

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.06.0776

骨关节炎关节液促进滑膜间充质干细胞软骨分化

崔岩¹, 张治宇^{1*}, 程战², 曾雪艳³, 倪胜辉¹

1. 中国医科大学附属第四医院骨科, 沈阳 110032

2. 解放军 93277 部队卫生队, 沈阳 110032

3. 解放军 463 医院血液净化中心, 沈阳 110042

[摘要] **目的** 观察骨关节炎(OA)关节液对滑膜间充质干细胞(SDSCs)软骨分化能力的影响。**方法** 用 OA 患者手术切除的滑膜组织标本分离培养 SDSCs 并诱导成软骨分化。将 OA 患者的关节液加入诱导后的 SDSCs 培养液中, 模拟体内的 OA 关节环境继续培养(实验组), 以不加 OA 关节液的 SDSCs 作为对照组。测量两组 SDSCs 形成的软骨小球的直径, 采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测成软骨相关标志物 COL II、Aggrecan、SOX9 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** OA 关节液处理 16 d 后, 实验组软骨小球直径大于对照组 ($P < 0.05$), COL II、Aggrecan、SOX9 mRNA 和蛋白的表达均高于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** OA 关节液能够促进 SDSCs 软骨分化。

[关键词] 骨关节炎; 关节液; 间充质干细胞; 软骨分化

[中图分类号] R 684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)06-0776-04

Synovial fluid of osteoarthritis promotes the differentiation of synovial mesenchymal stem cells

CUI Yan¹, ZHANG Zhi-yu^{1*}, CHENG Zhan², ZENG Xue-yan³, NI Sheng-hui¹

1. Department of Orthopedics, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning, China

2. Medical Team, No. 93277 Troop of PLA, Shenyang 110032, Liaoning, China

3. Blood Purification Center, No. 463 Hospital of PLA, Shenyang 110042, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of synovial fluid of osteoarthritis (OA) on the differentiation of synovium-derived stem cells (SDSCs). **Methods** The SDSCs from the synovium of OA patients were identified and were induced to cartilage differentiation. The SDSCs were cultured with OA joint fluid (experimental group) or without OA joint fluid (control group). The diameter of the cartilage was measured. The mRNA and protein expressions of COL II, Aggrecan and SOX9 were determined by RT-PCR and Western blotting analysis. **Results** The diameter of the cartilage in the experimental group was greater than that in the control 16 days after cultured with OA joint fluid ($P < 0.05$). And the levels of COL II, Aggrecan and SOX9 mRNA and protein in the experimental group was significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$).

Conclusion The OA joint fluid can promote differentiation of SDSCs.

[Key words] osteoarthritis; synovial fluid; mesenchymal stem cells; cartilage differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(6): 776-779]

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是临床常见的一种退行性疾病,它不仅影响患者的关节功能及生活质量,也严重影响整个社会健康水平^[1-2]。关节软骨退变和软骨缺损为 OA 的主要病理改变,在软骨缺损区重建透明软骨、实现关节软骨的功能是治疗该疾病的难点^[3]。用组织工程的方法可在缺损区形成真正的透明软骨,实现关节软骨功能,其中将滑膜间充质干细胞(synovium-derived stem cells, SDSCs)

作为种子细胞来修复软骨缺损是目前研究的主流方向^[4-7]。该方法首先在体外培养 SDSCs 并进行软骨诱导分化,然后植入 OA 关节的软骨缺损区,诱导分化后的细胞将会受到周围关节液的影响。目前研究证明,急性膝关节损伤的关节液可促进软骨形成,而慢性损伤的关节液对软骨形成起抑制作用^[8]。OA 是关节表面退行性疾病,关节液中含有多种炎症介质和细胞因子。本研究采用体外实验,将 OA 关节

[收稿日期] 2016-02-12 **[接受日期]** 2016-05-17

[作者简介] 崔岩,博士,讲师、主治医师。E-mail: cuiyan_2008@sina.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 024-62043459, E-mail: zhangzycmu4@sina.com

