

## · 基础研究 ·

## 结缔组织生长因子促进半月板无血管区损伤愈合

何蔚<sup>1</sup>, 刘明<sup>1</sup>, 青祖宏<sup>1</sup>, 高巍<sup>1</sup>, 刘玉杰<sup>2</sup>, 黄潇楠<sup>3</sup>

(1. 解放军 305 医院骨科, 北京 100017; 2. 解放军总医院骨科, 北京 100853; 3. 首都师范大学化学系, 北京 100037)

**【摘要】** 目的: 探讨结缔组织生长因子(CTGF)对纤维软骨细胞外基质分泌、VEGF 表达及促进半月板无血管区的损伤修复中的作用。方法: 将新西兰大白兔半月板白区, 经胶原酶消化、离心分离后, 提取半月板纤维软骨细胞, 培养至第 2 代。用流式细胞仪鉴定该细胞表面 CD31, CD44, CD45 和 CD105 标志物, 并用 II 型胶原抗体做免疫细胞化学鉴定, 以证明所培养、传代的细胞是纤维软骨细胞。分别将细胞培养在浓度 100 ng/ml 的 CTGF 培养基中 3、14 d 后, 通过实时定量聚合酶链反应, 检测 I 型胶原、II 型胶原和 VEGF 基因的表达变化情况。造模, 在兔半月板中央区, 制作长 3 mm 的纵行撕裂。将 45 只大白兔随机分为 3 组, 处理方式: 半月板单纯缝合术, 缝合术加填充 PBS-纤维蛋白胶, 缝合术加填充 1.5 μg CTGF-纤维蛋白胶。术后第 1、4、10 周用荧光免疫组织化学分析法显示 I 型、II 型胶原和 VEGF 在损伤处的表达与分布情况, 直观撕裂处的愈合情况。结果: 体外实验第 14 天, 定量 RT-PCR 结果显示, 100 ng/ml CTGF 组中的 I 型、II 型胶原和 VEGF mRNA 表达比 PBS 对照组, 明显增加。体内实验的荧光免疫组织化学结果显示, 在术后第 10 周, CTGF 治疗组中的 I 型、II 型胶原和 VEGF 已完全填充撕裂损伤处。PBS-蛋白胶组中, 损伤处仍有明显裂隙。结论: CTGF 可促进半月板无血管区重要的细胞外基质(I 型、II 型胶原)的合成, 同时损伤处 VEGF 的表达活性明显增强, 有利于促进无血管区半月板撕裂损伤的愈合。

**【关键词】** 结缔组织生长因子; 纤维软骨细胞; 半月板; 血管内皮生长因子类; 胶原 I 型; 胶原 II 型

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.08.017

**Enhancement of meniscal tearing damage repairing in the avascular zone using connective tissue growth factor (CTGF) in the rabbit model** HE Wei, LIU Ming\*, QING Zu-hong, GAO Wei, LIU Yu-jie\*\*, and HUANG Xiao-nan. \*Department of Orthopaedics, the 305th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100017, China; \*\*Department of Orthopaedics, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China

**ABSTRACT** **Objective:** To investigate effect of connective tissue growth factors (CTGF) on secretion of extracellular matrix synthesis of meniscal fibrochondrocytes, expression of vascular endothelial growth factors (VEGF), and angiogenesis during the repair of meniscal tearing damage. **Methods:** Meniscal fibrochondrocytes were isolated from the inner-1/2 of rabbits' meniscus by collagenase enzymatic digestion, centrifugal separation, and treated with 100 ng/ml CTGF in vitro. Characterization of fibrochondrocytes was identified by flow cytometry analysing CD31, CD44, CD45 and CD105, and was further tested by type II collagen immunocytochemistry. Changes in gene expression of meniscal fibrochondrocytes were monitored by quantitative real-time polymerase chain reaction. In vitro, the sections of the 3 mm of the longitudinal teared in the middle of the rabbit's meniscus, and then the defects were dealt with simple suture, suture and implanting with PBS-fibrin glue, sutured and implanting with 1.5 μg CTGF respectively. Expression and distribution of type I and II collagen and VEGF, the tearing healing were observed by fluorescence-immunohistochemistry analysis on the 1st week, the 4th week and the 10th week. **Results:** Quantitative RT-PCR assays showed that type I and type II collagen, and VEGF mRNA expression in the 100 ng/ml CTGF group had been remarkably enhanced than in the PBS group on the 14th day. Consistent with these effects in vitro, fluorescence-immunohistochemical analysis revealed that in the group implanted with CTGF-fibrin glue, type I collagen, type II collagen and capillaries completely filled the defect on the 10th week postoperatively. In contrast, only soft tissue repair occurred after the PBS-fibrin glue was implanted. **Conclusion:** CTGF can significantly promote extracellular matrix (I collagen, II collagen) of the meniscal avascular zone synthesis, and CTGF can greatly heighten the expression of VEGF activity at the same time in vitro, so that it can further enhance the repair of meniscal tearing damage in the avascular zone.

基金项目: 全军医学科技“十二五”科研项目(编号: CWS11C290); 国家自然科学基金青年基金(编号: 00912210010006); 国家高技术研究发展计划(863 计划)(编号: 2006AA02A136)

Fund program: Provided by Military Medical Research Twelve-Five Project (No. CWS11C290); National Science Youth Foundation of China (No. 00912210010006)

通讯作者: 刘明 Tel: 010-66799386 E-mail: liuming1970@163.com; 刘玉杰 Tel: 010-66938007 E-mail: liuyj301yy@yahoo.com.cn

**KEYWORDS** Connective tissue growth factors (CTGF); Fibrochondrocyte; Meniscus; Vascular endothelial growth factors(VEGF); Collagen type I; Collagen type II

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(8): 681-688 www.zggszz.com

膝关节半月板位于股骨髁和胫骨平台之间。它在承重、稳定关节和减震方面起着重要的作用。半月板损伤后会导致剧烈疼痛和不适,影响日常生活,同时会急剧增加膝关节的平均应力,造成股骨和胫骨表面的关节软骨磨损、剥脱。又因为半月板内侧是无血管区,其损伤后的再生能力十分有限,因此,半月板组织工程是一种很有前途的治疗方式,以促进半月板无血管区的损伤愈合。半月板组织工程的一个重要挑战是能否产生足够的细胞外基质(I型胶原和II型胶原),以恢复半月板内部框架结构,满足力学要求。目前常见的刺激纤维软骨细胞产生基质的方法是局部使用生长因子。结缔组织生长因子(CTGF)是CCN的家庭成员。CTGF可通过与整合素的相互作用,促进成纤维细胞的生存、附着和迁移,促进体外培养的透明软骨细胞增殖和分化,促进体内实验的毛细血管形成,促进体内实验中受损的关节透明软骨再生<sup>[1]</sup>。本研究用CTGF复合纤维蛋白胶修复半月板无血管区撕裂损伤,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**

