

人骨形成蛋白4基因腺相关病毒及绿色荧光蛋白基因腺相关病毒体外诱导成骨的比较*[△]

赵希春¹, 董智勇¹, 郑召民², 邝冠明^{△3}

AAV-hBMP-4 versus AAV-EGFP for osteogenic induction of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

Zhao Xi-chun¹, Dong Zhi-yong¹, Zheng Zhao-min², Kuang Guan-ming³

Abstract

BACKGROUND: The releasing speed of human bone morphogenetic protein (hBMP) is not consistent with the new bone formation, thus, it is necessary to adjust the BMP release speed by suitable vector.

OBJECTIVE: To determine osteogenic effects of transfection of adeno-associated virus (AAV)-hBMP-4 and AAV-enhanced green fluorescent proteins (EGFP) on rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*.

METHODS: The BMSCs were cultured using total bone marrow method, and then the cells were transfected with AAV-hBMP-4 and AAV-EGFP, respectively, with 5×10^4 infection value. After that, the differences of osteogenic effects of 2 groups were compared by observing cell morphological changes, alkali phosphatase staining, Von Kossa staining, alizarin bordeaux staining and alkali phosphatase content.

RESULTS AND CONCLUSION: The ossification of BMSCs was obviously observed after transfected with AAV-hBMP4, which was identified by alkali phosphatase staining, Von Kossa staining and alizarin bordeaux staining. No similar changes were observed in the AAV-EGFP group. The content of alkali phosphatase was greater in the AAV-hBMP4 group than that of the AAV-EGFP group ($P < 0.01$). The results demonstrated that AAV-EGFP transfected BMSCs presented notably osteogenic activity.

Zhao XC, Dong ZY, Zheng ZM2, Kuang GM. AAV-hBMP-4 versus AAV-EGFP for osteogenic induction of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(20): 3637-3640. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 由于骨形成蛋白的释放速度与新骨生长速度不匹配, 单纯应用骨形成蛋白的效果尚不理想, 因此, 应有合适的载体来调节骨形成蛋白的释放速度。

目的: 观察重组人骨形成蛋白4基因腺相关病毒及绿色荧光蛋白基因腺相关病毒诱导兔骨髓间充质干细胞向成骨方向分化的作用。

方法: 全骨髓法培养兔骨髓间充质干细胞, 分别应用人骨形态形成蛋白4基因腺相关病毒载体及绿色荧光蛋白基因腺相关病毒转染兔骨髓间充质干细胞, 设定感染复数值为 5×10^4 , 观察两组细胞形态改变, 分别行碱性磷酸酶染色、Von Kossa染色、茜素红染色及碱性磷酸酶含量测定, 比较两组成骨活性差异。

结果与结论: 人骨形态形成蛋白4基因腺相关病毒组转染骨髓间充质干细胞后, 细胞形态呈现典型的成骨改变, 碱性磷酸酶染色及 Von Kossa 染色、茜素红染色均出现成骨的特征性改变。绿色荧光蛋白基因腺相关病毒组未观察到上述改变。人骨形态形成蛋白4基因腺相关病毒组碱性磷酸酶含量高于绿色荧光蛋白基因腺相关病毒组($P < 0.01$)。提示人骨形态形成蛋白4基因腺相关病毒转染骨髓间充质干细胞后, 骨髓间充质干细胞表现出更加明显的成骨活性改变。

关键词: 人骨形成蛋白; 绿色荧光蛋白; 腺相关病毒; 骨组织工程; 骨髓间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.20.007

赵希春, 董智勇, 郑召民, 邝冠明. 人骨形成蛋白4基因腺相关病毒及绿色荧光蛋白基因腺相关病毒体外诱导成骨的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(20):3637-3640. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

基因治疗的兴起为骨组织工程提供了新的研究思路, 重组人骨形成蛋白4(human bone morphogenetic protein 4, hBMP4)基因及腺相关病毒载体(adeno-associated virus, AAV)引起了研究者的极大关注。腺相关病毒因其具有高效感染靶细胞、长期稳定表达外源基因以及安全性好等特点, 有望成为骨组织工程领域中

