

神经生长因子促进兔骨髓间充质干细胞软骨分化并抑制肥大分化

杨治航, 孙祖延, 黄文良, 万 喻, 陈仕达, 邓 江

<https://doi.org/10.12307/2025.005>

投稿日期: 2023-10-20

采用日期: 2023-12-14

修回日期: 2024-01-10

在线日期: 2024-01-27

中图分类号:

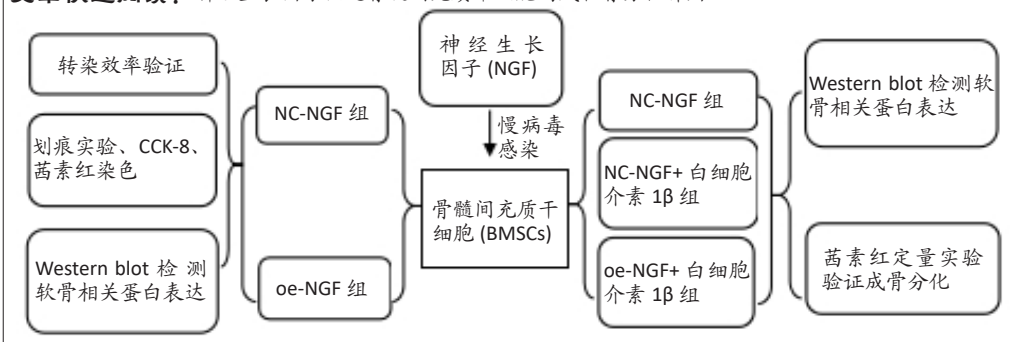
R459.9; R318.19; R394.2

文章编号:

2095-4344(2025)07-01336-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 神经生长因子促进骨髓间充质干细胞的成软骨分化作用



文题释义:

神经生长因子: 由Rita Levi-Montalcini首次发现, 是一种诱导神经生长的蛋白质, 能调节间充质干细胞的增殖、分化等生物学行为。

骨髓间充质干细胞: 属于中胚层的一类多能干细胞, 主要存在于结缔组织和器官间质中, 以骨髓组织含量最为丰富, 具有强大的增殖能力和多向分化潜能。

摘要

背景: 神经生长因子是一种诱导神经生长的蛋白质, 能调节间充质干细胞的增殖、分化等生物学行为。

目的: 探讨神经生长因子对骨髓间充质干细胞成软骨分化的促进作用。

方法: 分离培养兔骨髓间充质干细胞, 将神经生长因子通过慢病毒转染的方式转染到骨髓间充质干细胞, 以转染空载病毒为对照, CCK-8法、细胞划痕实验、茜素红染色、Western blot检测神经生长因子对骨髓间充质干细胞增殖、迁移、肥大分化、成软骨分化的影响。为进一步探讨神经生长因子对骨髓间充质干细胞成软骨分化的促进作用, 转染空载病毒和转染神经生长因子的骨髓间充质干细胞分别加入白细胞介素1 β 诱导培养14 d, Western blot检测成软骨分化、肥大分化相关蛋白的表达。

结果与结论: ①CCK-8检测结果表明神经生长因子对骨髓间充质干细胞增殖没有明显影响; ②与对照组相比, 过表达神经生长因子后细胞迁移能力增强, 成软骨相关蛋白II型胶原、SOX9的表达上调($P < 0.05$), 肥大相关蛋白X型胶原、RUNX2的表达下调($P < 0.05$); ③与空载病毒+白细胞介素1 β 组相比, 过表达神经生长因子+白细胞介素1 β 组成软骨相关蛋白II型胶原、SOX9的表达上调($P < 0.05$), 肥大相关蛋白X型胶原、RUNX2的表达下调($P < 0.05$); ④结果表明, 神经生长因子可促进骨髓间充质干细胞成软骨分化。

关键词: 神经生长因子; 骨髓间充质干细胞; 软骨分化; 骨关节炎; 软骨细胞; 肥大分化

Nerve growth factor promotes chondrogenic differentiation and inhibits hypertrophic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

Yang Zhihang, Sun Zuyan, Huang Wenliang, Wan Yu, Chen Shida, Deng Jiang

Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (First People's Hospital of Zunyi), Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Yang Zhihang, Master candidate, Physician, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (First People's Hospital of Zunyi), Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Deng Jiang, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (First People's Hospital of Zunyi), Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: Nerve growth factor is a protein that induces nerve growth and regulates biological behaviors such as proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To investigate the promoting effect of nerve growth factor on chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured, and nerve growth factor was transfected into bone marrow mesenchymal stem cells by lentiviral transfection. The effects of nerve growth factor on the proliferation, migration, hypertrophic differentiation, and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells were detected by CCK-8 assay, cell scratch assay, alizarin red staining, and western blot assay, using the transfected null-loaded virus as control. To further investigate the promoting effect of nerve growth factor on the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, interleukin 1 β was added in bone marrow mesenchymal stem cells transfected with empty virus and nerve growth factor for 14 days. The expression of proteins related to chondrogenic differentiation and hypertrophic differentiation was detected by western blot assay.

遵义医科大学第三附属医院 (遵义市第一人民医院), 贵州省遵义市 563000

第一作者: 杨治航, 男, 1996年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 遵义医科大学在读硕士, 医师, 主要从事关节软骨损伤修复研究。

通讯作者: 邓江, 教授, 主任医师, 博士生导师, 遵义医科大学第三附属医院 (遵义市第一人民医院), 贵州省遵义市 563000

<https://orcid.org/0009-0008-6092-181X> (杨治航)

基金资助: 国家自然科学基金(81660367), 项目负责人: 邓江; 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzkwj 2021-236), 项目负责人: 邓江; 贵州省卫健委科研项目(gzwwkj2018-2-05), 项目负责人: 黄文良; 遵义市科技局科研项目[遵市科合社字(2018)181], 项目负责人: 黄文良

引用本文: 杨治航, 孙祖延, 黄文良, 万喻, 陈仕达, 邓江. 神经生长因子促进兔骨髓间充质干细胞软骨分化并抑制肥大分化[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(7):1336-1342.



