

学校代码: 10730
分类号: R78

密级:

兰州大学
硕士学位论文
(学术学位)

论文题目(中文) 与颞下颌关节盘细胞共培养诱导骨髓间充
质干细胞向成纤维细胞样细胞分化的研究

论文题目(外文) Differentiation of goat bone marrow
mesenchymal stem cells induced by
co-culture with temporomandibular joint disc
cells into fibrochondrocyte-like cells

作者姓名 张玲

学科专业 口腔临床医学

研究方向 组织工程

教育类型 学历教育硕士

指导教师 包广洁 教授

合作导师 康宏 教授

论文工作时段 2017 年 6 月至 2019 年 1 月

论文答辩日期 2019 年 5 月

校址: 甘肃省兰州市城关区天水南路 222

学 院：口腔医学院

学 号：220160914960

学生姓名：张玲

导师姓名：包广洁

学科名称：口腔医学·口腔临床医学

论文题目：与颞下颌关节盘细胞共培养诱导骨髓间充质
干细胞向成纤维细胞样细胞分化的研究



原创性声明

本人郑重声明：本人所呈交的学位论文，是在导师的指导下独立进行研究所取得的成果。学位论文中凡引用他人已经发表或未发表的成果、数据、观点等，均已明确注明出处。除文中已经注明引用的内容外，不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究成果做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：

张玲

日 期：2019.5.29

关于学位论文使用授权的声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属兰州大学。本人完全了解兰州大学有关保存、使用学位论文的规定，同意学校保存或向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权兰州大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用任何复制手段保存和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为兰州大学。

本学位论文研究内容：

☒可以公开

☐不宜公开，已在学位办公室办理保密申请，解密后适用本授权书。

(请在以上选项内选择其中一项打“√”)

论文作者签名：

张玲

导师签名：

包广洁

日

期：

2019.5.29

日

期：

2019.5.29

与颞下颌关节盘细胞共培养诱导骨髓间充质干细胞

向成纤维细胞样细胞分化的研究

中文摘要

目的:

探讨直接接触共培养法和 Transwell 间接接触共培养法诱导山羊骨髓间充质干细胞 (Goat bone marrow mesenchymal stem cells, gBMSCs) 向山羊颞下颌关节盘细胞 (Temporomandibular joint disc cells, TMJ disc cells) 中成纤维细胞样细胞分化的可行性及共培养最佳比例, 为颞下颌关节盘组织工程的种子细胞来源提供理论依据。

方法:

1. BMSCs 的提取培养和鉴定——提取培养原代 BMSCs 并传代; 流式细胞仪检测 BMSCs 表面标志物; 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF 的成纤维软骨诱导液诱导的 BMSCs; 甲苯胺蓝染色、天狼猩红染色、番红 O 染色、I 型胶原免疫组织化学染色分别检测生长因子诱导后的 BMSCs 成纤维细胞样分化的潜能。

2. TMJ disc cells 的原代、传代培养并鉴定其特异性——提取并培养原代山羊颞下颌关节盘细胞; CCK8 法检测细胞的增殖活性; 甲苯胺蓝和天狼猩红染色鉴定 TMJ disc cells; 免疫组织化学染色检测 I、II 型胶原的分布; Elisa 试剂盒检测糖胺聚糖 (Glycosaminoglycan, GAG) 表达水平。

3. BMSCs 和 TMJ disc cells 共培养——在直接共培养体系和 Transwell 共培养体系中, 均按 1:2、1:1、2:1 的比例 (BMSCs : TMJ disc cells) 对 BMSCs 和 TMJ disc cells 进行共培养, 同时设置相同浓度的 BMSCs 在 DMEM/F12 培养液中培养为阴性对照组, 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF 的成纤维软骨诱导液诱导的 BMSCs 为阳性对照组, 分别观察共培养前后细胞的形态与增殖情况; 共培养 21d 时, 定性检测——用甲苯胺蓝、天狼猩红、番红 O 以及免疫荧光染色技术分别检测 I 型胶原、II 型胶原和 GAG 含量分布; 定量检测——对各组细胞爬片进行 GAG, I 型胶原和 II 型胶原含量检测; 分子水平检测——实时荧光定量 PCR 检测 I 型胶原和 II 型胶原 mRNA 的表达。蛋白水平检测——Western blot 检测细胞 I 型胶原、II 型胶原蛋白表达水平。

结果:

1. 山羊 BMSCs 表达特异性抗原 CD44, 而低表达造血干细胞标志抗原

CD34 和 CD45; 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF 的成纤维软骨诱导液诱导 BMSCs, 早期细胞形态未见明显变化, 10d 后以类似于颞下颌关节盘纤维软骨样细胞的长三角形、长梭形细胞为主; 诱导后 BMSCs 的甲苯胺蓝、天狼猩红的组织学染色和 I 型胶原免疫组化染色均呈阳性, 表明 BMSCs 具有向关节盘细胞诱导分化的能力。

2. 山羊颞下颌关节盘细胞的甲苯胺蓝染色和天狼猩红染色均呈阳性, 说明分离提取得到的是关节盘细胞; 检测 P1 到 P5 代关节盘细胞的生长曲线图, P1, P2 和 P3 山羊颞下颌关节盘细胞生长曲线图相似, P4 开始增殖能力下降; 同时从分子水平检测 I 型胶原和 GAG 的表达, 从第 4 代起 I 型胶原和 GAG 表达逐渐减少, 说明关节盘细胞中成纤维细胞样细胞数量减少, 而且合成 I 型胶原和 GAG 的能力下降。

3. 在共培养实验中, CCK8法检测各组细胞的生长曲线的对比分析发现: 共培养组的生长速度对比关节盘细胞对照组相对较高, 而BMSCs组生长速度最慢, 且生长速度最高的是直接共培养组1:2 (BMSCs : TMJ disc cells), 因此共培养组的细胞增长相对于Transwell间接培养体系和BMSCs诱导组生长增值能力更强; 直接接触组的GAG、I 型胶原的合成和基因表达明显高于Transwell共培养组和BMSCs诱导组, 且在直接共培养组的1:2 (BMSCs : TMJ disc cells) 表达量最高。GAG和 I 型胶原是成纤维细胞样细胞特异性细胞外基质^[20-21], 两者的存在说明有成纤维细胞样细胞的产生; 而 II 型胶原合成及其基因表达在Transwell共培养组中较高, II 型胶原是软骨样细胞的特异性细胞外基质, 在Transwell间接培养组中的含量表达明显, 表明Transwell培养体系诱导BMSCs向软骨样细胞分化。

结论:

1. 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF 诱导后的 BMSCs 具有向成纤维细胞样细胞分化增殖的能力

2. 取生长良好、I 型胶原和 GAG 表达量居多的 P2 或 P3 关节盘细胞进行研究。

3. 在细胞直接接触共培养体系和 Transwell 间接接触共培养体系中, 直接共培养法对 BMSCs 向成纤维细胞样细胞分化的影响大于 Transwell 共培养体系和 BMSCs 诱导组, 且直接共培养最佳比例为 1:2 (BMSCs : TMJ disc cells)。

关键词: 颞下颌关节盘; 骨髓间充质干细胞; 共培养; 成纤维细胞样细胞;

DIFFERENTIATION OF GOAT BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS INDUCED BY CO-CULTURE WITH TEMPOROMANDIBULAR JOINT DISC CELLS INTO FIBROCHONDROCYTE-LIKE CELLS

Abstract

Objective

To study the effect and the convert ratio if the co-culture by different contact methods of goat temporomandibular joint disc cells and goat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) in vitro can affect differentiation of BMSCs into fibrochondrocyte-like cells.

Methods

1.Goat BMSCs expressed specific antigen CD44, while low expression of hematopoietic stem cell marker antigens CD34 and CD45; 10 μ g/L bFGF fibrocartilage induced fluid induced BMSCs, no obvious changes in early cell morphology, similar to temporomandibular joint disc after 10 days The long triangles and long spindle cells of fibrocartilage-like cells were dominant; the histological staining of toluidine blue and Sirius red and the immunohistochemical staining of type I collagen in BMSCs after induction were positive, indicating that BMSCs were induced into articular disc cells. The ability to differentiate.

2. Primary, subculture and identification of TMJ disc cells - extraction and culture of primary goat temporomandibular joint disc cells; CCK8 assay for cell proliferation activity; toluidine blue and Sirius red staining identification TMJ disc cells Immunohistochemical staining was used to detect the distribution of type I and type II collagen; Elisa kit was used to detect the expression level of glycosaminoglycan (GAG).

3. BMSCs and TMJ disc cells co-culture - BMSCs and TMJ discs in the ratio of

1:2, 1:1, 2:1 (BMSCS:TMJ disc cells) in the direct co-culture system and Transwell co-culture system. The cells were co-cultured, and the same concentration of BMSCs was cultured in DMEM/F12 culture medium as a negative control group. The BMSCs induced by fibrocartilage induction solution of 10 µg/L bFGF were used as positive control group, and the cells before and after co-culture were observed. Morphology and proliferation; qualitative analysis - detection of type I collagen, type II collagen and GAG content by toluidine blue, Sirius red, Safranin O and immunofluorescence staining for 21 days of co-culture; quantitative detection - GAG, type I collagen and type II collagen content were detected in each group of cell slides; molecular level detection--real-time quantitative PCR was used to detect the expression of type I collagen and type II collagen mRNA. Protein level detection—Western blot detection of type I collagen and type II collagen expression.

Results

1. Goat BMSCs expressed specific antigen CD44, while low expression of hematopoietic stem cell marker antigens CD34 and CD45; 10 µg/L bFGF fibrocartilage induced fluid induced BMSCs, no obvious changes in early cell morphology, similar to temporomandibular joint disc after 10 days. The long triangles and long spindle cells of fibrocartilage-like cells were dominant; the histological staining of toluidine blue and Sirius red and the immunohistochemical staining of type I collagen in BMSCs after induction were positive, indicating that BMSCs were induced into articular disc cells. The ability to differentiate.

2. Toluidine blue staining and Sirius red staining of goat temporomandibular joint disc cells were positive, indicating that the disc cells were isolated and extracted; the growth curve of P1 to P5 generation disc cells was detected, P1, P2 and P3 goats. The growth curve of the mandibular joint disc was similar, and the proliferative ability of P4 decreased. At the same time, the expression of type I collagen and GAG was detected at the molecular level, and the expression of type I collagen and GAG decreased gradually from the fourth passage, indicating fibroblasts in the articular disc cells. The number of cell-like cells is reduced, and the ability to synthesize type I collagen and GAG is decreased.

3. In the co-culture experiment, the CCK8 method for the comparison of the growth curves of the cells in each group found that the growth rate of the co-culture group was relatively higher than that of the articular disk control group, while the

growth rate of the BMSCs group was the slowest, and the highest growth rate was Direct co-culture group 1:2 (BMSCs:TMJ disc cells), so the cell growth of the co-culture group was stronger than that of the Transwell indirect culture system and the BMSCs induction group; the synthesis of GAG and type I collagen in the direct contact group The gene expression was significantly higher than that of the Transwell co-culture group and the BMSCs induction group, and the expression level of 1:2 (BMSCs:TMJ disc cells) was the highest in the direct co-culture group. GAG and type I collagen are fibroblast-like cell-specific extracellular matrices, the presence of both indicates the production of fibroblast-like cells; and type II collagen synthesis and gene expression in the Transwell co-culture group In the middle, the type II collagen is a specific extracellular matrix of chondrocyte-like cells, and the expression in the Transwell indirect culture group is obvious, indicating that the Transwell culture system induces BMSCs to differentiate into cartilage-like cells.

Conclusions

1. The ability of BMSCs induced by 10 μ g/LbFGF to differentiate into fibroblast-like cells
2. P2 or P3 articular disc cells with good growth, type I collagen and GAG expression were studied.
3. In the direct co-culture system and Transwell indirect contact co-culture system, the direct co-culture method has greater influence on the differentiation of BMSCs into fibroblast-like cells than the Transwell co-culture system and BMSCs induction group, and the optimal ratio of direct co-culture is 1 : 2 (BMSCs:TMJ disc cells).

Key words The temporomandibular joint disc ;Bone mesenchymal stem cells; co-culture; fibrochondrocyte-like cells

目 录

中文摘要	II
Abstract	IV
目 录	VII
前言	1
第一章 骨髓间充质干细胞的培养、鉴定和诱导	10
1.1 引言	10
1.2 实验方法	10
1.2.1 山羊 BMSCs 的分离培养	10
1.2.2 BMSCs 表面标记检测	10
1.2.3 CCK8 法检测 BMSCs 的增殖活性	11
1.2.4 BMSCs 成纤维软骨诱导	11
1.2.5 BMSCs 的冻存与复苏	11
1.2.5.1 BMSCs 冻存	11
1.2.5.2 BMSCs 复苏	11
1.3 实验结果	11
1.3.1 原代 BMSCs 的形态学观察	11
1.3.2 BMSCs 诱导后倒置显微镜观察	12
1.3.3 BMSCs 表面标志物检测	12
1.3.4 CCK8 法检测 BMSCs 的增殖活性	12
1.3.5 BMSCs 诱导后组织学染色结果	13
1.4 讨论	14
1.5 小结	15
第二章 颞下颌关节盘细胞的培养	16
2.1 引言	16

2.2 实验方法	16
2.2.1 山羊 TMJ disc cells 的分离培养	16
2.2.2 山羊 TMJ disc cells 的复苏与冻存	16
2.3 实验结果	18
2.4 讨论	20
2.5 小结	20
第三章 直接和间接 Transwell 共培养体系下诱导骨髓间充质干细胞 向成纤维细胞样细胞分化的研究.....	21
3.1 引言	21
3.2 实验方法	21
3.2.1 BMSCs 和颞下颌关节盘细胞直接共培养法.....	21
3.2.2 BMSCs 和颞下颌关节盘细胞 Transwell 共培养法.....	21
3.2.3 细胞增值能力分析	22
3.2.4 测定指标	22
3.2.5 GAG 的定量检测.....	23
3.2.6 实时荧光定量 PCR I 型、II 型胶原基因表达分析.....	23
3.2.7 WB 检测 I、II 型胶原.....	23
3.2.8 统计学处理	24
3.3 实验结果	24
3.3.1 CCK8 法检测共培养细胞的增殖活性.....	24
3.3.2 I 型胶原的定性检测	24
3.3.3 GAG 定性检测.....	26
3.3.4 II 型胶原定性检测	27
3.3.5 GAG 定量检测.....	27
3.3.6 I 型胶原和 II 型胶原基因表达的定量分析	28
3.3.7 I 型胶原和 II 型胶原蛋白表达量检测	28

3.4 讨论	29
3.5 小结	30
全文总结	31
1 本文的主要小结.....	31
2 本文的创新之处.....	31
3 尚需完善及进一步研究之处.....	31
参考文献	33
缩略词表	42
在学期间成果	43
临床病例 左上后牙牛牙症 RCT 一例	45

