

# 转化生长因子 $\beta 3$ 复合海藻酸钠水凝胶修复膝关节软骨缺损

<https://doi.org/10.12307/2022.248>

刘莹松<sup>1</sup>, 郭晓鹏<sup>1</sup>, 魏明珠<sup>2</sup>

投稿日期: 2020-10-13

送审日期: 2020-10-14

采用日期: 2020-11-11

在线日期: 2021-05-07

中图分类号:

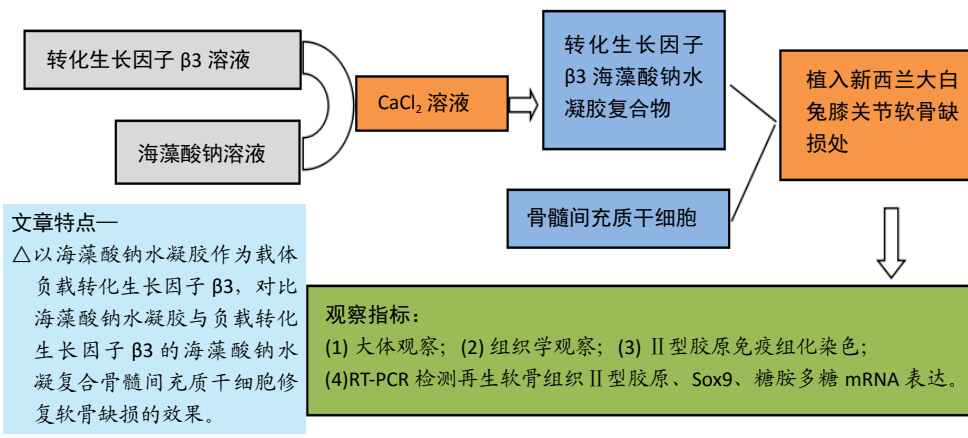
R459.9; R318.08; R-332

文章编号:

2095-4344(2022)16-02504-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:



### 文章特点一

△以海藻酸钠水凝胶作为载体负载转化生长因子  $\beta 3$ , 对比海藻酸钠水凝胶与负载转化生长因子  $\beta 3$  的海藻酸钠水凝胶复合骨髓间充质干细胞修复软骨缺损的效果。

### 观察指标:

(1) 大体观察; (2) 组织学观察; (3) II型胶原免疫组化染色; (4) RT-PCR 检测再生软骨组织 II型胶原、Sox9、糖胺多糖 mRNA 表达。

## 文题释义:

**转化生长因子  $\beta 3$ :** 为关节软骨组织形成的重要调节因子, 可以促进干细胞迁移和成软骨分化, 增强软骨损伤的修复, 是一种理想的干细胞招募和促分化因子。

**海藻酸钠:** 为海藻酸衍生物的一种, 是由  $\beta$ -1, 4-D甘露糖醛酸作为M单元和  $\alpha$ -1, 4-L-古洛糖醛酸作为G单元经糖苷键连接而成的天然高分子, 价格便宜且容易获得, 具有较强的亲水性、较低的免疫原性与一定的生物惰性, 为经典的软骨组织工程支架材料。

## 摘要

**背景:** 已经有大量研究报道转化生长因子  $\beta 3$  与藻酸盐、间充质干细胞复合修复软骨缺损的动物实验, 但是关于转化生长因子  $\beta 3$  与海藻酸钠水凝胶复合骨髓间充质干细胞修复软骨损伤的研究较少。

**目的:** 对比海藻酸钠水凝胶与负载转化生长因子  $\beta 3$  的海藻酸钠水凝胶分别复合骨髓间充质干细胞修复骨缺损的效果。

**方法:** 体外分离培养兔骨髓间充质干细胞备用; 制备转化生长因子  $\beta 3$  海藻酸钠水凝胶复合物; 移植前, 将骨髓间充质干细胞悬液与水凝胶等体积混合。取48只新西兰大白兔制备膝关节软骨缺损, 随机分3组: 损伤组不作任何处理, 对照组植入海藻酸钠水凝胶与骨髓间充质干细胞悬液, 观察组植入转化生长因子  $\beta 3$  海藻酸钠水凝胶复合物与骨髓间充质干细胞悬液。术后12周时取材, 分别进行大体、组织学观察、II型胶原免疫组化染色与 RT-PCR检测。

**结果与结论:** ①大体观察: 术后12周时, 损伤组缺损部位由大量肉芽组织填充, 对照组由半透明状软骨样组织填充, 观察组由新生组织填充; ②组织学观察: 术后12周苏木精-伊红染色与番红O染色可见, 损伤组缺损部位被较多的纤维组织填充, 中央部位存在较大的缝隙; 对照组可见较多的软骨样组织与成纤维组织, 表面欠规则, 材料大部分降解, 材料周围由大量的骨小梁包绕; 观察组可见大量的软骨样组织, 表面较光滑且结构较致密, 类似于周围正常软骨组织; ③II型胶原免疫组化染色: 损伤组仅见极其微弱的阳性染色, 对照组、观察组可见阳性染色, 并且观察组的阳性着色程度明显强于对照组; ④RT-PCR检测: 对照组再生软骨组织的II型胶原、Sox9、糖胺多糖mRNA表达均低于观察组 ( $P < 0.05$ ); ⑤结果表明: 负载转化生长因子  $\beta 3$  的海藻酸钠水凝胶-骨髓间充质干细胞复合物可促进关节软骨缺损的修复, 提升关节软骨基因的表达。

