

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.14.013

右归饮诱导的骨髓间充质干细胞/纤维蛋白胶复合物对膝关节软骨缺损兔软骨修复的影响

马春涛, 谭昱*, 肖育志, 陈立刚, 郭良

(三亚市中医院, 海南省三亚市吉阳区凤凰路 106 号, 572000)

摘要 目的 观察右归饮对兔骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 软骨分化的效果及其诱导的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物对兔膝关节软骨缺损的修复效果。方法 分离兔胫骨和股骨骨髓细胞, 传代培养得到兔 BMSCs, 将兔 BMSCs 分为对照组、诱导组和右归饮低、中、高剂量组, 检测 BMSCs 细胞中 II 型胶原、聚集蛋白多糖 mRNA 和蛋白表达情况, 筛选右归饮后续实验浓度。将膝关节软骨损伤模型兔随机分为 5 组, 每组 6 只, 其中右归饮组将经筛选浓度的右归饮诱导 1 周的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物植入兔软骨缺损部位; TGF- β 1 组将经转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导 1 周的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物植入兔软骨缺损部位; 纤维蛋白胶组将纤维蛋白胶植入兔软骨缺损部分; 模型组缺损旷置; 另设正常对照组不做任何处理。各组均干预 8 周后, 取膝关节软骨缺损部位, 通过大体观察、HE 染色及 Wakitani 评分评估软骨损伤修复效果。结果 与对照组比较, 右归饮中、高剂量组 II 型胶原蛋白、聚集蛋白多糖 mRNA 和蛋白水平均明显上调, 且以右归饮高剂量组效果最好 ($P < 0.05$), 故选右归饮 400 mg/ml 进行后续实验。正常对照组兔膝关节形态正常, 表面光滑, 无损伤; 模型组兔膝关节软骨缺损处呈暗红色, 软骨缺损处组织结构不规则, 未见软骨细胞, 仅可见少量纤维组织, 软骨组织 Wakitani 评分升高 ($P < 0.05$)。纤维蛋白胶组兔膝关节软骨缺损面积变小, 软骨缺损处有修复填充物, Wakitani 评分降低 ($P < 0.05$)。与纤维蛋白胶组比较, 右归饮组和 TGF- β 1 组兔膝关节软骨缺损基本修复完整, 修复部位 HE 染色与周边正常组织较为接近, 可见大量软骨细胞, 出现软骨陷窝结构, 软骨组织 Wakitani 评分降低 ($P < 0.05$)。结论 右归饮可诱导兔 BMSCs 的成软骨分化, 其所诱导的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物对兔膝关节软骨缺损修复具有促进作用。

关键词 右归饮; 骨髓间充质干细胞; 纤维蛋白胶; 膝关节; 软骨缺损

膝关节软骨具有减少关节摩擦、分散骨承担的压力等作用, 由于软骨组织中无血管分布, 因此软骨组织的自发修复能力有限^[1]。目前临床上多采用微折术、软骨细胞移植术等对损伤软骨组织进行修复, 但术后新生的软骨组织中会出现大量纤维软骨成分, 影响关节的灵活度, 造成长期疗效满意度低^[2]。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有分化成多种细胞谱系的潜能, 如软骨、成骨、脂肪、神经源性等多种细胞系^[3]。研究报道, 在动物模型中, 将 BMSCs 转移至骨损伤部位后, BMSCs 具有修复成骨、形成成骨的潜能^[4]。研究证实, BMSCs 可与多种颗粒骨架形成

复合物用于促进骨缺损修复中的骨再生^[5], 而对纤维蛋白胶体外构建组织工程修复软骨损伤的研究相对较少。右归饮是一种常用补肾中药, 有研究表明, 右归饮可在关节炎发生早期减轻关节软骨退行性病变程度^[6]。本研究旨在探讨右归饮对兔 BMSCs 软骨分化的诱导效果, 并通过构建兔膝关节软骨损伤模型, 探讨右归饮对 BMSCs/纤维蛋白胶复合物对兔膝关节软骨缺损的修复效果。

1 材料

1.1 动物

SPF 级出生 1 周内的新西兰兔 5 只, 雌雄不限, 体重 200 ~ 300 g; SPF 级 3 月龄健康新西兰兔 36 只, 雌雄不限, 体重 2.0 ~ 2.3 kg。实验兔均购自广东省医学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK-(粤) 2015-0001。本实验通过三亚市

基金项目: 国家自然科学基金 (81373669); 海南省卫生计生行业科研项目 (16A200122)

