

徐菊菊, 谢燕燕, 郭志义, 等. 构建兔软骨脱落细胞三维支架及与干细胞相容性评价的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(8): 1012-1022.

XU J J, XIE Y Y, GUO Z Y, et al. Experimental study to construct the three-dimensional scaffold of rabbit cartilage-shedding cells and evaluate their compatibility with stem cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(8): 1012-1022.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.08.007

# 构建兔软骨脱落细胞三维支架及与干细胞相容性评价的实验研究

徐菊菊<sup>1,2</sup>, 谢燕燕<sup>2</sup>, 郭志义<sup>3</sup>, 马雨凯<sup>3</sup>, 王霖虹<sup>2</sup>, 杨美荣<sup>2</sup>, 邓昭玲<sup>2</sup>,  
华宝来<sup>4\*</sup>, 闫振宇<sup>1,2\*</sup>

- (1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000;  
3. 华北理工大学公共卫生学院实验医学技术系, 河北 唐山 063000;  
4. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100015)

**【摘要】** 目的 制备不同浓度的兔软骨脱落细胞支架, 并评估其理化性能和干细胞的相容性, 为软骨修复提供实验依据。方法 Percoll 密度分离法培养骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs), 并进行流式细胞学鉴定和成骨、成软骨分化能力检测。从兔膝、股关节中切取软骨片, 进行物理粉碎、反复冻融以及各种酶混合消化脱细胞。为比较并观察不同浓度脱细胞支架的理化性能差异, 设计3组支架, 浓度分别为100%(A组)、50%(B组)、30%(C组), 每组3只。将第3代PKH26示踪的BMSCs接种于最适浓度支架上培养1周, 观察细胞生长情况。结果 流式技术检测BMSCs表面抗原, CD44、CD90呈阳性表达, CD45阴性表达; 成骨诱导茜素红染色可见红色钙结节; 软骨诱导阿利新蓝染色见软骨结节呈蓝色; 3组支架经苏木素-伊红(HE)、甲苯胺蓝染色后未观察到明显细胞形态。样本脱细胞后的DNA浓度与未脱支架的指标均值差异具有显著性( $P < 0.05$ )。糖胺聚糖含量较正常值稍偏低。3组支架两两比较孔径、吸水膨胀率、孔隙率、支架断裂强度、杨氏模量差异具有显著性( $P < 0.05$ ); 干细胞与支架共培养后细胞附着良好。结论 Percoll 密度分离法可获取高纯度的兔BMSCs; 应用混合脱细胞方法脱细胞较彻底。B组支架可作为构建组织工程软骨修复的最适方案。体外培养的BMSCs在B组支架生长良好。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞; 组织工程; 软骨脱细胞支架; 共培养

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 08-1012-11

## Experimental study to construct the three-dimensional scaffold of rabbit cartilage-shedding cells and evaluate their compatibility with stem cells

XU Jujū<sup>1,2</sup>, XIE Yanyan<sup>2</sup>, GUO Zhiyi<sup>3</sup>, MA Yukai<sup>3</sup>, WANG Linhong<sup>2</sup>,  
YANG Meirong<sup>2</sup>, DENG Zhaoling<sup>2</sup>, HUA Baolai<sup>4\*</sup>, YAN Zhenyu<sup>1,2\*</sup>

- (1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 2. Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 3. Department of Experimental Medical Technology, School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 4. Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Corresponding author: YAN Zhenyu. E-mail: hbyzy2011@163.com; HUA Baolai. E-mail: baolaihua@hotmail.com

**【基金项目】** 2019年河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目。

Funded by the Government Funded Clinical Excellence Training Program of Hebei Province in 2019.

**【作者简介】** 徐菊菊, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 血液内科学。Email: 1054461671@qq.com

**【通信作者】** 闫振宇, 男, 主任医师, 教授, 博士, 研究方向: 止血与血栓。Email: hbyzy2011@163.com;

华宝来, 男, 副主任医师, 副教授, 博士, 研究方向: 血液病学血栓与止血。Email: baolaihua@hotmail.com。

\* 共同通信作者

**[Abstract] Objective** To prepare decellularized scaffolds from rabbit cartilage at various concentrations and assess their physicochemical properties and compatibility with stem cells to provide an experimental basis for cartilage repair. **Methods** Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured using the Percoll density gradient separation method, and this was followed by flow cytometric analysis and testing of their osteogenic and chondrogenic differentiation capabilities. Cartilage pieces were excised from rabbit knees and hip joints and subjected to physical crushing, repeated freeze-thaw cycles, and mixed enzymatic digestion for decellularization. To compare and observe the physicochemical properties of the decellularized scaffolds at different concentrations, three groups of scaffolds (labeled A, B, and C) were designed with concentrations of 100%, 50% and 30%, with three replicates each. Third-generation PKH26-labeled BMSCs were seeded onto optimally concentrated scaffolds and cultured for 1 week to observe cell growth. **Results** Flow cytometry detected BMSC surface antigens with positive expression of CD44 and CD90 and negative expression of CD45. Osteogenic induction stained with alizarin red showed red calcific nodules, and chondrogenic induction stained with alcian blue showed blue cartilaginous nodules. No apparent cell morphology was observed in the three groups of scaffolds stained with hematoxylin-eosin, and toluidine blue. There was a significant difference in DNA concentration between decellularized samples and non-decellularized scaffolds ( $P < 0.05$ ). The content of glycosaminoglycans was slightly lower than the normal values. Significant differences were observed between the three groups of scaffolds in terms of pore size, water absorption, porosity, tensile strength, and Young's modulus ( $P < 0.05$ ). After co-cultivation of stem cells with the scaffolds, cell adhesion was found to be good. **Conclusions** Percoll density gradient separation can obtain high-purity rabbit BMSCs, and the mixed decellularization method is superior. Group B scaffolds were the most suitable for tissue-engineered cartilage repair. BMSCs cultured *in vitro* grew well on Group B scaffolds.

**[Keywords]** bone marrow mesenchymal stem cells; organizational engineering; cartilage decellularized scaffold; co-cultivation

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

软骨受损是由生理或病理条件下韧带超重负荷和不稳定而导致过度异常活动的相关损失<sup>[1]</sup>。目前尚未有治疗关节软骨损伤的“黄金标准”。治疗主要分为药理性和非药理性,微创技术也可应用于关节表面损伤:(1)微骨折技术刺激骨髓及再生过程,促进纤维透明软骨的形成;(2)同种异体和自体软骨圆柱体的移植;(3)体外软骨细胞培养并植入到软骨受损部<sup>[2-4]</sup>。关节软骨的内在愈合能力较差,其修复仍然是一个重大的临床挑战<sup>[5]</sup>。

