

小鼠毛囊来源间充质干细胞体外诱导成软骨的细胞标记物*

宾志文, 陈丽霞

Cell surface markers during chondrogenic induction of mesenchymal stem cells derived from mouse hair follicle *in vitro*

Bin Zhi-wen, Chen Li-xia

文章亮点:

结果表明小鼠毛囊来源的间充质干细胞能诱导形成软骨样细胞; CD54 和 CD166 以及硫酸黏多糖可作为对小鼠毛囊来源的间充质干细胞向软骨细胞分化的监测指标。

Abstract

BACKGROUND: Mesenchymal stem cells derived from mouse hair follicle possess multipotential differentiation ability. There have been few reports describing cell surface marker during chondrogenic induction process of mesenchymal stem cells derived from mouse hair follicle *in vitro*.

OBJECTIVE: To investigate cell morphology, cell surface markers and sulfate glycosaminoglycan level during chondrogenic induction of mesenchymal stem cells derived mouse hair follicle.

METHODS: IRC newborn mouse skin stem cells were *in vitro* isolated and cultured. Then cells were cultured with chondrogenic culture medium for 7 and 14 days for determination of indices.

RESULTS AND CONCLUSION: After treated with chondrogenic medium, the counts of CD44⁺ cells did not increase dramatically and the level of sulfate glycosaminoglycan was not changed, but the counts of CD54⁺ cells and CD166⁺ cells were significantly increased and the levels of corresponding sulfate glycosaminoglycans showed the same increasing tendency. These results suggest that mesenchymal stem cells derived from mouse hair follicle could differentiate into chondrocyte-like cells under the induction of medium; CD44 could not be used as the cell surface marker of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from mouse hair follicle, while CD54 and CD166 as well as corresponding sulfate glycosaminoglycans are competent for cell surface from marker of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from mouse hair follicle.

Bin ZW, Chen LX. Cell surface markers during chondrogenic induction of mesenchymal stem cells derived from mouse hair follicle *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(32): 5973-5977.

[<http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html>]

摘要

背景: 小鼠毛囊来源的间充质干细胞有很强的多向诱导分化能力, 但少有研究关注其在诱导分化为软骨细胞过程中的细胞表面标记物。

目的: 观察小鼠毛囊来源的间充质干细胞分化为软骨细胞过程中的形态、细胞表面标记物和硫酸黏多糖含量的变化。

方法: 体外分离培养 ICR 新生小鼠皮肤干细胞, 用成软骨细胞诱导液诱导培养 7, 14 d 观察各项指标。

结果与结论: 经成软骨细胞诱导液处理后, 小鼠毛囊来源的间充质干细胞中 CD44(+)细胞数量无明显增加, 硫酸黏多糖含量无变化, CD54(+)细胞和 CD166(+)细胞则显著增加, 两者硫酸黏多糖含量亦明显升高。表明小鼠毛囊来源的间充质干细胞能诱导形成软骨样细胞; CD44 不能作为小鼠毛囊来源的间充质干细胞向软骨细胞分化的细胞表面标记物; CD54 和 CD166 以及硫酸黏多糖可作为对小鼠毛囊来源的间充质干细胞向软骨细胞分化的监测指标。

关键词: 间充质干细胞; 小鼠; 毛囊; 软骨; 细胞表面标记物; CD54; CD166; 干细胞

宾志文, 陈丽霞. 小鼠毛囊来源间充质干细胞体外诱导成软骨的细胞标记物[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(32): 5973-5977. [<http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html>]

Department of Stomatology, Guilin Second People's Hospital, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Bin Zhi-wen*, Master, Attending physician, Department of Stomatology, Guilin Second People's Hospital, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China ggglm@126.com

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.32.016

Received: 2012-03-20
Accepted: 2012-05-31

桂林市第二人民医院口腔科, 广西壮族自治区桂林市 541001

宾志文*, 男, 1967 年出, 广西壮族自治区朔阳县人, 汉族, 2007 年中山大学光华口腔医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事颌面外科创伤修复方面的研究。ggglm@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)32-05973-05

收稿日期: 2012-03-20
修回日期: 2012-05-31
(20120320008/W · S)

