

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.011

3 种间充质干细胞成软骨分化潜能比较 *

韩俊柱¹ 朱勋兵¹ 武世伍² 李徽徽² 王 胜¹

(1 蚌埠医学院第二附属医院骨科 安徽 蚌埠 233040; 2 安徽省组织移植重点实验室 安徽 蚌埠 233030)

摘要 目的:比较骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、滑膜间充质干细胞 3 种间充质干细胞的成软骨分化潜能,为软骨组织工程中种子细胞的选择提供实验依据。**方法:**采用贴壁法分别分离提取兔骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、滑膜间充质干细胞 3 种间充质干细胞,并进行传代培养,绘制 3 种间充质干细胞的生长曲线并比较其倍增时间。将 3 种间充质干细胞成软骨诱导 14 d 后,行甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫组化染色以观测 3 种细胞成软骨分化能力。**结果:**脂肪间充质干细胞的倍增时间短于骨髓间充质干细胞,滑膜间充质干细胞的倍增时间最短;3 种细胞成软骨诱导 14 d 后均产生糖胺聚糖和 II 型胶原,且组与组之间 II 型胶原表达水平的差异有统计学意义,骨髓间充质干细胞组高于脂肪间充质干细胞组($P < 0.01$),滑膜间充质干细胞组高于骨髓间充质干细胞组($P < 0.01$)。**结论:**在一定的培养条件下,3 种间充质干细胞均有一定的成软骨细胞分化潜能,滑膜间充质干细胞最快的增殖速度及最强的成软骨分化潜能。

关键词:干细胞;骨髓间充质干细胞;脂肪间充质干细胞;滑膜间充质干细胞;成软骨分化

中图分类号: Q95-3; R331.2; R318.08; R68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)12-2252-04

Comparison of Chondrogenic Differentiation Potential of Three Mesenchymal Stem Cells*

HAN Jun-zhu¹, ZHU Xun-bing¹, WU Shi-wu², LI Hui-hui², WANG Sheng¹

(1 Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, 233040, China;

2 Anhui Key Laboratory of Tissue Transplantation, Bengbu, Anhui, 233030, China)

ABSTRACT Objective: To compare the chondrogenic differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs) and synovi-al mesenchymal stem cells (SMSCs). **Methods:** The rabbit BMSCs, AMSCs and SMSCs were respectively separated with the adherence screening method, and were continually subcultured. The growth curves of the passage 3 BMSCs, AMSCs and SMSCs were drawn, and the doubling times of three kinds of cells were compared. Then the passage 3 BMSCs, AMSCs and SMSCs were treated with chondrogenic induction. After induced for 14 days, the BMSCs, AMSCs and SMSCs were treated with toluidine blue staining and type II immunohistochemistry staining respectively to evaluate the ability of the chondrogenic differentiation potential of them. **Results:** The doubling time of AMSCs was shorter than that of the BMSCs. The doubling time of SMSCs was the shortest of the three. After induced for 14 days, all of them could express glycosaminoglycans and type II collagen, and there was significant difference in the expression of collagen type II between any two groups. The expression level of type II collagen in SMSCs after chondrogenic induction was higher than that in the BMSCs ($P < 0.01$), and the expression level of type II collagen in BMSCs after chondrogenic induction was higher than that in the AMSCs ($P < 0.01$). **Conclusion:** BMSCs, AMSCs and SMSCs all could transform into chondrocytes under certain conditions, but SMSCs seemed to be the fastest proliferation and the most potential of the three.

Key words: Stem cells; Bone marrow mesenchymal stem cells; Adipose-derived mesenchymal stem cells; Synovial mesenchymal stem cells; Chondrogenic differentiation

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R331.2; R318.08; R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)12-2252-04

前言

先天性异常、关节退化性疾病和创伤都可造成关节软骨损伤^[1],由于关节软骨缺乏血供且无神经支配,自身修复能力非常有限^[2,3]。组织工程与再生医学使用干/祖细胞已成为有效的替

代经典修复技术^[4]。作为组织工程的重要组成部分,种子细胞的选择对于构建组织工程软骨非常重要^[5]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其来源广泛、增殖力强和多向分化潜能,已成为治疗软骨缺损中重要的细胞来源^[6]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)、脂肪间

