



薛明明, 李冯淼, 雒亚彪, 杨晓阳, 谢福音, 产舒恒, 汤启国, 方美英. 猪骨髓间充质干细胞成软骨分化过程能量代谢动态变化分析[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(02): 141-151.

XUE Mingming, LI Fengmiao, LUO Yabiao, YANG Xiaoyang, XIE Fuyin, CHAN Shuheng, TANG Qiguo, FANG Meiyin. Analysis of dynamic changes in energy metabolism during chondrogenic differentiation of porcine bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(02): 141-151.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.02.14

猪骨髓间充质干细胞成软骨分化过程能量代谢动态变化分析

薛明明¹ 李冯淼¹ 雒亚彪¹ 杨晓阳¹ 谢福音¹ 产舒恒¹ 汤启国¹ 方美英^{1,2*}

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院, 北京 100193;

2. 中国农业大学 三亚研究院, 海南 三亚 572025)

摘要 为探究猪(*Sus scrofa*)骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, PBMSCs)成软骨分化过程中能量代谢动态变化以及与软骨形成之间的关系,本研究分离并鉴定猪骨髓间充质干细胞,并通过建立诱导分化培养体系获得猪软骨细胞。对PBMSCs成软骨诱导分化第1、6、12和18天的细胞进行软骨形成标记基因、能量代谢相关基因表达模式分析以及能量代谢产物含量检测,且对软骨形成标记基因与能量代谢产物进行相关性分析。结果表明:1)在成软骨分化过程,软骨形成标记基因II型胶原 $\alpha 1$ 链(Collagen type II alpha 1 chain, *COL2A1*)、SRY-box 转录因子9(SRY-box transcription factor 9, *SOX9*)、聚集蛋白聚糖(Aggregan, *ACAN*)、基质金属蛋白酶13(Matrix metalloproteinase 13, *MMP13*)、RUNX 家族转录因子2(RUNX family transcription factor 2, *RUNX2*)表达水平显著提高($P < 0.05$);糖酵解限速酶基因己糖激酶1(Hexokinase 1, *HK1*)、丙酮酸激酶L/R(Pyruvate kinase L/R, *PKLR*)和乳酸转运关键基因溶质载体家族16成员1(Solute carrier family 16 member 1, *SLC16A1*)表达水平显著提高($P < 0.05$),葡萄糖转运关键基因溶质载体家族2成员4(Solute carrier family 2 member 4, *SLC2A4*)表达水平显著降低($P < 0.05$);2)随着成软骨分化时间增加,胞内ATP含量和葡萄糖含量显著降低($P < 0.05$),胞内乳酸、乳酸和葡萄糖比率显著增加($P < 0.05$)。3)成软骨分化关键基因与能量代谢产物的相关性分析表明, PBMSCs成软骨过程与糖酵解代谢显著相关($P < 0.05$)。综上,本研究成功建立了一种诱导PBMSCs分化成软骨细胞的方法,并发现在间充质干细胞诱导成软骨细胞过程中,细胞氧化磷酸化水平逐渐降低,糖酵解代谢逐渐增强,为后续深入解析猪体生长发育机制提供新视角。

关键词 猪; 骨髓间充质干细胞; 细胞分化; 软骨细胞; 能量代谢

中图分类号 S828

文章编号 1007-4333(2024)02-0141-11

文献标志码 A

Analysis of dynamic changes in energy metabolism during chondrogenic differentiation of porcine bone marrow mesenchymal stem cells

XUE Mingming¹, LI Fengmiao¹, LUO Yabiao¹, YANG Xiaoyang¹, XIE Fuyin¹, CHAN Shuheng¹, TANG Qiguo¹, FANG Meiyin^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Sanya Research Institute, China Agricultural University, Sanya 572025, China)

收稿日期: 2023-06-16

基金项目: 三亚崖州湾科技城管理局2020年度科技计划项目(SKJC-2020-02-007);国家自然科学基金项目(32072700; U22A20508);国家重点研发计划(2022YFF1003401);山东省重点研发计划农业良种工程(2022LZGQY007);财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-35)

第一作者: 薛明明(ORCID: 0000-0003-1316-8534),博士研究生, E-mail: mingmxue@163.com

通讯作者: 方美英(ORCID: 0000-0001-8732-745X),教授,主要从事动物物种资源分子遗传性研究, E-mail: meiyin@cau.edu.cn

Abstract In order to explore the dynamic changes in energy metabolism during the chondrogenic differentiation of porcine bone marrow mesenchymal stem cells (PBMSCs) and its relationship with cartilage formation, PBMSCs were isolated and identified, and porcine chondrocytes were obtained through an induction differentiation culture system. Analyses of the expression patterns of cartilage marker genes and energy metabolism-related genes were performed, as well as measurements of energy metabolites content, in PBMSCs induced to differentiate into chondrocytes for 1, 6, 12, and 18 days. Pearson correlation analyses between cartilage marker genes and energy metabolism products were conducted. The results showed that: 1) During the chondrogenic differentiation of PBMSCs, the expression levels of cartilage marker genes, including *COL2A1*, *SOX9*, *ACAN*, *MMP13*, and *RUNX2*, were significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of the glycolytic rate-limiting enzyme genes *HK1*, *PKLR*, and the lactate transporter key gene *SLC16A1* were significantly upregulated ($P < 0.05$), while the expression level of the glucose transport critical gene, *SLC2A4*, was significantly reduced ($P < 0.05$). 2) With the increase of chondrogenic differentiation time, intracellular levels of ATP and glucose were significantly decreased ($P < 0.05$), while the intracellular ratio of lactate to glucose was significantly increased ($P < 0.05$). 3) The correlation analysis of key chondrogenic genes and energy metabolic products suggested a significant association between the chondrogenesis process of PBMSCs and glycolytic metabolism ($P < 0.05$). In summary, this study successfully developed a method of inducing PBMSCs into chondrocyte, and revealed oxidative phosphorylation levels gradually decreased, and glycolytic metabolism gradually increased during the PBMSC-induced chondrogenic differentiation process. These findings provide a new perspective for further analysis of pig body length development.

