

转化生长因子 β 及周期性拉伸应变条件下骨髓间充质干细胞向软骨样细胞的分化

郝耀, 乔梁, 郝永壮, 向川(山西医科大学第二医院骨科, 山西省太原市 030001)

文章亮点:

实验特征性地通过周期性拉伸应变力学刺激联合转化生长因子 β 来诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化, 结果显示二者具有协同作用, 周期性拉伸应变可以增强转化生长因子 β 的信号传导通路, 而转化生长因子 β 又能增强骨髓间充质干细胞对力学刺激的敏感性, 进而进一步促使其向软骨细胞分化。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 转化生长因子 β ; 周期性拉伸应变; 软骨细胞; 分化

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 软骨细胞; 转化生长因子 β ; 生物力学; 细胞分化

摘要

背景: 研究表明转化生长因子 β 对骨髓间充质干细胞的软骨方向分化具有显著的诱导作用。周期性拉伸应变可以模拟软骨细胞在体内的力学环境, 对细胞的增殖和分化起着重要的调节作用。

目的: 探讨转化生长因子 β 及周期性拉伸应变在诱导骨髓间充质干细胞向软骨样细胞分化过程中是否具有协同作用。

方法: 取2月龄新西兰大白兔10只, 骨穿针穿入股骨髓腔内, 抽取骨髓3.0-4.0 mL并分离培养骨髓间充质干细胞, 传至3代后随机分为4组, 分别为空白组、转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变组以及周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组, 作用1, 3, 6 d后取出相应细胞, 番红O染色观察大体形态, 阿尔新蓝染色检测糖胺聚糖水平, ELISA检测上清液基质金属蛋白酶13及基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平, RT-PCR检测II型胶原、基质金属蛋白酶13及基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA相对表达量。

结果与结论: 番红O染色可见细胞呈梭形或不规则三角形样改变, 各实验组较空白组细胞数量及基质分泌增多。作用第3天时转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组上清液糖胺聚糖水平较空白组均升高($P < 0.05$), 周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组II型胶原 mRNA相对表达量较空白组增高($P < 0.05$)。结果提示转化生长因子 β 及周期性拉伸应变均可诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化, 二者具有明显的协同作用。

郝耀, 乔梁, 郝永壮, 向川. 转化生长因子 β 及周期性拉伸应变条件下骨髓间充质干细胞向软骨样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4429-4436.

Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells under the conditions of transforming growth factor beta and cyclical tensile strain

Hao Yao, Qiao Liang, Hao Yong-zhuang, Xiang Chuan (Department of Orthopedics, Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Transforming growth factor- β has been shown to exert an obvious induction effect on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes. Cyclical tensile strain simulates mechanical environment of chondrocytes in the body, and plays an important regulatory role in cell proliferation and differentiation.

OBJECTIVE: To discuss the synergy of transforming growth factor- β and cyclical tensile strain in inducing the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells.

METHODS: A total of 10 2-month-old New Zealand rabbits were selected. Bone needle was used to penetrate the medullary cavity of bone. 3.0-4.0 mL of bone marrow was extracted for isolation and culture of bone marrow mesenchymal stem cells. Passage 3 cells were randomly assigned to four groups: blank, transforming growth factor- β , cyclical tensile strain and cyclical tensile strain + transforming growth factor- β groups. After 1, 3 and 6 days, cells were obtained. General morphology was observed using safranin O staining. Glycosaminoglycan levels were detected by alcian blue staining. Matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in supernatant were measured using ELISA. Type II collagen, matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA relative expression was detected using RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Safranin O staining showed fusiform or irregular triangular cells. Cell number

郝耀, 男, 1985年生, 山西省吕梁市人, 汉族, 山西医科大学骨科在读硕士, 主要从事关节软骨的损伤与修复方面的研究。

通讯作者: 向川, 副教授, 山西医科大学第二医院骨科, 山西省太原市 030001

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.001
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)28-04429-08

稿件接受: 2014-05-19

Hao Yao, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: Xiang Chuan, Associate professor, Department of Orthopedics, Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Accepted: 2014-05-19

and matrix secretion increased in each experimental group than in blank group. Glycosaminoglycan levels in the supernatant were greater in the transforming growth factor- β and cyclical tensile strain + transforming growth factor- β groups than in the blank group ($P < 0.05$). Type II collagen mRNA relative expression was higher in the cyclical tensile strain + transforming growth factor- β group than in the blank group ($P < 0.05$). Results indicated that transforming growth factor- β and cyclical tensile strain could induce the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes, showing an apparent cooperative action.

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; chondrocytes; transforming growth factor beta; biomechanics; cell differentiation

Hao Y, Qiao L, Hao YZ, Xiang C. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells under the conditions of transforming growth factor beta and cyclical tensile strain. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(28):4429-4436.

0 引言 Introduction

关节软骨退变以及继发的软骨下骨骨质增生所导致的骨性关节炎的发病率近年来呈上升趋势。有报道指出,全世界范围内骨性关节炎的发病率大约为15%,其中60岁以上的患病率约为50%,而75岁以上人的患病率更是高达80%^[1]。膝关节骨性关节炎发病率约占各种类型骨性关节炎的40%,主要表现为膝关节疼痛、僵硬以及活动受限等,其严重影响中老年人的生活质量。骨性关节炎是在力学及生物学因素共同作用下导致的软骨细胞、细胞外基质以及软骨下骨三者之间稳态的破坏。

骨髓间充质干细胞是来源于中胚层的具有很强增殖能力的一类成体干细胞^[2],其具有多向分化潜能,存在于不同种属动物体内,主要分布于全身结缔组织中,其中又以骨髓组织含量最为丰富。在适当的诱导条件下,骨髓间充质干细胞可以分化为骨细胞、软骨细胞等,现已成为组织工程中一种常用的种子细胞^[3-4]。

