

人骨形成蛋白9基因修饰的兔骨髓间充质干细胞异位成骨实验研究

江标, 李明, 曹豫江

重庆医科大学附属儿童医院 骨科 (重庆 400014)

【摘要】 目的 探讨人骨形成蛋白9(human bone morphogenetic 9, hBM P-9)基因治疗与骨组织工程技术相结合的可行性。方法 采用阳离子脂质体介导 hBM P-9 基因转染兔骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 荧光显微镜观察及流式细胞学检测, 碱性磷酸酶(ALP)活性定量测定及Von Kossa's 钙结节染色; MSCs 与聚乳酸-羟基乙酸(poly lactide-co-glycolide, PLGA) 支架共培养, 荧光显微镜及扫描电镜观察MSCs 在PLGA 上的黏附、生长情况; 将转染与未转染 hBM P-9 基因的MSCs 分别与PLGA 支架复合培养, 构建组织工程化骨并回植兔肌肉内, 组织植入4、8周后进行HE 染色观察。结果 流式细胞仪测定质粒转染率为34.15%; 转染组MSCs 的ALP 活性较未转染组明显增高($P < 0.01$), Von Kossa's 钙结节染色比较转染细胞形成的钙结节明显大于未转染组; 荧光显微镜及扫描电镜观察见MSCs 在PLGA 支架上的黏附、生长良好; 异位回植术后4、8周组织HE 染色见肌肉内有新生骨基质分泌, 成骨面积定量分析转染组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 阳离子脂质体介导的质粒能稳定转染MSCs, BM P-9 能刺激MSCs 的ALP 活性增强, 诱导钙结节形成; BM P-9 基因转染的MSCs 作为一种新型的种子细胞, 其与PLGA 支架复合用于骨缺损的修复具有较强的可行性。

【关键词】 骨髓间充质干细胞 BM P-9 PLGA 组织工程

【中图分类号】 R782

Ectopic Bone Formation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Gene Transfer of Human Bone Morphogenetic Protein-9 Gene in Rabbit J I A N G B i a o, L I M i n g, C A O Y u - j i a n g. *Department of Pediatric Orthopaedics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China*

【Abstract】 Objective To investigate the method combining hBM P-9 gene therapy with tissue-engineering techniques to improve osteogenesis in an ectopic bone formation model in rabbits. **Methods** Rabbit marrow MSCs were transferred with BM P-9 gene by cationic liposome, and then were subjected to a series tests including fluorescent microscope, Flow cytometer (FCM), ALP activity quantitative assay and Von Kossa's calcium nodus staining; MSCs transfected with BM P-9 gene successfully were seeded onto scaffolds of poly lactide-co-glycolide (PLGA). Cell matrix interactions were observed with fluorescent microscopy and scanning electronic microscopy. The tissue-engineered bones with MSCs seeded on PLGA were further subcutaneously implanted into rabbits. The implants were evaluated with histological staining at 4 and 8 weeks after surgery. **Results** The gene transfer efficiency of MSCs transfected with BM P-9 gene was 34.15%, which was measured by FCM. The ALP activity of MSCs with BM P-9 gene transfer was higher than that of non-transferred cells ($P < 0.01$). The calcium nodus formation of MSCs was enhanced by the gene modification of BM P-9 gene. MSCs seeded on PLGA showed high level of cell proliferation, and efficient synthesis of cell matrix was observed with scanning electronic microscopy. In the ectopic bone formation model, new bone area was also significantly improved by BM P-9 gene modified MSCs seeded on PLGA ($P < 0.05$). **Conclusion** hBM P-9 gene modified MSCs could enhance ectopic new bone formation in rabbits. These results indicated that the strategy combining BM P-9 gene modified MSCs with PLGA might be suitable for bone tissue engineering applications.

