

永生化软骨细胞为基础的工程化软骨修复 软骨缺损的实验研究

方泽强¹ 李慧增¹ 王常勇² 孙远¹

(1. 第三军医大学西南医院口腔科, 重庆 400038; 2. 军事医学科学院基础医学研究所)

【摘要】 目的 探讨用永生化软骨细胞作为种子细胞修复羊关节软骨缺损的可行性。方法 把人端粒酶催化亚基(hTERT)转染羊关节软骨细胞,筛选阳性克隆并通过旋转生物反应器-微载体技术进行大量扩增;将扩增的永生化软骨细胞与β磷酸三钙复合并在体外培育后,植入羊前肢肱骨头关节面软骨缺损处;3和6个月取材,进行形态学和免疫组织化学评价。**结果** 实验组,术后6个月,缺损区被新生的软骨组织所充填,Ⅱ型胶原染色呈强阳性,与对照组差别有显著性差异($P < 0.01$)。在材料组,缺损区边缘可见部分新生软骨组织;空白对照组,缺损区新生软骨组织形成。**结论** 永生化软骨细胞在软骨组织工程中具有潜在的应用前景。

【关键词】 永生化; 组织工程; 软骨

Experimental study on repair of articular cartilage defects by engineered cartilage based on immortalized chondrocytes FANG Ziqiang, LI Huizeng, WANG Changyong, et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University (Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To investigate the feasibility of repair of goat articular cartilage defects by tissue engineered cartilage based on immortalized chondrocyte **Methods** The hTERT gene was introduction into chondrocytes of goat and the positive clones were selected to culture and subculture with rotary cell culture system (RCCS)-microcarrier technique. Immortalized chondrocyte-loaded β-tricalcium phosphate (β-TCP) complexes were incubated in vitro and implanted into the defects of the articular cartilage in the humeral head of the goat. The specimens were taken within 3 and 6 months after surgical procedure for histological and immunohistochemical evaluation. **Results** In experimental group, defects were filled with cartilaginous tissue entirely. Histological and immunohistochemical analysis showed extensively cartilage formation in the defect field and the staining for Ⅱ collagen was positive obviously. In the β-TCP group, the defects were partly repaired by new-formed cartilage around the defects and there is no cartilage formation in the scaffold center. In the control groups, only a little new-formed cartilage can be demonstrated around the margin of defects. There is a significant difference between the experimental and the other two groups ($P < 0.01$). **Conclusions** Immortalized chondrocytes may have a significant application in the cartilage tissue-engineering field.

【Key words】 Immortalization; Tissue engineering; Cartilage

本实验采用 hTERT 转染羊关节软骨细胞和微载体扩增技术,获得大量的永生化软骨细胞并构建工程化软骨细胞-β-TCP 复合体,体外培育后移植到羊关节软骨缺损处;3个月和6个月取材进行免疫组织化学评价,并探讨永生化软骨细胞在软骨组织工程领域中应用的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料和实验分组 6个月龄羊30只(由军事医学科学院实验动物中心提供)分为3组:实验组($n = 10$, 永生化细胞-材料复合体修复缺损),材料组($n = 10$,

β-TCP 修复缺损),空白对照组($n = 10$, 不进行修复)。

1.2 羊软骨细胞分离培养、hTERT 转染 无菌下取羊自体前肢肘关节非负重区软骨块,0.15%Ⅱ型胶原酶(Gibco)消化制备软骨细胞悬液,进行原代培养,细胞长至80%汇合时用0.25%胰酶(Gibco)消化传代。

