

· 基础研究 ·

自体软骨细胞修复关节软骨缺损的机制探讨

余方圆¹, 卢世璧², 黄利虹², 许文静², 彭江², 赵斌², 袁玫², 黄靖香²

(1 解放军 309 医院骨科, 北京 100091; 2 解放军总医院骨科研究所, 北京 100853)

【摘要】 目的: 观察团块样自体软骨细胞植入关节软骨缺损后的病理变化, 探讨自体软骨细胞移植修复关节软骨缺损的病理生理机制。方法: 24 只 3.0 kg 以上 4~6 月龄新西兰大白兔, 雌雄不限, 随机分为两组: 实验组和对照组。实验组 12 只, 20% 的速眠新 (1 mg/kg) 肌肉注射麻醉后取肩关节软骨组织, 0.2% II 型胶原酶消化分离软骨细胞, 体外单层培养, 细胞长成肉眼可见的膜状后收集固体的组织样细胞团, 动物再次麻醉制造双膝股骨滑车 4.0 mm×6.0 mm 方形缺损, 植入细胞团块, 骨膜覆盖, 缝合骨膜于双股骨髁上。对照组 12 只, 同实验组手术方法进行缺损单纯骨膜移植。1、3、12、24 周两组各 3 只动物空气栓塞处死取材, 观察细胞团块变化和缺损修复情况。结果: 1 周时软骨细胞朝向关节面部分细胞变大变圆, 产生大量基质; 3 周时此种变化更加明显, 但骨膜与细胞团块已然不能分开; 12 周时缺损为类透明软骨组织修复; 24 周时修复组织为透明软骨样组织, 对照组为纤维软骨组织修复。结论: 关节软骨细胞体外聚集培养形成的细胞团块内的细胞有迁移生长能力; 细胞团块移植方法植入的细胞数量大, 表型好, 细胞在缺损内不会流失; 关节软骨缺损修复是由植入的细胞团块生长分化而来; 自体关节软骨细胞团块植入关节缺损内后, 在关节应力的影响下, 先从朝向关节面的一侧逐渐发生细胞成熟分化和软骨基质产生, 逐渐完成缺损的修复。

【关键词】 软骨, 关节; 移植, 自体; 软骨细胞; 软组织损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.09.014

Mechanisms of autologous chondrocytes mass transplantation in the repair of cartilage defects of rabbits' knee YU Fang-yuan, LU Shi-bi*, HUANG Li-hong, XU Wen-jing, PENG Jiang, ZHAO Bin, YUAN Mei, HUANG Jing-xiang. * Orthopaedics Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

ABSTRACT **Objective:** To trace the pathological changes of the cultured autologous chondrocytes mass after implanted in cartilage defects and investigate the pathophysiological mechanisms of the autologous chondrocytes mass transplantation in the repair of cartilage defects. **Methods:** Twenty-four New Zealand white rabbits of 4 to 6 month-old and weighing more than 3.0 kg (female and male was unrestricted) were randomly divided into experiment group and the control group. For 12 rabbits of experiment group, the cartilage defects were repaired with the autologous chondrocytes mass and sealed with one piece of periosteum. Firstly, cartilage tissue of 10 to 30 mg was obtained from the shoulder of the rabbits after anaesthetized by 1 mg/kg 20% sumianxin. Then, chondrocytes were isolated from the cartilage tissue with 0.2% type II collagenase digestion and were cultured in DMEM/F-12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 50 μg/ml ascorbic acid-2-phosphate, 0.4 mM proline, 5 μg/ml insulin and 1 mM non-essential amino acids (NEAA) in flasks in vitro. The cells were harvested until a thin film of the cells covered the bottom of the flask could be seen with naked eyes. Then the film was collected with a curled glass stick and formed a solid mass. On this time, the animal was anaesthetized again and the full-thickness cartilage square defect of 4.0 mm×6.0 mm was fabricated in the patellar groove of distal femur, and then the cellular mass was transplanted into the defect covered by one piece of periosteum which obtained from the upper anterior of tibia and sealed with the femoral condyles. For 12 rabbits of the control group, the defects were sealed with one piece of periosteum only. The animals were sacrificed in the 1st, 3rd, 6th and 12th weeks after the operation respectively. The histologic sections were stained with safranin O-fast green, hematoxylin-eosin (H&E) and picric acid-Sirius red and immunostained for type II collagen and aggrecan. **Results:** In the 1st week, the transplanted cells oriented to articular surface differentiated to matured hyaline chondrocytes and excrete large amount cartilage matrix. In the 3rd week, the trend was more obvious and the periosteum was union to the cell mass. In the 12th week, the defects were repaired with hyaline-like cartilage tissue, and in the 24th week, the repair tissue turned to matured hyaline cartilage. In the control group, the defects were repaired with fibrocartilage tissues. **Conclusion:** It was evidenced that the defects were repaired by the autologous chondrocytes mass transplantation. The procedure was gradual and initialed from up toward joint to down to the deep of the defect.

