基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001157

重组 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ基因表达质粒促进 SD 大鼠牙囊细胞增殖及早期成骨分化效应的实验研究

李亚明[1],田常生[2],胡 波[1],曹 礼[1],宋锦璘[1]

(1. 重庆医科大学附属口腔医院、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室、重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室,重庆 401147;2. 重庆医科大学附属第二医院口腔科,重庆 400010)

【摘 要】**目的**:通过胰岛素样生长因子-Ⅰ(insulin-like growth factor-Ⅰ,IGF-Ⅰ)与增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)融合表达,构建重组质粒 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ。体外实验分析脂质体介导 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ转染 SD 大鼠牙囊细胞(rat dental follicle cells,rDFCs)对其增殖及早期成骨分化效应的影响。**方法**:体外分离培养 rDFCs 并分为空白组、pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组、pEGFP-N1+脂质体组和 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组。采用荧光显微镜观察绿色荧光表达情况,MTT 法检测细胞增殖活性,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性检测法检测 ALP 活性,PCR 检测Ⅰ型胶原(collagen type 1,Col1)表达情况。**结果**:荧光显微镜观察结果表明 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ成功转染入 rDFCs。转染后 48 h,脂质体处理组(pEGFP-N1+脂质体组和 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组)转染效率较非脂质体处理组(空白组和 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组)高。MTT 结果表明,pEGFP-N1-IGF-Ⅰ能增强 rDFCs 细胞活性,而脂质体毒性对细胞活性具有抑制作用。ALP 活性检测结果显示 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ能增强 rDFCs 的 ALP 活性。PCR 结果证明 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ能增加 Col1α1 及 Col1α2 的相对表达量。**结论**:pEGFP-N1-IGF-I 能促进 rDFCs 增殖和早期成骨分化效应,为 IGF-Ⅰ基因在牙周组织修复再生中的应用提供了实验依据。

【关键词】胰岛素样生长因子-Ⅰ;牙囊细胞;增殖;早期成骨分化

【中图分类号】R329-33 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-03-14

Recombinant plasmid pEGFP-N1-IGF-Ⅰ transfection enhances proliferation and early stage osteogenic differentiation of rat dental follicle cells *in vitro*

Li Yaming[1], *Tian Changsheng*[2], *Hu Bo*[1], *Cao Li*[1], *Song Jinlin*[1]

(*1. College of Stomatology, Chongqing Medical University; Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences; Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education;*

2. Department of Stomatology, the Second Affliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To construct recombinant plasmid pEGFP-N1-IGF-Ⅰ by fusing expression of insulin-like growth factor-Ⅰ (IGF-Ⅰ) and enhanced green fluorescent protein(EGFP); to investigate accelerating effect of pEGFP-N1-IGF-Ⅰ transfection on cytoactive and early stage osteogenic differentiation of rat dental follicle cells(DFCs) *in vitro*. ***Methods***: The rat dental follicle cells (rDFCs) were obtained and divided into four groups: blank group, pEGFP-N1-IGF-Ⅰ group, pEGFP-N1+liposome group and pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+liposome group. The proliferation and early stage osteogenic differentiation of DFCs were analyzed. The green fluores cence expression, MTT assay, ALP quantitative detection, Type Ⅰ collagen Col1α1 and Col1α2 gene expression analysis were used. ***Results***: The green fluorescence expression results showed that the pEGFP-N1-IGF-Ⅰ was successfully transfected in DFCs and the transfection efficiency was higher in liposome treated group(pEGFP-N1+liposome group and pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+liposome group) than in pEGFP-N1-IGF-Ⅰ group and blank group at 48 h. The MTT assay elucidated that the pEGFP-N1-IGF-Ⅰ may enhance the cytoactive of DFCs but the cytotoxicity of liposome may reduce the cell variability. The assay of alkaline phosphatase(ALP) activity indicated that pEGFP-N1-IGF-Ⅰ was able to increase the ALP activity. The PCR results illustrate that pEGFP-N1-IGF-Ⅰ could enhance the relative expression of Col1α1 and Col1α2. ***Conclusion***: pEGFP-N1-IGF-Ⅰ could enhance the proliferation and early stage osteogenic differentiation of DFCs, and provide a reference for the usage of IGF-Ⅰ gene in periodontal tissue engineering.

