

[文章编号] 1000-4718(2006)08-1581-05

## 成年比格犬骨髓间质干细胞体外软骨方向分化的实验研究\*

田 军<sup>1,2</sup>, 王跃建<sup>2</sup>, 柯 晖<sup>3</sup>, 苏振忠<sup>1</sup>, 余伟华<sup>3</sup>, 项 鹏<sup>3</sup>

(中山大学<sup>1</sup>附属第一医院临床医学博士后工作站,<sup>3</sup>干细胞与组织工程研究中心, 广东 广州 510080;

<sup>2</sup>广东省佛山市第一人民医院, 广东 佛山 528000)

[摘要] 目的: 体外诱导成年比格犬骨髓间质干细胞(BMSCs)定向分化为软骨细胞, 探讨体外诱导成软骨的方法和条件。方法: 比格犬股骨取骨髓 10 mL, 体外行原代和传代培养扩增, 加入转化生长因子(TGF- $\beta_1$ ), 以高密度细胞团块培养, 诱导 BMSCs 分化为软骨细胞。甲苯胺蓝染色检测软骨基质的分泌, 免疫组织化学染色检测软骨特异性 II 型胶原表达。结果: 诱导的软骨样组织甲苯胺蓝染色阳性; II 型胶原免疫组织化学检测阳性。结论: 应用含 TGF- $\beta_1$  的诱导液在体外可以诱导比格犬 BMSC 分化为软骨细胞, 诱导的软骨细胞可作为软骨组织工程较理想的种子细胞。

[关键词] 骨髓间质干细胞; 软骨细胞; 转化生长因子  $\beta$ ; 比格犬

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

### Induction of stem cells from adult Beagle canine bone marrow into chondrocytes *in vitro*

TIAN Jun<sup>1,2</sup>, WANG Yue-jian<sup>2</sup>, KE Hui<sup>3</sup>, SU Zhen-zhong<sup>1</sup>, YU Wei-hua<sup>3</sup>, XIANG Peng<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Clinical Postdoctoral Workstation, Guangzhou 510080, China;

<sup>2</sup>The First People's Hospital of Foshan City, Foshan 528000, China; <sup>3</sup>Centre for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[ABSTRACT] AIM: To explore the methods of the differentiation from adult Beagle canine bone marrow stem cells (BMSCs) into chondrocytes *in vitro* and determine the factors involved in the differentiation process. METHODS: About 10 mL BMSCs were aspirated from canine femoral bone, primarily cultured and subcultured *in vitro*. TGF- $\beta_1$  was added into the culture medium. BMSCs were cultured and expanded in the medium until they reached the required quantity. BMSCs were induced to differentiate into chondrocytes at high cell density. Matrix of cartilage cells was detected by toluidine blue stain, and cartilage specific collagen II was detected by immunohistochemistry. RESULTS: The structure of cellular cartilage form BMSCs was uniformly positive of toluidine blue staining. Immunohistochemical staining was positive for the collagen II. CONCLUSION: Application of TGF- $\beta_1$  may induce canine bone marrow stem cells into chondrocytes *in vitro*, which can be used as seeding cells in cartilage tissue engineering.

[KEY WORDS] Bone marrow stem cells; Chondrocytes; Transforming growth factor beta; Beagle canine

因肿瘤、外伤、感染所致的广泛气管病变而需手术长段袖状切除者, 在临床工作中时常可以遇到, 100 多年来许多学者尝试应用同种异体移植、自体组织移植以及人工材料替代物等方法, 效果均不理想。到目前为止尚无可靠的、理想的长段气管重建的方法<sup>[1]</sup>。喉气管重建中最难解决的是软骨支架的重建

问题, 组织工程的出现为气管重建外科开辟了新途径。

作为组织工程的种子细胞之一, 干细胞以其自身的优点, 在生命科学的基础应用和临床应用起着越来越重要的作用。近年来, 骨髓间质干细胞 BMSCs (bone marrow stem cells) 因具有高度自我更新能力、多向分化潜能和取材方便等优点而备受关

