

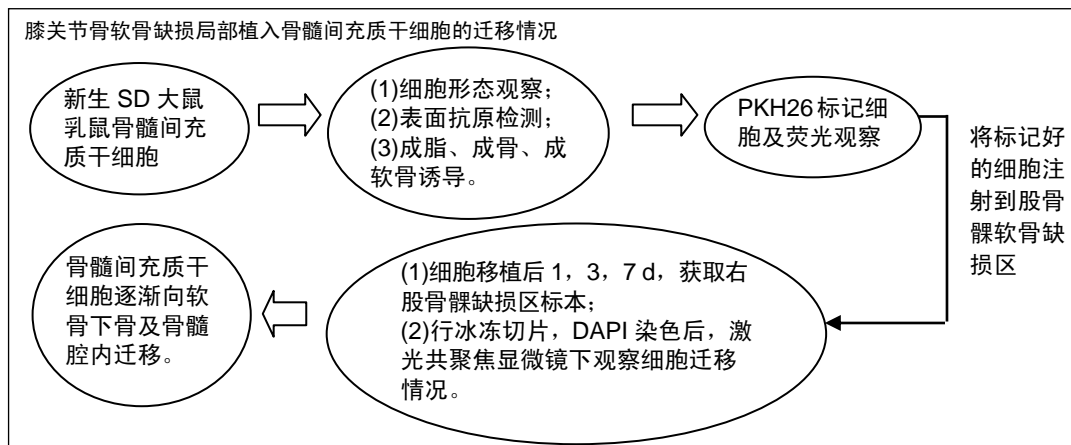
# 关节软骨损伤大鼠关节腔内移植骨髓间充质干细胞的迁移

孙百川<sup>1,2,3</sup>, 王守锋<sup>1</sup>, 刘雪剑<sup>1,2,3</sup>, 张凯红<sup>2,3</sup>, 陈鹏<sup>2,3</sup>, 黄绍代<sup>2,3</sup>, 鲁长风<sup>2,3</sup>, 王冲<sup>2,3</sup>, 余文<sup>2,3</sup>, 王玉<sup>2,3</sup>, 张增增<sup>1,2,3</sup>, 周成福<sup>1</sup>, 彭江<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江省佳木斯市 154003; <sup>2</sup>中国人民解放军总医院骨科研究所, 北京市 100853; <sup>3</sup>骨科再生医学北京市重点实验室, 北京市 100853)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0514

ORCID: 0000-0003-2263-4218(孙百川)

文章快速阅读:



孙百川, 男, 1991 年生, 山东省聊城市人, 汉族, 佳木斯大学在读硕士, 主要从事周围神经损伤和修复, 特别是干细胞归巢机制的研究。

通讯作者: 周成福, 教授, 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江省佳木斯市 154003

并列通讯作者: 彭江, 博士, 教授, 中国人民解放军总医院骨科研究所, 北京市 100853; 骨科再生医学北京市重点实验室, 北京市 100853

文题释义:

**PKH26:** 是一种亲脂性荧光染料, 专利膜标记技术, 稳定的与细胞膜脂质区结合并发出红色荧光, 染色方式依赖于细胞与膜的类型, 主要用于细胞体外标记、体外细胞增殖研究及体内外细胞示踪研究, 其在 551 nm 波长处可被激发红色荧光。随着细胞分裂, 标记物也随之等份的分配给子细胞。

**共聚焦显微镜:** 普通荧光显微镜分辨率较低, 在观察荧光染料时噪点较多, 会对实验结果产生干扰, 但使用共聚焦显微镜得到的共聚焦图像则分辨率高, 图像清晰, 噪点较少, 结合明场图像可清晰显示出细胞的迁移位置, 达到实验目的。

摘要

**背景:** 应用间充质干细胞治疗软骨损伤已成为研究热点, 但是间充质干细胞在体内的分布情况、是否发挥作用以及如何发挥作用还需进一步研究。

**目的:** 观察膝关节炎软骨缺损局部植入骨髓间充质干细胞的迁移情况。

**方法:** 30 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 每组 15 只。假手术组单纯切开关节囊暴露股骨髌滑车, 不行骨软骨缺损造模, 缝合后关节腔内注射 PKH26 标记的骨髓间充质干细胞; 骨软骨缺损组构建大鼠股骨滑车直径 1 mm, 深 1 mm 的骨软骨缺损模型, 术后向骨软骨缺损处注射 PKH26 标记的骨髓间充质干细胞。注射后 1, 3, 7 d 获取右股骨髌缺损区标本, 行冰冻切片, DAPI 染色后, 在激光共聚焦显微镜下观察骨髓间充质干细胞的迁移情况。