【Key words】 MSCs BM P-9 PLGA Tissue Engineering

骨缺损修复一直是骨科领域的难题之一, 目前常用的人工合成替代物、异体骨移植、自体骨移植等在不同程度上存在一些问题。近年来, 组织工程化骨

的研究为骨缺损修复提供了全新的思路和方法, 是研究的热点之一。大量研究已证实骨形成蛋白(BMP)能有效的促进骨生成, 已知的BMP 中成骨活性最显著的是BMP-2、-7 和-9, 既往对BMP-2、7 等家族成员研究较多, 而对BMP-9 诱导成骨的应用

Corresponding author, E-mail: lm3180@163.com

研究尚少。本实验通过将BM P-9 基因转染兔骨髓间充质干细胞(M SCs), 观察M SCs 转染、表达情况, 并与聚乳酸-羟基乙酸(PL GA) 支架复合培养, 探讨PL GA 作为BM P-9 基因转染的M SCs 支架材料及其作为组织工程骨的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

新西兰大白兔(重庆医科大学动物中心提供, 体质量约为2 kg 左右, 雌雄不限), DM EM /F12(Gibco 公司), 特级胎牛血清 FBS (杭州四季青公司), pA rhBM P-9 和pA GFP (绿色荧光蛋白, 重庆医科大学附属儿童医院康权博士构建并惠赠), GenExtract™ 质粒中量提取无内毒素试剂盒(道普生物科技有限公司), Lipofectamine2000 转染试剂(Invitrogen 公司), 碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), PL GA (济南岱罡生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 兔骨髓M SCs 的分离和培养 采用全骨髓贴壁培养法^[1]。

1.2.2 带有pA GFP 的pA rhBM P-9 基因的扩增和鉴定 采用碱裂解-中和法, 按GenExtract™ 质粒中量提取无内毒素试剂盒步骤, 应用常规台式高速冷冻离心机, 经反应条件最优化后, 使含有pA GFP 的pA rhBM P-9 基因质粒的上清通过离心吸附柱式结构, 被特殊硅基质材料高效专一吸附。被吸附的质粒DNA 用洗脱缓冲液从离心吸附柱上洗脱下来。洗脱下的质粒DNA 用紫外分光光度仪进行浓度和纯度鉴定, 将紫外分光光度仪调零后, 取60 mL 稀释的DNA 液分别测其OD₂₆₀值(A₁)及OD₂₈₀(A₂)值, 根据每个OD₂₆₀值计算所抽提质粒的量, 再根据A₁/A₂值估计其纯度。并利用Kpn I 和Hind III进行双酶切凝胶电泳鉴定。

1.2.3 带有pA GFP 的pA rhBM P-9 基因转染M SCs 将阳离子介导的带有pA GFP 的pA rhBM P-9 质粒转染贴壁率达到80%第3代的M SCs, 每个25 cm²的培养瓶中加入9.6 μg 带有pA GFP 的pA rhBM P-9 质粒和20 μL 的Lipofectamine2000 试剂, 按Lipofectamine2000 转染试剂说明书步骤转染M SCs, 4~6 h 后换成正常培养液继续培养。并以MTT 法测定转染与未转染组细胞吸光度值(A 值, 490 nm), 绘制细胞生长曲线。

1.2.4 荧光显微镜和流式细胞学(FCM)观察细胞转染率 转染后24 h 在荧光显微镜下观察细胞转染情况, 转染成功的细胞能表达绿色荧光, 并作流式细胞学检测细胞转染率。

1.2.5 ALP 活性定量测定及Von Kossa's 钙结节染色 将转染和未转染细胞分别选择8 瓶在第7 d 消化, 离心, 0.5 mL 生理盐水悬浮细胞, 超声碎细胞仪(400 J 2 s/次, 间隔2 s, 5 次)破碎细胞, 用ALP 测定试剂盒测定(OD₅₂₀), 并根据公式 [ALP(金氏单位/100 mL) = 测定管吸光度/标准管吸光度 × 标准管含酚的量(0.005 mg) × 100 mL/0.05 mL] 计算ALP 含量。2 周后再分别取转染及未转染的M SCs 培养皿各2 个, PBS 缓冲液洗涤2 次, 丙酮固定10 min, PBS 缓冲液洗涤2 次, 自然晾干, 加入5 mL 新鲜配制的5% 硝酸银溶液, 紫外线下照射45 min, 三蒸水洗干净, 5% 硫代硫酸钠水溶液浸染10 min, 充分水洗, 中性红衬染5 min, 酒精脱水后倒置相差显微镜观察。

