

转化生长因子 β 对骨形成蛋白-2基因 转染细胞生物学行为的影响

司晓辉 杨连甲 金 岩

摘要 目的: 探讨骨形成蛋白-2(BM P-2)和转化生长因子 β (TGF β)对细胞增殖分化的调控作用及其机制。方法: 构建含有人BM P-2基因的噬菌粒表达载体 pBK-B2, 利用脂质体转染方法将其导入 NIH3T3细胞, 通过 G-418筛选获得阳性细胞克隆, 细胞原位杂交、免疫组化法检测 BM P-2基因的稳定转染及表达, 并检测了外源性 TGF β 对转染细胞增殖活力及碱性磷酸酶活性和骨钙素含量的影响。结果: TGF β (50 ng/ml)促进 BM P-2转染细胞的增殖, 但是抑制其碱性磷酸酶活性和骨钙素的含量。结论: TGF β 的生物学效应与多种因素密切相关, BM P 和 TGF- β 在细胞生长分化过程中具有协同作用。

关键词 转化生长因子 β 骨形成蛋白-2 基因转染 细胞分化

骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 作为骨的生长因子属于 TGF β 超家族的一个成员。BMPs 的一个重要特点是能在非骨组织如肌肉中诱导新的软骨和骨形成, 随着对 BMPs 研究的不断深入, 揭示了它在形态发生和细胞分化过程中发挥重要的作用。BMP 家族至少包括20个成员, 其中BM P-2被认为是活性最强的唯一能单独诱导成骨的因子。转化生长因子 β (transforming growth factor β TGF β)对多种组织细胞的生长分化及功能过程具有调控作用, 它与 BMPs 最明显的区别是 TGF β 本身无异位成骨的作用。本文以 BM P-2基因为目的基因, 以小鼠成纤维细胞为载体细胞, 建立了稳定表达 BM P-2的细胞株, 并检测了外源性 TGF β 对转染细胞的增殖活力和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性、骨钙素 (osteocalcin, OC) 含量的影响, 进一步从分子水平探讨 BM P-2和 TGF β 对细胞增殖分化的调控作用以及二者的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

pBK-B2噬菌粒表达载体由第四军医大学口腔医院病理科构建¹, Lipofectamine 转染试剂盒、DMEM、G-418为美国 Gibco 公司产品, ABC 试剂盒为美国 Vector 公司产品, 牛血小板 TGF β 由第四军医大学口腔医院病理科制备²。MTT 为美国 Sigma 公司产品, ALP 检测试剂盒购自广州标佳科技有限公司, OC 放免检测试剂盒购自北京东亚免疫

技术研究所。

1.2 基因转染和克隆筛选

采用脂质体载体 (lipofectamine) 将 pBK-B2 转染 NIH3T3细胞。转染3 d后, 弃去原培养液, 加入含 G-418 (500 μ g/ml) 的DMEM 培养液(含10% FCS), 在标准环境下培养, 15 d后绝大多数细胞死亡, 收集 G-418抗性的细胞克隆, 扩大培养并制备细胞爬片。

1.3 原位杂交³

细胞爬片经4%多聚甲醛(PFA)/PBS(pH7.4)固定, 分别用0.3% Triton X-100/PBS、0.1 mol/L HCl及蛋白酶 K 处理, 4% PFA 后固定及逐级酒精脱水干燥后, 滴加热变性后的含地高辛标记BM P-2探针的杂交液, 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜。缓冲液2 \times SSC、1 \times SSC、0.5 \times SSC 充分漂洗, 正常羊血清封闭, 然后滴加标记碱性磷酸酶的抗地高辛抗体 (Anti-DIG-AP) 37 $^{\circ}$ C 温育2 h。缓冲液 I、缓冲液III充分漂洗后, NBT/BCIP 暗处显色20 h。TE 终止反应, 逐级酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.4 免疫组化

已固定的细胞爬片经1% H₂O₂/PBS、0.3% Triton X-100/PBS 处理后, 滴加正常马血清37 $^{\circ}$ C 温育30 min, 弃去血清后滴加鼠抗人 BM P-2单抗(G8A6), 4 $^{\circ}$ C 过夜。滴加生物素化的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 温育30 min。滴加ABC 复合物37 $^{\circ}$ C 温育30 min, 上述各步之间均以 PBS 充分振洗。最后滴加新鲜配制的DAB 显色液, 室温10 min, 蒸馏水洗终止反应, 苏木精衬染, 逐级酒精脱水后二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.5 MTT 检测

