

基础研究 ·

重组人骨形成蛋白 2 基因转染大鼠自体骨髓基质细胞成骨能力研究

陈希哲 杨连甲 田卫东 杨维东

【摘要】 目的 在构建的 SD 大鼠骨组织工程模型中,观察以含孔磷酸钙陶瓷为支架的基因转染自体骨髓基质细胞异位骨形成能力。方法 成年雄性 SD 大鼠 20 只,全麻及无菌条件下取其左侧股骨及胫骨,将骨髓冲入 75 ml 培养瓶中并在常规培养条件下进行体外扩增;5 d 后将部分骨髓基质细胞消化并通过 LipofectAMINE™2000 介导进行重组人骨形成蛋白(rhBMP₂)基因转染及 G418 连续筛选 14 d;再将转染和未转染的自体细胞一同接种于经纤连蛋白表面修饰的含孔磷酸钙陶瓷上继续培养 10 d,并将细胞-陶瓷复合体对应地种植于大鼠背部皮下及肌肉内。分别于 2~20 周处死动物,从形态学及组织学角度观察异位骨形成情况。结果 基因转染细胞-陶瓷复合体无论种植于皮下或肌肉内均表现明显的异位骨形成能力;其同期骨形成与早期实验中的经诱导骨髓基质细胞-陶瓷复合体异位骨形成相似。结论 应用以含孔磷酸钙陶瓷为支架的 rhBMP₂ 基因转染自体骨髓基质细胞移植,可获得与诱导分化的自体骨髓基质细胞相同的成骨能力,说明基因转染自体骨髓基质细胞再次植入体内后,可相当于生物反应器,在增殖的同时促进干细胞的分化和成骨潜能。

【关键词】 异位骨形成; 自体骨髓基质细胞; 磷酸钙陶瓷; 人骨形成蛋白 2; 基因转染

Heterotopic Osteogenesis of Autogenous Marrow Stromal Cells with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 Gene Transfection and Porous Calcium Phosphate Ceramic as a Scaffold

CHEN Xizhe*, YANG Lianjia, TIAN Weidong, et al. (* Key Lab. of Oral Biomedical Engineering, Sichuan University, Ministry of Education, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective To observe the heterotopic osteogenesis of autogenous marrow stromal cells loading on porous calcium phosphate ceramic scaffolds with rhBMP₂ gene transfection in a Sprague-Dawley rat model. **Methods** Autogenous marrow stromal cells were obtained from left femurs and tibias of 20 male adult SD rats under general anesthesia and sterile condition and cultured in -Minimal Essential Medium supplemented with 15 % fetal bovine serum. RhBMP₂ gene was transfected into stromal cells by means of LipofectAMINE™2000 reagent five days after primary culture. The stably gene expressive cells were selected with G418 for 14 days and mixed with stromal cells without transfection. The mixture cells were seeded and subcultured for another 10 days in porous calcium phosphate bioceramic that had been subjected to surface-modification via soaking in human plasma fibronectin. The cell-ceramic compound was implanted subcutaneously and intramuscularly in the corresponding rat. Lab animals were sacrificed at two-week intervals till twenty weeks postoperatively and the involved samples were removed. **Results** Morphologic and histological study demonstrated that cell-ceramic compound had an ability of heterotopic osteogenesis, which was similar to that of autogenous osteoblasts in previous study. **Conclusion** It seems that autogenous stromal cells with rhBMP₂ transfection acts as a bioreactor promoting proliferation and differentiation of stem cells when they are replanted into the corresponding animals.

