

机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001848

透明质酸钠结合尿源性干细胞修复 创伤性软骨缺损的实验研究

王远政, 陈 龙, 余荣峰, 戴 涛, 张 一

(贵州省人民医院骨科, 贵阳 550002)

【摘要】目的:透明质酸钠复合尿源性干细胞复合溶液体系对比格犬膝关节软骨缺损动物模型进行关节腔注射治疗, 观察其关节软骨修复效果。**方法:**应用离心贴壁法从健康成人尿液中分离提取出尿源性干细胞, 进行原代及传代细胞培养, 并行表面标志物及多向分化潜能鉴定。选用透明质酸钠作为细胞载体材料, 将其与第 4 代尿源性干细胞混合制成细胞混悬液。将 12 只比格犬建立膝关节股骨内、外髁直径 5 mm 的软骨全层缺损动物模型, 造模成功 3 周后随机平均分为 3 组, 分别为透明质酸钠细胞悬液治疗组、透明质酸钠治疗组和生理盐水空白对照组, 按分组相应行膝关节注射。注射后 12 周处死取材, 取大体标本观察软骨缺损处形态变化, 标本切片后进行 HE 染色和甲苯胺蓝染色评价膝关节软骨修复效果。**结果:**治疗后 12 周, 透明质酸钠细胞悬液治疗组的膝关节软骨缺损修复效果明显优于透明质酸钠治疗组及生理盐水空白对照组, 大体标本可见透明质酸钠细胞悬液组软骨缺损区基本被软骨样组织填满, 具有光滑的表面。切片 HE 染色和甲苯胺蓝染色显示相比较于其他两组, 其缺损部位软骨细胞呈柱状排列, 透明样软骨组织覆盖良好, 与相邻边缘软骨组织完全整合, 但软骨厚度较周围正常软骨组织稍薄。**结论:**透明质酸钠复合尿源性干细胞溶液体系对关节软骨缺损具有明显的修复作用, 为一种新的软骨缺损治疗方案提供实验学依据。

【关键词】尿源性干细胞; 透明质酸钠; 软骨缺损; 组织工程

【中图分类号】R816.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-04-24

Sodium hyaluronate combined with human urine-derived stem cells in repairing traumatic cartilage defect: an experimental study

Wang Yuanzheng, Chen Long, She Rongfeng, Dai Tao, Zhang Yi

(Department of Orthopaedics, Guizhou Provincial People's Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of a complex solution system of sodium hyaluronate and human urine-derived stem cells (hUSCs) in repairing articular cartilage by intra-articular injection in beagles with knee cartilage defect. **Methods:** The centrifugation and adherence method was used to isolate hUSCs from fresh urine of healthy adults, and primary cell culture and subculture were performed. Surface markers and multipotential differentiation were identified. Sodium hyaluronate was used as a cell carrier and mixed with the fourth-generation hUSCs to prepare cell suspension. A total of 12 beagles were used to establish a model of full-thickness cartilage defect with a diameter of 5 mm at the medial and lateral epicondyles of the femur in the knee joint. At 3 weeks after the model being established, the beagles were equally and randomly divided into sodium hyaluronate cell suspension treatment group, sodium hyaluronate treatment group, and normal saline blank control group, and injection into the knee joint was performed accordingly. The beagles were sacrificed at 12 weeks after injection, and related samples were collected. Gross specimens were used to observe the morphological changes of cartilage defect, and HE staining and toluidine blue staining were performed for sections to evaluate the repair of knee cartilage. **Results:** At 12 weeks after treatment, the sodium hyaluronate cell suspension treatment group had a significantly better improvement in knee cartilage defect than the sodium hyaluronate treatment group and the normal saline blank control group, and gross evaluation showed that in the sodium hyaluronate cell suspension treatment group, the area of cartilage defect was almost filled with newly formed cartilage-like tissue and had a smooth surface. HE staining and toluidine blue staining of sections showed that compared with the sodium

