

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.015

DDR2 基因缺失对小鼠骨髓间充质干细胞生物学特性的影响 *

隋珂^{1,3} 丁寅^{1Δ} 卜歆² 赵虎² 季海宁¹ 苏金^{2Δ}

(1 第四军医大学口腔医院正畸科 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710032;3 中国人民解放军空军总医院口腔科 北京 100142)

摘要 目的:骨髓间充质干细胞(Bone Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)是骨再生工程中重要的种子细胞,它对骨组织缺损的修复有着良好的效果。但是 BMSCs 向成骨细胞分化并修复骨组织缺损是由细胞外因子共同作用产生的结果。DDR2(Discoidin Domain Receptor 2)作为 I 型胶原的特异性受体在成骨细胞的分化中发挥重要的调节作用。而对于其在 BMSCs 向成骨细胞的分化过程中的所起到的作用还鲜有研究,对其作用机理尚不明确。因此我们希望通过分离、培养并鉴定比较 DDR2 基因缺失小鼠与野生型小鼠来源的骨髓间充质干细胞了解其生物学特性,为后续的实验奠定理论基础。**方法:**采用改良型的全骨髓贴壁细胞分离方法分离培养两种小鼠来源的骨髓间充质干细胞,采用流式细胞技术鉴定其表面标记物的表达,并利用诱导培养液诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞和成脂肪细胞分化。**结果:**分离培养的两种骨髓间充质干细胞形态一致,增殖能力和自我更新能力强,流式细胞术检测其表面标记物 CD29, Sca-1 均表达阳性,CD105, CD45 表达为阴性,分离得到的两种细胞均有向成骨细胞和成脂肪细胞分化的能力,但可以明显观察到 DDR2 基因缺失小鼠的骨髓间充质干细胞的成骨分化能力减弱。**结论:**本实验通过对于 DDR2 基因缺失小鼠 BMSCs 分离、培养和鉴定,初步探索 DDR2 基因缺失在成骨过程中的作用结果,为进一步研究提高 BMSCs 的成骨分化能力奠定理论基础。经实验证明,DDR2 基因缺失小鼠来源的骨髓间充质干细胞虽然仍具备干细胞的生物学特性,但其向成骨细胞的分化能力明显减弱,说明 DDR2 基因缺失对其骨髓间充质干细胞的成骨分化等有着重要的影响。

关键词: DDR2; 骨髓间充质干细胞; 流式; 分化

中图分类号: R783 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)28-5458-05

Biological Characteristics of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) Derived from Discoidin Domain Receptor 2 Knockout Mice*

SUI Ke^{1,3}, DING Yin^{1Δ}, BU Xin², ZHAO Hu², JI Hai-ning¹, SU Jin^{2Δ}

(1 The Fourth Military Medical University School of Stomatology Department of Orthodontics, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 The Fourth Military Medical University Department of Biochemistry and molecular biology, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Stomatology, Air Force General Hospital, Beijing, 100142, China)

ABSTRACT Objective: Bone Mesenchymal Stem Cells are a kind of stem cell, which are the common cell source of osteoblasts, have good ability to repair bone defects. However, the differentiation of BMSCs into osteoblasts is a very complicated process, DDR2 (Discoidin Domain Receptor 2) as a specific receptors of type I collagen, plays an important role in regulation of osteoblast differentiation. However, the function of DDR2 on the osteogenic differentiation of BMSCs is rarely studied, and its functional mechanism is also unclear. Therefore, we hope that through isolated, cultured and identified comparison between DDR2 gene deletion in mice and wild-type mice bone marrow-derived mesenchymal stem cells to understand their biological characteristics, the theoretical basis for the subsequent experiments. **Methods:** BMSCs were isolated from DDR2 knockout mice by using a modified adherent culture method, and general BMSCs surface markers were detected by flow cytometry method. To detect their differentiation capacity, BMSCs were differentiated into osteoblasts and adipocytes. Upon certain induction conditions. **Results:** The BMSCs showed spindle-shape morphology and high capacity of proliferation and self-renewal. The cells were CD105⁺ and Sca-1⁺, but CD29⁻ and CD45⁻. They also showed the differentiation capacity into osteoblasts and adipocytes. **Conclusions:** In this study, we isolated, cultured and identified the BMSCs derived from DDR2 gene knockout mice and explored the influence of DDR2 on the biological characteristics and osteogenic ability of BMSCs, to lay the theoretical foundation for the promotion of BMSCs ability on bone regeneration. These results illustrated that BMSCs derived from DDR2 knockout mice have perfect stem biological characteristics, but their differentiation ability into osteoblasts are significantly reduced, which suggests that DDR2 has very important role in BMSCs' differentiation.

