

软骨干/祖细胞修复软骨损伤的研究进展

曹瑞祺 尹合勇 于浩森 马立峰 郭艾

【摘要】 关节软骨损伤是临床常见的运动损伤,然而关节软骨缺乏血管、神经支配,损伤后难以自身完全再生修复,缺乏有效的治疗会导致骨关节炎(OA)的发生。随着组织工程学的发展,近期研究发现,软骨组织中存在具有多向分化潜能的软骨干/祖细胞(CSPC),可以分化成高度同质化的软骨细胞。这种细胞在软骨损伤后自发迁移并参与软骨损伤组织修复和再生,有望成为治疗软骨损伤的新方法。本文对CSPC的分布、特征及其在软骨损伤和OA中的作用和应用进行综述,旨在为CSPC的研究应用及软骨损伤的治疗提供理论基础,为临床上治疗软骨损伤开拓新方向。

【关键词】 运动损伤; 软骨, 关节; 骨关节炎; 干细胞; 细胞移植

Research progress of cartilage stem/progenitor cell in joint cartilage repair Cao Ruiqi, Yin Heyong, Yu Haomiao, Ma Lifeng, Guo Ai. Department of Orthopaedics, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: Guo Ai, Email: guoaij@139.com

【Abstract】 Articular cartilage injury represents is a most common athletic injury in the clinic. However, articular cartilage lacks of blood vessels and innervation, it is difficult to completely regenerate and repair itself after injury. Without effective medical intervention, it usually develops into osteoarthritis (OA). With the rapid development of tissue engineering, cartilage stem/progenitor cell (CSPC) has been found to be presented in cartilage tissue and shows great potential to develop into highly homogenous chondrocytes recently. Moreover, CSPC tends to migrate into cartilage damage site and involves in cartilage tissue repair and regeneration. These findings suggest that CSPC is one of the most promising seed cells for articular cartilage injury treatments. This article reviews the sources, characteristics and the role and application in cartilage injury and OA of CSPC, with the purpose to propose the new insights on cartilage repair, and to exploit a novel direction in the solution to conundrums to cartilage injury.

【Key words】 Athletic injuries; Cartilage, articular; Osteoarthritis; Stem cell niche; Cell transplantation

软骨是覆盖于关节表面的一层结缔组织,在关节活动中起着润滑、传递分布负荷、减震等作用。关节软骨组织缺乏血管、神经等结构,其营养主要来源于关节液^[1]。创伤、退变、炎症等因素会导致关节软骨损伤,关节软骨得不到有效的修复会发展成骨关节炎(osteoarthritis, OA),最终造成全关节功能障碍,严重危害患者关节运动功能^[2]。目前软骨损伤的治疗方法以手术治疗为主,主要包括软骨下骨钻孔术、微骨折术、自体软骨移植术和基于软骨细胞或干细胞的组织工程修复技术等^[3]。近期研究发现,软骨细胞并非是软骨组织中唯一的细胞类型,软骨组织中除了软骨细胞之外还存在软骨干/祖细胞(cartilage stem/progenitor cell, CSPC),CSPC具有自我更新、多向分化以及克隆形成等干细胞的基本特征^[3]。在软骨损伤微环境中,其可定向迁移并分化成表型稳