1.2.6 PL GA 支架预处理及M SCs 接种 将PL GA 支架剪成0.8 cm × 0.8 cm × 0.2 cm 大小块状, 95% 乙醇浸泡45 min 后PBS 洗涤3 次, 75% 乙醇浸泡45 min 后PBS 洗涤30 min/次 × 3 次, 培养液洗涤1 次, 加入含20% FBS 的DM EM /F12 培养液置入37 ℃、5% CO₂ 孵箱中过夜备用。将转染和未转染的M SCs 分别消化离心收集后, 将细胞悬浮密度约为5 × 10⁶/mL^[2], 将PL GA 支架放入有无菌干纱布的离心管内, 1000 r/min × 5 min, 直至材料块彻底干燥被压缩成白色片状, 取出材料后用1 mL 的注射器将M SCs 注入PL GA 支架内, 细胞黏附1 h 后, 再添加培养液联合培养, 为提高接种细胞密度, 次日更换培养液以去除未能与材料黏附的细胞, 然后同上法重复接种1 次。细胞支架共培养1 周后, 倒置荧光显微镜观察支架上的荧光表达, 并制作扫描电镜标本, 观察细胞在材料上的黏附、生长情况。

1.2.7 PL GA 支架及M SCs 复合物皮下肌肉内回植 新西兰大白兔26 只, 分为3 组: 实验组(n=10)、实验对照组(n=10)及空白对照组(n=6)。将转染和未转染的M SCs 种植的PL GA 支架体外培养1 周后植入动物双侧臀部肌袋内(空白对照组仅植入PL GA 支架), 术后常规喂养(肌注青霉素80 × 10⁴ U), 术后4、8 周在实验及实验对照组各取4 只, 空白组取3 只行组织包埋切片行HE 染色检查; 并采用病理图文分析系统(V9.5)进行成骨面积定量分析: 标本沿最大径连续切片, 每个标本随机取2 张

(两组分别为16张),分别测量新骨成骨面积和截面总面积,计算所占百分比。

1.3 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 带有 pAGFP 的 pA rhBM P-9 基因的扩增和鉴定

应用紫外分光光度仪进行浓度和纯度鉴定,得到浓度为 1.55 mg/mL 左右, $OD_{260} / OD_{280} = 1.81$ 纯度较高的DNA质粒。经 *Kpn* I 和 *Hind* III 进行双酶切后凝胶电泳,可见 pA dT rack 载体片段和 1.3 kb 目的片断两个条带,结果显示所得质粒为正确的穿梭质粒 pA dT rack-BM P-9 (图1)。

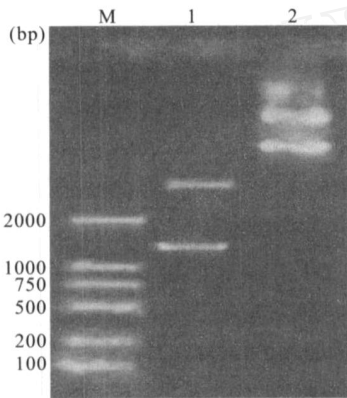


图1 质粒 pA rhBM P-9 双酶切鉴定结果

Fig 1 Identification of the plasmid pA rhBM P-9 by restriction enzyme digestion

M: DNA marker; 1: Plasmid BM P-9 digested by *Kpn* I and *Hind* III; 2: Plasmid pA rhBM P-9 no digested

2.2 MSCs 形态学观察及转染后荧光显微镜观察

细胞转染后MTT法测定生长曲线,细胞的生长增殖不受影响,与对照组无显著差异(图2)。接种后4h已有细胞贴壁,24h换液除去大量漂浮红细胞,贴壁细胞大部分呈圆形、短或长梭型,3~4d后部分贴壁细胞呈克隆样、漩涡状生长,传代细胞培养后,趋于均匀,以梭型为主,部分为不规则型。细胞转染成功后能表达绿色荧光(图3)。

2.3 FCM 检测结果

pA rhBM P-9(编码有GFP标记基因)转染后24h,对照未转染组的绿色荧光表达为0.40%,转染组发绿色荧光细胞占细胞总数比率为34.55%,即瞬时转染率为34.15%。

