

体外构建腺病毒介导骨形态发生蛋白2基因转染骨髓间充质干细胞复合纳米羟基磷灰石的植骨材料**

黄俊锋^{1,2}, 王大平², 何春末¹, 杨欣建², 刘黎军², 陈宏贤², 彭亮权²

Adenovirus mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfection of bone marrow mesenchymal stem cells combined with nano-hydroxyapatite to construct bone graft material *in vitro*

Huang Jun-feng^{1,2}, Wang Da-ping², He Chun-lei¹, Yang Xin-jian², Liu Li-jun², Chen Hong-xian², Peng Liang-quan²

Abstract

BACKGROUND: With advanced tissue engineering and gene engineering technologies, gene enhanced tissue engineered bone provides prosperous application for the repair of bone deficits.

OBJECTIVE: To study the adhesion, proliferation and expression of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on nano-hydroxyapatite (Nano-HA) bone graft material after transfection of adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 expression vector (Ad-BMP-2).

METHODS: BMSCs were transfected using Ad-BMP-2. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect BMP-2 expression in transfected cells. After transfected 48 hours, cells were inoculated on Nano-HA bone graft material evenly, scanning electron microscopy was used to observe the adhesion status of cells on material, and MTT test was used to assay the proliferation of transfected BMSCs. Cells adhered on material were gathered on days 3, 5, 7, Western blot was used to detect the expression of BMP-2 of the adhered cells.

RESULTS AND CONCLUSION: After transfection, BMP-2 protein was highly expressed in BMSCs; Using scanning electron microscopy, the transfected BMSCs were seen to grow well around or in pores of the Nano-HA bone graft material, and proliferated. MTT test assay showed that, the Nano-HA bone graft material couldn't inhibit *in vitro* proliferation of BMSCs. The transfection cells adhered on composite had a higher BMP-2 protein expression. Results demonstrated that Ad-BMP-2-transfected BMSCs are well biocompatible to Nano-HA bone graft material, the transfected cells in material can secrete BMP-2 stably for a long time.

¹Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China;
²Department of Orthopaedics, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China

Huang Jun-feng★, Master, Attending physician, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China; Department of Orthopaedics, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China
hj097@163.com

Huang JF, Wang DP, He CL, Yang XJ, Liu LJ, Chen HX, Peng LQ. Adenovirus mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfection of bone marrow mesenchymal stem cells combined with nano-hydroxyapatite to construct bone graft material *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(38): 7031-7036. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 随着组织工程和基因工程技术迅速发展, 基因增强的组织工程骨为临床治疗骨缺损带来美好的前景。

目的: 观察经腺病毒介导的人骨形态发生蛋白2表达载体(Ad-BMP-2)转染后的兔骨髓间充质干细胞在纳米羟基磷灰石植骨材料上的黏附、增殖及骨形态发生蛋白2的表达情况。

方法: 用 Ad-BMP-2 转染兔骨髓间充质干细胞, 免疫组化、蛋白印迹法检测转染后细胞内骨形态发生蛋白2的表达情况。将转染48 h的细胞均匀接种到纳米羟基磷灰石植骨材料上, 扫描电镜观察细胞黏附状况, 并采用 MTT 比色法测定骨髓间充质干细胞的增殖情况; 消化收集黏附植骨材料上第3, 5, 7天的细胞, 蛋白印迹检测黏附材料上细胞骨形态发生蛋白2的表达。

结果与结论: 转染后, 骨髓间充质干细胞内骨形态发生蛋白2有高表达; 扫描电镜见转染细胞在纳米羟基磷灰石材料孔隙周围及孔隙内黏附生长良好并大量增殖, MTT 分析结果显示, 纳米羟基磷灰石对骨髓间充质干细胞的体外增殖无抑制作用, 复合后骨形态发生蛋白2有较高表达。结果表明经 Ad-BMP-2 转染后的骨髓间充质干细胞与纳米羟基磷灰石植骨材料生物相容性好, 细胞在材料上能稳定长效地分泌骨形态发生蛋白2。

