

# 生长分化因子 5 基因转染大鼠脂肪干细胞在 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶中的培养

陈方舟<sup>1</sup> 谭俊峰<sup>1</sup> 孙凯<sup>2</sup> 刘洋<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:将生长分化因子 5(GDF-5)基因转染于大鼠脂肪干细胞并将其培养于 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶,并比较其与二维培养大鼠脂肪干细胞成软骨细胞分化效率。方法:选取雄性 SD 大鼠采用酶消化-密度梯度离心法提取脂肪干细胞行体外培养,并通过流式细胞术鉴定脂肪干细胞。采用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 进行脂质体 pcDNA3.1(+)/GDF-5 重组质粒瞬间转染大鼠脂肪干细胞。将转染大鼠脂肪干细胞分别置于三维 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶(实验组)及普通二维培养基培养(对照组)。通过 RT-PCR、免疫组化及免疫荧光等方法检测培养 1 和 2 周后特异性细胞外基质Ⅱ型胶原蛋白(Collagen Ⅱ)和蛋白聚糖(Aggrekan)表达水平。结果:RT-PCR、免疫组化及免疫荧光检测结果表明 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶组细胞在诱导 7 d 后有 Collagen Ⅱ 和 Aggrekan 表达,并且 RT-PCR 检测结果表明 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶组细胞的 Collagen Ⅱ 和 Aggrekan mRNA 表达水平较对照组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:三维 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶有利于生长分化因子 5 转染脂肪干细胞Ⅱ型胶原蛋白和蛋白聚糖的表达,促进生长分化因子 5 转染脂肪干细胞向成软骨细胞方向分化,RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶是较好的软骨组织工程细胞支架。

**[关键词]** 生长分化因子 5;脂肪干细胞;自组装肽纳米凝胶

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)08-0011-03

## Transfecting Growth and Differentiation Factor 5 Gene of Adipose-derived Stem Cells Cultured in Self-assembling Peptide Hydrogel of RAD16-Ⅱ

CHEN Fangzhou<sup>1</sup> TAN Junfeng<sup>1</sup> SUN Kai<sup>2</sup> LIU Yang<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>Fifth Hospital of Wuhan(Second Hospital Affiliated of Jianghan University), Wuhan 430050, China;

<sup>2</sup>Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China.

**Abstract Objective:** To transfect the GDF-5 gene into ADSCs cultured in three-dimensional self-assembling peptide hydrogel of RAD16-Ⅱ, and to compare the transfection efficiency with ADSCs cultured in two-dimensional medium. **Methods:** Male SD rats were selected for in vitro culture of adipose stem cells by enzyme digestion and density gradient centrifugation, and adipose stem cells were identified by flow cytometry. The liposome pcDNA3.1(+)/GDF-5 recombinant plasmid was transiently transfected into rat adipose stem cells using Lipofectamine<sup>TM</sup>2000. Adipose-derived stem cells were transfected into three-dimensional RAD16-Ⅱ self-assembled peptide nanogels (experimental group) and normal two-dimensional culture medium (control group). The level of specific extracellular matrix Collagen Ⅱ and Aggrekan expression were measured by RT-PCR, immunohistochemistry, and immunofluorescence 1 and 2 weeks after culture. **Results:** The results of RT-PCR, immunohistochemistry and immunofluorescence showed that the RAD16-Ⅱ self-assembled peptide nanogels were expressed in Collagen Ⅱ and Aggrekan after 7 d of induction, and the RT-PCR detection results showed that the mRNA expression level of Collagen Ⅱ and Aggrekan in the RAD16-Ⅱ self-assembled peptide nanogels was higher than that of the control group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Three-dimensional RAD16-Ⅱ self-assembling peptide nanogels are beneficial to the expression of type Ⅱ Collagen and proteoglycan in adipose stem cells transfected with growth factor 5, and promote the differentiation of adipose stem cells transfected with

growth factor 5 into chondrocytes. RAD16-Ⅱ self-assembling peptide nanogels are a preferred scaffold for cartilage tissue engineering.

