

# 利用脂肪干细胞构建软骨修复兔膝关节 软骨缺损的初步研究

王兆杰 安荣泽 张强 齐新文

中图分类号: R684.05 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)07-0501-05

**摘要:**目的 利用兔同种异体软骨脱细胞基质支架和脂肪干细胞体外构建组织工程软骨,探讨其修复关节软骨损伤的可行性。方法 将新西兰大白兔的脂肪干细胞与软骨脱细胞基质支架复合,于软骨细胞方向诱导培养基中培养两周,构建组织工程软骨。兔 24 只随机分为 A、B、C 3 组,A 组关节软骨缺损处置入经诱导的脂肪源干细胞复合软骨基质支架,B 组缺损处只置入软骨基质支架,C 组软骨缺损处不做任何处理。分别于术后第 12 周处死动物,修复处行大体、组织学、Ⅱ型胶原免疫组化染色和透射电镜检测。结果 A 组软骨缺损处被类软骨组织填充,修复区表面光滑;Ⅱ型胶原免疫组化染色和甲苯胺蓝染色阳性,电镜下可见软骨陷窝内有细胞结构存在,且有大量均匀颗粒状细胞分泌基质成分存在,细胞周围大量胶原纤维。B 组软骨缺损处为纤维组织状物填充,C 组软骨缺损处无修复组织填充。结论 脂肪干细胞与软骨脱细胞基质复合并向软骨诱导后可良好地修复关节软骨缺损,具有替代正常软骨的潜力。

**关键词:**脂肪干细胞;软骨脱细胞基质;软骨;组织工程

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.07.006

**The initial study on repair of rabbit articular cartilage defects using tissue engineered cartilage constructed with adipose derived stem cells** WANG Zhaojie, AN Rongze, ZHANG Qiang, et al. The Orthopedics Department of the Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai, Guangdong 519100, China

**Abstract:** **Objective** To evaluate the healing behavior of rabbits articular cartilage defects repaired with tissue engineered cartilage constructed by acellular articular cartilage matrices(AACMs) seeded with adipose derived stem cells(ADSCs). **Methods** ADSCs with rabbit-induced were seeded in AACMs with rabbit-developed and cultured in chondrogenic differentiation medium for two weeks in order to construct tissue engineered cartilage. 24 New Zealand white rabbits were divided into A, B and C groups randomly. Then engineered cartilage was transplanted into cartilage defect position of rabbits in the group A. AACMs was for the group B and nothing for the group C. The rabbits were killed in the 12th week. Restored tissue was evaluated using naked eyes, histology, immunohistochemistry and transmission electron microscope(TEM). **Results** In the group A, articular cartilage defects of the rabbits were filled with chondrocyte-like tissue which cells were positive of Alcian blue staining and type II-collagen either in expression. The chondrocytes can be seen in the recesses and there were plenty of the matrix particles and collagen surrounding the cells with TEM scanning. In the group B, the defect was filled with fibrous tissue. No tissue was found in the group A. **Conclusions** Tissue engineered cartilage using AACMs seeded with ADSCs cultured in chondrogenic differentiation medium can be well repair of articular cartilage defects in rabbits. It has the potential to substitute for the normal cartilage.

**Key words:** Adipose-driven stem cell; Acellular cartilaginous matrix; Cartilage; Tissue engineering

基金项目:贵州省科技厅和珠海市医学重点专科建设基金资助项目 黔科合 NY 字[2006]3036 珠卫[2008]30

作者单位:519100 珠海,遵义医学院第五附属(珠海)医院骨科

通讯作者:安荣泽,Email:zhaojiewang@163.com

关节软骨因损伤或退行性病变引起缺损后,自身修复能力十分有限。近年来,软骨组织工程技术的迅速发展,为解决这个难题提供了新的途径<sup>[1-3]</sup>。而寻找一种合适的软骨细胞载体则是当前软骨组织工程研究的焦点之一。脱软骨细胞基质是近几年发

展起来的天然支架材料,因其去除了组织中的抗原性成分,故具有良好生物相容性,在组织工程中应用广泛<sup>[4]</sup>。

2001年Zuk等<sup>[5]</sup>从人和大鼠的脂肪组织中发现了具有自我更新能力、活力持久及多向分化潜能的细胞并命名为脂肪源性干细胞。2003年Gimble和Guilak<sup>[6]</sup>又在不同诱导方案下诱导脂肪源性干细胞向脂肪细胞、成骨细胞、肌肉细胞、心肌细胞、神经细胞、软骨细胞等分化进一步证实其干细胞的特性。本实验采用软骨脱细胞基质复合脂肪干细胞的方法体外构建组织工程软骨,观察其修复兔关节软骨缺损的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

