

基础医学

肝细胞生长因子诱导前软骨干细胞向软骨细胞的分化

饶耀剑,曹向阳,刘慧娟

Hepatocyte growth factor induces the differentiation of precartilaginous stem cells into chondrocytes

Abstract

AIM: To explore the mechanism of hepatocyte growth factor (HGF) to induce precartilaginous stem cells (PSCs) into chondrocytes.

METHODS: The experiment was conducted in the Henan Research Institute of Orthopedics from December 2005 to March 2006. PSCs were isolated from the metaphysis of long bone of ten neonatal rabbits (average body mass of 3 kg) by immunomagnetic beads coated with the second antibody. MTT assay was performed to observe the proliferation of PSCs cultured with HGF at concentrations of (0.5, 1, 2, and 4 $\mu\text{g/L}$); As observing the effect of HGF on differentiation toward chondrocytes, 2 $\mu\text{g/L}$ HGF was co-cultured with PSCs and the cells in control group was cultured with medium. The morphous and proliferation were observed by light microscope; the expression of type II collagen was observed by immunofluorescence to observe, and expression of type II collagen mRNA was determined by RT-PCR.

RESULTS: After isolated and purified, PSCs stably attached the culture flask, and presented polygon and fusiform shape, with good growth condition and luminosity by light microscope study. The proliferation of PSCs was promoted by HGF in a dose- and time-dependent manner in 24, 48, and 72 hours. Expression of type II collagen protein appeared on the fifth day by HGF. Expression of type II collagen mRNA appeared on the third day induced by HGF, and was increasing in five and seven days.

CONCLUSION: Expression of type II collagen is found in PSCs induced by HGF, and the proliferation of PSCs is promoted. It indicates that HGF can induce PSCs to differentiate toward chondrocytes, which may be because there is HGF receptor in PSCs.

Rao YJ, Cao XY, Liu HJ. Hepatocyte growth factor induces the differentiation of precartilaginous stem cells into chondrocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(27):5299-5302(China)
[www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/07-27/27k-5299(ps).pdf]

摘要

目的 探讨肝细胞生长因子诱导前软骨干细胞向软骨细胞分化的机制。

方法 实验于2005-12/2006-03在河南省正骨研究院完成。实验材料:普通级新生兔10只,平均体质量3 kg。实验干预:采用免疫磁珠分离技术分离新生兔长骨干骺端前软骨干细胞。利用肝细胞生长因子(浓度分别为0.5、1、2、4 $\mu\text{g/L}$)作用前软骨干细胞;另以2 $\mu\text{g/L}$ 肝细胞生长因子作用前软骨干细胞,对照用相同剂量的培养基。检测前软骨干细胞II型胶原及II型胶原mRNA的表达。实验评估:采用光学显微镜观察前软骨干细胞形态及生长情况,四甲基偶氮唑盐比色法检测前软骨干细胞的增殖,免疫荧光检测II型胶原表达,反转录-聚合酶链反应检测II型胶原mRNA的表达。

结果:前软骨干细胞形态及生长情况:分离纯化的前软骨干细胞贴壁稳定,在光学显微镜下呈多角和梭形,生长旺盛,曲光度好。前软骨干细胞增殖情况:细胞增殖率上升,在24、48、72 h内呈时间浓度依赖。II型胶原表达:肝细胞生长因子作用第5天前软骨干细胞出现II型胶原蛋白的表达。II型胶原mRNA的表达:在肝细胞生长因子刺激3 d开始出现表达,并且5 d、7 d逐渐增加。

结论:肝细胞生长因子作用前软骨干细胞后,出现软骨特征标志抗原II型胶原的表达,细胞增殖活性上升,表明肝细胞生长因子能诱导前软骨干细胞向软骨细胞方向分化。其机制可能是前软骨干细胞也存在肝细胞生长因子受体。

关键词 肝细胞生长因子;干细胞;软骨/细胞学;细胞分化;组织构建

饶耀剑,曹向阳,刘慧娟.肝细胞生长因子诱导前软骨干细胞向软骨细胞的分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(27):5299-5302
[www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/07-27/27k-5299(ps).pdf]

