

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.03.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0016-05

低氧诱导因子-1 α 转染对骨髓间充质干细胞与 β -磷酸三钙支架相容性的影响研究*

张扬¹, 李学渊², 牟怡平¹

(1. 沈阳医学院附属中心医院 手外科, 辽宁 沈阳 110024;
2. 中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: **目的** 探讨应用脂质体将 Hif-1 α 稳定转染至 MSCs 是否影响其与 β -TCP 支架的相容性。**方法** 应用直接贴壁法提取原代 MSCs, 流式细胞仪鉴定干细胞表面抗原并行向成骨细胞诱导分化鉴定。通过脂质体将 Hif-1 α 转染至第 3 代 (P3) MSCs, 经遗传霉素 (G418) 筛选获得稳定转染的细胞。将 β -TCP 支架分为两组: A 组, MSCs 与 β -TCP 支架共培养; B 组, Hif-1 α 稳定转染的 MSCs 与 β -TCP 支架共培养。观察比较两组样品中 MSCs 的成活细胞数和生长曲线, 分析 Hif-1 α 稳定转染对 MSCs 与 β -TCP 支架相容性的影响。**结果** Hif-1 α 转染前后 MSCs 均可在 β -TCP 支架上良好生长, 且两组细胞均保持细胞干性, 两组间细胞数目和细胞增殖差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** Hif-1 α 转染不会对 MSCs 在 β -TCP 支架上的生长增殖产生影响。

关键词: 低氧诱导因子-1 α ; 骨髓间充质干细胞; 转染; β -磷酸三钙支架

中图分类号: Q813.11

文献标识码: A

Effect of HIF-1 α expression on compatibility of MSCs with β -TCP scaffolds*

Yang Zhang¹, Xue-yuan Li², Yi-ping Mou¹

(1. Department of hand surgery, Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110024, China; 2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) on compatibility of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) with beta tricalcium phosphate (β -TCP) scaffold. **Methods** The primary MSCs were isolated by direct adherent method. Flow cytometry was performed for validation of MSCs as well as its differential capacity to osteoblast. HIF-1 α was transfected into the third generation (P3) of MSCs by liposome. HIF-1 α positive cells were screened by geneticin 418 (G418). β -TCP scaffold plus MSCs was divided into 2 groups: group A in which MSCs and β -TCP scaffolds were co-cultured, group B in which HIF-1 α positive MSCs and β -TCP were co-cultured. The survival rate and growth curve of MSCs were observed. **Result** MSCs grew well on the β -TCP scaffolds prior and post HIF-1 α transfection, maintaining differential capacity without statistical significance ($P > 0.05$). No significant difference was observed between the two groups in cell number and cell proliferation ($P > 0.05$). **Conclusion** HIF-1 α expression does not affect the growth and proliferation of MSCs on β -TCP scaffold.

Keywords: hypoxia inducible factor-1 α ; mesenchymal stem cells; transfection; beta tricalcium phosphate

收稿日期: 2017-04-17

* 基金项目: 沈阳医学院科技基金 (No: 20155047); 辽宁省教育厅科技一般项目 (No: L2013316)

骨缺损是骨科治疗面临的主要难题之一,目前的治疗方法主要包括骨移植、二次手术内固定及人工骨填充,由于前两者并发症较多^[1-2],人工骨以及联合干细胞治疗越来越引起人们的重视。但由于骨缺损局部微环境处于低氧低血供的状态,因此细胞增殖和毛细血管网再造都很困难。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , hif-1 α) 是1种关键的平衡氧稳态和调节缺氧反应的转录因子,其靶基因包括骨形态生成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP-2)、基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、血管内皮生长因子 (vescular endothelial growth factor, VEGF) 及其受体 (vescular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 等,该因子参与细胞增生、血管生成及血红蛋白合成等病理生理过程。因此, hif-1 α 转染的骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 可能通过增加组织功能骨的局部血管化、促进细胞增殖等作用改善 MSCs 在缺氧局部的功能并从而促进骨缺损的修复。本研究的目的主要是探讨 hif-1 α 转染是否会对 MSCs 与 β -磷酸三钙 (β -tricalcium phosphate, β -TCP) 支架的相容性产生影响。

