

· 基础研究 ·

兔脂肪间充质干细胞膜片促进关节软骨损伤修复

贾海栋, 李毅*

(邯郸市中心医院, 河北邯郸 056000)

摘要: [目的] 探讨兔脂肪间充质干细胞膜片对兔关节软骨损伤的修复作用。[方法] 体外分离培养兔脂肪间充质干细胞, 通过多系分化对细胞进行鉴定。通过化学方法构建兔脂肪间充质干细胞膜片(添加 50 $\mu\text{g/ml}$ 抗坏血酸), 膜片构建成功后对其进行检测: 分别在倒置相差显微镜下观察膜片的结构, 大体观以及扫描电镜观察。制备兔膝关节骨软骨缺损模型(直径为 3.5 mm, 深度为 3 mm), 然后将实验分为两组: 对照组和细胞膜片组。术后 3 个月取标本进行检测, 观察软骨的修复情况。[结果] 原代兔脂肪间充质干细胞呈短梭形、三角形贴壁生长, 经过传代培养后细胞逐渐呈涡旋状生长, 第 3 代兔脂肪间充质干细胞具有多系分化能力; 兔脂肪间充质干细胞膜片具有多层结构, 细胞分泌大量的细胞外基质, 将细胞镶嵌在其中。术后 3 个月取标本观察检测提示: 细胞膜片组骨软骨缺损处可见大量新生的软骨组织再生, 新生的软骨组织形态和颜色均接近于正常软骨; 而对照组几乎没有新生软骨的形成。O' Driscoll 评分结果也显示细胞膜片组的评分明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] 兔脂肪间充质干细胞膜片能够促进兔关节软骨的再生, 为临床软骨损伤的修复提供了新的思路。

关键词: 脂肪间充质干细胞膜片, 关节软骨, 组织工程

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 16-1497-06

Adipose-derived mesenchymal stem cell sheet for promoting the repair of articular cartilage defect in rabbit // JIA Haidong, LI Yi. Central Hospital of Handan City, Handan 056000, China

Abstract: [Objective] To explore the repair effect of adipose-derived mesenchymal stem cell sheet on articular cartilage defect in rabbit. [Methods] In vitro, rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells were isolated and cultured, and then were identified by multi-line differentiation. Subsequently, the adipose-derived mesenchymal stem cell sheet was constructed by chemical method with adding 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid. The sheet structure of the cell was investigated by inverted phase contrast microscope, in addition, the gross observation and scanning electron microscope. In vivo, the osteochondral defect models with 3.5mm in diameter and 3mm in depth was prepared on the femoral condyles in rabbits, and divided into two groups, the blank control group and cell sheet group with a cell sheet implanted on the defect. Three months later, specimens were harvested for gross evaluation and histological observation. [Results] In vitro, the primary rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells grew adherently in a short spindle shape and triangle shape. After subculture, the cells gradually grew in a vortex shape. The third-generation rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells had multi-lineage differentiation capacity. The rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells sheet had a multi-layer structure, and the cells secreted a large amount of extracellular matrix, with cells embedded in it. In vivo, the osteochondral defect had a large amount of new cartilage tissue regenerated in the cell sheet group at 3 months after implantation, which looked like normal cartilage in shape and color, whereas no new cartilage was seen in the blank control group. The cell sheet group was marked significantly higher O' Driscoll score than the blank control group ($P < 0.05$). [Conclusion] This adipose-derived mesenchymal stem cell sheet does promote the articular cartilage regeneration in rabbit, which might provide a new idea for the repair of cartilage damage in clinical setting.

Key words: adipose-derived mesenchymal stem cell sheet, articular cartilage, tissue engineering

软骨主要分布在长骨的末端, 具有重要的生理作用: 能够缓冲压力、承受力学负荷^[1]。其中, 关节软骨由丰富的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 及少量的软骨细胞构成, 细胞外基质的主要成分是蛋

白聚糖和 II 型胶原^[2]。关节软骨损伤后, 软骨细胞很难自发地从软骨陷窝中迁移到软骨损伤处进行损伤后的自我修复, 因此, 关节软骨损伤后很难自我修复。如果没有得到早期有效、系统的干预和治疗, 关