近年来,组织工程以指数级速度发展,旨在生产功能性组织用于重建或再生结构受损或丢失的组织和器官,如皮肤、软骨、血管、肝等。生物构建组织一般指将功能性的细胞植入具有抗炎、免疫调节等微环境的生物材料组织中<sup>[6]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有自我更新能力、多向分化能力、骨髓支撑能力、抗炎和免疫调节的特性,此外取材简便、来源充足,在体外培养时易分离和扩增<sup>[7]</sup>。单一使用 BMSCs 疗法已成功运用到软骨修复上,但是最佳的细胞来源、性质及正确的数量存在争论。功能性生物材料支架丰富,比如金属和复合材料、陶瓷和聚合物、水凝胶、软骨脱落细胞可用于成骨的再生支架<sup>[8-10]</sup>。脱细胞的细胞外基质支架通过物理、反复冻融、酶消

化等多种方法混合应用去除了组织中的细胞组分,保留相关基质,有效降低了天然材料的免疫原性,生物相容性表现优异,并且其所保留的软骨基质成分可提供软骨再生微环境促进细胞附着、增殖迁移、分化和分泌以及软骨的形成,已被证明是一种良好的软骨再生生物材料<sup>[10-11]</sup>。若不能充分去除软骨脱落细胞支架软骨的细胞成分,这些剩余的细胞成分很可能会引发不良的炎症反应并抑制建设性重塑,包括细胞密度、基质密度、厚度、孔隙和形态在内的许多变量都会影响组织和器官脱落细胞的程度,从而影响所得支架的完整性和物理特性<sup>[12-13]</sup>。不同浓度的软骨脱落细胞支架能影响其吸水率、孔隙大小以及杨氏模量等方面。

本研究旨在选择最适合浓度的软骨脱落细胞支架以及与兔 BMSCs 共培养 1 周后 BMSCs 的生长情况,证实了组织工程学模式构筑新型组织工程支架的可行性,进而为组织工程支架临床应用研究奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

8 只 3 月龄普通级日本大耳兔,体重约 2.1 kg,

雄性,购自北京金牧阳实验动物养殖有限公司【SCXK(京)2020-0003】,于华北理工大学实验动物中心【SYXK(冀)2020-007】饲养。日本大耳兔采用分笼饲养,模拟兔子在自然条件下所经历的昼夜循环 12 h/12 h 饲养,动物房饲养的温度控制在 22 ~ 25 °C,环境湿度维持在 40% ~ 50%,兔子自由摄水摄食。实验方案经华北理工大学动物学院伦理委员会批准(2023-SY-058),严格遵循了科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》中规定的伦理和福利标准。

### 1.1.2 主要试剂与仪器

陆眠宁(批号 070011777,吉林华牧),1% TritonX-100 溶液(批号 A6345,美国 Sigma),PMSF Solution(批号 P0231C,碧云天),PBS(批号 20230321,北京索莱宝),抑肽酶溶液(批号 C3214,美国 Sigma),DNA 酶(批号 D8017,美国 Sigma),RNA 酶(批号 R8020,美国 Sigma),特级胎牛血清(批号 16420-50,北京普诺赛),Percoll 细胞分离液(批号 20220319,河北瑞帕特有限公司),0.25% Trypsin 和 0.02% EDTA(批号 25200-56,美国 Gibco 公司),PicoGreen dsDNA 定量检测试剂盒(批号 P9740,北京 Solarbio),CD44(批号 MA4400,美国 Thermo Scientific),PKH26 红色荧光细胞连接器试剂盒(批号 D0030,美国 Sigma 公司),兔糖胺聚糖检测(批号 23012029,上海恒远公司)

37 °C 恒温气浴震荡仪(常州市鸿科仪器公司,型号 MH-2),高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司,型号 Micro7),冷冻干燥机(北京亚泰科隆仪器技术有限公司,型号 YTLG-10A),电子万能材料试验机(日本 SHIMADZU 公司,型号 0-500N),紫外光联仪(新芝生物科技有限公司,型号 SZ03-II),共聚焦显微镜(德国 Leica 公司,型号 XW880),荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号 bx61)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 兔骨髓间充质干细胞分离、培养及传代

陆眠宁按 0.1 mL/kg 肌注日本大耳兔大腿根部,固定兔四肢于手术台,对胫骨内侧毛发进行清洁和剃毛,碘伏消毒 3 次,铺无菌手术洞巾;用 14 号骨髓穿刺针刺穿胫骨内侧进入骨髓腔,穿刺针筒内及 20 mL 注射器各加入 1 mL 单位为 3000 U/mL 的肝素冲洗,防止骨髓液凝固,抽取骨髓液 5 mL。将骨髓液缓慢加到预先置有 1.077 g/L 的 Percoll 淋巴细胞分离液 5 mL(骨髓液和淋巴细胞分离液体积比

约为 1 : 1) 的 15 mL 离心管中,2500 r/min 离心 20 min。吸取第 2 层乳白色的界面层(含目标细胞层)转移到新的 15 mL 离心管中,PBS 洗涤细胞 2 次,高速离心 1000 r/min,5 min;去上清液,加 5 mL 的 DMEM/F-12 完全培养基轻轻重悬细胞,种植至无菌的 T25 培养瓶,放入 37 °C、体积分数为 0.05 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。第 3 天半量培养基更换,第 5 天更换新的培养基并去除未贴壁细胞。当细胞融合度达 80% ~ 90% 时,采用 1 : 2 传代;用生理盐水洗涤细胞 2 ~ 3 次,去除残余液体。加入 500 μL 的 0.25% Trypsin + 0.02% EDTA,轻轻倾斜并摇动培养;在培养箱中取出细胞,酶解 1 min,在显微镜下检查细胞状态,若细胞呈现透明圆形则终止酶解。向培养瓶中添加 2 mL 完整的 DMEM/F-12 培养基停止胰酶活性,用移液器轻轻吹打以确保细胞完全分离,然后将细胞转移到一个新的 15 mL 离心管内,在 1000 r/min 离心 5 min,收集细胞沉淀。去上清,用新鲜的 DMEM/F-12 完全培养基重新悬浮细胞,按照 1 : 2 的比例进行传代,放入设定为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内继续培养,隔日观察。取第 3 代 BMSCs 进行后面的实验。

### 1.2.2 兔骨髓间充质干细胞表面标志物鉴定

流式细胞仪检测 BMSCs 表面标志物:对第 3 代 BMSCs(融合度达到 80% ~ 90%)操作如下:吸除培养基,加 2 mL PBS 洗涤 2 次细胞,每次不超过 30 s,以除去死细胞和代谢废物。吸弃 PBS,加入 500 μL 的 0.25% Trypsin + 0.02% EDTA,轻摇培养瓶,确保均匀覆盖底部。放置培养箱内 60 ~ 80 s 促细胞脱落。加入 2 mL 完整培养基中止胰蛋白酶反应,将细胞转入 15 mL 的离心管,以 1000 r/min 离心 5 min,以便收集细胞沉淀。弃上清,用 200 μL PBS 重新悬浮细胞,准备标记;向流式管中加 2.5 μL CD44 抗体,均匀混合。室温避光孵育 1 h,期间轻弹管子 2 ~ 3 次;加入 1 mL PBS 冲悬,1500 r/min 离心 5 min;弃上清,收集单细胞悬液,冲悬于 200 μL PBS 中;加入 2.5 μL 的二抗加到流式管内,混匀,室温避光孵育 30 min,期间轻弹管体 2 ~ 3 次;加入 2.5 μL CD45、CD90 抗体,混匀;流式细胞术分析前的准备:设定流式细胞仪的参数,收集目标抗体染色组的细胞数据,并通过 FlowJo 10.0 软件进行数据分析,评估细胞表面标志物的表达。

