [#]	0.25 \pm 0.437 [#]	0.35 \pm 0.571 [#]	1.65 \pm 1.187 [#]
B	2.90 \pm 0.553 [*]	1.95 \pm 0.514 [*]	1.90 \pm 0.552 [*]	1.25 \pm 0.444 [*]	1.30 \pm 0.572 [*]	9.25 \pm 1.618 [*]
C	3.75 \pm 0.443	2.80 \pm 0.410	2.83 \pm 0.411	1.8 \pm 0.410	2.75 \pm 0.444	13.5 \pm 1.273

注: [#]与 B 组、C 组比较, $P < 0.05$; ^{*}与 A 组、C 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

1743 年, Hunter 指出软骨一旦损伤^[9], 就不能修复。所以关节软骨缺损的治疗一直是围绕医学界的一大难题, 随着组织细胞工程学的发展, 利用组织工程的方法治疗关节软骨缺损已成为研究的热点。

而真皮多能干细胞的研究起步较晚, 对于它的生物学认识最近几年才刚刚开始, 因此真皮多能干细胞目前尚未统一定义。但现在的研究结果证实, 这种间充质来源的真皮多能干细胞在成体内参与皮肤的再生与修复过程, 且皮肤创伤后造成的微环境对真皮多能干细胞具有一定的调控作用, 这可能是由于创伤后皮肤局部因子发生改变, 促进了真皮多能干细胞的迁移分化, 从而加速了创伤的修复。2001 年加拿大科学家 Toma 等^[10, 11]分离到了大鼠真皮干细胞。同年我国学者史春梦等^[12]就分离得到了大鼠的真皮干细胞, 并对此报道。

2004 年, Fernandes 等^[13]报道了成人包皮的真皮干细胞分离。在此基础上, 文亮等^[14]对真皮干细胞在创伤愈合中的作用做了初步探讨。Tana 等的研究表明, 利用添加表皮生长因子 (EGF) 和碱性成纤维生长因子 (bFGF) 的培养液对分离得到的真皮多能干细胞进行体外培养, 可形成球形克隆。目前的资料显示, 真皮多能干细胞可在体外进行扩增培养, 并能传 20 代以上, 具有强的增殖能力, Yoko 等在研究证实真皮多能干细胞的体外培养体系中添加 TGF- β , 在保证细胞特性稳定的前提下, 可进一步促真皮多能干细胞的增殖, TGF-

在真皮多能干细胞的增殖过程中有一定的作用。而最新研究资料表明, 真皮多能干细胞在添加一定的因子, 如地塞米松、维生素 C、维 A 酸等的分化诱导体系中培养, 真皮多能干细胞也可向骨样细胞、软骨样细胞、脂肪样细胞、神经样细胞进行分化, 具有多向分化潜能^[15]。而作者实验中采用转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 与软骨源性形态发生蛋白 - 1 (CDMP-1) 作为诱导生长体系, 并且实验证明在间充质干细胞诱导体系中两者有明显的向软骨细胞分化的协同作用^[16]。

