论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0866-04

兔膝关节内纳米超顺磁性氧化铁颗粒标记细胞磁靶向模型建立

王凤玲,林 肖,陈加荣,尹 力,王富友,杨 柳 (400038 重庆,第三军医大学西南医院关节外科中心)

[摘要] **目的** 建立活体兔膝关节腔内磁靶向细胞移植模型,探讨纳米超顺磁性氧化铁颗粒(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记的种子细胞磁靶向移植修复关节软骨缺损的可行性。**方法** 将8只家兔按随机数字表法分成2组,在其左膝股骨滑车中央制造直径5 mm、深6 mm的圆柱形骨软骨缺损,实验组($n=4$)缺损内置入钕铁硼强力磁体,对照组($n=4$)置入骨水泥;将体外培养扩增的同种异体兔膝关节软骨细胞经BrdU及SPIO双重标记后注入上述活体兔膝关节腔内,1周后取缺损区组织分别行HE、普鲁士蓝染色及BrdU显色。**结果** 实验动物均存活。HE染色示实验组缺损区内大量细胞聚集生长,SPIO及BrdU双重标记结果显示其来源为外源性注入,形态类似软骨细胞;对照组见缺损区纤维组织增生明显,间以大量炎性细胞,SPIO及BrdU双重标记示外源性注入的细胞散在分布,少量集中于缺损区。实验组与对照组相比,高倍镜下缺损区阳性细胞数有显著性差异($t=6.343$,$P=0.001$)。**结论** 该模型可较好完成SPIO标记的关节软骨细胞活体兔膝关节腔内的磁靶向移植研究,并证实磁靶向技术可以显著提高移植细胞向目标区域聚集生长的效率,且能保留较高的细胞活性。

[关键词] 磁靶向;SPIO;骨软骨组织工程;关节软骨缺损
[中图法分类号] R-332; R329.28; R684.05 [文献标志码] A

Establishment of a rabbit model of targeted magnetic delivery system of superparamagnetic iron oxide-labeled chondrocytes for articular cartilage repair

Wang Fengling, Lin Xiao, Chen Jiarong, Yin Li, Wang Fuyou, Yang Liu (Center for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To establish a rabbit model of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled chondrocytes magnetic targeting in the treatment of cartilage defects. Methods Eight rabbits were used to create osteochondral defect of 5.0 mm in diameter, 6.0 mm in depth in the left knee joint, and then all animals were divided into 2 groups randomly, that is, experimental group and control. A powerful magnet of neodymium iron boron (NdFeB) was placed into the defect in the experimental group, while the bone cement in the control. Rabbit chondrocytes were labeled with BrdU and SPIO, and then injected into the knee joint cavity of rabbit models. Animals were sacrificed in 1 week after the injection. The distal femurs containing the defects were resected, fixed, decalcified, and then performed by HE, Prussian blue and anti-BrdU staining. Results All animals were alive at the end of the experiment. Histological and immunohistochemical staining showed that a large of double-labeled chondrocytes were deposited around the osteochondral defect area, and the double-labeling indicated these cells were exogenous and in a shape like chondrocytes. But in the control group, fibrotic proliferation was observed in the defect, with a great deal of inflammatory cells and some scattered double-labeled cells (a few deposited in the middle of defect). Significant difference was found in the number of double positive cells in the defect between the 2 groups ($t=6.343$, $P=0.001$). Conclusion This animal model displayed that BrdU and SPIO-labeled chondrocytes can be targeted to the bone defect of rabbit knee joint through magnetic targeting transplantation, indicating magnetic targeting improves transplanted cells' alive and growth in the target place. It can be applied for the research of magnet targeting in the repair of osteochondral defect in rabbits.

