

## · 实验研究 ·

重组转化因子  $\beta_1$  的表达及修复骨缺损的研究刘强<sup>1</sup> 陈君长<sup>2</sup>

(1. 山西医科大学第一医院, 山西 太原 030001; 2. 西安医科大学第二医院, 陕西 西安 710004)

**【摘要】** 目的 运用基因重组的方法, 对人 TGF $\beta_1$  的进行基因克隆, 在大肠杆菌中表达, 并进行重组 TGF- $\beta_1$  修复骨缺损的实验研究。方法 以 pBV<sub>220</sub> 作为原核细胞表达载体, 将 TGF- $\beta_1$  cDNA 片段定向重组到 pBV<sub>220</sub> 的多克隆位点上, 构建原核细胞表达质粒 pTGF $\beta_1$  并转化至大肠杆菌中进行温度诱导表达。在兔顶骨两侧各制造直径为 10mm 的骨缺损, 左侧缺损植入纤维蛋白加重重组 TGF $\beta_1$  100 $\mu$ g 作为实验组, 右侧缺损单纯植入纤维蛋白作为对照组, 术后进行组织学和平均灰重测定。结果 表达产物经 SDS-PAGE 分析, 该表达体系可高效表达 TGF $\beta_1$ , 其表达产物占菌体可溶性蛋白的 23%, 用 NRK 细胞检测本研究生产的 TGF $\beta_1$  具有该蛋白的野生活性。实验组缺损区组织学及平均灰重明显优于对照组 ( $P < 0.05$ )。结论 TGF $\beta_1$  原核表达体系的建立为 TGF $\beta_1$  的生产提供了高效的表达工程菌, 重组 TGF $\beta_1$  能有效地修复骨缺损。

**【关键词】** 转化生长因子 $\beta$  骨疾病 基因重排

**Expression of Recombinant Mature Peptide of Human Transforming Growth Factor $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) in Escherichia Coli and A Study of TGF $\beta_1$  in Repairing Bone Defects** LIU Qiang, CHEN Jun-chang. The 1st Affiliated Hospital of Shanxi Medical University (Shanxi Taiyuan, 030001)

**【Abstract】 Objective** Using the method of gene recombination to express TGF $\beta_1$  in Escherichia Coli and to determine its ability of repairing bone defects. **Methods** TGF $\beta_1$  cDNA fragment was inserted into pBV<sub>220</sub>, a prokaryotic expression vector, the recombinant plasmid was transformed into E. coli to establish the prokaryotic expression system and induced to express encoded protein. The experimental models were made by drilling 1cm circular defects in bilateral parietal bones of the rabbit. The left defect was used as a carrier of filled with TGF $\beta_1$  composite and the right side was filled with fibrin. Four weeks after operation, histological changes were observed and ash weight measured. **Results** The system can express efficiently TGF $\beta_1$ , which was 23 percent of the total bacterial soluble protein. The osteogenesis of TGF $\beta_1$  and fibrin group surpassed obviously that of fibrin group. **Conclusion** The system is able to stimulate obviously the repair of bone defects.

**【Key Words】** TGF $\beta_1$  Bone diseases Gene rearrangement

TGF $\beta_1$  在诱导新骨形成和促进骨损伤修复等方面具有广阔的实际应用前景。本实验探索了应用基因重组的方法获取 TGF- $\beta_1$  及应用其修复动物颅骨缺损来检测其成骨能力, 现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 重组人 TGF $\beta_1$ 在大肠杆菌中的表达

**1.1.1 实验材料** pBSks TGF $\beta_1$  全长 3.3kb, 以 pBSks 为载体, 含编码成熟的 TGF $\beta_1$  基因 (本室保存); pBV<sub>220</sub>: 全长 3.67kb, 为原核细胞表达载体 (本室保存); 工具酶: 限制性内切酶 EcoR、BamH、Pst、Hind III、Sma II、RNA 酶、T4DNA 连接酶等 (购自华美生物工程公司及美国 Promega 公司)。

