

[文章编号] 1000-1182(2007)05-0504-04

腺病毒介导的骨形态发生蛋白2基因转染 肌卫星细胞诱导成骨的动物实验研究

张风河¹, 黄萍², 魏奉才², 孙树洋¹

(1.山东大学口腔医院 口腔颌面外科; 2.山东大学齐鲁医院 口腔颌面外科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的 观察腺病毒介导的BMP-2基因转染肌卫星细胞后体内骨诱导能力。方法 采用动物实验方法, 将转染BMP-2基因的绿色荧光蛋白(GFP)转基因鼠肌卫星细胞吸收到胶原支架上, 然后将细胞胶原支架复合物移植入野生型129sv小鼠的后小腿肌肉中, 应用X线片观察、组织学检查及荧光显微镜观察转染细胞的诱导成骨能力。结果 用BMP-2基因转染的肌卫星细胞复合胶原支架移植入野生型小鼠后小腿筋膜下肌肉后会产生异位骨形成, 移植2周后其中有GFP阳性的成骨细胞和骨细胞, 3周后形成良好的骨组织, 4周时已形成成熟的骨组织, 而且骨组织具有GFP荧光。对照组用胶原支架和未转染的肌卫星细胞移植, 未出现诱导性异位骨形成。结论 Ad-BMP2转染的肌卫星细胞以胶原为支架可以在肌肉内诱导骨组织形成。

[关键词] 骨诱导; 移植; 肌卫星细胞; 骨形态发生蛋白-2

[中图分类号] R782.2⁴ **[文献标识码]** A

Ectopic bone induction in vivo after transplantation of skeletal satellite cells from green fluorescence protein transgenic mouse transfected by adenoviral vectors encoding bone morphogenetic protein-2 ZHANG Feng-he¹, HUANG Ping², WEI Feng-cai², SUN Shu-yang¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology School of Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] Objective To observe the ability of induced ectopic bone using skeletal muscles satellite cells(SMSCs) from newborn green fluorescence protein(GFP) transgenic mice mediated by Ad-BMP2. Methods Transplantation of SMSCs transduced with Ad-BMP2 into back lamb muscles of subfascia in wildtype 129sv mice with a complex of collagen scaffolds, then the tissue histologic examination, X ray plain film, fluorescence microscopy were used. Results Transplantation of SMSCs transfected with Ad-BMP2 into back lamb muscles of subfascia generated ectopic bone formation involving GFP-positive osteoblasts and osteocytes 2 weeks and mature bone formation 4 weeks after transplantation. SMSCs non-transfected with Ad-BMP2 failed to induce ectopic bone formation. Conclusion SMSCs retain differentiation potentiality into osteoblasts in response to Ad-BMP2. They are useful tools for analyzing the process of osteoblast differentiation in vivo after transplantation.

[Key words] bone induction; transplantation; skeletal muscle satellite cell; bone morphogenetic protein-2

研究^[1]发现, 骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)可以抑制成肌细胞向肌肉分化, 将其转化通道转为成骨细胞分化通道。研究^[2-3]表明, 腺病毒介导的骨形态发生蛋白2(adenoviral vectors encoding BMP-2, Ad-BMP2)转染肌卫星细胞后, 可以诱导成骨标志物如碱性磷酸酶活性及骨钙素产物。虽然这些体外实验获得了良好的结果, 但是由于活体环境非常复杂, 植入活体后Ad-BMP2

能否成骨仍然需要进一步证实。本实验应用胶原支架作为植入细胞的载体, 将胶原支架和转染及非转染肌卫星细胞复合物植入6-8周的129sv小鼠的后小腿筋膜下肌肉内, 观察感染了Ad-BMP2的肌卫星细胞是否参与了异位诱导骨形成。

1 材料和方法

1.1 实验动物及仪器

1.1.1 实验动物 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)转基因鼠10只, 鼠龄为出生后3 d, 体重5~7 g。129sv小鼠30只, 鼠龄为出生后6~8周, 体

[收稿日期] 2006-12-05; [修回日期] 2007-02-27

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(Y2006C33)

[作者简介] 张风河(1965-), 男, 山东人, 副教授, 博士

[通讯作者] 魏奉才, Tel: 0531-82169002

重24~30 g。皆由澳大利亚Flinders大学医学中心动物实验室提供。

1.1.2 实验仪器 Olympus BX-50荧光显微镜及照相系统(Olympus公司, 日本), Leica 1600硬组织冷冻切片(Leica公司, 德国)。BL13-C型软X线机(能量范围0.1~3.0 keV, Photon公司, 美国)。

