

运动训练对静电纺丝荷载间充质干细胞 修复大鼠软骨损伤的影响

仝敬平

(河南师范大学 体育学院,河南 新乡 453007)

摘要:[目的]研究有氧运动训练在荷载有脂肪充质干细胞(ADSCs)的纳米静电纺丝材料修复大鼠关节软骨损伤中的作用与影响.[方法]分离培养大鼠 ADSCs,体外扩增,流式鉴定,荷载于聚碳酸亚丙酯/聚己内酯/左旋聚乳酸-磷酸四钙(PPC/PCL/g-TTCP)纳米静电纺丝载体上,植入到大鼠膝关节软骨缺损处.实验大鼠随机分为 2 组:1)正常对照组;2)运动训练组.训练组采用中等强度的水平跑台运动(12 m/min 的速度,持续 30 min),术后第 3 周开始训练,每周训练 5 d,每天训练 2 次,训练 8 周后,对修复组织进行苏木素-伊红(HE)和 II 型胶原等染色和组织学检查,采用 Wakitani 评分系统进行软骨修复评分,采用 Graphpad Prism 6.01 进行统计分析.[结果]PPC/PCL/g-TTCP 与大鼠 ADSCs 具有很好的相容性,可以成功荷载和诱导成骨分化;在运动训练组的关节软骨修复评分指标中,细胞形态,基质染色强度,表面规整度,修复软骨相对厚度以及移植与宿主整合度 5 项指标评分均显著优于对照组;II 型胶原和 HE 染色显示运动训练组软骨细胞增生明显,II 型胶原阳性细胞占比显著提高.[结论]中强度运动训练可以显著提高荷载 ADSCs 的纳米静电纺丝对大鼠关节软骨损伤的修复水平.

关键词:有氧运动;软骨损伤;软骨修复;间充质干细胞;静电纺丝

中图分类号:G804.53

文献标志码:A

膝关节软骨损伤是运动创伤领域的常见病和多发病^[1].软骨损伤后若得不到有效处理,可能会进一步发展为骨关节炎,导致膝关节功能丧失^[1-2].另外,膝关节软骨磨损,又称膝关节退行性病变、骨关节炎、老年性关节炎等,是常见的慢性、进展性关节疾病.虽然此病进展缓慢,但最后都会转归为膝关节行走功能丧失^[3].病人十分痛苦.

关节软骨是一种特殊的结缔组织,由软骨细胞及软骨基质组成,没有血管、淋巴管及神经,营养主要来自关节腔内的滑液和软骨下血管.所以,人体软骨自我修复能力本身就非常差,并且随着年龄的增长而迅速降低^[4].至今,软骨的损伤修复,仍是医学界的一个难题,临床上缺乏有效的治疗方案.目前临床外科所采用的软骨钻孔、微骨折等通过人为制造微损伤诱导骨再生的手段,临床效果并不理想^[5].

近些年,干细胞和组织工程技术领域发展迅速,为骨和软骨缺损的治疗提供了新的途径.在骨修复领域,间充质干细胞(MSCs)具有良好的骨和软骨诱导分化潜能,是目前研究最多的用于骨修复研究的干细胞^[6-8].常见的用于组织修复的间充质干细胞主要包括胎盘间充质干细胞(PDSCs),脐血间充质干细胞(UCMSCs),骨髓间充质干细胞(BMSCs),以及脂肪来源的间充质干细胞(ADSCs).其中 PDSCs 和 UCMSCs 自体来源受限,多由异体提供,存在免疫排斥风险.BMSCs 则取材不便,患者依从性差.所以,ADSCs 由于来源丰富,取材方便,扩增能力强和多向诱导分化潜能等优点,近年来逐渐成为组织工程领域的研究热点^[8-9].

由于关节腔的特殊构造,单纯的干细胞悬液原位注射容易弥散,难以达到对缺损部位的精确修复.近些年,三维支架领域发展迅速,如 PLGA 目前已经获 FDA 批准是可以用于人体组织工程的支架材料^[10].其中,采用静电纺织技术可以制备具有机械性能良好,组织相容性好,可控降解的三维组织工程支架,通过荷载 MSCs 在骨和软骨缺损修复中显示了很好的应用前景^[11].

已有研究表明,适当的运动康复训练可以显著促进骨损伤的修复过程^[12-16].然而,对于运动训练在三维支架荷载间充质干细胞修复软骨损伤中的作用和影响,尚无报道.本研究通过建立大鼠关节软骨损伤模型,评价中等强度跑台运动对荷载有 ADSCs 的纳米静电纺丝材料在软骨损伤修复的作用与影响.本文可为使用干细胞进行骨修复过程中的康复训练提供实验基础.

收稿日期:2019-03-20;**修回日期:**2019-08-03.

基金项目:国家自然科学基金(81803075)

作者简介(通信作者):仝敬平(1979—),男,河南新乡人,河南师范大学讲师,研究方向为运动训练和运动损伤修复,
E-mail:tongjingping@126.com.

1 材料与方法

1.1 实验材料

8周龄的雄性 Wistar 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,大鼠平均体质量为 (192.3 ± 7.1) g.该实验获得河南师范大学动物伦理委员会批准开展.

