

• 临床医学 •

文章编号: 1002-0217(2019) 01-0025-04

间歇性循环张力对人间充质干细胞成软骨分化的影响

杨必敬 汪 靖 葛 鑫 徐子昂 徐宏光

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 脊柱外科 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 研究间歇性循环张力(ICMT) 对人间充质干细胞(hMSCs) 成软骨分化的影响。方法: 取人间充质干细胞建立体外软骨分化的模型, 将人间充质干细胞以 $8 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 的密度接种于被 I 型胶原覆盖处理过的 BioFlexTM 六孔加力板中, 置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养, 待细胞贴壁后加入成软骨诱导液培养。根据间歇性循环张力的影响分为加力组和对照组, 加力组: 细胞通过 Flexcell FX-5000TM 应变加载系统在培养箱中(37°C 、 $5\% \text{CO}_2$) 给予力学刺激(10% 伸长率、 0.5 Hz 、 8 h/d) 处理; 对照组: 不加以力学刺激放在相同环境下一起培养。两组细胞分别在加成软骨诱导液后 1、3、6、8、10 d 用 CCK-8 法检测细胞增殖。第 14 天用番红 O 染色观察细胞成软骨变化, 用流式细胞术检测细胞凋亡情况, 用 Real-time PCR 的方法检测细胞成软骨基因 ACAN、COL II、SOX9 的表达变化。结果: 间歇性循环张力可以抑制间充质干细胞的增殖。第 14 天的加力组细胞明显凋亡, 番红 O 染色比对照组浅, 软骨基因的表达被抑制。结论: 间歇性循环张力抑制人间充质干细胞成软骨分化。

【关键词】人间充质干细胞; 间歇性循环张力; 软骨分化

【中图分类号】R 329.2; R 68 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2019.01.007

Impact of intermittent cyclic mechanical tension on chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells

YANG Bijing, WANG Jing, GE Xin, XU Ziang, XU Hongguang

Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To investigate the impact of intermittent cyclic mechanical tension (ICMT) on chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells (hMSCs). **Methods:** Human mesenchymal stem cells were obtained to develop the chondrogenic differentiation model using *in vitro* technique. hMSCs were planted in density of $8 \times 10^4 / \text{cm}^2$ in a BioFlexTM six-well multi-directional force plate coated with type I collagen, and cultured in $5\% \text{CO}_2$ incubator at 37°C . Upon cell adhesion, chondrogenic inducer was added *in vitro*. Then hMSCs were divided into afterburning group and control group according to the influence of intermittent cyclic tension. Cells in the afterburning group were treated by mechanical stimulation in a $5\% \text{CO}_2$ incubator(10% 0.5 Hz 8 h/d at 37°C) using Flexcell FX-5000TM cell strain loading system, and hMSCs in the control group were cultured in the same environment without mechanical stimulation. Cell proliferation was detected by CCK-8 method at day 1, 3, 6, 8 and 10 after addition of chondrogenic inducing agent. Cartilage changes were observed at the 14th day using Safranin O staining kit. Flow cytometry was performed to examine the cell apoptosis, and expression changes of the cartilage genes ACAN, COLII and SOX9 were detected by RT-PCR. **Results:** ICMT inhibited the proliferation of mesenchymal stem cells, and cells in the afterburning group were found to be obviously apoptotic at the 14th day, with lighter Safranin O staining. Inhibited chondrogenic gene expression was also found in the afterburning group. **Conclusion:** ICMT is able to inhibit the differentiation of human mesenchymal stem cells into cartilage.

【Key words】human mesenchymal stem cells; intermittent cyclic mechanical tension; cartilage differentiation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 细胞, 具有多向分化的能力和自我复制的特点, 研究是干细胞家族中重要组成成员之一, 属于多功能干 细胞, 证明 MSCs 在特定的环境下能够分化成骨、软骨、神

基金项目: 国家自然科学基金项目(81572185); 安徽省自然科学基金项目(1708085MH185); 安徽省自然科学基金青年项目(1708085QH205)

收稿日期: 2018-08-20

作者简介: 杨必敬(1993-), 男, 2017 级硕士研究生, (电话) 15955134771, (电子信箱) 15955134771@163.com;

徐宏光, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) xuhg@medmail.com.cn, 通信作者。