**关键词:** 软骨; 材料; 水凝胶; 转化生长因子  $\beta 3$ ; 海藻酸钠水凝胶; 软骨缺损; 软骨组织工程

## Transforming growth factor beta 3 and alginate hydrogel complex on the repair of articular cartilage defects of the knee

Liu Yingsong<sup>1</sup>, Guo Xiaopeng<sup>1</sup>, Wei Mingzhu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Taihe Hospital (Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China; <sup>2</sup>Functional Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Liu Yingsong, MD, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Taihe Hospital (Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China

**Corresponding author:** Guo Xiaopeng, Master, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Taihe Hospital (Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China

<sup>1</sup>十堰市太和医院骨科(湖北医药学院附属医院), 湖北省十堰市 442000; <sup>2</sup>十堰市中西医结合医院功能科, 湖北省十堰市 442000

第一作者: 刘莹松, 男, 1978年生, 湖北省十堰市人, 博士, 副主任医师, 主要从事骨科方向的研究。

通讯作者: 郭晓鹏, 硕士, 副主任医师, 十堰市太和医院骨科(湖北医药学院附属医院), 湖北省十堰市 442000

<https://orcid.org/0000-0002-6201-7647> (刘莹松)

引用本文: 刘莹松, 郭晓鹏, 魏明珠. 转化生长因子  $\beta 3$  复合海藻酸钠水凝胶修复膝关节软骨缺损 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(16):2504-2509.



**Abstract**

**BACKGROUND:** Numerous studies have reported that transforming growth factor beta 3 combined with alginate and mesenchymal stem cells can repair cartilage defects in animal experiments. However, there is little research about the effect of transforming growth factor beta 3 and sodium alginate hydrogel combined with mesenchymal stem cells on repairing cartilage injury.

**OBJECTIVE:** To compare effects of sodium alginate hydrogel and sodium alginate hydrogel loaded with transforming growth factor beta 3 on bone defect with bone marrow mesenchymal stem cells.

**METHODS:** Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured *in vitro*. A suitable amount of transforming growth factor beta 3 was added into sodium alginate solution. Before transplantation, bone marrow mesenchymal stem cell suspension was mixed with the hydrogel in equal volumes. Totally 48 New Zealand white rabbits were used to prepare unilateral articular cartilage defects and randomly divided into three groups. The injury group did not take any treatment; the control group was implanted with alginate hydrogel and bone marrow mesenchymal stem cell suspension; and the observation group was implanted with transforming growth factor beta 3-sodium alginate hydrogel complex and bone marrow mesenchymal stem cell suspension. At 12 weeks after operation, the samples were taken for gross and histological observation and type II collagen immunohistochemical staining and RT-PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) General observation: At 12 weeks, the defect site of the injury group was filled with a large number of granulation tissue; the control group was filled with translucent cartilage like tissue; and the observation group was filled with new tissue. (2) Histological observation: At 12 weeks after operation, hematoxylin-eosin staining and safranin O staining showed that the defect site in the injury group was filled with more fibrous tissue, and there was a large gap in the central part. In the control group, there were more cartilage like tissue and fibroblast tissue; the surface was irregular; most of the material was degraded; and the material was surrounded by a large number of bone trabeculae. In the observation group, there was a large number of cartilage like tissue, with smooth surface and dense structure, similar to the surrounding normal cartilage tissue. (3) Immunohistochemical staining of type II collagen: only very weak positive staining was found in the injury group, while positive staining was found in the control group and the observation group, and the degree of positive staining in the observation group was significantly stronger than that in the control group. (4) RT-PCR detection: mRNA expression of type II collagen, Sox9 and glycosaminoglycan in the regenerated cartilage of the control group was lower than that of the observation group ( $P < 0.05$ ). (5) The results suggest that transforming growth factor beta 3-sodium alginate hydrogel complex with bone marrow mesenchymal stem cells can promote the repair of articular cartilage defects and enhance the expression of articular cartilage genes.

**Key words:** cartilage; material; hydrogel; transforming growth factor beta 3; sodium alginate hydrogel; cartilage defect; cartilage tissue engineering

**How to cite this article:** LIU YS, GUO XP, WEI MZ. Transforming growth factor beta 3 and alginate hydrogel complex on the repair of articular cartilage defects of the knee. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(16):2504-2509.

## 0 引言 Introduction

关节软骨具有其自身独特的生理结构，缺乏血管及营养供应，自然退变或是创伤引发的软骨缺损会导致不可逆的损伤<sup>[1-2]</sup>，目前常用的修复方法主要有软骨下钻孔<sup>[3-4]</sup>、软骨下微骨折<sup>[5-7]</sup>、骨软骨自体移植等<sup>[8-10]</sup>，但是这些方法的修复效果有限，同时还存在软骨退行性改变的特点。近年来软骨组织工程研究成为软骨损伤修复的研究热点。软骨组织工程最常用的种子细胞主要为软骨细胞与间充质干细胞，但是自身软骨细胞数量较少，达不到软骨组织工程对细胞密度的要求，而体外培养的细胞又容易发生无分化，所以间充质干细胞成为软骨组织工程研究的重要细胞来源<sup>[11-12]</sup>。支架材料可为细胞的生长提供附着点与物理环境，促进细胞间的接触与信号传递<sup>[13-16]</sup>，但不同的支架材料的作用有一定的差异。水凝胶与非水凝胶材料为目前主要应用于软骨组织工程的支架材料，由于大多数水凝胶材料的结构类似于关节软骨组织外基质，并且具有较高质量的水分，较适宜作为软骨组织工程的支架材料。

