

种植转染 VEGF₁₆₅ 基因骨髓基质细胞的脱蛋白异体骨在裸鼠体内的成骨

刘日光¹, 尹培荣¹, 杨述华², 易诚青², 刘建湘², 杨操²

(1. 贵阳医学院附属医院骨科, 贵州 贵阳 550004; 2. 华中科技大学同济医学院协和医院骨科)

摘要 目的:探讨脱蛋白骨支架种植转染血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)₁₆₅基因的骨髓基质细胞体内的成骨作用。方法:从狗的髌骨穿刺骨髓分离骨髓基质细胞,应用脂质体转染 VEGF₁₆₅基因,以 RT-PCR 检测转染的基因表达。随机选取 4 周龄 BALB/C 裸鼠 30 只,随机分为 3 组,各组 10 只。实验组 A 为脱蛋白骨 + 转染 pcDNA₃-hVEGF₁₆₅基因的骨髓基质细胞;实验组 B 为脱蛋白骨 + 骨髓基质细胞;对照组 C 为单纯植入脱蛋白骨 + DMEM。在脊柱两侧分开肌间隙,每只裸鼠植入 2 块脱蛋白骨材料至肌腹内。术后 4、8 周处死取材,经大体观察、组织形态学与免疫组化方法检查细胞-材料复合物植入后的成骨作用及 VEGF 表达。结果:组织学检查 A、B 组均有成骨,并随时间延长而新骨增多,但其中转基因的 A 组其成骨作用明显,并在植入 4 周后免疫组化可见 VEGF 表达呈阳性;对照组 C 无成骨现象。结论:转染 VEGF₁₆₅基因骨髓基质细胞复合脱蛋白骨在体内具有较好的成骨作用。

关键词 脱蛋白骨; 血管内皮生长因子; 骨髓基质细胞; 骨组织工程

Osteogenic potentiality of deproteinized bone composited with dog marrow stromal cells transfected with VEGF₁₆₅ gene after implantation into nude mice LIU Ri-guang*, YIN Pei-rong, YANG Shu-hua, YI Cheng-qing, LIU Jian-xiang, YANG Cao. *Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, GuiZhou Guiyang, 550004, China

Abstract Objective: To study the osteogenic potentiality of deproteinized bone composited with dog marrow stromal cells(MSCs) transfected with VEGF₁₆₅ gene implantation in vivo. **Methods:** Marrow stromal cells were obtained from the dual ilium of three adult dogs. The recombinant pcDNA₃-hVEGF₁₆₅ plasmid was transfected into the MSCs with lipofectin and expression of VEGF₁₆₅ in MSCs was detected by RT-PCR. Deproteinized bone was composed with transfected MSCs or untransfected MSCs cultured for one week before being implanted into nude mice. 30 nude mice were divided into three groups at random as follows: the group A was implanted with deproteinized bone composed with transfected MSCs; group B used deproteinized bone composed with untransfected MSCs; the control group C used deproteinized bone composed with culture medium DMEM. The osteogenesis of material with cells was studied through gross observation, hematoxylin and eosin staining, immunochemsitry and quantitative analysis. **Results:** Deproteinized bone composed with transfected or untransfected MSCs could produce cartilage tissue and bone in vivo, and more new bone tissue produced gradually as the time after implantation went by. The transfected MSCs material group had more contents of ossification and angiogenesis than those in the untransfected group. Expression of VEGF₁₆₅ could be detected 4 weeks after implantation and many capillaries were observed in the transfected MSCs material group. However, there was no bone production in the control group. **Conclusion:** MSCs transfected with VEGF₁₆₅ gene has good osteogenesis and angiogenesis potentiality composited with deproteinized bone implantation.