作者介绍: 王远政, Email: wangyuanzheng1978@163.com,

研究方向: 创伤骨科。

通信作者: 张 一, Email: 616442750@qq.com。

基金项目: 贵州省高层次创新型人才千人计划资助项目 (编号: GZSYQCC[2015]002); 贵州省人民医院博士基金资助项目 (编号: GZSYBS[2017] 04)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180929.1339.014.html>
(2018-09-29)

nificantly better improvement in knee cartilage defect than the sodium hyaluronate treatment group and the normal saline blank control group, and gross evaluation showed that in the sodium hyaluronate cell suspension treatment group, the area of cartilage defect was almost filled with newly formed cartilage-like tissue and had a smooth surface. HE staining and toluidine blue staining of sections showed that compared with the sodium

hyaluronate treatment group and the normal saline blank control group, the sodium hyaluronate cell suspension treatment group had the columnar arrangement of cartilage cells and good coverage of hyaline cartilage tissue in the area of defect, which was fully integrated with the adjacent cartilage tissue and was slightly thinner than the adjacent normal cartilage tissue. **Conclusion:** The complex solution system of sodium hyaluronate and hUSCs has a marked effect in repairing articular cartilage defect, which provides an experimental basis for a new treatment regimen for cartilage defect.

【Key words】human urine-derived stem cell; sodium hyaluronate; cartilage defect; tissue engineering

创伤引起的关节软骨缺损在临床上多见,但由于其自身中不含神经、血管及淋巴组织,自我修复能力极差,因此一直是临床治疗的难题。近年来随着组织工程技术飞速发展,采用组织工程学方法构建软骨复合组织已成为治疗软骨损伤的一种新手段,但软骨种子细胞缺乏仍然是限制其进步发展的关键问题。

尿源性干细胞是一种多能成体干细胞,来源于尿液,相比于其他类型的成体干细胞,尿源性干细胞主要表现出下列优势:便于取材、安全、花费少、可重复取材、无创性,且表现出多向分化功效,能够分化成各种类型的细胞,并继续维持其生物有效性及安全性^[1-2]。目前研究提示尿源性干细胞很可能来源于肾脏皮质组织^[1,3]。与其他成体干细胞相比,上述优点使得尿源性干细胞可作为干细胞诊疗和组织细胞学相关研究中的重要种子细胞^[4]。透明质酸是无硫酸基的蛋白多糖,系软骨细胞外基质的关键组成要素。透明质酸具有较高的孔隙率,提升了其空间及表面积,便于粘附细胞。此外,透明质酸还有助于细胞外基质的沉积(如胶原、蛋白多糖等),便于输入气体及营养物质,输出代谢物质,是软骨组织工程优良的支架材料^[5-7]。

本研究拟应用透明质酸钠复合尿源性干细胞进行关节腔注射,探索其修复效果及尿源性干细胞作为软骨组织工程种子细胞的可能性,为临床中创伤引起的软骨缺损性疾病提供一种可能的治疗手段。

1 材料与方法

1.1 尿源性干细胞的分离、培养及鉴定

根据 Zhang^[8]和 Chen^[9]等的分离培养方法,尿源取样于 5 名平均年龄 25 岁(23~27 岁)的健康青年男性,每次取样 200 mL;于取样尿液中加入 1%双抗(青霉素及链霉素)混匀后转移至 50 mL 离心管于 1 500 r/min 离心 10 min。弃上清

液,余底部 1 mL 液体;加入含 1%双抗的无菌 PBS 25 mL 混匀,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液余少于 1 mL 管底部液体,加入 5 mL 配置好的尿源性干细胞培养基,混匀后移至 6 孔板内,置于细胞孵箱中培养;7 d 后更换 1 次培养基,此后每周更换 2 次培养基;待原代细胞融合达到 80%~90%后,传代至 T25 培养瓶中,置于细胞孵箱中培养,随后每 2~3 d 更换培养基。取第 4 代细胞,应用流式细胞学技术对其表面标志物进行鉴定;分别行成骨、成脂及成软骨诱导培养,采用茜素红、油红 O 及甲苯胺蓝染色对其诱导培养后的细胞进行染色鉴定。

1.2 比格犬膝关节软骨缺损模型建立

取成年比格犬 12 只,性别不限,体质量 5~8 kg。通过戊巴比妥钠 1 mL/L 进行腹腔注射麻醉。麻醉后行仰卧位,取两侧后腿关节,然后剃毛、消毒及铺巾。术前肌注青霉素 80 万单位;行 3.0~4.0 cm 大小的膝关节髌韧带内侧边切口,进入部位为髌韧带内侧,将膝关节弯曲,使髌骨朝外端脱位,从而使股骨内外髁暴露在外。使用手摇钻(2 mm)于内外髁负重区进行定位,轻钻出一个小凹陷,再使用钻头(5 mm)建立全层关节软骨缺损(深约 3 mm、直径约 5 mm);使用乳突刮匙进行软骨刮除,操作轻柔,避免损伤软骨下骨;生理盐水将血块及组织碎屑冲洗干净,不做额外操作,完成关节的复位,依次缝合伤口,将膝关节关闭;术后每天给予 1 次 80 万单位青霉素钠,共给予 3 d,避免发生感染。

