

人源脐带间充质干细胞对膝骨关节炎模型大鼠的治疗作用

李 伟, 李政楠, 王秀娟, 牟春琳, 杨 莹, 金 星, 徐永胜*

天津长和生物技术有限公司, 天津 301925

摘要: 目的 观察人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)对SD大鼠膝骨关节炎的治疗效果。方法 8周龄近交系SD雄性大鼠6只,均采用自身双侧对照研究。应用手术方法切断双膝关节前交叉韧带,手术后不固定伤肢,笼内自由活动。术后4周,右侧作为模型侧,左侧膝关节注射hUC-MSCs 100 μ L (1×10^7 cells/mL)。注射后4周,处死所有实验组大鼠并收取双侧膝关节标本,进行HE和甲苯胺蓝染色。结果 模型侧细胞排列紊乱,细胞簇集明显,有细胞消失、基质染色不均、软骨结构改变、表面凹凸不平、软骨层次较差等现象,表明软骨蜕变,骨关节炎形成;hUC-MSCs治疗侧与模型侧相比,软骨细胞排列基本整齐,呈柱状,细胞增生较多,细胞簇集明显减少,潮线较完整。软骨表面相对平滑,表明软骨处于损伤修复中。结论 hUC-MSCs移植治疗有助于改善大鼠膝骨关节炎,使大鼠关节软骨破坏减轻,促进软骨组织修复。

关键词: 脐带间充质干细胞; 骨关节炎; HE染色; 甲苯胺蓝染色

中图分类号: R329 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)12-2380-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.004

Experimental study of human umbilical cord mesenchymal stem cells in treatment of knee osteoarthritis in rats

LI Wei, LI Zhengnan, WANG Xiujuan, MOU Chunlin, YANG Ying, JIN Xing, XU Yongsheng

Ever Union Biotechnology Company Limited, Tianjin 301925, China

Abstract: **Objective** To observe the therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell injection on knee osteoarthritis in SD rats. **Methods** Inbred Sprague Dawley (SD) male rats of eight weeks old were studied by bilateral self control. The anterior cruciate ligament of both knee joints was cut by surgical method, the injured limb was not fixed after surgery, and the cage was free to move. Four weeks after the operation, human umbilical cord mesenchymal stem cell injection of 100 μ L (1×10^7 cells/mL) was injected into the left knee joint. Four weeks after injection, all rats in the experimental group were sacrificed and bilateral knee specimens were collected. **Results** HE and toluidine blue staining showed that the cells on the single operation side were disordered, the cell clusters were obvious, the cells disappeared, the matrix staining was uneven, the cartilage structure changed, the surface was uneven, and the cartilage level was poor, indicating that the cartilage was in metamorphosis and osteoarthritis was formed. Compared with the single operation side, the stem cell treatment side showed that chondrocytes were arranged in a basically neat columnar shape, with more cell proliferation, significantly reduced cell clusters, and relatively intact tidal line. The cartilage surface is relatively smooth, indicating that the cartilage is in repair from injury. **Conclusion** hUC-MSCs transplantation therapy can improve the arthritis of rats, reduce the damage of articular cartilage and repair the cartilage tissue.

Key words: human umbilical cord mesenchymal stem cell; knee osteoarthritis; HE staining; toluidine blue staining

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种严重危害人类健康的慢性骨关节疾病,其在关节病中数量最多,超过类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)等其他关节炎的总和。在病理水平,OA表现为关节软骨的

破坏及骨赘的异常增生,以致临床上出现关节疼痛、活动受限及关节畸形等。同时,OA是导致青壮年劳动力下降的最主要病因,造成重大经济负担。流行病学研究显示,在世界范围内,65岁以上的人口中,有超过一半为OA患者^[1]。在我国,随着人口

收稿日期: 2020-09-11

基金项目: 国家重点研发计划“干细胞及转化研究”重点专项(2019YFA0112100);天津市科技计划项目(17ZXXYSY00020)

*通信作者: 徐永胜,临床医学博士。E-mail: brian.xu@chinaecbio.com

老龄化的进程,OA的发病也呈现逐年上升的趋势。

我国曾开展了大规模关于膝关节OA的流行病学研究,结果显示在中国症状性膝关节OA的患病率为8.1%^[2],这一数据高于西方,而且在中国农村地区的患病率高于城市地区^[3]。同时,在中国农村地区,症状性膝关节OA会增加人群的全因死亡率^[4]。因此,非常有必要以膝关节OA为切入点,采取有效的治疗手段控制OA的发展,缓解症状,提高患者的生存质量。

