

rhBMP-2 对兔骨髓基质细胞 VEGF 表达及成骨潜能的影响

常祺¹, 刘建¹, 胡蕴玉¹, 孟国林¹, 魏福岭²

(1. 第四军医大学西京医院全军创伤骨科研究所, 陕西 西安 710032; 2. 解放军第 309 医院)

摘要 目的: 观察经不同剂量重组人骨形态发生蛋白 2(recombinant human bone morphogenetic protein 2, rhBMP 2) 刺激后的兔骨髓基质细胞(marrow stromal cell, MSC), 其血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达及成骨潜能变化的情况。方法: 取兔双侧股骨骨髓基质细胞体外培养, 分别以不同剂量 rhBMP 2 刺激细胞, 并设立空白对照组。培养 5 d 后, 进行细胞形态(HE 染色)、增殖情况(细胞记数法与 MTT 法)、碱性磷酸酶(组化染色与活性测定)、钙化结节(图像分析)、VEGF 阳性细胞率(免疫组化染色)等项目的检测。结果: 不同剂量组间在碱性磷酸酶活性、矿化面积百分率、VEGF 阳性细胞率三项观测指标上差异显著, rhBMP 2 剂量为 100 ng/ml 左右时效果最佳; 在细胞记数与 MTT 检测上各组差别不显著。结论: 应用 rhBMP 2 在促进基质细胞成骨潜能的同时, 还可促进 VEGF 的表达, 其应用剂量与效果之间存在明显相关关系, 应用剂量为 100 ng/ml 左右时, 其促进 VEGF 表达及成骨潜能作用同时达到最佳效果, 超过此应用剂量, 两者则有下降趋势。应用 rhBMP 2 对促进骨髓基质细胞增殖无明显影响。

关键词 血管内皮细胞生长因子; 重组人骨形态发生蛋白 2; 骨髓基质细胞; 细胞, 培养的

Effects of different dose of rhBMP 2 on VEGF expression and osteogenic potential of rabbits bone marrow stromal cells CHANG Qi, LIU Jian, HU Yunyu, MENG Guolin, WEI Fuling. Chinese PLA Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University (Shanxi Xi'an, 710032, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of different dose of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP 2r) on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and osteogenic potential of rabbit bone marrow stromal cells. **Methods:** The marrow stromal cells (MSC) of the rabbit's femur were procured and cultured, the samples were treated with different dose of rhBMP 2, and without treatment as control. Five days later, the effects were observed with histopathological analysis, cells proliferation, alkaline phosphatase activities detection, the computer analysis of bone clusters, detection of ratio VEGF positive cells (immunohistochemistry). **Results:** There was statistically significant difference between different doses of groups in alkaline phosphatase activities detection, the computer analysis of bone clusters and detection of ratio VEGF-positive cells, the group treated with 100 ng/ml rhBMP 2 had the best effects in these items. We found no statistically difference between different dose groups in other items. **Conclusion:** rhBMP 2 is a wonderful osteoinductive reagent, when it is used to stimulate marrow stromal cells, both VEGF expression and osteogenic potential of the cells advance, and there are obvious relative relationship between doses and effects. The effects also indicate that the ability of rhBMP 2 enhancing VEGF expression and osteogenic potential reached to its highest point, when applying dose of rhBMP 2 is 100 ng/ml, when exceeding the dose, it has a downtrend. There are no obvious effects of rhBMP 2 on marrow stromal cells' proliferation.

Key words Vascular endothelial growth factor (VEGF); Recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP 2); Marrow stromal cell (MSC); Cells, cultured

昂贵,这给其应用带来很大不便。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)不仅有较强的诱导成骨能力,近来的一些研究发现它们与 VEGF 的分泌及表达存在着密切关系。此实验中,我们采用不同剂量 rhBMP-2 刺激体外培养的骨髓基质细胞(marrow stromal cell, MSC),观察其 VEGF 表达及成骨潜能的变化,为下一步临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM 培养基,胎牛血清, L-谷氨酰胺,地塞米松,维生素 C, rhBMP-2 (购自华东制药集团基因研究所), VEGF 单抗及 SP 试剂盒(购自迈新公司), ALP 检测试剂盒(购自美国 Sigma 公司)。