理想的病毒载体^[1]。hBMP4因其高效成骨诱导活性, 在脊柱融合及骨缺损治疗中日益受到关注^[2]。而目前相关的研究尚存缺陷, 无法有效评价AAV-hBMP4促进成骨的能力。

1 材料和方法

设计: 对比观察基因转染实验。

时间及地点: 于2005-06/2006-12在中山大学附属第一医院骨科研究所完成。

¹Department of Orthopaedics, Jiaozhou Central Hospital of Qingdao City, Qingdao 266300, Shandong Province, China; ²Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yet-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; ³Department of Orthopaedics, the University of Hong Kong, Hong Kong, China

Zhao Xi-chun, Associate professor, Associate chief physician, Department of Orthopaedics, Jiaozhou Central Hospital of Qingdao City, Qingdao 266300, Shandong Province, China zhiyongzsy@163.com

Correspondence to: Zheng Zhao-min, Professor, Doctor, Doctoral supervisor, Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yet-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China zhengzm1@163.com

Supported by: the Fok Ying-Tong Education Foundation, No.94020*

Received: 2009-11-16 Accepted: 2009-12-12

¹ 青岛市胶州中心医院骨科, 山东省青岛市 266300; ² 中山大学附属第一医院脊柱外科, 广东省广州市 510080; ³ 香港大学矫形外科学系, 中国香港

赵希春, 男, 1963年生, 汉族, 山东省平度市人, 1986年潍坊医学院毕业, 副教授, 副主任医师, 主要从事脊柱外科研究。
zhiyongzsy@163.com

通讯作者: 郑召民, 教授, 博士, 博士生导师, 中山大学附属第一医院脊柱外科, 广东省广州市 510080
zhengzm1@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)20-03637-04

收稿日期: 2009-11-16
修回日期: 2009-12-12 (20090925008/GW-Z)

材料: 2月龄雄性新西兰大白兔12只, 由中山大学实验动物中心提供及饲养。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

实验用试剂:

试剂	来源
LG-DMEM 标准胎牛血清配制成体积分数 10%的 DMEM 培养液	Gibco 公司 兰州民海生物公司
0.25%胰蛋白酶, 含 0.02%EDTA 碱性磷酸酶染色及检测试剂盒	Sigma 公司 南京建成生物制品公司
Von Kossa 染色试剂盒 重组增强型绿色荧光蛋白基因的腺相关病毒载体	南京建成生物制品公司 八六三国家病毒研究基地本元正阳公司

实验方法:

AAV-hBMP4构建: 由本课题组采用武志坚等及杨辉等^[3-6]报告的方法构建完成。

兔骨髓间充质干细胞分离培养: 采用全骨髓法分离培养获得^[7-8]。注射器肝素化后自兔双侧胫骨结节内侧0.5 cm处各抽取骨髓约2.5 mL, 加入相同体积的DMEM液, 转入离心管, 1 200 r/min离心8 min, 弃上清及脂肪层, 加入含体积分数10%FBS的DMEM液5 mL, 充分混匀, 按 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于25 cm²培养瓶中, 置于37 °C、体积分数5% CO₂饱和湿度的CO₂孵箱中培养。48 h半量换液, 弃去未贴壁细胞及红细胞, 以后每72 h换液1次, 换液2次后杂细胞显著减少。原代培养10~12 d后细胞达80%融合, 含0.02%EDTA的0.25%胰蛋白酶消化后传代培养。行流式细胞仪表面抗原及成骨诱导鉴定。选取生长状态良好的第3代细胞进行转染实验。

病毒转染方法: 采用随机、对照原则, 选取生长状态良好的细胞, 接种至12块24孔板中进行实验, 随机分为2组, 分别采用AAV-hBMP4及AAV-EGFP进行细胞转染实验。取生长状态良好的第3代细胞, 0.25%胰蛋白酶消化计数后, 接种到24孔板, 每孔均匀接种 10^5 个, 普通培养液培养至80%融合, 进行病毒转染。实验按本课题组前期研究确定的感染复数值转染细胞, 感染复数值为 5×10^4 ^[7-8]。计算各孔需要加入的病毒量(病毒滴度为 6×10^{11} vg/mL), 将所需的病毒分别加入无血清DMEM中, 每孔加入的液体总量为200 μL, 分别滴加至各孔, 摇匀使病毒液与细胞充分接触, 置于37 °C、体积分数5% CO₂饱和湿度的CO₂孵箱中培养, 每25 min取出摇匀1次。2 h后吸出病毒液, 加入普通培养基, 常规培养, 3 d换液1次。待细胞达到80%