海藻酸钠为海藻酸衍生物的一种，是由 $\beta$ -1, 4-D 甘露糖醛酸作为 M 单元和 $\alpha$ -1, 4-L- 古洛糖醛酸作为 G 单元经糖苷键连接而成的天然高分子，价格便宜且容易获得，具有较强的亲水性、较低的免疫原性与一定的生物惰性，为经典的软骨组织工程支架材料<sup>[17-18]</sup>。

细胞因子相较于生物活性分子具有用量少、特异性高、疗效优等优势，其中的转化生长因子 $\beta$ 为多数参与调节软骨中起主要诱导作用的修复生长因子<sup>[19-20]</sup>。作为转化生长因子 $\beta$ 家族中的一员，转化生长因子 $\beta$ 3可有效发挥软骨诱导作用，促进间充质干细胞分化为软骨细胞，同时促进软骨特异性基质的合成<sup>[21]</sup>。已经有大量关于转化生长因子 $\beta$ 3促进干细胞向软骨分化的研究，转化生长因子 $\beta$ 3与藻酸盐、间充质干细

胞复合修复软骨缺损的动物实验也有报道，例如：邓明等<sup>[22]</sup>的研究以负载转化生长因子 $\beta$ 3的藻酸钙凝胶复合脂肪间充质干细胞构建了组织工程软骨，用于兔软骨缺损中获得了良好的修复效果，并且是一种结构性的修复。但是关于转化生长因子 $\beta$ 3与海藻酸钠水凝胶复合间充质干细胞修复软骨损伤的研究较少。因此，实验以海藻酸钠水凝胶作为载体负载转化生长因子 $\beta$ 3，对比海藻酸钠水凝胶复合骨髓间充质干细胞与负载转化生长因子 $\beta$ 3的海藻酸钠水凝胶复合骨髓间充质干细胞修复软骨缺损的效果。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年3月至2020年3月在湖北医药学院完成。

1.3 材料

1.3.1 主要试剂 戊巴比妥钠(STY667, 98%)购自郑州四季化工产品有限公司；LG-DMEM培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司；胎牛血清购自郑州德宁生物技术有限公司；成脂诱导分化培养基、成骨诱导分化培养基购自上海逍鹏生物科技有限公司；海藻酸钠(S100126)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；转化生长因子 $\beta$ 3(CYT-368)购自北京启维益成科技有限公司；鼠抗兔II型胶原购自焦作路非凡生物科技有限公司；生物素标记山羊抗小鼠IgG二抗购自碧云天生物技术有限公司；RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit试剂盒购自北京麦瑞康国际基因科技有限公司；PrimeScript™ RT试剂盒购自北京智杰方远科技有限公司。

1.3.2 主要设备 CO<sub>2</sub>培养箱购自山东鑫贝西科学仪器有限公司；流式细胞仪购自苏州赛恩斯仪器有限公司；石蜡切片机购自瑞沃德生命科技有限公司。

1.3.3 实验动物 3月龄健康新西兰大白兔3只, 体质量1.8–2.0 kg, 雌雄不拘, 用于分离培养骨髓间充质干细胞。5月龄健康新西兰大白兔48只, 体质量2.3–2.5 kg, 雌雄不拘, 用于关节软骨缺损造模。实验动物均由湖北医药学院实验中心提供。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的培养 采用密度梯度离心法结合贴壁法分离培养骨髓间充质干细胞<sup>[23]</sup>。具体方法为: 耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉实验兔, 取仰卧位, 以双侧股骨大转子为中心备皮6–8 cm, 消毒、铺巾; 以股骨大转子为标志, 将骨穿针转入骨髓腔内, 每侧抽取骨髓约2.5 mL, 加入离心管内, 以等体积的LG-DMEM培养基稀释, 吹打均匀后加入淋巴分离液3 mL, 2 000 r/min离心15 min; 吸取中间薄雾状的单核细胞层于另一离心管内, 加入适量的LG-DMEM培养基混匀, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 重复2次; 加入含体积分数10%胎牛血清的LG-DMEM培养基, 吹打均匀后分装于培养瓶内, 置于37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱内孵育。24 h后首次半量换液, 48 h后全量换液, 此后每3 d换液一次。观察细胞长满培养瓶底面大约85%时进行传代培养。传至P3代后, 胰蛋白酶消化细胞, 制备成浓度为1×10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>的细胞悬液, 备用。

#### 1.4.2 骨髓间充质干细胞的鉴定

**表面标志物检测:** 将骨髓间充质干细胞悬液分装于EP管内, 向EP管内分别加入鼠抗兔CD29、CD44、CD31和CD45抗体, 上流式细胞仪检测。

**多向诱导分化潜能:** ①成脂诱导分化: 将P3代骨髓间充质干细胞按照2×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>的细胞密度接种于6孔板内, 加入2 mL完全培养基, 置于细胞培养箱内培养, 每3 d换液。观察细胞融合达到100%时吸弃旧的培养基, 更换为成脂诱导培养基。诱导21 d后吸弃培养基, PBS清洗2次, 以多聚甲醛固定30 min, 油红O染色后显微镜下观察成脂染色效果。②成骨诱导分化: 将P3代骨髓间充质干细胞按照2×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>的细胞密度接种于包被明胶的6孔板内, 加入2 mL完全培养基, 置于细胞培养箱内培养, 每3 d换液。观察细胞融合达到70%时吸弃旧的培养基, 更换为成骨诱导培养基。诱导28 d后吸弃培养基, PBS清洗2次, 以多聚甲醛固定30 min, 茜素红染色后显微镜下观察成骨染色效果。

