

重组反转录病毒碱性成纤维细胞生长因子基因转染对人骨髓基质细胞成骨的影响

周荣兴¹, 陈 华², 郭 军¹, 吕慧成¹, 杨铁翼¹

Effect of recombinant retrovirus pLXSN/basic fibroblast growth factor transfection on osteogenesis of human marrow stroma cells

Zhou Rong-xing¹, Chen Hua², Guo Jun¹, Lü Hui-cheng¹, Yang Tie-yi¹

Abstract

BACKGROUND: In home and abroad have many studies on basic fibroblast growth factor (bFGF) transfection for improving the growth of muscle and vessel, but little studies on bFGF for improving the growth of osteogenesis.

OBJECTIVE: To investigate the effect of recombinant retrovirus pLXSN/bFGF transfection on osteogenic potential of human marrow stroma cells (hMSCs).

METHODS: hMSCs isolated from health volunteers, cultured and purified *in vitro* were randomly divided into four groups. Retrovirus pLXSN/bFGF group with recombinant retrovirus pLXSN/bFGF was added into culture medium. Retrovirus pLXSN group with recombinant retrovirus pLXSN was added to take the place of retrovirus pLXSN/bFGF. Positive control group with dexamethasone, glycerophosphate and ascorbic were added into culture medium. Blank control group without any special treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: hMSCs were uniform spindle-shape fibroblast after several passages. After treatment, hMSCs in retrovirus pLXSN/bFGF and positive control groups gradually showed flat shape. Immunohistochemical staining showed that the level of bFGF expression in retrovirus pLXSN/bFGF group was higher than that of the other three groups. Mineralized nodules and bone collagen were formed, and alkaline phosphatase activity was improved in retrovirus pLXSN/bFGF and positive control groups. Recombinant of retrovirus pLXSN/bFGF gene transfection into hMSCs can promote the osteogenic potential of hMSCs.

Zhou RX, Chen H, Guo J, Lü HC, Yang TY. Effect of recombinant retrovirus pLXSN/basic fibroblast growth factor transfection on osteogenesis of human marrow stroma cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(49): 9211-9214. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 国内外有关成纤维细胞生长因子基因转染促血管和促肌肉生长的研究较多, 而成纤维细胞生长因子基因促成骨的研究未见报道。

目的: 观察重组反转录病毒 retrovirus pLXSN/碱性成纤维细胞生长因子基因转染对人骨髓基质细胞成骨能力的影响。

方法: 从健康志愿者全骨髓中分离培养人骨髓基质细胞, 体外扩增纯化后分为 4 组: ①retrovirus pLXSN/碱性成纤维细胞生长因子组: 培养液中加入碱性成纤维细胞生长因子基因重组反转录病毒。②retrovirus pLXSN 组: 培养液中加入反转录病毒空载体。③阳性对照组: 培养液中添加地塞米松、抗坏血酸和 β -甘油磷酸钠。④空白对照组: 不给予特殊处理。

结果与结论: 经多次换液传代, 人骨髓基质细胞呈均一梭形形态。处理后 retrovirus pLXSN/碱性成纤维细胞生长因子组与阳性对照组细胞形态逐渐趋于扁平, 突起减少。免疫组织化学染色见 retrovirus pLXSN/碱性成纤维细胞生长因子组碱性成纤维细胞生长因子表达明显强于其他 3 组。retrovirus pLXSN/碱性成纤维细胞生长因子和阳性对照组可引起细胞碱性磷酸酶活性增高和矿化结节及骨胶原形成。提示基因重组反转录病毒成纤维细胞生长因子转染对人骨髓基质细胞成骨能力具有促进作用。

关键词: 成纤维细胞生长因子; 骨髓基质细胞; 反转录病毒; 基因转染; 骨生成

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.49.021

周荣兴, 陈华, 郭军, 吕慧成, 杨铁翼. 重组反转录病毒碱性成纤维细胞生长因子基因转染对人骨髓基质细胞成骨的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(49):9211-9214. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨髓基质细胞(bone marrow stroma cells, BMSCs)为主要存在于骨髓中来源于中胚层的成体干细胞, 具有很强的成骨分化能力, 是有可能用于骨缺损等难治性骨疾病治疗的一类细胞^[1-3]。

人骨髓基质细胞(hBMSCs)还是基因治疗的

良好载体, 很容易携带外源性目的基因。人碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)可以促进骨组织的修复^[4-5]。本文试图通过重组反转录病毒成纤维细胞生长因子基因转染的方法, 来观察BMSCs成骨能力的变化。

