

• 基础研究 •

骨髓间质干细胞体外定向诱导分化为软骨细胞的实验研究

同志超¹, 杨镇¹, 同志勤², 王坤正², 杨团民¹, 石宗利³, 李毅¹, 郭雄⁴

(1.西安市红十字会医院骨科, 陕西 西安 710054; 2.西安交通大学第二医院骨科; 3.兰州交通大学机电工程学院材料研究所; 4.西安交通大学骨病研究所)

【摘要】 目的: 探讨分离骨髓间充质干细胞(MSCs)并诱导其向软骨细胞转化的体外培养方法, 为软骨组织工程的种子细胞来源提供实验依据。方法: 抽取兔髌骨骨髓液, 经梯度离心法和贴壁法进行体外培养, 贴壁细胞传代, 取第3代细胞在培养基中添加软骨分化诱导剂[转化生长因子(TGF-β₂)10 ng/ml、地塞米松 10⁻⁷ mol/L、维生素 C 50 μmol/L], 经 7、14、21 d 诱导培养后, 倒置显微镜观察细胞形态, 免疫组织化学染色检测软骨特异性 II 型胶原表达。将诱导细胞与软骨支架材料——聚磷酸钙纤维/左旋聚乳酸(CPP/PLLA)复合, 1 周后终止培养, 扫描电镜观察细胞黏附情况。结果: 诱导后细胞体外扩增能力显著降低, 细胞形态由成纤维样梭形向多角形、多边形或类圆形转变, 诱导 21 d 后细胞形态变化最为显著, II 型胶原免疫组化染色深而均匀。诱导后的 MSCs 可在支架材料内良好黏附生长。结论: 体外培养的 MSCs 可定向诱导分化为软骨细胞, 分泌软骨细胞特异性基质, 可用作软骨组织工程的种子细胞。

【关键词】 骨髓; 间充质干细胞; 软骨细胞; 组织工程

Study of inducing bone marrow-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes in vitro TONG Zhi-chao*, YANG Zhen, TONG Zhi-qin, WANG Kun-zheng, YANG Tuan-min, SHI Zong-li, LI Yi, GUO Xiong. *Department of Orthopaedics, Xi'an Red Cross Society Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective: To explore a method of isolation, culture and chondrogenic phenotype differentiation of mesenchymal stem cells(MSCs) from the bone marrow of rats in vitro and to offer experimental reference for the resources of seeding cells in cartilage tissue engineering. **Methods:** MSCs were isolated from bone marrow and purified by density gradient centrifuge and cultured in vitro. The MSC adherence formed and those in passage 3 were chosen to induce into chondrogenic differentiation. After 7, 14, 21 days, immunohistochemical technique was applied to detect the expression of collagen type II. The differentiated cells were implanted on the CPP/PLLA composites. After the cell-scaffold complex was cultured in vitro for one week, the ultrastructure of the scaffold was observed with scanning electron microscopy. **Results:** The differentiated cells changed from a spindle-like fibroblastic appearance to a polygonal shape, the capability of proliferation was down markedly. Immunohistochemical staining of collagen II were positive for the pass age, especially in the 21st days. Induced MSCs were well adherent to the scaffold composites and the cells were embedded by the cell-matrix. **Conclusion:** Under the induced medium, MSCs can differentiate into chondrogenic phenotype and secrete specificity matrix of cartilage in vitro. MSCs can likely be served as optimal cell source for cartilage tissue engineering.

Key words Bone marrow; Mesenchymal stem cells(MSCs); Chondrocytes; Tissue engineering

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(5):362-364 www.zggszz.com

骨髓间质干细胞(MSCs)是目前倍受关注的一类具有多向分化潜能的干细胞, 在体外特定的诱导条件下可分化为骨、软骨、脂肪、肌肉、神经、肌腱及韧带等组织。MSCs 来源充足, 取材方便, 有望成为软骨组织工程较为理想的种子细胞来源。本实验旨在应用 MSCs 作为种子细胞体外定向诱导分化为软骨细胞, 为软骨组织工程的临床应用提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养液、Percoll 细胞分离液均为 Gibco 产品, 胎牛血清为杭州四季青生物制品有限公司产品, 地塞米松、维生素 C、胰酶为 Sigma 产品, 重组人转化生长因子(rhTGF-β₂)为 PeproTech 产品, 鼠抗兔 II 型胶原多克隆抗体为北京中山生物技术有限公司产品。聚磷酸钙纤维/左旋聚乳酸(CPP/PLLA)软骨支架材料由兰州交通大学复合材料系复合材料研究室石宗利教授提供并指导制作。

1.2 兔 MSCs 的分离及培养 3 月龄新西兰兔, 雌雄不限, 体

基金项目: 陕西省社会发展攻关项目(编号: 2002K10-G1)

