

# TGF- $\beta$ 1 和 EGFP 体外电转染兔骨髓间充质干细胞的实验研究

文剑明<sup>1</sup>, 王锐英<sup>1</sup>, 高燕<sup>2</sup>, 胡译文<sup>1</sup>, 陶波<sup>1</sup>, 周文静<sup>1</sup>

**摘要** 目的 通过电转染介导转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 转染兔骨髓间充质干细胞 (BMSCs), 观察 II 型胶原表达的情况。方法 用全骨髓细胞贴壁培养法分离、培养兔 BMSCs; 诱导 14 d 后, 免疫组化和 Western blot 法检测 II 型胶原表达。结果 BMSCs CD90 表达阳性, CD31 表达阴性; 成功转染 TGF- $\beta$ 1 至 BMSCs; 通过免疫组化及 Western blot 法检测 TGF- $\beta$ 1 组细胞内 II 型胶原有较强的表达, 与增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 组和空白对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 电转 TGF- $\beta$ 1 质粒至兔 BMSCs, 可以促进 II 型胶原表达。

**关键词** TGF- $\beta$ 1; 骨髓间充质干细胞; 电转染; II 型胶原

**中图分类号** R 682.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)05-0581-04

椎间盘退行性变在现实生活中是一种常见而棘手的疾病, 给患者带来巨大的痛苦, 同时也让家庭承受沉重的经济负担, 但是目前尚无有效的方法可以根治这一病症。椎间盘退行性变的始动因素就是髓核细胞发生退变, 由于髓核细胞数量有限, 发生退变后自身修复和增殖困难。目前干细胞治疗退变椎间盘已经成为研究的热点<sup>[1-2]</sup>。该实验在电转染介导下, 将转化生长因子  $\beta$ 1/增强型绿色荧光蛋白 (trans-

forming growth factor beta1/enhanced green fluorescent protein, TGF- $\beta$ 1/EGFP) 导入骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 中, 由于细胞内的 TGF- $\beta$ 1 基因能高效表达, 并能持续分泌 TGF- $\beta$ 1 目的蛋白, 诱导 BMSCs 向类髓核细胞方向分化, 从而为修复退变的椎间盘提供种子细胞。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及主要试剂仪器** 健康雄性新西兰大白兔 1 只, 2 周龄, 清洁级, 约 250 g, 由桂林医学院实验动物中心提供。胎牛血清、DMEM 低糖培养基和胰蛋白酶 (美国 HyClone 公司); 混合质粒 TGF- $\beta$ 1/EGFP (美国 Sigma 公司); 兔抗人 II 型胶原蛋白单克隆抗体 (武汉博士德公司); 流式一抗小鼠抗兔 CD90 (美国 Abcam 公司); CD31 (美国 Antigenix 公司); 同型对照小鼠抗兔 IgG1 K (美国 eBiosciences 公司); 流式二抗 PerCP 标记 (美国 jackson 公司); 二抗免疫组织化学染色试剂盒、二抗 FITC 标记 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); FACSAria<sup>TM</sup> III 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 倒置相差显微镜、正置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); CO<sub>2</sub> 孵箱 (美国 Thermo 公司)。

**1.2 BMSCs 的取出、培养及鉴定** 麻醉后处死兔子, 取兔两边的股骨、胫骨和肱骨, 从两边干骺端剪断, 剔除肌肉, 移至培养皿中, 吸取培养液冲洗股骨骨髓腔, 取冲洗液置于培养箱中培养。利用 BMSCs 贴壁的特性, 48 h 后首次换液, 以后每 2 d 换液 1

2015-02-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31260233)

作者单位: <sup>1</sup> 桂林医学院附属医院骨二科, 桂林 541000

<sup>2</sup> 桂林医学院护理学院外科护理教研室, 桂林 541000

作者简介: 文剑明, 男, 硕士研究生;

王锐英, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-

mail: rywang@glmc.edu.cn

of Col1A1 and  $\alpha$ -SMA. The protein expression levels of Col1A1 and  $\alpha$ -SMA were detected by Western blot. MTT assay was used to determine the proliferation influence of the transfected cardiac fibroblasts. **Results** The cardiac fibroblasts transfected microRNA-21 inhibitors exhibited down-regulated microRNA-21 expression and attenuated Col1A1 and  $\alpha$ -SMA mRNA expression. The cardiac fibroblasts proliferation activity decreased significantly after transfected microRNA-21 inhibitors. **Conclusion** MicroRNA-21 inhibitors can suppress the proliferation activity of cardiac fibroblasts significantly, implicating microRNA-21 as a potential target for cardiac fibroblasts activation and proliferation and pointing out that this result can provide a new idea for intervening and preventing the myocardial fibrosis occurrence and development.