**结果与结论:** ①假手术组大鼠关节腔内未见到细胞迁移到软骨下骨; ②细胞注射第 1, 3 天, 骨软骨缺损组软骨下骨区可见骨髓间充质干细胞, 第 7 天时骨髓腔内可见间充质干细胞; ③以上结果显示, 当大鼠股骨髌软骨层未破坏时, 其完整的功能结构能够阻止关节腔内的骨髓间充质干细胞向软骨下骨及骨髓腔内迁移; 若股骨髌软骨层缺损, 随着时间的进展骨髓间充质干细胞逐渐向软骨下骨及骨髓腔内迁移。

关键词:

骨髓间充质干细胞; 迁移; 骨软骨缺损; PKH26; 干细胞; 国家自然科学基金

主题词:

骨软骨病; 骨髓; 间充质干细胞移植; 细胞迁移分析; 组织工程

基金资助:

国家重点研发计划(2016YFC1102104-1); 国家自然科学基金(81572148); 北京市科技专项(Z161100005016059); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531717)

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

稿件接受: 2018-02-09

Sun Bai-chuan, Master candidate, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China; Institute of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; Beijing Key Laboratory of Regenerative Medicine in Orthopaedics, Beijing 100853, China

Corresponding author: Zhou Cheng-fu, Professor, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Peng Jiang, M.D., Professor, Institute of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; Beijing Key Laboratory of Regenerative Medicine in Orthopaedics, Beijing 100853, China

## Intra-articular migration of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells in rats with articular cartilage injury

Sun Bai-chuan<sup>1,2,3</sup>, Wang Shou-feng<sup>1</sup>, Liu Xue-jian<sup>1,2,3</sup>, Zhang Kai-hong<sup>2,3</sup>, Chen Peng<sup>2,3</sup>, Huang Shao-dai<sup>2,3</sup>, Lu Chang-feng<sup>2,3</sup>, Wang Chong<sup>2,3</sup>, Yu Wen<sup>2,3</sup>, Wang Yu<sup>2,3</sup>, Zhang Zeng-zeng<sup>1,2,3</sup>, Zhou Cheng-fu<sup>1</sup>, Peng Jiang<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China; <sup>2</sup>Institute of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; <sup>3</sup>Beijing Key Laboratory of Regenerative Medicine in Orthopaedics, Beijing 100853, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** The application of mesenchymal stem cells (MSCs) in the treatment of cartilage damage has become a hot spot of research. Further studies on the distribution of MSCs in the body after injection and on the underlying mechanism of action are needed.

**OBJECTIVE:** To observe the migration of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) after injection into the region of osteochondral defect.

**METHODS:** Thirty Sprague-Dawley rats were randomized into two groups ( $n=15$  per group). In the control group, the femoral trochlear was exposed but an osteochondral defect was not made; and after the suture, PKH26-labeled BMSCs were directly injected into the articular cavity of rats. In the experimental group, a cartilage defect of 1 mm in diameter and 1 mm in depth was made in the rat femoral trochlea, and  $5 \times 10^6$  PKH26-labeled BMSCs were injected into the defect after operation. At 1, 3 and 7 days after injection, the femoral condyle was taken to make frozen sections followed by DAPI staining. The distribution of BMSCs was observed under laser scanning confocal microscope.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In the control group, PKH26-labeled BMSCs were not transferred to the subchondral bone. In the experimental group, BMSCs were detected in the subchondral bone area at 1, 3 days after injection of PKH26-BMSCs in the bone cartilage defect area, and the BMSCs were also found in the bone marrow cavity at 7 days after injection. In conclusion, BMSCs in the articular cavity cannot migrate into the subchondral bone and bone marrow cavity unless the cartilage of the femoral condyle is damaged.

**Subject headings:** Osteochondrosis; Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Cell Migration Assays; Tissue Engineering

**Funding:** National Key Research and Development Program of China, No. 2016YFC1102104-1; National Natural Science Foundation of China, No. 81572148; Beijing Municipal Science and Technology Project, No. Z161100005016059; Science and Technology Research Project of Heilongjiang Provincial Education Department, No. 12531717

## 0 引言 Introduction

由创伤、炎症、退变等原因导致的关节软骨损伤在骨科临床上极为常见。关节软骨损伤后,自身修复能力有限,会逐渐发展为骨性关节炎,造成整个关节功能丧失<sup>[1-2]</sup>。

随着组织工程技术的出现及发展,为软骨损伤的治疗带来了新的希望<sup>[3]</sup>,其原理为将组织工程支架复合软骨细胞或间充质干细胞植入软骨损伤区域实现软骨再生<sup>[4]</sup>。骨性关节炎患者关节腔内注射自体骨髓间充质干细胞能够减轻疼痛,改善软骨质量<sup>[5]</sup>。研究表明,关节软骨损伤后,关节腔内的干细胞数量增加<sup>[6]</sup>。既然干细胞数量增加,为什么骨性关节炎一旦发生,症状越来越重呢?这些干细胞的转归是当前需要继续明确的问题。