通讯作者: 同志超 E-mail: zhichaotong@126.com

质量 2~2.5 kg, 18 号针头或骨髓穿刺针接 10 ml 注射器, 从髂后上棘穿刺骨髓腔, 抽取骨髓液 3~4 ml, 缓慢注入已预加 4 ml Percoll 分离液(密度 1.073)的试管内。细胞悬液 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中间乳白色的单个核细胞层, PBS 洗 2 次, 以 1×10^4 /ml 的密度接种于 50 ml 培养瓶内, 加 4 ml 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。在 37 °C、饱和湿度、5%CO₂ 培养箱内常规培养, 72 h 后更换培养液, 全部弃掉未贴壁的细胞, 继续培养且每周换液 2 次, 每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。细胞生长至 85% 融合后, 加入 0.25% 胰酶消化, 以 5×10^4 /ml 密度接种于 50 ml 培养瓶中进行传代培养。

1.3 MSCs 向软骨表型的定向诱导分化 取第 3 代形态均一的 MSCs, 0.25% 胰酶消化, 以 5×10^4 /ml 密度接种于有盖玻片的 24 孔板, 待细胞 85% 融合进行分组培养, 每组 12 孔。实验组用含诱导因子的 DMEM 无血清培养液 (TGF- β_2 10 ng/ml、地塞米松 10^{-7} mol/L、维生素 C 50 μ mol/L) 培养; 对照组用不含诱导因子的 DMEM 无血清培养液培养。每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.3.1 II 型胶原免疫组化染色 分别于诱导后第 7、14、21 天, 每组取 4 孔盖玻片, 中性甲醛固定 15 min, 蒸馏水洗; 含 0.5% H₂O₂ 的 99.9% 甲醇室温浸泡 30 min, 蒸馏水洗 3 次; 滴加山羊血清封闭液, 室温 20 min, 甩去余液; 滴加浓度 5 μ g/ml 的 II 型胶原多克隆抗体, 置于 4 °C 过夜, PBS 洗 2 min \times 3 次; 生物素化山羊抗小鼠 IgG 37 °C 作用 20 min, PBS 洗 2 min \times 3 次; 链霉亲和素-过氧化物酶复合物室温 30 min, PBS 洗 5 min \times 4 次; DAB 显色, 脱水, 透明, 封片。倒置显微镜下观察细胞生长情况及 II 型胶原免疫组化染色情况。

1.3.2 诱导 MSCs 与 CPP/PLLA 支架材料复合 收获 MSCs 诱导后且表达软骨细胞表型的软骨前体细胞, 制成细胞悬液(细胞密度 4×10^7 /ml)待用。将切割成圆盘状的 CPP/PLLA 用 DMEM 培养液浸泡, 无菌脱脂棉吸干液体后, 将其置于 10 ml 离心管底部, 加入细胞悬液, 培养箱中静置 2 h, 加入 6 ml 含诱导因子的 DMEM 无血清诱导培养液 (TGF- β_2 10 ng/ml、地塞米松 10^{-7} mol/L、维生素 C 50 μ mol/L) 培养, 将细胞载体复合物置于 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 每 3 d 用诱导培养液换液, 1 周后终止培养, 1.25% 戊二醛溶液固定, 液氮冷冻, 剖开断面, 扫描电镜观察。

2 结果

2.1 MSCs 的原代及传代培养倒置显微镜观察 原代 MSCs 早期接种时, 细胞呈圆形, 折光性好, 与周围的杂质细胞(血细胞)相混杂。骨髓细胞接种 48 h 后出现贴壁的 MSCs 的形态逐渐延伸成梭形, 即成纤维样细胞, 胞核清晰, 可见核仁。未贴壁的细胞在换液过程中逐步被清除。贴壁细胞生长迅速, 接种后 1 周, 可见明显的集落形成。集落中的细胞不断扩增, 呈放射状向周围扩展, 逐渐与邻近集落相融合。接种后 12~14 d, 各个集落之间基本汇合达 85%, 此时细胞相互间紧密贴附, 单个细胞呈狭长梭形, 从整体来看大多数细胞沿胞体长轴呈有序排列。集落中心细胞排列更加致密, 呈旋涡状生长, 复层生长的细胞形态呈多边、角形。MSCs 传代后生长更加迅速, 传代细胞呈均一长梭形、多角形、短梭形, 紧密排列似旋涡状(见图 1), 非贴壁细胞经反复换液绝大部分已被去除。

2.2 MSCs 定向诱导培养的倒置显微镜观察 实验组: 加入诱导剂 7 d, 细胞增殖速度明显低于对照组, 细胞体积明显增大, 细胞形态由梭形向多角形、多边形转变, 带有多个凸起, 核周可见黑色颗粒。诱导 14 及 21 d 后多数细胞变成多边形, 核周颗粒密集排布, 部分细胞边界不清, 呈圆形, 核偏位, 核周颗粒明显(见图 2)。对照组: 未经诱导的 MSCs 呈纺锤形或梭形, 原代集落样生长, 传代后可形成单层, 类成纤维细胞样生长, 有一定的方向性。