1.3 尿源性干细胞-透明质酸钠细胞悬液制备

取第 4 代尿源性干细胞,弃去培养瓶中原培养基。向培养瓶中每次加入 2 mL PBS 缓冲液反复漂洗细胞;除去 PBS 缓冲液,加入 0.5 mL 0.04% EDTA 及 0.5 mL 0.5%胰酶,使之混匀并覆盖整个瓶底。于室温下将培养瓶每 0.5 min 置于显微镜下观察,直至细胞形态变圆并开始脱落,每个培养瓶中加入 2 mL 尿源性干细胞培养基终止消化。吹打瓶壁未脱落的细胞,使之脱落;将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中。以 1 000 r/min 离心 5 min。去上清液,吸取 1 mL 1%透明质酸钠-生理盐水溶液加入离心管,小心吹打与细胞悬液混匀。混匀过程尽量避免混合液内产生气泡,混匀至肉眼下无明显的细胞沉淀为止。细胞与透明质酸比例为 1×10^8 尿源性干细胞/1 mL 1%透明质酸钠。

1.4 关节腔注射及观察

将造模成功的 12 只比格犬分为 3 组,每组 4 只,透明质酸钠细胞悬液治疗组(注射 1×10^8 尿源性干细胞/1 mL 1%透

明质酸钠细胞悬液),透明质酸钠治疗组(注射 1 mL 1%透明质酸钠),空白对照组(注射 1 mL 生理盐水)。注射完后笼中饲养,自由活动。注射后 12 周时处死动物取材,肉眼观察标本大体情况,经全自动脱水机脱水,包埋,切片后行 HE 染色及甲苯胺蓝,观察缺损修复情况和新生组织类型,评估各组修复效果。

2 结果

2.1 尿源性干细胞的分离、培养及鉴定

尿源性干细胞的分离培养鉴定结果与本课题组之前研究结果^[9]相似。经过 7~10 d 原代培养,可在倒置显微镜下观察到 3~5 个克隆形成,形态为短梭或多角形,为典型尿源性

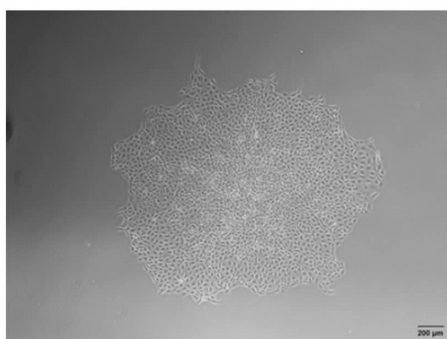
干细胞形态。经过 10~15 d 培养后细胞融合程度达到 80%~90%,消化传代后镜检,尿源性干细胞为成纤维细胞样细长形。流式细胞术细胞表面抗原检测发现,尿源性干细胞不表达阴性抗体 CD34、CD45 以及 MHC-II HLA-DR,高表达阳性抗体 CD29、CD73、CD90、CD105、CD166,符合干细胞鉴定标准。此外,茜素红、油红 O 及甲苯胺蓝染色均为阳性,表明尿源性干细胞具有向成骨、成脂及成软骨分化的潜能(图 1^[9])。

2.2 动物造模

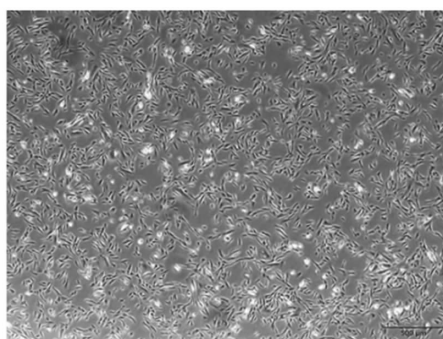
经历消毒、铺巾、暴露、软骨刮除、冲洗及关闭切口等步骤后,成功建立了直径 5 mm 的比格犬股骨内外髁软骨缺损动物模型(图 2)。

