

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.14.003 [http://www.crter.org]

尹承慧, 邱俊钦, 曾昭勋, 陈宗雄. 腺病毒介导的人骨形态发生蛋白2基因转染骨髓间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(14):2488-2494.

## 腺病毒介导的人骨形态发生蛋白2基因转染骨髓间充质干细胞\*☆

尹承慧, 邱俊钦, 曾昭勋, 陈宗雄

解放军南京军区福州总医院骨科, 福建省福州市 350025

### 文章亮点:

- 1 实验采用密度梯度离心结合贴壁细胞筛选法, 进行细胞的分离筛选, 随着传代次数的增加, 得到高纯度的骨髓间充质干细胞。
- 2 联合应用细胞形态观察、流式细胞仪检测细胞表面标志物及多向诱导分化对所获细胞进行鉴定, 验证了实验所得细胞为骨髓间充质干细胞。
- 3 通过重组腺病毒载体系统自带报基因增强型绿色荧光蛋白, 直接观察转染情况。
- 4 实验验证了重组腺病毒载体为基因载体将目的基因人骨形态发生蛋白2插入骨髓间充质干细胞基因组中, 转染后的骨髓间充质干细胞可成功表达人骨形态发生蛋白2及碱性磷酸酶。

### 关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 腺病毒载体; 人骨形态发生蛋白2; 骨髓间充质干细胞; 基因转染; 大鼠; 碱性磷酸酶; MTT法; 基因工程技术; 种子细胞; 骨缺损; 省级基金; 干细胞图片文章

### 摘要

**背景:** 骨髓间充质干细胞作为骨、软骨创伤缺损及退变修复的种子细胞越来越受到关注。

**目的:** 分析人骨形态发生蛋白2基因转染对白色封闭群大鼠(SD大鼠)骨髓间充质干细胞的影响。

**方法:** 分离纯化SD大鼠骨髓间充质干细胞并体外扩增, 通过腺病毒载体介导人骨形态发生蛋白2基因转染骨髓间充质干细胞, 分别通过荧光显微镜观察荧光表达情况及蛋白质水平来测定转染后人骨形态发生蛋白2的表达, 碱性磷酸酶定量测定鉴定成骨活性及MTT法评估人骨形态发生蛋白2转染对骨髓间充质干细胞的影响。

**结果与结论:** 从SD大鼠骨髓提取物中分离培养的细胞形态为梭形, 呈铺路石状、漩涡状生长, 经流式细胞仪检测及多项分化能力鉴定符合骨髓间充质干细胞的特征; 经转染人骨形态发生蛋白2基因后, 骨髓间充质干细胞表达人骨形态发生蛋白2、碱性磷酸酶; MTT法检测转染人骨形态发生蛋白2基因后, 骨髓间充质干细胞增殖能力明显增强( $P < 0.05$ )。说明人骨形态发生蛋白2基因转染骨髓间充质干细胞后可以持续、高效表达人骨形态发生蛋白2和碱性磷酸酶, 在体外明显促进骨髓间充质干细胞的增殖。

尹承慧☆, 男, 1971年生, 山东省曲阜市人, 汉族, 2003年解放军第二军医大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事临床骨科方面的研究。

chenghuiyin@hotmail.com

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)14-02488-07

收稿日期: 2012-07-17

修回日期: 2012-08-26

(20120417013/D·S)

## Adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene transfects bone marrow mesenchymal stem cells

Yin Cheng-hui, Qiu Jun-qin, Zeng Zhao-xun, Chen Zong-xiong

Department of Orthopedics, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Bone marrow mesenchymal stem cells as the seed cells for repair of bone and cartilage trauma and degeneration have been paid increasing attention.

Yin Cheng-hui☆, M.D.,  
Associate chief physician,  
Department of Orthopedics,  
Fuzhou General Hospital, PLA  
Nanjing Military Area  
Command, Fuzhou 350025,  
Fujian Province, China  
chenghuiyin@hotmail.com

Supported by: the Youth  
Science and Technology Talent  
Innovation Program of Fujian  
Province, No. 20055075\*

Received: 2012-07-17  
Accepted: 2012-08-26

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of human bone morphogenetic protein 2 gene transfection on Sprague-Dawley rat bone marrow mesenchymal stem cells.