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.16.12

作者简介: 贾海栋, 主治医师, 硕士学位, 研究方向: 骨与软骨的基础研究, (电话)13831033381, (电子信箱)818637@qq.com

* 通信作者: 李毅, (电话)0310-2112580, (电子信箱)384739850@qq.com

节软骨损伤可能导致非常严重的后遗症^[3]。其中,骨性关节炎(osteoarthritis)是关节软骨损伤后严重的晚期并发症,其主要症状是关节的疼痛^[4]。因此,早期有效的治疗具有重大的意义。目前临床上用于治疗软骨损伤的方法有很多,保守治疗、关节镜下清理、骨髓刺激、骨软骨移植、应用新型生物材料等。但是,每种治疗方法都存在一定的局限性,很难在临床上广泛应用。

细胞膜片技术最早是由 Yamada 等^[5]在 1990 年首次提出,该技术利用温敏型聚合物-聚 N 异丙基丙烯酰胺(polyN-isopropylacrylamide, PNIPAm)对培养基进行特殊处理,不需要使用胰酶对细胞进行消化处理即可获取完整的细胞膜片,可应用于组织工程的构建。细胞膜片技术不需要胰酶的处理即可获得种子细胞及完整的细胞膜片,因此保留了大量的细胞外基质及细胞间的各种生长因子。细胞外基质是细胞生长、迁徙、分化非常重要的微环境,因此,细胞膜片技术应用于体内具有较好的适应性。目前制备细胞膜片的方法有很多,包括:电反应系统、磁反应系统、光反应系统、PH 系统等,但均存在一定局限性:电反应系统的涂层材料对细胞的粘附生长有一定的影响^[6];磁反应系统通常只能形成多层结构的细胞膜片^[7];光反应系统所形成的细胞膜片存在分离困难的问题^[8];PH 系统对细胞有一定的损伤作用,形成的膜片同样存在分离困难的问题^[9]。化学反应系统具有操作简单、价格低廉的优势,同时,其形成的细胞膜片通过简单的物理方法即可分离^[10],因此得到了广泛的应用。目前应用于细胞膜片技术的种子细胞也很多,包括:骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、牙周膜干细胞等^[11-14]。

目前细胞膜片技术已经广泛应用于各个研究领域,包括:心脏、角膜的损伤修复^[15, 16]。但是其在软骨损伤修复中的研究还不多,因此,本研究采用脂肪间充质干细胞作为种子细胞来构建细胞膜片,探讨其是否能够促进兔关节软骨损伤后的修复,旨在为骨软骨缺损修复提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

健康成年的新西兰大白兔 14 只(2 只用于细胞的提取,12 只用于体内实验),体重约 2.5~3.0 kg,雄性。倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);超净工作台(北京冠鹏

净化设备公司);CO₂恒温箱(美国 Thermo Scientific 公司);DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);I 型胶原酶(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);青霉素/链霉素(索莱宝公司);双抗(索莱宝公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)。

1.2 体外实验

1.2.1 兔脂肪间充质干细胞的分离培养

新西兰大白兔按 0.75 ml/kg、3%戊巴比妥钠进行麻醉。于腹部备皮、消毒,切开皮肤及皮下组织。切取腹部脂肪组织放入含有双抗的 PBS 中,将脂肪组织用无菌 PBS 反复冲洗并充分剪碎,然后加入 0.1%的 I 型胶原酶,37℃水浴摇床消化约 40 min。充分消化后加入等体积的 DMEM/F12 培养基终止消化,1 000 r/min,离心 5 min。离心完成后弃上层组织,200 目筛网过滤。再次离心后,DMEM/F12 培养基重悬,然后接种到 T75 培养瓶中,5%CO₂、37℃孵箱中培养。24 h 后镜下观察细胞的形态,每 2~3 d 换 1 次培养液。待细胞长到约 80%~90%时进行传代培养,显微镜下观察细胞的形态并拍照记录。