实验制备大鼠膝关节软骨缺损模型,在缺损处植入PKH26标记的骨髓间充质干细胞进行示踪<sup>[7]</sup>,观察缺损局部植入细胞的迁移情况,探索最佳的观察方法,验证这一现象的存在,为今后对干细胞迁移机制和转归的研究奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 观察性实验。

1.2 时间及地点 于2017年10月至2018年10月在解放军总医院骨科研究所完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性SD大鼠30只,三四周龄,体质量80-100 g; 出生24 h的新生乳鼠12只, SPF级,均购买于解放军总医院实验动物中心,许可证号: SCXK(军)2012-0004。

实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

1.3.2 实验试剂 低糖DMEM(Cellgro公司,美国); 胰蛋白酶(Sigma公司,美国); 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司); OCT冰冻切片包埋剂(Sakura公司,美国); PKH26(Sigma公司,美国); CD29, CD34, CD45, CD90单克隆抗体(BD公司,美国); SD大鼠骨髓间充质干细胞成骨、成脂、成软骨诱导分化完全培养基(Caygen公司,美国)。

1.3.3 实验仪器 B5060型CO<sub>2</sub>培养箱(Hereus公司,德国); SW-CJ-1F生物净化台(苏州净化设备有限公司); BX51型光学显微镜及成像系统(Olympus公司,日本); Image Pro Plus图像分析系统(Media Cybernetics公司,美国); BH-2型光学显微镜(Olympus公司,日本); Leitz1516型组织切片机(Leica公司,德国); cm1850型冷冻切片机(Leica公司,德国); SP8激光共聚焦显微镜(Leica公司,德国)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的分离、培养 取出生24 h的新生SD大鼠乳鼠12只,颈椎脱臼法处死后,浸泡于体积分数为75%乙醇中消毒3-5 min并转移入超净台; 在超净台上,用已消毒灭菌的眼科剪、眼科镊剥离小鼠双下肢皮肤,暴露双下肢,用眼科剪沿下肢内侧贴近脊柱处完整取下乳鼠双下肢,用含5%双抗的PBS清洗3 min,转移至含有无血清培养基的培养皿中待用; 尽可能的去除小鼠下肢骨上的肌肉和筋膜组织, PBS清洗3次,将骨转移至青霉素小瓶中用眼科剪剪碎至1-3 mm<sup>3</sup>, 转移入25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,加入5 mL完全培养基重悬、混匀后置于体积分数为5%

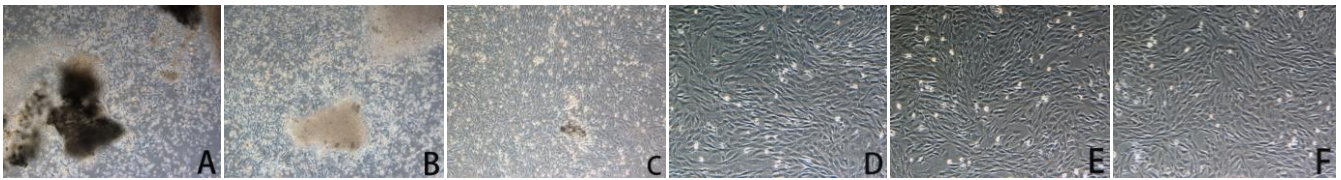


图2 新生SD大鼠骨髓间充质干细胞的形态(x100)

Figure 2 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells of newborn Sprague-Dawley rats (x100)

图注: 图中A为培养第2天时, 骨片周围爬出少量细胞, 细胞呈长梭形; B为培养第3天时, 从骨片周围爬出的细胞增多; C为培养第4天时, 细胞数目增多, 细胞融合; D-F为第1, 2, 3代细胞, 细胞形态均一, 呈长梭形。

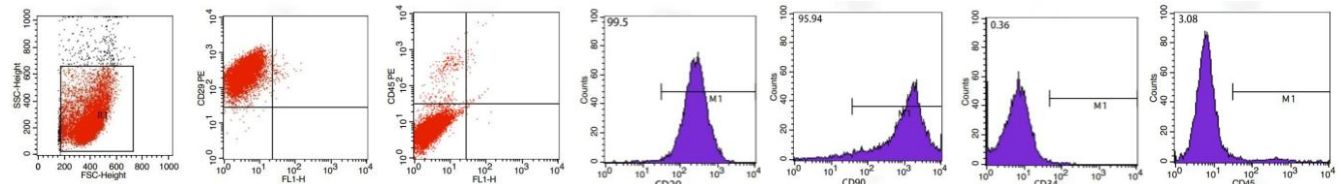


图3 流式细胞仪检测第3代骨髓间充质干细胞表面标志

Figure 3 Detection of surface markers of the third generation of bone marrow mesenchymal stem cells by flow cytometry

