论著

文章编号:1000-5404(2014)02-0098-07

不同剂量 TGF-β1 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中的作用

李锐冬[1],邓忠良[1],张亚梅[2],汪 洋[1],尹良军[1],陈 亮[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:骨科[1],麻醉科[2])

[摘要] **目的** 分析联合应用不同剂量 TGF-β1 对 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化过程的影响,寻找最佳的促进 BMP9 成骨的 TGF-β1 剂量,为联合不同细胞因子促进组织工程骨再生寻找有效途径。**方法** 应用鼠间充质干细胞株 C3H10T1/2,以重组腺病毒法将其导入 BMP9,再分别施加0、5、10、20 ng/mL TGF-β1 蛋白处理,建立 BMP9 联合 TGF-β1 诱导间充质干细胞成骨分化模型。条件培养基法获取含活性良好的 TGF-β1 蛋白上清液;改良 SEAP 化学发光法和组织化学染色法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)表达及活性;茜素红 S 染色检测钙盐沉积;实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法分别检测成骨相关基因Ⅰ型胶原(collagen Ⅰ,COLⅠ)、骨桥素(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OCN)的 mRNA 转录表达水平和蛋白表达水平改变;流式细胞仪检测细胞周期;台盼蓝拒染法计数活细胞监测细胞增殖。**结果** 5 ng/mL TGF-β1 与 BMP9 联合处理较 BMP9 单独处理能更早、更多地提高 ALP 活性和引起钙盐沉积,持续处理17 d后钙盐沉积结果不再显示明显差异,TGF-β1 单独处理与对照组间无明显差异。随 TGF-β1 剂量增加,ALP 活性和钙盐沉积效应受到抑制。5 ng/mL TGF-β1 与 BMP9 联合处理较 BMP9 单独处理使 COLⅠ、OPN、OCN 的 mRNA 转录水平和蛋白表达水平明显增高,COLⅠ增高变化发生较早和显著;TGF-β1 应用剂量达到 20 ng/mL 出现基因转录和蛋白表达受到抑制,但 COLⅠ升高趋势仍能维持。BMP9 促进细胞增殖,TGF-β1 对该效应起抑制作用,细胞周期转化表现 G_0/G_1 期阻滞。**结论** 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中,适量的 TGF-β1 联合应用具有促进作用;BMP9 与 TGF-β1 在诱导成骨分化中可能存在协同作用关系。

[关键词] 骨形成蛋白9;转化成因子β1;间充质干细胞;成骨分化

[中图法分类号] R322.71;R329.21;R341 [文献标志码] A

Effects of different concentrations of TGF-β1 on BMP9-induced osteogenesis in mesenchymal stem cells

Li Ruidong[1], Deng Zhongliang[1], Zhang Yamei[2], Wang Yang[1], Yin Liangjun[1], Chen Liang[1] ([1]Department of Orthopaedics, [2]Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** The effectiveness of bone morphogenetic protein 9 (BMP9)-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) in combination with transforming growth factor-β1 (TGF-β1) is investigated to find the optimal concentration of TGF-β1 for bone regeneration of tissue engineering. **Methods** Mouse MSC C3H10T1/2 cell line was used to construct the osteogenic differentiation cell model by the steps of transfection of recombinant adenovirus with BMP9 and stimulation with different concentrations of TGF-β1 protein(0, 5, 10, and 20 ng/mL). Alkaline phosphatase (ALP) activity was assayed by the modified SEAP chemoluminescence assay and histochemical staining assay. Alizarin Red S staining was used for matrix mineralization. Real-time PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of collagen type Ⅰ (COL Ⅰ), osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN). Viable cell counting with trypan blue staining was used to detect cell proliferation and flow cytometry to test cell cycle. **Results** It was found that BMP9 combined with 5 ng/mL TGF-β1 produced higher ALP activity and more matrix mineralization at earlier period as compared to single BMP9 treatment group. Matrix mineralization had no significant difference after 17 days's treatment. Meanwhile, TGF-β1 alone had no difference with control group. BMP9 combined with higher concentration TGF-β1 inhibited ALP activity and matrix mineralization in a dose-dependent manner. In real-time

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272005,31000434)

[通信作者] 邓忠良,E-mail: deng7586@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131029.1723.010.html(2013-10-29)

PCR and Western blot results, BMP9 combined with 5 ng/mL TGF-β1 increased mRNA transcription and protein expression of COL Ⅰ, OPN and OCN. COL Ⅰ expression increase was observed earlier and more significant. TGF-β1 of 20 ng/mL combined with BMP9 decreased the expression of OPN and OCN but COL Ⅰ. TGF-β1 inhibited the proliferation of MSCs during the BMP9-induced osteogenic differentiation and arrested the cells in G_0/G_1 phase. **Conclusion** Suitable concentration of TGF-β1 can promote BMP9-induced osteogenic differentiation of MSCs. TGF-β1 and BMP9 may have synergistic effect.

