文章编号:1000-5404(2009)05-0383-04

论著

Cad-Ⅱ基因转染的hMSCs在异种骨基质材料上的粘附和增殖研究

向 强[1],邓聪颖[2],陈庆海[3],郭国宁[3],张 远[1],郑文杰[1],周 跃[1] (第三军医大学:[1]新桥医院骨科,重庆 400037,[3]西南医院急救部,重庆 400038;[2]解放军324医院神经外科,重庆 400020)

摘 要:目的 探讨经Cad-Ⅱ(OB-Cadherin,成骨细胞特异性钙粘蛋白)基因转染的人骨髓间充质干细胞(human marrow mesenchymal stem cells,hMSCs)在骨基质材料上的粘附性和增殖情况。**方法** 将脂质体介导的Cad-Ⅱ cDNA转染体外分离培养的hMSCs,再将已转染和未转染的hMSCs分为实验组和对照组,分别与异种冻干脱钙骨基质材料复合体外构建组织工程骨,通过相差显微镜、扫描电镜及MTT检测对比观察两组细胞在材料上的黏附和增殖情况。**结果** 2组细胞均能在骨基质材料上粘附、伸展、增殖,其中增殖情况无明显差异($P>0.05$),但Cad-Ⅱ基因转染组的上架细胞数和上架率(84.5%),显著高于未转染组(71.7%),差异显著($P<0.05$)。**结论** Cad-Ⅱ基因转染能提高种子细胞在支架材料上的粘附性,但对细胞增殖无影响。

关键词: Cad-Ⅱ; 基因转染; 粘附
中图法分类号: R318.08; R322.71; R329.28 **文献标识码:** A

Adhesion and proliferation of Cad-Ⅱ-transfected human marrow mesenchymal stem cells cultured on xenogeneic demineralized bone matrix

XIANG Qiang[1], DENG Cong-ying[2], CHEN Qing-hai[3], GUO Guo-ning[3], ZHANG Yuan[1], ZHENG Wen-jie[1], ZHOU Yue[1] ([1]Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Neurosurgery, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020; [3]Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of Cad-Ⅱ gene (OB-Cadherin) transfection on the adhesion and proliferation of human marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) cultured on xenogeneic demineralized bone matrix. **Methods** The Cad-Ⅱ gene was transfected into hMSCs, and those without transfection served as control group. Then they were seeded onto the xenogeneic demineralized bone matrix respectively and cocultured *in vitro*. The densities of seeded cells and adhesion rate was measured, the adhesion with bone matrix complex was also observed by contrast microscopy and electron scanning microscopy. And the cell proliferation was measured with MTT method. **Results** The 2 groups of hMSCs adhered to the surface and inner walls of bone matrix, and spread extensively, with no significant difference in cell proliferation between them. But in the transfection group there were more adhesion cells on the scaffolds, and the adhesion rate (84.5%) was significantly higher than that in control group (71.7%, $P<0.05$). **Conclusion** The Cad-Ⅱ gene transfection may enhance the seeded cells adhesion to scaffolds, but has no obvious effect on cell proliferation.

Key words: Cad-Ⅱ; gene transfection; adhesion

Cad-Ⅱ属Ⅱ型钙粘附蛋白,近年来研究表明其在介导细胞粘附中发挥重要作用,并与胚胎肢节形成和骨组织的形成密切相关[1]。但Cad-Ⅱ是否有助于骨种子细胞在支架材料上的粘附和增殖,尚不清楚,本研究将Cad-Ⅱ基因转染人骨髓间充质干细胞(human marrow mesenchymal stem cells,hMSCs),观测了基因修饰的hMSC在骨基质材料上的粘附和增殖情况,为通过种子细胞的基因改建解决细胞-材料粘附难题提供了初步实验依据。

基金项目:国家自然科学基金(30700892,30572166);重庆市自然科学基金(CSTC,2007BB5058)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700892, 30572166) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5058)

作者简介:向 强,男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事骨组织损伤的重建修复方面的研究,现在西南医院急救部工作。E-mail:xqiang163@163.com
通信作者:周 跃,E-mail:happyzhou@vip.163.com