0 引言

颞下颌关节的关节软骨、关节盘的破坏以及退行性变是临床颌面外科多见病之一。颞下颌关节是人体惟一的联动关节,其特殊的解剖结构导致特征性的外伤后并发症,对患者的预后及生活质量的影响有特殊意义^[1]。因此,解决颞下颌关节的关节软骨和关节盘的重建,是不容忽视的问题。目前许多学者致力于软骨代用品的研究,然而,尚未有理想材料能达到有足够坚韧度,形变1 000%以上不发生断裂的要求^[2];同时,软骨代用品能否正常刺激滑膜分泌关节液,是否会导致关节液成分的改变以及在达到要求坚韧度的同时,能否充分缓冲应力保护颅底不受损伤等问题仍需进一步深入研究^[3-5],因此软骨的组织工程再生研究就显得更具意义。

皮肤毛囊来源的间充质干细胞属于成体干细胞,是毛囊中的原始细胞,主要位于毛囊上皮及间充质,以毛球部和毛囊外根鞘的隆突部为主,具有慢周期性、未分化性、自我更新和体外增殖能力强的特点。其在体内处于静止状态,但在体外培养内环境作用下表现出惊人的增殖能力^[6-8],是一个巨大的干细胞储存库。近年来发现皮肤毛囊来源的间充质干细胞可以参与皮肤的创伤愈合过程,分化成表皮、毛囊、皮脂腺甚至脂肪、骨组织、神经以及角膜上皮^[9-12]。同时,因其易于获得、创伤小、数量多的特点,使之受到了许多学者的重视,是目前组织工程研究的热点。

目前骨髓间充质干细胞的细胞表面标记物已有大量研究,包括CD44、CD54、CD105^[13]、CD71、CD73^[14]和CD271等^[15],本实验拟通过标记CD44、CD54和CD166来明确其能否作为小鼠皮肤毛囊来源的间充质干细胞向软骨细胞分化过程中的特征性标记物^[16-17],并通过sulfate GAGs的定量分析来判断软骨样细胞的形成。

1 材料和方法

设计: 细胞学观察性实验。

时间及地点: 2011-03/2012-01在广西医科大学基础实验室完成。

材料:

实验动物: ICR新生小鼠由广西医科大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(桂)2005-0027。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基	Thermo, 美国
Dispase II、胶原酶、维生素 C、地塞米松、成纤维细胞生长因子	Sigma
1,9-二甲基亚甲蓝(1,9-dimethylmethylene blue, DMMB)	
DMEM/F-12、Alexa Fluor 488 二抗、转化生长因子 β 3	Invitrogen
CD44 单克隆抗体	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
CD54 单克隆抗体	eBioscience, CA, USA
CD166 单克隆抗体	Millipore, MA, USA
盐酸胍	上海欧伟达
4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, RTD2856)	Roche
荧光显微镜(Power BX-26)、倒置显微镜(GX41)	Olympus

实验方法:

间充质干细胞的分离及培养: 皮肤干细胞的分离步骤遵从Tomal^[18]文献: 新生小鼠脱臼处死,于体积分数75%乙醇中浸泡15 min,在无菌条件下,取下小鼠背部皮肤,与200 U/mL的Dispase II反应,4 °C冰箱过夜。第2天,将上皮和脂肪组织去除,将剩余组织剪成2 mm×4 mm的小片,用10倍于组织体积的0.2%胶原酶反应,37 °C,1 h。用含血清的DMEM终止反应,吹打后,用100目金属滤器滤去胶原酶,PBS稀释上清液,以1 500 r/min高速离心5 min,2次。待细胞完全融合时,进行传代,传代密度为 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 。体外扩增到第2代后,进行细胞诱导。

观察成软骨诱导培养基中细胞形态变化: 将诱导组第2代细胞以 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种于10 mm的DMEM培养基中,另加入3%PBS,10 $\mu\text{g/L}$ 的成纤维细胞生长因子,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松,50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸维生素C,5 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 β 3,24 h后,保留贴附细胞,每两三天换1次液^[19]。对照组为第2代细胞接种后在含体积分数10% FBS的DMEM培养液常规培养。用倒置显微镜观察7 d的细胞形态。

CD44、CD54和CD166的免疫荧光检测: 将诱导组第3代细胞以 $2.5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度移至分别含有抗CD44抗体,抗CD54抗体,和抗CD166抗体的DMEM/F-12溶液中,在冰冻条件下反应30 min后,加入二抗Alexa Fluor 488抗马IgG抗体和Alexa Fluor 594抗兔IgG抗体,DAPI核染色,继续反应30 min,PBS冲洗,用流式细胞仪对含不同表面标记物的细胞进行分筛,细胞标记物定

