

生长分化因子5转染对大鼠骨髓间充质干细胞增殖分化的影响^{*}

杨 治, 张 铭, 许 鹏^{**}

(西安交通大学医学院附属红会医院 关节外科, 陕西 西安 710054)

[摘要] 目的: 探讨生长分化因子5(GDF5)基因转染对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖分化的影响。方法: 采用密度梯度离心法分离培养大鼠 BMSCs, pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染大鼠 BMSCs 后, 利用免疫荧光法、聚合酶链式反应(PCR)法检测 GDF5 蛋白及 mRNA 的表达, 利用³H-TdR 检测细胞 DNA 合成, 采用流式细胞仪检测细胞生长周期比例; 利用甲苯胺蓝染色、阿辛蓝染色及 PCR 法检测 II 型胶原的表达。结果: pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染大鼠 BMSCs 后可以稳定表达, 转染 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs cpm 值明显高于未转染 BMSCs 组($P < 0.05$); 转染 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs 的 G1 期和 G2 期细胞的比例下降, S 期细胞的比例上升; 转染 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs 的 II 型胶原的表达水平增高。结论: pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒可以成功转染大鼠 BMSCs, 促进 BMSCs 增殖并诱导其向软骨细胞分化。

[关键词] 生长分化因子5; 骨髓间充质干细胞; 软骨细胞; 基因转染

[中图分类号] R681.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)10-1197-07

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.10.018

Effect of Growth Differentiation Factor 5 Gene Transfer on the Proliferation and Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

YANG Zhi, ZHANG Ming, XU Peng

(Department of Joint Surgery, Honghui Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of gene transfection of growth differentiation factor 5 (GDF5) on the proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods:** Rat BMSCs were isolated by density-gradient centrifugation. The protein and mRNA expression of GDF5 were detected by immunofluorescence and polymerase chain reaction (PCR) methods after pcDNA3.1(+)/hGDF5 recombinant plasmid transfection into BMSCs. The DNA synthesis count and cell growth cycle were measured by ³H-TdR and flow cytometry. The expression of collagen II was detected by toluidine blue staining, alcian blue staining and PCR method. **Results:** GDF5 gene was stably expressed after pcDNA3.1(+)/hGDF5 recombinant plasmid transfection into BMSCs. The value of cpm was significantly higher in the transfection group than in the non-transfection group ($P < 0.05$). The proportion of G1 and G2 phase cells decreased and the proportion of S cells increased in the BMSCs with pcDNA3.1(+)/hGDF5 recombinant plasmid transfection. The expression of collagen II increased in the BMSCs with pcDNA3.1(+)/hGDF5 recombinant plasmid transfection. **Conclusion:** pcDNA3.1(+)/hGDF5 recombinant plasmid was successfully transfected into rat BMSCs. The gene could promote proliferation and induce chondrogenesis of the BMSCs.

^{*} [基金项目] 陕西省科技计划项目(2013K12-17-03)

^{**} 通信作者 E-mail: yangzhijhonghui@126.com

网络出版时间: 2016-10-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20161017.1445.050.html>

[**Key words**] growth differentiation factor 5; bone marrow mesenchymal stem cells; chondrocyte; gene transfection

生长分化因子 5 (growth/differentiation factor 5, GDF5) 又称软骨形态发生蛋白 1 (cartilage-derived morphogenetic protein-1, CDMP -1), 属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族成员, 在软骨形成、骨骼发育过程中发挥重要的调节作用^[1-4]。有实验表明外源性 GDF5 可刺激成熟软骨细胞增殖, 促进软骨细胞合成蛋白多糖和 II 型胶原, 并能维持软骨细胞的生物学特性^[5], 同时研究还发现在骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 中加入外源性 GDF5 可促进其增殖^[6]。为了进一步研究 GDF5 在体内的作用, 本研究将 pcDNA3.1 (+) /hGDF5 重组质粒通过 FuGENE6 转染入大鼠 BMSCs, 并探讨 GDF5 的表达情况及对 BMSCs 增殖分化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

pcDNA3.1 (+) /hGDF5 重组质粒由本实验组前期构建, 健康 SPF 级 4 周龄雌性 Wistar 大鼠 8 只, 体质量 (85 ± 7) g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。抗 GDF5 抗体 (Santa Cruz Biotech, 德国), 细胞周期检测试剂盒 (BD 公司, 美国), 转染试剂 FuGENE6 (Roche 公司, 德国), 胎牛血清 (杭州四季青公司), TRIzol 液 (Invitrogen 公司, 美国), 逆转录试剂盒试剂盒 (Fermentas 公司, 立陶宛), PCR 引物 (上海生工生物工程技术有限公司, 中国) 及 PCR 试剂 (宝生物工程 (大连) 有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 BMSCs 的分离、培养 采用 2.5 mg 氯胺酮和 0.25 mg 甲苯噻嗪腹部注射麻醉大鼠, 无菌切取股骨和胫骨, 剪断骨髓段, 用 DMEM 培养液冲洗骨髓腔, 收集的冲洗液经 125 μ m 网孔过滤膜过滤, 1 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 加入 PBS 2.0 mL 制成单细胞悬液, 加入密度为 1.073 的 Percoll 4.0 mL 后 2 000 r/min 离心 20 min, 收集中间乳白色的单个核细胞层, 用 PBS 洗 2 次, 按 1×10^6 个细胞接种于直径为 10 cm 的培养皿中, 加入 10 mL 的 DMEM 培养液 (含 10% FCS + 1% P/S +