### 1.2.3 骨髓间充质干细胞分化诱导

(1)将 1 mL 0.1% 明胶加入到六孔板中,摇匀,

均匀覆盖各孔底部。置于无菌的超净台或 CO<sub>2</sub> 培养箱至少 30 min。随后用移液枪吸弃明胶溶液进行细胞铺板。每孔接种密度设置为  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, 并且向每孔加入 2 mL 的完全培养基进行培养。当细胞汇合度达到 70% 时, 表示细胞已经达到了足够的密集程度, 适合开始分化诱导, 并向每个孔中加入 2 mL 的成骨诱导分化培养基。在成骨诱导分化过程中, 每 3 d 更换 1 次新鲜的成骨诱导分化培养基, 共培养 28 d。

(2) 骨髓间充质干细胞成软骨诱导: 将第 3 代 BMSCs 进行消化、离心操作, 将  $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$  个待诱导的细胞转移至 15 mL 离心管中, 1000 r/min 离心 4 min, 并用移液枪吸除上清。加入 0.5 mL 成软骨诱导分化预混液, 重悬离心所得的细胞悬液, 以 1000 r/min 离心 5 min。用无菌胶头吸管吸取 500  $\mu$ L 密度约  $2 \times 10^5$  细胞悬液, 随后加入 0.5 mL 成软骨诱导分化完全培养基重悬, 以 1000 r/min 离心 5 min。将其竖立放置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养, 24 h 内静置离心管, 使得细胞悬液更易成团; 在细胞培养期间, 每隔 2 ~ 3 d 给细胞更换新配制的成软骨诱导分化完全培养基, 共培养 31 d。

#### 1.2.4 兔软骨脱细胞支架的制备及理化性能检测

处理兔双侧股骨、胫骨, 去除关节周围的皮肤、脂肪, 保护关节软骨。无菌手术刀切割软骨, 切成 2 mm<sup>3</sup> 小块并置于冰上的 50 mL 离心管中保存。然后进行生理盐水冲洗 3 次, 预冻后置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱过夜。48 h 冻干 (参数设定为 0.009 Pa, 冰冷器为 -60  $^{\circ}$ C), 然后研磨 (频率 70 Hz、90 s) 5 次, 100 目滤网去除未充分研磨的较大软骨颗粒, -20  $^{\circ}$ C 保存。软骨颗粒置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中 2 h, 37  $^{\circ}$ C 快速震荡融化 1 h; 融化后再次置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中, 上述步骤重复 6 个循环; 向 50 mL 离心管中添加 5 mL 软骨颗粒, 然后加入 5% 胰蛋白酶消化液 30 mL 进行酶消化 6 h, 6 个周期。PMSF 消化脱细胞 4 h; 离心去除上清液, 加入 PBS 清洗, 并吹打混匀, 以 4000 r/min 离心颗粒 20 min; 准备 10 mol/L Tris-HCl (pH = 7.4) 溶液; 配制含有 50 U/mL 脱氧核糖核酸酶和 1 U/mL 核糖核酸酶 A 的核酸酶溶液; 准备含有 10 U/mL 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.4) 抑肽酶溶液用于清洗样本中蛋白酶活性。将软骨颗粒 2500 r/min 离心 20 min, 去除上清液加入 30 mL 核酸酶溶液消化 4 h; 加入 30 mL 含有 10 U/mL 抑肽酶的

10 mmol/L Tris-HCl 溶液孵育 20 h, 最后用 PBS 洗涤。1% Triton-X100/PBS 溶液孵育 24 h; PBS 洗涤 6 次。将颗粒粉末制作成不同浓度的支架, 即 A 组 (100%)、B 组 (50%)、C 组 (30%) 共 3 组, 每组以 01、02、03 作为标记置于聚四氟乙烯模具中, 预冻后进行冻干 72 h, 紫外交联消毒 48 h。

支架行大体观察、物理性能、力学性能相关检测以及组织学评估。支架微观结构用扫描电镜观察: 将支架贴于导电碳膜双面胶上, 放入离子溅射仪样本台上进行喷金 30 s。将经过镀膜处理的支架放入样本交换室中, 进行真空抽取显微镜下观察并拍照记录。

#### 1.2.5 PKH26 标记骨髓间充质干细胞与支架共培养 1 周后甲苯胺蓝染色及激光共聚焦显微镜观察

(1) PKH26 标记示踪骨髓间充质干细胞: 将状态良好的第 2 代骨髓间充质干细胞以密度为  $2 \times 10^7$ /L 细胞加入离心管中, 首先用不含血清培养基清洗细胞 1 遍, 以 1000 r/min 离心 5 min。在完成细胞离心后, 小心吸除上层的上清液, 保留不超过 25  $\mu$ L; 向离心管中加入 1 mL 稀释液 C, 并使用移液管轻轻吹打以混合, 从而制备细胞悬液。将 4  $\mu$ L PKH26 乙醇溶液加入 1 mL 稀释液 C 中, 充分吹打混匀, 以备用。取大约  $4 \times 10^6$ /L 细胞密度的 1 mL 细胞悬液加入 1 mL 染色液中, 立即使用移液管轻轻吹打混匀, 使最终细胞密度达到  $1 \times 10^7$ /L, 混匀后室温下避光处孵育 1 ~ 5 min, 加入 2 mL 血清以终止染色反应, 孵育 1 min 以结合多余的染料。在 20 ~ 25  $^{\circ}$ C 条件下, 1500 r/min 离心 10 min, 小心吸除上清, 以避免吸走细胞沉淀。使用 10 mL 的完全培养基, 轻轻重悬沉淀的细胞, 确保细胞均匀分散, 将重悬的细胞转移到 1 个新的无菌离心管中, 以减少交叉污染的风险。再次离心 5 min, 以沉淀细胞。使用 10 mL 的完全培养基对细胞进行 2 次清洗, 每次清洗后都要进行离心和上清液的移除, 以确保去除未结合的染料。在最后一次清洗后, 用 4 mL 的完全培养基轻轻重悬细胞, 并充分吹打混匀。将细胞接种至 T25 培养瓶中, 放回培养箱内继续培养, 以促进细胞扩增。

兔 BMSCs 与支架共同培养 1 周: 将接种细胞的支架用 PBS 清洗 2 次, 每次 1 h, 加入完全培养基浸泡 48 h, 后将 PKH26 标记的细胞接种在支架上, 在培养箱共同培养 1 周。冰冻切片处理后甲苯胺蓝染色机共聚焦显微镜下观察细胞生长情况。

