基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001451

BMP-2及FGF-2对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

白　燕[1],王士斌[2],陈爱政[2],肖　唯[1],张然熙[1]

(1. 重庆医科大学药学院药剂学教研室,重庆　400016;2. 福建省生物化工技术重点实验室,厦门　361021)

【摘　要】目的:研究骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)和碱性成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2,FGF-2)单独或联合应用对大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)增殖和成骨分化的诱导作用。**方法**:体外培养大鼠骨髓间充质干细胞,分别用不同浓度的 BMP-2(10.0、100.0、200.0 ng/mL)和 FGF-2(0.1、1.0、10.0 ng/mL)单独或联合诱导其增殖和成骨分化,于培养的第 3、7 天检测细胞增殖,第 7 天检测细胞周期分布,第 7、14 天检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)表达量,第 14、21 天采用茜素红染色检测钙结节的形成情况。**结果**:单独应用 BMP-2 能够明显促进 BMSCs 成骨分化,最佳剂量为 200.0 ng/mL。当 BMP-2 为 200.0 ng/mL 时,ALP mRNA 表达量为 2.29 ± 0.14(P<0.01),钙结节形成达 2.68 ± 0.45(P<0.01)。单独应用 FGF-2 能够明显促进 BMSCs 增殖,最佳剂量为 1.0 ng/mL(P<0.01)。联合应用 BMP-2 和 FGF-2 时,较低浓度就能明显促进 BMSCs 的增殖和分化(BMP-2 为 10.0 ng/mL,FGF-2 为 0.1 ng/mL),ALP mRNA 表达量为 2.52 ± 0.15(P<0.01),钙结节形成达 3.18 ± 0.45(P<0.01),具有显著的协同诱导效应。**结论**:BMP-2 可促进 BMSCs 向成骨分化,FGF-2 可促进 BMSCs 增殖,两者联合应用可协同诱导 BMSCs 增殖和成骨分化。

【关键词】骨形态发生蛋白-2;碱性成纤维细胞生长因子-2;增殖;碱性磷酸酶;矿化

【中图分类号】R318　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-02-21

Effects of bone morphogenetic protein-2 and fibroblast growth factor-2 on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells

Bai Yan[1], Wang Shibin[2], Chen Aizheng[2], Xiao Wei[1], Zhang Ranxi[1]

(1. Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chongqing Medical University;

2. Fujian Provincial Laboratory of Biochemical Technology)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inductive effects of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) or/and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) on proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells(BMSCs). ***Methods***: Rat BMSCs were cultured in DMEM with the different doses of BMP-2(10.0,100.0,200.0 ng/mL) and FGF-2(0.1,1.0,10.0 ng/mL) alone or in combination. Cell proliferation was studied after 3- and 7-day culture respectively. Cell cycle of BMSCs was studied after 7-day culture. Alkaline phosphate production of the cells was measured after 7- and 14-day culture respectively. Calcification capacity of the cells was examined with Alizarin red S staining after 14- and 21-day culture respectively. ***Results***: When different doses of BMP-2 and FGF-2 were used alone, BMP-2 at 200.0 ng/mL effectively enhanced BMSCs osteogenic differentiation. ALP mRNA expression and mineralization treated with BMP-2 of 200.0 ng/mL were 2.29 ± 0.14(P<0.01) and 2.68 ± 0.45(P<0.01) respectively. FGF-2 at 1.0 ng/mL significantly improved BMSCs proliferation(P<0.01). The combination of BMP-2 and FGF-2 could synergistically promote the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs, with low concentrations(10.0 ng/mL BMP-2 and 0.1 ng/mL FGF-2) being enough to show the synergistic promotion. ALP mRNA expression and mineralization were 2.52 ± 0.15(P<0.01) and 3.18 ± 0.45(P<0.01) respectively. ***Conclusion***: BMSCs osteogenic differentiation could be increased by BMP-2; BMSCs proliferation could be increased by FGF-2, and the combination of BMP-2 and FGF-2 could synergistically promote the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs.

【Key words】bone morphogenetic protein-2; fibroblast growth factor-2; proliferation; alkaline phosphate; mineralization

作者介绍:白　燕,Email:baiyan1226@163.com,

研究方向:组织工程、药物缓释。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81401535)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171130.1009.002.html

(2017-11-30)

骨髓间充质干细胞（bone mesenchymal stem cells，BMSCs）具有多向分化的潜能，它能够分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等[1]。由于 BMSCs 具有良好的成骨分化能力并易于分离和体外培养，被认为是骨组织工程的理想种子细胞。BMSCs 的分化取决于培养条件，包括培养液中不同生长因子种类和浓度、激素、有无其他因子的作用等[2]。骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMP）是广泛分布于动物骨骼组织中的一族低分子糖蛋白多肽，它有很多种克隆，其中骨形态发生蛋白-2（bone morphogenetic protein-2，BMP-2）是目前已知效应最强、应用最广泛的骨生长因子，可明显增加细胞中碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）的活性，促进Ⅰ型胶原、骨钙素等的表达，从而表现强烈而稳定诱导成骨的作用[3]。碱性成纤维细胞生长因子-2（fibroblast growth factor-2，FGF-2）是多种细胞的主要有丝分裂原和形态发生因子[4]，特别是对于神经外胚层和中胚层来源的细胞，如成纤维细胞、血管内皮细胞、软骨细胞等[5]，均有显著促进增殖、迁移及分化的作用。