两性霉素 B 0.25 mg/L), 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养 5 d 后更换培养液, 弃掉全部未贴壁的细胞, 继续培养且每周更换培养液 2 次。12 ~ 14 d 后细胞基本生长至 85% 融合后传代, 以 5×10^8 /L 密度接种于直径为 10 cm 的培养皿中。此细胞记作 P1, 重复以上操作, 选用 P2 细胞进行后续实验。

1.2.2 pcDNA3.1 (+) /hGDF5 重组质粒转染转染大鼠 BMSCs BMSCs 接种于直径为 10 cm 的培养皿中, 12 h 后换新鲜培养液 (DMEM + 10% FCS + 1% P/S), 40 min 后进行转染。转染液包括: 350 μ L DMEM (不含 FCS 及 P/S)、10 μ L FuGENE6 及 pcDNA3.1 (+) /hGDF5 重组质粒 3.5 μ g, 将转染液均匀滴于培养液中。培养皿放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养, 6 h 后换新鲜培养液。转染后 48 h 更换含有 400 mg/L G418 的培养基, 培养 1 周后改为 200 mg/L G418, 继续培养 2 周至阳性克隆形成, 去除 G418 培养基, 加入 DMEM + 10% FCS + 1% P/S 培养液扩大培养, 待细胞出现约 80% 融合时 T/E 液收集细胞用于后续实验。

1.2.3 GDF5 蛋白表达 采用免疫荧光法检测, 基因转染 BMSCs 培养 48 h 后利用 PBS 洗涤 2 次细胞后加入甲醇固定 5 min; 加入 PBS 液洗涤 3 次细胞, 加入 1:4 的山羊血清室温下封闭 30 min; 加入 PBS 液洗涤 3 次细胞, 加入 1:100 的 GDF5 抗体, 室温下孵育 60 min; PBS 液洗涤 3 次细胞后加入 FITC 标记的二抗, 室温下避光孵育 60 min; 加入 Roti[®]-Histolitt 后, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 GDF5 mRNA 的表达 采用 PCR 法检测, 收集 1×10^6 个 BMSCs, 加入 Trizol 1.0 mL 提取细胞总 RNA, 利用逆转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链, 按照试剂盒说明操作。采用 Primer5.0 软件设计 GDF5 引物, 上游引物 5'-CAGAGCGGGCCTTA-ATCT-3', 下游引物 5'-CGTGCTCAGGAAGCAGAG-3', 扩增产物长度为 443 bp, 20 μ L PCR 反应体系包括 PCR 反应缓冲液 10 μ L、上下游引物各 1 μ L、模板 1 μ L 及双蒸水 7 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 45 s、50 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后紫外线分析仪下观察, 并用计算机图像分析系统拍摄像片。

1.2.5 细胞 DNA 合成 采用³H-TdR 检测, 取生

长良好 BMSCs, 各按 1×10^4 /孔接种于 96 孔培养板(培养液为 DMEM + 5% FCS + 1% P/S), 每个样本设 5 个复孔。37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养 12 h, DMEM + 1% P/S 饥饿培养 12 h, 再换用 DMEM + 1% FCS + 1% P/S 培养。细胞生长至对数生长期时, 吸出培养液, 每孔加含 3.7×10^4 Bq ³H-TdR 的无血清 DMEM 50 μL 培养; 24 h 后每孔加 0.1 mol/L NaOH 100 μL, 24 h 后收集裂解液入闪烁瓶; 加 8 μL 闪烁剂, 3 μL 反淬灭剂, 暗适应 3 h, 液体闪烁计数器检测各孔每分钟计数(cpm)值。

1.2.6 细胞生长周期 采用流式细胞仪检测, 取生长良好的转染 hGDF5 重组基因和未转染 BMSCs, 各按 1×10^6 /孔接种于直径为 10 cm 的培养皿中, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内 DMEM + 5% FCS + 1% P/S 培养 12 h, DMEM + 1% P/S 饥饿培养 12 h, 再 DMEM + 1% FCS + 1% P/S 培养。细胞生长至对数生长期时, T/E 液消化, 离心重悬为单细胞悬液。每个测试管中放入 1×10^9 /L 细胞, 加入反应体系- DNA 低渗缓冲液, 静置 10 min, 混匀上机检测。

