

• 干细胞与组织工程 •

慢病毒介导沉默 P75 神经营养蛋白受体联合 NGF 过表达转染 BMSCs 复合脱钙骨基质异位成骨的实验研究



陈俊毅, 王宁, 张衡, 张贤平, 赵利民, 朱伦井, 黎智君, 贝朝涌

桂林医学院附属医院四肢创伤骨科(广西桂林 541000)

【摘要】 目的 探索沉默 P75 神经营养蛋白受体 (p75 neurotrophin receptor, P75NTR) 联合 NGF 过表达对大鼠 BMSCs 增殖活性和复合脱钙骨基质 (demineralized bone matrix, DBM) 构建组织工程骨异位成骨能力的影响。方法 通过贴壁分离法培养 SD 大鼠 BMSCs 并传代。取第 3 代 BMSCs, 分别用慢病毒介导沉默 P75NTR 基因 (B 组)、NGF 过表达基因 (C 组)、沉默 P75NTR 和 NGF 过表达双基因 (D 组) 转染, 以未转染细胞作为对照 (A 组)。转染 7 d 后荧光显微镜观察目的基因荧光蛋白表达; 细胞计数试剂盒 8 法检测转染后连续 8 d 细胞的活性; Western blot 检测各组 P75NTR 和 NGF 蛋白表达。倒置相差显微镜和扫描电镜分别观察沉默 P75NTR 和 NGF 过表达双基因转染后 BMSCs 与 DBM 的黏附情况。将上述 4 组转染后 BMSCs 分别与 DBM 共培养制备组织工程骨后, 埋植于 8 周龄 SD 大鼠背侧皮下构建皮下异位成骨模型 ($n=6$), 术后 4、8 周行 HE 染色, 术后 8 周 ALP 染色观察钙结节形成, 实时荧光定量 PCR 检测成骨相关基因 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2)、ALP 和骨钙素 (osteocalcin, OCN) 表达。**结果** 转染 7 d A 组未见荧光表达, B 组呈红色荧光表达, C 组呈绿色荧光表达, D 组呈红绿色复合荧光表达; 目的基因荧光表达率可达 70% 左右。Western blot 检测示, A、C 组 P75NTR 蛋白相对表达量显著高于 B、D 组, C、D 组 NGF 蛋白相对表达量显著高于 A、B 组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。随时间推移, 各组细胞增殖活性均上升, 其中 D 组上升最明显, 3~8 d 细胞活性明显高于 A 组 ($P<0.05$)。倒置相差显微镜和扫描电镜观察示, BMSCs 能与 DBM 形成良好黏附。皮下异位成骨实验中, HE 染色示术后 4、8 周, D 组比其余 3 组有更多的骨组织形成。ALP 染色示 D 组 ALP 活性最高, 有更好的成骨表达。实时荧光定量 PCR 检测示, 与 A 组比较, D 组 Runx2、ALP、OCN mRNA 相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** 沉默 P75NTR 联合 NGF 过表达双基因共转染 BMSCs 复合 DBM 构建组织工程骨具有良好的异位成骨能力, 通过提高 NGF 的水平、关闭 P75NTR 凋亡通道, 不仅可以提高细胞活性, 还能更好地促进骨组织再生。

【关键词】 P75 神经营养蛋白受体; NGF; BMSCs; 细胞活性; 脱钙骨基质; 异位成骨; 大鼠

Lentivirus-mediated silencing of P75 neurotrophin receptor combined with nerve growth factor overexpression and transfection of bone marrow mesenchymal stem cells combined with demineralized bone matrix for heterotopic osteogenesis

CHEN Junyi, WANG Ning, ZHANG Heng, ZHANG Xianping, ZHAO Limin, ZHU Lunjing, LI Zhijun, BEI Chaoyong

Department of Orthopedics for Limb Trauma, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin Guangxi, 541000, P.R.China

Corresponding author: BEI Chaoyong, Email: beichy2008@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of silencing P75 neurotrophin receptor (P75NTR) and nerve growth factor (NGF) overexpression on the proliferative activity and ectopic osteogenesis ability of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) combined with demineralized bone matrix for heterotopic osteogenesis. **Methods** BMSCs of Sprague Dawley (SD) rats were cultured and passaged by adherent isolation method. The third generation BMSCs were

DOI: 10.7507/1002-1892.202003166

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660366)

