

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.49.004 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
陈剑, 袁文, 宋滇文, 胡凯猛, 范立星, 刘厚奇. 骨形态发生蛋白2和7共转染骨髓间充质干细胞的成骨分化[J].
中国组织工程研究, 2012, 16(49):9139-9145.

骨形态发生蛋白2和7共转染骨髓间充质干细胞的成骨分化*

陈剑^{1,2}, 袁文³, 宋滇文³, 胡凯猛⁴, 范立星⁴, 刘厚奇⁴

文章亮点: 与传统成骨诱导液诱导的方法以及单独骨形态发生蛋白2或骨形态发生蛋白7基因转染相比, 联合转染了骨形态发生蛋白2和骨形态发生蛋白7基因后, 骨髓间充质干细胞的向成骨细胞分化的能力在 mRNA 水平和蛋白质水平都得到了明显的加强。为进一步构建转基因骨髓间充质干细胞组织工程骨打下了良好的基础。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 干细胞; 腺病毒; 骨形态发生蛋白2; 骨形态发生蛋白7; 型胶原; 共转染; 成骨诱导; 成骨活性; 成骨蛋白; 组织工程

缩略语: 骨形态发生蛋白: bone morphogenetic protein, BMP

摘要

背景: 骨形态发生蛋白最主要的作用是诱导骨形成, 但因提取困难、代谢速度快、难以准确控制其使用浓度、价格昂贵等限制了其在体外和体内相关研究中的应用。

目的: 构建含特异细胞生长因子基因骨形态发生蛋白2, 7的腺病毒载体, 观察骨形态发生蛋白2和骨形态发生蛋白7基因共转染对骨髓间充质干细胞成骨分化的促进作用。

方法: 将全骨髓贴壁法分离得到骨髓间充质干细胞传至第3代, 分为5组, 空白组和常规诱导组分别以常规培养基和成骨诱导分化培养基培养; 骨形态发生蛋白2, 7腺病毒转染组: 分别单独以骨形态发生蛋白2、骨形态发生蛋白7腺病毒进行转染; 联合转染组: 以2种骨形态发生蛋白腺病毒联合转染。

结果与结论: 转染第7天, 联合转染组成骨相关基因 Runx-2、Osx、型胶原和碱性磷酸酶 mRNA 表达均较其他各组增高($P < 0.05$); 骨形态发生蛋白2, 7腺病毒转染组上述指标较空白组和常规诱导组增高($P < 0.05$)。转染第14天, 联合转染组4个指标均较其他各组明显增高($P < 0.05$); 同时, 4个指标表达均高于第7天($P < 0.05$)。病毒转染后第7天, 联合转染组型胶原和骨钙素蛋白表达均较其他组明显增高($P < 0.05$)。提示对骨髓间充质干细胞进行骨形态发生蛋白2腺病毒和骨形态发生蛋白7腺病毒共转染后, 较单基因转染和成骨诱导液诱导更能促进成骨相关基因和蛋白的表达。

Bone morphogenetic protein 2 co-transfected with bone morphogenetic protein 7 for osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

Chen Jian^{1,2}, Yuan Wen³, Song Dian-wen³, Hu Kai-meng⁴, Fan Li-xing⁴, Liu Hou-qi⁴

Abstract

BACKGROUND: The most important role of bone morphogenetic protein is the induction of bone formation some factors, including difficulty in sample extract, rapid metabolic rate, difficulty in accurate concentration control and high cost, limit the application for *in vitro* and *in vivo* studies.

OBJECTIVE: To establish the adenoviral vectors containing bone morphogenetic protein 2 and bone morphogenetic protein 7 in order to observe the promotion effect of co-transfection of bone morphogenetic protein 2 and bone morphogenetic protein 7

METHODS: The rabbit bone marrow mesenchymal stem cells separated by the whole bone marrow adherence method were passaged to the third generation, and divided into five groups: the control group and the conventional induction group were cultured with conventional culture medium and osteo-induction culture medium; bone morphogenetic protein 2 group and bone morphogenetic protein 7 group were transfected with bone morphogenetic protein 2 adenovirus and bone morphogenetic protein 7 adenovirus; the combination group was co-transfected with bone morphogenetic protein 2 adenovirus and bone morphogenetic protein 7 adenovirus.

RESULTS AND CONCLUSION: At 7 days after transfection, the expression levels of Runx-2, Osx, alkaline phosphatase and Collagen mRNA in the combination group were higher than those in the other four groups ($P < 0.05$); the indicators above in the bone morphogenetic protein 2 group and bone morphogenetic protein 7 group were higher than those in control group and the conventional induction group ($P < 0.05$). At 14 days after transfection, the expression of Runx-2, Osx,

浙江大学医学院附属邵逸夫医院,¹骨科,²临床研究所,浙江省杭州市310016;³解放军第二军医大学附属长征医院骨科,上海市200003;⁴解放军第二军医大学组织胚胎学教研室,上海市200433

陈剑,男,1979年生,浙江省杭州市人,汉族,2011年解放军第二军医大学毕业,博士,主治医师,主要从事脊柱外科和组织工程研究。chenjianhz@hotmail.com