经、血管等不同组织的细胞^[1-2]。半月板的损伤可以破坏膝关节的稳定性并使其退变,利用间充质干细胞的治疗潜力可以恢复半月板的独特结构和功能,临床上也可以减轻患者的痛苦^[3-4]。一定的力学刺激在人的骨骼发育、骨质生长、骨折的损伤修复过程中起到了重要作用^[5],间歇性循环张力(intermittent cyclic mechanical tension, ICMT)可以重排软骨细胞的骨架引起细胞形态上的改变,但是短时间内给予适当的力学牵张可以调节钙化相关的基因表达从而维持软骨细胞表型和功能的稳定^[6-7]。骨性关节炎是骨科中的常见病,其主要原因就是软骨细胞合成和分解平衡失调,导致软骨不断减少,从而发生炎症反应。目前临床上缺乏有效的方法去修复软骨细胞的缺损。本实验主要研究在间歇性循环张力作用下,能否促进干细胞向软骨方向分化,进而为探索出有效治疗骨性关节炎的新方法提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 人间充质干细胞购自美国 ScienCell 公司。试剂及仪器: DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(Gibico, 美国); 成人软骨诱导液(赛业生物科技有限公司, 中国); CCK-8 试剂盒(翔博生物科技有限公司, 中国); 凋亡试剂盒(凯基生物技术公司, 中国); 番红 O 染色试剂盒(索莱宝生物科技有限公司, 中国); Trizol(Invitrogen, 美国); Nano-Drop2000(Thermo&Scientific, 美国); Real-time PCR 试剂盒(Takara, 日本); RT-PCR 仪(Roche LightCycler480, 德国); FX-5000 细胞应变加载系统、BioFlex™ 六孔加力板(美国 Flexcell 国际公司)。

1.2 方 法

1.2.1 培养人间充质干细胞 复苏原代人间充质干细胞,将其放入 37℃ 水浴锅快速融化,移入 15 mL 离心管并以 10 000 r/min 离心 5 min,去上清,然后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 1 mL 吹打混匀,接种到 10 cm 培养皿后放入培养箱内培养(37℃、5% CO₂) 3 d 换一次液,直到细胞融合至 80%~90% 时按 1:2 或 1:3 传代,取 P2 代细胞进行实验,待 P2 代细胞贴壁后加入成软骨诱导液,实验分为加力组(10% 伸长率、0.5 Hz、8 h/d) 和对照组(不加力相同环境下培养)进行细胞检测。

1.2.2 用 CCK-8 试剂检测细胞增殖 取两组细胞,弃上清,每孔加入含 100 μL CCK-8 的培养液 1 mL,放入培养箱孵育 2 h,之后吹打混匀(注意不能产生

气泡),每孔吸 100 μL 放入 96 孔板在酶联免疫检测仪上测量 OD 值,测量波长为 450 nm,每组设 4 个副孔,计算其平均 OD 值,绘制细胞增殖曲线。

1.2.3 用流式细胞术检测细胞凋亡 收集两组细胞,取 1×10⁵ 细胞用 500 μL Binding Buffer 重悬,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀,最后再加入 5 μL 碘化丙啶染色液混匀。室温、避光反应 15 min,在流式细胞仪下检测细胞染色情况,利用 Flow JO 软件分析细胞凋亡情况。

1.2.4 番红 O 染色检测成软骨情况 取两组细胞吸去培养液,用 PBS 洗 2 次,再用 4% 的多聚甲醛固定 5~6 min, PBS 洗 2 遍,加入番红 O 染色 5~6 min,吸除染液, PBS 洗涤,晾干后观察拍照。

1.2.5 RNA 的提取及 Real-time PCR 吸去六孔板中的培养液,用 PBS 洗两次,每孔加入 1 mL Trizol 冰上裂解 20 min,提取 RNA,用 Nano-Drop 2000 测定 RNA 浓度并达到实验要求纯度,按 20 μL 反转录体系反转成 cDNA 后进行 RT-PCR,每个样品均设 3 个副孔。反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s; 60℃ 退火延伸 25 s,扩增 50 个循环。PCR 反应引物如表 1, GAPDH 为内参。使用 Roche LightCycler480 软件分析结果,计算 2^{-ΔΔCt} 值。

表 1 实时聚合酶链反应引物序列表

引物	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
ACAN	F: GTGCCTATCAGGACAAGGTCT	167
	R: GATGCCTTTTACCACGACTTC	
COL II	F: TGGACGATCAGGCCGAAACC	244
	R: GCTGCGGATGCTCTCAATCT	
SOX-9	F: AGCGAAGCGACATCAAGAC	85
	R: CTGTAGCGATCTGTTGGGG	
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	197
	R: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同时点结果比较采用 *F* 检验; 两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CCK-8 检测细胞增殖结果 前期加力组与对照组的增殖水平大致相同,从第 6 天开始加力组抑制间充质干细胞的增殖,差异有统计学意义(*P* < 0.05) (表 2 图 1)。