【Key words】insulin-like growth factor-Ⅰ; dental follicle cells; proliferation; early stage osteogenic differentiation

作者介绍:李亚明,Email:199711825@qq.com,研究方向:牙周组织工程。

通信作者:宋锦璘,Email:soongjl@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81570981);重庆市科委自然科学基金项目(cstc2014jcyjA10039)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170104.0958.004.html (2017-01-04)

牙周炎、咬合创伤以及矫正不当等常引起牙周组织不同程度炎症及破坏，最终导致牙齿脱落[1]。实现理想的牙周组织修复及再生有必要采用组织工程技术引入种子细胞及生长因子进行相关治疗[2]。牙囊细胞（dental follicle cells，DFCs）是牙周组织的前体细胞，具有干细胞特性及多向分化潜能，是牙周组织工程理想的种子细胞之一[3-4]。胰岛素样生长因子-Ⅰ（insulin-like growth factor-Ⅰ，IGF-Ⅰ）是骨基质中含量最多的生长因子[5]，能参与新陈代谢及生长发育的过程[6]。

目前商品化生长因子的制备工艺和生产设备复杂，生产周期长，价格昂贵，具有免疫原性，这些不足均使生长因子难以在临床上获得广泛应用[7]。现有研究证实在牙周缺损处植入转染后的种子细胞，可使局部微环境改善并获得良好生物活性，使牙周组织再生治疗获得更好的疗效[8-10]。

为进一步研究 IGF-Ⅰ在牙周组织再生中的作用及机制，本实验通过 IGF-Ⅰ与增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，EGFP）融合表达，构建重组质粒 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ，并将其转染进 SD 大鼠牙囊细胞（rat dental follicle cells，rDFCs），分析其对细胞增殖能力及早期成骨分化能力的影响，为 IGF-Ⅰ在牙周组织工程中的进一步应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~7 日龄 SD 大鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 FBS 购于美国 Gibico 公司，DMEM 高糖培养基购于美国 Hyclone 公司，MTT 由口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室提供，DMSO 购于美国 Sigma 公司，RNAiso Plus、Primix Taq Version 2.0、T-A、pMD19-T Vector、*Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ、DNA Ligation Kit 购于大连宝生物工程有限公司，pEGFP-N1 Vector 购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司，RIPA 细胞裂解液购于上海博彩生物科技有限公司，细胞碱性磷酸酶定量检测试剂盒购于南京建成科技有限公司，Lipofectamine 2000 Reagent 购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 rDFCs 的分离、传代、培养 取 6~7 日龄 SD 乳鼠，眼科显微剪分离下颌骨，体式显微镜下用显微外科镊剥离 SD 乳鼠下颌磨牙的牙胚，分离出牙囊组织，转移至含 1%青、链霉素的 DMEM/F-12 培养基中，1 000 r/min 离心 3 min，弃上清液，加入 0.1%Ⅰ型胶原酶 2 mL，置于 37 ℃恒温水浴锅中消化 45 min，每 3~5 min 进行摇晃，待组织块分散均匀后，滴入 0.25%胰酶 1 mL，继续消化 3 min 后加入 3 mL 含有 12% FBS 的完全培养基终止消化。1 000 r/min 离心 3 min 后弃上清液，加入 3 mL 含有 12% FBS 的完全培养基，吹打均匀，移入底面积 25 cm^2 的培养瓶中，放入 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中静置培养，每 3 d 换液，倒置显微镜下观察、记录细胞生长状态，当细胞达 80%左右贴壁率时进行传代培养。利用 DFCs 与间充质上皮细胞对胰酶的耐受性差异除去间充质上皮细胞，从而达到纯化牙囊细胞的目的，取第 3 代 rDFCs 用于后续实验。