**1.1 材料与试剂** 鼠抗兔II型胶原多克隆抗体(北京中山生物技术公司), I型胶原酶(GIBCO BRL公司), α-MEM (Sigma公司), 5%胎牛血清(JRH公司), 100 μm的尼龙过滤器(FALCON公司), 重组人CTGF(Peprotech公司), 纤维蛋白胶(悦灵, 珠海健奇医疗技术公司)。抗I型胶原蛋白, 抗II型胶原蛋白和抗血管内皮生长因子(VEGF)(BSF-0578R, BS-0709R, BS-0279R; 北京博奥森公司)。二抗pe(红)和fitc(绿)标记的羊抗兔IgG(北京博奥森)。定量PCR与IQ5系统(BIO-RAD), Olympus BX51正置荧光显微镜。

**1.2 实验动物与分组** 雄性新西兰大白兔(6周龄, 体质量2.5~3 kg)45只, 购于解放军总医院动物实验中心。动物编号后, 随机分为3组, 每组15只。处理方式: ①单纯缝合术; ②缝合术加损伤处填充PBS-纤维蛋白胶; ③缝合术加损伤处填充1.5 μg CTGF-纤维蛋白胶。每组分别于术后第1、4、10周随机各处死5只, 半月板取材, 制作石蜡切片。用荧光免疫组织化学分析法显示I型胶原、II型胶原和VEGF在损伤处的表达、分布情况, 直观撕裂处的愈合程度。

**1.3 实验方法**

**1.3.1 纤维软骨细胞的分离** 半月板纤维软骨细胞

取自雄性新西兰大白兔的半月板内侧1/2体积, 经胶原酶消化、离心分离后, 培养至第2代。将切碎的半月板, 先后置于0.05%透明质酸酶中消化5 min, 0.2%胰蛋白酶消化30 min, 最后置于0.2% I型胶原酶孵育过夜。培养基为α-MEM, 含有5%胎牛血清。然后用100 μm的尼龙过滤器过滤。细胞接种在6孔板的培养皿中, 密度为2.5×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>, 培养基为含10%胎牛血清的α-MEM。在37℃, 5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

**1.3.2 纤维软骨细胞的增殖培养** 纤维软骨细胞培养在6孔板中, 培养基为含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的α-MEM。每3 d换液, 直到细胞的增殖达到85%的每孔覆盖面积。传代的细胞先在含有0.5%FBS和上述成分的培养基中预培养24 h, 以使细胞贴壁并可以消除残留的消化酶。然后将细胞分成两组: 一组为培养基中含有100 ng/ml的重组人CTGF; 另一组培养基中不含CTGF, 作为对照组。两组细胞均培养3 d和14 d。

**1.3.3 CTGF复合纤维蛋白胶的制备** 实验组中, 每个半月板损伤处所需填充的“CTGF复合纤维蛋白胶”的制作步骤<sup>[2]</sup>: 将1.5 μg的CTGF混合在10 μl的PBS<sup>[1]</sup>, 然后用0.22 μm的过滤器过滤去除细菌, 将其混和在1 mg的纤维蛋白胶中。对照组的制作: 将无CTGF的10 μl的PBS混合入纤维蛋白胶。

**1.3.4 动物模型的制备** 动物实验程序经过中国人民解放军总医院动物委员会的批准。手术麻醉按标准剂量2.7 mg/kg戊巴比妥钠经腹膜内注射。术前30 min, 肌注青霉素钠盐40万U预防感染。麻醉成功后, 沿内侧副韧带前缘做长约2 cm的锐性切口。将皮下软组织钝性剥离, 显露关节囊。将髌骨向外侧脱位, 暴露内侧半月板的前角和体部。沿半月板纵轴, 在体部的中心做一长约3 mm的锐性、纵向撕裂。实验分组: ①将15个损伤半月板进行单纯的间断缝合, 缝合线为7-0; ②在15个损伤半月板的缝隙内填充PBS复合的纤维蛋白胶后, 进行间断缝合; ③在15个损伤半月板的缝隙内填充CTGF复合的纤维蛋白胶后, 进行间断缝合。髌骨复位后, 用尼龙缝合线缝合关节囊内侧, 逐层缝合筋膜、皮下组织和皮肤。碘伏消毒, 下肢石膏管形固定患侧膝关节, 注意防止皮肤压伤。术后肌注庆大霉素4万U和青霉素钠盐40万U 3 d, 以预防感染。于术后第3周拆除石膏。分别于术后第1、4、10周处死动物取材, 半月板制作切片, 做荧光免疫组织化学染色, 观察半月板

损伤处的愈合情况。

**1.4 观察项目与方法**

**1.4.1 体外培养纤维软骨细胞的表征** ①光镜下,将细胞采用苏木素染色,大体观察培养的细胞形态。②流式细胞分析:细胞生长接近融合时,取第 2 代生长良好的细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化后,用 PBS 冲洗 2 遍,并制备成(5~10)×10<sup>8</sup> /L 浓度的细胞悬液,取 0.1 ml 的细胞悬液置于不同的离心管中,各个离心管中分别加入 CD31,CD44,CD45 和 CD105 的一抗。37 °C 孵箱孵育 20 min 后,用 PBS 冲洗两遍,加入二抗。37 °C 孵箱孵育 20 min。冲洗后,重悬细胞于 0.5 ml PBS 中待用。③免疫细胞化学的方法<sup>[3]</sup>:用 II 型胶原抗体分别标记纤维软骨细胞和成纤维细胞,以排除培养的细胞是成纤维细胞。因为电镜下纤维软骨细胞和成纤维细胞类似,难以将两者区分。

