

## 去分化间充质干细胞成骨再分化潜能的实验研究

张 慧<sup>1</sup>, 王贵超<sup>1</sup>, 韩兴龙<sup>1</sup>, 顾巧丽<sup>1</sup>, 黄 晨<sup>1</sup>, 谢 芳<sup>2</sup>, 施 勤<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 苏州大学附属第一医院骨科, 江苏 苏州 215006; <sup>2</sup> 苏州大学基础医学与生物科学学院病理系, 江苏 苏州 215021)

**[摘 要]** **目的:**研究去分化间充质干细胞(de-differentiated mesenchymal stem cells, De-MSCs)成骨再分化能力。**方法:**以 MSCs 为对照, 分别采用 Cell Count Kit(CCK8)法、实时定量 PCR(qPCR)、碱性磷酸酶(ALP)活性和茜素红染色法检测 De-MSCs 增殖能力、成骨相关基因、成骨再分化能力等。**结果:**De-MSCs 可表达干细胞表面标志, 在成骨培养基中增殖能力高于 MSCs ( $P < 0.05$ ), 成骨相关基因 (Runx2、Osterix、Bmp2) 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), ALP 活性检测发现 De-MSCs 明显高于 MSCs 组 ( $P < 0.05$ ), 28 d 后茜素红染色可见红色结节。**结论:**De-MSCs 具备某些 MSCs 特征, 但是体外再次成骨效率明显提高, De-MSCs 可作更优质种子细胞, 为再生医学开拓新的思路。

**[关键词]** 去分化间充质干细胞; 间充质干细胞; 成骨再分化

**[中图分类号]** Q254

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)08-1044-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130804

### Osteogenic redifferentiation of de-differentiated MSCs

Zhang Hui<sup>1</sup>, Wang Guichao<sup>1</sup>, Han Xinglong<sup>1</sup>, Gu Qiaoli<sup>1</sup>, Huang Chen<sup>1</sup>, Xie Fang<sup>2</sup>, Shi Qin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006; <sup>2</sup>Department of Pathology, College of Medicine and Biological Sciences of Soochow University, Suzhou 215021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the osteogenic differentiation potential of de-differentiated mesenchymal stem cells (De-MSCs).

**Methods:** Compared with MSCs, the proliferation capacity and osteogenic related-gene expression of De-MSCs were detected using CCK8 and qPCR assay. Meanwhile the osteogenic redifferentiation potential was measured by the ALP activity assay and the bone formation was confirmed by alizarin red staining. **Results:** De-MSCs could express stem cells markers, proliferation capacity was obviously higher than MSCs in osteogenic medium statistically. The expression levels of osteogenic related genes and ALP activities were remarkably increased compared with MSCs. Red nodules were observed with alizarin red staining after De-MSCs were cultured in osteogenic medium for 28 days. **Conclusion:** De-MSCs retain some MSC traits, with a higher osteogenic differentiation efficiency than MSCs. De-MSCs could be an alternative potential seed cells in tissue engineering.

**[Key words]** dedifferentiation mesenchymal stem cell; mesenchymal stem cell; osteogenic redifferentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8):1044-1048]

间充质干细胞是一群自我更新的细胞群体, 由于具有低免疫原性和多向分化潜能<sup>[1-2]</sup>, 成为组织工程和再生医学中良好的种子细胞。但是随着研究的深入, 发现移植后的间充质干细胞存在大量死亡的现象, 其低存活率限制了间充质干细胞移植在临床中的应用<sup>[3]</sup>。

去分化是指通过撤除细胞诱导因素, 使已分化细胞失去特有的结构与功能而回复到具有未分化细胞特性的一种细胞修复机制<sup>[4]</sup>, 去分化后的细胞具备了某些原始干细胞特性<sup>[5-6]</sup>, 且再分化速度和效率均有提高<sup>[7]</sup>。Liu 等<sup>[7]</sup>研究表明间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)源性的神经元细胞在撤除神经诱导因子后具有更高的成神经再分化效率。本实验通过将 MSCs 短暂成骨诱导后撤除成骨培养基, 进行去分化培养后, 再次成骨诱导, 分析成骨再分化效率, 阐明去分化 MSCs(De-MSCs)潜在的临床价值, 为临床再生医学提供更优质的种子细胞和新

