DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000222

FGF-2真核表达质粒的构建及对 C3H10 细胞增殖及成软骨分化的影响

杨　琼[1],李　明[1],曹豫江[1],何通川[2],罗　聪[1],曹光彪[1],刘江华[2],毕　杨[2]
（重庆医科大学附属儿童医院 1. 骨一科;2. 干细胞研究室,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,重庆　400014）

【摘　要】**目的**:构建成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2,FGF-2)真核表达质粒,检测其对小鼠间充质干细胞 C3H10 增殖、成骨及成软骨分化作用的影响。**方法**:以质粒 pAd-Trace-FGF-2 为模板,PCR 扩增目的基因 FGF-2,经 *Bgl* Ⅱ、*Sal* Ⅰ双酶切后连接至 pIRES2-EGFP 表达载体中获得 pIRES2-EGFP-FGF-2 真核表达质粒,脂质体转染到 C3H10 细胞中,另设 pIRES2-EGFP 空载体转染对照组和空白细胞对照组。RT-PCR 及 Western blot 法验证各组 FGF-2 的表达水平,MTT 法和流式细胞术检测细胞的增殖活力及细胞周期分布,RT-PCR 检测成骨及成软骨、Wnt 信号通路相关基因的 mRNA 水平表达变化,Western blot 法检测Ⅱ型胶原(collagen Ⅱ,Col Ⅱ)的表达,甲苯胺蓝染色检测软骨基质的表达。**结果**:重组表达质粒 pIRES2-EGFP-FGF-2 经双酶切及测序证实构建正确;质粒转染 C3H10 细胞后,其 FGF-2 基因的 mRNA 和蛋白水平表达较 2 个对照组明显增高,细胞增殖活力明显增高($P<0.05$),软骨相关标志物Ⅰ型胶原(collagen Ⅰ,Col Ⅰ)、Col Ⅱ、蛋白聚糖(aggrecan,ACAN)mRNA 转录水平较 2 个对照组均明显增高($P<0.05$),骨钙蛋白(osteocalcin,OC)、骨保护素(osteoprotegerin,OPG)、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)mRNA 转录水平无明显升高($P>0.05$),Wnt5a 及 Fzd8 mRNA 转录水平降低($P<0.05$),FGF-2 转染组细胞甲苯胺蓝染色呈现紫红色异染。**结论**:成功构建 FGF-2 基因重组真核表达质粒,FGF-2 过表达可提高 C3H10 细胞的增殖活力,对 C3H10 细胞有成软骨效应,但短期成骨效应不明显,可能与下调 Wnt5a 及受体 Fzd8 的表达有关。

【关键词】成纤维细胞生长因子-2 基因;真核表达载体;C3H10 细胞;增殖;成骨分化;成软骨分化
【中图分类号】R684.3　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2013-09-01

Construction of eukaryotic vector expressing FGF-2 gene and its effect on proliferation and cartilage differentiation of mesenchymal stem cells C3H10

Yang Qiong[1], Li Ming[1], Cao Yujiang[1], He Tongchuan[2], Luo Cong[1], Cao Guangbiao[1], Liu Jianghua[1], Bi Yang[1]
(1. Department of Orthopedics; 2. Stem Cell Biology and Therapy Laboratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】***Objective***: To construct an eukaryotic vector of pIRES2-EGFP-FGF-2 and to investigate its effect on the proliferation, osteogenesis and chondrogenesis of mouse mesenchymal stem cells C3H10. ***Methods***: FGF-2 gene was amplified by PCR from plasmid pAd-Trace-FGF-2. After being digested with *Bgl* Ⅱ and *Sal* Ⅰ, the PCR product was inserted into pIRES2-EGFP to construct pIRES2-EGFP-FGF-2. pIRES2-EGFP-FGF-2 plasmid was transfected into C3H10 by Liposomes, and C3H10 transfected with pIRES2-EGFP and untreated were set up as controls. The mRNA and protein expression levels of FGF-2 were determined by RT-PCR and Western blot respectively. The proliferation activity and cell cycle phase of C3H10 were examined by MTT and flow cytometry. The mRNA transcription levels of collagen Ⅰ (Col Ⅰ), osteocalcin (OC), osteoprotegerin (OPG), osteopontin (OPN), collagen Ⅱ (Col Ⅱ), aggrecan (ACAN) and Wnt pathway molecules were detected by RT-PCR. The protein expression of Col Ⅱ was detected by Western blot. Toluidine blue staining was carried out to measure the secretion of cartilage oligomeric matrix protein by cells in culture. ***Results***: Restriction analysis and sequencing proved that recombinant plasmid pIRES2-EGFP-FGF-2 was constructed correctly. Both the mRNA and protein expression level of FGF-2 increased significantly in pIRES2-EGFP-FGF-2 transfected C3H10 cells. Cell proliferation activity of the experimental group increased significantly ($P<0.05$). The mRNA transcription levels of Col Ⅰ, Col Ⅱ and ACAN in C3H10 cells transfected with pIRES2-

作者介绍:杨　琼,Email:yangqiong0102@163.com,研究方向:小儿矫形骨科。
通信作者:李　明,Email:lm3180@163.com。
基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号:CSTC2011JJA0227);重庆市卫生局医学科学技术研究资助项目(编号:渝卫科教[2010]51 号-2010-2-197)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxb.000222.html

EGFP-FGF-2 recombinant plasmid increased significantly ($P<0.05$), however there was no significant increase in the mRNA expression of OC, OPG, OPN ($P>0.05$). The transcription levels of Wnt5a and Fzd8 decreased significantly ($P<0.05$). Toluidine blue staining showed purple metachromatic in the cells FGF-2 overexpressed C3H10 cells. ***Conclusion***: The recombinant eukaryotic expression vector for FGF-2 gene is successfully constructed and overexpression of FGF-2 can promote chondrogenesis and proliferation activity of C3H10 cells but there is no significant effect on osteogenic differentiation in short-term. The effect of FGF-2 on chondrogenesis maybe involve in the downregulation of Wnt5a and Fzd8.

【Key words】fibroblast growth factor-2 gene; eukaryotic expression vector; C3H10 cell; proliferation; osteogenesis; chondrogenesis

关节软骨的自身修复能力非常受限，临床治疗软骨损伤的方法很多，如利用微骨折术刺激骨髓，软骨下骨钻孔，自体软骨细胞移植术，骨膜和软骨膜移植术等，但都未达到满意效果，关节软骨缺损的修复已成为临床骨科急需解决的问题之一[1]。组织工程学修复软骨缺损是目前研究的热点，基因治疗与组织工程结合技术虽然在软骨修复中取得了一定的成功，但选择合适的细胞因子仍然是解决软骨缺损这一难题的关键。成纤维细胞生长因子 2（fibroblast growth factor-2，FGF-2）是成纤维细胞因子家族一员，在体内广泛分布，与肝素有高亲和力，对器官发生、血管形成及组织损伤修复等方面有强烈的生物学作用[2-4]，可参与调节软骨损伤的速发型应答[5]，在软骨再生过程中起重要作用[6]。本实验通过构建 FGF-2 真核表达质粒，检测其对多潜能间充质干细胞 C3H10 成软骨分化的作用及可能的分子机制，为进一步研究利用 FGF-2 基因作为软骨缺损修复的细胞因子提供实验基础，从而解决软骨缺损的修复问题，为组织工程技术探索一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

质粒 pAd-Trace-FGF-2 由美国芝加哥大学分子生物研究所何通川教授馈赠，真核表达载体 pIRES2-EGFP、多潜能干细胞 C3H10 和 DH5α 感受态细胞为重庆医科大学附属儿童医院干细胞实验室保存，胎牛血清购自美国 Hyclone 公司，T4 DNA Ligase、*Bgl* Ⅱ 和 *Sal* Ⅰ 内切酶购自 TaKaRa 公司，β-actin 抗体、FGF2 一抗及羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物有限公司，Ⅱ型胶原（collagen Ⅱ，Col Ⅱ）一抗购自美国 Immunoway 公司，脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司，胶回收试剂盒、纯化试剂盒及质粒提取试剂盒购自美国 Omega 公司，反转录试剂盒购自美国 Biomage 公司，Tap Platinum DNA Polymerase 及聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）试剂盒购自天根生物公司，甲苯胺蓝染料购自 Solarbio 公司。用 Primer 3.0 软件设计引物序列（表 1），华大基因公司完成合成及质粒测序。

1.2 方法

1.2.1 重组真核表达质粒的构建 以质粒 pAd-Trace-FGF-2 为模板，用 FGF-2 基因的特异性引物（上游：5'-GAAAGATCTACCACCATGGGGGACCGCGGGCGCGGCCGCGCGCTGCCGGGCGGCAG-3'，下划线部分为 *Bgl* Ⅱ 酶切位点；下游：5'-CGCGTCGACTCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAGAAAAAGTATAGCTTTCTGCCCAG-3'，下划线部分为 *Sal* Ⅰ 酶切位点，扩增片段 651 bp）经 PCR 扩增获得目的基因，PCR 反应条件：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 30 个循环。分别将 PCR 扩增产物和 pIRES2-EGFP 载体用 *Bgl* Ⅱ、*Sal* Ⅰ 双酶切，37 ℃，4 h，纯化后按 3:1 量浓度混合，用 T4 DNA Ligase 连接过夜，将连接产物转化入 *E.coli* DH5α 感受态细菌，接种于含有卡那霉素（50 μg/ml）的 LB 固体培养基上，培养过夜，随机挑选 8 个单个菌落，摇菌培养过夜，提取质粒，经 *Bgl* Ⅱ、*Sal* Ⅰ 双酶切初步鉴定，将酶切正确的质粒送华大基因公司，以 pIRES2-EGFP 质粒中与增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，EGFP）基因末端序列互补 DNA 序列为引物（5'-CTTCGGCCAGTAACGTTAG-3'），测序插入的外源基因，测序正确的质粒命名为 pIRES2-EGFP-FGF-2。

1.2.2 C3H10 细胞的培养及转染 C3H10 细胞接种于 6 孔板中，置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，37 ℃、5%的 CO_2 培养箱中培养。至细胞 80%汇合时，按 Lipofectamine™ 2000 的说明书进行脂质体转染。每孔按 DNA（μg）:Lipofectamine™ 2 000（μl）=1:3 转染。转染 6 h 后，更换为含 10%胎牛血清的完全新鲜培养基继续培养至 48 h。同时设 pIRES2-EGFP 空载体转染对照组和未处理的空白对照组。转染后 48 h，在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达并拍照。

1.2.3 RT-PCR 法检测转染细胞中 FGF-2 基因、成骨及成软骨指标、Wnt 信号通路相关基因 mRNA 转录水平 转染 48 h 后，提取各组细胞总 RNA，合成 cDNA 第 1 链，再以其为模板，采用 Touch-down PCR 扩增 FGF-2、成骨及成软骨相关基因，Wnt 信号相关信号分子，以 GAPDH 为内参标化模板，引物见表 1。PCR 反应条件：94 ℃ 2 min；93 ℃ 20 s，65 ℃~55 ℃ 20 s（每个循环降低 1 ℃），72 ℃ 80 s，9 个循环；93 ℃ 20 s，55 ℃ 20 s，72 ℃ 80 s，28 个循环；72 ℃ 2 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 Western blot 法检测转染细胞中 FGF-2 和 Col Ⅱ 蛋白的表达 转染 48 h 后，提取各组细胞总蛋白，取 50 μg 经 10%SDS-PAGE 分离后，电转移至 PVDF 膜上，用 5%脱脂奶

表 1 RT-PCR 引物序列表

Tab.1 Sequences of RT-PCR primers

基因	引物序列（5'-3'）	序列号	PCR产物大小（bp）
GAPDH	上游 GGCTGCCCAGAACATCAT 下游 CGGACACATTGGGGGTAG	NM_008084	175
FGF-2	上游 GTGTTACGGATGAGTGTTTCTT 下游 CCAGTTCGTTTCAGTGCC	NM_002006.4	106
Col Ⅰ	上游 CCAGCGGTGAAGAAGGAAA-GAG 下游 GAACCACGATTGCCAGGAG-GAC	NM_007743.2	154
Col Ⅱ	上游 GGCAACAGCAGGTTCACATA 下游 ATGGGTGCGATGTCAATAAT	NM_031163	131
ACAN	上游 CAGAGTTAGTGGAGGGTGTGA 下游 AGACCCTGGGAAGTTTGT	NM_007424.2	152
OC	上游 CCTTCATGTCCAAGCAGGA 下游 GGCGGTCTTCAAGCCATAC	NM_007541.2	161
OPG	上游 GTTCCTGCACAGCTTCACAA 下游 AAACAGCCCAGTGACCATTC	NM_008764.3	121
OPN	上游 CCTCCCGGTGAAAGTGAC 下游 CTGTGGCGCAAGGAGATT	AF515708.1	124
Fzd1	上游 CAAGGTTTACGGGCTCATGT 下游 GTAACAGCCGGACAGGAAAA	NM_021457	178
Fzd4	上游 AACCTCGGCTACAACGTGAC 下游 TGGCACATAAACCGAACAAA	NM_008055	150
Fzd5	上游 AGGCATCCCGATTTTCTTTT 下游 TGAGCGAGGGCAGAGTATTT	NM_022721	170
Fzd6	上游 TCCGACGCTTGAAGAAAACT 下游 CAACCCCAGGTCCTCAAGTA	NM_008056	155
Fzd8	上游 CTGTTCCGAATCCGTTCAGT 下游 CGGTTGTGCTGCTCATAGAA	NM_008058	155
Wnt3a	上游 GCCTCGGAGATGGTGGTA 下游 TTGGGTGAGGCCTCGTAG	NM_009522.2	125
Wnt5a	上游 TTGGCCACGTTTTTCTCC 下游 TGGCTGCAGAGAGGCTGT	NM_009524.3	125
Wnt7a	上游 TTCGGGAAGGAGCTCAAA 下游 GCCACAGTCGCTCAGGTT	NM_009527.3	120

注：Ⅰ型胶原（collagen Ⅰ），蛋白聚糖（aggrecan，ACAN），骨钙蛋白（osteocalcin，OC），骨保护素（osteoprotegerin，OPG），骨桥蛋白（osteopontin，OPN），跨膜受体（frizzled，Fzd），GAPDH 是甘油醛-3-磷酸脱氢酶

粉室温封闭 1~2 h；TBST 洗膜 3 次，加入兔抗小鼠 FGF-2 一抗（1:200 稀释）和小鼠抗小鼠 β-actin 单抗（1: 200 稀释），兔抗小鼠 Col Ⅱ一抗（1:500 稀释），4 ℃过夜；洗膜，分别加入 HRP 标记的羊抗兔或羊抗鼠 IgG（1:1 000 稀释），室温孵育 1 h；TBST 洗膜 3 次后 ECL 发光成像。

1.2.5 转染细胞增殖能力检测 将生长良好的 C3H10 细胞 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，细胞贴壁后按 Lipofectamine™ 2000 的说明书进行脂质体转染，每孔 100 μl 按 DNA（μg）：Lipofectamine™ 2000（μl）=1:3 转染。分别在 24、48、72 h 后向每孔加入 25 μl MTT（5 mg/ml），培养 4 h 后，吸去孔内培养液，每孔中加入 150 μl 二甲基亚砜，振荡 15 min，使结晶物充分溶解。酶联免疫仪测定各孔吸光度值（A_{570}）。以时间为横轴，吸光度值为纵轴，绘制细胞增殖曲线图。

1.2.6 转染细胞增殖周期分析 C3H10 细胞在成功转染 72 h 后用胰酶消化，收集于 EP 管内，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，磷酸盐缓冲液（phosphate buffer，PBS）洗 2 次后用预冷的 70%（体积比）乙醇固定，流式细胞术分析细胞增殖周期。

1.2.7 甲苯胺蓝染色检测软骨基质分泌 C3H10 细胞在成功转染 7 d 后，PBS 洗 2 次，4%多聚甲醛固定过夜，再用蒸馏水洗 2 次，每次 5 min，加 1%甲苯胺蓝浸染 2 h，去除多余染液，镜下观察，晾干，中性树胶封片。

1.3 统计学分析

数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 Excel 2003 进行统计分析，3 组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 目的基因 FGF-2 的获取

PCR 扩增质粒 pAd-Trace-FGF-2 获取目的基因 FGF-2，PCR 产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析，可见约 651 bp 的特异性目的条带，大小与预期一致（图 1A）。

2.2 真核表达重组质粒 pIRES2-EGFP-FGF-2 的鉴定

重组质粒 pIRES2-EGFP-FGF-2 的双酶切（*Bgl* Ⅱ、*Sal* Ⅰ）产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析，可见约 651 bp 的目的基因条带和 5 300 bp 的载体片段（图 1B），大小均与预期一致，表明目的基因片段已成功插入表达载体。



A. PCR 扩增获取基因 FGF-2 的电泳图

B. 重组质粒 pIRES2-EGFP-FGF-2 经 *Bgl* Ⅱ、*Sal* Ⅰ双酶切产物鉴定结果

1. PCR 扩增产物；2. DNA Marker Ⅱ；3. 重组质粒 pIRES2-EGFP-FGF-2 双酶切产物；4. DNA Marker DL5000

图 1 基因 FGF-2 PCR 产物凝胶电泳图及重组质粒 pIRES2-EGFP-FGF-2 双酶切的鉴定

Fig.1 Gel electrophoresis of PCR products of FGF-2 gene and double restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pIRES2-EGFP-FGF-2

2.3 重组质粒转染细胞后的荧光显微镜观察

脂质体转染 pIRES2-EGFP-FGF-2 重组质粒和pIRES2-EGFP 空载体 48 h 后，在荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的表达(图 2)，空白对照组未见绿色荧光蛋白的表达。



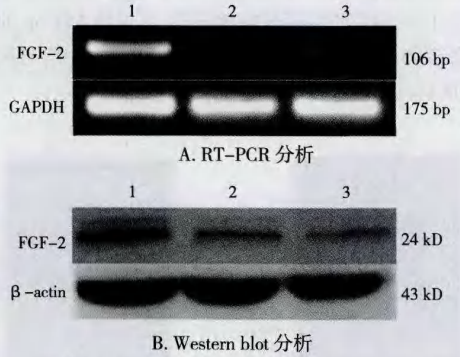
A. 转染质粒 FGF-2 组　B. 空载体转染对照组　C. 空白对照组

图 2　FGF-2 转染 C3H10 细胞 48 h 后的荧光显微镜观察(100×)

Fig.2　Fluorescent microscopy of C3H10 cells at 48 h after the transfection with FGF-2(100×)

2.4 pIRES2-EGFP-FGF-2 重组质粒介导 FGF-2 基因在 C3H10 中过表达

RT-PCR 分析显示，pIRES2-EGFP-FGF-2 重组质粒转染组 FGF-2 的 mRNA 相对转录水平显著高于 2 对照组(F=43.28，P=0.000 3)，图像经 Image 软件进行半定量分析，差异有统计学意义(F=85.450，P=0.000)。Western blot 分析显示，在各组 β-actin 表达一致的情况下，pIRES2-EGFP-FGF-2 重组质粒转染组在相对分子质量约 24 kD 处可见目的蛋白条带，转染组 FGF-2 蛋白相对表达量(2.392 ± 0.295)明显高于空载体转染对照组(0.940 ± 0.104)及空白对照组(0.809 ± 0.163)(F=85.450，P=0.000)，而空载体转染对照组及空白对照组 FGF-2 蛋白的表达量无统计学意义(图 3)。



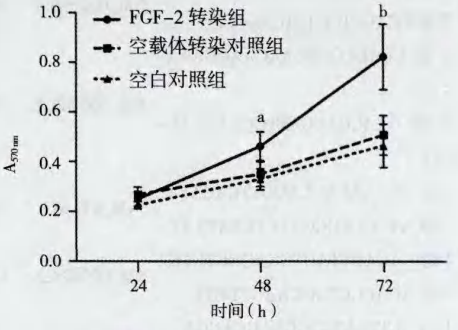
1. FGF-2 转染组；2. 空载体转染对照组；3. 空白对照组

图 3　RT-PCR 及 Western blot 检测各组细胞 FGF-2 mRNA 和蛋白的表达水平

Fig.3　Transcription level of FGF-2 mRNA and protein determined in each group by RT-PCR and Western blot

2.5 MTT 法检测 FGF-2 过表达对 C3H10 细胞增殖能力的影响

各组细胞增殖曲线如图 4，成功转染 24 h 后，各组细胞增殖缓慢，48 h 后 FGF-2 转染组细胞较空载体转染对照组和空白对照组增殖加快，差异有统计学意义(F=11.966，P=0.001)。提示重组质粒 FGF-2 能促进 C3H10 细胞增殖。



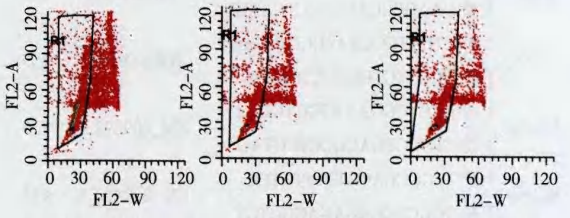
a. P=0.003，b. P=0.000，与 2 对照组相比

图 4　各组 C3H10 细胞的生长曲线

Fig.4　Growth curve of C3H10 cell in each group

2.6 转染细胞的增殖周期分析

流式细胞仪检测各组细胞增殖周期结果如表 2 和图 5 所示，G2 期和 S 期反映细胞的增殖活性，利用公式细胞增殖指数(proliferation index，PrI)=(G2+S)%，可以看出 FGF-2 转染组细胞 PrI 最高(52.347 ± 3.265)，同 2 对照组相比差异有统计学意义(F=26.534，P=0.001)，说明转染组的细胞增殖能力强，提示 FGF-2 对 C3H10 细胞有促进细胞有丝分裂的作用。



A. FGF-2 转染组　B. 空载体转染对照组　C. 空白对照组

图 5　流式细胞仪检测各组细胞增殖周期结果

Fig.5　Proliferation of C3H10 cell in each group by flow cytometry

2.7 FGF-2 过表达对 C3H10 成骨及成软骨指标 mRNA 转录水平及 Col Ⅱ 蛋白表达水平的影响

如图 6 和表 3 所示，FGF-2 转染组 Col Ⅰ、Col Ⅱ、ACAN

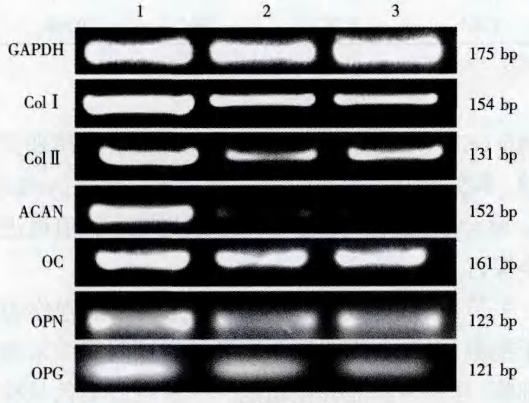
表 2　FGF-2 基因过表达对 C3H10 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$，%，n=3)

Tab.2　Effect of FGF-2 overexpression on cell cycle of C3H10 cell ($\bar{x} \pm s$，%，n=3)

组别	G1	G2	S	PrI
FGF-2转染组	47.653 ± 3.265	10.490 ± 1.914	41.857 ± 1.356	52.347 ± 3.265[a]
空载体转染对照组	82.527 ± 10.079	6.300 ± 3.667	11.173 ± 6.435	17.473 ± 10.079
空白对照组	83.910 ± 5.561	7.7867 ± 2.517	8.303 ± 3.916	16.090 ± 5.561

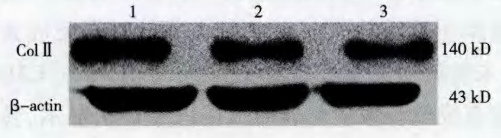
注：a，与 2 对照组相比，F=26.534，P=0.001

mRNA相对转录水平升高且差异有统计学意义($P<0.05$)，但中晚期成骨指标 OC、OPG、OPN mRNA 转录水平无明显升高($P>0.05$)，同时 Western blot 检测显示 Col Ⅱ 蛋白的表达在 FGF-2 转染组明显高于 2 对照组(图 6B)，提示 FGF-2 过表达可促进 C3H10 细胞向软骨方向分化，短期对成骨分化没有明显作用。



A. RT-PCR 分析

1. FGF-2 转染组；2. 空载体转染对照组；3. 空白对照组



B. Western blot 分析

1. FGF-2 转染组；2. 空载体转染对照组；3. 空白对照组

图 6 RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞成骨及成软骨指标 mRNA 及蛋白的表达水平

Fig.6 mRNA and protein expression of chondrogenesis and osteogenesis markers in each group by RT-PCR and Western blot

2.8 甲苯胺蓝染色分析 FGF-2 过表达对 C3H10 软骨特异性糖胺聚糖分泌的影响

各组细胞甲苯胺蓝染色结果如图 7 所示，FGF-2 转染组的细胞外基质呈现紫红色异染，提示分泌基质中含有大量的糖胺聚糖；而 2 对照组均未着色。进一步证实 FGF-2 过表达可促进 C3H10 软骨分化，增加其特异性软骨基质的分泌。



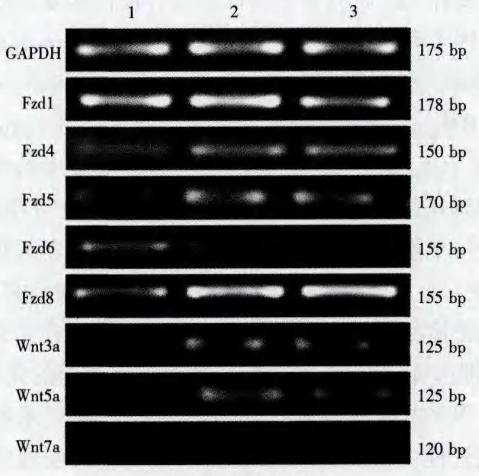
A. FGF-2 转染组　B. 空载体转染对照组　C. 空白对照组

图 7 各组 C3H10 细胞甲苯胺蓝染色(100×)

Fig.7 Toluidine blue staining of C3H10 cell in each group(100×)

2.9 FGF-2 过表达对 Wnt 信号通路相关指标 mRNA 转录水平的影响

Wnt 信号分子在 C3H10 的基础表达不完全一致，其中受体 Fzd1 和 Fzd8 相对高表达。FGF-2 转染组 Wnt5a 及 Fzd8 mRNA 相对转录水平降低且差异有统计学意义($P<0.05$)，Wnt3a、Wnt7a 及其他受体的 mRNA 转录水平无明显变化($P>0.05$)(图 8 和表 4)。提示 Fzd8 是 C3H10 细胞中 Wnt信号的优势受体，FGF-2 过表达可下调 Wnt5a 及 Fzd8 的表达。



A. RT-PCR 分析

1. FGF-2 转染组；2. 空载体转染对照组；3. 空白对照组

图 8 RT-PCR 检测各组细胞 Wnt 信号分子及相关受体 mRNA 的表达水平

Fig.8 Determination of transcription level of Wnt pathway molecule mRNA in each group by RT-PCR

表 3 RT-PCR 检测成骨及成软骨指标 mRNA 水平

Tab.3 mRNA expression of chondrogenesis and osteogenesis markers by RT-PCR

分组	Col Ⅰ	Col Ⅱ	ACAN	OC	OPN	OPG
FGF-2转染组	136.364 ± 28.792[a]	100.978 ± 3.659[a]	96.788 ± 13.572[a]	79.321 ± 29.687	98.194 ± 26.911	109.955 ± 26.979
空载体转染对照组	87.118 ± 27.083	64.305 ± 16.316	58.183 ± 23.338	50.796 ± 16.644	82.977 ± 24.682	78.303 ± 31.448
空白对照组	65.887 ± 23.415	60.674 ± 12.908	42.286 ± 24.547	44.587 ± 12.069	67.938 ± 21.376	51.825 ± 17.695
F 值	5.574	10.026	5.310	2.368	1.150	3.755
P 值	0.043	0.0122	0.047	0.175	0.378	0.088

注：与 2 对照组比较，a，$P<0.05$

表 4 RT-PCR 检测 Wnt 信号分子及相关受体 mRNA 的表达水平

Tab.4 Determination of transcription level of Wnt pathway molecule mRNA by RT-PCR

分组	Fzd1	Fzd4	Fzd5	Fzd6	Fzd8	Wnt3a	Wnt5a	Wnt7a
A组	126.193 ± 31.536	94.536 ± 22.632	103.011 ± 8.182	79.551 ± 15.021	71.435 ± 13.249[a]	94.186 ± 12.537	69.710 ± 5.545[a]	58.005 ± 22.243
B组	133.681 ± 2.760	112.147 ± 3.249	100.459 ± 11.614	60.317 ± 12.155	113.976 ± 4.764	92.065 ± 10.814	93.185 ± 6.100	51.413 ± 27.871
C组	133.081 ± 34.19	114.219 ± 4.173	102.059 ± 14.531	58.383 ± 11.289	131.101 ± 10.195	98.769 ± 9.837	92.454 ± 7.488	45.778 ± 32.448
F 值	0.058	1.949	0.036	2.461	28.110	0.285	12.926	0.145
P 值	0.944	0.223	0.964	0.166	0.001	0.762	0.007	0.868

A组：FGF-2 转染组；B 组：空载体转染对照组；C 组：空白对照组；a：与 2 对照组比较，$P<0.05$

3 讨 论

目前，软骨组织工程的兴起与发展为解决关节软骨损伤修复这一难题打开了一扇窗户，其主要结构包括种子细胞、细胞支架、细胞因子三大类[7]。其中多肽生长因子对关节软骨的内环境稳态及修复起重要作用。研究较多的促进软骨损伤修复的多肽生长因子有转化生长因子（transformating growth factor，TGF）、骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMPs）、胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor，IGF）等[8-10]。近年 FGF-2 在软骨修复中的作用引起越来越多的医学工作者的关注。研究发现，软骨缺损早期修复过程中 FGF-2 的 mRNA 表达明显增加[11]，而一旦间充质干细胞分化成软骨细胞完成，就无法检测到 FGF-2 的活性，认为 FGF-2 在间充质干细胞向软骨分化的早期可能扮演了重要的角色。Chia 等[12]先构建 FGF-2 基因敲除小鼠，再手术制造小鼠骨性关节炎（osteoarthritis，OA）模型，发现皮下注射重组 FGF-2 后 OA 有所改善，并提出 FGF-2是一种新型的关节软骨的内生软骨保护剂。Argün 等[13]利用骨膜移植术及注射重组 FGF-2 在 12 周内成功修复了兔关节软骨全层缺损。本实验拟选用 FGF-2 作为软骨组织工程的细胞因子，在体外细胞水平进一步确定其修复关节软骨缺损的作用。本实验采用带有 EGFP 基因的真核表达质粒 pIRES2-EGFP 作为基础质粒，绿色荧光可用于判断外源基因的转染效率，后续体内试验进行细胞示踪。获得的 pIRES2-EGFP-FGF-2 质粒转染 C3H10 细胞可高效表达 FGF-2，促进 C3H10 细胞生长，S 期细胞比例明显增加，PrI 明显增高，与文献[14]报道一致。细胞周期是一个高度有序的运转过程，它的正确运转是在适宜的环境中通过对细胞周期蛋白/周期蛋白依赖性激酶（cyclin/Cdks）复合物的活性进行精确调控来实现的。本实验中 FGF-2 过表达是否通过调节 cyclin/Cdks 复合物的活性促进 C3H10 细胞增殖，值得进一步探讨。

关节软骨缺损修复多选用间充质干细胞作为种子细胞，C3H10 细胞为小鼠胚胎时期间充质来源干细胞，具有多潜能分化功能。甲苯胺蓝染色是检测软骨细胞特性的方法之一，可使软骨细胞分泌的酸性糖胺多糖异染成紫红色。本实验结果显示，转染重组质粒后的 C3H10 细胞大部分被异染成紫红色，未转染组无紫红色异染，提示 FGF-2 对 C3H10 细胞有成软骨效应。同时 RT-PCR 分析显示，转染组的 Col Ⅱ及 ACAN 的 mRNA 水平显著升高，进一步验证了 FGF-2 有诱导 C3H10 细胞向软骨分化效应[14-15]。

Varkey 等[16]提出 FGF-2 能强有力地促进间充质干细胞向成骨细胞分化，因其有效剂量可低至 10 ng/ml。但本研究发现 C3H10 细胞中 FGF-2 过表达，仅早期成骨检测指标 Col Ⅰ的 mRNA 水平较对照组高表达，中晚期成骨检测指标 OPN、OPG 和 OC 的表达增高不明显，考虑可能是成骨基质蛋白在 C3H10 细胞中表达不敏感，FGF-2 转染剂量不足且时间较短，短期对 C3H10 细胞的成骨效应没有完全表现出来。

本研究进一步探讨了 FGF-2 诱导 C3H10 细胞成软骨分化可能的分子机制。Wnt 信号通路在骨与软骨发育中发挥重要作用，参与了间充质干细胞增殖分化的过程[17]。其中 Wnt3a 主要参与成骨分化调节[18]，而 Wnt5a 和 Wnt5b 在体外可以促进早期软骨形成，在体内抑制软骨终末分化[19]。本实验发现 FGF-2 过表达，能抑制 Wnt5a 及受体 Fzd8 的表达，而 Wnt3a 和 Wnt7a 的表达无明显变化。Wnt5a 是Wnt 蛋白家族重要成员，通过结合胞膜表面受体（Fzds）及

其协同受体(如 ROR2、PYK)一起诱导激活非经典 Wnt 信号通路,在软骨细胞形成与分化及细胞外基质代谢过程中起重要调控作用。Yang 等[20]通过构建 Wnt5a 及 Wnt5b 转基因小鼠发现Wnt5a 可能通过下调 SOX9 的转录水平促进软骨细胞肥厚，同时增加 p130 表达,抑制 cyclin D1 表达进而抑制软骨细胞增殖,Ryu 和 Chun[21]发现 Wnt5a 通过JNK 通路抑制软骨细胞 ColⅡ的表达,同时 Wnt11 通过 PKC 通路增强 ColⅡ的表达。因此,FGF-2 促进 C3H10 细胞增殖,诱导其成软骨分化的机制可能与下调 Wnt5a有关,C3H10 细胞中优势受体 Fzd8 的表达水平最高,其下调与 Wnt5a 正相关,Fzd8 是否参与了 Wnt5a 对 C3H10 细胞软骨分化的调节需要进一步探讨。

综上所述,本实验成功构建了具有正常生物学活性的 FGF-2 真核表达质粒,FGF-2 过表达能促进 C3H10 细胞增殖,并有效诱导成软骨分化,这一效应可能与下调 Wnt5a 及受体 Fzd8 的表达有关。本实验拟将进行体内试验,探索利用 FGF-2 修复关节软骨缺损的方法。

参 考 文 献

[1] Smith GD,Knutsen G,Richardson JB.A clinical review of cartilage repair techniques[J].J Bone Joint Surg Br,2005,87(4):445-449.

[2] Gospodarowicz D,Ferrara N,Schweigerer L,et al.Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor[J].Endocr Rev,1987,8(2):95-114.

[3] Rifkin DB,Moscatelli D.Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor[J].J Cell Biol,1989,109(1):1-6.

[4] Tanaka H,Mizokami H,Shiigi E,et al.Effects of basic fibroblast growth factor on the repair of large osteochondral defects of articular cartilage in rabbits:dose-response effects and long-term outcomes[J].Tissue Eng,2004,10(3-4):633-641.

[5] Hiraki Y,Shukunami C,Iyama K,et al.Differentiation of chondrogenic precursor cells during the regeneration of articular cartilage[J].Osteoarthritis Cartilage,2001,9(sA):102-108.

[6] Vincent T,Hermansson M,Bolton M,et al.Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury[J].Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(12):8259-8264.

[7] Khan IM,Francis L,Theobald PS,et al.In vitro growth factor-induced bio engineering of mature articular cartilage[J].Biomaterials,2013,34(5):1478-1487.

[8] Shi S,Mercer S,Ecker GJ,et al.Growth factor regulation of growth factors in articular chondrocytes[J].J Biol Chem,2009,284(11):6697-6704.

[9] Fortier LA,Barker JU,Strauss EJ,et al.The role of growth factors in cartilage repair[J].Clin Orthop Relat Res,2011,469(10):2706-2715.

[10] Ishii I,Mizuta H,Sei A,et al.Healing of full-thickness defects of the articular cartilage in rabbits using fibroblast growth factor-2 and a fibrin sealant[J].J Bone Joint Surg Br,2007,89(5):693-700.

[11] Mizuta H,Kudo S,Nakamura E,et al.Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage[J].Osteoarthritis Cartilage,2004,12(7):586-596.

[12] Chia S L,Sawaji Y,Burleigh A,et al.Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis[J].Arthritis Rheum,2009,60(7):2019-2027.

[13] Argün M,Ner M,Güney A,et al.The healing of full-thickness articular cartilage defects in rabbits:successful results with fibroblast growth factor[J].Eklem Hastalik Cerrashisi,2010,21(3):147-152.

[14] Mastrogiacomo M,Cancedda R,Quarto R.Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells[J].Osteoarthritis Cartilage,2001,9(sA):36-40.

[15] Cheng T,Yang C,Weber N,et al.Fibroblast growth factor 2 enhances the kinetics of mesenchymal stemcell chondrogenesis[J].Biochem Biophys Res Commun,2012,426(4):544-550.

[16] Varkey M,Kucharski C,Haque T,et al.In vitro osteogenic response of rat bone marrow cells to bFGF and BMP-2 treatments[J].Clin Orthop Relat Res,2006(443):113-123.

[17] Etheridge SL,Spencer GJ,Heath DJ,et al.Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells[J].Stem Cells,2004,22(5):849-860.

[18] Boland GM,Perkins G,Hall DJ,et al.Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells[J].J Cell Biochem,2004,93(6):1210-1230.

[19] Church V,Nohno T,Linker C,et al.Wnt regulation of chondrocyte differentiation[J].JCell Sci,2002,115(Pt 24):4809-4818.

[20] Yang Y,Topol L,Lee H,et al.Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation[J].Development,2003,130(5):1003-1015.

[21] Ryu JH,Chun JS.Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1 beta regulation of type Ⅱ collagen expression in articular chondrocytes[J].J Biol Chem,2006,281(31):22039-22047.

（责任编辑:关蕴良）