前言

颞下颌关节(The temporomandibular joint, TMJ)关节盘属于纤维软骨样组织,该组织位于下颌髁状突和颞骨关节窝之间,关节盘在颞下颌关节运动过程中润滑关节表面,减少关节之间的摩擦;在下颌进行复杂机械运动时减少冲击,缓冲载荷^[1-3]。TMJ 关节盘主要由关节盘细胞(纤维软骨样细胞)和细胞外基质(I型胶原蛋白, II型和III型胶原蛋白,糖胺聚糖(glycosmiloglycan, GAG),聚集蛋白聚糖(aggrecans, AGCs)),水和部分弹性蛋白纤维组成。I型胶原蛋白和GAG是细胞外基质的主要成分,增加了关节盘的粘弹性并使其具有抵抗外界压力,吸收和分散负荷的能力^[4-6]。颞下颌关节紊乱症(temporomandibular disorder, TMD)颌面部最常见的复杂的退行性疾病,可能是关节机械超负荷、雌性激素和细胞外基质的变化引起,其病理原因仍不明^[7]。而临床上高达70%的TMD是由于关节盘的变薄、透明样变、穿孔等不可逆性病变而导致^[8],由于关节盘组织自身无营养支持,因此损伤后病变不可逆,并对周边其他软组织造成继发降解,最终使TMD加重^[9]。目前临床上使用各种各样的可替代材料来代替病损关节盘,包括由硅树脂制成的合成材料、聚四氟乙烯^[10-11]和自体移植^[12],但治疗效果甚微,因此,有必要探索解决这一棘手问题的最佳有效方法。近年来,组织工程在真皮^[13],软骨^[14]和骨^[15]的成功应用表明颞下颌关节盘组织工程技术能够为损伤的颞下颌关节盘修复重建带来新的治疗思路。

1987年,“组织工程”由美国国家科学基金会正式提出,组织工程学是一门将多种学科联合应用的新兴学科技术,由于它较良好的发展前景,目前已经在生物学方面的发展应用更加广泛。组织工程技术相比传统的临床治疗方法而言,具有以下几点优势:1. 缺损组织通过组织工程技术的修复,会实现性能与结构的双重生物修复;2. 数量较少的细胞经过体外培养后形成细胞膜片,可修复大范围的缺损组织,彻底改变传统手术的治疗方式,创造新的治愈方法;3. 生物支架材料具有一定的软弹性,因此可以按照组织缺损部位的的形态外观进行材料的改造,最终将缺损部位修复出满意的形态。在组织工程领域研究的重点主要集中在3个方面:种子细胞,细胞因子和支架材料^[16, 17]的选择。

1. 颞下颌关节盘组织工程研究的技术的背景

近年来,国内外的许多科研工作者先后将组织工程技术应用于软骨组织再造的研究中。焦岩涛等^[18]用微载体细胞培养技术^[19]对日本大耳白兔髁状突软骨细胞进行大规模扩增,而后把细胞植入到实验动物体内进行观察,植入12周后,

髌状突软骨细胞在胶原膜内生长良好,并形成类似软骨样的乳白色组织,其表面光滑,有弹性;甲苯胺蓝染色细胞外基质阳性表达,表明有 GAG 产生。Cooke^[20]等在 PGA/PLA 支架上以一定比例接种了猪耳廓软骨细胞和 BMSCs,构建了具有良好机械性能的耳廓软骨样组织,植入猪耳后皮下后,仍能维持类似软骨样的形态稳定存活并 20 周左右,且其组织学性能和生物力学性能相较天然耳廓软骨无明显差异。吕玮等^[21]将颞下颌关节盘细胞和 BMSCs 体外共培养数天接种到预制琼脂糖井内培养至 42d。在 14d、28d、42d 观察并检测自组装体的形态、成分变化以及它的弹性力学性能。通过实验观察到实验体的表面比较均匀光滑,呈不规则球体,且轻触有回弹,并检测细胞外基质可见 GAG 生成;14d、28d、42d 时的 I 型胶原免疫组织化学染色呈阳性,表明该组装基体可产生作为天然颞下颌关节盘组织的主要成分 I 型胶原。以上实验均表明未来我们可以有效的进行颞下颌关节盘再造的组织工程技术。

2. 颞下颌关节盘组织工程的细胞来源

种子细胞是决定组织工程中生物再生的重要因素,因此理想的细胞来源的是组织工程中的核心要素。理想的细胞来源应该是易获取、数量多、健康的, TMJ 关节盘是纤维组织和软骨组织组成,细胞由 3 种细胞构成——成纤维细胞样细胞,纤维软骨样细胞和软骨细胞样细胞^[22]。由于细胞成分繁杂,因此目前并未建立关节盘细胞系,实验所需要的关节盘细胞必须通过体外进行原代培养获得。

2.1 自体关节盘细胞

研究证实体外单层分离培养的山羊颞下颌关节盘 1~3 代细胞增殖更明显,且形态更趋向于成纤维细胞样细胞,可作为颞下颌关节盘组织工程再造的种子细胞。Thomas M^[23]将 TMJ 关节盘细胞作为种子细胞运用到关节盘组织工程技术中,通过尝试发现,这些细胞未能接近替换盘功能使用所需的生化成分或机械强度。使用 TMJ 关节盘细胞具有如下缺点:关节盘细胞每传一代 ECM 中蛋白多糖、I 型胶原的含量减少 20%和 23%,这些难以通过体内提取获得数量较多的健康细胞,体外培养无法产生足够的细胞外基质^[24, 25]。此外, TMJ 关节盘同时经历了衰老和退行期间的病理和生理变化,在培养过程中细胞表型易于改变,这些细胞在组织工程中的表现变得无法预测^[26]。尽管有研究证明颞下颌关节盘来源的细胞在体外适宜的条件下能够合成软骨样细胞外基质^[27, 28],但是细胞的提取得从活体动物组织上得来,操作步骤麻烦,且获取的细胞成分混杂,数量也少,因而越来越多的实验研究开始倾向于探索其他的潜在的细胞来源。

2.2 软骨组织来源

体外单层培养的软骨细胞随着传代次数的增加,细胞由不规则圆形逐渐伸长

变为长梭形的纤维细胞样细胞，胶原蛋白由 II 型变成 I 型、III 型，表现出去分化倾向^[29-31]。髌突^[32]、窝隆起^[33]和肩部^[34]的关节软骨细胞均已被实验证实可用来构建颞下颌关节盘。不同类型的髌突细胞与颞下颌关节髌突细胞在利用支架进行髌状软骨工程方面进行了比较^[35]。将踝关节软骨细胞与 PGA 种植的髌状突纤维软骨细胞进行比较，并经 IGF-1 处理后，踝关节软骨细胞的生长性能优于髌状软骨细胞，分别产生 10 倍和 6 倍的 GAG 和胶原。Wang 等^[36]将人脐带基质干细胞与颞下颌关节髌突纤维软骨细胞进行比较，结果表明：人脐带基质干细胞 TMJ 髌突纤维软骨细胞相比，GAG 和细胞数明显增加，但胶原含量无明显增加。值得注意的是，I 型胶原和 II 型胶原是在干细胞种子结构中观察到的，而在髌状突纤维软骨细胞培养物中则没有观察到。这些研究表明，髌状突纤维软骨细胞的培养仍需进一步的研究。目前，各种细胞类型在髌突纤维软骨组织工程中的应用前景大于 TMJ 关节盘细胞。

2.3 真皮成纤维细胞

真皮成纤维细胞可以向成骨和成软骨的谱系分化^[37, 38]，真皮成纤维细胞本质上具有纤维化性，其 ECM 成分与关节盘 ECM 类似，主要产生，可维持真皮的弹性和稳定性，细胞易于获取，且来源丰富，自体细胞的使用将大大降低免疫应答的机会，并且定位于皮肤的供体位点将显着减少与供体发病率有关的问题，因此它是 TMJ 关节盘组织工程上理想可行的细胞来源^[39]。Almaraz 等^[40]将 1 : 1（真皮成纤维细胞：肋软骨细胞）体外接触共培养发现 ECM 明显增多。Hiramatsu 等^[41]证实了 IGF 体外诱导成人真皮成纤维细胞 3 周后 I 型胶原和 GAG 分泌增加。

2.4 干细胞来源

作为 TMJ 关节盘组织工程和其他软骨组织工程的细胞来源中目前越来越受到人们关注的干细胞是间充质干细胞（mesenchymal stem cell, MSCs）^[42-44]。干细胞数量多、具有广泛增殖和分化的巨大潜力，可以从骨髓^[45, 46]，脂肪^[47-49]，脐带血^[50, 51]，滑膜^[52, 53]和胚胎来源^[54-56]等多种类型的组织中提取并培养获得大量健康的干细胞。干细胞在特定因素刺激下可分化为软骨细胞或纤维软骨细胞，但干细胞的分化机制是自身因素决定还是外在条件的驱使，目前还没有明确的说法^[57]。

2.4.1 胚胎干细胞

胚胎干细胞（embryonic stem cell, ESC）是一种高度未分化的，胚胎早期的细胞团中分离得到的全能干细胞，ESC 生长增殖较强，免疫排斥反应弱，可作为软骨组织工程中理想的细胞来源^[54, 56, 58, 59]。有实验通过研究 ESC 和软骨细胞共培养，验证 ESC 的分化潜能^[60]：在该研究中，将生长因子 BMP-2，BMP-4 诱导的 ESC 和软骨细胞/纤维软骨细胞共培养 3 周，检测 ECM 的分泌情况，结果

显示, 诱导后的 ESC 与纤维软骨共培养, 相比无诱导的对照组, GAG 和 I 型胶原分别增加 6.7 倍和 4.8 倍; 与软骨细胞共培养 II 型胶原蛋白增加 9.8 倍。但是由于 ESC 的多向分化潜能特性, 体外培养分化为理想的细胞难以控制, 还有可能还会出现畸形瘤体^[55, 59]; 另一方面是伦理道德的问题, 或许 ESC 成为理想的可应用细胞仍需进一步探索。

2.4.2.1 脂肪干细胞

脂肪组织中含有数量较多的自体多能干细胞, 取材相对简便。由于它们也类属于间充质干细胞, 脂肪干细胞 (adipose tissue-derived derived mesencymal stem cell, ASCs) 具有分化为成纤维细胞和软骨细胞谱系的能力^[48, 61, 62], 并且可以作为 TMJ 关节盘组织工程的良好替代细胞来源。Maenpaa 等^[63]首次证明脂肪干细胞是一种潜在可行的颞下颌组织工程细胞来源, ASCs 在软骨细胞培养基中培养一定时间后转移到 PLA 非织造双层可生物降解支架中继续培养, 会检测到相关 ECM 的表达。ECM 分泌增加, 阿利新蓝染色显示硫酸化 GAG 表达量增加。尽管 mRNA 水平显示 ASCs 向 TMJ 关节盘细胞分化数量较少, 但 ASCs 仍被认为是可用于组织工程 TMJ 关节盘置换术中潜在的种子细胞来源^[49, 64, 65]。Ahtiainen 等^[66]研究了自体 ASCs 和双层 PLA 材料作为 TMJ 关节的潜在替代品。将细胞材料构建体在培养基中预培养 1 周, 并检测出纤维软骨基因的表达。将 ASCs 关节盘分别植入兔的一侧 TMJ 中, 持续培养 6 个月和 12 个月。尽管在组织学上未检测到感染、炎症或异物反应的迹象, 但在所有关节手术的 CBCT 中均观察到慢性关节病和髁突肥大迹象^[63, 67, 68, 69]。ASCs 是否是种子细胞的理想来源仍需进一步实验证据来证明。

2.4.2.2 骨髓间充质干细胞

干细胞中最常用于研究的是骨髓来源的干细胞, 骨髓间充质干细胞 (Bone marrow derived mesencymal stem cell, BMSCs) 是存在于骨髓和骨膜中的未分化的一种易于获取、黏附性良好、具有成纤维细胞样作用的多潜能非造血系干细胞, 在骨髓的髓核中 BMSCs 含量仅有 0.001%~0.01%, 但其体外扩增迅速, 在不同条件诱导下具有多向分化潜能^[45, 46, 70, 71]。目前在颞下颌关节盘组织工程中, 诱导 BMSCs 分化为成纤维细胞样细胞的细胞微环境是关节盘组织工程的重要所在^[72], BMSCs 与其他细胞共培养可诱导干细胞向不同类型细胞分化, 国外学者将 BMSCs 在不同诱导因子作用下进行成软骨和成骨诱导实验, 和支架材料一起培养形成具有髁突形态的软骨样组织^[73]。Fan 等^[74]将 BMSCs 与韧带成纤维细胞共培养数周后, 镜下发现细胞呈长梭形的成纤维细胞形态, 并且 I 型胶原含量增加。国内学者将分离培养出 1 月龄山羊的 BMSCs 在不同

浓度的 bFGF 诱导下可向颞下颌关节盘中的成纤维细胞样细胞形态分化^[75]。以上实验研究均证明 BMSCs 可作为颞下颌关节盘组织工程中重要的种子细胞来源。

3. 支架材料的选择

理论上讲支架材料是一种替代细胞外基质的人工合成材料,因此材料的特性如适当的孔隙密度、表面积、硬度、一定的缓释功能等等,都会直接影响细胞的生长、黏附、增殖、分化、迁移和功能代谢^[76-78]等生物学特性,最终影响组织构建的成功或者失败。目前颞下颌关节盘组织学工程的支架材料有合成材料聚乳酸(P L A)^[79]、聚羟基乙酸(P G A)^[80]、聚癸二酸甘油酯(P G S 等)^[81]和天然材料包括胶原、透明质酸、层黏连素及藻酸盐类等^[82, 83, 84]。钟妮等^[85]利用静电纺丝技术把 PGS 与 PLLA 合成为新型三维纳米材料,通过力学实验和生物相容性等试验初步验证了这种混合材料基本满足软骨组织工程的技术要求。Almaraz 等^[86]将猪颞下颌关节盘干细胞植入到 P G A 支架上,培养适宜时间后组织切片,天狼猩红染色,显微镜下观察有大量 I 型胶原产生。本课题组在前期实验中在琼脂糖井里培养纯关节盘细胞形成细胞球而构建的自组装组织工程模型,经过实验证明可产生 I 型胶原和糖胺多糖等类似于天然关节盘的细胞外基质成分^[87]。Brown 等^[88]模拟颞下颌关节盘的形状,大小,将来源于猪的细胞外基质支架种植于双侧关节盘切除术后的犬类动物体内。6 个月后,植入侧与未植入侧对比发现植入支架一侧的大小,形态和组织功能都与天然颞下颌关节盘组织相似。王春晖等^[89]将颞下颌关节盘细胞和滑膜干细胞共培养形成细胞膜片接种到静电纺丝形成的 PLGA 支架上形成具有一定形态结构的类软骨组织,在 TGF- β 因子作用下表现出明显的软骨细胞表型,细胞外基质水平也有上调。在颞下颌关节盘组织工程中无论是合成材料,还是天然材料,都需要具备机械性能强,抗原性弱,生物相容性良好,可降解性等^[90, 91]优点,才能达到颞下颌关节组织再生的要求。新的组织工程时代给以往传统外科手法所不能修复治愈的颞下颌关节盘组织带来了福音。虽较其他相对成熟的组织工程领域而言,颞下颌关节盘组织工程还处于一个初步研究探索阶段,我们对于天然的颞下颌关节盘组织的表征研究,种子细胞的来源性,支架材料的可替代性等的研究范围和深度都尚不完善。但自 20 世纪 80 年代 E. Bell 通过组织工程技术创造出软骨、韧带等附属组织至今,组织工程技术的应用生生不息。这为颞下颌关节盘组织工程技术的开展奠定了良好的基础。

