

血管内皮生长因子 165/ 骨形态发生蛋白改善缺氧复氧状态下成骨细胞损伤

赵伊婷¹, 张裕祥², 马洁¹, 何雪娇¹<https://doi.org/10.12307/2024.809>

投稿日期: 2023-10-25

采用日期: 2023-12-28

修回日期: 2024-01-25

在线日期: 2024-02-07

中图分类号:

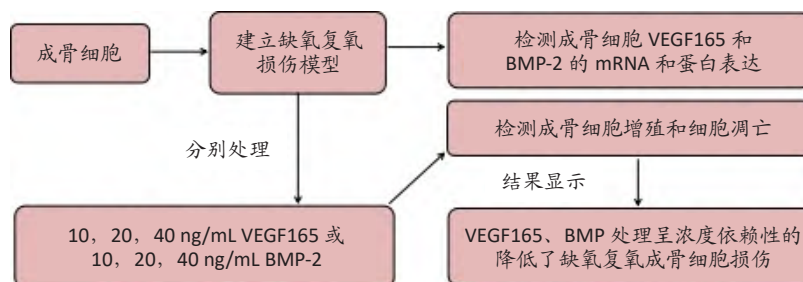
R496; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)35-05669-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白对缺氧复氧成骨细胞损伤有保护作用



文题释义:

缺氧复氧细胞损伤模型: 是一种常用的细胞损伤实验模型, 可用于研究各种细胞在缺氧和复氧条件下的损伤和恢复过程, 以及评估不同保护策略的效果。

血管内皮生长因子165: 是一种重要的细胞因子, 它在血管生成、维持和修复以及其他生理过程中起着关键作用, 并通过与其受体结合, 促进内皮细胞增殖、迁移和血管新生, 以此保证组织得到足够的氧气和营养物质供应。

摘要

背景: 研究发现, 血管内皮生长因子165和骨形态发生蛋白两种因子在缺氧复氧过程中相互作用, 通过调节细胞内信号通路的活化, 参与骨细胞损伤的修复过程。

目的: 进一步探究血管内皮生长因子165/骨形态发生蛋白与缺氧复氧成骨细胞损伤的关系分析。

方法: 取成骨细胞, 建立缺氧复氧损伤模型, 建模前后Real-Time PCR法和免疫印迹法检测血管内皮生长因子165、骨形态发生蛋白2的mRNA及蛋白表达。分别给予建模后成骨细胞不同质量浓度(10, 20, 40 ng/mL)血管内皮生长因子165或骨形态发生蛋白2处理12, 24, 36, 48, 72 h, CCK-8法检测细胞增殖, DAPI检测细胞凋亡。

结果与结论: ①与建模前相比, 建模后成骨细胞中血管内皮生长因子165、骨形态发生蛋白2的mRNA和蛋白表达量显著降低($P < 0.05$); ②成骨细胞增殖率随着血管内皮生长因子165质量浓度的升高而明显升高($P < 0.05$); 成骨细胞凋亡率随着血管内皮生长因子165质量浓度的升高而明显降低($P < 0.05$); ③成骨细胞增殖率随着骨形态发生蛋白2质量浓度的升高而明显升高($P < 0.05$); 成骨细胞凋亡率随着骨形态发生蛋白质量浓度的升高而明显降低($P < 0.05$); ④结果表明, 血管内皮生长因子165、骨形态发生蛋白在缺氧复氧成骨细胞损伤中低表达, 给予血管内皮生长因子165、骨形态发生蛋白处理后缺氧复氧成骨细胞损伤明显降低, 且呈浓度依赖性, 提示血管内皮生长因子、骨形态发生蛋白对缺氧复氧成骨细胞损伤有明显保护作用。

关键词: 血管内皮生长因子165; 骨形态发生蛋白2; 缺氧复氧; 成骨细胞; 细胞凋亡

Vascular endothelial growth factor 165/bone morphogenetic protein improves osteoblast injury under hypoxic and reoxygenated conditions

Zhao Yiting¹, Zhang Yuxiang², Ma Jie¹, He Xuejiao¹¹Department of Orthopedics, ²Clinical Laboratory, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Zhao Yiting, Associate chief technician, Department of Orthopedics, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhang Yuxiang, Clinical Laboratory, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: It has been found that vascular endothelial growth factor 165 and bone morphogenetic proteins interact with each other during hypoxia-reoxygenation and are involved in the repair process of osteoblast injury by regulating the activation of intracellular signaling pathways.

OBJECTIVE: To further investigate the relationship between vascular endothelial growth factor 165/bone morphogenetic protein and hypoxic-reoxygenated osteoblast injury.

