

· 实验研究 ·

兔胫骨骨膜下注射转化生长因子(TGF) β 1 和 β 2 促进骨膜生发层细胞增殖的研究

荆立忠 胡跃林 郭秦炜* 张继英

(北京大学第三医院运动医学研究所, 北京 100191)

【摘要】 目的 研究向胫骨骨膜下单次注射转化生长因子(TGF) β 1 和 β 2 后成年大白兔骨膜生发层细胞组织学的变化,探讨生长因子促进骨膜生发层细胞增殖的效果。**方法** 4月龄新西兰大白兔 22 只,分为 3 组,分别向两侧胫骨近端内侧骨膜下注射 Tris 溶液(对照组)(6 只)、40 ng TGF β 1(8 只)、40 ng TGF β 2(8 只),2 个实验组均于 2 个相距 5 mm 的部位分别注射 20 ng。于术后第 3、5、7 及 10 天取材。标本均进行 HE 染色,对生发层厚度以及细胞密度进行观察测量及统计学分析。**结果** 各组不同时间点生发层厚度比较,对照组注射后各时间点差异无显著性($P > 0.05$);注射后第 5 天,TGF β 1 组生发层厚度(73 ± 10) μm 和 TGF β 2 组生发层厚度(112 ± 13) μm 较第 3 天明显增加;两实验组最大厚度(117 ± 26) μm 、(130 ± 19) μm 均出现在注射后第 7 天($P < 0.05$),注射后第 10 天与第 3 天差异无显著性($P > 0.05$)。同时间点 3 组间生发层厚度比较,注射后第 3 天、第 10 天差异无显著性($P > 0.05$);注射后第 5 天、第 7 天 TGF β 1 和 TGF β 2 组均明显高于对照组,且注射后第 5 天 TGF β 2 组厚度(112 ± 13) μm 明显大于 TGF β 1 组(73 ± 10) μm ($P = 0.017$)。细胞密度比较,3 组注射后不同时间点以及 3 组间差异均无显著性($P > 0.05$)。**结论** 单次骨膜下注射 TGF β 1 和 TGF β 2 均能一过性促进成年新西兰大白兔骨膜生发层细胞增殖。相比于 TGF β 1,TGF β 2 促进成年兔骨膜生发层细胞增殖效应较强。

【关键词】 骨膜; 生发层细胞; 转化生长因子; 组织学

中图分类号:R-332

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2012)09-0848-04

Comparative Observation of Cambium Cells Proliferation in Rabbits Induced by Subperiosteal Injection of TGF β 1 and TGF β 2 Jing Lizhong, Hu Yuelin, Guo Qinwei, et al. Institute of Sports Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】 Objective To study the proliferation of cambium cells in adult rabbits after a single local subperiosteal injection of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) or TGF β 2. **Methods** Totally 22 New Zealand white rabbits (4 months old) were divided into three groups to receive subperiosteal injection of Tris solution (control group, $n = 6$), 40 ng TGF β 1 (TGF β 1 group, $n = 8$), or 40 ng TGF β 2 (TGF β 2 group, $n = 8$). In the TGF β 1 and TGF β 2 groups, the injections were made at two sites with 5 mm away from each other (20 ng at each site). Specimens were obtained at days 3, 5, 7, and 10 after the injection for HE staining. The thickness and cell density of the cambium layer were determined under a microscope. **Results** In the control group, no difference existed in the cambium thickness among each time points after the injections ($P > 0.05$). On day 5, the cambium layers in both the TGF β 1 and TGF β 2 groups [(73 ± 10) μm and (112 ± 13) μm , respectively] were significantly thicker than those on day 3. In both the groups, the thickness of the cambium layer reached to the peak on day 7 [(117 ± 26) μm and (130 ± 19) μm , respectively] ($P < 0.05$); the thickness detected on day 10 were not significantly different from day 3 ($P > 0.05$). No significant difference was detected in the cambium layer thickness among the three groups at days 3 and 10, however, at days 5 and 7, the thickness in the TGF β 1 and TGF β 2 groups were significantly higher than that in the control; furthermore, on day 5, the thickness of the TGF β 2 group was significantly higher than that in the TGF β 1 group [(112 ± 13) μm vs. (73 ± 10) μm ($P = 0.017$)]. However, at none of the time points we detected difference in the cell density of the cambium layer among the three groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Single subperiosteal injection of both TGF β 1 and TGF β 2 transiently improves the proliferation of cambium cells in adult New Zealand white rabbits, and TGF β 2 is more effective than TGF β 1.

