

骨科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000367

BMP9 和 VEGF 联合诱导小鼠间充质干细胞成骨分化的体外研究

贺引¹, 何昀²

(1. 重庆市第九人民医院儿科, 重庆 400700; 2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所小儿外科, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨重组腺病毒介导的骨形态发生蛋白 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9) 和血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 共感染对骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨分化的影响。**方法:**将重组腺病毒介导的 BMP9 和 VEGF 分 5 组感染小鼠间充质干细胞 C3H10T1/2, Ad-BMP9 组、Ad-VEGF 组、Ad-VEGF+Ad-BMP9 组、空载体腺病毒组和空白组, 感染 7 d 后, real-time PCR 检测 BMP9 和 VEGF 的 mRNA 水平, real-time PCR 检测成骨指标骨钙蛋白 (osteocalcin, OC)、骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 的 mRNA 水平, Western blot 检测 OPN 蛋白的表达, 各组细胞行碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性的定量检测、ALP 染色和钙盐沉积的检测。**结果:**BMP9 和 VEGF 在 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组高效共表达, OC、OPG、OPN mRNA 水平和 OPN 蛋白水平在 Ad-BMP9 组和 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组的表达明显高于其他各组 ($P < 0.05$), 且在 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组表达最高 ($P < 0.05$)。Ad-VEGF+Ad-BMP9 组的 ALP 活性、ALP 染色和钙盐沉积明显高于其他各组 ($P < 0.05$)。**结论:**联合 VEGF 可明显增强 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化能力。

【关键词】骨形态发生蛋白 9; 血管内皮细胞生长因子; 成骨分化

【中图分类号】R683

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-09

Combination of BMP9 and VEGF induces osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mouse mesenchymal stem cells *in vitro*He Yin¹, He Yun²

(1. Department of Pediatrics, the Ninth People's Hospital of Chongqing; 2. Department of Surgery, Pediatric Research Institute, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of recombinant adenovirus-mediated co-infection of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and vascular endothelial growth factor (VEGF) gene on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods:** C3H10T1/2 cells were infected by recombinant adenovirus-mediated of BMP9 and VEGF as follow five groups: Ad-BMP9 group, Ad-VEGF group, Ad-VEGF+Ad-BMP9 group, Ad-null group and control group. After infecting for 7 days, RT-PCR was performed to detect the mRNA expression level of BMP9 and VEGF, and real-time PCR was carried out to detect the mRNA expression level of osteogenesis index osteocalcin (OC), osteoprotegerin (OPG), osteopontin (OPN). Western blot was used to detect the protein expressions level of OPN. Alkaline phosphatase (ALP) activity was measured by quantitative and staining assay, and calcium deposition was determined by Alizarin Red S staining in each group. **Results:** BMP9 and VEGF co-expressed effectively in Ad-VEGF+Ad-BMP9 group. The mRNA level of OC, OPG, OPN and the protein level of OPN in Ad-BMP9 group and Ad-VEGF+Ad-BMP9 group were statistically higher than those of other groups ($P < 0.05$), and were the highest in Ad-VEGF+Ad-BMP9 group ($P < 0.05$). The activity and staining assay of ALP, and the deposition of calcium in Ad-VEGF+Ad-BMP9 group were statistically higher than those in the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Combination of BMP9 and VEGF may promote osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells *in vitro*.

【Key words】bone morphogenetic protein 9; vascular endothelial growth factor; osteogenesis

作者介绍: 贺引, Email: heyin8057@163.com,

研究方向: 儿科学。

通信作者: 何昀, Email: yun_he@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81001030)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1109.007.html>

(2014-07-15)