液加入诱导后 SDSCs 的培养液中,模拟体内的 OA 关节环境,观察 OA 关节液对 SDSCs 的软骨分化能力的影响,进一步验证 SDSCs 作为修复 OA 关节软骨缺损的种子细胞的可能性。

1 材料和方法

1.1 SDSCs 的分离培养 选取因膝关节 OA IV 期行膝关节置换的病例 12 例,其中男 4 例,女 8 例,平均年龄(64.4±5.1)岁。术前向患者交代实验目的,所有入选患者均签署知情同意书。保存手术中切除的滑膜组织标本,并抽取关节液备用。将标本置入加有 PBS 的培养皿中,剪除脂肪和结缔组织,分离出滑膜组织,用 PBS 冲洗 3 次。用小组织剪将滑膜片剪成 1~2 mm 大小的小碎块后移入直径为 35 mm 的培养皿中,加入 I 型胶原酶(0.4 g/100 mL, Biosharp)4 mL,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中消化 4 h。将组织消化液经 120 目尼龙网(70 μm)过滤,用移液管将过滤液移入离心管中,560×g 离心 10 min 后弃去上清液。获得的细胞用 PBS 重悬,560×g 离心 10 min,重复 3 次,弃去含胶原酶的上清液。使用含 10%胎牛血清(FBS, Hyclone)的 DMEM 培养液培养细胞,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h,弃去未贴壁细胞,贴壁细胞即为原代 SDSCs。继续培养约 7 d,用 0.05%胰蛋白酶-0.02%EDTA 消化后进行传代培养。

1.2 SDSCs 表面标记物鉴定 取培养后第 4 代 SDSCs,弃去原有培养液,用 PBS 漂洗 2 次,加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶。镜下观察,当细胞稍微变圆时,加入含血清培养液终止反应,离心收集细胞;加入固定液,重悬细胞,摇床摇动 30 min,离心收集细胞,PBS 漂洗 2 次,去除多余固定液;最后用 PBS 重悬细胞,使细胞密度达到 1×10⁷/mL。流式管中加入带有 FITC 或 PE 标记的 CD44、CD45、CD90、CD105 抗体(均购自 eBioscience),冰上孵育 30 min,离心收集细胞,小心吸尽上清,PBS 漂洗 2 次。用 1%多聚甲醛 500 μL 重悬细胞,上流式细胞仪检测。

1.3 成软骨诱导 配制诱导培养液:高糖 DMEM 培养液(Gibco)+100 mg/mL丙酮酸钠+40 mg/mL 脯氨酸+50 mg/mL 抗坏血酸+100 mmol/L 地塞米松+10 ng/mL 转化生长因子 β₃ (TGF-β₃) + 1 mg/mL 牛血清白蛋白+10% FBS。选择生长状态良好的第 4 代 SDSCs,PBS 清洗 2 次,加入 0.25% 的胰蛋白酶消化,室温消化 1 min 左右;加入

DMEM 完全培养液终止反应,收集细胞混合液,560×g 离心 3 min。离心后去上清,加入 1 mL 的 DMEM 完全培养液,重悬细胞,制成细胞悬液,并进行计数。以 8×10⁵ 个细胞/管将细胞接种至 15 mL 离心管中,672×g 离心 3 min,去上清,加入成软骨诱导液 5 mL。同时再以 1×10⁵ 个细胞每孔将细胞接种至 24 孔板中,培养诱导,待细胞贴壁后(此时细胞密度达 70%),加入成软骨诱导液 1 mL,每 3 d 换液 1 次,诱导 21 d。将成软骨诱导分化 21 d 所得组织经 4%甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,切片厚度 4 μm,进行阿利辛兰染色和番红 O 染色,显微镜下观察。

1.4 OA 关节液处理及分组 第 4 代 SDSCs 经成软骨诱导分化 21 d 后,分为实验组和对照组。将实验组中 5%的培养液更换为 OA 关节液,每 3 d 换液 1 次,处理 16 d;对照组不更换含 OA 关节液的培养液,其余同实验组。