0 引言

前软骨干细胞是一类具有多向分化潜能的成体干细胞,在特定条件下可分化为成骨细胞、软骨细胞。在本实验中利用肝细胞生长因子作用前软骨干细胞来观察其向软骨分化的特征。

1 材料和方法

设计:以细胞为观察对象,随机对照实验。

单位:河南省正骨研究院。

材料:实验于2005-12/2006-03在河南省正骨研究院完成。普通级新生兔10只,平均体质量3 kg(郑州大学动物实验中心提供)。II型胶原酶(Sigma公司);胎牛血清(Gibco公司);DMEM/F12培养基(Gibco公司)中培养;miniMACS磁性细胞分选系统(Miltenyi公司);Trizol(美国Gibco公司)。

设计、实施、评估者:实验设计和主要实施者为第一作者,接受过正规训练。

方法:

兔前软骨干细胞的分离和培养:按

Department of Spinal Surgery, Henan Luoyang Orthopedic Hospital, Luoyang 471000, Henan Province, China

Rao Yao-jian, Doctor, Attending physician, Department of Spinal Surgery, Henan Luoyang Orthopedic Hospital, Luoyang 471000, Henan Province, China
raotony2003@yahoo.com.cn

Correspondence to: Cao Xiang-yang, Chief physician, Department of Spinal Surgery, Henan Luoyang Orthopedic Hospital, Luoyang 471000, Henan Province, China

Received: 2006-12-23
Accepted: 2007-02-15

河南省洛阳正骨医院脊柱外科,河南省洛阳市 471000

饶耀剑 男,1972年生,湖北省武穴市人,汉族,2005年华中科技大学同济医学院毕业,博士,主治医师,主要从事脊柱和软骨工程研究。
raotony2003@yahoo.com.cn

通讯作者:曹向阳,主任医师,河南省洛阳正骨医院脊柱外科,河南省洛阳市 471000

中图分类号:R329
文献标识码:A
文章编号:1673-8225(2007)27-05299-04

收稿日期:2006-12-23
修回日期:2007-02-15
(06-50-12-9266/W-A)

课题背景:课题受河南省洛阳正骨研究院资助,获得河南省中医药管理局二等奖。软骨损伤一直都是临床治疗的难点,软骨细胞移植为软骨细胞缺损治疗开辟了新途径。前软骨干细胞有干细胞普通的习性,能在一定条件下分化为软骨细胞,为提供充足的软骨细胞来源带来希望。

Robinson 等^[1]报道的取材定位方法,取新生兔处死、消毒,手术显微镜下(10倍)环行切取 La Croix 环,即骨骺板与股骨间界面上方 1.5 mm 至下方 0.5 mm、宽约 2 mm、厚约 0.5 mm 骨骺软骨膜。以 1 g/L 的Ⅰ型胶原酶 37 ℃ 消化 1 h,200 目滤网过滤,离心收集细胞,按 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 接种于含体积分数为 0.1 的胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养。以程浩等^[2]报道的采用 miniMACS 磁性细胞分选系统分离纯化得到前软骨干细胞。

四甲基偶氮唑盐比色法检测肝细胞生长因子对前软骨干细胞增殖的影响:将生长良好的前软骨干细胞细胞,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,置 CO_2 培养箱中过夜培养。待细胞充分贴壁后,加入肝细胞生长因子,浓度分别为 0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/L}$ (对照组无肝细胞生长因子);每种浓度设 3 个复孔,分别培养 24, 48, 72 h 后每孔加入 5 g/L 四甲基偶氮唑盐比色法 10 μL ,继续孵育 4 h,倾去培养液,每孔加入 100 μL 二甲亚砜终止反应,振荡 15 min,450 型 ELISA-Reader 酶标仪 (Bio-Rad 公司) 570 nm 波长检测吸光度。以对照组细胞活力为 100%,按公式细胞增殖率 = (药物组吸光度 / 对照组吸光度 - 1) $\times 100\%$ 。

