



## 经转染人骨形态发生蛋白7基因后骨髓间充质干细胞mRNA的表达

骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, MSCs)是骨组织工程良好的种子细胞,而骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)可诱导MSCs向成骨细胞转化。在骨组织的构建过程中如何保证BMP的持续释放并发挥其诱导成骨功能仍是当前亟待解决的问题,而利用基因转移技术将编码BMP的基因片段转移至MSCs中则可能对上述问题的解决提供新的思路和方法,本实验对此开展了如下相关研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料及试剂

MSCs由本科室分离培养, pBluscript SK(-)-人骨形态发生蛋白7(pBSK(-)-hBMP-7, 含hBMP-7全长cDNA质粒, 购自American Tissue Culture Collection); PLNCX<sub>2</sub>逆转录病毒载体和PT67包装细胞(美国Gene Company); 限制性内切酶Sal I、Sma I、T4连接酶(英国New England Biolab.); 脂质体转染试剂FuGENE<sup>TM</sup>6(Promega); SuperScript One-Step RT-PCR试剂盒(美国Life Technologies); hBMP-7原位杂交试剂盒(武汉博士德公司)。

#### 1.2 方法

1.2.1 hBMP-7逆转录病毒载体的构建 以Sal I酶切pBSK(-)-hBMP-7和PLNCX<sub>2</sub>逆转录病毒载体, 平末端连接后提取质粒以Sma I进行酶切鉴定, 筛选出正确插入的重组质粒PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7。采用Sanger法进行测序并与Genebank中基因序列对比。

1.2.2 DNA的转染与包装及重组病毒液的制备 于转染前一天选择生长状态良好的PT67细胞, 按(1~2) × 10<sup>5</sup>接种于6孔板中。以G418(600 ng/ml)筛选经FuGENE<sup>TM</sup>6转染的PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7和PLNCX<sub>2</sub>质粒至阳性克隆形成, 扩增阳性克隆细胞, 收集上清, 得到PT-PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7液(简称BMP7液)和PT-PLNCX<sub>2</sub>病毒液(简称病毒液)。

1.2.3 病毒滴度的测定 将NIH3T3细胞以5 × 10<sup>4</sup>/孔接种于6孔板中, 从包装细胞中收集含病毒的培养基。从1 × 10<sup>-5</sup> ~ 1 × 10<sup>-1</sup>按不同梯度稀释感染NIH3T3细胞, 采用G418(400 ng/ml)进行抗性筛选4周。经筛选的细胞可逐渐形成克隆, 统计细胞克隆数并计算病毒滴度。本组病毒滴度在2.0 × 10<sup>3</sup> ~ 5.6 × 10<sup>5</sup> cfu/ml之间, 以稀释1 × 10<sup>3</sup>倍的病毒液滴度最高, 即采用此浓度进行下一步实验。

1.2.4 BMP-7逆转录病毒液转染MSCs 转染前12~18 h以1.5 × 10<sup>5</sup>的密度将MSCs接种于6孔板中。将细胞分为PT-PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7转染组(转染组)、PT-PLNCX<sub>2</sub>转染组(阴性对照组)和未转染组。选择滴度较高的BMP-7液和病毒液加入MSCs中, 培养24 h后更换培养基。细胞继续培养48 h后进行短暂表达检测。同时使用G418(700 ng/ml)筛选细胞至阳性克隆形成(约2周), 扩增阳性克隆细胞, 传代并检测其稳定表达。

1.2.5 RT-PCR检测转染后MSCs中hBMP-7mRNA的表达 以TRIzol RNA提取试剂盒提取经转染后48 h的MSCs总RNA进行RT-PCR反应, 上游引物为5' - AGCCAGAACCGCTCCAAGACG -3', 下游引物为5' - CTA GTG GCA

GCC ACA GGC CGG -3'，琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物(若有hBMP-7mRNA的表达则应出现396 bp的DNA片段)。

