

人转化生长因子 β 3基因转染KLD-12自组装纳米肽纤维支架三维培养前软骨干细胞*[☆]

丁然, 张勇, 游洪波, 李锋, 孙凯

Transfecting human transformation growth factor beta 3 gene into precartilaginous stem cells cultured in three-dimensional self-assembled peptide nanofiber scaffold of KLD-12

Ding Ran, Zhang Yong, You Hong-bo, Li Feng, Sun Kai

Abstract

BACKGROUND: Previous tests of our research group have proved that, exogenous cytokines human transforming growth factor- β 3 (hTGF- β 3) has a strong capacity of inducing precartilaginous stem cells (PSCs) differentiate to mature cartilage and of promoting the proliferation. Abroad studies also confirmed a beneficial effect on the proliferation and differentiation of cartilage-derived stem cells in three-dimensional culture of the self-assembled peptide nanofiber scaffold.

OBJECTIVE: To transfect the hTGF- β 3 gene in the PSCs cultured in three-dimensional self-assembled peptide nanofiber scaffold of KLD-12, and to compare the transfection efficiency with PSCs cultured in two-dimensional medium.

METHODS: The PSCs were obtained and purified using magnetic-activated cell sorting method, then transplanted into the self-assembled peptide nanofiber scaffold of KLD-12. The gene of hTGF- β 3 was respectively transfected into the PSCs cultured in self-assembled scaffold and common two-dimension medium by means of xfectTM stem nano-transfection reagent. After 48 hours, the gene expression levels of hTGF- β 3 were detected by immunofluorescence and RT-PCR, and the concentration of TGF- β 3 in the supernatant of medium was determined in different groups and different time points after transfection by the method of ELISA.

RESULTS AND CONCLUSION: Immunofluorescence results showed that the rate of TGF- β 3-positive cells in the group of PSCs cultured in three-dimensional self-assembled scaffold of KLD-12 was higher than those cultured in common two-dimensional medium ($P < 0.05$), which was consistent with the test results of RT-PCR. By the method of ELISA, the concentration of TGF- β 3 in the supernatant of medium increased at 24 hours after transected, and reached peak after 72 hours, then decreased a little and entered the plateau stage. It's indicated that the transfection efficiency of hTGF- β 3 gene in PSCs cultured in self-assembled peptide nanofiber scaffold is higher than the group in common two-dimensional medium.

Ding R, Zhang Y, You HB, Li F, Sun K. Transfecting human transformation growth factor beta 3 gene into precartilaginous stem cells cultured in three-dimensional self-assembled peptide nanofiber scaffold of KLD-12. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(29): 5339-5343. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 作者前期试验证实了外源性细胞因子人转化生长因子 β 3具有很强的诱导前软骨干细胞向成熟软骨分化并促进其增殖的能力。国外的研究均证实了在自组装肽纳米纤维支架中三维培养有利于软骨源性干细胞的增殖与分化。

目的: 将人转化生长因子 β 3基因转染于三维培养于KLD-12肽纳米纤维支架内的前软骨干细胞中, 并比较其与二维培养前软骨干细胞转染效率的差异。

方法: 以免疫磁珠分选法获取并纯化前软骨干细胞, 将其种植于KLD-12肽纳米纤维支架内, 使用xfectTM stem纳米干细胞转染试剂将人转化生长因子 β 3基因分别转染入KLD-12三维支架内培养的前软骨干细胞和普通二维培养基培养的前软骨干细胞, 通过免疫荧光和反转录-聚合酶链反应法测定转染后48 h不同组别转化生长因子 β 3基因的表达情况, 并利用酶联免疫吸附法测定转染后不同时间细胞培养上清液中转化生长因子 β 3的质量浓度。

结果与结论: 免疫荧光结果显示, KLD-12三维支架内培养的前软骨干细胞转染后转化生长因子 β 3阳性细胞率明显高于普通二维培养基内前软骨干细胞($P < 0.05$), 与反转录-聚合酶链反应法检测结果相同。酶联免疫吸附法测定结果显示, 转染24 h前软骨干细胞上清液中转化生长因子 β 3蛋白水平呈上升趋势, 72 h后达到峰值, 随后稍下降进入平台期。提示人转化生长因子 β 3基因在三维培养于KLD-12肽纳米纤维支架内前软骨干细胞中的转染效率高于普通二维培养基培养的前软骨干细胞。