1 材料和方法

设计: 以细胞为对象, 对比观察实验。

¹Department of Trauma Orthopaedic, Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Department of Internal Medicine, First Hospital of Inner Mongolia Prison Administration Bureau, Hohhot 010000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Zhou Xing-rong, Professor, Chief physician, Department of Trauma Orthopaedic, Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010000, Inner Mongolia Autonomous Region, China
zhourongxing888@126.com

Received: 2011-06-01
Accepted: 2011-07-11

¹ 内蒙古医学院第二附属医院创伤骨科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010000; ² 内蒙古监狱管理局第一医院内科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010000

周荣兴, 男, 1964年生, 内蒙古自治区呼和浩特市人, 汉族, 1988年内蒙古医学院毕业, 教授, 主任医师, 主要从事创伤骨科疾病方面的研究。
zhourongxing888@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)49-09211-04

收稿日期: 2011-06-01
修回日期: 2011-07-11
(20110113013/G · G)

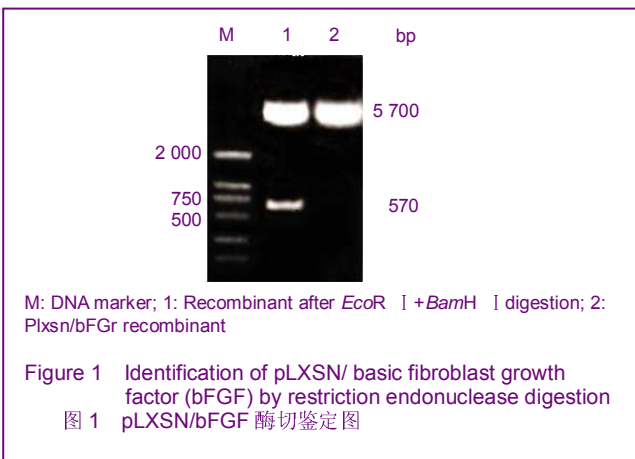
时间及地点: 于2009-07/2010-03在内蒙古医学院第二附属医院完成。

材料: hBMSCs取自18岁健康男性自愿者, 实验方法得到医院伦理道德委员会批准。新生牛血清购自杭州四季青生物有限公司, 高糖DMEM购自美国Gibco公司, 免疫组织化学SABC即用型试剂盒购自武汉博士德公司。

方法:

hBMSCs分离培养及鉴定: 采用全骨髓培养法。选择成年健康志愿者, 从髂前上棘无菌抽取新鲜骨髓10 mL, 肝素抗凝。加入无血清DMEM, 洗涤1次, 用含体积分数15%新生牛血清DMEM培养液, 按 $1 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$ 接种于25 cm一次性塑料培养瓶中, 于37 °C、体积分数5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。接种24 h后换液, 去除大部分未贴壁细胞, 此后每三四天换液1次, 细胞达70%融合时按1:3传代。

实验分组及处理: 取上述50%融合P2代人hBMSCs分为4组: ①retrovirus pLXSN/bFGF组: 在细胞培养液中, 按 1×10^{10} OPU/mL滴加成纤维细胞生长因子基因重组反转录病毒(retrovirus pLXSN/bFGF, 前期构建), 见图1, 孵育24 h后换为普通完全培养液, 继续培养。②retrovirus pLXSN组: 培养液中用retrovirus pLXSN空载体取代retrovirus pLXSN/bFGF, 其余处理与retrovirus pLXSN/bFGF组相同。③阳性对照组: 培养液中添加地塞米松(1 nmol/L)、抗坏血酸(50 mg/L)和β-甘油磷酸钠(10 mmol/L), 三四天换条件培养液1次。④空白对照组: 不进行特殊处理。



主要观察指标:

培养上清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测: 于处理第12天, 各组部分细胞换液为无血清DMEM培养液, 48 h后收集培养上清液, 上样全自动生化分析仪检测各组培养液ALP活性。

免疫组织化学染色与Von Kossa染色: 每张爬片计数5个视野, 用Image Pro Plus 6.0分析, 计算出平均每个细胞中bFGF和骨胶原阳性信号的强弱, 重复5次, 其平

均值作为目的蛋白表达量。

免疫组织化学染色方法: 于处理第14天, 取各组细胞, 吸除培养液, PBS冲洗2次, 体积分数10%的甲醛固定20 min。免疫组织化学染色采用即用型免疫组织化学试剂盒, 具体步骤参照试剂盒说明书。