Key words Deproteinized bone; Vascular endothelial growth factor; Marrow stromal cells; Bone tissue engineering

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30170945)

贵州省科学技术基金项目(编号:3049)

通讯作者:刘日光 Tel: 0851-6855119-3153 E-mail: liuriguang5629519@tom.com

应用组织工程方法生成自体组织是目前生物医学研究的热点之一,其中骨组织工程为骨组织修复

重建提供了新的希望,而适宜骨种子细胞与支架材料是决定其有效性和可行性的两个重要因素。本实验采用转染血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)₁₆₅基因的骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)为种子细胞,用表面脱钙的脱蛋白异体骨作为支架材料,形成复合人工骨植入裸鼠背部肌肉内,观察其异位成骨作用,探索该方法形成组织工程骨的有效性和可行性,为下一步用组织工程方法治疗骨缺损与骨坏死实验作准备。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司,小牛血清(FCS)购自中生公司,-甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸、EDTA 购自 Sigma 公司,二氧化碳培养箱与超净工作台由 SABC 公司生产、倒置显微镜为 OL YPUS,脱蛋白异体骨自制、pcDNA₃-hVEGF₁₆₅由杨操博士^[1]惠赠。

1.2 骨髓基质细胞的分离培养 取成年杂交狗 3 只(同济医学院实验动物中心提供),戊巴比妥 30 mg/kg 静脉麻醉,消毒铺巾后,用 16 号骨穿针穿刺髂前上棘下缘,以含肝素 800 U/ml 的 DMEM(含地塞米松 10^{-8} mol/L, -甘油磷酸钠 10 mmol/L 及抗坏血酸 50 μg/ml,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)抽取骨髓,离心后吸取含 20% FCS 的 DMEM 吹打细胞团成细胞悬液,置 50 ml 的 2 个塑料培养瓶中,于条件为 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。7 d 后换液,倒置显微镜下观察细胞贴壁及生长情况。在原代细胞融合为单层后,用 0.25% 胰蛋白酶(PBS 配制)消化并传代。实验用 MSCs 均为第 2 代。

1.3 VEGF₁₆₅基因转染 MSCs 及表达测定 以每孔 1.5×10^5 细胞传代至 6 孔板(内置盖玻片),将细胞分为 pcDNA₃-hVEGF₁₆₅转染组(转染组)、pcDNA₃ 转染组、骨髓基质细胞组。待培养细胞占孔面积 50%~80%时,按 lipofectamine 试剂盒要求进行标准转染基因。继续培养 48 h 用 300 μg/ml 的 G418 筛选并传代。收集已筛选 3 周的被转染骨髓基质细胞,用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,采用 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达,用 pcDNA₃ 转染骨髓基质细胞及骨髓基质细胞提取 RNA 作对照。目的基因 h-VEGF₁₆₅正、反义引物序列分别为 5'-TT GCTGC TCTACCTCCAC-3' 和 5'-A A TGCTTTCTCCGCTC TG-3';参照基因为 G_βPDH,正、反义引物序列分别为 5'-TCCCTCAAGA TTG TCAGCAA-3' 和 5'-A-

GA TCCACAACGGATACATT-3',琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物(如果有 h-VEGF₁₆₅ mRNA 表达则出现 590 bp 的 DNA 片段)。

1.4 骨髓基质细胞的接种 骨髓基质细胞融合后,以胰蛋白酶消化,进行细胞计数,调节细胞密度至 5×10^5 /ml,接种于预湿的脱蛋白骨材料上,确使细胞悬液浸润每块材料,DMEM 培养基培养,培养条件为 37 °C, 体积分数为 5% CO₂、饱和湿度, pH 7.2, 培养 1 周,倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.5 实验动物分组与手术方法 选取 4 周龄 BALB/C 裸鼠 30 只,体重 25~28 g,雌雄不拘(由同济医学院实验动物中心提供),随机分为 3 组,各组 10 只。实验组 A 为:脱蛋白骨 + 转染 pcDNA₃-hVEGF₁₆₅基因的骨髓基质细胞;实验组 B 为:脱蛋白骨 + 骨髓基质细胞;对照组为:单纯植入脱蛋白骨 + DMEM。用 10% 乌拉坦腹腔麻醉,于背部作一 3 cm 的切口,切开皮肤及皮下组织,暴露肌组织,在脊柱两侧分开肌间隙,植入材料至肌腹内,每只裸鼠 2 块,然后严密褥式缝合切口,术后将各组动物置无菌条件下分笼饲养。

