

技术与方法

一种新方法获取颞下颌关节骨关节炎患者滑膜间充质干细胞及细胞培养鉴定

胡程晨^{1,2} 方泽强¹ 冯 驰¹ 庞 谅^{1,2} 任 为^{1,2} 邱丽华^{1*}¹重庆医科大学附属口腔医院口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147;²重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室, 重庆 401147)

摘要 该研究探讨从颞下颌关节骨关节炎患者的关节冲洗液中获取滑膜间充质干细胞(synovial mesenchymal stem cells, SMSCs)并进行体外培养, 研究其间充质干细胞特性。采用离心、贴壁培养法从颞下颌关节骨关节炎患者的关节冲洗液中提取并分离细胞, 进行细胞形态学观察、细胞生长及周期的分析, 细胞表面标志物流式细胞术检测, 间充质干细胞标志物免疫荧光检测, 成骨、成脂、成软骨多向分化能力检测, 促血管分泌因子检测。结果显示, 通过离心、贴壁培养法可稳定地从患者颞下颌关节冲洗液中获取滑膜间充质干细胞, 体外培养呈对数生长。SMSCs表达间质源性细胞的特异性标记物CD73、CD90、CD105、波形蛋白(Vimentin)以及 α 平滑肌肌动蛋白的特异性标记物 α -SMA。经诱导培养基诱导, SMSCs可分化为骨、软骨和脂肪细胞, 细胞分泌液中可检测到如成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、angiopoietin、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等10余种促血管生长因子。以上结果表明, 该研究成功建立了以微创的方式获取颞下颌关节骨关节炎患者的滑膜间充质干细胞, 有望为组织工程应用于骨软骨修复提供良好种子细胞的来源。

关键词 颞下颌关节骨关节炎; 间充质干细胞; 滑膜; 关节液; 修复

A New Method to Isolate, Culture and Identify the Synovial Mesenchymal Stem Cells from the Patients with Temporomandibular Joint Osteoarthritis

Hu Chengchen^{1,2}, Fang Zeqiang¹, Feng Chi¹, Pang Liang^{1,2}, Ren Wei^{1,2}, Qiu Lihua^{1*}¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University,

Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China;

²Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing 401147, China)

Abstract Our objective is to isolate and identify the character of synovial mesenchymal stem cells (SMSCs) derived from the rinse solution of patients with temporomandibular joint osteoarthritis. Synovial-derived

收稿日期: 2017-05-18 接受日期: 2017-08-10

重庆市社会民生科技创新专项(批准号: cstc2016shmx00010)、2016年重庆高校创新团队建设计划资助项目和重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室资助项目资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-88860097, E-mail: gqyidi2001@163.com

Received: May 18, 2017 Accepted: August 10, 2017

This work was supported by the Project of Social and People's Livelihood Science and Technology Innovation in Chongqing (Grant No.cstc2016shmx00010), the Program for Innovation Team Building at Institutions of Higher Education in Chongqing in 2016 and Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education

*Corresponding author. Tel: +86-23-88860097, E-mail: gqyidi2001@163.com

网络出版时间: 2017-09-18 17:27:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170918.1727.002.html>

mesenchymal stem cells were collected from rinse solution of the temporomandibular joint osteoarthritis patients, cultured *in vitro* and the cell growth curve and cell morphology were analyzed; cell surface markers were detected by immunofluorescence and stem cell markers were detected by flow cytometry. We also detected the osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation ability and the secretion factor of the cell. The results showed that we could steadily obtain the SMSCs from rinse solution of the temporomandibular joint osteoarthritis patients by means of centrifugation and adherent culture. Our results showed the logarithmic growth *in vitro*, expression of the surface markers (CD73, CD90, CD105), vimentin and alpha-SMA in cultured SMSCs. The SMSCs could also be induced to differentiate into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages *in vitro*. More than 10 kinds of vascular growth factors such as FGF, angiopoietin, TGF- β can be detected from the cell secretion. These results indicated that SMSCs were obtained by minimally invasive method which provided a new resource of seed cell for the treatment of temporomandibular joint osteoarthritis.

Keywords temporomandibular osteoarthritis; mesenchymal stem cell; synovial membrane; joint synovia; renovation

近年来,由于精神心理、自身免疫和创伤等因素,颞下颌关节骨关节病发病率呈上升趋势,严重影响患者的生活质量^[1],其病理变化主要包括软骨的缺损和退行性变^[2]。传统的治疗方法因药物效果差、手术创伤大等局限,使其临床应用受限。干细胞移植为治疗颞下颌关节骨关节病带来了新的方向。自体干细胞移植具有再生能力强和适应组织微环境等优点。与肌肉、骨髓及脂肪来源的间充质干细胞相比,滑膜间充质干细胞(synovial mesenchymal stem cells, SMSCs)具有更强的成软骨能力,更适用于修复软骨损伤^[3]。因自体干细胞移植免疫排斥反应很小且不涉及伦理道德问题,所以越来越受到研究者的重视。2001年, de Bari等^[4]首次在关节置换术的骨关节炎患者滑膜中消化分离得到了SMSCs。目前获取颞下颌关节SMSCs常用的方法是酶消化法和组织块接种法,然而几乎都聚焦于滑膜组织本身,获取手术有创且酶解过程对细胞易造成损伤,还没有针对颞下颌关节腔中滑膜液中的SMSCs特性研究^[4-6],本研究对颞下颌关节冲洗液中的滑膜间充质干细胞进行分离、纯化并探究其作为组织工程种子细胞的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂与器材

