

血小板衍生生长因子A基因转染成骨细胞生长特性的影响*

朱建华, 毛 玲, 孙 健, 刘继光

Influence of platelet-derived growth factor A gene transfection on osteoblasts growth

Zhu Jian-hua, Mao Ling, Sun Jian, Liu Ji-guang

文章亮点:

以成骨细胞为种子细胞, 通过基因转染的方式, 将血小板衍生生长因子 A 真核表达质粒转入成骨细胞, 促进了细胞的增殖和迁移。

Abstract

BACKGROUND: Today's hot issue in the tissue engineering is to strengthen or reconstruct the function of seeding cells by gene transfection technology. But osteoblasts transfected by platelet-derived growth factor A (PDGF-A) for periodontal tissue regeneration is rarely reported.

OBJECTIVE: To observe the influence of PDGF-A gene transfection on osteoblasts growth.

METHODS: The eukaryotic expression plasmid of PDGF-A was constructed. 3T3 cells were isolated and transfected with various methods. The gene expression of PDGF-A in osteoblasts was detected by reverse transcription-PCR method, and cells proliferation activity was detected with MTT method, as well as the migration of cells was observed by the experiment of cells scratch test *in vitro*.

RESULTS AND CONCLUSION: The results of reverse transcription-PCR showed that the expression of osteoblasts transfected by eukaryotic expression plasmid carrying PDGF-A was significantly increased, and growth rate and migration speed was accelerated obviously ($P < 0.05$). These findings suggest that the liposome mediator PDGF-A gene can transfect osteoblasts successfully to promote the growth, proliferation and migration of osteoblasts, laying a foundation for PDGF-A gene treatment in periodontal tissue regeneration.

Zhu JH, Mao L, Sun J, Liu JG. Influence of platelet-derived growth factor A gene transfection on osteoblasts growth. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(28): 5131-5135. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 采用基因转染技术加强或改造种子细胞的功能是当今组织工程研究中的热点问题, 用血小板衍生生长因子 A 转染成骨细胞用于牙周组织再生少见报道。

目的: 观察血小板衍生生长因子 A 基因转染成骨细胞后对其生长特性的影响。

方法: 构建血小板衍生生长因子 A 真核表达质粒, 分离培养 3T3 细胞并进行不同方式的转染, RT-PCR 检测血小板衍生生长因子 A 基因在成骨细胞中的表达; MTT 法检测细胞的增殖活性; 体外细胞划痕实验观察细胞的迁移情况。

结果与结论: RT-PCR 检测结果显示, 血小板衍生生长因子 A 真核表达质粒转染的细胞表达量明显增加、生长、迁移速度明显增快($P < 0.05$)。说明脂质体介导血小板衍生生长因子 A 基因成功转染成骨细胞, 并能促进细胞的增殖和迁移, 为血小板衍生生长因子 A 基因在牙周组织中的治疗奠定基础。

关键词: 血小板衍生生长因子 A; 成骨细胞; 基因转染; 增殖; 迁移; 组织构建

缩略语: 血小板衍生生长因子: platelet-derived growth factor, PDGF

朱建华, 毛玲, 孙健, 刘继光. 血小板衍生生长因子 A 基因转染成骨细胞生长特性的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(28): 5131-5135. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of
Periodontal Mucosa,
Stomatological
College of Jiamusi
University, Jiamusi
154002, Heilongjiang
Province, China

Zhu Jian-hua,
Professor,
Department of
Periodontal Mucosa,
Stomatological
College of Jiamusi
University, Jiamusi
154002, Heilongjiang
Province, China
chenxiangtao0298@
163.com

Corresponding
author: Liu Ji-guang,
Doctor, Professor,
Department of
Periodontal Mucosa,
Stomatological
College of Jiamusi
University, Jiamusi
154002, Heilongjiang
Province, China
liujg5550@163.com