转染细胞以 4×10^3 的细胞密度(200 μ l)接种于96孔板,在含10% FCS 的DM EM、标准环境下培养3 d后,弃去原培养液,每孔加含1%血清DM EM 稀释的TGF β 终含量分别为5 ng/ml、50 ng/ml和500 ng/ml,继续培养3 d后,每孔加MTT (5 mg/ml) 20 μ l,继续培养4 h,轻轻吸尽上清,加150 μ lDM SO 振荡15 min,使结晶物充分溶解,用EL ISA 仪测定490 nm 的光密度(OD)值。同时设空白对照。采用统计学软件Statgraphics(3.0版本)进行组间统计学分析,下同。

1.6 ALP 检测

细胞接种与培养同前。弃去孔内培养液,PBS (pH7.4)洗涤细胞2次,每孔加入0.2% Triton X-100/PBS (pH7.4) 100 μ l,冰浴下超声粉碎,加入200 μ l底物反应液,37 $^{\circ}$ C 孵育30 min,0.1 mol/L NaOH 终止反应。用EL ISA 仪测定410 nm 的OD 值。同时设空白对照,统计学分析。

1.7 OC 检测

细胞接种与培养同前。取待测培养液100 μ l 125 I 标记的OC100 μ l与OC 抗体100 μ l混合后4 $^{\circ}$ C 放置24 h。每管加分离剂0.5 ml,混匀后室温放置20 min,4 $^{\circ}$ C 3500 r/min 离心20 min,弃上清,检测沉淀物放射剂量。由自动 γ 计数器(Cap-R ia,美国)预先编制程序,直接给出相关参数、标准曲线及样品浓度。最后以ng/ml表示。同时设空白对照,统计学分析。

2 结 果

2.1 原位杂交

转染细胞的胞浆中有蓝色颗粒样阳性杂交信号(图1),而亲本细胞为阴性,证明pBK-B2成功导入细胞,并有mRNA 的较高表达。

2.2 免疫组化

转染细胞的胞浆中有棕色阳性信号(图2),而亲本细胞为阴性,证明人BM P-2基因在N H3T3细胞中得到表达。

2.3 MTT 检测

TGF β (50 ng/ml)作用于转染细胞后,活力细胞数增加,二者间有显著性差异,而5 ng/ml组和500 ng/ml组对细胞增殖无明显影响(表1)。

表1 TGF β 作用于转染细胞的MTT 检测

TGF β (ng/ml)	n	OD 值($\bar{x} \pm s$)	P
0	10	0.230 \pm 0.019	
5	12	0.246 \pm 0.005	> 0.05
50	12	0.254 \pm 0.005	< 0.05
500	12	0.238 \pm 0.003	> 0.05

2.4 ALP 活性

TGF β (50 ng/ml)抑制转染细胞的ALP 活性,二者间有显著性差异,而5 ng/ml组和500 ng/ml组对细胞ALP 活性无明显影响(表2)。

表2 TGF β 作用于转染细胞的ALP 活性检测

TGF β (ng/ml)	n	OD 值($\bar{x} \pm s$)	P
0	10	0.021 \pm 0.002	
5	10	0.020 \pm 0.000	> 0.05
50	10	0.017 \pm 0.015	< 0.05
500	10	0.019 \pm 0.001	> 0.05

2.5 OC 含量

TGF β (5 ng/ml、50 ng/ml及500 ng/ml)抑制转染细胞OC 的合成,二者间有显著性差异(表3)。

表3 TGF β 作用于转染细胞的OC 含量检测

TGF β (ng/ml)	n	OD 值($\bar{x} \pm s$)	P
0	14	2.227 \pm 0.310	
5	5	0.336 \pm 0.229	< 0.05
50	5	0.170 \pm 0.100	< 0.05
500	5	0.536 \pm 0.300	< 0.05

