

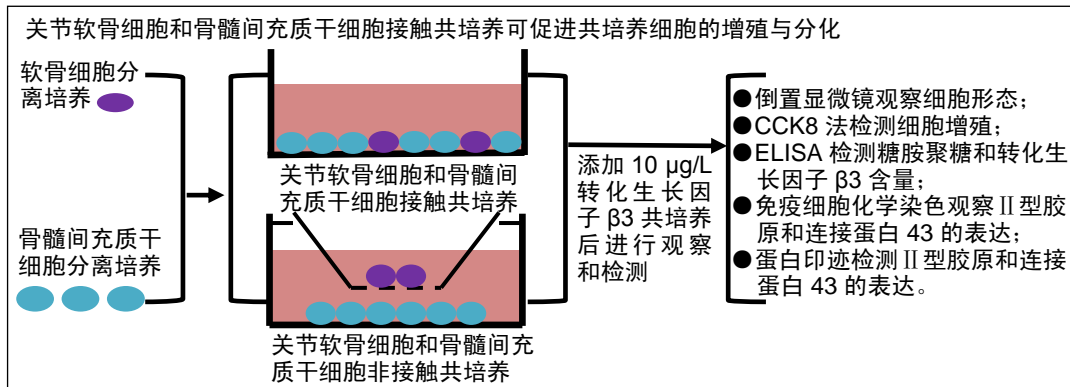
关节软骨细胞和骨髓间充质干细胞不同共培养方式对细胞增殖与分化的影响

赵文慧¹, 皮洪涛¹, 冯万文¹, 李向东¹, 王建伟¹, 刘岳鹏¹, 姜洋², 马建新¹, 夏亚一³, 王翠芳³, 邵林林¹, 李春辉¹, 郁洪阳¹, 刘尚林¹, 董言斌¹, 马亚辉² (¹徐州医科大学附属连云港市东方医院临床研究中心, 江苏省连云港市 222042; ²蚌埠医学院研究生院, 安徽省蚌埠市 233000; ³兰州大学第二医院骨科研究所, 甘肃省兰州市 730030)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1521

ORCID: 0000-0002-4472-5981(冯万文)

文章快速阅读:



赵文慧, 女, 1988 年生, 山西省大同市人, 汉族, 2014 年中国医科大学毕业, 硕士, 助理研究员, 主要从事细胞生物学和分子生物学的研究。

并列第一作者: 皮洪涛, 男, 1971 年生, 江苏省连云港市人, 汉族, 主治医师, 主要从事细胞病理学和分子病理学的研究。

通讯作者: 冯万文, 主任医师, 研究生导师, 徐州医科大学附属连云港市东方医院临床研究中心, 江苏省连云港市 222042

文献标识码:A

稿件接受: 2018-10-08

Zhao Wenhui, Master, Assistant researcher, Center for Clinical Research and Translational Medicine, Lianyungang Oriental Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Lianyungang 222042, Jiangsu Province, China

Pi Hongtao, Attending physician, Center for Clinical Research and Translational Medicine, Lianyungang Oriental Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Lianyungang 222042, Jiangsu Province, China

Zhao Wenhui and Pi Hongtao contributed equally to this work.

Corresponding author: Feng Wanwen, Chief physician, Master's supervisor, Center for Clinical Research and Translational Medicine, Lianyungang Oriental Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Lianyungang 222042, Jiangsu Province, China

文题释义:

缝隙连接和连接蛋白: 缝隙连接是存在于 2 个细胞间的特殊连接结构, 由相邻细胞膜上的 2 个连接子相互锚定组成, 而连接子由连接蛋白组成。通过缝隙连接通道进行细胞间直接通讯联系, 又称缝隙连接细胞间通讯。缝隙连接分布广泛, 几乎存在于所有的动物细胞中。连接蛋白是由 10 余个成员组成的保守大家族, 各亚成员之间有 50%-60% 同源, 主要差别在于连接蛋白分子的胞浆部分。连接蛋白组成的缝隙蛋白通道允许离子、代谢物和一些第二信使及寡聚核苷酸通过, 通过物质交换构成缝隙连接细胞间通讯, 对细胞的分化、生长、发育和凋亡具有调节作用。

非接触共培养: 是将 Transwell 小室放入培养板进行细胞培养, 该小室有一层带有微孔的聚碳酸酯膜, 孔径 ≤ 0.4 µm, 允许生物分子自由通过, 而细胞不能通过隔膜, 避免了细胞间直接接触, 有利于观察细胞的生长状态, 探究细胞间相互作用的机制。

摘要

背景: 在关节软骨细胞和骨髓间充质干细胞共培养环境中, 软骨细胞功能活跃, 增殖速度加快, 骨髓间充质干细胞促进了软骨细胞的表型维持, 而且少量软骨细胞提供的微环境能够诱导骨髓间充质干细胞成软骨分化, 降低了软骨分化过程中出现的肥大表型和软骨内骨化, 但是影响共培养系统中细胞增殖分化的因素和细胞间相互作用的机制尚不明确。

