

## · 基础研究 ·

## 巨噬细胞过表达 Wnt5a 对其炎症反应及共培养体系中 MSCs 成软骨分化的影响研究

桂先革<sup>1</sup>, 曾晖<sup>2</sup>, 陶可<sup>3</sup>

(1. 浙江医院骨 1 科, 浙江 杭州 310013; 2. 北京大学深圳医院骨关节科, 广州 深圳 518036; 3. 北京大学人民医院骨关节科, 北京 100044)

**【摘要】** 目的: 通过构建和比较经 Wnt5a 基因修饰的巨噬细胞分别与骨髓干细胞(MSCs)2D 单层贴壁与骨髓液跨小室共培养模型, 旨在探索 Wnt5a 信号通过调控巨噬细胞炎症反应对 MSCs 成软骨分化产生的影响。方法: 自 2015 年 9 月至 2018 年 12 月收集 6 例重度膝关节骨关节炎拟行全膝关节置换术者的巨噬细胞、MSCs 和骨髓液, 其中男 2 例, 女 4 例; 年龄 58~71 岁。膝关节囊滑膜组织常规消化取得单细胞, 经反复贴壁并行 Ficoll 液密度梯度离心和抗 CD14 抗体流式细胞术测定巨噬细胞纯度。将上述经鉴定的巨噬细胞置于 IFN- $\gamma$  联合 TNF- $\alpha$  刺激 48 h 后, 再使用重组腺相关病毒(rAAV)-lacZ 或 Wnt5a 转染 24 h, 分别与 MSCs 2D 单层贴壁或骨髓液构建跨小室共培养模型, 采用 HE 染色、软骨特殊染色、X-gal 染色、抗 Wnt5a、抗 II 和 X 型胶原免疫组化染色对细胞形态与增殖能力、病毒转染效率和成软骨分化能力等进行检测。结果: 抗 CD68 免疫组化显示骨关节炎患者滑膜组织巨噬细胞明显增多。抗 CD14 流式细胞术证实经分离的滑膜巨噬细胞纯度为 90.31%, IFN- $\gamma$  联合 TNF- $\alpha$  刺激后发现上清液中单核细胞趋化素蛋白-1(MCP-1)水平明显升高, 提示巨噬细胞被激活; rAAV-lacZ 转染 3 d 后, X-gal 染色发现其能有效转染巨噬细胞, 效率高达 97.50%, 且至少持续 21 d; rAAV-Wnt5a 转染巨噬细胞后通过刺激其 Wnt5a 的表达, 而增加两种模型中的 Wnt5a 表达, 抑制 MCP-1 的分泌, 两种模型中 Wnt5a 组 MCP-1 表达量分别为 14.76 和 61.51 pg/ml; 此外, rAAV-Wnt5a 转染后能促进细胞增殖及成软骨分化、软骨基质合成。结论: 在巨噬细胞与 MSCs 2D 单层贴壁或骨髓液跨小室共培养条件下, rAAV 介导的 Wnt5a 过表达能通过影响巨噬细胞炎症反应而促进软骨稳态的维持以及 MSCs 成软骨分化, 巨噬细胞可能通过 Wnt5a 信号影响软骨稳态与 MSCs 成软骨分化。

**【关键词】** 巨噬细胞; Wnt5a 蛋白; 软骨细胞; 干细胞; 骨髓

中图分类号:

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2019.11.010

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Effects of macrophage with Wnt5a over-expression on inflammation and chondrogenic differentiation in co-culture system** GUI Xian-ge, ZENG Hui, and TAO Ke\*. \*Department of Arthritis, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

**ABSTRACT Objective:** To construct and compare macrophage by gene modification of Wnt5a which co-cultured by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) with two dimension (2D) and bone marrow aspirates in vitro transwell, in order to investigate the effect of Wnt5a signaling on cartilage homeostasis through regulation of macrophage pro-inflammatory responses. **Methods:** Macrophages, MSCs and bone marrow aspirates specimens were extracted from 6 patients with severe knee deformities undergoing total knee arthroplasty (2 males, 4 females, aged from 58 to 71 years old) from September 2015 to December 2018. The synovial tissues of knee joints were exposed to type II collagenase and obtained single cell suspensions, and the purity of macrophages was determined by Ficoll gradient centrifugation and anti-CD14 antibody flow cytometry. The macrophages were transduced with IFN- $\gamma$  combined with TNF- $\alpha$  for 48 h, and rAAV-lacZ or Wnt5a transfected for 24 h, then co-cultured model by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) with two dimension (2D) and bone marrow aspirates in vitro transwell. HE staining, toluidine blue staining, X-gal staining and anti-Wnt5a, anti-II, X collagen immunohistochemical staining and enzyme-linked immunosorbent assay were applied to detect cell morphology and proliferation (cel-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81672183); 浙江省医药卫生一般研究计划项目(编号: 2018KY204); 深圳市科技研发计划资助项目(编号: JCYJ20170307111755218); 北京市自然科学基金资助项目(编号: 7182172); 北京大学人民医院院内发展基金资助项目(编号: RDY2016-15, RDY2018-04)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 81672183)

通讯作者: 陶可 E-mail: keryee@163.com

Corresponding author: TAO Ke E-mail: keryee@163.com

lularity), viral transfection efficiency respectively. **Results:** Results of anti-CD68 immunohistochemistry showed macrophage of patients with osteoarthritis increased obviously. Anti-CD 14 flow cytometry confirmed that percentage of isolated synovial macrophages was 90.31%. The level of monocyte chemotactic protein-1 in supernatants was significantly increased after stimulation with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , indicating that the macrophages were activated and at proinflammatory condition. After transduction with rAAV-lacZ for 3 days, X-gal staining indicated that lacZ gene transfer could efficiently transduce the activated macrophages with the efficiency over 97.50% for at least 21 days. After ?transfection macrophages by rAAV-Wnt5a stimulated expression of Wnt5a, and enhanced expression of Wnt5a between two models and inhibited the secretion of MCP-1. The expression of MCP-1 in Wnt5a group was 14.76 and 61.51 pg/ml respectively. In addition, rAAV-Wnt5a gene transfer could promote cell proliferation, chondrogenic differentiation and cartilage matrix synthesis. **Conclusion:** Under the condition of macrophage and MSCs 2D monolayer or aspirates transwell co-culture, rAAV-mediated over-expression of Wnt5a could promote maintenance of cartilage homeostasis and chondrogenic differentiation of MSCs via macrophage inflammatory response, macrophages may affect cartilage homeostasis and MSCs chondrogenesis through Wnt5a signaling pathway.

