

· 组织工程与细胞培养 ·

重组人干扰素 $\beta 1a$ 对人骨髓间充质干细胞成软骨细胞定向分化的影响

李乔乔¹, 张丽君², 黄志立², 王飞¹, 吴振强¹, 王妍²

1 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

2 深圳职业技术学院 应用化学与生物技术学院, 广东 深圳 518055

李乔乔, 张丽君, 黄志立, 等. 重组人干扰素 $\beta 1a$ 对人骨髓间充质干细胞成软骨细胞定向分化的影响. 生物工程学报, 2018, 34(6): 964-972.

Li QQ, Zhang LJ, Huang ZL, et al. Effects of recombinant human interferon $\beta 1a$ on the chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cell. Chin J Biotech, 2018, 34(6): 964-972.

摘要: 重组人干扰素 β (rhIFN- β) 是通过基因表达的一种糖蛋白, 具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用, 虽有研究表明其他亚型干扰素如干扰素 γ 对细胞增殖和分化有一定的作用, 但 rhIFN- β 对人骨髓间充质干细胞 (hMSCs) 诱导分化的影响尤其是成软骨细胞定向分化的研究尚少。文中采用成球法研究在常规 TGF- $\beta 3$ 诱导分化培养基中添加重组 IFN- $\beta 1a$ 后对诱导 hMSCs 分化成软骨球的影响。hMSCs 经诱导分化后, 收集软骨球, 通过定量检测糖胺多糖 (GAG) 含量、软骨球形态测定、Alcian Blue 组织染色、Real-time PCR 和 Western blotting 检测 Sox9 和 Collagen II 的表达。结果显示, 在常规 TGF- $\beta 3$ 诱导分化培养基中添加 100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 能显著提高 GAG 含量, 增大软骨球尺寸, 促进聚集蛋白聚糖形成, 上调 Sox9 和 Collagen II 的表达。研究结果表明, 重组人 IFN- $\beta 1a$ 能够与 TGF- $\beta 3$ 联合作用促进 hMSCs 成软骨细胞定向分化。

关键词: 重组人干扰素 $\beta 1a$, TGF- $\beta 3$, hMSCs, 成软骨分化

Received: November 13, 2017; **Accepted:** February 5, 2018

Supported by: Science and Technology Project of Shenzhen Science and Technology Innovation Commission (Nos. JCYJ20170306144035589, JCYJ 20170306144523128, GGJS20130331152344401), Key Projects of Shenzhen Polytechnic (No. 601522k27009).

Corresponding authors: Yan Wang. Tel: +86-755-26018301; E-mail: wangsusan@szpt.edu.cn

Zhenqiang Wu. Tel: +86-20-39380663; E-mail: btzhqwu@scut.edu.cn

深圳市科技创新委项目 (Nos. JCYJ20170306144035589, JCYJ 20170306144523128, GGJS20130331152344401), 深圳职业技术学院重点项目 (No. 601522k27009) 资助。

网络出版时间: 2018-02-28

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180228.0955.001.html>

Effects of recombinant human interferon β 1a on the chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cell

Qiaojiao Li¹, Lijun Zhang², Zhili Huang², Fei Wang¹, Zhenqiang Wu¹, and Yan Wang²

¹ School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

² Shenzhen Institute of Applied Chemistry and Biotechnology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract: Recombinant human interferon beta (rhIFN- β) is a glycoprotein produced by genetically engineered cells and has anti-virus, anti-tumor and immunoregulation functions. Although studies have shown that other subtypes of IFN such as IFN- γ affects cell proliferation and differentiation to some extent, the effect of rhIFN- β on chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) is less known. In this study we studied the effect of rhIFN- β on the chondrogenic differentiation of hMSCs by inducing hMSCs into cartilage pellet via adding IFN- β 1a into regular TGF- β 3 chondrogenic differentiation medium. We collected the induced pellets and then detected GAG content, assessed pellets size, observed aggrecan using alcian blue staining, and analyzed the expression of Sox and Collagen II using real-time PCR and Western blotting. Addition of 100 ng/mL IFN- β 1a to regular TGF- β 3 chondrogenic differentiation medium could improve the concentration of GAG, increase the size of pellets, promote the formation of aggrecan and up-regulate the expression of Collagen II and Sox9. IFN- β 1a combined with TGF- β 3 could promote chondrogenic differentiation of hMSCs.