目的: 观察关节软骨细胞和骨髓间充质干细胞接触共培养对细胞增殖分化的影响, 进一步优化共培养方式, 为探讨共培养系统中二者的相互作用机制提供依据。

方法: 分离和培养新西兰兔(南京医科大学实验动物中心提供)软骨细胞和骨髓间充质干细胞, 取第 2 代软骨细胞和骨髓间充质干细胞, 以 1:3 的比例直接混合在 24 孔板进行接触共培养为接触共培养组, 以 1:3 比例分别在 Transwell 的上室和下室进行非接触共培养为非接触共培养组, 共培养 21 d。细胞爬片进行甲苯胺蓝染色、COL2a1 及 Cx43 细胞免疫化学染色。应用 CCK8 检测共培养系统中细胞的增殖情况, ELISA 检测共培养细胞上清液中糖胺聚糖和转化生长因子 β3 水平, Western blot 检测共培养细胞 COL2a1 和 Cx43 的表达。然后添加转化生长因子 β3 进行关节软骨细胞和骨髓间充质干细胞接触共培养和非接触共培养, 比较细胞增殖、糖胺聚糖水平、COL2a1 及 Cx43 蛋白表达的变化。

结果与结论: ①随着共培养时间的延长, 细胞增殖能力逐渐增高, 接触共培养组细胞吸光度值明显高于非接触共培养组 ($P < 0.05$), 糖胺聚糖和转化生长因子 β3 水平以及 COL2a1 和 Cx43 的蛋白表达明显高于非接触共培养组; ②添加 10 µg/L 转化生长因子 β3 共培养 21 d, 接触共培养组细胞增殖、糖胺聚糖水平、COL2a1 及 Cx43 的表达与未添加转化生长因子 β3 比较无明显变化 ($P > 0.05$), 而非接触共培养组的细胞增殖、糖胺聚糖水平、COL2a1 及 Cx43 蛋白表达明显提高 ($P < 0.05$), 但仍明显低于未添加转化生长因子 β3 的接触共培养组 ($P < 0.05$); ③结果表明, 接触共培养比非接触共培养明显促进细胞的增殖和分化, Cx43 在其中起重要作用。

关键词:

关节软骨细胞; 骨髓间充质干细胞; 共培养; 增殖; 分化; 糖胺聚糖; II 型胶原; 转化生长因子 β3; 缝隙连接; 连接蛋白; 干细胞

主题词:

软骨细胞; 骨髓; 间质干细胞; 共同培养技术; 转化生长因子 β3; 连接蛋白 43; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2

基金资助:

江苏省“333重点人才培养工程”项目(201412), 项目负责人: 冯万文; 连云港市科技局社会发展项目(SH1545), 项目负责人: 冯万文; 连云港市卫计委科研计划项目(201728), 项目负责人: 冯万文

缩略语:

关节软骨细胞: articular chondrocytes, ACs; 骨髓间充质干细胞: bone marrow mesenchymal stromal cells, BMSCs; 连接蛋白 43: connexin 43, Cx43; II型胶原: type II collagen, COL2

Contact or noncontact cocultures of articular chondrocytes with bone marrow mesenchymal stem cells: cell proliferation and differentiation

Zhao Wenhui¹, Pi Hongtao¹, Feng Wanwen¹, Li Xiangdong¹, Wang Jianwei¹, Liu Yuepeng¹, Jiang Yang², Ma Jianxin¹, Xia Yayi³, Wang Cuifang³, Shao Linlin¹, Li Chunhui¹, Yu Hongyang¹, Liu Shanglin¹, Dong Yanbin¹, Ma Yahui² (¹Center for Clinical Research and Translational Medicine, Lianyungang Oriental Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Lianyungang 222042, Jiangsu Province, China; ²Bengbu Medical College Postgraduate School, Bengbu 233000, Anhui Province, China; ³Orthopaedic Institute of Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Coculture of articular chondrocytes with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) can contribute to proliferation and phenotype maintenance of articular chondrocytes and chondrogenic differentiation of BMSCs as a result of the microenvironment provided by the small number of articular chondrocytes. Furthermore, the coculture system decreases hypertrophic phenotype and enchondral ossification during BMSCs chondrogenic differentiation. However, the mechanisms underlying the cell-cell interactions in the coculture system of articular chondrocytes with BMSCs have not been fully clarified and necessitate further studies.

OBJECTIVE: To investigate the effect of the contact coculture of articular chondrocytes with BMSCs on the cell proliferation and differentiation *in vitro*, and to further optimize the coculture pattern providing a basis for further exploring the interaction mechanism of articular chondrocytes and BMSCs in the coculture system.