**Key words** microRNA-21; cardiac fibroblasts; Col1A1;  $\alpha$ -SMA; Western blot

次。细胞达 80% 及以上融合后,用胰蛋白酶消化传代,重复上述培养方法进行传代后的细胞培养。

收获第 5 代 BMSCs,胰酶消化,1 500 r/min 离心 5 min, PBS 重悬细胞; 分别加一抗鼠抗兔 CD90、CD31 4 ℃ 避光保存 30 min; PBS 洗涤 2 次,重悬细胞,加入相应二抗山羊抗小鼠 PerCP 标记单克隆抗体,4 ℃ 避光放置 30 min; 加 PBS 洗涤 3 次, PBS 重悬细胞,上机检测。

**1.3 电转染 质粒比例配置:** TGF-β1 和 EGFP 各取 10 μl。ECM830 电穿仪电转参数:电压 540 V,脉宽 30 μs,脉冲数 3 次,脉冲间隔时间 1 000 ms。电穿孔缓冲液:272 mmol/L 蔗糖,7 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,pH 值为 7.4 的等渗溶液 90 μl。收集第 5 代细胞与质粒 TGF-β1/EGFP 和电转液加入到电转杯中充分悬浮,于电转槽中完成电转后继续培养,于转染 48 h 后荧光显微镜下观察转染 TGF-β1/EGFP 的 BMSCs 绿色荧光蛋白的表达。

**1.4 免疫组化分析** 取 TGF-β1/EGFP 转染 14 d 后的细胞消化后爬片,4% 多聚甲醛固定,按 SP 免疫组化试剂盒进行操作,DAB 显色、封片、倒置显微镜观察,空质粒组及未转染组作对照。

**1.5 Western blot 法测定 II 型胶原蛋白的表达** 收集转染 14 d 后的细胞,用裂解液提取蛋白;用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度;上样、煮沸 10 min,离心 10 s,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(10% SDS-PAGE)分离;常规转膜,90 A 电流转印 50 min;4 ℃ 孵育过夜;使用一抗稀释液按比例稀释一抗(兔抗人 II 型胶原蛋白单克隆抗体),摇床中摇荡 1 h,以封闭液按比例稀释二抗(辣根酶标记抗体),摇床中摇荡 1 h;加 TBST 后在摇床中摇荡各洗涤 3 次,每次 10 min;ECL 发光液(A 液 200 μl; B 液 200 μl)室温中孵育 1 min,暗室中胶片曝光 5 min,取同样数量的 EGFP 组细胞和未转染组细胞蛋白作为对照。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,多组间均数比较采用单因素方差分析,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验。

