

携带人骨形态发生蛋白2可诱导慢病毒载体转染人脐带间充质干细胞的成骨★

张 镇¹, 田少奇¹, 张才龙¹, 孙 康¹, 张积华², 隋爱华³, 周 明¹, 冯学涛¹

In vitro osteogenic effects of the Tet-On lentiviral vectors carrying human bone morphologic protein 2 transfected human umbilical cord mesenchymal stem cells

Zhang Zhen¹, Tian Shao-qi¹, Zhang Cai-long¹, Sun Kang¹, Zhang Ji-hua², Sui Ai-hua³, Zhou Ming¹, Feng Xue-tao

Abstract

BACKGROUND: In addition to the advantages of conventional lentiviral vectors, Tet-On lentiviral vectors can regulate the expression of target gene by doxycycline or similar analogue because of insertion of trans-acting factors.

OBJECTIVE: To investigate the effects of Tet-On lentiviral vectors carrying human bone morphologic protein 2 on transfection and osteogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUMSCs).

METHODS: The cultured passage 3 hUMSCs were divided into four groups. In the hUMSC + doxycycline group, cells were stably transfected with Tet-On lentiviral vectors carrying human bone morphologic protein 2 and 10 mg/L doxycycline was added. In the hUMSC group, cells were treated the same as the hUMSC + doxycycline group, with the exception of addition of doxycycline. In the empty virus group, cells were transfected by green fluorescence protein. In the blank control group, cells were not treated.

RESULTS AND CONCLUSION: Human bone morphologic protein 2 expression was significantly higher in the hUMSC + doxycycline group than that in the hUMSC group ($P < 0.05$). Human bone morphologic protein 2 expression was not detected in the empty virus and blank control groups. Alkaline phosphatase staining results showed that a large number of red or brown granules appeared in the cytoplasm in the hUMSC+ doxycycline group, and there were a few red or brown granules in the cytoplasm in the hUMSC group. Alkaline phosphatase activity was significantly higher in the hUMSC+ doxycycline group than in the hUMSC group ($P < 0.05$). Such red or brown granules were not observed in the empty virus and blank control groups. Tubercles developed in the hUMSC + doxycycline group and hUMSC group. The tubercles were more and larger in the hUMSC + doxycycline group compared with the hUMSC group. Tubercles were not observed in the empty virus and blank control groups. These findings suggest that Tet-On lentiviral vectors carrying human bone morphologic protein 2 can stably transfect human umbilical cord mesenchymal stem cells and significantly increase cellular osteogenic capability.

¹Department of Joint Surgery, ²Regular Physical Examination Center, ³Central Laboratory, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Zhang Zhen, Studying for master's degree, Physician, Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China
cj198426@163.com

Received: 2012-01-07
Accepted: 2012-02-28

Zhang Z, Tian SQ, Zhang CL, Sun K, Zhang JH, Sui AH, Zhou M, Feng XT. In vitro osteogenic effects of the Tet-On lentiviral vectors carrying human bone morphologic protein 2 transfected human umbilical cord mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2545-2549. [http://www.crtor.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: tet-on 慢病毒载体除了具有传统慢病毒载体的优点外,因载入一个反向反式激活因子,可通过强力霉素或其类似物对目的基因的表达进行调控。

目的: 观察携带骨形态发生蛋白2的 tet-on 慢病毒载体对人脐带间充质干细胞转染表达及稳定转染后成骨的影响。

方法: 取第3代人脐带间充质干细胞分组培养:实验组稳定转染携带骨形态发生蛋白2的 tet-on 慢病毒载体,并加入10 mg/L 强力霉素;未加强力霉素组:同实验组但不加强力霉素;空病毒组转染携带绿色荧光蛋白的慢病毒载体;空白对照组未进行任何处理。

结果与结论: ①骨形态发生蛋白2表达:实验组、未加强力霉素组均有表达,且实验组表达量高于未加强力霉素组($P < 0.05$);空病毒组、空白对照组未见表达。②碱性磷酸酶染色:实验组可见细胞胞浆中出现大量红色或红棕色颗粒,未加强力霉素组可见少量红色颗粒,实验组碱性磷酸酶活性高于未加强力霉素组($P < 0.05$);空病毒组、空白对照组未见明显红色颗粒。