1.2.6 原位杂交检测转染后MSCs中hBMP-7mRNA的表达 将经转染的MSCs接种于经硅化处理的盖玻片上，培养2 d后，用含0.1%DEPC的4%多聚甲醛固定，使用随试剂盒所带寡核苷酸探针(三相): GTCTC GCGGT GCTTC GACAC GCCGC GGC GT、CCGGG ACCCA TGACT TCTGC CGGAA CATCC、GTTGA ACCCC AACTA CGAGA CGGGT AGGTC进行杂交反应，操作过程按照试剂盒说明书进行，DAB显色。

## 2 结果

### 2.1 hBMP-7逆转录病毒载体的构建和鉴定

以Sma I 酶切重组质粒后的琼脂糖凝胶电泳结果见图1。其中，d组为正向连接的PLNXC<sub>2</sub>-BMP-7，经酶切后产生1 923、2 564、3 061 bp三个DNA片段，a组为未连接的PLNXC<sub>2</sub>，经酶切后产生3 061、3 039 bp两个DNA片段，由于两条片段仅相差22 bp，因此在电泳图上显示为一条带。采用Sanger法测序结果显示插入的BMP-7基因方向正确、无碱基错误和缺失。

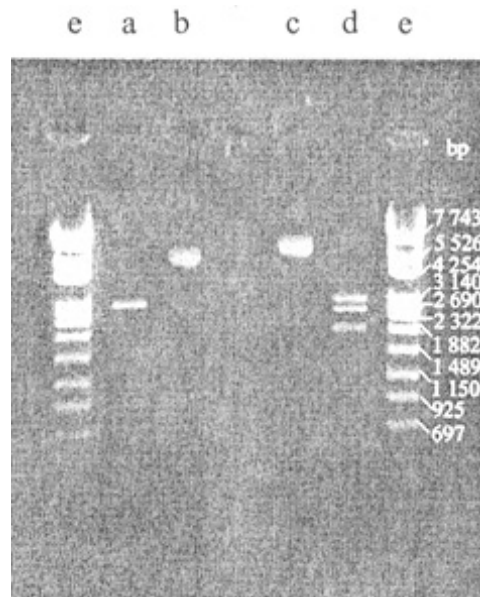


图1 PLNXC<sub>2</sub>-BMP-7酶切结果

Fig.1 Restriction digestion of plasmid pBSK(-)-hBMP-7

a: PLNXC<sub>2</sub> digested with Sma I ; b: PLNXC<sub>2</sub>; c: PLNXC<sub>2</sub>-BMP-7; d: PLNXC<sub>2</sub>-BMP-7 digested with Sma I ; e: Marker

### 2.2 重组病毒液的制备及病毒滴度的测定

利用脂质体介导方法成功地将PLNXC<sub>2</sub>-BMP-7和PLNXC<sub>2</sub>导入PT67包装细胞中，经G418抗性筛选后，形成了多个抗性克隆，未转染的PT67细胞则于10~14 d后全部死亡。以2组细胞克隆数的平均数乘以病毒稀释倍数，即为重组逆转录病毒的实际感染性病毒的滴度。

### 2.3 RT-PCR检测转染后MSCs中hBMP-7mRNA的表达

PCR产物经琼脂糖凝胶电泳可见转染组的RT-PCR产物为396 bp的DNA片段，有外源性BMP-7mRNA的表达(图2)。而阴性对照组和未转染组的MSCs则未见396 bp的DNA片段，由此可证实未经转染的MSCs无hBMP-7 mRNA的表达。