1 材料与方法

1.1 MSCs 培养和鉴定

鼠龄 3 ~ 4 周 Wistar 大鼠 6 只, 体重 100 ~ 120 g, 雌性, 直接贴壁法分离大鼠 MSCs^[3]。当 MSCs 70% ~ 80% 铺满培养瓶底时, 进行传代培养。所得细胞记为 P1, 同样方法获得 P2、P3 代细胞。应用流式细胞仪检测细胞表面抗原 CD45、CD90、CD14、CD73、CD105 和 CD34 的表达。应用成骨诱导分化条件培养液 [DMEM/F12 培养基, 0.01 μ mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 50 μ mol/L 维生素 C, 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)] 培养进行成骨细胞诱导, 茜素红染色鉴定^[4]。

1.2 Hif-1 α 瞬时转染

应用感受态细菌 (大肠杆菌 DH5 α) 扩增 pcDNA 3.0-HIF-1 α -eGFP (本实验室保存, 人 HIF-1 α), 按质粒小提试剂盒说明书步骤操作提取质粒, 核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度及纯度, DNA 纯度为 260/280 1.7 ~ 1.9, 置入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。标本送至大连 TaKaRa 生物公司测序^[4]。应用脂质体 LipofectamineTM 2000 将 pcDNA3.0-HIF-1 α -eGFP 质粒转染至 MSCs^[4]。转染条件: 细胞达 >80% 汇合、转染反

应时间 4 h、DNA 和脂质体比为 (μ g/ μ l) 1.00 : 1.25。

1.3 MSCs 转染后稳定筛选 (有限稀释法)

瞬时转染 48 h 后培养基中加入遗传霉素 (geneticin, G418) 筛选, 其终浓度为 200 mg/L, 每 3 ~ 5 天更换 1 次含有 G418 的筛选液。筛选 7 d 后胰酶消化细胞, 离心, 制成 1 000 个/ml 的单细胞悬液。将获得的细胞悬液接种于 96 孔板, 96 孔板预先除第一排外每孔加 0.1 ml 不含抗生素的全培养基 (11%FBS); 第 1 排每孔加 0.1 ml 细胞悬液; 第 2 排每孔加 0.1 ml 细胞悬液并混匀后, 从中吸出 0.1 ml 细胞悬液, 加入到第 3 排中; 在从第 3 排混匀的细胞悬液中吸取 0.1 ml 加入到第 4 排孔中; 以此类推, 最后 1 排每孔中吸出的 0.1 ml 悬液弃去。第 2 天显微镜下观察标记有单个细胞的孔, 继续培养, 此时应用不加 G418、含有青链霉素的全培养基, 待细胞长满后, 消化传代, 移至较大培养器皿中培养。应用成骨诱导分化条件培养液 (DMEM/F12 培养基, 0.01 μ mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 50 μ mol/L 维生素 C, 10% FBS) 培养进行成骨细胞诱导, 茜素红染色鉴定。

1.4 样品分组

随机选取 P3 代 MSCs 细胞 (A 组) 和 pcDNA3.0-HIF-1 α -eGFP 质粒稳定转染的 MSCs 细胞 (B 组) 各 3 瓶, 与 β -TCP 支架共培养后观察细胞生长和增殖情况。

1.5 细胞与 β -TCP 支架共培养

β -TCP 支架材料加工成体积为 20 mm \times 15 mm \times 15 mm 大小, 超声清洗后烘干, 高温高压灭菌备用。细胞消化, 收集于 15 ml 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用完全培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 2.0×10^7 个/ml, 接种到制备好的 β -TCP 支架上, 使细胞悬液均匀浸满整个支架材料。接种完毕, 转移细胞-材料复合物到培养皿中, 放置到 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO₂ 条件下的恒温培养箱中培养, 常规换液。