成年新西兰大白兔,体重约为2.5~4 kg,雌雄不限,广东省医学实验动物中心提供,SPF级。

### 1.2 主要试剂和仪器

DMEM购自Gibco公司;特级胎牛血清购自杭州四季青公司;I型胶原酶、胰岛素和转铁蛋白购自Sigma,TGF- $\beta_1$ 、胰蛋白酶(Amresoco美国),Vit C(invitrogen美国),II型胶原小鼠抗兔单克隆抗体(Calbiochem UK),免疫组化SP试剂盒(天津瀛洋生物),相差倒置显微镜(德国Leica),调温震荡培养箱(金坛富华),透射电镜(日本HITACHI),荧光显微镜系统(德国Leica);液氮生物容器(中国四川金凤)。

### 1.3 脂肪干细胞(ADSCs)传代培养

取3月龄新西兰大白兔颈背部脂肪组织约3g,除去血管及浅筋膜等组织,用PBS液反复冲洗,剪刀剪碎,0.1% I型胶原酶在37℃水浴摇床中轻搅拌消化20~30 min。使用等量体积的完全培养基中和后,离心1000g 10 min,弃上清,沉淀重悬后以80目尼龙筛网过滤,用肽盼蓝染色检测细胞活性,加入10%FBS的DMEM培养基中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养过夜。待细胞生长融合达80%即可传代,取第3代细胞供实验用。

### 1.4 软骨脱细胞基质支架的制备

手术取成年兔新鲜耳廓软骨制备成5 mm×5 mm×1 mm体积大小。首先于液氮罐中冻干12 h;随后按以下步骤处理:①软骨组织块在含苯甲基磺酰氟(0.35 ml/L)的低渗 Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4)中4℃下持续震荡24 h。②上述溶液中加入10 g/L的Triton X-100继续震荡48 h。③软骨块三蒸水充

分漂洗后DNA酶、RNA酶消化过夜。④于含10 g/L的Triton X-100的Tris-HCl缓冲液中处理24 h。最后以三蒸水漂洗48 h。冻干后紫外线照射灭菌。-20℃储存备用。用前DMEM液浸泡2 h。

### 1.5 细胞与软骨基质支架的复合并向软骨方向诱导

将培养的脂肪干细胞消化后制成细胞悬液,细胞密度调整为 $2 \times 10^7$ /ml,向材料表面加0.2 ml细胞悬液,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中静置4 h后加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,继续培养。7天后改换含有10 ng/ml TGF- $\beta_1$ 、10 mg/L转铁蛋白、6.25  $\mu$ g/ml胰岛素、10<sup>-7</sup>M地塞米松、50 nM VitC的软骨诱导培养基继续培养2周。

### 1.6 兔全层软骨缺损模型的建立及组织工程软骨的植入

选取健康成年新西兰大白兔24只,编号后随机分成3组,饱和硫化钠脱去兔膝关节上下约5 cm的兔毛,异戊巴比妥钠3 mg/kg耳缘静脉麻醉。常规消毒、铺无菌巾。沿髌韧带内侧做一长约5 cm的切口,进入关节腔后在股骨髁间窝用4 mm的环钻打孔,以似乎要出血但未出血为准。A组在孔内植入制备的组织工程软骨,B组在孔内只植入制备的基质支架,C组缺损处不作任何处理,无菌盐水冲洗关节腔,仔细分层缝合。术后笼内自由饲养,肌注青霉素1周预防感染。

### 1.7 甲苯胺蓝染色

标本经甲醛固定、脱钙、石蜡包埋、沿矢状面垂直于缺损区进行切片,甲苯胺蓝染色5 min,镜下观察。

### 1.8 II型胶原免疫组化染色

应用II型胶原单克隆抗体行免疫组织化学染色,一抗为鼠抗兔II型胶原单克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠多克隆抗体,采用3-3'-二氨基联苯(DAB)染色。

### 1.9 透射电镜观察

标本经固定、漂洗、脱水、浸透、包埋后,切60~90 nm超薄片,200目铜网捞片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色,电镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 大体观察

实验动物于术后12周用空气栓塞法处死,观察A组缺损处多完全填充,修复组织色泽、质地同正常关节软骨,表面光滑,与周围正常软骨组织界限

模糊,结合紧密,不易剥离(图 1a)。B 组缺损内无软骨修复,保留原植入支架形态。部分修复,表面欠平整,凸凹不平,交界区界限明显(图 2b)。C 组缺损内无软骨修复组织,部分底缘有少量修复,但修复组织量较少,不起填充作用(图 2c)。

