

# 骨膜复合骨髓间充质干细胞和软骨细胞体内移植修复软骨缺损

刘吉斌, 侯连东, 于强, 白毅, 王彦东(大连大学附属中山医院骨科, 辽宁省大连市 116001)

## 文章亮点:

- 1 以往软骨缺损主要采用磨削灌洗、钻孔、微骨折技术等对缺损组织进行修复, 但多数技术被认为具有一定的局限性, 且只能减轻患者疼痛或仅短期有效。近年来越来越多的研究表明, 软骨组织工程修复技术对于软骨的再生及修复具有重要意义, 具有广阔的应用前景。
- 2 实验将骨髓间充质干细胞与软骨细胞混合培养, 移植入动物体内, 利用骨膜固定减少细胞流失, 成功构建出组织工程软骨, 实现了修复软骨缺损的目的。

## 关键词:

生物材料; 软骨生物材料; 骨膜; 软骨缺损; 骨髓间充质干细胞; 软骨细胞

## 主题词:

骨膜; 干细胞; 软骨细胞

## 摘要

**背景:** 以往主要采用磨削灌洗、钻孔、微骨折技术等对软骨缺损组织进行修复, 但多数技术被认为具有一定的局限性, 只能减轻患者疼痛或仅短期有效。近年来越来越多的研究表明, 软骨组织工程修复技术对于软骨再生及修复具有重要意义。

**目的:** 观察自体骨膜复合骨髓间充质干细胞和软骨细胞修复兔膝关节间窝软骨缺损的效果。

**方法:** 取新西兰大白兔 28 只, 随机均分为两组, 建立双侧膝关节间窝关节软骨缺损模型, 实验组左侧植入自体骨膜与骨髓间充质干细胞-软骨细胞复合物, 右侧不植入任何材料作为空白对照; 对照组左侧植入自体骨膜, 右侧不植入任何材料作为空白对照。术后第 8, 12 周, 取膝关节软骨缺损部位新生组织, 行大体、组织学观察及 Wakitani 评分。

**结果与结论:** 术后 12 周, 实验组修复组织表面基本光滑, 与周围软骨色泽极其相近, 出现大量软骨细胞及软骨陷窝, 形成软骨基质, II 型胶原免疫组织化学染色呈阳性, 甲苯胺蓝染色较深; 对照组修复组织仍为白色, 新生修复组织局部凹陷, 表面欠光滑, 质地较硬, 仅有极少量软骨细胞, 甲苯胺蓝染色较浅, II 型胶原免疫组织化学染色呈阴性, 无软骨基质形成; 空白对照组软骨缺损塌陷, 表面不规则, 修复组织为纤维组织, 甲苯胺蓝染色较浅。表明自体骨膜复合骨髓间充质干细胞与软骨细胞移植能够较好修复关节软骨缺损。

刘吉斌, 侯连东, 于强, 白毅, 王彦东. 骨膜复合骨髓间充质干细胞和软骨细胞体内移植修复软骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(3):364-369.

## Repairing articular cartilage defects by transplantation of periosteum combined with bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes *in vivo*

Liu Ji-bin, Hou Lian-dong, Yu Qiang, Bai Yi, Wang Yan-dong (Department of Orthopedics, Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** The main strategies for cartilage repair include abrasion and lavaging, drilling, microfracture technology. But most of these technologies are considered certain limitations that can only alleviate pain and have short-term effects. Cartilage tissue engineering technology has great significance and broad application prospects for cartilage regeneration and repair.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of periosteum combined bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes on the repair of articular cartilage defects in the intercondylar fossa of the rabbit knee joints.

**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes were isolated and purified from rabbits. Twenty-eight New Zealand white rabbits were enrolled to create articular defects in the intercondylar fossa with peosteal coverage in both knee joints, and then these rabbits were randomly divided into two groups:

experimental and control groups. The defects in the left side were treated with transplantation of periosteum combined with bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes or autologous periosteum in the experimental and control groups, respectively, while the defects in the right side received no treatment as blank controls. These rabbits were killed at 8 and 12 weeks after surgery in each group and newborn tissue samples at defect site were taken for gross observation, histological observation and Wakitani scoring.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 12 weeks after surgery, in the experimental group, the repaired tissues were substantially smooth with a very similar color to the surrounding cartilage tissues, a large number of chondrocytes and cartilage lacunae were visible to form the cartilage matrix, type II collagen immunohistochemical staining was

刘吉斌, 男, 1977 年生, 辽宁省大连市人, 汉族, 2012 年延边大学医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事创伤骨科研究。