新疆医科大学第六附属医院, ¹骨科, ²检验科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001

第一作者: 赵伊婷, 女, 1982年生, 甘肃省人, 汉族, 副主任技师, 主要从事免疫方面的研究。

通讯作者: 张裕祥, 新疆医科大学第六附属医院检验科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001

<https://orcid.org/0009-0005-6694-6936> (赵伊婷)

引用本文: 赵伊婷, 张裕祥, 马洁, 何雪娇. 血管内皮生长因子 165/ 骨形态发生蛋白改善缺氧复氧状态下成骨细胞损伤 [J]. 中

国组织工程研究, 2024, 28(35):5669-5674.



METHODS: Osteoblasts were selected and the hypoxic-reoxygenated injury model was established. Vascular endothelial growth factor 165 and bone morphogenetic protein expressions at mRNA and protein levels were detected by real-time PCR and western blot before and after modeling. After modeling, osteoblasts were given different concentrations of vascular endothelial growth factor 165 and bone morphogenetic protein 2 (10, 20, 40 ng/mL). Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 method and apoptosis was detected by DAPI at 12, 24, 36, 48, and 72 hours after treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with before modeling, the mRNA and protein expressions of vascular endothelial growth factor 165 and bone morphogenetic protein 2 in osteoblasts after modeling were significantly decreased ($P < 0.05$). The proliferation rate of osteoblasts was significantly increased with the increase of vascular endothelial growth factor 165 concentration ($P < 0.05$), while the apoptosis rate of osteoblasts decreased significantly with the increase of vascular endothelial growth factor 165 concentration ($P < 0.05$). The proliferation rate of osteoblast was significantly increased with the increase of bone morphogenetic protein 2 concentration ($P < 0.05$), while the apoptosis rate of osteoblast decreased significantly with the increase of bone morphogenetic protein 2 concentration ($P < 0.05$). To conclude, vascular endothelial growth factor 165 and bone morphogenetic protein are lowly expressed in hypoxic-reoxygenated osteoblast injury, and treatment with vascular endothelial growth factor 165 and bone morphogenetic protein can reduce the injury of hypoxic-reoxygenated osteoblast in a concentration-dependent manner, suggesting that vascular endothelial growth factor 165 and bone morphogenetic protein have a significant protective effect against the injury of hypoxic-reoxygenated osteoblasts.

Key words: vascular endothelial growth factor 165; bone morphogenetic protein 2; hypoxia-reoxygenation; osteoblast; cell apoptosis

How to cite this article: ZHAO YT, ZHANG YX, MA J, HE XJ. Vascular endothelial growth factor 165/bone morphogenetic protein improves osteoblast injury under hypoxic and reoxygenated conditions. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(35):5669-5674.

0 引言 Introduction

骨损伤是一种常见的骨骼系统问题，是指骨骼系统遭受外力或其他因素引起的损伤或破坏，包括骨折、骨裂、骨挫伤等多种类型，严重的骨损伤甚至可能导致骨折不愈合或功能障碍，严重影响着患者的生活质量，故及时诊断和治疗至关重要^[1-5]。众所周知，骨组织中的成骨细胞主要负责新骨的形成和修复，在骨损伤发生后，成骨细胞会被激活并迁移到受损部位，从而参与骨损伤的修复过程^[6-9]。然而，如果骨损伤过于严重或者机体内的因素影响了成骨细胞的功能，可能导致愈合过程受阻或发展为骨不连、骨无菌坏死等不良结局，因此对成骨细胞的正常活动和功能研究是骨损伤治疗的重要方向之一^[10-11]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)165 在血管生成和组织修复中起着重要作用，研究发现在骨损伤中，VEGF165 可以促进血管生成，增加血供，促进骨细胞增殖和分化，从而促进骨愈合^[12]。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMP) 在骨组织发育和再生中起着重要作用，研究发现其可促进干细胞分化为成骨细胞，从而促进骨组织的生成和修复^[13]。缺氧是指组织或细胞受到供氧不足的条件，而复氧则是指恢复正常供氧情况下的状态，有研究表明，缺氧复氧可能对成骨细胞造成损伤，从而对其生存、增殖、分化等功能产生重要影响^[14]。但目前关于 VEGF165/BMP 与缺氧复氧成骨细胞损伤的关系研究有限，因此，该文章就 VEGF165/BMP 与缺氧复氧成骨细胞损伤的关系分析进行探讨，以期对骨损伤的治疗和康复提供新的治疗策略。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验或 SNK-*q* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 1 月至 2023 年 6 月在新疆医科大学医学实验室完成。

1.3 材料 成骨细胞、CCK-8 试剂盒 (货号: CTCC-071ES, CTCC-M006, 无锡菩禾有限公司); VEGF165 (货号: UA040019, 南京优爱有限公司); BMP、Trizol 试剂 (货号: A-01K99647, Invitrogen, 上海文初有限公司); BIOG 反转录