1.2 方法 取幼兔骨髓细胞培养,分别以不同剂量 rhBMP-2 刺激细胞,同时设立空白对照组。适当时期检测 MSC 的 VEGF 表达水平及其成骨能力。具体如下:①MSC 原代培养:取 1 周龄幼兔 1 只,杀死,无菌条件下取出双侧股骨和肱骨,去除骨外膜,DMEM 液冲洗 3 次,用注射器反复冲洗骨髓腔,冲出的骨髓细胞接种于装有适量培养液(DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素)的培养瓶中,置于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 恒温培养,24 h 后吸除悬浮细胞,用 DMEM 液冲洗后,留下贴壁细胞(MSC)继续培养。而后隔日换液,观察细胞生长情况。细胞融合成片,长满培养瓶底部后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,传代培养。②实验分组:将 rhBMP-2 溶于 DMEM 中,针头滤器过滤除菌。第 4 代细胞传代后,分别用含 rhBMP-2 0 ng/ml、20 ng/ml、40 ng/ml、60 ng/ml、80 ng/ml、100 ng/ml、120 ng/ml、160 ng/ml 的血清培养液培养。

1.2.1 观察 rhBMP-2 对 MSC 细胞形态的影响 取第 4 代 MSC,以消化法传代后,调整细胞浓度至 1×10^4 /ml,按以上分组方法加入不同剂量 rhBMP-2,接种于 50 ml 培养瓶,置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱内培养。隔日换液 1 次。每 4~6 h 在倒置显微镜下观察细胞形态。另取第 4 代细胞传代后,调整细胞浓度至 1×10^4 /ml,按以上分组方法加入不同剂量 rhBMP-2,接种于 50 ml 培养瓶(瓶中预先置入盖玻片),培养 5 d 后,取出盖玻片, PBS 冲洗 3 次,75% 酒精固定,行 HE 染色。

1.2.2 观察 rhBMP-2 对 MSC 细胞增殖的影响 取第 4 代 MSC,以消化法传代后,按以上分组方法加入不同剂量 rhBMP-2,调整细胞浓度至 1×10^4 /ml,接种于 24 孔培养板内,放置于培养箱内,隔日换液。①细胞计数法:细胞培养 5 d 后以胰蛋白酶消化,用细胞计数板计数细胞,每孔重复 3 次,取均值。②噻唑蓝(MTT)法:细胞培养 5 d 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μ l,温箱内培养 4 h 后,吸弃孔内上清,每孔内加入 150 μ l 纯 DMSO,震荡 10 min,使结晶充分溶解,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 A 值。

1.2.3 细胞碱性磷酸酶(ALP)组化染色及活性检测 ①ALP 染色:第 4 代培养细胞长满后,胰酶消化制成浓度为 1×10^4 /ml 的细胞悬液,接种于事先放入盖玻片的 24 孔板内,按以上分组方法加入不同剂量 rhBMP-2。培养 5 d 后取出盖玻片,4 °C 生理盐水冲洗,置于冷丙酮中固定 15 min,而后用改

良钙-钴法染色。②ALP 活性检测:去除上清,用 0.01 mol/l PBS 冲洗 3 次,吸干,每孔加 50 μ l 0.1% Triton X-100 置 4 °C 冰箱过夜,镜下观察已无明显细胞结构,经反复吹打后加入 ALP 检测试剂盒内新配制的底物 100 μ l/孔,温箱内 30 min,每孔加 0.2 mol/l NaOH 50 μ l 终止反应。在酶联免疫检测仪上选择 410 nm 波长检测各孔吸光度 OD 值。

1.2.4 MSC 体外成骨能力测定 取第 4 代 MSC,传代后按 1×10^4 /ml 细胞浓度接种于有条形盖玻片的培养瓶内,加入条件培养液(含 10% 胎牛血清,10 mM β -甘油磷酸钠,80 μ g/ml L-抗坏血酸, 10^{-7} M 地塞米松),按以上分组方法加入不同剂量 rhBMP-2。置于标准环境下培养,隔日换液,连续观察细胞生长情况,记录钙化结节形成过程。培养 4 周后在倒置显微镜下观察钙化结节,并随机抽取不同视野 3 次,做图像分析,计算平均矿化面积百分比。

1.2.5 VEGF 免疫组化染色 取第 4 代 MSC,传代后调整细胞浓度至 1×10^4 /ml,接种于事先放入盖玻片的 24 孔板内,按以上分组方法加入不同剂量 rhBMP-2。培养 5 d 后(中间换液 1 次),取出盖玻片。采用 SABC 法检测 VEGF 表达。I 抗按 1:30 加在玻片上,4 °C 过夜后,加入 SABC,37 °C 反应 20 min, PBS 洗 2 次。最后用 DAB 显色,苏木素轻度复染,常规脱水、透明、封片,显微镜观察并摄片。每张切片随机记数 3 个高倍视野,计算 VEGF 阳性细胞率。