研究表明,体内软骨细胞能通过分泌大量细胞因子促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞的增殖和分化,转化生长因子 β 为主要的细胞因子。转化生长因子 β 作为一种多肽类因子,对骨髓间充质干细胞的软骨方向分化具有显著的诱导作用^[5]。研究表明体外将人骨髓间充质干细胞离心后,可以形成高密度的微团,加转化生长因子 β 后,骨髓间充质干细胞向细胞外分泌富含蛋白多糖的基质,并表达关节软骨的标志性蛋白——II型胶原。

随着生物力学研究的深入,其已从器官、组织水平深入到细胞、分子水平甚至基因水平,由此也产生了一门新兴的学科——力学生物学。研究表明,外力可以通过影响细胞内基因表达和蛋白质的合成来调节细胞功能,在细胞的生理、病理过程中发挥着重要作用^[6-9]。周期性拉伸应变(cyclical tensile strain, CTS)作为生物力学的一种表现形式,其可以模拟软骨细胞在体内的力学环境,对细胞的增殖和分化起着重要的调节作用,故成为近年来研究的热点。研究发现,适当强度的刺激能诱导和促进细胞增殖。最近研究发现,人成骨细胞的增殖依赖于其所使用的机械刺激的加载周期数量,而与加载的频率并没有明显的关系;相同的加载条件下作用15 min可以促进骨细胞的生

长,而作用72 h后致使细胞增殖下降^[10]。因此合适强度的力学刺激才能达到诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的作用。

本实验观察在转化生长因子 β 、周期性拉伸应变及二者共同作用下骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的特点,以及转化生长因子 β 、周期性拉伸应变在软骨分化过程中各自的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 析因设计动物实验。

时间及地点: 实验于2012年2至6月在山西医科大学第二医院骨科实验室及太原理工大学生物力学实验室完成。

材料:

实验动物: 随机选取10只2月龄新西兰大白兔,雌雄不拘,体质量1.4-1.7 kg,由山西医科大学实验动物中心提供。

转化生长因子 β 及周期性拉伸应变条件下骨髓间充质干细胞分化实验试剂和仪器:

| 试剂和仪器 | 来源 |
|--|--------------------------|
| 肝素 | Aventis Intercontinental |
| DMEM/F12 | 美国Hyclone公司 |
| 胎牛血清 | 杭州四季青公司 |
| Trizol | 天根生化科技公司 |
| 硫酸软骨素 | 美国Sigma公司 |
| 基质金属蛋白酶13、基质金属蛋白酶组织抑制剂1 ELISA试剂盒 | 武汉博士德公司, 进口分装 |
| 转化生长因子 β | 美国Sigma公司 |
| PrimeScript™ RT试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒 | Takara公司 |
| BioFlex培养板(型号BF-3001C) | 美国 Flexcell公司 |
| BB5060培养箱 | Heraeus公司 |
| Mx3005P型PCR扩增仪 | Stratagene公司 |
| XSZ-D2倒置相差显微镜 | 日本Olympus公司 |
| TGL-168台式高速离心机 | 加拿大Fermentas公司 |
| Flexcell 4000柔性基底拉伸系统 | 美国Flexcell公司 |

实验方法:

骨髓间充质干细胞的获取及培养: 随机选取10只2月龄新西兰大白兔, 氯胺酮肌注, 用骨穿针自股骨大转子处穿入股骨髓腔内, 骨穿针接5 mL注射器(内含3 000 U/mL的肝素0.2 mL), 抽取骨髓3.0–4.0 mL。加等量的DMEM培养液与之充分混匀, 加入相对密度为1.077的Percoll细胞分离液, 1 500 r/min离心15 min, 吸取液面交界处的单个核细胞层的细胞, 制成单细胞悬液, 并计数细胞。将上述细胞悬液以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于25 cm^2 细胞培养瓶, 加入适量DMEM/F-12培养液(含有体积分数为10%的胎牛血清), 放置于37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 条件下培养3 d。待细胞融合达到90%后, 用0.25%的胰酶消化并传代。将第3代骨髓间充质干细胞按 2×10^5 /孔, 接种于BioFlex培养板中, 每孔补充培养液至2 mL, 置于37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 的培养箱培养。

诱导剂的配置及实验分组: 转化生长因子 β 的质量浓度为10 mg/L。将药物加入细胞培养液DMEM/F12(含体积分数为10%胎牛血清)中, 达到预设浓度后, 4 $^\circ\text{C}$ 储存备用。实验分为空白组和实验组。空白组细胞共9孔, 无周期性拉伸应变和转化生长因子 β 的干扰; 实验组分转化生长因子 β 组, 周期性拉伸应变组, 周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组, 每组细胞9孔, 分别进行转化生长因子 β 、应力刺激、应力刺激+转化生长因子 β 的处理。其中各组的干预时间为1, 3, 6 d。

骨髓间充质干细胞的干预处理: 将骨髓间充质干细胞传至第3代, 利用胰酶消化, 按 2×10^5 /孔接种于BioFlex培养板, 待细胞全部贴壁, 弃去上清液, 加入配好的转化生长因子 β , 2 mL/孔。

软骨细胞动力学加载: Flexcell 4000系统是美国Flexcell公司设计的, 并且由其特定软件(FX-4000)控制。该系统利用真空泵对其特质培养板下部的硅胶膜施加负压, 使基底膜发生变形, 进而使基底膜上贴壁的细胞发生相应的变形, 细胞由此产生变化。此系统可通过计算机软件FX-4000设置频率、加载波形、最小拉伸率、最大拉伸率和作用时间。其中最大拉伸率反应了软骨细胞被拉伸的最大变形, 可衡量软骨细胞受到力学刺激的强度。本研究在加入诱导剂同时, 将培养板嵌入加载平台上, 通过密封圈与加载平台紧密相连, 放置与37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 的培养箱中, 设置最小拉伸率为0%, 最大拉伸率为1%, 频率为0.5 Hz, 正弦波4 h/D。

