

Notch信号通路阻断剂对人脐带间充质干细胞软骨分化的影响

张家文¹, 罗二梅¹, 吴颜晖¹, 符淑莹¹, 陈丹纯¹, 宇丽¹, 唐明乔²(暨南大学, ¹医学院生物化学系, ²理工学院力学和土木工程系, 广东省广州市 510632)

文章亮点:

1 Notch 信号通路是在细胞增殖和分化过程中起重要作用的信号通路, 目前其在人脐带间充质干细胞体外向软骨细胞诱导分化过程的作用仍然未知。

2 实验首次对 Notch 信号通路特异性阻断剂 DAPT 在人脐带间充质干细胞向软骨细胞诱导分化过程的影响进行初步研究。实验证明 Notch 信号存在于人脐带间充质干细胞中, 一旦诱导人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化, 这种信号强度迅速减弱; DAPT 可能通过 Jag-1-Notch-1-Hes-1 途径阻止人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 分化; 人脐带间充质干细胞; 软骨细胞; DAPT; Notch 信号通路; 蛋白聚糖; II 型胶原蛋白; 甲苯胺蓝染色; 免疫荧光染色; qPCR; 广东省自然科学基金

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 脐带; 软骨细胞; 受体, Notch; 广东省自然科学基金

缩略语:

2,4-二氨基-5-苯噻唑; 2,4-diamino-5-phenylthiazole; amiphenazole, DAPT

基金资助:

广东省自然科学基金资助项目(9151008901000050); 暨南大学大学生创新创业训练计划(Cx12200)

摘要

背景: Notch 信号通路作为一条在细胞增殖和分化过程中起重要作用的信号通路, 目前它在人脐带间充质干细胞在体外向软骨细胞诱导分化过程中的作用仍然未知。

目的: 首次探讨 Notch 信号通路特异性阻断剂 2, 4-二氨基-5-苯噻唑(DAPT)对人脐带间充质干细胞向软骨细胞诱导分化的影响。

方法: 从人脐带中分离获得间充质干细胞, 体外向软骨细胞诱导分化。实验分 4 组: ①无诱导组换成含体积分数 5%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 高糖培养基培养。②单纯诱导组换成终浓度为 6.25 mg/L 胰岛素、6.25 mg/L 转铁蛋白、10 μg/L 转化生长因子 β1、0.1 μmol/L 地塞米松、50 mg/L 维生素 C、体积分数 5%胎牛血清和 1%双抗的软骨诱导培养基培养。③二甲基亚砷组在软骨诱导培养基中加入终浓度为 0.1%的二甲基亚砷培养。④2, 4-二氨基-5-苯噻唑组在软骨诱导培养基中加入终浓度为 5 μmol/L 的 2, 4-二氨基-5-苯噻唑(溶于二甲基亚砷)培养, 二甲基亚砷终浓度为 0.1%。

结果与结论: 诱导人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化后, 细胞形态由长梭形变为多边形, 且甲苯胺蓝染色和免疫荧光染色均呈现阳性; 软骨诱导分化后 Jag-1、PS-1、Notch-1、Hes-1 的基因表达均明显下降($P < 0.01$); 添加 2, 4-二氨基-5-苯噻唑后, 与单纯诱导组相比, 人脐带间充质干细胞中 Jag-1、PS-1、Hes-1($P < 0.01$)和 Notch-1($P < 0.05$)的基因表达显著降低; 蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白含量均降低($P < 0.01$); 蛋白聚糖的基因表达显著降低($P < 0.01$), II 型胶原蛋白的基因表达也出现一定程度的下降。提示 Notch 信号存在于人脐带间充质干细胞中, 诱导人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化后, 这种信号强度迅速减弱; 2, 4-二氨基-5-苯噻唑可能通过 Jag-1-Notch-1-Hes-1 途径抑制人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化。

张家文, 罗二梅, 吴颜晖, 符淑莹, 陈丹纯, 宇丽, 唐明乔. Notch 信号通路阻断剂对人脐带间充质干细胞软骨分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(23):3609-3615.

A Notch signaling pathway inhibitor affects chondrogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Zhang Jia-wen¹, Luo Er-mei¹, Wu Yan-hui¹, Fu Shu-ying¹, Chen Dan-chun¹, Yu Li¹, Tang Ming-qiao² (¹Department of Biochemistry, Medical School of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China; ²Department of Mechanics and Civil Engineering, School of Science and Engineering of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Notch signaling pathway is very important for cell proliferation and differentiation, but its role is still unknown during chondrogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To investigate the effect of N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-(S)-phenylglycine-butyl ester

张家文, 男, 1988 年生, 广东省云浮市人, 汉族, 暨南大学在读硕士, 主要从事软骨组织工程研究。

通讯作者: 宇丽, 博士, 教授, 暨南大学医学院生物化学系, 广东省广州市 510632

并列通讯作者: 唐明乔, 工程师, 暨南大学理工学院力学和土木工程系, 广东省广州市 510632

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.23.001
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)23-03609-07

稿件接受: 2014-04-24

Zhang Jia-wen, Studying for master's degree, Department of Biochemistry, Medical School of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Corresponding author: Yu Li, M.D., Professor, Department of Biochemistry, Medical School of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Corresponding author: Tang Ming-qiao, Engineer, Department of Mechanics and Civil Engineering, School of Science and Engineering of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-04-24

(DAPT) on inducing human umbilical cord mesenchymal stem cell differentiation into chondrocytes.