关键词: 前软骨干细胞; 转化生长因子 β 3; KLD-12肽纳米纤维支架; 转染效率; 纳米转染试剂

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.29.005

丁然, 张勇, 游洪波, 李锋, 孙凯. 人转化生长因子 β 3基因转染KLD-12自组装纳米肽纤维支架三维培养前软骨干细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(29):5339-5343. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Orthopedic Surgery, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Ding Ran[☆], Studying for doctorate, Department of Orthopedic Surgery, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China dana_doctor@hotmail.com

Correspondence to: You Hong-bo, Doctor, Associate professor, Department of Orthopedic Surgery, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China youhongbo003@yahoo.com.cn

Supported by: the Natural Science Foundation of China, No. 30571873*

Received: 2010-04-18 Accepted: 2010-06-03

华中科技大学附属同济医院矫形外科, 湖北省武汉市 430030

丁然☆, 男, 1979年生, 湖北省武汉市人, 汉族, 华中科技大学附属同济医院在读博士, 主要从事脊柱关节方面的研究。
dana_doctor@hotmail.com

通讯作者: 游洪波, 博士, 副教授, 华中科技大学附属同济医院矫形外科, 湖北省武汉市 430030
yuhongbo003@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2010)29-05339-05

收稿日期: 2010-04-18
修回日期: 2010-06-03
(20091214003/G·Y)

0 引言

伴随种子细胞的研究, 用于修复软骨缺损的组织工程学支架材料的研究也在不断深入, 近年来, 一种新型的由多肽合成的生物材料, 可以在较低的浓度(0.1%~1%)下自组装形成稳定的凝胶装物质^[1-3], 成为一种极为理想的分子工程学支架, 运用于组织修复领域, 它们在去离子水环境下能形成稳定的片状结构, 溶解于电解质溶液中能自发相互交联形成网状纳米纤维^[4]。自组装肽凝胶是具有独特性质的组织工程学聚合物支架, 其纳米纤维结构较大部分聚合物纤维小接近3个数量级, 这样的其孔隙与空间结构很适宜细胞的生长与生理功能的实现。甚至研究人员能根据不同的细胞特性设计肽链的氨基酸序列来影响细胞的分化和组织构成^[5]。研究人员发现不同类型的动物细胞能吸附并在未组装的多肽凝胶表面增殖。两种多肽(EAKA4及RADA)注射于Fisher 344大鼠后腿肌肉内均为发生不良反应^[6]。有学者将包埋如成软骨细胞的纳米多肽支架注射入动物模型软骨缺损部位达到了较为理想的治疗效果^[7]。

前软骨干细胞具有活跃的增殖能力并可向软骨细胞分化, 从而控制肢体生长^[8], 作为一种组织工程化软骨种子细胞其作用越来越为学者所重视。通过前期试验作者证实了外源性细胞因子人转化生长因子β3(hTGF-β3)具有很强的诱导前软骨干细胞向成熟软骨分化并促进其增殖的能力^[9]。本实验拟通过构建hTGF-β3基因质粒并将此质粒通过新型纳米载体xfect stem转染入三维培养于自组装肽纳米纤维KLD-12支架内的前软骨干细胞, 比较前软骨干细胞在负载质粒的纳米支架中三维转染与二维转染效率的差异, 从而为下一步体外构建组织工程化软骨寻找一种全新的方法和理论依据。

1 材料和方法

设计: 对比观察实验。

时间及地点: 于2008-07/2009-09在同济医院矫形外科实验室完成。

材料: 新生纯系清洁级SD大鼠10只, 雌雄不限, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供(许可证号: SCXK(鄂)2004-0007)。

实验中对动物处置方法符合动物伦理学要求^[10]。

实验试剂及仪器:

试剂与仪器	来源
DMEM 培养基	Hyclone, USA
Gibco 优质胎牛血清	Gibco, USA
MiniMACS 磁珠细胞分选系统、羊抗兔 IgG 免疫磁珠	Miltenyi, Ger
兔多克隆抗体 FGFR-3、兔抗鼠 TGF-β3 抗体	Santa Cruz, USA
Trizol 试剂盒	Invitrogen, USA
反转录试剂盒	TOYOBO, JPN
聚合酶链反应引物	Invitrogen 公司代为合成
TaqMix DNA 聚合酶	TOYOBO, JPN
含有 pcDNA3.1(+)-TGF-β3 质粒的大肠杆菌菌株 E.coli DH5α	-
胰蛋白胍和酵母提取物	Ameresco 公司
Xfect Stem 转染试剂盒	Clontech, USA
兔多克隆 TGF-beta3 抗体	MBL, JAP
免疫荧光染色试剂盒-抗兔 FITC	碧云天生物公司
转化生长因子 β3(TGF-β3)	武汉华美生物
ELISA 试剂盒(通用型)	工程有限公司
合成 KLD-12 所需的序列 Ac-Lys-Leu-Asp-Leu-Lys-Leu-Asp-ku-Lys-Leu-Asp-Leu 的多肽片段	上海强耀生物科技有限 公司合成
Quanta 200 环境扫描电子显微镜、Tecnai G2 20 透射电子显微镜	荷兰 FEI 公司

实验方法:

前软骨干细胞的提取分离纯化与培养: 详见本实验室前期试验的方法^[11],

质粒DNA的制备与纯化: 质粒的合成与测序已在前期的研究中完成具体方法参照刘铁^[12]相关方法。

KLD-12肽纳米纤维制备: 将订制的纯度为98%的多肽序列为 Ac-Lys-Leu-Asp-Leu-Lys-Leu-Asp-ku-Lys-Leu-Asp-Leu-NH₂, 即 KLD-12干粉溶于含NaOH(0.1 mol/L)的去离子水中, 调整pH值为7.5(KLD-12为酸性物质), 加入含体积分数10%胎牛血清低糖DMEM培养基, 使KLD-12终浓度为0.5%。将该混合物置于一干净1.5 mL EP管中, 置室温过夜, 使其自组装形成凝胶。使用冰冻切片后置于铜网格中, 透射电镜显像。

KLD-12纳米纤维三维培养前软骨干细胞: 将处于指数生长期的前软骨干细胞制成细胞悬液, 调整密度为 $10 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 实验组使用预先溶于含NaOH(0.1 mol/L)去离子水溶解的KLD-12干粉与上述细胞悬液混合, 加入含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基, 保持KLD-12终浓度为0.5%, pH值7.5, 转入24孔板中, 每孔培养基250 μL, 细胞数量为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 放置于37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中诱导其实现自组装。

空白对照组细胞悬液加入24孔板后, 加入低糖DMEM培养基, 将两组细胞置于37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中, 24 h后显微镜下观察。

使用xfect™ stem分别将TGF- $\beta 3$ 转染入三维和二维培养体系中的前软骨干细胞中: 转染步骤参照xfect™ stem转染说明书: 当待转染细胞融合率达到70%后, 预先在室温下溶解于250 μ L的xfect stem反应缓冲液的pcDNA3.1 (+)-TGF- $\beta 3$ 质粒20 μ g, 与溶解于250 μ L的xfect stem反应缓冲液的10 μ L xfect stem复合物混合均匀室温孵育10 min后, 三维培养转染组(纳米凝胶共培养组)与三维培养转染组(单纯细胞培养组)每孔加入上述混合液50 μ L, 逐滴滴入并轻轻晃动孔板, 使之混合均匀, 置于37 °C环境孵育3 h, 小心移除转染液与培养液的混合液体, 每孔加入含体积分数10%胎牛血清的低糖DMEM培养基300 μ L, 空白对照组细胞前软骨干细胞进行转染, 将3组细胞置于37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中, 隔天换液。

间接免疫荧光法测定转染细胞内TGF- $\beta 3$ 表达: 转染后培养48 h, 向三维培养转染组支架三维培养细胞的孔板内每孔加入1 g/L的II型胶原酶溶液100 μ L, 室温轻轻摇晃下待自组装支架溶解后将细胞悬液置于离心管中转速1 000 r/min, 离心5 min, 弃上清液, 加入含体积分数10%胎牛血清的低糖DMEM培养基重新悬浮细胞, 移至清洁24孔板中, 将两组细胞制作细胞爬片, 40 g/L多聚甲醛固定。免具体实验步骤参照免疫荧光染色试剂盒—抗兔FITC说明书, 采用荧光显微镜观察, 评判标准为(-)无荧光; (\pm)极弱可疑荧光; (+)荧光较弱但仍可看清楚; (++)荧光明亮。(-)及(\pm)为阴性细胞, 随机选择10个高倍镜视野, 计算总细胞数和阳性细胞数。得到阳性细胞百分率, 采用3名观察者上述方法重复3次后取平均值。

