

# 重组 PcDNA3.1-hBMP-2 转染骨髓基质干细胞及复合异种骨支架体外构建组织工程骨

卜丽莎<sup>1</sup>, 李建军<sup>2</sup>, 韩东<sup>3</sup>, 景元海<sup>4</sup>, 王宏<sup>2</sup>, 王玲<sup>5</sup>, 徐莘香<sup>2</sup>

(1. 吉林大学中日联谊医院中心研究室, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院骨科; 3. 吉林大学中日联谊医院手外科; 4. 吉林大学中日联谊医院骨科; 5. 吉林大学白求恩医学院分子生物学研究室)

**摘要** 目的: 构建人骨形态发生蛋白-2 (human bone morphogenetic protein, hBMP-2) 真核表达载体 PcDNA3.1-hBMP-2, 转染兔骨髓基质干细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs), 种植去抗原牛松质骨 (bovine cancellous bone, BCB) 支架体外构建组织工程骨。方法: 蛋白印迹法检测转染后细胞 BMP-2 的表达, 碱性磷酸酶 (ALPase) 活性检测分析基因转染对细胞分化的影响。然后将转染后细胞接种到 BCB 支架上, 扫描电镜观察细胞贴附、生长状况。结果: 转染后, BMSCs 表达 BMP-2, ALP 活性明显增高。扫描电镜见转染细胞分布均匀, 伸展良好。结论: 在脂质体介导下, BMP-2 基因可导入细胞且稳定表达基因产物促进自身增殖分化, 转染后细胞在支架材料上贴附生长良好, 为进一步应用携带 BMP-2 基因的人工骨修复骨缺损奠定了实验基础。

**关键词** 骨形态发生蛋白; 骨髓基质干细胞; 基因转染; 组织工程骨

**Construction of tissue engineering bone with hBMP-2 gene transfected bone marrow stromal cells and bovine cancellous bone scaffold in vitro** BU Li-sha, LI Jian-jun, HAN Dong, JING Yuan-hai, WANG Hong, WANG Ling, XU Shen-xiang. The China-Japan Union Hospital of Jilin University (Jilin Changchun, 130021, China)

**Abstract Objective:** To construct rabbit bone marrow stromal cells (BMSCs) transfecting by a recombinant plasmid carrying the human bone morphogenetic protein-2 gene (PcDNA3.1-hBMP-2) seeded into bovine cancellous bone (BCB) scaffolds to construct tissue engineering bone in vitro. **Methods:** The expression of hBMP-2 in these cells after transfection was determined by Western blot analysis. The changes of cellular differentiation were observed by ALPase activity analysis. BMP-2 transduced cells were then seeded into BCB scaffolds. The attachment and growth of the cells on the scaffold were examined using scanning electron microscope (SEM). **Results:** The expression of hBMP-2 was confirmed and ALPase activity obviously increased in the cells after transfection. SEM examination revealed extensive cellular attachment and growth on the BCB block. **Conclusion:** With the help of lipofectamine, the transfection of PcDNA3.1-hBMP-2 to BMSCs is carried out successfully. The cells after transfection grow well on a BCB scaffold. Tissue engineering bone used to regional gene therapy is constructed successfully.

**Key words** Bone morphogenetic protein; Bone marrow stromal cells; Gene transfection; Tissue engineering bone

我们以前研究证实, 骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein, BMP-2) 基因转染可促进骨髓基质干细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 增殖和向成骨细胞转化<sup>[1]</sup>。本实验在此基础上, 将转染细胞接种到去抗原牛松质骨 (bovine cancellous bone,

BCB) 支架, 观察转染后细胞附着、生长情况, 探讨以细胞为工具运载 BMP-2 因子的体外基因治疗策略, 为进一步应用基因治疗的组织工程骨修复骨缺损奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 BMP-2 基因质粒、载体和受体菌 psp65-hBMP-2 cDNA 质粒由美国基因研究所 (Cambridge, MA, USA) Nguyen 博士馈赠, 宿主菌为 JM109。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39800151)

吉林省科技厅基金资助项目 (20010110)

通讯作者: 卜丽莎 Tel: 13009113666 E-mail: bulisha@163.com

PcDNA3.1(+)质粒由长春生物制品研究所丁永和博士馈赠。

1.1.2 异种骨支架 条形去抗原牛松质骨,参照袁志等<sup>[2]</sup>方法制备。

1.2 实验方法

1.2.1 重组真核表达载体 PcDNA3.1-hBMP-2 的构建和鉴定 将 psp65-hBMP-2 质粒大量提取和酶切(Sal 和 Xba ),回收 1.24 kb hBMP-2 片段;将 PcDNA3.1(+)真核表达载体用 Xho 和 Xba 双酶切回收线性化 PcDNA3.1。用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶将两者连接后转化感受态大肠杆菌 JM109,挑选单个阳性菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 震荡过夜,以碱裂解法小量提取质粒。分别用 EcoR 、Xba 双酶切和 Xho 单酶切,电泳鉴定、测序。