**2 结果**

**2.1 倒置相差显微镜观察** 原代培养 BMSCs 48 h 换液后大量细胞贴壁生长,传代细胞呈梭形,漩涡状排列。见图 1。

**2.2 BMSCs 的鉴定** 本实验培养的兔第 5 代 BMSCs 的 CD90 阳性率为 99.2%,CD31 阳性率为

0.5%,说明大多数细胞表面表达 CD90 分子;而 CD31 表达阴性,符合实验要求。见图 2。

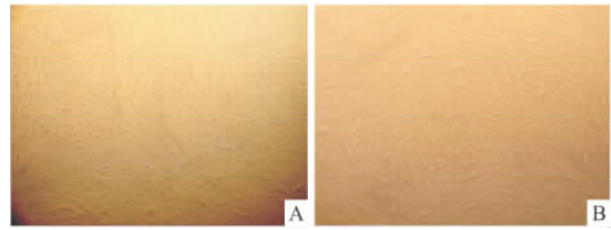


图 1 倒置相差显微镜观察 ×40  
A: 原代细胞; B: 传代细胞

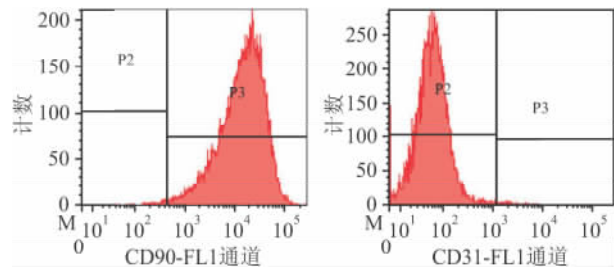


图 2 兔 BMSCs 表面标志物的表达

**2.3 荧光显微镜观察 BMSCs 转染效果** 在显微镜下观察质粒的转染效率,可见大量转染 TGF-β1/EGFP 的 BMSCs 绿色荧光蛋白的表达,计算细胞转染率约为 70% ~ 80%,见图 3。

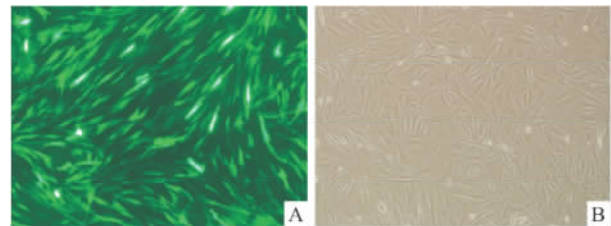


图 3 TGF-β1/EGFP 质粒电转染 BMSCs 48 h 后观察 ×100  
A: 荧光显微镜下; B: 倒置显微镜下

**2.4 II 型胶原免疫组织化学染色及光密度值** 免疫组化结果显示 TGF-β1 组细胞呈多边形,胞核清晰,胞质呈棕褐色。EGFP 组及空白对照组未见明显棕褐色。见图 4。用 IPP 图像分析软件半定量测定各组 II 型胶原蛋白含量[以染色平均吸光度(optical density, OD) 值表示]。结果显示 TGF-β1 组免疫组化平均光密度值(0.487 0 ± 0.018 1)与 EGFP 组(0.085 8 ± 0.009 7)及空白对照组(0.080 5 ± 0.009 8)比较,差异有统计学意义(*F* = 1 916.510, *P* < 0.05);EGFP 组与空白对照组比较,差异无统计学意义。

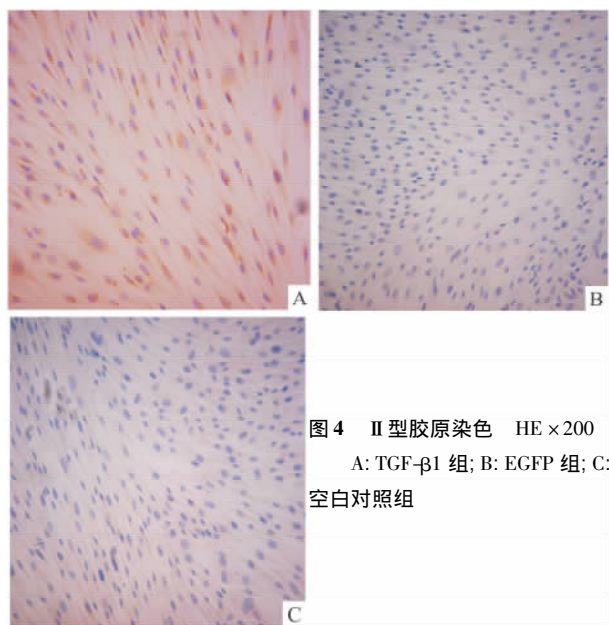


图4 II型胶原染色 HE×200  
A: TGF-β1组; B: EGFP组; C:  
空白对照组

**2.5 Western blot 法检测 II 型胶原表达** 分别提取转染 14 d 后及未转染的细胞蛋白, Western blot 法检测到在相对分子质量约 140 ku 处有一阳性条带, 见图 5。SensiAnsys 凝胶图像分析系统分析结果显示, TGF-β1 组 II 型胶原表达(0.450 0 ± 0.106 7) 与 EGFP 组(0.201 2 ± 0.007 4) 及空白对照组(0.196 4 ± 0.004 1) 比较差异有统计学意义( $F = 33.089$ ,  $P < 0.05$ ); EGFP 组与空白对照组比较差异无统计学意义。