1.2.2 免疫组化及流式细胞术鉴定 取对数生长期的第 3 代 rDFCs 以 5×10^4 个/mL 制备细胞爬片，PBS 漂洗，加入 1 mL 多聚甲醛（4%）固定 30 min；PBS 洗去多聚甲醛，加入 0.25% Triton X100，静置 15 min 后，1% BSA 于 37 ℃下封闭 30 min，弃血清，加入细胞丝蛋白、角蛋白益康，4 ℃过夜。过夜后用 PBS 漂洗 3 次，加入二抗工作液，37 ℃孵育 15 min，PBS 漂洗 3 次，加入 DAB 显色液，用苏木精复染细胞核，梯度脱水，封片，正置荧光显微镜下拍照、记录。为鉴定 rDFCs 的免疫表型，按照抗体说明书取第 3 代 rDFCs 与抗体 STRO-1、CD34、CD73、CD146 避光于室温下培养 45 min，PBS 漂洗后上机检测分析。

1.2.3 实验分组 空白组；pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组；pEGFP-N1+脂质体组和 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组。

1.2.4 pEGFP-N1/IGF-Ⅰ重组质粒的构建与鉴定 引物由 Primer Primer 5.0 软件设计，见表 1。于 SD 大鼠肝脏中提取 RNA，随后配置反转录反应液和 cDNA 标本。目的基因由巢式 PCR 进行扩增，并对 PCR 产物进行电泳鉴定，纯化。纯化后的 IGF-Ⅰ基因片段按试剂盒说明书书与 pMD19-T 的 T-A 转化、连接并进行克隆筛选。提取重组质粒 pMD19-T-IGF-Ⅰ并进行 PCR 鉴定、酶切鉴定及测序鉴定。将 pMD19-T-IGF-Ⅰ和 pEGFP-N1 分别用限制性内切酶 *Eco*RⅠ与 *Xho*Ⅰ双酶切，最终获得 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ重组质粒。

1.2.5 脂质体介导 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ质粒转染 采用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 介导 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ质粒，并将其转染进 rDFCs。胰蛋白酶消化对数期生长的 DFCs，以 5×10^4 个/mL 的细胞密度接种细胞，根据试剂盒说明书进行转染：96 孔板每孔接种 0.2 μg DNA 和 0.5 μL Lipofectamine 2000 溶液；24 孔板每孔接种 0.8 μg DNA 和 2 μL Lipofectamine 2000；6 孔板每孔接种 4.0 μg DNA 和 10 μL Lipofectamine 2000。

1.2.6 荧光显微镜观察绿色荧光表达情况 倒置荧光显微镜下观察记录转染后 48 h 各组细胞形态及生长状况。

1.2.7 MTT 检测细胞增殖活力 转染后每 24 h 收集 96 孔板中细胞，测试各组细胞的生长活力，共检测 4 d。每孔细胞加入 20 μL MTT，放入 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 4 h，随后滴加 150 μL DMSO 溶解蓝紫色结晶甲瓒（Formazan）。枪头吹打混匀，10 min 后吸出 DMSO，并加入新的 96 孔板中，测量各组吸光度（absorbance，A）值，绘制各组细胞的增殖曲

表 1　引物序列与产物长度

Tab.1　Primer sequences and product length

引物	引物序列	产物长度（bp）
IGF-Ⅰ外侧引物上游	5'-C CTGCTGTGTAAACGACCCG-3'	715
IGF-Ⅰ外侧引物下游	5'-ATCTACCCACGCCAGGACC-3'	715
IGF-Ⅰ内侧引物上游	5'-ccgctcgagATGTCGTCTTCACATCTCTTC-3'	399
IGF-Ⅰ内侧引物下游	5'-ccggaattcTCTGTAGGTCTTGTTTCC-3'	399
Col1α1 上游	5'-AGCCCCTCAACCCCCAGCCTAC-3'	158
Col1α1 下游	5'-CCCCAGCACAGGCCCTCAAA-3'	158
Col1α2 下游	5'-CCCCAGCCAAGAATGCATACAG-3'	224
Col1α2 下游	5'- GCGGCCTGTCTCCTCGTCC-3'	224
β-actin 下游	5'-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3'	250
β-actin 下游	5'-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3'	250