通讯作者: 侯连东, 主任医师, 大连大学附属中山医院骨科, 辽宁省大连市 116001

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2015.03.007

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)03-00364-06

稿件接受: 2014-12-25

Liu Ji-bin, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China

Corresponding author: Hou Lian-dong, Chief physician, Department of Orthopedics, Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-12-25

positive, and the tissue was stained darker with toluidine blue; in the control group, the repair tissues were still white, the newborn tissues presented with local depression, less smooth surface, and hard texture, there was only a very small amount of chondrocytes, toluidine blue staining was shallow, type II collagen immunohistochemical staining was negative, and no cartilage matrix formed; in the blank control group, the cartilage defects collapsed with irregular surface, the repaired tissues were fibrous tissues and stained lighter with toluidine blue. These findings indicate that autologous periosteum combined with bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes can effectively repair articular cartilage defects.

**Subject headings:** Periosteum; Stem Cells; Chondrocytes

Liu JB, Hou LD, Yu Q, Bai Y, Wang YD. Repairing articular cartilage defects by transplantation of periosteum combined with bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes in vivo. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(3): 364-369.

## 0 引言 Introduction

关节软骨缺损是常见的疑难病症之一, 软骨损伤后很难自我修复, 伴随着人口老龄化的到来, 各种病因导致关节软骨损害的发病率逐年升高。软骨损伤病程漫长, 反复疼痛, 最终导致骨性关节炎病发甚至致残, 给患者经济上造成巨大损失, 身心上造成巨大伤害, 带来一系列社会问题。以往软骨缺损主要采用磨削灌洗、钻孔、微骨折技术等对缺损组织进行修复, 但多数技术被认为具有一定的局限性<sup>[1]</sup>, 且只能减轻患者疼痛或仅短期有效。近年来越来越多的研究表明, 软骨组织工程修复技术对于软骨的再生及修复具有重要意义, 具有广阔的应用前景<sup>[2-9]</sup>。本实验在体外将软骨细胞与骨髓间充质干细胞混合培养后植入实验动物股骨髁间窝非负重区域的软骨缺损处, 并以骨膜封固定, 以期构建出高质量组织工程软骨, 达到修复早期骨关节炎软骨损伤的目的。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 于2011年4月至2012年4月在大连大学附属中山医院完成。

**材料:**

**实验动物:** 普通级4月龄新西兰大白兔28只, 雌雄不拘, 体质量2.5-3.0 kg; 1月龄雌性新西兰大白兔, 体质量约1 kg, 用于软骨细胞的分离培养; 均由大连医科大学实验动物中心提供。将28只4月龄新西兰大白兔随机均分为两组, 实验组左膝关节软骨缺损处植入骨髓间充质干细胞-软骨细胞-骨膜复合体, 右膝关节软骨缺损处不植入移植物(空白对照); 对照组左膝植入单纯骨膜, 右膝关节软骨缺损处不植入移植物(空白对照)。

组织工程软骨体内移植修复软骨缺损实验用主要试剂:

试剂	来源
DMEM/F12 培养基	Cellgro, 美国
胰蛋白酶	Gibico, 美国
CD34、CD44 或 CD90 多克隆抗体, 入鼠抗兔 II 型胶原单克隆抗体, 兔抗 II 型胶原抗体, 生物素化羊抗兔 IgG	博士德生物工程有限公司
II 型胶原酶	Sigma, 美国

### 实验方法:

**骨髓间充质干细胞的分离与培养:** 取实验组兔麻醉, 无菌条件下于以骨髓穿刺针在兔股骨下端和胫骨上端进针, 抽取骨髓 2 mL, 用 DMEM/F12 培养基制成细胞悬液, 小心加入预先有相对密度为 1.108 3 Percoll 分离液的离心管内, 两种液体的体积比为 1:1。以 1 800 r/min 离心 20 min, 小心吸取中间界云雾状的单个核细胞层, PBS 洗涤 2 次后, 加含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基重悬, 以  $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  的细胞浓度接种于  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶内培养。每二三天换液 1 次, 注意观察培养液的颜色变化情况。倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

**骨髓间充质干细胞的传代培养:** 待细胞长满瓶底的 85% 时即达到亚饱和状态, 弃去旧培养液, 用 DMEM/F12 清洗 2 次, 加入适量的 0.25% 胰蛋白酶/EDTA, 室温下振荡 30 s-1 min。镜下观察贴壁细胞变成圆形, 个别细胞开始脱落, 即加入含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基终止消化, 吹打混匀, 离心 1 200 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 接种培养, 按 1:2 或 1:3 的比例传代, 置于 37 °C, 体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养。