免疫荧光检测肝细胞生长因子作用前软骨干细胞后Ⅰ型胶原的表达:在预先放置盖玻片的 24 空板中接种前软骨干细胞,加入培养基于培养箱中培养,待细胞充分贴壁后,每孔加入 2 $\mu\text{g/L}$ 的肝细胞生长因子,对照用相同剂量的培养基,作用 5, 7 d 后取出盖玻片,常规免疫组织化学步骤,一抗Ⅰ型胶原以 1:40 稀释。二抗 FITC 标记 1:200 稀释。荧光显微镜观察Ⅰ型胶原的表达情况。

反转录-聚合酶链反应检测肝细胞生长因子作用后前软骨干细胞Ⅰ型胶原 mRNA 的表达:将生长良好的前软骨干细胞接种到 6 孔细胞培养板中,待细胞充分贴壁,每孔加入 2 $\mu\text{g/L}$ 的肝细胞生长因子,对照用相同剂量的培养基,每孔设 2 个复孔,作用 3, 5, 7 d 后收集细胞用 2.5 g/L 胰酶消化,血清终止,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,磷酸盐缓冲液冲洗 1 次,计数 5×10^6 个细胞,离心,弃上清。按照产品说明书,用 Trizol 裂解细胞,分别提取总 RNA。经紫外分光光度法定量后取 2 μg RNA 进行反转录反应合成 cDNA。以 GAPDH 为参照,分别 1 μL cDNA 模板进行聚合酶链反应,

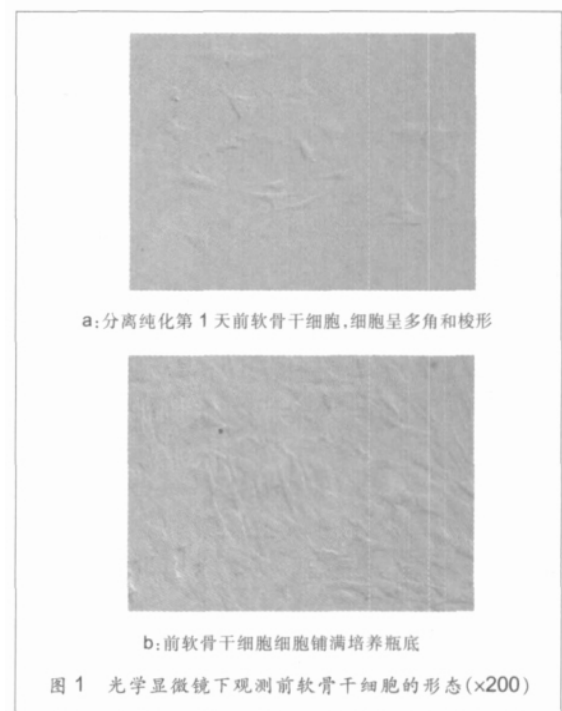
相应的引物序列和反应条件分别为:GAPDH (230 bp),上游 5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3',下游 5'-TGA TTT TGG AGG GAT CTC CTC-3';Ⅰ型胶原 (345 bp),上游 5'-TCA GGC GGG TGA ACC TGG CA-3',下游 5'-TCA CCA GGG CGA CCG GTA A G-3',94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 75 s,30 个循环。

主要观察指标:光学显微镜下观察前软骨干细胞形态及生长情况。肝细胞生长因子对前软骨干细胞增殖的影响。分化细胞特征蛋白Ⅰ型胶原 mRNA 表达情况。

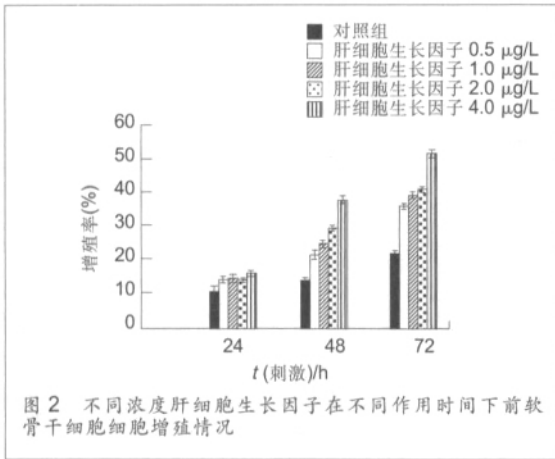
统计学分析:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计分析软件包分析,进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 具统计学意义。