细胞形态观察: 在Flexcell 4000培养板中行番红O染色。取培养板中各组软骨细胞, 弃上清, 每孔加入2 mL 40 g/L多聚甲醛室温固定2 h, 番红O 2 mL/孔, 染色3 min。镜下观察、拍照。

上清液检测: 利用1.5 mL Eppendorf管, 收集药物和拉伸应力干预3 d后培养板中的上清液, 每孔抽取250 μL , 6孔/组, 分装于Eppendorf管中, -70 $^\circ\text{C}$ 冻存作为待检测的

样本。

阿尔新蓝染色检测糖胺聚糖水平: 阿尔新蓝作为阳离子染料, 可以与带负电荷的蛋白多糖稳定地按比例结合, 最后通过检测得到吸光度值来推算上清液中糖胺聚糖水平。实验采用Alcian blue染色沉淀法检测上清液中糖胺聚糖水平。首先分别配制标准品溶液为10, 20, 40 mg/L的硫酸软骨素。取各浓度的标准品和样本各100 μL 加入不同的1.5 mL EP管中, 分别加入8 mol/L盐酸胍溶液50 μL , 混匀后加入50 μL 试剂 I (0.75% Triton X-100, 3% H_2SO_4), 混匀后室温下静置15 min; 加入650 μL 冰冷的试剂 II (双蒸馏水稀释3倍的试剂 I), 4 $^\circ\text{C}$ 沉淀1 h。在4 $^\circ\text{C}$, 12 000 r/min的条件下离心15 min, 各取上清液700 μL 移入新的1.5 mL EP管中(注意此过程务必不可吸到白色沉淀物); 加入冰冷的试剂 III (0.08% Alcian blue, 0.25% Triton X-100, 0.5 mol/L 盐酸胍)500 μL , 摇匀后4 $^\circ\text{C}$ 下过夜; 次日在4 $^\circ\text{C}$, 12 000 r/min的条件下离心15 min, 弃去上清液, 分别加入二甲基亚砷洗液(0.03 mol/L MgCl_2 , 40%二甲基亚砷)750 μL , 室温下振荡30 min, 在同样条件下离心15 min, 弃上清液, 加入分散液(33%正丙醇, 4 mol/L 盐酸胍)500 μL , 振荡15 min, 将各溶液加入ELISA板中, 每孔240 μL , 用酶标仪在600 nm波长下测定吸光度值。各样品均检测2次, 结果取平均值, 得出该样品上清液中糖胺聚糖水平。

ELISA检测上清液基质金属蛋白酶13及基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平: 基质金属蛋白酶13的检测采用兔基质金属蛋白酶13酶联免疫分析试剂盒, 基质金属蛋白酶组织抑制剂1的检测采用人基质金属蛋白酶组织抑制剂1酶联免疫分析试剂盒。实验前先将试剂盒与待测样本放置室温下(20–28 $^\circ\text{C}$)平衡30 min, 将标准品和待测样品按每孔50 μL 依次加入微孔中, 并做好标记, 在标准品和待测样本中加入25 μL 的酶联亲和物, 充分混匀, 将包被微孔板覆膜并在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育反应60 min后充分弃尽孔内液体并扣干孔内剩余残液, 用清洗液充分冲洗5次, 并扣干微孔内的液体, 每孔分别加入底物 I、II 各50 μL , 充分反应并在室温下静置15 min, 反应过后分别加入终止液50 μL , 充分混匀, 使用酶标仪在450 nm处测定吸光度值, 每个样品检测2次, 结果取平均值, 得出该上清液基质金属蛋白酶13及基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平。

RT-PCR检测:

Trizol法提取骨髓间充质干细胞总RNA: ①将EP管和离心管编号, 将Flexcell培养板中的细胞用0.25%的胰酶消化3–5 min, 转移至15 mL离心管, 1 500 r/min, 离心后弃去上清液, 加入1 mL Trizol, 吹打混匀, 使得核酸蛋白复合物全部分离后, 全部转移至1.5 mL EP管中室温静置5 min。②在各EP管中加入0.2 mL氯仿, 振荡15 s, 22 $^\circ\text{C}$ 下静置5 min。在4 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min的条件下离心15 min。吸取上层水相(约400 μL)转移至新EP管中。③每管加入400 μL 冰冷的异丙醇, 混匀, 22 $^\circ\text{C}$ 放置10 min后。4 $^\circ\text{C}$

12 000 r/min的条件下离心10 min, 弃掉上清液。可见白色沉淀。④每管加入1 mL预冷的体积分数为75%乙醇(750 μ L乙醇+250 μ L RNase-free ddH₂O)混匀洗涤。4 $^{\circ}$ C 7 500 r/min的条件下离心5 min。弃掉上清液后, 22 $^{\circ}$ C的条件下放置晾干。⑤每管加入50 μ L RNase-free ddH₂O, 混匀直至RNA沉淀完全溶解后分装于小EP管中(每管10 μ L)。⑥将EP管放入-70 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

RNA反转录为cDNA: ①取出小EP管(10 μ L), 另外准备几个小EP管, 每管分装2 μ L之前提纯的RNA。②取出反转录试剂盒, 每管再分别加入以下试剂: 1 μ L Oligo(dT) 18Primer, 8 μ L RNase-free ddH₂O, 4 μ L 5 \times Reaction Buffer, 1 μ L RiboLock RNase Inhibitor, 2 μ L 10 mmol/L dNTP Mix, 4 μ L M-MuLV Reverse Transcriptase, 配成20 μ L的反应体系。③小离心机甩一下后, 用振荡器混匀, 再用小离心机甩一下。④将小EP管用封口膜封住, 放入梯度PCR仪。⑤反转录反应条件: Step 1: 37 $^{\circ}$ C \times 60 min, Step 2: 75 $^{\circ}$ C \times 15 min, Step 3: 4 $^{\circ}$ C \times forever。⑥结束后用微量分光光度计测cDNA的浓度。然后分装使cDNA浓度为50 μ g/L, 最后放入-70 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

