

转化生长因子  $\beta 3$  对成骨细胞增殖和成骨能力的影响<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3156>

艾力麦尔旦·艾尼瓦尔, 王玲, 古丽, 迪丽达尔·塔西甫拉提, 王珊, 尹宏斌

2095-4344.3156

投稿日期: 2020-03-16

送审日期: 2020-03-21

采用日期: 2020-05-30

在线日期: 2020-11-10

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)17-02664-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

## 文章特点

- 观察不同质量浓度的转化生长因子  $\beta 3$  对成骨细胞生长增殖和成骨能力的影响;
- 转化生长因子  $\beta 3$  在 10-100  $\mu\text{g/L}$  剂量范围内可促进成骨细胞的增殖和成骨能力, 其中 10  $\mu\text{g/L}$  质量浓度效果最佳。

## 实验分组

- 对照组: 常规培养;
- 实验组: 分别用含 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  的转化生长因子  $\beta 3$  培养。

## 观察

- 细胞生长情况; 细胞增殖情况; 碱性磷酸酶水平; 胶原蛋白 1A1、Runx-2 和骨钙素基因表达; 细胞矿化能力。

## 文题释义:

**转化生长因子 $\beta 3$ :** 是转化生长因子 $\beta$ 的亚型。转化生长因子 $\beta$ 是一类具有多重效能的生长因子家族, 参与调控机体胚胎发育、组织再生、免疫调节、血管再生和癌细胞增殖凋亡等, 它是骨基质中含量丰富的生物因子, 能与细胞膜表面特异的细胞靶点结合, 参与调控细胞的生存、分化、增殖、黏附、代谢和功能调节。转化生长因子 $\beta 3$ 在软骨和纤维组织形成、组织创伤修复方面的研究比较成熟, 其在间充质来源的干细胞增殖和成骨向分化方面的作用近年逐渐被证实, 而转化生长因子 $\beta 3$ 的作用最佳浓度存在较大的差异。

**Runt相关转录因子2(Runt related transcription factor 2, Runx2):** 是成骨分化和骨形成过程中的重要调节因子, 出现在成骨分化的早期, 可激活、启动下游包括碱性磷酸酶、骨钙素和 I 型胶原蛋白等基因的转录和表达, 在尚未成熟的成骨细胞中表达最高而随着成骨细胞的成熟其表达下降。

## 摘要

**背景:** 转化生长因子 $\beta 3$ 对成骨细胞增殖和成骨能力的影响相关研究甚少。

**目的:** 观察不同质量浓度的转化生长因子 $\beta 3$ 对成骨细胞生长增殖和成骨能力的影响。

**方法:** 采用课题组前期方法改良酶消化法分离获得新西兰幼兔颅盖骨成骨细胞, 差速贴壁法纯化并鉴定。将成骨细胞分为对照组和实验组, 对照组为常规培养的成骨细胞, 实验组为分别含 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  的转化生长因子 $\beta 3$ 培养。各组每天观察细胞生长情况; 培养 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 d 采用 MTT 法检测各组细胞增殖情况并绘制细胞生长曲线; 培养 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 d 检测各组碱性磷酸酶水平; 培养第 7, 14 天用 RT-qPCR 法检测各组胶原蛋白 1A1、Runx-2 和骨钙素基因表达情况; 培养 21 d 茜素红染色法检测各组细胞矿化能力。实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准。

**结果与结论:** ①成功分离培养、纯化并鉴定成骨细胞; ②10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子 $\beta 3$ 组细胞增殖活性明显高于对照组( $P < 0.05$ ); 10, 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子 $\beta 3$ 组碱性磷酸酶水平高于对照组( $P < 0.05$ ); ③10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子 $\beta 3$ 组胶原蛋白 1A1、Runx-2 和骨钙素基因表达量始终高于对照组( $P < 0.05$ ); 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子 $\beta 3$ 组胶原蛋白 1A1、Runx-2 和骨钙素基因表达量在第 7 天时高于对照组( $P < 0.05$ ); ④10, 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子 $\beta 3$ 组矿化结节较对照组大且多, 其中 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子 $\beta 3$ 组的矿化结节数明显多于对照组( $P < 0.05$ ); ⑤结果说明, 转化生长因子 $\beta 3$ 在 10-100  $\mu\text{g/L}$  范围内可促进成骨细胞的增殖和成骨能力, 其中 10  $\mu\text{g/L}$  质量浓度的转化生长因子 $\beta 3$ 效果最佳。

**关键词:** 骨; 生长因子; 成骨; 成骨细胞; 细胞增殖; 碱性磷酸酶; 基因

**缩略语:** Runt 相关转录因子 2: Runt related transcription factor 2, Runx2

## Effect of transforming growth factor-beta3 on the proliferation and osteogenic capability of osteoblasts

Ailimaierdan·Ainiwaer, Wang Ling, Gu Li, Dilidaer·Taxifulati, Wang Shan, Yin Hongbin

Maxillofacial Surgery Clinic, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Affiliated Stomatological Hospital), Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)颌面外科门诊, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

第一作者: 艾力麦尔旦·艾尼瓦尔, 男, 1992 年生, 维吾尔族, 硕士, 医师, 主要从事骨组织工程、口腔种植方面的研究。

通讯作者: 尹宏斌, 副主任医师, 新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)颌面外科门诊, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

<https://orcid.org/0000-0002-7564-2169> (艾力麦尔旦·艾尼瓦尔)

基金资助: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2016D01C250), 项目负责人: 王玲

引用本文: 艾力麦尔旦·艾尼瓦尔, 王玲, 古丽, 迪丽达尔·塔西甫拉提, 王珊, 尹宏斌. 转化生长因子  $\beta 3$  对成骨细胞增殖和成骨能力的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(17):2664-2669.