METHODS: Human umbilical cord mesenchymal stem cells were isolated from human umbilical cord, then were induced to differentiate into chondrocytes. There were four experimental groups: non-induced group, high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% fetal bovine serum and 1% double antibody; induced group, induced medium containing 6.25 mg/L insulin, 6.25 mg/L transferrin, 10 μg/L transforming growth factor beta 1, 0.1 μmol/L dexamethasone, 50 mg/L vitamin C, 5% fetal bovine serum and 1% double antibody; dimethyl sulfoxide group, induced medium containing 0.1% dimethyl sulfoxide; DAPT group, induced medium containing 5 μmol/L DAPT.

RESULTS AND CONCLUSION: After chondrogenic induction, the morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells became polygon and positive for toluidine blue and immunofluorescence staining; the expression of Jag-1, PS-1, Notch-1 and Hes-1 decreased significantly ($P < 0.01$). After the addition of DAPT, compared with the induced group, the relative gene expression of Jag-1, PS-1 and Hes-1 decreased markedly ($P < 0.01$), the relative gene expression of Notch-1 decreased obviously as well ($P < 0.05$), and the contents of proteoglycan and collagen type II proteins decreased significantly ($P < 0.01$). At the same time, the relative gene expression of proteoglycan decreased obviously ($P < 0.05$), and the relative gene expression of collagen type II decreased in part. Notch signaling pathway exists in human umbilical cord mesenchymal stem cells, once chondrogenesis begins, the signaling strength will decline rapidly. DAPT may prevent human umbilical cord mesenchymal stem cells from differentiating into chondrocytes by Jag-1-Notch-1-Hes-1 pathway.

Subject headings: stem cells; mesenchymal stem cells; umbilical cord; chondrocytes; receptors, Notch

Funding: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 9151008901000050; Innovation and Entrepreneurship Training Program for Students in Jinan University, No. Cx12200

Zhang JW, Luo EM, Wu YH, Fu SY, Chen DC, Yu L, Tang MQ. A Notch signaling pathway inhibitor affects chondrogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(23):3609-3615.

0 引言 Introduction

关节软骨组织由软骨细胞和细胞外基质组成, 蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白是关节软骨组织细胞外基质的主要成分, 在体内起着重要作用^[1-2]。关节缺损及骨关节炎等原因造成的关节软骨损伤和退化是骨科常见的难题, 给患者带来极大的痛苦和经济负担。虽然自体软骨细胞移植取得了比较满意的临床效果, 但是软骨组织自我修复能力有限以及软骨细胞来源紧缺仍然是关节软骨损伤修复的主要障碍^[3-4]。软骨组织工程被认为是最有可能解决关节软骨损伤修复的方法, 其中获得大量高效的种子细胞是软骨组织工程的关键^[5-7]。

间充质干细胞是一种广泛分布于人体内的未分化细胞, 它在适当的诱导环境中可分化为软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞等多种组织细胞, 是组织工程种子细胞以及临床应用研究的热点^[8-9]。近年来, 国内外学者都致力于骨髓间充质干细胞的研究, 并取得一定的成果, 但骨髓间充质干细胞作为种子细胞来源有限, 难以在体外大量扩增, 且随着供者年龄增长其扩增和分化能力明显下降^[10]。人脐带间充质干细胞是从人脐带间质中分离获得的一种间充质干细胞, 与其他来源的间充质干细胞相比, 人脐带间充质干细胞具有以下优势: 来源丰富, 不存在伦理道德问题, 对供者无不良影响; 移植后发生移植植物抗宿主反应的风险低, 可扩大供者范围^[11-12]。因此, 人脐带间充质干细胞在组织工程方面的应用具有得天独厚的优越性。

Notch 信号是一条在进化过程中高度保守的信号通路, 在细胞增殖、分化、器官发育以及疾病发生中起重要作用^[13]。Notch 信号分子 Jag-1、PS-1、Notch-1 和 Hes-1 均存在于哺乳动物细胞内^[14], 已有研究表明 Jag-1 介导的 Notch 信号在细胞分化和多种组织发育中起作用^[15-16], 并对人骨髓间充

质干细胞的软骨形成起关键作用^[17], Notch-1 和 PS-1 在哺乳动物细胞中起重要作用^[18], 也对软骨形成初期起调控作用^[19], Hes-1 是与软骨形成相关的一个靶基因^[20]。

2, 4-二氨基-5-苯噻唑 (2, 4-diamino-5-phenylthiazole; amiphenazole, DAPT) 是 Notch 信号的特异性阻断剂, 能特定地抑制 γ 分泌酶的作用, 从而阻止 Notch 信号活化。目前国内外对人脐带间充质干细胞在体外软骨分化过程中的信号通路研究得比较少, 而 Notch 信号在此分化过程中的作用仍然未知, 实验采用单层细胞培养的方法在体外诱导人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化, 首次探讨 DAPT 对这个过程的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 分组对照细胞学实验。

时间及地点: 实验于 2014 年 1 月在暨南大学医学院生物化学系实验室及田家炳医学中心实验室完成。

材料:

人脐带间充质干细胞软骨分化实验所用试剂和仪器:

试剂和仪器	来源
胶原酶 II	美国 Sigma 公司
DMEM 高糖、低糖培养基、胰酶、胎牛血清	美国 GIBCO 公司
转化生长因子 β1	北京 Sino Biological 公司
DAPT	美国 Selleck 公司
总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒	北京 Tiangen 公司
qPCR 试剂盒	日本 TOYOBO 公司
荧光显微镜、相差倒置显微镜	日本 Nikon 公司

人脐带间充质干细胞来源: 本实验所用的人脐带间充质干细胞均从暨南大学第一附属医院妇产科当天剖宫产健康婴儿的新鲜脐带中分离获得, 胎龄39至40周, 无先天性疾病, 产妇身体健康, 产妇及其家属对脐带用于实验研究均知情同意, 并经医院伦理道德委员会批准。