虽然目前已经有研究利用 BMP-2 及 FGF-2 来促进 BMSCs 的成骨分化，但对于它们诱导 BMSCs 成骨分化的剂量、协同调控作用还没有进行系统的研究。本文拟通过检测细胞增殖、碱性磷酸酶微量蛋白、矿化形成的钙结节研究 BMP-2 及 FGF-2 诱导 BMSCs 增殖和成骨分化的最佳剂量和协同效应，建立一种理想的诱导 BMSCs 成骨的培养体系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

荧光倒置显微镜（Olympus）、酶标仪（Bio-rad）、CO_2 细胞培养箱（Thermo）、96 孔培养板（Gibco）、DMEM（Gibic）、胎牛血清（Hyclone）、CCK-8（碧云天生物技术研究所）、生长因子（Peprotech）、引物（Sangon）、RT-PCR 试剂盒（碧云天生物技术研究所）、茜素红 S（Sigma）。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 的分离、培养和鉴定 采用直接培养法和传代筛选贴壁的方法相结合，分离培养 BMSCs。具体步骤如下：选用 2 只 6 周龄 SD 大鼠，脱臼处死，取出股骨和胫骨，75%乙醇消毒，再漂洗数次。注射器针头刺入骨髓腔，用 DMEM 反复冲洗骨髓腔，充分混匀后，用移液枪将其吹打成单细胞悬液。细胞接种于 25 mL 培养瓶，于 37 ℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养。3 d 后首次半量更换培养液，7 d 后首次更换新鲜的含 10 %胎牛血清的 DMEM 培养液，弃去悬浮细胞，待贴壁细胞接近 70%~80%融合后消化传代备用。培养后每天用倒置相差显微镜观察细胞形态变化及生长状况并拍照。

BMSCs 的鉴定：采用流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达，细胞消化离心，PBS 清洗，依次加入单克隆抗体 CD34、CD44、CD45、CD90。同时每管样品设立同型阴性对照。避光冰上孵育 45 min，用 PBS 洗涤，以除去未结合抗体，用 PBS 重悬细胞，流式细胞仪进行检测分析。

细胞接种于 96 孔板中培养 24 h 后弃去培养液，加入含 1%胎牛血清和不同浓度生长因子的 DMEM 培养液。实验组 A：培养液中含 BMP-2[6]（10.0、100.0、200.0 ng/mL），实验组 B：培养液中含 FGF-2[6]（0.1、1.0、10.0 ng/mL），实验组 C：培养液中同时含 BMP-2（10.0 ng/mL）和 FGF-2（0.1 ng/mL）。

1.2.2 细胞增殖检测 采用 CCK-8 法检测细胞增殖。取对数生长期的第 3 代 BMSCs 接种于 96 孔板培养 24 h 后按照实验分组每孔加入含不同生长因子的培养基，继续培养 7 d。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，酶标仪检测 450 nm 处吸光度（absorbance，A）值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 BMSCs 接种于 6 孔板培养 24 h 后按照实验分组每孔加入不同培养液，于第 7 天弃去培养液，消化收集细胞，调整细胞浓度为 1.0×10^6 个/mL。加 100 μL RNaseA 37 ℃水浴 30 min，再加入 400 μL PI 染色混匀，4 ℃避光 30 min，流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.4 ALP 及活性考察 BMSCs 接种于 96 孔板培养 24 h 后按照实验分组每孔加入不同培养液。于第 7、14 天将 96 孔板取出，弃去培养液，PBS 漂洗，加入 4%多聚甲醛固定 10 min，再 PBS 漂洗。每孔加入 100 μL BCIP/NBT 碱性磷酸酶染色工作液。室温避光孵育 5~30 min，直至显色完全。除去染色工作液，用蒸馏水洗涤 1、2 次终止显色反应，于倒置显微镜下拍照观察。

1.2.5 ALP mRNA 表达量的检测 细胞总 RNA 提取：取对数生长期的第 3 代 BMSCs 培养 24 h，然后按照实验分组每孔加入含不同生长因子的培养基。选取各时间点细胞，加入 1 mL Trizol。室温放置 5 min，使细胞充分裂解。将裂解液转入 EP 管，离心，收集上清液。加入氯仿，振荡 15 s，放置 3 min，待其自然分层。12 000 r/min 离心 10 min，收集上层水相。加入 0.5 mL 异丙醇，充分混匀，沉淀 10 min。4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min，弃上清。加入 75 %乙醇 1 mL，混匀，洗涤 RNA。离心，弃去乙醇留沉淀，反复操作 2 次。干燥 5 min，加入双蒸水，检测 260 nm 和 280 nm 处 A 值，并用 DNase 消化，去除 DNA 污染，于-80 ℃冷冻保存。反转录得到 cDNA，然后进行实时荧光定量 PCR 扩增目的基因。

