

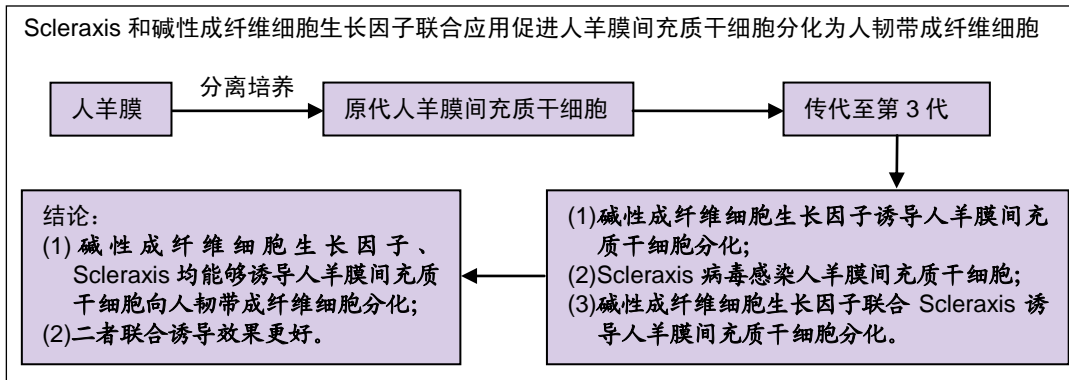
# Scleraxis联合碱性成纤维细胞生长因子体外促进人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞的定向分化

桑 鹏, 刘 毅(遵义医科大学附属医院骨一科, 贵州省遵义市 563000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1803

ORCID: 0000-0002-3795-9704(桑鹏)

文章快速阅读:



桑鹏, 男, 1986 年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 2013 年遵义医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事运动医学的研究。

通讯作者: 刘毅, 教授, 硕士生导师, 遵义医学院附属医院骨一科, 贵州省遵义市 563000

文献标识码: B

稿件接受: 2019-04-17



文题释义:

**Scleraxis:** 是肌腱/韧带细胞特异性的表达分子, 不仅参与肌腱/韧带祖细胞的聚集及分化, 还影响肌腱/韧带细胞外基质的形成, 在肌腱/韧带的发生发育和损伤修复中扮演着重要的角色。

**碱性成纤维细胞生长因子:** 是成纤维细胞生长因子家族中的一员, 不仅能够加速细胞增殖、促进细胞有丝分裂, 还能够促进新血管形成, 目前已经广泛应用于各种损伤组织修复的研究。

摘要

**背景:** 人羊膜间充质干细胞具有多向分化能力, 相关研究表明 Scleraxis 和碱性成纤维细胞生长因子均能够促进人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞定向分化。

**目的:** 探讨 Scleraxis 联合碱性成纤维细胞生长因子促进人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞分化的效果。

**方法:** 经遵义医学院附属医院伦理委员会批准, 术前签署知情同意书, 取足月产胎盘羊膜组织, 两步酶消化法分离人羊膜间充质干细胞, 倒置相差显微镜观察细胞形态; 苏木精-伊红染色观察新鲜人羊膜结构; 取第 3 代人羊膜间充质干细胞分 4 组进行培养: ①单纯人羊膜间充质干细胞培养组; ②人羊膜间充质干细胞经 Scleraxis 基因慢病毒感染组; ③人羊膜间充质干细胞经碱性成纤维细胞生长因子诱导组; ④人羊膜间充质干细胞经 Scleraxis 和碱性成纤维细胞生长因子联合诱导组。细胞培养 3 d 开始采用 CCK-8 法检测各组细胞增殖能力; 细胞培养 14 d 后, 实时荧光定量 PCR 评价各组细胞向人韧带成纤维细胞定向分化的效果。

**结果与结论:** ①第 3 代人羊膜间充质干细胞呈长梭形、涡旋状贴壁生长; ②新鲜人羊膜呈明显的分层结构, 共分为 5 层: 上皮层、基底层、致密层、纤维母细胞层和海绵层; ③人羊膜间充质干细胞经 Scleraxis 基因慢病毒感染 24 h 后表达绿色荧光, 荧光表达量较强且稳定; 经过碱性成纤维细胞生长因子诱导后 14 d 的形态近似于人韧带成纤维细胞; ④CCK-8 实验结果显示: 4 组细胞均呈 S 型生长, 其中 Scleraxis 基因慢病毒感染组、碱性成纤维细胞生长因子诱导组、联合诱导组较单纯培养组增殖能力强 ( $P < 0.05$ ), 但这 3 组间的增殖能力差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); ⑤实时荧光定量 PCR 显示: Scleraxis 基因慢病毒感染组、碱性成纤维细胞生长因子诱导组、联合诱导组韧带相关基因 I 型胶原、III 型胶原、Fibronectin、Tenascin-C、TNMD 的 mRNA 表达量均高于单纯培养组 ( $P < 0.05$ ), 联合诱导组上述韧带相关基因的 mRNA 表达量高于 Scleraxis 基因慢病毒感染组和碱性成纤维细胞生长因子诱导组 ( $P < 0.05$ ); ⑥结果表明, Scleraxis 基因和碱性成纤维细胞生长因子联合促进人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞分化, 为韧带损伤修复治疗提供了新的思路。

关键词:

人羊膜间充质干细胞; Scleraxis; 碱性成纤维细胞生长因子; 定向分化; 人韧带成纤维细胞; 慢病毒感染; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2; R686

## Scleraxis combined with basic fibroblast growth factor promotes the differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into human ligament fibroblasts *in vitro*

Sang Peng, Liu Yi (First Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

Sang Peng, Master, Attending physician, First Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Liu Yi, Professor, Master's supervisor, First Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Human amniotic mesenchymal stem cells have multi-directional differentiation ability. Studies have shown that both Scleraxis and basic fibroblast growth factor can promote the differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into human ligament fibroblasts.