* 通讯作者: ts543718@163.com

中医院动物实验伦理委员会批准, 批准文号: 20150124。

1.2 药物

右归饮组成: 山萸肉 3g、熟地黄 9g、肉桂 3g、杜仲 6g、炮附片 9g、山药 6g、枸杞子 6g、炙甘草 3g。煎煮浓缩至终浓度为 0.70 g/ml 生药备用。

1.3 主要试剂与仪器

苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号: E607319-0200)、低糖改良杜氏培养基 (DMEM, 货号: E600008-0500)、高糖 DMEM 培养基 (货号: E600003-0500)、青霉素 (批号: B540734-001)、胎牛血清 (货号: E510002-0100)、蛋白裂解液 (货号: C500001-0010)、BCA 试剂盒 (货号: C503021-0500)、纤维蛋白原 (货号: D111003)、抑肽酶 (货号: A600153-0050)、凝血酶 (货号: C600413-4000)、无水 CaCl_2 (货号: A501330-0500)、15% FBS (货号: E510002-0100)、甲苯胺蓝染液 (货号: E670105-0100)、15% EDTA 溶液 (货号: E671001-0100)、4% 多聚甲醛 (货号: E672002-0100), 均购自上海生工生物工程有限公司; II 型胶原蛋白 (货号: ab12168)、聚集蛋白多糖单克隆抗体 (货号: ab187414), 购自美国 Cayman Chemical 公司; 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, 货号: ab50036), GAPDH 单克隆抗体 (货号: ab8255), 二抗 (货号: ab6729), CD29、CD34、CD45、CD90 混合抗体 (货号: ab93758), 均购自美国 Abcam 公司; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (货号: RR037A), 购自日本 Takara 公司; AceQ qPCR SYBR[®] Green Master Mix (货号: Q111-02), 购自南京 Vazyme 生物公司; Trizol 试剂 (货号: 10296010), 美国 Thermo 公司; 氨甲环酸 (货号: 1672745), 美国 Sigma 公司。

自动脱水机 (型号 TP1020)、切片机 (型号 RM2235)、石蜡烤片机 (型号 HH1220), 德国 Leica 公司; 倒置显微镜 (型号 CKX41), 美国 Olympus 公司; 荧光定量 PCR 仪 (型号 IQ5), 美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪 (BD FACSCalibur 型), 上海普迪生物技术有限公司; 全自动数码凝胶图像分析系统 (型号 3500/3500R), Tanon 公司。

2 方法

2.1 兔 BMSCs 的分离、鉴定

按照全骨髓贴壁筛选法分离培养 BMSCs^[4]。选用出生 1 周内的新西兰兔, 用 3% 巴比妥钠

(2 ml/kg) 麻醉后放血处死, 消毒, 分离胫骨、股骨和肱骨, 用 2 ml 低糖 DMEM 培养基反复吹洗骨髓腔, 2000 r/min (半径 10 cm) 离心 10 min 弃上清, 加入 6 ml 密度梯度离心分离液, 2000 r/min (半径 10 cm) 离心 10 min, 吸取富含 BMSCs 的乳白色层移至无菌离心管, 加入低糖 DMEM 培养液 1 ml (含 15% FBS、100 U/ml 青霉素) 重悬, 接种至 15 cm 细胞培养皿中, 置于 5% CO_2 培养箱 37℃ 进行传代扩增, 每天在倒置显微镜下观察并记录细胞生长情况。取第 3 代 BMSCs 分别加入 CD29、CD34、CD45、CD90 混合抗体, 采用流式细胞仪对细胞表面标志物进行检测, 观察阳性表达 (+) 情况, 并绘制细胞生长曲线。

2.2 右归饮实验浓度的筛选

2.2.1 实验分组及干预方法 将第 3 代兔 BMSCs 分为对照组、诱导组及右归饮低、中、高剂量组, 每组 6 个复孔。右归饮低、中、高剂量组分别在高糖 DMEM 培养基中加入终浓度为 100、200、400 mg/ml 的右归饮培养 BMSCs 细胞; 诱导组加入终浓度 100 ng/ml TGF- $\beta 1$ 培养细胞; 对照组加入 500 μl 生理盐水, 每 2 天更换 1 次加有相应药物的新鲜培养基, 右归饮诱导 1 周后, 收集细胞, 用于后续实验。

