

# iPSC-MSCs 体外抑制 ADAMTS 保护骨关节炎患者软骨基质

张峰,程刚,吴玉娇,储柱平,王旭蕾,王惠敏,王康,魏伟,严尚学

**摘要** 目的 研究诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(iPSC-MSCs)体外对膝骨关节炎(KOA)患者软骨基质的保护作用及其部分机制。方法 收集 KOA 患者关节置换手术切除的软骨组织,分别进行组织和细胞实验。软骨组织剪成小块,随机分为对照组、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )诱导组和 iPSC-MSCs 组。除对照组外,各组软骨组织予以 IL-1 $\beta$ (10 ng/ml)刺激 96 h,再与不同数量 iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ )细胞共培养 72 h 后取出软骨组织进行石蜡包埋切片,免疫组化法检测组织中带有血小板凝血酶敏感蛋白结构域的解聚蛋白样金属蛋白酶家族(ADAMTS-4、ADAMTS-5)及 II 型胶原(COL2)表达,ELISA 法检测共培养上清中基质金属蛋白酶 13(MMP13)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)水平,苏木精伊红(HE)染色检测离体软骨组织的病理改变。分离 KOA 患者软骨组织中软骨细胞,经 IL-1 $\beta$ (10 ng/ml)刺激 48 h 后,将软骨细胞与不同数量 iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ )共培养 72 h。免疫荧光和蛋白免疫印迹法检测软骨细胞中矮小相关转录因子 2(RUNX2)、ADAMTS-4、ADAMTS-5 的表达。结果 与对照组比较,IL-1 $\beta$  可诱导软骨组织 RUNX2、ADAMTS-4、ADAMTS-5 水平升高、COL2 水平降低,培养上清中 MMP-13、IL-6 水平升高( $P < 0.05$ ),IL-10 水平减少( $P < 0.05$ );与 IL-1 $\beta$  诱导组比较,不同数量 iPSC-MSCs 共培养可降低上清中 MMP-13、IL-6 水平,降低 RUNX2、ADAMTS-4、ADAMTS-5 的表达,促进 COL2 表达,并升高 IL-10 水平。结论 iPSC-MSCs 体外可抑制 ADAMTS-4、ADAMTS-5 表达,减少软骨细胞外基质降解,起到关节软骨保护作用。

**关键词** 骨关节炎;诱导多能干细胞;关节软骨;带有血小板凝血酶敏感蛋白结构域的解聚蛋白样金属蛋白酶家族

**中图分类号** R 684.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1522-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.014

2023-08-23 接收

基金项目:安徽高校自然科学研究重大项目(编号:KJ2020ZD15)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032

作者简介:张峰,男,硕士研究生;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:wwei@ahmu.edu.cn;

严尚学,男,研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail:yan-shx@163.com

骨关节炎(Osteoarthritis, KOA)是一种慢性关节疾病,一般认为关节软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成和降解的失衡是引起关节软骨功能下降的重要原因<sup>[1]</sup>。在炎症等各种因素刺激下,活化的软骨细胞通过合成和分泌蛋白酶如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和具有血栓反应蛋白基序的解聚素及金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)等促进了 ECM 的分解代谢,ECM 合成与降解失衡,软骨细胞出现肥大、死亡等病理变化并最终导致关节软骨钙化<sup>[2]</sup>。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)在组织愈合和再生医学中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。骨髓、脐带、脂肪等不同来源的 MSC 存在由于单一个体所能提供的数量有限、不同供体的细胞增殖、分化以及外分泌能力差异较大,以及伦理等诸多原因限制了 MSCs 在临床上的应用<sup>[4]</sup>。而自体体细胞重编程来源的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)分化而来的 MSC(iPSC derived MSCs, iPSC-MSCs)展示了一种较成体 MSC 更强的增殖、分化及促进损伤组织再生的能力,为细胞医疗临床转化开辟了新途径<sup>[5]</sup>。现以 KOA 患者膝关节软骨组织和细胞为对象,观察 iPSC-MSCs 体外对软骨组织和软骨细胞 ECM 的保护作用及其部分机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 样本来源** 安徽医科大学第一附属医院骨科收治的膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)患者行人工关节置换手术后的软骨组织,所有样本均经患者知情同意。

**1.2 细胞及主要试剂** iPSC-MSCs(批号:202009005)由安徽中盛溯源生物科技有限公司提供。IL-1 $\beta$ (SRP3083)购自美国 Sigm-Aldrich 公司;Anti-RUNX2 antibody(ab76956)购自英国 Abcam 公司;ADAMTS4 Antibody(NBP1-54369)、ADAMTS5 Antibody(NBP2-15286)、Collagen II Antibody(NB600-844)购自美国 Novus Biologicals 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 软骨组织处理及分组** 经知情同意,将临床膝关节关节炎关节置换手术病人捐献的关节软骨组织剪成直径约5 mm厚1 mm的组织块,随机分为KOA对照组、IL-1 $\beta$ (10 ng/ml)诱导组和iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ) cells共培养组,每组设3个复孔。将剪好的组织块置于24孔板中,加入1 ml含10%胎牛血清的DMEM培养液,37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 培养48 h。除KOA对照组,每孔加入IL-1 $\beta$ (终浓度10 ng/ml)培养96 h后,加入不同数量iPSC-iMSC,继续培养72 h,分别收集组织块和培养上清液。