* 基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2018A0243);蚌埠医学院科技发展基金项目(BYKF17112)

作者简介:韩俊柱(1979-),博士研究生,副主任医师,主要研究方向:骨与软骨缺损修复,

电话:13855278458, E-mail: hanjunzhu1979@163.com

(收稿日期:2019-01-29 接受日期:2019-02-22)

充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, AMSCs)、滑膜间充质干细胞(synovial mesenchymal stem cells, SMSCs)是最为常见且最易获取的3种MSCs,均具有向软骨细胞分化的潜能^[2,3,6-11]。多数学者的实验结果证实在相同的成软骨诱导条件下SMSCs具有更强的增殖能力和成软骨分化潜能^[9-13],但近年来也有学者得出不同或不完全相同的实验结果^[14,15]。本实验通过比较上述3种MSCs成软骨分化潜能,以期对软骨组织工程寻找到理想的种子细胞提供一定的理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 3月龄新西兰纯种大白兔20只,每只体重约2.5 kg,由南京医科大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(苏)2016-0015。实验操作通过蚌埠医学院实验动物伦理委员会审查。

1.1.2 主要仪器及试剂 胎牛血清及DMEM培养基及0.25%胰蛋白酶(Gibco公司,美国)、阿利新蓝染液(Cyagen公司,美国)、II型胶原单克隆鼠抗兔抗体(Calbiochem公司,美国)、免疫组化试剂盒(上海容创生物技术有限公司)、低速离心机及冷冻离心机(Hitachi公司,日本)、倒置相差显微镜及HFX-DX显微摄影系统(Nikon公司,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 3种MSCs(BMSCs、AMSCs、SMSCs)的分离与培养 取6只3月龄新西兰大白兔,气体栓塞法处死后,抽取双股骨髓液冲洗除去红细胞、脂肪细胞及细胞杂质,加入DMEM培养基培养。另取6只3月龄新西兰大白兔,处死后取其腹部脂肪,去除血管筋膜并剪碎后离心,去掉上清,洗去红细胞、成熟脂肪细胞及细胞杂质,加入DMEM培养基培养。再取8只3月龄新西兰大白兔,处死后取其膝关节滑膜,去除结缔组织并剪碎后离心,去掉上清,洗去红细胞、脂肪细胞及细胞杂质,加入DMEM培养基培养。倒置显微镜下分别观察3组细胞形态及

生长情况,至细胞长满80%左右时,用胰酶消化法按1:2传代培养。

1.2.2 3种MSCs增值能力分析 用胰酶消化法将3种第3代MSCs制成单细胞悬液,接种于24孔板种,每24小时取3孔细胞,倒置显微镜下计数并取平均值。观察7d后绘制生长曲线并计算对数倍增时间。对数倍增时间=(终止时间-起始时间) $\lg 2 / (\lg \text{终止细胞数} - \lg \text{起始细胞数})$ ^[11]。

1.2.3 3种MSCs的成软骨诱导 分别将3种第3代MSCs用胰酶消化法制成浓度为 $4 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液,用成软骨诱导液(DMEM培养基中加入 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松、 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 转铁蛋白、 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸、 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\beta 1$ 转化生长因子及1%胎牛血清)进行培养。

1.2.4 3种MSCs成软骨鉴定染色 将3种第3代MSCs于体外培养14d后取出细胞爬片,分别行甲苯胺蓝染色和II型胶原免疫组化染色^[16],以观测3组第3代MSCs成软骨分化情况,并比较3种第3代MSCs成软骨诱导培养后II型胶原的表达水平。每组各取12张爬片,每张爬片随机抽取不重复的5个阳性视野,取其平均值作为该爬片的阳性灰度值^[11]。

1.3 统计学方法

应用SPSS19.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用方差分析,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3种MSCs分离与培养过程中的形态观察

在倒置显微镜下观察:原代的BMSCs呈短柱形,见图1A;第3代的BMSCs呈长梭形,呈"鱼群"样分布,见图1B。原代的AMSCs呈多角形或梭形,纯度较低,杂有其他细胞,见图2A;第3代的AMSCs呈梭形,呈"向日葵"样分布,见图2B;原代的SMSCs呈多边形或星形,见图3A,第3代的SMSCs呈纺梭形,呈"漩涡"样分布,见图3B。

