

TGF- β 3 和 BMP-7 腺病毒共转染兔骨髓间充质干细胞向类髓核细胞分化的研究

康健, 侯洋, 周许辉, 杨立利, 陈华江, 唐先业, 袁文

(上海长征医院骨科 200003 上海市)

【摘要】目的:探讨利用转基因技术构建的转化生长因子 β 3(transforming growth factor beta 3, TGF- β 3)和骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP-7) 重组腺病毒转染兔骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchyme stem cells, BMSCs), 诱导其向类髓核细胞分化的可行性。**方法:**将培养获得的 BMSCs 分成 5 组, A:空白对照组, B:免疫荧光对照组, C:TGF- β 3 单独转染组, D:BMP-7 单独转染组, E:TGF- β 3+BMP-7 共转染组。利用转基因技术构建的 TGF- β 3 和 BMP-7 重组腺病毒对 BMSCs 进行转染, 荧光显微镜观察其转染效率, 培养 14d 后, 再以 Western-Blot 方法检测 A、C、D、E 组细胞 TGF- β 3 和 BMP-7 蛋白分泌情况, 以 Realtime PCR 方法检测各组蛋白聚糖 (ACAN)、I 型胶原 (Collagen I)、II 型胶原 (Collagen II)、X 型胶原 (Collagen X)、SOX9 基因表达水平, 明确腺病毒转染后兔骨髓间充质干细胞的分化情况。**结果:**以 TGF- β 3 和 BMP-7 重组腺病毒转染兔 BMSCs 后常规 DMEM 培养基培养 14d, 细胞形态出现明显变化, 圆形及椭圆形细胞明显增多。Western blot 方法检测, 共转染组 TGF- β 3 和 BMP-7 蛋白表达水平明显增高。培养 14d 时, Realtime PCR 检测 ACAN、Collagen I、Collagen II、SOX9 基因的表达水平转染组 (C、D、E 组) 较对照组 (A、B 组) 明显升高 ($P < 0.05$), 其中 Collagen I 和 SOX9 表达单独转染组 (C、D 组) 与共转染组 (E 组) 比较差异无显著性 ($P > 0.05$), Collagen II 表达共转染组较单独转染组明显增高 ($P < 0.05$)。TGF- β 3 单独转染组和共转染组的 Collagen X 基因表达较 BMP-7 单独转染组和对照组明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:**转基因技术重组 TGF- β 3 和 BMP-7 腺病毒可成功转染兔 BMSCs, 获得 TGF- β 3 和 BMP-7 蛋白的表达。TGF- β 3 和 BMP-7 腺病毒共转染兔 BMSCs 后, 可有效诱导兔 BMSCs 向类髓核细胞方向分化。

【关键词】 TGF- β 3; BMP-7; 骨髓间充质干细胞; 腺病毒; 种子细胞

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2014.02.11

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2014)-02-0157-07

Differentiation of rabbit bone marrow mesenchyme stem cells co-transfected by TGF- β 3 and BMP-7 adenoviral vectors into nucleus pulposus-like cells/KANG Jian, HOU Yang, ZHOU Xuhui, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(2): 157-163

【Abstract】 Objectives: To induce rabbit bone marrow mesenchyme stem cells (BMSCs) differentiating into nucleus pulposus-like cells (NPCs) by co-transfecting with TGF- β 3 and BMP-7 adenoviral vectors. **Methods:** BMSCs were divided into five groups: A, blank control group; B, transfected by blank GFP adenoviral vector group; C, transfected by TGF- β 3 adenoviral vector group; D, transfected by BMP-7 adenoviral vector group; E, co-transfected by TGF- β 3 and BMP-7 adenoviral vectors group. The transfection result was observed by fluorescence microscope. After 14 days' cultivation, the expressions of TGF- β 3 and BMP-7 protein (group A, C, D, E) and ACAN, Collagen I, Collagen II, Collagen X and SOX9 (all group) in mRNA level were measured by Western blot and Realtime PCR respectively. **Results:** 14 days after culture of co-transfected BMSCs, the shape of most cells changed obviously. Western blot showed higher expression of TGF- β 3 and BMP-7 proteins in group E. The expressions of ACAN, Collagen I, Collagen II and SOX9 gene were much higher than those control group (group A, B) ($P < 0.05$), and the expression of Collagen II in co-transfected

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81071509)

第一作者简介: 男 (1983-), 医学博士, 研究方向: 脊柱外科 (现在济南军区总医院骨病科)

电话: (021)81886806 E-mail: 9696392@qq.com

通讯作者: 袁文 E-mail: yuanwen214@163.com

group was higher compared with single-transfected groups ($P < 0.05$). The expression of Collagen X in TGF- β 3 transfected group and co-transfected group was obviously lower than that of BMP-7 transfected group and control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** The rabbit BMSCs are able to express TGF- β 3 and BMP-7 proteins and differentiate into NPCs after co-transfected by TGF- β 3 and BMP-7 adenoviral vectors.