通信作者: 贝朝涌, Email: beichy2008@126.com

transfected with lentivirus mediated P75NTR gene silencing (group B), NGF overexpression gene (group C), P75NTR silencing and NGF overexpression double genes (group D), respectively, and untransfected cells as control (group A). After 7 days of transfection, the expression of fluorescent protein of the target gene was observed by fluorescence microscope; cell counting kit 8 method was used to detect the cells activity for 8 days after transfection; the expressions of P75NTR and NGF proteins in each group were detected by Western blot. The adhesion of BMSCs to demineralized bone matrix (DBM) was observed by inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope after transfection of p75NTR silencing and NGF overexpression double genes. After transfection, BMSCs and DBM were co-cultured to prepare 4 groups of tissue engineered bone, which were respectively placed in the dorsal subcutaneous tissue of 8-week-old SD rats to construct subcutaneous ectopic osteogenesis model ($n=6$). HE staining was performed at 4 and 8 weeks after operation. ALP staining was used to observe the formation of calcium nodules at 8 weeks after operation. The expressions of Runt-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (ALP), and osteocalcin (OCN) were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** At 7 days after transfection, there was no fluorescence expression in group A, red fluorescence expression was seen in group B, green fluorescence expression in group C, and red-green compound fluorescence expression in group D. The fluorescence expression rate of target gene was about 70%. Western blot detection showed that the relative expression of P75NTR protein in groups A and C was significantly higher than that in groups B and D, and the relative expression of NGF protein in groups C and D was significantly higher than that in groups A and B ($P<0.05$). With the passage of time, the cell proliferation activity increased in all groups, especially in group D, which was significantly higher than that in group A at 3-8 days ($P<0.05$). The results of inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope showed that BMSCs could adhere well to DBM. In the subcutaneous ectopic osteogenesis experiment, HE staining showed that at 4 and 8 weeks after operation, the more bone tissue was formed in group D than in the other 3 groups. ALP staining showed that group D had the highest ALP activity and better osteogenic expression. Compared with group A, the relative expressions of Runx2, ALP, and OCN mRNAs in group D were significantly higher than those in group A ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing P75NTR and NGF overexpression double genes co-transfected BMSCs with DBM to construct tissue engineered bone has good ectopic osteogenic ability. By increasing NGF level and closing P75NTR apoptosis channel, it can not only improve cell activity, but also promote bone tissue regeneration.

【Key words】 P75 neurotrophic protein receptor; nerve growth factor; bone marrow mesenchymal stem cells; cell activity; decalcified bone matrix; ectopic osteogenesis; rat

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81660366)

骨折不愈合发生率为 5% ~ 10%，其危险因素包括年龄、饮酒、吸烟、非甾体类抗炎药、糖尿病以及骨折类型、部位、软组织损伤严重程度和感染等^[1-3]。骨组织工程的发展大大提高了骨折不愈合治疗率，良好的种子细胞、分泌一定功能的神经因子以及性能良好的支架材料是骨组织工程的 3 个基本要素。BMSCs 具有多向分化和自我更新能力，是一种良好的种子细胞^[4]。脱钙骨基质 (demineralized bone matrix, DBM) 是一种常见的骨组织工程支架材料，具有一定的骨传导性、骨诱导性、黏附性和降解性等^[5-6]。血管形成和纤维蛋白降解是骨折愈合的重要因素，NGF 有促进血管生成作用，能够促进骨折愈合^[7]。

P75 神经营养蛋白受体 (P75 neurotrophin receptor, P75NTR) 是一种相对分子质量为 75×10^3 的跨膜蛋白，属于 TNF 受体超家族成员，具有广泛的生物学功能，包括细胞生长、增殖、凋亡、神经发育和信号转导。NGF 与低亲和力受体

P75NTR 结合可介导细胞凋亡，但在有足够 NGF 的情况下，可以关闭 P75NTR 细胞凋亡通道。因此，沉默 P75NTR 联合 NGF 过表达双基因转染 BMSCs，理论上可以增加 BMSCs 的活性和促进骨折愈合。因此，本研究通过慢病毒介导沉默 P75NTR 联合 NGF 过表达双基因转染 BMSCs，检测细胞活性，并进一步复合 DBM 构建一种新的组织工程骨，探究其异位成骨能力，为用于治疗骨缺损提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

8 周龄 SD 大鼠 25 只，雌雄不限，体质量 (200 ± 10) g，由桂林医学院实验动物中心提供。

L-DMEM 培养基、FBS、彩虹 Marker (GIBCO 公司，美国)；PBS、青链霉素、胰蛋白酶、RIPA 裂解液、戊二醛固定液、苏木素-伊红染液、中性树脂、ALP 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)；二

抗 FITC 标记(上海生工生物工程股份有限公司); 沉默 P75NTR 慢病毒载体、NGF 过表达慢病毒载体(上海吉凯基因医学科技股份有限公司); DBM (3 mm×3 mm×2 mm; Wright 公司, 美国); BCA 蛋白测量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); CD14、CD29、CD34、CD44 和 CD45 流式一抗, 兔抗 P75NTR 单克隆抗体、NGF 抗体(Abcam 公司, 英国); GAPDH、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8; 同仁公司, 日本); 成骨诱导液(广州赛业生物科技有限公司); 水合氯醛、二甲苯(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。-80℃ 冰箱(海尔公司); SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); 恒温培养箱、普通离心机、冷冻高速离心机(Thermo Scientific 公司, 美国); 流式细胞仪、MLDEL680 型酶标仪(Bio-Rad 公司, 美国); 倒置相差显微镜(Olympus 公司, 美国); JSM-6390A 型扫描电镜(JEOL 公司, 美国)。