### 1.3 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8.0 软件中进行数据分析和作图,将符合正态分布的定量数据用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。对于两个独立样本的平均值进行比较时,应用 *t* 检验;而在对多个样本组的平均值进行比较时,则使用单因素 ANOVA(单变量方差分析),并通过 SNK(Student-Newman-Keuls)方法进行两两比较。所有的均采用双侧检验,以  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs 的形态观察

原代细胞形成集落,贴壁细胞明显增多,纤维状或星形状的细胞,形态不规则,传代细胞呈纺锤形、多角形,呈漩涡状生长(图 1A);每 2 或 3 d 进行

换液,待贴壁细胞融合度达到 80% ~ 90%时,可进行第 1 次细胞传代,比原代细胞更规则,细胞间隙减少,细胞形态更加紧密(图 1B);待细胞传至第 2 代时,细胞生长速度增快,细胞形态逐渐统一,分布不均(图 1C);第 3 代间充质细胞纯度较高,细胞呈对数期增长,细胞形态呈现为小弓箭型、多边形,呈现漩涡状生长(图 1D)。

### 2.2 流式细胞仪鉴定 BMSCs 表面抗原

流式细胞分析结果:表面 CD45 抗体细胞数占细胞总数的 0.37%,而 CD90 抗体阳性细胞占细胞总数的 98.20%,CD44 抗体总数占细胞总数的 99.00%,除了不表达 CD45 之外,CD44 和 CD90 的阳性表达与 BMSCs 的生物学特性相符,证明了通过 Percoll 密度梯度离心法分离得到的细胞是 BMSCs,见图 2。

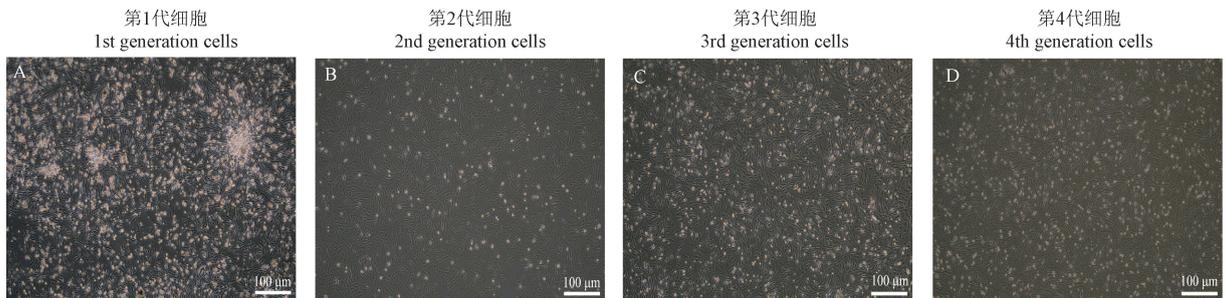


图 1 显微镜下 BMSCs 的形态学变化

Figure 1 Morphological changes of BMSCs observed under the microscope

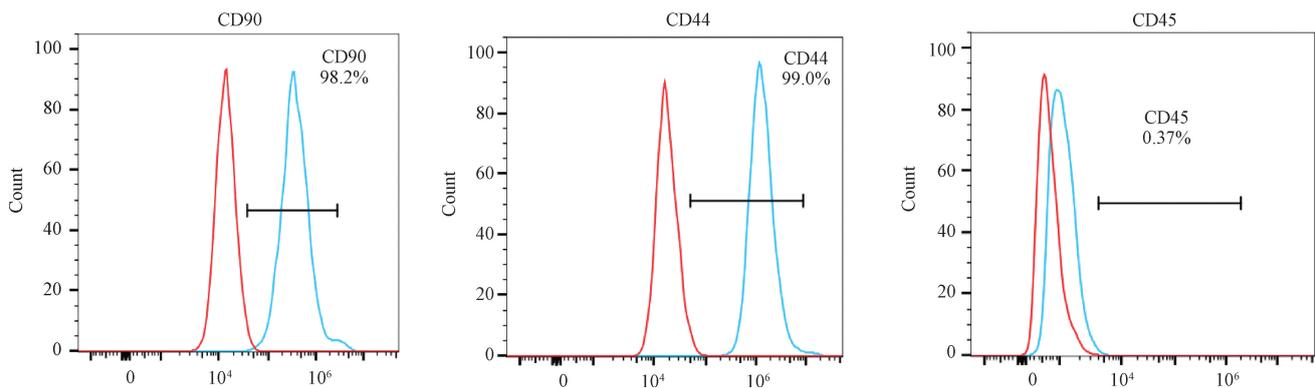


图 2 骨髓间充质干细胞表面抗原 CD44、CD45 和 CD90 测定

Figure 2 Measurement of surface antigens CD44, CD45 and CD90 on bone marrow mesenchymal stem cells

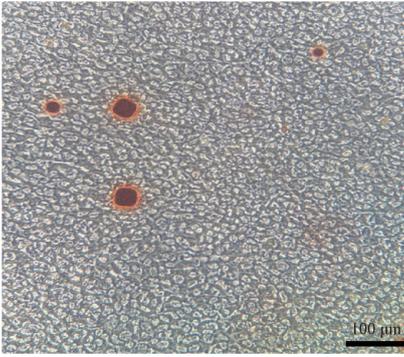
### 2.3 骨髓间充质干细胞成骨、成软骨诱导分化

BMSCs 经过 21 d 成骨诱导后逐渐发展出不规则的钙化结节,进一步应用茜素红染色后,钙化结节显示出醒目的深红色,见图 3;BMSCs 用软骨诱导液诱导初始阶段细胞形态无显著变化。随着诱导过程的延续,软骨结节逐渐变得明显,直到 31 d 后,

用阿利新蓝染色液染色,可观察到软骨结节周围的形态及排列发生了变化,呈现出蓝色,见图 4。

### 2.4 软骨脱细胞支架的大体观察

支架一般为乳白色棒状体,直径约 5 mm,高度约 10 mm,其表面呈现出粗糙的质地,并可见到多个细小的孔隙(图 5)。

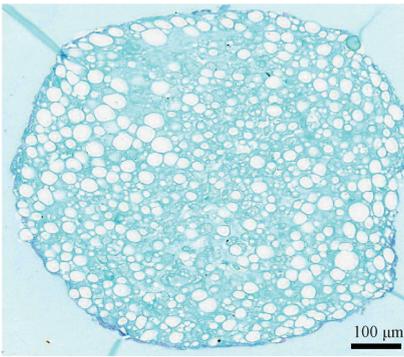


注:成骨细胞中的钙盐沉积茜素红染成橙红色。

**图 3** BMSCs 成骨诱导 21 d 后茜素红染色

Note. Calcium deposits in osteoblasts stain orange-red with alizarin red.

**Figure 3** Alizarin red staining of BMSCs after 21 d of osteogenic induction



注:可见大量空泡形成,细胞染成蓝色,说明含有酸性多糖。

**图 4** 兔 BMSCs 成软骨诱导分化阿利新蓝染色

Note. Extensive vacuole formation with cells stained blue, indicating the presence of acid mucopolysaccharides.