Ailimaierdan-Ainiwaer, Master, Physician, Maxillofacial Surgery Clinic, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Affiliated Stomatological Hospital), Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

**Corresponding author:** Yin Hongbin, Associate chief physician, Maxillofacial Surgery Clinic, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Affiliated Stomatological Hospital), Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Less is reported on the effect of transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3) on the proliferation and osteogenic capability of osteoblasts till now. **OBJECTIVE:** To investigate the ability of TGF- $\beta$ 3 in different doses on the proliferation and osteogenic capability of osteoblasts.

**METHODS:** We isolated osteoblasts from the calvarium of neonatal New Zealand white rabbit according to our previous method, purified and identified the cells using differential attachment method. The osteoblasts were divided into a control group and an experimental group. The osteoblasts in the control group were cultured with conventional culture medium, and those in the experimental group were cultured in the medium containing separately 0.1, 1, 10, and 100  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 3. The morphology and growth of osteoblasts were observed daily. Cell proliferation was detected by MTT assay and the growth curve was drawn at 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 13 days of culture. Alkaline phosphatase activity was measured at 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15 days of culture. The expression levels of collagen 1A1, Runt related transcription factor 2 (Runx-2) and osteocalcin genes were measured by RT-qPCR at 7 and 14 days of culture. Alizarin red S staining was carried out to testify mineralized matrix productivity of each group at 21 days of culture. The study was approved by the Animal Experimental Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The osteoblasts were isolated, purified and identified successfully. MTT assay results showed that the cell proliferation activity of 10  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 3 group was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The alkaline phosphatase activity of 10 and 100  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 3 groups was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). RT-qPCR results revealed that the mRNA expressions of collagen 1A1, Runx-2 and osteocalcin in the 10  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 3 group were always higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expressions of collagen 1A1, Runx-2 and osteocalcin in the 100  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 3 group were higher than those in the control group at 7 days of culture ( $P < 0.05$ ). Alizarin red S staining showed that the mineralized nodules of the 10 and 100  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 3 groups, especially in the 10  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 3 group ( $P < 0.05$ ), were bigger and more than those in the control group. To conclude, 10–100  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 3 can improve the proliferation and osteogenic capability of osteoblasts and these effects are more obvious when the concentration of TGF- $\beta$ 3 is 10  $\mu$ g/L.

**Key words:** bone; growth factor; osteogenesis; osteoblast; cell proliferation; alkaline phosphatase; gene

**Funding:** the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2016D01C250 (to WL)

**How to cite this article:** AINIWAER A, WANG L, GU L, TAXIFULATI D, WANG S, YIN HB. Effect of transforming growth factor-beta3 on the proliferation and osteogenic capability of osteoblasts. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(17):2664-2669.

## 0 引言 Introduction

各种原因引起的颌面部骨缺损的修复和重建, 加速其成骨过程是目前颌面部组织工程面临的重要问题之一<sup>[1]</sup>。颅盖骨来源的成骨细胞与颌面部诸骨具有相同的组织来源, 是研究颌面部骨组织工程中常用的细胞。转化生长因子  $\beta$ 3 是一类多效能生长因子, 可以结合细胞膜上的特异性受体, 调节细胞生长、增殖、分化、信息传递和细胞凋亡的过程, 是组织工程领域中比较理想的细胞因子<sup>[2]</sup>。课题组前期研究证实转化生长因子  $\beta$ 3 以剂量依赖的方式促进兔牙髓干细胞的成骨向分化过程<sup>[3]</sup>; 而转化生长因子  $\beta$ 3 对颅盖骨来源的成骨细胞的增殖和分化能力是否产生影响目前尚无研究报道。此次课题组以前期研究为基础, 拟用不同质量浓度的转化生长因子  $\beta$ 3 作用于成骨细胞, 探索其对成骨细胞的增殖和矿化能力产生的影响和其初步机制, 为利用组织工程方法提高颌面部骨组织形成速度提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 细胞学体外实验

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 3 月至 9 月在新疆医科大学第一附属医院科技楼干细胞研究实验室完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 清洁级新西兰大白兔幼兔 3 只, 1 周龄, 体质量 70–90 g, 雌雄不限, 由新疆医科大学实验动物中心提供, 使用许可证编号: SYXK(新)2010-0001; 生产许可证号: SCXK(新)2011-0004。

1.3.2 实验用试剂与仪器 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS)、青链霉素、胰蛋白酶、高糖 DMEM 培养基 (Hyclone, 美国), 转化生长因子  $\beta$ 3 (Peprotech, 美国), 碱性磷酸酶活性测定试剂盒 (南京建