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81101369); 留学回国人员基金

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: shiqin@suda.edu.cn

的治疗策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

低糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(澳大利亚 Gibco 公司),胰蛋白酶、地塞米松、 $\beta$ -磷酸甘油、2-磷酸-左旋 VitC、茜素红(美国 Sigma 公司),试验涉及流式抗体(美国 eBioscience 公司),CCK8 试剂盒(日本 Dojindo 公司),TRIzol、逆转录试剂及 qPCR 试剂(日本 TaKaRa 公司),ALP 试剂盒(南京基天公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MSCs 分离培养

无菌条件下采集健康成人骨髓 3 ml(按医院规定,并经过患者或家属同意),经 Ficoll 梯度离心收集单个核细胞以  $1 \times 10^5$  个/ml 密度重悬 MSCs 培养基(L-DMEM,10%FBS),接种于 6 孔板中,3 d 换液,经 MSCs 表型鉴定后传代培养,3 代以后用于实验。

#### 1.2.2 De-MSCs 培养

细胞约长满  $75 \text{ cm}^2$  培养皿 80%,PBS 洗 2 次后加入成骨培养基(低糖 DMEM、10%FBS、L-抗坏血酸  $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $\beta$ -磷酸甘油钠  $10 \text{ mmol/ml}$ 、地塞米松  $10^{-8} \text{ mol/L}$ ),7 d 后 PBS 冲洗 2 次,加入 MSCs 培养基继续培养 2 周成为 De-MSCs。

#### 1.2.3 De-MSCs 表面分子标志物的检测

细胞以 0.05%胰蛋白酶消化后按  $1 \times 10^6$  个/管密度重悬,分别加入 CD29-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD90-FITC、CD105-PE、HLA-DR-FITC 抗体,避光孵育 30 min 后 PBS 洗 2 次,流式细胞仪分析。

#### 1.2.4 成骨分化和再分化

将 MSCs 组和 De-MSCs 组细胞胰酶消化后重悬于成骨培养基(浓度均为  $7 \times 10^5$  个/皿),培养 7 d 后分别成为 MSCs-obs 和 De-MSCs-obs,收集细胞,待用。

#### 1.2.5 细胞增殖分析

将 MSCs 组和 De-MSCs 组离心弃上清后重悬于成骨培养基,密度为  $4 \times 10^3$  个/孔,接种于 96 孔板培养。于 1、3、5、7 d 检测细胞增殖能力,实验终止前加入 CCK-8( $20 \mu\text{l/孔}$ ),继续孵育 3 h 后,在 450 nm 波长处检测吸光度值。

#### 1.2.6 成骨能力检测

分别收集 MSCs 组和 De-MSCs 组细胞,经 TRIzol 提取总 RNA,逆转录为 cDNA,行 qPCR 检测相关成骨基因(Runx2、BMP2、Osterix)表达,设 GAPDH 为内对照。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR		
基因	引物序列	
BMP2	Sense	5'-CTTTGGAAGAACTACCAGAAACGAG-3'
	Anti-sense	5'-ATTCGGTGATGGAAACTGCTATTG-3'
Runx2	Sense	5'-CCATATCTCTACTATGGCACTTC-3'
	Anti-sense	5'-GCTTCCATCAGCGTCAACACCATC-3'
Osterix	Sense	5'-CAACTGGCTCTTCTGCGGCAAGAG-3'
	Anti-sense	5'-GCTGGTGTGCTCAGGTGGTC-3'
GAPDH	Sense	5'-CGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTG-3'
	Anti-sense	5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGTTGAAG-3'