实验需要的试剂与器材有:高糖DMEM培养基(青/链双抗),10%胎牛血清(Gibco公司),CCK-8试剂盒(细胞增殖检测试剂盒)、兔抗人波形蛋白(vimentin)单克隆抗体、兔抗人 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体

及二抗羊抗兔抗体(BD公司),FITC-鼠抗人IgG、PE-IgG1、FITC-IgG1、CD24-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-PE、CD105-FITC、CD117-FITC、CD133-FITC、OCT-4-PE小鼠抗人单克隆抗体(Abcam公司),DAPI染色试剂盒(Leagene公司),50 μ g/mL碘化丙啶(propidium iodide, PI),0.5% Triton X-100(Amresco公司),成骨、成脂和成软骨培养基(Hyclone公司),碱性磷酸酶(ALP Fast Red)检测试剂盒(Sigma公司),茜素红、油红O、阿利辛蓝染色试剂盒(Omega公司),人促血管生长因子检测试剂盒(R&D公司),倒置相差显微镜及照相系统(Nikon公司),CO₂孵箱(Thermo公司)和流式细胞分析仪FACSArray(BD公司)。

1.2 材料来源和收集方法

细胞来源于2016年11月~2017年3月重庆医科大学附属口腔医院关节门诊的颞下颌关节骨关节病患者,共83例。其中,男38例,女45例,平均年龄46.5岁,均行颞下颌关节灌洗术,并收集灌洗液。术前已告知患者收集样本的目的和用途,征得患者同意并签订知情同意书。纳入标准:患者有明显的临床症状,进行过临床检查、影像学检查,并排除全身系统性疾病。研究内容通过重庆医科大学附属口腔医院伦理委员会审核并批准。

收集方法:嘱患者取仰卧位并进行张口运动,通过扪诊找到颞下颌关节的位置,常规消毒后,2%利多卡因局部浸润。在耳屏前与髁突的后斜面之间、耳屏中点至外眦连线上距耳屏约1 cm处即进针点处进针。然后,将注射针沿前上内30°的方向进针

2~3 cm, 抵在关节结节后斜面或者髌突后斜面, 留置针头。换生理盐水注射器冲洗数次, 在冲洗过程中, 令患者做下颌运动, 冲洗后关节腔内有清凉的液体流出, 收集3~4 mL冲洗液后将冲洗液置于4 °C低温保存盒中, 送至实验室。

1.3 SMSCs分离和培养

首先观察颞下颌关节冲洗液的颜色, 一般冲洗液呈无色透明或微红色, 若呈血红色或明显浑浊则丢弃。取15 mL离心管, 预先放入1 mL DMEM培养基, 转移冲洗液至离心管, 吹打混匀。1 500 r/min离心5 min, 保留管底50 μ L液体及沉淀, 弃上清液。加入1 mL含10%胎牛血清的培养基, 吹打混匀后接种到24孔培养板中(1 mL/孔, 每例患者样品1孔), 于5% CO₂、37 °C孵箱中培养。第3 d和第6 d半换液, 若观察过程中有污染孔, 则弃掉该孔。观察滑膜间充质干细胞克隆的形成和增殖, 当孔板细胞覆盖60%~70%时进行细胞传代。

1.4 SMSCs的细胞生长曲线的绘制及倍增时间的测定

取第3代SMSCs, 用0.25%胰蛋白酶消化成细胞悬液, 进行细胞计数, 按1 500/孔的细胞浓度接种于96孔培养板, 置于37 °C、含5% CO₂的孵箱中培养。先后于1~9 d每日分别加入CCK-8试剂, 在酶标仪下检测450 nm处的吸光度(*D*)值, 绘制细胞增殖曲线。

1.5 SMSCs的周期检测

取第3代SMSCs, 0.25%胰蛋白酶消化, 1 500 r/min离心5 min后弃上清液, 用预冷的PBS洗涤细胞2次, 留管底沉淀及50 μ L底液, 加入1 mL冰冻的70%乙醇后转入1.5 mL EP管中, 于4 °C过夜。1 500 r/min离心5 min后, 1 mL PBS洗涤细胞1次, 加入500 μ L含50 μ g/mL碘化丙啶(PI), 100 μ g/mL RNaseA和含0.2% Triton X-100的PBS溶液, 4 °C避光孵育30 min, 放入流式细胞分析仪检测。