[收稿日期] 2006-03-10 [修回日期] 2006-04-07

\* [基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (No. 5301073); 佛山市科技攻关项目 (No. 200508003)

E-mail: tjunmail@126.com

注,逐渐成为细胞治疗与组织工程的理想种子细胞。特别是骨髓间质干细胞可以在合适的诱导条件下分化成为软骨细胞,为解决软骨支架的重建问题提供了新的思路和方法<sup>[2]</sup>。

对于目前尚处于动物实验阶段的长段气管重建,建立合适的动物模型十分必要,比格犬作为标准实验动物一直以来是喉、气管重建外科研究的最佳动物模型,具有种系纯、喉、气管解剖结构和组织结构与人的极为相近的优点,对于骨髓间质干细胞的研究结果便于比较。但是,目前关于比格犬 BMSCs 的研究还很少,比格犬 BMSCs 如何在体外条件下分化为软骨细胞? 本实验拟对比格犬骨髓间质干细胞体外定向软骨方向分化进行研究,以期获得组织工程气管构建中较理想的种子细胞并探讨体外诱导比格犬骨髓间质干细胞定向分化为软骨的方法和条件。

## 材 料 和 方 法

### 1 一般材料

1 岁龄健康、纯种试验用比格犬,购自广东省肇庆市实验动物科技研究中心,体重 15 kg。

### 2 主要试剂

L - DMEM 培养基,胎牛血清(FBS),淋巴细胞分离液 [Percoll, (1 063 ± 1) g/L], 胰蛋白酶 (Hyclone); Antibiotic - antimycotic (Gibco - BRL); 维生素 C, 地塞米松, β - 甘油磷酸钠, 3 - 异丁基 - 1 - 甲基黄嘌呤 (IBMX); 牛胰岛素, 丙酮酸钠, 转铁蛋白 (Sigma); TGF - β<sub>1</sub> (Peprotech); 碱性磷酸酶染色剂 (BCIP/NBT, Maxim Biotech Inc USA); 兔抗人 II 型胶原单克隆抗体 (Rockland); II 抗 Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti - Rabbit IgG R - phycoerythrin (R - PE) conjugate (Southern Biotech)。

### 3 方法

#### 3.1 骨髓间质干细胞(BMSCs)的分离、培养、扩增及成脂、成骨鉴定

① BMSCs 来源 选取正常 1 岁龄纯种实验用比格犬, 15 kg, 取氯胺酮 100 mg 肌肉注射麻醉, 无菌条件下用骨穿针在股骨大转子处进针, 抽取 10 mL 骨髓, 立即放入肝素钠防凝无菌管中, 轻柔地摇匀, 待用。

② BMSCs 的分离和体外培养 骨髓样品用 PBS 以 1:1 的比例稀释, 把稀释后的样品小心地铺到密度为 1 063 g/L 的 Percoll 密度梯度离心液的分层液界面上, 以 2 000 r/min 离心 20 min; 小心吸取云雾状单个核细胞层, 用不含血清的低糖 DMEM 培养液洗涤 2 次 (1 000 r/min, 5 min); 离心后沉积的细胞团用完全

培养液重悬 (含低糖 DMEM、10% 胎牛血清、antibiotic - antimycotic), 移至 T75 培养瓶, 加至 10 mL 完全培养液, 放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。孵育 72 h 后更换完全培养液, 去除红细胞及其它未贴壁细胞。以后每 3 - 4 d 更换 1 次培养液。

③ BMSCs 体外扩增 9 - 10 d 待原代细胞 (P<sub>0</sub>) 生长融合约 70% - 80% 后, 将旧培养液吸出, PBS 洗涤 2 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合消化液, 消化收集细胞悬液, 离心, 以 (1 - 2) × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> 密度种植。

