

促进小鼠骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的血管内皮生长因子

张连方¹, 康辉², 邓廉夫², 杨惠林¹ (1苏州大学附属第一医院骨科, 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215006; 2上海市伤骨科研究所, 上海交通大学医学院附属瑞金医院骨科, 上海市 200025)

文章亮点:

- 1 血管内皮生长因子对骨髓间充质干细胞的增殖有促进作用, 且有浓度依赖性。
- 2 血管内皮生长因子干预后, 骨髓间充质干细胞中 Osterix、Runx2、骨钙素和碱性磷酸酶的 mRNA 表达显著升高, 形成的钙结节数量也显著增多, 说明血管内皮生长因子可显著促进骨髓间充质干细胞向成骨方向分化。
- 3 血管内皮生长因子可促进骨髓间充质干细胞内血红素氧化酶 1 在 mRNA 和蛋白水平的高表达, 这或许是血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞成骨方向分化的机制之一。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 血管内皮生长因子; 骨髓间充质干细胞; 增殖; 成骨分化; 血红素氧化酶 1; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 血管内皮生长因子类; 血红素加氧酶-1

基金资助:

国家自然科学基金项目资助(81061160510)

摘要

背景: 血管内皮生长因子是骨髓间充质干细胞所处骨髓微环境中的重要调控因子, 其可促进骨髓间充质干细胞的血管内皮方向分化, 但尚无其对骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化调控作用的报道。

目的: 探讨血管内皮生长因子对骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的调控作用及其机制。

方法: 分离、培养小鼠骨髓间充质干细胞, CCK8 方法检测不同质量浓度血管内皮生长因子重组蛋白对骨髓间充质干细胞增殖的影响, 选定适宜血管内皮生长因子重组蛋白质量浓度并检测其对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响, 分子生物学方法检测血管内皮生长因子干预下骨髓间充质干细胞中 Osterix, Runx2, 碱性磷酸酶、骨钙素和血红素氧化酶 1 的表达。

结果与结论: ①血管内皮生长因子可以促进骨髓间充质干细胞增殖, 且具有浓度依赖性, 100 μg/L 血管内皮生长因子重组蛋白的促增殖作用最显著。②成骨诱导剂存在条件下, 血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞成骨标志基因 Osterix、Runx2、碱性磷酸酶和骨钙素的表达; 血管内皮生长因子干预组骨髓间充质干细胞成骨分化的钙结节数量较对照组增加。③血管内皮生长因子可诱导骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶 1 mRNA 和蛋白水平的高表达。以上结果表明血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞增殖和向成骨细胞分化的调控机制可能与骨髓间充质干细胞内血红素氧化酶 1 表达增加有关。

张连方, 康辉, 邓廉夫, 杨惠林. 促进小鼠骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的血管内皮生长因子[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(41): 6591-6596.

Vascular endothelial growth factor promotes the proliferation and osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells

Zhang Lian-fang¹, Kang Hui², Deng Lian-fu², Yang Hui-lin¹ (1Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Orthopaedic Institute of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; 2Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Department of Orthopedics of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract

BACKGROUND: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a crucial factor for regulating bone marrow mesenchymal stem cells in microenvironment, which can promote endothelial differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. But there is no report about VEGF effect on regulating the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To investigate the regulatory role of VEGF in the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: The bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured from mouse long bones. Cell Counting Kit-8 was used to test the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells cultured with different concentrations of recombinant VEGF proteins. The appropriate concentration of VEGF recombinant protein was selected to test their effects on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. The

张连方, 男, 1983年生, 山东省宁阳县人, 汉族, 2013年上海交通大学毕业, 博士, 医师, 主要从事骨发育及骨质疏松相关研究。

通讯作者: 杨惠林, 博士, 教授, 博士生导师, 苏州大学附属第一医院骨科, 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215006

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.41.006
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)41-06591-06

稿件接受: 2014-09-04

Zhang Lian-fang, M.D.,
Physician, Department of
Orthopaedics, the First Affiliated
Hospital of Soochow University,
Orthopaedic Institute of
Soochow University, Suzhou
215006, Jiangsu Province,
China

