文章编号:1000-5404(2005)10-0961-03

论著

腺病毒介导的 Cbfa1 基因转移对 NIH3T3 细胞的调节作用

郭国宁,张正丰,周 跃,郭志良,李华壮,张传志,曹国永 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要: 目的 探讨腺病毒介导的核心结合因子 a1(core binding factor a1, Cbfa1)基因转移对 NIH3T3 细胞的调节作用。**方法** 含有 Cbfa1 基因的重组腺病毒转染 NIH3T3 细胞,RT-PCR 检测成骨标志基因骨钙素(osteocalcin, OCN)、Ⅰ型胶原(type Ⅰ collagen)、骨唾液蛋白(bone sialoprotein, Bsp)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、Cbfa1 的表达。Western blot 检测 Cbfa1 的表达,免疫细胞化学染色检查 OCN 的表达。**结果** NIH3T3 细胞在 Cbfa1 基因转移后 RT-PCR 检测到 OCN、Bsp、AKP、type Ⅰ collagen 基因的表达, Western blot 检测到 Cbfa1 蛋白的表达,免疫细胞化学染色检测到了 OCN 蛋白的表达。**结论** 腺病毒介导 Cbfa1 基因转移 NIH3T3 细胞后出现成骨表型。

关键词: Cbfa1;成骨;NIH3T3
中图法分类号: R329.24; R373.9; R394-3 **文献标识码**: A

Modulation effect of adenovirus-transcripted Cbfa1 gene on NIH3T3 cells

GUO Guo-ning, ZHANG Zheng-feng, ZHOU Yue, GUO Zhi-liang, LI Hua-zhuang, ZHANG Chuan-zhi, CAO Guo-yong (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the modulation effect of adenovirus-transcripted transfer of core binding factor a1 (Cbfa1) gene on NIH3T3 cells. **Methods** After the adenovirus-transcripted transfer of Cbfa1 gene in NIH3T3 cells, the expression of osteocalcin (OCN), type Ⅰ collagen, bone sialoprotein (Bsp) and alkaline phosphatase (AKP) was determined with RT-PCR. The expression of Cbfa1 gene was screened with Western blotting. The expression of OCN was examined with immunocytochemical staining. **Results** After the transfer of Cbfa1 gene, the expression of type Ⅰ collagen, OCN, Bsp and AKP was detected with RT-PCR. Expression of Cbfa1 was identified with Western blotting. The expression of OCN was confirmed with immunocytochemical staining. **Conclusion** The transfer of Cbfa1 gene results in the appearance of the osteogenetic phenotype of NIH3T3 cells.

Key words: core-binding factor a1; osteogenesis; NIH3T3 cells

核心结合因子 a1(core binding factor a1, Cbfa1)又称多瘤病毒增强子结合蛋白(polymavirus enchancer binding protein, PEBP)或急性髓系白血病因子(acute myeloid leukemia, AML),属于 runt 结构域基因家族,通过 runt 与 DNA 结合,Cbfa1 是成骨细胞分化和成骨的特异性转录因子[1],是细胞因子诱导成骨的共同的信号分子[2]。成纤维细胞和成骨细胞都起源于间充质干细胞,具有类似的成骨样表型,但是没有 Cbfa1 表达。NIH3T3 是瑞士小鼠胚胎来源的成纤维细胞,能够稳定表达。本实验利用 Cbfa1 重组腺病毒转染 NIH3T3 细胞,来观察 NIH3T3 细胞向成骨表型转变的可能性。

作者简介:郭国宁(1974-),男,内蒙自治区古卓资县人,博士研究生,主要从事骨愈合方面的研究。电话:(023)65230730,E-mail gotoguoguo@sohu.com
通讯作者:周 跃,电话:(023)68755608
收稿日期:2005-03-22;修回日期:2005-04-07

1 材料与方法

1.1 主要试剂

重组腺病毒 AdEasy1/Cbfa1 及对照病毒 AdEasy1/GFP 为作者构建并纯化和表达[3],NIH3T3 细胞株由本校基础医学部免疫教研室提供,小牛血清及 DMEM/F12、胰酶购于 Hyclone 公司,Trizol 及 RT-PCR 试剂盒购于 Takara 公司,Cbfa1 兔多克隆抗体购自 Santa 公司,PVDF 膜购自 Millopore 公司,预染蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司,OCN 抗体购自北京东亚免疫研究所,免疫组化试剂盒及 DAB 购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Swiss 小鼠胚肾细胞株 NIH3T3 在含有 10%的小牛血清的 DMEN/F12 培养基中培养,培养条件为 37 ℃、5% CO_2。