收稿日期:2008-06-27;修回日期:2008-07-29

1 材料与方法

1.1 材料

含人Cad-Ⅱ cDNA片段的pGCad-1质粒(带有GFP绿色荧

光标志）由武汉晶赛生物科技公司合成（GenBank 序列号：nm001797）；Percoll 细胞分离液（天津 TBD 公司），优等胎牛血清（Hyclone 公司），DMEM 培养基、地塞米松、β2 甘油磷酸钠、维生素 C、胰蛋白酶、EDTA（Sigma 公司），胰蛋白酶（Sigma）；Lipofectin-2000（Sigma）；鼠抗人 Cad-Ⅱ一抗（Sigma）、羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶标记二抗（Santa Cruz）；考马斯亮蓝 R-250（Sigma）；醋酸纤维膜（Pharmacia）；化学发光增强试剂盒（Pierce），成年日本大耳白兔购于第三军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 异种脱钙骨基质的制备 取日本大耳白兔椎体松质骨，制成 0.6 cm×0.6 cm×0.3 cm 全松质骨骨片，按 Urist 等[2]的方法经脱脂、去抗原、脱钙、冻干后，^{60}Co 消毒制成脱钙骨基质材料。取部分样本作扫描电镜观察。使用前将材料用 0.01 mol/L PBS 液反复漂洗，再用含 10% 优质胎牛血清培养液浸泡 12 h，甩干后备用。

1.2.2 hMSCs 的原代培养 参照文献[3]的方法，从健康男性志愿者（$n=5$）髂前上棘处取材，骨穿成功后骨髓注入 DMEM 培养液中，把细胞悬液缓慢加入密度 1.073 Percoll 分离液液面上，离心（2 000 r/min×20 min），吸取中间交界面细胞，DMEM 培养液洗涤 2 次（1 500 r/min×5 min），加入 DMEM 低糖完全培养液（含 10% 优胎血清、青霉素钠 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml），以 $2\times10^5/cm^2$ 的密度接种，48 h 首次换液，以后每 3 天换液 1 次。孵箱内 37 ℃、5% CO_2 的空气、饱和湿度条件下培养。

1.2.3 细胞转染 转染前 1 d 用含 10 % 胎牛血清（fetal calf serum，FCS）的 DMEM 调整原代培养的 hMSCs 浓度至 $3\times10^5\ ml^{-1}$，在 6 孔板中每孔加入细胞悬液 1 ml，37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下培养 24 h，至细胞长成单层，70% ~80% 融合；按 Lipofectin 2000 转染说明书将整合有 Cad-Ⅱ基因的 pGCad-1 质粒与其形成转染复合物。将已形成的转染复合物与 hMSCs 混合，吸出转染液，加入含 10 % FCS 的 DMEM 继续培养。在已建立的培养条件下孵育 24 h 后，荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达，检测转染效率。

1.2.4 荧光显微镜检测转染率 转染组 hMSCs 培养 24 h 后在波长为 488 nm 的荧光显微镜下和波长 488 nm 的激光共聚焦显微镜下观察细胞绿色荧光产生情况。记录每个转染细胞培养孔四周和中央 5 个视野内所观察到的细胞数，并计算转染率。

$$转染效率(\%)=\frac{发出绿色荧光的细胞数}{可见光下总细胞数}\times100\%$$

1.2.5 转染后 hMSCs 的干细胞特性鉴定 把转染后的 hMSCs进行了多向诱导培养鉴定，分别进行了向成骨细胞方向转化鉴定（碱性磷酸酶染色，钴钙法），向成软骨细胞方向转化鉴定（HE 染色和甲苯胺蓝染色）及向成脂肪细胞方向转化的鉴定（苏丹 IV 脂肪染色）。

1.2.6 Western blot 检测 hMSCs Cad-Ⅱ蛋白水平的表达 取转染组和对照组培养 14 d 的 hMSCs，每组细胞各取 5×10^6，RIPA 法抽提总蛋白，Bradford 法定量，各取 45 μg 总蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至膜，再用鼠兔抗人 Cad-Ⅱ抗体（1∶1 500）杂交，洗膜后再与生物素化的羊抗鼠 IgG（1∶1 500）结合，ECL 显色，曝光显影成像。

