

# 马的骨髓间充质干细胞诱导为软骨细胞和成骨细胞及其鉴定

房君 魏奥 刘乐 徐鸿洋 张焱如 周欢敏\*

内蒙古农业大学生命科学学院生物制造重点实验室 呼和浩特 010018

**摘要:** 本研究旨在将建立的马 (*Equus caballus*) 骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞和软骨细胞。通过原代细胞培养获取马的骨髓间充质干细胞, 并对第 3 代 (P3) 纯化细胞进行干细胞特性鉴定, 之后诱导其向不同细胞分化并对诱导分化的细胞进行染色和特异性基因表达的鉴定。实验结果显示, 获得的马骨髓细胞表达了干细胞转录因子和间充质干细胞表面标记物, 确定获得的细胞为马骨髓间充质干细胞。P3 代细胞经诱导培养后由长梭形转变为“骨结节”形态的成骨细胞和“铺路石”形态的软骨细胞。茜素红将诱导的成骨细胞团染成红色, 并随着时间的递增红色“骨结节”逐步增大; 阿尔新蓝则将蛋白聚糖和透明质酸等含量丰富的诱导细胞染为蓝色, 并且随着诱导天数的增加被染成蓝色的软骨细胞逐渐增多, 而对照组细胞未见着色。实时荧光定量 PCR 检测发现, 成骨细胞中 *Col* 和 *ALPL* 基因的表达量随诱导时间的延长发生明显变化; 普通 PCR 结果显示, 在诱导的软骨细胞中扩增获得了 *collagen II*、*aggrecan* 和 *Sox9* 软骨特异基因, 而对照组细胞不表达特异基因。综上所述, 本实验建立了马骨髓间充质干细胞并成功将其诱导分化为成骨细胞和软骨细胞, 为骨组织缺损修复和软骨细胞的治疗提供了实验基础。

**关键词:** 马; 骨髓间充质干细胞; 诱导分化; 成骨细胞; 软骨细胞

**中图分类号:** Q952.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 03-353-10

## Induction of Horse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes and Osteoblasts

FANG Jun WEI Ao LIU Le XU Hong-Yang ZHANG Yan-Ru ZHOU Huan-Min\*

College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

**Abstract:** The purpose of the experiment was to induce the differentiation of osteoblasts and chondrocytes from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in the horse (*Equus caballus*). BMSCs were obtained by primary cell culture, and stem cell characteristics of the third generation (P3) of purified cells were identified. Then, the BMSCs were induced to differentiate in vitro, and the differentiated cells were stained and identified

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31560621);

\* 通讯作者, E-mail: huanminzhou@263.net;

**第一作者介绍** 房君, 女, 博士研究生; 研究方向: 发育生物学; E-mail: 340695804@qq.com。

收稿日期: 2019-11-18, 修回日期: 2020-03-31 DOI: 10.13859/j.cjz.202003009

for specific gene expression. The results showed that the obtained horse bone marrow cells expressed stem cell transcription factors and mesenchymal stem cell surface markers. The cells obtained were thought to be horse BMSCs. After induction culture, P3 generation cells changed in shape from "long spindle" to "bone nodules" osteoblasts and "paving stones" chondrocytes. Alizarin red staining showed that the induced red osteoblasts, and the red "bone nodules" gradually increased with time. The number of Alsin blue stained chondrocytes, which were rich in proteoglycan and hyaluronic, increased with extended induction time, while no staining was observed in the control group. The expressions of *Col* and *ALPL* genes in osteoblasts changed significantly with the induction time. Common PCR results showed that chondrogenic genes such as *collager II*, *aggrecan* and *Sox9* were amplified in the induced chondrocytes, while the control cells did not express these specific genes. In conclusion, BMSCs were successfully induced to differentiate into osteoblasts and chondrocytes, providing experimental basis for the repair of bone tissue defects and the treatment of chondrocytes.

**Key words:** Horse, *Equus caballus*; Bone marrow mesenchymal stem cells; Induced differentiation; Osteoblasts; Chondrocytes

速度赛马是赛马中最吸引人的运动项目之一。在长期高强度的训练中,马(*Equus caballus*)经常会关节软骨摩擦造成损伤,如果损伤部位不及时修复,就会引起慢性关节炎,使关节变大、失去弯曲能力,从而影响赛马的表现。影响严重者会导致残疾甚至死亡,并造成不必要的经济损失(Cokelaere et al. 2016)。目前,软骨损伤的治疗主要采用维持治疗方法,以避免进一步的软骨损伤。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有分离容易、含量丰富、体外易扩增和富集、多向分化潜能大、免疫原性低等优点,有望成为组织工程和再生医学的理想种子细胞(Castro-Manreza et al. 2014, Baker et al. 2015)。