关键词: 腺病毒载体; 骨形态蛋白; 纳米羟基磷灰石; 骨髓间充质干细胞; 组织工程骨

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.38.001

Correspondence to: Wang Da-ping, Professor, Chief physician, Doctor, Department of Orthopaedics, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China
dapingwang@medmail.com.cn

Supported by: Science and Technology Projects by Health Bureau of Shenzhen, No. 200630*

Received: 2010-04-21
Accepted: 2010-05-18

黄俊锋, 王大平, 何春末, 杨欣建, 刘黎军, 陈宏贤, 彭亮权. 体外构建腺病毒介导骨形态发生蛋白2基因转染骨髓间充质干细胞复合纳米羟基磷灰石的植骨材料[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(38):7031-7036.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

长期以来, 在生物材料及临床骨科研究领域, 骨缺损的修复一直是一个重要课题, 然而迄今为止, 创伤、感染和肿瘤切除后所造成的

大节段骨缺损的修复问题仍未得到有效的解决。随着组织工程和基因工程技术迅速发展, 以种子细胞与生物材料相结合的骨组织工程及以重组DNA为核心的细胞基因修饰技术的联合应用为临床治疗骨缺损带来美好的前景。骨组织工程的种子细胞可来源于骨外膜、骨松

¹广州医学院, 广东省广州市 510182; ²深圳市第二人民医院创伤骨科, 广东省深圳市 518035

黄俊锋★, 男, 1977年生, 广东省潮州市人, 汉族, 2002年中山大学医学专业毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事创伤骨科、手外科临床工作。hj097@163.com

通讯作者: 王大平, 教授, 主任医师, 博士, 深圳市第二人民医院创伤骨科, 广东省深圳市 518035。dapingwang@medmail.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)38-07031-06

收稿日期: 2010-04-21
修回日期: 2010-05-18
(20100421012/M·Y)

质、骨髓和骨外其他组织, 其中骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 的来源广、取材创伤小、增殖快^[1-2], 已成为骨组织工程首选的种子细胞。骨形态发生蛋白2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 在骨修复过程中可促进成骨细胞增殖、基质分泌和血管化, 在体外、体内异位均可诱导骨形成^[3-4]。但是天然BMP-2提取困难、重组人BMP-2不能耐受37℃的体内环境、半衰期短难以维持有效浓度等不足使其应用受到限制。BMP-2转基因诱导成骨可实现一定时间内的BMP-2持续表达, 克服直接应用的不足。目前, 病毒型和非病毒型BMP-2表达载体都被用于BMP-2基因转移诱导成骨研究, 其中腺病毒介导的BMP-2转基因方法被认为是其中最有效的手段^[5]。本实验将腺病毒介导的人骨形态发生蛋白2表达载体 (Ad-BMP-2) 转染后的兔BMSCs复合纳米羟基磷灰石 (Nano-HA) 植骨材料上, 探讨Nano-HA植骨材料作为转染后BMSCs载体的可行性。

1 材料和方法

设计: 细胞-材料学, 体外观察实验。

时间及地点: 实验于2009-10在深圳市第二人民医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 新西兰大白兔6只, 3~5月龄, 体重2.0~2.5 kg, 雌雄不限, 购自南方医科大学实验动物中心。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

Nano-HA植骨材料: 由深圳市第二人民医院组织工程实验室与中南大学粉末冶金工程研究中心联合研制, 为长方体状条块, 7 mm×7 mm×15 mm, 孔隙率约90%, 孔隙直径为100~250 μm, 见图1, 2。



Figure 1 Nano-hydroxyapatite artificial bone under inverted microscope (×400)
图1 Nano-HA人工骨于倒置显微镜下(×400)

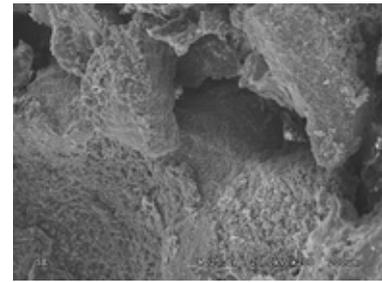


Figure 2 Nano-hydroxyapatite artificial bone under scanning electron microscope (20 kV, ×200)
图2 Nano-HA人工骨于扫描电镜下(20 kV, ×200)

