

补肾活血汤结合组织工程软骨修复兔膝关节软骨缺损

李春根 宋广明 康晓乐 叶超 陈江

摘要 目的 进一步验证补肾活血汤对骨髓基质干细胞(BMSCs)复合体修复兔关节软骨缺损的影响,评价修复效果。**方法** 取兔骨髓基质干细胞进行密度离心法结合贴壁培养法体外增殖后,复合于改建后的脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)载体上,植入到兔膝关节软骨缺损,并以中药补肾活血汤灌胃为复合组,并设立单纯中药组、单纯干细胞复合组、空白组为对照组。4、8、12周后分别对修复组织进行形态学观察及组织学检查。进行Wakitani评分,观察其体内修复关节缺损效果。**结果** 术后12周,复合组的缺损由透明软骨样组织充填,软骨及软骨下骨组织基本修复,修复的软骨组织在组织形态学上优于其他各组。**结论** 骨髓基质干细胞复合体能修复家兔膝关节软骨缺损,中药补肾活血汤能促进软骨的修复,且提高了修复质量。

关键词 骨髓基质干细胞 关节软骨 缺损 补肾活血汤 兔

Bushenhuoxue Decoction Combined with Bone Marrow Stromal Stem Cells Complex in Repair of Articular Cartilage Defects in Rabbits. Li Chungen, Song Guangming, Kang Xiaole, Ye Chao, Chen Jiang. Department of Orthopaedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Abstract Objective To further verify Bushenhuoxue decoction effects on the repair of rabbit articular cartilage defects using BMSCs complex. **Methods** Isolated from a 3-month-old rabbit by a combination method of density gradient centrifugation and adherent culture, the BMSCs was then implanted into rabbit knee cartilage defects. Chinese medicine Bushenhuoxue decoction was given, which served as Bushenhuoxue decoction + stem cell group. The study also set Bushenhuoxue decoction group, composite group and blank group (control group). Morphological observation and histological examination were performed in repaired tissue at 4, 8, 12 weeks. Wakitani score was counted to evaluate the repairing effect. **Results** After 12 weeks, the defects in the Bushenhuoxue decoction + stem cell group was filled with hyaline cartilage-like tissue; cartilage and subchondral bone tissue were basically repaired; repair of cartilage in histomorphology was superior to other groups. **Conclusion** BMSCs complex can repair articular cartilage defects in rabbits, and Chinese medicine Bushenhuoxue decoction can promote cartilage repair and improve the quality of repair.

Key words Bone marrow stromal stem cells; Articular cartilage; Defect; Bushenhuoxue decoction; Rabbit

随着社会经济的发展,生活水平的提高以及人口老龄化现象,以关节软骨退变为主要表现的骨关节炎的发病率日益增加。因关节软骨解剖位置的特殊性,使其易受到机械性创伤和炎症的损害,进而发展为骨关节炎。关节软骨不含有血管、神经组织,对损伤的修复能力极其有限,目前在实验研究方面,采用组织工程学方法,以骨髓间充质干细胞为种子细胞,证实能较好地修复实验性软骨缺损^[1]。中药复方在临床治疗骨关节炎,保护软骨及软骨修复方面有一定的疗效。本研究自2010年4~8月应用补肾活血汤,观察其对骨髓基质干细胞复合体修复软骨缺损的影响,进行了如下实验。

材料与方 法

1. 实验材料:(1)动物:24只,3~4月龄健康新西兰大白兔,雌雄不限,体重2.0~2.5kg,由北京海淀兴旺实验动物

养殖场提供,合格证号:SCXX(京)2006-0006。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求,符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。(2)受试药物:补肾活血汤主要成分有熟地、杜仲、枸杞子、骨碎补、菟丝子、归尾、没药、山茱萸、红花、独活、淡苡蓉等中药。由北京中医药大学东直门医院中药制剂室按传统方法制备提供。全方按严格中药提取工艺制成0.704g生药/毫升的供试药液(合临床成人日用量的8倍)。(3)主要试剂:低糖DMEM和胎牛血清由杭州四季青公司提供;Masson三色染色试剂盒由上海虹桥医用试剂研究所提供;胰蛋白酶-EDTA由Gibco公司提供;Percoll淋巴细胞分离液(1.073g/ml)由美国Pharmacia公司提供。

