论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1396-03

FGFR3转染小鼠骨髓间充质干细胞对Cbfa Ⅰ和Collagen Ⅰ表达的影响

刘志君,陈 林 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400035)

提 要: 目的 观察腺病毒载体Ad-FGFR3转染对小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)相关成骨基因Cbfa Ⅰ与Collagen Ⅰ表达的影响。**方法** 采用Ad-FGFR3与重组空载体Ad-GFP病毒上清转染小鼠MSCs,RT-PCR和Western blot等方法检测FGFR3、Cbfa Ⅰ与Collagen Ⅰ mRNA及蛋白的表达水平。**结果** RT-PCR及Western blot检测结果显示Ad-FGFR3转染组MSCs FGFR3、Cbfa Ⅰ与Collagen Ⅰ的表达显著增强($P<0.05$)。**结论** Ad-FGFR3转染显著增强MSCs相关成骨基因Cbfa Ⅰ和Collagen Ⅰ的表达。

关键词: FGFR3; 骨髓间充质干细胞;转染

中图法分类号: R329.2;R394-33;R394.2 **文献标识码**: A

Effect of FGFR3 transfection on Cbfa Ⅰ and Collagen Ⅰ expression in mouse mesenchymal stem cells

LIU Zhi-jun, CHEN Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) on the expressions of Cbfa Ⅰ and Collagen Ⅰ in mesenchymal stem cells (MSCs) after Ad-FGFR3 transfection. **Methods** After Ad-FGFR3 and Ad-GFP were respectively transfected into mouse mesenchymal stem cells, the expression of FGFR3, CbfaⅠ and Collagen Ⅰ mRNAs and proteins were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The expressions of FGFR3, CbfaⅠ and Collagen Ⅰ were significantly higher in Ad-FGFR3 transfected MSCs than in Ad-GFP group. **Conclusion** FGFR3 can up-regulate the expression of CbfaⅠ and Collagen Ⅰ.

Key words: fibroblast growth factor receptor 3; mesenchymal stem cells; transfection

成纤维细胞生长因子受体3(fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3)是一种具有调节发育等功能的蛋白质,属酪氨酸蛋白激酶类受体[1]。近年来的研究表明,FGFR3在骨骼形成过程中起着非常重要的作用。目前已明确FGFR3在软骨细胞发育阶段具有重要的调控作用,认为FGFR3是软骨细胞生长、分化的负性调控因子[2],而有关其在成骨细胞分化过程中的作用尚少见报道。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的干细胞,可以分化为肌细胞、骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等多种组织细胞,是骨形成过程中成骨细胞分化的主要来源。

本实验采用基因转染方式将FGFR3体外转染小鼠MSCs,观察转染后成骨标志基因CbfaⅠ与CollagenⅠ的表达,初步探讨FGFR3对MSCs成骨分化的影响,为阐明FGFR3在成骨细胞分化过程中的作用以及应用FGFR3治疗骨骼疾病提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与动物

培养基DMEM,胎牛血清(Hyclone),RT-PCR Kit(TaKaRa),Trizol(Gibco),兔抗鼠FGFR3、Cbfa Ⅰ多克隆抗体和羊抗人Collagen Ⅰ多克隆抗体(Santa Cruz),兔抗羊免疫荧光二抗、抗兔与抗羊辣根过氧化物酶二抗(北京中杉),化学发光试剂盒(Pirece)。

C57BL/6小鼠由本院实验动物中心饲养。重组腺病毒Ad-FGFR3和Ad-GFP由本实验室保存。实验中所用引物:Cbfa Ⅰ正义5′-CCTGAACTCTGCACCAAGTC-3′;反义5′-GAGGTGGCAGTGTCATCATC-3′;Coll Ⅰ正义5′-GAAGTCAGCTGCATACAC-3′;反义5′-AGGAAGTCCAGGCTGTCC-3′;FGFR3正义5′-GGTCCAGAGCAGCGAGTT-3′;反义5′-CGGGCGAGTCCAATAAGG-3′;GAPDH正义5′-CAAATTCCATGGCACCGTCA-3′;反义5′GGAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3′。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的扩增及滴度测定 待HEK293细胞生

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522604) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522604)