并列第一作者:袁文,男,1962年生,汉族,解放军第二军医大学毕业,教授,主要从事脊柱外科研究。yuanwenspine@163.com

通讯作者:宋滇文,副教授,解放军第二军医大学附属长征医院骨科,上海市200003。songdw@sh163.net

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2012)49-09139-07

收稿日期:2012-04-13
修回日期:2012-06-22
(20111223002/N·C)

¹Department of Orthopedics, ²Institute of Clinical Research, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang Province, China; ³Department of Orthopedics, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; ⁴Department of Histology and Embryology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Chen Jian, Doctor, Attending physician, Department of Orthopedics, Institute of Clinical Research, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang Province, China chenjianzh@hotmail.com

Yuan Wen, Professor, Department of Orthopedics, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China yuanwenspine@163.com

Chen Jian and Yuan Wen contributed equally to this paper.

Corresponding author: Song Dian-wen, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China songdw@sh163.net

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30970735*

Received: 2012-04-13 Accepted: 2012-06-22

alkaline phosphatase and collagen mRNA in the combination group were higher than those in the other four groups ($P < 0.05$); and the indicators at 14 days after transfection were higher than those at 7 days after transfection ($P < 0.05$). At 7 days after transfection, the expression levels of collagen and osteocalcin protein in the combination group were higher than those in the other four groups ($P < 0.05$). After co-transfected by both bone morphogenetic protein 2 and bone morphogenetic protein 7 adenoviral vectors, bone marrow mesenchymal stem cells could express high levels of osteogenesis related gene in both mRNA level and protein level than induced by conventional culture medium or osteo-induction culture medium.

Chen J, Yuan W, Song DW, Hu KM, Fan LX, Liu HQ. Bone morphogenetic protein 2 co-transfected with bone morphogenetic protein 7 for osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(49):9139-9145.

0 引言

骨髓间充质干细胞是目前骨组织工程中应用最广泛的种子细胞,具有取材方便、对机体损伤少、与生物支架材料的黏附性能好、在体外培养具有较强的增殖传代能力等优点^[1],目前正在被十分广泛的研究与应用。

在骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein ,BMP)家族中 ,BMP-2骨诱导活性最强^[2],能够诱导未分化的间充质细胞分化为骨,但BMP-2只是骨生成的启动因子,对已分化的成骨细胞无进一步的促增殖作用。BMP-7则具有较强的骨诱导能力及维持软骨细胞的表型、促进细胞增殖和细胞外基质如蛋白多糖和型胶原合成的能力^[3-4]。Bustos-Valenzuela等^[5]的研究提示应用rhBMP-2和rhBMP-7后几乎所有的成骨相关基因表达全部明显上调。因此BMP-2和BMP-7的联合使用会更有利于骨髓间充质干细胞向成骨细胞转化以及细胞的增殖。不过代谢速度快、价格昂贵等限制了BMP-2和BMP-7蛋白在促干细胞分化或骨愈合中的作用。将BMP-2和BMP-7基因转染入骨髓间充质干细胞后,不仅可以利用生长因子对干细胞的促定向分化作用,其在置入体内后骨髓间充质干细胞还可以作为BMP-2和BMP-7基因的载体在局部长时、高效的表达及旁分泌BMP-2和BMP-7生长因子,从而有效促进组织结构的重塑过程^[6-7]。

复制缺陷的重组腺病毒是目前组织工程中广泛应用的一种基因载体,其具有许多优点,如转染细胞种类广并同时能高效感染分裂期细胞和非分裂期细胞;转染效率可达90%-100%;在宿主体内不能自我复制,安全性好,无致癌性;病毒基因组游离于宿主基因组外,无插入突变风险。转染基因一般可在体内持续表达6周

以上^[8-9]。实验通过BMP-2基因以及BMP-7基因的共修饰,观察两种基因促骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的效果,为进一步构建组织工程骨奠定基础。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计,对比观察。

时间及地点: 实验于2010年4月至2011年6月在解放军第二军医大学基础医学部组织胚胎教研室完成。

材料:

实验动物: 新西兰大白兔5只,兔龄3个月,雌雄不拘,由上海市松江区松联实验动物场提供,许可证号:SCXK(沪)2007-0011。

骨形态发生蛋白2和7共转染骨髓间充质干细胞成骨分化实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
体积分数为10%胎牛血清、DEME-LG培养基、胰酶	Gibco
BMP-2腺病毒载体	Invitrogen
BMP-7腺病毒载体	解放军第二军医大学长海医院心胸外科龚德军博士惠赠
Trizol、Oligo(dT)	Invitrogen
M-MLV Reverse Transcriptase、Recombinant Rnasin、Taq DNA聚合酶和SYBR Green dNTPmix	Promega
化学发光试剂盒ECLTM	Transhold
Western Blotting Detection Western Blot一级抗体(鼠抗兔)	GE Healthcare
β -Actin(ab6276), Collagen(ab90395), Osteocalcin(ab13418)	Abcam
抗小鼠IgG Horseradish Peroxidase (HRP)标记的二级抗体	R&D
Realtime PCR仪	Biorad
自动温控细胞培养箱	Heraeus (5060/BB16)