**METHODS:** Sprague-Dawley rat bone marrow mesenchymal stem cells were *in vitro* isolated, purified and amplified. Adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein 2 was transfected into bone marrow mesenchymal stem cells. CD90 and CD45 expression levels were tested by flow cytometry. The successfully packaged virus was transfected into bone marrow mesenchymal stem cells and expression of human bone morphogenetic protein 2 gene was confirmed by enhanced green fluorescent protein expression under the fluorescence microscope. Enzyme linked immunosorbent assay was performed to monitor the expression levels of human bone morphogenetic protein 2 and alkaline phosphatase in mesenchymal stem cells. The effect of human bone morphogenetic protein 2 on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Bone marrow mesenchymal stem cells were successfully harvested from bone marrow of sprague-dawley rats and identified by flow cytometry. After primary culture for 7-10 days, cultured cells displayed typical fusiform shape and the growth status was like "cobblestones" or "whirlpool" under light microscope and could be differentiated into osteoblast-, adipocyte- and neuron-like cells *in vitro*. After transfection by human bone morphogenetic protein 2 gene, bone marrow mesenchymal stem cells expressed human bone morphogenetic protein 2 and alkaline phosphatase. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay showed that after transfection by human bone morphogenetic protein 2 gene, bone marrow mesenchymal stem cells exhibited a stronger proliferation capacity ( $P < 0.05$ ). These findings suggest that human bone morphogenetic protein 2 gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells can successively express high level of human bone morphogenetic protein 2 and alkaline phosphatase, indicating that human bone morphogenetic protein 2 gene can significantly promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells.

**Key Words:** stem cells; bone marrow-derived stem cells; adenovirus vector; human bone morphogenetic protein 2; bone marrow mesenchymal stem cells; gene transfection; rats; alkaline phosphatase; MTT assay; gene engineering; seed cells; bone defects; provincial grants-supported paper; stem cell photographs-containing paper

Yin CH, Qiu JQ, Zeng ZX, Chen ZX. Adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene transfects bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(14):2488-2494.

## 0 引言

骨髓间充质干细胞是存在于骨髓中具有多项分化潜能的一类干细胞<sup>[1]</sup>, 在适宜的微环境下可分化为软骨细胞、成骨细胞、肌细胞、神经细胞等谱系<sup>[2]</sup>, 是组织工程和基因工程理想的种子细胞, 且具有获得容易、增殖迅速、无免疫原性、能稳定表达外源基因、具有多项分化潜能的干细胞, 其作为骨、软骨创伤缺损及退变修复的种子细胞越来越受到关注。骨形态蛋白2是诱导成骨关键物质<sup>[3-4]</sup>, 它参与调节从细胞增殖、种系分化、到细胞死亡等一系列的生物过程。实验通过基因工程技术, 将腺病毒介导的骨形态发生蛋白2基因转染骨髓间充质干细胞, 研究其对间充质干细胞的影响, 为进一步治疗骨缺损的动物实验奠定基础。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞生物学观察实验。

**时间及地点:** 于2010年4月至2011年3月在解放军南京军区福州总院实验室完成, 实验室的生物安全的防护水平为BSL-2, 为省级重点实验室。

**材料:**

**腺病毒载体:** 人骨形态发生蛋白2腺病毒表达载体为邱俊钦、曾昭勋于福州总医院实验室构建、鉴定并提供, 由AdMax腺病毒包装系统(上海沃森生物科技有限公司)包装而成。

**实验动物:** 健康雄性SD大鼠, 24只, 3周龄, 体质量50-80 g, 清洁级, 由解放军南京军区福州总医院动物实验中心提供, 许可证: SYXK-(军)2007-036。常规饲养1周后进入细胞实验。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

**主要试剂及仪器:****Main experimental reagents and instruments:**

| 试剂及仪器   | 来源            |
|---|---------------|
| DMEM/F12 培养基、FBS                                    | Hyclone 公司    |
| 大鼠碱性磷酸酶 Elisa 试剂盒、人骨形态发生蛋白 2 ELISA Kit 试剂盒          | 华美公司          |
| Trizol RNA 试剂盒、qRT-PCR 试剂盒                          | invitrogen 公司 |
| 油红 O 粉剂   | 厦门泰京生物技术有限公司  |
| IX51 型生物倒置显微镜、Q-IMAGING 型显微数码照相系统、SZX2-ILLB 型 荧光显微镜 | Olympus 公司    |
| EPICS XL 型流式细胞仪                                     | Coulter 公司    |
| TDZ5-WS 型医用台式离心机                                    | 长沙平凡仪器仪表有限公司  |

**实验方法:**

**SD大鼠骨髓间充质干细胞培养及鉴定:** 用全骨髓密度梯度离心结合贴壁细胞筛选法分离培养SD大鼠的骨髓间充质干细胞<sup>[5]</sup>, 7-10 d贴壁细胞(原代细胞)基本长满单层后, 按1:3比例进行传代培养, 当传代至第3代细胞时应用, 通过流式细胞仪及多向诱导分化能力进行鉴定。