2.3 MSCs 定向诱导培养的 II 型胶原免疫组化染色观察 实验组诱导 7 d 的 MSCs 在细胞密集处, 少量细胞胞浆中呈明显棕褐色, 大部分细胞胞浆呈不明显黄棕色; 诱导 14 d 的 MSCs 呈现大量的棕褐色染色, 但染色较淡, 在细胞密集处细胞周围可见黄褐色染色; 诱导 21 d 的 MSCs 呈现广泛的棕褐色染色, 染色深而均匀(见图 3)。对照组 21 d 中也有极少量 II 型胶原免疫组化染色阳性细胞出现。

2.4 软骨前体细胞种植软骨支架(CPP/PLLA)的三维立体培养扫描电镜观察 在材料表面有大量细胞贴附生长, 呈圆球形, 并有不规则突起; 断面剖开后观察, 见材料内部有大量细胞黏附生长, 呈圆球形, 细胞被分泌的胶原基质包裹, 在微孔壁及边缘密集分布, 部分区域细胞堆积(见图 4)。显示细胞与 CPP/PLLA 生物相容性好, MSCs 对材料黏附力强。

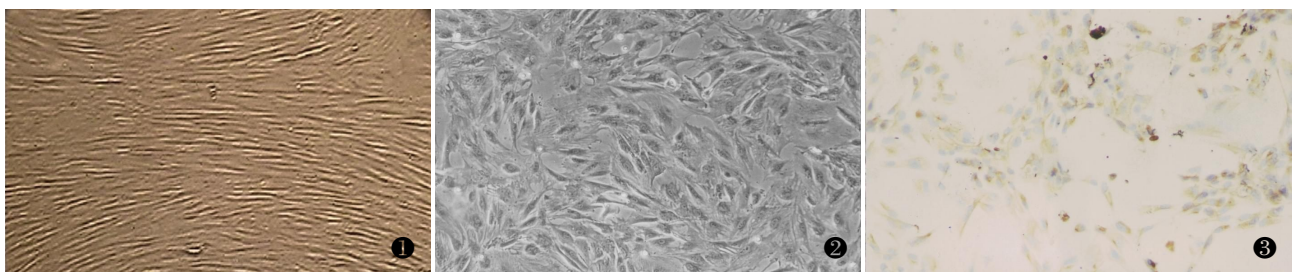


图 1 MSCs 传代培养(P1 代, 第 3 天)倒置显微镜下可见: 细胞呈均一长梭形、多角形, 紧密排列, 类似旋涡状($\times 10$) **图 2** MSCs 经无血清软骨定向诱导培养液诱导 14 d, 倒置显微镜下可见: 多数细胞变成多边形, 核周颗粒密集排布($\times 10$) **图 3** MSCs 软骨表型诱导 21 d, II 型胶原免疫组化染色可见: 细胞呈现广泛的棕褐色染色($\times 10$)

Fig.1 Primary MSCs showed fibroblast-like, polygonal cells aligning as whirlpool under the inverted microscope($\times 10$) **Fig.2** MSCs were cultured in chondrogenic medium for 14 days. Under the inverted microscope, many MSCs changed to polygonal shape and much particle around cell nucleus($\times 10$) **Fig.3** The expression of type II collagen was positive and extensive after MSCs were induced into chondrogenic differentiation for 21 days($\times 10$)

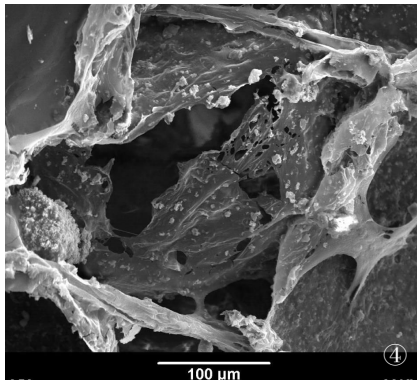


图 4 软骨前体细胞种植 CPP/PLLA 的三维立体培养扫描电镜观察, 可见材料内部有大量细胞贴附生长, 呈圆球形, 细胞被分泌的胶原基质包裹, 部分区域细胞堆积($\times 250$)

Fig.4 Photomicrograph from scanning electron-microscope examination of CPP/PLLA composites seeded of induced MSCs; Many global cells growthed in CPP/PLLA composites, and cells were embeded by collagen matrix ($\times 250$)