2.2 组织学观察

A 组修复组织原支架形态大部分已经被吸收,修复组织与正常软骨组织边界尚清,细胞排列较为

紊乱。修复组织甲苯胺蓝染色阳性,组织内细胞排列较为紊乱(图 2a)。Ⅱ型胶原免疫组化染色阳型(图 3a)。B 组修复组织保留原植入支架形态,组织间连接极为松散,组织块切片时易脱落,易碎。原移植甲苯胺蓝染色阳性,边缘与正常软骨组织分界清,载体支架内未见细胞结构(图 2b)。Ⅱ型胶原免疫组化染色阳型(图 3b)。C 组因无修复组织或修复组织太少故未做形态学观察。



图 1a 组织工程软骨组修复 12 周后,软骨缺损区内见软骨组织修复,光滑,与正常软骨组织分界不清



图 1b 单纯支架组 12 周后软骨缺损区内见原移植的软骨基质支架及其形态,软骨修复不著,交界区界限明显



图 1c 对照组 12 周后软骨缺损区无软骨修复组织

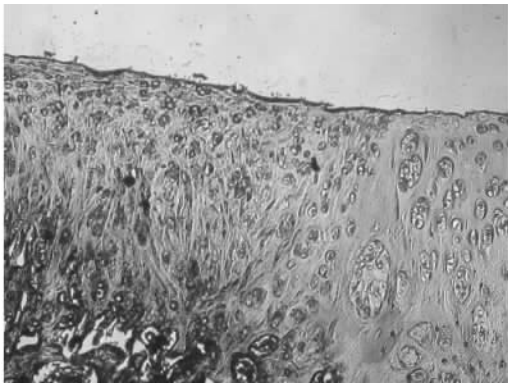


图 2a 组织工程软骨组甲苯胺蓝染色阳性,细胞排列较为紊乱,可见其与正常软骨组织分界(×200)

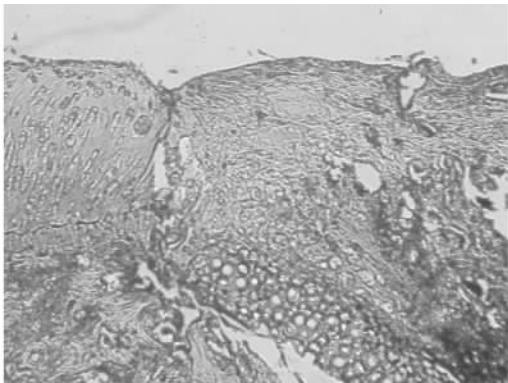


图 2b 单支架组甲苯胺蓝染色阳性,软骨陷窝内无细胞结构,与正常软骨组织分界清(×200)

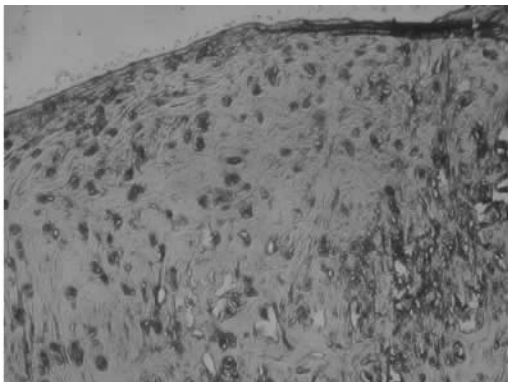


图 3a 组织工程软骨组Ⅱ型胶原免疫组化染色阳性,细胞排列较为紊乱,可见其与正常软骨组织分界(×200)

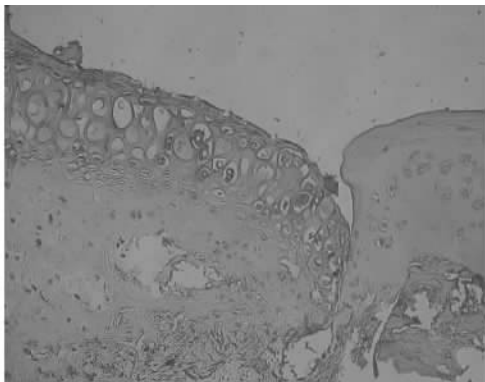


图 3b 单支架组Ⅱ型胶原免疫组化染色阳性,软骨陷窝内无细胞结构,与正常软骨组织分界清(×200)

