

## • 基础研究 •

## 鹿茸多肽对兔骨髓间质干细胞体外软骨表型诱导分化的影响

修忠标<sup>1</sup>, 林建华<sup>2</sup>, 吴朝阳<sup>2</sup>, 王日雄<sup>2</sup>

(1. 福建中医学院附属人民医院骨科, 福建 福州 350004; 2. 福建医科大学附属第一医院骨科)

**【摘要】** 目的: 通过对体外培养的兔骨髓间质干细胞(MSCs)在特定培养液作用下向软骨细胞表型分化的研究, 探讨鹿茸多肽对其软骨分化的影响。方法: 将第3代兔MSCs随机分为A组(空白对照组)、B组(诱导组)、C组(鹿茸多肽组), 并取兔的关节软骨作为D组(关节软骨组)。A、B、C3组分别采用普通培养液、诱导培养液、含10 ug/ml鹿茸多肽的诱导培养液于离心管内进行培养, 分别于1、2、3周后取材, 通过组织学、生物化学和RT-PCR技术, 对离心管内构建的软骨组织进行形态学和细胞功能状态的观察。结果: A组培养2周后, 细胞团块逐渐崩解, 无法进行HE染色。B、C组细胞团块除有轻度收缩外, 呈白色半透明状, HE染色发现细胞为圆形或卵圆形, 表层细胞密度大。B、C组糖胺多糖(GAG)含量及II型胶原mRNA表达随培养时间延长而增多, 并以C组为著; 各时间点B、C组与A组相比明显增多, 且差异有显著性统计学意义( $P < 0.01$ ), C组与B组相比较多, 差异有显著性统计学意义( $P < 0.01$ ), C组与D组相比较少, 差异有显著性统计学意义( $P < 0.01$ )。结论: MSCs在特定培养条件下能向软骨细胞表型分化, 且鹿茸多肽对其定向软骨分化有明显促进作用。虽然在体外可以构建出软骨组织, 但其与关节软骨质量相比仍有很大差距。

**【关键词】** 鹿茸多肽; 间质干细胞; 软骨; 组织工程; 细胞分化

**Effect of pilose antler polypeptides (PAP) on chondrogenic phenotype differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) of rabbit in vitro** XIU Zhong-biao<sup>1</sup>, LIN Jian-hua, WU Zhao-yang, WANG Rixiong.<sup>\*</sup> Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medical College of Fujian, Fuzhou 350004, Fujian, China

**ABSTRACT Objective** To study the feasibility of chondrogenic phenotype differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in a defined medium and explore the effect of pilose antler polypeptides (PAP) on chondrogenic phenotype differentiation of MSCs in vitro. **Methods** The third passage MSCs of rabbit were randomly divided into control group (A), induced group (B), PAP group (C), which were cultured in centrifuge tubes respectively in ordinary medium, defined medium and defined medium containing 10 ug/ml PAP. The cellular morphological and functional characteristics were observed at the 1, 2, 3 weeks after culture in centrifuge tubes by histological, biochemical and RT-PCR technique. **Results** The cellular clump in group A gradually crumbled after 2 weeks, and the HE stain couldn't be done. Those in group B and group C were semitransparent, but slightly contracted. The cells in these clumps were round or orbicular ovate (HE stain), and the density of cellular surface was increased. The content of glycosaminoglycan (GAG) and mRNA expression of collagen type II in group A was negative, and it gradually increased in group B and group C, especially in group C. There was significant difference between group B and group A ( $P < 0.01$ ), between group C and group A ( $P < 0.01$ ). But there was less expression in group B than group C, and less expression in group C than group D, the difference was significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MSCs can differentiate into chondrogenic phenotype in defined medium, and PAP can significantly enhance chondrogenic phenotype differentiation of MSCs. But the quality cultured of cartilage tissue was poor than the articular cartilage.

**Key words** Pilose antler polypeptides; Mesenchymal stem cells; Cartilage; Tissue engineering; Cell differentiation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(1): 31-33 www.zzgssz.com

组织工程化软骨形成的重要条件之一是必须获得大量的有功能和活力的软骨细胞, 而MSCs在组织工程领域展现了其良好的应用前景。我们的研究旨在建立一种持续、稳定

地向软骨细胞表型分化的MSCs体外培养体系, 并观察鹿茸多肽对其向软骨细胞表型分化的影响, 为软骨组织工程种子细胞的优化提供依据。

## 1 材料与amp;方法

**1.1 动物** 6周龄新西兰健康大白兔(福建医科大学实验动物中心提供), 体重(1 000 ± 10) g 皆为雌性。

基金项目: 福建省教育厅科技项目(NO. JB05160)