量测量, 用荧光显微镜观察。

测定硫酸黏多糖含量: 通过测定硫酸黏多糖含量来确定软骨组织形成量^[20]。第7, 10天时, 将2 mL细胞原液, DMMB16 mg/L, 适量体积分数5%乙醇和0.2 mol/L盐酸胍混合, 调至pH 3.0, 震荡30 min, 进行络合反应。反应结束后, 滤出沉淀物, 加入4 mol/L盐酸胍, 10%丙烷-1-醇, 调至pH 6.8, 用分光密度仪定量检测硫酸黏多糖。

主要观察指标: ①间充质干细胞生长方式及形态变化。②不同细胞表面标记物的免疫荧光检测结果。③不同表面标记物细胞的sulfate GAGs的检测结果。

2 结果

2.1 间充质干细胞生长方式及形态变化 见图1, 在经诱导液培养7 d后, 95%细胞为聚集贴壁生长, 胞体呈椭圆形, 体积较小, 核大, 为典型幼稚软骨细胞形态, 60~100个/目, 增殖力旺盛。

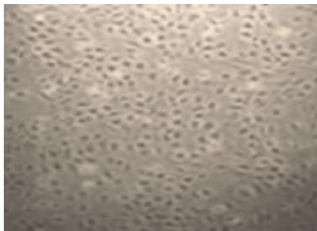


Figure 1 Morphology of mesenchymal stem cells derived from mouse hair follicle after treated with chondrogenic culture medium for 7 d
图1 成软骨培养液处理下的小鼠毛囊来源的间充质干细胞

2.2 不同细胞表面标记物的免疫荧光检测结果 见图2, 3。

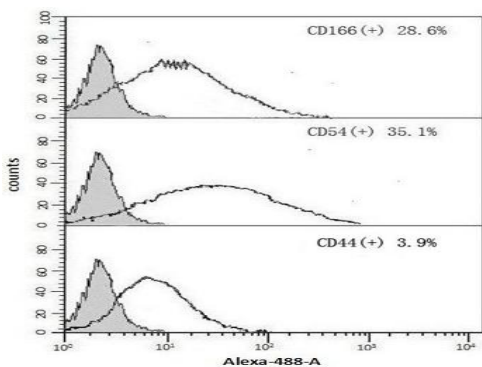


Figure 2 The flow cytometry of cells with CD44, CD54 and CD166 antibodies
图2 CD44(+)细胞和、CD54(+)细胞和 CD166(+)细胞的流式细胞图