主要试剂及仪器:

主要试剂及仪器	来源
Ad-BMP-2 及腺病毒绿色荧光载体(Ad-GFP)	深圳市第二人民医院组织工程实验室构建与保存
Trizol Reagent	Invitrogen 公司
DMEM-LG 及胎牛血清、Percoll 分离液、胰蛋白酶、双抗	Hyclon 公司
地塞米松、β-甘油磷酸、抗坏血酸、MTT 液及二甲亚砜	Sigma 公司
鼠抗人 I 抗、羊抗鼠 II 抗 IgG-HRP	Santa Cruz 公司
S-P 超敏试剂盒	福州迈新生物公司
通用型 ECL 免疫印迹化学发光溶液	GENMED 公司

方法:

兔BMSCs的分离培养: 氯胺酮静脉麻醉后于兔胫骨结节处穿刺, 抽取骨髓液4 mL。采用密度梯度离心法联合贴壁法分离培养BMSCs^[7], 10 d时细胞长至80%汇合时吸掉原培养基, 用0.25%胰蛋白酶消化, 按1:2的比例传代培养。取第3代细胞用于以下实验。

诱导BMSCs分化成骨细胞: 取第3代BMSCs以 $6 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种于放置有无菌盖玻片的6孔培养板中, 当细胞长满50%~60%时, 成骨诱导实验组将培养基更换为含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM培养液, 其中含成骨诱导液(抗坏血酸50 mg/L, β-甘油磷酸钠10 mmol/L, 地塞米松 10^{-8} mol/L); 以后每2 d换诱导液1次, 诱导3周。

Ad-BMP-2/GFP转染兔BMSCs: 第3代融合率为80%左右的细胞, 更换无血清的培养液孵育4 h后吸出培养液, 根据病毒滴度以感染倍数 (multiplicity of infection, MOI) 50、100、200感

染BMSCs, 转染后不加培养液放置培养箱中培养1 h, 每15 min轻轻摇动培养瓶, 1 h后换含体积分数为10%血清的正常培养液继续培养。同等条件下用Ad-GFP转染孵育的细胞, 48 h后荧光显微镜(德国Leica)下观察转染Ad-GFP的BMSCs绿色荧光蛋白的表达, 以此间接反应BMP-2成熟肽的表达及转染效率, 来确定最适感染倍数。

免疫组化检测转染后细胞BMP-2的表达: 转染细胞消化后爬片、固定, 按S-P免疫组化试剂盒进行操作, DAB显色。

Western-blot检测转染后细胞BMP-2的表达: 分别于转染后24, 48, 72 h取约 10^6 个细胞用TRIzol提取转染后不同时期细胞的蛋白; 10%SDS-PAGE凝胶电泳(Biorad垂直电泳仪), 15 μ L上样, 120 V, 电泳60 min; 30 V电压转印30 min (Biorad SD 型半干转膜仪); 1%BSA 4 $^{\circ}$ C封闭过夜; 分别用一抗、二抗(均用1%BSA 1:1 000稀释)孵育1 h, 0.1%Tween-PBS各洗涤3次, 每次3 min; ECL发光液(A液1 mL: B液20 μ L)室温中孵育1 min, 装暗盒暗室中胶片曝光3 min, 取同样数量的未转染细胞蛋白作为对照。

BMSCs 复合 Nano-HA 植骨材料: 将 Nano-HA 制成 7 mm \times 7 mm \times 7 mm 的立方体, 高温、高压消毒灭菌后在体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液中浸泡过夜, 使用前用无菌滤纸吸干备用。胰酶消化收集上述未转染BMSCs及转染后BMSCs, 制成单细胞悬液(约 1×10^9 L $^{-1}$), 分别均匀接种于Nano-HA材料块, 37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂培养箱中贴附2 h后缓慢加入体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液继续培养, 2 d换液1次。

扫描电镜检测细胞载体复合物: 材料与细胞复合培养第3, 5天, 分别取出两组材料, PBS漂洗, 2%戊二醛固定, PBS液洗涤, 乙醇、丙酮系列脱水, 乙酸异戊酯置换, 临界点干燥, 喷金后观察。通过扫描电镜(日本日立公司)观察材料表面细胞附着、分布、生长情况。