1.5 软骨小球直径测量 测量两组细胞团培养形成的软骨小球的直径和最小直径,取其平均值作为软骨小球直径。

1.6 成软骨相关基因表达检测 采用实时定量 PCR 检测两组成软骨相关基因 COL II、Aggrecan、SOX9 mRNA 的表达。提取细胞总 RNA,用 SuperScript™ 试剂盒(Invitrogen)合成 cDNA。引物序列 COL II: F 5'-CAA GAA CAG CAT TGC CTA TCT G-3', R 5'-CCA TCC TTC AGG GCA GTG TA-3'; SOX9: F 5'-TAA AGG CAA CTC GTA CCC AAA T-3', R 5'-GTC CAG TTT CTC GTT GAT TTC G-3'; Aggrecan: F 5'-CAC CTA CAA ACG CAG ACT ACA GA-3', R 5'-AAA GCG ACA AGA AGA GGA CAC C-3'; βactin: F 5'-CTT AGT TGC GTT ACA CCC TTT CTT G-3', R 5'-CTG TCA CCT TCA CCG TTC CAG TTT-3'。实时定量 PCR 反应体系:SYBR Green PCR Master Mix 21 μL,上游引物和下游引物各 1 μL,cDNA 模板 2 μL。利用 Exicycler™ 96 荧光定量仪(韩国 BIONEER 公司)进行荧光定量分析。

1.7 关节软骨标志性蛋白检测 采用蛋白质印迹法检测关节软骨标志性蛋白 COL II、Aggrecan、SOX9 蛋白的表达。用 NP-40 裂解液(碧云天生物技术研究所)裂解细胞,提取蛋白质,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所)定量。行 SDS-PAGE,转膜,脱脂奶粉封闭。加入一抗

(COL II、Aggrecan 抗体购自 Santa Cruz, SOX9 抗体购自 Abcam, β -actin 抗体购自康成生物工程有限公司)孵育,加入二抗孵育。ECL 化学发光染色。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件对各组数据进行统计学分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两样本均数比较的 t 检验比较两组之间的差异,检验水准 (α)为 0.05。

2 结果

2.1 获得的 SDSCs 具备成软骨分化能力 采用流式细胞术鉴定第 4 代 SDSCs 的相关表面标记物 CD44、CD45、CD90、CD105,结果显示 CD45 阴性, CD44、CD90、CD105 阳性,与 SDSCs 的特点相符(图 1)。经成软骨诱导后,细胞团逐渐变大,形成透明样软骨小球,阿利辛兰染色可见细胞外基质中的蛋白聚糖被染成深蓝色(图 2A),番红 O 染色显示细胞外基质中的蛋白聚糖被染成红色(图 2B),表明本研究分离培养的 SDSCs 具备成软骨分化能力。

