

# 与韧带成纤维细胞间接共培养对大鼠骨髓间充质干细胞胶原蛋白和韧粘素-C 表达的影响\*

张 蕾<sup>1,2</sup> 陈槐卿<sup>1Δ</sup> Wang Xiong<sup>2</sup> Nguyen. Tran<sup>3</sup>

1(四川大学 华西医学中心 生物医学工程研究室, 成都 610041)

2(L E M T A - C N R S U M R 7563, V andoeuvr e-les-N ancy, N ancy U niversity, F rance)

3 (Surgical School of the Faculty of M edicine, N ancy U niversity, V andoeuvr e-les-N ancy, F rance)

**摘要** 骨髓间充质干细胞(BM SCs)可分化成多种细胞。已有研究表明,局部微环境影响细胞的生长、分化等功能,不同的细胞共培养可为细胞提供特定的环境。因此,本实验将大鼠BM SCs与大鼠韧带成纤维细胞间接共培养不同时间段后,检测其I型、III型胶原和韧粘素-C的mRNA表达以及I型、III型胶原的蛋白合成量。结果显示,体外培养6 d,间接共培养组BM SCs I型胶原mRNA的表达量( $3.9 \pm 0.2$ )是对照组( $1.9 \pm 0.3$ )的2.0倍;间接共培养组BM SCs III型胶原的表达量( $1.9 \pm 0.2$ )是对照组( $0.8 \pm 0.1$ )的2.2倍,而韧粘素-C的mRNA表达量两组间无明显差异。体外培养12 d,间接共培养组BM SCs的I型和III型胶原mRNA表达量继续升高,它们的蛋白含量分别从对照组的 $12.4 \pm 0.8$  ng/ $\mu$ g和 $5.0 \pm 0.4$  ng/ $\mu$ g,增加到 $13.6 \pm 1.3$  ng/ $\mu$ g和 $5.9 \pm 0.5$  ng/ $\mu$ g;韧粘素-C的mRNA表达量( $0.14 \pm 0.02$ )为对照组( $0.07 \pm 0.02$ )的2.0倍。结果提示与韧带成纤维细胞间接共培养,可以促进BM SCs I型、III型胶原蛋白和韧粘素-C的合成。

**关键词** 大鼠骨髓间充质干细胞 间接共培养 胶原蛋白 韧粘素-C

## Expressions of Type I and Type III Collagens and Tenascin-C in Rat Bone Mesenchymal Stem Cells Co-cultured with Ligament Fibroblasts

Zhang Lei<sup>1,2</sup> Chen Huaqing<sup>1</sup> Xiong Wang<sup>2</sup> Nguyen. Tran<sup>3</sup>

1(Institute of Biomedical Engineering, West China Center of Medical Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

2(L E M T A - C N R S U M R 7563, V andoeuvr e-les-N ancy, N ancy U niversity, F rance)

3 (Surgical School of the Faculty of M edicine, N ancy U niversity, V andoeuvr e-les-N ancy, F rance)

**Abstract** Bone marrow mesenchymal stem cells (BM SCs) can be directed to differentiate into a variety of cell types depending on their micro-environment. In this study, rat BM SCs were co-cultured with rat ligament fibroblasts during different time courses. The mRNA expressions of type I, type III collagens and tenascin-C were measured by real time RT-PCR, and the corresponding protein levels of type I and type III collagens by radioimmunoassay. Results show that the mRNA expressions of type I and type III collagens in the BM SCs were 2 times up-regulated after a 6-day co-culture, and the relative mRNA expressions of type I and type III collagens were  $3.9 \pm 0.2$  and  $1.9 \pm 0.2$ , while they were  $1.9 \pm 0.3$  and  $0.8 \pm 0.1$  in the control groups, respectively. The protein syntheses of these two collagens were also increased after a 12-day co-culture; the type I and type III collagens synthesis were  $13.6 \pm 1.3$  ng/ $\mu$ g and  $5.9 \pm 0.5$  ng/ $\mu$ g in co-culture groups and  $12.4 \pm 0.8$  ng/ $\mu$ g and  $5.0 \pm 0.4$  ng/ $\mu$ g in their control groups, respectively. Likewise, there was a 2 times enhancement in tenascin-C mRNA expression after the 12-day co-culture ( $0.07 \pm 0.02$  by control group and  $0.14 \pm 0.02$  by co-culture group,  $P < 0.05$ ). These data suggest that the presence of the ligament fibroblast promotes the syntheses of type I and the III collagens and tenascin-C in the rat BM SC.