**1.4.2 实时荧光 定量 RT-PCR 检测 I 型胶原、II 型胶原和 VEGF 基因表达** ①引物设计: I 型胶原、II 型胶原、VEGF 和 GADPH 引物由北京奥科生物技术有限责任公司设计合成,引物序列参见表 1。②总 RNA 的提取:将第 3、14 天的纤维软骨细胞,按每 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 个细胞加入 TRIzol 裂解液 1 ml,裂解后加入 0.2 ml 氯仿。离心后吸取上清,加入 0.5 ml 异丙醇。离心沉淀后弃上清,75%乙醇洗涤沉淀。最后加入适量 0.1%焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理过的无菌双蒸水溶解 RNA。③逆转录:参照说明书配制逆转录反应体系,总反应体积 10 μl:RNA 2 μl,5×PrimeScript™ Buffer 2 μl,Prime Script™ RT Enzyme Mix I 0.5 μl,Random 6 mers 0.5 μl, Oligo dT Primer 0.5 μl,RNase Free dH<sub>2</sub>O 4.5 μl。将反应成分混匀于 0.2 ml Eppendorf 管中。按以下条件进行逆转录:37 °C 逆转录 15 min,85 °C 灭活逆转录酶 5 s,-20 °C 保存。④聚合酶链反应。PCR 反应体系的配置和条件设定:参照说明书配置 PCR 反应体系,总反应体积为 25 μl:cDNA 2 μl,2×SYBR® Premix Ex Taq™ II 12.5 μl,上下游引物各 1 μl,dH<sub>2</sub>O 8.5 μl。将反应成分混匀于 0.2 ml Eppendorf 管中。按照以下条件进行 PCR 反应:95 °C 预变性 2 min,95 °C 变性 20 s,60 °C 退火、延伸 30 s,50 个循环,72 °C 延伸 30 s,72 °C 采集荧光信号。标准曲线、融解曲线及相对定量分析:采用 1、10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup> 共 5 个浓度梯度稀释 cDNA,按上述反应体系和条件分别进行目的基因(I 型胶原、II 型胶原、VEGF)与管家基因(GADPH)的扩增,形成以 Ct 值(达到阈值时的循环次数)为纵坐标,稀释度为横坐标的标准曲线。该条件下扩增的目的基因与内参基因的融解曲线均只有 1 个峰值,提示各基因的扩增具有特异性。每份标本均行复管

检测(n=3),取其循环阈值均值。以第 1 天,0 ng/ml CTGF 所培养的纤维软骨细胞各基因的表达结果作为对照组,计算第 3、14 天时,CTGF 浓度分别是 0 ng/ml 和 100 ng/ml 刺激后纤维软骨细胞相应基因的相对表达量=2<sup>-ΔΔCt</sup><sup>[4]</sup>,ΔCt=目的基因平均 Ct 值-管家基因平均 Ct 值,ΔΔCt=实验组 ΔCt-对照组 ΔCt。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Tab.1 Primers used for quantitative Real-time PCR

		reaction	
基因		引物序列	温度(°C)
I 型胶原	Sense	5-GGTAACAGTGGTGAACCT-3	60
	Antisense	5-CTCCTCGCTTTCCTTCCT-3	60
II 型胶原	Sense	5-CTGTGCGACGACATAATCTG-3	60
	Antisense	5-TCCTACGATATCCTTGATGTCTC-3	60
VEGF	Sense	5-AAGAAGGAGGAACAAGCC-3	60
	Antisense	5-AATCCGAAGTACTGGGA-3	60

**1.4.3 免疫荧光组织化学分析** 将切片常规脱蜡至水,PBS 洗 5 min,3 次。枸橼酸缓冲液热修复,沸水浴 15 min,自然凉,PBS 洗 5 min,3 次。正常山羊血清封闭 20 min,37 °C。一抗孵育(抗 I 型胶原蛋白、抗 II 型胶原蛋白、抗 VEGF),4 °C 过夜。复温 10 min,PBS 洗 5 min,3 次。二抗 pe(红)和 fitc(绿)标记的羊抗兔 IgG(1:100),37 °C 孵育 90 min。PBS 洗 5 min,3 次,甘油缓冲液封片。正置荧光显微镜下观察(激发波长 550 nm,发射波长 570 nm)。

**1.5 统计学处理** 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,所有实验数据以均数±标准差表示。相同基因各组间 ΔCt 值采用单因素方差分析(ANOVA)检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 兔纤维软骨细胞的鉴定** ①光镜下苏木素染色显示,纤维软骨细胞呈成纤维细胞样的形态(图 1a)。②II 型胶原抗体标记的纤维软骨细胞经免疫细胞化学染色进一步证明:纤维软骨细胞的 II 型胶原染色为阳性(图 1b),但成纤维细胞的 II 型胶原染色为阴性(图 1c)。③流式细胞仪分析纤维软骨细胞表面 CD31、CD45、CD44 和 CD105 标志物显示(图 2),纤维软骨细胞阴性表达 CD45(白细胞共同抗原)和 CD31(血小板-内皮细胞黏附分子),阳性表达间质细胞标志物 CD44 和 CD105。这些结果表明,培养基中所培养的细胞是纤维软骨细胞,这与其他报道的结果一致<sup>[5]</sup>。

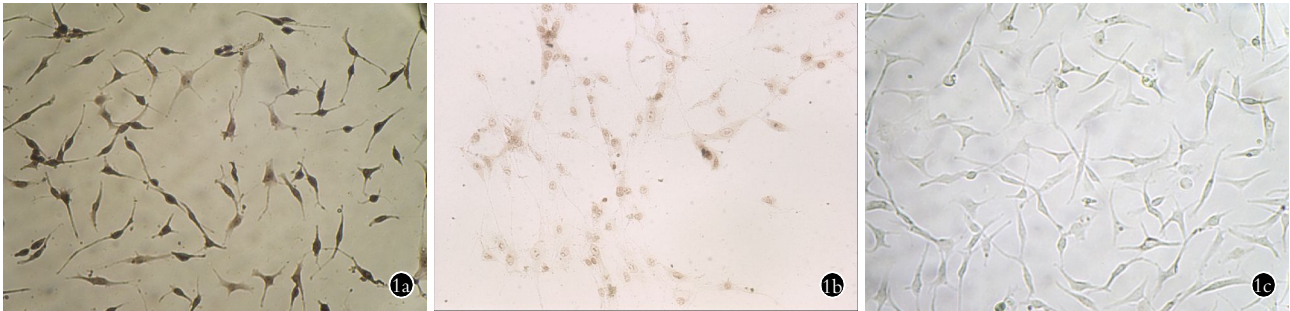
**2.2 CTGF 诱导纤维软骨细胞的多种基因表达**

**2.2.1 CTGF 诱导 I 型胶原基因表达** 经 100 ng/ml CTGF 培养的纤维软骨细胞在培养 3、14 d 后,通过

实时荧光定量 RT-PCR 分析 I 型胶原蛋白基因的表达情况。将第 1 天、0 ng/ml CTGF 培养的纤维软骨细胞的 I 型胶原基因相对于其 GAPDH 基因的相对表达量  $\Delta Ct$ , 作为对照组。第 3 天时, 0 ng/ml CTGF 组和 100 ng/ml CTGF 组 I 型胶原基因较第 1 天对照组均没有显著增加。而在第 14 天时, 100 ng/ml CTGF 组的 I 型胶原基因较第 1 天对照组增加了  $(35.97 \pm 8.2)$  倍(图 3a), 0 ng/ml CTGF 组的 I 型胶原基因较第 1 天对照组增加了  $(15.72 \pm 3.68)$  倍(图