1.6 SMSCs细胞表面标志物检测

取第3代SMSCs, 用胰蛋白酶消化细胞, 然后加入4 mL培养基终止消化, 计数, 约10⁶/管, 共11管, 转移至15 mL离心管, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清液, 加入PBS洗涤, 重复2次, 弃上清液。每管分别加入流式细胞术抗体5 μ L(CD24-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-PE、CD105-FITC、CD117-FITC、CD133-FITC、Oct-4-PE以及同型对照PE-IgG1、FITC-IgG1小鼠抗人单克隆抗体), 4 °C避光孵育30 min, 加

入1 mL PBS再次洗涤细胞, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清液, 加入300 μ L PBS重悬细胞, 放入流式细胞仪检测。

1.7 SMSCs免疫荧光染色

取第3代SMSCs, 用胰蛋白酶消化细胞并接种至放有爬片的24孔板中(300/孔), 放入孵箱培养, 待细胞长满玻片。用PBS浸洗3次, 每次5 min, 10%的多聚甲醛固定爬片15 min, PBS浸洗玻片5 min, 重复3次。0.5% Triton X-100(PBS配制)室温通透20 min, PBS浸洗玻片3 min, 重复3次, 吸水纸吸干PBS, 滴加山羊血清, 室温封闭30 min。吸除封闭液, 每张玻片滴加50 μ L稀释的一抗(兔抗人波形蛋白抗体、 α -SMA抗体和角蛋白抗体), 并放入湿盒, 4 °C孵育过夜。次日复温, PBS浸洗3次, 加入稀释后的荧光二抗孵育1 h, PBS洗涤, 滴加DAPI试剂染色30 min, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 荧光显微镜下观察并采集图像。

1.8 SMSCs的成骨诱导分化

取第3代SMSCs, 按照2 \times 10⁴/cm²接种至6孔板并加入普通培养基培养, 当细胞汇合至70%时, 更换为诱导培养基, 每次加入2 mL成骨诱导培养液, 3 d换液1次, 诱导3周。成骨诱导7 d后, 吸走培养液, PBS清洗3次, 10%多聚甲醛固定15 min, PBS清洗3次, 滴入稀释后的碱性磷酸酶染料染色5 min, PBS清洗2次, 镜下观察观察钙结节的形成情况。成骨诱导21 d后, PBS清洗2次, 茜素红染液染色15 min, PBS清洗2次, 倒置相差显微镜观察并照相。

1.9 SMSCs的成脂诱导分化

取第3代SMSCs, 按照2 \times 10⁴/cm²接种至6孔板并加入普通培养基培养, 待细胞达到90%汇合时, 移去旧的培养液。加入2 mL成脂诱导液A开始诱导, 3 d后更换成成脂诱导液B液进行维持, 24 h后再更换成成脂诱导液A诱导, 如此进行3个循环。诱导14 d后镜下可观察到细胞间有大量脂滴形成。第21 d吸走培养基, PBS浸洗3次, 4%多聚甲醛室固定30 min, PBS浸洗3次, 经油红O溶液染色20 min, PBS洗涤3次, 倒置相差显微镜观察并照相。

1.10 SMSCs的成软骨诱导分化

取第3代SMSCs, 经胰蛋白酶消化成单个悬浮细胞, 计数。取2.5 \times 10⁵细胞离心, 弃上清液, PBS洗2次, 加入500 μ L含有TGF- β 3的软骨诱导培养基, 吹打混匀, 1 500 r/min离心5 min, 吸走上层培养基。再加

入500 μ L相同培养基,吹打混匀,重复离心后直接放入37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂的孵箱中静置培养。24 h后可发现细胞成球,轻弹管底使其悬浮,每隔3 d换液,每次500 μ L。28 d后将诱导成的软骨球夹出,经10%甲醛中脱水、石蜡包埋切片、脱蜡蒸馏水冲洗,行阿利辛蓝染色后在倒置相差显微镜下观察并照相。

1.11 血管生长因子分泌功能检测

取 1×10^5 细胞数的SMSCs接种至10 cm培养皿中,待细胞长至70%~80%培养皿面积时弃DMEM培养基, PBS洗涤3次,用无血清DMEM培养基培养48 h。收集并采用冻干法浓缩DMEM培养基,用人促血管生长因子检测试剂盒进行检测。采用相同方法培养骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs),收集培养液对比检测。加入显影液进行X线曝光,重复做3次,利用ImageJ软件对进行灰度分析并整理。

1.12 统计学分析

所有统计数据均采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。实验数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对两组间数据比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 细胞分离培养及形态观察

原代培养3~4 d,可观察到单个细胞贴壁,形态呈长梭形,周围有少量红细胞残留(图1A),成克隆样生长,7 d左右长至60%~70%汇合即可传代至P1,细胞体积偏小,排列疏松(图1B)。3 d后长至50%~60%汇合,继续传代至P2、P3,细胞基本保持长梭形,为间充质干细胞的形态学特征(图1C和图1D)。