**Key words** Rat bone mesenchymal stem cells (BM SCs) Indirect co-culture Collagen Tenascin-C

\* 中法先进研究计划合作项目 Programme de Recherches Avancees (PRA) franco-chinois (PRA B03-06); 四川省科技厅资助项目 (05JY029-029-2)

$\Delta$  通讯作者。E-mail: chq@wcum.s.edu.cn

## 1 引言

韧带是骨与骨之间连接的致密结缔组织,在关节运动和维持骨架稳定中发挥着重要作用。韧带损伤会直接导致关节功能障碍。某些部位的韧带,如前交叉韧带,损伤后不易修复,且主要以瘢痕填补来修复。目前多采用自体或异体组织替代的治疗方法,但自体肌腱移植修复韧带,会损害健康的正常组织,并延长外科手术时间。而异体组织移植,易导致慢性排斥反应,延长愈合时间,且移植组织不宜韧带化。韧带组织工程学则为构建有生物活性的韧带组织提供了新的思路。韧带组织工程学是综合运用生物学、生物化学、材料学和生物物理学等学科的基本原理和技术方法,从仿生学的角度出发,研究如何在体外条件下模拟构建韧带,再用构建韧带替代病损部位。简而言之,就是将活细胞与生物相容性好、可降解并有适当力学强度的材料复合,使其可以在体内或体外形成韧带样有活性的组织,替代病损的韧带,其性质应与韧带几乎相同,不引起受体的免疫排斥反应。

有研究表明<sup>[1]</sup>,受损韧带在修复过程中,局部会出现来源于骨髓间充质干细胞(Bone Mesenchymal stem cells, BM SCs)的成纤维细胞。BM SCs具有很强的自我复制和多向分化潜能,可产生具有各种表型的子代细胞。在体内、外不同的诱导条件下BM SCs具有向中胚层和神经外胚层组织细胞分化的能力,如分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞、肌细胞、神经细胞及支持造血的基质细胞等。Watanabe等<sup>[2]</sup>将转基因大鼠(供体)的BM SCs注射到受损的野生型(wild-type)大鼠(受体)韧带,28 d后在已经愈合的野生型大鼠韧带中检测到存活的BM SCs,其性状与周围的韧带成纤维细胞相似。Young等<sup>[3]</sup>用种植了BM SCs的胶原纤维替代兔的跟腱,4、8和12周后检测,种植了BM SCs的胶原纤维比未种植组排列更加整齐有序,更具方向性,且新形成的韧带纤维明显比对照组粗。Award等<sup>[4]</sup>曾用大鼠的自体BM SCs修复大鼠受损的韧带,4周后,发现BM SCs可提高修复韧带的机械性能,新形成组织的弹性模量、能承受的最大强度及应变能密度均显著增高。

由于BM SCs具有来源相对容易,可从自身获取,体外培养条件不高、分裂增殖能力强,具有在体外诱导分化的潜能,这些特性使干细胞治疗疾病成为可能。近年来有大量的研究致力于BM SCs的体外诱导定向分化。

尽管很多研究工作表明,BM SCs在韧带修复中有潜在的应用价值,有望作为组织工程韧带中的种子细胞。但BM SCs替代韧带成纤维细胞(Ligament fibroblast)的研究仍只停留在对受损韧带局部修补的体内研究,体外诱导BM SCs向韧带细胞转化的方法还不成熟。

细胞的扩增、分化受细胞微环境的影响。因此,我们设想BM SCs在韧带修复中的转化也会受韧带局部微环境的影响,包括周围韧带成纤维细胞的影响。为进一步探明其机理,本试验将大鼠BM SCs和其韧带成纤维细胞间接共培养后,分别检测其3种韧带特性蛋白I型胶原蛋白、III型胶原蛋白和韧带素-C的表达合成,旨在探讨体外培养条件下韧带成纤维细胞提供的微环境是否影响BM SCs的蛋白合成功能,促进BM SCs向韧带成纤维细胞转化。