METHODS: Articular chondrocytes and BMSCs were isolated from New Zealand white rabbits (provided by the Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Nanjing, China) and expanded *in vitro*. The articular chondrocytes and BMSCs both at passage 2 were harvested and cocultured at the ratio of 1:3 for 21 days. The coculture patterns included the cell-cell contact coculture in the 24-well plates as experimental group and cell-cell noncontact coculture through a Transwell chamber as control group. Cytochemistry staining and immunocytochemistry staining were performed to observe cell morphology and to evaluate distribution of related proteins. Cell proliferation was determined using Cell Counting Kit-8. Levels of glycosaminoglycans and transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) in the medium supernatants of the experimental and control groups were detected by ELISA. Expression of type II collagen alpha 1 (COL2a1) and connexin 43 (Cx43) in the coculture system of articular chondrocytes with BMSCs were analyzed using western blot. Cell proliferation, glycosaminoglycan level and expression levels of COL2a1 and Cx43 in the two groups were evaluated following TGF- β 3 supplementation in each group and articular chondrocytes were subsequently cocultured with BMSCs in the contact or noncontact manner.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The ability of cell proliferation gradually increased with prolonged coculture time, the mean absorbance value of the experimental group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The mean levels of glycosaminoglycan and TGF- β 3 and expression levels of COL2a1 and Cx43 in the experimental group were significantly higher than those in the control group respectively. (2) Following addition of 10 μ g/L TGF- β 3, the aforementioned indicators showed no significant changes in the experimental group ($P > 0.05$), whereas increased significantly in the control group, but still lower than those in the experimental group with no TGF- β 3 supplementation ($P < 0.05$). Our results indicate that the contact coculture of articular chondrocytes with BMSCs significantly promotes cell proliferation and differentiation as compared with the noncontact coculture, and Cx43 plays an important role in cell proliferation and differentiation.

Subject headings: Chondrocytes; Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Coculture Techniques; Transforming Growth Factor beta3; Connexin 43; Tissue Engineering

Funding: Jiangsu Provincial Key Talent Training Project, No. 201412 (to FWW); Social Development Project of Lianyungang Science and Technology Bureau, No. SH1545 (to FWW); Scientific Research Program of Lianyungang Health and Family Planning Commission, No. 201728 (to FWW)

0 引言 Introduction

由于关节软骨无血管、神经组织,其自身缺乏有效的修复能力,组织工程技术为解决这一难题提供了新思路,安全可靠的种子细胞源是构建组织工程化软骨的前提。自体关节软骨细胞(articular chondrocytes, ACs)作为种子细胞,其在体外培养增殖能力低,连续传代后发生去分化丧失表达II型胶原的能力,从而失去原有的表型,并且获取软骨细胞的来源受限,存在供区并发症;而骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)作为种子细胞则需要多种生长因子的诱导,分化过程中产生典型的肥大表型和骨化标志碱性磷酸酶及X型胶原而发生软骨内骨化^[1-3]。因此,ACs和BMSCs均不能完全满足软骨组织工程对种子细胞的要求,而将两种细胞进行共培养就

成为可供选择的方式^[1-6]。大量的研究和作者前期实验发现ACs和BMSCs接触共培养能够促进ACs的增殖和表型维持,而且少量ACs为BMSCs提供了软骨分化的微环境,因此,ACs和BMSCs共培养为解决ACs来源不足提供了切实可行的途径^[3-6],但是影响共培养系统中细胞增殖和分化的因素及调节细胞之间作用的机制尚不明确,为此,该研究观察ACs和BMSCs接触共培养对细胞增殖和分化的影响,进一步优化共培养方式,为构建工程化软骨提供新的策略。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学及分子生物学随机对比实验。

1.2 时间及地点 于2017年1至12月在徐州医科大学附属连云港市东方医院临床研究中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康2月龄新西兰兔12只, 雌雄不限, 体质量0.8–1.2 kg, 由南京医科大学实验动物中心提供, 动物使用许可证号: 201500099。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

1.3.2 实验试剂与仪器 DMEM培养基(Gibco公司, 美国); 青/链霉素(碧云天生物技术研究, 上海); 胎牛血清(Hyclone公司, 美国); 转化生长因子 β 3(Peprotech公司, 美国); 甲苯胺蓝染液(Sigma公司, 美国); Transwell培养系统(Corning公司, 美国); CCK8试剂盒(碧云天生物技术研究, 上海); II型胶原酶(Gibco公司, 美国); GAG定量分析酶联吸附分析试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司USCN, 武汉); 转化生长因子 β 3免疫试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司USCN, 武汉); II型胶原(type II collagen, COL2)单克隆抗体(Novus, 美国); 连接蛋白43(connexin 43, Cx43)单克隆抗体(Abcam公司, 美国); GAPDH单克隆抗体(Abcam公司, 美国); HRP标记的山羊抗兔二抗(中杉金桥, 北京); DAB显色剂(碧云天生物技术研究, 上海); 相差显微镜(Olympus显微镜, 日本); CO₂恒温孵育箱(Thermo公司, 美国); 酶标仪(Molecular Devices公司, 美国); Tanon-5200化学发光仪(天能公司, 上海)。

1.4 实验方法

1.4.1 BMSCs和ACs的分离培养和共培养 应用作者所在实验室提供的方法进行BMSCs和ACs分离培养^[3, 6]。

在局麻下用骨穿针于新西兰兔胫骨和股骨骨髓腔抽取骨髓并且肝素化, 应用密度梯度离心和贴壁培养法分离出BMSCs, 在体积分数5%CO₂孵育箱中37 °C饱和湿度条件下用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基进行培养。