1.2.6 钙结节染色及定量检测 采用茜素红 S 定量评价方法考察各组 BMSCs 矿化形成钙结节的情况。各实验组于第 14、21 天弃去培养液，加入 PBS 漂洗，再加入 4%多聚甲醛固

定 10 min，弃去固定液，再 PBS 漂洗。加入 1%茜素红 S 染色液，室温染色 30~45 min，吸出染色液，用蒸馏水洗涤 2 次终止显色反应，于倒置显微镜下拍照观察，所得图片用 Image Pro Plus 5.0 专业图像分析软件进行钙结节计数。然后加入茜素红 S 抽提液，室温避光抽提 30 min，摇晃均匀，检测 450 nm 处 A 值，按照相关方程计算各孔实际茜素红 S 的浓度。

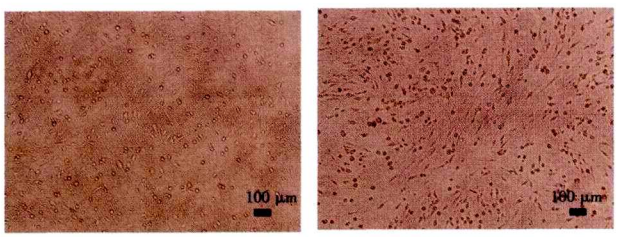
1.3 统计学分析

采用 SPSS 统计软件对数据进行方差分析。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各实验组与空白对照组的检测结果采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 BMSCs 的形态学观察

原代培养：BMSCs 细胞呈圆形，大小不一，折光性较强。24 h 换液后可见大量细胞开始贴壁，可见短梭形、星形细胞分散贴壁生长，如图 1A 所示。3 d 后细胞数量增多，可见放射状排列的细胞集落，伸出长短不一、粗细不均的突起，梭形细胞为主，细胞质丰富、细胞核大、核仁清晰。7 d 后细胞集落增加，集落中心周围有放射状生长的贴壁细胞，胞体略大，形态均一，多呈梭形，排列紧密。10 d 后细胞排列紧密，沿胞体长轴有序排列，呈漩涡状，如图 1B 所示。消化传代后 2 h 即贴壁，细胞增殖速度较快，不再以集落的方式生长，而是呈均匀分布的纺锤形细胞平均生长，细胞形态均一，呈梭形漩涡状生长。



A. 培养 24 h　　B. 培养 10 d

图 1 BMSCs 光学照片

Fig.1 Optical images of BMSCs

2.2 BMSCs 细胞表面标志物的表达

流式细胞仪检测结果显示（图 2），培养的第 3 代 BMSCs 中 CD44 和 CD90 阳性率分别为 94.78%和 96.53%，而 CD34 和 CD45 阳性率分别为 1.05%和 1.34%。

2.3 BMP-2、FGF-2 对 BMSCs 增殖的影响

从表 1 可以看出，单独应用 BMP-2 时，第 3 天检测细胞增殖，实验组与空白对照组均没有统计学差异，3 个不同浓度的 BMP-2 都对 BMSCs 增殖没有明显影响。培养到第 7 天时，仅高浓度的 BMP-2（浓度大于 100.0 ng/mL）对细胞增殖有明显的促进作用。结果证明，短期内单独应用 BMP-2 对 BMSCs 增殖没有明显的诱导作用。单独应用 FGF-2 时（表 2），实验组与空白对照组均有统计学差异，且随剂量增大而增大，当 FGF-2 浓度为 10.0 ng/mL 时促增殖作用最显著。证明 FGF-2 能够明显促进 BMSCs 增殖，而且其诱导作用呈现出一种剂量依赖性趋势。当 BMP-2 和 FGF-2 同时应用时（表 3），最低浓度（BMP-2 为 10.0 ng/mL，FGF-2 为 0.1 ng/mL）的促增殖作用明显高于单独应用每种因子的最佳实验组。