## 2 材料与方法

### 2.1 主要试剂和仪器

2.1.1 仪器装置 CO<sub>2</sub> 孵箱(SANYO); EPTCSXL-31240型流式细胞仪(Coulter,美国); FTC<sup>TM</sup>-2000 system实时定量PCR循环仪(Roche,德国);低温高速离心机(Eppendorf,德国);水平式电泳仪(BioRad,美国);680型酶标仪(BioRad); $\gamma$ 计数器(XH-6010A型 $\gamma$ 计数器西安二六二厂生产);以PET(polyethylene terephthalate)半透膜隔开的间接共培养双层培养皿(Invitrogen)。

2.1.2 细胞培养主要试剂 DMEM培养基(Gibco);DMEM/F12(Gibco)培养基;胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, Gibco);1.073 g/ml淋巴细胞分离液(北京中山公司);L-谷氨酰胺(Gibco);0.25%胰酶(Gibco);胶原酶IX(Sigma);HBSS(D-Hanks)液(Sigma);细胞消化液(用PBS配制,含0.05%胰酶和0.1%EDTA(ethylene diamine tetra acetic));细胞裂解液(0.5mM NaCl, 0.1mM Tris-HCl, 1% Triton-X100, 1Protease inhibitor cocktail tablet/50ml)。荧光标记小鼠抗大鼠单抗CD90-FITC(Antigenix America), CD44-FITC(Caltag Tebubio), CD45-PE(CALTAG TEBUBIO), CD34-PE(Santa Cruz)。DEPC(Amersco,美国);TRIZOL试剂(Invitrogen);逆转录试剂盒(IScript<sup>TM</sup> cDNA synthesis Kit, BioRad);SYBR Green I荧光染料(Invitrogen);LightCycler实时定量PCR毛细管(Roche,德国)。细胞总蛋白测定试剂盒(DC protein assay, BioRad);放免法I型

胶原检测试剂盒(O rion Diagnostica, 芬兰); 放免法 III 型胶原检测试剂盒(O rion Diagnostica, 芬兰); 复合蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor cocktail tablets, Roche)。

## 2.2 实验方法

**2.2.1 细胞培养及检测** BM SCs 培养方法参见本实验室前期工作<sup>[5]</sup>: 取第4代BM SCs 检测细胞表面 CD90、CD44、CD34 和 CD45 分子的表达, 以鉴定细胞。来源于6例不同大鼠的第4代80%融合的BM SCs, 用细胞消化液消化, 计数, 制成 $10^5$ 细胞数/ml 级的悬液。分别加入荧光标记小鼠抗大鼠单抗 CD90-FITC, CD44-FITC, CD45-FITC, CD34-FITC 和同型阴性对照小鼠抗大鼠 IgG1-FITC 10  $\mu$ l, 每100  $\mu$ l 细胞悬液加入10  $\mu$ l, 混匀, 室温下避光反应30 min, PBS 清洗, 弃上清, 细胞重悬于500  $\mu$ l PBS 中, 流式细胞仪检测, CellQuest 软件分析。

**韧带成纤维细胞培养:** 取大鼠膝关节双侧副韧带(M edial collateral ligament, MCL)、前后交叉韧带(A nterior and posterior cruciate ligament, ACL) 和髌韧带(Patellar ligament) 放入盛有无血清HBSS 液的培养皿中, 以解剖刀剔除滑膜等外周组织后, 在无血清HBSS 液中漂洗, 37  $^{\circ}$ C 的0.25%胰酶消化30 min, 用眼科剪将韧带剪成 $1\text{mm}^3$ 左右的碎块。韧带组织碎块在含400 U/ml 胶原酶的DMEM 的培养液中, 37  $^{\circ}$ C, 震荡消化2 h, PBS 冲洗, 离心, 以含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12 培养液悬浮细胞, 接种于涂有鼠尾胶原的培养瓶中, 置于37  $^{\circ}$ C、5%

CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。每3 d 换液, 待细胞融合后, 正常传代。第4代细胞用于与BM SCs 间接共培养。

**2.2.2 细胞间接共培养条件** 间接共培养组, BM SCs 培养于六孔板的外培养室中, 韧带成纤维细胞培养在内室中, 两室间以PET 半透膜隔开。分别取第4代80%融合的BM SCs 和韧带成纤维细胞, 用含0.25%胰酶消化, 计数后, 韧带成纤维细胞均以 $5 \times 10^4$ 个细胞/孔种植在内室中, BM SCs 分别以 $2 \times 10^5$ 个细胞/孔,  $1 \times 10^5$ 个细胞/孔和 $5 \times 10^4$ 个细胞/孔的密度种植于外培养室中, 每3 d 换液。对照组内室中种植于韧带成纤维细胞同样密度的BM SCs, 外室与实验组相同。分别收集间接共培养3 d、6 d 和12 d 的BM SCs 及相应对照组外室中的细胞, 进行实时荧光RT-PCR 和放射免疫法检测。