基于以上认识,本课题拟就找到合适的颞下颌关节盘组织工程种子细胞来源问题,通过直接接触共培养法和 Transwell 间接接触共培养法共培养 BMSCs

和 TMJ disc cells，以期取得诱导 BMSCs 向山羊颞下颌关节盘细胞中的成纤维细胞样细胞分化的最适培养方式和最佳培养比例，不仅为进一步探讨共培养系统中 BMSCs 和关节盘细胞相互作用机制奠定基础，也是为了构建高质量颞下颌关节盘组织工程对以后临床应用组织工程学技术修复颞下颌关节盘缺损提供理论依据。

本课题将从以下三部分进行研究：

第一部分：BMSCs 的提取，培养，鉴定和生长因子诱导

1. 原代 BMSCs 提取培养并传代；

2. BMSCs 鉴定

(1) 流式细胞术检测 BMSCs 的表面标志物；

3. BMSCs 生长因子诱导

4. 诱导组和非诱导组成纤维软骨能力

第二部分：TMJ disc cells 的培养

1. 提取 TMJ disc cells 并传代培养

2. 鉴定 TMJ disc cells

3. CCK8 法检测 TMJ disc cells 的增殖活性

4. 实时定量 PCR 检测 TMJ disc cells 的 GAG 和 COL I mRNA 的表达量

第三部分：BMSCs 和 TMJ disc cells 的共培养

1. 按一定比例在直接共培养和 Transwell 共培养体系中共培养 BMSCs 和 TMJ disc cells

2. 定性检测 GAG，COL I 和 COL II 的含量

3. ELISA 定量检测 GAG

4. 实时定量 PCR 检测 COL I 和 COL II mRNA 的相对表达量

5. WB 检测 COL I、COL II 型胶原蛋白的相对表达量

实验材料与方法

一. 实验试剂

试剂	购买公司及产地
DMEM/F12 培养基	Hyclone 公司, 美国
胎牛血清	Gibco 公司, 美国
胰蛋白酶	Gibco 公司, 美国
4%多聚甲醛	Sigma 公司, 美国
维生素 C	Sigma 公司, 美国
甲苯胺蓝	Sigma 公司, 美国
番红 O	Sigma 公司, 美国
天狼猩红	Sigma 公司, 美国
非必需氨基酸	Hyclone 公司, 美国
青、链霉素	上海翊圣生物科技有限公司, 中国
bFGF	Bio-Techne 公司, 美国
CCK8	北京博奥龙免疫技术有限公司, 中国
I 型胶原鼠单克隆抗体	CST 公司, 美国
DAB 显色试剂盒	北京中杉金桥生物科技有限公司, 中国
Trizol	Invitrogen 公司, 美国
硫酸氨基聚糖检测试剂盒	Biocolor 公司, 英国
PIPA 裂解液	北京索莱宝公司, 中国
β -actin 抗体	CST 公司, 美国
羊抗 IgG	北京中杉金桥生物科技有限公司, 中国

二. 实验仪器

仪器	购买公司（型号）及产地
生物安全柜	苏州净化设备厂，中国
倒置相差显微镜	Olympus公司，日本
台式离心机	TD5，中国
二氧化碳恒温培养箱	Heraeus公司，德国
机械波超声清洗器	SB25-12DT，中国
水浴恒温摇床	SHZ-82，中国
电子分析天平	BT125D，中国
酶标仪	上海沛欧分析仪器有限公司，中国
流式细胞仪	BD公司，美国
实时定量PCR仪	Thermo公司，美国
Transwell小室	Corning 公司，美国
PVDF膜	Millipore公司，德国
反转录试剂盒	Millipore公司，德国

三. 主要试剂配制

1. 15%完全培养液: DMEM/F12 培养基 83 mL, FBS 15 mL, VC 1 mL, 青、链霉素双抗液 1 mL, 密封置 4℃ 保存使用
2. 0.1 mol/L PBS: 称取氯化钠 8g, 磷酸氢二钠 3.479 g, 氯化钾 0.2 g 和磷酸二氢钾 0.2 g 加 1000 mL 蒸馏水, 磁力搅拌 1 h, 高温高压, 密封后 4℃ 储存。
3. 2.5 g/L VC: 称取溶于 100mL PBS 的 250 mg 抗坏血酸 Vc 粉末, 磁力搅拌 30min 直至粉末完全溶解, 过滤并除菌, 储存至-20℃。
4. 1%甲苯胺蓝溶液: 称取甲苯胺蓝粉末 1 g, 加 100 mL 蒸馏水, 磁力搅拌 30min 至粉末完全溶解, 过滤并除菌, 分装后于 4℃ 保存。
5. 1g/L天狼猩红溶液: 在10 mL苦味酸饱和溶液中加入取0.01 g天狼猩红粉末不停搅拌直至溶解, 并在4℃下避光保存。
6. 0.1%番红O溶液: 称取0.1 g番红O粉末溶于100 mL蒸馏水中, 磁力搅拌 30min直至粉末完全溶解, 过滤并除菌, 分装后于4℃保存。
7. bFGF: 将15μ g bFGF溶于10mL 10%FBS的完全培养基, 充分溶解, 并在-20℃下保存。
8. 诱导液: DMEM/F12 43 mL, FBS 5 mL, 双抗0.5mL, NEAA 0.5 mL, 谷氨酰胺浓缩液0.5 mL, VC 0.5mL, bFGF 0.5 mL。
9. 2.5g/L 胰蛋白酶: 将 250 mg 胰蛋白酶溶解在 100 mL PBS 中, 磁力搅拌

30min 直至粉末完全溶解，过滤并除菌，分装后储存于-20℃。

10. 胎牛血清的灭活和分装：将储存在-20℃的血清放 4℃冰箱中解冻 24 h 后，然后把血清放在温度调节至 56℃恒温水浴箱中灭活补体 35 min，每 5 min 震摇一次，无菌条件下，将灭火的血清静置到室内温度，分装后放置-20℃直接使用。

第一章 骨髓间充质干细胞的培养、鉴定和诱导

1.1 引言

BMSCs主要存在于骨髓和骨膜中,是一种易于获取并在体外扩增迅速的具有多向分化潜能的未分化细胞。已有实验证明P2或P3代BMSCs在生长因子诱导或者和某些细胞共培养下,可分化为成纤维细胞,并检测到I型胶原的分泌^[45, 46, 70, 71]。因此BMSCs经适当的微环境诱导,有可能向TMJ关节盘细胞方向分化,目前在颞下颌关节盘组织工程研究中,有学者研究证明用5 $\mu\text{g/L}$ bFGF或10 $\mu\text{g/L}$ bFGF诱导山羊BMSCs,通过检测I型胶原和GAG的表达并且与单纯BMSCs培养组进行比较发现,诱导后的细胞I型胶原和GAG合成量明显增加^[92]。因此本研究首先采用procell密度梯度离心法提取BMSCs并鉴定其表面抗原标志物,然后用10 $\mu\text{g/L}$ bFGF诱导P2代BMSCs向关节盘细胞分化,观察细胞形态和ECM分泌情况,与接下来的细胞共培养实验作对比,以期得到更适合诱导BMSCs向成纤维细胞样细胞方向分化的培养方法。

1.2 实验方法

1.2.1 山羊 BMSCs 的提取和培养

无菌条件下从山羊新鲜股骨两端抽取4~6ml骨髓后随即用肝素抗凝,PBS液冲洗,采用procell密度梯度离心提取白膜层,含有10%血清的DMEM/F12培养基调整细胞密度,以 $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种至 25cm^2 培养瓶中放在培养箱中培养到48h后先半量换液,此后隔天换液直至2周左右细胞达到90%融合,为原代细胞,记为P0。原代细胞用0.25%的胰蛋白酶消化离心,离心后将离心管底部的细胞团块按1:3比例接种至15% FBS的完全培养基中,继续传代培养。

1.2.2 BMSCs 表面标记检测

取对数生长期的P2代细胞,0.25%的胰蛋白酶消化,PBS洗涤3次,加入培养基轻力吹打使贴壁细胞脱落,细胞密度调整为 5×10^5 个。同型对照管加入羊IgG-CYS, IgG-PE, IgG-FITC,检测管分别加入CD44-FITC、CD34-PE、CD45-PE-CYS等各10 μl ,在避光条件下常温培养30min用流式细胞术法检测表面抗原CD45,CD44 和CD34 并进行结果分析。

1.2.3 BMSCs 成纤维软骨诱导

对数生长期的P2代细胞达到90%融合,0.25%胰蛋白酶消化,PBS洗涤3次,1000rpm离心5min将细胞调整密度 5×10^4 个接种到18mm×18mm无菌盖玻片的六孔板中放在培养箱中培养到24h后,吸液枪吸去原有的培养液,加入含有10 μ g/LbFGF的成纤维软骨诱导液2 mL,对照组未诱导的BMSCs仍用DMEM/F12培养液作为对照,以后24h换液,培养2周后终止。取出实验组和对照组内的盖玻片,用PBS冲洗3次×15min,4%多聚甲醛固定20min,分别进行番红O、天狼猩红、I型胶原染色,再用PBS冲洗至背景干净,晾干后甘油封固,观察BMSCs诱导组和非诱导组向纤维软骨分化的能力。

1.2.4 BMSCs 的冻存与复苏

1.2.4.1 BMSCs 冻存

镜下观察细胞长满瓶底后,PBS洗3遍,0.25%胰蛋白酶消化转至离心管中,800rpm,离心5分钟,弃去上清液,加入细胞冻存液(FBS:DMEM/F12:DMSO=4:5:1),吹打均匀,将处理好的细胞悬液以1.5mL的量加入一次性无菌冻存管中并做好标记,先在4℃下放置20min,-20℃下放置20min,-80℃下冰箱过夜,然后转移至液氮罐中储存。

1.2.4.2 BMSCs 复苏

从液氮罐中取出装有细胞的冻存管,立即将其置入37℃水浴中(不要将冻存管顶部全部没入,防止细胞被污染),并在1min内快速摇动以使冻存液完全融化。75%酒精消毒后在超净台里将冻存液转移至离心管中并加入适量的完全培养基,以1000rpm离心5分钟,弃去上清液,并将细胞重悬于完全培养基中,将细胞密度调节至 $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种至25 cm^2 培养瓶中放在培养箱中培养到48h后首次全量换液,观察有无污染以及细胞的生长情况。

1.3 实验结果

1.3.1 原代 BMSCs 的形态学观察

细胞培养36 h后进行第一次的半量换液,将未贴壁的悬浮细胞清除,大部分贴壁细胞呈卵圆形,可见明显的强折光性,少部分细胞伸长呈三角形,纺锤样等不规则形态(图1-1A),随着培养时间延长,细胞增殖能力变快,细胞进一步纯化,不规则细胞形态减少,呈均一细长的梭形。

1.3.2 BMSCs 诱导后倒置显微镜观察

10 μ g/L bFGF的成纤维软骨诱导液诱导早期细胞形态未见明显变化, 10d后以类似于颞下颌关节盘纤维软骨样细胞的长三角形、长梭形细胞为主, 不规则形细胞减少(图1-1B)。

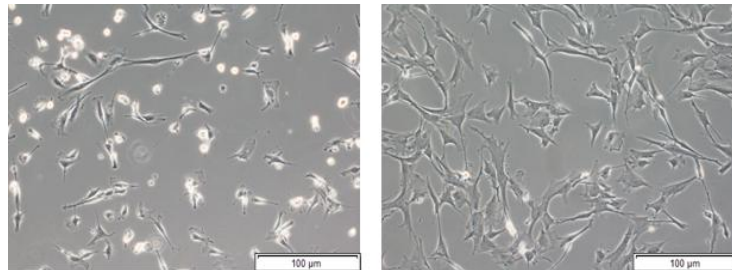


图1-1 原代及碱性成纤维细胞生长因子诱导后的BMSCs形态($\times 100$)

Figure 1-1 the morphology of bone marrow mesenchymal stem cells after primary culture and after induction by basic fibroblast growth factor ($\times 100$)

1.3.3 BMSCs 表面标志物检测

流式细胞学检测细胞表面标记物: 骨髓间充质干细胞高表达特异性抗原CD44, 而低表达抗原CD34和CD45 (图1-2)。

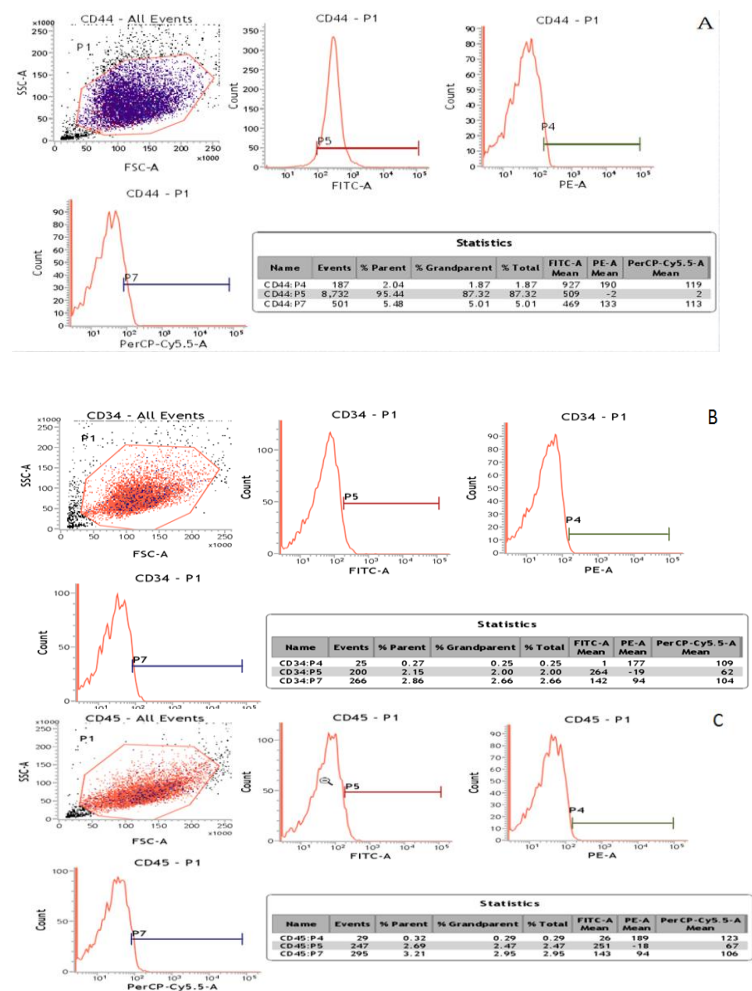


图1-2 BMSCs表面抗原标志物检测

Figure 1-2 Expression of surface markers of BMSCs

A. surface markers of CD44; B. surface markers of CD34; C. surface markers of CD45

1. 3. 4 BMSCs 诱导后组织学染色结果

P2代BMSCs经10 $\mu\text{g/L}$ bFGF的成纤维软骨诱导液诱导和正常培养组分别培养3周后，诱导组与非诱导组进行天狼猩红染色，甲苯胺蓝染色以及I型胶原免疫组化染色镜下观察可见：

天狼猩红染色结果示，非诱导组细胞基本不着色（图1-4A），诱导后BMSCs染色呈强阳性，细胞被染成粉红色(图1-4B)，表明BMSCs具有在体外成关节盘细胞诱导分化的能力。

甲苯胺蓝染色结果示，非诱导组细胞基本不着色（图1-4C）诱导后BMSCs染色呈强阳性，细胞被染成蓝色，表明BMSCs具有在体外成关节盘细胞诱导分

化的能力(图1-4D)。

I型胶原免疫组化染色可见,非诱导组细胞着色较浅(图)诱导后BMSCs染色呈强阳性,胞质、胞核有棕色颗粒(图1-4E, 1-4F),表明BMSCs具有在体外成关节盘细胞诱导分化的能力。