[**Key words**] bone morphogenetic proteins; transforming growth factor-β1; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

Supported by the General Programs of National Natural Science Foundation of China (81272005, 31000434). Corresponding author: Deng Zhongliang, E-mail: deng7586@gmail.com

目前骨组织工程实验研究思路主要从成骨支架、成骨种子细胞和调控成骨分化的细胞因子三方面着手,提高对缺损、创伤部位进行骨组织工程修复的效果。如何恰当使用各种细胞因子诱导调控成骨种子细胞向成骨方向分化以用于骨再生、骨重建是当前研究的重点。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是目前最有希望在临床广泛使用的组织工程种子细胞[1]。C3H10T1/2 细胞是间充质干细胞类在成骨诱导分化中最具有代表性的实验细胞株[2]。骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)属于转化生长因子(transforming growth factor-β, TGF-β)超家族成员,众多 BMP 分子在诱导骨发生、形成和修复中具有特定作用,能异位诱导成骨。BMP9 是近期研究发现成骨诱导能力最强的细胞因子之一[3],其诱导干细胞成骨的作用强于目前该领域应用的 BMP2、BMP7。TGF-β1 是细胞和组织中最丰富的 TGF-β 成员,是骨组织细胞的重要生长调节因子。其作为细胞的生长调节因子,可能存在协同 BMP9 诱导成骨作用,但作用方式有待阐明。本研究以 BMP9 定向诱导鼠间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化[4],联合施加不同浓度的 TGF-β1,建立成骨分化模型。观察 TGF-β1 对 BMP9 诱导成骨分化中Ⅰ型胶原(collagen Ⅰ, COL Ⅰ)、非胶原骨基质蛋白骨桥素(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OCN)和矿化过程形成的影响,以及细胞周期转化、细胞增殖的改变,探讨不同剂量 TGF-β1 在 BMP9 诱导成骨分化中的作用,为联合应用细胞因子诱导成骨提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

BMP9、TGF-β1 重组腺病毒和 GFP 空载腺病毒由美国芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠,人胚肾 HEK293、鼠间充质干细胞株 C3H10T1/2、人结肠癌 HCT116 细胞株均购自美国模式菌种保藏中心(ATCC),DMEM 高糖培养基、MEM/EBSS 培养基购自美国 Hyclone 公司,BME 培养基、优质新生胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司。RNA 提取试剂盒、Real time PCR 试剂盒、dNTP、RNA 酶抑制剂和随机引物购自 TaKaRa 公司,M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司,碱性磷酸酶(ALP)染色及定量检测试剂盒购自 BD 公司,茜素红 S(Alizerin Red S)、维生素 C 和 b-甘油磷酸钠购自 Sigma 公司,TGF-β1 Elisa 试剂盒购自美国 RD 公司,鼠 OPN 单克隆抗体、羊 COL Ⅰ多克隆抗体和羊 OCN 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,Real time PCR 引物由上海生物工程公司合成,其余为进口分装或国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 细胞常规复苏、接种和传代培养。所用培养基含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 硫酸链霉素。HEK293 细胞培养采用 DMEM 高糖培养基,应用于 BMP9 腺病毒扩增;HCT116 细胞培养采用 MEM/EBSS 培养基,应用于 TGF-β1 蛋白条件培养基制备;C3H10T1/2 细胞培养采用 BME 培养基,应用于成骨分化模型建立。C3H10T1/2 细胞培养进入对数生长期(融合度 50%)后,施加处理至各实验方法对应的时间点用于进行实验指标检测,换液维持处理浓度,对照组平行处理。

实验分组:①BMP 单独处理(BMP)组:向 C3H10T1/2 细胞加入预先制备的 BMP9 腺病毒[5],感染效率 30%,8 h 后更换 BME 培养基。②BMP9 + TGF-β1 联合处理组,包括 TGF-β1 低浓度组(5 ng/mL)、中浓度组(10 ng/mL)、高浓度组(20 ng/mL)分别命名为 BT5、BT10、BT20 组:向 C3H10T1/2 细胞加入预先制备的 BMP9 腺病毒(感染效率 30%),8 h 后更换 BME 培养基,加入 TGF-β1 蛋白条件培养基达终浓度。③TGF-β1 单独处理组(TGF):向 C3H10T1/2 细胞加入预先制备的 TGF-β1 蛋白条件培养基达终浓度。④空载腺病毒阴性对照(GFP)组:向 C3H10T1/2 加入预先制备的 GFP 腺病毒,感染效率 30%,8 h 后更换 BME 培养基。成骨早期指标 ALP 检测和成骨晚期指标钙盐沉积实验证实 TGF-β1 单独处理组对间充质干细胞 C3H10T1/2 无独立的定向成骨的诱导效应,实验分组设计可以简化成为 3 组:①BMP 单独处理组;②BMP9 与 TGF-β1 联合处理组;③GFP 组。

1.2.2 条件培养基制备及鉴定 接种人结肠癌细胞 HCT116 至培养皿,待细胞贴壁细胞融合度达 80% 后,加入 TGF-β1 腺病毒,感染效率 70%,感染 8 h 后更换为 BME 常规培

养基,48 h后收取上清液,用TGF-β1 ELISA试剂盒以双抗体夹心法测定上清液内TGF-β1蛋白浓度[6]。所获条件培养基TGF-β1蛋白浓度水平约为30 ng/mL,使用时按需调整浓度。