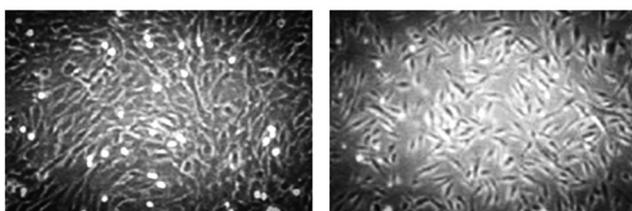


图1 A 原代 BMSCs(40 \times) B 第三代 BMSCs(40 \times)

Fig.1 The morphology of primary generation and the third generation of BMSCs(40 \times)

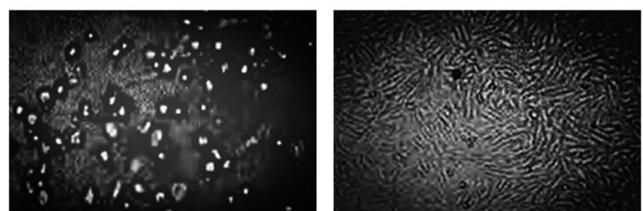


图2 A 原代 AMSCs(40 \times) B 第三代 AMSCs(40 \times)

Fig.2 The morphology of primary generation and the third generation of AMSCs(40 \times)

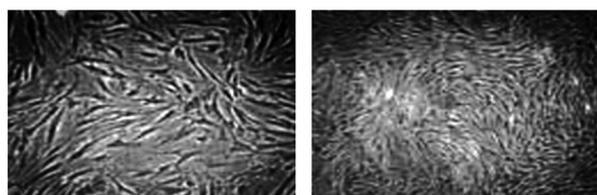


图3 A 原代 SMSCs(40 \times) B 第三代 SMSCs(40 \times)

Fig.3 The morphology of primary generation and the third generation of SMSCs(40 \times)

2.2 3种MSCs增值能力比较

3种第3代MSCs的生长曲线如图4:接种后第3代BMSCs、AMSCs、SMSCs均出现约24小时生长停滞期,48小时后3种MSCs的增值速度以SMSCs最快,AMSCs次之,BMSCs最慢,72小时后3种MSCs均进入对数生长期。第3代BMSCs的倍增时间约为36小时,第3代AMSCs的倍增时间约为30小时,第3代SMSCs的倍增时间约为26小时,SMSCs的增值速度最快。

2.3 3种MSCs成软骨染色比较

3种MSCs经成软骨诱导14d后糖胺聚糖染色后,其细胞

基质均可见均匀蓝染,见图 5,表明 3 种 MSCs 经成软骨诱导后均产生了软骨细胞基质糖胺聚糖;经 II 型胶原免疫组化染色后,其胞浆中均可见棕黄色细密颗粒,表明 3 种 MSCs 经成软骨诱导后均产生了软骨细胞特异性基质 II 型胶原,见图 6,II 型胶原的表达水平两两比较用方差分析,各组间两两比较均有统计学意义($P < 0.01$),BMSCs 组高于 AMSCs 组,SMSCs 组高于 BMSCs 组,见表 1。

3 讨论

由于关节软骨无血管、神经组织,其自身缺乏有效的修复能力,组织工程技术为解决这一难题提供了新思路,安全可靠的种子细胞源是构建组织工程化软骨的前提^[7]。BMSCs、AMSCs、