1.2.7 细胞-支架材料复合 选 Cad-Ⅱ转染 48 h 后的细胞和同期培养的对照组细胞，调整细胞密度为 $1\times10^6\ ml^{-1}$ 的细胞悬液，将细胞悬液以 0.05 ml/块滴入备用的 0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm 大小的脱钙骨基质中，每组各 15 片，充分渗入后，在37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下静置 5 h，再加入培养液继续培养。

1.2.8 细胞增殖的研究 于培养 1、3、5、7、9 d 后向转染组和对照组分别加入 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3 min，然后加入含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 终止消化。500×g 离心 10 min，每管重新加入 DMEM 培养液 200 μl，接种至 96 孔培养板。每组 5 孔，每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μl，37℃孵育 4 h。在酶联免疫检测仪上测波长 490 nm 处每孔光密度值[D(490)]，并绘制生长曲线。

1.2.9 细胞在骨基质材料上粘附的研究 接种 24 h 后，将细胞支架复合物取出用 0.01 mol/L 的 PBS 轻轻漂洗 1 遍后置于新的培养板中培养，对未上架的细胞计数，计算细胞的上架率和上架细胞数。并在复合后 1、7、14 d 取材，部分以 10% 中性甲醛液固定，石蜡包埋、切片，HE 染色，光镜观察。部分样本以 3% 戊二醛溶液固定，于我校电镜中心作扫描电镜观察。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件包，组间比较采用方差分析及独立样本 t 检验。

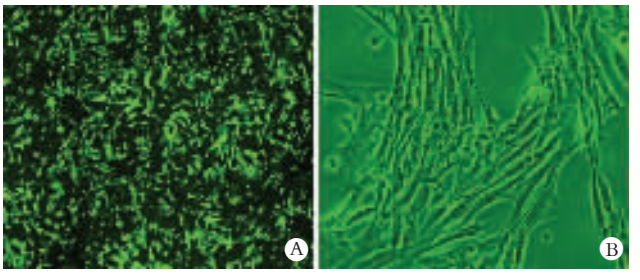
2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察

原代培养：24 h 有个别细胞贴壁，稍微变化，48 h 有极少数细胞贴壁呈成纤维样细胞，主要为长条索状，少数为多角形，以后细胞呈克隆样生长。血细胞因不贴壁而随换液逐渐清除。12 ~14 d 单层细胞长满瓶底。传代培养：2 h 细胞开始贴壁变形，24 h 基本完成贴壁，6 d 长满瓶底，若继续培养则某些局部细胞可复层生长成团。

2.2 转染效率判定

hMSCs 转染后 24 h，在荧光显微镜下可见绝大部分细胞内存在明亮的绿色荧光（图 1A），提示细胞转染成功，转染率超过 90%。可见光下转染的 hMSCs 同未转染细胞相比，转染后初始有部分细胞呈皱缩表现，由纺锤状或梭状变为球状，少量表现为核固缩、碎裂、死亡（图 1B）。



A：荧光显微镜（×100）；B：可见光观察（×400）

图 1 转染 pGCad-1 质粒的 hMSCs 形态观察

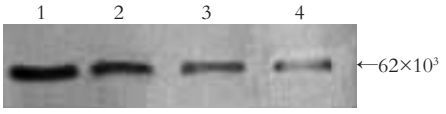
2.3 转染后 hMSCs 的干细胞特性鉴定

转染后的 hMSCs 细胞仍保持未分化状态，经诱导后可向成骨、成软骨和成脂肪转化，间接证实了转染后的 hMSCs 具有多向分化潜能，仍旧保留了干细胞特性。

2.4 Western blot 检测 Cad-Ⅱ蛋白表达

转染组与对照组都有 Cad-Ⅱ蛋白条带的出现，转染组 Cad-

Ⅱ蛋白的表达(IOD 值为 0.3413 ±0.0137),与对照组 Cad-Ⅱ的表达(IOD 值为 0.6152 ±0.0143)相比差异显著($P<0.05$),提示转染组 Cad-Ⅱ蛋白表达量明显高于对照组(图 2)。



1、2:转染组;3、4:对照组

图 2　培养 hMSCs Cad-Ⅱ蛋白的 Western blot 检测

2.5　细胞增殖情况

MTT 检测经方差分析, Cad-Ⅱ转染组与对照组各自的细胞总数在测定时间内随培养时间的增加而增大,各检测时间点之间有显著性差异($P<0.05$),而在相应时相点, Cad-Ⅱ转染组与对照组之间相比,细胞增殖能力无显著差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1　2 组细胞不同培养时间增殖情况[$D(490), n=5, \bar{x}\pm s$]