通讯作者: 修忠标 Tel 0591-87285772 E-mail xzdocto@sina.com

**1.2 主要试剂** 高糖 αMEM 培养基、胎牛血清 FBS(Hyclone 公司);胰蛋白酶 Trypsin 1 250(Amersco公司);转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>) (Pepro Tech EC 公司); 1, 9-二甲基亚甲蓝 DMB(A lrich 公司);木瓜蛋白酶 (Signag公司); TRIZOL, RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen公司); PCR 引物 (上海生物工程有限公司);鹿茸多肽粉针 (长春中医学院附属医院新药研究中心)。

**1.3 MSCs的软骨诱导培养** 在无菌条件下穿刺抽取兔髌髌部骨髓分离 MSCs。将第 3代兔 MSCs(活力 > 90%) 分别按 2 × 10<sup>7</sup>个 /管接种入 15 ml锥形聚丙烯离心管, 1 500 r/min离心 5 min 弃上清, 随机分为 A 组(空白对照组)、B 组(诱导组)、C 组(鹿茸多肽组), 并取等量兔的关节软骨作为 D 组(关节软骨组), 每组 6 份。A、B、C 3 组分别采用普通培养液、诱导培养液(高糖 αMEM 培养基、胰岛素 6.25 mg/ml 转铁蛋白 6.25 mg/ml 亚硒酸 6.25 mg/ml 亚油酸 5.35 mg/ml 抗坏血酸 37.5 mg/ml 牛血清白蛋白 1.25 mg/ml TGF-β<sub>1</sub> 10 ng/ml 地塞米松 10<sup>-7</sup> mol/l)、含 10 ug/ml 鹿茸多肽的诱导培养液于离心管内进行培养, 培养液每周更换 2 次, 连续培养 3 周。

**1.4 HE染色显微镜观察** 培养至第 1、2、3 周, 4% 多聚甲醛固定, 常规包埋、切片, HE 染色, 显微镜下观察。

**1.5 二甲基亚甲蓝显色法测定 GAG 含量** 每周分别取 A、B、C 3 组样品, 同时取 D 组作对照, 用滤纸吸干组织所带水分, 电子天平称组织湿重。将样品用木瓜蛋白酶消化后用二甲基亚甲蓝显色法测定 GAG 含量, 每克湿重组织中 GAG 含量按下列公式计算: 单位 GAG 含量 (mg/g) = GAG 含量 (mg) / 组织湿重 (g)

**1.6 RT-PCR 检测 II 型胶原 mRNA 表达** 每周分别取 A、B、C 组样品, 同时取 D 组作对照, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 再用随机引物, 逆转录酶转录为 cDNA, 然后以此 cDNA 第 1 链为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。

II 型胶原: 5'-CTG CTC GTC GCC GCT GTC CTT-3'  
5'-AAG GGT CCC AGG TTC TCC ATC-3' (225 bp);  
β-actin 5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTTGG-3'  
5'-GGAACCGCTCATTGCCAATG-3' (499 bp)

扩增条件如下: 94℃ 变性 45 s 60℃ 退火 50 s 72℃ 延伸 1 min 30 次循环, 最后 72℃ 延伸 2 min 后, 扩增产物片段长度为 225 bp。取 5 μl PCR 产物在含有 1% 琼脂糖的 0.5 × TBE 缓冲液中电泳, 电压控制在 100 V, 时间控制在 30~40 min 用 Gel Doc 2000 型凝胶图像分析系统拍照, 用 Gelwoks 1D Intermediate 软件定量分析。

**1.7 统计学方法** 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。定量资料实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 相同时间点 GAG 含量及 II 型胶原 mRNA 表达应用组间独立样本 t 检验, 多组样本均数比较采用方差分析。

**2 结果**

**2.1 离心管聚集体培养的细胞团块形态学观察** A 组培养 2 周后, 细胞团块逐渐崩解, 无法进行 HE 染色。B、C 组培养 2 周后细胞团块除有轻度收缩外, 呈白色半透明状; HE 染色

发现细胞为圆形或卵圆形, 表层细胞密度大, 见图 1。

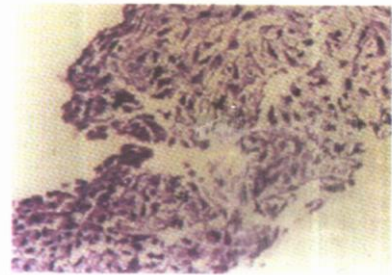


图 1 培养 2 周后 C 组细胞染色 (HE × 100)  
Fig.1 The cell stain in group C at 2 weeks after culture (HE × 100)