近些年,骨组织工程技术的应用为临床解决骨缺损和骨不连等难题打开了一扇窗。骨组织工程主要包括种子细胞、生长因子及载体支架 3 个要素。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一类具有多向分化潜能的干细胞,可分化成为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞和肝实质细胞等,是公认的骨组织工程中的理想种子细胞^[1]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是目前研究较多的骨生长因子,是 TGF- β 超家族成员之一,是诱导间充质干细胞成骨分化最强的调控因子之一^[2],BMP9 可有效诱导成骨、促进骨再生,但效果仍然欠理想,可能与 BMP9 等 BMPs 家族因子促进骨胶原合成和成骨细胞增殖分化能力等作用有限相关,需要寻找解决这一问题的方法。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管形成的关键因子,在软骨内骨化的成骨途径中起着重要的作用^[3]。因此,在联合应用外源性骨生长因子促进骨缺损的研究中,探究骨生长因子之间的相互作用,寻找骨缺损愈合期间各生长因子的不同作用以及各因子联合应用时最佳剂量比,已成为目前研究的热点。

本实验选择小鼠胚胎期间充质干细胞 C3H10T1/2 作为种子细胞,以 BMP9 和 VEGF 作为研究对象,旨在研究联合应用这 2 种骨生长因子对 C3H10T1/2 细胞成骨分化的影响,为临床治疗骨缺损寻找更加有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重组腺病毒 Ad-BMP9、Ad-VEGF 及空载体腺病毒由美国芝加哥大学分子肿瘤中心何通川教授馈赠,小鼠间充质干细胞 C3H10T1/2 购自 ATCC,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,real-time PCR 反应试剂盒和 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克公司,PCR mix 购自东盛生物科技公司。 β -actin 抗体、羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物有限公司,骨桥蛋白(os-teopontin, OPN)一抗购自美国 Immunoway 公司,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒及其定量检测试剂盒购自美国 BD 公司,茜素红染料购自美国 Sigma 公司,其他试剂为进口分装或国产分析纯。用 Primer 3.0 软件设计引物序列(表 1),华大基因公司完成合成。

1.2 方法

1.2.1 C3H10T1/2 细胞的培养及感染 C3H10T1/2 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,置 37 °C、5%的 CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴

壁后,分为 5 组分别感染重组腺病毒:Ad-VEGF 组、Ad-BMP9 组、Ad-VEGF+Ad-BMP9 组、空载体腺病毒(Ad-null)组和空白(Control)组,每组设 3 个复孔,感染 48 h 后,在倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况。

1.2.2 Real-time PCR 法检测各组细胞中 VEGF、BMP9 基因的 mRNA 水平 将上述 5 组细胞感染 2 d 及 7 d 后,提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度,逆转录合成 cDNA 第 1 链,再以其为模板,real-time PCR 反应体系:2 $\times$ SYBR Green 10 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,模板 2 μ l,加水至 20 μ l。反应条件:95 °C 3 min;95 °C 15 s,55 °C 30 s,72 °C 20 s,共 40 个循环;溶解曲线 65 °C~95 °C,以 β -actin 为内参标准化各组 cDNA 模板。引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列表
Tab.1 Sequences of real-time PCR primers

基因	引物序列(5' -3')	产物大小(bp)
β -actin	上游:AGGGAATCGTCGCTGAC	146
	下游:CGCTCGTTGCCAATACTGA	
VEGF	上游:CCCACTGAGGAGTCCAAC	172
	下游:AAAGCTTTCTCCGCTCT	
BMP-9	上游:GACGCCTATGAGTGTAAAGG	208
	下游:TCCCTCATAGTGCTACTTG	
OPN	上游:CCTCCCGGTGAAAGTGAC	124
	下游:CTGTGGCGCAAGGAGATT	
OPG	上游:GTTCTGCACAGCTTCACAA	121
	下游:AAACAGCCCAGTGACCATTC	
OC	上游:CCTTCATGTCCAAGCAGGA	161
	下游:GGCGGTCTTCAAGCCATAC	

1.2.3 Real-time PCR 检测成骨指标 OC、OPN、OPG 的 mRNA 水平 取腺病毒感染 7 d 后 5 组逆转录合成的 cDNA,再用于检测成骨指标骨钙蛋白(osteocalcin, OC)、OPN、骨保护素(os-teoprotegerin, OPG)的 mRNA 水平。real-time PCR 反应体系:2 $\times$ SYBR Green 10 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,模板 2 μ l,加水至 20 μ l。反应条件:95 °C 3 min;95 °C 15 s,55 °C 30 s,72 °C 20 s,共 40 个循环;溶解曲线 65 °C~95 °C,以 β -actin 为内参标准化各组 cDNA 模板。引物序列见表 1。