1.2.2 兔脂肪间充质干细胞的鉴定

取第 3 代兔脂肪间充质干细胞接种到六孔板,等到细胞长到约 70%~80%时,弃掉原来的培养基,用无菌的 PBS 清洗 2 次,然后将培养基分别更换为成骨诱导培养基和软骨诱导培养基;对照组仍然继续用原来的基础培养基培养,每隔 2~3 d 换液 1 次。诱导 14 d 后吸掉原培养基,4%多聚甲醛固定约 30 min, PBS 洗 3 次,然后分别加入碱性磷酸酶溶液、茜素红染液和甲苯胺蓝染色液染色。染色后用 PBS 冲洗,然后在光学显微镜下观察并拍照。

1.2.3 细胞膜片的构建

取第 3 代脂肪间充质干细胞,以 2×10^5 个/cm²的密度接种到 6 孔板内,常规培养至细胞铺满六孔板至 80%~90%时,更换为成膜片诱导培养基(10%血清,1%双抗,50 μg/ml 抗坏血酸的 DMEM 培养基)连续培养,每隔 2~3 d 换液 1 次。连续培养 14 d 后,在六孔板底部可见一层白色的膜片样物质形成。将已经诱导形成膜片的六孔板放于 37℃、水浴摇床中以 45 r/min 的速度进行震荡 25 min,然后用显微镊子沿六孔板边缘划一圈使膜片边缘与六孔板分离,最后用细胞刮刀沿六孔板底部将膜片轻轻刮起,获得完整的细胞膜片。

1.2.4 扫描电镜检测细胞膜片

随机选取培养状态良好的脂肪间充质干细胞膜片,用 PBS 将其清洗 2 次,每次 5 min;然后用 2.5%戊二醛固定,固定后用生理盐水清洗 2 次,每次 5

min; 梯度浓度的乙醇(从低浓度到高浓度)逐级脱水各1次, 每次5 min; 然后用叔丁醇从低浓度到高浓度各清洗1次, 每次5 min; 最后将样品喷金, 扫描电镜下观察并拍照。

1.3 体内实验

1.3.1 动物手术处理

将新西兰大白兔常规麻醉(0.75 ml/kg、3%戊巴比妥钠静脉注射), 在兔右膝关节处消毒铺巾、逐层切开皮肤、打开关节囊后充分暴露关节腔。将髌骨外脱位, 使用口腔钻在股骨滑车处制作直径3.5 mm、深3 mm的骨软骨缺损模型。然后将实验分为两组, 分别为对照组(n=6)和细胞膜片组(n=6)。对照组骨软骨缺损处未作特殊处理, 细胞膜片组将制备好的脂肪间充质干细胞膜片移植到缺损处, 然后复位髌骨, 逐层缝合切口并将切口再次消毒。术后连续7 d 静脉注射青霉素预防术后感染(20万 U/只)。术后3个月将兔子用过量的戊巴比妥钠处死, 然后将股骨及远端取下进行后续检测。

1.3.2 大体观和大体评分

将取下的标本用剪刀及刀片去除多余的组织, 用生理盐水清洗去除血渍, 进行大体观察并拍照。然后

进行大体评分, 主要参照O'Driscoll评分法进行评分。

1.3.3 组织学检测

将标本取下后立即用4%的多聚甲醛室温固定24 h, 用含有EDTA的脱钙液脱钙约14 d。将标本脱水处理, 石蜡包埋后切片。然后进行HE、番红固绿以及II型胶原免疫组化染色甲苯胺蓝观察缺损处的修复情况。

1.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 7.0 统计软件对数据进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔脂肪间充质干细胞的形态

倒置相差显微镜下观察兔脂肪间充质干细胞, 可见原代细胞呈贴壁生长, 含有少量的杂细胞。散在分布, 形态不一, 呈短梭形、三角形或多边形生长。当细胞传代至第3代, 细胞均匀分布, 呈典型的涡旋状贴壁生长(图1)。