真核表达载体 pCI-hTERT(军事医学科学院郭希民博士惠赠)采用脂质体转染法,用含 G418(Gibco)筛选,获得稳定表达 hTERT 克隆。

1.3 永生化软骨细胞的扩增和鉴定 将适量预处理的 Cytodex-3 微载体 (Pharmacia, U.S.A) 与永生化软骨细胞悬液充分混匀, 加入到 110 ml RCCS (Synthecon, U.S.A) 中, 并补加 DMEM 培养基至 110 ml, 调整细胞密度为 $4.0 \times 10^5/L$ 。在 $37^\circ C$ 、5% CO_2 孵箱内培养 10 d, 收集扩增的转染软骨细胞与 β -TCP 复合, 少部分用于软骨细胞的鉴定 (一抗为鼠抗人 II 胶原单克隆抗体, 1:100, ABC) 和继续传代 (100 代)。

1.4 端粒酶活性的检测 使用端粒酶检测试剂盒 (Sigma) 采用 TRAP (PCR-based telomerase repeat amplification protocol) 按试剂盒提供的方法进行检测。TS 引物 (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), CX 引物 (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') (上海生工生物公司合成), 反应条件为: $94^\circ C$, 30 s; $60^\circ C$, 30 s; $72^\circ C$, 45 s; 30 个循环, 最后 $72^\circ C$ 延伸 10 min。阴性对照以裂解液代替端粒酶提取液, 以 GAPDH 上游引物 (5'-CTCAGACAC-CATGGGAAGGTGA-3') 代替 TS 引物。PCR 产物用 9% 聚丙烯酰胺电泳 (175 V 45 min, 240 V 1 h) 进行分离。用试剂盒提供的 TSR8 作为阳性对照。

1.5 转染细胞致瘤性检测 将转染的软骨细胞 (1.5×10^8 个) 接种于裸鼠皮下, 3 个月和 6 个月取材进行 HE 染色。

1.6 体外构建工程化软骨、羊关节软骨缺损模型的制备和修复 将体外培养扩增的永生化软骨细胞 (1×10^8 个) 接种到 β -TCP (法国地中海大学研制和提供) 支架上, $37^\circ C$ 孵育 8 h 后, 在 DMEM (含 10% FBS) 中培养 24~48 h, 备用。

无菌下, 用特制中空的旋转站 (内径 10 mm) 垂直于羊右前肢肱骨远端关节面制备软骨缺损 ($\phi 10$ mm, 深度 4 mm)。把构建好的复合体移植入实验组关节软骨缺损处, 材料组只植入 β -TCP, 对照组缺损不修复。

1.7 关节软骨缺损修复的检测 术后 3 个月和 6 个月分别取材, 标本经 4% 多聚甲醛固定、脱钙、包埋、切片, 进行 HE、苏木素-番红“O”-亮绿和甲苯胺蓝染色; ABC 法进行 II 型胶原免疫组织化学检测 (一抗为鼠抗人 II 胶原单克隆抗体, 1:100)。

1.8 统计学处理 图像用 Fragment Manager 图像分析仪 (Amersham Pharmacia) 进行自动分析。配对资料用 t 检验进行。 $P < 0.01$, 认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 永生化软骨细胞的鉴定 永生化软骨细胞 II 胶原免疫组织化学染色阳性, 说明转染扩增后的细胞仍然具有软骨细胞的特征。

端粒酶活性检测显示, 转染后的细胞可见相隔 6 bp 的多条电泳带, 端粒酶呈阳性表达, 而未转染的软骨细胞则为阳性。

2.2 致瘤性检测结果 3 个月可见大部分转染的软骨细胞死亡, 6 个月软骨细胞全部坏死、吸收, 转染软骨细胞致瘤性为阴性。

2.3 缺损修复的大体观察 术后 3 个月, 实验组可见缺损区大部分充满新生的软骨样组织, β -TCP 内有大量新生软骨组织长入; 6 个月后, 实验组缺损区充满修复组织, 新生组织与周边软骨组织连接良好; 材料组缺损周边有新生软骨组织形式, 但中间无新生软骨组织; 空白对照组缺损区无新生软骨组织形成, 表面只有少许纤维组织覆盖 (图 1)。