【Key Words】 Periosteum; Cambium cell; Transforming growth factor; Histomorphology

骨膜由纤维层和生发层两部分构成,生发层含有大量干细胞,在特定环境下可分化为软骨细胞。骨膜移植作为修复软骨缺损的常见术式之一已有多

年历史^[1,2],其主要优点在于操作简单、可以整体移植等。但随着年龄的增长,骨膜生发层厚度及干细胞数量会逐渐减少^[3],是导致骨膜移植修复软骨损

* 通讯作者, E-mail: guoqinwei@sina.com

伤效果不佳的原因之一。促进骨膜生发层干细胞的增殖,增强其成软骨能力,成为移植前要解决的重要问题。大量实验已证实,转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β 具有促进干细胞增殖、调节细胞分化等作用。在骨膜移植前通过微量注射器局部注射 TGF 以促进骨膜生发层细胞增殖具有微创、作用直接等优点。本实验通过比较单次注射 TGF β 1 或 TGF β 2 对骨膜生发层细胞增殖效应的异同,初步探讨促进骨膜生发层细胞增殖的可行性及规律,以期提高成年动物骨膜生发层细胞的成软骨能力。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

4 月龄的成年新西兰大白兔 22 只, (3.0 ± 0.5) kg,雌雄不限(北京大学医学部实验动物科学部提供,许可证编号:SCXK 京 2011-0008)。

实验材料:Hamilton 微量注射器(容量 10 μ l,针头 30 gauge)为瑞士 Hamilton 公司生产;TGF β 1 与 TGF β 2 为美国 Peprotech 公司生产(catalog:100-21;100-35)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计与操作 沿兔耳缘静脉缓慢推注 20% 乌拉坦全身麻醉,术前肌注 1 ml 氯胺酮。以胫骨结节最高点为骨性标志,在其内侧 5 mm 处做一 5 mm 的纵行皮肤切口,勿伤及深层组织,使用微量注射器于胫骨结节最高点内侧 5 mm 注射一针,于第一针以远 5 mm 处注射第二针(图 1)。将大白兔分为 3 组:①对照组,于两位置分别注射 10 μ l Tris 溶液(Tris pH = 8.0, Sigma 公司);②TGF β 1 实验组:于两位置分别注射 20 ng (10 μ l) TGF β 1;③TGF β 2 实验组:于两位置分别注射 20 ng (10 μ l) TGF β 2。

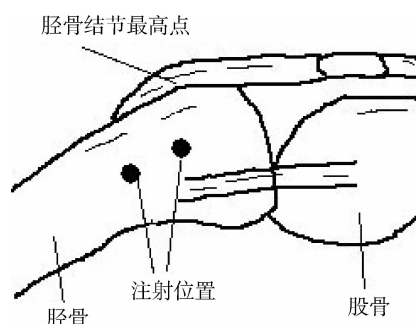


图 1 示注射部位

2 个实验组各 8 只兔,对照组 6 只,每组两侧胫骨均纳入操作。TGF β 1 组:首先对全部 8 只兔的左侧胫骨进行注射操作,于第 3 天对其中 4 只右侧胫骨进行注射操作,第 5 天处死,从而得到 3 天、5 天两个时间点的标本;于第 4 天对另外 4 只右侧胫骨