2.2.2 观察指标及方法 1) 实时荧光 PCR 法检测兔 BMSCs 中 II 型胶原蛋白、聚集蛋白多糖 mRNA 表达。Trizol 法提取各组 BMSCs 细胞总 RNA, 反转录得 cDNA。在定量 PCR 仪中对 II 型胶原蛋白、聚集蛋白多糖基因进行扩增。反应体系: 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μl , SYBR[®] Green Mix 5 μl , cDNA (50 ng/ μl) 1 μl , ddH₂O 3.2 μl , 共 10 μl 。反应条件: 95℃, 90 s; 95℃, 30 s; 62℃, 30 s; 72℃, 20 s; 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对扩增结果进行定量分析, 结果与内参基因 (GAPDH) 的比值表示。引物序列由上海生工生物工程有限公司合成, II 型胶原蛋白: 上游 AGTCGCTGCTGCTGCT-GAC, 下游 GGGGTCCTTTAGGTCCTACG, 产物大小 186bp; 聚集蛋白多糖: 上游 CCCAGAACAAC-CGGGACATC, 下游 TCACGCGCAGTTGGCACTC-CT, 产物大小 201bp; GAPDH: 上游 GATCATT-GCTCCTCCTGAGC, 下游 ACTCCTGCTTGCTGATC-CAC, 产物大小 128bp。

2) 蛋白免疫印记法检测兔 BMSCs 中 II 型胶原蛋白、聚集蛋白多糖蛋白表达水平。各组 BMSCs 细胞在液氮中研磨, 加入 1.2 ml 蛋白裂解液提取

总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白总量。SDS-凝胶电泳后, 半干转印至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉, 封闭 1h; 分别加入一抗 (1 : 500), 4℃ 孵育过夜; 加入二抗 (1 : 5000), 室温孵育 1h。经化学发光法进行检测, 全自动数码凝胶图像分析系统拍摄图像并进行半定量分析, 结果与内参蛋白条带灰度值的比值表示。

2.3 右归饮对膝关节软骨损伤兔模型软骨修复的影响

2.3.1 膝关节软骨损伤模型的建立 3 月龄新西兰兔腹腔注射 3% 巴比妥钠 (50 mg/kg) 进行麻醉, 在特定固定盒中进行仰卧固定, 将兔膝关节处脱毛、消毒。在无菌条件下, 沿兔膝内侧纵向切口 2 cm, 暴露股骨滑车, 使用手术转头取出股骨软骨 (直径 5 mm × 高度 4 mm) 造成软骨缺损模型^[8], 无菌盐水冲洗, 共造模成功 30 只。

2.3.2 右归饮诱导 BMSCs/纤维蛋白胶复合物 取经筛选浓度的右归饮诱导 1 周后的兔 BMSCs 细胞, 离心得到细胞, 采用含 60 ng/ml 纤维蛋白原的低糖 DMEM 培养基, 配置细胞悬浮液 (2×10^7 个/ml), 记为溶液 A; 另配置含 400 ng/ml 抑肽酶、100 IU/ml 凝血酶、40 ng/ml 氨甲环酸、2.2 mg/ml 无水 CaCl_2 的无糖 DMEM 培养基 100 ml, 记为溶液 B; 分别取溶液 A、溶液 B 各 0.7 ml, 加入 6 孔板中 (每孔共 1.4 ml), 轻轻混匀后, 孵育 5 min, 观察兔 BMSCs 与纤维蛋白胶复合物成型情况。然后向 6 孔板中加入含 15% FBS 低糖 DMEM 培养基, 每孔 1 ml, 置于加湿 5% CO_2 培养箱 (95% 湿度、37℃) 中培养, 隔天换液。4 周后, 采用甲苯胺蓝染液对兔 BMSCs/纤维蛋白胶复合物进行染色, 制备切片, 显微镜下观察兔 BMSC 在纤维蛋白胶中生长、分化情况。

2.3.3 实验分组及干预方法 将膝关节软骨损伤模型兔按照随机数字表法分为 5 组, 每组 6 只。右归饮组: 将经右归饮诱导 1 周 (方法同 2.3.2) 的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物植入兔软骨缺损部位; TGF- β 1 组: 将经 100 ng/ml TGF- β 1 诱导 1 周的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物植入兔软骨缺损部位; 纤维蛋白胶组: 将纤维蛋白胶植入兔软骨缺损部位; 模型组: 缺损旷置。另设正常对照组: 不对试验兔做任何处理。各组均观察 8 周。

2.3.4 观察指标及方法 1) 软骨修复的大体观察。8 周后采用静脉注射空气处死新西兰兔, 由构建模型时切口进入, 打开兔关节囊, 观察缺损区修复情况并拍照。2) 软骨修复的组织学观察。8 周