2.4 组织化学和免疫组织化学检测 实验组术后 3 个月, 组织切片番红“O”和甲苯胺蓝染色均呈阳性; 材料组切片周边有少许番红“O”和甲苯胺蓝染色阳性; 空白对照组染色为阴性。术后 6 个月, 材料基本降解, 实验组新生软骨组织相互连接融合, 软骨细胞和软骨基质丰富, 番红“O”和甲苯胺蓝染色阳性; 材料组切片周边番红“O”和甲苯胺蓝染色阳性, 且范围较 3 个月有所增加; 空白对照组为阴性 (图 2, 3)。

实验组, 术后 3 个月切片 II 型胶原染色均呈大片阳性, 6 个月整个切片阳性 (图 4); 材料组, 6 个月切片周边可见 II 型胶原染色阳性, 但中间为阴性; 空白对照组, 无阳性染色。实验组与其余两组比较 $P < 0.01$ (图 5), 两者相差有显著性差异。

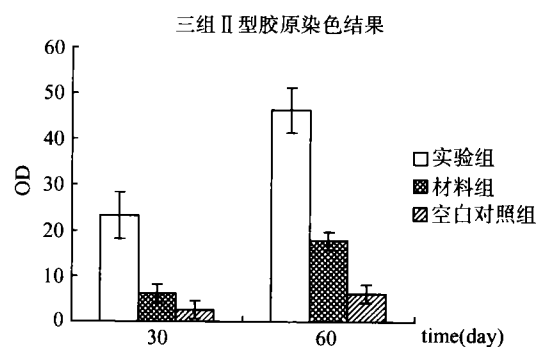


图 5 三组 II 型胶原表达结果
实验组 VS 材料组和对照组, $P < 0.01$

3 讨论

由于软骨本身的修复能力非常有限,使许多关节软骨缺损不能得到有效的修复,而目前也缺乏有效的外科手段来修复损伤的关节软骨,因此,关节功能障碍甚至功能丧失的修复和重建是关节外科当前研究的热点和重点之一^[1]。软骨组织工程的诞生与发展给软骨缺损的修复带来了希望,但是,如何在体外短时间内获取大量的软骨细胞是其面临的困难之一^[2]。

近年来,端粒酶因其在抗细胞老化方面的重要性而倍受关注。端粒酶是一种核糖核蛋白复合体,具有逆转录活性,可以自身 RNA 为模板合成染色体末端端粒的重复序列(TTAGGG),保持端粒长度的稳定,进而延长细胞的寿命甚至使细胞获得永生^[3]。Gurwitz D 等^[4]证实转染端粒酶基因而永生化的细胞寿命和体外培养时间大大超出正常同种细胞,而且能够维持其表型不变,该研究的成功为大规模的体外扩增细胞提供了可能。同时,他们还证明,该细胞不具有恶性细胞的特征。本实验结果也显示,转染端粒酶基因的软骨细胞传至 100 代仍然具有旺盛的分裂趋势,而无致瘤性,这进一步说明该细胞具有应用的安全性。

永生化虽然可以延缓细胞老化,但是不能解决在短时间内扩增出大量细胞的问题。微载体培养技术为体外大规模培养贴壁细胞成为可能^[5],因为该培养体系能够为贴壁细胞培养提供充分的表面积,从而有效地快速大规模扩增细胞;而 RCCS 则有利于细胞的营养物质交换,使细胞在破坏力最小的条件下得到迅速、大量扩增^[6]。实验结果表明,扩增后永生生化软骨细胞 II 型胶原表达为阳性。这进一步说

明,在 RCCS 和微载体培养体系中不但可以大量扩增永生生化软骨细胞,而且可以维持其表型。

组织化学结果显示,实验组修复区有大量软骨样组织生成,弹性较好且与周围软骨组织连接良好;相反,材料组,只有周边带可见部分新生软骨样组织。免疫组织化学结果也显示,实验组 II 型胶原染色强阳性;材料组只见周边有部分阳性;而空白对照组则无明显软骨组织形成。这可能是 β -TCP 的组织生长引导作用和软骨自身有限修复的结果,这进一步表明以永生生化软骨细胞为种子细胞的工程化软骨具有修复软骨缺损的能力。