实时定量荧光PCR: ①取出小EP管, 另外准备八连管。②取出PCR试剂盒, 每管中分别加入以下试剂: 12.5 μ L SYBR, 9 μ L RNase-free ddH₂O, 0.75 μ L上游引物、0.75 μ L下游引物、2 μ L cDNA。③扩增反应条件如下: 预变性: 60 $^{\circ}$ C \times 120 s循环1次, 75 $^{\circ}$ C \times 600 s循环1次; PCR反应: 变性95 $^{\circ}$ C \times 15 s, 退火65 $^{\circ}$ C \times 30 s, 延伸70 $^{\circ}$ C \times 30 s, 一共循环60次; 熔解曲线: 95 $^{\circ}$ C \times 60 s, 60 $^{\circ}$ C \times 30 s, 95 $^{\circ}$ C \times 30 s, 一共循环65次。

引物序列分别为:

| 基因 | 引物 |
|---------------|---|
| II型胶原 | 上游引物5'-ACA CTG CCA ACG TCC AGA TG-3' 下游引物5'-GTG ATG TTC TGG GAG CCC TC-3' |
| 基质金属蛋白酶13 | 上游引物5'-ACA CCG GAT CTG CCA AGA GA-3' 下游引物5'-CTG GAG AAC GTG ATT GGA GTC A-3' |
| 基质金属蛋白酶组织抑制剂1 | 上游引物5'-AGC GTA GGT CTT GGT GAA G-3' 下游引物5'-GCAACT CCG ACC TTG TCA TC-3' |
| GAPDH | 上游引物5'-GGT GAA GGT CGG AGT GAA CG-3' 下游引物5'-AGT TAA AAG CAG CCC TGG TGA-3' |

数据处理: 计算机上可以得到各个不同指标的Ct值。各指标相对转录水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta E - \Delta C$, $\Delta E = Ct_{exp} - Ct_G$, $\Delta C = Ct_{ctl} - Ct_G$ 。其中exp表示各检测指标, G表示GAPDH, ctl表示各指标样本量的均值。

主要观察指标: ①各组骨髓间充质干细胞形态。②各组培养上清液中糖胺聚糖、基质金属蛋白酶13、基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平。③各组细胞中II型胶原、基质金属蛋白酶13、基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA的表达。

统计学分析: 所有实验结果计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 根据

析因实验设计的原则, 采用SPSS 13.0统计学软件进行统计分析, $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞形态 干预第1, 3, 6天, 细胞呈长梭形或不规则三角形样改变, 各实验组较空白组细胞数量及基质分泌增多。周期性拉伸应变组沿垂直于培养皿半径方向排列, 细胞长度明显增加, 呈长三角或卵圆形, 较转化生长因子 β 组细胞数量有所减少, 基质分泌呈减少趋势; 周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组较单独转化生长因子 β 组或周期性拉伸应变组细胞数量及基质分泌明显增多(图1)。

2.2 各组上清液中糖胺聚糖水平

第1天: 周期性拉伸应变组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中糖胺聚糖水平较空白组相比降低($P < 0.05$) (表1, 图2)。

第3天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中糖胺聚糖水平与空白组相比差异均有显著性意义($P < 0.05$), 其中转化生长因子 β 组和周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组与空白组相比有上升趋势(表1, 图2)。

第6天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中糖胺聚糖水平与空白组相比差异均有显著性意义($P < 0.05$), 其中转化生长因子 β 组和周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组与空白组相比有上升趋势, 空白组、转化生长因子 β 组上清液中糖胺聚糖水平较第3天均增高($P < 0.05$) (表1, 图2)。

各组第3天、第6天中糖胺聚糖水平较第1天增高($P < 0.05$), 且呈逐渐上升趋势(表1, 图2)。

2.3 各组上清液中基质金属蛋白酶13水平

第1天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中基质金属蛋白酶13水平较空白组均降低($P < 0.05$) (表2, 图3)。

第3天: 转化生长因子 β 组中基质金属蛋白酶13水平较空白组升高($P < 0.05$) (表2, 图3)。

第6天: 周期性拉伸应变组中基质金属蛋白酶13水平较空白组升高($P < 0.05$), 各组上清液中基质金属蛋白酶13水平较第3天均明显增高($P < 0.05$) (表2, 图3)。

空白组第3天、第6天基质金属蛋白酶13水平与第1天相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组第6天基质金属蛋白酶13水平较第1天均升高($P < 0.05$) (表2, 图3)。