1.2.4 Western blot 法检测各组细胞中成骨指标 OPN 蛋白的表达 按上述分组方法培养 C3H10T1/2 细胞,感染 7 d 后,提取各组细胞总蛋白,取 50 μ g/孔上样,经 10%SDS-PAGE 分离后,250 mA,1 min/KD 湿转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1~2 h;TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,加入兔抗鼠 OPN (1:500 稀释)和小鼠抗小鼠 β -actin 单抗(1:200 稀释),4 °C 过夜;TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,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 ALP 活性的定量检测 将 2 $\times$ 10⁵ 个 C3H10T1/2 细胞接种于 24 孔板,同上设置各组,每组设 3 个复孔,病毒感染 7 d 后去除培养基,PBS 轻洗细胞 2 遍;每孔加 1 $\times$ Luciferase

细胞裂解液 100 μ l 裂解细胞 5 min,将悬液转移至 EP 管中,离心(13 000 r/min $\times$ 3 min);取离心上清液 5 μ l,加 ALP 底物 5 μ l,1 $\times$ Lupo buffer 15 μ l,避光反应 30 min,单孔荧光检测仪检测 562 nm 波长处吸光值;余下的上清用 BCA 法测各组蛋白浓度,标化 ALP 读数。

1.2.6 ALP 表达的检测 细胞分组及培养同 1.2.5,病毒感染 7 d 后采用 ALP 染色法检测。双蒸水中加入少量的 Fast Blue BB salt 粉末,使其成为淡黄色即可,再加入 1/25 体积的 AS-MX 染料,配置成染液。PBS 轻洗细胞 2 遍,每孔加 200 μ l 染液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,去除染液,PBS 轻洗后光镜下观察染色情况。

1.2.7 各组细胞中钙盐沉积的检测 细胞分组及培养同 1.2.5,病毒感染 2 d 后,加入终浓度为 50 μ g/ml 的维生素 C 和 10 mmol/L 的 β -磷酸甘油,培养 21 d 后茜素红 S 染色检测钙盐沉积;弃去培养基,PBS 轻洗细胞 2 遍,4%多聚甲醛固定 2 h,PBS 洗 2 次,加入 250 μ l 2%茜素红-Tris-Hcl (pH=8.3) 染液,37 $^{\circ}$ C 染色 30 min,双蒸水冲洗后,光镜下观察。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用双侧 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞的效果

重组腺病毒感染 48 h 后,在倒置荧光显微镜下显示荧光蛋白的表达,提示腺病毒可有效感染 C3H10T1/2 细胞,见图 1。

2.2 Real-time PCR 检测腺病毒介导 VEGF 和 BMP-9 在 C3H10T1/2 细胞中的高表达

Real-time PCR 分析显示,虽然腺病毒转染 7 d 时较 2 d 时各组基因表达下降,但 VEGF 在 Ad-VEGF 组和 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组的 mRNA 水平相对其他 3 组高表达,BMP9 的 mRNA 水平在 Ad-BMP9 组和 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组相

对其他 3 组高表达,提示腺病毒介导的 VEGF 和 BMP-9 在 C3H10T1/2 细胞中获得有效表达。见图 2 和表 2。

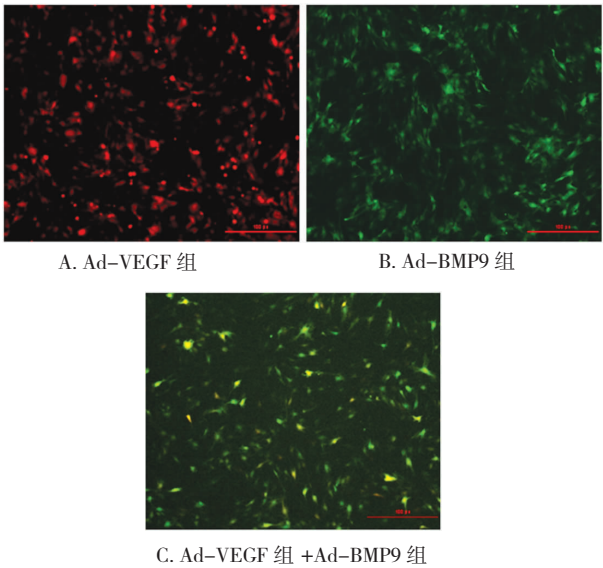


图 1 重组腺病毒感染 C3H10 细胞 48 h 后的
荧光显微镜观察 (100 $\times$)
Fig.1 Fluorescent microscopy of C3H10 cells 48 h after infection
with recombinant adenoviruses (100 $\times$)