**1.3.2 软骨组织病理学检测** 收集的软骨组织经多聚甲醛固定,EDTA脱钙液脱钙后,石蜡纵向包埋、切片进行HE染色,玻片扫描仪扫描全片观察组织病理学改变。

**1.3.3 免疫组化法检测软骨组织中ADAMTS-4、ADAMTS-5、COL2的表达** 软骨组织石蜡纵向包埋切片后,置于烘箱60  $^{\circ}\text{C}$ 烤片2 h梯度脱蜡处理后0.25% Triton-100通透20 min,EDTA抗原修复10 min,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 进行阻断,排除内源性过氧化物的干扰,然后再滴加一抗于4  $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育并过夜。次日将切片复温后用PBS洗涤3遍,之后在滴加二抗并孵育30 min,最后用DAB、苏木素染色,梯度脱水后风干,中性树脂封片置于光镜下观察。染色结果用Image J软件分析量化。

**1.3.4 ELISA法检测软骨组织体外培养上清液MMP-13、IL-6、IL-10水平** 取软骨组织培养上清液,按照ELISA检测试剂盒说明书操作检测各因子水平。

**1.3.5 人软骨细胞的分离与培养** 将软骨组织剪成约1  $\text{mm}^3$ 左右小块,转移至50 ml无菌离心管中,0.25%胰蛋白酶37  $^{\circ}\text{C}$ 消化45 min,吸弃胰酶,加入含血清培养基终止消化,PBS清洗2~3遍,0.2% II型胶原酶溶液37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡消化至软骨组织块基本消失为止(6~8 h),吸取培养液于15 ml离心管中,4  $^{\circ}\text{C}$ ,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入2.5 ml完全培养基,分散后转移至细胞培养瓶中培养。原代细胞覆盖80%上时,采用0.25%胰蛋白酶进行消化,传代培养按1:2比例。

**1.3.6 Transwell小室共培养** 用2~5代的软骨细胞铺板,设置KOA对照组、IL-1 $\beta$ (10 ng/ml)诱导组和iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ 个细胞)共培养组。待细胞长至50%,用IL-1 $\beta$ (10 ng/ml)刺激48 h后(KOA对照组除外),加入相应不同数

量的iPSC-MSCs共培养72 h,进行下一步实验。

**1.3.7 免疫荧光法检测软骨细胞中RUNX2、ADAMTS-4、ADAMTS-5的表达** 在24孔板中放入细胞爬片,每孔接种 $10^5$ 个软骨细胞,Transwell共培养后弃去培养基。PBS洗涤2~3次,4%多聚甲醛固定10 min,破膜,室温放置20 min,一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日滴加荧光二抗避光孵育1 h后,用DAPI染色液进行细胞核染色。取出爬片倒扣于滴有抗荧光淬灭剂的载玻片上,指甲油封片,激光共聚焦显微镜下观察RUNX2、ADAMTS-4、ADAMTS-5的表达。

**1.3.8 Western blot检测软骨细胞中RUNX2、ADAMTS-4、ADAMTS-5的蛋白表达** 细胞共培养72 h后,去除培养基,用PBS清洗2~3次,加裂解液冰上裂解30 min后,12 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,取上清。测定蛋白浓度后确定上样量,10% SDS-PAGE电泳结束后,进行转膜,室温封闭1 h。TPBS洗膜3次,一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。回收一抗,TPBS洗膜3次,室温孵育二抗2 h,然后TPBS洗膜3次后,采用超敏ECL化学发光试剂盒,等比例混合后上机显影。

**1.4 统计学处理** 使用GraphPad(6.0版)进行统计分析,组间比较用One-way ANOVA分析,所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 iPSC-MSCs体外对KOA患者关节软骨组织病理的影响** HE染色结果显示,与对照组比较,IL-1 $\beta$ 可诱导软骨组织中软骨细胞肿胀变形、核皱缩或破裂死亡,组织表面不均匀和/或裂隙/裂纹形成,软骨细胞数量和组织体积减少。iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ 个细胞)与软骨组织共培养可改善IL-1 $\beta$ 诱导的软骨组织病理变化(图1),软骨细胞死亡减少,分布较均匀,大小和形态一致。

**2.2 iPSC-MSCs体外对KOA患者关节软骨组织ADAMTS-4、ADAMTS-5及COL2表达的影响** 免疫组化法检测软骨组织中ADAMTS-4、ADAMTS-5及COL2的表达水平,结果显示,IL-1 $\beta$ 可诱导软骨组织中ADAMTS-4、ADAMTS-5表达升高( $P < 0.01$ ),而iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ 个细胞)与软骨组织共培养后,可降低组织中ADAMTS-4、ADAMTS-5表达水平(图2~3, $P < 0.01$ )。同时,IL-1 $\beta$ 诱导组中COL2在软骨组织中的表达量较对照组降低( $P < 0.01$ ),iPSC-MSCs