2.4 各组上清液中基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平

第1天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平与空白组比较差异无显著性意义(表3, 图4)。

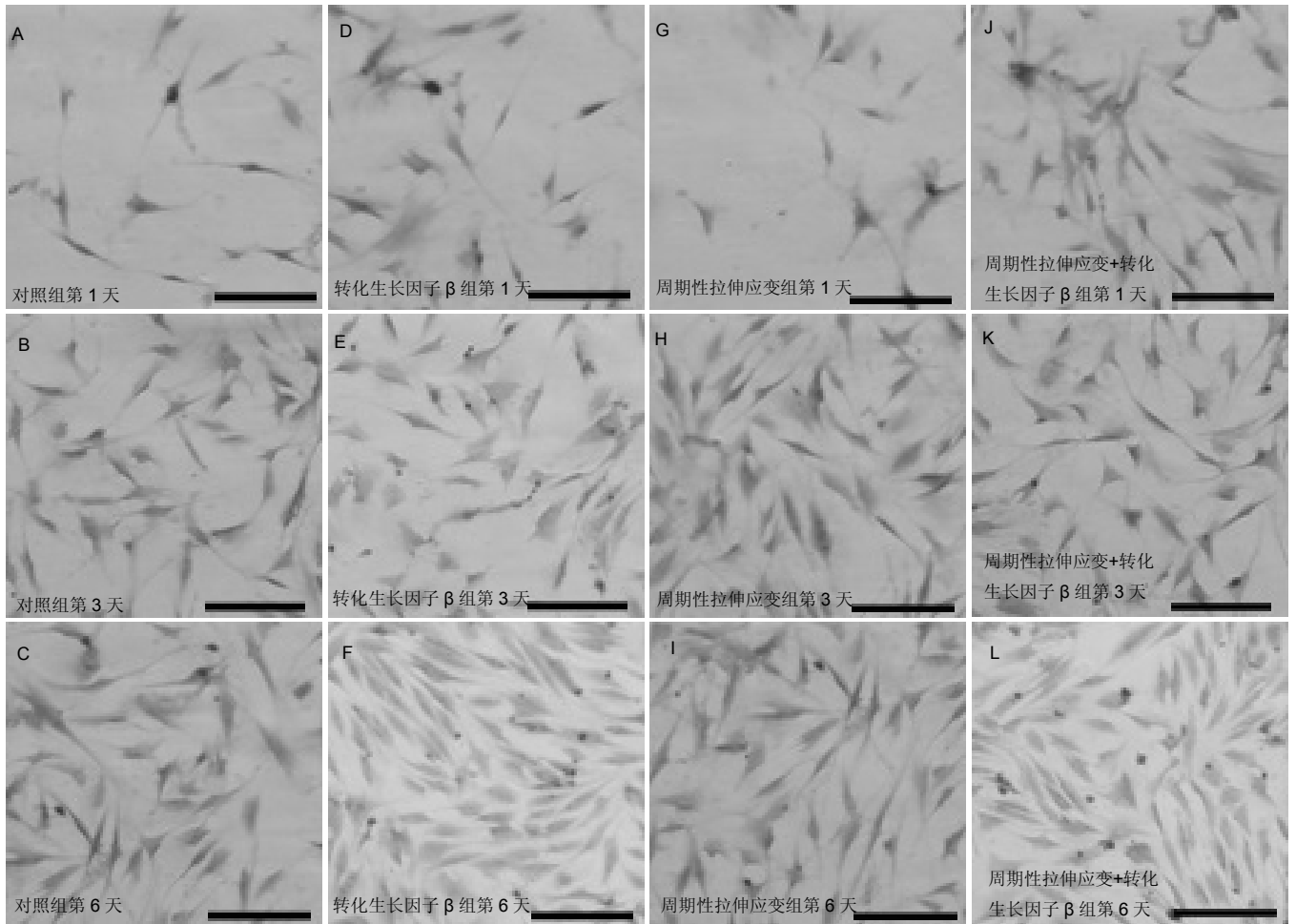


图 1 干预 1, 3, 6 天时各组骨髓间充质干细胞形态和数量(番红 O 染色, 标尺 75 μm)

Figure 1 Morphology and number of bone marrow mesenchymal stem cells in each group after 1, 3 and 6 days of intervention (safranin O staining, scale bars=75 μm)

图注: 周期性拉伸应变+转化生长因子β组的细胞数量及基质分泌较单独转化生长因子β组、周期性拉伸应变组明显增多。

表 1 各组上清液中糖胺聚糖水平

Table 1 Glycosaminoglycans levels in the supernatant of each group ($\bar{x}\pm s$, n=6, μg/L)

| 组别 | 第 1 天 | 第 3 天 | 第 6 天 |
|------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白组 | 11.20±4.76 | 16.44±5.84 ^b | 19.92±5.13 ^{bc} |
| 转化生长因子β组 | 9.50±3.61 ^d | 21.22±4.15 ^{abd} | 25.39±7.83 ^{abd} |
| 周期性拉伸应变组 | 5.82±2.81 ^a | 12.97±4.43 ^{abd} | 14.12±3.85 ^{abd} |
| 周期性拉伸应变+转化生长因子β组 | 6.40±3.17 ^a | 25.60±9.15 ^{ab} | 26.17±8.87 ^{ab} |

表注: 与空白组比较, ^aP < 0.05; 与第 1 天比较, ^bP < 0.05; 与第 3 天比较, ^cP < 0.05; 与周期性拉伸应变+转化生长因子β组比较, ^dP < 0.05。

表 3 各组上清液中基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 水平

Table 3 Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels in the supernatant of each group ($\bar{x}\pm s$, n=6, mg/L)

| 组别 | 第 1 天 | 第 3 天 | 第 6 天 |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| 空白组 | 1.91±0.41 | 2.01±0.87 | 1.53±0.54 |
| 转化生长因子β组 | 1.91±0.81 | 1.88±0.93 | 1.64±0.51 |
| 周期性拉伸应变组 | 1.84±0.95 | 2.20±0.76 | 1.57±0.47 |
| 周期性拉伸应变+转化生长因子β组 | 2.28±0.54 | 1.96±0.37 | 1.75±0.85 |

表注: 转化生长因子β组、周期性拉伸应变组基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 水平与周期性拉伸应变+转化生长因子β组相比差异无显著性意义。

表 2 各组上清液中基质金属蛋白酶 13 水平

Table 2 Matrix metalloproteinase-13 levels in the supernatant of each group ($\bar{x}\pm s$, n=6, mg/L)

| 组别 | 第 1 天 | 第 3 天 | 第 6 天 |
|------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| 空白组 | 10.84±3.35 | 7.81±2.14 ^b | 12.89±4.97 ^{bc} |
| 转化生长因子β组 | 8.03±2.87 ^a | 9.97±3.96 ^a | 13.93±3.18 ^{bcd} |
| 周期性拉伸应变组 | 9.06±3.06 | 8.88±3.71 | 14.77±5.74 ^{abd} |
| 周期性拉伸应变+转化生长因子β组 | 8.02±2.51 ^a | 8.36±3.86 | 11.04±4.76 ^{bc} |

表注: 与空白组比较, ^aP < 0.05; 与第 1 天比较, ^bP < 0.05; 与第 3 天比较, ^cP < 0.05; 与周期性拉伸应变+转化生长因子β组比较, ^dP < 0.05。