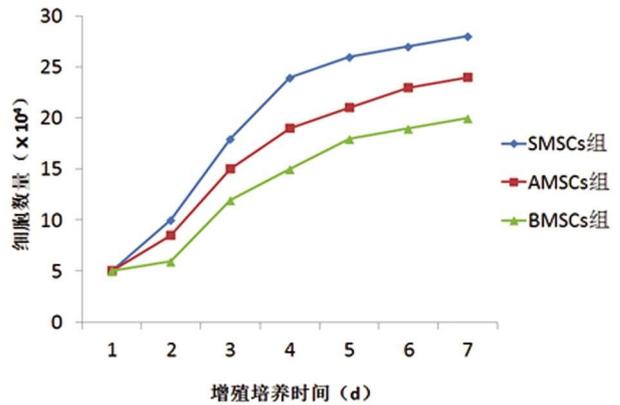
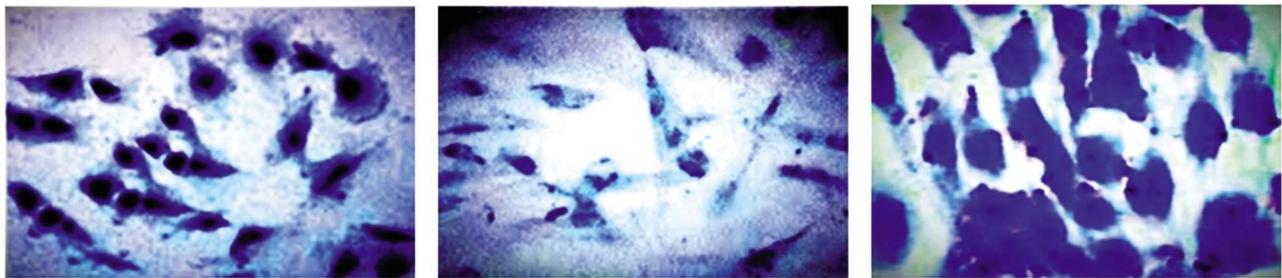
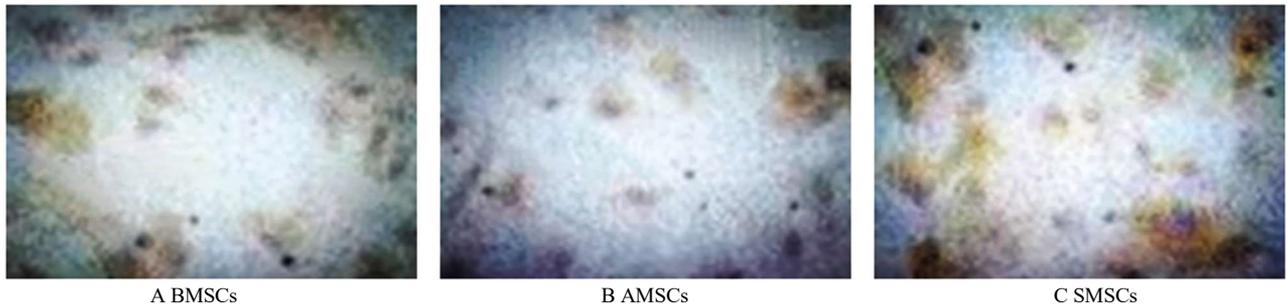


图 4 第三代 BMSCs、AMSCs、SMSCs 生长曲线
Fig.4 The growth curves of generation III BMSCs, AMSCs and SMSCs



A BMSCs(甲苯胺蓝染色,200×) B AMSCs(甲苯胺蓝染色,200×) C SMSCs(甲苯胺蓝染色,200×)
图 5 第三代 BMSCs、AMSCs、SMSCs 成软骨诱导后产生软骨细胞基质糖胺聚糖(甲苯胺蓝染色,200×)

Fig.5 Glycosaminoglycan in the chondrocyte matrix of generation III BMSCs, AMSCs and SMSCs(Toluidine blue staining, 200×)



A BMSCs B AMSCs C SMSCs
图 6 第三代 BMSCs、AMSCs、SMSCs 成软骨诱导表达 II 型胶原(免疫组化染色,200×)

Fig.6 Expression of type II collagen in the generation III BMSCs, AMSCs and SMSCs (Immunohistochemistry staining, 200×)

表 1 成软骨诱导后 BMSCs、AMSCs、SMSCs II 型胶原表达水平
Table 1 Expression level of type II in the BMSCs, AMSCs and SMSCs after chondrogenic induction(n=12)

Groups	$\bar{x} \pm s$	P value
BMSCs group	135.92± 5.30	<0.01
AMSCs group	119.17± 6.46	
BMSCs group	135.92± 5.30	<0.01
SMSCs group	168.92± 4.08	
AMSCs group	119.17± 6.46	<0.01
SMSCs group	168.92± 4.08	

SMSCs 是骨组织工程中最常用且最易获取的 3 种 MSCs, 且均能够向软骨细胞分化^[2,3,6-11], 然而何种 MSCs 的增殖能力及成软骨能力分化潜能更强, 尚缺乏足够的理论及实验依据。