线图。本实验重复 3 次，每组 3 复孔，并记录平均值。

1.2.8　ALP 活性的检测　转染后每 24 h 收集 24 孔板中细胞及培养基，每孔中含有 1 mL 培养基。根据试剂盒说明书进行 ALP 活性检测。520 nm，1 cm 光径比色，测定各组吸光度值。根据以下公式求得每孔培养基中总的碱性磷酸酶量（单位：金氏单位）：1 mL 培养基中碱性磷酸酶总量=（测定 A 值/标准 A 值）×0.005 mg（标准管含酚量）×（1 mL/0.05 mL）。重复 3 次，每组 3 复孔。

1.2.9　Ⅰ型胶原基因的表达的检测　选取 6 孔板中转染后 48 h 的 rDFCs 进行各组细胞总 RNA 的提取及逆转录。按照试剂盒说明进行逆转录制备 cDNA。分别进行普通 PCR 鉴定及定量 PCR 鉴定。

RT-PCR 鉴定：反应条件：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s、57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，28 次循环后，72 ℃延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。反应液包括 18 μL 水，25 μL Premix LA Taq，2 μL 外侧引物，2 μL 内侧引物和 3 μL cDNA。

qRT-PCR 鉴定：反应条件：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，45 次循环后，72 ℃延伸 10 min。反应液包括 7 μL 水，7 μL SYBR，0.5 μL 外侧引物，0.5 μL 内侧引物和 2 μL cDNA。根据扩增曲线获得内参基因及目的基因的 Ct（threshold cycle）值。根据公式 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 计算各组相对表达量，本实验重复 3 次，每组 3 复孔。

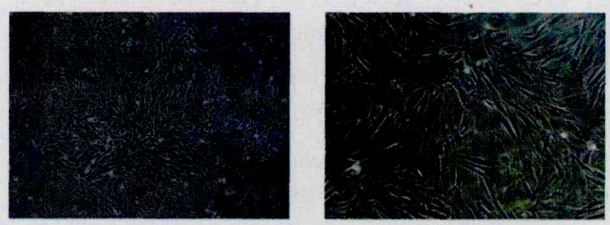
1.3　统计学分析

所有数据采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行处理，所得数值均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，本研究中多组计量资料的均值比较采用单因素方差分析，不同处理因素对细胞增殖及 ALP 总量的影响数据采用重复测量方差分析，各组间比较采用 LSD-t 法进行两两对比。检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　细胞生长情况观察

接种后 2 d，可见“日晕”状细胞从组织块周围爬出，放射状生长，主要呈长梭形和多角形。4 d 后可见部分组织块开始脱落，周围细胞迅速迁移。传至第 3 代时，间充质上皮细胞明显减少，细胞质丰富，细胞核大，生长状态良好，可用于后续实验。如图 1 所示。



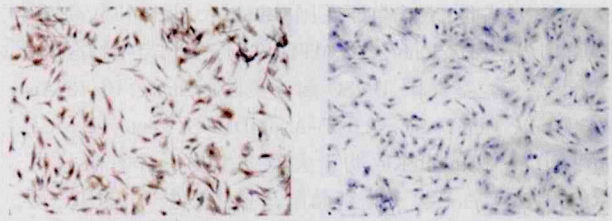
A. 原代 DFCs 从组织块中爬出（40×）　　B. 第 4 代 DFCs（100×）

图 1　倒置显微镜观察 DFCs 生长状况

Fig.1　Growth condition of DFCs under inverted microscope

2.2　组织学来源的鉴定

免疫组化鉴定第 4 代 rDFCs 组织学来源，波形丝蛋白阳性着色，细胞质为棕黄色；角蛋白阴性着色，细胞质未着色，细胞核呈蓝色；通过形态学观察、取材部位可判定所取材细胞组织学来源为外胚层间充质，可证明该细胞是 rDFCs。如图 2 所示。



A. 波形蛋白染色阳性（100×）　　B. 角化蛋白染色阴性（100×）

图 2　免疫组化结果

Fig.2　Immunohistochmical staining results

2.3　流式细胞术检测结果

流式细胞术结果显示，rDFCs 表达间充质干细胞表面标志物 STRO-1 阳性率为 1.76%，CD146 阳性率为 75.14%，淋巴细胞表面标志物 CD73 阳性率为 98.36%；阴性表达造血干细胞表面标志物 CD34 阳性率只有 0.24%。提示细胞符合间充质干细胞特征，如图 3 所示。