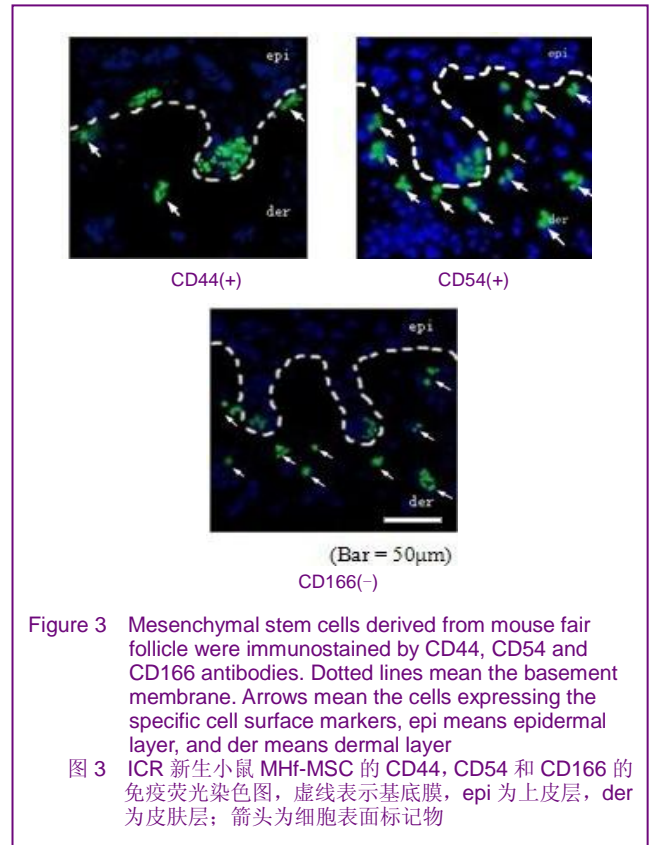


Figure 3 Mesenchymal stem cells derived from mouse fair follicle were immunostained by CD44, CD54 and CD166 antibodies. Dotted lines mean the basement membrane. Arrows mean the cells expressing the specific cell surface markers, epi means epidermal layer, and der means dermal layer
图3 ICR 新生小鼠 MHf-MSC 的 CD44, CD54 和 CD166 的免疫荧光染色图, 虚线表示基底膜, epi 为上皮层, der 为皮肤层; 箭头为细胞表面标记物

经免疫荧光染色后, 所有皮肤层细胞中均可见细胞表面标记物的表达: CD54(+)细胞和CD166(+)细胞较CD44(+)细胞表达广泛。流式细胞仪显示: CD44(+)细胞无明显增加, 仅为3.9%, CD54(+)细胞和CD166(+)细胞则显著多于前者, 分别为35.1%和28.6%, 可见, CD54(+)细胞和CD166(+)细胞在皮肤组织中表达较CD44(+)细胞更显著。

2.3 不同表面标记物细胞的sulfate GAGs的检测结果 见图4, 5。

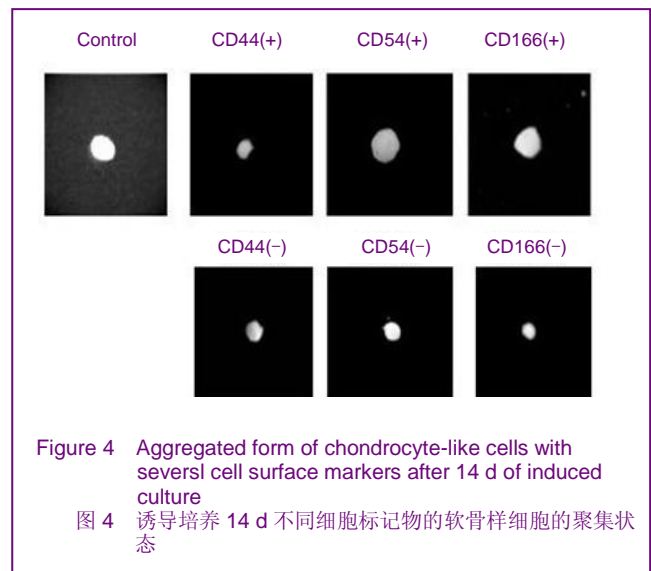


Figure 4 Aggregated form of chondrocyte-like cells with several cell surface markers after 14 d of induced culture
图4 诱导培养 14 d 不同细胞标记物的软骨样细胞的聚集状态

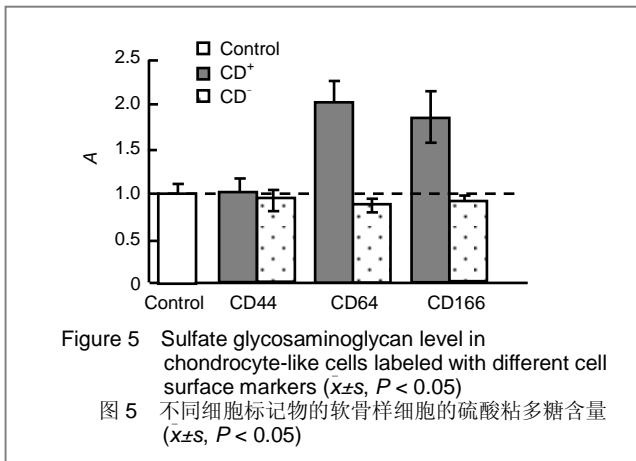


图4为经流式细胞仪对不同抗体标记的细胞分筛后,继续诱导液培养至14 d时,软骨样细胞在培养皿中的聚集状态: CD44(+)细胞无增加, CD54(+)细胞和CD166(+)细胞显著增加,尤以CD54(+)细胞最多;由图5可知,CD54(+)细胞和CD166(+)细胞的sulfate含量高于CD44(+)细胞($P < 0.05$),可推知CD54(+)细胞和CD166(+)细胞向软骨细胞分化的概率高于CD44(+)细胞。

