

· 基础研究 ·

# SDF-1/NELL-1 双基因转染促进脂肪干细胞体外成骨<sup>△</sup>

郭延伟<sup>1</sup>, 王永曼<sup>1</sup>, 杨世茂<sup>2\*</sup>, 房殿吉<sup>3</sup>

(1. 济宁口腔医院口腔颌面外科, 山东济宁 272000; 2. 济南市口腔医院口腔颌面外科, 山东济南 250001;  
3. 上海闵行区牙病防治所口腔颌面外科, 上海 201100)

**摘要:** [目的] 观察腺病毒载体转染基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 和尼尔样-1 型分子 (Nel-like molecule-1, NELL-1) 基因对兔脂肪干细胞 (adipose stem cells, ADSCs) 体外成骨分化能力的影响。[方法] 自兔分离培养 ADSCs, 分为单纯细胞组 (original cell control, OCC)、空质粒转染组 (empty vector control, EVC)、SDF-1 组、NELL-1 组和 SDF-1/NELL-1 组, 给予相应体外处理。成骨诱导 14 d 后, 茜素红染色检测钙结节形成及碱性磷酸酶活性, Western blot 检测和 RT-PCR 检测相应蛋白与 mRNA 表达水平。[结果] 单纯 SDF-1 或 NELL-1 转染, 或 SDF-1/NELL-1 两者共同转染均显著增加目标基因的蛋白表达水平 ( $P<0.05$ ), 特别是共同转染同时增加两种基因蛋白的表达。茜素红染色钙结节计数和 ALP 活性检测方面, SDF-1 组、NELL-1 组和 SDF-1/NELL-1 组均显著高于 OCC 组和 EVC 组 ( $P<0.05$ ), 其中, SDF-1/NELL-1 组最高。RT-PCR 检测方面, SDF-1 组、NELL-1 组和 SDF-1/NELL-1 组的 OPN 和 OCN mRNA 表达水平高于 OCC 组和 EVC 组 ( $P<0.05$ ), 其中 SDF-1/NELL-1 组的 OPN 和 OCN mRNA 表达水平最高。[结论] SDF-1、NELL-1 单独转染, 或两者共转染 ADSCs 均可获得目标蛋白的高表达, 以上两种基因单独转染, 特别是两种基因共同转染, 可显著增强 ADSCs 的体外成骨。

**关键词:** 基质细胞衍生因子-1 (Stromal cell-derived factor-1, SDF-1), 尼尔样-1 型分子 (Nel-like molecule-1, NELL-1), 脂肪干细胞, 成骨

中图分类号: R318 文献标志码: A 文章编号: 1005-8478 (2022) 17-1597-06

**SDF-1 and NELL-1 co-transfection promotes osteogenesis differentiation of rabbit adipose stem cells in vitro** // GUO Yan-wei<sup>1</sup>, WANG Yong-man<sup>1</sup>, YANG Shi-mao<sup>2</sup>, FANG Dian-ji<sup>3</sup>. 1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Jining Hospital of Stomatology, Jining 272000, China; 2. Department of Endodontics, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250001, China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dental Institute of Minhang District, Shanghai 201100, China

**Abstract:** [Objective] To explore the effect of adenovirus-mediated stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and Nel-like molecule-1 (NELL-1) genes transfection on osteogenic differentiation of the rabbit adipose stem cells (ADSCs) in vitro. [Methods] ADSCs isolated from rabbit adipose tissue were divided into 5 groups, including the original cell control (OCC) group, the empty vector control (EVC) group, the SDF-1 transfected group, the NELL-1 transfected group and the SDF-1/NELL-1 transfected group, which received corresponding treatment involving transfection by adenovirus vectors carrying different target genes. Subsequently, alizarin red staining for calcium nodule formation and alkaline phosphatase (ALP) assay were conducted 14 days of osteoinductive culture, additionally, western blot and RT-PCR assays were done to detect expression levels of related proteins and mRNA of genes. [Results] Both SDF-1 and NELL-1 gene transfections, as well as the co-transfection of them significantly increased the expressions of target proteins, especially the co-transfection. In terms of calcium nodule accounts with alizarin red staining and ALP activity assay, the SDF-1 group, the NELL-1 group and the SDF-1/NELL-1 group proved significantly greater than the OCC and EVC groups ( $P<0.05$ ), with the co-transfection group the highest among the 5 groups. In terms of RT-PCR assays, the SDF-1 group, the NELL-1 group and the SDF-1/NELL-1 group had significantly greater expression of mRNAs of osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN) than the OCC and EVC groups ( $P<0.05$ ), among which the co-transfection group was the highest. [Conclusion] ADSCs transfected by both SDF-1 and NELL-1 genes, as well as co-transfection of them do highly express the target proteins, which considerably enhance osteogenesis in vitro, especially the adenovirus-mediated co-transfection of the two genes.