Keywords pig; bone marrow mesenchymal stem cells; cell differentiation; chondrocyte; energy metabolism

体长性状是衡量体型最常用的指标之一。在家畜中,体长性状与动物的产肉量息息相关,作为改善家畜生产性能的重要指标,具有重要的经济价值。猪体长的增长主要是通过脊椎数量的增加和单节脊椎的伸长来实现的,而脊椎数差异仅占体长表型变异的少数^[1-2],因此解析单节脊椎体的发育至关重要。骨形成的起始阶段是从胚胎期衍生的间充质细胞迁移到未来骨骼位置开始的。在这里,它们出现高密度的细胞凝聚,勾勒出未来骨骼的形状和大小。椎骨的发育模式是软骨内成骨,间充质干细胞分化为软骨细胞,软骨细胞进一步成熟肥大,最终出现矿化,并被血管和成骨细胞侵入,实现骨的纵向伸长^[3]。因此间充质干细胞成软骨分化过程是椎骨纵向伸长的关键。*SOX9*、*COL2A1*、*ACAN*和*MMP13*等多个软骨标记基因已被证明在软骨细胞生成和成熟过程的具有重要调节作用^[4-6]。尤其是*SOX9*在胚胎发育过程中对软骨细胞命运的决定至关重要。

能量代谢是指细胞内产生和利用ATP的过程,能量代谢紊乱会导致软骨细胞功能失调,影响软骨细胞存活^[7]。由于软骨细胞群缺乏血管和氧气,因此,糖酵解快速产生ATP为骨骼生长提供能量。与

大多数细胞类型相比,软骨细胞的耗氧量较低。在有氧环境下,软骨细胞也能保持高水平糖酵解,这种现象称为Warburg效应^[8]。葡萄糖代谢在软骨内骨化和软骨发育过程起关键作用,在软骨发育过程中,通过干预葡萄糖转运蛋白1(Glucose transporter type 1, GLUT1)^[9]或参与调节葡萄糖代谢的信号分子^[10-11]来扰乱软骨细胞的葡萄糖代谢,可改变软骨细胞成熟和肢体形成。为确定软骨细胞仍利用氧化磷酸化产生ATP,有研究使用解偶联试剂2,4-二硝基苯酚(DNP)处理骨髓软骨细胞,DNP可以将电子传递和ATP合成过程解偶联,从而消除氧化磷酸化产生的ATP^[12],研究表明,DNP大大减少了ATP的产生,但糖酵解产物乳酸的水平并未增加,这表明糖酵解已经在高速率发生,同时软骨细胞仍依赖氧化磷酸化获取能量。Rajpurohit用DNP处理可显著降低增殖型软骨细胞中ATP的产生,但不会降低肥大型软骨细胞中的ATP产生;同时发现包含增殖型软骨细胞的软骨切片比包含肥大型软骨细胞的软骨切片有着更低的乳酸与葡萄糖消耗比率,并产生更少的NADH^[13]。线粒体是产生ATP的主要场所,软骨细胞中线粒体通过提供电子受体以维持糖酵解。与肥大型软骨细胞相比,增殖型软骨中存在

更高的线粒体蛋白含量和更少的线粒体数量^[14]。以上研究表明不同发育阶段软骨细胞的能量水平不同,其能量利用的方式也可能存在差异。间充质干细胞向软骨细胞方向的分化作为软骨形成的初始阶段,经历了细胞类型的转变,能量代谢活动对软骨细胞生成和成熟至关重要,但在软骨形成过程中不同分化期软骨细胞的能量代谢变化模式尚不清楚。

软骨细胞起始于间充质干细胞,由间充质干细胞分化而来。间充质干细胞广泛存在于骨髓组织中,由于骨髓间充质干细胞取材方便、增殖力强,且具有分化潜能,在软骨组织工程中也常作为种子细胞^[15-16]。因此本研究分离原代猪骨髓间充质干细胞(Porcine bone marrow mesenchymal stem cells, PBMSCs),利用成软骨诱导分化方法获得不同发育阶段的软骨细胞,初步分析猪软骨细胞形成过程中能量代谢动态变化规律和特征。通过探究猪软骨细胞分化及其能量代谢活动可以更好地掌握猪骨骼发育过程的内在变化,为猪脊椎体进一步延伸从而增加猪肉产量提供参考。

1 材料与方法

1.1 PBMSCs的分离与培养

取出生后3 d的大白猪四肢骨,去除关节软骨,收集骨髓液,经红细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司)裂解15 min,1 500 r/min离心10 min,去除上清。重复裂解,直至获得的PBMSCs沉淀呈白色。PBS重悬细胞沉淀,使用500目细胞过滤器过滤细胞悬液。通过1 000 r/min离心5 min收集细胞沉淀,将细胞接种至含有10%胎牛血清(FBS, NEWZERUM)和1%青霉素-链霉素混合液(Gibco公司)的DMEM-F12(Gibco公司)完全培养基中,在37℃、5%二氧化碳的条件下培养12 h,去掉未贴壁细胞,继续培养,后续试验使用3代以内的原代细胞进行。

1.2 PBMSCs诱导成软骨、成骨分化

细胞接种至细胞培养板,培养2 d至细胞汇合度达到90%以上,使用诱导成软骨或成骨分化培养液培养,每2 d换一次培养液。成软骨分化培养液的组成为10 ng/mL TGF- β 1(北京索莱宝科技有限公司)、100 nmol/L地塞米松(Sigma-Aldrich公司)、1%胰岛素-转铁蛋白-硒(Gibco公司)、40 μ g/mL

L-脯氨酸(北京索莱宝科技有限公司)、50 μ g/mL抗坏血酸(北京索莱宝科技有限公司)、100 μ g/mL丙酮酸盐(北京索莱宝科技有限公司)、1.25 mg/mL牛血清白蛋白(Sigma-Aldrich公司)、5% FBS、1%青霉素-链霉素混合液和DMEM高糖培养基(Gibco公司)。成骨分化培养液组成为100 nmol/L地塞米松(Sigma-Aldrich公司)、0.05 mmol/L抗坏血酸及10 mmol/L β -磷酸甘油钠(Sigma-Aldrich公司)、1%青霉素-链霉素混合液、10% FBS和 α -MEM培养基(Gibco公司)。

1.3 细胞染色鉴定

去除细胞培养液,细胞用PBS漂洗两遍。加入细胞固定液(北京索莱宝科技有限公司)固定30 min,用PBS漂洗3次。诱导成软骨分化的细胞使用阿利新兰染色试剂染色30 min;诱导成骨分化的细胞使用茜素红染色试剂染色30 min。染色结束后,PBS漂洗3次,置于Echo显微镜下观察并记录。

1.4 RNA提取、RT-qPCR和半定量PCR检测

采用Trizol试剂(天根生化科技(北京)有限公司)裂解细胞,按照说明书要求抽提总RNA。使用FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂(天根生化科技(北京)有限公司)进行RT-PCR反应,按照试剂盒说明书合成cDNA,反转录反应条件为42℃、15 min;95℃、3 min。

使用染料法进行基因相对定量分析,qPCR反应体系:Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)5 μ L、上下游引物各0.5 μ L、cDNA 1 μ L、ddH₂O 3 μ L。PCR反应条件为95℃、5 min;95℃、10 s,60℃、30 s,40个循环。猪RN18S作为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}对数据进行分析^[17]。

半定量PCR反应体系:TaqMix(北京汇天东方科技有限公司)10 μ L、上下游引物各0.5 μ L、cDNA 1 μ L、ddH₂O 8 μ L。反应条件:95℃、5 min;95℃、30 s,60℃、30 s,72℃、18 s,28个循环;72℃、5 min。PCR反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,使用G:BOX Chemi XRQ成像仪呈像并记录。