表 4 各组细胞 II 型胶原 mRNA 相对表达量

Table 4 Relative expression of collagen II mRNA of cells in each group ($\bar{x}\pm s$, n=5)

| 组别 | 第 1 天 | 第 3 天 | 第 6 天 |
|------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | 1.89±0.27 | 4.78±0.90 ^b | 2.36±0.58 ^c |
| 转化生长因子β组 | 3.31±0.35 ^a | 5.19±0.77 ^b | 3.91±0.53 ^{bc} |
| 周期性拉伸应变组 | 2.37±0.17 | 4.28±0.28 ^{bd} | 5.91±0.17 ^{ab} |
| 周期性拉伸应变+转化生长因子β组 | 3.79±0.60 ^a | 6.29±0.76 ^{ab} | 4.06±0.60 ^{bc} |

表注: 与空白组比较, ^aP < 0.05; 与第 1 天比较, ^bP < 0.05; 与第 3 天比较, ^cP < 0.05; 与周期性拉伸应变+转化生长因子β组比较, ^dP < 0.05。

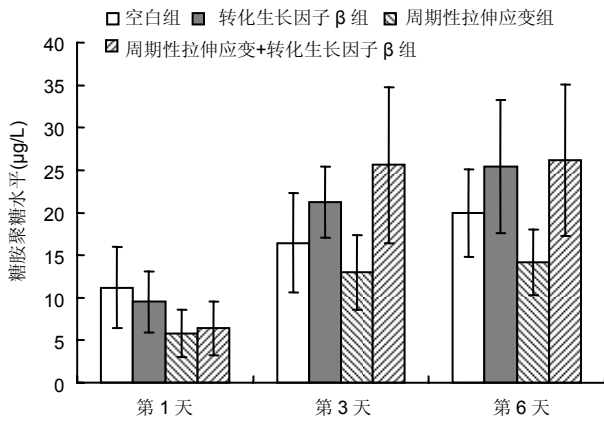


图2 各组上清液中糖胺聚糖水平
Figure 2 Glycosaminoglycans levels in the supernatant of each group

图注: 干预第3天时周期性拉伸应变+转化生长因子β组糖胺聚糖水平与转化生长因子β组、周期性拉伸应变组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明转化生长因子β与周期性拉伸应变对骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化有一定的协同作用。

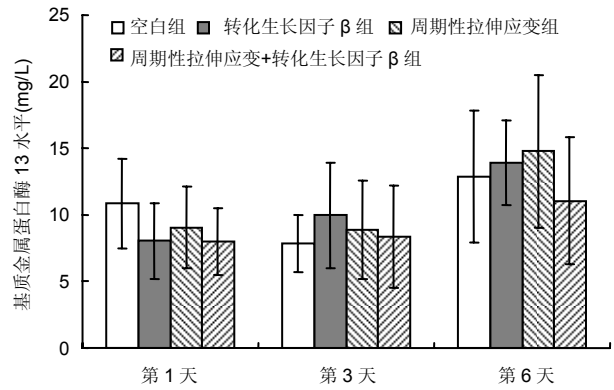


图3 各组上清液中基质金属蛋白酶13水平
Figure 3 Matrix metalloproteinase-13 levels in the supernatant of each group

图注: 干预第6天时转化生长因子β组、周期性拉伸应变组基质金属蛋白酶13水平与周期性拉伸应变+转化生长因子β组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明转化生长因子β+周期性拉伸应变可以有效降低基质金属蛋白酶13的表达, 从而防止细胞外基质的降解, 为骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化提供支持。

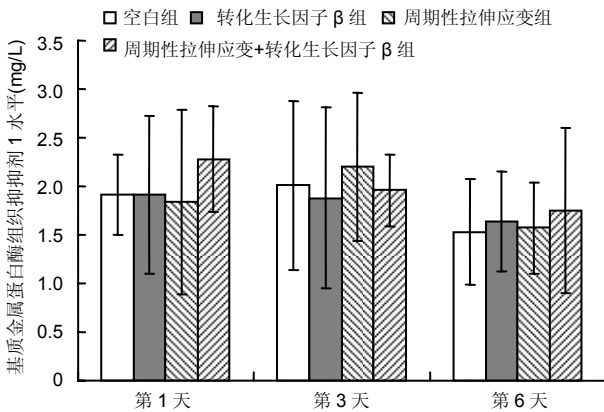


图4 各组上清液中基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平
Figure 4 Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels in the supernatant of each group

图注: 转化生长因子β组、周期性拉伸应变组基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平与周期性拉伸应变+转化生长因子β组相比差异无显著性意义。

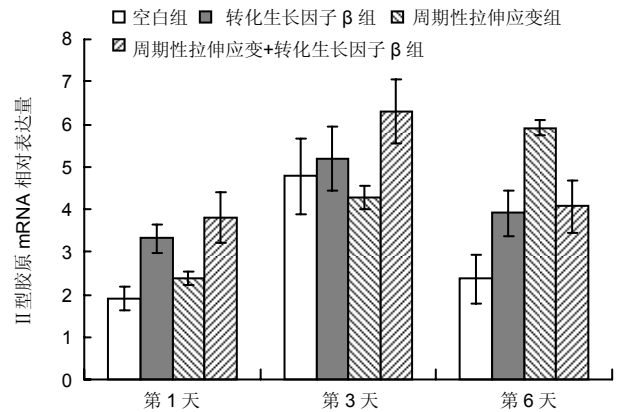


图5 各组细胞中II型胶原 mRNA 相对表达量
Figure 5 Relative expression of collagen II mRNA of cells in each group

图注: 干预第3天时周期性拉伸应变组II型胶原 mRNA 水平与周期性拉伸应变+转化生长因子β组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明转化生长因子β与周期性拉伸应变有一定协同作用。