Corresponding author: Yang
Hui-lin, M.D., Professor,
Doctoral supervisor,
Department of Orthopaedics,
the First Affiliated Hospital of
Soochow University,
Orthopaedic Institute of
Soochow University, Suzhou
215006, Jiangsu Province,
China

Accepted: 2014-09-04

mRNA and protein levels of Osterix, Runx2, alkaline phosphatase, osteocalcin and heme oxygenase-1 in bone marrow mesenchymal stem cells under induction of VEGF were detected by molecular biology methods.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) VEGF promoted the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells dose-dependently, and 100 $\mu\text{g/L}$ was the optimum concentration. (2) VEGF promoted the expression of Osterix, Runx2, alkaline phosphatase and osteocalcin in bone marrow mesenchymal stem cells under osteogenic induction. Similar results were obtained by alizarin red staining and quantification of numbers of calcium nodules. (3) VEGF induced the expression of heme oxygenase-1 in bone marrow mesenchymal stem cells at mRNA and protein levels. These findings indicate that VEGF can induce the expression of heme oxygenase-1 in bone marrow mesenchymal stem cells, and promote the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; vascular endothelial growth factors; heme oxygenase-1
Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81061160510

Zhang LF, Kang H, Deng LF, Yang HL. Vascular endothelial growth factor promotes the proliferation and osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2014;18(41): 6591-6596.

0 引言 Introduction

在20世纪70年代Friedenstein等^[1]首次发现, 啮齿动物骨髓中的成纤维细胞可以体外形成集落, 因此命名为集落形成单位成纤维细胞。Castro-Malaspina于1980年成功地从人骨髓中分离出集落形成单位成纤维细胞^[2]。1991年, 集落形成单位成纤维细胞正式更名为间充质干细胞^[3], 并沿用至今。间充质干细胞体外分化成各种间充质系细胞, 比如成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞, 还可分化成为肌细胞、肝细胞和神经元细胞等多种细胞系细胞^[4-5]。

骨髓间充质干细胞的增殖与分化, 受骨髓微环境中存在的众多调节因子的调控, 血管内皮生长因子则是其中之一^[6-8]。骨髓间充质干细胞内血管内皮生长因子的高表达可促进骨髓间充质干细胞向内皮细胞方向分化^[9], 在兔骨髓间充质干细胞的成骨分化过程中血管内皮生长因子呈现先增强后减弱的趋势^[10]。体内研究发现, 上调小鼠成骨细胞内低氧诱导因子的表达, 引起下游血管内皮生长因子的高表达, 从而在小鼠长骨骨髓腔内产生大量的高度血管化的骨组织^[11]。然而, 血管内皮生长因子在骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化中的具体作用及其机制仍不是很明了。

血红素氧化酶1(heme oxygenase, HO-1)是血红素降解过程中的限速酶, 主要在应激状态下保护细胞和组织, 对抗应激反应^[12-15]。氧化应激是影响骨髓间充质干细胞功能的主要因素, 可促进骨髓间充质干细胞的脂肪分化却抑制成骨分化。骨髓间充质干细胞的成骨分化或脂肪分化受多种信号通路的调节, 这些信号通路受血红素氧化酶1和血红素氧化酶2的调节。有研究表明, 通过多种方式促进骨髓间充质干细胞内血红素氧化酶1表达或增强其活性后, 骨髓间充质干细胞的成骨细胞分化均有所增强, 并且其向脂肪细胞分化的能力受到抑制^[16-18]。

为了研究血管内皮生长因子在骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化中的具体作用及其机制, 设计并进行了下面的实验。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 实验于2013年10月至2014年5月在苏州大学骨科研究所细胞生物实验室完成。

材料:

实验动物: 40只三四周龄雄性C57BL/6J小鼠, 平均体质量(15.00 \pm 2.16) g, 由苏州大学动物实验中心提供。

血管内皮生长因子促进小鼠骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化实验用主要仪器和试剂:

仪器及试剂	公司	原产国
常规培养箱 BNA-311	Thermo	USA
倒置相差显微镜 SIX70	OLMPUS	Japan
倒置相差荧光显微镜	ZEISS	Germney
高速离心机	Beckman	USA
酶标仪 MK2	Labsystems	Finland
PCR 扩增仪 7500	ABI	USA
天能凝胶成像和分析系统 4100	上海天能公司	中国
琼脂糖凝胶电泳槽 HE-120、聚丙烯酰胺凝胶电泳系统 GIS-2800	Bio-RAD	USA
胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、DMEM-alpha细胞培养液、青霉素/链霉素(P/S)	GIBCO	USA
二甲基亚砜、地塞米松、抗坏血酸盐、磷酸甘油	Sigma	USA
反转录试剂盒	Promega	USA
Trizol试剂盒	Invitrogen	USA
CCK8	Yeasen	USA
血管内皮生长因子重组蛋白(VEGF-165)	R&D	USA
HO-1抗体	Abcam	USA

实验方法:

小鼠骨髓间充质干细胞的分离培养^[19-20]: 将三四周龄雄性C57BL/6J小鼠断颈处死, 置于体积分数为70%乙醇中浸泡10 min, 无菌条件下取出股骨、胫骨, 用无菌组织剪剪去两侧干骺端。用1 mL注射器吸取全培养液(体积分数为20%胎牛血清的DMEM培养液, 1%青霉素链霉素, 1%谷氨酰胺)将骨髓腔内的细胞吹至无菌培养皿中。收集骨髓, 用移液器轻轻反复吹打, 70目过滤网过滤, 细胞计数

后以 $25 \times 10^6/cm^2$ 密度接种。3 h后首次换液, 每8 h更换1次培养液直至72 h, 随后隔2 d更换培养液。2周后待细胞生长至70%左右时, 0.25%胰酶消化, 按1:3传代培养。以下实验选取的是第五六代细胞。

Cell Counting Kit(CCK-8/WST-8)检测骨髓间充质干细胞的增殖率: ①在96孔板中配置100 μ L的骨髓间充质干细胞悬液, 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为5% CO_2 培养24 h。②吸取原细胞培养液, 更换含血管内皮生长因子的培养液, 依据所含血管内皮生长因子蛋白(VEGF-165)质量浓度分为5组: 0, 20, 50, 100, 200 μ g/L。③将培养板在培养箱孵育24 h。④向每孔加入10 μ L CCK溶液。⑤将培养板在培养箱内孵育4 h。⑥用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

骨髓间充质干细胞的成骨分化诱导: 将骨髓间充质干细胞接种到6孔板和6 cm培养皿中, 待细胞长满后, 吸取原培养液, 更换含血管内皮生长因子的培养液, 分为两组: 0, 100 μ g/L血管内皮生长因子组, 然后加入成骨细胞分化诱导剂(10^{-7} mol/L地塞米松、10 mmol/L甘油磷酸盐和50 μ mol/L抗坏血酸盐)。

茜素红染色: 各组细胞诱导培养21 d, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗5 min, 0.1%茜素红室温下染色30 min, 倾去茜素红染液后去离子水洗5 min, 大体观察每组细胞钙结节形成情况并拍照, 显微镜下计数单位视野内钙结节的数量。

Realtime PCR分析骨髓间充质干细胞中Osterix、Runx2、碱性磷酸酶、骨钙素和血红素氧化酶1的表达: ①各组细胞诱导培养3, 7 d取出6孔板, 每孔加入0.5 mL Trizol核酸提取液, 提取细胞中总RNA, 并测定RNA浓度和纯度。②取2 μ g总RNA, 随机引物1 μ L, 补加DEPC处理的双蒸水至12 μ L, 70 $^{\circ}$ C孵育5 min; 再置于冰上, 依次加入 $5 \times$ 反应缓冲液4 μ L, 10 nmol/L dNTP 2 μ L, RNAase抑制剂0.5 μ L, 加DEPC处理的双蒸水至19 μ L, 25 $^{\circ}$ C孵育5 min; 加入反转录酶(M-MLV) 1 μ L, 终体积为20 μ L。按照25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min进行孵育, 结束后置于冰上终止反应。③Real time PCR反应, 在PubMed中查找Osterix、Runx2、碱性磷酸酶、骨钙素和血红素氧化酶1的核酸序列, 根据Primer 5.0引物设计软件设计各引物, 由上海生工生物公司合成。各基因引物序列见表1。