2.2 细胞生长曲线描绘及周期检测

颞下颌关节骨关节炎患者关节冲洗液中分离的SMSCs呈对数生长(图2A)。计算倍增时间和测定增殖活力(CCK-8法),结果显示,细胞传代培养0~3 d细胞生长速度缓慢;3~7 d细胞处于对数增长期,生长迅速;7~9 d细达平台期,细胞停止生长甚至开始凋亡。流式细胞术分析细胞周期,结果显示,83.4%处于G₀/G₁期,6.52%处于S期,10.1%处于G₂/M期,表明细胞增殖能力较强,且处于相对稳定的生长状态(图2B)。

2.3 SMSCs免疫荧光化学染色检测间充质干细胞标志物

第3代SMSCs细胞质中,间质来源细胞的特异性标记物波形蛋白和成纤维样细胞的标记物 α -SMA

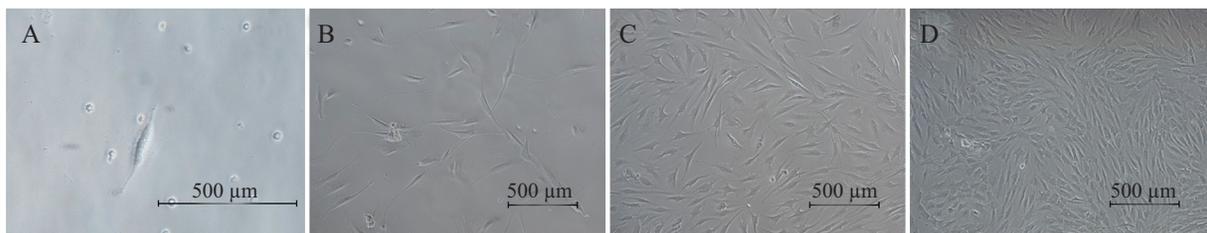


图1 原代、第一代、第二代和第三代SMSCs细胞形态(A~D)

Fig.1 Morphology of primary passage, the first passage, the second passage and the third passage of SMSCs (A-D)

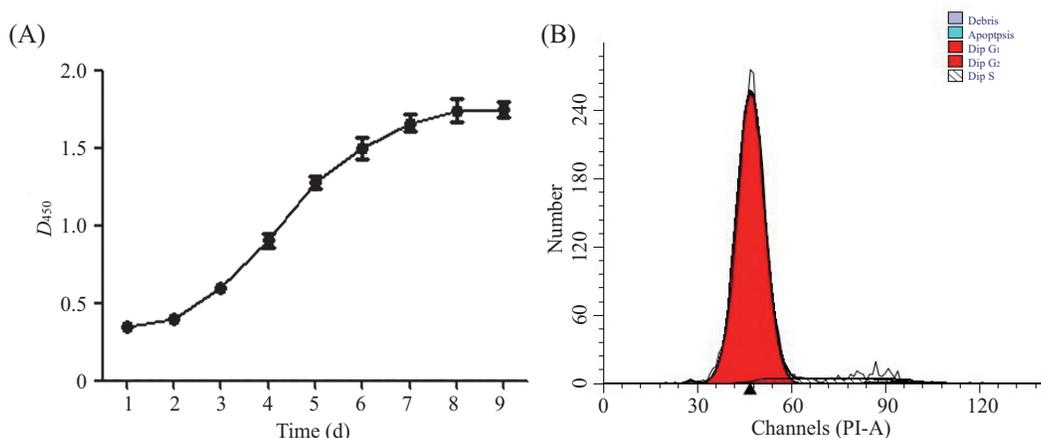
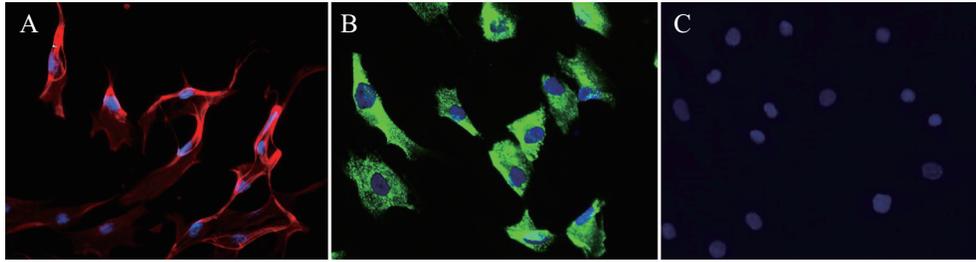


图2 SMSCs细胞生长曲线(A)和细胞周期流式结果图(B)

Fig.2 Cell growth curve (A) and cell cycle (B) of SMSCs



A: 波形蛋白; B: α -SMA; C: 角蛋白。

A: vimentin; B: α -SMA; C: keratin.