骨髓间充质干细胞来源于中胚层,存在于骨髓及多种组织中多向分化的一类干细胞,可向软骨细胞、成骨细胞、心肌细胞、皮肤角质形成细胞和脂肪细胞等细胞发生诱导分化(Friedenstein et al. 1966, Kopen et al. 1999, Meirelles et al. 2009)。骨髓间充质干细胞表达转录因子,如 *Sox2*、*Nanog* 和 *Oct4* (Kashani et al. 2014),同时也表达细胞表面标记分子,如 *CD90* 和 *CD105* (Ghaneialvar et al. 2018)。另外,已经发现软骨细胞合成的 2 型胶原(collagen

typen II alpha1, COL2A1) 可以诱导骨髓间充质干细胞在体内外分化为软骨细胞,促进软骨缺损的愈合 (Chiu et al. 2014),具有良好的临床应用前景 (Wang et al. 2017)。

本研究的目的是寻找一种简单可行的骨髓间充质干细胞分离培养方法,并诱导为软骨细胞和成骨细胞,为马软骨和骨损伤的临床应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

4 岁雄性成年蒙古马,取自内蒙古农业大学动物科学学院。马宰杀后 4 h 内取得胸骨,并转移至实验室。尽量剔除干净非骨骼成分。取胸骨端部进行骨髓间充质干细胞的分离培养。

### 1.2 骨髓间充质干细胞的分离培养

成年马屠宰后,取胸骨,75%酒精消毒骨体,再进行后续无菌操作。粉碎胸骨两端,用购自天津生化试剂公司的含 0.1%青霉素和链霉素的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)将红色浆体冲出,收集至 15 ml 无菌离心管中,1 500 r/min 离心 5 min。弃上清,用完全培养基(含 DMEM/F-12、15%胎牛血清、

0.1%青霉素、0.1%链霉素)重悬细胞沉淀,以  $5 \times 10^6$  个/瓶的密度接种于 T25 卡式瓶中,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、完全湿度的培养箱中培养。48 h 后半量换液,以后隔天全量换液待细胞长至 70%~80%汇合时,弃掉培养液,用 0.25% 胰蛋白酶 (Trypsin/EDTA Solution-Gibco™) 常规消化 40~60 s,按照 1:3 的比例进行传代培养。

### 1.3 马骨髓间充质干细胞转录因子及表面标志物的鉴定

取生长良好的 P3 代细胞,用 Trizol 裂解液方法 (TaKaRa) 提取总 RNA,并根据 TaKaRa 公司反转录试剂盒说明反转录成 cDNA。根据 NCBI 上公布的马科动物的 mRNA 基因序列,用 Primer premier 5.0 软件设计引物,引物序列见表 1。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{l}$ : cDNA 2  $\mu\text{l}$  (100 mg/L), Ex Taq 2  $\mu\text{l}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{l}$  (10 mg/L), ddH<sub>2</sub>O 补足。PCR 反应条件:  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $94^\circ\text{C}$  变性 30 s, 退火 (退火温度见表 1) 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  后延伸 5 min;  $4^\circ\text{C}$  保存。PCR 扩增产物

用琼脂糖凝胶电泳检测骨髓间充质干细胞的干细胞转录因子 *Nanog* 基因以及特异性表面标记 *CD44*、*CD90* 和 *CD105* 的表达,以及诱导的软骨细胞分子因子鉴定,包括特异基因 *collagen II*、*aggrecan* 和 *Sox9* 的表达情况。

### 1.4 马骨髓间充质干细胞向成骨和软骨细胞的诱导分化

取马骨髓间充质干细胞 P3 代细胞,分为对照组和诱导组。当细胞长至 80%时,诱导组加入诱导培养液,继续培养 28 d,每隔 1 d 换液 1 次;对照组继续更换完全培养基,并且将细胞长至 80%时记为 0 d。之后隔天换液,每天拍照记录细胞分化情况。成骨诱导培养液: 0.1 mmol/L 地塞米松 (Sigma-Aldrich)、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸二钠盐合物 (Sigma)、50 mg/L 维生素 C (Sigma); 软骨诱导培养液: 含糖、0.1% 青霉素、0.1%胰岛素转铁蛋白硒 (Sigma-Aldrich)、100 mg/L BMP-7 (Gibco™)、10 mg/L TGF- $\beta$ 3 (Gibco™)、1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松、50 mg/L 抗坏血酸 (Gibco™)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequences	退火温度 ( $^\circ\text{C}$ ) Annealing temperature	产物大小 (bp) Product size	GenBank 登录号 GenBank
<i>Nanog</i>	F: TACCTCAGCCTCCAGCAGATGC R: CCAGGAATGGTTGCTCCAAGACTG	61	2 003	XM_023643093.1
<i>CD44</i>	F: CCACTAATGCGAGTCACCACA R: TCATCATCATCAATGCCTGATCCA	57	142	EU366979.1
<i>CD90</i>	F: CCATGAGAATACCACCGCCACAC R: GGAGCACAGAGACAGTCTTGTGG	61	361	EU881920.1
<i>CD105</i>	F: AGTCTGCATTGCACCGTCATGAG R: AGCGAGAGGCTCTCCGTGTTG	61	301	KF181205.1
<i>GAPDH</i>	F: TTCAACGGCACAGTCAAG R: TACTCAGCACCAAGCATCA	57	128	NM_001163856.1
<i>Sox9</i>	F: CACACGCTGACCACGCTGAG R: GCTGCTGCTGCTCGCTGTAG	55	135	XM_023652130.1
<i>aggrecan</i>	F: GCTACGACGCCATCTGCTACAC R: TGATGTCCTCCTCGCCACTCAC	57	155	XM_023650286.1
<i>collagen II</i>	F: CAGCAAGAGCAAGGAGAA R: GGACAGTAGACGGAGGAA	56	175	XM_005611082.3