酶 (货号: 31011, 常州百代股份有限公司); 荧光实时定量 PCR 仪 (型号: Rotor-Gene 3000, 上海铂力有限公司); 细胞裂解液 (货号: AP01L076, 上海和元李记有限公司); Bradford 蛋白定量试剂盒 (货号: R21252, 上海源叶有限公司); VEGF165 抗体 (货号: orb1715761, 武汉博欧特有限公司); BMP-2 抗体 (货号: YJ14459, 上海一基有限公司); GAPDH 抗体 (货号: GTX100118, 深圳欣博盛有限公司); ECL 检测试剂盒 (货号: 3502, 上海晶风有限公司); 酶标仪 (型号: SpectraMax, 上海道鹏有限公司); DAPI (货号: HB21606yy, 上海化邦有限公司); 荧光显微镜 (型号: QLS-scope, 北京 Quantum 有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 成骨细胞使用 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养, 添加体积分数 10% FBS (胎牛血清) 和 1% 抗生素混合物, 将细胞培养在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中, 培养至细胞贴壁达到 80% 时进行传代培养, 培养两三代, 收集细胞进行后续实验。

1.4.2 缺氧复氧成骨细胞损伤模型的建立^[15] 取成骨细胞, 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于 24 孔板, 每孔 100 μL , 加入 400 μL 培养液于无血清培养基孵育 12 h 后, 将培养的成骨细胞放入一个密闭的缺氧箱中, 调节缺氧箱内的气体组成为体积分数 5% CO₂、94% N₂、1% O₂, 并将温度保持在 37 °C, 在缺氧箱中培养细胞 6 h 以模拟缺氧环境, 然后将缺氧箱中的培养板取出, 将细胞培养回常规的培养条件, 即 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中进行复氧 12 h, 收集细胞进行后续实验。

1.4.3 VEGF165、BMP 处理细胞^[15] 取建模后的成骨细胞, 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于 24 孔板, 每孔 100 μL , 分别给予含不同质量浓度的 VEGF165、BMP-2 的无血清培养基 (加入培养液 400 μL), 质量浓度分别为 10, 20, 40 ng/mL, 常规培养 48 h 后收集细胞用于后续实验。

1.4.4 Real-time PCR 法检测 mRNA 相对表达^[16] 取待测细胞, Trizol 试剂提取总 RNA, BIOG 反转录酶反转录合成 cDNA, 完成后加入 cDNA 4 倍体积的 TE 稀释, 根据实验设计, 制备 PCR 反应体系见表 1。将反应体系加入实时 PCR 系统, 进行

PCR 扩增, 根据引物设计, 选择合适的 PCR 程序和温度梯度。VEGF165、BMP-2 引物序列见表 2; PCR 反应程序见表 3, 反应结束后进行数据分析, 以同一样本中的 GAPDH 的 Ct 值作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其基因相对表达量。qPCR 引物由上海生工提供。

表 1 | qPCR 反应体系
Table 1 | qPCR reaction system

组分	用量
2×buffer	5 μL
Forward primer	500 nmol/L
Reverse primer	500 nmol/L
cDNA	0.5 μL
ddH ₂ O	Make up to 10 μL

表 2 | 引物序列
Table 2 | Primer sequences

基因	序列	产物大小(bp)
血管内皮生长因子 165	上游 5'- AGG GCA GAA TCA TCA CGA AGT-3'	217
	下游 5'- TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA T-3'	
骨形态发生蛋白 2	上游 5'- GGC GGA CCT GGA GTA CCT C-3'	435
	下游 5'- GGT TCA TGC GCT GTC ACA AA-3'	
GAPDH	上游 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'	126
	下游 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'	

表 3 | PCR 反应程序
Table 3 | PCR reaction procedures

步骤	温度 (°C)	时间	循环数
1	95	3 min	1
2	95	10 s	1
3	Primer specific	30 s	1
4	重复 2, 3 步骤		39
5	信号采集		
6	65-95	每上升 0.5 °C 持续 5 s 采集信号	5

1.4.5 免疫印迹法检测蛋白表达^[17] 取待测细胞加入胰蛋白酶进行消化后重悬细胞, 并将细胞浓度调整为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于 6 孔板中, 每孔细胞悬液 100 μL, 加入培养液 400 μL, 培养 24 h, 用细胞裂解缓冲液裂解细胞, 用 Bradford 法测定细胞裂解物中的蛋白质含量, 然后根据蛋白质大小, 选择合适的凝胶浓度和分辨率, 将裂解物样品加载到 SDS-PAGE 凝胶上, 进行电泳分离, 将分离好的蛋白质迁移到 PVDF 膜上, 将转印膜放入阻断缓冲液中, 在室温下轻轻摇动或孵育, 阻断非特异性结合位点, 用含有 VEGF165、BMP 特异性的一抗溶液 (1 : 200) 孵育转印膜 12 h, 洗膜后, 将与特异性一抗结合的辣根过氧化物酶标记的二抗溶液 (1 : 5 000) 加入转印膜上, 室温孵育 2 h, 用 ECL 荧光试剂盒测定结果, 计算与 GAPDH 比值求得 VEGF165、BMP 蛋白的相对表达量。