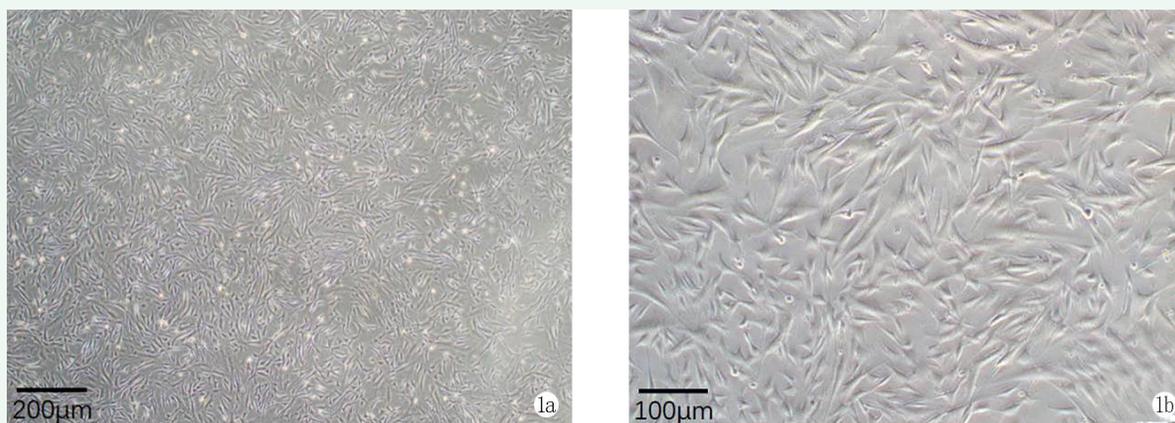


图1 兔脂肪间充质干细胞的形态 1a: 40倍镜下第3代兔脂肪间充质干细胞的细胞形态, 呈涡旋状贴壁生长, 细胞分布均匀, 形态规则 1b: 100倍镜下第3代兔脂肪间充质干细胞的细胞形态

2.2 兔脂肪间充质干细胞的鉴定

兔脂肪间充质干细胞成骨诱导后, 细胞体积增大, 随着诱导时间的延长逐渐形成圆形的矿化结节, 碱性磷酸酶染色呈阳性(图2a), 茜素红染色后可见红色沉淀(图2b)。成软骨诱导后, 细胞的形态逐渐由长梭形变为圆形和椭圆形, 甲苯胺蓝染色结果呈阳性(图2c)。

2.3 细胞膜片的构建及检测

第3代兔脂肪间充质干细胞成膜片诱导14 d

后, 六孔板底部可明显看到一层厚薄均匀的白色细胞膜片, 用细胞刮轻轻将膜片的周边刮起, 可以将膜片折叠成一定的形状(图3a)。倒置相差显微镜下观察可见细胞呈长梭形紧密排列, 排列均匀整齐, 纵横交错(图3b)。扫描电镜观察发现兔脂肪间充质干细胞膜片呈多层结构, 细胞呈长梭形排列, 细胞分泌大量的细胞外基质, 细胞外基质之间相互融合, 将细胞镶嵌在细胞外基质中(图3c)。

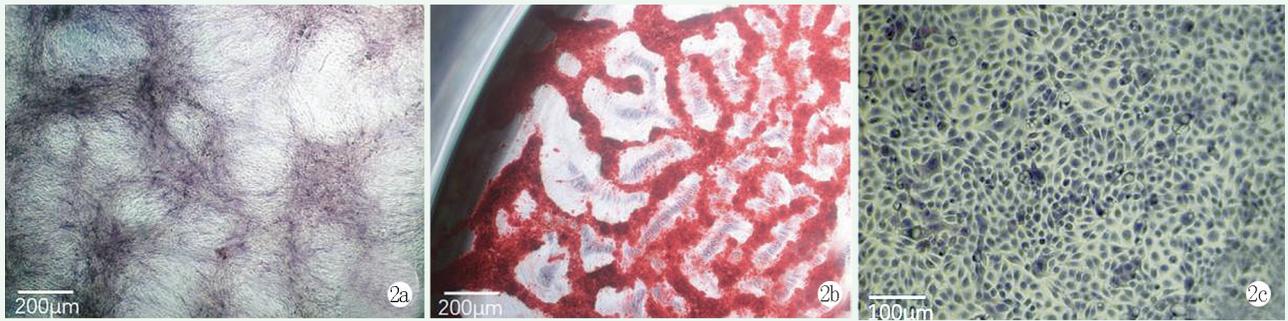


图2 兔脂肪间充质干细胞的鉴定 2a: 兔脂肪间充质干细胞成骨诱导后碱性磷酸酶染色 2b: 兔脂肪间充质干细胞成骨诱导后茜素红染色 2c: 兔脂肪间充质干细胞成软骨诱导后甲苯胺蓝染色