1.2 实验方法

1.2.1 纳米静电纺丝支架的制备

纳米静电纺丝的制备参照 Wang 等的研究方法,并做简单改动^[17].将聚碳酸亚丙酯(polypropylene carbonate,PPC,购自河南天冠公司),聚己内酯(poly ϵ -caprolactone,PCL,购自 Sigma)和左旋聚乳酸-磷酸四钙(poly L-lactic acid-grafted tetracalcium phosphate,g-TTTP,购自中国 Ensail 公司)3种成分按照 7:2:1 的比例过夜溶解于二氯甲烷中(6%).PPC/PCL/g-TTTP 混悬液通过注射器(BD,USA)和注射泵(Smiths Medical Instrument,Zhejiang),并在喷嘴尖端施加 18 kV 电压(北京高电压技术研究所),以 5 mL/h 的速度在恒温(20 °C)恒湿(40%)的环境下持续喷射在旋转收集器上.获得的纳米静电纺丝在真空箱中放置 48 h 以除去溶剂残留物,修剪成一定的形状后采用环氧乙烷灭菌待用.

1.2.2 大鼠 ADSCs 的分离与鉴定

大鼠 ADSCs 的分离大鼠脂肪间充质干细胞的分离和鉴定参考 XU 等人的研究^[18],并略作修改.无菌条件下,分离大鼠腹股沟脂肪垫,并于 PBS 中清洗 3 次,剪碎后用 0.1% 的 I 型胶原酶(购自 Gibco 公司)37 °C 消化 1 h.然后添加等体积的无血清 DMEM-LG 培养基(Gibco)稀释,并采用 100 μ m 孔径的尼龙滤网(BD Falcon)过滤除去大的团块.离心收集滤液中的细胞,DMEM-LG 重悬清洗后再离心,最后将收集的细胞重悬于 10% FBS 的 DMEM-LG 培养基中(添加 100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素,购自 Gibco),37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养.第 2 天换液除去非贴壁的细胞,细胞 80% 满时进行传代.

大鼠 ADSCs 的鉴定收集分离后第 3 代的 ADSCs 用于流式分析. 1×10^6 的 ADSCs 经过预冷的 PBS 清洗后,与不同荧光标记的抗体(anti-rat CD45-PECy5,anti-rat CD31-PE,anti-rat CD44H-FITC,anti-rat CD105-FITC 和 anti-rat CD29-FITC 均购自 Biolegend 公司)于 4 °C 分别进行染色 30 min.预冷 PBS 清洗 2 次之后,进行流式分析(BD Biosciences,US).

1.2.3 纳米纤维荷载 ADSCs 以及成骨诱导分化

大鼠 ADSCs 在纳米纤维支架的荷载与成骨诱导分化纳米纤维支架经过环氧乙烷灭菌后,铺于 6 孔板底部.分离培养的第 4 代 ADSCs,胰酶消化后, 2×10^5 的细胞种均匀滴加在铺有纤维支架的 6 孔板中.CM-Dil 和香豆素荧光染料分别染 ADSCs 和纳米纤维,用于荧光显微镜观察拍照.成骨诱导分化实验是将 DMEM-LG 培养的 ADSCs,换成成骨诱导培养基(DMEM-HG,10% FBS,添加 0.1 μ Mol dexamethasone,10 mMol b-glycerolphosphate 和 50 mg/L ascorbate-2,培养基和血清购自 Gibco,其他购自 Sigma,USA),1 周换 2 次诱导培养基,2 周后,4% 多聚甲醛固定后,进行茜素红(购自 Sigma,USA)染色分析.

1.2.4 软骨损伤模型制备

大鼠的麻醉采用吸入异氟醚然后注射戊巴比妥(1 mL/kg,购自美国 Sigma).于大鼠两膝关节的内侧髌骨旁切开,推髌骨错位暴露股骨沟,使用活检穿孔器在股骨沟中心制造直径 1.5 mm,深度达软骨下骨(约 3 mm).然后将荷载有 ADSCs 的静电纺丝材料填入软骨缺损处,缝合关节囊和皮肤切口.术后不输注抗生素,膝关节也不予以制动,放回饲养笼中自由活动.术后每日观察手术切口,观察愈合情况以及是否存在感染现象.

1.2.5 运动训练方案

大鼠饲养在 SPF 级动物房,饲养室温度保持在 20~25 °C,相对湿度为 50%~65%,采用 12 h 光照和 12 h 黑暗的昼夜光变化周期.

实验鼠术后于笼中自由活动,观察 2 周,剔除感染和活动异常鼠.术后第 3 周开始训练,实验大鼠随机分为 2 组:1)自由活动对照组;2)运动训练组,每组 10 只.训练组采用中等强度的水平跑台运动(12 m/min 的速度,持续 30 min)^[12].小动物跑台购自安徽正华生物仪器设备有限公司.每周训练 5 d,每天训练 2 次,训练 8 周后,处死实验鼠,进行软骨修复的组织学评估.软骨的修复评估采用 Wakitani 软骨修复评分系统^[19].

1.2.6 免疫组化与免疫荧光分析

剥离含缺损处的股骨于 4% 多聚甲醛中固定过夜,并于 10% EDTA 中脱钙后进行石蜡包埋和切片.石蜡切片经过脱蜡,0.3% 过氧化氢阻断内源过氧化物酶活性,1% 透明质酸酶(Sigma,USA)常温处理 1 h,PBS 漂洗后用 2% 山羊血清常温处理 1 h,之后可以进行 Hematoxylin-eosin(HE)等各种组织化学染色.Ⅱ型胶原酶的免疫荧光染色使用能够识别大鼠 Collagen II 的小鼠单克隆抗体(2B1.5,1:200,Thermo,USA),4 °C 孵育过夜,PBS 清洗 2 次后,使用 Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(1:500,碧云天生物技术有限公司,A0521)常温孵育 1 h,DAPI 染色并 PBS 清洗后,于正置荧光显微镜拍照统计(蔡司,德国).