④ 体外定向诱导 BMSCs 分化为成骨细胞<sup>[3]</sup> 取 6 孔板里长势良好, 细胞融合达 80% 的 P<sub>5</sub> BMSCs, 加入成骨细胞诱导液 (OS) (含 10<sup>-7</sup> mol/L 地塞米松、10 mmol/L β - 甘油磷酸钠、50 mg/L vitamin C) 2 mL; 对照组每孔加入含 10% HS 的 L - DMEM 培养液, 置培养箱中。隔天换液 1 次, 镜下观察细胞形态的变化和生长情况。

⑤ 成骨细胞鉴定 采用碱性磷酸酶 (AP) 染色与钙结节茜素红 S 法染色<sup>[3]</sup>。

⑥ 体外定向诱导 BMSCs 分化成脂肪细胞<sup>[4]</sup> 分别将传至第 1、5 代的 β MSCS 按 2 × 10<sup>8</sup>/L 密度接种于 6 孔板。细胞达到完全融合 1 - 2 d 后, 加入含 1 μmol/L 的地塞米松、0.5 mmol/L 的 3 - 异丁基 - 1 - 甲基黄嘌呤、10 mg/L 的牛胰岛素、100 mmol/L 的消炎痛、10% FCS 的 H - DMEM 诱导 3 d; 再用含 10 mg/L 的牛胰岛素、10% FCS 的 H - DMEM 处理 1 d。如此循环 3 次后, 用含 10 mg/L 的牛胰岛素、10% FCS 的 H - DMEM 处理 7 d, 每隔 3 - 4 d 换液 1 次; 对照组加入含 10 mg/L 的牛胰岛素、10% FCS 的 H - DMEM, 每隔 3 - 4 d 换液 1 次。镜下观察细胞形态的变化和生长情况。脂肪细胞的鉴定采用油红 O 染色。

3.2 体外定向诱导 BMSCs 分化成软骨细胞 取生长状态良好的 BMSCs, 消化进行细胞计数。取 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞于塑料离心管中, 500 × g 离心 5 min。小心吸去上清, 加入 2 mL 成软骨细胞诱导液 (CHS) 无血清特定培养液进行诱导培养 (含 6.25 mg/L 胰岛素、37.5 mg/L VitC、6.25 mg/L 转铁蛋白 (transferin)、1 mmol/L 丙酮高糖酸、10<sup>-7</sup> mol/L 地塞米松 (dexamethasone)、10 μg/L TGF - β<sub>1</sub>、1.25 mg/L BSA (bovine serum albumin), 每 2 d 更换 1 次诱导液。对照组加入完全培养液进行培养, 每 2 d 更换 1 次培养液, 诱导 21 d 进行结果观察。

#### 3.3 软骨团块的鉴定

① 甲苯胺蓝染色 取出管底的细胞团块, 石蜡切片

(厚度为 5  $\mu\text{m}$ ) 进行甲苯胺蓝染色, 显微镜下观察染色结果, 比较实验组和对照组染色情况。

② II 型胶原免疫荧光染色 细胞团块 4% 多聚甲醛固定 30 min, 冰冻切片(厚度为 5  $\mu\text{m}$ ), 用 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 遍, 每次 5 min, 室温下用正常山羊血清封闭液封闭 1 h, 加入用 PBS 稀释的 I 抗(1:100); 室温下孵育 1-2 h; 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 遍, 每次 5 min。加入 II 抗 Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG R-phycoerythrin(R-PE) conjugate(1:1 000), 40-60 min, (暗盒中)。荧光显微镜下观察染色结果, 比较实验组和对照组染色情况。同时做大鼠关节成熟软骨组织的 II 型胶原免疫组化荧光染色, 作为阳性对照。

