

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.44.011 [http://www.crter.org]

陆一鸣, 桂鉴超, 徐扬, 尹昭伟, 杨晓斐, 蒋逸秋. 软骨细胞迁徙能力与自体细胞软骨移植中整合的相关性[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(44):7721-7728.

软骨细胞迁徙能力与自体细胞软骨移植中整合的相关性**

陆一鸣, 桂鉴超, 徐扬, 尹昭伟, 杨晓斐, 蒋逸秋(南京医科大学附属南京医院骨科, 江苏省南京市 210006)

文章亮点:

1 整合不良是导致自体细胞移植修复软骨缺损失败的原因之一。软骨细胞迁徙能力被证明和整合有相关性, 但具体作用途径需要进一步阐明。国内外有关整合方面的报道较少, 且大多从大体和组织学角度对整合进行研究。

2 文章采用一种最新的细胞软骨环整合模型来研究软骨细胞的整合, 这种细胞/软骨环共培养模型很大程度上模拟了临床上采用的自体细胞软骨移植技术, 实验中没有加入支架, 为的是想更好地模拟自体细胞软骨移植。

3 结果显示, 可以通过 Src-磷酸化磷脂酶 Cy1-细胞外调节蛋白激酶 1/2 通路调节软骨细胞的迁徙能力从而对软骨的整合能力。首次从分子层面阐明软骨细胞的迁徙能力和软骨的整合密切相关, 为后续的临床治疗提供了指导。

关键词:

器官移植; 细胞移植; Src; 磷酸化磷脂酶 Cy1; 细胞外调节蛋白激酶 1/2; 软骨细胞; 迁徙; 整合; 自体软骨细胞移植; 省级基金

主题词:

软骨细胞; 移植, 自体; 免疫印迹法; 生物力学

基金资助:

江苏省“科教兴卫”工程资助项目(YZK07119)*

摘要

背景: 在关节外科中常用自体细胞软骨移植技术修复软骨缺损, 整合不良是导致修复失败的原因之一。软骨细胞迁徙能力被证明和整合有相关性, 某些通路如 Src-磷酸化磷脂酶 Cy1-细胞外调节蛋白激酶 1/2 已经被证实和软骨细胞的迁徙能力相关, 但是否和整合相关还是个未知数。

目的: 阐明软骨细胞迁徙通路在自体细胞软骨移植中和整合之间的相关性。

方法: 将来源于猪膝关节的软骨细胞分成 4 组, 为 Src、磷酸化磷脂酶 Cy1、细胞外调节蛋白激酶 1/2 抑制组以及正常组, 通过博伊登小室来量化 4 组软骨细胞的迁徙能力。将处理后的软骨细胞与软骨环建立共培养模型培养 28 d 后, 进行组织学、生物化学、生物力学、免疫蛋白印迹以及细胞示踪等分析来观察正常组与抑制组之间的差异。

结果与结论: 当用抑制剂处理软骨细胞后, 软骨细胞的迁徙能力明显下降。在软骨细胞软骨环共培养 28 d 后, 免疫印迹蛋白分析表明通路抑制剂一直存在于整个培养周期中。同时正常组迁徙到整合区域中的软骨细胞数量和距离以及分泌的胶原、基质和力学强度明显高于其他 3 个抑制组。说明可以通过 Src-磷酸化磷脂酶 Cy1-细胞外调节蛋白激酶 1/2 通路调节软骨细胞的迁徙能力从而影响软骨的整合能力。

Correlation between chondrocyte migration and integration capability during autologous chondrocyte transplantation

Lu Yi-ming, Gui Jian-chao, Xu Yang, Yin Zhao-wei, Yang Xiao-fei, Jiang Yi-qiu (Department of Orthopedics, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In joint surgery, the commonly used autologous chondrocyte transplantation often used to repair cartilage defects, and poor integration is one of the reasons that leading to failure repairing. Chondrocytes migration capability is proven to have correlation with integration and some pathways, such as Src-phosphorylated phospholipase Cy1-extracellular regulated kinase 1/2 has been confirmed to have correlation with the migration ability of chondrocytes, but the correlation with the integration is still unknown.

OBJECTIVE: To determine the chondrocyte signaling pathways involved in autologous chondrocyte migration and their effects on cartilage integration in autologous chondrocyte implantation.

METHODS: Articular chondrocytes were isolated from immature pig knee joints. The cells were divided into four groups: Src group, phosphorylated phospholipase Cy1 group, extracellular regulated kinase 1/2 group and control group, then the Boyden chambers were used to quantify the chondrocyte migration. The chondrocytes/

陆一鸣★, 男, 1986 年生, 江苏省南通市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事关节软骨修复及再生研究。luyiming_191877890@qq.com

通讯作者: 桂鉴超, 南京医科大学附属南京医院骨科, 江苏省南京市 210006
gui1997@126.com

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)44-07721-08

收稿日期: 2013-03-15
修回日期: 2013-05-02
(201302050/G · C)

Lu Yi-ming★, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
luyiming_191877890@qq.com

Corresponding author: Gui Jian-chao, Department of Orthopedics, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
gui1997@126.com

Received: 2013-03-15
Accepted: 2013-05-02

cartilage ring integration model was developed and cultured for 28 days, and then histology, biochemistry, biomechanics, western blot analysis and cell tracking analysis were performed to observe the differences between the control group and the suppression groups.

RESULTS AND CONCLUSION: The migration ability of chondrocytes was significantly decreased after pretreated with inhibitors. After the chondrocytes/cartilage ring co-cultured for 28 days, Western blot analysis showed that the pathway inhibitors has been presented in the entire culture cycle. The number and length of chondrocytes migrated into the integration area, collagen secretion level, matrix and mechanical strength in the control group were higher than those in three suppression groups. The results suggest that chondrocyte migration ability can affect the cartilage integration capability through Src-phosphorylated phospholipase $Cy1$ -extracellular regulating kinase 1/2 signal transduction pathway.