Key words: DDR2; Mesenchymal Stem Cells; Flow Cytometry; Differentiation

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81372389)

作者简介:隋珂(1985-),女,硕士,主要研究方向:骨组织工程,电话:18089247798, E-mail:178976618@qq.com

Δ 通讯作者:苏金, E-mail:sujin923@fmmu.edu.cn; 丁寅, E-mail:dingyin@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-02-17 接受日期:2014-03-15)

Chinese Library Classification(CLC): R783 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5458-05

前言

DDR2 (Discoidin Domain Receptor 2) 是 DDRs (Discoidin Domain Receptors) 家族中的一员。它可以选择性地被纤维性胶原刺激活化,当 DDR2 与胶原结合后,首先发生磷酸化,并进一步发生受体酪氨酸残基磷酸化的扩大,激活下游信号分子的活化与级联放大,从而介导细胞与细胞外基质之间的信号传导。有研究表明,DDR2 参与了包括有小鼠的个体发育^[1]以及肿瘤的转移^[2]、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、组织修复等重大疾病过程。其主要表达于间质来源的细胞,通过介导基质金属蛋白酶的产生调节细胞外基质的微环境^[3,4],而 I 型胶原是成骨细胞分化的早期标志性分子,同时也是成骨细胞胞外基质的重要组成部分,因此,DDR2 作为胶原的特异性受体,必然在成骨细胞的分化中发挥重要的调节作用^[5-7]。

骨髓间充质干细胞(Bone Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)是一种具有多向分化能力的多能干细胞,其在体外向成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等多个方向诱导分化^[8,9],因其较低免疫原性,和较强的多向分化能力,现已成为组织工程中热门的种子细胞^[10,11]。

DDR2 作为成骨过程中的特异性受体,如何在成骨分化过程中对骨髓间充质干细胞的增殖分化产生影响使得分离、培养 DDR2 基因缺失小鼠自体的骨髓间充质干细胞并掌握其生物学特性显得尤为重要了。

1 材料和方法

1.1 实验动物

取同窝生 6-8 周龄野生型 C57 小鼠、DDR2 基因缺失 C57 小鼠,各 20 只,雄性,体重 18-22 g,基因缺失小鼠于第四军医大学基础部生物化学教研室繁殖以获得足够的动物样本。

1.2 细胞分离和培养

使用改良型全骨髓贴壁法培养小鼠 BMSCs^[15]。在超净工作台内,用颈椎脱臼法处死小鼠,取出小鼠四肢,将剪下的四肢放于 75%乙醇浸泡 5 min 后,在 PBS 中去除附着在下肢上的筋膜、肌肉、其他结缔组织,尽量保持其完整。之后于两端的骨骺段剪断,用 1 mL 无菌注射器吸取含 10%FBS 的 α -MEM 培养液,反复冲洗骨髓腔,将骨髓腔冲干净,收集冲出液。将培养液中骨髓块反复吹打至均匀,将细胞计数后按 3×10^6 个/mL 的细胞密度接种于 25 cm² 的培养瓶中,置于 37 °C, 5%CO₂ 孵箱中培养。48 h 后半量换液,以后每隔 72 h 全量换液,显微镜下观察细胞形态的变化,待细胞生长至 80%密度时,用含有 EDTA 的 0.25%胰酶消化并按 1:2 比例传代培养^[12]。

DDR2 基因缺失小鼠骨髓间充质干细胞的传代:经 12-14 d 的原代培养后,细胞贴壁生长达到 70%-80%时,去除培养基并用 PBS 冲洗 2 次,然后加入胰酶室温下消化贴壁生长的细胞,显微镜下观察,待大部分贴壁生长的细胞变圆或漂起时,加入适量培养液终止胰酶消化作用,反复、轻柔吹打仍贴壁的细胞,转移细胞悬液到离心管中,800 rpm 离心 5 min,重新加入培养

