

УДК 577.152.2

## ГЕПАРАНСУЛЬФАТ 6-СУЛЬФОТРАНСФЕРАЗА 3 ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ В ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА\*

© 2015 Шанченг Жао<sup>1</sup>, Чао Денг<sup>2</sup>, Жен Ванг<sup>1</sup>,  
Липинг Тенг<sup>2</sup>, Джинхуа Чен<sup>1,3\*\*</sup>

<sup>1</sup> School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University,  
Wuxi 214122, PR China; E-mail: zhaoshancheng2008@163.com

<sup>2</sup> Jiangnan University, Wuxi medical school, Wuxi 214122,  
PR China

<sup>3</sup> Jiangnan University, Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry  
and Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, PR China;  
E-mail: jhchenwhut@126.com

Поступила в редакцию 21.10.14  
После доработки 13.01.14

Наши знания о роли таких соединений, как гепарансульфат (HS), участвующих в процессах воспроизводства/самообновления и дифференцировки стволовых клеток очень незначительны. HS представляет собой линейную сульфатированную полианионную полисахаридную цепочку, состоящую из повторяющихся дисахаридных звеньев. HS может взаимодействовать со многими белками, включая структурные белки внеклеточного матрикса (ВКМ), а также с факторами роста и их рецепторами. Таким образом, изучение роли HS в самообновлении и дифференцировке стволовых клеток способствует выяснению теоретических основ и поискам новых методов использования этих клеток в клинике. Мы изолировали и очистили мезенхимные клетки стромы костного мозга (BMMSC) методом центрифугирования в градиенте плотности Перкола, провели методом проточной цитофлуорометрии анализ характерных для стволовых клеток поверхностных белков-маркеров, а также идентифицировали экспрессированные в клетках сульфотрансферазы, осуществляющие модификацию HS. Остеогенная дифференцировка, вызванная обработкой BMMSC химическими индукторами, была подтверждена наблюдениями за активностью щелочной фосфатазы (ALP) и экспрессией белковых маркеров Runx2 и Osp. Методами обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР) и иммуноблоттинга были идентифицированы сульфотрансферазы, экспрессированные в недифференцированных и индуцированных к дифференцировке BMMSC крысы. Установлено, что при высокой степени плотности монослоя, как в контрольной, так и дифференцирующейся культуре формировались клеточные сфероиды. Гистохимические исследования показали, что этот тип клеточного сфероида содержал обогащенные соединениями кальция (кальцифицированные) узелки. Среди всех исследованных сульфотрансфераз, в кальцифицированных клеточных сфероидах наблюдалось увеличение транскрипционной и трансляционной экспрессии только гепарансульфат 6-сульфотрансферазы 3 (HS6ST3). «Нокдаун» HS6ST3 в клетках BMMSC с помощью интерферирующей shRNA сопровождался снижением активности ALP и подавлением экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки Runx2 и Osp. Полученные результаты позволяют предположить, что HS6ST3 принимает участие в дифференцировке BMMSC. Возможно, что в будущем могут быть предложены новые клинические методы, основанные на гликоterapiи.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** BMMSC, остеогенная дифференцировка, внеклеточный матрикс, гепарансульфат, сульфотрансфераза.

По мере расширения исследований генома все большее внимание привлекает изучение генов гликопротеинов, участвующих в регуляции прогрессии опухолей и воспроизводстве и дифференцировке стволовых клеток [1]. Стволовые клетки – это специфическая популяция поли-

потентных клеток, способных к самовоспроизводству и дифференцировке в клетки различных типов, что открывает широкие возможности для их использования в регенеративной терапии [2]. Пути развития стволовых клеток жестко контролируются с помощью различных ростовых факторов, модулируемых полисахаридными цепочками протеогликанов. Гепарансульфат (HS)-содержащие протеогликанов – это один из подтипов протеогликанов, участвующих во множе-

\* Английский вариант рукописи был опубликован в журнале «Biochemistry» (Moscow), том 80, вып. 3, 379–389.

\*\* Адресат для корреспонденции.

стве биологических процессов, включающих имплантацию зародыша, тканевый морфогенез, заживление ран, образование новых кровеносных сосудов и регуляцию дифференцировки стволовых клеток. HS-содержащие протеогликаны оказывают свое воздействие на клеточные процессы путем регуляции активности ростовых факторов и создания морфогенных градиентов [3, 4].

Мезенхимные клетки стромы, полученные из костного мозга взрослого организма, обладают рядом преимуществ над эмбриональными стволовыми клетками при их использовании в клинике: запас этих клеток довольно значителен, они не инвазивны, их легко получить без риска для донора и, наконец, они были слабо иммуногенными для реципиента [5]. Протеиноподобные биореагенты, используемые в настоящее время для стимуляции процессов воспроизводства и дифференцировки стволовых клеток, подвержены быстрой инактивации и оказывают побочные воздействия на организм. Успешное извлечение мезенхимных клеток стромы является первым этапом их использования в тканевой терапии. Техника их дальнейшей трансплантации все еще находится в процессе разработки. Более того, пока еще мало известно о регуляции процесса выбора этими клетками путей дифференцировки в клетки различных тканей. В данной работе была изучена роль HS в некоторых из этих процессов.

Важнейшими факторами, определяющими судьбу стволовых клеток, являются сигнальные белковые молекулы. Установлено, что картина экспрессирующихся белков, среди которых отмечены ростовые факторы и компоненты ВКМ, сильно меняется в процессе развития стволовых клеток [6]. Кроме того, экспрессия различных белков в стволовых клетках тесно связана с клеточным окружением. Хорошо известно также, что биологические макромолекулы, в том числе гликозаминогликаны и РНК, также принимают участие в регуляции этих процессов путем взаимодействия с различными белками [7–11]. Существенным является тот факт, что такие гликозаминогликаны, как HS и хондроитинсульфат (CS), очень стабильны и синтезируются в значительных количествах [12]. Различные аминоклики интенсивно исследуются с целью применения в качестве вспомогательных компонентов для тканевой терапии [7–10, 13], однако механизмы их регуляторного воздействия на белки неизвестны. В данной работе мы изучали воздействие гепарановых сульфотрансфераз на остеогенную дифференцировку мезенхимных клеток стромы костного мозга (BMMSC) крыс. Был также разработан уско-

ренный метод изоляции BMMSC и представлен расширенный протокол для изучения биологической активности HS. Поскольку физиология крыс во многом сходна с человеческой, эти клетки являются подходящей моделью для дальнейших исследований.

Предполагается, что HS служит связующим звеном в функционировании вне- и внутриклеточных сигнальных систем [6, 14]. В частности, сейчас активно исследуется взаимодействие HS с белками семейства фактора роста фибробластов (FGF). HS вызывает димеризацию FGF и активацию тирозинспецифической протеинкиназы рецепторов этих факторов. Установлено, что для такой активации необходимо наличие сульфогрупп в положениях 2-О и 6-О гепарансульфата [15]. Мезенхимные клетки стромы в костном мозге окружены внеклеточным матриксом, локально обогащенном FGF2 и содержащем HS, что может способствовать переходу этих клеток из состояния покоя в состояние быстрого самовоспроизводства в процессе репарации ткани. Более того, такое микроокружение может регулировать образование предшественников костной ткани (остеобластов) при участии RUNX2 (runt-related transcription factor 2) [16, 17]. Известно, что BMP2 (Bone morphogenetic protein 2) также может индуцировать остеогенную дифференцировку клеток BMMSC [3]. Оба ростовых фактора (FGF2 и BMP2) способны связывать HS. Связывание с HS может защищать эти факторы от протеолитической деградации, а также образующиеся комплексы (FGF2-HS или BMP2-HS) могли бы стимулировать регуляторные сигнальные клеточные пути [6, 18]. В частности, добавление к клеткам BMMSC крыс гепарансульфата, экстрагированного из нейроэпителиальных клеток мышей, способствовало стимуляции их пролиферации и дальнейшей остеогенной дифференцировке *in vitro* посредством воздействия на рецептор FGF1 [4].