1.2.7 统计分析

Wakitani 软骨修复评分和Ⅱ型胶原 IHC 染色定量分析统计采用 Mann-Whitney 检验,分析软件和绘图采用 Graphpad

prism 6.0, $P < 0.05$, 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ADSCs 表面标志物的流式鉴定分析

脂肪组织分离的间充质干细胞经过体外 3 代传代, 细胞形态基本全部呈典型的间充质干细胞形态。此时, 通过流式细胞仪分析 CD44, CD105 和 CD29 典型的间充质干细胞表面标志物表达情况。这 3 个标志物在分离的 ADSCs 中均呈阳性, 表明这些 ADSCs 为典型的间充质干细胞(MSCs)。而造血干细胞标志物 CD45 和内皮细胞标志物 CD31 为阴性, 表明不存在造血和内皮细胞的污染(图 1)。

2.2 纳米静电纺丝荷载 ADSCs 及成骨诱导分化

图 2(a)显示的是 PPC/PCL/g-TTCP 纳米静电纺丝的电镜图。可以看到这 3 种成分的混合物可以成功纺出均匀的纳米纺丝。在成骨诱导培养基中诱导 2 周后, 通过茜素红染色证明, ADSCs 在二维培养皿和 PPC/PCL/g-TTCP 纳米静电纺丝上均可以向成骨细胞分化(图 2(b))。进一步通过荧光染料 CM-Dil 和香豆素分别对 ADSCs 和纳米纤维染色, 可以看到 PPC/PCL/g-TTCP 纳米静电纺丝与 ADSCs 具有很好的生物相容性, 该静电纺丝支架能够荷载 ADSCs。

2.3 通过 Wakitani 软骨修复评分系统评估运动训练对荷载 ADSCs 的纳米静电纺丝对大鼠关节软骨损伤的修复情况

大鼠膝关节软骨缺损造模并植入荷载 ADSCs 的 PPC/PCL/g-TTCP 纳米静电纺丝, 术后恢复观察 2 周, 第 3 周开始训练, 训练 8 周后, 对修复组织进行各种染色和组织学检查, 并采用 Wakitani 评分系统对运动组和对照组大鼠膝关节软骨损伤处进行打分评估和统计分析。如图 3 所示, 与自由活动的正常对照组相比, 运动训练组大鼠软骨损伤在细胞形态, 基质染色强度, 表面平整度, 修复软骨相对厚度, 与相邻软骨组织整合度等全部 5 个参数均得到了修复和改善, 其中细胞形态, 修复软骨相对厚度以及相邻组织整合度 3 个参数达到了非常显著的水平($P < 0.01$)。Wakitani 总评分也显示与对照组相比, 运动训练组大鼠膝关节软骨损伤修复得到了非常显著水平的改善($P < 0.01$)。

2.4 通过 II 型胶原染色分析评估运动训练对荷载 ADSCs 的纳米静电纺丝对大鼠关节软骨损伤的修复情况

通过对软骨组织特异表达的 II 型胶原进行免疫荧光染色, 分析运动训练对软骨损伤再生修复的影响。如图 4(a-c)所示, 运动训练组大鼠膝关节软骨损伤处的 II 型胶原表达量显著高于正常对照组, 统计达到极显著水平($P < 0.001$)。进一步通过 HE 染色, 可以看到正常对照组软骨损伤依然明显, 而运动训练组软骨损伤处得到了明显的修复, 成串生长的软骨细胞清晰可见, 见图 4(d)。