**腺病毒载体介导人骨形态发生蛋白2基因转染大鼠骨髓间充质干细胞:** 通过不同病毒感染复数值(60, 80, 100, 120)感染大鼠P3的骨髓间充质干细胞, 于病毒转染48-72 h后, 在荧光显微镜及光镜下分别观察绿色荧光蛋白表达情况和细胞生长情况, 选择最优的病毒感染复数(100)进行转染大鼠骨髓间充质干细胞。

**RT-PCR 检测目的基因:** 按 Trizol RNA 试剂盒及 qRT-PCR 试剂盒方法提取目的基因, 经1%琼脂糖电泳鉴定RT-PCR产物。

**酶联免疫吸附实验(ELISA)检测人骨形态发生蛋白2及碱性磷酸酶的表达量:** 设置人骨形态发生蛋白2转染组、空病毒转染组及未转染组, 分别于转染后3, 6, 9, 12 d, 取细胞上清液经碱性磷酸酶 Elisa试剂盒检测。

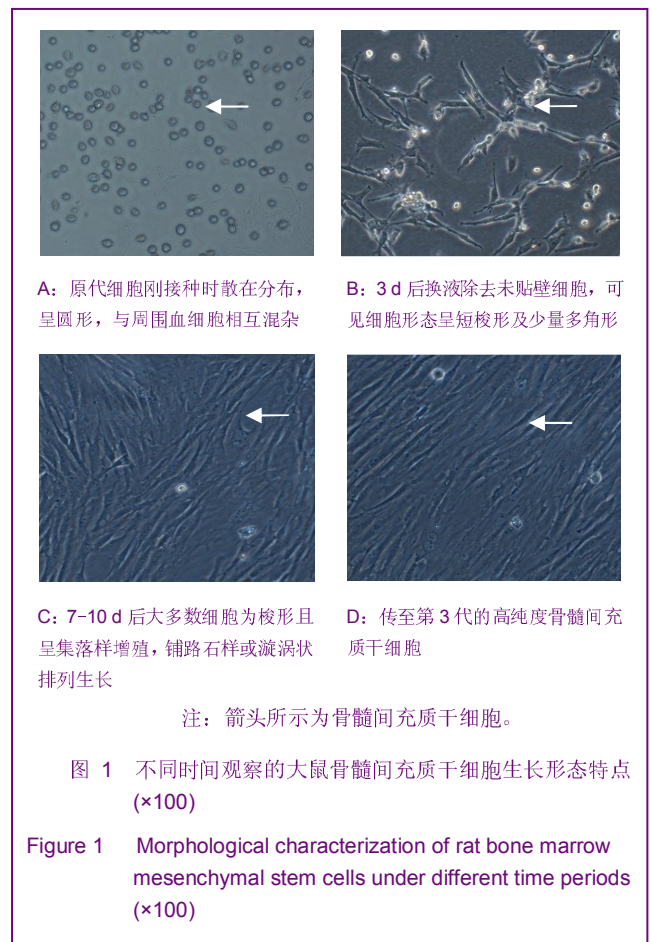
**MTT法检测人骨形态发生蛋白2基因转染对骨髓间充质干细胞的影响:** 设人骨形态发生蛋白2转染组、空病毒转染组及未转染组, 各组分别设6个平行孔, 分别于接种后1-6 d进行MTT检测, 用全自动酶标仪490 nm检测吸光度(A<sub>490</sub>)值, 各实验均重复3次以上, 数据以SPSS 17.0软件处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据比较采用t 检验。

**主要观察指标:** ①大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养和鉴定。②以不同病毒感染复数值转染骨髓间充质干细胞的荧光表达的观察。③RT-PCR鉴定目的基因的。④酶联免疫吸附实验(ELISA)检测人骨形态发生蛋白2的表达及碱性磷酸酶的活性。⑤MTT法检测骨形态发生蛋白2对骨髓间充质干细胞增殖的影响。