【Key words】 BMSCs; Adenovirus; TGF- β 3; BMP-7; Seed cell

【Author's address】 Department of Spine Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchyme stem cells, BMSCs) 具有向多种细胞分化的能力, 合适的微环境及环境中相关细胞因子的存在是 BMSCs 定向分化的前提。单纯利用转化生长因子 β 3 (transforming growth factor beta 3, TGF- β 3) 和骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP-7) 注入细胞培养环境进行诱导, 存在价格昂贵、代谢速度快、降解失活、浓度不易稳定控制等多种缺点^[1-4]。而利用转基因技术将 TGF- β 3 和 BMP-7 基因转入 BMSCs, 对其进行功能改造, 以期使其在生长、繁殖过程中能够同时具备分泌 TGF- β 3 和 BMP-7 蛋白的能力, 通过自分泌、旁分泌等方式较长时间地高效表达 TGF- β 3 和 BMP-7 生长因子, 从而有效地诱导 BMSCs 向类髓核细胞 (NPCs) 定向分化, 获得构建组织工程髓核所需要的种子细胞, 已经成为研究热点。我们利用转基因技术构建的 TGF- β 3 和 BMP-7 重组腺病毒转染兔 BMSCs, 观察了诱导其向类髓核细胞分化的可行性, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

BMP-7 重组腺病毒、TGF- β 3 重组腺病毒 (上海鸿鸣生物构建)、Trizol (Invitrogen)、BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo)、一抗 (SIGMA)、羊抗兔二抗 (santa cruz Biotechnology, Inc.)、HRP 直标 GAPDH 单抗 (上海康成生物工程公司)、微量分光光度计 (GE Healthcare)、PCR 仪 (BIO-RAD)、电泳系统 (BIO-RAD)、成像仪 (BIO-RAD)、新西兰兔 (上海生旺实验动物养殖有限公司)。

1.2 兔 BMSCs 的分离培养

以全骨髓贴壁法分离兔 BMSCs, 每日在显微镜下观察细胞形态, 待原代细胞爬满瓶底时, 进行细胞传代培养。传代前用 0.25% 的胰蛋白酶消化 5min 后得到细胞悬液。

1.3 实验分组

将分离培养并传至第 3 代的兔 BMSCs 分为五组, 分别为: A (空白对照组), 单纯兔 BMSCs 以 10% FBS 的 DME-LG 培养基培养; B (免疫荧光对照组), 兔 BMSCs 转染无目的基因的 GFP 腺病毒, 1d 后换液, 以 10% FBS 的 DME-LG 培养基培养; C (BMP-7 单独转染组), 兔 BMSCs 以 MOI 值 90 进行 BMP-7 重组腺病毒转染, 1d 后换液, 以 10% FBS 的 DME-LG 培养基培养; D (TGF- β 3 单独转染组), 兔 BMSCs 以 MOI 值 90 进行 TGF- β 3 重组腺病毒转染, 1d 后换液, 以 10% FBS 的 DME-LG 培养基培养; E (共转染组), 兔 BMSCs 以 MOI 值 90 进行 BMP-7 和 TGF- β 3 重组腺病毒共转染, 1d 后换液, 以 10% FBS 的 DME-LG 培养基培养。

1.4 重组腺病毒转染兔 BMSCs

取第 3 代的兔 BMSCs, 将细胞以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度分别接种于 5 个 6 孔板上, 每板三孔细胞, 当细胞 80% 贴壁时, 调整病毒剂量, 获得转染复数值 (MOI) 为 90 的病毒液各 600 μl , 将第一板加入 10% FBS 的 DMEM-LG 培养基, 第二板中加入无目的基因的 GFP 空白腺病毒, 第三板中加入 BMP-7 腺病毒稀释液, 第四板加入 TGF- β 3 腺病毒稀释液, 第五板同时加入 BMP-7 腺病毒和 TGF- β 3 腺病毒稀释液, 于 37°C、5% CO_2 环境下培养 24h 后更换新鲜培养液, 此后每 2d 换液 1 次, 连续培养 14d。将转染重组腺病毒 (带 GFP 荧光标记) 后的兔 BMSCs 培养 48h 后, 以荧光显微镜观察病毒转染效率。