1.2 沉默 P75NTR 联合 NGF 过表达双基因转染大鼠 BMSCs 观测

1.2.1 BMSCs 培养及鉴定 取 1 只 SD 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 1 mL 麻醉后, 完整取出双侧股骨, 按照常规贴壁培养法培养大鼠 BMSCs 并传代。经细胞形态学观察及 CD14、CD29、CD34、CD44、CD45 流式细胞仪鉴定, 所培养细胞为 BMSCs。取第 3 代细胞用于以下实验研究。

1.2.2 基因转染大鼠 BMSCs 荧光表达检测 取第 3 代 BMSCs, 待细胞增殖至融合度为 70% 左右时分为 4 组, A 组为未转染组, B 组为沉默 P75NTR 基因转染组, C 组为 NGF 过表达基因转染组, D 组为沉默 P75NTR 和 NGF 过表达双基因转染组。按照转染复数为 50、总体积 2.5 mL, B、C、D 组分别添加对应慢病毒 50 μ L, 48 h 后更换新鲜 L-DMEM 培养液继续培养, 隔日换液。7 d 后荧光显微镜观察目的基因荧光蛋白表达情况。

1.2.3 Western blot 检测 P75NTR 和 NGF 蛋白表达 BMSCs 同 1.2.2 方法分组处理, 慢病毒转染后 7 d 加入 RIPA 裂解液裂解, 4℃ 以 12 000 r/min 离心 30 min; 取上清液蛋白, 按照 BCA 蛋白定量法测量蛋白, 然后经电泳、转膜、牛奶孵育; 加入 P75NTR、NGF 一抗工作液(1:1 000), 4℃ 封闭过夜; 加入对应二抗工作液(1:8 000), 以 GAPDH 为内参。以各条带灰度值与 GAPDH 灰度值的比值表示各蛋白相对表达量。

1.2.4 CCK-8 法检测基因转染对 BMSCs 增殖活性的影响 BMSCs 同 1.2.2 方法分组并转染后, 于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱继续培养。每天每组加入 CCK-8 培养 4 h 后, 酶标仪测量 490 nm 处细胞吸光度(A)值。连续测量 8 d, 绘制细胞生长曲线。

1.3 组织工程骨的构建及体内外检测

1.3.1 双基因转染 BMSCs 种植 DBM 的体外观察

取第 3 代 BMSCs, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 参照 1.2.2 中转染条件, 以沉默 P75NTR 和 NGF 过表达双基因转染细胞; 无菌条件下取出 DBM, L-DMEM 培养液浸泡后转至上述细胞培养液中, 培养液刚浸过 DBM 为宜, 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱继续培养。培养 7 d 取 DBM, 倒置相差显微镜观察细胞黏附情况; DBM 以 PBS 清洗 2 遍, 戊二醛固定 4 h, PBS 冲洗 30 min, 梯度乙醇依次脱水 10 min, 60℃ 烘干 2 h, 喷金镀膜, 扫描电镜观察双基因转染后 BMSCs 的形态和黏附情况, 以空白 DBM 作为对照。

1.3.2 组织工程骨构建 BMSCs 按 1.2.2 方法分组并转染 3 d 后, 将各组培养液换为成骨诱导液继续培养 7 d。各组分别与 DBM 复合培养构建组织工程骨, A 组为未转染 BMSCs-DBM, B 组为沉默 P75NTR 基因转染 BMSCs-DBM, C 组为 NGF 过表达基因转染 BMSCs-DBM, D 组为沉默 P75NTR 和 NGF 过表达双基因转染 BMSCs-DBM。

1.3.3 动物皮下异位成骨模型构建 取 24 只 SD 大鼠分为 4 组, 每组 6 只, 腹腔注射 10% 水合氯醛 1 mL 麻醉后, 备皮, 聚维酮碘溶液消毒 3 遍后, 切开皮肤, 取上述 A~D 组组织工程骨分别置于大鼠背侧皮下组织, 每只皮下埋植 2 个组织工程骨, 缝合皮肤, 术后每天密切观察背部切口愈合情况和组织工程骨的硬度。