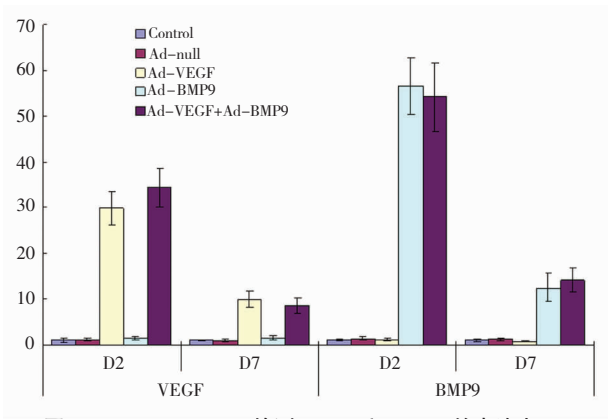


图 2 Real-time PCR 检测 VEGF 和 BMP9 的表达水平
($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig.2 Transcription level of VEGF and BMP9 mRNA detected by
real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 2 Real-time PCR 检测 VEGF 和 BMP9 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab.2 Transcription level of VEGF and BMP9 mRNA detected by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	VEGF		BMP-9	
	D2	D7	D2	D7
Control组	1.000 $\pm$ 0.548	1.000 $\pm$ 0.071	1.000 $\pm$ 0.218	1.000 $\pm$ 0.256
Ad-null组	1.112 $\pm$ 0.333	0.951 $\pm$ 0.285	1.374 $\pm$ 0.291	1.190 $\pm$ 0.242
Ad-VEGF组	29.857 $\pm$ 3.646 ^a	9.895 $\pm$ 1.844 ^a	1.160 $\pm$ 0.256	0.655 $\pm$ 0.105
Ad-BMP9组	1.390 $\pm$ 0.271	1.458 $\pm$ 0.448	56.511 $\pm$ 6.192 ^b	12.459 $\pm$ 3.087 ^b
Ad-VEGF+Ad-BMP9组	34.401 $\pm$ 4.297 ^a	8.560 $\pm$ 1.715 ^a	54.104 $\pm$ 7.627 ^b	14.181 $\pm$ 2.748 ^b
F 值	134.980	45.025	136.453	40.355
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与 Control 组,Ad-null 组,Ad-BMP9 组相比, $P<0.05$;b,与 Control 组,Ad-null 组,Ad-VEGF 组相比, $P<0.05$

2.3 Real-time PCR 及 Western blot 检测 C3H10T1/2 细胞成骨指标的表达

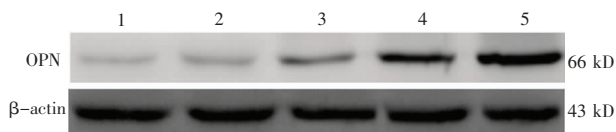
见表 3, real-time PCR 显示, 腺病毒感染 7 d 后, 成骨指标 OC、OPG、OPN 的 mRNA 水平和蛋白水平在 Ad-BMP9 组和 Ad-VEGF + Ad-BMP9 组都较其他 3 组高表达 ($P < 0.05$), 且在 Ad-VEGF + Ad-BMP9 组表达较 Ad-BMP9 组更高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在 Ad-VEGF 组无明显增高 ($P > 0.05$)。同时, Western blot 分析显示 OPN 蛋白在 Ad-VEGF + Ad-BMP9 组表达最高, 见图 3。提示单一应用 VEGF 短期内对 C3H10T1/2 细胞无成骨分化能力, 单一应用 BMP9 短期内对 C3H10T1/2 细胞有成骨分化能力, 且联合应用 VEGF 和 BMP9 可增强 BMP9 的成骨分化能力。