Von Kossa染色方法: 清洗及固定同免疫组织化学。双蒸水漂洗2次, 自然凉干; 每孔加入新配制的1.5%硝酸银溶液1 mL, 暗室中避光10 min; 吸干后用去离子水冲洗2次, 双蒸水覆盖细胞表面, 紫外线下暴露, 肉眼及显微镜下观测黑色结节。去离子水清洗, 5%的硫代硫酸钠浸泡2 min; 充分水洗后中性红复染, 显微镜下观测红色骨胶原组织。

统计学分析: 统计学处理者为周荣兴, 应用SPSS 13.0统计分析软件辅助计算, 采用单因素方差分析比较各组培养上清ALP活性, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 hBMSCs分离培养及鉴定结果 全骨髓接种后, 可见少量贴壁梭形细胞和大量悬浮造血细胞。经三四次换液, 悬浮细胞基本除尽。经过三四天潜伏期后, 贴壁细胞增殖加快, 呈集落方式生长, 并相互融合。7~9 d达到70%融合, 进入传代培养。

传代细胞仍呈梭形, 形态均一, 呈集落样生长, 增殖迅速, 集落中央细胞呈多层重叠, 边缘细胞以螺旋方式生长排列并与相邻集落融合。一般四五天达到70%融合, 可再次传代。

retrovirus pLXSN/bFGF组和阳性对照组经相应处理后, 细胞逐渐转变为多边形或不规则形, 突起减少, 同时增殖趋缓, 集落生成不明显, 一般六七天铺满瓶底。retrovirus pLXSN组与空白对照组hBMSCs形态与处理前无明显变化。细胞呈梭形, 以集落方式生长, 圆环状融合。六七天后达到80%融合, 见图2。

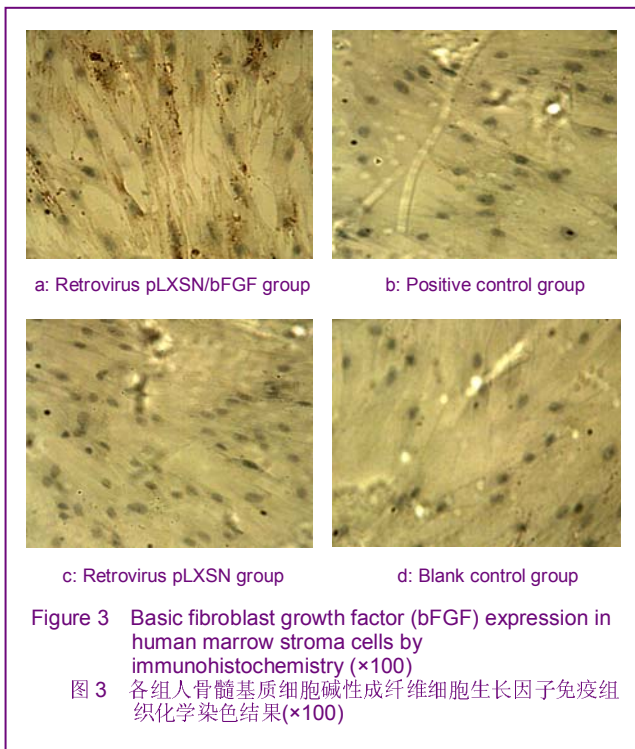
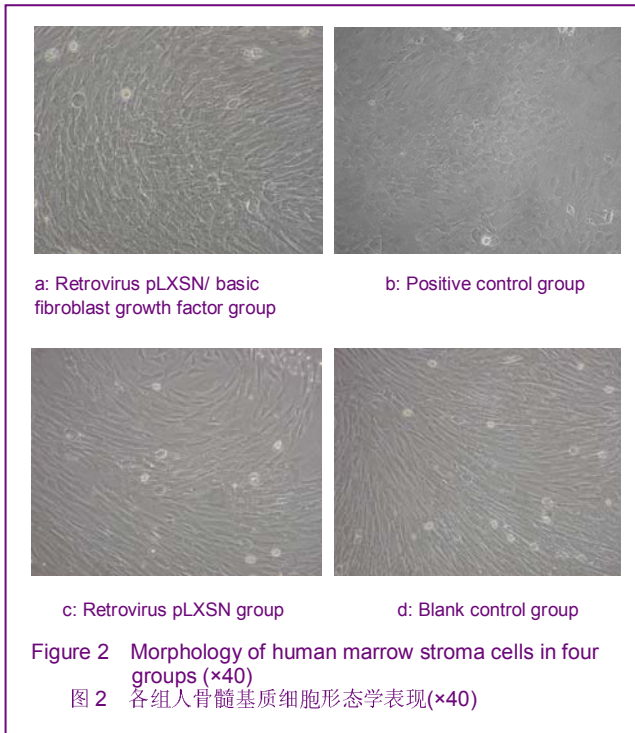
2.2 ALP活性检测结果 经统计学分析, retrovirus pLXSN/bFGF组与retrovirus pLXSN组、空白对照组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 以上3组与阳性对照组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 各组人骨髓基质细胞碱性磷酸酶、人碱性成纤维细胞生长因子、骨胶原表达情况比较
Table 1 Activity of alkaline phosphatase (ALP), basic fibroblast growth factor (bFGF) and bone collagen in four groups ($\bar{x} \pm s, n=16$)

