

技术与方法

两种不同的体外诱导人脐带间充质干细胞成软骨细胞方法的比较

张权^{1#} 陈恋^{2#} 常钺² 张亚奇² 肖翠红¹ 饶巍¹ 韩兵¹ 武栋成^{1,2*}¹武汉汉密顿生物科技股份有限公司, 武汉 430075; ²武汉大学基础医学院, 武汉 430072)

摘要 该课题探讨了3D悬滴培养与贴壁培养体外诱导人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)在成软骨分化特性上的差异。采用机械匀浆法和组织块贴壁培养法体外分离培养获得第5代hUC-MSCs, 流式细胞术检测干细胞表面免疫标记物, 经3D悬滴培养与贴壁培养诱导应用番红O和阿利辛蓝染色及荧光定量检测富含透明质酸糖胺聚糖的细胞外基质形成情况以及不同时间点(3天、7天、14天)成软骨相关基因ACAN、MIA、COL1A2、COL2A1和COL10A1表达, 并用免疫组化染色的方法检测II型胶原的表达情况。结果显示, 流式细胞术检测的第5代hUC-MSCs间充质干细胞表面标记物结果符合国际细胞疗法协会制定的鉴定标准; 3D悬滴培养的hUC-MSCs可形成致密的细胞聚合物, 贴壁培养的细胞形态成长梭形; 番红O和阿利辛蓝染色结果显示, 3D悬滴培养和贴壁培养的hUC-MSCs均能形成软骨细胞; 但荧光实时定量PCR结果显示, 3D悬滴培养的hUC-MSCs形成软骨细胞的成软骨相关基因的表达明显多于贴壁培养细胞形成软骨细胞的成软骨相关基因; II型胶原免疫组化染色的阳性细胞染色及统计结果显示, 3D悬滴培养比贴壁培养的诱导的hUC-MSCs成软骨能力更强。3D悬滴培养法是一种理想的hUC-MSCs诱导成软骨培养方法。

关键词 人脐带间充质干细胞; 3D悬滴培养; 贴壁培养; 3D微球; 成软骨细胞诱导

Comparison of Two Different Methods Induced Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells to Differentiate into Chondrocytes *In Vitro*

ZHANG Quan^{1#}, CHEN Lian^{2#}, CHANG Cheng², ZHANG Yaqi², XIAO Cuihong¹, RAO Wei¹,
HAN Bing¹, WU Dongcheng^{1,2*}¹Wuhan Hamilton Biotechnology-Co., LTD, Wuhan 430075, China;²Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract The purpose of this study is to study the chondrogenic properties capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) after three-dimensional hanging drop culture method and adherent

收稿日期: 2019-03-04 接受日期: 2019-05-21

武汉市“3551光谷人才计划”资助项目(批准号: 武新管(2017)129号)和武汉市科技局应用基础研究计划(批准号: 2017060201010201)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 027-87276298, E-mail: bcdcwu@hotmail.com

Received: March 4, 2019 Accepted: May 21, 2019

This work was supported by the 3551 Optical Valley Talents Plan of Wuhan City (Grant No.WXG(2017)129) and the Applied Basic Research Program of Wuhan Science and Technology Bureau (Grant No.2017060201010201)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-27-87276298, E-mail: bcdcwu@hotmail.com

网络出版时间: 2019-11-12 12:36:39 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1219.040.html>

culture method. The hUC-MSCs were isolated from Wharton's jelly and cultured by mechanical homogenization *in vitro*. The morphology of 3D spheroid under optical microscope, and surface antigens were examined by flow cytometric analysis were compared. The hUC-MSCs were induced to differentiate into chondrocytes *in vitro*, and expression levels of chondrocyte related genes *ACAN*, *MIA*, *COL1A2*, *COL2A1* and *COL10A1* were detected by fluorescence quantitative PCR on the 3rd, 7th and 14th day. The microspheres were induced for a chondro-like appearance and visualized by Saffron O staining and Alcian blue staining. Immunohistochemistry was used to detect the expression of type II collagen. Flow cytometry data showed the hUC-MSCs at passage 5 are positive for CD105, CD90, CD44, CD73, negative for CD19, CD34, CD45, HLA-DR, which were in line with The morphological characteristics and surface immune markers of mesenchymal stem cells developed by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) in 2006. The hUC-MSCs cultured in 3D hanging drop culture can form a dense cell polymer, and the cell morphology of adherent culture can grow into a spindle shape. The results of Saffron O and Alcian blue staining showed that both the hUC-MSCs cultured in 3D hanging drop culture and adherent culture could form chondrocytes, but the results of fluorescence real-time quantitative PCR showed that the number of chondrogenic genes related to the formation of chondrocytes in the hUC-MSCs cultured in 3D hanging drop culture were more than that in the adherent culture. The semi-quantitative analysis result of type II collagen with immunohistochemistry showed that the chondrogenic ability of hUC-MSCs induced by 3D hanging drop culture was stronger than that by adherent culture. 3D hanging drop cultured technology is an ideal method to culture hUC-MSCs.

