

## 基础研究 ·

# 基因修饰的组织工程骨修复节段性骨缺损及相关免疫学研究

李建军<sup>1</sup>, 白伦浩<sup>1</sup>, 王欢<sup>1</sup>, 徐莘香<sup>2</sup>

(1. 中国医科大学附属二院骨科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 吉林大学第一医院骨科)

**摘要** 目的: 观察骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 基因修饰的组织工程骨修复节段性骨缺损效果及异种骨支架体内应用的安全性。方法: 制备去抗原牛松质骨块 (BCB), 植入小鼠股四头肌袋内, 术后行淋巴细胞转化试验和组织学观察。在腺病毒载体介导下将 BMP-2 基因导入兔骨髓间质干细胞后, 种植到 BCB 支架中, 构建基因修饰的组织工程骨。于兔双侧桡骨中段造成 15 mm 骨缺损, 采用 5 种方法进行处理: BMP-2 基因转染细胞 + BCB (A 组); 未转染细胞 + 重组 BMP-2 + BCB (B 组); 对照基因转染细胞 + BCB (C 组); 未转染细胞 + BCB (D 组); 单纯 BCB (E 组)。术后 4、8、12 周行 X 线、组织学和生物力学检测。结果: BCB 具有较低的抗原性和良好的组织相容性; A 组术后 4 周诱导生成软骨组织并向编织骨转化, 12 周骨缺损修复, 髓腔再通, 新骨强度明显优于其他各组 ( $P < 0.01$ )。结论: BMP-2 基因修饰的组织工程骨是修复节段性骨缺损的好方法。

**关键词** 骨形态发生蛋白质类; 基因疗法; 组织工程; 骨再生; 免疫学

**Study of repairing segmental bone defects by using gene modified tissue engineering bone** LI Jian-jun<sup>\*</sup>, BAI Lun-hao, WANG Huan, XU Xin-xiang. <sup>\*</sup> Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China

**Abstract Objective:** To observe the effects of BMP-2 gene modified tissue engineering bone in the treatment of segmental bone defects and the safety of xenogenetic scaffolds in vivo. **Methods:** Antigen-free bovine cancellous bone (BCB) was prepared and implanted into the quadriceps femoris of mice. Lymphocytes proliferation assay and histological observation were done after operation. The rabbit bone mesenchymal stem cells (BMSC) were transfected by BMP-2 gene which mediated by adenovirus vector (Ad-BMP-2), then was seeded on the BCB scaffolds to create gene modified tissue engineering bone. Bone defects of 15 mm were created on the bilateral radius of rabbits and treated with five kinds of implantations: Ad-BMP-2 infected BMSC with BCB (Group A); BMSC-BCB with recombinant hBMP-2 (Group B); Ad-LacZ infected BMSC-BCB (Group C); BMSC-BCB (Group D) and only BCB scaffolds (Group E). After 4, 8, and 12 weeks of the operations, X-ray, histological examination and biomechanics analysis were conducted. **Results:** BCB had low antigenicity and fine histocompatibility; In group A, cartilage formation was observed and transformed into woven bone after 4 weeks. Bone defects healed and marrow cavity opened again after 12 weeks. The new bone strength was obviously superior to that of other groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** BMP-2 gene modified tissue engineering bone is good to repair segmental bone defects.

**Key words** Bone morphogenetic protein; Gene therapy; Tissue engineering; Bone regeneration; Immunology

我们以前的研究表明<sup>[1,2]</sup>, 在腺病毒载体介导下, 骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 基因可高效

导入骨髓间质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSC), 促进其增殖及向成骨细胞转化; 以转基因细胞复合异种骨支架构建基因修饰的组织工程骨, 细胞在支架环境中保持存活并继续表达外源基因。然而这种基因修饰的组织工程骨修复骨缺损的效果及异种骨支架体内应用的安全性还不十分清楚, 我们就此展开研究。

基金项目: 1. 国家自然科学基金项目 (39800151)

2. 吉林省科技厅基金项目 (20010110)