[**Key words**] magnetic targeting;SPIO;osteochondral tissue engineering;articular cartilage defect

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30870639). Corresponding author: Yang Liu, Tel: 86-23-68765280, E-mail: jointsurgery@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30870639)
[通信作者] 杨 柳,电话:(023)68765280,E-mail:jointsurgery@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130125.0838.003.html(2013-01-25)

临床上由于各种原因引起的关节软骨损伤十分常见,因软骨细胞的再生能力差,导致其损伤后难以自行修复,故应用组织工程技术进行关节软骨再生修复成为当前的研究热点之一,其中,经关节腔注射外源性种子细胞疗法被认为是目前最微创的治疗方式之一,展示了光明的前景[1]。但种子细胞在活体关节腔内的特异性归巢能力不足,散在分布而向目标区域的聚集效率甚低的问题成为该疗法的一个瓶颈,亟须解决[2]。本课题组前期成功运用超顺磁性氧化铁颗粒(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记细胞在关节腔内进行活体无创示踪研究[3],并利用SPIO具有铁磁性,能在磁场牵引作用下定向移动、聚集的特性,进行了体外三维空间SPIO标记细胞磁靶向模拟实验。本实验进一步尝试制作了活体兔膝关节磁靶向细胞移植模型,并对SPIO标记磁靶向疗法的可行性及应用前景进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与器材

钕铁硼强力磁体(四川绵阳西磁科技有限公司),DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶(Gibco),BrdU(Sigma),磷酸盐缓冲液PBS(北京中杉金桥),戊巴比妥钠(武汉银河化工有限公司),甲醛(上海沪宇生物科技有限公司),PEI/SPIO溶液(四川大学国家生物医学材料工程研究中心),CO_2培养箱(美国Sheldo公司),倒置荧光相差显微镜(日本OLYMPUS公司),切片机(德国Leica公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物及分组 3~4月龄家兔8只,体质量2.5~3.0 kg,雌雄不限(第三军医大学实验动物中心提供),适应性喂养1周,左膝关节纳入实验,按随机数字表法分为实验组(左膝股骨滑车置入磁体,A组,$n=4$)及对照组(左膝股骨滑车置入骨水泥,B组,$n=4$)。手术操作及处死均按照动物伦理学要求执行。

1.2.2 兔膝关节股骨滑车骨软骨缺损制作 动物术前6 h禁食禁水以防麻醉后误吸。3%戊巴比妥钠1 mL/kg耳缘静脉注射麻醉,肌注兽用苄星青霉素5 $\times 10^4$ U/kg预防感染。左膝关节备皮,常规消毒铺单,作髌骨内侧直切口,逐层切开皮肤、皮下、关节囊,进入膝关节腔,向外侧脱位髌骨,显露股骨滑车,于其中央钻取直径5 mm、深6 mm的骨软骨缺损。

1.2.3 磁体/骨水泥置入 向实验组骨软骨缺损内置入灭菌后的圆柱形钕铁硼强力磁体(直径5 mm、高4 mm、表面中心场强0.35T),对照组置入相同规格大小的骨水泥。生理盐水冲洗关节腔,逐层严密缝合切口。

1.2.4 术后管理 动物常规分笼饲养,每天观察动物全身一般情况及左膝伤口愈合情况,术后3 d内肌注苄星青霉素每天1次,每次5 $\times 10^4$ U/kg。术后3~4 d切口愈合拆线。

1.2.5 软骨细胞的获取、体外培养和扩增 无菌条件下取家兔双膝关节软骨,削剪成1 mm×1 mm×1 mm大小的碎片,0.25%胰蛋白酶消化2 h,换Ⅱ型胶原酶消化过夜,含10% FBS的DMEM中和,离心,弃上清,以2 $\times 10^5$/cm^{2}接种于玻璃培养瓶,置于5% CO_2、37 ℃、100%湿度饱和培养箱中,4 d首次换液,以后每3天换液1次,待细胞生长至约80%满时,以0.25%胰蛋白酶消化、制悬,按1∶2传代培养,倒置相差显微镜动态观察细胞生长状况,取第4代细胞用于实验。