RESULTS AND CONCLUSION: (1) CCK-8 assay results showed that nerve growth factor had no significant effect on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells. (2) Compared with the control group, overexpression of nerve growth factor enhanced the migration ability of the cells, and the expression of cartilage-associated proteins type II collagen and SOX9 was up-regulated ($P < 0.05$), while the expression of hypertrophic-associated proteins type X collagen and Runx2 was down-regulated ($P < 0.05$). (3) Compared with the empty virus-interleukin 1β group, the expression of cartilage-associated proteins type II collagen and Sox9 was up-regulated ($P < 0.05$), and the expression of hypertrophy-associated proteins type X collagen and Runx2 was down-regulated after overexpression of nerve growth factor ($P < 0.05$). (4) The results indicated that nerve growth factor could promote the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

Key words: nerve growth factor; bone marrow mesenchymal stem cell; chondrogenic differentiation; osteoarthritis; chondrocyte; hypertrophic differentiation

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81660367 (to DJ); Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project, No. gzwkj2021-236 (to DJ); Research Project of Guizhou Provincial Health Commission, No. gzwjkj2018-2-05 (to HWL); Research Project of Zunyi Science and Technology Bureau, No. (2018)181 (to HWL)

How to cite this article: YANG ZH, SUN ZY, HUANG WL, WAN Y, CHEN SD, DENG J. Nerve growth factor promotes chondrogenic differentiation and inhibits hypertrophic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(7):1336-1342.

0 引言 Introduction

近年来骨关节炎发病率逐年上升,究其原因包括关节损伤、肥胖等的患病率提高^[1-2]。骨关节炎的特征包括滑膜炎、软骨下骨重塑和骨赘形成,最突出的是进行性软骨退化^[3-4]。此外,骨关节炎作为一种无菌性炎症在发生发展过程中也会产生许多促炎因子,其中以白细胞介素 1β 为主,这些促炎因子会加速骨关节炎的进展,促使软骨细胞的肥大分化并形成矿化区^[5]。由于缺血、低氧等恶劣生存环境,关节软骨的再生潜力较低^[6],故各种危险因素引起的损伤更易导致软骨结构和功能的变化。临床上,创伤及退变性关节软骨损伤可以通过止痛及抗炎等药物治疗或者微骨折术^[7-8]、骨软骨移植^[9]、自体软骨细胞移植等侵入性治疗来延缓人工关节置换的时间^[10]。然而,这些方法修复的都是机械性较差的纤维软骨,其在组织学上与透明软骨不同,且存在移植组织来源有限、免疫排斥等问题未能获得满意的治疗效果,限制了其应用,而组织工程的出现为软骨再生提供了可行的方法。骨髓间充质干细胞具有多谱系分化潜力和免疫调节特性,成为骨组织工程和再生医学的重要种子细胞^[11]。

神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 是神经营养因子家族的成员之一,因其在神经系统胚胎发育和神经元细胞存活/分化中的关键作用而受到广泛关注^[12]。NGF 在神经系统方面的研究较为透彻,但在骨修复中的应用未得到充分研究^[13],目前研究发现 NGF 及其受体参与调节骨髓间充质干细胞的增殖、分化和血管生成等生物学行为^[14-16],且部分接受抗 NGF 治疗的骨关节炎患者表现出快速的关节破坏,导致关节置换时间早于预期,也增加了发生快速进行性骨关节炎的风险^[17],说明 NGF 在维持关节软骨损伤修复的动态平衡中起重要作用。CHARTIER 等^[18]研究表明位于软骨下骨/关节软骨界面的细胞中 NGF 免疫染色强阳性,并且可以释放 NGF,可延缓软骨随着骨关节炎疾病进展而导致的弹性和强度下降。总之,NGF 在许多方面发挥重要作用,如神经再生^[19]、改善疼痛^[20],亦可成为骨关节炎及其他骨相关疾病的潜在治疗靶点^[21-22]。该研究旨在探讨 NGF 对骨髓间充质干细胞软骨分化、迁移的作用,以期望为 NGF 应用于组织工程奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 3 月至 2023 年 3 月在遵义医科大学第三附属医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 新西兰大白兔 9 只,3 月龄左右,雌雄不限,体质量 2.0~2.5 kg,购自重庆康格生物科技有限公司,实验动物合格证号: SCXK(黔)2021-0001,饲养于遵义医科大学第三附属医院中心实验室动物中心,通风良好,自由饮水,定期饲养。

该研究方案已通过遵义市第一人民医院实验动物伦理委员会审核[伦审(2022)-2-12 号]。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,并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 实验试剂和仪器 CO_2 恒温培养箱 (Panasonic 公司); DMEM 低糖培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (Biological Industries); T25 培养瓶、15 mL 离心管、50 mL 离心管 (NEST); 成软骨诱导培养基 (Sciencell 公司); 成骨诱导培养基、成脂诱导培养基 (Procell 公司); 细胞计数板 (Thermo Fisher Scientific); 反转录试剂盒 (Takara 公司); CCK-8 试剂盒、胰酶、茜素红 S 染色液、油红 O 染色液、阿利新蓝染色试剂盒、高效 RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、DAPI 溶液、氯化十六烷基吡啶-水合物、嘌呤霉素 (Solarbio 公司); 白细胞介素 1β (义翘公司); PAGE 凝胶快速制备试剂盒、5× 蛋白上样缓冲液、双色预染蛋白 Marker(10~250 kD)、Omni-ECL™ 超灵敏化学发光检测试剂盒 (飞克级)、无蛋白快速封闭液 (5×) (雅酶生物公司); GAPDH 抗体 (NO.GTX100118, GeneTex 公司); II 型胶原抗体 (NO.28459-1-AP, Proteintech 公司); 抗 RUNX2 抗体、抗 X 型胶原抗体、抗 SOX9 抗体、抗 NGF 抗体 (HUABIO 公司,批号分别为 NO. ET1612-47, NO. ET1702-13, NO. ET1611-56, NO. ET1606-29); Goat Anti-Rabbit IgG-H&L (HRP) (欣博盛生物公司); PVDF 膜 (0.45 μm , Millipore 公司); PrimeScript RT Reagent Kit (Takara 公司); CD29 抗体、CD44 抗体、CD90 抗体、CD34 抗体、HLA-DR 抗体 (Bioss

