

## TGF-β1 和 BMP-2 对终板软骨细胞增殖和糖胺多糖合成的影响

李逸峰 徐宏光 王 弘

( 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 骨科 安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 探讨转化生长因子 β1( TGF-β1) 和骨形态发生蛋白 2( BMP-2) 对体外培养大鼠终板软骨细胞增殖和合成糖胺多糖的影响。方法: 取原代大鼠终板软骨细胞, 体外培养传代至第二代, 常规培养液培养组为对照组, 培养液中加入 TGF-β1 及 BMP-2 作用于软骨细胞为实验组, 观察细胞的生长情况, 测定终板软骨细胞增殖和糖胺多糖( GAG) 含量的变化, 分析两种因子对软骨细胞增殖行为和合成糖胺多糖的影响。结果: 单独应用 TGF-β1 与 BMP-2 刺激, 终板软骨细胞增殖能力及糖胺多糖合成较对照组增高, 而 TGF-β1 与 BMP-2 联合使用能够更加明显地促进终板软骨细胞增殖能力及糖胺多糖的合成。结论: 一定浓度的 TGF-β1 与 BMP-2 联合使用, 能有效促进体外培养的软骨细胞增殖和合成 GAG 基质的能力。

**【关键词】**转化生长因子-β1; 骨形态发生蛋白-2; 软骨细胞

**【中图分类号】**R 329.25 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2015.06.004

## Effects of transforming growth factor beta-1 and bone morphogenetic protein-2 on the proliferation of endplate chondrocytes and synthesis of glycosaminoglycans

LI Yifeng, XU Hongguang, WANG Hong

Department of Orthopedics, The first Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To *in vitro* observe the effects of transforming growth factor beta-1( TGF-β1) and bone morphogenetic protein-2( BMP-2) on the proliferation of cartilaginous endplate cells and synthesis of glycosaminoglycan in rats. **Methods:** Primary endplate chondrocytes were obtained from the rats and *in vitro* subcultivated. Conventional nutrient solution was applied to control group and solution containing TGF-β1 and BMP-2 acting to the experimental group. Cell growth was observed in the two groups and the effects of TGF-β1 and BMP-2 on the proliferation of cartilaginous endplate cells and synthesis of glycosaminoglycans were examined by measuring the changes of the cell proliferation and the content of glycosaminoglycan. **Results:** Single use of either TGF-β1 or BMP-2 had increased proliferation of the endplate chondrocytes and synthesis of glycosaminoglycan, whereas combined use of the two factors had resulted in better cell growth and synthesis of glycosaminoglycans. **Conclusion:** Combined use of TGF-β1 and BMP-2 by certain extent can effectively generate proliferation of the endplate chondrocytes and synthesis of glycosaminoglycans in rats.

**【Key words】**transforming growth factor beta-1; bone morphogenetic protein-2; chondrocytes

椎间盘退变( intervertebral disc degeneration, IVDD) 是脊柱退行性疾病发生发展的始动因素和病理基础, 营养供应的减少是椎间盘退变的关键因素。终板软骨作为椎间盘的主要营养途径, 对髓核的营养供应和形态维持具有重要的作用, 终板软骨的生物学活性及表型维持与椎间盘退变密切相关。

终板软骨属于透明软骨, 由软骨细胞和细胞外基质( ECM) 组成, 蛋白多糖( PG) 是软骨细胞和软骨基质构建的协调者。软骨细胞传代培养过程中, 随着形态的改变, 伴随有表型的丢失及代谢的变化,

转化生长因子 β1( TGF-β1) 具有调节关节软骨细胞分化和促进胞外基质合成的作用<sup>[1-2]</sup>, 骨形态发生蛋白 2( BMP-2) 作为 TGF-β 的超基因家族成员之一, 也可促进关节软骨细胞合成 PG<sup>[3]</sup>, 但对软骨细胞的增殖作用与 TGF-β 不尽相同。虽然终板软骨与关节软骨同属透明软骨, 然而二者又都具有各自不同的特点, 而 TGF-β1 与 BMP-2 对于终板软骨细胞增殖及细胞外基质的合成是否有影响尚无定论, 本实验就 TGF-β1、BMP-2 联合应用对体外培养大鼠终板软骨细胞增殖和合成糖胺多糖的影响作初步