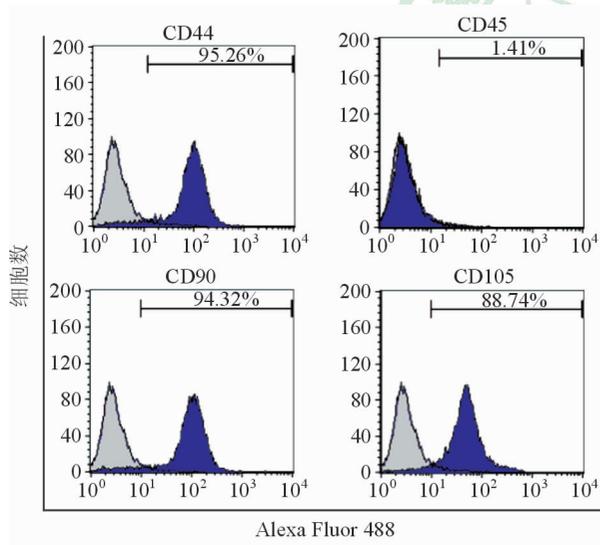


图 1 流式细胞术显示滑膜间充质干细胞(SDSCs)表面 CD45 阴性,CD44、CD90、CD105 阳性

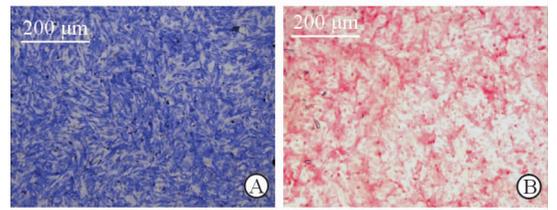


图 2 滑膜间充质干细胞(SDSCs)成软骨诱导后阿利辛兰染色(A)和番红 O 染色(B)结果

2.2 OA 关节液促进软骨小球增长 实验组成软骨诱导生成的软骨小球经 OA 关节液处理 16 d 后,肉眼观察发现其直径大于对照组,而且形状更规则,表面更光滑。经测量,实验组软骨小球直径大于对照组($P < 0.05$,图 3)。

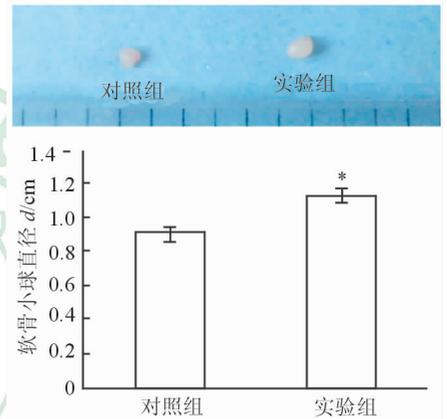


图 3 两组软骨小球肉眼观及直径的比较 * $P < 0.05$ 与对照组比较. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.3 OA 关节液促进关节软骨标志蛋白合成 实时定量 PCR 结果显示,实验组细胞经 OA 关节液处理 16 d 后,其关节软骨常用标志性基因 COL II、Aggrecan、SOX9 mRNA 的表达高于对照组($P < 0.05$,图 4A₁~4A₃);蛋白质印迹结果与此一致(图 4B₁~4B₃)。说明 OA 关节液促进了 COL II、Aggrecan、SOX9 的合成,对 SDSCs 的软骨形成能力有促进作用。

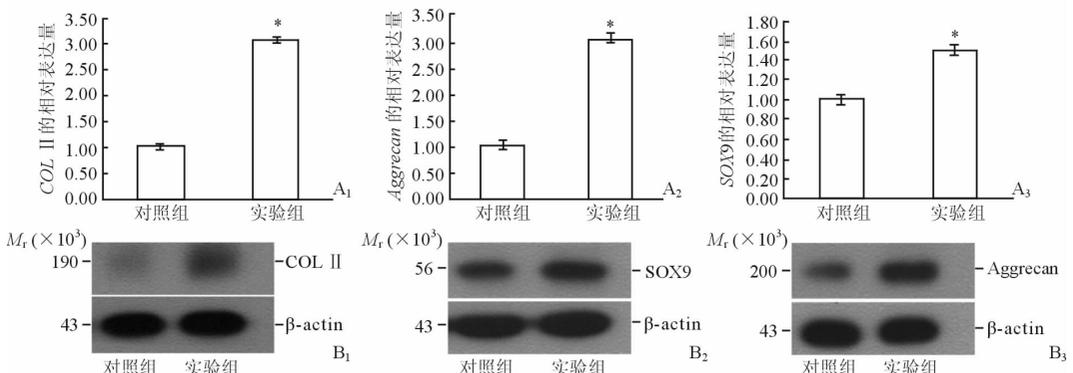


图 4 两组细胞 COL II、Aggrecan、SOX9 mRNA 和蛋白的表达

A₁~A₃: 实时定量 PCR 检测 mRNA 表达; B₁~B₃: 蛋白质印迹分析检测蛋白表达. * $P < 0.05$ 与对照组比较. $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