1.4.6 CCK-8 法检测细胞增殖^[18] 取 48 h 后收集的细胞, 不同质量浓度的 VEGF165、BMP 的无血清培养基分别处理 12, 24, 36, 48, 72 h 后, 取待测细胞, 离心后弃掉上清液, 重悬细胞后将其接种于 48 孔板中并调整密度为 1×10^4 个 / 孔, 每孔加入培养液 400 μL, 将其置于 37 °C 的培养箱中预培养 24 h, 按照 CCK-8 试剂盒的说明书, 将 CCK-8 试剂稀释到适当浓度的培养基中, 将预培养后的细胞培养液抽取一部分,

加入相应比例的 CCK-8 试剂, 将含有 CCK-8 试剂的细胞培养皿放回 37 °C 的培养箱中继续孵育 4 h, 用酶标仪在 450 nm 波长下测量细胞培养液的吸光度, 根据吸光度值, 记录并分析数据。

1.4.7 DAPI 法检测细胞凋亡^[19] 取待测细胞, 离心后弃掉上清液, 重悬细胞后将其接种于 48 孔板中并调整浓度为 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 每孔细胞悬液 100 μL。10% 缓冲甘油石蜡固定细胞 10 min, 用 PBS 洗涤固定的细胞, 去除残留的固定剂, 加入 300 μL DAPI 染液, 在室温下孵育细胞 15-30 min, 使 DAPI 荧光染料与细胞 DNA 结合, 用 PBS 洗涤细胞, 去除未结合的 DAPI 染料, 用荧光显微镜观察并记录 DAPI 染色的细胞, 凋亡细胞核呈现强烈的蓝色荧光。

1.5 主要观察指标 ①成骨细胞 VEGF165、BMP 的 mRNA 和蛋白表达; ②不同质量浓度 VEGF165/BMP 处理对成骨细胞增殖的影响; ③不同质量浓度 VEGF165/BMP 处理对成骨细胞凋亡的影响。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析, 数据符合正态分布, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验或 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。该文章的统计学方法已经新疆医科大学第六附属医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 成骨细胞 VEGF165、BMP 表达结果

2.1.1 VEGF165、BMP-2 mRNA 的表达 与建模前相比, 建模后成骨细胞中 VEGF165、BMP-2 mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.05$), 见表 4。图 1。

表 4 | 建模前后成骨细胞中血管内皮生长因子 165 及骨形态发生蛋白 2 mRNA 表达
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 | mRNA expressions of vascular endothelial growth factor 165 and bone morphogenetic protein 2 in osteoblasts before and after modeling

时间	血管内皮生长因子 165	骨形态发生蛋白 2
建模前	1.00±0.00	1.00±0.00
建模后	0.58±0.07	0.63±0.08
t 值	14.700	11.330
P 值	< 0.001	< 0.001

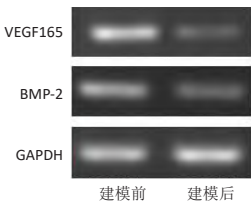


图 1 | 建模前后成骨细胞血管内皮生长因子 165(VEGF)、骨形态发生蛋白 2(BMP-2)PCR 电泳图
Figure 1 | PCR electrophoretogram of vascular endothelial growth factor 2 165 and bone morphogenetic protein in osteoblasts before and after modeling

2.1.2 VEGF165、BMP-2 蛋白的表达 与建模前相比, 建模后成骨细胞中 VEGF165、BMP-2 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$), 见表 5, 图 2。

2.2 不同质量浓度 VEGF165 处理对成骨细胞活性的影响

2.2.1 成骨细胞增殖 成骨细胞增殖率随着 VEGF165 质量浓度的升高而明显升高 ($P < 0.05$), 见表 6, 图 3。

时间	血管内皮生长因子 165	骨形态发生蛋白 2
建模前	1.55±0.14	1.64±0.15
建模后	1.05±0.08	1.17±0.11
t 值	7.596	6.189
P 值	< 0.001	< 0.001

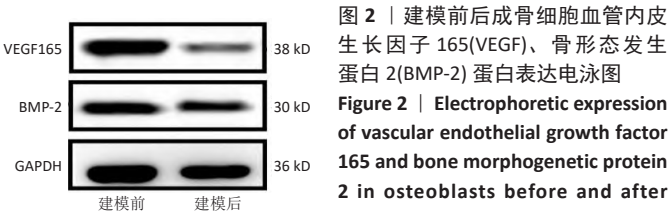


表 6 | 不同质量浓度血管内皮生长因子 165 处理成骨细胞增殖率 ($\bar{x}\pm s$, %)
Table 6 | Proliferation rate of osteoblasts treated with different concentrations of vascular endothelial growth factor 165