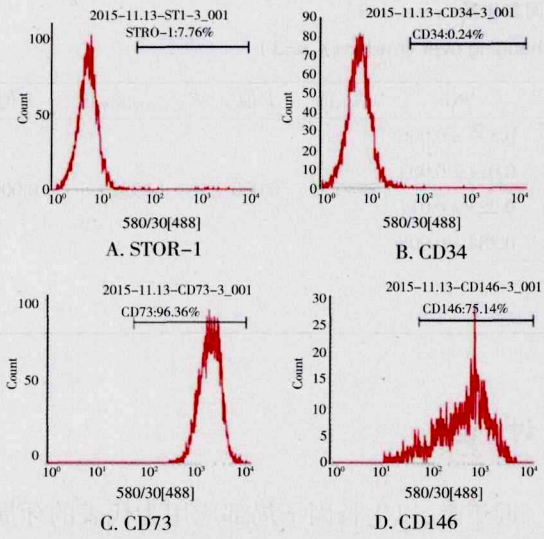


图 3　流式细胞术检测细胞表型

Fig.3　Flow cytometry analysis

2.4　荧光显微镜观察绿色荧光表达情况

转染后 48 h 使用倒置荧光显微镜拍照记录各组细胞生长状况及形态。绿色荧光结果显示 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ重组质粒成功转染进 rDFCs，而脂质体处理组（pEGFP-N1 质粒+脂质体组和 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ质粒+脂质体组）在转染后 48 h 绿色荧光表达量相似，并较非脂质体处理组（空白组和pEGFP-N1-IGF-Ⅰ质粒组）高。如图 4 所示。

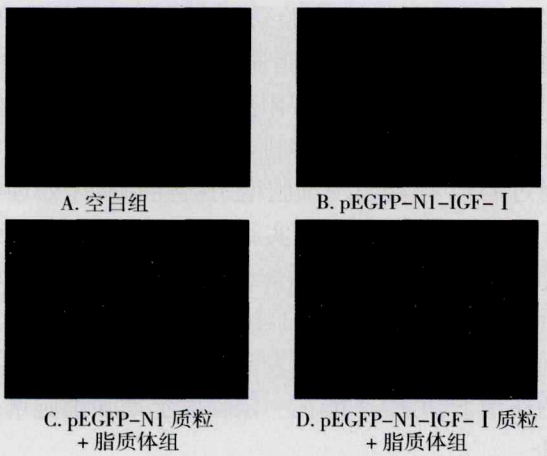


图 4　倒置显微镜下观察各组细胞转染后 48 h 绿色荧光表达情况

Fig.4　Green fluorescent observed in inverted microscope after 48 h of transfection

2.5　MTT 检测 DFCs 增殖活性

由于瞬时转染表达具有时间特异性，故仅对转染后 96 h 进行统计学分析。由各组细胞增殖曲线可见，在转染后 96 h 内，各组细胞增殖活性整体趋势是非脂质体处理组（空白组和 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ质粒组）明显较脂质体处理组（pEGFP-N1 质粒+脂质体组和 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ质粒+脂质体组）强（表 2，图 5）。