图3 兔脂肪间充质干细胞膜片的大体观和微观结构 3a: 兔脂肪间充质干细胞膜片的镜下观 3b: 兔脂肪间充质干细胞膜片的大体结构 3c: 兔脂肪间充质干细胞膜片的扫描电镜观察结果

2.4 体内实验的大体观察

体内实验模型的制备及处理见图4。术后3个月取标本进行大体观及O'Driscoll评分。术后所有兔子均未出现感染及死亡的情况，也未发生其他并发症。对照组骨软骨缺损处可见明显的缺口，虽然有再生组织的填充，但是缺损仍然比较明显，与周围的正常组织存在明显的界限，缺损部位的颜色和光泽与正常组织存在明显差异（图5a）。细胞膜片

组可见再生的组织填满整个缺损部位，未见明显的骨软骨缺损。同时，再生的软骨组织与周围的正常软骨之间未见明显的界限，与周围正常组织连接较好，颜色接近于正常软骨，表面规则且光滑（图5b）。O'Driscoll评分结果显示细胞膜片组的评分明显高于对照组（图5c），差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），说明脂肪间充质干细胞膜片具有促进软骨修复的作用。



图4 体内动物实验操作过程 4a: 暴露膝关节关节腔 4b, 4c: 制备直径为3.5 mm、深度为3 mm的骨软骨缺损模型

2.5 组织学检测

术后3个月将标本进行常规切片，然后进行HE、番红固绿、II型胶原免疫组化染色。HE染色结果显示：对照组可见明显的缺口，几乎很少的再生组织，骨软骨缺损处与周围正常的软骨组织存在

明显的界限（图6a）；番红固绿染色结果提示：对照组骨软骨缺损处番红固绿染色呈阴性，有明显的缺损存在（图6b）；对照组II型胶原免疫组化染色结果呈阴性，说明几乎没有新生软骨的产生（图6c）。细胞膜片组HE染色结果显示：新生的软骨组