1.4.3 水凝胶的制备 将海藻酸钠溶解于PBS中, 配置质量分数为0.5%的海藻酸钠溶液, 静置以去除气泡。将转化生长因子β3溶解于PBS中, 制备100 mg/L的转化生长因子β3溶液。将适量转化生长因子β3溶液加入海藻酸钠溶液中, 混合均匀, 其中转化生长因子β3的最终质量浓度为2 mg/L。向混合溶液中滴加2%的CaCl<sub>2</sub>溶液静置15 min, 滤出凝胶备用。同理制备不含转化生长因子β3的海藻酸钠水凝胶。动物实验修复软骨缺损前将等体积的骨髓间充质干细胞悬液注入海藻酸钠水凝胶中, 混合均匀, 细胞浓度为1×10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>。

1.4.4 软骨缺损模型的制作 取48只新西兰大白兔, 耳缘静

脉注射3%戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉, 取后肢膝关节内侧切口, 暴露髌骨外侧缘后切开关节囊, 使髌骨内脱位以暴露股骨滑车表面, 利用电钻在股骨滑车面制作直径4.5 mm、深度3 mm的全层软骨缺损, 见图1, 生理盐水冲洗缺损部位后随机分成3组, 每组16只: 损伤组不进行任何的处理; 对照组植入不含转化生长因子β3的海藻酸钠水凝胶25 μL与骨髓间充质干细胞悬液25 μL, 细胞浓度为1×10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>; 观察组植入含转化生长因子β3的海藻酸钠水凝胶25 μL与骨髓间充质干细胞悬液25 μL, 细胞浓度为1×10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>。再次再用生理盐水冲洗伤口, 逐层缝合, 术后每只兔每天肌注青霉素40×10<sup>4</sup> U, 连续3 d。术后单笼饲养, 自由活动。

1.4.5 大体观察 术后6, 12周时, 每组随机处死8只兔, 打开关节腔后取出膝关节, 观察缺损修复程度、表面光滑及与周围区域整合程度等。按照国际软骨修复协会(International Cartilage Repair Society, ICRS)评分标准进行缺损大体评分<sup>[24]</sup>, 该评分主要包括缺损修复程度、边界的整合、大体表现3个方面, 每个参数0–4分, 总分12分为正常, 8–11分为接近正常, 4–7分有异常, 1–3分严重异常。

1.4.6 组织学观察 分离股骨滑车标本, 生理盐水冲洗, 置于体积分数4%甲醛溶液中固定48 h, 投入脱钙液中脱钙20 d。体积分数95%, 100%乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋、切片, 切片厚度约5 μm, 进行常规苏木精–伊红染色与番红O染色。

1.4.7 免疫组化染色 大体观察后分离股骨滑车标本, 生理盐水冲洗, 置于体积分数4%甲醛溶液中固定48 h, 投入脱钙液中脱钙20 d。体积分数95%, 100%乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋、切片, 切片厚度约4 μm。捞于防脱载玻片上, 65℃展片30 min, 滴加胰蛋白酶工作液抗原修复15 min, 室温下滴加山羊血清封闭液封闭15 min, PBS清洗后滴加稀释(1:200)的鼠抗兔II型胶原孵育过夜, 滴加生物素标记山羊抗小鼠IgG二抗孵育30 min, DAB显色, 苏木精复染, 脱水、透明、中性树脂封固, 显微镜下分析II型胶原表达。

1.4.8 组织学Wakitani评分 根据组织学与免疫组化染色结果, 采用Wakitani评分标准进行组织学评分<sup>[25]</sup>, 该评分主要包括细胞形态、修复组织表面平整度、修复组织厚度、修复组织与周围软骨结合情况、II型胶原染色几个方面, 总分0–14分, 总评分越低说明修复效果越好。

1.4.9 RT-PCR检测 术后12周时取对照组与观察组修复软骨组织块, 利用RT-PCR法检测II型胶原、Sox9、糖胺多糖mRNA表达。按照RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit试剂盒说明书操作提取修复组织总RNA, 以PrimeScript™ RT试剂盒将总RNA反转录为cDNA。以cDNA为模板行RT-PCR反应, 设计引物序列, 见表1。反应条件为: 95℃经30 s循环1次; 95℃变性5 s, 55–60℃退火20 s, 95℃60 s, 55℃30 s, 95℃60 s。以18S为内参。

1.5 主要观察指标 各组兔软骨缺损部位大体、组织学观察、II型胶原免疫组化染色与RT-PCR检测结果。

1.6 统计学分析 采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较。



表 1 | RT-PCR 反应引物序列

Table 1 | Primer sequences of RT-PCR

基因名称	上游引物	下游引物
II 型胶原	5'-CCA GGA ACT ATG AAG GAG AGG-3'	5'-TGT GAA GGC GTT GTA GAC TG-3'
Sox9	5'-GCT CAA CCC CTC AAA TGC-3'	5'-GAC GCA GAA GCG GTG TTG-3'
糖胺多糖	5'-AAG CCT ATT CCC AAG TGA TG-3'	5'-TCG TTA CTG TTG AGG AGG G-3'
18S	5'-ACC TGA AGA ATG CCT CCT C-3'	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

## 2 结果 Results

**2.1 骨髓间充质干细胞的表面标志物与多向分化潜能检测** 接种于培养瓶内的骨髓间充质干细胞形态为长梭形，贴壁生长，呈旋涡状排列，具有较强的增殖能力。流式细胞仪检测结果显示，实验分离的细胞间充质细胞 CD29、CD44 表面标志物呈高表达，造血细胞 CD31、CD45 表面标志物呈低表达，符合间充质干细胞表面标志物检测结果，见图 2。成脂诱导分化 21 d 后的油红 O 染色可见，分离培养的细胞可分化为脂肪细胞，见图 3A、B；成骨诱导分化 28 d 后的茜素红染色可见，分离培养的细胞可分化为成骨细胞，见图 3D、E，而未经诱导的细胞未见染色阳性表达，见图 3C、F。