1.2.3 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性及染色检测 按3×10^4/孔接种C3H10T1/2细胞至24孔板,按实验设计分组处理培养至第1、5、9天,弃去培养基。活性检测:裂解细胞,离心取上清,加入ALP底物缓冲液混匀,室温避光30 min,化学发光法检测,用BCA法检测细胞内总蛋白含量进行校正。染色观察:使用0.1 mg/mL napthol AS-MX phosphate和0.6 mg/mL Fast Blue BB salt混合液进行染色,室温避光30 min后光镜下观察。

1.2.4 钙盐沉积实验 培养基中加入终浓度为50 μg/mL的维生素C和10 mmol/L的β-磷酸甘油。按3×10^4/孔接种C3H10T1/2细胞于24孔板,按实验设计分组处理培养至第5、9、13、17天,进行茜素红S染色:弃去培养基上清并以PBS清洗,戊二醛固定后经ddH_2O清洗,加入0.4%茜素红S,光镜下观察监测,待出现红色物质堆积时(约5 min),弃去染液,ddH_2O终止反应和洗涤,光镜下观察。

1.2.5 实时荧光定量PCR检测成骨相关基因mRNA转录表达 常规接种培养C3H10T1/2细胞于T-25细胞培养瓶,细胞融合度达50%后,分组处理,培养至第1、5、9、13天进行检测。采用Trizol法提取细胞总RNA,测定浓度和纯度,按逆转录试剂盒说明书取2 μg总RNA行逆转录反应。实时荧光定量PCR检测成骨相关基因COLⅠ、OPN和OCN的转录表达,以β-actin基因作为内参照。反应体系为SYBR Green mix 12.5 μL、ddH_2O 8 μL、上下游引物各1 μL、cDNA 2.5 μL,共25 μL。各样本在扩增效率一致的情况下用比较Ct法($\Delta\Delta$Ct)测定平均相对含量。以$2^{-\Delta\Delta Ct}$值表示各基因相对表达量,数据取3次重复的平均值。所用引物序列见表1。

表1 COLⅠ、OPN、OCN和β-actin的qPCR引物

基因	上游引物(5′→3′)	下游引物(5′→3′)	片段长度(bp)
COLⅠ	AGCGAAGAACTCATACAGCCG	TGCCCGTCTCCTCATCCA	218
OPN	CTTTCACTCCAATCGTCCCTAC	CTGCCCTTTCCGTTGTTGTC	238
OCN	GGACCATCTTTCTGCTCACTCTG	ACCTTATTGCCCTCCTGCTT	124
β-actin	CTGAGAGGGAAATCGTGCGT	CCACAGGATTCCATACCCAAGA	208

1.2.6 Western blot检测成骨相关基因的蛋白表达 常规培养C3H10T1/2细胞于T-25培养瓶,分组处理。于第5天进行COLⅠ、OPN蛋白表达检测,第9天进行OCN蛋白表达检测。分别收集各实验处理组与对照组细胞,RIPA细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白。Bradford法测定蛋白含量,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至PVDF膜。常规封闭、洗膜后与特异性抗体4 ℃孵育过夜(COLⅠ、OPN、OCN抗体工作浓度均为1∶500),洗膜后加入1∶5 000酶标兔抗羊或兔抗鼠多克隆抗体(IgG/HRP)37 ℃孵育2 h,ECL显色。用Bio-Rad图像分析系统照相,用Quantity One软件分析,以相应蛋白条带灰度值/β-actin蛋白带灰度值表示相对蛋白含量。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期及细胞增殖计数 台盼蓝拒染法计数活细胞:取对数生长期C3H10T1/2细胞制成细胞悬液,经计数后调整细胞数,以1.2×10^5/瓶平行接种于各个T-25培养瓶,各瓶加入等量培养液,分为BMP9单独组、BMP9联合5 ng/mL TGF-β1组进行处理,处理培养至24、48、72 h时间点,分别收集细胞,台盼蓝染色计数活细胞,实验重复3次取均值。流式细胞仪检测:C3H10T1/2细胞常规培养至对数生长期,如上分组处理48 h,胰酶消化收集细胞,PBS洗涤,70%冷乙醇固定,4 ℃过夜。洗涤后加入含100 μg/mL RNase的PBS溶液500 μL,37 ℃水浴30~60 min,加入含20 μg/mL的碘化丙啶(PI)的PBS溶液1 mL,避光染色30 min,BD. LSR流式细胞仪测定荧光强度(激发波长488 nm)。采用MODFIT 2.0分析软件进行细胞周期DNA含量分析。

1.3 统计学分析

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,多组间比较采用重复测量设计资料方差分析,两组间比较采用独立样本t检验,各实验均重复3次。

2 结果

2.1 TGF-β1对BMP9诱导C3H10T1/2细胞成骨分化早期ALP表达的影响

单独应用TGF-β1组对ALP影响很低,与GFP对照组无显著差异($P>0.05$)。BMP9单处理组ALP活性增高,5 ng/mL TGF-β1蛋白联合BMP9组比BMP9单独处理组能较早更多地提高ALP活性,从第3天即出现明显表达,第5天持续表达增高,与GFP对照组差异非常显著($P<0.01$),第9天ALP活性达到高峰($P<0.01$)。见表2。

ALP染色可见TGF-β1蛋白联合BMP9组较BMP9单处理组在细胞和基质中呈现更多浓密的蓝色深染物。不同剂量TGF-β1联合BMP9组间,随着TGF-β1应用剂量增高,ALP活性增加受到抑制,当剂量达到20 ng/mL,第5、9天ALP活性低于BMP单独处理组。见图1。