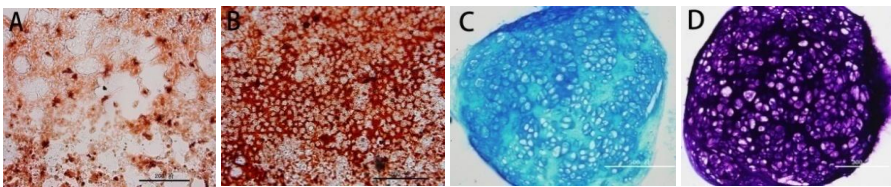


图4 骨髓间充质干细胞的成脂、成骨、成软骨诱导分化能力

Figure 4 The ability of bone marrow mesenchymal stem cells to induce adipogenesis, osteogenesis and chondrogenesis

图注: 图中A为油红O染色后脂滴呈红色(x200); B为茜素红染色后细胞及骨基质呈红色(x200); C为阿利新蓝染色后软骨基质呈蓝色, 软骨细胞呈淡蓝色(x100); D为甲苯胺蓝染色后软骨细胞呈紫红色(x200)。

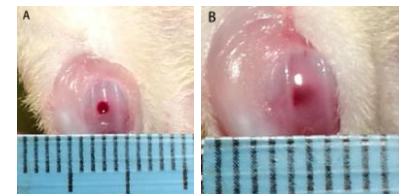


图1 骨软骨缺损模型及细胞注射

Figure 1 Osteochondral defect model and cell injection

图注: 图中A为骨软骨缺损位于股骨滑车, 直径1 mm, 深1 mm; B为骨软骨缺损处注射 PKH26 标记的骨髓间充质干细胞。

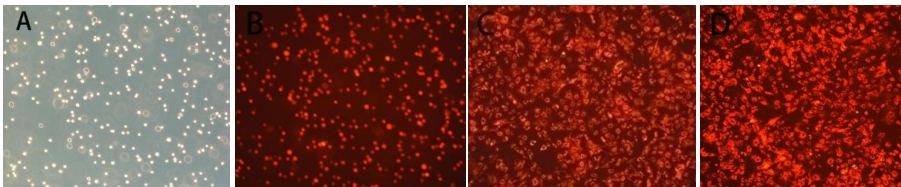


图5 PKH26 标记的骨髓间充质干细胞(x100)

Figure 5 PKH26-labeled bone marrow mesenchymal stem cells (x100)

图注: 图中A为PKH26标记前; B为PKH26标记后, 细胞轮廓清晰, 胞膜完整, 倒置荧光显微镜下呈红色荧光; C为PKH26标记后24 h, 细胞贴壁生长, 形态良好, 倒置荧光显微镜下呈红色荧光; D为PKH26标记细胞传代后, 荧光显微镜下仍呈红色荧光。

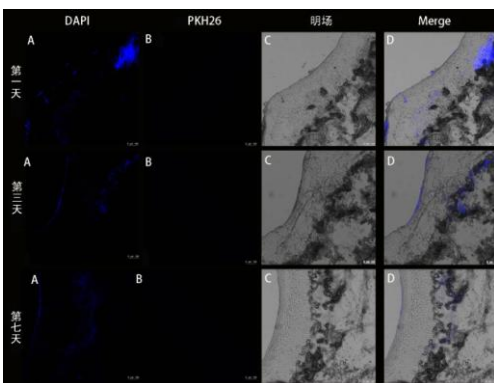


图6 假手术组股骨髁冰冻切片(x40, 标尺为100 μm)

Figure 6 Frozen sections of the femoral condyle in the control group (x40, scale bars=100 μm)

图注: 假手术组大鼠关节腔内注射 PKH26 标记的骨髓间充质干细胞第1, 3, 7天, 股骨髁软骨区及软骨下骨区未见明显红色荧光细胞。

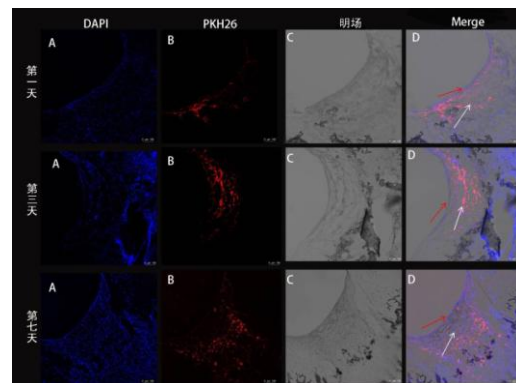


图7 骨软骨缺损组股骨髁冰冻切片(x40, 标尺为100 μm)

