

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)13-1211-03

nell-1 基因直接体内转染修复犬下颌骨的缺损

陈明¹ 张宇² 倪龙兴¹(¹ 第四军医大学口腔医学院牙体牙髓病科 陕西 西安 710033 , ² 南方医科大学南方医院口腔科 广东 广州 510515)

Repair of segmental mandible bone defects in Beagle dogs using *nell-1* gene transfer *in vivo*

CHEN Ming¹, ZHANG Yu², NI Long-Xing¹

¹Department of Endodontics, College of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 AIM : To detect the repairing ability of PT-PLNCX₂-*Nell-1* viral solution composited with PLGA biomaterials for segmental mandible defect of the beagle dogs. **METHODS** : *Nell-1* eukaryotic expression vector was constructed in retroviral solution PT-PLNCX₂-*Nell-1*. Segmental 15 mm × 10 mm × 5 mm defects were created surgically in the mandible of beagles. The PLGA was used alone (as control group, n = 8) or in conjunction with PT-PLNCX₂-*Nell-1* retroviral solution (as experimental group, n = 8). Their repairing abilities were assessed by gross observation, X-ray examination and histological detection of the repaired bone. **RESULTS** : All defects in the experimental group healed radiographically at 16 weeks postoperatively, while no bone healing was found in the control group. Histological analysis of the specimens revealed that the defects in the experimental group were filled with coarse trabecular bone, whereas in the control group there was only fibrous tissue filled in the defects. **CONCLUSION** : Direct, local retroviral delivery of *Nell-1* gene may lead to the healing of segmental mandible defect in beagles.

【Keywords】 *Nell-1* bone defect gene transfer

【摘要】 目的 : 探讨含 *Nell-1* 基因逆转录病毒液与聚羟基丁酸酐 (PLGA) 生物材料复合后修复犬下颌骨缺损的效果。方法 : 制备含 *Nell-1* 真核细胞表达载体的逆转录病毒液 PT-PLNCX₂-*Nell-1*。制备比格犬下颌骨 15 mm × 10 mm × 5 mm 的箱状缺损模型, 修复实验分为 2 组 : PT-PLNCX₂-*Nell-1* + PLGA 修复组 (实验组), PLGA 修复组 (对照组), 每组 8 个样本, 分别于术后 8、16 wk 进行大体观察、X 线检测和组织学检测。

收稿日期 2006-12-22 ; 接受日期 2007-03-29

基金项目 : “十一五”全军医药卫生面上项目(06ma1134)

通讯作者 : 陈明, 博士生(导师倪龙兴)。Tel (029) 84776038

Email zhenmingdental@yahoo.com

结果 : PT-PLNCX₂-*Nell-1* 重组病毒液与生物材料复合修复组可见在骨缺损处有骨性连接形成, 骨缺损修复, 组织学观察见有大量新生骨组织形成 ; PLGA 修复组未见骨性连接形成, 仅在部分骨缺损两断段形成少量骨组织。结论 : 利用 *Nell-1* 基因体内局部、直接转移的方法能够用于犬下颌骨缺损的修复。

【关键词】 *Nell-1* 基因 ; 骨缺损 ; 基因转染

【中图分类号】 R782 **【文献标识码】** A

0 引言

近年来基因转移技术在骨组织再生、骨缺损研究中的作用越来越受到重视, 将相关生长因子通过体外转移或体内直接转移的方法能够新生骨组织。*Nell-1* 是一种具有较强成骨活性的生长因子, 其成骨能力已得到证实^[1]。用逆转录病毒介导的方法可以将 *Nell-1* 蛋白转入犬骨髓间充质干细胞(BMSc) 中, 在获得外源 *Nell-1* 表达的同时, BMSc 的成骨活性也得到显著提高。但含有 *Nell-1* 基因的逆转录病毒液在体内是否具有诱导成骨活性、其形成骨组织并修复骨缺损的能力仍需验证。