1.3.4 HE 染色观察 术后 4、8 周各组各取 3 只大鼠的组织工程骨, 常规石蜡切片, 部分切片行 HE 染色, 倒置相差显微镜观察。

1.3.5 ALP 染色观察 取各组术后 8 周部分切片, 按照 ALP 试剂盒说明书, 采用改良钙钴法^[8-9]进行 ALP 染色, 倒置相差显微镜观察。ALP 染色阳性表达呈棕黑色, 颜色越深, 表示酶的活性越高。

1.3.6 实时荧光定量 PCR 检测成骨相关基因表达

术后 8 周各组取 6 个组织工程骨, 迅速置于经液氮预冷的研钵中, 反复研磨至粉末状, 再将其移动至预冷的匀浆器内, 按照 Trizol 法提取细胞总 RNA, 随后将 RNA 反转录为 cDNA。行成骨相关基因 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcri-

ption factor 2, Runx2)、ALP 和骨钙素 (osteocalcin, OCN) 表达检测。引物序列见表 1。反应条件: 95℃、10 min; 95℃、10 s, 60℃、30 s, 30 个循环。进行熔解曲线分析和数据收集, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 各基因引物序列及扩增产物长度

Tab.1 Primer sequence and product length of each gene in real-time fluorescent quantitative PCR

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增产物 长度 (bp) Product length (bp)
Runx2	上游 ACTTCGTCAGCGTCTATC Forward	147
	下游 ATCAGCGTCAACACCATC Reverse	
ALP	上游 CAGTGGTATTGTAGGTGCTGTGGT Forward	181
	下游 GACGGTGTCGTAGCCTTCTGG Reverse	
OCN	上游 TGAATGCGAGAAGGAGGAGT Forward	81
	下游 TGCTTGATGAAGACGAAGAGTT Reverse	
GAPDH	上游 CGGAGTCAACGGATTGGTAT Forward	256
	下游 AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA Reverse	

1.4 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验; 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 沉默 P75NTR 联合 NGF 过表达双基因转染大鼠 BMSCs 观测

2.1.1 基因转染大鼠 BMSCs 荧光表达检测 转染 7 d 荧光显微镜观察示, A 组未见荧光表达。B 组呈红色荧光表达, C 组呈绿色荧光表达, D 组呈红绿色复合荧光表达; B、C、D 组细胞形态良好, 目的基因荧光表达率可达 70% 左右。见图 1。

2.1.2 Western blot 检测 P75NTR 和 NGF 蛋白表达

转染后 7 d, A、C 组 P75NTR 蛋白相对表达量显著高于 B、D 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); A、C 组间及 B、D 组间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。C、D 组 NGF 蛋白相对表达量显著高于 A、B 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); A、B 组间及 C、D 组间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 2。

2.1.3 CCK-8 法检测基因转染对 BMSCs 增殖活性的影响 随时间推移, 各组细胞增殖活性均上升,

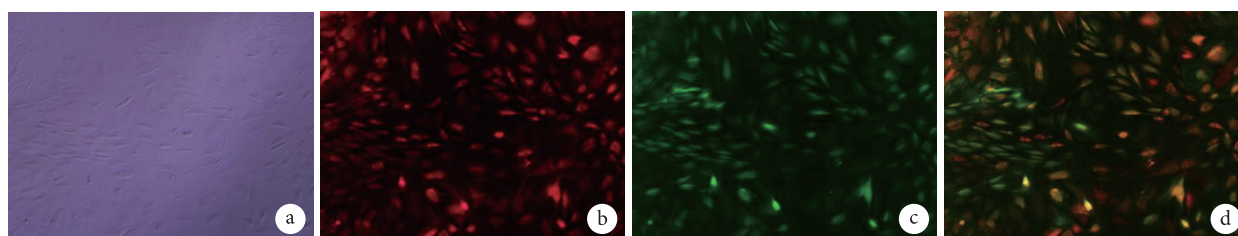


图 1 慢病毒转染 7 d 荧光表达观察 (荧光显微镜×100) a. A 组; b. B 组; c. C 组; d. D 组

Fig.1 Observation on fluorescence expression of lentivirus transfection for 7 days (Fluorescence microscope×100) a. Group A; b. Group B; c. Group C; d. Group D

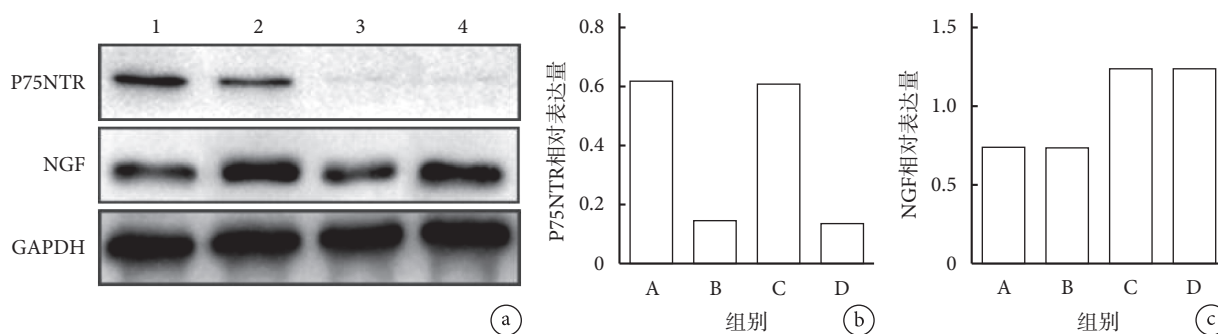


图 2 Western blot 检测慢病毒转染后 7 d 各组细胞 P75NTR 和 NGF 蛋白表达 a. 电泳图 1: A 组 2: C 组 3: B 组 4: D 组; b. 各组 P75NTR 蛋白相对表达量; c. 各组 NGF 蛋白相对表达量

