

小鼠胚胎瘤来源细胞系 ATDC5 的体外软骨分化诱导研究

金旻 戚华兵 苏楠 杜晓兰 杨京 赵玲 陈林

中图分类号: R329.2+8 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)10-0737-04

摘要:目的 在体外建立稳定有效的软骨细胞分化模型。方法 复苏 ATDC5 细胞,在倒置显微镜下观察细胞形态及其生长情况,细胞 90% 融合时分别用不含 Vc 和含 Vc 的诱导培养基培养进行分化诱导。诱导 21 d 阿力新蓝染色,RT-PCR 检测 II、X 型胶原表达进行鉴定。结果 含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Vc 的诱导培养基诱导 1 周便可见明显的软骨小结,细胞产生软骨基质明显增多,II 及 X 型胶原表达明显增高,且 X 型胶原表达呈提前。结论 利用 ATDC5 细胞系可成功建立软骨细胞分化体外模型。

关键词: ATDC5; 软骨细胞; 分化

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.10.005

The model of chondrogenic differentiation *in vitro* induced by mouse embryonal carcinoma-derived cell line ATDC5 JIN Min, QI Huabing, SU Nan, et al. Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: **Objective** To set up a stable and effective model *in vitro* of chondrogenic differentiation. **Methods** ATDC5 cells were reanimated from liquid nitrogen, and cultured in the maintenance medium consisting of a 1:1 mixture of DME and Ham's F-12 medium containing 5% FBS. The morphological changes and growth feature were observed under the inverted microscope each day. When ATDC5 cells rapidly proliferated to form 90% confluency, the cells were cultured in differentiation medium supplemented with Vc or no Vc for 21 d. The extent of chondrogenic differentiation was examined by alcian blue staining and RT-PCR detection of the expression level of mRNA of type II collagen and type X collagen. **Results** For ATDC5 cells cultured in differentiation medium containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Vc, cartilaginous nodules were detectable apparently at 7 d after chondrogenic differentiation induction, the synthesis of glycosaminoglycans (GAGs) were increased, and the expression levels of type II collagen and type X collagen mRNA were also upregulated, with earlier expression of type X collagen. **Conclusion**

The method used in this work can provide an *in vitro* chondrogenic differentiation model.

Key words: ATDC5; Chondrocytes; Differentiation

软骨内成骨从间质细胞集聚开始,到分化为软骨细胞,形成未来骨骼的软骨样骨雏形,软骨细胞经历增殖、分化、凋亡等步骤最终被骨组织取代。其中,软骨细胞的肥大成为驱动长骨纵向生长的力量^[1]。

ATDC5 来源于小鼠胚胎瘤细胞,为软骨祖细胞系,胰岛素诱导其分化可以模拟在体软骨发育^[2]。

本实验对以往 ATDC5 分化诱导方法进行改进,减短了诱导时间,确立了快速高效的诱导体系,为研究软骨发育提供了良好的体外实验模型。

1 材料和方法

1.1 材料

ATDC5 细胞(由美国纽约大学医学中心整形外科赠送),DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司),胰蛋白酶(Sigma 公司),1%阿力新蓝染液(Sigma 公司),ITS 诱导剂(Sigma 公司),维生素 C(Sigma 公司),TRIZOL(Invitrogen 公司),反转录试剂盒(Takara 公司)。

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(30530410);国家杰出青年科学基金资助项目(30425023)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者:陈林,Email:linchen70@163.com

1.2 方法

1.2.1 ATDC5 细胞复苏、培养和观察 :自液氮罐中取出冷冻管,立即放入 37℃ 水槽中快速解冻,1000 r/min 离心 5 min。去上清,加入完全培养基(含 5% 胎牛血清 + 100 U/mL 青霉素 + 100 U/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基)吹打,然后移入培养瓶中,置于 CO₂ 培养箱中培养(温度 37℃,饱和湿度,5% CO₂)。48 h 后视细胞贴壁情况更换培养液,以后每 2~3 d 换液 1 次。倒置显微镜下观察细胞生长情况并拍照。当倒置显微镜下观察软骨细胞至 90% 融合,倾去培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶进行传代培养。

1.2.2 ATDC5 细胞分化诱导 :将细胞以 1×10^5 密度接种至 24 孔板,细胞长满后无血清培养基过夜(血清饥饿)后,分别加入含 ITS 诱导剂(100×)、含 50 μg/mL 维生素 C (Vitamin C, Vc) + ITS 诱导剂(100×)的完全培养基开始诱导。诱导开始记为 0 d,诱导至 21 d。

1.2.3 阿力新蓝染色 :PBS 洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 20 min,1% 阿力新蓝染液染色 15 min,蒸馏水冲洗。