融合时传代。

两组转染后对细胞形态学的影响: 于转染后7, 14 d倒置相差显微镜观察细胞形态改变, 并进行以下检测观察成骨分化。

成骨染色:

碱性磷酸酶染色^[7-8]:

取2组细胞转染后7, 14 d的细胞爬片, PBS冲洗后丙酮固定, 采用改良Kaplow法进行碱性磷酸酶染色, 苏木精复染, 观察碱性磷酸酶分泌。

Von Kossa 法钙结节染色^[7-8]:

按 Von Kossa 染色试剂盒说明行 Von Kossa 染色, Mayer's 苏木精复染, 观察细胞钙盐沉积情况, 判断细胞成骨活性。

茜素红染色^[7-8]:

用 PBS 冲洗培养的待测骨髓间充质干细胞, 1%茜素红(体积分数2%乙醇配置)染色5 min, 用水冲洗5次, 观察染成红色的钙化沉积。

碱性磷酸酶活性测定:

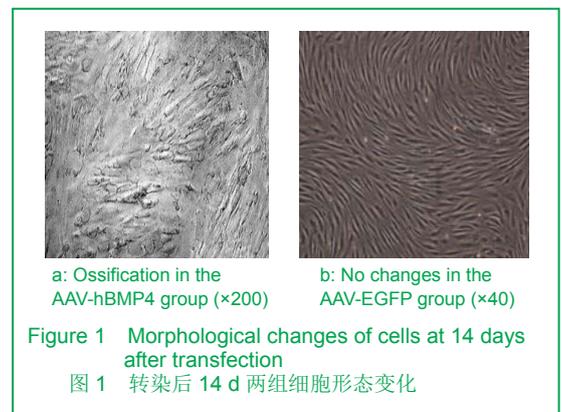
分别收集2组细胞转染后3 d细胞上清, 每组样本数为6, 按碱性磷酸酶检测试剂盒说明处理上清, 比色仪测定(520 nm, 1 cm光径比色), 计算细胞上清中碱性磷酸酶活性。

设计、实施、评估者: 由全体作者共同完成。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.5统计学软件进行分析, 组间比较采用t检验, P < 0.05认为差异有显著性意义。

2 结果

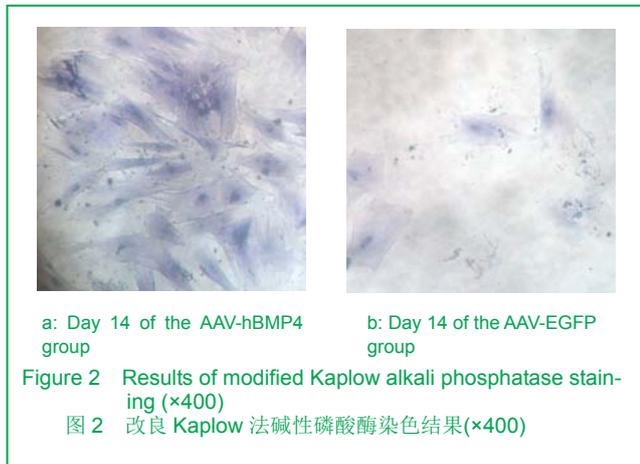
2.1 细胞形态改变 见图1。



AAV-hBMP4转染组及AAV-EGFP转染组细胞, 于转染后7, 14 d倒置相差显微镜观察, 可观测到两组细胞形态差异较大。AAV-hBMP4组于7 d可观察到细胞形态发生改变, 呈多角形,