3 讨 论

许多研究表明,外源性BM P不仅可以诱导未分化间充质细胞向骨-软骨细胞分化,而且还具有诱导肌源性细胞、成骨前体细胞、成纤维细胞等向骨细胞系分化的作用。BM P能够促进Balb-c 3T3、Sw iss 3T3及3T3-L1等成纤维细胞向脂肪细胞或成骨细胞分化⁴。N H3T3细胞来源于Sw iss小鼠胚胎,它可能向几个方向分化,受到诱导后可向成骨样细胞或脂肪细胞分化,而BM P-2是重要的细胞诱导因子,并且小鼠胚胎N H3T3细胞与标记的BM P-2有高亲和力⁵,这些提示N H3T3细胞是BM P-2的靶细胞,将BM P-2基因导入N H3T3细胞基因组中并检测其功能,有助于从分子水平研究BM P-2对细胞表型的影响及其调控机理。第四军医大学口腔医院病理科构建了原核、真核均表达的噬菌粒表达载体pBK-B2,利用简单、安全、高效的新一代产品脂质体载体,将其导入小鼠N H3T3细胞,并在G-418压力下筛选抗性克隆,获得稳定表达BM P-2的细胞克隆,通过核酸原位杂交和免疫组织化学检测,从mRNA 水平及蛋白质水平证实稳定转染后的N H3T3细胞可以表达外源BM P-2

基因,表明BM P-2转染N H3T3细胞是成功的。转染BM P-2后细胞的增殖能力减弱,但ALP活性和OC含量提高,表现出成骨细胞的表型⁶。

TGF β 是骨重建的关键性因子,它促进成骨细胞增殖而抑制破骨细胞分化。TGF β 以剂量依赖方式(0.1~100 ng/ml)促进体外培养的骨膜移植物的软骨成骨,尤其以50 ng/ml组最为显著⁷。与BM P不同的是TGF β 无诱导未分化间充质细胞向骨细胞分化的作用,它主要对已经分化的细胞发挥作用⁸。TGF β 抑制MC3T3-E1细胞的ALP活性,而成骨素(osteogenin,即BM P-3)可以在48 h之内逆转这种抑制作用⁹。骨折愈合过程中BM P-2和TGF β mRNA的表达时期及表达细胞既有重叠又有差异³。这些均提示BM P和TGF β 在刺激骨生长和骨愈合方面存在协同作用。

MTT比色实验是一种检测细胞存活和生长的方法。在一定范围内,MTT结晶物形成的量与细胞数成正比。ALP是成骨细胞分化成熟的重要标志之一,是参与骨组织形成、代谢及再生的重要物质。OC是唯一已知的由成骨细胞产生的骨特异性蛋白,又称骨玻璃蛋白(bone glass protein, BGP),它在骨细胞分化的终末阶段出现。用¹²⁵I标记的OC抗体,通过放射免疫法可测定细胞中OC的含量。本实验结果显示,TGF β 对ALP活性和OC含量的影响与它对转染细胞增殖的作用相反,即50 ng/ml的TGF β 能够促进细胞的增殖,但却抑制ALP活性和OC含量,提示成骨细胞的增殖和分化过程可以独立进行。田卫东等¹⁰观察TGF β 对人胚成骨样细胞生物学行为的影响也得出相同的结论。而在5 ng/ml组和500 ng/ml组,其对ALP的活性无明显影响,而对OC的合成有抑制作用,这可能与TGF β 的剂量、细胞分化的时期等因素有关。

以往的研究表明,外源性TGF β 抑制多潜能的细胞系ROB-C26和分化程度较高的成骨样细胞系ROB-C20的ALP活性,也不诱导OC的产生;而BM P-2则刺激C26细胞ALP活性并增加这两种细胞的OC含量¹¹。本实验结果显示,N H3T3细胞在转染BM P-2基因后表现出某些成骨细胞的表型(ALP活性和OC含量提高),TGF β 能够促进此细胞的增殖却抑制ALP和OC的活性,说明TGF β 具有双重效应,其对靶细胞作用的性质取决于细胞类型、分化状态、生长条件、剂量及其它生长因子的存

在等因素。

综上所述,TGF β 能够促进BM P-2基因转染细胞的增殖能力,但却抑制该细胞的ALP活性和OC含量。TGF β 对细胞的作用性质与细胞的分化状态和剂量等因素密切相关。由于BM P和TGF β 对细胞生物学作用不尽相同,如何合理地将两者用于细胞分化的不同时期以加速骨修复是值得深入探讨的问题。

(本文图见中心插页15)