Fig.2 The expressions of P75NTR and NGF proteins detected by Western blot at 7 days after lentivirus transfection a. Electrophoretic map 1: Group A 2: Group C 3: Group B 4: Group D; b. Relative expression of P75NTR protein in each group; c. Relative expression of NGF protein in each group

其中D组上升最明显, 3~8 d 细胞活性明显高于A组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B、C组 5~8 d 细胞活性明显高于A组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图3。

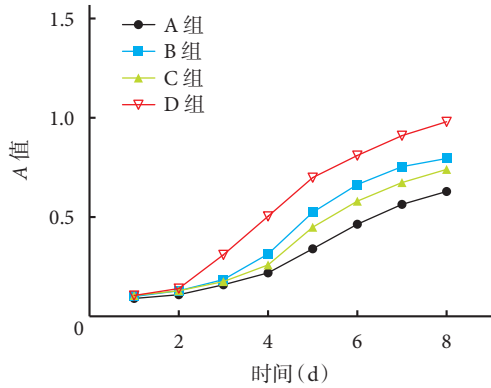


图3 CCK-8法检测基因转染对各组BMSCs增殖活性的影响
Fig.3 Effect of gene transfection on proliferation of BMSCs in each group detected by CCK-8 method

2.2 组织工程骨的构建及体内外检测

2.2.1 双基因转染BMSCs种植DBM的体外观察

倒置相差显微镜观察示BMSCs黏附于DBM上。进一步扫描电镜观察示, 对比空白DBM, 双基因转染组DBM可观察到细胞不规则聚集在DBM支架孔隙间, 细胞之间可互相重叠。见图4。

2.2.2 HE染色观察

术后4周, 各组均可见纤维组织和纤维细胞成束排列, 伴有较多炎症细胞浸润, 主要为淋巴细胞, 部分伴结缔组织坏死、组织充血, 可见较多红细胞。与A、B、C组比较, D组可见少量新骨组织形成, A、B、C组间无明显差异。术后8周, 各组均可见新骨组织形成, 其中D组新骨组织形成最多、最明显, 可见骨陷窝; B、C组相较于A组皆可见较多新骨组织形成。各组炎症细胞较4周时吸收减少。见图5。

2.2.3 ALP染色观察

术后8周, 各组均可见颜色深浅不一的钙结节, D组呈深棕色和深黑色, B、C

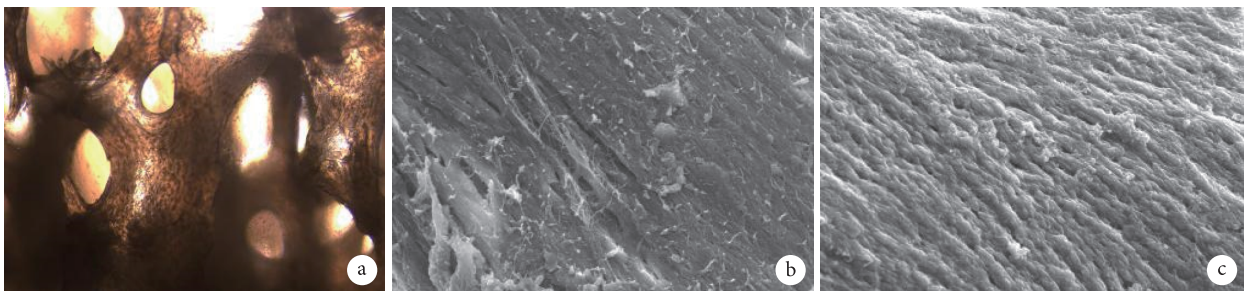


图4 双基因转染BMSCs种植DBM的体外观察 a. 倒置相差显微镜观察(x100); b. 空白DBM扫描电镜观察(x2000); c. 双基因转染组DBM扫描电镜观察(x2000)

Fig.4 *In vitro* observation of double genes transfected BMSCs implanted with DBM a. Inverted phase contrast microscope observation (x100); b. Scanning electron microscope observation of blank DBM (x2000); c. Scanning electron microscope observation of DBM in double gene transfection group (x2000)