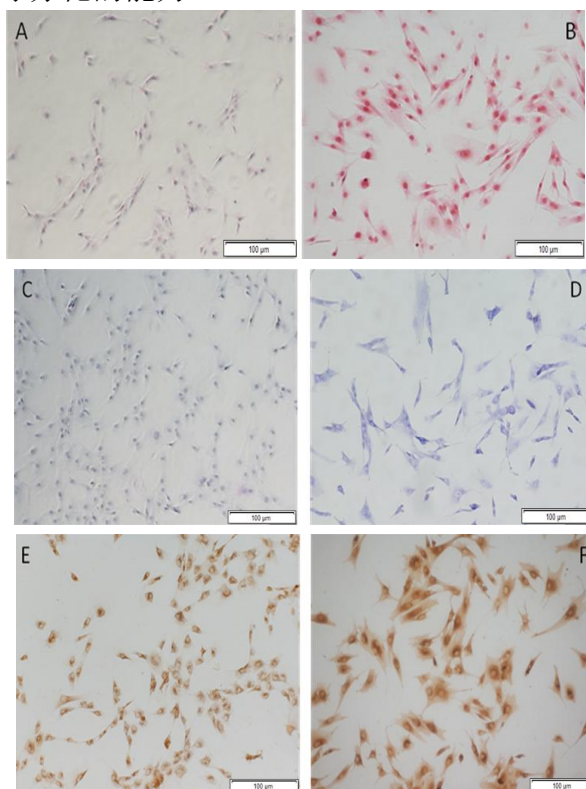


图1-4 BMSCs未诱导组 (A、C、E) (×40)和诱导组 (B、D、F) (×100)染色结果

Figure 1-4 BMSCs uninduced (A、C、E) (×40) or induced by basic fibroblast growth factor (B、D、F) (×100)

1.4 讨论

因为BMSCs在特定微环境诱导下能够向成纤维细胞样细胞分化,所以目前在颞下颌关节盘组织工程中,如何诱导BMSCs分化为成纤维细胞样细胞的细胞微环境是关节盘组织工程的关键所在。本课题组在前期实验中通过bFGF诱导BMSCs,证实了诱导出BMSCs能够分泌I型胶原和GAG,而I型胶原和GAG是关节盘细胞外基质的特征性指标,所以本实验首先将分离出的BMSCs在体外培养后,检测其表面抗原标志物表型发现,骨髓间充质干细胞高表达特异性抗原

CD44, 而对于抗原CD34和CD45呈低表达现象, 可以鉴定实验所用的细胞是骨髓干细胞; 用10 $\mu\text{g/L}$ bFGF的成纤维软骨诱导液诱导的BMSCs, 通过镜下观察, GAG的定性分析和I型免疫组化染色均表明诱导后的BMSCs能够向成纤维细胞样细胞分化增殖。

1.5 小结

1. 采用procell密度梯度离心法提取的BMSCs生长扩增能力良好
2. 经过流式细胞仪进行干细胞表面标记物鉴定, 确定本实验提取的细胞为BMSCs
3. 诱导后的BMSCs具有向成纤维细胞样细胞分化增殖的能力

第二章 颞下颌关节盘细胞的培养

2.1 引言

颞下颌关节盘是关节盘细胞、基质以及纤维构成, 关节盘细胞并非由单一细胞组成, 包括软骨细胞样细胞、成纤维细胞样细胞和透明软骨样细胞, 而软骨细胞样细胞和成纤维细胞样细胞在细胞组成中占比例较大, 二者细胞比约为1:2.05[4]。关节盘的胞外基质有I型, 少量II型和III型胶原蛋白, GAG, AGCs, 水和部分弹性蛋白纤维组成, 其中I型胶原蛋白和GAG是ECM的主要成分, 也是关节盘纤维软骨特异性分子及关节盘细胞分化的特征[5, 6]。本实验采用I型胶原酶组织消化法和胰蛋白酶细胞消化法从月龄山羊的关节盘组织中分离并提取颞下颌关节盘细胞, 将该细胞在体外传代培养至第5代, 从P1-P5代中选取合适代数的关节盘细胞应用于共培养实验中。

2.2 实验方法

2.2.1 山羊 TMJ disc cells 的分离培养

山羊头用流水清洗干净后把提取组织部位的毛发修剪干净, 75%酒精浸泡30min, 紫外光照20min, 无菌条件下在山羊头耳屏前做“T”型切口, 提取双TMJ关节盘, 无菌PBS冲洗, 剪成约1mm³大小的碎块, 置于0.2% I型胶原酶锥形瓶中, 瓶口密封, 放在设置好的温度和转速(105 r/min, 37℃)的恒温浴摇床消化14小时左右。无菌条件下, 离心提取关节盘细胞, 以 $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接至25cm²培养瓶中放在培养箱中培养到48h后首次半量换液把没有消化的组织除掉, 此后隔天换液此后至2周左右细胞达到90%融合, 为原代细胞, 记为P0并注意观察细胞生长状况, 保持细胞液清亮。原代细胞生长至平台期后即可进传代, 用0.25%的胰蛋白酶消化, 离心, 提取细胞团块按1:3比例接种至15%FB的完全培养基中, 继续传代培养。

2.2.2 山羊 TMJ disc cells 的复苏与冻存

2.2.2.1 山羊 TMJ disc cells 的冻存

由于细胞提取困难因此部分P0或者P1代细胞可先冻存, 将长满培养瓶瓶底的细胞倒去培养液用PBS洗3遍, 0.25%胰蛋白酶消化, 800rpm, 离心5分钟, 弃

去上清液，加入细胞冻存液(FBS:DMEM/F12:DMSO=4:5:1)，吹打均匀，将处理好的细胞悬液以1.5mL的量加入一次性无菌冻存管中并做好标记，先在4℃下放置20min，-20℃下放置20min，-80℃下冰箱过夜，然后转移至液氮罐中储存。

2.2.2.2 山羊 TMJ disc cells 的复苏

从液氮罐中取出装有细胞的冻存管，立即将其置入37℃水浴中（不要将冻存管顶部全部没入，防止细胞被污染），并在1min内快速摇动以使冻存液完全融化。75%酒精消毒后在超净台里将冻存液转移至已加入5mL完全培养基的离心管中，以1000rpm离心5分钟，弃去上清液，并将细胞重悬于完全培养基中，将细胞密度调节至 $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种至25cm²培养瓶中放在培养箱中培养到48h后首次全量换液，观察有无污染以及细胞的生长情况。

2.2.3 山羊 TMJ disc cells 的形态学染色

取对数生长期的P2代细胞，0.25%胰蛋白酶消化，离心后提取离心管中的细胞悬液，调整细胞密度 $1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种至放有18mm×18mm的无菌盖玻的6孔板里放在培养箱中培养到24h后首次全量换液，观察有无污染以及细胞的生长情况。待细胞生长约60%~70%，取出盖玻片，用PBS冲洗3次×15min，4%多聚甲醛固定20min ①甲苯胺蓝染液室温染色40min检测GAG；②天狼猩红染液染色1h观察胶原纤维的分布。再用PBS冲洗至背景干净，晾干后甘油封固，显微镜下观察分析。

2.2.4 CCK8 法检测山羊 TMJ disc cells 的增殖活性

取对数生长期的P1-P5代TMJ disc cells调整细胞密度 $0.8 \times 10^4/\text{cm}^2$ 每组100ul/孔的重复6个孔接种至96孔培养板中，将培养板放在培养箱中培养直至细胞生长约80%，向每孔滴加10ul的CCK-8溶液继续把培养板放在培养箱内孵育4h，然后用酶标仪测量每组细胞在波长450nm处的OD值并记录数据。

2.2.5 统计学分析统计学处理

采用 SPSS21.0 软件分析统计，组间两两的比较用的方法是：LSD-t 检验分析法，多组间比较可以用方差分析法，如果出现方差不齐时用 Dunnett's 方法分析，采用 SPSS21.0 软件分析统计，绘图使用 Origin pro 8.5 软件进行绘图。

2.3 实验结果

2.3.1 TMJ disc cells 的形态学观察

原代TMJ disc cells培养48h后基本全部贴壁，细胞由椭圆形和多角形逐渐变成细长形，连续培养至第2周后，关节盘细胞以长梭形的成纤维细胞样细胞为主，可见少部分椭圆形的软骨细胞样细胞（图2-1A, B）。

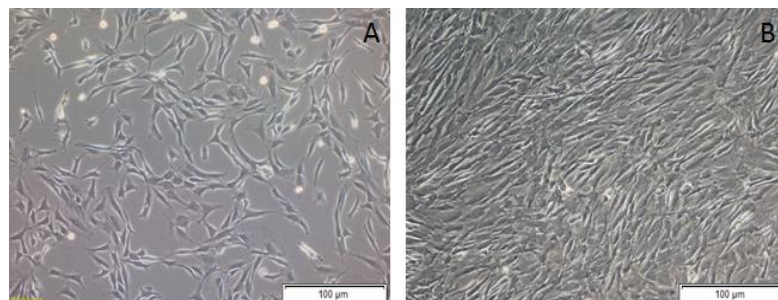


图2-1 颞下颌关节盘细胞的镜下观察(×100)

Figure 2-1 the morphology of goat temporomandibular joint disc cells (×100)

2.3.2 TMJ disc cells 的组织学染色

原代颞下颌关节盘细胞的天狼猩红染色结果示，细胞被染成粉红色（图2-2A）；甲苯胺蓝染色结果示，染色呈强阳性，可见细胞周围被蓝染，胞核着色更明显（图2-2B）。

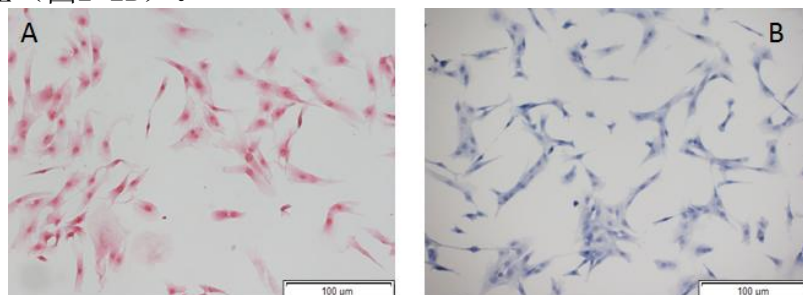


图2-2 颞下颌关节盘细胞天狼猩红(图A)和甲苯胺蓝染色（图B）(×100)

Fig 2-2 The result of Sirius red staining and Toluidine blue staining of goat temporomandibular joint disc cells(×100)

2.3.3 CCK8 法检测 TMJ disc cells 的增殖活性

CCK8法检测P1-P5代细胞的增值能力并绘制生长曲线做比较。结果显示，P1-P3代颞下颌关节盘细胞增值能力更快，P2代最明显在对数生长期增长速度加快明显；从P4代起至P5代细胞的生长增值能力相对缓慢（图2-3）。

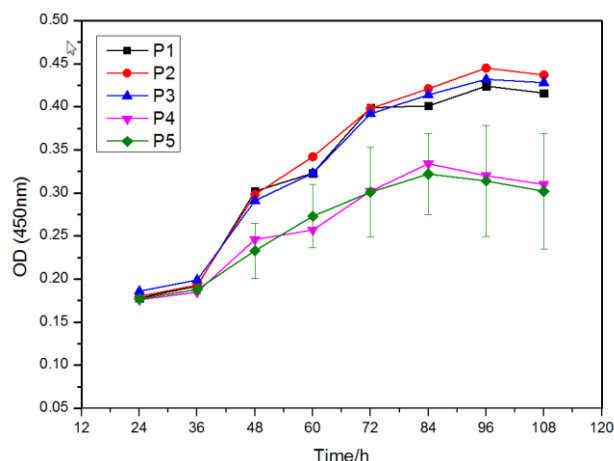


图2-3 颞下颌关节盘细胞的生长曲线

Figure2-3 the growth curve of goat temporomandibular joint disc cells

2.3.4 TMJ disc cells 的 GAG 表达量检测

通过实验发现颞下颌关节盘细胞GAG在P2代表达最显著,随着传代次数增加, GAG含量逐渐减少,随着细胞传代次数增加,去分化现象明显(图2-4)。

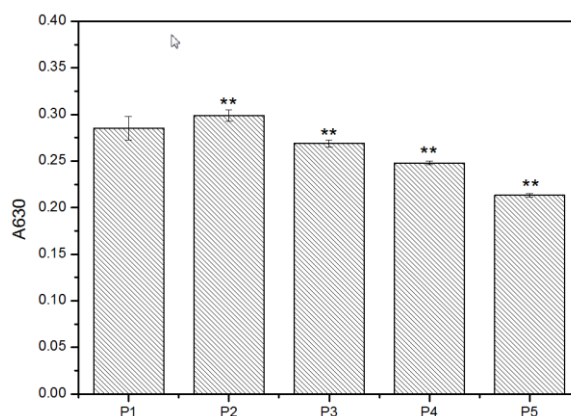


图2-4 颞下颌关节盘细胞GAG表达量(** $p<0.01$)

Figure 2-4 GAG expression level of goat temporomandibular joint disc cells

2.3.5 TMJ disc cells 的 I 型胶原表达量检测

通过实验发现颞下颌关节盘细胞I型胶原在P3代之前较显著, P4代起I型胶原表达量呈减少趋势表明细胞有去分化现象,至第5代时细胞时数值下降显著, I型胶原表达量减少更明显(图2-5)。

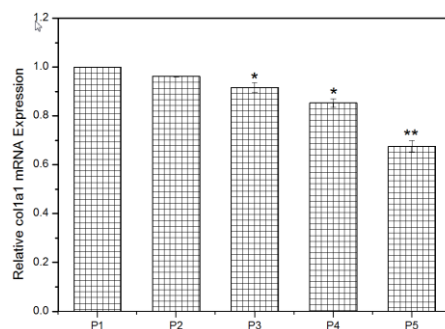
图2-5 颞下颌关节盘细胞COL I mRNA表达量(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Figure 2-5 Expression level of COL I mRNA of goat temporomandibular joint disc cells

2.4 讨论

本实验采用1月龄期山羊为研究对象的原因有以下几点：①山羊的TMJ disc与人的TMJ disc无论形状、大小还是其构成、功能方面都较为相似；②月龄山羊正处于生长发育阶段，细胞生长活跃，软骨细胞含量少；③山羊是研究TMD比较理想的动物模型^[93-94]。本课题组前期实验研究发现山羊颞下颌关节盘细胞中以成纤维细胞样细胞数量居多，软骨细胞样细胞占比较少，二者细胞比约为2.05：1。本实验通过对颞下颌关节盘细胞进行形态学观察以及形态学染色观察关节盘细胞外基质的表征产物I型胶原和GAG的分泌情况，确定培养的细胞是关节盘细胞^[1, 76, 77]。通过对P1-P5代关节盘细胞的生长增殖能力及分子水平检测I型胶原和GAG的含量发现：4、5代细胞增殖能力明显减弱并且I型胶原和GAG表达量逐渐减少，说明关节盘细胞中成纤维细胞样细胞数量减少，因此下一步共培养实验中，选用生长速度稳定、基因表达稳定的P2或P3关节盘细胞继续进行研究。