**OBJECTIVE:** To explore whether Scleraxis combined with basic fibroblast growth factor can promote the differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into human ligament fibroblasts and to observe their differentiation effects.

**METHODS:** The study protocol was approved by the ethic committee of the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, and written informed consent was obtained from each puerpera. The amniotic membrane from the full-term placenta was separated, and human amniotic mesenchymal stem cells were isolated by a two-step enzyme digestion. The morphology of the cells was observed by inverted phase contrast microscope. The structure of fresh human amniotic membrane was observed by hematoxylin-eosin staining. The third generation of human amniotic mesenchymal stem cells were cultured in four groups: (1) normally cultured human amnion mesenchymal stem cell culture (simple culture group); (2) human amniotic mesenchymal stem cells infected with Scleraxis gene lentivirus (Scleraxis group); (3) human amniotic mesenchymal stem cells induced by basic fibroblast growth factor (basic fibroblast growth factor group); (4) human amniotic mesenchymal stem cells induced by Scleraxis and basic fibroblast growth factor (combined induction group). The proliferation ability of the cells in each group was detected by cell counting kit-8 method at 3 days of cell culture. Real-time quantitative PCR was performed to evaluate the cell differentiation into human ligament fibroblasts in each group at 14 days of culture.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Under the inverted phase contrast microscope, the third-generation human amniotic mesenchymal stem cells were long-fusiform and exhibited vortex-like adherent growth. (2) Under the inverted phase contrast microscope, the fresh human amniotic membrane had an obvious layered structure, which was divided into five layers: epithelial layer, basal layer, dense layer, fibroblast layer and sponge layer. (3) Human amniotic mesenchymal stem cells strongly and stably expressed green fluorescence at 24 hours after infection with Scleraxis gene lentivirus. The morphology of human amniotic mesenchymal stem cells induced by basic fibroblast growth factor was changed, and after 14 days of induction its morphology was similar to that of human ligament fibroblasts. (4) The results of cell counting kit-8 showed that the four groups of cells showed a S-type growth. The Scleraxis group, basic fibroblast growth factor group, combined induction group had stronger proliferation ability than the simple culture group, but there was no significant difference in the proliferative capacity between the three groups. (5) Real-time fluorescent quantitative PCR showed that the mRNA expression levels of ligament-related genes type I collagen, type III collagen, Fibronectin, Tenascin-C and TNMD in the Scleraxis group, basic fibroblast growth factor group, and combined induction group were significantly higher than those in the simple culture group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of ligament-related genes in the combined induction group were significantly higher than those in the Scleraxis group and basic fibroblast growth factor group ( $P < 0.05$ ). These results indicate that the combination of Scleraxis gene and basic fibroblast growth factor can promote the differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into human ligament fibroblasts, providing a new idea for the treatment of ligament injury.

**Key words:** human amniotic mesenchymal stem cells; Scleraxis; basic fibroblast growth factor; directed differentiation; human ligament fibroblasts; lentivirus infection; tissue engineering

## 0 引言 Introduction

前交叉韧带损伤或断裂是临床上最常见的疾病之一, 由于前交叉韧带损伤后很难自行修复愈合, 其治疗一直困扰着当今的临床医生<sup>[1]</sup>。目前临床上常用的治疗手段是韧带重建, 包括自体/异体人韧带、人工韧带等, 但是都存在一定的缺陷和不足<sup>[2-3]</sup>。近年来随着再生医学和组织工程技术的快速发展, 通过使用各种生长因子来促进韧带损伤修复已经取得了不错的进展, 例如使用转化生长因子 $\beta$ 、胰岛素样生长因子1、碱性成纤维细胞生长因子等来促进韧带损伤的修复<sup>[4-5]</sup>。

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是体内广泛分布的细胞因子, 其与肝素具有较好的亲和力, 是成纤维生长因子家族中的一员<sup>[6]</sup>。人类的碱性成纤维细胞生长因子基因定位于四号染色体, 为单拷贝基因, 长度在40 kb左右<sup>[7]</sup>。碱性成纤维细胞生长因子具有促进有丝分裂和加速增殖的作用, 目前广泛应用于组织工程修复, 例如骨组织工程技术、软骨组织工程技术、腱-骨愈合等<sup>[8-12]</sup>。碱性成纤维细胞生长因子能够促进人羊膜间充质干细胞向韧带成纤维细胞定向分化, 为临床韧带损伤的修复提供了新的方向<sup>[13]</sup>。

Scleraxis是bHLH家族中的成员之一, 其作为肌腱/韧带细胞的特异性标志分子, 不仅参与肌腱和韧带的发生和发育, 还能够诱导干细胞向肌腱/韧带的定向分化<sup>[14-17]</sup>。最近几年, 随着分子生物学和转染技术的快速发展, 利用慢

病毒/腺病毒转染目的基因到靶细胞来治疗相关疾病已经取得了不错的效果。因此, 通过病毒转染技术将Scleraxis基因导入干细胞从而促进干细胞向人韧带成纤维细胞分化来修复韧带损伤, 有望成为一种新的治疗方法。

人羊膜间充质干细胞来源广泛、获取简单、增殖能力较强、低免疫原性、具有多向分化潜能<sup>[18-20]</sup>, 现已经广泛应用于多个领域<sup>[21-24]</sup>。课题组长期以来一直从事人羊膜间充质干细胞的体外分离培养和诱导分化研究, 并且相关实验已经证明人羊膜间充质干细胞具有向韧带成纤维细胞分化的能力。此次实验拟用Scleraxis联合碱性成纤维细胞生长因子来诱导人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞定向分化, 并观察其分化效果。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年6月至2019年2月在遵义医科大学附属医院细胞工程实验室完成。

1.3 材料 实验所用的1个胎盘来自于遵义医科大学附属医院产科足月健康产妇, 无其他基础疾病, 术前均已签署知情同意书并同意参与该科学研究, 符合遵义医科大学附属医院伦理委员会要求。