无菌条件下切取新西兰兔膝关节软骨, PBS漂洗后用眼科剪刀剪成1 mm×1 mm×1 mm大小, 应用0.25%胰蛋白酶和0.1% II型胶原酶进行消化, 200目滤网过滤后离心, 用PBS漂洗再次离心后在同一条件下进行ACs培养。

实验取第2代ACs和第2代BMSCs以1:3的比例进行接触共培养和非接触共培养, 细胞总数为 4×10^4 。

1.4.2 ACs和BMSCs接触共培养和非接触共培养 取第2代ACs和第2代BMSCs, 按1:3的比例在上述同一条件下直接混合进行接触共培养为接触共培养组, 按1:3的比例在Transwell的上室和下室进行非接触共培养为非接触共培养组。孔板底部和Transwell的下室均放置盖玻片进行细胞爬片。每3 d更换1次培养基, 共培养21 d。

1.4.3 添加转化生长因子 β 3进行BMSCs和ACs接触共培养和非接触共培养 向接触共培养组和非接触共培养组分别加入10 μ g/L的转化生长因子 β 3进行共培养21 d。

1.5 主要观察指标

1.5.1 共培养后细胞形态学变化以及免疫化学染色检测共培养细胞COL2a1和Cx43的表达 共培养21 d, 取出细胞爬片, PBS冲洗后应用预冷的40 g/L多聚甲醛固定10 min, 加入甲苯胺蓝进行细胞染色, 相差显微镜下观察细胞形态和蛋白多糖的合成。分别应用COL2a1和Cx43的鼠抗兔单克隆抗体进行细胞免疫化学染色评价共培养细胞

COL2a1和Cx43的表达。

1.5.2 CCK8试剂盒检测共培养细胞的增殖情况 取共培养细胞悬液100 μ L接种至96孔板, 每孔加入10 μ L的CCK8 ($n=6$), 在培养箱中共孵育2 h, 根据操作说明, 应用酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度值, 根据吸光度值绘制共培养细胞的生长曲线。

1.5.3 ELISA法测定共培养系统中糖胺多糖和转化生长因子 β 3水平 收集共培养细胞的上清液, 按照酶联免疫试剂盒操作说明检测共培养细胞上清液中糖胺多糖和转化生长因子 β 3水平。

1.5.4 Western blot检测共培养细胞COL2a1和Cx43的表达 共培养21 d, 加入预冷的RIPA裂解液裂解细胞, 4 °C下12 000 r/min离心10 min, 收集细胞上清液。应用BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度, 加入5×RSB, 煮沸5 min, -20 °C保存。每个泳道加20–40 μ g蛋白样品, 10% SDS-PAGE电泳后转印到PVDF膜上, 分别与COL2a1和Cx43的单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗结合, 检测上述蛋白的表达水平。应用Image J图像分析系统, 根据蛋白条带灰度分析共培养细胞COL2a1和Cx43表达的差异。

1.6 统计学分析 应用SPSS 17.0统计软件进行数据处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布的两组均数比较采用独立样本 t 检验; 多组比较采用单因素方差分析, 各组之间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 共培养细胞的形态变化 分离培养的第2代BMSCs呈纺锤形或长梭形, 细胞折光性强, 与成纤维细胞形态相似, 排列具有方向性, 呈漩涡样或辐射状, 见图1A。第2代ACs呈多角形、三角形或不规则的卵圆形, 核为圆形或椭圆形, 可见成簇生长现象, 细胞核居细胞中心, 胞浆丰富, 细胞增殖融合为单层, 呈多边形或星形, 排列紧密为“铺路石”样, 见图1B。

接触共培养组共培养4 h细胞开始贴壁, 随着ACs和BMSCs共培养时间的延长, 长梭形细胞逐渐变为多角形、类圆形, 呈聚集生长, 形态接近软骨细胞。接触共培养21 d, 甲苯胺蓝染色显示共培养细胞及其周围基质浓染, 细胞核质分界清晰, 细胞核被染成深蓝色, 胞质染成蓝紫色, 见图2A。细胞免疫化学COL2a1染色后胞浆染成棕黄色, 胞核不着色, 为强阳性, 见图2B。

非接触共培养组共培养21 d, 观察Transwell下室的BMSCs, 发现仅有部分细胞变为多角形或类圆形, 大部分细胞仍呈长梭形或短梭形, 甲苯胺蓝染色显示共培养细胞及其周围基质染色较浅, COL2a1染色为弱阳性, 而ACs体积和核浆比例变化不大, 见图3。

2.2 ACs和BMSCs接触共培养对细胞增殖分化的影响 随着ACs和BMSCs共培养时间的延长, 共培养细胞平均吸光度值逐渐增高, 共培养21 d接触共培养组细胞吸光度值明显高于非接触共培养组($P < 0.05$), 见图4。培养上清液中糖胺多糖和转化生长因子 β 3水平, 见表1。共培养细胞