实验方法:

人脐带间充质干细胞分离培养及鉴定: 采用酶消化法从人脐带中成功分离出间充质干细胞, 培养及鉴定方法参考文献[21]的方法。

人脐带间充质干细胞向软骨细胞的诱导分化: 取第3代人脐带间充质干细胞, 以 2×10^5 /孔接种于6孔板中。待细胞达到90%融合时, 分4组: ①无诱导组换成含体积分数5%胎牛血清和1%双抗的DMEM高糖培养基培养。②单纯诱导组换成终浓度为6.25 mg/L胰岛素、6.25 mg/L转铁蛋白、10 μg/L转化生长因子β1、0.1 μmol/L地塞米松、50 mg/L维生素C、体积分数5%胎牛血清和1%双抗的软骨诱导培养基培养。③二甲基亚砜组在软骨诱导培养基中加入终浓度为0.1%的二甲基亚砜培养。④DAPT组在软骨诱导培养基中加入终浓度为5 μmol/L的DAPT(溶于二甲基亚砜)培养, 二甲基亚砜终浓度为0.1%。各组分别诱导18 d, 每3 d换1次液, 倒置显微镜下观察并拍照。

甲苯胺蓝染色鉴定蛋白聚糖: 诱导18 d后, 弃去六孔板中的培养基, PBS洗涤3次, 40 g/L多聚甲醛固定10 min。PBS洗涤3次, 0.1%甲苯胺蓝工作液常温染色30 min。弃去染料, 蒸馏水冲洗干净, 倒置显微镜下观察并拍照。

免疫荧光染色鉴定II型胶原蛋白: 诱导18 d后, 弃去六孔板中的培养基, PBS洗涤3次, 40 g/L多聚甲醛固定10 min。PBS洗涤3次, 用0.5% TritonX-100对细胞透化处理10 min。PBS洗涤3次, 0.5% BSA室温封闭30 min。PBS洗涤3次, 一抗4 °C孵育过夜(稀释比例为1:120)。PBS洗涤3次, 二抗室温避光孵育60 min(稀释比例为1:80)。PBS洗涤3次, 荧光倒置显微镜下观察并拍照。

蛋白聚糖的含量测定: 诱导18 d后, 取各组细胞上清200 μL, 加入40 μL木瓜蛋白酶消化24 h; 加入100 μL 8 mol/L盐酸胍和750 μL 0.25%阿利新蓝溶液, 4 °C反应1 h; 12 000 r/min离心15 min, 弃上清, 加入150 μL异丙醇溶解沉淀, 600 nm波长处测定吸光度值。以一系列浓度梯度的硫酸软骨素标准液制作标准曲线, 将吸光度值代入标准曲线求得蛋白聚糖含量。

II型胶原蛋白的含量测定: 诱导18 d后, 取各组细胞上清250 μL, 加入羟脯氨酸消化液50 μL, 加入羟脯氨酸反应液2 mL, 60 °C水浴15 min, 冷却后3 500 r/min离心10 min, 取150 μL上清, 560 nm波长处测定吸光度值。以一系列浓度梯度的羟脯氨酸标准液制作标准曲线, 将吸光度值代入标准曲线求得II型胶原蛋白含量。

实时定量PCR检测基因表达: 诱导18 d后, 提取各组

人脐带间充质干细胞总RNA, 以300 ng总RNA量反转录成cDNA。实时定量PCR反应体系如下: SYBR qPCR Mix 10 μL, 上下游引物各3 μL, cDNA 4 μL; 反应条件如下: 95 °C 1 min, 95 °C 15 s, Tm 30 s, 72 °C 1 min, 40个循环。数据分析采用 $\Delta\Delta Ct$ 法, 即相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{实验组} - \Delta Ct_{诱导组})} = 2^{-[(Ct_{实验组} - Ct_{内参}) - (Ct_{诱导组} - Ct_{内参})]}$ 。所用引物序列见表1。

表1 实时定量荧光PCR引物序列
Table 1 Primer sequence of real-time quantitative PCR

基因名称	引物序列	产物长度
JAG-1	Forward: 5'-GGT CAA CGG CGA GTC CTT TA-3' Reverse: 5'-AGA CAC ACC GGT AGC CAT TG-3'	257 bp
PS-1	Forward: 5'-CCA CCT GAG CAA TAC TGT ACG-3' Reverse: 5'-GCC CAC AGT CTC GGT ATC T-3'	319 bp
NOTCH-1	Forward: 5'-GCC GCC TTT GTG CTT CTG TTC-3' Reverse: 5'-CCG GTG GTC TGT CTG GTC GTC-3'	300 bp
HES-1	Forward: 5'-AAG AAA GAT AGC TCG CGG CA-3' Reverse: 5'-CCT CGG TAT TAA CGC CCT CG-3'	208 bp
COL-2A1	Forward: 5'-GCA GGA TGG GCA GAG GTA TAA-3' Reverse: 5'-GCA CTC TCC GAA GGG GAT CT-3'	151 bp
GAG	Forward: 5'-ACA CTG GCG AGC ACT GTA AC-3' Reverse: 5'-CCT TCG ATG GTC CTG TCG TT-3'	235 bp
GAPDH	Forward: 5'-TGT TGC CAT CAA TGA CCC CTT-3' Reverse: 5'-CTC CAC GAC GTA CTC AGC G-3'	202 bp

主要观察指标: ①各组人脐带间充质干细胞的形态变化。②甲苯胺蓝染色和免疫荧光染色的异染情况。③蛋白多糖和II型胶原蛋白的含量测定。④Notch信号分子和蛋白多糖与II型胶原蛋白的基因表达。