KEYWORDS Cartilage, articular; Transplantation, autologous; Chondrocytes; Soft tissue injuries

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(9): 683-687 www.zggszz.com

基金项目: 国家 863 计划 (编号: 2002AA205021); 国家自然科学基金青年项目 (编号: 30801159)

通讯作者: 卢世璧 Tel: 010-66939205 E-mail: shibilu302@yahoo.com.cn

自体关节软骨细胞移植修复关节软骨缺损已经有 20 余年的临床应用历史(Brittberg, 1994)。但体外培养传代的软骨细胞在关节软骨缺损内的动态病理变化鲜有报道。此外,细胞悬液在缺损内容易流失,因此修复效果欠佳。本研究用聚集培养(confluent culture)方法获得的固体性的软骨细胞团块移植,修复兔股骨髁间软骨缺损,获得良好的修复效果,本文旨在探讨这一修复的发生机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 DMEM/F-12(天津 TBD 公司); II 型胶原酶、HEPES、L-脯氨酸、维生素 C、胰岛素、辅助添加剂 ITS(100x)、藻酸(低黏性,粉剂)均为 Sigma 公司出品;非必须氨基酸(NEAA)、标准胎牛血清为 Hyclone 公司出品; I 型胶原鼠抗人单克隆抗体(北京中山公司); II 型胶原羊抗人单克隆抗体(Neo-markers, abcam 公司); aggrecan 鼠抗人多克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

1.2 实验动物及分组 24 只 3.0 kg 以上 4~6 月龄新西兰大白兔,雌雄不限,购于解放军总医院动物实验中心。动物编号后,随机分为 2 组,实验组和对照组各 12 只。

1.3 实验方 法

1.3.1 实验组实验方 法

(1)细胞准备。①取材:取左或右肩关节软骨(左侧 6 只,右侧 6 只)。20%速眠新注射麻醉(1 mg/kg),动物肩关节周围剪毛,消毒,铺无菌单。肩关节弧形切口,长约 3 cm,切开皮肤和皮下组织,纵行切开三角肌,前外侧切开肩袖,显露肱骨头关节面,刮除软骨组织,注意勿带软骨下骨或周围纤维软骨、纤维组织。取材 10~20 mg,立即放入含抗生素的普通培养基里。②细胞分离培养:取材组织在超净工作台中用 D-hank's 平衡液冲洗 3 遍,用直眼科剪剪切成细砂样,加入 10 倍体积 0.2% II 型胶原酶消化液,37℃,搅拌、消化 3 h,离心(500 g×5 min),沉淀用 D-hank's 平衡液洗 2 遍,再用含 20%胎牛血清的培养基洗 1 遍,全部接种到 1 个 25 ml 培养瓶中,用含 20%胎牛血清的软骨细胞培养基稀释,37℃、5%CO₂ 培养。细胞长满汇合后,继续培养,直至瓶底形成一肉眼可见的膜状物,用前端弯的细滴管刮除收集,获得固体的组织样细胞团待用。

(2)手术。获得细胞团块当日安排动物体内植入手术。①切取骨膜:麻醉同前,动物双膝剪毛,常规消毒铺单,取左或右膝胫骨上端内侧纵切口,长约 2 cm,切开皮肤和皮下组织。刮除骨膜上纤维组织,用锐利豆刀分离、切取胫骨上端骨膜 6.0 mm×8.0 mm 大小,立即放入生理盐水中。②造缺损模型及细胞回