## 结 果

### 1 BMSCs 的原代培养

在用含 10% FBS 的 L-DMEM 培养液原代培养早期, 培养体系中以悬浮、折光性强的圆形细胞为主。24 h 后部分细胞完成贴附, 48 h 后开始分裂增殖, 先形成散在分布的细胞小团簇, 大多呈现成纤维细胞的梭形外观, 细胞接种 72 h 后全量换液; 6-7 d 后, 贴壁细胞数目明显增多、胞体增大, 呈成纤维样细胞长梭形外观, 贴壁细胞多聚集成群, 以克隆样方式生长(图 1), 9-10 d 后, 多个克隆可以合成均质的梭形细胞单层, 细胞排列有方向性, 呈平行、漩涡状、辐射、网格状排列。

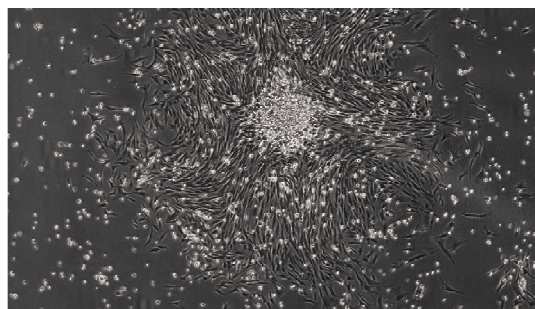


Fig 1 BMSCs P<sub>0</sub> at eight days (x40).

图 1 BMSCs 原代第 8 d

### 2 BMSCs 的体外扩增

原代培养的细胞传代后生长周期一般为 3-4 d, 消化传代后第 1-3 d 进入生长滞留期, 第 4 d 进入对数生长期, 之后到平台期。P<sub>1</sub>-P<sub>5</sub> 的细胞(图 2) 仍可呈高度均质的梭形细胞群, 平行或网格状方式生长。

### 3 成骨细胞鉴定

实验组的 BMSCs 加入 OS 诱导液后, 第 2 d 即可见部分细胞由长梭形逐渐变为立方形, 并进而转变

为多角形, 体积增大。随着培养时间的延长, 这种多角形细胞逐渐增多。细胞持续增殖, 开始呈多层重叠生长, 逐渐聚集形成多个散在的岛状细胞结构并被分泌的基质所包埋, 14 d 左右出现钙结节, 随着培养时间的延长, 可观察到较大的细胞结节, 有明显的钙沉积。对照组细胞增殖良好, 形态不变; 随着培养时间延长, 呈克隆生长。细胞融合, 但不见致密的岛状细胞结构和钙化结节。



Fig 2 BMSCs (P<sub>1</sub>, x40).

图 2 BMSCs(第 1 代)

在成骨细胞诱导培养的第 14 d 用茜素红可检测到钙沉积的情况, 实验组镜下可见散在大量橘红色的钙结节, 茜素红与钙盐形成的橘红色的复合物(图 3), 对照组结果为阴性。在诱导培养的第 7 d, 做 AP 染色, 可观察到部分细胞, 特别在细胞密集区碱性磷酸酶呈阳性反应, 诱导第 14 d, AP 反应为强阳性, 细胞密集区出现紫黑色颗粒(图 4), 胞浆内有紫黑色的颗粒沉淀。对照组 AP 染色呈阴性或弱阳性反应。

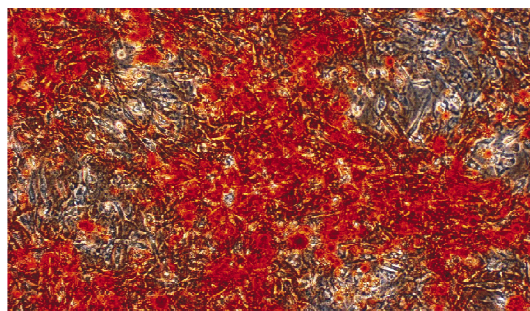


Fig 3 Alizarin bordeaux staining for osteoblasts (x100).