成骨诱导培养基的配制: 含地塞米松 10^{-9} mol/L, β -甘油磷酸钠10 mmol/L, 抗坏血酸钠0.2 mmol/L, 体积分数为5%胎牛血清, DMEM-LG培养基, 1%双抗溶液。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离、培养: 由全骨髓贴壁法原代培养获得。将3月龄新西兰大白兔静脉麻醉后, 常规消毒备皮, 自左侧股骨大转子处作骨髓穿刺术。严格无菌操作, 以预装2 mL肝素抗凝的注射器抽取骨髓约3 mL。将骨髓置于10 mL离心管, 加入3 mL左右PBS, 1 000 r/min离心10 min; 弃上清和脂肪, 加PBS以同样方法在洗涤2次。将洗涤后的骨髓置入含有DMEM-LG, 体积分数10%FBS, 1%双抗(青霉素/链霉素)的培养基5 mL的100 mm培养皿中, 体积分数5%CO₂, 37 °C环境中培养。48 h后换液, 以PBS冲洗3遍, 非贴壁细胞被去除, 换上新鲜培养基, 体积分数5%CO₂, 37 °C环境中继续培养。两三日换液1次, 待到细胞集落呈70%-80%汇合时, 进行传代。

骨髓间充质干细胞的鉴定: 向成骨细胞方向诱导: 取第6代细胞进行细胞爬片, 细胞传代后加入成骨诱导培养基(地塞米松 10^{-9} mol/L, β -甘油磷酸钠10 mmol/L, 抗坏血酸钠0.2 mmol/L, 体积分数5%胎牛血清, DMEM-LG培养基, 1%双抗溶液)。每3 d换液, 培养第7天, 以40 g/L多聚甲醛固定后碱性磷酸酶染色, 其余细胞继续培养共21 d。终止培养后40 g/L多聚甲醛固定, 茜素红S染色。向成脂肪细胞方向诱导: 取第6代细胞进行细胞爬片, 细胞传代后加入成脂肪诱导培养基(地塞米松 10^{-7} mol/L, IBMX 0.5 mmol/L, 吲哚美辛0.05 mmol/L, 体积分数2%胎牛血清, DMEM-HG培养基, 1%双抗溶液)。每3 d换液, 共培养21 d。终止培养后40 g/L多聚甲醛固定, 油红O染色。向成软骨细胞方向诱导: 取第6代细胞, 消化后于离心机800 r/min离心3 min, 将离心所得细胞团悬浮培养, 加入成软骨诱导液(地塞米松 10^{-7} mol/L, 抗坏血酸钠0.2 mmol/L, 转化生长因子 β 1 10 μ g/L, ITS+LA 胰岛素6.25 mg/L, 转铁蛋白6.25 mg/L, 亚硒酸6.25 mg/L+亚油酸5.35 g/L, 丙酮酸钠: 1 mmol/L, 体积分数2%胎牛血清, DMEM-HG培养基, 1%双抗溶液)。每3 d换液, 共培养21 d。终止培养后40 g/L多聚甲醛固定, 甲苯胺蓝染色。

骨髓间充质干细胞进行BMP-2、BMP-7腺病毒联合转染: 取第3代兔骨髓间充质干细胞, 将细胞(总数 5×10^4 左右)分别接种于2块6孔板上, 当细胞80%贴壁时进行转染。将准备转染的骨髓间充质干细胞分为5组, 每组2孔。根据上一部分的结果设定各组病毒的转染复数值(MOI),

分别为: 空白组: 骨髓间充质干细胞继续以含体积分数10%胎牛血清的DEME-LG培养基培养。常规诱导组: 细胞改用成骨诱导培养基培养。BMP-2腺病毒转染组: 以MOI值200进行BMP-2腺病毒转染, 24 h后换液, 以成骨诱导培养基培养。BMP-7腺病毒转染组: 以MOI值50进行BMP-7腺病毒转染, 24 h后换液, 以成骨诱导培养基培养。联合转染组: 细胞以MOI值200和50同时进行BMP-2腺病毒和BMP-7腺病毒转染, 24 h后换液, 以成骨诱导培养基培养。于处理后的7, 14 d时, 对上述5组细胞行Realtime PCR法检测Runx-2、Osx、I型胶原和碱性磷酸酶基因的mRNA表达水平。于处理后的第7天, 对上述5组细胞行Western Blot法检测I型胶原和骨钙素基因的蛋白质表达水平。

上、下游引物由Invitrogen合成, 见表1。

表1 Real-time PCR 引物信息
Table 1 Real-time PCR primers

Gene	Marker of gene	Primer sequence	Tm (°C)	Length (bp)
Rabbit Runx-2	tnt277f	5' CGA GGC AAA CAC AGG CTA AG 3'	88.3	119
	tnt277r	5' AGT TGG GTG GGG TTA GTG GAC 3'		
Rabbit OSX	tnt279f	5' GCA CGA AGA AGC CAT ACT C 3'	85.9	101
	tnt279r	5' TGA CAG AAG CCC ATT GGT 3'		
Rabbit Col	tnt278f	5' AGA CAT CCC GCC AGT CAC 3'	87	125
	tnt278r	5' AGA TCA CGT CAT CGC ACA AG 3'		
Rabbit AKP	tnt265f	5' TGG ACC TCG TGG ACA TCT G 3'	87.1	128
	tnt265r	5' CGG CTC AAA GAG ACC CAA G 3'		