根据引物设计原则,利用NCBI在线工具Primer-BLAST设计跨基因内含子的荧光定量PCR和半定量PCR引物。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。

1.5 免疫荧光法鉴定原代PBMSCs

取原代猪骨髓间充质细胞接种至48孔板进行培养,待细胞汇合度达到90%以上时,弃去培养液,加入细胞固定液固定30 min,用PBS漂洗3次,加入免疫染色通透液Triton X-100(上海碧云天生物技

术有限公司)处理细胞10 min,用PBS漂洗3次,加入免疫染色封闭液(上海碧云天生物技术有限公司)处理细胞1 h,PBS漂洗3次。按1:200配制CD90一抗(北京博奥森生物技术有限公司)溶液,4℃过夜孵育细胞。按1:500配制Alexa Fluor 488

表1 本研究中所用PCR引物
Table 1 Primers used for PCR in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度/bp Length
CD29-F	AGTTCAGTTTGCTATGTGTTTGGC	103
CD29-R	ATCCACAATTTGGCCCTGCT	
CD90-F	GCTCTCTTGCTAACAGTCTTGC	109
CD90-R	TGGTATTCTCATGGCGGCAG	
CD34-F	TGGCCAACGGAACAGAACTT	241
CD34-R	TCTTCGCCCAGCCTTTCTC	
CD45-F	TCAAGGGAAAAGCAGAGCGT	141
CD45-R	CGGTAGGAGGCGTACAAGTC	
COL2A1-F	GGAATTTGGTGTGGACATAGGG	144
COL2A1-R	GGTCAGGTCAGCCATTTCAGT	
SOX9-F	GGAGAAAGTCGGTGAAGAACG	173
SOX9-R	TGGTGGACCCTGGGATTGC	
ACAN-F	CGTGTC AACAGTGCCTACCA	196
ACAN-R	TGGCTCTGTAATGGAACACGA	
MMP13-F	TCCTGAAGAAAACGGCAGCA	290
MMP13-R	CAGAGGTGTCACATCAGACCAA	
RUNX2-F1	TACTGT CATGGCGGTAACG	174
RUNX2-R1	GTGGCTACTTGCGGAGGATT	
SLC2A4-F	GTCGGGCTTCCAACAGATCG	160
SLC2A4-R	GCTCTGTTCAATCACCTTCTGG	
HK1-F	CAGTGGAAGCCAGCTTTTCG	122
HK1-R	TGGATTGCCGACAAGGGAAA	
PKLR-F	CCAGCTTAGCCCAACTGACC	265
PKLR-R	GACTCAGCGTGGTACTCGTG	
SLC16A1-F	TTGGAGTCATTGGAGGTCTTGG	179
SLC16A1-R	TCTCCAGCCGTAGATACCGA	
ATP5A1-F	GCAAGGACAGTATGCTCCCA	160
ATP5A1-R	TTTTCCCAACAGGGCTTGGT	
RN18S-F	GCCCTCGGTCGAGTTGTC	113
RN18S-R	CTTGCAGGGCGGTGACAG	

标记山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗(上海碧云天生物技术有限公司)溶液,室温孵育1 h。在每次孵育抗体结束后,用PBS漂洗3次细胞。最后用DAPI染液(上海碧云天生物技术有限公司)对细胞染色10 min后,在Echo倒置荧光显微镜下观察并记录。

1.6 细胞内葡萄糖、乳酸和ATP含量的检测

分别收集诱导分化第1、6、12和18天的成软骨细胞,PBS漂洗2遍后,加入细胞裂解液,4℃12 000 r/min离心10 min,收集上清液,置于-80℃冰箱保存。采用BCA蛋白浓度测定试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)测定细胞样品的蛋白浓度。配置2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5和0 mg/mL共7个浓度的BSA标准品溶液,用于构建标准曲线。在562 nm波长下测定样品的吸光度。

按照ATP检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明书进行细胞ATP含量测定。配置10、2.5、0.062 5、0.015和0.03 mmol/L共5个浓度的ATP标准品溶液,用于构建标准曲线。使用BioTek仪器进行化学发光检测。

按照乳酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行细胞乳酸含量测定。配置3、1.5、0.75、0.375和0.187 5 mmol/L共5个浓度的乳酸标准品溶液,用于构建标准曲线。在530 nm波长下测定样品的吸光度。

按照葡萄糖检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明书进行细胞葡萄糖含量测定。配置500、125、62.5、31.25、7.81和0 mg/dL共6个浓度的葡萄糖标准品溶液,用于构建标准曲线。在630 nm波长下测定样品各管吸光度。

1.7 统计分析

采用SPSS 25.0进行数据统计,多组间数据的统计比较采用单因素ANOVA方差分析,在事后检验分析中假定等方差采用Duncan法,不假定等方差采用Dunn's test进行显著性分析。不同小写字母表示具有统计学显著差异,检验标准 $P<0.05$ 。统计数据使用Excel软件进行图形可视化。在R软件中,利用corrplot包进行皮尔逊相关分析和图形可视化,*代表 $P<0.05$,**代表 $P<0.01$,***代表 $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 PBMSCs特性鉴定分析