③茜素红染色:实验组、未加强力霉素组均可见钙结节形成,实验组较未加强力霉素组矿化结节数量多,面积更大;空病毒组、空白对照组未见明显矿化结节形成。表明携带骨形态发生蛋白2的慢病毒载体可稳定转染人脐带间充质干细胞,显著增强其成骨能力。

关键词: 可诱导慢病毒;人脐带间充质干细胞;骨形态发生蛋白2; tet-on 系统;强力霉素;骨生成

缩略语注释: HUCMSCs: human umbilical cord mesenchymal stem cells, 人脐带间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.015

张镇, 田少奇, 张才龙, 孙康, 张积华, 隋爱华, 周明, 冯学涛. 携带人骨形态发生蛋白2可诱导慢病毒载体转染人脐带间充质干细胞的成骨[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2545-2549. [http://www.crtor.org http://cn.zglckf.com]

青岛大学医学院附属医院, ¹关节外科, ²体检中心, ³中心实验室, 山东省青岛市 266000

张镇★,男,1984年生,山东省潍坊市人,汉族,青岛大学在读硕士,医师,主要从事骨关节损伤研究。
cj198426@163.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:1673-8225 (2012)14-02545-05

收稿日期:2012-01-07
修回日期:2012-02-28
(20120107007/GW-S)

0 引言

临床骨缺损、骨坏死目前尚缺乏非常有效的治疗手段。近年来,随着干细胞和转基因技术的不断发展,基因治疗骨缺损和骨不连已成为一种新兴的、并具有广阔应用前景的治疗手段^[1]。本

实验所研究的tet-on慢病毒载体除了具有传统慢病毒载体的优点外,因载入一个反向反式激活因子,可通过强力霉素或其类似物对目的基因的表达进行调控^[2-3]。

间充质干细胞因其良好的多向分化潜能,已被越来越广泛地应用于实验研究和临床治疗^[4-6]。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord

mesenchymal stem cells, HUCMSCs)作为一种新型的种子细胞, 具有免疫原性低、增殖能力强、取材方便、来源广泛等优点, 应用前景广阔^[7-9]。本实验主要观察携带骨形态发生蛋白2的tet-on慢病毒载体对HUCMSCs的体外成骨能力的影响。

1 材料和方法

设计: 多因素对照细胞学实验。

时间及地点: 于2011-04/10在青岛大学医学院附属医院完成。

材料:

脐带组织: 脐带取自青岛大学医学院附属医院妇产科健康剖宫产产妇, 经产妇及家属授权同意。

主要试剂、仪器:

试剂及仪器	来源
携带骨形态发生蛋白 2 的 tet-on 慢病毒载体和携带绿色荧光蛋白的慢病毒载体	前期实验构建获得 ^[2]
H-DMEM 培养基	HyClone 公司, 美国
0.25%胰蛋白酶	武汉华美生物公司
PBS、FBS	GIBCO 公司, 美国
强力霉素、嘌呤霉素、G418、聚凝胺、碱性磷酸酶定量检测试剂盒	Sigma 公司, 美国
ELISA 试剂盒	BD 公司, 美国
RT-PCR 试剂盒	Takara 公司, 日本
琼脂糖凝胶回收试剂盒	北京天根生化科技有限公司
碱性磷酸酶染色试剂盒	南京建成生物公司
PCR 仪	Bio-Rad 公司, 美国
电泳仪与电泳槽	北京六一仪器厂
恒温培养箱	东方电热干燥设备厂
超净台	AIRTech 公司, 日本
恒温水浴锅	深信实验仪器有限公司
J-30I 高速离心机	Beckman 公司, 美国
倒置荧光显微镜	Olympus 公司, 日本

方法:

HUCMSCs分离及培养^[7-9]: 于无菌玻璃皿中用解剖刀将脐带分割成1 cm长的小段, 用剪刀将脐静脉和脐动脉剖开, 剔除血凝块, 用PBS反复冲洗洗净残血。将1段处理干净的脐带片段转移到无菌平皿中, 用眼科剪剪碎成为1.0~2.0 mm³的组织块, 不时添加少量的PBS保持湿润。用宽口移液管将组织块铺到培养瓶中, 组织块间隔0.5 cm, 总共铺大约30粒组织块, 加入5 mL含体积分数20%血清的培养基, 将培养瓶倒置放于培养箱中, 每隔2 h翻转培养瓶浸润一次组织块, 仍然倒置培养, 12 h后, 组织块贴壁变牢, 正置培养瓶进行培养。细胞开始从组织块中爬出后, 更换普通生长培养基, 每二三天换液1次, 继续培养细胞。

HUCMSCs表型鉴定: 以0.05%胰蛋白酶消化收集第3代HUCMSCs, 用PBS洗涤2次, 分装成每管含5×10⁵个细胞, 分别加入小鼠抗人PE 或FITC 标记的单抗CD34、CD44、CD45、CD 73、CD105、HLA-DR及同型对照10 μL, 4 ℃避光孵育30 min, PBS洗涤后用10 g/L多聚甲醛重悬, 流式细胞仪分析。

实验分组: 取第3代HUCMSCs, 根据实验要求分为4组: 实验组稳定转染HUCMSCs+强力霉素(10 mg/L), 未加强力霉素组稳定转染HUCMSCs, 空病毒组转染携带绿色荧光蛋白慢病毒载体的HUCMSCs, 空白对照组未进行任何处理。

慢病毒转染HUMSCs: 用制备好的pLV/EXP2-Neo-TRE-hBMP-2和pLV/EXP2-Puro- EF1A-rtTA 共同转染HUMSCs。转染前1 d按1×10⁵/孔将第3代HUMSCs接种到6孔板上; 转染当天细胞融合达30%~50%后, 去除培养液, 加入含pLV/EXP2-Neo-TRE-hBMP-2和pLV/EXP2-Puro-EF1A-rtTA的无血清培养基, 转染复数为8, 同时加入聚凝胺促进转染, 使其终浓度为2 mg/L, 于37 ℃、体积分数5% CO₂及饱和湿度培养箱培养。转染后8 h去除含有病毒的培养液, 加入新鲜的完全培养液, 于37 ℃、体积分数5%CO₂及饱和湿度培养箱培养。转染后24 h, 加入1 mg/L嘌呤霉素和600 mg/L G418进行筛选。筛选3 d后换液, 将嘌呤霉素和G418质量浓度调整为600 μg/L和300 mg/L; 培养7 d后, 将存活的单克隆消化挑出, 转入培养瓶换完全培养液于37 ℃、体积分数5% CO₂及饱和湿度培养箱培养, 获得稳定转染HUMSCs。以同样方法转染绿色荧光蛋白慢病毒。

半定量RT-PCR检测: 加入强力霉素培养4 d后, 收集4组细胞检测骨形态发生蛋白2表达, 以β-actin作为内参。骨形态发生蛋白2引物序列为: 上游引物为: 5'-AGT TTA TCA CCT CAG CAG AGC-3', 下游引物为: 5'-CCT GCT TGC ATT CTG ATT CAC-3', 扩增片段为182 bp; 内参GAPDH上游引物为: 5'-AACA GCCTCAA GA TCA T CA GCAA-3', 下游引物为5'-GACTGTGGTCA TGA GTCCTTCCA-3', 扩增片段为150 bp。用Trizol试剂提取4组细胞总RNA, 进行RT-PCR反应, 反应条件: 94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 72 ℃ 10 min, 30个循环。各取4 μL扩增后产物行2%琼脂糖凝胶电泳, Gel-Pro Analyzer 4凝胶定量分析软件测定平均灰度值, 目的基因与内参GAPDH灰度值的比值为mRNA表达的水平。

碱性磷酸酶染色: 将4组细胞分别按8×10⁴/孔密度接种至6孔板, 培养基加入VitC 50 mg/L, 3 d换液1次, 于培养12 d时, 按碱性磷酸酶试剂盒说明进行染色。