2.3 软骨缺损修复的情况

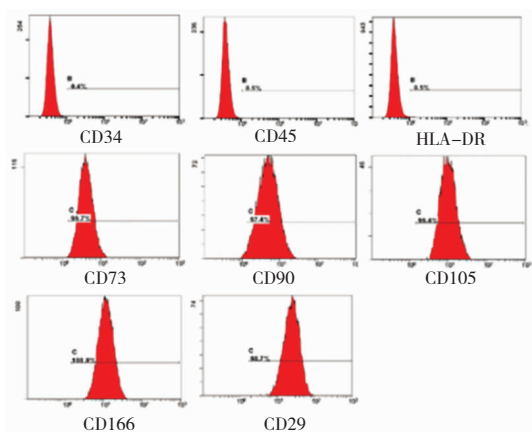
透明质酸钠细胞悬液组大体标本可见透明样软骨组织



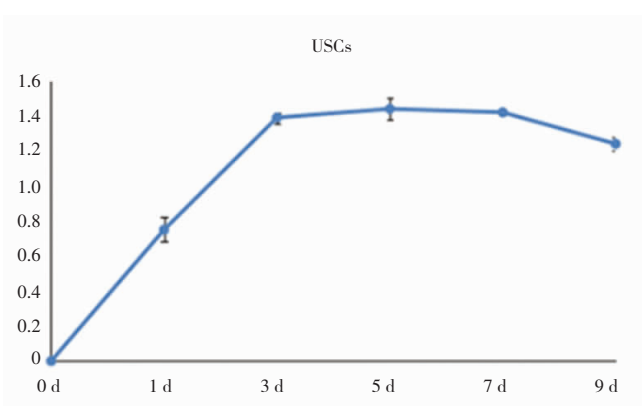
A. 原代尿源性干细胞镜下形态



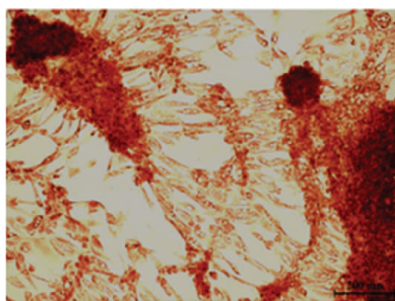
B. 第 4 代尿源性干细胞镜下形态



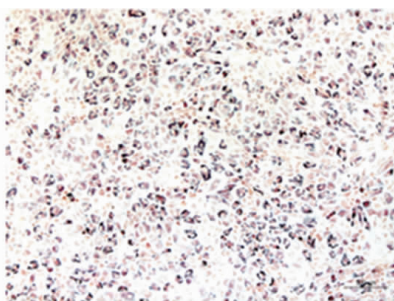
C. 尿源性干细胞表面标志物表达



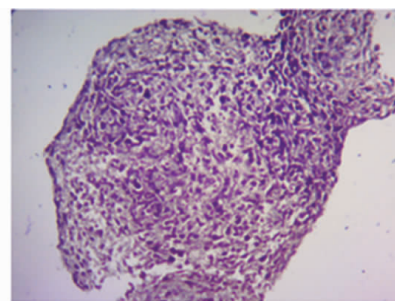
D. 尿源性干细胞细胞增殖曲线



E. 尿源性干细胞成骨诱导茜素红染色



F. 尿源性干细胞成脂诱导油红 O 染色



G. 尿源性干细胞成软骨诱导甲苯胺蓝染色

图 1 尿源性干细胞的形态和特点



图 2 比格犬膝关节股骨内外髁全层软骨缺损动物手术步骤

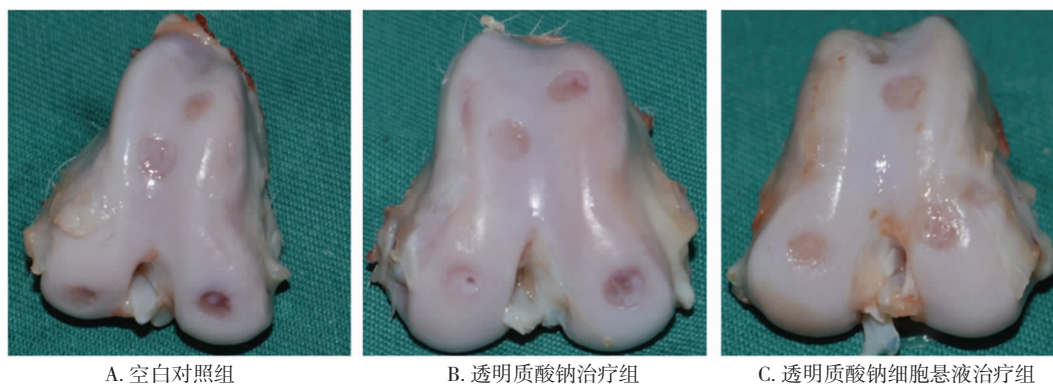


图 3 注射后 12 周,大体标本比较 3 组修复效果

已基本覆盖缺损部分,与周围软骨组织整合良好。透明质酸钠组可见部分缺损有透明软骨样组织生成,覆盖欠佳,与周围组织整合较差。空白对照组可见缺损内覆盖少量纤维瘢痕组织,与周围组织整合不佳,关节软骨磨损,出现早中期骨关节炎表现(图 3)。