**1.1.2 蛋白表达方法** (1) 质粒重组, 细胞转化及克隆筛选参照 Birnboim 等方法<sup>[1]</sup>; (2) 蛋白质的诱导表达: 将经限制性

内切酶谱分析证实重组正确的质粒 pTGF $\beta_1$  分别转化至大肠杆菌 DH<sub>5 $\alpha$</sub> 、JM<sub>109</sub> 后, 挑取单菌落接种于 5ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 160r/min 振荡过夜。取 1ml 混匀的菌液移至 50ml LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡 2~3 小时至 OD<sub>600</sub> 为 0.8~1.0 时取出, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。次晨将菌液按 1:40 的比例移至 500ml M9 培养液中 (含 0.4% 胰蛋白胍, pH7.4), 30 $^{\circ}$ C 振荡 3~4 小时至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6 时取出, 立即将菌液转至 42 $^{\circ}$ C 继续培养 5 小时。4 $^{\circ}$ C, 50000r/min 离心 20 分钟, 回收菌体, 用无菌的双蒸水漂洗菌体 2 次, 如上离心回收菌体, -20 $^{\circ}$ C 贮存备用; (3) 表达产物的检测: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE); (4) 离心收集诱导后菌体, 用含 0.3% 2-巯基乙醇的样品液处理, 100 $^{\circ}$ C 3~5min。15% 分离胶, 8~12mA 电泳用考马斯亮蓝 G-250 染色。

### 1.2 TGF-β<sub>1</sub> 修复颅骨缺损

1.2.1 动物分组与手术 青紫兰兔 40 只, 雌雄不限, 体重 1.5~ 2.0kg, 3% 戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉 (0.5ml/kg), 消毒, 取颅顶部正中切口暴露顶骨, 以直径 1cm 环钻左右各造成 10mm 外板缺损, 同时切除 1.5cm 直径骨膜。按照 Durham 等方法<sup>[2]</sup>制造纤维蛋白载体。左侧缺损用纤维蛋白加重重组 TGFβ<sub>1</sub> 100μg 充填为实验组, 右侧单纯纤维蛋白充填为对照组, 关闭创口。

1.2.2 检测方法 (1) 组织学检查: 术后 4 周, 用直径 1cm 的环钻取下修复的骨缺损区组织, 标本用中性福尔马林液固定, 酸性脱钙液脱钙, 冲洗, 脱水, 石蜡包埋, 制成平行缺损区表面半圆大小 5μm 厚切片, HE 染色, 光镜观察。(2) 骨灰重测定: 按照丁真奇等方法<sup>[3]</sup>取下缺损区的新生组织, 和距实验区 0.5cm 处的颅顶骨直径 1cm、相同重量的周围骨块, 烧灰称重。

## 2 结果

2.1 重组人 TGFβ<sub>1</sub> 在大肠杆菌中的表达 经温度诱导培养, 离心收集菌体, 超声破菌后行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结果见图 1。在分子量 14400 附近, 有一明显的蛋白条带, 与文献报道的 TGFβ<sub>1</sub> 单体的分子量 12500 相接近。

2.2 组织学检查 移植后 4 周, 实验组骨缺损区完全被新生软骨和骨组织充填, 中央有大量软骨, 周边有骨小梁形成 (图 2), 而对照组骨缺损处中央主要由新生软骨组织充填, 周边骨小梁少 (图 3)。

2.3 骨缺损内新生骨及缺损周围骨块的灰重测定 结果显示, 实验组和对照组缺损区灰重均大大低于缺损周围区灰重, 而实验缺损区灰重高于对照组缺损区灰重, 经 t 检验两组有显著性差异 (P < 0.05) (见表 1)。

表 1 实验组与对照组植入缺损区的灰重 (x̄ ± s, mg/样品)