**KEYWORDS** Macrophages; Wnt-5a protein; Chondrocytes; Stem cells; Bone marrow

炎症因素导致的关节软骨细胞代谢与功能紊乱、细胞外基质退变与丢失、软骨下骨板异常硬化或囊性变、半月板和前后交叉韧带结构完整性破坏, 关节囊内滑膜组织炎症反应和炎性滑液的异常增多致关节腔内持续高压及骨髓干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)自我更新与成软骨分化障碍等是骨关节炎(osteoarthritis, OA)防治的中心环节<sup>[1]</sup>。研究显示巨噬细胞分泌的大量致炎性细胞或化学因子及其激活的下游信号通路在 OA 病变过程中发挥重要作用, 但具体机制尚未完全明确。鉴于 Wnt5a 信号直接参与 OA 进展并影响巨噬细胞炎症反应水平, 本研究通过构建和比较经重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)-Wnt5a 基因修饰的巨噬细胞分别与 MSCs 2D 单层贴壁及骨髓液 3D 原位间跨小室共培养模型, 旨在探索 Wnt5a 信号介导的巨噬细胞炎症反应对软骨稳态的影响, 为调控 Wnt5a 信号介导的巨噬细胞炎症反应以实现软骨动态平衡及建立有效的 rAAV 基因治疗提供重要依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

DMEM 培养液(Sigma 公司, 货号 D9785), Opti-MEM™(Thermo Fisher 公司, 货号 31985-062), 胎牛血清(Gibco 公司, 货号 10099141), 0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA(Thermo Fisher 公司, 货号 R001100), 磷酸盐缓冲液(PBS)(Thermo Fisher 公司, 货号 10010023), 转化生长因子(TGF)- $\beta$ 3(PeproTech 公司, 货号 100-36E), 干扰素(IFN)- $\gamma$ (PeproTech 公司, 货号 315-05)和 TNF- $\alpha$ (PeproTech 公司, 货号 315-01A), Ficoll 淋巴细胞分离液(GE 公司, 货号 17-1440-02), 人胚胎肾 293T 细胞、AAV-2 质粒(pACP)、Ad5 和 Ad8 腺病毒等为本实验室提供。II 型胶原酶(Sigma 公司, 货号 C-6885), HEPES(Sigma 公司, 货号 H3375), KN93(Calbiochem 公司, 货号 422708), 限制性内切酶 XbaI (Rothe 公司, 货号

E052), PacI (Rothe 公司, 货号 ER2201), BamHI (Rothe 公司, 货号 FD0596)和 EcoRI(Rothe 公司, 货号 FD0274), HE 染液 (Rothe 公司, 货号 HHS16 和 E4009), X-gal 染色试剂盒 (Rothe 公司, 货号 71077), 单核细胞趋化素蛋白(MCP)-1 酶联免疫吸附试验试剂盒(Biosource 公司, 货号 AYQ-E11213)。FITC 标记的小鼠抗人 CD14 抗体(Bio-technique 公司, 货号 FAB3832A), CD34 抗体(Bio-technique 公司, 货号 FAB7227A), CD45 抗体 (Bio-technique 公司, 货号 AF114), CD73 抗体 (Bio-technique 公司, 货号 5795-EN), CD90 抗体(Bio-technique 公司, 货号 AF2067)和 CD105 抗体(Bio-technique 公司, 货号 DNDG00)。兔抗人 CD68 多克隆一抗(Abcam 公司, 货号 ab125212), 抗 Wnt5a(Abcam 公司, 货号 ab174963), 抗 II (Abcam 公司, 货号 ab34712)和抗 X 型(Abcam 公司, 货号 ab58632)。酶标仪(Bio-Rad 公司, 680 型), 流式细胞仪(BD FACS 公司, FACSCanto™ II 型), 激光共聚焦显微镜 (Confocal, Olympus 公司, FLUOVIEW FV3 000 型)。

### 1.2 标本获取

试验已获得浙江医院伦理委员会同意并与每位参与的患者签署知情同意书。整个试验过程中均遵从赫尔辛基宣言等, 严格保护受试者权益。实验后, 严格遵循实验室生化试剂使用后的无害化处理原则并按照医疗废物处理规章制度处理实验用标本。

自 2015 年 9 月至 2018 年 12 月收集 6 例重度膝 OA(K-L<sup>[2]</sup>分级 3~4 级拟行全膝关节置换术患者的滑膜组织、巨噬细胞、MSCs 和骨髓液, 其中男 2 例, 女 4 例; 年龄 58~71 岁; 正常滑膜组织来源于与上述 OA 年龄相近的 6 例半月板损伤患者, 其中男 3 例, 女 3 例; 年龄 55~67 岁, 均排除强直性脊柱炎、类风湿关节炎等疾病。

### 1.3 hMSCs 的培养与鉴定

MSCs 从患者股骨远端截骨处分离, 并按照 Tao

等<sup>[3]</sup>方法获取。具体如下:向骨髓液中加入 50 ml 的 DMEM 培养液,2 000 r/min 离心 10 min,然后加入红细胞裂解液和 DMEM 培养液至 50 ml,再次 2 000 r/min 离心 10 min,微球重悬后以 0.4% 台盼蓝拒染法用血细胞计数板计数细胞成活率,调整细胞浓度到  $1 \times 10^6$ /ml,以 3 ml/每孔接种到 6 孔板中,24 h 后换液洗除未贴壁细胞,加入含 10% 血清干细胞维持培养基(Gibco 公司)混匀,置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。流式细胞术对 hMSCs 的细胞表面标记 CD34、CD44、CD73、CD90 和 CD105 等分子进行检测。后以  $10^4$  细胞/孔接种于 96 孔板,每 3 d 更换 1 次培养基。