成, 中国), 甲基噻唑基四唑 (MTT)、茜素红 S (Sigma-Aldrich, 美国), 定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 5%CO<sub>2</sub> 恒温孵箱、离心机、酶标仪 (Thermo, 美国), 倒置显微镜 (Leica, 德国)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 成骨细胞分离培养并差速贴壁法纯化 将幼兔断颈处死, 无菌条件下取出颅盖骨, 剔除骨块表面骨膜、血管和结缔组织等, 参照课题组前期研究介绍的改良酶解组织块法分离获得成骨细胞<sup>[4]</sup>, 获得的细胞每两三天换液 1 次, 待原代细胞长满培养皿 80%–90% 后, 根据前期研究方法用差速贴壁法纯化以得到高纯度的成骨细胞<sup>[4]</sup>, 有效去除原代成骨细胞内成纤维细胞等混杂细胞, 纯化后的细胞每两三天换液 1 次, 待细胞长满培养皿 80%–90% 后传代, 培养至第 3 代细胞后用于后续实验。原代细胞和传代后的细胞每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况及细胞形态并拍照。

#### 成骨细胞的培养及鉴定

细胞来源:	新西兰大白兔幼兔
培养基介绍:	完全培养液
添加材料:	含体积分数 10%FBS、1% 双抗的 DMEM 高糖培养液
培养时间:	48 h
细胞传代:	两三天换液 1 次, 待细胞长满培养皿 80%–90% 后传代, 取第 3 代细胞后用于后续实验
细胞鉴定:	通过观察细胞形态、碱性磷酸酶活性检测、胶原蛋白 1A1、Runt 相关骨形成蛋白 2、骨钙素的检测及成骨细胞矿化能力进行成骨细胞鉴定
伦理学批准:	实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准

1.4.2 成骨细胞的鉴定 参照课题组前期研究方法<sup>[4]</sup>, 分离培养并纯化的第 3 代成骨细胞培养每日显微镜下观察细胞形态, 培养前 15 d 隔日行碱性磷酸酶活性检测; 培养第 7, 14 天采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法行成骨标志基因胶原

蛋白 1A1, Runt 相关骨形成蛋白 2(Runt-related transcription factor-2, Runx-2) 以及骨钙素的检测; 培养 21 d 行茜素红染色检测成骨细胞矿化能力以评估所分离纯化细胞的成骨细胞特性。

**1.4.3 实验分组** 分离培养并纯化的第 3 代成骨细胞分为实验组和对照组, 实验组分为 4 组, 分别为 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  的转化生长因子  $\beta 3$  组, 即含体积分数 10%FBS, 1% 双抗的 DMEM 高糖培养液中加入质量浓度分别为 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  的转化生长因子  $\beta 3$ ; 对照组为常规培养的成骨细胞组, 即含体积分数 10%FBS, 1% 双抗的 DMEM 高糖培养液培养的成骨细胞。

**1.4.4 MTT 法检测各组细胞增殖活性** 取第 3 代成骨细胞, 计数后以  $2 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  细胞浓度接种于 7 块 96 孔板中, 每组设 5 个复孔 (其中一孔为空白对照), 细胞完全贴壁后随机分组开始实验, 连续培养 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 d 后, 分别取一块培养板用 MTT 法酶标仪测 490 nm 处各孔吸光度 (A) 值, 取各组平均值, 以细胞培养时间为横轴, A 值为纵轴绘制生长曲线。

**1.4.5 碱性磷酸酶水平测定** 取第 3 代成骨细胞,  $6 \times 10^3 \text{ L}^{-1}$  细胞浓度接种于 8 块 24 孔板中, 细胞贴壁后每块 24 孔板上的细胞均随机分为 5 组开始实验, 各组培养 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 d 各取一块培养板按照碱性磷酸酶试剂盒说明书进行操作, 490 nm 处酶标仪测 A 值并根据计算公式计算碱性磷酸酶活性 (金氏单位), 以培养时间为横坐标, A 值为纵坐标绘制曲线。

**1.4.6 RT-qPCR 检测胶原蛋白 1A1、Runx-2、骨钙素基因表达** 取第 3 代细胞以  $1 \times 10^6 / \text{孔}$  密度接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后随机分为 5 组培养, 每两三天换液 1 次, 培养第 7, 14 天, 各取一块培养板用 Trizol 法提取细胞 mRNA, 第一链 cDNA 反转录试剂盒合成第一链 cDNA 模板, 以  $\beta$ -actin 为内参对照。引物由广州天一辉远公司设计合成 (引物序列见表 1), PCR 反应条件:  $50^\circ\text{C}$  2 min,  $95^\circ\text{C}$  10 min,  $95^\circ\text{C}$  30 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s, 40 循环。最终数据以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  进行分析, 用 GraphPad Prism7.0 软件统计分析并绘图。

表 1 | PCR 基因引物序列

Table 1 | Primer sequences for RT-qPCR

基因	引物序列	产物大小 (bp)
COL-1A1	Forward: 5'- GTT CAG CTT TGT GGACCTCC -3' Reverse: 5'- CTC GAC TCC TGT GGT TTC CT -3'	250
Runx-2	Forward: 5'- TGG CGG GTA ATG ATG AAA AT -3' Reverse: 5'- GAG GCG GTC AGA GAA CAA A -3'	269
骨钙素	Forward: 5'- ACT CTT GTC GCC CTG CTG -3' Reverse: 5'- CCT GCC CGT CGA TCA GTT -3'	160
$\beta$ -actin	Forward: 5'- TGG CTC TAA CAG TCC GCC TAG -3' Reverse: 5'- AGT GCG ACG TGG ACA TCC G -3'	295