Keywords human umbilical cord mesenchymal stem cells; three-dimensional hanging drop culture; adherent culture; three-dimensional spheroid; chondrocytes induction

关节软骨是一种表面光滑,能减少相邻两骨摩擦,缓冲运动时产生振动但缺乏自身修复能力的负重结缔组织。目前治疗软骨缺损的方法主要包括自体 and 异体骨软骨移植术、自体软骨细胞移植术、微裂缝和镶嵌成形术等,但这些方法各自都有其局限性。近年来,组织工程软骨修复成为软骨修复研究的热点与重点。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是当前最有前景的种子细胞。MSCs作为一类具有自我更新和多向分化潜能的未分化细胞,因其具有自我更新复制和多向分化潜能,已被证明具有强大的修复再生损伤组织的能力。其主要作用机制包括:迁移定植于损伤部位、分化再生损伤的组织细胞,分泌细胞生长因子、营养局部组织、刺激内源性干细胞活化,分泌免疫调节和炎症抑制因子、降低局部炎性反应、保护组织细胞等^[1-2]。大量研究表明, MSCs可以诱导分化成为成骨和成软骨细胞^[3-6]。MSC的这一特性已经成为鉴定其多向分化潜能的常规指标之一。MSCs疗法被应用于治疗各种难治性疾病,其中包括骨性疾病,如骨关节炎、股骨头坏死和椎间盘退化等^[7]。其中,人脐带来源间充质干细(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)作为更为“年轻”的成体干细胞,免

疫原性低、无致瘤性、安全可靠,且具有增殖能力、分化潜能、免疫调节与抑制炎症反应等优势,明显优于其他成体MSCs。加之取材培养更为容易且无伦理障碍、细胞质量受供体影响极小、临床研究应用前景更为优越、可操作性更好,有望成为骨组织工程理想的种子细胞来源。

二维细胞培养技术可通过细胞的快速分裂高效率地制造产物,但在很多情况下,单层细胞培养技术所得到的研究结果和体内的情况不符,因为细胞在体外的环境下增生,逐渐丧失了原有的性状。随着组织工程学新兴发展,以3D悬滴培养为代表三维细胞培养技术就应运而生了^[8]。一方面,3D悬滴培养由于细胞排列更加紧密,细胞间的微环境的改变使干细胞表面膜分子间的一系列信号转导及细胞内的信号传导发生变化,促进各种干细胞的分化^[9-10],如有学者指出,使用3D球形体系培养骨髓MSCs,其成脂和成骨分化能力与二维单层细胞培养体系相比均显著增强^[11]。但3D悬滴培养是否能促进hUC-MSCs分化潜能尚未见报道。另一方面,成软骨能力较强的MSCs作为种子细胞,多培养在含有细胞分化因子的细胞外基质材料上,与组织工程材料一起用于修复外伤或骨关节炎等疾病引起的关节损伤、关

节软骨缺损^[12], 虽然可分化成能表达蛋白多糖和II型胶原蛋白的稳定成熟的软骨细胞^[13], 但用作组织替代品的理想生物材料必须具备良好的生物相容性和生物降解性, 并且能够支持MSCs的增殖和分化, 而生物材料的优化仍然面临巨大的挑战。采用悬滴培养法使细胞液滴倒挂在培养板上, 细胞通过重力作用相互紧密接触, 形成悬浮生长的微球。与组织材料提供的三维培养技术相比较, 3D悬滴培养简单方便, 不需要特定的生物材料, 细胞聚集生长, 形成组织样结构, 可以更好地模拟体内生理状况^[14]。本研究将分离的hUC-MSCs传代培养至第5代, 研究3D悬滴培养与贴壁培养的hUC-MSCs在形态学和成软骨分化特性上的差异, 为下一步试验和临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脐带组织 新鲜脐带采集于足月健康剖腹产新生儿, 由产妇自愿捐赠并签署知情同意书。脐带采集前产妇经筛选无家族遗传病史, 无传染病史并经HBV、HCV、HIV、梅毒检测阴性。脐带采集后4℃保存, 6 h内完成华通氏胶分离培养。

1.1.2 主要试剂及仪器 干细胞专用培养基、血清替代物ALL Ultrosor G购自美国Lonza公司、DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰酶、L-谷氨酰胺等均购自美国Gibco公司; 丙酮酸钠、地塞米松、ITS、TGF-β等均购自Biosharp公司; 荧光标记的鼠抗人

CD105-FITC、CD90-PE、CD44-PE、CD73-FITC、CD19-PE、CD34-FITC、CD45-PE和HLA-DR-PE单克隆抗体均购自美国BioLegend公司; 干细胞成软骨诱导培养基购自深圳伟通生物科技有限公司; 抗坏血酸、脯氨酸、冰乙酸、甲醇购自国药集团化学试剂有限公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司; TRIzol购自美国Invitrogen公司。荧光定量PCR引物由天一辉远生物科技有限公司合成, 相关引物序列详见表1。倒置显微镜购自重庆澳浦光电有限公司; 流式细胞仪购自美国Beckman公司; 实时荧光定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 hUC-MSCs的分离与培养 新鲜脐带采集于足月健康剖腹产新生儿, 由产妇自愿捐赠并签署知情同意书, 并通过武汉大学中南医院伦理委员会批准。脐带采集前产妇经筛选无家族遗传病史, 无传染病史并HBV、HCV、HIV、梅毒检测阴性。hUC-MSCs的分离培养采用自主研发的人脐带间充质干细胞分离培养方法^[16]进行。收集分离的原代hUC-MSCs, 以2 500细胞/cm²的密度接种培养于无血清干细胞专用培养液中, 当细胞生长至融合度为80%~90%时, 常规胰酶消化收集细胞, 反复传代培养至第5代hUC-MSCs备用。