Ранее методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией и путем анализа связывания лектинов было показано, что степень сульфатирования макромолекул в клетках BMMSC увеличивалась после индукции их дифференцировки в остеобласты [19], однако ответственные за эти изменения сульфотрансферазы не были идентифицированы. В данной работе были изолированы мезенхимные клетки стромы из костного мозга крыс и на их основе создана модель остеогенной дифференцировки с использованием химических индуцирующих реагентов. Уровни экспрессии различных HS сульфотрансфераз в клетках BMMSC до и после индукции дифференцировки были определены

методом ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга. Мы показали, что уровни транскрипционной и трансляционной экспрессии сульфогепаран 6-сульфотрансферазы 3 (HS6ST3) возрастали в сильно кальцифицированных клеточных сфероидедах. Это наблюдение дало возможность предположить, что сульфоефирная модификация гепарина требуется для процесса дифференцировки стволовых клеток. Для дальнейшего исследования роли HS6ST3 в остеогенной дифференцировке BMMSC был проведен «нокдаун» HS6ST3 с помощью интерферирующей малой РНК (shРНК-плазмида) и показано, что при этом существенно снижался остеогенный потенциал этих клеток. Наши исследования могут послужить для выработки новых технических приемов манипуляции со стволовыми клетками при проведении тканевой терапии.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Изоляция BMMSC крыс и их характеристика методом проточной цитофлуориметрии.** Эксперименты на животных были выполнены с соблюдением всех соответствующих этических требований. Крысу («Шанхайский центр по исследованию лабораторных животных», Китай) трехнедельного возраста умерщвляли путем смещения шейных позвонков, помещали на 10 мин в 75%-ный спирт и затем выкладывали в большую стеклянную кювету на чисто вымытом столе. Бедренные и большие берцовые кости задних конечностей вырезали с помощью офтальмологических ножниц и москитного зажима, помещали в чашку с 75%-ным этанолом и затем дважды промывали стерильным буфером PBS. Концы костей отсекали, а мозговую полость перфузировали из шприца 2 мл культуральной среды LG-DMEM («Nucclone», США). Содержимое костей собирали в центрифужную пробирку, содержащую 10 мл среды LG-DMEM, и суспендировали при пипетировании. Клеточную суспензию наслаивали на поверхность перколовой смеси Percoll Lymphocytes Separation Medium (раствор Перкола/Н<sub>2</sub>О/1,5 М NaCl = 2,6/1,9/0,5) («GE, Healthcare», США) согласно инструкции производителя. Клетки центрифугировали при 2500 г 30 мин при 20° и отбирали супернатант. Рыхлый беловатый слой осторожно промывали перколовой смесью, дважды буфером PBS и центрифугировали при 1800 г в течение 10 мин при 20°. Далее клетки ресуспендировали в среде LG-DMEM, содержащей 10%-ную фетальную сыворотку крупного рогатого скота (FBS, «Sijiqing», Китай), их количество просчитывали и доводили концентрацию до  $2 \times 10^6$ /мл. Затем клетки

помещали во флаконы объемом 75 мл и выращивали во влажном инкубаторе в атмосфере 5%-ной СО<sub>2</sub> при 37°. Культуральную среду обновляли каждые три дня в зависимости от плотности культуры.

Чистоту фракции BMMSC анализировали методом проточной цитофлуориметрии, используя антитела против поверхностных белковых маркеров клеток BMMSC: CD29, CD44, CD71, CD90 и CD106, а также против белков-маркеров гемопоэтических клеток: CD34 и CD45 (отрицательный контроль). ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат)-меченые антитела против белков CD29, CD44, CD45, CD71, CD90 и CD106 («Bio-legend», США) и против CD34 («Santa Cruz Biotechnology», США) были использованы в соответствии с протоколами фирм-производителей. Клетки BMMSC собирали с помощью трипсина («Beyotime», Китай) в буфер PBS, дважды промывали этим же буфером и ресуспендировали в PBS с 2%-ной фетальной сывороткой. К клеткам добавляли ФИТЦ-меченые антитела (1 мкг/10<sup>6</sup> клеток) и инкубировали 30 мин при 4°. Затем клетки дважды промывали буфером PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur («BD Biosciences», США). В каждом случае было проанализировано по 10 тыс. клеток. Скорость пролиферации клеточной культуры определяли с помощью МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-ил)-2,5-диметилтетразолийбромид): клетки высевали в 96-луночные планшеты ( $5 \times 10^3$ /см<sup>2</sup>), инкубировали в присутствии МТТ, растворяли образующийся формазан в ДМСО и определяли поглощение при 570 нм.

**Индукция остеогенеза и определение активности щелочной фосфатазы (ALP).** Остеогенную дифференцировку BMMSC крысы индуцировали следующим образом. Клетки высевали в 96-луночные планшеты ( $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>) и подразделяли на две группы в четырех повторях каждая. Клетки первой группы культивировали в базовой среде (LG-DMEM + 10%-ная фетальная сыворотка), второй – в среде, индуцирующей дифференцировку (LG-DMEM + 10%-ная фетальная сыворотка + 10 нМ дексаметазон + 10 мМ β-2-глицерофосфат + 50 мг/мл L-аскорбиновой кислоты). Индукцию проводили в течение 7 или 14 дней, а затем определяли активность ALP в клеточных экстрактах как описано в работе [20]. Клетки были лизированы в 50 мкл 0,5%-ного Triton X-100 при встряхивании на шейкере (300 об/мин) 30 мин при комнатной температуре. Концентрацию белка в лизатах определяли в аликвотах по 10 мкл с использованием набора BCA Protein Assay Kit («Beyotime», Китай). Поглощение при 562 нм измеряли с помощью ридера для микропланшетов Multiskan GO («Thermo

Scientific», США). Для определения активности ALP аликвоты по 20 мкл из каждой лунки переносили в 96-луночные планшеты и добавляли к ним по 50 мкл раствора *p*-нитрофенилфосфата (1 мг/мл в 0,5 М 2-амино-2-метил-1-пропанол, рН 10,3) (все «Aladdin», Китай). Через 30 мин инкубации при 37° измеряли поглощение при 405 нм. Относительную активность ALP рассчитывали как отношение поглощения при 405 нм к концентрации белка в образце.

Гистохимическое окрашивание ALP проводили с использованием набора BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Color Development Kit («Beyotime», Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Интенсивность темно-синей окраски NBT-формаза отражала активность ALP и была прямо пропорциональна уровню ее содержания в клетках. Клетки фотографировали с помощью микроскопа фирмы «Leica DM1L», (Германия).

**Обратная транскрипция-ПЦР (ОТ-ПЦР)** была использована для оценки уровней экспрессии мРНК различных сульфотрансфераз. Как было описано выше, клетки были подразделены на две группы: контрольную – клетки, культивированные в отсутствие индукторов дифференцировки, и экспериментальную – в присутствии индукторов остеогенной дифференцировки. Клетки каждой группы высевали в 6-луночные планшеты ( $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>), каждая группа в четырех повторах. Через определенные промежутки времени клетки лизировали в Биозоле («Beyotime», Китай). Сфероиды сформировались в 3-недельной культуре, достигшей высокой плотности монослоя. Общая фракция РНК была экстрагирована хлороформом и изопропанолом; весь материал был свободен от РНКаз. Образцы кДНК синтезировали с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», США). Амплификацию кДНК проводили методом ПЦР с помощью Premix Taq™ («Takara», Китай) на термосайклере фирмы «LongGene Scientific Instruments» (Китай) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Все использованные олигонуклеотидные праймеры перечислены в таблице.

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в агарозном геле, проводили GoldView окрашивание, количественно оценивали с использованием программы Quantity One (все «Bio-Rad», США). Каждый эксперимент выполняли в трех независимых повторах и нормализовали полученные средние значения уровня экспрессии относительно уровня GAPDH (глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа) мРНК для каждого образца клеток.

**Получение клеточных экстрактов и иммуно-**

**блоттинг.** Клетки подразделяли на две группы (контрольная и экспериментальная) и высевали в шестилуночные планшеты, как было описано выше. Через 14 дней клетки обрабатывали лизирующим буфером для вестерн-блоттинга и изофокусирования («Beyotime», Китай) в соответствии с прилагаемой инструкцией. (Сфероиды формировались и в 14-дневной контрольной группе.) Полученные лизаты центрифугировали при 13 000 g в течение 10 мин при 4° для получения осветленных экстрактов. Концентрацию белка определяли с помощью набора BCA Protein Assay Kit («Beyotime», Китай). К образцам белка (20 мкг) добавляли 6× смесь для образцов («Beyotime», Китай) и проводили Ds-Na-ПААГ-электрофорез. Белки переносили на поливинилидендифторидные мембраны (PVDF; «Beyotime», Китай). Мембраны блокировали 5%-ным обезжиренным молоком в буфере TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,5 mM NaCl, 0,5%-ный Tween 20) в течение 2 ч и затем инкубировали с первичными антителами: мышинные анти-GAPDH («Beyotime», Китай), козы анти-NDST1, кроличьи анти-HS6ST3 или козы анти-HS3ST1 (все «Santa Cruz Biotechnology», США) в течение ночи при 4°. В качестве вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой, были использованы антимышинные, антикроличьи и антикозы IgG («Beyotime», Китай). Специфические иммунореактивные полосы визуализировали с использованием набора DAB Horseradish Peroxidase Color Development Kit («Beyotime», Китай). Каждый эксперимент выполняли в трех независимых повторах и нормализовали полученные средние значения относительно уровня GAPDH в каждом образце.

Сфероиды с высокой контрастностью, а также свободно растущие клетки из культур с высокой плотностью клеточного монослоя ( $5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>) лизировали и анализировали методом вестерн-блоттинга. Обе группы клеток продолжали культивировать дальше в шестилуночных планшетах.

