腺病毒介导的骨形态发生蛋白基因增强在骨组织工程中的应用*

潘 乐[1]，康建敏[2]

Application of adenovirus mediated bone morphogenetic protein gene enhanced tissue engineering in bone tissue engineering

Pan Le[1], Kang Jian-min[2]

Abstract

BACKGROUND: The vector tool is needed when the target gene transduces into target cells, the vector can help the gene transduces into the cells and promote the protein expression. Vector selection is the key of the gene transduction.

OBJECTIVE: To review research progress of the application of adenovirus medicated bone morphogenetic protein gene enhanced tissue engineering in osteogenic induction and repair of bone defects.

METHODS: A computer-based search was performed on the PubMed database and CNKI database from January 1989 to January 2012 for the articles on the osteogenic induction of adenovirus medicated bone morphogenetic protein gene transfection and the articles on bone morphogenetic protein gene modified tissue engineered bone repair the bone defects. The key words were “adenovirus, bone morphogenetic protein, gene transfection, bone tissue engineering” in English and Chinese. The repetitive articles and the articles not in English or Chinese were eliminated, and finally, a total of 24 articles were included to review.

RESULTS AND CONCLUSION: Adenovirus-mediated bone morphogenetic protein gene enhanced tissue engineering transfers the gene encoding with specific function factor to the seed cells using genetic engineering technology, which make the gene to produce the growth factor continuously. Transgenic cells stay on the surface of the stent and release the growth factor slowly, and can promote the proliferation and differentiation of osteoblast precursor cells and induce the directed differentiation of the osteoblast precursor cells in the bone defect area to osteoblasts, in order to repair the bone defects.

Pan L, Kang JM. Application of adenovirus mediated bone morphogenetic protein gene enhanced tissue engineering in bone tissue engineering. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(20): 3797-3800. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

[1]Department of Physical Education, Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, Hebei Province, China; [2]Department of Physical Education, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, Hebei Province, China

Pan Le★, Master, Lecturer, Department of Physical Education, Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, Hebei Province, China
Panl80@126.com

Received: 2011-11-12
Accepted: 2012-02-04

摘要

背景：将目的基因转导到靶细胞中需要载体工具，载体可协助基因进入细胞及表达蛋白，载体的选择是转基因成败的关键。

目的：总结腺病毒介导的骨形态发生蛋白基因增强用于诱导成骨和修复骨缺损的研究现状。

方法：应用计算机检索 PubMed 数据库及中国期刊网全文数据库 1989–01/2012–01 有关腺病毒介导骨形态发生蛋白基因转染的诱导成骨作用，骨形态发生蛋白基因修饰的组织工程化骨修复骨缺损的文章，英文检索词为“adenovirus，bone morphogenetic protein, gene transfection, bone tissue engineering”，中文检索词为“腺病毒，骨形态发生蛋白，基因转染，骨组织工程”。排除重复性及非中英文语种研究，共保留 24 篇文献进行综述。

结果与结论：腺病毒介导的骨形态发生蛋白基因增强的组织工程利用基因工程技术将编码特定功能因子的基因转移到种子细胞上，使其持续产生生长因子。转基因后的细胞停留支架材料表面缓慢释放生长因子，促进成骨前体细胞增殖分化，也可在骨缺损处诱导成骨前体细胞向成骨细胞定向分化，从而修复骨缺损。

关键词：骨形态发生蛋白；腺病毒；基因转染；骨组织工程；综述文献
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.20.042

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

潘乐，康建敏. 腺病毒介导的骨形态发生蛋白基因增强在骨组织工程中的应用[J].中国组织工程研究，2012，16(20): 3797-3800. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肿瘤及创伤等导致的大块骨缺损一直是骨科医生面临的难题之一。随着基因工程的发展，组织工程学与分子生物学有机结合，运用分子生物学的理论和技术，组织诱导因子、种子细胞及生物材料的相互作用，为研制能更有效地恢复、维持或改善病损组织功能的生物替代物即基因修饰组织工程奠定基础。特别是以病毒载体为基础的基因转移技术的应用，为组织工程学中细胞因子的获得提供了一条的新思路。

转化生长因子超家族的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein，BMP)是一组分泌性、疏水性、酸性糖蛋白，能够在体内诱导骨和软骨形成的因子，并在肢体生长、软骨内骨化、骨折早期、软骨修复时表达，对骨骼的胚胎发育和再生修复起重要作用。参与骨骼的生长、发育及创伤的修复。BMP 在骨发生的过程中主要起 3 个作用：促进细胞的趋化、有丝分裂和细胞分化。直接应用 BMP 修复骨缺损有一定局限性，包括具有生物活性的生长因子半衰期短，局部使用后很快降解，难以保持有效的浓度，需反复多次给药或增加使用剂量，效