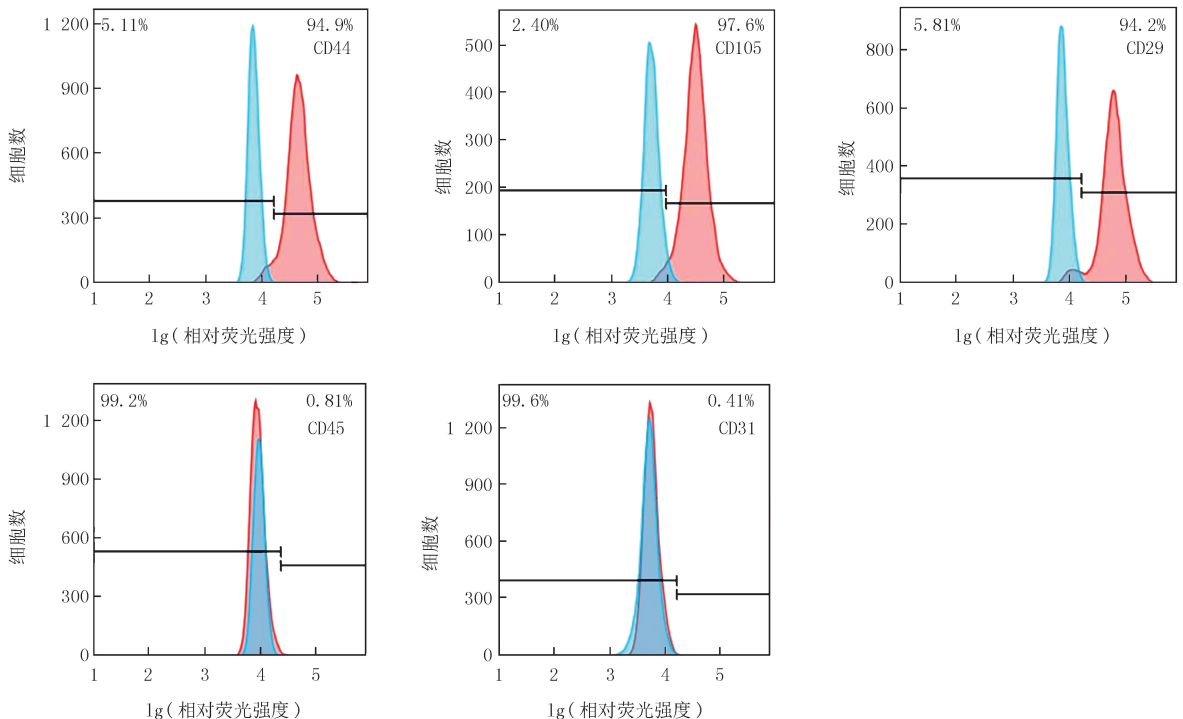
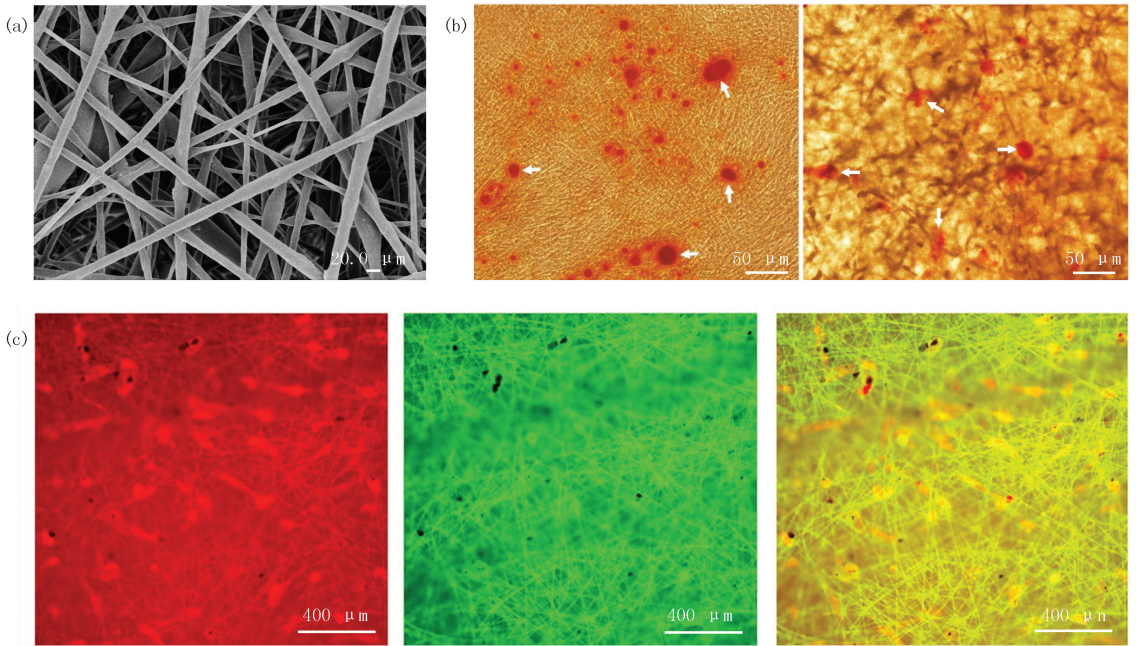


图 1 大鼠脂肪间充质干细胞表面标志物的流式分析

Fig. 1 Flowcytometry analysis of the surface markers on rat ADSCs



(a) 纳米静电纺丝电镜图;(b)ADSCs在二维培养皿(左图)及三维纳米静电纺丝(右图)中的成骨诱导分化,箭头代表茜素红(Alizarin Red)染色阳性的细胞;(c)纳米静电纺丝荷载ADSCs的荧光图,CM-DiI将ADSCs染上红色荧光(左图),香豆素将纳米纤维染上绿色荧光(中图),右图为拼合在一起的荧光图。

图2 纳米静电纺丝荷载ADSCs及成骨分化

Fig.2 Proliferation and osteogenic differentiation of ADSCs on electrospun nanofiber