**2.2.3 实时定量RT-PCR 检测 I 型胶原、III 型胶原和 粘素-C mRNA 的表达** RNA 提取按 TRIZOL 试剂说明书进行, 按常规方法获逆转录 cDNA。LightCycler 毛细管实时定量 PCR 仪及 SYBR Green I PCR 合成试剂盒用于检测 I 型胶原、III 型胶原和粘素-C mRNA 转录的检测。每个样本中, 这3种 mRNA 表达量和该样本中内对照 GAPDH 的比值作为该样本中 I 型胶原、III 型胶原和粘素-C mRNA 的表达量。每个毛细管反应体系总量为20  $\mu$ l, 其中含 cDNA 样本2  $\mu$ l, 反应条件见表1。每样本重复做3次, 以均值作为该样本的结果, qBase 软件用于结果分析。

表1 实时定量荧光PCR 引物及反应条件

Table 1 Primers' sequences and conditions for Real-Time PCR

Gene	Primer sequence	Base Pairs	Annealing Temp ( $^{\circ}$ )	Annealing Time(S)	Extension Time(S)
Collagen I <sup>[6]</sup>	Forward: 5'-CCCA CCCC GCCGCAA GA GT-3' Reverse: 5'-TTGGGTCCCTCGACTCCTACA -3'	352	51	10	15
Collagen III <sup>[7]</sup>	Forward: 5'-TGCCCA CA GCCTTCTACACCT-3' Reverse: 5'-CA GCCA TTCCTCCCACTCCA G-3'	244	58	10	10
Tenascin <sup>[8]</sup>	Forward: 5'-CA GAA GCTGAA CCGGAA GTTG-3' Reverse: 5'-GGCTGTTGTTGCTA TGGCQCT-3'	278	55	10	11
GAPDH <sup>[9]</sup>	Forward: 5'-TCCCTCAA GATTGTCA GCAA -3' Reverse: 5'-A GA TCCA CAACGGA TACA TT-3'	308	55	10	12

## 2.2.4 竞争放免法 I 型和 III 型胶原蛋白含量测定

分别收集间接共培养不同时间的BM SCs 及其对照 BM SCs。用 PBS 冲洗2次, 吸干 PBS 后, 用细胞裂解液0.5 ml 裂解, 收集裂解液至1.5 ml Eppendorf 离心管, -20  $^{\circ}$ C 冻融1次, 微量移液器反复吹打, 4  $^{\circ}$ C, 12 000 g  $\times$  10 min 离心, 提取上清液, -70  $^{\circ}$ C 保存。将上述收集液冻干, 处理成为干粉状,

0.5 ml 蒸馏水稀释后, 用总蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度, 采用竞争放免法, 按照试剂盒说明书, 分别测定 I 型胶原和 III 型胶原的蛋白含量。测定时, 测定管中依次加入样本200  $\mu$ l 标记抗原100  $\mu$ l 抗体100  $\mu$ l, 充分混匀, 室温静置20 min, 4  $^{\circ}$ C, 3500 g  $\times$  25 min 离心, 弃上清, 用  $\gamma$  计数仪测定沉淀物放射性强度, 强度单位用每分钟放射性计数

(Count per minute, cpm)表示。每个标本双管计数率(计数·分<sup>-1</sup>, cpm)的平均值在标准曲线上读取浓度值(ng/ml),经RIA软件处理,得到样本I型和III型胶原的蛋白含量。以每 $\mu\text{g}$ 总蛋白中胶原蛋白的含量(ng/ $\mu\text{g}$ )作为样本胶原蛋白的含量。

**2.2.5 结果统计** 实时定量RT-PCR检测I型胶原、III型胶原和粘素-C mRNA的表达每组样本为7例,竞争放免法测定I型和III型胶原蛋白含量的实验,每组样本量为6例。所有参数均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $t$ 检验用于检测样本的组间差异,样本的可信区间为95%, $P$ 值小于0.05为组间有显著性差异。