1.2.4 RT-PCR 检测 II 型及 X 型胶原表达 :Trizol 提取各组诱导不同时相点细胞 RNA,按照 Takara 公司试剂盒说明进行反转录和扩增,扩增条件如下:94℃ 变性 40s,58℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1 min,30 次循环,最后 72℃ 延伸 10 min 后。引物序列如下:

Collagen II Forward: 5'-CTGGTGGAGCAGCA-AGAGCAA-3', Collagen II Reverse: 5'-CAGTGGAC-AGTAGACGGAGGAAAG-3', 扩增产物片段长度为 146

bp; Collagen X Forward: 5'-GCAGCATTACGACCCA-AGAT-3', Collagen X Reverse: 5'-CATGATTGCACTC-CCTGAAG-3', 扩增产物片段长度为 190 bp; β-actin Forward: 5'-TTGTTACCAACTGGGACGACATGG-3', β-actin Reverse: 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3', 扩增产物片段长度为 764 bp。

2 结果

2.1 倒置显微镜下观察

复苏的 ATDC5 细胞呈圆球形,呈悬浮状态,接种后 12 h 开始贴壁,24 h 大部分贴壁伸展,呈纤维状,部分细胞出现分裂相,48 h 大部分贴壁,分裂增殖加快。培养的软骨细胞胞浆丰富,胞核清晰,有 1~2 个核仁,约 4 d 左右汇合成单层铺满整个培养皿底面。传代后生长速度加快,约 3 d 左右即可传代,细胞周围可见具有折光性的细胞外基质(图 1)。ITS + Vc 诱导 4 d 出现软骨小结,诱导至 7 d 软骨小结数量明显增多(图 2)。

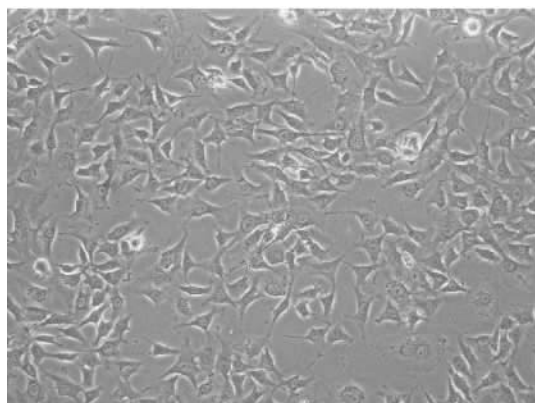


图 1 复苏后的 ATDC5 细胞(200×)

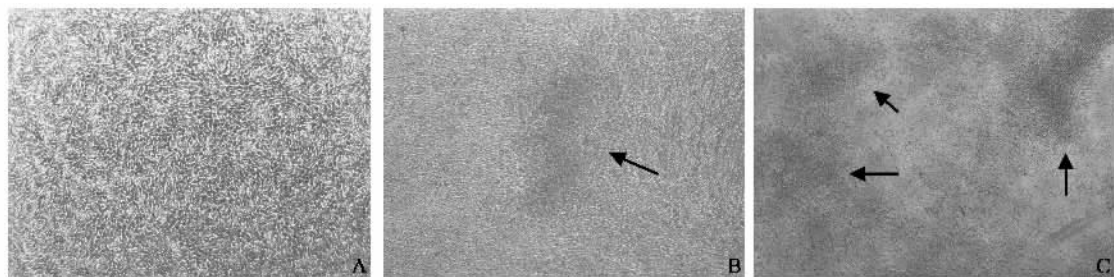


图 2 ITS + Vc 诱导过程 ATDC5 细胞的形态变化(40×)

A: 诱导 0 d; B: 诱导 4 d; C: 诱导 7 d。箭头示意软骨小结

2.2 阿力新蓝染色

ITS + Vc 诱导 7 d ATDC5 细胞染色后,细胞外基质呈明显的浅蓝色(图 3)。

2.3 RT-PCR 检测 II 型及 X 型胶原表达

整个诱导过程 ITS 诱导组 II 型胶原的表达没有显著变化,ITS + Vc 诱导 10~14 d II 型胶原的表达

明显增高而后降低(图 4、图 5A),且各诱导时相点的表达量明显高于 ITS 诱导组。ITS 诱导 21d 的 ATDC5 细胞中可检测到 X 型胶原的表达,ITS + Vc

诱导 3 d 便检测到 X 型胶原的表达,且随着诱导时间的增长逐渐增高,说明 ITS + Vc 诱导 ATDC5 细胞的肥大分化早于 ITS 诱导组(图 4、图 5B)。