3 讨论

毛囊干细胞超微结构及生化特征均具有分化细胞的特点:体积小,细胞器少,克隆形成能力高,细胞周期慢,无限次分裂^[21]。毛囊干细胞的分化需经3个阶段:毛囊干细胞、短暂增殖细胞有丝分裂后分化细胞。目前尚未证明,其是否是真正的同源干细胞或干细胞的前体细胞^[22]。Bajpai等^[23]发现毛囊干细胞有多向分化潜能,但其本身向不同组织分化时的速度各不相同,会因周围环境变化而变化,包括pH值,温度以及细胞因子浓度。Tomal等^[18]已证明小鼠和人类的干细胞表面标记物完全一致,因此本实验采用小鼠为实验对象所得的结果具有较高的参考价值。

骨髓干细胞表面有多种标记物, CD44、CD54、CD105、CD71、CD73、CD271, STRO-1^[24], 其可以作为筛选不同分化潜能的干细胞的方法。然而,少有实验关注毛囊干细胞的表面标记物, Yamada等^[25]证明CD44是脂肪干细胞表面标记物,因此本实验采用CD44, CD54以及CD166为观察对象,研究其在软骨细胞分化过程的变化,进而确定其能否成为毛囊干细胞向软骨细胞定向分化的监测指标。结果显示,在诱导培养14d后, CD44(+)细胞并无明显增加,含量仅为3.9%,而CD54(+)细胞和CD166(+)细胞则有显著增加,可见CD44(+)细胞的含量与软骨形成不成正比关系,甚至可

以推断CD44(+)细胞与软骨形成无直接关联。前期研究证实CD44(+)细胞有向脂肪细胞、成骨细胞和成软骨细胞分化的能力,当分化为脂肪细胞时,其含量最高^[26],但合并本实验结果考虑,可能CD44(+)细胞向脂肪细胞分化的能力强于向软骨细胞分化的能力,因此其应优先用作脂肪细胞的表面标记物,而非软骨细胞标记物。早期研究证实CD54和CD166均与细胞增殖和转化有密切关系,合并本实验结果,可推知CD54和CD166可作为小鼠毛囊来源的间充质干细胞向软骨细胞增殖分化的表面标记物。

黏多糖是构成细胞外环境的主要大分子,硫酸黏多糖与核心蛋白以共价键结合构成蛋白多糖,后者牢固地附着于细胞表面,存在于细胞间质内。Sanchez-Adams等^[27]发现用转化生长因子 β 1和骨形态发生蛋白2诱导山羊毛囊干细胞时,随着软骨细胞不断分化,硫酸黏多糖含量也有明显增加。本实验采用改进的硫酸黏多糖含量检测方法来确定软骨形成量^[28],改进之处在于:加入了盐酸胍,将pH值调至3.0,提高了DMMB与硫酸黏多糖所形成络合物的稳定性,可在空气中放置4 d;控制DMMB的浓度为16 mg/L,防止因DMMB过剩,影响检测结果的准确性;盐酸胍可以将DNA从核蛋白中解离,避免了DNA与DMMB的反应(DNA-DMMB络合物的吸收波长与硫酸黏多糖-DMMB络合物的吸收波长相同),保证检测结果不受干扰^[29-30]。图3可见CD44(+)细胞的硫酸黏多糖含量无增加,而CD54(+)细胞和CD166(+)细胞均显著增加,表明CD54(+)细胞和CD166(+)细胞已逐渐分化为软骨细胞,而CD44(+)细胞则无向成软骨细胞分化的趋势,此与前述内容的结果一致。

结论: CD44不能作为毛囊干细胞向软骨细胞分化的细胞表面标记物; CD54、CD166以及硫酸黏多糖的数量与软骨细胞及软骨形成成正性关系,可作为观察毛囊干细胞向软骨细胞分化的监测指标。

4 参考文献

- [1] Outani H, Okada M, Hiramatsu K, et al. Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(3):607-612.
- [2] Huang AH, Yeger-McKeever M, Stein A, Mauck RL. Tensile properties of engineered cartilage formed from chondrocyte- and MSC-laden hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16(9): 1074-1082.
- [3] Eleswarapu SV, Leipzig ND, Athanasiou KA. Gene expression of single articular chondrocytes. *Cell Tissue Res.* 2007;327(1):43-54.