2.4 ALP 活性定量测定

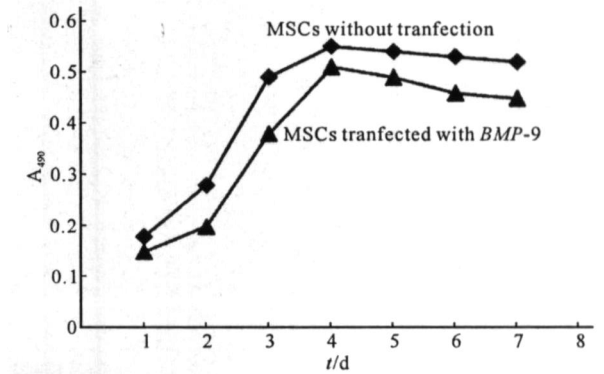


图2 MSCs 生长曲线

Fig 2 Growth curve of MSCs

rhBM P-9 基因转染后MSCs的ALP活性定量测定分别为:转染组(2.09 ± 0.20)金氏单位/100 mL,未转染组(1.38 ± 0.13)金氏单位/100 mL,转染组较未转染组明显增强($P < 0.01$),rhBM P-9 基因能显著增强MSCs的ALP活性。

2.5 Von Kossa's 钙结节染色

rhBM P-9 基因转染后的钙结节形成早,在转染后第10d即可见到细胞分泌的结晶形成(图4A),在2周后Von Kossa's 钙结节作染色见未转染组(图4B)也有结节形成,但明显小于转染组(图4C)。

2.6 PLGA 支架与细胞共培养后的形态观察

倒置荧光显微镜观察到未转染组不发荧光,支架成网状结构,而转染组可见绿色荧光表达(图5)。扫描电镜观察见空白PLGA材料孔径约为 $250 \mu\text{m}$ 左右,孔隙率约85%,细胞支架共培养1周后见细胞黏附材料生长情况良好,细胞明显生长汇合,形态为典型的成纤维细胞形态,形态部分不很规则,单个细胞表面可见大量毛刺突起结构(图6)。

2.7 支架植入后动物的组织学观察

所有动物术后伤口愈合好,22只伤口未见明显红肿等炎症反应,4只因伤口感染退出实验,但无一例动物死亡。回植后第4周,取出标本后见支架还有小部分未降解,组织HE染色空白对照组可见有少量炎性细胞浸入,支架部分降解,边界不清;实验组支架材料表面可见岛状和带状软骨,实验对照组中有部分新生骨基质形成,但软骨量较转染组差(图7)。两组的组织切片成骨面积定量分析结果分别为:实验组为(12.5 ± 0.82)%,实验对照组为(8.3 ± 0.66)%,实验组成骨量明显较大($P < 0.05$)。术后8周时PLGA空白组材料未见新骨形成,材料降解加快,约降解70%,材料内部主要为丰富纤维组织;实验组材料中新生骨软骨样组织较多,骨细胞成熟,并