**实验用主要试剂和仪器:** DMEM/F12培养液(美国Gibco公司); 胰蛋白酶、II型胶原酶(美国Gibco公司); RNAiso plus、转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(日本

Takara公司); CCK-8试剂盒(索莱宝试剂公司); 超净工作台(北京冠鹏净化设备公司); 冷冻离心机(德国Eppendorf公司); 倒置相差显微镜(日本Olympus公司); CO<sub>2</sub>恒温箱(美国Thermo Scientific公司)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 人羊膜间充质干细胞的分离与培养** 在无菌条件下将胎盘胎儿面羊膜剥离并在4 °C条件下迅速转移至实验室, 在超净台上用含青霉素/链霉素(青霉素1×10<sup>5</sup> U/L、链霉素1×10<sup>5</sup> U/L)的无菌PBS反复冲洗3次, 将羊膜放在玻璃皿中用刀片反复刮, 剔除结缔组织并冲洗掉血渍。然后将羊膜用剪刀剪成大小约为1 mm×1 mm×1 mm的碎片, 加入羊膜体积2倍的0.05%EDTA-胰蛋白酶在37 °C恒温水浴摇床上连续消化2次, 每次30 min, 再用含双抗的PBS冲洗, 加入与羊膜等体积的0.75 g/L II型胶原酶于37 °C恒温水浴摇床充分震荡消化50 min, 直到肉眼观察到羊膜碎片完全消失, 300目滤网过滤, 收集细胞滤液, 以1 700 r/min离心7 min, 弃上清, 加入含体积分数为10%胎牛血清、青霉素1×10<sup>5</sup> U/L、链霉素1×10<sup>5</sup> U/L、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸的L-DMEM/F12培养基重悬细胞, 以(1.5-2.0)×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>的浓度将细胞接种于75 cm<sup>2</sup>培养瓶, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养箱培养, 每3 d更换1次培养基, 倒置相差显微镜观察细胞贴壁及生长情况、形态变化并拍照记录。

#### 人羊膜间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	人胎盘组织
原代培养方法:	酶消化法
基础培养基:	DMEM/F12 培养基
添加材料:	10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素、1%谷氨酰胺和非必需氨基酸
原代培养时间:	原代细胞培养两三天开始换液, 待细胞快长满培养瓶时传代
细胞传代:	细胞融合至 80%-90%用胰酶消化传至下 1 代, 两三天传代 1 次, 一般传到 2 代的细胞用于后续实验
细胞鉴定:	采用流式细胞仪和三系分化实验鉴定细胞为人羊膜间充质干细胞
伦理学批准:	该实验经过遵义医科大学附属医院伦理学委员会批准

**1.4.2 人羊膜间充质干细胞的传代** 镜下观察细胞融合率为80%-90%时, 加入0.125%胰酶置于孵箱中消化3 min, 使贴壁细胞脱落、变圆, 然后加入等体积含体积分数10%胎牛血清的LG-DMEM/F12培养基终止消化, 以1 500 r/min的转速离心6 min, 弃上清液, 加入LG-DMEM/F12培养基吹打重悬细胞, 进行细胞计数, 细胞数(/mL)=(4个大格的总数/4)×10<sup>4</sup>。以1×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>细胞浓度接种于75 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 人羊膜间充质干细胞传至第3代细胞种板进行相关实验。

**1.4.3 苏木精-伊红染色观察羊膜结构** 将取下的新鲜羊膜剪成大小均匀的块状置于培养皿中, 然后加入40 g/L多聚甲醛固定, 经过乙醇脱水、石蜡包埋并切片, 切片的厚度约为4 μm, 然后进行苏木精-伊红染色。

**1.4.4 慢病毒包装载体的构建与包装** 将pHBLVCMVIE-

ZsGreen-Puro载体及含有酶切位点及3×Flag标签的Scleraxis多核苷酸序列(三博远志生物技术公司)分别经EcoR I、Xba I酶切后纯化(40 μL体系: 2 μL载体, 1 μL EcoR I, 2 μL Xba I, 8 μL 10×buffer, 27 μL H<sub>2</sub>O; 37 °C作用2 h), 纯化后载体及目的片段用T<sub>4</sub>连接酶连接(20 μL体系: 2 μL酶切后片段, 100-200 ng酶切后载体, 2 μL ligase buffer, 1 μL T<sub>4</sub> ligase, 15 μL H<sub>2</sub>O; 16 °C过夜), 使用大肠杆菌DH5α感受态细胞转化后进行挑单克隆及质粒抽取, 测序确定目的片段已转入质粒载体。当293T细胞(贴壁细胞培养法: 使用含体积分数10%胎牛血清的LG-DMEM/F12培养基, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养箱培养; 当细胞融合率80%时进行0.125%胰酶消化并传代培养)汇合率约60%, 参照Lipofectamine™2000转染说明书, 将空质粒和pHBLVCMVIE-ZsGreen-Puro-3XFLAG-SCX质粒分别与pSPAX2、pMD2G质粒共转染入293T细胞。转染后48, 72 h分别收集上清, 4 °C, 20 000 r/min离心120 min, 用无血清PBS溶解病毒沉淀后分装保存于-80 °C冰箱。