2. 实验方法:(1)骨髓间充质干细胞的体外培养增殖:取3~4月龄健康家兔,3%戊巴比妥钠30mg/kg,耳缘静脉麻醉后,在无菌条件下用1ml肝素(3000U/ml)预处理过的16号穿刺针(防止吸收黏稠骨髓时出现针道内溶血)从兔股骨大粗隆处抽取骨髓3~5ml,加入1.073g/ml的percoll分离液,1500r/min离心20min,收集最上层培养液中及培养液-分离

液交界处的单个核细胞,加入 10% 胎牛血清(PBS)的 DMEM 液(同时加有青霉素 100mg/L、链霉素 100mg/L, pH 7.3), 1500r/min 离心 10min,洗涤 2 次,弃上清液,留底部沉淀部分,以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于 75cm^2 培养瓶中,在 37°C 温箱, 5% CO_2 饱和湿度下培养。48h 后首次全量换液 1 次。以后隔天换液,大约经过 2~3 周,干细胞贴壁生长至 85% 融合时,用 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化(37°C 、3~5min),倒置相差显微镜观察细胞变圆时(细胞仍贴壁)吸出胰酶,加入含 FBS 的培养液中和残余胰酶后,吹打制成细胞悬液,1:2 比例接种,细胞计数后,按 $5 \times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ 的密度接种于培养瓶中,细胞生长汇合后再次传代。(2)脱细胞真皮基质载体的制作:取新生小牛的真皮层,切成 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 的正方形小块,浸在自制脱细胞剂中脱细胞。石蜡切片观察真皮结构变化及细胞残留数目。以自制脱细胞剂方法进行脱细胞处理,按一定浓度配比的消化液对自制脱细胞剂脱细胞后的真皮基质进行消化。切成直径为 3.5mm,并且经过⁶⁰Co 消毒备用。(3)骨髓间充质干细胞复合体的制备:培养增殖后的骨髓间充质干细胞经 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化后,1500r/min,离心 10min,浓集,进行细胞计数。制成单细胞悬液,并接种于改建后的脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)载体上(5×10^4 个/毫升),在含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液中培养,隔日换液,制成干细胞复合体备用,培养 3 天后,2.5% 戊二醛固定后,用常规扫描电镜制备标本行扫描电镜观察(图 1)。(4)动物模型制备:3% 戊巴比妥钠(1ml/kg)静脉麻醉。双膝备皮消毒,无菌条件下股骨髁滑车关节面钻孔,直径 3.5mm、深 3.0mm,达软骨下骨。缺损处按实验分组填满干细胞复合体,空白组缺损不作处理。将髌骨复位,逐层缝合膝关节囊和皮肤。术后青霉素 10 万 U 肌肉注射 1 周。术后动物单笼饲养,观察动物大小便防止腹泻及其他传染病,不固定术肢,自由活动。(5)实验动物分组:24 只新西兰大耳白兔 48 侧后膝关节,雌雄不限,随机分为 4 组,A 组即补肾活血汤结合干细胞复合体实验组;缺损中种植干细胞复合体,每天中药补肾活血汤(3.2g/kg)灌胃。B 组即单纯复合体组:缺损中种植干细胞复合体;C 组即单纯补肾活血汤组:缺损中不种植干细胞复合体,每天单纯补肾活血汤(3.2g/kg)灌胃;D 组即空白组:缺损不作任何处理。分别于 4、8、12 周耳缘静脉注入气栓处死各取材 2 只。标本 10% 甲醛固定。行 Masson 三色染色检查。(6)设计:分组对照观察。(7)实验地点:实验在北京中医药大学细胞与生化实验室(国家中医药管理局三级实验室)完成。

3. 主要观察指标:参照 Wakitanis 等^[2] 制定的评分标准组织形态学评分标准,对实验组和对照组修复组织形态学进行半定量评分。

4. 设计、实施、评估者:设计为第一作者,实施为全部作者,评估为第一作者,均经过正规培训。

5. 统计学方法:使用 SPSS 11.5 统计软件进行数据统计处理,数据用均数 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用 *t* 检验,并进行组

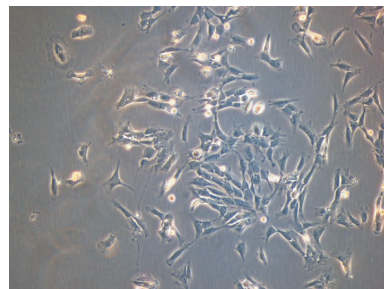


图 1 原代细胞培养 7 天($\times 100$)