本实验通过 hTERT 转染羊关节软骨细胞并在微载体-RCCS 中大量扩增,与 β -TCP 一起成功地修复了羊关节软骨缺损。实验结果证明 hTERT 转染的永生生化软骨细胞在软骨组织工程领域具有重要的应用前景。(图 1-4 见插页 1)

参考文献

- 1 Howard AB, Tom M, Hsu HP, et al. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1997, 79(10):1439-1451.
- 2 Lisa EF, Ivan M, Gordana VN. Frontiers in tissue engineering in vitro modulation of chondrogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1999, 367(Spp):46-58.
- 3 Richard CA, Homayoun V, Christother P, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:10114-10118.
- 4 Gurwitz D, Andrea GB, Michel O, et al. Extension of life-Span by introduction of telomerase into normal human fibroblasts. *Clin Genet*, 1999, 55:305-308.
- 5 Wu SC, Huang GY. Stationary and microcarrier cell culture processes for propagating Japanese encephalitis virus. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(1):124-128.
- 6 Hammond TG, Hammond JM. Optimized suspension culture; The rotating-wall vessel. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, 281(1):12-25.

(收稿:2002-11-25 修回:2003-03-18 编辑:李为农)

欢迎订阅 2004 年《中国骨伤》

《中国骨伤》杂志是中国中西医结合学会和中国中医研究院主办的国家级专业性学术期刊,是中国期刊方阵双奖期刊。本刊坚持中西医并重原则,突出中西医结合特色,执行理论与实践、普及与提高相结合的方针。主要报道中医、西医和中西医结合在骨伤科领域的科研成果、理论探讨和临床诊疗经验,反映我国骨伤科在医疗、科研工作中的新进展,以促进国内外骨伤科的学术交流。

本刊主要设有专家述评、论著、骨伤论坛(学术探讨)、生物力学研究、临床研究、影像分析、诊治失误、经验交流、文献综述、手法介绍、学习园地、科研思路与方法、临床病例报告、国内外骨伤科医学动态以及医学书刊评价等栏目。

本刊为月刊,每月 25 日出版,2004 年期刊内页采用全新的 80 g 亚光铜版纸,国际通用 16 开大版本,64 页,单价 8.80 元,全年价 105.60 元。国内外公开发售,全国各地邮局订阅,邮发代号:82-393。如错过征订机会,本刊编辑部亦可代办补订(请直接汇款至编辑部),国内订户我们将负责免费邮寄。

编辑部地址:北京东直门内南小街甲 16 号《中国骨伤》杂志编辑部 邮编:100700

电话:(010)64014411-2693 传真:(010)84036581

http://www.corthotrauma.com E-mail:zggszz@sina.com

牵拉肘机制的有关解剖学观测

(正文见 652 页)



图1 婴幼儿肘关节(关节囊已切开)示桡骨头明显比桡骨颈大。图2 婴幼儿肘关节上面观(关节囊已切开)示围绕桡骨头周围丰富的滑膜皱襞,桡骨头后内侧滑膜皱襞呈叶片状,前外侧呈膜片状及绒毛状。图3 婴幼儿肘关节上面观(关节囊已切开,显示桡侧部分)示围绕桡骨头周围丰富的滑膜皱襞,桡骨头后内侧呈大片叶状的滑膜皱襞,前外侧滑膜皱襞呈月牙状并向前内侧延伸。

改良组织块混合酶消化法成骨样细胞培养

(正文见 661 页)