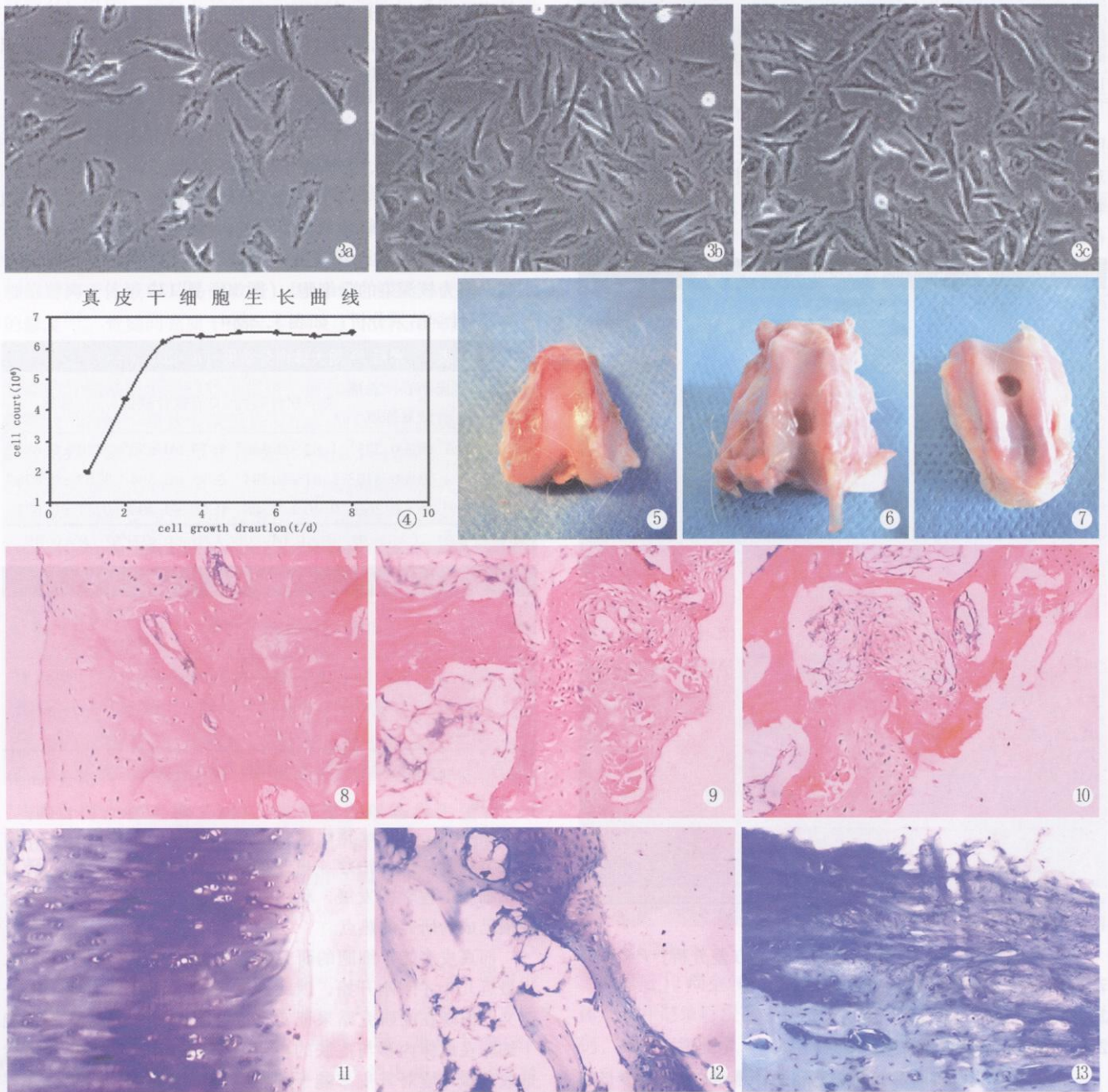


图 3 原代细胞培养结果 图 3a 培养 2 d 原代细胞 $\times 200$ 图 3b 培养 4 d 原代细胞 $\times 200$ 图 3c 原代细胞接种 5 d 后融合成片 $\times 200$
图 4 真皮干细胞的生长曲线 图 5 12 周后大体 A 组 图 6 12 周后大体 B 组 图 7 12 周后大体 C 组 图 8 12 周后 HE 染色 A 组 $\times 100$
图 9 12 周后 HE 染色 B 组 $\times 100$ 图 10 12 周后 HE 染色 C 组 $\times 100$ 图 11 12 周后甲苯胺蓝染色 A 组 $\times 100$ 图 12 12 周后甲苯胺蓝染色 B 组 $\times 100$ 图 13 12 周后甲苯胺蓝染色 C 组 $\times 100$

总之,真皮组织像骨髓一样,含有一类具有广泛自我更新能力和向多谱系分化潜能的细胞,其分离培养技术已取得巨大进步,人们甚至可以将其从人体皮肤活检的正常组织中分离培养出来,也可用无生长因子的培养基分离培养出来,但要获取从病人的活检组织中常规地分离出这些细胞的技术仍需进一步的努力。真皮间充质干细胞的动物实验应用研究取得了可喜的成果,但要像造血干细胞和骨髓间充质干细胞那样真正应用于临床尚需大量的研究工作。然而,就目前短短数年研究所取得的进步而言,也许在不久的将来它即可发挥易于获取这一优势,成为成体干细胞替代治疗以及基础研究领域的先锋。

本实验采用真皮多能干细胞修复关节软骨缺损,取材方便,并发症少。结果表明,其关节软骨缺损修复效果明显良好,修复12周后可见软骨缺损愈合良好,关节面光滑、完整、无裂隙、富有弹性,与周围软骨界限不清,缺损区内软骨细胞丰富,排列趋于正常,软骨下骨进一步改建,软骨厚度基本达到正常软骨厚度。因而可以考虑作为组织化软骨修复中种子细胞选择之一,并进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] Alford J W, Cole B J. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options[J]. *Am J Sports Med*, 2005, 33: 295 - 306.
- [2] Brittberg M, Peterson L, Sjöström E, *et al.* Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation: a review of recent developments [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85: 109.
- [3] Kang SW, Yoon J R, Lee J S, *et al.* The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees[J]. *J Bio Sci Polym Ed*, 2006, 17: 925 - 939.
- [4] Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, *et al.* Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports[J]. *Cell Transplant*, 2004, 13: 595 - 600.
- [5] Young H E, Steele T A, Bray R A, *et al.* Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal, muscle and dermis derived from fetal, adult and geriatric donor[J]. *Anat Rec*, 2001, 264: 51 - 62.
- [6] 夏亚一,冯万文,孙正义等.自体骨髓间充质干细胞和软骨细胞共培养复合同种异体完全脱蛋白骨修复关节软骨全层缺损的研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14: 1245 - 1248.
- [7] Moran M E, Kim H K, Salter R B. Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit. Investigation of autogenous periosteal grafts subjected to continuous passive motion [J]. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1992, 74: 659 - 667.
- [8] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, *et al.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1994, 76: 579 - 592.
- [9] Buckwalter J A, Mankin H J. Articular cartilage: Part I tissue design and chondrocyte matrix interactions [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1997, 79: 600 - 611.
- [10] Toma JG, McKenzie A, Bagli D, *et al.* Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin [J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 727 - 737.
- [11] Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 778 - 784.
- [12] 史春梦,程天民.大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养[J]. *第三军医大学学报*, 2001, 23: 1068.
- [13] Fernandes KJ, McKenzie A, Mill P, *et al.* A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 1082 - 1093.
- [14] 文亮,屈纪富,刘明华,等.真皮多能干细胞在创伤愈合中作用的实验研究[J]. *世界危急重病医学杂志*, 2006, 1: 1074 - 1077.
- [15] 赵春华.干细胞原理、技术与临床 [M]. 北京:化学工业出版社, 2006, 137 - 138.
- [16] Song YH, Gehrmerts S, Sedats, *et al.* VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354: 999 - 1003.

(收稿:2008-04-17 修回:2008-06-27)