间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异显著性。

结 果

1. 实验动物大体观察:实验选用新西兰大耳白兔 24 只,分为 4 组,无脱失,进入结果分析 24 只,术后 3 天,所有试验兔均稍跛行,膝关节轻度红度肿胀,活动减少,以后则肿胀逐渐消退,活动逐渐增加,8 天左右活动自如。伤口愈合良好,无关节积液及感染征。

2. 兔骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)倒置显微镜下的观察结果:初步分离的 BMSCs,未贴壁时呈圆球形,体积较大,BMSCs 接种后 4h 开始贴壁,贴壁后呈梭形外观的成纤维细胞,24h 大量细胞贴壁并伸展开,48h 后首次换液,可见大小不等的集落,隔日换液,贴壁细胞体积增大,镜下细胞绝大多数呈梭形外观的成纤维细胞,少量细胞呈三角形、多边形,核居中,1~3 个核仁。有不规则的生长突生出,细胞间充质折光性强;4~5 天后细胞形成集落状,形态比较单一,基本上呈梭形或多角形(图 1);原代培养 10~15 天的细胞即铺满培养瓶底 90% 以上融合(图 2),传代后生长速度更快,以 1:3 的比例传代约 5~7 天铺满。

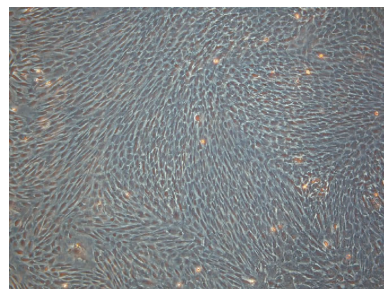


图 2 首次传代的细胞

细胞呈均匀生长,形态单一,基本呈梭形,排列呈有规律的方向性($\times 100$)

3. 骨髓干细胞复合体扫描电镜检查:支架呈三维多孔立体结构,孔隙均匀,平均孔隙能达到 $500\mu\text{m}$ 左右,干细胞大量结合在支架上,与胶原纤维黏附性好,

生长良好,可见蛭蚰触角一样的“丝状伪足”(图3)。

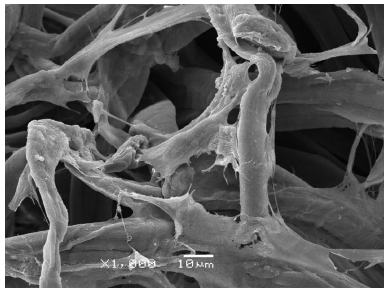


图3 制备好的骨髓间充质干细胞复合体(×1000)

4. 修复软骨的大体形态学观察修复关节缺损效果观察:①A组:术后4周修复区与周围软骨界限清楚,修复区低于周围软骨高度,可见少量白色、半透明类软骨样组织所填充,表面不光滑。术后8周,可见白色半透明,具一定弹性和韧性的软骨样组织填充,与周围正常软骨的界限模糊,表面光滑,半透明光滑组织,表面较平整,与周围软骨组织边界开始变模糊。术后12周,修复区和周围正常组织边界模糊,缺损的软骨质地,颜色与周围正常软骨相似,边界很难区分;②B组:修复与实验组相似但光泽度差,表面不光滑;③C组:术后4周缺损处由少量肉芽组织填充,与周围正常软骨组织界限清楚。术后8周,缺损处修复组织变成半透明组织,与周围软骨组织边界开始变模糊。12周缺损处平坦,与周围正常软骨界限模糊;④D组术后4周,缺损区充满红色半透明肉芽组织样物质,表面粗糙不平,无光泽,明显凹陷。术后8周,填充物为红色半透明肉芽组织样物质,表面欠平整,稍凹陷。术后12周,仍存在有明显缺损及周边凹凸不平瘢痕组织充填入,瘢痕组织形成软组织少许粘连,缺损区覆盖物为较厚的毛糙纤维样组织。

5. 修复关节缺损效果组织学观察:第12周:A组,软骨表面光滑,软骨细胞数量多,排列较规则,与周围组织整合良好,可见亮绿色胶原纤维,修复部位内的细胞具有正常软骨细胞圆球形的组织学基本特征,但与宿主软骨细胞相比体积较小(图4A),修复的组织呈现出均匀的异染性着色,软骨深层染色浓,细胞形态大(图5A)。B组12周,软骨细胞数量增多,排列欠规则,软骨表面凹陷,与周围组织分界较明显,有少量的亮绿色胶原纤维。间充质染色浅,细胞陷凹少。C组12周修复的软骨组织排列较紊乱,表面凹陷,可见少量亮绿色胶原纤维。D组12周修复的组织仅见少量的亮绿色胶原纤维,无软骨细胞生成(图4B、图5B)。