**Key words:** stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), Nel-like molecule-1 (NELL-1), adipose stem cells (ADSCs), osteogenesis

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.17.11

<sup>△</sup>基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81170935);山东济南市临床医学科技创新计划项目(编号:202019066)

作者简介:郭延伟,主治医师,研究方向:口腔颌面外科,(电话)15864549260,(电子信箱)guoweikq@126.com

\* 通信作者:杨世茂,(电子信箱)yangshimao@163.com

骨组织的改建及修复过程是一个由多细胞、多种生长因子和信号通路共同参与调控的成骨分化过程。随着基因转染技术的成熟发展,利用种子细胞多向分化能力结合基因重组技术为临床成骨提供了巨大便利条件<sup>[1-4]</sup>。脂肪干细胞(adipose stem cells, ADSCs)因其具有易取材、易增殖,传代稳及衰亡率低等优点,兼具易与自体细胞共生,可按需诱导并促进自身迁移,是目前临床及科研工作中常用的靶细胞<sup>[5-7]</sup>。骨组织的生长、发育、修复需要多因子、多细胞的共同作用,基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)作为重要的趋化蛋白,有研究证明其在创伤修复过程中对干细胞募集、动员及微血管生成方面也深具意义<sup>[8-11]</sup>。尼尔样-1型分子(Nel-like molecule-1, NELL-1)是一种隐匿蛋白,最初发现在颅缝早闭症,多项研究证实其在促成骨方面与颌骨发育有高度特异性,可明显促进颅颌面骨的发育、软骨内骨化<sup>[12-15]</sup>。本实验利用重组DNA技术结合各因子生物学特性探索SDF-1/NELL-1转染脂肪干细胞后促进其成骨的协同意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与主要试剂

健康新西兰白兔8只,雌雄不限,体重3~4 kg,济南市金丰实验动物实验中心提供。腺病毒SDF-1、NELL-1表达载体由AdMax腺病毒包装系统包装而成, $\alpha$ -MEM培养基购自中国武汉生之源科技公司;胎牛血清、胰蛋白酶、PBS、青链霉素购自美国HyClone公司;BCA蛋白定量试剂盒购自美国Gibco公司,ADSCs完全培养基购自美国BD公司;ExKine™ Total Protein Extraction Kit购自美国ABI公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒购自上海博森公司;Trizol及总RNA提取试剂盒购自美国Invitrogen公司;电泳系统,DMEM培养基、荧光染色及定量检测试剂盒,PCR仪、成像仪、倒置相差显微镜(Nikon,日本);化学发光仪(BIO-RAD,美国);FEI-Quanta 200型扫描电镜(Phillips,荷兰);荧光倒置显微镜(Nikon,日本)。

### 1.2 ADSCs分离与培养

局麻下取兔腹股沟处脂肪清洗干净,每块大小约1~2 mm<sup>3</sup>,于37℃恒温水浴箱进行梯度震荡1.5 h至糊状,振荡频率由低到高,取Accutase II型细胞消化液进行消化30 min,脂肪组织体积与消化液体积约1:2,2 600 r/min离心去上清后用D-HANK S液对其