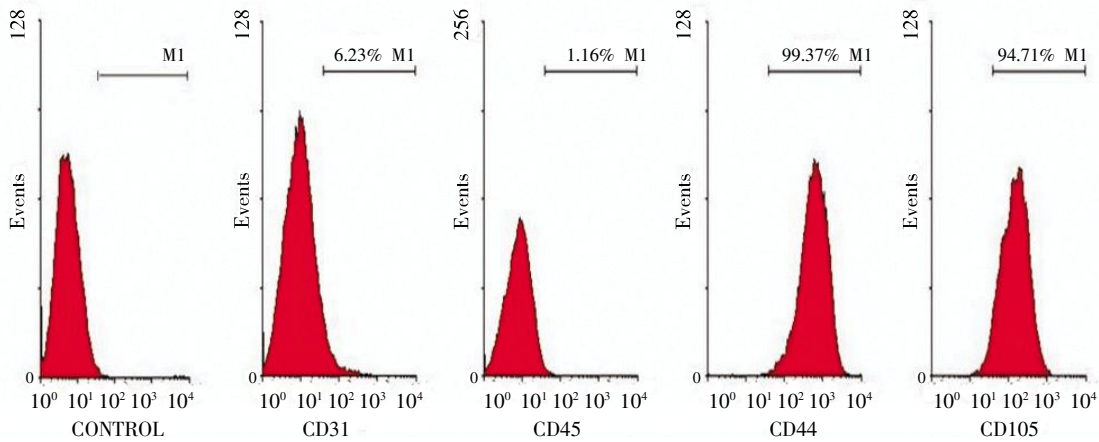
3a), 同时第 14 天的 100 ng/ml CTGF 组的 I 型胶原基因较第 14 天的 0 ng/ml CTGF 组增加了  $(2.38 \pm 0.63)$  倍(图 3a)。

**2.2.2 CTGF 诱导 II 型胶原的基因表达** 将第 1 天、0 ng/ml CTGF 培养的纤维软骨细胞的 II 型胶原基因相对于其 GAPDH 基因的相对表达量  $\Delta Ct$ , 作为对照组。第 3 天时, 0 ng/ml CTGF 组和 100 ng/ml CTGF 组的 II 型胶原基因较第 1 天对照组均没有显著增加。第 14 天时, 100 ng/ml CTGF 组的 II 型胶原



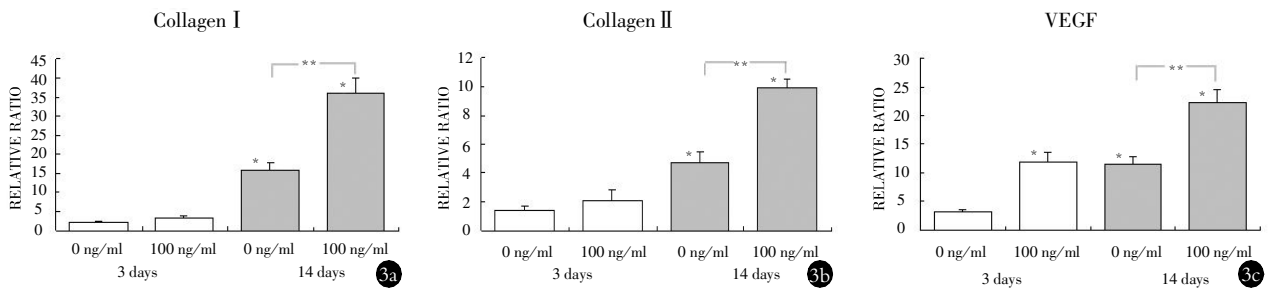
**图 1** 光镜下兔纤维软骨细胞形态 **1a.** 光镜下兔纤维软骨细胞铁苏木素染色( $\times 100$ ): 呈成纤维细胞样的形态 **1b.** 纤维软骨细胞 II 型胶原免疫细胞染色( $\times 100$ ): 阳性 **1c.** 成纤维细胞 II 型胶原免疫细胞染色( $\times 100$ ): 阴性

**Fig.1** Appearance of fibrochondrocytes by light microscope **1a.** Identification of fibrochondrocytes (Light microscope, magnification 100 times); Adherent and fibroblast-like morphology of fibrochondrocytes were dyed by hematoxylin **1b.** Fibrochondrocytes were positive for type II collagen Immunocytochemistic staining **1c.** Fibroblasts were negative for it



**图 2** 流式细胞术检测兔纤维软骨细胞表面抗体(CD31 阴性, CD45 阴性, CD44 阳性, CD105 阳性)

**Fig.2** Flow cytometric histograms of fibrochondrocytes (Flow cytometric analysis shows that fibrochondrocytes were negative for CD31 and CD45, but positive for CD44 and CD105)



**图 3** qPCR 法检测兔纤维软骨细胞 3 种基因的相对表达量 **3a, 3b, 3c.** qPCR 检测纤维软骨细胞的 I 型胶原、II 型胶原和 VEGF 基因于培养第 3 天和第 14 天的相对表达量。白色柱状图为细胞培养第 3 天的结果, 灰色柱状图为细胞培养第 14 天的结果(与对照组比较,  $*P < 0.05$ )

**Fig.3** Three genes expression were quantified by quantitative real-time RT-PCR in fibrochondrocytes. Type I collagen gene expression (3a), type II collagen gene expression (3b), VEGF gene expression (3c) were quantified by quantitative real-time RT-PCR in fibrochondrocytes at the 3rd day (white bar) and the 14th day (gray bar) of treatment without CTGF or 100 ng/ml CTGF after isolation (compared with control group,  $*P < 0.05$ )



基因较第 1 天对照组增加了(9.92±2.17)倍(图 3b), 0 ng/ml CTGF 组的 II 型胶原基因较第 1 天对照组增加了(4.70±1.42)倍(图 3b), 第 14 天的 100 ng/ml CTGF 组的 II 型胶原基因较第 14 天的 0 ng/ml CTGF 组增加了(2.96±0.87)倍(图 3b)。