1.6 扫描电镜观察

细胞接种 β -TCP 支架 1 周后对所得的样本进行电镜观察, PBS 冲洗后应用 2.5% 的戊二醛 4 $^{\circ}$ C 下固定 1 h, 梯度酒精脱水, 临界点干燥。表面喷金后, 扫描电镜下观察。

1.7 荧光染色观察 β -TCP 支架上成活细胞数

采用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 荧光染色法。 β -TCP

支架用 $1 \times \text{PBS}$ 洗 3 次后用 4% 甲醛固定 20 min, PBS 冲洗 2 次, 用 100 nm 的 DAPI (sigma) 溶液染细胞核 2 min。用荧光显微镜拍摄图像。每个样品随机要确定每个样品上的细胞附着的水平, 在同样大的不同区域取 5 个细胞核的图像, 然后把每个样品的细胞数 / 单位面积进行比较。

1.8 细胞增殖检测

采用 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐法 (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT) 法。 β -TCP 支架在最佳培养条件下用 3×10^4 个 / cm^2 密度孵育, 后用 PBS 洗涤, 再在 MTT (sigma) 溶液 (0.5mg/ml) 中孵育 4 h。之后, 移除 MTT 溶液, 加入等量的二甲基亚砷 (dimethyl sulphoxide, DMSO), 低速振荡 10 min, 以溶解晶体, 并使溶液呈现紫色。200 μl 所得溶液置于 96 孔板内和应用酶标仪测定在 570 nm 处的吸光度值。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 用配对样本 Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 形态学观察

原代细胞接种 24 h 后已大部分贴壁, 贴壁后 MSCs 呈棒状或纺锤状 (见图 1)。1 ~ 2 d 后, 细胞可形成大小不等分散的细胞簇, 细胞多伸展为长梭形, 胞核 1、2 个, 圆形居中, 可有 1 个至数个核仁。2 ~ 4 d 后, 细胞簇增大, 呈鱼群样或漩涡状生长, 与其他细胞簇逐渐融合 (见图 2)。培养 4 ~ 5 d 可传一代。

2.2 细胞表面抗原及细胞分化功能鉴定结果

流式细胞表面抗原检测结果表明 P3 代的 MSCs 表达 CD90 (95.5%)、CD73 (95.4%)、CD105 (97.9%), 基本不表达 CD45 (1.2%)、CD14 (0.6%)、CD34 (0.4%)。分离培养的 MSCs 经成骨诱导分化条件培养液培养后能够成功诱导成为成骨细胞 (见图 3)。

2.3 Hif-1 α 转染后 MSCs 分化功能鉴定及荧光表达

稳定转染 Hif-1 α 的 MSCs 仍能诱导分化为成骨细胞, 证明转染后的 MSCs 仍保持细胞干性 (见图 4)。Hif-1 α 瞬时转染后 12 h 可见细胞有微弱荧光表达, 24 h 后可见绿色荧光, 48 h 后阳性细胞增多, 荧光强度增强 (见图 5); 72 h 后荧光逐渐减弱。稳定转染后