### 3 结果

#### 3.1 BMSCs 细胞培养及鉴定

流式细胞仪检测第4代BMSCs,结果如图1所示,细胞表面分子阳性表达率分别为:CD90 94.9%  $\pm$  3.2%, CD44 89.1%  $\pm$  2.7%, CD34 1.7%  $\pm$  1.1%, CD45 7.4%  $\pm$  5.7%。

#### 3.2 BMSCs I型胶原、III型胶原和粘素-C mRNA 的表达

如图2所示,体外培养3 d,间接共培养组BMSCs I型胶原、III型胶原和粘素-C的mRNA表达无显著性差异。体外培养6 d,间接共培养组I型和III型胶原mRNA表达明显上调,I型胶原mRNA的表达量( $3.9 \pm 0.2$ )是对照组( $1.9 \pm 0.3$ )的2.0倍;III型胶原mRNA的表达量( $1.9 \pm 0.2$ )是对照组( $0.8 \pm 0.1$ )的2.3倍(见图2a、2b);III型与I型胶原mRNA表达比例与对照组相比亦增高,粘素-C mRNA表达与对照组相比有所升高,但无统计学差异。体外培养12 d,间接共培养组胶原mRNA的表达量( $4.2 \pm 0.6$ )是对照组( $2.0 \pm 0.2$ )的2.2倍;III型胶原mRNA的表达量( $2.1 \pm 0.2$ )是对照组( $0.9 \pm 0.1$ )的2.1和2.4倍;而III型与I型胶原mRNA的表达量的比例,在间接共培养组( $0.5 \pm 0.04$ )高于对照组( $0.44 \pm 0.03$ )( $P < 0.05$ ) (见图2d)。间接共培养组BMSCs粘素-C mRNA的表达量( $0.14 \pm 0.02$ )为对照组( $0.07 \pm 0.02$ )的2.0倍(见图2c)。

#### 3.3 BMSCs I型胶原、III型胶原的蛋白含量

图3为竞争放免法检测I型和III型胶原的蛋白含量结果。与对照组相比,与韧带成纤维细胞间接共培养12 d,BMSCs I型胶原和III型胶原的蛋白含量与对照组相比显著增高( $P < 0.05$ ),I型和III型胶原的蛋白含量在对照组分别为: $12.4 \pm 0.8 \text{ ng}/\mu\text{g}$

和 $5.0 \pm 0.4 \text{ ng}/\mu\text{g}$ ,在间接共培养组分别为: $13.6 \pm 1.3 \text{ ng}/\mu\text{g}$ 和 $5.9 \pm 0.5 \text{ ng}/\mu\text{g}$ ;III型胶原和I型胶原蛋白的比例由对照组的 $0.40 \pm 0.02$ ,增加到间接共培养组的 $0.43 \pm 0.16$ ,与对照组相比有统计学意义( $P < 0.05$ ) (见图3)。

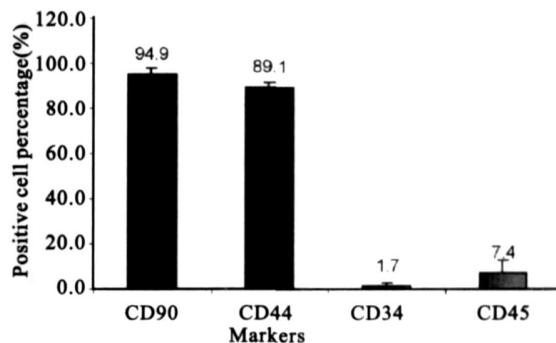


图1 流式细胞仪检测大鼠第4代BMSCs表面分子表达(n=6)

Fig 1 Expression of typical markers by rat BMSCs of Passage 4 (n = 6)

### 4 讨论

具有多种潜在分化能力的BMSCs在组织修复和维持体内内环境稳态中发挥重要作用。受损韧带在修复过程中,局部会出现来源于骨髓间充质干细胞的成纤维细胞。但BMSCs在韧带修复这一病理过程中究竟发挥着怎样的作用还不清楚。众所周知,BMSCs在特定条件下可以分化成多种结缔组织细胞,如成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞、肌细胞、神经细胞及支持造血的基质细胞等。这一理论目前已被广泛接受和证明<sup>[10]</sup>。加之,BMSCs具有来源相对容易、易培养、可采用自体来源等特点。因此,近10年来,许多研究者在利用BMSCs作为种子细胞修复韧带和基建的研究中作了大量尝试。