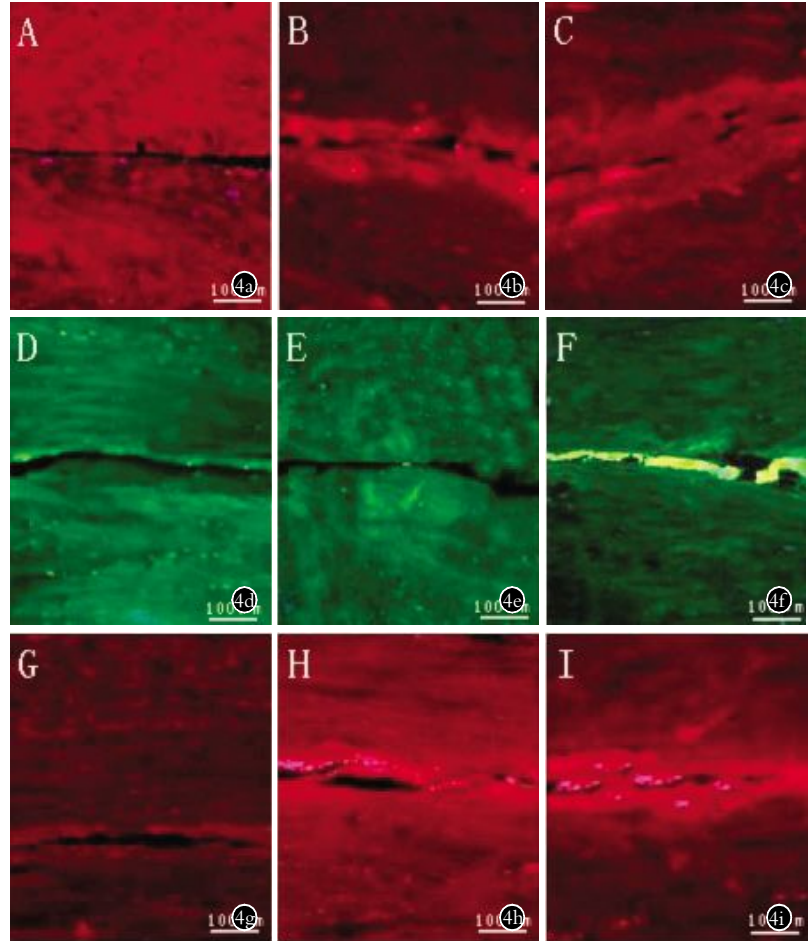
**2.2.3 CTGF 诱导 VEGF 基因表达** 将 0 ng/ml CTGF 培养第 1 天的纤维软骨细胞的 VEGF 基因相对于其 GADPH 基因的相对表达量  $\Delta Ct$ , 作为对照组。第 3 天 0 ng/ml CTGF 组 VEGF 基因较第 1 天对照组没有显著增加(图 3c), 100 ng/ml CTGF 组 VEGF 基因较第 1 天对照组增加(11.78±3.31)倍(图 3c), 第 3 天 100 ng/ml CTGF 组的 VEGF 基因较第 3 天 0 ng/ml CTGF 组增加了(3.76±0.82)倍(图 3c)。第 14 天时 100 ng/ml CTGF 组 VEGF 基因较第 1 天对照组增加(22.32±4.35)倍(图 3c), 0 ng/ml CTGF 组的 VEGF 基因较第 1 天对照组增加(11.45±2.61)倍(图 3c), 第 14 天 100 ng/ml CTGF 组的 VEGF 基因较第 14 天的 0 ng/ml CTGF 组增加(2.14±0.56)倍(图 3c)。

**2.3 免疫荧光染色分析** 结果见图 4-6。图 4-6 分别显示了在术后第 1、4、10 周时, 3 mm 的半月板损伤伤口愈合情况。图 4a、4d、4g, 图 5a、5d、5g 和图 6a、6d、6g 代表损伤处采用单纯的间断缝合, 下文简称缝合组; 图 4b、4e、4h, 图 5b、5e、5h 和图 6b、6e、6h 代表采用间断缝合, 伤口填充 PBS 纤维蛋白胶, 下文简称蛋白胶组; 图 4c、4f、4i, 图 5c、5f、5i 和图 6c、6f、6i 代表采用间断缝合, 伤口填充 CTGF-纤维蛋白胶, 下文简称 CTGF 处理组。

第 1 周的染色结果显示(图 4): 缝合组, 切口边缘尖锐, 切口两侧没有明显的 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白和 VEGF 的分泌; 蛋白胶组, 损伤处被填充有部分的蛋白胶, 但仍可见到较明显的裂口, 由于纤维蛋白胶中含有胶原蛋白的成分, 所以切口中的胶原可显示为染色阳性; CTGF 处理组, 与蛋白胶组相比, I 型和 II 胶原染色显示切口中填充着更多的纤维

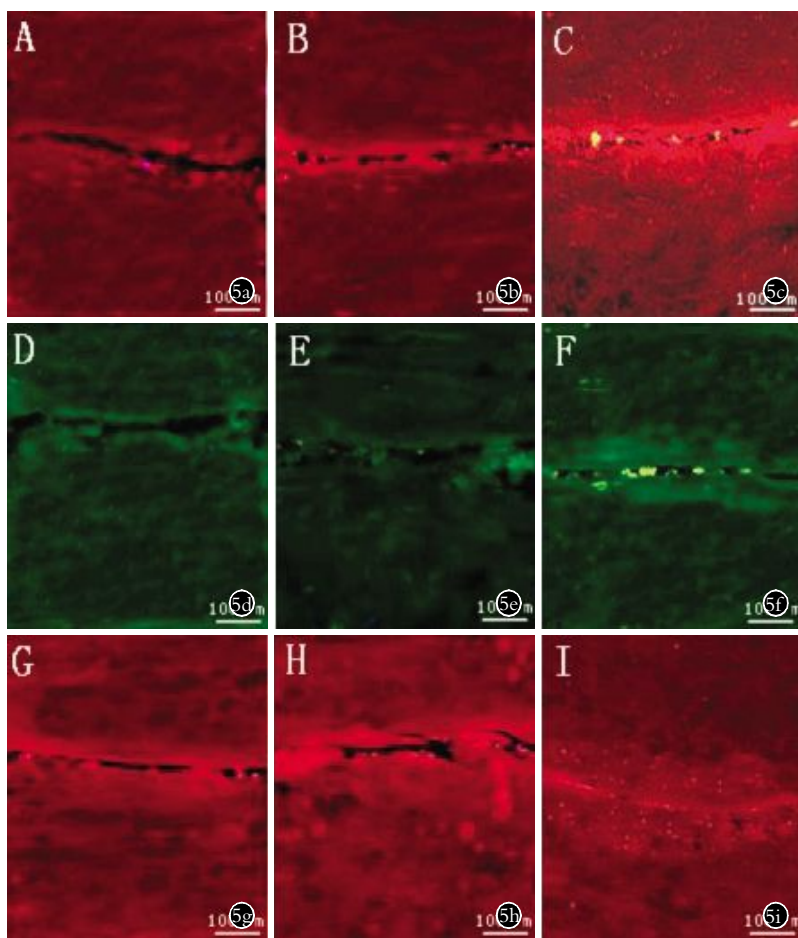
蛋白胶, 切口两侧 VEGF 的阳性染色面积和强度与其他两组相比, 显示出明显的增强反应。

