

细胞外基质增强人脐带干细胞的抗氧化能力

赵一朗^{1,2}, 刘滔¹, 杨惠林^{1,2}, 何帆^{1,2} (¹苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006; ²苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215007)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2086

ORCID: 0000-0003-2164-2902(赵一朗)

文章快速阅读:

文章特点—

- (1)由于炎症等原因造成的过量活性氧水平降低了间充质干细胞的质量和存活率,限制了其应用效果;
- (2)细胞外基质由网状结构和小束胶原纤维组成,不仅在体外模拟了间充质干细胞生长的微环境,而且可以调节生长因子和激素的生物作用;
- (3)实验证实了用细胞外基质培养脐带干细胞可以降低胞内活性氧水平,提高其增殖能力,促进成骨分化。

胰酶消化:
脐带干细胞

接种

聚苯乙烯

细胞外基质

结论:

- (1)用细胞外基质培养脐带干细胞可以增强其抗氧化能力;
- (2)促进增殖和成骨分化。

细胞增殖能力

活性氧水平

抗氧化酶表达

成骨分化能力

过氧化氢

预处理

模拟氧化

应激环境

赵一朗,男,1994年生,江苏省徐州市人,汉族,在读硕士,主要从事干细胞组织工程和再生医学研究。

通讯作者:何帆,博士,研究员,硕士生导师,苏州大学骨科研究所,江苏省苏州市 215007

文献标识码:A

投稿日期:2019-09-24

送审日期:2019-09-30

采用日期:2019-11-15

在线日期:2020-03-23



文题释义:

脐带间充质干细胞:是来源于脐带华氏胶质组织的间充质干细胞,同时具有胚胎干细胞和成人干细胞的特点,增殖和多向分化能力较强,能在体外扩增更长时间,可以通过非侵入性的方式获取,不会引起伦理问题,因而在组织工程研究和再生医学应用领域引起广泛关注。

脱细胞:是将细胞去除而保留细胞外基质的方法。在细胞外基质分泌较多之后,用 PBS 配制 5% 曲拉通 X-100、20 mmol/L 氨水洗涤液,预热至 50 °C,过滤后将洗涤液加至培养板或培养瓶,37 °C 条件下反应 3 min, PBS 清洗 3 遍,即获得细胞外基质。脱细胞处理后获得的细胞外基质可继续用于细胞培养。

摘要

背景:已有研究表明细胞外基质可以促进细胞增殖,降低细胞内活性氧水平,但细胞外基质是否能够增强脐带干细胞的抗氧化能力以提高其在再生医学和组织工程中的应用效果,相关研究较少。

目的:探讨细胞外基质对脐带干细胞增殖、抗氧化以及成骨分化潜能的影响。

方法:将脐带干细胞分 4 组:①聚苯乙烯组:用普通聚苯乙烯培养板培养脐带干细胞,无其他特殊处理;②细胞外基质组:用细胞外基质培养脐带干细胞,无其他特殊处理;③聚苯乙烯+过氧化氢组:用聚苯乙烯板培养脐带干细胞,并用 200 μmol/L 过氧化氢预处理细胞 2 h;④细胞外基质+过氧化氢组:用细胞外基质培养脐带干细胞,并用 200 μmol/L 过氧化氢预处理细胞 2 h。过氧化氢预处理 2 h 结束后采用 CCK-8 法检测脐带干细胞的增殖能力;过氧化氢预处理 2 h 结束后继续培养 72 h,流式细胞实验和 qRT-PCR 实验检测脐带干细胞的抗氧化能力;过氧化氢预处理 2 h 结束后成骨诱导分化 14 d,采用茜素红染色和 qRT-PCR 实验检测脐带干细胞的成骨能力。

结果与结论:①细胞外基质组和细胞外基质+过氧化氢组的吸光度值分别高于聚苯乙烯组和聚苯乙烯+过氧化氢组;②聚苯乙烯+过氧化氢组和聚苯乙烯组活性氧水平分别高于细胞外基质组和细胞外基质+过氧化氢组 ($P < 0.05$);抗氧化酶相关基因 SOD2 和 CAT 的表达水平在细胞外基质组和细胞外基质+过氧化氢组分别较聚苯乙烯组和聚苯乙烯+过氧化氢组明显上调 ($P < 0.05$);③细胞外基质组成骨相关基因 COL1A1、RUNX2、OCN、OSTERIX 表达量最高,细胞外基质+过氧化氢组次之,聚苯乙烯+过氧化氢组最低,各组间差异有显著性意义 ($P < 0.05$);④结果表明,细胞外基质可以提高脐带干细胞的增殖能力、抗氧化能力和成骨分化潜能,是一种有广泛应用前景的细胞体外扩增培养方法。

关键词:

细胞外基质;脐带间充质干细胞;活性氧;抗氧化酶;细胞增殖;成骨分化

中图分类号:R459.9;R394.2;R318

基金资助:

国家自然科学基金(31570978, 31771063),项目负责人:何帆

Extracellular matrix improves antioxidant capacity of human umbilical cord stem cells

Zhao Yilang^{1,2}, Liu Tao¹, Yang Huilin^{1,2}, He Fan^{1,2} (¹Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; ²Institute of Orthopaedics at Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China)

Zhao Yilang, Master candidate, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; Institute of Orthopaedics at Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China

Corresponding author: He Fan, MD, Researcher, Master's supervisor, Institute of Orthopaedics at Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Extracellular matrix has been shown to improve cell proliferation and reduce intracellular reactive oxygen species levels. However, there is little research on whether extracellular matrix can enhance the antioxidant capacity of umbilical cord stem cells to enhance their application in regenerative medicine and tissue engineering.

OBJECTIVE: To investigate the effect of extracellular matrix on umbilical cord stem cell proliferation, antioxidant and osteogenic capacity.

METHODS: The umbilical cord stem cells were divided into four groups. In the polystyrene group, the umbilical cord stem cells were cultured with ordinary polystyrene culture plate without other special treatment. In the extracellular matrix group, the umbilical cord stem cells were cultured with extracellular matrix without other special treatment. In the polystyrene + hydrogen peroxide group, the umbilical cord stem cells were cultured with polystyrene plate and pretreated with 200 $\mu\text{mol/L}$ hydrogen peroxide for 2 hours. In the extracellular matrix + hydrogen peroxide group, umbilical cord stem cells were cultured with extracellular matrix and pretreated with 200 $\mu\text{mol/L}$ hydrogen peroxide for 2 hours. The cells were pretreated with 200 $\mu\text{mol/L}$ hydrogen peroxide for 2 hours. Proliferation capacity of umbilical cord stem cells was detected by CCK-8 assay. The cells were cultured for 72 hours after hydrogen peroxide pretreatment for 2 hours. The antioxidant capacity of umbilical cord stem cells was detected by flow cytometry and qRT-PCR. After 2 hours of hydrogen peroxide pretreatment, the cells were induced to differentiate into osteoblasts for 14 days. The osteogenic capacity of umbilical cord stem cells was detected by alizarin red staining and qRT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The absorbance values of extracellular matrix group and extracellular matrix + hydrogen peroxide group were higher than that of polystyrene group and polystyrene + hydrogen peroxide group, respectively. The levels of reactive oxygen species in the polystyrene + hydrogen peroxide group and the polystyrene group were higher than those in the extracellular matrix group and the extracellular matrix + hydrogen peroxide group, respectively ($P < 0.05$). The expression levels of antioxidant enzyme-related genes SOD2 and CAT in the extracellular matrix group and extracellular matrix + hydrogen peroxide group were significantly higher than those in the polystyrene group and the polystyrene + hydrogen peroxide group, respectively ($P < 0.05$). The expression of bone related genes COL-1, RUNX2, OCN, and OSTERIX was highest in the extracellular matrix group, followed by the extracellular matrix + hydrogen peroxide group, and lowest in the polystyrene + hydrogen peroxide group; there was significant difference between the groups ($P < 0.05$). The results show that extracellular matrix can increase the proliferation capacity, antioxidant capacity and osteogenic differentiation potential of umbilical cord stem cells. It is a method for *in vitro* amplification and culture of cells with wide application prospects.

Key words: extracellular matrix; umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; reactive oxygen species; antioxidant enzyme related genes; cell proliferation; osteogenic differentiation

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 31570978 and 31771063 (both to HF)

0 引言 Introduction

近年来, 间充质干细胞因其具有自我更新和多向分化潜能而在组织工程研究和再生医学应用领域引起广泛关注^[1]。间充质干细胞可从骨髓、脂肪、滑膜、羊水等多种组织或器官中获得^[2-3]。脐带干细胞(human umbilical-cord derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs)同时具有胚胎干细胞和成人干细胞的特点^[4-5]。另外, 脐带干细胞可以通过非侵入性方法获取并且不会引起伦理问题^[6]。更重要的是, 与其他来源的间充质干细胞相比, 脐带干细胞具有更强的增殖能力, 可以在体外扩增更长时间^[7]。

间充质干细胞在临床的应用还存在诸多问题, 其中主要原因之一是其不适应体内的炎症环境。炎症细胞因子激发炎症细胞生成大量的活性氧自由基, 例如过氧化氢、羟基和超氧化物阴离子等使间充质干细胞受到氧化应激损伤, 其增殖、成骨分化能力受损, 干细胞干性降低^[8-9]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)包括含有不同离子的超氧化物歧化酶1和超氧化物歧化酶2两种同工酶^[10], 可以将超氧化物阴离子转化成过氧化氢。由超氧化物歧化酶产生的过氧化氢可以被过氧化氢酶进一步分解为水和氧气, 从而使间充质干细胞免受活性氧自由基造成的氧化应激损伤。

