

## 外周血来源的间充质干细胞在脱矿松质骨支架中的增殖和成软骨能力的实验研究

王少杰<sup>1,3</sup> 李鹏强<sup>2</sup> 张继英<sup>1</sup> 王薇<sup>2</sup> 余家阔<sup>1</sup>

1 北京大学第三医院运动医学研究所(北京 100191)

2 长春理工大学化学与环境工程学院

3 厦门大学附属中山医院关节外科和运动医学科

**摘要 目的:**研究外周血来源的间充质干细胞(PBMSCs)在3D多孔支架中的生物学行为。**方法:**将兔PBMSCs接种到猪脱矿松质骨(DCB)支架中,并以骨髓间充质干细胞(BMMSCs)以及关节软骨细胞(ACCs)进行对照,通过扫描电镜观察3D环境中的细胞形态和分布;通过Live/Dead染色检测细胞活性,Hoechst33258法检测DNA含量,二甲基亚甲基蓝(DMMB)法检测糖胺聚糖(GAG)含量,酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫荧光法检测二型胶原(COL 2)表达,RT-PCR法定量分析软骨分化相关基因的表达。**结果:**扫描电镜(SEM)观察显示3种细胞在支架中均匀贴附,Live/Dead染色显示接种3天后3种细胞存活率相似( $P>0.05$ ),7天后3种细胞增殖能力以及DNA含量无明显差异( $P>0.05$ )。PBMSCs和BMMSCs均较ACCs分泌更多GAG,但COL 2分泌量相似。此外,PBMSCs和BMMSCs的聚集蛋白聚糖(AGC),COL 2和碱性磷酸酶(ALP)等基因表达均明显上调( $P<0.05$ );而ACCs组这些基因的表达显著下调( $P<0.05$ )。MSCs组的COL 1表达趋于增加,而ACCs组中的表达趋于减少( $P>0.05$ )。在成软骨诱导21天时,PBMSCs和BMMSCs的COL 2和ALP表达较ACCs升高( $P<0.05$ ),AGC和COL 1表达与ACCs相比无显著差异( $P>0.05$ )。**结论:**外周血来源的间充质干细胞在异种脱矿松质骨支架中具有与骨髓间充质干细胞相似的良好增殖和成软骨能力,但体外培养条件下依然存在肥大软骨细胞基因表达的现象,需要对培养条件进一步优化。

**关键词** 间充质干细胞;外周血;软骨损伤;组织工程;支架

DOI:10.16038/j.1000-6710.2017.10.009

### Proliferative and Chondrogenic Potential of Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells in Demineralized Cancellous Bone Scaffolds

Wang Shaojie<sup>1,3</sup>, Li Pengqiang<sup>2</sup>, Zhang Jiying<sup>1</sup>, Wang Wei<sup>2</sup>, Yu Jiakuo<sup>1</sup>

1 Institute of Sports Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

2 School of Chemistry and Environmental Engineering, Changchun University of Science and Technology, Jilin 130022, China

3 Department of Joint Surgery and Sports Medicine, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Fujian 361004, China

Corresponding Author: Wang Wei, Email: weiwanglg@163.com;

Yu Jiakuo, Email: yujiakuo@126.com

**Abstract Objective** To study the biological behavior of peripheral blood mesenchymal stem cells (PBMSCs) in 3D composite scaffolds. **Methods** The proliferation and chondrogenesis of rabbit PBMSCs seeded on porcine cancellous bone (DCB) scaffolds were evaluated, and bone marrow mesenchymal

收稿日期:2017.03.23

基金项目:国家自然科学基金面上项目(51273004)

第1作者:王少杰,Email:wade301@163.com;李鹏强,Email:pqlichem@outlook.com;

通信作者:王薇,Email:weiwanglg@163.com;余家阔,Email:yujiakuo@126.com

stem cells (BMMSCs) and articular chondrocytes (ACCs) were used as controls. Cell morphology and distribution in scaffolds were observed using scanning electron microscopy (SEM). Live/Dead staining was employed to detect cell viability, Hoechst 33258 method to measure DNA content, dimethylmethylene blue (DMMB) assay to detect glycosaminoglycan (GAG), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence to detect the content of type 2 collagen (COL 2), and RT-PCR to analyze chondrogenesis-related gene expression. **Results** SEM showed that three kinds of cells uniformly adhered and evenly distributed in DCB scaffolds. Live/Dead staining observed the similar viability of the three kinds of cells three days after seeding ( $P>0.05$ ). There was no significant difference in the proliferation ability and DNA content among three kinds of cells after seven days of in vitro culture. After 21 days of chondrogenic culture, both PBMSCs and BMMSCs secreted more GAGs than ACCs, while the secretion of COL 2 was similar to that of ACCs. Moreover, the gene expression of AGC, COL 2 and alkaline phosphatase (ALP) were significantly up-regulated ( $P<0.05$ ) in PBMSCs and BMMSCs but significantly down-regulated in ACCs ( $P<0.05$ ). The expression of COL 1 in MSCs groups displayed an increasing trend but a decreasing trend in ACCs group ( $P>0.05$ ). The gene expression of COL 2 and ALP, but not of AGC and COL 1, in PBMSCs and BMMSCs was higher than those in ACCs ( $P<0.05$ ). **Conclusions** PBMSCs and BMMSCs have similarly excellent proliferation and chondrogenesis potential in 3D porous DCB scaffolds. However, hypertrophic gene expression is still observed under in vitro culturing condition, suggesting the need to further optimize the culture system.