近年来,在基础研究方面,组织工程技术的发展为脐带间充质干细胞(UC-MSCs)治疗提供了大量的机会。作为前体细胞的UC-MSCs可以定向分化为各种体细胞,包括成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞等^[5-8]。因此,有研究利用UC-MSCs的这种定向分化功能治疗软骨再生^[9]。同时,UC-MSCs还具有抑制T淋巴细胞的功能,从而降低了OA中的炎症反应^[10]。还有研究显示,UC-MSCs具有旁分泌功能,其可以分泌表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、血管内皮生长因子(VEGF)等生长因子,从而促进软骨的再生^[10]。另外,UC-MSCs还会释放一些细胞因子缓解疼痛,从而减轻患者的症状^[8,10]。最新的研究表明,UC-MSCs释放的外泌体携带有多种microRNA、mRNA、脂质体、蛋白等,这些生物因子可能在促进软骨细胞的再生中发挥了重要作用^[11]。由此可见,UC-MSCs通过多种机制在软骨修复和缓解疼痛方面发挥了作用。

本研究通过人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)干预SD大鼠OA的模型,观察治疗效果。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠,8周龄,6只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2017-0011。

1.2 主要试剂

阿佛丁注射液(中国科学院生物物理研究所,批号T48402);10×磷酸盐缓冲液[中科迈晨(北京)科技有限公司];Avertin(Sigma-Aldrich);叔戊醇、乙二醇四乙酸、无水乙醇、二甲苯(国药集团);氯化钠注射液(石家庄四药有限公司);伊红染色液、苏木素染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);甲苯胺蓝染色液(北京欣华绿源科技有限公司)。

1.3 主要仪器

石蜡包埋机(型号EG1150H)、全封闭组织脱水机(型号ASP200S)、轮转式切片机(型号RM2255)、

多功能染色机(型号ST5020)、全自动封片机(型号CV5030),徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;生物显微镜[尼康仪器(上海)有限公司,型号Ci]。

2 方法

2.1 hUC-MSCs的制备

利用脐带组织原代培养法提取hUC-MSCs。无菌条件下,取脐带1根(脐带来源于健康状态良好、足月剖宫产产妇自愿捐献),剪成2 cm长小段,去除脐带表皮、动脉及静脉,用PBS反复清洗3次,去除红细胞。将清洗完毕的脐带组织剪碎至乳糜状,用无菌巴士管以2 mm³点板,10 cm组织培养皿置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。1 h后补充完全培养基,72 h后换液,观察细胞生长情况。随后每3天换液,10 d左右传代至P1代,随后按照1:5进行扩增培养,每4天传代1次,至P5代细胞冻存。冻存前进行细胞计数,无菌、内毒素、流式分析,结果符合要求。按试验所需细胞数量复苏,hUC-MSCs浓度为1×10⁷ cells/mL,批号M2017122501,保存条件2~8℃,有效期12 h。

2.2 OA模型建立与治疗^[12-15]

经过适应性培养的SD大鼠,均采用自身双侧对照研究。ip阿佛丁注射液进行麻醉,剂量为2.5 g/mg,麻醉前禁食禁水12 h。麻醉后,于双侧膝关节沿髌韧带内侧缘切口,打开关节腔后,切断前交叉韧带,保留后交叉韧带,术闭缝合伤口,不固定伤肢,自由活动,术后抗感染止痛。4周后,ip阿佛丁注射液进行麻醉,右侧作为模型侧,左侧膝关节腔内注射hUC-MSCs 100 μ L(1×10⁷ cells/mL),注射后大鼠可在笼内自由活动。

2.3 大鼠膝关节取材

注射hUC-MSCs 4周后,通过CO₂窒息的方式处死SD大鼠并收集双侧膝关节标本。随机选取一组进行大体标本观察,其余浸泡在4%多聚甲醛溶液中用于制备石蜡切片,进行HE、甲苯胺蓝法检测。

2.4 HE、甲苯胺蓝染色

将浸泡在4%多聚甲醛溶液中的组织取出,置于10% EDTA磷酸盐缓冲液(PBS)中,进行脱钙处理,每隔3~4 d更换1次脱钙液。

2.4.1 蜡块制备及切片 将浸泡在10% EDTA脱钙液中的组织取出,置于70%乙醇溶液,再经过脱水机自控完成80%、90%、95%、100%乙醇浸泡2 h,完成脱水过程。经过透明过程后,将组织放入熔化的石蜡中浸渍。待石蜡凝固后,即得到带组织的蜡