血管内皮生长因子 165	成骨细胞增殖率				
	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
10 ng/mL	16.55±1.01	23.79±1.34	39.88±2.41	45.42±3.65	53.54±4.72
20 ng/mL	25.66±2.02 ^a	34.74±3.33 ^a	48.97±3.40 ^a	63.22±4.64 ^a	75.06±6.73 ^a
40 ng/mL	36.77±3.34 ^{ab}	48.33±4.56 ^{ab}	60.54±5.67 ^{ab}	74.33±6.71 ^{ab}	85.34±7.84 ^{ab}
F 值	9.881	7.472	5.343	7.386	6.413
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表注：与 10 ng/mL 相比，^a $P < 0.05$ ，与 20 ng/mL 相比，^b $P < 0.05$ 。

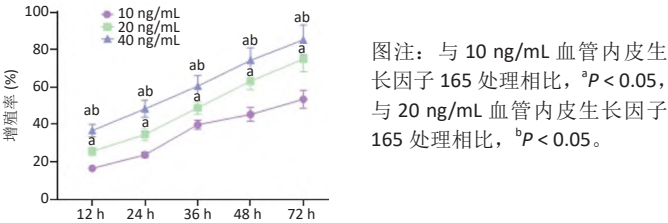


图 3 | 血管内皮生长因子 165 处理后成骨细胞增殖率
Figure 3 | Osteoblast proliferation rate after treatment with vascular endothelial growth factor 165

2.2.2 成骨细胞凋亡 成骨细胞凋亡率随着 VEGF165 质量浓度的升高而明显降低 ($P < 0.05$)，见表 7，图 4。

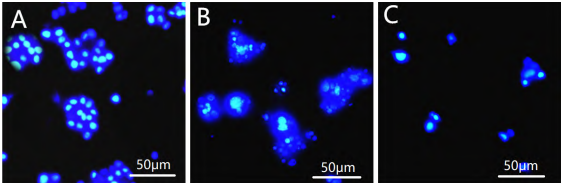
表 7 | 不同质量浓度血管内皮生长因子 165 处理成骨细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s$, %)
Table 7 | Apoptosis rate of osteoblasts treated with different concentrations of vascular endothelial growth factor 165

血管内皮生长因子 165	凋亡率
10 ng/mL	31.53±3.11
20 ng/mL	20.86±2.13 ^a
40 ng/mL	11.65±1.47 ^{ab}
F 值	6.934
P 值	< 0.001

表注：与 10 ng/mL 相比，^a $P < 0.05$ ，与 20 ng/mL 相比，^b $P < 0.05$ 。

2.3 不同质量浓度 BMP-2 处理对成骨细胞活性的影响

2.3.1 成骨细胞增殖 成骨细胞增殖率随着 BMP-2 质量浓度的升高而明显升高 ($P < 0.05$)，见表 8，图 5。



图注：A 为 10 ng/mL；B 为 20 ng/mL；C 为 40 ng/mL。成骨细胞凋亡率随着血管内皮生长因子 165 质量浓度的升高而明显降低。

图 4 | 血管内皮生长因子 165 处理后成骨细胞凋亡情况 (DAPI 染色)
Figure 4 | Apoptosis of osteoblasts treated with vascular endothelial growth factor 165 (DAPI staining)

表 8 | 不同质量浓度骨形态发生蛋白 2 处理后成骨细胞增殖率 ($\bar{x}\pm s$, %)
Table 8 | Proliferation rate of osteoblasts treated with different concentrations of bone morphogenetic protein 2

骨形态发生蛋白 2	成骨细胞增殖率				
	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
10 ng/mL	16.47±1.23	20.54±1.39	36.32±2.90	45.95±4.02	54.29±5.06
20 ng/mL	28.51±2.49 ^a	40.01±3.96 ^a	53.91±4.66 ^a	68.07±6.55 ^a	75.25±7.24 ^a
40 ng/mL	37.52±3.06 ^a	48.79±4.37 ^{ab}	68.52±6.13 ^{ab}	76.52±7.18 ^{ab}	86.27±8.36 ^{ab}
F 值	10.620	11.360	7.850	7.050	5.812
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表注：与 10 ng/mL 相比，^a $P < 0.05$ ，与 20 ng/mL 相比，^b $P < 0.05$ 。