图3 细胞免疫荧光检测SMSCs中间充质干细胞标志物的表达

Fig.3 Immunofluorescence detection of mesenchymal stem cell marker expressions in SMSCs

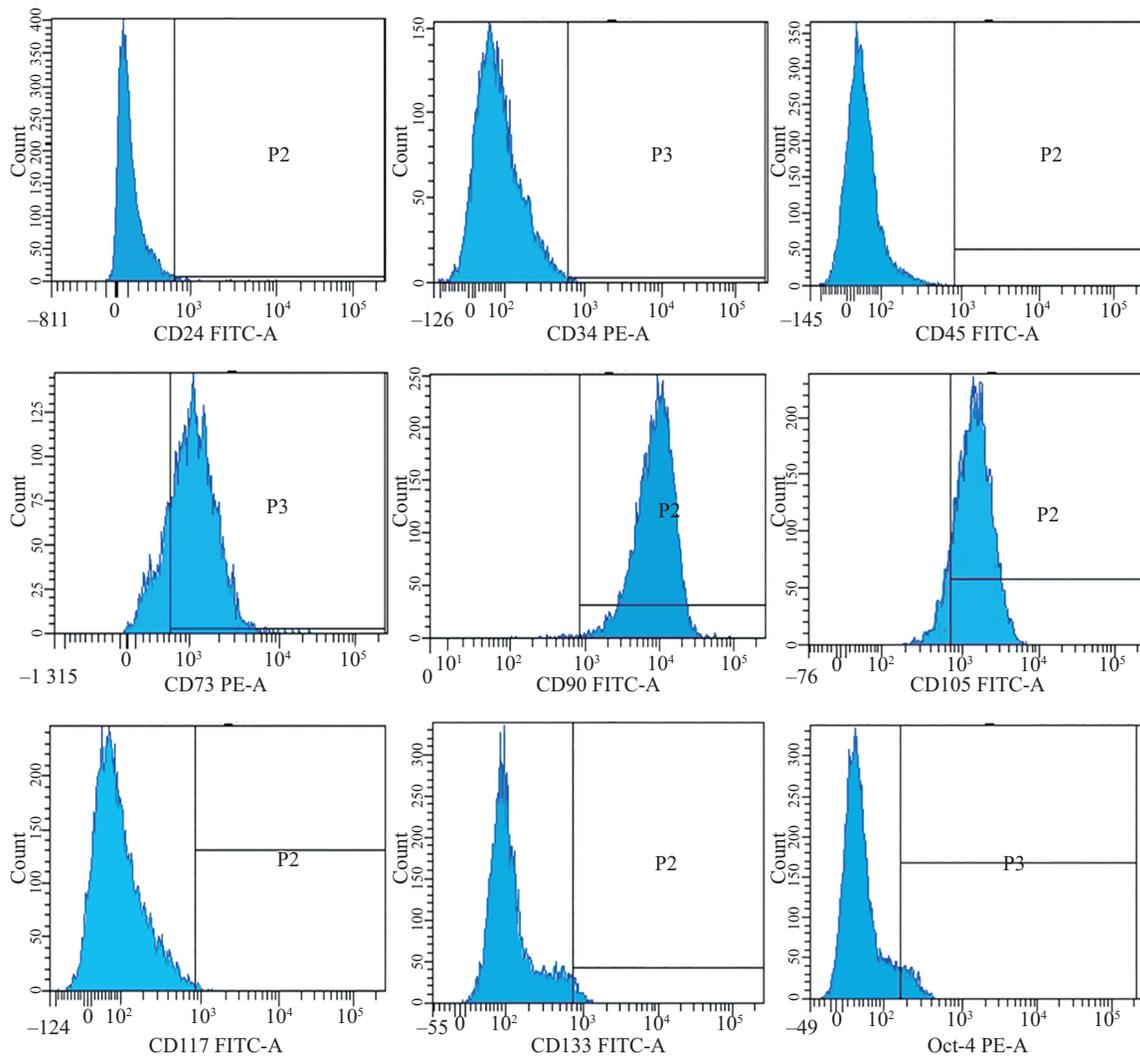


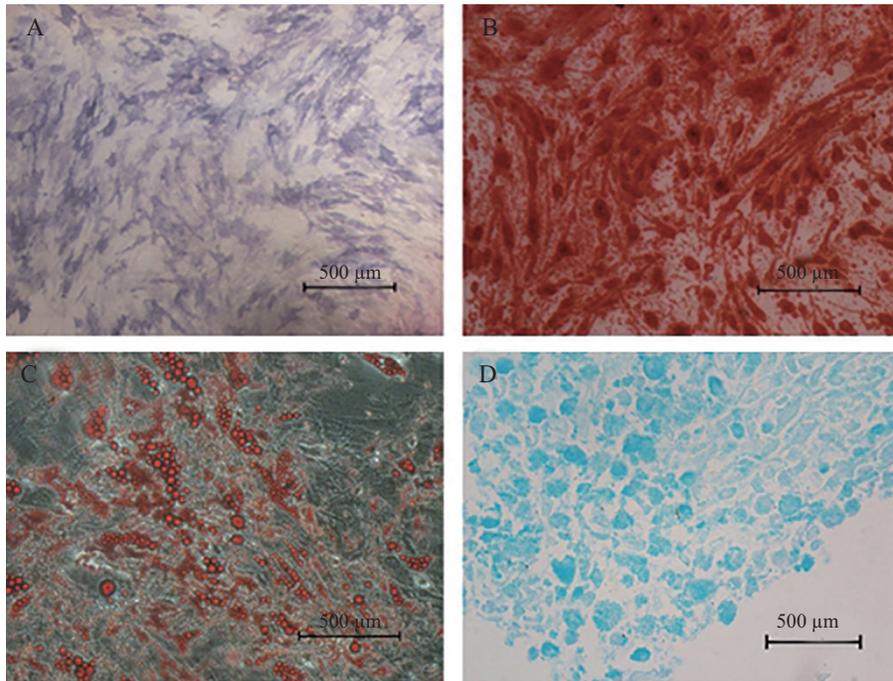
图4 间充质干细胞表面标志物的流式细胞术检测结果

Fig.4 Surface markers of mesenchymal stem cells analyzed by flow cytometry

抗体反应均呈阳性, 波形蛋白表达在SMSCs的胞质和胞膜上, 膜周表达相对明显, 胞质染色较轻(图3A)。 α -SMA特异性表达在SMSCs胞质和胞膜中, 胞质和胞膜荧光染色强度无明显差别(图3B)。上皮细胞特异性标志物角蛋白反应呈阴性(图3C)。

2.4 细胞表面标志物的表达

流式细胞术结果(图4)显示, 表达间充质干细胞表面标志物CD73、CD90和CD105等, 其中, CD73(90.0%)、CD90(99.6%)表达强烈, CD105(88.5%)、胚胎干细胞Oct-4(7.1%)低表达, 造血干细胞CD133(2.1%)极低表



A: 成骨诱导7 d, 碱性磷酸酶染色; B: 成骨诱导22 d, 茜素红染色; C: 成脂诱导21 d, 油红O染色; D: 成软骨诱导28 d, 阿利辛蓝染色。

A: alkaline phosphatase identified osteogenic induction for 7 days; B: Alizarin red staining identified osteogenic induction for 22 days; C: oil red O staining identified adipogenic induction for 21 days; D: Alcian blue staining identified chondrogenic induction for 28 days.