1.2.2 BMSC 培养及转染 在胫骨结节抽取成年家兔骨髓 1 ml,用 10%胎牛血清的 DMEM 培养液分离培养,在细胞汇合后采用脂质体介导的方法将重组质粒 PcDNA3.1-hBMP-2 导入 BMSCs 内,转染后的细胞采用 G418 600 μg/ml 进行筛选,4 周收集 G418 抗性的细胞克隆,扩增培养,检测指标。

1.2.3 蛋白印迹法(Western blot)检测 BMP-2 表达 实验分三组:空质粒转染组,hBMP-2 基因转染组,未转染组,阳性对照采用 BMP-2 蛋白 20 ng。制备样品蛋白及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):胰酶消化收集细胞,加入 50 μl 样品缓冲液。取 15 μl 以 12% SDS-PAGE 分离。常规转膜,封闭,使用 Tween 20-PBS 稀释一抗,二抗(辣根酶标记羊抗兔 IgG)与滤膜共温浴,显色。

1.2.4 碱性磷酸酶(ALPase)活性检测 将转 hBMP-2 基因和转空质粒细胞接种 24 孔板(1 × 10<sup>4</sup>/孔),培养 7 d。按试剂盒说明处理细胞,测定吸光值,标准曲线上读取酶活性值。数据采用 SPSS 统计软件处理,t 检验比较转染效果。

1.2.5 基因治疗的组织工程骨体外构建 胰酶消化收集 BMP-2 基因转染细胞,制成单细胞悬液(5 × 10<sup>6</sup>/ml),均匀种于 2 枚 BCB 材料块,每块材料 100 μl。4 h 后待细胞基本贴壁,再缓慢加入培养液 1.5 ml。常规培养 1 d 后,2.5%戊二醛固定,水平中央剖开,扫描电镜观察材料原始面和横切面细胞附着、分布、生长情况。

2 结果

2.1 重组真核表达载体 PcDNA3.1-hBMP-2 的酶切

鉴定 用 EcoR 和 Xba 双酶切,可切下 5.38 kb (PcDNA3.1 载体)和 1.3 kb (hBMP-2 cDNA)两条带,PcDNA3.1-hBMP-2 重组质粒上 Xho 酶切位点消失,符合物理图谱,表明 PcDNA3.1 载体中已插入 BMP-2 的 cDNA 序列,且连接正确,重组真核表达载体 PcDNA3.1-hBMP-2 构建成功(图 1)。

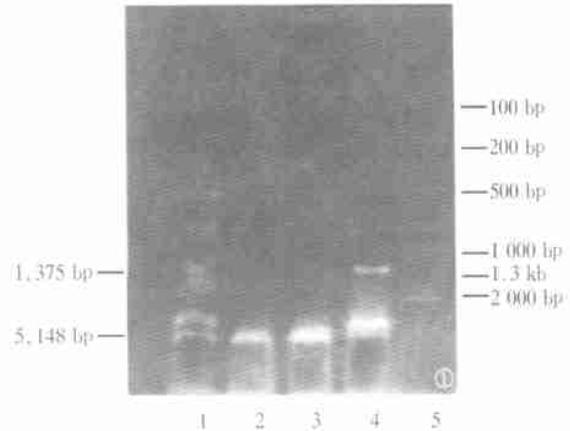


图 1 重组 PcDNA3.1-hBMP-2 的酶切鉴定 1. λDNA/EcoR I + Hind III markers; 2. 未酶切的重组质粒; 3. Xho I 单酶切, Xho I 酶切位点消失; 4. EcoR I 和 Xba I 双酶切得到 1.3 kb 和 5.38 kb 两个片段; 5. DL2000 markers

2.2 BMSCs 细胞形态学观察 骨髓细胞接种 24 h 后可见大量密集的造血系细胞或悬浮于培养液中,或沉积于培养皿底壁,无菌 PBS 液反复冲洗后可见少量散在分布的贴壁细胞,呈多角形、短梭形。贴壁细胞一般 2 周左右可长满培养瓶底壁,细胞相互间紧密贴附,排列呈旋涡状。hBMP-2 基因转染后细胞形态规则、生长迅速,随培养时间延长多角型细胞逐渐增多。

2.3 Western Blot 检测 转染组有 BMP-2 阳性条带,而空质粒转染组和未转染组仅有隐约可见的 BMP-2 条带(图 2)。

2.4 转染后 ALP 活性检测 转染后细胞 ALP 活性较对照组明显增高,转染组(31.26 ± 3.17) U/ml,对照组(22.38 ± 2.64) U/ml, P < 0.01,表明转染后细胞表达的 BMP-2,促进 BMSCs 向成骨细胞转化。

2.5 扫描电镜观察 培养 1 d 后,扫描电镜见支架材料表面平整,规则分布一些陷窝和孔隙,孔隙 φ 200 ~ 300 μm。BMP-2 基因转染后的 BMSCs 在 BCB

材料表面均匀分布,原始面与剖开面一致,细胞贴附伸展良好,呈纺锤形,有较长突起,相互连接,未贴壁细胞散在分布。高倍镜下见未贴壁细胞伸出丝状突起,相互网络。



图2 转染后兔骨髓基质干细胞 BMP-2 表达的蛋白印迹条带  
1. 未转染组; 2. hBMP-2 基因转染组; 3. 阳性对照 (rhBMP-2 标准蛋白); 4. 空质粒转染组