进行2次洗涤沉淀,最后稀释、过滤、离心后收集所培养细胞进行传代。倒置相差显微镜下常规观察细胞培养期间形态变化,并随机选第3代制备细胞悬液用于下一步实验。

### 1.3 构建SDF-1及NELL-1重组腺病毒表达载体

首先对含有SDF-1 ORF克隆的序列信息测序验证后扩增。调整SDF-1上游引物序列:5'-GAAATCTGACTAGTCGGTACCC-3',下游引物序列:5'-TCCGAAGTCGGTTCATTACG-3',然后以模板为ORF克隆质粒对携带Bgl II及Sal I酶切位点的SDF-1基因片段进行扩增,纯化回收后的连接目的载体pIRES2-DSRED后得到共表达tdTomato-RED质粒并继续行序列测定后扩增,再以SDF-1-(tdTomato-RED)共表达质粒为模板扩增带att $\beta$ 1和att $\beta$ 2的SDF-1-(tdTomato-RED)的基因片段后进行电泳回收。使用Invitrogen BP重组系统,将上述目的片段通过Cre-loxp重组到基因表达载体p-EF1a上,再通过LR重组系统,将目的序列基因重组到腺病毒载体得到最终腺病毒质粒pAD/VIA-SDF-1。转染前将目的重组质粒置入PacI单酶切体系线性化后转化到DH5a感受态细胞,荧光显微镜下观察pAD/VIA-SDF-1-RFP表达,PCR鉴定后扩增并梯度纯化,测量OD<sub>260</sub>,计算病毒感染滴度。同法制备pAD/VIA-NELL-1-GFP腺病毒表达载体。

### 1.4 ADSCs分组与干预

#### 1.4.1 分组

按照试验计划将培养的ADSCs分成5组,分别为单纯细胞组(original cell control, OCC)、空质粒转染组(empty vector control, EVC)、SDF-1转染组、NELL-1转染组和SDF-1/NELL-1共转染组,体外给予相应处理。其中,SDF-1组、NELL-1组、SDF-1/NELL-1组取相应感染复数(MOI)分别为60、90、120、160的病毒溶液进行细胞转染,并观察转染后ADSCs形态有无明显变化,以标准视野下转染效率最佳,无明显细胞凋亡的最大MOI作为最佳MOI值进行后续实验。

#### 1.4.2 转染

取第3代兔ADSCs,将细胞密度调整为 $5 \times 10^4$ /cm<sup>3</sup>分别接种在5个6孔板,每板为3孔细胞。由上步实验得出腺病毒最佳MOI值为90,现各取相应病毒液含量500  $\mu$ l按照不同实验分组分别添加,OCC组和EVC组为空白对照,不添加转染液;SDF-1组添加SDF-1腺病毒转染液500  $\mu$ l,NELL-1组添加NELL-1腺病毒转染液500  $\mu$ l,

SDF-1/NELL-1 组先添加 SDF-1 腺病毒转染液 250  $\mu$ l, 培养 12 h 无异常后再添加 NELL-1 腺病毒转染液 250  $\mu$ l。常规细胞培养箱换液培养, 荧光显微镜下观察 14 d 后各组 ADSCs 发育状态及转染效率并记录。

#### 1.4.3 诱导成骨培养

取转染后培养 14 d 的各组 ADSCs, 弃掉上清, 按照 OriCell 干细胞成骨诱导分化试剂盒说明行各组细胞成骨分化诱导, 每 2~3 d 更换成骨诱导培养基, 于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养环境下培养约 14 d, 取细胞进行检测。

#### 1.5 检测指标

##### 1.5.1 Western blot 检测

成骨诱导 14 d 时取各组细胞行 PBS 液清洗, 使用 ExKine™ Total Protein Extraction Kit 和 BCA 定量试剂盒进行总蛋白提取及样品浓度测定。根据目的分子量进行常规配胶、转膜, 封闭后进行一抗、二抗的孵育, 最后用 Enlight 超敏 ECL、Film Development Kit 进行显影定影。使用 Align3 软件分析各组 ADSCs 吸光度 (A) 值, 设标准 GAPDH 为内参值, 分别检测 SDF-1 和 NELL-1 目标蛋白与 A 值、GAPDH 值相对表达量。重复检测 3 次。

##### 1.5.2 茜素红染色

成骨诱导 14 d 时取各组细胞, 将无菌的玻璃片放入细胞培养板中, 加入适量的细胞悬液, 作细胞爬片, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 每 2 d 换液 1 次。PBS (pH7.2, 不含钙镁) 洗涤 2 次, 70%乙醇室温固定细胞 60 min, 再用 PBS 洗涤 2 次; 以茜素红染色液覆盖样本, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤 5 次。观察倒置显微镜下各组细胞的生长发育情况, 包括钙结节大小、形态等变化, 200 倍镜多视野下计数各组钙结节数量。重复检测 3 次。