### 1.5 染色鉴定成骨和软骨细胞

在培养第 7、14 和 21 天时, 分别对诱导组和对照组的细胞进行茜素红染色 (索莱宝-G8850) 和阿尔新蓝染色 (索莱宝-G1560), 组织学水平检测分化组细胞是否有变化。具体操作为弃掉培养液, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 2 min; 4% 多聚甲醛在室温下固定 30 min; PBS 清洗 3 次, 每次 2 min; 加入 1% 阿尔新蓝染色 5 min, 或加几茜素红染色 30 min; PBS 清洗 3 次, 每次 2 min; 倒置显微镜 (Olympus-SZX12) 下观察。

### 1.6 定量 PCR 检测

以反转录获得的 cDNA 为模板, 设置 *GAPDH* 为内参基因进行 PCR 扩增。定量 PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, 包括 SYBR Premix Ex TaqII (2 $\times$ ) 10  $\mu$ l、正反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.8  $\mu$ l、DNA 模板 2  $\mu$ l, 无酶水补足。反应条件为, 预变性 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。通过两步法实验结束后, 确认 q-PCR 的扩增曲线和融解曲线, 制作标准曲线进行分析。引物设计见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 马骨髓间充质干细胞系的建立

#### 2.1.1 马骨髓间充质干细胞的分离和纯化

原代细胞接种 48 h 后开始贴壁生长且形态不规则; 换液可除去大部分未贴壁杂细胞, 3 或 4 d 时开始游离出长梭形细胞 (图 1a, b), 5 或 6 d

时贴壁细胞增多, 之后逐渐融合成片生长且增殖速度加快; 7 或 8 d 左右细胞达 80% 汇合, 呈漩涡状生长 (图 1c, d)。原代细胞经 2 或 3 次传代后细胞基本纯化, 形态一致呈长梭形、“成纤维细胞”状。之后每传代一次 3 或 4 d 便可达到 80% 汇合。

#### 2.1.2 马骨髓间充质干细胞转录因子基因的检测

经 PCR 检测, 分离细胞表达了干细胞转录因子 *Nanog* 以及间充质干细胞表面标志物 *CD44*、*CD90* 和 *CD105*, 这 4 个基因的扩增长度分别为 2 003 bp、301 bp、361 bp 和 142 bp (图 2)。根据电泳条带位置初步判断分离得到的细胞为马骨髓间充质干细胞。

### 2.2 马骨髓间充质干细胞向成骨的诱导分化及鉴定

#### 2.2.1 马骨髓间充质干细胞向成骨的诱导分化

将诱导分化的细胞在第 2 天 (图 3a, b)、第 14 天 (图 3c, d)、第 28 天 (图 3e, f) 时分别拍照。随诱导时间的增加, 细胞团由小变大, 由薄变厚, 最终呈“骨结节”状细胞形态。

#### 2.2.2 马骨髓间充质干细胞诱导成骨的染色鉴定

将诱导不同时间成骨细胞分别进行茜素红染色, 发现随着诱导时间的增加, 红色细胞“骨结节”逐步增大 (图 4, 5)。阿尔新蓝染色显示, 诱导的骨髓间充质干细胞细胞聚集在一起, 蛋白多糖和透明质酸等含量丰富, 被染为蓝色。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	退火温度 ( $^{\circ}$ C) Annealing temperature	产物大小 (bp) Product size	GenBank 登录号 GenBank
<i>GAPDH</i>	F: TTCAACGGCACAGTCAAG R: TACTCAGCACCAGCATCA	57	159	XM_014734891.2
<i>ALPL</i>	F: CCAGGCACAAGCACTCTCACTAC R: TCGGTCACGTTGTTCTGTTTCAG	56	136	XM_005607380.3
<i>COL6A1</i>	F: GTACAAGGACGGAGCGGTCAATG R: AGCGACACATCCAACAGGAACAC	56	90	XM_001488351.5
<i>COL1A2</i>	F: CCGTGGAAGCGATGGAAGTGTG R: ACCAGGCTCACCAACGAGTCC	57	349	XM_001492939.4
<i>COL2A1</i>	F: GGAGCAGCAAGAGCAAGGACAAG R: TGGACAGCAGACGCGAAGG	56	138	NM_001081764.1