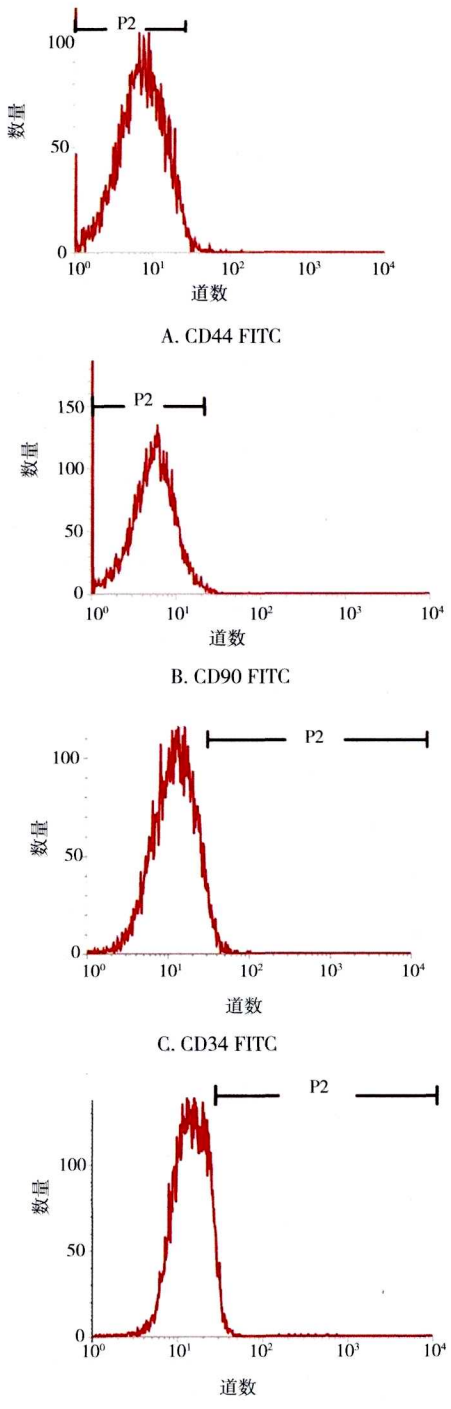


图 2 流式细胞术检测 BMSCs 表面标志物

Fig.2 Phenotype of BMSC identified by flow cytometry

表 1 BMP-2 对 BMSCs 细胞增殖的影响

Tab.1 Effect of BMP-2 on BMSCs proliferation

分组(ng/mL)	第 3 天	第 7 天
空白对照组	1.21 ± 0.00	1.40 ± 0.08
BMP-2(10.0)组	1.23 ± 0.03	1.43 ± 0.03[a]
BMP-2(100.0)组	1.24 ± 0.01	1.49 ± 0.03[ab]
BMP-2(200.0)组	1.23 ± 0.02	1.51 ± 0.02[ab]
F 值	216.361	16.402
P 值	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与 BMP-2(10.0)组比较，$P<0.05$

表 2 FGF-2 对 BMSCs 细胞增殖的影响

Tab.2 Effect of FGF-2 on BMSCs proliferation

分组(ng/mL)	第 3 天	第 7 天
空白对照组	1.21 ± 0.00	1.40 ± 0.08
FGF-2(0.1)组	1.30 ± 0.02[a]	1.62 ± 0.06[a]
FGF-2(1.0)组	1.47 ± 0.03[ab]	1.65 ± 0.10[a]
FGF-2(10.0)组	1.54 ± 0.03[ab]	1.70 ± 0.09[a]
F 值	208.044	18.803
P 值	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与 FGF-2（0.1）组比较，$P<0.05$

表 3 BMP-2 和 FGF-2 对 BMSCs 细胞增殖的影响

Tab.3 Effect of BMP-2 and FGF-2 on BMSCs proliferation

分组(ng/mL)	第 3 天	第 7 天
空白对照组	1.21 ± 0.00	1.40 ± 0.08
BMP-2（200.0）组	1.23 ± 0.02	1.51 ± 0.02[ad]
FGF-2（10.0）组	1.54 ± 0.03[ae]	1.70 ± 0.09[a]
BMP-2+FGF-2 组	1.80 ± 0.02[abc]	1.90 ± 0.06[abc]
F 值	226.052	25.801
P 值	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与 BMP-2（200.0）组比较，$P<0.05$；c：与 FGF-2（10.0）组比较，$P<0.05$；d：与 BMP-2（10.0）组比较，$P<0.05$；e：与 FGF-2（0.1）组比较，$P<0.05$

2.4 BMP-2、FGF-2 对 BMSCs 细胞周期的影响

细胞周期分布表示细胞所处的不同状态(图 3 和表 4)。G0/G1 期细胞处于休眠期；G2 期为 DNA 合成后期，是有丝分裂的准备期；S 期即 DNA 合成期，表示细胞增殖分裂的活性期。细胞周期分析结果见表 1，单独应用浓度为 200.0 ng/mL BMP-2 时，75.00%的 BMSCs 处于 G0/G1 期，6.17 %处于 G2 期，18.50%处于 S 期，细胞凋亡率为 22.50%。单独应用浓度为 10.0 ng/mL 的 FGF-2 时，处于 G2 期的 BMSCs 为 6.17%，处于 S 期的细胞为 18.50%(明显高于空白对照组)，细胞凋亡率为 24.40%，表明 FGF-2 对BMSCs 的分裂增殖能力具有较强的影响。同时应用 10.0 ng/mL 的 BMP-2 和 0.1 ng/mL 的 FGF-2 时，处于 S 期的细胞为34.25%，明显高于空白对照组，细胞凋亡率为 16.59%，明显低于空白对照组，证明 2 种因子结合应用能够显著促进 BMSCs 分裂增殖，并降低细胞凋亡率。