##### 1.5.3 ALP 活性检测

成骨诱导 14 d, 取各组细胞上清液, 采用 CheKine™ 检测试剂盒进行细胞 ALP 活性检测。重复检测 3 次。

##### 1.5.4 RT-PCR 检测

成骨诱导 14 d 取各组细胞, 使用 Invitrogen™ 试剂盒进行各组细胞总 RNA 提取、反转录、扩增。设计 OPN 引物序列: 正向引物 5'-CAGGTAC-GACTCCCAGATACGAT-3', 反向引物 5'-ACGTG-GTTTAAACGTACCGTACGT-3', 预计产物 430bp。OCN 引物序列: 正向引物 5'-AACGTTAAACCCGAT-

GGCAGCA-3', 反向引 5'-CGTTAAACGGGTACGT-TACGTA-3', 预计产物 410bp; 内参对照  $\beta$ -actin 基因的引物序列: 正向引物 5'-ACCGAGTGCAGGCTT-GACCGA-3', 反向引物 5'-ACCTTGGGAACCCGTAC-GTAC-3', 预计产物 170bp。分别检测骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 基因 mRNA 的相对表达量, 记录 CT 值行后续统计分析。重复检测 3 次。

#### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行统计, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 资料呈正态分布时, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 *LDS* 法。资料呈非正态分布时, 采用 *Kruskal-Wallis H* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ADSCs 分离与培养

原代细胞接种后, 细胞多呈现圆形, 大小不一, 而后呈三角形、多边形散在悬浮于培养液, 大约 2 周后 OCC、EVC 组多可见散在多边形、三角形细胞分布, 其他三组开始出现长梭形细胞呈鱼群状团簇分布, 排列紧密。14 d 时荧光显微镜观察见 OCC 组内无荧光表达, EVC 组为空质粒转染组, 无目的基因表达, 为散在绿色荧光表达, SDF-1 组可见红色荧光表达, 证明 pAD/VIA-SDF-1-RFP 可有效表达在 ADSCs, NELL-1 组可见绿色荧光表达, 证明 pAD/VIA-NELL-1-GFP 在 ADSCs 的有效表达, SDF-1/NELL-1 组可见棕黄色荧光表达, 证明了 pAD/VIA-SDF-1-NELL-1 在 ADSCs 的共表达, 通过同倍数多视野转染细胞占比率计算得出单基因转染效率在 95% 左右, 双基因转染效率在 85% 左右, 转染效率佳。

### 2.2 Western blot 检测

Western blot 检测结果见表 1, SDF-1 蛋白表达水平由低至高依次为, EVC 组<NELL-1 组<OCC 组<SDF-1 组<SDF-1/NELL-1 组, 整体差异有统计学意义 (P<0.05)。两两比较, SDF-1 组与 SDF-1/NELL-1 组的 SDF-1 蛋白表达水平的差异无统计学意义 (P>0.05), 但均显著高于其他 3 组 (P<0.05); OCC 组、EVC 组和 NELL-1 组三组间两两比较差异均无统计学意义 (P>0.05)。