实时定量PCR法检测骨髓间充质干细胞转染BMP-2、BMP-7腺病毒后成骨相关基因的mRNA表达: 在细胞转染培养后第7, 14天检测成骨相关基因的mRNA表达。加入Trizol从组织中提取RNA。提取出的mRNA进行反转录, 成为cDNA模板: 在mRNA中加入Oligo(dT), 轻轻混匀、离心; 70 °C加热5 min, 将离心管插入冰浴中1 min; 然后加入Reverse Transcription反应液, 混匀后, 42 °C反应60 min。以cDNA为模板, 进行Real Time PCR实验: 溶解引物: 先12 000 r/min离心5 min, 用ddH₂O溶解成100 μ mol/L, 然后配成2 μ mol/L的工作浓度($\times 10$)。按表2程序进行Realtime PCR, 最后基因表达水平以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示, ΔCt 为目的基因与内参基因(β -actin)Ct值之差。

表2 Real-time PCR 扩增程序
Table 2 Real-time PCR amplification program

Conditions	Reaction cycle number
95 15 min	1 cycle
95 15 s	
60 10 s	40 cycles
72 20 s	

Western Blot法检测兔骨髓间充质干细胞转染BMP-2和BMP-7腺病毒后成骨相关基因的蛋白质表达:在细胞转染培养后第7天检测。提取蛋白,BCA蛋白质定量,绘制标准曲线,使用标准曲线定量待测样品蛋白浓度。
SDS-PAGE电泳:制备分离胶(pH 8.8,凝胶浓度10%);制备积层胶(pH 6.8,凝胶浓度4%);加入电泳缓冲液,上样,使用BioRad电泳装置,样品首先在20 mA恒定电流下电泳至染料接近分离胶顶端。然后60 mA恒定电流电泳至溴酚蓝刚出胶底部。凝胶电泳于4 h。蛋白质转移:准备好Bio-Rad蛋白转移装置夹板,30 mA恒流条件下,4 h转移过夜。抗体结合:5%BSA封闭过的膜加入一抗4 h过夜,抗原抗体结合。加入HRP标记的二抗以结合一抗,室温孵育膜1 h。将膜置于发光反应液中室温孵育5 min。去除过量的溶液,将膜夹在两塑料薄膜之间,以X射线胶片曝光。图片扫描保存为电脑文件,并用分析软件Image J 1.43将图片上每个特异条带灰度值的数字化,然后按以下公式计算荧光强度值。

$$\text{荧光强度值} = \frac{\text{检测条带灰度值}}{\text{内参条带}(\beta\text{-actin})\text{灰度值}}$$

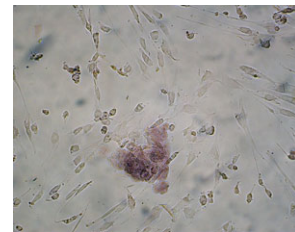
主要观察指标:培养不同时间各组细胞Runx-2、Osx、碱性磷酸酶和I型胶原基因的mRNA及各组细胞骨钙素和I型胶原基因的蛋白质表达水平。

统计学分析:由第一作者采用SPSS 12.0软件完成统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

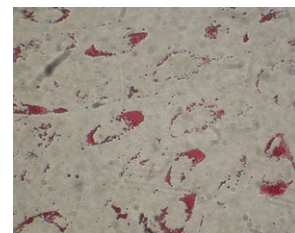
2 结果

2.1 兔骨髓间充质干细胞的定向分化鉴定 在成骨诱导培养液的诱导分化条件下,7 d就可检测到向成骨细胞分化的早期特征——碱性磷酸酶的表达;而细胞形态在10 d左右发生改变,细胞体积变大,形态呈类圆形或多边形。诱导21 d时茜素红S染色显示细胞外基质中有钙结节形成,见图1a。在成脂肪细胞培养液的诱导分化条件下,细胞形态在诱导3 d左右出现形态改变,10 d时可在相差显微镜下观察到细胞质中发亮的脂滴,随着

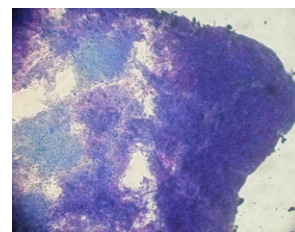
诱导时间的延长,脂滴变大、增多,脂肪样细胞也逐渐增多。诱导21 d时油红O染色结果多数细胞的细胞质中的脂滴都被染成红色,见图1b。在成软骨细胞培养液的诱导分化条件下,细胞团在三维的培养体系中体积无明显变化,随着诱导时间增加,细胞团逐渐表现更加致密。而未加诱导的细胞团则在培养第2天就缩小,并在第1次换液时被吹散成松散的细胞团,第2次换液时则被完全吹散成细胞悬液。诱导21 d时收获细胞团,40 g/L多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,甲苯胺蓝染色结果显示细胞内以及细胞外基质中有氨基多糖成分,见图1c。



a: Osteogenic differentiation: alizarin red S staining showed that the calcium nodule formation could be seen in the extracellular matrix ($\times 100$)



b: Adipogenic differentiation: oil red O staining showed that the lipid droplets in the cytoplasm of most cells were stained red ($\times 400$)