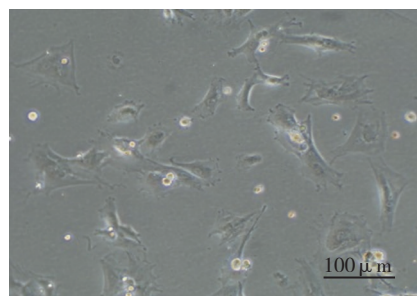


图 1 MSCs 接种 24 h 呈棒状或纺锤状

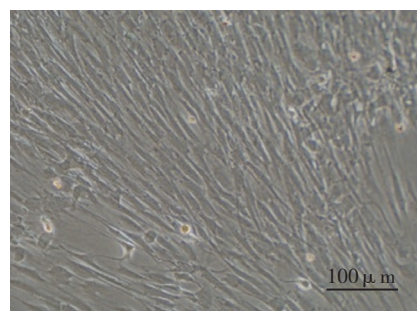


图 2 MSCs 培养 2 ~ 4 d 后, 细胞簇呈鱼群样生长

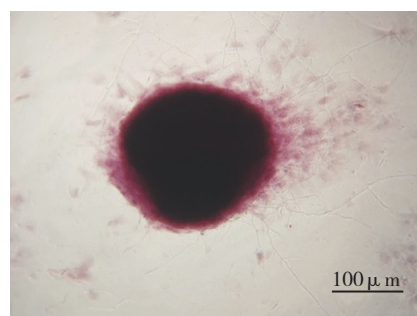


图 3 MSCs 成功诱导为成骨细胞 (茜素红染色 $\times 100$)

可见细胞核和细胞浆内都有 GFP 表达 (见图 6)。

2.4 在支架上生长的 MSCs 形态学观察结果

在培养 1 周时电镜下观察可见细胞贴附于材料的表面, 伸展性好, 一些聚集在一起, 有的细胞可覆盖材料孔隙表面, 生长较好, 可见有突起连接并附着于孔隙内壁, 并见有胶原分泌 (见图 7)。

2.5 Hif-1 α 转染前后 β -TCP 支架 MSCs 成活细胞数比较

随着培养时间的延长 β -TCP 支架上生长的 MSCs 的数目也逐渐增多, 在培养 3 d 时细胞数目增多明显 (见图 8), 但在 Hif-1 α 转染前后 MSCs 在 β -TCP 支架上的生长细胞数差异无统计学意义 ($P = 0.725$), 见图 9。