Figure 7 Frozen sections of the femoral condyle in the experimental group (x40, scale bars=100 μm)

图注: 骨软骨缺损组大鼠缺损区注射 PKH26 标记的骨髓间充质干细胞, 第1天时, 细胞在骨软骨缺损区; 第3天时, 细胞向软骨下骨区迁移; 第7天时, 细胞迁移至骨髓腔内。红色箭头为软骨层, 白色箭头为软骨下层。

CO<sub>2</sub>, 37 °C恒温培养箱中培养; 接种48 h, 首次半量换液; 接种96 h后, 观察细胞生长情况, 若细胞密度达50%, 进行1:1传代, 若细胞密度低于50%, 则继续培养1 d后按1:1传代。

**1.4.2 细胞形态学观察** 在原代培养的第2, 3, 4天以及传代培养后第1, 2, 3代观察细胞形态及生长状况并用倒置显微镜拍照记录。

**1.4.3 流式细胞仪检测表面抗原** 取第3代骨髓间充质干细胞, 用胰酶消化, 1 200 r/min离心3 min, PBS洗涤2次; PBS重悬, 细胞计数, 将细胞浓度调整为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ; 加入大鼠单克隆抗体, 常温避光孵育30 min; PBS洗涤2次, 流式细胞仪检测CD29, CD34, CD45, CD90的表达。

**1.4.4 骨髓间充质干细胞的成脂、成骨、成软骨诱导分化**

**成脂诱导:** 取第3代骨髓间充质干细胞, 以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞量用无血清培养基接种于6孔板中, 3 h后观察细胞生长情况, 若细胞贴壁均匀、生长良好, 则更换为成脂诱导培养基, 每孔2 mL。成脂诱导液分为A液和B液, 成脂诱导A液成分为: 体积分数为10%胎牛血清, 10  $\mu\text{mol/L}$ 双抗, 10  $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酰胺, 2  $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素, 1  $\mu\text{mol/L}$  IBMX, 1  $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮, 1  $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 成脂诱导分化A液基础培养基。成脂诱导B液成分为: 体积分数为10%胎牛血清, 10  $\mu\text{mol/L}$ 双抗, 10  $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酰胺, 2  $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素, 成脂诱导分化B液基础培养基。成脂诱导分化A液诱导3 d后, 换成B液诱导24 h, A液和B液交替作用3-5次后, 继续用B液维持培养4-7 d直到脂滴变得足够大、圆, 用油红O进行染色鉴定。

**成骨诱导:** 取第3代骨髓间充质干细胞, 以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞量用无血清培养基接种于6孔板中, 3 h后观察细胞生长情况, 若细胞贴壁均匀、生长良好, 则更换为成骨诱导培养基, 每孔2 mL。成骨诱导培养液成分为: 体积分数为10%胎牛血清, 10  $\mu\text{mol/L}$ 双抗, 10  $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酰胺, 10  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -甘油磷酸钠, 2  $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 成骨诱导分化基础培养基。每隔3 d换1次液, 诱导2-4周后, 用茜素红进行染色鉴定。

**成软骨诱导:** 取第3代骨髓间充质干细胞, 进行消化、离心后, 吸去上清。将所得沉淀用骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化完全培养基按照 $5.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度进行重悬。取0.5 mL细胞悬液转移至15 mL聚丙烯离心管中, 室温下200-300 r/min离心5 min。成软骨诱导培养液成分为: 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 10  $\mu\text{mol/L}$  ITS添加物, 1  $\mu\text{mol/L}$ 脯氨酸, 1  $\mu\text{mol/L}$ 丙酮酸钠, 3  $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸, 10  $\mu\text{mol/L}$ 转化生长因子 $\beta_3$ , 成软骨诱导分化基础培养基。当细胞团出现聚拢现象时(一般为24 h或48 h后)轻弹离心管底部使软骨球脱离管底悬浮在液体中, 每隔两三天换1次液, 诱导28 d后, 对软骨球进行甲醛固定和石蜡包埋切片, 最后进行阿利新蓝染色和甲苯胺蓝染色鉴定。

