

## 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

金丹<sup>1</sup>,曾位森<sup>2</sup>,裴国献<sup>1</sup>,齐凤菊<sup>1</sup>,魏宽海<sup>1</sup>,王珂<sup>1</sup>,陈滨<sup>1</sup>(第一军医大学<sup>1</sup>南方医院创伤骨科,<sup>2</sup>细胞生物学教研室,广东广州,510515)

**摘要:**目的 构建人骨形态发生蛋白 7(humanbonemorphogeneticprotein7, hBMP-7)逆转录病毒载体并检测经逆转录病毒介导基因转染的兔骨髓间充质干细胞 (bonemarrow-derivedmesenchymalstemcell, MSCs)mRNA 的表达。方法 构建 hBMP-7 逆转录病毒载体后利用脂质体介导的基因转移技术转染包装细胞 PT67,制备含目的基因的重组逆转录病毒液并感染兔骨髓间充质干细胞,采用原位杂交、RT-PCR 检测 hBMP-7mRNA 在 MSCs 中的表达。结果 成功构建了 hBMP-7 逆转录病毒载体,经 hBMP-7 基因转染的 MSCs 可表达外源性 BMP-7mRNA。结论 采用逆转录病毒介导的方法可以将 hBMP-7 转染至 MSCs 中并表达外源性基因。

**关键词:**骨形态发生蛋白;骨髓间充质干细胞;基因表达;组织工程

**中图分类号:**R318.08 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2588(2002)03-0222-04

Expression of human bone morphogenetic protein 7 mRNA after the gene transfection in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells

JINDan<sup>1</sup>,ZENGWei-sen<sup>2</sup>,PEIGuo-xian<sup>1</sup>,QIFeng-ju<sup>1</sup>,WEIKuan-hai<sup>1</sup>,WANGKe<sup>1</sup>,CHENBin<sup>1</sup>

Department of Orthopedics and Traumatology, Nanfang Hospital<sup>1</sup>, Department of Cell Biology<sup>2</sup>, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract** Objective To detect the expression of human bonemorphogenetic protein 7 (hBMP-7) mRNA in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells with hBMP-7 gene transfection mediated by retroviral vector. Methods Retroviral vector for hBMP-7 gene was constructed that was transferred into the packaging cell PT67 mediated by liposome. hBMP-7 gene-positive cell clones were selected with G418 (600ng/ml) and amplified to obtain the retroviral supernatant containing the target gene that were subsequently used to transfect rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs). hBMP-7 mRNA expression in the MSCs was examined by way of *in situ* hybridization and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Results hBMP-7 retroviral vector was successfully constructed and transferred into PT67 cells with resistance to G418, and after transfection with the recombinant retrovirus, transcription and expression of hBMP-7 mRNA were detected in MSCs. Conclusion Rabbit bone marrow stem cells transfected with hBMP gene via retroviral vector can secrete the correspondent protein, indicating the possibility of enhancing the osteogenic capacity of MSCs in the study of bone tissue engineering.

**Key words** bonemorphogenetic protein; bonemarrow-derived mesenchymal stem cells; gene expression; tissue engineering

骨髓间充质干细胞 (bonemarrow-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<sup>I</sup>、Sma<sup>I</sup>、T4 连接酶 (英国 New England Biolab.); 脂质体转染试剂 FuGENE™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<sup>I</sup> 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<sup>I</sup> 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

收稿日期:2001-12-07

基金项目:国家重点基础研究发展规划 973 项目 (1999054309)

作者简介:金丹 (1971-),男,河南洛阳人,1999 年毕业于第一军医大学,硕士,主治医师,电话 020-85141744, E-mail:nfjindan@263.net

转染前一天选择生长状态良好的 PT67 细胞,按  $(1\sim 2)\times 10^5$  接种于 6 孔板中。以 G418 (600ng/ml) 筛选经 FuGENE™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  $5\times 10^4$  孔接种于 6 孔板中,从包装细胞中收集含病毒的培养基。从  $1\times 10^{-5}\sim 1\times 10^{-1}$  按不同梯度稀释感染 NIH3T3 细胞,采用 G418 (400ng/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  $2.0\times 10^3\sim 5.6\times 10^5$  cfu/ml 之间,以稀释  $1\times 10^3$  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  $1.5\times 10^5$  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 (700ng/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-7 mRNA 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'-CTAGTGGCAGCCACAGGCCGG-3', 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 (若有 hBMP-7 mRNA 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-7 mRNA 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 GGCCTCCGGG ACCCA TGACTTCTGCCGGAA CATCCGTTGA 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 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 PLNCX<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 PLNCX<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 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。