MTT分析Nano-HA植骨材料对转染后BMSCs存活及增殖的影响: 实验分Nano-HA组和对照组。实验组为转染后BMSCs/Nano-HA复合物, 对照组单纯转染后BMSCs, 分别于2, 4, 6, 8 d弃原培养基, 加100 μ L MTT (5 g/L), 37 $^{\circ}$ C孵育4 h后, 吸弃孔内上清液, 加入二甲基亚砜1 mL, 振荡15 min裂解细胞, 使沉淀物充分溶解; 取出材料后在酶联免疫检测仪上测定光吸收值, 测定波长为570 nm。

Western Blot检测复合后细胞BMP-2蛋白的表达: 分别于复合后第3, 5, 7天, 取细胞载体复合物PBS洗涤3次后, 0.25%胰蛋白酶消化5 min, 加入DMEM终止消化, 把细胞悬液转移至离心管2 500 r/min, 离心10 min, 弃上清加TRIzol提取消化复合后细胞蛋白质, 按上述方法进行电泳分离, 转膜, 封闭, 一、二抗孵育, ECL显色。

设计、实施、评估者: 实验设计为通讯作者, 实施为第三作者, 评估为第一作者。

统计学分析: 采用SPSS 10.0统计软件对实验数据进行统计学分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs的分离培养与鉴定 BMSCs表现为长梭形的成纤维细胞样表型, 排列呈旋涡状, 见图3, 经诱导鉴定可向成骨细胞分化并形成矿化结节, 见图4。

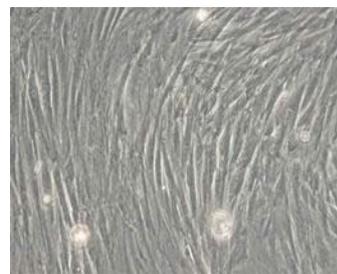


Figure 3 Primary cells covered the bottom of culture flask, orderly arranged along long axis of cells body (Inoculation 12 d, $\times 100$)

图3 原代细胞长满瓶底, 沿胞体长轴有序排列(接种12 d, $\times 100$)



Figure 4 Osteogenic induction for 21 d, alizarin red staining of calcium nodules were red (Inverted microscope, $\times 100$)

图4 成骨诱导21 d, 钙结节茜红染色呈红色(倒置显微镜, $\times 100$)

2.2 Ad-GFP转染效率的检测 Ad-GFP转染48 h后, 荧光显微镜观察, MOI为100时转染的细胞状态较好, 几乎全部可见绿色荧光, 转染效率近乎100%, 见图5; MOI为50时转染的细胞状态最好, 但细胞内出现绿色荧光蛋白少, 转染效率差; MOI为200时绿色荧光蛋白较多, 但光镜下可见部分贴壁细胞形态回缩及少数漂浮细胞, 考虑与腺病毒感染对细胞的毒性有关; 表明最适MOI为100。6周后在荧光显微镜下, 仍可见少量绿色荧光。

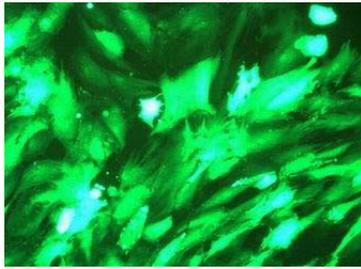


Figure 5 Cells transfected by adenovirus-green fluorescent protein 48 h were almost green fluorescent (MOI=100)

图5 Ad-GFP 转染 48 h, 转染的细胞几乎全部可见绿色荧光(MOI=100)

2.3 Ad-BMP-2转染后目的基因在BMSCs的表达

免疫组化检测BMP-2的表达: 细胞BMP-2免疫组化检测结果显示转染后BMSCs的胞浆中有棕黄色颗粒性阳性信号, 见图6, 而未转染细胞则为阴性, 见图7。

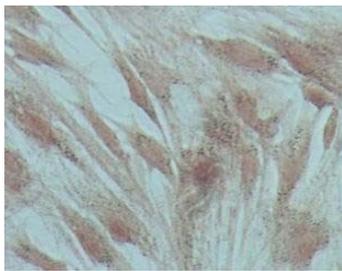


Figure 6 Transfection 72 h, bone morphogenetic protein-2 immunohistochemical staining showed positive expression in cytoplasm (DAB coloration, × 100)