图5 SMSCs成骨、成脂及成软骨诱导染色观察

Fig.5 Staining observation of the SMSCs differentiating into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes

达, 而神经干细胞标志物CD24、血管内皮细胞标志物CD34和白细胞表面标志物CD45、CD117无表达, 符合间充质干细胞表面标志物的特征。

2.5 细胞成骨、成脂和成软骨诱导后细胞形态观察

经过3 d成骨诱导后, 细胞逐渐聚拢, 并且随着时间的延长开始堆积, 形成多个结节。第7 d, 早期成骨标志物碱性磷酸酶染色呈阳性(图5A)。培养22 d, 后茜素红染色能够可见大量橘红色片状矿化结节中心(图5B)。经过7 d成脂诱导, 细胞质内开始出现明亮的小脂滴, 随着时间推移, 逐渐变大, 折光性变强, 并且在克隆中心集中明显。第21 d油红染色结果显示, 骨髓间充质干细胞克隆中心的细胞质内可见大量颗粒状的红色脂滴, 在低倍镜下显示大量串珠状的脂滴(图5C)。细胞成软骨诱导24 h后, 可发现细胞成团状, 轻弹离心管底部使其悬浮。诱导培养第28 d后, 将诱导形成的软骨球进行福尔马林固定和石蜡包埋切片, 行阿利辛蓝染色后显示, 软骨组织中的内酸性黏多糖呈蓝色, 提示细胞成软骨诱导成功(图5D)。

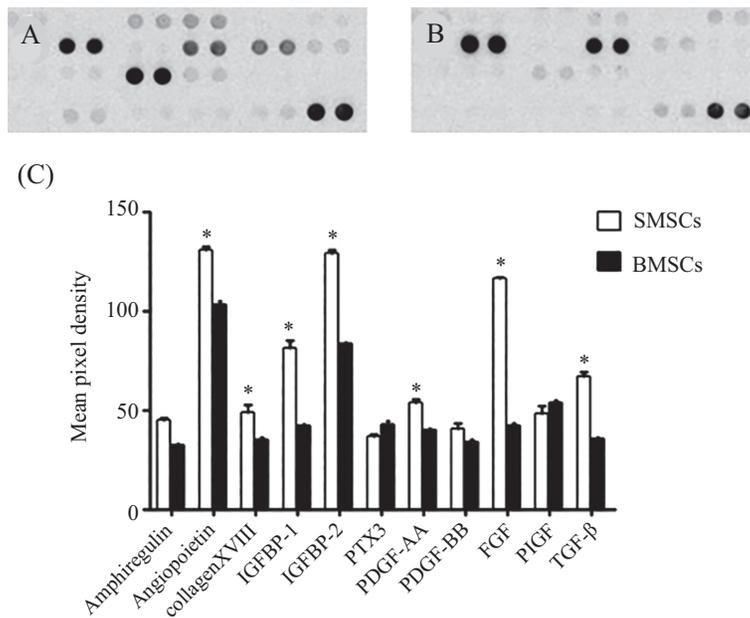
2.6 血管生长因子分泌功能的检测

促血管生长因子检测结果显示, 共检测出了11种促血管生长因子。和骨髓间充质干细胞(BSMCs)相比,

除Amphiregulin、穿透素-3(PTX3)、血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)、胎盘生长因子(PIGF)4种因子分泌量未见明显差别外, 在其余因子的检测中, SMSCs显示出更强的促血管生长因子分泌功能(图6A~图6C, $P < 0.05$)。