Fig. 2 Western blot analysis of the rBMSCs after PcDNA3.1-hBMP-2 transfection 1. No transfection; 2. hBMP-2 gene transfection; 3. rhBMP-2 standard protein; 4. Blank plasmid transfection

### 3 讨论

本研究利用 hBMP-2 重组质粒转染 BMSCs 后种植异种骨支架,证实 BMP-2 基因可导入细胞且稳定表达基因产物促进自身增殖分化,转染后细胞在支架材料上贴附生长良好,为将来应用携带 BMP-2 基因的人工骨修复骨缺损奠定了实验基础。

BMSCs 是骨组织工程中良好的进行基因转染种子细胞来源<sup>[3]</sup>,在多种动物模型中,转染 BMP-2 基因的 BMSCs 成功的诱导了骨形成。不过考虑到 BMSCs 的实际临床应用,目前的实验研究探索了自体移植和同种异体移植两种方法。自体来源显然效果理想,但随着患者年龄增大,其体外培养困难和成骨潜能下降,并且在某些病理条件下,患者的骨髓可能被破坏或者健康细胞的数量减少,这些导致自体移植受到限制。此外,自体来源细胞在体外扩增到足够数量,周期较长,有时不能满足临床需要。Tsuchida 等<sup>[4]</sup>采用大鼠同种异体转染 BMP-2 基因的 BMSCs 修复股骨缺损,在接受短期免疫抑制治疗后,获得和自体移植同等程度的修复效果,免疫抑制剂对骨愈合无明显影响。同时观察到异体基因转染细胞不仅是运载生长因子的工具,而且直接参与骨形成。这种方法操作简便,但究竟排斥反应如何及免疫抑制剂的使用上,仍需深入研究。

细胞外基质材料是细胞附着、生长和矿化的场所,它在调节与其相联系的种植细胞生物学行为方面起着十分复杂而重要的作用。理想的骨组织工程细胞外基质材料应具备:良好的生物相容性和表面活性;良好的生物降解性;多孔性和高孔隙率;可塑性和一定机械强度;骨传导性和骨诱导

性。本实验采用的 BCB 支架,以牛松质骨经脱脂脱蛋白及部分脱钙获得,这种天然结构能提供支持及有利于细胞生长增殖的表面环境,适宜的降解速度和力学强度,三维多孔结构便于细胞立体生长及血管长入,既保留了一定骨矿物质以维持其机械强度又保留了胶原纤维以维持其韧性,适合生理载荷。相对而言,BCB 是目前较理想的生物类基质材料。

本实验观察到,将 BMP-2 基因转染后的细胞以  $5 \times 10^6$  个/ml 的浓度接种于支架中,细胞整体分布均匀,与材料表面贴附紧密,生长良好,形态规则,为体内移植提供了可靠保证。在移植细胞数量的选择上,相对多的细胞有利于运载较多的 BMP-2 到特定的部位诱导骨形成,但过多的细胞会占据支架材料内过多的空间而使新生血管的长入变得困难,从而影响骨组织的再生,研究报道  $5 \times 10^6$  个/ml 的浓度比较合适<sup>[5]</sup>。

基因转移方法和表达载体选择是保证 BMP-2 局部持续有效表达的关键。目前认为<sup>[3]</sup>,采用腺病毒载体体外转染比较理想,但其残存的免疫原性在一定程度上限制了临床应用。Park 等<sup>[6]</sup>比较了 BMP-2 重组质粒和腺病毒转染的 BMSCs 修复骨缺损的效果,发现质粒转染组成骨速率虽不如腺病毒转染组,但仍然获得了满意的骨愈合结果。并且质粒制备简单,成本低,使用安全,适合临床应用。本实验亦证实重组真核表达载体 PcDNA3.1-hBMP-2 体外转染 BMSCs 是可行的。

### 参考文献

- 1 李建军,王文军,景元海,等.重组 PcDNA3.1-hBMP-2 转染骨髓基质干细胞和对其增殖及 VEGF 表达的影响.中国修复重建外科杂志,2004,18(2):100-103.
- 2 袁志,马平,胡蕴玉,等.复合 rhBMP-2 的异种骨 (rhBMP-2/BCB) 与骨膜联合移植修复兔髌骨节段性骨缺损.中华骨科杂志,1999,19(9):557-561.
- 3 李建军,刘建国,韩东,等.人骨形态发生蛋白-2 腺病毒表达载体转染人骨髓基质干细胞及其增殖的影响.吉林大学学报(医学版),2003,29(4):421-424.
- 4 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.
- 5 Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, et al. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: Effect of culture conditions and donor age. Tissue Eng, 2002, 8(6):911-920.
- 6 Park J, Ries J, Gelse K, et al. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: A comparison of adenoviral vectors and liposomes. Gene Ther, 2003, 10(13):1089-1098.

(收稿日期:2003-10-29 本文编辑:李为农)