基吹打成细胞悬液,计数后按 2×10^6 个/cm² 的浓度接种细胞于培养瓶中扩增培养^[12,13]。

DDR2 基因缺失小鼠的骨髓间充质干细胞的形态及生长状态的观察:相差倒置显微镜下观察分离所得骨髓间充质干细胞在不同生长点的生长状态和形态特征。

1.3 对 DDR2 基因缺失小鼠及野生小鼠的骨髓间充质干细胞成骨分化能力的研究

取第 2 代 BMSCs,消化后重悬细胞,镜下计数以 3×10^5 个/mL 的密度铺于 6 孔板中,观察细胞贴壁长满后,换培养液为含有 10% FBS 的成骨诱导液^[14,15],每 3 d 换液。21 d 后弃去培养液,用 PBS 冲洗 2 遍。在室温下,4%多聚甲醛固定 40 min,弃去固定液,PBS 冲洗 2 遍,弃去。加入茜素红染液,室温下染色 30 min,PBS 冲洗 2 遍,镜下观察^[16-18]。对照组野生型小鼠骨髓间充质干细胞同上处理,镜下观察。

1.4 诱导 DDR2 基因缺失小鼠的骨髓间充质干细胞及野生小鼠的骨髓间充质干细胞向成脂分化

取对数生长期的第 2 代 BMSCs,以 3×10^5 个/mL 密度接种于 6 孔板中待细胞贴壁长满后,加入成脂诱导液每 3 d 换液一次,观察细胞分化情况^[19]。镜下可见培养第 7-10 d 后细胞质中开始出现圆形透明脂滴,14 d 后油红 O 染色。染色前 4%多聚甲醛固定细胞 30 min。将配好的油红 O 染剂静置 10 min,滤纸过滤。吸出孔内固定液,PBS 冲洗,加入油红 O 染液,室温下避光染色 30-40 min,弃去油红 O,PBS 冲洗 2 遍,镜下观察^[16,19-22]。对照组野生型小鼠骨髓间充质干细胞同上处理,镜下观察。

1.5 流式细胞技术检测

选用第 2 代处于对数生长期的两种 BMSCs,弃去培养液后用 PBS 清洗 2 遍,常规方法消化,离心,弃上清,加入含 10% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞,计数使细胞密度为 1×10^7 个/mL,均匀吹打后,分别加入到 4 个 1.5 mL 的 EP 管中,每管 100 μ L,再分别加入 CD29、CD45、CD105 以及 sca-1 抗体。每隔 15 min 轻晃,共孵育 1 小时。吸出抗体,用 PBS 洗 2 遍,离心(800 rpm / 5 min),重悬细胞,于流式细胞仪检测细胞表面分子的表达水平^[16]。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

原代细胞培养 24 h 后开始贴壁,但数量极少。刚贴壁细胞不规则,原代培养 3-5 d 后,大部分细胞贴壁生长,大部分细胞形态呈多变形,散在分布(图 1A,B)。经原代培养 7 d 后,培养的细胞开始进入对数生长期,倒置显微镜下观察可见细胞形态为梭形,呈漩涡状生长并有细胞集落形成(图 1C,D)。传代后,细胞增殖速度较快,大约 4 h 后贴壁,一般 3-4 d 细胞呈漩涡状或放射状排列,即可长满。倒置显微镜下观察,传代培养的 BMSCs,细胞生长密集,基本以长梭形为主(图 1E-H)。

