bFGF 和 TGF-β 对原发性骨关节炎软骨间充质祖细胞增殖调控作用

刘 军,王洪伟,陈 语,于海龙,王 琪,杨会峰,马骏雄,项良碧 (沈阳军区总医院骨科,辽宁 沈阳 110016)

[摘 要] **目的** 观察 bFGF 和 TGF-β_1 对原发性骨关节炎(OA)关节软骨间充质祖细胞(MPCs)的促增殖作用,为通过调控关节软骨 MPCs 以防治原发性 OA 提供理论依据。**方法** 采用 MTT 法测定不同浓度 bFGF 和 TGF-β_1 单独或联合作用下对原发性 OA 关节软骨 MPCs 的增殖作用。**结果** 10.0 ~ 50.0 ng/mL 的 bFGF、0.1 ~ 1.0 ng/mL 的 TGF-β_1 单独作用于传代培养原发性 OA 关节软骨 MPCs 时,其培养细胞的增殖速率显著增加($P<0.05$),而随着二者浓度的进一步增加,其增殖速率无显著变化($P>0.05$);bFGF 10.0 ng/mL + TGF-β_1 1.0 ng/mL 联合作用时,对原发性 OA 关节软骨 MPCs 具有明显促增殖作用($P<0.05$)。**结论** bFGF、TGF-β_1 对原发性 OA 关节软骨 MPCs 增殖具有重要作用,不同浓度的 bFGF、TGF-β_1 及 bFGF + TGF-β_1 促增殖作用不同,提示通过适宜浓度的 bFGF、TGF-β_1 对原发性 OA 关节软骨 MPCs 的作用,可能具有促进原发性 OA 关节软骨损伤修复的效果。

[关键词] 骨关节炎;间充质祖细胞;bFGF;TGF-β
[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)03-0244-03

Regulatory effect of bFGF and TGF-β for the proliferation of mesenchymal progenitor cells derived from primary osteoarthritis cartilage

LIU Jun, WANG Hong-wei, CHEN Yu, YU Hai-long, WANG Qi, YANG Hui-feng, MA Jun-xiong, XIANG Liang-bi
(Department of Orthopedics, General Hospital of Shenyang Military Area Command of PLA, Shenyang Liaoning 110016, China)

Abstract: Objective To observe the regulatory effect of bFGF and TGF-β_1 for the proliferation of mesenchymal progenitor cells (MPCs) derived from primary osteoarthritis cartilage, and to provide theoretical evidence in preventing and curing primary OA. **Methods** Different concentrations of bFGF and TGF-$\beta_1$1 (alone or combined) were used to treat primary OA cartilage and their effects on proliferation of MPCs were tested by MTT method. **Results** Either bFGF (10.0 ~ 50.0 ng/mL) or TGF-β_1 (0.1 ~ 1.0 ng/mL) alone can significantly promote the proliferation of MPCs derived from primary OA cartilage ($P<0.05$). But with their increased concentration, the proliferation rate was of no significant changes ($P>0.05$). The combination of 10.0 ng/mL bFGF and 1.0 ng/mL TGF-β_1 significantly increased the proliferation of MPCs from primary OA ($P<0.05$). **Conclusion** Both bFGF and TGF-$\beta_1$1 play important roles in the proliferation of MPCs in

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201403009
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30672200,C030313)
[通讯作者] 王洪伟,E-mail:cplawhw@163.com;项良碧,E-mail:xiangliangbi1963@163.com
[收稿日期] 2014-01-08 [修回日期] 2014-01-20