作者简介:刘志君(1975-),女,湖南省洞口县人,博士研究生,主要从事干细胞与组织工程方面的研究。电话:(023)68757572

通讯作者:陈 林,电话:(023)68757122

收稿日期:2007-04-29;修回日期:2007-06-05

长融合至 80% 时，分别加入重组腺病毒 Ad-FGFR3 及 Ad-GFP 稀释液 1 ml，摇匀后培养箱内培养 2 h。然后，吸去病毒液，加入 DMEM 培养液继续培养至出现细胞病变效应（cytopathetic effect，CPE）；收集病毒上清，采用氯化铯梯度纯化。

1.2.2　细胞培养　取体质量（20 ± 2）g，4 ~ 6 周龄 C57 BL/6 小鼠，雌雄不限，无菌条件下分离小鼠的胫骨与股骨，冲洗骨髓腔内的细胞，制备成单细胞悬液。在离心管内加入 Percoll 细胞分离液，沿管壁缓慢加入等体积的细胞悬液，2 000 r/min，离心 20 min，吸取中间层细胞入另一无菌离心管，并用无菌 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次；培养液重悬细胞，调整细胞浓度至 1×10^6/ml，37 ℃，5% CO_2 饱和湿度的培养箱内进行培养，24 h 后全量换液，待细胞生长至 80% ~90% 时进行传代。取第 3 代生长至 70% 融合的 MSCs，分别加入 Ad-FGFR3 及 Ad-GFP 上清各 1 ml（2×10^7 pfu/ml），37 ℃培养 4 h，吸去病毒液后加入正常培养液继续培养。48 h 后，加入 bFGF 20 ng/ml 的培养液刺激培养 48 h。

1.2.3　免疫细胞化学检测　转染腺病毒后的 MSCs 爬片经 bFGF 刺激培养 48 h 后，终止培养。4% 多聚甲醛固定 15 min，进行 Collagen Ⅰ免疫荧光检测。设转染 Ad-GFP 的 MSCs 为对照组，同时设不加一抗的空白对照组。

1.2.4　半定量 RT-PCR 检测 MSCs 转染后 FGFR3、Collagen Ⅰ与 Cbfa Ⅰ表达水平的变化　转染腺病毒后的 MSCs 爬片经 bFGF 刺激培养 48 h 后，按照 Trizol 操作手册提取总 RNA。两步法进行半定量 RT-PCR 扩增 FGFR3、Collagen Ⅰ与 Cbfa Ⅰ，同时设 GAPDH 为内参。反应条件为：94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，3 种基因退火温度分别为 55 ℃、57.5 ℃、57 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，72 ℃ 10 min。

1.2.5　Western blot 检测 FGFR3 与 Cbfa Ⅰ蛋白的表达　提取 Ad-FGFR3 及 Ad-GFP 转染后的 MSCs 总蛋白，考马斯亮蓝吸收曲线测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白转移至 PVDF 膜。经牛血清白蛋白封闭过夜、兔抗鼠 FGFR3、Cbfa Ⅰ与羊抗人的一抗孵育 6 h 及辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h，按照化学发光试剂盒进行化学发光显色。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