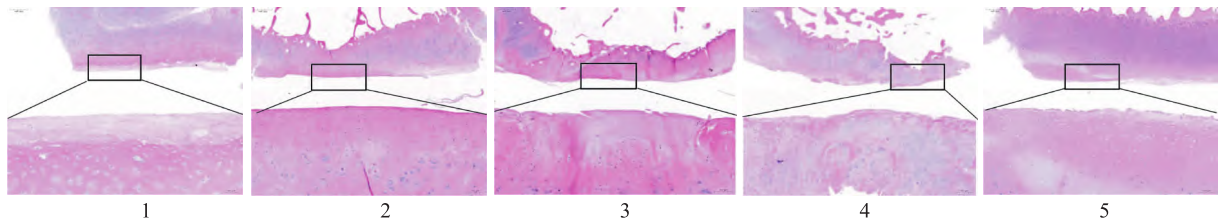


图1 检测 iPSC-MSCs 体外对 KOA 患者关节软骨组织病理的影响 HE 染色 ×10  
1:对照组; 2:IL-1β 诱导组; 3:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>4</sup>); 4:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>5</sup>); 5:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>6</sup>)

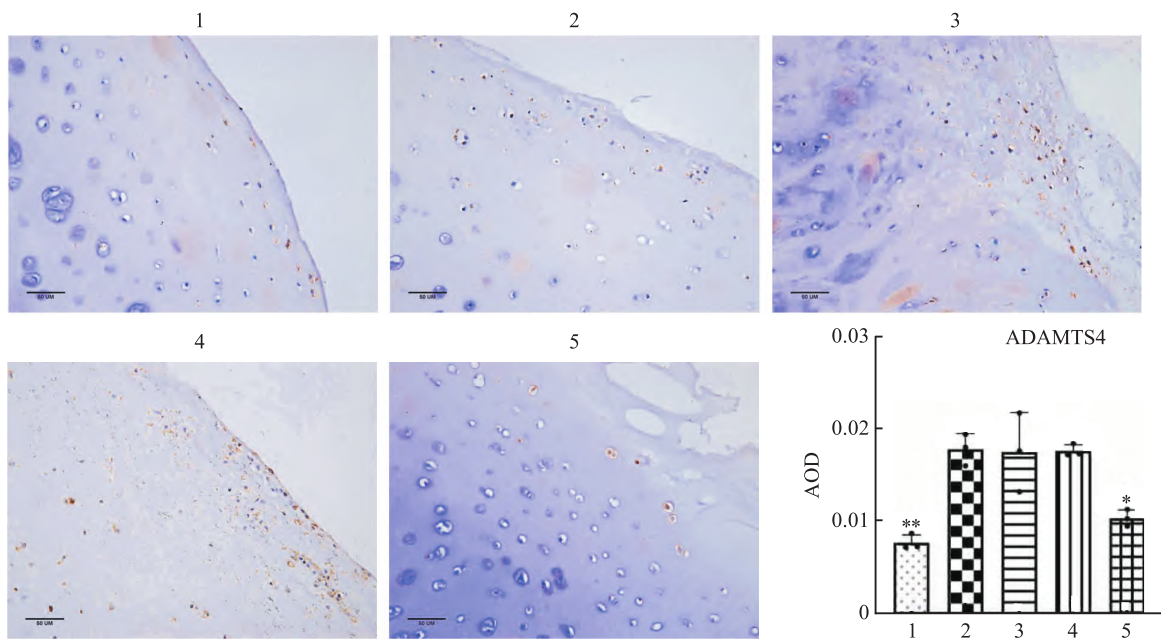


图2 iPSC-MSCs 对 KOA 患者关节软骨组织 ADAMTS-4 免疫组化表达 ×20

1:对照组; 2:IL-1β 诱导组; 3:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>4</sup>); 4:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>5</sup>); 5:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>6</sup>); 与 IL-1β 诱导组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