第 4 周的染色结果显示(图 5): 缝合组和蛋白胶组的 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白、VEGF 染色均比第 1 周时的染色面积大、强度高, 并且裂口明显变小。然而, CTGF 处理组, 裂缝两侧的 I 型胶原、II 型



**图 4** 术后第 1 周, 半月板损伤处的 I 型胶原(红色荧光, 4a, 4b, 4c)、II 型胶原(绿色荧光, 4d, 4e, 4f)、VEGF(红色荧光, 4g, 4h, 4i)的荧光免疫组化染色(x100)结果。3 mm 纵形撕裂损伤处理方式: 单纯缝合(4a, 4d, 4g), 缝合加 PBS-纤维蛋白胶(4b, 4e, 4h), 缝合加 1.5  $\mu$ g CTGF-纤维蛋白胶(4c, 4f, 4i)。缝合组(4a, 4d, 4g): 切口边缘尖锐。蛋白胶组(4b, 4e, 4h): 损伤处被填充有部分的蛋白胶, 但仍可见到较明显的裂口。CTGF 处理组(4c, 4f)与蛋白胶组(4b, 4e)相比, I 型胶原和 II 胶原染色显示: 切口中填充着更多的纤维蛋白胶。CTGF 处理组(4i)中, 切口两侧 VEGF 的阳性染色面积和强度与其他两组(4g, 4h)显示出明显的增强反应

**Fig. 4** At the 1st week postoperatively, fluorescence-immunohistochemistry stain (x100): type I collagen (red fluorescence, 4a, 4b, 4c), type II collagen (green fluorescence, 4d, 4e, 4f) and VEGF (red fluorescence, 4g, 4h, 4i). The 3 mm longitudinal tearing defects were respectively dealt with simple suture (4a, 4d, 4g), suture composite of PBS-fibrin glue (4b, 4e, 4h) and suture composite of 1.5  $\mu$ g CTGF-fibrin glue (4c, 4f, 4i). The suture group (4a, 4d, 4g) demonstrated that the edge of the incision was sharp. The fibrin glue group (4b, 4e, 4h) showed that part of the incision was filled with fibrin glue, but a clear fissure in the glue was apparent. In the CTGF-treated group (4c, 4f), types I and II collagen staining revealed that the incision was filled with more fibrin glue, as compared with the fibrin glue group (4b, 4e). Compared to the other two groups (4g, 4h), the CTGF-treated group (4i) showed enhanced staining for VEGF



**图 5** 术后第 4 周,半月板损伤处的 I 型胶原(红色荧光,5a,5b,5c)、II 型胶原(绿色荧光,5d,5e,5f)、VEGF(红色荧光,5g,5h,5i)的荧光免疫组化染色( $\times 100$ )结果。3 mm 纵形撕裂损伤处理方式:单纯缝合(5a,5d,5g),缝合加 PBS-纤维蛋白胶(5b,5e,5h),缝合加 1.5  $\mu\text{g}$  CTGF-纤维蛋白胶(5c,5f,5i)。缝合组(5a,5d,5g)和蛋白胶组(5b,5e,5h)的 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白、VEGF 染色,均比第 1 周(图 4)时的染色,面积大、强度高,并且裂口明显变小。CTGF 处理组(5c,5f),裂缝两侧的 I 型胶原、II 型胶原染色较其他两组(5a,5d,5b,5e)染色面积最大、强度最高。CTGF 处理组的 VEGF 染色(5i)在切口两侧和缺损处均较第 1 周(4i)时明显增加

**Fig. 5** At the 4th week postoperatively, fluorescence-immunohistochemistry stain ( $\times 100$ ): type I collagen (red fluorescence, 5a, 5b, 5c), type II collagen (green fluorescence, 5d, 5e, 5f) and VEGF (red fluorescence, 5g, 5h, 5i). The 3 mm longitudinal tearing defects were respectively dealt with simple suture (5a, 5d, 5g), suture composite of PBS-fibrin glue (5b, 5e, 5h) and suture composite of 1.5  $\mu\text{g}$  CTGF-fibrin glue (5c, 5f, 5i). Types I and II collagen staining in the suture group (5a, 5d, 5g) and in the fibrin glue group (5b, 5e, 5h) were enhanced as compared to staining at 1 week (Fig.4), and the incision was significantly smaller. However, in the CTGF-treated group (5c, 5f), the magnitude of types I and II collagen staining on the sides of the incision was more obvious, and the area of collagen staining was the largest. In the CTGF-treated group (5i), the magnitude and the area of VEGF staining on the sides of the incision were larger at 4 weeks than at 1 week (4i)

胶原染色较其他两组染色面积最大、强度最高。从图 5c、5f 可以看出,CTGF 处理组的切口闭合程度较其他两组更加的紧密;而且,在 CTGF 处理组的缺损处, I 型胶原染色比 II 型胶原染色的强度更高,切口两侧的 I 型胶原染色面积更大。CTGF 处理组的 VEGF 染色在切口两侧和缺损处均较第 1 周时明显增加。