1.2.7 甲苯胺蓝染色 生长良好的转染 hGDF5 重组基因 BMSCs, 按 1×10^5 /孔接种于 6 孔培养板中, 弃细胞培养液, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min; 蒸馏水冲洗, 1.5% 甲苯胺蓝 200 μL 室温下染色 2 min; 蒸馏水冲洗, 50% 乙醇冲洗, 倒置显微镜下观察。未转染细胞做对照, 每个样本设 3 个复孔。

1.2.8 阿辛蓝染色 生长良好的转染 hGDF5 重组基因 BMSCs, 按 6×10^4 /孔接种于 24 孔培养板, 每个样本设 5 个复孔, PBS 冲洗后, DMEM/F12 + 1% FCS + 1% P/S 培养, 并分别添加浓度为 0、1、10、100、1 000 μg/L 的 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒。细胞培养 14 d, 每周更换培养液 3 次。4 °C 的 PBS 冲洗 2 次, -20 °C 甲醇固定 2 min; 蒸馏水清洗, 0.1% 阿辛蓝室 200 μL 温下染色 12 h; 蒸馏水清洗 3 次, 加 6 mol/L 盐酸胍 150 μL 室温孵育 8 h, 在酶标仪(波长 620 nm)上比色, 读取吸光度值。未转染的细胞作为对照。

1.2.9 II 型胶原 mRNA 表达 采用 PCR 法检测, 取生长良好转染 hGDF5 重组基因的 BMSCs, 按 1×10^5 /孔接种于 6 孔培养板, 每孔设 3 个复孔, 培养 21 d, 分别于 1、3、5、7、10、14、18 及 21 d 收获细胞, -20 °C 保存待测。未转染细胞做对照。加入的 Trizol 1 mL 提取细胞总 RNA, 利用逆转录试剂

盒合成 cDNA 第 1 链, 按照试剂盒说明书操作。采用 Primer5.0 软件设计 II 型胶原引物, 上游引物 5'-GCCTCGCGGTGAGCCATGATC-3'、下游引物 5'-TGGGGCACCGTCTCTACCTC-3', 产物长度为 268 bp; 内参 GAPDH 上游引 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'、下游引物 5'-AACCCCCAGTTGCTCTTAA-3', 产物长度为 443 bp, PCR 20 μL 反应体系包括 PCR 反应缓冲液 10 μL、上下游引物各 1 μL、模板 1 μL 及双蒸水 7 μL; PCR 反应条件为: 94 °C 5 min 预变性; 94 °C 45 s、50 °C 45 s、72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 6 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后紫外线分析仪下观察, 并用计算机图像分析系统拍摄相片。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 形态学改变

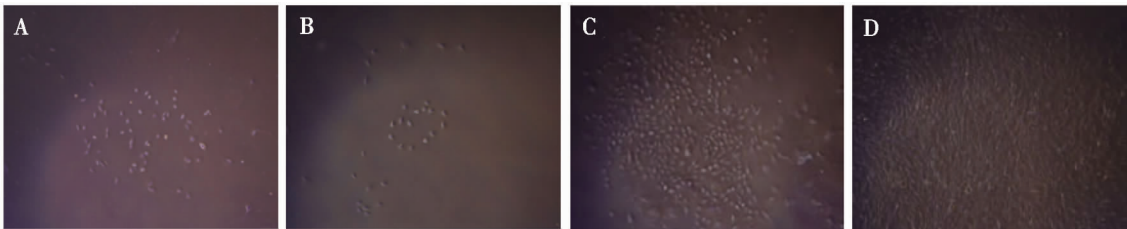
pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染 BMSCs 后, 细胞外形变化不大, 48 h 内生长良好。更换 400 mg/L G418 培养基后, 细胞均发生不同程度的胞膜皱缩, 细胞生长迟缓或停止, 约 50% ~ 60% 细胞在 1 周内裂解死亡, 见图 1A、B。改换 200 mg/L G418 培养基后, 残存细胞生长有所恢复, 并缓慢分裂, 在 2 周内形成大小不同的细胞克隆, 见图 1C。当培养液为 DMEM + 10% FCS + 1% P/S 时, 细胞生长快速, 双核分裂细胞增加明显, 3 ~ 5 d 内达到融合, 整个培养期细胞均为梭形或多角形, 见图 1D。未转染细胞组经 400 mg/L G418 培养后, 细胞均死亡, 无存活细胞。

2.2 BMSCs 中 GDF5 蛋白表达

FuGENE6 介导 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染 BMSCs 48 h 后 GDF5 蛋白免疫荧光显示, 约 40% 的 BMSCs 出现绿色荧光, 虽然不强烈, 这表明外源基因已进入细胞, 并产生相应蛋白质。在随后的 G418 筛选中, 阳性细胞克隆仍有荧光出现, 但非常弱。见图 2A、B、C。