1.2.6 BrdU标记软骨细胞 待第4代软骨细胞生长至约70%满时,弃去原有培养基,PBS清洗,更换为等量含BrdU终浓度为10 μg/mL的培养基,37 ℃、5% CO_2、100%湿度饱和培养箱中孵育48 h。

1.2.7 SPIO标记软骨细胞 将PEI/SPIO原液用含10% FBS的DMEM培养基稀释为终浓度为8 μg/mL的磁标记液,从培养箱中取出已行BrdU标记的软骨细胞,弃去原BrdU标记液,更换为等量磁标记液孵育24 h,培养条件同1.2.6。取部分软骨细胞作爬片行免疫组化FITC荧光素显色和普鲁士蓝染色。

1.2.8 细胞磁标记效率的鉴定 细胞爬片1 d,弃去原培养基,PBS清洗,以含肝素钠10 U/mL的PBS溶液清洗去除细胞外游离的铁离子,再次PBS清洗,4%多聚甲醛固定30 min,Perl反应液孵育30 min,PBS冲洗1次,核固红复染1~2 min,以细胞内可见蓝染颗粒计为普鲁士蓝染色阳性,100倍显微镜下随机10个视野计数阳性细胞,测定软骨细胞磁标记阳性率:染色阳性细胞数/细胞总数×100%。

1.2.9 标记细胞关节腔注射 将磁标记24 h后的细胞取出,弃去标记液,PBS清洗,含肝素钠10 U/mL的PBS溶液洗去细胞外游离的铁离子,再次PBS清洗后以0.25%胰蛋白酶消化、制悬、计数,制成含细胞数约1 $\times 10^6$的悬液3 mL,麻醉下分别注入每只兔的左膝关节腔中,注射时另补充生理盐水1~2 mL以撑开关节腔,便于种子细胞的迁移。术后常规分笼饲养观察。

1.3 造模后观测指标

1.3.1 一般情况 观察造模后动物的精神、食欲、步态、伤口、有否髌骨脱位及异常死亡。

1.3.2 大体标本 细胞移植后1周过量麻醉处死动物,取左股骨远端,生理盐水清洗,观察标本形态、颜色、质地,关节腔内滑膜增生及感染等情况,缺损区及周围组织形态。

1.3.3 组织学观察 将标本置于4%多聚甲醛固定48 h,从股骨远端后方取出置入的磁体或骨水泥,6%硝酸溶液脱钙,石蜡包埋,同一组织连续切片交叉行HE染色、普鲁士蓝染色和BrdU免疫组化显色。于200倍显微镜下任选10个不重叠视野计数阳性细胞,比较实验组与对照组缺损区阳性细胞个数。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 18.0统计软件进行独立样本t检验。