定的软骨细胞。CSPC的发现与研究为软骨损伤的治疗提供了一种新的思路,为软骨损伤修复带来了新的希望。

一、CSPC的分布

软骨组织的结构相对简单且不均质,由浅至深分为3层:表层,其内软骨细胞呈扁平状,与关节面平行分布;中层,细胞为椭圆状,呈柱状排列,主要分泌中层蛋白;深层,细胞体积较大,与关节面垂直排列,主要分泌X型胶原蛋白等。软骨细胞作为分化成熟的细胞,曾被认为是软骨组织中唯一的细胞类型^[4]。软骨损伤后软骨细胞很难定向迁移,参与组织的自我修复,所以临床上软骨损伤后很难通过自我修复而得到功能良好的软骨。近期研究表明,可以从人、马、牛、羊等软骨组织中分离培养出具有多向分化、自我更新、克隆形成的CSPC^[5-9]。Barbero等^[5]在体外培养的去分化人来源关节软骨细胞中发现了集落细胞的存在,这些细胞具有成软骨、成骨和成脂肪分化的潜能。Alsalamah等^[6]发现正常软骨或OA软骨来源的一些细胞可以共表达干细胞的表面标志物CD105⁺/CD166⁺,并具有多向分化潜能,阐述了CSPC存在的可能。Hattori等^[7]对关节软骨的表面区域进行流式细胞荧光分选技术和蛋白质免疫印记检测,再次证实关

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2022.01.013

基金项目:国家自然科学基金(82002285);北京市自然科学基金(7192045)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院骨科

通信作者:郭艾, Email: guoaij@139.com

节软骨表面存在干细胞。Koelling等^[10]通过逆转录-聚合酶链反应,免疫组织化学染色、流式细胞荧光分选技术等手段,从晚期OA软骨组织中分离出与软骨细胞、间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)等明显不同的细胞集落,这些细胞能分化成表型稳定的软骨细胞。Ma等^[8]从羊胚胎软骨中发现了能表达MSC特异性表面标志物CD105⁺/CD166⁺的细胞群,为CSPC的存在提供了有力的依据。

不同层面的软骨细胞表型存在差异,目前大部分研究支持CSPC主要存在于软骨的表层。软骨生长依赖于表层软骨细胞的不断叠加,表明软骨表层细胞具有自我更新能力^[11]。Hattori等^[7]通过对牛软骨细胞进行流式细胞荧光分选、Hoechst 33342试剂染色等实验方法,从软骨表层筛选出具有干细胞特性的软骨细胞亚群。Koelling等^[10]研究发现OA患者膝关节软骨中不仅表层中有干细胞,损伤的软骨裂隙周围也存在这些细胞。而正常软骨中,这类细胞只能在表层观察到,这表明CSPC主要存在于软骨组织表层,在软骨组织发生损伤后,其可迁移至损伤微环境。软骨组织深层也分布着一定数量的CSPC, Yu等^[9]使用荧光激活细胞分选技术在牛软骨深层发现了CSPC的存在,但细胞数量明显低于软骨表层中CSPC的数量。CSPC不局限分布于表层的情况可能与其迁移特点有关。Matsushita等^[12]研究发现在骨骼生长发育过程中,长骨生长板附近有可以表达轴抑制蛋白,类似CSPC的细胞参与长骨的生长。CSPC具有成骨、成软骨和成脂肪的分化能力,其中成软骨分化的能力最强。

二、CSPC的特征

许多研究者都在积极探索软骨组织中的CSPC特异性表面标志物,但是目前研究表明软骨组织中的CSPC缺乏特异性表面标志物,只能根据MSC相关的表面标志物来将其与软骨细胞进行区分^[13]。研究发现CSPC表达MSC相关的经典干细胞标志物,如CD105⁺、CD73⁺和CD90⁺等,同时不表达CD45⁺、CD34⁺、CD14⁺、CD11b⁺、CD79a⁺和CD19⁺等标志物^[14]。与此同时,CSPC还表达Notch-1、Stro-1、VCAM-1等干细胞标志物^[15]。研究表明,CSPC也可以表达软骨组系相关标志物,如SOX9^[10,16]。CSPC表面标志物在不同生理状态的软骨组织中存在一定差异,正常CSPC共表达CD166⁺/CD90⁺^[17],然而OA软骨中提取的CSPC共表达CD9⁺/CD90⁺/CD166⁺^[13],CD105⁺/CD166⁺在正常软骨细胞或者OA软骨细胞中都有表达^[18]。Su等^[19]通过流式细胞荧光分选技术发现CD146⁺的CSPC表达高水平的MSC表面抗原,相较于其他来源的MSC有更强的成软骨分化能力,因此可以作为CSPC的一种标志物。更具软骨组系特异性的表面标志物的筛选仍是未来CSPC研究的主要和重点方向之一。