**Keywords:** growth and differentiation factor-5; adipose-derived stem cells; self-assembling peptide hydrogel

基金项目:武汉市科学技术局基金资助项目(2013060602010265)

<sup>1</sup> 武汉市第五医院(江汉大学第二附属医院)骨科(武汉,430050)

<sup>2</sup> 武汉大学人民医院

△通信作者 E-mail:liuyang19642000@163.com

研究发现,脂肪干细胞(Adipose-derived Stem Cells, ADSCs)在体外经诱导后能向脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞分化<sup>[1]</sup>,而生长分化因子5(Growth Differentiation Factor-5, GDF-5)在早期软骨形成和关节发育过程中起着重要的调控作用,它能促进肢体中软骨细胞的增殖,从而促进软骨的发育和成熟<sup>[2,3]</sup>。RAD16-Ⅱ是一种多肽序列为(AcN-(RARADADA)2-CNH<sub>2</sub>)的肽,其纤维直径约30 nm,孔径小于细胞直径,能为细胞的分化、表型维持和细胞外基质的合成分泌提供一个真正的三维培养的微环境,更利于细胞的生长和分化。本实验利用GDF-5诱导ADSCs置于RAD16-Ⅱ自组装肽纳米凝胶内三维培养的和普通培养瓶内二维培养,对比其在向成软骨细胞特性方向分化过程中特异性细胞外基质的表达情况,了解RAD16-Ⅱ自组装肽纳米凝胶对ADSCs的分化所产生的影响,为将RAD16-Ⅱ自组装肽纳米凝胶-ADSCs复合物构建组织工程化软骨奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

4周龄雄性SD大鼠10只,雌雄不限。由武汉大学医学院动物实验中心提供,动物使用许可证号为SCXK(鄂)2012-2016。实验方案得到武汉市第五医院伦理委员会的批准与认可。实验过程中对动物的处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

### 1.2 主要试剂与仪器

阳离子脂质体、0.25%胰蛋白酶溶液(Sigma,美国);第一链合成试剂盒(Invitrogen,美国);胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)(Hyclone,澳大利亚);达氏修正依氏培养液(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(Hyclone,美国);小鼠Ⅱ型胶原单克隆抗体、小鼠GDF-5多克隆抗体(SantaCruz,美国);二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)试剂盒、甲苯胺蓝、链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(Streptavidin-peroxidase, SP)免疫组织化学染色试剂盒、GDF-5真核表达质粒、pcDNA3.1(+)/GDF-5(中国武汉谷歌生物有限公司)Trizol试剂。

### 1.3 方法

**1.3.1 脂肪干细胞的分离、培养及鉴定** 详见本研究前期实验的方法<sup>[4]</sup>。

**1.3.2 pcDNA3.1(+)/生长分化因子5质粒构建** pcDNA3.1(+)/生长分化因子5质粒构建合成由武汉谷歌生物有限公司完成。

**1.3.3 脂肪干细胞的转染与培养** 采用Lipofectamine™2000进行脂质体pcDNA3.1(+)/GDF-5重组质粒瞬间转染大鼠脂肪干细胞(具体质粒转染步骤详见本研究前期实验方法)<sup>[4]</sup>。将质粒转染脂肪干细胞培养液取50 μL分别置于三维RAD16-Ⅱ自组装肽纳米凝胶(实验组)及普通二维培养基培养(对照组),逐滴加入孔板,轻轻晃动使之均匀混合。将其置

于37℃环境孵育3h后,实验组去除转染液及培养液,每孔加入体积分数10%胎牛血清的低糖DMEM培养基300 μL。将两组细胞置于37℃,体积分数5%胎牛血清中进行培养,隔天换液。