**骨髓间充质干细胞的鉴定:** 取第 3 代骨髓间充质干细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 先制备细胞爬片, 固定, 脱水后行苏木精-伊红染色。在避光下进行 CD34、CD44 或 CD90 多克隆抗体免疫荧光染色, 以 PBS 代替一抗作为空白对照, 而阴性对照组只滴加二抗。

**软骨细胞的分离与培养:** 经静脉迅速注射空气 20 mL 将 1 月龄雌兔处死, 锐性器械体外分离肱骨头、股骨头、股骨滑车及胫骨平台处软骨, 制成软骨碎块后用 PBS 洗涤 3 次。加入浓度为 0.25% 的胰酶/EDTA, 37 °C 消化 30 min 后, 丢弃上清液体; 再加入浓度为 0.2% II 型胶原酶, 37 °C 消化 5 h 后, 以 1 000 r/min 离心 6 min, 倒掉上清后, 浅白色沉淀即为软骨细胞, 收集软骨细胞于离心管内。吸出少量细胞悬液, 计数, 将原代细胞以  $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  的细胞浓度接种于培养瓶内, 放入培养箱常规培养。每二三天换液 1 次, 注意观察培养液颜色变化及有无浑浊现象。

**关节软骨细胞的传代培养:** 将软骨细胞接种于培养皿中, 接种细胞浓度为  $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 放入 37 °C、体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。每隔 2 d 或 3 d 换液 1 次, 在倒置

显微镜下观察并拍照, 待软骨细胞达到亚饱和状态后, 去除旧培养液, 用PBS清洗2次, 加入适量0.25%胰蛋白酶/EDTA消化液, 室温下消化2.0–3.0 min。镜下观察贴壁细胞逐渐脱落, 变成圆形, 个别细胞开始漂浮时立即加入含体积分数10%FBS的DMEM/F12完全培养基终止消化以防止细胞损伤而影响增殖力, 吹打混匀, 1 000 r/min离心5 min, 收集细胞沉淀, 接种于培养瓶培养, 传代比例设为1:2或1:3, 尽快放入37 °C、体积分数5%的CO<sub>2</sub>培养箱继续培养。

**软骨细胞的鉴定:** 取第2代软骨细胞以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于预先经多聚赖氨酸处理的并消毒盖玻片上, 培养3 d后, 取出盖玻片, PBS洗涤2次, 注意在洗涤过程防止细胞脱落, 体积分数10%中性甲醛固定30 min, PBS洗涤后行II型胶原免疫组化染色: 软骨细胞爬片以0.01 mol/L PBS(pH=7.4)冲洗3次, 注意预防细胞脱片, 用体积分数95%乙醇固定30 min; PBS冲洗, 3 g/L Triton X-100室温下处理10 min; 以PBS冲洗, 体积分数3%双氧水封闭内源性过氧化物酶10 min; 正常山羊血清封闭10 min; 分别加入鼠抗兔II型胶原单克隆抗体(1:100), 37 °C孵育2 h; 滴加1:150稀释的兔抗II型胶原抗体, 4 °C过夜; PBS洗10 min×3次; 滴加生物素化羊抗兔IgG, 37 °C 30 min; PBS洗10 min×3次; 滴加适当浓度的DAB显色液, 室温显色, 注意在光学显微镜下控制反应时间; 用蒸馏水洗涤, 终止显色; 脱水, 透明, 最后封固。

**甲苯胺蓝染色:** 制备软骨细胞爬片, 将其浸于甲苯胺蓝染液内10 min取出, 蒸馏水洗, 常规脱水干燥、透明封固后在显微镜下观察。

**骨髓间充质干细胞与软骨细胞共同培养:** 取第3代骨髓间充质干细胞和第2代软骨细胞, 根据参考文献[16]按体积比1:2混合培养, 细胞总数为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶培养, 细胞达到85%融合时, 常规消化留用。

**实验动物膝关节软骨缺损的造模:** 将28只实验兔以3%戊巴比妥钠(剂量为30 mg/kg)经耳缘静脉注射, 麻醉生效后取仰卧位, 双侧膝关节术区备皮, 常规消毒铺巾, 取每只双膝关节作内侧纵行切口进入膝关节腔, 暴露关节面。在股骨内髌关节面用直径4 mm钻头钻孔, 深度3 mm, 穿至软骨下骨, 略有阻力感即止, 制成全层关节软骨缺损(图1)。取同侧胫骨上段骨膜, 面积约4 mm×4 mm, 较软骨缺损区略微大, 并将骨膜生发层面向股骨以覆盖缺损的软骨, 缝合4针, 实验组将浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的骨髓间充质干细胞和软骨细胞混合细胞用1 mL注射器, 经骨膜缝隙注入左股骨髌间窝软骨缺损处, 右膝作为空白对照组, 不移植入任何材料; 对照组左膝仅将单纯骨膜覆盖于缺损处, 将生发层朝向股骨, 右膝只钻孔不作任何处理。术毕, 冲洗关节腔, 髌骨复位, 逐层缝合。术后自由活动, 标准饲料单笼喂养, 术后3 d常规肌肉注射青霉素及手术切口, 并注

