

# 自体骨髓基质细胞立体培养修复关节软骨缺损的实验研究

秦 骥<sup>1</sup>, 蔡道章<sup>2</sup>, 卓 巍<sup>1</sup>

[摘要]目的: 探讨细胞载体 I 型胶原海绵与骨髓基质细胞的组织相容性及利用自体骨髓基质细胞立体培养构建的组织工程软骨修复关节软骨的效果。方法: 在 24 只 4~6 月龄新西兰大白兔股骨粗隆、胫骨下端进行骨穿, 获取骨髓基质细胞进行体外培养、扩增, 三代后获取足够细胞数量, 制成  $10^8$  ml 细胞悬液, 植入细胞载体 I 型胶原海绵立体培养, 2 周后移植到直径 3.5 mm 的软骨缺损面上, 于 1、2、3 个月处死动物检查。结果: 骨髓基质细胞与细胞载体 I 型胶原海绵有良好的组织相容性, 形成自体组织工程软骨能完成关节软骨缺损修复。第 1 个月修复组织具备纤维软骨特征, 第 2 个月具备透明软骨特征, 第 3 个月修复组织具备透明软骨的生物学特性。结论: 细胞载体 I 型胶原海绵与骨髓基质细胞体外培养形成的组织工程软骨, 能完成关节软骨的修复, 修复组织为透明软骨。

[关键词] 生物医学工程; 软骨; 关节; 细胞; 培养的; 骨髓基质细胞; 兔

[中国图书资料分类法分类号] R 318 R 327.72 [文献标识码] A

## Experimental study of three dimensional culture of marrow stromal cells for repair of articular cartilage defects

QIN Ji<sup>1</sup>, CAIDAO zhang<sup>2</sup>, ZHUO Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Orthopedic Surgery, Bengbu Third People's Hospital Bengbu 233000

2. Department of Orthopedic Surgery, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of three dimensional culture of bone marrow stromal cells for the repair of articular cartilage defects. **Method** Twenty four rabbits aged between 4 and 6 months were selected randomly for cells harvest. These cells were cultured for three generations. Then the cells were used to make  $1 \times 10^8$  ml suspended and transplanted into collagen I sponge. Two weeks later the cells were transplanted into self cartilage with 3.5 mm diameter and observed in Month One, Two and Three. **Results** Bone marrow stromal cells can grow well in collagen I sponge. The cartilage forms and repairs the chondral defects. The repair organism featured fibro cartilage in Month One. It showed characteristics of hyaline cartilage in Month Two and biologic functions in Month Three. **Conclusions** The engineered cartilage can repair chondral defects and the hyaline cartilage is involved in repair organism.

[Key words] biomedical engineering; cartilage; articular cells; cultured marrow stromal cell; rabbits

关节软骨自身修复能力有限, 组织工程方法修复关节软骨研究已有大量报道<sup>[1-3]</sup>, 且部分用于临床, 但修复组织的临床效果都不是很理想。本文应用自体骨髓基质细胞修复关节软骨缺损具有突出的优势, 同时应用细胞立体培养方式具有很大的改进, 解决了细胞流失和细胞分布不均问题, 目前相关报道较少。本文就此作一报道。

### 1 材料与方法

1.1 主要实验设备和材料 实验动物: 24 只新西兰大白兔(中山医学院动物中心提供)。培养设备: CO<sub>2</sub> 孵箱(日本三洋公司), 倒置显微镜及照相系统(柯尼卡公司), 超净台(苏州净化设备厂), 离心机,

烘箱, 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 其它常用设备。试剂: DMEM (H 型), Heps 2 g/L, EDTA, II 型胶原酶(以上均由 Gibco 公司提供), 0.125% 胰蛋白酶(上海生化试剂厂产品), 胎牛血清(杭州四季青公司), PBS(中山医学院动物中心试剂部提供), 青霉素 100 u/ml 链霉素 100 u/ml 细胞载体: I 型胶原海绵(哈佛医学院骨科实验室提供)。