图 3 ITS + Vc 诱导 0~7 d 阿力新蓝染色结果(40×)。A:诱导 0 d;B:诱导 1 d;C:诱导 7 d

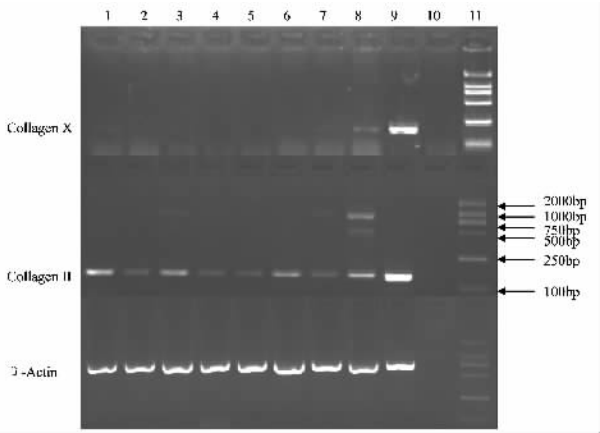


图 4A ITS 诱导 0~21 d ATDC5 细胞中 Collagen II 及 Collagen X 的表达结果。(1~8 分别为诱导 0、3、5、7、10、14、18、21 d,9 为阳性对照,10 为阴性对照,11 为 DL2000)

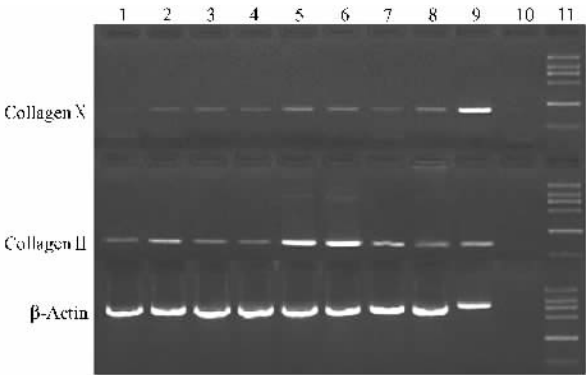


图 4B ITS + Vc 诱导 0~21 d ATDC5 细胞中 Collagen II 及 Collagen X 的表达结果。(1~8 分别为诱导 0、3、5、7、10、14、18、21 d,9 为阳性对照,10 为阴性对照,11 为 DL2000)

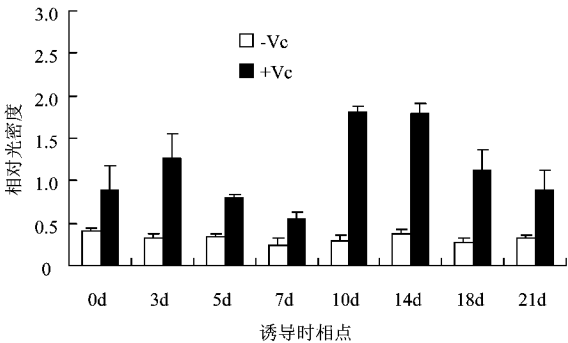


图 5A ITS 诱导(-Vc)、ITS + Vc(+Vc)诱导 0~21 d ATDC5 细胞中 Collagen II 表达的半定量分析结果

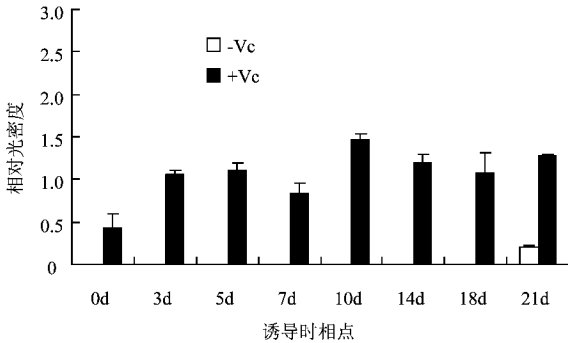


图 5B ITS 诱导(-Vc)、ITS + Vc(+Vc)诱导 0~21 d ATDC5 细胞中 Collagen X 表达的半定量分析结果

3 讨论

脊椎动物胚胎发生过程脊柱、骨盆及上下肢的骨骼来源于最初的软骨模型。这一过程即软骨内成骨,包括一系列精确的事件:间充质细胞聚集和分化、软骨细胞的增殖、肥大和凋亡^[3]。细胞增殖细胞形态学、产生胞外基质大分子的性质和数量例如胶