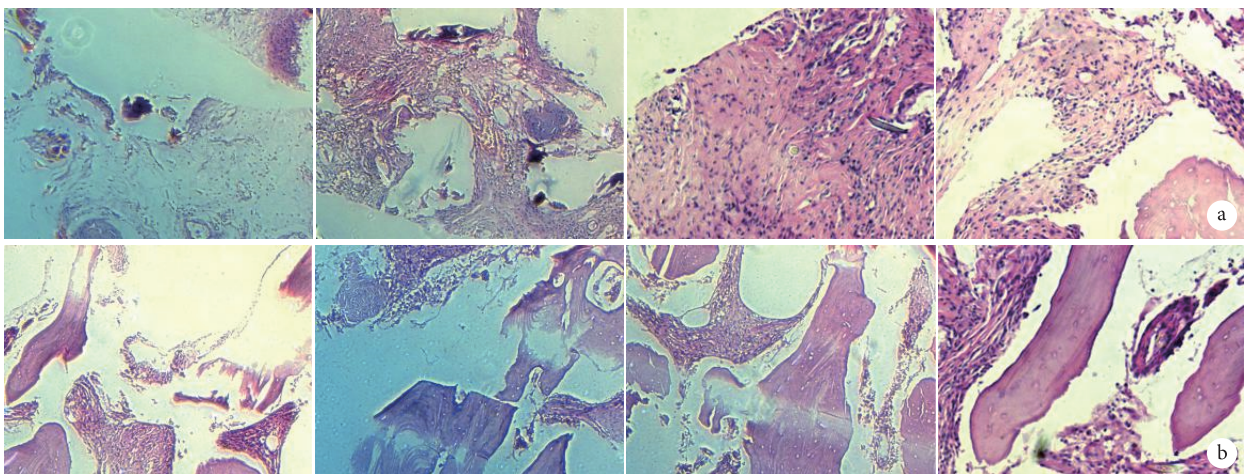


图5 各组皮下异位成骨HE染色观察(倒置相差显微镜x100) 从左至右依次为A、B、C、D组 a. 术后4周; b. 术后8周

Fig.5 HE staining observation of subcutaneous ectopic osteogenesis in each group (Inverted phase contrast microscope x100) From left to right for groups A, B, C, and D, respectively a. At 4 weeks after operation; b. At 8 weeks after operation

组呈大量棕色，A 组钙结节较少、呈较浅棕色。表明 D 组 ALP 活性最高，有更好的成骨表达。见图 6。

2.2.4 实时荧光定量 PCR 检测成骨相关基因表达

与 A 组比较，B、D 组 Runx2 mRNA 相对表达量显著升高，B、C、D 组 ALP mRNA 相对表达量显著升高，D 组 OCN mRNA 相对表达量显著升高，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；其余各组间比较各基因相对表达量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 7。

3 讨论

组织工程骨的构建是骨组织工程最基础的研究。通过皮下异位成骨的实验研究，初步探讨组织工程骨的成骨能力，可为其用于临床治疗骨缺损提供理论依据^[10]。BMSCs 具有来源丰富、取材方便、多向分化、免疫原性低以及强大的自我更新能力，在一定条件下可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等，目前主要用于抗炎修复、细胞移植、基因治疗和骨组织工程等方面。近年文献报道，神经因子对骨折愈合起着重要作用，神经因子可影响机体反应，从而调节细胞的增殖、迁移、分化以及凋亡。NGF 是一种常见的神经营养因子，具有促进骨痂生成和骨折愈合的作用，NGF 通过促

进突触发育，在骨折局部营养神经的再生，以及调节多种神经肽类的释放，增强局部血供，从而促进成骨作用^[7,11]。

P75NTR 抑制骨组织修复的表现在于，首先，P75NTR 表达升高能抑制四肢血管、肺血管和视网膜血管的再生，从而影响骨折愈合^[12-14]。其次，骨折不愈合局部 P75NTR 表达升高，可通过下调丝氨酸蛋白酶、组织型纤溶酶原激活物 and 上调纤溶酶原激活物抑制剂 1 限制纤维蛋白的降解，阻碍骨折愈合^[15-16]。同样，本课题组前期研究发现，在骨折不愈合处 P75NTR 处于一种高表达状态，分析 P75NTR 与骨折不愈合相关^[17]。慢病毒构建过表达 P75NTR 转染 BMSCs 的体外成骨分化实验研究发现，过表达 P75NTR 可抑制 BMSCs 成骨分化，具有成骨抑制作用^[18]。因此，P75NTR 通过抑制纤维蛋白的降解和新生血管的生成，从而起到抑制成骨作用，导致骨折不愈合^[19-21]。P75NTR 发挥该作用的机制主要与 P75NTR 介导的细胞凋亡有关，P75NTR 通过 NF- κ B、JNK-p53-Bax 及神经酰胺 3 条通路介导细胞凋亡^[22-24]。因此，理论上 P75NTR 可以诱导靶细胞死亡，抑制 P75NTR 可以有效减少细胞凋亡，提高细胞的活性，使其更好地向成骨定向分化。