碱性磷酸酶活性定量检测: 将4组细胞分别按3×10³/孔密度接种至24孔板, 分别于3, 6, 9, 12, 15 d吸出

培养液, 用Tris缓冲盐溶液冲洗3次, 每孔加入0.5 mL 50 mmol/L的Tris, 用细胞刮将细胞刮出, 放于-20 °C冰箱中备测。检测时, 室温下解冻, 超声裂解, 使用碱性磷酸酶定量检测试剂盒检测裂解液中碱性磷酸酶活性。不同时间各组的样本数均为5。

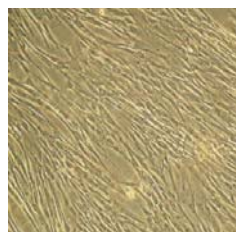
茜素红染色: 将4组细胞分别按 8×10^4 /孔密度接种至6孔板, 培养基加入VitC 50 mg/L, 3 d换液1次, 于培养21 d时, 进行茜素红染色。

主要观察指标: 各组细胞骨形态发生蛋白2表达及碱性磷酸酶、茜素红染色结果。

统计学分析: 采用SPSS 18.0统计软件包进行分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

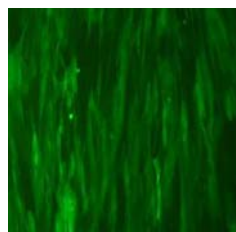
2.1 HUMSCs的形态学观察 原代培养3 d后可见细胞从组织块周围爬出, 细胞呈梭形或不规则形, 7 d时爬出细胞增多, 12 d时细胞融合度接近100%, 传代换液。传至3代时可见细胞呈长梭形, 呈集落状生长, 见图1a。获得稳定转染后, 细胞形态未见明显改变, 仍为长梭形, 见图1b, c。



a: hUMSCs at passage 3 (optical microscope)



b: hUMSCs at 4 d after transfection (optical microscope)



c: hUMSCs at 4 d after transfection (fluorescence microscope)

Figure 1 Morphological observation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUMSCs, $\times 100$)

图1 人脐带间充质干细胞的形态学观察($\times 100$)

2.2 HUCMSCs的表型鉴定 流式细胞仪检测示分离得到的HUCMSCs不表达造血细胞表面标记CD45、CD34和HLA-DR, 而表达间充质干细胞表面标记CD44、CD105 和CD73, 见图2。

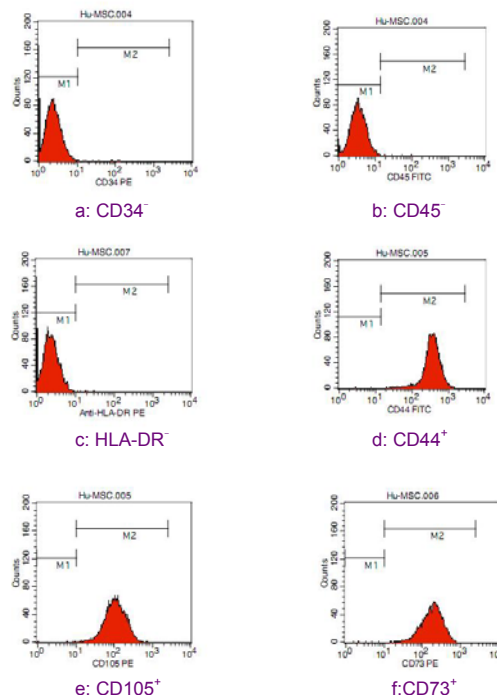
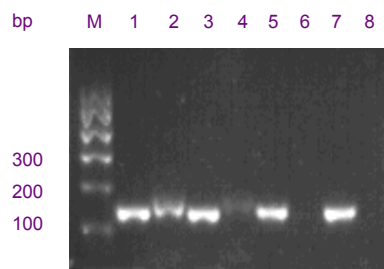


Figure 2 Phenotype characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells by flow cytometry
图2 流式细胞仪鉴定人脐带间充质干细胞表型特征

2.3 半定量RT-PCR检测各组细胞骨形态发生蛋白表达 可见实验组、未加强力霉素组均有骨形态发生蛋白2表达, 分别为 0.625 ± 0.060 , 0.120 ± 0.038 ; 空病毒组、空白对照组未见表达, 见图3, 其中实验组骨形态发生蛋白2表达量明显高于未加强力霉素组($P < 0.05$)。