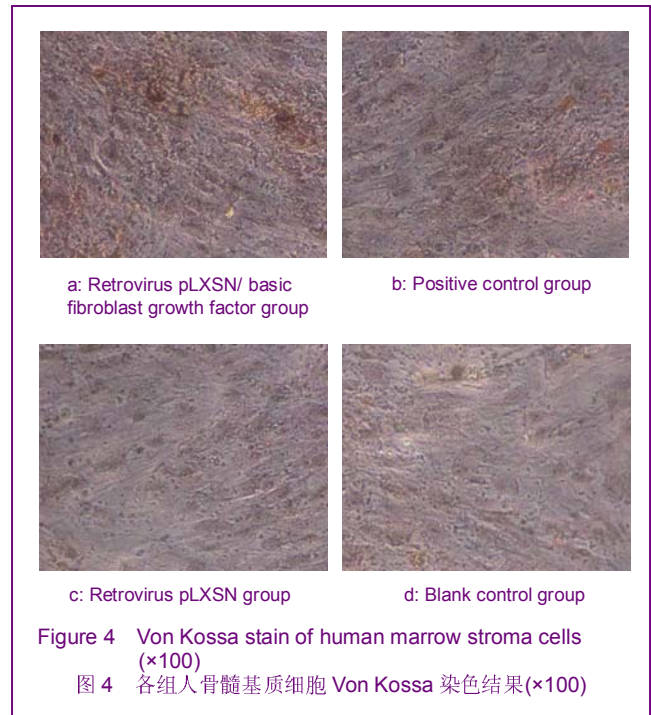
Item	pLXSN/bFGF	Positive control	pLXSN	Blank control
ALP ($\mu\text{kat/L}$)	1.41 \pm 0.15 ^a	1.54 \pm 0.16 ^a	0.66 \pm 0.12	0.71 \pm 0.13
bFGF	0.36 \pm 0.09 ^a	0.16 \pm 0.03	0.15 \pm 0.05	0.13 \pm 0.07
Bone collagen	0.32 \pm 0.03 ^a	0.29 \pm 0.05 ^a	0.11 \pm 0.02	0.13 \pm 0.06

^a $P < 0.05$, vs. blank control group

2.3 免疫组织化学染色 免疫组织化学染色提示bFGF主要在BMSCs胞浆内表达, 经统计学分析, pLXSN/bFGF组bFGF表达明显高于其他3组($P < 0.05$), 见表1, 图3。



2.4 Von Kossa染色结果 经Von Kossa染色, 经统计学分析, pLXSN/bFGF组和阳性对照组形成骨胶原明显多于retrovirus pLXSN组与空白对照组($P < 0.05$), 见表1, 图4。



3 讨论

hBMSCs的纯化目前常用全骨髓培养法、密度梯度离心法和免疫磁珠分离法等方法。密度梯度离心法和免疫磁珠分离法分离的原代hBMSCs纯度相对较高, 但细胞生长缓慢, 培养周期长, 难以满足临床研究需要, 而尽管全骨髓法培养法纯化的原代hBMSCs中混有较多造血干细胞, 但随着培养时间的延长, 悬浮生长的造血干细胞随换液而被去除, 仍然可以获得较高纯度的hBMSCs, 而且细胞增殖迅速, 培养周期短, 适合临床应用, 本文即采用全骨髓培养法。反转录病毒因其较高的有效性和安全性, 近年来被广泛应用于基因重组研究。本实验用免疫组织化学染色方法证实, retrovirus pLXSN/bFGF组bFGF表达明显高于其他3组, 说明外源性bFGF基因被有效整合到宿主细胞并能表达bFGF蛋白。高ALP是培养条件下成骨细胞的特征之一, 而矿化结节和骨胶原则是成骨细胞最可靠的证据。本文在ALP检测之前换液为无血清培养, 旨在消除血清中ALP对结果的干扰。结果表明, retrovirus pLXSN/bFGF和阳性对照组可引起细胞ALP活性增高和矿化结节及骨胶原形成, 有力地证明了bFGF有促进BMSCs成骨的作用。