**Figure 4** Rabbit BMSCs stained with Alcian blue for chondrogenic differentiation induction



注:支架表面粗糙可见细小孔隙。

**图 5** 软骨悬液经过冷冻、干燥后制备的 3 组支架三维多孔支架

Note. Scaffold surface is rough with visible fine pores.

**Figure 5** Three-dimensional porous scaffolds prepared from cartilage suspension after freezing and drying

## 2.5 软骨脱细胞支架的组织学评估

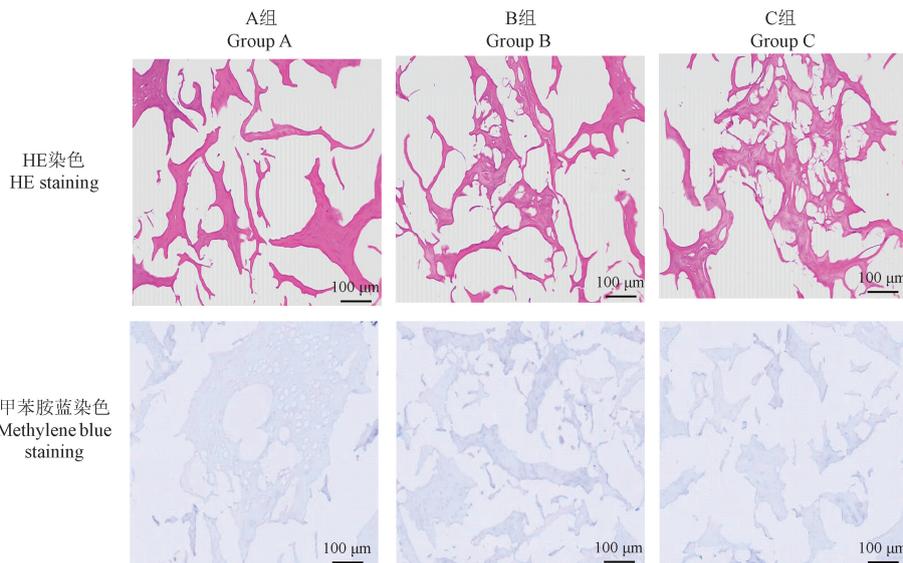
苏木素-伊红(HE)染色:支架内部呈现伊红的红色,形成了网状的疏松排列,这种结构中存在大量的交联孔隙,在网状支架上并未观察到明显的细胞形态(图 6)。

甲苯胺蓝染色:支架内部呈现蓝色,脱细胞基质的微丝之间形成互相连接的网络结构,布局呈现为疏松且网状的排列,在这些网状支架上,没有观察到明显的细胞形态(图 6)。

GAG 浓度测定:以兔糖胺聚糖标准品的浓度作为横轴,以 450 nm 波长的吸光值作为纵轴,制作标准曲线。其线性关系方程表达为  $y = 0.0007x + 0.0329$ ,且相关系数  $R^2$  达到 0.9951。这表明,在所考察的范围内,本方法展现出优秀的线性关系,见图 7。利用此标准曲线方程,可以计算测试样本中的糖胺聚糖含量。3 份供试品溶液中兔糖胺聚糖浓度平均值为  $180.52 \pm 4.06 \mu\text{g/L}$ ,其较正常值稍偏低,说明支架脱细胞后仍保留糖胺聚糖。

DNA 定量分析:未脱细胞及脱细胞支架在经蛋白酶 K 处理且彻底溶解后,通过离心操作未观察到任何沉淀;对未经脱细胞处理的样本溶液中的 DNA 含量进行测定,约为  $328.00 \pm 2.30 \text{ ng/mL}$ ,脱细胞后的支架 DNA 浓度为  $21.20 \pm 1.08 \text{ ng/mL}$ 。未脱样本与脱细胞后支架的 DNA 浓度 2 组浓度均数采用  $t$  检验,结果显示  $P < 0.05$ ,表明脱细胞前后 DNA 浓度之间差异具有显著性,即脱细胞过程显著降低了支架中的 DNA 含量。

微观结构:在使用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)对不同组别的支架样本进行观察时(图 8),首先在 50 倍的放大倍数下,可以明显看到支架内部的孔隙结果是相互贯通的,且分布较为均匀。当放大倍数增加到 300 倍时,支架的胶原纤维结构变得清晰可见。通过对 3 组支架的孔径进行测量和计算,可以得到 3 组支架的孔径为  $114.20 \pm 1.58 \mu\text{m}$ 、 $154.20 \pm 7.73 \mu\text{m}$ 、 $202.00 \pm 10.73 \mu\text{m}$ 。对于软骨支架来说,孔径大小建议在  $100 \sim 500 \mu\text{m}$ ,这个范围有利于 BMSCs 的附着、生长和软骨分化。3 组支架的孔径均在此范围内,较大的孔径更有助于营养物质的交换,故认为 C 组支架更有利于细胞的生长。3 组支架的孔径均值比较采用单因素方差分析,结果表明差异具有显著性( $P < 0.05$ )。随后,通过 SNK 检验进行两两比较, A 组与 B 组之间差异具有显著性( $P < 0.05$ ), B 组与 C 组差异具



注:3组支架的基质微丝相互连接,呈现网状结构疏松排列。

图6 3组支架经 HE 和甲苯胺蓝染色观察到支架内无细胞残留

Note. Matrices of three groups of scaffolds are interconnected, forming a loosely arranged mesh structure.

Figure 6 Three groups of scaffolds showed no cellular residue within the scaffolds after HE and methylene blue staining

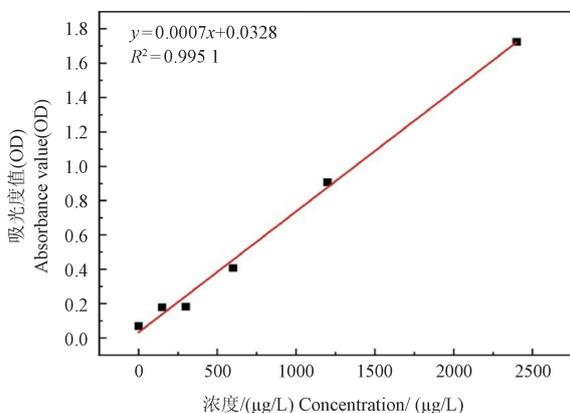


图7 兔软骨糖胺聚糖浓度与吸光度的标准曲线

Figure 7 Concentration and absorbance of rabbit cartilage glycosaminoglycans

有显著性( $P < 0.05$ ),A组和C组差异具有显著性( $P < 0.05$ )。

## 2.6 软骨脱细胞支架的物理性能

密度:3组支架的密度分别是  $20.00 \pm 0.30$ 、 $16.00 \pm 0.25$ 、 $14.00 \pm 0.32 \text{ mg/cm}^3$ 。A、B、C 3组支架密度均值比较采用单因素方差分析,结果表明差异具有显著性( $P < 0.05$ )。随后,通过SNK检验进行两两比较,A组与B组之间差异具有显著性( $P < 0.05$ ),B组与C组差异具有显著性( $P < 0.05$ ),A组和C组差异具有显著性( $P < 0.05$ )。3组支架的密度会随着支架的浓度升高而呈现上升的趋势。