**2.2 软骨修复大体观察结果** 术后 6 周时，损伤组缺损部位可见少量肉芽组织填充，缺损面积稍微减小，与周围正常软骨组织界限清晰；对照组缺损部位可见半透明纤维样组织填充，表面粗糙，与周围正常软骨组织界限较清晰；观察组缺损部位可见半透明软骨样组织填充，表面光滑，与周围正常软骨组织界限模糊。术后 12 周时，损伤组缺损部位由大量肉芽组织填充，与周围正常软骨组织界限模糊；对照组缺损部位由半透明状软骨样组织填充，表面较光滑，与周围正常软骨组织界限不清晰；观察组缺损部位由新生组织填满，表面光滑平整，与周围组织无明显界限。3 组术后 6、12 周的大体标本，见图 4。

ICRS 评分结果显示，3 组间术后 6、12 周的 ICRS 评分比较差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )，评分由高到低的顺序为：损伤组 < 对照组 < 观察组，见表 2。

表 2 | 各组兔关节软骨标本 ICRS 评分与 Wakitani 评分 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 | ICRS score and Wakitani score of articular cartilage specimens in rabbits of each group

组别	ICRS 评分		Wakitani 评分	
	术后 6 周	术后 12 周	术后 6 周	术后 12 周
损伤组	0.68±0.22	1.69±0.15	12.09±0.52	10.37±0.41
对照组	2.01±0.28 <sup>a</sup>	5.56±0.13 <sup>a</sup>	10.67±0.98 <sup>a</sup>	7.88±0.77 <sup>a</sup>
观察组	3.99±0.37 <sup>ab</sup>	8.39±0.78 <sup>ab</sup>	8.25±0.33 <sup>ab</sup>	5.96±0.72 <sup>ab</sup>

表注：与损伤组对比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与对照组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$

### 2.3 软骨修复组织学观察结果 见图 5。

**苏木精 - 伊红染色：**术后 6 周时，损伤组缺损部位可见少量纤维样组织填充，未见明显细胞与新生软骨组织；对照组可见水凝胶材料，未见明显的新生软骨，但是材料周围被骨小梁包围；观察组可见少量的新生软骨样组织，可见较多的细胞，并且结构较致密，水凝胶材料少量降解，材料周围被骨小梁包围。术后 12 周时，损伤组缺损部位被较多的纤

维组织填充，中央部位存在较大的缝隙；对照组缺损部位可见较多的软骨样组织与成纤维组织，表面欠规则，材料大部分降解，材料周围由大量的骨小梁包绕；观察组可见大量的软骨样组织，表面较光滑且结构较致密，类似于周围正常软骨组织。

**番红 O 染色：**损伤组术后 12 周时均未见明显的着色，染色阴性；对照组术后 6 周时仅见较弱的阳性染色，术后 12 周时阳性染色有所增强；观察组术后 6 周时可见较明显的阳性染色，术后 12 周时阳性染色进一步增强。

**2.4 软骨修复免疫组化染色结果** 损伤组术后 6、12 周时仅见极其微弱的 II 型胶原阳性染色；对照组、观察组术后 6、12 周时均可见 II 型胶原阳性染色，但是观察组的阳性着色程度明显强于对照组，见图 6。

**2.5 软骨修复组织学评分结果** 随着术后时间的延长，3 组 Wakitani 评分不同程度地降低。对照组术后 6、12 周的 Wakitani 评分均低于损伤组 ( $P < 0.05$ )，观察组术后 6、12 周的 Wakitani 评分均低于对照组 ( $P < 0.05$ )，见表 2。

**2.6 软骨修复 RT-PCR 检测结果** 对照组术后 12 周的 II 型胶原、Sox9、糖胺多糖 mRNA 表达均低于观察组 ( $P < 0.05$ )，见图 7。

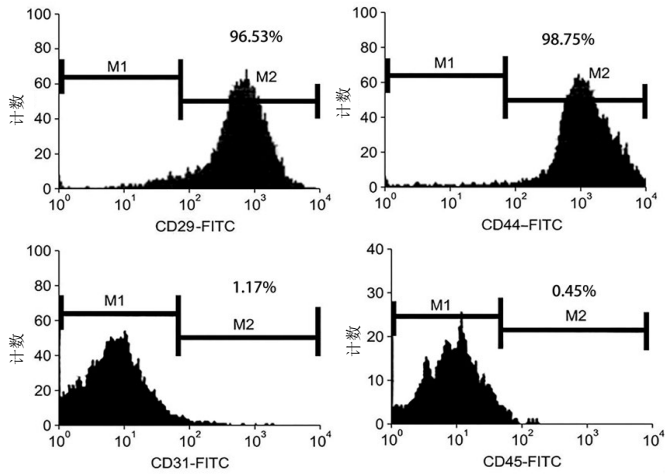
## 3 讨论 Discussion

软骨组织工程的三大要素为种子细胞、支架材料与生物活性因子<sup>[26]</sup>。实验以骨髓间充质干细胞为种子细胞、选择海藻酸钠水凝胶为支架材料、转化生长因子  $\beta 3$  为生物活性因子构建组织工程软骨，探讨其对兔软骨缺损的修复作用。海藻酸钠具有良好的生物相容性、生物降解性、生物稳定性与安全性，作为一种天然多糖可吸水膨胀形成孔径约为 5 nm 的水凝胶，大多数的药物或是蛋白质均可从凝胶中扩散释放，一些粒径较大的 DNA 分子或是抗体也可通过水凝胶降解释放。海藻酸钠的柔韧性使其能够完全适应组织缺损，并可负载生物活性分子，其特有的三维凝胶结构可为种子细胞提供立体的生长空间，其表面光滑且性状较规则，因此在软骨、骨及皮肤组织修复中应用较广泛。在体外实验中，将转化生长因子  $\beta 3$  负载于海藻酸钠水凝胶中之后冷冻干燥浸泡于 PBS 中进行缓释实验，结果发现该水凝胶可持续释放转化生长因子  $\beta 3$  长达 2 个月之久，具有优良的缓释性能，为其体内应用打下了一定的基础。