图6 转染 72 h, BMP-2 免疫组化染色见胞浆中呈阳性表达(DAB 显色, ×100)

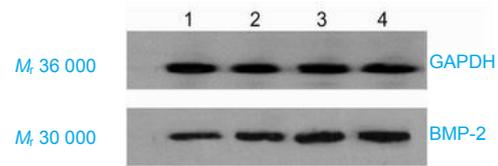


Figure 7 Untransfected cells were negative for bone morphogenetic protein-2 immunohistochemical staining (DAB coloration, × 100)

图7 未转染细胞 BMP-2 免疫组化染色呈阴性(DAB 显色, ×100)

Western blot检测BMP-2蛋白的表达: 提取转染后BMSCs第1, 2, 3天细胞的蛋白, Western-blot检测到约M_r 30 000大小的阳性条带, 说明转染后Ad-BMP-2转染组有BMP阳性条带, 且随时间的增长条带呈强阳性, 而未转染组可见较弱的条带, 见图8, 说明病毒转染

BMSCs后在蛋白水平也有高表达。



1: Standard group; 2: 1 d; 3: 2 d; 4: 3 d

Figure 8 Western blot detection of bone morphogenetic protein-2 expression

图8 Western blot 检测 BMP-2 的表达

2.4 BMSCs复合Nano-HA植骨材料扫描电镜观察 复合培养第3天, 扫描电镜见载体表面不规则, 其间可见微孔并且部分被细胞覆盖, 转染后的细胞在Nano-HA材料块陷窝和空隙中黏附良好, 密集处连接成片, 细胞贴附伸展良好, 见图9。

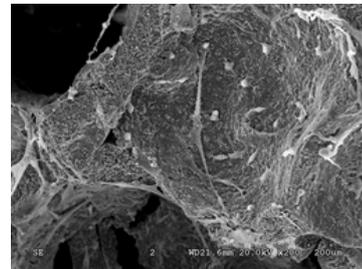


Figure 9 Compound for 3 d, transfected bone marrow mesenchymal stem cells adhere and extend good in the lacunae and loophole of nano-hydroxyapatite material (Scanning electron microscopy, 20 kV, ×200)

图9 复合 3 d, 转染后的 BMSCs 在 Nano-HA 材料块陷窝和空隙中贴附伸展良好(扫描电镜, 20 kV, ×200)

复合第5天细胞在材料表面完全铺展, 并伸出伪足, 图中可见长伪足与材料表面融合紧密, 见图10, 细胞边缘可见钙盐分泌及沉积, 说明了材料有很高的细胞亲和性, 适合细胞生长。

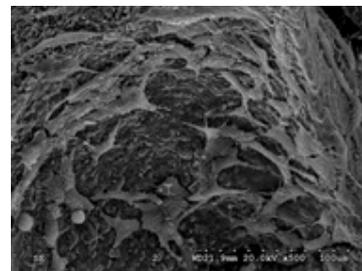
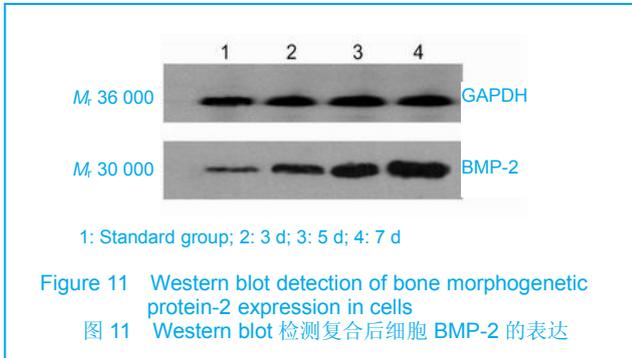