#### 1.2.7 碱性磷酸酶(ALP)活性检测

MSCs 与 De-MSCs 分别以  $5 \times 10^5$  个/孔密度接种于 6 孔板中进行成骨诱导,14 d 后收集培养上清,检测碱性磷酸酶活性,分析 ALP 含量。

#### 1.2.8 形态学检测

MSCs 组与 De-MSCs 组成骨诱导 28 d 后,弃上清,去离子水清洗 3 遍,加入固定液固定细胞 30 min 后茜素红染色 45 min,去离子水清洗 3 遍,光镜下观察。

### 1.3 统计学方法

数据分析处理运用 SPSS11.0 软件分析,检验方法采用  $t$  检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。每组实验独立重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 MSCs 与 De-MSCs 形态

光镜下见 MSCs 呈长梭形,经 7 d 成骨诱导后 MSCs 形成明显结节状结构,撤除诱导继续培养 2 周后的 De-MSCs 结节状结构消失,回复到长梭样状态,形态近似 MSCs(图 1)。

### 2.2 De-MSCs 表面分子标志物的检测

流式结果显示 De-MSCs CD90、CD105 表达阳性,CD34、CD45、HLA-DR 表达阴性,提示 De-MSCs 具有某些 MSCs 样细胞特性(图 2)。

### 2.3 细胞增殖分析

MSCs 与 De-MSCs 组在成骨培养基中培养,结果显示 De-MSCs 在 1、3、5、7 d 的增殖力均高于同一时间点的 MSCs。提示 De-MSCs 在再次进行成骨诱导时细胞增殖能力更强( $P < 0.01$ ,图 3)。

### 2.4 成骨能力检测

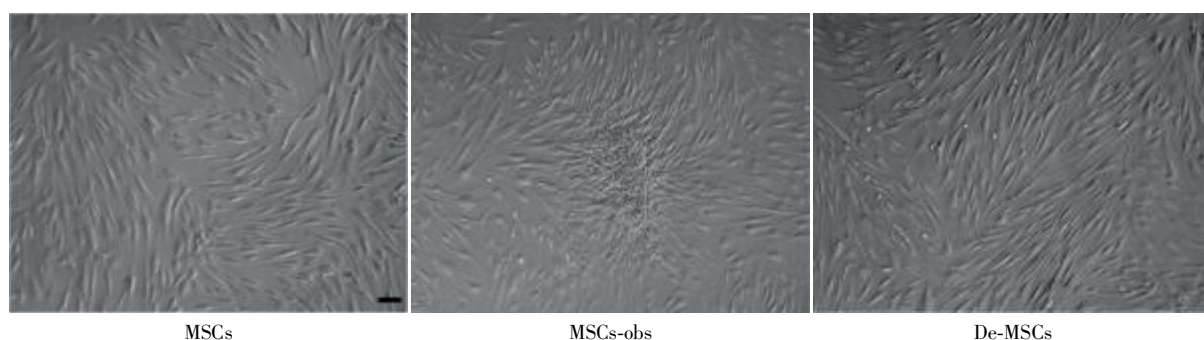
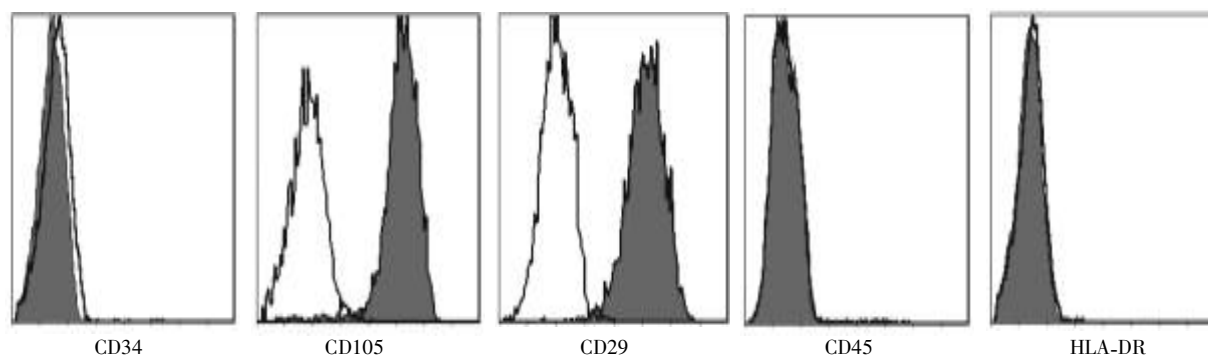
图1 光镜下观察 MSCs、MSCs-obs 及 De-MSCs 形态( $\times 50$ )Figure 1 The morphology of MSCs, MSC-obs and De-MSCs ( $\times 50$ )