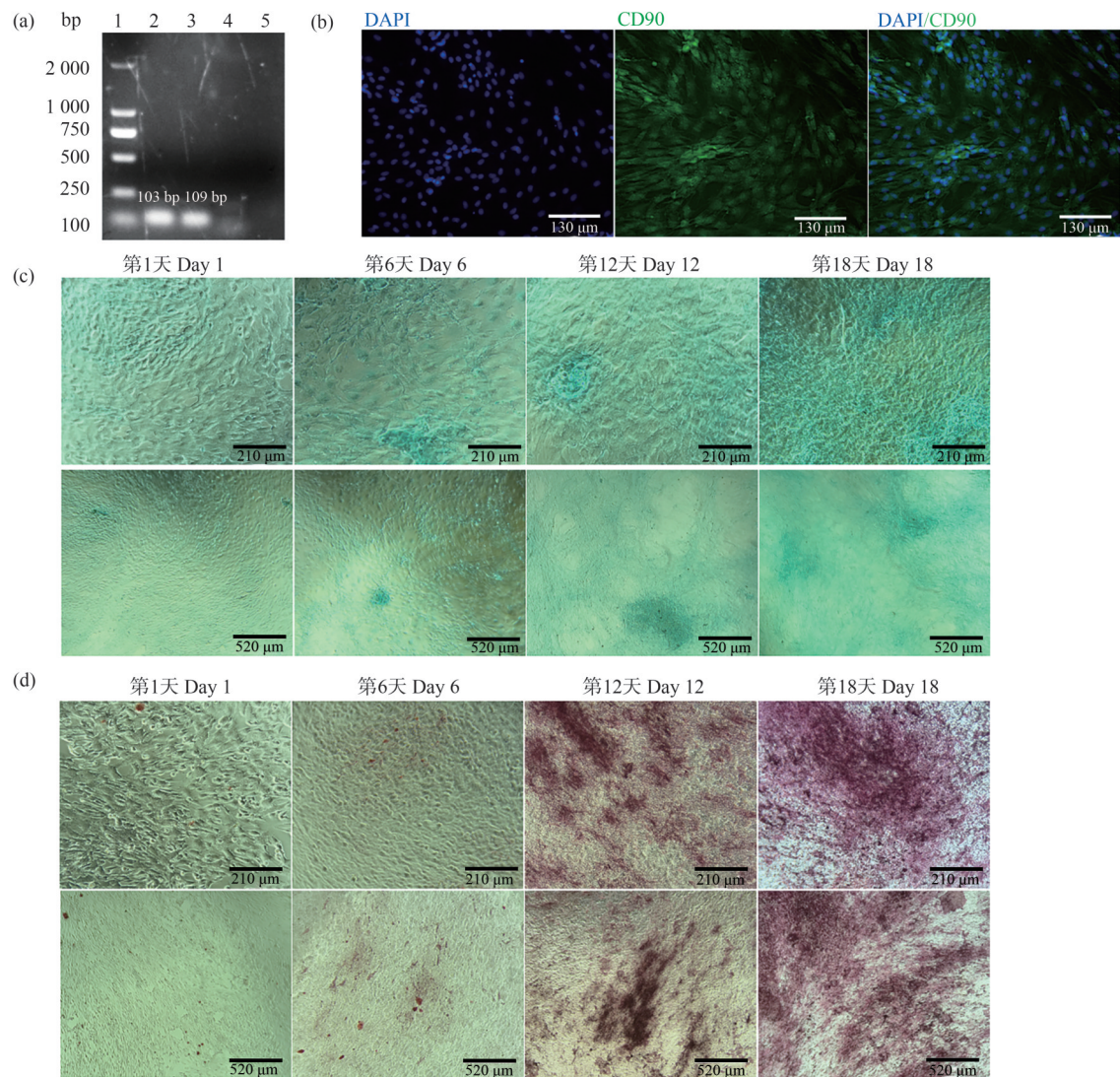
骨髓间充质干细胞具有成软骨、成骨分化的细胞特性。对原代猪骨髓间充质干细胞进行特异性表达的标记基因整合素亚基 $\beta 1$ (Integrin subunit beta 1, CD29)、细胞表面抗原(Thy-1 cell surface antigen, CD90)以及阴性对照基因CD34分子(CD34 molecule, CD34)、蛋白酪氨酸磷酸酶C型受体(Protein tyrosine phosphatase receptor type C, CD45)进行半定量分析,如图1(a)所示,可见明显的CD29和CD90条带,且CD34和CD45无条带产生。免疫荧光结果显示CD90在原代猪骨髓间充质干细胞中阳性表达(图1(b))。对猪骨髓间充质干细胞进行成软骨诱导分化1 d后,细胞呈长梭形,排列规则,局部呈涡旋状排列;诱导第6天细胞密度变大,排列不规则,开始出现复层生长;诱导第12天细胞复层生长区域增加;诱导第18天细胞呈多层堆积样排列,着色明显(图1(c))。猪骨髓间充质干细胞进入成骨诱导1 d后,细胞体积变大;诱导第6天开始出现钙结节,低倍镜下着色不明显;诱导第12天可观察到较多钙结节;诱导第18天大量细胞着色,且细胞开始堆积(图1(d))。结果表明,本研究分离的PBMSCs特异性表达间充质干细胞标记基因,且具有成骨、成软骨多向分化潜能。

2.2 PBMSCs成软骨分化过程软骨形成关键基因表达模式分析

随着PBMSCs成软骨诱导分化时间的增加,COL2A1相对表达水平逐渐增加,COL2A1相对表达水平在诱导分化第1天和第6天较低,且显著低于其他时期($P<0.05$),在第12天时显著低于第18天($P<0.05$)(图2(a));SOX9相对表达水平随分化时间逐渐上升,到第18天达到最高,且显著高于前3个分化时期($P<0.05$)(图2(b))。ACAN相对表达水平在第1天表达最低,显著低于第6天、第12天和第18天($P<0.05$),且其他3个时期之间不存在显著性差异($P>0.05$)(图2(c))。MMP13和RUNX2相对表达水平在第1天、第6天和第12天之间差异不显著($P>0.05$),且均显著低于第18天($P<0.05$)(图2(d)和(e))。结果表明,本研究的成软骨诱导方法可成功诱导PBMSCs成软骨分化,多个软骨形成关键基因的表达水平不断增强。

2.3 PBMSCs成软骨分化过程能量代谢关键基因表达模式分析

随着诱导分化时间的增加,葡萄糖转运的关键



(a)琼脂糖凝胶电泳检测半定量PCR产物。泳道1~5分别代表Marker 2 000、CD29、CD90、CD34和CD45;(b)免疫荧光法鉴定CD90在原代猪骨髓间充质干细胞中的表达。比例尺为130 μm ;(c)阿利新兰染色鉴定诱导软骨分化第1、6、12和18天的细胞。第一行、第二行图片的比例尺分别为210和520 μm ;(d)茜素红染色鉴定诱导成骨分化第1、6、12和18天的细胞。第一行、第二行图片的比例尺分别为210和520 μm 。

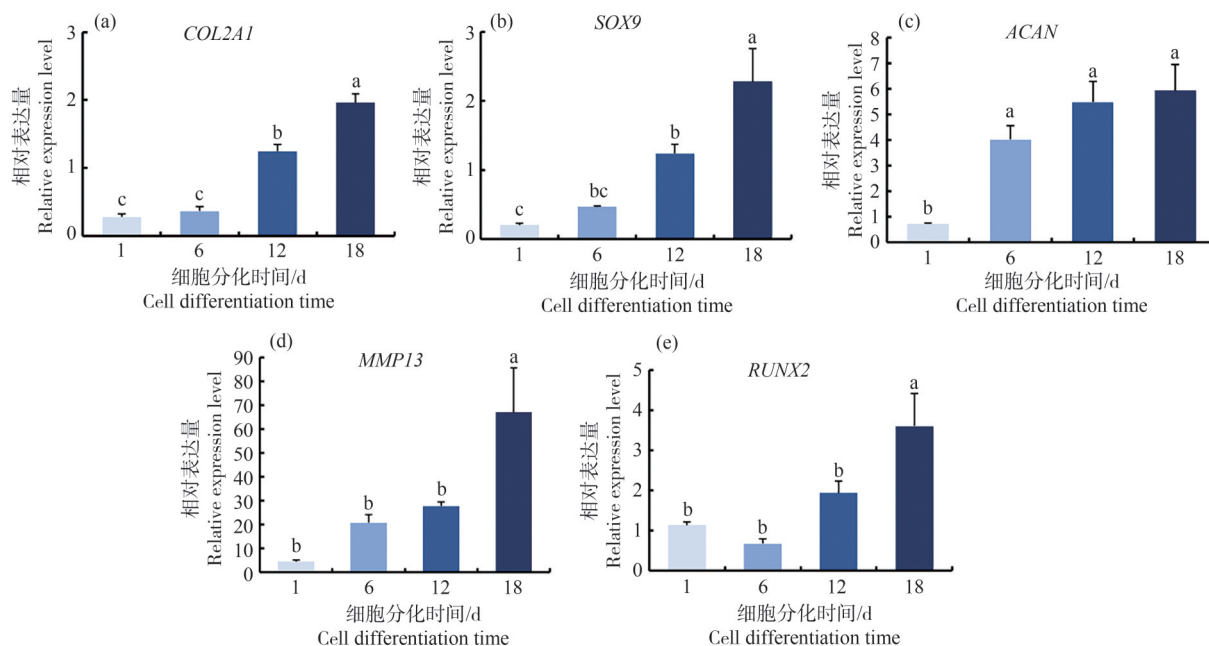
(a) Semi-quantitative PCR product analysis by agarose gel electrophoresis. Lanes 1~5 represent Marker 2 000, CD29, CD90, CD34, CD45, respectively; (b) Immunofluorescence detection of CD90 expression in primary PBMSCs. Scale bar represents 130 μm ; (c) Alcian blue staining for cells induced for chondrogenic differentiation on day 1, 6, 12 and 18. The scale bars of the images in the first and second rows are 210 μm and 520 μm , respectively; (d) Alizarin red staining for cells induced for osteogenic differentiation on day 1, 6, 12 and 18. The scale bars of the images in the first and second rows are 210 and 520 μm , respectively.