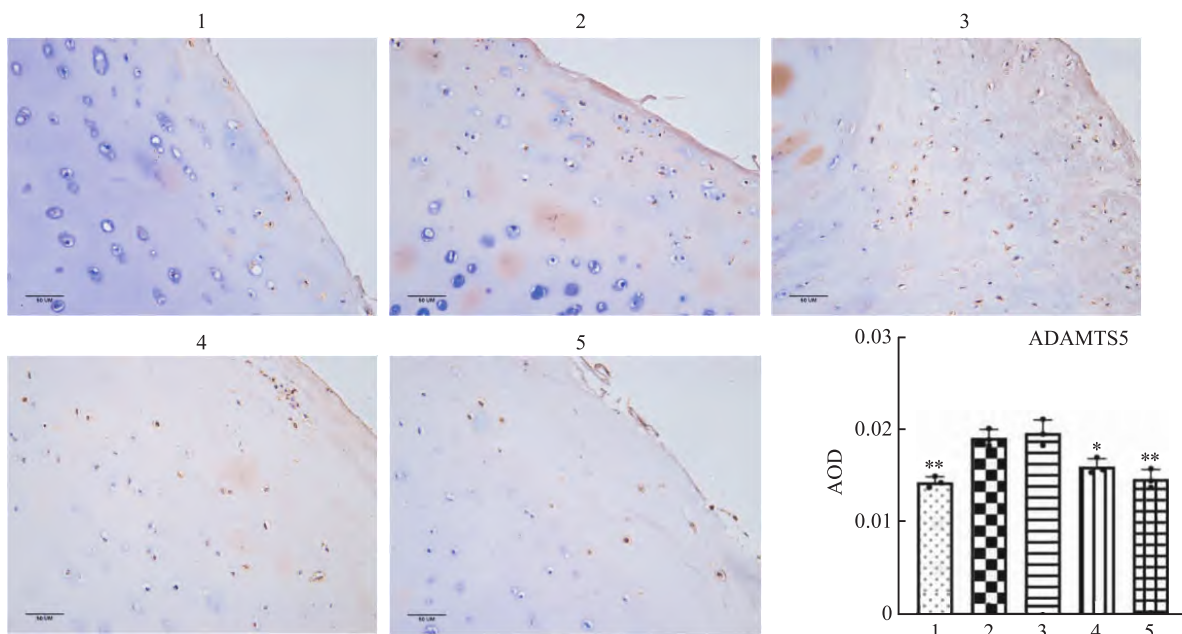


图3 iPSC-MSCs 对 KOA 患者关节软骨组织 ADAMTS-5 免疫组化表达 ×20

1:对照组; 2:IL-1β 诱导组; 3:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>4</sup>); 4:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>5</sup>); 5:iPSC-MSCs(1 × 10<sup>6</sup>); 与 IL-1β 诱导组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$



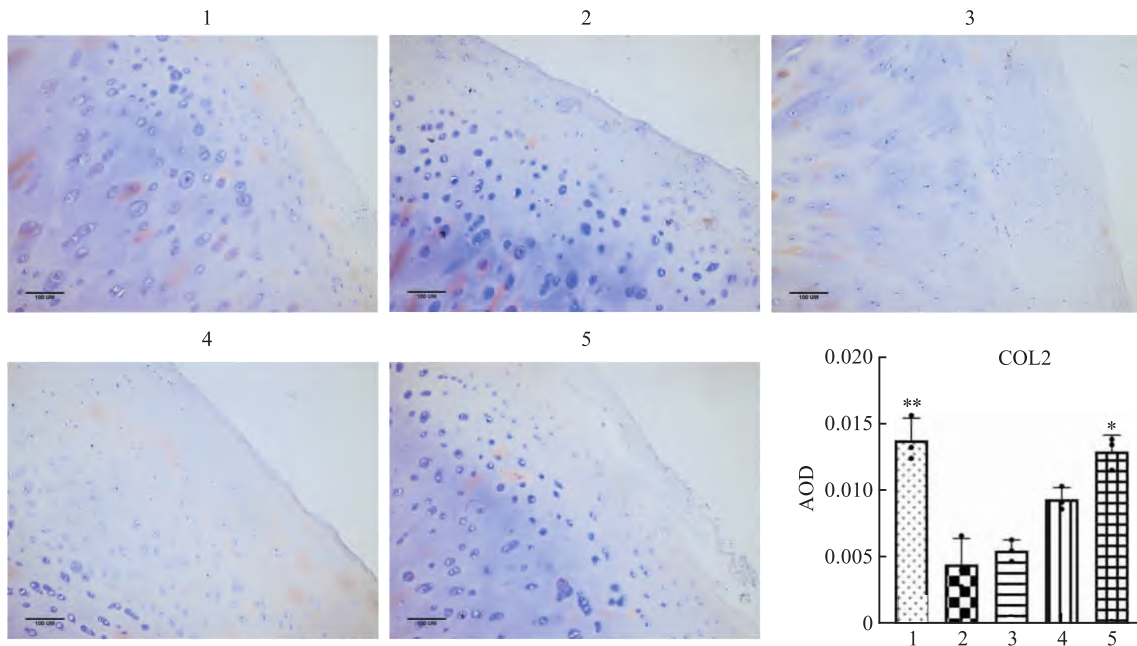


图4 iPSC-MSCs对KOA患者关节软骨组织COL2免疫组化表达  $\times 10$

1:对照组; 2:IL-1 $\beta$ 诱导组; 3:iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ); 4:iPSC-MSCs( $1 \times 10^5$ ); 5:iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ ); 与IL-1 $\beta$ 诱导组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