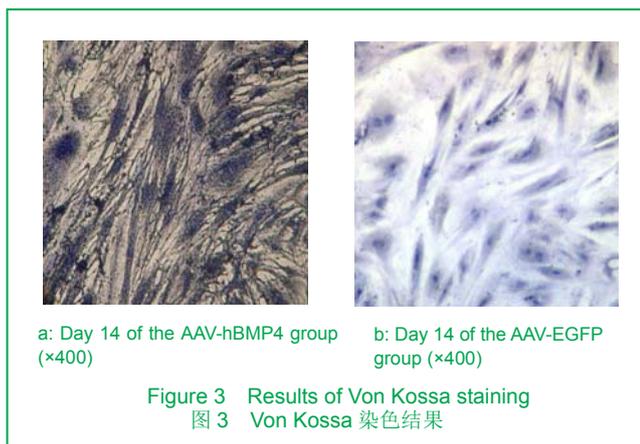
高倍视野下可见胞浆内出现大量棕褐色颗粒; 14 d后可见细胞呈复层生长, 胞浆内棕褐色颗粒较前次观察更为明显, 见图1a。AAV-EGFP组仅见细胞收缩, 边缘不规则, 无成骨细胞分化的特异性改变, 见图1b。

2.2 碱性磷酸酶染色结果 见图2。



AAV-hBMP4组转染后7 d碱性磷酸酶染色可见大部分染色的细胞呈阳性反应, 胞浆内出现大量棕黑色细小均匀颗粒, 胞外出现散在的黑染颗粒; 转染后14 d出现染色呈强阳性的大多角性细胞, 胞浆内棕黑色颗粒数量较前明显增多, 见图2a。细胞周围黑染颗粒明显增多, 细胞聚集区出现大块黑色浓染区, 提示细胞碱性磷酸酶分泌旺盛, 呈现典型的成骨细胞表现。AAV-EGFP组未出现上述改变, 见图2b。

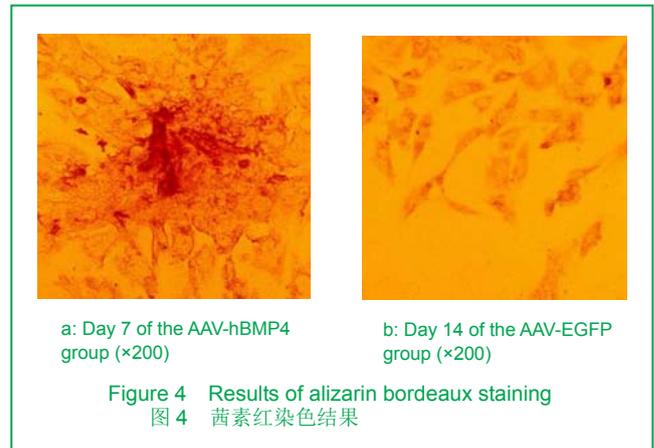
2.3 Von Kossa法钙结节染色结果 见图3。



AAV-hBMP4组转染后7 d Von Kossa染色可见大部分细胞胞浆内出现均匀黑染的钙盐沉积区; 14 d染色可见细胞呈集落生长并出现钙结节, 细胞间形成致密的不透光团块, 出现大块片状黑染区, 着色区域范围广, 面积大, 见图3a, 细胞表现明显的成骨活性。而对照AAV-EGFP组细胞胞浆内及细胞外均无此棕黑色染色区, 见图3b。

2.4 茜素红染色结果 AAV-hBMP4组转染后7 d茜素

红染色可见大部分细胞胞浆内出现均匀红染的钙盐沉积区; 14 d染色可见细胞呈集落生长并出现红染的钙结节, 细胞间形成致密的不透光团块, 出现大块片状红染区, 见图4a, 细胞表现明显的成骨活性。而对照AAV-EGFP组细胞胞浆内及细胞外均无此钙结节红染区, 见图4b。



2.5 碱性磷酸酶活性测定 两组细胞转染后3 d的细胞上清, 计算出各组不同样本的碱性磷酸酶活性。AAV-hBMP4组为(84.18 \pm 3.83) nkat, AAV-EGFP组为(34.51 \pm 1.00) nkat, 两组间比较差异有显著性意义($t=2.179$, $P < 0.01$)。