1.4 滑膜巨噬细胞的分离、纯化与鉴定

巨噬细胞的分离、纯化与培养方法具体如下:无菌操作条件下,将新鲜获取的膝关节周围滑膜组织,PBS 冲洗至液体无色透明,眼科剪剔除周围脂肪组织,剪碎后用 1 mg/ml II 型胶原酶消化 6 h,离心弃去上清,加入 10% 胎牛血清 DMEM 培养基(含青霉素和链霉素)重悬单细胞,分装于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶培养。24 h 后换液去除未贴壁的细胞,利用反复贴壁法分离并行 Ficoll 液密度梯度离心纯化,台盼蓝染色计数细胞及存活率(>95%),随后采用抗 CD14 抗体流式细胞术对分离培养的细胞进行鉴定并测定纯度。倒置相差显微镜每天对细胞进行形态学观察,每 3 d 更换 1 次巨噬细胞条件培养基(无血清低糖 DMEM+胰岛素-转铁蛋白-硒、庆大霉素、两性霉素 B、L-抗坏血酸二磷酸)<sup>[1]</sup>。

1.5 建立人骨髓液培养模型

将股骨远端截骨处新鲜获取的骨髓液按每孔 100 μl 接种于 96 孔板,后分别立即加入 100 μl 成软骨诱导培养基(无血清低糖 DMEM、胰岛素-转铁蛋白-硒、青霉素、链霉素、L-抗坏血酸、丙酮酸钠、TGF-β3)。

1.6 检测项目与方法

1.6.1 rAAV-hWnt5a 载体的包装、鉴定与滴度检测 具体方法如下<sup>[4-6]</sup>:RT-PCR 扩增和获取人 Wnt5a cDNA 后,限制性内切酶和 0.5% 琼脂糖凝胶

电泳检查完整性;DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化回收,分光光度值(OD 值)标记检测浓度;使用 T4 DNA 连接酶,将 Wnt5a 基因插入表达载体 pACP(来源于 pSSV9,是 AAV-2 基因克隆之一);取 2 μl 上述反应产物进行转化感受态大肠杆菌,最后涂在含有 100 mg/ml 青霉素的 LB 平板上进行筛选,平板置于 37 °C 孵箱过夜,观察阳性克隆。在腺病毒 Ad 5 和 Ad 8 的辅助下,向 70%~80% 生长融合的 293 T 细胞加入上述经鉴定的 pACP 质粒进行转染,24 h 后收集含 rAAV 载体的病毒粗提液;以 -80 °C、37 °C 各 1 min 反复冻融 4 次,10 000 r/min 超高速离心得病毒上清液,置于 -80 °C,备用。同样的方法构建、包装与鉴定 rAAV-lacZ 载体。最后,采用半数细胞培养感染剂量法(TCID 50)测定病毒滴度。

1.6.2 巨噬细胞活化与 rAAV 病毒转染 根据已报道的方法<sup>[7]</sup>,使用 10 ng/ml IFN-γ 联合 10 ng/ml TNF-α 刺激上述巨噬细胞 48 h,ELISA 法检测上清液中 MCP-1 水平;随后,再使用 rAAV-lacZ 或 hWnt5a 病毒载体转染激活的巨噬细胞 24 h;再根据 Proksch 等<sup>[8]</sup>报道的共培养方法,将活化的经 rAAV 转染的巨噬细胞分别与预置于 96 孔板的 hMSCs 2D 单层贴壁、直径 4 mm 的软骨组织块,100 μl 骨髓液或 1.5 ml EP 管中的 hMSCs 3D 微球共培养,在 10 μM 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶(CaMK) II 特异性抑制剂 KN93 孵育下构建跨小室模型(图 1)。

1.6.3 rAAV 病毒载体转染效率的测定 采用 X-gal 活组织染色分别检测两种模型中 rAAV 病毒载体转染效率。X-gal 染色定性检测 rAAV-lacZ 转染结果。具体方法为:将上述模型中经 rAAV-lacZ 转染的细胞标本用 2% 福尔马林液固定后,加入新鲜配置的 X-gal 染液,分别于 30 min、1 h、2 h 在光镜下观察并拍照<sup>[9]</sup>,以随机 10 个高倍镜下的阳性细胞数(深蓝色染色)/总细胞数×100%为阳性率,也即转染效率。以上各组实验均重复 3 次。

1.6.4 rAAV 病毒载体转染对成软骨分化的影响检测 首先,rAAV 病毒载体转染 21 d 后对细胞增殖



图 1 实验设计示意图 1a. 活化的经 rAAV 病毒载体修饰的巨噬细胞(上层)与 hMSCs 2D 单层贴壁(下层)跨小室共培养 1b. 活化的经 rAAV 病毒载体修饰的巨噬细胞(上层)与骨髓液(下层)共培养  
Fig.1 Schematic diagram of experimental design 1a. Activated rAAV-modified macrophages (upper layer) and hMSCs 2D monolayer adherent (lower layer) were co-cultured 1b. Activated rAAV-modified macrophages (upper layer) and bone marrow aspirates (lower layer) were co-cultured through the transwell chamber



能力的影响检测,分别收集组织和细胞标本。进行如下操作:分别用苏木素-伊红(HE)染色并计数两种模型中各组单位面积下的细胞数<sup>[4-7]</sup>,以不同模型中 lacZ 转染的细胞增殖为标准基础,确定各组的细胞增殖情况。其次,定期采用甲苯胺蓝、抗 II 型和抗 X 型胶原免疫组化染色对细胞形态和成软骨分化能力进行检测。方法如下:分别将软骨组织、骨髓液和 hMSCs 3D 微球标本使用 4%福尔马林液常规固定后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,石蜡包埋切片,厚度为 3 μm,小鼠抗人 II 和 X 型胶原一抗液(1:400, 1:200)4 ℃孵育过夜,羊抗小鼠二抗孵育 30 min, DAB 显色,中性树胶封片;同样检测各组标本中 Wnt5a 表达。2D 细胞标本抗 Wnt5a、II 型胶原抗体染色采用与上述相似的方法,使用荧光二抗替换生物素标记的二抗孵育 30 min,激光共聚焦显微镜下观察并拍照。以上实验重复 3 次,结果取平均值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,定量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,rAAV 载体转染对两种不同培养模型 4 个分组中的细胞增殖与 MCP-1 表达、rAAV 转染效果、成软骨分化能力的影响等各组间数据用单因素方差分析(LSD 法)和两种不同培养模型 4 个分组中的两组间比较采用 Student *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常与骨关节炎膝关节滑膜病理组织学特点