**Key words** mesenchymal stem cells, peripheral blood, cartilage injury, tissue engineering, scaffolds

关节软骨一旦损伤,其自身修复能力十分有限,基于细胞的组织工程手段是一种具有良好前景的软骨修复策略。自 1987 年以来,自体软骨移植 (autologous chondrocyte implantation, ACI) 就被用于治疗软骨缺损的治疗<sup>[1]</sup>。然而,该技术存在诸多弊病,例如供区损伤,可得到的细胞数量有限,体外扩增软骨细胞发生快速去分化等<sup>[2,3]</sup>。因此,研究者们积极寻找软骨细胞的替代来源作为种子细胞。因间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的快速增殖以及多向分化能力,来源于不同组织的 MSCs 得到广泛重视<sup>[4,5]</sup>。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 是目前最常用的 MSCs, 但可获得的骨髓样本量少, 创伤相对较大。在前期研究中, 我们成功从新西兰大白兔和大鼠的外周血中分离并扩增出外周血来源的间充质干细胞 (peripheral blood mesenchymal stem cells, PBMSCs)<sup>[6,7]</sup>。PBMSCs 具有和 BMMSCs 相似的增殖能力以及多向分化潜能, 并且其可以大量微创获取的特点非常适合临床应用, 具有良好的应用前景。不仅如此, 相比 BMMSCs, PBMSCs 具有相似的生物学特性, 甚至更强大的成软骨分化能力<sup>[8]</sup>。

然而, 此前多数关于 PBMSCs 的研究都是基于 2D 平面培养的结果, 这显然与细胞在体内所处的 3D 环境是不同的。研究者们对 PBMSCs 在 3D 多孔支架中的生物学行为知之甚少。对此方面进行深入研究, 为后续研究工作提供更加可靠和具有指导作用的 3D 微环境中的生物学行为, 对于组织工程软骨的设计和构建大

有裨益。本研究的主要目的是对 PBMSCs 在脱矿松质骨 (demineralized cancellous bone, DCB) 支架中的生物学行为进行深入研究。DCB 是组织工程软骨构建中的一种极为常见的生物活性支架。通过将同种异体兔来源的 PBMSCs 接种到猪 DCB 支架后, 对 PBMSCs 的形态、粘附、增殖、成软骨分化的能力进行评估和分析, 并与兔来源的 BMMSCs 以及关节软骨细胞 (articular cartilage chondrocytes, ACCs) 进行对照分析, 以验证 PBMSCs 替代 BMMSCs 和 ACCs 作为种子细胞用于软骨缺损修复的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、主要材料、试剂与仪器

实验所用动物和实验设计均通过北京大学第三医院动物伦理委员会论证和批准, 新西兰大白兔 (4 周龄, 1 kg 左右) 购自北京大学医学部动物实验中心。AMD3100 (Sigma, 美国) 淋巴细胞分离液 (Ficoll-paque™, 1.077 g/mL, 美国), 兔成软骨诱导培养基 (RBX-MX-90041, 赛业); Live/Dead 染色试剂盒 (Invitrogen, 美国), Hoechst 33258 木瓜蛋白酶 (Sigma, 美国), CCK-8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 试剂盒 (Dojindo, 日本), COL 2 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (Cloud-clone, 美国), 激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国), 多功能酶标仪 (Thermoscientific, 美国)。

### 1.2 细胞培养

### 1.2.1 外周血MSC的动员,分离和培养

连续5天按50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量在兔皮下注射粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF),末次注射24 h后按5  $\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量静脉注射趋化因子受体-4 (chemokine receptor-4, CXCR4)拮抗剂AMD3100。在注射AMD3100一小时后,耳缘静脉取血10 mL加入到含Ficoll淋巴细胞分离液的离心管中离心后吸取富含单个核细胞的白膜层细胞,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤后重悬于 $\alpha$ -MEM完全培养基(含有10% FBS, 100 U / mL青霉素, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素, 25  $\text{ng}/\text{mL}$ 两性霉素B, 2  $\text{mM}$  L-谷氨酰胺),置于37°C含5%  $\text{CO}_2$ 和一定湿度的培养箱中孵育。经过3~4天后弃去非贴壁细胞和碎片,此后每3~4天更换完全培养基一次。大约10~15天细胞达到80%~90%融合。收集第4代PBMSCs细胞用于后续实验。

### 1.2.2 BMMSCs的分离和原代培养

在麻醉和无菌条件下,从兔髌骨抽吸3 mL骨髓。每份骨髓样本用1:1 PBS稀释,同样以密度梯度离心法分离单核细胞, PBS洗涤后,重悬于 $\alpha$ -MEM完全培养基(含有10% FBS, 100 U / mL青霉素, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素, 25  $\text{ng}/\text{mL}$ 两性霉素B, 2  $\text{mM}$  L-谷氨酰胺),置于37°C含5%  $\text{CO}_2$ 和一定湿度的培养箱中孵育。传代和扩增见PBMSCs分离和培养,收集第4代BMMSCs细胞用于后续实验。