**1.4.5 PKH26 标记骨髓间充质干细胞及荧光观察** 所有操作在25 °C进行。①将骨髓间充质干细胞用胰酶和/或

EDTA消化形成单细胞悬液; ②取 $2 \times 10^7$ 个细胞于锥形离心管中, 用无血清培养基洗1次; ③600-700 r/min离心5 min形成松散的细胞团; ④吸去上清, 细胞团上剩余液体 $< 25 \mu\text{L}$ ; ⑤加1 mL稀释液C, 重悬细胞保证完全分散, 制备2 $\times$ 的细胞颗粒, 此过程不要振荡; ⑥染色前, 将4  $\mu\text{L}$ 的PKH26乙醇染料加入离心管中, 用1 mL稀释剂C制备2 $\times$ 的染料溶液( $4 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ )。为使乙醇影响最小, 染料的加入量应小于总量的1%。如果需要更大的稀释染料, 应用无水乙醇25 °C稀释; ⑦尽快将1 mL 2 $\times$ 细胞加到1 mL 2 $\times$ 染料中, 立即用吸管均匀快速混合样品; ⑧25 °C孵育2-5 min, 定时轻轻颠倒离心管保证在25 °C充分混匀; ⑨加入等量血清或1%BSA中止染色反应, 孵育1 min; ⑩用等量含血清培养基4 mL稀释中止的反应液; ⑪600-700 r/min 25 °C离心10 min, 去上清; ⑫将细胞团转入新试管中, 用10 mL含血清培养基进一步洗3次; ⑬加10 mL完全培养基, 离心, 重新悬置细胞到所需浓度; ⑭荧光显微镜观察细胞标记情况。

**1.4.6 大鼠股骨髁骨软骨缺损模型建立** SD大鼠称质量, 用3%戊巴比妥钠溶液(25 mg/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 术区剃毛, 碘伏消毒。在右膝, 髌骨右侧做一纵向切口, 长约1 cm, 在髌骨内侧切开关节囊, 切开股四头肌肌腱, 向外侧推使髌骨脱位, 暴露股骨髁滑车, 用直径为1 mm的角膜环钻在股骨髁滑车正中取直径1 mm, 深1 mm的骨软骨缺损(图1), 缺损造模完成后将髌骨复位, 缝合关节囊。术后大鼠常规饲养, 正常进食饮水, 自由活动。

**1.4.7 动物分组及干预** 30只SD大鼠按随机原则分为2组, 每组15只。假手术组: 单纯切开关节囊暴露股骨髁滑车, 不进行骨软骨缺损造模, 缝合后关节腔内注射PKH26标记的骨髓间充质干细胞。骨软骨缺损组: 骨软骨缺损造模后, 缺损处注射 $5 \times 10^6$ 个PKH26标记的骨髓间充质干细胞。

**1.5 主要观察指标** 两组均在细胞移植后1, 3, 7 d取右侧股骨髁, 每组每个时间点5只。将获取的右股骨髁缺损区标本立即用OCT冰冻包埋剂包埋并在冰冻切片机内进行冰冻切片, 标本厚5-7  $\mu\text{m}$ , 用DAPI将细胞核染色, 在SP8激光共聚焦显微镜下观察PKH26标记的骨髓间充质干细胞的迁移情况。

## 2 结果 Results

**2.1 细胞形态** 原代培养至第2天, 倒置显微镜下观察, 大部分细胞从骨片周围爬出, 细胞呈长梭形; 第3天时, 细胞爬出的数量增多; 第4天时, 细胞数量明显增多, 细胞呈长梭形围绕骨片生长, 部分细胞集落间有融合现象, 当细胞密度达50%时, 1:1传代。第1-3代骨髓间充质干细胞均呈长梭形, 细胞形态无明显差异(图2)。

**2.2 流式细胞鉴定结果** 流式细胞仪检测细胞表面抗原, 高表达CD29和CD90, 低表达CD34和CD45(图3)。

**2.3 成脂、成骨、成软骨诱导分化能力** 成脂诱导10 d后,



大部分细胞内出现圆形脂滴,细胞由长梭形变成圆形或多边形,油红O染色后脂滴呈红色(图4A);成骨诱导3周后,细胞呈结层状、结节状生长,失去原始细胞结构,茜素红染色呈红色(图4B);成软骨诱导4周后,细胞由扁平的细胞团块逐渐变成球形,并且软骨球不断增大、变圆,软骨球经石蜡切片阿利新蓝染色后软骨基质呈蓝色(图4C),甲苯胺蓝染色后软骨细胞呈紫红色(图4D)。

**2.4 荧光显微镜观察骨髓间充质干细胞标记情况** PKH26染色的骨髓间充质干细胞标记率达98%,染料均匀分布在细胞膜上,在倒置荧光显微镜下呈红色荧光,细胞轮廓清晰,胞膜完整。继续培养24 h后,细胞贴壁生长,形态良好,荧光显微镜下呈红色。细胞传代后荧光显微镜下仍呈红色荧光(图5)。