图2 流式细胞仪检测 De-MSCs 表达部分 MSCs 表面标志

Figure 2 The surface markers of De-MSCs detected by FACS

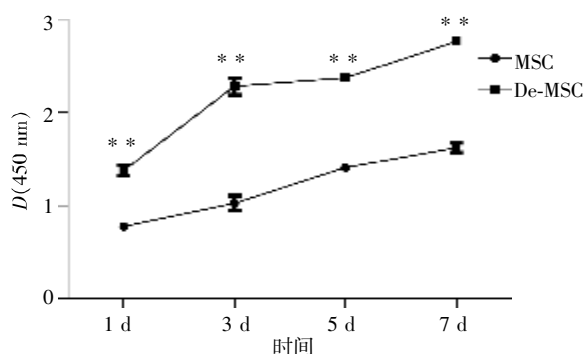
与同时时间点的 MSCs 比较,  $**P < 0.01 (n = 5)$ 。

图3 CCK8 检测 De-MSCs 细胞增殖能力增强

Figure 3 Proliferation potential of De-MSCs increased detected by CCK8

将 MSCs 与 De-MSCs 两组细胞同时成骨诱导 7 d 后检测成骨相关基因, 发现以 MSCs 为对照, De-MSCs 再成骨后基因表达明显高于 MSCs 成骨, Runx2 表达增加约 3 倍, BMP2 增加约 4.5 倍, Osterix 增加约 14 倍 ( $P < 0.01$ , 图 4), 表明 De-MSCs 有更强的成骨分化潜能, 成骨分化效率更高, 诱导后的成骨基因表达比未诱导状态更加明显。

## 2.5 ALP 活性检测

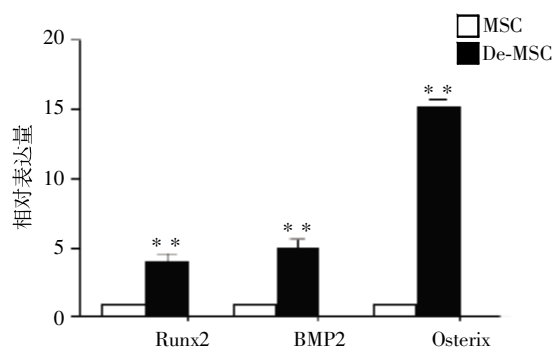
与同时时间点的 MSCs 比较,  $**P < 0.01 (n = 3)$ 。

图4 qPCR 检测 De-MSCs 再次成骨诱导后相关基因表达高于 MSCs

Figure 4 The osteogenic related-gene expressions of De-MSCs were higher than MSCs detected by qPCR

ALP 是成骨细胞活动产物, 浓度值正相关于成骨能力, 是反映成骨能力敏感指标。De-MSCs 与 MSCs 同时成骨诱导 14 d, 分别记为 MSC-obs 和 De-MSC-obs。收集上清检测 ALP 浓度值, 结果显示 De-MSC-obs 显著高于 MSC-obs (MSC-obs 组  $0.58 \pm 0.015$ , De-MSC-obs 组  $0.720 \pm 0.006$ ,  $P < 0.01$ ), 说明 De-MSCs 成骨分化能力较 MSCs 更强(图 5)。