通讯作者: 李建军 Tel: 024-83956511 E-mail: lijianjun71@yahoo.com.cn

### 1 材料与方法

1.1 材料 基因载体,携带人 BMP-2 和 - $\beta$ 乳糖酐酶的腺病毒载体 (Ad-BMP-2 和 Ad-LacZ) 由美国哈佛医学院分子骨科中心 Oliver 博士及吉林大学病理教研室高航博士馈赠。去抗原牛松质骨支架 (BCB) 制备,参照文献方法并加以改进<sup>[3]</sup>。

#### 1.2 方法

1.2.1 BCB 的免疫学检测 动物实验及分组:6~8 周昆明小鼠 72 只(雌雄不限),体重 20~25 g,随机分为 4 组,乙醚麻醉后将异种骨块植入小鼠双侧股四头肌肌袋内。组植入新鲜未经任何处理的骨块;组植入去抗原牛松质骨骨块;组植入商品化异种骨块(天津金世植骨公司提供);组为假手术组。分别于 5 d、2 周、4 周处死取材。淋巴细胞转化实验:常规制备脾细胞悬液( $1 \times 10^7$  细胞/ml),加入 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l (1 只  $\times$  4 孔)。然后分别加入 100  $\mu$ l ConA (5  $\mu$ g/ml) 和 IMDM (阴性对照) 各 2 复孔,置 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱 48 h,每日观察各组淋巴细胞生长情况。逐孔加入 MTT 100  $\mu$ l,继续孵育 4 h。弃上清液,加入 DMSO 显色,酶标仪测定吸光值,计算出刺激指数 (SI)。SI = 特异性抗原刺激组 (OD) / 阴性对照组 (OD),SI > 1 说明存在特异性淋巴细胞刺激增殖效应。组织学观察:取材时将植入物周围肌肉组织一并取出,10% 甲醛固定,脱钙,石蜡包埋,切片 HE 染色,光镜观察。

1.2.2 BMP-2 基因修饰的组织工程骨体外构建 见参考文献<sup>[1]</sup>。

1.2.3 节段性骨缺损修复 实验动物及分组:新西兰大白兔 60 只,体重 2.0~2.2 kg,随机分为 5 组,每组 12 只。于兔双侧桡骨中段造成 15 mm 骨缺损(包括全部骨膜),植入不同组人工骨。A 组:Ad-BMP-2 转染细胞 + BCB 支架;B 组:未转染细胞 + 重组 BMP-2 + BCB;C 组:Ad-LacZ 转染细胞 + BCB;D 组:未转染细胞 + BCB;E 组:单纯 BCB。各组再均分为 4、8、12 周观察组。额外增加 1 只,植入 A 组 2 枚骨块,5 d 时取材行 HE 染色观察转基因细胞体内存活及免疫反应。

X 线检查:于术后 4、8、12 周将兔麻醉后,摄双侧前肢正位 X 线片。生物力学检测:将 12 周各组标本进行三点抗弯曲强度测试,跨距 20 mm,速度 2 mm/min。比较各组骨缺损区修复性新骨的抗弯曲强度。组织学观察:术后各组标本行 HE、甲苯胺兰染色,观察骨缺损修复及矿化程度。

### 2 结果

#### 2.1 BCB 支架的免疫学检测

2.1.1 体外淋巴细胞转化实验 结果表明,组具有较强的抗原性,在不同时间点均可明显刺激淋巴细胞增殖 ( $P < 0.05$ ),植入体内后即可刺激机体免疫系统,引起明显的免疫排斥反应。、组之间的 SI 指数无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),SI 不随时间改变(见表 1)。

2.1.2 组织学观察 植入 5 d 时,移植骨周围组织轻度水肿,可见大量单核细胞浸润。2 周时,组有大量炎性细胞在植入物局部浸润,以淋巴细胞为主。、组移植骨界面除可见少数淋巴细胞,单核细胞浸润外,尚可见成纤维细胞,4 周成纤维细胞明显增多,局部出现较致密结缔组织,并可见少许新生骨。