公司); Coralite488-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (Proteintech 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞分离与培养 取新西兰大白兔 9 只, 用 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉, 待麻醉成功后, 采取仰卧位固定四肢, 兔膝关节部位备皮, 消毒, 铺治疗巾, 用无菌骨穿针接 20 mL 注射器, 预先吸取含肝素、体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基 5 mL, 然后抽取双侧股骨骨髓 5 mL, 上下颠倒轻轻摇匀后注入含 4 mL DMEM 低糖培养基的培养瓶中, 置于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 细胞培养箱中静置培养, 2 d 后首次半换液, 以后每两三天换液 1 次, 在显微镜下观察细胞生长状态。待细胞长满瓶底 80%–90%, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 以 1 : 2 比例传代处理, 记为第 1 代, 依次类推。

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	兔骨髓
培养基介绍:	采用全骨髓贴壁培养法培养
基础培养基:	DMEM 低糖培养基 (含双抗)
添加材料:	体积分数 10% 无菌胎牛血清
原代培养时	原代细胞培养 48 h 后首次换液, 以后每两三天换液 1 次, 待细胞
间:	长满瓶底 80%–90% 开始传代
细胞传代:	当细胞融合至 80%–90% 用胰酶消化传至下 1 代, 按 1 : 2 比例传代处理, 传至第 3 代用于后续实验
细胞鉴定:	成软骨、成骨、成脂诱导分化鉴定; 免疫荧光染色鉴定表面分子表型
伦理学批准:	该实验经遵义医科大学第三附属医院伦理学委员会批准

1.4.2 骨髓间充质干细胞多向分化潜能鉴定及免疫荧光鉴定细胞表型 取第 3 代生长状态良好的骨髓间充质干细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 1.0–2.0 mL 0.25% 胰酶进行消化处理, 将消化下来的细胞转移至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL 细胞悬液, 待细胞融合达孔底 80%–90% 时, 分别加入不同的培养基: 成骨诱导培养基、成软骨诱导培养基、成脂诱导培养基, 连续培养 14 d 后, 分别进行茜素红染色、阿利新蓝染色、油红 O 染色, 各组染色方法根据染色试剂盒说明书进行, 然后于显微镜下观察并拍照。

取第 3 代生长状态良好的骨髓间充质干细胞, 胰酶消化处理后, 以 5×10^3 /孔密度接种至 6 孔板中培养, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱, 待细胞贴壁后取出 6 孔板, 通过免疫荧光染色检测骨髓间充质干细胞表面分子 CD29、CD44、CD90、CD34 的表达, 具体染色步骤如下: 用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 30 min, 每孔加入 1 mL 免疫染色通透液室温通透 10 min, PBS 洗涤, 每孔加入 1 mL 5%BSA 封闭 30 min; 加入一抗 (CD29、CD44、CD90、

CD34、HLA-DR, 稀释比例均为 1 : 200), 4 °C 冰箱孵育过夜, 加入二抗 [Coralite488-conjugated Goat anti-Rabbit IgG(H+L), 1 : 200], 室温避光孵育 1 h, DAPI 溶液复染 10 min, PBS 洗涤, 滴加抗荧光淬灭剂封固, 荧光显微镜下观察。

1.4.3 细胞转染 NGF 过表达慢病毒载体委托贵州禾晋生物科技有限公司构建及包装, 分别命名为 NC-NGF (对照组, 空载病毒)、oe-NGF。取对数生长期且 3 代及以上的骨髓间充质干细胞, 细胞达到约 80% 汇合度时, 用胰酶消化, 离心弃上清, 加 1 mL 细胞培养基重悬并计数, 最终调整细胞浓度至 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 然后每孔加 2 mL 含血清低糖培养基和 4.5 μL Polybrene, 将孔板置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱 30 min; 设置不同感染复数值: 20, 30, 40, 每个感染复数值设 3 个复孔, 计算所需病毒体积, 公式为病毒体积 (mL) = 细胞数 $\times$ 感染复数值 / 病毒滴度, 根据计算出的体积添加病毒, 混匀室温放置 15 min 后置于细胞孵箱中培养; 24 h 后贴壁细胞更换含血清低糖培养基, 培养两三天后, 在荧光显微镜下观察转染细胞情况, 得出该病毒的最佳感染复数值为 40, 故后续转染细胞均选用感染复数 = 40 进行转染。将嘌呤霉素设置为 5 个浓度梯度, 分别为 1, 2, 3, 4, 5 $\mu\text{g/mL}$, 每组设置 3 个复孔。将感染慢病毒的细胞重悬混匀, 将细胞浓度调整为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 每孔 100 μL 细胞悬液, 向每孔加入不同浓度梯度的含嘌呤霉素的培养基 2 mL, 加入嘌呤霉素 1–3 d 后观察不同浓度梯度的细胞生长状态, 当观察到大部分未转染慢病毒的细胞被杀死而对转入慢病毒的细胞无影响时, 此时的嘌呤霉素质量浓度为筛选出的最佳质量浓度; 该实验的最佳嘌呤霉素质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 。构建稳转细胞株后, 选取细胞状态良好且 3 代及以上的稳转细胞用于后续实验。