2 结果

2.1 一般情况

造模后动物均存活,其中1只兔因术后啃咬切口缝线致皮下感染,清创缝合后伤口延迟愈合,其余造模动物及时以颈围保护,伤口正常愈合。术后1周均能自由活动,无明显跛行。

2.2 软骨细胞体外培养和扩增

获取的兔关节软骨细胞经4代培养后生长旺盛,呈长梭形、多边形紧密排列生长(图1)。

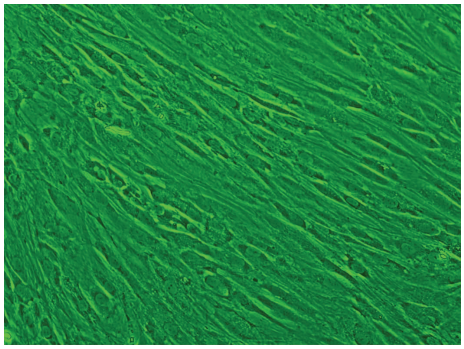


图1 兔关节软骨细胞经4代培养后生长情况 （倒置相差显微镜 ×100）

2.3 细胞磁标记的鉴定

SPIO标记细胞普鲁士蓝染色可见细胞内大量蓝色致密颗粒，磁标记有效率达95%以上（图2）。

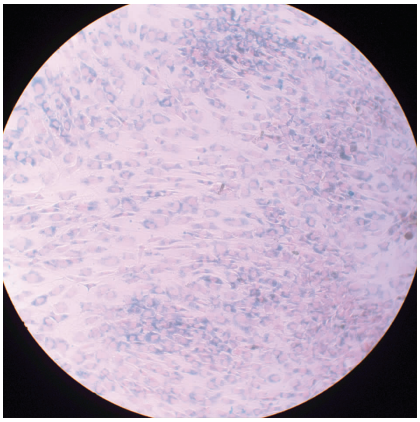
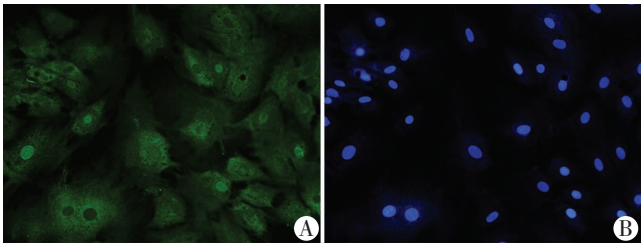


图2 普鲁士蓝染色观察SPIO标记的兔关节软骨细胞 （×100）

2.4 BrdU标记兔关节软骨细胞的鉴定

BrdU标记细胞免疫组化FITC荧光素显色呈绿色、梭形或多边形，细胞核显色清晰、明显（图3）。



A：FITC荧光素显色；B：同一视野下胞核显色

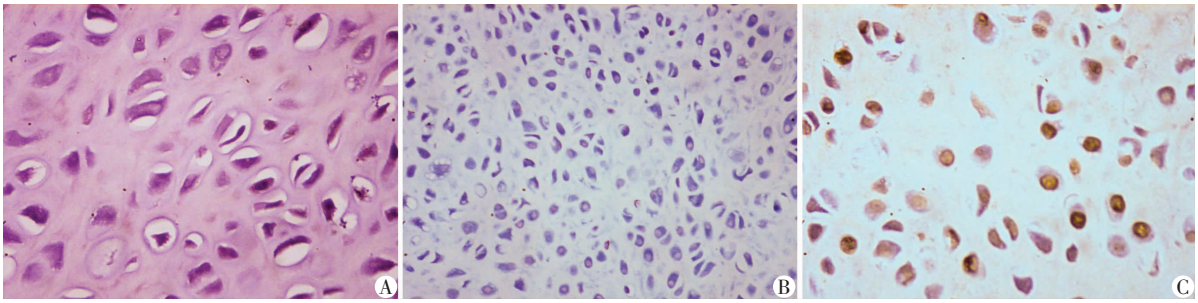
图3 BrdU标记兔关节软骨细胞的免疫组化观察 （×200）

2.5 大体观察

关节腔内无感染，见轻度炎性反应，少量滑膜增生，关节液清亮，关节软骨光滑、光泽度好，表面无裂痕、糜烂等异常，缺损区见褐色组织覆盖。与缺损相对应的髌骨面未见明显异常。