2.2 TGF-β1对BMP9诱导C3H10T1/2细胞成骨晚期钙盐沉积的影响

第5、9、13、17天通过茜素红S染色发现:单独TGF-β1组与GFP无明显差异,5 ng/mL TGF-β1蛋白联合BMP9组从第5天就有少量的红色矿化钙结节产生,而BMP9单处理组从第13天开始才具有成形的钙结节。当到达第17天钙盐沉积高峰期,

表2 TGF-β1对BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化早期ALP表达的影响($\times10^3$, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

时间	GFP组	TGF组	BMP组	BT5组	BT10组	BT20组
第3天	3.298±0.436	3.108±0.629	23.543±0.421[a]	56.589±0.808[a]	50.214±0.200	36.574±0.182
第5天	21.636±1.378	19.598±0.739	171.636±8.713[a]	418.421±10.651[a]	232.236±19.495[a]	85.617±3.445[a]
第9天	70.035±3.259	59.595±2.761	344.626±8.719[a]	995.339±17.922[a]	417.238±24.852[a]	155.040±11.014[a]

a: $P<0.01$,与GFP组比较

5 ng/mL TGF-β1 联合 BMP9 组与 BMP9 单处理组无明显差异。随着 TGF-β1 应用剂量增加,TGF-β1 联合 BMP9 组促进钙盐沉积的效应受到抑制,TGF-β1 剂量达到 20 ng/mL,第 13 天后钙盐沉积效应低于 BMP9 单处理组。见图 2。

2.3 TGF-β1 使 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨相关基因转录水平改变

5 ng/mL TGF-β1 与 BMP9 联合组较 BMP9 单处理组的成骨相关基因转录水平有明显增高($P<0.01$),以 COL Ⅰ增高变化出现较早、明显和持续(图 3A);成骨中晚期指标 OPN 和 OCN 分别相继于第 5、9 天表达显著增高($P<0.01$,图 3B、C)。随着 TGF-β1 应用浓度增高,COL Ⅰ转录表达能保持增高趋势,OPN、OCN 转录增高明显受抑($P<0.01$),10 ng/mL TGF-β1 联合组不表现增高,20 ng/mL TGF-β1 联合 BMP9 组反而出现下降,以 OCN 下降更明显($P<0.01$)。

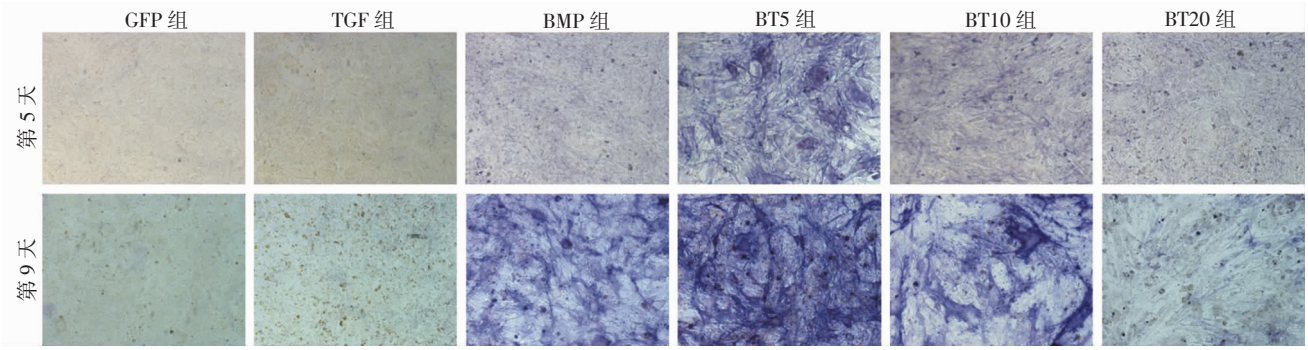


图 1 ALP 染色观察 TGF-β1 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化早期的影响 (×200)