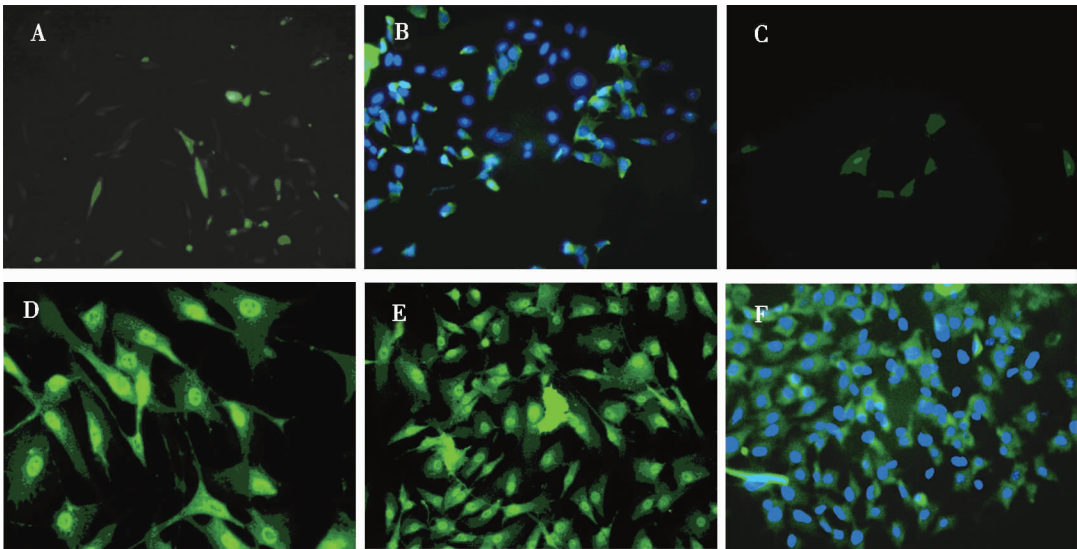
G418 筛选的纯化转染 BMSCs GDF5 蛋白免疫荧光显示, 在培养 7 d 时, 细胞核分裂活跃, 绿色荧光强烈; 14 d 时细胞仍然活跃, 绿色荧光强烈; 21 d

时绿色荧光有减弱,这表明转染的外源 hGDF5 基因 21 d 内均存在于 BMSCs,并能稳定产生相应蛋白,未转染 BMSCs 21 d 内未出现绿色荧光。见图 2D、E、F。



注:A、B 为 G418 培养基培养 1 周时散在阳性细胞, C 为 G418 培养基培养 2 周时阳性细胞克隆, D 为扩大培养的阳性细胞
图 1 转染 pcDNA3.1(+) /hGDF5 重组质粒后的 BMSCs 形态学改变 (100 ×)

Fig. 1 Morphological changes of BMSCs after transfection of pcDNA3.1
(+) /hGDF5 recombinant plasmid (100 ×)

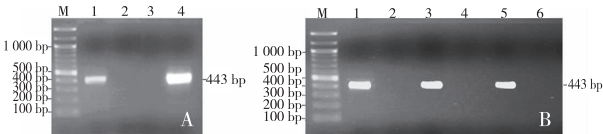


注:A 为转染 48 h, B 为转染 48 h 后与 DAPI 复合染色, C 为 G418 培养 1 周后染色, D 为筛选后 T/E 液消化收集的纯化转染 BMSCs 培养 1 周后染色, E 为纯化转染 BMSCs 培养 2 周后染色, F 为纯化转染 BMSCs 培养 3 周后与 DAPI 复合染色
图 2 转染 pcDNA3.1(+) /hGDF5 重组质粒后 BMSCs 中 GDF5 表达 (免疫荧光, ×200)

Fig. 2 Immunofluorescence staining of BMSCs after transfection of pcDNA3.1
(+) /hGDF5 recombinant plasmid (200 ×)

2.3 BMSCs 中 GDF5 mRNA 表达

FuGENE6 介导 pcDNA3.1(+) /hGDF5 重组质粒转染 BMSCs 48 h 后 PCR 检测结果显示,转染后的 BMSCs 表达 GDF5 基因,凝胶中出现明显相应条带,而未转染的 BMSCs 不表达 GDF5 mRNA,凝胶中未出现相应条带,表明 pcDNA3.1(+) /hGDF5 重组质粒已成功转入部分 BMSCs,并产生活性。见图 3A。G418 筛选的纯化转染 BMSCs RT-PCR 结果显示,在培养的 7、14、21 d 转染细胞均表达 GDF5 mRNA,出现明显的泳带,表明转染的 pcDNA3.1(+) /hGDF5 重组质粒 21 d 内均存在于 BMSCs,并稳定表达 mRNA。未转染 BMSCs 21 d 内未出现电泳条带。见图 3B。