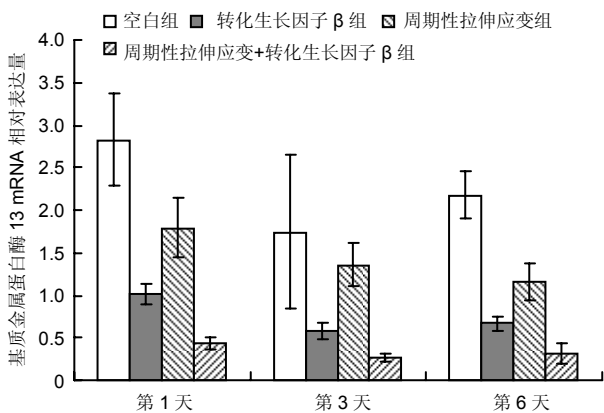


图6 各组细胞中基质金属蛋白酶13 mRNA 相对表达量
Figure 6 Relative expression of matrix metalloproteinase-13 mRNA of cells in each group

图注: 转化生长因子β组、周期性拉伸应变组基质金属蛋白酶13 mRNA 相对表达量与周期性拉伸应变+转化生长因子β组相比差异无显著性意义。

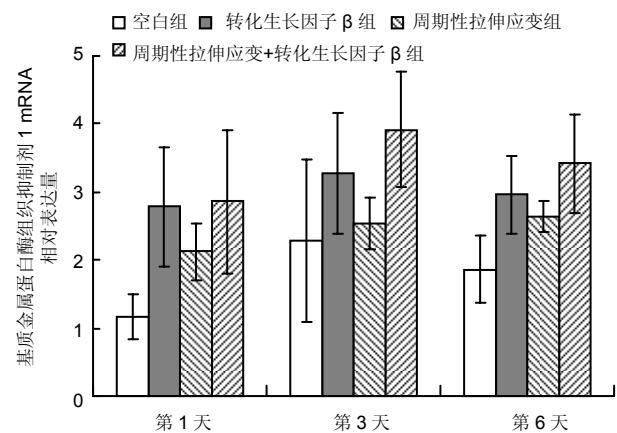


图7 各组细胞中基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA 相对表达量
Figure 7 Relative expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA of cells in each group

图注: 转化生长因子β组、周期性拉伸应变组基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA 相对表达量与周期性拉伸应变+转化生长因子β组相比差异无显著性意义, 但均较空白组增高($P < 0.05$)。

表5 各组细胞基质金属蛋白酶13 mRNA相对表达量

Table 5 Relative expression of matrix metalloproteinase-13 mRNA of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 组别 | 第1天 | 第3天 | 第6天 |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 空白组 | 2.83±0.54 | 1.74±0.90 ^b | 2.18±0.27 ^c |
| 转化生长因子 β 组 | 1.01±0.12 ^a | 0.58±0.09 ^a | 0.67±0.08 ^a |
| 周期性拉伸应变组 | 1.79±0.35 | 1.36±0.26 | 1.15±0.22 ^a |
| 周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组 | 0.43±0.08 ^a | 0.27±0.05 ^a | 0.32±0.12 ^a |

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与第1天比较, ^b $P < 0.05$; 与第3天比较, ^c $P < 0.05$ 。

第3天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平与空白组比较差异无显著性意义(表3, 图4)。

第6天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中基质金属蛋白酶组织抑制剂1水平与空白组比较差异无显著性意义(表3, 图4)。

2.5 RT-PCR检测结果

2.5.1 II型胶原(Col- II)mRNA的表达

第1天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中II型胶原mRNA相对表达量较空白组增高($P < 0.05$)(表4, 图5)。

第3天: 周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组II型胶原mRNA相对表达量较空白组增高($P < 0.05$)(表4, 图5)。

第6天: 各实验组II型胶原mRNA相对表达量较空白组均增高($P < 0.05$)。空白组、转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中II型胶原mRNA相对表达量分别为较第3天均降低($P < 0.05$)(表4, 图5)。

各组第3天II型胶原mRNA相对表达量分别为较第1天均增高($P < 0.05$)。周期性拉伸应变组第6天II型胶原mRNA相对表达量为较第1天增高($P < 0.05$)(表4, 图5)。

2.5.2 基质金属蛋白酶13 mRNA的表达

第1天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中基质金属蛋白酶13 mRNA相对表达量较空白组均降低($P < 0.05$)(表5, 图6)。

第3天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中基质金属蛋白酶13 mRNA相对表达量较空白组均降低($P < 0.05$)。空白组第3天基质金属蛋白酶13 mRNA相对表达量为较第1天降低($P < 0.05$)(表5, 图6)。

第6天: 各实验组基质金属蛋白酶13 mRNA相对表达量较空白组均降低($P < 0.05$)。空白组中基质金属蛋白酶13 mRNA相对表达量较第3天升高($P < 0.05$)(表5, 图6)。

2.5.3 基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA的表达

第1天: 转化生长因子 β 组、周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组中基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA相对表达量较空白组增高($P < 0.05$)(表6, 图7)。

第3天: 周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA相对表达量为较空白组增高

表6 各组细胞基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA相对表达量

Table 6 Relative expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 组别 | 第1天 | 第3天 | 第6天 |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 空白组 | 1.17±0.34 | 2.28±1.20 | 1.86±0.49 |
| 转化生长因子 β 组 | 2.78±0.87 ^a | 3.27±0.89 | 2.96±0.58 |
| 周期性拉伸应变组 | 2.12±0.41 | 2.54±0.38 | 2.64±0.22 |
| 周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组 | 2.86±1.05 ^a | 3.91±0.85 ^a | 3.42±0.72 ^a |