表 1 术后不同时间体外淋巴细胞转化实验刺激指数

( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 1 Stimulation index of lymphocytes proliferation assay in the different date after transplantation ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Groups	5 d	2 weeks	4 weeks
	1.94 $\pm$ 0.42	1.85 $\pm$ 0.32	1.84 $\pm$ 0.33
	1.57 $\pm$ 0.55	1.38 $\pm$ 0.27	1.60 $\pm$ 0.26
	1.46 $\pm$ 0.22	1.43 $\pm$ 0.29	1.52 $\pm$ 0.18
	1.29 $\pm$ 0.18	1.42 $\pm$ 0.14	1.35 $\pm$ 0.20

注:与组比较, $P < 0.05$  ( $F = 31.83$ ),而、组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ );组间比较,各组间差异无显著性,  $P > 0.05$

Note: Compared with group,  $P < 0.05$  ( $F = 31.83$ ), but there were no statistical differences among group, group, group ( $P > 0.05$ );

In group comparison, there were no statistical differences between the groups,  $P > 0.05$

#### 2.2 节段性骨缺损修复

2.2.1 转基因细胞体内增殖 体内植入后 5 d, HE 染色见细胞在支架表面分布均匀,形态良好,功能活跃。支架孔隙内未见炎细胞浸润及纤维组织长入。

2.2.2 X 线及组织学观察 术后各组于各时间点移植骨周围未见明显的炎性细胞浸润,无明显的排斥反应存在。A 组:术后 4 周,移植骨内弥漫性成骨影。支架部分降解吸收,可见大量增生肥大的软骨细胞,软骨岛相互融合成编织骨。8 周,移植骨完全被新骨取代,骨痂较致密均匀。缺损区主要为编织骨,少部分转化成密质骨,髓腔扩大,新骨开始塑形。12 周骨缺损修复完善,塑形较好,骨皮质连续,髓腔再通(图 1)。8 周时甲苯胺兰染色见新生骨组织含钙量不同,颜色深浅不一。B 组:4 周时,移植骨内见点、片状密度增高影。BCB 框架内为新生软骨及骨组织填充;8 周时缺损区内成骨增多,骨密度增高但不均匀。新生软骨、骨大量形成,融合成片,新骨为软骨内成骨,出现编织和骨髓腔,少量 BCB 残留。12 周时骨缺损初步修复,早期骨改建,髓腔部分再通。C 组和 D 组:4 周时有隐约可见的成骨影,8 周时呈片状密度增高,12 周时骨



图 1 术后不同时期 X 线表现 ① 术后 4 周时移植骨内弥漫性成骨影 ② 术后 8 周时骨缺损初步修复 ③ 术后 12 周时皮质骨连续,髓腔再通。

Fig. 1 The X-ray images at the different date after operation ① Diffuse formed bony shadow in the transplanted bone after 4 weeks ② Basic repair of bony defect after 8 weeks ③ Successive lamellar bone and recanalized marrow cavity after 12 weeks

质较致密,密度不均,骨折线模糊。E组:4、8周时BCB无成骨,呈纹理清晰的网架结构,骨端骨痂向BCB两端生长;12周骨端骨痂停止生长,髓腔封闭,BCB大部分被吸收,残留骨缺损。

2.2.3 生物力学检测 术后12周三点弯曲试验结果表明(见表2),各组之间有显著性差异( $P < 0.01$ ),A组与B组之间有显著性差异,而C组与D组之间差异无显著性( $P > 0.05$ )。

表2 术后12周各组抗弯曲负荷检测结果

( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 2 Measurements of anti-bending strength post operative 12 weeks ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Groups	Anti-bending strength
A	192.83 $\pm$ 7.47
B	167.33 $\pm$ 8.12
C	134.00 $\pm$ 8.72
D	133.17 $\pm$ 9.41
E	86.50 $\pm$ 6.66

注:组间比较, $P < 0.01$  ( $F = 146.26$ ),C组与D组比较, $P > 0.05$

Note: In group comparison,  $P < 0.01$  ( $F = 146.26$ ); compared group C with group D,  $P > 0.05$