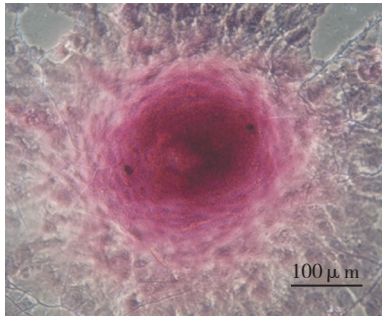


图 4 MSCs 瞬时转染 Hif-1 α 后成功诱导为成骨细胞

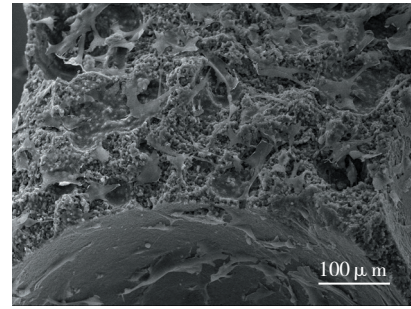


图 7 生长于 β -TCP 支架表面的 MSCs

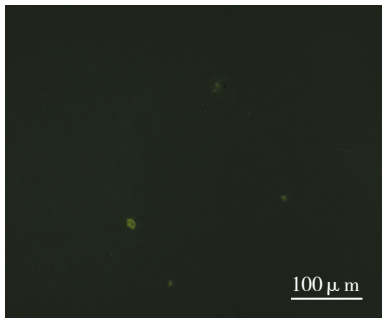


图 5 MSCs 瞬时转染 Hif-1 α 48 h 后 GFP 荧光蛋白表达

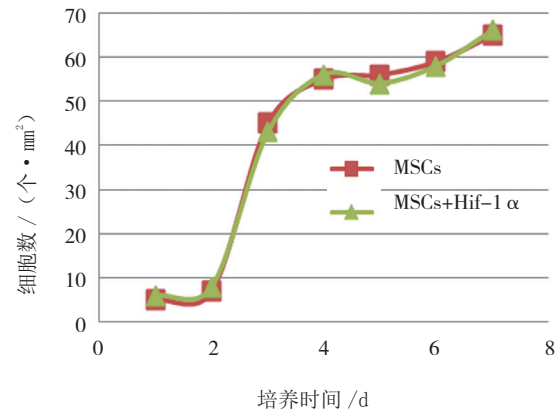


图 8 两组细胞在 β -TCP 支架的生长情况

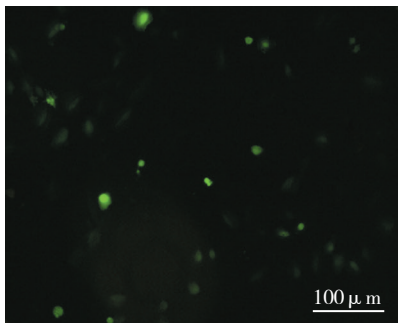


图 6 稳定筛选后的转染细胞 (MSCs) 胞核与胞质均有绿色荧光蛋白表达 (×100)

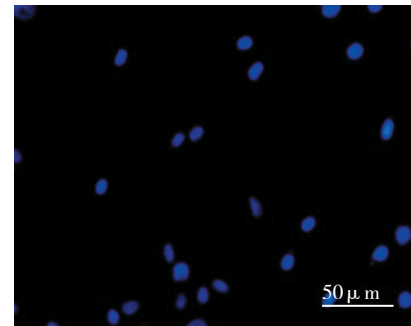
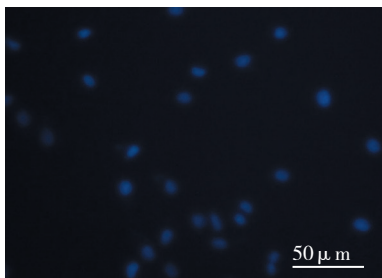


图 9 生长在 β -TCP 支架上的细胞 (DAPI 荧光染色)

2.6 Hif-1 α 转染前后 β -TCP 支架 MSCs 增殖比较

研究结果显示, MTT 法检测细胞增殖的结果。Hif-1 α 转染前后 MSCs 在 β -TCP 支架上增殖差异无统计学意义 ($P=0.612$)。见图 10。



A MSCs

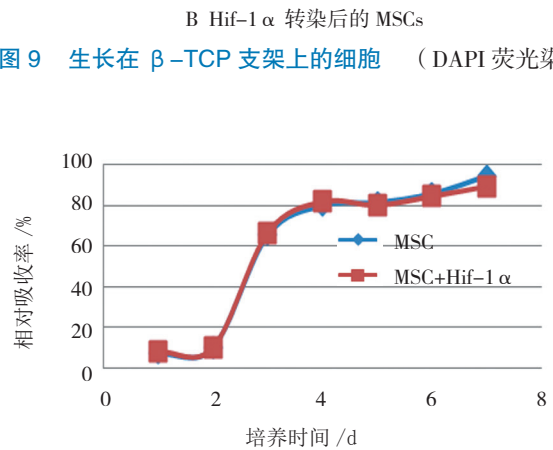


图 10 两组细胞增殖情况 (MTT 法)