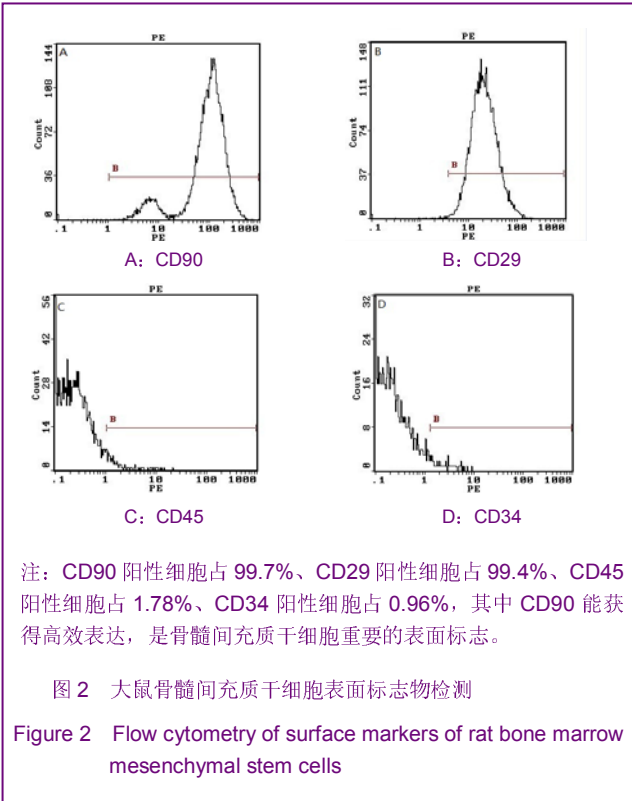
**统计学分析:** 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据间比较采用t 检验, 通过SPSS 17.0统计软件进行处理, 由第二作者完成。应用方差分析比较组间差异, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

**2 结果****2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养和鉴定**

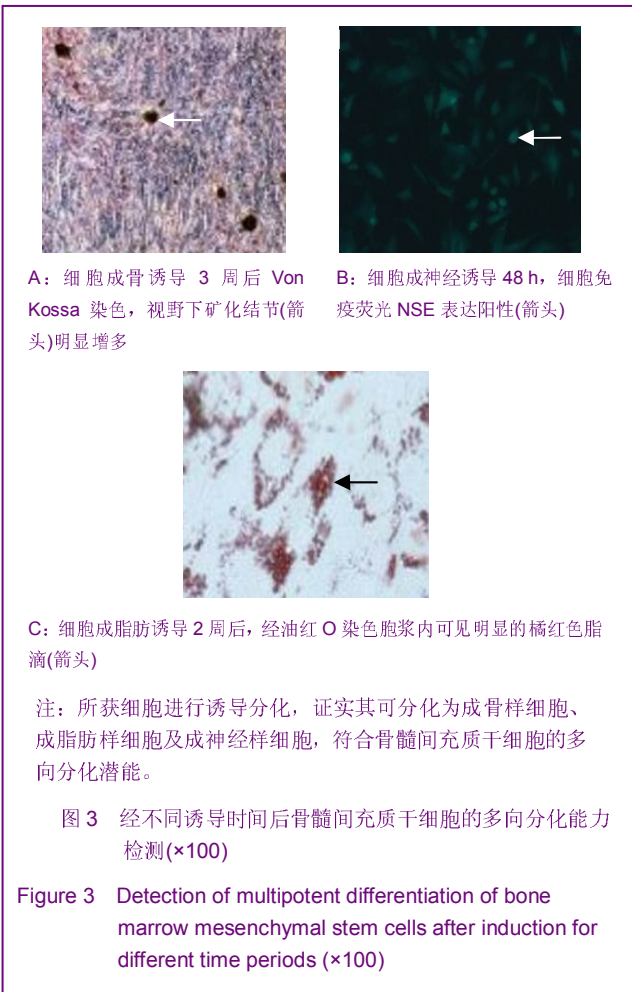
**大鼠骨髓间充质干细胞的细胞形态:** 倒置显微镜下可见原代细胞刚接种时散在分布, 呈圆形, 与周围血细胞相互混杂, 见图1A, 3 d后换液除去未贴壁细胞, 可见细胞形态呈短梭形及少量多角形, 见图1B。7-10 d后大多数细胞为梭形且呈集落样增殖, 铺路石样或漩涡状排列生长, 见图1C。传代后, 随着传代次数的增加, 可得到高纯度的骨髓间充质干细胞, 见图1D。



**流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞的表面标志物:** 流式细胞仪检测P3 骨髓间充质干细胞的表面标志物的结果为: CD90阳性细胞占99.7%, 见图2A; CD29阳性细胞占99.4%, 见图2B; CD45阳性细胞占1.78%, 见图2C; CD34阳性细胞占0.96%, 见图2D。可见通过密度梯度离心分离并贴壁细胞筛选培养可获得高纯度的骨髓间充质干细胞。