[1] 石家庄学院体育系，河北省石家庄市 050035; [2] 河北经贸大学体育教学部，河北省石家庄市 050061

潘乐★，男，1980年生，河北省赞皇县人，汉族，2003年河北师范大学体育学院毕业，硕士，讲师，主要从事运动康复、运动训练学的研究。
Panl80@126.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号: 1673-8225(2012)20-03797-04

收稿日期: 2011-11-12
修回日期: 2012-02-04
(20081110005/H · C)

率低；提取或基因重组的生长因子价格昂贵。故使生长因子在局部持续控制释放、高效发挥作用是关键问题。如果能通过基因转染技术，将编码表达这些生长因子的基因导入靶细胞用于治疗，使局部持续高表达相应生长因子而使治疗性蛋白在特定区域持续高表达，达到改善局部微环境使其获得良好生物活性的目的[1]。

将 BMP 基因转导到靶细胞中需要载体工具，载体可协助基因进入细胞及表达蛋白，载体的选择是转基因成败的关键[2-3]。载体分为两类即非病毒载体和病毒载体。非病毒载体常见的有脂质体、质粒等，它们制作简单，化学稳定性好，抗原性低，生物安全性高。但与病毒类载体相比，转染效率明显低、基因表达的水平低，表达持续时间较短[4]，病毒载体转染率较高，常用的有反转录病毒和腺病毒。反转录病毒载体可整合到宿主细胞染色体上，随着靶细胞的增殖，目的基因不断被复制表达。可能会导致肿瘤的发生，而且转染效率低，故不常用于体内模式[5]；腺病毒载体是腺病毒基因重组而成的，没有致癌和致突变的危险，不会引起宿主细胞的损伤或病毒扩散[6]，是目前基因治疗中应用最为广泛的一种病毒载体[7]。

为此，文章以腺病毒载体为主要综述对象，总结其携带 BMP 在骨组织工程中的作用。

1 资料和方法

1.1 **资料来源** 由作者检索 1989-01/2012-01 PubMed 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)及万方数据库(http://www.wanfangdata.com.cn) 。英文检索词为“adenovirus， bone morphogenetic protein, gene transfection, bone tissue engineering”，中文检索词为“腺病毒，骨形态发生蛋白，基因转染，骨组织工程”。

1.2 **纳入标准** ①文章所述内容需涉及腺病毒介导 BMP 基因转染的诱导成骨作用、BMP 基因修饰的组织工程化骨修复骨缺损的研究。②语种为中文或英文。③已发表的文章。

1.3 **排除标准** 重复性研究。

1.4 **数据的提取** 计算机初检得到 50 篇文献，阅读标题和摘要进行初筛，排除因研究目的与本文无关、其他语种及内容重复的研究 26 篇，共保留其中的 24 篇归纳总结。

1.5 **质量评估** 符合纳入标准的 24 篇文献中，文献[1，8-23]探讨了腺病毒介导的 BMP-7，BMP-2，BMP-9 基因增强用于诱导成骨和修复骨缺损现状。

2 结果

2.1 BMP-7 BMP-7 是目前已知 BMP 生长因子家族中诱导成骨能力最强的生长因子之一，它又名成骨蛋白 1，由于获得有活性的 BMP-7 的难度较大，且 BMP-7 半衰期只有 30 min 很容易被体液稀释，应用时需多次反复给药，成本高：这些缺点限制了 BMP-7 的临床应用。基因治疗作为一种新的治疗方法，使用 BMP-7 的基因治疗与植入基因工程重组的 BMP 相比，理论上讲具有能够进行 BMP 持续释放的优点[8]。腺病毒介导的 BMP-7 基因转染的诱导成骨和修复骨缺损的研究进展，见表 1。

表 1 腺病毒介导的骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7，BMP-7)基因转染的诱导成骨作用