3 讨论

目前,大部分研究结果提示人工骨支架、MSCs 以及细胞因子联合治疗骨缺损效果最佳:BEHNIA 等研究者证明应用纳米骨支架联合 MSCs 和富含血小板的生长因子治疗兔颅骨骨缺损能够有效促进骨再生^[5];LUCARELLI 等人应用同种异体骨联合基质干细胞和富含血小板的血浆移植治疗 3 cm 的羊骨缺损,在术后 4 个月的随访时骨组织计量学分析显示有 42.8%~54.1% 的新骨形成^[6];LI 等人研究得出结论,应用 β -TCP 联合 BMP-2 基因修饰的脂肪间充质干细胞治疗犬尺骨骨缺损,随访 16 周时骨组织计量学分析表明联合治疗组新骨形成增加,骨缺损新骨面积/总表面积为 $(39.95 \pm 8.55)\%$ ^[7];HE 等人使用聚乳酸-羟基乙酸共聚物/磷酸钙骨水泥联合 BMSCs 和富含血小板的血浆治疗兔 6 mm × 10 mm 股骨骨缺损,术后 12 周显示联合治疗组新骨形成较好^[8];PROSECKÁE 等研究者证明在应用 ϵ 聚己内酯/羟基磷灰石联合 MSCs 和富含血小板溶液可获得最多且分布最均匀的新生骨^[9];KIM 等发现,在临床上 ϵ 聚己内酯-磷酸三钙联合自体纤维蛋白胶以及 MSCs 和重组人 BMP-2 的复合材料是促进新骨形成的最佳组合^[10]。在相关研究中,LIU 等人的研究表明,纳米羟基磷灰石/聚 L-乳酸联合骨髓干细胞和重组人 BMP-2 共同治疗 8 mm 大小的兔牙槽骨的骨缺损所得骨矿物质沉积为 $(1.77 \pm 0.11)\%$,其小于应用不含重组人 BMP-2 的对照组,后者的骨矿物质沉积为 $(2.52 \pm 0.33)\%$ ^[11]。联合治疗更有效的原因可能是细胞因子的应用增加细胞的生物活性和局部血管化。Hif-1 α 的靶基因编码的蛋白,如 VEGF、BMP-2 等均在此方面具有优势,因此可以考虑将 Hif-1 α 引入复合组织人工骨中。

Hif-1 α 转染与其他细胞因子复合相比较的优势在于其可表达多种细胞因子,且具有稳定表达 Hif-1 α 的干细胞可以持续且稳定的分泌细胞因子,不会因术后时间的延长而作用快速消失。而且 Hif-1 α 能够改善低氧环境下细胞的生物活性,对骨缺损的低氧低灌注微环境下干细胞的存活提供有利条件。本研究结果证明 Hif-1 α 转染前后 MSCs 的细胞干性和生物活性均无变化,后者与支架之间的相容性亦未受到影响,而且通过脂质体转染的方法可以避免应用病毒转染的继发风险,因此应用本研究的方法合成组织人工骨是

可行的。

本研究的局限性在于只证实 Hif-1 α 转染的 MSCs 用于联合支架治疗骨缺损的可行性,其有效性还需进一步研究证实。

参 考 文 献:

- [1] HENKEL J, WOODRUFF M A, EPARI DR, et al. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions-A 21st century perspective[J]. *Bone Res*, 2013, 1(3): 216-248.
- [2] LIU Y, LIM J, TEOH S H. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(5): 688-705.
- [3] LI X Y, ZHANG Y, QI G X. Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Cytotechnology*, 2013, 65(3): 323-334.
- [4] 张扬, 辛畅泰. HIF-1 α 转染方法的优化及其对间充质干细胞存活及分化功能的影响[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(3): 365-371.
- [5] BEHNIA H, KHOJASTEH A, KIANI M T, et al. Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel, platelet-rich growth factor, and mesenchymal stem cells: a histologic study in rabbit calvaria[J]. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 2013, 115(2): e7.
- [6] LUCARELLI E, FINIM, BECCHERONI A, GIAVARESI G, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2005(435): 62-68.
- [7] LI H, DAI K, TANG T, et al. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(4): 836-842.
- [8] HE F, CHEN Y, LI J, et al. Improving bone repair of femoral and radial defects in rabbit by incorporating PRP into PLGA/CPC composite scaffold with unidirectional pore structure[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(4): 1312-1324.
- [9] PROSECKÁ E, RAMPICHOVÁ M, LITVINEC A, et al. Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(2): 671-682.
- [10] KIM S J, KIM M R, OH J S, et al. Effects of polycaprolactone-tricalcium phosphate, recombinant human bone morphogenetic protein-2 and dog mesenchymal stem cells on bone formation: pilot study in dogs[J]. *Yonsei Med J*, 2009, 50(6): 825-831.
- [11] LIU H C, WANG D S, SU F, et al. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nanohydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide)[J]. *Tissue Eng A*, 2011, 17(19/20): 2417-2433.

(王荣兵 编辑)