1.6 检测内容

1.6.1 一般观察 观察术后动物活动、饮食、伤口情况,植入材料取出后的大体观察及其与周围组织的关系。

1.6.2 组织学检查 术后 4、8 周扭颈致死取材,取材标本大体观察后,多聚甲醛固定、EDTA 脱钙,脱水,石蜡包埋切片,HE 染色,观察骨形成情况。各组选 5 张切片,按文献方法^[2]进行组织学评分:无软骨形成:0 分;间质细胞增生,少量软骨形成:1 分;肥大软骨及骨样组织形成:2 分;较多软骨形成:3 分;幼稚编织骨形成:4 分;成熟编织骨形成:5 分。

1.6.3 免疫组化检测 VEGF 的表达 采用 SABC 法检测,取上述石蜡切片,用多聚赖氨酸贴片。抗为鼠抗人 VEGF₁₆₅ IgG 单克隆抗体(武汉博士德公司),抗为生物素化兔抗鼠 IgG,操作过程按试剂盒说明书进行,DAB 显色,苏木素轻度复染。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件包进行组间 *t* 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测转染 MSCs 表达 hVEGF₁₆₅ mRNA 的结果 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见转染 hVEGF₁₆₅组的扩增产物为 590 bp 的 DNA 片段(图 1),而未转染组的 MSCs 未见 590 bp 的 DNA 片段。

说明转染 MSCs 可表达 hVEGF₁₆₅ mRNA。



图 1 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳结果 1 泳道为未转染对照
2 泳道为转染 VEGF 3 泳道为转染 pcDNA₃ 4 泳道为
Marker 5 泳道为生理盐水对照

Fig.1 Results of agarose gel electrophoresis of PCR products
1 swimming path of untransfected control 2 swimming path of transfection VEGF 3 swimming path of transfection pcDNA₃ 4 swimming path of Marker 5 swimming path of saline control

2.2 实验动物情况 所有裸鼠无一死亡,术后饮食、活动正常。背部植入部位伤口无红肿渗液及感染,植入物无脱出,无异物反应及免疫排斥反应。

2.3 组织学观察 在植入的同期标本大体观察发现,实验组标本硬度明显高于对照组,且随时间延长实验组标本硬度呈明显递增趋势。镜下观察见,实验 A 组 4 周后呈现岛状细胞团,并可见类骨质样组织;植入 8 周后,骨形成量增加,HE 染色较深,并出现少量编织骨样外观及原始髓腔。实验组 B 镜下表现 4 周为软骨细胞埋于软骨基质的腔隙内,形成软骨陷窝,软骨陷窝大小差异悬殊;植入 8 周实验组 B 也有骨组织形成,多数新骨组织形态多样,骨细胞分布不规则。镜下可见各组均有血管长入,但数量不同,未见有明显的炎细胞浸润征象,无渗出、变性和坏死征象。各实验组植入的成骨程度:实验组 A、B 成骨程度不同,其形成软骨和新骨的程度以实验组 A 为最好,4、8 周分别为 2.96 ± 0.42 和 4.84 ± 0.64 ;而 B 组 4 周时为 1.86 ± 0.32 ,8 周时为 3.02 ± 0.78 。经 *t* 检验 4 周与 8 周时实验组 A 与实验组 B 比较,差异有显著性意义 ($n = 10, t = -3.12, P < 0.01$)。对照组植入的脱蛋白骨未能见到任何软骨或新骨形成,可见到材料周围的肌肉、结缔组织等。

2.4 免疫组化结果 实验 A 组 4 周时可见类骨质样组织周围的岛状细胞团 VEGF 呈阳性表达,8 周时未能见到 VEGF 表达呈阳性的细胞;实验 B 组及对照 C 组 4、8 周均未见有 VEGF 表达。