3 讨论

滑液中含有多种细胞, 如滑膜细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、白细胞等^[7], 可在生长发育过程中一直存在, 也可由于关节滑膜组织摩擦脱落产生。2001年, de Bari等^[4]首次在关节置换术的骨关节炎患者滑膜中消化分离得到了SMSCs。现在认为, 滑膜干细胞根据形态和功能分为A型和B型细胞。A型细胞也称为滑膜巨噬样细胞, 具有吞噬组织碎片及异物的能力, 并参与和介导免疫反应。B型细胞也称为滑膜成纤维样细胞, 合成和调节内膜的细胞外基质和滑液成分, 是主要的滑膜细胞^[8-9]。蔡谓等^[10]发现, A型细胞数所占比例平均为23.17%, 体外培养第3 d可见B型细胞大量增加, 培养1周时A型细胞几乎全部被B型细胞掩盖, 所以我们培养到第3代的SMSCs是富集B型细胞的细胞群。相比常用的滑膜组织消



A: SMSCs促血管生长因子; B: BSMCs促血管生长因子; C: SMSCs和BSMCs促血管生长因子分泌结果对比($\bar{x} \pm s$, $n=3$), $*P<0.05$ 。

A: angiogenesis growth factor secretion of SMSCs; B: angiogenesis growth factor secretion of BSMCs; C: histogram of angiogenesis growth factor secretion comparative result ($\bar{x} \pm s$, $n=3$), $*P<0.05$.

图6 SMSCs和BSMCs血管生长因子分泌检测

Fig.6 Angiogenesis growth factor secretion of SMSCs and BSMCs

化法来获取颞下颌关节中的滑膜间充质干细胞, 本研究采取从颞下颌关节骨关节炎患者的关节冲洗液中提取滑膜间充质干细胞, 方法更简单, 对机体和细胞的损伤很小; 通过细胞生长曲线、表面标志物和多向分化能力等方面证实, 我们从人的颞下颌关节冲洗液中成功分离培养出滑膜间充质干细胞。

Harvanova等^[11]在人膝关节滑膜组织和关节液中滑膜间充质干细胞的对比研究中发现, 在细胞形态、生长增殖速度以及常见的细胞表面标记物(CD44、CD45、CD90、CD105)等方面无明显区别, 并认为滑膜液中滑膜细胞可能为滑膜壁细胞脱落下的细胞。然而到目前为止, 关节液中SMSCs的来源还尚无明确定论, 同时也没有一个标记物能特异性标记SMSCs^[12]。Morito等^[13]认为, 关节液中的SMSCs可能来自滑膜, 因为从细胞形态、细胞克隆以及基因表达谱结果提示, 其更有可能来源于滑膜而非骨髓源性。de Bari等^[4]根据滑膜组织的双层结构为理论基础, 提出SMSCs可能来自血管周细胞或骨髓前体细胞。相比间充质干细胞的其他来源, 滑膜是最接近关节软组织的组织, 具有较高的软骨形成能力^[14], 并且滑膜是唯一能在良性条件下产生透明软组织的组织^[15]。值得注意的是, CD90是间充质干细胞成软

骨能力的重要指标^[15], 实验中SMSCs流式检测CD90高达99.6%, 提示其具有很强的成软骨分化潜能。在促血管生长因子检测中, 相比骨髓间充质干细胞, 本实验分离培养出的滑膜间充质干细胞能总体分泌更多的促血管生长因子, 尤其胰岛素样生长因子结合蛋白-1(insulin-like growth factors-binding protein-1, IGFBP-1)、IGFBP-2、FGF、TGF-β对软骨的形成意义重大^[6], 进一步证实本研究分离出的SMSCs在应用于关节软骨修复中具有很大的潜力。

颞下颌关节骨关节炎的主要病理表现为关节骨质侵袭、软骨损坏、骨赘形成和软骨下骨硬化、滑膜改变等, 治疗方法包括合垫、理疗、药物、关节手术、内窥镜微创手术等^[17-18], 主要目的是缓解疼痛、维持颞下颌关节功能的正常运作等, 尚缺乏逆转关节软骨等的损伤和退行性病变的治疗方法。由于成熟的关节软骨细胞只分泌软骨基质而不再分裂, 一旦软骨细胞受损之后, 修复能力随之降低且不可恢复^[9], 所以, 具有高度增殖和分化潜能的滑膜间充质干细胞便成为修复颞下颌关节的理想方式。其中, 自身移植细胞的来源通常要求获取创伤小、性状稳定、免疫排异低和较强的成软骨能力。目前, 最常见的滑膜间充质干细胞的采集方式是手术切取