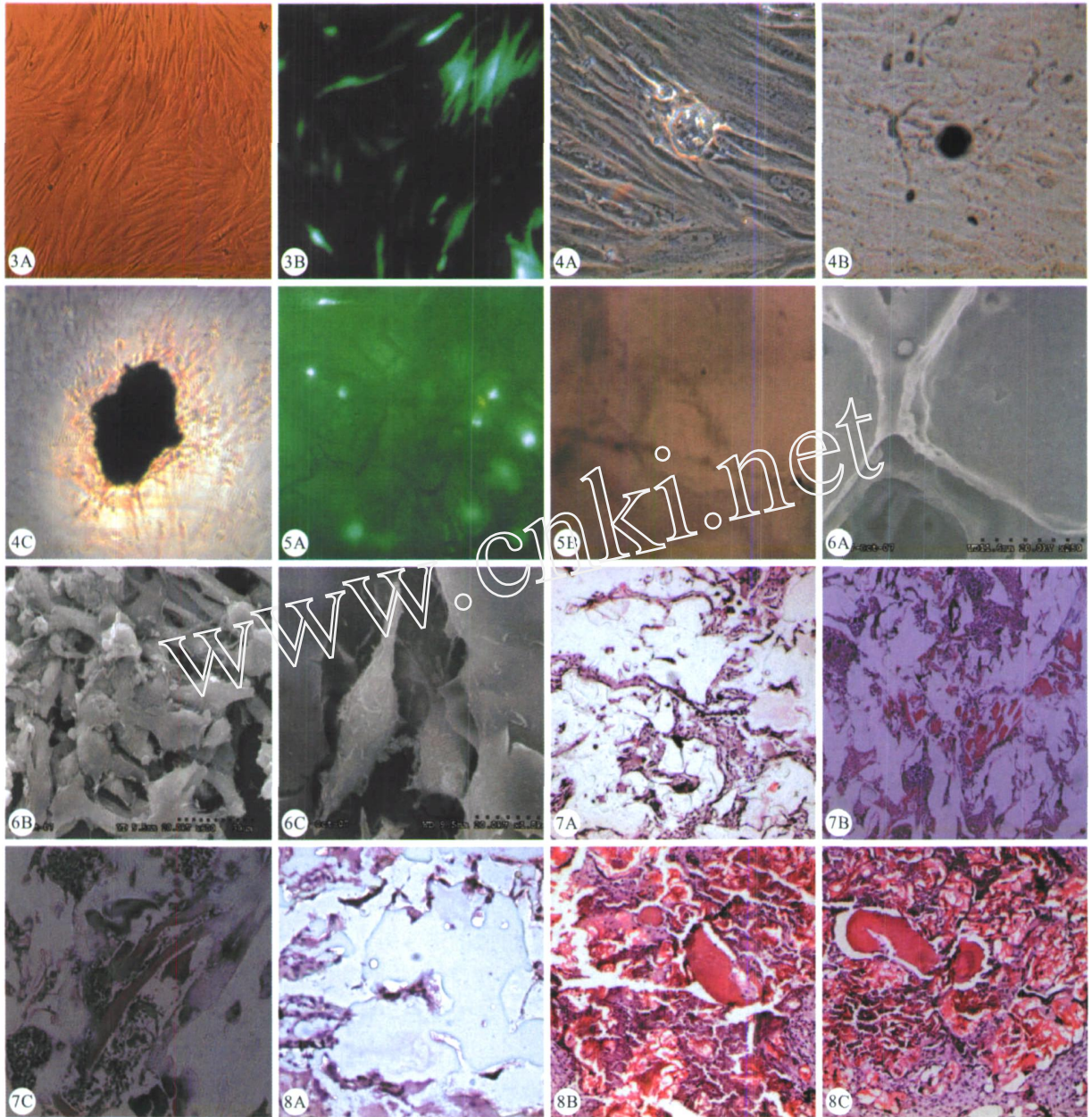


图3 MSCs 转染前(A)和转染后24 h(B)荧光显微镜观察。×200
 图4 MSCs 转后Von Kossa's 钙结节染色。×200
 图5 倒置荧光显微镜下观察。×100
 图6 扫描电镜观察
 图7 术后4周动物组织HE 染色观察。×100
 图8 术后8周动物组织HE 染色观察。×100

图4 MSCs 转后Von Kossa's 钙结节染色。×200

图5 倒置荧光显微镜下观察。×100

Fig 3 Fluorescent microscope of MSCs before transfection (A) and 24 h after transfection (B). ×200
 Fig 4 Ven Kossa's crystal of MSCs after transfection (A: 10 days after transfection; B: 2 weeks without transfection; C: 2 weeks after transfection). ×200
 Fig 5 Fluorescence microscope observe(A: Co-culture of PLGA andMSCs transfected with BMP-9; B: Simple PLGA bracket). ×100
 Fig 6 Scanning electron microscope observe(A: Simple PLGA bracket ×250; B: Co-culture of PLGA andMSCs transfected with BMP-9 ×600; C: Co-culture of PLGA andMSCs transfected with BMP-9 ×1800)
 Fig 7 Observe of zoogenic tissue in 4 weeks after implantation (A: Simple PLGA bracket; B: PLGA bracket andMSCs compounds; C: PLGA bracket andMSCs of transfection compounds). HE ×100
 Fig 8 Observe of zoogenic tissue in 8 weeks after implantation (A: Simple PLGA bracket; B: PLGA bracket andMSCs compounds; C: PLGA bracket andMSCs of transfection compounds). HE ×100

可见大量骨基质形成,可见成熟编织骨、骨小梁结构出现;实验对照组中有部分新骨或新生软骨形成,但成熟程度及成骨量均较实验组差(图8),两组的组织

切片成骨面积定量分析结果分别为:实验组为(26.9 ± 3.73)%,实验对照组为(16.9 ± 1.74)%,实验组成骨量明显较大(P < 0.05)。

3 讨论

骨髓MSCs具有多向分化潜能,可体外分离、培养、扩增和诱导分化,向成骨细胞转化,具有明确的成骨能力。但单纯的体内植入细胞并不能有效地形成新的组织,其主要原因在于以液态形式注入体内的细胞在局部微环境的作用下,无法保持局部有效浓度,导致新生组织数量下降。因此,就需要采用组织工程学方法选用适宜的细胞载体,为细胞提供黏附及增殖的空间,使之在相对稳定的环境中发挥作用有利于组织的再生。