3 讨论

能够促进骨愈合及脊柱融合的生长因子很多, 转化生长因子 β 超家族成员骨形成蛋白在细胞生长及骨形成过程中扮演关键的角色, 因而一直处于研究的重点^[9]。在已发现的20余种BMPs中, BMP2、BMP4、BMP7(OP-1)的骨诱导能力最强^[10-17]。尤其是BMP4因子, 最近引起了研究者的极大关注^[2,18]。

然而, 由于BMP的释放速度与新骨生长速度不匹配, 单纯应用BMP的效果尚不理想, 因此, 应有合适的载体来调节BMP的释放速度。应用基因工程技术将BMP基因重组入宿主细胞基因组中, 使BMP获得持续的表达是这一领域中重要的突破方向^[19]。反转录病毒介导的基因转移技术在欧美已用于某些遗传性疾病和骨外疾病的基因治疗^[20]。但它只整合入增殖期的靶细胞, 插入突变的可能性较大, 限制了其进一步应用。腺病毒载体具有较大的宿主范围, 目前在基因治疗的研究中较多^[21-22]。但重组腺病毒仅存在于细胞浆中而不能整合入靶细胞染色体, 外源基因只能瞬时表达。这促使人们寻找其他更适合BMPs表达的病毒载体, 相关的研究也逐渐展开。AAV逐渐引起了人们的重视。AAV基因组可以整合入宿主细胞的基因组DNA中, 保证了外源基因长期稳定表达; 该病毒载体可整合入分裂及非分裂期细胞, 宿主范围

较宽^[1, 3, 8-9],因而可能是目前所知骨组织工程领域中最合适的病毒载体之一。

实验综合上述两个方面的研究成果,选取基于人BMP-4基因以及AAV载体构建的重组人骨形态形成蛋白4基因腺相关病毒载体,以同法构建的AAV-EGFP作为对照病毒,分别转染种子细胞骨髓间充质干细胞,比较其体外诱导成骨的作用,初步探讨AAV-hBMP-4应用于骨组织工程的前景。

实验设计中选用AAV-EGFP作为对照组,选取此组的目的在于其与实验组相比,细胞、病毒载体构建方法、转染方法均相等,仅携带的目的基因不同,实验条件最接近,可以有效地排除非实验因素的干扰,突出实验因素(hBMP-4)的作用,减少偏倚,结果对比更具说服力和可信性。AAV-hBMP-4转染骨髓间充质干细胞,相对于对照组,细胞形态由梭形逐渐向多角性、立方形转化,呈现明显的成骨改变;碱性磷酸酶的表达亦较对照组明显增高,形成的钙结节数量多,体积大。随着转染时间的延长,上述特征性改变更趋显著。研究表明,转染AAV-hBMP-4的细胞BMP-4表达增高,通过自分泌和(或)旁分泌作用加速骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。