图1 猪骨髓间充质干细胞鉴定

Fig. 1 Identification of porcine bone marrow mesenchymal stem cells

基因 *SLC2A4* 相对表达水平逐渐降低,在第1天的表达最高,均显著高于其他3个时间($P<0.05$),且在第6、12、18天之间差异不显著($P>0.05$)(图3(a))。糖酵解限速酶基因 *HK1*、*PKLR* 的相对表达水平和乳酸转运关键基因 *SLC16A1* 类似,均在第1天最低,显著低于其他3个时期($P<0.05$),且在其

他3个时期均不存在显著差异($P>0.05$)(图3(a)~(d))。ATP合成酶相关基因ATP合酶F1亚基 α (ATP synthase F1 subunit alpha, *ATP5A1*)相对表达在4个诱导分化时间差异不显著($P>0.05$)(图3(e))。结果表明,葡萄糖代谢相关基因在PBMSCs成软骨分化过程中起调节作用,葡萄糖转运作用逐



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

图2 PBMSCs成软骨分化第1、6、12和18天细胞中软骨标记基因(a)COL2A1、(b)SOX9、(c)ACAN、(d)MMP13和(e)RUNX2的表达水平

Fig. 2 The expression levels of chondrogenic marker genes (a) *COL2A1*, (b) *SOX9*, (c) *ACAN*, (d) *MMP13*, and (e) *RUNX2* in PBMSCs induced for chondrogenic differentiation for 1, 6, 12 and 18 days

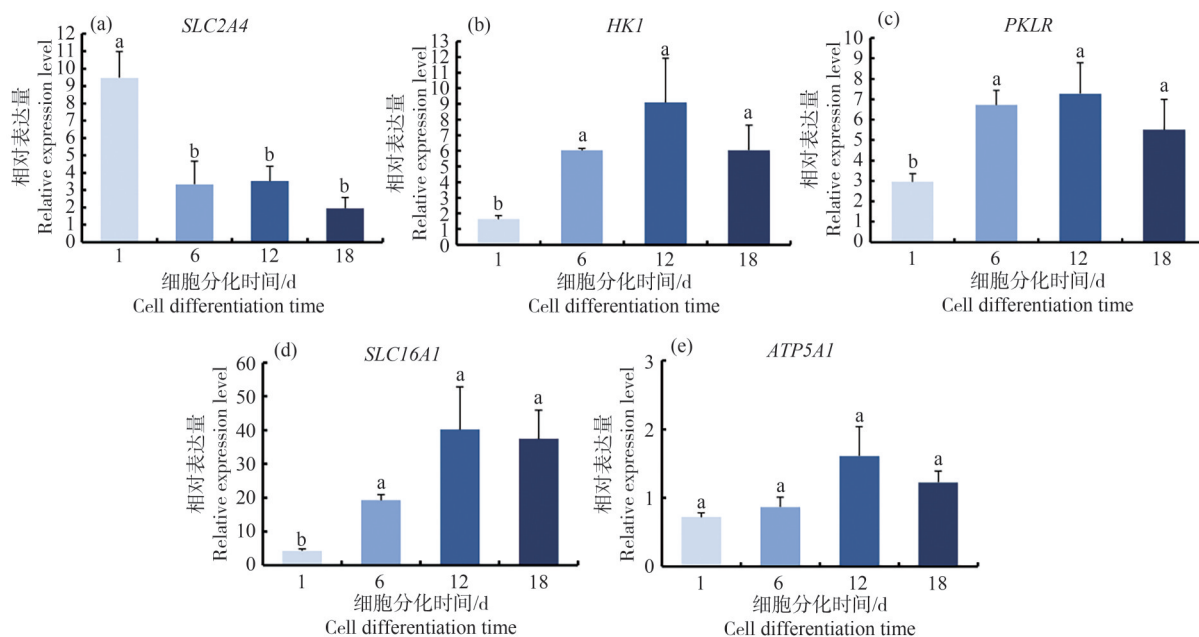


图3 PBMSCs成软骨分化第1、6、12和18天细胞中能量代谢相关基因(a)SLC2A4、(b)HK1、(c)PKLR、(d)SLC16A1和(e)ATP5A1的表达水平

Fig. 3 The expression levels of energy metabolism related genes (a) *SLC2A4*, (b) *HK1*, (c) *PKLR*, (d) *SLC16A1*, and (e) *ATP5A1* in PBMSCs induced for chondrogenic differentiation for 1, 6, 12 and 18 days

渐降低,乳酸转运作用逐渐升高,糖酵解代谢作用增强。

2.4 PBMSCs成软骨分化过程能量代谢产物的动态变化分析

为探究PBMSCs成软骨分化过程能量代谢的动态变化情况,对诱导分化第1天、6天、12天和18天的细胞进行ATP、葡萄糖和乳酸含量检测,同时进行蛋白浓度测定,用于消除样品制备时由于蛋白量的差异而造成的误差。分别构建对应物质的标准曲线,相关系数均高于0.99。ATP含量在成软骨分化第1天最高,显著高于其他3个分化时间($P<0.05$),并在第6、12和18天3个分化时间差异不显著($P>0.05$)(图4(a))。结果表明,PBMSCs向软骨细胞方向分化时能量水平显著降低。葡萄