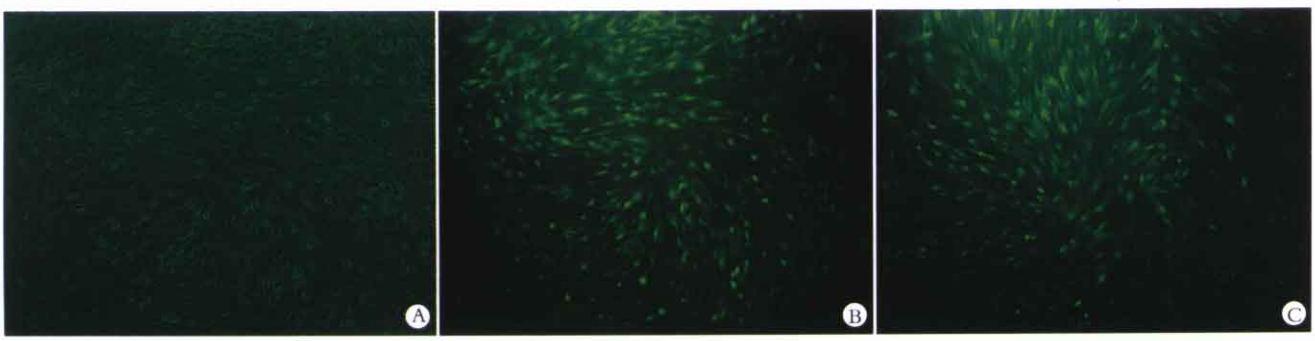
2　结果

2.1　重组腺病毒扩增

正常 HEK293 细胞呈多边形，在感染重组腺病毒 12 h 即出现形态变化，细胞体收缩、变圆，至第 3 天即出现细胞大面积变圆回缩、脱离瓶底部。

2.2　MSCs 转染重组腺病毒的特点

正常的 MSCs 呈梭形或纺锤形，感染重组腺病毒（2×10^9 pfu/ml）后细胞仍呈长梭形，形态无异常变化（图 1）。

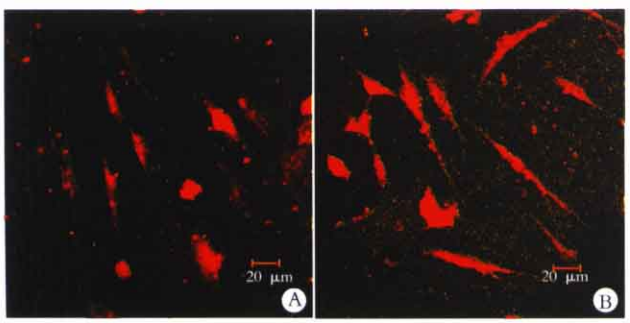


A：转染前；B：Ad-FGFR3 转染 MSCs；C：Ad-GFP 转染 MSCs

图 1　MSCs 转染前后形态变化　（倒置显微镜 ×100）

2.3　免疫细胞化学检测

Ad-FGFR3 及 Ad-GFP 转染后的 MSCs，经免疫荧光染色后，在荧光显微镜下可观察到 Ad-FGFR3 转染组细胞有较强的红色荧光，而转染 Ad-GFP 的对照组仅有较弱的红色荧光（图 2）。

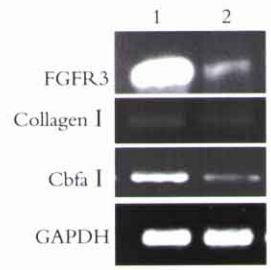


A：Ad-GFP 转染 MSCs；B：Ad-FGFR3 转染 MSCs

图 2　免疫荧光检测 Collagen Ⅰ的表达　（免疫荧光 ×200）

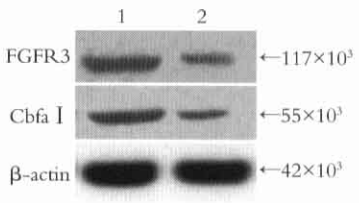
2.4　FGFR3、Collagen Ⅰ与 Cbfa Ⅰ mRNA 与蛋白的表达

RT-PCR 产物电泳显示，转染重组腺病毒 Ad-FGFR3 的 MSCs FGFR3、Collagen Ⅰ与 Cbfa Ⅰ mRNA 的表达显著增高（$P < 0.05$）（图 3）。Western blot 蛋白印迹法显示转染 Ad-FGFR3 组细胞 FGFR3 与 Cbfa Ⅰ的表达明显增高（$P < 0.05$）（图 4）。