分组	动物数	缺损区	缺损周围区
实验组	20	16.2 ± 1.7*	72.3 ± 18.1
对照组	20	7.6 ± 0.9	71.6 ± 17.8

注: 实验组与对照组相比, \* P < 0.05

## 3 讨论

3.1 重组 TGFβ<sub>1</sub> 的生产及意义 本实验首先将 pBSK-s TGFβ<sub>1</sub> 中编码成熟的 TGFβ<sub>1</sub> cDNA 片段通过定向克隆的方法插入至原核表达载体 pBV<sub>220</sub> 上, 构建了 TGFβ<sub>1</sub> 的原核表达质粒 pTGFβ<sub>1</sub>。pBV<sub>220</sub> 作为表达载体具有如下几个优点<sup>[4]</sup>: (1) clts857 抑制子基因与 PL 启动子在同一个载体上可以转化任何菌株, 以便选用蛋白酶活性较低的宿主菌, 使表达产物不易降解。我们分别选用 DH<sub>5α</sub>、JM<sub>109</sub> 作为转化宿主菌, 均得到了高效表达; (2) SO 序列后面紧跟多克隆位点区, 便于插入带起始 ATG 的外源基因, 可表达非融合蛋白, 其产品可供人体使用; (3) 强的转录终止信号可防止出现“通读”现象, 有利于质粒-宿主系统的稳定; (4) P<sub>RR</sub>、P<sub>LL</sub> 都是强启动子, 将它们串联在一起有增强作用, 可驱动克隆在其下游的外源基因高效转录。它们又受控于温度敏感阻抑物 (clts857), 后者在 28~ 32℃ 时阻抑转录, 当温度升至 42℃ 时, Cl 蛋白被破坏,

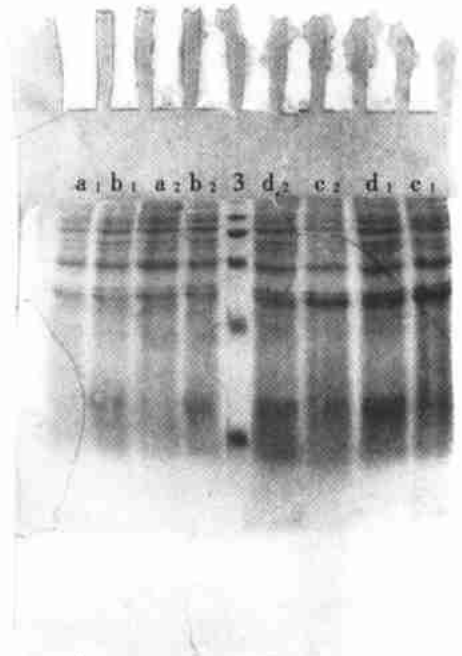


图 1 pTGFβ<sub>1</sub>-JM<sub>109</sub> 和 pTGFβ<sub>1</sub>-DH<sub>5α</sub> 的 SDS-PAGE 分析 a 表示 pBV<sub>220</sub>-DH<sub>5α</sub>, b 表示 pTGFβ<sub>1</sub>-DH<sub>5α</sub>, c 表示 pBV<sub>220</sub>-JM<sub>109</sub>, d 表示 pTGFβ<sub>1</sub>-JM<sub>109</sub>, 1 表示超声 20 次碎菌, 2 表示超声 48 次碎菌, 3 表示中分子量蛋白标准。

图中可见标准蛋白电泳“3”处有五条蛋白条带, 最下方为分子量 12 500, a 和 c 因不是表达质粒, 所以 a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub> 超声碎菌后在相应 12 500 分子量处无蛋白条带。b 和 d 是表达质粒, 表达后超声碎菌, 电泳图上在分子量 14 400 处 b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub> 均有蛋白条带, 表明有新的蛋白质, 即 TGFβ<sub>1</sub> 在大肠杆菌中表达

解除了对启动子的封闭, 使外源基因在 P<sub>RR</sub>、P<sub>LL</sub> 启动子的驱动下得以转录。这样使宿主菌的生长与外源基因的表达分开, 减轻了宿主细胞的代谢负荷, 表达水平得以提高<sup>[5]</sup>。事实上, 我们将重组质粒 pTGFβ<sub>1</sub> 分别转化大肠杆菌 DH<sub>5α</sub>、JM<sub>109</sub>, 经温度诱导培养后, 该体系可高效表达 TGFβ<sub>1</sub>, 其产量占菌体可溶性蛋白的 23%。采用 NRK 细胞单层培养法检测活性初步表明, 与对照组相比, 重组人 pTGFβ<sub>1</sub> 表达产物具有抑制 NRK 细胞单层生长的能力。这与 Roberts 等<sup>[6]</sup>报道的实验现象一致。

通过本文的研究, 证明可以用原核基因工程的方法表达和生产 TGFβ<sub>1</sub> 蛋白。TGFβ<sub>1</sub> 这一原核表达体系的建立为基因工程生产 TGFβ<sub>1</sub> 蛋白提供了实验依据, 积累了实验资料。利用原核基因工程的方法生产 TGFβ<sub>1</sub> 还是一较新领域, 对许多问题如分离纯化工艺的完善和表达产物生物学功能的研究有待于进一步深入。