6. 修复软骨的组织形态学评分及统计分析:见表1。

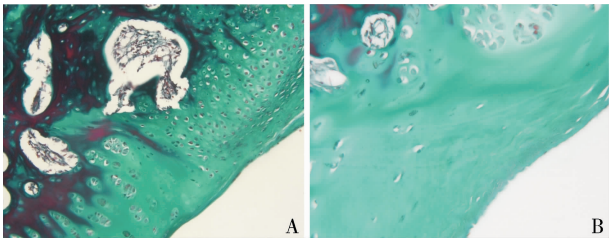


图4 MASSON 染色(×200)

A. 实验组12周;B. 空白对照组12周

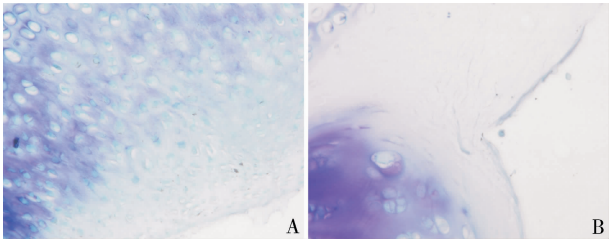


图5 甲苯胺蓝染色(×400)

A. 实验组12周;B. 空白对照组12周

表1 修复后软骨组织形态学分值($\bar{x} \pm s$)

组别	4周	8周	12周
补肾活血汤结合干 细胞复合体实验组	8.23 ± 0.58	6.41 ± 0.54	4.36 ± 0.88
单纯复合体组	11.50 ± 0.57	9.72 ± 0.63	8.50 ± 0.52
补肾活血汤组	12.57 ± 0.54	9.57 ± 0.56	8.06 ± 0.49
空白组	13.40 ± 0.55	11.64 ± 0.33	10.62 ± 0.51

12周后干细胞复合体实验组与其他3组相比较有明显差异, $P < 0.05$;单纯复合体组与单纯中药组相比较无明显差异, $P > 0.05$,但两者与空白组相比较均有显著差异, $P < 0.05$

讨 论

软骨组织工程包括种子细胞的获得,支架材料及其构建,种子细胞的增殖及与环境的相互作用。理想的支架材料作为组织工程种子细胞的生长及营养和代谢的运输载体在组织工程方法中至关重要。支架材料作为人工的细胞外基质(extra cellular matrix, ECM),主要作用是模拟细胞体在其内生长的空间,为细胞形成软骨提供一个继续增殖分化的微环境。理想的细胞支架必须具备以下特性:与种子细胞和宿主组织有良好的组织相容性;具有三维立体结构;具有可塑性,可被加工成所需的形状;具有良好的生物可降解性。天然材料胶原最突出的优点是抗原性低,生物相容性好,具有细胞识别信号,有利于细胞行为。

骨髓中的 BMSCs 增殖能力强,具有多向分化能力,可以分化为骨、软骨、肌肉、脂肪等多种组织,更具有采集方便、对机体损伤小的特点,是软骨组织工程理想的种子细胞。而且 BMSCs 具有多向分化能力,种植软骨缺损区内的 BMSCs 可同时向成骨和成软骨

方向分化,能同时修复软骨和软骨下骨的损伤,使移植植物与宿主形成良好的结合^[4,5]。

骨髓间充质干细胞含量极少,因此有效的分离方法非常重要,本实验利用骨髓中细胞成分的比重不同和贴壁生长的特性,采用比重为 1.073 的 Percoll 细胞分离液进行贴壁培养分离法和密度梯度离心法来体外培养干细胞使绝大部分的血细胞除去,最终使骨髓间充质干细胞得以纯化并且缩短细胞培养的时间。

BMSCs 在机体自身修复细胞难以到达缺损中央区,发挥重要作用,支架上种植 BMSCs 保证了组织修复的完整性和均衡性^[6],本实验使用的脱细胞、纤维改建、交联的 ADM 载体主要成分是二型胶原,并且无明显免疫原性,保持载体的立体结构,使其具备一定的可塑性,也可以减慢胶原载体内的降解速度,使载体表现出适宜的生物降解性,在兔软骨缺损内可降解完全,未见排异反应,支架孔隙均匀,平均孔隙能达到 500 μ m 左右,利于细胞的黏附和长入、营养成分的渗入,及代谢产物的排出附和的细胞能够长时间存活并进行增殖,从而完成软骨缺损修复^[7]。本实验利用在组织工程化脱细胞真皮基质上接种兔骨髓间充质干细胞,培养 3 天后,经扫描电镜显示可见细胞伸出像蜥虫触角一样的“丝状伪足”,在胶原纤维黏附性好,支架呈三维多孔立体结构,孔隙均匀。