意切口以碘伏消毒。

**细胞的观察:** 在显微镜下观察细胞形态的变化、折光性强弱、细胞排列方式及其增殖速度。骨髓间充质干细胞的苏木精-伊红染色情况; 骨髓间充质干细胞表面抗原CD44、CD34、CD90免疫荧光染色结果是否显示细胞着色为绿色。软骨细胞的II型胶原免疫组织化学染色结果: 胞浆内有无棕黄色颗粒形成。

**实验动物的一般观察及标本大体观察:** 术后观察动物肢体活动情况, 分别在术后8, 12周时各处死动物7只, 大体观察膝关节软骨缺损修复情况: 新生组织的色泽质地, 表面平整与否及与周围软骨结合情况等。

**标本组织学检查:** 分别于8, 12周各处死动物7只, 取双侧缺损处新生组织以体积分数10%甲醛固定, 脱钙, 脱钙满意后行组织学包埋, 制成切片。分别行苏木精-伊红、甲苯胺蓝染色修复组织软骨基质II型胶原免疫组织化学。在光学显微镜下观察软骨缺损修复情况。并取术后标本按照改良Wakitani score行软骨缺损评分及修复结果评级<sup>[3]</sup>。

**统计学分析:** 采用SPSS 14.0统计软件数据分析。组织学评分结果行析因方差分析及配对t检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 骨髓间充质干细胞的分离、培养与鉴定** 骨髓间充质干细胞原代培养12 h左右后大部分细胞贴壁, 细胞形态呈梭形或多边形, 折光性较强, 可见细胞集落形成, 集落中央细胞复层生长, 有部分无核细胞悬浮或沉于培养瓶底。48 h后首次换液, 细胞的形态较为均一, 可见三角形和梭形细胞增多, 细胞两端形成突起, 有的突起较长, 极少数的贴壁细胞为圆形(图2A)。7 d左右第1代细胞达到亚饱和状态, 细胞轮廓模糊, 呈漩涡状或放射状排列(图2B)。细胞增殖迅速, 一般3 d左右即可传代, 细胞核明显, 核仁清晰, 核浆比例较大。苏木精-伊红染色示: 第3代骨髓间充质干细胞呈梭形生长, 细胞核较大, 细胞排列无取向性(图2C)。

**在荧光显微镜下见:** CD90阳性, CD44阳性, 表达为绿色, 而CD34阴性, 未表达绿色(图2D–F)。

**2.2 软骨细胞的培养与鉴定** 分离的软骨细胞呈球形, 折光性较强, 24 h内逐渐贴壁, 并逐渐伸展为三角形、多角形或梭形, 细胞核为圆形或椭圆形。培养3 d后, 可见细胞集落, 维持圆形或椭圆形生长状态, 且出现重叠生长现象, 可见网织状分布。II型胶原免疫组织化学染色阳性, 软骨细胞内有棕黄色物质形成(图3A)。甲苯胺蓝染色阳性, 细胞密集处染色较重, 提示软骨细胞分泌出软骨基质(图3B)。

### 2.3 一般观察及标本大体观察

**一般观察:** 所有实验兔术后肢体活动无障碍, 切口愈合良好, 无红肿, 脓液形成等炎性反应。术后兔无意外死亡, 关节内无感染、无粘连, 无游离体及骨赘形成, 所有移植处缝合骨膜均未脱落。



图1 兔膝关节软骨缺损模型的制作  
Figure 1 The rabbit model of knee joint cartilage defect

表1 术后不同时间点各组新生组织的组织学评分结果 (x±s)  
Table 1 Histological scores of newborn tissues in each group at different time after operation

组别	术后 8 周	术后 12 周
实验组	4.91±0.64 <sup>ab</sup>	3.65±0.51 <sup>ab</sup>
与实验组对应的空白对照组	8.21±0.62	8.11±0.53
对照组	7.37±0.52	7.12±0.42
与对照组对应的空白对照组	8.31±0.71	8.16±0.69

表注: 与相对应的空白对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与对照组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