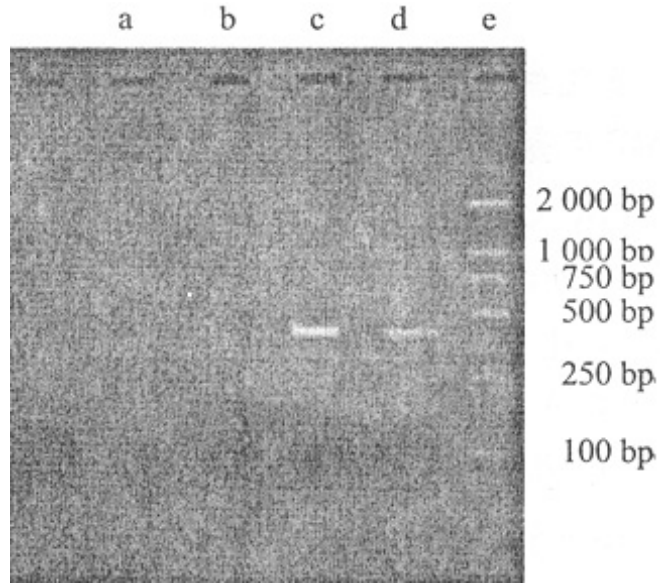


图2 转染后MSCs中hBMP-7 mRNA的表达(RT-PCR检测)

Fig.2 Expression of hBMP-7 mRNA in MSCs transferred by PLNCX<sub>2</sub>-hBMP-7 (RT-PCR)

a: MSCs without gene transfer; b: MSCs transferred by PLNCX<sub>2</sub>; c, d: MSCs transferred by PLNCX<sub>2</sub>-hBMP-7; e: Marker

#### 2.4 原位杂交检测转染后MSCs中hBMP-7mRNA的表达

转染组MSCs中可见有棕黄色的颗粒出现，分布于细胞质中，深浅不一。而阴性对照组和未转染组MSCs中未见棕黄色的颗粒(图3、4)。

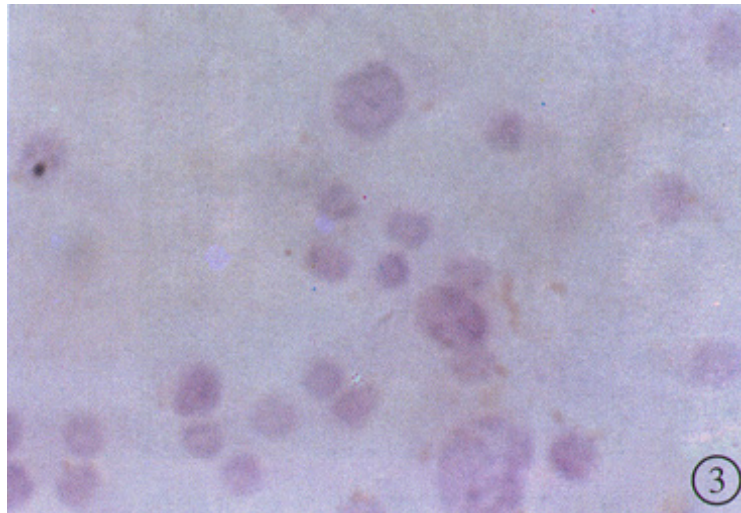


图3 未经转染的MSCs(原位杂交, DAB显色, ×800)

Fig.3 Expression of hBMP-7 mRNA in MSCs without gene transfer (in situ hybridization, DAB staining, ×800 )

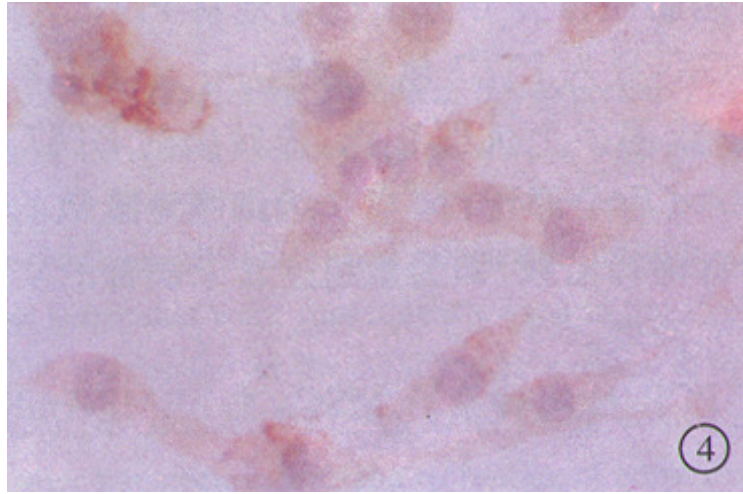


图4 经PLNCX<sub>2</sub>-hBMP-7转染的MSCs(原位杂交, DAB显色, ×800)

