

[文章编号]1000-1182(2004)05-0420-03

人重组骨形成蛋白-2 诱导 NIH3T3 细胞 向成骨细胞表型转化

王军琳, 刘 源, 金 岩, 王新文, 李 媛

(第四军医大学口腔医学院 组织病理学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 探讨人重组骨形成蛋白-2 (rhBMP-2) 对 NIH3T3 成纤维细胞生物学行为的影响。方法 培养 NIH3T3 细胞, 加入外源性 rhBMP-2, 用生长曲线、噻唑蓝 (MTT) 比色、流式细胞仪 (FCM) 分析、BrdU 检测观察细胞的增殖和 DNA 合成, 并检测碱性磷酸酶 (ALP) 活性和骨钙素 (OC) 含量观察细胞是否有成骨趋向。结果 加药组细胞的增殖活性下降、DNA 合成变慢, ALP 活性和 OC 含量均增高。结论 rhBMP-2 使 NIH3T3 细胞增殖活性变弱, 表现成骨细胞表型。

[关键词] 成纤维细胞; 骨形成蛋白; 成骨细胞

[中图分类号] R 708.2 **[文献标识码]** A

Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Transform NIH3T3 Fibroblast to Osteo-like Cells WANG Jun-lin, LIU Yuan, JIN Yan, WANG Xin-wen, LI Yuan. (Dept. of Oral Histology and Pathology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To examine the effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on NIH3T3 cells. **Methods** The NIH3T3 cells were cultured in DMEM with 50 $\mu\text{g/L}$ rhBMP-2. The proliferation ability, alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin (OC) quantity of NIH3T3 cells were investigated. **Results** The cells showed decreased proliferation ability but enhanced ALP activity and OC quantity. **Conclusion** 50 $\mu\text{g/L}$ rhBMP-2 can transform NIH3T3 fibroblasts to osteo-like cells.

[Key words] fibroblast; bone morphogenetic proteins; osteoblast

骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是一个至少包括 20 个成员的家族, 其成员在结构上相似, 但其功能在不同时期、不同阶段有着极大的差异。BMPs 不仅在骨、软骨及与骨骼有关的结缔组织的形成上有重要作用, 而且在胚胎发育、器官形成及细胞分化中起着十分重要的调控作用^[1]。在脊椎动物中胚层的发育诱导过程中, BMPs 是重要的背-腹化发育促进因子, 几乎胚胎发育的关键步骤都受到了 BMPs 的调控^[2]。本实验旨在观察人重组骨形成蛋白-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 对 NIH3T3 细胞的作用, 从细胞生物学水平研究 BMP-2 在胚胎发育、器官形成及细胞分化中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

rhBMP-2 (由军事科学院基础医学研究所生化实

验室提供), NIH3T3 细胞 (由西京医院刘松波赠送), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 检测试剂盒 (购自北京中生生物工程技术有限公司), 骨钙素 (osteocalcin, OC) 放免检测试剂盒 (购自北京东亚免疫技术研究所), MTT (Sigma 公司, 美国), BrdU 检测试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司, 德国)。

1.2 NIH3T3 细胞的培养

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度下培养 NIH3T3 细胞, 3 d 换液 1 次, 传代 3 到 4 次使细胞达到良好的生长状态。

将 NIH3T3 细胞分为两组, 其中一组的培养如上所述; 另一组用含 10% 胎牛血清并加入 50 $\mu\text{g/L}$ rhBMP-2 的 DMEM 培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度下培养。

1.3 细胞增殖活力检测

1.3.1 细胞生长曲线 在 24 孔板上以 2×10^7 个/L 的密度接种前述两组细胞。每 24 h 取 3 孔进行细胞计数, 连续观察 10 d, 绘制细胞生长曲线。

1.3.2 噻唑蓝 (methabenzthiazuron, MTT) 比色 在 96 孔板上以 4×10^7 个/L 的密度接种前述两组细胞。培

[收稿日期]2003-12-16; [修回日期]2004-06-20

[作者简介]王军琳 (1970-), 女, 重庆人, 讲师, 硕士

[通讯作者]王军琳, Tel.: 13991811898

养 3 d 后,每孔加入 MTT(5 g/L)20 μ l,继续培养 4 h,吸弃上清,加入 150 μ l DMSO 振荡 15 min,用酶联免疫检测仪测定 490 nm 的 OD 值。

1.3.3 流式细胞仪检测 取细胞 5×10^8 个/L,800 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗 2 次,70%乙醇固定,4 $^{\circ}$ C 过夜。上机前离心去除乙醇,PBS 洗 2 次,加入溴化丙锭染液 1 ml,4 $^{\circ}$ C 闭光染色 30 min,上机检测分析。