3.2 外源性 TGFβ<sub>1</sub> 修复骨缺损的可行性 骨折早期 TGFβ<sub>1</sub> 由血小板释放入血肿中, 继而在软骨痂中由增生、分化的细胞合成。TGFβ<sub>1</sub> 可能通过刺激成软骨细胞的活性直接刺激膜内成骨, 并刺激成骨细胞合成 I 型胶原和骨连结素来促进成骨。本实验结果显示: 在外源性 TGFβ<sub>1</sub> 存在下可促进骨缺损的愈合, 而对照组骨缺损骨痂量少, 且未充填整个缺损区, 说明 TGFβ<sub>1</sub> 可以诱导骨生成过程, 同时具有修复骨缺损

的能力。 (本文图 2~3 见插页 1)

#### 参考文献

- [1] Bimboim HC, Doly JA. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7 (12): 1513-1519.
- [2] Durham LH, Willatt DJ, Young MW, et al. A method for preparation of fibrin glue. *J Laryngol Otol*, 1987, 101(11): 1182-1186.
- [3] 丁真奇, 谭富生, 吴祖尧, 等. 四种移植材料修复颅骨缺损的比较

研究. *中华创伤杂志*, 1994, 10(6): 261-263.

- [4] 张智清, 姚立红, 候云德. 含 P<sub>IR</sub> P<sub>L</sub> 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. *病毒学报*, 1990, 6(2): 111-117.
- [5] 卢至栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993, 375-380.
- [6] Roberts AB, Anzano MA, Wakefield MB. Type-β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(2): 119-126.

(收稿: 1999 04 23 修回: 2000 01 30 编辑: 房世源)

## • 经验交流 •

# 尺骨鹰嘴悬吊牵引治疗肱骨髁间骨折

孙红旗

(花都市中医院, 广东 花都 510800)

关节僵硬是肱骨髁间骨折最常见的并发症, 临床治疗颇为困难。笔者自 1986 年 3 月~1998 年 2 月采用尺骨鹰嘴悬吊牵引, 手法复位, 夹板固定, 早期功能锻炼等综合疗法治疗新鲜肱骨髁间骨折 21 例, 收到较好疗效, 报告如下。

### 1 临床资料

本组 21 例, 男 13 例, 女 8 例; 年龄 17~68 岁; 均为新鲜骨折。其中“T”型骨折 8 例, “Y”型骨折 7 例, 粉碎型 5 例。明显移位 16 例, 轻度移位 5 例。

### 2 治疗方法

病人仰卧, 臂丛麻醉。肩外展 70°, 前臂中立位, 二助手分别握住前臂及上臂作缓慢持续牵引 5 分钟, 同时术者两手掌在肘关节两侧抱髁向中心挤压。如有侧方移位, 则将两手掌移至上下侧位缓缓对向推挤。如有前后移位, 术者两拇指移到尺骨鹰嘴处推骨折远端向前, 两手四指拉近端向后, 同时两虎口对向挤压两髁, 助手在维持牵引下缓缓屈肘至 90°。复位后, 术者固定骨折部及前臂, 助手消毒、铺巾, 用骨钻在尺骨鹰嘴尖下 2cm 与尺骨髓旁开 1cm 交点处钻入克氏针。将二个滑轮固定在床架顶上, 一个牵引尺骨鹰嘴, 另一个悬吊绷带托起前臂腕部, 使患肢呈屈肘 90°中立位, 前臂与胸壁平行, 牵引重量 2~4 公斤。装好牵引后即可指导患者做 20°左右肘关节屈伸活动, 以后随着肿胀消退逐步加大活动度。二周一般可达 30°~60°, 病人自主活动能力差者适当配合被动活动。以上活动的原则是病人均应在无痛情况下进行。牵引第一周应床边 X 线拍片了解骨折对位情况, 如有两髁翻转, 用柔和手法分次抱髁挤压肘部, 每日二次, 并在肿胀有所消退后用髁上夹板及软纸垫固定, 防止翻转移位。必要时电视 X 线下克氏针撬拔复位。若骨块向后移位成角, 放低前臂使屈肘小于 90°, 反之, 抬高前臂, 使屈肘大于 90°。一般牵引 4 周肿胀消退, 骨折稳定此时解除牵引, 带夹板功能锻炼。骨牵引针眼愈合后, 解除夹板中药熏洗肘部, 加大活动度。治疗中切忌粗暴手法复位。