后采用手工锯截取股骨远端, 洗净后置于 4% 多聚甲醛中固定 1 周, 转至 15% EDTA 溶液中脱钙 4 周, 逐级脱水、透明、制备常规石蜡切片, 脱蜡、水化后, 采用 HE 染色液对切片进行染色, 中性胶封片, 置于光学显微镜下, 200 倍镜下观察兔膝关节软骨组织形态并拍照。3) 软骨修复的 Wakitani 组织学评分^[9]。对兔膝关节损伤处再生软骨组织的细胞形态、表面规则性、基质染色情况、软骨厚度、与正常软骨结合度等情况进行评价。

2.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5 统计学软件进行分析。计量资料符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验; 不符合正态分布采用秩和检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 兔 BMSCs 的培养及鉴定结果

按照全骨髓贴壁筛选法培养的 BMSCs, 传代至第 3 代, 细胞形态一致, 呈纺锤形。流式细胞仪对 BMSCs 表面分子进行鉴定, 结果显示: 细胞具有较好的分群, CD90^+ 细胞为 99.6%, CD29^+ 细胞为 98.6%, 而 CD34^+ 细胞为 0.56%、 CD45^+ 细胞为 0.89%, 进一步证实本研究成功获得稳定 BMSCs 细胞株, 且细胞纯度符合要求^[10], 用于后续实验。第 3 代兔 BMSCs 生长曲线如图 1 所示。接种 1~2 天为平缓生长期, 第 3~5 天细胞呈对数生长, 第 6 天后细胞生长趋于平缓, 进入平台期, 细胞生长曲线呈“S”形。

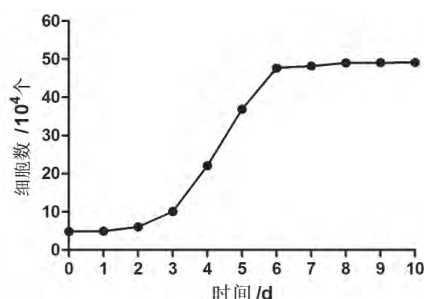


图 1 第 3 代兔骨髓间充质干细胞的生长曲线

3.2 右归饮实验浓度筛选结果

表 1 示, 与对照组比较, 诱导组和右归饮中、高剂量组兔 BMSCs 细胞中 II 型胶原、聚集蛋白多糖 mRNA 表达及蛋白表达水平均显著升高, 而右归饮低剂量组水平降低 ($P < 0.05$)。右归饮中、高剂量组兔 BMSCs 细胞中 II 型胶原、聚集蛋白多糖 mRNA 表达及蛋白表达水平高于右归饮低剂量

表 1 各组 BMSCs 中 II 型胶原蛋白、聚集蛋白多糖 mRNA 及蛋白表达比较 (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	II 型胶原		聚集蛋白多糖	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
对照组	6	1.09 ± 0.13	0.19 ± 0.04	1.01 ± 0.09	0.21 ± 0.06
诱导组	6	3.07 ± 0.43*	2.97 ± 0.42*	3.23 ± 0.38*	3.04 ± 0.41*
右归饮低剂量组	6	0.56 ± 0.13*#	0.65 ± 0.12*#	0.53 ± 0.12*#	0.52 ± 0.11*#
右归饮中剂量组	6	2.47 ± 0.57*△#	2.07 ± 0.51*△#	2.75 ± 0.49*△#	2.15 ± 0.47*△#
右归饮高剂量组	6	3.52 ± 0.69*△▲	3.41 ± 0.66*△▲	3.67 ± 0.71*△▲	3.37 ± 0.58*△▲

注: BMSCs, 骨髓间充质干细胞; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与右归饮低剂量组比较, △ $P < 0.05$; 与右归饮中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$; 与诱导组比较, # $P < 0.05$

组, 且右归饮高剂量组兔 BMSCs 细胞中 II 型胶原、聚集蛋白多糖 mRNA 表达及蛋白表达水平高于右归饮中剂量组 ($P < 0.05$)。与诱导组比较, 右归饮低、中剂量组 II 型胶原蛋白、聚集蛋白多糖 mRNA 及蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$), 而右归饮高剂量组与诱导组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 故本研究选取右归饮 400 mg/ml 剂量进行后续实验。

3.3 右归饮诱导 BMSCs/纤维蛋白胶复合物结果

纤维蛋白胶易凝固成固定形状, 薄厚均匀, 弹性好, 有一定机械强度; 将右归饮诱导后的 BMSCs 与纤维蛋白胶复合物培养 4 周, 发现凝胶支架形态基本完整, 无明显降解; 甲苯胺蓝染色后, 支架基质呈蓝色, 可见大量圆形软骨细胞生长。