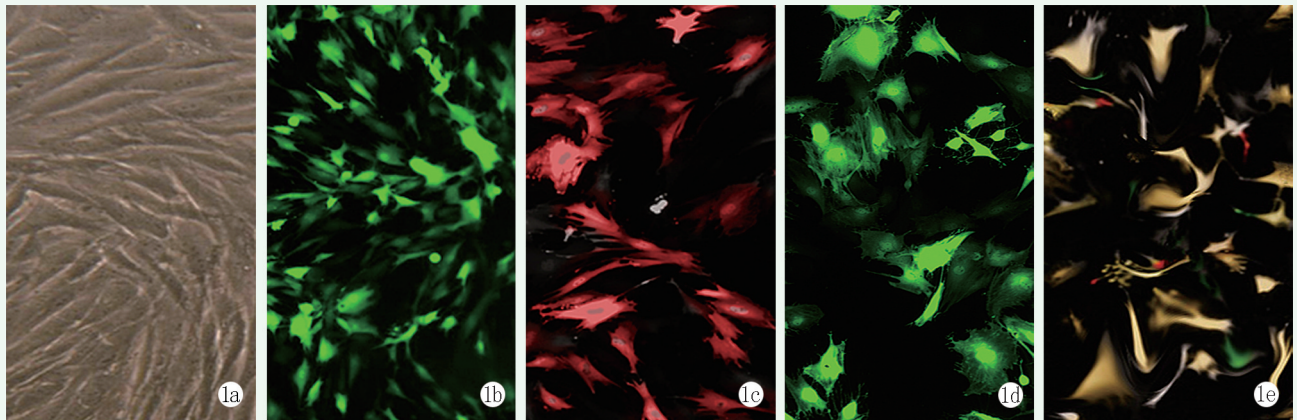


图 1 转染培养 14 d 各组细胞荧光镜下所见 1a: OCC 组 ( $\times 200$ ) 1b: EVC 组 ( $\times 100$ ) 1c: SDF-1 组 ( $\times 200$ ) 1d: NELL-1 组 ( $\times 200$ ) 1e: SDF-1/NELL-1 组 ( $\times 200$ )

NELL-1 蛋白表达水平由低至高依次为, EVC 组 < SDF-1 组 < OCC 组 < NELL-1 组 < SDF-1/NELL-1 组, 整体差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两两比较, NELL-1 组显著低于 SDF-1/NELL-1 组和 NELL-1 组蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 但此两组均显著高于其他 3 组 ( $P < 0.05$ ); OCC 组、EVC 组 和 SDF-1 组三组间两两比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )

### 2.2.2 茜素红染色

茜素红染色观察见图 2, 成骨诱导培养 3 周后通过倒置相差显微镜观察同倍数不同视野观察, 发

现 SDF-1 组、NELL-1 组和共转染组均较 OCC 组和 EVC 组钙盐沉积更为明显, 以共转染组钙盐沉积最显著。钙结节计数结果见表 1, 钙结节计数由低至高依次为, EVC 组 < OCC 组 < SDF-1 组 < NELL-1 组 < SDF-1/NELL-1 组, 整体差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两两比较, NELL-1 组钙结节形成情况显著强于 SDF-1 组 ( $P < 0.05$ ), 但显著弱于共转染组 ( $P < 0.05$ ), 共转染组钙结节形成均显著强于他 4 组 ( $P < 0.05$ )。而 OCC 组与 EVC 两组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

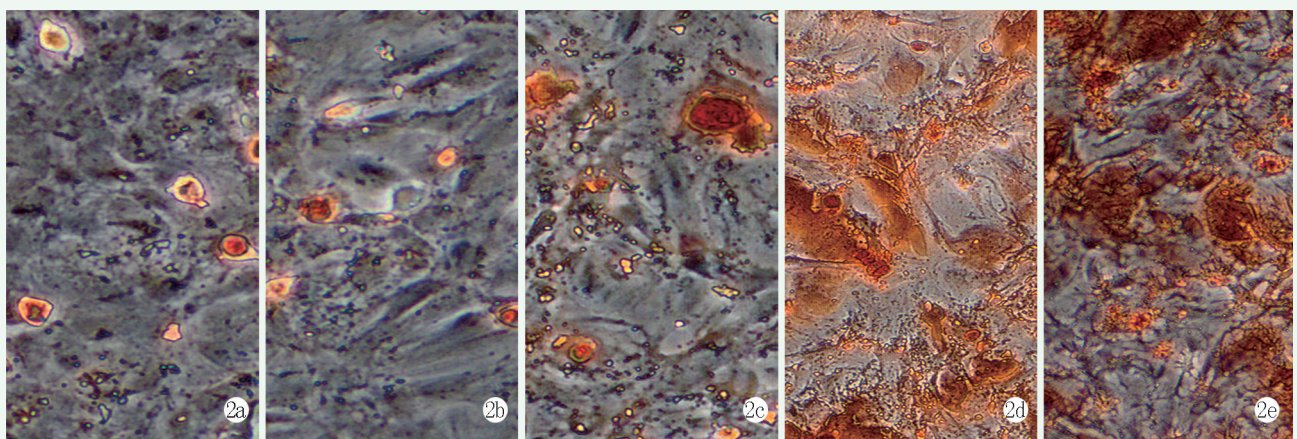


图 2 成骨诱导培养 14 周时各组茜素红染色倒置显微镜下所见 ( $\times 200$ ) 2a: OCC 组 2b: EVC 组 2c: SDF-1 组 2d: NELL-1 组 2e: SDF-1/NELL-1 组