既往的研究着重于研究采用多种技术手段来修复缺损,即使在早期获得了再生的透明软骨,但这些透明软骨无论在生物力学和结构上与正常关节软骨都不相同,任何组织工程替代物都难以模拟天然软骨多的结构和性质^[8]。因此,如何提高再生软骨的质量,延缓退变就成为软骨修复的关键。膝骨性关节炎的主要病理变化是关节软骨退变,属中医“骨痹”范畴,《内经》提出“风寒湿三气杂致合而为痹”。祖国医学认为其发病以肝肾亏虚为内因,风寒湿邪侵袭为外因,瘀血及痰湿为病理产物,属本虚标实之证。病位在膝关节,与肝肾有关。《灵枢本脏篇》云:“血和则经脉流行,营复阴阳,筋骨劲强,关节清利矣”。血瘀是骨关节炎发病的重要环节,膝骨性关节炎的一个主要症状就是疼痛,严重降低患者的生活质量,而中医学认为“痛则不通,通则不痛”,发生疼痛主要就是气血运行不畅,经脉痹阻。补肾活血汤出自《伤科大成》,补肾壮筋,活血止痛。补肾活血中药能够降低血清、关节软骨及滑膜一氧化氮水平,延缓骨关节炎的组织学改变,抑制膝骨关节炎的发生与发展,同时还具有抗脂质过氧化、提高抗氧化酶活性、保护软骨细胞免于自由基损害、

延缓关节软骨退变以及促进关节软骨修复的作用^[9]。

刘毅等^[9]通过实验研究发现补肾活血方能显著降低血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平。研究结果提示,通过抑制炎症因子的产生,从而减轻炎症反应是补肾活血方改善骨关节炎(osteo arthritis, OA)临床症状的重要机制之一。梁祖建等^[10]通过临床研究发现补肾活血方可以调控关节软骨细胞外基质的降解以及调节基质金属蛋白酶,抑制炎症,抑制氧自由基损伤,抑制软骨细胞凋亡,延缓软骨损伤,延缓关节退变,对骨关节炎的软骨有保护和促进修复作用。

笔者通过实验发现中药干细胞复合体组在 12 周时兔子的活动功能自如,载体区与周围软骨交界面有大量的软骨细胞增殖。种植物与周围组织结合紧密,有骨样组织长入种植物。修复组织与正常软骨组织已经非常相似,病理切片提示修复组织与正常软骨组织结构类似,并且与周围组织整合良好。随着实验条件的不断完善,实验技术的不断进步,中医药防治 OA 的作用机制将会得到更全面的阐述。

参考文献

- 李春根,康晓乐,宋广明,等. 独活寄生汤结合骨髓基质干细胞复合体修复兔膝关节软骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32): 5957-5961
- Wakitanis, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg (Am), 1994, 74(4): 579-592
- Nicola Tremain, Jatma Korkko, David Ibberson, et al. Microsoft analysis of 2,353 expressed genes in a single cell derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages[J]. Stem Cells, 2001, 19(5): 408-418
- Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells[J]. Ann NY Sic, 2009, 1176: 101-117
- 刘明,项舟,裴福兴,等. BMSCs 种植双相复合支架修复兔关节软骨及软骨下骨缺损[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(1): 87-93
- 江健,孙磊,冯华,等. 脱细胞真皮基质的改建及其作为软骨细胞移植载体在兔软骨缺损修复中的应用[J]. 中国运动医学杂志, 2008, 27(4): 412-415
- Chung C, Burdick JK. Engineering cartilage tissue[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60: 243-262
- 杨平林,刘德玉,贺西京,等. 补肾活血中药对膝骨性关节炎家兔血清、滑膜及关节软骨一氧化氮水平的影响[J]. 中国骨伤, 2003, 16(11): 667-669
- 刘毅,周青. 补肾活血法治疗肾虚型骨关节炎临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(10): 12-13
- 梁祖建,韩清民,张还添. “补肾活血方”对骨关节炎软骨保护的效应与机制研究[J]. 江苏中医药, 2009, 41(3): 33-34

(收稿:2011-06-01)

(修回:2011-06-10)