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
对照组	0.193 ±0.057	0.237 ±0.072	0.275 ±0.041	0.314 ±0.063	0.327 ±0.059
转染组	0.189 ±0.061[a]	0.241 ±0.054[a]	0.283 ±0.059[a]	0.299 ±0.047[a]	0.315 ±0.063[a]

a: $P<0.05$, 与对照组比较

2.6　细胞粘附情况

2.6.1　细胞上架率　　对照组细胞上架率低,为 35.56% ± 1.75%, Cad-Ⅱ转染组细胞上架率稳定在 80% 以上,明显高于对照组($P<0.01$)。

2.6.2　细胞上架数量　　从细胞上架的绝对数量来说,对照组的上架细胞数低,每块材料上的细胞不足 2.7×10^4。Cad-Ⅱ转染组上架细胞的数量非常显著地高于对照组($P<0.01$),每块材料上的细胞可高达 5.0×10^5。

2.6.3　光镜观察　　复合培养 7 d 后,HE 染色结果显示,对照组 hMSCs 在材料上分布不均、细胞较少;在 Cad-Ⅱ转染组,HE 染色结果显示,细胞较多,分布较均匀,呈椭圆形或长梭形(图 3)。

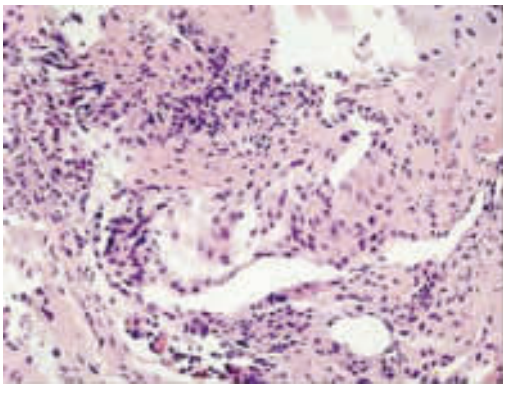


图 3　Cad-Ⅱ转染组复合培养 7d 后 hMSCs 光镜观察结果　(HE ×200)

2.6.4　扫描电镜观察　　复合培养 24 h 观察,对照组 hMSCs 在支架上分布不均、细胞较少;Cad-Ⅱ转染组细胞较多,且分布均匀,支架表面及内部的孔壁均有大量形态为圆形、椭圆形或长梭形的细胞生长。培养 7 d 后转染组可见部分细胞分泌较多基质将骨基质材料的网孔铺满,大量细胞在支架材料上呈成簇状分布(图 4)。

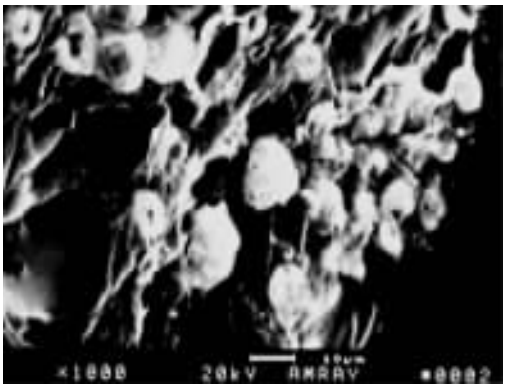


图 4　转染组复合培养 14 d hMSCs 电镜观察结果　(SEM ×1 000)

3　讨论

足够数量种子细胞在支架材料上的特异性粘附是其获得良好生物活性的首要条件,也是构建的组织工程骨在体内成骨的保证[4]。为解决细胞-材料的粘附难题,目前研究主要集中于应用物理或化学的方法在材料上接上粘附性蛋白或多肽进行生物改性,而对于种子细胞自身基因改建促粘附的研究较少[5,6]。随着基因工程技术的发展,通过基因改建增进种子细胞的粘附性,有望成为解决种子细胞和材料粘附难题的新途径。