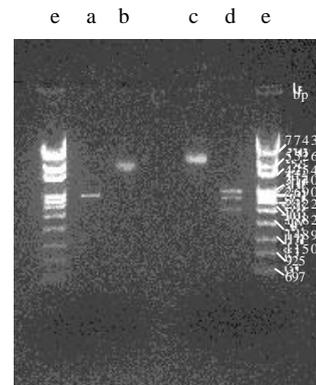


图 1 PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7 酶切结果

Fig.1 Restriction digestion of plasmid pBSK-hBMP-7  
a:PLNCX<sub>2</sub> digested with Sma ;b:PLNCX<sub>2</sub>;c:PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7;d:PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7 digested with Sma ;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 PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7 和 PLNCX<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-7 mRNA 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-7 mRNA 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。

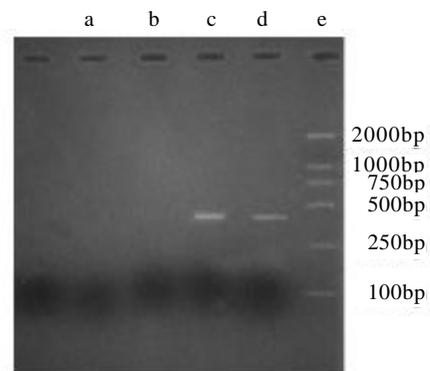


图 2 转染后 MSCs 中 hBMP-7 mRNA 的表达 (RT-PCR 检测)

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)。

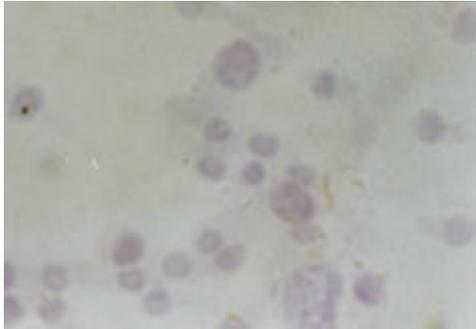


图 3 未经转染的 MSCs  
(原位杂交, DAB 显色, ×800)

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

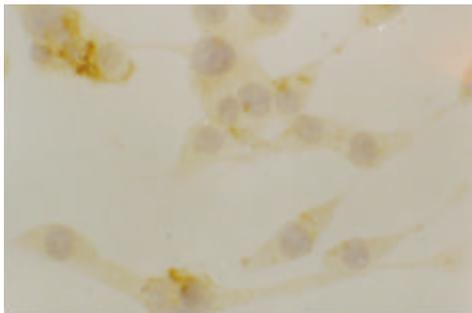


图 4 经 PLNCX<sub>2</sub>-BMP-7 转染的 MSCs  
(原位杂交, DAB 显色, ×800)

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-β 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-7cDNA 全长 1293bp, 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 [4-6] 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、骨不连以及创伤性骨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的应用的可能性

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 TK, 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 *in 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.

## 膝关节功能障碍的综合康复训练 36 例疗效观察

姚红华 (第一军医大学珠江医院康复理疗科, 广东 广州 510282)

**摘要:**目的 探讨综合康复治疗对膝关节损伤后功能障碍的疗效。方法 对 36 例膝关节损伤的患者进行物理治疗、关节松动术、增强肌力训练等综合康复治疗,并在治疗前后用 HSS 膝关节评分法 (Hospital for Special Surgery knee rating scale) 进行康复评定。结果 综合康复治疗后 HSS 评分明显提高,临床效果显著。结论 对膝关节损伤后的综合康复训练有助于下肢综合运动功能的提高。

**关键词:** 关节功能障碍; 关节松动; 肌力训练

中图分类号: R493 文献标识码: B 文章编号: 1000-2588(2002)03-0225-02

Comprehensive rehabilitation program for knees with impaired function observation of the effect in 36 cases

YAO Hong-hua

Department of Rehabilitation and Physiotherapy, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract** Objective To observe the effect of comprehensive rehabilitation program in patients with impaired function of the knees. Methods Thirty six patients with knee injury received physiotherapy, mobilization and muscle-strengthening exercise, and the improvement in knee function was assessed by means of the hospital for special surgery knee rating scale (HSS) that was applied both before and after the therapy. Result Significant increase in the scores of HSS was noted after rehabilitation therapy, and the knee function improvement was obvious. Conclusion Comprehensive rehabilitation program may help improve the motor function of lower limbs with impaired knee function.

**Key words** knee function; joint mobilization; muscle-strengthening exercise

收稿日期: 2001-10-04

作者简介: 姚红华 (1966-), 女, 浙江永康人, 1998 年毕业于安徽医科大学, 康复治疗师, 电话 020-85143451

膝关节及其邻近组织外伤多采用内、外固定或行外科手术, 往往造成膝关节功能障碍。有一部分患者伴有不同程度的膝屈、伸肌肌肉萎缩, 时间较长者则严重影响治疗后的日