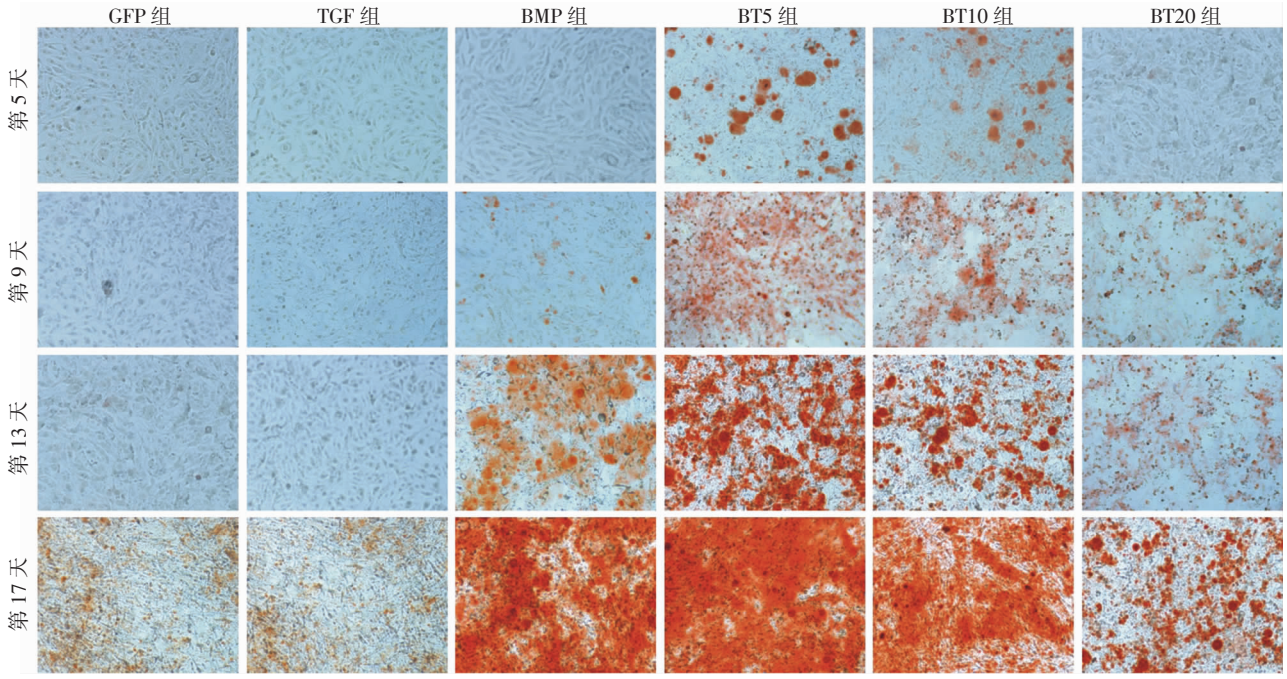
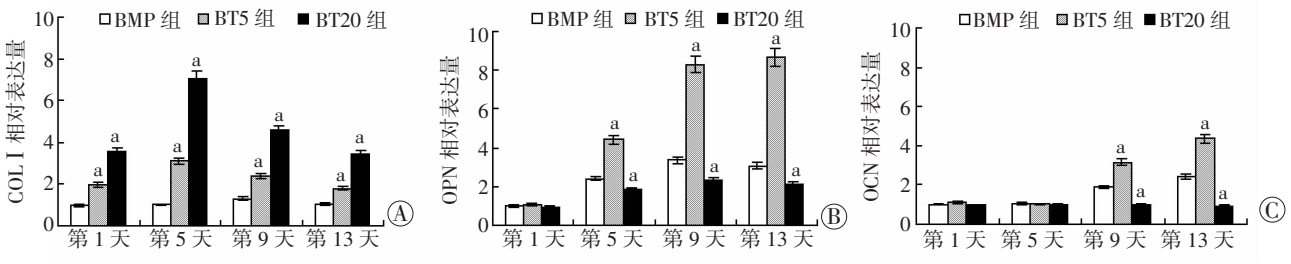


图 2 第 5、9、13、17 天 TGF-β1 对 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积观察 (茜素红 S ×100)

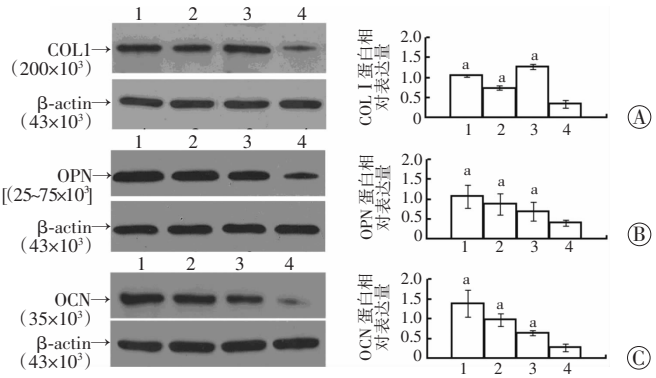


a: $P<0.01$, 与 BMP 组比较

图 3 第 1、5、9 天和第 13 天 TGF-β1 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨相关基因 COL Ⅰ(A)、OPN(B)和 OCN(C)转录水平的影响

2.4 TGF-β1 使 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨相关蛋白表达改变

Western blot 检测 COLⅠ、OPN 第5天和 OCN 蛋白第9天的表达，结果显示：5 ng/mL TGF-β1 与 BMP9 联合组较 BMP9 单处理组阳性表达明显增高，升高幅度分别达 42.6%、22.8% 和 53.3%（$P<0.01$）。随 TGF-β1 应用浓度增加，COLⅠ表现为继续增高，20 ng/mL TGF-β1 联合 BMP9 组较 BMP9 单处理组升高幅度为 154.9%（$P<0.01$），OPN 和 OCN 表达增高受到抑制，20 ng/mL TGF-β1 联合 BMP9 组较 BMP9 单处理组反而出现下降，分别下降 18.5% 和 42.8 %（$P<0.01$）。见图4。

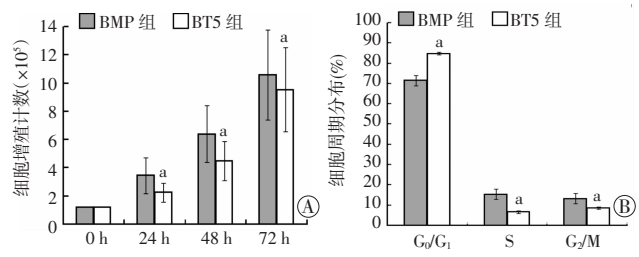


1：BT5 组；2：BMP9 组；3：BT20 组；4：GFP 组；A～C：分别为 COL、OPN、OCN Western blot 检测结果（左）和蛋白相对表达量分析结果（右）