- [4] Koay EJ, Athanasiou KA. Development of serum-free, chemically defined conditions for human embryonic stem cell-derived fibrochondrogenesis. *Tissue Eng Part A*.2009; 15(8):2249-2257.
- [5] Solorio LD, Fu AS, Hernandez-Irizarry R, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cell aggregates via controlled release of TGF-beta1 from incorporated polymer microspheres. *Biomed Mater Res A*.2010;92(3): 1139-1144.
- [6] Stephens P, Genever P. Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Dis*.2007;13:1-10.
- [7] Tiede S, Kloepper JE, Bodò E, et al. Hair follicle stem cells: Walking the maze. *Eur J Cell Biol*. 2007;86(7):355-376.
- [8] Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, et al. Beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*;2001; 105:533-545.
- [9] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Bio Cell*.2002;13:4279-4295.
- [10] Stephens P, Genever P. Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Dis*. 2007;13:1-10.
- [11] Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, et al. Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral nerve injury: an advantageous alternative to ES and iPS cells. *J Cell Biochem*.2009;107(5): 1016-1020.
- [12] Blazejewska EA, Schlerzer U, Schrehardt U, Zenkel M, et al. Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells. *Stem Cells*.2009;27(3): 642-652.
- [13] Chunmeng S, Tianmin C, Yongping S, et al. Effects of dermal multipotent cell transplantation on skin wound healing. *Surg Res*.2004;121:13-19.
- [14] Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol* 2008;17:925-932.
- [15] Lysy PA, Smets F, Sibille C, et al. Human skin fibroblasts: from mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology* 2007;46:1574-1585.
- [16] Botchkarev VA, Yaar M, Peters EM, et al. Neurotrophins in skin biology and pathology. *Invest Dermatol*. 2006;126: 1719-1727.
- [17] 常红星, 杨柳, 戴刚. 正常人膝关节软骨细胞体外培养中细胞表面标志及功能变化[C]. 第四届COA国际学术大会, 2009.
- [18] Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*.2001;3:778-786.
- [19] Liu JC, Liu X, Cao YL. *Zhongguo Xiufu Zhongjian Waikexue*. 2011;25(5):618-623.
刘瑾春, 刘霞, 曹谊林. 体外诱导BMSCs向软骨分化的方法研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(5): 618-623.
- [20] Quintana L, Zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*.2009;15(1):29-41.
- [21] Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, et al. Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis. *J Dermatol Sci*. 2011;62(2): 98-106.
- [22] Crane JF, Trainor PA. Neural crest stem and progenitor cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2006; 22:267-286.
- [23] Bajpai VK, Mistriotis P, Andreadis ST. Andreadis Clonal multipotency and effect of long-term in vitro expansion on differentiation potential of human hair follicle derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*. 2012;8(1):74-84.
- [24] Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005;23(6):727-737.
- [25] Yamada T, Akamatsu H, Hasegawa S, et al. Age-related changes of p75 neurotrophin receptor-positive adipose derived stem cells. *Dermatol Sci*. 2010;58:36-42.
- [26] Wei Y, Hu H, Wang H, et al. Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA. *Cell Transplant*. 2009; 18(2): 159-170.
- [27] Sanchez-Adams J, Athanasiou KA. Athanasiou, Dermis isolated adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(1):109-119.
- [28] Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, et al. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*. 2003;13: 647-653.
- [29] Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, et al. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*. 2003;13(9):647-653.
- [30] Stone JE, Akhtar N, Botchway S, et al. Interaction of 1,9-dimethylmethylene blue with glycosaminoglycans. *Ann. Clin. Biochem*. 1994;31:147-152.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 设计、实施、评估者为本文作者。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章概要:

文章要点: 观察小鼠毛囊来源的间充质干细胞分化为软骨细胞过程中的形态、细胞表面标记物和硫酸黏多糖含量的变化。

关键信息: 结果表明小鼠毛囊来源的间充质干细胞能诱导形成软骨样细胞; CD54 和 CD166 以及硫酸黏多糖可作为对小鼠毛囊来源的间充质干细胞向软骨细胞分化的监测指标。

研究的创新之处: 实验研究了小鼠毛囊来源间充质干细胞诱导体外成软骨的细胞标记物, 并通过细胞形态关系、细胞表面标记和硫酸黏多糖检测对多种方法进行了评价, 技术方法具有一定的先进性。