织几乎填充整个缺损处，其表面光滑，颜色与正常的软骨组织相似，新生的软骨组织形态规则（图

6b）；细胞膜片组番红固绿染色和II型胶原免疫组化染色结果均呈阳性（图6e, 6f）。



图5 术后3个月大体观和大体评分 5a: 术后3个月对照组大体观 5b: 术后3个月细胞膜片组大体观 5c: 术后3个月两组的O' Driscoll评分结果

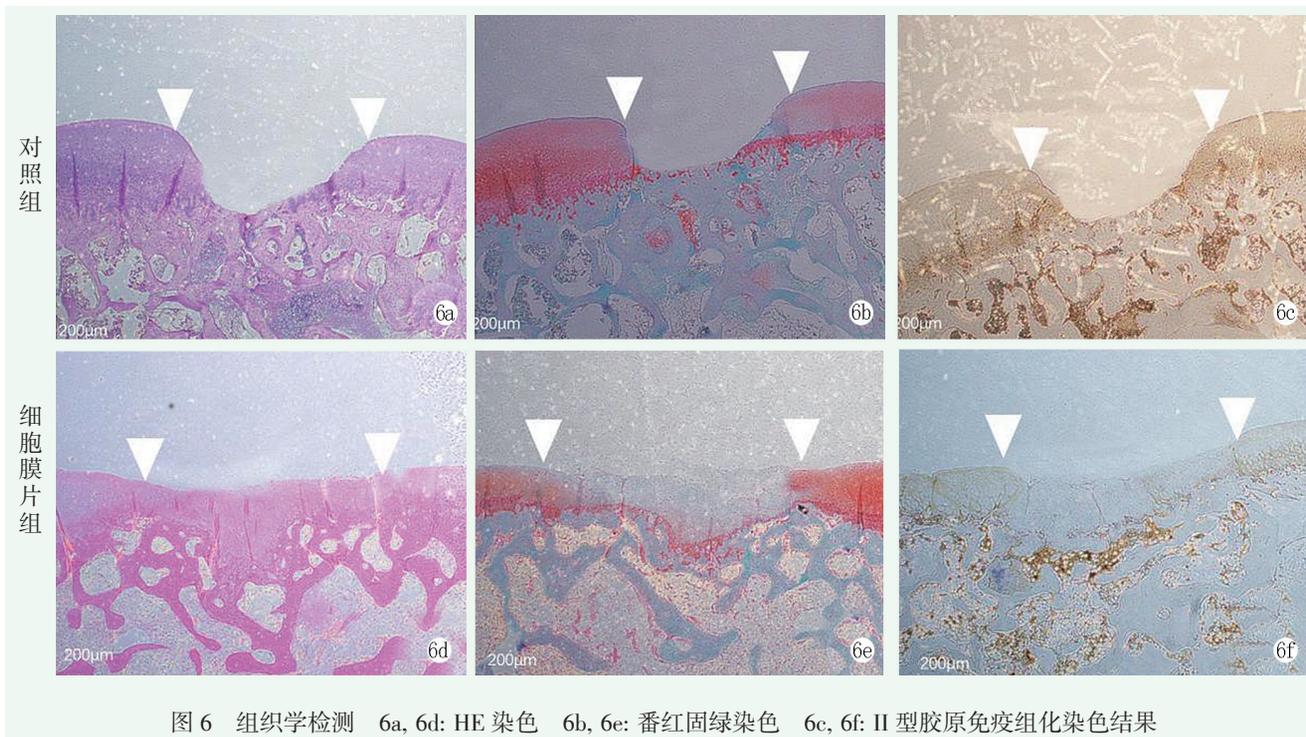


图6 组织学检测 6a, 6d: HE染色 6b, 6e: 番红固绿染色 6c, 6f: II型胶原免疫组化染色结果

3 讨论

关节软骨损伤是临床常见疾病，主要由关节严重的创伤、感染或退行性疾病引起。由于软骨无血管结构，因此，损伤后的软骨难以自我修复，常需要借助外界干预才能到达修复的效果。但是，目前临床上尚无治疗软骨损伤的金标准，各种治疗方案虽然能够在一定程度上缓解症状、改善关节功能，但是，目前还不能达到完全修复的效果，再生的软骨组织与正常的软骨还存在一定的差距。相关文献报告提示：细胞外

基质能够招募大量的内源性干细胞并到达损伤部位，从而加速组织损伤的修复进程。关节软骨周围的细胞外基质同样具有重要的作用，其对关节周围细胞的增殖、分化和迁移具有重要的调节作用。此外，关节周围的细胞外基质对软骨细胞有一定的营养作用，能够为关节软骨提供一定的营养成分。因此，关节周围的细胞外基质对关节软骨损伤后的修复具有重要的作用。

细胞膜片技术是一种有效的获取细胞外基质的方法，其不经过胰酶的处理，保留了完整的细胞外基质，同时还能促进细胞分泌大量的细胞外基质，使细

胞能生存在近似于原来生存的微环境。目前用于制备细胞膜片的方法有很多,本研究采用的是化学方法制备细胞膜片,即:添加 50 $\mu\text{g/ml}$ 抗坏血酸,通过该方法能够刺激细胞分泌大量的细胞外基质,抗坏血酸加入后 14 d 可以看到在培养皿的底部有完整的细胞膜片的形成。该方法具有操作简单方便,价格成本低等优势。

该研究首先分离培养了兔脂肪间充质干细胞,然后将细胞传代培养后并对细胞进行鉴定,证实该细胞能够多系分化。然后,用兔脂肪间充质干细胞作为种子细胞,采用化学方法制备细胞膜片。膜片诱导后,通过大体观和扫描电镜观察检测膜片的结构,该膜片具有多层结构,细胞分泌了大量的细胞外基质。其分泌的细胞外基质为细胞的粘附、增殖、分化提供了良好的微环境,具有一定的修复效果。体内通过制备兔膝关节软骨损伤模型,观察细胞膜片技术对损伤后的关节软骨的修复作用。该模型是目前应用比较广泛的用于研究和观察关节软骨损伤的模型,制备简单。术后 3 个月取标本进行相应的检测发现:细胞膜片组有大量的新生软骨的形成,且新生软骨形状、颜色都接近于正常的关节软骨,而对照组几乎很难观察到再生的软骨。说明细胞膜片具有促进兔关节软骨损伤修复的作用,为临床治疗软骨损伤提供了新的思路 and 方向。