**2.5 激光共聚焦显微镜下观察PKH26标记的骨髓间充质干细胞在体内的迁移情况** 关节腔内注射PKH26标记的骨髓间充质干细胞,第1, 3, 7天行股骨髁冰冻切片,DAPI染色,在激光共聚焦荧光显微镜下观察。

**假手术组:**图6A为DAPI染色结果,细胞发出蓝色荧光,图6B为PKH26标记的骨髓间充质干细胞发出红色荧光,图6C为明场下的大鼠股骨髁冰冻切片,图6D为重叠图像。结果显示:正常大鼠关节腔注射PKH26标记的骨髓间充质干细胞,未见明显红色荧光细胞向软骨及软骨下骨区迁移。

**骨软骨缺损组:**图7A为DAPI染色结果,细胞发出蓝色荧光,图7B为PKH26标记的骨髓间充质干细胞发出红色荧光,图7C为明场下的大鼠股骨髁冰冻切片,图7D为重叠图像。注射细胞后第1天,骨髓间充质干细胞在骨软骨缺损区;注射细胞后第3天,红色荧光细胞在缺损旁软骨及软骨下骨区;注射细胞后第7天,在骨髓腔内可见大量的PKH26标记的骨髓间充质干细胞。

### 3 讨论 Discussion

成人骨髓间充质干细胞已用于软骨修复的实验室和临床研究<sup>[8]</sup>,常用于治疗软骨损伤的方法是微骨折术和间充质干细胞修复术<sup>[9]</sup>。微骨折术的治疗理念是将骨髓血引导至软骨缺损处,通过体内微环境的诱导使骨髓血中的间充质干细胞分化进而修复缺损。间充质干细胞修复术则是关节腔内直接注射间充质干细胞,通过诱导关节腔内细胞迁移到软骨缺损处分化进而修复缺损,并且已有实验证明关节腔内注射自体骨髓间充质干细胞能够减轻骨性关节炎患者的疼痛,改善软骨质量<sup>[5]</sup>。间充质干细胞是一种罕见的前体细胞群,其能够维持造血并能在体内和体外分化成3种(成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞)或更多的(肌细胞、心肌细胞、神经元等)细胞类型<sup>[10-13]</sup>。间充质干细胞还能分泌一系列营养因子、细胞因子和神经调节肽等,它们在组织修复中发挥作用并调节炎症和免疫应答<sup>[14-15]</sup>。因此,间充质干细胞在细胞组织工程中引起人们的广泛关注。目前动物实验和临床研究中的间充质干细胞主要来源于骨髓和脐

带组织。实验采用了一种新的分离方法<sup>[16]</sup>,成功培养出了新生SD大鼠乳鼠骨髓间充质干细胞。

为观察骨髓间充质干细胞注射大鼠体内后的迁移和分布情况,需要对细胞加以标记示踪,目前常用的细胞标记方法有核酸标记法如5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)<sup>[17]</sup>,基因转染标记法如绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)<sup>[18]</sup>,放射性同位素标记法<sup>[19]</sup>,磁共振成像技术<sup>[20]</sup>,荧光染料标记法如CM-Dil<sup>[21]</sup>、PKH26等<sup>[22]</sup>。实验采用荧光染料PKH26标记法标记骨髓间充质干细胞。PKH26是一种亲脂性的荧光染料,能够与细胞膜脂质区发生不可逆的结合,在波长为551 nm的激发光激发时可呈现红色荧光,PKH26标记细胞后不会对细胞的增殖活性和凋亡产生影响<sup>[22]</sup>,标记后的细胞仍可正常增殖,并且子代细胞仍然有红色荧光,是一种简便的细胞标记方法,可用于骨髓间充质干细胞在动物体内的迁移示踪<sup>[23]</sup>。

实验构建大鼠股骨滑车直径1 mm,深1 mm的骨软骨缺损模型,术后向骨软骨缺损处注射PKH26标记的骨髓间充质干细胞。由于普通荧光显微镜分辨率较低,且噪点较多,首次采用激光共聚焦显微镜观察细胞的迁移情况,结合明场图像可清晰显示出细胞的迁移位置。采用骨冰冻切片方法,减少对组织和细胞形态的影响,最大程度上保存PKH26标记的骨髓间充质干细胞的荧光特性。实验结果显示,当大鼠股骨软骨层未被破坏时,其完整的功能结构能够阻止关节腔内的干细胞向软骨下及骨髓腔内迁移;若股骨髁骨软骨层缺损,随着时间的进展间充质干细胞逐渐向软骨下骨及骨髓腔内迁移。考虑原因可能为,当关节软骨损伤后,关节内产生的趋化因子会诱导软骨损伤区域或者关节腔内注射的干细胞向软骨下骨及骨髓腔内迁移,干细胞不能停留在软骨损伤区发挥应有的修复作用,而是迁移到软骨下骨及骨髓腔内通过异常的骨形成影响软骨损伤转归,还会通过血管生成作用影响关节退变,最终会导致骨性关节炎的加重。因此,关节软骨损伤后植入的干细胞应当加以调控,才能发挥其修复作用。