本研究首先通过慢病毒介导沉默 P75NTR 基

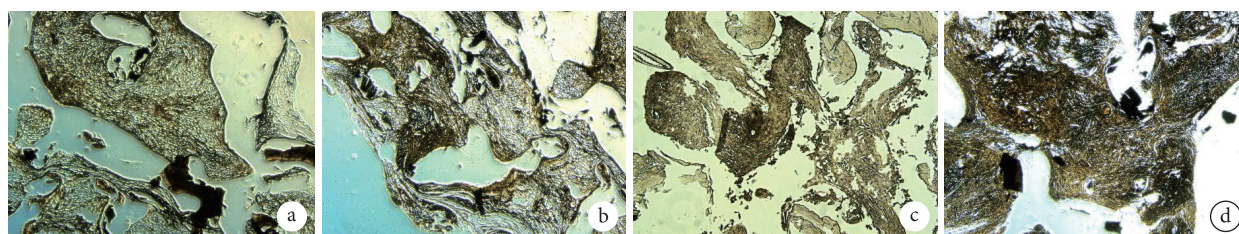


图 6 各组皮下异位成骨 ALP 染色观察 (倒置相差显微镜 $\times 100$) a. A 组; b. B 组; c. C 组; d. D 组

Fig.6 ALP staining of subcutaneous ectopic osteogenesis in each group (Inverted phase contrast microscope $\times 100$) a. Group A; b. Group B; c. Group C; d. Group D

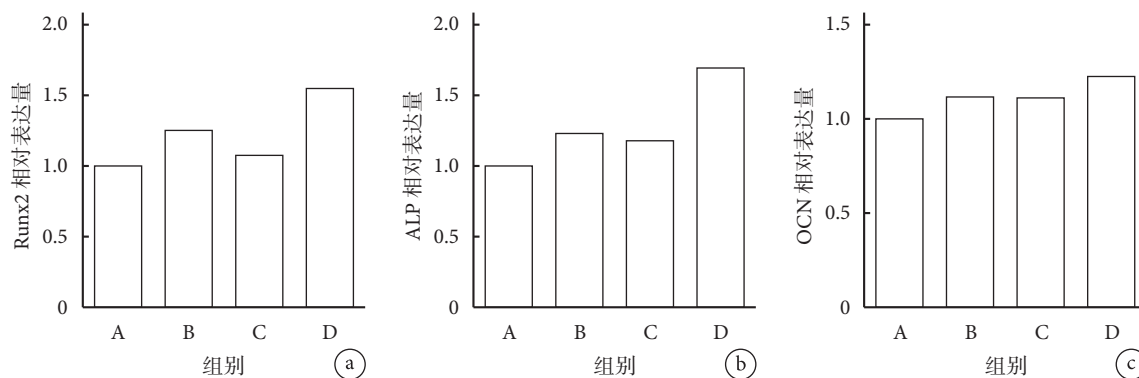


图 7 实时荧光定量 PCR 检测各组成骨相关基因表达 a. Runx2; b. ALP; c. OCN

Fig.7 The expression of osteogenesis related genes detected by real-time fluorescent quantitative PCR a. Runx2; b. ALP; c. OCN

因、NGF 过表达基因、沉默 P75NTR 和 NGF 过表达双基因转染 BMSCs, 荧光显微镜和 Western blot 初步检测了相关目的基因荧光度和蛋白的表达; CCK-8 法检测转染后细胞活性变化, 显示双基因转染后可显著促进细胞增殖能力。ALP 是一种成骨标志物, 广泛存在于机体各种组织细胞中, 如肝脏、血管、卵巢等处, 改良钙钴法可根据沉淀颜色评价酶活性, 随着成骨分化作用的增强, 硫化钴沉淀颜色越深, 其酶活性也越高^[8-9]。本研究通过 HE 染色及 ALP 染色发现, 双基因转染组在局部有更多新骨组织表达和钙结节沉积。最后, 通过实时荧光定量 PCR 检测示, 双基因转染组成骨相关基因 Runx2、ALP 和 OCN mRNA 相对表达量均明显高于未转染组。从上述结果分析, 双基因转染比未转染组具有更强的促成骨能力。

综上所述, 沉默 P75NTR 联合 NGF 过表达双基因共转染 BMSCs 复合 DBM 构建组织工程骨, 具有良好的异位成骨能力, 通过提高 NGF 的水平、关闭 P75NTR 凋亡通道, 不仅可以提高细胞活性, 还能更好促进骨组织再生。P75NTR 和 NGF 双基因促进成骨的效果对比单基因更为明显, 二者可以形成一种良好的复合因子, 有助于提高细胞活性, 具有良好的成骨作用, 为骨组织工程治疗骨缺损提供了新思路 and 理论依据。

作者贡献: 贝朝涌负责实验设计; 陈俊毅负责实验实施、实验结果统计分析及文章撰写; 王宁、张衡负责文献查询及实验评价; 张贤平、赵利民、朱伦井、黎智君负责实验结果收集整理。