**1.4.5 实验分组** 实验分4组: 单纯人羊膜间充质干细胞培养组、Scleraxis基因慢病毒感染组、碱性成纤维细胞生长因子诱导组、Scleraxis/碱性成纤维细胞生长因子联合诱导组。

**1.4.6 慢病毒滴度测定及感染人羊膜间充质干细胞** 以4×10<sup>4</sup>/孔的密度将293T细胞接种到96孔板, 24 h后准备6个EP管, 第1个EP管中加入10 μL病毒液, 做3倍梯度稀释, 共6个稀释度, 将病毒稀释液加入培养基中至总体积为100 μL, 24 h后加入DMEM/F12完全培养基100 μL, 96 h后观察荧光表达情况, 计算荧光细胞百分比在10%-30%的病毒滴度。滴度(TU/mL)=细胞数×荧光细胞百分比×感染复数(1)×病毒稀释倍数×10<sup>3</sup>。取第3代人羊膜间充质干细胞以3×10<sup>5</sup>/孔接种于6孔板, 24 h后当汇合率接近50%-60%时, 加入6.5 μL病毒浓缩液及1.2 μL聚凝胺(5 mg/L), 感染24 h后换液, 感染48 h后将细胞传至10 cm培养皿, 待细胞汇合度为60%时, 以3.5×10<sup>-3</sup> mg/L的嘌呤霉素对感染细胞进行筛选, 从而获得稳定过表达Scleraxis蛋白的人羊膜间充质干细胞。

**1.4.7 碱性成纤维细胞生长因子诱导人羊膜间充质干细胞** 将装有50 μg碱性成纤维细胞生长因子的塑料管以10<sup>4</sup> r/min离心1 min后, 转移于超净台内, 用450 μL灭菌超纯水溶解后, 加入含有1%BSA的无菌PBS定容至500 μL, 稀释成10 g/L的储备液, 分装后-20 °C保存。使用时按照每100 mL培养液中加入10 μL储备液, 使用终质量浓度为10 μg/L。将第3代人羊膜间充质干细胞以1.5×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>的细胞浓度接种于6孔板, 用含碱性成纤维细胞生长因子的DMEM/F12培养基诱导, 每3 d更换1次培养基。诱导后7, 14, 21 d, 倒置显微镜下观察细胞的形态改变。

**1.4.8 CCK-8检测细胞活性** 诱导培养后3 d开始, 各组细胞消化并制备成浓度为1×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>的细胞悬液, 取100 μL加入96孔板, 同时设置3个副孔, 在96孔板的4边孔(共36孔)中加入100 μL PBS, 置于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h, 加入10 μL CCK-8溶液, 放置于培养箱内

孵育1-4 h, 酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度值, 每天测定1次, 重复连续测定7 d, 记录数据并绘制增殖曲线。

**1.4.9 实时荧光定量PCR检测慢病毒感染人羊膜间充质干细胞后Scleraxis的表达及韧带成纤维细胞相关基因的表达** 细胞诱导培养14 d后, PBS冲洗3遍, 采用Trizol法提取各组细胞的RNA, 用紫外分光光度计测定RNA的质量。用反转录试剂盒得到的cDNA为模板, 进行实时荧光定量PCR检测, 见表1。以GAPDH为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因相对表达量。引物在NCBI基因库中对比后, 由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表1 基因引物序列及产物长度

Table 1 The primer sequences and product lengths

基因	引物序列(5'→3')	产物长度
GAPDH	Forward: CCA TGT TCG TCA TGG GTG T	96 bp
	Reverse: CCA GGG GTG CTA AGC AGT T	
Scleraxis	Forward: GCA CCA ACA GCG TGA ACA	120 bp
	Reverse: GGT GCG AGA TGT AGC TGG AG	
I型胶原	Forward: GAG GGC CAA GAC GAA GAC ATC	140 bp
	Reverse: CAG ATC ACG TCA TCG CAC AAC	
III型胶原	Forward: GCC AAA TAT GTG TCT GTG ACT A	145 bp
	Reverse: GGG CGA GTA GGA GCA GTT G	
Fibronectin	Forward: GAG AAT AAG CTG TAC CAT CGC A	200 bp
	Reverse: CGA CCA CAT AGG AAG TCC CAG	
Tenascin-C	Forward: TCC CAG TGT TCG GTG GAT CT	131 bp
	Reverse: TTG ATG CGA TGT GTG AAG ACA	
TNMD	Forward: CCA TGC TGG ATG AGA GAG GT	124 bp
	Reverse: CTC GTC CTC CTT GGT AGC AG	

**1.5 主要观察指标** 各组细胞的增殖能力及向人韧带成纤维细胞定向分化的效果。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 18.0统计软件对数据进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用t检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 人羊膜间充质干细胞的形态** 倒置相差显微镜显示: 40倍镜下第3代人羊膜间充质干细胞呈长梭形贴壁生长, 可见漩涡形成, 见图1A; 100倍镜下可见细胞接触紧密, 类似于三角形或长菱形, 见图1B; 200倍镜下观察细胞长梭状明显, 细胞间相互黏附, 见图1C。

**2.2 倒置显微镜下羊膜的结构** 人新鲜羊膜经过切片、苏木精-伊红染色后在倒置显微镜下观察呈现明显的分层结构, 一共分为5层, 分别为上皮层、基底层、致密层、纤维母细胞层和海绵层, 各层均比较明显且很完整, 见图2。

**2.3 慢病毒包装载体的构建、包装与滴度检测结果** 病毒梯度法感染293T细胞96 h后, 荧光显微镜观察目的荧光表达量: 0.03  $\mu$ L/孔表达量约50%, 0.10  $\mu$ L/孔表达量约80%, 0.30  $\mu$ L/孔表达量约95%, 见图3。