植:双膝外侧切口,长约 4 cm,切开皮肤和皮下组织,膝关节内侧切开,翻开髌骨,显露股骨髁间软骨,自髁间凹上 4 mm 开始用锐利豆刀刮除软骨,制造一 4.0 mm×6.0 mm 方形缺损,深约 2 mm,植入团块样自体软骨细胞,骨膜覆盖,缝合骨膜于双股骨髁上。术毕冲洗、关闭切口,动物清醒后放回笼中自由活动。将移植后剩余的细胞团继续接种至培养瓶培养。

1.3.2 对照组实验方 法 动物手术方 法同上,软骨缺损单纯骨膜缝合覆盖,没有细胞移植。

1.4 动物取材与标本处理 分别于手术后 1、3、12、24 周空气栓塞处死动物,每取样点每组各 3 只动物,1、3 周标本争取把骨膜和下方结构分开分别取材;12、24 周标本连同软骨下骨和周围正常骨软骨组织取材。标本用 10%甲醛固定 1 周,50%甲酸脱钙,流水冲洗过夜,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,5 μm 切片,分别行 HE、蕃红花 O 染色(光镜下观察)和苦味酸—天狼星红染色(偏振光显微镜观察)。

1.5 观察项目与方 法

1.5.1 细胞培养观察 单层培养生长情况、细胞团形成情况及细胞团内细胞的迁移能力。

1.5.2 大体标本观察 ①关节腔有无感染或积液,缺损区大小、形状、色泽、质地等;②骨膜是否脱落及变化,是否与骨膜下组织粘合;③修复组织与周围界限的整合等。

1.5.3 切片观察 软骨缺损修复情况(修复组织厚度、形态均一性、与软骨下骨及周围交界区整合情况等),修复组织病理(细胞形态、细胞外基质分泌情况、偏振光显微镜观察胶原结构及组分)。

1.5.4 修复组织评估 12、24 周组标本按 Kim 等(1991)制订的软骨修复组织评估标准进行评估,并按 Wakitani 评分进行量化处理(Wakitani, 1994)。

2 结 果

2.1 细胞培养观察 细胞平均在 7~10 d 长满汇合(图 1)。细胞在汇合后培养过程中会自发形成软骨结节(cartilage nodule),继续培养 3~5 d,即可瓶底形成一肉眼可见的膜状物,用前端弯的细滴管刮除收集,即可获得固体的组织样细胞团(图 2)。收获后的细胞团继续接种后,在细胞团周围能放射性地生长大量软骨细胞(图 3),说明细胞团内细胞仍有很强的迁移增殖能力。

2.2 大体标本观察 1 周时,缺损凹陷,骨膜变白、增厚、回缩,骨膜能与其下移植的细胞团分开(骨膜与细胞团块分开取材)(图 4);3 周时,缺损仍凹陷,骨膜进一步增厚,但已经与缺损周围和下方组织成为一体,不易分开(图 5);12 周时缺损完全修复,修

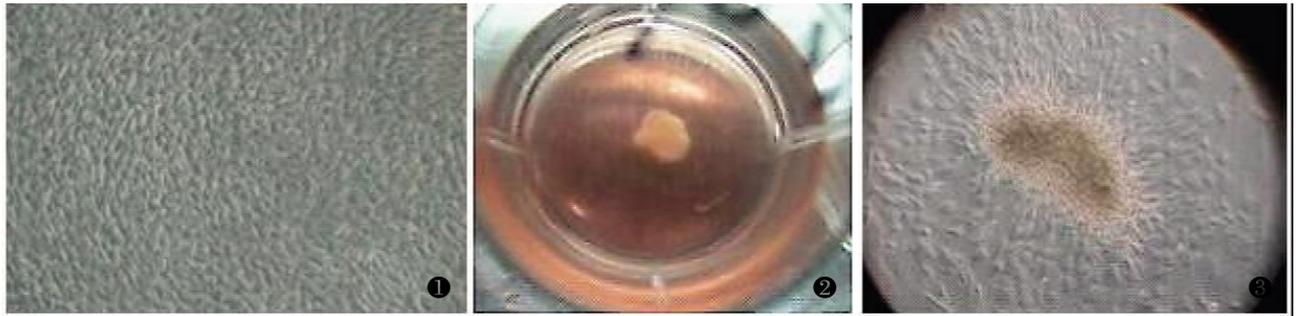


图 1 兔软骨细胞长成肉眼可见的膜状(倒置显微镜,10×10) 图 2 25 cm² 培养瓶单层培养 2 周收集的细胞团(6 孔培养板孔中) 图 3 细胞团块重新培养,细胞从四周放射状地爬出扩增(倒置显微镜,10×10)