2 结果

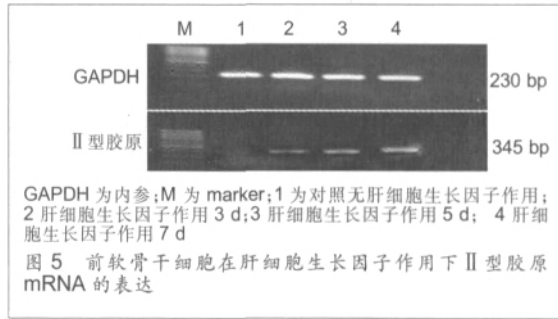
2.1 光学显微镜下观测前软骨干细胞的形态及生长情况 分离纯化的前软骨干细胞呈多角和梭形,贴壁稳定,细胞生长旺盛,透光性能好,见图 1。



2.2 四甲基偶氮唑盐比色法检测肝细胞生长因子对前软骨干细胞增殖的影响 前软骨干细胞在肝细胞生长因子的作用下细胞增殖率,在 24, 48, 72 h 内呈时间浓度依赖性,随肝细胞生长因子作用时间和浓度的增加,其细胞增殖率逐渐增加。见图 2。



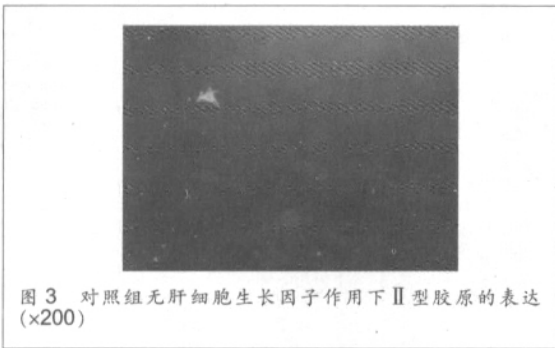
细胞生长因子干预时间的增加 型胶原 mRNA 的表达增强,见图 5。



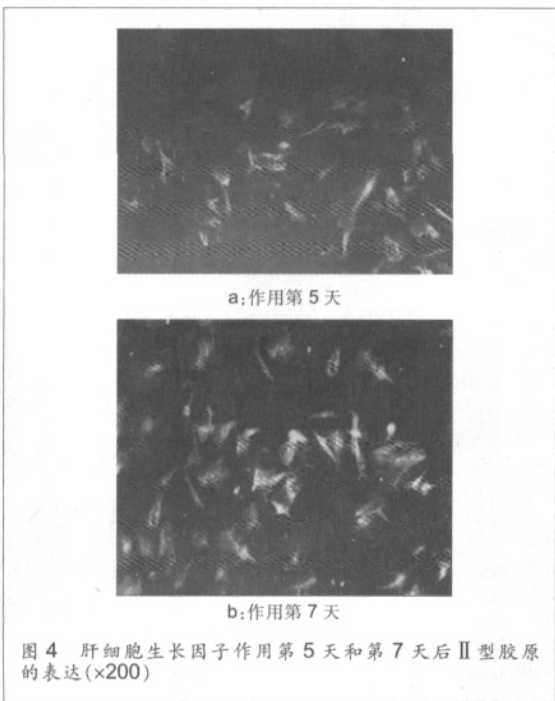
应用要点: 前软骨干细胞在 0.5, 1, 2, 4 µg/L 剂量肝细胞生长因子的作用下,在 24, 48, 72 h 内呈时间浓度依赖性,随肝细胞生长因子作用时间和浓度的增加,其细胞增殖率逐渐增加。前软骨干细胞在肝细胞生长因子刺激 3 d 时开始出现表达,随干预时间和因子量的增加表达逐渐增强。实验结果提示:前软骨干细胞在肝细胞生长因子的作用下可逐渐向软骨方向分化。

2.3 免疫荧光检测 型胶原的表达 对照组表达很少,见图 3;不同时间肝细胞生长因子干预下 型胶原的表达,第 5 天出现 型胶原的表达,且第 7 天表达的细胞数增加,见图 4。