1 材料和方法

1.1 材料 比格犬为广东省医药工业研究所提供 ; 逆转录病毒基因载体转移系统试剂盒 (包括 PLNCX₂ 逆转录病毒载体、PT67 包装细胞 (Clontech 美国)、限制性内切酶 *Sal* I *Sma* I (New England Biolab 美国)。

1.2 方法

1.2.1 *Nell-1* 逆转录病毒液的制备 使用 *Sal* I 酶切 PB-SK-*Nell-1* (American Tissue Culture Collection) 和 PLNCX₂ 逆转录病毒载体 (Clontech) 黏端连接后提取质粒进行酶切鉴定 (*Sma* I 酶切), 筛选出正确插入的重组质粒 PLNCX₂-*Nell-1*。使用脂质体转染 PLNCX₂-*Nell-1* 包装细胞 PT67, 使用 G418 筛选至阳性克隆形成, 将阳性克隆细胞进行扩增, 收集培养上清液, 命名为 PT-PLNCX₂-*Nell-1* 病毒液。

1.2.2 生物材料的制备 聚羟基丁酸酐 (PLGA) 生物材料由中国科学院化学研究所制备并惠赠。材料呈多孔块状, 参数基本如下 : 孔径为 200 ~ 300 nm, 孔隙率大于 90%。将生物材料修剪成体积为 0.2 cm ×

0.2 cm × 1.5 cm 长条状。使用 750 mL/L 乙醇浸泡，无菌 0.1 mol/L PBS 反复冲洗并浸泡后，紫外线下晾干，封装备用。用于骨缺损修复实验前取 1 mL PLNCX₂-*Nell-1* 病毒液浸泡生物材料 24 h。单纯材料修复组用相应细胞培养基浸泡。

1.2.3 犬下颌骨缺损修复 实验动物选择健康比格犬 8 只，雌雄不拘，体质量 13 ~ 15 kg，年龄 1 ~ 1.2 岁，适应性饲养 2 wk。按自身同期对照研究的设计原则，在犬下颌骨上设计两个 15 mm × 10 mm × 5 mm 的全层箱状缺损，在其中一个植入相应大小的 PT-PLNCX₂-*Nell-1* + PLGA 复合材料，另一侧植入单纯 PLGA 作为对照。实验方法：以 846 合剂和氯胺酮 1:1 混合后，按混合液中 846 合剂的 0.12 ~ 0.15 mg/kg 肌肉注射。用金刚砂切片切开骨皮质，用牙科台式电钻于犬下颌骨下缘中份骨皮质上造成两个长 15 mm，宽 10 mm，深 5 ~ 6 mm 的箱状缺损，术中应避免伤及下颌神经血管束，保留骨膜，在其中一个缺损内放入相应大小的 PT-PLNCX₂-*Nell-1* + PLGA 复合材料，另一缺损植入单纯 PLGA，分层缝合创口。术后肌注青霉素 80 万 U，庆大霉素 4 万 U，2 次/d，4 d，预防感染。术后分笼常规饲养。

1.2.4 检测方法 大体形态观察：术后 8、16 wk 取骨缺损修复标本进行大体观察，观察骨缺损部位骨组织再生情况、修复程度以及有无炎症反应。X 线观察：分别于 8、16 wk 进行 X 线检测，观察各组骨缺损区骨痂生长和骨连接情况。组织学切片观察：标本经 40 g/L 多聚甲醛固定后 EDTA 脱钙，石蜡包埋、切片，常规 HE 染色，显微镜下观察。

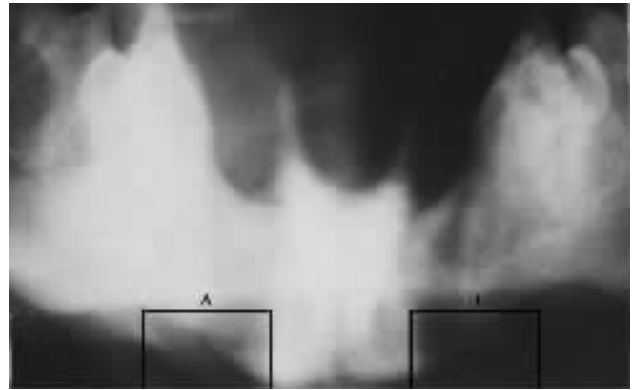
2 结果

2.1 动物一般情况 动物术后 2 h 内苏醒，1 wk 内均恢复正常饮食，术后 3 ~ 7 d 术区局部组织肿胀明显，2 wk 后伤口逐渐愈合，肿胀也逐渐消失，仅缝线处有轻微红肿，缝线 1 ~ 2 mo 后部分自行脱落。未观察到动物机体的明显排斥反应和材料的裸露。