Real time PCR反应体系如下: SYBR[®]Premix Ex Taq[™] 10 μ L, ROX Reference Dye II 0.4 μ L, 引物(30 pmol/L)上下游各0.8 μ L, cDNA模板2.0 μ L, ddH₂O补足体系至20 μ L。

RT-PCR反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 如此循环35次后72 $^{\circ}$ C 5 min结束反应。

Western Blot分析骨髓间充质干细胞分化过程中血红素氧化酶1的表达: 取成骨诱导第3天的骨髓间充质干细胞, 采用RIPA裂解液提取细胞总蛋白, BCA法检测蛋白浓度,

将各组蛋白浓度调到同一水平, 然后行Western blot分析骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶1的蛋白表达。

表1 Real time PCR 目的基因引物序列

Table 1 Sequences of oligonucleotide primers

基因	引物序列
Osterix	5'-ACC AGG TCC AGG CAA CAC-3'
	5'-GCA GTC GCA GGT AGA ACG-3'
Runx2	5'- GTG TCA CTG CGC TGA AGA GG -3'
	5'- GAC CAA CCG AGT CAT TTA AGG C -3'
碱性磷酸酶	5'-GGT AGA TTA CGC TCA CAA CAA -3'
	5'-AGG CAT ACG CCA TCA CAT -3'
骨钙素	5'- ACC CTG GCT GCG CTC TGT CTC T -3'
	5'- AGG TAG CGC CGG AGT CTG TTCAC -3'
血红素氧化酶1	5'- AAG CCG AGA ATG CTG AGT TCA -3'
	5'- GCC GTG TAG ATA TGG TAC AAG GA -3'

主要观察指标: ①CCK8试剂盒检测不同质量浓度重组血管内皮生长因子蛋白干预后骨髓间充质干细胞的增殖情况。②Real time PCR检测骨髓间充质干细胞中Osterix、Runx2、碱性磷酸酶、骨钙素和血红素氧化酶1 mRNA表达。③Western Blot分析骨髓间充质干细胞分化过程中血红素氧化酶1的表达。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件包进行统计学分析, 以Student-*t* 检验作为统计方法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞的增殖 CCK8试剂盒检测在含不同质量浓度重组血管内皮生长因子蛋白的培养液下骨髓间充质干细胞的增殖情况, 发现20, 50, 100, 200 μ g/L重组血管内皮生长因子蛋白培养下骨髓间充质干细胞的增殖率分别是对照组的1.44倍、1.90倍、2.81倍和2.92倍, 可见骨髓间充质干细胞的增殖随培养液中血管内皮生长因子蛋白质量浓度的增加而增加, 100 μ g/L促增殖作用最显著, 而200 μ g/L较100 μ g/L对骨髓间充质干细胞的促增殖作用无差异(图1)。这说明血管内皮生长因子对骨髓间充质干细胞的增殖有促进作用, 且有浓度依赖性; 200 μ g/L组较100 μ g/L组无差异, 可能是因为在100 μ g/L这一质量浓度时受体已经饱和的缘故, 因而后面的实验选用100 μ g/L这一质量浓度。

2.2 血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化 骨髓间充质干细胞在有成骨细胞分化诱导剂的培养液中培养第3天, Real-time PCR方法检测其成骨细胞分化早期基因Osterix和Runx2的表达; 培养第7天检测碱性磷酸酶和骨钙素的表达。发现培养3 d后100 μ g/L血管内皮生长因子组骨髓间充质干细胞的Osterix和Runx2表达分别是对照组的4.61倍($P < 0.001$)和3.52倍($P < 0.001$)(图2A, B); 培养第7天, 100 μ g/L血管内皮生长因子组骨髓间充质干细胞中碱性磷酸酶和骨钙素的表达分