### 3 治疗结果

本组 21 例, 复位良好, 关节面基本平整者 10 例; 复位欠佳, 关节面轻度错位分离在 0.5cm 以内者 7 例。复位不良, 关节面破坏不整, 夹有碎骨块者 4 例。随访 5 个月~1 年, 疗效良好, 肘关节屈伸活动基本正常, 活动范围大于 90°者 12 例。疗效一般, 屈伸 60°~90°、关节无疼痛者 5 例。疗效差, 屈伸在 30°以下、关节有轻度疼痛者 4 例, 其中 2 例改行关节融合术。

### 4 讨论

肱骨髁间骨折是发生在成年人的严重的肘部损伤, 其骨折常劈裂成“T”型、“Y”型和粉碎型。一般均有明显移位, 并伴有关节囊及周围软组织的广泛撕裂, 因此容易形成关节周围的广泛粘连, 引起关节僵硬。目前, 各家治疗意见不一, 缺乏满意的方法。一般认为骨折早期肘部肿胀严重, 单纯手法整复, 夹板、石膏固定很难达到有效复位及固定。而手术切开复位, 虽能较好复位, 但将增加新的手术创伤, 术后疤痕粘连, 往往疗效更差<sup>[1]</sup>。笔者采用尺骨鹰嘴悬吊牵引, 配合手法复位, 夹板固定, 早期功能锻炼等综合治疗, 较好地弥补了上述单一疗法的不足。这是因为, 在尺骨鹰嘴牵引下, 肘部皮肤、筋膜、肌腱、关节囊等软组织均处在张力状态, 这种张力对骨折部形成一种持续的挤压力, 使骨折相对稳定, 不会重叠和增加移位。对翻转移位, 则配合手法整复、夹板加垫固定纠正, 达到良好固定效果。牵引克氏针与肘关节纵轴平行, 不影响关节屈伸活动。牵引部位在尺骨鹰嘴下 2cm, 不影响髁上夹板对双髁的固定。患肢抬高悬吊后, 静脉回流增强, 肿胀消退快。即使骨折对位较差, 通过早期锻炼, 鹰嘴半月切迹对破裂的滑车面持续的模造作用, 可以恢复关节面的平整。积极的主动锻炼, 又可增加关节周围软组织的血液循环, 增强组织活力, 减少软组织的粘连和挛缩, 达到良好疗效<sup>[2]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 王桂生. 骨科手术学. 人民卫生出版社, 1982. 227-228.
- [2] 天津医院骨科. 临床骨科学(一) 创伤. 人民卫生出版社, 1973. 196.

(编辑: 李为农)

# 重组转化因子 $\beta_1$ 的表达及修复骨缺损的研究

(正文见 715 页)