本实验选用的PLGA是具有一定机械强度和良好加工性能的生物降解材料,而且其生物降解性可以根据需要调节,是骨组织工程中良好的支架材料,已得到美国FDA的临床认证^[3]。该聚合物的PLA:PGA比例为75:25,此种比例更适合成骨细胞生长分泌ALP^[4],材料孔径为200~300 μm,孔隙率约85%左右,与我们的扫描电镜观察结果一致。PLGA支架能黏附MSCs,对细胞的增殖及细胞周期也无影响^[5],在本实验中扫描电镜及荧光显微镜观察结果也充分证实MSCs能在PLGA支架上黏附及增殖,且相容性好,基本符合骨组织工程支架材料的要求,因此PLGA能用作组织工程研究中的细胞载体,具有良好的应用前景。

在组织工程化新生骨组织的发生过程中,生长因子不仅能够发挥诱导性成骨作用,也能够促进种子细胞的增殖分化,直接推动骨组织的形成。因此设想将种子细胞+细胞因子+支架三者复合后植入体内,应能更快更好地形成骨组织^[6]。BMPs是βTGF超家族成员之一,既往对BMP-2、7等家族成员研究较多,而本实验选用的BMP-9是新近发现,研究相对较少的BMPs的一种亚型,但研究显示其具有促进骨形成及软骨形成的作用^[7],并有研究^[8]发现BMP-9是BMPs家族最具潜力的促骨分化生长因子之一,其诱导干细胞成骨的作用甚至强于目前该领域研究的BMP-2、-7。与其他BMPs相比,BMP-9介导的骨分化作用不受BMP-3的影响,而其他成骨作用明显的BMP-2、-6和-7可以被抑制。

本实验试用rhBMP-9基因转染MSCs后复合支架异位回植观察BMP-9的成骨能力,利用基因转染可以防止BMP直接递送所带来的困难,能够长时间、高水平蛋白质表达而避免局部使用BMPs蛋白

半衰期短的缺陷,避免了寻找合适的BMPs载体的困难。本实验结果显示脂质体介导的基因转染能获得较好的稳定的瞬时转染率(34.15%),达到了本实验的要求,转染后MTT法绘制细胞生长曲线与对照组无显著差异,且基因转染后能最大限度的刺激细胞ALP活性增加及诱导矿化结节形成,在动物异位成骨实验中也发现转染BMP-9组能很好的诱导MSCs向成骨细胞分化,并分泌大量的成骨基质,转染基因复合PLGA支架组的成骨面积明显大于单纯MSCs复合PLGA支架组,提示BMP-9在诱导MSCs向成骨细胞分化、促进成骨方面中起了重要作用,但关于成骨的质量尚需进一步研究。

BMP-9基因修饰的MSCs成骨能力较单纯MSCs明显增强,然而BMP-9介导的成骨信号转导机制尚不明确,BMP-9基因转染的MSCs作为一种新型的种子细胞,其与PLGA支架复合用于骨缺损的修复具有较强的可行性,采用基因治疗与组织工程方法结合取得了良好同种异体异位成骨能力,可望为骨缺损的修复提供新的方法。

参 考 文 献

- 1 艾国平,栗永萍,闫国和等.骨髓间充质干细胞的分离与培养.第三军医大学学报,2001;23(5):553-555
- 2 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
- 3 Karp JM, Shoichet MS, Davies JE. Bone formation on two-dimensional poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds in vitro. J Biomed Mater Res A, 2003; 64(2): 388-396
- 4 李玉宝.生物医学材料.第1版.北京:化学工业出版社,2003:216
- 5 胡稷杰,裴国献,全大萍等.新型聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)支架的细胞相容性研究.中华创伤骨科杂志,2005;7(4):358-362
- 6 Musgrave DS, Fu FH, Huard J. Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery. J Am Acad Orthop Surg, 2002; 10(1): 6-15
- 7 Chizhikov VV, Millen KJ. Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. Dev Biol, 2005; 277(2): 287-295
- 8 Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. Gene Ther, 2004; 11(17): 1312-1320

(2008-01-21收稿,2008-06-20修回)

编辑 汤洁