统计学分析: 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD法), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 各组人脐带间充质干细胞的形态观察 与无诱导组相比, 诱导组、二甲基亚砜组和DAPT组的细胞形态由长梭形变为棱形、多边形, 并出现聚集生长, 类似于软骨细胞的形态特征, 从形态上可以判断这几组的人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化成功(图1)。

2.2 蛋白聚糖和II型胶原蛋白的定性分析

甲苯胺蓝染色鉴定各组人脐带间充质干细胞的蛋白聚糖: 与无诱导组相比, 诱导组、二甲基亚砜组和DAPT组的甲苯胺蓝染色均呈现阳性, 细胞被染成紫蓝色, 表明这几组人脐带间充质干细胞的细胞质中有蛋白聚糖存在(图2)。

免疫荧光染色鉴定各组人脐带间充质干细胞的II型胶原蛋白: 与无诱导组相比, 诱导组、二甲基亚砜组和DAPT组的免疫荧光染色均呈现阳性, 细胞质中出现绿色荧光, 表明细胞质中有II型胶原蛋白的存在(图3)。

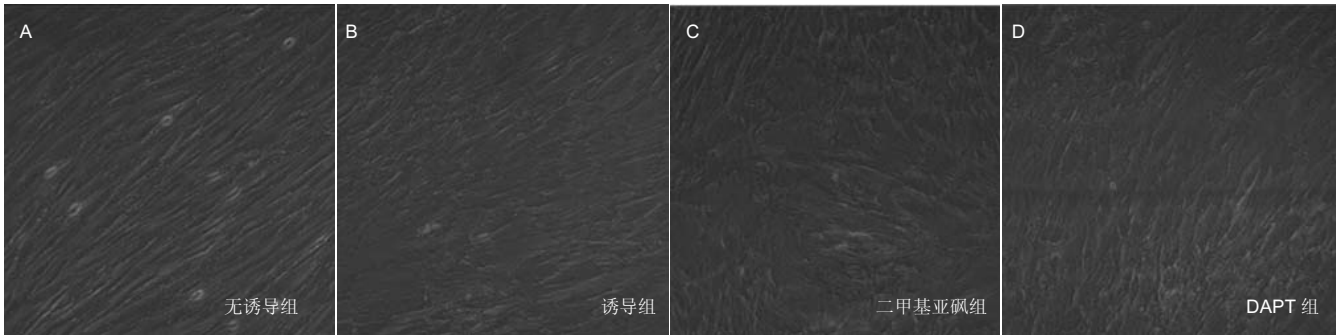


图 1 人脐带间充质干细胞形态观察(×100)

Figure 1 The morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells (×100)

图注: 诱导组、二甲基亚砜组和 DAPT 组的细胞类似于软骨细胞的形态特征, 表明人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化成功。

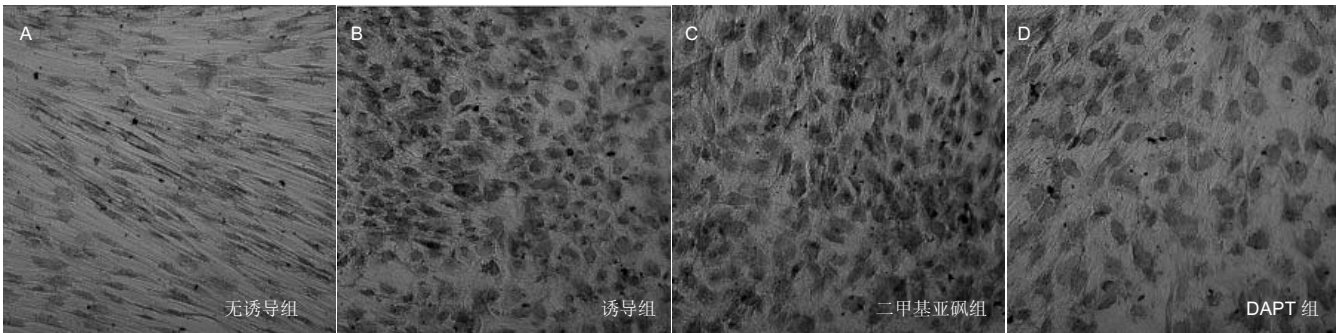


图 2 各组人脐带间充质干细胞的蛋白聚糖鉴定(甲苯胺蓝染色, ×100)

Figure 2 Toluidine blue staining of human umbilical cord mesenchymal stem cells in each group (Toluidine blue staining, ×100)

图注: 诱导组、二甲基亚砜组和 DAPT 组的甲苯胺蓝染色均呈现阳性, 表明细胞质中有蛋白聚糖存在。

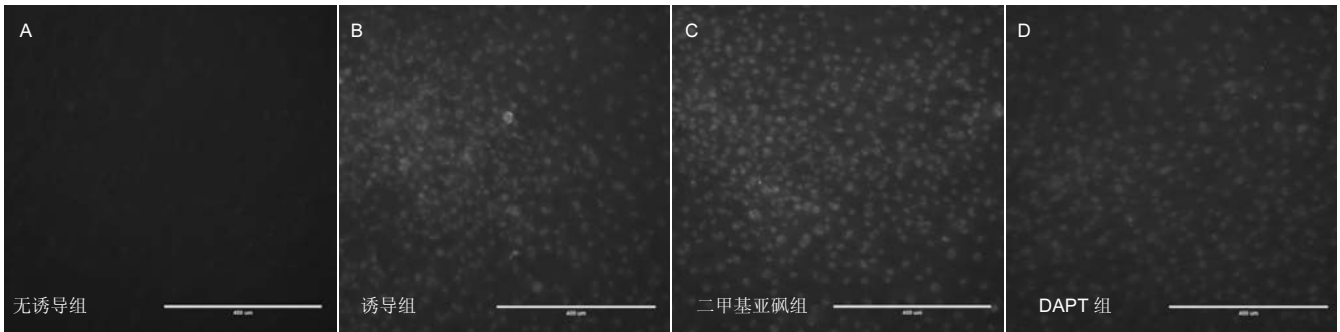


图 3 各组人脐带间充质干细胞的 II 型胶原蛋白鉴定(免疫荧光染色, 标尺=400 μm)

