

• 异体及异种移植 •

异体软骨细胞移植修复猪膝关节软骨 缺损的免疫学观察

蔡伟平[#] 汤亭亭 张晓玲 丁惠锋

【摘要】 目的 应用同种异体软骨细胞移植修复猪膝关节软骨缺损,评估术后免疫学表现及其修复效果。

方法 供体为1月龄上海白猪2头,取其膝关节全层软骨片,0.25%胰蛋白酶和0.2%Ⅰ型胶原酶消化,分离培养软骨细胞。受体为2月龄巴马猪8头,在两侧股骨髁关节负重面造成0.5 cm×0.5 cm软骨缺损,深及软骨下骨。于受体猪双侧膝关节软骨缺损处注入软骨细胞悬液0.2 ml,含软骨细胞 $(1.0\sim 2.0)\times 10^6$ 个,密封人口。术前、术后3、5、7、12周分离受体外周血淋巴细胞,检测其与异体软骨细胞混合后的刺激指数(stimulation index, SI);术后5、7、24周取修复区软骨及软骨下骨观察局部组织学反应。 **结果** 术后3、5、7、12周受体外周血淋巴细胞SI分别为 1.457 ± 0.062 、 1.739 ± 0.142 、 1.548 ± 0.047 和 1.216 ± 0.028 ,较术前 (1.102 ± 0.034) 增高,且差异均有统计学意义($P<0.05$);SI术后3周开始升高,5周达高峰,7、12周后开始逐渐下降;3、7、12周SI与5周比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。组织学观察:术后5周,出现较多的炎性浸润,分散于软骨下骨、修复组织与正常软骨的整合部等;7周,炎性浸润开始减退,仅在软骨下骨可见;24周,缺损处修复软骨与周围软骨整合良好。 **结论** 异体软骨细胞移植后,免疫反应一般在移植早期开始出现,并逐渐达到高峰,但随着软骨基质的重新合成,免疫反应也逐渐下降,并最终修复全层关节软骨缺损。

【关键词】 软骨缺损 异体软骨细胞移植 免疫反应 猪

中图分类号: R318.06 R681.3 文献标识码: A

IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION OF REPAIR OF ARTICULAR CARTILAGE DEFECTS WITH ALLOGENEIC CHONDROCYTES IN PORCINS/CAI Weiping, TANG Tingting, ZHANG Xiaoling, et al. Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200011, P. R. China

Corresponding author: TANG Tingting, E-mail: tingtingtang@hotmail.com

【Abstract】 Objective To evaluate the immunological reaction and the outcome of allogeneic chondrocyte transplantation in repairing articular cartilage defects in porcins. **Methods** Full articular cartilage from the knee of two Shanghai white porcins about one-month-old was removed and cut mechanically, digested by 0.25% trypsin and 0.2% type I collagenase and cultured in 10% DMEM medium. Defects of 0.5 cm×0.5 cm involving the subchondral bone were created in both the left and right femur condyloid in 8 two-month-old Yunnai bama porcins. Allogeneic chondrocyte transplantation were implanted in defects at a density of $(1.0\sim 2.0)\times 10^6$, 0.2 ml. The lymphocytes from the receivers' blood were collected before transplantation and after 3, 5, 7 and 12 weeks of transplantation, then mixed with allogeneic chondrocytes to determin the lymphocyte stimulation index(SI) *in vitro*. The histological observation *in vivo* was made after 5, 7 and 24 weeks of transplantation. **Results** Lymphocyte SI at 3, 5, 7 and 12 weeks (1.457 ± 0.062 , 1.739 ± 0.142 , 1.548 ± 0.047 , 1.216 ± 0.028) after transplantation was higher than that before transplantation (1.102 ± 0.034 , $P<0.05$). SI began to increase in the 3rd week and reached the peak value in the 5th week, then gradually declined at the 7th and 12th weeks, showing significant differences when compared with in the 5th week ($P<0.05$). Inflammation and lymphocytes infiltration could be seen in subchondral bone and the intergration area between repair tissue and normal cartilage in the 5th week, and then decreased and limited in subchondral bone in the 7th week. Defects were filled with cartilage tissue, which had good intergration with subchondral bone at 24 weeks after transplantation. **Conclusion** Immunological reactions can be found at early stage of allogeneic chondrocyte transplantation and then decreased with the time, the full-thickness articular cartilage defects could be repaired mainly