1.1.3 实验试剂 胶原支架BD™ 3D复合胶原支架(Kensley Nash公司, 美国), 微孔直径300~500 μm 。腺病毒介导的人骨形态发生蛋白-2(山东大学齐鲁医院魏奉才提供)。

1.2 骨骼肌卫星细胞培养及鉴定^[4]

将新生的绿色荧光蛋白转基因小鼠麻醉后, 无菌条件下切取咀嚼肌, 在外科显微镜下剔除肌肉表面筋膜及内部血管, 含双抗的D-Hank's液冲洗3次(双抗为: 青霉素100 U/mL、链霉素100 $\mu\text{g/mL}$), 移入培养皿中, 用显微外科剪剪取标本组织块, 移入离心管中, 加入培养液, 静置3 min, 去掉上层漂浮组织, 体积分数为0.1% 型胶原酶消化30 min, 加DMEM/F12培养液离心(1 000 r/min)3次, 弃上清。体积分数为0.25%胰蛋白酶消化1 h, 加含体积分数为20%胎牛血清的培养液终止消化, 依次滤过100、200、400目不锈钢网, 滤液1 000 r/min离心5 min, 含体积分数为20%胎牛血清的培养液重新悬浮细胞, 采用差速贴壁法纯化细胞, 细胞计数后接种于多聚赖氨酸处理的玻璃培养瓶或未做处理的塑料培养瓶中。3 d后换液, 以后每天一次, 倒置相差显微镜及荧光显微镜下观察细胞的形态及生长情况。当细胞接近80%汇合后, 传代培养。对细胞经行骨骼肌肌动蛋白单抗鉴定后确定为骨骼肌卫星细胞。

1.3 Ad-BMP2转染肌卫星细胞

取传至第2代生长良好的骨骼肌卫星细胞, 用体积分数为0.25%胰蛋白酶消化后, 按 1×10^5 个/孔细胞重新接种于6孔板, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 的恒温培养箱中培养1 d。用吸管吸尽培养液, D-Hank's液洗2次。6孔板中加入Ad-BMP2 100 μL 转染细胞, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 的恒温培养箱中培养1 h, 补足培养液继续培养。

1.4 Ad-BMP2转染的肌卫星细胞及胶原复合物制备

将胶原支架浸于基因转染的含有肌卫星细胞 5×10^5 个/mL的培养液中10 min, 形成复合体。为保证细胞黏附到胶原支架上, 每一个胶原支架都要在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置于含体积分数为5% CO_2 的恒温培养箱中2 h。

1.5 Ad-BMP2转染肌卫星细胞的动物实验

每只129sv小鼠按1 $\mu\text{L/g}$ 氯胺酮和0.5 $\mu\text{L/g}$ 甲苯噻嗪(Troy公司, 澳大利亚)腹腔注射麻醉, 常规

消毒铺巾。手术区采用体积分数为1%的利多卡因(含少量肾上腺素)浸润麻醉。无菌条件下切开129sv小鼠后小腿皮肤及筋膜, 于筋膜下进行肌肉内分离, 将细胞胶原复合物植入30只小鼠右侧后小腿肌肉内用来观察其诱导成骨潜能, 对侧植入未转染的细胞及胶原支架作为对照, 生理盐水冲洗后, 分层严密切闭创口。

1.6 Ad-BMP2转染肌卫星细胞的观察指标

1.6.1 X线片检查 各组分别在植入后2、3、4周处死10只, 应用体积分数为5%的水化氯醛麻醉后, 立即取下后腿行X线片检查, 检查项目为后小腿移植区骨密度变化。

1.6.2 组织学观察 X线片检查后, 将后小腿标本脱钙, 切片, 行常规的苏木精-伊红染色, 中性树胶封片, 显微镜下观察骨组织形成情况。

1.6.3 荧光显微镜观察 X线片检查后, 将后小腿标本取出, 置于体积分数为4%的多聚甲醛中浸泡24 h固定, 然后依次置于体积分数为10%、20%、30%的蔗糖PBS缓冲液中过夜, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻切片机上连续切片, 切片厚16 μm , 将切片直接贴到明胶处理过的玻片上, 待干燥后直接在荧光显微镜下观察, 其激发光波长为395 nm, 观察光波长为509 nm。