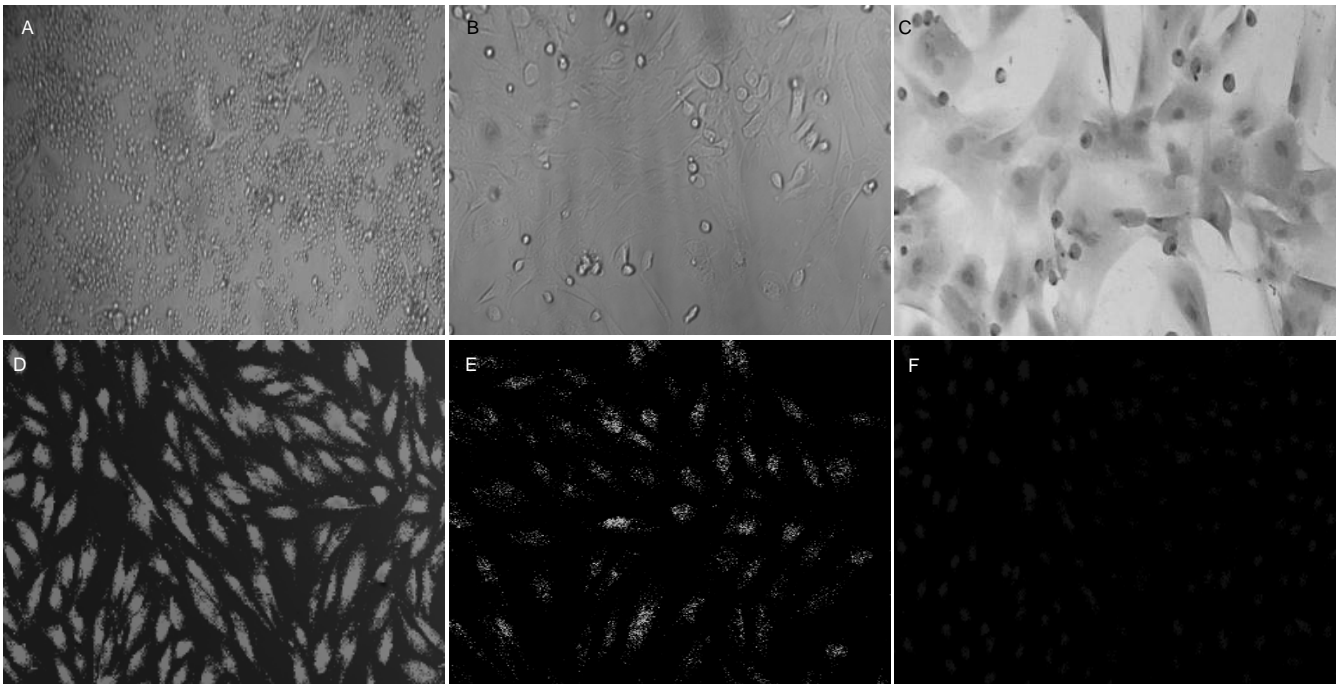


图2 兔骨髓间充质干细胞的培养与鉴定  
Figure 2 Culture and identification of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为骨髓间充质干细胞原代培养 48 h(x100); B 为骨髓间充质干细胞原代培养 7 d(x100); C 为骨髓间充质干细胞的苏木精-伊红染色(x200); D 为骨髓间充质干细胞 CD44 表面抗原阳性表达(x100); E 为骨髓间充质干细胞 CD90 表面抗原阳性表达(x100); F 为骨髓间充质干细胞细胞核 DAPI 复染。

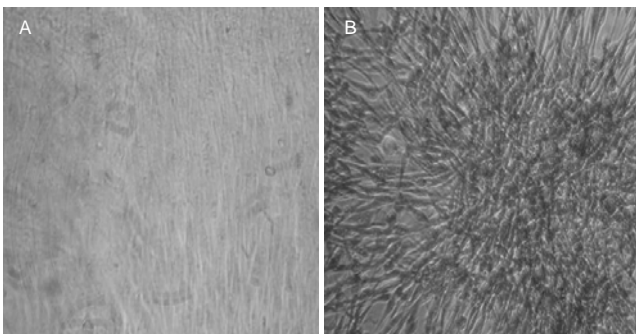


图3 兔软骨细胞的鉴定(x100)  
Figure 3 The identification of rabbit chondrocytes(x100)