基金项目:上海市科委重点资助项目(05JC14034)

作者单位:上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科(上海,200011)

[#]现在上海市青浦区中医医院

通讯作者:汤亭亭,教授,博士生导师,研究方向:骨软骨再生, E-mail: tingtingtang@hotmail.com

with hyaline cartilage by the allogeneic chondrocyte transplantation. This may provide a new method to repair articular cartilage defects clinically.

【Key words】 Cartilage defects Allogeneic chondrocyte transplantation Immune response Porcin

Foundation item: Key Project of Shanghai Scientific and Technological Committee(05JC14034)

软骨细胞移植修复关节软骨缺损已成为研究热点。自体软骨细胞来源有限,且需二次手术,因此自体软骨细胞移植修复关节软骨缺损给医生和患者带来极大不便。异体软骨细胞因取材方便,且易培养获得足够优质种子细胞而倍受欢迎,但对于能否引发免疫反应还存在疑问。既往研究多采用同一封闭种群不同个体间的异体软骨细胞移植,相互之间亲缘关系较近,影响对移植效果的评价^[1,2]。我们的研究应用不同种系来源的同种异体软骨细胞移植修复猪膝关节软骨缺损,并通过观察混合淋巴细胞反应及淋巴细胞浸润来评价移植术后免疫学和组织学表现。报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

受体为 2 月龄巴马猪 8 头,体重约 20 kg;供体为 1 月龄上海白猪 2 头,体重约 10 kg,均由中国科学院实验动物中心提供。巴马猪为封闭培育,适度近交品系,遗传学分析显示有较高的纯合性,品系内相似系数为 0.928^[3]。上海白猪为性状一致、遗传稳定的封闭种群。动物术前 1 d 禁食。

1.2 软骨细胞分离与培养

无菌条件切取供体猪股骨髁部全层软骨片,标本立刻置入无血清 DMEM 培养液,2 h 内移入超净工作台。手术刀片将软骨片切成细条状,再切成 0.5~1.0 mm³ 碎粒,PBS 冲洗 2 次,移入 45 ml 离心管,称重;然后酶消化,先用 5 倍容积的 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 培养箱内消化 30~45 min,除去可能附着的成纤维细胞,加入等量 10% DMEM (含 10% 胎牛血清) 终止消化,吹打后,离心半径 15 cm,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入 5 倍容积的 0.2% I 型胶原酶 (10% DMEM 配制),37℃ 培养箱内消化 4~6 h,每隔 20 min 晃动离心管 1 次,观察软骨块基本被消化后,加入等容积 0.02% EDTA-Na₂,吹打混匀后,同上法离心 5 min,弃上清液;加入 10% DMEM 培养液 2 ml,吹打均匀,血球计数板计数及苔盼蓝染色后移入直径 10 cm 培养皿,加 10% DMEM 培养液至 10 ml,37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。当软骨块大部分未消化但悬液混浊时,同上法离心后吸取上清液收集部分细胞,剩余软骨加 0.2% I 型胶原酶继续消化,6 h 后未消化的软骨加 0.1% I 型胶原酶过夜。

1.3 软骨缺损模型的制备

受体猪氯氨酮肌肉注射 (15 mg/kg) 麻醉诱导成功后,10% 水合氯醛 80~100 ml 静脉注射麻醉,40 min 后再次静脉注射 10% 水合氯醛 50~100 ml。双侧膝关节去毛、消毒、铺巾,取髌内侧切口,向外侧翻转髌骨,曲膝,暴露股骨髁关节负重面软骨,造成 0.5 cm×0.5 cm 正方形软骨缺损,深及软骨下骨,将骨膜(生发层面向缺损面)用 6-0 无损伤线缝至周围软骨,检查密封性能,必要时封胶。