块。蜡块固定在切片机上后,将组织切成5 μm 的切片,用毛笔轻轻托起放在纸上。用眼科镊镊起蜡带轻轻平铺在40~45 $^{\circ}\text{C}$ 的水面上,借水的张力和水的温度,将蜡带自然展平。待切片在恒温水面上充分展平后,将蜡片放置载玻片上,倾去载玻片上的余水,磨砂面标记编号。

2.4.2 HE染色 将切片置入染色机配套的玻片篮,放入65~70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烤箱,烤片15 min,置入染色机中,详细操作见表1。待程序结束后,从二甲苯中取出切片,置入自动封片机,中性树胶封片、固定。

表1 HE染色操作步骤

Table 1 Operation steps of HE dyeing

操作顺序	试剂	作用时间
1	二甲苯	6 min
2	二甲苯	6 min
3	二甲苯	6 min
4	无水乙醇	40 s
5	无水乙醇	40 s
6	95%乙醇	40 s
7	95%乙醇	40 s
8	80%乙醇	40 s
9	自来水	1 min
10	苏木素	10 min
11	自来水	30 s
12	1%盐酸乙醇	12 s
13	自来水	12 s
14	促蓝液	30 s
15	自来水	8 min
16	0.5%水溶性伊红	2 min
17	自来水	12 s
18	80%乙醇	12 s
19	95%乙醇	12 s
20	95%乙醇	12 s
21	无水乙醇	12 s
22	无水乙醇	12 s
23	苯酚二甲苯	3 min
24	二甲苯	30 s
25	二甲苯	30 s

2.4.3 甲苯胺蓝染色 将切片置入染色机配套的玻片篮,放入65~70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烤箱,烤片15 min,置入染色机中,详细操作见表2。待程序结束后,从二甲苯中取出切片,置入自动封片机,中性树胶封片、固定。

2.4.4 切片观察 用尼康显微镜Ci显微镜观察HE、甲苯胺蓝等方法染色后的切片,用NIS-Elements F软件,在相同的曝光时间下记录切片的染色情况,并拍摄的照片,判断损伤情况。

表2 甲苯胺蓝染色操作步骤

Table 2 Operation steps of toluidine blue staining

操作顺序	试剂	作用时间
1	二甲苯	6 min
2	二甲苯	6 min
3	二甲苯	6 min
4	无水乙醇	40 s
5	无水乙醇	40 s
6	95%乙醇	40 s
7	95%乙醇	40 s
8	80%乙醇	40 s
9	自来水	1 min
10	甲苯胺蓝	10 min
11	自来水	2 min
12	80%乙醇	12 s
13	95%乙醇	12 s
14	95%乙醇	12 s
15	无水乙醇	12 s
16	无水乙醇	12 s
17	苯酚二甲苯	3 min
18	二甲苯	30 s
19	二甲苯	30 s

3 结果

3.1 膝关节大体标本观察

SD大鼠膝关节大体标本显示,其关节软骨均有不同程度损伤,建模成功。

3.2 组织学观察

HE和甲苯胺蓝染色结果表明,模型侧软骨细胞排列紊乱,细胞簇集明显,有细胞消失、基质染色不均、软骨结构改变、表面凹凸不平、软骨层次较差等现象,表明软骨处于蜕变,骨关节炎形成;与模型侧相比,hUC-MSCs侧软骨细胞排列基本整齐,呈柱状,细胞增生较多,细胞簇集明显减少,潮线较完整。软骨表面相对平滑,表明软骨处于损伤修复中。hUC-MSCs侧从组织学观察均优于模型侧。结果见图1、2。

4 讨论

最早用于治疗OA的细胞治疗技术是自体软骨细胞移植,其优势在于使用自己细胞降低了免疫原性,成功率高,并获得FDA批准等,其劣势在于两次手术增加患者的痛苦,取材及软骨细胞扩增数量有限,细胞增殖能力随年龄增长而下降等^[16]。胚胎干细胞的优势在于具有很强的自我更新和多能分化功能,具有无限增殖能力等,而劣势在于较高的致癌风险、伦理问题以及免疫异质性^[17]。诱导多能干细胞是从体细胞向干细胞逆分化从而获得干细胞的功能,其优势在于较低的免疫源性,具有较强的