**2.2 GAG 含量** A 组在各个时间点均没有检测到 GAG, 而 B、C 组随培养时间延长 GAG 含量增加, 且以 C 组增加明显, 各时间点 B、C 组与 A 组比较明显增多, 且差异有统计学意义 (P < 0.01), C 组与 B 组相比较, 差异有显著性统计学意义 (P < 0.01), C 组与 D 组相比较, 差异有显著性统计学意义 (P < 0.01), 见表 1。

表 1 不同培养时间各组单位 GAG 含量 ( $\bar{x} \pm s$  mg/g)  
Tab 1 The contents of GAG of different group at different time ( $\bar{x} \pm s$  mg/g)

组别 Groups	兔数 Rabbits	1周	2周	3周
A	6	0	0	0
B	6	5.36 ± 0.02 <sup>*</sup>	11.65 ± 0.09 <sup>†</sup>	13.71 ± 0.01 <sup>‡</sup>
C	6	15.68 ± 0.12 <sup>*#</sup>	22.93 ± 0.05 <sup>#</sup>	29.74 ± 0.01 <sup>*#</sup>
D	6	46.17 ± 0.05	45.86 ± 0.02	46.38 ± 0.08

注: B、C 组与 A 组相比, \* P < 0.01; C 组与 B 组相比, <sup>†</sup> P < 0.01; C 组与 D 组相比, <sup>‡</sup> P < 0.01

Note Group B and C VS group A, \* P < 0.01; group C VS group B <sup>†</sup> P < 0.01; group C VS group D, <sup>‡</sup> P < 0.01

**2.3 II 型胶原 mRNA 的表达** 在 1、2、3 周 3 个时间点 A 组 II 型胶原 mRNA 表达阴性, B、C 组 II 型胶原 mRNA 表达均呈逐渐上升趋势, C 组表达较多, 与 B 组相比差异有显著性统计学意义 (P < 0.01), 但 C 组与 D 组相比表达较少, 差异有显著性统计学意义 (P < 0.01), 见表 2。在 2 周时 II 型胶原 mRNA D 组表达最多, B、C 组表达较少, 而 A 组无表达, 见图 2。

表 2 不同时间各组 II 型胶原 mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$  %)  
Tab 2 The mRNA expression of collagen type II of different groups at different time ( $\bar{x} \pm s$  %)

组别 Groups	兔数 Rabbits	1周	2周	3周
A	6	0	0	0
B	6	0.21 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>†</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>‡</sup>
C	6	0.32 ± 0.01 <sup>*#</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>#</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>*#</sup>
D	6	0.87 ± 0.01	0.86 ± 0.02	0.85 ± 0.01

注: B、C 组与 A 组相比, \* P < 0.01; C 组与 B 组相比, <sup>†</sup> P < 0.01; C 组与 D 组相比, <sup>‡</sup> P < 0.01

Note Group B and C VS group A, \* P < 0.01; group C VS group B <sup>†</sup> P < 0.01; group C VS group D, <sup>‡</sup> P < 0.01

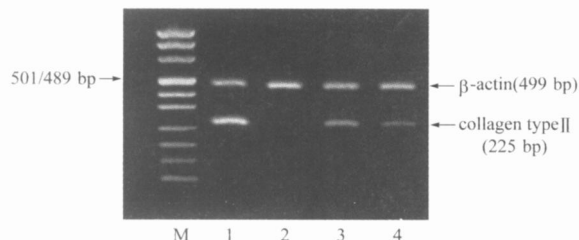


图 2 RT-PCR 检测 2 周后各组 II 型胶原 mRNA 的表达 注: II 型胶原 mRNA 的表达水平为 225bp  $\beta$ -actin (499 bp) 作为内参照, M: (501/489 bp) 为 DNA 分子量标记, 1、2、3、4 分别为 D、A、C、B 组

Fig. 2 The mRNA expression of collagen type II in different groups by RT-PCR technique at 2 weeks after culture Note Total mRNA was amplified for collagen type II (225 bp) and  $\beta$ -actin (499 bp), M: DNA ladder marker lanes 1 2 3 4 were group D, A, C, B respectively

### 3 讨论

种子细胞是组织工程中用于重建新生组织的原动力。MSCs 是软骨组织工程最有希望的种子细胞来源之一<sup>[1]</sup>。然而, MSCs 在体外培养条件下软骨表型的分化却是一个受多种因素限制的复杂过程。目前其调控机制仍不是很清楚。已知局部环境是影响 MSCs 向软骨细胞转化的重要因素<sup>[2]</sup>。