### 2.2.3 ALP 活性检测

ALP 检测结果见表 1, ALP 活性由低至高依次为, EVC 组 < OCC 组 < SDF-1 组 < NELL-1 组 < SDF-1/NELL-1 组, 整体差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两两比较, SDF-1 组、NELL-1 组和 SDF-1/NELL-1 组间的 ALP 活性两两比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 均高于显著 OCC 组和 EVC 组 ( $P < 0.05$ ); 而 OCC 组和 EVC 组的 ALP 活性的差异无统计学意义

( $P > 0.05$ )。

### 2.2.4 RT-PCR 检测

ADSCs 成骨诱导实验 14 d 后 RT-PCR 检测结果见表 1。OPN 和 OCN 的 mRNA 表达水平由低至高均依次为, OCC 组 < EVC 组 < SDF-1 组 < NELL-1 组 < SDF-1/NELL-1 组, 整体差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两两比较, SDF-1 组、NELL-1 组和 SDF-1/NELL-1 组间的 OPN 和 OCN 的 mRNA 表达水平两两

比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 均高于显著  
OCC 组和 EVC 组 ( $P<0.05$ ); 而 OCC 组和 EVC 组的  
差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 1 五组细胞检测结果 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ ) 与比较

指标	OCC 组	EVC 组	SDF-1 组	NELL-1 组	SDF-1/NELL-1 组	P 值
Western blot						
SDF-1 蛋白 (ng/ $\mu$ l)	1.08 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.06	32.04 $\pm$ 0.68	1.05 $\pm$ 0.05	32.20 $\pm$ 1.39	<0.001
NELL-1 蛋白 (ng/ $\mu$ l)	1.08 $\pm$ 0.05	1.05 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.06	44.24 $\pm$ 0.98	52.46 $\pm$ 0.57	<0.001
茜素红染色						
钙结节数 (个)	7.17 $\pm$ 0.75	7.00 $\pm$ 0.89	11.67 $\pm$ 0.81	17.17 $\pm$ 0.75	22.17 $\pm$ 0.75	<0.001
ALP 检测						
ALP 活性 (u/ $\mu$ g)	15.69 $\pm$ 0.50	15.62 $\pm$ 0.61	19.65 $\pm$ 0.52	26.80 $\pm$ 0.48	32.55 $\pm$ 0.62	<0.001
RT-PCR 检测						
OPN-mRNA (ng/ml)	11.86 $\pm$ 0.53	11.90 $\pm$ 0.57	22.29 $\pm$ 0.92	30.45 $\pm$ 0.70	42.06 $\pm$ 0.19	<0.001
OCN-mRNA (ng/ml)	13.94 $\pm$ 1.47	15.53 $\pm$ 0.52	32.55 $\pm$ 0.54	35.72 $\pm$ 0.41	52.48 $\pm$ 0.63	<0.001

### 3 讨论

骨组织的发育、修复和再生重建过程是一个复杂过程, 涉及多种细胞及多种生物因子、多个信号通路共同参与, 另外又包含全身因素如内分泌及相关代谢的关联作用。复杂的分子生物调节在骨缺损修复过程的各个环节都有着不同的作用<sup>[16-18]</sup>。随着骨组织工程与基因技术相结合的进一步发展, 如何更合理地利用种子细胞和生物因子的潜在关系, 是目前构成活性成骨材料的关键所在。本实验正是利用重组 DNA 技术结合各因子生物学特性探索 SDF-1/NELL-1 双基因转染脂肪干细胞后促进体外成骨的协同意义, 为未来构建人工工程骨提供必要依据。

细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 是机体重要趋化蛋白之一, 主要由骨髓基质细胞分泌释放, 可直接作用于干细胞的受体并与其相结合, 促进干细胞的动员、归巢及分化, 在机体各方面包括成骨、成血管促进组织修复方面发挥着积极作用<sup>[19-22]</sup>。尼尔样-1 型分子 (NELL-1) 在颅颌面骨的成骨发育和分化具有高度特异性, 其组织产物蛋白作为重要的成骨生长因子在促进干细胞在成骨分化内环境刺激骨改建、膜内成骨过程中具有明显意义<sup>[23-25]</sup>。本实验首先通过腺病毒载体成功将目的基因 SDF-1、NELL-1 转入 ADSCs 内, 且通过最佳 MOI 值确定了其稳定转染效率。然后通过荧光显微镜与光镜形态观察比较转染后各组细胞生长状况并结合 Western blot 检测各组目的蛋白的时间表达, 发现 SDF-1 在促 ADSCs 分化生长速度均优于其他各组,