本实验中所采用的骨髓来源的细胞,其细胞表面抗原分子均阳性表达CD90和CD44,阴性表达CD34和CD45,符合骨髓间充质干细胞的特征<sup>[4]</sup>,说明我们采用的细胞是骨髓间充质干细胞。

BMSCs与其他细胞体外间接共培养的研究最初多集中于BMSCs对其他细胞的影响,如皮肤成纤维细胞与BMSCs间接共培养后可以向肌成纤维细胞转化,BMSCs对造血干细胞的支持和营养作用。其后,共培养后其他细胞对BMSCs影响的研究报道逐年增多。Ball等<sup>[11]</sup>发现BMSCs与冠状动脉内皮细胞或平滑肌细胞间接共培养5 d后,BMSCs胞浆内 $\alpha$ -肌动蛋白纤维增加。认为BMSCs在局部

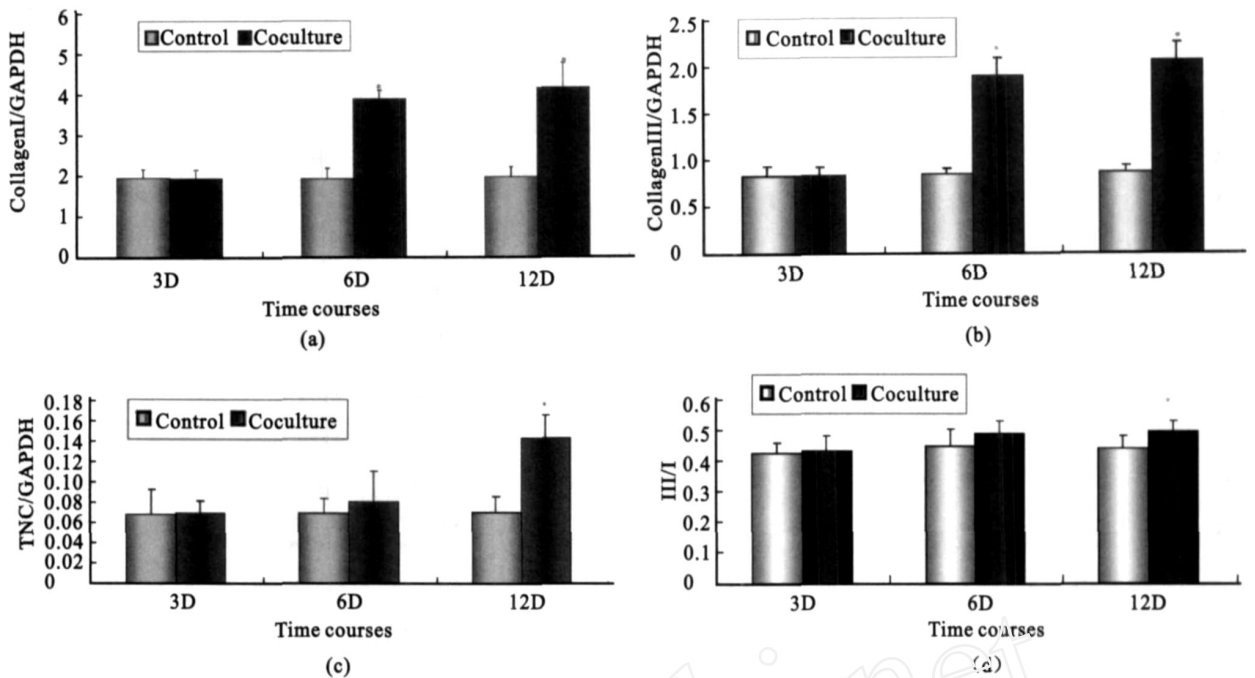


图2 与成纤维细胞间接共培养前、后,大鼠BM SCs I型、III型胶原和韧粘素mRNA的表达 (n=7)

(a) 与成纤维细胞间接共培养前、后鼠BM SCs I型胶原的mRNA表达; (b) 与成纤维细胞间接共培养前、后鼠BM SCs III型胶原的mRNA表达; (c) 与成纤维细胞间接共培养前、后鼠BM SCs 韧粘素C的mRNA表达; (d) 与成纤维细胞间接共培养前、后鼠BM SCs III型胶原与I型胶原mRNA表达的比例 (\* 与相应对照组相比,  $P < 0.05$ )

Fig 2 mRNA Expressions of type I, type III collagens and tenascin-C by rat BM SCs with or without co-culture (n=7)