【Key words】 heterotopic osteogenesis; autogenous marrow stromal cells; calcium phosphate; human bone morphogenetic protein 2; gene transfection

骨形成蛋白在细胞分化和组织形态发生方面具有重要作用,其中骨形成蛋白 2 被认为是活性最强的

惟一能单独诱导成骨的因子¹。本实验利用重组人骨形成蛋白 2 (recombinant human bone morphogenetic protein 2, rhBMP₂) 噬菌粒表达载体对大鼠骨髓基质细胞进行基因转染并复合含孔磷酸钙陶瓷,研究其自体异位种植成骨能力,探索组织工程与基因工程联合应用于骨缺损修复的可行性。

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 30070818)

作者单位:610041 口腔生物医学工程教育部重点实验室(四川大学)(陈希哲),第四军医大学口腔医院口腔颌面外科(杨连甲,杨维东),四川大学华西口腔医院口腔颌面外科(田卫东)

1 材料和方法

1.1 材料

LipofectAMINE™ 2000 (简写 LF2000) (Gibco 公司, 美国), Geneticin (简写 G418) (Gibco 公司, 美国), DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国), FBS 血清 (Hyclone 公司, 美国), α -MEM 培养基 (Hyclone 公司, 美国), pBKBMP₂ 噬菌粒表达载体 (司晓辉构建² 并惠赠), 含孔磷酸钙陶瓷 (Isotis 公司, 荷兰), CO₂ 细胞培养孵箱 (Heraeus 公司, 德国), 超净工作台 (Nuair 公司, 日本), 低温高速离心机 (Heraeus 公司, 德国)。

1.2 骨髓基质细胞分离培养

350 g 成年雄性 SD 大鼠 (由四川大学华西实验动物中心提供) 20 只, 在每公斤体重 35 mg 戊巴比妥腹腔注射麻醉下取左股骨、左胫骨。于超净工作台中将骨髓细胞冲入含体积分数 15 % FBS 的 α -MEM 培养基中, 置入体积分数为 5 % 的 CO₂ 孵箱中 37 °C 培养 5 d。

1.3 骨髓基质细胞 rhBMP₂ 基因转染及筛选

按以下方法进行 LipofectAMINE™ 2000 介导的 pBKBMP₂ 转染: 转染前 1 d 将原代培养的骨髓基质干细胞用 2.5 g/L 的胰酶消化并计数, 按 1×10^5 个/L 接种于 6 孔培养板, 1 ~ 2 d 达 90 % ~ 95 % 融合时, 弃除原来含血清培养基换为 2.5 ml 无血清 DMEM 培养基; 每孔加入用 250 μ l 无血清 DMEM 稀释的 25 μ g pBKBMP₂; 每孔加入用 250 μ l 无血清 DMEM 培养液稀释的 10 μ l LF2000, 室温下孵育 5 min; 将稀释的 pBKBMP₂ 与稀释的 LF2000 混合并在室温下孵育 5 min 以促使混合物形成; 每孔直接加入 pBKBMP₂-LF2000 混合物 500 μ l, 前后轻轻晃动培养板以充分混匀, 将培养板置入体积分数为 5 % 的 CO₂ 孵箱中 37 °C 培养 24 ~ 48 h, 此间不必换液。此后可将细胞按 1:10 或更高的比例稀释传代于新鲜完全培养基中, 次日进行 G418 抗性筛选 (30 mg/L) 连续 14 d, 每 3 天换液 1 次; 同时设置未转染的骨髓基质干细胞为对照。

1.4 磷酸钙生物陶瓷预备

将体积为 5 mm \times 5 mm \times 5 mm 的磷酸钙陶瓷 40 块用蒸馏水洗净, 超声净化 2 次, 每次 20 min, 自然干燥, 高压灭菌, 纤连蛋白浸渍表面修饰, 自然干燥。

1.5 转染细胞与生物陶瓷复合体构建

rhBMP₂ 基因转染的骨髓基质细胞经 G418 连续筛选后, 其增殖能力明显下降, 表现为细胞群体倍增时间由转染前的 32 h 延长至 84 h。在复合磷酸钙陶瓷时需将转染及未转染的同体骨髓基质细胞混合以获得 5×10^5 个/L 的细胞浓度。细胞-陶瓷复合体在 α -MEM 完全培养基及体积分数为 5 % 的 CO₂ 孵箱中 37 °C 继续培养 10 d, 隔日换液。