研究	携带基因的病毒载体	转染的种子细胞	支架材料	研究结论
程雷(2006年)[8]	腺病毒	大鼠骨髓间充质干细胞	纳米羟基磷灰石/胶原复合材料	骨髓基质干细胞通过腺病毒介导BMP-7基因转染后，可产生充足的BMP-7蛋白，骨髓间充质干细胞在BMP-7蛋白的作用下转化为成骨细胞，成骨细胞和纳米羟基磷灰石/胶原复合材料互相的作用诱导了脊柱的融合，这种骨诱导的能力非常强
许国华(2006年)[9]	腺病毒	胎盘源性成骨细胞	纳米磷酸钙生物玻璃复合骨支架	构建的转Ad-hBMP7基因组织工程化纳米人工骨无急性毒性反应和溶血反应，动物实验中成功的修复了大段承重部位的骨缺损。证明构建的转基因纳米人工骨具有良好的骨替代作用
鱼兵(2005年)[10]	腺病毒	兔骨髓间充质干细胞	聚乳酸-羟基乙酸支架	骨髓基质干细胞经BMP-7基因修饰后，体外能向成骨细胞作定向分化，与聚乳酸-羟基乙酸复合后可用于制备组织工程化骨，并且在体内修复骨缺损效果良好
马三成(2005年)[11]	腺病毒	兔骨髓间充质干细胞	纳米级羟基磷灰石/聚酰胺支架	通过腺病毒介导，体外成功地将大鼠BMP-7转染至兔骨髓间充质干细胞，无免疫排斥反应；为异种间基因移植提供了一定实验依据。BMP-7-骨髓间充质干细胞复合纳米级羟基磷灰石/聚酰胺支架在动物体内能早期诱导大量新骨生成，新骨形成量明显多于未采用基因技术组
康焱，等(2007年)[12]	基因重组35型腺病毒	大鼠脂肪源性干细胞		基因重组35型腺病毒介导hBMP-7基因可促进脂肪源性干细胞向成骨细胞定向分化

2.2 BMP-2 BMP-2是BMPs家族的一员，在体外和体内实验中证明有诱导成骨、促进骨修复的作用。BMP-2在骨生成的过程中具有关键性意义，在刺激间充质细胞的趋化及分化阶段具有诱导成骨的多重效应[13-15]，同时能升高成骨细胞分化标志蛋白如碱性磷酸酶、骨钙素、骨桥蛋白的表达[16-17]，可刺激组织来源不同的各间充质干细胞株分化为骨细胞[18]。腺病毒介导的BMP-2基因转染的诱导成骨和修复骨缺损的研究进展，见表2。

表 2 腺病毒介导的骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2，BMP-2 基因转染的诱导成骨作用

研究	携带基因的病毒载体	转染的种子细胞	支架材料	研究结论
郑培惠(2006年)[7]	重组腺病毒表达载体	大鼠脂肪组织来源干细胞	壳聚糖-磷酸三钙支架材料	以壳聚糖−磷酸三钙支架复合体外Ad-BMP-2基因转染的脂肪组织来源干细胞构建的组织工程化骨有较好的成骨潜能，在裸鼠体内成骨明显。在SD大鼠体内修复颌骨缺损可靠
陈利武(2010年)[18]	腺病毒	兔骨髓基质细胞	纳米羟基磷灰石支架材料	在Adv-hBMP-2/BMCSc 作为组织工程化骨种子细胞参与成骨的同时，合成和分泌具有很强的成骨能力的BMP-2 促进了新生骨组织的形成，增强了骨缺损的修复的能力。Adv-hBMP-2/BMCSc/Nano-HA 复合人工骨具有良好的骨缺损修复能力
于威，等(2008年)[19]a	腺病毒		聚乳酸/聚己内酯生物可降解材料	聚乳酸、聚己内酯协同纤维蛋白凝胶运载BMP-2基因修复节段性骨缺损可达到较好的效果
崔少千(2007年)[20]	重组腺病毒表达载体	兔骨髓间充质干细胞	复合胶原基纳米生物材料	BMP-2基因修饰的骨髓间充质干细胞在体内保持存活并继续表达外源基因，同时促进植入细胞向成骨细胞转化，参与成骨，促进椎间融合
张凤河(2006年)[21]	腺病毒	鼠骨骼肌卫星细胞	胶原支架	绿色荧光蛋白转基因鼠骨骼肌卫星细胞经腺病毒介导的BMP-2基因转染后具有转化成成骨样细胞的能力并具有成骨细胞的特性。Ad-BMP2转染的肌卫星细胞以胶原为支架可以在肌肉内诱导骨组织形成并可以修复骨缺陷
张年春(2004年)[13]	腺病毒	兔肌源性干细胞		AdBMP2转达染的肌源性干细胞与AdAng1转染的肌源性干细胞以4：1混合培养，在体外诱导成骨的效果最好。AdBMP2和AdAng1以不同比例混合肌注在免疫力正常的兔骨骼肌内诱导异位骨形成的效率较低，AdBMP2体外转染肌源性干细胞后肌注能更有效地诱导异位骨形成