在生物学行为方面,CSPC还具有自我更新、细胞的集落形成能力和迁移聚集的特点。研究发现对分选的CSPC进行体外培养,可传代超过60代^[16]。端粒是染色体复制所必需的DNA序列,干细胞在无限复制的同时保持其端粒长度,表现出强大的自我更新能力,而软骨细胞等分化成熟的细胞经过数次传代后,出现端粒缩短、细胞衰老、失去表型等现象。Williams等^[16]在对软骨细胞进行数代培养后,发现一组软骨祖细胞亚群,其端粒酶活性更高,且端粒长度不会随着细胞增

殖而缩短,进一步证实了CSPC具有自我更新的能力。

在软骨损伤后,损伤的软骨释放的相关趋化因子可以引导CSPC迁移,并参与软骨的自我修复。体外软骨损伤模型中,在趋化因子高迁移率组蛋白B1的作用下,CSPC表现出明显的定向迁移的现象^[9]。Seol等^[20]发现软骨损伤模型建立后5 d,CSPC开始迁移并聚集到损伤部位。多项研究表明在软骨损伤发生后,软骨基质的降解物可以引起CSPC的迁移聚集^[20-21]。通过结晶紫和4',6'-二脒基-2-苯基吲哚染色,在OA的不同阶段都可以发现CSPC的迁移,但是OA严重程度不同,CSPC迁移能力也不相同,和较轻的I、II级OA相比较,较重的III、IV级OA中的CSPC迁移能力更强^[22]。

三、CSPC在软骨损伤和OA中的作用

大量研究证实组织来源干细胞具有自我更新,多向分化的能力,并参与组织修复以维持组织稳态^[23-26]。例如在受损肌纤维中,肌肉干细胞进行自我更新并参与受损肌纤维的修复^[27]。有学者提出与其他类型干细胞相似,CSPC在关节软骨损伤和OA中也起着维持软骨组织稳态和组织修复的作用^[28]。Seol等^[29]在软骨钝性损伤后7~14 d观察到损伤部位软骨基质周围存在着迁移的CSPC细胞群。这种细胞迁移活动可能跟组织损伤后释放出的细胞因子相关^[20]。与其他类型MSC相比,迁移的CSPC高表达PRG4基因,产生更多的润滑素^[29],而关节内的润滑素可以减缓滑膜细胞的过度生长,防止软骨细胞的凋亡^[30]。因此在软骨损伤中迁移的CSPC可能参与软骨的重塑。

细胞增殖的相关标志物以及干细胞的相关表面标志物在OA软骨中的表达较正常软骨升高,研究证实含有CD105⁺、CD166⁺的细胞在OA软骨细胞中的比例高达8%,而在正常软骨中只有4%以下,提示CSPC与OA的发病以及病理过程相关^[6]。早期OA患者膝关节病理结果中发现CSPC存在于软骨裂隙内部及其附近,细胞代谢合成的标志物增多,且大部分表达Notch-1、Stro-1和VCAM-1等^[28,31],表明CSPC可能参与早期OA软骨基质的重建。而晚期OA患者膝关节软骨病理结果显示软骨基质的破坏改变了软骨与软骨下骨、滑膜以及邻近组织的交互方式,而CSPC可能在组织间迁移的过程中传递生物信息^[32]。在OA进展过程中,CSPC在软骨、软骨下骨及滑膜之间如何作用仍然需要进一步研究。

四、CSPC的应用

(一)CSPC在软骨损伤中的应用

软骨损伤通常由外伤导致。动物实验证实,通过对兔软骨损伤模型进行各种干细胞移植治疗,其中CSPC相比骨髓干细胞、脂肪干细胞等具备更强的增殖能力和更好的成软骨倾向^[33]。一项临床试验研究发现,在15例膝关节软骨缺损患者缺损处植入含有CD146⁺的CSPC后,缺损处可以形成透明软骨,术后影像学、组织学及关节功能等方面的评估较术前有显著的改善^[14]。