Subject headings: chondrocytes; transplantation, autologous; immunoblotting; biomechanics

Funding: Project of "Science and Education Promoting Health Engineering" of Jiangsu Province, No. YZK07119*

Lu YM, Gui JC, Xu Y, Yin ZW, Yang XF, Jiang YQ. Correlation between chondrocyte migration and integration capability during autologous chondrocyte transplantation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(44):7721-7728.

0 引言 Introduction

关节软骨损伤是临床上常见病, 多见于关节外伤、运动损伤和年龄老化等, 约占关节外科门诊病例的1/2, 且每年新增病例数在逐渐增加。由于关节软骨再生能力极为有限, 损伤后难以自身修复, 若得不到适当的治疗, 损伤会逐渐扩大, 最终导致关节功能的完全丧失。采用组织工程技术修复关节软骨损伤是目前公认的一个有效治疗手段, 但该技术尚不完善, 修复组织与宿主软骨组织整合不良是国内外学者公认的修复失败的主要原因之一。整合过程包括了由软骨细胞以及整合界面的微环境等等一系列的复杂过程^[1]。某些学者发现整合的过程开始于孤立的软骨细胞和整合界面的接触^[2]。Pabbruwe等^[3]最近的研究发现和整合界面相接触的软骨细胞在整合过程中会逐渐迁徙到周围软骨组织中去。因此可推断出, 软骨细胞的迁徙可能对整合界面的形成具有重要的意义。然后Theodoropoulos等^[4]在体外的整合模型中却发现没有软骨细胞能够渗透到宿主软骨中去。因此, 软骨细胞的迁徙能力和软骨整合两者之间的关系需要进一步的阐明。

当软骨细胞受到细胞外的刺激时, 通过一系列复杂的信号通路的传导, 使得软骨细胞的迁徙能力发生变化。某些信号通路, 包括磷脂酰肌醇激酶、促分裂素原活化蛋白激酶、磷酸化磷脂酶 Cy 被有选择的用来研究软骨细胞的迁徙能力^[5]。但国内外学者从未从分子水平上进行过软骨细胞的迁徙能力和软骨整合之间的相关性研究。

细胞外调节蛋白激酶是一种受到细胞微环境变化从而发生调节的丝氨酸和酪氨酸激酶, 它在很多种细胞内, 尤其是软骨细胞中发现和细胞迁徙能力密切相关。Src是一种能够影响很多下游信号蛋白的络氨酸蛋白激酶。Whitney等^[6]发现超声能够通过影响Src和细胞外调节蛋白激酶表达从而促进软骨细胞的迁徙能力而且Src是细胞外调节蛋白激酶的一个上游蛋白。磷酸化磷脂酶 $Cy1$ 是磷酸化磷脂酶 Cy 的一种丝氨酸苏氨酸激酶, 而

且磷酸化磷脂酶 $Cy1$ 在小鼠胚胎成纤维细胞的信号传导中起着很重要的作用。最近有学者发现周期性应力可以通过刺激Src-磷酸化磷脂酶 $Cy1$ -细胞外调节蛋白激酶1/2通路从而促进细胞的迁徙^[7]。但是这个信号通路在体外的整合模型中能否通过影响软骨细胞的迁徙能力而进一步影响整合, 存在着一个很大的疑问。

从上述的发现中, 假设软骨细胞的迁徙能力可以通过Src-磷酸化磷脂酶 $Cy1$ -细胞外调节蛋白激酶1/2通路发生改变, 从而影响修复组织和周围组织的整合。在作者看来, 这是国内外首次从分子机制上研究软骨的整合, 从而可以从分子水平的角度给临床治疗带来某些启示。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 对比观察实验。

时间及地点: 于2012-03-01/10-30在南京医科大学附属南京医院中心实验室完成。

材料:

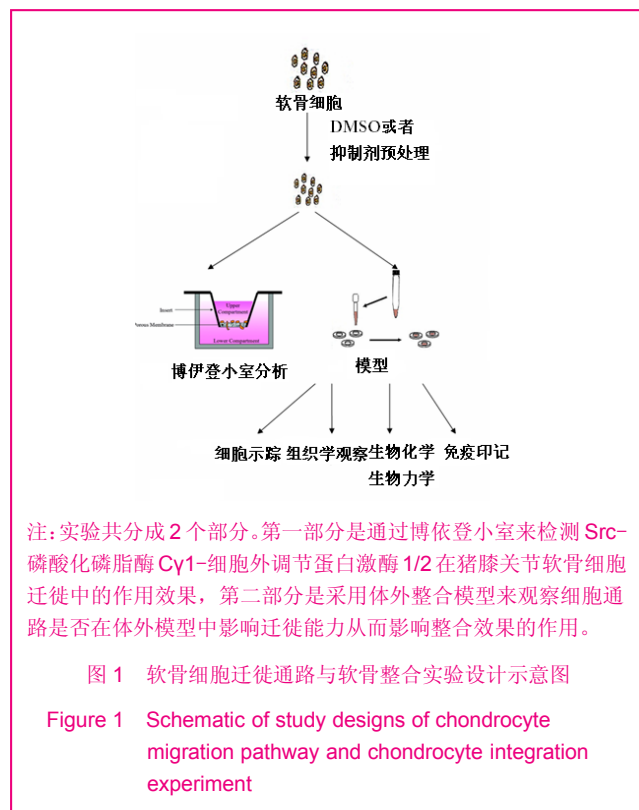
实验动物: 普通健康4月龄小型猪, 雌雄不拘, 体重约为30 kg, 由南京医科大学动物实验中心提供, 许可证号: SYXK(苏)2008-0007。