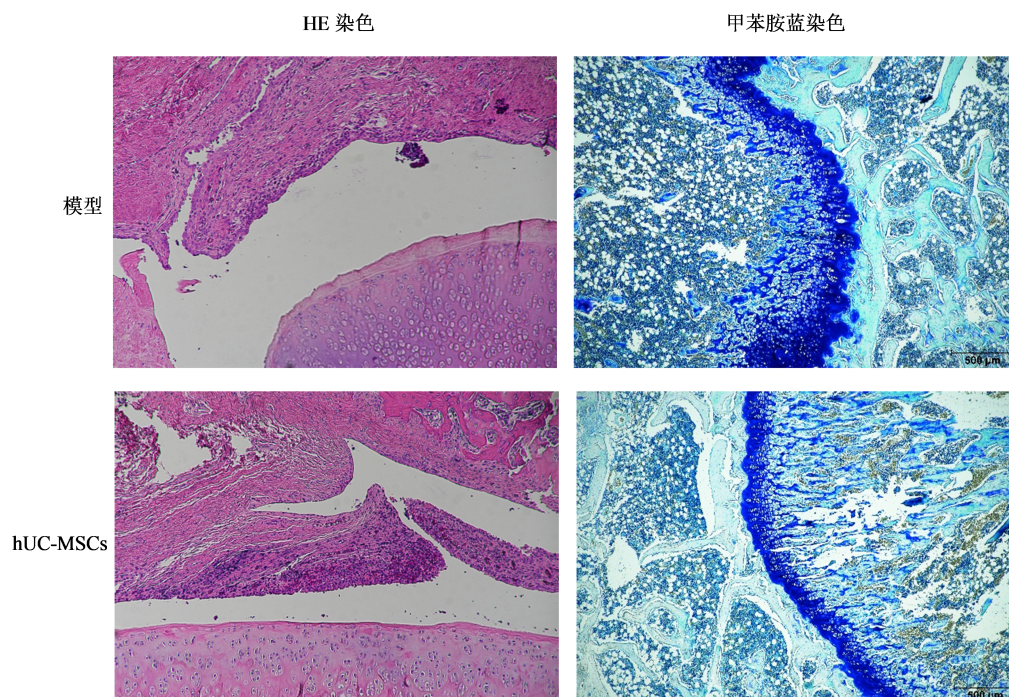


图1 膝关节组织切片染色结果(×10)

Fig. 1 staining results of knee joint tissue section (×10)

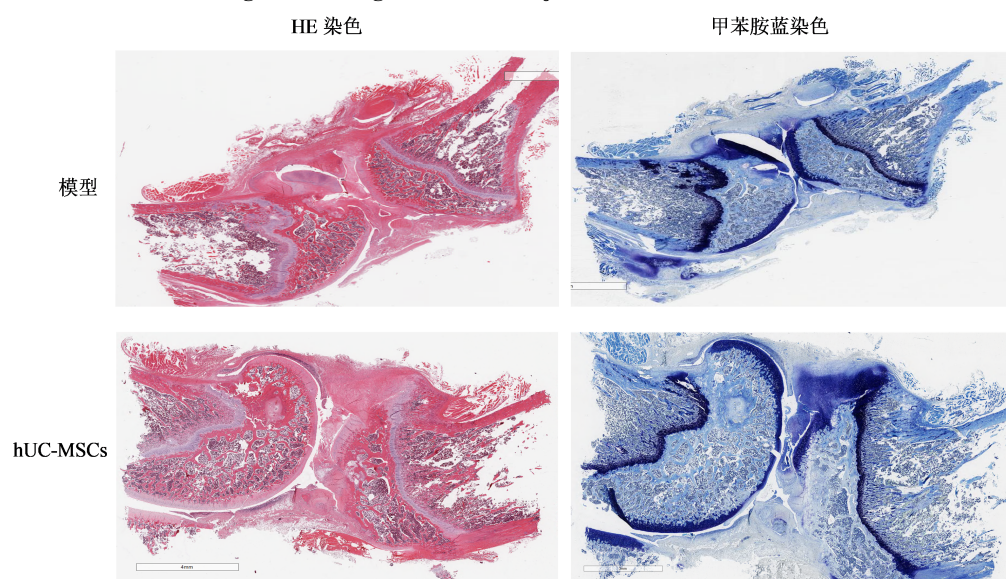


图2 膝关节组织切片染色全景扫描结果(×10)