Keywords: recombinant human interferon beta 1a, TGF- β 3, hMSCs, chondrogenic differentiation

关节软骨是高度分化的组织,它的组织结构决定了软骨细胞代谢缓慢,受损伤后难以自行修复,如果关节软骨损伤未得到及时修复,则会造成骨性关节炎。关节软骨损伤及缺损一直是骨科治疗的难题^[1-2]。目前,组织工程软骨已在临床应用方面进行了初步尝试,为临床软骨缺损的修复提供了新的思路与途径,种子细胞、生物材料以及细胞因子是组织工程软骨的重要因素。骨髓间充质干细胞(Human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs)具有自我增殖能力和多向分化潜能,在特定条件下可分化为软骨细胞,且移植后能够与软骨下板更好地融合,是软骨组织工程的理想细胞,已有的研究表明细胞因子是定向诱导 hMSCs 分化成软骨细胞的关键因素,如转化生长因子 β (TGF- β)、骨形态发生蛋白 (BMP)、地塞米松 (DEX) 等^[3-5]。然而细胞因子的作用是一个复杂的过程,其诱导效应与细胞因子的来源、浓度、剂量等多种因素有关,需要不断探索新的细胞因子以及各种因子相互作用关系,因此细胞因子对

hMSCs 诱导分化方向影响及作用机制一直以来都是干细胞研究中的一个热点。

干扰素 β (IFN- β) 是成纤维细胞和某些上皮细胞产生的一类糖蛋白,具有抗病毒、抗细胞分裂及免疫调节等多种生物学活性。重组人干扰素 β (rhIFN- β) 是通过基因工程改造得到的,对性病、多发性硬化症、丙型肝炎及相关肝癌、其他病毒性疾病以及多种肿瘤具有明显的疗效,虽有研究表明其他亚型干扰素如干扰素 γ 对细胞增殖和分化有一定的作用,但重组人干扰素 β 体外对 hMSCs 向软骨细胞分化作用的研究尚少^[6-8]。本次实验通过观察重组人干扰素 β 1a 对 hMSCs 向软骨细胞分化的影响,探讨重组人干扰素 β 1a 体外是否能够促进 hMSCs 向软骨细胞分化,为软骨损伤治疗提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

hMSCs 细胞株 (赛业 (广州) 生物科技有限

公司),成人骨髓间质干细胞的基础培养基(赛业(广州)生物科技有限公司),成软骨分化培养基(赛业(广州)生物科技有限公司),胰酶(美国Gibco公司),Trizol(美国Invitrogen公司),SYBR荧光定量试剂盒(美国Invitrogen公司),转录试剂盒(Promega 生物技术有限公司),内参 GAPDH(上海康成生物),兔抗人 Collagen II 抗体(英国Abcam 公司),兔抗人 Sox9 抗体(英国 Abcam 公司),羊抗兔 IgG-HRP 二抗(美国 Southern biotech 公司),重组人干扰素 β 1a(以色列 ProSpec-Tany 公司),Alcain blue 染色试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司),GAG 总含量检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司)。

Hera Cell 240 型细胞培养箱(美国热电公司),Olympus CKX41 型倒置相差显微成像系统(日本奥林巴斯公司),净安泰 BHC-1000IIA2 型生物安全柜(江苏苏净集团有限公司),Eppendorf 5810 R 型台式离心机(德国 Eppendorf 公司),Spectramax M5e 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司),核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hMSCs 细胞培养方法

hMSCs 细胞培养于含 10%胎牛血清、1% 5 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青/链霉素的成人骨髓间质干细胞基础培养基中,37 °C 下于 5% (体积分数) CO₂ 培养箱中孵育至细胞铺满瓶底时,用 0.25% (质量分数) 的胰蛋白酶消化传代,于每 3 天换液,每 7 天传代,至第 6 代用于实验。

1.2.2 hMSCs 成软骨细胞分化方法

取第 6 代 hMSCs 胰酶消化计数,2 000 r/min 离心 5 min,用软骨分化培养基按照 5.0×10^5 cells/mL 的密度进行重悬。室温下 2 000 r/min 离心 5 min,吸去上清,分别加入 1 mL 成人骨髓间质干细胞的完全培养基、成软骨分化培养基 I (含 10 ng/mL

TGF- β 3)、成软骨分化培养基 II (含 100 ng/mL IFN- β 1a)、成软骨分化培养基 III (含 10 ng/mL TGF- β 3 和 50 ng/mL IFN- β 1a)、成软骨分化培养基 IV (含 10 ng/mL TGF- β 3 和 100 ng/mL IFN- β 1a)、成软骨分化培养基 V (含 10 ng/mL TGF- β 3 和 200 ng/mL IFN- β 1a) 和成软骨分化培养基 VI (含 10 ng/mL TGF- β 3 和 400 ng/mL IFN- β 1a),室温下 2 000 r/min 离心 5 min,拧松离心管盖以便气体交换,将其放置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。24 h 后轻弹离心管底部使软骨球脱离管底悬浮在液体中。自接种开始计算,每隔 3 d 换液,换液后轻弹离心管底部使软骨球脱离管底悬浮在液体中。

1.2.3 GAG 总含量测定

收集诱导 21 d 的细胞,按试剂盒说明测定 GAG 含量,方法如下:加入 300 μ L 萃取液,充分混匀,56 °C 孵育 16 h,90 °C 孵育 10 min。13 000 r/min 离心 10 min,移取上清,置于冰上备用;取 25 μ L 上清加入 400 μ L 染色液,室温下孵育 30 min,避免光照,期间每隔 5 min 涡旋振荡 15 s,13 000 r/min 离心 10 min,抽去上清,加入 400 μ L 解离液,室温下孵育 5 min,避免光照。取 200 μ L 样品,在酶标仪上以 656 nm 波长测定 OD 值,每组 3 个复孔。