**2.4 病毒感染人羊膜间充质干细胞** 6.0  $\mu$ L病毒原液感染人羊膜间充质干细胞96 h后荧光显示感染率良好, 见图4。

**2.5 碱性成纤维细胞生长因子诱导人羊膜间充质干细胞形态发生改变** 14 d时最明显, 细胞呈涡旋状, 形似人韧带成纤维细胞, 见图5。

带成纤维细胞, 见图5。

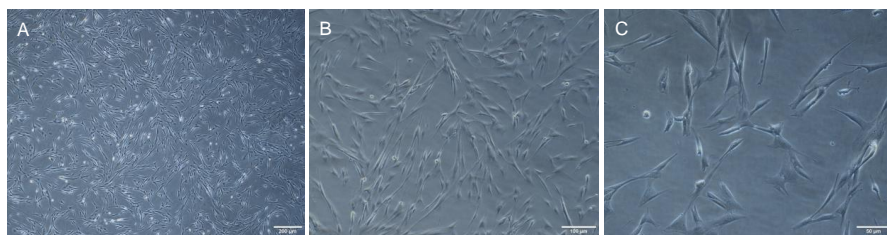
**2.6 CCK-8检测人羊膜间充质干细胞活性** 各组细胞的增殖能力均呈S型生长, 其中Scleraxis基因慢病毒感染组、碱性成纤维细胞生长因子诱导组、联合诱导组较对照组增殖能力强( $P < 0.05$ ), 但这3组间的增殖能力差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图6, 说明Scleraxis、碱性成纤维细胞生长因子不仅能够促进羊膜间充质干细胞分化, 而且还能够促进其增殖。

**2.7 实时荧光定量PCR检测慢病毒感染人羊膜间充质干细胞后Scleraxis的表达及韧带成纤维细胞相关基因的表达** Scleraxis基因慢病毒能够成功感染人羊膜间充质干细胞, 感染后Scleraxis mRNA的表达量急剧升高, 是未转染组的40倍左右, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); Scleraxis基因慢病毒感染组、碱性成纤维细胞生长因子诱导组、联合诱导组韧带成纤维细胞相关基因mRNA的表达量均高于单纯人羊膜间充质干细胞培养组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 联合诱导组韧带相关基因的mRNA表达量高于Scleraxis基因慢病毒感染组和碱性成纤维细胞生长因子诱导组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), Scleraxis基因慢病毒感染组、碱性成纤维细胞生长因子诱导组韧带相关基因的表达差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图7。

## 3 讨论 Discussion

前交叉韧带损伤或断裂是临床上较为常见的一种疾病, 尽管有相关文献报道损伤的前交叉韧带经缝合后具有一定的自我修复能力<sup>[25-27]</sup>, 但是临床上目前的主流方案仍然是前交叉韧带重建。腱-骨愈合是重建术后恢复的一大关键和难点, 因此急需新的治疗方案来弥补其不足。组织工程技术的出现和迅速发展为韧带损伤修复提供了新的思路 and 方向, 也取得了一定的成绩。既往相关研究表明, 人羊膜间充质干细胞的增殖能力较骨髓间充质干细胞更强, 并且具有高纯度、高活力、高丰度等特点, 此外, 人羊膜间充质干细胞来源广泛, 不存在道德伦理问题。基于以上各大优势, 实验采用人羊膜间充质干细胞作为种子细胞来诱导其向人韧带成纤维细胞分化, 为韧带损伤修复开辟新的道路。实验结果显示: 人羊膜间充质干细胞具有干细胞特性, 在倒置相差显微镜下原代细胞多呈椭圆形或者不规则形生长, 经过传代后其多呈长梭形、涡旋状贴壁生长。

Scleraxis是韧带和肌腱的特异性分子标志, 作为韧带和肌腱的主要转录分子, Scleraxis表达于韧带和肌腱细胞分化的各个阶段, 对韧带和肌腱细胞的发生和发育起着重要的作用<sup>[28-30]</sup>。研究发现, Scleraxis可以在韧带/肌腱形成早期检测到, 且在其整个发育和分化时期高表达。在Scleraxis基因敲除的小鼠模型中能够观察到韧带和肌腱明显的生长和分化缺陷, 说明Scleraxis在韧带和肌腱的发育和分化过程中具有重要的作用<sup>[31-32]</sup>。Alberton等<sup>[33]</sup>研究发现, 在人骨髓间充质干细胞中过表达Scleraxis后其向成骨和成软骨分化能力减弱, 但是能够高表达韧带相关蛋白和胶原, 此外, 还能够明显增强韧带的另一个标志蛋白TNMD的表达。Gulotta等<sup>[34-35]</sup>利用Scleraxis来修饰骨髓间

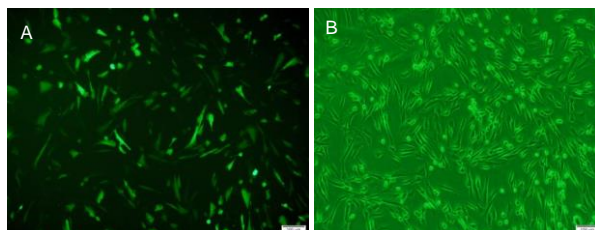


图注: 图中 A 为 40 倍倒置显微镜下第 3 代人羊膜间充质干细胞, 呈长梭形贴壁生长; B 为 100 倍镜下第 3 代人羊膜间充质干细胞, 类似于三角形或长菱形; C 为 200 倍镜下第 3 代人羊膜间充质干细胞, 长梭状较明显, 细胞间相互黏附。  
图 1 人羊膜间充质干细胞的形态  
Figure 1 Morphology of human amniotic mesenchymal stem cells



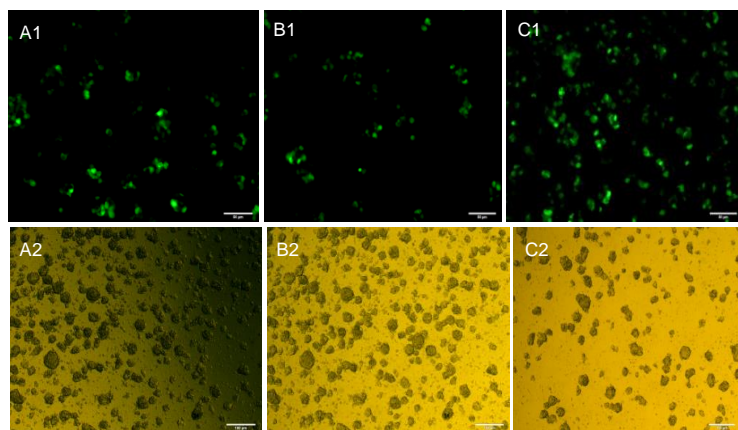
图注: 新鲜人羊膜具有明显的分层结构, 共 5 层, 分别为上皮层、基底膜、致密层、纤维母细胞层和海绵层。

