·基础研究·

碱性成纤维细胞生长因子对肌腱细胞基质合成及 NF-κB 基因表达的作用

徐燕 汤锦波

【摘要】 目的 探讨碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)对兔屈肌腱细胞 DNA 合成、I 型胶原和 NF-κB 基因表达的作用。方法 采用 BrdU 掺入技术,观察肌腱细胞 DNA 合成情况;采用 RT-PCR 方法,检测 I 型胶原 mRNA、NF-κB mRNA 在不同浓度 bFGF 作用下的合成变化。结果 质量浓度为 2 ng/ml 的 bFGF 组、质量浓度为 10 ng/ml 的 bFGF 组与正常对照组相比,肌腱细胞 DNA 合成显著增多($t = -3.747$、-4.488, $P < 0.01$)。质量浓度为 10 ng/ml 的 bFGF 组和正常对照组相比,I 型胶原密度表达相对比值显著增加($t = -6.254$, $P < 0.01$)。NF-κB 基因表达增强,实验组和正常对照组相比,差异有显著意义($t = -11.174$、-2.634、$P < 0.01$)。结论 bFGF 可提高 I 型胶原和 NF-κB 基因表达水平。

【关键词】 成纤维细胞因子,碱性; 胶原; 基因表达; 腱细胞增殖

Effect of basic fibroblast growth factor on matrix synthesis and NF-κB gene expression of tendoncyte *XU Yan*, *TANG Jin-bo*. *Department of Hand Surgery*, *Affiliated Hospital of Nantong Medical College*, *Nantong* 226001, China

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of basic fibroblast growth factor(bFGF) on synthesis of tenocyte DNA and type I collagen, and NF-κB gene expression of flexor tendons at rabbits. **Methods** The tendoncyte DNA synthesis was observed by 5-Bromo-2'-deoxymidine incorporation (BrdU). The changes of type Ⅰ collagen mRNA, NF-κB mRNA under different concentrations of bFGF were checked by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** When compared with the normal control group, the tendon cell DNA synthesis increased markedly in bFGF groups at a concentration of 2ng/ml and 10 ng/ml. The type I collagen expression density was significantly up-regulated in the groups of adding bFGF at 10 ng/ml, when compared with the control group. Basic fibroblast growth factor at experimental group significantly enhanced the gene expression of NF-κB. **Conclusion** This study indicated bFGF may up-regulate the gene expression of type I collagen and NF-κB.

【**Key words**】 Fibroblast growth factor, basic; Collagen; Gene expression; Tendon proliferation

指屈肌腱损伤修复后,目前尚难以达到非常满意的效果。近年来,众多学者从促进肌腱细胞生长增殖的生物活性方面进行研究,期望提高肌腱的愈合能力;结果发现生长因子对肌腱细胞的增殖有一定的作用[1,2]。本实验旨在研究 bFGF 对腱细胞的促进作用,以探索调节生长因子作用的中心环节。

材料与方法

一、肌腱的获取和培养

无菌条件下,切取 6 只新西兰白兔的趾深屈肌腱,将肌腱端剪成 1 mm^3 大小的组织块,置于 F-12∶DMEM 完全培养基培养。游出的肌腱细胞增殖至几乎覆盖培养皿底时进行传代。

二、实验分组

将肌腱细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种于 24 孔板(每块板接种 12 孔),每孔肌腱细胞铺满培养皿底面积的 60% ~ 70%,共接种 28 块板。其中 7 块板用于检测肌腱细胞的增殖率,另 21 块板用于检测基因的表达。每块板的孔按加入 bFGF(美国 Chemicon 公司生产)浓度的差异随机分成 3 组:质量浓度为 2 ng/ml 的 bFGF 组,质量浓度为 10 ng/ml 的 bFGF 组,正常对照组。其中的 7 块板同时加入 BrdU(美国 Sigma 公司产品),BrdU 终浓度为 5 μmol/L。37℃恒温、体积分数为 5% 的 CO_2 和饱和湿度下培养 5 d,中途换 1 次培养液、bFGF 和 BrdU。