对半月板损伤和 OA 膝关节滑膜衬里层与衬下层的病理学特点进行 HE 染色定性分析,发现各期 OA 滑膜均明显增生;免疫组化染色检测滑膜 CD68、Wnt5a 表达差异,结果发现 CD68、Wnt5a 主要分布于表层滑膜,CD68 阳性滑膜组织区域 Wnt5a 明显增多;Wnt5a 免疫组化染色发现 OA 滑膜中均有一定量的 M1 型巨噬细胞浸润(抗 CD68 阳性细胞),而 Wnt5a 在滑膜中表达明显增多,与巨噬细胞的浸润成正相关,推测 Wnt5a 可能参与并介导 OA 滑膜中的巨噬细胞浸润(图 2)。

2.2 巨噬细胞纯度、活化检测与 hMSCs 鉴定

首先,倒置相差显微镜对细胞进行形态学观察发现:新鲜收集的巨噬细胞培养 24 h 后,细胞贴壁生长,且出现较多伪足。经反复贴壁法分离并行 Ficoll 液密度梯度离心纯化后,采用抗 CD14

流式细胞术发现巨噬细胞纯度为 90.31%,达到后续实验所需要求<sup>[1]</sup>。MCP-1 主要由活化的炎症巨噬细胞分泌,随后,将 IFN-γ 和 TNF-α 同时加入至上述纯化的巨噬细胞培养体系中,24 h 后 ELISA 检测上清液发现,MCP-1 水平较对照组(无明显变化)明显升高,提示巨噬细胞被激活,可用于后续研究。与此同时,采用抗 CD34、CD45、CD73、CD90 和 CD105 抗体孵育 MSCs,流式细胞术检测发现 95% 以上的 MSCs 表达 CD73、CD90 和 CD105,少于 3% 的 MSCs 表达 CD34 和 CD45,证明培养的 MSCs 干性良好,满足实验要求<sup>[7]</sup>。

2.3 rAAV 载体滴度与转染效率测定

采用半数细胞培养感染剂量法(TCID 50)测定病毒滴度,最终得到的 rAAV-lacZ 滴度为每毫升  $1.00 \times 10^{11}$  病毒颗粒;使用 OD<sub>260</sub> 法进行病毒感染效力(MOI)测定,为  $10 \pm 2$ <sup>[4-7]</sup>。随后,将 rAAV-lacZ 和 rAAV-Wnt5a 分别转染活化的巨噬细胞,3 d 后 X-gal 染色发现 rAAV 载体能有效转染巨噬细胞,有效率达 97.50% 以上,且至少持续 21 d。同时,还发现 CaMK II 特异性抑制剂 KN93 对 rAAV 载体的转染效率无明显影响(图 3)。

2.4 rAAV 载体转染对两种不同培养模型的细胞增殖与 MCP-1 表达的影响

rAAV 载体转染 21 d 后,HE 染色分别计数两种模型中单位面积下的细胞数检测 Wnt5a 转染对细胞增殖能力的影响。结果如下:在 2D 单层贴壁

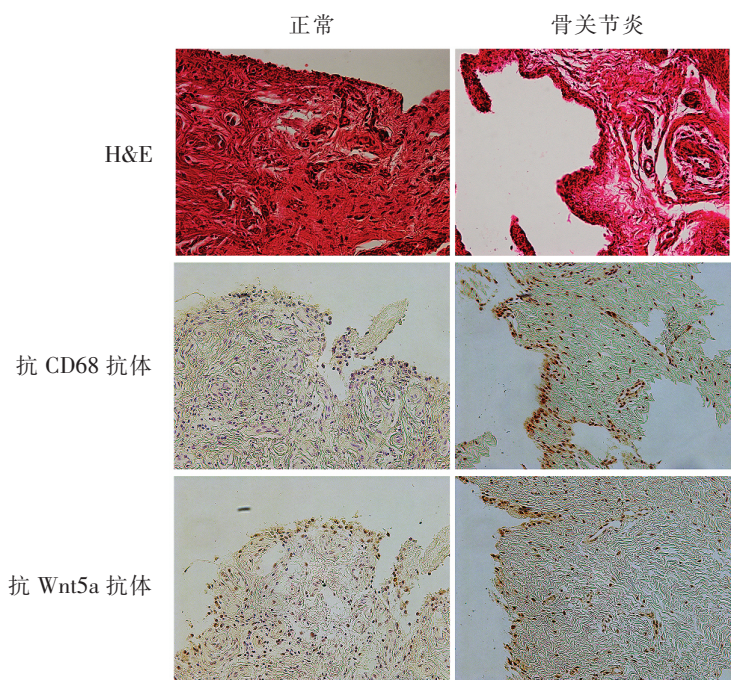


图 2 正常与骨关节炎膝关节滑膜 HE、抗 CD68 抗体、抗 Wnt 5a 抗体染色(×20)  
Fig.2 HE, anti-CD68 antibody, anti-Wnt 5a antibody between normal and osteoarthritic knee joint(×20)

模型中, lacZ 组 hMSCs 的细胞密度为 15.75 个/ $\mu\text{m}^2$ , lacZ+KN93 组、Wnt5a 组、Wnt5a+KN93 组分别为 17.25、37.75、17.5 个/ $\mu\text{m}^2$ , Wnt5a 刺激培养后细胞增殖能力明显增强, 结果分别为其余 3 组的 2.40、2.19 和 2.16 倍 ( $F=42.15, P<0.05$ , 图 4); 而骨髓液跨小室共培养条件下的细胞增殖能力情况相似, Wnt5a 刺激培养后细胞增殖能力明显增强, 达 99.28 个/ $\mu\text{m}^2$ , 结果分别为其余 3 组的 1.59、1.73 和 1.91 倍 ( $F=99.38, P<0.05$ )。

为了检测 rAAV 载体转染对两种不同培养模型 MCP-1 表达的影响, 当 rAAV 转染 20 d 时, 更换无血清 DMEM 培养基, 24 h 后 ELISA 法检测上清液中 MCP-1 水平, 在 2D 单层贴壁模型中, lacZ 组、lacZ+KN93 组、Wnt5a 组、Wnt5a+KN93 组 MCP-1 表达分别为 19.19、25.83、14.76、22.77 pg/ml, Wnt5a 刺激培养后细胞分泌 MCP-1 能力明显受到抑制, 结果分别为其余 3 组的 0.77、0.57 和 0.65 倍 ( $F=6.78, P<0.05$ ); lacZ 组、lacZ+KN93 组、Wnt5a 组、Wnt5a+KN93 组骨髓液模型中的 MCP-1 表达分别为 80.93、83.12、61.51、84.26 pg/ml, 分别为其余 3 组的 0.76、0.74 和 0.73 倍 ( $F=74.67, P<0.05$ )。

