

血管内皮生长因子及骨形态发生蛋白 2 对成骨细胞生长的促进作用

朱海燕 邹浩 甘一波

【摘要】目的 研究血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)以及骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2)对成骨细胞增殖的调节作用。**方法** 提取人骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)并使其分化为成骨细胞,分别添加不同浓度的 VEGF 和 BMP-2 进行药物干预,用四甲基偶氮唑盐(MTT)法研究成骨细胞的增殖率。**结果** 两组干预组的吸光度(A)值与对照组的 A 值相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),对成骨细胞增殖的调节作用均随剂量和时间变化而改变,两组调节作用的最佳时间均为 72 h 左右。两组最佳作用浓度分别为: BMP-2 为 1.8×10^{-9} mol/L,对成骨细胞的增殖率达 179.59%; VEGF 为 1×10^{-8} mol/L,其增殖率达 189.80%。**结论** VEGF 对成骨细胞增殖的促进作用不亚于 BMP-2。

【关键词】 血管内皮生长因子类;骨形态发生蛋白质类;间质干细胞;成骨细胞

Promoting effect of VEGF and BMP-2 on growth of osteoblasts. ZHU Haiyan, ZOU Hao, GAN Yibo, Department of Orthopaedics, Xiangyang Dongfeng People's Hospital, Xiangyang 441004, China

【Abstract】Objective To study the regulatory effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) on proliferation of osteoblasts. **Methods** The human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated and differentiated into osteoblasts, and different concentrations of VEGF and BMP-2 were added for drug intervention. MTT assay was used to examine the proliferation of osteoblasts. **Results** There was significant difference in absorbance values between intervention group and control group ($P < 0.05$). The regulatory effects of VEGF and BMP-2 on proliferation of osteoblasts were time- and concentration-dependent. The optimal time was about 72 h in both two groups. BMP-2 1.8×10^{-9} mol/L obtained proliferation rate of 179.59%, and VEGF 1×10^{-8} mol/L obtained proliferation rate of 189.80%. **Conclusion** The promoting effect of VEGF on proliferation of osteoblasts is similar to that of BMP-2.

【Key words】 Vascular endothelial growth factors; Bone morphogenetic proteins; Mesenchymal stem cells; Osteoblasts

已知骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2)可直接促进成骨细胞生长、增殖和分化。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)最初是由多种培养的肿瘤细胞系中发现的一种新型的生长因子,有多项研究表明其可促进骨细胞的增殖,本文以山羊成骨细胞为研究对象,研究 VEGF、BMP-2 对成骨细胞的调节作用,寻找能够替代 BMP-2 的细胞因子。

材料与方 法

一、试剂及来源

成骨细胞由山羊间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化而来;RPMI1640 培养基(In-vitrogen, 美国);胎牛血清(北京洪生生物工程材料

有限公司);MTT 试剂盒(上海华星生物科技有限公司);VEGF 和 BMP-2(武汉 Sinm 公司);IGF-1(广东英凯公司);胰酶(融通公司)。

二、细胞培养

山羊 MSCs 由活组织提取所得,经 10^{-8} mol/L 地塞米松、 10^{-2} mol/L β -甘油磷酸钠、50 mg/L 维生素 C 的 RPMI1640 液(含体积分数为 15%胎牛血清)进行培养诱导,使其分化为成骨细胞,之后进行常规细胞培养。

三、药物干预

将成骨细胞按 1×10^5 个/孔接种于 92 孔细胞培养板,含 15%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,等待细胞培养到达 24 h 时,吸去培养液,用 PBS 洗 3 次,加入 0.1% BSA-RPMI1640 培养基继续培养 24 h。按下列浓度依次进行药物干预: BMP-2 蛋白: 1×10^{-9} 、 2×10^{-9} 、 4×10^{-9} mol/L; VEGF: 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 2×10^{-8} mol/L,另设立无处理的浓度为 0 mol/L 的阴性对照组,同时设 3 个空白孔不

加成骨细胞。每个处理过程重复 2 次,分别于 24、48、72、96 h,按四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒说明书测定样品在 490 nm 波长吸光度(A₄₉₀)值。

四、统计学方法

用 SPSS 12.0 统计软件,采用 t 检验。

结 果

一、成骨细胞诱导结果

经过 10⁻⁸ mol/L 地塞米松、10⁻² mol/L β-甘油磷酸钠、50 mg/L 维生素 C 诱导的 MSCs 成功地 toward 成骨细胞方向分化,用碱性磷酸酶染色发现 83% 的细胞呈阳性。