细胞外基质是由网状结构和小束胶原纤维组成的, 脱细胞过程保留了原有的纤维组织和蛋白成分^[11], 不仅在体外模拟了间充质干细胞生长的微环境, 而且可以调节生长因子和激素的生物作用^[11-12]。有文献报道, 细胞外基质可以提高间充质干细胞对氧化应激和细胞周期阻滞的抵抗力^[13], 但细胞外基质能否提高脐带干细胞对氧化应激性损

伤抵抗力的研究较少。在此次研究中, 作者提出细胞外基质可以提高脐带干细胞抗氧化能力的假设。为了验证这一假设, 分别用细胞外基质和聚苯乙烯培养脐带干细胞, 检测细胞增殖、抗氧化以及成骨分化潜能等。

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2019年2至7月在苏州大学附属第一医院骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验材料、试剂 脐带干细胞(广州赛业公司); 明胶、戊二醛、乙醇胺、氨水、抗坏血酸、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、过氧化氢、茜素红、TRIzol(美国Sigma公司); 曲拉通X-100(Biosharp公司); α -MEM培养基(美国Hyclone公司); 细胞培养瓶/板(美国Corning公司)。

1.3.2 实验仪器 PCR仪(美国Bio Rad公司); 酶标仪(美国BioTek公司); 纯水仪(美国Thermo公司); 倒置荧光显微镜(日本Olympus公司); 流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞外基质的制备

(1)预处理: 向培养板或培养瓶中加入0.2%明胶, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育60 min, 吸弃明胶, PBS冲洗1次, 以1%适量戊二醛覆盖底面, 室温静置30 min, 吸弃戊二醛, PBS清洗1次, 加适量1 mol/L乙醇胺, 室温静置30 min, 吸弃乙醇胺, PBS冲洗3次。

(2)接种细胞:将第4代脐带干细胞接种在经过预处理的培养板或培养瓶中,当细胞密度超过90%时,在 α -MEM培养基中加入100 mmol/L维生素C,培养7 d后进行脱细胞。

(3)脱细胞:配制5%曲拉通X-100、20 mmol/L氨水洗液,预热至50 °C,过滤后使用。将洗涤液加至培养板或培养瓶,37 °C条件下反应3 min, PBS清洗3遍,放入4 °C冰箱待用。

1.4.2 扫描电镜分析 脱细胞后吸弃培养液, PBS清洗2遍, 40 g/L多聚甲醛固定细胞外基质10 min, 梯度乙醇脱水, 先在普通光学显微镜下拍照, 之后用镊子夹出细胞爬片(接种细胞前放在培养板中的细胞爬片), 临界点干燥后在扫描电镜下采集图像。

1.4.3 实验分组 ①聚苯乙烯组:用普通聚苯乙烯培养板培养脐带干细胞, 无其他特殊处理; ②细胞外基质组:用细胞外基质培养脐带干细胞, 无其他特殊处理; ③聚苯乙烯+过氧化氢组:用聚苯乙烯板培养脐带干细胞, 并用200 μ mol/L过氧化氢预处理细胞; ④细胞外基质+过氧化氢组:用细胞外基质培养脐带干细胞, 并用200 μ mol/L过氧化氢预处理细胞。

1.4.4 脐带干细胞的培养及过氧化氢处理 将从赛业公司购入的脐带干细胞于37 °C水浴锅中解冻约3 min, 等冻存管中液体完全解冻后将液体移至离心管中, 逐滴滴入 α -MEM培养基, 以1 200 r/min离心约5 min, 弃去上清, 用 α -MEM培养基重悬细胞, 移至培养瓶中, 于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱中培养, 每3 d换液1次, 当细胞密度超过90%时, 用胰蛋白酶消化细胞, 传代供下一阶段实验使用。当第4代脐带干细胞密度达到50%左右时, 加入200 μ mol/L过氧化氢, 于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱中预处理2 h, 然后用PBS清洗2次, 去除残留的过氧化氢, 加入 α -MEM培养基继续培养, 供以下实验检测。

1.4.5 CCK-8实验检测细胞增殖能力 过氧化氢预处理2 h结束后各组脐带干细胞以1 $\times$ 10³/cm²密度接种于96孔板, 接种后第1, 3, 5, 7天进行CCK-8实验检测, 按1:10比例混合CCK-8溶液和无血清 α -MEM培养基, 每孔加入110 μ L CCK-8工作液, 于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱孵育60 min, 酶标仪测定每孔450 nm波长处吸光度值。