表 3 各组感染细胞 OC、OPN、OPG 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.3 Expressions of OC, OPN and OPG of infected cells in various groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	OC	OPN	OPG
Control组	1	1	1
Ad-null组	1.022 ± 0.171	1.120 ± 0.117	0.951 ± 0.139
Ad-VEGF组	1.160 ± 0.118 ^a	1.219 ± 0.214 ^a	1.370 ± 0.118 ^a
Ad-BMP9组	4.716 ± 0.469 ^a	3.947 ± 0.650 ^a	5.797 ± 0.326 ^a
Ad-VEGF+Ad-BMP9组	9.025 ± 0.474 ^{ab}	6.111 ± 0.715 ^{ab}	8.729 ± 0.569 ^{ab}
F 值	380.742	76.959	337.135
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a, Ad-BMP9 组, Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Control 组, Ad-null 组, Ad-VEGF 组相比, $P < 0.05$; b, Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-BMP9 组相比, $P < 0.05$; OC 的表达: $F=380.742, P=0.000, P(\text{Ad-null 组与 Control 组})=0.931, P(\text{Ad-VEGF 组与 Control 组})=0.545, P(\text{Ad-BMP9 组与 Control 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Control 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF 组与 Ad-null 组})=0.603, P(\text{Ad-BMP9 组与 Ad-null 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-null 组})=0.000, P(\text{Ad-BMP9 组与 Ad-VEGF 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-VEGF 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-BMP9 组})=0.000$ 。OPN 的表达: $F=76.959, P=0.000, P(\text{Ad-null 组与 Control 组})=0.751, P(\text{Ad-VEGF 组与 Control 组})=0.565, P(\text{Ad-BMP9 组与 Control 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Control 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF 组与 Ad-null 组})=0.794, P(\text{Ad-BMP9 组与 Ad-null 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-null 组})=0.000, P(\text{Ad-BMP9 组与 Ad-VEGF 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-VEGF 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-BMP9 组})=0.000$ 。OPG 的表达: $F=337.135, P=0.000, P(\text{Ad-null 组与 Control 组})=0.861, P(\text{Ad-VEGF 组与 Control 组})=0.204, P(\text{Ad-BMP9 组与 Control 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Control 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF 组与 Ad-null 组})=0.154, P(\text{Ad-BMP9 组与 Ad-null 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-null 组})=0.000, P(\text{Ad-BMP9 组与 Ad-VEGF 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-VEGF 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-BMP9 组})=0.000$ 。



1. Control 组; 2. Ad-null 组; 3. Ad-VEGF 组; 4. Ad-BMP9 组; 5. Ad-VEGF+Ad-BMP9 组

图 3 Western blot 检测成骨指标

Fig.3 Osteogenesis indicators detected by Western blot

2.4 ALP 活性的定量分析及染色

见表 4 及图 4, 腺病毒感染 7 d 后, Ad-BMP9 组和 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组的 ALP 读数都较其他 3 组高 ($P < 0.05$), 且在 Ad-VEGF + Ad-BMP9 组最高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Ad-VEGF 组读数较 Ad-null 组和 Control 组无明显差异 ($P > 0.05$)。同时, ALP 染色结果显示在 Ad-BMP9 组和 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组可以看到被染成紫蓝色的阳性细胞, 其他 3 组几乎无阳性细胞, 且 Ad-VEGF + Ad-BMP9 组的阳性细胞更多, 颜色更深 (图 5)。提示联合应用 VEGF 和 BMP9 可提高 BMP9 增强 ALP 活性及表达的能力。

表 4 各组感染细胞 ALP 活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.4 ALP activity of infected cells in various groups

($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	ALP活性
Control组	3 883.000 ± 200.507
Ad-null组	4 308.333 ± 368.793
Ad-VEGF组	5 604.000 ± 797.714 ^a
Ad-BMP9组	131 104.700 ± 10 925.210 ^a
Ad-VEGF+Ad-BMP9组	166 080.700 ± 6 365.775 ^a
F 值	594.940
P 值	0.000