反转录-聚合酶链反应检测3组细胞hTGF- $\beta 3$ 表达: 转染后48 h, 按上述方法收集三维培养转染组细胞, 5 g/L胰酶消化收集二维培养转染组以及空白对照组细胞, trizol提取总RNA, 取2 μ g用于反转录, 设计TGF- β 3引物序列上游引物5' - GAA CTG AGT CAG GGT GCC -3', 下游引物5' - CGA CCA GAC CAC TTG TTA AA-3', 产物片段为121 bp, 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 70 °C延伸30 s, 循环次数30次, 后70 °C延伸5 min。反应结束后取5 μ L扩增产物在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳。聚合酶链反应产物经电泳、DNA吸光度扫描检测; 显色条带图像分析系统检测(Alpha Imager 2000)检测其积分吸光度值, 与内参 β -actin条带的比值为mRNA表达水平参数。

酶联免疫吸附法测定转染后不同时间TGF- $\beta 3$ 表达: 收集转染后24, 48, 72, 96, 120 h后三维培养转染组、二维培养转染组与对照组细胞上清液, 1 000 g离心20 min取上清, 采用双抗夹心酶联免疫吸附法, 具体步骤参考

ELISA Kit说明书, 以TGF- $\beta 3$ 纯品制作标准曲线, 测定两组细胞培养液中TGF- $\beta 3$ 细胞因子质量浓度。

主要观察指标: 通过免疫荧光和反转录-聚合酶链反应法测定转染后48 h不同组别转化生长因子 $\beta 3$ 基因的表达情况, 并利用酶联免疫吸附法测定转染后不同时间细胞培养上清液中转化生长因子 $\beta 3$ 的质量浓度。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估均为本文作者, 经过正规培训, 采用双盲评估。

统计学分析: 由本文作者进行数据处理, 各项指标的检测均在相同实验条件下重复3次, 每次1个样本。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各参数间差异显著性采用SPSS 11.0统计处理软件进行One-Way ANOVA检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 自组装肽纳米纤维扫描电镜观察结果 扫描电镜下可见KLD-12多肽形成空间网状结构相互交织, 直径约为10 nm, 长度为数百纳米, 交织的纤维之间存在孔径为数百至数千的孔隙, 见图1。

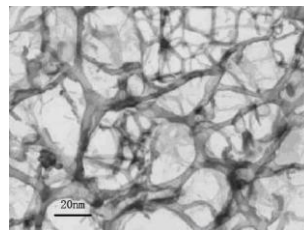


Figure 1 Scanning electron microscopy image of sectioned self-assembled peptide nanofiber scaffold (KLD-12)

图1 扫描电镜下自组装肽纳米纤维(KLD-12)支架

2.2 细胞支架复合体显微镜下观察结果 显微镜下见前软骨干细胞均匀分布于KLD-12形成的纳米凝胶内, 见图2。

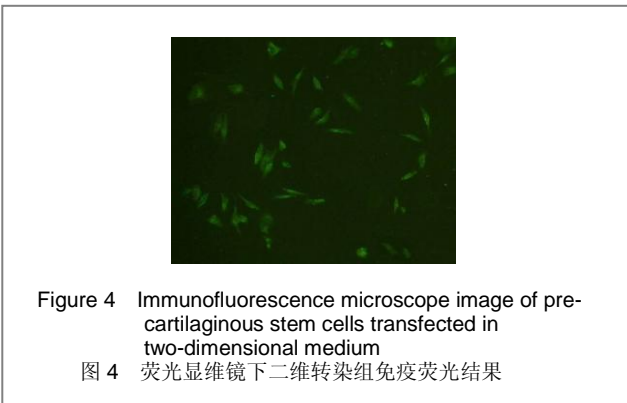
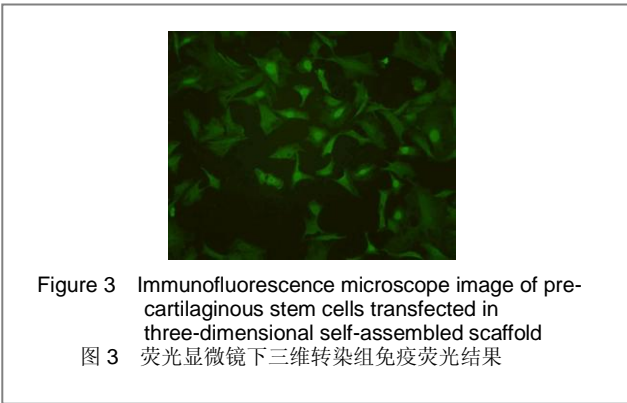