**Кратковременный «нокдаун» HS6ST3 в клетках VMMS с помощью shРНК.** Клетки культивировали в 24-луночных планшетах до 80%-ной плотности монослоя, а затем добавляли по 0,5 мкг/лунку HS6ST3-специфичной shРНК-плазмиды (группа si-HS6ST3) или «пустой» плазмиды (группа NC; отрицательный контроль) (все «GenePharm», Китай) вместе с 2 мкл реагента для трансфекции: 2 мкл Lipofectamine™ LTX и 0,5 мкл Plus™ («Invitrogen», США), в соответствии с прилагаемой инструкцией. В качестве базового контроля использовали клетки без указанных выше добавок (группа Mock). Через 48 ч все клетки фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM1L

## Праймеры и условия проведения ПЦР

Ген	Специфические праймеры	Продукт ПЦР, пн	Процедура*	Количество циклов ПЦР
<i>gapdh</i>	AGCACCTCGTTCACCAAT CTCCAGGGCAAACATCATA	711	1	22
<i>ndst1</i>	CGGAGAGGACTGGACGGTGTTC GGCAGGCTTCAGATGCGGGTA	739	2	32
<i>ndst2</i>	TTCCGAGCCCACGAGCATAG GACGCTTGCCAGTGAGGTAT	400	1	35
<i>hs2st1</i>	AGCACCTCGTTCACCAAT CTCCAGGGCAAACATCATA	711	1	25
<i>hs6st1</i>	CCTGTATCCCGCTACCTGA GTCCTCATCCACCTCCACA	438	1	32
<i>hs6st2</i>	AGTTCGCCAGGTTTGTA TTCTCCCACTCTTCGTTG	473	3	35
<i>hs6st3</i>	CTAACAACCGCCAAGTCCGCAT TCCTCAGTGACAGTCCCCTCTA	472	2	35
<i>hs3st1</i>	GCTGCCACAGACTATCATCATTG ATGGGTGGGTAAGGTTTGTGC	363	2	40
<i>Heparinase 1</i>	CCTCGTTCCTGTCCATCA GTCGCAACTCGTCCATTC	757	1	35
<i>runx2</i>	GCGGACGAGGCAAGAGTT AAGTGAAGGTGGCTGGATAG	627	3	35
<i>Ocn</i>	GGACCCTCTCTGCTCACT TAAACGGTGGTGCCATAGAT	295	1	35
<i>C5 epimerase</i>	GCAGCAGTCAGAGGAGGCATTT TGGGCACAGTCCATTCATTAGG	554	1	32
<i>iduronate 2-sulfatase</i>	TTTGAGAATGCCTTTGCT TGAAATTCCTTAGGGTATCTG	497	1	35
<i>glucoamine(N-acetyl)-6-sulfatase</i>	AGTCCAACTCTGAGCCATTC TCGGGTCGGTGACATTAC	624	1	32
<i>Sulfatase 1</i>	TAGGGAGTCTGGTTATCGC AGTGGTTGTTGTCGTGGG	740	1	30
<i>Sulfatase 2</i>	TGACTACTCCACGGATTACC TCACTTTGTCAACCTCCC	731	1	30

\* 1) 95° 5 мин, 95° 30 с, 55° 45 с, 72° 1 мин/т.п.н.; 2) 95° 5 мин, 98° 10 с, 68° 1 мин/т.п.н.; 3) 95° 5 мин, 95° 30 с, градиент 61–54°.

(«Solms», Германия), чтобы подтвердить эффективность трансфекции. Клетки собирали и оценивали в них уровни транскрипционной и трансляционной экспрессии HS6ST3 методом ОТ-ПЦР и иммуноблоттингом соответственно. Каждый эксперимент выполняли в трех независимых повторах.

**Оценка остеогенного потенциала BMMSC после «нокдауна» HS6ST3.** В клетках всех трех исследуемых групп (si-HS6ST3, NC и Mock) была индуцирована остеогенная дифференцировка, и через 7 дней после начала индукции в этих клетках была определена активность ALP с *p*-нитрофенилфосфатом или гистохимически, как было описано выше. В качестве базового контроля были использованы клетки, не индуцированные к остеогенезу. Транскрипционную экспрессию генов остеогенной дифференцировки (*RUNX2* и *OCN*) определяли методом ОТ-ПЦР. Каждый эксперимент выполняли в трех независимых повторах.

**Статистический анализ** проводили с использованием *t*-теста Стьюдента и программы Origin 8.0 («OriginLab Corp.», США). Различия с  $p < 0,05$  считались статистически значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение BMMSC крысы.** Одним из существенных факторов, ограничивающих использование стволовых клеток в клинике, является необходимость в быстром наращивании их в культуре *in vitro* [13]. В своей работе мы успешно применили технику центрифугирования в градиенте Перкола для быстрой изоляции BMMSC крысы в одну стадию. Предложенный нами метод позволяет получать BMMSC в достаточном количестве для изучения их самовоспроизводства, дифференцировки и регуляции различными факторами с целью дальнейшего использования этих клеток в медицине. Как показано на рис. 1, А, BMMSC имели форму фибробластов и хорошо росли в культуре *in vitro*. Анализ поверхностных антигенов этих клеток показал, что они экспрессируют антигенные маркеры стволовых клеток: CD29, CD44, CD71, CD90 и CD106, но не несут антигенные маркеры гематопоэтических клеток: CD34 и CD45 (рис. 1, В). Эти данные свидетельствовали о чистоте популяции BMMSC. Эти клетки активно пролиферировали (рис. 1, А) и их было необходимо пересевать каждые 2–3 дня.

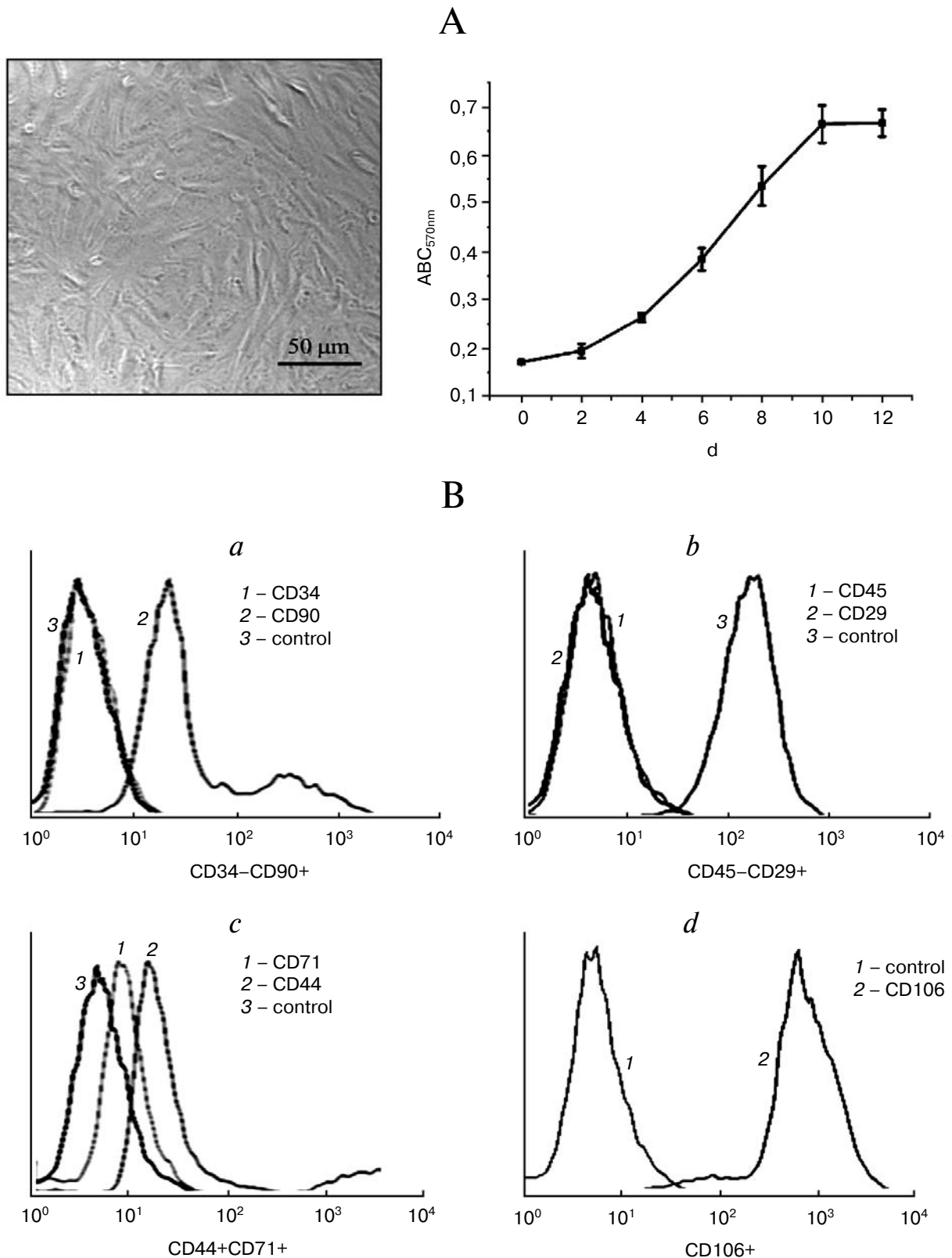
**Создание модели остеогенной дифференцировки на основе клеток BMMSC крысы.** Остеогенез – это процесс пролиферации и последующей дифференцировки клеток BMMSC в зрелые остециты, и дальнейшей минерализацией

ВКМ, секретлируемого этими клетками в процессе развития или заживления костей [14]. Этот процесс регулируется ростовыми факторами, такими как FGF2 и BMP. Известно, что FGF2 регулирует пролиферацию, а BMP индуцирует дифференцировку стволовых клеток [14]. В своей модели остеогенной дифференцировки мы использовали химические индукторы. Для количественной оценки остеогенеза мы тестировали активность и уровни экспрессии ALP – маркера остеогенеза. Как показано на рис. 2, А–D, клетки BMMSC демонстрировали высокие уровни экспрессии ALP на 7-й и 14-й дни после начала индукции остеогенеза. Активность ALP также существенно возрастала в дифференцирующихся клетках по сравнению с контролем (рис. 2, гистограмма).