bFGF由成骨细胞产生, 贮存在骨基质中, 像自分泌/旁分泌因子一样起作用。bFGF能促进多种细胞的增殖及分化, 这些细胞包括上皮细胞、心肌细胞、成骨细胞及软骨细胞^[6-13]。在特定的细胞培养条件下, bFGF能促进骨细胞及骨样细胞增殖。有研究发现bFGF能促使细胞内基质产生成骨细胞的特征性基因表达, 可见, bFGF可能参与了局部的骨形成^[14]。体内研究证实bFGF能促进

胶原累积, 增加成骨细胞数目。有研究发现bFGF能有效地促使未成熟间质细胞分裂, 如前软骨细胞、前成骨细胞, 而对成熟的分化好的成骨细胞作用较弱^[1, 15-18]。体内研究认为bFGF能促进骨折愈合, 防止骨不连^[19-20]。当bFGF与成骨细胞的前体细胞表面的受体相结合后, 可以促使其向成骨细胞转化。经体外实验证实, bFGF可直接刺激大鼠颅骨成骨细胞内的DNA合成增加, 从而增加了合成胶原蛋白的成骨细胞数量^[21-25]。又有人在体外培养成骨细胞过程中发现bFGF可以刺激成骨细胞内骨钙素增加, 加快骨的矿化, 使新骨形成增加^[26-27]。在骨髓基质细胞的培养过程中, 用地塞米松和bFGF共同处理成骨细胞, 发现细胞数量明显增加, 且细胞表型特征明显。经过成纤维细胞生长因子基因重组反转录病毒处理后, 细胞不仅在形态和生长方式上趋向成骨细胞, 同时ALP表达增加, 钙结节和骨胶原形成。在本实验中又增加了retrovirus pLXSN组进行对比, 发现未携带bFGF基因的retrovirus pLXSN转染对hBMSCs无类似促进成骨作用。说明成纤维细胞生长因子基因重组反转录病毒对hBMSCs的促成骨作用, 是成纤维细胞生长因子基因表达的结果, 而不是反转录病毒载体的作用。

本实验通过重组反转录病毒成纤维细胞生长因子转染hBMSCs, 证实hBMSCs成骨能力增加, 为bFGF和hBMSCs应用于骨科临床以解决骨坏死、骨缺损和骨不连等疾病提供了一定的理论依据, 但其在临床实践中的安全性和有效性还有待进一步研究证实。

4 参考文献

[1] Keiichi K, Mitsunobu K, Masafumi S, et al. Induction of new bone by basic FGF-loaded porous carbonate apatite implants in femur defects in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(6):560-565.

[2] Oi Y, Ota M, Yamamoto S, et al. Beta-tricalcium phosphate and basic fibroblast growth factor combination enhances periodontal regeneration in intrabony defects in dogs. *Dent Mater J.* 2009;28(2):162-169.

[3] Kawaguchi H. [Bone fracture and the healing mechanisms. Fibroblast growth factor-2 and fracture healing]. *Clin Calcium.* 2009;19(5):653-659.

[4] Kodama N, Nagata M, Tabata Y, et al. A local bone anabolic effect of rhFGF2-impregnated gelatin hydrogel by promoting cell proliferation and coordinating osteoblastic differentiation. *Bone.* 2009;44(4):699-707.

[5] Nakahara T, Sato H, Shimizu T, et al. Fibroblast growth factor-2 induces osteogenic differentiation through a Runx2 activation in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(2):243-248.

[6] Ahn HJ, Lee WJ, Kwack K, et al. FGF2 stimulates the proliferation of human mesenchymal stem cells through the transient activation of JNK signaling. *FEBS Lett.* 2009;583(17):2922-2926.

[7] Ameri J, Stahlberg A, Pedersen J, et al. FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner. *Stem Cells.* 2010;28(1):45-56.