Figure 3 Detection of collagen type II of human umbilical cord mesenchymal stem cells in each group (immunofluorescence staining, bar=400 μm)

图注: 诱导组、二甲基亚砜组和 DAPT 组的免疫荧光染色均呈现阳性, 表明细胞质中有 II 型胶原蛋白的存在。

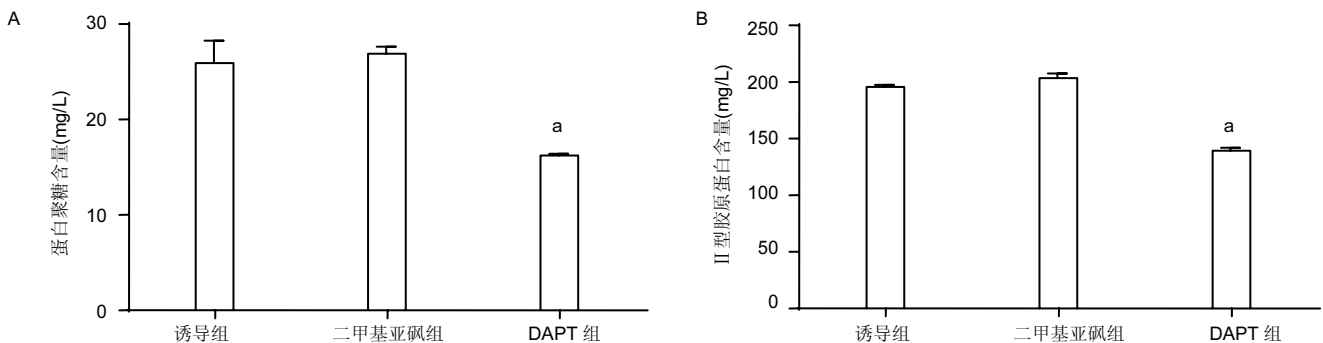


图 4 人脐带间充质干细胞蛋白聚糖及 II 型胶原蛋白定量测定结果

Figure 4 The proteoglycan and collagen type II contents in human umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: ①与单纯诱导组相比, 添加 5 μmol/L DAPT 后细胞外基质中的蛋白聚糖水平显下降, 说明 DAPT 对蛋白聚糖的表达有抑制作用。与诱导组比较, ^a $P < 0.01$ 。②与单纯诱导组相比, 添加 5 μmol/L DAPT 后人脐带间充质干细胞的 II 型胶原蛋白含量明显下降($P < 0.01$), 说明 DAPT 对 II 型胶原蛋白的表达有抑制作用。与诱导组比较, ^a $P < 0.01$ 。

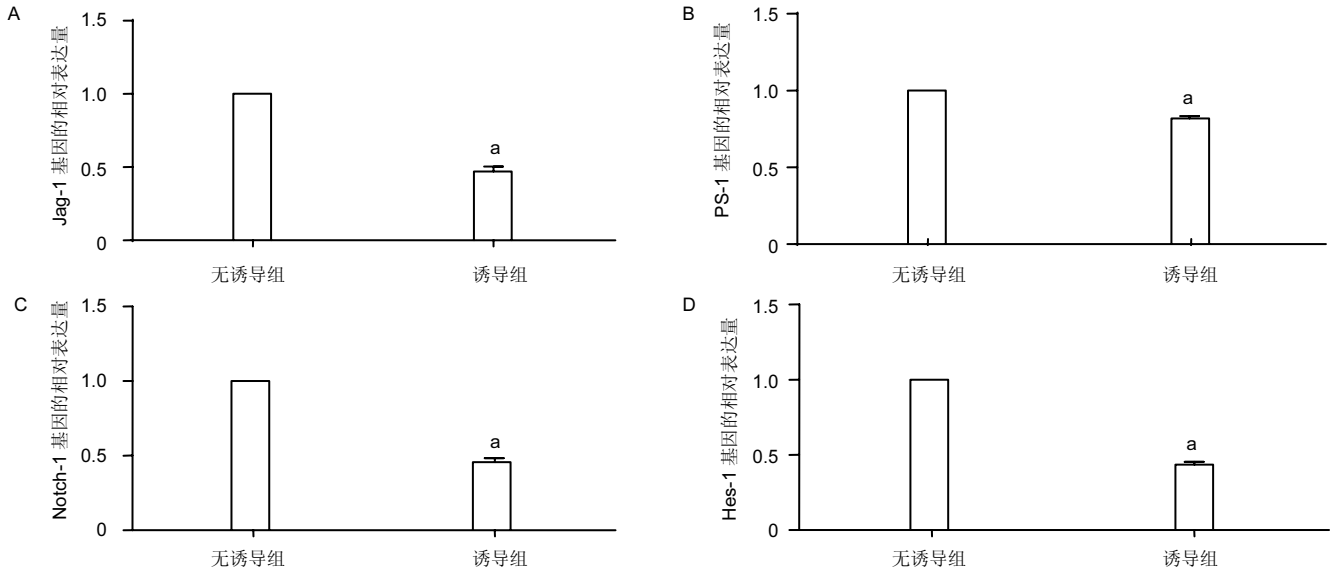


图5 人脐带间充质干细胞软骨诱导分化后 Notch 信号分子的基因表达

Figure 5 The relative gene expression of Notch signaling factors after chondrogenic induction of human umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 诱导组细胞软骨诱导分化后 Jag-1、PS-1、Notch-1 和 Hes-1 的基因表达均明显下降。与无诱导组比较, $^aP < 0.01$ 。