**1.4.7 茜素红染色检测矿化结节形成情况** 取第 3 代成骨细胞, 以  $2 \times 10^6$  个 / 孔密度接种于六孔板, 待细胞贴壁后随机分为 5 组开始实验, 每两三天换液 1 次, 分组培养第 21 天取培养板弃培养液, PBS 冲洗后用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 1 h,

PBS 冲洗 3 次, 现配的 1% 茜素红染液 1 mL 室温孵育 50 min 后蒸馏水冲洗表面的染液, 置于室温下的超净台内随其自然干燥, 镜下观察矿化结节并拍照。每个孔随机选取中段 5 个视野计算其矿化结节数量和大小并分析各组之间的差异。

**1.5 主要观察指标** ①原代成骨细胞的形态及鉴定; ②成骨细胞的增殖; ③细胞的碱性磷酸酶活性; ④各组细胞胶原蛋白 1A1、Runx-2、骨钙素基因的表达; ⑤细胞茜素红染色结果。

**1.6 统计学分析** 应用 SPSS 25.0 统计软件对结果数据进行统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析。  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 细胞形态观察** 在倒置显微镜下观察, 原代培养 48 h 后可观察到有细胞从组织块周围呈放射状爬出 (图 1A), 贴壁生长并包绕组织块聚集成生长呈多个细胞团块, 细胞形态多呈三角形、梭形、多角形, 7-10 d 细胞生长满培养皿 80%-90%, 进行差速贴壁法纯化和传代, 随培养时间和代数增加细胞形态趋于单一 (图 1B) 并可见复层生长情况。

**2.2 成骨细胞鉴定结果** 成骨细胞分离培养并纯化后呈典型的成骨细胞形态, 表达成骨细胞的典型标志物碱性磷酸酶, 并表达成骨标志基因胶原蛋白 1A1、Runx-2 和骨钙素, 常规培养 21 d 后出现矿化结节, 呈现出典型的矿化能力。以上结果均说明分离培养的成骨细胞具有典型的成骨细胞特征。

**2.3 MTT 测定结果** 成骨细胞增殖潜伏期约为 3 d, 随后进入对数增长期, 约在第 9 天细胞增殖达到平台期; 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组成骨细胞增殖能力明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 1, 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组成骨细胞增殖能力在培养前 7 d 高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 其余时间与对照组无明显差别 ( $P > 0.05$ ); 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组成骨细胞增殖能力第 9 天以后仍高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 说明细胞在对数增长后期仍保持良好的细胞增殖能力 (图 2)。

**2.4 碱性磷酸酶活性测定结果** 对照组碱性磷酸酶水平约在培养第 9 天达到高峰随后下降 (图 3), 表示成骨细胞分泌的碱性磷酸酶随着成骨细胞增殖分化而增加, 随后细胞进入矿化成熟期, 碱性磷酸酶分泌随之减少; 10, 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组碱性磷酸酶活性均大于对照组 ( $P < 0.05$ ); 1  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组初期碱性磷酸酶活性与对照组无明显差别, 而第 9 天后高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

**2.5 RT-qPCR 结果** 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组胶原蛋白 1A1、Runx-2、骨钙素基因表达量始终高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 1, 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组第 7 天时胶原蛋白 1A1 水平高于对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组 Runx-2 基因表达量始终高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 第 7 天时 1  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组 Runx-2 基因表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组 Runx-2 基因表达量明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组骨钙素基因表达量始终高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 1  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组 14 d 时

骨钙素基因表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组 14 d 时骨钙素基因表达量明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。

**2.6 茜素红染色结果** 各组细胞培养第 21 天均可见细胞汇合成块并且局部聚集成灶, 大体观察可见白色结节, 茜素红染色即可见多个大小不等的矿化结节(图 5A), 其中 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组矿化结节多且明显(图 5B)。矿化结节数分别为: 对照组  $2.63 \pm 0.42$ , 0.1  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组  $2.54 \pm 0.37$ , 1  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组  $2.81 \pm 0.39$ , 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组  $3.32 \pm 0.54$ , 100  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组  $2.93 \pm 0.48$ , 其中 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组与对照组比较差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论 Discussion

创伤、肿瘤、炎症以及牙源性、牙周性疾病引起的各类颌面部骨缺损的修复重建是当今骨组织工程面临的重要问题<sup>[5]</sup>。虽然各类干细胞、生长因子以及支架材料的结合在骨再生领域的应用逐渐趋于成熟, 但如何在尽可能短的时间内安全又便捷地修复骨缺损、促进骨形成仍然是目前骨组织工程的研究难点<sup>[1, 6-7]</sup>。新西兰大白兔作为中型动物, 与人类生物行为特征相似, 而且性格温顺, 易于饲养, 是研究组织工程比较理想的动物。成骨细胞取材部位选择颅盖骨, 颅盖骨来源的细胞易于获取, 应用比较成熟和广泛, 能够分离获得的细胞数目多<sup>[4, 8]</sup>, 而且颅盖骨源于原始间充质, 与颌面部诸骨具有相同的来源, 因此选取颅盖骨成骨细胞研究颌面部骨组织工程具有同源优越性。所以此次研究选择新西兰幼兔的颅盖骨作为细胞来源, 成骨细胞的提取分离完全参照课题组前期的改良酶消化法并加用差速贴壁法消除成骨细胞里可能掺杂的成纤维细胞<sup>[4]</sup>、破骨细胞、骨生成细胞等混杂细胞, 纯度高, 保证了研究结果的准确性和说服力。