1.2 骨髓基质细胞的获取和培养 4~6 月龄新西兰大白兔 24 只, 雄性 14 只, 雌性 10 只, 体重 2.5~3.5 kg。氯胺酮 0.01 ml/kg 肌肉注射麻醉满意后, 胫骨结节或股骨粗隆处无菌状态下进行骨穿, 预先用肝素 0.1~0.2 ml 预湿注射器和穿刺针, 抽取骨髓约 0.5~1.5 ml 直接接种到含有 10% 胎牛血清 DMEM 的培养皿中, 分散骨髓细胞, 用吹打管轻轻吹打, 分散取得的骨髓使其均匀, 过滤杂质后, 离心 (1 000 r/min) 5 min 后, 弃去上清液, 加入含有 10% 胎牛血清 DMEM 液 4 ml 吹打均匀, 制成单细胞悬液, 计数有核细胞, 按  $10^6$  个有核细胞接种到 25 cm<sup>2</sup>

[收稿日期] 2006-06-22

[基金项目] 广东省组织工程基金资助(20020267)

[作者单位] 1. 安徽省蚌埠市第三人民医院 骨科, 233000 2. 中山大学附属第三医院 骨科, 广东广州 510630

[作者简介] 秦 骥(1969-), 男, 硕士, 主治医师。

的细胞培养瓶中,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱中培养,第 3天换去一半培养液,2天后全部换液,弃去未贴壁的细胞。观察到培养液由桃红色变为橙黄色时换液,待细胞长满底壁后,用 0.125% 胰蛋白酶消化传代。计数每个培养皿约  $4.3 \times 10^6$  个,按 1:3 比例分装到 3 个培养皿中,继续培养,最后收集所有自体骨髓基质细胞制成  $10^8$  个 毫升浓度细胞悬液备用。

1.3 自体组织工程软骨形成 I 型胶原海绵紫外线消毒 8~12 h 后,放入无菌 PBS 液中浸泡 2 h 取出,无菌吸水纸吸干,放入  $10^8$  个 毫升浓度细胞悬液中,振荡 30 min 放入培养皿中继续培养。2 周后切片证实:细胞在海绵中生长良好,然后移植到动物软骨缺损模型上,每隔 1 个月处死 8 只观察。

1.4 动物模型建立、复合体移植、分组 在每只兔膝关节两侧的股骨下端髌股关节面上做一个直径 3.5 mm 软骨缺损,深达软骨钙化层,不见出血点为准。一侧膝关节作为实验组,用细胞复合体移植;另一侧用空白对照或者用 I 型胶原海绵填充,形成自身对照,观察组有空白组、I 型胶原海绵、骨髓基质细胞组。

1.5 术后自由活动,观察步态 24 只兔 1、2、3 个月分批处死 8 只,观察关节液情况,然后对修复组织进行大体观察,组织学切片、染色、关节软骨特异性染色,电镜观察,组织学评分,分析修复组织是否是透明软骨。

1.6 统计学方法 修复组织用 Pinda 法行组织学半定量评分,评分结果用秩和检验,同一个月份对照组与实验组之间采用配对资料秩和检验。

## 2 结果

2.1 骨髓基质细胞培养及复合体形成 细胞培养 3 天后,倒置显微镜下可见到散在的骨髓基质细胞,呈长条状,胞质丰富,体积较大。第 5 天开始伸出伪足,逐渐分裂,增殖,形成细胞克隆,并向四周扩展成结节,螺旋状生长(见图 1)。细胞存活率测定达 90% 以上,II 代、III 代骨髓基质细胞克隆呈涡轮状生长,细胞呈梭形,细胞核不明显,在培养基上固定染色见骨髓基质细胞核明显。

骨髓基质细胞接种到 I 型胶原海绵复合体在 1 周后逐渐变小,表面变光滑。2 周后复合体标本作垂直、水平两个角度病理切片见骨髓基质细胞比较均匀分布在海绵。骨髓基质细胞在复合体内以球形多见,还有多角形等(见图 2)。

24 只实验兔 3 天后活动渐增加,1 周后活动自如。1 只兔切口感染,1 只兔的左膝关节活动度差。

2.2 空白组及 I 型胶原海绵对照组 在 3 个月观察期间内,缺损的关节软骨面始终未得到修复,空白及 I 型胶原海绵两个对照组结果相似,1 个月后,胶原海绵消失,剩下缺损面,在修复上无任何优势。

2.3 实验组大体观 关节软骨缺损面得到修复,1 个月后修复组织为类软骨样,乳白色,修复组织稍低于正常关节面,表面凸凹不平,有明显的阶梯感,与正常关节软骨相比硬度较小,与周围软骨连接紧密,按压时不能与周围分离;2 个月后见修复组织与周围软骨相似,表面光滑,无阶梯感,质地硬度明显好转,与周围正常软骨稍有差别;3 个月后修复组织与正常关节软骨几乎无差别,表面光滑、平坦。