2.2 DDR2 基因缺失小鼠与正常野生型 C57 小鼠的骨髓间充质干细胞表面抗原表达的鉴定结果

结果显示:C57 小鼠骨髓间充质干细胞 CD29 和 Sca-1 阳

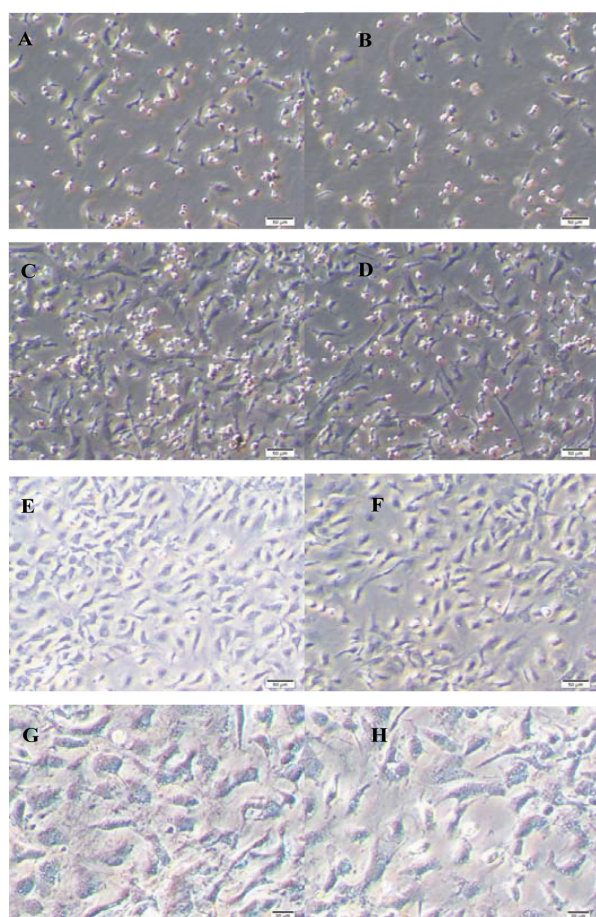


图1 BMSCs在不同培养天数的形态学特征

注:A为野生小鼠BMSCs培养第3天($\times 100$);B为DDR2基因缺失小鼠BMSCs培养第3天($\times 100$);
C为野生小鼠BMSCs培养第10天($\times 100$);D为DDR2基因缺失小鼠BMSCs培养第10天($\times 100$);
E为野生小鼠BMSCs P2代($\times 100$);F为DDR2基因缺失小鼠BMSCs P2代($\times 100$);
G为野生小鼠BMSCs P2代($\times 200$);H为DDR2基因缺失小鼠BMSCs P2代($\times 200$)

Fig. 1 Morphology of two groups of BMSCs after culturing the cells for different days

Note: A, BMSC derived from wild type mice culturing for 3 days ($\times 100$); B, BMSC derived from DDR2 knockout mice culturing for 3 days ($\times 100$); C, BMSC derived from wild type mice culturing for 10 days ($\times 100$); D, BMSC derived from DDR2 knockout mice culturing for 10 days ($\times 100$); E, the second passage of BMSC derived from wild type mice ($\times 100$); F, the second passage of BMSC derived from DDR2 knockout mice ($\times 100$); G, the second passage of BMSC derived from wild type mice ($\times 200$); H, the second passage of BMSC derived from DDR2 knockout mice ($\times 200$)

性率分别为95.2%和94.7%,DDR2基因缺失小鼠骨髓间充质干细胞CD29和Sca-1阳性率为95.4%和92.4%。C57小鼠骨髓间充质干细胞CD105和CD45阴性率分别为0.6%和5.2%,DDR2基因缺失小鼠骨髓间充质干细胞CD105和CD45阴性率为1.0%和5.1%(图2)。