1.4.4 CCK-8 实验 选取细胞状态良好且 3 代及以上的稳转细胞进行消化, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 按照 5×10^3 /孔的细胞密度接种到 96 孔板, 放于 CO₂ 孵箱中, 在接种后的 1, 2, 3, 4, 5 d 取出相应的 96 孔板, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 孵育 1.5 h, 在酶标仪 450 nm 处检测吸光度值, 每组细胞至少设置 3 个复孔。

1.4.5 划痕实验 选取细胞状态良好且 3 代及以上的稳转细胞进行消化, 以 1×10^5 /孔的细胞密度接种到 6 孔板, 细胞达到约 80% 汇合度, 使用无菌移液器 10 μL 吸头划出无细胞区域, 然后细胞用无血清低糖培养基进一步培养, 在倒置光学显微镜下拍摄培养 24, 48 h 的细胞图像。

1.4.6 茜素红染色及钙含量分析 选取细胞状态良好且 3 代及以上的稳转细胞, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 遍, 1% 茜素红室温染色 1 h, PBS 孵育 15 min, 显微镜下拍照, 弃上清, PBS 洗 3 遍, 加入氯化十六烷基 1 mL 室温孵育 30 min, 吸取上清, 使用酶标仪检测波长 562 nm 处

吸光度值,用氯化十六烷基溶液调零,同时测定未加茜素红的单纯细胞上清吸光度值,每个样本重复3次。最终样本测定吸光度值=样本吸光度值-单纯细胞上清吸光度值。

1.4.7 白细胞介素 1 β 干预 选取细胞状态良好且3代及以上的稳转细胞,分为NC-NGF组,NC-NGF+白细胞介素1 β 组,oe-NGF+白细胞介素1 β 组,NC-NGF组骨髓间充质干细胞正常用含血清低糖培养基培养14 d,NC-NGF+白细胞介素1 β 组和oe-NGF+白细胞介素1 β 组骨髓间充质干细胞用含0.1 ng/mL白细胞介素1 β 的低糖培养基培养14 d。

1.4.8 Western blot 检测相关蛋白表达 按照总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,加入1/4蛋白体积的5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,煮沸变性10 min,待冷却后放入-20 $^{\circ}$ C保存备用。Western blot 步骤:制备SDS-PAGE凝胶,加入蛋白样品和Marker后,将电压调至70 V恒压电泳,待蛋白跑最下方时停止电泳,取出玻板,根据目的蛋白分子质量大小进行切胶,裁剪好合适大小PVDF膜,放入甲醇中浸泡3-5 min,按照“黑胶白膜”的顺序放置凝胶和PVDF膜,制备类似“三明治”结构,放入转膜槽中,倒满电转液,盖好盖子将电流调至295 mA,转膜50 min。转膜结束后将PVDF膜放入封闭液中室温封闭1 h,TBST洗涤,加入一抗[α -GAPDH(1:1 000)、 α -II型胶原(1:1 000)、 α -SOX9(1:500)、 α -X型胶原(1:1 000)、 α -RUNX2(1:1 000)、 α -NGF(1:1 000)],4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜,TBST洗涤,加入二抗[Goat Anti-Rabbit IgG-H&L(HRP)1:6 000]室温孵育1 h,TBST洗涤,ECL化学发光液浸泡PVDF膜后于凝胶成像仪下显影曝光。对目的蛋白的灰度值进行统计分析,计算目的蛋白的相对表达量。

1.5 主要观察指标 ①过表达NGF对骨髓间充质干细胞增殖、迁移的影响;②过表达NGF对骨髓间充质干细胞成骨及成软骨相关蛋白表达的影响;③促炎因子环境下过表达NGF对骨髓间充质干细胞成骨及成软骨相关蛋白表达的影响。

1.6 统计学分析 应用SPSS 29.0统计软件进行数据处理。数值变量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法经过遵义医科大学相关统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 兔骨髓间充质干细胞的形态 首次换液后可见细胞呈集落样生长,继续培养3 d后可见细胞明显增多,细胞数量越加密集,呈纺锤形或梭形,培养至第7天后细胞继续增多,更加密集生长。经过传代处理后,细胞基本长满,见图1。

2.2 兔骨髓间充质干细胞多向分化能力鉴定及免疫荧光鉴定细胞表型 诱导骨髓间充质干细胞向成骨、成软骨、成

脂分化,采用茜素红、阿利新蓝、油红O染色鉴定骨髓间充质干细胞的多向分化能力,茜素红染色可见红色钙结节;阿利新蓝染色可见许多蓝色的颗粒,细胞质染成红色,聚集在一起,形成细胞外基质;油红O染色可见大量的褐色沉着,见图2。免疫荧光染色显示:骨髓间充质干细胞高表达CD29(+)、CD44(+)、CD90(+),不表达CD34(-)、HLA-DR(-),见图3。

2.3 NGF 慢病毒转染构建稳定细胞株 通过Western blot检测验证转染效率,与NC-NGF组相比,oe-NGF组NGF表达上调($P<0.05$),见图4。

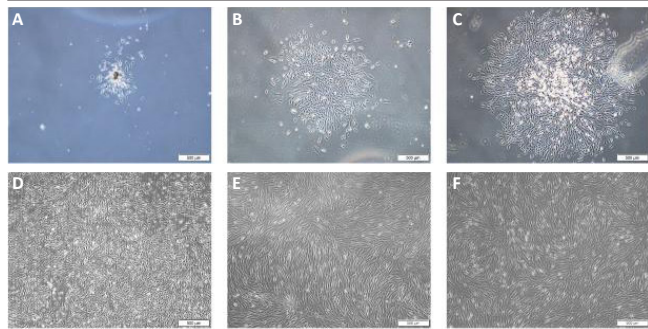
2.4 过表达 NGF 对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响 两组骨髓间充质干细胞增殖活性均显著升高,且oe-NGF组与NC-NGF组相比无显著差异,说明NGF对骨髓间充质干细胞的增殖活性无显著影响,见图5。