1.3.4 BrdU 检测 实验前一天接种前述两组细胞于放有玻片的培养板中,吸弃培养液,加入含 1% BrdU 的培养液,继续培养 1 h,取出细胞爬片用抗 BrdU 单抗检测,计算阳性细胞个数。

1.4 成骨表型指标检测

1.4.1 ALP 检测 在 96 孔板上以 4×10^6 个/L 的密度接种前述两组细胞。培养 4 d 后,取各孔培养液测定 ALP 活性。

1.4.2 OC 检测 在 96 孔板上以 4×10^6 个/L 的密度接种前述两组细胞。培养 4 d 后,取各孔培养液 100 μ l, 125 I 标记的 OC 100 μ l 与 OC 抗体 100 μ l 混合后 4 $^{\circ}$ C 放置 24 h。加分离剂 500 μ l,混匀后室温放置 20 min,4 $^{\circ}$ C 3 500 r/min 离心 20 min,吸弃上清,检测沉淀物放射剂量。

1.5 统计学处理

所得数据使用第四军医大学统计学教研室 SPSS 软件处理,计量资料以均数 \pm 标准差表示,组间行 t 检验。

2 结果

2.1 NIH3T3 细胞形态

加入 rhBMP-2 50 μ g/L 后,NIH3T3 细胞体积变小,由梭形向多角形转化,细胞形态有明显变化(图 1、2)。

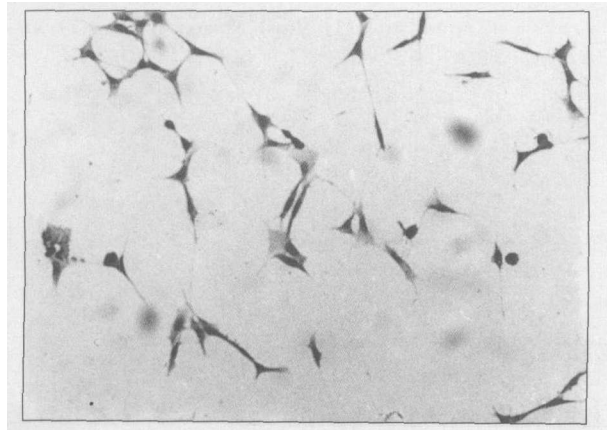


图 1 未加 rhBMP-2 的 NIH3T3 细胞形态 HE $\times 100$

Fig 1 The NIH3T3 cells without rhBMP-2 HE $\times 100$

2.2 细胞增殖活力检测

2.2.1 细胞生长曲线 加入 rhBMP-2 50 μ g/L 后,

NIH3T3 细胞增殖活力变慢,与加药前相比有显著性差异($P < 0.05$),见图 3。

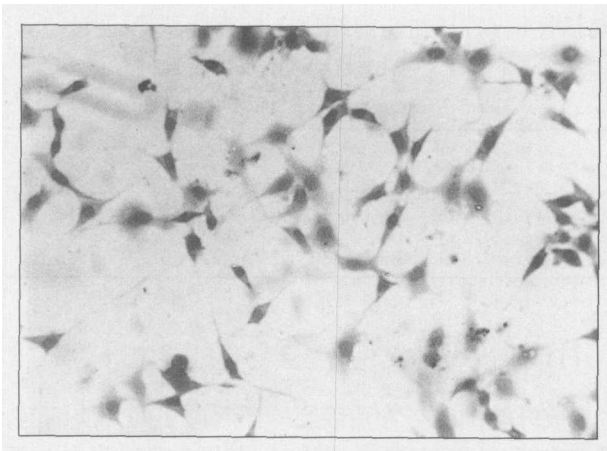


图 2 加 rhBMP-2 后 NIH3T3 细胞形态 HE $\times 100$

Fig 2 The NIH3T3 cells with rhBMP-2 HE $\times 100$

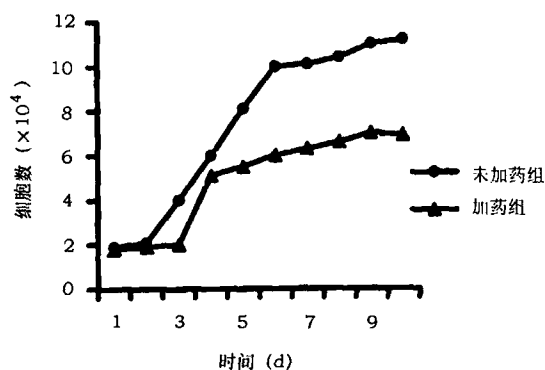


图 3 细胞生长曲线

Fig 3 Cell growth curve

2.2.2 MTT 比色、BrdU 检测 加入 rhBMP-2 50 μ g/L 后,NIH3T3 细胞增殖活力变慢,与加药前相比有显著性差异,见表 1。

表 1 MTT 比色、BrdU 检测($n = 10$)

Tab 1 Results of MTT and BrdU detecting($n = 10$)

项目	加药前	加药后	P 值
MTT(OD 值)	0.480 \pm 0.012	0.360 \pm 0.016	< 0.05
BrdU(阳性指数)	22.000 \pm 1.900	11.000 \pm 3.400	< 0.05

2.2.3 流式细胞仪(flowcytometry, FCM)分析 加药细胞与未加药细胞相比,反应细胞增殖活力的增殖指数明显下降($P < 0.05$),结果与 MTT 比色一致。