高密度的种子细胞能够促进细胞与细胞之间的接触与相互作用, 并且细胞通过自分泌、旁分泌的方式分泌多种细胞生长因子从而影响软骨的增殖、分化<sup>[3]</sup>。本研究细胞密度较高, 达  $2 \times 10^7$  个/管, 并通过离心的方法使细胞聚集成团, 创造了细胞与细胞之间的紧密接触以及相互作用的环境, 当细胞分泌基质后, 转化的软骨细胞随后就被埋于三维基质中, 从而使细胞与在体环境较为相似。本实验 B 组及 C 组细胞团块的 HE 染色发现细胞为圆形或卵圆形, 表层细胞密度大。

研究发现软骨内含有许多细胞因子及其受体, 并且表明这些细胞因子通过自分泌和旁分泌这两种分泌基本方式来调节软骨的生成<sup>[4]</sup>。软骨组织工程种子细胞需适当的生长因子调控才能获得良好的生物学活性。鹿茸多肽是从梅花鹿茸中提取的一种多肽类生物活性因子, 为鹿茸主要活性成分, 实验研究证明它能刺激软骨细胞增殖<sup>[5]</sup>。本实验结果证实, 鹿茸多肽在软骨诱导培养条件下可促进 MSCs 分泌软骨基质并表达 II 型胶原, 说明鹿茸多肽对 MSCs 软骨分化有明显的

促进作用。

细胞本身的功能表达不仅取决于细胞内在的基因序列, 在很大程度上受到外界环境因素的影响, 其中细胞外基质 (ECM) 有着很重要的作用。ECM 不仅为细胞生长提供支持 and 保护, 更重要的是调节细胞的形态发生过程, 影响细胞生存、迁移、增殖和功能代谢。所以, 在软骨组织工程研究中制备和筛选有利于种子细胞的黏附、增殖和分化的生物材料是十分重要的。本实验结果证实该培养体系可诱导 MSCs 形成一定组织结构软骨, 但只表层细胞密度大, 这可能与中心部物质交换不足有关。因此, 有必要研制具有高孔隙率的三维支架材料以利于组织生成过程中的物质交换。

蛋白多糖聚集体是软骨两大特异性基质成分之一<sup>[6]</sup>, 其分子结构中的主要组成即为 GAG。所以, 细胞外基质中 GAG 的含量可作为判断体外培养扩增软骨细胞分泌基质功能的可靠依据。本实验结果显示 DMB 比色法具有较好的精确度, B 组及 C 组随培养时间延长 GAG 含量增加, 且以鹿茸多肽组增加明显, 两者相比差异有显著性统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 进一步说明鹿茸多肽在软骨诱导培养条件下, 可促进 MSCs 向软骨细胞表型分化。C 组在各个时间点较 D 组 GAG 含量明显减少, 与之相比差异有显著性统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 提示本实验虽在体外可以构建出软骨组织, 但其与关节软骨组织质量相比仍有很大差距。如何于体外培养出高质量的软骨组织, 仍需进一步探索。

### 参考文献

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284: 143-147.
- Frenkel SR. Degradation and repair of articular cartilage. *Front Biosci* 1999, 15: 671-685.
- Freed LE, Martin I, Vunjak-Novakovic G. *Frontiers in tissue engineering Clin Orthop Relat Res* 1999, 367 (Suppl): S46-58.
- 修志标, 林建华. 骨髓间质干细胞软骨分化生物学的影响因素. *骨与关节损伤杂志*, 2004, 19(8): 574-576.
- 郭颖杰, 周秋丽, 刘平等. 鹿茸多肽对骨、软骨细胞增殖的实验研究. *中国生化药物杂志*, 1998, 19(2): 74-75.
- Sandell LJ, Suga J, Trippel SB. Expression of collagens I, II, X and XI and aggrecan mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ. *J Orthop Res* 1994, 12: 1-14.

(收稿日期: 2006-06-15 本文编辑: 王宏)

## 致谢《中国骨伤》杂志 2006 年度审稿人

《中国骨伤》编辑委员会及杂志社对 2006 年度的审稿人表示衷心地感谢!

(以姓氏汉语拼音字母为序)

董福慧 董健 房世源 韩凤岳 胡良平 李晋波 李为农 吕厚山 罗从凤 邱勇 阮狄克 孙常太  
谭明生 王友京 卫小春 喻晓春 张保中 张功林 张磊 张英泽 赵勇 钟红刚 周卫