4 参考文献

- [1] Dong ZY, Kuang GM, Zheng ZM. Zhongguo Jiaoxing Waikē Zazhi. 2005;13(21):1665-1667.
董智勇, 邝冠明, 郑召民. 基因治疗促进脊柱融合的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(21): 1665-1667.
- [2] Guo X, Lee KM, Law LP, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-4 (rhBMP-4) enhanced posterior spinal fusion without decortication. J Orthop Res. 2002;20(4):740-746.
- [3] Wu ZJ, Wu XB, Cao H, et al. A novel and highly efficient production system for recombinant adeno-associated virus vector. Science in China (Series C). 2002;45(1):96-103.
- [4] Wu ZJ, Wu XB, Cao H, et al. Zhonghua Shiyān he Linchuāng Bingduxue Zazhi. 2001;15(3):300-301.
伍志坚, 吴小兵, 曹晖, 等. 表达绿色荧光蛋白的重组腺病毒伴随病毒的产生[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15(3): 300-301.
- [5] Yang H, Tian YK, Wang P, et al. Zhonghua Mazuixue Zazhi. 2005; 25(1):34-36.
杨辉, 田玉科, 王鹏, 等. 重组人前脑啡肽原基因腺相关病毒载体的构建[J]. 中华麻醉学杂志, 2005, 25(1): 34-36.
- [6] Dong ZY, Zheng ZM, Kuang GM, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikē Zazhi. 2007;7(7):738-742.
董智勇, 郑召民, 邝冠明, 等. 重组人骨形成蛋白4基因腺相关病毒载体的构建[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 7(7): 738-742.
- [7] Dong ZY, Zheng ZM, Kuang GM, et al. Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi. 2007;9(1):53-57.
董智勇, 郑召民, 邝冠明, 等. AAV-hBMP-4对骨髓基质干细胞生物学行为的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2007, 9(1): 53-57.
- [8] Zheng ZM, Dong ZY, Kuang GM, et al. Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi. 2006; 8(10): 914-918.
郑召民, 董智勇, 邝冠明, 等. 兔骨髓基质干细胞成骨诱导及增强型绿色荧光蛋白基因腺相关病毒体外转染的研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8(10): 914-918.
- [9] Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am. 2002;84-A(6):1032-1044.
- [10] Fu, Chen WJ, Chen LH, et al. Enhancement of posterolateral lumbar spine fusion using low-dose rhBMP-2 and cultured marrow stromal cells. J Orthop Res. 2009;27(3):380-384.
- [11] Yao G, Qian Y, Chen J, et al. Evaluation of insoluble bone gelatin as a carrier for enhancement of osteogenic protein-1-induced intertransverse process lumbar fusion in a rabbit model. Spine. 2008;33(18):1935-1942.
- [12] Benglis D, Wang MY, Levi AD. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. Neurosurgery. 2008;62(5 Suppl 2): S423-431.
- [13] Hsu WK, Wang JC. The use of bone morphogenetic protein in spine fusion. Spine J. 2008;8(3):419-425.
- [14] Robinson Y, Heyde CE, Tschöke SK, et al. Evidence supporting the use of bone morphogenetic proteins for spinal fusion surgery. Expert Rev Med Devices. 2008;5(1):75-84.
- [15] Minamide A, Yoshida M, Kawakami M, et al. The effects of bone morphogenetic protein and basic fibroblast growth factor on cultured mesenchymal stem cells for spine fusion. Spine. 2007; 32(10): 1067-1071.
- [16] Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). J Tissue Eng Regen Med. 2008;2(1):1-13.
- [17] Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). J Tissue Eng Regen Med. 2008;2(2-3):81-96.
- [18] Luk KD, Chen Y, Cheung KM, et al. Adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-4 gene therapy for in vivo bone formation. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 308(3): 636-645.
- [19] Franceschi RT. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. J Dent Res. 2005;84(12):1093-1103.
- [20] Laurencin CT, Attawia MA, Lu LQ, et al. Poly (lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration. Biomaterials. 2001; 22(11):1271-1277.
- [21] Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. Gene Ther. 2004;11(17): 1312-1320.
- [22] Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. Spine. 2008;33(8):863-869.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 教育部霍英东教育基金“优选资助课题”(94020)“转 BMP-4 基因的骨祖细胞 D1BAG 促进脊柱融合的研究”。

利益冲突: 无相关利益冲突。

课题的创新点: 课题创新地以绿色荧光蛋白为对照, 研究探讨骨形成蛋白促进种子细胞—骨髓间充质干细胞诱导分化成骨的作用。应用基因转染技术来实现细胞因子蛋白质的有效表达, 达到诱导种子细胞分化, 促进成骨的作用。

课题评估的“金标准”: 目前体外成骨研究中评价成骨的主要指标为碱性磷酸酶染色、Von Kossa 染色、茜素红染色及碱性磷酸酶含量测定。本课题主要结果指标评价均采用上述公认的“金标准”。

设计或课题的偏倚与不足: 因本课题组构建的病毒量所限及需进行后续试验, 实验组及对照组样本量偏小, 实验结果可能存在偏倚。

提供临床借鉴的价值: 在本实验的基础上行体内成骨实验, 人骨形成蛋白 4 高效转染骨髓间充质干细胞后, 复合胶原载体, 可以在体内成骨局部长期高效分泌具有全部生物活性的人骨形成蛋白 4 因子, 获得与自体骨相近的成骨微环境, 启动骨诱导, 促进体内成骨及脊柱融合。指导进行临床前期研究。