1.2.2 hUC-MSCs免疫标记鉴定 收集第5代hUC-MSCs, PBS洗涤后, 制备6×10⁶细胞/mL的细胞悬液。将细胞悬液按100 μL/管(5×10⁵细胞)分装, 分别加

表1 成软骨基因荧光定量PCR引物序列(根据参考文献[15]修改)

Table 1 qRT-PCR primers for expression of chondrocytic genes (modified from reference [15])

基因 Genes	引物 Primers	引物序列(5'→3') Sequences of primers (5'→3')
GAPDH	GAPDH-F	TGC ACC ACCAACTGCTTAGC
	GAPDH-R	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG
ACAN	ACAN-F	TGC ATT CCA CGA AGC TAA CCT T
	ACAN-R	GAC GCC TCG CCT TCT TGA A
MIA	MIA-F	CCC AGT AGC ATT GTC CGA GA
	MIA-R	GGC AGT AGA AAT CCC ATT TGT CT
COL1A2	COL1A2-F	GCT GGC AGC CAG TTT GAA TAT AAT
	COL1A2-R	CAG GCG CAT GAA GGC AAG T
COL2A1	COL2A1-F	AGA GGT ATA ATG ATA AGG ATG TGT GGA AG
	COL2A1-R	GTC GTC GCA GAG GAC AGT CC
COL10A1	COL10A1-F	CAC GCA GAA TCC ATC TGA GAA T
	COL10A1-R	CGT TCA GCG TAA AAC ACT CCA T

入5 μL 不同荧光素标记的CD105、CD90、CD44、CD73、CD19、CD34、CD45及HLA-DR单克隆抗体,轻微振荡混匀,避光室温孵育30 min; PBS洗涤2遍,加500 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测hUC-MSCs表面抗原^[17]。

1.2.3 hUC-MSCs成软骨细胞诱导分化 hUC-MSCs细胞活率:取重悬于无血清干细胞专用培养液的第5代待测hUC-MSCs,采用Live/Dead染色法进行细胞计数并检测细胞活率。

3D微球和贴壁细胞的制备: hUC-MSCs以 1×10^7 个/mL的密度重悬于LONZA培养基完全培养液中;将细胞悬液滴加至6孔细胞培养板底部(15 μL /滴,5~7滴/孔),设置诱导组和对照组;小心移于细胞培养箱中,以5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的条件培养2 h后,加入完全培养基2 mL/孔,继续培养过夜待细胞滴收缩形成细胞微球。同时,将hUC-MSCs细胞以 1×10^6 个/孔的数量hUC-MSCs细胞接种至含有细胞爬片6孔板中,37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的无菌培养箱中培养24~48 h。

诱导hUC-MSCs向软骨细胞分化的方法步骤。

(1)对于3D悬滴培养,待细胞微球形成后,诱导组更换成LONZA培养基软骨诱导分化培养基,对照组继续使用LONZA培养基完全培养液,每3天分别更换培养基1次,培养14~28天。对于贴壁培养,观察hUC-MSCs的生长状态,直至细胞融合度达到80%,诱导组吸去培养基,更换为成软骨诱导培养基。

(2)培养第3、7、14天,分别取诱导组和对照组细胞各1孔,去培养基,PBS清洗1次,分别加入TRIzol试剂1 mL/孔,反复吹打至细胞微球溶解,提取RNA备用。

(3)培养28天后,除去诱导培养基,PBS清洗细胞微球1次,4%的甲醛溶液固定细胞30 min; PBS清洗2次,分别做如下处理:

(a)直接肉眼观察拍照。

(b)1%的阿利辛蓝染色30 min; 0.1 mol/L HCl清洗3次,去除残留的染色液;肉眼观察拍照。

(c)对固定后的细胞微球进行常规石蜡包埋、制片、脱蜡和清洗,然后加入0.1%番红O染色液染色1 min,并依次用95%乙醇脱水2~3 s、二甲苯透明15 min、二甲苯II透明5 min,最后用中性树脂封片液固定封片,镜下观察拍照。

(d)另取部分细胞微球,置于-80 $^\circ\text{C}$ 冰冻后切片,然后滴加1%阿利辛蓝染色1 min,经水清洗去染色液

后用中性树脂封片,镜下观察拍照。

1.2.4 石蜡切片免疫组化实验 免疫组化是利用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及定量的研究。本研究将包埋的石蜡切片脱蜡至水、抗原修复后阻断内源性过氧化物酶,经过血清封闭后,进行一抗、二抗孵育,最后采用DAB法显色,并用苏木素复染细胞核、脱水封片后置于显微镜下观察,拍照保存。

1.2.5 荧光定量PCR法检测诱导成软骨相关基因的相对表达量分析 提取成软骨诱导培养3、7、14天的RNA,按逆转录试剂盒说明书操作合成cDNA,并经荧光定量PCR法检测与细胞分化类型相关的特征性基因(成软骨:COL2A1、ACAN、MIA、COL1A2、COL10A1)的表达情况。相关引物序列详见表1。设定PCR反应条件为:95 $^\circ\text{C}$ 预变性3 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性20 s, 55 $^\circ\text{C}$ 退火30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸30 s,第2步至第4步重复40个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算样品中检测基因相对于内参基因的相对表达量,具体算法为:相对表达量= $2^{-(\text{检测基因}-\text{Ct内参基因})}$ 。诱导组相对于对照组表达量的倍数=诱导组相对表达量/对照组相对表达量。