a 经 BMP2 腺病毒载体与纤维蛋白凝胶和聚乳酸/聚己内酯处理的人工骨

2.3 BMP-9 BMP-9 是近期发现的研究相对较少的 BMPs 的一种亚型，其具有促进骨形成及软骨形成的作用备受关注[22-23]，并且其是 BMPs 家族中最具潜力的促骨分化生长因子之一，其诱导干细胞成骨的作用甚至强于 BMP-2，BMP-7。与其他 BMPs 相比，BMP-9 介导的骨分化作用不受 BMP-3 的影响，而其他成骨作用明显的 BMP-2，BMP-6，BMP-7 可以被 BMP-3 抑制[1]。有研究通过体外培养羊骨髓间充质干细胞，并利用 BMP-9 基因转染骨髓间充质干细胞，接种于可吸收明胶海绵在体外构建组织工程骨[1]；并将该组织工程骨复合物移植到羊胫骨大段骨缺损处，发现转染了 BMP-9 的骨髓间充质干细胞在可吸收明胶海绵上生长良好，成功构建了 BMP-9 基因修饰的组织工程骨。BMP-9 基因修饰的骨髓间充质干细胞可作为骨组织工程的种子细胞。

3 小结

腺病毒载体被认为是基因治疗中很有前途的重要工具，具有很多优点，如能有效转染增殖和非增殖细胞，蛋白表达水平高，没有插入性突变的危险，无包膜不易被补体灭活等。组织工程和基因工程的有机结合，为解决骨缺损修复问题带来了希望[24]。腺病毒介导的 BMP 基因增强的组织工程是结合组织工程和基因工程两大技术，利用基因工程技术将 BMP 基因转移到种子细胞上，使其持续产生生长因子。支架材料发挥着骨传导的作用，同时为成骨细胞生长、分化提供场所，转基因后的细胞停留支架材料表面缓慢释放生长因子，可促进成骨前体细胞增殖分化，也可促进骨缺损处的可诱导成骨前体细胞向成骨细胞定向分化。

腺病毒介导的 BMP 基因增强的组织工程方法应用于临床运用仍存在许多问题：①试验动物与人的差异性问题。②基因载体问题，病毒运载体尚存在致瘤性、炎性反应的可能。③基因表达调控问题，基因表达产物过少则不能达到理想的效果，过多则可能对机体有害，如何调控基因适时、适量表达仍需要进一步研究[18]。

4 参考文献

[1] 向慧.BMP-9基因转染羊骨髓间充质干细胞的实验研究及其修复同种异体羊大段骨缺损的初步研究[D].重庆:重庆医科大学,2010.
[2] Crane GM,Ishaug SL,Mikos AG,et al.Bone tissue engineering.Nat Med.1995;1(12):1322-1324.
[3] Vacanti CA,Upton J.Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices.Clin Plast Surg. 1994; 21:445-462.
[4] Bruder SP,Kraus KH,Goldberg VM,et al.The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects.J Bone Joint Surg(Am).1998；80(7):985.
[5] Friedlaender GE.Bone grafts.The basic science rationale for clinical applications.J Bone Joint Surg Am.1987;69(5):786-790.
[6] Younger EM.Chapman MW.Morbidity at bone graft donor sites.J Orthop Trauma.1989;3(3):192-195.
[7] 郑培惠.BMP-2基因转染ADSCs复合CTCP成骨及修复颌骨缺损的实验研究[D].济南:山东大学,2006.
[8] 程雷.BMP-7局部基因治疗和组织工程化骨对脊柱融合影响的实验研究[D].济南:山东大学,2006.
[9] 许国华.转Ad-hBMP-7基因组织工程化纳米人工骨的研究[D].上海:第二军医大学,2006.
[10] 鱼兵.腺病毒介导的hBMP-7基因治疗骨缺损的实验研究[D].西安:第四军医大学,2005.
[11] 马三成.BMP7基因修饰的兔骨髓间充质干细胞复合纳米羟基磷灰石/聚酰胺66仿生骨修复兔下颌骨缺损的实验研究[D].成都:四川大学,2005
[12] 康焱,廖威明,袁振华,等.重组35型腺病毒介导人骨形成蛋白基因对脂肪源性干细胞的诱导分化[J].中国修复重建外科杂志,2007,21(2):125-129.
[13] 张年春.重组BMP2和Angiopoietin-1腺病毒诱导肌源性干细胞成骨的实验研究[D].重庆:第三军医大学,2004
[14] Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. Clin Orthop Relat Res. 1998;(355Suppl):S66-72.
[15] Wozney JM, Rosen V.Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone of formation and repair.Clin Orthop Relat Res. 1998;(346):26-37.