转化生长因子  $\beta$  是一类具有多重效能的生长因子家族, 参与调控机体胚胎发育、组织再生、免疫调节、血

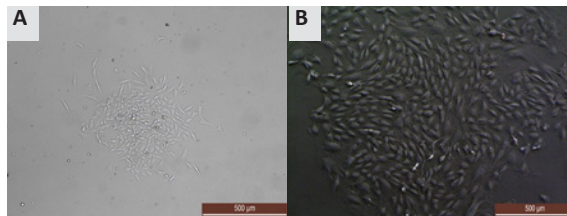
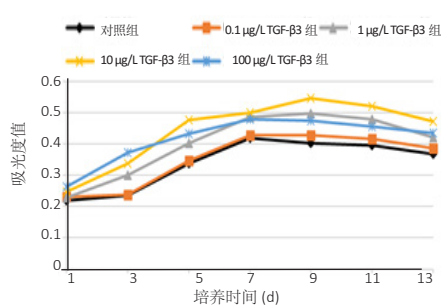


图 1 | 成骨细胞形态观察 ( $\times 50$ )

Figure 1 | The morphology of osteoblasts ( $\times 50$ )

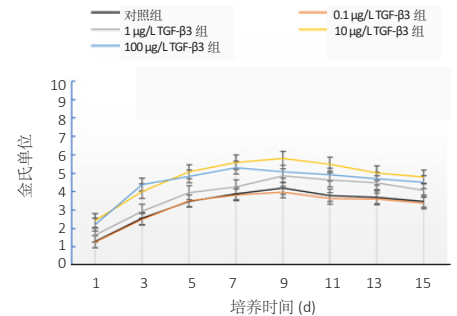
图注: 图 A 为幼兔颅盖骨原代成骨细胞培养 48 h, 细胞从组织块儿周围爬出, 图 B 为第 3 代成骨细胞, 细胞形态单一, 局部可见复层生长



图注: 成骨细胞增殖潜伏期约 3 d, 约 9 d 进入生长平台期, 10  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta 3$  组成骨细胞增殖能力明显高于对照组, 1, 100  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta 3$  组成骨细胞增殖能力在培养前 7 d 高于对照组。TGF- $\beta 3$ : 转化生长因子  $\beta 3$

图 2 | 各组成骨细胞生长曲线

Figure 2 | Growth curve of osteoblasts in each group



图注: 对照组碱性磷酸酶水平约培养第 9 天达到高峰随后下降进入矿化成熟期; 10, 100  $\mu\text{g/L}$  (TGF- $\beta 3$ ) 组碱性磷酸酶活性均大于对照组 ( $P < 0.05$ )。TGF- $\beta 3$ : 转化生长因子  $\beta 3$

图 3 | 各组细胞碱性磷酸酶活性

Figure 3 | Alkaline phosphatase activity of the cells in each group

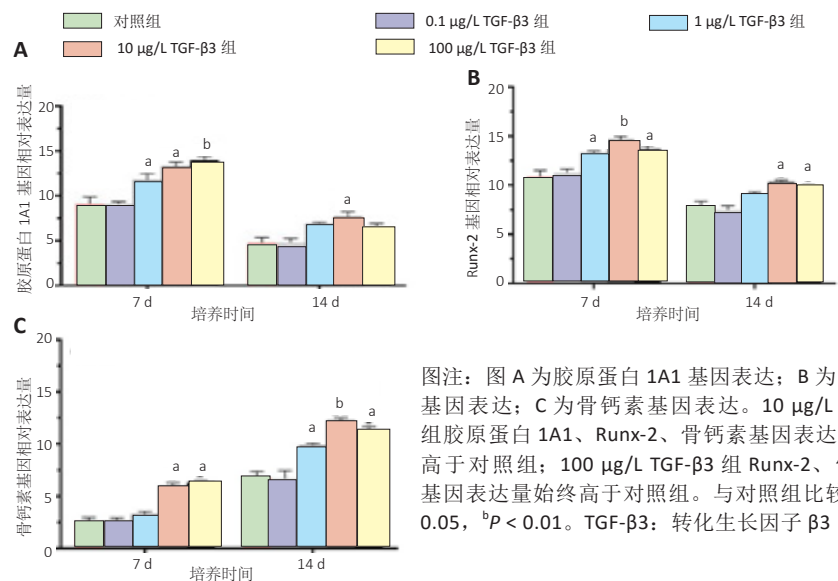


图 4 | 各组细胞分别培养 7, 14 d 后胶原蛋白 1A1、Runx-2、骨钙素基因表达

Figure 4 | The relative gene expression of collagen 1A1, Runt related transcription factor 2 and osteocalcin in the cells at 7 and 14 days of culture