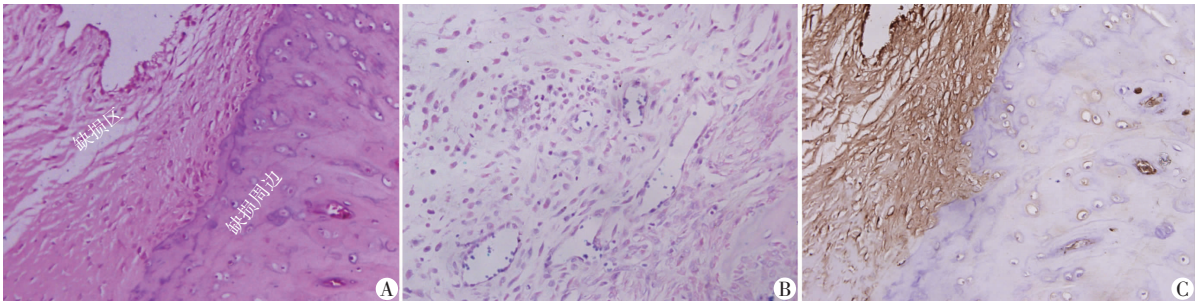
2.6 组织学观察

组织切片HE染色见实验组置入物表面（原缺损区）大量细胞聚集生长，部分呈巢状，形态类似软骨细胞，可见分裂象，细胞密度略高于周边正常软骨组织；普鲁士蓝染色示实验组置入物周边细胞内见大量蓝染颗粒，同时BrdU显色示大量细胞核深染为棕黄色（图4），表明为外源性植入的细胞，阳性细胞数为（273.6±72.4）/HP。对照组相同区域可见大量成纤维细胞呈条索状排列生长，间以炎性细胞浸润，以淋巴细胞为主，并可见新生血管长入，少量软骨细胞散在分布，蓝染细胞及棕黄色细胞核数目稀少（图5），阳性细胞数为（39.6±14.4）/HP。2组比较差异有统计学意义（$t=6.343$，$P=0.001$）。



A：HE染色示缺损区大量细胞聚集生长，形态类似软骨细胞（×200）；B：普鲁士蓝染色示细胞蓝染（×100）；C：BrdU显色示细胞核呈棕色，表明为标记后植入的种子细胞（×200）

图4 实验组兔软骨组织学观察



A：HE染色示缺损区大量成纤维细胞增生，少量软骨细胞散在分布；B：普鲁士蓝染色示缺损区蓝染细胞稀少，可见血管长入；C：BrdU见少量呈棕色细胞核散在分布

图5 对照组兔软骨组织学观察 （×100）

3 讨论

随着组织工程技术的飞速发展，用细胞疗法治疗关节软骨缺损见于众多研究报道，并应用于临床[1,4-5]。目前细胞移植修复关节软骨缺损主要有细胞-支架复合体局部植入和关节腔注射两种方式。前者虽能在直视下将种子细胞准确移植到缺损区，但手术创伤较大、细胞分布不均、并发症多、费用高昂，且支架长期使用生物安全性不确定[6]；而后者因其创伤小、操作简便、可重复、并发症少等优点，被认为是目前微创的治疗途径之一。但前期研究结果证实，注射进关节腔的细胞归巢能力不足，易被关节液稀释而呈散在分布，易引起滑膜增生，形成游离体、瘢痕增生等并发症[7-8]。因此，一种能克服上述两种移植方式缺陷的细胞传递策略将具有十分重要的临床意义。

纳米SPIO因具有顺磁性和良好的生物安全性，已较广泛用于磁共振无创示踪领域[9]以及肿瘤的药物靶向治疗[10]。本单位率先将SPIO标记技术引入骨软骨组织工程领域[11]，进行了一系列实验证实了该技术的安全性及可靠性，并对标记方法及参数进行了研究和改进[12]，又进一步在体外实验中利用磁场成功引导SPIO所标记的细胞定向迁移并定植于目标区域[13]。Kyrtatos等[14]将SPIO标记的内皮祖细胞注入小鼠动脉损伤模型中，实验组在损伤处外置磁场，对照组不置磁场，发现实验组损伤处标记细胞数量明显比对照组多，提示了磁靶向的可行性。但该技术在骨软骨组织工程领域尚少见相关报道，且磁标记并靶向后的细胞能否存活等关键问题仍悬而未决。因此，本实验进一步在活体兔膝关节腔内进行磁场靶向的细胞移植研究，结果证实，在关节腔内复杂的生理环境和解剖结构中，该方法能够特异、高效地将种子细胞靶向至目标位置并利用磁力完成早期的贴附生长，在磁力辅助固定一定时间后，细胞之间可以通过分泌细胞外基质和黏附分子达到生物学黏附，实现三维生长[15]。移植后短期内的组织切片染色表明，植入细胞生长状态良好。目前虽缺乏长期的观察及进一步的生物学特性分析，但本研究为解决活体内细胞移植的空间定位问题提供了一种令人鼓舞的新思路，减少并发症，提高疗效，值得进一步的探索。若能进一步研究获取适宜的参数等相关条件，磁靶向移植技术不仅可应用于骨软骨组织工程，更有望扩展至其他研究及治疗领域。