1.2.2 AdEasy1/Cbfa1 转染 转染前消化 1 瓶 NIH3T3 细胞并计数,按照 10^6 接种到新的培养瓶中。细胞分为两组,一组加入 AdEasy1/Cbfa1 转染,另一组单纯 AdEasy1/GFP 作对照;当细胞达

到80%融合时，弃掉培养液，0.01 mol/L PBS 洗 1 次，按照感染复数为(multiplicity of infection, MOI)80 进行转染，孵育24 h，荧光显微镜观察感染效率后更换完全培养液，继续培养24 h。

1.2.3 细胞 RNA 的提取 病毒感染后 48 h 提取总 RNA。详细步骤参见说明书。提取的 RNA 测定 *D* 值并计算浓度，按照说明书进行 RT 反应。PCR 检测 OCN、Type Ⅰ collagen、Bsp、Cbfa1、AKP 的表达。Genebank 中找出小鼠的 OCN、Type Ⅰ collagen、Bsp、Cbfa1、ALP 基因，Primer premier 5 设计引物(表 1)，上海博亚公司合成，反应后 β-actin 和目的片断各 5 μl 混合后 1.5% 的琼脂糖电泳观察结果。

表 1 PCR 引物

Tab 1 PCR primers

Gene	Sequence of primer	Anneal(℃)	Size(bp)	Cycle
Type Ⅰ collagen	F 5′CCAGCGAAGAACTCATACAGCC			
	R 5″TTGGAGCAGCCATCGACTAG	56	323	35
Cbfa1	F 5′AGTCCCAACTTCCTGTGCT			
	R 5′GTGTCATCATCTGAAATACGC	51	680	35
ALP	F 5′GCAGGATTGACCACGGACACTATG			
	R 5″TTCTGCTCATGGACGCCGTGAAGC	57	391	35
OCN	F 5′GAACAGACAAGTCCCACAC			
	R 5′GTGTGGGACTTGTCTGTTC	51	218	30
Bsp	F 5′AAATGGAGACGGCGATAGTTC			
	R 5′CTTCTTGGGCAGTTGGAGTG	51	217	30
β-actin	F 5′GTGGGGCGCCCCAGGCACCA			
	R 5′CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	56	540	30

1.2.4 Western blot 检测 Cbfa1 的表达 RIPA 提取 AdEasy1/Cbfa1 感染 NIH3T3 细胞和单纯对照病毒 AdEasy1/GFP 感染染细胞的总蛋白，Bradford 法定量蛋白，变性后 40 μg/孔行 SDS-PAGE 电泳，半干法(BIORAD)转膜，条件为 0.25 mA/cm² 恒流，30 min。Cbfa1 兔多克隆抗体(1∶100)杂交袋中 4 ℃过夜，PBST 洗膜后辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG(1∶5 000)室温孵育 2 h，洗膜后 DAB 显色。

1.2.5 免疫细胞化学染色检测 OCN 的表达 NIH3T3 细胞按照 10^5 接种到 6 孔培养板，AdEasy1/Cbfa1 感染和单纯对照病毒感染染 48 h 后 PBS 洗，5 min×3 次，用 10% 多聚甲醛固定 30 min，PBS 洗，加入封闭血清室温孵育 10 min，加入 1∶100 的骨钙素抗体 4 ℃过夜，PBS 洗，加入生物素标记的羊抗兔 IgG(1∶5 000)，室温 30 min，PBS 洗 5 min×3 次，加入辣根过氧化酶标记的链霉卵白素工作液室温 30 min，PBS 洗 5 min×3 次，DAB 显色，自来水冲洗，复染后烤干封片，以未转染组为对照。

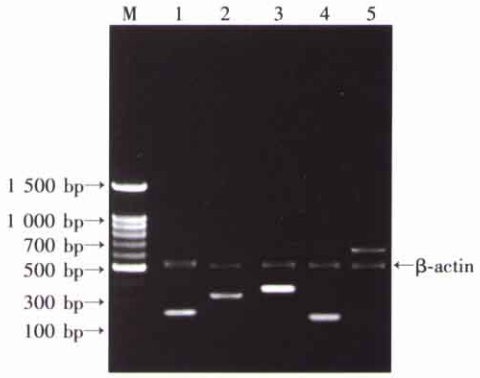
2 结果

2.1 AdEasy1/Cbfa1 感染 NIH3T3 后 GFP 的表达

用 MOI 为 80 的纯化病毒 AdEasy1/Cbfa1 感染细胞后，24 h 后 NIH3T3 细胞即有绿色荧光表达[3]，细胞计数后计算出感染效率为 70%。