1.5 转染后兔 BMSCs 目的蛋白的分泌情况

将培养 14d 的 A、C、D、E 组细胞 PBS 清洗后, 以 Western-Blot 方法检测其中 BMP-7 和 TGF- β 3 蛋白的表达情况, 并用 Gel-Pro Analyzer 软件扫描各条带光密度值: 荧光强度值 = 检测条带光密度值 / 内参条带 (GAPDH) 光密度值, 以明确转染后目的蛋白的表达效果。

1.6 转染后兔 BMSCs 下游基因的表达情况

将培养 14d 的五组细胞 PBS 清洗后, 加入 Trizol 试剂提取细胞中的 RNA, 再使用 First Strand cDNA Synthesis Kit 将其逆转录为 cDNA, 然后以 cDNA 为模板, 进行 Realtime PCR 反应, 检测 ACAN、Collagen I、Collagen II、Collagen X、SOX9 基因的表达情况。引物序列见表 1。

1.7 统计学处理

将所得实验结果, 以 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 先行组间的单因素方差分析(ANOVA), 再以 Bonferroni 法行两两之间的多重比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 兔 BMSCs 分离培养结果

原代细胞接种后, 细胞多呈现圆球形, 大小不均一, 呈散在分布, 悬浮于培养液中, 大约 2 周细胞已基本融合, 细胞之间相互重叠, 细胞排列紧密, 细胞大小、形态均一。传代细胞在培养瓶中均匀分布后呈贴壁生长, 细胞间形态较为一致, 呈纺锤形外观。

2.2 重组腺病毒转染兔 BMSCs 后细胞生长情况

转染 48h 后以荧光显微镜观察重组腺病毒的转染效率, 可见腺病毒转染率较高, 转染效果良好(图 1)。培养 14d 后, 显微镜下观察发现部分细胞变为椭圆形、圆形和不规则形, 在 BMP-7 单独转染组中可见少量长梭形细胞出现, 在共转染组中圆形和椭圆形细胞明显增多, 仅见少量梭形细胞。

2.3 重组腺病毒转染兔 BMSCs 后目的蛋白分泌情况

将转染 BMP-7 和 TGF- β 3 重组腺病毒后的兔 BMSCs 于 37℃、5%CO₂ 环境下培养 14d 后, 行

Western-Blot 检测, 检测结果见图 2、表 2。由检测结果可以看出, 对于样本的 BMP-7 蛋白表达来看, BMP-7 和 TGF- β 3 重组腺病毒共转染后的兔 BMSCs, 比较空白对照组蛋白表达量明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对比 BMP-7 和 TGF- β 3 重组腺病毒单独转染组并无明显差异 ($P > 0.05$), 推断可能 TGF- β 3 基因存在一定的促进细胞释放 BMP-7 蛋白的作用。样本的 TGF- β 3 蛋白表达结果显示, 共转染组对比空白对照组和 BMP-7 腺病毒单独转染组蛋白表达量明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而较 TGF- β 3 转染组, TGF- β 3 蛋白表达并无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.4 腺病毒转染兔 BMSCs 后下游基因表达情况

在以 BMP-7 和 TGF- β 3 腺病毒转染兔 BMSCs 后 14d, 采用 Realtime PCR 方法对 ACAN、Collagen I、II、X、SOX9 基因进行定量检测, 结果显示, BMP-7 单独转染组、TGF- β 3 单独转染组和共转染组的 ACAN、Collagen I、Collagen II 和 SOX9 基因表达水平较对照组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TGF- β 3 单独转染组和共转染组的 Collagen X 基因表达较 BMP-7 单独转染组和对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。通过 BMP-7 单独转染组、TGF- β 3 单独转染组和共转染组三组对比发现, ACAN 表达 BMP-7 组略高, 但三组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SOX9 表达三组基本相同, Collagen I 表达共转染组最高, BMP-7 组次之, TGF- β 3 组最低, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Collagen II 表达共转染组最高, TGF- β 3 组次之, 三者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 1 Realtime PCR 相关基因引物序列
Table 1 Sequences of Primers in Real time PCR