Fig.1 Rabbit's articular chondrocytes develop into a film which could be seen by naked eye(Inverted microscope 10×10) Fig.2 Tissue like mass collected from a 25 cm² flask by 2 weeks culture (in 6 well cell culture plate) Fig.3 Cells migrate radially around from the tissue like mass when reculturing of the mass(Inverted microscope 10×10)

复组织与正常软骨一致,非常平整,交界区模糊,质地与正常软骨一致(图 6);24 周时缺损修复进一步改善,修复组织与正常软骨完全整合,非常平整,颜色、质地等与正常软骨一致(图 7)。

2.3 切片观察 1 周时,移植细胞仍以团块样形式存留缺损内,但在关节应力作用下,团块延展,均匀分布于缺损内(图 8);在朝向关节面的一侧,细胞变圆,有类似陷窝形成,细胞周围已经分泌大量蛋白多糖,番红 O 染色强阳性(图 9),aggrecan 免疫组化强阳性(图 10),说明移植的细胞在关节应力环境下,迅速向成熟关节软骨细胞分化修复缺损。3 周时,细胞团与骨膜和周围组织愈合在一起,无法将骨膜或移植细胞团单独取材,细胞进一步向成熟软骨细胞分化,基质更加丰富。12 周时,缺损为类透明软骨组织修复,修复组织内细胞有柱状排列趋势,番红 O 染色强阳性,修复组织与缺损周围关节软骨整合较好,交界区内有细胞迁移修复,软骨厚度与正常软骨一致(图 11),但苦味酸—天狼星红染色偏振光显微镜观察显示,胶原类型为 I 型和 II 型混合(图 12),排列结构与正常透明关节软骨组织(图 13)相差较

大。24 周时,缺损为成熟透明软骨组织修复(图 14),与正常透明软骨一致,细胞柱状排列,基质染强阳性,厚度与正常软骨一致或略薄,与软骨下骨及周围正常软骨整合较好,潮线明显,aggrecan 免疫组化修复组织与正常软骨非常一致,苦味酸—天狼星红染色显示柱状 II 型胶原网架,与周围正常软骨一致(图 15)。

2.4 修复组织评估 (两组第 12、24 周标本综合评分) 12 周和 24 周组标本修复组织评估见表 1,实验组与对照组比较差异有统计学意义,实验组评分低于对照组。

3 讨论

3.1 自体关节软骨细胞研究应用进展 由于软骨内无血管,缺乏未分化的干细胞,软骨细胞被限制在一个由胶原和蛋白多糖组成的致密的陷窝里,因此关节软骨的病变难以自身修复。自体关节软骨细胞移植修复关节软骨缺损已经有 20 多年的临床应用历史,但软骨细胞体外培养传代容易丢失细胞表型(去分化,dedifferentiation)^[1-4],细胞悬液在缺损内容易流失,因此修复效果欠佳。虽然此后采用骨膜移植



图 4 大体标本,细胞团移植后 1 周,缺损凹陷,骨膜能分离 图 5 大体标本,细胞团植入后 3 周,缺损凹陷,骨膜与其下及周围组织愈合在一起 图 6 大体标本,细胞团植入后 12 周,缺损修复平整,交界区整合好 图 7 大体标本,细胞团植入后 24 周,缺损修复良好

Fig.4 Gross view,in the experiment group the defect depressed,periosteum could be separated from the defect in 1 week after chondrocytes mass transplantation Fig.5 Gross view,in the experiment group the defect depressed,periosteum could not be separated from the defect with the surrounding tissues in 3 weeks after implantation Fig.6 Gross view,in the experiment group,the repaired tissue was smooth and integrated well with the surrounding tissues in 12 weeks after implantation Fig.7 Gross view,the defect was repaired perfectly in 24 weeks after implantation