1.4.6 细胞内活性氧检测 过氧化氢预处理2 h结束后继续培养72 h, 各组脐带干细胞以3 000/cm²密度接种于6孔板中, PBS清洗, 加入适量10 μ mol/L DCF-DA工作液, 37 °C条件下避光孵育30 min, PBS清洗重悬细胞, 收集至流式管, 上流式细胞仪检测, 使用FlowJo10软件分析数据。

1.4.7 成骨分化及茜素红染色 过氧化氢预处理2 h结束后各组脐带干细胞以3 000/cm²密度接种于6孔板中, PBS清洗2次, 加入含0.2 mmol/L维生素C、100 nmol/L地塞米松、10 mmol/L β -磷酸甘油的 α -MEM培养基诱导脐带干细胞成骨分化, 诱导14 d后加入40 g/L多聚甲醛固定30 min, 加入0.1%茜素红染料(pH值调至4.3)染色1 h, 普通明场显

微镜采集图像。茜素红定量分析:将5%高氯酸加入孔中, 室温静置15 min后转移至96孔板, 用酶标仪检测420 nm波长处吸光度值。

1.4.8 qRT-PCR检测抗氧化酶和成骨相关基因的表达 过氧化氢预处理2 h结束后继续培养72 h, 检测抗氧化相关基因SOD2和CAT的表达水平; 过氧化氢预处理2 h结束成骨诱导14 d, 检测成骨相关基因RUNX2、COL1A1、OCN、OSTERIX的表达水平。操作步骤:吸去原培养基, PBS清洗2次, 按照TRIzol Reagent说明书操作步骤提取细胞总RNA, 用反转录试剂盒获得cDNA, 使用iTap™ Universal SYBR® Green Supermix kit(Bio-Rad)试剂盒进行RT-PCR检测, PCR扩增条件:95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 60 °C延伸30 s, 用荧光法作定量分析, 重复40次实验。以GAPDH作为内参, 通过2^{- $\Delta\Delta$ CT}法对各组基因表达量进行统计。相关引物见表1。

表1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of each gene

基因	前引物(5'-3')	后引物(5'-3')
GAPDH	ACT TTG TGA AGC TCA TTT CCT GGT A	GTG GTT TGA GGG CTC TTA CTC CTT
SOD2	GGG GAT TGA TGT GTG GGA GCA CG	AGA CAG GAC GTT ATC TTG CTG GGA
CAT	TGG GAT CTC GTT GGA AAT AAC AC	TCA GGA CGT AGG CTC CAG AAG
RUNX2	AGA AGG CAC AGA GAC AGA GAA GCT TGA	AGA AGG CAC AGA CAG ACA GAA GCT TGA
COL1A1	CAG CCG CTT CAC CTA CAG C	TTT TGT ATT CAA TCA CTG TCT TGC C
OCN	GAG CCC CAG TCC CCT ACC	GAC ACC CTA GAC CGG GCC GT
OSTERIX	CCC TCC CTT TTC CCA CTC AT	CAT GGA TGC CTG CCT TGT AC

1.5 主要观察指标 ①各组细胞增殖能力; ②各组细胞活性氧水平和抗氧化酶相关基因的表达; ③各组细胞茜素红染色结果及成骨相关基因的表达。

1.6 统计学分析 应用GraphPad Prism 7.0软件对实验数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单组t检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 细胞外基质的特征 在普通光学显微镜下观察, 细胞外基质材料为纤维样无色膜状结构; 在扫描电镜下观察, 细胞外基质由小纳米纤维束构成, 见图1。

2.2 用聚苯乙烯和细胞外基质培养脐带干细胞的形态 在倒置显微镜下观察, 接种1 d后细胞贴壁明显, 用聚苯乙烯培养的细胞呈纺锤状, 与典型的间充质干细胞形态相似, 用细胞外基质培养的细胞呈长梭形; 第3天贴壁细胞密度明显增加, 细胞状态良好; 第5天细胞密度超过90%, 可以传代或用作其他实验检测, 见图2。

2.3 细胞外基质对脐带干细胞增殖的影响 在培养第3, 5, 7天, 细胞外基质组和细胞外基质+过氧化氢组的吸光度值分别高于聚苯乙烯组和聚苯乙烯+过氧化氢组, 证明细胞外基质可以促进脐带干细胞的增殖并逆转过氧化氢预处理对脐带干细胞增殖能力的抑制作用, 见图3。