注:A 为转染 48 h 后结果, M 为 DNA Marker, 1、4 为转染细胞, 2、3 为未转染细胞, B 为筛选纯化转染细胞培养 7、14、21 d 结果, 1、3、5 为转染细胞, 2、4、6 为未转染细胞

图 3 转染 pcDNA3.1(+) /hGDF5 重组质粒后 BMSCs 中 GDF5 表达 (PCR)

Fig. 3 PCR amplification results of GDF5 mRNA in BMSCs after transfection of pcDNA3.1(+) /hGDF5 recombinant plasmid

2.4 转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒对 BMSCs 增殖的影响

2.4.1 甲苯胺蓝染色结果 转染及未转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒 BMSCs 经过甲苯胺蓝染色后 4~6 h 完全贴壁,开始伸出突起;更换无血清培养液后,细胞停止生长;更换为 1% FCS 培养液后,细胞又缓慢恢复生长。未转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs 生长缓慢,分裂细胞少,第 6 天后细胞生长稍增快,第 10 天时细胞约占培养皿面积 45%,见图 4A、B;转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs 生长较快,第 3~7 天为细胞快速生长期,在第 10 天细胞达到 95% 以上融合。两组细胞均未见细胞形态明显改变,但转染后期有明显细胞聚集,见图 4C、D。

2.4.2 对 BMSCs 中 DNA 合成的影响 ^3H -TdR 检测结果显示,转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs 组 cpm 为(261 745 \pm 31 047),明显高于未转染的 BMSCs 组 cpm(115 237 \pm 15 213),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4.3 对 BMSCs 细胞生长周期的改变 流式细胞仪检测显示,未转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs 组 G1 期的细胞为 71.2%,而 S 期细胞仅占 4.6%;而基因转染的 BMSCs 组的 1 期和 G2 期细胞比例呈现不同程度的下降,S 期细胞的比例上升至 35.1%,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1;提示转染转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒后 BMSCs 的 DNA 合成及增生活活动增强。

表 1 BMSCs 的细胞周期分布(%)
Tab. 1 Distribution of cell cycle in BMSCs

组别	G1 期	S 期	G2 期
转染细胞组	47.3 ⁽¹⁾	35.1 ⁽¹⁾	17.5
未转染细胞组	71.2	4.6	24.0

⁽¹⁾ 与未转染细胞组比较, $P < 0.05$

2.5 转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒对 BMSCs 分化的影响

2.5.1 甲苯胺蓝染色结果 在诱导培养液中,hGDF5 重组质粒转染 BMSCs 可逐渐向软骨细胞分化,7 d 内细胞数量增加,增殖明显;7 d 后接近融合的细胞由单层向复层生长,出现细胞聚集趋势;12 d 后细胞聚集明显,14~21 d 聚集的细胞形成很多细胞小结;细胞形态在 7 d 内主要为梭形,8 d 后融合的细胞逐渐由梭形变为圆形;14~21 d 形

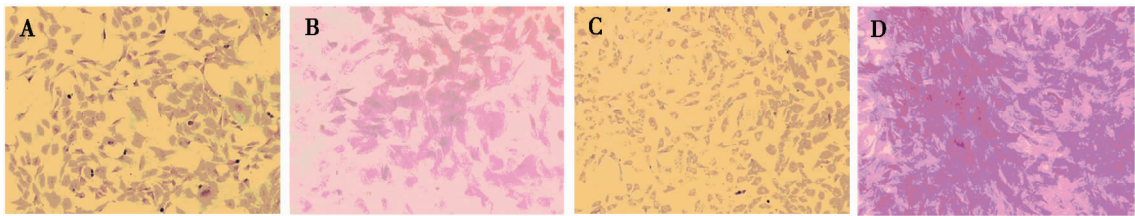
成细胞小结过程中细胞大多仍保持圆形,部分细胞为多角形。未转染细胞组细胞生长较缓慢,约第 9 天时融合,后呈旋涡状生长,部分复层生长,无细胞小结形成;21 d 内细胞主要为梭形。甲苯胺蓝染色在转染 BMSCs 组细胞小结区明显,细胞聚集区次之,而细胞小结及聚集区外弱;在未转染 BMSCs 组,染色很弱,见图 5。

2.5.2 阿辛蓝染色结果 未转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs 在分化诱导培养液中培养,21 d 内均未见阿辛蓝染色;转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒的 BMSCs 在相同培养液中培养,从第 10 天左右开始出现浅而散在的蓝色,随时间染色深度和密度增加,第 21 天时较明显的染色约占培养皿面积的 50%。显微镜下见阿辛蓝染色主要为细胞聚集区和细胞小结区,而单层非密集区,即使细胞圆形染色亦淡,见图 6。