Figure 2 Low magnification microscope image of precartilaginous stem cells embedded in a self-assembled scaffold (KLD-12)

图2 低倍镜下包埋前软骨干细胞的KLD-12支架

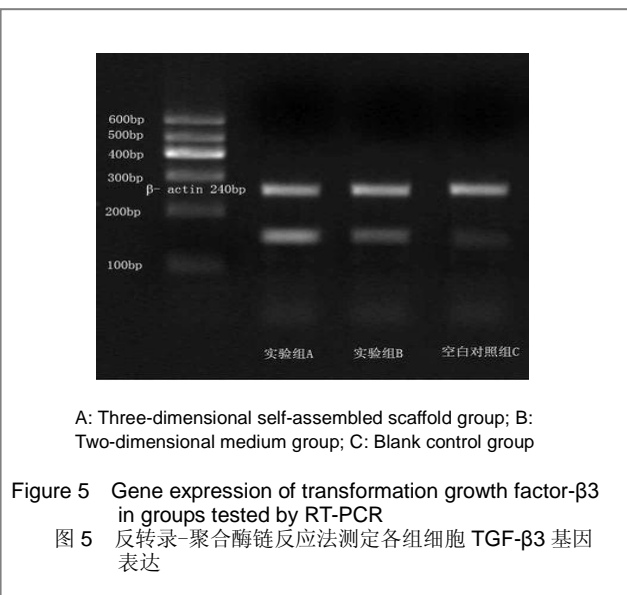
2.3 转染后免疫荧光结果 荧光显微镜观察见TGF- $\beta 3$ 阳性前软骨干细胞细胞核与胞浆内可见明亮绿色颗粒

状物质, 见图3, 4。



三维培养转染组TGF-β3阳性细胞率为51.21%，二维培养转染组阳性细胞率为43.32%，空白对照组阳性细胞率为3.75%，三维培养转染组与二维培养转染组差异具有显著性意义(P < 0.05)，而空白对照组与两实验组差异具有极显著性意义(P < 0.01)。

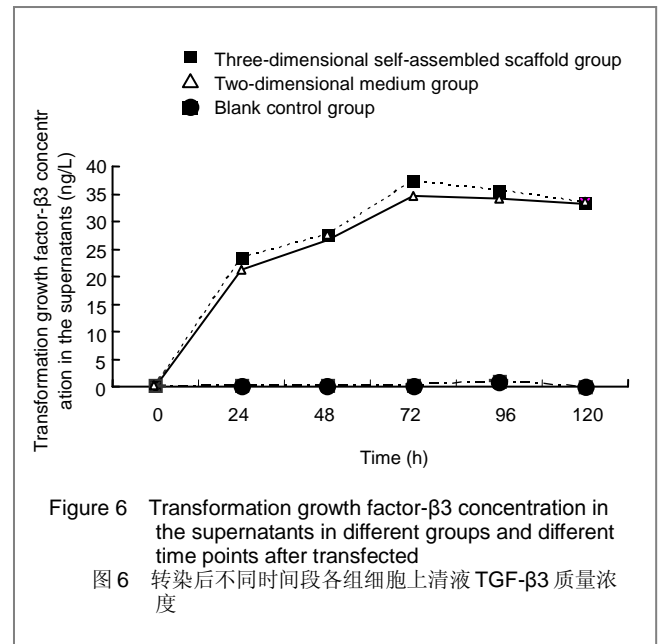
2.4 反转录-聚合酶链反应法测定转染后各组细胞TGF-β3的表达 转染后48 h各组前软骨干细胞TGF-β3 mRNA表达的反转录-聚合酶链反应结果, 见图5。



三维培养转染组与二维培养转染组TGF-β3 mRNA

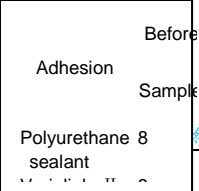
的表达均明显亮于未经转染的空白对照组, 吸光度与内参β-actin的比值三维培养转染组与二维培养转染组差异具有显著性意义(0.842±0.165, 0.734±0.095, P < 0.05), 而三维培养转染组、二维培养转染组与空白对照组(0.106±0.284)差异均有极显著性意义(P < 0.01)。