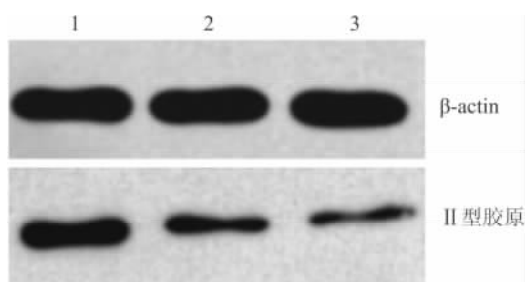


图5 Western blot 法检测各组 II 型胶原的表达  
1: TGF-β1 组; 2: EGFP 组; 3: 空白对照组

### 3 讨论

椎间盘退变的修复是临床常见的难题之一, 近年来随着软骨组织工程的发展为修复退变的椎间盘带来了希望。在软骨组织工程中利用外源基因转染种子细胞并使其高效表达, 诱导靶细胞向软骨细胞分化。目前, 主要的转染方法有脂质体转染、病毒转染和物理转染方法等。脂质体转染效率低, 病毒转染效率高, 对细胞毒性也高。物理转染方法在组织

工程的 TGF-β1 基因转染应用中少见相关报道<sup>[3]</sup>。理想的种子细胞应具有取材方便、对机体损伤小、在体外容易培养扩增等优点。组织工程中常用的有 BMSCs、脂肪间干细胞、关节软骨细胞等, 其中 BM-SCs 应用最广泛。

BMSCs 是一类存在于髓腔内、具有自我更新、增殖和多向分化潜能的非造血干细胞, 是目前应用较广泛的骨组织工程的重要种子细胞之一<sup>[4]</sup>。原代培养的 BMSCs 杂质较多, 形态不一, 接种 2 d 后可见较多的梭形细胞排列生长, 随后细胞长满时, 呈漩涡状生长。细胞表面标记 CD90 表达阳性, CD31 表达阴性可初步判断为兔 BMSCs<sup>[5-6]</sup>。

II 型胶原是软骨组织中重要的细胞外基质成分, 在软骨中占大部分比例, 是髓核细胞的特异性标志物之一<sup>[7]</sup>。本实验 BMSCs 经软骨诱导后, 细胞质内的 II 型胶原蛋白含量较未诱导组明显提高。结果证明经诱导后 BMSCs 成功向类髓核细胞分化。

适当浓度的 TGF-β1 能刺激软骨细胞增殖、分裂和分化, 故目前是软骨组织工程研究中首选生长因子<sup>[8]</sup>。大量研究<sup>[9]</sup>结果表明, 在低氧环境及 TGF-β1 存在的条件下, 具有能诱导 BMSCs 向类髓核细胞方向分化的作用, 具有取材方便、便于保存、操作简单的优点。TGF-β 家族的传导通路主要是 Smad 蛋白<sup>[10]</sup>, 可增强胶原、细胞黏附蛋白的表达。Smad-3 为 Smad 基因家族成员, 其基因产物是 TGF-β 信号通道中的细胞质成分, 具有 MH1、MH2 和 L 区 3 个功能域<sup>[11]</sup>, TGF-β1 激活的 Smad-3 能抑制基质降解酶, 诱导胶原蛋白表达, 促进软骨基质的合成<sup>[12]</sup>。

单纯应用生长因子诱导细胞, 需要不断添加生长因子, 存在持续时间短、效率低、成本高的缺点; 转基因技术可将多种软骨生长因子导入细胞, 具有广阔应用前景<sup>[13]</sup>。电转染的原理是通过高强度电场的作用, 瞬时增加细胞膜的通透性, 从而使细胞周围外源分子进入细胞内部; 具有较高的转染效率, 适用范围广, 转染后细胞可继续培养不影响细胞增殖速度; 此外, 不需要构建基因载体, 对细胞无毒性。有研究<sup>[14]</sup>表明电转染不影响细胞的生物学特性。

本实验利用电转染介导 TGF-β1 和 EGFP 体外转染 BMSCs, 其中 EGFP 作为报告基因, 因此只要出现荧光就说明 TGF-β1 在细胞内。经 TGF-β1 转染后, 免疫组化示 BMSCs 胞质呈阳性表达, Western blot 检测结果示 II 型胶原能高效表达。因此根据实验结果可认为, 电转染介导 TGF-β1 和 EGFP 基因转染 BMSCs 可使 TGF-β1 目的基因在细胞内能持续高