2.4 光镜下 1 个月切片苏木精-伊红染色见:修复组织比正常关节软骨染色较深,与周围关节组织分界清楚,可见 7~8 个细胞宽度的无细胞分布区域,与周围关节软骨连接紧密,无空隙,基质相互连接,有凸起的数个丘状结构;修复组织细胞分布均匀,看不到同源细胞群,细胞体积较大,核深染,细胞周围陷窝不明显(见图 3)。2 个月后修复组织细胞体积小,陷窝小,呈小串珠状,表面较光滑平坦,小丘状结构消失,表面与正常关节软骨平齐,连接紧密,无凹陷,修复组织内见大量同源细胞群,呈柱状排列,细胞周围陷窝清晰可见,但比正常关节软骨细胞陷窝较小,修复组织深部细胞的陷窝较大,浅层变小,甚至消失,有时看不到细胞。3 个月见修复组织与正常关节软骨之间几乎没有任何区别,仅交界处的表面稍凹陷,分界处有 2~3 排体积较小的细胞,呈柱状。修复组织染色稍深,表面光滑,内部细胞分化良好,同源细胞群体积稍小于正常,细胞陷窝明显,接近正常,基质与正常几乎无差别,稍微深染。

2.5 甲苯胺蓝染色 1 个月后整个修复组织淡染,从浅到深部修复组织比较均匀,细胞呈球形,约 50% 细胞被甲苯胺蓝异染,而 50% 细胞淡染,呈现细胞轮廓,靠近深部细胞异染明显,基质纤维较粗,排列紊乱,初步具备纤维软骨特性。2 个月后甲苯胺蓝异染明显,染色明显加深,但较正常组织仍染色淡,分界清楚,同源细胞体积较小,深部分化较好,浅部欠佳,细胞排列较规则,基质纤维颗粒小,排列规则,初步具备透明软骨的特点(见图 4)。3 个月后染色比正常关节软骨稍微淡,区分不明显,细胞分化良好,同源细胞群多见,已趋成熟,比较均匀,细胞排

列规则,细胞陷窝明显,具备软骨生物学特点(见图5)。

2.6 电镜 见修复组织表面光滑,修复组织细胞周围有软骨陷窝,细胞表面有许多不规则突起,胞质内有大量粗面内质网和高尔基体、糖原颗粒,细胞周围基质内胶原纤维较细且均匀分布,符合透明软骨的生物学特性。

2.7 Pinda组织学评分 空白组和胶原海绵对照组均未完全修复,结果相似,因此把两对照组合并与骨髓基质细胞实验组做统计学分析,Pinda组织学评分,1、2、3个月两组差异均有统计学意义( $T_1=40$ ,  $T_2=77$ ,  $T_3=89$ ,  $P<0.01$ )。

### 3 讨论

3.1 骨髓基质细胞特点 骨髓基质细胞具有成骨和成软骨的能力,分布广泛,获取容易,是比较好的软骨缺损修复种子细胞。骨髓基质细胞在体内体外的成软骨能力均已报道<sup>[3,4]</sup>;骨髓基质细胞在体外长期培养,大量扩增,仍可保留多向分化的潜能,且遗传背景相当稳定。但此种细胞在骨髓中含量极少,每 $10^4\sim 10^5$ 个单核细胞中只有1个,而组织工程对细胞的数量要求大,因此,体外扩增骨髓基质细胞就显得尤为重要。骨髓基质细胞是对血系细胞起支持和连接作用的一类细胞的总称,其中30%~40%是有成软骨能力的干细胞。利用骨髓基质细胞有贴壁生长的特点,血细胞不贴壁,可以将两种细胞分离。

3.2 细胞载体选择 用于吸附细胞的载体是组织工程关键因素,理想的材料应具备:(1)组织兼容性,不引发可能削弱组织功能临近组织的反应;(2)可吸收性,最终材料完全被移植床吸收取代,吸收率要与组织修复速度相配;(3)易于重复制作,可加工成各种形态适应缺损的要求;(4)材料表面与移植细胞相互作用,以保留分化细胞的功能或促进生长的可能<sup>[5]</sup>。本实验利用I型胶原海绵作为细胞载体,基本上具备上述优势,因为关节软骨的基质成分为I型胶原和II型胶原纤维,所以I型胶原海绵降解的同时,它的成分可以再次被利用,生成关节软骨所需要的基质。