COL2a1和Cx43的表达明显高于非接触共培养组($P < 0.05$), 见图5。

表1 共培养21 d时软骨细胞和骨髓间充质干细胞培养上清液中糖胺多糖和转化生长因子 $\beta 3$ 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/L}$)

Table 1 The levels of glycosaminoglycan and transforming growth factor- $\beta 3$ in the contact and non-contact cocultures of articular chondrocytes with bone marrow mesenchymal stem cells at 21 days of culture

共培养方式	糖胺多糖	转化生长因子 $\beta 3$
接触共培养	327.52 \pm 24.31 ^{ab}	82.56 \pm 2.13 ^{ab}
接触共培养+转化生长因子 $\beta 3$	351.41 \pm 13.12	-
非接触共培养	171.61 \pm 13.13 ^b	21.47 \pm 1.64 ^b
非接触共培养+转化生长因子 $\beta 3$	241.54 \pm 15.60	-

表注: 与非接触共培养组比较, ^a $P < 0.05$; 与非接触共培养+转化生长因子 $\beta 3$ 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.3 外源性转化生长因子 $\beta 3$ 对共培养细胞增殖分化的影响 接触共培养组和非接触共培养组添加10 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 3$ 进行共培养21 d, 接触共培养组添加转化生长因子 $\beta 3$ 前后细胞增殖无明显变化($P > 0.05$), 见图4, 培养上清液中糖胺多糖水平和共培养细胞COL2a1及Cx43的表达增高也无显著性意义($P > 0.05$); 而非接触共培养组添加转化生长因子 $\beta 3$ 后细胞的增殖、培养上清液糖胺多糖水平和共培养细胞COL2a1及Cx43的表达则明显提高($P < 0.05$), 但仍明显低于接触共培养组($P < 0.05$), 见表1, 图5和图6。

3 讨论 Discussion

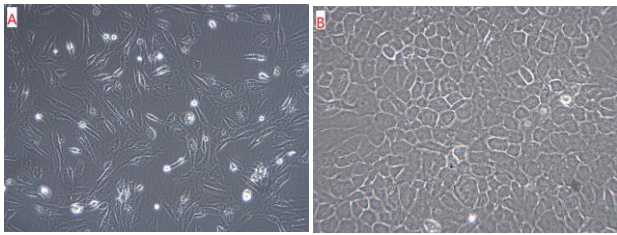
关节软骨主要由透明软骨细胞和细胞外基质(以II型胶原和多聚蛋白多糖为主)构成, 无血管和神经支配, 损伤缺损后难以自我修复^[1-6]。组织工程学技术为解决这一难题提供了新方法, 安全可靠的种子细胞源是构建组织工程化软骨的前提。ACs和BMSCs都可能用于构建组织工程化软骨, 但是软骨细胞获取受限, 并且体外培养增殖能力低, 在连续传代后发生去分化丧失表达II型胶原的能力, 其表型难于维持, 产生的细胞外基质以I型胶原为主, 其机械强度、弹性模量等力学性能较II型胶原明显降低; 而BMSCs作为种子细胞则需要多种生长因子的诱导, 分化过程中产生典型的肥大表型和骨化标志X型胶原及碱性磷酸酶而发生软骨内骨化。因此, ACs和BMSCs均不能完全满足软骨组织工程对种子细胞的要求^[1-6]。大量研究表明BMSCs和ACs共培养能够促进ACs的增殖和表型维持, 而且少量ACs为BMSCs的软骨分化提供了微环境, 减少了ACs的需要量, 并且共培养可降低分化过程中出现的钙化和肥大表型^[3-6], 但是影响共培养系统中细胞增殖分化的因素和调节机制尚不明确, 因此研究ACs和BMSCs接触共培养方式对细胞增殖和分化的影响, 可以优化共培养方式, 对进一步探讨共培养系统中BMSCs和ACs相互作用机制奠定基础, 为临床应用组织工程学技术修复关节软骨缺损提供理论支撑。

共培养系统中最佳的细胞比例是构建高质量组织工程化软骨的关键因素。不同共培养条件下两种细胞的最佳共

培养比例尚未确定^[7]。Kang等^[8]研究表明ACs和BMSCs共培养中ACs的比例达到20%以上时, 与同等数量单纯ACs构建的软骨较为接近, 当ACs达到一定数量时, 增加ACs的比例, BMSCs的诱导结果不发生改变, 提示ACs对BMSCs的诱导作用存在饱和现象, 并且降低BMSCs在共培养系统中的比例, 也会减少BMSCs对ACs的营养支持作用^[9-10]。Meretoja等^[11]研究表明1:3的细胞比例既能维持ACs的表型以及为BMSCs软骨分化提供微环境, 又能明显减少ACs的用量, 与Yao等^[12]的研究结果一致。因此, 该实验以1:3比例的ACs和BMSCs进行共培养实验。