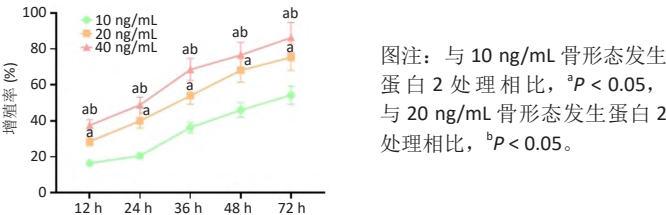


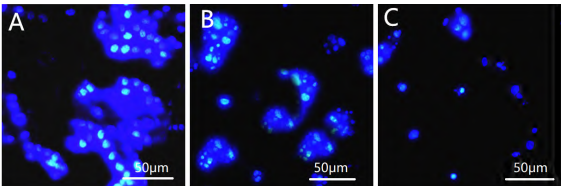
图 5 | 骨形态发生蛋白 2 处理后成骨细胞增殖率
Figure 5 | Osteoblast proliferation rate after treatment with bone morphogenetic protein 2

2.3.2 成骨细胞凋亡 成骨细胞凋亡率随着 BMP-2 质量浓度的升高而明显降低 ($P < 0.05$)，见表 9，图 6。

表 9 | 不同质量浓度骨形态发生蛋白 2 处理后成骨细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s$, %)
Table 9 | Apoptosis rate of osteoblasts treated with different concentrations of bone morphogenetic protein 2

骨形态发生蛋白 2	凋亡率
10 ng/mL	30.88±3.47
20 ng/mL	25.51±2.09 ^a
40 ng/mL	13.46±1.35 ^{ab}
F 值	3.247
P 值	0.008

表注：与 10 ng/mL 相比，^a $P < 0.05$ ，与 20 ng/mL 相比，^b $P < 0.05$ 。



图注：A 为 10 ng/mL；B 为 20 ng/mL；C 为 40 ng/mL。成骨细胞凋亡率随着骨形态发生蛋白 2 质量浓度的升高而明显降低。

图 6 | 骨形态发生蛋白 2 处理后成骨细胞凋亡情况 (DAPI 染色)
Figure 6 | Apoptosis of osteoblasts treated with bone morphogenetic protein 2 (DAPI staining)

3 讨论 Discussion

成骨细胞是一种特殊的骨细胞,也称为骨母细胞,是骨组织中最重要细胞类型之一,负责骨骼的生长、修复和再生^[20]。成骨细胞主要存在于骨骼中的骨小梁上,并且是骨骼中唯一能够直接合成骨基质的细胞^[21]。研究发现,当骨组织受到损伤时,就会触发机体的修复机制,随后成骨细胞开始发挥作用,其从骨骼中的骨小梁上分化出来,进入骨损伤处,在骨损伤的断面上,成骨细胞通过合成骨基质来建立新的骨组织,从而促进骨损伤的修复^[22]。但骨损伤后成骨细胞也会随之受到不同程度的损伤,从而导致其功能异常或死亡,因此随着时间的推移,成骨细胞的活动会逐渐减弱,进而导致骨组织生成减少或骨重构受阻^[23]。由此可见,骨损伤与成骨细胞之间存在密切的相互关系,充分理解和掌握成骨细胞的功能对于骨损伤的治疗和康复非常重要。

VEGF165和BMP是两种与骨组织修复和再生密切相关的因子,VEGF165可通过促进血管形成和提供氧气及营养物质,帮助细胞生长和分化,并加速骨组织的修复和再生;BMP则可促进干细胞定向分化为成骨细胞和软骨细胞,并刺激骨基质合成,同时还可招募和激活其他修复和再生相关的细胞,如间充质干细胞和造血干细胞,促进骨组织的修复和再生^[24-25]。近年来,VEGF165和BMP在成骨细胞损伤的修复和再生方面的研究已经得到国内外许多研究人员的关注,一项研究发现,VEGF165和BMP通过激活相关信号通路,促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,并改善骨折愈合;还有研究表明,VEGF165和BMP可以增加骨髓间充质干细胞的增殖和迁移能力,有助于骨组织修复过程中细胞的定向导向^[26-27]。由此可见,VEGF165和BMP在成骨细胞损伤的修复和再生过程中起到重要作用,进一步研究VEGF165和BMP在成骨细胞损伤修复中的作用机制,有助于揭示骨细胞损伤修复的分子机制,开发新的治疗策略,从而为相关临床治疗提供理论基础。

缺氧复氧细胞损伤模型是一种常用的细胞损伤实验模型,可用于研究各种细胞在缺氧和复氧条件下的损伤和恢复过程,以及评估不同保护策略的效果。此次实验建立缺氧复氧成骨细胞损伤模型,以评估VEGF165和BMP对成骨细胞损伤的影响^[28],结果显示,与建模前相比,建模后成骨细胞中VEGF165、BMP mRNA表达量及蛋白表达量显著降低。这与杨森^[29]的研究结果类似,说明VEGF165、BMP与成骨细胞损伤密切相关。分析原因可能是:损伤状态下,会导致诸多生物化学反应的紊乱以及调控因子的异常,从而抑制VEGF165和BMP的产生和释放;细胞还会释放炎症递质,引发炎症反应,从而可以抑制VEGF165和BMP的表达,并干扰其正常功能;此外细胞外基质会发生改变,影响VEGF165和BMP的细胞信号传导及其与细胞受体的结合,从而导致其活性下降。