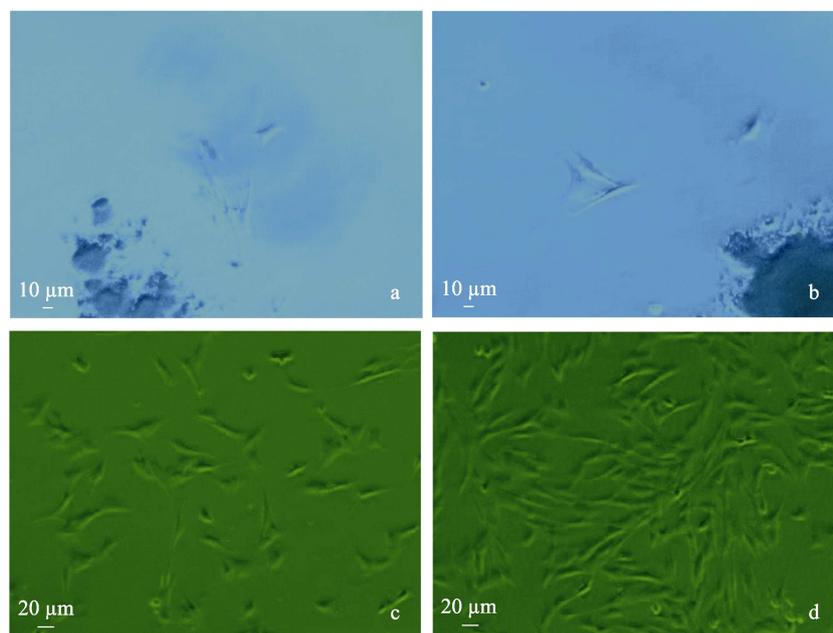


图 1 马骨髓间充质干细胞的原代培养

Fig. 1 Primary culture of horse bone marrow mesenchymal stem cells

a、b. 培养 3 或 4 d 游离出的细胞; c、d. 培养 7 或 8 d 的细胞状态。

a, b. Free cells at 3 to 4 days of culture; c, d. State of cells cultured for 7 to 8 days.

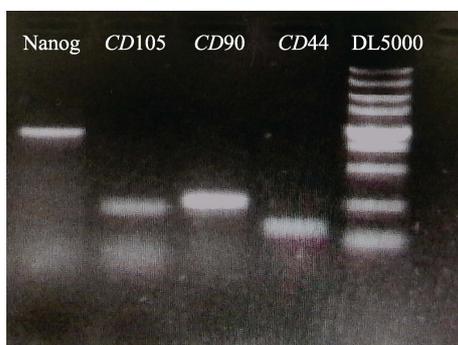


图 2 成骨细胞标记基因的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of osteoblast marker genes

*Nanog*、*CD105*、*CD90* 和 *CD44* 的大小分别为 2 003 bp、301 bp、361 bp 和 142 bp; DL5000. DNA 分子量标准。

The sizes of *Nanog*, *CD105*, *CD90* and *CD44* are 2 003 bp, 301 bp, 361 bp and 142 bp, respectively; DL5000. DNA marker.

**2.2.3 成骨特异基因表达的鉴定** 实时荧光定量 PCR 检测发现成骨细胞 *Col*、*ALPL* 表达量随诱导时间延长明显增加, 在培养 14 d 时, *ALPL* 和 *Col* 基因表达量增加, *ALPL* 基因在 30 d

时表达量达到最大 (图 6)。

### 2.3 马骨髓间充质干细胞向软骨细胞诱导分化及鉴定

**2.3.1 马骨髓间充质干细胞向软骨细胞的诱导分化** 经过纯化的骨髓间充质干细胞接种到 4 个 35 mm 培养皿, 对照组加无血清培养基, 诱导组加诱导液, 分别诱导培养 14 d 和 21 d。其中, 对照组细胞形态随着培养天数的增加一直都呈长梭形 (图 7a), 表现典型的成纤维状并且随着培养天数的增加细胞呈涡旋状生长, 而且会出现细胞老化及凋亡现象。诱导组细胞则随着诱导时间的增加不再显现长梭状, 而是逐渐变成三角形的形态, 诱导第 7 天, 大部分细胞没有明显的棱角而是呈多边形 (图 7b), 第 12 天细胞呈现“铺路石”状, 表现软骨细胞典型形态 (图 7c); 第 17 天后软骨细胞形态更加清晰 (图 7d), 从形态上初步证明骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞。