糖含量随着诱导分化时间的增加而逐渐减少,在第1天达到最高,且显著高于其他时间($P<0.05$);在第6天和12天之间不存在显著性差异($P>0.05$);在第18天降至最低,且显著低于其他3个分化时间($P<0.05$)(图4(b))。胞内乳酸含量和乳酸与葡萄糖消耗比率在4个时期的趋势类似,在第1天时最低,且显著低于其他时间($P<0.05$);在第6天和第12天之间差异不显著($P>0.05$);在第18天达到最高的水平($P<0.05$),且显著高于其他3个分化时间($P<0.05$)(图4(c)和(d))。结果表明,乳酸葡萄糖消耗比率反映糖酵解速率,糖酵解相关代谢物的变化与糖酵解限速酶基因表达一致,均在PBMSCs成软骨分化过程中显著升高,即糖酵解水平显著升高。

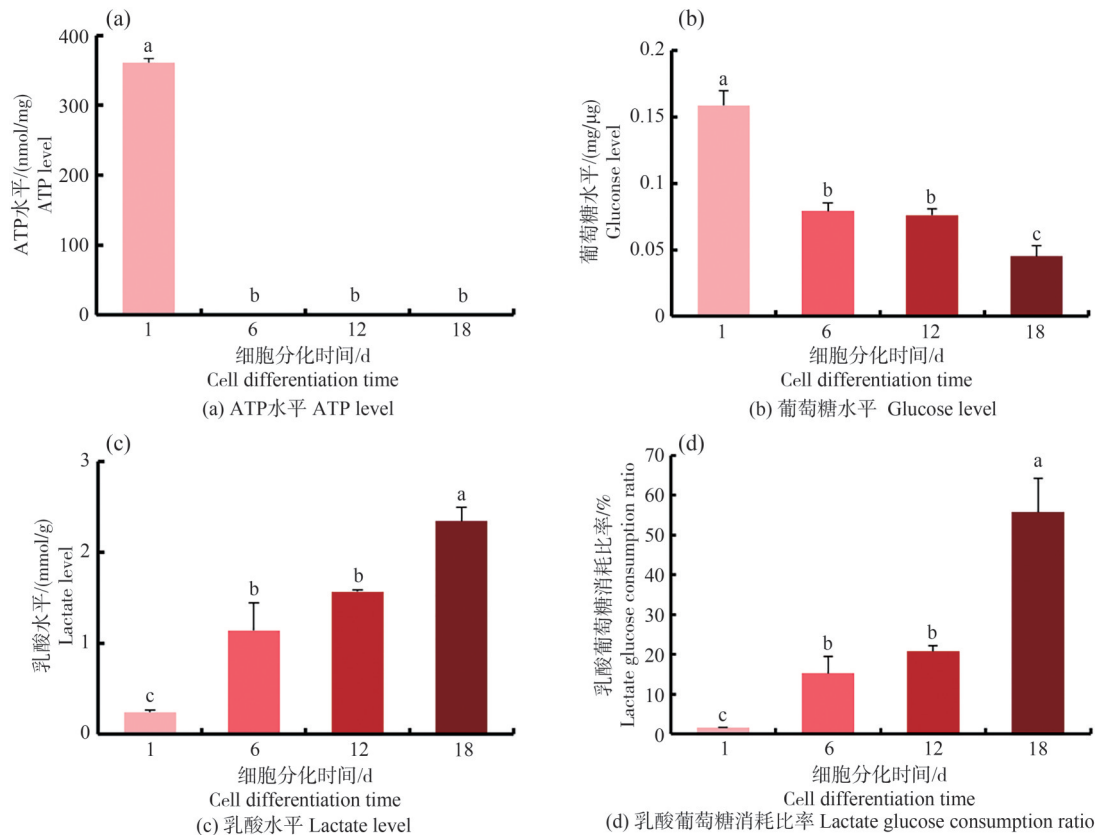


图4 PBMSCs成软骨分化第1、6、12和18天细胞能量代谢产物含量检测

Fig. 4 Quantification of cellular energy metabolites during chondrogenic differentiation of PBMSCs for 1, 6, 12 and 18 days

2.5 PBMSCs成软骨分化关键基因与能量代谢产物的相关性分析

为探究PBMSCs成软骨分化与能量代谢的相关关系,对软骨细胞标记基因和能量代谢产物进行相关性分析,如图5所示,ACAN、SOX9、MMP13、

COL2A1与ATP含量、葡萄糖含量呈显著负相关($P<0.05$),与乳酸含量、乳酸和葡萄糖消耗比率呈显著正相关($P<0.05$)。RUNX2与葡萄糖含量呈显著负相关($P<0.05$),与乳酸含量、乳酸和葡萄糖消耗比率呈显著正相关($P<0.05$),与ATP含量不

存在显著性相关性($P>0.05$)。结果表明,能量代谢活动与PBMSCs成软骨分化显著相关。

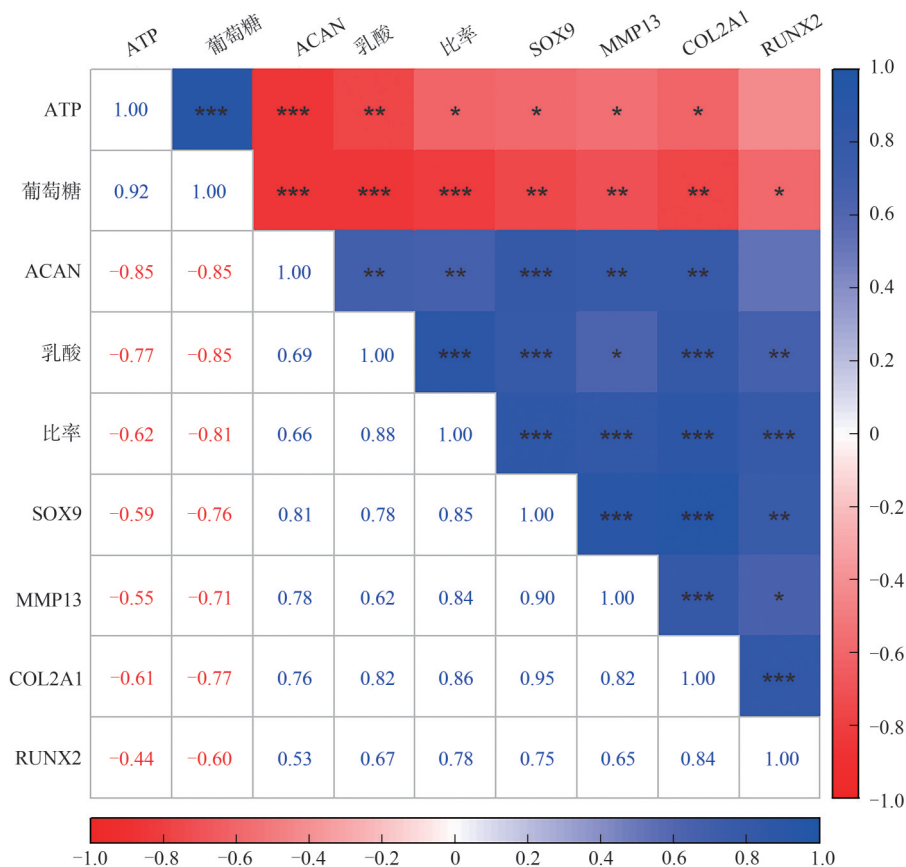


图 5 PBMSCs成软骨分化与能量代谢活动的相关性分析

Fig. 5 Analysis of the relationship between chondrogenic differentiation of PBMSCs and energy metabolism activity