图 3 成骨茜素红染色

### 4 脂肪细胞鉴定

脂肪诱导液加入后 48 h, 细胞中有小脂滴出现主要集中于细胞核周围, 随着细胞诱导时间的延长小脂滴逐渐聚集成大的脂泡, 细胞逐渐增大, 由原来的梭形变为圆形或多角形。对照组诱导 3 周后, 无变化, 细胞内没有脂滴出现。诱导培养 20 d 后, 10% 中性甲醛固定, 油红 O 染色, 镜下观察, 脂滴为橙红色, (图 5), 脂肪细胞中含大小不等的脂肪滴。对照组则无脂滴出现。

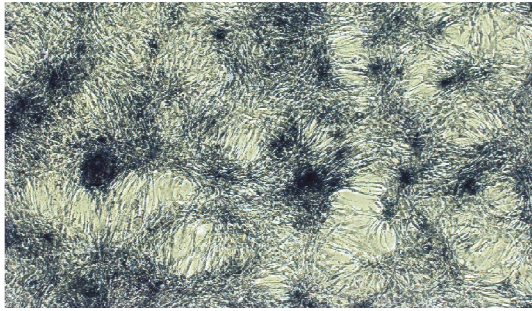


Fig 4 Osteoblast AP staining ( ×40).  
图 4 成骨碱性磷酸酶染色

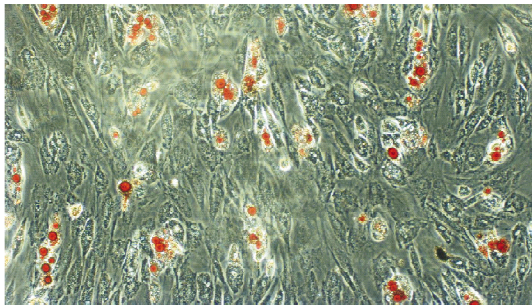


Fig 5 Oil red staining for adipocyte( ×100).  
图 5 成脂肪油红染色

### 5 软骨分化的鉴定

团块培养的实验组细胞在诱导过程中,从贴附于离心管底部的扁平细胞团逐渐变成细胞球。可以观察到细胞球逐渐变大,变圆,表面变得光滑。

**5.1 甲苯胺蓝染色** 对照组切片细胞核被染成蓝色,细胞间只见淡蓝的浅色背景,细胞的排列仍然具有一定的方向性,细胞与细胞之间距离相近,未见明显的细胞距离增大(图6)。实验组切片细胞核也被染成蓝色,但部分区域细胞与细胞之间距离明显增大,胞间充满大量被染成紫红色的物质(图7),代表了由 BMSCs 分化成的软骨细胞产生的蛋白多糖经甲苯胺蓝异染而呈现的颜色。

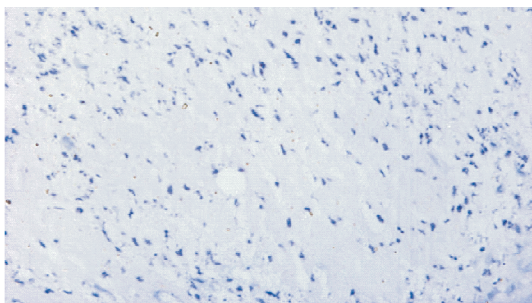


Fig 6 Negative in control for toluidine blue staining ( ×400).  
图 6 甲苯胺蓝染色阴性

**5.2 II型胶原免疫荧光染色** 可见实验组切片呈现弥漫的红色荧光,而对对照组未见任何阳性荧光(图8)。实验组与成熟软骨组织阳性对照组(图9)得到

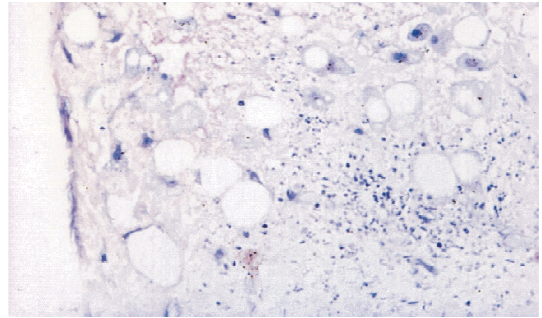


Fig 7 Positive reaction for toluidine blue staining, prunosus indicate containing proteoglycan( ×400).