收稿日期: 2015-05-02

作者简介: 李逸峰( 1974-) 男, 主治医师, ( 电话) 15955356679 ( 电子信箱) lyf\_0209@126.com;

徐宏光, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, ( 电子信箱) xuhg@medmail.com, 通讯作者。

研究。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 选取3~4周龄清洁级SD大鼠30只,体质量160~180g,由南京青龙山动物实验室提供。

1.2 实验试剂及仪器 DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、II型胶原酶均购自上海生工公司,重组人TGF- $\beta$ 1、重组人BMP-2均购自美国ReproTech公司,CellTiter96 AQueous单溶液增殖反应试剂分析盒为美国Promega公司产品,Nano-Drop 2000美国Thermo & Scientific公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 大鼠终板软骨细胞的分离培养与分组 取10只SD大鼠,颈椎脱臼处死后75%酒精浸泡15min,置于超净台内取出整个腰椎,剥离腰1至腰5椎间盘的终板软骨。酶消化法分离终板软骨细胞,分离和培养具体方法参考相关文献<sup>[4]</sup>。终板软骨细胞单层融合80%~90%时传代:吸尽培养液,PBS清洗 $\rho$ .25%胰蛋白酶消化2min,含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液终止消化,1000 r/min离心5min收集细胞,均匀种植于培养皿中。选取第2代软骨细胞。将收集的软骨细胞分别接种入96孔板,每孔为 $2 \times 10^3$ 细胞,各孔加入0.1 mL的培养液,培养液为含10%胎牛血清DMEM/F12。根据培养液中含生长因子的不同分4组:A组:培养液中无生长因子(对照组);B组:培养液中加入TGF- $\beta$ 1(10 ng/mL)(实验组);C组:培养液中加入BMP-2(10 ng/mL)(实验组);D组:培养液中加入TGF- $\beta$ 1(10 ng/mL)和BMP-2(10 ng/mL)(实验组)。每组4 $\times$ 10孔,置5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。每3天常规换液一次,每天在倒置相差显微镜下观察软骨细胞的生长情况及形态变化,连续培养16d。

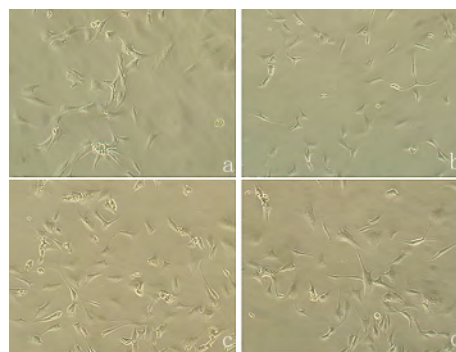
1.3.2 细胞增殖的测定及GAG定量 细胞增殖测定:以CellTiter 96~AQueous单溶液细胞增殖反应试剂分析盒测定增殖活性,在细胞培养孔内加入少量分析试剂并培养4h,通过测定酶标仪在492nm波长测定OD值来确定活细胞的数量,同一条件的四孔数值平均后作为最终数据。阿辛蓝染色及GAG定量:吸除培养液,PBS洗涤3次,以4%多聚甲醛固定30min后,自来水洗涤15min,阿辛蓝染色4h,自来水洗涤,自然晾干后,Odyssey红外扫描仪扫描成像,应用Image J软件对扫描图像进行半定量分析,输出数据为GAG相对定量。

1.4 统计学处理 实验数据采用SPSS 18.0进行

分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及t检验进行差异显著性检测。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