2.3 DDR2基因缺失小鼠与正常野生型C57小鼠的骨髓间充质干细胞多向分化能力的鉴定结果

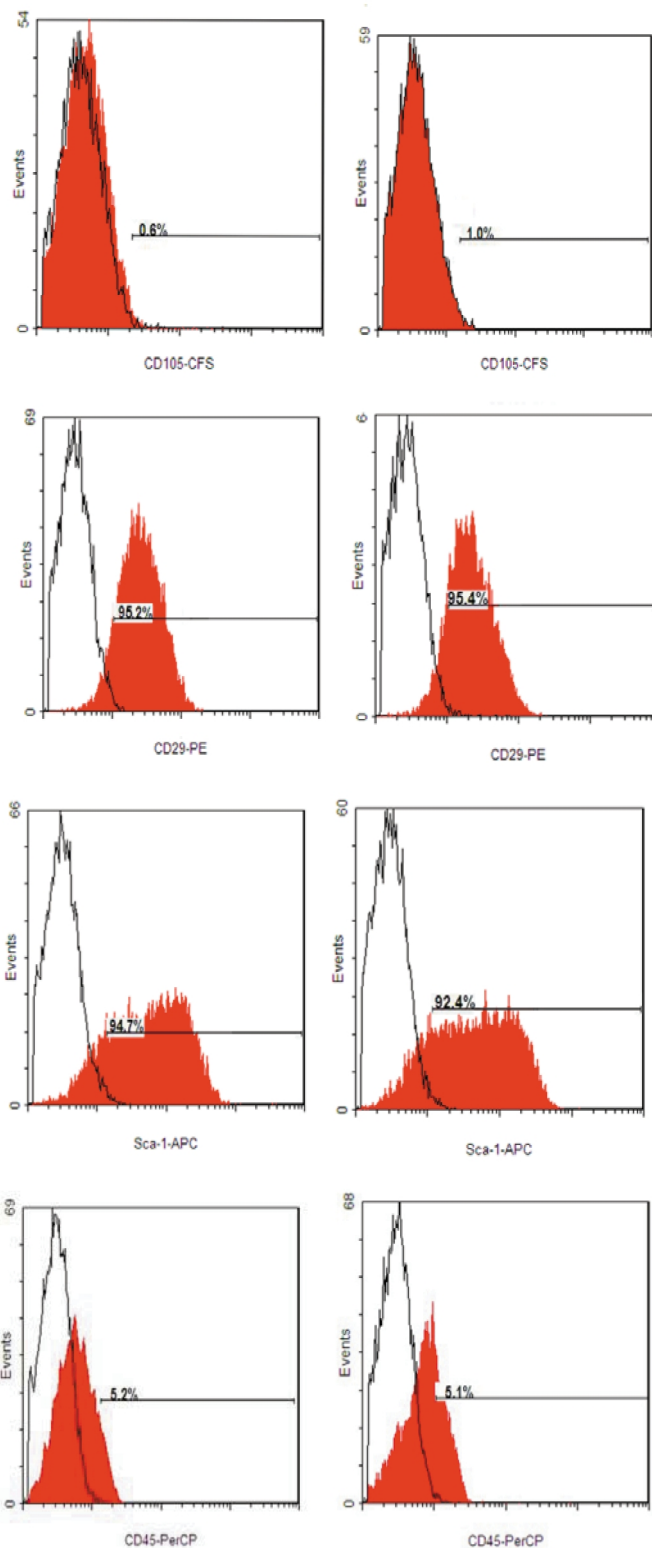


图2 流式细胞仪对培养细胞表面抗原表达情况的检测结果

Fig.2 Flow cytometry analysis of the expression of stem cell surface markers

2.3.1 不同来源两组BMSCs向成骨细胞方向分化结果的比较
野生型小鼠骨髓间充质干细胞在成骨诱导过程中,可观察到细胞形态的改变。成骨诱导14d后在显微镜下观察到一些散在分布的小褐色结节。成骨诱导21d后,茜素红染色可见大量的矿化结节形成。但是DDR2基因缺失型小鼠的骨髓间充质干细胞的成骨诱导第21d,镜下观察可见矿化结节形成量极少。茜素红染色同样证实了镜下观察(图3)。

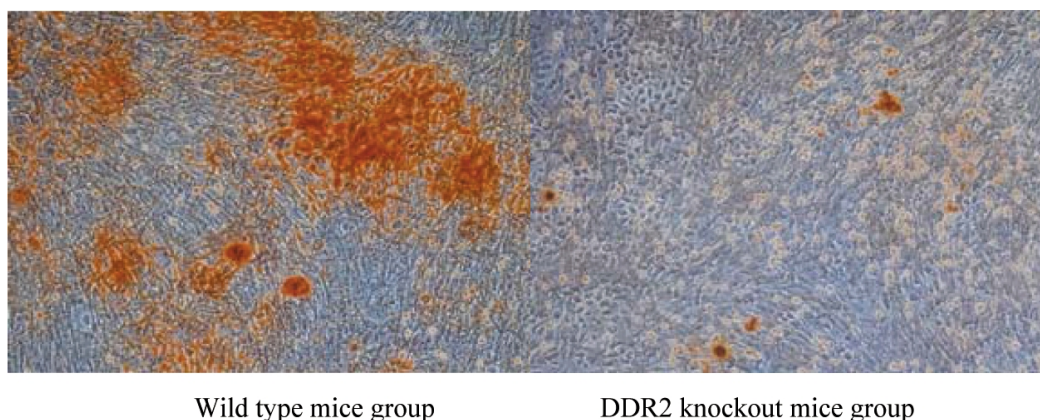


图3 茜素红染色结果

Fig.3 Alizarin Red S staining to detect the osteogenic differential ability of BMSC in two groups

2.3.2 骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化结果 镜下可观察到两种骨髓间充质干细胞均可见细胞内出现小的圆形脂滴,随着