2.3 电子显微镜观察

A 组透射电镜观察修复组织可见大部分陷窝内有细胞结构存在,且有大量均匀颗粒状细胞分泌基质成分存在(图 4a),扫描电镜观察到细胞在软骨基

质表面及内部黏附变形(图 5a)。B 组软骨陷窝内无软骨细胞存在(图 4b, 5b)。C 组因无修复组织或修复组织太少故也未做电镜观察。

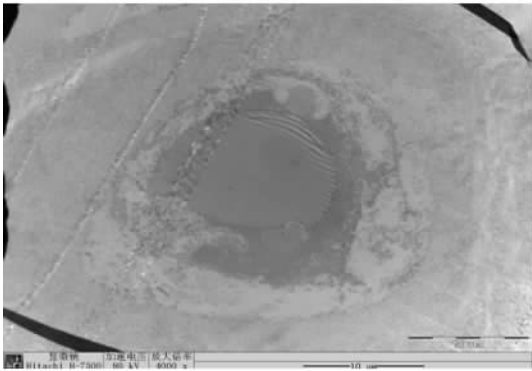


图 4a 组织工程软骨组透射电镜观察陷窝内有细胞结构存在,且有大量均匀颗粒状细胞分泌基质成分存在(×5000)

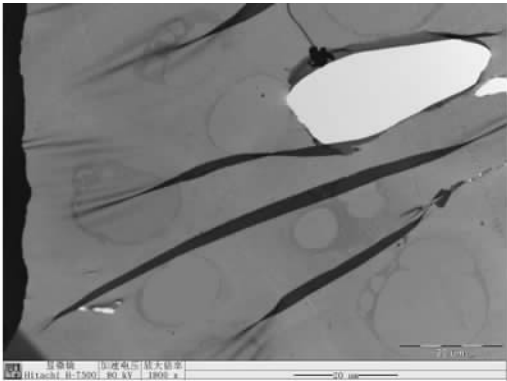


图 4b 单支架组透射电镜观察(×1800)软骨陷窝内无软骨细胞结构成分存在

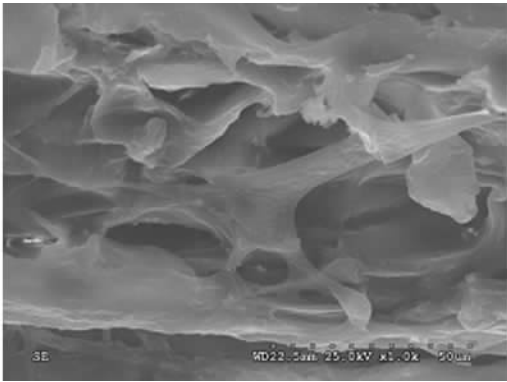


图 5a 组织工程软骨组扫描电镜观察软骨基质表面和内部可以看到软骨细胞结构存在(×1000)

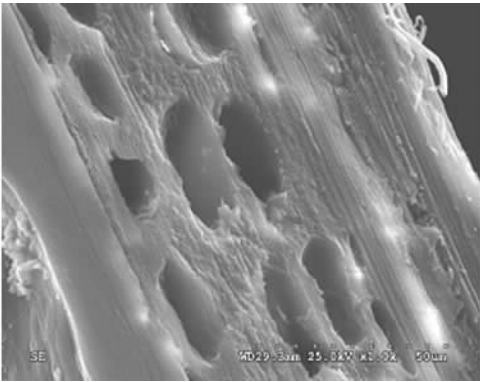


图 5b 单支架组扫描电镜观察软骨基质表面和内部无软骨细胞结构存在(×1000)

4 讨论

4.1 组织工程软骨的构建

组织工程是应用生命科学与工程学的原理与技术,制作人体各种组织或器官损伤后的功能和形态的生物替代物。本试验组应用工程学和生命科学技术,以软骨基质为载体复合脂肪干细胞并向软骨方向诱导后,构建组织工程软骨,以图其能够修复、改善和重建损伤或缺失的关节软骨。

脂肪干细胞是来源于中胚层的成体干细胞,具有取材容易、生长快和生物学特征稳定的优点,且其向软骨细胞分化确切<sup>[7]</sup>,是软骨组织工程研究的热点细胞。软骨基质是软骨细胞间的填充,也是软骨组织的支架,是维持关节软骨生物力学特点的主要