表 2 FCM 分析结果

Tab 2 Results of FCM analysis

组别	G ₁ 期	S 期	G ₂ M 期	增殖指数 (S + G ₂ M)
加药组	90.9	6.3	2.8	9.1
未加药组	85.3	7.9	6.8	14.7

2.3 ALP 检测、OC 检测结果

加入 rhBMP-2 50 $\mu\text{g/L}$ 后, NIH3T3 细胞的 ALP 及 OC 活性增高, 与加药前相比有显著性差异, 见表 3。

表 3 ALP 检测、OC 检测结果

Tab 3 Results of ALP and OC detecting

项目	n	加药前	加药后	P 值
ALP 活力 (U/L)	6	236.030 \pm 3.030	379.820 \pm 2.050	< 0.05
OC 值 ($\mu\text{g/L}$)	10	0.108 \pm 0.057	3.237 \pm 0.290	< 0.05

3 讨论

成纤维细胞与骨系细胞一样起源于间充质细胞, 研究表明, 外源性 BMP 可以诱导成纤维细胞向骨系细胞分化, 而 NIH3T3 细胞正是 BMP-2 的靶细胞。本实验采用 ALP 活性及 OC 含量作为判断 NIH3T3 细胞是否具有成骨倾向的指标, 结果显示, NIH3T3 细胞加入 rhBMP-2 后, 其形态、活力、ALP 活性及 OC 含量都有显著性变化, 提示 rhBMP-2 使 NIH3T3 细胞增殖活性变弱, 表现成骨细胞表型。

BMPs 是结构类似的高度保守的功能蛋白质族, 这个家族至少包括 20 个成员。BMPs 最初是作为一种可在异位诱导骨和软骨形成的蛋白质被发现^[3,4], 但后来的研究^[2]发现其功能不仅限于此, 因为 dpp/BMP-4 的信号机制在 6 亿年前即已存在, 大大早于骨、软骨的出现。BMPs 在胚胎发育、器官形成中的重要作用日益为人们所认识, 例如: 在早期胚胎发育时, BMPs 指导身体基本形态的形成并在特定的部位引导形成特异的组织^[5]。

BMPs 及其受体的表达对于胚胎发育、器官形成具有重要作用。脊椎动物胚胎发育的几乎所有步骤都受到了 BMPs 的调控。BMPs 家族成员都通过结合丝氨酸/苏氨酸激酶受体发挥作用, 其机制是典型的细胞表面接受配体信号, 胞浆内进一步处理, 随后信号进入胞核的过程。在 BMP 的信号转导中, BMPs 的 I、II 型受体与配体结合力都不强。当 I、II 型受体形成复合物后, 才与配体有高亲和力^[6]。BMPs 合成

时是大的前体蛋白, 经蛋白水解作用形成活性二聚体, 再与受体复合体结合, 导致 I 型受体的磷酸化, I 型受体再作用于 Smad1 或 Smad5 使其磷酸化。Smad1 或 Smad5 被激活后再结合 Smad4, 该复合物进入胞核后, 与 PDRII-BF1 (果蝇 schnurri 基因产物中的一个同源物) 结合形成一个活性转录调节复合体, 其与特异的启动基元结合, 再作用于下游因子 P-15, c-myc 等, 影响一些特定基因的转录, 从而参与细胞的胞内生理活动^[7]。

近年来对 BMPs 信号转导的研究日益深入, 取得了极大的进展。一旦彻底理解了其信号转导机制, 则利用 BMPs 的基因治疗将指日可待。NIH3T3 细胞中有 BMPs 信号转导因子的表达, 而其本身并不表达 BMP, 因此用 NIH3T3 细胞来研究 BMPs 信号转导机制具有重要的价值。

[参考文献]

- [1] Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and morphogenetic gene family in bone formation and repair[J]. Clin Orthop, 1998, 346: 26-37.
- [2] Coucouvanis E, Martin GR. BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo[J]. Development, 1999, 126(3): 535-546.
- [3] Urist MR. Bone: formation by autoinduction[J]. Science, 1965, 150 (698): 893-899.
- [4] 陈希哲, 杨连甲, 田卫东, 等. 重组人骨形成蛋白 2 基因转染大鼠自体骨髓基质细胞成骨能力研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(6): 419-421.
- [5] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through Smad proteins[J]. Nature, 1997, 390 (6659): 465-471.
- [6] Takase M, Imamura T, Sampath TK, et al. Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244 (1): 26-29.
- [7] Mehler MF, Mabie PC, Zhang DM, et al. Bone morphogenetic proteins in the nervous system[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(7): 309-317.

(本文编辑 汤亚玲)

医学论文中有关实验动物描述的要求

在医学论文描述中, 凡涉及到实验动物者, 在描述中应符合以下要求: (1) 品种、品系描述清楚, (2) 强调来源, (3) 遗传背景, (4) 微生物学质量, (5) 明确体重, (6) 明确等级, (7) 明确饲养环境和实验环境, (8) 明确性别, (9) 有无质量合格证, (10) 有对饲养的描述 (如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求), (11) 所有动物数量准确, (12) 详细描述动物的健康状况, (13) 对动物实验的处理方式有单独清楚的交代, (14) 全部有对照, 部分可采用双因素方差分析。