图 2 倒置显微镜下观察人羊膜的结构(苏木精-伊红染色, x200)  
Figure 2 Morphology of human amniotic membrane under the inverted phase contrast microscope (hematoxylin-eosin staining, x200)



图注: 图中 A 为 6.0 μL 病毒原液感染人羊膜间充质干细胞 96 h 后荧光表达量; B 为对应的人羊膜间充质干细胞形态。

图 4 病毒感染人羊膜间充质干细胞(x100)  
Figure 4 Infection of human amniotic mesenchymal stem cells (x100)



图注: 图中 A1-C1 分别为 0.03, 0.10, 0.30 μL 病毒原液感染 293T 细胞 96 h 后荧光表达量; A2-C2 为对应白光下的细胞形态。

图 3 荧光显微镜观察目的荧光表达量  
Figure 3 Target fluorescent expression under fluorescence microscopy

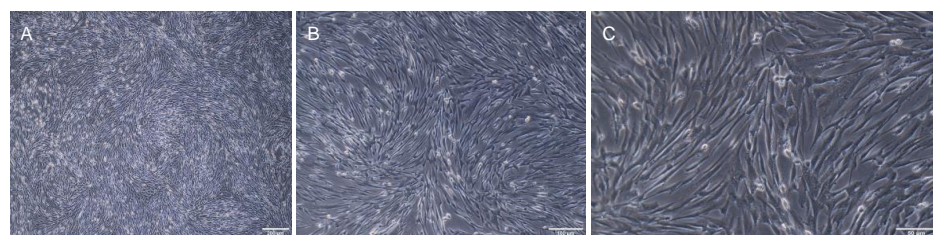
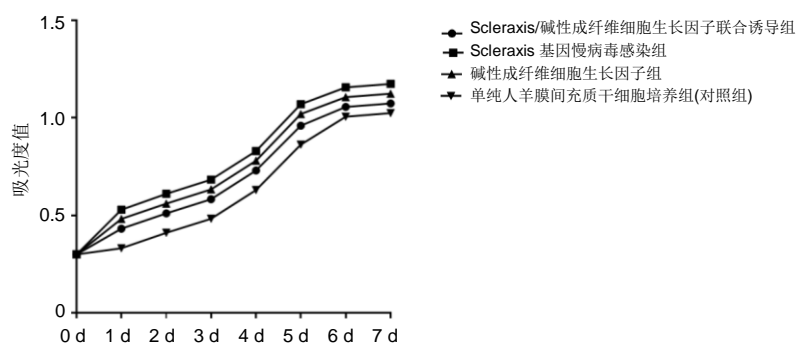


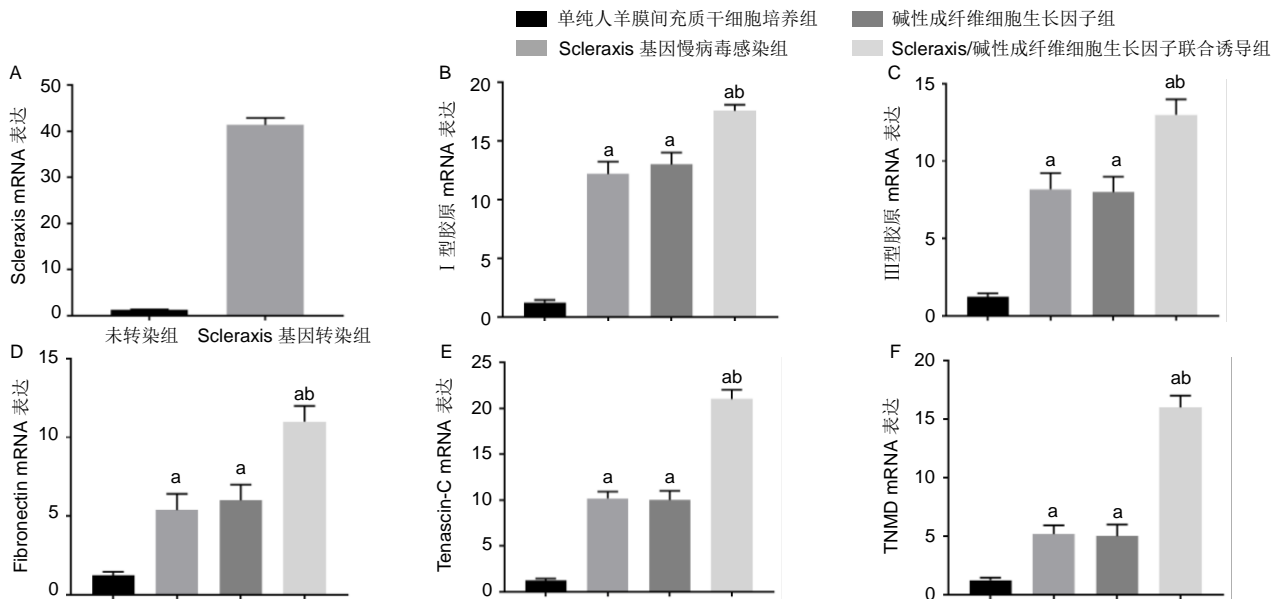
图 5 人羊膜间充质干细胞经 10 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子诱导 14 d 后的形态变化

Figure 5 Morphology of human amniotic mesenchymal stem cells after 14 days of induction with 10 μg/L basic fibroblast growth factor



图注: Scleraxis 基因慢病毒感染组、碱性成纤维细胞生长因子诱导组、Scleraxis/碱性成纤维细胞生长因子联合诱导组较对照组增殖能力强( $P < 0.05$ ), 但这 3 组间的增殖能力差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