基因 (Gene)	引物序列 (Sequences of primers)	基因序列编码 (The number of gene)
蛋白聚糖 (ACAN)	正义链 (sense strand): CACCCGAGAATCAAATGG 反义链 (antisense strand): GTTGGGACGAGACCTT	XM_002723376
Collagen I	正义链 (sense strand): CTACCAACTTGCCTTCATGC 反义链 (antisense strand): TGTCTTCCCATTCATTGTC	NM_001195668
Collagen II	正义链 (sense strand): GGCTCCAGAACATCACCTAC 反义链 (antisense strand): CAGTCTTGCCCCACTTACCG	NM_001195671
Collagen X	正义链 (sense strand): ACTCCCATTCATTGATAAG 反义链 (antisense strand): TACAGGCGTGCCATTCTT	XM_002714724
SOX9	正义链 (sense strand): CCAGGTGCTCAAGGGCTACG 反义链 (antisense strand): CGGCTGCTCTTCTTGCTGCTG	XM_002719499
家兔 β -actin (LOC100348739)	正义链 (sense strand): CATCCACGAGACCACCTTCA 反义链 (antisense strand): CGTGCTCCTGCTTGCTGA	XR_085044

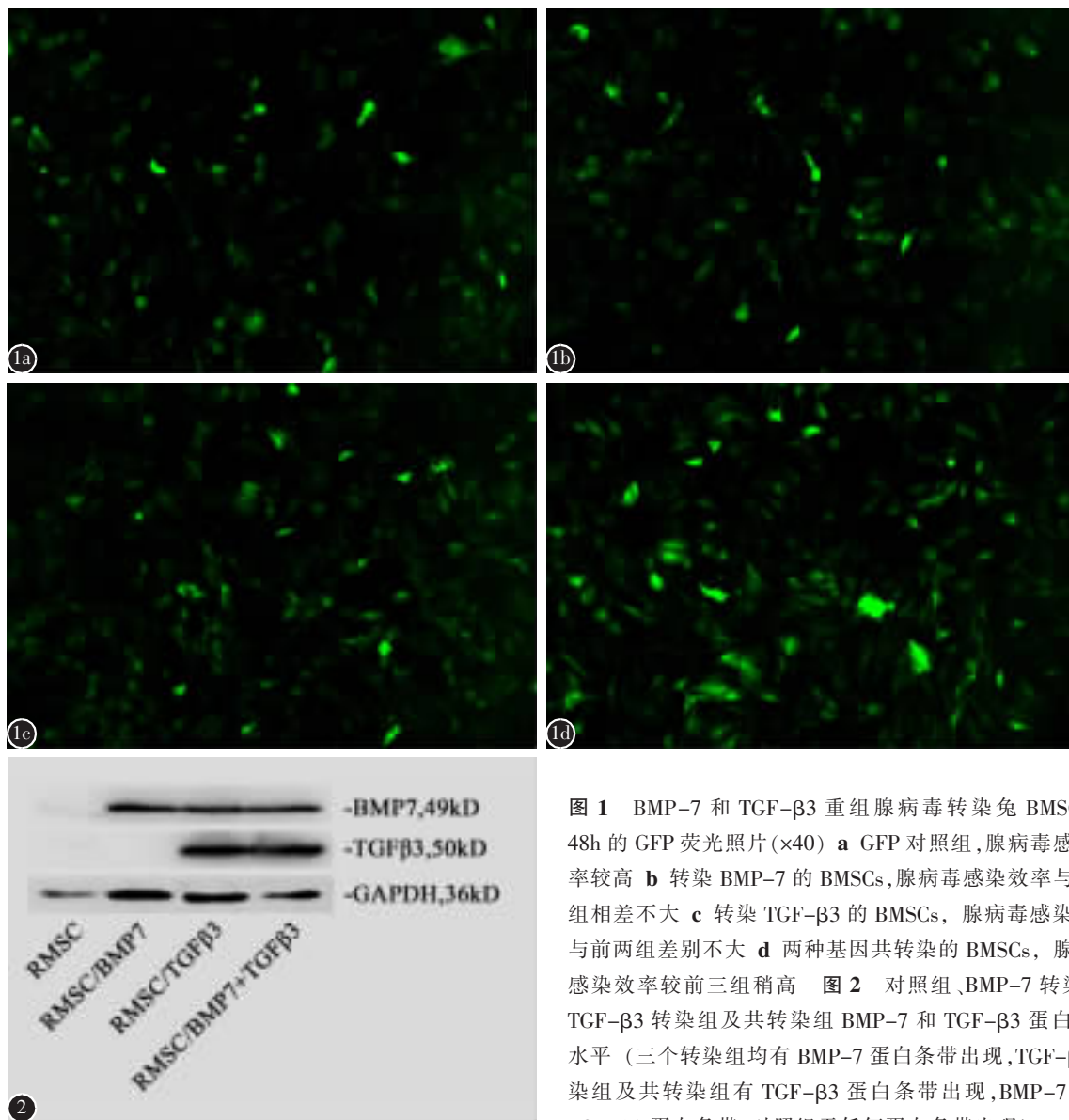


图 1 BMP-7 和 TGF- β 3 重组腺病毒转染兔 BMSCs 后 48h 的 GFP 荧光照片($\times 40$) a GFP 对照组,腺病毒感染效率较高 b 转染 BMP-7 的 BMSCs,腺病毒感染效率与对照组相差不大 c 转染 TGF- β 3 的 BMSCs,腺病毒感染效率与前两组差别不大 d 两种基因共转染的 BMSCs,腺病毒感染效率较前三组稍高 图 2 对照组、BMP-7 转染组、TGF- β 3 转染组及共转染组 BMP-7 和 TGF- β 3 蛋白表达水平(三个转染组均有 BMP-7 蛋白条带出现,TGF- β 3 转染组及共转染组有 TGF- β 3 蛋白条带出现,BMP-7 组无 TGF- β 3 蛋白条带,对照组无任何蛋白条带出现)

Figure 1 GFP fluorescence photos of BMSCs transfected by adenoviral vectors with TGF- β 3 and BMP-7 48 hours after transfection($\times 40$) a Control group, a high transfection efficiency of adenovirus had been observed b BMSCs transfected by adenoviral vectors with BMP-7 group, a similar transfection efficiency of control group had been observed c BMSCs