软骨细胞迁徙通路与软骨整合实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清、胰蛋白酶、DMEM、II型胶原酶、I型胶原一抗、II型胶原一抗	Gibco
Src 抗体、磷酸化 Src 抗体、磷脂酶 $Cy1$ 抗体、磷酸化磷酸化磷脂酶 $Cy1$ 抗体、细胞外调节蛋白激酶 1/2 抗体、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2、PD98059	CST Co., Ltd
PP2	BIOMOL
U73122	Santa Cruz
生物力学测定仪器	常州康辉医疗器械公司
激光共聚焦显微镜	ZEISS, L710, 德国

实验方法: 软骨细胞共分为4组, 分别用Src抑制剂PP2组(10 μ mol/L)、磷酸化磷脂酶 $Cy1$ 抑制剂U73122

组($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)、细胞外调节蛋白激酶 1/2 抑制剂 PD98059 组($50\text{ }\mu\text{mol/L}$) 或同体积的二甲亚砷(体积分数 10%, 正常组)预处理 30 min。实验共分成 2 个部分。第一部分是通通过博依登小室来检测 Src-磷酸化磷脂酶 Cy1 -细胞外调节蛋白激酶 1/2 在软骨细胞迁徙中的作用效果。第二部分是采用体外整合模型来观察细胞通路是否在体外模型中影响迁徙能力从而影响整合效果的作用, 示意图见图 1。



细胞分离和培养: 软骨细胞来源于动物实验用猪的膝关节。将做成体外整合模型之后剩余的软骨块切碎成 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 大小的碎块。然后用 PBS 反复冲洗, 在含有 0.2% 的胰蛋白酶溶液中过夜孵育。消化后的悬液用孔径 $75\text{ }\mu\text{m}$ 的细胞筛滤过后, 按照 1×10^6 的浓度种植于 150 mm 的培养皿中。 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 含有体积分数 5% CO_2 的培养箱中孵育, 每隔 3 d 换液 1 次。当细胞传至第 2 代时, 开始用于实验^[8]。

博依登小室评估软骨细胞迁徙能力: 在实验前, 细胞先用无血清的 DMEM 预处理饥饿细胞 12 h, 然后分别用抑制剂或者二甲亚砷预处理 0.5 h。将各组细胞消化后用不含血清的 DMEM 重悬, 分别取大约 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的细胞悬液($1\times 10^9\text{ L}^{-1}$)加入到博依登小室的上室中, 在下室中加入含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM。经过 16 h 的孵育后, 用结晶紫染色膜的下表面, 计数细胞。

软骨环的制作: 用直径为 6 mm 的皮肤科打孔器在实验用猪的股骨髁上打孔, 接着再用 3 mm 的皮肤科打孔器在上述圆环的中心打孔, 用手术刀将其切下。就制作

成了外径为 6 mm, 内径为 3 mm, 厚度约为 3 mm 的软骨环。将上述软骨环取下, 放置含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养箱中培养备用。其余剩余的软骨碎片, 按照上述分离软骨细胞用^[8]。

体外软骨整合模型的建立: 约 1 周后, 软骨细胞在体外增殖到第 2 代。模型是建立在六孔板上的。含有 1% 低熔点琼脂糖的 PBS 在高压蒸汽锅内消毒, 当冷却到 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 在孔中加入 1 mL 的上述溶液, 迅速摇匀, 这样就在培养皿的底部形成约 1 mm 厚的封底, 立刻将软骨环种于培养皿的中间, 放置 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱中 5 min, 待琼脂糖凝固后, 用移液枪头将软骨环内环里的琼脂糖吸除干净, 将 $10\text{ }\mu\text{L}$ (约 1.25×10^6 细胞) 上述处理后的 4 组细胞悬液加入到内环中, 培养箱中孵育 4 h 后, 加培养液没过软骨环共培养。每隔 3 d 换液, 换液前用含有抑制剂或等量的二甲亚砷的无血清培养液预处理整合模型 30 min。培养 28 d 后取模型检测^[8]。

细胞标记评估软骨迁徙: 在软骨细胞用抑制剂或者等量的二甲亚砷处理之后, 软骨细胞加入到环中以前, 将软骨细胞用 PKH26 所标记。将 10×10^6 个软骨细胞用试剂盒中 1 mL 溶液重悬后, 加入等量的含有 PKH26 的溶液, 约 5 min 后, 加入等量的血清中止反应, 重悬到所需浓度按照上述建立模型。

28 d 培养后, 将整合模型取出, 冰冻切片切成约 $10\text{ }\mu\text{m}$ 薄片, DAPI 复染后, 激光共聚焦显微镜下成像。采用 Aim Image Brower 来分析细胞迁徙的两种指标: 最远迁徙距离以及最大迁徙细胞数。从每组中分别取 5 张照片。沿着环的内径画同心圆, 找出距离软骨环内径最远的细胞, 即为最远迁徙距离; 从每张照片中随机画一个直径约为 0.2 mm 的正方形, 正方形的面积一半在环上, 一半在环内, 计算这个正方形内的细胞数, 即为最大迁徙细胞数。

组织学、生化测定: 28 d 培养后, 切片后常规苏木精-伊红、番红 O、I 型、II 型胶原纤维染色。内径为直径 3 mm 的内芯, 假设内芯的外周 1 mm 为整合区域, 测定外周 1 mm 和中间 2 mm 的糖胺多糖, 胶原, DNA 以及内芯和整合界面发生位移的生物力学。

生物力学测定: 需要制作用于实验的特制夹具, 已由常州康辉医疗器械有限公司完成制作。采用 Instron 6022 生物力学实验机(东南大学生物科学与医学工程学院生物力学中心协助测试)进行测定, 通过推压软骨组织环中央孔处新生软骨块来获得整合界面的力学参数。推压棒以 0.5 mm/min 的速率进行推压, 测得应力和应变值, 制作应力应变曲线, 求得整合界面的弹性模量, 持续推压直到界面发生完全破坏为止, 然后再重复 1 次试验, 以排除摩擦力的影响, 以第 1 次测量值减去第 2 次测量值即可求得最大破坏能。