1.4 软骨细胞移植术

于受体猪双侧膝关节软骨缺损处注入软骨细胞悬液 0.2 ml,含软骨细胞 (1.0~2.0)×10⁶ 个,密封入口。自体骨膜取自胫骨近端内侧。术后受体猪室内恒温 (24℃)、50% 湿度下,自来水和添加维生素的清洁饲料喂养。术后 5 d 内肌注青霉素 80 万 U/d。

1.5 检测指标

1.5.1 混合淋巴细胞反应 受体猪于移植术前和术后 3、5、7、12 周抽颈静脉血 10 ml, Ficoll 分离淋巴细胞,计数后调整细胞浓度。刺激抗原为分离的同种异体猪软骨细胞。96 孔培养板每孔加入淋巴细胞 1×10⁵、同种异体软骨细胞 1×10⁴,作为刺激组。另外加空白培养液 100 μl 作为对照,每组重复 5 孔。置 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 72 h,逐孔加入 0.2 μCi 的 ³H-TdR,继续培养 16 h,收集淋巴细胞,在液体闪烁计数器上计数 1 min 脉冲数 (即 ³H-TdR 掺入率, incorporation rate per minute, CPM),计算各时间段淋巴细胞刺激指数 (stimulation index, SI)。SI=(刺激组 CPM-本底 CPM)/(对照 CPM-本底 CPM)。

1.5.2 组织学观察 移植术后 5、7 周抽颈静脉血后各处死 1 头动物,24 周处死剩余 6 只动物,取修复区软骨及软骨下骨,4% 多聚甲醛固定,脱钙后石蜡包埋,HE 染色,观察局部免疫学反应及软骨缺损修复情况。

1.6 统计学方法

采用 SAS 6.12 统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 *q* 检验,*P* 值<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 混合淋巴细胞反应

移植术前及术后 3、5、7、12 周,受体猪外周静脉血

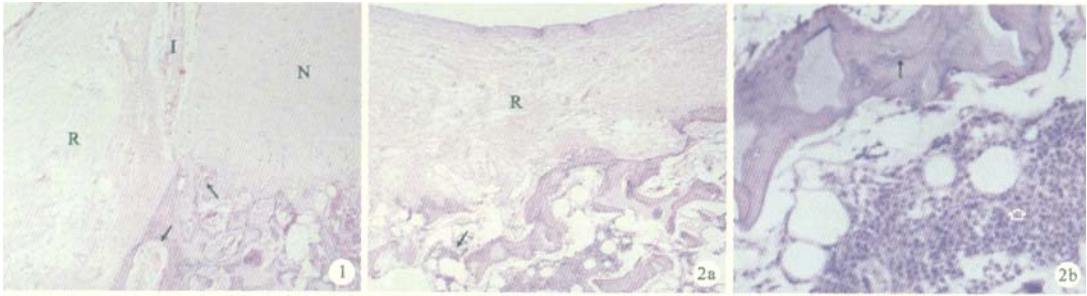


图 1 术后 5 周,以淋巴细胞为主的炎性浸润(↑),部位较分散(HE×80) R:修复组织 N:正常软骨 I:整合部 图 2 术后 7 周,组织学观察 (a) 炎性浸润开始减退,仅在软骨下骨可见(↑)(HE×80) R:修复组织 (b) 可见软骨陷窝(↑),淋巴细胞浸润(⇨)(HE×200)

Fig. 1 Inflammation infiltration with the lymphocytes could be seen (↑) at 5 weeks after transplantation(HE×80) R: Repair tissue N: Normal cartilage I: Intergration area Fig. 2 Histological observation 7 weeks after transplantation (a) Inflammation infiltration in subchondral bone (↑) gradually declined at 7 weeks after transplantation(HE×80) R:Repair tissue (b) Cartilage lacuna(↑) and the lymphocytes infiltration (⇨)could be seen (HE×200)

体外淋巴细胞 SI 分别为: 1.102 ± 0.034、1.457 ± 0.062、1.739 ± 0.142、1.548 ± 0.047、1.216 ± 0.028。术后 3、5、7、12 周 SI 增高,与术前比较差异有统计学意义(P<0.05)。术后 3 周 SI 开始升高,5 周达高峰,7、12 周后逐渐下降,各时间点与 5 周比较差异均有统计学意义(P<0.05)。