表2 两组 CCK-8 检测细胞增殖结果比较

组别	1 d	3 d	6 d	8 d	10 d	F	P
对照组	1.00±0.43	1.99±0.45	4.28±0.41	21.05±0.79	15.91±0.49	1149.908	0
加力组	1.03±0.31	1.09±0.48	4.55±0.62	10.29±0.40	6.75±0.40	299.299	0

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡情况 细胞培养第 14 天,加力组细胞凋亡数(17.62±0.75)多于对照组(8.26±0.81) $t = 14.786, P < 0.01$,说明加力促进细胞凋亡(图2)。

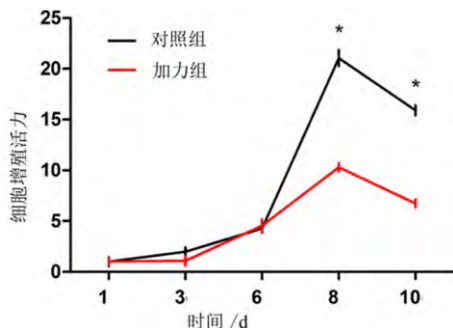


图1 加力对间充质干细胞增殖的影响

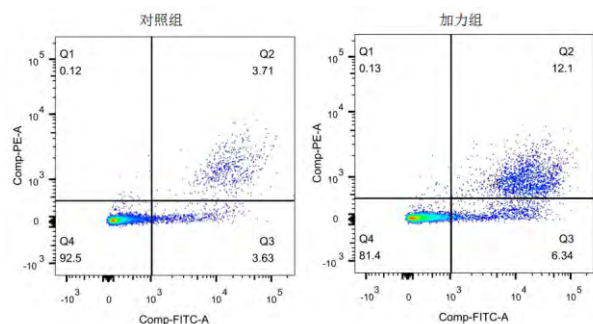


图2 流式细胞术检测细胞凋亡情况

2.3 番红 O 染色检测成软骨结果 细胞培养第 14

天,番红 O 染色加力组颜色浅于对照组(图3)。

2.4 Real-time PCR 检测软骨基因表达结果 第 14 天检测细胞软骨基因的表达水平,结果显示对照组软骨基因表达水平高于加力组,加力可以抑制 ACAN、COL II、SOX9 的表达,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 4。

表3 两组 Real-time PCR 检测软骨基因表达结果

组别	ACAN	SOX9	COL II
对照组	1.01±0.08	1.02±0.19	1.01±0.11
加力组	0.44±0.18	0.62±0.14	0.66±0.13
t	5.181	3.494	2.989
P	0.007	0.026	0.045

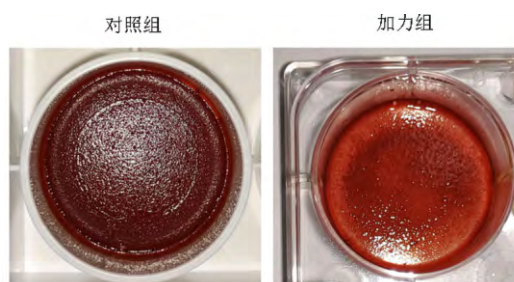
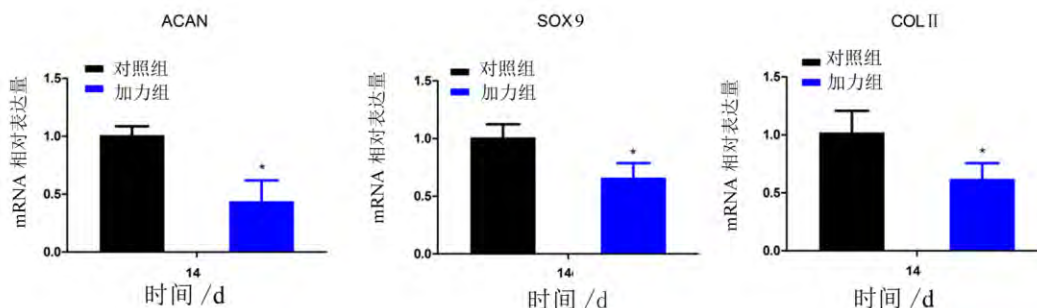


图3 对照组与加力组番红 O 染色深浅的比较



第 14 天加力组 ACAN、COL II、SOX9 基因的表达水平低于对照组,差异具有统计学意义(* $P < 0.05$)。

图4 加力对细胞软骨基因表达水平的影响

3 讨论

软骨细胞作为种子细胞存在来源不足、机体损伤及老化等多种问题,而间充质干细胞具有自我复制和多向分化的潜能^[8-10]。我们可以利用间充质干细胞这一特性,找到固定的条件使间充质干细胞向成软骨方向分化,解决软骨组织工程中种子细胞来