3.4 各组兔膝关节软骨缺损修复情况的大体观察结果

8 周后正常对照组兔膝关节形态正常, 表面光滑, 无损伤; 模型组兔膝关节软骨缺损处呈暗红色, 未见明显软骨组织和纤维组织填充, 与周边软骨有清楚分界; 与模型组比较, 纤维蛋白胶组兔膝关节软骨缺损面积变小, 可见灰白色组织填充, 表面不平整, 有凹陷, 与周边软骨有较清楚分界; 与纤维蛋白胶组比较, 右归饮组及 TGF-β1 组兔膝关节软骨缺损基本修复完整, 再生软骨组织呈粉白色, 表面平整有光泽, 与周边软骨分界模糊, 不易辨别, 外形与正常膝关节接近。

3.5 各组兔膝关节软骨缺损修复 HE 染色观察结果

8 周后正常对照组兔膝关节软骨组织结构紧致, 软骨细胞分布均匀; 模型组兔膝关节软骨缺损处组织结构不规则, 未见软骨细胞, 仅可见少量纤维组织; 与模型组比较, 纤维蛋白胶组兔膝关节软骨缺损处有修复物填充, 纤维蛋白胶基本降解, 修复部位染色较周边正常组织浅, 可见软骨细胞和少量成纤维细胞; 与纤维蛋白胶组比较, 右归饮组兔膝关节软骨缺损处几乎被完全修复, 纤维蛋白胶基

本降解, 修复部位染色与周边正常组织较为接近, 可见大量软骨细胞, 出现软骨陷窝结构。

3.6 各组兔膝关节软骨缺损修复 Wakitani 评分比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 模型组、纤维蛋白胶组、右归饮组、TGF-β1 组兔膝关节软骨组织 Wakitani 评分均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 纤维蛋白胶组、右归饮组、TGF-β1 组兔膝关节软骨组织 Wakitani 评分均降低, 右归饮组、TGF-β1 组兔膝关节软骨组织 Wakitani 评分较纤维蛋白胶组降低 ($P < 0.05$), 且右归饮组与 TGF-β1 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组兔膝关节软骨组织 Wakitani 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

BMSCs 组别	兔数	Wakitani 评分
正常对照组	6	0
模型组	6	10.65 ± 1.86*
纤维蛋白胶组	6	8.97 ± 1.41*△
右归饮组	6	3.21 ± 0.55*△▲
TGF-β1 组	6	3.45 ± 0.68*△▲

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与纤维蛋白胶组比较, ▲ $P < 0.05$

4 讨论

中医学认为, “肾主骨, 生髓”, 肾脏盛亏与骨骼组织及其细胞的生长分化密切相关^[1]。右归饮方来自《景岳全书》, 具有滋肾养筋、活血化痰、通气止痛的功效, 是一种常用补肾中药。膝关节损伤常导致软骨损伤, 软骨细胞作为膝关节软骨组织中唯一的细胞, 具有分泌聚集蛋白多糖和 II 型胶原蛋白等功能, 在修复软骨损伤过程中发挥重要作用^[2]。已有研究表明, 右归饮能调控 BMSCs 成软骨分化过程, 促进 miR-24-3p 等多种 miRNAs 的表达, 抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路, 促进 BMSCs 合成聚集蛋白多糖和 II 型胶原蛋白, 促进软骨分化^[3]。

BMSCs 是一种具有多向分化潜能的多能干细胞, 参与调控机体免疫、促进干细胞植入、造血支

持及自我复制等生物学过程^[4]，因此作为本研究的种子细胞。本研究采用的间充质干细胞来自兔骨髓，利用全骨髓贴壁筛选法进行培养，培养时细胞贴壁生长，传至第 3 代时，细胞形态趋于一致，呈纺锤形。流式细胞仪检测发现细胞呈现出较好的分群，与文献^[4]中报道 BMSCs 的特定细胞表型一致，提示本研究分离培养所得为标准 BMSCs。正常情况下，在生物体内 BMSCs 可自主分化为软骨细胞，然而体外情况下则必须依赖于诱导物质。聚集蛋白多糖和Ⅱ型胶原蛋白是软骨细胞分化和形态发生中大量表达的蛋白，是软骨组织中最重要蛋白，可作为软骨分化的标志物^[5]。多项研究发现，TGF- β 1 可通过一系列作用促进 BMSCs 细胞表达聚集蛋白多糖和Ⅱ型胶原蛋白，促进 BMSCs 细胞向软骨细胞分化，呈现软骨细胞形态特征^[6-17]。本研究以 TGF- β 1 诱导为阳性对照，观察右归饮对 BMSCs 成软骨分化的诱导作用，结果发现，与对照组比较，右归饮高剂量组兔 BMSCs 细胞形态转为圆形，表现为软骨细胞样形态特征，细胞中软骨细胞标志物Ⅱ型胶原蛋白、聚集蛋白多糖 mRNA 和蛋白水平均显著上调，并与 TGF- β 1 效果相当，提示在体外培养条件下，右归饮可诱导 BMSCs 向软骨细胞分化，以 400 mg/ml 的诱导作用最显著。