**2.5 rAAV 载体对成软骨分化或软骨重塑能力影响**

以相同单位 rAAV 病毒量转染上述两种模型 21 d 后, 常规行病理组织/细胞学固定, 以甲苯胺蓝软骨组织特殊染色(蛋白多糖)以及抗 Wnt5a、II 和 X 型胶原抗体免疫组织化学染色(骨髓液)和免疫细胞荧光染色(MSCs 2D 单层贴壁)来反应 Wnt5a 通过

调控巨噬细胞炎症反应对各种模型中的成软骨分化或软骨重塑能力的影响。具体为: 光镜下以随机 10 个高倍镜下的单位面积下的色素大小反应免疫组织化学染色阳性强度<sup>[5-7]</sup>。

首先, 比较了两种模型各组中抗 Wnt5a 免疫组化或免疫荧光染色差异, 结果分别为: 2D 单层贴壁模型 Wnt5a 组与 Wnt5a+KN93 组抗 Wnt5a 的荧光强度相近, 均明显强于 lacZ 组和 lacZ+KN93 组, 后两组间的荧光强度亦接近, KN93 对荧光表达无明显影响(图 5), 上述结果表明 rAAV-Wnt5a 转染活化的巨噬细胞能通过刺激其 Wnt5a 的表达, 进而弥散进入培养体系中被跨小室的 MSCs 2D 单层贴壁、骨髓液所摄取, 故 Wnt5a 表达升高, 而 KN93 对 Wnt5a 表达无明显阻断效应。其次, 骨髓液模型中的甲苯胺蓝软骨组织特殊染色的结果为: lacZ 组、lacZ+KN93 组、Wnt5a 组、Wnt5a+KN93 组半定量分析依次为 25、21.5、38.5、22, Wnt5a 组分别为其余 3 组的 1.54、1.79 和 1.75 倍 ( $F=5.05, P<0.05$ , 图 6)。与此同时, 抗 II 和 X 型胶原免疫组化染色的结果如下: 2D 单层贴壁模型 Wnt5a 组抗 II 的荧光强度最高, 明显强于其余 3 组, 后两组间的荧光强度亦接近, 表明 Wnt5a 能诱导 II 型胶原的表达, 相反, KN93 抑制 II 型胶原的表达(图 5)。lacZ 组、lacZ+KN93 组、Wnt5a 组及 Wnt5a+KN93 组骨髓液模型中 II 型胶原表达分别为 64.5、60.0、93.5、66.5, X 型胶原表达半定量分析分别是 19.0、20.0、61.5、22.0, Wnt5a 组 II 型、X 型胶原表达分别是 lacZ 组、lacZ+KN93 组和 Wnt5a+KN93 组

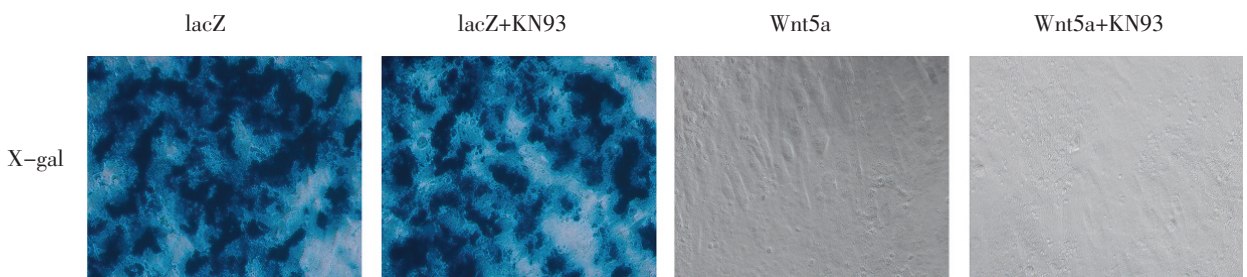


图 3 X-gal 染色检测各组 rAAV 载体转染效果(x40)  
Fig.3 X-gal staining detecting rAAC vector transfection among different groups(x40)

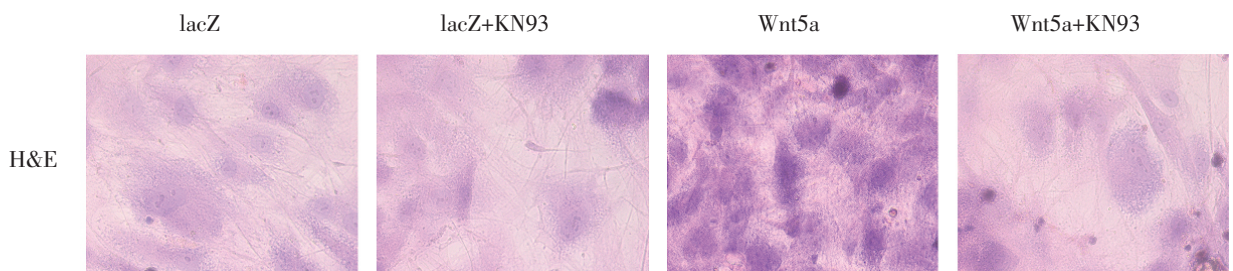


图 4 HE 染色检测各组 rAAV 载体转染后 MSCs 单层培养时效果(x40)  
Fig.4 HE staining detecting MSCs monolayer cultured after rAAV vector transfection among different groups(x40)