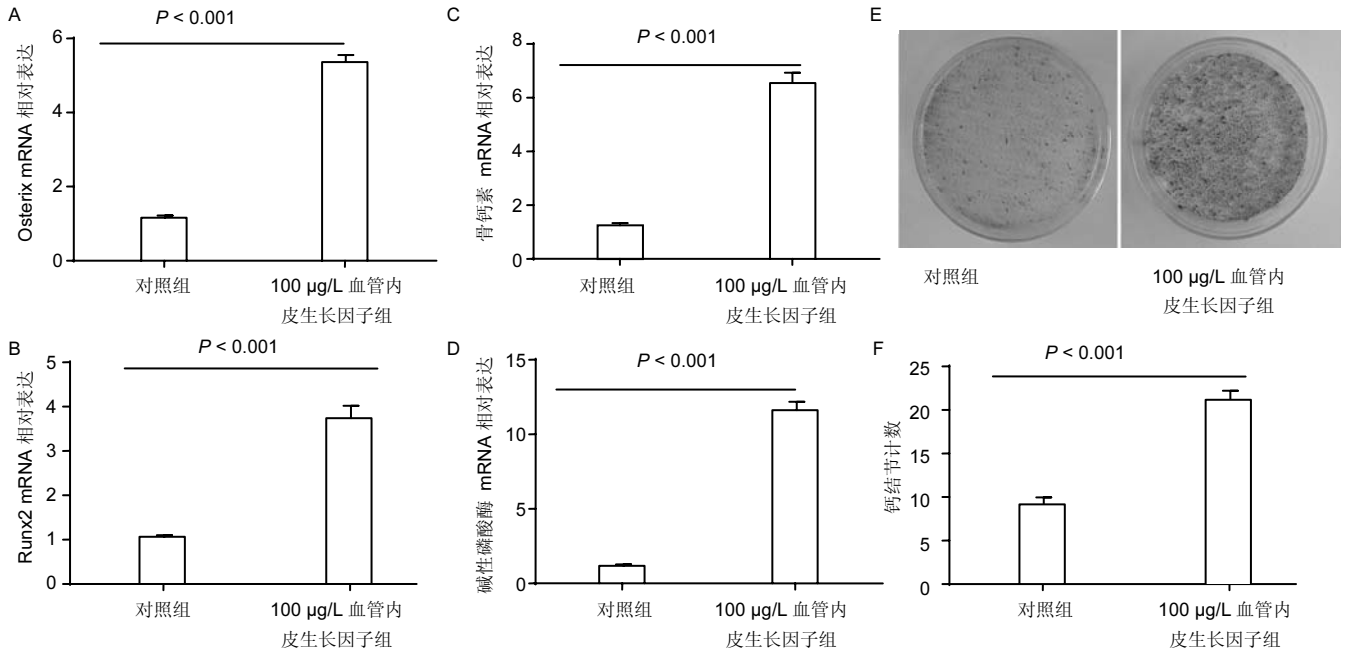


图2 血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化

Figure 2 Vascular endothelial growth factor promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: A, B 分别为成骨诱导分化第 3 天骨髓间充质干细胞中 Osterix 和 Runx2 的 mRNA 表达; C, D 分别为成骨诱导分化第 7 天骨髓间充质干细胞中骨钙素和碱性磷酸酶的 mRNA 表达; E 为成骨诱导分化第 21 天, 骨髓间充质干细胞茜素红染色的大体照片, F 为显微镜下计数茜素红染色的钙结节数量。通过此图证明血管内皮生长因子干预后, 骨髓间充质干细胞中 Osterix、Runx2、骨钙素和碱性磷酸酶的 mRNA 表达较对照组显著升高, 形成的钙结节数量也显著增多; 说明血管内皮生长因子可显著促进骨髓间充质干细胞向成骨方向分化。