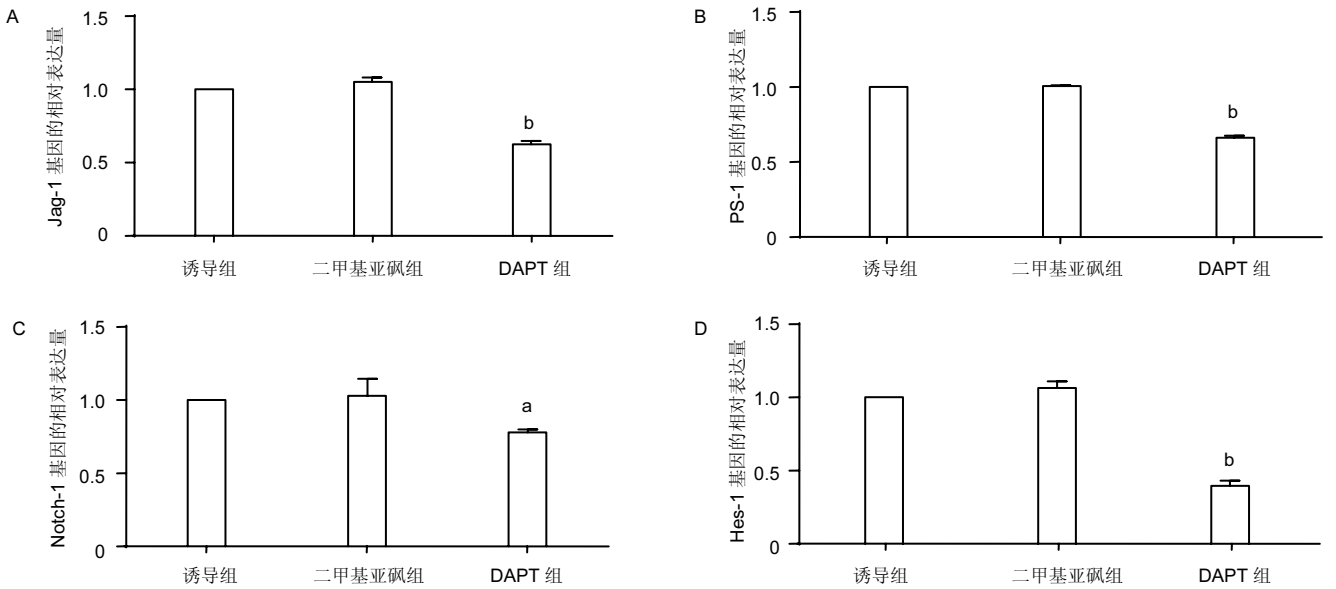


图6 添加 DAPT 后人脐带间充质干细胞 Notch 信号分子的基因表达

Figure 6 The relative gene expression of Notch signaling factors after addition of DAPT

图注: 添加 5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 后人脐带间充质干细胞中 Jag-1、PS-1、Hes-1 及 Notch-1 基因表达显著降低。与诱导组比较, $^aP < 0.05$; $^bP < 0.01$ 。

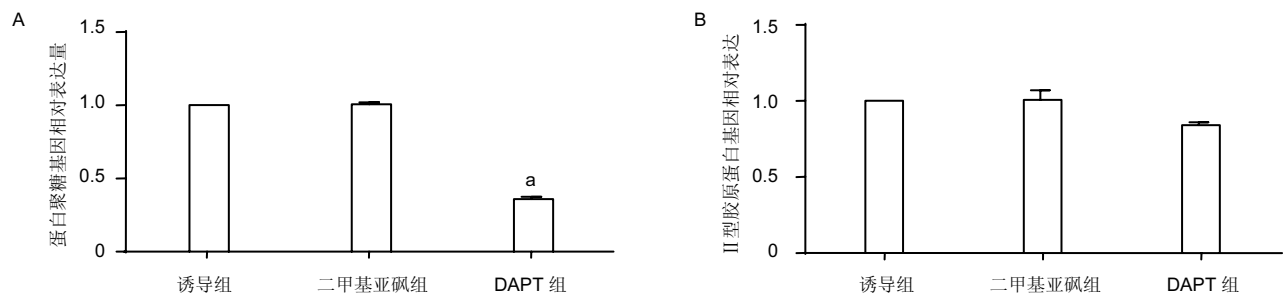


图7 添加 DAPT 后人脐带间充质干细胞蛋白聚糖基因及 II 型胶原蛋白基因表达

Figure 7 Relative gene expression of proteoglycan and collagen type II after addition of DAPT

图注: 添加 5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 后蛋白聚糖的基因表达明显下降。与诱导组比较, $^aP < 0.01$ 。添加 5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 后 II 型胶原蛋白的基因表达出现一定程度的下降。

2.3 蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的定量分析

阿利新蓝法检测各组人脐带间充质干细胞的蛋白聚糖含量: 与单纯诱导组相比, 添加5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT后人脐带间充质干细胞细胞外基质中的蛋白聚糖含量明显下降 ($P < 0.01$), 说明DAPT对蛋白聚糖的表达有抑制作用, 但诱导组和二甲基亚砷组之间的差异不明显 ($P > 0.05$), 见图4A。