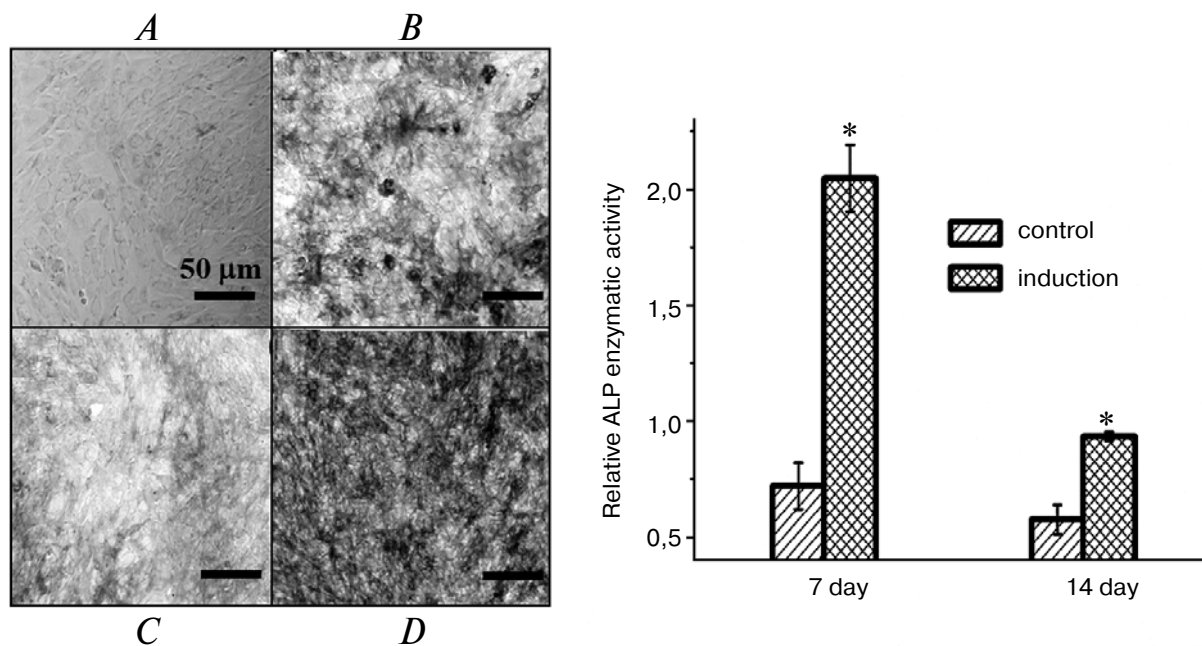
Для подтверждения дифференцировки BMMSC в остеогенные клетки мы определяли в них уровни мРНК, кодирующих маркерные белки остеогенных клеток (*RUNX2* и *OCN*). Установлено, что оба эти белка экспрессируются в BMMSC в процессе их дифференцировки (рис. 3, В). Полученные данные явились еще одним подтверждением успешной индукции остеогенной дифференцировки клеток BMMSC.

Отмечено, что количество ALP в клетках BMMSC на 14-й день после индукции дифференцировки было выше, чем на 7-й день, о чем свидетельствовало более темное окрашивание; кальцифицированные узелки образовывались в областях с высокой плотностью клеток. Полученные результаты свидетельствовали о том, что высокая плотность монослоя воздействует на процесс остеогенеза. Фактически, известковые конкреции формируются как индуцированными, так и контрольными клетками BMMSC в условиях высокой плотности монослоя *in vitro* (рис. 3, А). Обнаружено, что на 7-й день плотный клеточный монослой был еще не организован ( $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>), но на 14-й день он становился сплошным и плотным, что сопровождалось формированием сфероидов (рис. 3, А, а–b). В культуре с высокой плотностью ( $5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>) сфероиды формировались в течение недели. Они содержали узелки, сильно обогащенные соединениями кальция и окрашиваемые BCIP/NBT или ализариновым красным (рис. 3, А).

Химические индуцирующие агенты, использованные в нашей модели остеогенной дифференцировки, были выбраны исходя из их стабильности и относительной дешевизны. Известно, что дексаметазон может стимулировать образование ALP-позитивных колоний клеток и синтез коллагена [21]; L-аскорбиновая кислота ускоряет гидроксिलирование пролина и лизина



**Рис. 1.** А – Микрофотография BMMSC крысы (слева) и кривая роста культуры клеток (справа); В (*a-d*) – определение антигенных маркеров стволовых (CD29, CD44, CD71, CD90 и CD106) и гематопоэтических (CD34 и CD45) клеток на поверхности BMMSC методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфических к этим белкам ФИТЦ-меченых антител. На микрофотографиях здесь и далее приведены размеры масштабных отрезков



**Рис. 2.** Микрофотографии BMMSC после гистохимического окрашивания ALP с помощью ВІСР/НВТ (слева) и определение активности ALP в культуре BMMSC до (control) и после индукции (induction) остеогенной дифференцировки (гистограмма справа). На фотографиях: 7-дневные контрольные (A) и индуцированные (B) клетки; 14-дневные контрольные (C) и индуцированные (D) клетки. На гистограммах здесь и далее (\*) –  $p < 0,05$

в процессе синтеза коллагена, стимулирует синтез белков неколлагенового ВКМ и регулирует активность ALP;  $\beta$ -2-фосфолицерат гидролизует под действием ALP, а образующийся Pi принимает участие в минерализации ВКМ [22]. Эти химические реагенты были использованы в нашей модели *in vitro* для изучения роли HS, который вместе с ростовыми факторами регулирует дифференцировку BMMSC. Среди HS-связывающих белков, участвующих в остеогенезе, можно отметить индуцирующие агенты: Sonic hedgehog и Wnt, митогены: PDGF (ростовой фактор, продуцируемый тромбоцитами), VEGF (васкулярный эндотелиальный ростовой фактор), FGF, BMP-2, -4 и -7, рецепторы: к FGF и к BMP, фактор роста опухолей- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), коллаген, ламинин, фибронектин, а также медиаторы межклеточных взаимодействий – кадерины [18].

**Транскрипционная экспрессия HS сульфотрансфераз в клетках BMMSC до и после индукции остеогенной дифференцировки.** Во время развития или при заживлении костной ткани происходит регуляция пролиферации и остеогенной дифференцировки клеток, а также процесса образования ВКМ [23]. В частности, для остеогенной дифференцировки необходимо присутствие определенных ростовых факторов и такого компонента матрикса, как HS. Структура HS изменя-

ется по мере дифференцировки клеток также, как и комбинации участков связывания цепей гепарансульфата с белком [24]. Дефицит HS может приводить к нарушениям в развитии костей скелета у эмбриона, вызванным блокировкой FGF-, Hedgehog- и Wnt-зависимых путей передачи внутриклеточного сигнала [18]. Мы считаем, что специфические гликозаминогликаны принимают участие на различных стадиях развития стволовых клеток и выступают в качестве посредников, координирующих взаимодействия этих клеток с ростовыми факторами, ВКМ, а также с другими клетками различных типов.