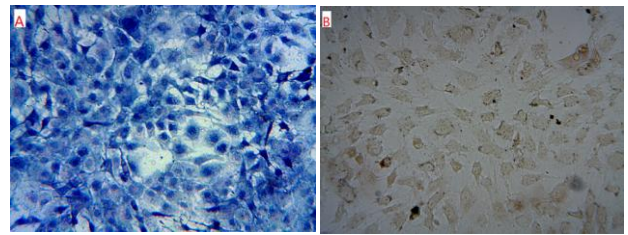
细胞接触共培养和经Transwell非接触共培养是不同的两种共培养方式, Transwell培养瓶的隔离膜孔径0.4 μm , 仅能允许可溶性分子通过, 而BMSCs和ACs不能自由通过, 这就消除了细胞之间相互接触的影响。实验应用接触和非接触两种共培养方式对BMSCs与ACs增殖、分化的影响进行了比较研究, 结果表明: 接触共培养系统中糖胺多糖和转化生长因子 $\beta 3$ 水平及COL2a1的表达均高于非接触共培养, 并且接触共培养系统中ACs体积增大, 核浆比例提高, 提示ACs功能活跃, 增殖速度快, 甲苯胺蓝染色及细胞免疫染色显示有大量的软骨陷窝形成和COL2a1的合成, 说明接触共培养明显促进ACs的增殖和表型的维持, ACs的微环境诱导了BMSCs的软骨分化。Cx43存在于多种类型的细胞中, 正常软骨组织和BMSCs均表达Cx43^[13-15], De Windt等^[16]应用BMSCs和ACs进行共培养研究, 结果表明BMSCs和ACs之间通过Cx43使两种细胞建立了缝隙连接通道。此次研究检测了共培养细胞的Cx43表达, 结果表明接触共培养细胞Cx43及COL2a1的表达明显高于非接触共培养细胞, 说明Cx43参与了共培养细胞增殖和分化的调节^[16]。

ACs和BMSCs共培养促进细胞增殖和分化的机制是活性因子的营养作用还是直接接触的作用还存在争议^[10, 16-17]。为消除两种共培养系统中内生性转化生长因子对细胞增殖和分化的影响, 该实验向ACs和BMSCs共培养系统中添加转化生长因子 $\beta 3$ 进行比较研究, 结果表明: 接触共培养细胞的增殖、糖胺多糖水平、COL2a1及Cx43的表达无明显变化, 说明接触共培养细胞具有明显的成软骨活性和增殖能力, 也侧面证实了ACs和BMSCs接触共培养不需要诱导因子的刺激。Dahlin等^[18]在ACs和BMSCs共培养系统中应用不同质量浓度的转化生长因子 $\beta 3$ 进行诱导共培养, 结果表明应用1 $\mu\text{g/L}$ 或10 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 3$ 共培养, 共培养细胞产生同样的糖胺多糖, 与ACs或BMSCs单层培养比较, 共培养有效降低了转化生长因子 $\beta 3$ 的用量和时间, 达到了同样的软骨分化水平; 去除转化生长因子 $\beta 3$ 刺激后, 共培养细胞的软骨分化表型更稳定。因此, 共培养系统的微环境提高了共培养细胞对生长因子反应的敏感性^[19-20]。该研究添加转化生长因子 $\beta 3$ 进行非接触共培养, 共培养细胞的增殖、糖胺多糖水平、COL2a1及Cx43的表达增强, 但仍明显低于未添加转化生长因子 $\beta 3$ 的接触共培养, 说明细胞间直接接触比转化生长因子促进共培养细胞增殖和分化的作用更为重要, Cx43的表达水平影响了细胞



图注: 图中 A 为第 2 代骨髓间充质干细胞呈纺锤形或长梭形, 排列具有方向性, 为漩涡样或辐射状生长; B 为第 2 代软骨细胞呈多角形或不规则的卵圆形, 核为圆形或椭圆形, 可见成簇生长, 排列紧密成“铺路石”样。

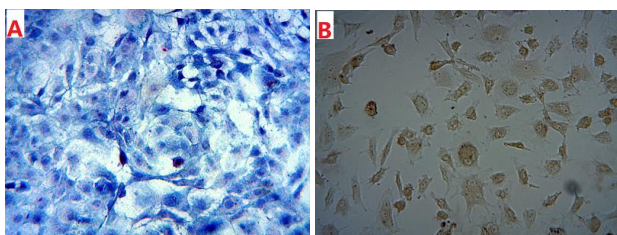
图 1 第 2 代新西兰兔骨髓间充质干细胞和软骨细胞(x100)
Figure 1 Morphology of rabbit articular chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells at passage 2 (x100)



图注: 图中 A 为接触共培养 21 d 甲苯胺蓝染色, 大部分骨髓间充质干细胞形态类似软骨细胞; B 为接触共培养 21 d COL2a1 染色为强阳性。

图 2 第 2 代软骨细胞和第 2 代骨髓间充质干细胞以 1:3 的比例接触共培养(x100)