1.2.4 Alcain blue 染色

取诱导 21 d 的软骨球经石蜡包埋切片,脱蜡和脱水,阿利新蓝染液染色 30 min,自来水冲洗 2 min,蒸馏水冲洗 1 次,显微镜下观察阿利新蓝染色效果。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测成软骨分化相关基因表达

取诱导分化后细胞,Trizol 法提取细胞总 RNA,按照 Promega 逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,用 SYBR Green qPCR SuperMix 进行荧光定量 PCR 扩增,检测 Collagen II 和

Sox9 的 mRNA 表达,引物序列见表 1。每个样本设 3 个复孔,在 Real-time PCR 仪上进行反应。反应条件:50 °C 2 min;95 °C 2 min;95 °C 15 s;60 °C 32 s,共 40 个循环。以 18S rRNA 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达的相对水平。

1.2.6 Western blotting 检测成软骨分化相关蛋白表达

取诱导分化后细胞,按 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。加入 5×蛋白质上样缓冲液煮沸 10 min 使其变性。SDS-PAGE 凝胶电泳,然后用湿转法将凝胶中的蛋白转至 PVDF 膜上,TBST 漂洗 1 次 5 min;将 PVDF 膜置于含 5%脱脂奶粉溶液中室温摇床封闭 1 h,TBST 洗膜 1 次 10 min;分别加入含 Collagen II (1:1 000)、Sox9 (1:1 000)、内参 GAPDH (1:10 000) 一抗工作液 4 °C 过夜,TBST 漂洗 4 次,每次 10 min;用含标记辣根过氧化物酶的二抗(1:20 000) 37 °C 孵育 1 h,TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。将杂交膜置于一透明塑料板上,注意不要让膜干燥。用移液器将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面,并使反应持续 5 min。用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液,放至暗盒显影。

1.2.7 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件对实验数据进行统计学分析,数据以“平均值±平均标准误差 ($\bar{x} \pm s$)”的形式表示,采用 t 检验,若 $P < 0.05$ 则认为差异有统计学意义。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Sequences of the primers for real-time PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Collagen II-forward	CAGATGACCTTCCTACGCCT
Collagen II-reverse	TCTTCTGTGACCGGTACTCG
Sox9-forwardF	CCACCCGGATTACAAGTACC
Sox9-reverse	GCCTTGAAGATGGCGTTGG
18S rRNA-forward	CCTGGATACCGCAGCTAGGA
18S rRNA-reverse	GCGGCGCAATACGAATGCCCC

2 结果与分析

2.1 GAG 总含量检测结果

糖胺多糖 (GAG) 总含量是代表 hMSCs 成软骨分化水平的重要生化指标。通过检测细胞的 GAG 总含量,结果见图 1,发现单独添加 10 ng/mL TGF- $\beta 3$ 组和单独添加 100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 组无显著差异 ($P > 0.05$)。而 TGF- $\beta 3$ 和 IFN- $\beta 1a$ 联合诱导组均高于单独添加组,其中联合添加 10 ng/mL TGF- $\beta 3$ 和 100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 组显著高于其他组 GAG 含量 ($P < 0.05$)。结果表明在常规 TGF- $\beta 3$ 诱导分化过程添加 100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 能够提高 GAG 含量,促进 hMSCs 成软骨分化程度。

2.2 hMSCs 软骨分化形态检测结果

成软骨立体诱导 1 d 时可见到离心管底有峭状突起形成,在诱导 3 d 可见突起形成小球状。轻轻振荡离心管可见小球在培养液中漂浮,并不散开,随后小球缓慢增大。21 d 后取出小球,小球柔软略有弹性及一定的粘性。测量软骨球直径见图 2,可见

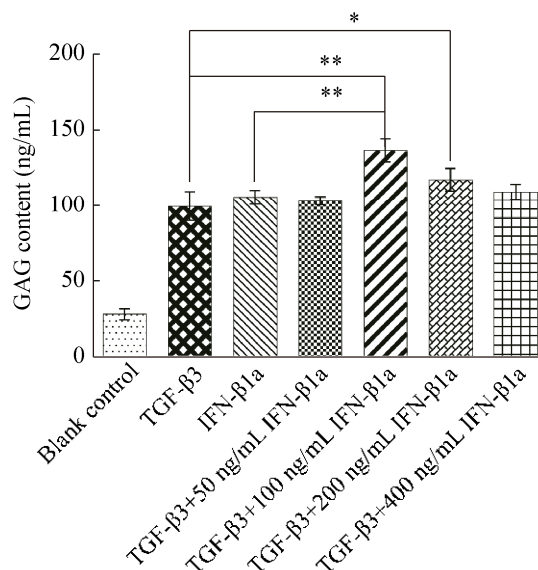


图 1 诱导过程添加不同 IFN- $\beta 1a$ 浓度对细胞 GAG 含量的影响

Fig. 1 Effect of different IFN- $\beta 1a$ concentration on GAG content during chondrogenic differentiation of hMSCs. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