Figure 10 Compound for 5 d, transfected bone marrow mesenchymal stem cells fully spread and extend pseudopodia on the surface of nano-hydroxyapatite material, calcium deposit can be seen around the cells (Scanning electron microscopy, 20 kV, ×500)

图10 复合 5 d, 转染后的 BMSCs 在材料表面完全铺展并伸出伪足, 细胞边缘可见钙盐沉积(扫描电镜, 20 kV, ×500)

2.5 Western Blot 检测复合后细胞 BMP-2 蛋白的表达
消化、提取复合后第 3, 5, 7 天的细胞, 提取细胞蛋白, Western-blot 检测转染组 BMP-2 蛋白有高表达, 见图 11, 说明转染后的细胞载体复合物可继续分泌 BMP-2。



2.6 MTT 分析 Nano-HA 对 BMSCs 存活及增殖的影响
Nano-HA 组和对照组的吸光度值都随时间延长而逐渐增高, 经检测于 2, 4, 6, 8, 20 d 两组吸光度值差异无显著性意义, 见表 1。

表 1 MTT 分析骨髓间充质干细胞的增殖能力		
Table 1 MTT analysis of bone marrow mesenchymal stem cell proliferation (x±s, n = 12, A value)		
Group	2 d	4 d
Nano-hydroxyapatite	0.135±0.009	0.274±0.013
Control	0.133±0.011	0.269±0.015
<i>t</i>	0.487	0.873
<i>P</i>	> 0.05	> 0.05
Group	6 d	8 d
Nano-hydroxyapatite	0.379±0.011	0.489±0.012
Control	0.383±0.013	0.482±0.015
<i>t</i>	0.975	1.262
<i>P</i>	> 0.05	> 0.05

3 讨论

长期以来, 骨缺损尤其是大段骨缺损是临床骨科面临的难题之一。传统的自体骨移植由于其取材有限及并发症使其应用受到限制, 而同种异体骨及人工骨无活性细胞, 其治疗效果并不满意。基因增强的组织工程结合组织工程和基因工程两大技术, 近年来它的发展为解决该难题提供了很好的思路^[8]。组织工程学是 20 世纪 80 年代兴起的一门多学科交叉的边缘科学, 是应用工程学与生命科学的原理与技术, 研制生物替代物, 以修复或重建组织器官功能。组织工程的三大要素包括种子细胞、生物材料及组织工程化组织的构建^[9]。

理想的骨组织工程种子细胞应具有以下几个特点: 取材容易, 对机体的损伤小; 体外扩增能力强; 易定向

分化为成骨细胞; 植入体内后能很好地适应受区生理、病理和应力环境并保持成骨活性。骨髓间充质干细胞, 是一种多潜能干细胞, 其来源广泛, 取材方便, 容易培养, 且增殖较快^[10], 在一定条件下可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞和造血支持基质^[11], 最有可能作为组织工程人工骨构建的理想种子细胞。骨髓间充质干细胞具有独特的细胞增殖分裂模式, 使得外源基因易于导入和表达而成为潜在的基因治疗靶细胞^[12]。因此, 本实验中把骨髓间充质干细胞进行体外扩增, 然后进行基因修饰, 借助于生物材料载体构成细胞与材料的复合物, 下一步将其回植体内, 进行骨缺损的修复实验。