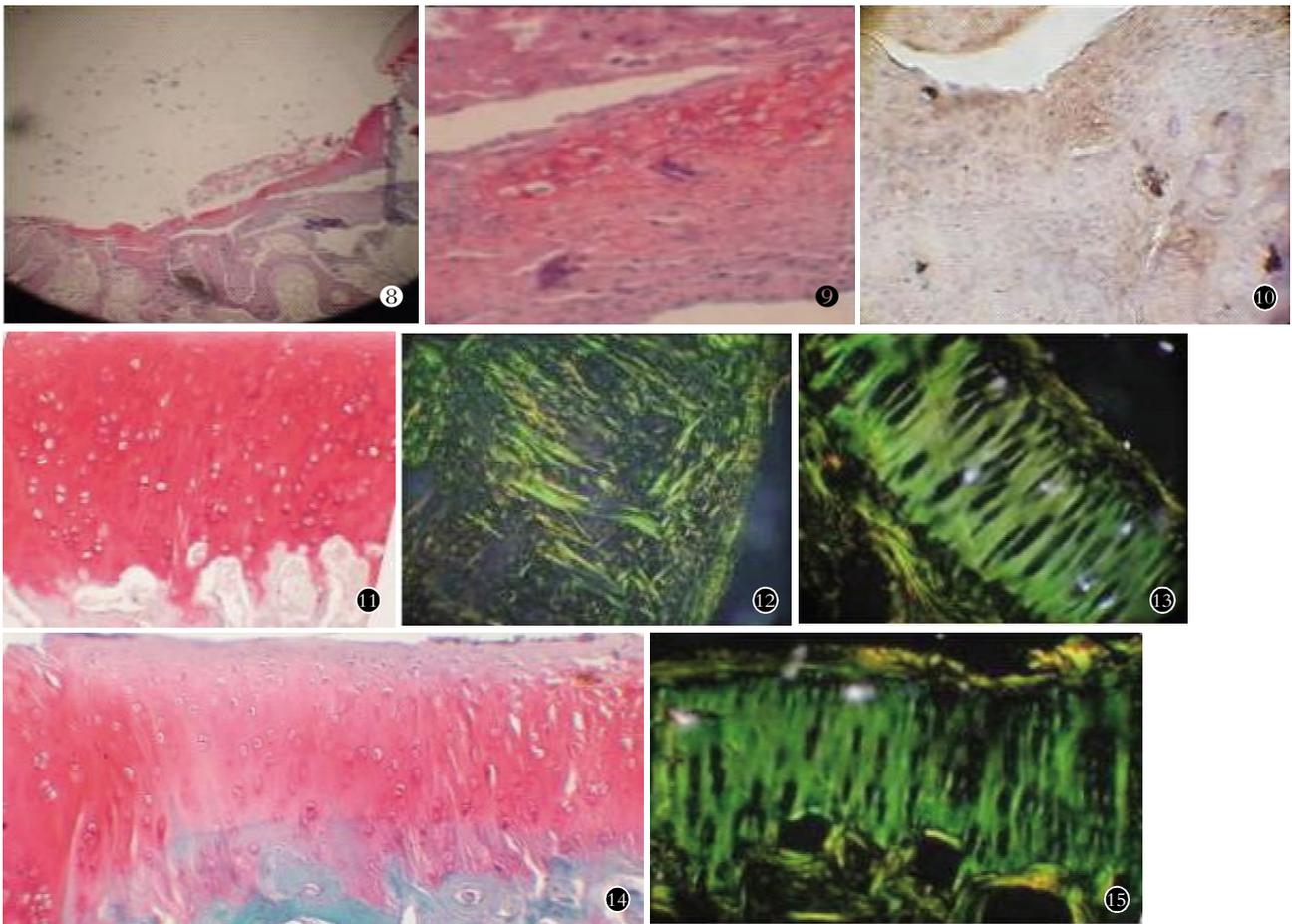


图 8 细胞团块植入缺损内 1 周, 番红 O 染色阳性, 尤其在朝向关节的一侧(骨膜已经单独取材)(光镜, 4×10) **图 9** 第 8 图局部放大, 细胞向成熟软骨细胞分化, 基质沉积(光镜, 10×10) **图 10** 自体软骨细胞团植入 1 周, aggrecan 免疫组化阳性(光镜, 10×10) **图 11** 移植后 12 周, 石蜡切片, 番红 O 染色, 类透明软骨组织修复(光镜, 10×10) **图 12** 苦味酸—天狼星红染色, 偏振光显微镜观察, 移植后 12 周, 胶原为 I 型和 II 型混合 **图 13** 苦味酸—天狼星红染色, 偏振光显微镜观察, 缺损周围正常软骨组织, II 型胶原结构呈“哥特式建筑样结构” **图 14** 移植后 24 周, 石蜡切片, 番红 O 染色, 成熟透明软骨组织修复(光镜, 10×10) **图 15** 苦味酸—天狼星红染色, 偏振光显微镜观察, 移植后 24 周, 胶原为 II 型, 排列接近正常软骨

Fig.8 Paraffin section of the tissue like mass after 1 week implanting. The safranin O staining was positive, particularly in the side toward the joint (periosteum had been draw separately) (Light microscope 4×10) **Fig.9** Zoom in of the local area of the fig.8. The cells differentiated to the mature chondrocytes, and the extracellular matrix deposited (Light microscope 10×10) **Fig.10** One week after implantation, positive staining for aggrecan was observed (Light microscope 10×10) **Fig.11** Twelve weeks after implantation, the safranin O staining was positive and the defect was repaired with hyaline-like cartilage tissue (Light microscope 10×10) **Fig.12** The picosirius red staining of the normal cartilage tissue surrounding the defect showed the architecture of type II collagen was like Gothic