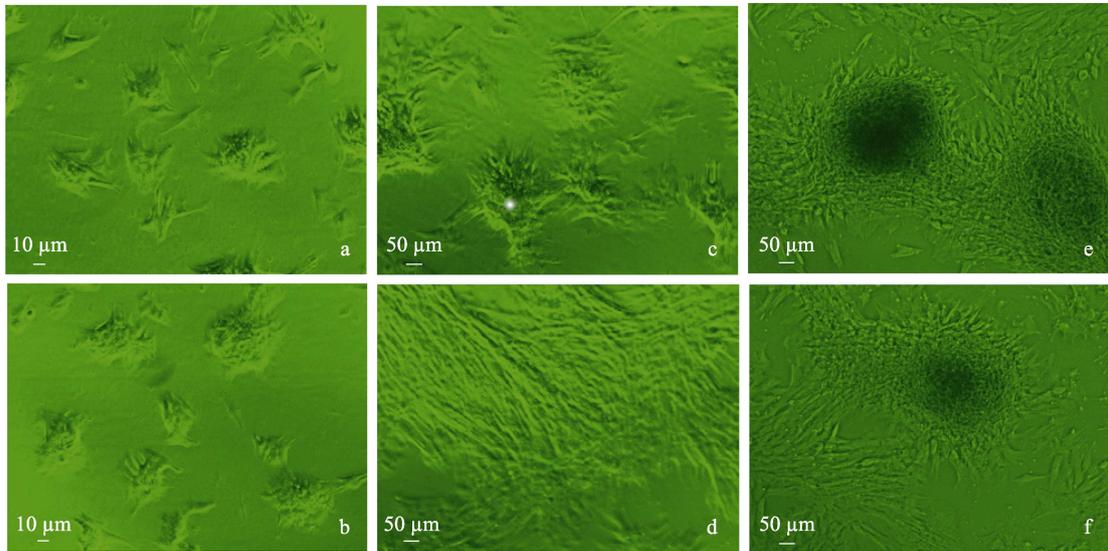


图 3 诱导分化的成骨细胞 (20 ×)

Fig. 3 Differentiated osteoblasts (20 ×)

a、b. 骨髓间充质干细胞诱导分化 2 d 时细胞形态；c、d. 骨髓间充质干细胞诱导分化 14 d 时细胞形态；e、f. 骨髓间充质干细胞诱导分化 28 d 时细胞形态。

a, b. Cell morphology at the second day of differentiation induction of bone marrow mesenchymal stem cells; c, d. Cell morphology at the 14th day of differentiation; e, f. Cell morphology at the 28th day of differentiation.

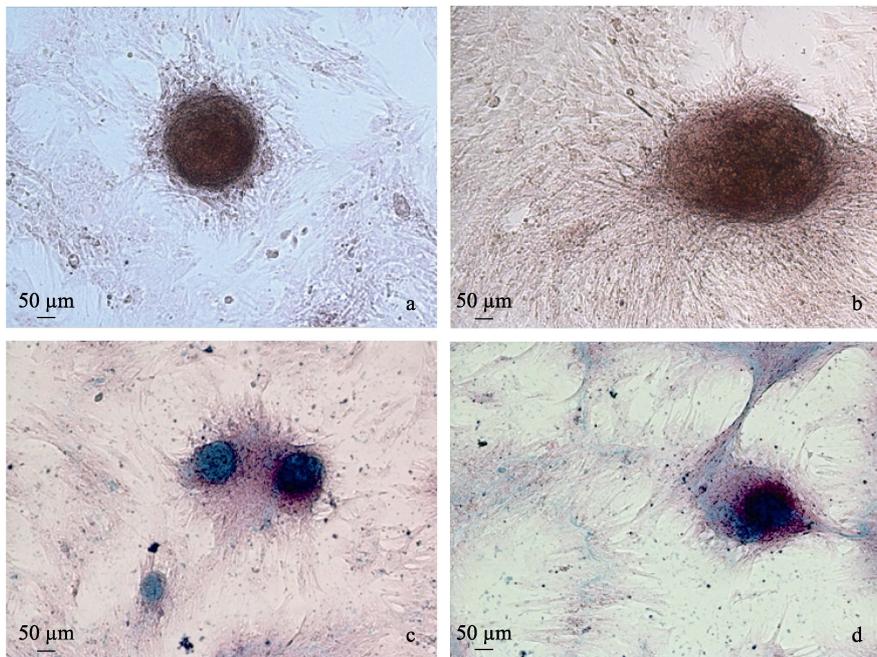


图 4 马骨髓间充质干细胞诱导分化的茜素红 (a 和 b) 和阿尔新蓝 (c 和 d) 染色

Fig. 4 Alizarin red (a and b) and Alsin blue (c and d) staining of cells differentiated from horse BMSC on the 28<sup>th</sup> day



图 5 马骨髓间充质干细胞诱导分化的茜素红和阿尔新蓝染色实物图

Fig. 5 Physical map of Alizarin red and Alsin blue staining

两个卡式瓶分别为诱导 28 d (左) 和 14 d (右) 时茜素红染色; 12 孔板细胞为诱导 28 d 时茜素红 (上) 与阿尔新蓝 (下) 染色对比。

Alizarin red staining was performed on the 28<sup>th</sup> day (left) and 14<sup>th</sup> day (right) of induction; Alizarin red staining was performed on 12 holes (top) and Alsin blue taining was shown (bottom) after induction for 28 days.

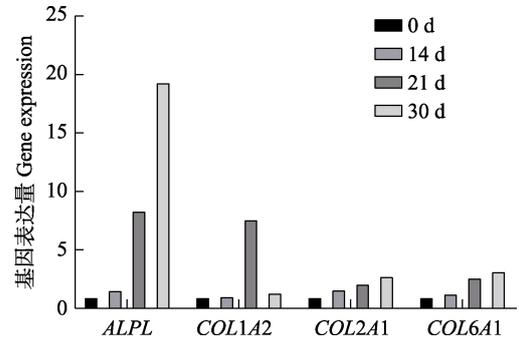


图 6 诱导不同天数成骨特异基因的表达量

Fig. 6 Inducing the expression of cartilage-specific genes after culture for different periods