三、肌腱细胞增殖率和基因表达的测定

1. BrdU 掺入技术检测肌腱细胞 DNA 合成

吸去培养液,经体积分数为 4% 的多聚甲醛固定、含体积分数为 10% 的羊血清的 0.01 M PBS 液封闭及一抗、二抗(均为美国 Sigma 公司产品)孵育后,在荧光显微镜下(×135)用 γ 波长观察,计数每 mm^2 视野内的荧光细胞数。

基金项目:本课题为国家教委优秀年轻教师基金、江苏省"333"工程基金、江苏省临床重点学科基金和江苏省青蓝工程基金资助项目

作者单位:226001 南通医学院附属医院手外科

万方数据

2. RT-PCR 法测肌腱细胞Ⅰ型胶原和 NF-κB 的基因表达

(1) 引物合成：3-磷酸甘油脱氧酶(glyceraldehyole-3-phosphate dehydrogenases，GAPDH)是所有细胞均存在的一种看家基因，本实验将其作为检测目的基因表达的对照。采用 DNA/RNA 自动合成仪合成兔Ⅰ型胶原、NF-κB 和 GAPDH 的引物。Ⅰ型胶原和 GAPDH 引物，引用 Im 等[3]、Majima 等[4]所得的序列。NF-κB 引物序列，遵循引物设计原则，根据基因库 NF-κB 的基因序列，由本实验室设计。NF-κB 引物序列为：left primer：5'-TGCACCTAGCTGCCAAAGAAGGA-3'，right primer：5'-TCTGCTCCTGCTGCTTTGAGAA-3'，预期扩增产物长度 376 bp。

(2) 总 RNA 提取和鉴定：TRIzol 法提取所有培养的腱细胞 RNA，经甲醛变性胶电泳检测 RNA 完整性，并用紫外分光光度计测定 OD_{260}、OD_{280}。

(3) cDNA 第一链合成及 PCR 扩增：取不同组别的 RNA 样本 1 μg，按逆转录 Kit(德国 Qiagen 公司产品)操作步骤合成 cDNA。在 PCR 合成仪上扩增Ⅰ型胶原和 NF-κB 基因。Ⅰ型胶原的反应程序为：94℃变性 3 min，94℃变性 45 s、59℃变性 45 s、72℃变性 45 s，循环 30 次。NF-κB 的反应程序为：94℃变性 5 min，94℃变性 15 s、56℃变性 30 s、72℃变性 30s，共循环 35 次。以 GAPDH 为内参照，每管加入内参 GAPDH 引物 s + as(各 10 pmol)1 μl，采用浓度为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测Ⅰ型胶原和 NEkB 扩增产物。

(4) 电泳条带密度分析：用基因条带图像处理系统，将电泳结束后的凝胶块放入紫外投射仪的暗箱内。将 GAPDH 的密度值设定为 1，目的基因条带密度相对于 GAPDH 条带密度的比值即为目的基因的相对密度值，测量 3 次，取平均值进行分析。

五、统计学分析

测量数据采取单因素方差(one-way ANOVA)分析，F 值有意义后，分别将质量浓度为 2 ng/ml、10 ng/ml 的 bFGF 组和正常对照组间进行肌腱细胞的 BrdU 标记阳性细胞数、Ⅰ型胶原/GAPDH 及 NF-κB/GAPDH 比值的 t 检验，$P < 0.05$ 示两者差异有显著意义。

结　果

一、BrdU 掺入技术检测肌腱细胞 DNA 合成

BrdU 是胸苷的类似物，能代替胸苷掺入 DNA，使染色体着色有所变化。本实验结果显示每 mm^2 视野下的荧光细胞数(个)，对照组、质量浓度为 2 ng/ml 和 10 ng/ml 的 bFGF 组(实验组)分别为(68.8 ± 19.1)、(298.0 ± 44.5)和 700.8 ± 163.3)，$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$，下同。两实验组分别与对照组相比，差异均有非常显著意义($t = -3.747$、-4.488，$P < 0.01$)。

二、甲醛变性胶电泳检测 RNA 完整性

用 Trizol 法提取 RNA。正常对照组与实验组 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 ~ 2.3 之间。总 RNA 经甲醛变性胶电泳，紫外透射灯上观察：28S、18S 条带清晰可见，28S 条带亮度大于 18S 条带的亮度，提示提取的总 RNA 完整，没有降解。