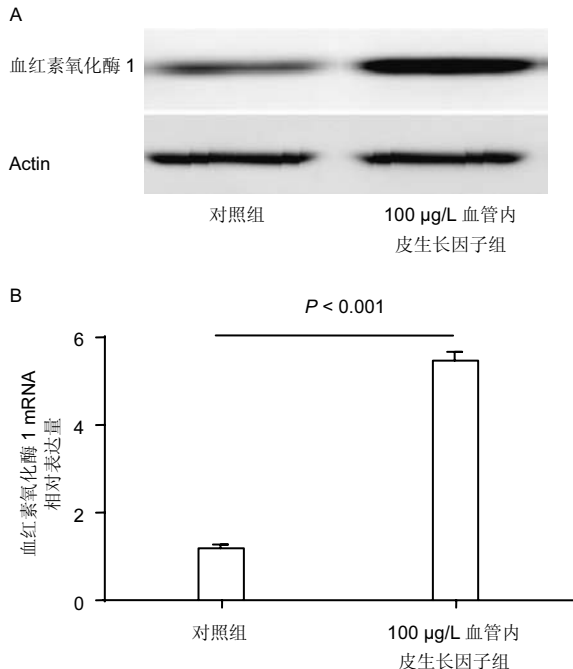


图3 血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶 1 的表达

Figure 3 Vascular endothelial growth factor induces the expression of heme oxygenase-1 in bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为 Real time PCR 检测骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶 1 mRNA 的表达; B 为 Western blot 检测骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶 1 蛋白的表达。可见血管内皮生长因子可显著促进骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶 1 在 mRNA 和蛋白水平的高表达。

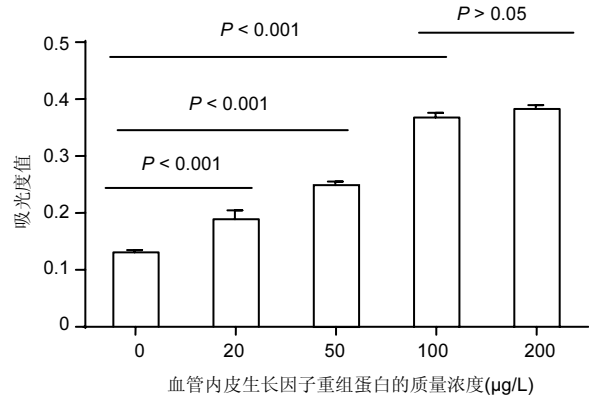


图1 CCK8 检测不同质量浓度血管内皮生长因子蛋白对骨髓间充质干细胞增殖的影响

Figure 1 Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells cultured with different concentrations of vascular endothelial growth factor detected by Cell Counting Kit-8

图注: 20, 50, 100 µg/L 血管内皮生长因子干预组的吸光度值均较对照组显著升高, 且具有明显的浓度依赖性, 但 200 µg/L 干预组较 100 µg/L 干预组无显著差异。说明血管内皮生长因子可促进骨髓间充质干细胞的增殖, 且该作用具有浓度依赖性。

别是对照组的 9.79 倍($P < 0.001$)和 5.25 倍($P < 0.001$)(图 2C, D)。成骨诱导培养下第 21 天, 对骨髓间充质干细胞行茜素红染色(图 2E), 镜下计数钙结节, 100 µg/L 血管内皮生长因子组钙结节数量(31.78 ± 3.14)是对照组(9.22 ± 1.41)的 3.45 倍($P < 0.001$)(图 2F)。结果证实血管内皮生长因子可显著促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化。

2.3 血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞内血红素氧化酶1的表达 为研究血管内皮生长因子对血红素氧化酶1表达的影响, 实验检测骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶1的mRNA和蛋白表达。研究发现100 $\mu\text{g/L}$ 血管内皮生长因子组骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶1的mRNA是对对照组的4.45倍($P < 0.001$) (图3A)。

Western blot检测结果同Real time PCR结果一致: 血管内皮生长因子明显促进骨髓间充质干细胞中血红素氧化酶1的蛋白表达(图3B)。

3 讨论 Discussion

血管内皮生长因子是刺激骨修复的重要介质之一, 大多数骨诱导性生长因子及超声波均可诱导其表达。血管内皮生长因子可影响内皮细胞、成骨细胞和破骨细胞等多种细胞的趋化、增殖、生存及活性^[21-23]。血管内皮生长因子可刺激内皮细胞合成骨性因子而间接促进骨的形成。抑制血管内皮生长因子表达可抑制体外成骨分化及骨生长^[24], 可降低碱性成纤维生长因子和骨形态发生蛋白2对血管生成的诱导作用^[24-26], 也可降低骨形态发生蛋白7和骨形态发生蛋白4对成骨细胞的诱导分化作用^[24-28]。本实验运用重组血管内皮生长因子蛋白来干预骨髓间充质干细胞, 检测发现血管内皮生长因子可促进骨髓间充质干细胞的增殖, 并且促进其成骨方向分化。