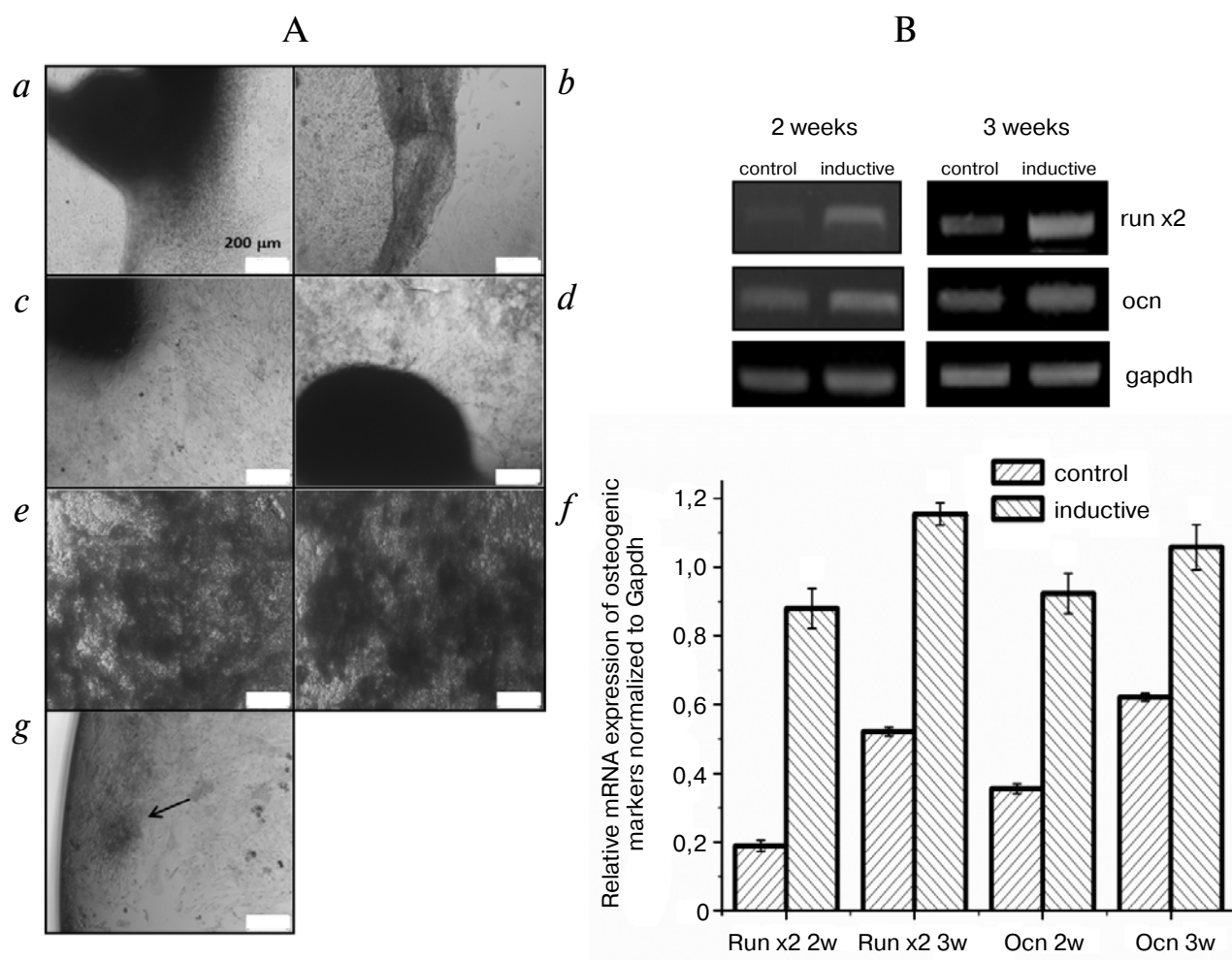
Пока еще не ясна регуляторная роль ВКМ в крайне динамичном и сложном процессе развития костной ткани. Для изучения роли гликозаминогликанов, и особенно HS, мы определяли уровни экспрессии мРНК различных HS сульфотрансфераз в BMMSC крысы до и после их вступления в процесс остеогенной дифференцировки. Были исследованы все трансферазы, участвующие в сульфатировании этого полисахара, начиная с *N*-деацетилазы/*N*-сульфотрансферазы (NDST) – первого участника процесса сульфатирования, и заканчивая последним – гепарансульфат 3-сульфотрансферазой (HS3ST). Оказалось, что, по меньшей мере, по одному представителю каждого типа сульфатирующих ферментов, модифицирующих различные участ-



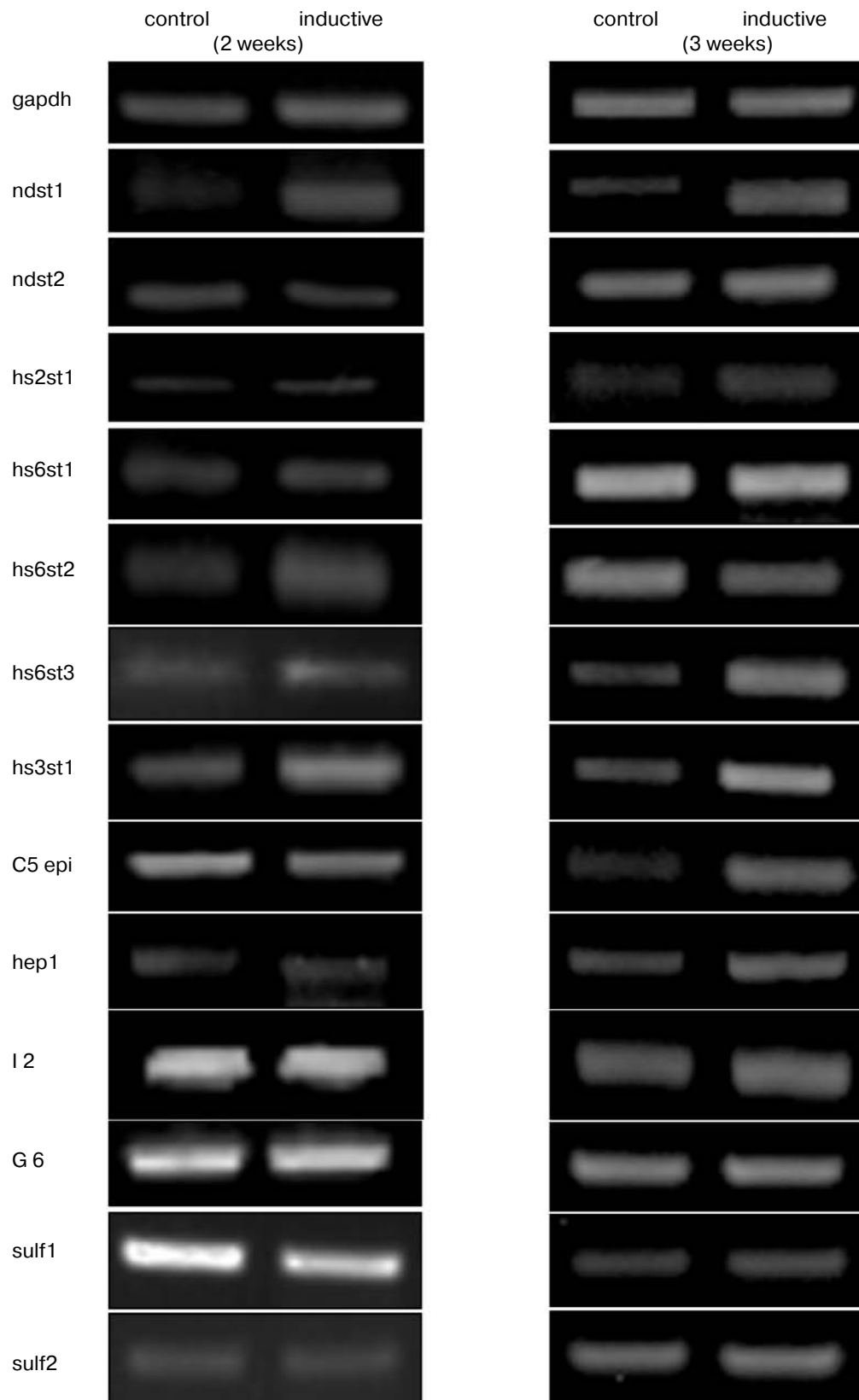
ки главных цепей HS, были экспрессированы в BMMSC (рис. 4). За исключением слабо экспрессированной HS3ST1, все другие сульфатирующие ферменты число циклов ПЦР в таблице и рис. 4). Фермент HS2ST1 имел наибольший уровень экспрессии, в то время как NDST1, NDST2, HS6ST1, HS6ST2, HS6ST3 и гликозил С5-эримераза (Glc5epi), а также идуронат 2-сульфатаза (I2), *N*-ацетилглюкозамин 6-сульфатаза (G6), Сульфатазы 1 и 2 (Sulf1 и Sulf2) – были экспрессированы на промежуточных уровнях. Разрушающий гепаран фермент – гепараназа 1 (hep1) – экспрессирована на среднем уровне, а экспрессия NDST4, HS3ST2 и гепараназы 2 –

вообще не была зарегистрирована. Наши результаты согласуются с полученными ранее данными других авторов, показавших, что в процессе остеогенеза клеток остеосаркомы MG-63 были экспрессированы сульфатирующие ферменты всех типов [14].