2 结果

2.1 X线片观察结果

2周时, 实验组动物X线片可见移植部位出现密度稍高影像, 边缘较模糊; 3周时, 实验组动物X线片可见移植部位出现较高密度骨化影像, 边界仍较模糊; 4周时, 实验组动物X线片可见移植部位出现高密度骨化影像, 边缘较清楚。所有时间的对照组均未见高密度影像(图1)。

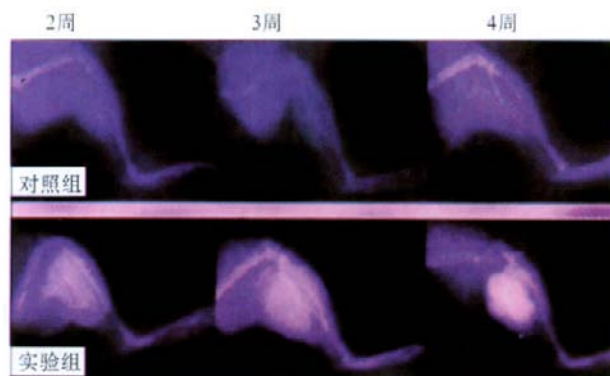


图1 植入转染细胞不同时间后对照组与实验组植入区X线片表现

Fig 1 The X-ray manifestation of different transplantation time in control and experimental groups

2.2 组织学观察结果

2周时, 实验组胶原纤维支架还没有完全吸收,

微孔内转染的肌卫星细胞向成骨细胞转化。3周时,实验组植入区可见有大量新生的软骨细胞和成骨细胞聚集成团,外面包被着纤维组织膜,软骨细胞和成骨细胞间有少量的纤维组织;有的标本已经形成良好的骨组织,骨组织间还有少量空隙;对照组肌肉内未见骨组织形成。4周时,实验组可见成熟骨小梁形成,髓腔内充满骨髓组织(图2),新骨内见成骨细胞和软骨细胞,对照组肌肉未见明显变化。

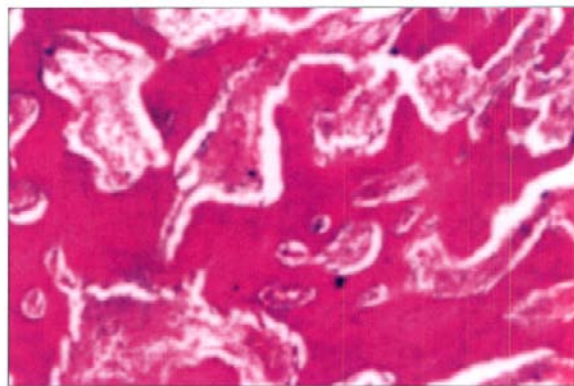


图2 4周时,实验组植入区骨组织有骨小梁形成,髓腔内充满骨髓组织 HE $\times 400$

Fig 2 Formation of trabecula and myeloid tissue of cavitas medullaris in experimental group 4 weeks after transplantation HE $\times 400$

2.3 荧光显微镜观察结果

2周时,实验组可以见到植入体周围有明显的荧光出现,细胞进入到胶原支架的微孔中,形成网状结构。高倍镜下可见到网孔边界周围成骨细胞附着(图3)。3周时,实验组可以见到许多骨组织已经形成,但仍然有许多的孔状结构,可能为胶原吸收后遗留结构(图4)。4周时,实验组已经形成了良好的骨结构成分,整个骨质呈现荧光,周围更强烈一些(图5)。骨组织已经发育良好,呈强烈的荧光现象,骨细胞及结构在高倍镜下清晰可见。

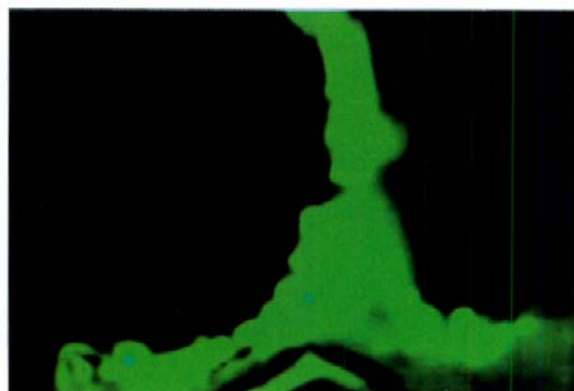


图3 2周时,实验组胶原支架微孔内有明显的成骨细胞形成 荧光显微镜 $\times 400$

Fig 3 The osteoblasts in the micropores of scaffolds in high magnification in experimental group 2 weeks after transplantation fluorescence microscope $\times 400$