1：Ad-FGFR3；2：Ad-GFP

图 3　半定量 RT-PCR 检测 FGFR3、Collagen Ⅰ与 Cbfa Ⅰ mRNA 表达



1:Ad-FGFR3; 2:Ad-GFP

图4 Westernblot 检测 FGFR3 与 Cbfa Ⅰ 蛋白的表达

3 讨论

成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3)属于酪氨酸激酶家族成员,广泛参与细胞的生长、分化、迁移、血管生成及伤口的愈合的多种生理、病理过程并发挥重要作用[1]。FGFR3是机体长骨生长、骨骼发育的重要调节因子之一,其基因突变或缺失可导致严重的肢体畸形,骨骼发育不良[3]。大量实验证实FGFR3功能增强型点突变可导致侏儒症,其中包括季肋发育不全、软骨发育不全及致死性软骨发育不良等疾病[4,5]。目前,尽管有诸多的研究显示FGFR3在骨骼发育中的重要性,但均集中于软骨细胞分化调控研究,而关于FGFR3在成骨细胞分化中作用的研究极少。Valverde-Franco等[6]发现FGFR3基因敲除小鼠的骨皮质变薄,比正常小鼠更易于骨折,且MSCs体外成骨能力下降。关于FGFR3相对特异性配体FGF2、FGF9、FGF18的研究亦表明,FGF9或FGF18基因敲除小鼠胚胎发育中期出现钙化延迟[7,8];FGF2基因敲除小鼠成年后可出现小梁骨量的下降,体外分离培养其MSCs,发现其矿化能力显著下降[9]。提示FGFR3在成骨细胞分化过程中起着重要的调节作用。

骨骼形成或修复时其细胞主要来源于骨膜、骨髓及周围其他组织的干细胞,其中MSCs是骨骼发育形成和骨缺损修复中成骨细胞分化的主要细胞来源。MSCs是体内一类具有多向分化潜能的干细胞,来源丰富,取材方便,增殖能力强,可进行基因修饰,因而是临床实验中骨缺损修复治疗或组织工程中首选的种子细胞。本实验中,我们将外源基因FGFR3成功转染入MSCs,并获得较高水平的表达。

Cbfa Ⅰ是成骨细胞特异性转录因子,其对MSCs向成骨细胞分化起着决定性的作用[10]。可上调成骨细胞标志基因的表达。Ducy等[11]研究证实小鼠颅骨来源的非分化细胞MC3T3E-1,瞬时转染Cbfa Ⅰ即可明显上调Ⅰ型胶原(Collagen Ⅰ)、骨钙素、OPN等基因的表达。Piccolo等[12]通过观察BMP-2和BMP-7对C3H10T1/2的促成骨分化作用,发现在成骨细胞特异性基因表达前,首先表达Cbfa Ⅰ,认为Cbfa Ⅰ发挥了成骨细胞分化的开关作用。Ⅰ型胶原是矿化的骨组织中唯一类型的胶原,占矿化基质的90%以上,是钙盐沉积和细胞附着的支架,是成骨细胞成熟和矿化功能实现的前提条件,Collagen Ⅰ表达的高低直接影响成骨细胞的矿化功能。本研究中转染后的相关成骨基因Collagen Ⅰ与Cbfa Ⅰ mRNA和蛋白检测分析结果均显示较对照组显著增高,说明FGFR3可通过调节Collagen Ⅰ与Cbfa Ⅰ的表达,调控MSCs向成骨细胞分化;Collagen Ⅰ表达的增高提示FGFR3不仅可能参与成骨细胞分化的调控,还可能参与成骨细胞成熟与矿化的调控。

参考文献:

[1] Ornitz D M, Marie P J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease[J]. Genes Dev, 2002, 16(12): 1446-1465.

[2] Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth[J]. Cell, 1996, 84(6): 911-921.

[3] Cohen M M, Jr.. Achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia: clinically related skeletal dysplasias that are also related at the molecular level[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 1998, 27(6): 451-455.

[4] Chen L, Adar R, Yang X, *et al*. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis[J]. J Clin Invest, 1999,104(11): 1517-1525.

[5] 杨启红, 陈 林, 朱京慈. 小鼠胫骨骨折愈合中FGFR3基因表达的原位定位[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1220-1222.

[6] Valverde-Franco G, Liu H, Davidson D, *et al*. Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3 -/- mice[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(3):271-284.

[7] Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, *et al*. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis[J]. Genes Dev, 2002, 16(7): 870-879.

[8] Colvin J S, Feldman B, Nadeau J H, *et al*. Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene[J]. Dev Dyn, 1999, 216(1): 72-88.

[9] Montero A, Okada Y, Tomita M, *et al*. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation[J]. J Clin Invest, 2000, 105(8): 1085-1093.

[10] Tou L, Quibria N, Alexander J M. Regulation of human cbfa1 gene transcription in osteoblasts by selective estrogen receptor modulators (SERMs)[J]. Mol Cell Endocrinol, 2001, 183(1-2): 71-79.

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

[12] Piccolo S, Agius E, Leyns L, *et al*. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals[J]. Nature, 1999, 397(6721): 707-710.

(编辑 张大春)