近年来，组织工程学的发展和应用给软骨损伤修复提供了新策略，组织工程中多采用生物支架起支撑作用，常用的有聚羟基乙酸、聚乳酸等，虽然支持作用较好，但是生物相容性欠缺，同时其降解时易产生酸性物质，影响机体修复过程^[18]。纤维蛋白胶是一种天然生物材料，具有良好的可降解性、生物相容性和力学支撑性，是组织缺损修复的理想生物支架^[19]。Murphy 等^[20]研究表明，BMSCs 移植入纤维蛋白凝胶中形成复合物后能够再生骨组织。在本研究中，右归饮诱导后的 BMSCs 与纤维蛋白胶共培养时，BMSCs 可在纤维蛋白胶中正常生长，呈软骨细胞形态特征，表明经右归饮诱导后的兔 BMSCs 在纤维蛋白胶中具有成软骨分化能力，可正常生长，提示纤维蛋白胶具有良好的生物相容性，能为 BMSCs 黏附生长、增殖分化提供适宜的支架支撑。

据报道，骨骼发育成熟的动物骨软骨修复能力较未发育成熟的动物弱，在兔膝关节软骨损伤模型中，缺损直径在 5mm 及以上时关节软骨缺乏自发修复能力^[21]。本研究中兔膝关节软骨缺损模型中未发现透明样软骨修复组织，而将纤维蛋白胶植入

兔膝关节损伤处发现，纤维蛋白胶组兔膝关节软骨损伤处可见灰白色组织填充，缺损面积变小，修复部位 HE 染色较周边正常组织浅，可见软骨细胞和少量成纤维细胞，并且软骨组织 Wakitani 评分明显低于模型组。这些结果表明，本研究成功构建了不可自我修复的兔膝关节损伤模型，且纤维蛋白胶具有促进骨软骨再生的潜能。将右归饮诱导的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物植入兔膝关节软骨损伤处发现，右归饮组兔膝关节软骨缺损基本修复完整，修复部位 HE 染色与周边正常组织较为接近，可见大量软骨细胞，出现软骨陷窝结构，再生软骨组织呈粉白色，与周边软骨分界模糊，外形与正常膝关节接近，软骨组织 Wakitani 评分显著低于模型组，并与 TGF- β 1 诱导的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物作用基本一致，提示右归饮诱导的兔 BMSCs/纤维蛋白胶复合物具有良好的软骨缺损修复能力，具有软骨再生潜能。

综上所述，右归饮具有诱导 BMSCs 成软骨分化的作用，纤维蛋白胶可为 BMSCs 黏附生长、增殖分化提供支架支撑，且右归饮诱导的 BMSCs/纤维蛋白胶复合物能够促进兔膝关节软骨损伤处的软骨再生，具有一定成软骨分化的潜力。

参考文献

- [1] DANIELI MV, GUERREIRO JP, QUEIROZ AD, et al. Diagnosis and classification of chondral knee injuries: comparison between magnetic resonance imaging and arthroscopy [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2016, 24(5): 1627-1633.
- [2] CHAWLA A, TWYLCROSS-LEWIS R, MAFFULLI N. Microfracture produces inferior outcomes to other cartilage repair techniques in chondral injuries in the paediatric knee [J]. Br Med Bull, 2015, 116(1): 93-103.
- [3] GARCÍA-GARCÍA A, DE CASTILLEJO CL, MÉNDEZ-FERRER S. BMSCs and hematopoiesis [J]. Immunol Lett, 2015, 168(2): 129-135.
- [4] LI X, LI Y, ZUO Y, et al. Osteogenesis and chondrogenesis of biomimetic integrated porous PVA/gel/V-n-HA/pa6 scaffolds and BMSCs construct in repair of articular osteochondral defect [J]. J Biomed Mater Res, 2015, 103(10): 3226-3236.
- [5] KIM IG, HWANG MP, DU P, et al. Bioactive cell-derived matrices combined with polymer mesh scaffold for osteogenesis and bone healing [J]. Biomaterials, 2015, 50(1): 75-86.