图 6 CCK-8 法检测各组人羊膜间充质干细胞活性  
Figure 6 Cell viability in each group detected by cell counting kit-8



图注:图中 A 为 Scleraxis 基因慢病毒感染后人羊膜间充质干细胞中 Scleraxis 的表达急剧升高;B-F 分别为各组韧带成纤维细胞相关基因 mRNA 的表达量,与单纯人羊膜间充质干细胞培养组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,与 Scleraxis 基因慢病毒感染组和碱性成纤维细胞生长因子诱导组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。  
图 7 实时荧光定量 PCR 检测慢病毒感染后人羊膜间充质干细胞 Scleraxis 表达及韧带成纤维细胞相关基因的表达

Figure 7 Expression of Scleraxis and ligament-related genes after induction of human amniotic mesenchymal stem cells detected by real-time PCR

充质干细胞,发现其能够促进腱-骨界面的愈合和修复。以上实验均证实了 Scleraxis 能够促进细胞的成韧带分化,为韧带损伤修复提供了新的思路。

碱性成纤维细胞生长因子在韧带损伤修复过程中发挥着重要的作用,是韧带/肌腱损伤修复过程中的一个重要的因子,在损伤后高表达<sup>[36-38]</sup>。韧带损伤重建术后1周,碱性成纤维细胞生长因子的表达达到峰值,并且持续表达3周,在第8周时其表达再次升高<sup>[39]</sup>。在韧带损伤修复早期,碱性成纤维细胞生长因子的表达开始升高,主要是韧带细胞分泌的内源性碱性成纤维细胞生长因子通过刺激细胞增殖、迁徙,促进血管再生和提高III型胶原的表达来发挥作用,但是作用效果和持续作用时间有限,所以导致韧带损伤自行愈合的能力较弱<sup>[40]</sup>。因此,有学者开始试着将外源碱性成纤维细胞生长因子导入细胞内从而来促进韧带损伤修复。Thomopoulos等<sup>[41]</sup>在韧带损伤后早期(10 d左右)加入外源性碱性成纤维细胞生长因子,结果发现外源碱性成纤维细胞生长因子与内源碱性成纤维细胞生长因子能够产生协同效应,促进细胞增殖、加速细胞外基质形成和重塑,从而明显缩短韧带愈合时间。

此实验首先用 Scleraxis 基因慢病毒感染人羊膜间充质干细胞,促进其向人韧带成纤维细胞分化,实验结果显示慢病毒能够成功感染人羊膜间充质干细胞,其转染效率高且持续,转染后24 h即可以看到绿色荧光, Scleraxis mRNA 表达量急剧升高,说明通过慢病毒转染技术能够成功将 Scleraxis 基因导入人羊膜间充质干细胞。通过实时荧光定量 PCR 实验发现转染后韧带相关基因的 mRNA 表达量明显上调,说明转染 Scleraxis 基因后人羊膜间充质干细胞能够向人韧带成纤维细胞分化。单独用 10  $\mu\text{g/L}$  碱性成纤维细胞生长因子诱导人羊膜间充质干细胞,14 d 后细胞形态发生明显改变,近似人韧带成纤维细胞。实时荧光定量 PCR

结果提示:诱导后人羊膜间充质干细胞确实向人韧带成纤维细胞分化,其韧带相关基因的 mRNA 表达量上调。最后,通过 Scleraxis 和碱性成纤维细胞生长因子联合来诱导人羊膜间充质干细胞,仍然能够向人韧带成纤维细胞分化,并且其分化效果强于单纯转染 Scleraxis 基因和单纯应用碱性成纤维细胞生长因子。该研究还发现,经慢病毒转染 Scleraxis 基因与碱性成纤维细胞生长因子诱导人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞的效果没有明显差异。

综上所述,实验通过联合 Scleraxis 基因和碱性成纤维细胞生长因子来促进人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞分化,为韧带损伤修复治疗提供了新的思路。但是实验还存在一些不足之处:①此实验只是在体外证明了 Scleraxis 联合碱性成纤维细胞生长因子能够促进人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞分化,为韧带损伤修复提供了新的方向。但是,还缺乏相应的体内实验,后期还应在体内进一步证实其促进韧带损伤修复的作用;②碱性成纤维细胞生长因子诱导浓度是否为最佳还需要进一步的实验证实。

**作者贡献:** 实验设计为桑鹏,实验实施为桑鹏,实验评估为刘毅教授,资料收集为桑鹏。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究的实施符合遵义医科大学附属医院的相关伦理要求。