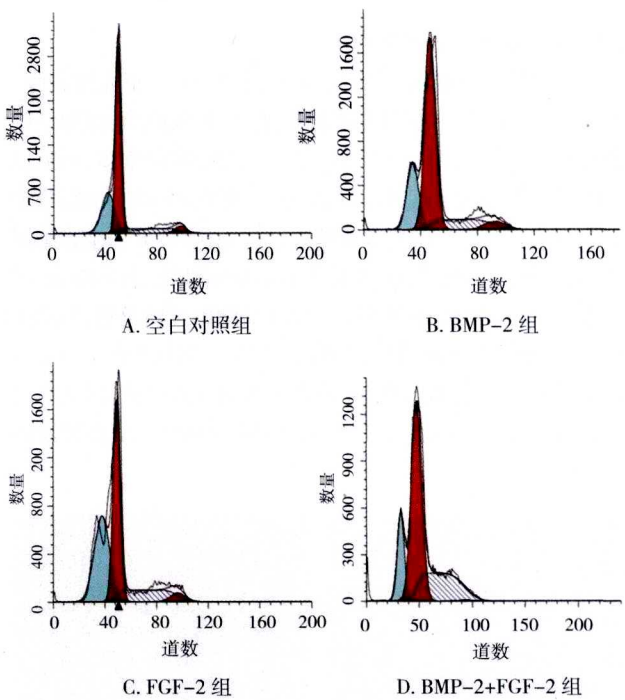


图 3 BMP-2 和 FGF-2 单独或联合应用对 BMSCs 细胞周期分布的影响

Fig.3 Effects of single application of BMP-2 or FGF-2, and their combination on the cell cycle arrest of BMSCs

表 4 BMSCs 细胞周期

Tab.4 Cell cycle of BMSCs

分组（ng/mL）	G0/G1期	G2期	S期	凋亡率（%）
空白对照组	78.00 ± 0.50	5.58 ± 0.03	16.42 ± 1.06	28.54 ± 0.87
BMP-2（200.0）组	75.00 ± 1.00[a]	6.17 ± 3.55	18.50 ± 0.40[a]	22.50 ± 1.14[ab]
FGF-2（10.0）组	70.24 ± 0.26[ab]	6.00 ± 0.60	23.75 ± 1.14[ab]	24.40 ± 1.03[a]
BMP-2+FGF-2 组	65.03 ± 0.33[abc]	0.71 ± 0.07[abc]	34.25 ± 0.94[abc]	16.59 ± 0.84[abc]
F 值	275.411	5.443	220.258	77.713
P 值	0.000	0.025	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与 BMP-2 组比较，$P<0.05$；c：与 FGF-2 组比较，$P<0.05$

2.5 BMP-2、FGF-2 对碱性磷酸酶 mRNA 表达量的影响

从细胞 ALP mRNA 表达量的结果可以看出，单独应用 BMP-2 时，第 7 天和第 14 天实验组与空白对照组对 ALP mRNA 表达的影响都具有统计学差异，且不同浓度的 BMP-2 实验组之间也有统计学差异(表 5)。ALP 是骨髓间充质干细胞早期成骨分化的重要标志，在细胞外基质矿化过程中具有重要的作用。本研究对 96 孔板中培养的 BMSCs 进行 ALP 染色，成骨诱导 7、14 d 行 ALP 染色分析均为阳性，ALP 阳性产物定位于细胞膜或细胞质，呈蓝紫色(图 4)。随着 BMP-2 浓度的提高，诱导 BMSCs 表达 ALP mRNA 表达越多，当 BMP-2 为 200.0 ng/mL 时 ALP mRNA 表达量最多。因此，BMP-2 能够明显促进 BMSCs 成骨分化，而且这种诱导作用具有剂量依赖性。单独应用 FGF-2 时(表 6)，实验组与空白对照组ALP mRNA 的表达具有统计学差异，但不同浓度的 FGF-2 实验组之间 ALP mRNA 的表达没有统计学差异。结果证明，FGF-2 能够显著促进 BMSCs 中 ALP mRNA 的表达，但不存在明显的剂量依赖性。由表 7 可知，当 BMP-2 和 FGF-2 结合应用时，较低浓度即可明显促进细胞中 ALP mRNA 的表达量，且与单因子的最佳剂量实验组均有统计学差异，表现出强烈的协同诱导效应。

表 5 BMP-2 对 BMSCs ALP 表达的影响

Tab.5 Effect of BMP-2 on ALP production of BMSCs

分组(ng/mL)	第 7 天	第 14 天
空白对照组	1.20 ± 0.06	1.30 ± 0.16
BMP-2(10.0)组	1.58 ± 0.08[a]	2.06 ± 0.24[a]
BMP-2(100.0)组	2.02 ± 0.06[ab]	2.20 ± 0.19[a]
BMP-2(200.0)组	2.09 ± 0.08[ab]	2.29 ± 0.14[a]
F 值	73.313	3.554
P 值	0.000	0.012

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与 BMP-2(100.0)组比较，$P<0.05$

表 6 FGF-2 对 BMSCs ALP 表达的影响

Tab.6 Effect of FGF-2 on ALP production of BMSCs

分组(ng/mL)	第 7 天	第 14 天
空白对照组	1.20 ± 0.06	1.30 ± 0.16
FGF-2(0.1)组	1.76 ± 0.08[a]	1.81 ± 0.26[a]
FGF-2(1.0)组	1.79 ± 0.09[a]	1.90 ± 0.16[a]
FGF-2(10.0)组	1.82 ± 0.10[a]	2.01 ± 0.22[a]
F 值	77.235	3.310
P 值	0.014	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$