2.5 酶联免疫吸附法测定不同时间段各组TGF-β3蛋白的表达 三维培养转染组、二维培养转染组均显示转染后24 h后前软骨干细胞上清液TGF-β3蛋白表达呈上升趋势, 72 h后达到峰值, 随后稍下降进入平台期, 见图6。



3 讨论

TGF-β是一类多肽生长因子的统称, 其在软管的生长和发育过程中发挥着极其重要的作用。它能够通过增加SRY-BOX9转录因子(SOX-9)基因的上调促进软骨细胞的增殖, 通过上调RUN2基因水平从而抑制成骨细胞分化^[13-15]。大量研究证实TGF-β可诱导骨髓间充质细胞等相关干细胞向软骨细胞分化, 且在TGF-β的3个亚型中TGF-β3对成软骨的诱导分化作用最强^[16]。众所周知种子细胞、细胞生长因子和支架是组织工程的三大要素, 作者选用了Kisidy等^[17]设计的KLD-12自组装纳米纤维, 支架的纤维直径约为10 nm, 形成5~200 nm的孔径, 与本实验所得结果相符合, 且由于此材料降解产物为多肽, 对细胞无毒性, 并可在一定pH值电解质溶液中根据容器的形状自行组装形成具有一定强度的固体物质, 并能允许大分子物质和水通过, 是一种理想的适合细胞生长的三维支架。国外的研究均证实了在支架中三维培养有利于软骨源性干细胞的增殖与分化^[18], 某些脂质分子被发现能提高DNA的摄取效率^[19], 病毒载体也能产较高的转移基因表达且具有强的持续性。单层培养的



软骨细胞能迅速被病毒载体如鼠类淋巴细胞病毒, 慢病毒和腺病毒转染表达不同类型的基因例如转化生长因子1、骨形态发生蛋白2、胰岛素样生长因子1或骨形态发生蛋白7从而表现促进软骨细胞特定细胞基质的合成例如: II型胶原、蛋白聚糖, 并抑制软骨分化^[20-21]。转移由细胞基质编码的基因 II型微小基因会导致人类胚胎软骨细胞合成细胞外基质成分增加^[22], 转录因子 SOX-9介导下能提高体外三维培养软骨细胞 II型胶原的表达^[23-24], 然而过表达转录因子Runx-2刺激软骨细胞成熟并诱导产生肥大细胞表型 II, X胶原, 以及碱性磷酸酶和成骨标志性基因^[25]。以上研究均表明基因修饰的方法能显著改变软骨细胞生物学活性。

由于传统的脂质体转染剂细胞毒性大, 且转染效率低下, 故本实验采用了最新的纳米转染材料, 其最大的优势在于毒性低, 可以在存在血清的环境中工作, 对于难以转染的干细胞转染效率高^[26]。本实验中将前软骨干细胞置于模拟体内环境生长的三维培养支架中培养并比较处于不同培养模式中前软骨干细胞转染效率的差异, 结果发现三维培养的效率高于后者。其原因可能是由于三维培养导致细胞较为分散且与周围环境接触面积增大, 增加了吸收质粒的概率, 其次由于分子在此纳米级的环境中弥散速度降低, 形成局部分子梯度, 导致纳米粒子向细胞附近聚集同样可以增加转染的效率。

综上, 本实验构建了hTGF- $\beta 3$ 质粒, 并成功地在模拟人体内环境的三维支架内原位将质粒转染入前软骨干细胞, 为组织工程骺板的体外构建, 以进一步的体内试验打下了良好的基础。