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$ 。

($P < 0.05$)(表6, 图7)。

第6天: 周期性拉伸应变+转化生长因子 β 组基质金属蛋白酶组织抑制剂1 mRNA相对表达量较空白组增高($P < 0.05$)(表6, 图7)。

3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞由Friedenstein等^[11]发现,其自身具有极强的繁殖能力,在特定的培养条件下,骨髓间充质干细胞可分化成为软骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞等。骨髓间充质干细胞在向软骨细胞表型分化过程中,很多因素都具有影响性,包括转化生长因子 β 、胰岛素样生长因子1、力学刺激、低氧条件、地塞米松、维生素C等。其中转化生长因子 β 是骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化过程中极为重要的诱导因子,可使细胞特异性细胞外基质快速沉积^[12-13],并诱导原始的间充质细胞分化为软骨组织,促进软骨细胞的增殖和成熟,增加软骨细胞合成和分泌糖胺多糖的作用^[14]。体外培养骨髓间充质干细胞时,在培养基中加入转化生长因子 β 可以诱导其定向分化为软骨细胞,II型胶原的表达与转化生长因子 β 的剂量呈正相关^[15]。Bounediene等^[16]的实验表明转化生长因子 β 在多种因素下,对骨髓间充质干细胞的分化和功能有双向调节作用。

力学刺激对细胞的增殖和分化起着重要的调节作用,近年来国内外学者致力于力学刺激对体外培养骨髓间充质干细胞增殖和定向诱导分化的研究^[17-19]。研究发现力学因素对骨髓间充质干细胞增殖和分化起着重要的作用。而且力学的大小、强度以及作用时间对骨髓间充质干细胞定向分化的调节作用不尽相同。周期性拉伸应变对软骨组织和软骨细胞的代谢有巨大影响。高强度载荷抑制细胞代谢,而适当强度的载荷和合适的频率能导致软骨细胞的合成反应^[20]。Angele等^[21]利用单一因素的力学刺激骨髓间充质干细胞后发现,部分骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化。

本实验的意义在于建立了一种体外诱导骨髓间充质干细胞向软骨方向分化的体系,从分子水平证实,转化生长因子 β 可以诱导骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞。进而研究发现,周期性拉伸应变(最小拉伸率为0%,最大拉伸率

为1%, 频率为0.5 Hz, 正弦波, 4 h/D)可以促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞的分化。二者具有协同作用, 周期性拉伸应变可以增强转化生长因子 β 的信号传导通路, 而转化生长因子 β 又能增强骨髓间充质干细胞对力学刺激的敏感性, 进而进一步促使其向软骨细胞分化。该结果为后期利用骨髓间充质干细胞形成组织工程化软骨修复关节软骨损伤的研究奠定了基础。

综上所述, 影响骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的因素很多, 需将这些因素进行优化组合才能提高骨髓间充质干细胞的成软骨效应。研究表明, 多种细胞因子联合诱导及多基因共同转染对骨髓间充质干细胞有着更大的成软骨效应, 但联合细胞因子的种类、细胞因子的浓度、转染基因的种类、转染基因的量等都尚未明确, 有待进一步研究。

致谢: 感谢山西医科大学第二医院骨科实验室的各位老师及师兄弟的支持, 同时感谢太原理工大学生物力学实验室的李晓娜、王力老师在 Flexcel 力学加载系统的操作、实验技术方面给予的极大支持和帮助。

作者贡献: 实验设计为向川副教授, 实验实施为郝耀, 实验评估为郝永壮, 资料收集为乔梁。郝耀成文并对文章负责, 郝永壮审校。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

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

学术术语: 细胞工程-应用细胞生物学和分子生物学原理和方法, 通过某种工程学手段, 在细胞整体水平或细胞器水平上, 依照人们的需要和设计来改变细胞内遗传物质或获得细胞产品的一门综合科学技术。

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] Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. Clin Geriatr Med. 2010;26(3):355-369.
- [2] Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. Rheumatology (Oxford). 2008;47(2): 126-131.
- [3] Bruder SP, Kurth AA, Shea M, et al. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1998;16(2):155-162.
- [4] Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. J Cell Physiol. 1998;176(1):57-66.
- [5] Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. Chondrocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells undergoing chondrogenesis in agarose hydrogels of solid and channelled architectures respond differentially to dynamic culture conditions. J Tissue Eng Regen Med. 2011;5(9):747-758.
- [6] Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. Physiol Rev. 1995;75(3):519-560.
- [7] Malek AM, Izumo S. Control of endothelial cell gene expression by flow. J Biomech. 1995;28(12):1515-1528.
- [8] Davies PF, Spaan JA, Krams R. Shear stress biology of the endothelium. 2005;33(12):1714-1718.
- [9] Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. Bone. 2003;33(1):1-13.
- [10] Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, et al. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. J Biomech. 2002;35(7):873-880.
- [11] Fridenshtein Ala, Piatetskii-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. Arkh Anat Gistol Embriol. 1969;56(3):3-11.
- [12] Barry F, Boynton RE, Liu B, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. Exp Cell Res. 2001;268(2):189-200.
- [13] Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng. 1998;4(4):415-428.
- [14] van den Berg WB, van der Kraan PM, Scharstuhl A, et al. Growth factors and cartilage repair. Clin Orthop Relat Res. 2001;(391 Suppl):S244-250.
- [15] Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, et al. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. Am J Vet Res. 2000;61(9):1003-1010.
- [16] Boumediene K, Vivien D, Macro M, et al. Modulation of rabbit articular chondrocyte (RAC) proliferation by TGF-beta isoforms. Cell Prolif. 1995;28(4):221-234.
- [17] Song G, Ju Y, Shen X, et al. Mechanical stretch promotes proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Colloids Surf B Biointerfaces. 2007;58(2):271-277.
- [18] 彭磊, 胡蕴玉, 徐华梓, 等. 间歇性压力培养环境对兔骨髓基质干细胞增殖的影响[J]. 中国骨伤, 2007, 20(2): 92-93.
- [19] Marolt D, Augst A, Freed LE, et al. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. Biomaterials. 2006;27(36):6138-6149.
- [20] Potier E, Noailly J, Ito K, et al. Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. J Biomech. 2010;43(5): 807-817.
- [21] Angele P, Yoo JU, Smith C, et al. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. J Orthop Res. 2003;21(3):451-457.