透明质酸钠细胞悬液组 HE 染色可见新生软骨的 4 层结构清晰,软骨表面光滑、完整,软骨细胞呈柱状排列。透明样软骨组织已基本覆盖缺损部分,与周围软骨组织整合良好。透明质酸钠组 HE 染色可见新生组织表面不光整,有台阶样不平,大部分为纤维软骨细胞。新生组织已基本覆盖缺损部分,与周围软骨组织整合差。空白对照组 HE 染色可见新生组织表面极不光整,大部分为非软骨细胞。新生纤维结缔组织覆盖缺损,与周围软骨组织整合极差(图 4)。

透明质酸钠细胞悬液组甲苯胺蓝染色可见新生软骨表面稍有不平,透明软骨细胞呈柱状排列,细胞核被染成蓝色,胞浆几乎不着色,基质呈淡蓝紫色。透明样软骨组织已基本覆盖缺损部分,与周围软骨组织整合良好。透明质酸钠组甲苯胺蓝染色可见新生组织表面不光整,有台阶样不平,大部分为纤维软骨细胞,基质染色明显减退。新生组织表面仍有部分缺损,与周围软骨组织整合差。空白对照组甲苯胺蓝染

色可见新生组织表面极不光整,仍有缺损,大部分为非软骨细胞,无基质异染。新生纤维结缔组织部分覆盖缺损,与周围软骨组织整合差(图 5)。

3 讨论

关节软骨的构成要素包括丰富的软骨基质与较低比例的软骨细胞,肉眼观为半透明状,能够发挥润滑和缓冲关节的作用。因为关节软骨中不含神经、血管及淋巴组织,只能由软骨下骨及滑液采用弥散形式为关节软骨输送营养物质,因此出现受损现象时附近软骨通常自我修复能力较差、无法再生^[10-11]。为了缓解疼痛、恢复受损关节软骨的结构和功能,临床上使用了许多修复治疗的方法,包括关节软骨成形术、微骨折术及钻孔术等。然而,这些外科治疗后产生的纤维样软骨难以达到正常关节的生理需求。随着组织工程技术的飞速发展,采用组织工程学方法构建软骨复合组织已成为治疗软骨