图 7 甲苯胺蓝染色阳性,紫红色间质为蛋白多糖异染区

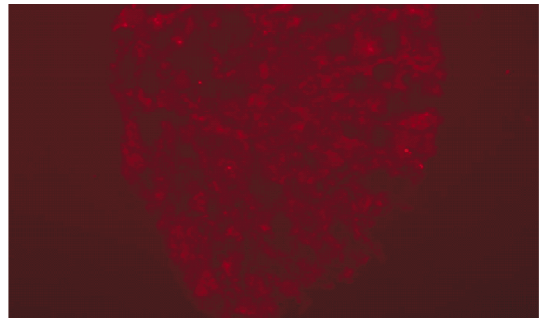


Fig 8 Cell pellet (experiment group) : red fluorescence indicate type II collagen( ×400).

图 8 团块培养实验组 II 型胶原显示红色荧光

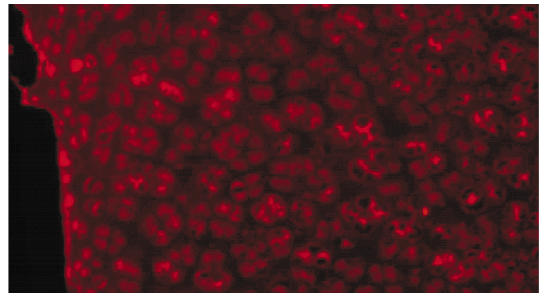


Fig 9 Immunofluorescence in cartilage as positive control ( ×400).

图 9 软骨组织阳性对照的免疫荧光

相似的荧光观察结果。

### 讨 论

对于组织工程气管重建已经获得了可喜的进展, Vacanti 等<sup>[5]</sup>用软骨细胞体外扩增培养后,制成柱状软骨来重建裸鼠的气管缺损。Kojima 等<sup>[6]</sup>取自体软骨细胞和成纤维细胞制成螺旋形气管软骨的“气管”。Kojima 等<sup>[7]</sup>又用软骨细胞和鼻上皮细胞构建成功管腔内覆有纤毛柱状上皮的“气管”,探讨了构建复合气管组织的可能性。但是,以上组织工程方法构建长段气管面临着种子细胞来源不足的重要问题。Kojima 等<sup>[8]</sup>在进行了大量的组织工程气管重建研究后认为需要进一步研究骨髓间质干细胞以得到

实际临床应用的组织工程气管。

种子细胞是组织工程的基本要素之一,来源于自体软骨细胞虽然没有免疫反应,但是软骨组织来源有限,增生能力有限<sup>[9]</sup>。来源于自体的骨髓间质干细胞(BMSCs)具有来源不受年龄等因素限制,取材方便,易于分离扩增,大量传代培养后仍具有成软骨能力,没有免疫排斥反应等优点,决定了它可以成为组织工程软骨种子细胞的理想来源。这对耳鼻咽喉科领域的喉、气管软骨损伤的修复与功能重建具有十分重要的意义。

近年来,开展了大量的用 BMSCs 修复关节软骨缺损的基础和临床研究<sup>[10]</sup>,但是,应用 BMSCs 重建喉、气管是整块软骨环的重建,干细胞缺乏与周围软骨组织细胞之间的相互作用,以及关节腔的独特密闭环境,目前尚未见有体内应用 BMSCs 移植重建喉、气管的报道。所以完善 BMSCs 体外定向软骨分化的研究具有重要意义。