图注: 图 A 为胶原蛋白 1A1 基因表达; B 为 Runx-2 基因表达; C 为骨钙素基因表达。10  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta 3$  组胶原蛋白 1A1、Runx-2、骨钙素基因表达量始终高于对照组; 100  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta 3$  组 Runx-2、骨钙素基因表达量始终高于对照组。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。TGF- $\beta 3$ : 转化生长因子  $\beta 3$

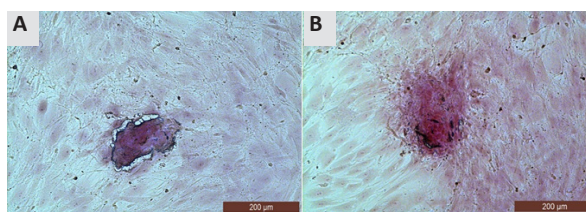


图 5 | 培养 21 d 成骨细胞茜素红染色结果 ( $\times 100$ )

Figure 5 | Alizarin red S staining of osteoblasts at 21 days of culture ( $\times 100$ )

图注: 图 A 为对照组, 图 B 为 10  $\mu\text{g/L}$  转化生长因子  $\beta 3$  组

管再生和癌细胞增殖凋亡等,它是骨基质中含量丰富的生物因子,能与细胞膜表面特异的细胞靶点结合,参与调控细胞的生存、分化、增殖、黏附、代谢和功能调节<sup>[2, 9]</sup>。目前哺乳类体内发现3个转化生长因子 $\beta$ 亚型,即转化生长因子 $\beta 1$ 、转化生长因子 $\beta 2$ 和转化生长因子 $\beta 3$ 。转化生长因子 $\beta$ 对成骨细胞增殖和成骨能力的作用虽然存在分歧,但大多数研究结果证实其对成骨细胞的增殖存在促进作用,而且此作用存在时间和剂量依赖性,在成骨不同阶段转化生长因子 $\beta$ 对成骨细胞的矿化能力影响不同<sup>[10]</sup>。有学者发现转化生长因子 $\beta 1$ 在5–10  $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内可促进成骨样细胞的增殖和I型胶原蛋白的分泌;而100  $\mu\text{g/L}$ 时则起抑制作用<sup>[11]</sup>。转化生长因子 $\beta 3$ 作为较新被发现的亚型,其在软骨和纤维组织形成、组织创伤修复方面的研究比较成熟<sup>[12–15]</sup>。转化生长因子 $\beta 3$ 在间充质来源的干细胞增殖和成骨向分化方面的作用近年逐渐被证实<sup>[16–18]</sup>,而转化生长因子 $\beta 3$ 的作用最佳浓度存在较大的差异。

课题组前期研究证实80  $\mu\text{g/L}$ 的转化生长因子 $\beta 3$ 对兔牙髓干细胞的成骨向分化有促进作用<sup>[3, 19]</sup>,其机制是通过提高碱性磷酸酶、胶原蛋白1A1、Runx-2、骨钙素和BSP基因的表达来实现并有Smad通路的参与。Li等<sup>[20]</sup>证实转化生长因子 $\beta 3$ 能够有效促进牙周膜干细胞的成骨向分化,其成骨能力在500  $\mu\text{g/L}$ 质量浓度的转化生长因子 $\beta 3$ 诱导时效果最佳。DENG等<sup>[21]</sup>发现25  $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 3$ 能够诱导人骨髓间充质干细胞成骨向分化从而刺激骨再生。而转化生长因子 $\beta 3$ 对成骨细胞的增殖和矿化能力国内外至今尚无相关报道。所以作者选择0.1–100  $\mu\text{g/L}$ 质量浓度的转化生长因子 $\beta 3$ ,首先探索对成骨细胞的增殖和矿化能力比较适宜的浓度区间,实验结果显示在10–100  $\mu\text{g/L}$ 范围内,转化生长因子 $\beta 3$ 能有效促进成骨细胞的增殖和成骨矿化能力,其中10  $\mu\text{g/L}$ 的转化生长因子 $\beta 3$ 效果最佳。有学者证实0.5–5  $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内转化生长因子 $\beta 1$ 在细胞培养的前期可促进在金属钽多孔状结构中培养的成骨样细胞的增殖<sup>[11]</sup>,其中5  $\mu\text{g/L}$ 的作用最明显,而10  $\mu\text{g/L}$ 的转化生长因子 $\beta 1$ 反而抑制其增殖。

成骨标志蛋白有碱性磷酸酶、I型胶原蛋白、Runx-2、骨钙素、BSP、Ox和骨桥蛋白等<sup>[22]</sup>,此次研究选取其中具有代表性且与成骨细胞关系较为密切的成骨指标作为检测对象,探讨转化生长因子 $\beta 3$ 对成骨细胞表达标志基因的影响。碱性磷酸酶是成骨细胞分化的早期指标,此次实验结果显示10–100  $\mu\text{g/L}$ 质量浓度的转化生长因子 $\beta 3$ 能够提高成骨细胞表达的碱性磷酸酶活性并且10  $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 3$ 的作用较明显。I型胶原蛋白是骨基质的重要组成部分,胶原蛋白1A1是I型胶原蛋白亚型中与成骨密切相关的蛋白,也是成骨细胞重要的特异性基因<sup>[10, 23]</sup>。骨钙素在成骨细胞分化晚期开始活跃,其表达升高说明成骨细胞开始进入矿化期<sup>[22]</sup>。Runx-2又称核心结合因子Cbfa1,是成骨分化和骨形成过程中的重要调节因子<sup>[24]</sup>,出现在成骨分化的早期,可激活、启动下游包括碱性磷酸酶、骨钙素和I型胶原蛋白等基因的转