常规 TGF- β 3 诱导分化过程添加 100 ng/mL IFN- β 1a 形成的软骨球明显大于其他组单一成分组。

2.3 阿利新蓝染色结果

聚集蛋白聚糖是软骨细胞表面标志物, 该物质经阿利新蓝染色会呈现蓝色。hMSCs 诱导 21 d 成软骨球后, 切片、染色, 结果见图 3。TGF- β 3 和 IFN- β 1a 单独添加组之间无明显的差异。而常规 TGF- β 3 诱导分化过程添加 100 ng/mL IFN- β 1a 蓝色所占比例明显提高。组织染色结果也表明添加 IFN- β 1a 能促进 hMSCs 成软骨分化。

2.4 荧光定量 PCR 检测成软骨分化标志基因表达结果

添加不同诱导分化培养基诱导 4、7、11、14、21 d 后, qRT-PCR 检测 Sox9 和 Collagen II 基因 mRNA 表达水平。对于 Sox9, 在诱导分化不同

时间点, 与对照组相比, 其他各组表达量均显著高于对照组, 且 IFN- β 1a 组和 TGF- β 3+100 ng/mL IFN- β 1a 组均显著高于 TGF- β 3 组, 但当诱导至 21 d 时, 只有 TGF- β 3+100 ng/mL IFN- β 1a 组显著高于 TGF- β 3 组 ($P < 0.01$) (图 4A)。结果同时表明, 随着诱导分化时间延长, 各诱导组中 Sox9 mRNA 的表达量均有升高, 其中 TGF- β 3 组和 TGF- β 3+100 ng/mL IFN- β 1a 组增加显著, 而 IFN- β 1a 组在第 7 天有明显升高, 而后随着诱导时间延长, 其表达量上升趋势不明显。对于 Collagen II, 其 mRNA 的表达规律与 Sox9 相似, 但在第 7 天之后, IFN- β 组和 TGF- β 3 组之间表达无显著差异, 而 TGF- β 3+100 ng/mL IFN- β 1a 组相对表达量在不同诱导时间点均显著高于其他组 (图 4B)。

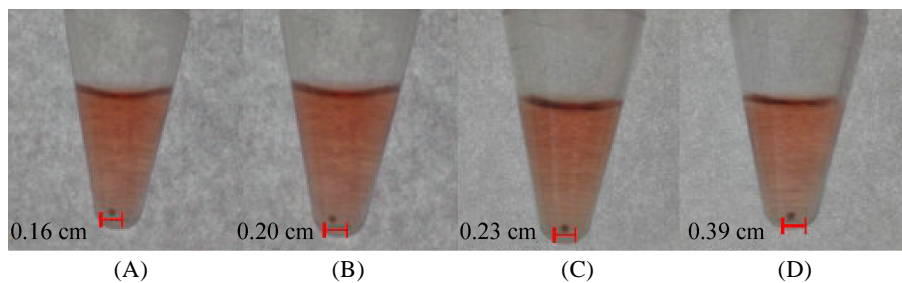


图 2 软骨球形态学观察

Fig. 2 Morphological observation of cartilage ball. (A) Blank control group. (B) TGF- β 3 group. (C) IFN- β 1a group. (D) TGF- β 3+100 ng/mL IFN- β 1a group.

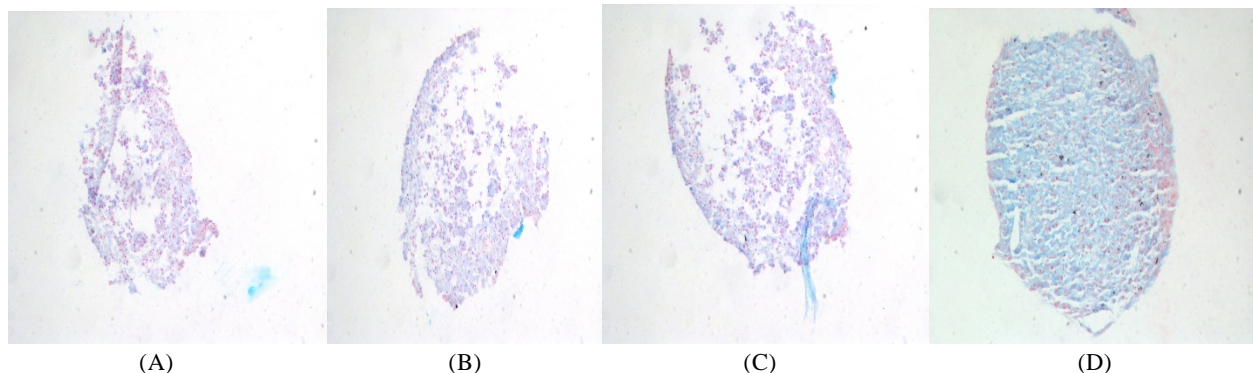


图 3 阿利新蓝染色结果

Fig. 3 Alcian blue staining results. (A) Blank control group. (B) TGF- β 3 group. (C) IFN- β 1a group. (D) TGF- β 3+100 ng/mL IFN- β 1a group.