**知情同意问题:** 实验所用胎盘标本来源于遵义医科大学附属医院产科足月产产妇,术前已签署知情同意书。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经遵义医科大学统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; 8(12): a022103.
- [2] Iliadis DP, Bourlos DN, Mastrokalos DS, et al. LARS Artificial Ligament Versus ABC Purely Polyester Ligament for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Orthop J Sports Med.* 2016;4(6):2325967116653359.
- [3] Spragg L, Chen J, Mirzayan R, et al. The Effect of Autologous Hamstring Graft Diameter on the Likelihood for Revision of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Am J Sports Med.* 2016;44(6):1475-1481.
- [4] Thompson SM, Salmon LJ, Waller A, et al. Twenty-Year Outcome of a Longitudinal Prospective Evaluation of Isolated Endoscopic Anterior Cruciate Ligament Reconstruction With Patellar Tendon or Hamstring Autograft. *Am J Sports Med.* 2016;44(12):3083-3094.
- [5] Proffen BL, Sieker JT, Murray MM. Bio-enhanced repair of the anterior cruciate ligament. *Arthroscopy.* 2015;31(5):990-997.
- [6] Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2000;7(3):165-197.
- [7] Brancaloni GH, Lourenzoni MR, Degrève L. Study of the influence of ethanol on basic fibroblast growth factor structure. *Genet Mol Res.* 2006;5(2):350-372.
- [8] Ide J, Kikukawa K, Hirose J, et al. The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. *J Shoulder Elbow Surg.* 2009;18(3):391-398.
- [9] Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, et al. Fibroblast growth factor-2 promotes the repair of partial thickness defects of articular cartilage in immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(8):636-641.
- [10] Chuma H, Mizuta H, Kudo S, et al. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(10):834-842.
- [11] Li X, Su G, Wang J, et al. Exogenous bFGF promotes articular cartilage repair via up-regulation of multiple growth factors. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(10):1567-1575.
- [12] Wang H, Zou Q, Boerman OC, et al. Combined delivery of BMP-2 and bFGF from nanostructured colloidal gelatin gels and its effect on bone regeneration in vivo. *J Control Release.* 2013;166(2):172-181.
- [13] Li Y, Liu Z, Jin Y, et al. Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells into Human Anterior Cruciate Ligament Fibroblast Cells by In Vitro Coculture. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7360354.
- [14] Carlberg AL, Tuan RS, Hall DJ. Regulation of scleraxis function by interaction with the bHLH protein E47. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;3(2):82-86.
- [15] Hu JS, Olson EN, Kingston RE. HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol Cell Biol.* 1992;12(3):1031-1042.
- [16] Liu Y, Watanabe H, Nifuji A, et al. Overexpression of a single helix-loop-helix-type transcription factor, scleraxis, enhances aggrecan gene expression in osteoblastic osteosarcoma ROS17/2.8 cells. *J Biol Chem.* 1997;272(47):29880-29885.
- [17] Alberton P, Popov C, Präger M, et al. Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. *Stem Cells Dev.* 2012;21(6):846-858.
- [18] 金瑛, 李豫皖, 张承昊, 等. 体外诱导人羊膜间充质干细胞向韧带细胞分化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2016,30(2):237-244.
- [19] Filioli Uranio M, Dell'Aquila ME, Cairra M, et al. Characterization and in vitro differentiation potency of early-passage canine amnion- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age. *Mol Reprod Dev.* 2014;81(6):539-551.
- [20] 丁志, 杨松林. 间充质干细胞生物学特性及其分化潜能[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011,15(1):147-150.
- [21] 周文然, 李新, 王文波, 等. 人羊膜间充质干细胞生物学特征及向多巴胺能神经元样细胞的分化[J]. *中国组织工程研究*, 2014,18(23):3682-3690.
- [22] Maidhof R, Rafiuddin A, Chowdhury F, et al. Timing of mesenchymal stem cell delivery impacts the fate and therapeutic potential in intervertebral disc repair. *J Orthop Res.* 2017;35(1):32-40.
- [23] Nogami M, Kimura T, Seki S, et al. A Human Amnion-Derived Extracellular Matrix-Coated Cell-Free Scaffold for Cartilage Repair: In Vitro and In Vivo Studies. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(7-8):680-688.
- [24] 洪佳琼, 高雅, 宋洁, 等. 人羊膜间充质干细胞与骨髓间充质干细胞的生物学特性及免疫抑制作用的比较[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016,24(3):858-864.
- [25] Hong Y. ACL injury: incidences, healing, rehabilitation, and prevention: part of the Routledge Olympic special issue collection. *Res Sports Med.* 2012;20(3-4):155-156.
- [26] Zaffagnini S, Signorelli C, Bonanzinga T, et al. Technical variables of ACL surgical reconstruction: effect on post-operative static laxity and clinical implication. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016;24(11):3496-3506.
- [27] Ahn JH, Lee YS, Ko TS, et al. Accuracy and Reproducibility of the Femoral Tunnel With Different Viewing Techniques in the ACL Reconstruction. *Orthopedics.* 2016;39(6):e1085-e1091.
- [28] Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, et al. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development.* 2001;128(19):3855-3866.
- [29] Cserjesi P, Brown D, Ligon KL, et al. Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development.* 1995;121(4):1099-1110.
- [30] Pryce BA, Brent AE, Murchison ND, et al. Generation of transgenic tendon reporters, ScxGFP and ScxAP, using regulatory elements of the scleraxis gene. *Dev Dyn.* 2007;236(6):1677-1682.
- [31] Mendias CL, Gumucio JP, Bakhurin KI, et al. Physiological loading of tendons induces scleraxis expression in epitenon fibroblasts. *J Orthop Res.* 2012;30(4):606-612.
- [32] Murchison ND, Price BA, Conner DA, et al. Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development.* 2007;134(14):2697-2708.
- [33] Alberton P, Popov C, Präger M, et al. Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. *Stem Cells Dev.* 2012;21(6):846-858.
- [34] Gulotta LV, Rodeo SA. Emerging ideas: Evaluation of stem cells genetically modified with scleraxis to improve rotator cuff healing. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(10):2977-2980.
- [35] Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med.* 2011;39(6):1282-1289.
- [36] Longo UG, Lamberti A, Maffulli N, et al. Tissue engineered biological augmentation for tendon healing: a systematic review. *Br Med Bull.* 2011;98:31-59.
- [37] Durgam SS, Stewart AA, Pondenis HC, et al. Responses of equine tendon- and bone marrow-derived cells to monolayer expansion with fibroblast growth factor-2 and sequential culture with pulverized tendon and insulin-like growth factor-I. *Am J Vet Res.* 2012;73(1):162-170.
- [38] Brent AE, Tabin CJ. FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression. *Development.* 2004;131(16):3885-3896.
- [39] 陈志达, 蔡发艺, 吴进, 等. 成纤维细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞分化髓细胞的研究[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2017,32(8):819-822.
- [40] Chen CH, Cao Y, Wu YF, et al. Tendon healing in vivo: gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period. *J Hand Surg Am.* 2008;33(10):1834-1842.
- [41] Thomopoulos S, Das R, Sakiyama-Elbert S, et al. bFGF and PDGF-BB for tendon repair: controlled release and biologic activity by tendon fibroblasts in vitro. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(2):225-234.