Fig. 2 Panoramic scanning results of section staining of knee joint tissue (×10)

自我分化和增殖能力等,劣势在于逆分化的难度、残存部分体细胞表型以及高致瘤风险等^[18]。hUC-MSCs治疗OA的优势在于组织来源广泛,扩增分化容易,分化的细胞具有组织特异性、抗炎和招募作用、低成瘤风险、免疫源性低等特点,但目前的临床随机对照试验数量有限,尚需要进一步的临床研究证实其疗效^[19-20]。

本研究存在的主要不足是研究还处于动物实验阶段;对hUC-MSCs缓解疼痛的机制、软骨细胞再生和软骨祖细胞原位再生,以及受损关节软骨修

复过程和机制不清。hUC-MSCs对治疗OA有多大效果,是能够逆转OA的发病机制,使其恢复正常,还是能够阻止已有症状的关节炎进一步发展,仍需要大量基础研究以及临床实验后才能得出结论。

参考文献

- [1] Bijlsma J W, Berenbaum F, Lafeber F P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice [J]. Lancet, 2011, 377(9783): 2115-2126.
- [2] Tang X, Wang S, Zhan S, et al. The prevalence of symptomatic knee osteoarthritis in China: results from

- the china health and retirement longitudinal study [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(3): 648-653.
- [3] Kang X, Fransen M, Zhang Y, et al. The high prevalence of knee osteoarthritis in a rural Chinese population: the Wuchuan osteoarthritis study [J]. Arthritis Rheum, 2009, 61(5): 641-647.
- [4] Liu Q, Niu J, Huang J, et al. Knee osteoarthritis and all-cause mortality: the Wuchuan Osteoarthritis Study [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7): 1154-1157.
- [5] Fulzele S, Chothe P, Sangani R, et al. Sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2: expression and function in bone marrow stromal cells and in osteogenesis [J]. Stem Cell Res, 2013, 10(1): 36-47.
- [6] Sangani R, Pandya C D, Bhattacharyya M H, et al. Knockdown of SVCT2 impairs in-vitro cell attachment, migration and wound healing in bone marrow stromal cells [J]. Stem Cell Res, 2014, 12(2): 354-363.
- [7] Sangani R, Periyasamy-Thandavan S, Kolhe R, et al. MicroRNAs-141 and 200a regulate the SVCT2 transporter in bone marrow stromal cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 410: 19-26.
- [8] Freitag J, Bates D, Boyd R, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy - a review [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17: 230.
- [9] Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, et al. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions [J]. Maturitas, 2014, 78(3): 188-198.
- [10] Djouad F, Boufffi C, Ghannam S, et al. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases [J]. Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(7): 392-399.
- [11] Burke J, Kolhe R, Hunter M, et al. Stem cell-derived exosomes: a potential alternative therapeutic agent in orthopaedics [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 5802529.
- [12] 崔云鹏, 曹永平, 刘恒, 等. 骨髓间充质干细胞治疗大鼠骨关节炎的实验研究 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2015, 47(2): 211-218.
- [13] Yang X, Zhu T Y, Wen L C, et al. Intraarticular injection of allogenic mesenchymal stem cells has a protective role for the osteoarthritis [J]. Chinese Med J-Peking, 2015, 128(18): 2516.
- [14] Gupta P K, Chullikana A, Rengasamy M, et al. Efficacy and safety of adult human bone marrow-derived, cultured, pooled, allogeneic mesenchymal stromal cells (Stempeucel®): preclinical and clinical trial in osteoarthritis of the knee joint [J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18(1): 301.
- [15] Frisbie D D, Kisiday J D, Kawcak C E, et al. Evaluation of adipose - derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis [J]. J Orthop Res, 2009, 27(12): 1675-1680.
- [16] Bennell K L, Hunter D J, Hinman R S. Management of osteoarthritis of the knee [J]. BMJ, 2012, 345: e4934.
- [17] Zhang W, Ouyang H, Dass C R, et al. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis [J]. Bone Res, 2016, 4: 15040.
- [18] Wei Y, Zeng W, Wan R, et al. Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix [J]. Eur Cell Mater, 2012, 23: 1-12.
- [19] Davatchi F, Abdollahi B S, Mohyeddin M, et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients [J]. Int J Rheum Dis, 2011, 14(2): 211-245.
- [20] Bianco P, Cao X, Frenette P S, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine [J]. Nat Med, 2013, 19(1): 35-42.