图注: 图中 A 为 II 型胶原免疫组织化学染色, 软骨细胞内有棕黄色物质形成; B 为甲苯胺蓝染色, 细胞密集处染色较重, 提示软骨细胞分泌出软骨基质。

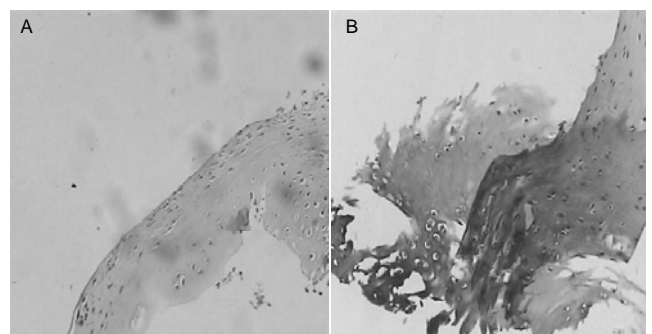


图4 实验组术后 12 周骨缺损处新生骨组织苏木精-伊红染色与甲苯胺蓝染色(x100)

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining and toluidine blue staining of newborn bone tissue at defect site at 12 weeks after operation in the experimental group (x100)  
图注: 图中 A 为新生骨组织苏木精-伊红染色; B 为新生骨组织甲苯胺蓝染色。

**标本大体观察:** 所有造模中软骨缺损处移植骨膜缝合良好, 没有脱落及皱缩发生。8周后, 实验组软骨缺损区域修复组颜色为乳白色, 与周围正常软骨组织色泽基本相同, 表面光滑平整但质地柔软类似于正常软骨, 修复平面低于周围正常软骨, 界限可辨; 对照组修复缺损组织也为乳白色, 表面光滑且有轻微凹陷, 与周围正常软骨组织之间界限清晰可见; 空白对照组缺损处新生组织形状不规则或缺损区凹陷明显, 与周围组织之间界限清晰。

12周后, 实验组修复组织表面基本光滑, 与周围软骨色泽极其相近, 二者间界限模糊不清; 对照组修复组织仍为白色, 新生修复组织局部凹陷, 表面欠光滑, 质地较硬, 与周围组织界限清楚; 空白对照组软骨缺损塌陷, 表面不规则, 修复失败。

**2.4 组织学观察** 术后8周, 实验组中修复组织内细胞呈圆形, 散在分布、排列无取向性, 其细胞数目少于周围正常软骨, 软骨陷窝形成, 基质甲苯胺蓝染色较深, II型胶原免疫组织化学弱阳性, 基质染色呈淡黄色; 对照组修复组织内极少量软骨细胞形成, 基质甲苯胺蓝染色较浅, II型胶原免疫组织化学阴性, 基质染色无淡黄色; 空白对照组新生组织内纤维组织形成。12周后, 实验组中修复组织浅层内细胞变小, 呈层状排列, 深层组织内细胞数较多且较大, 为透明样软骨, 有同源细胞群形成, 基质染色较深, II型胶原免疫组织化学阳性, 棕黄色颗粒形成(图4)。

**2.5 评分结果** 组织学评分结果(表1)表明, 术后8周, 实验组评分低于空白对照组( $P < 0.05$ ); 对照组评分略低于相对应的空白对照组, 但差异无显著性意义。术后12周, 实验组评分低于空白对照组( $P < 0.05$ ); 对照组评分同样略低于相对应的空白对照组, 但差异无显著性意义(表1)。实验组术后8, 12周评分低于对照组( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论 Discussion

**3.1 关节软骨的特点** 关节软骨由软骨细胞及其细胞外基质构成, 软骨细胞被包埋于基质内, 有独特的生理及生物力学特征。软骨单位是关节软骨最基本的解剖功能结构, 它是由一个或几个软骨细胞与其细胞周基质构成。细胞周基质是软骨细胞与细胞外基质交通的重要媒介, 在软骨细胞代谢及力学传导方面有着重要作用。浅层软骨单位主要有细胞周基质包裹1个软骨细胞构成, 而深层软骨单位包裹的软骨细胞数目逐渐增多, 可以为2-4个, 且细胞周基质所占体积比例及其形状有明显变化。软骨细胞是由间充质细胞分化而来, 可以生成并维持软骨细胞外基质。关节软骨缺损, 在临床中常见, 又是疑难病症之一, 如骨性关节炎患者在关节软骨损伤的晚期时, 需行关节置换方可治愈。关节软骨损伤后难以自我修复的主要原因有以下几点: ①软骨相对较薄, 缺乏血管及修复缺损所需未分化的细胞<sup>[10]</sup>。②软骨细胞再生能力低下<sup>[11]</sup>。③软骨细胞被包埋于致密的胶原-蛋白多糖基质中, 限制了细胞的增殖和迁移能力<sup>[12]</sup>。