源问题。

机械牵张力是一种能够影响细胞功能和结构的外界刺激,不同种类的细胞具有明显的差异性,对相同的力学刺激所表达出的结果不同,同种类细胞对不同的力学刺激所产生的结果也不同^[11]。研究表明适当的力学刺激可以加速牙周韧带干细胞的增殖

和成骨分化,使产生破骨细胞和炎症因子的量达最低水平;过度的力学刺激则会导致相反的结果^[12]。还有研究发现在没有任何生物化学因子影响的条件下,3%左右的牵张力可以促进间充质干细胞向成骨方向分化,而10%的牵张力可以使其向平滑肌细胞分化^[13]。大部分的研究证明,力学刺激可以影响干细胞的增殖和成骨分化,但张力对人间充质干细胞成软骨分化影响很少有文献报道。本实验在10%的力学刺激作用下,通过检测间充质干细胞增殖、凋亡、体外成软骨染色和软骨基因的表达,证明了10%的力学刺激是抑制间充质干细胞向软骨分化的。当然本文的不足之处为只研究了10%的力学刺激,其他的力学强度以及力学频率还没有去验证。另外,我们之所以会选择第14天去检测软骨基因表达是因为番红O染色最少要两周才能染出软骨基质的颜色,我们想从同一时间点的软骨染色和软骨基因表达两个指标去验证力学刺激对软骨分化的影响。但是两周之前软骨基因的表达变化我们尚不清楚,所以加力后检测软骨基因表达的时间可能还需要调整。

目前软骨缺损和修复问题面临很大的挑战,本研究发发现间歇性循环张力作用下影响了干细胞成软骨分化,这为临床上治疗软骨再生问题提供了新思路,同时也为今后骨关节炎的治疗奠定了实验和理论基础。

【参考文献】

[1] ALEXANIAN AR. An efficient method for generation of neural-like cells from adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Regen Med* 2010, 5(6): 891-900.
 [2] KISIEL AH, MCDUFFEE LA, MASAOU D, *et al.* Isolation, characterization and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle and periosteum[J]. *Am J Vet Res* 2012, 73(8): 1305-1317.
 [3] RANGANATH SH, LEVY O, INAMDAR MS, *et al.* Harnessing the

mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease[J]. *Cell stem cell* 2012, 10(3): 244-258.
 [4] YU H, ADESIDA AB, JOMHA NM. Meniscus repair using mesenchymal stem cells—a comprehensive review[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 1-10.
 [5] LUO W, XIONG W, ZHOU J, *et al.* Lamina shear stress delivers cell cycle arrest and anti-apoptosis to mesenchymal stem cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin* 2011, 43(3): 210-216.
 [6] JI ML, LU J, SHI PL, *et al.* Dysregulated miR-98 contributes to extracellular matrix degradation by targeting il-6/stat3 signaling pathway in human intervertebral disc degeneration[J]. *J Bone Miner Res* 2016, 31(4): 900-909.
 [7] SAY YH. The association of insertions/deletions (INDELS) and variable number tandem repeats (VNTRs) with obesity and its related traits and complications[J]. *J Physiol Anthropol*, 2017, 36(1): 25.
 [8] LOHBERGER B, PAYER M, RINNER B, *et al.* Human intraoral harvested mesenchymal stem cells: characterization, multilineage differentiation analysis and 3-dimensional migration of natural bone mineral and tricalcium phosphate scaffolds[J]. *J Oral Maxillofac Surg* 2012, 70(10): 2309-2315.
 [9] PAPADIMITRIOU N, LI S, BARRETO HENRIKSSON H. Iron sucrose-labeled human mesenchymal stem cells: in vitro multilineage capability and in vivo traceability in a lapine xenotransplantation model[J]. *Stem Cells Dev* 2015, 24(20): 2403-2412.
 [10] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
 [11] XU B, SONG G, JU Y, *et al.* RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Physiol* 2012, 227(6): 2722-2729.
 [12] LIU J, LI Q, LIU S, *et al.* Periodontal ligament stem cells in the periodontitis microenvironment are sensitive to static mechanical strain[J]. *Stem Cells Int* 2017, 2017(3): 1-13.
 [13] DELAINE-SMITH RM, MACNEIL S, REILLY GC. Matrix production and collagen structure are enhanced in two types of osteogenic progenitor cells by a simple fluid shear stress stimulus[J]. *Eur Cell Mater* 2012, 24(4): 162-174.