进行注射操作,第 10 天处死,从而得到 7 天、10 天两个时间点的标本。对照组和 TGF β 2 组操作与 TGF β 1 组相同,只是对照组每次 3 只。大体观察后取胫骨近端附带骨膜的骨皮质标本做组织学切片(每块标本包含 2 个注射点),这样实验组的每个时间点即可获得 8 个观察数据,对照组为 6 个。

1.2.2 大体观察 术后第 3 天、5 天、7 天、10 天将全部兔通过注射过量乌拉坦处死,分离胫骨近端内侧骨膜表面深筋膜等软组织,大体观察各组注射位置骨膜的增生、肿胀情况。

1.2.3 标本的处理 用骨刀切取胫骨近端附带骨膜的骨皮质标本(包含 2 个注射点),面积约 10 mm \times 10 mm,修切整齐,立即浸入 4% 多聚甲醛固定 24 小时,生理盐水冲洗,然后放入 10% 甲酸脱钙液脱钙 5~7 天,将标本切成两块(每块包含 1 个注射点),石蜡包埋后切片,厚度 5 μ m。

1.2.4 组织化学染色及显微镜下观察 将各组标本切片脱蜡,进行 HE 染色。应用 Image-Pro PLUS 医学图像分析系统对标本进行成像,低倍镜放大 200 倍,测量生发层厚度(μ m)、计算细胞密度($\times 10^4/\text{cm}^2$);高倍镜放大 400 倍,观察细胞大体形态。为保证结果可靠,测量 3 次取平均值。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计学软件进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间采用单因素方差分析检验进行比较,两两之间比较采用 LSD。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

大体观察各组注射部位,与外周相比,2 个实验组 5 天、7 天时间点的注射部位略显肿胀,间或见注射器刺激骨膜后形成的微血管网。2 个实验组 3 天、10 天及对照组仅可见微血管网,无明显肿胀。各组骨膜注射部位表面均有光泽。

低倍镜下观察,骨膜分为两层:浅层纤维层胶原纤维排列紧密,细胞呈长梭形,细胞数量少;深层(即生发层)细胞呈圆形或椭圆形,细胞数量相对较多。

各组不同时点生发层厚度比较(表 1):对照组注射后各时点差异无显著性($P > 0.05$);TGF β 1 组和 TGF β 2 组注射后第 5 天生发层厚度较第 3 天明显增加,最大厚度均出现在注射后第 7 天($P < 0.05$),注射后第 10 天与第 3 天差异无显著性($P > 0.05$)。3 组间生发层厚度比较(表 1):注射后第 3 天、第 10 天差异无显著性($P > 0.05$);注射后第 5 天、第 7 天 TGF β 1 和 TGF β 2 组均明显高于对照组,且注射后第 5 天 TGF β 2 组厚度明显大于 TGF β 1 组($P = 0.017$)。细胞密度比较(表 1):3 组注射后不同时点以及 3 组间差异均无显著性($P > 0.05$)。

表 1 注射 TGFβ1 和 TGFβ2 后不同时间段生发层厚度、细胞密度的比较

检测指标	组别 (n=6/8)	注射后 3 天	注射后 5 天	注射后 7 天	注射后 10 天	F, P 值
生发层厚度 (μm)	对照组①	38 ± 11	37 ± 8	43 ± 9	35 ± 6	1.25, 0.312
	TGFβ1 组②	50 ± 6	73 ± 10	117 ± 26	40 ± 8	15.70, 0.000
	TGFβ2 组③	40 ± 7	112 ± 13	130 ± 19	38 ± 7	55.16, 0.000
	F, P 值	2.21, 0.135	22.80, 0.000	26.81, 0.000	1.08, 0.358	
细胞密度 (10 ⁴ /cm ²)	对照组	3.5 ± 0.7	4.1 ± 1.6	4.2 ± 1.3	3.4 ± 0.3	2.45, 0.085
	TGFβ1 组	3.7 ± 1.0	3.5 ± 0.9	4.3 ± 1.1	3.3 ± 0.4	2.60, 0.105
	TGFβ2 组	4.0 ± 0.5	4.1 ± 0.5	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.5	2.28, 0.121
	F, P 值	1.96, 0.166	1.87, 0.179	2.64, 0.095	0.82, 0.416	