3 讨 论

间充质干细胞来源于胚胎期中胚层,广泛存在于骨髓、脂肪等成体组织和器官中,具有多向分化的潜力^[15-16]。体外分离培养骨髓间充质干细胞是遗传学和再生医学研究的常用方法^[18-20]。本研究从猪四肢骨髓中分离和培养猪骨髓间充质干细胞,用于探究猪骨髓间充质干细胞定向诱导成软骨细胞过程的能量代谢变化。干细胞的表面抗原标志为非单一性,本研究分离的PBMSCs可阳性表达间充质干细胞表面标记物CD29和CD90^[21],且不表达原始造血祖细胞标志物CD34和泛白细胞标志物CD45;在特定诱导方法下,PBMSCs成功向成骨、成软骨方向分化^[22]。综上,本研究成功分离培养了PBMSCs。基于目前对猪骨髓间充质干细胞成软骨分化的诱导方法较少,通过借鉴人骨髓间充质干细胞成软骨分化的研究及诱导方法^[23-25],本研究建立

了一套猪骨髓间充质干细胞诱导分化成软骨细胞的方法,并通过细胞染色和标记基因鉴定证明该诱导方法的有效性。其中诱导剂TGF- β 1常被用于骨髓间充质干细胞成软骨体系中,可以通过调节细胞聚集诱导软骨形成^[26-28];胰岛素-转铁蛋白-硒可以促进软骨细胞的形成与增殖^[29]。在成软骨诱导分化过程中,多个软骨细胞形成和代谢相关基因表达逐渐升高,SOX9调控间充质干细胞的软骨分化过程,通过转录激活形成和维持软骨所必需的基因,可调节软骨胶原蛋白编码基因COL2A1和蛋白多糖编码基因ACAN的表达^[30]。在成软骨诱导分化后期,软骨细胞肥大化调节基因RUNX2表达显著提高,同时MMP13表达显著提高,MMP13在软骨细胞分化后期高表达,具有降解软骨中的胶原蛋白、蛋白多糖、骨粘连蛋白的作用^[31]。由此说明,PBMSCs在成软骨过程中,前期主要进行软骨的形成和发育,后期软骨细胞逐渐成熟。

细胞进行氧化磷酸化和糖酵解均能分解葡萄糖产生ATP,糖酵解产生乳酸并产生少量ATP,氧化磷酸化会彻底分解葡萄糖产生大量ATP,并抑制糖酵解过程^[32]。*SLC2A4*基因及其表达产物GLUT4是细胞摄取葡萄糖的重要转运蛋白^[33]。在本研究中,猪骨髓间充质干细胞诱导分化过程中细胞增殖和成软骨分化均需要利用葡萄糖,*SLC2A4*主要是前期表达较高,后期降低,结合所测得的细胞中葡萄糖含量和ATP含量变化,说明诱导分化前期细胞有较高的葡萄糖转运活动且氧化磷酸化强度较高。乳酸与葡萄糖消耗比率反应糖酵解水平。乳酸含量和乳酸与葡萄糖消耗比率逐渐升高,表明猪骨髓间充质干细胞成软骨分化过程中细胞糖酵解强度增强。*HK1*基因编码的蛋白是细胞控制葡萄糖代谢速率的第一个关键酶^[34]; *PKLR*基因编码的蛋白是一种能够催化磷酸烯醇丙酮酸与ADP发生转磷酸作用,生成丙酮酸盐和ATP的关键糖酵解酶类^[35],二者可以判断成软骨过程中细胞的糖酵解速率。*PKLR*和*HK1*在成软骨分化中的由低到高的表达趋势同样说明糖酵解速率在升高。*SLC16A1*基因编码的蛋白是一种质子连接的单羧酸盐转运蛋白,可催化许多单羧酸盐(乳酸)穿过质膜,在成软骨分化过程中*SLC16A1*的高表达有利于乳酸的转运以维持细胞稳态^[36]。相关性分析结果表明PBSCs成软骨分化严重依赖糖酵解代谢活动,软骨的形成和分解代谢随着糖酵解程度的增强而提高,且存在显著性的相关性。本研究初步揭示了二者相关性,其具体调节机制尚需深入挖掘。

4 结 论

本研究成功分离猪原代骨髓间充质细胞并建立了一套成软骨诱导分化方法。对不同分化时期软骨细胞中能量代谢物和基因表达水平的分析探明了解能量代谢活动在软骨细胞生成中的调节作用。在PBSCs成软骨分化过程中,细胞通过降低ATP水平和葡萄糖转运作用,以及增强糖酵解代谢和乳酸转运作用以促进软骨细胞的形成和成熟。

参考文献 Reference

[1] Reece J S, Mehta R S. Evolutionary history of elongation and maximum body length in moray eels (Anguilliformes: Muraenidae)[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2013, 109(4): 861-875

[2] King J W B, Roberts R C. Carcass length in the bacon pig: its association with vertebrae numbers and prediction from radiographs of the young pig [J]. *Animal Production*, 1960, 2(1): 59-65

[3] Salhotra A, Shah H N, Levi B, Longaker M T. Mechanisms of bone development and repair [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(11): 696-711

[4] Song H, Park K H. Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2020, 67 (Pt 1): 12-23

[5] Hu G, Codina M, Fisher S. Multiple enhancers associated with ACAN suggest highly redundant transcriptional regulation in cartilage [J]. *Matrix Biology*, 2012, 31(6): 328-337

[6] Seidl C I, Fulga T A, Murphy C L. CRISPR-Cas9 targeting of MMP13 in human chondrocytes leads to significantly reduced levels of the metalloproteinase and enhanced type II collagen accumulation [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2019, 27(1): 140-147

[7] Wu X, Liyanage C, Plan M, Stark T, McCubbin T, Barrero R A, Batra J, Crawford R, Xiao Y, Prasad I. Dysregulated energy metabolism impairs chondrocyte function in osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2023, 31(5): 613-626

[8] Tcheta E V, Markova G A. Regulation of energy metabolism in the growth plate and osteoarthritic chondrocytes [J]. *Rheumatology International*, 2018, 38(11): 1963-1974

[9] Lee S Y, Abel E D, Long F X. Glucose metabolism induced by Bmp signaling is essential for murine skeletal development [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4831