transfected by adenoviral vectors with TGF- β 3 group, a similar transfection efficiency of previous two groups had been observed d BMSCs co-transfected by adenoviral vectors with TGF- β 3 and BMP-7 group, a higher transfection efficiency than previous three groups had been observed **Figure 2** Expression level of BMP-7 and TGF- β 3 proteins in four groups (Three transfected groups express BMP-7 protein, TGF- β 3 group and co-transfected group express TGF- β 3 protein, control group express none of these two proteins)

3 讨论

骨髓间充质干细胞(BMSCs)向类髓核细胞的诱导分化过程需要多种细胞因子的参与,并且需要在适宜的微环境中才能进行。以往研究采用直接将细胞因子加入到细胞培养液进行骨髓间充质干细胞的诱导分化,存在很多缺点,如体外诱导过

程中,生长因子的浓度较难控制,体内诱导过程中部分生长因子不能耐受体内环境、降解速度加快、诱导时间过短等问题。这种方法在实验研究及以后的临床应用中受到很大的制约。本实验采用基因转染技术,将 TGF- β 3 和 BMP-7 基因转入兔 BMSCs 中,使其能够分泌 TGF- β 3 和 BMP-7 细

表 2 兔 BMSCs 转染后 BMP-7 与 TGF- β 3 蛋白表达荧光强度值**Table 2** Immunofluorescence intensity of BMP-7 and TGF- β 3 protein in four groups

IOD值 (IOD value)	分组 (Group)			
	A	C	D	E
BMP7/GAPDH	1.0000	20.7661 ^①	20.9967 ^①	21.9782 ^①
TGF- β 3/GAPDH	1.0000	0.9286	79.3991 ^{①②}	71.9437 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.05$, ②与 C 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with group A, $P<0.05$, ②Compared with group C, $P<0.05$

胞因子,并使两种细胞因子能够获得长效稳定的表达,从而使其在细胞周围环境及胞浆中维持稳定的浓度,经过体外细胞培养,诱导 BMSCs 分化为类髓核细胞,从而为组织工程髓核的构建提供合适的种子细胞。

本实验选取腺病毒作为载体,主要因为腺病毒载体具有以下优点^[5-7]:(1)宿主范围广,对人致病性低,70%~80%的成人體內都有腺病毒中和抗体在,感染后一般仅会产生轻微的自限症状,病毒唑治疗有效,且本实验中选用的转录复制缺陷型腺病毒作为载体,最大程度降低了病毒的潜在危