羟脯氨酸法检测各组人脐带间充质干细胞的 II 型胶原蛋白含量: 与单纯诱导组相比, 添加5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT后人脐带间充质干细胞的 II 型胶原蛋白含量明显下降 ($P < 0.01$), 说明DAPT对 II 型胶原蛋白的表达有抑制作用, 但诱导组和二甲基亚砷组之间的差异不明显 ($P > 0.05$), 见图4B。

2.4 实时定量荧光PCR检测相关基因的表达

软骨诱导分化前后Notch信号分子的基因表达: 与无诱导组相比, 诱导组人脐带间充质干细胞在软骨诱导分化后 Jag-1、PS-1、Notch-1和Hes-1的基因表达均明显下降 ($P < 0.01$), 说明Notch信号存在于人脐带间充质干细胞中, 当人脐带间充质干细胞向软骨细胞诱导分化后, Notch信号表达下降(图5)。

添加DAPT后Notch信号分子的基因表达: 与单纯诱导组相比, 添加5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT后人脐带间充质干细胞中 Jag-1、PS-1、Hes-1的基因表达明显下降 ($P < 0.01$), Notch-1基因表达也显著降低 ($P < 0.05$), 说明了DAPT在人脐带间充质干细胞诱导分化后的信号水平上, 进一步减弱了Notch信号(图6)。

添加DAPT后蛋白聚糖的基因表达: 与单纯诱导组相比, 添加5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT后蛋白聚糖的基因表达明显下降 ($P < 0.01$), 说明了DAPT抑制蛋白聚糖的基因表达, 但诱导组和二甲基亚砷组之间的差异不明显 ($P > 0.05$), 见图7A。

添加DAPT后 II 型胶原蛋白的基因表达: 与单纯诱导组相比, 添加5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT后 II 型胶原蛋白的基因表达出现一定程度的下降, 但诱导组和二甲基亚砷组之间的差异不明显 ($P > 0.05$), 见图7B。

3 讨论 Discussion

目前对组织工程种子细胞的研究主要集中在诱导条件的优化上, 而对其分化过程的分子机制研究甚少, 成为制约软骨组织工程进一步发展的瓶颈^[22]。Notch信号通路作为生物进化和器官发育过程中一条极其保守的信号通路, 它通过Notch受体与配体结合、Notch受体的酶切活化、可溶性Notch胞内段转移到细胞核并与CSL DNA结合蛋白相互作用, 最终调控靶基因的表达^[23-24]。研究表明, Notch信号在成骨分化^[25]、心肌细胞的生长与分化^[26-27]、神经干细胞的增殖与分化以及人脂肪间充质干细胞的脂肪形成等过程中起作用^[28-29], 并参与调控人的软骨发育和软骨细胞

的增殖与分化^[30-31], 也有研究表明Notch信号干扰鸟类的软骨发育^[31]。

本实验采用单层细胞培养的方法诱导人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化。结果显示, 与无诱导组相比, 各实验组人脐带间充质干细胞的细胞形态由长梭形变为棱形、多边形, 且细胞外基质中出现蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白, 表明在添加DAPT后人脐带间充质干细胞仍能被诱导分化为软骨细胞, 但定量分析结果显示其蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白含量远远低于单纯诱导组, 说明DAPT抑制了蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白合成。实时定量荧光PCR结果显示, 在软骨诱导分化后, 人脐带间充质干细胞的Notch信号分子基因表达均明显下降, 证明Notch信号存在于人脐带间充质干细胞中。添加DAPT后, 与单纯诱导组相比, Jag-1、PS-1、Hes-1和Notch-1的基因表达均显著降低, 且蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的基因表达也低于单纯诱导组, 提示使用DAPT进一步减弱Notch信号会抑制蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的基因表达, 这可能与SOX9转录因子的调控有关^[32-33]。另外, 无论是Jag-1、PS-1、Notch-1、Hes-1的基因表达, 还是软骨特异性基质产物蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的基因表达与含量检测, 单纯诱导组和二甲基亚砷组之间都没有显著差异, 表明低浓度的二甲基亚砷对人脐带间充质干细胞形成软骨细胞的影响微乎其微。

综上所述, 实验证明Notch信号存在于人脐带间充质干细胞中, 一旦诱导人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化, 这种信号强度迅速减弱; DAPT可能通过Jag-1-Notch-1-Hes-1途径阻止人脐带间充质干细胞向软骨细胞分化。由于时间所限, 本实验只是对DAPT这种效应的分子机制进行了初步的研究, 因为Notch信号通路中还存在其他种类的配体、受体和靶基因, 且软骨形成过程中还受到其他信号通路的影响^[34-35], 因此是否存在其他种类的配体、受体或靶基因与Jag-1-Notch-1-Hes-1途径共同起作用, 或者其他信号通路与Notch信号是否共同起作用, 需要作进一步的探讨和研究。

作者贡献: 设计和评估为第一作者及通讯作者, 实施为全体作者, 第一作者成文并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不相关利益冲突。