作为关节软骨组织形成的重要调节因子，转化生长因子  $\beta 3$  可以促进干细胞迁移和成软骨分化，增强软骨损伤的修复<sup>[27-29]</sup>，是一种理想的干细胞招募和促分化因子。刘登榜等<sup>[30]</sup>通过体外实验探索转化生长因子  $\beta 3$  诱导大鼠骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化的培养方法，证实转化生长因子  $\beta 3$  能快速地诱导骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化。BARRY 等<sup>[31]</sup>的研究发现，转化生长因子  $\beta 3$  的成骨诱导作用强于转化生长因子  $\beta 1$  (转化生长因子  $\beta 1$  为转化生长因子  $\beta$  家族的另一成员)。但是目前关于转化生长因子  $\beta 3$  的作用浓度研究较少，其适合软骨缺损的浓度仍有待研究。

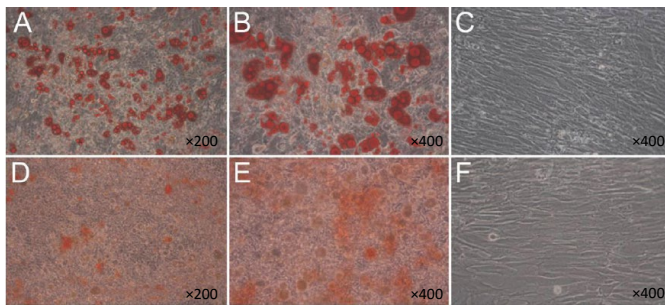


图 1 | 兔关节软骨缺损模型  
Figure 1 | Rabbit articular cartilage defect model



图注: CD29、CD44 表面标志物呈高表达, CD31、CD45 表面标志物呈低表达  
图 2 | 骨髓间充质干细胞表面标志物检测

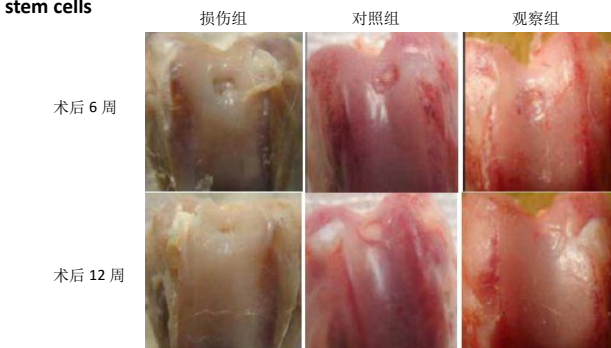
Figure 2 | Detection of surface markers of bone marrow mesenchymal stem cells



图注: A、B 为骨髓间充质干细胞成脂诱导分化油红 O 染色, 可见脂肪细胞; C 为阴性对照, 未见染色阳性表达。D、E 为骨髓间充质干细胞成骨诱导分化茜素红染色, 可见成骨细胞; F 为阴性对照, 未见染色阳性表达

图 3 | 骨髓间充质干细胞的多向诱导分化

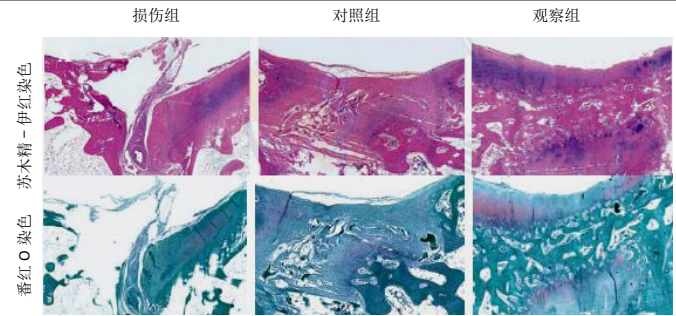
Figure 3 | Multi-directional differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells



图注: 术后 6 周时, 损伤组缺损部位可见少量肉芽组织填充, 缺损面积稍微减小; 对照组可见半透明纤维样组织填充, 表面粗糙; 观察组可见半透明软骨样组织填充, 表面光滑。术后 12 周时, 损伤组缺损部位由大量肉芽组织填充; 对照组由半透明状软骨样组织填充, 表面较光滑; 观察组由新生组织填满, 表面光滑平整

图 4 | 各组兔关节软骨标本大体观察

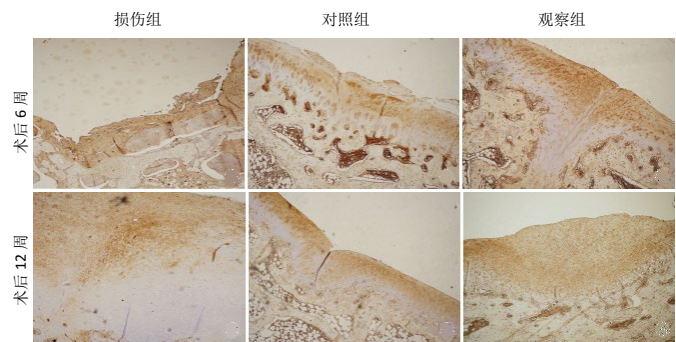
Figure 4 | Gross specimens of rabbit articular cartilage specimen in each group