Пока еще не ясно, какую роль гликозаминогликаны играют в формировании костного скелета, а также в развитии и дифференцировке стволовых клеток и остеобластов [25–27]. Известно, что на поздних стадиях остеогенеза преобладающие в ВКМ гепаран-содержащие протеоглики заменяются на CS (хондроитинсульфат)-содержащие. Первые предназначены для



**Рис. 3.** А – Микрофотографии клеточных сфероидов, сформировавшиеся в культурах BMMSC с высокой плотностью клеток: (a, b) – неокрашенные сфероиды; (c, d) – кальцифицированные сфероиды, окрашенные BCIP/NBT; (e, f) – кальцифицированные сфероиды, окрашенные ализариновым красным; (g) – области с высокой плотностью клеток, расположенные на краях культуральной чашки и окрашенные в темно-синий цвет с помощью BCIP/NBT. Индуцированные клетки (a, d, f); контрольные неиндуцированные клетки (b, c, e, g); В – уровни экспрессии мРНК белковых маркеров остеогенной дифференцировки (run x2 и ocn) в контрольных (control) и индуцированных (inductive) BMMSC на второй и третьей неделе после начала индукции. На гистограмме представлены средние значения уровней экспрессии, нормированные относительно уровня экспрессии GAPDH



**Рис. 4.** Уровни экспрессии мРНК различных сульфотрансфераз в клетках VMSC до и после индукции остеогенной дифференцировки, определенные методом ОТ-ПЦР

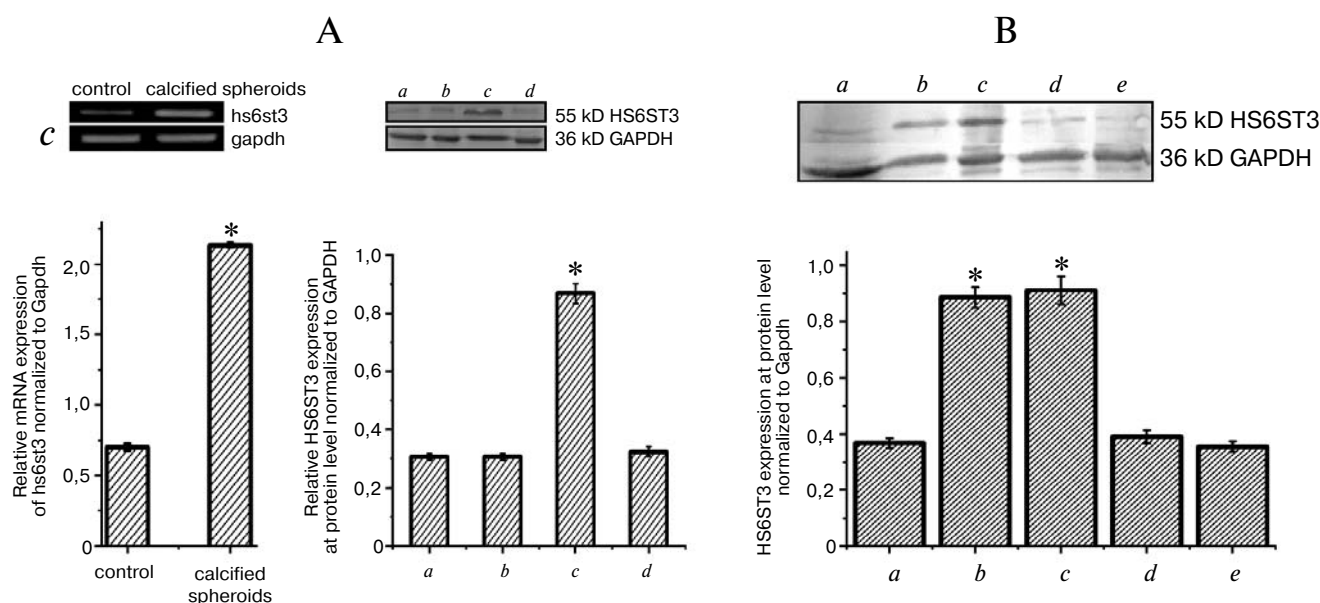
усиления действия ростовых факторов, вторые поддерживают стабильность зрелой костной ткани, поскольку способны связывать кальций, минерализоваться и обеспечивать гидратацию ткани.

CS-содержащие протеоглики объединяются с нерастворимым фиброзным коллагеном I, придавая структуру зрелой кости [18]. В своей работе мы показали, что все необходимые для этого сульфатирующие ферменты экспрессируются на каждой стадии процесса остеогенной дифференцировки BMMSC. Таким образом, хотя содержание HS-протеогликанов в общей массе гликозаминогликанов зрелых костей и не велико, тем не менее все типы их сульфатированных форм экспрессируются и могут выполнять важные регуляторные функции на всех стадиях остеогенеза.

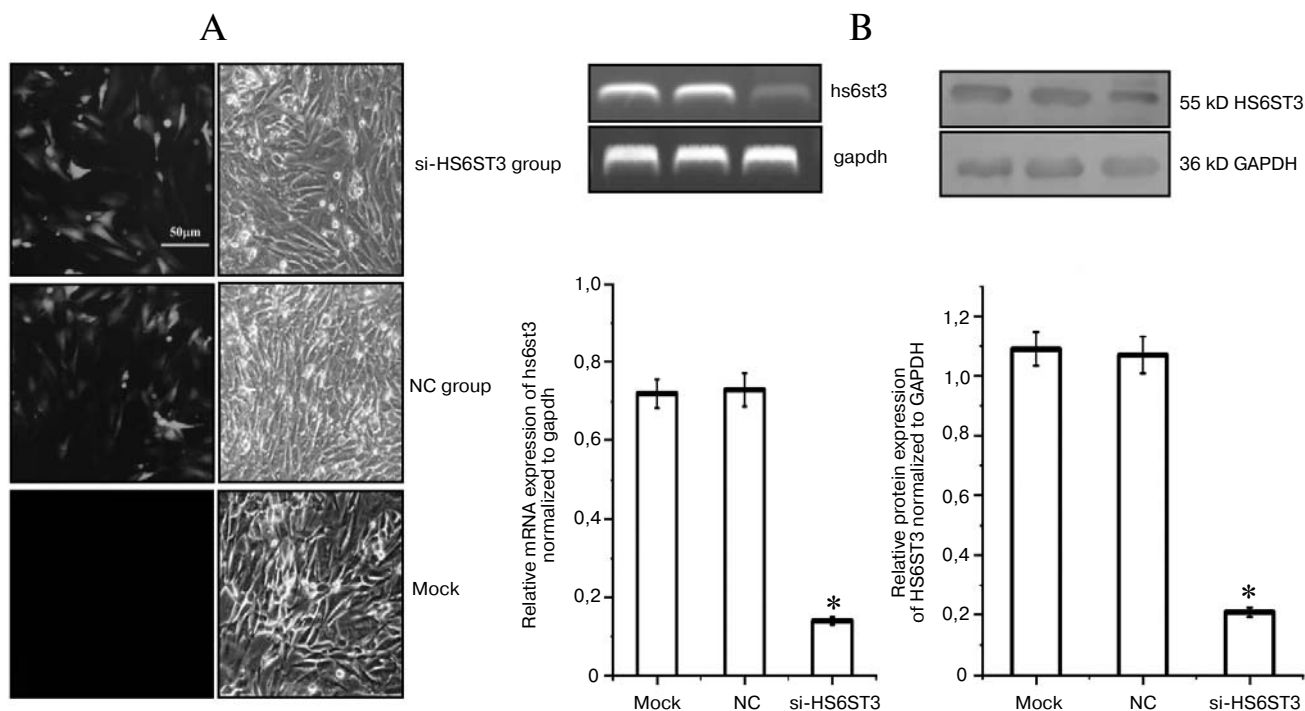
**Остеогенная дифференцировка BMMSC сопровождается экспрессией HS сульфотрансфераз.** Протеоглики играют ключевую роль в сборке и ремоделировании ВКМ, который принимает участие в процессе дифференцировки BMMSC в остеобласты [18, 28]. Взаимодействие HS с факторами роста фибробластов (FGF) и рецепторами к этим факторам способствует оп-

тимизации митогенного воздействия этих белков [15]. Считается, что рецепторы морфогенных белков кости (BMP) могут связывать HS через посредство своего киназного домена [29]. Существуют различные формы HS-содержащих протеогликанов: встроенные в мембрану (интеркалирующие) — синдеканы, ассоциированные с мембранами — глипиканы, специфичные для ВКМ секретируемые — перлеканы [6]. Известно, что синдеканы важны для пролиферации и дифференцировки остеобластов, а генетическое повреждение или отсутствие глипикана 3 приводит к нарушению развития и дефектам костей скелета [30, 31].