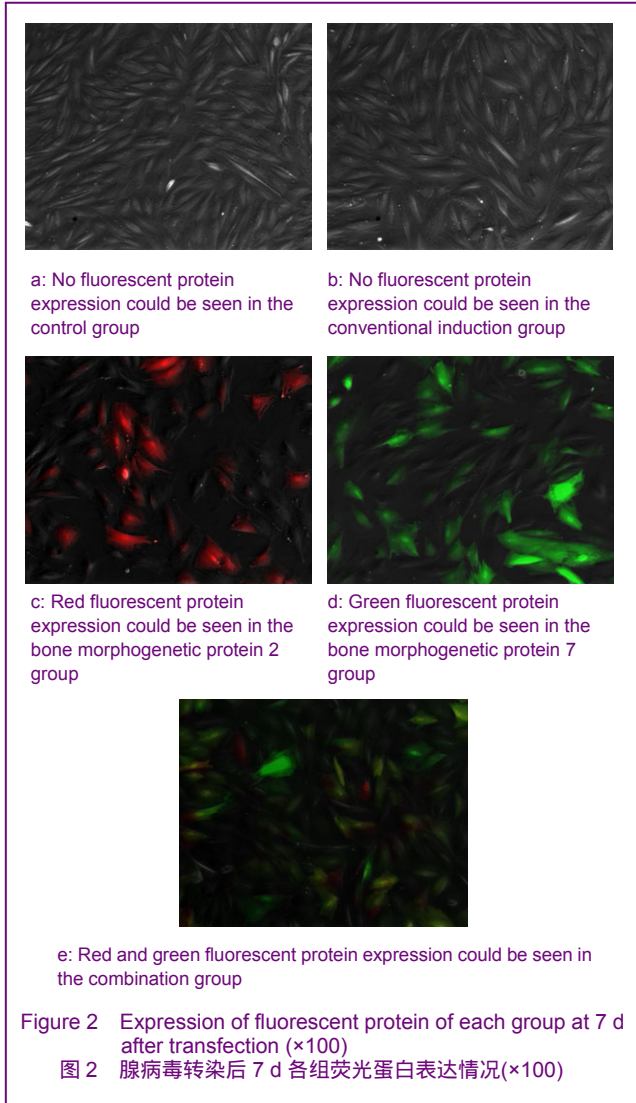


c: Chondrogenic differentiation: toluidine blue staining showed that the glycosaminoglycan component could be seen in the intracellular and extracellular matrix ($\times 40$)

Figure 1 Directed osteogenic differentiation and identification results of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

图1 兔骨髓间充质干细胞的定向成骨分化鉴定结果

2.2 兔骨髓间充质干细胞转染BMP-2和BMP-7腺病毒后形态学改变 转染后第7天,荧光显微镜下发现空白组和常规诱导组细胞内无荧光蛋白表达;BMP-2腺病毒转染组出现红色荧光蛋白表达;BMP-7腺病毒转染组出现绿色荧光蛋白表达;而联合转染组则同时出现红色和绿色荧光蛋白的表达,见图2。



2.3 兔骨髓间充质干细胞转染BMP-2和BMP-7腺病毒后成骨相关基因mRNA的表达 见表3。

表 3 兔骨髓间充质干细胞转染骨形态发生蛋白 2 腺病毒和骨形态发生蛋白 7 腺病毒 7 d 各目的基因表达变化

Table 3 Target gene expression after rabbit bone marrow mesenchymal stem cells transfected with bone morphogenetic protein 2 and bone morphogenetic protein 7 adenovirus for 7 d ($\bar{x} \pm s$)

Group	Runx-2	Osx
Control	$1.195 \times 10^{-7} \pm 0.567 \times 10^{-7}$	$6.052 \times 10^{-6} \pm 3.457 \times 10^{-6}$
Conventional induction	$2.501 \times 10^{-4} \pm 0.981 \times 10^{-5}$	$2.087 \times 10^{-6} \pm 1.532 \times 10^{-6}$
BMP-2	$5.847 \times 10^{-4} \pm 1.562 \times 10^{-4}$	$1.083 \times 10^{-5} \pm 0.496 \times 10^{-6}$
BMP-7	$5.551 \times 10^{-4} \pm 7.345 \times 10^{-5}$	$1.315 \times 10^{-5} \pm 6.451 \times 10^{-6}$
Combination	$2.167 \times 10^{-3} \pm 1.104 \times 10^{-3}$	$1.447 \times 10^{-4} \pm 4.034 \times 10^{-5}$