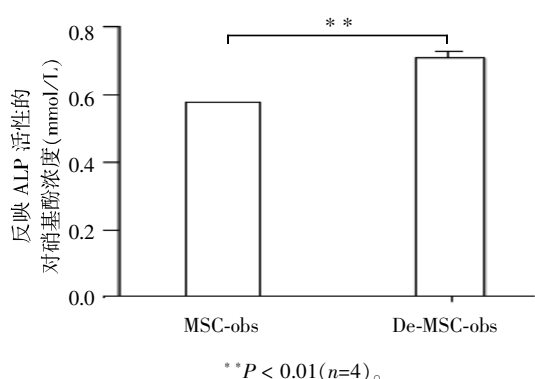
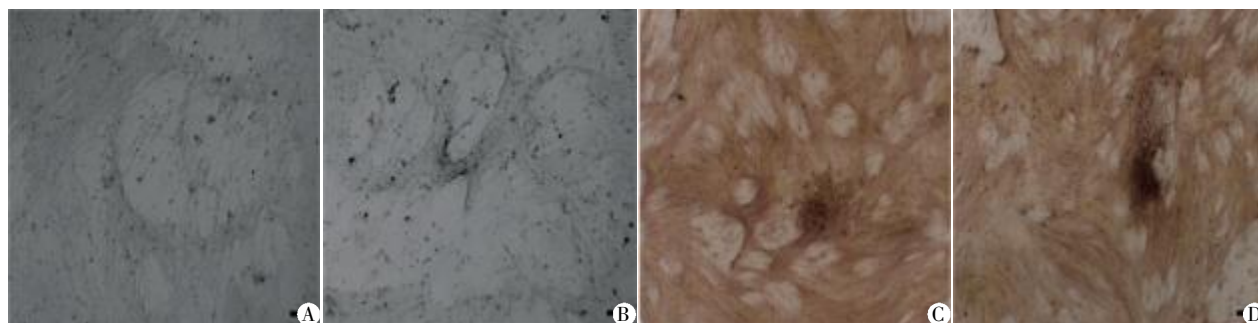


图 5 De-MSCs 再成骨诱导后 ALP 活性增加

Figure 5 ALP activity of De-MSCs increased after osteogenic redifferentiation, compared with MSCs



A: MSCs 成骨; B: De-MSCs 成骨; C: MSCs 成骨; D: De-MSCs 成骨。A、B: 成骨培养基中直接观察 (×50); C、D: 茜素红染色后观察 (×200)。

图 6 MSCs 和 De-MSCs 成骨诱导 28 d 后茜素红染色显示钙结节形成

Figure 6 Red nodules were observed by alizarin red staining

大地限制了 MSCs 的分化效率和临床上的应用前景。

去分化的细胞具有再分化能力。成熟脂肪细胞在体外培养可去分化和再分化为脂肪细胞和成骨细胞。Hallman 等<sup>[8]</sup>进一步证实了这个现象,近曲小管上皮细胞去分化后移植到损伤部位,可再分化恢复肾小管的结构和功能。人软骨细胞、上皮细胞、胰岛细胞均已证实可发生去分化和再分化。有文献提出可将去分化 MSCs (De-MSCs) 作为再生医学的种子细胞,但是较少有文献报道关于 De-MSCs 再分化能力与 MSCs 分化能力的比较。