录和表达,在尚未成熟的成骨细胞中表达最高而随着成骨细胞的成熟其表达下降<sup>[25–26]</sup>。此次研究RT-qPCR结果显示10–100  $\mu\text{g/L}$ 浓度范围的转化生长因子 $\beta 3$ 均能提高成骨细胞表达上述基因,胶原蛋白1A1、Runx-2基因在第7天时的相对表达量高于14 d,说明10–100  $\mu\text{g/L}$ 浓度范围的转化生长因子 $\beta 3$ 在成骨早期就提高上述基因的表达;而100  $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 3$ 组骨钙素基因表达量第7天最高,14 d时10–100  $\mu\text{g/L}$ 浓度范围的转化生长因子 $\beta 3$ 组骨钙素表达量最高,表明转化生长因子 $\beta 3$ 在10–100  $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内可促进成骨细胞进入矿化期。成骨过程的环节分为3部分:首先是细胞增殖,基质成熟而后就是细胞外基质的矿化从而形成矿化结节,这是成骨形成的最终环节<sup>[8, 22]</sup>。此次研究茜素红染色结果显示10–100  $\mu\text{g/L}$ 浓度范围的转化生长因子 $\beta 3$ 对成骨细胞的矿化能力均有促进作用,其中10  $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 3$ 组形成的矿化结节较对照组明显而且结节大。以上结果均表明成骨细胞的成骨能力在转化生长因子 $\beta 3$ 质量浓度为10–100  $\mu\text{g/L}$ 范围内时较佳。

转化生长因子 $\beta$ 特异性受体I和II(T- $\beta$ RI, T- $\beta$ RII)是转化生长因子 $\beta 3$ 的特异性受体,转化生长因子 $\beta 3$ 表面的受体磷酸化后与细胞核内的Smad蛋白结合(Smad家族中Smad2和Smad3是转化生长因子 $\beta 3$ 的特异受体结合蛋白)从而完成目的基因的表达<sup>[2, 27–28]</sup>,转化生长因子 $\beta$ 信号通路包括转化生长因子 $\beta$ -Smad依赖和转化生长因子 $\beta$ -Smad不依赖的通路<sup>[28]</sup>。在转化生长因子 $\beta 3$ 诱导的成骨细胞矿化过程中是否有Smad通路的参与及其具体机制有待进一步研究。此次研究结果显示在转化生长因子 $\beta 3$ 质量浓度为10–100  $\mu\text{g/L}$ 范围内均对成骨细胞成骨有促进作用,其中10  $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 3$ 促进成骨能力较强,而中间浓度的转化生长因子 $\beta 3$ 是否会有促进峰值或者在此浓度范围内是否会有先促进后抑制作用及其具体界限和机制需要后期深入进行体内和体外实验进一步探讨。

综上所述,10–100  $\mu\text{g/L}$ 浓度范围的转化生长因子 $\beta 3$ 对成骨细胞的增殖和成骨具有一定的促进作用,其中转化生长因子 $\beta 3$ 质量浓度为10  $\mu\text{g/L}$ 时效果比较理想。通过实验为成骨细胞和转化生长因子 $\beta 3$ 联合应用解决颌面部骨组织缺损,加速其成骨过程提供了崭新的视角和一定的理论基础。

**作者贡献:**艾力麦尔旦·艾尼瓦尔参与实验设计、实验实施、文章撰写及修改,古丽·迪丽达尔·塔西甫拉提、王珊参与实验数据整理,王玲参与文章审校,尹宏斌参与实验设计、文章审校。

**经费支持:**该文章接受了“新疆维吾尔自治区自然科学基金(2016D01C250)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:**文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:**实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重：**文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审：**文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权：**文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明：**这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

[1] FUNDA G, TASCHEI S, BRUNO GA, et al. Nanotechnology Scaffolds for Alveolar Bone Regeneration. *Materials*. 2020;13(1):201.

[2] DAVID CJ, MASSAGUÉ J. Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(7):419-435.

[3] 艾力麦尔旦·艾尼瓦尔, 张晓莉, 卡米力江·买买提明, 等. 转化生长因子β3促进兔牙髓干细胞成骨向分化的体外实验研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2019, 35(4): 485-489.

[4] 艾力麦尔旦·艾尼瓦尔, 李鹏, 刁兆峰, 等. 幼兔颅盖骨成骨细胞的分离培养及鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(7): 996.

[5] VIGNESH U, MEHROTRA D, HOWLADER D, et al. Bone Marrow Aspirate in Cystic Maxillofacial Bony Defects. *J Craniofac Surg*. 2019;30(3):e247-e251.

[6] AL-MORAISSEI EA, OGGINI FO, MAHYOUB HMA, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells versus conventional bone grafts in the regeneration of maxillary alveolar bone: A systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020;35(1):79-90.