1.3 统计学分析

用Image-Pro Plus分析系统(Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA)分析免疫组织化学染色结果,选择梗塞区域中透明和非重叠组织的7个视野用于半定量分析。应用SPSS 19(SPSS Science Inc., Chicago, Illinois)软件进行数据分析。所有的数据均以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 第5代hUC-MSCs的表面免疫标志物鉴定

流式细胞仪检测结果(图1)显示,本次第5代hUC-MSCs的表面标记CD73、CD90、CD105阳性表达率均 $>98\%$,CD34、CD14、CD45、CD19、HLA-DR阳性表达率均 $<2\%$,完全符合国际细胞疗法协会所制定的间充质干细胞表面免疫标志物的鉴定标准^[18],细胞均一度高。

2.2 hUC-MSCs细胞3D微球的形成和形态

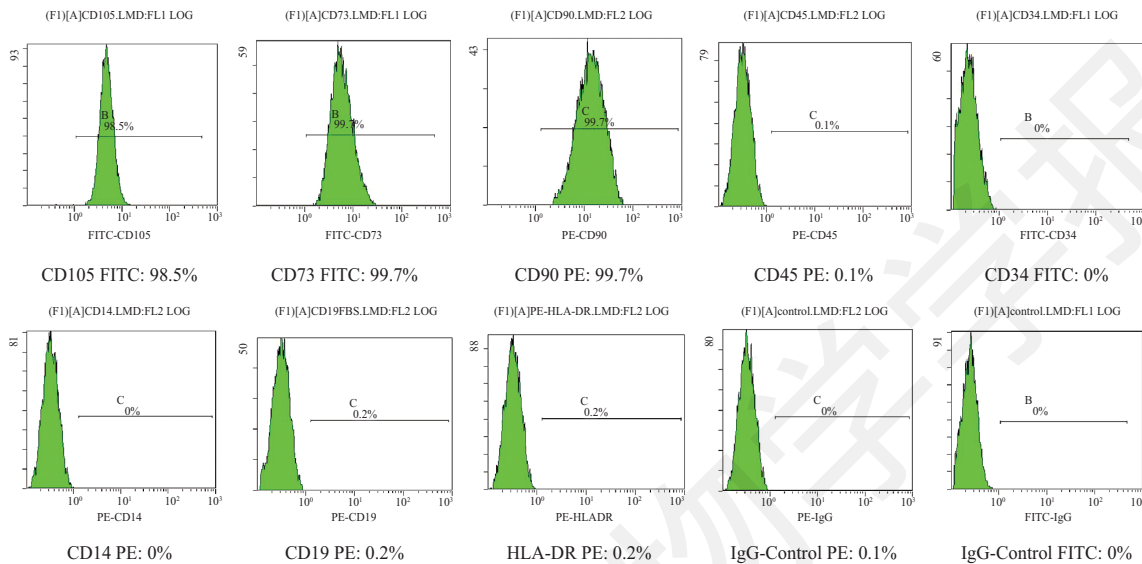
首先将第5代hUC-MSCs制成高浓度细胞悬液,并于24 h时观察细胞微球形成情况(图2)。结果发现,

细胞团自发收缩形成细胞微球并完全脱离培养载体底部成悬浮状态(图2A~图2D)。细胞团中细胞分散并呈贴壁生长状态, 因此不能收缩形成细胞微球(图2A~图2E)。镜下观察发现, 贴壁培养的第5代hUC-

MSCs的细胞形态与排列类似于成纤维细胞, 呈长梭形流水状生长(图2F和图2G)。

2.3 hUC-MSCs成软骨细胞诱导分化结果

间充质干细胞的多向分化潜能是其临床应用



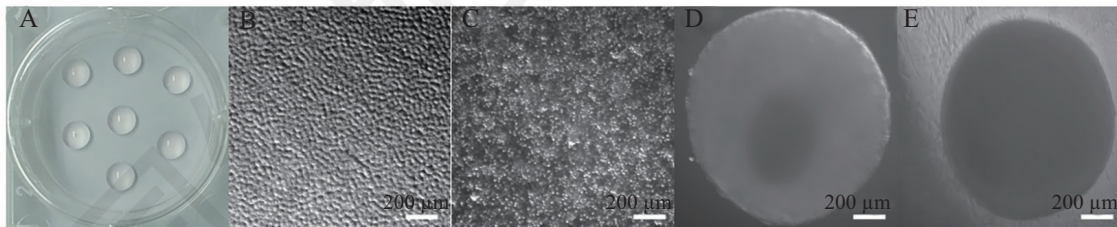
流式细胞分析结果显示, 第5代的hUC-MSCs的细胞表面免疫标志物呈完全相同的表达模式: CD105、CD90和CD73阳性表达, 而CD19、CD34、CD14、CD45及HLA-DR阴性表达。

Flow cytometry data show a expression pattern of the surface markers on hUC-MSCs at passage 5 tested: CD105, CD90, CD73 positive expression, and CD19, CD34, CD14, CD45, HLA-DR negative.