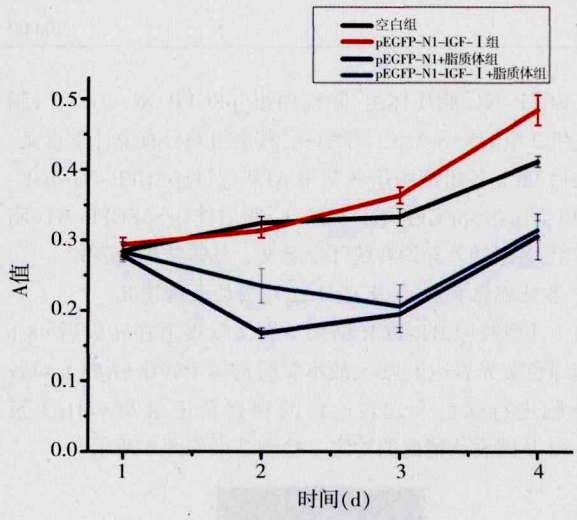


图 5　各组细胞增殖曲线

Fig.5　Proliferation curve of each group

2.6　各组细胞培养基中 ALP 总量随时间的变化

整体趋势：除转染后 24 h 及 96 h 空白组 ALP 含量高于 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组外，其余时间空白组、pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组 2 组较为接近，pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组 ALP 含量在转染后 96 h 内始终最高，在 72 h 时达最高值，pEGFP-N1+脂质体组 ALP 含量在转染后 96 h 内始终最低。转染后 24 h 各组细胞培养基中 ALP 总量：pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组>空白组>pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组>pEGFP-N1+脂质体组，各组间差异均有统计学意义。转染后 48 h 各组细胞培养基中 ALP 总量：pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组>pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组>空白组>pEGFP-N1+脂质体组，除空白组、pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组 2 组间差异无统计学意义，其余有统计学意义。转染后 72 h 各组细胞培养基中 ALP 总量：pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组>pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组>空白

表 2　转染后 96 h 内不同处理组细胞增殖情况表（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2　Cell proliferation in different treatment groups after 96 h of transfection（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	$F_{时间}$值	P 值	$F_{交互(处理\times时间)}$值	P 值
空白组	0.285 ± 0.002	0.326 ± 0.003	0.334 ± 0.006	0.403 ± 0.002				
pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组	0.294 ± 0.003	0.314 ± 0.006	0.364 ± 0.005	0.486 ± 0.007	740.980	0.000	118.420	0.000
pEGFP-N1+脂质体组	0.278 ± 0.001	0.171 ± 0.004	0.191 ± 0.006	0.312 ± 0.009				
pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组	0.285 ± 0.009	0.245 ± 0.013	0.205 ± 0.008	0.316 ± 0.005				
$F_{组别}$值	1 113.792							
P 值	0.000							

表 3 各组细胞培养基中 ALP 总量随时间变化量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 ALP amount in the cell culture medium changing over time（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	$F_{时间}$值	P值	$F_{交互(处理×时间)}$值	P值
空白组	0.235±0.009	0.243±0.005	0.301±0.017	0.334±0.006				
pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组	0.302±0.009	0.366±0.009	0.392±0.003	0.054±0.003	288.220	0.000	14.932	0.000
pEGFP-N1+脂质体组	0.188±0.009	0.210±0.013	0.266±0.004	0.223±0.011				
pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组	0.211±0.002	0.246±0.001	0.302±0.002	0.284±0.008				
$F_{组别}$值		403.999						
P值		0.000						

组>pEGFP-N1+脂质体组，除空白组、pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组 2 组间差异无统计学意义，其余组差异有统计学意义。转染后 96 h 各组细胞培养基中 ALP 总量：pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组>空白组>pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组>pEGFP-N1+脂质体组，各组间差异均有统计学意义。具体结果见表3。

2.7 各处理组 Col1α1 及 Col1α2 基因的表达情况

2.7.1 Ⅰ型胶原 RT-PCR 结果 有文献报道在转染后 48 h 细胞绿色荧光表达最强[15]，故本实验选择于转染后 48 h 对各组细胞进行绿色荧光表达量的观察及记录及 Col1α1 及 Col1α2 基因表达情况的检测。检测结果如图 6 所示。



注：从左至右，依次为空白组、pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组、pEGFP-N1+脂质体组和 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组

图 6 Col1α1 及 Col1α2 基因 RT-PCR 表达情况

Fig.6 Reverse transcription PCR results of Col1α1 and Col1α2

2.7.2 Ⅰ型胶原 qRT-PCR 结果 以空白组为对照，计算出转染后 48 h 各组Ⅰ型胶原相对表达量。Col1α1 相对表达量：pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组>pEGFP-N1+脂质体组>空白组>pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组。Col1α2 相对表达量：pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组>pEGFP-N1+脂质体组>空白组>pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组，各组间差异有统计学意义。具体结果见表4。