2.5 过表达 NGF 对骨髓间充质干细胞迁移能力的影响 细胞划痕实验显示:培养24 h时两组骨髓间充质干细胞较0 h发生迁移,但并无明显区别;培养48 h时oe-NGF组无细胞区域基本被迁移的细胞填满,而NC-NGF组虽较24 h迁移的细胞增多,但较oe-NGF组无细胞区域较大,说明NGF可以促进骨髓间充质干细胞的迁移,见图6。

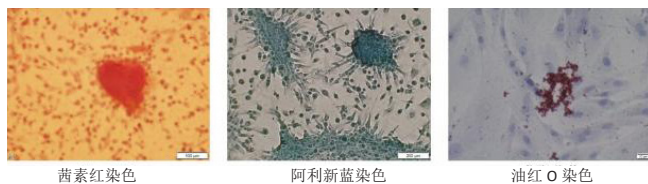
2.6 过表达 NGF 对骨髓间充质干细胞成骨及成软骨相关蛋白表达的影响 Western blot检测成软骨分化相关蛋白II型胶原、SOX9和肥大分化相关蛋白X型胶原、RUNX2的表达,与NC-NGF组相比,oe-NGF组成软骨相关蛋白II型胶原、SOX9表达上调($P<0.05$),肥大分化相关蛋白X型胶原、RUNX2表达下调($P<0.05$),见图7。

2.7 过表达 NGF 减弱白细胞介素 1 β 对骨髓间充质干细胞软骨表型稳定的影响 Western blot检测成软骨分化相关蛋白II型胶原、Sox9和肥大分化相关蛋白X型胶原、Runx2的表达,与NC-NGF组相比,NC-NGF+白细胞介素1 β 组成软骨相关蛋白II型胶原、SOX9表达下调($P<0.05$),肥大分化相关蛋白X型胶原、RUNX2表达上调($P<0.05$);与NC-NGF+白细胞介素1 β 组相比,oe-NGF+白细胞介素1 β 组成软骨相关蛋白II型胶原、SOX9表达上调($P<0.05$),肥大相关蛋白X型胶原、RUNX2表达下调($P<0.05$),见图8。

2.8 过表达 NGF 减弱白细胞介素 1 β 引起骨髓间充质干细胞的肥大分化 与NC-NGF组相比,oe-NGF组骨髓间充质干细胞的钙含量降低($P<0.05$),表明NGF可以抑制骨髓间充质干细胞的肥大分化;与NC-NGF组相比,NC-NGF+白细胞介素1 β 组骨髓间充质干细胞的钙含量升高($P<0.05$);与NC-NGF+白细胞介素1 β 组相比,oe-NGF+白细胞介素1 β 组骨髓间充质干细胞的钙含量下降($P<0.05$),表明NGF可以减弱白细胞介素1 β 引起骨髓间充质干细胞的肥大分化,见图9。

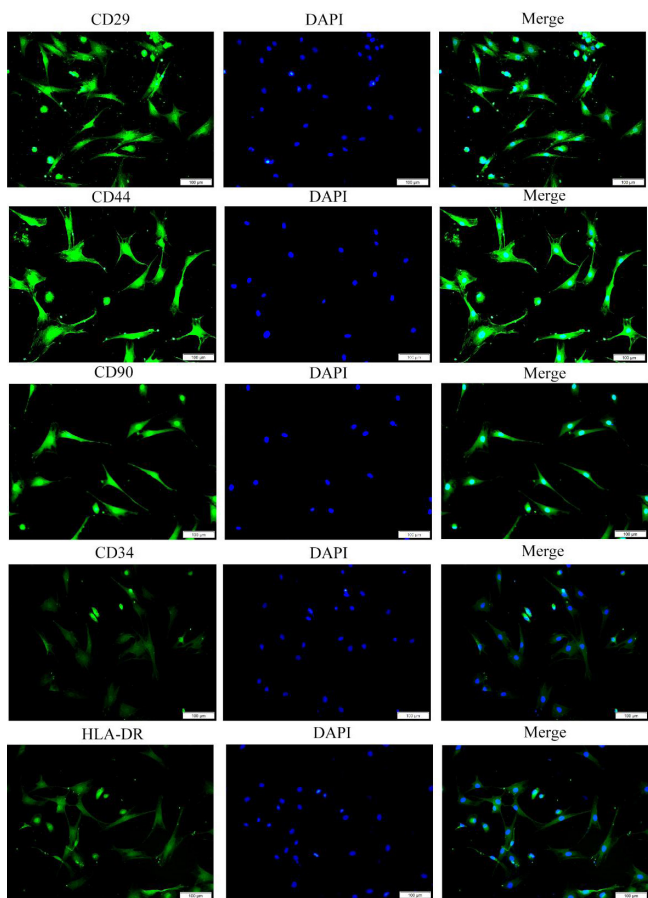


图注: 图 A-C 为原代细胞培养 1, 3, 7 d; D-F 为第 1, 2, 3 代细胞。
图 1 | 兔骨髓间充质干细胞培养不同时间点的形态变化 (标尺 = 500 μm)
Figure 1 | Morphological changes in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells at different time points in culture (scale bars=500 μm)