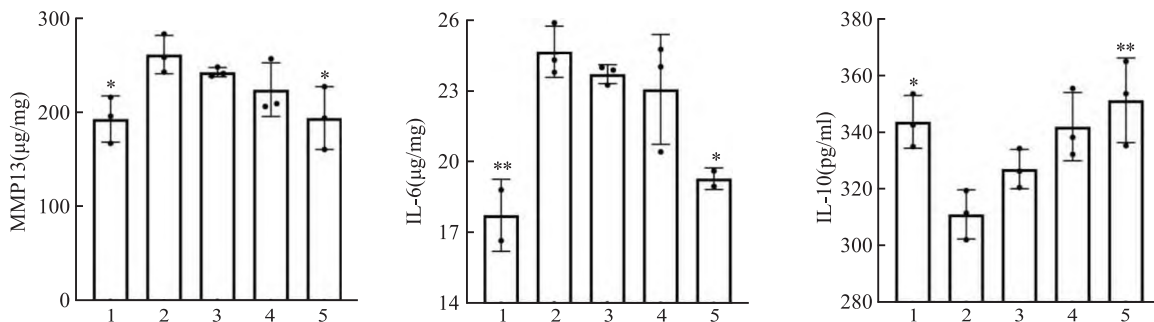


图5 iPSC-MSCs体外对KOA患者关节软骨组织MMP-13、IL-6和IL-10分泌水平的影响

1:对照组; 2:IL-1 $\beta$ 诱导组; 3:iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ); 4:iPSC-MSCs( $1 \times 10^5$ ); 5:iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ ); 与IL-1 $\beta$ 诱导组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

( $1 \times 10^6$  个细胞) 与软骨组织共培养可升高软骨组织中 COL2 表达水平( $P < 0.01$ ), 见图 4。

**2.3 iPSC-MSCs 体外对 KOA 患者关节软骨组织 MMP-13、IL-6 和 IL-10 分泌水平的影响** Elisa 检测组织培养上清, 结果显示(图 5), 与对照组相比, IL-1 $\beta$  诱导组培养上清中 MMP-13、IL-6 水平升高( $P < 0.05$ ), 而 IL-10 水平下降( $P < 0.05$ ); 与 IL-1 $\beta$  诱导组相比, iPSC-MSCs 共培养组可不同程度地降低培养上清中 MMP-13、IL-6 水平, 升高 IL-10 水平。

**2.4 iPSC-MSCs 对软骨细胞中 RUNX2、ADAMTS-4、ADAMTS-5 表达的影响** 免疫荧光法检测软骨组织中 RUNX2、ADAMTS-4、ADAMTS-5 的表达水平, 结果显示, IL-1 $\beta$  可诱导软骨细胞中转录因

子 RUNX2(绿色)入核增加, ADAMTS-4、ADAMTS-5(红色)表达水平升高, 而 iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ )与软骨组织共培养后, 可降低 RUNX2、ADAMTS-4、ADAMTS-5 表达水平(图 6-8)。同时, Western blot 定量分析也得到类似的结果, 见图 9。

### 3 讨论

关节软骨基质中聚集蛋白聚糖 (aggrecan, ACAN) 是构成软骨基质的另一重要组成部分, 可以保持软骨的弹性、含水量和结构完整性, 其与糖胺多糖 (glycosaminoglycans, GAG) 透明质酸形成巨大的聚集体, 吸水后膨胀的聚集体受另一种软骨成分 COL2 网的束缚, 这种复合结构赋予软骨基质抗压

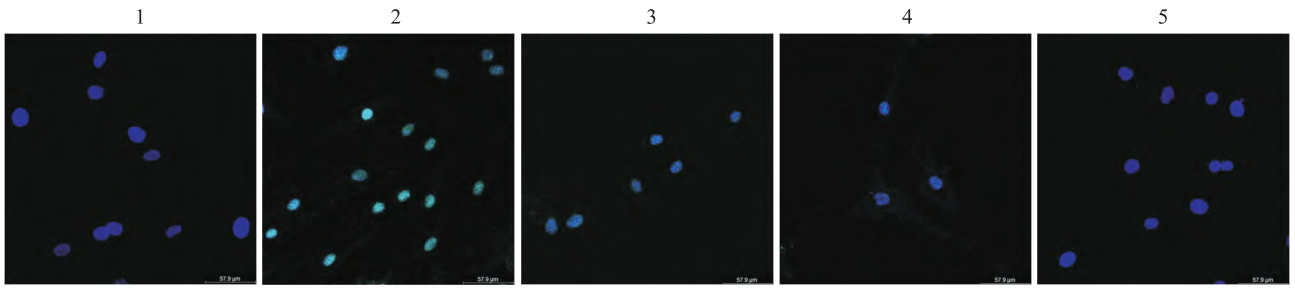


图6 免疫荧光检测 iPSC-MSCs 体外对软骨细胞中 RUNX2 表达的影响

1:对照组; 2:IL-1 $\beta$  诱导组; 3:iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ); 4:iPSC-MSCs( $1 \times 10^5$ ); 5:iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ )

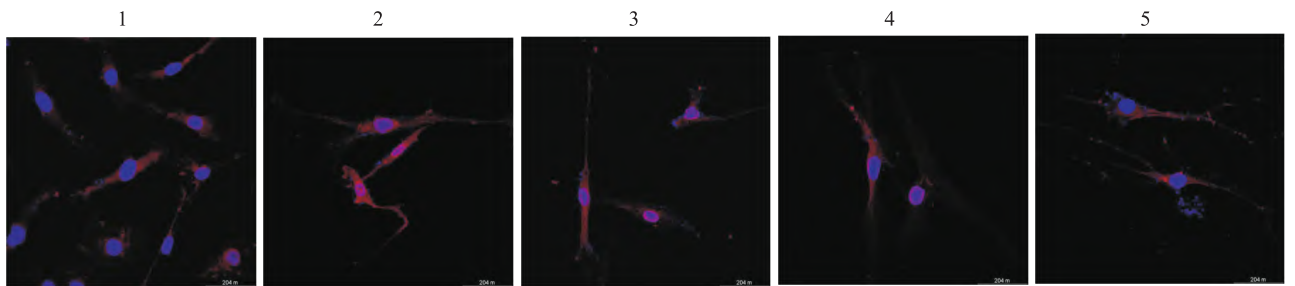


图7 iPSC-MSCs 体外对软骨细胞中 ADAMTS-4 免疫荧光表达的影响

1:对照组; 2:IL-1 $\beta$  诱导组; 3:iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ); 4:iPSC-MSCs( $1 \times 10^5$ ); 5:iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ )

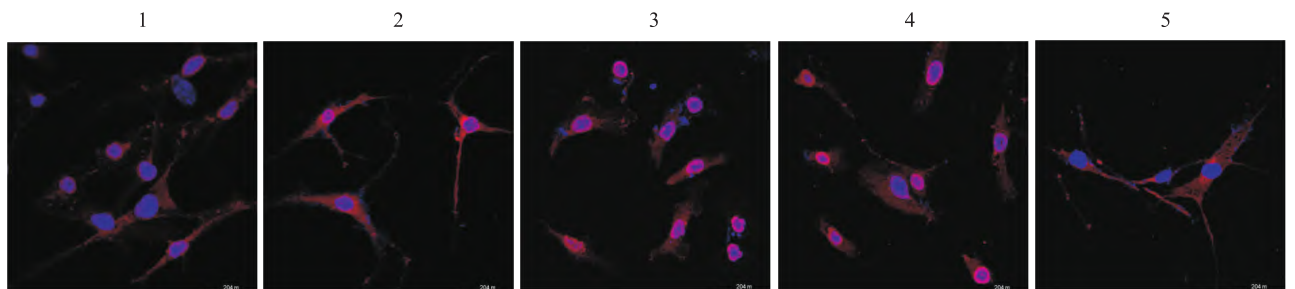


图8 iPSC-MSCs 体外对软骨细胞中 ADAMTS-5 免疫荧光表达

1:对照组; 2:IL-1 $\beta$  诱导组; 3:iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ); 4:iPSC-MSCs( $1 \times 10^5$ ); 5:iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ )

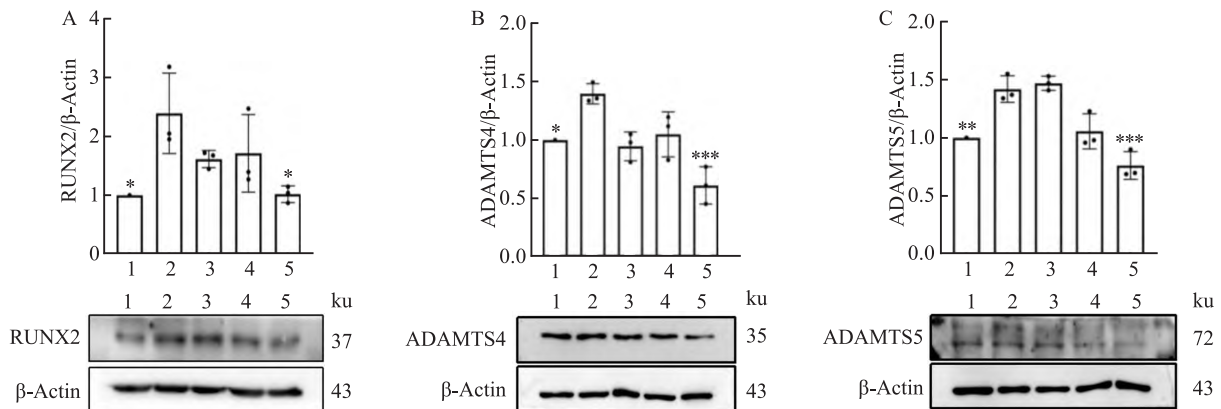


图9 iPSC-MSCs 体外对 KOA 患者软骨细胞中 RUNX2、ADAMTS4、ADAMTS-5 蛋白表达

1:对照组; 2:IL-1 $\beta$  诱导组; 3:iPSC-MSCs( $1 \times 10^4$ ); 4:iPSC-MSCs( $1 \times 10^5$ ); 5:iPSC-MSCs( $1 \times 10^6$ ); 与 IL-1 $\beta$  诱导组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