3 讨论

骨髓 MSCs 取材方便, 在体外培养能保持其多向分化潜能, 并且较其他来源的 MSCs 有更好的软骨细胞表型分化能力^[1], 无免疫排斥反应, 易于临床应用等特点, 是软骨组织工程中理想的种子细胞来源。MSCs 分离培养是实验的关键。目前用于分离 MSCs 的方法主要有 3 种, 即密度梯度离心法、流式细胞仪分离法和贴壁筛选法。本实验采用密度梯度离心和贴壁筛选法相结合, 分离培养中出现的杂质血细胞, 在 2~3 周内随换液被除去。传代后所获得的 MSCs 细胞形态均一, 增殖速度快, 生长性状稳定, 细胞为均一的成纤维样, 具有 MSCs 一般的特性^[2]。

作为种子细胞的 MSCs 需特定的培养条件才能向软骨细胞表型分化, 其分化过程受多种因素限制, 其中 TGF- β 是 MSCs 向软骨细胞分化所必须的, 其三种异构体(TGF- β_1 、 β_2 、 β_3)均可使软骨细胞特异性细胞外基质快速沉积, 但 TGF- β_2 、 β_3 较 TGF- β_1 可更快速有效地促进 MSCs 向软骨方向分化, TGF- β_2 、 β_3 之间诱导水平未见显著性差别^[3-6], 但 TGF- β_3 可能促进软骨细胞的去分化^[7], 因此, 本实验选用 TGF- β_2 作为软骨诱导的主诱导剂。地塞米松可抑制 MSCs 向脂肪细胞分化, 两者联合应用可有效地促进 MSCs 表达软骨的特征性细胞外基质^[8]。维生素 C 可使细胞分泌的基质和胶原纤维有机地组成与排列, 利于细胞发生自分泌与旁分泌作用, 保证内外源因子的传输, 具有非特异的促进细胞增殖与转化作用, 同时维生素 C 是一种抗氧化剂, 可抑制或减少诱导过程中凋亡的产生。

在本实验诱导条件下, 兔 MSCs 逐渐向软骨样细胞分化, 首先增殖的细胞由单层向复层生长, 进而发生聚集, 形成多个细胞小结。细胞形态由梭形变为圆形, 而周边部细胞仍为梭形, 在细胞小结区域内, 呈明显的 II 型胶原免疫组化强阳性, 表明 MSCs 已向软骨细胞表型分化并具有分泌软骨细胞特异性 II 型胶原的功能。在胚胎发育过程中, 体内软骨形成最早的形态学变化是间充质细胞间距缩小, 细胞与细胞之间形成紧

密接触状, 这是软骨形态发生前的重要步骤。实验中 MSCs 聚集成细胞小结加强了细胞和细胞之间的通讯及相互作用, 有利于细胞基质的积累, 其类似于胚胎发育过程中软骨形态发生前间充质细胞聚集, 在生长因子继续作用的情况下, 可进一步诱导 MSCs 向软骨细胞方向的分化。实验中, 对照组也出现少量阳性细胞, 可能与培养液中复合营养成分的作用以及高细胞密度利于 MSCs 向软骨方向转化有关。

我们进一步将成功诱导为软骨细胞表型的 MSCs 接种于 CPP/PLLA 支架, CPP/PLLA 具有良好的生物相容性, 合理的微孔直径, 较高的孔隙率等特性^[9], 易于细胞悬液完全浸入。扫描电镜证实诱导的 MSCs 细胞以球形构型黏附到生物支架的表面及孔隙内壁, 细胞大量生长、增殖, 甚至聚集成团, 分泌细胞外基质, 形成外在的胶原包裹^[10], 说明诱导后的细胞对该种材料有很强的黏附性, 可用作软骨组织工程的种子细胞。

参考文献

- Bernardo ME, Emons JA, Karperien M, et al. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. *Connect Tissue Res*, 2007, 48(3): 132-140.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001, 19(3): 180-192.
- 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.
- Wang WG, Lou SQ, Ju XD, et al. In vitro chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in monolayer culture: activation by transfection with TGF- β_2 . *Tissue Cell*, 2003, 35(1): 69-77.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSCs chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(6): 1152-1163.
- Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, et al. Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture. *Tissue Eng*, 2006, 12(6): 1393-1403.
- Goessler UR, Bugert P, Bieback K, et al. In-vitro analysis of the expression of TGF beta-superfamily-members during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture. *Cell Mol Biol Lett*, 2005, 10(2): 345-362.
- Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, et al. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*, 2006, 24(6): 1487-1495.
- 石宗利, 王彦平, 戴刚, 等. CPP/PLLA 软骨组织工程支架复合材料初步研究. *复合材料学报*, 2002, 19(6): 97-100.
- Xin XJ, Hussain M, Mao JJ. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in lectrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials*, 2007, 28: 316-325.

(收稿日期: 2007-08-16 本文编辑: 王宏)