2.2 组织学观察

异体软骨细胞移植后 5 周,出现较多炎性浸润,分散于软骨下骨、修复组织与正常软骨整合部等(图 1); 7 周,炎性浸润开始减退,仅在软骨下骨可见,同时可见软骨陷窝及淋巴细胞浸润(图 2); 24 周,关节软骨缺损处以透明样软骨组织修复,与周围关节软骨及软骨下骨整合良好,无淋巴细胞浸润。

3 讨论

异体软骨细胞移植存在两大争议,首先是异体软骨细胞移植是否存在免疫反应,其次异体软骨细胞移植修复关节软骨缺损的效果究竟如何。在我们的实验中,采用不同近交系猪作为供受体,通过混合淋巴细胞反应和组织学检测来进一步回答上述问题。

Elves 等^[4,5]认为软骨细胞具有抗原性,而细胞基质则为低抗原性。在软骨细胞移植早期可有免疫反应,随着存活软骨细胞大量合成基质后,基质中的黏多糖将软骨细胞封闭在陷窝内,防止软骨细胞抗原暴露,避免排斥反应。软骨细胞移植的效果取决于供、受体之间的免疫相容性。异体软骨细胞由于表达主要组织相容性复合体、软骨细胞特异分化抗原等^[6,7],且易受自然杀伤细胞攻击,移植后使受体产生细胞排斥反应。但有

研究者在分析了近几年各种异体软骨细胞移植修复软骨缺损的实验研究后发现:大多数移植都缺乏免疫反应征象,而他们在造模、软骨细胞来源和移植方法上均各不相同^[8]。产生上述结果的可能原因有:① 实验动物之间存在一定的近交性;② 软骨细胞受支架、基质保护;③ 造模中组织损伤产生临时性机械屏障。

在我们的实验中,采用不同种系猪作为供受体,排除了近交性对免疫反应的影响。实验采用的是单纯软骨细胞悬液,软骨细胞在移植早期不受基质保护。而造模中损伤组织产生临时性机械屏障却不可避免。从实验结果看,我们认为异体软骨细胞移植肯定存在免疫反应,只是程度不同而已,一般在移植早期开始出现,并逐渐达到高峰,随着软骨基质重新合成,免疫反应也逐渐下降,而这种免疫反应一般对软骨组织修复影响并不大。

组织工程方法是将软骨细胞与各种载体复合修复关节软骨缺损^[9-12]。它不但能支持、保留细胞于缺损处,还有隔离免疫细胞,减少免疫反应的作用。经美国 FDA 批准可用于临床的生物可降解支架有聚乙酸、聚乳酸、聚乙醇-乳酸多聚体等,它们在软骨细胞移植修复缺损中的作用已获得肯定^[13,14]。Cay 等发现,软骨细胞与藻酸盐一起培养后,其软骨特异性基因(Ⅱ型胶原)的表达增加,移植后修复组织经番红-O 染色、RT-PCR 等证实有Ⅰ型胶原产生^[15]。但这些材料本身的降解产物是否会引引起关节内异物反应,还有待进一步分析和评估。另外,可能的方法是根据软骨细胞表面主要组织相容性复合体的不同建立软骨细胞库,使细胞之间相互配型以减少免疫排斥的发生^[16,17]。