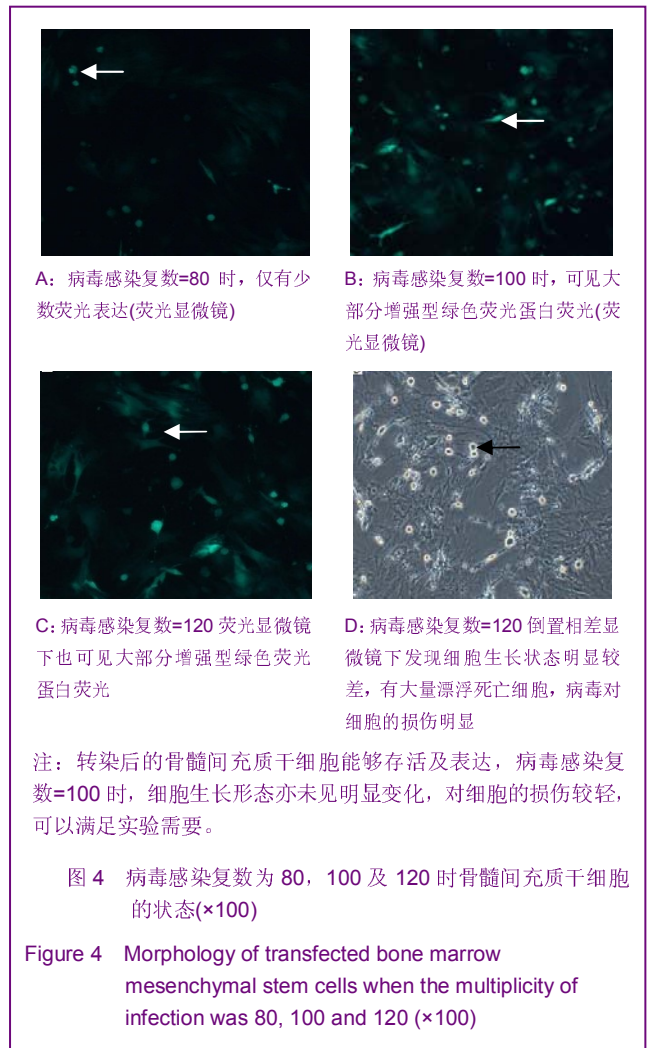


大鼠骨髓间充质干细胞的多向分化能力检测: 见图3。

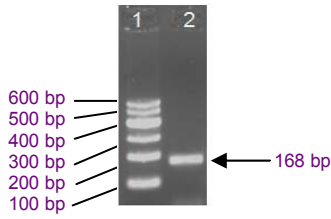


骨髓间充质干细胞成骨诱导3周后Von Kossa染色, 视野下矿化结节明显增多, 见图3A。骨髓间充质干细胞诱导48 h, 细胞免疫荧光NSE表达阳性, 见图3B。骨髓间充质干细胞成脂肪诱导2周后, 经油红O染色胞浆内可见明显的橘红色脂滴, 见图3C。

2.2 以不同病毒感染复数值转染骨髓间充质干细胞的荧光表达情况 分别以不同病毒感染复数转染P3代间充质干细胞, 3 d后观察荧光表达, 可见当病毒感染复数=80时, 少数荧光表达, 见图4A; 当病毒感染复数=100时, 转染速度明显加快, 可见大部分骨髓间充质干细胞表达增强型绿色荧光蛋白荧光, 见图4B; 病毒感染复数=120时, 也可见大部分骨髓间充质干细胞表达增强型绿色荧光蛋白荧光, 见图4C, 但在倒置相差显微镜下观察发现该组细胞生长状态明显较差, 有大量漂浮死亡细胞, 病毒对细胞的损伤明显, 见图4D。



2.3 RT-PCR检测目的基因 GAPDH为168 bp, 1%琼脂糖凝胶电泳于相应位置出现目的条带, 见图5。

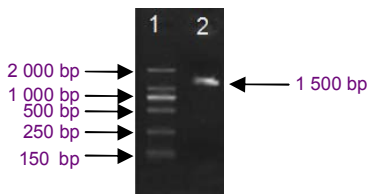


注: 1: 600 bp DNA marker: 600 bp、500 bp、400 bp、300 bp、200 bp、100 bp; 2: GAPDH。

图5 RT-PCR 所得 GAPDH

Figure 5 Electrophoresis analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in reverse transcription-PCR products