2.5 小结

1. 1月龄山羊关节盘中成纤维细胞样细胞数量多，可用作实验模型
2. 取生长良好、I型胶原和GAG表达量居多的P2或P3关节盘细胞进行研究。

第三章 直接和 Transwell 间接共培养体系下诱导骨髓间充质干细胞向成纤维细胞样细胞分化的研究

3.1 引言

种子细胞是确保组织工程持续性深入研究的基础,也是限制临床应用组织工程修复颞下颌关节盘缺损的首要因素。颞下颌关节盘细胞和BMSCs都是构建颞下颌关节盘组织工程中的种子细胞源^[91-92, 12]。关节盘细胞是TMJ关节盘组织工程中研究最早,也是最常采用的细胞类型^[8]。然而自体关节盘细胞的数量很少并且难以获得。因此来源广泛、易提取并具有成纤维细胞样作用的多潜能BMSCs成为了TMJ关节盘组织工程可靠的细胞来源之一^[9]。研究证明关节盘细胞的细胞微环境可以诱导BMSCs向成纤维细胞样细胞分化^[1, 15], BMSCs和关节盘细胞共培养能够促进关节盘细胞的增殖和表型维持,减少了关节盘细胞的需要量^[10, 97]。因此研究BMSCs和关节盘细胞共培养方式和最佳的细胞共培养比例不仅为进一步探讨共培养系统中BMSCs和关节盘细胞相互作用机制奠定基础,也是为了构建高质量颞下颌关节盘组织工程对以后临床应用组织工程修复颞下颌关节盘缺损提供理论依据。

直接接触共培养法和Transwell间接接触共培养法是不同的两种共培养方式,Transwell培养板的聚酯隔离膜孔径 $\leq 3.0\mu\text{m}$,仅能允许可溶性生物大分子通过,而细胞不能自由通过,且该聚酯膜为透明膜,不会影响镜下观察下层细胞^[98-100]。本研究旨在用直接共培养和Transwell共培养体系研究BMSCs向成纤维细胞样细胞分化的可行性及共培养最佳比例,寻找合适的种子细胞为颞下颌关节盘组织工程的细胞来源提供参考和依据。

3.2 实验方法

使用前述实验一和实验二中分类培养和鉴定后的第三代BMSCs和第二代颞下颌关节盘细胞进行共培养试验,以单独培养BMSCs为阴性对照,以 $10\mu\text{g/L}$ bFGF的成纤维软骨诱导液诱导的BMSCs为阳性对照。

3.2.1 BMSCs 和颞下颌关节盘细胞直接共培养法

调整细胞密度为 $3\times 10^4/\text{cm}^2$ 的对数生长期的第2代颞下颌关节盘细胞和第3

代BMSCs, 如表3-1所示比例接种于无菌的6孔板中进行共培养, 以单独培养BMSCs为阴性对照, 以 $10\mu\text{g/L}$ bFGF的成纤维软骨诱导液诱导的BMSCs为阳性对照。

3.2.2 BMSCs 和颞下颌关节盘细胞 Transwell 共培养法

调整细胞密度为 $3\times 10^4/\text{cm}^2$ 的对数生长期的第2代颞下颌关节盘细胞和第3代BMSCs, 如表3-1所示比例接种于无菌的6孔Transwell小室中, 上室加入颞下颌关节盘细胞, 下室加入BMSCs进行共培养, 以单独培养BMSCs为阴性对照, 以 $10\mu\text{g/L}$ bFGF的成纤维软骨诱导液诱导的BMSCs为阳性对照。

表3-1 BMSCs和关节盘细胞共培养比例

Cell	BMSCs	1:1	1:2	2:1	basic induction
BMSCs	3×10^4	3×10^4	3×10^4	3×10^4	3×10^4
TMJ disc cells	—	3×10^4	6×10^4	1.5×10^4	—

3.2.3 细胞增值能力分析

8组细胞培养21d后, 0.25%胰蛋白酶消化, 调整细胞密度 $0.8\times 10^4/\text{cm}^2$ 每组100 μl /孔的重复6个孔接种至96孔培养板中, 将培养板放在培养箱中培养直至细胞生长约80%, 向每孔滴加10 μl 的CCK-8溶液继续把培养板放在培养箱内孵育4h, 然后用酶标仪测量每组细胞在波长450nm处的OD值并记录数据。

3.2.4 测定指标

3.2.4.1 组织学染色

细胞培养21d后, 0.25%胰蛋白酶消化, 离心后提取离心管中的细胞悬液, 调整细胞密度 $1.0\times 10^4/\text{cm}^2$ 接种至18mm $\times$ 18mm的盖玻片, 细胞生长约60%~70%, PBS冲洗3次, 4%多聚甲醛固定30min, ①甲苯胺蓝染液染色40min检测GAG; ②天狼猩红染液染色1h观察胶原纤维的分布; ③番红染色法定性检测糖胺聚糖。再用PBS冲洗至背景干净, 晾干后甘油封固, 显微镜下观察分析。

3.2.4.2 免疫组织化学染色

细胞培养21d后, 0.25%胰蛋白酶消化, 离心后提取离心管中的细胞悬液, 调整细胞密度 $1.0\times 10^4/\text{cm}^2$ 接种至18mm $\times$ 18mm的盖玻片, 细胞生长约60%~70%, PBS冲洗3次, 4%多聚甲醛固定30min, ① I 型胶原定性检测: 固定后的

细胞爬片PBS清洗3次, 0.2%TritonX100破膜处理, 再用PBS洗3次, 5%的牛血清白蛋白(BSA)封闭20min, PBS洗3次×5min, 小鼠抗 I 型胶原单克隆抗体在4℃孵育12h左右, PBS洗3次×5min, 滴加聚合HRP标记抗鼠IgG, 37℃孵育30min, PBS洗3次×5min, DAB显色剂显色5min, 自来水充分冲洗, 晾干后甘油封片, 倒置相差显微镜下观察并拍照。②II型胶原免疫组化染色: 用兔抗II型胶原单克隆抗体进行和上述I型步骤相同的染色方法, 最后进行镜下观察。

3.2.5 GAG 的定量检测

细胞培养21d后, 每组加入0.25%木瓜蛋白酶2mL, 恒温水浴摇床升温至65℃消化3小时, 消化液用高速离心机1000g/min离心10min, 提取上清液根据糖胺聚糖(B1000)测定试剂盒说明书定量检测GAG, 最后在酶标仪656nm波长下测量吸光度值。

3.2.6 实时荧光定量 PCR I 型、II 型胶原基因表达分析

细胞培养21d后用0.25%胰蛋白酶消化, 离心细胞悬液收集 1.0×10^6 细胞, 用Trizol试剂盒书提取细胞总RNA, 通过超微分光光度计测定样品浓度 (ng/ul) 并检测各样本 (A260/A280) 的比值在1.8 - 2.1。取1μg总RNA用反转录酶试剂盒反转录为cDNA作为qPCR的模板, GAPDH 作为内参。反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线和融解曲线, 并确认获得的数据的可靠性。计算mRNA的相对表达量用 $\Delta\Delta Ct$ 法, 取3次数据重复实验的平均值。所使用引物序列见表3-2。

表3-2 I 型、II 型胶原实时定量PCR引物序列

Table3-1 Type I and type II collagen real-time quantitative PCR primer sequences		
Gene Name	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
I 型胶原	CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGAG	GCAATGCTGTTCTTGCAGTGGTA
II 型胶原	GTCACCCACCGACCAAGAAACC	AAGTCCAGGCTGTCCAGGGATG
GAPD	GATCATCAGCAATGCCTCCT	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA

3.2.7 WB 检测 I、II 型胶原

细胞培养21d后用0.25%胰蛋白酶消化, 离心后调整细胞密度, 收取 1.0×10^7 细胞, 加入1mL预冷的生理盐水冲洗两遍, 加入200μL RIPA组织裂解液 (含PMSF), 4℃ 12000rpm 离心15min提取细胞总蛋白。SDS-PAGE电泳后转印到PVDF膜上, 将膜置于2%酪蛋白溶液室温摇1.5h, 在按照目的蛋白所处位置

把膜裁成长条，然后用 I 型、II 型胶原一抗及带 HRP 的二抗进行曝光检测蛋白的表达水平。

3.2.8 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件分析统计，组间两两的比较用的方法是：LSD-t 检验分析法，多组间比较可以用方差分析法，如果出现方差不齐时用 Dunnett's 方法分析，采用 SPSS21.0 软件分析统计，绘图使用 Origin pro 8.5 软件进行绘图。

3.3 实验结果

3.3.1 CCK8 法检测共培养细胞的增殖活性

用 CCK8 检测 8 组细胞的生长增值能力并绘制生长曲线做比较如下图 3-1 所示，直接培养组 1:2 (BMSCs: TMJ disc cells) 生长增殖速度最快，其余几组细胞生长曲线基本类似，细胞的生长增值能力相对缓慢。

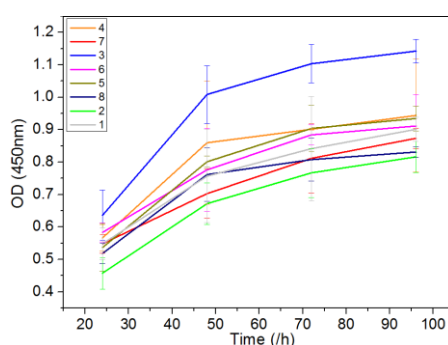


图3-1 8组细胞生长曲线

Figure 3-1 Growth curve of eight groups of cells

1. Transwell组2:1; 2. BMSCs组; 3. 直接培养组1:2; 4. 直接培养组1:1;

5. 直接培养组1:1; 6. Transwell组1:2; 7. Transwell组1:1; 8. BMSCs诱导组

3.3.2 I 型胶原的定性检测

3.3.2.1 番红 O 染色

培养 21d 时，将 8 组细胞爬片进行番红 O 染色检测，镜下观察染色结果并拍片，除 BMSCs 阴性对照组的细胞外，BMSCs 诱导组和共培养组的细胞染色均呈阳性，各实验组之间差异不明显 (图 3-2-1)。

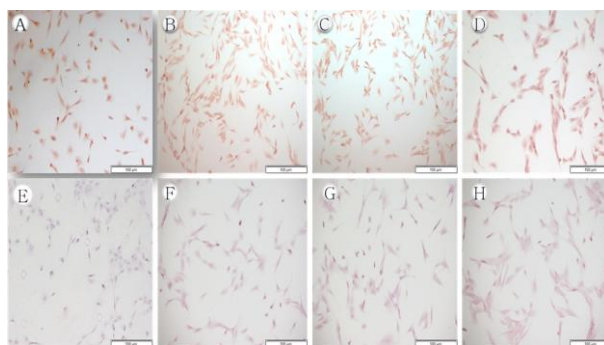


图3-2-1 番红O染色结果($\times 100$)

Figure 3-2-1 The result of Safranin O($\times 100$)

A:BMSCs诱导组; B:直接培养组1:2; C:直接培养组1:1; D:直接培养组2:1;

E:BMSCs组; F:Transwell组1:2; G:Transwell组1:1; H:Transwell组2:1

3. 3. 2. 2 天狼猩红染色

培养21d时,将8组细胞爬片进行天狼猩红染色检测,镜下观察染色结果并拍片,BMSCs阴性对照组和Transwell着色均较浅;BMSCs诱导组和直接共培养组的细胞染色均呈阳性,各实验组之间差异不明显(图3-2-2)。

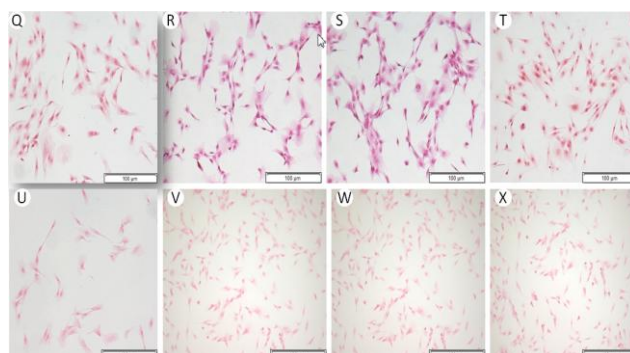


图3-2-2 天狼猩红染色结果($\times 100$)

Figure 3-2-2 The result of Sirius Red ($\times 100$)

Q:BMSCs诱导组; R:直接培养组1:2; S:直接培养组1:1; T:直接培养组2:1;

U:BMSCs组; V:Transwell组1:2; W:Transwell组1:1; X:Transwell组2:1

3. 3. 2. 3 I 型胶原免疫组织化学染

如图3-2-2:镜下观察染色结果并拍片,BMSCs阴性对照组和Transwell着色均较浅;BMSCs诱导组和直接共培养组的细胞染色均呈阳性,各实验组之间差异不明显。

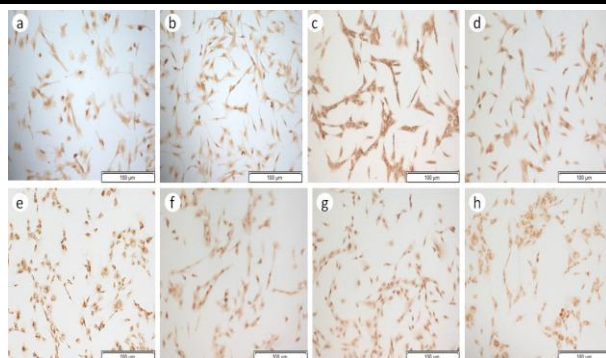


图3-2-3 I型胶原染色结果($\times 100$)

Figure 3-2-3 The result of Collagen type I($\times 100$)

a:BMSCs诱导组; b:直接培养组1:2; c:直接培养组1:1; d:直接培养组2:1;

e:BMSCs组; f:Transwell组1:2; g:Transwell组1:1; h:Transwell组2:1

3. 3. 3 GAG 定性检测

细胞培养21d时, 将8组细胞爬片进行甲苯胺蓝染色检测, 镜下观察染色结果并拍片, 染色结果可见, 除BMSCs单纯培养对照组的细胞不着色, BMSCs诱导组和共培养组的染色均成阳性, 细胞被染成蓝色(图3-3)。

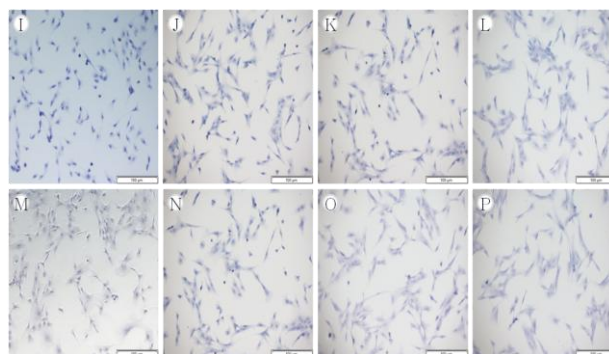


图3-3 甲苯胺蓝染色结果($\times 100$)

Figure 3-3 The result of Toluidine blue staining($\times 100$)

I:BMSCs诱导组; J:直接培养组1:2; K:直接培养组1:1; L:直接培养组2:1;

M:BMSCs组; N:Transwell组1:2; O:Transwell组1:1; P:Transwell组2:1

3.3.4 II型胶原定性检测

培养21d时, 将8组细胞爬片进行II型胶原免疫组织化学染色, 镜下观察染色结果并拍片, BMSCs诱导组和直接共培养组着色均较浅; BMSCs组和Transwell的细胞染色均呈阳性, 各实验组之间差异不明显(图3-4)。