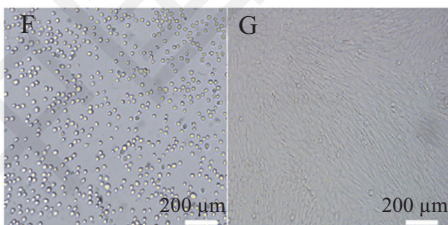
图1 第5代人脐带间充质干细胞的表面标记表达

Fig.1 Characterization of hUC-MSCs surface markers at passage 5

Observation on the formation and morphology of hUC-MSCs microspheres



Observation of the morphology of hUC-MSCs adherent culture



A: hUC-MSCs高浓度细胞悬液滴于6孔板底部; B: 显微镜下观察悬液滴加后的初始状态; C: 2~3 h后细胞贴附于培养皿底部; D: hUC-MSCs于24 h后形成细胞微球的典型形态; E: hUC-MSCs于24 h后不能形成微球的典型形态; F: hUC-MSCs接种于6孔板起始形态; G: hUC-MSCs于72 h后贴壁的典型形态。

A: hUC-MSCs high-concentration cell suspension droplets were placed at the bottom of the 6-well plate; B: observe the initial state of the suspension drops under a 100-fold microscope; C: the cells were attached to the bottom of the culture dish after 2-3 hours; D: typical morphology of cellular microspheres formed by hUC-MSCs after 24 h; E: hUC-MSCs could not form the typical morphology of microspheres after 24 h. F: hUC-MSCs were inoculated in the initial form of 6-well plate; G: typical morphology of hUC-MSCs after 72 h post-adherent.

图2 hUC-MSCs细胞微球的形成和形态

Fig.2 Formation and morphology of hUC-MSCs cell microspheres

的关键生物学特征之一。贴壁培养和3D悬滴培养诱导的第5代hUC-MSCs 3天、7天、14天成软骨诱导后,检测与细胞分化类型相关的特征性基因 $COL2A1$ 、 $ACAN$ 、 MIA 、 $COL1A2$ 、 $COL10A1$ 的表达模式存在差异性。结果显示,3个不同时间点3D悬滴培养诱导分化成软骨基因表达上调数分别为0、5、5个,而3个不同时间点中贴壁培养诱导分化成软骨基因表达上调数均为0、2、2个。同时还发现,诱导分化14天的细胞的多数基因表达水平方面均高于诱导分化3天的细胞(表2)。当3D悬滴培养和贴壁培养的

第5代hUC-MSCs 28天成软骨诱导后,诱导的第5代hUC-MSCs成软骨细胞进行番红O和阿利辛蓝染色,结果显示两种方法均具有诱导分化成软骨细胞的能力(图3)。

2.4 hUC-MSCs诱导成软骨II型胶原免疫组化染色结果

3D悬滴培养和贴壁培养的第5代hUC-MSCs 28天成软骨诱导后进行II型胶原免疫组化染色分析:对照组细胞质和细胞膜呈淡黄色,为弱阳性着色(图4A和图4D),成软骨细胞诱导组hUC-MSCs组

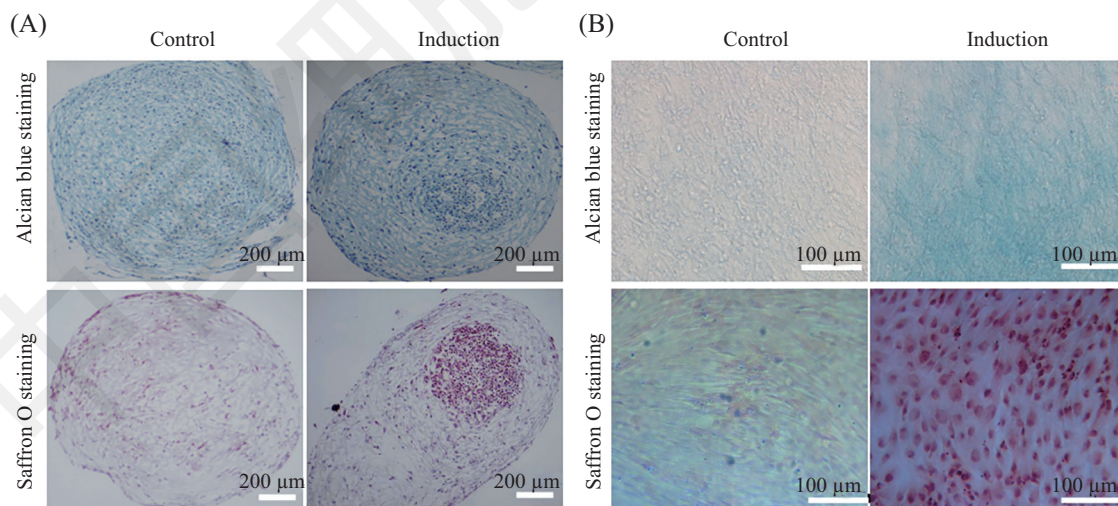
表2 3D悬滴培养和贴壁培养基因表达情况比较

Table 2 Comparison of gene expression of chondroblast between 3D hanging drop culture and adherent culture