免疫印记测定: 28 d 培养后, 将各组的内芯取出, 进

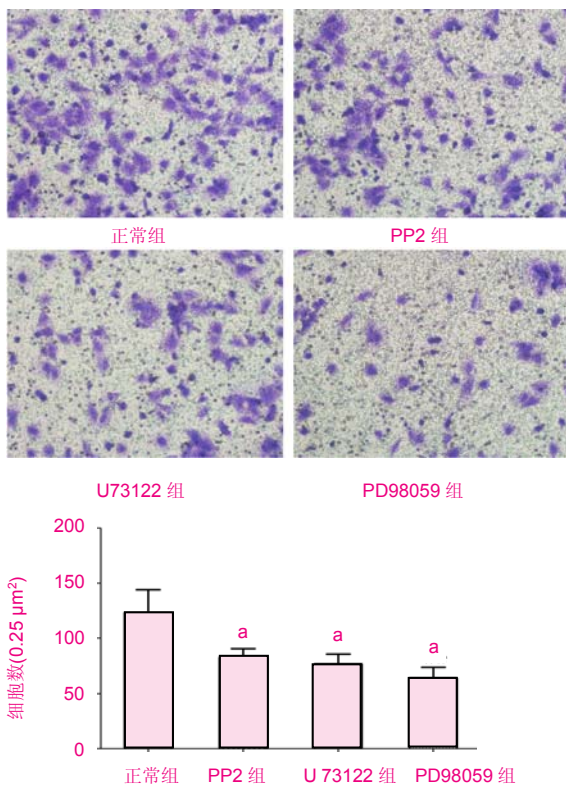
行免疫印记测定, 检测抑制组中Src-磷酸化磷脂酶Cy1-细胞外调节蛋白激酶1/2的表达和正常组是否有差异, 从而判断在这个整合过程中通路究竟是不是一直存在和起效。

主要观察指标: 各组博伊登小室过膜细胞数以及各模型中组织学、生化、力学以及免疫印记的指标分析。

统计学分析: 统计学处理者为第一、二作者, 采用t-test来检测正常组和抑制组之间的区别, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2在博伊登小室中能影响软骨细胞的迁徙能力 见图2。



与正常组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: PP2 为 Src 抑制剂, U73122 为磷酸化磷脂酶 Cy1 抑制剂、PD98059 为细胞外调节蛋白激酶 1/2 抑制剂。膜下表面的细胞是用结晶紫染色来量化的, 过膜细胞均被染成紫色。各组在膜下表面的细胞数为: 正常组 123±21, PP2 组 83±8, U73122 组 77±9, PD98059 组 64±10, 各抑制组迁徙细胞数量低于正常组, 差异有显著性意义($n=5$, $P < 0.05$), 说明 Src、磷酸化磷脂酶 Cy1、细胞外调节蛋白激酶 1/2 与软骨细胞的迁徙有相关性。

图2 Src、磷酸化磷脂酶 Cy1 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 对软骨细胞迁徙的影响(结晶紫染色, ×400)

Figure 2 Effect of Src, phosphorylated phospholipase Cy1 and extracellular regulated kinase 1/2 on chondrocytes migration (Crystal violet staining, ×400)

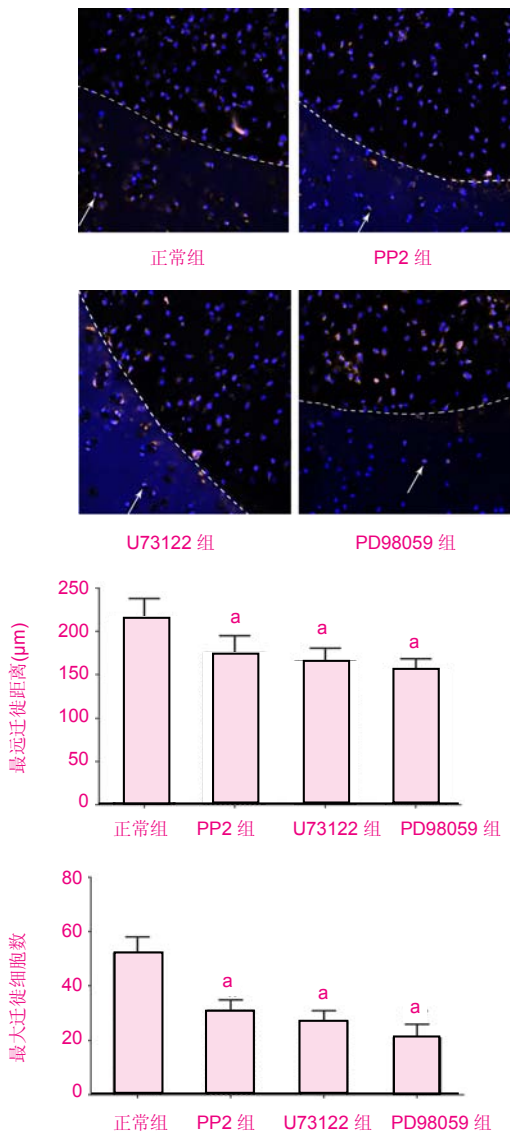
在倒置显微镜下观察博伊登小室后发现, 化学趋化因子(血清)能促进Src-磷酸化磷脂酶Cy1-细胞外调节蛋白激酶1/2。当Src、磷酸化磷脂酶Cy1、细胞外调节蛋白激酶1/2受到抑制后, 软骨细胞的迁徙能力下降, 表现为每个视野下迁徙过膜的软骨细胞数量减少($P < 0.05$), 见图2。