- [4] 王伟东, 邹阳, 沈建国, 等. 右归饮经过调节 SDF-1 的表达影响 OA 模型大鼠关节软骨退变的研究简 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 36(8): 3308-3311.
- [5] 武海军, 银和平, 李树文, 等. 密度梯度离心和贴壁筛选法分离培养兔骨髓间充质干细胞的形态学观察 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(22): 7261-7269.
- [6] 张加廷, 张东正, 丁一, 等. 后内侧入路建立兔膝关节软骨缺损动物模型 [J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(4): 1145-1149.
- [7] WAKITANI S, GOTO T, YOUNG RG, et al. Repair of large full-thickness articular defects with allograft articular chondrocytes embedded in collagen gel [J]. Tissue Eng, 1998, 4(4): 429-444.
- [8] DOMINICI M, LE BK, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-324.
- [9] 张鹏, 施杞, 王拥军. 论“肾者, 作强之官, 伎巧出焉”对中医骨伤科的指导意义 [J]. 中医杂志, 2012, 53(9): 795-796.
- [10] KATSARA O, ATTUR M, RUOFF R, et al. Increased activity of the chondrocyte translational apparatus accompanies osteoarthritic changes in human and rodent knee cartilage [J]. Arthritis Rheumatol, 2017, 69(3): 586-597.
- [11] 陈祁青, 金红婷, 应俊, 等. 右归饮含药血清对骨髓间充质干细胞成软骨分化的促进作用及其 microRNA 表达谱分析 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1380-1386.
- [12] KUSUYAMA J, KAMISONO A, SEONG C, et al. Spleen tyrosine kinase influences the early stages of multi-lineage differentiation of bone marrow stromal cell lines by regulating phospholipase C gamma activities [J]. J Cell Physiol, 2017, 233(3): 2549-2559.
- [13] NUMMENMAA E, HÄMÄLÄINEN M, MOILANEN T, et al. Effects of FGF-2 and FGF receptor antagonists on MMP enzymes, aggrecan, and type II collagen in primary human OA chondrocytes [J]. Scand J Rheumatol, 2015, 44(4): 321-330.
- [14] BABADAGLI ME, TEZCAN B, YILMAZ ST, et al. Matrilin-3 as a putative effector of C-type natriuretic peptide signaling during TGF-β1 induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(9): 5549-5555.
- [15] YING J, WANG P, ZHANG S, et al. Transforming growth factor-beta1 promotes articular cartilage repair through canonical Smad and Hippo pathways in bone mesenchymal stem cells [J]. Life Sci, 2018, 45(192): 84-90.
- [16] 刘相杰, 宋科官. 生物支架材料及间充质干细胞在骨组织工程中的研究与应用 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(10): 148-154.
- [17] MORIN KT, TRANQUILLO RT. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel [J]. Exp Cell Res, 2013, 319(16): 2409-2417.
- [18] MURPHY KC, HUGHBANKS ML, BINDER BY, et al. Engineered fibrin gels for parallel stimulation of mesenchymal stem cell proangiogenic and osteogenic potential [J]. Ann Biomed Eng, 2015, 43(8): 2010-2021.
- [19] VASEENON T, TOCHIGI Y, HEINER AD, et al. Organ-level histological and biomechanical responses from localized osteoarticular injury in the rabbit knee [J]. J Orthop Res, 2011, 29(3): 340-346.

Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells/Fibrin Glue Complex Induced by *Yougui Decoction* (右归饮) on Cartilage Repair of Knee Articular Cartilage Defects

MA Chuntao, TAN Yu, XIAO Yuzhi, CHEN Ligang, GUO Liang

(Sanya City Chinese Medicine Hospital, Sanya, Hainan Province 572000)

ABSTRACT Objective To observe the effects of *Yougui Decoction* (右归饮) on cartilage differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and the effects of its induced BMSCs/fibrin glue complex on the repair of rabbit knee articular cartilage defects. **Methods** Rabbit tibia and femur bone marrow cells were isolated and subcultured to obtain rabbit BMSCs. Rabbit BMSCs were divided into a control group, an induction group and *Yougui Decoction* low, medium and high dose groups. The expression of type II collagen and aggrecan mRNA in BMSCs cells and the expression of the protein was detected. The concentration of the subsequent experiment of *Yougui Decoction* was screened. Rabbits with knee joint cartilage injury were randomly divided into 5 groups, with 6 rabbits in each group. Among them, the *Yougui Decoction* group was implanted with the right concentration of BMSCs/fibrin glue complex for 1 week into the rabbit cartilage defect site; TGF-β1 group implanted BMSCs/fibrin glue complex induced by transforming growth factor β1 (TGF-β1) for 1 week into rabbit cartilage defect site; fibrin glue group implanted

fibrin glue into rabbit cartilage defect part; the model group's defect was put aside; another normal control group was set up without any treatment. After 8 weeks of intervention in each group, the cartilage defects of the knee joint were taken, and the cartilage injury repair effect was evaluated by gross observation, HE staining and Wakitani score.