**2.3.2 马骨髓间充质干细胞向软骨诱导分化的染色鉴定** 阿尔新蓝染料对软骨相关蛋白, 包括 II 型胶原蛋白 collagen II、聚集蛋白聚糖 aggrecan 进行染色鉴定。对照组细胞未着色 (图 8a)。诱导组细胞随着诱导天数的增加, 被阿尔新蓝染成蓝色的软骨细胞逐渐增多 (图 8b~d)。

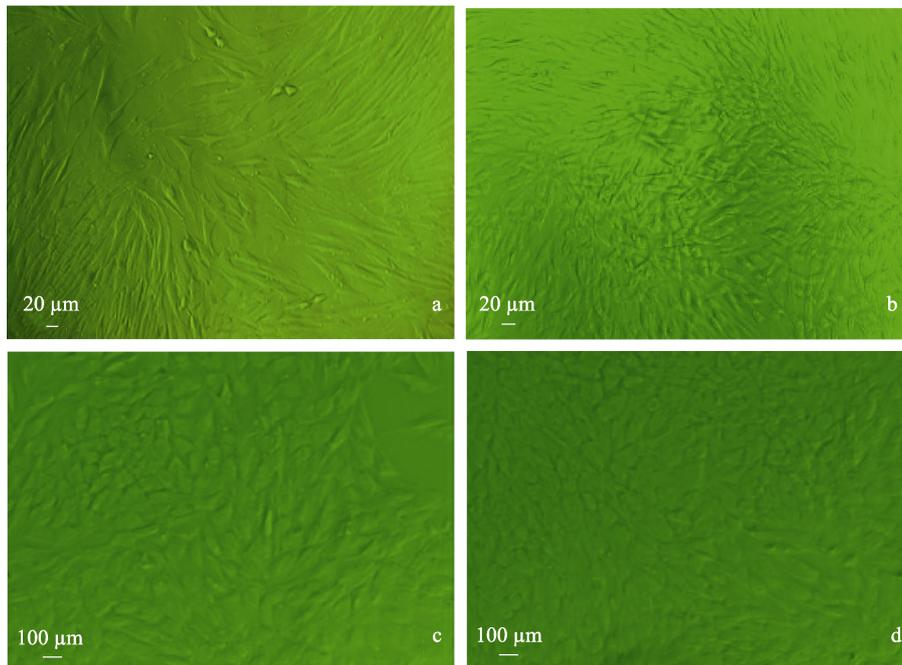


图 7 骨髓间充质干细胞成软骨诱导 (100 ×)

Fig. 7 Cartilage inducing from bone marrow mesenchymal stem cells (100 ×)

a. 对照组细胞; b. 诱导培养 7 d; c. 诱导培养 12 d; d. 诱导培养 17 d。

a. The control cells; b. The induction culture for 7 days; c. The induction culture for 12 days; d. The induction culture for 17 days.

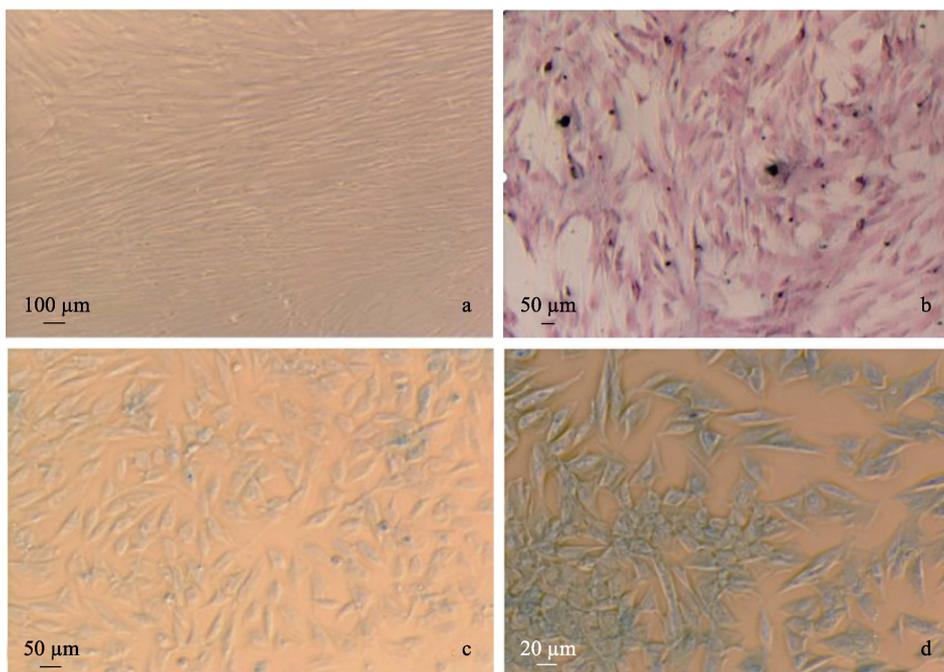


图 8 阿尔新蓝染色鉴定 (100 ×)

Fig. 8 Alcian blue staining identification (100 ×)

a. 对照组; b. 诱导培养 7 d; c. 诱导培养 12 d; d. 诱导培养 17 d.

a. The control group; b. The induction culture for 7 days; c. The induction culture for 12 days; d. The induction culture for 17 days.