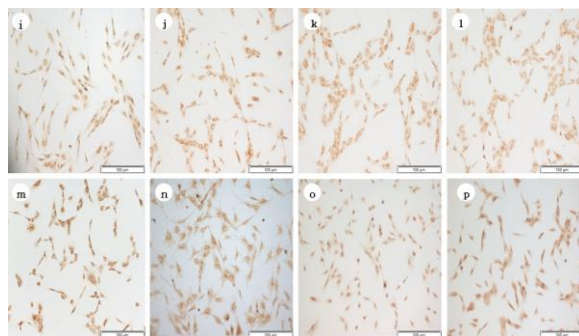


图3-4 II型胶原染色结果($\times 100$)

Figure 3-4 The result of Collagen type II($\times 100$)

i:BMSCs诱导组; j:直接培养组1:2; k:直接培养组1:1; l:直接培养组2:1;

m:BMSCs组; n:Transwell组1:2; o:Transwell组1:1; p:Transwell组2:1

3.3.5 GAG 定量检测

如图3-5所示, 实验结果与BMSCs诱导组对比发现: 单纯培养对照组的GAG值远低于诱导组, 且差异具有统计学意义($p < 0.01$); 1:2 (BMSCS:TMJ disc cells) 组最显著; Transwell共培养体系每组A630nm处的GAG值均小, 且差异具有统计学意义($p < 0.01$)。

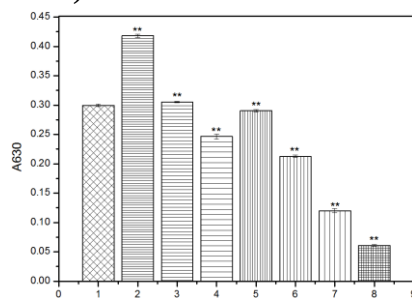


图3-5 GAG的定量结果 (** $p < 0.01$)

Figure3-5 The result of the content of glycosaminoglycan

1.BMSCs诱导组; 2.直接培养组1:2; 3.直接培养组1:1; 4.直接培养组2:1;

5.Transwell组1:2; 6.Transwell组1:1; 7.Transwell组2:1; 8.BMSCs组

3.3.6 I 型胶原和 II 型基因表达的定量分析

如图3-6实时荧光定量PCR结果所示,与BMSCs诱导组对比发现TMJ disc cells:BMSCs单纯培养对照组的COL I 和COL II mRNA表达量的值均低于诱导组($p < 0.01$);直接共培养实验组1:2和1:1 (BMSCS:TMJ disc cells)的COL I 的含量均高于BMSCs诱导组,其中又以1:2 (BMSCS: TMJ disc cells)组最高($p < 0.05$), Transwell共培养体系每组COL I 的含量均低于BMSCs诱导组($p < 0.05$)。COL II 含量在Transwell培养体系中表达量较高($p < 0.01$)

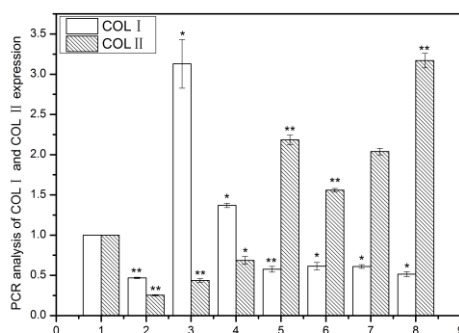


图3-6 I 型胶原和 II 型基因表达的定量分析(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Figure3-6 The expression level of COL I and COL II mRNA

1.BMSCs诱导组; 2.BMSCs组; 3.直接培养组1:2; 4.直接培养组1:1;

5.直接培养组2:1; 6.Transwell组1:2; 7.Transwell组1:1; 8.Transwell组2:1

3.3.7 I 型胶原和 II 型胶原蛋白表达量检测

如图3-7所示,实验结果与BMSCs诱导组对比发现: BMSCs单纯培养对照组的COL I 和COL II mRNA表达量的值均低于诱导组($p < 0.01$);直接共培养实验组1:2和1:1 (BMSCS:TMJ disc cells)的COL I 的含量均高于BMSCs诱导组,其中又以1:2 (BMSCS:TMJ disc cells)组最高($p < 0.05$), Transwell共培养体系每组COL I 的含量均低于BMSCs诱导组($p < 0.05$)。COL II mRNA在Transwell培养体系中表达量较高($p < 0.01$)。

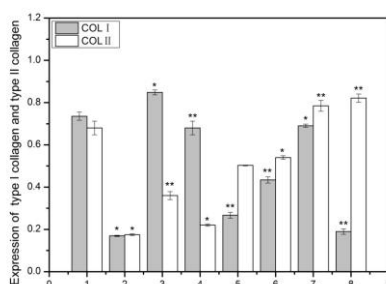


图3-7 I型胶原和II型胶原蛋白表达量检测(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

Figure3-7-1 Detection of type I collagen and type II collagen

1.BMSCs诱导组; 2.BMSCs组; 3.直接培养组1:2; 4.直接培养组1:1;

5.直接培养组2:1; 6.Transwell组1:2; 7.Transwell组1:1; 8.Transwell组2:1

3.4 讨论

TMJ关节盘是由关节盘细胞、基质以及纤维构成,且关节盘细胞中以成纤维细胞样细胞数量居多,基质中以I型胶原和GAG为主,但由于TMJ关节盘无血管、少细胞,因此损伤后难以自我修复^[1-3]。TMJ关节盘组织工程旨在通过使用活细胞与其产生的细胞外基质与支架材料形成细胞-支架构建体或无支架的自组装基体,最终形成结构上和功能上类似天然TMJ关节盘的替代物^[7]。颞下颌关节盘细胞和骨髓间充质干细胞是构建颞下颌关节盘组织工程中安全可靠的种子细胞源^[12, 91, 92],本研究BMSCs通过高表达CD44,而CD34和CD45低表达,符合骨髓来源的间充质干细胞的特性^[101, 102]。研究证明关节盘细胞的细胞微环境可以诱导BMSCs向成纤维细胞样细胞分化^[1, 15], BMSCs和关节盘细胞共培养能够促进关节盘细胞的增殖和表型维持,减少了关节盘细胞的需要量^[8, 10]。但是影响共培养系统中细胞增殖分化的因素和调节机制尚不明确,因此研究BMSCs和关节盘细胞共培养方式和最佳的细胞共培养比例不仅为进一步探讨共培养系统中BMSCs和关节盘细胞相互作用机制奠定基础,也是为了构建高质量颞下颌关节盘组织工程对以后临床应用组织工程学技术修复颞下颌关节盘缺损提供实验基础。

细胞共培养法是在体外模拟细胞与细胞之间相互作用的一种培养体系,从细胞层面实现一种对另一种细胞的调控作用,这种培养体系相比单一细胞的培养方式更能清晰地反应细胞整体情况,将几种不同类型的细胞培养在同

一种环境中,用来研究各细胞间复杂的相互影响。据文献报道,直接接触细胞共培养法和间接接触Transwell共培养法是两种不同的共培养方法,Transwell培养板的聚酯隔离膜孔径 $\leq 3.0\mu\text{m}$,仅能允许可溶性生物大分子通过,而不能让正常的细胞自由通过,而且这种聚酯膜的优点之一是它的透明性,方便实验中不用来回取动上层细胞就能方便的在显微镜下比较清晰的观察到下层细胞的生长状态^[98-100]。

本研究用上述两种不同细胞共培养方式对BMSCs和关节盘细胞增殖、分化的影响进行了比较研究,实验结果表明:在本研究中,CCK8法^[103]检测各组细胞的生长曲线,通过对比分析发现:共培养组的增长速度与BMSCs诱导的阳性对照组对比,增长速度相对较高,而BMSCs正常组组增长速度最慢,因此共培养组的细胞增长相对于单纯培养组更具优势。直接接触共培养组的GAG、I型胶原的合成量和基因表达量明显高于Transwell共培养组和对照组,且1:2直接共培养组最佳。研究证明GAG和I型胶原是成纤维细胞样细胞的特异性细胞外基质^[104, 105],所以本实验中GAG和I型胶原两者的存在说明细胞直接接触共培养诱导BMSCs向成纤维细胞样细胞分化是可行的;II型胶原是软骨样细胞的特异性细胞外基质^[106],在Transwell间接培养的1:2组中的含量表达明显,表明Transwell培养体系诱导BMSCs向软骨样细胞分化^[107-108]。

3.5 小结

1. 最佳的共培养比例为1:2(BMSCs:TMJ disc cells)。

2. 促进BMSCs向TMJ disc cells的成纤维细胞样细胞方向分化的培养方式中细胞直接接触共培养法最佳, BMSCs诱导法其次,而Transwell共培养法更倾向于促进BMSCs向软骨样细胞分化,因此,本实验也为TMJ disc cells的分化分选方向提供了一个良好的选择,因此,本实验也为TMJ disc cells的分化分选方向提供了一个良好的选择。

全文总结

1 本文的主要小结

1.1 山羊骨髓间充质干细胞的分离，培养和鉴定

(1) 采用procell密度梯度离心法提取和0.25%胰蛋白酶消化分离获得的BMSCs生长扩增能力良好。

(2) 经过流式细胞仪进行干细胞表面标记物鉴定，确定本实验提取的细胞为BMSCs。

(3) 10 μ g/LbFGF的成纤维软骨诱导液诱导的BMSCs具有向成纤维细胞样细胞分化的能力。

1.2 山羊颞下颌关节盘细胞的培养

(1) 1月龄山羊关节盘中成纤维细胞样细胞数量多，可用作实验模型

(2) 取生长良好、I型胶原和GAG表达量居多的P2或P3关节盘细胞进行研究。

1.3 两种共培养体系下骨髓间充质干细胞向成纤维细胞样细胞分化的研究

(1) 细胞直接接触共培养法对诱导BMSCs向成纤维细胞样细胞分化的影响大于BMSCs诱导组和Transwell间接培养法。

(2) 最佳的直接共培养比例为1 : 2(BMSCs : TMJ disc cells)。

2 本文的创新之处

目前的TMJ disc cells与BMSCs共培养研究实验中，并没有研究诱导BMSCs向成纤维细胞样细胞分化的最适方法和二者细胞共培养的最佳比例。本研究首次将碱性成纤维因子诱导法、细胞Transwell间接接触共培养法和直接接触共培养法3种诱导方式进行比较，寻找诱导BMSCs向成纤维细胞样细胞分化的最适方法以及TMJ disc cells与BMSCs共培养的最佳比例。

3 尚需完善及进一步研究之处

(1) 本实验第三部分在基因水平和蛋白水平检测了共培养细胞GAG和

col1a1的表达水平，后续本课题组将从信号通路着手，研究connexin-43等在两种细胞间建立细胞缝隙连接通道的信号分子，进一步研究探索BMSCs和关节盘细胞接触共培养中影响共培养细胞增殖和分化的调节机制。

(2)本实验通过3种方法比较诱导BMSCs向成纤维细胞样细胞分化的最佳方法和适宜的比例，下一步研究小组将把细胞直接接触共培养中得到的成纤维细胞样细胞接种到支架材料中进行下一步研究。

参考文献

- [1] Kuo J, Zhang L, Bacro T, Yao H. The region-dependent biphasic viscoelastic properties of human temporomandibular joint discs under confined compression. *J Biomech.* 2010 May 7;43(7):1316-21.
- [2] Johns DE, Athanasiou KA. Design characteristics for temporomandibular joint disc tissue engineering: learning from tendon and articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng H.* 2007 Jul;221(5):509-26.
- [3] Angelo DF, Morouço P, Alves N, Viana T, Santos F, González R, Monje F, Macias D, Carrapiço B, Sousa R, Cavaco-Gonçalves S, Salvado F, Peleteiro C, Pinho M. Choosing sheep (*Ovis aries*) as animal model for temporomandibular joint research: Morphological, histological and biomechanical characterization of the joint disc. *Morphologie.* 2016 Dec;100(331):223-233.
- [4] Nicoll SB, Hee CK, Davis MB, Winkelstein BA. A rat model of temporomandibular joint pain with histopathologic modifications. *J Orofac Pain.* 2010 Summer;24(3):298-304.
- [5] Jaisson M, Lestriez P, Taiar R, Debray K. Finite element modelling of the articular disc behaviour of the temporo-mandibular joint under dynamic loads. *Acta Bioeng Biomech.* 2011;13(4):85-91.
- [6] Ramos AM, Mesnard M. The stock alloplastic temporomandibular joint implant can influence the behavior of the opposite native joint: A numerical study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015 Oct;43(8):1384-91.
- [7] Shu W, Liu L, Bao G, et al. Tissue engineering of the temporomandibular joint disc: current status and future trends[J]. *International Journal of Artificial Organs*, 2015, 38(2):55.
- [8] Matuska AM, Muller S, Dolwick MF, McFetridge PS. Biomechanical and biochemical outcomes of porcine temporomandibular joint disc deformation. *Arch Oral Biol.* 2016 Apr;64:72-9.
- [9] Lowe J, Almarza AJ. A review of in-vitro fibrocartilage tissue engineered therapies with a focus on the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2017 Jul23;83:193-201.
- [10] Henry CH, Wolford LM. Treatment outcomes for temporomandibular joint reconstruction after Proplast-Teflon implant failure. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Apr;51(4):352-8; discussion 359-60.
- [11] Wolford LM, Pitta MC, Reiche-Fischel O, Franco PF. TMJ Concepts/Techmedica custom-made TMJ total joint prosthesis: 5-year follow-up study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Jun;32(3):268-74.
- [12] Undt G, Jahl M, Pohl S, Marlovits S, Moser D, Yoon HH, Frank J, Lang S, Czerny C, Klima G, Gentleman E, Ewers R. Matrix-associated chondrocyte transplantation for reconstruction of articulating surfaces in the temporomandibular joint: a pilot study covering medium- and long-term outcomes of 6 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 Aug;126(2):117-128.