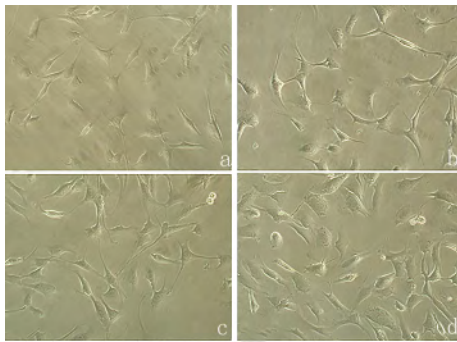
2.1 软骨细胞生长及形态观察 对照组A组细胞培养12h就可见细胞贴壁,2d后贴壁细胞增多,培养早期多为多角形、短柱状。实验组B组细胞12h就可见少量细胞贴壁,多为多角形、短柱状、细胞量少。C、D组细胞贴壁后呈多角形、短柱状少数呈梭形,偶有多角形和扁平状的小的集落,C、D组生长现象明显,部分形成集落生长(图1)。生长1d,A组正常生长,B、C、D组多数孔细胞融合形成单层,后可见到细胞逐渐变为多角形或多边形,体积增大,胞质内颗粒增多,细胞核间隙增大(图2)。生长3d,A组呈稀疏的长梭形,B、C、D组呈稠密的短梭形(图3),B组生长现象明显,且活性维持好。B组早期生长缓慢,中后期生长迅速,C、D组生长迅速,以增长期更为明显。生长7d时,实验组细胞数多于对照组,并且不再以集落生长,而是均匀分布呈短梭形,D组诱导细胞形态,成不规则形,胞质内细胞之间排列紧密(图4)。在常规培养条件下,生长后期10d,软骨细胞趋于成纤维细胞样表型,在TGF- $\beta$ 1及BMP-2作用下,D组软骨细胞多维持多角形或短梭形的正常形态表型,生长过程中的细胞集落和多层生长现象明显,且活性维持好,好于A组(图5)。



a. A组; b. B组; c. C组; d. D组

图1 体外培养终板软骨细胞1d( $\times 200$ )

2.2 细胞增殖测定 TGF- $\beta$ 1组单独作用早期(1~3d)呈现轻度的增殖抑制,其中在2d的抑制作用最明显,之后转为增殖,6~7d到达高峰。且由数值看,6、7d TGF- $\beta$ 1组的均值分别为0.921和0.905,高于对照组,具有统计学意义。表明TGF- $\beta$ 1相对低浓度和换液条件下对体外单层培养软骨细胞增殖表现为先抑制,后促进的作用。



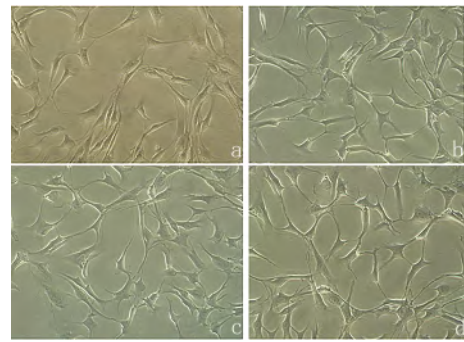
a. A 组; b. B 组; c. C 组; d. D 组

图2 体外培养终板软骨细胞 3 d( ×200)

BMP-2 组均表现为轻度的、显著的增殖促进效应 峰值同样出现在 6~7 d。且由数值看 ,6、7 d BMP-2 组的均值分别为 0.821 和 0.845 ,高于对照组 具有统计学意义。

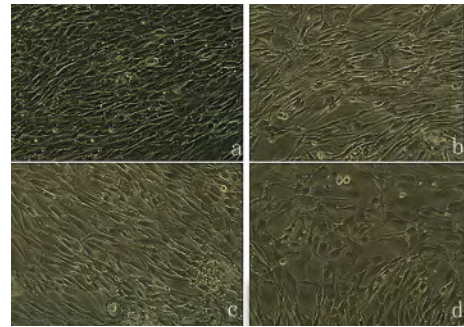
联合应用组在 6、7 d 的均值分别达到 0.965 和 1.011 ,高于单一最佳效应的 TGF-β1 组(  $P < 0.01$  ) 及 BMP-2 组(  $P < 0.01$  ) ,说明联合作用促增殖作用最强。从时间上看 ,联合作用组在实验早期没有出现增殖抑制 峰值同样出现在 6~7 d( 表 1 )。

**2.3 软骨细胞 GAG 含量测定** 与对照组相比 ,含生长因子的实验组均能明显促进体外培养的传代软骨细胞合成 GAG( 表 2 )。差异有显著性(  $P < 0.05$  )。联合应用 TGF-β1 及 BMP-2 组合成糖胺多糖的作用最强 ,差异更加明显(  $P < 0.01$  )。说明一定浓度的 TGF-β1 及 BMP-2 联合应用时在促进细胞增殖的前提下 ,能显著增加体外培养的第二代软骨细胞 GAG 的合成量。