(a) mRNA expression of type I collagen by rat BM SCs with or without co-culture, (b) mRNA expression of type III collagen by rat BM SCs with or without co-culture, (c) mRNA expression of tenascin-C by rat BM SCs with or without co-culture, (d) Ratio of the mRNA expressions of type III and type I collagens in BM SCs with or without co-culture

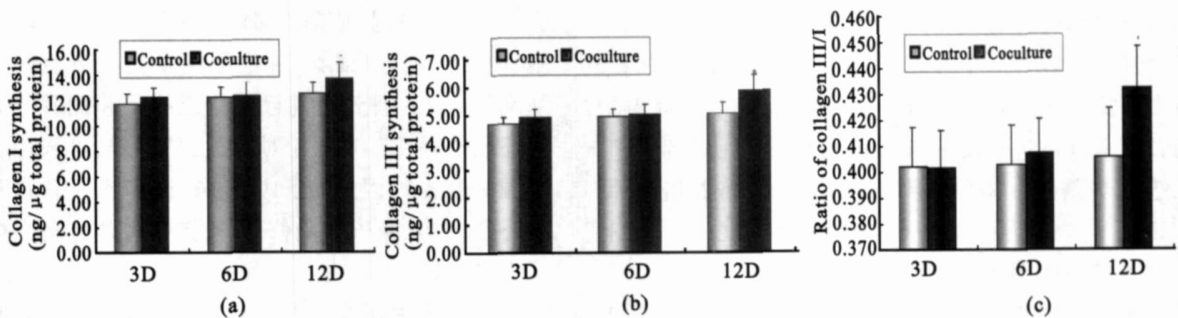


图3 与韧带成纤维细胞间接共培养前、后,大鼠BM SCs I型胶原和III型胶原的蛋白含量 (n=6)

(a) 与成纤维细胞间接共培养前后大鼠BM SCs I型胶原的蛋白含量; (b) 与成纤维细胞间接共培养前后大鼠BM SCs III型胶原的蛋白含量; (c) 与成纤维细胞间接共培养前后大鼠BM SCs III型胶原与I型胶原蛋白含量的比例 (\* 与相应对照组相比,  $P < 0.05$ )

Fig 3 Protein expressions of type I and type III collagens in rat BM SCs with or without co-culture with ligament fibroblasts (n=6)

(a) Type I collagen protein expression in rat BM SCs with or without co-culture, (b) Type III collagen protein expression in rat BM SCs with or without co-culture, (c) Type III collagen protein expression in rat BM SCs with or without co-culture

微环境作用下可以转化为心肌细胞。因此我们推测,与韧带成纤维细胞间接共培养也可能对BM SCs的转化有作用。

本实验结果可以观察到与韧带成纤维细胞间接

共培养后,BM SCs I型胶原、III型胶原和韧粘素-C的mRNA表达较对照组增高。间接共培养6d和12d,I胶原的mRNA表达分别是对照组的2.0和2.2倍,III胶原的mRNA表达分别是对照组的2.3和2.

4 倍, III 胶原和 I 胶原的比例在 12 天后由对照组的 0.44 增加到 0.50, 其增高与对照组相比有统计学意义。

同时, 放免法检测胶原的蛋白表达也观察到: 在与韧带成纤维细胞间接共培养 12 d 后, BM SCs 裂解液中 I 型和 III 型胶原的蛋白分别由  $12.4 \pm 0.9 \text{ ng}/\mu\text{g}$  总蛋白和  $5.0 \pm 0.4 \text{ ng}/\mu\text{g}$  总蛋白, 增加到  $13.6 \pm 1.3 \text{ ng}/\mu\text{g}$  总蛋白和  $5.9 \pm 0.5 \text{ ng}/\mu\text{g}$  总蛋白。说明间接共培养可以促进 BM SCs 合成胶原蛋白。这一结果支持 Lee 等<sup>[12]</sup>的实验结果, 他们用细胞电泳迁移技术 (electrophoretic mobility, EPM) 检测到, 与韧带成纤维细胞间接共培养 5 d, BM SCs 向韧带成纤维细胞分化, 但亦有研究者认为, 细胞与细胞直接相互作用在诱导细胞分化中起着重要作用, 单纯的间接共培养对细胞的分化几乎没有作用。根据本实验结果, 我们认为, 虽然直接共培养即细胞间的直接接触对细胞的生长分化极为重要, 但间接共培养即细胞分泌的生长因子、调节信号等也会对其他细胞产生调节作用。