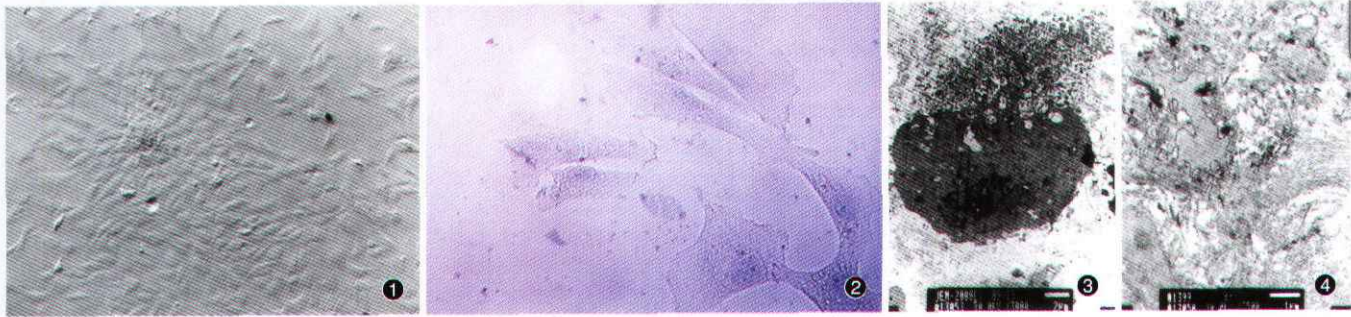


图1 细胞培养 10 d, 组织块周围大量细胞游出, 中央可见残留的组织碎片(倒置显微镜 $\times 100$) 图2 第三代成骨样细胞, 细胞呈梭状、立方形和多角形(HE 染色 $\times 400$) 图3 培养细胞呈椭圆形, 表面微绒毛丰富, 细胞核不规则(透射电镜 $\times 3000$) 图4 培养细胞粗面内质网发达, 池扩张, 细胞周围可见胶原纤维, 骨样基质形成(透射电镜 $\times 7500$)

永生软骨细胞为基础的工程化软骨修复软骨缺损的实验研究

(正文见 664 页)

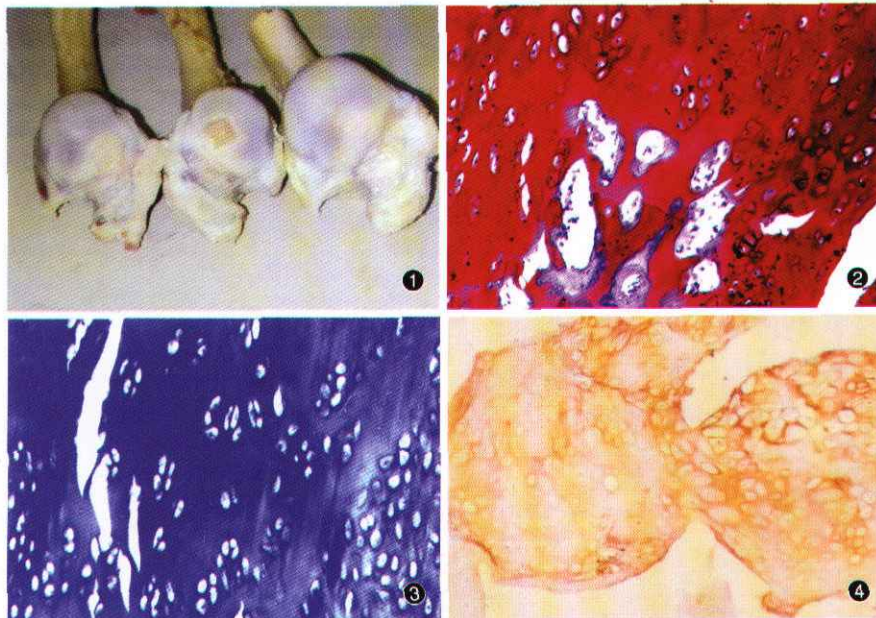


图1 术后6个月三组关节修复外观从右到左依次为: 实验组、对照组、材料组 图2 术后6个月实验组番红“O”染色 ($\times 200$) 图3 术后6个月实验组甲苯胺蓝染色 ($\times 200$) 图4 术后6个月实验组II型胶原染色 ($\times 200$)