**2.3.3 马骨髓间充质干细胞向软骨细胞诱导分化的鉴定** 普通 PCR 扩增了细胞内参基因 *GAPDH* 和软骨特异基因 *collagen II*、*aggrecan* 和 *Sox9*。内参基因 *GAPDH* 在诱导组和对照组细胞中都稳定表达，而 *collagen II*、*aggrecan*、*Sox9* 仅在诱导组细胞中稳定表达，扩增长度分别为 135 bp、155 bp 和 175 bp (图 9)。表明骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞并表达了软骨细胞特异标记基因。

### 3 讨论

本研究成功地建立了马骨髓间充质干细胞，并将其诱导分化为成骨细胞和软骨细胞。通过对分离的骨髓间充质干细胞进行形态学和功能方面的鉴定，分离和鉴定了具有典型成纤维细胞样形态的细胞，并采用 PCR 技术对马骨髓间充质干细胞、软骨细胞和成骨细胞进行了



图 9 软骨细胞标记基因

Fig. 9 Chondrocyte marker gene

其中 *GAPDH*、*collagen II*、*aggrecan* 和 *Sox9* 的大小分别为 128 bp、135 bp、155 bp 和 175 bp。M500. DNA marker.

The sizes of *GAPDH*, *collagen II*, *aggrecan* and *Sox9* are 128 bp, 135 bp, 155 bp and 175 bp, respectively. M500. DNA marker.

鉴别。

本实验证明马骨髓间充质干细胞可以成功诱导分化为软骨细胞和成骨细胞。实验采用马骨髓间充质干细胞体外特殊培养基培养，成骨诱导培养基中含有地塞米松、β-甘油磷酸二钠

盐水合物和维生素 C 等组分, 而软骨诱导培养基中含有高糖、青霉素、胰岛素转铁蛋白硒、BMP-7、TGF- $\beta$ 3、地塞米松和抗坏血酸等组分, 排除了广泛使用的条件培养基和含血清培养基中未知组分的影响。虽然来源于骨髓间充质干细胞的软骨细胞没有移植到软骨损伤动物体内, 但是简单的诱导培养条件为以后的分化实验提供了一种方便的方法。1995 年 Lennon 等建立了一种无血清的培养体系, 主要为 60% 低糖 DMEM 和 40% MCDB-201 为基础液, 添加胰岛素、亚油酸、牛血清白蛋白等, 可以将骨髓间充质干细胞诱导为成骨和软骨细胞。1997 年 Jaiswal 等发现地塞米松、L-抗坏血酸-2-磷酸盐和磷酸甘油钠的组合具有较好的诱导骨髓间充质干细胞成骨作用。随后的研究也显示, 不同物种中诱导剂有一些变化, 如大鼠 (*Rattus norvegicus*) 骨髓间充质干细胞成骨分化时添加胰岛素 (韩振忠等 2016), 而本实验马的骨髓间充质干细胞诱导时并未添加。也有研究使用血清替代物 (FBS-KSR) 组合培养基培养牛 (*Bos taurus*) 骨髓间充质干细胞, 并且结果显示细胞状态良好 (赵欣欣等 2018)。使用异体浓缩血小板制备的混合血小板裂解液和无血清培养体系原代培养人骨髓间充质干细胞, 以经典的胎牛血清培养方案作为对照, 发现三者均能够很好地支持人骨髓间充质干细胞的原代培养, 并且促进细胞增殖的能力均高于血清组, 而且混合血小板裂解液组在促进其成骨分化方面比其他两组更强 (徐杨等 2019)。骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞和成骨细胞的研究为修复动物骨损伤提供了治疗手段, 具有良好的临床应用前景 (Richardson et al. 2010)。成骨诱导培养基诱导马骨髓间充质干细胞的成骨细胞分化, 形态学观察到诱导组的细胞在第 2 天开始聚集, 细胞堆积呈逐渐增加和增厚的趋势, 并诱导其聚集成结节和团簇。组织学观察显示, 茜素红能够将诱导组的细胞团染成红色, 说明诱导 14 天后的细胞团生成钙磷灰石; 而阿尔辛蓝染料将诱导组的细胞团染成蓝色, 代表诱导

后的细胞团有透明质酸和多糖的存在。马骨髓间充质干细胞通过软骨细胞诱导培养基成功诱导成软骨细胞, 形态学表现为诱导软骨细胞特征从长梭形向上皮细胞样转变。随着诱导时间的延长, “铺路石” 样的形状变得更加明显。组织学观察发现, 阿尔辛蓝染色在诱导第 7 天时细胞核呈红色状态, 诱导第 17 天时软骨细胞在富含透明质酸的地方变蓝。