因而在修复软骨缺损时, 应在一段时间内避免应力影响, 以利于软骨细胞牢固黏附。然而目前人类无法再造出与天然生成的软骨具有相同生物力学性能的软骨组织, 只能力图在最大程度上模拟出质量较高的组织工程软骨。

**3.2 种子细胞** 目前修复软骨是从仿生学角度出发, 将组织工程学与生物力学等多学科结合起来, 模拟关节软骨生存环境及力学刺激条件, 构建出高质量的组织工程软骨。种子细胞是组织工程研究的基本要素<sup>[1]</sup>, 是关节软骨缺损修复的关键点。目前采用的种子细胞类型主要有间充质干细胞和软骨细胞。软骨细胞供源少, 异体排斥反应大, 体外培养时易难以维持细胞表型<sup>[5]</sup>。间充质干细胞作为最常用的种子细胞有其优势: ①供源丰富, 取材方便, 操作简单, 经济适用。②具有多向分化的潜能, 能在一定条件下转化为软骨细胞和骨髓间质干细胞, 可以实现同时修复软骨缺损及其软骨下骨缺损。③增殖能力较强, 可在体外扩增而又不丢失分化潜能。④间充质干细胞是免疫调节细胞, 可以逃避宿主的免疫清除, 异体移植时免疫排斥反应小<sup>[13-18]</sup>。然而单一应用骨髓间充质干细胞获得的组织工程软骨质量不高, 且软骨化过程长。本实验利用软骨细胞促进骨髓间充质干细胞软骨转化, 构建出高质量的软骨。

**3.3 力学因素对软骨形成的影响** 正常关节软骨中软骨细胞容易受环境中的机械力的影响, 软骨细胞的营养亦需要依赖应力环境。软骨组织在正常生理状态下是依靠周期性应力下产生的形变即抽吸作用来吸取关节液中的营养, 这也是软骨惟一营养摄取途径。李德强等<sup>[19]</sup>的研究表明, 适当增加流体剪切力可促进骨髓间充质干细胞的增殖, 但进一步增加时反而抑制细胞增殖。实验兔自由活动时关节腔内压力发生变化, 导致关节腔内流体剪切力发生变化, 有助于软骨的形成, 因此本实验中实验兔术后不给予肢体制动, 允许其自由活动。为了尽量排除力学因素对骨髓间充质干细胞分化的影响, 实验造模中制造股骨髁间窝非负重区缺损, 模拟早期骨关节炎的软骨缺损, 当然完全模拟骨性关节炎是不可能, 因为骨性关节炎发病机制复杂, 多种因素所致。力学因素对骨髓间充质干细胞软骨化的影响是多方面的, 有关力学因素具体影响尚需要进一步研究。实验造模是制造部分软骨缺损, 是为了避免动物自身骨髓间充质干细胞对软骨的修复作用而减少实验误差。因为在部分缺损中, 软骨下骨尚未穿透, 作为物理屏障阻止了自体骨髓间充质干细胞对软骨的修复。

**3.4 骨膜移植固定细胞修复软骨缺损的作用** 取第3代骨髓间充质干细胞和第2代软骨细胞混合培养, 8 d左右细胞达到亚饱和状态后, 回植入兔软骨缺损处, 术后8, 12周后分别处死兔, 取标本行甲苯胺蓝染色及II型胶原免疫组织化学染色。

甲苯胺蓝染色原理: 深部软骨基质对碱性材料(甲苯胺蓝)有亲和力, 显异染性, 而软骨基质的主要成分为软骨黏蛋白、多糖物质, 酸性硫酸根是软骨基质嗜碱性染料和异

染性的主要原因。II型胶原免疫组织化学染色机制: 软骨基质中II型胶原为主要成分之一, 根据抗原抗体特异性反应, 利用II型胶原抗体, 检测新生组织中有无抗原(即II型胶原)。

术后8周时, 实验组标本相关检查结果表明缺损处形成软骨细胞, 从表层到深层细胞逐渐增多, 但成熟细胞较少, 体积逐渐增大; 甲苯胺蓝染色及II型胶原免疫组织化学染色示, 实验组染色较对照组及空白对照组深, 但染色较正常软骨组织浅, 说明软骨基质形成。术后12周时, 实验组成熟软骨细胞增多, 且出现同源细胞群, 细胞基质形成, 甲苯胺蓝染色较对照组深, 与正常软骨组织非常相似; II型胶原免疫组织化学示新生组织内有棕黄色颗粒形成, 结果为阳性, 说明II型胶原形成, 即软骨基质形成, 因为II型胶原为软骨基质主要成分。因此本实验中软骨缺损处类软骨组织形成, 构建出组织工程软骨, 很好地修复了膝关节软骨缺损。