1.3 统计学处理 所测数据用 SAS 统计分析软件处理,数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并经方差分析及 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 细胞形态的观察 正常的 MSC 外观呈梭形、三角形或多角形,细胞突起较少,细胞内颗粒也较少;在 rhBMP-2 作用下,细胞的形态发生明显变化,表现为细胞突起增多,胞体增宽、增大,细胞内颗粒状物质增多。

2.2 细胞增殖的影响 每个培养孔细胞浓度为 1×10^4 /ml、DMEM/10% BS、37 °C、5% CO₂ 培养条件下,正常 MSC 增殖周期为 6~7 d;在不同 rhBMP-2 剂量组中,细胞的增殖周期没有明显的变化,第 5 代细胞培养 5 d 后细胞计数及 MTT 法测吸光度没有显著差异,说明 rhBMP-2 对 MSC 的增殖无明显的影响。(表 1)

2.3 细胞 ALP 组化染色及活性检测 正常 MSC 内有一定水平 ALP 的表达,表现为改良钙-钴法染色后胞质内可见黑染颗粒;在 rhBMP-2 作用下,细胞内的 ALP 染色加深,颗粒增多,活力明显增高。不同 rhBMP-2 剂量组的 MSC, ALP 活性表达差异显著。随着 rhBMP-2 浓度的增加,ALP 活力逐渐增强;当 rhBMP-2 浓度为 100~120 ng/ml 时,ALP 活性最高。当 rhBMP-2 浓度进一步增大时,ALP 活性反而下降,表现出双向作用。(表 1, 2)

2.4 MSC 体外成骨能力测定 正常 MSC 改用条件培养液培养后细胞生长速度明显变慢,1 周左右细胞基本长满,胞质内开始出现黑色颗粒,2 周后细胞逐渐聚集成多个结节,结节逐渐增大,由透明转变成不透明黑色团块;在应用 rhBMP-2 组这一过程有所短缩,所形成钙化结节也明显多于空白对照组。不同 rhBMP-2 剂量组间钙化结节面积相差显著,两者表现出一定的相关性。当 rhBMP-2 浓度为 100 ng/ml 时,所测

钙化结节面积所占总面积的比率最高。(表 1, 2)

2.5 VEGF 免疫组化染色 VEGF 免疫组化染色以胞浆和(或)胞膜、核膜有明确棕黄色着色者为阳性细胞。VEGF 阳性部位主要位于胞浆, 细胞外基质有时也可见阳性反应。从

统计数据中可以看出, rhBMP-2 对刺激 MSC 表达 VEGF 有明显促进作用, 并存在明显的剂量依赖关系。当其应用剂量达到 100 ng/ml 时, VEGF 表达达到最高点, 高于此剂量 VEGF 表达则有下降趋势。(表 1, 2)

表 1 不同 rhBMP-2 剂量组间细胞增殖、ALP 表达、矿化面积百分率、VEGF 阳性细胞率的测定($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 1 Detection of cell multiplication, ALPase activity, bone clusters, ratio of VEGF positive cells in groups treated with different doses of rhBMP-2 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	rhBMP-2 剂量 (ng/ml)							
	0	20	40	60	80	100	120	160
细胞计数(1×10^4 /ml)	8.2 ± 0.8	8.5 ± 0.6	8.8 ± 1.0	8.8 ± 0.5	9.2 ± 1.2	8.4 ± 0.7	8.6 ± 0.8	8.0 ± 0.3
MTT 检测(A 值)	0.45 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.45 ± 0.03
ALP 检测(OD 值)	0.038 ± 0.004	0.046 ± 0.005	0.089 ± 0.006	0.115 ± 0.006	0.150 ± 0.009	0.151 ± 0.005	0.152 ± 0.007	0.149 ± 0.008
矿化面积百分率(%)	25.8 ± 0.5	26.6 ± 0.6	30.7 ± 1.5	32.3 ± 1.1	33.0 ± 1.2	33.8 ± 0.7	33.6 ± 0.3	33.9 ± 0.4
VEGF 阳性细胞率(%)	2.8 ± 0.3	4.0 ± 0.6	3.8 ± 0.3	4.6 ± 0.4	7.3 ± 0.8	10.0 ± 0.7	9.2 ± 0.5	9.1 ± 0.7