(二)CSPC在OA中的应用

软骨损伤被认为是OA的早期阶段,随着病情进一步发展,可出现不同程度的软骨细胞肥大变性,软骨下骨重建,全关节慢性炎症等病理表现^[34]。研究表明OA的严重程度跟软骨基质的退变程度高度相关^[35]。早期OA软骨基质退变

较轻,软骨细胞可保持相对正常的状态^[31],因此,早期OA治疗以保护正常的软骨结构与功能,延缓或阻止软骨基质退变为主要任务。晚期OA软骨基质进一步丢失,CSPC迁移聚集进而对软骨的自我修复产生影响,因此晚期OA的治疗除了重建软骨基质外,还需要考虑CSPC在病变软骨组织中的迁移聚集活动^[8]。OA是关节内弥漫性病变,对于OA的细胞治疗,许多研究聚焦于关节腔内注射MSC。脂肪MSC、骨髓MSC、滑膜MSC等均有分化成软骨细胞的能力,但这些细胞除分化成软骨细胞外,仍可能分化成脂肪细胞、骨细胞等。而CSPC更容易分化成稳定的软骨细胞,有更为优越的软骨分化潜能^[3, 36]。临床医师更希望应用关节腔内注射CSPC的方法使CSPC在趋化因子的作用下迁移募集到损伤部位,向软骨分化并参与软骨重建。此外,Chen等^[37]发现CSPC在修复软骨的同时还可以抑制基质金属蛋白酶、炎症因子如白细胞介素-1等的产生,进一步减轻关节内炎症反应。

五、总结与展望

越来越多的证据支持软骨组织内存在CSPC,这些细胞具有自我更新、多向分化和细胞的集落形成的能力。相较于其他组织来源的MSC,CSPC具有更优越的成软骨能力,具有巨大的临床应用潜力,为软骨损伤相关疾病的治疗带来了希望。但是我们也应该认识到CSPC的研究仍存在诸多挑战,包括特异性表面标志物的鉴定、不同环境下细胞迁移并参与组织修复的分子机制等,未来仍需完成更系统更深入的研究以进一步阐明其相关的机制,为其临床应用提供指导。

参 考 文 献

- [1] Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(7): 1323-1330.
- [2] Liu Q, Wang S, Lin J, et al. The burden for knee osteoarthritis among Chinese elderly: estimates from a nationally representative study[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(12): 1636-1642.
- [3] Shafiee A, Kabiri M, Langroudi L, et al. Evaluation and comparison of the in vitro characteristics and chondrogenic capacity of four adult stem/progenitor cells for cartilage cell-based repair[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(3): 600-610.
- [4] Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes[J]. *J Knee Surg*, 2002, 15(3): 170-176.
- [5] Barbero A, Ploegert S, Heberer M, et al. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(5): 1315-1325.
- [6] Alsalameh S, Amin R, Gemba T, et al. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(5): 1522-1532.
- [7] Hattori S, Oxford C, Reddi AH. Identification of superficial zone articular chondrocyte stem/progenitor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(1): 99-103.
- [8] Ma C, Lu T, Wen H, et al. Isolation and biological characteristic evaluation of a novel type of cartilage stem/progenitor cell derived from Small tailed Han sheep embryos[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 525-533.
- [9] Yu Y, Zheng H, Buckwalter JA, et al. Single cell sorting identifies progenitor cell population from full thickness bovine articular cartilage[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22(9): 1318-1326.
- [10] Koelling S, Kruegel J, Irmer M, et al. Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(4): 324-335.
- [11] Martin JM, Smith M, Al-Rubeai M. Cryopreservation and in vitro expansion of chondroprogenitor cells isolated from the superficial zone of articular cartilage[J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(1): 168-177.
- [12] Matsushita Y, Ono W, Ono N. Growth plate skeletal stem cells and their transition from cartilage to bone[J]. *Bone*, 2020, 136: 115359.
- [13] Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers[J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(5): R422-432.
- [14] Jiang Y, Cai Y, Zhang W, et al. Human Cartilage-Derived Progenitor Cells From Committed Chondrocytes for Efficient Cartilage Repair and Regeneration[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(6): 733-744.
- [15] Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, et al. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(3): R85.
- [16] Williams R, Khan IM, Richardson K, et al. Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13246.
- [17] Ozbey O, Sahin Z, Acar N, et al. Characterization of colony-forming cells in adult human articular cartilage[J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(5): 763-770.
- [18] Pretzel D, Linss S, Rochler S, et al. Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(2): R64.
- [19] Su X, Zuo W, Wu Z, et al. CD146 as a new marker for an increased chondroprogenitor cell sub-population in the later stages of osteoarthritis[J]. *J Orthop Res*, 2015, 33(1): 84-91.
- [20] Seol D, Yu Y, Choe H, et al. Effect of short-term enzymatic treatment on cell migration and cartilage regeneration: in vitro organ culture of bovine articular cartilage[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(13/14): 1807-1814.
- [21] Jang KW, Ding L, Seol D, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes chondrogenic progenitor cell migration via focal adhesion kinase pathway[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(6): 1177-1786.
- [22] Wang YX, Zhao ZD, Wang Q, et al. Biological potential alterations of migratory chondrogenic progenitor cells during knee osteoarthritic progression[J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 62.
- [23] Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial

- homeostasis and regeneration[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 19-33.
- [24] Clevers H. STEM CELLS. What is an adult stem cell? [J]. *Science*, 2015, 350(6266): 1319-1320.
- [25] Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering[J]. *Arthritis Res Ther*, 2003, 5(1): 32-45.
- [26] Zhuge Y, Liu ZJ, Velazquez OC. Adult stem cell differentiation and trafficking and their implications in disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 695: 169-183.
- [27] Brack AS, Rando TA. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(5): 504-514.
- [28] Brack AS, Rando TA. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell[J]. *J Stem Cell*, 2012, 10(5): 504-514.
- [29] Seol D, McCabe DJ, Choe H, et al. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(11): 3626-3637.
- [30] Waller KA, Zhang LX, Elsaid KA, et al. Role of lubricin and boundary lubrication in the prevention of chondrocyte apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(15): 5852-5857.
- [31] Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, et al. Cartilage cell clusters[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8): 2206-2218.
- [32] Bastiaansen-Jenniskens YM, Wei W, Feijt C, et al. Stimulation of fibrotic processes by the infrapatellar fat pad in cultured synoviocytes from patients with osteoarthritis; a possible role for prostaglandin $\text{f}2\alpha$ [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(8): 2070-2080.
- [33] Wang K, Li J, Li Z, et al. Chondrogenic progenitor cells exhibit superiority over mesenchymal stem cells and chondrocytes in platelet-rich plasma scaffold-based cartilage regeneration[J]. *Am J Sports Med*, 2019, 47(9): 2200-2215.
- [34] Pap T, Korb-Pap A. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis--two unequal siblings [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(10): 606-615.
- [35] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [36] Huang YZ, Xie HQ, Silini A, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells derived from articular cartilage, synovial membrane and synovial fluid for cartilage regeneration: current status and future perspectives[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13(5): 575-586.
- [37] Chen B, Qin J, Wang H, et al. Effects of adenovirus-mediated bFGF, IL-1Ra and IGF-1 gene transfer on human osteoarthritic chondrocytes and osteoarthritis in rabbits[J]. *Exp Mol Med*, 2010, 42(10): 684-695.

(收稿日期:2021-12-11)

(本文编辑:杨立妍)

曹瑞祺, 尹合勇, 于浩森, 等. 软骨干/祖细胞修复软骨损伤的研究进展[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2022, 17(1): 72-75.