2.4 细胞外基质对脐带干细胞抗氧化能力的影响 200 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢预处理2 h结束后继续培养72 h, 流式细胞仪检测聚苯乙烯+过氧化氢组和聚苯乙烯组活性氧水平分别高于细胞外基质组和细胞外基质+过氧化氢组, 其中聚苯乙烯+过氧化氢组活性氧水平明显高于聚苯乙烯组, 各组间差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图4A, B。RT-PCR检测结果显示, 抗氧化酶相关基因SOD2和CAT的表达水平在细胞外基质组和细胞外基质+过氧化氢组分别较聚苯乙烯组和聚苯乙烯+过氧化氢组明显上调, 聚苯乙烯组SOD2和CAT表达水平较聚苯乙烯+过氧化氢组明显上调, 各组间差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图4C, D。

2.5 细胞外基质对脐带干细胞成骨分化潜能的影响 过氧化氢预处理2 h结束成骨分化诱导14 d进行茜素红染色和成骨基因RT-PCR检测。茜素红染色结果显示, 细胞外基质组橙红色范围最多, 颜色最深, 细胞外基质+过氧化氢组次之, 聚苯乙烯+过氧化氢组橙红色范围最小, 与茜素红定量分析结果一致($P < 0.05$), 见图5A, B。RT-PCR结果显示, 细胞外基质组成骨相关基因COL1A1、RUNX2、OCN、OSTERIX表达量最高, 细胞外基质+过氧化氢组次之, 聚苯乙烯+过氧化氢组最低, 各组间差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图5C-F。

3 讨论 Discussion

间充质干细胞在临床移植治疗和组织工程中有广泛的应用前景, 但是由于炎症等原因造成的过量活性氧水平降低了间充质干细胞的质量和存活率。例如, 在骨关节炎中活性氧水平升高, 损害软骨细胞线粒体功能和基质代谢能力^[14]。因此, 减轻氧化应激对细胞的损伤, 提高细胞体内移植的存活率尤为重要。该实验发现用细胞外基质培养脐带干细胞可以上调SOD2和CAT的表达, 从而降低活性氧水平。

大量研究表明, 过量的活性氧会损害细胞DNA、蛋白质和脂质。该实验发现, 细胞外基质培养的脐带干细胞具有更强的增殖能力, 这可能是因为使用细胞外基质培养的细胞内源性活性氧水平降低, 从而促进了细胞的生长^[15-16]。过氧化氢是活性氧的重要成分之一, 低浓度的过氧化氢可以增强细胞的增殖能力, 而高浓度的过氧化氢会导致细胞凋亡^[17-18]。该实验发现细胞外基质培养的脐带干细胞SOD2、CAT表达水平高于聚苯乙烯培养的脐带干细胞, 从而降低了细胞内过氧化氢水平, 这是用细胞外基质培养能够促进细胞在体外扩增的重要证据。骨关节炎软骨细胞的SOD2活性降低不仅会使软骨细胞受到氧化应激性损伤, 而且会加快骨关节炎的病理进展^[19]。因此, 使用褪黑

素等抗氧化剂可以通过上调抗氧化酶水平来提高细胞对氧化应激性损伤的抵抗力^[20]。

干细胞的增殖能力和干性对于干细胞治疗效果非常重要, 但是由体内到体外生长环境的改变对干细胞状态有很大影响。在体外扩增过程中干细胞的增殖能力会下降, 并且会逐渐丧失多向分化潜能^[21]。课题组之前的研究表明, 细胞外基质培养可以增强间充质干细胞增殖能力并保留分化能力^[22-23]。另外, 胎儿细胞脱细胞处理获得的细胞外基质比成人细胞脱细胞获得的细胞外基质更有利于间充质干细胞的体外扩增^[24]。脐带是胚外组织, 富含细胞外基质蛋白, 如胶原蛋白、层粘连蛋白和硫酸肝素蛋白聚糖等^[25]。因此作者假设脐带干细胞脱细胞处理获得的细胞外基质能够促进细胞增殖和多向分化。LI等^[24]通过蛋白质组学分析了细胞外基质的组成成分, 发现纤维蛋白——尤其I型胶原和III型胶原是其中含量最多的蛋白。细胞外基质中的蛋白聚糖能够促进细胞黏附, 提高细胞的增殖能力与分化潜能。层粘连蛋白是一种大分子量的蛋白聚糖, 被认为可以促进间充质干细胞的多向分化^[26]。LAI等^[27]证实了细胞外基质中的饰胶蛋白聚糖等小富含亮氨酸蛋白多糖可以促进成骨分化过程中的基质矿化和胶原聚集。细胞外基质中促进细胞增殖的关键生物活性成分目前不十分明确。LIN等^[28]最近的研究表明细胞外基质所包含的非胶原蛋白能够提高细胞的增殖能力和多向分化潜能。除了蛋白成分, 细胞外基质的力学特性如硬度等也可以调控间充质干细胞的特异性分化^[29]。