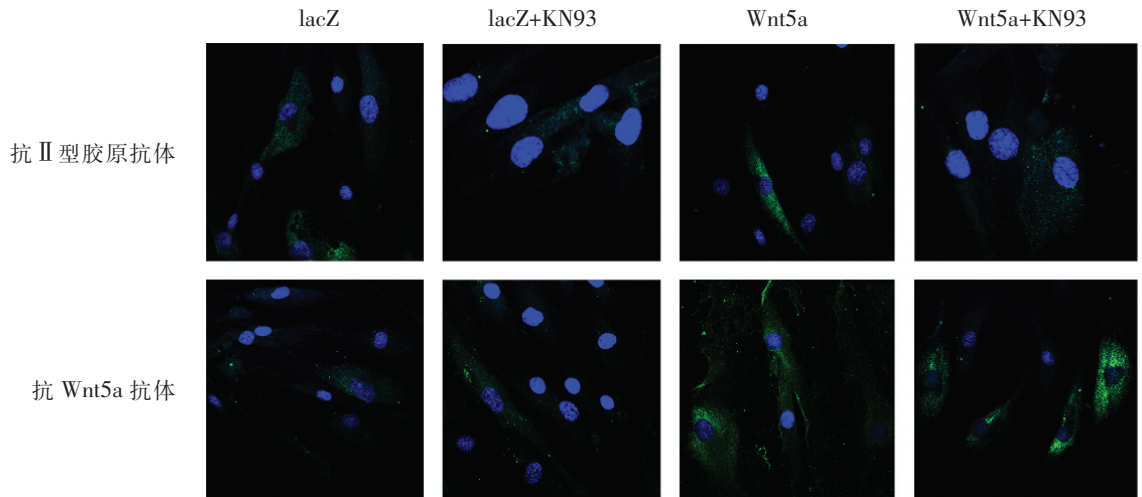


图 5 激光共聚焦显微镜下观察各组抗 II 型胶原抗体和抗 Wnt 5a 抗体变化(×60)

Fig.5 Changes of anti-collagen II antibody and anti Wnt 5a among different groups under laser scanning confocal microscope(×60)

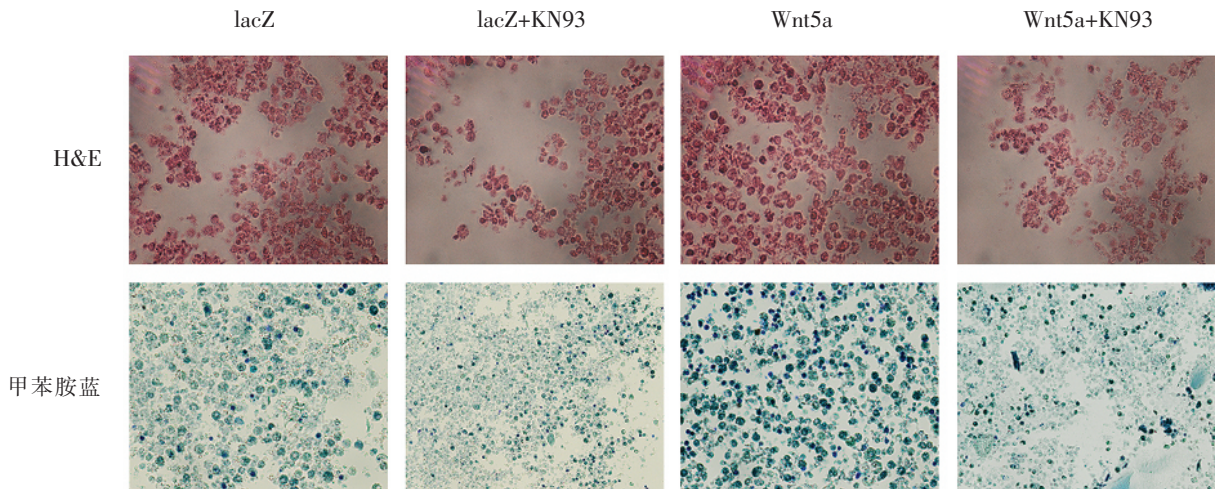


图 6 HE 和甲苯胺蓝染色检测各组 rAAV-Wnt 5a 转染骨髓液(×40)

Fig.6 HE and toluidine blue staining detecting rAAV-Wnt 5a transfected marrow solution(×40)

的 1.45、1.56、1.41 倍 ( $F=20.65, P<0.05$ ) 和 3.24、3.08、2.80 倍 ( $F=26.47, P<0.05$ , 图 7)。

### 3 讨论

软骨稳态是指在生理状态下软骨细胞自我更新、新陈代谢、细胞外基质合成、细胞间信号传递以及准确应答外界各种刺激和功能恢复的一种动态平衡过程,是关节功能正常发挥的基础。炎症、创伤、衰老、遗传易感性或代谢障碍等多种内外因素单独或联合导致的上述稳定平衡状态的破坏是 OA 始动因素,而 OA 治疗的核心原则就是通过各种策略恢复软骨稳态<sup>[9]</sup>。

#### 3.1 Wnt5a 信号通路在巨噬细胞炎症反应对 MSCs 增殖与成软骨分化的关系机制

目前,临床针对于 OA 软骨损伤的修复方法很多,其中以 MSCs 直接转移术,如软骨下骨钻孔术或

微骨折术,促进软骨下骨髓液中的 MSCs 通过人造空隙进入缺损区,或间接移植术(自体或异体 MSCs 分离后,经体外扩增单独或载于各种生物材料)最具应用前景。尽管上述方法均取得了一定的临床疗效,但移植后的 MSCs 增殖和成软骨分化过程直接暴露于慢性炎症微环境中,导致新生的软骨组织在形态、代谢、功能和机械性质与正常透明软骨相差较远,因而远期治疗效果往往不佳。近年来的研究表明,关节内滑膜巨噬细胞激活后通过直接侵蚀或分泌大量致炎性细胞因子影响移植后的 MSCs 各种功能,破坏其与移植区固有关节软骨的正常信号沟通,是导致 MSCs 移植后出现纤维化生、骨化、甚至剥脱丢失的主要原因<sup>[10]</sup>。进一步研究表明,Wnt5a 信号通路在巨噬细胞上述极化、致炎性功能激活以及软骨稳态等过程中发挥重要调控作用<sup>[11]</sup>。因此,如何通过调控