二、药物处理对成骨细胞的形态学影响

培养 72 h 后,显微镜下观察对照组细胞生长较少,细胞间隙明显加大,伪足缩短;BMP-2 和 VEGF 组细胞生长繁殖旺盛,出现多层细胞,细胞伪足明显,细胞间隙明显减小,如图 1。

三、BMP-2 对成骨细胞增殖的作用

与对照组相比,BMP-2 浓度为 1 × 10⁻⁹ mol/L 时,对成骨细胞的促进作用在 48 h 就比较显著(P < 0.01);当浓度增加到 2 × 10⁻⁹ mol/L 时,24 h 就能达到;但当 BMP-2 的浓度增加到 4 × 10⁻⁹ mol/L 时,对成骨细胞增殖的促进作用不再增加,反而下降到与 1 × 10⁻⁹ mol/L 时的作用几乎一样。因此,我们可以看出,BMP-2 对成骨细胞的促进作用有明显的剂量和时间依赖性,2 × 10⁻⁹ mol/L 的 BMP-2 在 72 h 时对成骨细胞的增殖效用最强,增殖率达 179.59%,如图 2。

四、VEGF 对成骨细胞增殖的调节作用

VEGF 浓度为 1 × 10⁻⁹ mol/L 时即可对成骨细胞表现出非常明显的增殖作用(P < 0.05);当浓度增加 10 倍时,作用就更加明显(P < 0.01),但浓度增至 20 倍时,对成骨细胞增殖的促进作用反而弱于 1 × 10⁻⁸ mol/L 浓度组(P > 0.05),充分说明 VEGF 对成骨细胞的增殖作用也同样有浓度依赖性。另外,随着作用时间增加,VEGF 对成骨细胞的增殖作用持续加强,至 72 h 时,达到峰值,超过 96 h 之后逐渐下降,由此可见 VEGF 对成骨细胞增殖作用也有时间依赖性。其中 VEGF 浓度为 1 × 10⁻⁸ mol/L 时的增殖率最高,为 189.80%,如图 3。

五、两组生长因子对成骨细胞生长调节作用的比较

选择浓度 1 × 10⁻⁹ mol/L 的 BMP-2 计算,获得 24、48、72、96 h 的增殖率比。在相同浓度条件下

(图 4),VEGF 的作用稍强于 BMP-2,两组差异无统计学意义(P > 0.05),但在作用 72 h 之后二者的增殖率比下降曲线几乎一样。

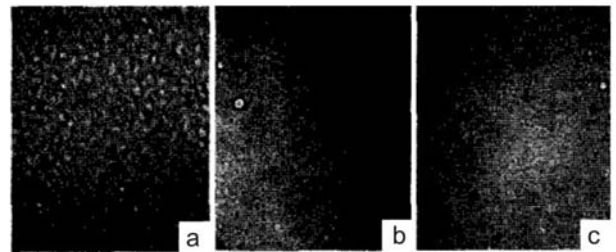


图 1 成骨细胞增殖形态影像 a: 对照组; b: BMP-2 组; c: VEGF 组

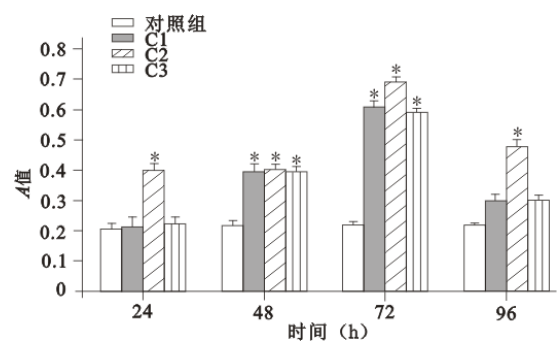


图 2 BMP-2 对成骨细胞的增殖图 C1、C2、C3: BMP-2 浓度分别为 1 × 10⁻⁹、2 × 10⁻⁹、4 × 10⁻⁹ mol/L, * 与同时时间的对照组比较 P < 0.01

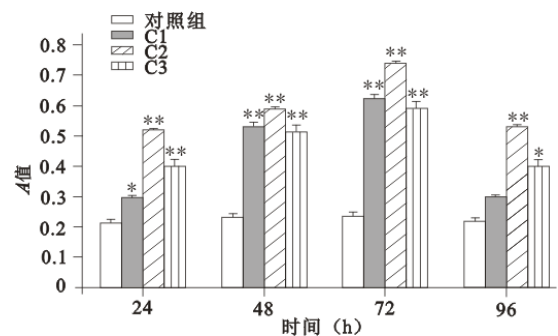


图 3 VEGF 对成骨细胞的增殖图 C1、C2、C3: VEGF 浓度分别为 1 × 10⁻⁹、1 × 10⁻⁸、2 × 10⁻⁸ mol/L, 与同时时间的对照组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