- [13] Kang N, Liu X, Guan Y, Wang J, Gong F, Yang X, Yan L, Wang Q, Fu X, Cao Y, Xiao R. Effects of co-culturing BMSCs and auricular chondrocytes on the elastic modulus and hypertrophy of tissue engineered cartilage. *Biomaterials*. 2012 Jun;33(18):4535-44.
- [14] Reing JE, Brown BN, Daly KA, Freund JM, Gilbert TW, Hsiong SX, Huber A, Kullas KE, Tottey S, Wolf MT, Badylak SF. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(33):8626-33.
- [15] Lino AB, McCarthy AD, Fernández JM. Evaluation of Strontium-Containing PCL-PDIPF Scaffolds for Bone Tissue Engineering: In Vitro and In Vivo Studies. *Ann Biomed Eng*. 2018 Dec 17.
- [16] Francis SL, Di Bella C, Wallace GG, Choong PFM. Cartilage Tissue Engineering Using Stem Cells and Bioprinting Technology-Barriers to Clinical Translation. *Front Surg*. 2018 Nov 27;5:70.
- [17] Fernandes HR, Gaddam A, Rebelo A, Brazete D, Stan GE, Ferreira JMF. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2018 Dec 12;11(12).
- [18] 焦岩涛, 马绪臣, 张震康, 于世凤, 武登诚. 组织工程重建兔颞下颌关节盘软骨[J]. 中华创伤杂志, 2001, (01):19-21.
- [19] El-Fiqi A, Buitrago JO, Yang SH, Kim HW. Biomimetically grown apatite spheres from aggregated bioglass nanoparticles with ultrahigh porosity and surface area imply potential drug delivery and cell engineering applications. *Acta Biomater*. 2017 Sep 15;60:38-49.
- [20] Cooke ME, Allon AA, Cheng T, Kuo AC, Kim HT, Vail TP, Marcucio RS, Schneider RA, Lotz JC, Alliston T. Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Oct;19(10):1210-8.
- [21] 吕玮. 干细胞源性纤维软骨自组装基体的构建及力学性能研究[D]. 兰州大学, 2016.
- [22] Leonardi R, Rusu MC, Loreto F, Loreto C, Musumeci G. Immunolocalization and expression of lubricin in the bilaminar zone of the human temporomandibular joint disc. *Acta Histochemica* 2012;114:1-5.
- [23] Thomas M, Grande D, Haug RH. Development of an in vitro temporomandibular joint cartilage analog. *J Oral Maxillofac Surg*. 1991 Aug;49(8):854-6; discussion 857.
- [24] Barrientos E, Pelayo F, Tanaka E, Lamela-Rey MJ, Fernández-Canteli A. Dynamic and stress relaxation properties of the whole porcine temporomandibular joint disc under compression. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016 Apr;57:109-15.
- [25] Kuroda M, Otonari-Yamamoto M, Sano T, Fujikura M, Wakoh M. Diagnosis of retrodiscal tissue in painful temporomandibular joint (TMJ) by fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) signal intensity. *Cranio*. 2015 Oct;33(4):271-5.
- [26] Matuska AM, Muller S, Dolwick MF, McFetridge PS. Biomechanical and biochemical outcomes of porcine temporomandibular joint disc deformation. *Arch Oral Biol*. 2016 Apr;64:72-9.

- [27] K. D. Allen and K. A. Athanasiou. Growth factor effects on passaged TMJ disk cells in monolayer and pellet cultures [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2006, 9[3]: 143-152.
- [28] D. E. Johns and K. A. Athanasiou. Improving culture conditions for temporomandibular joint disc tissue engineering [J]. *Cells issues Organs*, 2007, 185[4]: 246257.
- [29] Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982 Aug;30(1):215-24.
- [30] Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Ann Anat*. 2000 Jul;182(4):303-10.
- [31] Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002 Jan;10(1):62-70.
- [32] Wang F, Hu Y, He D, Zhou G, Yang X, Ellis E 3rd. Regeneration of subcutaneous tissue-engineered mandibular condyle in nude mice. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017 Jun;45(6):855-861.
- [33] Undt G, Jahl M, Pohl S, Marlovits S, Moser D, Yoon HH, Frank J, Lang S, Czerny C, Klima G, Gentleman E, Ewers R. Matrix-associated chondrocyte transplantation for reconstruction of articulating surfaces in the temporomandibular joint: a pilot study covering medium- and long-term outcomes of 6 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Aug;126(2):117-128.
- [34] Puelacher WC, Wissner J, Vacanti CA, Ferraro NF, Jaramillo D, Vacanti JP. Temporomandibular joint disc replacement made by tissue-engineered growth of cartilage. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994 Nov;52(11):1172-7; discussion 1177-8.
- [35] Chin AR, Gao J, Wang Y, Taboas JM, Almarza AJ. Regenerative Potential of Various Soft Polymeric Scaffolds in the Temporomandibular Joint Condyle. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Sep;76(9):2019-2026.
- [36] Wang L, Lazebnik M, Detamore MS. Hyaline cartilage cells outperform mandibular condylar cartilage cells in a TMJ fibrocartilage tissue engineering application. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Mar;17(3):346-53.
- [37] Qin Z, Fisher GJ, Voorhees JJ, Quan T. Actin cytoskeleton assembly regulates collagen production via TGF- β type II receptor in human skin fibroblasts. *J Cell Mol Med*. 2018 Sep;22(9):4085-4096.
- [38] Tanabe K, Ang CE, Chanda S, Olmos VH, Haag D, Levinson DF, Südhof TC, Wernig M. Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 19;115(25):6470-6475.
- [39] Johns DE, Wong ME, Athanasiou KA. Clinically relevant cell sources for TMJ disc engineering. *J Dent Res*. 2008 Jun;87(6):548-52.
- [40] Almarza AJ, Athanasiou KA. Effects of hydrostatic pressure on TMJ disc cells. *Tissue Eng*. 2006 May;12(5):1285-94.

- [41] Hiramatsu K, Sasagawa S, Outani H, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *J Clin Invest*. 2011 Feb;121(2):640-57.
- [42] Wang F, Hu Y, He D, Zhou G, Ellis E 3rd. Scaffold-free cartilage cell sheet combined with bone-phase BMSCs-scaffold regenerate osteochondral construct in mini-pig model. *Am J Transl Res*. 2018 Oct 15;10(10):2997-3010. eCollection 2018.
- [43] Zaki AA, Zaghloul M, Helal ME, Mansour NA, Grawish ME. Impact of Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells on Degenerative Changes of Articulating Surfaces Associated With the Arthritic Temporomandibular Joint: An Experimental Study in Rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Dec;75(12):2529-2539.
- [44] Sun H, Huang Y, Zhang L, Li B, Wang X. Co-culture of bone marrow stromal cells and chondrocytes in vivo for the repair of the goat condylar cartilage defects. *Exp Ther Med*. 2018 Oct;16(4):2969-2977.
- [45] Thej C, Ramadas B, Walvekar A, Majumdar AS, Balasubramanian S. Development of a surrogate potency assay to determine the angiogenic activity of Stempeucel®, a pooled, ex-vivo expanded, allogeneic human bone marrow mesenchymal stromal cell product. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Feb 28;8(1):47.
- [46] Sareen N, Abu-El-Rub E, Sequiera GL, Moudgil M, Dhingra S. Methods for Long-Term Storage of Murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2017;1553:241-248.
- [47] Han Y, Ren J, Bai Y, Pei X, Han Y. Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019 Jan 30;109:59-68.
- [48] Venkataiah VS, Handa K, Njuguna MM, Hasegawa T, Maruyama K, Nemoto E, Yamada S, Sugawara S, Lu L, Takedachi M, Murakami S, Okura H, Matsuyama A, Saito M. Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose Tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells in vivo. *Sci Rep*. 2019 Jan 29;9(1):921.
- [49] Azhdari Tafti Z, Mahmoodi M, Hajizadeh MR, Ezzatizadeh V, Baharvand H, Vosough M, Piryaee A. Conditioned Media Derived from Human Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells Improves Primary Hepatocyte Maintenance. *Cell J*. 2018 Oct;20(3):377-387.
- [50] Kim YJ, Seo DH, Lee SH, Lee SH, An GH, Ahn HJ, Kwon D, Seo KW, Kang KS. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochem Biophys Res*. 2018 Oct 25;16:96-102.
- [51] Kang I, Lee BC, Lee JY, Kim JJ, Lee SE, Shin N, Choi SW, Kang KS. Interferon- γ -mediated Secretion of Tryptophanyl-tRNA Synthetases Has a Role in Protection of Human Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells Against Experimental Colitis. *BMB Rep*. 2018 Oct 8. pii: 4235.
- [52] Sasaki A, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Otabe K, Tsuji K, Koga H, Mochizuki M, Sekiya I. Canine mesenchymal stem cells from synovium have a higher chondrogenic potential than

- p>those from infrapatellar fat pad, adipose tissue, and bone marrow. PLoS One. 2018 Aug 23;13(8):e0202922.
- [53] Reesink HL, Sutton RM, Shurer CR, Peterson RP, Tan JS, Su J, Paszek MJ, Nixon AJ. Galectin-1 and galectin-3 expression in equine mesenchymal stromal cells(MSCs), synovial fibroblasts and chondrocytes, and the effect of inflammation on MSC motility. Stem Cell Res Ther. 2017 Nov 2;8(1):243.
- [54] Opiela J, Bülbül B, Romanek J. Varied approach of using MSCs for bovine embryo in vitro culture. Anim Biotechnol. 2018 Nov 30:1-8.
- [55] Yu YB, Song Y, Chen Y, Zhang F, Qi FZ. Differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Mol Med Rep. 2018 Aug;18(2):2009-2016.
- [56] Cao J, Wei Y, Lian J, Yang L, Zhang X, Xie J, Liu Q, Luo J, He B, Tang M. Notch signaling pathway promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by enhancing BMP9/Smad signaling. Int J Mol Med. 2017 Aug;40(2):378-388.
- [57] Catacchio I, Berardi S, Reale A, De Luisi A, Racanelli V, Vacca A, Ria R.Evidence for bone applications of hematopoietic and mesenchymal stem cells transdifferentiation. Stem Cells Int. 2013;2013:589139.
- [58] Fuller MT. Differentiation in Stem Cell Lineages and in Life: Explorations in the Male Germ Line Stem Cell Lineage. Curr Top Dev Biol. 2016;116:375-90.
- [59] Pei H, Fu HY, Hirai H, Cho DS, O'Brien TD, Dutton J, Verfaillie CM, Hu WS.Generation of induced pluripotent stem cells from Chinese hamster embryonic fibroblasts. Stem Cell Res. 2017 May;21:132-136.
- [60] Pan X, Murashov AK, Stellwag EJ, Zhang B. Using Quantitative Real-Time PCR to Detect MicroRNA Expression Profile During Embryonic Stem Cell Differentiation.Methods Mol Biol. 2017;1622:255-265.
- [61] Tayyeb A, Shahzad N, Ali G. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Towards Nephrogenic Lineage and Their Enhanced Resistance to Oxygen Peroxide-induced Oxidative Stress. Iran J Kidney Dis. 2017 Jul;11(4):271-279.
- [62] Huang YS, Li IH, Chueh SH, Hueng DY, Tai MC, Liang CM, Lien SB, Sytwu HK, Ma KH. Mesenchymal stem cells from rat olfactory bulbs can differentiate into cells with cardiomyocyte characteristics. J Tissue Eng Regen Med. 2015 Dec;9(12):E191-201.
- [63] Mänpää K, Ellä V, Mauno J, et al. Use of adipose stem cells and polylactide discs for tissue engineering of the temporomandibular joint disc.[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2010, 7(42):177.
- [64] Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. J Dent Res. 2006 Nov;85(11):966-79.
- [65] Liu N, Lyu X, Fan H, Shi J, Hu J, Luo E. Animal models for craniofacial reconstruction by stem/stromal cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2014 May;9(3):174-86.
- [66] Ahtiainen K, Mauno J, Ellä V, Hagström J, Lindqvist C, Miettinen S, Ylikomi T, Kellomäki M, Seppänen R. Autologous adipose stem cells and polylactide discs in the replacement of the rabbit temporomandibular joint disc. J R Soc Interface. 2013 May 29;10(85):20130287.

- [67] Wang J, Wei Y, Zhao S, Zhou Y, He W, Zhang Y, Deng W. The analysis of viability for mammalian cells treated at different temperatures and its application in cell shipment. *PLoS One*. 2017 Apr 18;12(4):e0176120.
- [68] Kauts ML, Rodriguez-Seoane C, Kaimakis P, Mendes SC, Cortés-Lavaud X, Hill U, Dzierzak E. In Vitro Differentiation of Gata2 and Ly6a Reporter Embryonic Stem Cells Corresponds to In Vivo Waves of Hematopoietic Cell Generation. *Stem Cell Reports*. 2018 Jan 9;10(1):151-165.
- [69] Wang Y, Zhang D, Shen B, Zhang Y, Gu P. Stem/Progenitor Cells and Biodegradable Scaffolds in the Treatment of Retinal Degenerative Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018 Feb 23;13(3):160-173.
- [70] Markel TA, Crafts TD, Jensen AR, Hunsberger EB, Yoder MC. Human mesenchymal stromal cells decrease mortality after intestinal ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res*. 2015 Nov;199(1):56-66.
- [71] Ge Y, Zhang Y, Tang Q, Gao J, Yang H, Gao Z, Zhao RC. Mechanisms of the immunomodulation effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on facial nerve injury in SD rats. *Stem Cells Dev*. 2019 Feb 1.
- [72] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.[J]. *Nature*, 2016, 418(6893):41-9.
- [73] Moser C, Bardsley K, El Haj AJ, Alini M, Stoddart MJ, Bara JJ. A Perfusion Culture System for Assessing Bone Marrow Stromal Cell Differentiation on PLGA Scaffolds for Bone Repair. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018 Nov 15;6:161.
- [74] Fan H, Liu H, Toh SL, Goh JC. Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with ligament fibroblasts on gelatin/silk fibroin hybrid scaffold. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(8):1017-27.
- [75] 苏雪莲, 包广洁, 康宏, 等. 山羊骨髓间充质干细胞向纤维软骨分化的形态学改变[J]. *中国组织工程研究*, 2014 (6) : 860-865.
- [76] Abou Neel E A, Chrzanowski W, Salih V M, et al. Tissue engineering indentistry[J]. *Journal of Dentistry*, 2014, 42(8):915-28.
- [77] Vapniarsky N, Huwe LW, Arzi B, Houghton MK, Wong ME, Wilson JW, Hatcher DC, Hu JC, Athanasiou KA. Tissue engineering toward temporomandibular joint disc regeneration. *Sci Transl Med*. 2018 Jun 20;10(446).
- [78] Saeed WS, Al-Odayni AB, Alrahlah A, Alghamdi AA, Aouak T. Preparation and Characterization of Poly(δ -Valerolactone)/TiO(2) Nanohybrid Material with Pores Interconnected for Potential Use in Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2019 Feb 10;12(3).
- [79] Wang F, Hu Y, He D, Zhou G, Ellis E 3rd. Scaffold-free cartilage cell sheet combined with bone-phase BMSCs-scaffold regenerate osteochondral construct in mini-pig model. *Am J Transl Res*. 2018 Oct 15;10(10):2997-3010.
- [80] Bailey MM, Wang L, Bode CJ, Mitchell KE, Detamore MS. A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage. *Tissue Eng*. 2007 Aug;13(8):2003-10.