因素,在降低关节摩擦系数、缓冲震荡、介导细胞间信号的传递等方面发挥重要作用;在组织工程软骨的研究中其具有理想的三维结构、理化特性、与脂肪干细胞具有良好的生物相容性<sup>[8]</sup>的优点,是可靠的脂肪干细胞载体。在诱导干细胞向软骨细胞分化的研究过程中,经历了单细胞因子、联合细胞因子及贯穿应用细胞因子 3 个阶段。理想的诱导方案是能模拟软骨分化、发育过程中其微环境中细胞因子变化的贯穿应用,但由于其研究尚处于初始阶段,该技术还不成熟。联合应用细胞因子要优于单细胞因子的应用,本课题组选用 TGF- $\beta$ 1 联合转铁蛋白来诱导脂肪干细胞向软骨细胞分化,构建组织工程软骨,试图将脂肪干细胞复合软骨基质支架并向软骨方向诱导来构建合适的软骨移植物,期望它能够在修复的过

程中分泌细胞外基质与降解细胞外基质反复同时进行,并于正常软骨融合成一个整体,来修复、改善和重建损伤或缺失的关节软骨。

现在大部分研究学者多采用干细胞转化后种植于载体材料之上构建组织工程软骨。实验早期我们已使用以上方法,但发现存在转化后细胞形成软骨结节,不易进行分离,且分离后细胞活性下降,很快因为未转化脂肪干细胞的优势生长抑制作用而出现转化后软骨细胞的增值能力下降,乃至凋亡。加之种植于载体后细胞外环境的剧烈改变,过程的繁琐增加了污染的几率等诸多原因,结果很不理想。在我们将脂肪干细胞复合于软骨脱细胞基质后,再行软骨方向诱导分化,通过细胞因子及材料组成成分 II 型胶原和 GAG 的协同诱导作用,使脂肪干细胞成功向软骨细胞方向分化,使细胞有较高的 II 型胶原表达、分泌,取得了较理想的结果。

#### 4.2 组织工程软骨修复软骨缺损效果

关节软骨缺少血液供应,其自身修复能力十分有限。软骨缺损积极的手术治疗如:微骨折术<sup>[7]</sup>、软骨下钻孔术<sup>[8]</sup>、骨膜移植<sup>[9]</sup>等,均因修复组织往往为纤维软骨故总体效果不佳<sup>[10]</sup>。本试验利用脂肪干细胞构建的组织工程软骨,植入关节软骨缺损处 12 周后,缺损被修复,修复组织富含聚聚糖和 II 型胶原,与正常关节软骨相似。其在一定程度上修复关节软骨缺损,恢复了关节功能。但修复组织细胞密度高于正常软骨,细胞排列也欠缺规则,尚需要进一步的结构重塑才能达到正常软骨微观结构。

在实验结果鉴定方面在以 HE 染色及免疫组化充分说明细胞向材料内部迁徙,黏附、增值,并向软骨细胞转化后。采用电镜对修复的组织工程软骨进行扫描,从微观上观察细胞在材料陷窝内部分布特点及基质分泌情况。更加充分的、全面的阐述、分析了实验结果。

#### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Karlsson C, Brantsing C, Svensson T. Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *J Orthop Res* 2007, 25( 2 ):152-163.
- [ 2 ] Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials*, 2005, 9: 1473-1482.
- [ 3 ] 付勤,王勇,于冬冬,等. 外源性 TGF- $\beta_1$  及 IGF-1 诱导大鼠脂肪干细胞向软骨细胞分化的实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13( 12 ):848-853.
- [ 4 ] Badylak S, Obermiller J. Extracellular matrix for myocardial repair. *Heart Surg Forum* 2003, 27( 2 ):20-26.
- [ 5 ] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002, 13( 12 ):4279-4295.
- [ 6 ] Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: Isolation, characterization and differentiation potential. *Cytherapy*, 2003, 5( 5 ):362-371.
- [ 7 ] Kisiday JD, Kopesky PW, Evans CH, et al. Evaluation of adult equine bone marrow-and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *Orthop Res* 2008, 26( 3 ):322-331.
- [ 8 ] 张强,安荣泽,王兆杰,等. 兔软骨基质支架与脂肪干细胞的生物相容性. *中国组织工程研究与临床康复* 2008, 12( 49 ):9731-9734.
- [ 9 ] Takao M, Uchio Y, Kakimaru H, et al. Arthroscopic drilling with debridement of remaining cartilage for osteochondral lesions of the talar dome in unstable ankles. *Sports Med* 2004, 33( 2 ):332-336.
- [ 10 ] Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, et al. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am* 2005, 87( 9 ):1911-1920.
- [ 11 ] 彭飞,余国荣,余黎,等. 带血供的骨膜瓣修复兔关节软骨缺损的实验研究. *中国临床解剖学杂志* 2006, 24( 6 ):674-679.
- [ 12 ] Grande DA, Breitbart AS, Mason J, et al. Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop*, 1999, ( 367 Suppl ):176.