图5 TGF-β1 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨相关蛋白 COLⅠ、OPN 和 OCN 表达的影响

2.5 TGF-β1 对 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化中细胞增殖、细胞周期的影响

细胞培养过程中发现 TGF-β1 处理会使 C3H10 细胞增殖速率减慢，平行接种、分组处理培养 24、48、72 h 后的活细胞计数可见：5 ng/mL TGF-β1 联合 BMP9 组较 BMP9 单处理组细胞数明显减少，以 24、48 h 减少明显，72 h 后差异不再明显（图5A）；流式细胞术检测处理培养 48 h 后细胞周期显示：联合组较 BMP9 单处理组的 G0/G1 期细胞所占比例显著增加，S 期和 G_2/M 期细胞所占比例显著降低（图5B）。



a：$P<0.01$，与 BMP 组比较

图6 TGF-β1 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞增殖（A）与细胞周期（B）的影响

3 讨论

MSC 作为多能干细胞具有自我更新和多向分化的潜能，在适宜的培养条件下可被诱导分化成各种组织细胞，它还具有基质细胞的特性，能够分泌各种细胞因子，支持向对应的组织细胞生长、增殖、分化，它应用于治疗骨科疾病如骨缺损、骨不连具备极大潜能。较多学者认为 MSC 可以成为组织重塑和功能修复的理想细胞来源[1]。由于 MSC 中只有少量能自发地分化为成骨细胞的骨祖细胞，为了提高成骨效率，需要添加诱导因素以促进 MSC 分裂增殖并定向分化为确定性骨祖细胞，以及进一步的分化成骨[2]。

BMPs 可诱导 MSC 经过趋化、分裂、分化等过程不可逆地分化成骨或成软骨，是诱导成骨能力最强的、目前发现唯一能够异位诱导成骨的细胞因子，具有早期定向诱导 MSC 分化为确定性骨祖细胞的重要特点。BMP9 是近几年发现的成骨诱导潜力最强的、效果较理想的 BMP 家族成员[4]，具有良好的应用前景。BMP9 的发现为促进成骨干细胞增殖分化、骨再生和制作高效成骨植骨材料提供了重要的帮助[7]，已引起人们的极大关注。BMPs 主要通过经典的 BMPs-Receptor-Smad 信号转导途径传递信号，并发挥诱导成骨等生物学效应。BMPs 首先与具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的 TGF-βⅡ型受体和Ⅰ型受体结合，导致Ⅱ型受体与Ⅰ型受体形成复合体并使Ⅰ型受体活化，活化的Ⅰ型受体识别胞内相应的 R-Smads（receptor-activated-Smads），包括 Smad1、Smad5、Smad8，使之发生磷酸化，进而与 Smad4 形成复合物而转移到细胞核内，与其他转录因子或辅助因子共同作用，协助特异靶基因的转录，发挥效应。此外，有研究[8]表明 BMPs 也可能通过非 Smad 途径如 MAPKs、PI3K 等信号转导途径进行信号转导，这些途径不直接依赖于转录因子 Smad，被称为 BMPs 的非经典信号转导途径。BMP9 虽然可有效诱导成骨分化，但其成骨及骨再生效果仍然存在缺陷，主要如形成骨痂时间偏长或早期骨痂强度较差等，原因可能与 BMP9 这类 BMPs 因子促进骨胶原合成和成骨增殖分化能力有限有关[9]。TGF-β1 在骨祖细胞的成骨分化和骨改建过程中发挥重要作用。与 BMPs 不同，TGF-βs 只能诱导定型骨祖细胞增殖分化，对未定型骨祖细胞无诱导作用。TGF-β1 以自分泌、旁分泌方式调节成骨细胞活动，在成骨分化和骨改建中发挥重要作用。尽管 TGF-βs 和 BMPs 同属于 TGF-β 超家族成员，但 TGF-βs 激活受体对应 R-Smads 为 Smad2 和 Smad3。TGF-β1 能抑制破骨细胞形成和骨重吸收，激活成骨细胞的骨形成，调节成骨活动，促进产生 COLⅠ和非胶原骨基质蛋白，形成类骨质，促进骨组织的矿化，因而可增加骨组织的柔韧性和坚硬度，以及能够抑制脂肪细胞生成，抑制软骨细胞产生Ⅱ型胶原等。由此可以看出，TGF-β 和 BMP 在成骨中可能存在互补作用关系，TGF-β1 的成骨效应恰好弥补了