此次结果还显示,成骨细胞增殖率随着VEGF165质量浓度的升高而明显升高,凋亡率随着VEGF165质量浓度的升

高而明显降低;成骨细胞增殖率随着BMP-2质量浓度的升高而明显升高,凋亡率随着BMP-2质量浓度的升高而明显降低。这与王志浩^[30]、井文森等^[31]的研究结果类似,说明VEGF165、BMP对成骨细胞损伤具有保护作用,且呈浓度依赖性。分析原因可能是:①促进血管生成:VEGF165是一种强效的血管生成因子,能够促进新血管的形成和血供增加,血管生成对于骨修复过程中的营养供应和细胞迁移至受损区域非常重要,因此外源性VEGF165的提供可以增加血管生成,改善血液循环和细胞的营养供应,进而促进损伤成骨细胞的活性;②促进成骨分化:BMP是一类关键的促进骨组织形成和成骨细胞分化的信号分子,外源性BMP的提供可以增加成骨细胞中BMP的浓度,从而促进其成骨分化,并增加骨组织的生成和修复;③促进细胞增殖:VEGF165和BMP都可以促进细胞增殖,外源性VEGF165和BMP的添加可以增加损伤成骨细胞的增殖能力,使其更快地进行细胞增殖,加速骨组织修复过程;④抗炎作用:VEGF165和BMP都具有一定的抗炎作用。损伤状态下,炎症反应常常伴随着细胞凋亡和破坏,严重影响骨组织的修复,外源性VEGF165和BMP的提供可以减轻炎症反应,抑制细胞凋亡,从而保护损伤成骨细胞的活性。

综上所述,VEGF165、BMP在缺氧复氧成骨细胞损伤中低表达,VEGF165、BMP处理呈浓度依赖性的降低了缺氧复氧成骨细胞损伤,提示VEGF、BMP对缺氧复氧成骨细胞损伤有明显保护作用,这些结果为缺氧复氧成骨细胞损伤的治疗提供了新的思路和方法。但此研究仍存在一定局限性,如未添加阴性对照实验、未增加建模前细胞与VEGF165和BMP的浓度梯度关系,未探讨VEGF165和BMP的协同关系等。未来的研究应该继续探索VEGF165和BMP在骨细胞损伤修复中的作用机制,以及它们在临床应用中的潜力。

作者贡献: 文章设计为第一作者和通讯作者,全体作者参与实验研究。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] LI J, CHEN X, REN L, et al. Type H vessel/platelet-derived growth factor receptor β + perivascular cell disintegration is involved in vascular injury and bone loss in radiation-induced bone damage. *Cell Prolif*. 2023;56(7):e13406.