- [81] Hagandora CK, Gao J, Wang Y, Almarza AJ. Poly (glycerol sebacate): a novel scaffold material for temporomandibular joint disc engineering. *Tissue Eng Part A*. 2013 Mar;19(5-6):729-37.
- [82] Springer IN, Fleiner B, Jepsen S, Açı Y. Culture of cells gained from temporomandibular joint cartilage on non-absorbable scaffolds. *Biomaterials*. 2001 Sep;22(18):2569-77.
- [83] Scheller EL, Villa-Diaz LG, Krebsbach PH. Gene therapy: implications for craniofacial regeneration. *J Craniofac Surg*. 2012 Jan;23(1):333-7.
- [84] Bousnaki M, Bakopoulou A, Papadogianni D, Barkoula NM, Alpantaki K, Kritis A, Chatzinikolaidou M, Koidis P. Fibro/chondrogenic differentiation of dental stem cells into chitosan/alginate scaffolds towards temporomandibular joint disc regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Jun 26;29(7):97.
- [85] 钟妮, 包广洁, 李燕梅, 吕玮, 张文霞, 赵红斌, 康宏. PGS/PLLA 共纺膜片的降解性能及生物相容性研究[J/OL]. *口腔医学研究*, 2016, 32 (05) :427-431.
- [86] Almarza A J, Athanasiou K A. Seeding techniques and scaffolding choice for tissue engineering of the temporomandibular joint disk[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2004, 10(12):1787-1795.
- [87] 康宏, 李振强, 闭艳姐. 自组装山羊颞下颌关节盘组织工程纤维软骨模型的构建[J]. *华西口腔医学杂志*, 2011, 29 (03) :314-317.
- [88] Brown BN, Chung WL, Pavlick M, Reppas S, Ochs MW, Russell AJ, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive template for temporomandibular joint meniscus reconstruction: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Dec;69(12):e488-505.
- [89] 王春晖. 静电纺纤维负载共培养细胞膜片构建组织工程关节盘的实验研究[D]. 吉林大学, 2016.
- [90] Murphy MK, MacBarb RF, Wong ME, Athanasiou KA. Temporomandibular disorders: a review of etiology, clinical management, and tissue engineering strategies. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013 Nov-Dec;28(6):e393-414.
- [91] Ju HW, Sheikh FA, Moon BM, Park HJ, Lee OJ, Kim JH, Eun JJ, Khang G, Park CH. Fabrication of poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds containing silk fibroin scaffolds for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Aug;102(8):2713-24.
- [92] 苏雪莲. 骨髓间充质干细胞体外诱导山羊 TMJ 关节盘细胞的实验研究[D]. 兰州大学, 2010.
- [93] Wang YL, Li XJ, Qin RF, Lei DL, Liu YP, Wu GY, Zhang YJ, Yan-Jin, Wang DZ, Hu KJ. Matrix metalloproteinase and its inhibitor in temporomandibular jointosteoarthritis after indirect trauma in young goats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Apr;46(3):192-197.
- [94] 舒维娜, 康宏, 张卫平, 李欣, 包广洁. 山羊颞下颌关节盘细胞类型及分布表征在组织构建中的设计意义[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13 (46) :9022-9026.
- [95] Zaki AA, Zaghloul M, Helal ME, Mansour NA, Grawish ME. Impact of Autologous Bone With the Arthritic Temporomandibular Joint: An Experimental Study in Rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Dec;75(12):2529-2539.
- [96] Ahtiainen K, Mauno J, Ellä V, Hagström J, Lindqvist C, Miettinen S, Ylikomi T, Kellomäki M, rabbit temporomandibular joint disc. *J R Soc Interface*. 2013 May 29;10(85):20130287.

- [97] Wang CH, Wang S, Zhang B, Zhang XY, Tong XJ, Peng HM, Han XZ, Liu C. Layering Poly (lactic-co-glycolic acid)-based electrospun membranes and co-culture cell sheets for engineering temporomandibular joint disc. *J Biol Regul Homeost Agents*.2018 Jan-Feb;32(1):55-61.
- [98] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43.
- [99] Bärnsten F, Schliephake H. Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures. *Int J Oral Sci*. 2016 Dec 16;8(4):223-230.
- [100] Astuya A, Rivera A, Vega-Drake K, Aburto C, Cruzat F, Ulloa V, Caprile T, Gallardo-Rodríguez JJ. Study of the ichthyotoxic microalga *Heterosigma akashiwo* by transcriptional activation of sublethal marker *Hsp70b* in Transwell co-culture assays. *PLoS One*. 2018 Aug 2;13(8):e0201438.
- [101] Ninu AR, Maiti SK, Kumar S, P S, Kritaniya D, Gupta S, Saxena A, Kumar N. Isolation, proliferation, characterization and in vivo osteogenic potential of bone-marrow derived mesenchymal stem cells (rBMSC) in rabbit model. *Indian J Exp Biol*. 2017 Feb;55(2):79-87.
- [102] Beeravolu N, Khan I, McKee C, Dinda S, Thibodeau B, Wilson G, Perez-Cruet M, Bahado-Singh R, Chaudhry GR. Isolation and comparative analysis of potential stem/progenitor cells from different regions of human umbilical cord. *Stem Cell Res*. 2016 May;16(3):696-711.
- [103] Zeng Y, Hu W, Jing P, Chen X, Wang Z, Wang L, Wang Y. The regulation of ginsenoside Rg1 upon aging of bone marrow stromal cell contribute to delaying senescence of bone marrow mononuclear cells (BMNCs). *Life Sci*. 2018 Sep15;209:63-68.
- [104] Huang L, Li M, Li H, Yang C, Cai X. Study of differential properties of fibrochondrocytes and hyaline chondrocytes in growing rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Feb;53(2):187-93.
- [105] Lowe J, Almaraz AJ. A review of in-vitro fibrocartilage tissue engineered therapies with a focus on the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*. 2017 Nov;83:193-201.
- [106] Krüger JP, Hondke S, Lau S, Endres M. Characterization of plasma fibronectin for migration, proliferation and differentiation on human articular chondrocytes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Dec 14.
- [107] Murdoch AD, Hardingham TE, Eyre DR, Fernandes RJ. The development of a mature collagen network in cartilage from human bone marrow stem cells in Transwell culture. *Matrix Biol*. 2016 Mar;50:16-26.
- [108] Zhang ZQ, Wang CS, Yang P, Wang KZ. Mesenchymal Stem Cells Induced by Microencapsulated Chondrocytes on Repairing of Intervertebral Disc Degeneration. *Orthop Surg*. 2018 Nov;10(4):328-336.

- [109] Gago-Fuentes R, Fernández-Puente P, Megias D, Carpintero-Fernández P, Mateos J, Acea B, Fonseca E, Blanco FJ, Mayan MD. Proteomic Analysis of Connexin 43 Reveals Novel Interactors Related to Osteoarthritis. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Jul;14(7):1831-45.
- [110] Zhang X, Sun Y, Wang Z, Huang Z, Li B, Fu J. Up-regulation of connexin-43 expression in bone marrow mesenchymal stem cells plays a crucial role in adhesion and migration of multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. 2015 Jan;56(1):211-8.
- [111] Jin EJ, Lee SY, Jung JC, Bang OS, Kang SS. TGF-beta3 inhibits chondrogenesis of cultured chick leg bud mesenchymal cells via downregulation of connexin 43 and integrin beta4. *J Cell Physiol*. 2008 Feb;214(2):345-53.
- [112] Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Wang HZ, Fonseca E, Caeiro JR, Valiunas V, Brink PR, Mayan MD. Intercellular communication via gap junction channels between chondrocytes and bone cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018Dec;1860(12):2499-2505.

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
AGCs	aggrecans	聚集蛋白聚糖
bFGF	fibroblast growth factor-basic	碱性成纤维细胞生长因子
d	Day	天
DAPI	4,6-diamino-2-phenyl indole	4,6-二氨基-2-苯基吡啶
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FCM	Flow Cytometry	流式细胞术
GAG	glycosmioglycan	糖胺聚糖
h	hour	小时
min	mintue	分钟
NEAA	Non-essential amino acid	非必需氨基酸
OD	Optical density	吸光度
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
rpm	Round per minute	每分钟转速
TMJ	Temporomandibular joint	颞下颌关节
TMJ disc	Temporomandibular joint disc	颞下颌关节盘
TMD	Temporomandibular disorder	颞下颌关节紊乱病
Try	trypsin	胰蛋白酶

在学期间成果

1. Su X, Zhang L, Kang H, Zhang B, Bao G, Wang J. Mechanical, nanomorphological and biological reconstruction of early-stage apoptosis in HeLa cells induced by cytochalasin B. Oncol Rep. 2019 Feb;41(2):928-938.

致 谢

本研究在国家自然科学基金（81660189）和西北民族大学基金（31920170167）的资助下完成。绿树成荫的六月，在和风中即将结束三年的三点一线（实验室、医院、宿舍）式的日子，因为实验的瓶颈期后退无奈过，因为临床给病患解决痛苦开心过。我的导师包广洁教授和康宏教授在实验中给与了从开题的方向、设计，实验进程到论文的撰写、修改的精心指导，两位老师的悉心指导和鼓励支持给了我很大帮助，再次感谢两位老师，在这里衷心的写下“老师，您辛苦”！衷心感谢苏雪莲老师在实验中给与的耐心指导；感谢师姐们在前期探索实验中的指导和帮助；感谢课题组的成员在实验过程中的帮助和支持；感谢兰大口腔医院王静、司庆宗等老师及庞云清师兄在我临床见习中给与的关心与指导；感谢室友们在生活中的欢乐和鼓励；感谢家人在我求学生涯中的支持、鼓励和帮助；感恩父母在我迷茫困惑之际仍旧体贴挂念的关心爱护，愿所有我关心和关心我的亲朋好友们能够永远健康快乐，祝自己乘风破浪，在未来的人生道路中进一步成长，苦笑欢乐中坚定前行。

临床病例 左上后牙牛牙症 RCT 一例

初诊：2018 年 04 月 21 日

基本信息：张某某 男 22 岁

主诉：左上后牙食物嵌塞痛 1 周余。

现病史：1 周前患者左上后牙出现食物嵌塞不适并伴有冷热敏感以及偶有咬物不适，影响进食，前来就诊。

既往史：既往体健，否认高血压史，否认糖尿病，否认心血管疾病等系统疾病，否认艾滋等传染性疾病，否认食物、药物过敏史。

检查：

口 外：两侧面部对称，张口度、张口型正常；

口 内：A. 口腔卫生一般，牙龈色粉红、质韧、未见红肿及出血，牙龈无退缩。B. 26 牙近中邻面大面积龋坏达牙本质深层，龋洞内大量食物残渣，探痛

(+)，叩痛 (+)，冷刺激疼痛明显，牙齿不松动。

数字化 X 线 (RVG) 片示：

26 牙近中邻牙合面低密度阴影近髓，髓腔垂直高度过长，髓室底位于根中 1/3，髓腔在牙颈部异常变窄，牙根短小，根尖区骨质无明显异常 (图 1)。



图 1 26 牙牛牙症 X 线片

诊断：1. 26 牙慢性牙髓炎

2. 26 牙重度牛牙症

治疗计划：1. 26 牙 RCT+冠修复

2. 口腔卫生宣教

处理：26 牙橡皮障下去腐，腐质未净可见露髓孔，4%阿替卡因肾上腺素 (1:1 000 00) 注射液局部浸润麻醉，去冠髓拔根髓，髓腔清理，探及颊舌 3 根管，Pathfile 镍钛器械与 EDTA 凝胶疏通腭根及远颊根管，(近颊须根

管口有堵塞，疏通困难，需要在显微镜下进行疏通)，3%次氯酸钠+0.9%生理盐水交替冲洗根管，隔湿、纸捻干燥，干棉球*1，Ceivitron 暂封。

医嘱：1 为防止充填材料脱落，请治疗期间内不要用患侧进行咀嚼；

2. 如封药后疼痛明显，请及时就诊；如有轻微疼痛不适，属正常现象，一周后复诊。

复诊：2018 年 05 月 05 日

检查：26 牙暂封完好，叩痛（-），牙齿无松动，余未见明显异常。

处置：1、26 牙上橡皮障去除暂封，流体树脂+3M Z350 树脂恢复近中邻面壁，显微镜下疏通近颊根管，并未发现 MB2。测长：腭根 20mm，远中颊根：20mm，近中颊根 18.5mm（均平洞缘），EDTA 凝胶+M3 镍钛器械机扩至 30#04 锥度，3%次氯酸钠+0.9%生理盐水超声荡洗，隔湿、纸捻干燥，根管内封适量氢氧化钙糊剂，干棉球*1，Ceivitron 暂封。

医嘱：1 为防止充填材料脱落，请治疗期间内不要用患侧进行咀嚼；

2. 如封药后疼痛明显，请及时就诊；如有轻微疼痛不适，属正常现象，一周后复诊。



图 2 26 牙初尖锉 X 线片影像

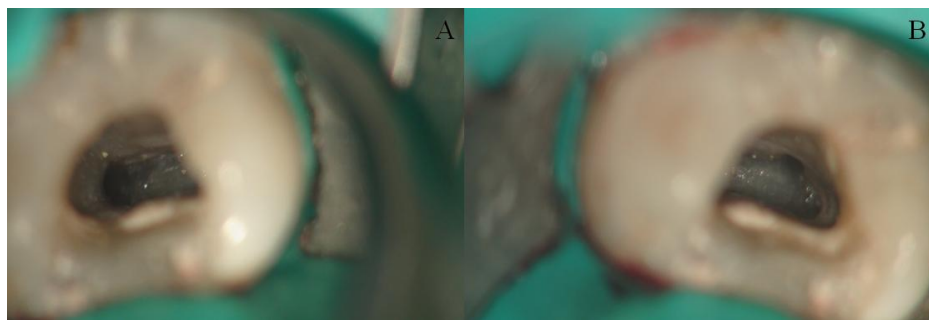


图 3 26 牙根管口显微影像
A. 腭根根管口 B. 近、远颊根根管口

复诊：2018 年 05 月 17 日

检查：26 牙暂封完好，叩痛（-），牙龈未见明显异常。

处置：26 牙上橡皮障去除暂封，3%次氯酸钠+0.9%生理盐水超声荡洗 3 根管，隔湿、干燥，iRoot-SP 根充糊剂+30#04 锥度的热牙胶尖垂直加压充填 3 个根管，X-ray 示：26 牙根充可。全酸蚀+3M Z350 树脂充填，调牙合、抛光。

医嘱：1. 术后轻微疼痛属正常，可自行缓解；

2. 1 周后无症状，建议行嵌体修复；

3. 3 月后复诊，不适随诊



图 4 26 牙根充后 X 线影像

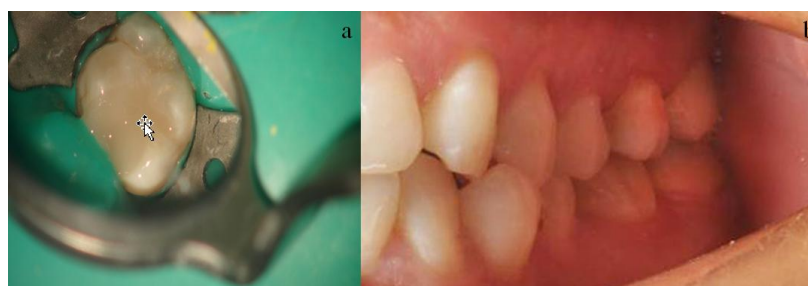


图 5 26 牙术后充填照
a. 牙合面观 b. 侧面观

二. 讨论

1. 临床上诊断牛牙症的依据。需要临床检查+X 线片辅助诊断, 根据牛牙症指数范围判断牛牙样牙的轻中重程度分型。

2. ①该类牙髓室底较低因此开髓揭顶一定要完全, 开髓揭顶的安全做法是: 高速手机将髓腔打开, 低速手机进行髓室揭顶。治疗时可能有较多出血会误认为出现底穿或者侧穿, 为了安全起见, 可以根据拍摄的 X 线片先测量出整个髓腔的高度, 然后进行开髓。②由于髓腔大因此牙髓组织较多, 要在后续治疗之前用 3%次氯酸钠辅助超声荡洗充分去除坏死牙髓组织, 防止根管阻塞。③在治疗中根管口到根尖孔要形成一定锥度, 有利于冲洗, 充填以及感染物的清除, 建议根充之前可以再次机扩根管, 去除可能仍然存在的玷污层等。④充分运用根管显微镜要, 手术前、手术中、手术后的 X 线片应清晰、详细。⑤根充过程中一定要做好根管的干燥、隔湿两步骤。

3. 牛牙症的冠修复治疗。牛牙样牙的牙髓还是根尖周病, 基本治疗方法就是根管治疗法。对于牙体缺损较多的牛牙样牙, 由于其髓腔大而深, 因此不能选择桩冠修复, 建议用嵌体修复可能效果较好。