另外, 间接共培养后, 细胞 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白合成均增高, 但 III 型胶原蛋白合成增高较 I 型胶原蛋白更明显。韧带细胞相对于其他细胞合成更多的 III 型胶原蛋白, 韧带细胞合成 III 和 I 型胶原蛋白的比例约为 0.55, 而皮肤成纤维细胞合成这两种蛋白的比例约为 0.25<sup>[13]</sup>。因此, 我们推测, 受韧带成纤维细胞的影响 BM SCs 的性质与韧带细胞更接近了, 这一特点使其有潜力作为替代韧带成纤维细胞的来源。III 型胶原蛋白增加组织弹性, 这一特点符合韧带功能的需要。

我们还注意到, 两种胶原 mRNA 表达的增高出现在间接共培养后 6 天, 而韧带素-C mRNA 表达的增高则出现在间接共培养后 12 d。有研究报道, TGF- $\beta$  可通过丝氨酸/苏氨酸激酶受体通路调节韧带成纤维细胞 I 型和 III 型胶原蛋白的合成, 但对韧带素-C 的调节并不通过这一通路<sup>[14]</sup>。因此我们推断, 韧带素-C mRNA 表达上调较胶原 mRNA 的表达出现得晚, 可能是因为他们细胞内的调节是通过不同的信号传导途径来实现的。

**综上所述, 我们认为细胞间的相互作用是多种因素共同作用的结果, 不仅有细胞间通过突触接触的信号传递, 也通过细胞分泌的调节信号。BM SCs 在韧带细胞的影响下合成的胶原蛋白和韧带素-C 增多, 为 BM SCs 在体内分化的机制提供一定的理论依据。也为 BM SCs 作为韧带组织工程的种子细胞,**

**在体外诱导分化条件的探索提供了一条新思路。**

## 参 考 文 献

- 1 Dye SF. The future of anterior cruciate ligament restoration. *Clin Orthop Relat Res*, 1996; 130
- 2 Watanabe N, Woo SL, Papageorgiou C, *et al*. Fate of donor bone marrow cells in medial collateral ligament after simulated autologous transplantation. *Microsc Res Tech*, 2002; 58: 39
- 3 Young RG, Butler DL, Weber W, *et al*. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 1998; 16: 406
- 4 Awad HA, Butler DL, Boivin GP, *et al*. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*, 1999; 5: 267
- 5 Chen Huaqing, Han Jun, Li Liang, *et al*. Osteocalcin and type I collagen mRNA expression of rat marrow stromal cells under induction condition. *Journal of West China University of Medical Sciences*, 2002; 32(2): 200 [陈槐卿, 韩君, 李良. 体外诱导条件下大鼠骨髓基质细胞骨钙素和 I 型胶原 mRNA 的表达. *华西医科大学学报*, 2002; 32(2): 200]
- 6 Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, *et al*. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol*, 1998; 16: 457
- 7 Lavaud S, Poirier B, Mandet C, *et al*. Inflammation is probably not a prerequisite for renal interstitial fibrosis in nonmolybdenic obese rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001; 280: F683
- 8 Shen J, Zhou AQ, Qin YM. Levels of tenascin mRNA in monocrotaline induced pulmonary hypertension in rat. *Clin J Contemp Pediatr*, 2001; 3(5): 519 [沈捷, 周爱卿, 秦玉明等. 野百合碱诱导大鼠肺高压时韧带素 mRNA 表达水平的动态变化. *中国当代儿科杂志*, 2001; 3(5): 519]
- 9 Ando T, Okuda S, Tamaki K, *et al*. Localization of transforming growth factor-beta and latent transforming growth factor-beta binding protein in rat kidney. *Kidney Int*, 1995; 47: 733
- 10 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284: 143
- 11 Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004; 36: 714
- 12 Lee JC, Wang JH, Lee YT, *et al*. The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007; 352: 147
- 13 Chen Y, DeSautel M, Anderson A, *et al*. Collagen synthesis is not altered in women with stress urinary incontinence. *NeuroUrodyn*, 2004; 23: 367
- 14 Kim SG, Akaike T, Sasagawa T, *et al*. Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct*, 2002; 27: 139

(收稿: 2007-03-15 修回: 2007-04-04)