### 1.2.3 新西兰大白兔关节软骨细胞的提取与培养

取3周龄新西兰大白兔膝关节软骨,含1%双抗的PBS溶液反复冲洗后,使用眼科剪剪成 $1\text{mm}^3$ 大小的碎片;用0.2%2型胶原酶消化法将软骨碎片在37°C培养箱内消化4~6 h;离心弃上清液,加入DMEM完全培养基(含有10% FBS, 100 U / mL青霉素, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素, 25  $\text{ng}/\text{mL}$ 两性霉素B),置于37 °C  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养(饱和湿度,5% $\text{CO}_2$ )。5~7天后,待原代ACCs融合90%以上,使用0.25%胰酶/0.1%EDTA消化,直至细胞以及软骨碎片从皿底脱落,使用含10% FBS的DMEM培养基终止消化。使用P2代ACCs用于后续实验。

## 1.3 支架制备,表征以及与细胞复合培养

### 1.3.1 猪脱矿松质骨支架的制备

取家猪膝关节股骨远端以及胫骨近端,剔除周围软组织,自来水冲洗干净,蒸馏水浸泡;使用电动摆锯制成厚度1~2 mm的薄片,去除骨碎屑,血块,以及脂肪组织;5%盐酸脱钙7天,蒸馏水洗;浓度为1:1的甲醇/氯仿液中脱脂48 h,蒸馏水洗;3%双氧水 $\text{H}_2\text{O}_2$ 中浸泡4 h,蒸馏水洗;采用冷冻干燥机将DCB冻干48 h;最后用角膜环钻裁成直径6 mm,高度2 mm圆柱形支架, $^{60}\text{Co}$ 消毒备用。

### 1.3.2 支架表征测定

将支架切成薄片,喷金60 s,然后用扫描电镜(scanning electronic microscopy, SEM)观察微观结构,并随机选取DCB电镜图片3张,每张图测定20个孔的最大直径,采用Image-pro Plus 6.0软件计算60个孔的平均孔径。

### 1.3.3 PBMSCs、BMMSCs、ACCs和支架材料的复合和培养

3种细胞均以相同方法接种,将40  $\mu\text{L}$  ( $5.0 \times 10^5$  cells)细胞悬液接种到DCB支架上(直径5 mm,厚度2 mm)。待细胞充分粘附后,加入含2 mL10%FBS的 $\alpha$ -MEM(用于MSCs-DCB复合培养)或10%FBS的DMEM(用于ACCs-DCB复合培养)。最后放置在37°C,5%  $\text{CO}_2$ 孵育箱中培养,培养第3天改用兔成软骨诱导培养基(RBXM-90041;赛业)成软骨诱导培养,每3天换液。

## 1.4 细胞形态学、活性和增殖检测

### 1.4.1 细胞在支架上的分布以及形态观察

细胞DCB支架复合物在生长培养基中培养24小时后取出;PBS洗5分钟后,入2.5%的戊二醛固定过夜;梯度酒精脱水后临界点干燥;高度真空中喷金60 s,形成5 nm金涂层;用SEM观察。

### 1.4.2 细胞活性检测

细胞DCB支架复合物在生长培养基中培养72小时后取出;PBS溶液浸洗,Live/Dead工作液中,置于37°C孵育箱中染色60 min;PBS浸洗2遍;在激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.4.3 CCK-8测定细胞增殖

在体外培养的不同时间点,如1、5、7天时,吸净培养基, PBS浸洗2 min;每个支架加入20  $\mu\text{L}$ 的CCK-8以及180  $\mu\text{L}$ 培养基,37°C孵育2 h;酶标仪测定450 nm波长处的孵育液吸光度。

## 1.5 DNA以及细胞外基质分泌含量检测

### 1.5.1 DNA以及GAG含量测定

DNA含量测定:体外成软骨诱导培养14、21天后,取出支架,滤纸吸干,微量天平称量湿重;将支架加木瓜蛋白酶裂解液(木瓜蛋白酶125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.1 M乙酸钠, 5  $\text{mM}$  L-半胱氨酸盐酸, 0.05 M EDTA; pH=6.0),眼科剪将支架剪碎,60°C水浴裂解48小时;取支架裂解液,通过Hoechst-33258(2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )37°C避光孵育1 h标记DNA,酶标仪设定波长360 nm,发射光波长460 nm测定裂解液荧光强度;根据标准曲线计算裂解液的DNA含量。取上述支架裂解液以1,9-二甲基亚甲蓝(dimethylmethyleneblue, DMMB)法测定波长525 nm的孵育液吸光度;用硫酸软骨素标准品(Sigma)作出浓度与吸光度的标准曲线;根据标准曲线算出待测支架裂解液的GAG含量;GAG含量与同一样本支架的DNA