图注: 苏木精-伊红染色显示, 损伤组缺损部位被较多的纤维组织填充; 对照组可见较多的软骨样组织与成纤维组织, 材料大部分降解, 材料周围由大量的骨小梁包绕; 观察组可见大量的软骨样组织, 表面较光滑且结构较致密, 类似于周围正常软骨组织。番红 O 染色显示, 损伤组未见明显的着色; 对照组、观察组可见明显的阳性染色

图 5 | 术后 12 周时各组兔关节软骨标本组织学观察 (×100)

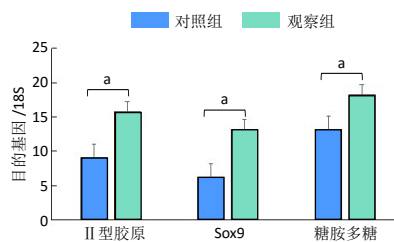
Figure 5 | Histological observation of articular cartilage specimen in rabbits of each group at 12 weeks after surgery (×100)



图注: 损伤组仅见极其微弱的 II 型胶原阳性染色; 对照组、观察组术后 6、12 周时均可见 II 型胶原阳性染色, 并且观察组的阳性着色程度明显强于对照组

图 6 | 术后不同时间点各组兔关节软骨标本 II 型胶原表达 (免疫组化染色, ×40)

Figure 6 | Expression of type II collagen in articular cartilage of rabbits at different time points after operation (immunohistochemical staining, ×40)



图注:  $^a P < 0.05$

图 7 | 术后 12 周各组兔关节软骨标本成软骨基因检测

Figure 7 | Detection of chondrogenic genes of articular cartilage specimens of rabbits in each group at 12 weeks after operation

实验组织学观察结果显示, 由转化生长因子  $\beta_3$ 、海藻酸钠、骨髓间充质干细胞构建的组织工程软骨植入软骨缺损部位后可形成类似透明软骨的新生组织, 并分泌细胞外基质。ICRS 评分、Wakitani 评分结果也显示该组的组织学修复效果明显强于其他两组, 差异有统计学意义, 说明实验构建的组织工程软骨对软骨缺损具有修复作用。未进行任何处理的损伤组也存在一定程度的自我修复, 但无论是从大体观察、组织学染色及 II 型胶原分泌方面都不及其他两组, 该种修复仅仅是对缺损部位的填充, 而不是真正意义上的结构与功能修复, 因此证实了关节软骨缺损的自身修复能力极其有限。对照组采用海藻酸钠水凝胶复合骨髓间充质干细胞修复软骨缺



损具有明显的效果,其修复程度弱于观察组但是强于缺损组,提示海藻酸钠水凝胶复合骨髓间充质干细胞可用于软骨缺损的修复。实验进一步对比了对照组与观察组修复组织内的 II 型胶原、Sox9、糖胺多糖的 mRNA 表达情况,结果显示,观察组修复组织内的 II 型胶原、Sox9、糖胺多糖的 mRNA 表达均明显高于对照组。Sox9 主要在软骨细胞中表达,作为软骨发育过程中的关键转录因子对胚胎时期的软骨发育及成熟具有重要的调节作用<sup>[32]</sup>,同时其可激活软骨细胞特征性分子(例如 II 型胶原、糖胺多糖)等表达,调控软骨主要基质成分基因,进一步调控软骨的分化。该实验结果证实了转化生长因子  $\beta 3$  在软骨修复中发挥了重要作用。

从实验结果分析,作者认为负载转化生长因子  $\beta 3$  的海藻酸钠水凝胶复合骨髓间充质干细胞植入软骨缺损区域可提高软骨基因的表达,增加细胞外基质的分泌,促进关节软骨缺损的修复,其具有广泛的应用前景。这可能与水凝胶中转化生长因子  $\beta 3$  的生物活性对骨髓间充质干细胞的作用有关,另外也可能是转化生长因子  $\beta 3$  通过内源或外源性的调节机制对缺损组织内的干细胞发挥了促进作用,增加了细胞外基质的分泌及软骨基因的表达,促进了软骨缺损的修复,但关于转化生长因子  $\beta 3$  的适宜体内应用浓度与远期效果仍有待验证。

**作者贡献:** 刘莹松进行实验设计,实验实施为刘莹松、魏明珠,实验评估为郭晓鹏,资料收集与成文为刘莹松,郭晓鹏审核。

**经费支持:** 该文章未接受任何经费支持。

**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中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经湖北医药学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。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**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期刊发表宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经湖北医药学院生物统计学专家审核。

**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 4.0”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

- ARMIENTO AR, STODDART MJ, ALINI M, et al. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomater.* 2018; 65:1-20.
- PARK IS, JIN RL, OH HJ, et al. Sizable Scaffold-Free Tissue-Engineered Articular Cartilage Construct for Cartilage Defect Repair. *Artif Organs.* 2019; 43(3):278-287.
- GAO L, GOEBEL LKH, ORTH P, et al. Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. *Dis Model Mech.* 2018;11(6):dmm034280.
- HUANG Y, WANG XL, QIU H, et al. Subchondral drilling method combined with gum-bletilla complex to repair articular cartilage defects. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2018;43(4):813-819.
- BECHER C, MALAHIAS MA, ALI MM, et al. Arthroscopic microfracture vs. arthroscopic autologous matrix-induced chondrogenesis for the treatment of articular cartilage defects of the talus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2019;27(9):2731-2736.