### 3 讨论

3.1 基因修饰的组织工程骨修复骨缺损的优点 通过基因治疗策略将骨诱导因子基因导入骨缺损部位,持续表达细胞因子并以自分泌/旁分泌形式诱导骨再生,将使骨缺损的治疗发生革命性变化,而且正成为基因治疗最有前途的领域之一<sup>[4]</sup>。Chang等<sup>[4]</sup>利用AdBMP-2转染的BMSC整合聚合物材料构建组织工程骨,自体移植修复迷你猪3 cm  $\times$  1.2 cm上颌骨缺损。3个月后骨缺损完全修复,新骨面积及抗负荷强度均优于对照组,以此验证基因修饰的组织工程骨临床应用的相关性。Rose等<sup>[5]</sup>报道,应用基因工程化产生BMP-4的肌衍生细胞,促进伴有严重软组织损伤的大鼠股骨缺损愈合,并且比较了稳定固定和不稳定固定的区别。观察发现BMP-4体外转染成肌细胞联合稳定固定在6周时可桥接骨缺损。Rutherford等<sup>[6]</sup>用AdBMP-7转染的成纤维细胞和多孔生物可降解支架复合物修复大鼠节段性股骨缺损,也获得了满意的效果。本研究结果显示,A组骨缺损的修复无论在速度还是成骨量上均优于B组,8周时甲苯胺兰染色见A组矿化程度明显优于B组,12周时三点弯曲试验示A组较B组具有更好的力学性能,表明BMP-2基因修饰的组织工程骨可同时发挥骨传导、骨诱导及自身成骨优势,比重组BMP-2蛋白外源

性复合具有更广泛的临床应用前景。

3.2 基因修饰组织工程骨的免疫反应 本实验采用异种骨支架,以牛松质骨经脱脂脱蛋白及部分脱钙获得,天然网架结构便于细胞生长增殖及血管长入,且具有良好的力学性能,但应用的关键是抗原性消除的程度。骨主要的抗原成分为主要组织相容性复合物(MHC)决定的细胞表面糖蛋白抗原,存在于骨髓细胞、成骨细胞和骨细胞等的细胞表面。骨中除含有多种细胞外,尚含有矿物质、胶原和基质,其中胶原和基质也具有一定的抗原性,而矿物质则无抗原性。本研究结果表明,在经过系列理化处理后,异种骨的抗原性基本消失,最大程度上保留了生物力学强度,组织学观察显示良好的组织相容性,可以安全地用于体内移植。

至于腺病毒载体存在的免疫原性问题,我们采用的基因转染策略是体外转染法,将腺病毒上的BMP-2基因在体外导入靶细胞,然后移植到体内,腺病毒的衣壳不进入体内,也不能在体内复制病毒颗粒,局部应用对全身影响小,因此其安全性较高<sup>[7]</sup>。本研究中未发现因腺病毒介导的基因治疗出现兔肺部炎症、急性免疫排斥反应或肿瘤等情况发生,局部组织学观察未见明显炎症细胞浸润,系统的免疫学检测有待于进一步研究证实。

### 参考文献

- 1 李建军,王文军,韩冬,等. 转染骨形态发生蛋白-2基因的人骨髓间质干细胞复合异种骨支架异位成骨的效果. 中华创伤杂志, 2004, 20(6):347-350.
- 2 李建军,崔亚楠,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和对其增殖及分化的影响. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(1):60-62.
- 3 卜丽莎,李建军,韩东,等. 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. 中国骨伤, 2004, 17(8):451-454.
- 4 Chang SC, Chuang HL, Chen YR, et al. Ex vivo gene therapy in autologous bone marrow stromal stem cells for tissue-engineered maxillofacial bone regeneration. Gene Ther, 2003, 10(24):2013-2019.
- 5 Rose T, Peng H, Usas A, et al. Gene therapy to improve osteogenesis in bone lesions with severe soft tissue damage. Langenbecks Arch Surg, 2003, 388(5):356-365.
- 6 Rutherford RB, Moalli M, Franceschi RT, et al. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. Tissue Eng, 2002, 8(3):441-452.
- 7 Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, et al. Evaluation of AdBMP-2 for enhancing fracture healing in an infected defect fracture rabbit model. J Orthop Res, 2004, 22(1):66-72.

(收稿日期:2005-02-20 本文编辑:李为农)