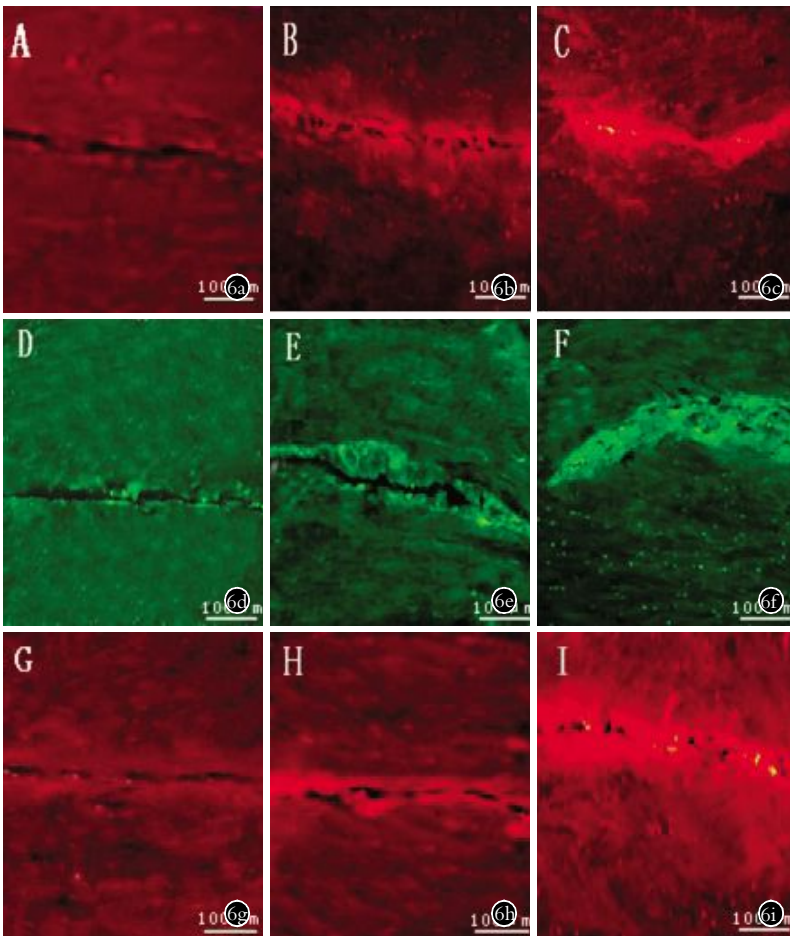
第 10 周的染色结果显示(图 6): CTGF 处理组的切口缺损处已完全被 I 型胶原、II 型胶原充满,并较其他两组、较以前的 2 个时间, I 型胶原、II 型胶原染色呈强阳性(图 6c、6f)。另一方面,如图 6b、6e 所示,蛋白胶组中,虽然 I 型胶原、II 型胶原染色较之前有所增加,但仍然可见明显的裂口。CTGF 处理组的 VEGF 染色与其他两组比较, VEGF 也近乎完全地填补了切口。

### 3 讨论

通过实验研究,笔者首次证明了浓度为 100 ng/ml 的 CTGF 可以显著促进半月板的纤维软骨细胞表达 I 型胶原和 II 型胶原的 mRNA。I 型胶原和 II 型胶原是作为最主要的半月板纤维软骨细胞的分化状态的敏感指标<sup>[5]</sup>。体外实验第 14 天,定量 RT-PCR 结果显示,100 ng/ml CTGF 组中的 I 型胶原、II 型胶原和 VEGF mRNA 表达比 PBS 对照组强。Fujisawa 等<sup>[6]</sup>指出 CTGF 维持软骨细胞表型的方式是促进细胞分泌 II 型胶原蛋白和蛋白多糖。动物实验中,笔者在新西兰大白兔的半月板无血管区,制作了 3 mm 的纵形撕裂损伤模型,术后第 10 周的荧光免疫组化研究显示,1.5  $\mu\text{g}$  CTGF 复合纤维蛋白胶可以明显促进半月板无血管区的愈合。

第 1 周的荧光免疫组化染色结果显示,蛋白胶组中的切口虽然填充了部分的纤维蛋白胶,但仍可看到明显的裂口。可能是由于人工的纤维蛋白胶,其内部结构疏松,没有韧性,质地较脆,部分蛋白胶被挤出切口。在 CTGF 处理组中, I 型胶原、II 型胶原染色显示切口内填充了大量的蛋白胶,并且无明显裂口。笔者分析,手术后的第 1 周,正是伤口愈合的应激时期,CTGF 的功能可以促进纤维软骨细胞增殖、聚集,使细胞长入蛋白胶中,同时 CTGF 可以刺激纤维软骨细胞分泌大量的细胞外基质(I 型胶原和 II 型胶原),这在笔者的体外试验已经证实。其他学者也证实 CTGF 还可以通过促进细胞分泌纤维粘连蛋白<sup>[7-9]</sup>,以加强细胞间、胶原蛋白间的粘连。所以观察





**图 6** 术后第 10 周,半月板损伤处的 I 型胶原(红色荧光,6a,6b,6c)、II 型胶原(绿色荧光,6d,6e,6f)、VEGF(红色荧光,6g,6h,6i)的荧光免疫组化染色( $\times 100$ )结果。3 mm 纵形撕裂损伤处理方式:单纯缝合(6a,6d,6g),缝合加 PBS-纤维蛋白胶(6b,6e,6h),缝合加 1.5  $\mu\text{g}$  CTGF-纤维蛋白胶(6c,6f,6i)。CTGF 处理组(6c,6f)的切口缺损处已完全被 I 型、II 型胶原充满,并较其他两组(6a,6d,6b,6e),较以前的 2 个时间(Fig. 4, Fig.5), I 型、II 型胶原染色呈强阳性。CTGF 处理组(6i)的 VEGF 染色与其他两组(6g,6h)比较,VEGF 也近乎完全地填补了切口

**Fig. 6** At the 10th week postoperatively, fluorescence-immunohistochemistry stain ( $\times 100$ ) type I collagen (red fluorescence, 6a, 6b, 6c), type II collagen (green fluorescence, 6d, 6e, 6f) and VEGF (red fluorescence, 6g, 6h, 6i). The 3 mm longitudinal tearing defects were respectively dealt with simple suture (6a, 6d, 6g), suture composite of PBS-fibrin glue (6b, 6e, 6h) and suture composite of 1.5  $\mu\text{g}$  CTGF-fibrin glue (6c, 6f, 6i). The incision in the CTGF treated group (6c, 6f) was completely filled with types I and II collagen, unlike the other two groups (6a, 6d, 6b, 6e), and the collagen was stained strongly positive. In comparison with the other two groups (6g, 6h), the VEGF staining in the CTGF-treated group (6i) demonstrated that VEGF almost completely filled the incision

到 CTGF 处理组较蛋白胶组无明显裂隙的原因,可能是蛋白胶中增殖的细胞分泌了大量纤维黏连蛋白,可把细胞分泌的 I 型胶原、II 型胶原和人工蛋白胶中可生物降解的纤维胶原有力的捆绑粘连成为一个整体,这样显著提高了蛋白胶的韧性,使之不易破碎。由于细胞分泌的 I 型胶原、II 型胶原数量少,所以,较第 4、10 周,胶原染色的强度不高。同时发现,II 型胶原比 I 型胶原的数量多。结合体外实验中第 3 天 qPCR 结果,可能的原因是 CTGF 刺激纤维软骨

细胞分泌 II 型胶原的时间比分泌 I 型胶原的早,且在愈合初期,分泌的 II 型胶原比 I 型胶原的数量多。结合半月板内侧 1/2 体积所含的 I 型胶原和 II 型胶原的比例是 2:3,笔者认为在正常生理环境中,纤维软骨细胞分泌 II 型胶原的能力比分泌 I 型胶原的能力明显。但在应激的环境中,纤维软骨细胞的分泌胶原的能力发生了很大的改变。第 14 天 qPCR 结果显示,100 ng/ml CTGF 组的 I 型胶原基因较第 1 天对照组明显增加,其原因可能是,在损伤应激时,加上 CTGF 的协同作用,可能明显地上调纤维软骨细胞 I 型胶原基因的表达活性。