Group	Alkaline phosphatase	Collagen
Control	$6.433 \times 10^{-7} \pm 1.232 \times 10^{-7}$	$5.913 \times 10^{-3} \pm 9.876 \times 10^{-4}$
Conventional induction	$5.395 \times 10^{-6} \pm 1.234 \times 10^{-6}$	$4.688 \times 10^{-2} \pm 5.348 \times 10^{-3}$
BMP-2	$3.170 \times 10^{-6} \pm 7.451 \times 10^{-6}$	$1.481 \times 10^{-1} \pm 2.482 \times 10^{-2}$
BMP-7	$1.385 \times 10^{-5} \pm 3.813 \times 10^{-6}$	$1.888 \times 10^{-1} \pm 1.659 \times 10^{-2}$
Combination	$2.430 \times 10^{-3} \pm 7.452 \times 10^{-4}$	$2.633 \times 10^{-1} \pm 5.623 \times 10^{-2}$

BMP: bone morphogenetic protein

转染第7天,联合转染组Runx-2、Osx、型胶原和碱性磷酸酶mRNA表达,均较其他各组明显增高($P < 0.05$);2个腺病毒转染组上述成骨相关基因mRNA表达均较空白组和常规诱导组增高($P < 0.05$);而BMP-2腺病毒转染组Runx-2和碱性磷酸酶mRNA表达水平高于BMP-7腺病毒转染组($P < 0.05$);Osx和型胶原mRNA表达水平低于BMP-7腺病毒转染组($P < 0.05$)。

转染第14天,结果与第7天相似,联合转染组Runx-2、Osx、型胶原和碱性磷酸酶mRNA表达均较其他各组明显增高($P < 0.05$);同时,4个检测指标基因mRNA表达第14天均高于第7天($P < 0.05$),见表4。

表 4 兔骨髓间充质干细胞转染骨形态发生蛋白 2 腺病毒和骨形态发生蛋白 7 腺病毒 14 d 各目的基因表达变化

Table 4 Target gene expression after rabbit bone marrow mesenchymal stem cells transfected with bone morphogenetic protein 2 and bone morphogenetic protein 7 adenovirus for 14 d ($\bar{x} \pm s$)

Group	Runx-2	Osx
Control	$2.266 \times 10^{-6} \pm 4.502 \times 10^{-7}$	$1.849 \times 10^{-6} \pm 3.098 \times 10^{-7}$
Conventional induction	$1.191 \times 10^{-3} \pm 6.487 \times 10^{-4}$	$1.661 \times 10^{-4} \pm 3.961 \times 10^{-5}$
BMP-2	$7.593 \times 10^{-2} \pm 2.491 \times 10^{-2}$	$2.452 \times 10^{-2} \pm 2.673 \times 10^{-3}$
BMP-7	$3.973 \times 10^{-2} \pm 5.672 \times 10^{-3}$	$1.004 \times 10^{-2} \pm 5.782 \times 10^{-4}$
Combination	$1.079 \times 10^{-1} \pm 4.281 \times 10^{-2}$	$3.730 \times 10^{-2} \pm 6.891 \times 10^{-3}$

Group	Alkaline phosphatase	Collagen
Control	$1.404 \times 10^{-6} \pm 5.281 \times 10^{-7}$	$2.876 \times 10^{-2} \pm 4.572 \times 10^{-3}$
Conventional induction	$3.223 \times 10^{-5} \pm 1.098 \times 10^{-5}$	$1.040 \times 10^{-1} \pm 3.672 \times 10^{-2}$
BMP-2	$1.772 \times 10^{-4} \pm 3.894 \times 10^{-5}$	$2.862 \times 10^{-1} \pm 4.702 \times 10^{-2}$
BMP-7	$6.565 \times 10^{-5} \pm 2.671 \times 10^{-6}$	$2.575 \times 10^{-1} \pm 3.452 \times 10^{-3}$
Combination	$4.485 \times 10^{-3} \pm 1.086 \times 10^{-3}$	$2.050 \times 10^0 \pm 8.231 \times 10^{-2}$

BMP: bone morphogenetic protein

2.4 兔骨髓间充质干细胞转染BMP-2和BMP-7腺病毒后成骨相关蛋白的表达 联合转染组型胶原和骨钙素蛋白质表达均较其他各组明显增高($P < 0.05$);而2个腺病毒转染组型胶原和骨钙素蛋白质表达均较空白组和常规诱导组增高($P < 0.05$),见图3,表5。