注: a, Ad-BMP9 组, Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Control 组, Ad-null 组, Ad-VEGF 组相比, $P < 0.05$; b, Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-BMP9 组相比, $P < 0.05$; $F=594.940, P=0.000, P(\text{Ad-null 组与 Control 组})=0.929, P(\text{Ad-VEGF 组与 Control 组})=0.718, P(\text{Ad-BMP9 组与 Control 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Control 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF 组与 Ad-null 组})=0.785, P(\text{Ad-BMP9 组与 Ad-null 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-null 组})=0.000, P(\text{Ad-BMP9 组与 Ad-VEGF 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-VEGF 组})=0.000, P(\text{Ad-VEGF+Ad-BMP9 组与 Ad-BMP9 组})=0.000$ 。

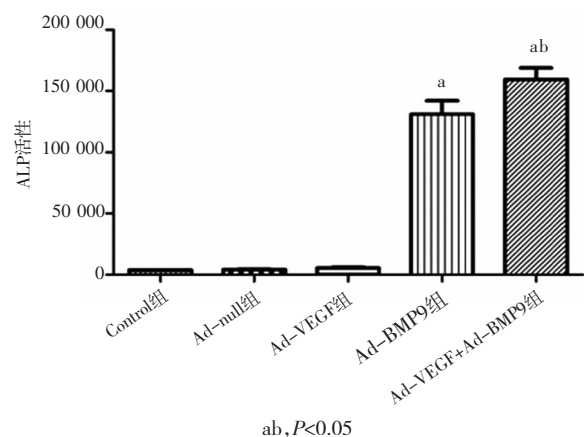


图 4 各组感染细胞 ALP 活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 ALP activity of infected cells in various groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 各组细胞中钙盐沉积的检测

茜素红染色显示 Ad-BMP9 组和 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组的红色钙盐结节较其他 3 组多, 且 Ad-VEGF+Ad-BMP9 组的红色钙盐结节数量最多, 颜色更深。提示联合应用 VEGF 和 BMP9 可促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积。见图 6。

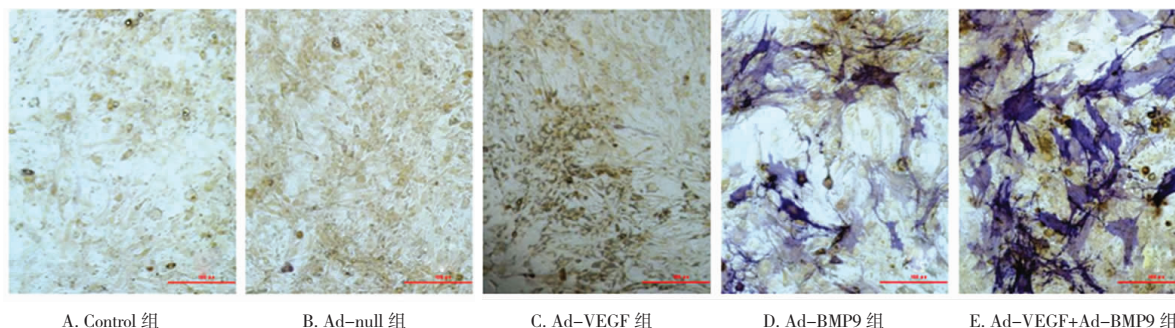


图 5 各组感染细胞的 ALP 染色 (100 ×)

Fig.5 ALP staining of infected cells in various groups (100 ×)