结果说明在化学趋化因子的刺激下Src、磷酸化磷脂酶Cy1、细胞外调节蛋白激酶1/2和软骨细胞的迁徙具有相关性。

2.2 Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2在体外整合模型中同样影响软骨细胞的迁徙能力 Src、磷酸化磷脂酶Cy1、细胞外调节蛋白激酶1/2已经被证明在博伊登小室中影响软骨细胞的迁徙能力, 但在体外整合模型中是否发挥作用还不能确定。实验结果显示种植在软骨环中的软骨细胞具有迁徙的能力。此外, 它们可以穿过整合界面, 迁徙到宿主软骨中去, 见图3。迁徙细胞的迁徙能力, 反映为最远迁徙距离以及最大迁徙细胞数, 抑制组是明显低于正常组的, 表现为正常组的最远迁徙距离以及迁徙细胞数显著高于其他3个抑制组($P < 0.05$), 见图3。结果证明了Src、磷酸化磷脂酶Cy1、细胞外调节蛋白激酶1/2信号通路在类似于自体细胞软骨移植的整合模型中对细胞迁徙具有重要意义。

2.3 软骨整合受到Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2介导的迁徙通路的影响 在Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2没有受到抑制的情况下, 软骨细胞的迁徙能力被证明是增强的。但是迁徙能力增强到底对整合有着何种效果还不得而知。如图4中所示, 在没有抑制剂存在的情况下, 更多的软骨细胞迁徙到整合区域中(苏木精-伊红染色)。这些软骨细胞保持正常的表型正如图4中所示分泌较多的II型胶原和较少的I型胶原。如图4中番红O和II型胶原的染色, 正常组中在整合区域要比其他3个抑制组要分泌更多的细胞外基质和胶原。而生物力学的结果是与组织学染色结果密切相关的。

整合区域中正常组的DNA含量要其他3个抑制组明显增多, 见图5, 结果提示更高的细胞密度存在于整合区域中。整个内芯的DNA含量并没有太大的区别, 见图5A, 所以能认定抑制剂对细胞增殖并没有太大的意义。因此判断正常组整合区域中的细胞较其他3个抑制剂组多是因为细胞迁徙的原因, 而不是细胞增殖的原因。整个内芯中的糖胺多糖/DNA或者胶原/DNA差异并无显著性学意义, 见图5, 说明抑制剂对细胞的分化并没有影响。正常组迁徙到整合区域的细胞较多, 导致分泌的胶原和细胞外基质也比抑制组高, 整合效果因此更好, 继而导致生物力学明显要强于其他3个抑制组。

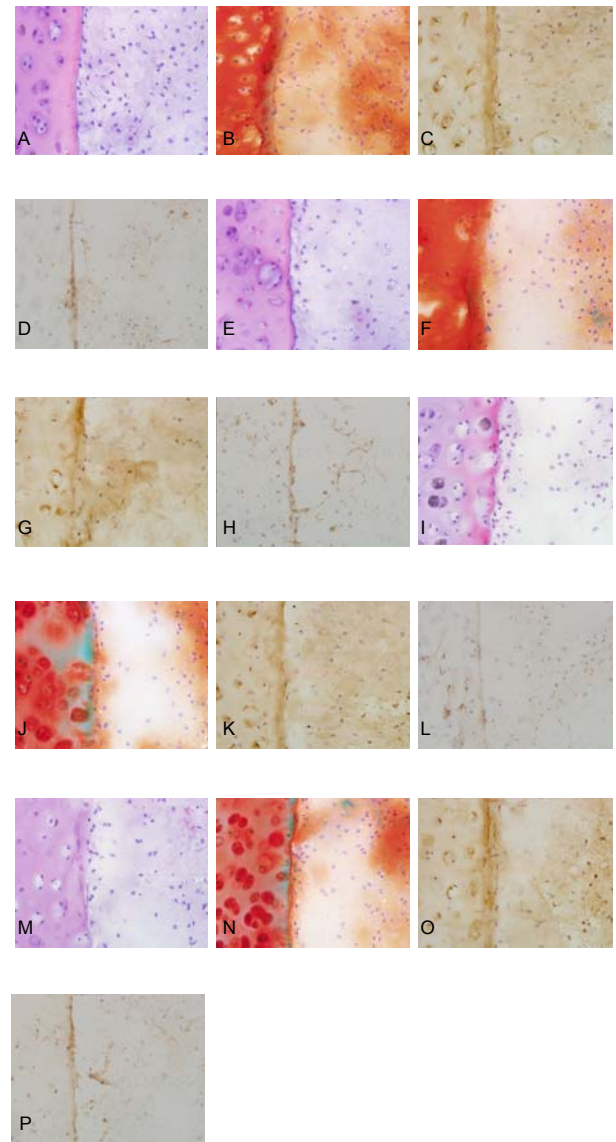


与正常组比较, $^*P < 0.05$ 。

注: PP2 为 Src 抑制剂, U73122 为磷酸化磷脂酶 C γ 1 抑制剂、PD98059 为细胞外调节蛋白激酶 1/2 抑制剂。造模前细胞用 PKH26 标记, 观察前用 DAPI 复染后, 标记的细胞呈现出紫色。环中的紫色细胞即箭头所指为迁徙进入宿主软骨中的细胞。统计学分析列于下方: 最远迁徙距离正常组 (214.564±23.256) μ m, PP2 组 (174.432±20.451) μ m, U73122 组 (164.936±15.434) μ m, PD98059 组 (153.726±14.255) μ m; 最大迁徙细胞数正常组 52±6, PP2 组 31±4, U73122 组 27±4, PD98059 组 21±5, 正常组的最远迁徙距离以及迁徙细胞数显著高于其他 3 个抑制组 ($n=5$, $P < 0.05$), 说明 Src、磷酸化磷脂酶 C γ 1 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 在体外整合模型中同样影响软骨细胞的迁徙能力。

图 3 培养 28 d 后 PKH26 标记的细胞在激光共聚焦显微镜下的成像($\times 200$)

Figure 3 Image of PKH26 labeled chondrocytes under laser scanning confocal microscope after cultured for 28 d ($\times 200$)