我们在前期研究中,利用原核表达体系产生的 Cad-Ⅱ蛋白涂布脱细胞骨基质材料,发现可以促进 MSCs 在材料的粘附,而且经过精确设计、制备的材料表面会对细胞产生特异的选择性吸附作用,同时 ALP 活性和骨钙素产量检测显示干细胞成骨分化能力增强。近期也有学者进行了 Cad-Ⅱ连接和粘附特性的精确亚结构域结构的研究。Pittet 等[7]利用 X 线衍射晶体分析法确定了 Cad-Ⅱ的胞外重复序列 1(EC1)编码蛋白决定着粘附的相互作用。人成骨细胞持续表达 Cad-Ⅱ,MC3T3-E1 细胞与支架材料复合培养 7 d 后, Cad-Ⅱ上调,同时 ALP 活性上升。二者同时上升提示在成骨细胞分化期二者具有协调性表达机制,或者细胞-细胞,细胞 - 材料的粘附是通过钙粘附蛋白增强细胞成熟信号来激活 ALP 表达。成骨细胞分化中存在着 Cad-Ⅱ与其他钙粘附蛋白的协同和/或转换,Cad-Ⅱ介导的细胞粘附相互作用是除了转录调控外,周围细胞外环境调控的重要形式[8]。

这些研究表明 Cad-Ⅱ蛋白的表达与种子细胞在支架材料上的粘附和成骨分化有紧密联系,我们猜想提高种子细胞 Cad-Ⅱ蛋白的表达,可能会促进细胞在材料上的粘附。与临床应用相联系,实验中我们选用了 hMSCs 作为基因转染的靶细胞,将整合有 Cad-Ⅱ基因的 pGCad-1 质粒通过脂质体介导转入培养的 hMSCs 中,并证实了转染后的 hMSCs 仍旧保留了干细胞特性。14 d 后 Western blot 检测显示转染组细胞 Cad-Ⅱ

蛋白的表达显著高于对照组,一方面说明通过基因转染提高目的基因在种子细胞的表达是可行的,另一方面 Cad-Ⅱ蛋白在对照组中的检出证实了 Cad-Ⅱ基因在 hMSCs 中发挥着作用。我们采用了自制的异种冻干脱钙骨基质与种子细胞复合构建组织工程骨,结果显示 2 组细胞都能在材料上粘附、伸展和增殖,其中 Cad-Ⅱ转染组每块材料上的细胞可达 5.0×10^5,细胞上架率稳定,平均达 84.5%,都显著高于对照组。对比 2 组间的细胞增殖情况,并无显著差异。实验结果证明了通过基因转染提高种子细胞 Cad-Ⅱ蛋白的表达可促进细胞在支架材料上的粘附,但对细胞增殖无影响。

本实验证实了提高 Cad-Ⅱ蛋白的表达可促进骨种子细胞在支架材料上的粘附,为通过种子细胞基因改建解决细胞-材料的粘附难题提供了初步试验依据,再结合对支架材料表面的生物、化学改性等方法可能会取得更好的效果。

参考文献:

[1] Patel SD, Ciatto C, Chen CP, *et al*. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity[J]. Cell, 2006, 124(6):1255 - 1268.

[2] Urist M R, Mikulski A, Boyd S D. A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks[J]. Arch Surg, 1975, 110(4):416 - 428.

[3] 杨 柳,段小军,戴 刚,等. 人间充质干细胞体外成骨诱导培养及其生物学特性变化[J]. 第三军医大学学报,2002,24(5):509 - 512.

[4] Polak J M, Bishop A E. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future[J]. Ann N Y Acad Sci,2006,1068:352 - 366.

[5] 李长文, 郑启新, 郭晓东, 等. RGD 多肽修饰的改性 PLGA 仿生支架材料对骨髓间充质干细胞粘附、增殖及分化影响的研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2006,25(2):142 - 146,157.

[6] Petrie T A, Capadona J R, Reyes C D, *et al*. Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports[J]. Biomaterials,2006,27(31):5459 - 5470.

[7] Pittet P, Lee K, Kulik A J, *et al*. Fibrogenic fibroblasts increase intercellular adhesion strength by reinforcing individual OB-cadherin bonds[J]. J Cell Sci,2007,121(Pt 6):877 - 886.

[8] Richardson S H, Starborg T, Lu Y, *et al*. Tendon development requires regulation of cell condensation and cell shape via cadherin-11-mediated cell-cell junctions[J]. Mol Cell Biol,2007,27(17):6218 - 6228.