滑膜组织,但创伤大,技术要求高,手术禁忌症较多。本研究采用的方法简单,适用人群更为广泛。同时,原代培养的颞下颌关节滑膜间充质干细胞与关节内部环境具有更多的相似性,更能适应关节内的微环境,且有文献表明,人间充质干细胞在关节腔中能够存活2~8周^[20],具有较好的稳定性。在体外培养中,我们分离培养出的滑膜间充质干细胞传至10代以上仍保持很好的增殖能力,是理想的间充质干细胞来源。本研究成功地证实,可以通过从颞下颌关节骨关节炎患者的关节冲洗液中分离出滑膜间充质干细胞,但仅对其细胞标志物、体外增殖能力、多项分化潜能等方面进行了研究,对其自身生理学、免疫学方面的研究还需要进一步深入探讨。随着体外培养、纯化、扩增技术的不断提高,从颞下颌关节骨关节炎患者的关节冲洗液中获取的滑膜间充质干细胞将有很好的临床应用前景。总之,本研究成功建立以微创的方式获取颞下颌关节骨关节炎滑膜间充质干细胞,有望为组织工程应用于骨软骨修复提供良好种子细胞来源。

参考文献 (References)

- 1 von Lindern JJ, Theuerkauf I, Niederhagen B, Bergé S, Appel T, Reich RH. Synovial chondromatosis of the temporomandibular joint: clinical, diagnostic, and histomorphologic findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2012; 94(1): 31-8.
- 2 Marotte H. The temporomandibular joint and inflammatory rheumatic diseases. *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale* 2016; 117(4): 223-7.
- 3 Jones BA, Pei M. Synovium-derived stem cells: a tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18(4): 301-11.
- 4 de Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44(8): 1928-42.
- 5 Miyamoto A, Deie M, Yamasaki T, Nakamae A, Shinomiya R, Adachi N, *et al.* The role of the synovium in repairing cartilage defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007; 15(9): 1083-93.
- 6 李健, 龙星, 柯金, 孟庆功, 房维. 颞下颌关节滑膜间充质干细胞的分离与培养. *中华口腔医学杂志*(Li Jian, Long Xing, Ke Jin, Meng Qinggong, Fang Wei. Identification and characterization of synovial mesenchymal stem cells in temporomandibular joint. *Chin J Stomato Sep*) 2005; 40(5): 362-4.
- 7 Kim YS, Lee HJ, Yeo JE, Kim YI, Choi YJ, Koh YG. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid in patients with osteochondral lesion of the talus. *Am J Sports Med* 2015; 43(2): 399-406.
- 8 Vandenable F, de Bari C, Morels M, Lambrechts I, Dell'Accio F, Lippens PL, *et al.* Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane. *Arch Histol Cytol* 2003; 66(2): 145-53.
- 9 Kurth TB, Dell'Accio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, de Bari C. Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium *in vivo*. *Arthritis Rheum* 2011; 63(5): 1289-300.
- 10 蔡谔, 王继芳, 卢世璧, 黄靖香, 顾峥. 人工关节材料颗粒对体外培养滑膜细胞生长特性的影响. *解放军医学院学报*(Cai Xu, Wang Jifang, Lu Shibi, Huang Jinxiang, Gu Zheng. Effect of particulate materials of prostheses on growth characteristics of synoviocytes *in vitro*. *Acad J PLA Postgrad Med Sch*) 2000; 21(4): 241-4.
- 11 Harvanová D, Tóthová T, Sarišský M, Amrichová J, Rosocha J. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha)* 2011; 57(3): 119-24.
- 12 de Sousa EB, Casado PL, Moura Neto V, Duarte ME, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(5): 112.
- 13 Morito T, Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, Makino H, *et al.* Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(8): 1137-43.
- 14 Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10(4): 505-17.
- 15 Nagase T, Muneta T, Ju YJ, Hara K, Morito T, Koga H, *et al.* Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(5): 1389-98.
- 16 Sakimura K, Matsumoto T, Miyamoto C, Osaki M, Shindo H. Effects of insulin-like growth factor I on transforming growth factor beta1 induced chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells cultured in a polyglycolic acid scaffold. *Cells Tissues Organs* 2006; 183(2): 55-61.
- 17 Navrátil L, Navrátil V, Hajkova S, Hlinakova P, Dostalova T, Vranová J. Comprehensive treatment of temporomandibular joint disorders. *Cranio* 2014; 32(1): 24-30.
- 18 Miernik M, Więckiewicz W. The basic conservative treatment of temporomandibular joint anterior disc displacement without reduction—review. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24(4): 731-5.
- 19 Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, Kobayashi E. Articular cartilage regenerative therapy with synovial mesenchymal stem cells in a pig model. *Clin Calcium* 2013; 23(12): 1741-9.
- 20 Horie M, Choi H, Lee RH, Reger RL, Ylostalo J, Muneta T, *et al.* Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20(10): 1197-207.