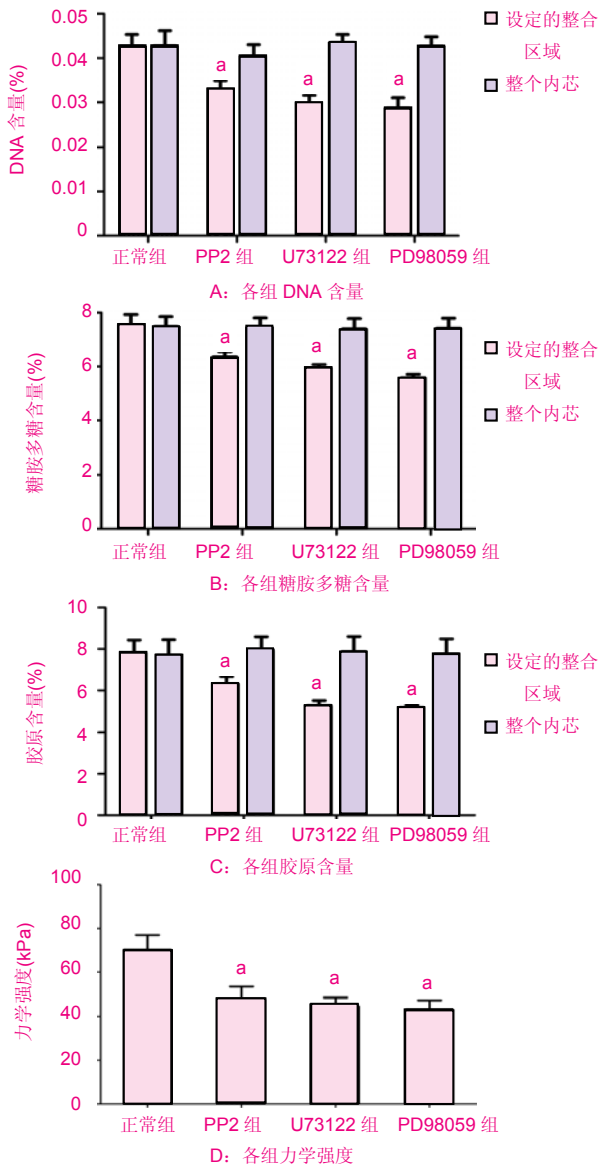


A, B, C, D: 正常组; E, F, G, H: PP2 组; I, J, K, L: U73122 组; M, N, O, P: PD98059 组; A, E, I, M: 苏木精-伊红染色; B, F, J, N: 番红 O 染色; C, G, K, O: II 型胶原染色; D, H, L, P: I 型胶原染色。

注: PP2 为 Src 抑制剂, U73122 为磷酸化磷脂酶 C γ 1 抑制剂、PD98059 为细胞外调节蛋白激酶 1/2 抑制剂。在没有抑制剂存在的情况下, 更多的软骨细胞迁徙到整合区域中, 表现为正常组比其他 3 个抑制组在整合区域有更多的细胞存在(苏木精-伊红染色)。同样在没有抑制剂存在的情况下, 整合区域存在更多的细胞外基质和胶原, 表现为正常组比其他 3 个抑制组在整合区域有更多的基质和胶原(番红 O 和 II 型胶原染色)。

图 4 体外整合模型整合区域的组织学和免疫组化染色评估($\times 400$)

Figure 4 Histological and immunohistochemical staining evaluation of the *in vitro* chondrocytes/cartilage ring integration model in the integration zone ($\times 400$)



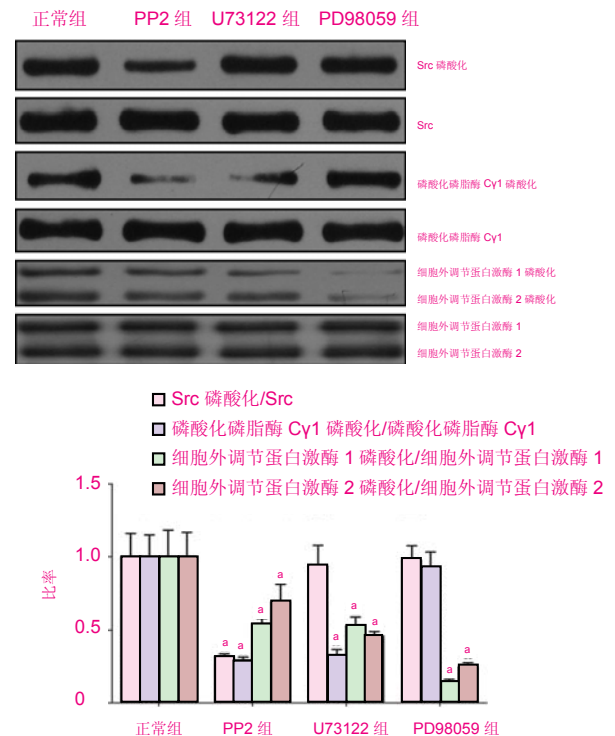
与正常组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: PP2 为 Src 抑制剂, U73122 为磷酸化磷脂酶 Cy1 抑制剂、PD98059 为细胞外调节蛋白激酶 1/2 抑制剂。在整合区域中糖胺多糖含量正常组为 $(8.14 \pm 0.39)\%$, 显著高于 PP2 组 $(6.34 \pm 0.20)\%$ 、U73122 组 $(5.94 \pm 0.14)\%$ 和 PD98059 组 $(5.57 \pm 0.10)\%$ ($n=5$, $P < 0.05$)。胶原含量正常组为 $(7.80 \pm 0.63)\%$, 显著高于 PP2 组 $(6.29 \pm 0.38)\%$ 、U73122 组 $(5.25 \pm 0.26)\%$ 和 PD9805 组 $(5.17 \pm 0.13)\%$ ($n=5$, $P < 0.05$)。DNA 含量正常组为 $(0.0426 \pm 0.0027)\%$, 显著高于 PP2 组 $(0.0327 \pm 0.0022)\%$ 、U73122 组 $(0.0293 \pm 0.0023)\%$ 和 PD98059 组 $(0.0286 \pm 0.0024)\%$ ($n=5$, $P < 0.05$)。整个内芯中的糖胺多糖/DNA 和胶原/DNA 比值差异无显著性意义。内芯中总的糖胺多糖、胶原、DNA 含量在 4 组中差异无显著性意义, 提示正常组迁徙到整合区域的细胞较多, 分泌的胶原和细胞外基质也比抑制组高, 导致力学强度优于其他 3 个抑制组 ($P < 0.05$)。