BMPs 成骨的不足之处[10],本研究对此作用关系进行了初步探讨证实。

本研究选用间充质干细胞株 C3H10T1/2 进行 BMP9 腺病毒感染定向诱导成骨分化,通过条件培养基法获得含活性良好的 TGF-β1 蛋白的上清液,ELISA 法检测调整使用浓度,施加处理,建立 BMP9 联合 TGF-β1 诱导 MSC 成骨分化模型。首先检测经典成骨指标 ALP 和钙盐沉积。ALP 作为成骨早期指标,表达高峰位于成骨诱导 7 ~ 9 d;钙盐沉积是细胞成骨分化晚期指标,通常在成骨诱导分化第 10 天以后开始表达,在 17 ~ 20 d 达到高峰[11]。本研究结果显示,5 ng/mL TGF-β1 联合 BMP9 比 BMP9 单独处理能更早更多地提高 ALP 活性和引起钙盐沉积,持续处理到达 C3H10T1/2 细胞的钙盐沉积高峰期后不再显示差异,说明在 BMP9 诱导细胞进入成骨方向基础上,TGF-β1 有促进成骨分化作用。TGF-β1 并不能使 C3H10T1/2 细胞发生早期定向成骨诱导分化,对未进入成骨方向的 MSC 没有促进成骨作用。TGF-β1 主要能够提速、加快 BMP9 诱导成骨分化,其效应在成骨过程早期、中期体现。不同剂量 TGF-β1 联合 BMP9 诱导成骨的作用不同,具有明显剂量依赖性,选取高 20 ng/mL、中 10 ng/mL、低 5 ng/mL 3 种浓度组 TGF-β1 联合 BMP9 处理,随应用剂量增加,显示诱导成骨效果与剂量呈负相关趋势,当浓度等于或高于 20 ng/mL 时反而抑制成骨效应。推测因为 BMPs 和 TGF-bs 均需与 TbR Ⅱ受体及 TbR Ⅰ受体结合,虽然信号转导中各自激活的 R-Smad不同,但过高浓度的 TGF-β1 占用受体过多影响了 BMPs 的成骨作用发生[12]。本实验在诱导成骨过程的第 13 天所见20 ng/mL高剂量 TGF-β1 联合 BMP9 较 BMP9 单独处理的钙盐沉积效应反而偏低,显示了 BMP9 在成骨晚期中可能具有的重要地位受到影响。

COL Ⅰ与骨基质非胶原蛋白紧密结合、相互作用是骨组织形成、矿化发生的基础,检测 COL Ⅰ和 OPN、OCN 基因转录水平及蛋白表达变化显示,5 ng/mL TGF-β1 与 BMP9 联合处理组较 BMP9 单独处理组 COL Ⅰ、OPN、OCN 均有明显增高,变化趋势与 ALP、钙盐沉积检测结果相一致。COL Ⅰ增高表现最为突出,成骨诱导过程的早期即可见变化出现;成骨中晚期阶段 OPN、OCN 表现增高,发生时间偏晚,其中 OCN 增高发生较迟缓。采用 20 ng/mL 的高浓度 TGF-β1 联合处理时,出现基因表达受到抑制,COL Ⅰ表达尚能见升高趋势的维持,OPN 和 OCN 表达明显降低,OCN 下降较为突出。COL Ⅰ作为机体中主要的结缔组织成分在成骨中具有重要地位,能增加骨组织形成过程中细胞黏附水平,增加 OPN、OCN 含量和 ALP 的活性[13-14],骨质的形成、骨盐沉积的多少、骨组织矿化程度与 COL Ⅰ生成量有密切联系。OPN、OCN 对羟基磷灰石有很高的亲和力,能特异地与骨羟基磷灰石结合,在连接细胞与基质黏附方面 OPN 更是有其特殊功能[15]。据此认为,TGF-β1 与 BMP9 存在协同作用影响成骨相关基因表达,进而调控成骨活动,适当偏低剂量的 TGF-β1 可促进 BMP9 诱导成骨中 COL Ⅰ和 OPN、OCN 的基因转录和蛋白表达,COL Ⅰ生成增多在 TGF-β1 促进 BMP9 诱导成骨中起到主要作用。

TGF-β1 对 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨过程中细胞增殖呈抑制效应,细胞周期转化表现 G_0/G_1 期阻滞,显示与其促进细胞分化作用存在相应关系。有关 TGF-β1 在成骨诱导过程中的作用结果存在不相一致的报道[16]。有研究[17]报道,利用病人全髋置换术后分离提取的股骨头成骨细胞,单纯施加人重组 TGF-β1 蛋白处理会导致细胞内 ALP、OCN、BMP2 以及骨保护素(Osteoprotegerin)的含量降低,但 OPN 的含量增加。在 TGF-β1 联合 BMPs 诱导成骨实验研究方面,近年出现一些成功的结果。Kuh 等[18]研究发现,TGF-β1 与人重组 BMP2 联合诱导骨髓间充质干细胞能够分化成类椎间盘样细胞,TGF-β1 与 BMP2 具有协同作用。Li 等[19]研究发现,BMP4 联合 TGF-β1 能够修复由火器造成的兔股骨干骨缺损,其成骨指标 ALP 及钙含量明显高于对照组,病理组织切片和 X 线监测均证实骨再生速度加快,骨生长良好。本研究结果显示,在 BMP9 诱导 C3H10T1/2 间充质干细胞成骨分化中,适量的 TGF-β1 应用具有促进作用,BMP9 与 TGF-β1 在诱导成骨中存在协同作用、互补效应。

参考文献:

[1] Panetta N J, Gupta D M, Quarto N, *et al*. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering[J]. Panminerva Med, 2009, 51(1): 25-41.

[2] Zhao L, Li G, Chan K M, *et al*. Comparison of multipotent differentiation potentials of murine primary bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cell line C3H10T1/2[J]. Calcif Tissue Int, 2009, 84(1): 56-64.