表 3 转染 BMP-7 腺病毒和 TGF- β 3 腺病毒 14d 后相关基因的表达**Table 3** Expression level of relative genes 14 days after transfection in five groups

基因 (Gene)	分组 (Group)				
	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D	E组 Group E
蛋白聚糖 (ACAN)	1.0000	0.8266	28.2467 ^{①②}	20.2706 ^{①②}	22.7549 ^{①②}
I 型胶原 (Collagen I)	1.0000	0.9548	57.1924 ^{①②}	45.5733 ^{①②}	92.1954 ^{①②}
II 型胶原 (Collagen II)	1.0000	0.9633	65.7440 ^{①②}	147.2684 ^{①②③}	255.5941 ^{①②③}
X 型胶原 (Collagen X)	1.0000	0.9048	1.6960 ^{①②}	0.0298 ^{①②③}	0.2190 ^{①②③}
SOX9	1.0000	1.5631	23.0444 ^{①②}	24.2791 ^{①②}	24.1407 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.05$, ②与 B 组比较 $P<0.05$, ③与 C 组比较 $P<0.05$,Note: ①Compared with group A, $P<0.05$, ②Compared with group B, $P<0.05$, ③Compared with group C, $P<0.05$

害,为将来动物体内试验以及更进一步的临床试验提供了基础。(2)腺病毒能感染除了一些抗腺病毒感染的淋巴瘤细胞外的几乎所有类型的细胞,而不需使细胞处于持续培养增殖状态。(3)腺病毒转染增殖效率好,病毒滴度高,根据本实验中的腺病毒转染荧光照片可以看出,腺病毒转染效果较好,这是试验成功的前提。(4)腺病毒感染除了卵细胞以外的几乎所有细胞后,基本都不会整合入细胞的基因组中,避免了插入基因片段所引起的基因突变、目的基因失活以及癌基因激活等风险。(5)腺病毒可以插入较大信息量的外源基因,第三代腺病毒可高达 35kb。(6)腺病毒可以在同一细胞株或组织中用来设计表达多个基因的表达系统。虽然腺病毒不能整合到转染细胞的目的基因中,从一定程度上限制了目的基因的表达时间,但是 BMSCs 诱导分化及繁殖的时间一般都在 6 周以内^[8-10],并未超过腺病毒中目的基因的表达时间,因此使用腺病毒并不影响本试验的目的基因对细胞的诱导分化作用^[11,12]。

从腺病毒转染后 BMP-7 和 TGF- β 3 的表达来看,BMP-7 转染组只存在 BMP-7 目的蛋白的高表达,而 TGF- β 3 表达则和对照组无明显差异,说明 BMP-7 腺病毒转染后成功表达 BMP-7 蛋白且达到理想水平。而 TGF- β 3 转染组则存在 BMP-7 和 TGF- β 3 两种目的蛋白的高表达,我们分析可能存在以下两个方面的原因:(1)TGF- β 3 是已知的明确可以诱导 BMSCs 向类软骨细胞和类髓核细胞分化的重要细胞因子,并且在软骨形成过程中有着重要的作用^[13]。在 You 等^[14]的研究中,向 MSCs 细胞培养液中加入外源性的 TGF- β 3,7d 后就可发现 II 型胶原的表达,而在 21d 后更可检测出 II 型胶原和蛋白聚糖等软骨基质成分的共同表达。而在 TGF- β 3 诱导细胞分化为类髓核细胞后,类髓核细胞也可在一定程度上表达 BMP-7 生长因子,从而出现 TGF- β 3 组的 BMP-7 蛋白也呈现高表达状态。(2)BMP 本身属于 TGF- β 超家族,在 TGF- β 3 的作用下可能会促进 BMP 家族的生长因子分泌。