图 5 体外整合模型的内芯生化和生物力学分析

Figure 5 Biochemical and biomechanical analysis of the cores of *in vitro* chondrocytes/cartilage ring integration model

2.4 Src、磷酸化磷脂酶Cy1 和细胞外调节蛋白激酶 1/2通路在培养过程中是持续存在的 见图6。



注: PP2 为 Src 抑制剂, U73122 为磷酸化磷脂酶 Cy1 抑制剂、PD98059 为细胞外调节蛋白激酶 1/2 抑制剂。培养 28 d 后, 在 PP2 组中, Src、磷酸化磷脂酶 Cy1 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 磷酸化和正常组比较都有显著降低; 在 U73122 组中, 磷酸化磷脂酶 Cy1 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 磷酸化和正常组比较都有显著降低; 在 PD98059 组中, 细胞外调节蛋白激酶 1/2 磷酸化和正常组比较都有显著降低 ($n=5$, $P < 0.05$), 说明 Src、磷酸化磷脂酶 Cy1 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 通路在培养过程中是持续存在的。

图 6 培养 28 d 后 Src、磷酸化磷脂酶 Cy1 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 磷酸化

Figure 6 Phosphorylation of Src, phosphorylated phospholipase Cy1 and extracellular regulated kinase 1/2 after cultured for 28 d

Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2三者之间的关系是用免疫印记来评估的。在PP2组中, Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2磷酸化和正常组比较都有显著降低 ($P < 0.05$, $n=5$)。在U73122组中, 磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2磷酸化和正常组比较都有显著降低 ($P < 0.05$, $n=5$), 然而Src的磷酸化差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。在PD98059组中, 细胞外调节蛋白激酶1/2磷酸化和正常组比较都有显著降低 ($P < 0.05$, $n=5$), 然而Src和磷酸化磷脂酶Cy1的磷酸化差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图6。此外, Src是磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激

酶1/2上游蛋白, 而细胞外调节蛋白激酶1/2是磷酸化磷脂酶Cy1的下游蛋白。因此, Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2在整个培养周期中是持续存在的。

3 讨论 Discussion

虽然很多种基于细胞理论的技术, 比如说胶原消化液和支架技术^[9], 被很多研究者认为对软骨修复是很有用处的。但是整合不良做为一个关键性难题至今并没有得到解决, 同时很少有基质去阐述它。整合是通过各种蛋白调节的一个复查的过程, 体内实验不能很精细的去研究, 因此体外模拟整合过程的研究是很有必要的。文献中用于研究整合的模型中, 最多报道的是细胞/软骨环共培养模型。这个模型是Enders等^[8]首先发明的, 作者采用并且加以改进, 用琼脂糖将软骨环和培养皿底部的空隙密封住, 这样就能防止细胞的外漏。虽然近些年有许多技术出现, 但是自体细胞软骨移植还是临床上被用作最多的治疗软骨缺损的手段。这种细胞/软骨环共培养模型很大程度上模拟了临床上采用的自体细胞软骨移植技术。因此, 作者没有加入支架, 为的是想更好地模拟自体细胞软骨移植技术。

细胞团块培养被证明是维持细胞表型, 防止去分化的最好的手段之一^[10]。单纯细胞培养容易导致细胞去分化, 从而失去正常的功能, 作者采用的细胞高密度培养完全可以近似于细胞团块培养, 进而能维持细胞正常的分化能力^[11]。

在这次实验中, 细胞迁徙是在整合过程中发生的普遍现象, 但驱使细胞发生迁徙的机制需要去阐明。Seol等^[12]发现软骨受伤会产生多种生化物质, 包括细胞溶菌产物HMGB1, RAGE。这些物质对软骨细胞有趋化性的作用, 而软骨细胞有许多种物理以及化学受体, 这些受体一旦激活后便能使得软骨细胞向受伤的部分产生迁徙。Raggatt等^[13]还发现MMP-13在机械压力作用下能直接释放到培养液中, 而且MMP-13还能直接促进细胞外调节蛋白激酶1/2的活性。Kudirka等^[14]也发现P2Y具有同样的作用。因此, 从破坏的软骨上, 诸如软骨环的切开分泌的某些化学因子能促进细胞外调节蛋白激酶1/2的活性从而使得修复组织的软骨细胞定向向整合区域迁徙。更关键的是, 这个释放化学因子的过程是一个缓慢持续的过程, 所以, 修复组织的软骨细胞长时间地自发向整合区域迁徙。

虽然有许多信号通路(诸如整合素、PI3K-Akt 和Wnt5b)被发现和软骨细胞的迁徙相关^[15]。但是在自体细胞软骨移植技术中软骨细胞内的迁徙相关信号仍然是未知的。Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2这些在其他细胞中已经被研究者们广泛地研究出和

细胞迁徙密切相关, 但是在自体细胞软骨移植模型中仍然未知。本实验研究证明这个通路在这样一个自体细胞软骨移植的环境中同样能够起到作用。这些发现符合之前其他学者对其他细胞与之类似的研究。另外, Src、磷酸化磷脂酶Cy1 和细胞外调节蛋白激酶1/2蛋白的磷酸化在培养28 d后始终存在, 说明这个通路在这个模拟自体细胞软骨移植技术软骨修复的过程中持续存在。Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2磷酸化的比例不对称可能是由于其他通路可能在里面也起作用而引起的, 这需要后续更加深入的研究。