含量的比值作为该支架上细胞分泌 GAG 含量。

### 1.5.2 共聚焦显微镜检测 COL 2 分泌

体外培养 3 周后,取出支架 PBS 冲洗,4%多聚甲醛固定 60 min; PBS 冲洗 15 min;10% FBS 封闭 1 h;小鼠抗兔 II 型胶原抗体 4°C 过夜孵育, PBS 冲洗; Alexa 594 标记的羊抗小鼠二抗室温孵育 2 h, PBS 冲洗, Hoechst-33258 工作液 500 μL, 室温 5 min; 激光共聚焦显微镜观测骨特异性基因 2 型胶原(collagen type 2, COL 2)。

### 1.5.3 ELISA 测定 COL 2 含量

在体外成软骨诱导培养后 14 和 21 天时使用 Cloud-clone Collagen Type 2 ELISA 检测试剂盒对支

架裂解液所含 COL 2 进行定量检测,操作按说明书进行。

### 1.6 RT-PCR 检测软骨分化相关基因表达

通过 RT-PCR 检测透明软骨特异性基因聚集蛋白聚糖 (aggrecan, AGC), COL 2, 纤维软骨基因 1 型胶原 (collagen type 1, COL 1), 成骨基因碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)。利用 Trizol 提取 RNA, 按 Promega 逆转录试剂盒说明书进行 mRNA 逆转录扩增操作, 以磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 为内参照, 引物序列见表 1。PCR 反应条件: 95°C 变性 10 min, 95°C 15s, 60°C 1min, 40 个循环, mRNA 相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示。

表 1 RT-PCR 引物序列

	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')
COL 1	TGGCAAGAACGGAGATGACG	GCACCATCCAAACCACTGAA
COL 2	CCACGCTCAAGTCCCTCAAC	AGTCACCGCTCTTCCACTCG
AGC	CGTGGTCTGGACAGGTGCTA	GGTTGGGGTAGAGGTAGACG
ALP	CGACACGGACAAGAAACCCT	TGTTGTGAGCGTAGTCCACC
GAPDH	CCATCACCATCTTCCAGGAG	GATGATGACCCTTTTGCTC

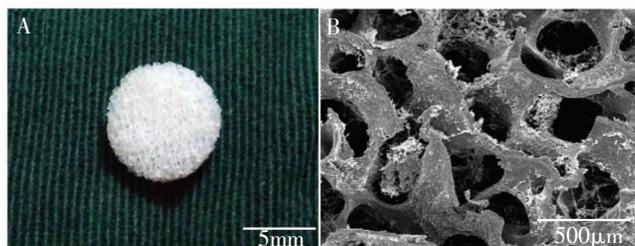
### 1.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行标准误、方差分析 (三组数据比较)、Student-t 检验 (两组数据比较) 等统计学分析, 当 P 值小于 0.05 时, 差异具有显著性。

## 2 实验结果

### 2.1 DCB 支架制作及表征测定

电镜观察可见 DCB 具有大量天然的高度联通的多孔结构, 孔径范围 137.9 ~ 558.1 μm (图 1A), 平均孔径  $332.3 \pm 136.7 \mu\text{m}$ , 平均孔隙率  $77.9\% \pm 0.03\%$  (图 1B)。



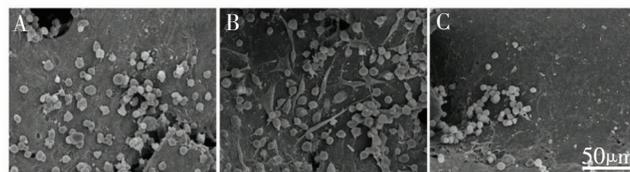
(A) DCB 支架肉眼观 (标尺 = 5 mm); (B) DCB 支架显示高度互相联通的多孔结构 (标尺 = 500 μm)。

图 1 支架大体形态观察以及扫描电镜下微观形貌

### 2.2 细胞在 DCB 支架上的存活, 增殖分析

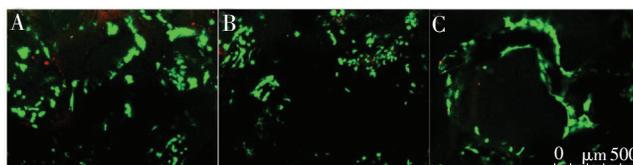
体外培养 24 h 后, SEM 观察发现 3 种细胞均在

DCB 支架的表面以及孔隙的侧壁上紧密贴附, 部分区域可见细胞成簇分布。PBMSCs 与 BMMSCs 为长梭形或多角形。而 ACCs 类似鹅卵石样或多角形 (图 2 A-C)。体外培养 72 h 后, 大量细胞活性良好 (图 3A-C)。如图 4 所示, CCK-8 法检测发现第 1 天 MSCs 数量多于 ACCs, 但第 5 天时 3 组细胞的数量无显著区别 ( $P > 0.05$ ), 第 7 天 PBMSCs 细胞数较 BMMSCs 略增加, 但 3 组细胞数较第 5 天无显著增加 ( $P > 0.05$ )。