对于下游基因的检测发现, 经过重组腺病毒转染后的兔 BMSCs, ACAN、Collagen I、Collagen II 和 SOX9 基因的表达较对照组明显增高, 而 Collagen X 的表达较对照组明显降低, 由于 Collagen X 在椎间盘内主要由退变过程中出现的肥大软骨细胞表达, 常出现于椎间盘退变晚期, 一定程度上可反映椎间盘退变的程度^[15], 而在 TGF- β 3 表达时, 可在一定程度上限制 TGF- β 1 和 TGF- β 2 的表达, 调节二者之间的比例, 防止成纤维细胞过度增生^[16,17], 从而防止椎间盘髓核组织退变。腺病毒转染组中 Collagen X 的表达降低, 一定程度上可以说明腺病毒转染后, 抑制了兔 BMSCs 向椎间盘退变细胞方向的分化。共转染组的 Collagen II 表达较高, 说明共转染组中 BMP-7 和 TGF- β 3 基因在诱导兔 BMSCs 向类髓核细胞分化过程中存在一定的协同作用。BMP 作为 TGF- β 超家族的成员, 具有 TGF- β 家族成员的多种生物学作用, 研究认为, BMP 在胚胎发育的各个时期, 甚至出生后均对软骨与骨的形成产生调节作用^[18]。在以往, BMP 家族多作为诱导间充质干细胞向成骨细胞分化的细胞因子而被广大学者研究^[19,20], 其在 MSCs 成骨分化中具有确定的作用。Knippenberg 等^[1]的研究表明, BMP-7 还能促进 AT-MSCs 向软骨细胞分化。Nishihara 等^[21]发现 rhBMP-7 在作用于自体骨, 可在骨表面形成关节软骨, 在特定条件下课促进软骨、肌腱和韧带的修复。丰干钧等^[4]将 hBMSCs 在 TGF- β 3 和 BMP-7 共同存在的环境下进行传代培养, 发现共培养组相对于单独 TGF- β 3 及 BMP-7 培养组能够表达更高量的 II 型胶原和蛋白聚糖, 说明二者存在协同作用。其原因可能为 BMP 信号传递途径能够协同 SOX9 维持中胚层的软骨表象分化^[22], 且 TGF- β 3 经由 smad 信号传导通路转入细胞核^[23]的过程中, 激活了 SOX9 的表达, 而 SOX9 则是 II 型胶原和蛋白聚糖基因转录的关键因子, 在 BMP 和 TGF- β 信号转导通路中起到了桥梁作用, 从而促进了蛋白聚糖和 II 型胶原表达的增加。另外 BMP 的诱导作用被抑制缝隙连接介导细胞间的通信所阻断^[24], 这也可能是 BMP 和 TGF- β 发挥协同作用的因素之一。同时我们还发现共转染组的 Collagen II 表达较 TGF- β 3 转染组明显增高, 但之前对于两种目的蛋白的检测两组之间并无明显差异, 造成 Collagen II 表达差异的原因我们认为

主要有以下两个方面: (1) BMP 家族多种生长因子之间表达具有一定的交叉诱导性, 而 BMP 家族中如 BMP-2 具有明显地促进软骨类细胞增殖分化和 II 型胶原表达的作用^[25]。(2) 根据之前我们的推断, 如果在 TGF- β 3 转染组诱导 BMSCs 向类髓核细胞分化后表达 BMP-7, 那么该组细胞 BMP-7 高表达的时间较之共转染组会有相应的缩短, 因此 Collagen II 的表达量也很可能存在差异。

通过本实验可以说明在 BMP-7 和 TGF- β 3 两种基因共转染情况下, 能够有效诱导 BMSCs 向类髓核细胞分化, 且二者之间有明显的协同促进作用, 较之单独转染组促分化作用明显增强, 为本实验以及将来的组织工程髓核构建工作提供了一种良好的种子细胞, 对于解决椎间盘退变以及组织工程髓核构建的实验研究提供了帮助。

4 参考文献

1. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh-Doulubi B, et al. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(3): 902-908.
2. Miyamoto C, Matsumoto T, Sakimura K, et al. Osteogenic protein-1 with transforming growth factor-beta1: potent inducer of chondrogenesis of synovial mesenchymal stem cells in vitro[J]. J Orthop Sci, 2007, 12(6): 555-561.
3. Steck E, Bertram H, Abel R. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(3): 403-411.
4. 丰干钧, 刘浩, 陈晓禾等. hBMSCs 诱导分化类髓核细胞[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(12): 1470-1475.
5. Bao JJ, Zhang WW, Kuo MT. Adenoviral delivery of recombinant DNA into transgenic mice bearing hepatocellular carcinomas[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(3): 355-365.
6. Smith AE. Viral vectors in gene therapy[J]. Annu Rev Microbiol, 1995, 49: 807-838.
7. Ali M, Lemoine NR, Ring CJ. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy[J]. Gene Ther, 1994, 1(6): 367-384.
8. Bolontrade MF, Sganga L, Piaggio E, et al. A specific subpopulation of mesenchymal stromal cell carriers overrides melanoma resistance to an oncolytic adenovirus[J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(14): 2689-2702.
9. Kosaka H, Ichikawa T, Kurozumi K, et al. Therapeutic effect of suicide gene-transferred mesenchymal stem cells in a rat model of glioma[J]. Cancer Gene Ther, 2012, 19(8): 572-578.
10. Tan WQ, Gao ZJ, Xu JH, Yao HP. Inhibiting scar formation in vitro and in vivo by adenovirus-mediated mutant Smad4: a preliminary report[J]. Exp Dermatol, 2011, 20(2): 119-124.
11. Brody SL, Jaffe HA, Han SG, et al. Direct in vivo gene