- ZHANG Y, LIU S, GUO W, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(7):954-965.
- 董岩, 崔鹏, 周敬滨, 等. 关节镜测量尺指导下微骨折术治疗膝关节软骨损伤的临床近期疗效观察 [J]. *中国运动医学杂志.* 2016,35(5):478-480.
- REDONDO ML, BEER AJ, YANKE AB. Cartilage Restoration: Microfracture and Osteochondral Autograft Transplantation. *J Knee Surg.* 2018;31(3):231-238.
- 张鹏, 荆琳, 邸冬雪, 等. 关节镜下自体骨软骨移植并服温阳益髓方修复膝关节炎的软骨缺损 [J]. *中国组织工程研究.* 2020,24(26):4135-4140.
- 马巧稚, 张仲文, 刘腾腾, 等. 3D-T1-VIBE 评价膝关节纤维蛋白凝胶型自体软骨细胞移植术后软骨修复 [J]. *中国医学影像技术.* 2020,36(2):271-275.
- 王晶, 塔依尔·阿力甫, 姚志涛, 等. 探究慢病毒介导 BMP-2 及 VEGF-165 转染山羊骨髓间充质干细胞向软骨方向分化的影响 [J]. *口腔医学研究.* 2020, 36(6):528-533.
- 刘杨, 张啸, 罗春阳, 等. 应用 3D 生物打印的软骨支架修复关节软骨缺损 [J]. *中华骨科杂志.* 2020,40(6):344-352.
- 肖红利, 邓江, 韩子冀, 等. 渐进性梯度孔径骨软骨支架的制备及细胞相容性研究 [J]. *中华老年医学杂志.* 2020,39(4):456-461.
- HOLZAPFEL BM, RUDERT M, HUTMACHER DW. Scaffold-based Bone Tissue Engineering. *Orthopade.* 2017;46(8):701-710.
- SHAFIEE A, ATALA A. *Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine.* *Annu Rev Med.* 2017;68:29-40.
- 易鹏. 水凝胶在软骨组织工程中的设计与应用进展 [J]. *疑难病杂志.* 2020,19(2):202-206
- 李云洁, 滕彬宏, 赵艳红, 等. 软骨组织工程用羧甲基壳聚糖/氧化海藻酸钠复合水凝胶的制备及体外评估 [J]. *华西口腔医学杂志.* 2019, 37(3):253-259
- 解光越, 孙振, 刘冠华, 等. 人脐带 Wharton 胶来源间充质干细胞复合海藻酸钠水凝胶构建组织工程软骨修复兔膝关节软骨缺损 [J]. *中国老年学杂志.* 2019,39(5):1170-1173
- THIELEN NGM, VAN DER KRAAN PM, VAN CAAM APM. TGF $\beta$ /BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells.* 2019;8(9):969.
- 黄冬娥, 秦茵, 林木南, 等. 不同波型电针治疗膝骨关节炎及对关节转化生长因子- $\beta 1$  的影响 [J]. *中国针灸.* 2020,40(4):370-374.
- 许颖捷, 邵博, 曾雪敏, 等. 慢病毒介导 TGF- $\beta 3$  转染脂肪间充质干细胞对其向成软骨细胞分化的影响 [J]. *新疆医科大学学报.* 2019,42(7):842-847.
- 邓明, 谢萍, 吴飞, 等. 负载转化生长因子  $\beta 3$  的藻酸钙凝胶复合脂肪间充质干细胞修复兔关节软骨缺损的实验研究 [J]. *中国医师杂志.* 2018,20(1):54-59.
- 刘洋, 吕洋, 王浩宇, 等. 1,25-维生素-D $_3$  体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的最适浓度 [J]. *解剖学报.* 2019,50(5):580-588.
- 邢丹, 刘伟, 赵昱, 等. 3D 干细胞微载体修复兔膝关节软骨缺损的实验研究 [J]. *中华骨科杂志.* 2020,40(14):945-952.
- 马春涛, 谭昱, 肖育志, 等. 右归饮诱导的骨髓间充质干细胞/纤维蛋白胶复合对膝关节软骨缺损兔软骨修复的影响 [J]. *中医杂志.* 2019, 60(14):1225-1231.
- MA Q, LIAO J, CAI X. Different Sources of Stem Cells and their Application in Cartilage Tissue Engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018;13(7):568-575.
- JING H, GAO B, GAO M, et al. Restoring tracheal defects in a rabbit model with tissue engineered patches based on TGF- $\beta 3$ -encapsulating electrospun poly(L-lactic acid-co-epsilon-caprolactone)/collagen scaffolds. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup1):985-995.
- YANG Q, TENG BH, WANG LN, et al. Silk fibroin/cartilage extracellular matrix scaffolds with sequential delivery of TGF- $\beta 3$  for chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12:6721-6733.
- LEE C H, COOK J L, MENDELSON A, et al. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. *Lancet.* 2010;376(9739):440-448.
- 刘登榜, 韩小松, 黄文良, 等. TGF- $\beta 3$  诱导大鼠骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化的实验观察 [J]. *中华医学杂志.* 2017,97(36):2860-2865.
- BARRY F, BOYNTON RE, LIU B, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res.* 2001;268(2):189-200.
- 陈臻浩. Sox9 对软骨细胞分化和基质产生的调控机制 [J]. *复旦学报 (医学版).* 2019,46(6):824-828.

(责任编辑: GW, ZN, SX)