2.6 BMP-2、FGF-2 对钙结节形成的影响

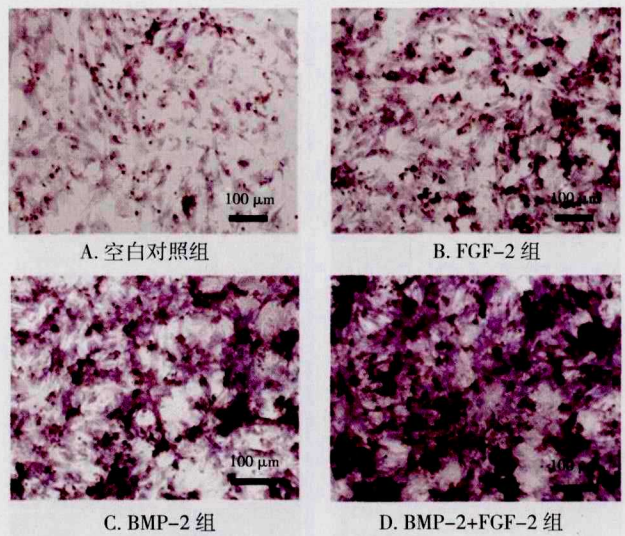
由图 5 和表 8 可知，单独应用 BMP-2 能够明显促进BMSCs 矿化形成钙结节的数量，从而推进 BMSCs 成骨分化的程度，随着 BMP-2 浓度的提高，其诱导 BMSCs 形成钙结节越多，具有剂量依赖性。但培养 21 d 时，当 BMP-2 浓度大于 100.0 ng/ml 时，钙结节的数量没有再随浓度提高而明显增多，剂量依赖性不明显。单独应用 FGF-2(表 9)培养 14 d 时，实验组与空白对照组对 BMSCs 矿化的影响没有统计学差异。培养 21 d 时，随着 FGF-2 浓度的提高，其诱导 BMSCs 形成钙结节越多。当 FGF-2 浓度为 1.0 ng/mL 时，能够明显促进 BMSCs 发生矿化形成钙结节，钙结节的形成数量达到最大(图 5B)。但当 FGF-2 浓度大于 1.0 ng/mL 时，钙结节的数量没有随其浓度提高而明显增多。当 BMP-2 与 FGF-2 联合应用时(图 5D 和表 10)，较低浓度(BMP-2 为 200.0 ng/mL，FGF-2 为 1.0 ng/mL)已显示出明显的促进作用，且与每种因子单独应用时的最佳诱导效果具有统计学差异。

表 7 BMP-2 和 FGF-2 对 BMSCs ALP 表达的影响

Tab.7 Effect of BMP-2 and FGF-2 on ALP production of BMSCs

分组(ng/mL)	第 7 天	第 14 天
空白对照组	1.20 ± 0.06	1.30 ± 0.16
BMP-2(200.0)组	2.09 ± 0.08[ad]	2.29 ± 0.14[a]
FGF-2(10.0)组	1.82 ± 0.10[a]	2.01 ± 0.22[a]
BMP-2+FGF-2 组	2.31 ± 0.08[abc]	2.52 ± 0.15[abc]
F 值	79.357	2.792
P 值	0.000	0.012

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与 BMP-2(200.0)组比较，$P<0.05$；c：与 FGF-2(10.0)组比较，$P<0.05$；d：与 BMP-2(10.0)组比较，$P<0.05$



A. 空白对照组　B. FGF-2 组　C. BMP-2 组　D. BMP-2+FGF-2 组

图 4 ALP 染色照片

Fig.4 ALP staining

表 8 BMP-2 对 BMSCs 矿化的影响

Tab.8 Effect of BMP-2 on BMSCs mineralization

分组(ng/mL)	第 14 天	第 21 天
空白对照组	1.23 ± 0.00	1.42 ± 0.03
BMP-2(10.0)组	1.35 ± 0.14	1.75 ± 0.40
BMP-2(100.0)组	1.55 ± 0.07	2.68 ± 0.45[ab]
BMP-2(200.0)组	1.69 ± 0.47[a]	2.70 ± 0.65[ab]
F 值	3.331	10.124
P 值	0.000	0.012

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与 BMP-2(10.0)组比较，$P<0.05$

表 9 FGF-2 对 BMSCs 矿化的影响

Tab.9 Effect of FGF-2 on BMSCs mineralization

分组(ng/mL)	第 14 天	第 21 天
空白对照组	1.23 ± 0.00	1.42 ± 0.03
FGF-2(0.1)组	1.30 ± 0.04	1.51 ± 0.14
FGF-2(1.0)组	1.36 ± 0.12	1.71 ± 0.27[a]
FGF-2(10.0)组	1.33 ± 0.16	1.62 ± 0.23[a]
F 值	2.755	12.031
P 值	0.000	0.000