原和蛋白聚糖,构成了软骨细胞分化不同阶段的特点。增殖及成熟中的软骨细胞主要合成Ⅱ、Ⅲ、Ⅺ型胶原和聚集蛋白聚糖,肥大软骨细胞在细胞外基质矿化前特异性合成Ⅹ型胶原。

ATDC5 细胞系是从 AT805 畸胎癌细胞分化培养中分离出来的,表现出处于生长期的成纤维细胞表型,是反映软骨内成骨过程软骨细胞分化不同阶段的极好的体外模拟模型^[2]。5% 胎牛血清和 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素条件下培养,ATDC5 细胞分化为表达Ⅱ型胶原的软骨细胞,经过细胞凝集形成软骨小结^[4]。这一分化过程始于含 5% FBS,转铁蛋白和硒培养基培养 3 w;加入胰岛素促进表达Ⅱ型胶原的软骨细胞进一步分化,经过细胞凝集,21 d 形成软骨小结。为了诱导肥大和矿物沉积,培养基由 DMEM 更换为 α -MEM,CO₂ 水平由 5% 调至 3%,在此条件下再培养 21 d^[2,5]。软骨小结生长和扩张后,肥大软骨细胞出现并伴随Ⅹ型胶原基因表达和碱性磷酸酶水平的提高以及基质矿化。因此,不添加任何生长因子和分化因子在胰岛素存在的条件下,ATDC5 细胞分化连续出现聚集的前软骨细胞、表达Ⅱ型胶原的软骨细胞、表达Ⅹ型胶原的肥大软骨细胞和矿化的软骨细胞^[4]。

以往使用的 ATDC5 细胞诱导方法耗时过长,为了观察软骨形成的各个阶段,需要用 3 种不同的培养基加之更换 CO₂ 水平,大约进行 63 d^[6]。因此,我们希望能够简化条件建立可重复的软骨细胞分化体外模型。既往的研究表明维生素 C 能够调节人皮肤成纤维细胞的胶原多肽合成,能够提高牛关节软骨中软骨形成标记的Ⅱ型胶原和聚集蛋白聚糖的表达水平^[7]。有研究发现维生素 C 增强鸡软骨细胞的碱性磷酸酶活性及Ⅹ型胶原的表达^[8]。维生素 C 促进早期和晚期的软骨细胞分化是由于它能够作为脯氨酰和赖氨酰羟化酶辅助因子稳定三螺旋状胶原的合成和分泌^[9]。维生素 C 还可以促进培养的人皮肤成纤维细胞中葡萄糖胺聚糖的合成^[8]。近来有研究发现诱导培养基中加入维生素 C(37.5 $\mu\text{g/mL}$)可促进 ATDC5 分化进程^[10]。

本实验分别采用不含 V_C 的 ITS(内含 5.5 $\mu\text{g/mL}$ 人转铁蛋白,3 $\times 10^{-8}$ M 亚硒酸钠,10 $\mu\text{g/mL}$ 牛胰岛素)诱导培养基、含 V_C(50 $\mu\text{g/mL}$)的 ITS 诱导培养基对 ATDC5 细胞进行分化诱导。本实验发现含 V_C(50 $\mu\text{g/mL}$)诱导培养基仅诱导 7 d 便产生大量的软骨小结,蛋白聚糖分泌明显增多。对诱导过程Ⅱ胶原及Ⅹ型胶原表达的检测结果表明 V_C 促进了 ATDC5 细胞的分化进程,大大缩短了诱导时间,使体外软骨细胞分化模型建立的条件得到优化,为研究软骨发育提供了高效稳定的体外实验模型。

【参 考 文 献】

- [1] Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 2003, 423(6937): 332-336.
- [2] Shukunami C, et al. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(8): 1174-1188.
- [3] DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(5): 309-334.
- [4] Shukunami C, et al. Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 *in vitro*: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol*, 1996, 133(2): 457-468.
- [5] Gori F, Demay MB. BIG-3, a novel WD-40 repeat protein, is expressed in the developing growth plate and accelerates chondrocyte differentiation *in vitro*. *Endocrinology*, 2004, 143(3): 1050-1054.
- [6] Chen L, et al. Temporal transcriptome of mouse ATDC5 chondroprogenitors differentiating under hypoxic conditions. *Exp Cell Res*, 2006, 312(10): 1727-1744.
- [7] McAlinden A, et al. Expression of two novel alternatively spliced COL2A1 isoforms during chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*, 2008, 27(3): 254-266.
- [8] Wescoe KE, et al. The role of the biochemical and biophysical environment in chondrogenic stem cell differentiation assays and cartilage tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*, 2008, 52(2): 85-102.
- [9] Franceschi RT, et al. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs*, 2009, 189(1-4): 144-152.
- [10] Altat FM, et al. Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater*, 2006, 12: 64-69; discussion 69-70.

(收稿日期 2009-06-02)