4 参考文献

- 1 司晓辉,杨连甲,金岩,等.人骨形成蛋白2噬菌粒表达载体的构建与鉴定.细胞与分子免疫学杂志,1998,17(2):141
- 2 司晓辉,金岩,杨连甲,等.转化生长因子 β 的提取、纯化及其促进骨生长作用的实验研究.细胞与分子免疫学杂志,1997,13(1):5~8
- 3 Si XH, Jin Y, Yang LJ, et al. Expression of BM P-2 and TGF- β mRNA during healing of the rabbit mandible. Eur J Oral Sci, 1997, 105(4): 325~330
- 4 Lindholm S. BMPs: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery. Texas, USA: R. G. Landes Company, 1996: 68~69
- 5 Iwasaki S, Tsuruoka N, Hattori A, et al. Distribution and characterization of specific cellular binding proteins for BM P2. J Biol Chem, 1995, 270(10): 5476~5482
- 6 司晓辉,杨连甲,金岩.人骨形成蛋白2基因转染对N H3T3细胞生物学行为的影响.中华口腔医学杂志,1999,34(2):103~105
- 7 Miura Y, Fitzsimmons JS, Comisso CN, et al. Enhancement of perosteal chondrogenesis in vitro: dose-response for TGF β . Clin Orthop, 1994, 301(3): 271~280
- 8 司晓辉,金岩,杨连甲.重组人骨形成蛋白2和转化生长因子 β 复合促进骨生长.实用口腔医学杂志,1997,13(3):166~168
- 9 Vukicevic S, Luyten FP, Reddi AH. Osteogenin inhibits proliferation and stimulates differentiation in mouse osteoblasts-like cells (MC3T3-E1). Biochem Biophys Res Commun, 1990, 166(2): 750~756
- 10 田卫东,王大章.生长因子网络调节对骨形成作用的研究 I. TGF β 对人胚成骨样细胞增殖及分化的影响.华西口腔医学杂志,1998,16(1):65~68
- 11 Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, et al. Recombinant human BM P2 stimulates osteoblasts maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. J Cell Biol, 1991, 113(3): 681~687

(1998-05-25收稿,1999-06-08修回)

Effects of TGFβ on BMP-2 Gene Transfection Cells in Vitro

Si Xiaohui, Yang Lianjia, Jin Yan

Department of Oral Pathology, Stomatological College, the Fourth Military Medical University

Abstract

Objective: To elucidate the mechanism of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and transforming growth factor β (TGFβ) on cell differentiation. **Methods:** A phagemid expression vector for human BMP-2 (pBKB2) was constructed and transfected into the NIH3T3 cells by using lipofectamine. Positive cell clones were selected with G418. The stable transfection and expression of BMP-2 were determined by using in situ hybridization and immunohistochemistry methods. The proliferativity of the transfected cells treated with TGFβ were assayed by MTT method. Alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC) production were also measured. **Results:** The proliferation of the transfected cells was stimulated after being treated with TGFβ (50 ng/ml). But the ALP activity and OC production were inhibited. **Conclusion:** The effects of TGFβ are closely related to many factors, and BMP and TGFβ may be synergistic in cell proliferation and differentiation.

Key words: transforming growth factor β bone morphogenetic protein 2 gene transfection cell differentiation

颌下淋巴结 Burkitt's 恶性淋巴瘤一例报告

何志秀 马莉 黄河长 陈艳

患者男性, 38岁, 农民, 住院号34920。因右颌下无痛性包块3⁺月入院。3月前偶然发现右颌下长一无痛包块, 包块进行性肿大, 生长迅速, 经抗炎治疗无效。自发病以来无发烧及消瘦, 精神、饮食较好。体格检查: 呼吸、心跳正常, 胸腹部检查未见异常。专科检查: 右颌下区1个4 cm × 4 cm 大小包块, 质地较硬, 边界欠清, 表面呈结节状, 无压痛, 活动度较差; 右下颌角下方可触及2 cm × 1.5 cm 硬结, 边界清楚, 表面光滑, 活动, 无压痛。颌下腺导管开口处无异常分泌物。实验室检查: 血常规、肝肾功、电解质、血糖均无异常。临床诊断: 右颌下恶性混合瘤。