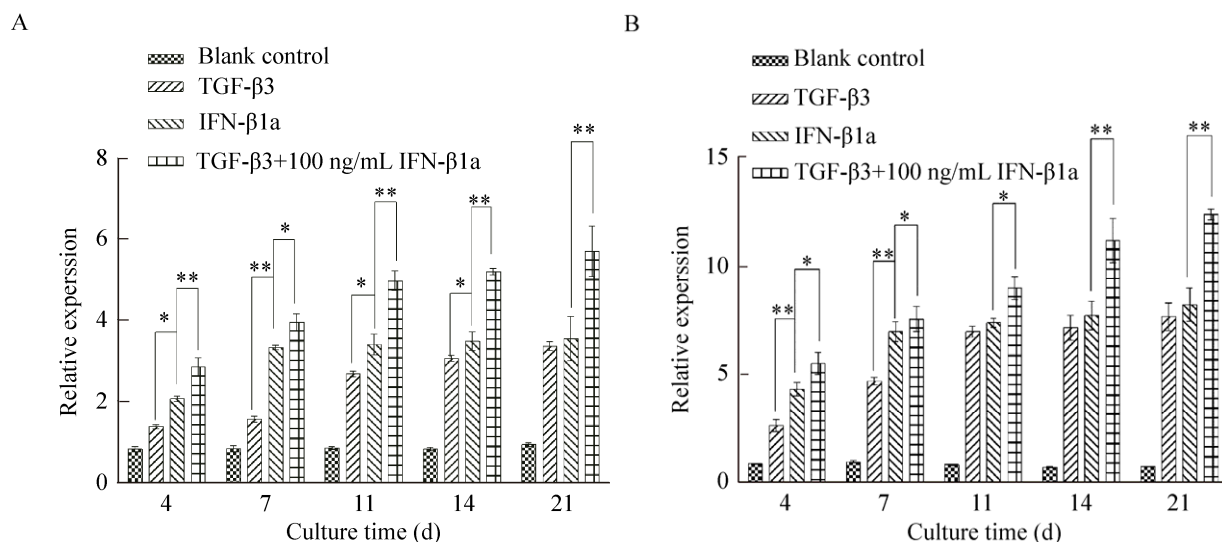


图 4 Sox9 (A) 和 Collagen II (B) 的 qRT-PCR 检测结果

Fig. 4 qRT-PCR result of gene Sox9 (A) and Collagen II (B).

2.5 Western blotting 检测成软骨分化相关蛋白表达结果

添加不同诱导分化培养基诱导 4、7、11、14、21 d 后, 收取各组细胞, Western blotting 检测 SOX9 和 COL II 蛋白表达水平。检测结果及灰度 (IOD) 分析结果表明 (图 5), 在不同诱导分化时间点, TGF- $\beta 3$ +100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 组的 SOX9 和 COL II 蛋白均显著高于其他组 ($P < 0.01$), 且随着分化时间延长, 上述两种蛋白表达呈上升趋势。而 IFN- $\beta 1a$ 组和 TGF- $\beta 3$ 相比较, 第 21 天 IFN- $\beta 1a$ 组表达的 SOX9 和 COL II 蛋白显著高于 TGF- $\beta 3$ 组, 但只有在第 11 天 IFN- $\beta 1a$ 组表达的 SOX9 蛋白显著高于 TGF- $\beta 3$ 组, 其他时间点均无显著差异。而且随着分化时间延长, IFN- $\beta 1a$ 组和 TGF- $\beta 3$ 中 SOX9 和 COL II 蛋白表达总体也呈上升趋势。

3 讨论

由于创伤、感染、痛风和退行性病变等各种原因导致的关节长期疼痛和功能障碍, 所致关节软骨缺损在临床十分常见, 软骨组织因缺乏血管和神经营养而自我修复能力不足, 软骨的缺损经常会导致以软骨退变、软骨下骨硬化、骨赘形成及关节

内炎症为病变特点的骨性关节炎 (Osteoarthritis, OA) 的发生^[9-10]。体外构建组织工程化软骨是治疗软骨缺损的重要途径之一, 其中骨髓间充质干细胞因其具有增殖传代能力强、细胞均一性好、能够多向分化、不存在伦理问题和排斥反应等特点^[11-12], 已经成为体外构建组织工程化软骨的细胞来源之一^[13-14]。但体外诱导 hMSCs 向软骨细胞的定向分化需要在一定的诱导条件。细胞因子是诱导分化的关键因素, 其中细胞因子 TGF- β 超家族主要包括 TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 和 TGF- $\beta 3$ ^[15], 广泛参与包括细胞增殖、分化、黏附、血管形成、骨骼形成和胚胎发育在内的重要生命活动^[16-17]。其中 TGF- $\beta 3$ 对细胞分化、增殖和细胞外基质沉积有重要作用, 在组织损伤修复中具有拮抗纤维化的作用, 是最经典的成软骨诱导因子, 可以促进未分化或分化早期的软骨细胞增殖^[18], 使间质细胞向软骨细胞分化, 还可增加 II 型胶原及蛋白多糖的合成^[19-20]。因此 TGF- $\beta 3$ 、地塞米松、维生素 C 的联合应用是体外诱导 hMSCs 向软骨细胞分化诱导的最经典方案。但细胞因子来源、浓度和因子之间的相互作用都对细胞增殖分化有影响, 因此需要探索更多细胞因子。