2.2 大体观察 术后 8 wk 时，各组缺损区内均有纤维结缔组织和血管长入，试验组修复区域中心区材料表面和骨缺损两断端均可见骨样组织出现，质地较硬，对照组仅在在缺损区两断端有少量骨样组织形成。术后 16 wk 时，试验组修复区域可见明显骨桥形成连接于骨缺损两断端，出现骨性愈合。对照组在缺损区两端骨组织量相应增加，但缺损区大部仍为结缔组织填充，未出现骨性连接，骨缺损未得到有效修复。

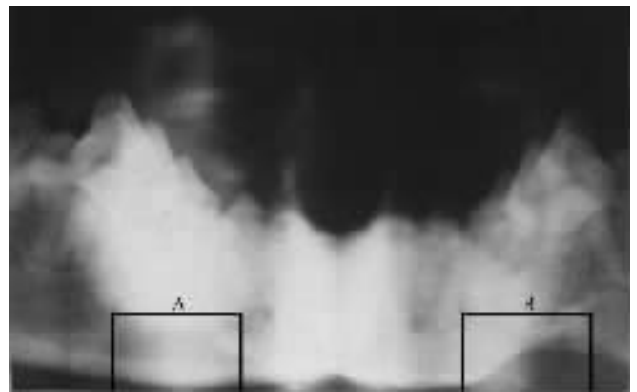
2.3 X 线观察 术后 8 wk 实验组骨缺损两端骨端和骨缺损中心区域可见有密度增高影，呈絮状或条索

状，新生骨组织桥接骨缺损，形状较为规则，髓腔未通。16 wk 时骨性愈合，骨皮质光滑连续，骨髓腔再通（图 1 2）。对照组在各时间点骨缺损界限清晰，骨缺损两端少量新生骨组织形成，骨缺损未被修复，16 wk 时其形状由‘□’变为‘○’（图 1 2）。



A: 试验; B: 对照.

图 1 8 wk 时 X 线观察



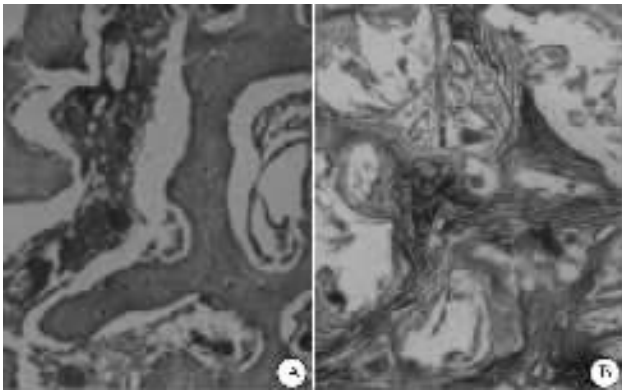
A: 试验; B: 对照.

图 2 16 wk 时 X 线观察

2.4 组织学观察 试验组术后 8 wk 可见材料表面及内部有结缔组织和小血管长入，在材料周边及内部孔隙内，有大量软骨细胞形成并向成骨细胞移行，并形成大量致密的不规则类骨质。部分区域可见骨小梁形成、出现骨陷窝结构，16 wk 时骨细胞成熟，形成板状骨结构。新生骨与缺损两断端连接，骨缺损修复（图 3A）。对照组仅在缺损断端有少量骨痂形成，缺损中心区域未见骨组织形成，骨缺损未被修复（图 3B）。

3 讨论

Nell-1 是在颅缝早闭患者过早闭合的骨缝连接处发现的一种分泌蛋白^[2]，美国加州大学洛杉矶分校 (UCLA) 的研究者们发现，*Nell-1* 诱导成骨细胞分



A: 试验; B: 对照.