表 4 转染后 48 h 各组细胞 Col1α1 和 Col1α2 相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Relative expression of Col1α1 and Col1α2 in each group after 48 h of transfection（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	Col1α1	Col1α2
空白组	1.000±0.000	1.000±0.000
pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组	1.498±0.019	1.115±0.004
pEGFP-N1+脂质体组	0.581±0.048	0.386±0.029
pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组	2.939±0.103	2.239±0.106
F值	320.091	173.242
P值	0.000	0.000

3 讨 论

近年来，以生长因子局部应用为代表的牙周再生治疗受到广泛关注。IGF-Ⅰ作为代谢调节因子，能促进成骨前体细胞向成骨细胞增殖、分化，提高牙周组织再生过程中必需细胞的生物学活性，从而促进牙周组织修复再生[11]。

大量研究表明 IGF-Ⅰ能显著促进多种细胞的增殖能力[12-14]。由于瞬时转染表达具有时间特异性，故本实验仅对转染后 96 h 细胞增殖活性进行了统计学分析。重组 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ基因表达载体直接转染率较低[15]，本实验采用脂质体介导其转染，通过绿色荧光观察可见脂质体能明显增强转染效率。有体外试验研究发现阳离子脂质体的生物降解性和亲脂性对转染后的细胞具有毒性作用[16]，本实验通过 MTT 检测发现细胞增殖活性脂质体处理组低于非脂质体处理组，证实脂质体确实存在一定细胞毒性。pEGFP-N1+脂质体组细胞增殖活性仅在转染后 48 h 低于 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组，其余时间差异无统计学意义，表明在同样受到脂质体毒性的作用下，IGF-Ⅰ能在一定程度上增强细胞增殖活性。

ALP 是参与骨形成、再生的重要酶类，是成骨分化早期的标志物之一[17]。本研究结果显示，pEGFP-N1-IGF-Ⅰ组 ALP 活性在转染后 96 h 始终最高，证明质粒转染对 ALP 的表达具有增强作用。pEGFP-N1+脂质体组 ALP 活性在转染后 96 h 内始终最低，证明脂质体毒性能抑制 ALP 表达。转染后空白组 ALP 活性大于 pEGFP-N1+脂质体组，提示脂质体毒性的影响是一方面，转染后的 pEGFP-N1 对其影响则是另一方面。pEGFP-N1-IGF-Ⅰ+脂质体组 ALP 活性在 48 h 时明显增高，而此时恰恰是脂质体转染

对细胞增殖影响较大的时间点，也是基因转染表达最强的时间点，进一步证实 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ对 ALP 活性表达的增强作用。以上结果表明 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ有增强 ALP 表达的作用，具有一定的促 rDFCs 早期成骨分化的作用。

Ⅰ型胶原是成骨过程中数量增加最多的生物大分子。Ishikawa 等[18]证明Ⅰ型胶原的形成是成骨细胞和成牙骨质细胞向牙周膜细胞分化的初始过程。Ⅰ型胶原是由 2 条 α1 链及一条 α2 链组成的三螺旋结构，其 Col1α1 及 Col1α2 基因分别编码 α1 链和 α2 链。本实验在 cDNA 逆转录反应时对 RNA 进行定量，基本去除细胞增殖的影响。PCR 结果表明，pEGFP-N1-IGF-Ⅰ有增强 Col1α1 及 Col1α2 表达的作用，间接提示 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ可促进 rDFCs 成骨分化。在细胞数基本一样的前提下，脂质体组转染效率较高，表明在加入脂质体增强细胞转染效率的条件下，能增强Ⅰ型胶原的相对表达量，进一步证明了Ⅰ型胶原表达具有剂量依赖性。空白组 Col1α1 及 Col1α2 基因的相对表达量较 pEGFP-N1+脂质体组更多，提示在细胞数目基本一样的情况下，pEGFP-N1 的转染降低了 Col1α1 及 Col1α2 基因的相对表达量。推测可能是因为 EGFP 蛋白在细胞中的表达加重了细胞生理代谢负荷，尚需进一步研究其具体机制。本研究仅比较了转染后 48 h 时各组基因表达的情况，尚需进一步探讨 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ质粒影响Ⅰ型胶原表达的时间特异性。