architecture (Polarized microscopy 10×10) **Fig.13** Twelve weeks after implantation, the picosirius red staining showed the collagen composition was a composite of type I and type II (Polarized microscopy 10×10) **Fig.14** Twenty-four weeks after implantation, the safranin O staining was positive. The defect was repaired with mature hyaline cartilage tissue (Light microscope 10×10) **Fig.15** Twenty-four weeks after implantation, the picosirius red staining showed the collagen composition was type II and the architecture was like normal cartilage (Polarized microscopy 10×10)

表 1 软骨缺损修复组织 Wakitani 病理评分结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Results of Wakitani scoring of the repaired tissue ($\bar{x} \pm s$)

组别	关节数	细胞形态	基质染色	表面平整度	新生软骨平均厚度	与受区整合	总分
对照组	12	1.62±0.28	2.00±0.36	0.92±0.25	1.15±0.40	0.38±0.13	6.07±1.36
实验组	11	1.18±0.34	0.82±0.22	0.91±0.31	0.55±0.33	0.36±0.15	3.82±1.12 ^{△△}

注: 与对照组比较, ^{△△}P<0.01

Note: Compared to control group, ^{△△}P<0.01

生物蛋白胶 (fibrin glue) 封闭等方法进一步减少细胞从缺损内流失, 但由于关节内应力, 缺损内细胞悬液

仍可能被挤压出缺损, 因此存留缺损内的细胞仍然难以保证。但修复效果与存留的细胞数量是非常相

关的,而且生物胶粘和骨膜难以抵挡缺损处所受的剪切力,骨膜容易脱落,而缝合过密,缝针导致的退行变会加重(Breinan, 1997)。因此本研究所尝试用聚集培养(confluent culture)方法获得固体性的软骨细胞团块移植修复关节软骨缺损,获得了良好的修复效果^[5],但这一修复机制的病理生理过程、移植的细胞团块在动物体内的病理发展变化尚不清楚,而且体外培养扩增的关节软骨细胞移植入体内后的动态病理变化也鲜有报道。

