

# 骨髓基质干细胞复合 PLGA 支架修复兔关节软骨缺损

刘方红<sup>1,2</sup> 张秋芳<sup>3</sup>

作者单位: 1 武汉大学医学院研究生 430071 2 湖北医药学院附属人民医院 442000  
3 湖北医药学院中药药理实验室 442000

**【摘要】** 目的 探讨骨髓基质干细胞复合 PLGA 支架对兔关节软骨损伤的修复作用。方法 以聚乳酸/聚羟基乙酸共聚物、磷酸三钙制备支架。取新西兰乳兔骨髓分离 BMSCs ,传代后接种于支架。54 只新西兰大白兔 ,建立膝关节软骨缺损模型 ,随机分为模型对照组、支架组和支架 + BMSCs 组。结果 光镜示 BMSCs 在支架内生长良好; 膝关节活动度和移植组织的平均厚度与周边正常软骨平均厚度百分比显著高于模型对照组( $P < 0.01$ )。结论 PLGA 支架复合 BMSCs 提高了兔关节软骨缺损的修复效果。

**【关键词】** 骨髓基质干细胞 关节软骨 支架 聚乳酸/聚羟基乙酸共聚物

**Articular cartilage defects repaired with bone marrow stromal cells and PLGA scaffold in rabbits**( LIU Fanghong<sup>1,2</sup> ,ZHANG Qiufang<sup>3</sup>. 1 School of medicine , Wuhan university , Wuhan 430071 , China. 2 people's hospital of Hubei university of medicine Shiyan 442000 ,China. 3 Laboratory of Chinese herb pharmacology , people's hospital of Hubei university of medicine , Shiyan 442000 , China. )

**【Abstract】 Objective** To explore the preparing methods in vitro and test the clinical applicability of implantation in vivo of bone marrow stromal stem cells( BMSCs) and polylactic-co-glycolic acid( PLGA) scaffold to repair the defects of articular cartilage in rabbits. **Methods** 54 adult rabbits were divided into 3 groups randomly , the carrier scaffold was composed of polylactic-co-glycolic acid( PLGA) , tricalcium phosphate( TCP) and other biomaterials. BMSCs was isolated from the bone marrow of femurs of young New Zealand rabbits using centrifuging , then seeded into the scaffold. The scaffold was implanted into the rabbit articular cartilage defect on the femoral condyle of the knees. **Results** Optical microscopy showed a good growth of BMSCs in scaffold without obvious cellular morphological changes and an acculation in the holes. Joint range of motion of knees and the height of the repairing tissue compared with the normal cartilage of scaffold + BMSCs group were better than the control group. **Conclusion** Scaffold PLGA combined with BMSCs can improve the repair effect on articular cartilage defects in rabbits.

**【Key words】** Bone marrow stromal stem cells , Articular cartilage , scaffold , Polylactic-co-glycolic acid

关节软骨自身修复能力较差 ,无血管和淋巴管 ,依靠关节液营养 ,一旦损伤 ,自我修复能力有限 ,治疗困难<sup>[1]</sup>。目前临床上主要采用手术移植、关节置换和软骨成形术等 ,临床疗效不够满意。近年来 ,随着组织工程方法的发展和应用于关节软骨的修复提供了新的思路和途径<sup>[2]</sup>。软骨组织工程研究包括支架材料、细胞因子和种子细胞等 ,而骨髓基质干细胞( bone marrow stromal cells ,BMSCs) 在体外可分化为骨和软骨祖细胞 ,移植到软骨缺损区后有软骨化潜能<sup>[3]</sup>。PLGA 是最常用的可降解性纳米高分子生物材料 ,是细胞移植的成功载体<sup>[4,5]</sup> ,本实验采用 PLGA 复合 BMSCs 植入关节软骨损伤处 ,观察其修复关节软骨缺损区的情况。

## 1. 材料与方

1.1 实验动物及主要试剂、仪器 2 周龄新西兰乳兔 2 只 ,雄性 ,平均体重  $120 \pm 10g$  ,54 只健康成年新西兰大白兔 ,雌雄不限 ,体重  $2.0 \sim 2.5kg$  ,由湖北医药学院动物中心提供。