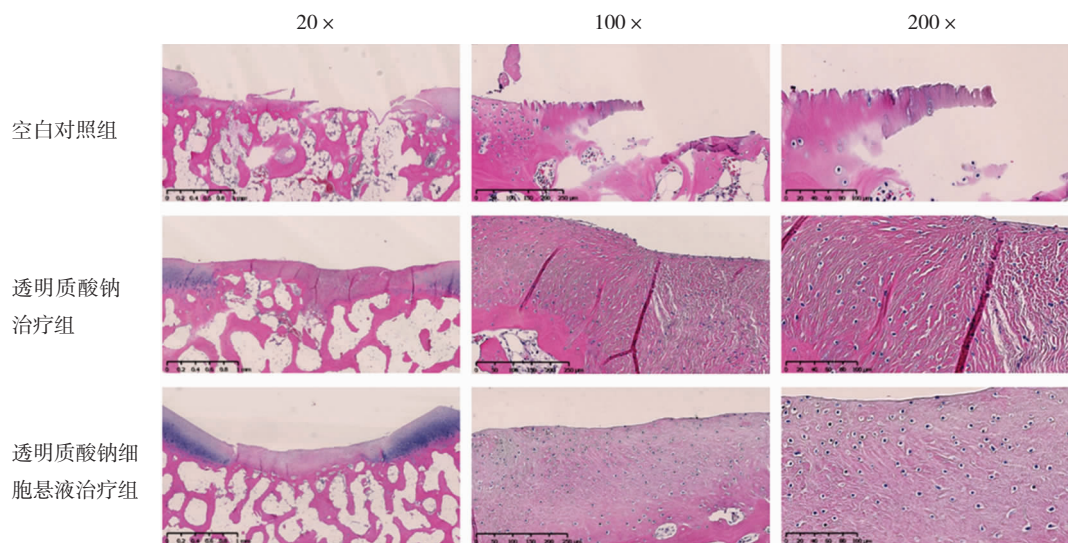


图4 注射后12周,HE染色比较3组修复效果

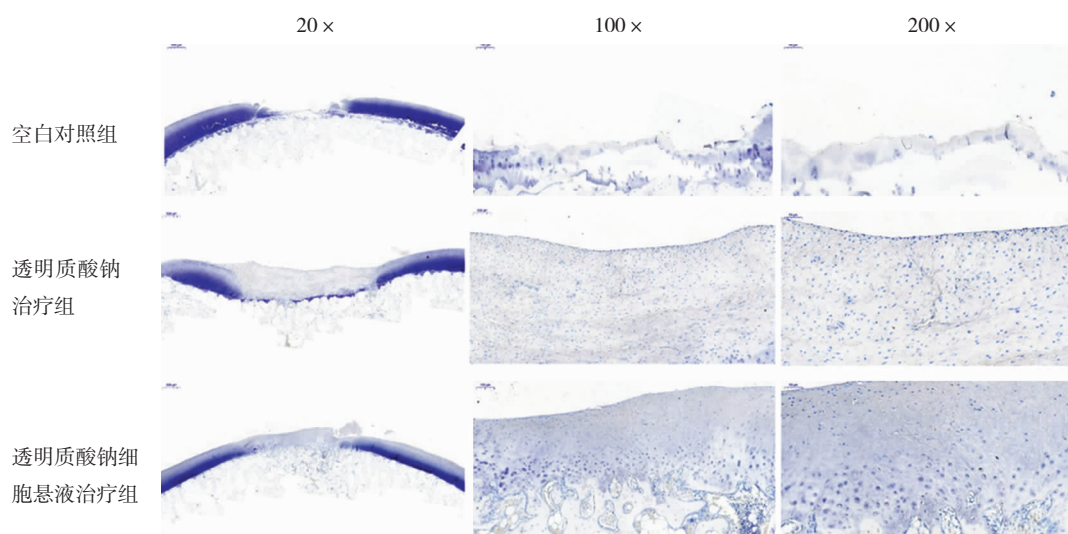


图5 注射后12周,甲苯胺蓝染色比较3组修复效果

损伤和缺损的一类新技术。

构建组织工程软骨时,种子细胞及支架材料的选择直接影响着后期软骨缺损的修复效果以及技术推广应用的可行性。目前已有很多研究利用不同来源的间充质干细胞进行软骨修复,包括骨髓、外周血、脐血、脐带及脂肪^[12-15]。其中应用得最广泛的是自体骨髓间充质干细胞,但骨髓间充质干细胞获取困难,额外的穿刺不仅增加医疗成本还增加了患者痛苦。尿源性干细胞这类多能成体干细胞来源于尿液,相比于其他类型的成体干细胞,尿源性干细胞主要表现出下列优势:便于取材、安全、花费少、可重复取材及无创性等。之前的研中^[9]已经成功从

人尿液中分离提取出尿源性干细胞,并从细胞形态、蛋白表达、基因表达3个层次证明了其可向软骨细胞分化。透明质酸是广泛存在于人体内的生理活性物质,是构成关节软骨和滑液的主要成分,是由乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖醛酸组成的双糖单位连接而成的一种高分子直链聚糖^[16]。作为一种天然降解且可吸收的医用生物材料,透明质酸具有高度黏弹性、渗透性、可塑性、独特的流变学特性以及良好的生物相容性等优点^[17]。Grigolo等^[18]通过利用软骨细胞、透明质酸衍生物联合培养对兔膝关节软骨缺损处进行修复,培养24周后能够检测到新生的透明软骨。透明质酸及其衍生物支架可诱导软骨细胞不断