(编辑 汪勤俭)

(上接 378 页)

2.3 预防血管痉挛、骨筋膜室综合征及感染等并发症

保持安静,限止探视,治疗处置尽量集中,以减少刺激;严禁病室内吸烟;室温应维持在 22 ~ 25℃,局部给 60 W 或 100 W 灯持续照射,照射距离 30 ~ 40 cm,避免寒冷刺激;做好患者心理护理,消除患者紧张、恐惧、焦虑等心理;术后常规使用自控镇痛泵。抬高伤肢,应用减轻水肿的药物(如 β - 七叶皂甙钠等),有利于静脉及淋巴回流,减轻肢体肿胀,防止骨筋膜室综合征的发生;术后常规应用抗菌素抗感染,监测体温 4 次/d,保持术区敷料清洁干燥,切开减压处伤口渗出多,应每日换药,并严格无菌操作。准确及时的补充血容量,维持血液循环稳定和水、电解质平衡,以预防休克。注意加强营养支持治疗,必要时配合静脉营养。

2.4 功能锻炼

伤者术后因怕痛或担心拉伤血管不愿活动,术后应加强宣教,协助指导患者有计划、循序渐进地进行功能锻炼。鼓励患者早期进行肢体按摩、未固定部位和行远端肢体的关节被动锻炼,2 周后可进行主动功能锻炼。

3 讨论

四肢主干血管损伤是外科较常见的危急重症,如治疗不及时可导致肢体缺血坏死,伤口出血导致休克而危及生命,必须尽早做出诊断[1],及时修复血管,最好在伤后 6 ~ 8 h 内恢复血运[2],可减少肢体坏死率和骨筋膜室综合征的发生率。筋膜间室内的压力增高可引起肌肉缺血和坏死,如肢体缺血时间较长,随着肢体血运的恢复,行预防性切开减压术,可有效的减轻肢体的再灌注损伤[3],在修复血管时,伴行静脉也应尽量一期修复,尤其是下肢,修复后可明显改善肢体的静脉回流,减轻术后肢体肿胀,从而减轻对血管的压迫,改善肢体血供[4]。术后的观察和护理也是保证手术成功的一个非常重要的环节。术后骨筋膜室综合征、感染、休克等并发症的发生均可导致手术失败,甚至危急生命。故术后严密观察伤肢的血供情况及全身的监测是术后护理的关键,做到及早发现,及早预防,及时报告,及时处理治疗,以挽救生命和降低致残率;术后严密观察全身情况及伤口出血情况,并对伤口渗血应有充分估计,全身低血压将直接影响吻合血管,导致手术失败,甚至截肢[5];定期监测血常规、电解质、肾功能等;术后功能锻炼有助于伤肢功能的恢复。本组 32 例,未发生护理并发症,有 30 例肢体成活,功能恢复良好。其中有 3 例通过密切观察,及早发现筋膜间压增高,及时行切开减压术,后经治疗和护理,伤者肢体成活,而另有 2 例术中即切开减压,因受伤时间长(均超过 17 h),肌肉软组织坏死多,通过监测及时发现肾功能减退,并予积极的处理,挽救了伤者生命,但肢体无法保留,给予截肢。

关键词: 四肢主干血管损伤;血管吻合术;护理
中图法分类号: R654.3 **文献标识码:** B

参考文献:

[1] 王亦聪. 骨与关节损伤[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:415 - 430.

[2] 温术民,宁志文,李成林, 等. 胫骨上段骨折合并腘动脉分叉附近损伤的临床治疗[J]. 中华创伤杂志,2005, 21(4):302 - 304.

[3] 汪群力,王钢. 肢体缺血再灌注损伤的治疗进展[J]. 中华骨科杂志, 2002, 22(10):638 - 640.

[4] 刘权溢, 岑海洋. 大隐静脉移植在修复四肢主干血管缺损中的应用[J]. 中华显微外科杂志, 2004, 27(2):151 - 152.

[5] 李俊明, 郑水长, 张云飞, 等. 四肢主干血管损伤的诊治[J]. 中国修复重建外科杂志,2008, 22(5):575 - 577.

(编辑 栾 嘉)