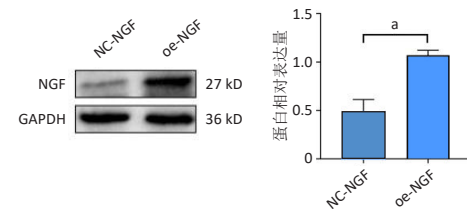


图注: 成骨分化后茜素红染色可见红色钙结节, 标尺 = 100 μm; 成软骨分化后阿利新蓝染色可见许多蓝色的颗粒, 细胞聚集在一起, 形成细胞外基质, 标尺 = 200 μm; 成脂分化后油红 O 染色可见褐色沉着, 标尺 = 20 μm。
图 2 | 兔骨髓间充质干细胞的多向分化能力
Figure 2 | Multidirectional differentiation capacity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

Figure 2 | Multidirectional differentiation capacity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells



图注: CD29(+), CD44(+), CD90(+) 表达阳性, CD34(-), HLA-DR(-) 表达阴性。
图 3 | 免疫荧光检测兔骨髓间充质干细胞表面 CD29、CD44、CD90、CD34、HLA-DR 的表达 (标尺 = 100 μm)
Figure 3 | Immunofluorescence detection of CD29, CD44, CD90, CD34, HLA-DR expression on surface of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells



图注: 与 NC-NGF 组相比, oe-NGF 组 NGF 表达上调, ^a $P < 0.05$ 。

图 4 | Western blot 检测神经生长因子 (NGF) 转染效率

Figure 4 | Western blot assay to verify transfection efficiency of nerve growth factor

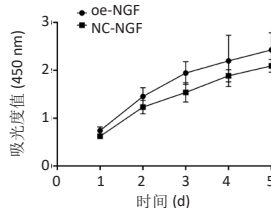


图 5 | 神经生长因子 (NGF) 对骨髓间充质干细胞增殖活性无显著影响

Figure 5 | Effect of nerve growth factor on the proliferative activity of bone marrow mesenchymal stem cells

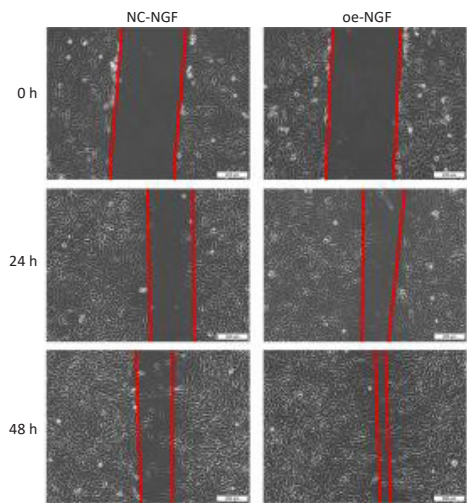
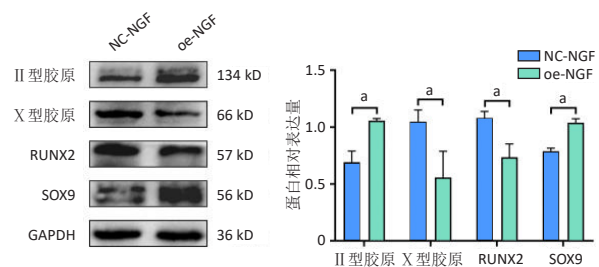


图 6 | 过表达神经生长因子 (NGF) 对骨髓间充质干细胞迁移能力的影响 (标尺 = 200 μm)

Figure 6 | Effect of overexpression of nerve growth factor on the migration capacity of bone marrow mesenchymal stem cells (scale bars=200 μm)



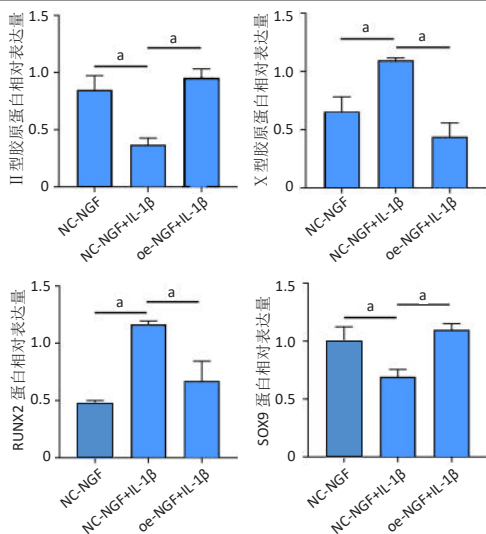
图注: ^a $P < 0.05$. NGF: 神经生长因子。

图 7 | Western blot 检测骨髓间充质干细胞中成软骨和肥大分化相关蛋白表达

Figure 7 | Western blot detection of chondrogenic and osteogenic-related protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells

3 讨论 Discussion

间充质干细胞的增殖、多向分化、迁移和免疫调节活性等生物学特性因体内环境以及分离和扩增方法而异, 不同组织分离的间充质干细胞之间也有所不同^[23]。此外, 第 8-15 代间充质干细胞开始退化并显示出一些细胞衰老迹象, 例如细胞体积较大、汇合度降低、增殖速度较慢、多向分化潜力减弱以及分子谱发生变化^[24]。因此间充质干细胞来源的软骨细胞易肥大分化被认为是阻碍软骨修复的主要原因^[25-26]。



图注: $^aP < 0.05$ 。NGF: 神经生长因子; IL-1 β : 白细胞介素 1 β 。

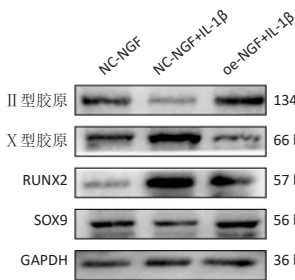
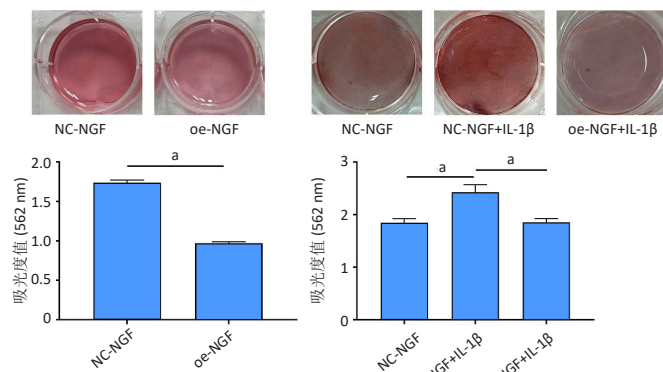