增强间充质干细胞多向分化能力对提高其临床应用效果至为关键。该实验的数据表明, 过氧化氢会损害脐带干细胞的成骨分化能力, 用细胞外基质培养脐带干细胞能够保留间充质干细胞的成骨分化能力。高浓度的过氧化氢会降低细胞的生存能力, 为了避免不同细胞密度对成骨分化的影响, 该实验使用200 $\mu\text{mol/L}$ 亚致死浓度的过氧化氢, 这与作者之前的实验一致^[30]。茜素红染色显示, 用过氧化氢预处理和未用过氧化氢预处理的细胞密度相似, 说明是由于过氧化氢导致脐带干细胞的成骨分化能力降低从而抑制其成骨分化, 并不是因为细胞生存能力下降。尽管这一结果与1篇报道过氧化氢会促进成骨以及血管平滑肌细胞钙化的文献不同^[31], 但是作者认为这种不同是因为过氧化氢对不同细胞成骨分化的作用不同, 并且不同来源间充质干细胞对过氧化氢引起的氧化应激的抵抗力也不同^[32-33]。

用细胞外基质培养细胞的缺点主要是需要花费更多的时间和精力去促进细胞产生细胞外基质并且去除了宝贵的细胞成分, 同时也需要更多的资金支持。在后续的实验中重点研究细胞外基质中关键的生物活性成分, 并分析基质结构对间充质干细胞的影响。该实验主要评价了细胞外基质增强脐带干细胞的抗氧化能力, 并未对细胞外基质抗氧化的机制进行深入研究, 这也是实验的不足之处, 在以后的实验中将对相关机制进行深入探讨。

致谢: 感谢苏州大学骨科研究所提供实验设备。

作者贡献: 所有作者均参与此次研究, 采用盲法评估。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(31570978, 31771063)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

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: 该研究的实施符合苏州大学附属第一医院的相关伦理要求。

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表宗旨。

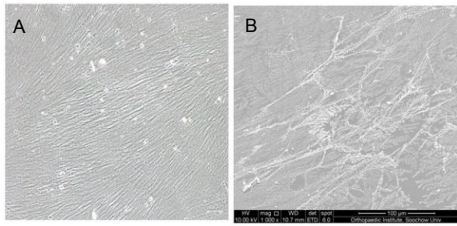
生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过苏州大学生物统计学专家审核。