[8] Boosani CS, Nalabothula N, Sheibani N, et al. Inhibitory effects of arrestin on bFGF-induced proliferation, migration, and matrix metalloproteinase-2 activation in mouse retinal endothelial cells. *Curr Eye Res.* 2010;35(1):45-55.

[9] Morito A, Kida Y, Suzuki K, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Arch Histol Cytol.* 2009;72(1):51-64.

[10] Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. *J Endod.* 2009;35(11):1529-1535.

[11] Quarto N, Longaker MT. FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng.* 2006;12(6):1405-1418.

[12] Quarto N, Wan DC, Longaker MT. Molecular mechanisms of FGF-2 inhibitory activity in the osteogenic context of mouse adipose-derived stem cells (mASCs). *Bone.* 2008;42(6):1040-1052.

[13] Zhang WX, Chen SL, Yao XL, et al. [Effects of BMP-2 and FGF-2 on osteoblast differentiation of murine MSCs in vitro]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2008;24(11):1062-1065.

[14] Schliephake H, Neukam FW, Lohr A, et al. The use of basic fibroblast growth factor (bFGF) for enhancement of bone ingrowth into pyrolyzed bovine bone. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1995;24(2):181-186.

[15] Vora SR, Palamakumbura AH, Mitsi M, et al. Lysyl oxidase propeptide inhibits FGF-2-induced signaling and proliferation of osteoblasts. *J Biol Chem.* 2010;285(10):7384-7393.

[16] Wang L, Huang Y, Pan K, et al. Osteogenic responses to different concentrations/ratios of BMP-2 and bFGF in bone formation. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(1):77-87.

[17] Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedhachalam C, et al. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone.* 2005;36(2):254-266.

[18] James AW, Xu Y, Wang R, et al. Proliferation, osteogenic differentiation, and fgf-2 modulation of posterofrontal/sagittal suture-derived mesenchymal cells in vitro. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122(1):53-63.

[19] Duan H, Fan Y, Chen J, et al. [Experimental studies on exterior bFGF for enhancement of membrane guided bone regeneration. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2004;21(6):879-883.

[20] Eppley BL, Doucet M, Connolly DT, et al. Enhancement of angiogenesis by bFGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg.* 1988;46(5):391-398.

[21] Ling L, Murali S, Dombrowski C, et al. Sulfated glycosaminoglycans mediate the effects of FGF2 on the osteogenic potential of rat calvarial osteoprogenitor cells. *J Cell Physiol.* 2006;209(3):811-825.

[22] Nagai H, Tsukuda R, Yamasaki H, et al. Systemic injection of FGF-2 stimulates endocortical bone modelling in SAMP6, a murine model of low turnover osteopenia. *J Vet Med Sci.* 1999;61(8):869-875.

[23] Wu X, Zhang J, Yi D, et al. Enhancement of proliferation and differentiation of bone mesenchymal stem cells by basic fibrous growth factor controlled release nanoparticles. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2010;27(1):80-85.

[24] Park SB, Yu KR, Jung JW, et al. bFGF enhances the IGFs-mediated pluripotent and differentiation potentials in multipotent stem cells. *Growth Factors.* 2009;27(6):425-437.

[25] Lee SK, Kim Y, Kim SS, et al. Differential expression of cell surface proteins in human bone marrow mesenchymal stem cells cultured with or without basic fibroblast growth factor containing medium. *Proteomics.* 2009;9(18):4389-4405.

[26] Hsu SH, Cowan CM, Liu A, et al. Transcatheter injection-induced changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Heng BC. Cell Transplant.* 2009;18(10):1111-1121.

[27] Langer HF, Stellos K, Steingen C, et al. Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(2):315-325.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 实验设计者为周荣兴、陈华, 实施者为周荣兴、陈华、郭军、吕慧成、杨铁翼, 评估者为周荣兴, 上述作者均经过正规培训。

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。

伦理批准: 健康男性自愿者对实验方案知情同意, 课题的实施经过内蒙古医学院伦理委员会批准。

本文创新性: 截止到2011-02-17, 检索中国知网数据库、Medline数据库, 国内外有关成纤维细胞生长因子基因转染促血管和促肌肉生长的研究较多, 而本实验的重点是成纤维细胞生长因子基因促成骨。课题创新性特点: ①首次采用全骨髓法培养和纯化 hBMSCs。②首次分析重组反转录病毒碱性成纤维细胞生长因子基因转染对人骨髓基质细胞成骨的影响。