图3 16 wk 时组织学观察 HE ×100

化和骨形成的能力要优于 BMP^[3]. *Nell-1* 的成骨活性已在动物试验中得到证实, *Nell-1* 复合生物材料可促进大鼠颅骨缺损的修复^[4].

本实验中采用含 *Nell-1* 的逆转录病毒载体直接转移的方法能够修复比格犬下颌骨 15 mm × 10 mm × 5 mm 的箱状缺损, 根据 X 线和组织学切片的结果, 采用本方法在体内诱导成骨的过程表现为较为典型的软骨内成骨过程. 在成骨的早期出现血管组织和软骨细胞, 随着时间的推移, 软骨细胞团的内部和周边开始出现成骨细胞, 并形成少量编织骨结构, 进而形成典型的板层骨结构, 并有不规则的大量骨髓腔形成, 其内可见较多的骨髓细胞.

将含 *nell-1* 基因的逆转录病毒置入骨缺损区后, 病毒液感染邻近肌肉组织内的肌细胞和骨缺损两端骨髓腔内的间充质细胞, 使合成表达外源性 *Nell-1*, 进而诱导周边的间充质细胞分化成软骨细胞, 通过软骨内成骨方式形成成熟的骨组织.

将 *nell-1* 基因置入体内可以采用直接注射或与生物材料复合后植入的方法. 直接注射的方法简便易行, 但考虑到临床实际骨缺损部位大多为疤痕或大量结缔组织填充或包绕, 很难完全体现 *Nell-1* 基因转染的效果. 而将 *Nell-1* 基因与相应的生物材料复合后, 通过外科手术的方法清除骨缺损区的疤痕组织再

植入, 应能取得较好效果, 同时生物材料也能为成骨细胞生长及骨组织的新生提供支架作用, 更有利于新生骨组织的形成.

我们应用的 PLGA 孔径为 200 ~ 300 μm, 孔隙率大于 90%. 动物体内实验结果表明此种生物材料与 PLNCX₂ - *Nell-1* 病毒液复合后能够形成新生骨组织. 虽然有报道认为 PLGA 材料存在一定的无菌性炎症反应问题, 但在本实验中仅观察到少量的炎性细胞浸润, 对骨组织的新生没有明显影响.

从理论上讲, 将含有外源 *Nell-1* 基因的病毒载体直接用于体内局部治疗时有可能出现过量异位成骨或体内致癌性的问题. 逆转录病毒载体虽然具有高效准确地整合到细胞基因组上的优势, 但这种整合作用又是随机的, 由于病毒的 LTR 中含有增强子等调控序列, 有可能激活原癌基因或阻断肿瘤抑制基因, 并且在产生目的病毒(非复制型逆转录病毒)的同时亦有可能产生野生型病毒(可复制型病毒), 导致肿瘤的发生^[5-6]. 我们观察到 16 wk 时在骨缺损修复区组织学检查未见肿瘤样组织出现, 初步表明采用此种方法制备的此种滴度的病毒液中可能并不含有野生型病毒. 但还需要进一步要进行 PCR, 裸鼠体内种植等实验进一步进行检测.

【参考文献】

- [1] Cowan CM, Cheng S, Ting K, et al. *Nell-1* induced bone formation within the distracted intermaxillary suture [J]. *Bone* 2006 38(1): 48-58.
- [2] Ting K, Vastardis H, Mulliken JB, et al. Human *NELL-1* expressed in unilateral coronal synostosis [J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(1) 80-89.
- [3] Zhang X, Kuroda S, Carpenter D, et al. Craniosynostosis in transgenic mice overexpressing *Nell-1* [J]. *J Clin Invest* 2002 110(6): 861-870.
- [4] Aghaloo T, Cowan CM, Chou YF, et al. *Nell-1*-induced bone regeneration in calvarial defects [J]. *Am J Pathol* 2006 169(3) 903-915.

编辑 井晓梅