注: TGFβ1 组不同时点生发层厚度: $P_{3-5}=0.041, P_{3-7}=0.026, P_{3-10}=0.492, P_{5-7}=0.038, P_{5-10}=0.046, P_{7-10}=0.024$
TGFβ2 组不同时点生发层厚度: $P_{3-5}=0.013, P_{3-7}<0.001, P_{3-10}=0.529, P_{5-7}=0.011, P_{5-10}=0.002, P_{7-10}<0.001$
注射后第 5 天 3 组生发层厚度: $P_{①-②}<0.001, P_{①-③}<0.001, P_{②-③}=0.017$
注射后第 7 天 3 组生发层厚度: $P_{①-②}<0.001, P_{①-③}<0.001, P_{②-③}=0.322$

高倍镜下观察, 对照组 (图 2a) 生发层细胞核呈椭圆形, 蓝色深染, 细胞数较少。TGFβ1 组注射第 3 天 (图 2b)、第 10 天 (图 2e) 与对照组生发层细胞形态类似, 第 7 天 (图 2d) 骨膜生发层细胞增殖显著, 胞核增大呈圆形或椭圆形, 蓝色深染, 胞

浆基质丰富, 细胞数目多。TGFβ2 组第 3 天 (图 2f)、第 10 天 (图 2i) 生发层细胞形态与 TGFβ1 组第 3 天 (图 2b)、第 10 天 (图 2e) 类似, 第 5 天 (图 2g) 与第 7 天 (图 2h) 细胞形态与 TGFβ1 第 7 天 (图 2d) 类似。