组织工程中另一个重要的因素是种子细胞的载体。本实验选择 Nano-HA 植骨材料为载体。羟基磷灰石是最常见的一种生物活性材料。其化学组成和结晶结构类似于人体骨骼中的磷灰石, 具有良好的骨传导性能和生物活性, 能促进骨骼生长, 相态比较稳定, 无毒性。但微米级羟基磷灰石的相态极为稳定, 生物可吸收性差, 而且力学性能差, 脆性大, 抗压、抗折强度低, 不是理想的骨组织材料。随着纳米科学技术在医学上的应用, Nano-HA 材料的研制与应用引起了国内外学者的广泛关注。Nano-HA 的晶粒尺寸、晶界宽度都只限于纳米量级的水平, 使得材料的内在缺陷减少, 同时具有表面效应和体积效应, 在力学和生物学方面有很大的优越性和应用潜力, 是一种理想的组织植入材料^[13], 它与生物磷灰石的结构非常相似, 十分有利于骨组织的整合, 适合细胞生长, 且骨传导性能和溶解性能较微米羟基磷灰石也有所提高。由本院与中南大学粉末冶金工程研究中心联合研制的新型纳米羟基磷灰石人工骨材料, 并通过不同的造模工艺得到不同孔径的人工骨, 经动物实验证明空隙率在 100~250 μm 的纳米羟基磷灰石材料的成骨能力明显高于 50~150 μm 和 300~500 μm 孔径的材料^[14-15]。本实验将转染后的 BMSCs 复合 Nano-HA 支架构建 BMP-2 基因强化的组织工程骨, 在扫描电镜下观察到 BMSCs 在 Nano-HA 支架表面和孔隙内黏附和生长, 并分泌细胞外基质及细胞表面有大量的微绒毛, 显示细胞在支架上生长形态良好。蛋白印迹检测细胞载体复合物可持续分泌 BMP-2, 为将来应用 BMP-2 基因强化的组织工程骨修复骨缺损奠定了实验基础。

MTT 比色法的原理是利用活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的四唑盐还原成难溶性的蓝紫色结晶物并沉积在细胞内, 而死细胞无此功能。二甲基亚砷可溶解细胞内的结晶物, 通过测定光吸收值, 间接反映活细胞数。该方法灵敏度高, 操作简单, 重复性好。本实验结果表明, 在 Nano-HA 植骨材料上的 BMSCs 增殖良好, 与对照组无明显差异, 说明 Nano-HA 植骨材料具有良好的生物相容性。

在众多的骨生长因子中, BMP-2 被认为是活性最强

的惟一能单独诱导成骨的因子^[16], 在促进骨缺损修复和骨折愈合过程中效果显著。在骨修复过程中, BMP-2能促进细胞增殖、分化和基质分泌, 在体内、体外均可诱导BMSCs向成骨细胞转化^[17-18]。但BMP-2诱导成骨是一个在时间上按趋化、募集、促进成骨前体细胞分化几个事件顺次发生的过程, 不同阶段所需BMP-2浓度存在由 10^{-15} mol/L到 10^{-3} mol/L的巨大差异^[19]。直接应用BMP-2一次性投药后, BMP-2很快被稀释和组织吸收^[20], 不符合BMP-2诱导成骨的自然规律。利用基因转移技术将编码BMP-2的基因片段转移至BMSCs中, 为上述问题的解决提供新的思路和方法。腺病毒表达载体因具有转染效率高, 目的基因高水平表达, 免疫排斥反应低, 安全系数高等优点亦成为临床基因治疗的主要载体。我们采用Gateway™技术构建腺病毒载体^[21], 采用体外基因治疗策略, 利用Ad-BMP-2/GFP转染兔BMSCs。通过实验发现, BMP-2基因可高效导入细胞且表达基因产物BMP-2, 感染BMSCs 2 d后就观察到外源基因产物GFP表达, 6周后逐渐消失。尽管腺病毒载体存在目的基因表达时间短的缺点(最长达6周), 但因为骨修复是一个阶段性过程, 不需要转染的目的基因长久表达, 因此利用其将目的基因导入BMSCs促进骨愈合比较理想^[22-23], 而且不必担心持续的过度表达引起骨质增生过度, 影响骨改建甚至致瘤性^[24]。实验表明腺病毒介导外源性目的基因表达是一种高效的基因转移方式, 其转染率和蛋白表达情况完全适合骨组织工程的需要。

综上所述, 经Ad-BMP-2转染后的BMSCs与Nano-HA植骨材料生物相容性好, 细胞在材料上能稳定长效地分泌BMP-2, 体外成功构建了新型组织工程化骨, 为进一步骨缺损修复的实验提供新型的骨替代材料。

4 参考文献

[1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418(6893):41-49.

[2] Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(4):487-500.

[3] Rutherford RB, Moalli M, Franceschi RT, et al. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. *Tissue Eng*. 2002;8(3):441-452.