[3] Deng Z L, Sharff K A, Tang N, *et al*. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development[J]. Front Biosci, 2008, 13: 2001-2021.

[4] Luu H H, Song W X, Luo X, *et al*. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 2007, 25(5): 665-677.

[5] Luo J, Deng Z L, Luo X, *et al*. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.

[6] Tang N, Song W X, Luo J, *et al*. BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-

catenin signalling [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8B): 2448 - 2464.
[7] Kang Q, Song W X, Luo Q, *et al*. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells [J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(4): 545 - 559.
[8] Song B, Estrada K D, Lyons K M. Smad signaling in skeletal development and regeneration[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5/6): 379 - 388.
[9] Gautschi O P, Frey S P, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications[J]. ANZ J Surg, 2007, 77(8): 626 - 631.
[10] Knippenberg M, Helder M N, Doulabi B Z, *et al*. Differential effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on gene expression of collagen-modifying enzymes in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(8): 2213 - 2225.
[11] Chen L, Jiang W, Huang J, *et al*. Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation[J]. J Bone Miner Res, 25(11): 2447 - 2459.
[12] Luo J, Tang M, Huang J, *et al*. TGFbeta/BMP type Ⅰ receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells[J]. J Biol Chem, 2010, 285(38): 29588 - 29598.
[13] Peng M, Chen S, Fang W, *et al*. Effects of leptin on the expression of alpha1 (Ⅰ) collagen gene in human osteoblast-like MG63 cells [J]. Biochem Cell Biol, 88(4): 683 - 686.
[14] Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, *et al*. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type Ⅰ collagen production[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(5): 1438 - 1450.
[15] Khoshniat S, Bourgine A, Julien M, *et al*. Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium[J]. Bone, 2011, 48(4): 894 - 902.
[16] Inkson C A, Ono M, Kuznetsov S A, *et al*. TGF-beta1 and WISP-1/CCN-4 can regulate each other's activity to cooperatively control osteoblast function[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(5): 1865 - 1878.
[17] Ehnert S, Baur J, Schmitt A, *et al*. TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e14073.
[18] Kuh S U, Zhu Y, Li J, *et al*. Can TGF-beta1 and rhBMP-2 act in synergy to transform bone marrow stem cells to discogenic-type cells? [J]. Acta Neurochir (Wien), 2008, 150(10): 1073 - 1079.
[19] Li B C, Zhang J J, Xu C, *et al*. Treatment of rabbit femoral defect by firearm with BMP-4 gene combined with TGF-beta1 [J]. J Trauma, 2009, 66(2): 450 - 456.

(**收稿**:2013-07-13;**修回**:2013-08-31)
(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)02-0104-02

剪毛法标记实验大鼠

邓青松,熊 青,符纯川,马宽生 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肝胆外科)

[**关键词**] 大鼠;标记;剪毛
[**中图法分类号**] R-332 [**文献标志码**] B

实验动物的标记方法多种多样,实验动物中又以大鼠最为常用。其中大鼠的标记方法有染料染色法、剪脚趾法、剪耳朵法、耳朵打孔法、烙印法、号牌法等[1],其中染料染色法在实验室最为方便、常用。上述方法具有刺激性、染料难购买、污染环境、残忍、易混淆等缺点,大多数不符合实验动物福利原则。本研究介绍一种新的大鼠标记方法,既解决了上述标记方法存在的不足,又符合动物福利原则。

1 材料与方法

1.1 传统实验大鼠标记方法

传统实验大鼠标记法以染色法最为常用,染色法标记时用毛笔或棉签蘸取染料,在动物体的不同部位涂上斑点,以示不同号码。编号的原则是:先左后右,从上到下。一般把涂在左前腿上的计为1号,左侧腹部计为2号,左后腿为3号[1],头顶部计为4号,腰背部为5号,尾基部为6号,右前腿为7号,右侧腰部为8号,右后腿计为9号。若动物编号超过10或更大数字时,可使用上述两种不同颜色的溶液,即把一种颜色作为个位数,另一种颜色作为十位数,这种交互使用可编到99号,假使把红的记为十位数,黄色记为个位数,那么右后腿黄斑,头顶红斑,则表示是49号鼠,其余类推。

1.2 新型实验大鼠标记方法

本方法是在现有的染色法之九分法的原理基础上通过改进而得来的。具体方法是:标记时用弯剪剪去大鼠不同部位适量的毛发(以可以区分为原则),以示不同编号。原则是:先左后右、从上到下。每个部位分为剪一处和剪两处,剪两处毛时每处之间留取毛发相隔开来,以便区分,但位于同一部位。左前肢剪毛表示1,腹部左侧示2 ,左后肢示3,头顶示4,腰背部示5,尾基部示6,右前肢示7,腹部右侧示8,右后肢示9[2]。剪一处示个位数,剪两处示十位数。那么左后腿剪一处表示是3号大鼠,右后腿剪一处表示是9号大鼠,右后腿剪两处,其余部位未剪毛表示是90号大鼠,右后腿剪两处、右前腿剪一处则表示是97号大鼠(图1、2)。其余类推。

(下转109页)

[**通信作者**] 马宽生,E-mail: makuansheng@vip.sina.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131127.1108.002.html(2013-11-27)