三、Ⅰ型胶原基因表达的变化(图 1)

Ⅰ型胶原密度相对比值见表 1。质量浓度为 10 ng/ml 的 bFGF 组Ⅰ型胶原基因表达相对比值约是对照组的 2 倍，两者相比差异有非常显著意义($t = -6.254$、$P < 0.01$)。质量浓度为 2 ng/ml 的 bFGF 组Ⅰ型胶原基因表达和对照组相比，差异无显著意义($t = -1.418$，$P > 0.05$)。

四、NF-κB 基因表达的变化

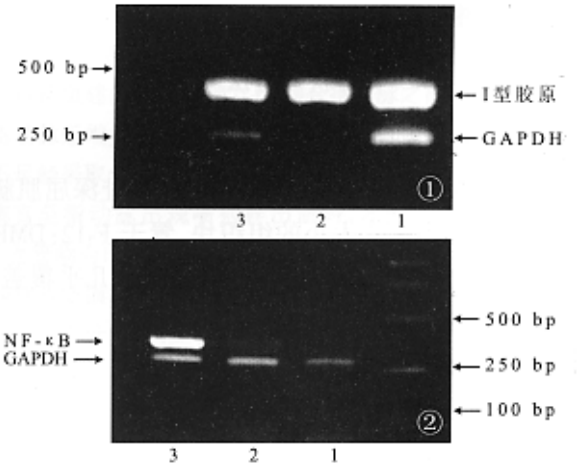
NF-κB 密度相对比值见表 1。NF-κB 基因在电泳图上的条带位置与设计的扩增长度相符(图 2)。质量浓度为 2 ng/ml 的 bFGF 组 NF-κB 基因表达比正常对照组增加 0.7 倍($t = -2.634$、$P < 0.05$)。质量浓度为 10 ng/ml 的 bFGF 组比正常对照组增加 8.6 倍($t = -11.174$、$P < 0.01$，图 3)。

讨　论

生长因子可促进肌腱分裂增殖，有望在临床上加

表 1　Ⅰ型胶原，NF-κB 基因电泳条带密度相对比值($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	24 孔板(块)	Ⅰ型胶原	NF-κB
正常对照组	7	2.6 ± 1.1	0.2 ± 0.1
2ng/ml bFGF 组	7	3.1 ± 1.3	0.3 ± 0.1
10ng/ml bFGF 组	7	5.0 ± 1.2	1.9 ± 0.6



1　正常对照组　2　2 ng/ml bFGF 组　3　10 ng/ml bFGF 组

图 1　Ⅰ型胶原基因表达电泳图
图 2　NF-κB 基因表达电泳图

万方数据

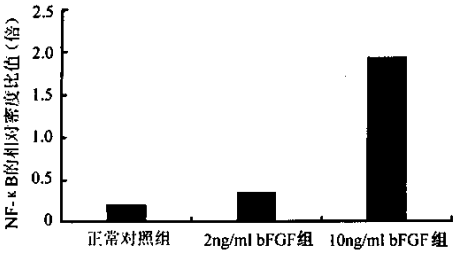


图 3 NF-κB 基因的表达

速肌腱愈合速度及强度，适应肌腱术后早期活动的需要和减少再次断裂的发生机会。bFGF、IGF、PDGF 和 TGF-β 均有明显促进细胞生长的作用[2,5-7]。崔志明等[8]使用自然凝胶电泳分离出相对分子质量为 45 000 的特异增强蛋白区带，而离体的实验结果也证实其具有促进腱细胞生长的能力。但是对于生长因子促进腱细胞的生长，仅局限于其能否发挥作用，而对调节其发挥作用的环节尚未有研究报道。本研究探索了和肌腱细胞作用密切相关的 I 型胶原合成基因，及在生长发育胚胎形成、炎症反应时具中心调节作用的 NF-κB 因子基因的表达水平，及其和生长因子浓度的关系。