**1.3.4 免疫组织化学法检测Ⅱ型胶原蛋白表达水平** 具体免疫组织化学法步骤详见本研究前期实验方法<sup>[4]</sup>。

**1.3.5 甲苯胺蓝染色检测蛋白聚糖表达水平** 将培养1和2周后细胞爬片经无水乙醇和丙酮固定20 min,蒸馏水稍洗后加入甲苯胺蓝液30 min,蒸馏水漂洗至水无色,二甲苯透明,中心树胶封固。

### 1.4 检测指标

通过RT-PCR、免疫组化及免疫荧光等方法检测培养1和2周后特异性细胞外基质Ⅱ型胶原蛋白(Collagen Ⅱ)和蛋白聚糖(AggreCAN)表达水平。

### 1.5 统计学方法

本实验所有分析数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各参数间差异显著性用统计学软件SPSS 19.0进行统计学处理,经One-Way ANOVA分析,进行多组比较及两两比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 pcDNA3.1(+)/生长分化因子5质粒鉴定结果

转染组有一大小为219 bp的特异性扩增条带,提示转染组基因转染脂肪干细胞后有基因转录发生。与GENEBANK数据库比较,质粒包含GDF-5基因,即基因序列为:5' tatggaccctgaatccacacc3'; 5' ccagatcacatccagagagtaagc3'。

### 2.2 培养2周后两组细胞Collagen Ⅱ和AggreCAN mRNA的表达

培养2周后,三维培养组Collagen Ⅱ和AggreCAN表达水平明显高于二维培养组,差异有统计学意义(AggreCAN,  $3.34 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ; Collagen Ⅱ,  $1.53 \pm 0.13$ ,  $P < 0.05$ ,见图1)。

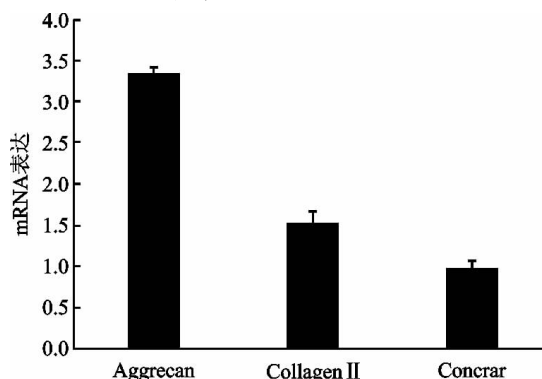


图1 三维培养转染组和二维培养转染组Collagen Ⅱ和AggreCAN mRNA的表达情况

### 2.3 Ⅱ型胶原蛋白表达

经GDF-5诱导的ADSCs在RAD16-Ⅱ自组装肽纳米凝胶内三维培养1周及2周后,免疫组化检测显示细胞及其周围凝胶中均有Collagen Ⅱ表达,培养2周细胞Collagen Ⅱ表达较1周强(图2-5)。经SP染色,三维培养转染组Ⅱ型胶原细胞胞浆中可见棕黄色染色。

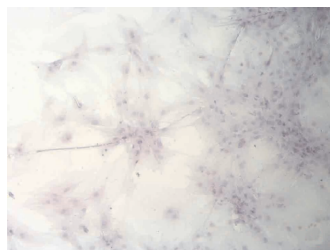


图 2 1 周后 Collagen II 免疫组  
织化学染色结果(100×)

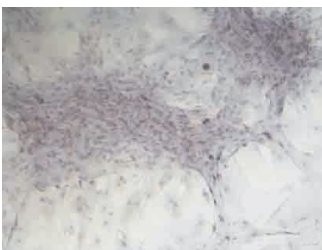


图 3 2 周后 Collagen II 免疫组  
织化学染色结果(100×)

## 2.4 蛋白聚糖的表达

经 GDF-5 诱导的 ADSCs 在 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶内三维培养 1 周及 2 周后,甲苯胺蓝染色可见细胞呈蓝色,细胞核染成深蓝色,提示 ADSCs 向成软骨细胞特性方向分化(见图 6-7)。