Supported by:
Science and
Technology Program
of Educational
Commission of
Heilongjiang
Province, No.
2511558*

doi:10.3969/j.issn.
2095-4344.2012.28.
001

Received: 2011-12-10
Accepted: 2012-01-14

佳木斯大学口腔医学院牙周粘膜科, 黑龙江省佳木斯市 154002

朱建华, 男, 1959年生, 湖南省长沙市人, 汉族, 1983年佳木斯医学院毕业, 教授, 主要从事牙周粘膜方面的研究。
chenxiangtao0298@163.com

通讯作者: 刘继光, 博士, 教授, 佳木斯大学, 黑龙江省佳木斯市 154002
liujg5550@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)28-05131-05

收稿日期: 2011-12-10
修回日期: 2012-01-14
(20111010018/D · T)

0 引言

随着组织工程学理论和技术的飞速发展, 用组织工程学方法促进牙周组织再生已经成为这一领域的研究热点之一^[1-2]。目前的研究已证实基因强化组织工程将可以解决供体来源不足的问题, 并且避免了免疫排斥反应, 转染细胞持续高效表达目的基因, 减少了长期反复大量使用外源性细胞因子所带来的不良反应等^[3]。为此, 已有一些学者进行了一些有益的尝试, 在细胞模型中, Ginanobile等^[4]发现用腺病毒转染血小板衍生生长因子A(platelet-derived growth factor, PDGF) A到成牙骨质细胞比单独应用rhPDGF-AA更能促进成牙骨质细胞的DNA合成和细胞增殖。Jin等^[5]在鼠体内直接腺病毒转染PDGF-B基因转染发现, PDGF不仅可以促进牙槽骨新生、牙周韧带形成, 还可以增进新牙骨质形成。Mizuno等^[6]用动物自体骨膜组织进行培养后, 移植到人工制备的III度根分叉缺损处, 结果证实可以有效地促进牙周骨组织再生。Park等^[7]研究用硫酸软骨素壳聚糖海绵载有的PDGF-BB能够增强成骨细胞的迁移和增殖。最近研究证实, 用胶原基质介导的腺病毒转染PDGF-B修复牙槽骨缺损可很好地将腺病毒转染PDGF-B局限在骨缺损局部而没有全身影响, 可安全应用于临床^[8]。

然而, 牙周组织工程尚存在许多待解决的问题——种子细胞的来源、生长因子的应用及缓释以及最优支架材料的选择等。为此, 本实验以成骨细胞为种子细胞, 通过基因转染的方式, 将pEGFP-N1-PDGFA真核表达质粒转入成骨细胞, 经体外培养方式观察被转染的成骨细胞生长特性的变化, 为以后复合支架修复牙槽骨缺损奠定理论基础。

1 材料和方法

设计: 对比观察实验。

时间和地点: 于2011-03在佳木斯大学生物实验室完成。

材料: α-MEM培养基购于吉诺生物; G418、胎牛血清购于Gibco; pEGFP-N1购于Clontech; Ts-mPDGF-A购于长沙赢润; MC3T3购于佳木

斯大学生物教研室; Trizol及反转录-聚合酶链反应试剂盒购于TaKara; 甲基噻唑基四唑(MTT)购于Sigma; CO₂培养箱购于上海易亮医疗器械有限公司; 倒置显微镜购于CKX41, 德国; PCR仪购于GeneAmp9600, USA; Gel Doc XR System凝胶成像系统购于美国Bio-Rad公司。

方法:

重组真核表达质粒pEGFP-N1-PDGFA的构建与鉴定: 以Ts-mPDGFA为模板, PCR扩增mPDGFA的CDS区, 目的基因序列如下:

mPDGFA-f: 5'-GAA GAT CTG CCA CCA TGA GGA CCT GGG CTT GCC T-3' Bgl II (说明: GCC ACC为Kozak序列, 增强基因表达用)。

mPDGFA-r: 5'-CCC AAG CTT CCT CAC ATC TGT CTC CTC CT-3' Hind III将PCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳, 回收mPDGFA条带、纯化。

Bgl II和Hind III分别双酶切pEGFP-N1和mPDGFA PCR产物, 低熔点凝胶回收mPDGFA片段和线性化的pEGFP-N1质粒, T₄ DNA Ligase连接, 转化至DH5α中, 对阳性重组体扩增后进行双酶切鉴定, 并送测序。