强度及减震性能<sup>[6]</sup>。ADAMTSs 家族中, ADAMTS4 和 ADAMTS5 主要参与细胞外基质中 II 型胶原 (type II collagen, COL2) 的裂解, ADAMTS-4 主要在 KOA 软骨中表达, 而 ADAMTS-5 在 KOA 和健康软骨组织中都有表达, 它们和基质金属蛋白酶 13 (MMP13) 分别是主要的聚集蛋白聚糖酶和胶原酶, 在 OA 软骨中高度表达并促进软骨 ECM 降解<sup>[7]</sup>。在 KOA 软骨的实验模型中, 发现沉默 ADAMTA-4 和 ADAMTS-5 的 siRNA 能减缓软骨的退化。在实验诱导的软骨变性模型中观察到 ADAMTS-4 mRNA 表达明显增强<sup>[8]</sup>。本研究结果表明, iPSC-MSCs 共培养可以抑制 KOA 患者软骨组织和细胞中 ADAMTA-4 和 ADAMTS-5 的表达, 上调 ECM 中 COL2 的表达, 保护关节软骨基质结构稳定。

此外, RUNX2 调控多种因素的精细平衡参与 OA 的发展, 主要通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 和 TGF- $\beta$  信号通路, 调控软骨细胞外基质分解代谢因子的表达, 被确定为 OA 疾病的主要标志物, 在 OA 小鼠模型和人类患者中高度表达<sup>[9]</sup>。作为 ADAMTS 的上游信号, 过表达 RUNX2 可以上调 MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达<sup>[10]</sup>, 导致细胞外基质及软骨下骨合成和降解失衡。研究结果发现, 随着 iPSC-MSCs 共培养细胞数目的增加, 软骨细胞中 RUNX2 的表达量逐渐降低, 下游蛋白 ADAMTA-4 和 ADAMTS-5 的表达也随之降低。因此, iPSC-MSCs 体外抑制 ADAMTA-4 和 ADAMTS-5 保护骨关节炎患者软骨基质, 可能与 iPSC-MSC 调节 RUNX2 的表达有关。

同时, 伴随 KOA 的发生, 软骨层退变脱落产生的软骨碎片进入滑液, 刺激滑膜出现炎症反应, 导致 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等炎性介质分泌增加, 又促进了 ADAMTS-4、MMP-13 等酶的合成, 使 COL2 等软骨基质进一步降解, 出现了恶性循环。本研究通过将不同数量的 iPSC-MSCs 体外与 KOA 患者关节软骨组织和细胞共培养发现, 培养上清中 MMP-13 和 IL-6 表达水平降低, 而抗炎因子 IL-10 的表达水平显著升高。

在 KOA 的治疗中, MSC 通过分泌细胞外囊泡特别是外泌体作为生长因子、营养因子或信号因子, 既能促进自身分化为软骨细胞, 也能提高软骨细胞活性抑制其凋亡, 还能影响免疫调节, 发挥抗炎作用<sup>[11]</sup>。作为干细胞的替代来源, iPSCs 可以从患者特异性成体细胞诱导而来, 在形态、自我更新和分化能力等方面与胚胎干细胞 (ESCs) 相似。因为它们是患者特异性的, iPSC 衍生的 MSC (iMSC) 理论上

可以消除受体对免疫抑制的需要。因此, 自体 iMSCs 可被视为 MSCs 取之不尽的来源, 用于满足临床需求。此外, 与 MSCs 相比, iMSCs 已被证明在细胞增殖、免疫调节、细胞因子谱、能够调节微环境的外泌体生成和生物活性旁分泌因子分泌方面具有优势<sup>[12]</sup>。另一方面, 由于关节软骨是非血管化和细胞化的结缔组织, 当关节软骨出现分解和磨损时, 没有自我愈合的潜力<sup>[13]</sup>。课题组前期研究发现 iPSC-MSCs 体内通过 KOA 大鼠关节腔内注射, 体外和 KOA 患者软骨组织共培养, 均可明显改善关节病理, 保护关节软骨, 但对软骨基质保护作用的机制尚未明确<sup>[14, 15]</sup>。因此, 作为 KOA 治疗的创新型细胞药物, 深入研究 iPSC-MSCs 对 KOA 的治疗作用及其作用机制, 为 iPSC-MSCs 最终在临床上应用提供实验研究依据, 早日服务临床 KOA 患者, 具有重要的意义。