吸水率:3组支架的吸水率比较结果见表1,与A组相比,B组和C组的支架吸水膨胀率显著增加( $P < 0.05$ ),表明B组和C组支架的性能在吸水方面有显著提升。进一步的比较发现,C组支架的吸水膨胀率也显著高于B组( $P < 0.05$ ),指出C组支架在这一性能指标上相比B组有进一步的提高。3组支架的吸水率会随着支架的浓度升高而呈现下降的趋势。软骨支架的高吸水率有利于营养物质的输送机代谢产物的移除,B组、C组支架较A组支架更有利。

表1 3组支架的吸水率及孔隙率结果( $n = 3$ )

Table 1 Results of water absorption and porosity of three groups of scaffolds ( $n = 3$ )

分组 Groups	吸水率/% Water absorption rate/%	孔隙率/% Porosity/%
A组 Group A	$697.03 \pm 12.50$	$52.34 \pm 0.23$
B组 Group B	$780.04 \pm 11.10^{**}$	$66.93 \pm 0.38^{**}$
C组 Group C	$828.73 \pm 9.00^{***\#\#}$	$81.88 \pm 0.44^{***\#\#}$

注:与A组相比,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与B组相比,## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with group A, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with group B, ## $P < 0.01$ .

孔隙率:3组支架的孔隙率分析结果见表1,与A组相比,B组和C组的支架孔隙率显著增加( $P < 0.05$ ),说明B组和C组的孔隙结构相对于A组更加发达。进一步比较揭示,C组的孔隙率比B组显

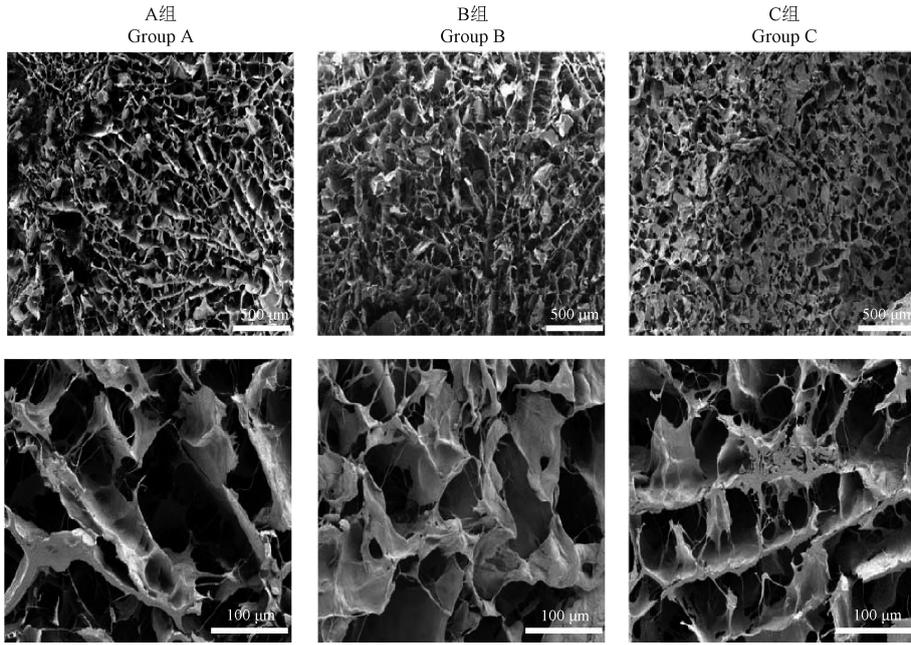


图 8 50 倍和 300 倍下观察 3 组支架

Figure 8 Observation of three groups of scaffolds under 50 × and 300 × magnification

著提高 ( $P < 0.05$ ); 3 组支架的吸水率会随着支架的浓度升高而呈现下降的趋势。B 组、C 组的高孔隙结构较 A 组更有利细胞生长。

### 2.7 支架的力学性能

经过测试及统计分析得出,在压缩位移下的应力变化,A 组显示出最渐进的应力增加,表明 A 组在受到压缩时比其他材料更柔软或更易于变形;B 组的斜率介于 A 组和 C 组之间,表明 B 组的刚度介于 A 组和 C 组之间,C 组似乎表现出应变硬化的特性,即在初始阶段相对柔软,但在一定位移后迅速变硬,见图 9。与 A 组相比,B 组和 C 组支架的断裂强度显著降低 ( $P < 0.05$ )。当 B 组与 C 组进行比

较时,C 组显著更低 ( $P < 0.05$ ),图 10。与 A 组相比,B 组和 C 组支架的杨氏模量显著降低 ( $P < 0.05$ )。进一步的比较发现,C 组的断裂强度比 B 组还要显著减少 ( $P < 0.05$ ),见图 11。断裂强度的关系与支架的杨氏模量一致,其会随着 ACM 浓度的升高而呈现上升趋势。正常膝关节软骨的数量级为 1.9 ~ 14.4 MPa,从图中可得出 3 组均接近于人正常的力学范围内。

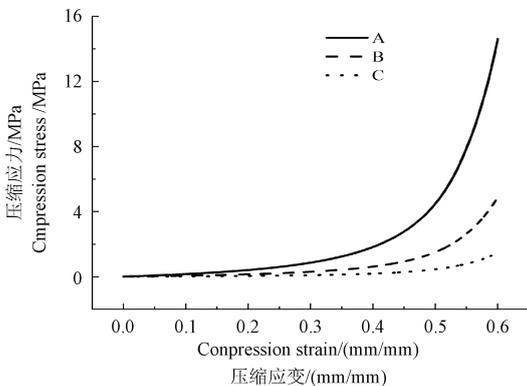
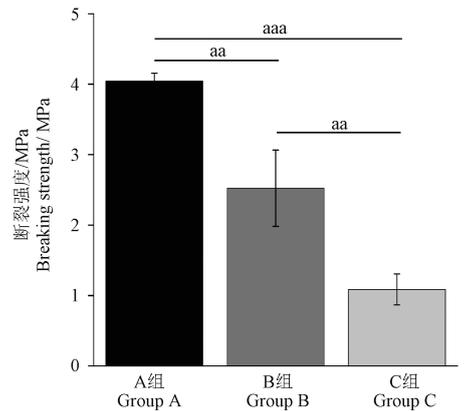


图 9 3 组支架的应变-应力曲线

Figure 9 Strain-stress curves of three groups of scaffolds



注:3 组支架两两相互比较,  $^{aa}P < 0.01$ ,  $^{aaa}P < 0.001$ 。(下同图)

图 10 3 组支架的断裂强度结果 ( $n = 3$ )