细胞培养: 取出液氮中保存的MC3T3细胞株, 复苏, 同时用含体积分数10%胎牛血清的α-MEM培养, 置于37℃、体积分数5%CO₂培养箱中培养, 及时换液, 待细胞生长至90%融合, 用0.25%胰酶消化, 常规传代。

基因转染: 于转染前1 d, 按 5×10^7 L⁻¹细胞浓度将指数生长期的3T3细胞接种于6孔板中, 细胞按照不同的转染方式分为3组: 转染pEGFP-N1-PDGFA组、转染pEGFP-N1组和空白对照组。转染pEGFP-N1-PDGFA组按6 μg pEGFP-N1-PDGFA质粒, 10 μL脂质体转染, α-MEM空培养基, 37℃、体积分数为5%的CO₂细胞培养箱5.5 h, 吸至薄薄一层, 加入2 mL的完全培养基, 48 h后荧光显微镜下观察细胞内荧光表达情况, 并检测转染的效率。转染pEGFP-N1组以6 μg pEGFP-N1空载体, 10 μL脂质体转染; 空白对照组未进行转染。

细胞活力测定: 48 h后, 将细胞(5×10^7 L⁻¹)接种于96孔板, 每组20孔。于1, 3, 6, 9 d每组各取5孔, 用MTT检测细胞的增殖活性。选择490 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸

光度值, 记录结果。

RT-PCR法检测PDGF-A mRNA 水平的表达: 用Trizol 分别提取3组成骨细胞的总RNA为模板进行cDNA第一链的合成, 以cDNA第一链为模板, 进行PDGF-A基因的扩增。PCR扩增采用Invitrogen公司的PCR试剂盒 PCR反应条件: 94 °C 4 min, 95 °C 30 s→55 °C 30 s→72 °C 30 s, 共计35个循环72 °C 7 min。每组均以 β -actin作为内参。

β -actin引物序列: Forward primer CCC TGAAGT ACC CCA TTG AA; Reverse primer CTT TTC ACG GTT GGC CTT AG。产物于1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像观察。

细胞划痕观察细胞迁移速度: 将各组细胞($5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$) 铺于6孔板, 在单层培养的细胞上, 沿培养板底部呈“一”字划痕, 于1, 2, 3 d倒置显微镜下观察细胞迁移情况。

主要观察指标: 荧光显微镜, RT-PCR检测成骨细胞在转染前后PDGFA基因表达; 四甲基偶氮唑蓝(MTT) 比色法检测细胞的增殖活性; 采用迁移模型观察细胞的迁移。

统计学分析: 应用SPSS 17.0对进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的差别用 t 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 重组真核表达质粒的限制性内切酶片段分析 重组真核表达质粒pEGFP-N1-PDGFA DNA *Bgl* II 和 *Hind* III酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析, 切下4 700 bp和678 bp片段, 见图1。公司测序结果, 说明pEGFP-N1-PDGFA真核表达载体得以成功构建。

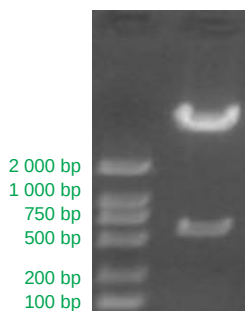
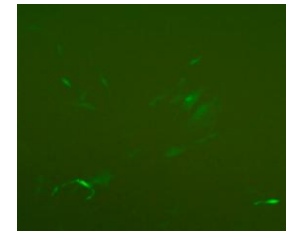


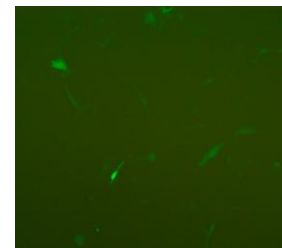
Figure 1 The restriction identification of recombinant eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-PDGFA
图1 重组真核表达质粒 pEGFP-N1 /PDGF-A 的酶切鉴定