[4] Santoni BG, Pluhar GE, Motta T, et al. Hollow calcium phosphate microcarriers for bone regeneration: in vitro osteoproduction and ex vivo mechanical assessment. *Biomed Mater Eng*. 2007;17(5): 277-289.

[5] Alden TD, Varady P, Kallmes DF, et al. Bone morphogenetic protein gene therapy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(16 Suppl 1):S87-93.

[6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

[7] Lennon DP, Haynesworth SE, Bruder SP, et al. Development of a serum screen for mesenchymal progenitor cells from bone marrow. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1996;32:602-611.

[8] Edwards PC, Ruggiero S, Fantasia J, et al. Sonic hedgehog gene-enhanced tissue engineering for bone regeneration. *Gene Ther*. 2005;12(1):75-86.

[9] Shen JY, Chan-Park MB, He B, et al. Three-dimensional microchannels in biodegradable polymeric films for control orientation and phenotype of vascular smooth muscle cells. *Tissue Eng*. 2006;12(8):2229-2240.

[10] Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(4):487-500.

[11] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001; 19(3):180-192.

[12] Peng LQ, Wang DP, He CL, et al. *Zhongguo Linchuang Jiepaoxue Zazhi*. 2009;27(3):321-324. 彭亮权, 王大平, 何春未, 等. 骨髓间充质干细胞的分离、培养与鉴定[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2009, 27(3):321-324.

[13] Tan W, Krishnaraj R, Desai TA. Evaluation of nanostructured composite collagen-chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2001;7(2):203-210.

[14] Wang DP, Han Y, Zhu WM, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(48):9641-9645. 王大平, 韩云, 朱伟民, 等. 不同孔径纳米羟基磷灰石人工骨修复兔桡骨缺损效果比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(48): 9641-9645.

[15] Zhu W, Xiao J, Wang D, et al. Experimental study of nano-HA artificial bone with different pore sizes for repairing the radial defect. *Int Orthop*. 2009;33(2):567-571.

[16] Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(346):26-37.

[17] Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, et al. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res*. 2003;21(1):44-53.

[18] Lee FY, Storer S, Hazan EJ, et al. Repair of bone allograft fracture using bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res*. 2002; (397):119-126.

[19] Reddi AH. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4(5):737-744.

[20] Lee SJ. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J*. 2000; 41(6):704-719.

[21] Peng LQ, Wang DP, Zhou K, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009;13(20):3942-3946. 彭亮权, 王大平, 周可, 等. 重组人骨形态发生蛋白2腺病毒载体的构建与鉴定[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(20):3942-3946.

[22] Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science*. 2000; 289(5484):1498-1500.

[23] Baltzer AW, Lattmann C, Whalen JD, et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther*. 2000;7(9): 734-739.

[24] Yang ZR, Wang HF, Zhao J, et al. Recent developments in the use of adenoviruses and immunotoxins in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*. 2007;14(7):599-615.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 深圳市卫生局科技计划项目资助(200630)。

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。

课题的意义: 研制理想的人工骨代替自体骨移植修复骨缺损, 是医学和生物材料科学领域中的一个重要课题。本课题通过运用纳米技术, 制备生物相容性好又有骨传导能力, 并在体内可生物降解的纳米羟基磷灰石, 再与人骨形态发生蛋白2基因增强的骨髓间充质干细胞结合, 制成既有骨传导及骨诱导作用, 不受供体来源限制, 可根据要求塑形、组织相容性好的人工骨, 形成含有干细胞的“活骨”, 最终实现活骨移植, 用于骨折不愈合的治疗及骨缺损的修复。

课题评估的“金标准”: 体外评价材料对细胞增殖的影响主要使用 MTT 法, 对于转染后细胞基因产物的检测主要通过 Western Blot 检测, 文中都有使用。

设计或课题的偏倚与不足: 本文为体外观察性实验, 按常规方法观察及设立检测指标, 没有太多的人为因素干扰, 没有明显的偏倚。

提供临床借鉴的价值: 体外实验后还将进行动物体内实验, 评价该人工骨的安全性及有效性, 以后有可能可进行临床实验, 如这种新型的基因增强的组织工程化骨的研制成功将为广大骨不连及骨缺损患者带来福音。