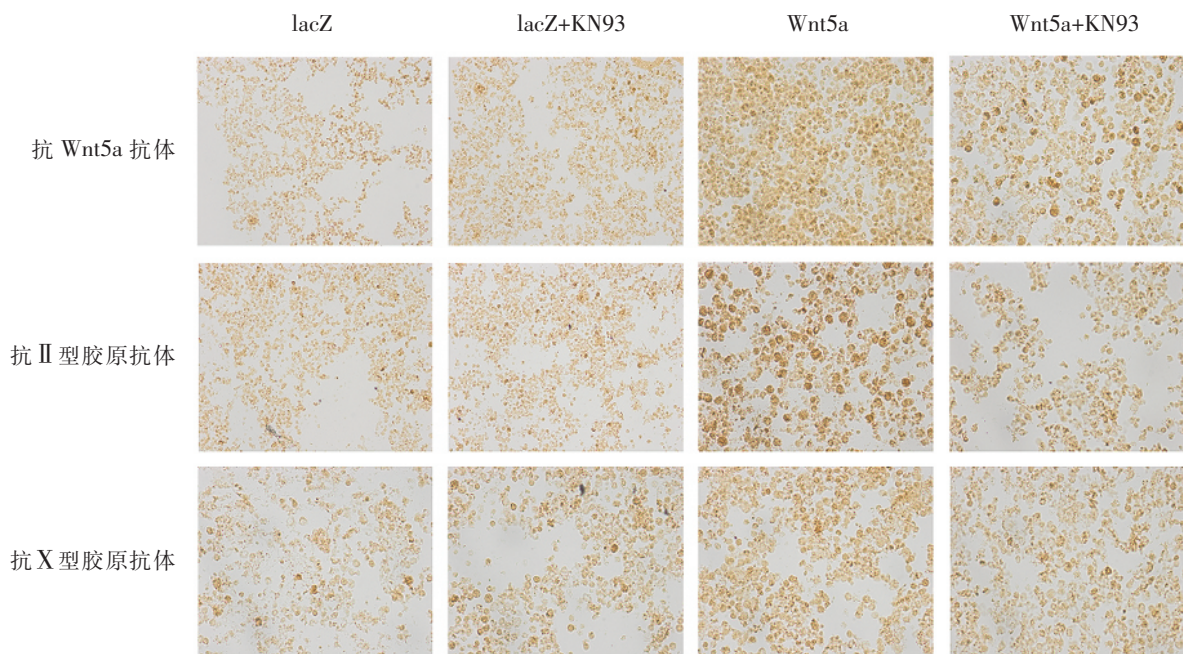


图 7 各组抗 Wnt5a 抗体、抗 II 型胶原抗体、抗 X 型胶原抗体免疫组化染色图(x40)

Fig.7 Immunohistochemical staining of anti-Wnt 5a antibody, anti-collagen II antibody and anti-collagen X antibody among different groups(x40)

Wnt5a 信号介导的巨噬细胞炎症反应，进而改善 MSCs 移植后的局部及整体生存微生态，促进其能稳定增殖并向透明软骨细胞分化及合成细胞外基质尤为关键。Yu 等<sup>[12]</sup>证实重组 Wnt5a 通过 TLR-4 引起巨噬细胞炎症细胞因子的产生及对微生物刺激的耐受。随后，有学者发现分泌型 Fzd 相关蛋白 5 能抑制 Wnt5a 诱导的巨噬细胞趋化和活化。本研究通过构建和比较经 Wnt5a 基因转染活化的巨噬细胞分别与 hMSCs 2D 单层贴壁、骨髓液之间跨小室共培养模型，以尝试调控 Wnt5a 信号通过巨噬细胞炎症反应对软骨稳态产生的影响。

### 3.2 Wnt5a 信号介导的巨噬细胞炎症反应对 MSCs 增殖和致炎性因子表达关系

在 rAAV 载体构建与转染效率的检测研究中，Frisch 等<sup>[13]</sup>利用 rAAV 携带 Sox9、转化生长因子 (TGF)-β 和胰岛素样生长因子 (IGF)-1 能 100% 有效转染骨髓液标本 21 d，且随着 rAAV 载体浓度的增加，转染效率不断提高。笔者以 rAAV-lacZ 和 rAAV-Wnt5a 分别转染活化的巨噬细胞，检测 2D 单层培养模型中 rAAV 转染效率，即计数蓝色阳性细胞数/光镜下的总细胞数。3 d 后 X-gal 染色发现 rAAV 载体能有效转染巨噬细胞，效率高达 97.50% 以上，且至少持续 21 d，未达到 100% 有效的可能原因是 rAAV-Wnt5a 转染巨噬细胞后通过调控其 Wnt5a 直接释放作用或致炎性细胞因子分泌而影响了其基因转染效率；此外，还发现 CaMK II 特异性抑制剂 KN93 对 rAAV 载体的转染效率无明显影响。

以上实验结果表明成功构建的 rAAV 病毒载体在体外能有效转染活化的巨噬细胞，为后续研究提供可靠保障。

在上述成功构建 rAAV 病毒载体和两种跨小室共培养模型的基础上，笔者探索了 rAAV 转染对两种不同培养模型的细胞增殖影响的研究。rAAV 病毒载体分别转染两种模型 21 d 后，HE 染色分别计数单位面积下的细胞数以检测 Wnt5a 转染对细胞增殖能力的影响，结果表明 rAAV-Wnt5a 转染活化的巨噬细胞能通过刺激其 Wnt5a 的表达，进而弥散进入跨小室的下层 2D 单层贴壁和骨髓液培养体系中的 MSCs 所摄取，所以 Wnt5a 表达量升高，这也形成一个正反馈环路，导致两种培养体系中的 Wnt5a 持续升高。本研究还发现加入的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 抑制剂 KN93 能明显抑制 Wnt5a 的细胞增殖效应，这也与 Martineau 等<sup>[14]</sup>之前报道的研究结果一致。笔者推测 Wnt5a 可能通过钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 途径调控 MSCs 的募集、软骨细胞的增殖并发挥核心作用。

体内外研究证实，巨噬细胞激活后能表达一定量的 MCP-1，是骨关节炎的炎症反应始动因素，决定骨关节炎关节软骨破坏程度，且与其炎症严重程度紧密相关。基于此，笔者在探索 rAAV-Wnt5a 转染巨噬细胞激活后的 MCP-1 表达的研究中，发现 Wnt5a 刺激培养后巨噬细胞分泌 MCP-1 能力明显受到抑制，以上结果也进一步证实调控 Wnt5a 信号介导的巨噬细胞活化水平能有效促进上述各种培养