有研究证实骨髓间充质干细胞是不表达任何一种血管内皮生长因子受体的, 但是血管内皮生长因子可与血小板衍生生长因子受体结合, 使后者胞内段的酪氨酸磷酸化, 从而促进骨髓间充质干细胞的迁移和增殖^[29]。实验证实血管内皮生长因子可促进骨髓间充质干细胞的增殖, 但其与骨髓间充质干细胞结合的方式以及具体的促增殖机制还有待进一步的研究。

血红素氧化酶是血红素降解过程中的限速酶, 其催化血红素降解产生一氧化碳、铁和胆绿素, 胆绿素随即在胆绿素还原酶作用下变为胆红素。近年研究发现, 血红素氧化酶1及其酶解产物胆绿素/胆红素、一氧化碳共同发挥着抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡和扩血管、改善组织微循环等保护性作用^[30]。

在干细胞分化过程中血红素氧化酶1表达显著升高, 随之碱性磷酸酶、骨形态发生蛋白、骨结合素和RUNX-2的mRNA表达升高^[31]。研究发现, 激活血红素氧化酶1可促进骨髓间充质干细胞的磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(pAMPK)和内皮型一氧化氮合酶的表达^[32-33]; 内皮型一氧化氮合酶促进一氧化氮的产生, 而一氧化氮对骨形成有着正性作用^[34-35]。此外, 体外应用血管内皮生长因子A早期可增加细胞内的p-Akt、p-ERK-1/2和p-PKC, 这些信号通路蛋白的磷酸化可引起一系列的信号级联放大, 并与骨髓间充质干细胞的增殖和功能有关^[36]。

体内研究证实, 在骨折愈合过程中激活低氧诱导因子

1 α 的表达, 可引起血管内皮生长因子和血红素氧化酶1的高表达^[37], 并且二者的表达具有时空的一致性, 说明两者之间或许会有相互作用。体外研究发现, 血管内皮生长因子可促进人脐静脉内皮细胞内血红素氧化酶1的表达上调, 并且引起血红素氧化酶1活性的增加^[38]。然而, 也有研究发现血红素氧化酶1及其酶解血红素产生的一氧化碳可通过激活Sp1蛋白来诱导心肌细胞中血管内皮生长因子的表达^[39]。实验通过Real time PCR和Western Blot方法检测发现, 血管内皮生长因子可促进骨髓间充质干细胞内的血红素氧化酶1在mRNA和蛋白水平的高表达, 这或许是血管内皮生长因子促进骨髓间充质干细胞成骨方向分化的机制之一。

综上所述, 本实验证明血管内皮生长因子可促进骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化, 其机制可能与血管内皮生长因子上调骨髓间充质干细胞内血红素氧化酶的表达有关。该发现对利用骨髓间充质干细胞进行组织工程研究, 以及治疗相关临床疾病具有重要的指导意义。

致谢: 感谢上海交通大学附属瑞金医院、上海市伤骨科研究所左贵来、贾鹏、陈浩、唐云对本实验的帮助。

作者贡献: 实验设计为杨惠林、张连方, 实验实施为张连方、康辉, 实验评估为邓廉夫、杨惠林, 资料收集为张连方。张连方成文, 杨惠林审校, 杨惠林对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 血红素氧化酶-是血红素降解过程中的限速酶, 可降解血红素产生一氧化碳、铁和胆绿素, 血红素氧化酶共有3种同工酶即血红素氧化酶1, 血红素氧化酶2和血红素氧化酶3, 血红素氧化酶2主要在正常生理状态下发挥调节作用, 而血红素氧化酶1则主要在应激状态下保护细胞和组织, 对抗应激反应。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Friedenstien AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.
- [2] Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980;56(2):289-301.
- [3] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-650.
- [4] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007; 213(2):341-347.
- [5] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(4):313-319.