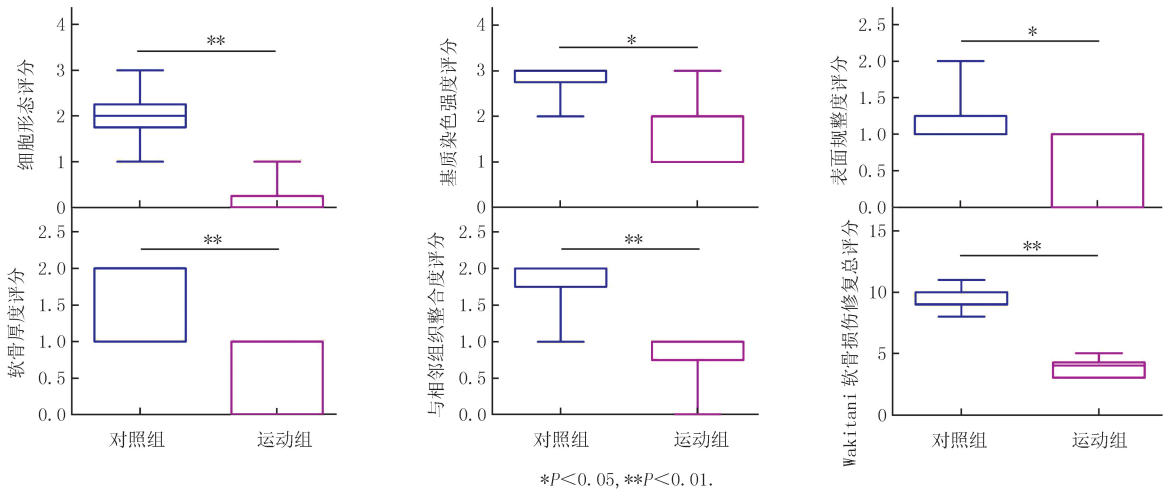


图3 Wakitani 软骨修复评分

Fig.3 Wakitani cartilage repair score

3 讨论

膝关节承载在身体的大部分重量,是运动损伤的重灾区^[20-22],随着年龄增长,关节损伤的自我修复能力迅速变差;随着世界人口平均寿命的延长,骨关节退行性病变得高发,如何对损伤的软骨进行有效修复,是全世界医药工作者难题^[4-5].近年,关于运动训练在恶性肿瘤、肥胖、运动功能障碍等诸多常见疾病的预防与治疗中的作用和功能越来越受到人们的重视^[23-26].相比运动训练在其他疾病缓解中的积极作用,运动在软骨损伤再生,退行性骨关节炎等关节损伤修复中的作用和功能情况相对复杂,有研究通过动物实验表明,过量的运动可以造成膝关节损伤和软骨退化^[27-28].ECKSTAIN 等通过对人体试验的数据研究颇有借鉴意义,如术后运动受限或瘫痪的病人,关节软骨会发生退行性变薄,然而过多的运动,如一些优秀运动员,其修复

软骨相对厚度比正常人并没有显著增厚^[29].另外,在对运动对自体软骨移植再生的临床试验研究中,研究者发现术后一定时间后适当运动训练可以显著提高受试者软骨再生水平^[16].总的来说,至今绝大部分动物实验及人体临床试验研究结果均表明,适当运动训练对软骨损伤修复具有积极的促进作用,所以本文采用中等强度的运动训练,在大鼠动物模型中证明其对纳米纤维荷载间充质干细胞在软骨损伤修复中的积极作用.