图 8 | Western blot 检测各组骨髓间充质干细胞成软骨和肥大分化相关蛋白表达

Figure 8 | Western blot detection of chondrogenic and osteogenic-related protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells of each group



图注: $^aP < 0.05$ 。NGF: 神经生长因子; IL-1 β : 白细胞介素 1 β 。

图 9 | 茜素红染色测定各组骨髓间充质干细胞中钙含量

Figure 9 | Calcium content of bone marrow mesenchymal stem cells in each group as determined by alizarin red staining

间充质干细胞成软骨分化过程涉及多种细胞因子, SOX9 是软骨细胞中的关键转录因子, 贯穿软骨细胞发育的各个阶段, 有研究表明 SOX9 在骨关节炎中下调, 也会随年龄增长显著降低, 而 SOX9 缺乏不会干扰关节形成和发展的过程, 但在承重区域, 它会在祖细胞阶段引起软骨细胞到成骨细胞的转化^[27-28]。软骨细胞外基质为软骨细胞提供物理支撑并调节许多细胞过程, 它的降解是骨关节炎软骨组织丧失的基础^[29], 软骨细胞外基质破坏和异常稳态作为软骨再生的治疗靶点越来越受到关注。II 型胶原不仅是软骨细胞外基质的重要有机成分之一^[30], 也是构成软骨细胞外基质的结构框架^[31]。综上所述, SOX9 和 II 型胶原对于软骨细胞的表型稳定起着关键作用。与

之相反的是间充质干细胞肥大分化, 不仅会破坏软骨细胞表型的稳定, 也会加速软骨细胞矿化和程序性死亡^[32], 并且不会产生透明软骨 (关节软骨的主要类型)^[33], 多项研究表明, RUNX2 在间充质干细胞肥大分化过程中表达上调, RUNX2 的表达与肥大分化指标 X 型胶原的表达增加密切相关, 二者使关节软骨中的蛋白聚糖减少, 钙化软骨区扩大^[34]。在该研究中, 慢病毒转染过表达 NGF 后 SOX9 和 II 型胶原表达上调, 而 RUNX2 和 X 型胶原表达降低, 表明 NGF 能维持骨髓间充质干细胞软骨表型的稳定, 抑制骨髓间充质干细胞的肥大分化, 体现了对骨髓间充质干细胞积极成软骨分化的作用。

有研究指出, 促炎细胞因子白细胞介素 1 β 在骨关节炎中大量表达^[35], 白细胞介素 1 β 在体外和体内影响软骨降解酶的产生, 抑制细胞外基质的合成, 并刺激骨关节炎组织中其他促炎细胞因子的表达^[36], 从而加速骨关节炎的发展。另外, 白细胞介素 1 β 刺激可诱导骨关节炎软骨细胞进行性增殖和肥大^[37], 促进软骨细胞的矿化和分解代谢^[38]。该研究结果显示, 加入白细胞介素 1 β 后, 肥大分化相关蛋白 (X 型胶原、RUNX2) 上调, 成软骨相关蛋白 (II 型胶原、SOX9) 下调, 而过表达 NGF 后可以减弱由白细胞介素 1 β 引起的肥大相关蛋白上调和成软骨相关蛋白下调, 表明 NGF 可以减轻关节软骨退化和软骨下骨破坏, 更好地保护关节软骨。

越来越多的研究表明, 内源性间充质干细胞从骨髓迁移到外周血和外周组织, 以应对损伤或各种病理状况, 并且损伤组织的再生能力取决于迁移细胞的再生能力^[39-40]。该研究发现与 NC-NGF 组相比, oe-NGF 组 48 h 的迁移细胞明显增多, 这表明 NGF 可以促进骨髓间充质干细胞的迁移。

综上所述, 神经生长因子可以促进骨髓间充质干细胞的成软骨分化, 增强迁移能力, 并且减弱由白细胞介素 1 β 引起的关节软骨退化和破坏, 抑制骨髓间充质干细胞的肥大分化。NGF 可作为组织工程中的生长因子并期望应用于软骨损伤修复。