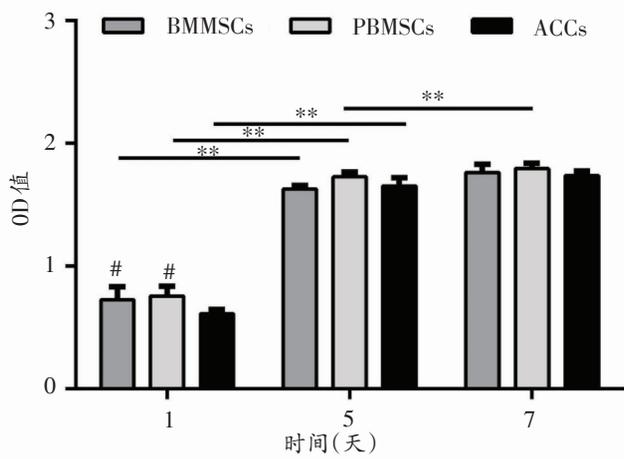
A: BMMSCs, B: PBMSCs, C: ACCs (标尺 = 50 μm)

图 2 扫描电镜显示不同细胞在 DCB 支架上体外培养 24 小时后在 DCB 支架表面形态



A: BMMSCs, B: PBMSCs, C: ACCs, (红色: 死细胞; 绿色: 活细胞; 标尺 500 μm)

图 3 激光共聚焦显微镜显示细胞在 DCB 支架上体外培养 72 小时后的细胞活性



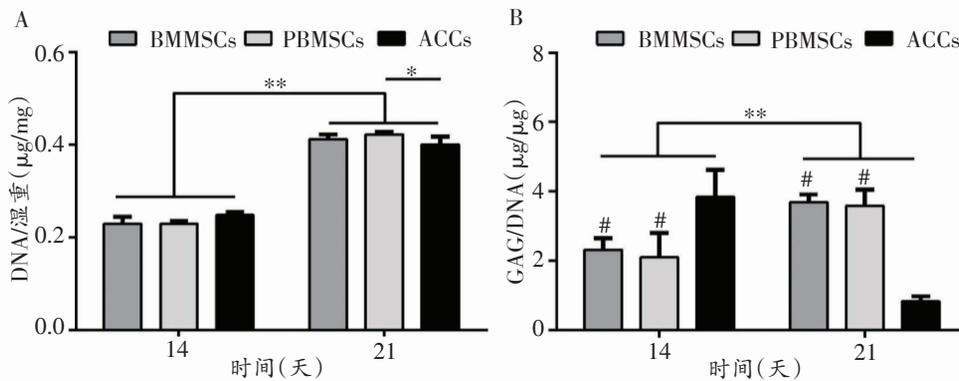
#P<0.05, 与同一时间点 ACCs 组相比; \*\*P<0.01

图4 CCK-8检测细胞增殖(n=3)

### 2.3 细胞在DCB支架上的软骨细胞外基质分泌

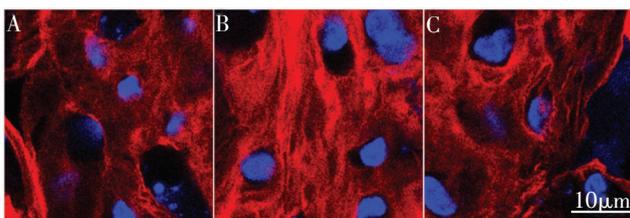
在体外培养3天后DCB支架上的细胞DNA含量也

逐渐增加。第14天PBMSCs的DNA含量与BMMSCs和ACCs相似(图5A)。体外培养21天后,两种MSCs的DNA含量相似,但PBMSCs略高于ACCs组(P<0.01)。ACCs的GAG早期大量表达,但体外培养14天后逐渐下降。PBMSCs和BMMSCs的GAG表达持续增加(图5B)。在体外培养14天MSCs的GAG分泌量与ACCs相似,在21天时, MSCs的GAG含量多于ACCs组。在各时间点, PBMSCs和BMMSCs组的GAG含量均无显著差异。如图6所示,体外成软骨诱导培养3周后MSCs周围均出现细胞外高强度COL 2表达,且与软骨细胞相似。如图7所示,ELISA法检测细胞外基质COL 2分泌情况发现3种细胞支架在共培养3周过程中COL 2分泌均逐渐增加。接种ACCs的DCB支架分泌COL 2逐渐减少,但COL 2在第21天时仍然高于接种MSCs的DCB支架。



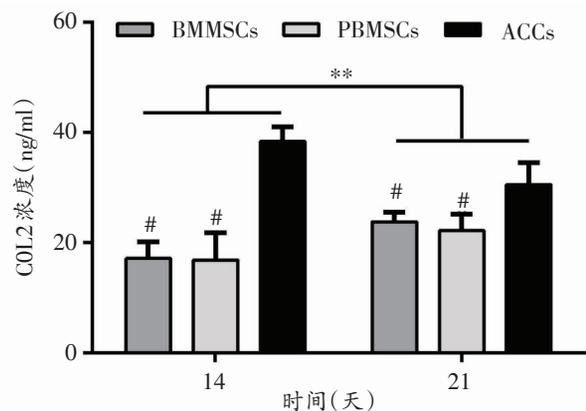
#P<0.05, 与同一时间点 ACCs 组相比; \*P<0.05, \*\*P<0.01

图5 DNA含量测定(A)和DMMB法检测GAG含量(B)(n=3)