聚乳酸/聚羟基乙酸共聚物( polylactic-co-glycolic acid , PLGA) 聚乳酸与聚羟基质量比为 75:25 ,磷酸三钙( tricalcium phosphate ,TCP) 济南岱盟生物科技有限公司; GMEM( GIB-

CO 公司); FBS( 杭州四季青生物工程有限公司); 胰蛋白酶( Amerco 公司)。

1.2 BMSCs 的制备 取 2 周龄新西兰乳兔 2 只 ,肌肉注射麻醉 ,在无菌条件下双侧股骨粗隆处用含有  $100\mu g/ml$  16 号穿刺针抽取骨髓  $3 \sim 5ml$  ,在超净台内把骨髓转入离心管内 ,利用密度梯度离心 ,采用  $2000r/min$  离心  $10min$  ,抽取中间层黄褐色有核细胞层 ,加入 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基置入  $CO_2$  培养箱(  $37^\circ C$  ,5%  $CO_2$ ) 进行培养 ,PLGA 复合的 BMSCs 选用第三代细胞。

1.3 组织工程支架的制备 组织工程支架由清华大学激光快速成形中心提供 ,采用高分子聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物和磷酸三钙复合材料制作用骨支架与软骨支架 ,支架表面均匀涂覆胶原 I 将支架放入 10% FBS 的高糖 DMEM 浸泡 24 小时。取第 3 代兔 BMSCs ,以细胞密度  $1 \times 10^6/ml$  接种于置有支架材料的经预湿处理的 6 孔板中 ,培养 1 周备用。

1.4 软骨缺损模型制备与实验分组 采用 2% 戊巴比妥钠  $30mg/kg$  兔耳缘静脉注射麻醉。麻醉后将两组大白兔固定 ,双下肢备皮 ,常规消毒铺巾 ,取左右膝关节内侧切口入

路,逐层切开皮肤、皮下组织及关节囊,牵拉髌向外侧脱位,屈膝约 70° 显露股骨滑车关节面,用直径 4.0mm 的钻头在滑车关节面的部位造出直径 4mm、深度 4mm 全层厚软骨的缺损,满意后冲洗关节腔,彻底清除软骨碎屑。实验分组分别为实验组(接收支架 + BMSCs)、支架组(只采用支架处理)、空白组(软骨缺损处不做处理),手术后所有动物不做固定,自由活动。术后连续 3 天肌注青霉素 16 万单位,每天 2 次。

1.5 观察指标 3 组于术后 4、8、12 周处死实验动物,取膝关节软骨缺损处为标本进行观察。

1.6 大体观察 观察术后动物饮食、跛行程度和伤口愈合情况,检测关节活动度(因定髌关节,距膝关节远侧相等距离悬挂同等重量砝码,测量膝关节活动度)。

1.7 测量修复移植组织的厚度 采用测量软件以 5 点平均法测量组织切片,计算修复移植组织平均厚度与周边正常软骨平均厚度的百分比。

1.8 组织学检查 取上述各时间点各组标本,4% 多聚甲醛固定、40% 甲酸脱钙后,常规石蜡包埋,5μm 厚度切片,行 HE 染色,观察新生软骨细胞、成骨细胞形态及分布情况。

1.9 统计学方法 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS13.0 进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐后,进行两两比较(LED,least significant difference)检验,  $P < 0.05$  表示有统计学差异。

2. 结果

2.1 一般情况及关节活动度 术后 1 周内全部动物活动减少,跛行、双膝肿胀,4 周后实验组动物活动正常而支架组与空白组动物仍有轻微跛行。采用 Clake weeknesser 检查标准测量膝关节活动度发现,术后 4 周、8 周、12 周支架 + BMSCs 组与空白对照组和支架组相比,膝关节活动度增大,并有统计学上显著差异(见表 1)

表 1 不同修复组兔膝关节伸屈活动范围( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	4 周	8 周	12 周
空白对照组	32.66 ± 2.01	38.62 ± 2.81	42.94 ± 3.54
支架组	33.45 ± 3.02	40.02 ± 3.12	41.72 ± 2.17
支架 + BMSCs 组	44.12 ± 2.07*	54.62 ± 3.43**	62.23 ± 3.07**