利益冲突: 所有作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。课题经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

机构伦理问题: 研究方案经桂林医学院动物实验伦理委员会批准 (GLMC201805018)。实验动物使用许可证号: SYXK (湘) 2016-0002。

参考文献

- Gaston MS, Simpson AH. Inhibition of fracture healing. *J Bone Joint Surg (Br)*, 2007, 89(12): 1553-1560.
- Calori GM, Alibisetti W, Agus A, *et al*. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury*, 2007, 38 Suppl 2: S11-18.
- Chu W, Gan Y, Zhuang Y, *et al*. Mesenchymal stem cells and porous β -tricalcium phosphate composites prepared through stem cell screen-enrich-combine (-biomaterials) circulating system for the repair of critical size bone defects in goat tibia. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 157.
- Song SH, Kim SG, Kim SE, *et al*. Is DBM beneficial for the enhancement of bony consolidation in distraction osteogenesis? A randomized controlled trial. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 281738.
- Moss SD, Joganic E, Manwaring KH, *et al*. Transplanted demineralized bone graft in cranial reconstructive surgery. *Pediatr Neurosurg*, 1995, 23(4): 199-204.
- García R, Aguiar J, Alberti E, *et al*. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(3): 753-754.
- Saglam A, Kim S, Ahn K, *et al*. BMP2 shows neurotrophic effects including neuroprotection against neurodegeneration. *Neuroreport*, 2014, 25(8): 549-555.
- 乔海兵, 邢开宇. 改良碱性磷酸酶染色法. *实用医技杂志*, 2006, 13(6): 1011-1012.
- 陈旭芳. 血清碱性磷酸酶检测恶性肿瘤骨转移诊断价值的探讨. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(12): 953-954.
- Rackwitz L, Reichert JC, Haversath M, *et al*. Cell-based and future therapeutic strategies for femoral head necrosis. *Orthopade*, 2018, 47(9): 770-776.
- Caporali A, Meloni M, Miller AM, *et al*. Soluble ST2 is regulated by p75 neurotrophin receptor and predicts mortality in diabetic patients with critical limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(12): e149-160.
- Meuchel LW, Thompson MA, Cassivi SD, *et al*. Neurotrophins induce nitric oxide generation in human pulmonary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(4): 668-676.
- Zhang J, Zhao J, Bai Y, *et al*. Effects of p75 neurotrophin receptor on regulating hypoxia-induced angiogenic factors in retinal pigment epithelial cells. *Mol Cell Biochem*, 2015, 398(1-2): 123-134.
- Koga T, Lee SY, Niikura T, *et al*. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on bone morphogenetic protein 7-induced osteogenic differentiation of human nonunion tissue-derived cells *in vitro*. *J Ultrasound Med*, 2013, 32(6): 915-922.
- Karnes JM, Daffner SD, Watkins CM. Multiple roles of tumor necrosis factor-alpha in fracture healing. *Bone*, 2015, 78: 87-93.
- 李家勇, 王铭, 彭称飞, 等. P75NTR 在兔骨折不愈合局部组织中的表达及意义. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(4): 437-440.
- 朱伦井, 段江涛, 黄义杰, 等. 过表达 P75 神经生长因子受体负向调控骨髓间充质干细胞的成骨分化. *中国组织工程研究*, 2020, 24(1): 20-26.
- Maes C, Kobayashi T, Selig MK, *et al*. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*, 2010, 19(2): 329-344.
- Caporali A, Meloni M, Nailor A, *et al*. p75(NTR)-dependent activation of NF- κ B regulates microRNA-503 transcription and pericyte-endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia. *Nat Commun*, 2015, 6: 8024.
- Shanab AY, Mysona BA, Matragoon S, *et al*. Silencing p75(NTR) prevents proNGF-induced endothelial cell death and development of acellular capillaries in rat retina. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2015, 2: 15013.
- Barcelona PF, Sitaras N, Galan A, *et al*. p75NTR and its ligand ProNGF activate paracrine mechanisms etiological to the vascular, inflammatory, and neurodegenerative pathologies of diabetic retinopathy. *J Neurosci*, 2016, 36(34): 8826-8841.

- 22 Schwabe P, Simon P, Kronbach Z, *et al.* A pilot study investigating the histology and growth factor content of human non-union tissue. *Int Orthop*, 2014, 38(12): 2623-2629.
- 23 Assimakopoulou M, Kondyli M, Gatzounis G, *et al.* Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas. *BMC Cancer*, 2007, 7: 202.
- 24 Suhl KH, Park JB, Park EY, *et al.* Effect of nerve growth factor and its transforming tyrosine kinase protein and low-affinity nerve growth factor receptors on apoptosis of notochordal cells. *Int Orthop*, 2012, 36(8): 1747-1753.

收稿日期: 2020-03-25 修回日期: 2020-07-31

本文编辑: 王雁