- transfer and expression in malignant cells using adenovirus vectors[J]. Hum Gene Ther, 1994, 5(4): 437-447.
12. Descamps V, Duffour MT, Mathieu MC, et al. Strategies for cancer gene therapy using adenovirals vectors[J]. J Mol Med, 1996, 74(4): 183-189.
13. Cancedda R, Descalzi, Cancedda F, et al. Chondrocyte differentiation[J]. Int Rev Cytol, 1995, 159: 265-358.
14. You HB, Chen AM. Transfection of precartilaginous stem cells with enhanced green fluorescence protein gene and transforming growth factor Binding chondrogenesis in precartilaginous stem cell[J]. Chin J Pediatr Surg, 2004, 25(6): 545-549.
15. Boos N, Nerlich AG, Wiest I, et al. Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration[J]. Histochem Cell Biol, 1997, 108(6): 471-480.
16. Hosokawa R, Nonaka K, Morifuji M, et al. TGF-beta 3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty [J]. J Dent Res, 2003, 82(7): 558-564.
17. Na K, Kim S, Woo DG, et al. Synergistic effect of TGF beta-3 on chondrogenic differentiation of rabbit chondrocytes in thermo reversible hydrogel constructs blended with hyalurnoic acid by in vivo test[J]. J Biotechnol, 2007, 128(2): 412-422.
18. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, et al. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis[J]. PLoS Genet, 2006, 2(12): e216.
19. Stone CA. A molecular approach to bone regeneration[J]. Br J Plast Surg, 1997, 50(5): 369-373.
20. 张子军, 卢世璧, 王继芳, 等. 骨缺损中内源性 BMP 的分布及其作用[J]. 中华外科杂志, 1996, 34(10): 596-597.
21. Nishihara A, Fujii M, Sampath TK, et al. Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(2): 617-622.
22. Chimon-Monray J, Rodriguez-Leon J, Montero JA, et al. Analysis of the molecular cascade responsible for mesoderm limb chondrogenesis: sox genes and BMP signaling[J]. Dev Biol, 2003, 257(2): 292-301.
23. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily[J]. Science, 2002, 296(5573): 1646-1647.
24. Solursh M. Formation of cartilage tissue in vitro[J]. J cell Biochem, 1991, 45(3): 258-260.
25. Kaps C, Bramlage C, Smolian H, et al. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(1): 149-162.
- (收稿日期: 2013-04-09 修回日期: 2013-12-16)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)

消息

第十四届全国经椎弓根内固定学习班暨脊柱固定新理念研讨会通知

中华医学会骨科分会脊柱学组、《中华骨科杂志》、《中国脊柱脊髓杂志》、《脊柱外科杂志》和海军总医院骨科拟定 2014 年 4 月中旬在北京联合举办第十四届全国经椎弓根内固定学习班暨脊柱固定新理念研讨会,届时将邀请国内著名脊柱外科专家做专题报告,同时安排学员进行尸体标本(或模型)操作训练。

时间:2014 年 4 月 18~20 日。

地点:北京。

报名及征文:北京阜成路 6 号海军总医院骨科何劼主任收,邮编 100048。截止日期:2014 年 3 月 31 日,有意大会发言者请寄 500~800 字摘要。联系电话:(010)68780323,(010)66958486。E-mail 地址: nghortho@163.com。

费用:参加学习班及研讨会的学员每人交会务费、资料费 1000 元,同时参加标本操作者每人另交材料费 500 元(标本数量有限,按报名顺序先后优先安排)。统一安排食宿,费用自理。

本学习班属国家级继续医学教育一类项目,学习结束颁发结业证书,记 6 学分。