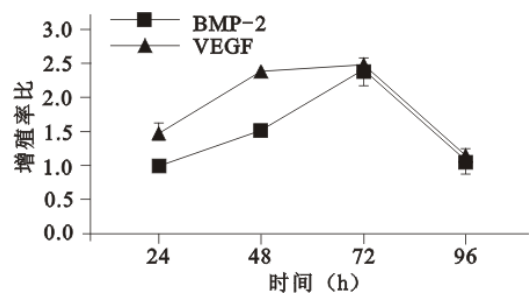


图 4 BMP-2 与 VEGF 对成骨细胞增殖效应的对比图

讨 论

BMP-2 有以下功能:①诱导细胞增殖分化、刺激骨基质合成和加速局部血管生成等功能;②可调节和促进骨生长和修复;③在骨新陈代谢中具有重要作用^[1];④有促进前体细胞定向分化为成骨细胞的能力^[2,3];⑤可诱导间充质干细胞、骨髓中的骨母细胞分化成为软骨细胞和成骨细胞,进而诱导软骨和骨形成^[4-6]。VEGF 是已知诱导血管再生作用最强的因子^[7]。在体内外均可以特异性促进血管内皮细胞的生长并诱导血管生成^[8]。近几年研究证明,外源性 VEGF 能使体外培养的成骨细胞碱性磷酸酶活性显著提高^[9],VEGF 对骨形成和代谢过程中起到了促进作用^[10]。本研究中应用 BMP-2 和 VEGF 两组同时干预成骨细胞的增殖并互相比较,结果显示,BMP-2 和 VEGF 均能够直接促进成骨细胞的增殖,并且均对剂量和时间有很强的依赖性。且 VEGF 在 72 h 之前的各个时间点,对成骨细胞增殖的促进作用与 BMP-2 相近,在相同浓度条件下(图 4),VEGF 的作用甚至稍强于 BMP-2。并且后者在活组织中容易被降解^[11],而 VEGF 却不易被降解,能够更加适宜于在活组织中应用。综上所述,VEGF 有望成为促进活体组织骨增殖的理想因子。

参 考 文 献

- [1] Theyse LF, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, van Doorn J, et al. Expression of osteotropic growth factors and growth hormone receptor in a canine distraction osteogenesis model. *J Bone Miner Metab*, 2006, 24(4): 266-273.
- [2] 杨小荣,方煌,罗永湘. 重组人骨形成蛋白 2 与骨诱导剂对大鼠骨髓间充质干细胞增殖分化的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(2): 140-144.
- [3] Ishikawa H, Kitoh H, Sugiura F, et al. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on

the osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Acta Orthop*, 2007, 78(2): 285-292.

- [4] 崔赅,李洁,雷伟,等. 纤维蛋白胶复合骨形成蛋白的注射型骨修复材料对兔骨髓基质细胞增殖和分化的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(1): 70-75.
- [5] Herford AS, Boyne PJ, Williams RP. Clinical applications of rhBMP-2 in maxillofacial surgery. *J Calif Dent Assoc*, 2007, 35(5): 335-341.
- [6] Huang KY, Yan JJ, Hsieh CC, et al. The *in vivo* biological effects of intradiscal recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the injured intervertebral disc: an animal experiment. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32(11): 1174-1180.
- [7] Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl)*, 1999, 77(7): 527-543.
- [8] Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. Lumbar intertransverse-process spinal arthrodesis with use a bovine bone-derived osteoinductive protein. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*, 1995, 77(9): 1404-1417.
- [9] Xi L, Tekin D, Bhargava P, et al. Whole body hyperthermia and preconditioning of the heart: basic concepts, complexity and potential mechanisms. *Int J Hyperthermia*, 2001, 17(5): 439-455.
- [10] Aspenberg P, Turek T. BMP-2 for intramuscular bone induction: effect in squirrel monkeys is dependent on implantation site. *Acta Orthop Scand*, 1996, 67(1): 3-6.
- [11] Kandziora F, Bail H, Schmidmaier G, et al. Bone morphogenetic protein-2 application by a poly (D, L-lactide)-coated interbody cage: *in vivo* results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg*, 2002, 97(1 Suppl): 40-48.

收稿日期: 2014-01-27