3.3 立体培养优点 I型胶原海绵与种子细胞立体培养,是一种新的培养方式,使细胞与载体有机结合,这样在移植后的修复过程中,不会因体位及周围环境变化使细胞分布不均,还可以避免细胞流失,使

细胞与周围邻近正常软骨更紧密接触,有利于和周围正常组织连接。

3.4 动物模型选择 本次实验没有选择全层软骨缺损,是因为软骨缺损模型保留软骨钙化层可以起到屏障作用:它阻止源于松质骨中骨髓基质细胞移行修复软骨缺损,干扰实验观察及防止源于深部松质骨中的血管长入缺损,修复关节软骨<sup>[6,7]</sup>。

3.5 组织工程软骨生长特点 骨髓基质细胞在关节软骨缺损内经历增殖和分化两个阶段,1个月内修复组织以增殖为主,缺损被修复组织填充,近关节面细胞表现为圆形或椭圆形,修复组织内可见少数带有软骨陷窝的细胞,基质中可以分辨出纤维结构,这是纤维组织向透明软骨转变的过程,深部出现少量钙化的骨组织。2个月、3个月修复组织已逐渐分化为透明软骨,无论是细胞还是基质逐渐具备透明软骨的生物学特性,近关节面细胞已分化为成熟的软骨细胞,有软骨陷窝,随着修复组织的逐渐成熟,软骨陷窝渐渐增大,同源细胞群变大,由原来的单一纵向生长转变为纵横向分化,日趋成熟,并出现软骨下骨化,基质中也看不到纤维结构,HE染色也接近正常关节软骨,这与良好的细胞载体和新的利用方式分不开的。

(本文图1~5见封三)

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Bahaud JM, Aitrot RG, Bouvet R, *et al*. Implantation of autologous chondrocytes for cartilaginous lesions in young patients: A study of 24 cases [J]. *Chirurgie* 1998; 123(6): 568-571.
- [2] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, *et al*. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees [J]. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(3): 199-206.
- [3] 董启榕,戴莲生.骨髓基质细胞增殖后移植修复关节软骨缺损的实验研究[J].中国矫形外科杂志,2000;7(10):983-985.
- [4] Diluch DR, Jordan LG, Mierisch CM, *et al*. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects [J]. *Arthroscopy* 2000; 16(6): 571-577.
- [5] Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, *et al*. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts [J]. *J Biomed Mater Res* 1997; 34(2): 211-220.
- [6] Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HR, *et al*. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee [J]. *J Orthop Res* 2000; 18(5): 790-799.
- [7] Katsube K, Ochi M, Udoh Y, *et al*. Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in a type I collagen gel. Comparison with cultured chondrocytes in suspension [J]. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000; 120(1): 121-127.

自体骨髓基质细胞立体培养修复关节软骨缺损的实验研究(正文见 508 页)