时间的变长,细胞逐渐变大,变圆,细胞内脂滴逐渐增多。诱导14 d后,油红O染色,可见细胞内明显的红色圆形脂滴,如图4。

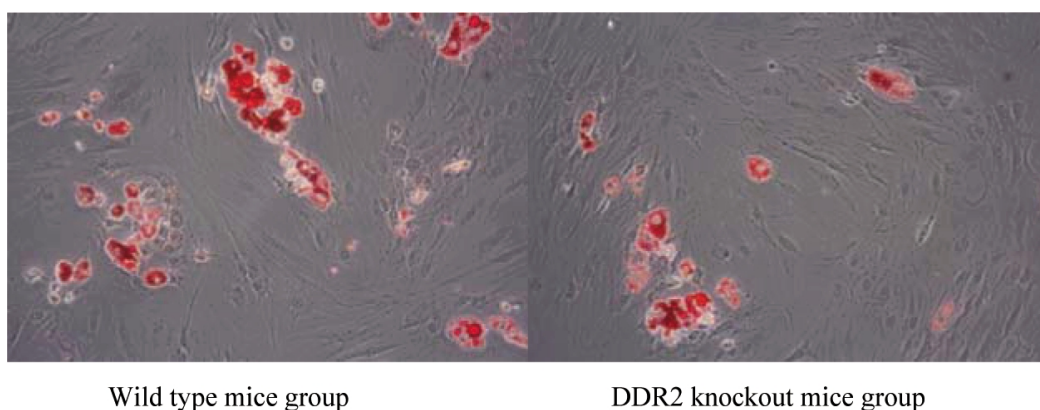


图4 油红O染色结果

Fig.4 Oil Red O staining to detect the adipogenic differential ability of BMSC in two groups

3 讨论

目前分离骨髓间充质干细胞的方法有很多种,常用的方法有:密度梯度离心法^[23],全骨髓贴壁法^[13,24],免疫磁珠分选法^[25]等等。经过多次实验比较,本实验选用了改良型的全骨髓贴壁法。该操作简单,不易污染且保持了骨髓的微环境有利于细胞的生长^[26]。

观察分离培养的DDR2基因缺失小鼠的骨髓间充质干细胞,发现原代培养过程中有细胞克隆形成现象,从第二代起细胞以梭型为主,增殖能力较强,可以稳定传代。这说明了DDR2基因敲除小鼠的骨髓间充质干细胞同样具有自我更新及较强的增殖能力。

对DDR2基因缺失小鼠的骨髓间充质干细胞的表面抗原采用流式细胞仪检测,骨髓间充质干细胞一直缺乏特异性的分子标记,大家所使用的表面抗原标记物各有不同^[27]。现阶段很多研究表明,经流式细胞仪检测的骨髓间充质干细胞可以表达内皮细胞,间质细胞,表皮细胞,以及肌肉细胞等多种细胞的表面标记,如CD44(透明质酸受体)、细胞因子类CD105(内皮因子表面标记)、CD29(结合素类)及其他因子CD90(Thy-1糖蛋白)等。但骨髓间充质干细胞不表达造血谱系细胞的表面标记

如CD45(白细胞标记),也不表达淋巴细胞表面标记CD11a和巨噬细胞表面标记CD11b等。流式细胞仪检测DDR2基因缺失小鼠的骨髓间充质干细胞的表面抗原结果与上述研究成果相符。

此外,本实验通过将培养的骨髓间充质干细胞向成骨及成脂方向诱导分化的实验,验证了DDR2基因缺失小鼠的骨髓间充质干细胞在体外同样具有向成骨细胞,成脂肪细胞分化的能力。