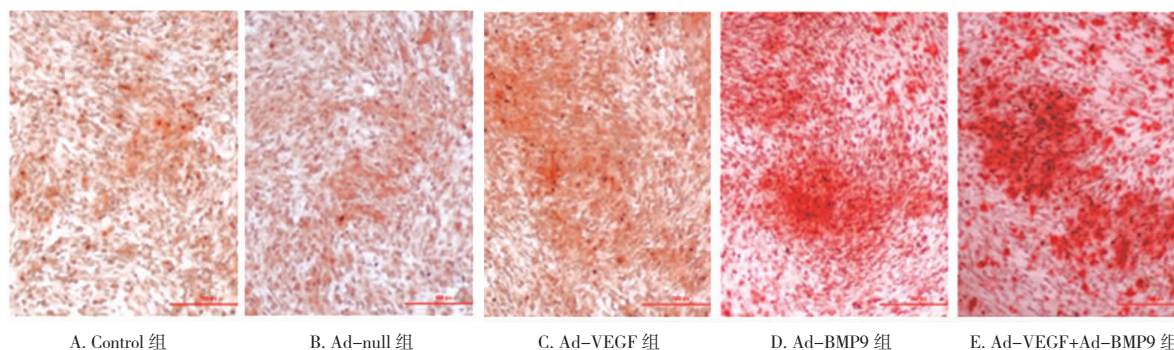


图 6 各组感染细胞的钙茜素红染色(100 ×)

Fig.6 Calcium-alizarin red staining of infected cells in various groups(100 ×)

3 讨论

骨缺损的修复是一个复杂的、受多种细胞因子调控的过程,这一过程包括骨生成和血管生成。血管生成能为骨生长提供氧及营养物质,促进新陈代谢,为局部骨再生提供有利的微环境,加速骨生长。因此,研究骨生长与血管生长的分子机制及二者之间的相互作用,将有助于为骨组织工程构建血管化骨支架结构提供理论依据^[4]。

BMP 属于 TGF- β 超家族中的一员,具有刺激成骨分化的生物学效应,它的一些重组形式(rhBMP2、rhBMP7)已经用于临床研究体内诱导骨形成的实验中^[5-6],其成员 BMP9 的成骨分化作用强于 BMP2、BMP7^[2],有很好的临床应用前景。VEGF 是体内促进血管内皮生长最重要的生长因子,通过结合血管内皮细胞膜上的受体,特异性的促进血管内皮细胞增生和血管生成。可见,BMP 和 VEGF 在骨生长过程中都是重要的细胞因子。已有研究表明,VEGF 与 BMP2、BMP4、BMP6 都有协同作用,通过诱导血管生

成能有效促进骨生长^[3,7-8]。而在干细胞介导的成骨作用方面,VEGF 与不同 BMP 的协同作用不同(与 BMP-4 联合的效果比与 BMP-2 的效果更强^[9])。有报道指出,BMP-9 能抑制 VEGF 诱导的血管生成作用^[10],但对成骨效应鲜有报道,因此,本研究以成骨诱导能力最强的 BMP9 为切入点,重在探讨 VEGF 对于 BMP9 诱导的 BMSCs 成骨分化的影响。

ALP 是成骨细胞分化早期的关键性酶,成骨细胞中的 ALP 作用产生磷酸,与钙生成磷酸钙沉积于骨中,故 ALP 活性的提高是 BMSCs 向成骨细胞分化的重要标志。ALP 染色及其活性的定量检测常被用来评价成骨细胞的分化成熟程度。本研究通过将重组腺病毒 Ad-VEGF 和 Ad-BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞 7 d 后显示,BMP9 能够增加 ALP 活性,这与文献报道一致^[11]。与 VEGF 在促进小鼠前成骨细胞系 D1 细胞体外成骨分化的诱导作用不同^[12],本实验没有观察到单用 VEGF 对 C3H10T1/2 细胞的成骨分化作用,可能由于 C3H10T1/2 较前成骨细胞的分化阶段更早期,对 VEGF 的作用不敏感,而在强成骨因子 BMP9 的联用刺激下,VEGF 可明显增强

其成骨作用,ALP 活性增加程度强于单一应用 BMP9,ALP 染色也验证了这一结果。本实验进一步检测了成骨细胞分化的中晚期标志 OC、OPN、OPG 和钙盐沉积,有研究^[13]证实 BMP9 可使 C3H10T1/2 细胞 OC 和 OPN 的表达增加,且钙盐结节增加,与本研究结果相符,另一方面,本研究发现联合应用 VEGF 增强了 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 OC、OPN、OPG 的表达和钙盐沉积。