本研究结果表明，bFGF 能显著刺激肌腱细胞的 DNA 和 I 型胶原的合成，并引起 NF-κB 这一早期即时转录因子基因表达的增强。DNA 合成代表肌腱的增殖，I 型胶原是肌腱基质的主要成分。NF-κB 因子的表达增加，提示 bFGF 可能通过 NF-κB 相关的作用信号传递途径使肌腱细胞的 DNA 和 I 型胶原合成增加。NF-κB 因子是 10 年前由 Sen 和 Baltimore 等首先发现的在转录水平起调节作用的因子，在治疗肿瘤、过敏、炎症、神经系统的疾病探索中，起重要调节作用[9]。但是 NF-κB 的作用具有明显的细胞种类特异性，在部分组织中不起调节作用。NF-κB 对腱细胞是否能起作用未见报道。本研究首次证实生长因子通过 NF-κB 因子对肌腱可起作用的依据。

NF-κB 因子是 MCP-1，IL-8 和 PDGF-BB 产生作用的共同 DNA 转录因子[10]。本研究发现 bFGF 也可以影响 NF-κB 的表达，这提示 bFGF 和 IL-8、PDGF-BB 具有共同的作用通路。因而，在设计使用生长因子促进肌腱细胞生长时，很可能以一种生长因子，或以一种生长因子为主即可达到目的。因为，多种生长因子可能通过共同的作用途径而发挥作用的；另外，直接调节 NF-κB 因子的表达水平，或外源性加入 NF-κB 因子可能会起到和多种生长因子应用同样的效果，从而可以在基因转录水平控制、促进或调节腱细胞的生长和增殖。

参 考 文 献

1 Duffy FJ, Seiler JG, Gelberman RH, et al. Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. J Hand Surg(Am), 1995, 20: 645-649.

2 Chang J, Most D, Thunder R, et al. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. J Hand Surg(Am), 1998, 23: 1052-1058.

3 Im GI, Kim DY, Shin JH, et al. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. J Bone Joint Surg (Br), 2001, 83: 289-294.

4 Majima T, Marchuk LL, Sciore P, et al. Compressive compared with tensile loading of medial collateral ligament scar in vitro uniquely influences mRNA levels for aggrecan, collagen type Ⅱ, and collagenase. J Orthop Res, 2000, 18: 524-531.

5 项舟，杨志明，魏大鹏，等. 类胰岛素生长因子促腱细胞生长的实验研究. 中华手外科杂志, 1997, 13: 183-186.

6 Yoshikawa Y, Abrahamsson SO. Dose-related cellular effects platelet-derived growth factor-BB differ in various types of rabbit tendons in vitro. Acta Orthop Scand, 2001, 72: 287-292.

7 王蔚，朴英杰，何恢绪. 转化生长因子-β1 对肌腱细胞增殖的调控作用. 中华手外科杂志, 2001, 17: 163-168.

8 崔志明，汤锦波. 屈肌腱愈合过程中产生的相对分子质量为 45 000 的蛋白对腱细胞生长的作用. 中华手外科杂志, 2001, 17: 119-121.

9 Siebenlist U, Franzoso G, Brown K, et al. Structure, regulation and function of NF-κB. Annu Rev Cell Biol, 1994, 10: 405-455.

10 Michael JM, Sankar G. Signal transduction through NF-κB. Immunol Today, 1998, 19: 80-88.

（收稿日期：2002-06-12） （本文编辑：郑忆柳）

《中国医学文摘·外科学》简介 ·消息·

《中国医学文摘·外科学》是国家卫生部主管的国内医学文献检索性期刊 18 个分册之一，自 1982 年创刊在国内公开发行以来，已连续发行 20 卷。目前收录国内公开发行的期刊 126 种，采用文摘、提要、题录三种方式，选择报道中央、省市一级医药卫生期刊、科研单位及高等医药院校出版的学报上有关专业文章的内容。设有外科基础、普外、骨科、神经外科、胸外科、泌尿外科、整形烧伤、器官移植等栏目。每期收录条目在 850 条左右，信息量多、覆盖面广，并附有年(卷)主题索引和作者索引，便于读者检查。

本刊为双月刊，16 开本，96 页。每年第 1 期刊登引用期刊一览表。国内统一刊号：CN32-1131/R ISSN：1001-1293。联系地址：南京市汉中路 129 号 江苏省医学情报研究所。 邮编：210029 电话：025-4706154 E-mail：yanglixiaolei@hotmail.com

《中国医学文献·外科学》编辑部

万方数据