3 讨论

骨髓基质细胞具有可靠的成骨潜能,但体外培养修饰的骨髓基质细胞植入体内是否能保持其性能的相对稳定,直接关系到组织工程化骨组织的形成。本实验采用狗骨髓基质细胞经脂质体介导转染 VEGF 基因,并能获得稳定表达,将其与冻干表面脱钙的脱蛋白异体骨复合植入裸鼠背部肌间隙内观察其体内成骨性能。由于裸鼠是一种免疫缺陷动物,可以忽略细胞来源、支架或载体与宿主之间的排斥反应,可直接研究动物体内构建组织工程化组织的可行性^[3]。本实验结果表明,没有复合骨髓基质细胞的对照组,未见有任何软骨及骨组织形成,而复合骨髓基质细胞的两实验组均有不同程度的软骨或骨组织形成,此与文献报告相一致^[2],说明成骨的细胞来源于外源性骨髓基质成骨细胞,构建组织工程骨复合成骨种子细胞是必须的。利用基因工程方法将各种生长因子基因转入细胞,可使细胞在增殖分化的同时表达所需的生长因子。VEGF 是一种血管内皮细胞特异性有丝分裂原,体外能促进内皮细胞生长,在体内可诱导血管发生。VEGF 在骨组织修复重建中也占有重要地位。Wang 等^[4]研究发现,VEGF 可促进血管内皮细胞分泌胰岛素样生长因子-1 及内皮素-1 刺激成骨细胞生长。Gerber 等^[5]研究表明阻断内源性 VEGF 的活性,骨形成与骨吸收就终止。Midy 等^[6]报道,VEGF 能直接刺激成骨细胞 ALP 活性,并促进成骨细胞有丝分裂。近来 Peng 等^[7]研究表明转染表达 VEGF 和 BMP-4 基因的 MSCs 可促进骨形成与骨折愈合。本实验复合转染基因 VEGF 的骨髓基质细胞的一组,在 4 周后仍可见到有细胞表达 VEGF,其新生的骨组织不论从数量与质量上均优于未被转染基因的细胞组,而且血管生长也明显增加。此说明经 VEGF 基因转染修饰的骨髓基质细胞可以成为一种良好的种子细胞,其表达的 VEGF 可通过自分泌方式发挥强大的生物学效应,促进血管生成、增强成骨活性。究其原因可能与细胞表达血管内皮生长因子有关,血管内皮生长因子有促于局部血管的生成,血运的改善为细胞的生存成骨提供更有利的微环境。

本研究中还发现,实验组材料细胞复合植入后先有软骨形成,后经形态发生形成骨组织,这与 Vacanti 等^[8]研究结果相似。表明脱蛋白异体骨复合骨髓基质细胞体内成骨主要是通过软骨化骨进行的,致于其机制还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 杨述华,杨操,许伟华,等.人血管内皮生长因子的 cDNA 克隆及其在成骨细胞中的表达.中华骨科杂志,2000,20(2):99.
- 2 孙磊,胡蕴玉,王玉清,等.不同处理的骨移植物的骨诱导活性比较.中国矫形外科杂志,1995,2(4):262-263.
- 3 Benya PD,Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes express the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell,1982,30:215-224.
- 4 Wang DS,Miura M, Demura H, et al. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. Endocrinol,1997,138(7):2953-2962.
- 5 Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples herpetic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med, 1999, 5(6):623-628.
- 6 Midy V, Plouet J. Vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199(1):380-386.
- 7 Peng H, Wright V, Usas A, et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expression VEGF and bone morphogenetic protein. J Clin Invest, 2002, 110(6):751-759.
- 8 Vacanti CA, Vacanti JP. Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. Otolaryngol Clin North Am, 1994, 27:263-267.