图 6 1 周后 Aggrecan 甲苯  
胺蓝染色结果(100×)

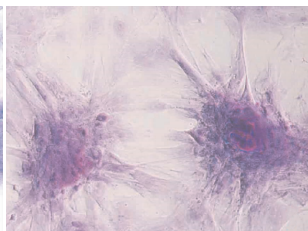


图 7 2 周后 Aggrecan 甲苯  
胺蓝染色结果(100×)

## 3 讨论

脂肪干细胞(ADSC)具有活跃的增殖能力,并可向软骨细胞分化,作为一种组织工程化软骨种子细胞,逐渐成为研究热点<sup>[5]</sup>。大量研究表明,ADSC 在不同的诱导条件下可以向多种细胞系分化<sup>[6]</sup>,诱导 ADSC 向软骨细胞分化的方法主要有三维支架培养、生长因素共培养、基因修饰、生长因子与共培养联合等<sup>[7]</sup>。外源性生长因子诱导 ADSC 分化为软骨细胞会出现早期肥大,内源性基因修饰诱导相对于外源性因子诱导更持久、更稳定<sup>[8,9]</sup>。

研究表明 GDF-5 在肌腱、骨、神经元、软骨等的形成过程中起着关键作用<sup>[10-15]</sup>。GDF-5 能促进软骨祖细胞的黏附和聚集,从而促进软骨细胞的增生以及肥大<sup>[16]</sup>。经 GDF-5 体外诱导的软骨细胞中蛋白聚糖和 Collagen II 的形成明显高于对照组<sup>[16]</sup>。同时,经 GDF-5 诱导脂肪干细胞向软骨方向分化过程中 Collagen II 和蛋白聚糖基因表达水平明显高于对照组<sup>[17]</sup>。

而对于组织工程,种子细胞、细胞生长因子、支架是其重要的三个要素。选择合适的细胞支架对细胞的机械稳定性和细胞分布起着重要作用。目前软骨组织工程运用较为成熟的有胶原凝胶、自组装多肽、壳聚糖等。以上细胞支架能为细胞提供一个良好的三维培养环境,并且能保持软骨细胞的表型。自组装多肽支架因其聚合后具有良好的三维结构,其自身交互的亲水性和疏水性氨基酸在水溶液中相互作用自组装形成稳定的 $\beta$ -片层结构,当其置于电解质溶液中时,促使 $\beta$ -片层架构形成相互交织的纳米纤维,目前在分子生物支架方面应用十分广泛<sup>[18]</sup>。RAD16-Ⅱ(多肽序列为

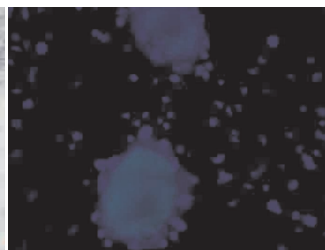


图 4 1 周后 Collagen II 免疫  
荧光结果

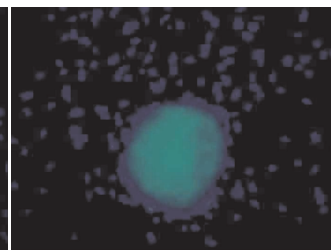


图 5 2 周后 Collagen II 免疫  
荧光结果

AcN-(RARADADA)2-CN<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)因其纤维直径小于细胞直径,从而能为细胞的分化、表型维持和细胞外基质的合成分泌提供一个真正的三维培养的微环境,更利于细胞的生长和分化。