注:与空白对照组比较\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

2.2 移植组织的平均厚度与周边正常软骨平均厚度的百分比 术后 4 周、8 周、12 周,支架 + BMSCs 移植组织的平均厚度与周边正常软骨平均厚度差异无显著统计学意义,但优于支架与空白对照组( $P < 0.01$ ,见表 2)。

表 2 移植组织的平均厚度与周边正常软骨平均厚度的百分比(%  $n = 8$ )

组别	4 周	8 周	12 周
空白对照组	9.02 ± 4.07	16.12 ± 5.23	18.27 ± 4.83
支架组	12.40 ± 3.82	20.45 ± 10.34	24.35 ± 8.72
支架 + BMSCs 组	75.23 ± 4.97**	93.12 ± 4.79**	99.13 ± 8.76**

注:与空白对照组比较\*\*  $P < 0.01$ 。

2.3 组织学观察 组织学观察显示术后 12 周,空白对照组关节软骨缺损持续存在,而支架组与支架 + BMSCs 组支架降解完全,但支架组仍有部分塌陷和不规则缺损而支架 + BMSCs 组关节面无塌陷,新生组织质地接近于正常组织。

3. 讨论

关节软骨损伤后自身修复能力非常有限,较大面积的缺损更加无法自行修复,所以有关软骨组织损伤的修复成为人们研究的热点。有关组织工程化关节软骨的研究近几年不断增加,主要集中在种子细胞、软骨组织工程载体和生物调控方面。种子细胞主要有骨髓干细胞、骨膜细胞、拉网骨细胞,其中骨髓干细胞为首选,它具有以下优势:①所需细胞数量低,具有强增殖能力和多向分化特性;②容易获得,手术操作简单载体包括天然和人工合成;③可修复关节软骨面的缺损,也可修复软骨下骨的关节软骨缺损,但其依赖外缘性生长因子而限制其应用<sup>[6]</sup>。而聚乳酸/聚乳酸复合物(poly(lactide-co-glycolic acid) PLGA)是目前最常用的支架材料,本实验采用 PLGA 与磷酸三钙(TCP)复合材料支架,并在骨区域和软骨区域支架涂覆较强的胶原材料,增加细胞的黏附能力,在 8~12 周降解完全<sup>[7,8]</sup>。

本实验结果显示,术后 4 周,PLGA 复合 BMSCs 组修复软骨组织呈灰白色,修复面较平整,与周围组织界线稍明显,到第 8 周修复组织色泽已接近正常,与周围界线不清,修复表面平整;术后 12 周已与周围组织外观不易区别,关节活动度明显好转。而支架组与空白对照组术后 4 周即形成纤维组织,缺损明显,关节活动度明显受限。这说明 PLGA 复合 BMSCs 可实现关节软骨损伤的修复作用。本实验观察了术后 12 周,已经基本满足软骨初步修复的时间,但长期疗效和修复效果需待进一步观察验证。

总之,本实验采用 PLGA 作为支架复合 BMSCs 移植修复关节软骨,并取得了一定疗效,将为临床关节软骨损伤的生物学治疗提供新的方法。

参 考 文 献

- 1 Klein TJ, Malda J, Sah RL, et al. Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones[J]. Tissue Eng Part B Rev 2009; 15(2): 143-57.
- 2 Hwang NS, Elisseeff J. Application of stem cells for articular cartilage regeneration[J]. J Knee Surg. 2009; 22(1): 60-71.
- 3 Obradovic B, Martin I, Padera RF, et al. Integration of engineered cartilage[J]. J Orthop Res, 2001, 19(6): 1089-1097.
- 4 Han SH, Kim YH, Park MS, et al. Histological and biomechanical properties of regenerated articular cartilage using chondrogenic bone marrow stromal cells with a PLGA scaffold in vivo[J]. J Biomed Mater Res, 2008, 87(4): 850-861.
- 5 Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis[J]. Biomaterials, 2005, 26(27): 5474-5491.
- 6 罗鹏,潘骏. 间充质干细胞体外诱导生成软骨细胞的研究进展[J]. 浙江创伤外科 2010, 15(6): 833-835.
- 7 Vozzi G, Flaim C, Ahluwalia A, et al. Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition[J]. Biomaterials, 2003, 24(14): 2533-2540.
- 8 Hu Y, Grainger DW, Winn SR, et al. Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 59(3): 563-572.

收稿日期: 2011-7-8