4 参考文献

- [1] Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, et al. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering[In Process Citation]. Clin Orthop. 2000;379 Suppl:S171-178.
- [2] Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. Clin Orthop Relat Res. 2001;391 Suppl:S108-115.
- [3] Steinert A, Palmer G, Ghivizzani SC, et al. Gene Therapy in the Treatment of Cartilage Injury. In: Mirzajan R., editor. Cartilage Injury in the Athlete. New York: Thieme Medical Publishers. 2006: 297-308.
- [4] Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, et al. Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2003;48(12):3442-3451.
- [5] Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, et al. Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(1):402-406
- [6] Hickey DG, Frenkel SR, Di Cesare PE. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. Am J Orthop. 2003;32(2):70-76.
- [7] Hoffmann A, Gross G. BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2001;11(13):23-45.
- [8] Robinson D, Hasharoni A, Cohen N, et al. Fibroblast growth factor receptor - 3 as a marker for precartilaginous stem cells. Clin Orthop. 1999;367 Suppl:163-175.
- [9] You HB, Chen AM. Zhonghua Xiaoeer Waike Zazhi. 2004;25(6):545-549.
- [10] 游洪波, 陈安民. 增强型绿色荧光蛋白基因转染及TGF诱导前软骨干细胞向成软骨方向分化[J]. 中华小儿外科杂志, 2004, 25(6):545-549.

- [11] Guo FJ, Chen AM, Huang SL. Zhonghua Shiyian Waike Zazhi. 2007; 24(2): 226-228. 郭风劲, 陈安民, 黄仕龙. 免疫分选软骨前体细胞并诱导永生化的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(2): 226-228.
- [12] Liu T. Huazhong Keji Daxue Xuebao: Yixueban. 2008;37(5):623-626. 刘铁. hTGF- $\beta 3$ 的构建及其在前软骨干细胞的瞬时表达[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2008, 37(5): 623-626.
- [13] Pei M, Chen D, Li J, et al. Histone deacetylase 4 promotes TGF-beta1-induced synovium-derived stem cell chondrogenesis but inhibits chondrogenically differentiated stem cell hypertrophy. Differentiation. 2009;78(5):260-268.
- [14] Park KH, Park W, Na K. Synthetic matrix containing glucocorticoid and growth factor for chondrogenic differentiation of stem cells. J Biosci Bioeng. 2009;108(2):168-173.
- [15] Ofek G, Willard VP, Koay EJ, et al. Mechanical characterization of differentiated human embryonic stem cells. J Biomech Eng. 2009; 131(6):610-611.
- [16] Li Z, Kupcsik L, Yao SJ, et al. Mechanical Load Modulates Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells through the TGF-beta Pathway. J Cell Mol Med. 2009. [Epub ahead of print]
- [17] Kisiday J, Jin M, Kurz B, et al. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(15):9996-10001.
- [18] Jung Y, Kim SH, Kim YH, et al. The effects of dynamic and three-dimensional environments on chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells. Biomed Mater. 2009;4(5):55009.
- [19] Samuel RE, Lee CR, Ghivizzani SC, et al. Delivery of plasmid DNA to articular chondrocytes via novel collagen-glycosaminoglycan matrices. Hum Gene Ther. 2002;13(7):791-802.
- [20] Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, et al. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. J Orthop Res. 2003;21(4):573-583.
- [21] Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, et al. Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. J Orthop Res. 1999;17(4):475-487.
- [22] Dharmavaram RM, Liu G, Tuan RS, et al. Stable transfection of human fetal chondrocytes with a type II procollagen minigene: expression of the mutant protein and alterations in the structure of the extracellular matrix in vitro. Arthritis Rheum. 1999;42(7): 1433-1442.
- [23] Li Y, Tew SR, Russell AM, et al. Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. Tissue Eng. 2004;10(34):575-584.
- [24] Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, et al. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage. 2005;13(1):80-89.
- [25] Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, et al. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. J Biol Chem. 2000;275(12):8695-8702.
- [26] Kilroy G, Burk DH, Floyd ZE. High efficiency lipid-based siRNA transfection of adipocytes in suspension. PLoS One. 2009; 4(9): e6940.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 国家自然科学基金项目(30571873)“携 TGF $\beta 3$ 基因的自组装肽纳米纤维取向支架与前软骨干细胞构建骺板的研究”。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 实验通过合成自组装纳米肽支架 KLD-12, 并比较包埋于其中的前软骨干细胞转染转化生长因子 $\beta 3$ 基因与传统转染环境转染效率的影响, 从而寻找出一种合适的前软骨干细胞转染方法, 为利用组织工程学原理及基因治疗软骨缺损探寻一条新的途径。

提供临床借鉴的价值: 实验构建了人转化生长因子 $\beta 3$ 质粒, 并成功地在模拟人体内环境的三维支架内原位将质粒转染入前软骨干细胞, 为组织工程骺板的体外构建, 以及进一步的体内实验打下了良好的基础。