说明 SDF-1 在 ADSCs 分化并促进其增殖发挥着重要作用。另外通过 Western blot 发现共转染组的 SDF-1/NELL-1 蛋白表达水平明显较其他各组高, 也说明了本实验所选双基因较单基因能够相互影响在 ADSCs 的表达量, 并促进自身在 ADSCs 的目的蛋白表达。在体外促成骨实验中, 转染组在钙结节形成和 ALP 活性检测中均明显优于对照组, 且共转染组钙结节形成速度及形态明显优于其他各组, 结合 NELL-1 组在促 ADSCs 体外成骨明显强于 SDF-1 组的结果和 SDF-1 组在促进 ADSCs 增殖分化的明显作用, 可以说明 SDF-1 能够结合 NELL-1 促体外成骨分化优势更好促进 ADSCs 动员、分化并共同促进 ADSCs 体外成骨。在 RT-PCR 检测中, 作者也发现共转染组 OPN、OCN 基因表达量明显高于其他各组, 各组目的基因表达量与上述钙结节形成和 ALP 活性的对应检测结果趋势相辅相成, 从而证实了 ADSCs 通过转染 SDF-1 和 NELL-1 后共同促进自身体外成骨分化的显著意义。

在成骨分化的过程中, 如何更好地启动内源性 & 外源性因素是个十分复杂的过程, 并不是单纯某一因子能够独立完成的, 需要多因素的成骨因子协同作用最终促进骨修复。已有研究证实单独应用 Nell-1 基因可以促进脂肪干细胞的成骨分化, 但 SDF-1 的加入是否可以增强其协同成骨作用未有相关研究。本研究中通过对细胞增殖及形态学观察、ALP 检测和目的蛋白基因层面证实了 SDF-1 和 NELL-1 双基因转染兔 ADSCs 在体外的成骨性能优于 NELL-1 单基因转染, 从侧面也验证了 SDF-1 基因的加入可以显著增强 NELL-1 基因协同成骨作用, 推测是趋化蛋白家

族 SDF-1 因子在细胞通路及旁分泌作用下, 可以促进 ADSCs 的动员及归巢, 最终可协同 NELL-1 促进 ADSCs 成骨。本实验从骨重建的临床需要出发, 将组织工程及基因生物学相结合, 证实了 ADSCs 可以作为腺病毒转染易感细胞, 为双目的基因转染和转染后促进 ADSCs 体外成骨表达提供又一模型, 为临床诱导成骨促进骨修复提供了理论依据, 也为后期动物体内成骨实验奠定了实验基础。