本研究的不足之处在于，因膝关节解剖形态特殊，动物实验中外置磁场难以固定，而磁场的大小、位形受到磁体材料、大小、形状、空间距离、介质等的影响，在动物体外布控稳定磁场的难度较大。作为一种探索和尝试，本实验将小磁体埋植入兔膝关节内，成本低，操作简便，可重复性强，且实验结果能达到预期要求，但仍存在明显的手术创伤，不能理想地避免异物反应。因此，该模型亦需进一步改进，比如可寻找具有良好生物相容性而又不影响磁场的包被材料将磁体包埋后再置入体内，减轻异物反应；并希望通过体外设备的研发而获得有效磁场，从而进行大动物实验，避免体内安置磁场所引起的创伤，以及潜在的感染、排异反应等并发症。

参考文献：

[1] Koga H, Engebretsen L, Brinchmann J E, *et al*. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009, 17(11): 1289-1297.

[2] Koga H, Shimaya M, Muneta T, *et al*. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R84.

[3] Jing X H, Yang L, Duan X J, *et al*. *In vivo* MR imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection[J]. Joint Bone Spine, 2008, 75(4): 432-438.

[4] Steinwachs M, Kreuz P C. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: a prospective study with a 3-year follow-up[J]. Arthroscopy, 2007, 23(4): 381-387.

[5] Basad E, Ishaque B, Bachmann G, *et al*. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010, 18(4): 519-527.

[6] O'Grady J E, Bordon D M. Global regulatory registration requirements for collagen-based combination products: points to consider[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(12): 1699-1721.

[7] Lee K B L, Hui J H, Song I C, *et al*. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model[J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2964-2971.

[8] Agung M, Ochi M, Yanada S, *et al*. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2006, 14(12): 1307-1314.

[9] Riegler J, Wells J A, Kyrtatos P G, *et al*. Targeted magnetic delivery and tracking of cells using a magnetic resonance imaging system[J]. Biomaterials, 2010, 31(20): 5366-5371.

[10] Zhu A, Yuan L, Jin W, *et al*. Polysaccharide surface modified Fe3O4 nanoparticles for camptothecin loading and release[J]. Acta Biomater, 2009, 5(5): 1489-1498.

[11] 金旭红，杨柳，段小军，等. 体外纳米磁标记骨髓间充质干细胞生物学特性及其MR成像[J]. 第三军医大学学报，2008，30(4)：275-279.

[12] 陈加荣，杨柳，戴刚，等. SPIO、GFP双重标记猪骨髓间充质干细胞的研究[J]. 第三军医大学学报，2011，33(21)：2313-2315.

[13] Feng Y, Jin X, Dai G, *et al*. *In vitro* targeted magnetic delivery and tracking of superparamagnetic iron oxide particles labeled stem cells for articular cartilage defect repair[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(2): 204-209.

[14] Kyrtatos P G, Lehtolainen P, Junemann-Ramirez M, *et al*. Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2009, 2(8): 794-802.

[15] Ando W, Tateishi K, Hart D A, *et al*. Cartilage repair using an *in vitro* generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells[J]. Biomaterials, 2007, 28(36): 5462-5470.

（收稿：2012-11-13；修回：2012-12-24）

（编辑 龙 亮）