**实验的不足之处:**由于关节软骨和骨之间结构的复杂性,未进行单纯软骨缺损模型的实验,注射的细胞在单纯软骨层缺损时能否发生迁移现象还需进一步观察;观察方法单一,需应用多种方法标记干细胞如绿色荧光蛋白、CM-Dil、LacZ腺病毒转导等方法进一步验证干细胞的迁移现象,并且实验仅观察细胞迁移现象,对于发生这种现象的机制及迁移到骨髓腔内的干细胞的转归还需进一步探讨。

**致谢:**感谢解放军总医院全军骨科研究所全体老师的指导,同时也感谢导师周成福老师对论文提出了宝贵修改意见,使论文更加完善。

**作者贡献:**第一作者与通讯作者负责实验设计与实施,其他共同作者协助实验设计与文章修改。

**经费支持:**该文章接受了“国家重点研发计划(2016YFC1102104-1)”、“国家自然科学基金(81572148)”、“北京市科技专项(Z161100005016059)”、“黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531717)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和

对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

**伦理问题:** 实验方案经解放军总医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):43-49.
- [2] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1697-1707.
- [3] Toh WS, Foldager CB, Pei M, et al. Advances in mesenchymal stem cell-based strategies for cartilage repair and regeneration. *Stem Cell Rev*. 2014;10(5):686-696.
- [4] Filardo G, Perdisa F, Roffi A, et al. Stem cells in articular cartilage regeneration. *J Orthop Surg Res*. 2016;11:42.
- [5] Orozco L, Munar A, Soler R, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation*. 2013;95(12):1535-1541.
- [6] Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, et al. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2012;30(6):943-949.
- [7] Kawaguchi K, Katsuyama Y, Kikkawa S, et al. PKH26 is an excellent retrograde and anterograde fluorescent tracer characterized by a small injection site and strong fluorescence emission. *Arch Histol Cytol*. 2010;73(2):65-72.
- [8] Wong KL, Lee KB, Tai BC, et al. Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. *Arthroscopy*. 2013;29(12):2020-2028.
- [9] Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(391 Suppl):S362-369.
- [10] Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*. 2000;105(12):1663-1668.
- [11] Clarke D, Frisén J. Differentiation potential of adult stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11(5):575-580.
- [12] Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):32-45.
- [13] Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med*. 2005;140(1):138-143.
- [14] Mobasher A, Kalamegam G, Musumeci G, et al. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas*. 2014;78(3):188-198.
- [15] Bashir J, Sherman A, Lee H, et al. Mesenchymal stem cell therapies in the treatment of musculoskeletal diseases. *PM R*. 2014;6(1):61-69.
- [16] 徐丽娟,张云巍,王淑芳,等.小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养新方法[J]. 肝脏, 2017,22(3): 252-255.
- [17] Dahia CL, Mahoney E, Wylie C. Shh signaling from the nucleus pulposus is required for the postnatal growth and differentiation of the mouse intervertebral disc. *PLoS One*. 2012;7(4):e35944.
- [18] Fang Z, Yang Q, Luo W, et al. Differentiation of GFP-Bcl-2-engineered mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype under hypoxia in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(3):444-450.
- [19] Wang D, Vo NV, Sowa GA, et al. Bupivacaine decreases cell viability and matrix protein synthesis in an intervertebral disc organ model system. *Spine J*. 2011;11(2):139-146.
- [20] de Chickera S, Willert C, Mallet C, et al. Cellular MRI as a suitable, sensitive non-invasive modality for correlating in vivo migratory efficiencies of different dendritic cell populations with subsequent immunological outcomes. *Int Immunol*. 2012;24(1):29-41.
- [21] Gołąb K, Kizilel S, Bal T, et al. Improved coating of pancreatic islets with regulatory T cells to create local immunosuppression by using the biotin-polyethylene glycol-succinimidyl valeric acid ester molecule. *Transplant Proc*. 2014;46(6):1967-1971.
- [22] Pastò A, Marchesi M, Diamantini A, et al. PKH26 staining defines distinct subsets of normal human colon epithelial cells at different maturation stages. *PLoS One*. 2012;7(8):e43379.
- [23] Chiba Y, Kuroda S, Osanai T, et al. Impact of ageing on biological features of bone marrow stromal cells (BMSC) in cell transplantation therapy for CNS disorders: functional enhancement by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Neuropathology*. 2012;32(2):139-148.