作者贡献: 实验设计为杨治航, 实验实施为杨治航、孙祖延、万喻、陈仕达, 实验评估和总体指导为邓江、黄文良, 资料收集为杨治航。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] HAWKER GA. Osteoarthritis is a serious disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37 Suppl 120(5):3-6.
- [2] CHARLIER E, DEROYER C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochem Pharmacol*. 2019;165:49-65.
- [3] TONG L, YU H, HUANG X, et al. Current understanding of osteoarthritis pathogenesis and relevant new approaches. *Bone Res*. 2022;10(1):60.
- [4] LI Z, HUANG Z, BAI L. Cell Interplay in Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:720477.
- [5] KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):33-42.
- [6] SINGH YP, BANDYOPADHYAY A, MANDAL BB. 3D Bioprinting Using Cross-Linker-Free Silk-Gelatin Bioink for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(37):33684-33696.
- [7] MITHOEFER K, MCADAMS T, WILLIAMS RJ, et al. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med*. 2009;37(10):2053-2063.
- [8] MITHOEFER K, WILLIAMS RJ 3RD, WARREN RF, et al. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(9):1911-1920.
- [9] GLENN RE JR, MCCARTY EC, POTTER HG, et al. Comparison of fresh osteochondral autografts and allografts: a canine model. *Am J Sports Med*. 2006;34(7):1084-1093.
- [10] HARRIS JD, SISTON RA, PAN X, et al. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(12):2220-2233.
- [11] ARTHUR A, GRONTHOS S. Clinical Application of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Repair Skeletal Tissue. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9759.
- [12] FREBEL K, WIESE S. Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 6):1287-1290.
- [13] RIVERA KO, RUSSO F, BOILEAU RM, et al. Local injections of β -NGF accelerates endochondral fracture repair by promoting cartilage to bone conversion. *Sci Rep*. 2020;10(1):22241.
- [14] ZHENG MG, SUI WY, HE ZD, et al. TrkA regulates the regenerative capacity of bone marrow stromal stem cells in nerve grafts. *Neural Regen Res*. 2019;14(10):1765-1771.
- [15] XU J, LI Z, TOWER RJ, et al. NGF-p75 signaling coordinates skeletal cell migration during bone repair. *Sci Adv*. 2022;8(11):eab5716.
- [16] KOLLI S, BOJIC S, GHAREEB AE, et al. The Role of Nerve Growth Factor in Maintaining Proliferative Capacity, Colony-Forming Efficiency, and the Limbal Stem Cell Phenotype. *Stem Cells*. 2019;37(1):139-149.
- [17] WISE BL, SEIDEL MF, LANE NE. The evolution of nerve growth factor inhibition in clinical medicine. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(1):34-46.
- [18] CHARTIER SR, MITCHELL SA, MAJUTA LA, et al. Immunohistochemical localization of nerve growth factor, tropomyosin receptor kinase A, and p75 in the bone and articular cartilage of the mouse femur. *Mol Pain*. 2017;13:1744806917745465.
- [19] WEI J, SU W, ZHAO Y, et al. Maresin 1 promotes nerve regeneration and alleviates neuropathic pain after nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):32.
- [20] DAI WL, YAN B, BAO YN, et al. Suppression of peripheral NGF attenuates neuropathic pain induced by chronic constriction injury through the TAK1-MAPK/NF- κ B signaling pathways. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):66.
- [21] ILAS DC, BABOOLAL TG, CHURCHMAN SM, et al. The osteogenic commitment of CD271+CD56+ bone marrow stromal cells (BMSCs) in osteoarthritic femoral head bone. *Sci Rep*. 2020;10(1):11145.
- [22] ILAS DC, CHURCHMAN SM, BABOOLAL T, et al. The simultaneous analysis of mesenchymal stem cells and early osteocytes accumulation in osteoarthritic femoral head sclerotic bone. *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(10):1777-1783.
- [23] PITTENGER MF, DISCHER DE, PÉAULT BM, et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med*. 2019;4:22.
- [24] NANTAVISAI S, EGUSA H, OSATHANON T, et al. Mesenchymal stem cell-based bone tissue engineering for veterinary practice. *Heliyon*. 2019;5(11):e02808.
- [25] LV S, XU J, CHEN L, et al. MicroRNA-27b targets CBFB to inhibit differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into hypertrophic chondrocytes. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):392.
- [26] BERTRAND J, KRÄFT T, GRONAU T, et al. BCP crystals promote chondrocyte hypertrophic differentiation in OA cartilage by sequestering Wnt3a. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(7):975-984.
- [27] HASEEB A, KC R, ANGELOZZI M, et al. SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(8):e2019152118.
- [28] SONG H, PARK KH. Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. *Semin Cancer Biol*. 2020;67(Pt 1):12-23.
- [29] SHI Y, HU X, CHENG J, et al. A small molecule promotes cartilage extracellular matrix generation and inhibits osteoarthritis development. *Nat Commun*. 2019;10(1):1914.
- [30] LAN W, XU M, ZHANG X, et al. Biomimetic polyvinyl alcohol/type II collagen hydrogels for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2020;31(9):1179-1198.
- [31] BAY-JENSEN AC, MOBASHERI A, THUDIUM CS, et al. Blood and urine biomarkers in osteoarthritis- an update on cartilage associated type II collagen and aggrecan markers. *Curr Opin Rheumatol*. 2022;34(1):54-60.
- [32] SOMOZA RA, WELTER JF, CORREA D, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(6):596-608.
- [33] LARSON BL, YU SN, PARK H, et al. Chondrogenic, hypertrophic, and osteochondral differentiation of human mesenchymal stem cells on three-dimensionally woven scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(8):1453-1465.
- [34] CHEN D, KIM DJ, SHEN J, et al. Runx2 plays a central role in Osteoarthritis development. *J Orthop Translat*. 2019;23:132-139.
- [35] CHIEN SY, TSAI CH, LIU SC, et al. Noggin Inhibits IL-1 β and BMP-2 Expression, and Attenuates Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Destruction in Experimental Osteoarthritis. *Cells*. 2020;9(4):927.
- [36] MCALLISTER MJ, CHEMALY M, EAKIN AJ, et al. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(5):612-619.
- [37] WANG BW, JIANG Y, YAO ZL, et al. Aucubin Protects Chondrocytes Against IL-1 β -Induced Apoptosis In Vitro And Inhibits Osteoarthritis In Mice Model. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:3529-3538.
- [38] JIN J, LV X, WANG B, et al. Limonin Inhibits IL-1 β -Induced Inflammation and Catabolism in Chondrocytes and Ameliorates Osteoarthritis by Activating Nrf2. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:7292512.
- [39] FU X, LIU G, HALIM A, et al. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*. 2019;8(8):784.
- [40] NAM D, PARK A, DUBON MJ, et al. Coordinated Regulation of Mesenchymal Stem Cell Migration by Various Chemotactic Stimuli. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8561.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)