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

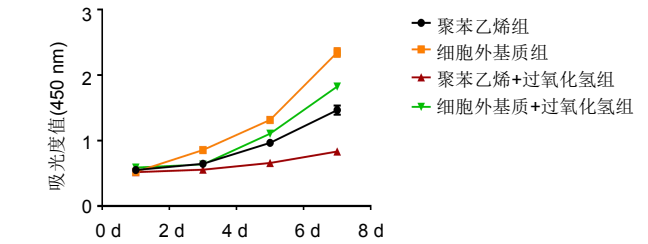
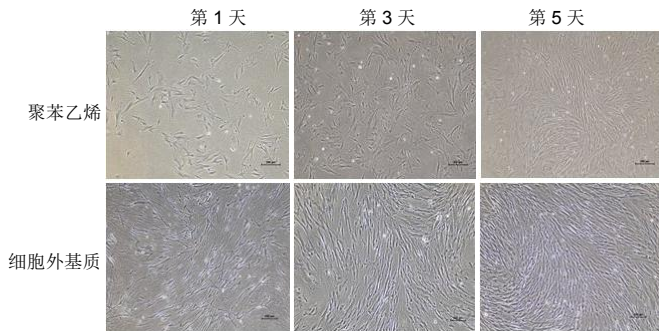
- OREFFO RO, COOPER C, MASON C, et al. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev*. 2005;1(2):169-178.
- BARRY F, MURPHY M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(10):584-594.
- KONG L, ZHENG LZ, QIN L, et al. Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *J Orthop Translat*. 2017;9:89-103.
- PAPPA KI, ANAGNOU NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med*. 2009;4(3):423-433.
- JANCZEWSKI AM, WOJTKIEWICZ J, MALINOWSKA E, et al. Can Youthful Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Bring a Breath of Fresh Air for COPD? *Int J Mol Sci*. 2017;18(11): E2449.
- HSIEH JY, FU YS, CHANG SJ, et al. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells Dev*. 2010;19(12):1895-1910.
- MITCHELL KE, WEISS ML, MITCHELL BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21(1):50-60.
- SCHIEBER M, CHANDEL NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-462.
- MINIERI V, SAVIOZZI S, GAMBAROTTA G, et al. Persistent DNA damage-induced premature senescence alters the functional features of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2015;19(4):734-743.
- ZELKO IN, MARIANI TJ, FOLZ RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337-349.
- HE F, LIU X, XIONG K, et al. Extracellular matrix modulates the biological effects of melatonin in mesenchymal stem cells. *J Endocrinol*. 2014;223(2):167-180.
- BHATA A, BOYADJIEV SA, SENDERS CW, et al. Differential growth factor adsorption to calvarial osteoblast-secreted extracellular matrices instructs osteoblastic behavior. *PLoS One*. 2011;6(10):e25990.
- PEI M, ZHANG Y, LI J, et al. Antioxidation of decellularized stem cell matrix promotes human synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Stem Cells Dev*. 2013;22(6):889-900.
- LIU-BRYAN R, TERKELTAUB R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):35-44.
- COURTIAL L, PICCO V, GROVER R, et al. The c-Jun N-terminal kinase prevents oxidative stress induced by UV and thermal stresses in corals and human cells. *Sci Rep*. 2017;7:45713.
- KAMATA H, HONDA S, MAEDA S, et al. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005;120(5):649-661.
- SKÓRKOWSKA-TELICHOWSKA K, KULMAA, GĘBAROWSKI T, et al. V79 Fibroblasts Are Protected Against Reactive Oxygen Species by Flax Fabric. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018;184(1):366-385.
- HAN MJ, KIM BY, YOON SO, et al. Cell proliferation induced by reactive oxygen species is mediated via mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Mol Cells*. 2003;15(1):94-101.
- YANG C, YOU D, HUANG J, et al. Effects of AURKA-mediated degradation of SOD2 on mitochondrial dysfunction and cartilage homeostasis in osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):17727-17738.
- OHTA Y, KONGO M, KISHIKAWA T. Effect of melatonin on changes in hepatic antioxidant enzyme activities in rats treated with alpha-naphthylisothiocyanate. *J Pineal Res*. 2001;31(4):370-377.
- JIANG T, XU G, WANG Q, et al. In vitro expansion impaired the stemness of early passage mesenchymal stem cells for treatment of cartilage defects. *Cell Death Dis*. 2017;8(6):e2851.
- PEI M, HE F, KISH VL. Expansion on extracellular matrix deposited by human bone marrow stromal cells facilitates stem cell proliferation and tissue-specific lineage potential. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(23-24):3067-3076.
- HARVESTINE JN, SAIZ JR AM, LEACH JK. Cell-secreted extracellular matrix influences cellular composition sequestered from unprocessed bone marrow aspirate for osteogenic grafts. *Biomater Sci*. 2019;7(5):2091-2101.
- LI J, HANSEN KC, ZHANG Y, et al. Rejuvenation of chondrogenic potential in a young stem cell microenvironment. *Biomaterials*. 2014;35(2):642-653.
- YANG Y, MELZER C, BUCAN V, et al. Conditioned umbilical cord tissue provides a natural three-dimensional storage compartment as in vitro stem cell niche for human mesenchymal stroma/stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:28.
- QU H, LIU X, NI Y, et al. Laminin 411 acts as a potent inducer of umbilical cord mesenchymal stem cell differentiation into insulin-producing cells. *J Transl Med*. 2014;12:135.
- LAI Y, SUN Y, SKINNER CM, et al. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(7):1095-1107.
- LIN H, YANG G, TAN J, et al. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials*. 2012;33(18):4480-4489.
- WEN JH, VINCENT LG, FUHRMANN A, et al. Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nat Mater*. 2014;13(10):979-987.
- ZHOU L, CHEN X, LIU T, et al. Melatonin reverses H₂O₂-induced premature senescence in mesenchymal stem cells via the SIRT1-dependent pathway. *J Pineal Res*. 2015;59(2):190-205.
- BYON CH, JAVED A, DAI Q, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*. 2008;283(22):15319-15327.
- LEE DH, LIM BS, LEE YK, et al. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol*. 2006;22(1):39-46.
- YOON SO, YUN CH, CHUNG AS. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev*. 2002;123(12):1597-1604.



图注: 图中 A 为光学显微镜下观察细胞外基质材料为纤维样无色膜状结构($\times 10$); B 为扫描电镜下观察细胞外基质呈小纳米纤维束结构($\times 1000$)

图 1 脐带干细胞来源细胞外基质的形态

Figure 1 Morphology of extracellular matrix derived from umbilical cord stem cells