Liu 等<sup>[7]</sup>表明 De-MSCs 具有更强的神经分化能力,本研究将 MSCs 和 De-MSCs 的成骨分化能力进行比较,结果证实 De-MSCs 在成骨培养基中增殖较 MSCs 为快。这可能与 De-MSCs 可表达一定量的成骨相关基因有关,在再次接受成骨诱导刺激时,激发了某些信号通路,而较 MSCs 更容易进入成骨分化状态,细胞生长能力较为明显。成骨相关基因表达较 MSCs 明显增高;成骨培养 14 d 后,培养上清液中 ALP 含量高于 MSCs。De-MSCs 再次成骨分化潜能较 MSCs 更为明显,分化效率显著高于 MSCs。提

## 2.6 茜素红染色

MSCs 与 De-MSCs 同时成骨诱导 28 d 进行茜素红染色。光镜下明显可见红色的钙结节,形态学上进一步证实了 De-MSCs 成骨能力(图 6)。

## 3 讨论

MSCs 具有的多向分化潜能和独特的低免疫原性使其成为理想的异基因移植首选,为器官组织损伤后的再生修复和自身免疫性疾病治疗带来了新的曙光,在骨的缺失和修复中更是得到广泛运用。但是大多数研究却表明, MSCs 在体内的生存期和分化效率都处于较低水平,并且移植细胞死亡率较高,这极

示在临床再生医学治疗中 De-MSCs 可为作为更加高效和优质的种子细胞。

有文献报道 De-MSCs 较 MSCs 有更强的抗凋亡能力,目前已经证实 De-MSCs 高存活能力与 bcl-2 家族的高表达有关,其中 bcl-x1 和 bcl-2 已经被证实是细胞抗凋亡能力的重要因素<sup>[9]</sup>。而文献报道 BMP2 与细胞抗凋亡有关,本研究发现 De-MSCs 在再次成骨分化过程中 BMP2 表达显著增高,本实验中检测到 BMP2 的表达上调,推测该分子不仅参与了成骨分化,也参与了 MSCs 抗凋亡调控过程。MSCs 具有低免疫原性,De-MSCs 在保持了 MSCs 的长梭样形态,保留 MSCs 细胞表面标志的同时,是否也维持了 MSCs 的低免疫原性,这值得进一步研究,此外对 De-MSCs 高效的再分化潜能所涉及的信号转导通路和调控机制也需要我们更加深入的研究。

## [参考文献]

- [1] Gioia R, Panaroni C, Besio R, et al. Impaired osteoblastogenesis in a murine model of dominant osteogenesis imperfecta: a new target for osteogenesis imperfecta pharma-

- cological therapy[J]. Stem Cell, 2012, 30(7):1465-1476
- [2] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(4):568-584
- [3] Zhao LR, Duan WM, Reyes M, et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats[J]. Exp Neurol, 2002, 174(1):11-20
- [4] Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton[J]. J Cell Biochem, 2010, 111(2):249-257
- [5] Tumber T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin [J]. Science, 2004, 303(5):359-363
- [6] Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, et al. Self-renewal, multipotency and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche [J]. Cell, 2004, 118(5):635-648
- [7] Liu Y, Jiang X, Zhang X, et al. Dedifferentiation-reprogrammed mesenchymal stem cells with improved therapeutic potential [J]. Stem Cells, 2011, 29(12):2077-2089
- [8] Hallman MA, Zhuang S, Schnellmann RG. Regulation of dedifferentiation and redifferentiation in renal proximal tubular cells by the epidermal growth factor Receptor[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 325(2):520-528
- [9] Qian L, Saltzman WM. Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification [J]. Biomaterials, 2004, 25(7-8):1331-1337

[收稿日期] 2013-01-04

## 本刊来稿题名和作者署名的注意事项

### 1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容, 要符合编制题录、索引和检索的有关原则, 并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字, 必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号, 尽量不出现数学式或化学式。

### 2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名, 这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序, 写法为: 姓前名后, 姓和名的首字母大写, 其余字母小写, 如 Zhou Ping, Shi Honglei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位, 如“南京医科大学第一附属医院心内科”, “南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“\*”, 并在论文首页下补充基金名称、编号, 以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑: 接雅俐)