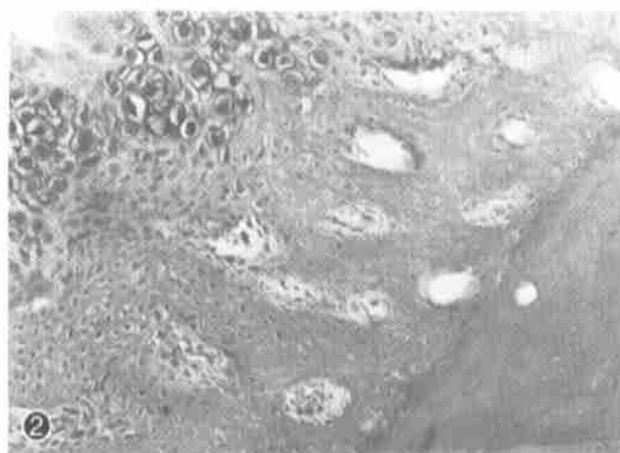


图2 实验组骨缺损修复术后4周骨缺损区中央有大量软组织,周边有性小梁形成 HE  $\times 400$

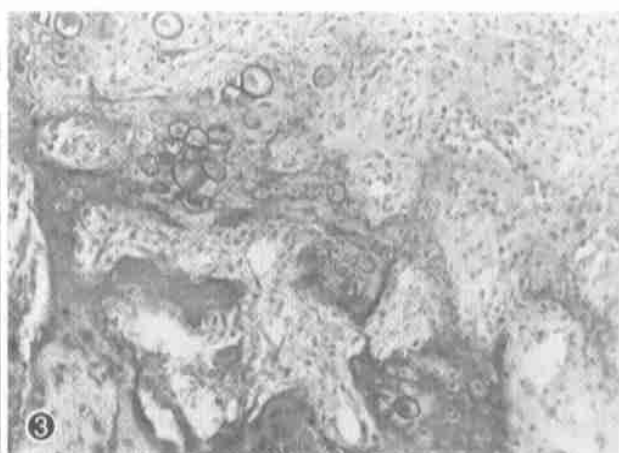


图3 实验组骨缺损修复术后4周骨缺损区中央软组织少,周边骨小梁少而排列不整齐 HE  $\times 400$

## 正常骺板及牵拉分离后胶原纤维构筑的扫描电镜观察

(正文见 718 页)

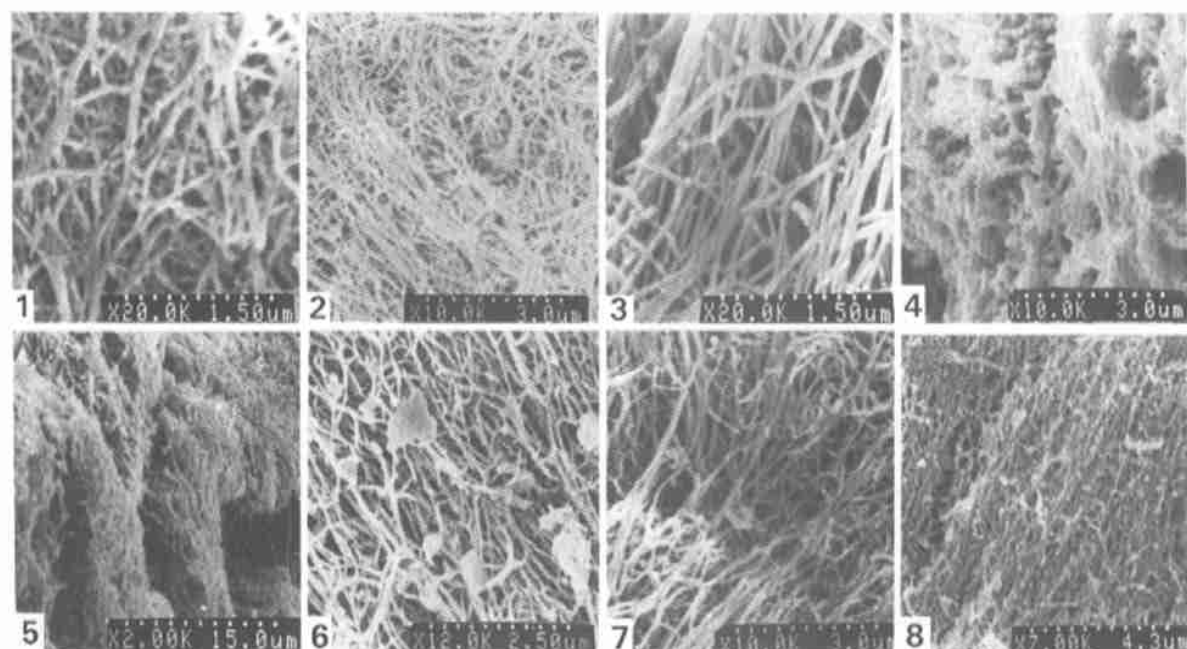


图1,2 正常骺板骺侧(储备区)胶原纤维的SEM照片。纤维呈分枝状,彼此交织成网,走向无规律,仅个别视野内可见呈纵行、横行或放射状的纤维束。图3 正常骺板中间部位(软骨细胞增殖区)胶原纤维的SEM照片。本区的细胞排列成纵行的细胞柱,胶原纤维束的走向均与长骨的纵轴平行。图4 正常骺板中间部位(软骨细胞增殖区)胶原纤维冷冻割断SEM照片。可见软骨细胞陷窝。图5 正常骺板于骺端侧(软骨细胞肥大区)胶原纤维的SEM照片。胶原纤维呈稀疏状分布于软骨陷窝之间。图6,7,8 依次为牵拉后骺板骺侧、中间部、于骺端侧胶原纤维的SEM照片。各区具有明显定向性,粗大的胶原纤维及纤维束均趋向于骺板的受力方向排列。