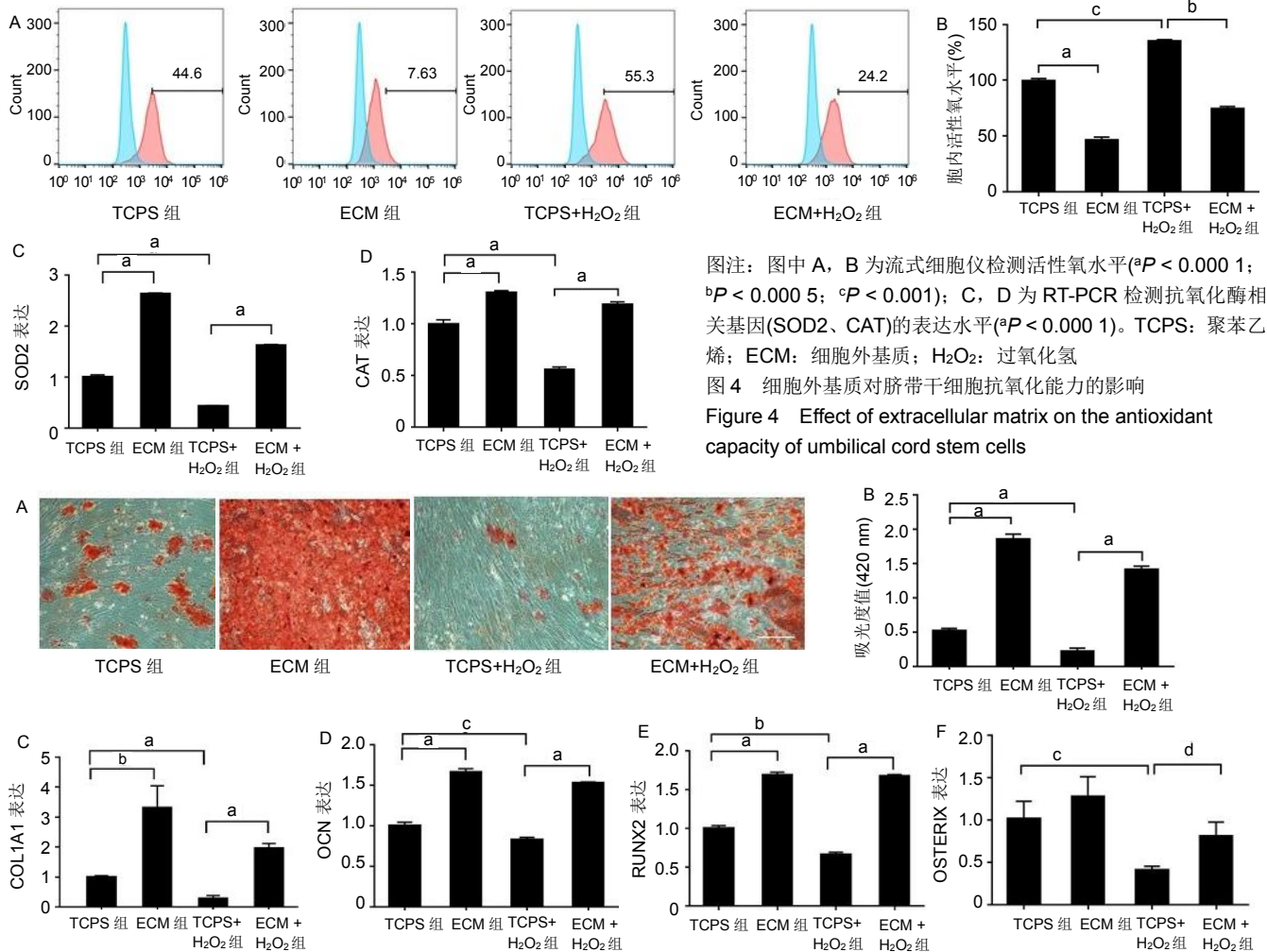
图注: CCK-8 增殖实验结果显示细胞外基质能够促进脐带干细胞的增殖
图 3 细胞外基质对脐带干细胞增殖的影响

Figure 3 Effects of extracellular matrix on umbilical cord stem cell proliferation

图注: 脐带干细胞在聚苯乙烯上呈典型的纺锤形, 在细胞外基质上呈长梭形; 接种第 1 天细胞贴壁约 50%, 到第 5 天细胞密度超过 90%

图 2 使用聚苯乙烯和细胞外基质培养脐带干细胞第 1, 3, 5 天的形态和密度($\times 5$)

Figure 2 Morphology and density of umbilical cord stem cells at 1, 3 and 5 days seeded on polystyrene and extracellular matrix ($\times 5$)



图注: 图中 A, B 为流式细胞仪检测活性氧水平($^aP < 0.0001$; $^bP < 0.0005$; $^cP < 0.001$); C, D 为 RT-PCR 检测抗氧化酶相关基因(SOD2, CAT)的表达水平($^aP < 0.0001$). TCPS: 聚苯乙烯; ECM: 细胞外基质; H₂O₂: 过氧化氢

图 5 细胞外基质对脐带干细胞成骨分化的影响

Figure 5 Effect of extracellular matrix on osteogenic differentiation of umbilical cord stem cells