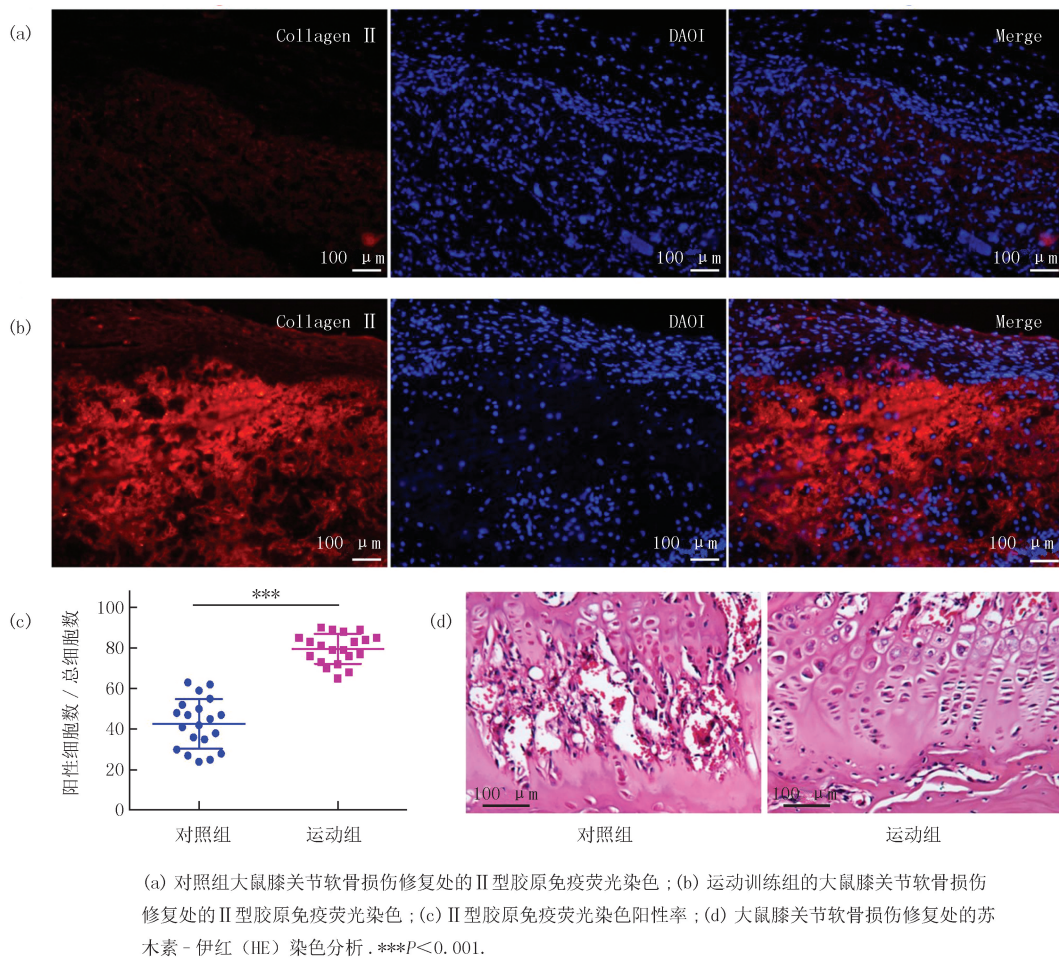


图 4 软骨损伤修复的组织学染色

Fig. 4 Histological staining of cartilage repair

软骨由于其自身结构的原因,自我修复能力很差,仅靠运动训练,对于关节损伤严重的患者,很难取得理想的效果.目前除了自体软骨移植手术,利用自体或异体 MSCs 辅助修复软骨损伤的研究非常多^[6-8].其中胎盘和脐血来源 MSCs 一般是异体来源,存在潜在的免疫排斥反应,用于软骨修复的研究较少. BMSCs 来源于骨髓,具有较好的成骨细胞生长因子分泌能力和再分化能力,在许多动物实验甚至人体临床试验中, BMSCs 在骨关节损伤修复中显示了一定的积极作用和潜在临床应用前景^[30-31].但是, BMSCs 临床取材非常不方便,患者依从性不好.为了克服这些困难,近些年研究者青睐于取材方便的自体 ADSCs 用于多种机体的损伤修复研究^[8-9].本研究分离大鼠自身的 ADSCs 用于软骨修复实验.结果表明,流式鉴定 MSCs 表面标志物阳性,内皮及造血干细胞标志物阴性,体外成骨细胞诱导分化实验也证明其完全具备成骨分化能力,提示 ADSCs 具有很好的临床应用转化潜能.

本研究采用的实验动物模型为小鼠.因为小鼠实验操作方便,所以是目前研究运动训练与关节损伤修复领域采用最多的动物模型.但是,小鼠属于啮齿类动物,其关节损伤修复与人类相比有很大差异.大体型动物,比如格犬、小型猪等,相比小鼠虽然操作难度大,但更适合做关节损伤修复的机理研究^[32].进一步采用大体型动物研究运动训练和三维支架荷载的干细胞对软骨损伤修复的作用及分子机理,是非常有必要的.

随着近些年组织工程的迅猛发展,水凝胶、纳米微球与胶束、纳米纤维、脱细胞支架、3D 打印生物相容性支架等名目繁多的概念与技术层出不穷,使组织再生与修复从 2D 时代进入了 3D 时代^[33-35].各种支架用于骨修复的研究也已经开展了很多.与 MSCs 直接注射相比,三维支架荷载的 MSCs 显示更好的再生修复效果和更广阔的应用前景^[35-37].采用各种可降解生物相容性纳米静电纺丝生产组织三维支架,近些年来发展很快,已有多篇研究表明其能够荷载 MSCs 用于骨损伤修复^[17,38-39].三

维支架荷载的细胞与传统 2D 培养的细胞具有很大差异,而三维支架荷载的 MSCs 与直接注射的 MSCs 在骨关节腔中的分布与修复作用同样具有较大差异。目前,尚未有运动训练对三维支架荷载的 MSCs 在软骨修复中的作用的研究报道。Yamaguchi 等人研究了中等强度运动在关节腔直接注射 MSCs 修复大鼠关节损伤中的作用,结果显示运动训练可以促进 II 型胶原分泌, Wakitani 总评分达到了显著改善,但是在 5 个评分指标中,只有 2 个(细胞形态和基质染色强度)达到了显著改善水平,另外 3 个差异统计学水平不显著^[40]。本研究比较了中等强度运动训练对纳米纤维荷载间充质干细胞对大鼠软骨损伤的修复效果。运动训练可以促进 II 型胶原分泌, Wakitani 总评分及所有 5 个评分指标均达到了显著水平的改善。与关节腔直接注射相比,三维支架荷载 MSCs 对关节软骨的损伤具有更显著的修复效果,而运动训练则可以进一步促进注射或三维支架荷载的 MSCs 在关节软骨损伤修复。

4 结 论

1) PPC/PCL/g-TTCP 与大鼠 ADSCs 具有很好的相容性,可以成功荷载和诱导成骨分化;2) 中强度运动训练组在细胞形态,基质染色强度,表面规整度,修复软骨相对厚度,移植物与宿主整合度全部 5 项 Wakitani 评分指标均显著优于对照组;3) 运动训练组关节软骨损伤处 II 型胶原阳性细胞占比提高,串状软骨细胞再生明显。说明中强度运动训练可以提高荷载有 AD-SCs 的纳米静电纺丝对大鼠关节软骨损伤的修复水平。