(收稿日期:2004-09-20 本文编辑:李为农)

短篇报道

极外侧型腰椎间盘突出症 12 例

刘雪涛¹, 张智¹, 汉恒德¹, 赵文海²

(1. 解放军第八十九医院骨科研究所, 山东 潍坊 261021; 2. 长春中医学院附属医院骨科)

极外侧型腰椎间盘突出症 (extreme lateral lumbar disc herniation, ELLDH), 是指突出椎间盘位于椎间孔内或孔外, 往往压迫自同一椎间隙水平发出的神经根, 导致独特临床表现的一类腰椎间盘突出症。我院自 1998 年 1 月 - 2003 年 5 月收治腰椎间盘突出症 536 例, 其中极外侧型 12 例, 占 2.72%。现报告如下。

1 临床资料

12 例患者中男 7 例, 女 5 例; 年龄 35 ~ 61 岁, 平均 48 岁。有外伤史者 3 例, 病程 1 个月 ~ 1 年, 平均 4.5 个月。12 例均有明显腰痛, 其中腰痛伴一侧肢体放射痛 10 例, 间歇性跛行 8 例。左侧 8 例, 右侧 4 例。突出间隙 L_{3,4} 1 例, L_{4,5} 7 例, L₅S₁ 4 例, 同时压迫上下两个神经根者 2 例。下肢麻木 7 例, 直腿抬高试验阳性 6 例, 股神经牵拉试验阳性 5 例, 膝反射减弱或消失 9 例; 痛觉减退 10 例, 敏感 2 例。12 例均作 CT 扫描, 6 例行 MR 检查, 均能清楚显示椎间盘向椎间孔内或外突出。根据患者腰腿痛病史、查体神经根定位与影像学显示椎间盘突出的椎间隙为同一序列, 术前诊断为 ELLDH, 术中及术后病理诊断证实。

2 治疗方法

12 例均行手术治疗, 椎板间开窗 9 例, 经椎板峡部小关节突切除 2 例, 经峡部外缘 1 例。

3 结果

随访 6 个月 ~ 5 年, 平均 22 个月, 采用中华骨科学会脊柱组腰痛手术评定标准 [胡有谷. 腰椎间盘突出症. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 236], 优 8 例, 良 2 例, 改善 1 例, 差

1 例。优良率 83.3%。

4 讨论

Bonneville [Rachis, 1990, 2:255] 将腰椎间盘突出症分为 4 型: 中央型、后外侧型、椎间孔型、椎间孔外型。椎间孔型和椎间孔外型的典型临床特点为常累及同序列的神经根, 因此大多数作者同意将椎间孔型、椎间孔外型腰椎间盘突出症统称为极外侧型腰椎间盘突出症。

极外侧型椎间盘突出症以 L_{4,5} 突出发生率为高, 其次为 L_{3,4}、L₅S₁ 间隙。临床表现为腰痛轻, 腿痛严重。多伴有股四头肌肌力减弱或肌肉萎缩, 较大者可压迫同一序列及下一节段神经根。影像学检查以 CT 及 MR 为主。CT 检查表现为椎间孔或椎间孔外至椎体后缘与椎间盘 CT 值相同的软组织影像。由于 CT 主要通过密度差异区别各种组织, 如需鉴定突出的椎间盘和其他密度接近的物质如神经鞘膜瘤、淋巴瘤等仍有一定的困难。另外 CT 图像受扫描节段性限制, 高位突出易漏诊, 故应结合造影及 MR 检查。

极外侧型腰椎间盘突出症的手术方法不一, 后路术式较常用, 本组 12 例均采用后方入路, 8 例采用椎板间扩大开窗, 尽量保留小关节, 在症状神经根的根管内探查, 找到突出的椎间盘组织, 在吸引器配合下, 认定突出组织, 以髓核钳咬持拖拽, 安全摘出髓核组织。4 例采用椎板侧方入路, 切除峡部外缘及上关节突外缘, 显露突出髓核组织并摘除之。本组采用该 2 种手术方法, 疗效满意。

(收稿日期:2004-03-30 本文编辑:连智华)