我们参考人骨髓间质干细胞向软骨方向诱导分化的方案<sup>[11]</sup>对比格犬的骨髓间质干细胞进行诱导分化。在体外模拟软骨的发生过程,将 BMSCs 形成高密度细胞聚集体(这与胚胎体内软骨发育的情形类似),在含有 TGF- $\beta_1$  的培养液中进行诱导分化,得到了软骨细胞团,并经过甲苯胺蓝染色和 II 型胶原的免疫荧光染色证实。蛋白多糖是软骨细胞特异分泌的基质成分,通过甲苯胺蓝染色软骨细胞球,软骨细胞产生的蛋白多糖经甲苯胺蓝异染后会呈现紫红色,可以判断 BMSCs 分化为软骨细胞。II 型胶原是软骨细胞合成的特异性成分。通过免疫组化的方法观测细胞 II 型胶原的表达情况,在荧光显微镜下观测到阳性荧光,说明 BMSCs 经诱导分化为软骨细胞,并且这种分化的软骨细胞产生了功能性的细胞外基质成分。蔡道章等<sup>[12]</sup>报道进行犬(未注明种类)BMSCs 体外定向诱导软骨细胞分化,与本实验不同,其诱导分化体系是序贯应用碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和 TGF- $\beta_1$ ,其中 TGF- $\beta_1$  的浓度为 1 mg/L,是本实验应用浓度(10  $\mu$ g/L)的 100 倍。TGF- $\beta_1$  价格昂贵,如此高的浓度在一定程度上会限制它的进一步应用。

TGF- $\beta_1$  诱导 BMSCs 分化的机制还不十分明确,但实验表明它在趋化性、细胞增殖、细胞分化中起着重要作用。TGF- $\beta$  是转化生长因子超家族中的成员,它介导的生物学效应十分广泛,对细胞分化、细胞基质形成等均有作用。在胚胎软骨中含有较高浓度 TGF- $\beta$ ,提示可能与软骨生成有直接的关系。目前,在人 BMSCs 定向软骨方向分化的诱导方

案中多数应用 10  $\mu$ g/L<sup>[11]</sup>,但是未见成年比格犬的 BMSCs 诱导方案的报道,本研究也应用 10  $\mu$ g/L 的 TGF- $\beta$ ,与人的诱导方案相似,取得与人 BMSCs 相似的结果。

BMSCs 能够定向软骨细胞分化显示它在临床治疗喉、气管缺损方面具有广阔的临床应用前景。本次实验探索的诱导 BMSCs 分化为软骨细胞的条件,为利用比格犬 BMSCs 建立动物模型,以及进行软骨缺损的治疗都提供了实验依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review[J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73(6): 1995-2004.
- [2] Spagnoli A, Longobardi L, O' Rear L. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells[J]. *Endocr Dev*, 2005, 9(1): 17-30.
- [3] 张丽蓉,夏文杰,项 鹏,等. 体外定向诱导人骨髓间质干细胞分化为成骨细胞的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(7): 745-748.
- [4] 项 鹏,张丽蓉,夏文杰,等. 成人骨髓间质干细胞定向诱导为脂肪细胞的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(7): 589-601.
- [5] Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, et al. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage[J]. *J Pediatr Surg*, 1994, 29(2): 201-205.
- [6] Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, et al. Autologous tissue-engineered trachea with sheep nasal chondrocytes[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123(6): 1177-1184.
- [7] Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, et al. A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells[J]. *Faseb J*, 2003, 17(8): 823-828.
- [8] Kojima K, Vacanti CA. Generation of a tissue-engineered tracheal equivalent[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004, 39(3): 257-262.
- [9] Saadeh PB, Brent B, Mehrara BJ, et al. Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development[J]. *Ann Plast Surg*, 1999, 42(5): 509-513.
- [10] Johnstone B, Yoo J. Mesenchymal cell transfer for articular cartilage repair[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1(6): 915-921.
- [11] Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1998, 80(12): 1745-1757.
- [12] 蔡道章,王其友,徐义春,等. 犬骨髓基质干细胞体外定向分化为软骨细胞[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2004, 6(7): 763-766.