A: BMMSCs, B: PBMSCs, C: ACCs (标尺=10 µm)

图6 支架内细胞体外成软骨诱导3周后3组细胞均显示高强度COL 2表达



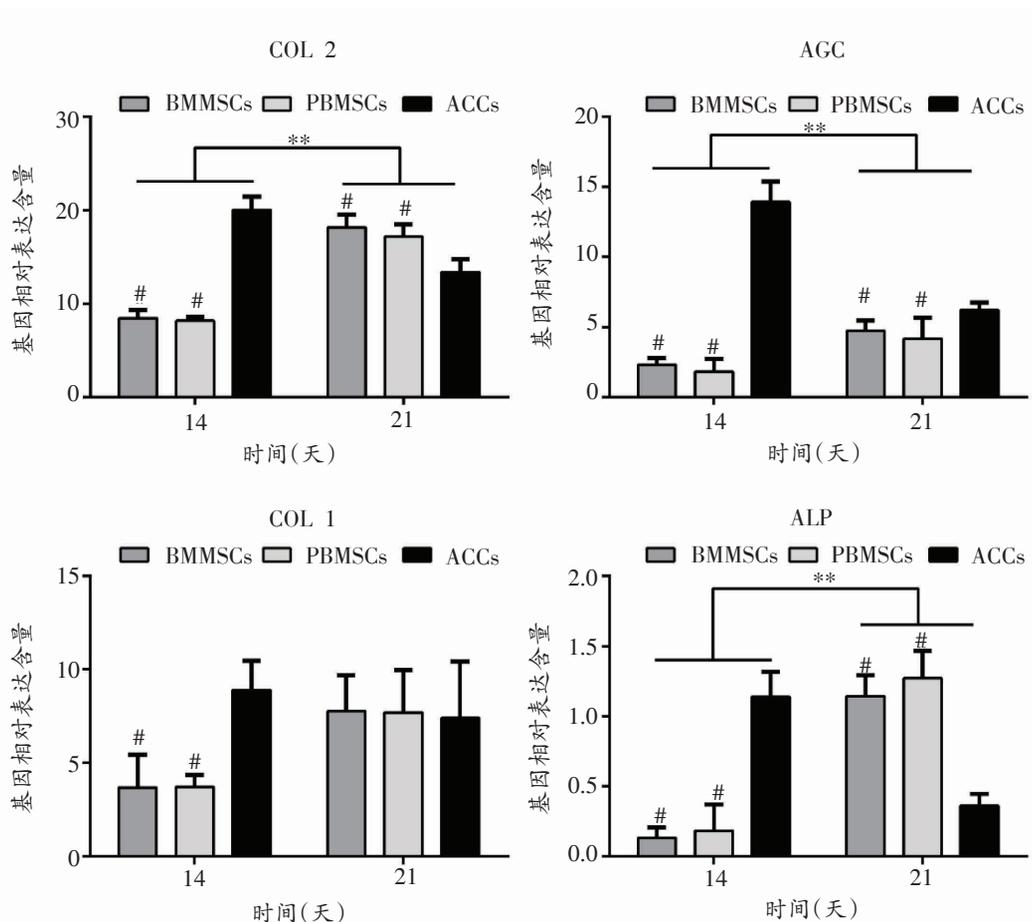
#P<0.05, 与同一时间点 ACCs 组相比; \*\*P<0.01

图7 ELISA法检测COL 2的分泌含量(n=3)

## 2.4 基因表达分析

3 组细胞间的基因表达在体外诱导培养 14 天和 21 天时均有显著区别(图 8)。与 14 天比较, MSCs 组在 21 天时的透明软骨特异性基因 (AGC, COL 2) 表达明显上调 ( $P < 0.01$ ), 成骨基因 ALP 相比升高 ( $P < 0.01$ )。ACCs 组在 21 天时的透明软骨基因和成骨基因 ALP 相比 14 天显著下调 ( $P < 0.01$ )。MSCs 组的纤维软骨基因 COL 1 表达趋势逐渐增加, 而 ACCs 组表达趋势逐渐减

少。此外, 3 种细胞组之间的基因表达也有显著区别。在成软骨诱导 14 天时, PBMSCs 和 BMMSCs 表达 COL 2, AGC, COL 1 和 ALP 的水平仍然显著低于 ACCs ( $P < 0.05$ )。在 21 天时, MSCs 组的 COL 2 和 ALP 的基因表达显著高于 ACCs 组 ( $P < 0.05$ ); MSCs 组 AGC 的表达虽增加, 但仍弱于 ACCs ( $P < 0.05$ ); MSCs 的 COL 1 表达水平和 ACCs 无显著差异 ( $P > 0.05$ )。



\* $P < 0.05$ , 与同一时间点 ACCs 组相比; \*\* $P < 0.01$

图 8 RT-PCR 法检测 3 种细胞 COL 2, AGC, COL 1 以及 ALP 的基因表达含量 ( $n=3$ )