取病毒感染复数=100转染细胞72 h后的骨髓间充质干细胞行PT-PCR, 经1%琼脂糖凝胶, 电泳40 min, 凝胶成像仪观察结果如下, 见图6。



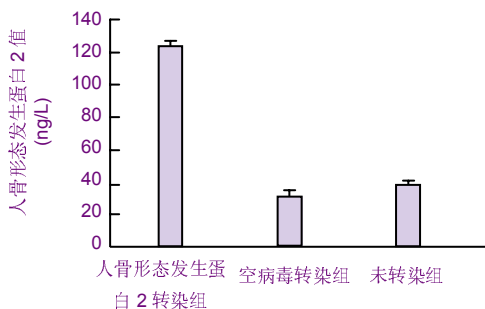
1: 2 kb Mark; 2: 人骨形态发生蛋白2基因。

注: 病毒感染复数=100转染细胞72 h后, 骨髓间充质干细胞高表达人骨形态发生蛋白2基因蛋白。

图6 RT-PCR 所得人骨形态发生蛋白2基因

Figure 6 Electrophoresis analysis of human bone morphogenetic protein 2 in reverse transcription-PCR products

2.4 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测人骨形态发生蛋白2的表达 结果显示各孔均有目的蛋白的分泌, 见图7。



注: 人骨形态发生蛋白2转染组人骨形态发生蛋白2表达明显高于空病毒转染组及未转染组。

图7 ELISA 检测骨髓间充质干细胞转染3 d后人骨形态发生蛋白2蛋白表达

Figure 7 Detection of human bone morphogenetic protein 2 expression in bone marrow mesenchymal stem cells after gene transfection for 3 d by enzyme linked immunosorbent assay

人骨形态发生蛋白2转染组、空病毒转染组及未转染组人骨形态发生蛋白2分别为(123.62±3.12), (32.51±2.83), (38.34±2.76) ng/L, 可见人骨形态发生蛋白2转染组人骨形态发生蛋白2表达明显高于空病毒转染组及未转染组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 空病毒转染组及未转染组之间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

2.5 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测碱性磷酸酶活性 人骨形态发生蛋白2腺病毒表达载体转染组碱性磷酸酶活性明显高于空病毒转染组及未转染组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 空病毒转染组及未转染组之间比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见表1。

表1 细胞经人骨形态发生蛋白2基因转染、空病毒转染后不同时间碱性磷酸酶活性的表达

Table 1 Alkaline phosphatase activity in each group at different time periods ( $\bar{x} \pm s, \times 16.67$  nkat/L)

| 时间   | 人骨形态发生蛋白2转染组              | 空病毒转染组      | 未转染组        |
|------|---------------------------|-------------|-------------|
| 3 d  | 78.68±24.34 <sup>a</sup>  | 25.51±13.00 | 28.01±17.34 |
| 6 d  | 105.69±23.17 <sup>a</sup> | 38.84±11.00 | 34.17±15.34 |
| 9 d  | 115.86±24.00 <sup>a</sup> | 42.00±12.34 | 39.01±18.17 |
| 12 d | 124.02±26.34 <sup>a</sup> | 49.34±13.50 | 56.35±18.34 |

与其他两组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

注: 人骨形态发生蛋白2腺病毒表达载体后碱性磷酸酶活性明显高于空病毒转染组及未转染组, 但空病毒转染组及未转染组之间差异无显著性意义。

2.6 MTT法检测骨形态发生蛋白2对骨髓间充质干细胞增殖的影响 见表2。

表2 骨形态发生蛋白2基因和空病毒转染对骨髓间充质干细胞增殖的影响

Table 2 Effect of human bone morphogenetic protein 2 gene transfection and empty virus transfection on proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells

| 时间  | 人骨形态发生蛋白2转染组       | 空病毒转染组 | 未转染组  |
|-----|--------------------|--------|-------|
| 1 d | 0.136 <sup>a</sup> | 0.122  | 0.124 |
| 2 d | 0.197 <sup>a</sup> | 0.182  | 0.190 |
| 3 d | 0.342 <sup>a</sup> | 0.288  | 0.301 |
| 4 d | 0.465 <sup>a</sup> | 0.386  | 0.398 |
| 5 d | 0.608 <sup>a</sup> | 0.491  | 0.504 |
| 6 d | 0.682 <sup>a</sup> | 0.534  | 0.583 |

与其他两组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

注: 经人骨形态发生蛋白2基因转染后, 骨髓间充质干细胞的增殖能力增强, 明显高于空病毒转染组及未转染组; 但空病毒转染组和未转染组之间无明显差异。

经人骨形态发生蛋白2基因转染后, 骨髓间充质干细胞的增殖能力得到增强, 人骨形态发生蛋白2腺病毒表达载体转染组对骨髓间充质干细胞的增殖能力影响明显高于空病毒转染组及未转染组( $P < 0.05$ ); 空病毒转染组和未转染组比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