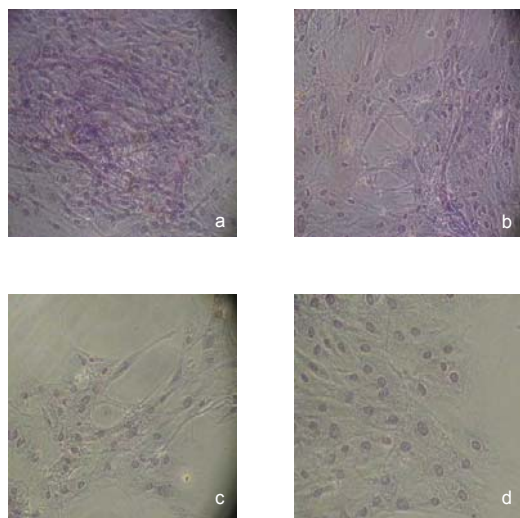


M: Marker; 1, 3, 5, 7 indicates internal reference in the hUMSC + doxycycline group, hUMSC group, empty virus group and blank control group, respectively; 2, 4, 6, 8 indicates target gene in the hUMSC + doxycycline group, hUMSC group, empty virus group and blank control group, respectively (hBMP-2:182 bp, GAPDH:150 bp)

Figure 3 Semi-quantitative RT-PCR detection of bone morphogenetic protein 2

图3 半定量RT-PCR 检测各组细胞目的基因骨形态发生蛋白2的表达

2.4 各组细胞碱性磷酸酶染色 实验组细胞胞浆中可见大量红色或红棕色颗粒, 见图4a, 未加强力霉素组可见少量红色颗粒, 见图4b, 空病毒组、空白对照组未见明显红色颗粒, 见图4c, d。



a-d: hUMSC + doxycycline group, hUMSC group, empty virus group and blank control group

Figure 4 Alkaline phosphatase staining of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUMSCs) in each group (inverted microscope, $\times 100$)
图4 各组人脐带间充质干细胞碱性磷酸酶染色(倒置显微镜, $\times 100$)

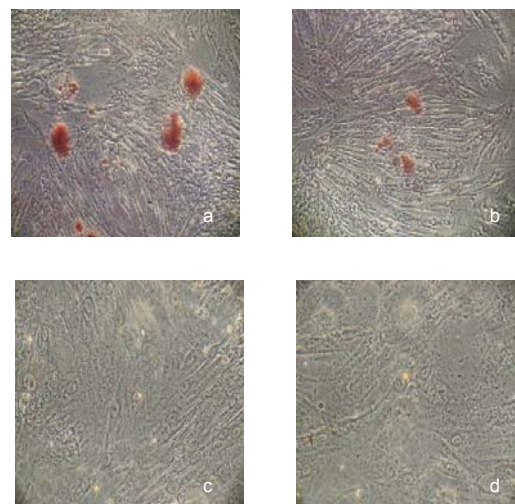
2.5 各组细胞碱性磷酸酶活性定量检测 实验组各时间点碱性磷酸酶活性均高于其他3组($P < 0.05$), 未加强力霉素组各时间点碱性磷酸酶活性高于空病毒组、空白对照组($P < 0.05$), 空病毒组和空白对照组之间无明显差异。各组均在12 d时碱性磷酸酶活性最高, 见表1。

表1 种板后不同时间点各组细胞碱性磷酸酶活性比较
Table 1 Alkaline phosphatase activity at different time points after implantation ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, $\mu\text{kat/L}$)

Time (d)	hUMSC + doxycycline	hUMSC	Empty virus	Blank control
3	51.84 $\pm$ 1.50 ^a	30.01 $\pm$ 2.00	20.50 $\pm$ 0.83	19.67 $\pm$ 1.33
6	80.52 $\pm$ 2.00 ^a	43.68 $\pm$ 1.67	31.17 $\pm$ 1.50	32.01 $\pm$ 0.83
9	147.86 $\pm$ 13.50 ^a	77.01 $\pm$ 9.84	46.18 $\pm$ 5.17	47.51 $\pm$ 6.67
12	243.72 $\pm$ 21.84 ^a	143.70 $\pm$ 11.67	75.35 $\pm$ 10.50	80.68 $\pm$ 12.50
15	214.71 $\pm$ 17.00 ^a	127.53 $\pm$ 18.50	64.85 $\pm$ 12.00	63.68 $\pm$ 14.34