综上所述，本研究构建了重组 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ基因表达质粒，通过脂质体介导 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ转染 rDFCs，并对各组细胞绿色荧光表达、增殖活性、ALP 活性、Ⅰ型胶原表达进行了对比分析。本研究证明 pEGFP-N1-IGF-Ⅰ对 rDFCs 增殖及早期成骨分化效应具有一定的促进作用，为 IGF-Ⅰ基因在牙周组织修复再生中的应用提供了实验依据，具有一定的科学研究价值和应用潜力。

参 考 文 献

[1] Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases [J]. Lancet, 2005, 366(9499): 1809-1820.

[2] Nguyen TT, Mui B, Mehrabzadeh M, et al. Regeneration of tissues of the oral complex: current[J]. Journal, 2013, 79(c140): d1.

[3] Luan X, Ito Y, Dangaria S, et al. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium[J]. Stem Cells & Development, 2006, 15(4): 595-608.

[4] Yao S, Pan F, Prpic V, et al. Differentiation of stem cells in the dental follicle[J]. Journal of Dental Research, 2008, 87(8): 767-771.

[5] Kawai M, Rosen CJ. Insulin-like growth factor-I and bone: lessons from mice and men[J]. Pediatric Nephrology, 2009, 24(7): 1277-1285.

[6] Yokota T, Shimokawa H, Shibata S, et al. Insulin-like growth factor-I regulates apoptosis in condylar cartilage[J]. Journal of Dental Research, 2008, 87(2): 159-163.

[7] Ferrandis E, Pradhananga SL, Touvay C, et al. Immunogenicity, toxicology, pharmacokinetics and pharmacodynamics of growth hormone ligand-receptor fusions[J]. Clinical Science, 2010, 119(11): 483-491.

[8] Chang PC, Cirelli JA, Jin QM, et al. Adenovirus encoding human platelet-derived growth factor-B delivered to alveolar bone defects exhibits safety and biodistribution profiles favorable for clinical use[J]. Human Gene Therapy, 2009, 20(5): 486-496.

[9] Premaraj S, Mundy B, Parker-Barnes J, et al. Collagen gel delivery of Tgf-β3-non-viral plasmid DNA in rat osteoblast and calvarial culture[J]. Orthodontics & Craniofacial Research, 2005, 8(4): 320-322.

[10] Murakami S, Takayama S, Kitamura M, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor(bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs[J]. Journal of Periodontal Research, 2003, 38(1): 97-103.

[11] Yokota T, Shimokawa H, Shibata S, et al. Insulin-like growth factor-I regulates apoptosis in condylar cartilage[J]. Journal of Dental Research, 2008, 87(2): 159-163.

[12] Nemoto E, Shimonishi M, Nitta Y, et al. The involvement of platelet-derived growth factor receptors and insulin-like growth factor-I receptors signaling during mineralized nodule formation by human periodontal ligament cells[J]. Journal of Periodontal Research, 2004, 39(6): 388-397.

[13] Matheny RW, Nindl BC, Adamo ML. Minireview: mechano-growth factor: a putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration[J]. Endocrinology, 2010, 151(3): 865-875.

[14] Tahimic CG, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton[J]. Frontiers in Endocrinology, 2013, 4: 6.

[15] 徐 萍，张克勤. IGF-Ⅰ与骨代谢[J]. 国外医学(内分泌学分册)，2005，25(1)：63-66.

[16] 李劲松，叶 展，赵涵芳，等. 阳离子脂质体介导的基因转染真核细胞的研究[J]. 上海第二医科大学学报，2005，25(10)：1025-1029.

[17] 王秋实，裴国献，江 汕，等. 感觉，运动神经匀浆对兔成骨细胞增殖与成骨功能的影响[J].南方医科大学学报，2008，28(5)：774-778.

[18] Ishikawa S, Iwasaki K, Komaki M, et al. Role of ascorbic acid in periodontal ligament cell differentiation[J]. J Periodontol, 2004, 75(5): 709-716.

（责任编辑：冉明会）