[3] 邵小萍. 全膝关节置换术后的康复护理[J]. 现代中西医结合杂志,2006,15(24):3444.
[4] 孙业青,朱裕昌,蔡新宇,等. 全膝关节置换术中髌骨处理方法的研究[J]. 中华创伤杂志,2012,28(11):996 - 1000.
[5] 李珊珊,苏 茵. 美国风湿病学会关于药物及非药物治疗骨关节炎的建议[J]. 中华风湿病学杂志,2012,16(8):526.
[6] 王国伟,孙 水,张 伟,等. 老年骨关节炎全膝置换术疗效影响因素分析[J]. 山东医药,2008,48(35):19 - 21.
[7] 郑佳鹏,张春礼,徐 虎,等. 膝关节单髁置换的疗效与评价研究[J]. 中国矫形外科杂志,2009,17(4):241 - 244.
[8] Fallah-Yakhdani HR, Abbasi-Bafghi H, Meijer OG, et al. Determinants of co-contraction during walking before and after arthroplasty for knee osteoarthritis[J]. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2012, 27(5): 485 - 494.
[9] Riddle DL, Kong X, Jiranek WA, et al. Factors associated with rapid progression to knee arthroplasty: complete analysis of three-year data from the osteoarthritis initiative[J]. Joint Bone Spine, 2012, 79(3): 298 - 303.
[10] 郝永壮,卫小春,段王平,等. 全膝关节置换翻修术中保留与非保留髌骨假体的 Meta 分析[J]. 中华关节外科杂志(电子版),2012,6(1):112 - 118.
[11] 李 锋,张 克,刘 岩,等. 保留髌骨膝关节置换的症状及影像学评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(26):4773 - 4776.
[12] Aärimaa V, Ranne J, Mattila K, et al. Patellar tendon shortening after treatment of patellar instability with a patellar tendon medialization procedure[J]. Scand J Med Sci Sports, 2008, 18(4): 442 - 446.

(编辑:余汇洋)

primary OA cartilage, and they can increase the proliferation in different degree with different concentrations. There must be feasible methods of gene technology to promote cell proliferation and differentiation of MPCs for repairing articular cartilage injury.

Keywords: osteoarthritis; mesenchymal progenitor cells; bFGF; TGF-β_1

原发性骨关节炎(osteoarthritis, OA)关节软骨间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells, MPCs)数量仅占关节软骨细胞数量的3% ~4%,虽然 OA 关节软骨的 MPCs 比正常人增殖活跃,但其成软骨、成骨分化能力均降低。如何利用相关生长因子进行刺激,调控原发性 OA 关节软骨 MPCs 的增殖和成软骨分化作用,恢复 OA 关节软骨细胞调节和维持软骨组织的损伤与修复的动态平衡,具有重要的临床应用前景。bFGF 和 TGF-β 均参与 MPCs 增殖的调控,生长因子对 MPCs 生物学行为的调控作用相当复杂,体外使用多种生长因子复合作用于 MSCs 才可能尽量模拟体内的生化环境,如何应用多种生长因子,单独使用还是联合使用生长因子等都有待进一步的实验研究[1-3]。本实验观察了不同浓度、单独或联合应用 bFGF 和 TGF-β_1 对 OA 关节软骨 MPCs 增殖作用的影响,为临床治疗软骨退变和软骨损伤提供新的理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人原发性骨关节炎关节软骨间充质祖细胞通过免疫磁珠方法分选得到。生长因子相关试剂:TGF-β_1(美国 R&D system)、bFGF(美国 PeproTech 公司)。

1.2 方法

将 P2 代 OA 关节软骨 MPCs 以每孔 1×10^4 的浓度接种于 96 孔板中,用含 10% FBS 的基础培养液分别配制含 bFGF 或/和 TGF-β_1 的培养液。每一浓度设 5 个复孔,对照组加入无上述生长因子的含 10% FBS 的基础培养液,隔日换液。生长因子促增殖培养第 1 ~7 天,每日进行 MTT 检测。生长因子按照下列分组加入:A 组按终浓度 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 ng/mL 加入 TGF-β_1;B 组按终浓度 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 ng/mL 加入 bFGF;C 组按终浓度(0.1 + 1.0)、(0.5 + 5.0)、(1.0 + 10.0)、(5.0 + 50.0)、(10.0 + 100.0) ng/mL 加入 TGF-β_1 + bFGF。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 13.0 统计软件建立数据库,进行统计分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较如方差齐性采用两样本 t 检验统计学方法,如方差不齐,则采用非参数统计学方法,多组间比较采用多样本方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,P 值均表示双侧概率。

2 结果

2.1 不同浓度 bFGF 对 MPCs 增殖的影响

结果显示(图 1),bFGF 在 10.0 ~50.0 ng/mL 范围内单独作用,均能够促进 OA 关节软骨 MPCs 的增殖($P<0.05$),而随着 bFGF 浓度的增加其促增殖作用无明显增加,各组之间比较,$P>0.05$。

2.2 不同浓度 TGF-β_1 对 MPCs 增殖的影响

结果显示(图 2),TGF-β_1 在 0.1 ~1.0 ng/mL 范围内单独作用,均能够促进 OA 关节软骨 MPCs 的增殖($P<0.05$),而随着 TGF-β_1 浓度的增加其促增殖作用无显著增加,各组之间比较,$P>0.05$。

2.3 不同浓度 bFGF + TGF-β_1 对 MPCs 增殖的影响

结果显示(图 3),不同浓度 TGF-β_1 和 bFGF 联合作用时,TGF-β_1 1.0 ng/mL + bFGF 10.0 ng/mL 能够促进 OA 关节软骨 MPCs 的增殖($P<0.05$),而随着 TGF-β_1 和 bFGF 浓度增高或减低其增殖作用均无明显增加($P>0.05$)。

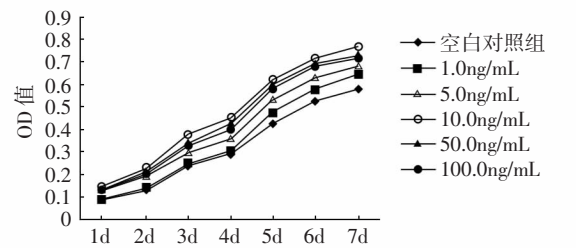


图 1 不同浓度 bFGF 对原发性 OA 关节软骨 MPCs 促增殖作用

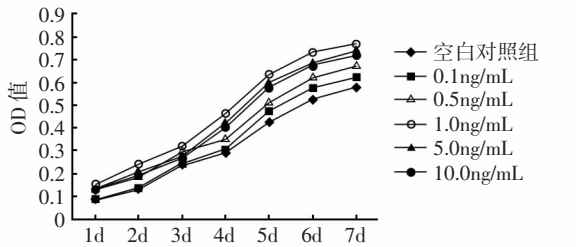


图 2 不同浓度 TGF-β_1 对原发性 OA 关节软骨 MPCs 促增殖作用

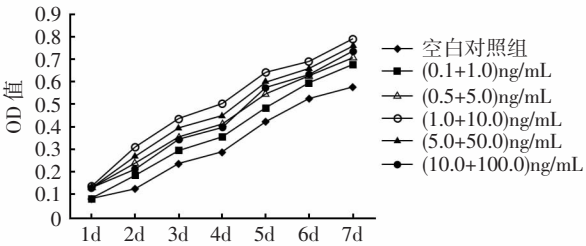


图 3 不同浓度 TGF-β + bFGF 对原发性 OA 关节软骨 MPCs 促增殖作用

3 讨论

FGF、TGF-β 等多种生长因子参与调控关节软骨 MPCs 的增殖作用[1-3]。bFGF 是一种广谱的有丝分裂和毛细血管增殖刺激剂,对来源于中胚层和神经外胚层的细胞如成纤维细胞、血管内皮细胞、软骨细胞等有明显的促增殖作用[4]。Scutt等[5]发现bFGF(5 ng/mL)可明显促进 MSCs 的增殖并且能增加传代的次数。Solchaga 等[6]的实验结果显示 1.0 ~ 10.0 ng/mL的 bFGF 与 MSCs 细胞克隆的数目呈正相关。TGF-β 主要存在于骨及软骨细胞内,它具有对细胞增殖及分化的双向调节功能,它一方面对中胚层的细胞具有加速分裂增生作用,另一方面又具有抑制细胞分化的作用[7]。Worster 等[8]对 MSCs 体外培养时发现,在培养基中加入 TGF-β 可以诱导 MSCs 定向分化为软骨细胞,其Ⅱ型胶原的表达与 TGF-β 的剂量呈正相关,5 ~ 10 ng/mL 的 TGF-β 可有效促进 MSCs 增殖和分化。TGF-β 浓度达到 10 ng/mL 可使Ⅱ型胶原、Aggercan 等因子的表达量提高 2 倍以上。最近的研究结果指出,TGF-β_3刺激细胞外基质的合成,并且在兔体外软骨急性损伤模型中进行了验证[9],TGF-β_1 在体外能够刺激滑模和骨髓来源的骨髓间充质干细胞的软骨形成[10],并且更加令人振奋的研究结果是 TGF-β_1 能够增强兔软骨缺损的修复[11]。

本实验结果显示,bFGF 在 10.0 ~ 50.0 ng/mL 范围内,TGF-β_1 在 0.1 ~ 1.0 ng/mL 范围内单独作用能显著促进 OA 关节软骨 MPCs 细胞的增殖,而随着浓度的增加其促增殖作用没有明显增加。bFGF 和 TGF-β_1两者联合作用,在 bFGF 10.0 ng/mL 和 TGF-β_1 1.0 ng/mL 促增殖作用增加明显,但随着浓度增高其增殖作用无显著提高,表明 bFGF 和 TGF-β_1 作为促细胞增殖的生长因子,在适宜浓度对细胞增殖具有促进作用。选择生长因子的最佳浓度促进关节软骨 MPCs 的增殖和生长在临床上具有重要作用。

随着分子生物学、遗传学、免疫学的发展及在医学中的应用,基因治疗作为近年来兴起的一种治疗方法,可在分子水平进行调控,从而为延缓或逆转疾病进程提供了可能。转染细胞不仅可持续表达目的基因,促进 RNA 和蛋白质的合成,而且可作为“蛋白质生产工厂”除影响自身的新陈代谢外,还影响周围未转染细胞、基质的新陈代谢,从而促进退变结构和功能的恢复。一定浓度的 bFGF、TGF-β_1 及 bFGF + TGF-β_1 对原发性 OA 关节软骨 MPCs 的增殖具有重要作用,而不同浓度的 bFGF、TGF-β_1 及 bFGF + TGF-β_1 对原发性 OA 关节软骨 MPCs 的增殖作用不同。

[参考文献]

[1] Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair[J]. Bone, 2006, 39(4): 678 - 683.

[2] Ellman MB, An HS, Muddasani P, et al. Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis[J]. Gene, 2008, 420(1): 82 - 89.

[3] Civinini R, Nistri L, Martini C, et al. Growth factors in the treatment of early osteoarthritis[J]. Clin Cases Miner Bone Metab, 2013, 10(1): 26 - 29.

[4] Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(2): 644 - 652.

[5] Scutt A, Bertram P. Basic fibroblast growth factor in the presence of dexamethasone stimulates colony formation, expansion, andosteoblastic differentiation by rat bone marrow stromal cells[J]. Calcif Tissue Int, 1999, 64(1): 69 - 77.

[6] Solchaga LA, Penick K, Porter JD, et al. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. J Cell Physiol, 2005, 203(2): 398 - 409.

[7] Sakimura K, Matsumoto T, Miyamoto C, et al. Effects of insulin-like growth factor I on transforming growth factor beta1 induced chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells cultured in a polyglycolic acid scaffold[J]. Cells Tissues Organs, 2006, 183(2): 5583 - 5598.

[8] Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, et al. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 2000, 61(9): 1003 - 1010.

[9] Lee CH, Cook JL, Mendelson A, et al. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study[J]. Lancet, 2010, 376(9739): 440 - 448.

[10] Fan J, Gong Y, Ren L, et al. In vitro engineered cartilage using synovium derived mesenchymal stem cells with injectable gellan hydrogels[J]. Acta Biomater, 2010, 6(3): 1178 - 1185.

[11] Diao H, Wang J, Shen C, et al. Improved cartilage regeneration utilizing mesenchymal stem cells in TGF-beta1 gene-activated scaffolds[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(9): 2687 - 2698.

(编辑:余汇洋)