3 讨论



前软骨干细胞是存在于胚胎或新生动物四肢干骺端 La Croix 环中的一种成体干细胞,其在体外有持续增殖及多向分化的能力,在特定的条件下可以向成骨及软骨方向分化^[1]。程浩等^[2]利用免疫磁珠分选和纯化出前软骨干细胞,为实验研究和将来的临床应用提供充足的细胞来源。



1984 年 Russell 等^[3-5]首次发现肝细胞生长因子,并于 1986 年 Nakamura 等^[6]从大鼠血小板内发现大量的肝细胞生长因子以来,肝细胞生长因子的作用得到广泛的推广^[7-10],它存在于肝、肺、肾等多种组织中,其作用是通过与其受体结合而产生效应的^[11-14]。有研究证实软骨细胞表达肝细胞生长因子受体^[15-18],肝细胞生长因子可以调节其细胞的增殖^[19-21],能够启动软骨再生,促进软骨基质合成。

2.4 反转录-聚合酶链反应检测 型胶原 mRNA 的表达 前软骨干细胞在肝细胞生长因子作用下 型胶原 mRNA 的表达,其中对照组没有显示 型胶原 mRNA 的表达,随肝

在本实验中利用肝细胞生长因子刺激前软骨干细胞向软骨方向分化。在实验中通过四甲基偶氮唑盐比色法检测的肝细胞生长因子刺激前软骨干细胞后细胞增殖率上升,随着肝细胞生长因子量和作用时间的增加而上升明显,明显高于对照组,免疫荧光显示在肝细胞生长因子刺激 5 d 后出现软骨特征抗原的表达,且到第 7 天表达高于第 5 天, 型胶原的表达水平随肝细胞生长因子作用时间的延长而升高; 型胶原的 mRNA 的表达在第 3 天出现表达,随作用时间的延长其表达呈上升趋势。

实验结果可以看出肝细胞生长因子作用前软骨干细胞后,出现软骨特征标志抗原 型胶原的表达,细胞增殖活性上升,说明前软骨干细胞在肝细胞生长因子的作用下逐渐向软骨方向分化,其机制可能是前软骨干细胞也存

术语解析:肝细胞生长因子是间质细胞衍生的一种多功能因子。它能调节细胞生长和运动,促进多种细胞组织形态的发生,是上皮细胞和间质细胞相互作用的体液介质,在胚胎生长、组织形成及肿瘤的进展中发挥重要作用。肝细胞生长因子除了由肝脏大量产生并释放进入血液,还可从胚胎肺成纤维细胞株中分离得到,因此又称扩散因子或肺成纤维细胞衍生生长因子。