Ранее было установлено, что во время остеогенной дифференцировки клеток остеосаркомы MG-63, белковые остовы (белки кора) HS-содержащих протеогликанов (синдеканов 2 и 4, глипиканов 1 и 6) появляются одновременно с нарастанием уровней HS и соответствующих сульфатирующих его ферментов [14]. Подобным же образом на 10-й день после индукции остеогенной дифференцировки BMMSC человека в них возрастала активность ксилотрансферазы-I (ХТ-I) — ключевого фермента, лимитирующего скорость пути биосинтеза глико-



**Рис. 5.** А — Относительные уровни экспрессии HS6ST3 мРНК (слева) и белка 55 кДа HS6ST3 (справа) в различных культурах BMMSC с низкой плотностью монослоя. *a* — Не индуцированная культура без кальцифицированных клеточных сфероидов на 7-й день роста; *b* — индуцированная культура без кальцифицированных клеточных сфероидов на 7-й день роста; *c* — индуцированная культура с кальцифицированными клеточными сфероидами на 14-й день роста; *d* — не индуцированная культура без кальцифицированных клеточных сфероидов на 14-й день роста; В — относительные уровни экспрессии белка 55 кДа HS6ST3 в различных культурах с низкой (*a, d*) или высокой (*b, c, e*) степенью плотности клеток BMMSC; *a* — клетки из неиндуцированной культуры с низкой степенью плотности; *b* — клеточные сфероиды из неиндуцированной культуры с высокой степенью плотности; *c* — клеточные сфероиды из индуцированной культуры с высокой степенью плотности; *d, e* — свободно растущие новообразованные клетки из контрольных (неиндуцированных) культур с низкой (*d*) и высокой (*e*) плотностью монослоя, образованного после формирования сфероидов



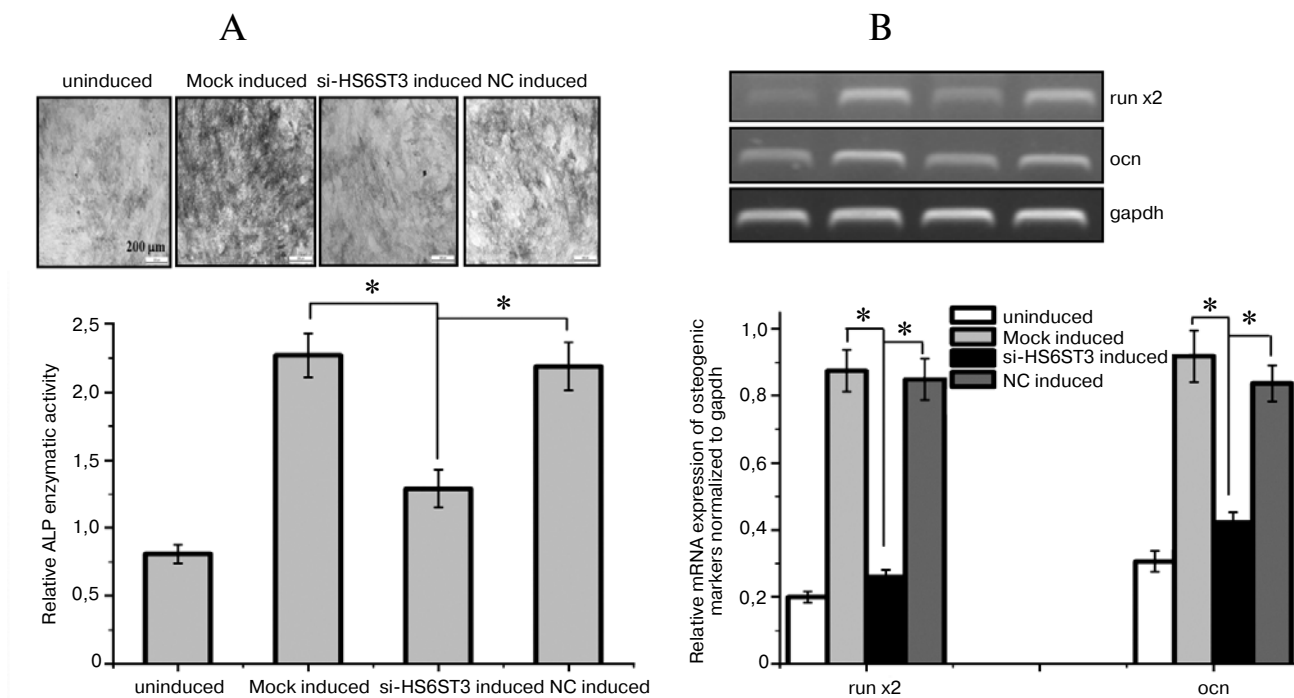
**Рис. 6.** А – Микрофотографии клеток BMMSC, трансфицированных HS6ST3-специфичной shRNA плазмидой (si-HS6ST3 group), неспецифичной плазмидой (NC group), и микрофотографии нетрансфицированных клеток (Mock). Ряд панелей слева – флуоресценция трансфицированной плазмиды, панели справа – снимок в проходящем свете; В – относительные уровни экспрессии HS6ST3 мРНК (hs6st3) и белка 55 кДа HS6ST3, определенные методом ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга

заминогликанов, а также увеличивался уровень экспрессии ХТ-1 мРНК. Кроме того, в это же самое время наблюдалось существенное увеличение уровней мРНК белков кора всех исследованных протеогликанов, за исключением декорина, который был экспрессирован уже на ранних стадиях остеогенеза. Предполагается, что биосинтез протеогликанов происходит согласованно с остеогенной дифференцировкой стволовых клеток и одновременно с минерализацией ВКМ [28].

В своей работе мы провели определение уровней экспрессии мРНК всех сульфотрансфераз и показали, что относительное содержание NDST1 мРНК, HS6ST3 мРНК и HS3ST1 мРНК были увеличены в индуцированных и обогащенных соединениями кальция культурах BMMSC (рис. 4). Кроме того, в кальцифицированных сфероидов были увеличены уровни белка HS6ST3 (рис. 5). Этот фермент катализирует реакцию сульфатирования HS по положениям 6-О моносахаридных остатков. Этот же тип модификации был основным при сульфатации HS во время остеогенной дифференцировки клеток остеосаркомы MG-63 [14]. (Мы не смогли провести де-

тектирование белков NDST1 и HS3S1; либо использованные нами антитела были видоспецифичными, либо титр использованных нами поликлональных антител был слишком низок.) Положительная регуляция сульфотрансферазы HS6ST3 позволяет предположить, что 6-О сульфогруппы в цепях HS протеогликанов нужны для усиления воздействия ростовых факторов и могут играть важную роль в остеогенной дифференцировке BMMSC.

**Кратковременный «нокдаун» HS6ST3 в клетках BMMSC влияет на остеогенез.** Мы трансфицировали в клетки BMMSC HS6ST3-специфичную shRNA-плазмиду (рис. 6, А) и установили, что в трансформированных клетках существенно снижались уровни экспрессии HS6ST3 мРНК и белка HS6ST3, определенные методом ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга соответственно (рис. 6, В). Высокая эффективность трансфекции малых интерферирующих siRNA в клетки BMMSC (рис. 6, А) позволяет рекомендовать их в качестве потенциальных агентов для использования в регенерационной терапии. Мы показали также, что после «нокдауна» HS6ST3 в клетках BMMSC падала активность ALP (рис. 7, А) и снижались



**Рис. 7.** А – Гистохимическое окрашивание ALP с помощью ВІСР/НВТ (микрофотографии) и относительная активность ALP в неиндуцированных (uninduced) и в различных группах индуцированных клеток BMMSC (гистограмма): нетрансфицированные (Mock induced), трансфицированные нейтральной siPHK (NC induced) или клетки после “нокдауна” HS6ST3-специфичной siPHK (si-HS6ST3 induced); В – относительные уровни экспрессии мРНК белковых маркеров остеогенной дифференцировки (run x2 и ocn), определенные методом ОТ-ПЦР

уровни экспрессии мРНК молекулярных маркеров остеогенеза (RUNX2 и OCN) (рис. 7, В). Полученные данные свидетельствовали о положительной корреляции между экспрессией HS6ST3 и остеогенной дифференцировкой клеток BMMSC. Мы предполагаем, что 6-О сульфогруппы важны для проявления остеогенного действия HS. Возможно, что использование искусственного 6-О сульфатированного HS при конструировании костной ткани может давать лучшие результаты, чем применение с этой целью ростовых факторов.

Для выяснения роли HS в остеогенезе необходимы дальнейшие исследования. В частности, следует более детально установить молекулярную структуру цепей HS на каждой стадии остеогенной дифференцировки, а также проследить влияние HS на дифференцировку клеток BMMSC, полученных от различных животных и человека.