### 参考文献

- [1] Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, et al. Interactions with nanoscale topography: adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage [J]. *Biomed Mater Res A*, 2009, 91 (1): 195-208.
- [2] Bardsley K, Kwarciak A, Freeman C, et al. Repair of bone defects in vivo using tissue engineered hypertrophic cartilage grafts produced from nasal chondrocytes [J]. *Biomaterials*, 2017, 112 (2): 313-323.
- [3] Jarrah AA, Schwarskopf M, Wang ER, et al. SDF-1 induces TNF-mediated apoptosis in cardiac myocytes [J]. *Apoptosis*, 2018, 23 (1): 79-91.
- [4] Hinton RJ, Jing Y, Jing J, et al. Roles of chondrocytes in endochondral bone formation and fracture repair [J]. *Dent Res*, 2017, 96 (1): 23-30.
- [5] 林浩, 孙中仪, 郑勇, 等. miR-122-3p 通过 wnt/ $\beta$ catenin 信号通道调控小鼠脂肪间充质干细胞成骨分化 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27 (24): 2272-2277.
- [6] 陈犹白, 陈聪慧, Zhang QX, 等. 脂肪干细胞成骨分化的研究进展 [J/CD]. *中华损伤与修复杂志 (电子版)*, 2016, 11 (2): 126-134.
- [7] Burrow KL, Hoyland JA. Human adipose-derived stem cells exhibit enhanced proliferative capacity and retain multipotency longer than donor-matched bone marrow mesenchymal stem cells during expansion in vitro [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 1-15.
- [8] Liu X, Zhou C, Li Y, et al. SDF-1 promotes endochondral bone repair during fracture healing at the traumatic brain injury condition [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (1): e54077.
- [9] Duan L, Lu Y, Xie W, et al. Leptin promotes bone metastasis of breast cancer by activating the SDF-1/CXCR4 axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (16): 16172-16182.
- [10] Carbone LD, Bžková P, Fink HA, et al. Association of plasma SDF-1 with bone mineral density, body composition, and hip fractures in older adults: the cardiovascular health study [J]. *Calcif Tissue Int*, 2017, 100 (6): 599-608.
- [11] Xu J, Chen Y, Liu Y, et al. Effect of SDF-1/Cxcr4 signaling antagonist AMD3100 on bone mineralization in distraction osteogenesis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2017, 100 (6): 641-652.
- [12] 李睿, 马崇文, 杨信信, 等. NELL-1 蛋白促成骨研究现状 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27 (4): 347-351.
- [13] Liu L, Lam WMR, Naidu M, et al. Synergistic effect of NELL-1 and an ultra-low dose of BMP-2 on spinal fusion [J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25 (23-24): 1677-1689.
- [14] Qi H, Kim JK, Ha P, et al. Inactivation of Nell-1 in chondrocytes significantly impedes appendicular skeletogenesis [J]. *Bone Miner Res*, 2019, 34 (3): 533-546.
- [15] James AW, Chiang M, Asatrian G, et al. Vertebral implantation of NELL-1 enhances bone formation in an osteoporotic sheep model [J]. *Tissue Eng Part A*, 2016, 22 (11-12): 840-849.
- [16] 陈宁, 蒋林彬, 粟谋, 等. 双基因 pCDNA 3.1-NGF-IRES-BMP2 真核质粒转染大鼠 BMSCs 诱导成骨的研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2016, 24 (4): 345-351.
- [17] Zhang W, Zhang X, Ling J, et al. Osteo-/odontogenic differentiation of BMP2 and VEGF gene-co-transfected human stem cells from apical papilla [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13 (5): 3747-3754.
- [18] Yang J, Li Y, Liu Y, et al. Role of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway in cartilage and subchondral bone in temporomandibular joint osteoarthritis induced by overloaded functional orthopedics in rats [J]. *Orthop Surg Res*, 2020, 15 (1): 330.
- [19] Solovyeva VV, Chulpanova DS, Tazetdinova LG, et al. In vitro angiogenic properties of plasmid DNA encoding SDF-1 $\alpha$  and VEGF165 genes [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 190 (3): 773-788.
- [20] Lauer A, Wolf P, Mehler D, et al. Biofabrication of SDF-1 functionalized 3D-printed cell-free scaffolds for bone tissue regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (6): 2175.
- [21] Periyasamy-Thandavan S, Burke J, Mendhe B, et al. MicroRNA-141-3p negatively modulates SDF-1 expression in age-dependent pathophysiology of human and murine bone marrow stromal cells [J]. *Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2019, 74 (9): 1368-1374.
- [22] Zhang H, Li X, Li J, et al. SDF-1 mediates mesenchymal stem cell recruitment and migration via the SDF-1/CXCR4 axis in bone defect [J]. *Bone Miner Metab*, 2021, 39 (2): 126-138.
- [23] 张弘, 姚宇, 孙佳栋, 等. NELL-1 调控 RUNX2 的 P1 启动子诱导成骨分化 [J/CD]. *中华口腔医学研究杂志 (电子版)*, 2017, 11 (4): 197-203.
- [24] James AW, Shen J, Tsuei R, et al. NELL-1 induces Sca-1+ mesenchymal progenitor cell expansion in models of bone maintenance and repair [J]. *CI Insight*, 2017, 2 (12): e92573.
- [25] Tanjaya J, Lord EL, Wang C, et al. The effects of systemic therapy of PEGylated NELL-like protein 1 (NELL-1) on fracture healing in Mice [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188 (3): 715-727.

(收稿:2021-10-01 修回:2022-03-28)  
(同行评议专家:王明国 高德)  
(本文编辑:宁桦)