Jung 等<sup>[19]</sup>实验研究表明,三维支架结构培养更有利于软骨源性干细胞的增殖与分化,本实验与其研究结论相符。笔者将 GDF-5 诱导 ADSCs 分别置于 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶内三维培养和普通培养瓶内二维培养,进而比较两种培养条件下 GDF-5 诱导 ADSCs 向软骨细胞方向分化过程中特异性细胞外基质的表达水平。本实验研究结果表明 GDF-5 诱导 ADSCs 在 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶三维立体培养系中能成功表达 Collagen II 和 Aggrecan 两种软骨细胞特异性细胞外基质,并且三维培养组 Collagen II 和 Aggrecan mRNA 表达水平明显高于二维培养组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。笔者认为 RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶三维培养更有利于软骨特异性细胞外基质的合成分泌,更有利于 GDF-5 质粒转染 ADSCs 向软骨细胞特性方向分化和细胞外基质的沉积, RAD16-Ⅱ 自组装肽纳米凝胶是较好的软骨组织工程细胞支架。

## 参考文献

- [1] Chen YL, Sun CK, Tsai TH, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells embedded in platelet-rich fibrin scaffolds promote angiogenesis, preserve heart function, and reduce left ventricular remodeling in rat acute myocardial infarction[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(5): 781-803.
- [2] Feng C, Liu H, Yang Y, et al. Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(1): 1-16.
- [3] Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, et al. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease[J]. World J Cardiol, 2015, 7(8): 454-465.
- [4] 吴磊, 刘洋, 谭俊峰. 生长分化因子 5 诱导脂肪干细胞向成软骨细胞方向分化的影响[J]. 生物医学工程与临床, 2017, 21(4): 429-434.
- [5] Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, et al. TGF- $\beta$ 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells[J]. Stem Cells, 2015, 33(3): 762-773.

- [6] Zuk P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration; a review[J]. *ISRN Stem Cell*, 2013(5).
- [7] 赵明臻, 刘畅. 脂肪干细胞在软骨组织工程中的研究进展[J]. *中国生物医学工程学报*, 2014, 33(4): 475-481.
- [8] Fan J, Park H, Tan S, et al. Enhanced osteogenesis of adipose derived stem cells with noggin suppression and delivery of BMP-2[J]. *PLOS One*, 2013, 8(8): e72474.
- [9] Bigot N, Mouche A, Preti M, et al. Hypoxia differentially modulates the genomic stability of clinical-grade ADSCs and BM-MSCs in long-term culture[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(12): 3608-3620.
- [10] Daans M, Luyten FP, Lories RJ. GDF-5 deficiency in mice is associated with instability-driven joint damage, gait and subchondral bone changes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(1): 208-213.
- [11] Chhabra A, Zijerdi D, Zhang J, et al. BMP-14 deficiency inhibits long bone fracture healing; a biochemical, histologic, and radiographic assessment[J]. *J Orthop Trauma*, 2005, 19(9): 629-634.
- [12] Toulouse A, Collins GC, Sullivan AM. Neurotrophic effects of growth/differentiation factor 5 in a neuronal cell line[J]. *Neurotox Res*, 2012, 21(3): 256-265.
- [13] Zaidi SH, Huang Q, Momen A, et al. Growth differentiation factor 5 regulates cardiac repair after myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(2): 135-143.
- [14] Gao S, Zheng Y, Cai Q, et al. Different methods for inducing adipose-derived stem cells to differentiate into Schwann-like cells[J]. *Arch Med Sci*, 2015, 11(4): 886-892.
- [15] Zhu P, Liu J, Shi J, et al. Melatonin protects ADSCs from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(9): 2232-2243.
- [16] Alexander TH, Sage AB, Chen AC, et al. Insulin-like growth factor I and growth differentiation factor-5 promote the formation of tissue-engineered human nasal septal cartilage[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(5): 1213-1221.
- [17] 李明辉, 刘洋, 孙凯, 等. 生长分化因子 5 诱导脂肪干细胞向软骨细胞的转化[J]. *中组织工程研究*, 2016, 20(51): 7628-7633.
- [18] Holmes T, De Lacalle S, Su X, et al. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6728-6733.
- [19] Daniunaite K, Serenaitė I, Misgirdaitė R, et al. Epigenetic regulation of human adipose-derived stem cells differentiation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 410(1-2): 111-120.