效表达,进而诱导 BMSCs 向类髓核细胞方向分化。

通过本次实验结果可知,利用电转染可将 TGF- $\beta$ 1 和 EGFP 基因高效导入 BMSCs 中,成功诱导为类髓核细胞,表达 II 型胶原,有望成为软骨组织工程中理想的种子细胞,从而为椎间盘退行性变化的治疗奠定基础。至于 TGF- $\beta$ 1 转染 BMSCs 植入体内后,目的基因是否还能持续高效的表达,并诱导成类髓核细胞、修复退变的椎间盘等问题尚需进一步研究。

### 参考文献

- [1] Yuan M, Yeung C W, Li Y Y, et al. Effects of nucleus pulposus cell-derived acellular matrix on the differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials* 2013, 34(16): 3948-61.
- [2] Feng G, Zhao X, Liu H, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration [J]. *J Neurosurg Spine* 2011, 14(3): 322-9.
- [3] 阮晓军, 周建生, 王志岩, 等. TGF- $\beta$ 1 基因转染在软骨组织工程中应用的研究进展 [J]. *中华全科医学* 2013, 11(2): 280-1.
- [4] 何秀华, 李东良, 江军, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养及示踪优化 [J]. *解放军医学杂志* 2011, 36(2): 137-40.
- [5] 邢承忠, 洪晶, 顾绍峰, 等. 兔骨髓间充质干细胞的分离、培养和鉴定 [J]. *中国医科大学学报* 2008, 37(1): 4-5.
- [6] Lee J W, Gupta N, Serikov V, et al. Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(10): 1259-70.
- [7] Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(6): 1152-63.
- [8] Kim H J, Im G I. Combination of transforming growth factor-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *Tissue Eng Part A* 2009, 15(7): 1543-51.
- [9] Risbud M V, Albert T J, Vresilovic E J, et al. Differentiation of senchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy [J]. *Spine* 2004, 29(23): 2627-32.
- [10] Lonn P, Moren A, Raja E, et al. Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads [J]. *Cell Res* 2009, 19(1): 21-35.
- [11] Rezaei H B, Kamato D, Ansari G, et al. Cell biology of Smad2/3 linker region phosphorylation in vascular smooth muscle [J]. *Clin Exp Pharmacol* 2012, 39(8): 661-7.
- [12] 朱兆华, 申才良, 张建湘, 等. TGF- $\beta$ 1 和 Smad3 在退变性腰椎滑脱症患者椎间盘中的表达及其相关因素分析 [J]. *安徽医药* 2013, 17(2): 219-21.
- [13] Shi S, Mercer S, Eckert G J, et al. Regulation of articular chondrocyte aggrecan and collagen gene expression by multiple growth factor gene transfer [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(7): 1026-31.
- [14] 崔洁, 蒋明德, 梅浙川, 等. 电穿孔法转染增强型绿色荧光蛋白基因对人骨髓间充质干细胞生物学特性的影响 [J]. *中国生物制品学杂志* 2011, 24(7): 797-801.

## TGF- $\beta$ 1 and EGFP electroporation on rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells *in vitro*

Wen Jianming<sup>1</sup>, Wang Ruiying<sup>1</sup>, Gao Yan<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541000;

<sup>2</sup>Dept of Surgical Nursing, Nursed Faculty of Guilin Medical University, Guilin 541000)

**Abstract Objective** To observe cases of type II collagen expression after transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) infected in rabbit bone mesenchymal stem cells (BMSCs) by electroporation. **Methods** BMSCs from rabbit were isolated and cultured. 14 days after induction, immunohistochemistry and Western blot methods type II collagen were used to detect the expression of type II collagen. **Results** CD90 was positive and CD31 was negative by flow cytometry; successfully transfected with TGF- $\beta$ 1 to the BMSCs, the strong expression of type II collagen in TGF- $\beta$ 1 group cells was shown by Western blot and immunocytochemical stain, which was compared with empty plasmid group and the control group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TGF- $\beta$ 1 plasmid by electroporation to rabbit BMSCs can facilitate expression of collagen II.

**Key words** transforming growth factor beta 1; mesenchymal stem cells; electroporation; collagen II