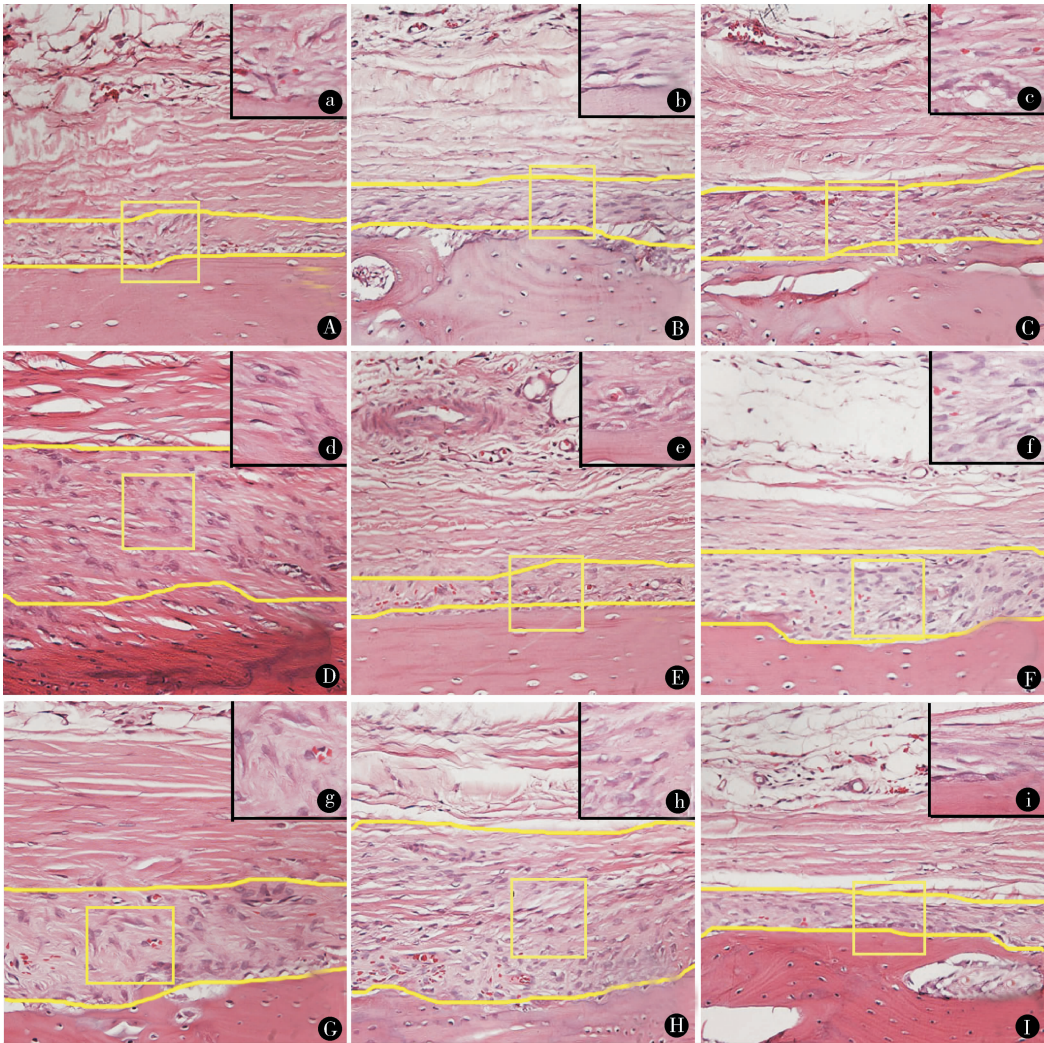


图 2 注射 TGFβ 后不同时间点骨膜 HE 染色 A 为空白对照组 (×200); B~E 分别为注射 TGFβ1 后第 3 天、5 天、7 天、10 天组 (×200); F~I 分别为注射 TGFβ2 后 3 天、5 天、7 天、10 天组 (×200); 右上角 a~i 分别为放大 400 倍图像

3 讨论

关节软骨缺损的修复一直是运动医学及骨关节外科研究的难点及重点。利用骨髓、脂肪组织等来源的干细胞修复软骨损伤的实验室研究显示了较满意的结果,但由于需进行体外培养、二次手术与污染风险等因素限制了其在临床上的应用。将骨膜应用于各种软骨缺损的修复已有多年历史^[1,2]。其主要优点在于可以整体移植,同时包含干细胞和各种细胞因子,无需体外培养,从而更加简单易行。骨膜生发层干细胞在一定条件下可以分化为软骨细胞,但随年龄增长,其增殖分化潜能会逐渐下降^[3]。因此,对于成年患者,其自身骨膜很难在细胞数量及密度上达到移植的标准^[4],这就有必要提高骨膜生发层干细胞的数量,从而提高骨膜的软骨修复能力。近年大量实验研究探讨了不同细胞因子对细胞增殖分化的影响,并且证实 TGF β 具有促进细胞增殖、调节细胞分化等作用^[5,6]。

本实验证实,单次注射 TGF β 时细胞的增殖是短暂的、一过性的。这一结论与 Reinholz 等^[7]的研究类似。Reinholz 等观察到向成年大白兔胫骨骨膜下单次注射 TGF β 1 后可以刺激骨膜生发层细胞增殖。其最大效应出现在注射后第 7 天,表现为生发层厚度最大,细胞数目最多。不同之处在于本实验第 3 天实验组与对照组相比虽略有增加,但并无明显差异。此外,本研究 2 个实验组注射后 10 天与对照组也无明显差别。这就进一步提示干预后间隔时间的长短将影响到骨膜生发层的增殖,时间过长或过短均达不到理想的效果。单次注射不同于连续注射,后者往往可以诱导软骨细胞生成^[8,9],但也容易导致骨组织的生成^[8],因此并不利于软骨缺损的修复。本研究表明,在 TGF 的干预下,骨膜生发层细胞(包括干细胞)会出现一过性增殖。在此时间段上,如果将 TGF 诱导的骨膜移植到关节内,保持持续性的刺激及适宜的微环境,则可能促进骨膜生发层细胞进一步向软骨分化。