成人骨髓间充质干细胞是最广泛应用于软骨组织工程构建研究中的间充质干细胞, 被认为是骨肌系统构建的“金标准”^[18]。Zhang 等^[9]发现脂肪间充质干细胞在未经诱导的情况下也能修复全层透明软骨缺损。Yoshimura 等^[12]通过动物实验对比了鼠来源 MSCs 在体内外软骨形成潜能, 发现 SMSCs 集落形成率、倍增速率和生长动力学均高于其他来源 MSCs, 与其他来源 MSCs 相比 SMSCs 能产生更多的软骨基质。Kubosch 等^[10]通过动物实验对比犬滑液、髌下脂肪垫、腹股沟脂肪和骨髓组织中 MSCs 的成软骨能力, 结果证实与 AMSCs 及 BMSCs 相比, 滑膜中的 MSCs 具有较高的增殖能力和成软骨分化潜能。此外, Kubosch 等^[13]还通过实验认为原代人骨髓间充质干细胞和滑膜间充质干细胞显示相似的成脂、成骨和软骨分化潜能和干细胞标记物表达, 但滑膜间充质干细胞中的软骨生成标记物 II 型胶原和糖胺聚糖的表达水平更高。而宋卓悦等^[14]经实验研究发现, 在体外二维培养条件下脂肪来源间充质干细胞的增殖速率高于炎性软骨细胞和滑膜来源间充质干细胞, 差异有显著性意

义($P<0.05$)。安荣泽等^[11]通过动物实验对比了兔来源 AMSCs 和 BMSCs 的成骨及成软骨分化潜能, 结果发现 AMSCs 增殖速度快于 BMSCs, 特定条件下两者均能向软骨细胞分化, 但 BMSCs 组较 AMSCs 组成软骨基因 II 型胶原的表达水平更高。Futami 等^[15]对比了鼠来源 SMSCs 和 BMSCs 的成骨及成软骨分化潜能, 结果发现 BMSCs 成骨能力强于 SMSCs, 而 SMSCs 的成软骨相关基因表达水平稍强, 但在软骨基质形成方面无明显差别。糖胺聚糖是软骨细胞外基质中的主要成分, II 型胶原是特异性成软骨基因, 两者的产生和表达均可证实软骨细胞的生成。本组实验中, 3 种 MSCs 经传代培养后, SMSCs 增殖速度快于 AMSCs, AMSCs 增殖速度快于 BMSCs; 3 组 MSCs 经成软骨诱导后, 行甲苯胺蓝染色均发现成软骨特异性标志物糖胺聚糖的存在, 行 II 型胶原免疫组化染色后均发现成软骨基因 II 型胶原的表达, 证实 3 种第 3 代 MSCs 经成软骨诱导后均能向软骨细胞分化, 且成软骨基因 II 型胶原的表达水平 BMSCs 组高于 AMSCs 组($P<0.01$), SMSCs 组高于 BMSCs 组($P<0.01$), 说明在此 3 种 MSCs 中 SMSCs 成软骨潜能最强, 与国内外多数学者研究实验结果一致。

综上, 基于本实验及以往多数学者的实验结果, 我们认为在相同的培养条件下, 这三种 MSCs 中 SMSCs 的成软骨分化潜能最强。但 MSCs 的成软骨细胞分化, 还受到生物诱导因子、微小 RNA、共细胞培养体系、细胞外基质材料、低氧等因素的影响^[19-28], 故哪种诱导方法或条件更有助于 SMSCs 的成软骨分化, 以充分发挥其成软骨分化的潜能, 需要进一步的实验研究。

参考文献(References)