参 考 文 献

- [1] TAKEDA H, NAKAGAWA T, NAKAMURA K, et al. Prevention and management of knee osteoarthritis and knee cartilage injury in sports[J]. *Br J Sports Med*, 2011, 45(4): 304-309.
- [2] ARØEN A, LØKEN S, HEIR S, et al. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies[J]. *Am J Sports Med*, 2004, 32(1): 211-215.
- [3] FELSON D T, ZHANG Y, HANNAN M T, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study[J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38(10): 1500-1505.
- [4] FELSON D T, NAIMARK A, ANDERSON J, et al. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study[J]. *Arthritis Rheum*, 1987, 30(8): 914-918.
- [5] CHIANG H, JIANG C C. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives[J]. *Formos Med Assoc*, 2009, 108(2): 87-101.
- [6] BRUDER S P, FINK D J, CAPLAN A I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy[J]. *Cell Biochem*, 1994, 56(3): 283-294.
- [7] LEE W Y, WANG B. Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives[J]. *Orthop Translat*, 2017, 9: 76-88.
- [8] GUPTA P K, DAS A K, CHULLIKANA A, et al. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3(4): 25.
- [9] KONNO M, HAMABE A, HASEGAWA S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine[J]. *Dev Growth Differ*, 2013, 55(3): 309-318.
- [10] MAKADIA H K, SIEGEL S J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier[J]. *Polymers (Basel)*, 2011, 3(3): 1377-1397.
- [11] SHAFIEE A, SOLEIMANI M, CHAMHEIDARI G A, et al. Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 99(3): 467-478.
- [12] SONG J Q, DONG F, LI X, et al. Effect of treadmill exercise timing on repair of full-thickness defects of articular cartilage by bone-derived mesenchymal stem cells: an experimental investigation in rats[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 90858.
- [13] RUEFF-BARROSO C R, MILAGRES D, DO VALLE J, et al. Bone healing in rats submitted to weight-bearing and non-weight-bearing exercises[J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14(11): BR231-236.
- [14] MUSUMECI G, CASTROGIOVANNI P, TROVATO F M, et al. Physical activity ameliorates cartilage degeneration in a rat model of aging: a study on lubricin expression[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2015, 25(2): e222-230.
- [15] GALOIS L, ETIENNE S, GROSSIN L, et al. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(10): 779-786.
- [16] ECKSTEIN F, HUDELMAIER M, PUTZ R. The effects of exercise on human articular cartilage[J]. *J Anat*, 2006, 208(4): 491-512.
- [17] WANG Y, DENG J, FAN R, et al. Novel nanoscale topography on poly(propylene carbonate)/poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers modifies osteogenic capacity of ADCs[J]. *RSC Adv*, 2015, 5: 82834-82844.
- [18] XU F, LIU J, DENG J, et al. Rapid and high-efficiency generation of mature functional hepatocyte-like cells from adipose-derived stem cells by a three-step protocol[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 193.
- [19] WAKITANI S, GOTO T, PINEDA S J, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage[J]. *Bone Joint Surg Am*, 1994, 76(4): 579-592.

- [20] 张钢林,黄涛,李新建.我国优秀武术散打运动员膝关节损伤调查与分析[J].北京体育大学学报,2010,33(6):51-53.
ZHANG G L,HUANG T,LI X J.Investigation and Analysis of Knee Joint Injury in Outstanding Wushu Sanshou Athletes of China[J].
Journal of Beijing Sport University,2010,33(6):51-53.
- [21] 王煜,张葆欣,王方,等.中国女子足球运动员膝关节运动损伤调查及预防对策[J].北京体育大学学报,2005,28(10):1362-1366.
WANG Y,ZHANG B X,WANG F,MAO J,HUANG Q.Survey and Preventive Strategy on Chinese Woman Football Players'Knee Joints
Sport Injury[J].Journal of Beijing Sport University,2005,28(10):1362-1366.
- [22] 刘明辉.我国优秀蛙泳运动员膝关节损伤的研究分析[J].北京体育大学学报,1998,21(4):36-39.
LIU M H.Study on Knee Joint Injuries in Chinese Elite Frog Stroke Swimmers[J].Journal of Beijing Sport University,1998,21(4):36-39.
- [23] PEDERSEN L, IDORN M, OLOFSSON G H, et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution[J]. Cell Metab, 2016, 23(3): 554-562.
- [24] BARRA N G, FAN I Y, GILLEN J B, et al. High Intensity Interval Training Increases Natural Killer Cell Number and Function in Obese Breast Cancer-challenged Mice and Obese Women[J]. Cancer Prev, 2017, 22(4): 260-266.
- [25] 苏坤霞.运动训练联合奥利司他对肥胖小鼠减肥及运动能力的影响[J].河南师范大学学报(自然科学版),2018,46(2):89-94.
SU K X.Effects of exercise training and orlistat on the weight loss and exercise capacity of obese mice[J].Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition),2018,46(2):89-94.
- [26] 吴雪萍,闻一鸣,孟杰.坐位振动训练对下肢运动功能障碍者平衡功能的影响[J].河南师范大学学报(自然科学版),2017,45(4):118-124.
WU X P,WEN Y M,MENG J.Seat Vibration training's Effects of Balance Ability on Patients with Lower Limb Motor Dysfunction[J].
Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition),2017,45(4):118-124.
- [27] BECKETT J, JIN W, SCHULTZ M, et al. Excessive running induces cartilage degeneration in knee joints and alters gait of rats[J]. Orthop Res, 2012, 30(10): 1604-1610.
- [28] SIEBELT M, GROEN H C, KOELEWIJN S J, et al. Increased physical activity severely induces osteoarthritic changes in knee joints with papain induced sulfate-glycosaminoglycan depleted cartilage[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(1): R32.
- [29] KREUZ P C, STEINWACHS M, ERGGELET C, et al. Importance of sports in cartilage regeneration after autologous chondrocyte implantation: a prospective study with a 3-year follow-up[J]. Am J Sports Med, 2007, 35(8): 1261-1268.
- [30] BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications[J]. Stem Cells, 2001, 19(3): 180-92.
- [31] WAKITANI S, OKABE T, HORIBE S, et al. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months[J]. Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(2): 146-150.
- [32] CHU C R, SZCZODRY M, BRUNO S. Animal models for cartilage regeneration and repair[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2010, 16(1): 105-115.
- [33] CHEN C, BANG S, CHO Y, et al. Research trends in biomimetic medical materials for tissue engineering: 3D bioprinting, surface modification, nano/micro-technology and clinical aspects in tissue engineering of cartilage and bone[J]. Biomater Res, 2016, 20: 10.
- [34] LI W, TULI R, HUANG X, et al. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold[J]. Biomaterials, 2005, 26(25): 5158-5166.
- [35] MORA-BOZA A, LOPEZ-DONAIRE M L. Preparation of Polymeric and Composite Scaffolds by 3D Bioprinting[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1058: 221-245.
- [36] YI H, UR REHMAN F, ZHAO C, et al. Recent advances in nano scaffolds for bone repair[J]. Bone Res, 2016(4): 16050.
- [37] WEI Y, HU H, WANG H, et al. Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA[J]. Cell Transplant, 2009, 18(2): 159-170.
- [38] LI W J, LAURENCIN C T, CATERSON E J, et al. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering[J]. Biomed Mater Res, 2002, 60(4): 613-621.
- [39] CHEN W, CHEN S, MORSI Y, et al. Superabsorbent 3D Scaffold Based on Electrospun Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(37): 24415-24425.
- [40] YAMAGUCHI S, AOYAMA T, ITO A, et al. The Effect of Exercise on the Early Stages of Mesenchymal Stromal Cell-Induced Cartilage Repair in a Rat Osteochondral Defect Model[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151580.