- [6] Liu Y, Teoh SH, Chong MS, et al. Vasculogenic and osteogenesis-enhancing potential of human umbilical cord blood endothelial colony-forming cells. *Stem Cells*. 2012; 30(9):1911-1924.
- [7] Liu CH, Hwang SM. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*. 2005;32(6):270-279.
- [8] Busletta C, Novo E, Valfrè Di Bonzo L, et al. Dissection of the biphasic nature of hypoxia-induced mitogenic action in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2011 Jun;29(6):952-963.
- [9] 王培蕊, 马学玲, 王心蕊, 等. 人骨髓间充质干细胞分离培养及血管内皮生长因子对其产生的诱导分化作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(46):9250-9254.
- [10] 刘悦, 张湘生, 张庆, 等. 骨髓间充质干细胞成骨分化中血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白2的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(36):6651-6657.
- [11] Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*. 2007;117(6): 1616-1626.
- [12] Bakken AF, Thaler MM, Schmid R. Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. I. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity. *J Clin Invest*. 1972;51(3): 530-536.
- [13] Pimstone NR, Engel P, Tenhunen R, et al. Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. *J Clin Invest*. 1971;50(10): 2042-2050.
- [14] Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem*. 1969;244(23):6388-6394.
- [15] Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;61(2):748-755.
- [16] Vanella L, Kim DH, Asprinio D, et al. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. *Bone*. 2010;46(1):236-243.
- [17] Barbagallo I, Vanella A, Peterson SJ, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(3):276-288.
- [18] Vanella L, Sanford C Jr, Kim DH, et al. Oxidative stress and heme oxygenase-1 regulated human mesenchymal stem cells differentiation. *Int J Hypertens*. 2012;2012:890671.
- [19] Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc*. 2009;4(1):102-106.
- [20] Hsiao FS, Cheng CC, Peng SY, et al. Isolation of therapeutically functional mouse bone marrow mesenchymal stem cells within 3 h by an effective single-step plastic-adherent method. *Cell Prolif*. 2010;43(3):235-248.
- [21] Dai J, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res*. 2007;86(10):937-950.
- [22] Drake CJ, LaRue A, Ferrara N, et al. VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. *Dev Biol*. 2000;224(2): 178-188.
- [23] Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol*. 2000;151(4):879-889.
- [24] Hiltunen MO, Ruuskanen M, Huuskonen J, et al. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation in vivo. *FASEB J*. 2003;17(9):1147-1149.
- [25] Claffey KP, Abrams K, Shih SC, et al. Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Lab Invest*. 2001;81(1):61-75.
- [26] Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*. 2002;143(4):1545-1553.
- [27] 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 Clin Invest*. 2002;110(6): 751-759.
- [28] Yeh LC, Lee JC. Osteogenic protein-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1999; 153(1-2):113-124.
- [29] Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Biol*. 2007;177(3):489-500.
- [30] Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*. 2008;60(1):79-127.
- [31] Komatsu DE, Hadjiargyrou M. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone*. 2004;34(4):680-688.
- [32] Bussolati B, Ahmed A, Pemberton H, et al. Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood*. 2004;103(3):761-766.
- [33] Lin HH, Lai SC, Chau LY. Heme oxygenase-1/carbon monoxide induces vascular endothelial growth factor expression via p38 kinase-dependent activation of Sp1. *J Biol Chem*. 2011;286(5):3829-3838.
- [34] Vanella L, Kim DH, Asprinio D, et al. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. *Bone*. 2010;46(1):236-243.
- [35] Barbagallo I, Vanella A, Peterson SJ, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(3):276-288.
- [36] Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999; 286(5446):1946-1949.
- [37] Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology*. 2001;142(2):760-766.
- [38] Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Curr Pharm Des*. 2001;7(8):715-736.
- [39] Penna C, Perrelli MG, Karam JP, et al. Pharmacologically active microcarriers influence VEGF-A effects on mesenchymal stem cell survival. *J Cell Mol Med*. 2013;17(1): 192-204.