## 3 讨论

本研究比较了 PBMSCs、BMMSCs 和 ACCs 三种细胞在 DCB 支架的 3D 微环境中的增殖以及成软骨分化能力。发现 PBMSCs 在 DCB 中维持增殖, 且细胞活性良好; PBMSCs 在 DCB 中可以分化为软骨细胞并且分泌大量软骨特异性细胞外基质; 在 3D 培养条件下, PBMSCs 具有与 BMMSCs 相似的增殖以及向软骨细胞分化的能力。目前对于 PBMSCs 的生物学行为研究多数是基于 2D 平面培养的结果, 本研究对 PBMSCs 在体外 3D 微环境中的细胞生物学特性进行详尽研究, 具有创新性。

SEM 观察发现, 3 种细胞均能够贴附在 DCB 支架的表面和孔的侧壁。体外培养 3 天后, 共聚焦显微镜观察发现 PBMSCs 在 DCB 上的分布均匀, 支架内部中也有大量细胞, 死细胞极少, 因此 PBMSCs 具有 BMMSCs 和 ACCs 相似的细胞活性。此外, CCK-8 和 DNA 含量检测发现 PBMSCs 数量逐渐增加, 上述这些结果均表明 PBMSCs 具有良好的生物增殖和软骨分化能力, 同时猪来源的 DCB 支架具有良好的生物相容性。

DMMB 和 ELISA 检测结果表明在成软骨诱导培养 3 周后, PBMSCs 和 BMMSCs 产生的 GAG 和 COL 2 逐渐增加, 在 21 天时, GAG 含量已明显高于 ACCs; 荧光检

测发现3种种子细胞分泌的COL 2水平相似(图6),但ELISA定量检测结果表明MSCs组的COL 2的蛋白水平仍然低于ACCs组。此外,干细胞向软骨细胞分化伴随着一系列软骨特异性基因的表达,包括COL 2, AGC等。3D环境中体外成软骨诱导培养3周后,外周血和骨髓来源的MSCs都能表达AGC和COL 2,且AGC表达水平与ACCs相似,但COL 2的基因表达水平高于ACCs。因为GAG和COL 2是软骨基质中的重要多糖类物质和主要胶原,我们可以认为PBMSCs在3D微环境以及成软骨诱导因子的双重作用下成功分化为软骨细胞。尽管第21天时PBMSCs和BMSCs的COL 2基因表达水平均强于ACCs组,但ELISA结果提示MSCs的COL 2蛋白表达水平仍然弱于ACCs组。基因表达和蛋白表达的不一致可能与此前报道的mRNA转录后调节有关<sup>[9]</sup>。例如,miRNAs可以通过对mRNA的降解或者沉默来调控骨关节炎进程以及成软骨过程中的蛋白质转录<sup>[10]</sup>。此外,本研究中ACCs在21天时仍然分泌更多COL 2可能与我们使用较早代数的ACCs(P3)有关。有研究发现在支架中培养的MSCs分泌的COL 2或者AGC与ACCs相似甚至更多<sup>[11-14]</sup>。这些研究中所采用的软骨细胞是骨关节炎的ACCs或者体外扩增多次的ACCs。

RT-PCR结果提示ALP和COL 1在体外培养3周后升高,这一现象与MSCs的自发成骨能力有关<sup>[15]</sup>。但纤维软骨基因COL 1和成骨基因ALP的表达水平远远低于透明软骨基因COL 2和AGC。与基线水平(第3天)相比,在DCB中成软骨诱导培养的条件下MSCs和ACCs仅有低水平的ALP和COL 1水平的表达。此外,纤维软骨基因COL 1和成骨基因ALP的表达还与材料本身的性质有关。有研究表明材料本身影响细胞的粘附、生长和分化<sup>[16]</sup>。COL 1是骨基质有机物的主要成分,也是纤维软骨的主要成分,被认为可以促进骨生成<sup>[17,18]</sup>,因此可能与DCB支架中种子细胞表达COL 1和ALP有关<sup>[19-22]</sup>。其他材料制作的支架也发现了这两种基因的升高<sup>[12,23,24]</sup>,这提示在体外条件下维持MSCs或者ACCs的软骨细胞表型,杜绝软骨细胞发生肥大或者分化成为成骨细胞还需要更多深入的研究。

两种来源的MSCs在DCB支架中进行成软骨诱导培养未显示明显成软骨特性的差异,这可能与PBMSCs是由骨髓中的MSCs动员而来<sup>[25]</sup>,而且3D的细胞培养条件比平面培养更能模仿体内的微环境<sup>[26,27]</sup>有关。不同的3D微环境对MSCs的成软骨能力也有影响<sup>[28,29]</sup>,还需要更多的比较研究进一步评价在不同的3D支架中,PBMSCs增殖和成软骨能力的变化。

DCB是常用的软骨组织工程的3D培养支架<sup>[21,30]</sup>;相对于同种异体骨而言,猪来源的DCB更加广泛和易

于获取,也更有可能应用于临床,因此,在本研究中我们选取了猪来源的DCB。DCB的主要成分是COL 1,经过脱蛋白处理后其抗原表面决定簇被破坏,不会导致免疫反应<sup>[31]</sup>,3种细胞和DCB之间良好的生物相容性提示DCB是一种安全的生物活性材料,具有良好的组织工程软骨应用前景。