研究发现^[14],TGF- β 促进 VEGF 的表达,而作为 TGF- β 家族的 BMP9 对 VEGF 的表达没有作用,同时,VEGF 过表达也不影响 BMP9 的转录调控,提示 2 者的协同效应可能通过下游的信号转导网络。Smad 蛋白家族是 TGF- β 超家族信号通路下游重要的转导蛋白,在调控多种细胞分化方面具有很重要的作用。与成骨细胞分化关系密切的是 Smad1 和 Smad5,BMPs 可刺激 Smad1 和 Smad5 磷酸化,与 Smad4 形成复合体,进入细胞核参与成骨细胞分化^[15-16]。另一方面,He 和 Chen^[14]发现在斑马鱼的 VEGF 启动子中存在 Smad1 和 Smad5 的绑定元素,提出 BMP/Smad 信号通路参与调控 VEGF 的表达。因此,本研究猜想 BMP9 与 VEGF 协同诱导成骨分化,可能与激活 BMP/Smad 信号通路相关,这将是下一步研究的重点。

综上所述,本研究通过重组腺病毒介导的基因感染 BMSCs 证实联合应用 BMP9 和 VEGF 可增强 BMSCs 体外的成骨分化能力,为骨组织工程寻找联合应用生长因子诱导成骨提供了实验基础。而 BMP9 和 VEGF 协同诱导成骨的具体分子机制是本研究的下一步目标。下一步,本研究还将进行体内实验,深入探讨协同促进种子细胞对动物骨缺损模型的修复作用,对骨组织工程在临床骨缺损的治疗具有重要的理论和现实意义。

参 考 文 献

[1] Caplan AL. Mesenchymal stem cells[J].J Orthop Res,1991,9(5):641-650.
[2] Kang Q,Sun MH,Cheng H,et al.Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant aden-

ovirus-mediated gene delivery[J].Gene Ther,2004,11(17):1312-1320.
[3] Peng H,Wright V,Usas A,et al.Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4[J].J Clin Invest,2002,110(6):751-759.
[4] Kanczler JM,Oreffo RO.Osteogenesis and angiogenesis:the potential for engineering bone[J].Eur Cell Mater,2008,15:100-114.
[5] Valentin-Opran A,Wozney J,Csimma C,et al.Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2[J].Clin Orthop Relat Res,2002(395):110-120.
[6] Dohin B,Dahan-Oliel N,Fassier F,et al.Enhancement of difficult nonunion in children with osteogenic protein-1(OP-1):early experience[J].Clin Orthop Relat Res,2009,467(12):3230-3238.
[7] Kanczler JM,Ginty PJ,White L,et al.The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation[J].Biomaterials,2010,31(6):1242-1250.
[8] Cui F,Wang X,Liu X,et al.VEGF and BMP-6 enhance bone formation mediated by cloned mouse osteoprogenitor cells[J].Growth Factors,2010,28(5):306-317.
[9] Peng H,Usas A,Olshanski A,et al.VEGF improves,whereas sFlt1 inhibits,BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis[J].J Bone Miner Res,2005,20(11):2017-2027.
[10] Scharpfenecker M,van Dinther M,Liu Z,et al.BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis[J].J Cell Sci,2007,120(Pt 6):964-972.
[11] Wu N,Zhao Y,Yin Y,et al.Identification and analysis of type II TGF- β receptors in BMP-9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells[J].Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2010,42(10):699-708.
[12] Cui F,Wang X,Liu X,et al.VEGF and BMP-6 enhance bone formation mediated by cloned mouse osteoprogenitor cells[J].Growth Factors,2010,28(5):306-317.
[13] 张 晓,徐道晶,林良波,等.Wnt3a 协同 BMP9 调控间充质干细胞成骨分化及机制研究[J].重庆医科大学学报,2012,37(7):565-569.
[14] He C,Chen X.Transcription regulation of the vegf gene by the BMP/Smad pathway in the angioblast of zebrafish embryos[J].Biochem Biophys Res Commun,2005,329(1):324-330.
[15] Chen G,Deng C,Li YP.TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation[J].Int J Biol Sci,2012,8(2):272-288.
[16] Liu DD,Zhang JC,Zhang Q,et al.TGF- β /BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J].J Cell Biochem,2013,114(5):1105-1114.

(责任编辑:冉明会)