**3.5 本实验不足之处** 本实验中利用自体骨膜移植固定细胞, 能够促进关节软骨缺损的修复, 但实验不足之处有: ①修复组织的长期疗效及如何促进新生修复组织与周围软骨组织的整合等问题还需要进一步研究。②实验中造模区位于非负重区髁间窝, 尽量减少力学因素的影响, 关于力学因素对骨髓间充质干细胞的影响尚需进一步研究。③临床上关节软骨损伤有的为陈旧性损伤, 与本次实验有一定的差距, 需要进一步研究羊膜复合骨髓间充质干细胞修复陈旧性软骨损伤的情况。

本实验将骨髓间充质干细胞与软骨细胞混合培养, 移植入体内, 利用骨膜固定减少细胞流失, 成功构建出组织工程软骨, 实现了修复软骨缺损的目的, 为临床治疗早期骨性关节炎软骨损伤提供了新的方法。

**致谢:** 向大连大学附属中山医院骨科全体医护人员及大连大学附属中山医院动物实验中心全体工作人员表示衷心感谢。

**作者贡献:** 刘吉斌、侯连东进行实验设计, 实验实施为刘吉斌、于强、白毅、王彦东, 实验评估为侯连东, 资料收集为刘吉斌, 刘吉斌成文, 侯连东审校, 刘吉斌对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验中对动物的处置符合动物伦理学标准。

**学术术语:** 软骨组织工程-是将软骨种子种植于可生物降解、组织相容性好的生物材料形成复合物, 然后再把该复合物植入软骨缺损处, 生物材料自行降解的过程中, 种植的细胞形成新的软骨来填充缺损。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 无一稿两投, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] McNickle AG, Provencher MT, Cole BJ. Overview of existing cartilage repair technology. *Sports Med Arthrosc*. 2008;16(4):196-201.
- [2] 漆白文, 喻爱喜, 祝少博, 等. CS/PVA凝胶负载Ad-hTGF-1转染的BMSCs移植修复兔关节软骨缺损[J]. *中华显微外科*, 2011, 34(3): 206.
- [3] Garcia-Castro J, Trigueros C, Madrenas J, et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6B): 2552-2565.
- [4] Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 2008;15(10):711-715.
- [5] Andrews EM, Tsai SY, Johnson SC, et al. Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat. *Exp Neurol*. 2008;211(2):588-592.
- [6] Dulchavsky D, Gao X, Liu YB, et al. Bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) interact with fibroblasts in accelerating wound healing. *J Invest Surg*. 2008;21(5):270-279.
- [7] Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(7):373-382.
- [8] Iskovich S, Kaminitz A, Yafe MP, et al. Participation of adult bone marrow-derived stem cells in pancreatic regeneration: neogenesis versus endogenesis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2007; 2(4):272-279.
- [9] Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*. 2010;21(9): 1045-1056.
- [10] Mauck RL, Byers BA, Yuan X, et al. Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. *Biomech Model Mechanobiol*. 2007;6(2):113-125.
- [11] Liu K, Zhou GD, Liu W, et al. The dependence of in vivo stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on endothelial differentiation in vitro. *Biomaterial*. 2008; 29(14):2183-2192.
- [12] Mo XT, Guo SC, Xie HQ, et al. Variations in the ratios of cocultured mesenchymal stem cells and chondrocytes regulate the expression of cartilaginous and OSSEOUS phenotype in alginate constructs. *Bone*. 2009;45(1):42-51.
- [13] Tsuchiya IL, Chen G, Ushida T, et al. The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro. *Materials Sci Eng*. 2004; C24:391-396.
- [14] 陈刚, 崔维顶, 范卫民. 软骨细胞和骨髓间充质干细胞混合培养构建组织工程软骨的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2010, 30(7): 684-688.
- [15] 孙明林, 吕丹, 朱雷, 等. 共培养系统下软骨细胞对骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的诱导作用[J]. *中华骨科杂志*, 2011, 31(9): 976-982.
- [16] O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(391 Suppl): 190-207.
- [17] Pittenger MF. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol*. 2008;449:28-45.
- [18] Ohgushi H, Calpan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*. 1999; 48(6):913.
- [19] 李德强, 戴克戎, 汤亭亭, 等. 适宜组织工程化骨构建的流体剪切力和物质转运速度的研究[J]. *中华骨科杂志*, 2011, 31(5):545-547.