综上所述, iPSC-MSCs 可以下调 RUNX2, 抑制 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的表达, 从而抑制 ECM 降解, 进而改善 KOA 患者关节软骨损伤。但由于 KOA 发病机制及关节腔内微环境复杂, iPSC-MSC 具体作用机制仍需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] McMahon M, Ye S, Pedrina J, et al. Extracellular matrix enzymes and immune cell biology [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 703868.
- [2] Carballo C B, Nakagawa Y, Sekiya I, et al. Basic science of articular cartilage [J]. *Clin Sports Med*, 2017, 36(3): 413-25.
- [3] 王新伟, 赵英杰, 常艳, 魏伟. 间充质干细胞治疗骨关节炎软骨损伤: 作用、应用与问题 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(31): 5053-8.
- [4] Hwang J J, Rim Y A, Nam Y, et al. Recent developments in clinical applications of mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 631291.
- [5] Selvam V, Rajasingh S, Sigamani V, et al. Comparative analysis of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(18): 8904-19.
- [6] Mead T J, Apte S S. ADAMTS proteins in human disorders [J]. *Matrix Biol*, 2018, 71-72: 225-39.
- [7] Ashruf O S, and Ansari M Y. Natural compounds; Potential therapeutics for the inhibition of cartilage matrix degradation in osteoarthritis [J]. *Life (Basel)*, 2022, 13(1): 102.
- [8] Li T, Peng J, Li Q, et al. The mechanism and role of ADAMTS protein family in osteoarthritis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 959.
- [9] Chen D, Kim D J, Shen J, Zou Z, O'Keefe RJ. Runx2 plays a

- central role in osteoarthritis development[J]. *J Orthop Translat*, 2019, 23:132–9.
- [10] Udagawa N, Koide M, Nakamura M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways[J]. *J Bone Miner Metab*, 2020, 39(1): 19–26.
- [11] Nguyen T H, Duong C M, Nguyen X H, Than UT. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for osteoarthritis treatment: extracellular matrix protection, chondrocyte and osteocyte physiology, pain, and inflammation management[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2887.
- [12] Zhu Y, Wang Y, Zhao B, et al. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 64.
- [13] Xing D, Zhao Y, Dong S. Global research trends in stem cells for osteoarthritis: a bibliometric and visualized study[J]. *Int J Rheum Dis*, 2018, 21(7): 1372–84.
- [14] 何继晨, 严君逸, 程琢玉等. 诱导多能干细胞来源间充质干细胞对大鼠骨关节炎的治疗作用[J]. *安徽医药*, 2019, 23(8): 1496–500.
- [15] 袁晓阳, 程刚, 吴玉娇等. iPSC-MSCs 体外对骨关节炎患者关节软骨组织的基质保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(8): 1247–51.

## Inhibition of ADAMTS by iPSC-MSCs *in vitro* protects cartilage matrix in patients with osteoarthritis

Zhang Feng, Cheng Gang, Wu Yujiao, Chu Zhuping, Wang Xulei, Wang Huimin, Wang Kang, Wei Wei, Yan Shangxue

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Centre for Anti-inflammatory and Immune Drugs, Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To study the protective effect and mechanism of iPSC-MSCs on cartilage matrix in knee osteoarthritis (KOA) patients *in vitro*. **Methods** Cartilage tissues removed from KOA patients with joint replacement surgery were collected and subjected to tissue and cellular experiments, respectively. Cartilage tissue was cut into small pieces and randomly divided into a control group, an IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) induction group, and iPSC-MSCs groups. Except for the control group, cartilage tissues from each group were stimulated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) for 96 h and then co-cultured with different amounts of iPSC-MSCs ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ) cells for 72 h. For *in vivo* tissues, the pathological changes of isolated cartilage tissues were examined by HE staining. The levels of ADAMTS-4, ADAMTS-5, and type II collagen expression were analyzed by immunohistochemistry, while the levels of MMP13, IL-6, and IL-10 in culture supernatants were detected by ELISA kits. The 2 to 5 generations of chondrocytes, which were extracted from cartilage tissue of KOA patients, were stimulated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) for 48 h and then co-cultured with different concentrations of iPSC-MSCs ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ) cells for 72 h. Immunofluorescence and Western blot detected the expression of RUNX2, ADAMTS-4, and ADAMTS-5 in chondrocytes. **Results** Comparison with the control group, in the IL-1 $\beta$ -induced group, the levels of RUNX2, ADAMTS-4, and ADAMTS-5 increased, the level of type II collagen decreased, the levels of MMP-13 and IL-6 in the culture supernatant increased ( $P < 0.05$ ), and the level of IL-10 decreased ( $P < 0.05$ ); Compared with the IL-1 $\beta$ -induced group, co-culture of different numbers of iPSC-MSCs reduced the levels of MMP-13 and IL-6 in the supernatant, decreased the expression of RUNX2, ADAMTS-4, and ADAMTS-5, promoted type II collagen expression and elevated IL-10 levels. **Conclusion** iPSC-MSCs inhibited ADAMTS-4 and ADAMTS-5 expression *in vitro*, reduced cartilage extracellular matrix degradation, and played a role in articular cartilage protection.

**Key words** osteoarthritis; iPSC derived MSCs; articular cartilage; a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs