维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0354-04

hIGF-1 基因修饰骨髓基质干细胞复合 PLGA 移植修复关节软骨缺损

丁幸坡,金先庆,刘 伟

(重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究人胰岛素样生长因子 -1(hIGF-1)基因修饰的骨髓基质干细胞(MSCs)复合 PLGA 材料移植对关节软骨缺损的修复作用。方法:从质粒 pcDNA3.1-hIGF-1 中扩增出 hIGF-1 基因,亚克隆后酶切出目的片段插入 pIRES2-EGFP 中,构建成真核表达载体 pIRES2-EGFP-hIGF-1,鉴定后转染兔 MSCs 并检测 hIGF-1 在其中的表达;将转染细胞复合 PLGA 支架材料立体培养后植入实验性兔关节软骨缺损处,不同时间取材,检测对软骨缺损修复的效果。结果:成功构建了 GFP 标记的真核载体 pIRES2-EGFP-hIGF-1,并在靶细胞中得到理想表达;hIGF1 基因修饰的 MSCs 复合支架材料移植明显促进了缺损软骨的修复质量,组织学评分与对照组相比有统计学差异($P<0.05$)。结论:IGF-1 是软骨组织工程种子细胞 MSCs 基因修饰的理想候选基因,以之修饰的 MSCs 作为种子细胞可以明显提高组织工程方法对软骨缺损的修复效果。

【关键词】人胰岛素样生长因子 -1;骨髓基质干细胞;关节软骨缺损

【中国图书分类法分类号】R681.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-11

Repair of articular cartilage defects by transplantation of PLGA compounded with mesenchymal stem cells modified by hIGF-1 gene

DING Xingpo, et al

(*Institute of Pediatric Research, Children' s Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To invest the repair effect of articular cartilage defects by transplantation of PLGA compounded with mesenchymal stem cells modified by hIGF-1 gene. *Methods*: After the amplification by polymerase chain reaction (PCR) from pcDNA3.1-hIGF-1, the human insulin-like growth factor-1 (hIGF-1) fragment was inserted to plasmid pIRES2-EGFP to get recombinated vector pIRES2-EGFP-hIGF-1, which followed by transfection of restructured vectors to mesenchymal stem cells and determination the expression of hIGF-1 gene. The gene-modified MSCs were compounded with PLGA and then cultured in standard condition. Then, the transplantation of graft to the defect positon of articular cartilage was performed. After the transplantation, the specimens was obtained in different time and the repair was inspected. *Results:* The reconstructed vector contained hIGF-1 and GFP genes was constructed successfully and high efficiency expression of hIGF-1 was detected in target cells. Compared to the control groups, the group of transplantation of graft compounded with MSCs modified hIGF-1 greatly improved the effect of articular cartilage defects. *Conclusions*: IGF-1 gene is one of the ideal candidate genes for the gene modification of MSCs, the seed cells of cartilage tissue engineering and the gene-modified MSCs can improved effective the repair of articular cartilage defects.

【Key words】Human insulin-like growth factor; Mesenchymal stem cells-1; Articular cartilage defects

关节软骨缺损的修复是临床极为棘手的问题。组织工程方法的出现给人们提供了可能最终解决问题的理想途径。骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)目前被认为是软骨组织工程最有价值的种子细胞,但被作为基因治疗的靶细胞则尚未引起足够重视。IGF-1 是软骨细胞增殖、分化过程中已知的作用最强的生长因子之一。本实验通过构建含截短型 hIGF-1 基因的重组真核表达载体并转染兔 MSCs,复合 PLGA 材料立体培养后移植实验性兔关节软骨缺损处,观察和检测对缺损软骨的修复效果。

作者介绍:丁幸坡(1973-),男,博士生,
主要研究方向:软骨组织工程。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 实验材料与动物

pcDNA3.1-hIGF-1 质粒（北大人类基因组实验室馈赠）；pIRES2-EGFP 质粒（重庆医科大学周亚莉博士馈赠）；大肠杆菌 DH5a（本实验室保存）；限制性内切酶 Nhe I、Xho I、Taq 酶、mRNA 抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、100bp DNA Ladder、X-gal、IPTG（Takara 公司）；RT-PCR 试剂盒（上海华舜）；DMEM/F12 培养基、胎牛血清、Percoll 细胞分离液（Gibico 公司）；Polyfect 转染试剂（改良的 PAMAM-D）、Endofree Plasmid Maxi kit（Qiagen 公司）；hIGF-1 一抗（兔抗人，Santa Cruz 公司），二抗（羊抗兔）、DAB 显色试剂盒、ELISA 试剂盒（Boster）；PLGA 无纺网（美国 EQUL 公司）；甲苯胺蓝（百萃公司）。新西兰大白兔（重庆医科大学实验动物中心）。

1.2 方法

1.2.1 构建表达载体 pEGFP-IRES2-hIGF-1 根据文献[1]公布的 hIGF-1 序列及载体 pIRES2-EGFP 酶切位点用 Primer5.0 软件设计包括上游 Nhe I 和下游 Xho I 位点的 PCR 引物（5′-gccgctagcgaagatgcacaccatgtcctc，3′-ccgctcgagctacatcctgtagttcttgtttc），从 pcDNA3.1-hIGF-1 中扩增截短的目的基因 hIGF-1，反应条件：94℃×2m×1c；94℃×15s，58℃×20s，72℃×20s，25c；72℃×5m×1c，电泳初步鉴定；将 PCR 产物片段亚克隆至 pMD18-T 载体转化 DH5α 感受态细菌，蓝白斑法筛选阳性菌落，PCR 快速鉴定出阳性质粒后抽提质粒 DNA，Nhe I、Xho I 进一步双酶切鉴定；Nhe I、Xho I 分别双酶切载体 pMD18-hIGF-1 和 pIRES2-EGFP，胶回收二者酶切产物后过夜连接、转化、扩增、鉴定，得到重组质粒 pEGFP-IRES2-hIGF-1，送 Takara 公司测序。

1.2.2 转染靶细胞及表达检测 采用标准的密度梯度离心法分离、纯化、培养 MSCs。将所得兔 MSCs 于 37℃、5% CO_2 孵箱培养，隔天换液，传至第 3 代用于实验。将兔 MSCs 细胞按 6×10^5 细胞/孔密度接种 6 孔板培养至 40%~80% 融合开始转染，具体操作严格按 Polyfect 转染试剂盒说明进行，转染后不同时间点观察并记录荧光表达情况，感染第 4 天消化细胞，流式细胞仪检测转染效率，收集同期转染细胞抽提总 RNA，RT-PCR 检测 hIGF-1 分子水平的表达；感染第 3 天准备细胞爬片次日免疫细胞化学方法检测胞浆中蛋白表达。分别收集转染后 24h，48h，72 h，1w、2w 的 MSCs 培养上清，酶联免疫吸附法（EL ISA）检测其中分泌型 hIGF-1 浓度。

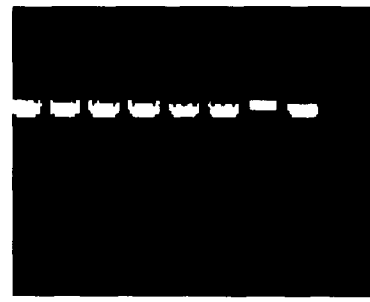
1.2.3 材料处理及细胞-支架复合物制备 将 PLGA 材料修剪至 φ4mm 大小，100% 异丙基浸泡 10min×3 次，70% 酒精预湿 2h，PBS 漂洗 30min×3 次，于含 15%FBS 的 DMEM/F12 全培养基的 6 孔板中浸泡过夜，次日使用；取感染第 4 天、融合率 80%~90% 的第 3 代 MSCs 胰酶消化，按照细胞密度 4~5×10^7/ml 滴加于吸干培养基的 PLGA 材料上，分组、标记后标准条件下培养，连续观察细胞生长状态及与材料的黏附情况。

1.2.4 模型制备及检测指标 麻醉（耳缘静脉予 3% 戊巴比妥 1.0 ml/kg）后，髌骨外侧纵切口暴露左右膝关节，以角膜环钻于股骨髁内、外侧滑车关节面上制成直径 3mm、深达软骨下层的全层软骨缺损，填充植入细胞-材料复合物，逐层关闭关节。每只动物两关节共制作 4 个缺损，自左到右为：A 组-空白对照；B 组-PLGA 移植；C 组：PLGA+MSCs 移植；D 组：PLGA+MSCs（hIGF-1 转染）移植。15 只动物均按相同步骤处理，术后动物单笼喂养，关节不予固定允许其自由活动，抗生素连用 1W。术后观察动物肢体活动、饮食量及伤口愈合等一般情况，分别于术后 4w（5 只）、8w（5 只）、12w（5 只）处死动物进行以下观察和检测：大体观察、Wakitani 组织学评分[2]，缺损局部取材，EDTA 脱钙液脱钙 3W 后进行常规固定、包埋、切片等处理，进行软骨特征成份染色。组织学评分结果用 SPSS13.0 软件进行统计处理，采用配对设计差值均数 t 检验进行分析，$a=0.05$ 作为检验标准。

2 结 果

2.1 重组质粒的鉴定

成功重组质粒 pEGFP-IRES2-hIGF-1，测序结果经 Blast2.0 比对与公布序列一致性 99.9%（281 位碱基同义突变，未影响氨基酸翻译：ggt/ggc-Gly）。用 Nhe I 和 Xho I 双酶切后电泳可得到约 410bp 大小清晰条带，电泳结果与预期相符（图 1），用上述 PCR 引物可扩增出约 410bp 的目的条带，证明载体重组成功。



1.100bpDNA ladder; 2. pMD18-hIGF-1;
3.pEGFP-IRES2; 4-6. pEGFP-IRES2-hIGF-1

图 1 重组质粒酶切鉴定（Nhe I，Xho I）

2.2 MSCs 的分离培养

原代细胞培养至 8 天时细胞融合已达 70%~80%，外观呈均一的长梭型，形态均一，呈典型的涡旋状排列，立体感强，贴壁紧密（图 2）。取不同时间培养细胞描绘生长曲线，测定细胞活力。

2.3 细胞荧光观察及基因表达检测

转染细胞后 17h 即可观察到零星绿色荧光出现，72h 达到最强（图 3），1w 后逐渐减弱，但局部单

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 原代 MSCs 培养第 8 天(×100)



图 3 转染后 72h MSCs 绿色荧光蛋白的表达
(倒置荧光显微镜×100)

克隆细胞簇的较强的荧光表达可持续长达 6w。取转染第 4 天的 MSCs 以未转染的 MSCs 作为荧光背景作流式细胞检测,显示转染率接近 40%。消化收集转染的 MSCs(细胞数约 5×10^6),抽提总 RNA 作 RT-PCR,扩增得到约 410bp 长度产物,证明 hIGF-1 在分子水平有表达;免疫细胞化学染色显示转染 MSCs 细胞胞浆中有明显棕黄色阳性颗粒出现,与对照组对比鲜明,表明目的基因在 MSCs 胞浆中有较好表达(图 4);ELISA 结果显示培养上清中分泌性 hIGF-1 的表达呈现一过性的升高和恢复的趋势,在 48h 最高可累计达到 56.4 ± 8.2ng/ml,其后逐渐下降,到 2w 时为 10.22 ± 3.7ng/ml。浓度的变化趋势大致类似于荧光强弱的改变。空载体转染组及未转染组培养上清中 hIGF-1 的浓度约为 0.22 ± 0.08ng/ml。各组未见明显的细胞毒性。

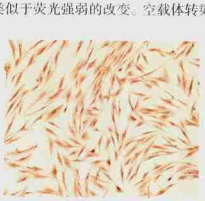


图 4 重组质粒 pEGFP-IRES2-hIGF-1 转染兔 MSCs 72h 免疫细胞化学(细胞爬片,SP 法,DAB 显色×200)

2.4 细胞在 PLGA 支架上的附着及生长情况

复合物培养第 2 天即可观察到细胞沿支架纤维走向黏附生长,1w 后即被此连接成片,取此时细胞-PLGA 复合材料进行缺损处移植;继续复合培养的材料在第 4w 左右逐渐降解,第 8w 周基本降解完全,未降解者镜下呈游离的短段、微曲的细丝状物。关节缺损区域移植物采样显示 PLGA 体内降解时间基本一致。

2.5 动物观察及组织学评分

动物于术后 2 天即基本恢复正常饮食及活动。术中及术后死亡动物两只,存活 13 只动物分别按设计时间点处死采样。大体观察显示,随时间推移各组均有不同程度的组织修复,12w 时部分 D 组缺损移植处处已可以看到被新生的光洁软骨样组织充满并部分凸出关节面,与周围正常组织无明显分界(图 5),组织学评分与对照组有明显的统计学差异($P<0.05$),而与正常软骨组织无明显统计学差异($P>0.05$),染色显示新生的类软骨组织含有大量胶原纤维(亮红,HE)、软骨基质(蓝紫色,甲苯胺蓝)等成熟软骨的特征成份(图 6,7),免疫组化 DAB 染色显示新生类软骨细胞胞浆内有大量的Ⅱ型胶原阳性着色(棕黄)(图 8)。



图 5 术后 12W 外观:C 区基底部有部分软骨样组织生长,D 区被新生类软骨组织完全覆盖且中部凸出关节面

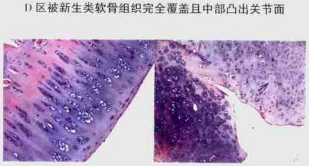


图 6 左:正常对照;右:D 组 12w,胶原纤维亮红色(HE×200)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 7 左:正常对照;右:D 组 12w,软骨基质蓝紫色(甲苯胺蓝×200)

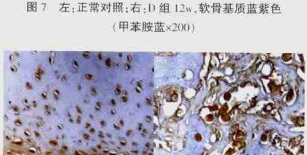


图 8 Ⅱ型胶原免疫组化(SP 法,DAB 显色,×400)
左:正常对照;右:D 组 12w,胞浆内出现棕黄色阳性信号。

3 讨 论

对种子细胞进行基因改良或基因修饰是目前组织工程研究的一个方向[2-4]。MSCs 作为种子细胞由于具有多种优势而成为目前软骨组织工程的公认的首选种子细胞[5],但在体内外向软骨细胞分化增殖过程中常需要某些特定外源性的生长因子(如 BMP,TGF-β1,IGF-1 等)的作用[6]。由于内源性生长因子的相对缺乏和外源性生长因子价格昂贵以及外源蛋白的免疫应激反应等限制了其功能的发挥和常规使用。若能将这些基因导入种子细胞(基因修饰)使之在体内或体外通过自分泌或旁分泌的方式对种子细胞发挥相应作用,则可能从根本上解决这一问题。

胰岛素样生长因子(IGF-1)的主要作用是在局部促进软骨细胞增殖与分化,并促进软骨细胞合成其特征性的Ⅱ型胶原和蛋白聚糖,维持软骨细胞表型[7-9],是目前已知的调节软骨代谢和维持软骨内环境诸多因素中最关键的生长因子之一。本实验将 hIGF-1 基因导入携带有 GFP 报告基因的真核载体,并在靶细胞 MSCs 中检测到了高效表达。由于该载体携带有 IRES(内部核糖体进入位点)序列,从而保证了目的基因与报告基因增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)在细胞内同时效的表达[10-11],检测更加直观简便。外源性基因导入细胞需要一定的介质。目前使用的各种病毒载体和非病毒载体等各有其优缺点,本实验选用当前更加安全和高效率的 Polyfect 转染试剂[12](最新改良的 PAMAM-D 纳米材料)将构建的重组载体高效导入 MSCs 并使之得以较强表达。

种子细胞的立体培养是模拟体内细胞环境的一个新的尝试。本实验将转染目的基因 hIGF-1 的 MSCs 种植于可降解的生物活性材料 PLGA (聚乳酸-聚乙醇酸共聚物)上进行三维培养后移植于实验性兔关节软骨缺损局部,12w 后发现缺损部位得到了完全的外观修补,新生组织含有较多透明软骨和纤维软骨成分,组织学评分、Ⅱ型胶原免疫组化以及组织学其它各种染色等均显示与正常软骨组织较为接近,证实 hIGF-1 基因修饰的 MSCs 复合移植极大的促进了缺损关节软骨的修复,修复效果与各对照组(未移植组、单纯支架移植组和未转染 MSCs 复合支架移植组)相比明显较好,组织学评分有统计学差异。

本实验成功构建了携带功能基因 hIGF-1 和标记基因 EGFP 的的真核表达载体,以之转染修饰的靶细胞 MSC 与 PGLA 复合培养并移植后,明显增强了对实验兔关节软骨缺损的修复作用,为基因强化组织工程关节软骨的构建提供了新的实验依据。

参 考 文 献

[1] Jansen M, van Schaik FM, Ricker AT, et al. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor [J]. Nature, 1983;306:609-611.

[2] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage [J]. J Bone Joint Surg Am JT - The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1994;76(4):579-592.

[3] Sixer RA, Bent SJ. Gene mediated insulin-like growth factor-1 delivery to the synovium [J]. J Orthop Res, 2001;19(5):759-767.

[4] Gelse K, von der Mark K. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells [J]. Arthritis Rheum, 2003;48(2):430-441.

[5] 孔清泉,顾 舟,杨志明.骨髓基质干细胞作软骨组织工程种子细胞研究[J].中国修复重建外科杂志, 2002;16(4):277-280.

[6] Randal S Goomer, David Amiel. Repair of articular cartilage defects by ex-vivo gene therapy[J]. Current Opinion in Orthopedics, 2000;11(5):378-382.

(下转第 390 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

中发现，无瘤生存者 survivin 着色阳性细胞百分数为(27.7 ± 24.8)，带瘤生存者为(51.1 ± 21.5)，死亡患者为(80.7 ± 8.7)。提示 survivin 表达率越高，患者的预后越差[10]，同时表明卵巢癌组织中 survivin 的表达与临床分期、组织学分级、临床预后显著相关，提示 survivin 有望成为判断预后的有价值的标记物。但是 Ferrandina G[11]研究了 110 例原发性卵巢癌病人，发现免疫组织化学染色检测 survivn 的表达并不能有助于判断预后，因此，survivin 在临床中的角色和意义仍需大量的研究。本文研究了 Survivin 及 AI 与预后的关系，结果显示 Survivin 表达阳性患者的 AI 明显低于 Survivin 表达阴性患者的 AI；AI 不但与临床分期有关，而且高凋亡指数(AI≥1.7%)患者的预后好于低凋亡指数患者 (AI<1.7%，$P<0.05$)。提示 survivin 有可能成为卵巢癌的一项重要预后预测因素和治疗靶点。目前已有研究表明[12]脂质体介导转染 survivin 反义寡核苷酸可以有效降低细胞内 survivin 基因的表达，抑制卵巢癌细胞生长。

癌细胞可能通过表达 Survivin 来抑制多种因素所诱导的细胞凋亡，使细胞处于不稳定状态。同时，Survivin 也具有调节血管形成作用，其通过抗凋亡特性保护肿瘤血管内皮细胞的生长增殖，为癌细胞的生长转移创造条件，从而影响癌细胞的生物学行为和患者的预后。本研究提示，Survivin 的异常表达与卵巢癌细胞凋亡抑制密切相关。

参 考 文 献

[1] Garewal H, Bernstein H, Bernstein C, et al. Reduced bile acid-induced apoptosis in "normal" colorectal mucosa: a potential biological marker for cancer risk [J]. Cancer Res, 1996; 56: 1480-1438.

[2] Nanashima A, Ito M, Sekine I, et al. Significant of factors in liver metastatic tumors originating from colorectal cancers[J]. Dig Dis Sci, 1998;43:2634-2640.

[3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 [J]. Biochemistry, 2001;40:1117-1123.

[4] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates procaspase3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death[J]. Oncogene, 2000;19:1346-1353.

[5] Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, et al. Expression of Survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium [J]. Mol Hum Reprod, 2000;6(6):529.

[6] Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, et al. Prognostic value of nuclear surviving expression in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2003;88(1):115-119.

[7] 杨锦芝，赵冬梅. 凋亡抑制基因 Survivin 在上皮性卵巢癌中的表达及其意义[J].滨州医学院学报, 2003,26(4):243-244.

[8] Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, et a1. Expression of theanti-apo ptotic gene survivin correlates with taxol resistance inhuman ovarian cancer [J]. Cell Mol Life Sci, 2002;59(8):1406-1412.

[9] 史惠蓉，兰 莉，乔玉环，等. 卵巢癌组织中 Survivin 和 PCNA 的表达[J]. 郑州大学学报(医学版),2004;39(4):552-554.

[10] Takai N, Miyazaki T, Nishida M, et a1. Expression of survivin is associated with malignant potential in epithelial ovarian carcinoma [J]. Int J Mol Med, 2002;10(2):211.

[11] Ferrandina G, Legge F, Martinelli E, et al. Survivin expression in ovarian cancer and its correlation with clinico-pathological, surgical and apoptosis-related parameters [J]. Br J Cancer, 2005 ;92(2):271-277.

[12] Ma X, Wang S, Zhou J, et al. Induction of apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells by antisurvivin oligonucleotides [J]. Oncol Rep, 2005;14(1):275-279.

(上接第 357 页)

[7] Starkman BG, Cravero JD, Delcarlo M, et al. IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK[J]. Biochem J, 2005;389(Pt 3):723-729.

[8] Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003;11(1):55-64.

[9] Madry H, Kaul G, Cucchiarini M, et al. Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I) [J]. Gene Ther, 2005;12(5):1171-1179.

[10] Sachs AB. Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail[J]. Cell JT - Cell, 2000;101(3):243-245.

[11] Pinstaff J K, Chappell SA. Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001; 98(5):2770-2775.

[12] Kramer M, Stumbe JF, Grimm G, et al. Dendritic polyamines: simple access to new materials with defined treelike structures for application in nonviral gene delivery [J]. Chembiochem JT- Chembiochem: a European journal of chemical biology, 2004; 5(8): 1081-1087.