**3.1 靶细胞** 骨髓间充质干细胞作为理想的种子细胞, 具有以下生物学特征: 取材方便、易于操作、机体损伤小; 体外易于培养、分离、纯化及增殖、传代能力强; 来自自体, 无须配型, 无抗原性, 具有良好的生物安全性; 具有多向分化能力, 适用于多种组织的修复重建; 更新率低、代谢活力高, 容易通过转基因技术获得目的基因并在体内表达<sup>[6-8]</sup>。骨髓间充质干细胞含量极低, 仅为骨髓单核细胞的0.001%~0.01%<sup>[9]</sup>, 远远达不到研究需求, 但通过原代和传代培养, 其数量成指数扩增。因此通过分离培养, 实现体外扩增, 是其能成功应用的关键。

实验采用密度梯度离心结合贴壁细胞筛选法, 按照细胞贴壁能力弱的原理进行分离筛选, 随着传代次数的增加, 可得到高纯度的骨髓间充质干细胞。但传代次数亦不宜过多, 在经历几次传代培养后骨髓间充质干细胞增殖速度将逐渐减慢。有实验认为骨髓间充质干细胞的体外增殖能力随着年龄增大而逐渐减小, 故应尽量选取幼龄大鼠进行原代提取<sup>[10]</sup>。

实验通过联合应用细胞形态观察、流式细胞仪检测细胞表面标志物及多向诱导分化对所获细胞进行鉴定<sup>[11]</sup>。在显微镜下可观察到细胞呈梭形或纺锥形, 漩涡状或铺路石状生长, 符合骨髓间充质干细胞形态生长特性, 再对所获细胞进行诱导分化, 证实其可分化为成骨样细胞、成脂肪样细胞及成神经样细胞。CD90的高效表达是验证骨髓间充质干细胞表面标志的重要指标<sup>[12]</sup>, 且骨髓间充质干细胞能表达CD44、CD90、CD106等表面标志, 不表达造血细胞表面标志如CD34、CD14、CD45<sup>[13-14]</sup>。本实验检测CD90阳性率99.7%而CD45阳性率仅1.78%, 与报道一致。说明本实验分离培养的细胞符合骨髓间充质干细胞的特征。

**3.2 骨形态发生蛋白2基因重组腺病毒转染大鼠骨髓间充质干细胞** 许多生长因子如骨形态蛋白家族、转化

生长因子 $\beta$ 等也可诱导其成骨分化<sup>[15-16]</sup>, 其中骨形态发生蛋白2已被公认为目前最强的骨诱导因子<sup>[17]</sup>, 在骨修复过程中, 通过分泌和旁分泌在细胞及细胞间进行信息传导, 调节细胞分泌和增生, 在骨折愈合中发挥着重要的作用。不同的载体对相同的靶细胞的转染效率不同, 相同的载体对不同的靶细胞的转染效率亦不同<sup>[18]</sup>, 本实验通过筛选最优的病毒感染复数值得到最佳的转染效率。病毒感染复数即病毒感染复数, 是感染时病毒数与细胞数的比值, 一定范围内通过提高病毒感染复数值, 可以克服细胞对腺病毒转染的抵抗, 进一步提高转染率, 但过高的病毒感染复数会对转染率产生负面影响, 如细胞损伤等。

实验选用的重组腺病毒载体系统自带报告基因增强型绿色荧光蛋白, 直接观察转染情况。实验设置了60, 80, 100及120的病毒感染复数梯度, 观察发现病毒感染复数=100时, 骨髓间充质干细胞生长形态亦未见明显变化, 对细胞的损伤较轻, 90%以上细胞出现荧光, 72 h内即可见大部分细胞表达增强型绿色荧光蛋白, 说明转染后骨髓间充质干细胞能够存活及表达, 满足实验的需要。通过ELISA试剂盒检测细胞上清液中的人骨形态发生蛋白2及碱性磷酸酶, 得出人骨形态发生蛋白2基因转染组均高于其他组( $P < 0.05$ ), 说明转染后骨髓间充质干细胞能高表达目的蛋白, 且具有一定的成骨活性。

**3.3 转染骨形态发生蛋白2基因对骨髓间充质干细胞的影响** MTT法是目前实验室广泛应用的体外检测细胞存活和生长的方法, 可用于骨髓间充质干细胞的体外活性筛选, 此方法所需细胞少、灵敏度高<sup>[19-21]</sup>。本实验证实转染人骨形态发生蛋白2基因对骨髓间充质干细胞的增殖活性有明显影响促进作用, 且对骨髓间充质干细胞的活性无明显不利影响, 为将在体内动物模型中的进一步研究提供条件。