基因 Genes	诱导分化3天 Induction on the 3 rd day		诱导分化7天 Induction on the 7 th day		诱导分化14天 Induction on the 14 th day	
	贴壁诱导 Adherent culture	悬滴3D诱导 3D hanging drop culture	贴壁诱导 Adherent culture	悬滴3D诱导 3D hanging drop culture	贴壁诱导 Adherent culture	悬滴3D诱导 3D hanging drop culture
$COL2A1$	0.69±0.23	1.10±0.23	2.71±0.44	2.64±0.17	5.32±1.54	12.94±1.56
$ACAN$	0.57±0.46	0.43±0.55	0.11±0.08	12.70±5.73	0.79±0.28	9.83±2.45
MIA	0.36±0.15	0.67±0.10	2.76±0.11	2.14±0.82	4.11±1.35	2.23±0.29
$COL1A2$	1.48±0.41	1.69±0.15	1.29±0.18	2.64±0.17	0.74±0.11	3.23±0.69
$COL10A1$	1.52±0.44	0.43±0.03	0.91±0.13	2.57±2.38	0.29±0.04	3.25±0.40
The number of up-regulated genes	0	0	2	5	2	5

基因相对表达倍数改变在2倍以上视为上调。 $\bar{x}\pm s, n=3$ 。

When the relative expression fold of gene is changed by more than 2 times, it is regarded as up-regulated. $\bar{x}\pm s, n=3$.

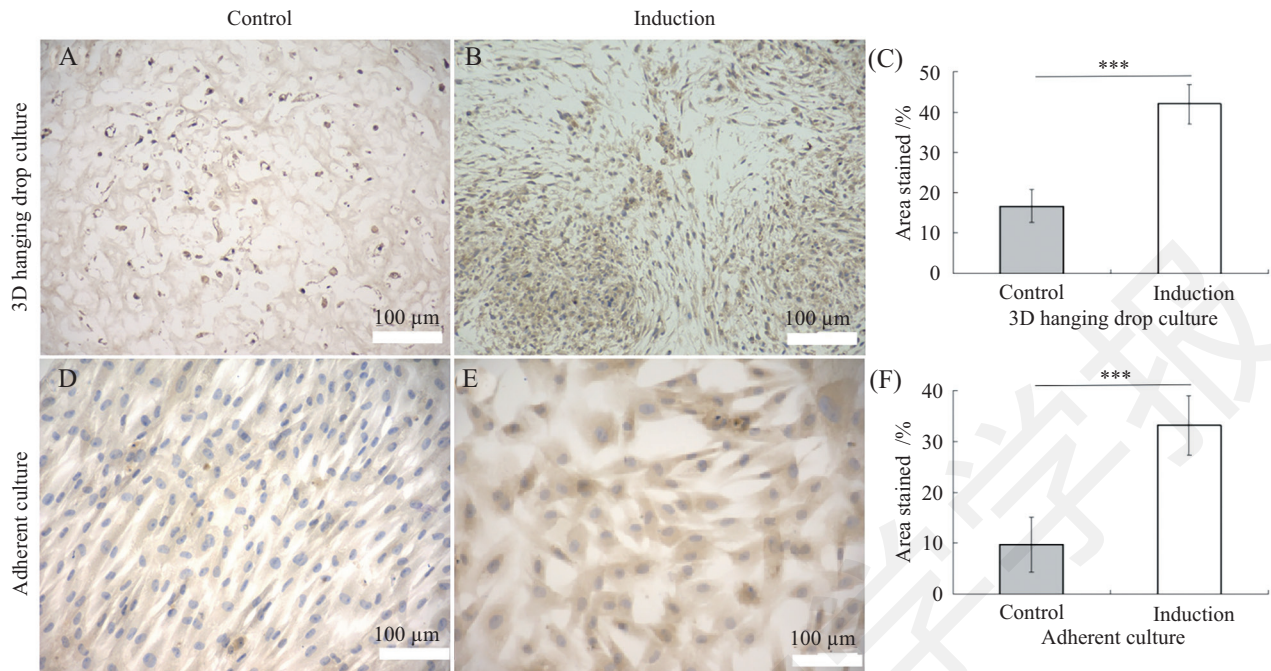


A: 成软骨分化3D微球成软骨分化培养,细胞微球石蜡包埋切片番红O染色与阿利辛蓝染色均见微球外周大量细胞外基质组分阳性着色; B: 成软骨分化2D诱导培养。

A: chondroblast differentiation 3D microspheres chondroblast differentiation culture. Chondroblast differentiation and culture of 3D microspheres. Paraffin-embedded paraffin-embedded sections of cell microspheres showed positive staining of a large number of extracellular matrix components around the microspheres in saffron O staining and in alcian blue staining. B: 2D induction culture of chondroblast differentiation.