^a $P < 0.05$, vs. the other three groups; hUMSC: human umbilical cord mesenchymal stem cells

2.6 各组细胞茜素红染色 实验组、未加强力霉素组均可见钙结节形成, 空病毒组、空白对照组未见明显矿化结节形成。实验组较未加强力霉素组矿化结节数量多, 面积更大, 见图5。



a-d: hUMSC + doxycycline group, hUMSC group, empty virus group and blank control group

Figure 5 Alizarin red staining of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUMSCs) in each group (inverted microscope, $\times 100$)
图5 各组人脐带间充质干细胞茜素红染色(倒置显微镜, $\times 100$)

3 讨论

近年来, 随着基因工程和干细胞技术的发展, 骨缺损和骨坏死等疾病骨形态发生蛋白等细胞因子的转基因治疗已成为众多学者研究的热点^[10-11]。这种内源性骨形态发生蛋白表达系统, 从根本上解决了外源性骨形态发生蛋白生物半衰期短、价格高、诱导成骨效应弱等缺点^[12]。人骨形态发生蛋白2被认为是对骨缺损修复和骨折愈合效果最为确切的成骨因子。有研究表明骨形态发生蛋白2 不仅具有良好的骨诱导活性, 同时也能上调成骨细胞中VEGF的表达, 具有显著的促血管生成作用。国内也有实验表明, 骨形态发生蛋白2基因转染可上调血管内皮生长因子的表达, 在异位能较快速诱导毛细血管长入移植骨内部, 加速新骨形成^[13-17]。

慢病毒作为一种新型的基因转染系统, 具有转染效率高、免疫原性低、可转染不分裂细胞和携带基因片段大等优点, 已越来越广泛地应用于基础和临床研究。但传统的慢病毒载体其基因表达具有不可控性, 不便于实验研究和临床治疗。本文所研究的tet-on慢病毒表达系统为解决这一问题提供了可能。该系统是四环素调控表达系统的一种, 是继Gossen等^[18]于1992年提出tet-off系统后开发出来的互补系统, tet-on系统由tet反应性元件(tetracycline responsive element, TRE)和1个融合的转录活化因子(reverse tetcontrolled transcriptional activator, RTTA)组成。RTTA必须与四环素衍生物DOX结合才能作为顺式作用元件作用于pTRE载体上的四环

素反应元件TRE,从而以剂量依赖关系启动目的基因的转录,在没有四环素或DOX情况下则没有目的基因的转录^[19-20]。本实验中未加强力霉素组有微量骨形态发生蛋白2表达,可能与该系统在无强力霉素诱导时仍有一定基础表达量有关。

2003年, Covas等^[21]首次提出在脐带组织中可能存在间充质干细胞。研究证明, HUCMSCs作为一种新型种子细胞,可很好地进行体外扩增并定向分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等,并且具有有免疫原性低、增殖能力强、取材方便、来源广泛等优点。本文对HUCMSCs在骨形态发生蛋白2诱导后的成骨能力进行了系统研究,可见HUCMSCs在骨形态发生蛋白2诱导后,其成骨特异性指标碱性磷酸酶活性呈高表达,成骨特异性染色碱性磷酸酶染色和茜素红染色均呈阳性,表明HUCMSCs具有良好的成骨能力。

综上所述,本实验中携带骨形态发生蛋白2的tet-on慢病毒载体成功转染HUCMSCs,并可获得稳定转染人UCMSCs,在强力霉素诱导后骨形态发生蛋白2表达量显著升高,成骨能力显著增强,为进一步研究骨形态发生蛋白2诱导人UCMSCs成骨分化治疗骨坏死和骨缺损奠定实验基础。