模型中的 MSCs 细胞增殖与抑制致炎性因子 MCP-1 的表达,笔者认为 Wnt5a 信号可能直接参与骨关节炎的巨噬细胞的活化并影响其炎症病理过程。

### 3.3 调控 Wnt5a 信号介导的巨噬细胞炎症反应对成软骨分化及软骨肥大化的影响

有学者发现 Wnt5a 和 Wnt5b 促进骨髓间充质干细胞向软骨方向的分化,进一步的研究还表明 Wnt5a 基因突变小鼠软骨细胞的肥大化和骨骼的骨化显著延迟,表明 Wnt5a 对软骨细胞和成骨细胞的分化中具有重要调控作用<sup>[15]</sup>。但调控 Wnt5a 信号介导的巨噬细胞活化与炎症反应是否对 hMSCs 成软骨分化及软骨肥大化产生影响尚未见文献报道。为此,笔者以相同单位量的 rAAV 病毒先转染巨噬细胞,再与两种跨小室模型中的 hMSCs 共培养 21 d 后,采用甲苯胺蓝染色及 II、X 型胶原免疫组化和免疫荧光染色分别检测 rAAV 病毒转染对成软骨分化及软骨肥大化能力的影响。骨髓液模型中的甲苯胺蓝软骨组织特殊染色的结果为:Wnt5a 组甲苯胺蓝染色最强。同时,抗 II 型胶原免疫荧光染色结果是:2D 单层贴壁模型 Wnt5a 组抗 II 型胶原抗体荧光强度最高,明显强于 lacZ 组、lacZ+KN93 组和 Wnt5a+KN93 组(而后两组间的荧光强度接近)。相反,钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 抑制剂 KN93 有抑制 II 型胶原表达的作用,Wnt5a 转染亦能促进骨髓液模型中 II 和 X 型胶原表达。以上结果表明 rAAV 病毒介导的 Wnt5a 基因转染能通过调控巨噬细胞的活性及上述致炎性因子 MCP-1 的分泌,进而显著增加软骨基质蛋白多糖与 hMSCs 成软骨分化特异性标志物 II 型胶原的表达。与此同时,软骨肥大化特异性标志物 X 型胶原的表达也有所升高,这可能是由于部分 hMSCs 定向成软骨分化后,在巨噬细胞分泌的致炎性因子等持续作用下,较幼稚的透明软骨样细胞继续向成熟的软骨细胞分化,进而肥大化软骨细胞的特异性标志物 X 型胶原有明显增加。笔者推测通过 Wnt5a 信号干预巨噬细胞激活和功能状态可以有效促进上述两种培养模型中的 hMSCs 的成软骨分化。

综合以上,本研究结果表明 rAAV-Wnt5a 转染能有效转染活化的巨噬细胞,通过调控其炎症反应水平,促进两种不同培养模型的软骨稳态的维持(细胞增殖、成软骨分化及软骨肥大化),为 OA 诊治提供体外模型、实验基础和新的思路。

#### 参考文献

[1] Lindberg GCJ, Longoni A, Lim KS, et al. Intact vitreous humor as a potential extracellular matrix hydrogel for cartilage tissue engineering applications[J]. Acta Biomater, 2019, 85: 117-130.  
[2] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis

[J]. Ann Rheum Dis, 1957, 16(4):494-502.

- [3] Tao K, Xiao D, Weng J, et al. Berberine promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells osteogenic differentiation via canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Toxicol Lett, 2016, 240(1):68-80.  
[4] Tao K, Rey-Rico A, Frisch J, et al. rAAV-mediated combined gene transfer and overexpression of TGF- $\beta$  and SOX9 remodels human osteoarthritic articular cartilage[J]. J Orthop Res, 2016, 34(12): 2181-2190.  
[5] Tao K, Frisch J, Rey-Rico A, et al. Co-overexpression of TGF- $\beta$  and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cell Res. Ther, 2016, 7(1):20.  
[6] 李虎,李儒军,曹宸喜,等.趋化素样因子 1 过表达促进强直性脊柱炎腕关节韧带成纤维细胞增殖和向成骨细胞转化的实验研究[J].中华风湿病学杂志,2017,21(9):614-621.  
LI H, LI RJ, CAO CX, et al. Recombinant adeno-associated virus-mediated chemokine like factor 1 gene transferring modulates the proliferative activities and osteogenic potentials of human hip ligaments of ankylosing spondylitis patients[J]. Zhonghua Feng Shi Bing Xue Za Zhi, 2017, 21(9):614-621. Chinese.  
[7] Utomo L, van Osch GJ, Bayon Y, et al. Guiding synovial inflammation by macrophage phenotype modulation: an in vitro study towards a therapy for osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(9):1629-1638.  
[8] Proksch S, Steinberg T, Vach K, et al. Shaping oral cell plasticity to osteogenic differentiation by human mesenchymal stem cell coculture[J]. Cell Tissue Res, 2014, 356(1):159-170.  
[9] Velusami CC, Richard EJ, Bethapudi B. Polar extract of Curcuma longa protects cartilage homeostasis: possible mechanism of action[J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(5):1233-1243.  
[10] 杨自权,门亚勋.等轴牵张应变对骨间充质干细胞成软骨分化早期的影响[J].中国骨伤,2018,31(9):846-852.  
YANG ZQ, MEN YX. Effect of equiaxial tensile strain in early differentiation of mesenchymal stem cells into cartilage cells[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(9):846-852. Chinese with abstract in English.  
[11] Daghestani HN, Pieper CF, Kraus VB. Soluble macrophage biomarkers indicate inflammatory phenotypes in patients with knee osteoarthritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(4):956-965.  
[12] Yu CH, Nguyen TT, Irvine KM, et al. Recombinant Wnt3a and Wnt5a elicit macrophage cytokine production and tolerization to microbial stimulation via Toll-like receptor 4[J]. Eur J Immunol, 2014, 44(5):1480-1490.  
[13] Frisch J, Rey-Rico A, Venkatesan JK, et al. rAAV-mediated overexpression of sox9, TGF- $\beta$  and IGF-I in minipig bone marrow aspirates to enhance the chondrogenic processes for cartilage repair[J]. Gene Ther, 2016, 23(3):247-255.  
[14] Martineau X, Abed É, Martel-Pelletier J, et al. Alteration of Wnt5a expression and of the non-canonical Wnt/PCP and Wnt/PKC-Ca2+ pathways in human osteoarthritis osteoblasts[J]. PLoS One, 2017, 12(8):e0180711.  
[15] Church V, Nohno T, Linker C, et al. Wnt regulation of chondrocyte differentiation[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 24):4809-4818.

(收稿日期:2019-08-21 本文编辑:李宜)