4 参考文献

- 1 Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, *et al.* Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogeneic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*, 2000, 21: 795-801.
- 2 Moskalewski S, Hyc A, Osiecka-Iwan A. Immune response by host after allogeneic chondrocyte transplant to the cartilage. *Microsc Res Tech*, 2002, 58(1): 3-13.
- 3 陈福祥, 谢晋, 张勇, 等. 中国猪种 DQA 新等位基因的克隆和分析. *中国免疫学杂志*, 2004, 20(2): 111-116.
- 4 Elves M. A study of the transplantation antigens on chondrocytes from articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am Br*, 1994, 56: 178.
- 5 Moskalewski S, Osiecka-Iwan A, Hyc A, *et al.* Mechanical barrier as a protection against rejection of allogeneic cartilage formed in joint surface defects in rats. *Cell Transplant*, 2000, 9(3): 349-357.
- 6 Gotoh H, Kawaguchi Y, Harigai M, *et al.* Increased CD40 expression on articular chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis; contribution to production of cytokines and matrix metalloproteinases. *J Rheumatol*, 2004, 31(8): 1506-1512.
- 7 Lance EM. Immunological reactivity towards chondrocytes in rat and man; relevance to autoimmune arthritis. *Immunol Lett*, 1989, 21(1): 63-73.
- 8 Moskalewski S, Hyc A, Osiecka-Iwan A. Immune response by host after allogeneic chondrocyte transplant to the cartilage. *Microsc Res Tech*, 2002, 58(1): 3-13.
- 9 Ameer GA, Mahmood TA, Langer R. A biodegradable composite scaffold for cell transplantation. *J Orthop Res*, 2002, 20: 16-19.
- 10 Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP. Tissue engineering auricular reconstruction; *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomaterials*, 2004, 25: 1545-1557.
- 11 Fukuda A, Kato K, Hasegawa M, *et al.* Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 2005, 26(20): 4301-4308.
- 12 Shangkai C, Naohide T, Koji Y, *et al.* Transplantation of allogeneic chondrocytes cultured in fibroin sponge and stirring chamber to promote cartilage regeneration. *Tissue Eng*, 2007, 13(3): 483-492.
- 13 Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21: 431-440.
- 14 吴炜, 毛天球, 封兴华, 等. 胶原-透明质酸支架的制备及其与软骨细胞复合培养的实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(4): 401-405.
- 15 Mierisch CM, Wilson HA, Turner MA, *et al.* Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg*, 2003, 85-A: 1757-1767.
- 16 Almqvist KF, Wang L, Broddelez C, *et al.* Biological freezing of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9(4): 341-350.
- 17 Gorti GK, Lo J, Falsafi S, *et al.* Cartilage tissue engineering using cryogenic chondrocytes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, 129(8): 889-893.

(收稿: 2006-12-01 修回: 2007-08-15)

(本文编辑: 荀莉)

• 信 息 •

第五届全国解剖与临床学术研讨会征文通知

由《解剖与临床》杂志社主办、兰州军区乌鲁木齐总医院协办的第五届全国解剖与临床学术研讨会, 拟于 2008 年 8 月下旬, 在新疆乌鲁木齐市召开。届时将邀请国内著名的解剖学专家和临床医学专家做学术报告和专题讲座。欢迎广大解剖与临床工作者踊跃投稿、积极参会。优秀论文将在《解剖与临床》杂志上发表(本刊于 2007 年 6 月被收录为中国科技核心期刊)。

征文内容: ①解剖与临床相结合的研究成果; ②临床应用解剖学及实验形态学研究成果; ③医学影像及其解剖学研究成果; ④微创外科及其解剖学研究成果; ⑤手术入路或术式创新及其解剖学研究成果; ⑥临床医学实践包括临床经验总结和新技术、新理论及新方法等的应用研究成果; ⑦解剖与临床相互结合的科研工作经验、方法和体会。

征文要求: ①来稿未经公开发表; ②全文或 500 摘要(结构式)一份, 以 word 格式、A4 纸、宋体 4 号字打印, 同时请附电子稿(通过 E-mail 发送); ③来稿请注明作者单位地址及联系电话、挂号邮寄, 信封正面注明“会议征文”字样; ④如同时投稿本刊, 请附函说明, 并寄 30 元稿件处理费。

截稿日期: 2008 年 6 月 30 日。

投稿地址: 安徽省蚌埠市长淮路 287 号(蚌埠医学院第一附属医院内)《解剖与临床》编辑部收, 邮编: 233004, 联系人: 张萍, 电话/传真: 0552-3053847, E-mail: jpylc@byfy.com.cn 或 jplc@chinajournal.net.cn

《解剖与临床》编辑部

2007-10-12