致谢: 感谢青医附院关节外科和中心实验室各位老师的支持。

4 参考文献

- [1] Franceschi RT. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. J Dent Res. 2005;84:1093-1103.
- [2] Zhou M, Shi XY, Tian SQ, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue. 2011;25(8):482-487.
周明,石新艳,田少奇,等.可诱导表达hBMP-2的慢病毒载体构建及其在人脐带间充质干细胞中的表达[J].中国修复重建外科杂志,2011,25(8):482-487.
- [3] Qian DY, Bai B, Liu Q, et al. Zhonghua Shengwu Yixue Gongcheng Zazhi. 2009;15(8):277-281.
钱东阳,白波,刘琦,等. Tet-On系统调控的人骨形态发生蛋白2基因的表达[J].中华生物医学工程杂志,2009,15(8):277-281.
- [4] Wang TH, Lee YS, Hwang SM. Transcriptome analysis of commongene expression in human mesenchymal stem cells derived from four different origins. Methods Mol Biol. 2011; 698: 405-417.
- [5] Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. Stem Cells Dev. 2010;19(10):1449-1470.
- [6] Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. Cytotherapy. 2008;10(4): 320-330.
- [7] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells. 2007;25(6):1384-1392.
- [8] Yoo KH, Jang IK, Lee MW, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cell Immunol. 2009;259(2):150-156.
- [9] Wang LM, Tran I, Kiran S, et al. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2009;15(8):2259-2266.

- [10] Baltser AW, Lattermann C, Whalen JD, et al. Gene enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by Adenoviral transfer of the BMP-2 gene. Gene Ther. 2000;7:734-739.
- [11] Musgraves DS, Fu FH, Huard J. Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery. J Am Acad Orthop Surg. 2002; 10:6-15.
- [12] Liberman JR, Daluiskia A, Stevenson S, et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2 producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defect in rats. J Bone Joint Surg (Am). 1999;81:905-917.
- [13] Alden TD, Varady P, Kallmes DF, et al. Bone morphogenetic protein gene therapy. Spine (Phila Pa 1976). 2002;27(16 Suppl 1): S87-93.
- [14] 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.
- [15] Yue B, Chen YF, Tang TT, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue. 2006;20(1): 53-57.
岳冰,陈燕飞,汤亭亭,等.骨形成蛋白2基因修饰的老年大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的研究[J].中国修复重建外科杂志,2006,20(1): 53-57.
- [16] Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology. 2002;143(4):1545-1553.
- [17] Li JJ, Wang WJ, Han D, et al. Zhonghua Chuangshang Zazhi. 2004; 20(6): 347-350.
李建军,王文军,韩冬,等. 转染骨形态发生蛋白-2 基因的人骨髓间充质干细胞复合异种骨支架异位成骨的效果[J].中华创伤杂志,2004,20(6): 347-350.
- [18] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89: 5547-5551.
- [19] Zalaba M, Wang L, Hernandez-Alcoceba R, et al. Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors. Cancer Res. 2004;64(8): 2799-2804.
- [20] Aurisicchio L, Bujard H, Hillen W, et al. Regulated and prolonged expression of mIFN(alpha) in immunocompetent mice mediated by a helper-dependent adenovirus vector. Gene Ther. 2001;8(24): 1817-1825.
- [21] Covas DT, Siufi JL, Silva AR, et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz J Med Biol Res. 2003;36(9): 1179-1183.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 张镇、田少奇进行实验设计,实验实施为张镇、冯学涛、周明,实验评估为孙康、张才龙,资料收集为张积华、隋爱华,张镇成文,田少奇审核,孙康对文章负责。

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: 人脐带来自于健康产妇,产妇及其家属对实验知情同意,并且实验已获得医院伦理委员会批准。

文章概要:

文章要点: 观察携带骨形态发生蛋白2的tet-on慢病毒载体对人脐带间充质干细胞的转染表达及稳定转染后成骨的影响。

关键信息: 脐带间充质干细胞为一种新型种子细胞,应用前景广阔。

研究的创新之处与不足: 可诱导慢病毒转染靶细胞之后其基因表达具有可控性等优点,但尚需进一步开展动物实验及相关临床实验等方面的研究。