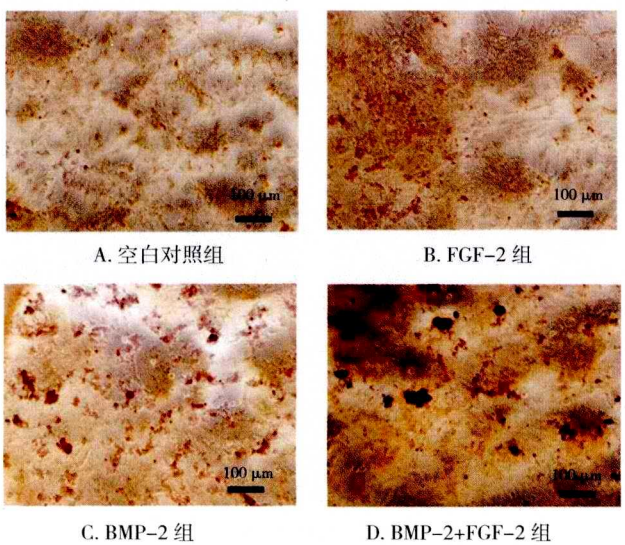
注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$

表 10 BMP-2 和 FGF-2 对 BMSCs 矿化的影响

Tab.10 Effect of BMP-2 and FGF-2 on BMSCs mineralization

分组(ng/mL)	第 14 天	第 21 天
空白对照组	1.23 ± 0.00	1.42 ± 0.03
BMP-2(200.0)组	1.69 ± 0.47[a]	2.70 ± 0.65[ad]
FGF-2(1.0)组	1.36 ± 0.12	1.71 ± 0.27[a]
BMP-2+FGF-2 组	1.85 ± 0.07[ac]	3.18 ± 0.45[abc]
F 值	3.572	10.721
P 值	0.012	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与 BMP-2(200.0)组比较，$P<0.05$；c：与 FGF-2(1.0)组比较，$P<0.05$；d：与 BMP-2(10.0)组比较，$P<0.05$



A. 空白对照组　B. FGF-2 组

C. BMP-2 组　D. BMP-2+FGF-2 组

图 5 茜素红 S 染色照片

Fig.5 Alizarin red S staining

3 讨 论

细胞增殖和分化是细胞生命进化过程中所获得的基本属性，细胞因此存在两种状态：增殖态和功能态。一般认为增殖态和功能态是细胞相对立的两种状态，以增殖态为主的细胞其功能低下，以功能态为主的细胞其增殖能力弱[7-8]。本实验证明，BMP-2 对 BMSCs 增殖没有明显的诱导作用，而 FGF-2能够显著促进 BMSCs 增殖，且呈剂量依赖性。其他研究认为，以较低浓度的 FGF-2 培养 BMSCs 能够明显促进其增殖分化，而较高浓度则会抑制细胞的增殖分化[9]。

ALP 的表达是 BMSCs 成骨分化早期的重要标志性蛋白，它在 BMSCs 体外钙化中起关键作用，ALP 没有表达，钙化就不会发生[6]，ALP 最先出现在细胞集落中央，中央细胞密集接触，生长受到抑制，细胞开始分化，在培养后的第 7 天 ALP mRNA 开始进入高峰期[7]。因此，通过检测 ALP 的合成能够考察 BMSCs 成骨分化早期的情况[10]。本研究证明，BMP-2 可明显促进 BMSCs 的 ALP 表达，以剂量依赖的方式诱导 BMSCs 向成骨细胞方向分化。FGF-2 也能显著促进 BMSCs 合成 ALP，但不存在明显的剂量依赖性。当 BMP-2 和 FGF-2 联合应用时，对 BMSCs 中 ALP 的表达产生最强的促进作用。

钙结节是 BMSCs 发生矿化时形成的，它的形成是细胞成骨分化逐渐成熟的标志，通过检测 BMSCs 形成钙结节的数量可以分析 BMSCs 成骨分化的程度[11]。BMP-2 能够显著促进 BMSCs 发生矿化形成钙结节的数量，从而推进 BMSCs 成骨分化的程度，且具有剂量依赖性。FGF-2 也可促进 BMSCs 发生矿化形成钙结节，但它对形成钙结节的诱导效应没有 BMP-2 强烈。而且，当 FGF-2 浓度大于 1.0 ng/mL时，钙结节的数量没有再随其浓度提高而显著增多。可能由于当 FGF-2 浓度大于 1.0 ng/mL 时，FGF-2 与细胞表面结合程度可能达到饱和，所以此时即使再提高浓度（如 10.0 ng/mL），已没有多余的细胞表面受体与之结合，不能充分发挥对 BMSCs 的成骨诱导作用，因而在 BMSCs 成骨分化后期不再呈现出剂量依赖性。Moscatelli[12]发现 FGF-2 在与成纤维细胞生长因子受体、胞外基质结合之间存在相互平衡，在体外细胞实验中用低 pH 的方法移走与成纤维细胞生长因子受体结合的 FGF-2 后，与胞外基质结合的 FGF-2 可向成纤维细胞生长因子受体转移，达到新的平衡。同时，细胞膜受体数量的有限和功能的高低也有可能是超高含量耐受性的原因。所以 FGF-2 对体外培养 BMSCs 的最佳剂量为 1.0 ng/mL，此时