注: 细胞计数、MTT(A 值)、ALP(OD 值)、矿化面积百分率(%)、VEGF 阳性细胞率(%)的 F 值分别为 1.73, 0.173, 29.87, 65.751, 54.05。细胞计数、MTT 检测, $P > 0.05$, 组间差异无显著性意义; ALP 活性、矿化面积百分率(%)、VEGF 阳性细胞率(%), $P < 0.01$, 组间差异显著

表 2 不同 rhBMP-2 剂量组间 ALP 表达、矿化面积百分率、VEGF 阳性细胞率 SNK-q 检验

Tab. 2 SNK-q tests among different rhBMP-2 doses groups in ALPase activity, bone clusters, ratio of VEGF positive cells

参数	rhBMP-2 剂量 (ng/ml)							
	0	20	40	60	80	100	120	160
ALP 检测(OD 值)	E	D	C	B	A	A	A	A
矿化面积百分率(%)	C	C	B	A	A	A	A	A
VEGF 阳性细胞率(%)	E	D	D	C	B	A	A	A

注: 结合各剂量组均值及 SNK-q 检验, 显示 rhBMP-2 促进 MSC 的 VEGF 及成骨表达的最佳剂量为 100 ng/ml 左右

3 讨论

3.1 VEGF 在骨形成与代谢中的作用 ①通过促进内皮细胞增殖、血管生成参与骨发育形成^[1]; ②作为旁分泌因子参与骨形成与代谢^[2]; ③VEGF 还可通过作用于成骨细胞强表达的 VEGFR-1(flt-1)受体增加成骨细胞移动和分化功能, 这对骨形成及修复起到正性调节作用^[3]。此外, 在不利于骨生长及修复的一些环境下, 如血肿形成、局部缺氧等情况下也可加速 VEGF 的分泌, 可加强局部血管增生、渗入和增加局部血流量, 从而加速骨形成及修复过程^[4]。

3.2 rhBMP-2 对 MSC 成骨效能与 VEGF 表达的影响 本实验发现在 rhBMP-2 作用下, MSC 的形态发生明显变化, 活力明显增高。ALP 是成熟的成骨细胞的标志之一, 其活性的高低也可反映 DOPC 的状况及成骨能力。本实验发现, 不同剂量 rhBMP-2 作用于 MSC, ALP 活性表达差异显著。当 rhBMP-2 浓度为 100 ng/ml 时对 ALP 活力促进作用最大; 当 rhBMP-2 浓度进一步增大时, ALP 活性反而有所下降。由此可以看出 rhBMP-2 对 MSC 诱导成骨能力存在一定的剂量区间。以含条件培养液培养 4 周后测矿化面积, 我们发现随 rhBMP-2 剂量的升高钙结节面积也明显增大, 两者表现出明显正相关。以上实验结果都表明, 应用适当剂量 rhBMP-2 可促进 MSC 向成骨细胞方向分化, 细胞分泌功能活动增强, ALP 水平及蛋白合成增加, 从而加强了成骨效能。但我们还发现, 在使用 rhBMP-2 的各组中, 细胞的增殖周期无明显变化, 细胞生长过程中的计数和 MTT 检测都无明显差别, 说明

rhBMP-2 对 MSC 的增殖无明显的影响。

在本实验中, 我们在显微镜下观察到, rhBMP-2 可以明显促进 MSC 的 VEGF 表达; 从统计数据中可以看出, 这种促进作用存在剂量依赖关系, 最佳剂量为 100 ng/ml 左右, 高于此剂量则有下降趋势。对此较为合理的解释就是大剂量外源性 rhBMP-2 的应用可能导致其受体的反应性降低。骨组织工程中如果能够合理使用 rhBMP-2, 不仅可以促进 MSC 向骨系细胞转化, 还可以通过促进 VEGF 的表达来促进工程化骨在宿主体内的血管化, 这将对工程化骨在体内的存活产生重要的作用。本实验为研制和开发新一代高活性骨替代材料提供了理论依据。

参考文献

- Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, et al. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. J Biol Chem, 1997, 272(11): 7151-7158.
- Wang S, Miura M, Demura H, et al. Anabolic effects of 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. Endocrinology, 1997, 138: 2953-2962.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol, 1995, 146: 1029-1039.
- Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, et al. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. Plast Reconstr Surg, 1999, 104: 738-747.