[7] MESHRA M, ANCHLIA S, SHAH H, et al. Buccal Fat Pad-Derived Stem Cells for Repair of Maxillofacial Bony Defects. *J Maxillofac Oral Surg*. 2019;18(1):112-123.

[8] PERPÉTUO IP, BOURNE LE, ORRISS IR. Isolation and Generation of Osteoblasts. *Methods Mol Biol*. 2019;1914:21-38.

[9] BATLLE E, MASSAGUÉ J. Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. 2019;50(4):924-940.

[10] GRAFE I, ALEXANDER S, PETERSON JR, et al. TGF-β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(5):a022202.

[11] 庞海涛, 甘洪全, 王茜, 等. 转化生长因子β1对多孔钽/MG63成骨样细胞复合物细胞增殖及分泌功能的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(25): 3680.

[12] LE M, NARIDZE R, MORRISON J, et al. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair in vivo. *PLoS One*. 2012;7(10):e48040.

[13] HUANG L, YI L, ZHANG C, et al. Synergistic Effects of FGF-18 and TGF-β3 on the Chondrogenesis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Pellet Culture. *Food Chem*. 2020;330:127212.

[14] LICHTMAN MK, OTEROVINAS M, FALANGA V. Transforming Growth Factors β (TGF-β) Isoforms in Wound Healing and Fibrosis. *Wound Repair Regen*. 2016;24(2):215-222.

[15] ISMAEEL A, KIM JS, KIRK JS, et al. Role of Transforming Growth Factor-β in Skeletal Muscle Fibrosis: A Review. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10):2446.

[16] 艾力麦尔旦·艾尼瓦尔, 木合塔尔·霍加. 生长因子诱导牙髓干细胞成骨向分化研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(2): 205-208.

[17] KRSTIC J, TRIVANOVIĆ D, OBRADOVIĆ H, et al. Regulation of mesenchymal stem cell differentiation by transforming growth factor beta superfamily. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(12):1138-1154.

[18] TSUTSUI TW. Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. *Stem Cells Cloning*. 2020;13:33-42.

[19] 艾力麦尔旦·艾尼瓦尔, 木合塔尔·霍加. 转化生长因子β3促进兔牙髓干细胞成骨向分化机制的初步研究[J]. *口腔医学*, 2019, 39(2): 7-12.

[20] LI Y, QIAO Z, YU F, et al. Transforming Growth Factor-β3/Chitosan Sponge (TGF-β3/CS) Facilitates Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):4982.

[21] DENG M, MEI T, HOU T, et al. TGFβ3 recruits endogenous mesenchymal stem cells to initiate bone regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):258.

[22] ROEDER E, MATTHEWS BG, KALAJZIC I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. *Bone*. 2016;92:189-195.

[23] MARUELLI S, BESIO R, ROUSSEAU J, et al. Osteoblasts mineralization and collagen matrix is conserved upon specific Col1a2 silencing. *Matrix Biology Plus*. 2020:100028.

[24] KOMORI T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol Cells*. 2020;43(2):168-175.

[25] KOMORI T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1694.

[26] GOMATHI K, AKSHAYA N, SRINAATH N, et al. Regulation of Runx2 by post-translational modifications in osteoblast differentiation. *Life Sci*. 2020;245:117389.

[27] LI SN, WU JF. TGF-β/SMAD signaling regulation of mesenchymal stem cells in adipocyte commitment. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):41.

[28] SUZUKI Y, NAKAJIMA A, KAWATO T, et al. Identification of Smad-dependent and-independent signaling with transforming growth factor-β type 1/2 receptor inhibition in palatogenesis. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2020;10(2):43-48.

(责任编辑: WZH, ZN, TXY)

(上接目次2“社长的话”)

### 3、更正与撤稿的流程

**3.1 根据 ICMJE 原则，如果需要更正，期刊应遵守以下最低标准：**

(1) 期刊应尽快发表更正启事，详细说明对原文所作的更改，而且应注明原文出处。更正启事应刊登在电子版或编有页码的印刷版期刊上，并在电子版或印刷版的目次中列出，以方便编制索引；

(2) 期刊还应发布论文的新版本，新版本应有对原始版本所有改动的详细说明，并注明更改日期；

(3) 期刊应存档论文的所有先前版本，读者可以直接获取或向期刊申请后获取该存档论文；

(4) 之前发表的电子版本应突出地注明该论文还有更新的版本；

(5) 应引用最新的版本。

**3.2 根据 COPE 原则，如果需要撤稿，期刊应遵守以下要求：**

(1) 撤稿提醒尽可能链接到原文（即，所有在线版本中）；

(2) 清楚地标识撤回的文章（例如，在撤回标题中包括标题和作者，或引用撤回的文章）明确标识为撤消（即与其他类型的更正或评论不同）；

(3) 及时发布以减少有害影响；

(4) 所有读者均可免费使用（即，避免访问障碍或仅对订户可用）；

(5) 说明撤回该文章单位；

(6) 说明撤稿原因；

(7) 客观，真实并避免在文章撤回中使用煽动性语言。

学术不端行为是监管部门、科研机构与科技期刊共同打击的不诚信行为，对学术不端“零容忍”应是各界的共识，科技期刊愿意与各行业部门共同努力营造一个诚信的学术氛围与科研成果的发表平台。

(编辑: 刘文君)