Results Compared with the control group, the mRNA and protein levels of type II collagen and aggrecan were significantly up-regulated in the middle and high dose groups of *Yougui Decoction*, and the effect was the best in the high-dose group of *Yougui Decoction* ($P < 0.05$). Therefore, *Yougui Decoction* 400 mg/ml was selected for subsequent experiments. In the normal control group, the knee joints were normal in shape and smooth, and there was no damage. In the model group, the knee joint articular cartilage defect was dark red, and the cartilage defect was irregular. No chondrocytes were seen, and only a small amount of fibrous tissue and cartilage tissue were observed. The Wakitani score was increased ($P < 0.05$). In the fibrin glue group, the knee articular cartilage defect area was smaller, the cartilage defect had repair filler, and the Wakitani score was decreased ($P < 0.05$). Compared with the fibrin glue group, the knee joint articular cartilage defects in the *Yougui Decoction* group and the TGF- β 1 group were basically repaired intact. The HE staining at the repair site was close to that of the surrounding normal tissues. A large number of chondrocytes were seen, and the cartilage lacuna structure appeared. The Wakitani score of cartilage tissue was reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yougui Decoction* can induce chondrogenic differentiation of rabbit BMSCs, and the induced BMSCs/fibrin glue complex can promote the repair of rabbit knee articular cartilage defects.

Keywords *Yougui Decoction* (右归饮); bone marrow mesenchymal stem cells; fibrin glue; knee joint; cartilage defect

(收稿日期: 2018-10-17; 修回日期: 2019-01-07)

编辑: 邓 媛

腰痛宁胶囊临床研究与应用征文通知

腰痛宁胶囊是颈复康药业集团有限公司生产的治疗腰腿痛的首选药品之一。为了总结腰痛宁胶囊多年来研究及临床应用经验,更好地指导临床用药,中医杂志社与颈复康药业集团有限公司联合主办此次有奖征文活动,现将有关事项通知如下。

一、征文内容

1. 腰痛宁胶囊治疗腰椎间盘突出症、坐骨神经痛、腰肌劳损、腰肌纤维炎、风湿性关节炎、症见腰腿痛、关节痛及肢体活动受限等病症的临床经验、体会与分析; 2. 腰痛宁胶囊临床用量、用法的研究与经验总结; 3. 腰痛宁胶囊组方研究、药理研究与探讨; 4. 腰痛宁胶囊临床扩大应用范围的探讨与研究; 5. 名医名家应用腰痛宁胶囊治疗腰椎间盘突出症等腰腿痛经验总结与分析; 6. 包括但不限于以上内容的文章。

二、征文要求

1. 来稿未公开发表,字数不低于 3000 字,请附单位介绍信,来稿不退; 2. 文章中涉及到的计量单位、实验数据等须采用法定标准方法表示; 3. 文题下署作者姓名、单位、通讯地址、邮编、联系电话等,请以 Word 形式投送电子稿件,不接受纸质投稿。

三、奖励办法

由全国中医药界知名专家组成评审委员会,将评出一等奖 1~2 篇,每篇奖励 5000 元; 二等奖 5~10 篇,每篇奖励 4000 元; 三等奖 10~15 篇,每篇奖励 3000 元; 优秀奖若干篇,每篇奖励价值 500 元的精美礼品一份。获奖者将获得由主办单位颁发的获奖证书、奖金或礼品,获奖文章达到刊用标准者将在《中医杂志》等期刊上发表,其他获奖文章达到标准者将在《中医杂志》增刊发表,并赠送样刊 1 册。评选结果将在颈复康药业集团有限公司官网、《中医杂志》《中国医药报》《中国中医药报》等媒体上公布。主办单位将邀请部分获奖者免费参加颁奖大会及学术交流会与知名专家现场交流。颁奖大会具体时间、地点另行通知。

本次征文不收取任何费用,来稿请于 2019 年 12 月 31 日前发至邮箱: jtem@163.com。联系地址: 北京市东直门内南小街 16 号中医杂志社,联系人: 22 号编辑,邮编: 100700,电话: (010) 64035632。