2.2 倒置显微镜观察 正常的成骨细胞呈梭形, 镜下观察发现转染前后细胞形态无明显变化。

2.3 荧光显微镜下观察 转染48 h后, 大量3T3 细胞发出强烈的绿色荧光, 荧光遍布整个细胞, 转染效率为70%; 转染10周后仍能观察到比较明显的荧光表达, 见图2。实验中未发现明显的细胞毒性反应。



a: Transfection after 48 h



b: Transfection after 10 wk

Figure 2 Green fluorescence protein expression in osteoblasts transfected with platelet-derived growth factor A gene under inverted fluorescence microscope

图2 倒置荧光显微镜检测, 已转入血小板衍生生长因子 A 基因的成骨细胞表达绿色荧光蛋白

2.4 MTT结果 在1~6 d, 细胞处于指数生长期, 各组增殖速度逐渐变快, 转染pEGFP-N1-PDGFA增殖速度明显高于其他两组, 每1代细胞组间比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 总体比较二者之间差异也有显著性意义($P < 0.01$), 见表1。

表1 MTT 法检测成骨细胞 A 值 Table 1 Absorbance of osteoblasts in the three groups detected by MTT assay ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, A)				
Group	1 d	3 d	6 d	9 d
A	0.227 $\pm$ 0.076 ^{ab}	0.229 $\pm$ 0.015 ^{ab}	0.607 $\pm$ 0.096 ^{ab}	0.525 $\pm$ 0.062 ^{ab}
B	0.074 $\pm$ 0.034 ^a	0.076 $\pm$ 0.015 ^a	0.086 $\pm$ 0.022 ^a	0.102 $\pm$ 0.018 ^a
C	0.081 $\pm$ 0.016	0.091 $\pm$ 0.087	0.122 $\pm$ 0.020	0.129 $\pm$ 0.019

A: Cells in recombinant plasmid transfection group; B: Cells in non-plasmid transfection group; C: Cells in non-transfection group; ^a $P < 0.05$, ^a $P < 0.01$ vs Group C

2.5 RT-PCR结果 经PDGF-A基因转染的成骨细胞生长良好, 提取细胞的总RNA, RT-PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 结果显示转染 pEGFP-NI-PDGFA的细胞扩增出678 bp 条带, 而转染pEGFP-N1组及空白对照组的细胞扩增未678 bp条带, 见内参条带。见图3。

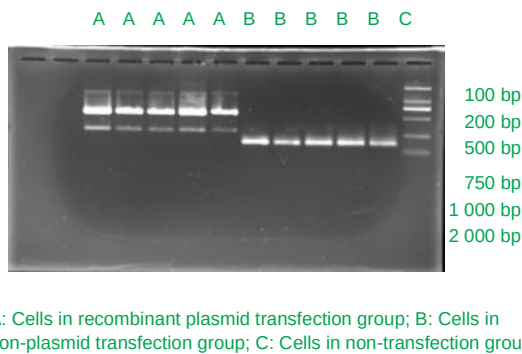


Figure 3 Detection of platelet-derived growth factor A mRNA expression in 3T3 cells after transfection with reverse transcription-PCR method
图 3 RT-PCR 检测转染后 3T3 细胞血小板衍生生长因子 A 表达

2.6 迁移结果 随着时间的增加, 每组都有不同程度的迁移, 迁移速率转染pEGFP-N1-PDGF-A组>空白对照组(3T3细胞组)>转染pEGFP-N1组, 见图4。