本研究主要在天然材料DCB中进行,还存在一些不足之处。PBMSCs在其他材料制备的支架,如高分子支架中的生物学特性还需要进一步验证。

## 4 结论

外周血来源的间充质干细胞在异种脱矿松质骨支架中具有与骨髓间充质干细胞相似的良好增殖和成软骨能力,但体外培养条件下依然存在肥大软骨细胞基因表达的现象,需要对培养条件进一步优化。鉴于外周血来源广泛,可微创获取,因此外周血来源的间充质干细胞可以作为一种极具应用前景的新型种子细胞用于组织工程软骨构建。

## 5 参考文献

- [1] Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee [J]. Clin Orthop Relat Res, 2000, 374 (374): 212-234.
- [2] Beane OS, Darling EM. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration [J]. Ann Biomed Eng, 2012, 40(10): 2079-2097.
- [3] Matricali GA, Dereymaeker GP, Luyten FP. Donor site morbidity after articular cartilage repair procedures: a review [J]. Acta Orthop Belg, 2010. 76(5): 669-674.
- [4] Nestic D, Whiteside R, Brittberg M, et al. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(2): 300-322.
- [5] Stoop R. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage [J]. Injury, 2008, 39 Suppl 1: S77-87.
- [6] Fu WL, Zhang JY, Fu X, et al. Comparative study of the biological characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow and peripheral blood of rats [J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(17-18): 1793-1803.
- [7] Fu WL, Zhou CY, Yu JK. A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model [J]. Am J Sports Med, 2014, 42(3): 592-601.
- [8] Wang SJ, Yin MH, Jiang D, et al. The Chondrogenic Potential of Progenitor Cells Derived from Peripheral Blood: A Systematic Review [J]. Stem Cells Dev, 2016. 25 (16): 1195-1207.

- [9] Caron MM, Emans PJ, Coolsen MM, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(10): 1170–1178.
- [10] Le LT, Swingle TE, Clark IM. Review: the role of microRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(8): 1963–1974.
- [11] Rackwitz L, Djouad F, Janjanin S, et al. Functional cartilage repair capacity of de-differentiated, chondrocyte- and mesenchymal stem cell-laden hydrogels in vitro [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22(8): 1148–1157.
- [12] Fernandes AM, Herlofsen SR, Karlsen TA, et al. Similar properties of chondrocytes from osteoarthritis joints and mesenchymal stem cells from healthy donors for tissue engineering of articular cartilage [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62994.
- [13] Facchini A, Lisignoli G, Cristino S, et al. Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold [J]. *Biorheology*, 2006, 43(3–4): 471–480.
- [14] Cui X, Wang S, Cai H, et al. Over expression of microRNA-634 suppresses survival and matrix synthesis of human osteoarthritis chondrocytes by targeting PIK3R1 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23117.
- [15] Peltari K, Winter A, Steck E, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2006, 54(10): 3254–3266.
- [16] Chang H-I, Wang Y. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds [B]. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering – Cells and Biomaterials*, Eberli Daniel, 2011.
- [17] Xiao G, Wang D, Benson MD, et al. Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(49): 32988–32994.
- [18] Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(6): 1152–1163.
- [19] Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, et al. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration [J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(13–14): 1313–1321.
- [20] Zhou S, Yates KE, Eid K, et al. Demineralized bone promotes chondrocyte or osteoblast differentiation of human marrow stromal cells cultured in collagen sponges [J]. *Cell Tissue Bank*, 2005, 6(1): 33–44.
- [21] Li X, Jin L, Balian G, et al. Demineralized bone matrix gelatin as scaffold for osteochondral tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(11): 2426–2433.
- [22] Wang X, Li Y, Han R, et al. Demineralized bone matrix combined bone marrow mesenchymal stem cells, bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta3 gene promoted pig cartilage defect repair [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e116061.
- [23] Somoza RA, Welter JF, Correa D, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(6): 596–608.
- [24] Agar G, Blumenstein S, Bar-Ziv Y, et al. The Chondrogenic Potential of Mesenchymal Cells and Chondrocytes from Osteoarthritic Subjects: A Comparative Analysis [J]. *Cartilage*, 2011, 2(1): 40–49.
- [25] Rankin SM. Impact of bone marrow on respiratory disease [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(3): 236–241.
- [26] Breyner NM, Hell RC, Carvalho LR, et al. Effect of a three-dimensional chitosan porous scaffold on the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes [J]. *Cells Tissues Organs*, 2010, 191(2): 119–128.
- [27] Benya P. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels [J]. *Cell*, 1982, 30(1): 215–224.
- [28] Ahmed M, Ramos TA, Damanik F, et al. A combinatorial approach towards the design of nanofibrous scaffolds for chondrogenesis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14804.
- [29] Jeong CG, Hollister SJ. Mechanical and biochemical assessments of three-dimensional poly(1,8-octanediol-co-citrate) scaffold pore shape and permeability effects on in vitro chondrogenesis using primary chondrocytes [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(12): 3759–3768.
- [30] Marijnissen WJCM, van Osch GJVM, Aigner J, et al. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM) [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(6): 571–580.
- [31] Tuli SM, Singh AD. The osteoinductive property of decalcified bone matrix. An experimental study [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1978, 60(1): 116–123.