本研究不足之处:(1)仅选用了 1 个时间截点(3 个月)观察软骨损伤后的修复情况。由于软骨损伤后的修复是渐变动态的过程,不同时间阶段修复效果不同,需要多时间点的连续观察,因此,后续还需要进一步的研究来观察不同时间点、不同处理条件下关节软骨的修复情况;(2)本研究选用的实验动物是兔子,与人的关节存在一定的差异。因此,以后需要尽量选择关节结构与人类接近的大动物来观察关节软骨的修复情况;(3)本研究的体内观察指标主要是组织学检测,未进行影像学观察。临床上评估患者软骨损伤的修复情况主要是通过影像学 and 体格检测,因此,后续实验还需要更进一步的影像学检查来观察关节软骨的修复情况。

本研究证实,细胞膜片能够促进兔关节软骨损伤修复,具有很大的应用前景,为临床治疗软骨损伤提供了新的思路 and 方向。

参考文献

[1] Kontturi LS, Jarvinen E, Muhonen V, et al. An injectable, in situ forming type II collagen/hyaluronic acid hydrogel vehicle for chon-

drocyte delivery in cartilage tissue engineering [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2014, 4 (2): 149-158.

[2] Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage [J]. *Biomaterials*, 2000, 21 (5): 431-440.

[3] Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair [J]. *Acta Orthop Belg*, 2011, 77 (6): 709-726.

[4] Montgomery SR, Foster BD, Ngo SS, et al. Trends in the surgical treatment of articular cartilage defects of the knee in the United States [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2014, 22 (9): 2070-2075.

[5] Yamada N, Okano T, Sakai H, et al. Thermo-responsive polymeric surfaces control of attachment and detachment of cultured cells [J]. *Macromol Rapid Commun*, 1990, 11 (11): 571-576.

[6] Guillaume-Gentil O, Gabi M, Zenobi-Wong M, et al. Electrochemically switchable platform for the micro-patterning and release of heterotypic cell sheets [J]. *Biomed Microdev*, 2011, 13 (1): 221-230.

[7] Ishii M, Shibata R, Numaguchi Y, et al. Enhanced angiogenesis by transplantation of mesenchymal stem cell sheet created by a novel magnetic tissue engineering method [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31 (10): 2210-2215.

[8] Hong Y, Yu M, Weng W, et al. Light-induced cell detachment for cell sheet technology [J]. *Biomaterial*, 2013, 34 (1): 11-18.

[9] Chen YH, Chung YC, Wang IJ, et al. Control of cell attachment on PH-responsive chitosan surface by precise adjust of medium PH [J]. *Biomaterials*, 2012, 33 (5): 1336-1342.

[10] Fan XJ, Liao XZ, Tian Y, et al. A prevascularized nerve conduit based on a stem cell sheet effectively promotes the repair of transected spinal cord injury [J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 101 (2): 304-313.

[11] Wu PH, Chung HY, Wang JH, et al. Amniotic membrane and adipose-derived stem cell co-culture system enhances bone regeneration in a rat periodontal defect model [J]. *J Formos Med Assoc*, 2016, 115 (3): 186-194.

[12] Long T, Zhu Z, Awad HA, et al. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice [J]. *Biomaterials*, 2014, 35 (9): 2752-2759.

[13] Wei F, Qu C, Song T, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity [J]. *Cell Physiol*, 2012, 227 (9): 3216-3224.

[14] Wei F, Song T, Ding G, et al. Functional tooth restoration by allogeneic mesenchymal stem cell-based bio-root regeneration in swine [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22 (12): 1752-1762.

[15] Seto Y, Inaba R, Okuyama T, et al. Engineering of capillary-like structures in tissue constructs by electrochemical detachment of cells [J]. *Biomaterials*, 2010, 31 (8): 2209-2215.

[16] Ito A, Hayashida M, Honda H, et al. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10 (5-6): 873-880.

(收稿:2021-08-26 修回:2022-05-30)

(同行评议专家:刘曦明)

(本文编辑:宁桦)