2.5.3 对 II 型胶原 mRNA 表达的影响 转染 pcDNA3.1 (+)/hGDF5 重组质粒及未转染的 BMSCs 用特殊培养液培养 21 d,分别于 1、3、5、7、10、14、18、21 d 收获细胞进行 PCR 扩增,见图 7。结果显示在培养第 7 d 转染 BMSCs 表达 II 型胶原 mRNA,出现 268 bp 电泳条带,后随时间延长,该带越来越明显。而未转染 BMSCs 同样培养液中培养 21 d,未出现 268 bp 条带。

3 讨论

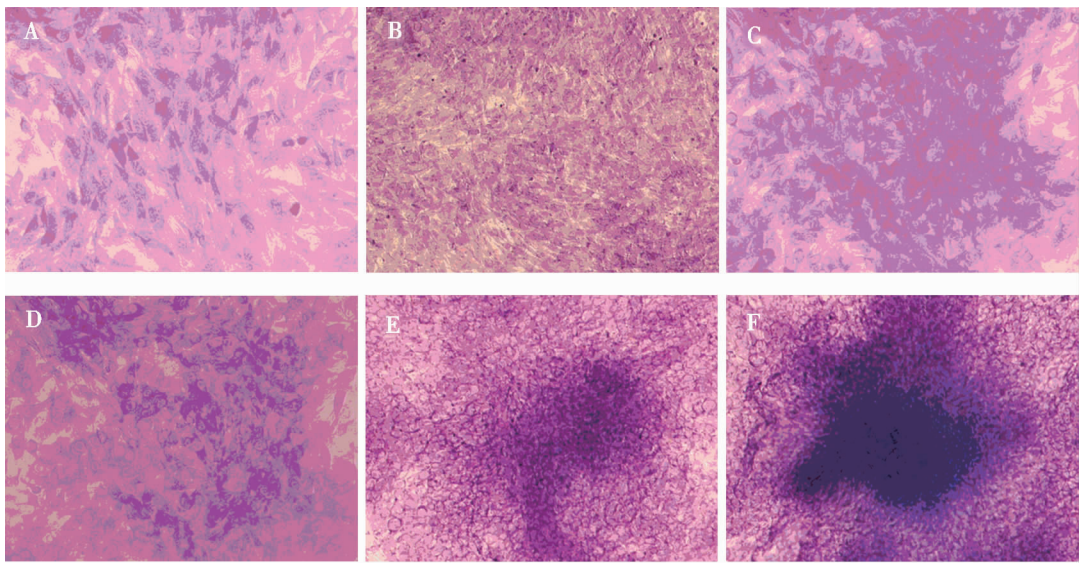
BMSCs 来源丰富易分离,对供体影响小,且能在一定条件下转化为软骨细胞,是关节软骨损伤修复基因治疗的常用靶细胞^[7],研究证实多种生长因子可以促进 BMSCs 的增殖分化,Guo 等^[8]通过脂质体将 TGF- β 1 基因转入大鼠 BMSCs,发现 TGF- β 1 基因的转入能诱导 BMSCs 从 G0/G1 期到 S1 期,调节 DNA 的复制,增加细胞 S1 期的 DNA 含量,从而有效促进 BMSCs 的增殖。此外生长因子做为诱导因子在 BMSCs 定向分化为软骨细胞的过程中发挥非常关键的作用,多种生长因子如 TGF- β 、骨形态发生蛋白-2 (Bone Morphogenetic protein-2, BMP-2) 和 BMP-9 等在适当的培养液中均能诱导 BMSCs 分化成软骨细胞。国内外多项研究证实多种基因已被成功转入 BMSCs^[9-11],Guo 等^[12]将大鼠全长 TGF- β 1 cDNA 通过脂质体介导转入 BMSCs,转基因细胞的 TGF- β 1 表达明显上调,且持续超过 4 周,BMSCs 向软骨细胞分化,分泌 II 型胶



注:A 为未转染细胞(6 d),B 为未转染细胞(10 d),C 为转染细胞(6 d),D 为转染细胞(10 d)

图 4 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染对 BMSCs 增殖的影响(200 ×)

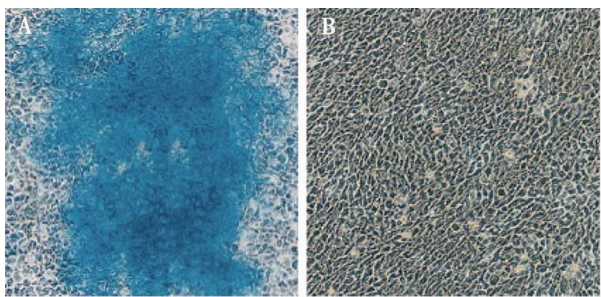
Fig.4 Proliferation culture observation of BMSCs after transfection of pcDNA3.1 (+) /hGDF5 recombinant plasmid