迁移、粘附、发育及分化,提升细胞外基质水平,在组织工程软骨支架材料的研究中有着举足轻重的地位^[19]。

对于动物膝关节软骨缺损模型的建立,Shapiro 等阐述:直径在 3 mm 以下、深度不达软骨下骨的软骨缺损,建模 6 周后不给予任何干预,软骨缺损便能自行部分或全部修复^[20]。为了提升实验结果的可信度,本实验建立了直径为 5 mm、深达但不破坏软骨下骨的股骨髁全层软骨缺损,避免骨髓来源间充质干细胞通过软骨下骨屏障进入关节软骨缺损区,干扰对尿源性干细胞修复效果的评估。本实验通过对标本 HE 染色和甲苯胺蓝染色分析后发现注射后 12 周,透明质酸钠细胞悬液组可观察到缺损部位有透明样软骨生长,具有光滑的表面,能够较好地与相邻边缘软骨组织整合。透明质酸钠组可观察到新生组织表面不光整,有台阶样不平,大部分为纤维软骨细胞,新生组织与周围组织整合较差。空白对照组可观察到软骨缺损部位极少透明软骨样组织生长,表面极不光整,大量纤维瘢痕样组织填充,软骨缺损部位覆盖较差,与周围软骨组织整合极差。

综上所述,利用尿源性干细胞复合透明质酸钠细胞悬液进行关节腔注射修复比格犬膝关节软骨缺损,取得了良好的修复效果。这说明尿源性干细胞-透明质酸钠溶液体系对关节软骨缺损具有有效的修复作用,能为临床上治疗创伤引起的软骨缺损提供一种新的方法和思路。

参 考 文 献

[1] Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology[J]. Stem Cells, 2013, 31(9): 1840-1856.

[2] 陈春媛, 牛鑫, 汪泱, 等. 尿源性干细胞的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2015, 29(3): 372-376.

[3] 高鹏, 姜大朋, 李昭铸. 人尿源干细胞及其在骨组织工程中应用的研究进展[J]. 中华外科杂志, 2016, 54(4): 317-320.

[4] 温晟. 人尿源性干细胞在再生医学中的研究进展[J]. 中华小儿外科杂志, 2014, 35(5): 383-385.

[5] 张晓庆, 秦建华, 刘慧. 透明质酸-明胶-纳米羟基磷灰石仿生骨支架的制备及成骨活性研究[J]. 高校化学工程学报, 2017, 31(2):

387-393.

[6] 何薇, 赵峰, 张国平, 等. 透明质酸对骨关节炎软骨细胞白细胞介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国老年学, 2017, 37(1): 25-27.

[7] 田红, 黄桂华, 窦明金. 透明质酸治疗骨关节炎的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(10): 168-171.

[8] Zhang Y, Meneill E, Tian H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. J Urol, 2008, 180(5): 2226-2233.

[9] Chen L, Li L, Xing F, et al. Human urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy of cartilage defects[J]. Stem Cells Int, 2018, 2018(2): 1-14.

[10] Galle J, Bader A, Hepp P, et al. Mesenchymal stem cells in cartilage repair: state of the art and methods to monitor cell growth, differentiation and cartilage regeneration[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(21): 2274-2291.

[11] 方楚玲, 田京. BMSCs 成软骨分化的影响因素[J]. 中国临床解剖学杂志, 2014, 32(3): 371-374.

[12] Bieback K, Klüter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2007, 2(4): 310-323.

[13] Gneccchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium[J]. Methods Mol Biol, 2009, 482(2): 281-294.

[14] Gruber HE, Deepe R, Hoelscher GL, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: direction to a phenotype sharing similarities with the disc, gene expression profiling, and coculture with human annulus cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(9): 2843-2860.

[15] Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord[J]. Int J Hematol, 2009, 90(2): 261-269.

[16] 凌沛学, 梁虹, 贺艳丽, 等. 透明质酸钠在关节疾病中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(1): 1-4.

[17] 顾其胜, 王文斌, 吴萍. 医用透明质酸钠在临床中的应用综述[J]. 中国修复重建外科杂志, 1998, 12(2): 124-126.

[18] Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff-11) into cartilage defects in rabbits[J]. Biomaterials, 2001, 22(17): 2417-2424.

[19] 张佼佼, 王冬青, 王志强, 等. 组织工程软骨支架材料的应用选择[J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(29): 5467-5470.

[20] Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg Am, 1993, 75(4): 532-553.

(责任编辑: 冉明会)