2.2 RT-PCR 检测成骨标志基因在转录水平的表达

AdEasy1/Cbfa1 感染 NIH3T3 细胞 48 h 后 RT-PCR 检测到了 OCN、Type Ⅰ collagen、Bsp、Cbfa1、AKP 的表达(图 1)，对照 AdEasy1/GFP 仅检测到 Type Ⅰ collagen 的表达。



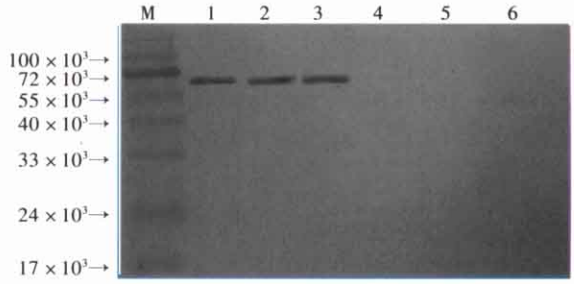
M: Marker; 1: OCN; 2: Type Ⅰ collagen; 3: ALP; 4: Bsp; 5: Cbfa1

图 1 AdEasy1/Cbfa1 感染 NIH3T3 细胞后 RT-PCR 检测成骨标志基因的表达

Fig 1 RT-PCR results of infected NIH3T3

2.3 Western blot 检测 Cbfa1 蛋白的表达

AdEasy1/Cbfa1 感染 48 h 后 Western blot 检测到了 Cbfa1 蛋白的表达，而对照 AdEasy1/GFP 没有检测到 Cbfa1 蛋白的表达(图 2)。



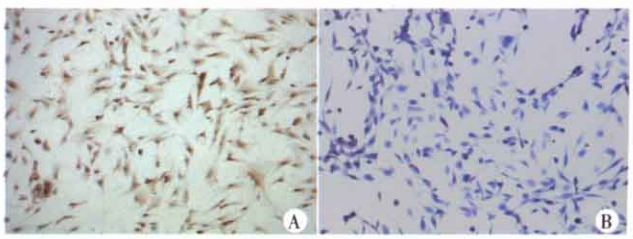
M: Marker; 1－3: AdEasy1/Cbfa1 transfected NIH3T3; 4－6: AdEasy1/GFP transfected NIH3T3

图 2 Western blot 检测 Cbfa1 蛋白表达

Fig 2 Western blot results of Cbfa1

2.4 免疫细胞化学染色检测 OCN 表达的结果

AdEasy1/Cbfa1 感染 48 h 后细胞免疫化学染色检测到了 OCN 的表达，位于细胞浆，呈棕褐色(图 3A)，而对照组 AdEasy1/GFP 感染后没有检测到 OCN 的表达(图 3B)。



A: OCN expression after AdEasy1/Cbfa1 infected NIH3T3; B: No OCN expression of control

图 3 OCN 表达免疫细胞化学染色结果 (S-P×200)

Fig 3 Immunocytochemical staining of OCN (S-P×200)

3　讨论

骨形成是骨诱导因子诱导间充质干细胞向成骨细胞分化和成骨细胞成骨的两个过程。成纤维细胞与成骨细胞都来源于间充质干细胞，成骨细胞能够生成细胞外基质（extracellular matrix，ECM）而成纤维细胞不能。目前发现成骨细胞仅比成纤维细胞多表达两个基因，即 OCN 和 Cbfa1，成纤维细胞是更高级的成骨细胞[4]。在骨折愈合的过程中，一直有成纤维细胞参与，在骨愈合晚期以成纤维细胞充填形成瘢痕阻止骨修复。如果改变成纤维细胞的特征，使之具有特征性的成骨表型，由于它较骨髓干细胞易于分离和增殖，将对骨修复提供简单有效的方法。核心结合因子 a1（core binding factor a1，Cbfa1）是成骨细胞分化和成骨的特异性转录因子，将小鼠两条 Cbfa1 等位基因缺失后出现肢体短小，全部的骨组织缺损，证实没有成骨细胞，AKP、Bsp、OCN 的基因表达明显下降[1]。Cbfa1 调节成骨细胞分化标志基因和成骨表型相关基因的表达而促进骨分化和骨形成。在 OCN、Bsp、Type Ⅰ collagen 等成骨特异性表达基因的启动子均发现存在 Cbfa1 特异结合的成骨细胞特异性顺式反应元件（osteoblast-specific cis-acting elements，OSEs）[1]；Cbfa1 是血管内皮生长因子[5]（vascular endothelial growth factor，VEGF）、骨形态发生蛋白[6]（bone morphogenetic protein，BMP）、成纤维细胞生长因子[7]（fibroblast growth factor，FGF）、甲状旁腺激素[8]（parathyroid hormone，PTH）等细胞因子促进成骨的共同信号分子[2]。新近发现的成骨细胞的另一个转录因子 Osteorix（Osx）也是通过 Cbfa1 发挥作用[9]。鉴于成纤维细胞和成骨细胞的基因表达差异，对成纤维细胞向成骨表型转变已经有了相关报道[10,11]。