分子实验表明, 收集培养的马骨髓细胞表达了干细胞转录因子 *Nanog* 和间充质干细胞表面标记物 *CD44*、*CD90* 和 *CD105*, 并且依据文献报道可以证实分离得到的细胞属于骨髓基质干细胞 (Mildmay-White 2017, Gale 2019)。定量 PCR 结果证实, *Col* 和 *ALPL* 基因在诱导成骨细胞中表达, 随着诱导时间的延长, 大多数基因的表达逐渐增加, 而 *COL1A2* 在第 21 天达到最大值, 这与 Yoo 等 (2011) 研究的 *Col* 基因表达一致。*ALPL* 的高表达被认为是成骨细胞诱导的关键指标之一 (Jo et al. 2019), 在本研究中, *ALPL* 的表达随着诱导时间的延长而增加。然而由于诱导细胞活性在 30 d 内下降, 无法继续观察基因表达。经 PCR 证实 *COL2A1*、*ACAN* 和 *Sox9* 在诱导软骨细胞中的表达, 而在非诱导细胞中没有表达。这些基因在诱导软骨细胞中的高表达与将间充质干细胞分化为软骨细胞的结果一致 (Read 2008, Gale 2019)。本结果表明, 两种诱导细胞在关键基因的表达上存在显著差异。马骨髓间充质干细胞可诱导成多种细胞类型, 有助于修复马的肌腱、韧带和软骨, 为马的损伤及再生医学提供研究依据。

综上所述, 本研究通过使用液体冲洗胸骨两端切面的方法获得的骨髓间充质干细胞可在培养基中稳定增殖, 并且来源于马的骨髓间充质干细胞具有分化成不同细胞的能力, 通过诱导剂可以诱导分化为形态不同的软骨细胞和成骨细胞。

## 参 考 文 献

- Baker N, Boyette L B, Tuan R S. 2015. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*,

- 70(2015): 37–47.
- Castro-Manreza M E, Mayani H, Monroy-García A, et al. 2014. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative *in vitro* analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem Cells and Development*, 23(11): 1217–1232.
- Chiu L H, Lai W F, Chang S F, et al. 2014. The effect of type II collagen on MSC osteogenic differentiation and bone defect repair. *Biomaterials*, 35(9): 2680–2691.
- Cokelaere S, Malda J, van Weeren R. 2016. Cartilage defect repair in horses: Current strategies and recent developments in regenerative medicine of the equine joint with emphasis on the surgical approach. *The Veterinary Journal*, 214: 61–71.
- Friedenstein A J, Piatetzky-Shapiro I I, Petrakova K V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryol Experimental Morphology*, 16(3): 381–90.
- Gale A L, Linardi R L, McClung G, et al. 2019. Comparison of the chondrogenic differentiation potential of equine synovial membrane-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 6: 178.
- Ghaneialvar H, Soltani L, Rahmani H R, et al. 2018. Characterization and classification of mesenchymal stem cells in several species using surface markers for cell therapy purposes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(1): 46–52.
- Jaiswal N, Haynesworth S E, Caplan A I, et al. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64(2): 295–312.
- Jo S, Han J, Lee Y L, et al. 2019. Regulation of osteoblasts by alkaline phosphatase in ankylosing spondylitis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 22(2): 252–261.
- Kashani I R, Zarnani A H, Soleimani M, et al. 2014. Retinoic acid induces mouse bone marrow-derived CD15<sup>+</sup>, Oct4<sup>+</sup> and CXCR4<sup>+</sup> stem cells into male germ-like cells in a two-dimensional cell culture system. *Cell Biology International*, 38(6): 782–789.
- Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 10711–10716.
- Lennon D P, Haynesworth S E, Young R G, et al. 1995. A chemically defined medium supports *in vitro* proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 219(1): 211–22.
- Meirelles L S, Fontes A M, Covas D T, et al. 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor reviews*, 20(5/6): 419–427.
- Mildmay-White A, Khan W. 2017. Cell surface markers on adipose derived stem cells: A systematic review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 12(6): 484–492.
- Reed S A, Johnson S E. 2008. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *Journal of Cell Physiology*, 215(2): 329–36.
- Richardson S M, Kalamegam G, Pushparaj P N, et al. 2010. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 222(1): 23–32.
- Wang Y, Wu M H, Cheung M P L, et al. 2017. Reprogramming of dermal fibroblasts into osteo-chondrogenic cells with elevated osteogenic potency by defined transcription factors. *Stem Cell Reports*, 8(6): 1587–1599.
- Yoo H J, Yoon S S, Park S Y, et al. 2011. Gene expression profile during chondrogenesis in human bone marrow derived mesenchymal stem cells using a cDNA microarray. *Journal of Korean Medical Science*, 26(7): 851–858.
- 韩振忠, 鲁艳芹, 王延宙, 等. 2016. 大鼠骨髓间充质干细胞原代培养及成骨成脂分化能力染色鉴定. *罕见疾病杂志*, 23(2): 1–4.
- 徐杨, 林飞跃, 尹晓明. 2019. 两种体外培养体系对人骨髓间充质干细胞原代培养、增殖和成骨分化的影响比较. *福建医药杂志*, 41(6): 136–141, 182.
- 赵欣欣, 姜禹, 安星兰, 等. 2018. 牛骨髓间充质干细胞体外培养体系的优化. *中国兽医学报*, 38(5): 942–949.