1.6 细胞-陶瓷复合体异位种植

在全麻并无菌条件下将立方状的细胞-陶瓷复合体 2 块分别植入与细胞对应的原动物背部皮下及肌肉内, 每 2 周为一个时间点各处处 2 只大鼠直至 20 周, 标本制成脱钙切片, 改良 Mallory 氏三色染色及 Von Kossa 硝酸银浸染 (AgNO₃ im-

pregnation), 光学显微镜下观察。

2 结 果

实验动物均存活, 无感染及其他并发症发生。细胞-陶瓷复合体无论植入皮下或肌肉内均有异位骨形成。4 周的脱钙切片在光学显微镜下显示体内尚未降解的磷酸钙陶瓷已被溶解而留下空白区域, 在陶瓷表面及孔隙中有较多骨组织形成, 改良 Mallory 氏三色染色显示紧贴陶瓷表面的是已矿化的骨组织 (红色), 其外侧是成骨细胞非常明显的新生骨组织 (蓝色) (图 1)。20 周时显示岛状骨组织已完全钙化, 且已形成内含黄色血细胞的骨髓腔 (图 2), 只是其处于皮下或肌肉内, 因不行使功能而不能成熟, 硝酸银浸染显示围绕陶瓷表面的骨细胞排列紊乱, 其陷窝小管虽然清晰可见, 但未见明确哈佛氏系统 (图 3)。



图 1 rhBMP₂ 转染骨髓基质细胞自体肌肉内埋植 4 周骨形成三色法 $\times 33$

Fig 1 Heterotopic bone formation showed intramuscularly four weeks after implantation of BMP₂ gene transfected autogenous MSCs loading on porous ceramic trichrome staining $\times 33$

3 讨 论

作为骨组织工程种子细胞之一的骨髓基质细胞, 其中的成体干细胞在体外培养过程中必须加以诱导才能促使其向成骨细胞分化, 而且在体外培养过程中, 细胞极易老化, 从而丧失增殖和分泌基质的能力, 难以用少量的骨髓经体外分离、培养、诱导获得大量的成骨细胞。因此, 如何防止细胞老化和获得足量的细胞来源, 是骨组织工程研究中首先要解决的关键问题³。将外源目的基因片段 (rhBMP₂) 同载体分子 (穿梭质粒 pBKBMP₂) 重组构成 pBKBMP₂ 表达载体, 并利用此载体先导入大肠杆菌中实现目的基因 rhBMP₂ 的克隆 (扩增)。经过筛选鉴定后, 再将提纯的这种含

有 rhBMP₂ 基因的表达质粒通过脂质体介导转入大鼠自体骨髓基质细胞,在体外把获得 rhBMP₂ 稳定表达的细胞克隆筛选并培养扩增,则这些种子细胞增殖的同时,又相当于生物反应器,实现外源基因 rhBMP₂ 持续高效的表达并调节细胞的增殖、分化及功能,这种构想不失为一种有价值的探索。



图2 rhBMP₂ 转染骨髓基质细胞自体皮下埋植 20 周骨形成三色法 ×33

Fig 2 Ectopic osteogenesis showed 20 weeks after cell-ceramic compounds implanted subcutaneously trichrome staining ×33