[16] Chen D, Harris MA, Rossini G, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3,BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. Calcif Tissue Int. 1997;60(3):283-290.
[17] Hughes FJ, Collyer J, Stanfield M, et al. The effects of bone morphogenetic protein-2,-4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. Endocrinology. 1995;136(6):2671-2677.
[18] 陈利武. 骨形态发生蛋白-2基因修饰的组织工程化骨修复骨缺损的实验研究[D].广州:广州医学院,2010.
[19] 于威,李建军.骨形态发生蛋白2基因复合纤维蛋白凝胶/聚乳酸-聚己内酯双相支架修复节段性骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(14):2761-2764.
[20] 崔少千.BMP-2基因修饰的骨髓基质干细胞复合纳米骨促进兔腰椎融合的实验研究[D].沈阳:中国医科大学,2007.
[21] 张风河,孙树洋,郝轶. GFP转基因鼠肌卫星细胞系的构建及基因介导成骨分化的实验研究[J].组织工程与重建外科杂志,2006,2(4):223-227.
[22] Kverborg M,Flyvbjerg A,Erisn E,et al.Transforming growth factor beta stimulated the production of insulin-like growth factor-l and insulin-like growth factor-binding protein-3 in human bone marrow stromal osteoblast progenitors.Endocrinology.2001,169(3):549-561.
[23] Dojouad F,Plence P,Bony C,et al.Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogneic animals.Blood.2003,102(10):3837-3844.
[24] 胡运生.磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶与基因修饰骨髓间充质干细胞构建组织工程骨的相关研究[D].西安:第四军医大学,2006.

作者贡献：作者进行资料收集、成文及审校，并对文章负责。

利益冲突：本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。

本综述的已知信息：将 BMP 基因转导到靶细胞中需要载体工具，载体可协助基因进入细胞及表达蛋白，载体的选择是转基因成败的关键。

本综述增加的新信息：腺病毒介导的 BMP 基因转染干细胞停留支架材料表面缓慢释放生长因子，可促进成骨前体细胞增殖分化，也可促进骨缺损处的可诱导成骨前体细胞向成骨细胞定向分化。

临床应用的意义：腺病毒介导的 BMP 基因增强的组织工程技术在骨缺损修复方面有一定应用前景。

ISSN 1673-8225 CN 21-1581/R 2012 年版权归《中国组织工程研究》杂志社所有

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of case-control studies

STROBE 声明：病例对照研究报告写作清单①对文题、摘要、引言、方法的写作要求

Ⅰ. Title and abstract 标题和摘要

1 (a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract

用常用术语在标题和摘要和指出研究设计

(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found

在摘要中充分、简洁提供所做和所发现的

Ⅱ. Introduction 引言

Background/rationale 背景和原理

2 Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported

解释其科学背景和研究原理

Objectives 目的

3 State specific objectives, including any prespecified hypotheses

陈述具体目的，包括任何预先设定的假设

Ⅲ. Methods 方法

Study design 研究设计

4 Present key elements of study design early in the paper

陈述论文研究设计主要因素

Setting 环境

5 Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection

描述环境，地点和日期，包括收集，暴露，随访和数据收集周期

Participants 参加者

6 (a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up

列出参加者选择的标准，来源和方法。描述随访方法

(b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed

配对研究给出配对标准，以及暴露和非暴露数字

Variables 变量

7 Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable

清晰的列出所有成果，暴露，预测，潜在的混杂因素，效果控制。如果适用，给出诊断原理

Data sources / measurement 数据源和测量

8 For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group

对每个研究变量给出详细的测定方法。若超过一个组，描述组间的测定方法可比性

Bias 偏差

9 Describe any efforts to address potential sources of bias

描述任何在测定过程中可能产生偏差的原因

Study size 研究规模

10 Explain how the study size was arrived at

解释如何达到研究规模

Quantitative variables 定量变量

11 Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why

解释在分析中定量变量如何掌控。如果适用，描述选择的组别并阐述原因

Statistical methods 统计方法

12 (a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding

描述所有统计方法，包括用来控制混杂因素的方法

(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions

描述检查亚组及相互作用的方法

(c) Explain how missing data were addressed

解释如何处理失访材料

(d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed

如果适用，解释如何处理随访丢失

(e) Describe any sensitivity analyses

描述任何敏感性分析

(资料来源于 Google 的检索和整理)