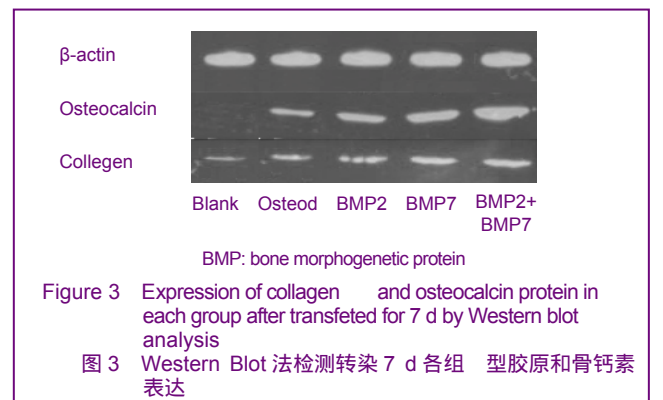


表5 兔骨髓间充质干细胞转染骨形态发生蛋白2和骨形态发生蛋白7腺病毒7 d 型胶原和骨钙素蛋白 Western blot 荧光强度半定量值

Table 5 Western blot fluorescence intensity semi-quantitative values of collagen and osteocalcin protein after rabbit bone marrow mesenchymal stem cells transfected with bone morphogenetic protein 2 and bone morphogenetic protein 7 adenovirus for 7 d ($\bar{x}\pm s$)

Group	Osteocalcin protein	Collagen
Control	0	0.123±0.032
Conventional induction	0.370±0.101	0.269±0.041
BMP-2	0.544±0.102	0.395±0.045
BMP-7	0.742±0.125	0.421±0.105
Combination	0.914±0.213	0.484±0.128

BMP: bone morphogenetic protein

3 讨论

细胞生长因子提取困难、代谢速度快、难以准确控制其使用浓度、价格昂贵等限制了其在体外和体内相关研究中的应用。实验通过构建含特异细胞生长因子基因BMP-2和BMP-7的腺病毒载体,再将BMP-2和BMP-7基因转染入骨髓间充质干细胞,使其稳定、高效、长时表达BMP-2和BMP-7蛋白,以观察BMP-2和BMP-7蛋白联合促骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的作用。

BMP是转化生长因子β超家族的成员,具有转化生长因子β家族的多种生物学作用,参与调节细胞生长、繁殖、分化和凋亡,不过其最主要的作用是诱导骨形成。研究发现,BMP参与胚胎发育过程中软骨与骨的形成,在胚胎发育各个时期,甚至出生后均发挥调节作用^[6]。BMP成骨作用的研究,主要集中在BMP-2,4,5,6,7,9等^[10-11]。其中BMP-2、7在骨骼和关节发育过程中发挥重要作用^[10]。BMP-2、7主要通过诱导间充质干细胞内转录因子Runx-2和Osterix的表达,诱导间充质干细胞向成骨细胞分化。BMPs诱导未分化的间充质细胞不可逆地分化为软骨细胞和成骨细胞,通过钙盐沉积,导致新骨形成,启动骨生成,具有高效的异位诱导成骨作用。但对已分化、成熟的成骨细胞和软骨细胞无生物学效应。

BMP-2诱导骨形成与周围环境有密切关系,不同组织部位的间充质细胞分化成骨的能力有很大差别。最理想的部位是肌肉、筋膜和骨膜等处,而在内脏的诱骨能力较弱。有研究发现BMP-2作用下的成骨能力如下:骨和骨膜>骨骼肌>皮下组织>真皮>脑>眼前房>睾丸>卵巢^[12]。另外,不同种属的BMPs有高度的同源性。但是在不同种属,对BMPs反应能力均不同。虽然高等动物对低等动物来源的BMPs反应不太敏感,但低等动物的

BMPs仍能在高等动物体内诱导成骨^[13]。

重组人BMP-7在大范围的骨缺损模型中能够诱导骨生长,完成骨修复能力。Cook等^[14]在灵长类动物尺骨缺损模型中发现重组人BMP-7能治愈自体骨不能愈合的缺损。重组人BMP-7作为涂层用在多孔和表面光滑的金属植入物上,可以在移植骨和新骨的界面间隙处诱导新骨形成,增强金属移植物的诱骨作用,实现骨修复。除此之外,Nishihara等^[15]研究发现重组人BMP-7在自体骨表面可以生成关节软骨面,还可以在某些环境下修复软骨、肌腱和韧带。

BMP-2/7并不直接作用于靶基因,而是通过BMP受体、信号途径和靶基因组成的一个较完整的信号系统发挥骨诱导作用,BMP-2/7处于系统的核心和启位点。作为信号蛋白,BMP的生物效应是通过其分子的抗原决定簇与细胞膜上的受体形成异聚复合物,并进一步将信号传递到下游。BMP-2与BMPR结合形成复合物再与BMPRα结合,激活BMPRα并将信号传递到下游信号通道^[16],激活的受体将激活一系列胞内信号转导蛋白,即Smads^[17]。Smads信号通路是BMPs信号转导中研究得较清楚的一种,也被证明是BMPs信号转导中最重要的通路之一。Ulsamer等^[18]发现BMPs可通过激活MAPK家族中的p38,刺激成骨细胞的碱性磷酸酶和骨钙素的表达,最终促进成骨细胞的成骨作用。Notch信号转导通路也可能参与BMPs,对成骨细胞的分化,并且与Smads,通路有一定的交叉^[19]。