实验利用重组腺病毒载体为基因载体将目的基因人骨形态发生蛋白2插入骨髓间充质干细胞基因组中, 转染后的骨髓间充质干细胞可成功表达人骨形态发生蛋白2及碱性磷酸酶。MTT法表明人骨形态发生蛋白2基因转染后的骨髓间充质干细胞增殖能力增强, 可在动物体内模型中进一步研究。

**基金资助:** 福建省青年科技人才创新项目(2005J075)。

**作者贡献:** 课题设计为第一作者, 课题实施为第二、三作

者, 评估者为第四作者, 使用盲法评估。

**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:** 未涉及与相关伦理道德冲突的内容。

**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。

#### 4 参考文献

- [1] Cheng SL, Lou J, Wright NM, et al. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene. *Calcif Tissue Int.* 2001; 68(2):87-94.
- [2] Czernik M, Fidanza A, Sardi M, et al. Differentiation potential and GFP labeling of sheep bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2012 Aug 6. doi: 10.1002/jcb.24310.
- [3] Chang SC, Chung HY, Tai CL, et al. Repair of large cranial defects by hBMP-2 expressing bone marrow stromal cells: comparison between alginate and collagen type I systems. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(2):433-441.
- [4] Han D, Li J, Guan X. Ectopic osteogenesis of hBMP-2 gene-transduced human bone mesenchymal stem cells/BCB. *Connect Tissue Res.* 2010;51(4):274-281.
- [5] Kitano Y, Radu A, Shaaban A, et al. Selection, enrichment, and culture expansion of murine mesenchymal progenitor cells by retroviral transduction of cycling adherent bone marrow cells. *Exp Hematol.* 2000;28(12):1460-1469.
- [6] Riew KD, Lou J, Wright NM, et al. Thoracoscopic intradiscal spine fusion using a minimally invasive gene-therapy technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(5):866-871.
- [7] Gu HL, Liu L, Lv G, et al. *Zhonghua Shiyuan Waike Zazhi.* 2007;24(3):368.  
顾海伦, 刘莉, 吕刚, 等. Ad-人骨形态蛋白-2转染人变性椎间盘髓核细胞对细胞外基质代谢的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(3):368.
- [8] Yao Y, Zhang F, Wang L, et al. Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci.* 2009;16:74.
- [9] Wang JC, Kanim LE, Yoo S, et al. Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(5):905-911.
- [10] Roth CM, Sundaram S. Engineering synthetic vectors for improved DNA delivery: insights from intracellular pathways. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6:397-426.
- [11] Park BW, Kang EJ, Byun JH, et al. In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. *Differentiation.* 2012;83(5):249-259.
- [12] Kisiel AH, McDuffee LA, Masaoud E, et al. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *Am J Vet Res.* 2012;73(8): 1305-1317.
- [13] Gonçalves Fda C, Paz AH, Lora PS, et al. Dynamic culture improves MSC adhesion on freeze-dried bone as a scaffold for bone engineering. *World J Stem Cells.* 2012;4(2):9-16.
- [14] Moscoso I, Rodriguez-Barbosa JI, Barallobre-Barreiro J, et al. Immortalization of bone marrow-derived porcine mesenchymal stem cells and their differentiation into cells expressing cardiac phenotypic markers. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6(8):655-665.
- [15] Murray SJ, Santangelo KS, Bertone AL. Evaluation of early cellular influences of bone morphogenetic proteins 12 and 2 on equine superficial digital flexor tenocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Am J Vet Res.* 2010;71(1):103-114.
- [16] Han D, Li J, Guan X. Ectopic osteogenesis of hBMP-2 gene-transduced human bone mesenchymal stem cells/BCB. *Connect Tissue Res.* 2010;51(4):274-281.
- [17] Shingen K, Nakamura T. Regenerative repair of the mandible using a collagen sponge containing TGF- $\beta$ 1. *The international of artificial organs.* 2002;25(11):1095-1102.
- [18] Yan MN, Dai KR, Tang TT, et al. Reconstruction of peri-implant bone defects using impacted bone allograft and BMP-2 gene-modified bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(1):304-313.
- [19] Real RP, Ooms E, Wolke JG, et al. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res A.* 2003;65(1):30-36.
- [20] Ten Dijke P, Fu J, Schaap P, et al. Signal Transduction of Bone Morphogenetic Proteins in Osteoblast Differentiation. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(3):34-38.
- [21] Mamalis AA, Silvestros SS. Analysis of osteoblastic gene expression in the early human mesenchymal cell response to a chemically modified implant surface: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(5):530-537.