Fig.4 Expression of hBMP-7 mRNA in MSCs transfected by PLNCX<sub>2</sub>-hBMP-7 (in situ hybridization, DAB staining, ×800 )

### 3 讨论

#### 3.1 骨形态发生蛋白-7的结构和功能特征

hBMP-7是TGF- $\beta$ 的超家族成员, 1990年分别有学者 [1][2] 从人胎盘以及以探针从人基因组文库中调出hBMP-7的cDNA, 后经多种比较发现二者为同一物质, 并且在骨发育和骨折愈合过程中表达增加。hBMP-7 cDNA全长1 293 bp, 它包含一个开放读码框(ORF), 由此编码产生由431个氨基酸构成的hBMP-7前体蛋白分为三部分, 即信号肽段、前体肽段和成熟肽段 [2][3]。作为BMP家族的一个成员, hBMP-7不仅与骨组织发生、发育、再生与修复密切相关, 而且具有明显地诱导异位成骨作用。有研究[4][5][6]发现hBMP-7可诱导鸡中胚层间充质细胞向软骨细胞方向分化并调节此类细胞的数量和空间分布, 刺激生长平台软骨细胞的增殖、分化等。有人将hBMP-7同大鼠胶原或其它载体结合, 埋植于植入动物骨缺损区中, 在实验侧发现有大量新骨形成, 而在对照侧则无新骨形成[7]。细胞体外培养实验证明hBMP-7可诱导未分化的间充质细胞向成软骨细胞分化, 而对已分化的成骨细胞则使其碱性磷酸酶和骨钙素表达增高, 增强成骨活性[8][9]。由此可见, hBMP-7是一种具有强大骨诱导活性的成骨因子, 极有可能在促进骨折愈合、骨不连以及创伤性关节炎等疾病的治疗中发挥重要的作用。

#### 3.2 基因转移技术在骨组织工程中应用的可能性

骨组织工程研究中为了获取大量细胞需进行长期体外培养, 在此过程中, 种子细胞的成骨表型和成骨能力会逐渐下降, 使得成骨效率、骨修复效果尤其是修复长段骨缺损的能力降低。研究表明, BMP-2、BMP-7是BMP家族中诱导成骨能力最强的生长因子[10][11], 而MSCs作为骨组织工程的种子细胞具有来源广泛、取材简便、成骨能力明确等优点[12]。因此, 利用基因转移技术将编码BMP基因片段转移至MSCs中, 可维持细胞的成骨能力并在局部释放生长因子。

#### 3.3 外源性人BMP-7在MSCs中的表达

本实验成功地构建了人BMP-7的逆转录病毒载体, 并通过逆转录病毒介导将人BMP-7基因转入兔骨髓间充质干细胞中。BMP-7 mRNA的表达既是BMP-7基因在MSCs基因组的整合有效与否的证明, 也是细胞表达BMP-7多肽蛋白的前提[13]。本实验通过RT-PCR和原位杂交证实重组基因逆转录病毒感染细胞后能够表达外源性BMP-7的mRNA, 从而证实采用此方法进行BMP-7基因转移是可行的。