实验将骨髓间充质干细胞分为5组,即空白组,常规诱导组、BMP-2基因单独腺病毒转染组,BMP-7腺病毒转染组以及联合转染组。从细胞形态上观察,3组病毒转染组的细胞在转染后初期均有不同程度的脱颗粒现象,细胞核增大,胞浆比例缩小,表现出细胞代谢活跃的特征。但是在处理后第7天开始,常规诱导组和3组病毒转染组的成骨早期转录因子Runx-2和Osx均开始出现升高,并在第14天时更加明显。同时将病毒转染组和常规诱导组比较,发现病毒转染组的Runx-2和Osx基因mRNA表达要明显高于常规诱导组;而且3组病毒转染组两两比较,发现是联合转染BMP-2和BMP-7基因组Runx-2和Osx表达升高最明显。同样,在处理第7天,常规诱导组和3组病毒转染组的成骨细胞特征性蛋白碱性磷酸酶和Ⅰ型胶原均开始出现升高,并在第14天时更加明显。同时将病毒转染组和常规诱导组比较,发现病毒转染组的碱性磷酸酶和Ⅰ型胶原基因mRNA表达要明显高于常规诱导组;而且3组病毒转染组两两比较,发现是联合转染组碱性磷酸酶和Ⅰ型胶原表达升高最明显。

在蛋白质水平的检测也得到了相似结果：在处理后的第7天，常规诱导组和3组病毒转染组的Ⅰ型胶原和骨钙素的蛋白质表达水平明显升高；病毒转染组和常规诱导组相比，发现病毒转染组的Ⅰ型胶原和骨钙素的蛋白表达要明显高于常规诱导组；3组病毒转染组两两比较，联合转染组Ⅰ型胶原和骨钙素的蛋白表达升高最明显。

根据上述结果，联合转染了BMP-2和BMP-7基因后，兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的能力得到了明显加强。与传统成骨诱导液诱导的方法以及单独BMP-2或BMP-7基因转染相比，在mRNA水平和蛋白质水平，都具有最强的成骨细胞分化能力，为进一步构建转基因骨髓间充质干细胞组织工程骨打下了良好的基础。

4 参考文献

- [1] Turgeman G, Pittman DD, Müller R, et al. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med.* 2001;3(3):240-251.
- [2] Jia TL, Wang HZ, Xie LP, et al. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(5):709-715.
- [3] Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, et al. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(3):902-908.
- [4] White AP, Vaccaro AR, Hall JA, et al. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop.* 2007 Dec;31(6):735-741.
- [5] Bustos-Valenzuela JC, Fujita A, Halcsik E, et al. Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells. *BMC Res Notes.* 2011;4:370.
- [6] Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, et al. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2006;2(12):e216.
- [7] Koh JT, Zhao Z, Wang Z, et al. Combinatorial gene therapy with BMP2/7 enhances cranial bone regeneration. *J Dent Res.* 2008;87(9):845-849.
- [8] Descamps V, Duffour MT, Mathieu MC, et al. Strategies for cancer gene therapy using adenoviral vectors. *J Mol Med (Berl).* 1996;74(4):183-189.
- [9] Brody SL, Jaffe HA, Han SK, et al. Direct in vivo gene transfer and expression in malignant cells using adenovirus vectors. *Hum Gene Ther.* 1994;5(4):437-447.
- [10] Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004;22(4):233-241.
- [11] Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, et al. Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J Bone Miner Metab.* 2006;24(2):95-99.
- [12] Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng.* 2000;6(4):351-359.
- [13] Zhang ZJ, Lu SB, Wang JF, et al. Zhonghua Waike Zazhi. 1996; 34(10):596-597.
张子军, 卢世璧, 王继芳, 等. 骨缺损中内源性BMP的分布及其作用[J]. 中华外科杂志, 1996, 34(10):596-597.
- [14] Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, et al. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(5):734-750.
- [15] Nishihara A, Fujii M, Sampath TK, et al. Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301(2):617-622.
- [16] Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 2001; 276(16):12477-12480.
- [17] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(3):251-263.
- [18] Ulsamer A, Ortuño MJ, Ruiz S, et al. BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38. *J Biol Chem.* 2008;283(7):3816-3826.
- [19] de Jong DS, Steegenga WT, Hendriks JM, et al. Regulation of Notch signaling genes during BMP2-induced differentiation of osteoblast precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(1):100-107.

来自本文课题的更多信息--

基金资助：国家自然科学基金项目(30970735)，转基因骨髓间充质干细胞与自体血小板凝胶生物支架构建组织工程骨的实验研究。

作者贡献：宋滇文进行实验设计，实验实施为陈剑、胡凯猛、范立星，实验评估为刘厚奇、胡凯猛，资料收集为陈剑、范立星，陈剑成文，袁文审校，宋滇文对文章负责。

利益冲突：课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求：实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性。首次应用兔骨髓间充质干细胞联合转染 BMP-2 和 BMP-7 基因来促进向成骨细胞方向分化。发现兔骨髓间充质干细胞在联合转染后向成骨细胞分化的能力在 mRNA 水平和蛋白质水平都得到了明显加强。

作者声明：文章为原创作品，数据准确，内容不涉及泄密，无一稿两投，无抄袭，无内容剽窃，无作者署名争议，无与他人课题以及专利技术的争执，内容真实，文责自负。