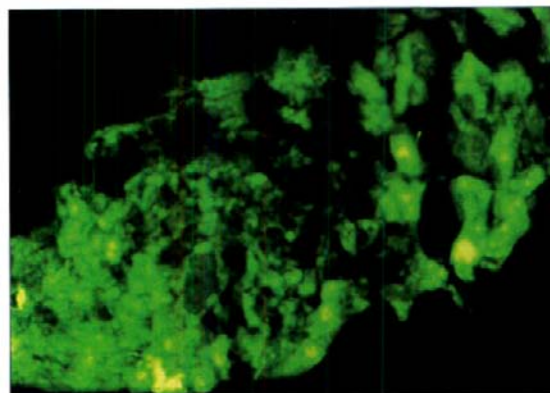


图4 3周时,实验组植入体大部分转化成为骨组织及成团的钙化组织 荧光显微镜 $\times 100$

Fig 4 Bone formation partly in experimental group 3 weeks after transplantation fluorescence microscope $\times 100$

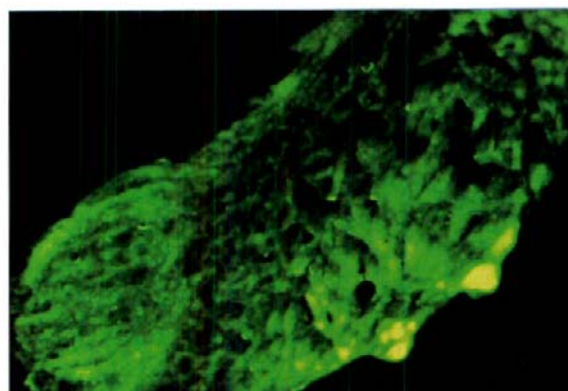


图5 4周时,实验组骨组织完全形成,可以见到良好的钙化 荧光显微镜 $\times 100$

Fig 5 Mature bone formation and still favourable calcification in experimental group 4 weeks after transplantation fluorescence microscope $\times 100$

3 讨论

肌卫星细胞是一群组织特异性干细胞,或者说祖细胞,它在成熟骨骼肌中占据一个特异的解剖环境,位于基底层下方,紧靠肌肉纤维。如果不被各种刺激因素激活,肌卫星细胞以静止状态而存在。当它们进入细胞周期并产生分裂形成祖细胞或称肌卫星细胞时,它们相互融合或与原有受到损伤的肌纤维细胞融合再生替代病变及损伤的组织。研究发现肌卫星细胞具有转分化的特点,从而改变了它们仅具有单向潜能的观点。

Kadowaki等^[5]应用Ad-BMP2及Ad-Runx2转导的C3细胞进行实验,虽然在体外实验中,Ad-BMP2及Ad-Runx2转导的C3细胞都有成骨标志物的表达,但在体内实验中,Ad-BMP2转染的C3细胞移植入肌肉后诱导了异位骨形成,而Ad-Runx2转染的C3细胞却不能诱导异位骨形成。同样,在将Ad-BMP2转染的C3细胞与PGS复合物移植入颅骨缺陷后可以成功的诱导骨修复,而Ad-Runx2转染的C3细胞却不能诱

导骨修复。为证实Ad- BMP2转染的肌卫星细胞在体外的成骨潜能,本实验将转染及非转染的肌卫星细胞和胶原支架复合物移植入野生型129sv小鼠后腿部肌肉的筋膜下区域。实验结果证实转染的肌卫星细胞分化成成骨细胞及骨细胞。这表明肌卫星细胞仍然保留着在BMP- 2条件下的分化潜能。将转染的肌卫星细胞与胶原载体的复合物异位植入体内后,能直接成骨,而且是板层骨;而同期植入的未转染的细胞的支架载体表面则未见成骨细胞形成。新形成的骨表面可见大量具有GFP活性的成骨细胞,另外还见到少量GFP荧光阴性的成骨细胞,说明基因转染后的肌卫星细胞直接分化为成骨细胞并成骨,少量的GFP荧光阴性的成骨细胞可能来源于间充质细胞。这说明转染的肌卫星细胞部分作为一个载体来保持局部BMP的释放,同时部分又作为BMP信号自动分泌的接受者^[6]。转染后的肌卫星细胞分泌BMP- 2后刺激了受区的间充质细胞分化成成骨细胞并成骨。从GFP转基因小鼠中分离的肌卫星细胞,在BMP- 2诱导下分化成成骨细胞,2周时荧光显微镜下观察到分化的成骨细胞具有GFP荧光,尽管GFP阳性细胞的数量随着移植时间的增长而减少,但移植后4周仍然在异位骨中可以见到GFP阳性细胞及GFP荧光的表达。