- [2] KHORSHIDPARAST S, AKHLAGHI P, ROUHI G, et al. Measurement of bone damage caused by quasi-static compressive loading-unloading to explore dental implants stability: Simultaneous use of in-vitro tests, μ -CT images, and digital volume correlation. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2023;138:105566.
- [3] XU TT, CHEN P, ZHANG CD, et al. Gut microbiome dysregulation drives bone damage in broiler tibial dyschondroplasia by disrupting glucose homeostasis. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2023;9(1):1.
- [4] XU W, YANG Y, LI N, et al. Interaction between Mesenchymal Stem Cells and Immune Cells during Bone Injury Repair. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(19):14484.
- [5] PONZANO M, WIEST MJ, COLEMAN A, et al. The use of alkaline phosphatase as a bone turnover marker after spinal cord injury: A scoping review of human and animal studies. *J Spinal Cord Med*. 2023; 46(2):167-180.
- [6] LI Y, NIE J, WU Q, et al. Circ-Sirt1 promotes osteoblast differentiation by activating Sirt1 and Wnt/ β -catenin pathway. *Acta Biochim Pol*. 2023; 70(1):51-57.
- [7] ZHU YS, MO TT, JIANG C, et al. Osteonectin bidirectionally regulates osteoblast mineralization. *J Orthop Surg Res*. 2023;18(1):761.
- [8] ZHENG C, LIU H, ZHAO P, et al. Targeting sulfation-dependent mechanoreciprocity between matrix and osteoblasts to mitigate bone loss. *Sci Transl Med*. 2023;15(710):eadg3983.
- [9] LU W, ZHENG C, ZHANG H, et al. Hedgehog signaling regulates bone homeostasis through orchestrating osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *Cell Mol Life Sci*. 2023;80(6):171.
- [10] WILLCOCKSON H, OZKAN H, VALDÉS-FERNÁNDEZ J, et al. CC-Chemokine Receptor-2 Expression in Osteoblasts Contributes to Cartilage and Bone Damage during Post-Traumatic Osteoarthritis. *Biomolecules*. 2023;13(6):891.
- [11] LIN Z, XIONG Y, SUN Y, et al. Circulating MiRNA-21-enriched extracellular vesicles promote bone remodeling in traumatic brain injury patients. *Exp Mol Med*. 2023;55(3):587-596.
- [12] 王洪君, 蔡波, 赵星宇, 等. VEGF165 基因修饰脂肪干细胞对糖尿病大鼠骨缺损的修复研究 [J]. *中国骨伤*, 2017,30(6):545-551.
- [13] 赵怡心. 骨细胞 BMP 信号调控成骨分化作用与机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.
- [14] ANRAKU T. Anoxia/reoxygenation enhances spontaneous contractile activity via TRPA1 channel and COX2 activation in isolated rat whole bladder. *NeuroUrol Urodyn*. 2022;41(8):1692-1702.
- [15] 马焰, 高伟, 孙月芬, 等. 碱性成纤维生长因子对大鼠骨骼肌细胞缺氧复氧损伤的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2002,27(10):895-896.
- [16] 方宇, 董重阳, 高斌礼, 等. 微小 RNA-214 靶向调控 PTEN 对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化、矿化的影响及机制研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2023,52(12):1619-1623+1630.
- [17] 赵敏, 孙红刚, 蹇洁, 等. 过表达 miR-664a-5p 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进骨质疏松大鼠骨重建 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(9):1298-1304.
- [18] 林维, 李超艺, 唐捷, 等. 高糖环境下成骨细胞 PAD4 表达和转录调控对成骨功能的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2023,40(9):1487-1493.
- [19] 谢圣男, 康权, 张遥, 等. 果糖 -1,6- 二磷酸酶 1(FBP1) 过表达对骨肉瘤细胞恶性逆转并向成骨分化的影响 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2019,41(12):2273-2281.
- [20] LI W, JIANG WS, SU YR, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy inhibits osteoblast apoptosis induced by advanced oxidation protein products. *Cell Death Dis*. 2023;14(2):88.
- [21] YANG Z, ZHANG XW, ZHUO FF, et al. Allosteric Activation of Transglutaminase 2 via Inducing an "Open" Conformation for Osteoblast Differentiation. *Adv Sci (Weinh)*. 2023;10(18):e2206533.
- [22] DEDE S, TAŞPINAR M, YÜKSEK V, et al. The Effects of Vitamin D Application on NaF-Induced Cytotoxicity in Osteoblast Cells (hFOB 1.19). *Biol Trace Elem Res*. 2023;201(2):698-705.
- [23] LI Q, ZHANG W, DENG J, et al. Ameliorative Effects of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells on Apoptosis and Differentiation of Osteoblasts Treated with CoCl₂. *Cell Reprogram*. 2023;25(3):99-108.
- [24] 温洋, 陈丽媛, 沈师, 等. VEGF165、BMP2 双基因转染 SD 大鼠 BMSCs 的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2020,49(20):3331-3336.
- [25] 张玲莉, 周绪昌, 吴伟. BMP-Smad 信号通路在骨髓间充质干细胞分化中的作用 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2019,12(6): 618-626.
- [26] 周桢杰, 李强, 李诗鹏, 等. 慢病毒介导骨形态发生蛋白 2 和血管内皮生长因子 165 双基因转染促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2018,22(25):3950-3955.
- [27] 肖飞, 焦亮, 黄玉成, 等. 人重组真核表达质粒 pIRES- 骨形态发生蛋白 - 血管内皮生长因子 165 的体外转染对兔骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018,35(7):1292-1296.
- [28] LI B, ZHOU P, YIN J, et al. Mechanism of microRNA-1 regulating H9c2 cardiomyocyte apoptosis after hypoxia/reoxygenation. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2021;33(10):1232-1236.
- [29] 杨森. 外源性 NGF 对兔下颌骨骨折合并局部神经损伤的愈合中 BMP-9 及 VEGF 表达的影响 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
- [30] 王志浩. 联合应用负载 BMP-2、VEGF 和 TGF- β 的壳聚糖纳米水凝胶缓释系统诱导成骨效果及机制的研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- [31] 井文森, 许珂, 高青, 等. 3D 打印对多孔 BMP-2 复合涂层钛合金试件 BMP-2 装载、释放及成骨细胞增殖、分化的影响 [J]. *山东医药*, 2023,63(4):33-37.

(责任编辑: LWJ, WZH, ZN, WL)