#### 3.4 逆转录病毒作为基因转移载体的优缺点

逆转录病毒介导的基因转移具有将外源性基因插入靶细胞基因组后能够获得外源性基因长效表达的特点



[14]。本实验也证实细胞转染后4~6周仍有较强的外源性BMP-7 mRNA的表达,这对于构建组织工程化骨组织是非常有利的。但是,由于逆转录病毒介导的基因转移是将外源性基因随机插入靶细胞基因组中的,这是否会造成细胞的畸变,而且经转染的细胞植入体内后是否会造成过量成骨或致癌、致畸仍有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family [J]. EMBO J, 1990, 9(7): 2085-93.
- [2] Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(24): 9843-7.
- [3] Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK, et al. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro[J]. J Cell Physiol, 2000, 184(1): 37-45.
- [4] Macias D, Ganan Y, Sampath T K, et al. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development[J]. Development, 1997, 124(6): 1109-17.
- [5] Sanchez-Quintana D, Macias D, Ganan Y, et al. Cardiac malformations induced after "in vivo" administration of OP-1 to the outflow tract in the developing chick[J]. Int J Dev Biol, 1996 (Suppl ):1265S-6S.
- [6] Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, et al. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107(1): 124-34.
- [7] Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83-A Suppl 1(Pt 2): S151-8.
- [8] Yeh LC, Unda R, Lee JC, et al. Osteogenic protein-1 differentially regulates the mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in primary cultures of osteoblasts [J]. J Cell Physiol, 2000, 185(1): 87-97.
- [9] Yeh LC, Mikhailov V, Lee JC, et al. Regulation of expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat osteoblastic cells by osteogenic protein-1 (BMP-7) [J]. J Cell Biochem, 2001, 36 (suppl): 46-54.
- [10] Salypaongse A, Billiar TR, Edington H. Gene therapy and tissue engineering[J]. Clin Plast surg, 1999, 26(4): 663-76.
- [11] Fang J, Zhu YY, Smily E, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 5735-8.
- [12] 金丹, 裴国献, 王前. 骨髓基质细胞与钙磷陶瓷复合构建组织工程化骨组织[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(3): 151-4.
- Jin D, Pei GX, Wang Q. New bone formation by bone marrow stromal cell combined with the bioactive glass ceramic using tissue-engineering methods[J]. Chin J Traumatol, 2001, 17(3): 151-4.
- [13] Lou J, Xu F, Merkel K, et al. Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation on vitro and bone formation in vivo[J]. J Orthop Res, 1999, 17(1): 43-50.
- [14] Helm GA, Alden TD, Beres EJ, et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent[J]. J Neurosurg, 2000, 92(S2 ):191-6.

## 参考文献:

- [1] Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family [J]. EMBO J, 1990, 9(7): 2085-93.
  - [2] Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(24): 9843-7.
  - [3] Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK, et al. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro[J]. J Cell Physiol, 2000, 184(1): 37-45.
  - [4] Macias D, Ganan Y, Sampath T K, et al. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development[J]. Development, 1997, 124(6): 1109-17.
  - [5] Sanchez-Quintana D, Macias D, Ganan Y, et al. Cardiac malformations induced after "in vivo" administration of OP-1 to the outflow tract in the developing chick[J]. Int J Dev Biol, 1996 (Suppl ):1265S-6S.
  - [6] Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, et al. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107(1): 124-34.
  - [7] Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83-A Suppl 1(Pt 2): S151-8.
  - [8] Yeh LC, Unda R, Lee JC, et al. Osteogenic protein-1 differentially regulates the mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in primary cultures of osteoblasts [J]. J Cell Physiol, 2000, 185(1): 87-97.
  - [9] Yeh LC, Mikhailov V, Lee JC, et al. Regulation of expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat osteoblastic cells by osteogenic protein-1 (BMP-7) [J]. J Cell Biochem, 2001, 36 (suppl): 46-54.
  - [10] Salypaongse A, Billiar TR, Edington H. Gene therapy and tissue engineering[J]. Clin Plast surg, 1999, 26(4): 663-76.
  - [11] Fang J, Zhu YY, Smily E, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 5735-8.
  - [12] 金丹, 裴国献, 王前. 骨髓基质细胞与钙磷陶瓷复合构建组织工程化骨组织[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(3): 151-4.
  - Jin D, Pei GX, Wang Q. New bone formation by bone marrow stromal cell combined with the bioactive glass ceramic using tissue-engineering methods[J]. Chin J Traumatol, 2001, 17(3): 151-4.
  - [13] Lou J, Xu F, Merkel K, et al. Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation on vitro and bone formation in vivo[J]. J Orthop Res, 1999, 17(1): 43-50.
  - [14] Helm GA, Alden TD, Beres EJ, et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent[J]. J Neurosurg, 2000, 92(S2 ):191-6.
-