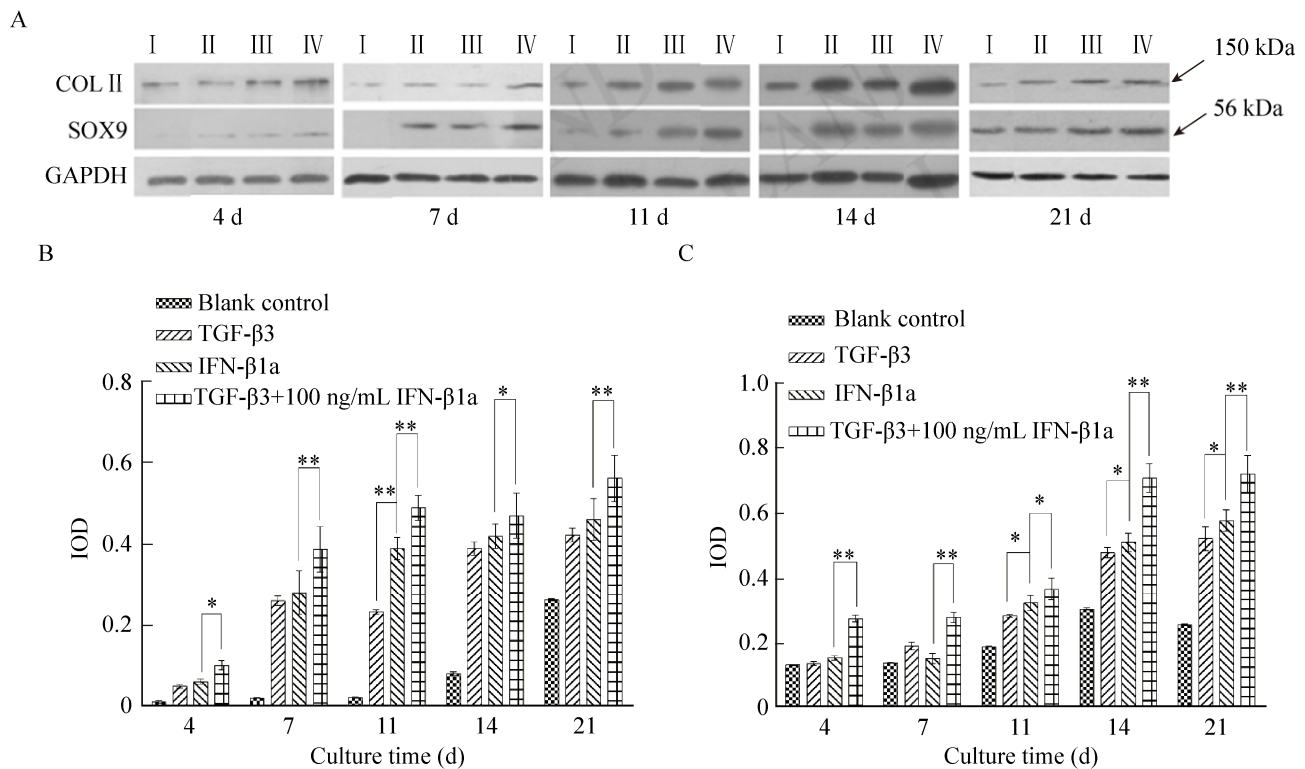


图5 SOX9和COL II的Western blotting检测结果

Fig. 5 Western blotting result of SOX9 and COL II in hMSCs. (A) The immune fluorescent protein electrophoresis figure at five time points. lane I: blank control group; lane II: TGF-β3 group; lane III: IFN-β1a group; lane IV: TGF-β3+100 ng/mL IFN-β1a group. (B) IOD analysis of SOX9. (C) IOD analysis of COL II.