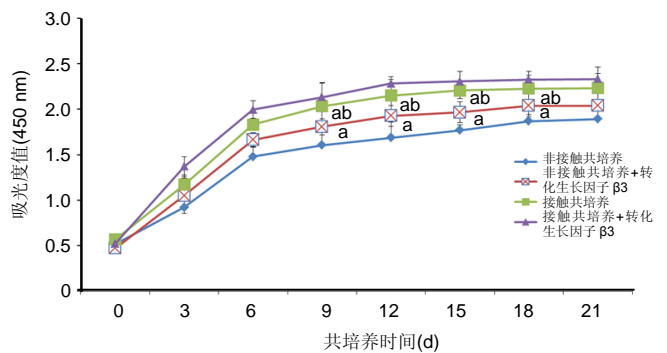
Figure 2 Morphological characteristics of contact cocultures of passage 2 articular chondrocytes with passage 2 bone marrow mesenchymal stem cells at the ratio of 1:3 (x100)



图注: 图中 A 为非接触共培养 21 d Transwell 下室骨髓间充质干细胞甲苯胺蓝染色较浅; B 为非接触共培养 21 d Transwell 下室骨髓间充质干细胞 COL2a1 染色弱阳性, 仅有少部分骨髓间充质干细胞形态类似软骨细胞。

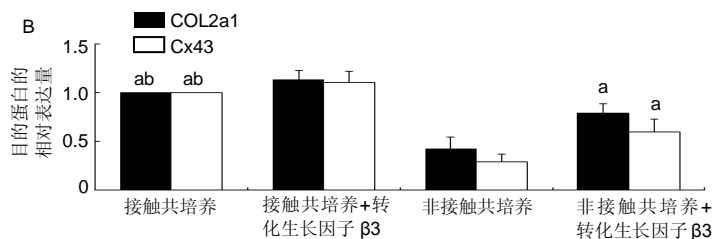
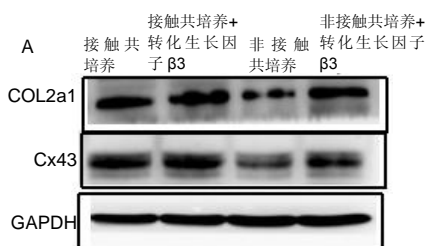
图 3 第 2 代软骨细胞和第 2 代骨髓间充质干细胞以 1:3 的比例非接触共培养(x100)

Figure 3 Morphological characteristics of noncontact cocultures of passage 2 articular chondrocytes with passage 2 bone marrow mesenchymal stem cells at the ratio of 1:3 (x100)



图注: 与非接触共培养组比较, ^a $P < 0.05$; 与非接触共培养+转化生长因子 β3 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

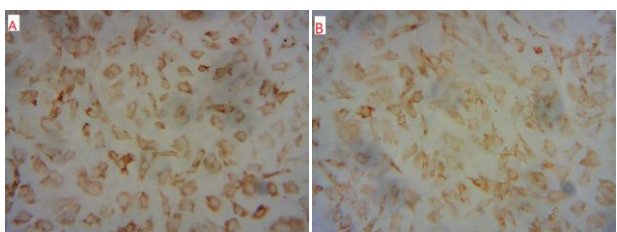
图 4 软骨细胞和骨髓间充质干细胞共培养 21 d 的增殖曲线(n=6)
Figure 4 Proliferation curves of articular chondrocytes cocultured with bone marrow mesenchymal stem cells for 21 days (n=6)



图注: 图中 A 为 COL2a1 和 Cx43 表达的电泳条带; B 为 COL2a1 和 Cx43 表达的统计结果分析。与非接触共培养组比较, ^a $P < 0.05$; 与非接触共培养+转化生长因子 β3 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 5 Western blot 检测共培养 21 d 时软骨细胞和骨髓间充质干细胞中 COL2a1 和 Cx43 蛋白表达

Figure 5 Western blot detection of the expression of type II collagen alpha 1 and connexin 43 in the cocultures of articular chondrocytes with bone marrow mesenchymal stem cells at 21 days of culture



图注: 图 A 为添加转化生长因子 β3 接触共培养 21 d, 共培养细胞 Cx43 染色浓染; B 为添加转化生长因子 β3 非接触共培养 21 d, 共培养细胞 Cx43 染色较浅。

图 6 添加转化生长因子 β3 共培养 21 d 时软骨细胞和骨髓间充质干细胞中 Cx43 的表达(x100)

Figure 6 Expression of connexin 43 in the cocultures of articular chondrocytes with bone marrow mesenchymal stem cells supplemented with transforming growth factor-β3 at 21 days of culture (x100)

的增殖和分化,与Zuo等^[7]和De Windt等^[16]的研究结果类似。Schrobback等^[21]在人BMSCs和ACs共培养系统中添加Cx43阻断剂甘草次酸进行共培养,分析共培养细胞的软骨分化潜能,结果表明BMSCs和ACs共培养期间经甘草次酸阻断后,COL2和细胞外ATP减少及软骨分化潜能下降,进一步证实了Cx43的表达水平决定了共培养细胞的增殖和分化。因此,应用外源性Cx43或其类似物可能为构建工程化软骨提供新的策略^[22-23],但是具体的机制和详细的信号传导通路尚不清楚,需要进一步研究。