FGF-2 呈现质量含量饱和。

此外，实验结果证明 BMP-2 与 FGF-2 联合应用时，细胞增殖、ALP 的表达量和钙结节形成数量显著高于其他实验组，联合应用对 BMSCs 的成骨分化有显著的协同诱导效应，最低浓度（10.0 ng/mL 的 BMP-2+0.1 ng/mL 的 FGF-2）即显示出明显的促进作用。因此，BMSCs 的成骨分化受这 2 种生长因子的协同调控，并且在对 BMSCs 成骨分化调控的过程中不同生长因子之间存在密切复杂的联系。BMP-2 和 FGF-2 各自的生物学效应均受到彼此的调节，不同因子之间的这种互相调节必然影响细胞内相关基因的表达和细胞的生物学功能，从而对组织再生修复产生协同促进作用。有学者研究证明，当 FGF-2 与 BMSCs 细胞膜上的受体 FGFRs 结合以后，能够激活细胞内 MAPK/ERK 信号通路，最终影响细胞的增殖以及细胞核内 VEGF，BMP-2 及其受体 BMPRs 和成骨转录因子 Runx2 的表达[13-14]。当 BMP-2 与 BMSCs 细胞膜上的受体 BMPRs 结合以后，激活细胞内 Smad 1、5 和 8 并使其发生磷酸化，然后与 Smad 4 共同组装成异源多聚蛋白，最后进入细胞核中参与调控目的基因的表达，包括 FGF-2、VEGF 及 Runx2/Cbfa 1 的表达[15-16]。由此可以推断，BMP-2 和 FGF-2 两者的协同效应可能是通过调控彼此的信号通路来实现的，它们之间各种复杂的联系最终共同诱导促进 BMSCs 成骨分化。

综上所述，生长因子的效应与生长因子的种类、浓度、种子细胞的来源、分化状态、培养条件及有无其他生长因子参与等多种因素有关。单独应用 BMP-2 能够显著促进 BMSCs 成骨分化，最佳剂量为 200.0 ng/mL，但对 BMSCs 增殖没有显著影响。单独应用 FGF-2 能够明显促进 BMSCs 增殖，最佳剂量为 1.0 ng/mL，但对钙结节的形成没有明显促进作用。BMP-2 和 FGF-2 联合应用对 BMSCs 的增殖和成骨分化有显著的协同诱导效应，较低浓度（BMP-2 为 10.0 ng/mL，FGF-2 为 0.1 ng/mL）已显示出明显的促进作用，所以在体外诱导 BMSCs 增殖分化时可采用该方法。但是体外与体内环境下生长因子的活性发挥不尽相同，因为生长因子在体内环境下会很快失活。所以，如何在体内环境下保持并尽可能延长生长因子的生物活性是使其能真正在临床发挥作用的关键，还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Abdallah BM, Jafari A, Zaher W, et al. Skeletal (stromal) stem cells: an update on intracellular signaling pathways controlling osteoblast differentiation[J]. Bone, 2015, 70: 28-36.

[2] Carrier-Ruiz A, Evaristo-Mendonça F, Mendez-Otero R, et al. Biological behavior of mesenchymal stem cells on poly-ε-caprolactone filaments and a strategy for tissue engineering of segments of the peripheral nerves[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6: 1-15.

[3] Murray SS, Brochmann Murray EJ, Wang JC, et al. The history and histology of bone morphogenetic protein[J]. Histology and Histopathology, 2016, 31(7): 721-732.

[4] Turner CA, Watson SJ, Huda A. The fibroblast growth factor family: neuromodulation of affective behavior[J]. Neuron, 2012, 76(1): 160-174.

[5] Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, et al. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line[J]. Differentiation, 2008, 76(4): 337-347.

[6] Bai Y, Yin G, Huang Z, et al. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 16(2): 214-223.

[7] Ghazy A, Abou-Easa KF, Ghazy AE, et al. Characterization of Behavior and Niche of Bovine Marrow Stem Cells In vitro[J]. Global Veterinaria, 2015, 14(6): 922-928.

[8] Yuan S, Pan Q, Fu CJ, et al. Effect of growth factors (BMP-4/7 & bFGF) on proliferation & osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. Indian J Med Res, 2013, 138: 104-110.

[9] Park JB. Effects of the combination of dexamethasone and fibroblast growth factor-2 on differentiation of osteoprecursor cells [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(2): 659-662.

[10] Golub EE, Harrison G, Taylor AG, et al. The role of alkaline phosphatase in cartilage mineralization[J]. Bone Miner, 1992, 17(2): 273-278.

[11] Giannoudis PV, Jones E, Einhorn TA. Fracture healing and bone repair[J]. Injury, 2011, 42(6): 549-550.

[12] Moscalelli DJ. Metabolism of receptor-bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells[J]. J Cell Biol, 1988, 107(2): 753-759.

[13] Abou-Khalil R, Colnot C. Cellular and molecular bases of skeletal regeneration: what can we learn from genetic mouse models?[J]. Bone, 2014, 64(7): 211-221.

[14] Boswell BA, Musil LS. Synergistic interaction between the fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein signaling pathways in lens cells[J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(13): 2561-2572.

[15] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(3): 251-263.

[16] Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells[J]. Gene, 2006, 366(1): 51-57.

（责任编辑：冉明会）