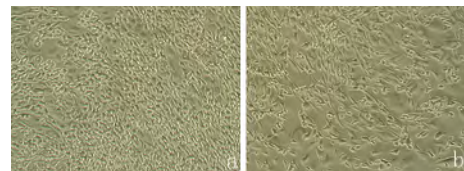
a. A 组; b. B 组; c. C 组; d. D 组

图3 体外培养终板软骨细胞 5 d( ×200)



a. A 组; b. B 组; c. C 组; d. D 组

图4 体外培养终板软骨细胞 7 d( ×200)



a. A 组; b. D 组

图5 体外培养终板软骨细胞 10 d( ×100)

表1 TGF-β1 及 BMP-2 对体外培养大鼠终板软骨细胞增殖的影响(  $\bar{x} \pm s$  ,  $n = 12$  )

时间( d)	A 组	B 组	C 组	D 组	F 值	P 值
1	0.295 ± 0.012	0.290 ± 0.016	0.305 ± 0.006	0.310 ± 0.013	6.61	<0.05
2	0.302 ± 0.032	0.301 ± 0.026	0.328 ± 0.012	0.336 ± 0.021	6.74	<0.05
3	0.401 ± 0.021	0.385 ± 0.021	0.483 ± 0.021	0.550 ± 0.009	200.91	<0.01
4	0.485 ± 0.201	0.501 ± 0.035	0.523 ± 0.035	0.562 ± 0.026	1.23	>0.05
5	0.621 ± 0.018	0.721 ± 0.019	0.672 ± 0.015	0.782 ± 0.031	121.33	<0.01
6	0.712 ± 0.026	0.921 ± 0.004**	0.821 ± 0.019**	0.965 ± 0.011**△#	518.72	<0.01
7	0.735 ± 0.025	0.905 ± 0.017**	0.845 ± 0.013**	1.011 ± 0.014**△#	499.12	<0.01
8	0.721 ± 0.014	0.842 ± 0.09	0.801 ± 0.036	0.921 ± 0.018	33.63	<0.01
9	0.705 ± 0.031	0.846 ± 0.031	0.782 ± 0.006	0.901 ± 0.019	147.51	<0.01
10	0.706 ± 0.024	0.812 ± 0.023	0.742 ± 0.031	0.852 ± 0.024	79.41	<0.01

与 A 组比较 ,\*\* $P < 0.01$ ; 与 B 组比较 ,△ $P < 0.01$ ; 与 C 组比较 # $P < 0.01$

### 3 讨论

细胞外基质是细胞附着的基本框架和代谢场所 ,是维持细胞正常生存、分化和运动的外环境 ,蛋白多糖类是软骨的主要细胞外基质 ,是关节软骨的主要成分之一。研究表明关节软骨中存在着许多生

长因子 ,它们通过自分泌或旁分泌两种基本方式来调节软骨细胞 ,同时软骨细胞也能合成许多生长因子和表达相应的受体 ,从而调控软骨组织、维持内环境的稳定及创伤修复等病理生理过程。

表2 TGF-β1 及 BMP-2 对外培养大鼠终板软骨细胞合成 GAG 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	GAG 含量( μg/L)						
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d
A	140 ± 15	220 ± 26	260 ± 20	300 ± 16	330 ± 18	280 ± 30	240 ± 20
B	160 ± 20	240 ± 26	280 ± 12	320 ± 20*	350 ± 10*	300 ± 22*	260 ± 16
C	170 ± 10	220 ± 18	260 ± 18	316 ± 26*	345 ± 16*	300 ± 12*	270 ± 16
D	210 ± 22	260 ± 22	320 ± 24	360 ± 30#	420 ± 12#	360 ± 22#	330 ± 16
F 值	34. 41	8. 148	26. 59	13. 99	93. 57	28. 63	61. 64
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与 A 组相比, \* P < 0.05 #P < 0.01

TGF-β1 是一类具有多功能的多肽, 在软骨细胞的增殖、死亡、迁移和分化中起着非常关键的作用<sup>[5]</sup>。TGF-β1 能促进软骨细胞增殖、调节细胞分化、细胞外基质合成和分泌。TGF-β1 在不同的条件下对软骨细胞有促进分化或降低分化的双重作用, 在软骨细胞未分化或分化早期, 促进细胞合成、增殖、分化和基质的合成, 但随着培养代数增加, 促进作用减小, 且细胞增殖能力大大减弱。研究表明它在软骨细胞发育的不同阶段起的作用并不相同。TGF-β1 对传代软骨细胞的基质合成作用可能与细胞外基质成分变化有关<sup>[6]</sup>, 研究也表明 TGF-β 不仅能促进体外培养软骨细胞增殖, 且也增加了 PG 合成, 而且 TGF-β 在增加细胞合成蛋白多糖的同时, 还改变了 PG 的糖基模式, 使硫酸软骨素链加长, 磷酸化程度更高。在对 TGF-β 信号传导的研究中, Hoover LL 发现 TGF-β 信号通路与其他信号传导通路存在交叉点<sup>[7]</sup>。