在肝细胞生长因子受体,肝细胞生长因子与其受体结合使前软骨干细胞增殖加快,启动前软骨干细胞型胶原反转录过程,导致型胶原的表达,细胞向软骨细胞定向分化过程加速。

4 参考文献

- 1 Robinson D, Hasharoni A, Cohen N, et al. Fibroblast growth factor receptor-3 as a marker for precartilaginous stem cells. Clin Orthop 1999 ;367(2):163-175
- 2 程浩,陈安民,游红波.前软骨干细胞的分离培养及其鉴定[J].中国康复,2004,19(4):198-200
- 3 Russell WE, McGowan JA, Bucher NL. Biological properties of a hepatocyte growth factor from rat platelets. J cell Physiol 1984 ;119(2):193-197
- 4 Scheving LA, Stevenson MC, Taylormoore JM et al. Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2002;290(1):197-203
- 5 Russell WE, McGowan JA, Bucher NL. Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. J Cell Physiol 1984;119(2):183-192
- 6 Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary culture. Proc Natl Acad Sci USA 1986 ;83(17):6489-6493
- 7 Oyagi S, Hirose M, Kojima M et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats. J Hepatol 2006;44(4):742-748
- 8 Futamatsu H, Suzuki J, Mizuno S et al. Hepatocyte growth factor ameliorates the progression of experimental autoimmune myocarditis: a potential role for induction of T helper 2 cytokines. Circ Res 2005 ;96(8):823-830
- 9 Matsumoto K, Nakamura T. hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. Int J Cancer 2006;119(3):477-483
- 10 Nakamura T, Matsumoto K, Mizuno S et al. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288 (5):H2131-H2139
- 11 Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP et al. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-met. Oncogene 1991;6:501-504
- 12 Generali D, Fox SB, Berruti A et al. Regulation of hepatocyte growth factor activator inhibitor 2 by hypoxia in breast cancer. Clin Cancer Res 2007;13(2):550-558
- 13 Takano Y, Yamauchi K, Hiramatsu N et al. Recovery and maintenance of nephrin expression in cultured podocytes and identification of HGF as a repressor of nephrin. Am J Physiol Renal Physiol 2007;15(3):559-561
- 14 Santangelo C, Matarrese P, Masella R et al. Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress. J Mol Endocrinol 2007;38(1):147-158
- 15 Takebayashi T, Iwamoto M, Jikko A, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes. J Cell Biol 1995;129 (5):1411-1419
- 16 Kitajima T, Terai H, Ito Y et al. A fusion protein of hepatocyte growth factor for immobilization to collagen. Biomaterials 2007 ;28 (11):1989-1997
- 17 Dankbar B, Neugebauer K, Wunrau C, et al. Hepatocyte growth factor induction of macrophage chemoattractant protein-1 and osteophyte-inducing factors in osteoarthritis. J Orthop Res 2007; 24(2):289-293
- 18 Ono K, Kamiya S, Akatsu T et al. Involvement of hepatocyte growth factor in the development of bone metastasis of a mouse mammary cancer cell line. Bone 2006;39(1):27-34
- 19 Guevremont M, Martel-Pelletier J, Massicotte F et al. Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. J Bone Miner Res 2003;18(6):1073-1081
- 20 Bhargava MM, Hidaka C, Hannafin JA et al. Effects of hepatocyte growth factor and platelet-derived growth factor on the repair of meniscal defects in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2005;41(8-9):305-310
- 21 Bau B, McKenna LA, Soeder S et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor is not a potent regulator of anabolic and catabolic gene expression in adult human articular chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun 2004;316(4):984-990



ISSN 1673-8225 CN 21-1539/R 2007 年版权归《中国组织工程研究与临床康复》杂志社所有

《中国神经再生研究 (英文版)》杂志介绍

详见 <http://www.sjzsyj.com>

Neural Regeneration Research (NRR)

《中国神经再生研究 (英文版)》Neural Regeneration Research (NRR) 杂志为全英文版期刊,是一本在神经再生研究领域具有国际水平的以国际通用语言英语为沟通平台的专业杂志。

NRR 为卫生部主管、中国康复医学会主办,《中国神经再生研究 (英文版)》杂志社编辑出版,电子版由 Elsevier (Singapore) Pte Ltd. 出版。月刊,全球范围内公开发行。CN 11-5422/R, ISSN 1673-5374。

编委会具有学术权威性。国际编委 65 名,来自全球 13 个国家的专业学者。在这些

专家的努力下,保证 NRR 客观、公正、及时、规范的审稿流程。投稿 20 天编辑部采用随机盲法抽取国内外评审专家审稿,符合采用标准的文章进入修稿程序,力求出版时效 120-150 天。

NRR 重点关注中枢及周围神经损伤及其神经修复再生方面的创新性研究。

NRR 组稿对象不仅包括从事神经生物学基础研究的工作者,也包括那些从事神经损伤与修复工作的神经内外科及其相关科室的临床应用性研究的工作者,以及进行骨科学基础研究和临床研究的骨科工作者。

NRR 具有良好的国际影响力及学科专业影响力,出版一年内,已被下列国际及国内著名数据库收录:

- Elsevier 电子期刊全文数据库
- ScienceDirect OnSite (SDOS) 文章出版后 1 周内可在线阅读
- 美国《化学文摘》(CA)
- 荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)
- 波兰《哥伯尼索引》(IC)
- 中国英文版科技期刊数据库(统计源期刊)
- 中国科学引文数据库(核心版)(CSCD)

投稿 E-mail: sjzs101@163.com

sjzs102@163.com

联系电话:024-23380579 13322433783