3.2 体外聚集培养细胞团生物学性状与关节软骨缺损修复关系的分析 自体软骨细胞移植修复软骨缺损最关键的问题是存留在缺损内的软骨细胞的质量(维持软骨细胞表型)和数量。从细胞质量分析,由于软骨细胞自分泌生长因子,在聚集培养过程中,局部细胞因子的浓度会大大提高,有利于细胞反分化(redifferentiation)^[6-8],因此细胞表型维持较好,而且细胞分泌的基质也得以保留,从而又促进了细胞与基质之间的信号传导作用,更利于细胞恢复表型。从数量上分析,细胞聚集培养后因自身分泌基质的沉积、合成,将细胞固定在基质网架中,因此细胞在缺损内不会流失,而且这种移植方式远较细胞悬液移植的细胞数量更多,因此缺损修复效果远较自体细胞悬液移植好^[5]。此外,软骨损伤后,缺损周围的软骨细胞会有增殖现象,但由于有致密的基质包裹,增殖的细胞很难迁移出软骨陷窝,因此缺损交界区的愈合、修复组织与周围正常关节软骨和软骨下骨的整合与植入细胞的迁移生长能力相关,细胞生长成团后是否还有迁移能力?本实验将收集的组织样细胞团重新培养,从团块周围放射状的长出大量细胞,说明团块内的细胞仍有良好的迁移能力,12、24周标本交界区的良好整合也说明了这一点。

3.3 自体关节软骨细胞移植后的动态病理变化 虽然自体关节软骨细胞移植已经大量临床应用,但体外培养扩增的关节软骨细胞移植入体内后的动态病理变化鲜有报道。本研究结果显示,移植后1周,移植的细胞团与骨膜尚未愈合一起,在关节应力作用下,团块延展,均匀分布于缺损内,在朝向关节面的一侧,细胞变圆,有类似陷窝形成,细胞周围分泌大量蛋白多糖。说明移植的细胞在关节应力环境下,先从朝向关节面的一侧开始,迅速向成熟关节软骨细胞分化;3周时细胞团与骨膜和周围组织愈合在

一起,细胞进一步向成熟软骨细胞分化,基质更加丰富;12周时缺损已经为类透明软骨组织修复,修复组织与缺损周围关节软骨整合较好,交界区内有细胞迁移修复,基质丰富,胶原为Ⅱ型,但结构尚紊乱,与正常透明关节软骨组织的穹隆样柱状结构“哥特式建筑样结构”相差仍较大;24周时修复组织已经较为成熟,与正常透明软骨一致,潮线明显,细胞柱状排列,基质更加丰富,与软骨下骨及周围正常软骨整合较好,大部分标本柱状Ⅱ型胶原网架与周围正常软骨较为一致,但部分标本Ⅱ型胶原的排列仍与成熟软骨组织有差别,说明修复组织的完全塑形需要6个月或更长时间。

关节软骨细胞体外聚集培养形成的细胞团块内的细胞有迁移生长能力;细胞团块移植方法植入的细胞数量大,表型好,细胞在缺损内不会流失;关节软骨缺损修复是由植入的细胞团块生长分化而来;细胞团块植入关节缺损后,在关节应力的影响下,先从朝向关节面的一侧逐渐发生细胞成熟分化和软骨基质产生,逐渐完成缺损的修复;在兔动物模型,修复组织塑形需要6个月或更长时间。

参考文献

- [1] Schulze-Tanzil G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair[J]. *Ann Anat*, 2009, 191(4): 325-338.
- [2] Courmil - Henrionnet C, Huselstein C, Wang Y, et al. Phenotypic analysis of cell surface markers and gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion[J]. *Biorheology*, 2008, 45(3-4): 513-526.
- [3] 张宇明, 卫小春. 兔关节软骨细胞体外培养的生物学特性及中药黄芪对其的影响[J]. *中国骨伤*, 2005, 18(5): 275-277.
- [4] 黄正, 傅文彧, 冯伟, 等. 循环静水压力对维持兔软骨细胞表型的影响[J]. *中国骨伤*, 2007, 20(3): 180-183.
- [5] 余方圆, 卢世璧, 黄利虹, 等. 自体软骨细胞团块植入修复陈旧性兔关节软骨缺损的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2009, 11(2): 56-61.
- [6] Takahashi T, Ogasawara T, Asawa Y, et al. Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(7): 1583-1592.
- [7] 余方圆, 卢世璧, 袁玫, 等. 兔关节软骨细胞聚集培养的生物学形状观察[J]. *中华外科杂志*, 2006, 44(12): 848-851.
- [8] 余方圆, 卢世璧, 赵斌, 等. 去分化关节软骨细胞生物反应器培养反分化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(8): 840-844.

(收稿日期:2009-12-25 本文编辑:王宏)