Note. Three groups of brackets were pairwise compared,  $^{aa}P < 0.01$ ,  $^{aaa}P < 0.001$ . (The same in the following figures)

Figure 10 Fracture strength results of three groups of scaffolds ( $n = 3$ )

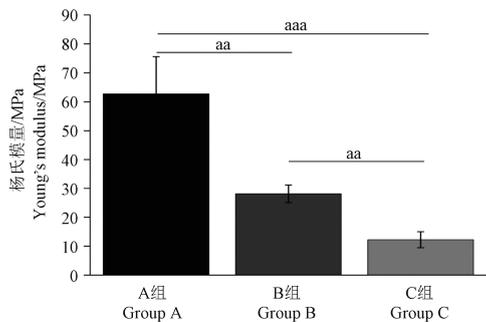
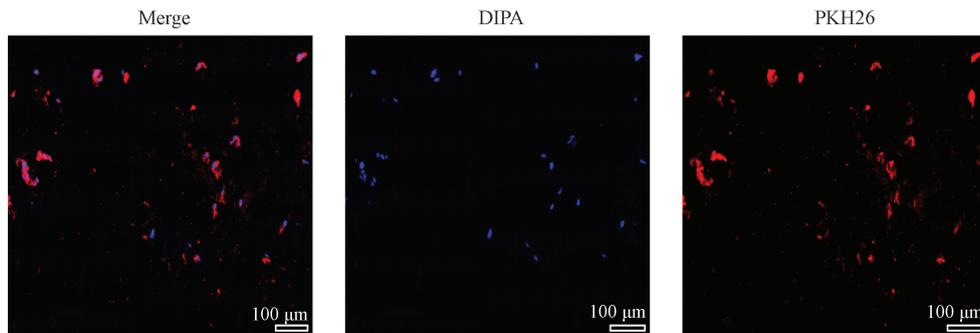


图 11 3 组支架的杨氏模量比较结果 ( $n = 3$ )

Figure 11 Comparison results of Young's modulus of three groups of scaffolds ( $n = 3$ )



注:软骨支架的 PKH26 荧光。

图 12 共聚焦电镜下支架细胞附着情况

Note. PKH26 immunofluorescence of cartilage scaffold.

Figure 12 Cell adhesion on scaffold under confocal microscopy

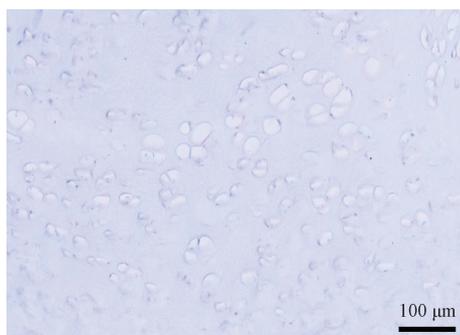


图 13 支架甲苯胺蓝染色细胞生长长情况

Figure 13 Cell growth on scaffolds stained with toluidine blue

### 3 讨论

近年来,组织工程得到了快速发展,临床上掀起应用于软骨修复的治疗热潮。目前,有临床前和临床研究表明,干细胞和生物材料的联合应用组织工程在关节软骨修复治疗方案取得了巨大的进步,例如类风湿关节炎、骨关节炎等,但还未应用到血友病关节中,为此研究人员一直在探寻有效的治疗

### 2.8 骨髓间充质干细胞与支架共培养后激光共聚焦显微镜观察结果

兔 BMSCs 与软骨脱细胞支架共培养 1 周后,共聚焦下可观察到细胞表现出良好黏附和分化,红色 PKH26 显色细胞膜延展性,显示形态变化,蓝色 DAPI 可见显示规则排列,反映细胞健康与功能。细胞膜连接显示细胞间的通讯。甲苯胺蓝染色可见支架细胞黏附,均匀分布,排列与支架孔隙结构相融合。软骨支架显示了较多的蓝色荧光标记的细胞核,以及红色荧光标记的细胞膜存在(见图 12)。

策略来治疗<sup>[14]</sup>。血友病关节炎是遗传性出血性血友病最常见的并发症之一,同时是一种特殊的关节炎,单纯干细胞疗法治疗效果持续性短暂需反复多次,而软骨脱细胞支架组织工程的出现有望突破血友病关节炎治疗的瓶颈,虽未应用到血友病动物模型中,但是点燃了治疗方案路上的火烛,照亮了未来的路。本研究制备了不同浓度的兔软骨脱细胞支架,并通过综合评估其理化性能和干细胞的相容性,为软骨修复打下良好基础。

BMSCs 在再生治疗中表现出许多优异的特性,包括多能分化、抗炎和免疫调节特性,还具有促进造血和刺激血管的能力。此外, BMSCs 释放的旁分泌因子会影响周围的微环境<sup>[11,15]</sup>。获得兔骨髓间充质干细胞的常用方法主要有全骨髓黏附法、密度离心法、骨片爬片法等<sup>[12]</sup>。本实验采用的是 Percoll 密度离心法,经过抗凝处理后和稀释的骨髓血在 Percoll 淋巴细胞分离液上并离心,红细胞及碎片沉积到底层,低密度的淋巴细胞置于淋巴细胞分离液和血浆之间的界面处,随后进行骨髓间充质干细胞的培养。此种方法经过不断地换液及传代,可得到

高纯度骨髓间充质干细胞。传代细胞形态多为长梭形,多边形,符合骨髓间充质干细胞的形态学特征,由于细胞的不断传代,获得的骨髓间充质干细胞会老化,这会对后续的实验产生一定的影响。此次采用流式细胞术鉴定第 3 代骨髓间充质干细胞的表面标志物。通过茜素红染色及阿利新蓝染色,可见成骨、成软骨诱导后的细胞团分别染成红色和蓝色,红色是钙结节;蓝色是软骨细胞特有的基质成分即透明质酸和多糖的存在<sup>[16-17]</sup>。2 次染色结果证实骨髓间充质干细胞在成骨和软骨诱导液分化下,最终分化成具有功能性的成骨细胞和软骨细胞。软骨修复组织工程中支架材料的选择也是一个非常关键的因素。在再生医学领域,器官被脱细胞以去除细胞成分,从而产生无细胞的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)或无细胞支架,由于这些支架缺乏细胞成分并维持 ECMs,因此在植入时“无排斥”,支架可以充当细胞反应的诱导介质,将外源种子细胞接种在脱细胞支架上使得细胞良好地发挥作用<sup>[18]</sup>。本实验采用的是脱细胞基质材料支架,支架经过脱细胞处理后导致无细胞成分存在,保留了天然的基质成分(即三维超微结构和生物化学成分),减少了炎症与免疫等反应,同时给予组织理想的支架。与其他类型的脱细胞材料不同,软骨脱细胞支架具备一定的机械性能。尽管软骨组织经过脱细胞后,机械性能明显下降,但仍优于其他生物材料<sup>[19]</sup>。本实验采用不同软骨基质支架的浓度来改变支架孔隙率和孔径大小,同时相应的压缩模量也随之改变,本研究得出浓度为 50% 时支架性能最好,其孔隙、吸水率的指标较高,同时杨氏模量接近于正常人关节软骨的力学性能,一个良好的软骨修复材料不仅需要高机械稳定性同时能承受较大应力,综合上述系数结果得知此浓度为软骨脱细胞支架的最适浓度支架。成功利用组织工程技术创建软骨工程基于 3 个关键要素的结合,分别是细胞成分、支架材料、生长信息因子<sup>[20-22]</sup>;实验中的 B 组(50%) 支架经过测量,杨氏模量接近于达到正常人关节软骨的数量级(1.9 ~ 14.4 MPa)。未脱细胞的蛋白含量较脱之后的蛋白含量较高,此外支架的糖胺聚糖含量为  $180.52 \pm 4.06 \mu\text{g/L}$ ,说明支架内还有糖胺聚糖成分,为后续细胞植入支架提供良好的生长微环境,此实验在定量支架的生长因子及胶原含量成分方面尚存在一些不足。