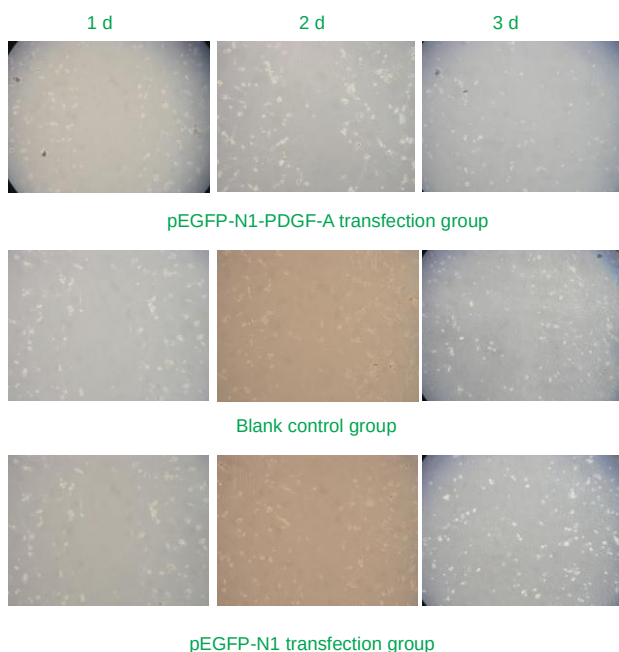


Figure 4 Comparison of cell migration at different degrees in each group
图 4 各组细胞不同程度迁移结果比较

3 讨论

近年来的研究发现, 成骨细胞等牙周前体细胞在牙根面的增殖、分化、生长和根向移行, 构成了促进牙槽骨再生和重建的生物学基础。成骨细胞是骨的增殖及细胞外基质形成过程中重要的功能细胞。它易获

得、具有很强的增殖能力, 通过基因治疗不仅可能成为诱导牙周组织再生的一种理想的靶细胞, 还可以释放生长因子使其成为组织再生中有效的生长因子缓释体系。目前认为采用基因转染的方法比重组蛋白直接使用有更大的优势, 这主要是因为基因转染可以达到较为长期、高效、局部的效果, 避免了直接应用生长因子时可能发生的过量反应和全身性毒副作用。采用这一策略, 不仅可以获取具有旺盛生理功能的种子细胞^[9-10], 而且还能使种子细胞大量表达需要的目的蛋白利于组织构建。

外源基因转染宿主细胞的方法主要有Ca/Pi 共沉淀、Calfection、脂质体介导、阳离子聚合物转染等方法。Ca/Pi共沉淀法是应用较早、使用广泛的转染方法, 亦可用于大规模悬浮细胞的转染^[10-13]。Calfection法适用于悬浮细胞转染^[14]。脂质体介导和阳离子聚合物转染法转染效率较高^[15-17]。脂质体转染法尤其是新一代的Li-pofectamine产品, 独特的精胺基团强负电子头部使之转染能力更强, 对于一些难转染的细胞优势尤其明显^[18]。

PDGF是一种骨细胞促分裂素及成骨细胞趋化因子, 具有刺激骨细胞DNA和蛋白质合成, 促进骨形成细胞的迁移募集、分裂增殖、分化及局部血液循环的重建等重要功能^[19]。PDGF作为一种促进有丝分裂和3受体结合, 对成骨细胞进行多方面的调节, 刺激成骨细胞复制和促进胶原降解, 从而促进骨形成^[20]。PDGF是引起广泛关注的牙周组织再生中最有效的因子, 能诱导纤维结合蛋白及 I、III、V 型胶原蛋白等的合成, 并能刺激成骨细胞活性, 促进牙骨质新生。

本实验以绿色荧光真核表达质粒 pEGFP-N1 作为表达载体, 将 PDGFA 基因插入其中, 通过酶切、测序等验证, 成功构建了真核表达载体pEGFP-N1-PDGFA。通过脂质体介导的pEGFP-N1-PDGFA 瞬时转染3T3 细胞, 转染后, 利用荧光显微镜下观察质粒的绿色荧光, 可以分析载体的亚细胞定位及转染的效率。本实验分别在mRNA水平检测PDGF-A的表达和分泌, 进一步说明所构建的载体可以在体外成功表达, 稳定压克隆后, 转染PDGF-A组可明显促进细胞的增殖和迁移, 从而为进一步研究基因导入方法及疗效, 以及PDGF-A用于牙槽骨缺损修复的基因治疗奠定了基础。

本项研究发现, 选择合适的生长因子, 通过基因转染的方法, 可以使3T3成为有效的种子细胞、PDGF-A成为合适的生长因子应用于牙周组织再生中, 并为牙周组织工程提供更为广阔的思路。