注:A 为未转染细胞 9 d (200 ×),B 为未转染细胞 21 d (100 ×),C 为转染细胞 9 d (200 ×),D 为转染细胞 12 d (200 ×),E 为转染细胞 15 d (100 ×),F 为转染细胞 21 d (100 ×)

图 5 分化培养 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染的 BMSCs(甲苯胺蓝)

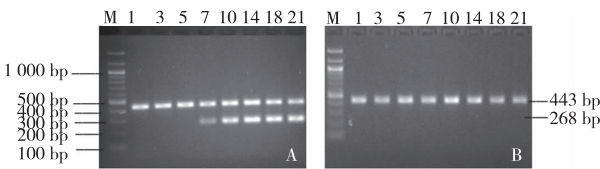
Fig.5 Differentiation culture observation of BMSCs after transfection of pcDNA3.1 (+) /hGDF5 recombinant plasmid



注:A 为转染细胞,B 为未转染细胞

图 6 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染对 BMSCs 分化培养的影响(21 d, × 阿辛蓝 100)

Fig.6 Differentiation culture observation of BMSCs after transfection of pcDNA3.1 (+) /hGDF5 recombinant plasmid at 21 days



注:A 为 hGDF5 基因转染 BMSCs 组, B 为未转染对照组, M 为 DNA marker,1~21 数字代表培养天数,443 bp 为 GAPDH 片段,268 bp 为 II 型胶原片段

图 7 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染对 BMSCs 中 II 型胶原 mRNA 表达的影响 (PCR 扩增,培养 21 d)

Fig.7 PCR amplification results of collagen II mRNA in BMSCs after transfection of pcDNA3.1 (+) /hGDF5 recombinant plasmid at 21 days

原。Palmer 等^[13]通过腺病毒将 TGF- β 1 和 BMP-2 基因转入人 BMSCs, 转染细胞聚集培养, 7 d 内可以分泌 TGF- β 1 和 BMP-2, 甲苯胺蓝染色阳性, II 型胶原基因免疫组化染色阳性, 但 IGF-1 基因同样的导入未能使 BMSCs 向软骨细胞分化。Kawamura 等^[14]将 TGF- β 1 导入人 BMSCs, 转染细胞离心成细胞球培养, 10 d 后可以表达 II 型胶原基因。

GDF5 是机体软骨形成及骨骼发育的重要调节因子之一, 在软骨形成初期可以促进间充质软骨前细胞的黏附、聚集和分化^[15,16], 有实验研究也发现外源性 GDF5 可促进 BMSCs 的增殖^[6]。为了进一步研究 GDF5 的作用, 本实验通过新型脂质体 FuGENE6 将 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转入 BMSCs, 转染效率约为 40%, 同时 BMSCs 外形变化不大, 生长良好; hGDF5 基因在 BMSCs 中可以表达超过 21 d, 细胞合成 GDF5 蛋白。在细胞合成 DNA 的过程中, 胸腺嘧啶脱氧核苷 (TdR) 是必需的成分, 将 TdR 用³H 标记后, 用液体闪烁计数器可间接测量到细胞摄取³H-TdR 的数量, 从而能在 DNA 水平了解细胞的增生能力。hGDF5 重组基因转染 BMSCs 组的³H-TdR 利用率明显高于未转染 BMSCs 组, 说明外源基因转染 BMSCs 的增殖及合成能力增强。流式细胞检测细胞周期发现 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染 BMSCs 组较未转染 BMSCs 组的 S 期细胞数量明显增多, 而 G1 期和 G2 期细胞数量减少, 表明外源基因转染 BMSCs 的 DNA 合成及增殖加强, 这些实验结果均表明 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染可促进 BMSCs 的增殖。本研究还利用甲苯胺蓝染色、阿辛蓝染色及 PCR 法检测发现基因转染 BMSCs 的 II 型胶原的表达, 提示基因转染的 BMSCs 可逐渐向软骨细胞分化, 这为应用 pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒转染的 BMSCs 修复软骨损伤奠定了良好的基础。

综上所述, pcDNA3.1(+)/hGDF5 重组质粒通过 FuGENE6 转染入大鼠 BMSCs 后, 可以促进 BMSCs 增殖并向软骨细胞分化, 但其具体作用机制有待于进一步研究, 随着研究的不断深入将为 GDF5 基因转染的 BMSCs 用于治疗软骨损伤提供理论基础。

4 参考文献

[1] Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, et al. Growth and

differentiation factor-5 (GDF-5) in the human intervertebral annulus cells and its modulation by IL-1 β and TNF- α in vitro[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014(2):225-229.