Nakahara等^[7]将小鸡成骨细胞与多孔磷酸钙复合培养后植入裸鼠皮下,结果表明复合成骨细胞的多孔磷酸钙中骨组织形成明显增加,而且骨形成是通过早期发生于孔隙周边的膜内成骨和后期发生于孔隙中央的软骨内成骨这两种机制得以实现。实验中该作者还注意到,成骨细胞形成骨和软骨结构的有效细胞浓度为 5.0×10^5 个/mL,低于此细胞浓度则骨与软骨结构的形成难以保证,而低于 5.0×10^3 个/mL则不能形成骨与软骨结构。本实验应用相同细胞浓度的肌卫星细胞,发现成骨能力更强,可能与肌卫星细胞生长活跃的特性有关。研究发现采用胶原支架与重组BMP- 2形成复合物,在最初的3 h内30%的rhBMP- 2可以释放到培养液中,24 h可以达到总的rhBMP- 2的56%。当肌源性干细胞在含有重组BMP- 2的胶原支架上培养时,碱性磷酸酶和骨钙素合成及分泌总是要比单纯细胞组高出许多。骨钙素在骨组织中具有很高的限制性的表达特性,这些特性只是特异出现于骨组织及细胞,骨钙素水平的增加被认为反映了骨形成及骨发生过程^[8]。一般认为,孔径500 μm 左右的支架材料最适合细胞生长及血管的长入^[9]。本研究采用的胶原支架孔径为300-500 μm ,结果发现,几乎所有的孔隙表面均有细胞生长,胶原支架的中心部位也有细胞生长,这说明此孔径能

够满足组织的营养及气体交换。另外,组织学发现胶原载体在移植后4周内完全降解,说明其不会成为骨组织形成和改建障碍,胶原载体不仅为成骨细胞附着、生长提供支架,更重要是提供了成骨细胞增殖微环境。另外它还可辅助诱导异位间充质细胞向成骨细胞分化,引导成骨细胞表型表达^[10]。

[参考文献]

- [1] Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage[J]. *J Cell Biol*, 1994, 127(6 Pt 1): 1755-1766.
- [2] Chen Y, Keith DK, Kenneth MC, et al. Combination of adeno-associated virus and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-2 produces enhanced osteogenic activity in immunocompetent rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(3): 675-681.
- [3] 孙树洋, 张风河, 郝 轶, 等. 骨骼肌卫星细胞体外培养及分化为成骨样细胞的实验研究[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2006, 16(1): 23-26.
SUN Shu-yang, ZHANG Feng-he, HAO Yi, et al. Study on the differentiation of skeletal muscle satellite cells transfected by Ad- BMP2 gene into osteoblast-like cells[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2006, 16(1): 23-26.
- [4] 张风河, 魏奉才, 黄 萍, 等. GFP转基因鼠咀嚼肌肌卫星细胞的分离、体外培养、鉴定及生物学特性的研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2007, 25(2): 188-191.
ZHANG Feng-he, WEI Feng-cai, HUANG Ping, et al. The isolation, identification, culture and the bionomics of skeletal muscles satellite cells from GFP transgenic mouse in vitro[J]. *West China J Stomatol*, 2007, 25(2): 188-191.
- [5] Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, et al. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice[J]. *Bone*, 2004, 34(6): 993-1003.
- [6] Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A, et al. Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2[J]. *Bone*, 2003, 32(5): 502-512.
- [7] Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI, et al. Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1992, (276): 291-298.
- [8] Sun JS, Wu SY, Lin FH. The role of muscle-derived stem cells in bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(18): 3953-3960.
- [9] Strayhorn CL, Garrett JS, Dunn RL, et al. Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes[J]. *J Periodontol*, 1999, 70(11): 1345-1354.
- [10] Reddi AH, Cunningham NS. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins[J]. *J Bone Miner Res*, 1993, 8(Suppl 2): S499-S502.