- [1] 宁晓婷, 邵博, 龚忠诚, 等. 滑膜间充质干细胞与软骨细胞三维条件下混合培养向软骨细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(34): 5434-5440
- [2] Ikeda Y, Sakaue M, Chijimatsu R, et al. IGF-1 Gene Transfer to Human Synovial MSCs Promotes Their Chondrogenic Differentiation Potential without Induction of the Hypertrophic Phenotype [J]. Stem Cells Int, 2017, (2017): 1-10
- [3] López-Ruiz E, Jiménez G, Kwiatkowski W, et al. Impact of TGF- β family-related growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from lipoaspirates and infrapatellar fat pads of osteoarthritic patients [J]. Eur Cell Mater, 2018, 10(35): 209-224
- [4] 张爽, 刘石, 汪宇峰, 等. 间充质干细胞修复骨关节炎软骨损伤的临床应用意义[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(33): 5379-5385
- [5] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(3): 199-206
- [6] 王志聪, 刘跃洪, 周庆, 等. 骨髓间充质干细胞体外成软骨分化的形态学变化[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(33): 5281-5285
- [7] Gao F, Peng C, Zheng C, et al. miRNA-101 promotes chondrogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 175-180
- [8] Nasrabadi D, Rezaeiani S, Eslaminejad MB, et al. Improved Protocol for Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells -Effect of PTHrP and FGF-2 on TGF β 1/BMP2-Induced Chondrocytes Hypertrophy[J]. Stem Cell Rev, 2018, 14(5): 755-766
- [9] Zhang HN, Li L, Leng P, et al. Uninduced adipose-derived stem cells repair the defect of full-thickness cartilage[J]. Chin J Traumatol, 2009, 12(2): 92-97
- [10] Kubosch EJ, Lang G, Furst D, et al. The potential for synovium-derived stem cells in cartilage repair[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2018, 13(3): 174-184
- [11] 安荣泽, 赵俊廷, 王兆杰. 脂肪干细胞与骨髓间充质干细胞成软骨能力的比较[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(32): 5793-5798
- [12] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle [J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(3): 449-462
- [13] Kubosch EJ, Heidt E, Niemeier P, et al. In-vitro chondrogenic potential of synovial stem cells and chondrocytes allocated for autologous chondrocyte implantation - a comparison: Synovial stem cells as an alternative cell source for autologous chondrocyte implantation[J]. Int Orthop, 2017, 41(5): 991-998
- [14] 宋卓悦, 王洋, 连晓磊, 等. 人脂肪间充质干细胞和滑膜间充质干细胞协同抑制炎性软骨细胞的退变 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(17): 2661-2668
- [15] Futami I, Ishijima M, Kaneko H, et al. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium [J]. PLoS One, 2012, 7(9): 1-12
- [16] Da H, Jia SJ, Meng GL, et al. The impact of compact layer in biphasic scaffold on osteochondral tissue engineering [J]. PLoS One, 2013, 8(1): 1-14
- [17] 赵文慧, 皮洪涛, 冯万文, 等. 关节软骨细胞和骨髓间充质干细胞不同共培养方式对细胞增殖与分化的影响[J]. 中国组织工程研究杂志, 2019, 23(1): 24-29
- [18] 张永兴, 赵庆华. 间充质干细胞在关节软骨组织工程中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45): 7342-7347
- [19] 卫旭东, 党源, 胡德庆. 间充质干细胞在软骨损伤修复中的研究进展[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2017, 7(3): 178-184
- [20] 黄弘轩, 张姝江, 白波. 调控骨髓间充质干细胞成软骨分化的研究进展[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2017, 11(6): 655-660
- [21] 陈翌, 周义钦, 周嵘, 等. 髌下脂肪垫来源间充质干细胞软骨分化的研究进展[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2018, 12(3): 379-384
- [22] 陈钦桂, 曾勉, 何婉媚, 等. 干扰 foxM1 基因表达可增强骨髓间充质干细胞的成骨分化能力 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(5): 673-679
- [23] 张聘, 张林香, 赵建宁, 等. 抑制 microRNA-202-3p 表达促进滑膜间充质干细胞软骨分化[J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(5): 21-25
- [24] Uzieliene I, Bernotas P, Mobasher A, et al. The Role of Physical Stimuli on Calcium Channels in Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 1-14
- [25] 覃李玲, 严妍, 余卓, 等. 骨髓干细胞在羟基磷灰石涂层钛片上向软骨的分化[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(1): 35-40
- [26] Marycz K, Lewandowski D, Tomaszewski KA, et al. Low-frequency, low-magnitude vibrations (LFLM) enhances chondrogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs)[J]. Int J Mol Sci, 2016, (4): 1-25
- [27] 刘凯, 马伟康, 张雷, 等. 不同龄大鼠骨髓间充质干细胞活性对比[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(6): 1024-1028
- [28] Bae HC, Park HJ, Wang SY, et al. Hypoxic condition enhances chondrogenesis in synovium-derived mesenchymal stem cells[J]. Biomater Res, 2018, (2018): 1-8