AdEasy1/Cbfa1 作为第 1 代腺病毒无致畸，既可感染增殖期细胞也可感染静止期细胞，带有绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）对转染效率可以进行方便的检测，我们构建了此载体及对照病毒载体。NIH3T3 细胞系是由早期的 NIH3T3 瑞士胚胎小鼠来源（Jainchill，1969）的一种克隆的非肿瘤来源的成纤维细胞系，在细胞培养中能够很稳定。它的诱导分化为研究提供方便的和可重复的细胞系统。

我们的研究结果表明 NIH3T3 细胞经过 AdEasy1/Cbfa1 基因转染后出现 Cbfa1 基因水平和蛋白水平的表达，而 AdEasy1/GFP 对照组没有 Cbfa1 的表达说明转染成功。AdEasy1/Cbfa1 组 RT-PCR 检测到成骨细胞特异性基因 OCN、AKP、Bsp 基因的表达，而 AdEasy1/GFP 对照组只有 Type Ⅰ collagen 基因的表达，说明在转录水平有成骨标志基因的表达，提示 NIH3T3 细胞在转入了 Cbfa1 基因后启动了 ALP、OCN、Bsp 的转录，免疫组化进一步证实了 OCN 蛋白的表达，从而改变 NIH3T3 的表型而向成骨方向表达，在细胞的水平证实了 NIH3T3 细胞表型改变的可能性。基因转染技术成熟，推测如果用 Cbfa1 基因转移骨缺损或骨不连的部位，将改变成纤维细胞的表型向成骨表型转变，增加成骨细胞的数量，使成骨能力加强，为下一步探索一种骨修复的简单有效的方法奠定基础。

参考文献：

[1] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, *et al*. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. Cell, 1997, 89(5): 747 - 754.

[2] Meyer U, Meyer T, Schlegel W, *et al*. Tissue differentiation and cytokine synthesis during strain-related bone formation in distraction osteogenesis[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2003, 41(1): 22 - 29.

[3] 郭国宁，周　跃，张正丰. 成骨细胞特异性转录因子 Cbfa1 重组腺病毒的构建、纯化及表达[J]. 免疫学杂志，2005，21(2)：150 - 154.

[4] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance[J]. Science, 2000, 289(5484): 1501 - 1504.

[5] Zelzer E, Glotzer D J, Hartmann C, *et al*. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2[J]. Mech Dev, 2001, 106(1-2): 97 - 106.

[6] Bae S C, Lee K S, Zhang Y W, *et al*. Intimate relationship between TGF-beta/BMP signaling and runt domain transcription factor, PEBP2/CBF[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83-A, Suppl(P1): S48 - S55.

[7] Kim H J, Kim J H, Bae S C, *et al*. The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2[J]. J Biol Chem, 2003, 278(1): 319 - 326.

[8] Fujita T, Fukuyama R, Izumo N, *et al*. Transactivation of core binding factor alpha1 as a basic mechanism to trigger parathyroid hormone-induced osteogenesis[J]. Jpn J Pharmacol, 2001, 86(4): 405 - 416.

[9] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al*. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2002, 108(1): 17 - 29.

[10] Shui C, Scutt A M. Mouse embryo-derived NIH3T3 fibroblasts adopt an osteoblast-like phenotype when treated with 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D (3) and dexamethasone *in vitro*[J]. J Cell Physiol, 2002, 193(2): 164 - 172.

[11] 邓廉夫，冯　伟，张　玥，等. 诱导成纤维细胞表达核结合因子的研究[J]. 中华外科杂志，2002，40(8)：592 - 595.

（编辑　周　芳）