不同 TGF β 亚型对不同的细胞或组织效应各异^[8]。本实验比较了骨膜下单次注射 TGF β 1 和 TGF β 2 后对生发层细胞增殖效应的异同。结果显示单次注射两者后生发层细胞数量均会一过性增加,并且 TGF β 2 对生发层细胞的增殖效应更为明显。多数研究是通过幼年动物^[8,9]或体外^[10]进行的,结果虽然也证明两者可以促进生发层细胞的增殖和分化,并且 TGF β 2 诱导软骨细胞分化的能力强于 TGF β 1,但成年动物体内 TGF β 1 和 TGF β 2 促生发层细胞增殖效应的异同尚无研究报道。本实验中 TGF β 2 的促增殖效应之所以相对较好,原因可能在于 TGF β 2 可以诱导合成 TGF β 1^[8],两者共同作用于生发层细胞产生协同效应,从而导致更为明显的增殖效应。Pombo-Suarez 等^[11]观察到在骨性关节炎

患者的软骨细胞内,TGF β 1 与 TGF β 2 的基因表达存在强烈的相关性,从而更进一步证实了这种可能性。

本文的不足之处在于没有对生发层细胞的性质做鉴定,毕竟生发层内包括成骨细胞、骨原细胞、成纤维细胞、纤维细胞等较多的细胞成分。因此,注射 TGF β 后增殖细胞的性质,还有待于通过流式细胞技术对其细胞表面标志物如 CD90、CD105 等^[12,13]进行进一步的验证。此外,本实验虽然初步确定了注射 TGF β 后生发层细胞增殖的时间窗,观察到注射后时间过短或过长增殖效应均不明显,但对于注射生长因子更长时间后生发层细胞的变化还有待于进一步研究。

参考文献

- Emans PJ, Surtel DA, Frings EJ, et al. In vivo generation of cartilage from periosteum. *Tissue Eng*, 2005, 11(3-4): 369-377.
- O' Driscoll SW, Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, 391(Suppl): S190-S207.
- O' Driscoll SW, Saris DB, Ito Y, et al. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res*, 2001, 19(1): 95-103.
- Jansen EJ, Emans PJ, Guldmond NA, et al. Human periosteum-derived cells from elderly patients as a source for cartilage tissue engineering? *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2(6): 331-339.
- Mara CS, Sartori AR, Duarte AS, et al. Periosteum as a source of mesenchymal stem cells; the effects of TGF-beta3 on chondrogenesis. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011, 66(3): 487-492.
- Olivos-Meza A, Fitzsimmons JS, Casper ME, et al. Pretreatment of periosteum with TGF-beta1 in situ enhances the quality of osteochondral tissue regenerated from transplanted periosteal grafts in adult rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(9): 1183-1191.
- Reinholz GG, Fitzsimmons JS, Casper ME, et al. Rejuvenation of periosteal chondrogenesis using local growth factor injection. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17: 723-734.
- Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, et al. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol*, 1990, 110(6): 2195-2207.
- Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. The effects of age on the response of rabbit periosteal osteoprogenitor cells to exogenous transforming growth factor-beta 2. *J Cell Sci*, 1994, 107(Pt 2): 499-516.
- Barry F, Boynton RE, Liu B, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow; differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*, 2001, 268(2): 189-200.
- Pombo-Suarez M, Castano-Oreja MT, Calaza M, et al. Differential upregulation of the three transforming growth factor beta isoforms in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(4): 568-571.
- Csaki C, Matis U, Mobasheri A, et al. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells; a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol*, 2007, 128(6): 507-520.
- Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3(2): 9-20.

(收稿日期: 2012-04-19)

(修回日期: 2012-06-27)

(责任编辑: 王惠群)