骨形态发生蛋白 BMP-2 是 TGF-β 的超家族成员之一, 对关节软骨修复具有促进作用<sup>[8]</sup>, 有促进软骨分化、基质形成, 并抑制软骨细胞去分化等作用, 能诱导间充质细胞不可逆地分化为软骨细胞<sup>[9]</sup>。BMP-2 对原代软骨细胞增殖作用不明显, 而促进其向成熟方向分化明显, 大量研究证实, BMP-2 信号通路参与成骨细胞分化和骨细胞细胞外基质合成与分泌, 促进骨形成, 增加骨量<sup>[10]</sup>。

由于软骨细胞具有高分化特性, 所以普通单层贴壁培养的软骨细胞表型难以维持, 软骨细胞将会发生一系列的变化, 包括形态、表型及相关基因的表达变化等去分化现象。软骨细胞贴壁后在倒置显微镜下细胞多呈多角形、星形, 胞质颜色较深, 胞核为圆形, 细胞饱满而大。单纯从细胞的形态特征看, 软骨细胞梭形变是判断软骨细胞表型是否改变的直观指标。

我们的结果表明 TGF-β1 与 BMP-2 联合使用, 能更加明显地促进体外培养的终板软骨细胞增殖,

提高合成 GAG 基质的能力, 有利于终板软骨细胞表型的维持, 为终板软骨细胞的进一步研究提供了新的思路。在生长因子调节软骨细胞的生物学行为的作用中, 相关生长因子间的相互作用以及受体-信号传导系统的变化仍然有待深入研究。

【参考文献】

[1] Park MS, Kim YH, Lee JW, et al. FAK mediates signal crosstalk between type II collagen and TGF-beta 1 cascades in chondrocytic cells[J]. Matrix Biol 2010, 29( 2) : 135 - 142.

[2] Orlandi A, Oliva F, Taurisano G, et al. Transglutaminase-2 differently regulates cartilage destruction and osteophyte formation in a surgical model of osteoarthritis [J]. Amino Acids, 2009, 36( 4) : 755 - 763.

[3] 倪滨, 李明. BMP 生物活性的研究现状[J]. 重庆医学, 2007, 36( 10) : 970 - 973.

[4] 徐宏光, 赖毕华, 陈学武, 等. Sox9 基因在终板软骨细胞退变模型中的表达变化及意义[J]. 中华医学杂志, 2008, 88( 37) : 2609 - 2613.

[5] Bhaskaran N, Souchelnytskyi S. Systemic analysis of TGFbeta proteomics revealed involvement of Plag1/CNK1/RASSF1A/Src network in TGFbeta1-dependent activation of Erk1/2 and cell proliferation[J]. Proteomics 2008, 8( 21) : 4507 - 4520.

[6] Ab-Rahim S, Selvaratnam L, Kamarul T. The effect of TGF-beta1 and beta-estradiol on glycosaminoglycan and type II collagen distribution in articular chondrocyte cultures [J]. Cell Biol Int 2008, 32( 7) : 841 - 847.

[7] Hoover LL, Kubalak SW. Holding their own: the noncanonical roles of Smad proteins[J]. Sci Signal 2008, 1( 46) : pe48.

[8] 贺继平, 苏晓云. 转化生长因子 β<sub>1</sub> 与骨形态发生蛋白 2 对关节软骨损伤修复的价值[J]. 中国组织工程研究与临床, 2009, 13( 46) : 9155 - 9158.

[9] Chen Y, Whetstone HC, Youn A, et al. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation [J]. J Biol Chem 2007, 282( 1) : 526 - 533.

[10] 王霖霞, 李玉坤. BMP-2 信号通路与成骨细胞分化[J]. 国际骨科学杂志, 2009, 30( 2) : 132 - 136.