综上,通过上述实验结果,说明DDR2基因缺失小鼠骨髓间充质干细胞具有良好的干细胞的生物学特性,但从诱导成骨分化实验的结果提示,DDR2基因缺失导致其骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的能力明显的下降。这与我们前期对DDR2作为I型胶原的受体参与到成骨过程中的预测一致。目前的研究鲜有DDR2对于BMSCs向成骨细胞分化方面的作用影响的相关报道,因此,本实验为研究DDR2基因缺失小鼠成骨能力低以及进一步深入研究DDR2基因作为成骨过程中重要的基因所发挥的作用提供了方法学上的指导和治疗学上的实验依据,为进一步了解DDR2成骨分化过程中作用的机制机理研究过程奠定理论基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Kano K, Marin de Evsikova C, Young J, et al. A novel dwarfism with gonadal dysfunction due to loss-of-function allele of the collagen receptor gene, *Ddr2*, in the mouse [J]. *Molecular endocrinology*, 2008, 22(8): 1866-1880
- [2] Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the *DDR2* kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer[J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(1): 78-89
- [3] Franceschi R T, Ge C, Xiao G, et al. Transcriptional regulation of osteoblasts[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1116(1): 196-207
- [4] Barker K T, Martindale J E, Mitchell P J, et al. Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, *DDR*, in human breast tumours [J]. *Oncogene*, 1995, 10(3): 569-575
- [5] Leitinger B, Kwan A P L. The discoidin domain receptor *DDR2* is a receptor for type X collagen[J]. *Matrix Biology*, 2006, 25(6): 355-364
- [6] Leitinger B, Steplewski A, Fertala A. The D2 period of collagen II contains a specific binding site for the human discoidin domain receptor, *DDR2*[J]. *Journal of molecular biology*, 2004, 344(4): 993-1003
- [7] Matsuyama W, Wang L, Farrar WL, et al. Activation of discoidin domain receptor 1 isoform b with collagen up-regulates chemokine production in human macrophages: role of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B[J]. *J Immunol*, 2004, 172(4): 2332-2340
- [8] De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle G R, et al. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells; a plea for uniformity[J]. *Theriogenology*, 2011, 75(8): 1431-1443
- [9] Lafforgue P. Mesenchymal stem cells: A new biotherapy for bone disease?[J]. *Joint Bone Spine*, 2010, 77(2): 99-101
- [10] Zhao W, Sarkar D, Ankrum J, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stem/multipotent stromal cells[M]. *Stem Cells & Regenerative Medicine*. Humana Press, 2011: 195-218
- [11] Caplan A I, Brunder S P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century [J]. *Trends in molecular medicine*, 2001, 7(6): 259-264
- [12] Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow [J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(1): 102-106
- [13] Nadri S, Soleimani M, Hossein RH, et al. An efficient method for Isolation of murine bone marrow mesenchymal cells[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2007, 51(8): 723-729
- [14] Harkness L, Mahmood A, Ditzel N, et al. Selective isolation and differentiation of a stromal population of human embryonic stem cells with osteogenic potential[J]. *Bone*, 2011, 48(2): 231-241
- [15] De Coppi, Pozzobon M, Piccoli M, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human vermiform appendix [J]. *Journal of Surgical Research*, 2006, 135(1): 85-91
- [16] Jin J D, Wang H X, Xiao F J, et al. A novel rich source of human mesenchymal stem cells from the debris of bone marrow samples[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, 376(1): 191-195
- [17] Shang YC, Wang SH, Xiong F, et al. Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells1 [J]. *Acta pharmacologica Sinica*, 2007, 28(11): 1761-1774
- [18] Shiota M, Heike T, Haruyama M, et al. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties [J]. *Experimental cell research*, 2007, 313(5): 1008-1023
- [19] Tomar G B, Srivastava R K, Gupta N, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010, 393(3): 377-383
- [20] Chan B P, Hui T Y, Yeung C W, et al. Self-assembled collagen-human mesenchymal stem cell microspheres for regenerative medicine [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(31): 4652-4666
- [21] Liu Y, Wang L, Fatahi R, et al. Isolation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells using Twist2 Cre transgenic mice [J]. *Bone*, 2010, 47(5): 916-925
- [22] Jang H J, Chos K S, Park H Y, et al. Adipose tissue-derived stem cells for cell therapy of airway allergic diseases in mouse [J]. *Acta histochemica*, 2011, 113(5): 501-507
- [23] Juopperi T A, Schuler W, Yuan X, et al. Isolation of Bone Marrow - Derived Stem Cells using Density-Gradient Separation[J]. *Experimental hematology*, 2007, 35(2): 335-341
- [24] Firinci F, Karaman M, Baran Y, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate the histopathological changes in a murine model of chronic asthma[J]. *International immunopharmacology*, 2011, 11(8): 1120-1126
- [25] Itoh S, Aubin J E. A novel purification method for multipotential skeletal stem cells[J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2009, 108(2): 368-377
- [26] Eslaminejad M B, Nikmahzar A, Taghiyar L, et al. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system[J]. *Development, growth & differentiation*, 2006, 48(6): 361-370
- [27] Si Y L, Zhao Y L, Hao H J, et al. MSCs: biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns[J]. *Ageing research reviews*, 2011, 10(1): 93-103