Bursell发现Src抑制剂PP2能促进软骨细胞的表型发生变化^[16], Ryan等^[17]发现细胞外调节蛋白激酶的活性升高能促进蛋白多糖类物质的聚合和表达。由此可见, Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2不仅仅使得软骨细胞的迁徙能力发生变化, 还能引起其他表型的变化。Yoon等^[18]在最近的1篇文献中报道说细胞外调节蛋白激酶对维持软骨细胞的表型起到一定的作用。这就很好的解释了在PD98059组中软骨细胞表型能够维持同时能够和正常组分泌类似的细胞外基质以及胶原。Ryan等^[17]发现PD98059抑制效应具有浓度效应, 这就很好地解释了作者采用50 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞迁徙起作用而不是Yoon使用的200 $\mu\text{mol/L}$ 对分化有效果的剂量。虽然在本实验中各抑制组中没有发现很明显的对分化有效果的依据, 但是因为任何一种抑制剂对蛋白所产生的效果涉及到许多通路, 是不是只对迁徙起到作用需要谨慎的评估。

虽然学者们也做了一些对于迁徙和软骨整合的研究, 但是两者相关性到现在还不是很清楚。在本实验中, 当信号通路蛋白受到抑制(Src、磷酸化磷脂酶Cy1和细胞外调节蛋白激酶1/2), 更少的蛋白迁徙到整合区域中, 于是就分泌更少的细胞外基质和胶原。DiMicco等^[19]发现整合区域的力学强度是由胶原的强度和位置所决定的。由上述可以得出细胞迁徙能力的强弱和力学强度是呈正相关的, 这是国内外第一次阐明细胞迁徙和软骨整合之间的关系。

同样, 实验也存在一些不足, 首先, 这是一个体外自体细胞软骨移植的模型, 它是静止的, 不像在人体中时时产生行走的压力。其次, 很多软骨破坏往往是由于炎症因子导致的, 但炎症因子作者并没有考虑在内。最后, 荧光标记28 d会发生衰变, 但是在本实验中观察的是相关数, 找到有迁徙的证据即可, 而不是找到迁徙细胞的绝对数。

致谢: 感谢南京市第一医院中心实验室对本实验的支持。

作者贡献: 实验设计者为第一、二作者, 实验实施者为第一、三、四作者, 评估者为全部作者, 均经过正规培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组

织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 细胞外调节蛋白激酶-细胞外调节蛋白激酶是一种受到细胞微环境变化从而发生调节的丝氨酸和酪氨酸激酶, 它在很多种细胞内, 尤其是软骨细胞中发现和细胞迁徙能力密切相关。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, et al. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater.* 2008;16:26-39.
- [2] Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, et al. Growth and integration of neocartilage with native cartilage in vitro. *J Orthop Res.* 2005;23(2):433-439.
- [3] Pabbruwe MB, Esfandiari E, Kafienah W, et al. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials.* 2009;30(26):4277-4286.
- [4] Theodoropoulos JS, De Croos JN, Park SS, et al. Integration of tissue-engineered cartilage with host cartilage: an in vitro model. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(10):2785-2795.
- [5] Beier F, Loeser RF. Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 kinase-Akt, and MAP kinase signaling pathways in chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2010;110(3):573-580.
- [6] Whitney NP, Lamb AC, Louw TM, et al. Integrin-mediated mechanotransduction pathway of low-intensity continuous ultrasound in human chondrocytes. *Ultrasound Med Biol.* 2012;38(10):1734-1743.
- [7] Nong L, Yin G, Ren K, et al. Periodic mechanical stress enhances rat chondrocyte area expansion and migration through Src-PLCgamma1-ERK1/2 signaling. *Eur J Cell Biol.* 2010;89(9):705-711.
- [8] Enders JT, Otto TJ, Peters HC, et al. A model for studying human articular cartilage integration in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(2):509-514.
- [9] Bos PK, DeGroot J, Budde M, et al. Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: implications for integrative cartilage repair. *Arthritis Rheum.* 2002;46(4):976-985.
- [10] Ahsan T, Sah R. Biomechanics of integrative cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999;7:29-40.
- [11] Ruggiero F, Petit B, Ronziere M, et al. Composition and organization of the collagen network produced by fetal bovine chondrocytes cultured at high density. *J Histochem Cytochem.* 1993;41:867-875.
- [12] Seol D, McCabe DJ, Choe H, et al. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3626-3637.
- [13] Raggatt LJ, Jefcoat SC Jr, Choudhury I, et al. Matrix metalloproteinase-13 influences ERK signalling in articular rabbit chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(7):680-689.
- [14] Kudirka JC, Panupinthu N, Tesseyman MA, et al. P2Y nucleotide receptor signaling through MAPK/ERK is regulated by extracellular matrix: involvement of beta3 integrins. *J Cell Physiol.* 2007;213(1):54-64.
- [15] Bradley EW, Drissi MH. Wnt5b regulates mesenchymal cell aggregation and chondrocyte differentiation through the planar cell polarity pathway. *J Cell Physiol.* 2011;226(6):1683-1693.
- [16] Bursell L, Woods A, James CG, et al. Src kinase inhibition promotes the chondrocyte phenotype. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R105.
- [17] Ryan JA, Eisner EA, DuRaine G, et al. Mechanical compression of articular cartilage induces chondrocyte proliferation and inhibits proteoglycan synthesis by activation of the ERK pathway: implications for tissue engineering and regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009;3(2):107-116.
- [18] Yoon YM, Kim SJ, Oh CD, et al. Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. *J Biol Chem.* 2002; 277(10):8412-8420.
- [19] DiMicco MA, Waters SN, Akeson WH, et al. Integrative articular cartilage repair: dependence on developmental stage and collagen metabolism. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(3): 218-225.