综上所述,ACs和BMSCs接触共培养能够明显促进细胞的增殖和分化,细胞间缝隙连接参与了共培养细胞增殖分化的调节,Cx43起到了重要作用。

致谢:感谢江苏省“333重点人才”培养工程项目和连云港市科技局社会发展项目及连云港市卫计委科研项目经费资助,感谢徐州医科大学附属医院连云港市东方医院病理科张明副主任医师给予的相关技术支持。

作者贡献:通讯作者和第一作者负责实验设计和实施,所有作者均经过正规的科研培训,实施或参与实验。通讯作者和第一作者负责文章的撰写、评估及审校。

经费支持:该文章接受了“江苏省333重点人才培养工程项目(201412)”、“连云港市科技局社会发展项目(SH1545)”,“连云港市卫计委科研项目(201728)”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:实验方案经徐州医科大学附属医院连云港市东方医院动物实验伦理委员会批准,批准号为20161016。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

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通过兰州大学基础医学院流行病学教研室樊景春副教授的审核。

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] Ko CY, Ku KL, Yang SR, et al. In vitro and in vivo co-culture of chondrocytes and bone marrow stem cells in photocrosslinked PCL-PEG-PCL hydrogels enhances cartilage formation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(10):E485-E496.

[2] Acharya C, Adesida A, Zajac P, et al. Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *J Cell Physiol*. 2012;227(1):88-97.

[3] 冯万文, 董浙军, 李小民, 等. 骨髓间充质干细胞和软骨细胞共培养种子细胞特征及体内成软骨活性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(3): 442-446.

[4] Bian L, Zhai DY, Mauck RL, et al. Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(7-8):1137-1145.

[5] Steck E, Fischer J, Lorenz H, et al. Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev*. 2009;18(7):969-978.

[6] 冯万文, 夏亚一, 孙正义, 等. 骨髓间充质干细胞和软骨细胞共培养复合同种异体脱钙骨基质修复关节软骨全层缺损[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(18):1683-1686.

[7] Zuo Q, Cui W, Liu F, et al. Co-cultivated mesenchymal stem cells support chondrocytic differentiation of articular chondrocytes. *Int Orthop*. 2013;37(4):747-752.

[8] Kang N, Liu X, Yan L, et al. Different ratios of bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes used in tissue-engineered cartilage and its application for human ear-shaped substitutes in vitro. *Cells Tissues Organs*. 2013;198(5):357-366.

[9] 陈宗雄, 刘晓强, 王万宗. 骨髓间充质干细胞和关节软骨细胞共培养与转化生长因子β1诱导的比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(27): 5037-5040.

[10] Wu L, Leijten JC, Georgi N, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(9-10):1425-1436.

[11] Meretoja VV, Dahlin RL, Kasper FK, et al. Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2012;33(27):6362-6369.

[12] Yao Y, Huang Y, Qian D, et al. Effect of Various Ratios of Co-Cultured ATDC5 Cells and Chondrocytes on the Expression of Cartilaginous Phenotype in Microcavitary Alginate Hydrogel. *J Cell Biochem*. 2017;118(11):3607-3615.

[13] Knight MM, McGlashan SR, Garcia M, et al. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors - a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium. *J Anat*. 2009; 214(2):275-283.

[14] Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, et al. Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1337-1346.

[15] Zhang X, Sun Y, Wang Z, et al. Up-regulation of connexin-43 expression in bone marrow mesenchymal stem cells plays a crucial role in adhesion and migration of multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(1):211-218.

[16] De Windt TS, Saris DB, Slaper-Cortenbach IC, et al. Direct Cell-Cell Contact with Chondrocytes Is a Key Mechanism in Multipotent Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(19-20):2536-2547.

[17] Yang YH, Lee AJ, Barabino GA. Coculture-driven mesenchymal stem cell-differentiated articular chondrocyte-like cells support neocartilage development. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(11):843-854.

[18] Dahlin RL, Ni M, Meretoja VV, et al. TGF-β3-induced chondrogenesis in co-cultures of chondrocytes and mesenchymal stem cells on biodegradable scaffolds. *Biomaterials*. 2014;35(1):123-132.

[19] Chen FM, Zhang M, Wu ZF. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(24):6279-6308.

[20] Dahlin RL, Meretoja VV, Ni M, et al. Chondrogenic phenotype of articular chondrocytes in monoculture and co-culture with mesenchymal stem cells in flow perfusion. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(21-22):2883-2891.

[21] Schrobback K, Klein TJ, Woodfield TB. The importance of connexin hemichannels during chondroprogenitor cell differentiation in hydrogel versus microtissue culture models. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(11-12): 1785-1794.

[22] Willebrords J, Maes M, Crespo Yanguas S, et al. Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2017;180:144-160.

[23] Zhang YD, Zhao SC, Zhu ZS, et al. Cx43- and Smad-Mediated TGF-β/BMP Signaling Pathway Promotes Cartilage Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Inhibits Osteoblast Differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(4):1277-1293.