- [2] Feng C, Liu H, Yang Y, et al. Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015(1):1-16.
- [3] Svala E, Thorve AI, Ley C, et al. Effects of interleukin-6 and interleukin-1 β on expression of growth differentiation factor-5 and Wnt signaling pathway genes in equine chondrocytes[J]. *Am J Vet Res*, 2014(2):132-140.
- [4] 张文婷, 罗飞宏. 生长分化因子 5 调控细胞分化机制研究新进展[J]. *医学综述*, 2014(2):199-202.
- [5] 张小卫, 王金堂, 李萌, 等. 生长分化因子-5 对大鼠关节软骨细胞生长代谢的影响[J]. *中医正骨*, 2010(10):17-21.
- [6] 刘林, 许珂, 姚建锋, 等. 生长分化因子 5 对大鼠骨髓间质干细胞生长分化的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2015(10):1237-1241.
- [7] Gopal K, Amirhamed HA, Kamarul T. Advances of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of cartilage defects: a systematic review[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2014(6):663-669.
- [8] Guo X, Zheng Q. Molecular tissue engineering: applications for modulation of mesenchymal stem cells proliferation by transforming growth factor beta 1 gene transfer[J]. *J Tongji Med Univ*, 2001(4):314-317.
- [9] Li W, Wei S, Liu C, et al. Regulation of the osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow-derived stromal cells by extracellular uridine triphosphate: The role of P2Y2 receptor and ERK1/2 signaling[J]. *Int J Mol Med*, 2016(1):63-73.
- [10] Zou D, He J, Zhang K, et al. The bone-forming effects of HIF-1 α -transduced BMSCs promote osseointegration with dental implant in canine mandible[J]. *PLoS One*, 2012(3):e32355.
- [11] Zhu C, Chang Q, Zou D, et al. LvBMP-2 gene-modified BMSCs combined with calcium phosphate cement scaffolds for the repair of calvarial defects in rats[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011(8):1965-1973.
- [12] Guo X, Du J, Zheng Q, et al. Expression of transforming growth factor beta 1 in mesenchymal stem cells: potential utility in molecular tissue engineering for osteochondral repair[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2002(2):112-115.

(下转第 1207 页)

测苗药头花蓼还可能通过影响尿素酶基因的转录,降低 *H. Pylori* 尿素酶的生成量。

综上所述,推测苗药头花蓼除了通过抑制尿素酶活性降低其催化效率外,还可能通过影响尿素酶基因的转录,降低 *H. Pylori* 尿素酶的生成量,进而降低 *H. Pylori* 在胃内的生存能力。

4 参考文献

- [1] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010(5):265-270.
 - [2] Figura N. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Helicobacter*, 2010(Suppl 1): 60-68.
 - [3] 张姝,罗昭逊,莫非,等. 头花蓼对幽门螺杆菌抗菌作用分析[J]. 中国医院药学杂志, 2015(2): 113-118.
 - [4] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration [J]. *The Lancet*, 1984(16): 1311-1315.
 - [5] 敬柏清,石玲. 生长迟缓儿童幽门螺杆菌感染情况调查[J]. 检验医学与临床, 2014(14): 1929-1930.
 - [6] Afifi RA, Ali DK, Shaheen IA. A localized case-control study of extra-gastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection in children [J]. *Indian J Pediatr*, 2011(4): 418-422.
 - [7] Eaton KA, Krakowka S. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* [J]. *Infect Immun*, 1994(9): 3604-3607.
 - [8] Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases [J]. *Microbiol Rev*, 1995(3): 451-480.
 - [9] Matsubara S, Shibata H, Ishikawa F, et al. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003(3):715-719.
 - [10] 彭知云,王旭东,冯玉婷,等. 4-4_羟基苯基-乙基儿茶酚作为尿素酶抑制剂的机理[J]. 吉首大学学报, 2012(6):85-88.
 - [11] Xiao ZP, Wang XD. Molecular docking, kinetics study and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors [J]. *J Agric Food Chem*, 2012(42): 10572-10577.
- (2016-07-30 收稿,2016-09-25 修回)
中文编辑:周 凌;英文编辑:赵 毅
-
- (上接第 1203 页)
- [13] Palmer GD, Steinert A, Pascher A, et al. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro[J]. *Mol Ther*, 2005(2):219-228.
 - [14] Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, et al. Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures[J]. *Exp Hematol*, 2005(8):865-872.
 - [15] Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, et al. TGF-beta1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells[J]. *Stem Cells*, 2015(3):762-773.
 - [16] Tian HT, Zhang B, Tian Q, et al. Construction of self-assembled cartilage tissue from bone marrow mesenchymal stem cells induced by hypoxia combined with GDF-5[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2013(5):700-706.
- (2016-08-28 收稿,2016-09-25 修回)
中文编辑:刘 平;英文编辑:刘 华