OA患者的关节液中含有多种成分,包括多种基质成分(如糖胺聚糖、硫酸软骨素、透明质酸等)、结晶(如焦磷酸钙盐、磷灰石)及多种细胞因子和炎症因子^[9-10]。研究表明,有些细胞因子及炎症因子可对SDSCs的软骨分化能力起到促进作用。TGF具有诱导SDSCs向软骨细胞分化、合成软基质的作用,可提高COL II的合成;胰岛素样生长因子同样有促进SDSCs软骨分化的作用,而且与TGF联合应用,其促进作用大于两种因子的单独使用,可以产生更多的透明软骨细胞外基质成分糖胺聚糖^[11]。骨形态发生蛋白(BMP)家族中的BMP-2和BMP-7对SDSCs软骨分化的促进作用大于TGF- β_1 ,其中BMP-7和TGF- β_1 的协同应用可提高SDSCs的软骨分化能力^[12]。

本研究结果显示,采用OA关节液处理的实验组软骨小球直径大于对照组,而且实验组形成的软骨小球形状比对照组更加规则、表面更加光滑,说明OA关节液有促进SDSCs软骨分化后软骨基质合成的作用;实验组细胞表面COL II、Aggrecan、SOX9 3种透明软骨标志性基因的表达量及蛋白的合成量明显高于对照组,说明OA关节液有上调COL II、Aggrecan、SOX9 3种基因表达及蛋白合成的作用,进一步证明OA关节液能够促进SDSCs软骨形成。以上实验结果说明OA关节液有促进SDSCs软骨分化的作用,提示SDSCs可作为修复OA关节软骨缺损的种子细胞。但OA关节液中含有各种成分和因子,其促进SDSCs软骨分化的机制可能较为复杂,有待深入研究。

[参考文献]

[1] DUARTE J H. Osteoarthritis: autophagy prevents age-related OA[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11: 683.

[2] ZAMBON S, SIVIERO P, DENKINGER M, LIMONGI F, VICTORIA CASTELL M, VAN DER PAS S, et al. Role of osteoarthritis, comorbidity, and pain in determining functional limitations in older populations: European project on osteoarthritis[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2016, 68: 801-810.

[3] ERHART-HLEDIK J C, FAVRE J, ANDRIACCHI T P. New insight in the relationship between regional

patterns of knee cartilage thickness, osteoarthritis disease severity, and gait mechanics[J]. *J Biomech*, 2015, 48: 3868-3875.

- [4] HENDERSON I, FRANCISCO R, OAKES B, CAMERON J. Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal chondral defects of the knee—a clinical, arthroscopic, MRI and histologic evaluation at 2 years[J]. *Knee*, 2005, 12: 209-216.
- [5] MINAS T. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(391 Suppl): S349-S361.
- [6] NIEMEYER P, KÖSTLER W, SALZMANN G M, LENZ P, KREUZ P C, SÜDKAMP N P. Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal cartilage defects in patients age 40 years and older: a matched-pair analysis with 2-year follow-up[J]. *Am J Sports Med*, 2010, 38: 2410-2416.
- [7] BARRY F P, MURPHY J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 568-584.
- [8] MOUISEDDINE M, MATHIEU N, STEFANI J, DEMARQUAY C, BERTHO J M. Characterization and histological localization of multipotent mesenchymal stromal cells in the human postnatal thymus[J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 1165-1174.
- [9] TCHETVERIKOV I, RONDAY H K, VAN EL B, KIERS G H, VERZIJJL N, TEKOPPELE J M, et al. MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63: 881-883.
- [10] GOBEZIE R, KHO A, KRASTINS B, SARRACINO D A, THORNHILL T S, CHASE M, et al. High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9: R36.
- [11] SAKIMURA K, MATSUMOTO T, MIYAMOTO C, OSAKI M, SHINDO H. Effects of insulin-like growth factor I on transforming growth factor β_1 induced chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells cultured in a polyglycolic acid scaffold[J]. *Cells Tissues Organs*, 2006, 183: 55-61.
- [12] MIYAMOTO C, MATSUMOTO T, SAKIMURA K, SHINDO H. Osteogenic protein-1 with transforming growth factor-beta1: potent inducer of chondrogenesis of synovial mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *J Orthop Sci*, 2007, 12: 555-561.