干扰素β (IFNβ) 是成纤维细胞和某些上皮细胞产生的一类糖蛋白, 具有抗病毒、抗细胞分裂及免疫调节等多种生物学活性。目前已发现的哺乳动物干扰素有10多个家族, 其中人干扰素有7个家族, 包括I型干扰素α、β、ε、τ、ω、κ, II型干扰素γ^[21], 另外, 还发现了干扰素样蛋白 (Interferon-like proteins), 也称为III型干扰素。重组人干扰素β (rhIFN-β) 是通过基因工程改造的一种糖蛋白, 具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用。根据表达IFN-β体系的不同, 可将其分为CHO细胞表达的rhIFN-β1a和在*E. coli*中表达的rhIFN-β1b。国外上市的rhIFN-β1a与rhIFN-β1b比较, rhIFN-β1a活性高、疗效好, 副反应更少。虽然干扰素一直用于临床抗病毒治疗, 但近年的研究也表明干扰素对细胞增殖分化有影响。Irudayam等^[6]研究结果显示IFN-α激活STAT-JAK

通路促进多功能干细胞分化。Diao等^[22]研究结果显示I型IFN在体外增加平滑肌细胞数。Matatall等^[23]发现I型和II型干扰素可促进造血干细胞细胞分裂, 干扰素γ信号有助于造血干细胞髓样分化。Hirsch等^[24]研究结果表明在体外低浓度IFN-β能够降低小鼠神经祖细胞 (NPCs) 的凋亡, 对中枢神经系统的细胞进行直接保护作用, 从而治疗多发性硬化症。而对于研究干扰素β体外对hMSCs诱导分化研究尚少。

糖胺多糖 (GAG) 总含量是代表hMSCs成软骨分化水平的重要生化指标。为了确定在常规TGF-β3诱导分化培养基中添加不同浓度IFN-β1a成软骨细胞分化的影响, 本研究中首先比较了添加50、100、200、400 ng/mL的IFN-β1a后各组细胞的GAG含量的变化, 结果表明在含有10 ng/mL TGF-β3的诱导分化培养基础上添加100 ng/mL

IFN- $\beta 1a$ 组显著高于其他组 GAG 含量 ($P < 0.05$), 说明 IFN- $\beta 1a$ 与 TGF- $\beta 3$ 联合使用能够促进 hMSCs 成软骨分化 (图 1)。诱导骨髓间充质干细胞成软骨分化有平面培养和成球培养, 离心管成球培养使细胞间的黏附增殖有利于细胞间信号传导, 为维持细胞的代谢活动提供了适宜的微环境, 聚集成球培养的 GAG、Collagen II 和 Sox9 表达量高于平面培养^[25], hMSCs 在成球培养条件下可获得更强的向软骨分化的能力^[26-27], 因此本次实验采用了成球培养。采用不同组诱导培养基对 hMSCs 进行成球成软骨诱导培养 21 d, 测量结果表明, 与对照组相比, TGF- $\beta 3$ 常规培养基组、100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 组、TGF- $\beta 3$ +100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 组软骨球尺寸均大于对照组, 且 TGF- $\beta 3$ +100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 组软骨球尺寸最大 (图 2)。进一步采用阿利新蓝染色软骨球中聚集蛋白聚糖 (Aggrecan), 结果也表明 TGF- $\beta 3$ +100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 组的染色之后, 蓝色所占比例增多, 说明添加 IFN- $\beta 1a$ 之后能促进 hMSCs 成软骨分化程度 (图 3)。

除检测添加 IFN- $\beta 1a$ 对上述成软骨细胞组织化学指标的影响之外, 本研究在 mRNA 水平和蛋白水平研究了成软骨细胞标志蛋白的影响。其中 Sox9 是一种高迁移率族蛋白转录因子, 是间质祖细胞成软骨分化早期阶段的标志^[28], Sox9 不但能结合并激活非软骨组织细胞的软骨基因增强子序列, 使之呈软骨细胞表型^[29], 其还能与 Wnt/ β -catenin 和 TGF- β /Smad 信号转导通路相互作用调控软骨细胞分化^[30-31]。而 Collagen II 是软骨细胞的主要结构成分, 维持细胞的基本骨架, 也是软骨细胞的标志性蛋白, 临床研究中多用于衡量软骨细胞的数量和成熟状态^[32], 因此上述两者是成软骨细胞的重要标志物。本研究中的结果表明, 在相同的诱导时间下, TGF- $\beta 3$ +100 ng/mL IFN- $\beta 1a$ 组中 Sox9 和 Collagen II 在 mRNA 水平和蛋白表达水平均显著高于 TGF- $\beta 3$ 组和 IFN- $\beta 1a$ 组, 且随着诱导时间的延长呈上升趋势。而 TGF- $\beta 3$ 组和