Effects of exercise training on repair of rat cartilage injury by electrospinning nanofiber loaded with mesenchymal stem cells

Tong Jingping

(College of Physical Education, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: [Aims] To study the functions and effects of aerobic training in the repair of rat articular cartilage injury by

electrospinning nanofibers loaded with adipose-derived mesenchymal stem cells(ADSCs).[Methods]Rat ADSCs were isolated, cultured and expanded in vitro.ADSCs were examined by flow cytometry.ADSCs were loaded on polypropylene carbonate/ poly ϵ -caprolactone/ poly L-lactic acid-grafted tetracalcium phosphate(PPC/PCL/g-TTCP)nano electrospinning carriers and implanted into the cartilage defects of rat knee joints.Experimental rats were randomly divided into two groups;1) Normal control group; 2)Exercise training group.The training group uses moderate-intensity horizontal treadmill exercise(12 meters per minute,last for 30 minutes).Training began in the third week after surgery.Training was conducted twice daily and five days a week.After eight weeks of training,hematoxylin-eosin(HE)and type II collagen were stained and histologically examined.Wakitan score system was used to evaluate the cartilage repair degree.Statistical analysis was performed by using Graphpad Prism 6.01.[Results]Rat ADSCs can proliferate and differentiate into osteocytes on PPC/PCL/g-TTCP; In the exercise training group,the scores of five indexes(cell morphology,matrix staining intensity,surface regularity, cartilage thickness and graft-host integration)were significantly lower than that of the control group; HE and type II collagen staining showed that the proliferation of chondrocytes and the proportion of type II collagen was significantly increased in the training group.[Conclusion]Moderate-intensity exercise training can significantly improve the level of repair of rat articular cartilage injury by electrospinning nanofiber loaded with ADSCs.

Keywords: aerobic exercise; cartilage injury; cartilage repair; mesenchymal stem cell; electrospinning nanofiber

[责任编辑 杨浦 王凤产]

(上接第 100 页)

- [11] SUZUKI K, YANO A, SHINSHI H. Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells[J]. *Plant Physiol J*, 1999, 119(4): 1465-1472.
- [12] IBORRA J, GUARDIOLA J, MONTANER S, et al. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for immobilized plant cells[J]. *Biotechnol Tech*, 1992, 6(6): 319-322.
- [13] COETZER C, CORSINI D, LOVE S, et al. Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase[J]. *J Agr Food Chem*, 2001, 49(2): 652-657.
- [14] DONG Y S, FU C H, SU P, et al. Mechanisms and effective control of physiological browning phenomena in plant cell cultures[J]. *Physiol. Plant*, 2016, 156(1): 13-28.

Mechanism of browning in suspension culture of licorice cells

Wang Jiaqi, Niu Wenqian, Li Yali, Zhao Zhou, Guo Rong

(School of Biology science and technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China)

Abstract: The direct production of medicinal ingredients using plant cell culture technology is an effective way to solve the problem of licorice resources, but there are a series of problems in the industrialization process of this technology, including the most common problem of browning cells throughout the amplification process. To determine the type of browning reaction, we measured the PPO activity, the total phenol content inside and outside the cell, the membrane permeability, mitochondrial activity at the early stage of solid-liquid transformation using ordois plateau urals licorice cell as the research object. Then under the different initial concentrations of sucrose of the liquid medium and different initial shaker rotational speed, the browning degree of cells, PPO activity and the total phenol content inside and outside cell were measured to analyze the relationship between the environmental factors of the suspension system and its enzymatic browning, understanding the main influence factors and the browning reaction pathway would promote the industrialization process of licorice cell mass culture.

Keywords: licorice; suspension culture; browning; polyphenol oxidase

[责任编辑 王凤产 杨浦]