骨髓来源的充质干细胞表现出典型的干细胞

特性,因其显著的自我更新能力及多向分化潜能而广泛应用于细胞生物学研究<sup>[23-24]</sup>。本研究通过设计不同浓度的脱细胞支架(100%、50%、30%),并对其理化性能,如孔径、吸水膨胀率、孔隙率、断裂强度和杨氏模量,系统地评估了不同浓度支架的结构和功能特性。本实验以 BMSCs 为有效的外源细胞,与脱落细胞软骨支架共培养,证实了特定浓度(50%) 支架对于 BMSCs 有良好的相容性和支持生长的能力。不仅展示了一种新的为软骨修复提供支架的方法,还为未来的组织工程应用提供了重要的实验数据和理论依据。鉴于 BMSCs 的诸多优点以及支架参数的改进,推测脱落细胞软骨支架构建的组织工程支架很可能成为临床修复的生物工具,可以作为骨坏死和软骨缺损的医疗植入物。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] BARANOWSKI M, CZUBAK J. New perspectives in joint cartilage treatment with special emphasis on new types of hydrogels: a review [J]. *Ortop Traumatol Rehabil*, 2019, 21(4): 237-251.
- [2] ANGELE P, DOCHEVA D, PATTAPPA G, et al. Cell-based treatment options facilitate regeneration of cartilage, ligaments and meniscus in demanding conditions of the knee by a whole joint approach [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2022, 30(4): 1138-1150.
- [3] YUNUS M H M, NORDIN A, KAMAL H. Pathophysiological perspective of osteoarthritis [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(11): 614.
- [4] SZPONDER T, LATALSKI M, DANIELEWICZ A, et al. Osteoarthritis: pathogenesis, animal models, and new regenerative therapies [J]. *J Clin Med*, 2022, 12(1): 5.
- [5] LU Y, WANG Y, ZHANG H, et al. Solubilized cartilage ECM facilitates the recruitment and chondrogenesis of endogenous BMSCs in collagen scaffolds for enhancing microfracture treatment [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(21): 24553-24564.
- [6] BERNEY T, WASSMER C H, LEBRETON F, et al. From islet of Langerhans transplantation to the bioartificial pancreas [J]. *Presse Med*, 2022, 51(4): 104139.
- [7] JIANG Z, YU S, LIN H, et al. Expression and function of cartilage-derived pluripotent cells in joint development and repair [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 111.
- [8] WANG Z, WANG Y, YAN J, et al. Pharmaceutical electrospinning and 3D printing scaffold design for bone regeneration [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 174: 504-534.
- [9] GHAFARI F, KARBASI S, BAGHABAN ESLAMINEJAD M, et al. Biological evaluation and osteogenic potential of polyhydroxybutyrate-keratin/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrospun nanocomposite scaffold: a novel bone regeneration construct [J]. *Int J Biol*

- Macromol, 2023, 242(1): 124602.
- [10] GHADIRIAN S, KARBASI S, KHARAZI A Z, et al. Evaluation of the effects of halloysite nanotubes on physical, mechanical, and biological properties of polyhydroxy butyrate electrospun scaffold for cartilage tissue engineering applications [J]. J Polym Environ, 2024, 32(3): 1170–1187.
- [11] ASGARI F, ASGARI H R, NAJAFI M, et al. Optimization of decellularized human placental macroporous scaffolds for spermatogonial stem cells homing [J]. J Mater Sci Mater Med, 2021, 32(5): 47.
- [12] KEANE T J, SWINEHART I T, BADYLAK S F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and *in vivo* relevance [J]. Methods, 2015, 84: 25–34.
- [13] XIAO H, HUANG W, XIONG K, et al. Osteochondral repair using scaffolds with gradient pore sizes constructed with silk fibroin, chitosan, and nano-hydroxyapatite [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 2011–2027.
- [14] ZHU Y, YAN J, ZHANG H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel therapeutic agent for tendon-bone healing (Review) [J]. Int J Mol Med, 2023, 52(6): 1–16.
- [15] YU Y, ALKHAWAJI A, DING Y, et al. Decellularized scaffolds in regenerative medicine [J]. Oncotarget, 2016, 7(36): 58671–58683.
- [16] JAATINEN T, LAINE J. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient [J]. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007, 2: 1–10.
- [17] PÖSEL C, MÖLLER K, FRÖHLICH W, et al. Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50293.
- [18] DANIELE M E, BOSIO L, FERRARI S, et al. 21Denuded descemet's membrane as potential tool to support human embryonic stem cell derived retinal pigment epithelial cells culture [J]. BMJ Open Ophthalmol, 2022, 7(2): A9.
- [19] ROJAS-MURILLO J A, SIMENTAL-MENDÍA M A, MONCADA-SAUCEDO N K, et al. Physical, mechanical, and biological properties of fibrin scaffolds for cartilage repair [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9879.
- [20] ROGINA A, PUŠIĆ M, ŠTEFAN L, et al. Characterization of chitosan-based scaffolds seeded with sheep nasal chondrocytes for cartilage tissue engineering [J]. Ann Biomed Eng, 2021, 49(6): 1572–1586.
- [21] ZHOU Z, CUI J, WU S, et al. Silk fibroin-based biomaterials for cartilage/osteochondral repair [J]. Theranostics, 2022, 12(11): 5103–5124.
- [22] SU X, WEI L, XU Z, et al. Evaluation and application of silk fibroin based biomaterials to promote cartilage regeneration in osteoarthritis therapy [J]. Biomedicines, 2023, 11(8): 2244.
- [23] ZHANG F, GAO H, JIANG X, et al. Biomedical application of decellularized scaffolds [J]. ACS Appl Bio Mater, 2023, 6(12): 5145–5168.
- [24] ALLAN S J, ELLIS M J, DE BANK P A. Decellularized grass as a sustainable scaffold for skeletal muscle tissue engineering [J]. J Biomed Mater Res A, 2021, 109(12): 2471–2482.

[收稿日期] 2024-02-29