IFN- $\beta 1a$ 组中上述两种标志因子在相同诱导时间下, 并非都有显著性差异。且随着诱导分化时间延长总体也呈上升趋势, 但 IFN- $\beta 1a$ 组在第 7、11 天后达到一个峰值, 分析可能 IFN- $\beta 1a$ 在开始阶段会强烈地刺激 hMSCs 的成软骨分化, 随着时间的推移这种刺激作用会减弱。上述研究结果表明, 在常规的 TGF- $\beta 3$ 诱导分化培养基中添加重组人 IFN- $\beta 1a$ 能促进 hMSCs 成软骨细胞定向分化, 且能上调 Sox9 转录因子。但是, 其具体的作用机制需要进一步的研究探索, 以期为今后重组人 IFN β 在细胞分化方面的应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Correa D, Lietman SA. Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 62: 67-77.
- [2] Wyles CC, Houdek MT, Behfar A, et al. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells Cloning*, 2015, 8: 117-124.
- [3] Tsai TL, Manner PA, Li WJ. Regulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis by glucose through protein kinase C/transforming growth factor signaling. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(2): 368-376.
- [4] Park JS, Shim MS, Shim SH, et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- $\beta 3$. *Biomaterials*, 2011, 32(32): 8139-8149.
- [5] Rodrigues M, Griffith LG, Wells A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 1(4): 32-41.
- [6] Irudayam JI, Contreras D, Spurka L, et al. Characterization of type I interferon pathway during hepatic differentiation of human pluripotent stem cells and hepatitis C virus infection. *Stem Cell Res*, 2015, 15(2): 354-364.
- [7] Zheng LS, Hitoshi S, Kaneko N, et al. Mechanisms for Interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(1): 73-84.
- [8] Suzuki H, Mochizuki A, Yoshimura K, et al. Bropiramine inhibits osteoclast differentiation through production of interferon- β . *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(1): 146-151.
- [9] Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, et al. Osteoarthritis.

- <https://www.nature.com/articles/nrdp201672>.
- [10] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(6): 1697–1707.
- [11] Shen H, Wang Y, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy: optimization of cell differentiation strategy. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 524756–524766.
- [12] Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(19): 8639–8643.
- [13] Sensebe L, Krampera M, Schrenzenmeier H, et al. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*, 2010, 98(2): 93–107.
- [14] Kanda A, Sotomaru Y, Nobukiyo A, et al. Characterization of common marmoset (*Callithrix jacchus*) bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Folia Histochem Cytobiol*, 2013, 51(4): 292–299.
- [15] Hall BE, Wankhade UD, Konkel JE, et al. Transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) knock-in ameliorates inflammation due to TGF- β 1 deficiency while promoting glucose tolerance. *J Biol Chem*, 2013, 288(44): 32074–32092.
- [16] Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, et al. Immunohistologic analysis of zygapophyseal joints in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(9): 2845–2851.
- [17] Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of transforming growth factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(3): 469–474.
- [18] Jayasuriya CT, Zhou FH, Pei M, et al. Matrilin-3 chondrodysplasia mutations cause attenuated chondrogenesis, premature hypertrophy and aberrant response to TGF- β in chondroprogenitor cells. *Int J Mol Sci*. 2014, 15(8): 14555–14573.
- [19] Jin XB, Sun YS, Zhang K, et al. Tissue engineered cartilage from h TGF beta2 transduced human adipose derived stem cells seeded in PLGA / alginate compound *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 86(4): 1077–1087.
- [20] Murata D, Miyakoshi D, Hatazoe T, et al. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *Vet J*, 2014, 202(1): 53–61.
- [21] Zhao GR. Research progress of recombinant human interferon. *Chin J Biol*, 2010, 23(12): 1384–1388 (in Chinese).
赵广荣. 重组人干扰素的研究进展. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(12): 1384–1388.
- [22] Diao Y, Mohandas R, Lee P, et al. Effects of long-term Type I interferon on the arterial wall and smooth muscle progenitor cells differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(2): 266–273.
- [23] Matatall KA, Shen CC, Challen GA, et al. Type II interferon promotes differentiation of myeloid-biased Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells*, 2014, 32(11): 3023–3030.
- [24] Hirsch M, Knight J, Tobita M, et al. The effect of interferon-beta on mouse neural progenitor cell survival and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(2): 181–186.
- [25] Liu J, Xu C, Yu L, et al. Induced differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into chondrocytes in two kinds of culture systems. *Chin J Tissue Engin Res*, 2012, 16(41): 7625–7630 (in Chinese).
柳菁, 许超, 宇丽, 等. 两种培养体系条件下人脐带间充质干细胞向软骨细胞的分化. *中国组织工程研究*, 2012, 16(41): 7625–7630.
- [26] Furukawa KS, Imura K, Tateishi T, et al. Scaffold-free cartilage by rotational culture for tissue engineering. *J Biotechnol*, 2008, 133(1): 134–145.
- [27] Wang Y, Kim UJ, Blasioli DJ, et al. *In vitro* cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 7082–7094.
- [28] Venkatesan JK, Ekici M, Madry H, et al. SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3(3): 22–37.
- [29] Furumatsu T, Shukunami C, Amemiya-Kudo M, et al. Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1): 148–156.
- [30] Topol L, Chen W, Song H, et al. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3323–3333.
- [31] Lorda-Diez CI, Montero JA, Martinez-Cue C, et al. Transforming growth factors beta coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme. *J Biol Chem*, 2009, 284(43): 29988–29996.
- [32] Whitaker AT, Berthet E, Cantu A, et al. Smad4 regulates growth plate matrix production and chondrocyte polarity. *Biol Open*, 2017, 6(3): 358–364.

(本文责编 陈宏宇)