第 4 周的荧光免疫组化染色结果显示 CTGF 处理组的切口两侧胶原对合更加严密,并且切口内 I 型胶原的染色强度比 II 型胶原明显增大,在切口边缘的 I 型胶原的面积也较 II 型胶原大。笔者推测,在 CTGF 因子的作用下,随着损伤区纤维软骨细胞的增殖,纤维软骨细胞的表型可能向类成纤维细胞转变,因为成纤维细胞主要分泌的是 I 型胶原。Chang 等<sup>[10]</sup>报道 CTGF 可促进培养的成纤维细胞表达 I 型胶原的 mRNA。

第 10 周的荧光免疫组化染色结果显示 CTGF 处理组的切口已完全被 I 型胶原和 II 型胶原所填充,且胶原染色呈强阳性。而蛋白胶组中的 I 型胶原和 II 型胶原染色,虽和之前时间段比,染色强度和染色面积稍有增加,但切口处仍存在较明显的裂口,提示人工合成的蛋白胶虽可起到短期填补切口缺损的作用,但结合本实验免疫组化染色结果,笔者分析可能由于蛋白胶本身内部结构松散、缺乏

韧性,在术后愈合过程,若有应力刺激,蛋白胶局部可出现第 2 次龟裂;又因为关节腔内本身充满关节液,关节液会浸入到龟裂的裂口处,进而影响愈合。但在 CTGF 处理组中,由于 CTGF 是均匀地混合在蛋白胶中,不仅可以促进大量增殖的纤维软骨细胞聚集到蛋白胶里,同时,刺激细胞自身分泌大量的细胞外基质,如:起半月板内部支架作用的 I 型胶原、起到牢固连接胶原作用的纤维粘连蛋白以及 II 型胶

原等。这样,随着术后初期起到填充缺口作用的人工蛋白胶的逐渐降解,增殖的细胞所自身分泌的多种细胞外基质可以起到随时地填补,并且因为有纤维黏连蛋白的作用,而使得切口的愈合变得更加的牢固,有韧性。

血管内皮细胞的增殖和迁移可被多种因子调节,比如 VEGF<sup>[11]</sup>和 CTGF<sup>[12]</sup>。当软骨细胞分化成肥大细胞时,会自身分泌有利于血管生成的刺激素<sup>[11]</sup>。CTGF 缺陷小鼠出生后不久死亡,原因是严重影响了软骨细胞的增殖和细胞外基质的产生,这表明 CTGF 可调节 VEGF 在肥大的软骨细胞中的表达,并且内皮细胞可以受 VEGF 的诱导进入到软骨生成区形成毛心血管丛<sup>[13]</sup>。Oka 等<sup>[14]</sup>报道,在软骨生成区可看到 CTGF 的明显表达。CTGF 可直接结合 VEGF<sup>[15]</sup>, VEGF 可诱导 CTGF 表达<sup>[16]</sup>,两者形成了一个互激活的正反馈环。结合笔者的实验结果同样发现,在半月板的无血管区,CTGF 和 VEGF 能够彼此调节和激活,这极有利于损伤处的愈合。

综上所述,在体外实验,CTGF 可显著提高半月板的纤维软骨细胞表达 I 型胶原、II 型胶原和 VEGF mRNA。术后第 10 周时,CTGF 复合纤维蛋白胶可促进在半月板无血管区的 3 mm 纵向撕裂损伤的修复。实验表明,CTGF 在维持半月板纤维软骨细胞的表型,促进 I 型胶原、II 型胶原和 VEGF 分泌中发挥着积极作用,为临床治疗半月板无血管区的损伤提供了新的思路。

#### 参考文献

- [1] Nishida T, Kubota S, Kojima S, et al. Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2(connective tissue growth factor)[J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(8):1308-1319.
- [2] 同志超,杨镇,同志勤,等.骨髓间质干细胞体外定向诱导分化为软骨细胞的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2008, 21(5):362-364. Tong ZC, Yang Z, Tong ZQ, et al. Study of inducing bone marrow-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes in vitro[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2008, 21(5):362-364. Chinese with abstract in English.
- [3] 何劼,杨翔,岳鹏举,等.纤维蛋白凝胶和脱钙骨基质支架材料复合软骨细胞修复兔膝关节软骨缺损的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2009, 22(7):523-526. He J, Yang X, Yue PJ, et al. Research of repairing rabbit knee joint cartilage defect by compound material of fibrin glue and decalcified bone matrix (DBM) and chondrocytes[J]. *Zhongguo Gu Shang / China J Orthop Trauma*, 2009, 22(7):523-526. Chinese with abstract in English.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [5] Verdonk PC, Forsyth RG, Wang J, et al. Characterisation of human knee meniscus cell phenotype[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13:548-560.
- [6] Fujisawa T, Hattori T, Ono M, et al. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates proliferation and differentiation of auricular chondrocytes[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2008, 16(7):787-795.
- [7] Wang X, McLennan SV, Twigg SM. CCN-2 is up-regulated by and mediates effects of matrix bound advanced glycated end-products in human renal mesangial cells[J]. *J Cell Commun Signal*, 2011, 5(3):193-200.
- [8] Nishida T, Kawaki H, Baxter RM, et al. CCN2 (Connective Tissue Growth Factor) is essential for extracellular matrix production and integrin signaling in chondrocytes[J]. *J Cell Commun Signal*, 2007, 1(1):45-58.
- [9] Hoshijima M, Hattori T, Inoue M, et al. CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin alpha5beta1[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580:1376-1382.
- [10] Chang HL, Bhranti S, Eduardo KM, et al. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9):3340-3349.
- [11] Maes C, Stockmans I, Moermans K, et al. Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(2):188-199.
- [12] Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, et al. Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo[J]. *J Biochem*, 1999, 126(1):137-145.
- [13] Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development[J]. *Development*, 2003, 130(12):2779-2791.
- [14] Oka M, Kubota S, Kondo S, et al. Gene expression and distribution of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) during secondary ossification center formation[J]. *J Histochem Cytochem*, 2007, 55(12):1245-1255.
- [15] Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, et al. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis[J]. *FASEB J*, 2002, 16(2):219-221.
- [16] Kondo S, Tanaka N, Kubota S, et al. Novel angiogenic inhibitor DN-9693 that inhibits post-transcriptional induction of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(1):129-137.

(收稿日期:2012-12-10 本文编辑:连智华)