致谢: 衷心感谢佳木斯大学刘爽老师、朱建华老师

和刘继光老师在实验测试过程中的帮助和指导,感谢佳木斯大学口腔研究生孙健,刘占领等对本实验及论文给予的真诚帮助。

4 参考文献

- [1] Bruckmann C, Walboomers XF, Matsuzaka K, et al. Periodontal ligament and gingival fibroblast adhesion to dentin-like textured surfaces. *Biomaterials* 2005;26(3):339-346.
- [2] Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, et al. In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue Eng* 2004;10(3-4):537-544.
- [3] Liu XY, Hu XL. Xiandai Kouqiang Yixue Yanjiu. 2009;23(1):91-92.
刘欣宇, 胡孝丽. 基因强化组织工程在牙髓牙本质复合体和牙周组织再生中的应用研究进展[J]. 现代口腔医学研究, 2009,23(1):91-92.
- [4] Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol*. 2001;72(6):815-823.
- [5] Jin Q, Anusaksathien O, Webb SA, et al. Engineering of tooth-supporting structures by delivery of PDGF gene therapy vectors. *Mol Ther*. 2004;9(4):519-526.
- [6] Mizuno H, Hata K, Kojima K, et al. A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng*. 2006;12(5):1227-1335.
- [7] Park YJ, Lee YM, Lee JY, et al. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *J Control Release*. 2000;67(2-3):385-394.
- [8] Chang PC, Cirelli JA, Jin Q, et al. Adenovirus encoding human platelet-derived growth factor-B delivered to alveolar bone defects exhibits safety and biodistribution profiles favorable for clinical use. *Hum Gene Ther*. 2009;20(5):486-496.
- [9] Awad HA, Zhang X, Reynolds DG, et al. Recent advances in gene delivery for structural bone allografts. *Tissue Eng*. 2007;13(8):1973-1985.
- [10] Vojislav L, Paulo M, Camargo, et al. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intro-bony periodontal defects in humans. *J Periodontol*. 2001;72(5):583-589.
- [11] Girard P, Derouazi M, Baumgartner G, et al. 100-liter transient transfection. *Cytotechnology*. 2002;38(1-3):15-21.
- [12] Wurm FM, Bernard A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol*. 1999;10(2):156-159.
- [13] Jordan M, Kvhne C, Wurm FM. Calcium-phosphate mediated DNA transfer into HEK-293 cells in suspension: control of physicochemical parameters allows transfection in stirred media: transfection and protein expression in mammalian cells. *Cytotechnology*. 1998;26(1):39-47.
- [14] Lindell J, Girard P, Müller N, et al. Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1676(2):155-161.
- [15] Wang L, Koynova R, Parikh H, et al. Transfection activity of binary mixtures of cationic o-substituted phosphatidylcholine derivatives: the hydrophobic core strongly modulates physical properties and DNA delivery efficacy. *Biophys J*. 2006;91(10):3692-3706.
- [16] Dai H, Jiang X, Tan GC, et al. Chitosan-DNA nanoparticles delivered by intrabiliary infusion enhance liver-targeted gene delivery. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(4):507-522.
- [17] Khalil IA, Kogure K, Futaki S, et al. Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery. *Gene Ther*. 2007;14(8):682-689.
- [18] Zheng AQ, Song XR, Yu JM, et al. Liposome transfected to plasmid-encoding endostatin gene combined with radiotherapy inhibits liver cancer growth in nude mice. *World J Gastroenterol*. 2005;11(28):4439-4442.
- [19] Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, et al. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2005;76(12):2205-2215.
- [20] Methrota M, Krane SM, Walters K, et al. Differential regulation of platelet-derived growth factor stimulated migration and proliferation in osteoblastic cells. *J Cell Biochem*. 2004;93(4):741-752.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 黑龙江省教育厅资助科研项目(2511558)。

作者贡献: 实验设计为朱建华, 实验实施为毛玲, 实验评估为朱建华, 资料收集为毛玲, 朱建华成文, 刘继光审校, 朱建华对文章负责。

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。