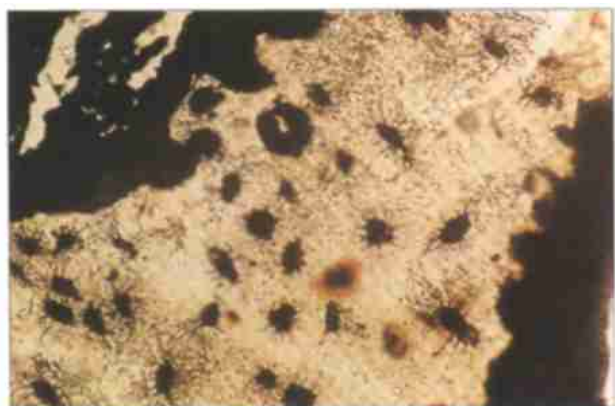


图3 rhBMP₂ 转染骨髓基质细胞自体皮下埋植 20 周时异位成骨的骨细胞及陷窝小管 硝酸银浸染法 ×142

Fig 3 Thread-like cell processes (bone tubular lacuna) of osteocytes in heterotopic bone showed 20 weeks after cell-ceramic compounds implanted subcutaneously AgNO₃ impregnation ×142

BMP₂cDNA 全长 1 587 bp,编码 396 个氨基酸。其非翻译区约为 340 bp,而司晓辉²选择在 cDNA 起始密码 ATG 前 2 个 bp 处用 Sal 酶切,删除大部分 5 端旁侧序列,并将此片段定向克隆于原核及真核细胞中均表达的 pBK-CMV 载体中,这将有利于 BMP₂cDNA 在真核细胞中表达。pBK-CMV 是一种可在原核和真核细胞内存活及复制的穿梭质粒,全长 4 518 bp,其真核系统构件包括巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子、猴病毒 40 (simian virus 40, SV40) 复制起始点、

SV40 polyA、SV40 的 5 端和 3 端剪切序列等以及 Kan 和 neo 抗性基因,多聚接头有 17 个可供利用的单一酶切位点。BMP₂ 基因噬菌粒表达载体的构建为目的基因转染及表达的研究奠定了基础。

研究骨形成的生物学机制时,常需要考虑以下 4 个因素: 直接参与骨形成的细胞; 细胞分泌的细胞外基质; 体液中所含的矿物离子; 决定细胞活力及钙化过程的调节因素。而异位骨形成实验的优点在于:细胞及体液已是恒定的,需要了解的仅是细胞外基质及调节因素对骨形成过程的作用;此外,骨形成过程可在特定区域从头至尾进行观察,所以细胞陶瓷复合体内异位成骨实验被认为是检测骨髓基质细胞分化及成骨能力的重要手段⁴。

本实验采用自体骨髓基质细胞 rhBMP₂ 转染,虽然基因转染后由于脂质体的毒性、基因片段的插入以及 G418 连续筛选对细胞的损伤而降低其增殖能力,但复合未经转染且未经诱导的同体骨髓基质细胞,也能达到足够的细胞浓度。这种混合细胞-陶瓷复合体植回原大鼠皮下或肌肉内,与以往诱导培养的自体成骨细胞-陶瓷复合体⁷一样具有异位骨形成能力,说明 rhBMP₂ 转染细胞在体内可相当于生物反应器,在本身增殖的同时,又持续、有效地在体内表达 BMP₂,刺激未经转染骨髓基质细胞的增殖与分化。但基因转染细胞参与成骨的量及方式,还需要通过标记实验进一步加以说明。此外,实验还发现在非功能部位所形成的骨组织,后期(20 周)发生骨吸收现象,骨细胞排列紊乱,无明确哈佛氏系统出现,充分说明了不接受应力,骨组织就永远不能成熟。

参考文献

- 1 Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop, 1998, 346(1): 26-37
- 2 司晓辉, 杨连甲, 金 岩, 等. 人骨形成蛋白 2 噬菌粒表达载体的构建与鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, 1998, 14(2): 141-142
- 3 Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: Current state and prospects. Annu Rev Med, 2001, 52: 443-451
- 4 Tsuruga E, Takita H, Itoh H, et al. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. J Biochem, 1997, 121(2): 317-324
- 5 陈希哲, 杨连甲, 付崇建, 等. 含孔磷酸钙陶瓷复合自体成骨细胞骨组织工程大鼠模型构建. 中华实验外科杂志, 2002, 19(5): 460-461

(2002-12-28 收稿)

(本文编辑 王 晴)