[10] Stegen S, Laperre K, Eelen G, Rinaldi G, Fraisl P, Torrekens S, Van Looveren R, Loopmans S, Bultynck G, Vinckier S, Meersman F, Maxwell P H, Rai J, Weis M, Eyre D R, Ghesquière B, Fendt S M, Carmeliet P, Carmeliet G. HIF-1 α metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes [J]. *Nature*, 2019, 565(7740): 511-515

[11] Hollander J M, Li L Y, Rawal M, Wang S K, Shu Y, Zhang M, Nielsen H C, Rosen C J, Zeng L. A critical bioenergetic switch is regulated by IGF2 during murine cartilage development [J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 1230

[12] Mickelson M N. Effect of uncoupling agents and respiratory inhibitors on the growth of *Streptococcus agalactiae* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, 120(2): 733-740

[13] Rajpurohit R, Mansfield K, Ohya K, Ewert D, Shapiro I M. Chondrocyte death is linked to development of a mitochondrial membrane permeability transition in the growth plate [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1999, 179(3): 287-296

[14] Shapiro I M, Srinivas V. Metabolic consideration of epiphyseal growth: survival responses in a taxing environment [J]. *Bone*, 2007, 40(3): 561-567

[15] Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise review: Mesenchymal stem cells: From roots to boost [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(7): 855-864

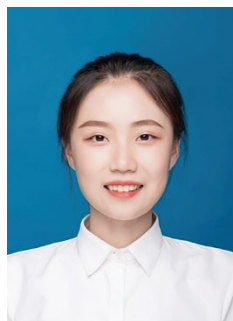
[16] Gimble J M, Guilak F, Nuttall M E, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell B A. *In vitro* differentiation potential of mesenchymal stem cells [J]. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2008, 35(3): 228-238

[17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408

[18] Steinert A F, Rackwitz L, Gilbert F, Nöth U, Tuan R S. Concise review: The clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: Current status and perspectives [J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2012, 1(3): 237-247

- [19] Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, Svinarich D, Dodds R, Govind C K, Chaudhry G R. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2019, 13(9): 1738-1755
- [20] Fu X R, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song A G. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 784
- [21] Rahimzadeh A, Tabatabaei Mirakabad F S, Movassaghpour A, Shamsasenjan K, Karimineko S, Talebi M, Shekari A, Zeighamian V, Gandomkar Ghalhar M G, Akbarzadeh A. Biotechnological and biomedical applications of mesenchymal stem cells as a therapeutic system[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2016, 44(2): 559-570
- [22] Karimineko S, Movassaghpour A, Rahimzadeh A, Talebi M, Shamsasenjan K, Akbarzadeh A. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine [J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2016, 44(3): 749-757
- [23] Akiyama K, You Y O, Yamaza T, Chen C, Tang L, Jin Y, Chen X D, Gronthos S, Shi S T. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2012, 3(5): 40
- [24] Kim S A, Sur Y J, Cho M L, Go E J, Kim Y H, Shetty A A, Kim S J. Atelocollagen promotes chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 10678
- [25] Ichinose S, Tagami M, Muneta T, Sekiya I. Morphological examination during *in vitro* cartilage formation by human mesenchymal stem cells[J]. *Cell and Tissue Research*, 2005, 322(2): 217-226
- [26] Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation[J]. *Cell Research*, 2009, 19(1): 103-115
- [27] Chen S, Liu S, Ma K, Zhao L, Lin H, Shao Z. TGF- β signaling in intervertebral disc health and disease [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2019, 27(8): 1109-1117
- [28] Roelen B A J, ten Dijke P. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members [J]. *Journal of Orthopaedic Science*, 2003, 8(5): 740-748
- [29] Chua K H, Aminuddin B S, Fuzina N H, Ruszymah B H I. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage[J]. *European Cells & Materials*, 2005, 9: 58-67
- [30] Kozhemyakina E, Lassar A B, Zelzer E. A pathway to bone: Signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation[J]. *Development*, 2015, 142(5): 817-831
- [31] Hu Q C, Ecker M. Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4): 1742
- [32] Chandel N S. Glycolysis [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2021, 13(5): a040535
- [33] Campello R S, Alves-Wagner A B, Lucas T F, Mori R C, Furuya D T, Porto C S, Machado U F. Estrogen receptor 1 agonist PPT stimulates Slc2a4 gene expression and improves insulin-induced glucose uptake in adipocytes [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, 12(19): 2059-2069
- [34] De Jesus A, Keyhani-Nejad F, Pusec C M, Goodman L, Geier J A, Stoolman J S, Stanczyk P J, Nguyen T, Xu K, Suresh K V, Chen Y H, Rodriguez A E, Shapiro J S, Chang H C, Chen C L, Shah K P, Ben-Sahra I, Layden B T, Chandel N S, Weinberg S E, Ardehali H. Hexokinase 1 cellular localization regulates the metabolic fate of glucose [J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(7): 1261-1277
- [35] Rab M A E, Van Oirschot B A, Kosinski P A, Hixon J, Johnson K, Chubukov V, Dang L, Pasterkamp G, Van Straaten S, Van Solinge W W, Van Beers E J, Kung C, Van Wijk R. AG-348 (Mitapivat), an allosteric activator of red blood cell pyruvate kinase, increases enzymatic activity, protein stability, and ATP levels over a broad range of PKLR genotypes[J]. *Haematologica*, 2021, 106(1): 238-249
- [36] Meredith D, Bell P, McClure B, Wilkins R. Functional and molecular characterisation of lactic acid transport in bovine articular chondrocytes [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2002, 12(4): 227-234

责任编辑:秦梅



第一作者简介:薛明明,中共党员,在读博士研究生,就读于中国农业大学动物科学技术学院动物遗传育种与繁殖专业。研究方向是猪体长性状的基因功能及调控机制研究。参与“十四五”国家重点研发计划“农业生物重要性状形成与环境适应性基础研究”重点专项。以第一作者在国内外学术刊物发表论文4篇,参与发表论文8篇,授权国家专利1项。具有较强的团队合作精神,始终保持对科研的热情,响应国家号召,以强农兴农为己任,助力农业发展。



第一作者简介:方美英,博士,中国农业大学动物科学技术学院教授、博士生导师,入选教育部“新世纪优秀人才”。担任国家畜禽遗传资源委员会猪专业委员会委员;畜禽遗传改良北京市重点实验室副主任;中国动物遗传育种学会理事及全国动物生物技术学会理事。主要从事动物种质资源分子遗传特性研究以及动物分子育种相关的科研和教学工作。主持多项国家自然科学基金、国家“863”计划、国家科技重大专项以及中乌政府间国际合作等国家级、省部级课题;参与完成了国家“973”和欧盟第七框架等科研项目,完成教育部新世纪优秀人才项目1项。以第一作者/通讯作者在国内外学术刊物累计发表70余篇,授权国家发明专利10余项,主编/参编著作4部,国家标准1项,获教育部科技进步奖2项、大北农科技特等奖和“吴常信动物遗传育种科技成果奖”各1项。