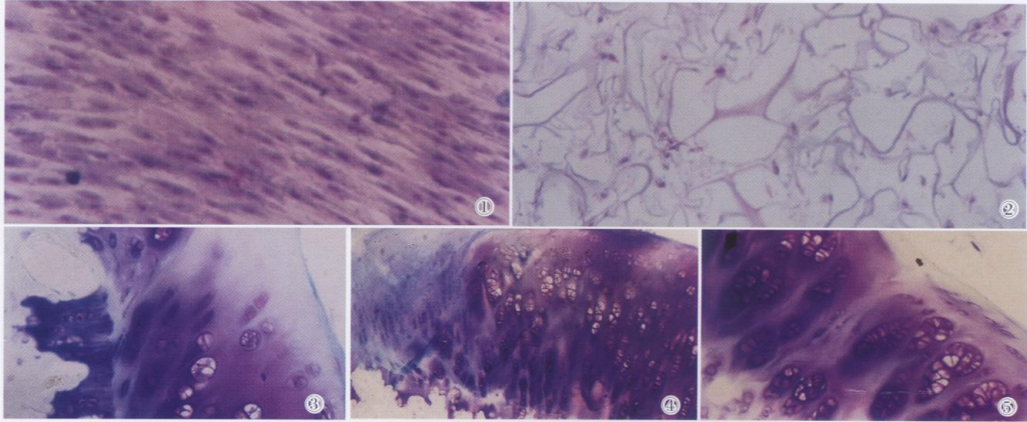


图1 贴壁生长的骨髓基质细胞 (HE 染色 10x40) 图2 骨髓基质细胞在 I 型胶原海绵中生长 (HE 染色 10x20) 图3 第 1 个月修复组织 (右边是修复组织, 可见细胞体积较小, 周围有软骨陷窝和软骨小囊, 基质纤维紊乱, 左上方为分界线及正常组织)(HE 染色 10x20) 图4 第 2 个月修复组织 (左边修复组织, 可见同源软骨细胞, 呈柱状排列, 细胞周围有软骨陷窝, 基质异染明显, 排列较规则, 右边为正常组织)(甲苯胺蓝染色 10x40) 图5 第 3 个月修复组织 (右边是修复组织, 可见细胞体积与正常组织相差不多, 同源软骨细胞多见, 周围有软骨陷窝, 基质纤维稍粗, 交界处可见 3 个柱状同源细胞群, 体积较小, 左侧是正常组织)(甲苯胺蓝染色 10x40)

兔深静脉血栓形成后内皮细胞凋亡的研究(正文见 511 页)

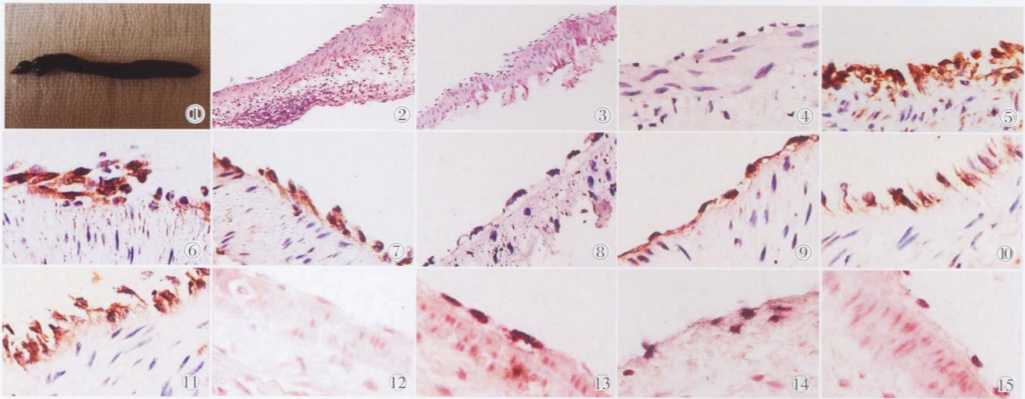


图1 兔后腔静脉血栓模型 x100 图2 血管壁三层炎性细胞浸润 x100 图3 血管内皮细胞单层变多层 x100 图4 bax 染色阴性 x400 图5 2 天时相 bax 表达 x400 图6 4 天时相 bax 表达 x400 图7 7 天时相 bax 表达 x400 图8 bcl-2 染色阴性 x400 图9 1 天时相 bcl-2 表达 x400 图10 4 天时相 bcl-2 表达 x400 图11 7 天时相 bcl-2 表达 x400 图12 tunel 标记阴性 x400 图13 tunel 标记 4 天 x400 图14 tunel 标记 1 天 x400 图15 tunel 标记 12 h x400

以瘢痕疙瘩为首发表现的皮肤转移性(胃)印戒细胞癌 1 例(正文见 630 页)

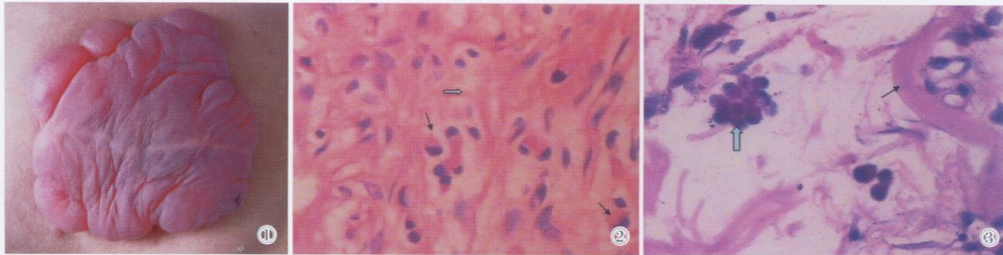


图1 中间见线形瘢痕(背部) 图2 见大量胶原及成簇的印戒细胞(空心箭头所指为胶原, 实心箭头所指为印戒细胞)(HE 染色 x100) 图3 见可印戒细胞和粗大的胶原(空心箭头所指为印戒细胞)[AB/PAS 染色(+) x400]