图3 第5代hUC-MSCs的体外诱导成软骨分化

Fig.3 Induced for chondrogenic differentiation of hUC-MSCs at passage 5 in vitro



A、D: 对照组II型胶原免疫组化染色结果; B、E: 诱导组II型胶原免疫组化染色结果; C、F: 3D悬滴培养和贴壁培养的细胞随机选取5个透明、非重叠样本区域, 用Image-Pro Plus分析系统对II型胶原免疫组化染色阳性结果进行统计分析结果, *** $P < 0.001$ 。

A,D: the immunohistochemical staining results of type II of control groups; B,E: the immunohistochemical staining results of type II of induction groups C,F: the semi-quantitative analysis result of immunohistochemistry between 3D hanging drop culture and adherent culture from 5 randomly selected fields using mage-Pro Plus分析系统, *** $P < 0.001$ 。

图4 3D悬滴培养和贴壁培养hUC-MSCs诱导28天成软骨II型胶原免疫组化染色结果

Fig.4 Immunohistochemical staining of type II collagen of cartilage induced by hUC-MSCs after 3D hanging drop culture and adherent culture on the 28th day

细胞质和细胞膜呈棕黄色, 为强阳性着色(图4B和图4E); 3D悬滴培养和贴壁培养的细胞随机选取5个透明、非重叠样本区域, 用Image-Pro Plus分析系统对II型胶原免疫组化染色阳性结果进行统计分析, 结果显示, 3D悬滴培养的诱导的第5代hUC-MSCs成软骨能力更强(图4C和图4F)。两组间比较用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 讨论

干细胞临床应用的前提条件是体外传代扩增培养, 获得足够数量的干细胞。本研究结果显示, 第5代次hUC-MSCs呈典型的干细胞表面标志物表达特征, 即CD105、CD73与CD90高表达(>98%), 而不表达或低表达CD14、CD19、CD34、CD45及HLA-DR(<2%)(图1), 证明我们的hUC-MSCs分离培养成功。已有研究证实, hUC-MSCs是一种较其他成体干细胞更年轻的间充质干细胞, 具有更强更高效的多向分化潜能, 可分化成外胚层的神经细胞和神经胶质细胞, 中胚层的成骨、成软骨和成脂肪细胞以

及内胚层的肝脏、胰岛细胞等^[19]。同时, 本实验室前期的工作也发现, hUC-MSCs经体外诱导可分化成为成骨和成脂肪细胞^[6]。

已有的大部分MSCs横向分化为成软骨细胞的研究显示, 贴壁培养中的二维贴壁细胞通过多种因子共同作用来实现分化。随着生物材料学的发展, 细胞3D悬滴培养技术可以有效地解决“细胞脱离体内三维生长环境而难以维持和行使正常的生物学功能”这一问题。有研究使用特定的诱导基质, 将MSCs接种至聚羧基乙酸内酯制成的纳米纤维支架中, 并通过各种技术手段对分化后的细胞进行了一系列的验证^[20], 证明MSCs成功诱导为脂肪细胞、软骨细胞和骨细胞。同时, 将人MSCs接种于0.3%的胶原凝胶中, 分别经过20天在软骨细胞诱导环境下分化为软骨细胞, 经过14天在骨细胞诱导环境下则分化为骨细胞。因此, 以生物工程材料作为培养基质, 可以为MSCs提供良好的三维分化环境^[21]。3D悬滴培养法是利用含细胞液滴的表面张力形成无骨架三维细胞球, 该方法简单便捷, 但通常是在培养皿中形

成细胞球。本研究的3D悬滴培养(图1A~图1C)的原理就是借助于重力作用,使液滴内的细胞相互紧密聚集,形成悬浮的球状二维结构(图1D),并得以在该结构内继续生长扩增。本研究采用3D悬滴培养法细胞形成3D微球的概率为90%~100%,主要与细胞的高浓度与悬滴滴加的稳定性相关。

与单层hUC-MSCs贴壁培养效果相比较,hUC-MSCs在3D结构中能更好地维持其分化成熟后的各种功能。在3D环境中,细胞之间的广泛接触,有助于细胞桥接、紧密连接和胆小管的形成,可以有效保持hUC-MSCs表型稳定。对石蜡包埋切片进行番红染色,可以看到大量细胞聚集在球体外侧面,球体内部形成一空囊样结构。3D悬滴法培养由于细胞间排列更加紧密及微环境的改变,使干细胞表面膜分子间的一系列信号转导及细胞内的信号传导发生了变化,可以有效促进干细胞的各种分化。另外,可利用成软骨细胞相关特征性基因(包括*ACAN*、*MIA*、*Col2A1*、*Col1A2*和*Col10A1*等)表达情况作为判定hUC-MSCs细胞成软骨分化能力的重要指标^[15,22]。如研究发现,MIA与促进细胞向软骨分化和抑制骨分化有关^[23]。本文采用的3D悬滴培养细胞微球诱导分化方法与贴壁细胞诱导分化方法诱导分化第3天、第7天、第14天相关软骨细胞特定基因表达的差异。结果发现,悬滴法3D细胞微球诱导分化方法在第7天、第14天诱导的细胞在基因表达上调的数目方面均多于贴壁细胞诱导分化方法(表2),但番红O和阿利辛蓝染色结果显示,3D悬滴培养和贴壁培养的hUC-MSCs均能形成软骨细胞,进而提示采用3D悬滴培养诱导分化方法较贴壁细胞诱导分化方法成软骨诱导分化效率更高,而长时间诱导分化较短时间诱导分化的效率高,同时也证实基于软骨细胞分化相关基因表达分析方法是一个有效的hUC-MSCs成软骨诱导分化能力的定量评价方法。

我们在hUC-MSCs成软骨细胞诱导分化研究中发现,采用商业化诱导分化培养基均能诱导贴壁培养的hUC-MSCs呈现阿利辛蓝染色阳性,单纯的贴壁培养的阿利辛蓝染色结果并不能有效预测相关细胞是否具有软骨样细胞微球形成能力。然而,3D悬滴培养的hUC-MSCs在经诱导分化形成软骨样细胞微球的能力上存在相对明显的差异,但可依赖主观的判断;结合3D悬滴培养和组织切片染色,可进一步分辨hUC-MSCs在成软骨细胞诱导分化能力上的