治疗采用手术摘除肿瘤加COM P 方案化疗。术中见包块位于颌下腺之外, 在腺体的前上内侧, 与内侧组织有轻度粘连。

病理学检查: 细胞学涂片(C65-95)检查见大量肿瘤细胞, 细胞大, 较为一致, 胞浆少, 几为裸核, 核仁明显, 核分裂象易见, 符合恶性淋巴瘤(图1)。大体检查见灰褐色组织1个, 1.2 cm × 1.2 cm × 1 cm 大小, 另一碎组织黄豆大小。光镜检查(473-95)见肿瘤为弥漫性, 瘤细胞形态一致, 中等大

小, 胞浆少, 核圆, 核膜厚, 核分裂象易见; 吞噬了死亡瘤细胞碎片的巨噬细胞, 均匀散布在瘤细胞之间, 胞浆淡染, 呈“星空现象”(图2)。免疫组化检查 CD20阳性。病理诊断: 右颌下 Burkitt's 恶性淋巴瘤。术后随访4年, 无复发, 情况良好。

讨论 本型淋巴瘤好发于中非儿童。我国亦有报道, 病因学研究该病与 EB 病毒密切相关。好发于颌骨, 约20%侵犯淋巴结。光镜检查特点为肿瘤细胞间的巨噬细胞吞噬瘤细胞碎片导致的“星空现象”。免疫组化检查为 CD20阳性, CD19阳性。分子生物学检查 EBV 阳性; 8, 14染色体易位及 C_mgc 基因易位。本病例为发生于颌下淋巴结的结内型 Burkitt's 恶性淋巴瘤, 国内少有报道。

(本文图见中心插页16)

(1999-01-08收稿)

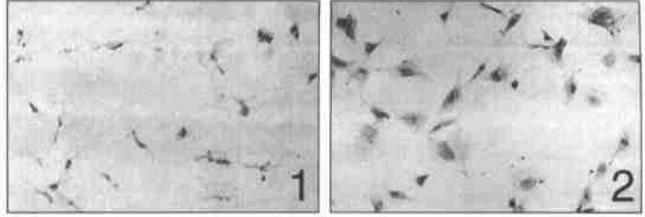
作者单位: 610041 华西医科大学口腔医院病理科(何志秀, 马莉, 陈艳), 中山医科大学附属第三医院(黄河长)

转化生长因子β对骨形成蛋白-2基因

转染细胞生物学行为的影响

(正文见第321页)

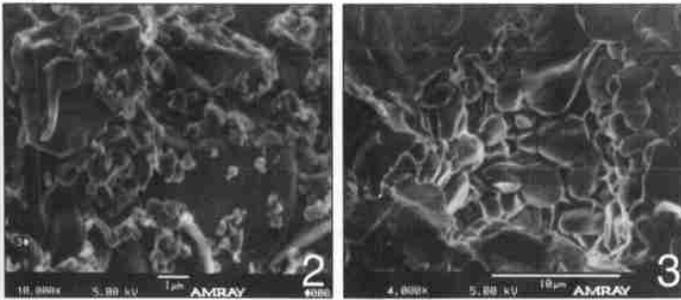
- 图1 转染细胞胞浆呈BMP2 mRNA阳性 原位杂交 ×100
 图2 转染细胞胞浆呈BMP2阳性 免疫组化, 苏木精衬染 ×100



可切削渗透陶瓷氧化铝基体的研究

(正文见第325页)

- 图2 G_{s2}组基体断面形貌 氧化铝粉体间呈紧密堆积, 颗粒呈多边形, 有的近乎球形, 粗细颗粒间呈弥散均匀分布
 图3 G_{s3}组基体断面形貌 基体中微细粉体大量熔失, 粗颗粒间颈部生长培接有所改善, 基体保持均匀的多孔结构



牙科用Ti-Zr合金的研制及性能特点

(正文见第329页)

- 图1 Ti-Zr合金金相显微组织结构 ×200
 图2 纯钛合金金相显微组织结构 ×200



下颌髁突软骨细胞传代过程中生物学特性变化

(正文见第355页)

<p>软骨细胞</p> <p>M₁-3T3E₁</p>		
<p>I型胶原</p> <p>II型胶原</p> <p>III型胶原</p>		
<p>1 3 5 7 (传代次数)</p> <p>1 3 5 7 (传代次数)</p>	<p>图1 原代培养的人髁突软骨细胞多数为多角形或圆形 ×100 图4 传代人髁突软骨细胞II型胶原的免疫印迹</p>	<p>图2 第5代人髁突软骨细胞多数为长梭形 ×100 图6 传代人髁突软骨细胞前胶原基因表达的变化</p>