伦理要求: 实验所用的人脐带间充质干细胞均从健康分娩新鲜脐带中分离获得, 产妇及其家属对脐带用于实验研究均知情同意, 并经医院伦理道德委员会批准。

学术术语: Notch 信号传导途径-在无脊椎动物和脊椎动物中广泛存在且高度保守。此途径介导由局部细胞间相互作用而产生的、对多种不成熟细胞分化的抑制信号, 在胚胎发育中起重要作用。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Wang X, Rackwitz L, Noth U, et al. Cartilage Development, Physiology, Pathologies, and Regeneration. Strategies in Regenerative Medicine. 2009; 367-393.
- [2] Coates EE, Fisher JP. Cartilage Engineering: Current Status and Future Trends. Biomaterials for Tissue Engineering Applications. 2011: 279-306.
- [3] Marlovits S, Zeller P, Singer P, et al. Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. Eur J Radiol. 2006;57(1):24-31.
- [4] Peeters CM, Leijts MJ, Reijman M, et al. Safety of intra-articular cell-therapy with culture-expanded stem cells in humans: a systematic literature review. Osteoarthritis Cartilage. 2013;21(10):1465-1473.
- [5] Keeney M, Lai JH, Yang F. Recent progress in cartilage tissue engineering. Curr Opin Biotechnol. 2011;22(5):734-740.
- [6] 孙安科, 裴国献. 软骨组织工程种子细胞的来源-培养和评价[J]. 国外医学生物医学工程分册, 2003, 26(4): 179-183.
- [7] 靳小兵. 软骨组织工程研究新进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(2): 187-192.
- [8] Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. Gene Ther. 2008; 15(2):109-116.
- [9] Aerts F, Wagemaker G. Mesenchymal Stem Cell Engineering and Transplantation. Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells. 2006: 1-44.
- [10] Chen PM, Yen ML, Liu KJ, et al. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. J Biomed Sci. 2011;18:49.
- [11] 徐若男, 施明, 王福生. 人脐带间充质干细胞的特征及其临床应用前景[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(1): 82-84.
- [12] Troyer DL, Weiss ML. Wharton's Jelly-derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. Stem Cells. 2008;26(3): 591-599.
- [13] Hansson EM, Lendahl U, Chapman G, et al. Notch signaling in development and disease. Semin Cancer Biol. 2004;14(5): 320-472.
- [14] Chiba S. Notch signaling in stem cell systems. Stem Cells. 2006;24(11):2437-2447.
- [15] Zhang S, Loch AJ, Radtke F, et al. Jagged1 is the major regulator of Notch-dependent cell fate in proximal airways. Dev Dyn. 2013;242(6):678-686.
- [16] Dishowitz M, Zhu F, Sundararaghavan HG, et al. Jagged1 immobilization to an osteoconductive polymer activates the Notch signaling pathway and induces osteogenesis. J Biomed Mater Res A. 2014;102(5):1558-1567.
- [17] Rachel A Oldershaw, Tim E Hardingham. Notch signaling during chondrogenesis of human bone marrow stem cells. Bone. 2010;46(2): 286-293.
- [18] Berezovska O, Frosch M, McLean P, et al. The Alzheimer-related gene presenilin1 facilitates notch1 in primary mammalian neurons. Brain Res Mol Brain Res. 1999;69(2):273-280.
- [19] Watanabe N, Tezuka Y, Matsuno K, et al. Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. J Bone Miner Metab. 2003;21(6):344-352.
- [20] Grogan SP, Olee T, Hiraoka K, et al. Repression of chondrogenesis through binding of notch signaling proteins HES-1 and HEY-1 to N-box domains in the COL2A1 enhancer site. Arthritis Rheum. 2008;58(9):2754-2763.
- [21] 罗二梅, 宇丽, 张家文, 等. 还原型谷胱甘肽对人脐带间充质干细胞成软骨诱导的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(3): 1-8.
- [22] Onyekwelu I, Goldring MB, Hidaka C. Chondrogenesis, Joint Formation, and Articular Cartilage Regeneration. J Cell Biochem. 2009;107(3):383-392.
- [23] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science. 1999;284(5415):770-776.
- [24] 洪奇华. Notch信号途径及其调控[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(4): 367-371.
- [25] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. J Cell Biochem. 2011;112(12):3491-3501.
- [26] Li H, Yu B, Zhang Y, et al. Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 341(2):320-325.
- [27] Sassoli C, Pini A, Mazzanti B, et al. Mesenchymal stromal cells affect cardiomyocyte growth through juxtacrine Notch-1/Jagged-1 signaling and paracrine mechanisms: Clues for cardiac regeneration. J Mol Cell Cardiol. 2011; 51(3):399-408.
- [28] Wang Y, Tu W, Lou Y, et al. Mesenchymal stem cells regulate the proliferation and differentiation of neural stem cells through Notch signaling. Cell Biol Int. 2009;33(11):1173-1179.
- [29] Osathanon T, Subbalekha K, Sastravaha P, et al. Notch signalling inhibits the adipogenic differentiation of single-cell-derived mesenchymal stem cell clones isolated from human adipose tissue. Cell Biol Int. 2012;36(12): 1161-1170.
- [30] Karlsson C, Jonsson M, Asp J, et al. Notch and HES5 are regulated during human cartilage differentiation. Cell Tissue Res. 2007;327(3):539-551.
- [31] Rebecca Williams, Larissa Nelson, Gary P Dowthwaite, et al. Notch receptor and Notch ligand expression in developing avian cartilage. J Anat. 2009;215: 159-169.
- [32] Hardingham TE, Oldershaw RA, Tew SR, et al. Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. J Anat. 2006; 209(4):469-480.
- [33] Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, et al. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. J Biol Chem. 2000;275(15):10738-10744.
- [34] Kita K, Kimura T, Nakamura N, et al. PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation. Genes Cells. 2008;13(8):839-850.
- [35] Bradley EW, Drissi MH. Wnt5b regulates mesenchymal cell aggregation and chondrocyte differentiation through the planar cell polarity pathway. J Cell Physiol. 2011; 226(6): 1683-1693.