强弱。组织切片染色可有效验证软骨样细胞微球形成能力,同时也克服了贴壁培养阿利辛蓝染色法的缺陷。本研究采用II型胶原免疫组化检测3D悬滴培养诱导hUC-MSCs成软骨的能力,结果显示,3D悬滴培养比贴壁培养诱导的hUC-MSCs成软骨能力更强,也确切地说明这一点。

综上所述,我们的研究显示,3D悬滴法悬滴培养较贴壁培养更易诱导hUC-MSCs成软骨。随着生物医药领域、再生医学领域和骨病学领域研究的进一步深入,3D悬滴培养hUC-MSCs以大量获得种子细胞并且提高种子细胞的多向分化潜能将会是一项重要的研究,为实现完全性和功能性的软骨组织再生、为探索新型的软骨组织疾病治疗手段提供理论和实验依据。

参考文献 (References)

- Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1): 125.
- 施福东, 赵同标, 伊焕发, 林同香, 杨永广, 徐洋, 等. 干细胞分化产生的免疫原性与免疫耐受诱导. 中国科技成果(Shi Dongfu, Zhao Tongbiao, Yi Huanfa, Lin Tongxiang, Yang Yongguang, Xu Yang, *et al.* China Science and Technology Achievements) 2017; 18: 50-2.
- Li M, Luo X, Lü XT, Liu V, Zhao GY, Zhang X, *et al.* In vivo human adipose-derived mesenchymal stem cell tracking after intra-articular delivery in a rat osteoarthritis model. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1): 160.
- Pablo FP, Rodríguez-Lesende I, Alexandre DL, Jesús Mateos F. CD105⁺-mesenchymal stem cells migrate into osteoarthritis joint: An animal model. *PLoS One* 2017; 12(11): e0188072.
- Wang W, He N, Feng C, Liu V, Zhang L, Wang F, *et al.* Human adipose-derived mesenchymal progenitor cells engraft into rabbit articular cartilage. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 12076-91.
- 张权, 张亚奇, 饶巍, 周端鹏, 韩兵, 武栋成. 长期传代培养对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响. 中国细胞生物学学报(Zhang Quan, Zhang Yaqi, Rao Wei, Zhou Duanpeng, Han Bing, Wu Dongcheng. Characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells after long-term expansion. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2019; 41(1): 42-52.
- Chang RW, Falconer J, Stulberg SD, Arnold WJ, Manheim LM, Dyer AR. A randomized, controlled trial of arthroscopic surgery versus closed-needle joint lavage for patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1993; 36(3): 289-96.
- Voytik-Harbin SL. Three-dimensional extracellular matrix substrates for cell culture. *Methods Cell Bio* 2001; 63(2): 561-81.
- Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung Ung-il, Yamasaki Y, *et al.* 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cell. *Biomaterials* 2009; 30(14): 2705-15.
- Bartosh TJ, Joni H Ylöstalo, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, *et al.* Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their anti-in-

- flammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(31): 13724-9.
- 11 Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung UI, Yamasaki Y, *et al.* 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2009; 30(14): 2705-15.
- 12 Wang Y, Yuan M, Guo QY, Lu SB, Peng J. Mesenchymal stem cells for treating articular cartilage defects and osteoarthritis. *Cell Transplant* 2015; 24(9): 1661-78.
- 13 Murdoch AD, Hardingham TE, Eyre DR, Fernandes RJ. The development of a mature collagen network in cartilage from human bone marrow stem cells in Transwell culture. *Matrix Biol* 2016; 50(11): 16-26.
- 14 Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2003; 427(6970): 148-54.
- 15 张可华, 刘静, 纳涛, 袁宝珠. 人间充质干细胞体外成软骨分化能力综合评价策略研究. *中国新药杂志*(Zhang Kehua, Liu Jing, Na Tao, Yuan Baozhu. A comprehensive evaluation strategy for chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of New Drugs*) 2017; 26(18): 2196-203.
- 16 姚惟琦, 武栋成. 一种人脐带间充质干细胞分离培养方法. *中国*(Yao Weiqi, Wu Dongcheng. A method for isolation of human umbilical cord mesenchymal stem cell. *China*) 201110261543.5. 2016-12-14.
- 17 Li S, Wang Y, Guan L, Ji M. Characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells during *ex vivo* expansion. *Mol Med Rep* 2015; 12(3): 4320-5.
- 18 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 19 Grade M, Difilippantonio MJ, Camps J. Patterns of chromosomal aberrations in solid tumors. *Recent Results Cancer Res* 2015; 200: 115-42.
- 20 Li WJ, Tuli R, Huang XX, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2005; 26(25): 5158-66.
- 21 Yoneno K, Ohno S, Tanimoto K, Honda K, Tanaka N, Doi T, *et al.* Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in three-dimensional collagen gel cultures. *J Biomed Mater Res Part A* 2005; 75(3): 733-41.
- 22 Tan L, Zhao B, Ge FT, Sun DH, Yu T. Shockwaves inhibit chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in association with adenosine and A2B receptors. *Sci Rep* 2017; 7(1): 14377.
- 23 Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001; 268(2): 189-200.