В этой работе было проведено изучение экспрессии генов различных сульфотрансфераз в клетках BMMSC до или во время остеогенной дифференцировки. Установлено, что ферменты, сульфатирующие HS по 2-N, а также по 2-, 3- и 6-О положениям различных сахаридных остатков, были экспрессированы на протяжении всего процесса дифференцировки BMMSC, а уровни HS6ST3 мРНК и белка HS6ST3 существенно возрастали. На основании результатов экспериментов по «нокдауну» сульфотрансферазы HS6ST3 путем трансдукции в клетки специфичной siPHK нами был сделан вывод об участии этого фермента в процессе остеогенеза. Дальнейшее изучение роли сульфозэфиров полисахаридов и соответствующих ферментов их обмена в переносе сигнала ростовыми факторами и в выборе стволовыми клетками путей дифференцировки может иметь большое значение в регенерационной тканевой терапии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. David, W. (2012) The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health, In *Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future*, National Academies Press (US) National Academy of Sciences, Washington (DC).
2. Cyranoski, D. (2012) Stem-cell pioneer banks on future therapies, *Nature*, **488**, 139.
3. Manton, K.J., Leong, D.F., Cool, S.M., and Nurcombe, V. (2007) Disruption of heparan and chondroitin sulfate signaling enhances mesenchymal stem cell-derived osteogenic differentiation via bone morphogenetic protein signaling pathways, *Stem Cells*, **25**, 2845–2854.
4. Dombrowski, C., Song, S.J., Chuan, P., Lim, X., Susanto, E., Sawyer, A.A., Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2009) Heparan sulfate mediates the proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dev.*, **18**, 661–670.
5. Charbord, P. (2010) Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts, *Hum. Gene Ther.*, **21**, 1045–1056.
6. Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2007) Heparan sulfate control of proliferation and differentiation in the stem cell niche, *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, **17**, 159–171.
7. Jackson, R.A., McDonald, M.M., Nurcombe, V., Little, D.G., and Cool, S.M. (2006) The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model, *J. Orthop. Res.*, **24**, 636–644.
8. Blanquaert, F., Saffar, J.L., Colombier, M.L., Carpentier, G., Barritault, D., and Caruelle, J.P. (1995) Heparan-like molecules induce the repair of skull defects, *Bone*, **17**, 499–506.
9. Lafont, J., Blanquaert, F., Colombier, M.L., Barritault, D., Caruelle, J.P., and Saffar, J.L. (2004) Kinetic study of early regenerative effects of RGTA11, a heparan sulfate mimetic, in rat craniotomy defects, *Calcif. Tissue Int.*, **75**, 517–525.
10. Luong-Van, E., Grondahl, L., Nurcombe, V., and Cool, S. (2007) *In vitro* biocompatibility and bioactivity of microencapsulated heparan sulfate, *Biomaterials*, **28**, 2127–2136.
11. Zangi, L., Lui, K.O., von Gise, A., Ma, Q., Ebina, W., Ptaszek, L.M., Spater, D., Xu, H., Tabebordbar, M., Gorbatov, R., Sena, B., Nahrendorf, M., Briscoe, D.M., Li, R.A., Wagers, A.J., Rossi, D.J., Pu, W.T., and Chien, K.R. (2013) Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 898–907.
12. Bhaskar, U., Sterner, E., Hickey, A.M., Onishi, A., Zhang, F., Dordick, J.S., and Linhardt, R.J. (2012) Engineering of routes to heparin and related polysaccharides, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1–16.
13. Helledie, T., Dombrowski, C., Rai, B., Lim, Z.X., Hin, I.L., Rider, D.A., Stein, G.S., Hong, W., van Wijnen, A.J., Hui, J.H., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2012) Heparan sulfate enhances the self-renewal and therapeutic potential of mesenchymal stem cells from human adult bone marrow, *Stem Cells Dev.*, **21**, 1897–1910.
14. Kumarasuriyar, A., Murali, S., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2009) Glycosaminoglycan composition changes with MG-63 osteosarcoma osteogenesis *in vitro* and induces human mesenchymal stem cell aggregation, *J. Cell Physiol.*, **218**, 501–511.
15. Ornitz, D.M. (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development, *Bioessays*, **22**, 108–112.
16. Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G. (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche, *Cell*, **116**, 769–778.
17. Marie, P., Debais, F., Cohen-Solal, M., and de Vernejoul, M.C. (2000) New factors controlling bone remodeling, *Joint Bone Spine*, **67**, 150–156.
18. Cool, S.M., and Nurcombe, V. (2005) The osteoblast-heparan sulfate axis: control of the bone cell lineage, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 1739–1745.
19. Heiskanen, A., Hirvonen, T., Salo, H., Impola, U., Olonen, A., Laitinen, A., Tiitinen, S., Natunen, S., Aitio, O., Miller-Podraza, H., Wuhler, M., Deelder, A.M., Natunen, J., Laine, J., Lehenkari, P., Saarinen, J., Satomaa, T., and Valmu, L. (2009) Glycomics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells can be used to evaluate their cellular differentiation stage, *Glycoconj. J.*, **26**, 367–384.
20. Peschel, D., Zhang, K., Fischer, S., and Groth, T. (2012) Modulation of osteogenic activity of BMP-2 by cellulose and chitosan derivatives, *Acta Biomater.*, **8**, 183–193.
21. Herbertson, A., and Aubin, J.E. (1997) Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures, *Bone*, **21**, 491–500.
22. Coelho, M.J., and Fernandes, M.H. (2000) Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation, *Biomaterials*, **21**, 1095–1102.
23. Khan, S.N., Bostrom, M., and Lane, J.M. (2000) Bone growth factors, *Orthop. Clin. North Am.*, **31**, 375–388.
24. Smith, R.A., Meade, K., Pickford, C.E., Holley, R.J., and Merry, C.L. (2011) Glycosaminoglycans as regulators of stem cell differentiation, *Biochem. Soc. Trans.*, **39**, 383–387.
25. Dziewiatkowski, D.D., and Majznerski, L.L. (1985) Role of proteoglycans in endochondral ossification: inhibition of calcification, *Calcif. Tissue Int.*, **37**, 560–564.
26. Takeuchi, Y., Matsumoto, T., Ogata, E., and Shishiba, Y. (1990) Isolation and characterization of proteoglycans synthesized by mouse osteoblastic cells in culture during the mineralization process, *Biochem. J.*, **266**, 15–24.
27. Dean, D.D., Schwartz, Z., Muniz, O.E., Gomez, R., Swain, L.D., Howell, D.S., and Boyan, B.D. (1992) Matrix vesicles are enriched in metalloproteinases that degrade proteoglycans, *Calcif. Tissue Int.*, **50**, 342–349.
28. Muller, B., Prante, C., Gastens, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Gotting, C. (2008) Increased levels of xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Matrix Biol.*, **27**, 139–149.
29. Irie, A., Habuchi, H., Kimata, K., and Sanai, Y. (2003) Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 858–865.
30. Paine-Saunders, S., Viviano, B.L., Zupicich, J., Skarnes, W.C., and Saunders, S. (2000) Glypican-3 controls cellular responses to Bmp4 in limb patterning and skeletal development, *Dev. Biol.*, **225**, 179–187.
31. Cano-Gauci, D.F., Song, H.H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., Pullano, R., Piscione, T.D., Grisaru, S., Soon, S., Sedlackova, L., Tanswell, A.K., Mak, T.W., Yeger, H., Lockwood, G.A., Rosenblum, N.D., and Filmus, J. (1999) Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome, *J. Cell Biol.*, **146**, 255–264.

## HEPARAN SULFATE 6-O-SULFOTRANSFERASE 3 IS INVOLVED IN BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELL OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

Shancheng Zhao<sup>1</sup>, Chao Deng<sup>2</sup>, Zhen Wang<sup>1</sup>,  
Liping Teng<sup>2</sup>, Jinghua Chen<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122,  
PR China; E-mail: zhaoshancheng2008@163.com

<sup>2</sup> Jiangnan University, Wuxi medical school, Wuxi 214122,  
PR China

<sup>3</sup> Jiangnan University, Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry  
and Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, PR China;  
E-mail: jhchenwhut@126.com

Received October 21, 2014

Revision received January 13, 2014

The roles of sugar chains such as heparan sulfate (HS) in stem cell self-renewal and differentiation are poorly understood. Heparan sulfate is a sugar chain with linear sulfated polyanionic disaccharide repeating structures that interact with many proteins, including structural proteins in the extracellular matrix (ECM) and growth factors and their receptors. Thus, unraveling the role of in stem cell self-renewal and differentiation might provide new insights and technical routes in clinical stem cell applications. Here, we purified rat bone marrow mesenchymal stromal cells (BMMSCs) by density gradient centrifugation, analyzed mesenchymal stromal cell surface stemness marker expression by flow cytometry, and identified the sulfotransferases responsible for sulfation ester modification of HS. An osteogenic differentiation model was established by chemical induction reagents and confirmed via alkaline phosphatase (ALP) activity detection and the expression of the osteogenic differentiation markers Runx2 and Ocn. The expression profiles of HS sulfotransferases in rat BMMSCs before and after osteogenic induction were detected by RT-PCR and Western blotting. Cell spheroids were formed in both control and osteogenic culture systems when BMMSCs were grown to high confluence. We determined that this type of cell spheroid is a highly calcified nodule by histochemical staining. Among all the sulfotransferases examined, HS6ST3 mRNA and protein were upregulated in these calcified cell spheroids. HS6ST3 knockdown BMMSCs were established with RNA interference, and they had significantly lower ALP activity and decreased expression of the osteogenic differentiation markers Runx2 and Ocn. These findings suggest that HS6ST3 is involved in BMMSC differentiation, and new glycotherapeutic-based technologies might be developed in the future.

*Key words:* BMMSCs, osteogenic differentiation, extracellular matrix, heparan sulfate, sulfotransferase